



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

FÚLVIA SOARES CAMPOS DE SOUSA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE
*Pyrostegia venusta***

Salvador, BA
Setembro - 2019

FÚLVIA SOARES CAMPOS DE SOUSA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE
*Pyrostegia venusta***

Tese apresentada à Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento.

Salvador, BA
Setembro - 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Sousa, Fúlvia Soares Campos de.

Potencial biotecnológico de fungos endofíticos *de Pyrostegia venusta* / Fúlvia Soares Campos de Sousa. - Salvador, 2019.

108 f.: il

Orientador: Dr. Roberto Meyer.

Tese (Doutorado) – Rede Nordeste de Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2019.

1. Fungos Endofíticos. 2. *Pyrostegia Venusta*. 3. Biomoléculas. I. Meyer, Roberto. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Rede nordeste de Biotecnologia. III. Título.

FÚLVIA SOARES CAMPOS DE SOUSA

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE
Pyrostegia venusta

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 28 de maio de 2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Roberto José Meyer Nascimento
Doutor em Imunologia
Universidade Federal da Bahia.

Profa. Josilene Borges Torres Lima Bastos
Doutora em Imunologia
Universidade Federal da Bahia.

Profa. Lilia Ferreira de Moura Costa
Doutora em Imunologia
Universidade Federal da Bahia.

Profa. Bruna Aparecida Souza Machado
Doutora em Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação SENAI CIMATEC.

Profa. Silvana Beutinger Marchioro
Doutora em Ciências, Programa de Pós-Graduação UFPL

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo Dom da VIDA!

Aos espíritos de Luz pela proteção e em especial ao meu guia espiritual pelas orientações constante.

Agradeço a minha mãe, exemplo de superação!

Agradeço a Samuel companheiro e amigo de todas as ocasiões (calmas, agitadas e tormentas), me ensinando a ter paciência e demonstrando sempre confiar em Deus.

Ao meu filho Samu por mostrar que longe é um lugar onde não existe.

As minhas filhas Aila e Sofia companheiras até nas madrugadas de estudos.

Meus netos Samir, Magno , Ravi pelas horas de descontração.

Agradeço as minhas amigas irmãs Anaide, Clara e Neila pois somos tudo junto e misturado.

Aos amigos professores pela atenção

A Luana companheira de experimento, guloseimas e risadas.

Aos Colegas Froes, Tadeu, Luiz Lazaro, Brena, Marcio, Eli, Marcia, Tâmires, Taty, Roberta, Sueli (in memoria)

Aliás quero agradecer pela rede de amigos que tenho neste Instituto de Ciências da Saúde!

RESUMO

Fungos endofíticos produzem metabólitos secundários e se destacam pelo seu potencial como fonte de moléculas para novos produtos que podem ser utilizados como agentes terapêuticos no tratamento de diversas doenças. Estes organismos são recursos microbianos promissores, pois podem produzir metabólitos idênticos aos das plantas hospedeiras e com estruturas inéditas. Daí a escolha da planta hospedeira a ser utilizada para a obtenção dos fungos endofíticos é importante e dentre os critérios, destacam-se plantas medicinais e as que ocorrem em regiões de grande biodiversidade. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo Avaliar o potencial biotecnológico para aplicação na área de saúde dos fungos endofíticos isolados da *Pyrostegia venusta*, como fonte de metabólitos ativos. Esta espécie vegetal é utilizada na medicina popular para o tratamento de infecções na pele, tosse, doenças do trato respiratório e diarreia. A partir das folhas sálias foram obtidos 60 fungos filamentosos. Para a determinação do potencial biotecnológico dos fungos e de sua planta hospedeira, foram produzidos extratos através da fermentação. Dentre os extratos fúngicos avaliados, 8 extratos apresentaram atividades proposta pelo trabalho Os compostos bioativos foram obtidos do extrato metabólico e do micélio dos fungos com solventes de diferentes polaridades como acetato de etila e metanol. As frações resultantes foram então submetidas a diferentes procedimentos de separação cromatográfica. Para identificar a estrutura dos metabólitos secundários, foram utilizados métodos como Infravermelho, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Espectrometria de Massa (EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Finalmente, todas as substâncias isoladas foram submetidas a diferentes bioensaios, incluindo-se citotoxicidade e ensaios antimicrobianos. Sendo este o primeiro estudo sobre fungos endofíticos de *Pyrostegia venusta*, os táxons mais encontrados foram *Colletotrichum* sp e *Phylosticta* sp.; nas frações foram verificadas atividade antimicrobiana (e estas foram potencializadas com técnica de nanotecnologia). O perfilamento químico preliminar das frações semi- purificadas demonstraram a presença de grupos de flavonoides e terpenos. Estes resultados apresentados são promissores para o protótipo de moléculas antimicrobianas, porém estudos mais aprofundados são requeridos para possíveis aplicações na indústria de fármacos.

Palavras-chave: Fungos endofíticos; Metabólitos secundários; Atividade antimicrobiana; Citotoxicidade.

ABSTRACT

Endophytic fungi produce secondary metabolites and stand out for their potential as a source of molecules for new products that can be used as therapeutic agents in the treatment of various diseases. These organisms are promising microbial resources because they can produce metabolites identical to those of host plants and with unprecedented structures. Hence the choice of the host plant to be used to obtain endophytic fungi is important and among the criteria, we highlight medicinal plants and those that occur in regions of great biodiversity. Thus, the present work aimed to evaluate the biotechnological potential for application in the health area of endophytic fungi isolated from *Pyrostegia venusta* as a source of active metabolites. This plant species is used in folk medicine for the treatment of skin infections, cough, respiratory tract disease and diarrhea. From the sound leaves 60 filamentous fungi were obtained. To determine the biotechnological potential of the fungi and their host plant, extracts were produced through fermentation. Among the fungal extracts evaluated, 8 extracts presented activities proposed by the work. Bioactive compounds were obtained from the metabolic extract and mycelium of the fungi with solvents of different polarities such as ethyl acetate and methanol. The resulting fractions were then subjected to different chromatographic separation procedures. To identify the structure of secondary metabolites, methods such as Infrared, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Mass Spectrometry (MS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) were used. Finally, all isolated substances were subjected to different bioassays, including cytotoxicity and antimicrobial assays. This being the first study on endophytic fungi of *Pyrostegia venusta*, the most common taxa found were *Colletotrichum* sp and *Phylosticta* sp .; In the fractions, antimicrobial activity was verified (and these were potentiated with nanotechnology technique). Preliminary chemical profiling of semi-purified fractions demonstrated the presence of flavonoid and terpene groups. These results are promising for the prototype antimicrobial molecules, but further studies are required for possible applications in the drug industry.

Keywords: Endophytic fungi; Secondary metabolites; Antimicrobial activity; Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta “Cipó de São João” encontrada em campos (Vila de Caetê-Açú, Distrito do Município de Palmeiras, na Bahia)	16
Figura 2. Localização do ponto de coleta	18
Figura 3. Esquema exemplificando o possível mecanismo de colonização desenvolvido por fungos simbiótico endófitos biotróficos (a-e) e patogênicos (f-j)	22
Figura 4. Interações em co-cultivo de fungos	28
Figura 5. Esquema ilustrativo da cromatografia de camada delgada	29
Figura 6. Processo de isolamento dos fungos endofíticos.....	33
Figura 7. Processo de obtenção dos extratos.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gêneros de fungos endofíticos isolados de diversas espécies hospedeiras.	15
Tabela 2. Quadro de substâncias isoladas de fungos endofíticos.	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Geral	13
2.2. Específicos	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1. Produtos naturais	14
3.2. Plantas medicinais e seus fungos endófitos	15
3.3. <i>Pyrostegia venusta</i> - “Cipó de São João”	16
3.4. Área de coleta	17
3.5. Fungos e os produtos naturais	18
3.5.1. Fungos endofíticos	19
3.5.1.1. Gênero <i>Colletotrichum</i>	23
3.5.1.2. Gênero <i>Phyllosticta</i>	24
3.5.1.3. Gênero <i>Aspergillus</i>	24
3.5.2. Metabólitos secundários	24
3.5.2.1. Metabólitos com ação antimicrobiana	25
3.5.2.2. Metabólitos com ação enzimática	27
3.6. Técnica de co-cultivo ou cultura pareada para o estudo de fungos endofíticos	28
3.7. Métodos analíticos	29
3.7.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	29
3.7.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	30
3.7.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	30
3.8. Potencializando as biomoléculas através da nanotecnologia	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. Coleta	32
4.2. Isolamento dos fungos endofíticos	32
4.3. Identificação dos fungos	34
4.3.1. Caracterização morfológica	34
4.3.2. Identificação molecular	34
4.4. Obtenção dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos	35
4.4.1. Seleção de antagonistas <i>in vitro</i> (co-cultura)	35
4.4.2. Processo de fermentação e extração dos metabólitos	36
4.5. Avaliação da atividade antimicrobiana	37

4.5.1. Método de difusão em disco..... SUMÁRIO	38
4.5.2. Antifungigrama pelo método de difusão	38
4.5.3 Ensaio para medir a Concentração Inibitória Mínima (CIM)	39
4.6. TLC	40
4.6.1. Cromatografia em Camada Delgada e Bioautografia	40
4.7. Produção de Enzimas	40
4.8. Caracterização dos compostos extraídos dos fungos endofíticos.....	41
4.8.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	41
4.8.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada ao Espectrômetro de Massas (EM)	41
4.8.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	42
4.8.4. Espectro da região do infravermelho	42
4.9. Formação de nanopartículas de prata (NPSAG)	42
4.10. Teste de citotoxicidade	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Isolamento, Identificação e preservação dos fungos endofíticos.....	44
5.1.1. Isolamento dos Fungos Endofíticos.....	44
5.1.2. Identificação dos fungos filamentosos endofíticos.....	45
5.2. Identificação Molecular dos Fungos.....	47
5.3. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	49
5.3.1 Difusão em disco	49
5.3.2. Avaliação das zonas de confronto: co-cultura	52
5.4. Cromatografia em Camada Delgada e Bioautografia	54
5.5. Potencial enzimático	56
5.6. Caracterização dos compostos extraídos dos fungos endofíticos.....	60
5.7. Biossíntese de nanopartículas de prata por fungos endofíticos.....	62
5.8. Teste de citotoxicidade	64
6. CONCLUSÕES	66
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	67
8. REFERÊNCIAS.....	68
9. ANEXOS	77
9.1. Métodos analíticos	77
9.1.1. Infravermelho	77

1. INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários são moléculas estruturalmente heterogêneas de baixo peso molecular que, diferentemente dos metabólitos primários, não são diretamente necessários para o desenvolvimento dos organismos que os produzem, que podem ser exclusivos para uma espécie ou gênero e podem aumentar sua sobrevivência e sua taxa tolerância a diferentes tipos de estresse ambiental (Kennedy e Wightman, 2011).

A bioprospecção de metabólitos secundários e o entendimento das interações planta-hospedeiro têm sido bastante estudados. Considerando que uma planta interage com diferentes microrganismos não patogênicos e patogênicos, são capazes de produzir metabólitos secundários de grande interesse (Wani et al., 2015).

Os micro-organismos endofíticos têm se destacado nas últimas décadas pela produção de metabólitos bioativos, especialmente os fungos, que representam uma importante fonte genética para a biotecnologia (PAMPHILE et al., 2014)

Vários estudos evidenciam que as plantas são habitadas por ao menos uma comunidade microbiana, além da comprovação de que estes micro-organismos são capazes de produzir metabólitos secundários iguais aos de sua planta hospedeira. Neste sentido, despertou-se o interesse para a investigação de microrganismos endofíticos com potencial aplicação em áreas como a indústria farmacêutica, agrônômica, alimentícia e química (NICOLETTI; FIORENTINO, 2015).

Os avanços obtidos no campo da Biotecnologia, aliado ao emprego de técnicas modernas de fracionamento químico, elucidação estrutural e screening na busca por novos protótipos bioativos, têm revelado um enorme potencial na descoberta e melhoramento de biomoléculas (Song et al. 2014).

A família Bignoniaceae é composta por cerca de 120 gêneros e 800 espécies de plantas predominantemente das Américas. *Pyrostegia venusta*, vulgarmente chamada de “Cipó” ou “Flor de São João”, é uma planta de ramagem densa, encontrada com muita frequência em campos e margens de estradas. Ela tem sido usada na medicina popular tradicional como um remédio para o tratamento de, infecções na pele, tosse, doenças do trato respiratório e diarreia. Na literatura científica, vários compostos bioativos já foram isolados e algumas atividades (LORENZI; SOUZA, 1995).

Nesse contexto, percebe-se a importância de serem elaborados instrumentos e ferramentas capazes de contribuir para elucidar substâncias, assim como catalogá-las nas pesquisas científicas e tecnológicas.

Diante o exposto, este trabalho teve como questão norteadora (objetivo geral) a prospecção de fungos endofíticos e seus bioativos de interesse em biotecnologia isolados de *Pyrostegia venusta*.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- ✓ Realizar o isolamento, caracterização e identificação de fungos endofíticos a partir da espécie vegetal de *Pyrostegia venusta*, bem como, avaliar o potencial biotecnológico através das análises de atividades antimicrobiana dos metabólitos secundários extraídos.

2.2. Específicos

- ✓ Isolar e identificar a comunidade de fungos endofíticos a partir da espécie vegetal *Pyrostegia venusta*;
- ✓ Extrair e avaliar o potencial antimicrobiano dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos isolados da *Pyrostegia venusta*;
- ✓ Caracterizar os metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos, através de métodos analíticos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produtos naturais

Produtos Naturais são definidos como pequenas moléculas orgânicas sintetizadas por um organismo que não são essenciais para seu próprio crescimento, desenvolvimento e reprodução. Eles têm sido uma fonte contínua de novos compostos na descoberta de medicamentos. Aproximadamente 35% das novas substâncias aprovadas como drogas nos últimos 30 anos são derivadas de Produtos Naturais e uma proporção significativa de drogas sintéticas também foi identificadas por estruturas naturais (NEWMAN e CRAGG, 2016).

A descoberta de medicamentos a partir de Produtos Naturais microbianos envolve um processo longo e complexo que tradicionalmente começa com a coleta de diferentes amostras ambientais de várias fontes, incluindo plantas, solo, fezes, invertebrados, sedimentos, líquenes, rochas, ninhos de pássaros, água ou materiais vegetais. Novos recursos e tecnologias foram desenvolvidos para aprimorar esta etapa do processo. As melhorias nos métodos de amostragem agora oferecem oportunidades para isolar microorganismos anteriormente não cultivados, incluindo a adaptação da técnica de diluição à extinção para o cultivo de fungos de alto rendimento (COLLADO et al., 2007).

A combinação de métodos aprimorados de isolamento e cultivo com técnicas independentes de culturas (baseadas em biologia molecular) revelou que os ecossistemas microbianos possuem níveis altos de diversidade e complexidade (RAMPELOTTO, 2013). Os isolados microbianos são selecionados com base em sua diversidade taxonômica e fermentados em diferentes condições, obtendo extratos que serão submetidos a um processo de triagem contra diferentes alvos de interesse terapêutico. Uma vez confirmada a atividade do extrato, tenta-se o isolamento guiado por bioensaio e a elucidação estrutural. Os compostos mais potentes e seletivamente ativos também devem passar por estudos toxicológicos e farmacológicos *in vitro*, além de um processo de otimização que garanta os requisitos de segurança para o composto principal (PELÁEZ, 2006).

Produtos naturais de micróbios e plantas produzem excelentes drogas. Um único micróbio pode produzir vários metabólitos secundários, chegando a 50 compostos. Os produtos mais úteis incluem antibióticos, agentes anticâncer, imunossuppressores, mas foram comercializados produtos para muitas outras aplicações, por exemplo, antivirais, anti-helmínticos, inibidores de enzimas, nutracêuticos, polímeros, surfactantes, bioherbicidas e vacinas (DEMAIN, 2014)

A importância da biodiversidade como fonte de novos medicamentos vem aumentando recentemente. É decisivo considerar plantas, microorganismos, organismos marinhos, animais e insetos como capazes de fornecer centenas de produtos naturais estruturalmente diferentes que podem resultar em novos condutores farmacêuticos (BRANDÃO et al. 2010). Assim, a biotecnologia abriu novos horizontes para a indústria farmacêutica e para o progresso nessa área, associada aos avanços da química sintética e das ciências médicas, que levaram à descoberta de novos medicamentos nos últimos anos, principalmente pelo uso de plantas, conforme descrito por Newman e Cragg (2016) Além disso, eles também enfatizaram a importância que deve ser dada aos microrganismos endofíticos como fontes promissoras de produtos naturais.

Finalmente, a combinação de engenharia microbiana, abordagens a bioinformáticas, tecnologias analíticas, ferramentas de detecção rápida e isolamento de compostos ativos e previsão estrutural promoveu um novo paradigma na pesquisa de Produtos Naturais (SHEN, 2015).

3.2. Plantas medicinais e seus fungos endófitos

Alguns fungos endofíticos podem produzir os mesmos compostos bioativos raros e importantes originalmente característicos da planta hospedeira (RAJAMANIKYAM, 2017). Essa capacidade é de grande importância, pois fornece uma estratégia alternativa para reduzir a necessidade de colher plantas de crescimento lento e possivelmente raras e também ajudar a preservar a biodiversidade cada vez menor do mundo. Além disso, a produção de um fitoquímico de alto valor através da exploração de uma fonte microbiana é mais fácil, econômica e leva a uma maior disponibilidade do bioproduto (STROBEL et al., 2004).

A Tabela 1 apresenta alguns fungos endofíticos e seus respectivos hospedeiros.

Tabela 1. Gêneros de fungos endofíticos isolados de diversas espécies hospedeiras

Nome científico	Nome popular	Fungos Endofíticos	autor
<i>Cymbopogon nardus</i> L. Rendle	Capim citronela	<i>Fusarium</i> sp., <i>Curvularia</i> sp., <i>Bipolaris</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Epicoccum</i> sp., <i>Pyricularia</i> sp.	Lopes et al.(2017)
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	boa-noite	<i>Alternaria</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Colletotrichum</i> sp. <i>Glomerella</i> sp. <i>Guignardia</i> sp. <i>Macrophomina</i> sp. <i>Nigrospora</i> <i>sphaerica</i> <i>Nodulisporium</i> sp. <i>Sporormiella</i> sp.	Araújo et al.,2018
<i>Ixora coccinea</i> L.	Alfinete de Soldado	<i>Curvularia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Guig</i> <i>nardia</i> , <i>Pestalotiopsis</i> , <i>Phoma</i> e <i>Xylaria</i>	Vieira et al., 2012
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Soja	<i>Botryotrichum</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Nigrospora</i> sp. <i>Bipolaris</i> sp. <i>Acrospeira</i> sp. <i>Phomopsis</i> sp. <i>Scopulariopsis</i> sp. <i>Mucor</i> sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Leptosphaerulina</i> sp. <i>Phomopsis</i> ; <i>Bipolaris</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Phoma</i> sp. <i>Trichothecium</i> sp <i>Papulaspora</i> sp. <i>Fusarium</i> sp	Wenzel et al.2013
<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	Palma-forrageira	<i>Chrysonilia sitophila</i> ; <i>Cladosporium</i> sp. ; <i>Cunninghamella</i> sp. <i>Curvularia</i> sp. <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Schldt</i> ; <i>Mucor</i> sp. ; <i>Penicillium</i> <i>citrinum</i> Thom; <i>Penicillium</i> <i>janthinellum</i> Biourge; <i>Phialophora repens</i> (R.W. Davidson) Conant; <i>Phoma</i> sp. ; <i>Rhinocladiella</i> sp. <i>Mycelia</i> <i>sterilia</i>	Freire et al.,2015
<i>Vernonia condensata</i>	Boldo do chile	<i>Colletotrichum</i> sp. <i>Phomopsis</i> sp. <i>Pestalotia</i>	Mussi-Dias et al.2012
<i>Protium heptaphyllum</i>	Breu branco	<i>Chaetomium globosum</i> <i>Phyllosticta</i> sp. <i>Meyerozyma</i> sp. <i>Xylaria grammica</i>	FIERRO-CRUZ et al.2017

Fonte: Próprio Autor

Muitos dos produtos farmacêuticos atualmente disponíveis têm uma longa história de uso como remédios de ervas, incluindo: ópio, aspirina, digitalina e quinina.

A demanda por produtos derivados de plantas aumentou em todo o mundo. No Oriente Médio, América Latina, África e Ásia, mais de 85% da população depende predominantemente da medicina tradicional, especialmente de fitoterápicos, para atender às suas necessidades de saúde. (JAMSHIDI-KIA,2018)

Nos últimos anos, muitos esforços têm sido empregados para identificar novas moléculas derivadas de fontes naturais que exibem uma série de atividades clínicas e farmacológicas. Isso levou a uma extensa pesquisa sobre substâncias orgânicas sintetizadas por várias plantas e microrganismos crescendo em diversos

habitats (MUSSI-DIAS et al., 2012).

3.3. *Pyrostegia venusta* - “Cipó de São João”

A família *Bignoniaceae* é composta por cerca de 120 gêneros e 800 espécies predominantemente das Américas, com poucas espécies distribuídas nas regiões temperadas (GENTRY, 1979). Pertencente a essa família, a *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl) Miers vulgarmente chamada de “Cipó ou Flor de São João”, é uma liana semi lenhosa de ramagem densa, encontrada com muita frequência em campos e margens de estradas (Figura 1) (LORENZI; SOUZA, 1995).

Figura 1. Planta “Cipó de São João” encontrada em campos (Vila de Caetê-Açú, Distrito do Município de Palmeiras, na Bahia)



Fonte: Próprio autor.

Pyrostegia venusta é uma planta nativa brasileira que tem sido usada na medicina popular tradicional como um remédio para o tratamento de manchas brancas (leucodermia, vitiligo) e infecções na pele (MOREIRA et al., 2012). Além disso, ela é utilizada para o tratamento de tosse, doenças comuns do trato respiratório e diarreia. A administração das partes aéreas ocorre na forma de chás e servem como um tônico geral (FERREIRA et al., 2000).

Na literatura científica, vários compostos bioativos como terpenoides, flavonoides, saponinas, alantoína, b-sitosterol, flavanona hesperidina já foram isolados (FERREIRA et al., 2000; FERNANDES et al., 2011) e atividades biológicas importantes,

como antimicrobiana, imunomoduladora e antitumoral, já foram atribuídas a esta espécie (ROY et al., 2012).

3.4. Área de coleta

A coleta do material utilizado no presente estudo foi realizada na Vila de Caetê-Açú, Distrito do Município de Palmeiras, na Bahia. A região também é conhecida como Capão ou Vale do Capão, localizada ao sul da sede do Município, com Latitude: -12,6183 e Longitude: - 41,4862. É uma região de transição de Biomas, por isso, abrange áreas de cerrado, caatinga, campos rupestres e matas de altitude (Figura 2).

Figura 2. Localização do ponto de coleta.



Fonte: Próprio autor.

3.5.1. Fungos endofíticos

Os microrganismos endofíticos formam uma associação mutualística com a planta hospedeira, podendo ser encontrados nas partes aéreas da planta, mas também nas raízes, que são uma das principais porta de entrada desses microrganismos,. Enquanto a planta fornece um ambiente de proteção e alimentação, os fungos por sua vez

produzem substâncias que podem aumentar o crescimento e proteger contra estresses bióticos e abióticos. Esse tipo de interação foi mencionada pela primeira vez no início do século XIX e, somente então, em 1866, Bary delineou uma possível distinção entre endófitos e fitopatógenos. (Azevedo et al., 2000; Strobel, 2004; Serrano, 2012; Piza, 2015).

Tipicamente, o processo de colonização de tecidos vegetais internos ocorre em um tecido específico ou através do sistema vascular ou apoplast, onde os orifícios de entrada podem ser: feridas, áreas radiculares laterais ou em germinação, estômatos e lenticelas. No entanto, as principais vias de colonização são lesões, pelos radiculares e células epidérmicas (Mesquita et al., 2013; Lacava & Sousa, 2016).

Além disso, há também evidências de que o endofítico pode penetrar na planta hospedeira degradando enzimaticamente as paredes celulares das células vegetais, produzindo celulasas e pectinases (Azevedo et al., 2000; Deshmukh et al., 2015). Esta infecção também pode ocorrer verticalmente através de sementes hospedeiras. Nesse contexto, o endófito pode colonizar uma planta ao longo de sua vida (Deshmukh et al., 2015; Lacava & Sousa, 2016), onde essa associação pode ser mantida em parte devido à produção de celulasas que permitem a sacarificação das paredes celulares das plantas (Zhang et al., 2017).

A produção de metabólitos biologicamente ativos, particularmente reguladores de crescimento de plantas, é considerada um dos mecanismos de ação mais importantes.

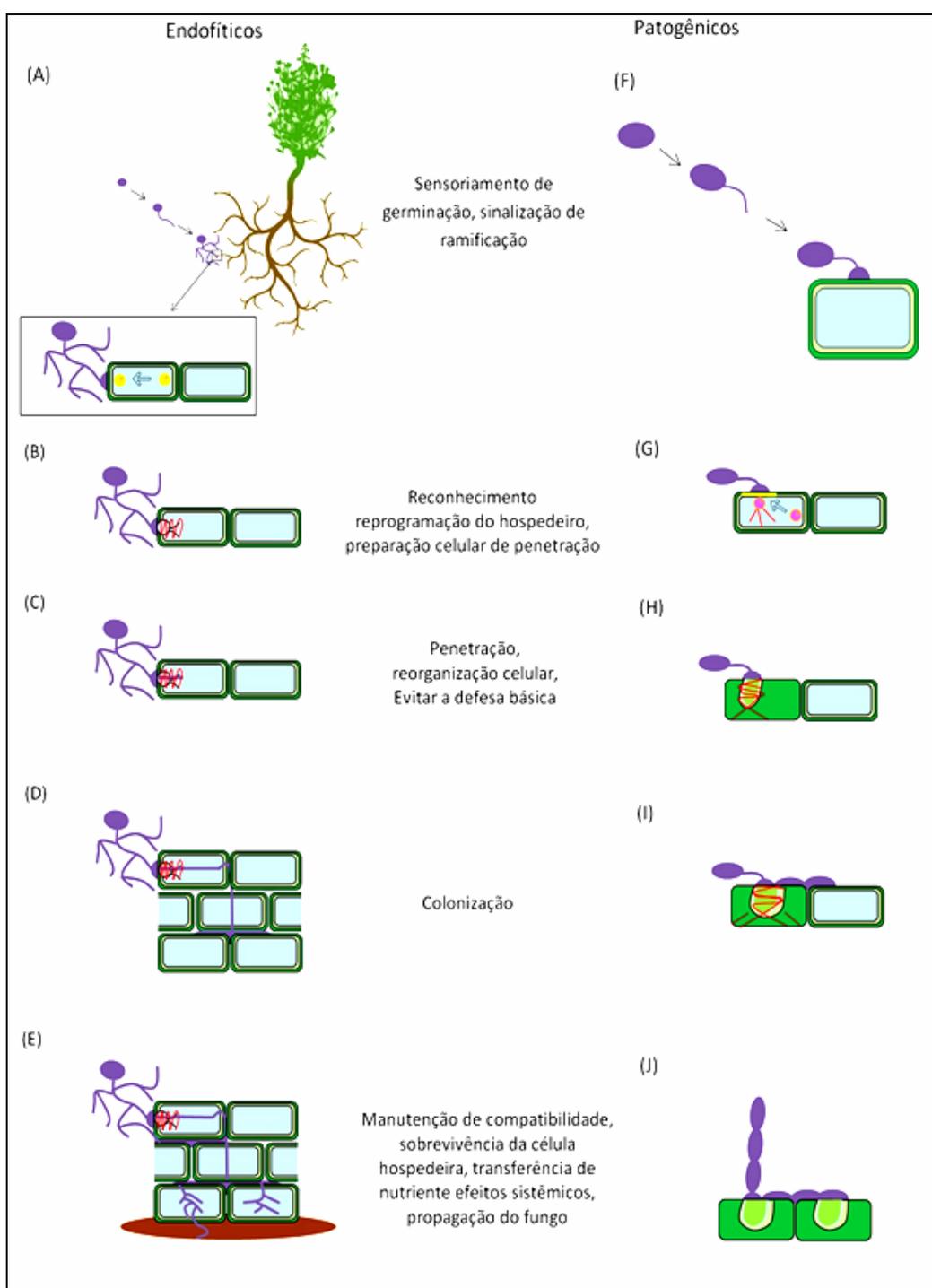
Estes podem atuar na solubilização e mineralização do fosfato no solo, podendo aumentar o uso de outras fontes menos solúveis. Eles também podem produzir fitonutrientes, como o ácido indolacético (IAA), que atua na raiz e crescimento radicular, aumentando assim a superfície de absorção de nutrientes e água (Godinho & Bhosle, 2013; Lacava e Sousa, 2016).

Além disso, esses microorganismos podem induzir uma resposta de resistência sistêmica na planta que normalmente é eficaz contra vários patógenos e pragas de insetos (Philippot et al., 2013). Vários estudos mostraram como essas interações podem ocorrer no espaço rizosférico e influenciar as comunidades acima do solo. Liu et al., 2017 estudaram a ação dos sideróforos produzidos por *Paenibacillus illinoisensis* e *Bacillus sp.* nas culturas de amendoim em solos calcários. Após a inoculação dos sideróforos YZ29 e DZ13, o teor de ferro e clorofila das folhas, atividade radicular, nitrogênio total, reserva de fósforo e potássio, bem como a qualidade e a biomassa dos grãos foram significativamente melhoradas em relação aos controles.

Xiang et al., 2017 avaliaram a ação de rizobactérias no controle de *Heterodera glycines* em culturas de soja. Neste estudo, uma bactéria do gênero *Bacillus* poderia gerar mais de 50% de morte desse parasita. No mesmo ano,

Ossowick et al., 2017 estudaram o isolamento de compostos voláteis produzidos por *Pseudomonas donghuensis*. Foram demonstradas fortes propriedades antifúngicas e inibição significativa dos fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*, *Verticillium dahliae* e *Pythium ultimum*. Portanto, as aplicações biotecnológicas desses diferentes grupos de microorganismos que vivem em associação consistem em uma fonte inexplorada de bioprodutos. A Figura 3 apresenta um esquema exemplificando o possível mecanismo de penetração e colonização dos fungos endofíticos.

Figura 3. Esquema exemplificando o possível mecanismo de colonização desenvolvido por fungos simbiótico endófitos biotróficos (a-e) e patogênicos (f-j).



Fonte: Adaptado de Kogel et al. (2006); Santos (2012).

As interações endófito e plantas são tão delicadas que as plantas normalmente não apresentam nenhuma mudança em suas características após a inoculação. Somente quando as plantas são submetidas a fatores estressantes, é que se compreende a importância dos endófitos. Porém, uma pequena fração das relações de simbiose planta-endófito tem sido avaliada para entender os custos e benefícios do hospedeiro em abrigar esses fungos em seus tecidos (ARNOLD, 2003).

Os fungos podem apresentar outras habilidades que não são expressas *in vitro*, que permitam a eles, no hospedeiro, competir em igualdade com os outros fungos. Pouco se sabe sobre o comportamento competitivo das espécies dentro do hospedeiro e na presença de outras espécies de microrganismos. Além disso, os fungos mais frequentemente isolados não são necessariamente os colonizadores primários. Alguns gêneros são comuns em plantas de clima temperado e tropical, tais como *Fusarium*, *Phomopsis*, *Phoma* e outros predominam em hospedeiros tropicais, como é o caso de *Xylaria*, *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Phyllosticta* e *Pestalotiopsis* (SCHULZ; BOYLE, 2005).

3.5.1.1. Gênero *Colletotrichum*

Os fungos do gênero *Colletotrichum* podem desenvolver diversos modos de vida, podendo atuar como fungos endofíticos, epifíticos, patógenos de plantas e eventualmente como patógenos humanos. Espécies de *Colletotrichum* foram encontradas como habitantes assintomáticos (endófitos) de tecidos de plantas. Como exemplos temos cepas de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, isoladas de folhas e pseudocaulis saudáveis de banana (*Musa acuminata*), gengibre (*Alpinia malaccensis*), gengibre selvagem (*Amomum siamense*), além de ter sido isolado como endófito de doze diferentes árvores da reserva florestal Iwokrama da Guiana (HYDE et al., 2009).

Estudos conduzidos por Rodriguez et al. (2009) mostram que os fungos do gênero *Colletotrichum* podem estar associados com plantas atuando como mutualistas assim como parasitas, dependendo do genótipo do hospedeiro. Esta observação indica que espécies de fungos deste gênero podem fornecer resultados promissores quando submetidos a estudos químicos e biológicos, uma vez que para a adaptação a muitos ambientes e modos de vida, eles desenvolvem um conjunto de mecanismos para produção de substâncias que controlam o *habitat* onde estão

instalados.

3.5.1.2 Gênero *Phyllosticta*

O gênero *Phyllosticta* é distinto de outros membros da família *Botryosphaeriaceae* em características culturais (tempo de crescimento, coloração e aspecto da colônia) e morfológicas (conídios envoltos em uma bainha mucóide e frequentemente com um apêndice apical). O metamorfismo sexual tem ascomata unilocular, ascosporos frequentemente com cápsulas mucóides e o tecido hematológico se desintegra na maturidade. As características que diferem esse gênero, também são apoiadas por análises filogenéticas (PHILLIPS et al., 2013).

Fungos desse gênero podem apresentar comportamento saprofítico, endofítico e/ou patogênico dependendo do hospedeiro e das condições ambientais as quais os mesmos encontram-se submetidos, destacando-se a *Phyllosticta citricarpa*, como agente causal da Mancha Preta dos Citros, e a *Phyllosticta capitalensis* como o endofítico cosmopolita mais isolado (WIKKE et al., 2013).

3.5.1.3. Gênero *Aspergillus*

Os fungos *Aspergillus* estão associados às plantas como endófitos, principalmente regiões tropicais (Isaka et al. 2001; Oliveira 2008; Prince 2008). O *Aspergillus* endofítico é considerado promissor para a produção de novos compostos antimicrobianos, uma vez que eles podem secretar essas moléculas quando cultivadas em condições controladas em laboratório.

Os fungos do gênero *Aspergillus* são os indicadores de deterioração em sementes e grãos causando danos no germe, descoloração, alterações nutricionais, perda da matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica (CORBELLINI, 2003).

O *Aspergillus* tem a capacidade de crescer em substratos de baixo custo, produzindo enzimas estáveis com variações de temperatura e pH, além de serem de fácil recuperação atendendo a diversas exigências para a produção comercial de enzimas (SANTOS, 2010; SLIVINSKI, 2007).

3.5.2. Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários são biocompostos que não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos. Os metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos foram considerados como produtos exclusivos de plantas. Na realidade, é possível que

vários metabólitos antes considerados como fitocompostos sejam na verdade produtos biossintetizados por microrganismos endofíticos (KUSARI, et al., 2012).

Além disso, os metabólitos secundários são fundamentais nas interações metabólicas entre o fungo endofítico e a planta hospedeira, estando envolvidos na sinalização, regulação e defesa da simbiose (Bhardwaj e Agrawal, 2014).

Chen et al. 2016 descreveram que os Fungos endofíticos tem sido reconhecidos como uma fonte promissora de metabólitos secundários que podem ser utilizados, principalmente, na área farmacêutica.

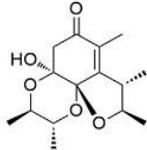
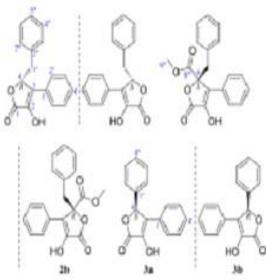
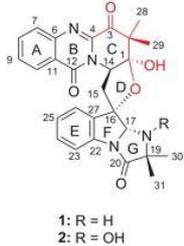
Na natureza, a síntese de metabólitos é influenciada por fatores bióticos e abióticos e está intimamente relacionada com a fisiologia do hospedeiro, já que a maioria dos endófitos coloniza os espaços apoplásticos entre as células vegetais. Assim, fatores ambientais como a disponibilidade de água, nutrientes e salinidade podem levar a uma alteração do ambiente em torno dos microrganismos, levando-os a adaptar-se para sobreviver nas novas condições (AZEVEDO et al., 2002).

Além disso, esses fungos também produzem compostos pertencentes a diversos grupos estruturais: terpenóides, esteroides, xantonas, chinonas, fenóis, isocumarinas, benzopirranonas, tetralonas, citocalasinas e enniatinas endófitos (ALY et al., 2010; ZHANG et al., 2006).

Para produção dos metabólitos secundários se faz necessário estabelecer os parâmetros ideais e avaliar a possibilidade de utilizar co-culturas de fungos endofíticos com outros micro-organismos, com o objetivo de ampliar a variedade de substâncias produzidas (SCHULZ et al. 2015)

O surgimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos comercialmente disponíveis tem estimulado a busca por novos metabólitos antimicrobianos (LIANG et al., 2012;) Diversos metabólitos secundários com atividade antimicrobiana têm sido isolados de fungos endofíticos. Estes metabólitos incluem: alcalóides, peptídeos, esteroides, terpenóides, fenóis, quinonas e flavonóides (Tabela 2) (YU et al., 2010).

Tabela 2. Quadro de substâncias isoladas de fungos endofíticos.

<i>Colletotrichum capsici</i>	<i>Siegesbeckia pubescens</i>	Citrinal B	Inibidor da enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1		Wang <i>et al.</i> , 2016 Cao <i>et al.</i> , 2017
<i>Phyllosticta sp.</i>	<i>Acorus tatarinowii</i>	R-xenofuranone B (1a), S-xenofuranone B (1b), enantio-flavipesin B (2a), flavipesin B (2b), S-3-hydroxy-4,5-diphenylfuran-2(5H)-one (3a), R-3-hydroxy-4,5-diphenylfuran-2(5H)-one (3b)	Atividade antimicrobiana		Yang <i>et al.</i> , 2017
<i>Neosartorya udagawae</i>	<i>Aricennia marina</i>	Neosartoryadins A e B	Atividade antiviral	 1: R = H 2: R = OH	Yu <i>et al.</i> , 2015

Fonte: Próprio autor.

Os metabólitos antimicrobianos produzidos pelos fungos endofíticos apresentam muitas vantagens incluindo o uso sustentável, a não destruição de recursos, a fácil produção industrial em grande escala e o controle de qualidade (LIANG *et al.*, 2012).

4.0. Técnica de co-cultivo ou cultura pareada para o estudo de fungos endofíticos

Os microrganismos estão em constante interação com seu ambiente natural, vivendo em contato e competindo por recursos com outros microrganismos. Sua capacidade de adaptar sua fisiologia às condições ambientais é a razão do fracasso de muitos experimentos *in vitro* que não imitam esses fenótipos corretamente (Brakhage *et al.*, 2008; Brizuela *et al.*, 1998, Combès *et al.*, 2012).

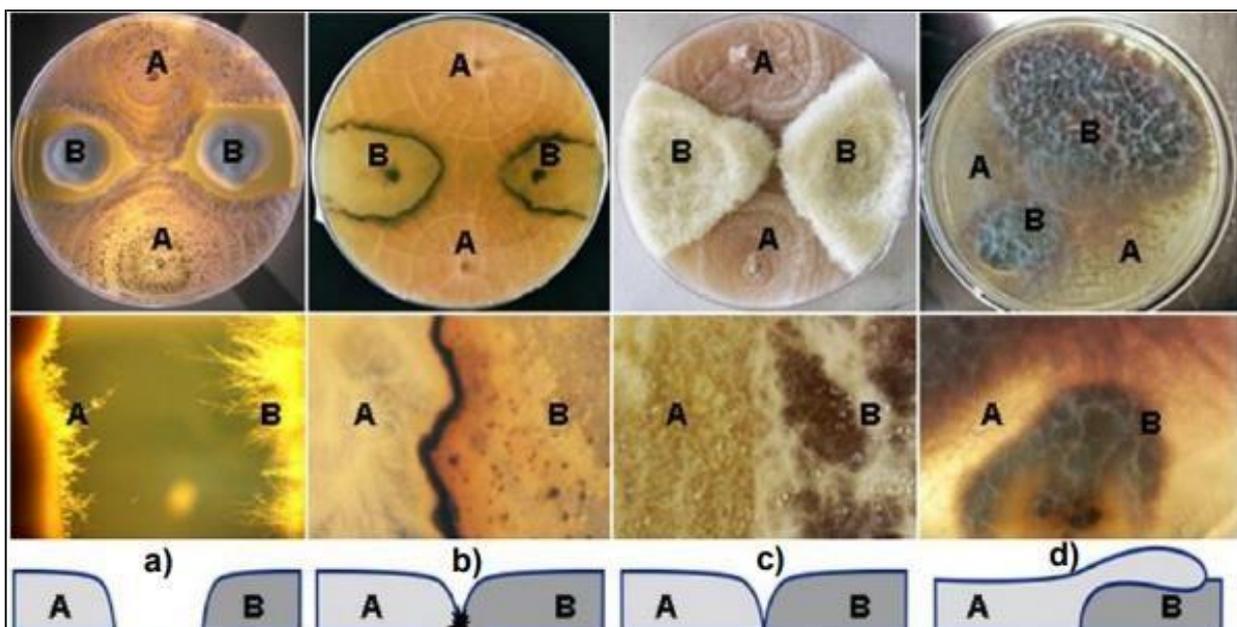
Interações microbianas com diferentes combinações de microrganismos têm sido amplamente relatadas para modular o metabolismo fúngico até o ponto de induzir a produção de novos metabólitos secundários. Essas interações podem levar à ativação de mecanismos reguladores complexos e, finalmente, induzir a biossíntese de uma ampla diversidade de produtos naturais (Bertrand *et al.*, 2014).

A co-cultura provou ser uma abordagem eficaz para simular parte das condições fisiológicas que ocorrem durante as interações fúngicas em seu ambiente natural e pode ter potencial para a descoberta de novas moléculas (Bader *et al.*, 2010; Brakhage, 2013; Netzker *et al.*, 2015).

Enquanto os processos tradicionais de triagem envolvem o cultivo de uma única cepa microbiana para descobrir novos compostos bioativos, o uso de co-culturas apresenta novas oportunidades para a potencial ativação de vias biossintéticas enigmáticas. Os microrganismos podem detectar a presença de outros microrganismos, isso pode desencadear respostas derivadas da interação, que às vezes podem promover mudanças na morfologia dos microrganismos envolvidos na interação, acopladas a uma possível indução de diferentes metabólitos secundários, enzimas ou outros componentes (Hynes et al. al., 2007).

Tais condições de cultura facilitaram a detecção de compostos que não são produzidos quando os fungos individuais são cultivados sozinhos (Hynes et al., 2007). Métodos analíticos permitiram a detecção de alterações nos seus perfis de metabolitos, dependendo dos fungos que interagem (Peiris et al, 2008;. Rodriguez-Estrada et al, 2011.).

Diferentes técnicas de co-cultura foram desenvolvidas para esse fim, incluindo o uso de meios líquidos ou sólidos, mas todas as abordagens consistem em cultivar dois ou mais microorganismos em um único ambiente confinado para facilitar as interações com a intenção de induzir a expressão de uma diversidade química adicional (Bertrand et al. al., 2013). Alguns exemplos de compostos derivados dessas interações incluem um inibidor de crescimento a longa distância relatado entre *Trichophyton rubrum* e *Bionectria ochroleuca* (Bertrand et al., 2013), a produção de acremostatinas A-C, por *Acremonium sp.* quando cultivadas em uma cultura mista com *Mycogone rosea* (Degenkolb et al., 2002), a produção de aspergicina por uma co-cultura de duas espécies de *Aspergillus* (Zhu et al., 2011) ou a produção de ciclo- (l-leuciltrans- 4-hidroxi-L-prolil-leucil-d-trans-4-hidroxi-L-prolina), quando duas estirpes derivadas de mangue de *Phomopsis sp.* e *Alternaria sp.* foram co-cultivadas em meio líquido (Li et al., 2014).

Figura 4. Interações em co-cultivo de fungos.

Fonte: Bertrand et al. (2014).

Os microrganismos quando cultivados em condições artificiais tendem a competir por nutrientes ou espaços, conseqüentemente ativando a produção de novos compostos ou aumentando a gama de agentes químicos. Isso requer abordagens analíticas sofisticadas e sensíveis, principalmente com base espectrometria de massas de alta resolução. Essas investigações são a chave para entender os eventos químicos que regem as interações entre os microrganismos (BERTRAND et al.,2014).

5.0.Métodos analíticos

5.1Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Na cromatografia em camada delgada, a fase móvel é o solvente de desenvolvimento e a fase estacionária encontra-se adsorvida à superfície da placa. A fase estacionária mais comum é constituída por uma camada de sílica-gel. A CCD pode ser analítica (CCDA) e/ou preparativa (CCDP) (Figura 5), e seu princípio consiste na análise dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana (AQUINO NETO, 2013).

5.2Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é a técnica analítica de separação mais desenvolvida e empregada nas indústrias químicas, farmacêuticas, radiofarmacêuticas, alimentícias, refinarias, cosméticos, petroquímicas, laboratórios de análises clínicas, ambiental e forense, além de aplicações nas áreas médicas e em muitos outros campos da ciência e da pesquisa. A capacidade de separar espécies em misturas complexas fez da HPLC uma técnica essencial para fins qualitativos e quantitativos (NAUSHAD, 2014).

5.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma técnica aplicada para a elucidação de estruturas de compostos puros usando informações de propriedades magnéticas de núcleos atômicos em um campo magnético forte. É hoje uma ferramenta indispensável em praticamente todos os campos de aplicação das análises químicas (MORAIS et al., 2013).

5.4 Potencializando as biomoléculas através da nanotecnologia

Nas últimas décadas o potencial biotecnológico dos fungos endofíticos tem aumentado com o advento da nanotecnologia (HOHENDORFF et al., 2016). Atualmente, a área da nano vem ganhando espaço e importância na biotecnologia e na inovação tecnológica mundial. Diante desse cenário os materiais como nanobiocompósitos e nanopartículas bioativas têm sido cada vez mais empregados nas mais diferentes áreas (TRATNYEK; JOHNSON, 2006; RODOVALHO, 2015).

A nanotecnologia permite sintetizar, manipular e caracterizar matéria em escala nanométrica (inferior a 10nm) com objetivo de criar novos materiais, desenvolver novos produtos e criar processos baseados na capacidade de ver e manipular átomos e moléculas (GONGORA-RUBIO et al., 2005).

A via de síntese biológica tem sido efetuada, sobretudo, através do uso de bactérias, fungos, plantas, cianobactérias e actinomicetos. Existem muitos relatos de micossínteses (síntese via fungos) de nanopartículas metálicas sendo usadas. Devido aos componentes biológicos presentes nas suas estruturas celulares, envolvidos em seus processos metabólicos, pode haver potencial para bioacumulação e tolerância a metais.

A biossíntese de nanopartículas metálicas por fungos demonstra que estes metais se apresentam monodispersos com diferentes composições químicas,

tamanhos variados e dimensões bem definidas (HULKOTI; TARANATH, 2014; MALISZEWSKA, 2011). Por isso, os fungos endofíticos estão presentes em diversos estudos sobre geração biológica de nanopartícula de prata, uma vez que podem ser obtidos em larga escala, além de propiciar viabilidade econômica para sua produção. A nanotecnologia desempenhará importante papel no desenvolvimento de diferentes ciências e tecnologias, devido a suas potenciais aplicações (RAI, 2013; SILVA, 2018).

6.MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Coleta

A coleta do material utilizado no presente estudo foi realizada na Vila de Caetê-Açú, Distrito do Município de Palmeiras, na Bahia. A região também é conhecida como Capão ou Vale do Capão, localizada ao sul da sede do Município, com Latitude: -12,6183 e Longitude: - 41,4862.

O material biológico foi obtido a partir das folhas sadias da planta *Pyrostegia venusta*, conhecida como Cipó de São João. O material coletado foi encaminhado de maneira asséptica para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Bahia.

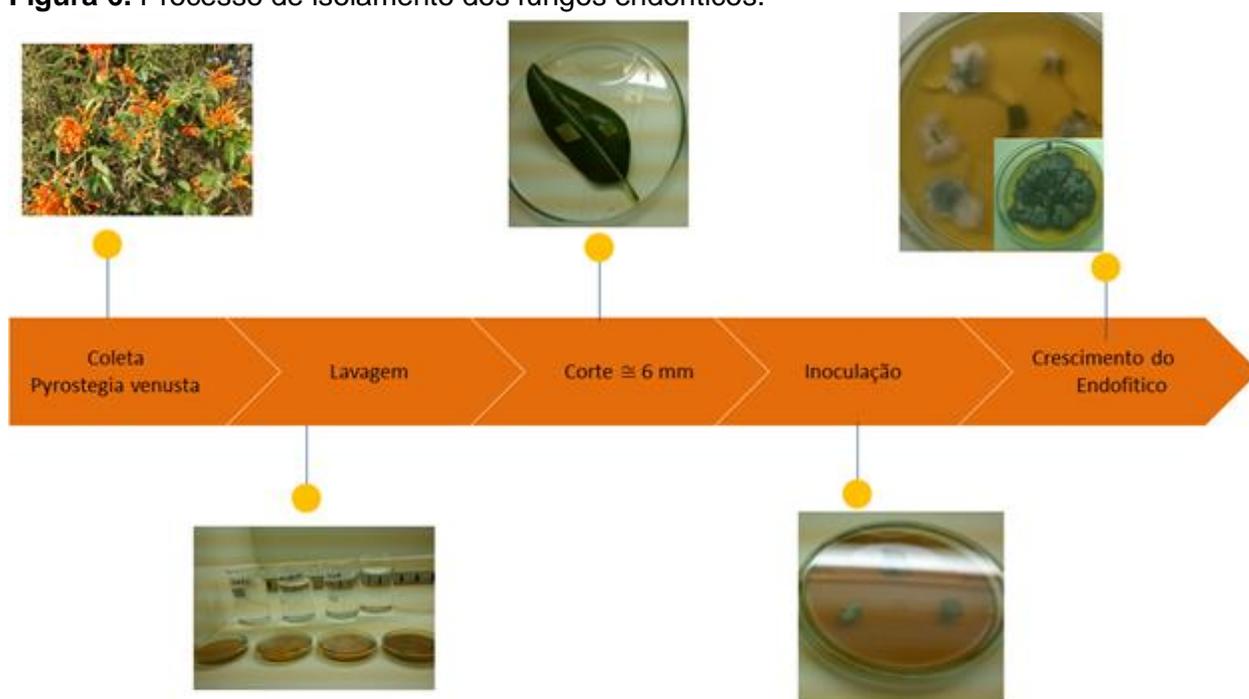
6.2.Isolamento dos fungos endofíticos

No Laboratório de Microbiologia, foi realizado o processamento das folhas, onde estas foram lavadas em água corrente para a retirada de resíduos visíveis (epifíticos), e desinfetadas por meio de banhos sucessivos em álcool 70% (3 minutos); solução de hipoclorito de sódio 2,5% (3 minutos); álcool 70% (30 segundos) e, finalmente, lavadas três vezes em água destilada esterilizada, para a retirada do excesso de álcool. Os controles foram efetuados com a inoculação de 200µL da última água de lavagem em meio de cultura Agar *Sabouraud* e Agar Dextrose Batata (BDA) e espalhamento com o auxílio de uma alça de Drigalsky, incubadas por 48 horas à 28°C. Esse processo teve como finalidade verificar a eliminação de comunidades microbianas externas.

Após o processo de desinfecção, a técnica de isolamento ocorreu por fragmentação do tecido vegetal (Figura 6) (ARAÚJO et al., 2002). Os fragmentos das folhas foram recortados em discos de 0,5 mm de diâmetro, 06 discos por folha,

num total de 90 discos da planta. Com auxílio de uma pinça flambada e em câmara asséptica, três discos foliares foram transferidos de forma equidistante para placas de Petri, contendo meio BDA e Agar *Sabouraud*, incubados a 28°C. A avaliação foi realizada a partir do terceiro dia, em intervalos de 2 a 5 dias. Com a observação de crescimento, foi realizada repicagem para novas placas de Petri contendo os respectivos meios de cultura, com a finalidade de se obter a cultura pura, e também para a realização de observações macroscópicas, de coloração e características de crescimento para auxiliar na identificação das espécies.

Figura 6. Processo de isolamento dos fungos endofíticos.



Fonte: Próprio autor.

Após 3-4 semanas de incubação, as pontas das hifas dos fungos foram removidas e transferidas para meio de BDA e *Sabouraud*. As placas foram preparadas em duplicatas para eliminar a possibilidade de contaminação. As estirpes puras foram armazenadas em tubos com meio BDA e método de Castellani, onde colônias puras do fungo são colocadas em um pequeno frasco contendo água destilada esterilizada ou solução salina, sendo posteriormente selado e armazenado em temperatura ambiente ou de refrigerador.

6.3. Identificação dos fungos

6.3.1. Caracterização morfológica

Os isolados foram separados em grupos morfológicos e grupos de crescimento, conforme sua coloração e taxa de crescimento micelial *in vitro*.

A caracterização morfológica foi realizada por meio da análise do aspecto, coloração e textura da colônia. Essa observação foi feita com o fungo cultivado no meio BDA (200 g/L⁻¹ de batata, 20 g/L⁻¹ de dextrose e 15 g/L⁻¹ ágar), por 10 dias a 28°C (NOBLES, 1948).

6.3.2. Identificação molecular

Todos os isolados que tiveram seu extrato bruto ativo foram selecionados para identificação molecular por meio de sequenciamento da região espaçadora transcrita interna (ITS1-ITS4), que amplificam a região responsável pela síntese DNA ribossomal.

O DNA total foi extraído de micélios frescos retirados da placa superficial de cada fungo endofítico. O DNA foi recuperado de micélios macerados usando o *Kit* de extração *NucleoSpin® Nucleo Spin RNA Plant and Fungi* seguindo o protocolo de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do DNA genômico foi avaliada usando o equipamento *Nanodrops (Thermo Scientific)*, seguido por eletroforese em gel de agarose.

Para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a amplificação foi realizada utilizando um "*primer*" universal de DNA, conforme descrita abaixo (WHITE et al., 1990):

ITS-1 - *forward* - 5'CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 3'

ITS-4 - *reverse* - 5'TCC TCC GCT TAT TGA GC 3'

Os reagentes utilizados na reação de PCR, para um volume final igual a 20,0 µL, são os que seguem: 4,0 µL de tampão, 1,2 µL de MgCl₂, 2,0 µL de dNTP, 0,6 µL of *primer forward*, 0,6 µL de *primer reverse*, 10,4 µL de água destilada e 1,0 µL de DNA. A PCR foi realizada usando o equipamento 2720 PCR *Thermo Cycler* seguindo o procedimento padrão: desnaturação inicial a 94°C por 1 min, seguido por 35 ciclos para cada desnaturação (94°C por 1 min), anelamento (51°C por 1 min) e

extensão (72°C durante 1 min). O último estágio foi a extensão final a 72°C por 8 min e resfriamento a 10°C. Posteriormente, os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (v/v) que foi corrido a 100v, 400 mA, durante 30 min. O gel foi corado com brometo de etídio e uma banda foi fotografada em um transiluminador de luz UV. Os amplicons foram limpos após a verificação de sua integridade antes das instruções de sequenciamento automático.

O resultado da PCR gerou um segmento de DNA de aproximadamente 1500 pb e o produto foi sequenciado pelo Laboratório de Imunologia. As sequências foram alinhadas e analisadas pelo programa MEGA 5 usando o teste de *bootstrap* para 1000 repetições com a técnica *Neighbour-Joining* gerado pelo algoritmo *Kimura 2*-parâmetros.

6.3.3. Obtenção dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos

6.3.4. Seleção de antagonistas *in vitro* (co-cultura)

A técnica de co-cultura ou cultura pareada foi realizada pela inoculação de discos de 6 mm de diâmetro de colônias crescidas à 28°C, 7 dias, dos fungos endofíticos: *Phylosticta*, *Colletotrichum*, *Aspergillus* sp e dos fitopatógenos *Fusarium*, *Phytophthora* e *Aspergillus niger*, em polos opostos da placa de Petri (4 cm de distância) contendo meio de cultura BDA. Os testes foram realizados em triplicata. Para o controle negativo, foram inoculados os fungos endofíticos e o fitopatógeno em placas distintas em apenas um polo da placa. As interações competitivas foram analisadas segundo Bertrand e colaboradores (2014).

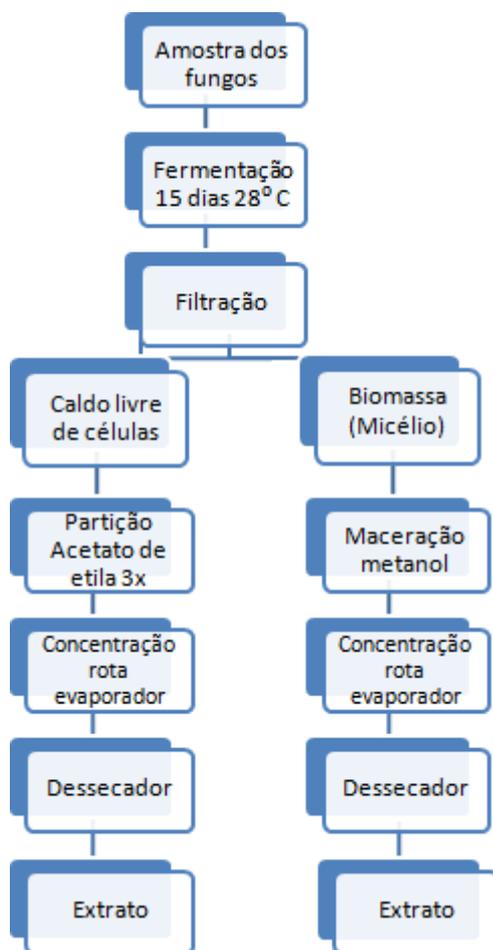
6.3.5. Processo de fermentação e extração dos metabólitos

A preparação do extrato fúngico bruto (EF) foi realizada seguindo Wiyakrutta et al. (2004), com modificações, onde dois tipos de extratos foram preparados: extrato bruto de sobrenadante (EBS) e extrato micelial bruto (EMB).

Os isolados foram semeados em meio BDA e incubados em estufa a 28°C por 7 dias. Após esse período, foi retirado um fragmento de 6 mm de cada isolado e inoculados individualmente em frasco de Erlenmeyer com capacidade de 1000 mL, contendo 500 mL de Caldo batata, e incubadas em agitador orbital a 28°C, 1200 rpm por 15 dias. Após a incubação os isolados foram submetidos ao sistema de filtração, ficando evidente a separação do caldo fúngico com a biomassa produzida pelo

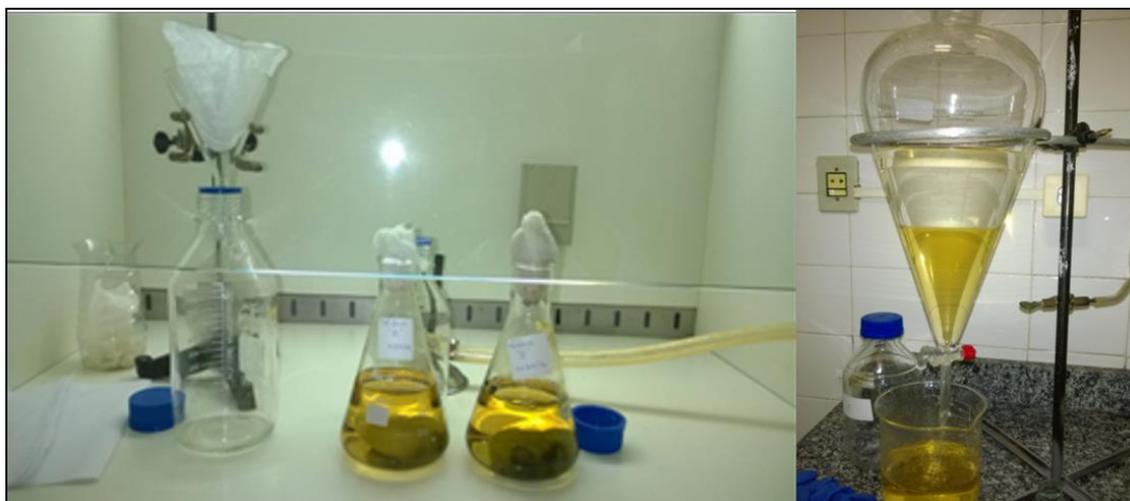
processo de fermentação dos fungos (Figuras 7 e 8).

Figura 7. Processo de obtenção dos extratos



Fonte: Próprio autor.

Figura 8. Obtenção de extratos fúngicos.



Fonte: Próprio autor.

O caldo livre de células foi submetido à partição líquido-líquido (1:1) com

solvente de baixa polaridade, acetato de etila. O caldo fermentado foi transferido para funil de separação e submetido a uma partição líquido-líquido com acetato de etila P.A. (3 vezes). Os caldos foram codificados como extrato EBS. A fase orgânica resultante da extração foi tratada com sulfato de sódio anidro.

Os micélios foram submetidos à extração por maceração com metanol (MeOH). Os extratos foram reunidos e filtrados em funil de separação, identificados e armazenados em geladeira para serem concentrados. Os extratos do micélio foram codificados como extrato EMB. Todos os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo, sob pressão reduzida com bomba de vácuo e mantidos em dessecador com sílica ativada.

6.3.6. Avaliação da atividade antimicrobiana e antifúngica

A atividade antimicrobiana dos extratos do caldo livre de células isolados dos fungos endofíticos foi avaliada pela técnica de antibiograma, pelo método de difusão em disco de Kirby-Bauer e seguindo as normas do NCCLS (2003). As bactérias testadas foram cepas de: ATCC25923 -*Staphylococcus aureus*, ATCC22922-*Escherichiacoli*, ATCC27853- *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebterium pseudotuberculosis* T01 e *Corynebterium pseudotuberculosis* VD57, ATCC90028 *Candida albicans*

6.3.7. Método de difusão em disco

Para os testes de antibiose, as bactérias indicadoras foram reativadas em placas contendo meio Ágar Mueller-Hinton, por 24 horas. As bactérias foram diluídas com solução salina 0,85%, conforme padronização com o tubo 0,5 da escala de McFarland, equivalendo a 10^8 UFC/mL.

As bactérias foram disseminadas com auxílio de um *swab* estéril, por toda a placa de Petri, contendo o meio Ágar Mueller-Hinton. Os extratos dos fungos com acetato de etila foram diluídos em água deionizada. Discos de papel de 6 mm foram colocados em microtubos contendo 20µL do extrato metabólico para melhor absorção e após retirados foram secos naturalmente por um dia. Continuando o processo os discos foram posicionados na placa semeada (37°C, 24H). Posteriormente foi realizada a medição do diâmetro dos halos de inibição (OSTROSKY et al. 2008). A gentamicina foi utilizada como medicamento padrão e como controle negativo o acetato de etila. Os bioensaios foram realizados em

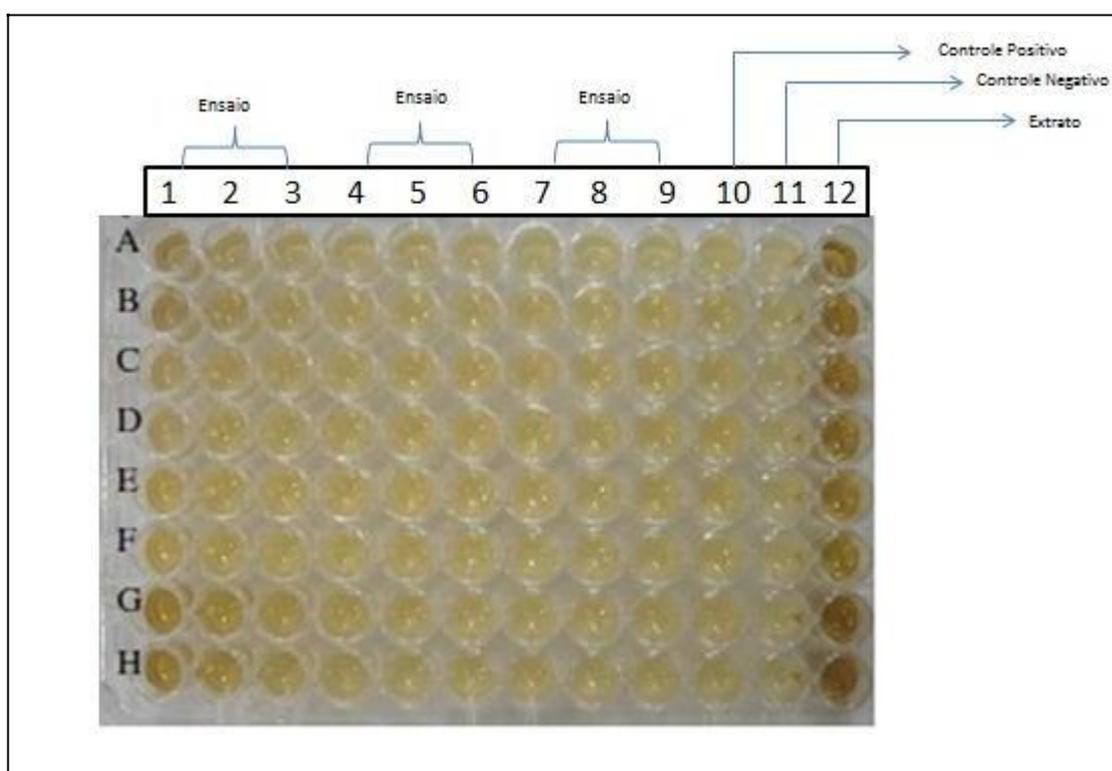
triplicata.

6.3.8. Ensaio para medir a Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Em cada placa de poliestireno de 96 poços foram adicionados 100 μ L de caldo BHI em cada cavidade. Em seguida acrescentou-se na primeira cavidade de cada coluna 100 μ L da solução contendo os extratos a serem testados e homogeneizou-se essa solução. Após isso foram realizadas diluições sucessivas, retirando-se 100 μ L da primeira cavidade, transferindo esse volume para a próxima e homogeneizando. Esse procedimento foi repetido até a penúltima cavidade da placa, de onde foram retirados 100 μ L e plaqueados. As três últimas linhas (10,11 e 12) da placa foram utilizadas como um controle: meio usado, extrato puro e a gentamicina. Em cada cavidade foi adicionado 5 μ L da suspensão das bactérias e levedura e incubaram-se as placas a 37° por 24 horas para bactérias e a 30 °C por 48-72 horas para leveduras.

Suspensões de células de cada micro-organismo foram padronizadas na concentração de aproximadamente 10⁸ UFC/mL para bactérias e 10⁶ UFC/mL para leveduras.

Figura 9. Protocolo do Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM).



Fonte: Próprio autor.

6.3.8. Cromatografia em Camada Delgada e Bioautografia

A cromatografia em camada delgada e bioautografia consistem na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial desses componentes quando arrastados pela fase móvel (solvente) sobre uma camada delgada de adsorvente.

Faz-se uma suspensão do adsorvente com um solvente adequado e mantendo-se a placa na horizontal, transfere-se a suspensão para a superfície da placa, espalhando-se de maneira bem uniforme. Deixa-se em repouso por alguns minutos e então se faz a ativação das placas. A ativação consiste em deixar a camada de adsorvente seca (livre do solvente usado na suspensão).

Os extratos fúngicos que se mostraram bioativos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), com cromatoplasmas de sílica em suporte de alumínio (20x20 cm). Como revelador foi utilizado vapor de iodo e luz na região do ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

Em seguida, o teste de bioautografia foi realizado para selecionar as substâncias bioativas, onde a cromatoplasma foi inserida em uma placa de Petri recoberta com Ágar Mueller-Hinton com e sem suplementação de dextrose. As bactérias e a levedura indicadoras foram inoculadas sobre a superfície do ágar (100 µL) e espalhadas com alça de Drigalski, depois incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para realização da leitura do diâmetro dos halos de inibição.

6.3.9. Caracterização dos compostos extraídos dos fungos endofíticos

6.3.9.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A pureza das frações foram analisada por HPLC em coluna de sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano (Supelco Analytical Ascentis® C18, 5,0 µm, 25 cm x 4,6 mm) análises de 50 minutos de duração e fluxo de 1,0 mL por minuto com gradiente exploratório de H₂O/MeOH com mudança linear do solvente até 40 minutos quando era atingida a proporção 100% MeOH que permanecia por 5 minutos até que a condição inicial fosse novamente atingida.

Os cromatogramas foram obtidos em equipamento de modelo Shimadzu LC-20A Prominence, equipado com um sistema binário de bombas modelo LC-20AR, um detector UV-visível com arranjo de diodos modelo SPD-M20A e um injetor automático modelo SIL-10AF e degaseificador modelo DGU-20^a.

2Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada ao

6.3.9.2. Espectrômetro de Massas (EM)

Os espectros de RMN foram compilados em uma tabela que se encontra em anexo. As análises de ^1H NMR, HSQC e HMBC foram realizadas usando o software ACDLabs.

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos nos modos de ionização positivo e negativo por “pulverização de elétrons” com analisador do tipo “Ion Trap” em um espectrômetro do modelo Bruker® □ AmaZon-X (MS-ESI-Ion Trap), acoplado ao sistema cromatográfico modelo Shimadzu LC-20A Prominence, pertencentes ao LMCA - Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises - no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba.

6.3.9.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN \rightarrow ^1H) foram adquiridos junto ao LMCA - Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises - do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba, utilizando um aparelho da Bruker® □ modelo Avance III HD, com operação de 400 MHz.

6.3.9.4. Espectro da região do infravermelho

As amostras foram levadas ao espectrômetro Vertex 70 (Bruker, EUA), calibrado para o método de ATR, os espectros foram obtidos com o software OPUS, a janela de leitura foi configurada para 4000 a 500 cm^{-1} e cada amostra foi lida 16 vezes (16 scans), o tratamento dos dados foram feitos no OriginPRO 8.5.

6.3.9.5. Formação de nanopartículas de prata (NPSAG)

Em 500 mL do filtrado celular dos fungos isolados adicionou-se 0,0017g de AgNO_3 (1mM), agente precursor metálico e incubou-se durante 7 dias em agitador orbital a 28°C , 120rpm. Essas amostras foram acompanhadas durante quatro semanas para observação das características ópticas (como coloração e espectro de absorção no UV-Visível no *MultiScan GO - Thermo Scientific*).

6.3.9.6. Teste de citotoxicidade

Utilizou-se para este ensaio células VERO foram cultivadas com o meio MEM-D suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e mantidas em estufa a 37°C. Foram utilizadas placas de poliestireno de 24 poços (*NUNC Co, USA*) para formação de monocamada celular e após 24 horas de cultivo a monocamada foi inoculada com os diferentes extratos fúngicos. As culturas foram mantidas com MEM-D sem a presença de SFB em estufa de 37°C. A toxicidade celular foi constatada mediante observação das culturas ao microscópio invertido.

7.RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Isolamento, Identificação e preservação dos fungos endofíticos

7.1.2.Isolamento dos Fungos Endofíticos

O processo de desinfestação superficial e plaqueamento dos fragmentos vegetais, utilizados no presente trabalho, representam uma metodologia tradicional para a detecção e quantificação dos fungos endofíticos (TAN & ZOU, 2001), bem como a utilização do meio de cultura BDA (ROSA et al., 2010). No presente trabalho, 60 isolados obtidos demonstraram que a metodologia utilizada (etapas de desinfestação superficial e uso do meio de cultura BDA) foi eficiente para a eliminação de microrganismos epifíticos e consequente obtenção de diferentes táxons da comunidade de fungos endofíticos da *Pyrostegia venusta*.

Outro importante fator que exerce influência na detecção e distribuição de fungos endofíticos é o tipo de tecido do hospedeiro (folhas, caule, raiz), utilizado para o isolamento dos microrganismos (STONE et al., 2004). Isto pode ser observado no presente trabalho uma vez que o total de fungos endofíticos obtidos foram 60 isolados das folhas. As folhas da *Pyrostegia venusta* possuem teor acentuado de flavonoides, que têm sido reconhecidos como responsáveis por atividade antialérgica, anti-inflamatória, antiviral, antiproliferativa e anticancerígena, além de afetar alguns aspectos do metabolismo de mamíferos (WATTENBERG, 1995).

Silva et. al. (2012) observaram atividade antitumoral do extrato hidroetanólico de *P. venusta* em um modelo experimental de tumor induzido por *Agrobacterium tumefaciens*. Segundo, Figueredo et al. (2014), investigaram atividade citotóxica e antitumoral de extrato de flores de *P. venusta* contra células de melanoma murino através de indução de apoptose.

Foi verificado por Roy et al. (2011) e Mostafa et al. (2013), que *Pyrostegia venusta* apresentam compostos com potencial de uso na medicina popular e na descoberta de novos produtos com potenciais farmacológicos.

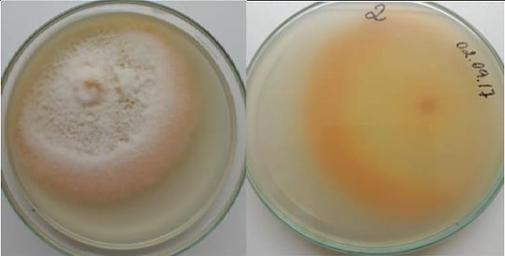
Foram catalogadas e preservadas 60 linhagens de fungos endofíticos de *Pyrostegia Venusta* que estão armazenados na coleção de fungos do LAMABI - ICS UFBA.

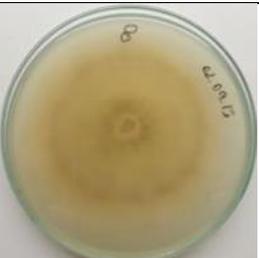
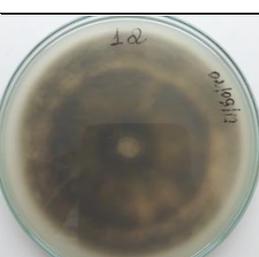
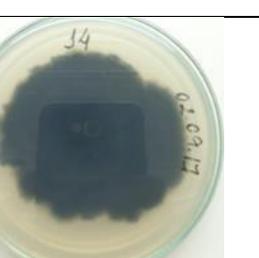
Estes recursos naturais são de grande importância para o conhecimento e a conservação da biodiversidade microbiana de floresta tropical, bem como uma fonte de produtos naturais que podem ser utilizados em pesquisas futuras.

7.1.3. Identificação dos fungos filamentosos endofíticos

As colônias dos fungos endofíticos foram agrupadas de acordo com as características morfológicas: cor da colônia (frente e anverso), textura da superfície (frente e anverso) e aspecto da borda (Figura 10)

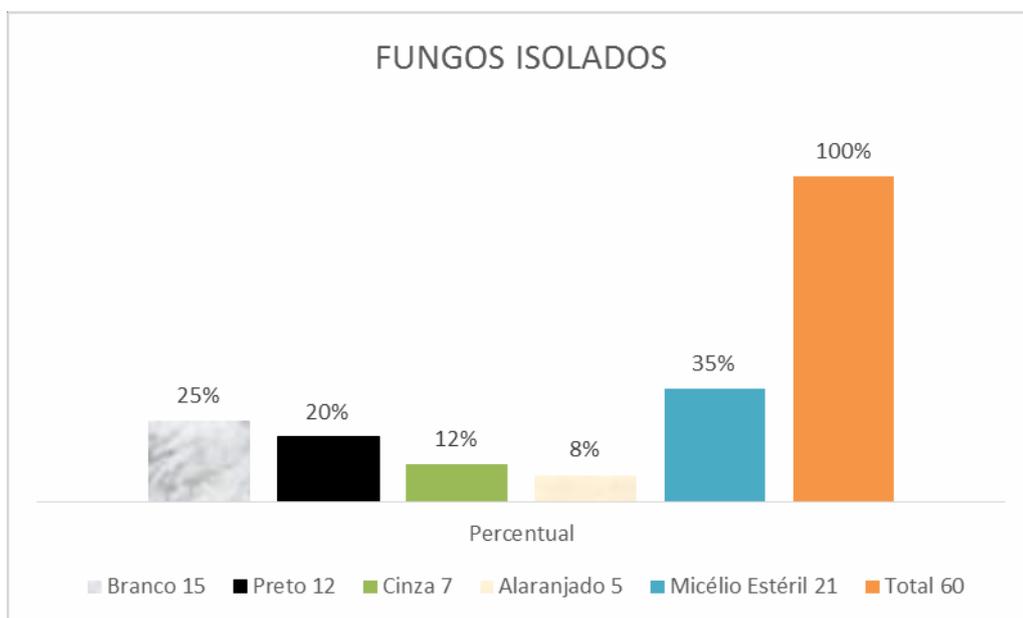
Figura 10. Características Morfológicas

MORFOTIPO	Caracterização macromorfológica	Frente/ Anverso
	Cor da frente/Cor do anverso /Aspecto da borda /outras informações relevantes	
PV2	Alaranjado com branco/alaranjada/ borda inteira/ textura aveludada	
PV 3	Cinza escuro/cinza/lisa/filamentoso/textura camurça	
PV 4	Branca/ bege clara/micélio rasteira/Textura aveludada	
PV 5	Branca/Branca/franjada/Textura Aveludada/ Produz exudato	

PV 6			
	Branca/Branca/bordas lisas/Textura camurça		
PV 7			
	Branca/Branca/borda franjada/Textura Aveludada		
PV08			
	Branca/Bege/borda lisa/Textura camurça		
PV 11			
	Cinza escuro/cinza/borda franjada/textura Aveludada		
PV 12			
	Branca/ bege clara/micélio rasteira/Textura aveludada		
PV 14			
	Preto/preto/borda lisa/ Textura Aveludada		

Fonte: Próprio autor.

Pela análise da Figura 11, é possível observar que os fungos brancos e pretos representaram 45% do total de isolados, sendo que os fungos brancos representaram 25% (15 isolados); enquanto os fungos pretos foram 20% (12); seguidos pelos endófitos cinzas - 12% (7); alaranjados, que somaram 8% (5 isolados) e 35% (21 isolados) Micélio Estéril.

Figura 11. Distribuição dos isolados fúngicos pela tonalidade das colônias

Fonte: Próprio autor.

Em alguns isolados não foi possível a identificação e em outros não se observou a presença de estruturas reprodutivas. Segundo Azevedo e colaboradores (2002), vários fungos filamentosos endofíticos não possuem estruturas reprodutivas quando cultivados em meio de cultura, o que torna a sua identificação morfológica bastante difícil.

7.1.4. Identificação Molecular dos Fungos

Os fungos endofíticos isolados de *Pyrostegia Venusta* para identificação por meio de técnicas da biologia molecular foram os catalogados como: PV02, PV03, PV04, PV05, PV06, PV07, PV11, PV14. A concentração do DNA extraído foi medida utilizando a quantificação do equipamento NANODROP (Tabela 3). Os resultados da quantificação foram os seguintes:

Tabela 3: Quantificação de DNA.

AMOSTRA	QUANTIFICAÇÃO de DNA
PV02	76,05 ng/μL
PV03	50,0 ng/μL
PV04	30,0 ng/μL
PV05	39,20 ng/μL
PV06	164,5 ng/μL
PV07	116,03 ng/μL
PV11	55,45 ng/μL

Fonte: Próprio autor.

Os fungos endofíticos selecionadas foram identificados em nível de gênero como: *Colletotrichum* sp.; (isolados **PV02**, **PV04**, **PV07**); o isolado **PV06** foi identificado em nível de espécie: *Colletotrichum boninense* e os isolados **PV03** e **PV11** foi identificado pelo gênero *Phyllosticta* sp. O isolado **PV05** identificado como da espécie *Aspergillus fumigatus*. O isolado **PV14** foi também identificado em nível de espécie como *Colletotrichum karstii* (Tabela 4).

Tabela 4. Fungos identificados pela região ITS.

Fungo isolado	Blast-n top hit (%ID/ E-value/ query cover)	Gene ITS
Isolado #PV 02	91% / 0.0 / 80%	<i>Colletotrichum</i> sp.
Isolado # PV 03	92% /0.0/ 95%	<i>Phyllosticta</i> sp.
Isolado # PV 04	94% /0.0/ 88%	<i>Colletotrichum</i> sp
Isolado # PV 05	93% /0.0/ 93%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Isolado # PV 06	99% /0.0/ 49%	<i>Colletotrichum boninense</i>
Isolado # PV 07	87% /0.0/ 92%	<i>Colletotrichum</i> sp.
Isolado # PV 11	92% /0.0/ 93%	<i>Phyllosticta</i> sp.
Isolado # PV 14	94% /4-140/ 94%	<i>Colletotrichum karstii</i>

Fonte: Próprio autor

Espécies do gênero *Colletotrichum* foram encontradas como habitantes assintomáticos (endófitos) de tecidos de plantas, como isoladas de folhas e pseudocaulis saudáveis de banana, gengibre, gengibre selvagem, e diferentes árvores (HYDE et al., 2009; ARNOLD et al., 2003; LUZ et al., 2006; SIQUEIRA et al., 2011; HUANG et al., 2008). Estudos conduzidos por Rodriguez e colaboradores (2009) mostram que os fungos do gênero *Colletotrichum* podem estar associados com plantas atuando como mutualistas assim como parasitas, dependendo do genótipo do hospedeiro.

De forma similar, fungos do gênero *Phyllosticta* sp. podem apresentar comportamento saprofítico, endofítico e/ou patogênico dependendo do hospedeiro e das condições ambientais as quais os mesmos encontram-se submetidos (WIKKEE et al., 2013).

A espécie *Aspergillus fumigatus* é um fungo patogênico frequentemente encontrado em ambiente hospitalar e compõe um grupo das principais espécies de microrganismos produtores de enzimas de interesse alimentício, como (pectinases), na fabricação de xaropes (amilases) (PEPPLER & REED, 1987) e na produção do ácido cítrico (AZEVEDO, 1997), além de ser um antimicrobiano contra *Mycobacterium tuberculosis* (SILVA et al., 2018).

Isolados de *Colletotrichum boninense* foram identificados como um dos agentes responsáveis de antracnose em abacate, limão, tomate, manga (MARTINEZ et al., 2009). Moriwaki e colaboradores (2003) descreveram que *C. boninense* representa um complexo de espécies. Damm e colaboradores (2012) relataram que foi isolado *C. boninense* como endofítico a partir das folhas da *Maytenus ilicifolia*.

Radiastuti e colaboradores (2017) isolaram da *Cinchona calisaya*, planta medicinal utilizada no tratamento da malária, várias espécies de *Colletotrichum*, inclusive *Colletotrichum karstii*, sendo este identificado como potencial produtor do alcalóide quinina.

Estudos utilizando abordagem metagenômica são necessários para analisar de forma mais ampla a diversidade de fungos endofíticos na *Pyrostegia venusta*, a respeito da presença de fungos específicos, devido a baixa taxa de diversidade microbiana encontrada.

7.2. Avaliação da atividade antimicrobiana

7.2.1. Difusão em disco

A **Tabela 5** mostra os resultados globais das propriedades antibacterianas e antifúngicas dos extratos do caldo dos fungos endofíticos. Através destes testes, pôde-se observar que apenas dois extratos dos fungos foram sensíveis contra *S. aureus* (*Phylosticta sp.* e *Colletotrichum sp.*), os halos de inibição foram < 10mm; um extrato apresentou atividade frente à *C. albicans* (Extrato: *EX Aspergillus fumigatus*), com halo de inibição < 15mm; cinco extratos apresentaram ação contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* cepa T01 (Extratos: *EX Colletotrichum sp.*, *EX Phylosticta sp.*, *EX Colletotrichum sp.*, *EX Colletotrichum boninense* e *EX Phylosticta sp.*), halo de inibição ≤ 15mm; e seis extratos foram ativos contra a *C. pseudotuberculosis* cepa VD57 (Extratos: *EX Colletotrichum sp.*, *EX Phylosticta sp.*, *EX Colletotrichum sp.*, *EX Aspergillus fumigatus*, *EX Colletotrichum boninense* e *EX Phylosticta sp.*). Nenhum extrato dos fungos endofíticos em estudo apresentaram ação inibitória frente as bactérias gram- negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Estes resultados corroboram com os dados encontrados na literatura, os quais demonstram que as bactérias Gram negativas são mais resistentes à ação de produtos naturais, como extratos, pois a membrana externa presente nessas bactérias forma um envelope complexo, protegendo-as contra a ação desses agentes antimicrobianos (OLADIMEJI et al., 2004; HOLLEY et al., 2005; VERAS, 2011, MOSTAFA et al., 2013).

Tabela 5. Resultados da ação antimicrobiana dos extratos do caldo dos fungos endofíticos obtidos por acetato de etila.

Extrato Caldo	Microrganismo					
	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Cp. T01	Cp. VD57
EXColletotrim	-	-	-	-	++++	+++
EXPhylosticta	-	++	-	-	++++	++++
EXColletotrim	-	++	-	-	++++	++++
EXA, <i>fumigatus</i>	+++	-	-	-	-	++++
EXC. <i>boninense</i>	-	-	-	-	+++	+++
EXColletotrim	-	-	-	-	-	-
EXPhylosticta	-	-	-	-	++++	++++

Fonte: próprio autor.

Legenda: (-) não houve inibição; (+) halo de inibição < 8mm; (++) halo de inibição < 10mm; (+++) halo e inibição <15mm; (++++) halo de inibição > 15mm

Os metabólitos produzidos pelos endófitos estão sendo reconhecidos como um arsenal versátil de agentes antimicrobianos, e alguns endófitos possuem capacidades biossintéticas superiores, devido à sua presumível recombinação de genes com o hospedeiro, enquanto residem e se reproduzem dentro dos tecidos vegetais saudáveis (LI et al., 2005; KASARI et al., 2012).

Dentre os fungos endofíticos estudados, os isolados de *Pyrostegia venusta* demonstraram possuir uma potencial ação na produção de moléculas protótipos para fármacos de origem antimicrobiana frente às bactérias Gram positivas. Há que se citar a importância na elucidação da estrutura do bioativo para a compreensão do mecanismo da atividade antimicrobiana aqui demonstrada.

7.2.2. Concentração Inibitória Mínima

Dando Continuidade as técnicas de antibiose, foi realizada a técnica da Concentração Inibitória Mínima (MIC), utilizando-se apenas os extratos mais ativos, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 90028 e *Corynebacterium pseudotuberculosis* cepa T01 e VD57.

Um dos extratos de isolados de *Phylosticta* sp (EX11) foi capaz de inibir *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). O extrato EX05 do isolado *Aspergillus fumigatus* e o EX11 de *Phylosticta* (EX11) inibiram apenas a levedura *Candida albicans* (ATCC 90028). Os extratos EX2 do isolado *Colletotrichum* sp., e EX3 e EX11 de *Phyllosticta* sp., também apresentaram efeito antimicrobiano sobre *Corynebacterium pseudotuberculosis* cepa T01. Os extratos dos isolados *Colletotrichum* sp. (EX4), *Colletotrichum boninense* (EX6) e *Colletotrichum* sp

.(EX07), também apresentaram efeito antimicrobiano sobre *Corynebacterium pseudotuberculosis* cepa VD57.

O isolado *Phylosticta* sp (EX11) inibiu 60% dos microrganismos-testes, inclusive *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), que não foi inibida no ensaio em meio sólido por nenhum dos extratos dos isolados estudados. Isso pode ter ocorrido devido ao extrato não difundir bem no meio sólido, o que não acontece em testes realizados em meio líquido, possibilitando a ação desses extratos dos isolados contra os microrganismos testados (RIOS et al., 1988).

Após o tempo de incubação as amostras que apresentaram atividade antimicrobiana foram caracterizadas como microbicidas ou microbiostáticas. Para essa avaliação foi utilizado 10 µL do poço no qual foi obtido o MIC. Esse volume foi semeado numa placa com ágar apropriado em condições adequadas de temperatura e tempo. Após o cultivo, pode ser considerado que a ação microbiostática da amostra é indicada através do crescimento do microrganismo e a ação microbicida através do não crescimento.

A atividade antimicrobiana realizada através da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) pelo método de microdiluição mostrou que os extratos do sobrenadante metabólico apresentaram atividade inibitória nas mesmas concentrações frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Nos experimentos realizados por Marson Ascêncio et al., (2014), foi evidenciado que as frações metanólica da *Costus spiralis*, apresentaram atividade inibitória contra as leveduras do gênero *Candida*, bem como contra bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Enterococcus*.

Orlandelli et al. (2012), testaram extratos de endófitos da *Piper hispidum* Sw. (falso-jaborandi) extraídos com acetato de etila apresentaram maior efeito antimicrobiano contra *S. aureus*.

No trabalho com metabólitos de fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Sapindus saponaria* L. apresentaram atividade antimicrobiana quando obtidos em acetato de etila, contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus*, Garcia et al. (2012)

SPECIAN et al., 2012, enfatizam a importância das pesquisas dos compostos produzidos pelo metabolismo secundário de fungos endofíticos com antimicrobiano de interesse biotecnológico como novas fontes de produtos, no intuito de facilitar a identificação e caracterização destes compostos.

7.2.3.. Avaliação das zonas de confronto: co-cultura

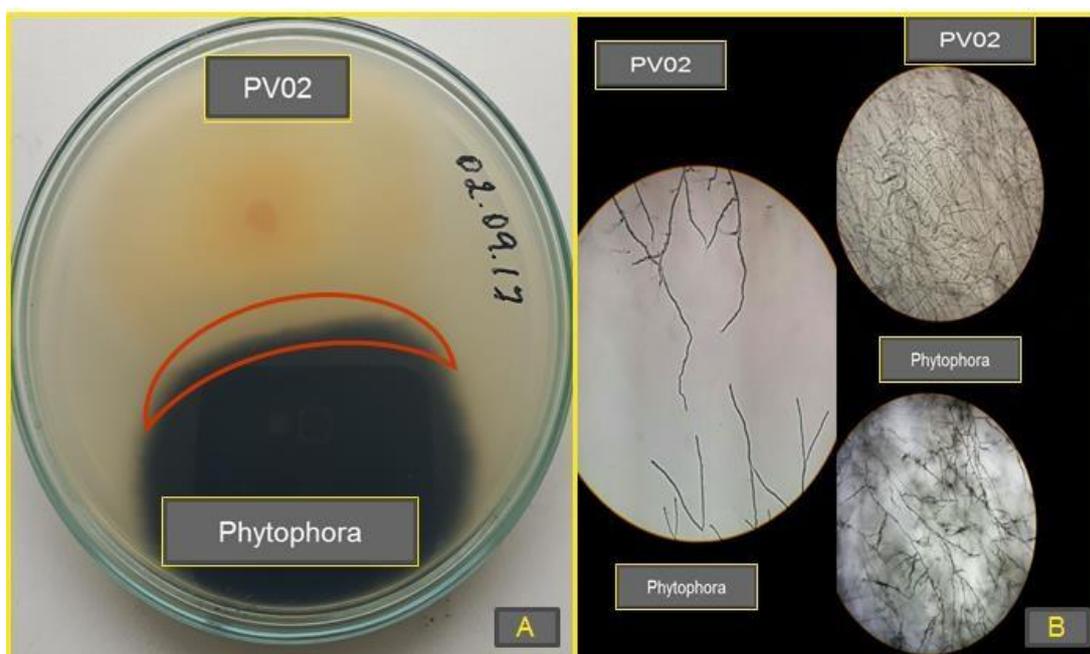
A produção de metabólitos pela interação entre micro-organismos, co-cultura

ou cultura pareada surgiu como uma interessante estratégia para induzir a resposta química de micro-organismos interagindo em um mesmo ambiente (LI et al., 1998).

A co-cultura é o processo onde se inocula diferentes microrganismos no mesmo meio de cultura induzindo a competição, simulando condições naturais como acontece no interior da planta, resultando na produção de compostos bioativos (CUETO et al., 2001; PETTIT et al., 2009; ALY et al., 2011;).

A **Figura 13** apresenta a atividade inibitória dos fungos endofíticos isolados da planta Cipó de São João frente a fungos patogênicos. Pela análise da figura é possível observar que o isolado 2 (*Colletotrichum* sp.) apresentou atividade antimicrobiana frente aos fungos patogênicos: *Fusarium* sp e *Phytophthora* sp. A interação entre o endófito e os fitopatógenos foi do tipo inibição a distância (BERTRAND et al., 2014).

Figura 13. Avaliação de ação inibitória dos fungos endofíticos.



Fonte: Próprio autor.

Segundo BERTRAND e colaboradores (2014) as co-culturas simulam as condições fisiológicas que ocorrem durante as interações dos fungos em seu ambiente natural e podem ter um enorme potencial para a descoberta de novas moléculas com aplicações industriais. Nas comunidades os microrganismos interagem através de moléculas de sinalização ou defesa, produzindo compostos que despertam interesse para descoberta de novas drogas.

7.2.4. Cromatografia em Camada Delgada e Bioautografia

Como os extratos fungicos possuem moléculas polares e apolares, a fase móvel indicada deve possuir polaridade intermediária para conseguir separar os compostos de maneira mais eficiente (WAKSMUNDZKA-HAJNOS et al., 2008).

A técnica CCD tem vantagens, como a otimização de outras análises cromatográficas, baixo custo e o fato de poder utilizar diferentes procedimentos na detecção de diferentes classes de compostos. A caracterização dos compostos é normalmente feita através da luz ultravioleta e também por meio de reveladores (WAKSMUNDZKA-HAJNOS et al., 2008)

Tabela 6: Proporção de solventes

	Extratos	Solventes	Proporção de mistura % volume	RESULTADO
1	EX2; EX3; EX4 EX5; EX6; EX11	Clorofórmio	100	Não separou
2	EX2; EX3; EX4 EX5; EX6; EX11	Metanol	100	Não separou
3	EX2; EX3; EX4 EX5; EX6; EX11	Clorofórmio / metanol	95:5	Separação parcial
4	EX2; EX3; EX4 EX5; EX6; EX11	Hexano	100	Não separou
5	EX2; EX3; EX4 EX5; EX6; EX11	Acetato de etila	100	Não separou
6	EX2; EX3; EX4 EX5; EX6; EX11	Hexano/ acetato de étila	5:95	Separação parcial
7	EX2; EX3; EX4 EX5; EX6; EX11	Acetato/ metanol/água	95:4:1	Separou total

Fonte: Próprio autor.

Figura14. Representação da eluição dos solventes e bioautografia.



Fonte: Próprio autor. **Onde:** **A** - Representa o solvente com pouca eluição; **B** - Representa a mistura de dois solventes com eluição moderada; **C** - Representa a mistura de dois solventes e água com eluição completa; **D** - Bioautografia com alo de inibição para *C. pseudotuberculosis*.

Ao observar um cromatograma, os spots significam grupos de compostos separados principalmente por diferenças de polaridade. Quanto mais próximo da

origem, mais polar é o do grupo destas substâncias, quanto mais próximo do ponto final da corrida do solvente, mais apolar são seus compostos (Burkhead, et al. 1995).

Hughes et al. (2013) com o objetivo de investigar o potencial antifúngico de 30 extratos brutos de diclorometano (DCM) de *Opuntia humifusa* e 80 DCM de fungos endofíticos isolados de *O. humifusa* contra os fitopatógenos *Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae* e *C. gloeosporioides* a uma concentração de 160 µg.mL⁻¹ por ensaio de bioautografia, verificaram que um total de 6 extratos (7,5 %) de fungos endofíticos mostraram propriedades antifúngicas com zonas de inibição variando de 5 a 16 mm, e nenhuma atividade antifúngica foi observada nos extratos brutos das plantas.

Dewanjee, (2015) evidencia a importância quando uma atividade foi localizada na placa de CCD, a amostra pode ser analisada por cromatografia líquida - espectrometria de massa para estabelecer se já é conhecidos ou novos compostos e/ou classes de substância estão envolvidos. Esta estratégia de triagem diz respeito à detecção rápida de compostos antibacterianos e antifúngicos.

Embora tenha se evidenciado zonas de inibição nas bioautografias, não foi possível prosseguir com o estudo e fazer a raspagem das zonas de inibição, ou seja, fazer o isolamento de tais substâncias, devido ao término do doutorado. Assim, trabalhos futuros devem ser realizados para tentar chegar à identificação das respectivas substâncias, e comparar os dados dos espectros de massas juntamente com os descritos na literatura.

Estes resultados são importante, pois corrobora com a possibilidade de obtenção de novas substâncias, o que justificaria a atividade antibacteriana destas frações.(FIGURA14)

7.2.5. Caracterização dos compostos extraídos dos fungos endofíticos

O HPLC detectou que as amostras são constituídas por misturas complexas, com pelo menos seis constituintes diferentes para cada um deles, apresentando alguns picos de maior intensidade e substâncias majoritárias. Moreira et al. (2012) avaliando extratos de folhas e flores de *Pyrostegia venusta* a esta modalidade cromatográfica detectou a presença de alantoína, substância utilizada em pomadas, como cicatrizante.

DiSalvo(2002) descreve que a alantoína, é um composto químico de fórmula C₄H₆N₄O₃, sendo uma das formas de excreção de nitrogênio nos mamíferos (exceto humanos e alguns outros primatas) resultante da degradação do ácido úrico. Esta molécula é também encontrada em plantas como o confrei. A alantoína é usada na cosmetologia por suas propriedades hidratantes, queratolíticas, suavizadoras,

curativas e de proteção contra agentes irritantes.

Os espectros de RMN foram compilados em uma tabela que se encontra em anexo. As análises de ^1H NMR, HSQC e HMBC foram realizadas usando o software ACDLabs. Os espectros de F2.1 (caldo) e F2.2 (micélio) mostraram sinais de maior intensidade, característicos de terpenos, na região dos olefínicos, apresentando um dublete em 5:11 (F2) e um multipletto em 5:36 (F2), sugerindo que são compostos da mesma classe. Vários espectros: F6, F7, F11 (micélio) e F14 (caldo) apresentam sinais característicos da presença de metoxila (OCH_3) em torno de 3,90 a 3,60 ppm.

Os sinais dos espectros de RMN de H' entre 6,5 e 7,9 ppm são característicos de compostos aromáticos. Eles estão em destaque nos extratos: F4, F6, F7, F11 (caldo); F7 (micélio) e F14. Entre eles observou-se a presença de singletos entre 6,2 e 6,8 ppm e dubletos entre 7,29 e 7,90 ppm, sugestivos da presença de flavonóides. As classes dos compostos naturais apresentam um perfil de deslocamentos químicos. A presença de elementos eletronegativos causa um efeito protetor deslocando os sinais para os campos mais altos da absorção. Em todos os espectros são observados sinais de lipídio em 1,27. Sinais de RMN de H' em torno de 4,0 a 5,0 ppm podem indicar a presença de hidrogênio em anel aromático e de açúcares que são reforçados pela presença de multipletos entre 3,0 e 4,0 ppm, como podem ser observados em alguns espectros (F2, F6, F7, F11 e F14).

A presença de sinais nos espectros de RMN de H' é indicativa da presença de cadeia lipídica e de moléculas de açúcar, podendo estas fazer parte da cadeia lateral de terpenos e flavonoides, ou de outros aromáticos, justificando os sinais observados no espectro de massa, na faixa de 900 Daltons. Observam-se ainda nos espectros de massa, a presença de mais de um sinal com intensidade elevada, confirmado a natureza complexa das amostras.

Dentre as amostras analisadas, os extratos F6, F11 (caldo) e F14 se destacam pela multiplicidade de sinais na região dos aromáticos e pela presença de sinais de hidrogênio olefínicos.

Os espectros do infravermelho também apresentam sinais sugestivos de hidroxilas, formando pontes de hidrogênio, da presença de compostos aromáticos, alongamentos C-H de cadeias alifáticas e deformações C-H ($914\text{-}850\text{-}771\text{cm}^{-1}$) de carboidratos. Sugerindo, portanto, a presença de terpenos, compostos aromáticos, carboidratos e lipídeos.

Importante estudo de extratos das folhas e flores e raízes de *Pyrostegia venusta* combinando estas metodologias de fracionamento e identificação foi realizado por Souza Filho (2010). Segundo este autor, da fração etanólica das flores foram isolados os compostos fenólicos verbascosídeo, rutina, isoquercetrina e

nicotiflorina e heterocíclico, a alantoína. Da fração metanólica das folhas foram isolados os compostos rutina e alantoína. Da fração metanólica das raízes foram isolados e caracterizados o verbascosídeo e a alantoína. Ainda este autor, por análise através da cromatografia gasosa – espectrometria de massa das frações acetato de etila de flores, folhas e raízes, identificou cinco fitoesteróis (β -sitosterol, estigmasterol, estigmastanol, campesterol e colesterol), 16 ácidos graxos saturados e monoinsaturados e o fitol.

Os resultados de fracionamento e identificação molecular dos compostos extraídos de fungos endofíticos encontrados do presente trabalho se encontram em anexo. Foram acima preliminarmente apresentados e será objeto de análise detalhada.

7.2.6. Biossíntese de nanopartículas de prata por fungos endofíticos

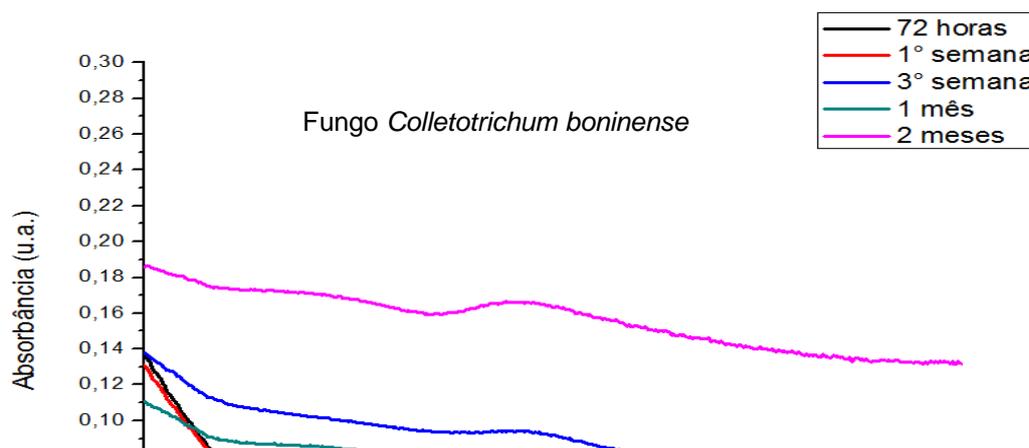
Ensaio preliminares mostram a formação de nanopartículas de pratas (NPsAg) obtidas através da adição do precursor nitrato de prata (AgNO_3) em alguns meios de cultura com diferentes fungos: *Colletotrichum sp*; *Phyllosticta sp*; *Colletotrichum sp*; *Aspergillus fumigatus*, *Colletotrichum boninense*; *Colletotrichum sp*. *Phyllosticta sp*; *Colletotrichum karstii*.

Inicialmente foi verificada a formação de NPsAg através da mudança de coloração do meio de incolor para castanho. Para verificar a presença de NPsAg foi realizado medidas de absorção eletrônica na região do UV-Visível.

A Figura 15 mostra os espectros obtidos após 72 horas (linha preta), 1 (linha vermelha), 3 (linha azul), e 4 semanas (linha verde).

A interface entre sistemas endofíticos e nanomateriais é uma área relativamente nova e inexplorada e pode abrir caminhos para novas aplicações futuras.

Figura 17. Análise da formação de nanopartículas em associação com o fungo.



Fonte: próprio autor.

Pela análise dos gráficos é possível observar que o fungo testado mostrou colorações de amarelo a castanho, indicando a mudança das propriedades ópticas do meio. Através dos espectros é possível observar que nessas amostras há completa formação de NPs_{Ag} após a terceira semana da adição de AgNO₃ (linha azul). Estas observações indicam que o agente redutor das NPs, agiu com mais eficiência após a terceira semana. Essa observação é evidenciada através do aumento da intensidade nos espectros de absorção. Esse aumento é observado na região de comprimento de onda de aproximadamente 400-600nm, evidenciando o efeito de ressonância plasmônica desses nanomateriais. Dentre os fungos selecionados, verificou-se que o fungo *Colletotrichum boninense* (Fig. 17) apresentou uma curva de absorção mais evidente. Essa absorção caracteriza a formação de NPs de prata.

Esse resultado demonstra que o fungo adsorve os íons de prata na sua parede celular e permite a formação de NPs_{Ag} na sua superfície, podendo assim ser utilizados como moldes para crescimento de material nanoparticulado. Assim como, permite a formação de nanopartículas de prata em solução, conforme apresenta a Figura 17. Essas nanopartículas de prata em solução podem ser utilizadas como agentes antibacterianos e antiparasitários, no tratamento da água, dentre outros (FANTI et al., 2017; MOUSTAFA, 2017; SARAVANAN et al., 2018).

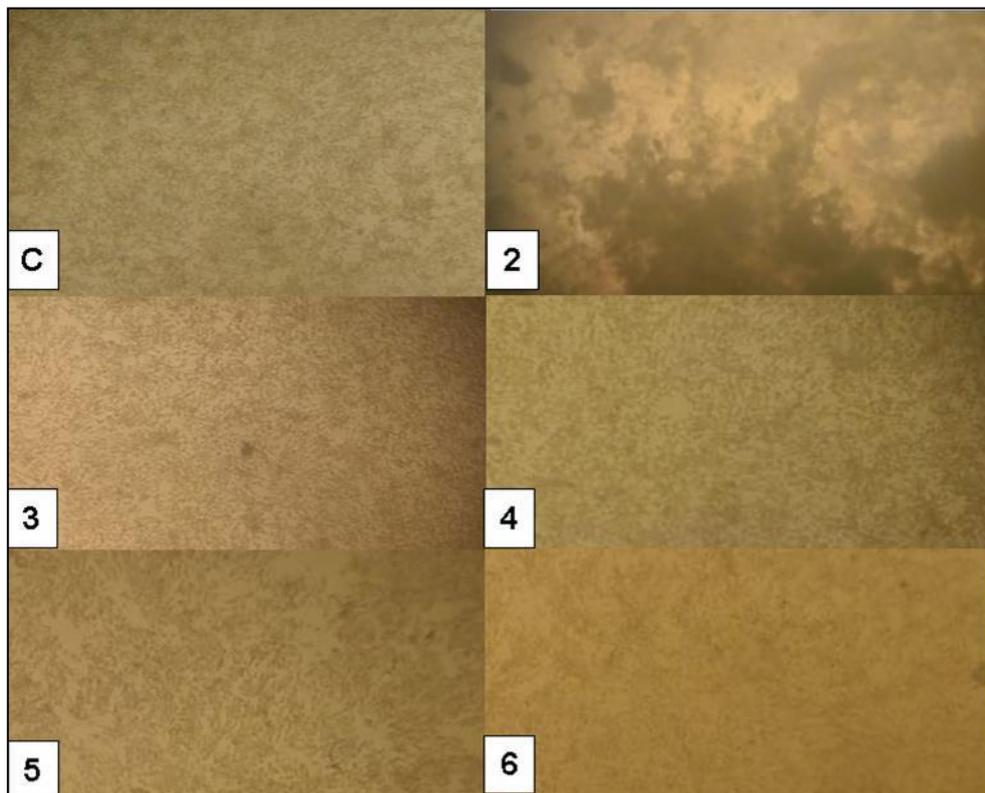
7.2.7. Teste de citotoxicidade

Para análise de citotoxicidade dos extratos, foi realizada um gradiente de concentração, variando de 0 μ L (controle) a 1 μ L dos extratos dos fungos endofíticos. O resultado do teste de citotoxicidade é apresentado na Figura 16.

Pela análise da figura é possível observar que nos extratos dos fungos *Colletotrichum sp*, *Phyllosticta sp* e *Aspergillus fumigatos*, ocorreu morte celular total após 24 horas de incubação, na concentração de 0,2 μ L do extrato bruto. Já nos extratos *Colletotrichum sp* e *Colletotrichum boninense*, após cinco dias de incubação, ainda havia células viáveis, na concentração de 0,2 μ L.

A morte apoptótica é caracterizada por mudanças geradas por caspases na membrana plasmática, no citoesqueleto, no DNA nuclear e nas mitocôndrias (DEVLIN, 2011; DANELUZZI et al., 2014). Estudos complementares deverão ser feitos para a determinação de compostos citotóxicos nos extratos.

Figura 18. Avaliação do teste de citotoxicidade dos fungos endofíticos.



Fonte: Próprio autor.

Onde: C - Controle; 2 - extrato *Colletotrichum sp*; 3 - extrato *Phyllosticta sp*; 4 - Extrato *Colletotrichum sp*; 5 - Extrato *Aspergillus fumigatus*; 6- extrato *Colletotrichum boninense*.

Alvin et al.(2014) sinalizaram que as moléculas produzidas por endófitos são menos propensas a serem tóxicas para os eucariontes, pois não causam danos a seu hospedeiro, fato este que evidencia com o resultado que foi encontrado no presente estudo. É importante destacar que o extrato fúngico de *Pyrostegia venusta* se mostrou um importante agente antimicrobiano, não apresentou toxicidade, resultado relevante quando se considera uma possível utilização terapêutica.

8.0 CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi relatado pela primeira vez os fungos endofítico da planta *Pyrostegia venusta*, popularmente conhecida como Cipó de São João. Foram isolados 60 fungos endofíticos, destes, oito apresentaram potencial na produção de biocompostos com atividade antimicrobiana e enzimática, sendo identificados em nível molecular como: *Colletotrichum* sp. (4); *Colletotrichum boninense* (1), *Phylosticta* sp (2); e *Aspergillus fumigatus*. (1).

A diversidade dos gêneros endófitos isolados não foi alta, indicando possível predominante na espécie vegetal avaliada.

Alguns dos endófitos possuem capacidades biossintéticas superiores, devido à sua presumível recombinação de genes com o hospedeiro, enquanto residem e se reproduzem dentro dos tecidos vegetais saudáveis.

Dentre os metabólitos, foram detectadas várias substâncias, destacando-se grupos de flavonoides e terpenos (indicativo de provável agente antimicrobiano).

Os resultados referentes à potencialidade desses fungos quanto à formação de nanopartículas demonstram que eles adsorvem íons de prata nas suas paredes celulares, o que permite a formação de NPsAg nas suas superfícies, podendo assim ser utilizados como moldes para crescimento de material nanoparticulado.

O composto puro dos extratos *Colletotrichum* sp e *Colletotrichum boninense* não demonstraram citotoxicidade contra células *Vero*, porém, mais investigações são necessárias para verificar o mecanismo de ação deste composto.

9.0.PERSPECTIVAS FUTURAS

Para a elucidação a respeito da comunidade de endófitos nesta planta, estudos utilizando abordagem molecular (como pirosequenciamento) são necessários. De fato, notou-se que apenas poucas espécies de cepas fúngicas foram isoladas das plantas, assim, ou de fato há espécies predominantes nela ou outras espécies podem estar presentes, mas não foram cultivadas *in vitro*.

Os estudos de espectroscopia estão em andamento para a elucidação das moléculas presentes nas frações que apresentaram atividades antimicrobiana, antifúngica e enzimática.

Os bioensaios de nanoencapsulação estão sendo conduzidos variando-se os protocolos para a obtenção de um melhor rendimento na atividade.

O Brasil é reconhecido mundialmente por ter uma biodiversidade singular, sendo esta potencial fonte de moléculas bioativas novas, e ainda assim, ocupa a 25ª posição no *ranking* de pedidos de patentes mundial (INPI, 2018). Para reverter essa situação é necessário investimento tecnológico, fortalecimento e inovação da indústria nacional e proteção dos recursos naturais brasileiros. Uma ferramenta que pode ajudar nesse processo é a prospecção tecnológica e a proteção das inovações através dos depósitos de patentes.

Durante este trabalho, uma patente foi depositada e um artigo foi submetido. Espera-se a elucidação química das moléculas para a redação de outras, assim como o emprego de novas substâncias microbianas na indústria.

10.0 REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4 ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L. Zootherapeutic practices among fishing communities in North and Northeast Brazil: A comparison. **Journal of Ethnopharmacology**, Cagliari. v. 111, p. 82-103, 2007.
- ALVIN, A.; MILLER, K.I.; NEILAN, B.A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiological Research**. v. 169, n. 7–8, p. 483-495. 2014
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2010.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1829-1845, 2011.
- AQUINO NETO, F.R.; NUNES, D.S.E.S. Cromatografia - princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: **Interciência**, 2003. 188p.
- ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K.; LAÇAVA, P.T. Manual: Isolamento de microrganismos endofíticos. **Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP**, Piracicaba, SP, 86 p., 2002.
- ARNOLD, A.E., MEJIA, L.C., KYLLO, D., ROJAS, E.I., MAYNARD, Z., ROBBINS, N., HERRE, E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 100:15649-15654.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHEORI, W. J.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biociência: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.
- AZEVEDO, J.L. Fungos – Genética e Melhoramento de Fungos na Biotecnologia. **Biociência, Ciência; Desenvolvimento**, v.1, p.12-15, 1997.
- BACKMAN, P. A.; SIKORA, R. A.; Endophytes: an emerging tool for biological control. **Biological Control**, v. 46, p. 1-3, 2008.
- BAKER, H. G. The evolution of weeds. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v. 5, p.1-24, 1974.
- BAKER, H. G. Self-compatibility and establishment after “long-distance” dispersal. **Evolution**, v. 9, p. 347-348, 1955.

BANHOS, E. F. D.; SOUZA, A. Q. L. D.; ANDRADE, J. C. D.; SOUZA, A. D. L. D.;
KOOLEN, H. H. F.; Albuquerque, P. M. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at

the Brazilian Amazon: distribution and bioactivity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 153- 162, 2014

BARBOSA, W. L. R. et al. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Revista científica da UFPA**, v. 4, n. 5, p. 1-19, 2004.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B. B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4 ed. Minnesota: **American Phytopathological Society Press**, 1998.

BEN SHEN. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **Cell**, v. 163, p. 1297-1300, 2015

BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S.; SCHUMPP, O.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J. L. Metabolite induction by microorganism co-culture - methods to tackle new chemical diversity for the discovery of pharmaceutically relevant metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1180-1204, 2014.

BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications **Biotechnol. Adv.**, v.15, n. 3–4, p. 583-620, 1997.

BHAVSAR, C.A.; BHALERAO, T.S. Cellulase Production by *A. niger* on Banana Pseudostem Waste. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 6, n.1, p. 2012.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American journal of botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

BOBOYE, B.E.; AJAYI, G.O. Biodegradation of Selected Nigerian Fruit Peels by the use of a Non-pathogenic Rhizobium species CWP G34B. **The Open Microbiology Journal**, v. 6, p. 88-96, 2011.

BRUNDRETT, M. Diversity and classification of mycorrhizal associations. **Biol. Rev.**, v. 79, p. 473-495, 2004.

BURKHEAD KD, SCHISLER DA, SLININGER PJ (1995) Bioautography shows antibiotic production by soil bacterial isolates antagonistic to fungal dry rot of potatoes. **Soil Biol Biochem** 27:1611– 1616

CHELLAPANDI, P.; JANI, H.M. (2008). Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. **Braz. J. Microbiol.** 39, 122-127

CORBELLINI et al. Aborto por *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* em bovinos no sul do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** [online]. 2003, vol.23, n.2, pp.82-86

CUETO, M.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C.; FENICAL, W.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1444-1446, 2001.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S.; TAN, Y. P.; SHIVAS, R. G.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 1-36, 2012.

DANELUZZI Avaliação dos potenciais fitotóxico e citotóxico de *Pyrostegia venusta* (ker gawl.) Miers (bignoniaceae). *Bioscience Journal*, v. 30, n. 4, 2014.

DEVLIN, T.M. Manual de bioquímica com correlações clínicas. São Paulo: **Blücher**, 2007. p.993-5.

DEWANJEE, S. et al. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 5, n. 2, p. 75-84, 2015.

DiSalvo, R.M.; Allantoin. in: *Chemistry and Manufacture of Cosmetics*; Allured (Edt), 2002, vol 3, p.29.

EBERSBERGER, I.; MATOS SIMOES, R.; KUPCZOK, A.; GUBE, M.; KOTHE, E.; VOIGT, K.; VON HAESELER, A. A consistent phylogenetic backbone for the fungi. *Molecular biology and evolution*, v. 29, n. 5, p. 1319-1334, 2012.

ELOFF, J. N. On expressing the antibacterial activity of plant extracts-a small first step in applying scientific knowledge to rural primary health care. *South African Journal of Science*, v. 96, n. 3, 2000.

ENARI, T. M. Microbial lipases. *Microbial enzymes and biotechnology*. Applied **Science Publishers**, 1983.

ESPOSITO, O. E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2. ed. **Caxias do Sul: Educs**, 2010.

FANTI, J. R.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; CATANEO, A. H. D.; ANDRADE, C. G. T. J.; PANIS, C.; RODRIGUES, J. H. D. S.; WOWK, P. F.; KUCZERA, D.; COSTA, I. N.; NAKAMURA, C. V.; NAKAZATO, G.; DURÁN, N.; PAVANELLI, W. R.; CONCHON-COSTA, I. Biogenic silver nanoparticles inducing *Leishmania amazonensis* promastigote and amastigote death in vitro. *Acta Tropica*, v. 178, p. 46-54, 2017.

FERREIRA, D. T.; ALVARES, P. S. M.; HOUGHTON, P. J.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from roots of *Pyrostegia venusta* and considerations about its medicinal importance. *Quím Nova*, v. 23, p. 42-46, 2000.

FIELD, K. J.; CAMERON, D. D.; LEAKE, J. R.; TILLE, S.; BIDARTONDO, M. I.; BEERLING, D. J. *Contrasting arbuscular mycorrhizal responses of vascular and non-vascular plants to a simulated Palaeozoic CO₂ decline*. *Nat. Commun*, v. 3, n. 835, 2012.

GARCIA, A. et al. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sapindus saponaria* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 22, n. 10, p. 035-040, 2012.

GENTRY, A. H. Coevolutionary patterns in Central American *Bignoniaceae*. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, v. 61, p. 728-759, 1979.

GONGORA-RUBIO, M. R.; SEABRA, A. C. Nanotecnologia: a última fronteira tecnológica. *Revista da FAT*, p. 7-13, 2005.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, v. 22, n. 4, p. 273-292, 2005.

HOLLIDAY, P. **Fungus diseases of tropical crops**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.

- HUANG, W.Y., CAI, Y.Z., HYDE, K.D., CORKE, H., SUN, M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 61-75, 2008.
- HULKOTI, N. I.; TARANATH, T. C. Biosynthesis of nanoparticles using microbes-A review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 474-483, 2014.
- HUMPHREYS, C. P.; FRANKS, P. J.; REES, M.; BIDARTONDO, M. I.; LEAKE, J. R.; BEERLING, D. J. *Mutualistic mycorrhiza-like symbiosis in the most ancient group of land plants*. **Nat Commun**, v. 1, n. 7, 2010.
- HUGHES, A. F. S. et al. Antifungal Activity from Stem Extract and Endophytic Fungi of *Opuntia humifusa* (Raf.) Raf. *Planta Medica*, v. 79, n. 05, p. 26, 2013
- HYDE, K. D. et al. *Colletotrichum*—names in current use. **Fungal Diversity**, v. 39, n. 1, p. 147-182, 2009.
- INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial). INPI lança boletim com ranking de escritórios nacionais de PI. Disponível em: < <http://www.inpi.gov.br/noticias/inpi-lanca-boletim-com-ranking-de-escritorios-nacionais-de-pi> >. Acesso em: 04 de 07 de 2019.
- JAHANGEER, S.; KHAN, S. J. SOHAIL, M. SHAHZAD, S.; AHMAD, A. KHAN, S. Screening and characterization of fungal celulasas isolated from the native environmental source. **Pakistan Journal of Botany, Peshawar**, v. 37, n. 3, p. 739-48, Mar. 2005.
- JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **J MicrobiolBiotechnol Res**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.
- JONES, J. D. G; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, 2006.
- KAVANAGH, K. **Fungi: biology and applications**. County Kildare: Wiley, 2005.
- KEMEN, E.; JONES, J. D.G. Obligate biotroph parasitism: can we link genomes to life-styles? **Trends in Plant Science**, v. 17, p. 448-457, 2012.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. 2008. **Dictionary of the Fungi**, 10th ed. Wallingford, UK: CABI.
- KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite - what decides? **Current opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 358-363, 2006.
- KUMAR, D. S. S.; HYDE, K. D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Divers**, v. 17, p. 69-90, 2004.
- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry e Biology**, v. 19, p. 798-792. 2012.
- LI, Y.; SONG, Y. C.; LIU, J. Y.; MA, Y. M.; TAN, R. X. Anti-helicobacter pylori substances from endophytic fangal cultures. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.21, p.553-558, 2005.

LIANG, XIQUAN, LANSHA PENG, KE LI, Todd Peterson, and Federico Katzen. "A method for multi-site-directed mutagenesis based on homologous recombination." *Analytical biochemistry* 427, no. 1 (2012): 99-101.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras.** Nova Odessa: Plantarum, 1995.

LUZ, J. S., SILVA, R.L.O., SILVEIRA, E.B., CAVALCANTE, U.M.T. 2006. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas do maracujazeiro-amarelo. **Revista caatinga.** 19 (2): 128-134.

MAIA, L. C., CARVALHO JÚNIOR, A. A. D., CAVALCANTI, L. D. H., GUGLIOTTA, A. D. M., DRECHSLER-SANTOS, E. R., SANTIAGO, A. L. D. A., & SOARES, A. M. D. S. (2015). Diversity of Brazilian fungi. **Rodriguésia**, 66(4), 1033-1045.

MALISZEWSKA, I. Microbial Synthesis of Metal Nanoparticles. **Metal Nanoparticles in Microbiology**, p. 153-175, 2011.

MARIANO, A. P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. **Tese (Doutorado em Geociências e meio Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Geociências**, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

Marson Ascêncio, P. G., Ascêncio, S. D., Aguiar, A. A., Fiorini, A., & Pimenta, R. S. (2014). Chemical assessment and antimicrobial and antioxidant activities of endophytic fungi extracts isolated from *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

MARTINEZ, J. L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1667), 2521-2530.

MCLAUGHLIN, D. J.; HIBBETT, D. S.; LUTZONI, F.; SPATAFORA, J. W.; VILGALYS, R. The search for the fungal tree of life. **Trends in microbiology**, v. 17, n. 11, p. 488-497, 2009.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORAIS, C. G., CADETE, R. M., UETANABARO, A. P. T., ROSA, L. H., LACHANCE, M. A., & ROSA, C. A. (2013). D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. **Fungal genetics and biology**, 60, 19-28.

MOREIRA, C. G; HORINOUCI, C. D.; SOUZA-FILHO, C. S.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F. Hyperpigmentant activity of leaves and flowers extracts of *Pyrostegia venusta* on murine B16F10 melanoma. **J Ethnopharmacol**, v. 141, p. 1005-1011, 2012.

MORIWAKI, J.; SATO, T.; TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. **Mycoscience**, v. 44, p. 47-53, 2003.

MOSTAFA, Pyrostegia venusta (Ker Gawl.) Miers: A Botanical, Pharmacological and Phytochemical Review **Med Aromat Plants** 2013, 2:3

MOUSTAFA, M. Removal of pathogenic bacteria from wastewater using silver nanoparticles synthesized by two fungal species. **Water Science**, n. 37, p.164-176, 2017.

MURRAY, C. J. L.; LOPEZ, A. D. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. **The lancet**, v. 349, p. 1269-1276, 1997.

MUSSI-DIAS, V., et al. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 14, n. 2, p. 261-266, 2012.

NAUSHAD, M.; KHAN, M. R.; ALOTHMAN, Z. A. History and Introduction of HPLC/MS. **CRC Press**, 2014.

NOBLES, M. STUDIES IN FOREST PATHOLOGY: VI. IDENTIFICATION OF CULTURES OF WOOD-ROTTING FUNGI. **Canadian Journal of Research**, v. 26, p. 281–431, 1948.

OLADIMEJI, F. A.; ORAFIDIYA, L. O.; OKEKE, I. N. Physical properties and antimicrobial activities of leaf essential oils of *Lippia multiflora* Moldenke. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 14, p. 162-168, 2004.

ORLANDELLI, R. C. et al. In vitro antibacterial activity of crude extracts produced by endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 10, p. 137-141, 2012.

PEPPLER, H. J.; REED, G. 1987. Enzymes in food on feed processing. *In*: Rehm, H.J.; Reed, G.; Kennedy, J. F. (Eds). *Biotechnology. Vol. 7a*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH. p. 547-603.

PETERSON, L. R.; DALHOFF, A. Towards targeted prescribing: will the cure for antimicrobial resistance be specific, directed therapy through improved diagnostic testing? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 902-905, 2004.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Nat Toxins**, v. 1, n. 3, p. 185-196, 1992.

PETTIT, R. K. Mixed fermentation for natural product drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, p. 19-25, 2009.

PFEFFERLE, C.; THEOBALD, U.; GURTLER, H.; FIEDER, H. P. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. **J Biotechnol.** v. 80, p. 135-142, 2000.

PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; ABDOLLAHZADEH, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in mycology**, v. 76, p. 51-167, 2013.

PINA, Z. **Encontro com a Villa Bella das Palmeiras**. Salvador, Bahia: Secretaria da Cultura e Turismo, 2005.

POLATTO, L.; DUTRA, J. C.; ALVES JUNIOR, V. Biologia reprodutiva de *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl) Miers (Bignoniaceae) e comportamento de forrageamento dos visitantes florais predominantes. **Revista de Biologia Neotropical / Journal of Neotropical Biology**, v. 4, n. 1, p. 46-57, 29 set. 2008.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. 2 ed. Santa Cruz do Sul: **Edunisc**, 2004.

RADIASTUTI, N., MUTEA, D., & SUMARLIN, L. O. (2017, February). Endophytic *Colletrotrichum* spp. from *Cinchona calisaya* wedd. and it's potential quinine production as antibacterial and antimalaria. In **AIP Conference Proceedings** (Vol. 1813, No. 1, p. 020022).

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Cienc. Cult.**, v. 65, n. 3, p. 44-48, 2013.

REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L. E. *Glomalean fungi from the Ordovician*. **Science**, v. 289, p. 1920-1921, 2000.

REMY, W.; TAYLOR, T. N.; HASS, H.; KERP, H. *Four-hundred-million-year-old vesicular-arbuscular mycorrhizae*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 11841-11843, 1994.

RIOS JL, RECIO MC, VILLAR A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. A review of the literature. **J. Ethnopharmacol.** 1988; 23: 127-49

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE, J. R. J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 182, n. 2, 314-330, 2009.

ROSA, L.H.; VIEIRA, M.L.A.; SANTIAGO, I.F.; ROSA, C.A. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 73, p. 178-189, 2010.

ROY, P.; AMDEKAR, S.; KUMAR, A.; SINGH, R.; SHARMA, P.; SINGH, V. In vivo antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **J. Ethnopharmacol.**, p. 1-7, 2012.

SAIKKONEN, K.; ION, D.; GYLLENBERG, M. The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations. Proceedings of the Royal Society of London. **Biological Sciences**, v. 269, n. 1498, p. 1397-1403, 2002.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; STANLEY, H. F. Evolution of endophyte – plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.

SAITO, K., KAWAMURA, Y., & ODA, Y. (2003). Role of the pectinolytic enzyme in the lactic acid fermentation of potato pulp by *Rhizopus oryzae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 30(7), 440-444.

SANTOS, S. N. Bioprospecção de fungos endofíticos isolados de *Combretum leproso* do Bioma Caatinga. **Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz"**, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SARAVANAN, M.; AROKIYARAJ, S.; LAKSHMI, T.; PUGAZHENDHI, A. Synthesis of silver nanoparticles from *Phenerochaete chrysosporium* (MTCC-787) and their antibacterial activity against human pathogenic bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, p. 68-72, 2018.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**. Cambridge, v. 109, p. 661-78, 2005.

SILVA, E. M. S., SILVA, I. R. D., Ogusku, M. M., Carvalho, C. M., Maki, C. S., & PROCÓPIO, R. E. D. L. Metabolites from endophytic *Aspergillus fumigatus* and their in vitro effect against the causal agent of tuberculosis. **Acta Amazonica**, v. 48, n. 1, p. 63-69, 2018.

SILVA-ROJAS, H. V.; AVILA-QUEZADA, G. D., Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. **Plant Pathology**, v. 60, p.899-908, 2011

SIMÕES, C. M. O., & SCHENKEL, E. P. (2002). A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista brasileira de farmacognosia**, 12(1), 35-40.

SIQUEIRA, V.M., CONTI, R., ARAUJO, J.M., SOUZA-MOTTA, C.M. 2011. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis** 53: 89-95.

SOUZA FILHO Estudo fitoquímico de *Pyrostegia venusta* monitorado por ensaios de proliferação de melanócitos *in vitro*. **Dissertação de Mestrado, Programa de Pósgraduação em Química**, Área de Concentração Química Orgânica, da Universidade Federal do Paraná, 2010.

SPECIAN, V., SARRAGIOTTO, M. H., PAMPHILE, J. A., & CLEMENTE, E. (2012). Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* isolated from *Luehea divaricata*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 43(3), 1174-1182.

STONE, J.K.; POLISHOOK, J.D.; WHITE, J.F. **Endophytic fungi**. In: Muller, G.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods. Elsevier Academic Press. p. 241-270, 2004.

STROBEL, G., DAISY, B., CASTILLO, U., & HARPER, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural products**, 67(2), 257-268

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257–268, 2004.

SUNITHA, V.; NIRMALA, D.; SRINIVAS, C. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1-9. 2013.

TAN, R.; ZOU, W. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural products reports**, v. 18, p. 448-459, 2001.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 448-459, 2001.

TRAPPE, J. M., & CLARIDGE, A. W. (2005). Hypogeous fungi: evolution of reproductive and dispersal strategies through interactions with animals and mycorrhizal plants. **Mycology Series**, 23, 613.

VERAS, H. N. H. Caracterização química e avaliação da atividade antimicrobiana e antiinflamatória tópica do óleo essencial de *Lippia sidoides* cham. (verbenaceae). 2011. **Dissertação (Mestre em Bioprospecção Molecular) - Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular**. Universidade Regional do Cariri, Crato.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, vol. 29, n.2, p. 326-337, 2006

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. **Chromatographic. Science series**, volume 99, 2008.

WATTENBERG, L.; J. *Celular Biochem* 1995, **Supplement** 22, 162.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **Academic Press, San Diego**, 1990.

WIKEE, S.; LOMBARD, L.; NAKASHIMA, C.; MOTOHASHI, K.; CHUKEATIROTE, E.; CHEEWANGKON, R.; MCKENZIE, E. H.; HYDE, K. D.; CROUS, P. W. A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (Botryosphaerales). **Studies in Mycology**, v. 76, p. 1-29, 2013.

WIYAKRUTTA, S., SRIUBOLMAS, N., PANPHUT, W., *et al.* (2004). Endophytic Fungi with Anti-microbial, Anti-cancer and Anti-malarial Activities Isolated from Thai Medicinal Plants. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.20, p. 265–272, 2004.

YU, H.; ZHANG, L.; LI, L.; ZHENG, C.; GUO, L.; LI, W.; QIN, L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological research**, v. 165, n. 6, p. 437-449, 2010.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Products Reports**, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.

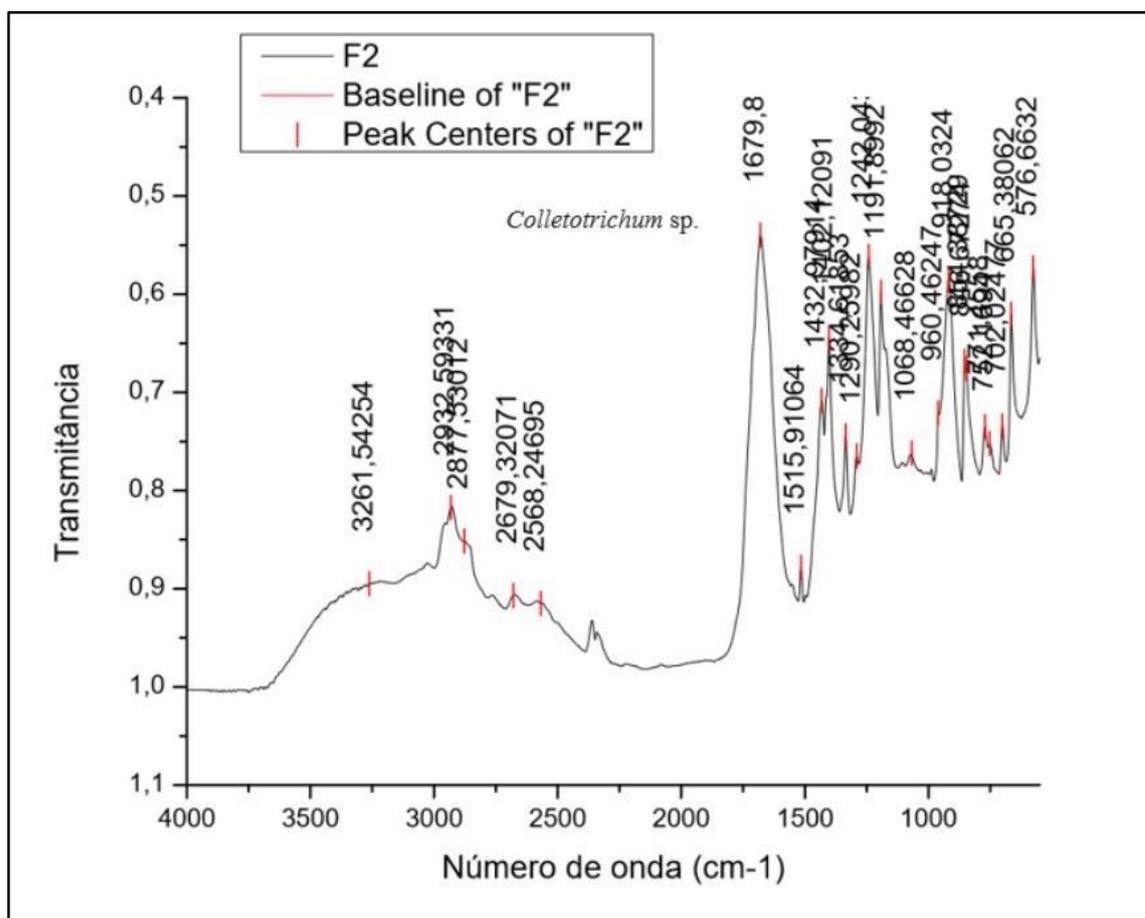
RAJAMANIKYAM, MAHESHWARI, VADLAPUDI, VARAHALARAO, AMANCHY, RAMARS, & UPADHYAYULA, SURYANARAYANA MURTY. (2017). Endophytic Fungi as Novel Resources of natural Therapeutics. *Brazilian Archives of Biology and Technology*,60, e17160542. Epub August 21, 2017

9. ANEXOS

Métodos analíticos

Infravermelho

F2: Amostra apresenta muitos picos, sinalizando uma mistura. A banda entre 3700 a 2500 possui picos compostos.



3500 – 2700 cm⁻¹: Vibração de alongamento do O-H em quinonas ou ácidos carboxílicos;

3261 cm⁻¹: Pontes de hidrogênio intermoleculares;

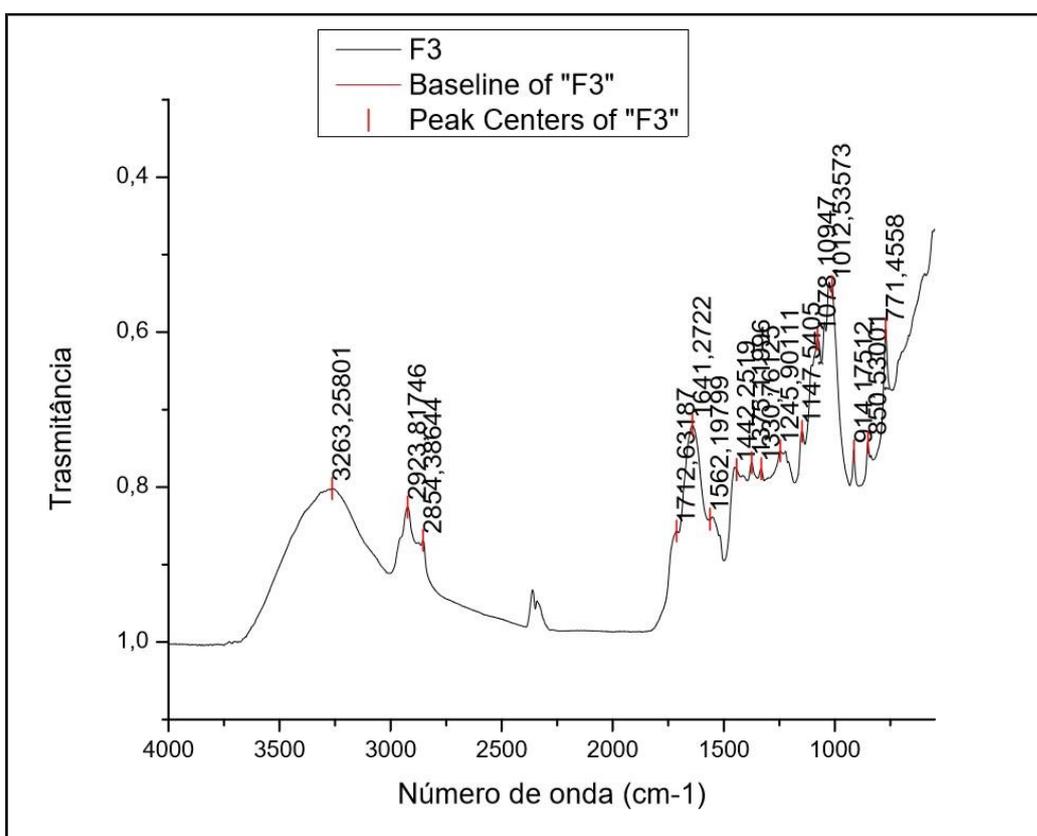
2932 cm⁻¹: Vibração assimétrica do C-H (pode ser cadeia acíclica, cetonas, compostos aromáticos) ;

2877 cm⁻¹: Vibração de estiramento do C-H (pode ser de esteres, aldeídos, aromáticos, aminoácidos);

2679 cm⁻¹: Possivelmente dicetonas;

- 2568 cm^{-1} : Possivelmente dicetonas;
- 1679 cm^{-1} : Vibração de estiramento do C=N em amidas;
- 1515 cm^{-1} : Vibração de estiramento do C=C em 3,4-Dihydroxy-3-cyclobutene-1,2-dione;
- 1432 cm^{-1} : C-H (ésteres, cetonas ou álcoois secundários livres);
- 1402 cm^{-1} : C-H (cetonas ou álcoois secundários livres/ligados);
- 1334 cm^{-1} : C-H álcoois secundários livres);
- 1242 cm^{-1} : Vibração de alongamento do C-O em fenóis;
- 1191 cm^{-1} : Compostos fosforados;
- 918 cm^{-1} : Vibração de alongamento do C-O em ésteres alifáticos saturados;
- 576 cm^{-1} : Vibração do esqueleto C-C

F3: Indicativo de polímero de açúcar, espectro apresenta mistura de diversos compostos, região 1450 a 1200 cm^{-1} apresenta muitos picos compostos.

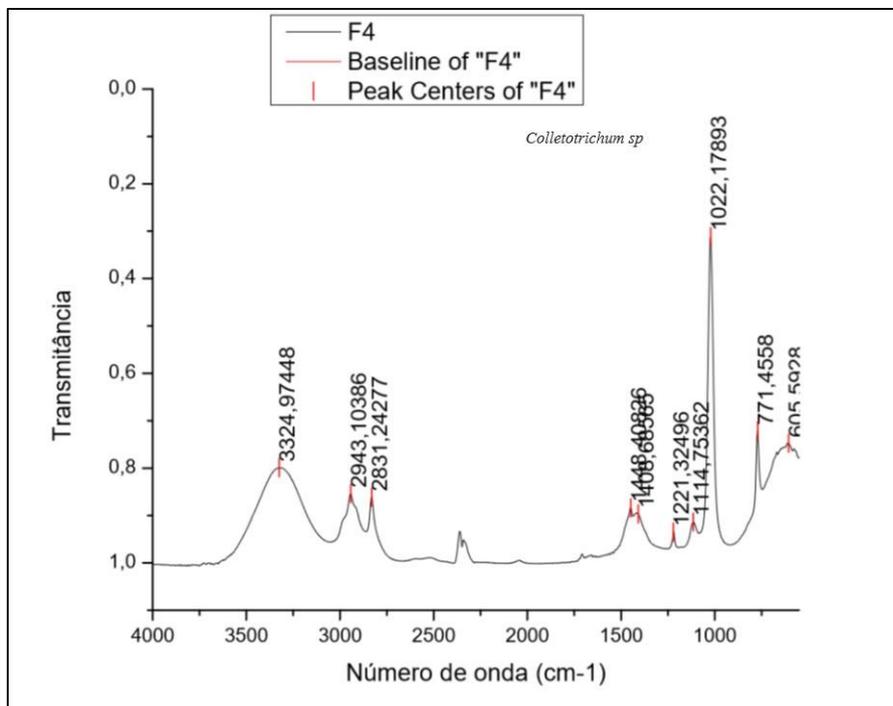


- 3263 cm^{-1} : pontes de hidrogênios;
- 2923 – 2854 cm^{-1} : vibração de alongamento do C-H em cadeias alifáticas;
- 1641 cm^{-1} : C=N aminas;
- 1562 cm^{-1} : vibração de anel em piridinas;

1078 – 1012 cm^{-1} : vibração do C-O-C-O-C;

914; 850; 771 cm^{-1} : deformação do C-H em carboidratos;

F4:



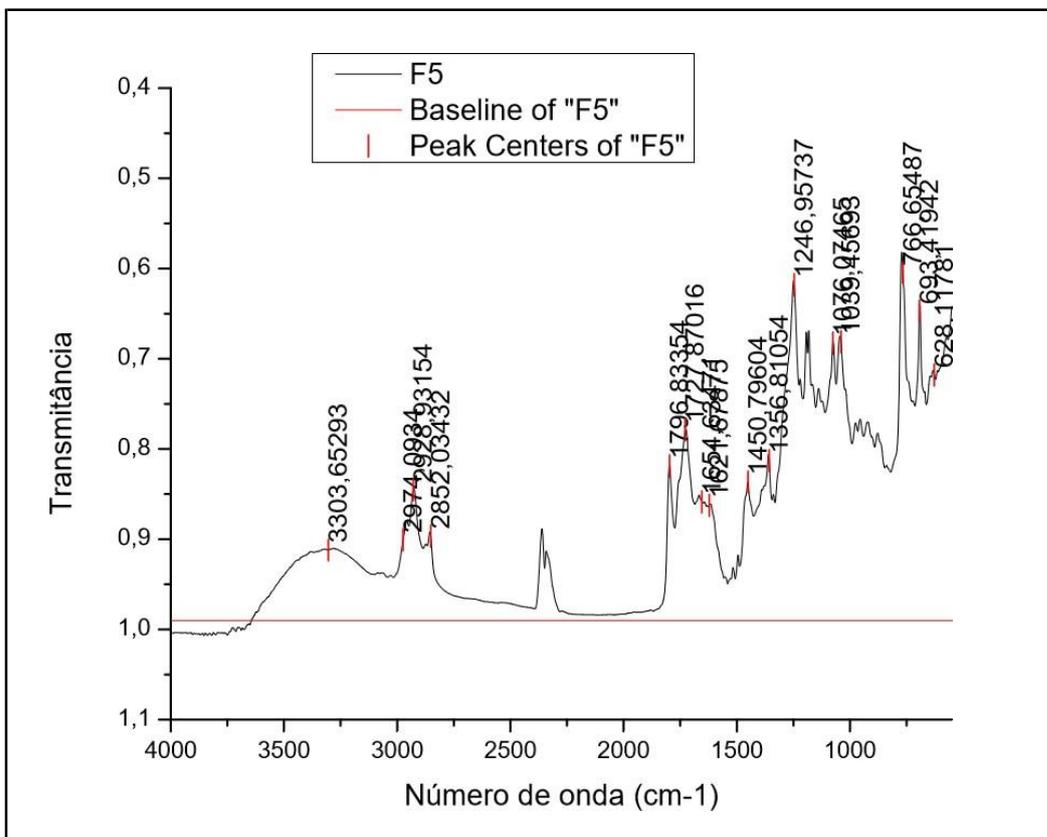
3324 cm^{-1} : pontes de hidrogênio;

2943 – 2831 cm^{-1} : vibração de alongamento do C-H em cadeias alifáticas;

1448 e 1408 cm^{-1} : pode ser pirimidinas ou acridinas;

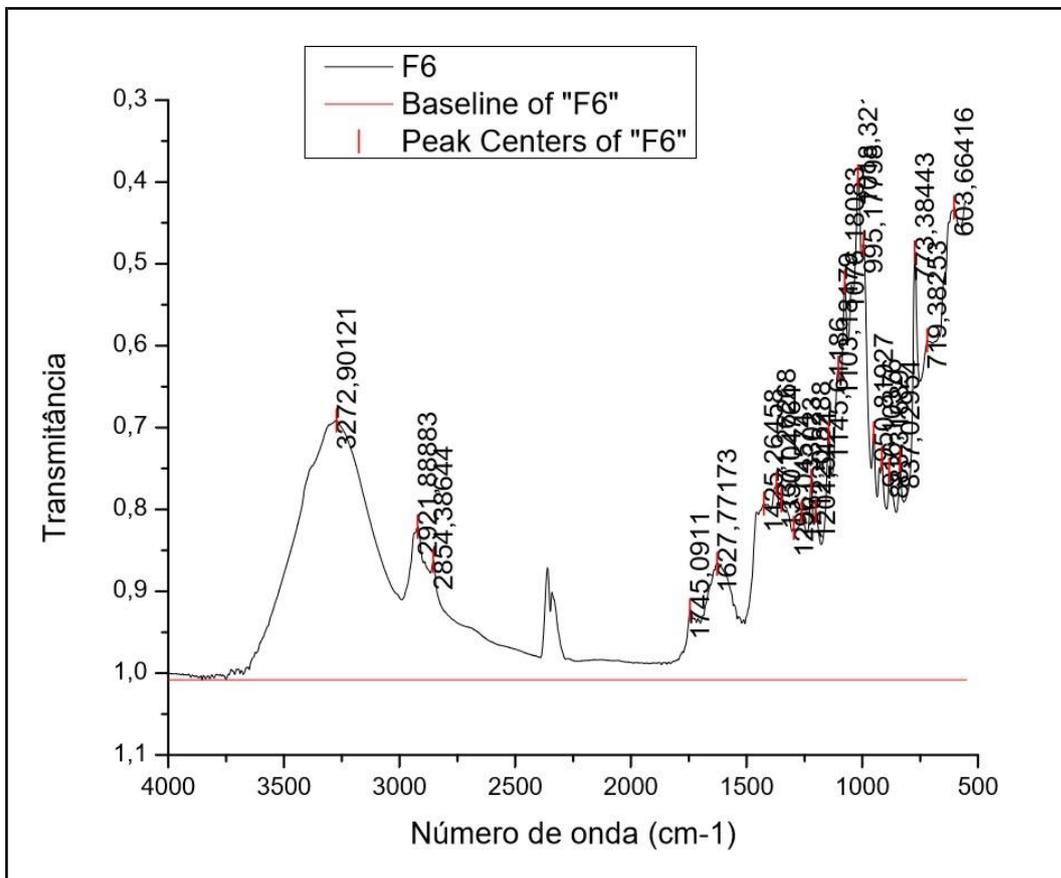
1221 cm^{-1} : vibração do C-H de álcoois secundários livres;

F5:

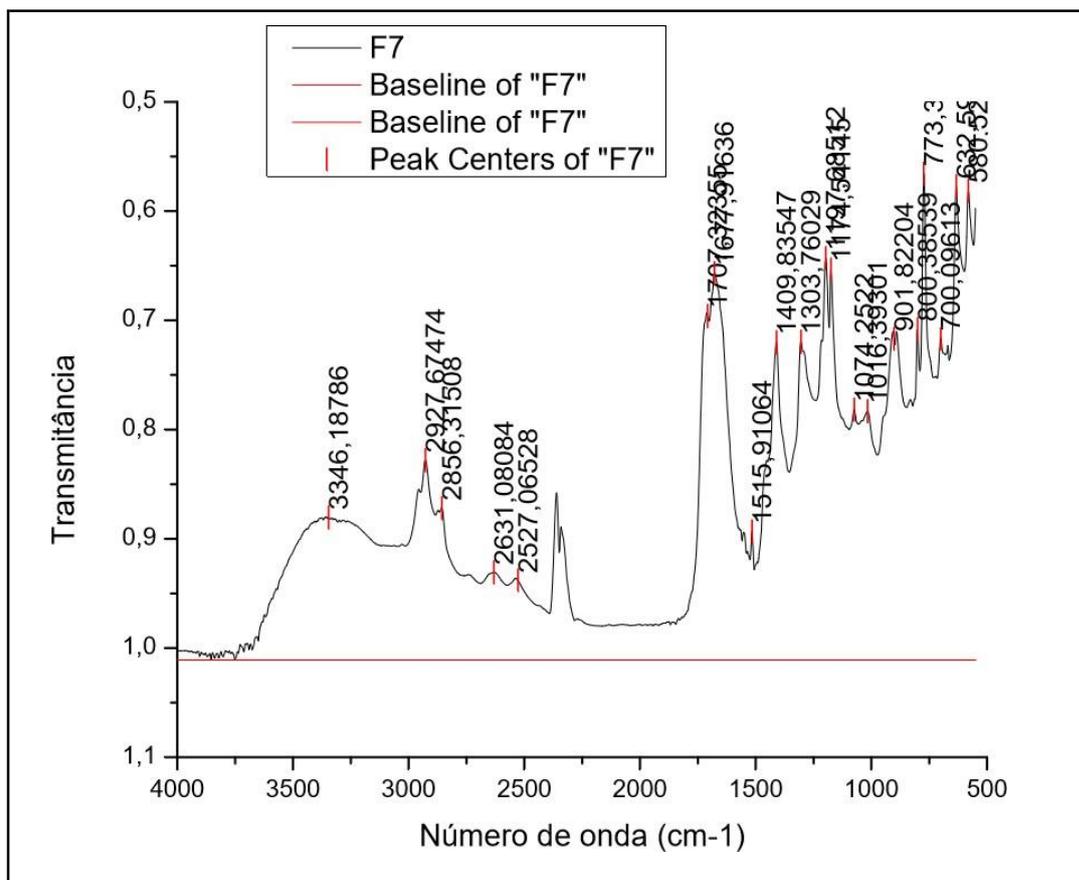


- 3303 cm^{-1} : vibração de pontes de hidrogênio entre hidroxilas -OH de álcoois;
- 2928 cm^{-1} : vibração do CH₂ em cadeias acíclicas;
- 2852 cm^{-1} : vibração do CH₂ em cadeias acíclicas ou CH₃;
- 1796 cm^{-1} : possível indicador do peróxido de diacetil;
- 1727 cm^{-1} : pico composto apresenta indicador de 3,4-Dihydroxy-3-cyclobutene-1,2-diones e vibração de alongamento de C=O de cetonas;
- 1654 – 1621 cm^{-1} : vibração C=C de polienos;
- 1450 cm^{-1} : vibração do C-H pode ser de eters, esterres, acetatos ou cetonas;
- 1356 cm^{-1} : apresenta picos compostos, vibração de deformação do C-H de acetatos, cetonas ou de álcoois secundários livres;
- 1246 cm^{-1} : picos compostos vibração de alongamento do C-O ou O-H de aromáticos, eters ou álcoois secundários livres;
- 1076 – 1039 cm^{-1} : vibração C-O em álcoois primários;
- 766 cm^{-1} : deformação do anel indicador de compostos com piranoses;
- 693 cm^{-1} : presença de anel aromático;

F6: Picos compostos, indica mistura de diversas substâncias, picos mais proeminentes indicam polímero de açúcar composto por piranoses, pode ser um polímero de frutose.



F7:



3500 – 2500 cm^{-1} : -OH de ácidos carboxílicos

3346 cm^{-1} : -OH de álcoois

2927 cm^{-1} : -CH₂ de cadeias acíclicas

2856 cm^{-1} : -CH₂ de cadeias acíclicas ou -CH₃

2631 e 2527 cm^{-1} : possíveis aminoácidos livres

1677 cm^{-1} : possível anel aromático

1515 cm^{-1} : Vibração de estiramento do C=C em 3,4-Dihydroxy-3-cyclobutene-1,2-dione;

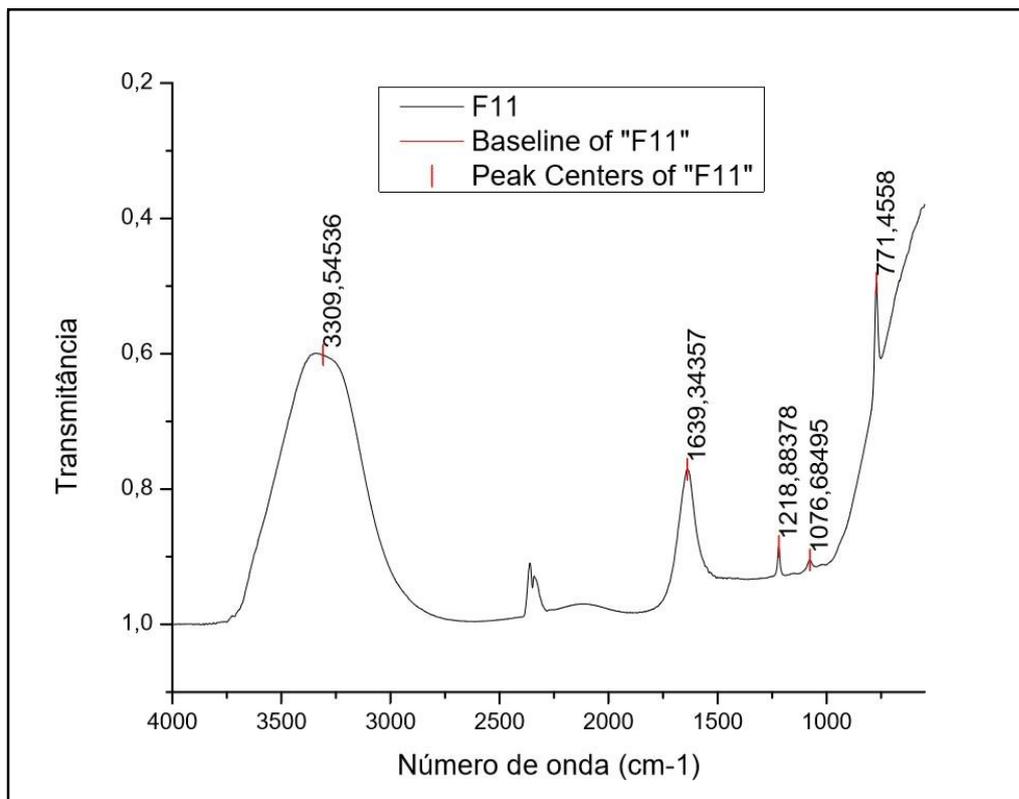
1409 cm^{-1} : Deformação do C-H em acetatos, cetonas, aldeídos ou álcoois secundários livres

1303 cm^{-1} : Deformação do C-H em álcoois secundários

1197 e 1174 cm^{-1} : Presença de dubleto, vibração assimétrica do SO₂ em aromáticos com enxofre e cloro;

1074 e 1016 cm^{-1} : indicador de peróxido de diacetil

773 cm^{-1} : vibração do C-H em compostos cíclicos

F11:

3750 – 2750 cm⁻¹: Pontes de hidrogênio do -OH associado a ácidos carboxílicos;

1639 cm⁻¹: Vibração de alongamento do C=N de Amidinas ou Guanidinas;

1218 cm⁻¹: Vibração do C-N em compostos nitrogenados

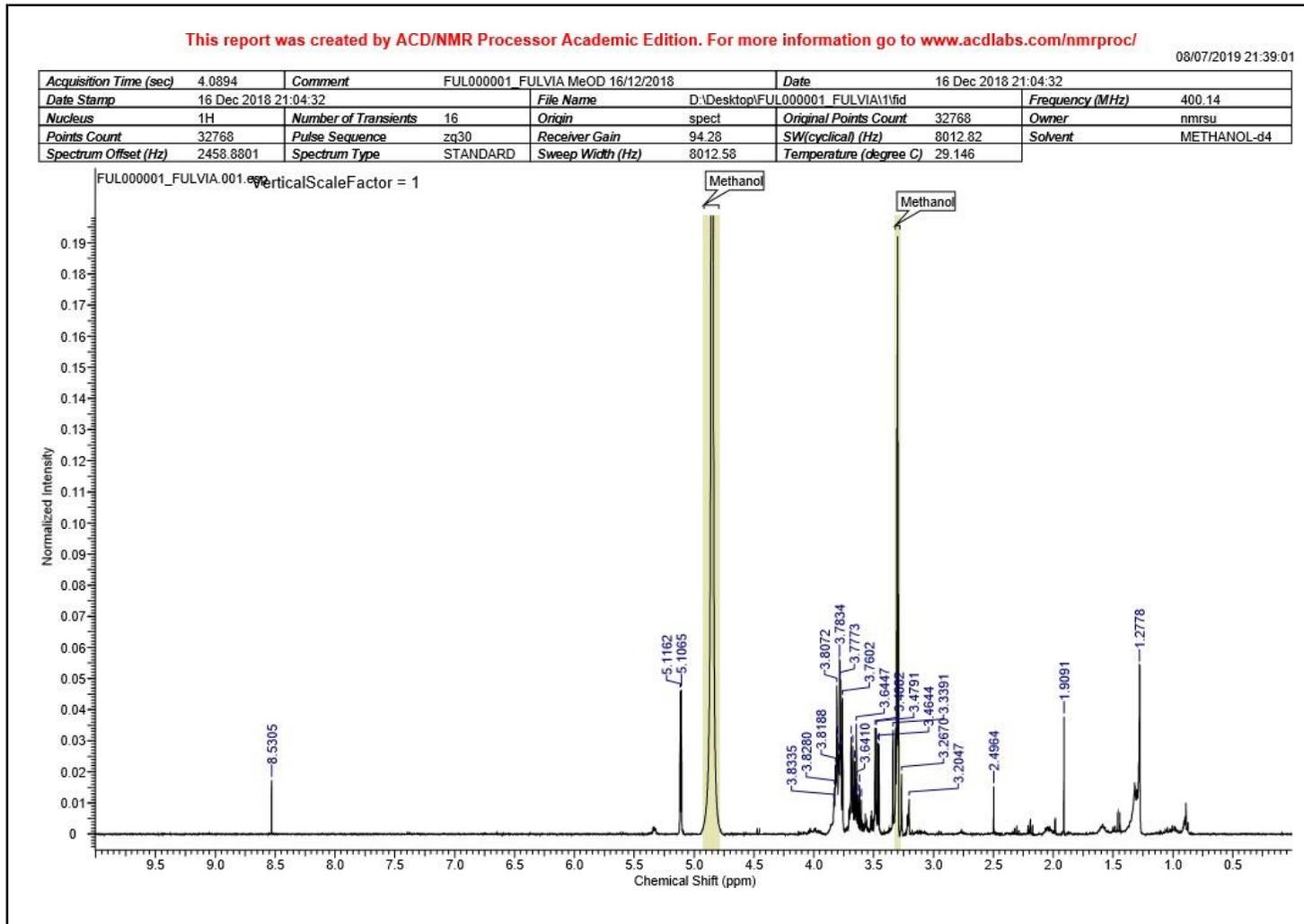
771 cm⁻¹: Presença de aromáticos

- Saliento que as amostras apresentam mais de uma molécula, mas como pode perceber, não aponta exatamente para um composto, embora os picos 1515 cm⁻¹ e 1727 cm⁻¹, apontam para uma molécula específica.

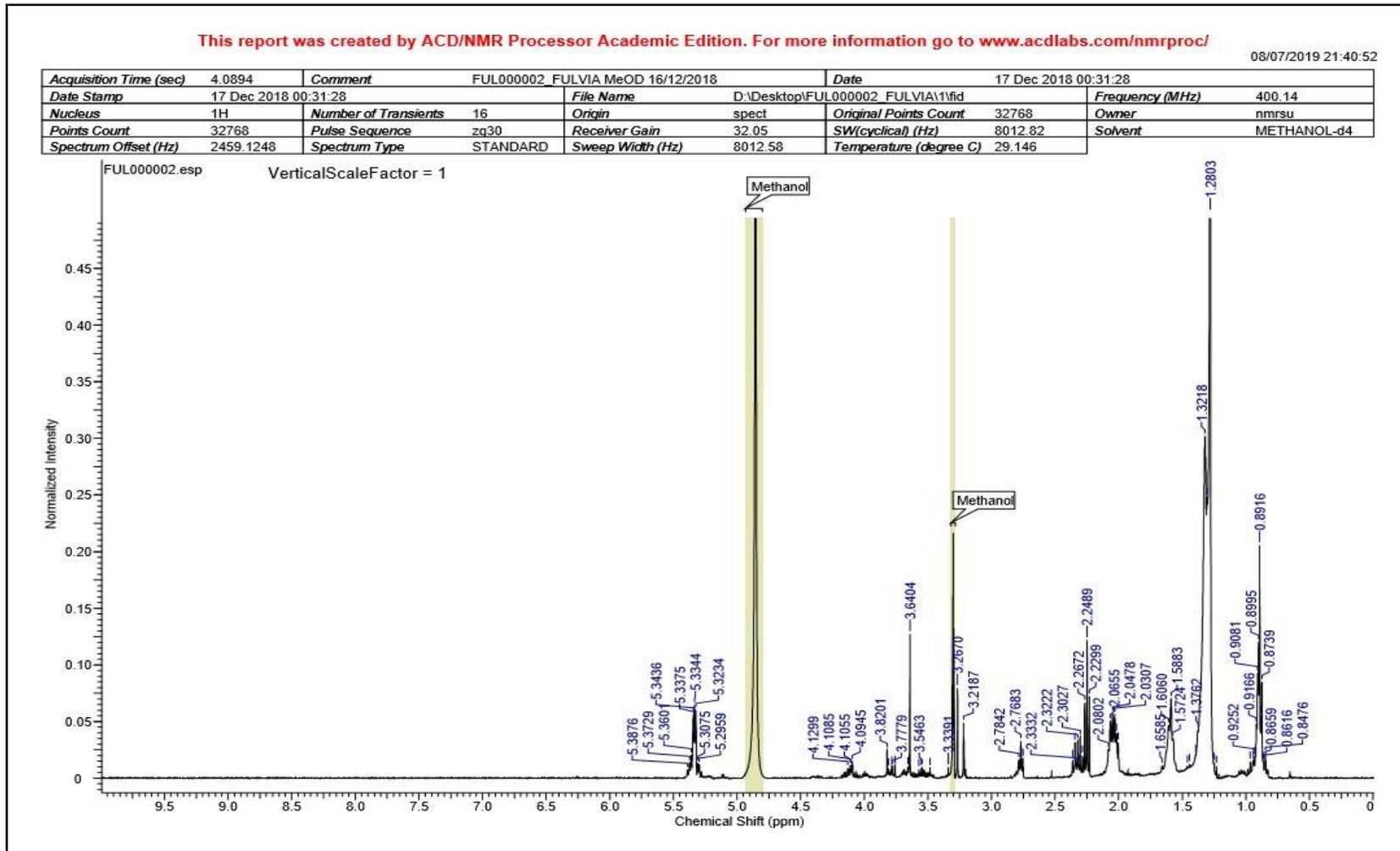
9.3 OS ESPECTROS DAS AMOSTRAS OBTIDOS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN H')

RMN H'									
Colletotrichum 1		Phylosticta 1		Colletotrichum 2	Colletotrichum bobinese	Colletotrichum 4		Phylosticta 2	
F1 - Caldo	F2- Micelio	F3- C	F4-M	F5-C	F6-C	F7-C	F8-M	F9-M	F10-C
8,56 s		8,03 s	7,54s	7,74 dd3,6-6,0	8,02 sl	8,45 S	8,48 s	5,36 t 3,2	7,38 d 1,2
5,11 d [4,0]	5,36 m	7,54 s	7,02 s	7,60 dd3,0-6,0	7,98 sl	8,31 s		5,12 d 3,6	7,31 d 1,2
3,85 d	4,18 d [4,8]	7,02 s	4,14 dd 7,0	7,28 t6,0	7,95m	7,29 d 8,8	5,37 -5,35 m	4,59 d 7,6	7,72 -7,67
3,86 t [9,2]	4,5 d [4,4]	5,36 m	3,98 s	4,26dd2,0 -5,0	7,88 d 8,0	7,47 d 8,8	5,33 -5,21 m	3,90 ddd 2,0	7,56 d 1,2
3,71d [5,6]	4,18 d [4,8]	4,32dd [4,2]	3,68	2,67 s	7,85 sl	7,30 m	4,88 d 3,6	3,84 t 3,2	7,55-7,53 m
3,67 t [6,0]	4,15 s	4,18 d [6,4]	3,67 sl	2,60 s	7,75-7,65 m	7,28 t 2,0	3,34 s	3,81 m	7,41 t 2,0
3,64 d [6,0]	4,13 t [4,0]	4,14 d [7,2]		2,61 s	7,38 d 7,6	7,26	3,32 d 1,2	3,79m	7,39-7,24
3,54 t [3,8]	4,12 s	3,68 s	3,66 sl	2,31 m	7,26d 1,6	7,25 d 2,0	3,31 d 1,2	3,73 -3,63 m	6,83 d 6,4
	4,11 - 4,0 m	3,51 s	3,51 sl	1,70 m	7,30 -7,18 m	7,23 d 2,0	3,24 d 3,6	3,56 d 2,0	6,81 d 6,4
	3,84 s	2,79 t	2,06 s	1,45 dd	7,05 d 8,4	7,22 d 2,0	3,22 d 3,6	3,54 d 2,0	6,50 t 7,0
	3,83-3,78 m	2,37 t [7,6]		1,34 t	6,98 d 8,8	7,21	3,17 s	3,36	6,30 s
3,50 dd [3,6]	3,67 s	2,06 s	1,27	1,38 - 1,32 m	6,65 d 8,4	7,20	3,14s	3,30	4,76 m

Especto 1 – Caldo fermentado do fungo *Colletotrichum sp*



Espectro 2 – Micélio do fungo *Colletotrichum sp*

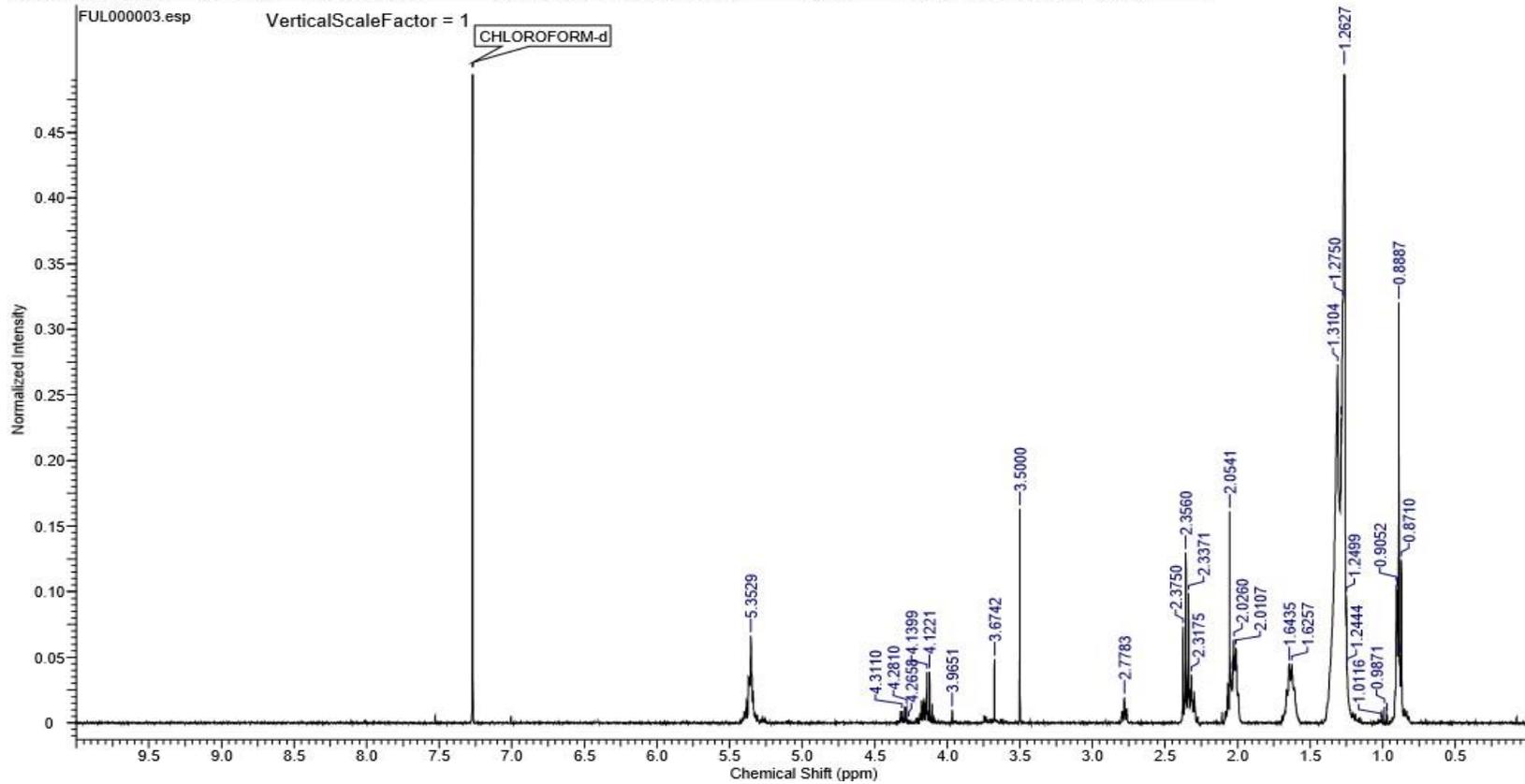


Especto 3 – Caldo fermentado do fungo *Phyllosticta sp.*

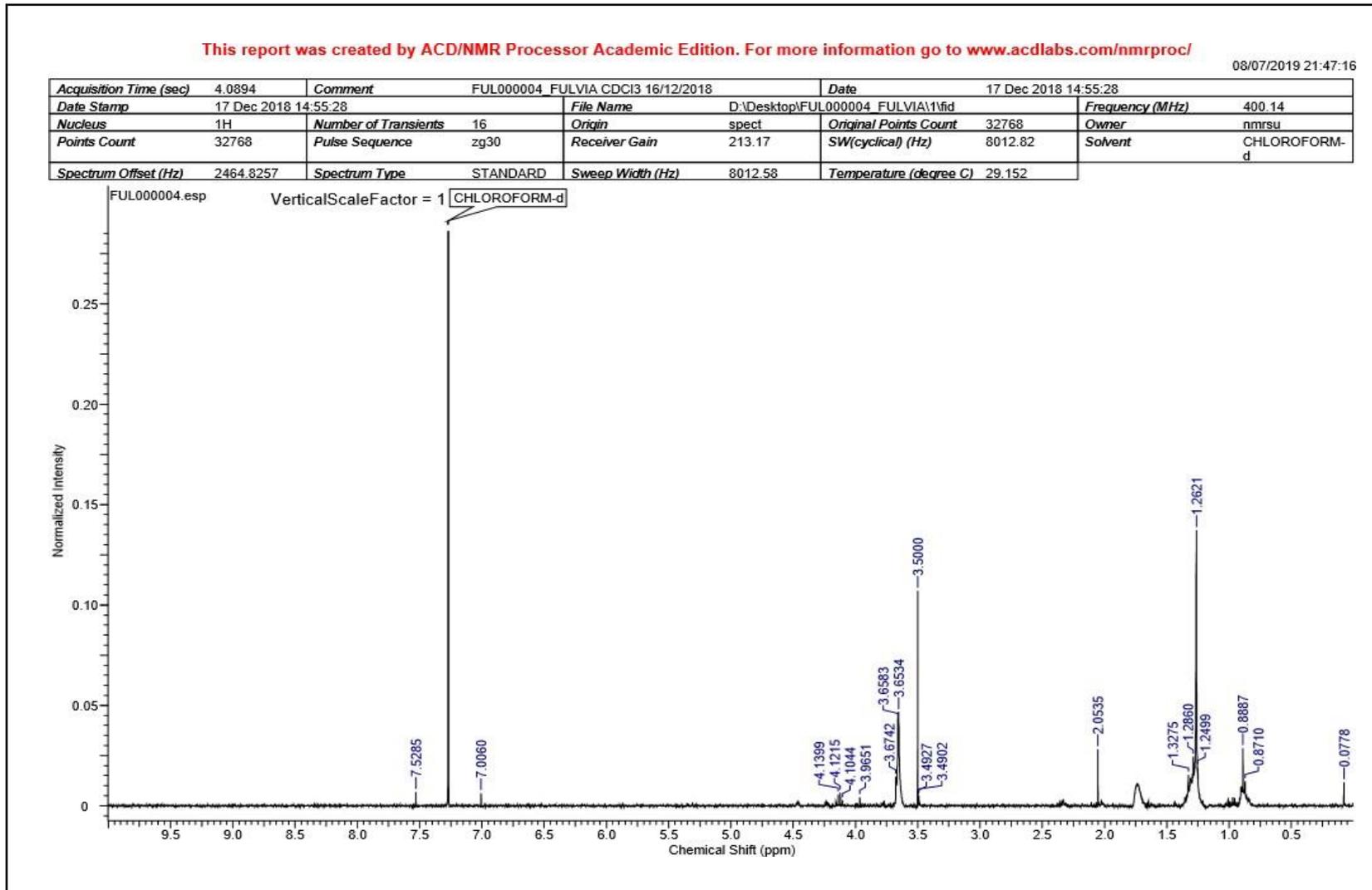
This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

08/07/2019 21:43:13

Acquisition Time (sec)	4.0894	Comment	FUL000003 FULVIA CDCI3 17/12/2018	Date	17 Dec 2018 15:10:24
Date Stamp	17 Dec 2018 15:10:24	File Name	D:\Desktop\FUL000003 FULVIA\1\fid	Frequency (MHz)	400.14
Nucleus	¹ H	Number of Transients	16	Origin	spect
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	213.17
Spectrum Offset (Hz)	2464.8257	Spectrum Type	STANDARD	SW(cyclical) (Hz)	8012.58
				Temperature (degree C)	29.150
				Solvent	CHLOROFORM-d



Espectro 4 – Micélio do fungo *Phyllosticta sp.*

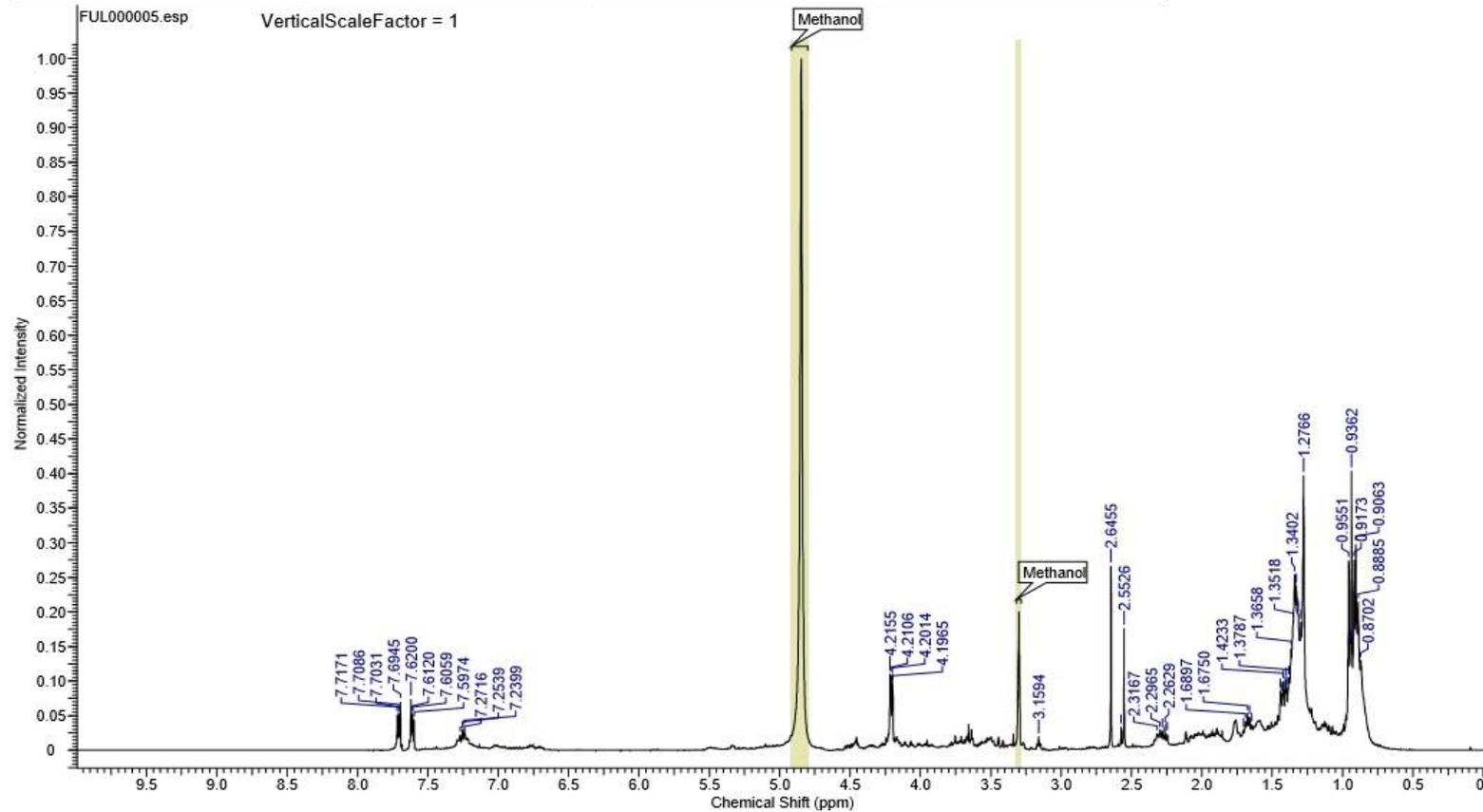


Espectro 5 – Caldo fermentado do fungo *Aspergillus fumigatus*

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

08/07/2019 21:53:22

Acquisition Time (sec)	4.0894	Comment	FUL000005_FULVIA MeOD 16/12/2018		Date	16 Dec 2018 20:58:08	
Date Stamp	16 Dec 2018 20:58:08	File Name	D:\Desktop\FUL000005_FULVIA\2\fid		Frequency (MHz)	400.14	
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zq30	Receiver Gain	32.05	SW(cyclical) (Hz)	8012.82
Spectrum Offset (Hz)	2458.8801	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	8012.58	Temperature (degree C)	29.150
						Solvent	METHANOL-d4

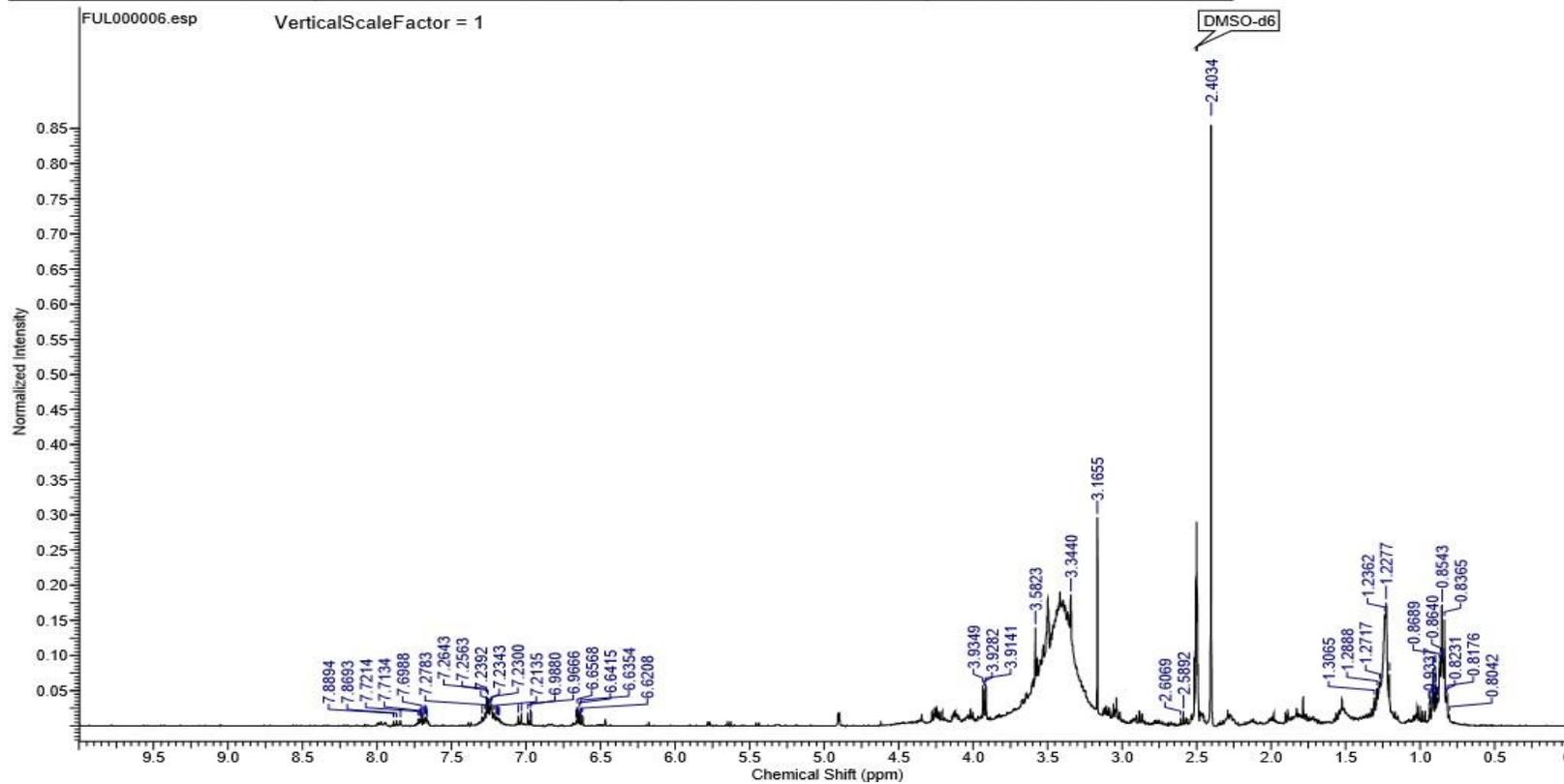


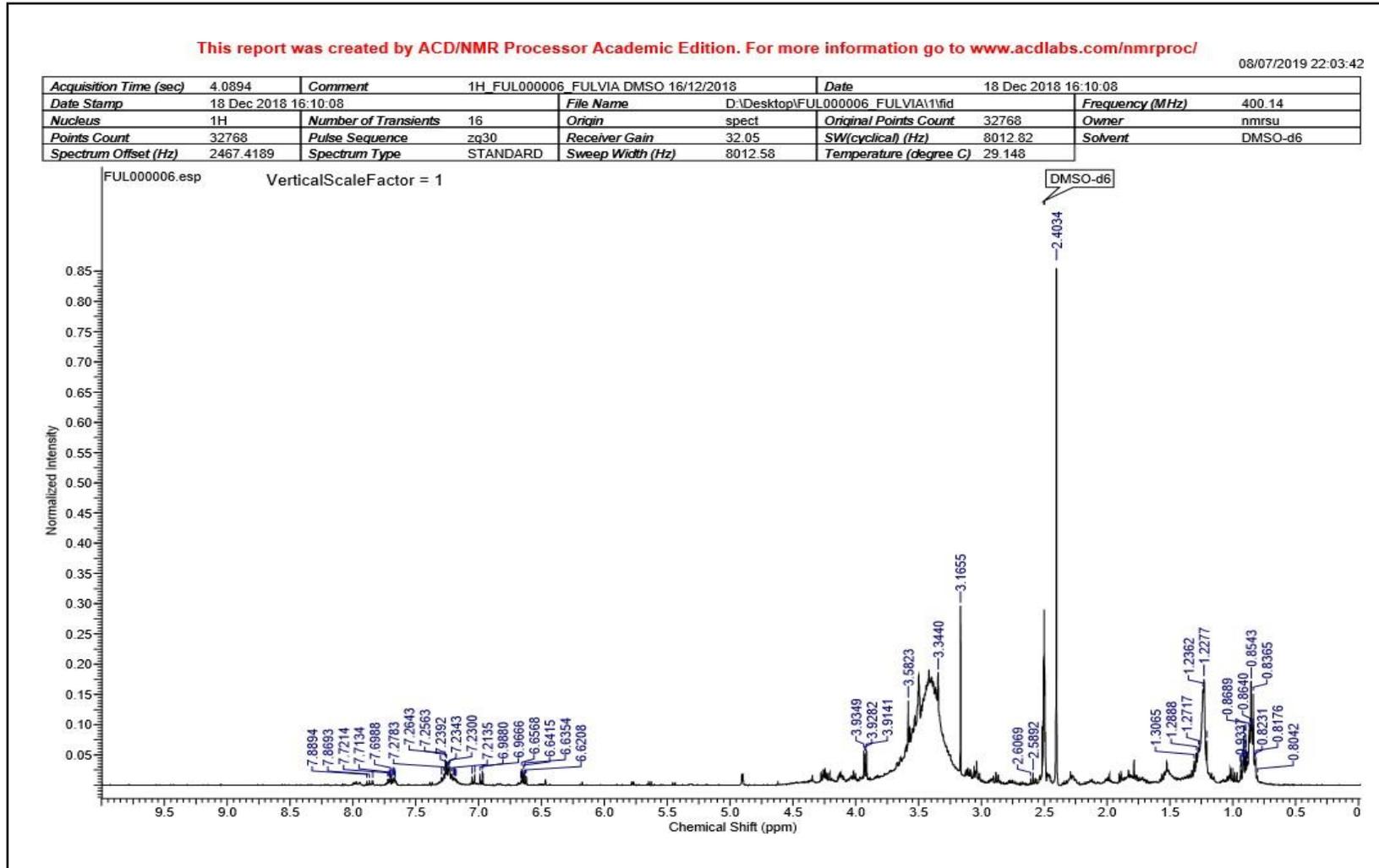
Espectro 6 – Caldo fermentado do fungo *Colletotrichum boninense*

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

08/07/2019 22:03:42

Acquisition Time (sec)	4.0894	Comment	1H_FUL000006_FULVIA DMSO 16/12/2018	Date	18 Dec 2018 16:10:08
Date Stamp	18 Dec 2018 16:10:08	File Name	D:\Desktop\FUL000006_FULVIA\1fid	Frequency (MHz)	400.14
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Original Points Count	32768
Spectrum Offset (Hz)	2467.4189	Spectrum Type	STANDARD	Receiver Gain	32.05
				SW(cyclical) (Hz)	8012.82
				Temperature (degree C)	29.148
				Solvent	DMSO-d6

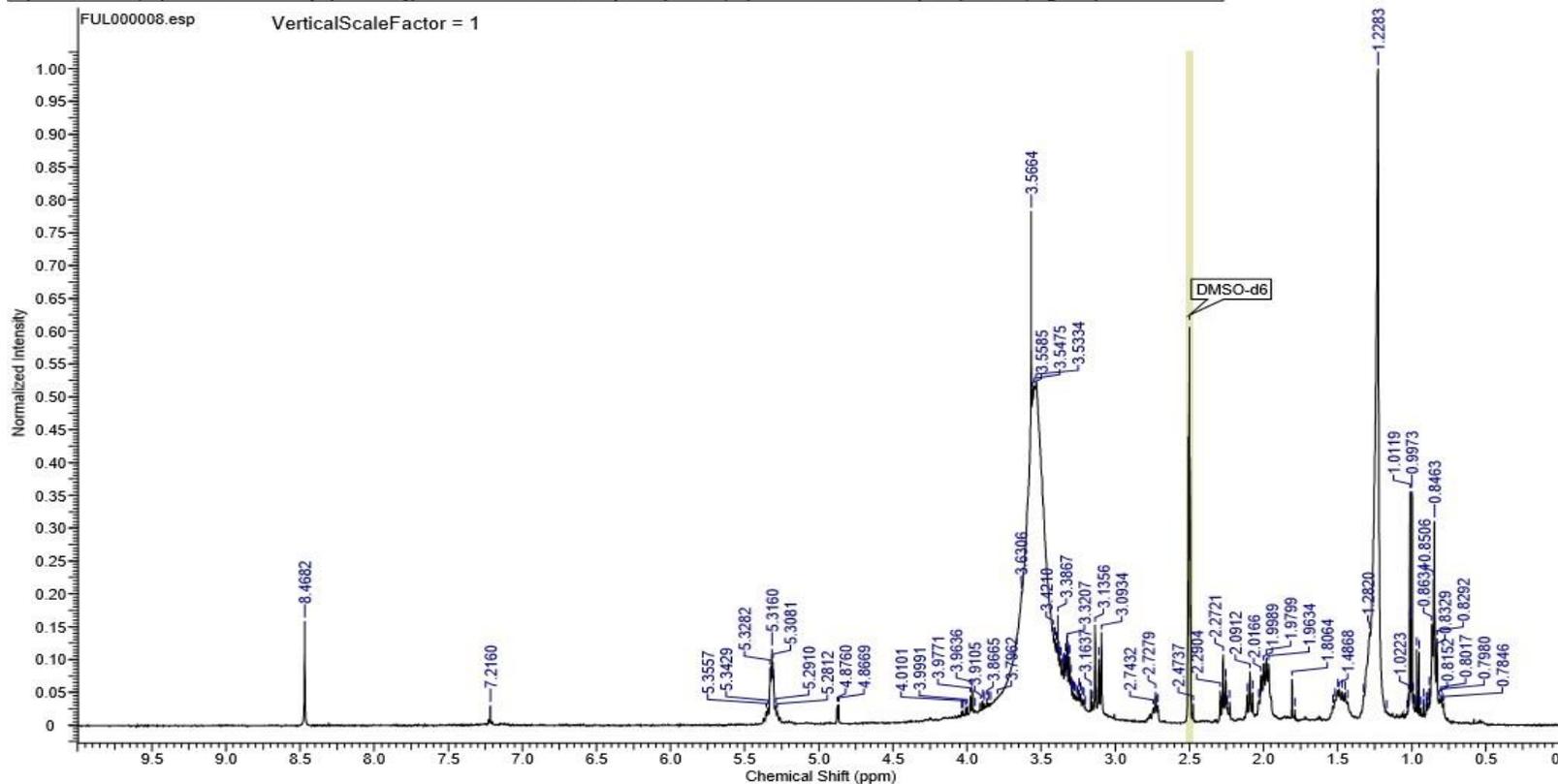


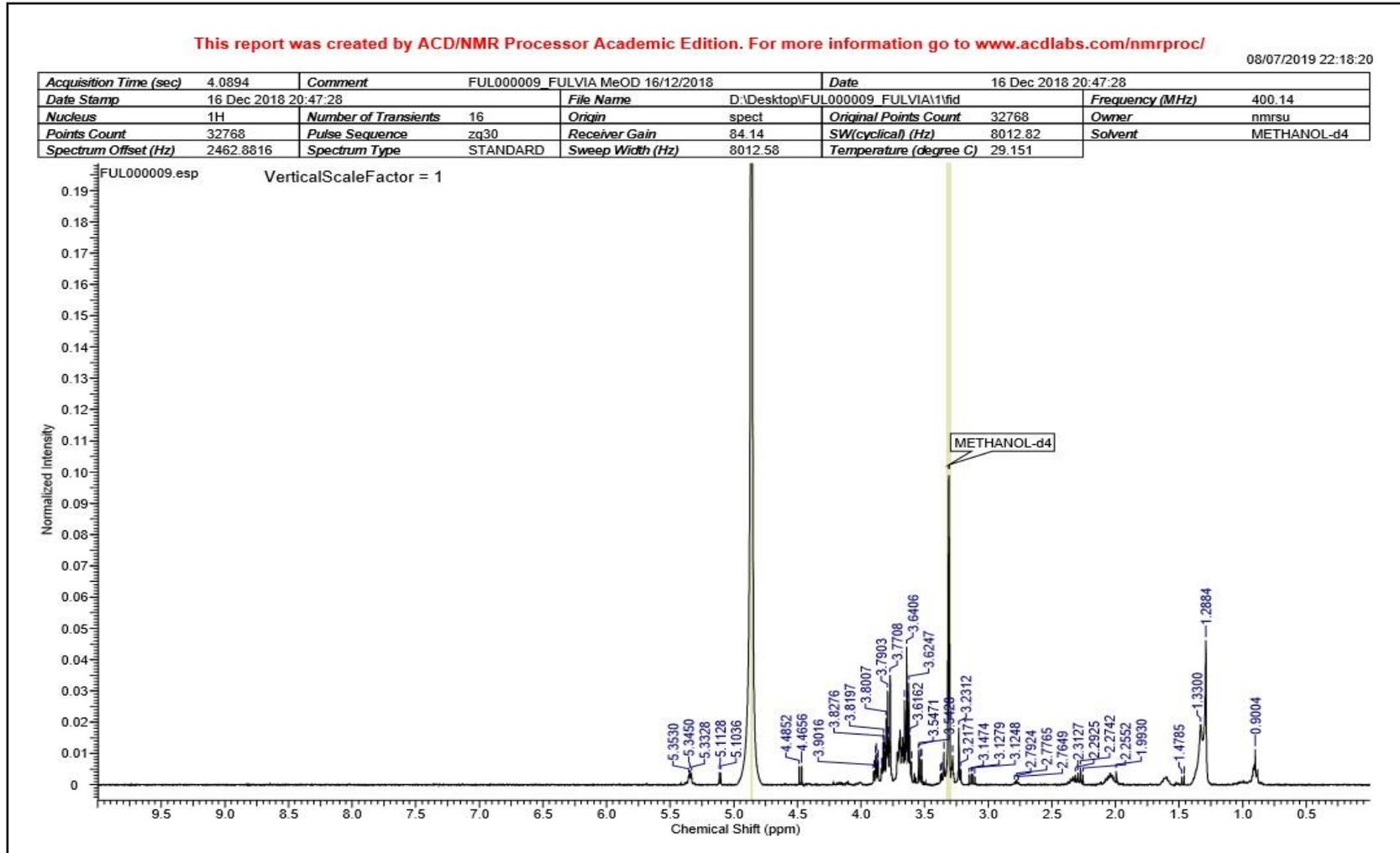
Espectro 7 – Caldo fermentado do fungo *Colletotrichum sp.*Espectro 8 – Micélio do fungo *Colletotrichum sp.*

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

08/07/2019 22:13:48

Acquisition Time (sec)	4.0894	Comment	1H_FUL000008_FULVIA DMSO 16/12/2018		Date	18 Dec 2018 16:14:24	
Date Stamp	18 Dec 2018 16:14:24	File Name	D:\Desktop\FUL000008_FULVIA\1\fid		Frequency (MHz)	400.14	
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zq30	Receiver Gain	32.05	SW(cyclical) (Hz)	8012.82
Spectrum Offset (Hz)	2467.6636	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	8012.58	Temperature (degree C)	29.147
		Solvent	DMSO-d6				

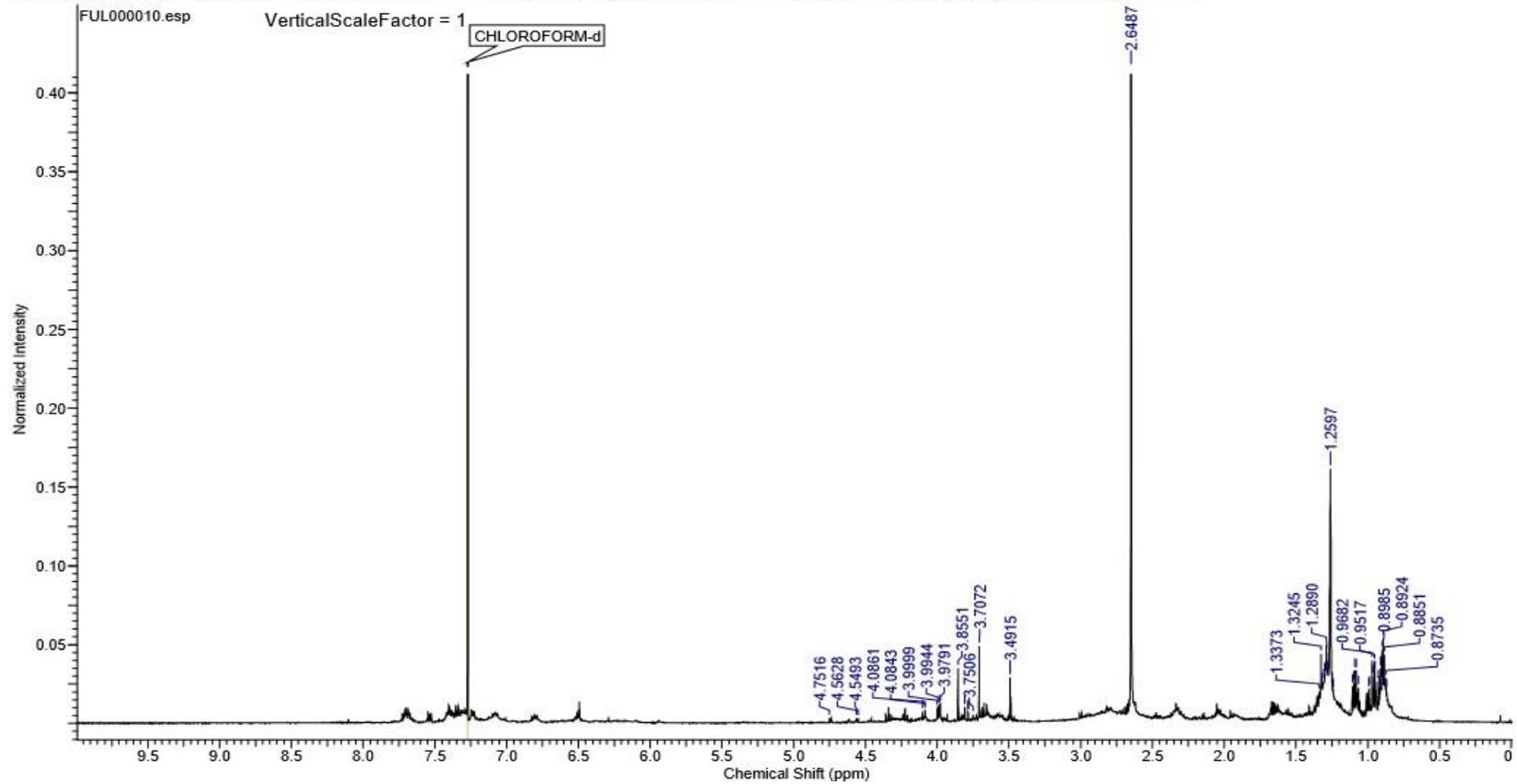


Espectro 9 – Micélio do fungo *Phyllosticta* sp.Espectro 10 – Caldo fermentado do fungo *Phyllosticta* sp.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

08/07/2019 22:22:42

Acquisition Time (sec)	4.0894	Comment	FUL000010_FULVIA CDCI3 17/12/2018	Date	17 Dec 2018 14:59:44
Date Stamp	17 Dec 2018 14:59:44	File Name	D:\Desktop\FUL000010_FULVIA\1\fid	Frequency (MHz)	400.14
Nucleus	¹ H	Number of Transients	16	Origin	spect
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	94.28
Spectrum Offset (Hz)	2465.0703	Spectrum Type	STANDARD	SW(cyclical) (Hz)	8012.82
				Temperature (degree C)	29.142
				Solvent	CHLOROFORM-d

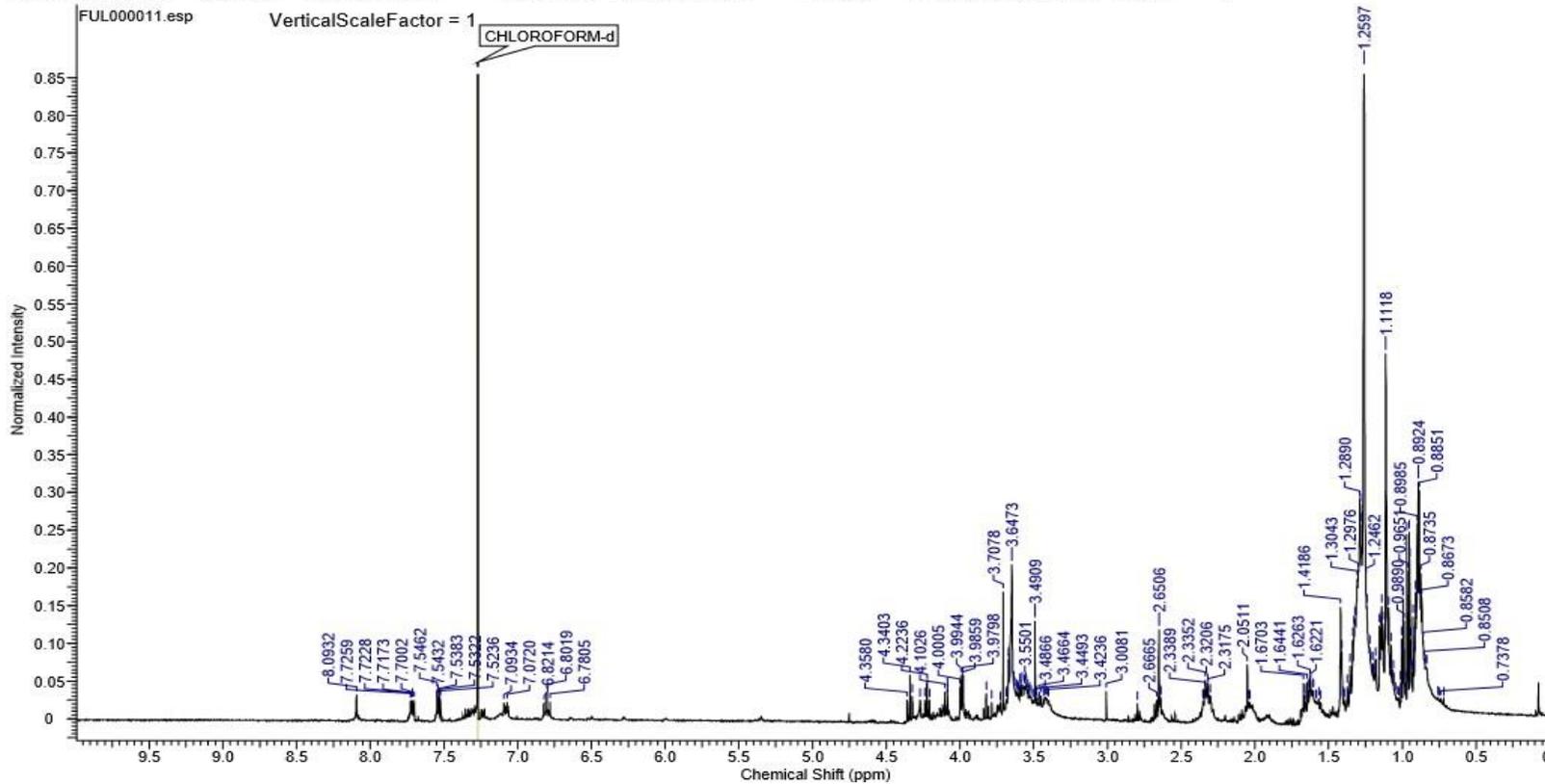


Espectro 11 – Caldo fermentado do fungo não identificado

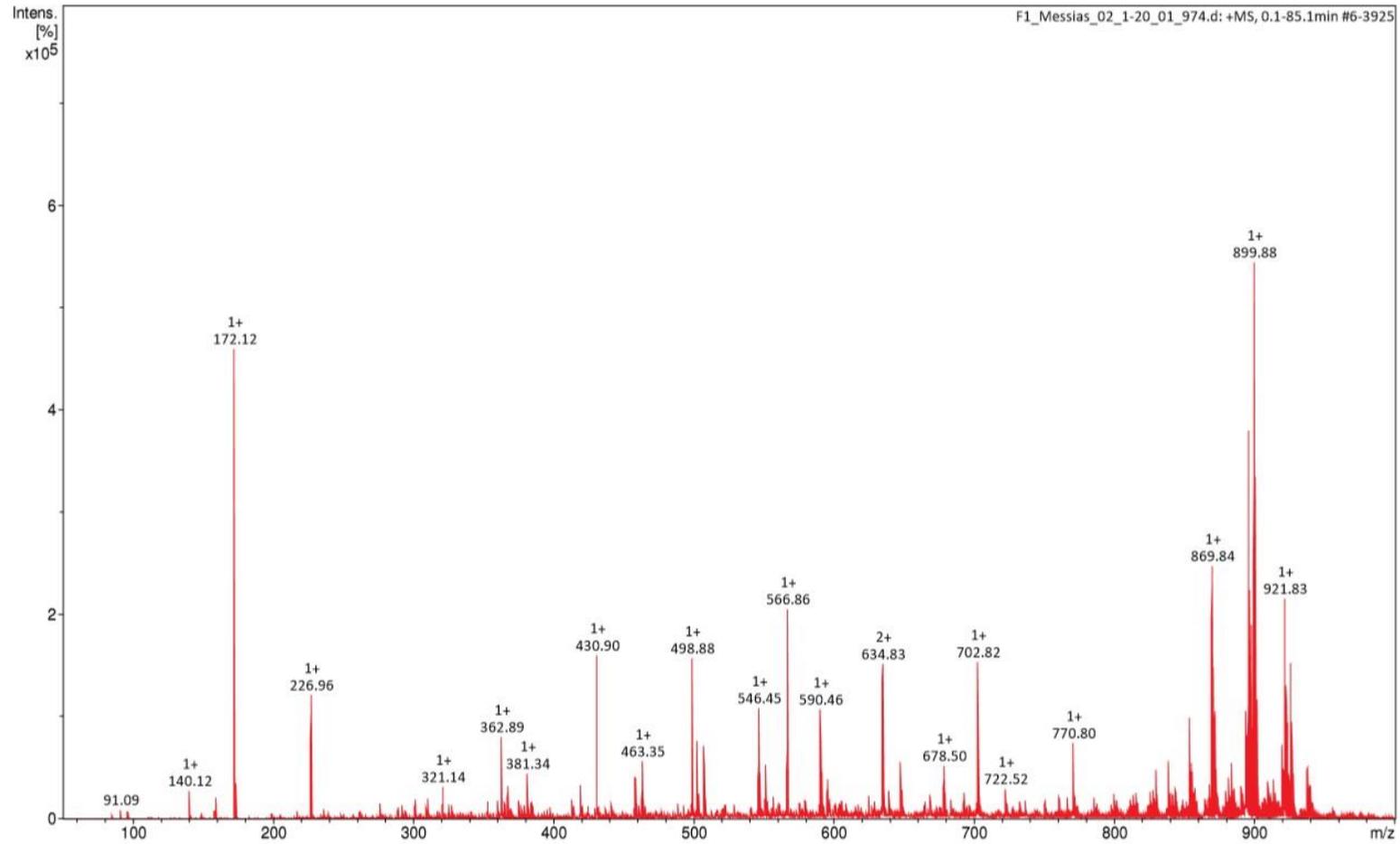
This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

08/07/2019 22:24:03

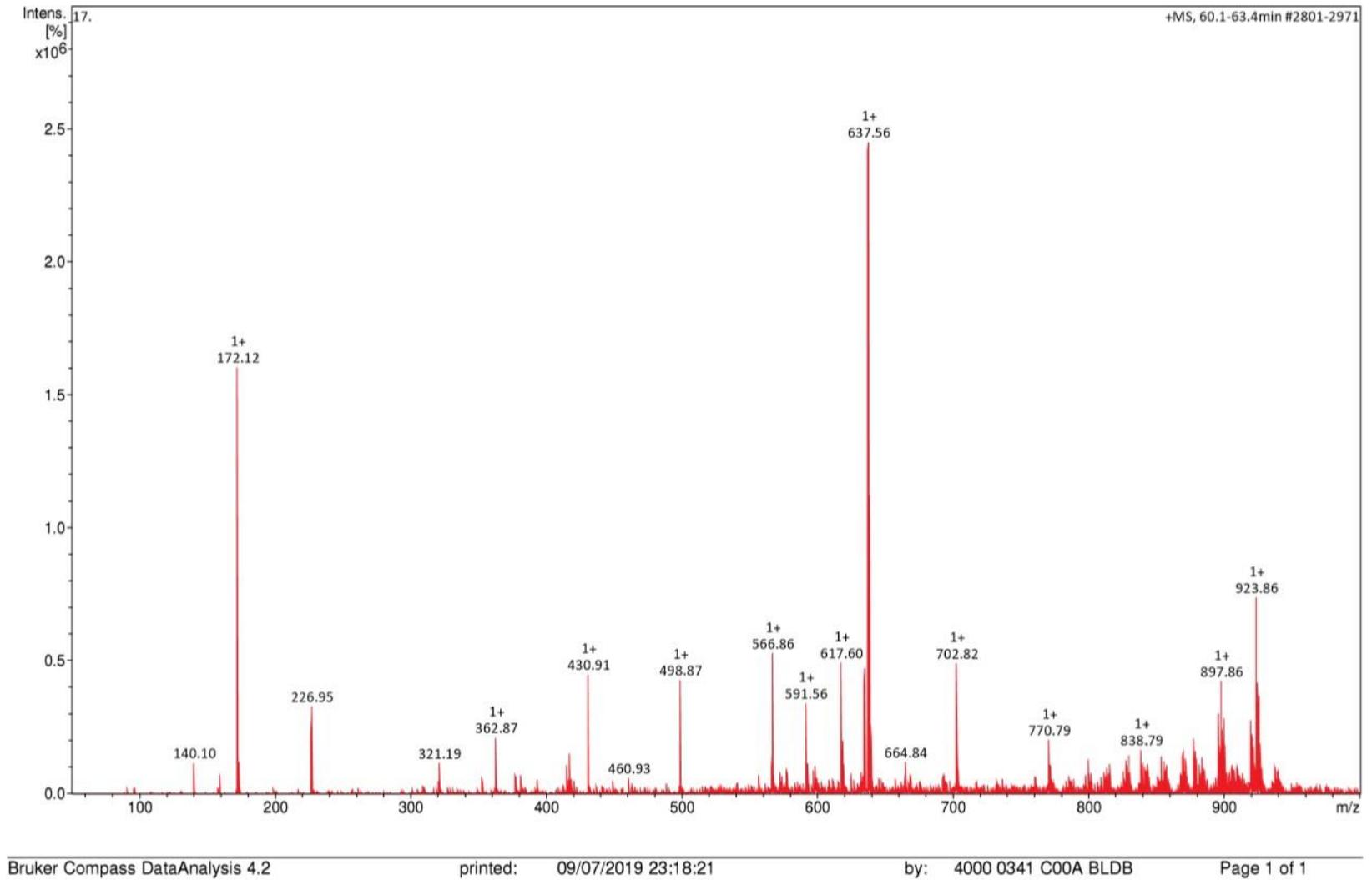
Acquisition Time (sec)	4.0894	Comment	FUL000011_FULVIA CDCI3 17/12/2018	Date	17 Dec 2018 15:04:00
Date Stamp	17 Dec 2018 15:04:00	File Name	D:\Desktop\FUL000011_FULVIA\1\fid	Frequency (MHz)	400.14
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Original Points Count	32768
Spectrum Offset (Hz)	2465.0703	Receiver Gain	64.22	SW(cyclical) (Hz)	8012.82
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	8012.58	Temperature (degree C)	29.149
				Solvent	CHLOROFORM-d



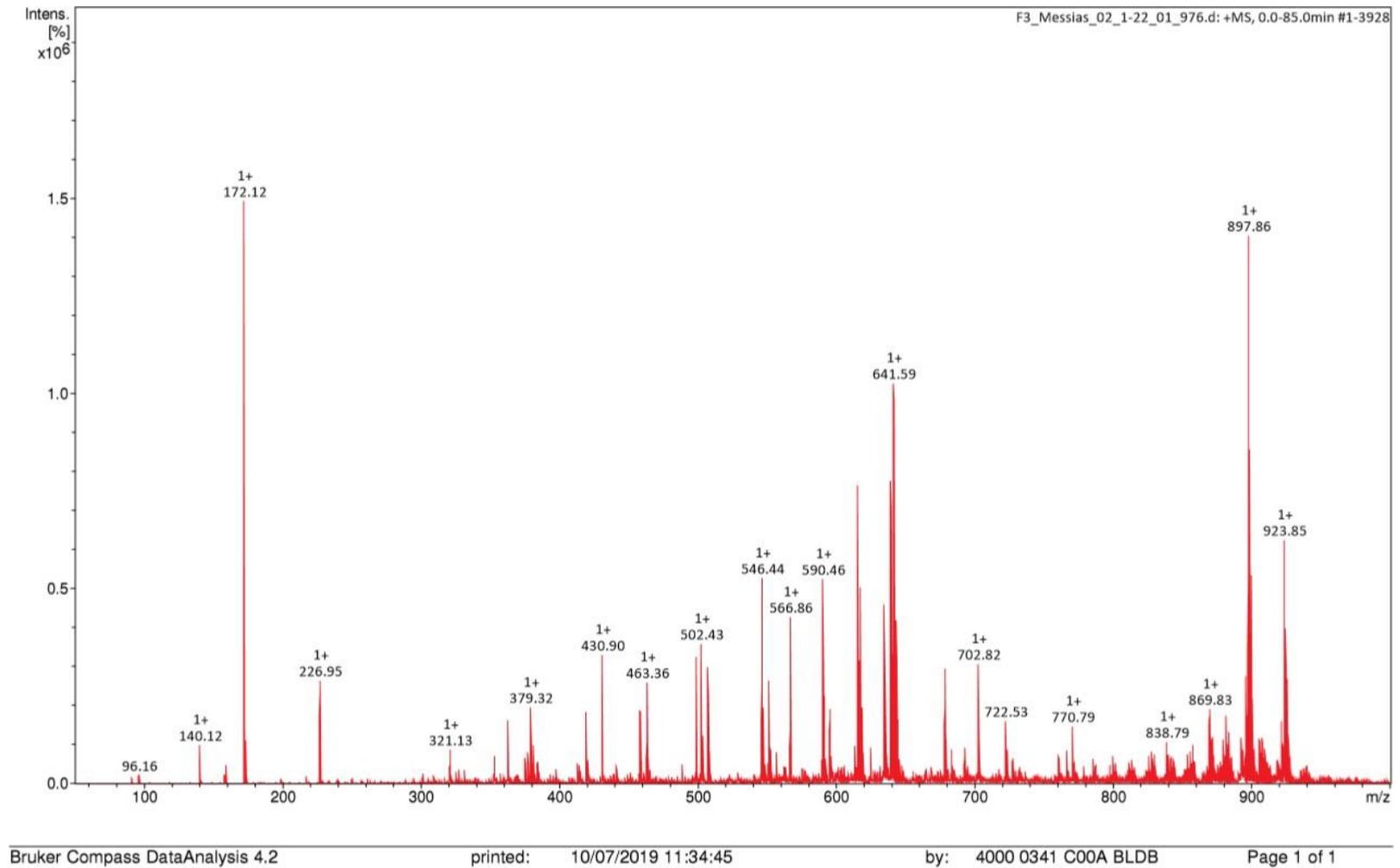
Espectro de Massa com os Picos mais intensos

F1- Caldo Fermentado do fungo *Colletotrichum* sp

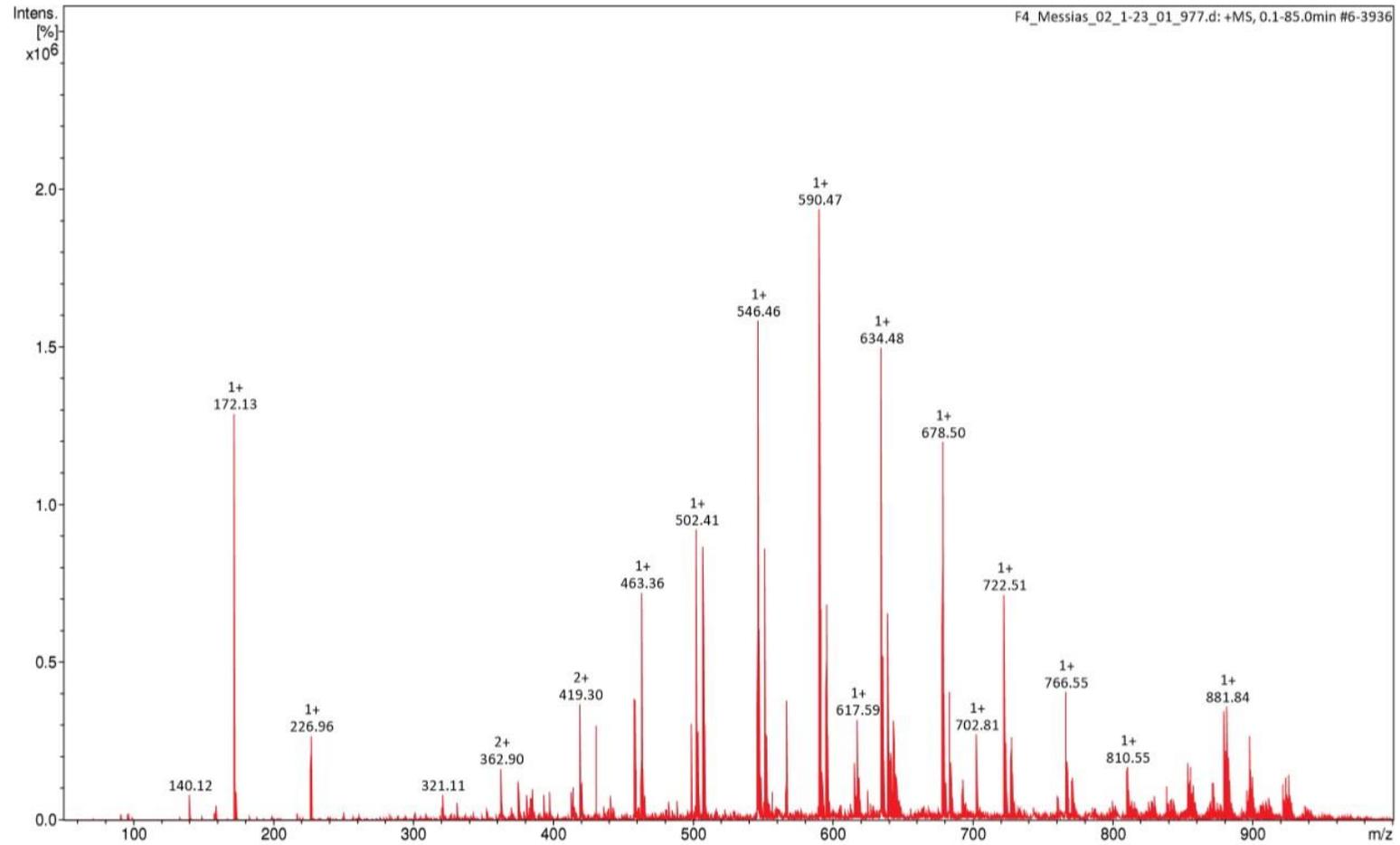
Espectro de Massa com os Picos mais intensos

F2- Micélio do fungo *Colletotrichum sp*

Espectro de Massa com os Picos mais intensos

F3- Caldo Fermentado do fungo *Phyllosticta* sp.

Espectro de Massa com os Picos mais intensos

F4- Micélio do fungo *Phyllosticta sp.*

Bruker Compass DataAnalysis 4.2

printed: 10/07/2019 11:48:11

by: 4000 0341 C00A BLDB

Page 1 of 1

Espectro de Massa com os Picos mais intensos

F- Caldo Fermentado do fungo *Colletotrichum boninense*