**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Estudo químico de duas linhagens de fungos endofíticos com atividade ao
fitopatógeno *Colletotrichum* sp**

Isabela Maria do Nascimento

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2015**

Isabela Maria do Nascimento
Graduada em Ciências Biológicas

Estudo químico de duas linhagens de fungos endofíticos com atividade ao fitopatógeno
***Colletotrichum* sp**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **SIMONE POSSEDENTE DE LIRA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Nascimento, Isabela Maria do

Estudo químico de duas linhagens de fungos endofíticos com atividade ao fitopatógeno
Colletotrichum sp / Isabela Maria do Nascimento. - - versão revisada de acordo com a
resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
101 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Fusarium* 2. *Penicillium* 3. Guaranazeiro 4. Metabólito secundário 5. Compostos
bioativos 6. Antracnose I. Título

CDD 589.2
N244e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

À Deus por mais uma fase concluída.

À professora Dra. Simone Possedente de Lira pela orientação, pela paciência, pelos conselhos, pelo apoio na realização deste trabalho e pela amizade.

A Universidade de São Paulo pela infraestrutura, e CAPES pela bolsa de estudos e FAPESP (processos 2014/15760-3 e 2013/50228-8) pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Microbiologia Agrícola pela oportunidade de realizar este trabalho de mestrado.

Ao Professor Dr. Roberto Gomes de Souza Berlink pela disponibilização de equipamentos.

Ao professor Dr. João Lúcio de Azevedo por ceder as linhagens de fungos endofíticos e ao professor Dr. Nelson Sidnei Massola por ceder as linhagens de fitopatógenos avaliados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. André Rodrigues e à doutoranda Luciana Mecatti Elias pela identificação das linhagens de fungos endofíticos estudadas.

Aos meus pais Jorcena e Vicente, que mesmo longe, sempre me apoiaram nos meus estudos e nos momentos difíceis. Ao meu irmão Marcondes, por me apoiar e estar sempre presente em minha vida em todos os momentos, mesmo que apenas por skype.

Ao meu namorado Bruno, por estar sempre do meu lado me apoiando e me ajudando sempre que possível.

A todos do Departamento de Ciências Exatas-Química/ESALQ, pela amizade durante esse tempo de convivência. Aos professores Marcos, Arquimedes, Wanessa e Simone; aos técnicos Beto, Felipe, Lenita e Janaina; às secretárias Helen e Nádia; aos amigos e colegas de laboratório Marcos (Pipoca), Gislaine, Andrea, Diana, Luciana, Sérgio, Flávio, Jeane, Amanda, Cleiton, Fernanda, Marina e Higor.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais, principalmente à Luciana e ao Flávio pela ajuda na realização das análises. Obrigada pelo ensinamentos e pela troca de conhecimento!

Aos amigos Gabriele, Simone, Andrea e Tiago que tive a oportunidade de conhecer e conviver ao longo dessa jornada. Muito obrigada pela amizade!

"A persistência é o menor caminho do êxito".

Charles Chaplin

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Fungos.....	21
2.2 Fungos Endofíticos.....	21
2.2.1 Ocorrência dos fungos endofíticos em plantas.....	22
2.3 Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos.....	25
2.3.1 Fungos endófitos do gênero <i>Fusarium</i>	27
2.3. Fungos endófitos do gênero <i>Penicillium</i>	33
2.4 Antracnose.....	38
2.4.1 Antracnose na cultura do citrus.....	39
2.4.2 Antracnose na cultura do morango.....	40
2.4.3 Antracnose na cultura do guaraná.....	42
3 OBJETIVOS	45
4 METODOLOGIA.....	47
4.1 Obtenção de material.....	47
4.1.1 Coleta de folhas de guaranazeiros do Amazonas.....	47
4.1.2 Isolamento dos fungos endofíticos.....	47
4.1.2 Linhagens de fungos fitopatogênicos.....	48
4.1.3 Preservação e armazenamento dos fungos.....	48
4.2. Ensaio Biológico por cultivo pareado.....	48
4.3. Ensaio biológicos por difusão em disco.....	48
4.4. Obtenção dos extratos brutos dos fungos endofíticos.....	49
4.5. Separação dos compostos.....	49
4.5.1 Análise química por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	50
4.5.2 Análise química por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada a UV-ELSD-MS.....	50
4.5.3 Análise química por Espectrometria de massas de alta resolução.....	51

4.6. Identificação das linhagens dos fungos endofíticos.....	51
4.7. Tipos de interações entre endofítico-fitopatógeno e índice de antagonismo.....	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
5.1 Cultivo pareado dos fungos endofíticos contra os fungos fitopatogênicos <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Colletotrichum acutatum</i>	53
5.2 Análises morfológicas e moleculares.....	56
5.3 Estudo dos metabólitos secundários do fungo endofítico <i>Fusarium sp</i> (591).....	58
5.3.1 Estudo da fração Fa6.....	59
5.3.1.1 Estudo da fração Fa6A.....	61
5.3.1.2 Estudo da fração Fa6A3.....	62
5.3.2 Estudo dos metabólitos secundários do fungo endofítico <i>Penicillium pinophilum</i> (479)	75
5.3.2.1 Estudo da fração Fd8.....	76
5.3.2.2 Estudo da fração Fd8b.....	77
5.3.2.3 Estudo da fração Fd8b.....	79
5.3.2.4 Estudo da fração Fd8b3.....	80
5.3.2.5 Estudo da fração Fd8b4.....	87
5.3.2.6 Estudo da fração Fd8b5.....	88
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
REFERÊNCIAS.....	93

RESUMO

Estudo químico de duas linhagens de fungos endofíticos com atividade ao fitopatógeno *Colletotrichum* sp

Os fungos endofíticos constituem uma fonte promissora para descoberta de novos compostos ativos de interesse biotecnológico. Nas últimas décadas, os fungos endofíticos têm recebido atenção no meio científico devido aos compostos que produzem, com estruturas únicas e atividades biológicas de relevância em diversas áreas, inclusive agrônômica. Um dos maiores problemas nesta área são as doenças causadas por fungos fitopatogênicos que acometem as culturas. Dentre elas, a antracnose é uma das principais doenças que atinge diversas culturas no Brasil, gerando grandes perdas agrícolas, principalmente as culturas do morango, guaraná e citrus, causadas por fungos do gênero *Colletotrichum*. Esse trabalho teve como objetivo investigar extratos de linhagens dos fungos endofíticos *Fusarium* e *Penicillium*, isolados de folhas do guaranazeiro, com atividade à fitopatógenos do gênero *Colletotrichum* isolados das culturas de guaraná, morango e citrus. Para tanto foi realizado uma triagem inicial de duas linhagens de fungos, dentre nove, por ensaios biológicos *in vitro* de cultivo pareado na atividade antifúngica aos três fitopatógenos. As duas linhagens selecionadas, apresentaram os maiores índices de antagonismo contra os três fitopatógenos e foram identificadas como *Fusarium* sp e *Penicillium pinophilum*. Os extratos e as frações semipurificadas se mostraram com grande potencial na inibição do crescimento do fitopatógeno do gênero *Colletotrichum*, causador da antracnose, que provoca grandes perdas nas culturas de importância econômica do Brasil.

Palavras-chave: *Fusarium*; *Penicillium*; Guaranazeiro; Metabólito secundário; Compostos bioativos; Antracnose

ABSTRACT

Chemical study of two strains of endophytic fungi with activity to phytopathogen *Colletotrichum* sp

Endophytic fungi are a promising source for discovery of new active compounds of biotechnological interest. In recent decades, endophytic fungi have received attention in the scientific community because of compounds they produce, with unique structures and biological activities of relevance in several areas, including agronomy. One of the greatest problems in this is diseases caused by phytopathogenic fungi that affect the crops. Among them, anthracnose is a major disease that affects several crops in Brazil, generating large agricultural losses, especially strawberry crops, guarana and citrus caused by fungi of the genus *Colletotrichum*. This study investigated endophytic fungi strains of *Fusarium* and *Penicillium* extracts isolated from guarana leaves, with activity to phytopathogens of the genus *Colletotrichum* isolated from guarana crops, strawberry and citrus. For that, it was conducted an initial screening of two strains of fungi, among nine, using *in vitro* biological assays of cultivation paired in antifungal activity to the three pathogens. The two strains selected had the highest rates of antagonism against the three phytopathogens and were identified as *Fusarium* sp and *Penicillium pinophilum*. Extracts and semi-purified fractions were shown with great potential to inhibit pathogen growth of the genus *Colletotrichum*, which causes anthracnose and, thus, great losses to crops of economic importance in Brazil.

Keywords: *Fusarium*; *Penicillium*; Guaranazeiro; Secondary metabolite; Bioactive compounds; Anthracnose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos de interações endófito-planta que ocorre ao longo de um continuum de interações de acordo com o modo de transmissão e forma de infecção.....	23
Figura 2 - Medicamento Paclitaxel e seu composto ativo taxol, isolado primeiramente da planta <i>Taxus brevifolia</i> , depois do fungo endofítico <i>Taxomyces andreanea</i> e atualmente de outros fungos endofíticos.....	26
Figura 3 - Estrutura química do composto Hipericina.....	27
Figura 4 - Estrutura química das Fumonisinás B ₁ (1), B ₂ (2) e B ₃ (3).....	30
Figura 5 - Estrutura química do Ácido Fusárico.....	30
Figura 6 - Estrutura química da Fusaristatina A (1) e B (2).....	31
Figura 7 - Estrutura química das Eniatinas A, A ₁ , B e B ₁	32
Figura 8 - Estrutura química dos compostos Desoxinivalenol e Diacetoxiscirpenol pertencentes à classe do Tricotecenos.....	33
Figura 9 - Estrutura química da Penicilina.....	34
Figura 10 - Estruturas químicas das substâncias produzidas por fungos do gênero <i>Penicillium</i>	35
Figura 11 - Estruturas químicas das substâncias produzidas pelos fungos <i>Penicillium crustosum</i> e <i>Penicillium brasilianum</i>	36
Figura 12 - Estruturas químicas das substâncias produzidas pelo fungo <i>Penicillium</i> sp.....	37
Figura 13 - Estruturas químicas dos compostos produzidos pelo fungo <i>Penicillium</i> sp.....	37
Figura 14 - Estruturas químicas dos compostos produzidos pelo fungo <i>Penicillium</i> sp.....	37
Figura 15 - Sintoma causado pelo fungo <i>Colletotrichum acutatum</i> em citrus.....	40
Figura 16 - Sintoma causado pelo fungo <i>Colletotrichum acutatum</i> em morango.....	41
Figura 17 - Sintoma causado pelo fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> no guaranazeiro e consequentemente no fruto.....	43
Figura 18 - Fitopatógenos L1: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (isolado do guaranazeiro), M1R1: <i>Colletotrichum acutatum</i> (isolado do morango), <i>Colletotrichum acutatum</i> (isolado do citrus).....	53
Figura 19 - Esquema representativo dos tipos de interação endofítico-patógeno. A: inibição mútua entre os organismos ocorrendo contato micelial; B: inibição mútua entre os organismos sem contato micelial e C: o endofítico pode crescer sobre o patógeno sem inibição inicial.....	54

- Figura 20 - Fungos *Penicillium pinophilum* e *Fusarium* sp em cultivo em placas de Petri e suas estruturas para identificação morfológica.....57
- Figura 21 - Bioensaio in vitro das frações obtidas da linhagem do endofítico *Fusarium* sp. Fa: fração acetato de etila; C1: controle com o fitopatógeno; C2: controle com o solvente MeOH; Fa1 a Fa11: frações obtidas na separação em coluna de sílica.....58
- Figura 22 - Bioensaio das frações após purificação em coluna pré-empacotada de sílica. C: controle com fitopatógeno; Fa6A à Fa6H: frações obtidas na separação em coluna.....60
- Figura 23 - Bioensaio das frações obtidas da fração Fa6A. C: controle com o fitopatógeno; Fa6A1 à Fa6A4: frações obtidas na separação em coluna.....61
- Figura 24 - Bioensaio das frações após purificação em coluna pré-empacotada de sílica. C: controle com fitopatógeno *C. acutatum*. Fa6A3b1 à Fa6A3b7: frações obtidas na separação em coluna.....63
- Figura 25 - Cromatograma da fração Fa6A4 analisada e separada no HPLC. Os números indicam as frações coletas nos respectivos tempos de retenção.....64
- Figura 26 - Cromatograma da fração Fa6A4'e após separação no HPLC, visualizado em diferentes absorções no UV.....65
- Figura 27 - Cromatograma da fração Fa6A4e mostrando a presença de 2 compostos.....66
- Figura 28 - Espectro da amostra mostrando o composto do pico 1. A: espectro de absorção do pico 1 no UV; B: espectro de massa com a massa do composto protonada com hidrogênio e sódio.....67
- Figura 29 - Espectro da amostra mostrando o composto do pico 2. A: espectro de absorção do pico 1 no UV; B: espectro de massa com a massa do composto protonada com hidrogênio e sódio.....69
- Figura 30 - Full scan da fração Fa6A4' analisada por espectrometria.....70
- Figura 31 - Bioensaio de atividade antifúngica dos compostos isolados da fração Fa6A4' de *Fusarium* sp contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*.....74
- Figura 32 - Bioensaio das frações após purificação em coluna pré-empacotada de sílica. C: controle com fitopatógeno *C. gloeosporioides*; Fc1 à F4: frações obtidas na separação em coluna.....75

Figura 33 - Bioensaio das frações após purificação em coluna pré-empacotada de sílica. C: controle com fitopatígeno; Fd1 à Fd10: frações obtidas na separação em coluna.....	76
Figura 34 - Bioensaio das frações após purificação em coluna pré-empacotada de sílica. C: controle com fitopatígeno C. gloesporioides; Fd8A à Fd8G: frações obtidas na separação em coluna	78
Figura 35 - Cromatograma da fração Fd8B após análise no HPLC. Os números indicam as frações coletadas nos respectivos tempos de retenção.....	79
Figura 36 - Bioensaio das frações após separação em HPLC. C: controle com fitopatígeno C. <i>gloeosporioides</i> ; Fd8B1 à Fd8B10: frações obtidas após a separação.....	80
Figura 37 - Cromatograma da fração Fd8B3 após separação no HPLC.	81
Figura 38 - Cromatograma da fração Fd8B3, em destaque o pico do composto.....	81
Figura 39 - Espectro da amostra mostrando o composto. A: espectro de absorção do composto no UV; B: espectro de massa com a massa do composto protonada com hidrogênio e sódio.....	83
Figura 40 - Espectro de alta resolução da Fração Fd8B3 evidenciando o valor do composto m/z 301,1413 $[M+Na]^+$	84
Figura 41 - Síntese do composto 9-Deoxycurvularin a partir do composto Curvularina.....	86
Figura 42 - Bioensaio da fração Fd8B3 contra o fitopatígeno C. <i>gloeosporioides</i>	86
Figura 43 - Cromatograma da fração Fd8B4 após separação no HPLC.....	87
Figura 44 - Bioensaio in vitro de atividade antifúngica da fração Fd8B4 contra o fitopatígeno C. <i>gloeosporioides</i>	88
Figura 45 - Cromatograma da fração Fd8B5 após separação no HPLC.....	89
Figura 46 - Bioensaio in vitro de atividade antifúngica da fração Fd8B5 contra o fitopatígeno C. <i>gloeosporioides</i>	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de interação entre endofítico-fitopatógeno e Índice de antagonismo.....	55
Tabela 2 - Estruturas químicas dos compostos com peso molecular 292 e demais informações.....	71
Tabela 3 - Estruturas químicas dos compostos com peso molecular 306 e demais informações.....	73
Tabela 4 - Estruturas químicas dos compostos com peso molecular 278 e demais informações.....	85

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos eucariontes, amplamente distribuídos na natureza, vivendo como saprófitos, parasitas, em simbiose ou mutualismo com outros organismos, inclusive plantas. Neste caso, são conhecidos por fungos endofíticos, os que habitam o interior das plantas sem causar danos aparentes. Estes fungos são responsáveis por aumentar a biomassa vegetal, tolerância da sua hospedeira à seca, diminuir a herbivoria, dentre outros benefícios mútuos. Atualmente tem-se isolado muitos fungos endofíticos de espécies vegetais que possuem valor econômico e importância biotecnológica.

A grande maioria dos fungos endofíticos produzem compostos biologicamente ativos, e possuem estruturas químicas únicas, o que representa um grande reservatório com potencial para aplicação em diversas áreas.

Nas últimas décadas, os fungos do gênero *Fusarium* têm recebido mais atenção no meio científico devido aos compostos que produzem. Estes compostos podem inibir o crescimento de fitopatógenos que provocam doenças em diversas culturas de importância econômica. Fungos do gênero *Penicillium* também são capazes de produzir uma vasta gama de metabolitos, sendo esta produção superior a outros gêneros de microrganismos. Ambos os gêneros, *Penicillium* e *Fusarium*, são frequentemente encontrados como endófitos em plantas, e por habitarem um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por fitopatógenos podem facilmente controlá-los por meio de competição por nutrientes, produção de substâncias antagônicas, parasitando o patógeno ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência.

Devido ao potencial desses microrganismos em produzirem novas substâncias bioativas e sua estreita relação com suas plantas hospedeiras, torna-se promissor o estudo de compostos produzidos por fungos endofíticos ativos contra fitopatógenos. Dentre as diversas doenças causadas por fitopatógenos que acometem as culturas, a antracnose está como uma das principais, que no Brasil gera grandes perdas agrícolas.

Diante do exposto, fica evidenciada a importância de estudos de bioprospecção com fungos endofíticos com propriedades antifúngicas a fitopatógenos. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo investigar extratos de linhagens dos fungos endofíticos *Fusarium* e *Penicillium*, isolados do guaranazeiro com atividade à fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos

Os fungos são organismos eucariontes, unicelulares (leveduriformes) ou multicelulares (filamentosos), haplóides, com parede celular contendo quitina e α -glucano. Tiveram seu grupo reconhecido como um reino (Fungi) a partir da descrição de cinco reinos por Whittaker em 1969, sendo agrupados com base na morfologia e no modo de nutrição. Em 1990, Carl Woese propôs o agrupamento dos cinco reinos estabelecidos por Whittaker em três domínios: Archaea, Bacteria e Eukaria, onde o reino Fungi faz parte do domínio Eukaria, que reúne todos os eucariotos. Eles estão divididos em sete filos (Microsporidia, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Glomeromycota, Ascomycota, e Basidiomycota).

A taxonomia dos fungos era baseada em caracteres citológicos e morfológicos, porém, com o desenvolvimento de técnicas bioquímicas e moleculares, novos caracteres foram adicionados para auxiliar na identificação das espécies fúngicas, como o uso de técnicas baseadas em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), 'Random Amplified Polymorphic DNA' (RAPD), 'Restriction Fragment Length Polymorphism' (RFLP), 'Amplified Fragment Length Polymorphism' (AFLP), sequenciamento de DNA e isoenzimas (MOLINARO et al., 2009).

Os fungos são seres cosmopolitas, amplamente distribuídos na natureza, heterotróficos vivendo como saprófitos, parasitas, em simbiose ou mutualismo com outros organismos. Eles se reproduzem de forma sexuada ou assexuada sendo divididos em três grupos: holomorfo, que realiza as reproduções, sexuada e assexuada no ciclo de vida; anamorfo, que realiza somente a reprodução assexuada no ciclo de vida; e teleomorfo, que realiza somente a reprodução sexuada no ciclo de vida.

Os fungos podem apresentar a forma anamórfica ou telemórfica, ou as duas formas em seu ciclo de vida. Alguns fungos fitopatogênicos podem apresentar as duas formas e causar a doença em uma ou outra forma. Por exemplo, o fungo *Glomerella cingulata*, agente causal da antracnose no maracujá, tem como forma anamórfica *Colletotrichum gloeosporioides* (MEDEIROS et al., 2012), já o fungo *Colletotrichum gossypii*, agente causal da antracnose do algodoeiro, tem como forma telemórfica *Glomerella gossypii* (ROCA et al., 2003).

2.2 Fungos Endofíticos

O termo endófito foi inicialmente proposto por De Bary (1866) e pode ser definido como micro-organismos que habitam o interior das plantas sem causar dano aparente (SAIKKONEN et al., 1998). Ou, segundo Stone e colaboradores (2000) são micro-organismos que habitam vários tecidos e órgãos de plantas terrestres e aquáticas sem causar sintomas aparentes.

Segundo Rodrigues e colaboradores (2008), os fungos endofíticos podem ser classificados em quatro classes, de acordo com o papel que desempenha e o local do qual foi isolado do material vegetal. Na classe 1, os fungos endofíticos aumentam a biomassa vegetal, contribuem para a tolerância à seca e são capazes de produzir substâncias químicas que são tóxicas para os animais, diminuindo a herbivoria. Na classe 2, os fungos endofíticos são capazes de crescer em tecidos que estão acima e abaixo do solo, podendo conferir tolerância específica para hospedeira ao stress do habitat, como alteração de pH, temperatura e salinidade. Na classe 3, os fungos endofíticos diferenciados com base na sua ocorrência principalmente ou exclusivamente em tecidos acima do solo. Essa classe inclui os fungos endofíticos associados com folhas de árvores tropicais, tais como plantas não vasculares, plantas vasculares sem sementes, coníferas e angiospermas lenhosas e herbáceas em biomas, também são encontrados em flores e frutos, assim como em madeira e casca interna das árvores. E na classe 4, pouco é conhecido sobre o grupo de fungos que constituem essa classe.

2.2.1 Ocorrência dos fungos endofíticos em plantas

Atualmente tem-se isolado muitos fungos endofíticos de espécies vegetais que possuem valor econômico e importância biotecnológica. Em *Palicourea longiflora* (Rubiaceae) (café-bravo), por exemplo, foram isoladas 512 espécies de fungos endofíticos cultiváveis (SOUZA et al., 2004), já em *Theobroma cacao* (Malvaceae) (cacau), cerca de 340 (ARNOLD et al., 2003), 130 em *Bauhinia brevipes* (Fabaceae) (unha-de-boi) (HILARIANO et al., 2009) e 60 em *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) (alecrim do campo) (OKI et al., 2009).

Alguns fatores interferem qualitativa e quantitativamente na biodiversidade de fungos endofíticos cultiváveis. Destacam-se a idade da planta, o tecido ou órgão da planta (SANTOS, 2011).

Os fungos endofíticos são encontrados em plantas hepáticas, antóceros, musgos, pteridófitas e plantas com sementes da tundra ártica aos trópicos (HUANG et al.,

2007). A colonização de tecidos vegetais por fungos endofíticos ocorre através de sua penetração através de lesões radiculares que são formadas a partir da abrasão das raízes contra o solo, aberturas naturais, tais como hidatódios e estômatos, aberturas artificiais feitas por animais ou fatores abióticos. Também existe a forma ativa de penetração nos vegetais na qual o micro-organismo produz enzimas e/ou estruturas que facilitam a entrada no hospedeiro (AZEVEDO, 1998).

A transmissão dos fungos endofíticos ocorre de duas formas, vertical ou horizontal (CARROLL, 1988). Na transmissão vertical o endófito é transmitido através de propágulos vegetativos ou via semente (CLAY, 2002). Nessa, a relação endófito-hospedeiro é mais próxima de ser mutualística, devido à relação já existente entre o fungo e a planta e a colonização ser do tipo sistêmica (SAIKKONEN et al., 1998). Já na transmissão horizontal os endófitos são transmitidos por meio de esporos, sexuados ou assexuados, transportados pelo ar, água ou insetos. Nesse tipo de transmissão a relação endófito-hospedeiro é mais próxima da antagonista ou neutra e a colonização é do tipo não sistêmica (Fig.1) (SAIKKONEN et al., 1998).

Figura 1: Tipos de interações endófito-planta que ocorre ao longo de um continuum de interações de acordo com o modo de transmissão e forma de infecção.

Fonte: SAIKKONEN et al., 1998

Após a colonização do tecido da planta hospedeira pelo endófito, a relação endofítico-hospedeiro se estabelece. Nessa relação os fungos endofíticos recebem nutrientes orgânicos e abrigo permitindo a sobrevivência da espécie, enquanto que as plantas

hospedeiras ficam mais vigorosas, resistentes à seca e a herbívoros, nematóides e patógenos de plantas infectadas (MÜLLER & KRAUSS, 2005).

Com o estabelecimento do fungo endofítico na planta hospedeira, eles podem assumir um estado latente (inativo) durante toda sua vida ou por um determinado período, ou seja, até que as condições bióticas e abióticas do ambiente favoreçam o desenvolvimento do micro-organismo para que ele atue de forma mutualística ou antagônica (GAO et al., 2010). Os fungos fitopatogênicos podem se tornar fungos endofíticos em determinado período de sua vida através de alterações mutagênicas para crescerem como endofíticos não patogênicos (RODRIGUES, 1993). Como também, os fungos que interagem de forma mutualística podem ser tornar patogênicos em momentos de stress do hospedeiro no ambiente (CLAY et al., 1991).

Os micro-organismos endofíticos habitam um nicho ecológico semelhante aquele ocupado por fitopatógenos, podendo assim controlá-los por meio de competição por nutrientes, produção de substâncias antagônicas, parasitando o patógeno ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência (CHAPLA et al., 2013). Investigações demonstram que *Xylaria* sp., um fungo endofítico frequentemente encontrado em várias espécies vegetais (como *Baccharis dracunculifolia*, *Rosa* sp., *Paulicourea longiflora*, dentre outras), apresentam atividade inibitória contra alguns micro-organismos, incluindo *Penicilium expansum* (bolor azul em citros) (COSTA & VEIGA, 1996), e *Aspergillus niger* (causador da podridão em tronco de sisal) (SANTOS et al., 2010). Outro fungo endofítico é o *Gliocladium* sp., isolado da planta *Eucryphia cordifolia* (Cunoniaceae) produz uma mistura de compostos orgânicos voláteis que auxiliam no controle de fungos fitopatogênicos como *Pythium ultimum* (causador da podridão negra em orquídeas) e *Verticillium dahliae* (conhecida como “murcha-do-verticilio”) (MICHEREFF et al., 2005).

Os fungos endofíticos podem contribuir para a defesa da planta hospedeira contra organismos fitopatogênicos através do controle das funções vegetais (GIMENEZ et al., 2007). O aumento do crescimento da planta pode ser influenciado por compostos como fitohormônios produzidos por fungos endofíticos. O hiperparasitismo também é uma forma dos endófitos fornecerem proteção para a planta hospedeira, no qual o patógeno é diretamente atacado por um endófito específico que mata seus propágulos (TRIPATHI et al., 2008). Os fungos endofíticos parasitam ao redor das hifas dos patógenos por meios como torção, penetrando as hifas dos patógenos e secretando enzimas para decompor a parede celular dos patógenos. Alguns endófitos podem apresentar comportamento predatório em condições limitadas em nutrientes, levando a supressão de fitopatógenos (GAO et al., 2010).

Estudos têm demonstrado que micro-organismos endofíticos podem contribuir para a redução do ataque de insetos herbívoros nas plantas hospedeiras (OKI et al., 2009), ser potenciais promotores de crescimento de plantas, atuar como agentes no biocontrole de patogenicias, aumentar a tolerância de plantas à seca e a condições de stress e promover a fixação não simbiótica do nitrogênio atmosférico (AZEVEDO, 1998). Trabalhos recentes têm evidenciado, também, que os endófitos podem ser utilizados como vetores para introdução de características de interesse biotecnológico na planta (SANTOS, 2011).

Devido ao potencial desses micro-organismos em produzirem novas substâncias bioativas e sua estreita relação com suas plantas hospedeiras, torna-se relevante o estudo de compostos isolados produzidos por fungos endofíticos.

2.3 Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos

Os produtos naturais têm sido explorados para uso humano por milhares de anos e as plantas têm sido a principal fonte de compostos utilizados pela medicina. Estes produtos naturais são compostos presentes como metabolitos secundários de micro-organismos, plantas ou animais (STROBEL & DAISY, 2003). Eles são uma fonte contínua de novos metabólitos bioativos de importância médica. Os produtos naturais microbianos representam um grande e inexplorado recurso de estruturas químicas únicas que vêm sendo otimizados pela (co-) evolução e provavelmente desempenham um importante papel para a comunicação ou a adaptação como uma resposta ao habitat e mudanças ambientais (GUNATILAKA, 2006). A especificidade do hospedeiro requer uma adaptação entre a planta hospedeira e sua parceira fúngica, sugerindo uma influência mútua decorrente de uma antiga convivência e co-evolução (ALY et al., 2011).

Aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem compostos biologicamente ativos, podendo ser utilizados como antibióticos, fungicidas e herbicidas, pois a penetração ativa do micro-organismo endofítico induz a planta hospedeira a sintetizar compostos que atuam sobre o patógeno, alterando a morfofisiologia vegetal. Essas alterações morfológicas e fisiológicas podem incluir desde o aumento da espessura da parede celular por deposição de lignina e glucanas, até o aumento da espessura da cutícula, bem como a síntese de fitoalexinas, o que dificulta a entrada e o desenvolvimento do patógeno na planta hospedeira (POLLI et al., 2012).

Vários produtos naturais produzidos por fungos endofíticos possuem estruturas únicas e bioativas, o que representa um grande reservatório, oferecendo maior potencial para a exploração em áreas agrícolas e industriais (KAUL et al., 2012).

Sabe-se que um único endófito pode ser capaz de produzir vários metabólitos bioativos. Alguns estudos também destacam que uma similaridade de substâncias bioativas produzidas entre o(s) fungo(s) endofítico(s) e sua planta hospedeira. Como é o caso do taxol (Fig.2) o qual teve sua produção demonstrada em 1993 pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanea*, encontrado no interior da planta *Taxus brevifolia* (SANTOS et al., 2011). O paclitaxel é um importante fármaco anticancerígeno que se liga a tubulina polimerizada promovendo assim a formação de microtúbulos e estabilização de microtúbulos contra a dissociação, o que conduz a inibição da mitose. Trabalhos posteriores evidenciam que diferentes espécies de fungos endofíticos produzem taxol, como por exemplo, *Pestalotiopsis microspora*, isolado de *Taxus wallachiana* (STROBEL et al., 1996), *Tubercularia* sp., isolado de *Taxus mairei* (WANG et al., 2000), *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de *Justicia gendarussa*, *Pestalotiopsis terminaliae*, isolado de *Terminalia arjuna* (GANGADEVI& MUTHUMARY, 2009; SANTOS et al.; 2011), *Gliocladium* sp., isolado de *Taxus baccata* (SREEKANTH et al., 2011), entre outras espécies.

Figura 2: Medicamento Paclitaxel e seu composto ativo taxol, isolado primeiramente da planta *Taxus brevifolia*, depois do fungo endofítico *Taxomyces andreanea* e atualmente de outros fungos endofíticos.

A produção de compostos comuns produzidos por endofíticos e plantas não é restringido a paclitaxel, mas estende-se também a outros produtos naturais importantes, como a camptotecina (AMNA et al., 2006) e podofilotoxina (KOUR et al., 2008) utilizados como fármacos, além de outros. Os fungos, além de serem fontes alternativas de metabólitos secundários, também produzidos por plantas, podem acumular uma riqueza de outros produtos naturais biologicamente ativos e estruturalmente diversos que são precedentes na natureza (VERMA et al., 2009) e são importantes para a descoberta de medicamentos ou compostos de interesse para a agricultura (MITCHELL et al., 2008). Portanto, os fungos

endofíticos representam um importante e largamente inexplorado reservatório de estruturas químicas únicas que foram modificados através da evolução e acredita-se estar envolvido na proteção da planta hospedeira e comunicação (ALY et al., 2010).

Outros exemplos de metabólitos secundários de plantas detectados em fungos endofíticos incluem compostos como hipericina (Fig.3), constituintes de Erva de São João (*Hypericum perforatum*). Espécies de *Hypericum* têm sido usadas por séculos contra formas leves de depressão e ansiedade. Um fungo endófito de *H. perforatum* foi encontrado produzindo hipericina em cultura (ALY et al., 2010).

Figura 3: Estrutura química do composto Hipericina.

Uma das vantagens de trabalhar com produtos naturais isolados de fungos endofíticos é a facilidade de seu cultivo em laboratório e a rapidez com que crescem em comparação as espécies animais e vegetais.

2.3.1 Fungos endófitos do gênero *Fusarium*

Nas últimas décadas, os fungos do gênero *Fusarium* têm recebido mais atenção no meio científico devido aos compostos que produzem, estes compostos podem ser benéficos, inibindo o crescimento de fitopatógenos que provocam doenças em culturas econômicas, ou podem ser maléficos, causando doenças em animais e inclusive em humanos.

As espécies do gênero *Fusarium* são amplamente distribuídas no solo, em partes aéreas das plantas, restos de plantas e outros substratos orgânicos (SHAMA et al., 1998). São encontrados desde regiões tropicais até regiões árticas. As espécies deste fungo são na maioria das vezes considerados fungos de solo devido sua abundância neste local e em associação com as raízes de plantas de forma parasítica ou saprofítica. Também podem ser encontrados como fungos endofíticos. A distribuição em diversos ambientes desse gênero se deve a capacidade de se desenvolver em diferentes tipos de substratos e a seus mecanismos

eficientes de dispersão (SCHROTH et al., 1962). Existem espécies patogênicas e não patogênicas, as espécies não patogênicas podem colonizar o córtex das raízes de plantas sem causar sintomas de doenças, sobreviver em tecido vivo e exercer o antagonismo contra as formas patogênicas no solo ou na planta hospedeira (RODRIGUES et al, 2005).

O gênero *Fusarium* foi descrito por Link em 1809, pertence à classe Ascomycete. Existem várias formas de classificação das espécies do gênero *Fusarium*, mas apenas duas formas são as mais utilizadas, a classificação de Wollenweber e Reinking e de Snyder and Hansen. Wollenweber e Reinking publicaram “*Die Fusarien*”, na qual os pesquisadores diminuíram o número de espécies para 142, o número de variedades e formas agrupando este número em 16 seções. Eles começaram com cerca de mil nomes de espécies de *Fusarium* e organizaram em 16 seções, sendo elas Eupionnotes, Macroconia, Spicarioides, Submicrocera, Pseudomicrocera, Arachnites, Sporotrichiella, Roseum, Arthrosporiella, Gibbosum, Discolor, Lateritium, Liseola, Elegans, Martiella, e Ventricosum. Cada seção continha 65 espécies, 55 variedades e 22 formas, listaram, também, 77 sinônimos para *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. e 133 sinônimos para *F. lateritium* Nees e sua forma telemorfica (WOLLENWEBER & REINKING, 1935). Foram utilizadas características distintas para separar as espécies, variedades e formas, como a presença ou ausência de microconídio, a forma do microconídio, a presença ou ausência de clamidosporos, a localização e a forma do clamidosporo e a forma das células basais ou do ápice dos macroconídeos.

No entanto, a forma de desenvolvimento dos fungos é muito complexa, sendo difícil usar essa classificação para construir uma chave de classificação prática. Os critérios utilizados para classificação são estáveis podendo ser alterados devido a fatores bióticos. Além disso, outros dois problemas podem ser responsáveis pela complexidade do sistema, a variação nas culturas ou a ocorrência de mutação pode não ter sido reconhecidas por estes autores e pode ter ocorrido o fato de algumas espécies terem sido denominadas com base em ou duas culturas, sendo necessário um grande número de culturas do mesmo organismo (NELSON et al., 1994).

Já na classificação de Snyder e Hansen foram criadas nove espécies além das espécies contidas nas 16 seções criadas por Wollenweber e Reinking. Eles se basearam na morfologia dos macroconídeos e no estudo da natureza e variabilidade das espécies de *Fusarium*. Foi realizada uma extensa análise dos conídeos das culturas dos fungos sob condições idênticas de substratos e condições ambientais, levando o estudo a mostrar uma grande variabilidade nas estruturas (SNYDER & HANSEN, 1954).

Estes dois sistemas de classificação possuem diferentes finalidades e se completam, mas um não substitui o outro. Sendo assim o gênero *Fusarium* é dividido em seções. A seção é usada para gêneros com grandes números de espécies com características morfológicas semelhantes. Em algumas seções, como Elegans e Spicarioides existe somente uma espécie, já em outras seções, como Gibbosum e Discolor podem existir de cinco a dez espécies (NELSON et al., 1994).

Além das técnicas morfológicas, as técnicas de biologia molecular como RAPD, RFLP, rDNA, seqüências de ITS1, ITS2 e gene histona têm possibilitado diferenciar os isolados do fungo *Fusarium*, principalmente no complexo de *Gibberella fujikuroi*, dos isolados de *F. subglutinans* (STEENKAMP et al., 1999). A distinção entre algumas espécies segregadas de *F. subglutinans* requer testes de patogenicidade ou de compatibilidade sexual com os grupos conhecidos.

No Brasil as espécies de *Fusarium* identificadas entre 1993 e 1996 são principalmente de importância econômica. Estes fungos são conhecidos pela produção de substâncias que prejudicam plantas, animais e humanos. A preocupação com esses compostos levaram a muitas pesquisas relacionadas à produção de metabólitos secundários por fungos deste gênero (REIS et al., 2005).

Uma espécie de fungo pode produzir um ou mais compostos, podendo um composto ser produzido por diferentes espécies de fungos (HUSSEIN; BRASSEL, 2001). As espécies de *Fusarium* sintetizam diversos compostos, sendo os mais importantes referentes à saúde animal e produtividade os tricotecenos, zearalenona e fumonisinas (D'MELLO; PLACINTA; MACDONALD, 1999). Dentre outros metabólitos produzidos por fungos endofíticos deste gênero, encontra-se deoxinivalenol, fusarina C, antibiótico Y, beauvericina, clamidosporina, aurofusarim e fusarelina (SORENSEN, et al., 2014), sendo que as fusarelinas variam de A-H (SORENSEN et al 2013).

Destes metabólitos, as fumonisinas são compostos secundários produzidos por *F. verticillioides* e *F. proliferatum* (CREPPY, 2002). Foram descobertas em 1988 por meio de seu isolamento de culturas de *F. verticillioides* MRC 826 (GELDERBLUM et al., 1988). As fumonisinas são estruturalmente parecidas com os esfingolipídeos, uma classe de lipídeos de membrana que apresentam importante papel na regulação celular. As fumonisinas inibem a enzima ceramida sintetase, uma enzima chave na biossíntese dos esfingolipídeos, levando ao acúmulo intracelular do precursor esfinganina (Sa) e diminuição da esfingosina (So) (TURNER; NIKIEMA; WILD, 1999). Essas substâncias também atuam nos sítios de regulação celular, independente do bloqueio do metabolismo dos esfingolipídeos, alterando a

proliferação e a comunicação celular, adesão, apoptose, indução de estresse oxidativo e modulação de expressão gênica (MOBIO et al., 2000). Já foram identificados quinze análogos de fumonisinas, sendo as quatro principais categorias, denominadas fumonisina A, B (Fig. 4), C e P, que são compostos por FA1, FA2, FA3, FAK1; FB1, FB2, FB3, FB4; FC1, FC2, FC3, FC4; FP1, FP2 e FP3 (MUSSER; PLATTNER, 1997).

Figura 4: Estrutura química das Fumonisinias B₁ (1), B₂ (2) e B₃ (3)

Fonte: MUSSER; PLATTNER, 1997

Os estudos sobre a toxicidade das fumonisinas estão dirigidos para FB1, o principal análogo produzido por *F. verticillioides* tanto em meios de cultura quanto em milho e produtos derivados naturalmente contaminados (UENO et al., 1993; MINAMI et al., 2004).

Um outro metabólito, o ácido fusárico (Fig. 5) foi isolado primeiramente de culturas de *Fusarium heterosporum* Nees por Yabuta (1937) e foi um dos primeiros metabólitos secundários de fungos responsável pelos sintomas da murcha do tomate causada pelo fungo *Fusarium oxysporum*.

Figura 5: Estrutura química do Ácido Fusárico

Fonte: <http://www.google.st/patents/US20130089926>

Esse composto apresenta propriedades farmacológicas importantes, e a sua toxicidade nos animais e as doenças nas plantas pode estar relacionada a interações sinérgicas com outros compostos tóxicos que ocorrem naturalmente no solo ou nas plantas (BACON et al., 2004). Dentre os fungos que produzem o ácido fusárico está o fungo *Fusarium*

verticillioides (Sacc.) Nirenberg (sinônimo *Fusarium moniliforme* Sheldon, teleomorfo *Gibberella moniliformis* Wineland). Estudos recentes tem mostrado que cepas de *F. oxysporum* que produzem ácido fusárico podem alterar o controle de atividade de cepas de *Pseudomonas fluorescens* através da repressão da expressão de genes que torna a bactéria inativa (NOTZ et al. 2002).

Pesquisas mostram que baixas concentrações de zinco reduz a produção de ácido fusárico e a biomassa total do fungo *F. oxysporum*. Além disso, o cobre teve um efeito semelhante ao de zinco (Duffyand Dèfago 1997). Foi estabelecido por Malini (1966) que este composto é formado por quelatos de metais pesado na ordem: cobalto = ferro > cobre, níquel > zinco > manganês. Assim, vários metais pesado no solo podem afetar a toxicidade do ácido fusárico produzido pelo fungo. (BACON e al., 2004).

Pesquisadores em busca de metabólitos secundários ativos produzidos pelo fungo endofítico *Fusarium equiseti* SF- 3-17 isolado da planta *Ageratum conyzoides* L., viram que seu extrato bruto apresentava atividade antifúngica contra *Aspergillus clavatus* atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*. Eles encontraram nesse extrato a substância fusaequisina A que é ativa contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, leveduras e alguns fungos. Esse composto apresentou atividade moderada contra *Staphylococcus aureus* NBRC 13276 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Esse endofítico também produz os compostos deoxineofusapirona e neofusapirona (SHIONO et al., 2013).

Já os lipopeptídeos cíclicos, Fusaristatina A e B (Fig. 6) foram isolados do fungo endofítico *Fusarium* sp., isolado da planta *Maackia chinensis*.

Figura 6: Estrutura química da Fusaristatina A (1) e B (2).
Fonte: SHIONO et al., 2007.

Esses compostos mostraram a atividade inibitória das topoisomerasas I e II, sem os complexos clivados, sendo um inibidor diferente dos já existentes (SHIONO et al., 2007).

Um estudo realizado por Tayung e colaboradores (2011) mostrou que os metabólitos hidrocarbonetos 1-tetradeceno, 8-octadecanona, 8-pentadecanona, octilciclohexano e 10-nonadecanona isolados do fungo endofítico *F. solani* isolado da planta *Taxus baccata* apresentou atividade antimicrobiana contra *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *C. tropicalis*.

Os metabólitos secundários Eniatinas (Fig.7) foram isolados primeiramente do fungo *Fusarium orthoceras*. São peptídeos que variam de acordo com a sequência de aminoácidos que apresentam, por exemplo, Eniatina B possui três N-metil-L-valina e três hidroxi-D-isovalericina, já o Eniatina B₁ contém 1 cadeia de N-metil-L-isoleucina, duas de N-metil-L-valina e três de hidroxi-D-isovalericina. Esses metabólitos possuem atividade contra insetos, são tóxicos para células cancerígenas, induzindo a apoptose dessas células (WATJEN et al., 2009).

Figura 7: Estrutura química dos Eniatina A, A₁, B e B₁

Fonte: WATJEN et al., 2009

Outros compostos pertencentes à classe dos tricotecenos (Fig. 8) são produzidos pelos fungos do gênero *Fusarium sp.*, e os principais compostos produzidos são: toxina T-2, deoxinivalenol e diacetoxiscirpenol (SANTURIO, 2000). Esses compostos atuam na defesa da planta contra herbivoria (VERDI, et al., 2005).

Figura 8: Estrutura química dos compostos Desoxinivalenol e Diacetoxiscirpenol pertencentes à classe do Tricotecenos

Fonte: SANTURIO, 2000/ VERDI, et al., 2005

Assim, os fungos do gênero *Fusarium* produzem diversos tipos de compostos e a produção destes podem variar de acordo com as condições do meio e da espécie. Estes fungos se mostram promissores para a produção de metabólitos secundários, para diversas aplicações, inclusive ser uma alternativa para o controle de fitopatógenos nas culturas de importância econômica.

2.3. Fungos endófitos do gênero *Penicillium*

Fungos do gênero *Penicillium* são muito conhecidos devido sua importância na indústria farmacêutica, agrícola, alimentícia, dentre outras.

O fungo *Penicillium*, foi descrito por Link em 1809 na Alemanha. Esse gênero possui uma forma anamorfica (fases assexuadas ou mitótica) e uma forma telemórfica (fase sexuada). É classificado na família Trichomaceae, ordem Eurotiales, de divisão insertae sedis, grupo dos fungos mitospóricos e sub-grupo hifomicetos. Este gênero é caracterizado pela produção de fiálides e conídios em cadeias (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1996).

Existem cerca de 1107 espécies, variedades e *formae speciales* de táxons pertencentes a esse gênero descritos na literatura. Foi observado 182 variedades e duas *formae speciales* associadas ao gênero (Index Fungorum, 2010). Dentre os 2140 registros de fungos endofíticos do gênero *Penicillium*, as plantas que apresentam mais espécies desse fungo são *Zea mays* L. (milho) apresentando 90 espécies e *Carya illinoensi* K apresentando 30 espécies.

Cerca de 40 espécies de *Penicillium* sp. foram registradas em plantas hospedeiras brasileiras (EMBRAPA, 2010).

Fungos do gênero *Penicillium* são encontrados em uma enorme variedade de habitats e são capazes de produzir uma vasta gama de metabolitos (PHIPPS, et al., 2011). Este gênero possui uma produção de metabólitos 73% superior à outras classes de microrganismos (SILVA, et al., 2010). Esses compostos podem ser antibióticos, micotoxinas, antioxidantes, anticancerígenos, inseticidas, herbicidas, enzimas e fungicidas (FRISVAD, et al., 2004).

Rancic et al., reportam que existe um grande número de extratos de fungos e/ou produtos extracelulares com atividade antimicrobiana, principalmente de espécies de *Penicillium* sp. As espécies *P. brevicompactum*, *P. carneus*, *P. citrinum*, *P. crhysogenum*, *P. dipodomyis*, *P. flavigenum*, *P. funiculosum*, *P. griseofulvio*, *P. nalgiovense*, *P. nordicum*, *P. persicinum* são relatadas como fontes de antibióticos, especialmente de penicilina (Fig.9) e griseofulvina. (SILVA, et al., 2010).

Figura 9: Estrutura química da Penicilina

Fonte: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/>

A penicilina, produzida pelo fungo *P. notatum*, foi descoberta pelo médico Alexander Fleming, em 1928, dando destaque aos fungos quanto à produção de antibióticos e outras substâncias de interesse farmacêutico.

Estudos mostram que policetídeos isolados do fungo *P. janthinellu*, isolado da planta *Melia azedarach*, possuem atividade inibitória do crescimento de *Leishmania mexicana*. Esses policetídeos são emodina, diidroclitronona e citrinina H-1 produzidos por *P. herquei*, fusarindina e citrinina produzidos por *Penicillium* sp, encontrado em *Muraya paniculata* (Fig. 10) (PASTRE, et al., 2007).

Figura 10: Estruturas químicas das substâncias produzidas por fungos do gênero *Penicillium*
 Fonte: Pastre et al., 2007

O fungo *Penicillium crustosum*, isolado da planta *Vigueira robusta*, é responsável pela produção do alcalóide fusaperazina E e o fungo *Penicillium brasiliamum* isolado da planta *Melia azedarach*, produz o alcalóide brasiliamida A, B, C, D, E e F (Fig. 11), não sendo relatada nenhuma atividade biológica desses compostos (GUTIERREZ, et al., 2012).

Figura 11: Estruturas químicas das substâncias produzidas pelos fungos *Penicillium crustosum* e *Penicillium brasiliamum*

Fonte: Gutierrez et al., 2012

Já o fungo *P. pinophilum* é responsável pela síntese do ácido fenol esterase, responsável pela manutenção da integridade estrutural da parede celular da planta e restrição da acessibilidade de outras enzimas hidrolíticas liberadas pelos microorganismos através da formação de retículos entre as cadeias de polissacarídeos (CASTANARES et al., 1992). Esse fungo também sintetiza a glicoproteína glicose oxidase, que também é produzida pelos fungos *Aspergillus niger*, *P. notatum*, *P. variable* e *Talaromyces flavus* (RANDO et al. 1997).

E o fungo *Penicillium sp.* é responsável pela síntese de muitos metabólitos importantes para indústria farmacêutica e agrícola. Esse fungo isolado da planta *Limonium tubiflorum*, é responsável pela produção dos compostos penilactona, epoxicurvularina, diantrona, neobulgarona G, sulfucumarina e sulfumarina. Esses metabólitos possuem atividade contra os protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* (Fig. 12) (ALY et al., 2011).

Figura 12: Estruturas químicas das substâncias produzidas pelo fungo *Penicillium* sp.
Fonte: ALY et al., 2011

Já o fungo *Penicillium* sp. isolado da planta *Tamarix chinensis* produz as substâncias arisugacinas I, J, F, G e B e territreme B e C. Esses compostos são meriterpernos com atividade anticolinesterase (Fig. 13) (SUN et al., 2013).

Figura 13: Estruturas químicas dos compostos produzidos pelo fungo *Penicillium* sp.
Fonte: SUN et al., 2013

E o fungo *Penicillium sp.*, isolado da planta *Hopea hainanensis*, biossintetiza os compostos monometilsulocrina, ácido rizoctonico, asperfumoide, pisciona, 7,8-dimetil-iso-alloxazina e ácido 3,5-dicloro-p-anísico, os quais possuem atividade contra os patógenos *Candida albicans*, *Tricophyton rubrum* e *Aspergillus niger* (Fig.14) (WANG et al., 2008).

Figura 14: Estruturas químicas dos compostos produzidos pelo fungo *Penicillium sp.*
Fonte: WANG et al., 2008

Portanto, os fungos do gênero *Penicillium* são grandes promissores para produção de metabólitos secundários que podem ter potencial de interesse biotecnológico.

2.4 Antracnose

Esta doença é causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, que são encontrados nas formas saprofíticas e patogênicas, sua fase sexuada perfeita ou teleomorfa, corresponde ao fungo *Glomerella cingulata* (Ston.) (JUNQUEIRA et al., 2001).

Originalmente descrito a partir de tecidos doentes de mamão e pimenta na Austrália por Simmonds (1965) é uma das espécies mais frequentemente relatados do gênero e causa doenças comumente conhecidas como antracnose em inúmeras plantas hospedeiras em todo o mundo (FARR& ROSSMAN, 2012).

A antracnose é uma doença considerada cosmopolita sendo encontrada em citrus, mamão, morango, guaraná, banana, goiaba, maracujá, ameixa, entre outros. Ataca todos os órgãos da parte aérea, causando apodrecimento (nas folhas, frutos e órgãos reprodutivos) ou crestamento (folhas e ramos) (FISCHER et al., 2005; BULHÕES, 2012).

Vários fatores relacionados com o fruto, o patógeno, o clima e as condições em

pós-colheita determinam a incidência e a severidade das doenças (ECKERT& EAKS, 1989). Entre estes, a quantidade e a qualidade do inóculo fúngico ocupam um lugar de destaque. A probabilidade de infecção depende da quantidade de inóculo presente em um ponto do fruto suscetível. O grau de maturação da fruta na colheita também é importante, pois condiciona a qualidade pós-colheita (FISCHER, 2008).

Estes fungos interagem de maneira diferenciada de acordo com cada hospedeiro, podendo atacar diferentes partes da planta, como caules, folhas, flores e frutos (KIM; OH; YANG, 1999). A sintomatologia típica da doença efetiva-se devido a produção de enzimas pectolíticas e toxinas pelo patógeno, que promovem desorganização celular correspondente as lesões de aspecto úmido que se desenvolvem com rapidez e também apresentam massa cotonosa constituída de hifas e estruturas de frutificação (BEDENDO, 1995). Essa produção de enzimas pode estar relacionada a alta fitopatogenicidade do micro-organismo.

A infecção do hospedeiro pelo fungo pode ser direta, com a formação de apressórios, os quais podem ficar latentes até um momento mais favorável à infecção e colonização ou através de ferimentos, como nos frutos. A temperatura ideal para ocorrência da infecção é entre 22 e 25°C. No geral, as frutas maduras são as mais propensas as doenças (JUNQUEIRA et al., 2001).

Diversas culturas são atingidas por essa doença, antracnose, sendo que no Brasil os principais cultivos que abastecem o mercado externo são atingidos por essa doença causando grandes perdas agrícolas.

2.4.1 Antracnose na cultura do citrus

O Brasil é responsável por 50% da produção mundial de suco de laranja e exporta 98% do que produz (NEVES et al., 2010). O estado de São Paulo é responsável por 80% da produção nacional de suco de laranja (FNP, 2011). Nos últimos anos a citricultura paulista sofreu grande migração para áreas do sudoeste do estado. Esse deslocamento foi motivado devido as condições climáticas favoráveis e baixa incidência de doenças que interferem no cultivo do citrus, como a podridão floral do citrus causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum*. Essa doença é de ocorrência esporádica em algumas regiões do estado de São Paulo, porém quando o período de chuva coincide com o período de floração os danos podem chegar a 70%.

Os primeiros sintomas de podridão floral do citrus foram observados em Belize, localizado na América Central, em 1956/1957, mas só foram relatados no final da década de 1970 por Fagan (1979), quando o mesmo descreveu sobre a presença de flores com pequenas manchas marrons nas pétalas e um grande número de cálices sem frutos.

O *Colletotrichum acutatum* pode sobreviver entre as floradas aderido a superfície das folhas de citrus na forma de apressório (TIMMER et al., 1996). Na presença de extrato floral, o apressório germina, produzindo hifas e conídios sem a formação de acérvulo. Os sintomas se caracterizam pela presença de lesões necróticas marrons ou alaranjadas nas pétalas, formação de acérvulos contendo conídios envolvidos por mucilagem em condições favoráveis e queda dos frutos recém formados, deixando os cálices e os pedúnculos retidos nos ramos (Fig.15) (TIMMER et al., 1994).

Figura 15: Sintoma causado pelo fungo *Colletotrichum acutatum* em citrus
Fonte: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/podridao-floral/>

Para que a doença seja controlada são utilizados produtos químicos como benzimidazóis, triazóis e ftalimida pulverizados nas culturas na época de florada. Porém, sob condições de chuvas prolongadas a eficiência dos fungicidas diminuiu, devido a dificuldade na aplicação do produto e por serem facilmente lavados (KUPPER et al., 2003).

2.4.2 Antracnose na cultura do morango

Estima-se que a produção do morango no Brasil esteja em torno de 105 mil toneladas. Segundo o Instituto Brasileiro de Frutos, o estado de Minas Gerais é o maior produtor da fruta com cerca de 40 mil toneladas por ano, aproximadamente 40% da produção, seguido do estado de São Paulo com aproximadamente 29% da produção nacional (ANTUNES, 2010).

No morango, o fitopatógeno *Colletotrichum acutatum* Simmonds causa a flor preta, podendo infectar flores, frutos, pedúnculos, folhas, meristemas apicais e parte superior

do rizoma (DOMINGUES, 2011). Os principais sintomas da doença são lesões escuras que se iniciam no cálice e, posteriormente, atingem o botão ou a flor, tornando-os secos, mumificados e de coloração castanho escura. O pistilo, ovário e cálice ficam totalmente secos e escuros. Nos folíolos observa-se a presença de manchas necróticas irregulares (Fig.16). O fungo é favorecido por temperaturas em torno de 25 a 30°C e alta umidade (DIAS-ARIEIRA et al., 2010).

Figura 16: Sintoma causado pelo fungo *Colletotrichum acutatum* em morango
Fonte: http://www.infobibos.com/Artigos/2011_4/Antracnose/Index.htm

Em grande parte devido à sua importância econômica como um patógeno do morango, este fitopatógeno foi tratado por muitos anos como uma praga controlada de planta pela Organização Europeia e Mediterrânea para a Proteção de Plantas (MPE) (DAMM et al., 2012).

Este fungo pode sobreviver na forma de apressórios aderidos as folhas (LEANDRO et al., 2001). A disseminação da doença nos canteiros dá-se pela água de chuva e irrigação, sendo favorecida pela cobertura plástica do canteiro. Adubações pesadas de nitrogênio e fósforo podem promover o aumento da incidência da doença, devido à maior quantidade de nutrientes disponível para o fitopatógeno. As perdas ocasionadas variam entre 30 e 68% (DIAS-ARIEIRA et al., 2010).

O controle da doença na cultura do morango pode ser feito através do uso de fungicidas, como procloráz, o qual garante maior produção de frutos e menor ocorrência da doença nas flores. Porém, somente o controle químico não tem sido eficiente para controlar a doença (OSHITA et al., 2012).

2.4.3 Antracnose na cultura do guaraná

O Brasil é praticamente o único produtor de guaraná do mundo, à exceção de pequenas áreas plantadas na Venezuela e no Peru, onde o cultivo comercial também é praticado. O guaranazeiro (*Paullinia Cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma das espécies mais importantes da Amazônia pelo seu potencial econômico, social e ecológico. Seu cultivo data da época pré-colombiana e era praticado por diversas tribos indígenas, entre elas os Maués e Andiras, no Baixo Amazonas e no Alto Rio Negro (CONAB). As sementes de guaranazeiro e os seus derivados (pó, bastões, xaropes, extratos, essências), em face de suas propriedades medicinais e estimulantes, tornaram-se mundialmente conhecidas e são utilizadas, em larga escala, no preparo de bebidas energéticas.

Até os anos 80, o município de Maués, no Amazonas, era líder na produção de guaraná, porém a ampliação do uso comercial da semente incentivou os agricultores da Bahia a começar o cultivo e comercialização do produto. O solo vermelho da região do baixo sul, seus elevados teores de compostos de ferro e boa drenagem interna, são adequados para a produção de mais de 70 culturas viáveis comercialmente

O município de Taperoá é considerado o maior produtor mundial de guaraná. De acordo com dados da EBDA (Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola), a região do Baixo Sul da Bahia conta com 1.700 hectares de área plantada, sendo 430 quilos de grãos por hectare plantado.

Em 2012, a Bahia produziu 140% a mais que o Amazonas, produzindo 2.540 mil toneladas de guaraná contra 1.080 toneladas de guaraná amazonense. O rendimento superior se deve à região possuir condições propícias ao desenvolvimento da planta, como boa distribuição de chuva ao longo do ano, solos de maior fertilidade e baixa incidência de doenças (Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola).

No entanto, a incidência de antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* leva a redução da produção do guaraná. O processo de infecção por este fungo inicia-se na cutícula e parede celular das folhas, e atinge a epiderme e o parênquima, levando à necrose rapidamente (BENTES et al., 2004). Nas plantas infectadas, o fungo induz o crestamento (queima) em folhas jovens, com sua subsequente queda. Em folhas novas, ainda em crescimento e antes da maturidade, os sintomas são lesões necróticas com formato variável de circular a elíptico, caracterizando o quadro da antracnose (Fig.17). As lesões nas folhas e galho prejudicam o desenvolvimento da planta e conseqüentemente do fruto, causando deformações, não amadurecimento. Quando numerosas, essas lesões causam

deformações e enrolamento das folhas, principalmente quando atingem as nervuras. Folhas maduras ou velhas não são infectadas. No Brasil, as culturas de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) são as mais prejudicadas por este tipo de infecção.

Figura 17: Sintoma causado pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* no guaranazeiro e consequentemente no fruto.

Fonte: <http://www.catalogosnt.cnptia.embrapa.br/>

Apesar das perdas econômicas devido a antracnose, o guaraná é de grande valor para a economia do Amazonas, pois alcança preços acessíveis na comercialização e constitui uma espécie com potencial na composição de sistemas agroflorestais, contribuindo para diversificação da agricultura (BENTES et al., 2004).

Para o controle dessa doença são realizadas podas das plantas daninhas ao redor do guaranazeiro ou uso de herbicidas, uma vez que essas plantas daninhas hospedam o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. (MILEO et al., 2007).

Diante do exposto, fica evidenciado a importância de estudos de bioprospecção com fungos endofíticos e a identificação dos seus respectivos metabólitos secundários utilizados para aplicação biotecnológica.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

- ✓ Realizar o estudo químico e biológico de 2 linhagens de fungos endofíticos isolados do guaranazeiro (*Paulinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke).

Objetivos específicos

- ✓ Selecionar 2 linhagens de fungos endofíticos, dentre 9, que apresentarem compostos quimicamente interessantes com atividade biológica a pelo menos um dos 3 fitopatógenos do gênero *Colletotrichum* isolados do citros, do morango e do guaranazeiro;
- ✓ Avaliar os extratos brutos em ensaios biológicos "in vitro", oriundos dos fungos endofíticos, frente ao crescimento dos fungos fitopatogênicos;
- ✓ Caracterizar quimicamente por espectrometria de massas frações semi puras e/ou compostos puros;
- ✓ Avaliar as frações semi puras e/ou compostos puros em ensaios biológicos "in vitro" contra o fitopatógeno *Colletotrichum* sp.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção de material

4.1.1 Coleta de folhas de guaranazeiros do Amazonas

As amostras de folhas foram coletadas em 2010, em Manaus/AM, na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e na Fazenda Santa Helena (Ambev – American Beverage Company), Maués/AM. Foram coletadas folhas de um total de 20 plantas adultas (10 de cada localidade). Estas foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório na UFAM, onde foram processadas, sob a responsabilidade do grupo do Dr. João Lúcio de Azevedo.

4.1.2 Isolamento dos fungos endofíticos

No laboratório da UFAM as amostras foram submetidas ao método de desinfecção superficial (PEREIRA et al., 1993; ARAÚJO et al., 2001), que consiste em lavar as amostras abundantemente em água corrente para a retirada de resíduos de poeira e solo; colocar imerso em etanol 70% por um minuto; colocar imerso em hipoclorito de sódio 3% por três minutos; colocar novamente imerso em etanol 70% por 30 segundos; enxaguar duas vezes em água destilada e esterilizada; e cortar as amostras em fragmentos de 8-12 mm. Estes procedimentos foram realizados para a retirada de micro-organismos epifíticos das folhas.

Após a assepsia, os fragmentos das amostras foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (Batata 200g -Dextrose 20% -Ágar 20%) com adição de 100 µg mL⁻¹ de cloranfenicol e de 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina. Sete fragmentos foram colocados em cada placa e as mesmas foram mantidas em incubadora do tipo B.O.D. a 28° C.

As placas foram observadas diariamente e após o crescimento dos fungos, fragmentos de micélio foram repicados para tubos de ensaio para a observação dos gêneros mais frequentes. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente até esporulação das colônias.

No total foram isolados em torno de 600 fungos endofíticos do guaranazeiro, dos quais 9 linhagens foram cedidas para o desenvolvimento deste trabalho. Inicialmente foram codificados como: 214, 222, 225, 249, 250, 479, 591, 472, 532.

4.1.2 Linhagens de fungos fitopatogênicos

Foram utilizadas as linhagens do fitopatógeno *Colletotrichum acutatum*, isolado do morango (causador da flor preta em morangueiros), a linhagem *Colletotrichum gloeosporioides* (responsável pela antracnose do guaranazeiro) e a linhagem de *Colletotrichum acutatum* isolado do citrus (responsável pela doença podridão floral do citrus). Essas linhagens foram cedidas pelos Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Junior, do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP e pelo grupo de pesquisa do Amazonas, UFAM.

4.1.3 Preservação e armazenamento dos fungos

Os fungos cedidos para investigação foram inoculados em placas de Petri (9 cm) contendo meio BDA e mantidos em BOD a 28 °C, durante sete dias. Os isolados foram mantidos em estoques através do método de Castellani (1939) e reativados com a transferência de fragmentos dos estoques para placas de Petri contendo meio sólido e mantidos em BOD a 28 °C. Também foi realizado um cultivo periódico (15 dias) dos fungos fitopatogênicos, que serviram de fonte contínua para a obtenção de micélio para os ensaios de sensibilidade aos compostos obtidos.

4.2. Ensaio Biológico por cultivo pareado

Para o estudo do efeito antagônico dos fungos endofíticos isolados do guaranazeiro frente ao crescimento micelial das linhagens dos fungos fitopatogênicos, foi utilizada a técnica de cultivo pareado em placas de Petri (DENNIS & WEBSTER, 1971). Para isso, discos de 5 mm de diâmetro de colônias de fungos endofíticos e dos fungos fitopatogênicos foram colocados em lados opostos em placas contendo meio de cultura BDA. Também foram preparadas placas contendo somente o patógeno, nas mesmas condições citadas anteriormente que serviram de controle. As placas foram incubadas a 28°C em câmara BOD. durante 7 dias.

4.3. Ensaios biológicos por difusão em disco

Os ensaios foram realizados visando à verificação da inibição de crescimento micelial dos fitopatógenos “in vitro” aos compostos presentes nos extratos, frações e compostos puros dos fungos endofíticos. Os bioensaios foram realizados por meio do método de difusão em disco (National Committee for Clinical Laboratory Standards, modificado por Karaman et al., 2003). Os compostos avaliados (2mg) foram aplicados em discos de papel filtro estéril de 6 mm de diâmetro. Esses discos foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA com um inóculo do fitopatógeno em disco de 5 mm de diâmetro. As placas inoculadas foram mantidas B.O.D. a 28° C até que o controle dos tratamentos houvesse colonizado mais de 50% da placa. Este período foi padronizado para 7 dias.

4.4. Obtenção dos extratos brutos dos fungos endofíticos

Para a obtenção dos extratos brutos, as linhagens de fungos endofíticos foram cultivadas em placas de Petri contendo meio BDA a 28° C. Após 7 dias de cultivo, fragmentos das bordas das colônias foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL de meio BD líquido (20% de batata, 2% dextrose). Os fungos foram cultivados durante 5 dias em agitação constante de 150 rpm a 28° C. Após este período o micélio foi retirado do meio de cultivo através de filtração, obtendo-se assim o extrato bruto.

O extrato bruto foi submetido a uma partição líquido-líquido com o solvente orgânico acetato de etila (300 mL em três repetições), obtendo-se duas frações: a fração aquosa e a fração acetato de etila.

4.5. Separação dos compostos

A separação dos compostos de interesse foi realizada por meio de técnicas cromatográficas. Para a separação dos compostos foram utilizadas colunas pré-empacotada do tipo Sep-Pak de 10 g (60 mL), de 5 g (20 mL), de 2 g (12 mL) e de 1 g (12 mL) (Phenomenex®), com fase estacionária de sílica Si-1 e a fase móvel com os solventes orgânicos, acetato de etila, metanol, hexano e diclorometano grau PA, otimizada de acordo com as características de cada fração a ter seus compostos separados. Também foi utilizada uma coluna com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com o grupo octadecilsilano e fase móvel com o solvente orgânico metanol e água ultrapura Mili-Q®. As frações foram reunidas segundo

similaridade química observada em cromatografia em camada delgada (CCD). Para a análise por CCD foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60, 20 x 20 cm (Macherey- Nagel), sobre poliéster com indicador de fluorescência (Polygram® Sil G/UV 254, 0,20 mm). Após a eluição das cromatofolhas, foi realizada uma verificação dos compostos sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm. Em seguida, as cromatofolhas foram reveladas borrifando-se os reagentes Ninidrina, Dragendorff e ácido fosfomolibdico (PMA). Apenas para o revelador PMA é necessário colocar as cromatofolhas em chapa aquecedora durante 5 min., os demais reveladores secaram naturalmente.

4.5.1 Análise química por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para análise das frações utilizou-se o equipamento Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC-UV/VIS1100 Agilent) com coluna de fase reversa de sílica derivatizada C₁₈, 250 x 4,6 mm 5 µm ECLIPSE XDB-C₁₈ (Marca: AGILENT HP), detector MWD (Multiple Wavelength Detector). A fase móvel com os solventes metanol, acetonitrila grau HPLC e água mili-q. O comprimento de onda do detector UV/VIS foram definidos de acordo com o perfil químico da fração. A amostra foi diluída em metanol para HPLC na concentração de 1 mg mL⁻¹ e o volume de amostra injetado foi de 20 µL. A fase móvel foi eluída com vazão de 1 mL min⁻¹.

4.5.2 Análise química por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada a UV-ELSD-MS

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detectores de ultravioleta de varredura em detector de arranjo de diodos, espalhamento dinâmico de luz e espectrometria de massas (HPLC-UV-ELSD-MS) da marca Waters®, modelo Alliance 2695, modelo Pump 600, um degaseificador Degasser acoplado a um detector espectrofotométrico UV-visível com detector de fotodiodos ("Photodiode Array Detector"), detector de espalhamento de luz modelo Waters 2424 ("Evaporative light scattering detector" – ELSD) e um detector de massas Micromass ZQ2000 com uma interface de EletroSpray. Todos gerenciados por um sistema MassLynx. Os parâmetros cromatográficos consistiram de uma fase estacionária em coluna com fase estacionária C₁₈ (Waters X-Terra MSC18 5µm 250x4,6 mm), e fase móvel em gradiente de água (0,1% ácido fórmico), metanol e acetonitrila em uma corrida de 40 minutos com vazão de 1 mL min⁻¹. As

amostras foram diluídas em metanol na concentração de 1 mg mL⁻¹ e injetados 20 µl para análise. A varredura do espectrômetro de massas compreendeu íons de m/z (massa sobre carga) 145 à 1500, a energia de ionização foi de 30 eV. A análise foi realizada pelo Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, sob responsabilidade do Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck.

4.5.3 Análise química por Espectrometria de massas de alta resolução

As frações purificadas foram submetidas a uma espectrometria de massas de alta resolução, realizada utilizando o espectrômetro de massas Maxis impact UHR-Qq-TOF com operador BDAL@DE no modo positivo. Os dados foram gerenciados por um sistema Bruker Compass Data analysis 4.2. A varredura do espectrômetro de massas compreendeu íons de m/z (massa sobre carga) 50 a 1500. A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Espectrometria de Massas (LMEM), Instituto de Química de Araraquara.

4.6. Identificação das linhagens dos fungos endofíticos

Os fungos foram identificados a nível morfológico e molecular. As análises foram realizadas pela doutoranda Luciana Mecatti Elias, sob supervisão do Prof. Dr. André Rodrigues no Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos da UNESP (Campus Rio Claro).

4.7. Tipos de interações entre endofítico-fitopatógeno e índice de antagonismo

No ensaio de cultivo pareado os tipos de interações entre os fungos endofíticos e os fitopatógenos foram analisados segundo a metodologia de Badalyan et al. (2002) e o índice de antagonismo (IA) foi calculado para cada linhagem testada de acordo com a fórmula $AI = (RM - rm) / RM \times 100$, na qual: RM: média dos raios nas outras três direções e rm: raio da colônia em direção ao fungo antagonico.

No ensaio biológico para avaliação das frações "in vitro", porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC), foi calculado pelo diâmetro médio (em cm) comparando as colônias nos tratamentos e a testemunha, após sete dias de incubação, segundo a fórmula de Edgington e colaboradores (1971):

$$\text{PIC} = \frac{(\text{crescimento da testemunha} - \text{crescimento do tratamento}) \times 100}{\text{crescimento da testemunha}}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Cultivo pareado dos fungos endofíticos contra os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*

Com o objetivo de selecionar 2 linhagens de fungos endofíticos para uma investigação química mais aprofundada, foi realizado um ensaio biológico por cultivo pareado com 9 linhagens de fungos endofíticos codificadas: 214, 222, 225, 249, 250, 472, 479, 532 e 591. Estes foram avaliados quanto a atividade antifúngica à 3 fitopatógenos do gênero *Colletotrichum* isolados do guaranazeiro, morangueiro e citrus. Os resultados podem ser observados na figura 18.

Figura 18: Ensaio biológico "in vitro" das 9 linhagens de fungos endofíticos e 3 fitopatógenos. Na parte superior da placa de Petri estão os fitopatógenos e na inferior os fungos endofíticos. Fitopatógenos L1: *Colletotrichum gloeosporioides* (isolado do guaranazeiro), M1R1: *Colletotrichum acutatum* (isolado do morango), CA142: *Colletotrichum acutatum* (isolado do citrus).

Foi observado vários tipos de interação entre os fungos endofíticos e os fitopatógenos. Os resultados foram analisados segundo a metodologia de Badalyan et al. (2002), na qual os antagonismos são distinguidos em três tipos de interações endofítico-patógeno (A, B e C) e quatro subtipos (C_{A1} , C_{B1} , C_{A2} e C_{B2}). Nos tipos A e B ocorre uma inibição mútua, na qual nenhum dos organismos é capaz de crescer um sobre o outro, no tipo A ocorre contato micelial e no tipo B não. No tipo C o endófito pode crescer sobre o patógeno, sem que ocorra uma inibição inicial (Fig.19). No subtipo C_{A1} ocorre crescimento parcial do endófito e no subtipo C_{A2} ocorre crescimento completo do endófito sobre o patógeno após uma inibição inicial com contato micelial. Já no subtipo C_{B1} ocorre um crescimento parcial do endófito e no tipo C_{B2} um crescimento completo do endófito sobre o patógeno, após inibição inicial sem contato micelial.

Figura 19: Esquema representativo dos tipos de interação endofítico-patógeno. A: inibição mútua entre os organismos ocorrendo contato micelial; B: inibição mútua entre os organismos sem contato micelial e C: o endofítico pode crescer sobre o patógeno sem inibição inicial.

Além desta avaliação, foi calculado o índice de antagonismo (IA) para cada linhagem de acordo com a fórmula $IA = (RM-rm)/RM \times 100$, na qual: RM: média dos raios nas outras três direções e rm: raio da colônia em direção ao antagonônico.

Os tipos de interações entre os fungos endofíticos e os fitopatógenos e o índice de antagonismo de cada endofítico pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1: Tipos de interação entre endofítico-fitopatógeno e Índice de antagonismo

Fungos endofíticos	Tipo de interação com L1	IA	Tipo de interação com M1R1	IA	Tipo de interação com CA142	IA
214	A	49,82%	C _{A1}	78%	C _{A2}	80,32%
222	B	49,71%	B	53,83%	C _{B1}	85,25%
225	B	52,89%	B	51,97%	C _{B1}	81,21%
249	A	47,53%	C _{A1}	77,51%	C _{A1}	97,68%
250	A	45,61%	C _{A1}	78,35%	C _{A1}	91,02%
472	C _{B2}	100%	C _{B2}	99,91%	C _{B2}	100%
479	C _{B2}	99,97%	C _{B2}	99,83%	C _{B2}	99,83%
532	B	50,02%	B	51,92%	B	83,55%
591	A	59,75%	C _{A1}	62,71%	C _{A1}	92,81%

Na avaliação do ensaio por cultivo pareado, observou-se que todas as linhagens de endofíticos apresentaram IA superior a 45% para os 3 fitopatógenos.

Para o fitopatógeno L1, os endofíticos codificados 472 e 479 apresentaram maior inibição. Os demais fungos endofíticos apresentaram crescimento igual ao do fitopatógeno foram os 214, 222, 225, 532 e 591 e os endófitos com menor taxa de inibição foram os codificados 249 e 250.

Para o fitopatógeno M1R1, os fungos que apresentaram maior antagonismo foram os de código 472, 479 e 591. Com taxas médias os endófitos de código 214, 249 e 250 que inclusive cresceram sobre o fitopatógenos e os endófitos codificados 222, 225 e 532 apresentaram crescimento semelhante ao fitopatógeno.

Na avaliação do fitopatógeno codificado CA 142, os endófitos que apresentaram maior antagonismo foram os 214, 249, 250, 472, 479 e 591. Os endófitos 222, 225 e 532 apresentaram menor atividade antagônica no cultivo pareado.

Comparando em conjunto todos os resultados obtidos neste ensaio os fungos que apresentaram melhor atividade antifúngica para os 3 fitopatógenos foram os 472 e 479, já os fungos endofíticos 214, 249, 250 e 591 apresentaram melhor atividade antifúngica para os fitopatógenos M1R1 e CA142. Os demais fungos endofíticos inibiram apenas um fitopatógeno, ou ambos cresceram até o centro da placa de Petri.

Como se pode observar na tabela 1, ocorreram 27 interações entre os fungos endofíticos e os fitopatógenos testados, sendo 4 interações do tipo A, 7 do tipo B e 16 do tipo C.

As 9 linhagens de fungos endofíticos interagiram com o fitopatógeno L1 de formas diferentes, sendo que ocorreram 4 interações do tipo A, 3 do tipo B e 2 do tipo C. Já com o fitopatógeno M1R1 as linhagens fúngicas interagiram de 2 formas diferentes, sendo 3 interações do tipo B e 6 do tipo C. E contra o fitopatógeno CA142, as linhagens de fungos interagiram de 2 formas, sendo predominante a interação do tipo C, ocorrendo em 9 linhagens fúngicas e 1 linhagem apresentou a interação do tipo B.

Os endofíticos testados contra o fitopatógeno L1 apresentaram índice de antagonismo (IA) entre 45,61% e 100%, já contra o fitopatógeno M1R1 o IA foi entre 51,92% e 99,91% e contra o fitopatógeno CA142 foi entre 80,32% e 100%. Como observado os endofíticos tiveram maior potencial antagonico ao fitopatógeno codificado CA142, seguido dos fitopaógenos codificados L1 e M1R1. Os resultados mostram que os fungos endofíticos codificados 472, 479 e 591 apresentaram maior taxa de inibição dos fitopatógenos, sendo que o endofítico codificado 472 apresentou maior taxa de inibição dos três fitopatógenos no teste de cultivo pareado. O fungo endofitico codificado 479 apresentou uma alta taxa de inibição contra os três fitopatógenos testados durante o pareamento em relação aos outros fungos endofíticos testados. Já o fungo endofitico codificado 591 apresentou diferentes taxas de inibição de acordo com os fitopatógenos testados, tendo maior inibição aofitopatógeno codificado CA142 e menor inibição ao fitopatógeno codificado L1. Os demais fungos endofíticos apresentaram taxas de inibições semelhantes para os três fitopatógenos, porém não tão eficiente quanto dos microrganismos selecionados.

Através destes estudos destacam-se como mais promissoras as linhagens dos fungos endofíticos 472, 479 e 591, e estes foram selecionados para uma investigação mais aprofundada.

5.2 Análises morfológicas e moleculares

As 3 linhagens selecionadas foram identificadas por técnicas morfológica e molecular. A identificação morfológica e molecular dos fungos selecionados para estudo foi realizada pela aluna de doutorado Luciana Mecatti Elias em colocaboração com o Dr. André Rodrigues.

Para a identificação morfológica foram observadas estruturas morfológicas caracterísitcas de cada gênero, como os conidióforos dos fungos e utilizada uma chave de identificação.

As análises morfológicas mostraram que os fungos com códigos 472 e 479 pertencem ao gênero *Penicillium* e o fungo com o código 591 pertence ao gênero *Fusarium* (Fig.20).

Linhagens em meio sólido	Estruturas morfológicas em microscopia
<p>a</p> <p><i>Penicillium pinophilum</i> (472 e 479)</p>	<p>c</p>
<p>b</p> <p><i>Fusarium</i> sp (591)</p>	

Figura 20: Fungos a: *Penicillium pinophilum*, b: *Fusarium* sp em cultivo em placas de Petri; c: estrutura para identificação morfológica do gênero *Penicillium*.

Autor: a e b: Isabela Nascimento; c: Luciana Elias

As análises moleculares mostraram que os fungos endofíticos sob os códigos 472 e 479 foram identificados como *Penicillium pinophilum* apresentando 99% de similaridade com as sequencias depositadas no banco de dados GenBank, do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), utilizando-se a ferramenta “Basic Local Aligment Search Tool” (BLAST). O fungo endofítico sob o código 591 foi identificado como *Fusarium* sp. apresentando 98% de similaridade com as sequencias depositadas no banco de dados GenBank e não foi possível chegar a nível de espécie.

Após a identificação das 3 linhagens de fungos endofíticos selecionadas, o fungo endofítico codificado 472 não foi selecionado por pertencer à mesma espécie do fungo 479. Sendo assim, foram seleconados os 2 fungos de gêneros diferentes, o 591 (*Fusarium* sp) e o 479 (*Penicillium pinophilum*) para terem seus extratos investigados quimicamente quanto a ação inibitória de seus metabólitos secundários ao *Colletotrichum* sp.

5.3 Estudo dos metabólitos secundários do fungo endofítico *Fusarium sp* (591)

A linhagem do fungo endofítico do gênero *Fusarium* foi cultivado em meio líquido e particionado com o solvente orgânico acetato de etila. Obteve-se a fração aquosa e a fração acetato de etila. A fração aquosa foi descartada por não apresentar atividade ao fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (L1), provavelmente por conter apenas componentes do meio de cultura nesta fração.

A fração acetato de etila se apresentou ativa (70%) e foi submetida a uma cromatografia em coluna pré-empacotada do tipo Sep-Pak com fase estacionária de sílica Si-1 e fase móvel em gradiente (diclorometano, acetato de etila, hexano e metanol). As frações obtidas foram monitoradas segundo similaridade química, observada em Cromatografia em Camada Delgada (CCD), e as semelhantes foram reunidas em 11 frações.

As frações obtidas foram submetidas a um bioensaio de atividade fúngica contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* (L1) à concentração de 2 mg mL⁻¹ (Fig. 21).

Figura 21: Bioensaio in vitro das frações obtidas da linhagem do endofítico *Fusarium sp*. Fa: fração acetato de etila; C1: controle com o fitopatógeno; C2: controle com o solvente MeOH; Fa1 a Fa11: frações obtidas na separação em coluna de sílica.

No estudo de investigação química dos metabólitos foi utilizado apenas o fitopatógeno *C. gloeosporioides* para a realização dos bioensaios monitorados ao longo das separações, devido a baixa quantidade de massa de compostos obtida das separações, o que é comum em trabalhos de produtos naturais..

Como pode-se observar, as frações que apresentaram atividade inibitória contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* foram Fa6, Fa7, Fa8 e Fa11. Porém, ao avaliar por CCD as 4 frações ativas, verificou-se que a fração Fa6 apresentou em seu perfil químico menos compostos e por isso foi selecionada para prosseguir a investigação química.

A seguir, o esquema 1 apresenta as etapas sumarizadas da linhagem *Fusarium* sp (591).

Esquema 1: Fluxograma do estudo químico do fungo endofítico *Fusarium* sp.

m: massa da fração

B: porcentagem de inibição contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* s (2mg mL⁻¹)

4.3.1. Estudo da fração Fa6

Para a separação dos compostos da fração Fa6 foi realizada uma cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak, com fase estacionária de sílica Si-1 e fase móvel com os eluentes diclorometano: metanol. As frações obtidas foram monitoradas por CCD, as

semelhantes foram reunidas e submetidas ao bioensaio *in vitro* de atividade fúngica contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* (à 2 mg mL⁻¹) (Fig. 22).

Figura 22: Bioensaio das frações após purificação em coluna pré-empacotada de sílica. C: controle com fitopatógeno; Fa6A à Fa6H: frações obtidas na separação em coluna.

Verificou-se no ensaio biológico que as 2 frações mais ativas foram Fa6A e Fa6D. A fração com maior atividade antifúngica e que apresentou menos compostos em CCD em comparação a outra fração ativa, foi a fração Fa6A. Esta foi submetida a novas separações cromatográficas.

A seguir, o esquema 2 apresenta as etapas sumarizadas do estudo da fração Fa6.

Esquema 2: Fluxograma do estudo químico da fração Fa6.

5.3.1.1 Estudo da fração Fa6A

A fração ativa Fa6A foi submetida à uma cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak, com fase estacionária de sílica Si-1, porém com menos fase estacionário que a cromatografia anterior, e fase móvel com os eluentes diclorometano: metanol. As frações obtidas foram monitoradas por CCD e as frações semelhantes foram reunidas e submetidas a bioensaio *in vitro* de atividade fúngica contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* (à 2 mg mL⁻¹) (Fig. 23).

Figura 23: Bioensaio das frações obtidas da fração Fa6A. C: controle com o fitopatógeno; Fa6A1 a Fa6A4: frações obtidas na separação em coluna

Como pode ser observado no ensaio biológico, somente a fração Fa6A3 demonstrou conter composto(s) ativo(s) ao fitopatógeno avaliado, ainda que verificado uma diminuição na atividade em relação a fração de origem Fa6A. Neste caso, não foi determinado o que ocasionou a diminuição de atividade, apenas vou verificado que não se trata de sinergismo porque nenhuma outra fração apresentou atividade além da Fa6A3.

A seguir, o esquema 3 apresenta as etapas sumarizadas do estudo da fração Fa6A.

Esquema 3: Fluxograma do estudo químico da fração Fa6A.

4.3.1.2. Estudo da fração Fa6A3

A fração ativa Fa6A3 foi submetida à cromatografia utilizando coluna pré-empacotada Sep-Pak Si-1, porém com menos fase estacionário que a cromatografia anterior, e fase móvel diclorometano: metanol. As frações obtidas foram monitoradas por CCD, sendo que as semelhantes foram reunidas. Ao refazer-se a análise em CCD verificou-se que não houve separação entre os compostos da fração Fa6A3.

A seguir, o esquema 4 apresenta as etapas sumarizadas do estudo da fração Fa6A3.

Esquema 4: Fluxograma do estudo químico da fração Fa6A.

Devido a não eficiência desta separação e à pouca quantidade de massa desta fração foi realizado um novo cultivo do fungo endofítico. Após sucessivas separações, as frações obtidas foram monitoradas por CCD e as frações semelhantes foram reunidas e submetidas a bioensaio de atividade fúngica (concentração de 1 mg mL^{-1}) o fitopatógeno *C. gloeosporioides* e o resultado foi negativo para todas as frações. Sendo assim, decidiu-se avaliar as frações obtidas a outro fitopatógeno, o *C. acutatum* (Fig. 24).

Figura 24: Bioensaio das frações após purificação em coluna pré-empacotada de sílica. C: controle com fitopatógeno *C. acutatum*. Fa6A3b1 à Fa6A3b7: frações obtidas na separação em coluna

Dentre as 7 frações obtidas, 4 apresentaram atividade contra o fitopatógeno *C. acutatum* (Fa6A3b1, Fa6A3b2, Fa6A3b4 e Fa6A3b6).

A seguir, o esquema 4 apresenta as etapas sumarizadas do estudo da fração Fa6A3b.

Esquema 4: Fluxograma do estudo químico da fração Fa6A3b.

As frações ativas (Fa6A3b1, Fa6A3b2, Fa6A3b4 e Fa6A3b6) foram analisadas em HPLC e apresentaram perfil cromatográfico semelhante ao perfil cromatográfico da fração Fa7, também ativa.

As frações Fa6A3b1, Fa6A3b2, Fa6A3b4, Fa6A3b6 e Fa7 foram reunidas, renomeadas como Fa6A4' e esta teve seus compostos separados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência –“HPLC” (gradiente iniciando em 5 MeOH: 95 H₂O durante 30 min).

A seguir, o esquema 5 apresenta as etapas sumarizadas do estudo da fração Fa6A4'.

Esquema 5: Fluxograma de estudo químico da fração Fa6A4'; HPLC: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ fase móvel com os eluentes água: metanol.

As frações foram coletadas de acordo com os intervalos indicados na figura

Fig.25.

Figura 25: Cromatograma da fração Fa6A4' analisada e separada no HPLC. Os números indicam as frações coletas nos respectivos tempos de retenção.

A fração **Fa6A4'e** (referente ao pico 5 no cromatograma) foi novamente analisada no HPLC para averiguar o grau de pureza, como mostra a figura 26.

Figura 26: Cromatograma da fração Fa6A4'e após separação no HPLC, visualizado em diferentes absorções no UV.

Foi verificado que a fração **Fa6A4'e** apresentou dois picos (referente a dois compostos) nos tempos de retenção 8,9 min. e 9,2 min. e pôde ser visualizado nos comprimentos de onda 275 nm, 254 nm, 210 nm e 365 nm. Nota-se ainda que os compostos presentes nesta fração apresentam uma maior absorção em 210 nm, que corresponde ao dobro da absorção apresentada em 254 nm, que por sua vez é maior que a observada em 275 nm. No comprimento 356 nm praticamente não ocorre absorção dos compostos. Isso significa que provavelmente os compostos presentes nesta fração apresentam poucos cromóforos, ou seja, insaturações e/ou anéis aromáticos, em suas estruturas químicas.

A amostra foi também submetida a análise por HPLC-UV-ELSD-MS (Fig. 27). Este equipamento permite a visualização em série em 3 detectores, um ultravioleta UV e UV-vis fazendo uma varredura em todos os comprimentos de onda de 200 a 800 nm, um detector

de espalhamento de luz e um detector espectrômetro de massas, conforme metodologia descrita no item 3.5.2.

Figura 27: Cromatograma da fração **Fa6A4'e** mostrando a presença de 2 compostos.

A amostra mostrou estar com alto grau de pureza, apresentando 2 compostos (como já observado) e uma impureza ($t_R=0,45$ min) não identificada. O composto 1 (pico 1) da fração com tempo de retenção em 10,14 min apresentou em seu espectro de UV 3 bandas máximas e seu espectro de massas apresentou vários picos de íon molecular, correspondentes a massa molar ionizada, sodiada, e fragmentos ionizados. Analisando o espectro de massas para este composto foi possível observar um pico intenso de relação massa/carga (m/z) 315,3 e outro menos intenso de m/z 293,4. Subtraindo-se estes valores de m/z resulta no valor de 22 unidades de massa, que se refere a massa do elemento sódio menos 1 unidade de massa que se refere ao elemento hidrogênio. A presença destes picos de íons moleculares sugere, portanto que m/z 315 refere-se a massa do composto com aduto de sódio $[M+Na]^+$ e m/z 293 refere-se a massa do composto protonada $[M+H]^+$ (Fig. 28).

Figura 28: Espectro da amostra mostrando o composto do pico 1. A: espectro de absorção do pico 1 no UV; B: espectro de massa, com picos de valores m/z indicando a massa do composto protonada com hidrogênio e sódio.

O segundo composto (pico2), visualizado no tempo de retenção de 10,50 min. apresentou em seu espectro de UV 3 bandas máximas e seu espectro de massas apresentou vários picos de íon molecular, correspondentes a massa molar ionizada, sodiada, e fragmentos

ionizados. Analisando o espectro de massas para este composto foi possível observar um pico intenso de relação massa/carga (m/z) 329,3 e outro menos intenso de m/z 307,3. Subtraindo-se estes valores de m/z resulta no valor de 22 unidades de massa, que se refere a massa do elemento sódio menos 1 unidade de massa que se refere ao elemento hidrogênio. A presença destes picos de íons moleculares sugere, portanto que m/z 329 refere-se a massa do composto com aduto de sódio $[M+Na]^+$ e m/z 307 refere-se a massa do composto protonada $[M+H]^+$ (Fig. 29).

Figura 29: Espectro da amostra mostrando o composto do pico 2. A: espectro de absorção do pico 2 no UV; B: espectro de massa com a massa do composto protonada com hidrogênio e sódio.

Adicionalmente a fração **Fa6A4'e** foi analisada por espectrometria de massas em alta resolução (Fig. 30), conforme descrito no item 3.5.3.

Figura 30: Full scan da fração Fa6A4'e analisada por espectrometria de massas em alta resolução.

No espectro pode ser observado todos os valores de m/z já observados nos espectros anteriores (de baixa resolução), porém neste a confiabilidade é de 2 casas decimais. O valor m/z 293,1748 $[M+1]^+$ protonado com hidrogênio e o valor m/z 315,1573 $[M+Na]^+$ protonado com sódio, que representa a massa do composto (pico 1). A partir desse resultado foi realizada uma busca no banco de dados "Dictionary of Natural Products", "Scifinder" e na literatura, verificando-se que para este valor de massa 292 são possíveis a 114 compostos. Para exemplificar, foram selecionados alguns destes compostos produzidos por fungos (tabela 2).

Tabela 2: Estruturas químicas dos compostos com peso molecular 292 e demais informações

Composto (fórmula molecular, peso molecular)	Classe química	Fórmula estrutural	Fonte	Atividade biológica	Referência
curvularina $C_{16}H_{20}O_5$ 292,1310	Macrolídeo		<i>Chrysosporium lobatum</i> <i>Penicillium</i> <i>sp.</i>	Atividade citotóxica contra bactérias gram positivas e antioxidante	Kumar et al., 2013
fusarocromanona $C_{15}H_{24}N_2O_4$ 292,1423	Sesquiterpe no		<i>Fusarium</i> sp.	micotoxina	Pathre et al., 1985
(z)-6-acetyl-3-(1,2- dihidroxi-3-propiliden- o)-5-hidroxi-8- metilcroman-2-ona $C_{15}H_{16}O_6$ 292,0946	Acridina		<i>Penicillium</i> sp.	-	Li et al., 2011
3-acetil-9,7(11)- dien-7-α-hidroxi-8- oxoeremophilana $C_{15}H_{24}O_4$ 292,1617	Sesquiterpe no		<i>Penicillium</i> sp	Atividade citotóxica contra linhagens celulares P388, A549, HL60, BEL7402 e K562	Huang et al., 2008
solaniol $C_{15}H_{16}O_6$ 292,0948	Quinona		<i>Fusarium</i> <i>solani</i>	-	Arsenault, 1968
citrovirina $C_{12}H_{14}Cl_2O_4$ 292,0228	Citroviridi na		<i>Penicillium</i> <i>citroviride B</i>	Micotoxina	Shizuri et al., 1986

Existem diversos compostos produzidos por fungos que apresentam o mesmo valor de massa molar, mas diferentes fórmulas moleculares e classes químicas, ou seja, são isômeros constitucionais.

Dentre os compostos encontrados, provavelmente, os compostos pertencentes às classes dos fenóis, terpenos e alcaóides não correspondem ao metabólito isolado da fração **Fa6A4'e**, pois ao longo da purificação os compostos quando analisados por CCD não revelaram positivamente para os reagentes niridrina, ácido fosfomolibdico e dragendorff.

Apesar do composto presente na fração ativa estar semi-puro, sua massa molar (292,1669) se assemelha a massa do composto curvularina, encontrado na literatura.

O metabólito curvularina é considerado um macrolídeo, um antimicrobiano constituído por um anel macrocíclico de lactona, com 12 a 16 átomos de carbono, ao qual ligam-se um ou mais açúcares, com atividade antibacteriana (MENEZES, et al., 2007). Essa substância foi isolada, primeiramente, do fungo *Curvularia* sp. (MUSGRAVE, 1956). Também já foi isolada de outros fungos como *Aspergillus aureofulgens* (CAPUTO e VIOLA, 1977), *Penicillium* sp. (KOBAYASHI et al., 1988), *Alternaria cinerariae* (ARAI et al. 1989), *Curvularia eragrostidis* (BICALHO et al. 2003), *Penicillium* sp. (ZHAN et al. 2004), *Penicillium sumatrense* (MALMSTROM et al., 2000), *Nectria galligena* (GUTIERREZ et al. 2005), *Eupenicillium* sp. (XIE et al. 2009) e *Alternaria alternata* (ROZO et al., 2014).

Kumar et al., 2013 isolou este composto do fungo *Chrysosporium lobatum* e verificou atividade antibacteriana, antitumoral e antioxidante. Tandon et al, isolou o composto curvularina do fungo *Curvularia lunata* e verificou que esse composto inibe o crescimento dos microrganismos *Chaetomium indicum*, *Phoma hibernica*, *Aspergillus flavus*, *Drechslera tetramera*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* e *Bacillus subtilis*.

Outros estudos mostram que esta substância, curvularina, apresenta atividade herbicida (JIANG et al. 2008), antiinflamatória (ELZNER et al., 2008), contra nematóides, antibiótica sobre alguns fungos e atua como fitotoxina não específica (ROBESON e STROBEL, 1981; KUMAR et al., 2013), mas não encontrou-se estudos que relatem esse composto sendo sintetizado pelo endofítico *Penicillium pinophilum* e por fungos do gênero *Fusarium*. Também não foi encontrado na literatura esses compostos apresentando atividade antifúngica a fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*.

Já com valor m/z 307,1906 $[M+H]^+$ ionizado com hidrogênio e o valor m/z 329,1730 $[M+Na]^+$ ionizado com sódio, que representa a massa molar do composto 2 (pico 2), foi realizada uma busca no banco de dados "Dictionary of Natural Products", "Scifinder"

verificando-se que o valor do composto (pico 2) corresponde a 386 compostos de mesma massa molar. Alguns destes compostos encontrados podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3: Estruturas químicas dos compostos com peso molecular 306 e demais informações

Composto (fórmula molecular, peso molecular)	Classe química	Fórmula estrutural	Fonte	Atividade biológica	Referência
10,11- epoxicurricularina $C_{16}H_{16}O_6$ 306,1078	Macrolídeo		<i>Penicillium</i> sp	atividade biológica contra <i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i>	Aly et al., 2011
expansolide A $C_{17}H_{22}O_5$ 306,1467	Sesquiterpeno		<i>P. expansum</i>	-	Massias et al., 1990
3,5-diidro-3- oxo-ML-236C $C_{14}H_{20}O_4$ 306,1809	Policetídeo		<i>Eupenicillium</i> <i>javanicum</i>	atividade antifúngica contra <i>Aspergillus</i> <i>fumigatus</i>	Okamoto et al., 2004
Novarubina $C_{15}H_{14}O_7$ 306.0739	Quinona		<i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i>	Atividade antifúngica contra <i>Nectria</i> <i>haematococca</i>	Kern et al., 1967
Canescine A 306.0739 $C_{15}H_{14}O_7$	Macrolídeo		<i>Penicillium</i> <i>canescen</i> , <i>Aspergillus</i> <i>malignus</i>	Inibe a germinação de esporos do fungo <i>Botrytis</i> <i>allii</i>	Brian et al., 1953

Pode-se observar que diversos compostos podem ser produzidos por fungos do gênero *Fusarium* e *Penicillium*. Provavelmente o composto purificado da fração Fa6A4'e, não pertence à classe química dos terpenos, fenóis e alcalóides, pois ao longo das separações a fração quando analisada por CCD e revelada com reagente ácido fosfomolibdico, drangendorff e niridrina, não se mostrou positiva. O segundo composto presente na amostra pode corresponder ao metabólito 3,5-diidro-3-oxo-ML-236C que apresenta peso molecular próximo ao do metabólito isolado nesse estudo (306,1827).

Este composto 3,5-dihydro-3-oxo-ML-236C é da classe química do policetídeo que já foi isolado do fungo *Eupenicillium javanicum* e possui atividade antifúngica contra *Aspergillus fumigatus* (OKAMOTO et al., 2004). Os policetídeos são produzidos por várias espécies do gênero *Penicillium*, não sendo demonstrado na literatura esse composto sendo produzido por fungos do gênero *Fusarium*, como demonstrado nesse trabalho. Isso torna importante o estudo de metabólitos secundários de fungos endofíticos, a fim de se isolar compostos produzidos por espécies de outros gêneros.

Foi realizado um bioensaio *in vitro* de atividade fúngica contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* (à 1 mg mL⁻¹) da fração **Fa6A4'e** (Fig. 31).

Figura 31: Bioensaio *in vitro* de atividade fúngica dos compostos isolados da fração **Fa6A4'e** do fungo *Fusarium* sp contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*.

O composto não apresentou atividade contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*. Na literatura, também não foi demonstrado atividade biológica dos compostos com os mesmos pesos moleculares contra fitopatógenos do gênero *Colletotrichum* sp.

Para conclusão inequívoca dos compostos presentes na fração, seria necessário realizar uma análise de ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio para elucidação estrutural.

5.3.2. Estudo dos metabólitos secundários do fungo endofítico *Penicillium pinophilum* (479)

A linhagem do fungo endofítico *Penicillium pinophilum* foi cultivado em meio líquido e particionado com o solvente orgânico acetato de etila. Obteve-se a fração aquosa e a fração acetato de etila. A fração aquosa foi descartada por não apresentar atividade contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* e provavelmente por conter apenas componentes do meio de cultura.

A fração acetato de etila, que se apresentou ativa (80%) foi submetida a uma cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak, com fase estacionária de sílica Si-1 e a fase móvel utilizando os solventes hexano , diclorometano , acetato de etila e metanol . As frações obtidas foram monitoradas segundo similaridade química observada em CCD e submetidas a um bioensaio de atividade fúngica contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* (Fig. 32).

Figura 32: Bioensaio das frações após purificação em coluna pré-empacotada de sílica. C: controle com fitopatógeno *C. gloeosporioides*; Fc1 à F4: frações obtidas na separação em coluna.

Como pode-se observar, as frações que apresentaram atividade inibitória contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* foram Fc2 e Fc3. As duas frações ativas foram reunidas, nomeadas Fd e submetidas a novas análises cromatográficas.

A seguir, o esquema 9 apresenta as etapas sumarizadas da linhagem *Fusarium* sp (591).

Esquema 9: Fluxograma do estudo químico do fungo endófito *Penicillium pinophilum*.

5.3.2.1 Estudo da fração Fd

Para a separação dos compostos da fração Fd foi realizada uma cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak com fase estacionária de sílica Si-1 e fase móvel com uma mistura de solventes (hexano, acetato de etila, diclorometano e metanol). As frações obtidas foram monitoradas por CCD e as semelhantes foram reunidas em 10 frações e submetidas a um bioensaio *in vitro* de atividade fúngica contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* (a 2 mg mL⁻¹) (Fig. 33).

Figura 33: Bioensaio das frações após purificação em coluna pré-empacotada de sílica. C: controle com fitopatógeno; Fd1 à Fd10: frações obtidas na separação em coluna.

Verificou-se no ensaio biológico que as 2 frações foram ativas foram Fd2 e Fd8. A fração com maior atividade antifúngica e que apresentou menos compostos em CCD em comparação à outra fração ativafoi a fração Fd8. Esta foi submetida a novas separações cromatográficas.

A seguir, o esquema 10 apresenta as etapas sumarizadas do estudo da fração Fd.

Esquema 10: Fluxograma do estudo químico da fração Fd.

4.3.2.2. Estudo da fração Fd8

Para a separação dos compostos da fração Fd8 foi realizada uma cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak, com fase estacionária de sílica Si-1 e fase móvel com gradiente de solventes orgânicos. As frações obtidas foram monitoradas por CCD e as semelhantes foram reunidas e submetidas a um bioensaio *in vitro* de atividade fúngica contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* (a 2 mg mL⁻¹) (Fig.34).

Figura 34: Bioensaio das frações após purificação em coluna pré-empacotada de sílica. C: controle com fitopatógeno *C. gloeosporioides*; Fd8A à Fd8G: frações obtidas na separação em coluna

Observou-se no ensaio biológico que as 3 frações ativas foram Fd8B, Fd8E e Fd8F. A fração com maior atividade antifúngica e com menos compostos em CCD foi a fração Fd8B. Esta foi submetida a novas separações cromatográficas. Também foi verificada uma mudança na morfologia do fitopatógeno durante seu crescimento.

A seguir, o esquema 11 apresenta as etapas sumarizadas do estudo da fração Fd8.

Esquema 11: Fluxograma do estudo químico da fração Fd8

A fração Fd8B foi submetida a uma análise em HPLC.

5.3.2.3. Estudo da fração Fd8b

A fração foi solubilizada em metanol (grau HPLC) e submetida a uma cromatografia por HPLC e seus compostos foram separados em coluna de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ (CSC-Inertsil 150 Å/ODS 2 de 5 µm de dimensões 25 x 0,94 cm) e fase móvel com os eluentes água: metanol (gradiente iniciando em 4:6; 3:7; 2:8; 1:9) durante 20 minutos e 0:10 durante 10 minutos, fluxo de 1 mL min⁻¹, comprimento de onda 254 nm). As frações foram coletadas de acordo com os intervalos indicados na figura 35.

Figura 35: Cromatograma da fração Fd8B após análise no HPLC. Os números indicam as frações coletadas nos respectivos tempos de retenção.

As frações separadas através de HPLC foram submetidas a um bioensaio de atividade fúngica *in vitro* contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* (a 1 mg mL⁻¹) (Fig. 36).

Figura 36: Bioensaio das frações após separação em HPLC. C: controle com fitopatógeno *C. gloeosporioides*; Fd8B1 à Fd8B10: frações obtidas após separação.

Como pode ser observado no ensaio biológico apenas a fração Fd8B2 apresentou atividade antifúngica, porém essa fração não foi selecionada para continuar o estudo por apresentar muitos compostos em análise por HPLC. Para prosseguir com o estudo, foram selecionadas as frações Fd8B3, Fd8B4 e Fd8B5.

A seguir, o esquema 12 apresenta as etapas sumarizadas do estudo da fração Fd8B.

Esquema 12: Fluxograma de estudo químico da fração Fd8B. HPLC: coluna de sílica C₁₈, fase móvel com os eluentes água: metanol

5.3.2.4. Estudo da fração Fd8b3

A fração Fd8B3 foi analisada em HPLC para averiguar o grau de pureza, como mostra a figura 37.

Figura 37: Cromatograma da fração Fd8B3 após separação no HPLC.

Foi verificado que a fração Fd8B3 apresentou um pico no tempo de retenção 10,1 min. e pôde ser visualizado nos comprimentos de onda 275 nm, 254 nm e 210 nm, mas ficou claro que a amostra tem maior absorção no comprimento de 210 nm. A amostra apresentou bom grau de pureza e foi submetida a uma análise por HPLC-UV-ELSD-MS (Fig. 38), conforme metodologia descrita no item 3.5.2 .

Figura 38: Cromatograma da fração Fd8B3, em destaque o pico do composto

O composto visualizado no tempo de retenção de 9,94 min. apresentou em seu espectro de UV 3 bandas máximas e seu espectro de massas apresentou vários picos de íon molecular, correspondentes a massa molar ionizada, sodiada, e fragmentos ionizados. Analisando o espectro de massas para este composto foi possível observar um pico intenso de relação massa/carga (m/z) 301 e outro menos intenso de m/z 279. Subtraindo-se estes valores de m/z resulta no valor de 22 unidades de massa, que se refere a massa do elemento sódio menos 1 unidade de massa que se refere ao elemento hidrogênio. A presença destes picos de íons moleculares sugere, portanto que m/z 301 refere-se a massa do composto com aduto de sódio $[M+Na]^+$ e m/z 279 refere-se a massa do composto protonada $[M+H]^+$ (Fig. 39).

Figura 39: Espectro da amostra mostrando o composto. A: espectro de absorção do composto no UV; B: espectro de massa com a massa do composto protonada com hidrogênio e sódio.

Esta fração (Fd8B3) foi submetida a análise em espectrometria de massas de alta resolução (Fig. 40), conforme descrito no item 4.5.3.

Figura 40: Espectro de alta resolução da Fração Fd8B3 evidenciando o valor do composto m/z 301,1413 $[M+Na]^+$.

No espectro pode ser observado o valor m/z 301,1413 $[M+Na]^+$ e o valor m/z 579,2930 $[2M+Na]^+$ protonados com sódio. A partir desse resultado foi realizada uma busca no banco de dados "Dictionary of Natural Products", "Scifinder" e na literatura, verificando-se que existem 751 compostos com o peso molecular com valor 278, e com o valor aproximado do composto em estudo (278,15) foram encontrados 101 compostos, sendo 6 produzidos por fungos do gênero *Penicillium*, dentre eles 9-deoxicurvularina, penicitrinol D e brefeldina A. Alguns destes metabólitos podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4: Estruturas químicas dos compostos com peso molecular 278 e demais.

Composto (fórmula molecular, peso molecular)	Classe química	Fórmula estrutural	Fonte	Atividade biológica	Referência
9-deoxicurvarina $C_{15}H_{19}O_4$ 278,1518	Macrolídeo		<i>Penicillium</i> sp, <i>Curvularia</i> sp, <i>Chochliobolus</i> sp e <i>Alternaria</i> sp	Atividade citotóxica	Elzner et al., 2008
3-Hidroxi-3- [(4-metoxifenil) metil]-1,4- dimetil-2,5- piperazinediona $C_{14}H_{18}N_2O_4$ 278.1266	Macrolídeo		<i>Penicillium bre</i> <i>vi-compactum</i>	Atividade citotóxica	Ayer et al., 1990
peneciraistina A $C_{15}H_{20}O_5$ 279,1238	Polifenol		<i>Penicillium</i> <i>raistrickii</i>	Atividade citotóxica contra tumor cancerígeno de pulmão e coração	Ma et al., 2012
penipanoid B $C_{16}H_{13}N_3O_2$ 279,0966	Alcalóide		<i>Penicillium</i> <i>paneum</i>	Atividade citotóxica	Li et al., 2011
brevioxima $C_{15}H_{22}N_2O_3$ 278.1630	Alcalóide		<i>Penicillium</i> <i>brevicompactu</i> <i>m</i>	Inibidor hormonal de desenvolvimen to de insetos	Moya et al., 1997

Existem diversos compostos produzidos por fungos do gênero em estudo que apresentam diferentes fórmulas moleculares, estruturais e diferentes classes químicas, porém o peso molecular semelhante. Provavelmente compostos das classes dos terpenos, fenóis, alcalóides ou aminoácidos não correspondem ao metabólito isolado da fração Fd8B3, pois ao

realizar as separações, os compostos foram analisados por CCD e quando revelados pelos reagentes ácido fosfomolibdico, ninidrina e dragendorff, não se mostraram positivos.

Apesar de ser uma fração semi pura, o metabólito secundário sintetizado pelo fungo *P. pinophilum* pode ser o composto 9-deoxicurvularina, uma vez que esta substância possui peso molecular próximo do peso molecular do composto isolado (278,1589). Elzner et al (2008) obteve o composto 9-deoxicurvularina através de uma hidrogenização, adicionando paladium/carbono a 10% em uma solução que continha a substância curvularina e acetato de etila. A suspensão foi agitada em atmosfera de hidrogênio durante 15 horas. Em seguida o solvente foi evaporado, obtendo-se o composto 9-deoxicurvularina (Fig.41). Esse composto, também, já foi isolado do fungo *Alternaria cinerariae* (LIU et al., 1998), porém, não foi relatado na literatura testes de atividade biológica com este composto, assim como a produção deste composto pelo fungo *P. pinophilum*.

Figura 41: Síntese do composto 9-Deoxycurvularin a partir do composto Curvularina

Foi realizado um ensaio biológico de atividade fúngica *in vitro* contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* com 1 mg mL⁻¹ da fração Fd8B3 (Fig.42).

Figura 42: Bioensaio *in vitro* de atividade fúngica da fração Fd8B3 contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*.

Como foi observado o composto isolado do fungo *P. pinophilum* não apresentou atividade antifúngica contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*. Segundo a literatura, os metabólitos com peso molecular semelhante ao do composto isolado, nesse estudo, não apresentam atividade antifúngica contra fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*.

5.3.2.5. Estudo da fração Fd8b4

A fração Fd8B4 foi analisada no HPLC para averiguar o grau de pureza e seu tempo de retenção, como mostra a figura 43.

Figura 43: Cromatograma da fração Fd8B4 após separação no HPLC.

Foi observado que a fração apresentou estar semi pura e o composto pode ser visualizado nos comprimentos de onda 275 nm, 254 nm e 210 nm. Nota-se que os compostos presentes nesta fração apresentam uma maior absorção em 210 nm, significando provavelmente que os compostos presentes nesta fração apresentam poucas insaturações em suas estruturas químicas.

A amostra foi submetida a uma análise por HPLC-UV-ELS-MS e também a uma análise em espectrometria de massas. Após a realização das análises observou-se que o composto isolado com valor m/z 292,16, se trata do mesmo composto isolado da fração **Fa6A4'e** do endofítico *Fusarium* sp., já discutido anteriormente.

Foi realizado um bioensaio de atividade fúngica *in vitro* contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* com 1 mg mL⁻¹ da fração Fd8B4 (Fig.44).

Figura 44: Bioensaio *in vitro* de atividade fúngica da fração Fd8B4 contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*.

Como pode ser observado a fração Fd8B4 não apresentou atividade contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*, assim como o composto (pico1) da fração Fa6A4'e isolada do endofítico *Fusarium* sp.

Compostos com este valor *m/z* são produzidos por fungos do gênero *Penicillium*, mas não foi relatado na literatura, sendo produzidos pelo fungo *Penicillium pinophilum*. Estudos adicionais seriam necessários para concluir se a perda da atividade da fração estaria relacionada com a degradação da molécula ou alguma outra reação do composto.

5.3.2.6. Estudo da fração Fd8b5

A fração Fd8B5 foi analisada no HPLC para averiguar o grau de pureza e seu tempo de retenção, como mostra a figura 45.

Figura 45: Cromatograma da fração Fd8B5 após separação no HPLC.

Foi observado que a fração apresentou alto grau de pureza e pôde ser visualizado nos comprimentos de onda 275 nm, 254 nm e 210 nm. Nota-se que os compostos presentes nesta fração, também apresentam uma maior absorção em 210 nm, significando provavelmente que os compostos presentes nesta fração apresentam poucas insaturações em suas estruturas químicas. A amostra foi submetida a uma análise por HPLC-UV-ELSD-MS conforme metodologia descrita no item 3.5.2 e também a uma análise em espectrometria de massas conforme descrito no item 3.5.3. Após a realização das análises observou-se que o composto isolado possui com valor m/z 306,1827, igualmente como observado no pico 2 da fração Fa6A4'e isolada do endofítico *Fusarium* sp., já discutido anteriormente.

Foi realizado um bioensaio de atividade biológica *in vitro* contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* com 1 mg mL⁻¹ da fração Fd8B4 (Fig.46).

Figura 46:B ioensaio *in vitro* de atividade fúngica da fração Fd8B5 contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*.

Como pode ser observado a fração Fd8B4 não apresentou atividade contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*, assim como o composto (pico 2) da fração Fa6A4'e isolada do endofítico *Fusarium* sp.

Compostos com este valor m/z são produzidos por fungos do gênero *Penicillium*, mas não foi relatado na literatura produzidos pelo fungo *Penicillium pinophilum*. Tanto na literatura como no nosso trabalho a fração com estes compostos não apresentaram atividade antifúngica fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*. Estudos adicionais seriam necessários para concluir se a perda da atividade da fração estaria relacionada com a degradação ou alguma outra reação do composto.

Para elucidar a estrutura química inequivocamente seria necessário realizar uma análise de ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi realizado o estudo de 9 linhagens de fungos endofíticos, isolados de folhas do guaranazeiro, por técnica de cultivo pareado, para avaliar a interação à 3 fitopatógenos do gênero *Colletotrichum* causador da antracnose. Nesta avaliação 2 linhagens se mostraram com potencial antifúngico.

Estas linhagens foram identificadas por técnicas morfológicas e moleculares como sendo *Penicillium pinophilum* e do gênero *Fusarium*.

Foram obtidos extratos brutos e frações com metabólitos secundários, das duas linhagens de fungos endofíticos, e ambos se apresentaram com atividade antifúngica aos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*, em ensaios *in vitro* pela técnica de difusão em disco de papel filtro.

As frações semi puras, obtidas no final do trabalho foram caracterizadas quimicamente por espectrometria de massas, porém não foi possível a atribuição inequívoca das moléculas presentes nas frações; bem como estas frações apresentam pouca atividade antifúngica aos fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*.

O presente estudo é uma contribuição científica, pois demonstrou o potencial de linhagens de fungos endofíticos e seus os extratos na inibição do crescimento dos fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*, o que pode ser uma alternativa ao uso de agroquímicos tóxicos ou ser um coadjuvante ao uso destes.

REFERÊNCIAS

- ALY, H. A.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, Dusseldorf, v.41, p.1–16, Fev. 2010.
- ALY, H. A.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, São Paulo, v. 90, p.1829–1845, Apr. 2011.
- AMNA, T.; PURI, S. C.; VERMA, V.; SHARMA, J. P.; KHAJURIA, R. K.; MUSSARRAT, J.; SPITELLER, M.; QAZI, G. N. Bioreactor studies on the endophytic fungus *Entrophospora infrequens* for the production of an anticancer alkaloid camptothecin. **Canadian Journal Microbiology**, Toronto, n. 52, p. 189–196, Mar. 2006.
- ANKANNA, S.; SAVITHRAMMA, N. Isolation and identification of phenolic compounds by HPLC and electrospray ionization mass spectrometry and their free radical scavenging activity of *Shorea tumbuggaia* Roxb. **International Journal of Phytomedicine**, Berlim, n. 5, p. 94-101, 2013.
- ANTUNES, L. E.C.; RISTOW, N. C.; KROLOW, A. C. R.; CAPENEDO, S.; REISSER JÚNIOR, R. N. Z. Yiled and quality of strawberry cultivars. **Horticultura Brasileira**, Pelotas, v. 28, p. 222-226, 2010.
- ARNOLD, L. E.; VITELLO, B.; MCDUGGLE, C.; SCAHILL, L.; SHAH, B.; GONZALEZ, N. M.; CHUANG, S.; DAVIES, M.; HOLLAWAY, J.; AMAN, M. G.; CRONIN, P.; KOENIG, K.; KOHN, A. E.; MCMAHON, D. J.; TIENEY, E. “Parent-Defined Target Symptoms Respond to Risperidone in RUPP Autism Study: Customer Approach to Clinical Trials.” **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**. Columbus, v.42, n.12, p.1443-1449, Dec. 2003.
- ARSENAULT, G.P. Quinones from *Fusarium solani* D2 purple and structure of (+)-solaniol. **Tetraedrom**, Nova Scotia, v. 24, p. 4745-4749, 1968.
- AYER, W. A.; ALTENA, I. V.; BROWNE, L. M. Three piperazinediones and a drimane diterpenoid from *Penicillium brevi-compactum*. **Phytochemistry**, Edmonton, v. 29, n. 5, p. 1661-1665, 1990.
- AZEVEDO, L.J.; MELO, I.S. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 137 p.
- BADALYAN, S.M.; INNOCENTI, G.; GARIBYAN, N.G. Antagonist activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v.41, p.200-225, 2002.
- BEDENDO, I.P. Oídios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**, 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v.1, p.866-871.
- BENTES, J. L. S.; BARRETO, R. W. Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuq. agente causal da antracnose do guaranazeiro / Taxonomic reevaluation of

Colletotrichum guaranicola Albuq. causal agent of guarana anthracnose. **Acta Amazônica**, Amazônia, v. 34, n.1, p. 129-131, 2004.

BRIAN, P. W.; HEMMING, H. G.; MOFFATT, J. S.; UNWIN, C. H. Canescin, an antibiotic produced by *Penicillium canescens*. **Transactions British Mycological Society**, Welwyn, v. 36, p. 243- 247, 1953.

BULHÕES, C. C.; BONALDO, S. M.; SANTOS, B. T.; TRENTTO, R. A. Produtos alternativos no controle de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), cladosporiose (*Cladosporium herbarum*) e bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*) em maracujazeiro no norte do Mato Grosso. **Revista Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias**, Mato Grosso, v.7, n.1, p. 12-19, 2012.

CASTANARES, A.; McCRAE, S. I.; WOOD, T. M. Purification and properties of a feruloyl/p-coumaroyl esterase from the fungus *Penicillium pinophilum*. **Enzyme and Microbial Technology**. Bucksburn, v. 14, p. 875-884.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Washington, v.42, p. 225-226, 1939

CLAY, K.; MARKS, S.; CHEPLICK, G. P. Effects of Fungal Endophytes on Interspecific and Intraspecific Competition in the Grasses *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne*. **Journal of Applied Ecology**, Bloomington, v.28, n. 1, p.194-204, Apr. 1991.

CLAY, K; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. **American Naturalist**, Chicago, v. 160, p. 99-127, 2002.

CHAPLA, V. M.; BIASSETO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, Araraquara, v. 5, n. 3, p. 421-437, Nov. 2013.

COSTA, I, F, D.; VEIGA, P. Inibição do desenvolvimento de *Penicillium expansum* (Link) Thom. por fungicidas, in vitro. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 26, n.3, p. 357-360, 1996.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUNDENBERG, J. H. C.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 37–113, Sep. 2012.

DIAS-ARIEIRA, C. R.; FERREIRA, L. R.; ARIEIRA, J. O.; MIGUEL, E.G.; DONEGA, M. A.; RIBEIRO, R. C. F. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.2, p.228-232, 2010.

DOMINGUES, R. J.; YOUNG, M. C. M.; TOFOLI, J. G.; MATHEUS, D. R. Potencial antifúngico de extratos de plantas e de basidiomicetos nativos sobre *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*. **Summa Phytopatology**. Botucatu-SP. v. 37, n.3, p. 149-151. 2011.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. Compendium of soil fungi. v. 1, **Academic Press**, London, 1980.

ECKERT, J. W.; EAKS, I. L. Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. In: **Reuter W, Calavan EC, Carman GE (Eds.) The Citrus Industry**. Berkeley, v. 5, 1989.

EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds. **Phytopathology**, Ontario, v.61, p.42-44, 1971.

EL-NEKETI, M.; EBRAHIM, W.; LIN, W.; GEDARA, S.; BADRIA, F.; SAAD, H. E. A.; LAI, D.; PROKSCH, P. Alkaloids and Polyketides from *Penicillium citrinum*, an Endophyte Isolated from the Moroccan Plant *Ceratonia siliqua*. **Journal of Natural Products**, Dusseldorf, n. 76, p. 1099-1104, 2013.

ELZNER, S.; SCHMIDT, D.; SCHOLLMAYER, D.; ERKEL, G.; ANKE, T.; KLEINERT, H.; FORSTERMANN, U.; KUNZ, H. Inhibitors of Inducible NO Synthase Expression: Total Synthesis of (S)-Curvularin and Its Ring Homologues. **ChemMedChem**, Mainz, n. 3, p. 924 – 939. 2008.

EMBRAPA, **Qualidade em plantas medicinais**, dez 2010. Disponível em < http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2010/doc_162.pdf> Acesso em: 4 jan 2015.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA, 2012. Disponível em: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldbases/>> Acesso em: 4 jan 2015.

FISCHER, I. H.; LOURENÇO, A. S.; AMORIM, L. Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, São Paulo, n. 33, p. 219-226, 2008.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Citros. In: **AGRIANUAL 2011**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2011, 520p.

FRISVAD, J. C., SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T. O.; SAMSON, R. A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Studies Mycology**, Moscow, v. 49, p. 201-41, 2004.

GANGADEVI, V. & MUTHUMARY, J. Taxol production by *Pestalotiopsis terminaliae*, an endophytic fungus of *Terminalia arjuna* (arjun tree). **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Chicago, n.52, p. 9-15, 2009.

GAO, F. K.; DAI, C. C.; LIU, X. Z. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. **African Journal of Microbiology Research**, Nanjing, v. 4, n.13, p. 1346-1351, 2010.

GELDERBLOM, W. C. A.; SEWRAM, V.; SHEPHARD, G. S.; SNIJMAN, P. W.; TENZA, K.; VAN DER WESTHUIZEN, L.; VLEGGAAR, R. Structure and natural occurrence of tereoisomers of the Fumonisin B series mycotoxins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Pretoria, n.55, p.4388-4394, 2007.

GIMENEZ, C.; CABRERA, R.; REINA, M.; GONZALEZ-COLOMA, A. Fungal endophytes and their role in plant protection. **Current Organic Chemistry**, Salamanca, v. 11, n.70, p.7–20. 2007.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal Natural Product**, San Francisco, v.69 p. 509–526, Mar. 2006.

GUTIERREZ, R. M. P.; GONZALEZ, A. M. N.; RAMIREZ, A. M. Compounds Derived from Endophytes: A Review of Phytochemistry and Pharmacology. **Current Medicinal Chemistry**, México, v. 19, n. 18, p. 2992-3030, 2012.

HILARINO, M.P.A., SILVEIRA, F.A.O., OKI, Y., RODRIGUES, L., SANTOS, J.C., CORREA-JÚNIOR, A., FERNANDES, G.W. & ROSA, C.A. Diversity and intra-specific variation in the community of leaf endophytic fungi in a tropical shrub, *Bauhinia brevipes* (Fabaceae). **Acta Oecologica**, Alberta, v. 23, p. 26-34, 2009.

HUANG, Y. F.; QIAO, L.; LV, A. L.; PEI, Y. H.; TIAN, L. Eremophilane sesquiterenes from the marine fungus *Penicillium* sp. BL27-2. **Chinese Chemical Letters**, Hangzhou, n. 19, p. 562-564, 2007.

HUANG, W. Y.; CAI, Y. Z.; XING, J.; CORKE, H.; SUN, M. A Potential Antioxidant Resource: Endophytic Fungi from Medicinal Plants. **Economic Botany**, Hong Kong, v. 61, n. 1, p. 14-30. 2007.

INDEX FUNGORUM, 2010. Disponível em < <http://www.indexfungorum.org/>>. Acesso em: 20 dez 2014.

International commission on microbiological specifications for foods, 1996. Disponível em < <http://www.icmsf.org/>>. Acesso em: 20 dez 2014.

JIANG, S. J.; QIANG, S.; ZHU, Y. Z.; DONG, Y. F. Isolation and phytotoxicity of a metabolite from *Curvularia eragrostidis* and characterisation of its modes of action. **Annals of Applied Biology**, Nanjing, p. 152:103–111, 2008. doi:10.1111/j.1744-7348.2007.00202.x

JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. V. M.; PEREIRA, M.; LIMA, M. M.; CHAVES, R. C. **Doenças da goiabeira no cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados. (Circular Técnica, 15), 32p. 2001.

KAUL, S.; GUPTA, S.; AHMED, M.; DHAR, M. K. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochem Review**, Jammu, n. 11, p. 487–505, Nov, 2012.

KERN, H.; NAEF-ROTH, S. Zweineue, durch Martiella-Fusarien gebildete Naphthazarin-Derivate. **Phytopathology**, Germany, v. 60, p. 316-324, 1967.

KIM, J. C.; LEE, Y. W.; TAMURA, H.; YOSHIZAWA, T. Sambutoxin: A New Mycotoxin Isolated from *Fusarium sambucinum*. **Tetrahedron Letters**, Hong Kong, v. 36, n. 7, p. 1047-1050, 1995.

KIM, K. D.; OH, B. J.; YANG, J. Differential interactions of a *Colletotrichum gloeosporioides* isolate with green and red pepper fruits. **Phytoparasitica, Bet Dagan**, Seoul, v. 27, n. 2, p. 97-106, 1999.

KORNSAKULKARN, J.; DOLSOPHON, K.; BOONYUEN, N.; BOONRUANGPRAPA, T.; RACHTWEE, P.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P.; THONGPANCHANG, C. Dihydronaphthalenones from endophytic fungus *Fusarium* sp. BCC14842. **Tetrahedron**, Thailand, v. 67, p. 7540- 7547, 2011.

KOUR, A.; SHAWL, A.S.; REHMAN, S.; QAZI, P. H.; SUDAN, P.; KHAJURIA, R. K.; SULTAN, P.; VERMA, V. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, New Delhi, n.24, p.1115–1121, 2008.

KUMAR, C. G.; MONGOLLA, P.; SUJITHA, P.; JOSEPH, J.; BABU, K. S.; SURESH, G.; RAMAKRISHNA, K, V, S.; PURUSHOTHAM, U.; SASTRY, G. N.; KAMAL, A. Metabolite profiling and biological activities of bioactive compounds produced by *Chrysosporium lobatum* strain BK-3 isolated from Kaziranga National Park, Assam, India. **SpringerPlus**, New Delhi, v. 2, n. 22, p. 1-9, 2013.

KUPPER, K. C.; FERNANDES, N. G.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, São Paulo, n. 28, p. 251-257, 2003.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 4, n. 2, p. 12-20. 2010.

LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; JENSEN, S. R. Aurantiamine, a diketopiperazine from two varieties of *Penicillium aurantiogriseum*. **Phytochemistry**, Chicago, v. 31, n. 5, p. 1613-161159, 1992.

LEANDRO, L. F. S.; GLEASON, M. L.; NUTTER JUNIOR, F. W.; WEGULO, S. N.; DIXON, P. M. Germination and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 7, p.659-664, 2001.

LI, J. T.; FU, X. L.; TAN, C.; ZENG, Y.; WANG, Q.; ZHAO, P. J. Two new chroman derivations from the endophytic *Penicillium* sp. DCS523. **Journal Molecules**. Osaka, n. 16, p. 686-693, 2011.

LIU, Y.; LI, Z.; VEDERAS, J. C. Biosynthetic Incorporation of Advanced Precursors into Dehydrocurvularin, a Polyketide Phytotoxin from *Alternaria cinerariae*. **Tetrahedron**. Alberta, v. 54, p. 15937-15958, 1998.

MA, L.Y.; LIU, W. Z.; SHEN, L.; HUANG, Y.; RONG, X.; XU, Y.; GAO, X.; Spiroketal, isocoumarin, and indoleformic acid derivatives from saline soil derived fungus *Penicillium raistrickii*. **Tetrahedron**, Qingdao, v. 68, p. 2276e2282, 2012.

MALMSTROM, J.; CHRISTOPHERSEN, C.; FRISVAD, J. C. Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. **Phytochemistry**, Copenhagen, v. 54, p. 301-309, 2000).

MASSIAS, M.; REBUFFAT, S.; MOLHO, L.; CHIARONI, A.; RICHER, C.; BODO, B. Expansolides A and B: Tetracyclic Sesquiterpene Lactones from *Penicillium expansum*. **Journal American Chemical Society**, Washington, v. 112, n. 22, p. 8112-8115, 1990.

MICHEREFF, S. et al. Manejo integrado de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S.J. et al. Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: UFRPE, p.367-388, 2005.

MENEZES, E. A.; SOARES, K. P.; NASCIMENTO, K. M.; AMORIM, L. N.; NETO, J. G. L.; CUNHA, F. A. Macrolídeos: Uma Atualização. **NewsLab**, Ceará, Ed. 85, p. 116- 126, 2007.

MITCHELL, A. M.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; VARGAS, P. N.; EZRA, D. Muscodor crispans, a novel endophyte from *Ananas ananassoides* in the Bolivian Amazon. **Fungal Diversity**, Amazônia, n. 31, p. 37–43, 2008.

MOLINARO, E. M. Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 4 / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira.- Rio de Janeiro, EPSJV,IOC, 2009. 496 p. ISBN:978-85-98768-41-0

MOYA, P.; CASTILLO, M.; FERA, E. P.; COUILLAUD, F.; MARTINEZ, R.; GARCERA, M. D.; MIRANDA, M. A.; PRIMO, J.; PARDO, R. M. Brevioxime: A New Juvenile Hormone Biosynthesis Inhibitor Isolated from *Penicillium brevicompactum*. **Journal of Organic Chemical**, Valencia, v. 62, p. 8544-8545, 1997.

MULLER, C.B.; KRAUSS, J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. **Current Opinion Plant Biology**, Switzerland, n.8, p. 450–456, Aug. p2005.

MUSGRAVE, O. C. Curvularin. Part I: Isolation and Partial Characterization of a Metabolic Product from a New Species of *Curvularia*. **Journal of the Chemical Society**, Rshire, p. 4301- 4305, 1956.

MUSGRAVE, O. C. Curvularin Part 2: The constitution of an aromatic degradation product and the partial structure of curvularin. **Journal of the Chemical Society**, Rshire, v. 3, p. 1104–1108, 1957.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat. p. 137, 2010.

OKAMOTO, S.; HOSOE, T.; ITABASHI, T.; NOZAWA, K.; OKADA, K.; TAKAKI, G. M. C.; CHIKAMORI, M.; YAGUCHI, T.; FUKUSHIMA, K.; MIYAJI, M.; KAWAI, K. New Decalin Derivatives, Eujavanoic Acids A and B, from *Eupenicillium javanicum*. **Journal of Natural Products**, Tokyo, v. 67, n. 9, p. 1580-1583, 2004.

OKI, Y.; SOARES, N.; BELMIRO, M.S.; CORRÊA-JUNIOR, A.; FERNANDES, G. W. Influência dos fungos endofíticos sobre os herbívoros de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Neotropical Biology and Conservation**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 83-88. 2009.

PASTRE, R.; MARINHO, A. M. R.; FILHO, E. R. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. **Química Nova**, São Carlos, v. 30, n. 8, p. 1867-1871, 2007

PATHRE, S. V.; GLEASON, W. B. The structure of fusarochromananone: new mycotoxin from *Fusarium roseum*, "Grarninearum". **Canadian Journal Chemical**, Minnessota, v. 64, p. 1308-1311, 1985.

PETRINI, O. Ecological and physiological aspects of host-specificity in endophytic fungi, in S.C. Redlin & L.M. Carris (eds), Endophytic fungi in Grasses and Woody Plants. **APS Press**, Minnesota, U.S.A, p.87-100, 1996.

PHIPPS, R. K.; GOTFREDSEN, C. H.; PALUDAN, S. R.; FRISVAD, J. C.; ERIKSEN, K.; PETERSEN, B. O.; DUUS, J. O.; LARSEN, T. O. Hesseltins B–G, novel meroterpenoids from a new *Penicillium* species. **Tetrahedron Letters**, Denmark, v. 52, p. 598–601, 2011.

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

POHANKA, A.; CAPIEAU, K.; BROBERG, A.; STENLID, J.; STENSTROM, E.; KENNE, L. Enniatins of *Fusarium* sp. strain F31 and their inhibition of *Botrytis cinerea* spore germination. **Journal of Natural Products**, Sweden, v.67, p. 851-857, 2004.

RANDO, D.; KOHRING, G. W.; GIFFHORN, F. Production, purification and characterization of glucose oxidase from a newly isolated strain of *Penicillium pinophilum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Hamburg, v.48, p. 34-40, 1997.

RANCIC, A.; SOKOVIC, M.; KARIOTI, A.; VUKOJEVIC, J.; SKALTSA, H. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Dusseldorf, v. 22, p. 80–4. 2006.

ROBESON, D. J.; STROBEL, G. A. α , β -Dehydrocurvularin and curvularin from *Alternaria cinerariae*. **Zeitschrift für Naturforschung**, Berlin, v. 36, p. 1081–1083, 1981.

RODRIGUES, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.59, p. 1109–1114, 2008.

ROZO, M. E. B.; PATRIARCA, A.; CABRERA, G.; PINTO, V. E. F.; Determinación de perfiles de producción de metabolitos secundarios característicos de especies del género *Alternaria* aisladas de tomate. **Revista Iberoamericana de Micología**, Buenos Aires, v. 31, n. 2, p. 119–124, 2014.

SAIKKONEN, K., FAETH, S.R., HELANDER, M. & SULLIVAN, T.J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Arizona, v. 29, p.319-343. 1998.

- SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Seminário: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina. v. 32, n. 2, p. 199-212. 2011.
- SEBASTIÀ, N.; MECA, G.; SORIANO, J. M.; MAÑES, J. Antibacterial effects of enniatins J1 and J3 on pathogenic and lactic acid bacteria. **Food and Chemical Toxicology**, Valencia, n. 49, p. 2710-2717, 2011.
- SHIZURI, Y.; NAGAHAM, M.; YAMAMUR, S.; KAWA, K.; KAWA, N.; FURUKAW, H. Isolation and Structures of Citreovirenone and Citreovirone. **Chemistry Letters**, Nagoya, p. 1129- 1132, 1986.
- SILVA, J. C.; FERNANDES, O. C. C.; MARTINS, M. S.; JUNIOR RODRIGUES, A. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, Amazonas, n. 30, p. 48-54, 2010.
- SINGH, S. B.; ZINK, D. L.; DOMBROWSKI, A. W.; POLISSHOOK, J. D.; ONDEYKA, J. G.; HIRSHFIELD, J.; FELOK, P.; HAZUDA, D. J. Integracides: tetracyclic triterpenoid inhibitors of HIV-1 Integrase produced by *Fusarium* sp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. West point, n.11, p. 1577–1582, Sep. 2003.
- SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.
- SREEKANTH, D.; SUSHIM, G. K.; SYED, A.; KHAN, B. M.; AHMAD, A. Molecular and Morphological Characterization of a Taxol-Producing Endophytic Fungus, *Gliocladium* sp., from *Taxus baccata*. **Mycobiology**, Leeds, v. 39, n. 3, p. 151-157, Sep. 2011.
- STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon CW, White JF (eds) **Microbial endophytes**. Dekker, New York, p. 3-30. 2000.
- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILHO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal Natural Product**, Salt Lake, n. 67, p. 257-268, 2004.
- SUMMERELL, B. A.; LESLIE, J. F. Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? **Fungal Diversity**, Manhatthan, v. 50, n. 1, p. 135-144, Aug, 2011.
- SUN, X.; KONG, X.; GAO, H.; ZHU, T.; WU, G.; GU, Q.; LI, D. Two new meroterpenoids produced by the endophytic fungus *Penicillium* sp. SXH-65. **Archives of Pharmacal Research**. Xangai, out. 2013.
- SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M. B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T.S. Fungal endophytes and bioprospecting. **British Mycological Society**, London, v. 23, p.9-19, May. 2009.

TIMMER, L. W.; AGOSTINI, J. P.; ZITKO, S. E.; ZULFIQUAR, M. Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, Manaus, n.78, p.329–334, 1994.

TIMMER, L. W.; PRIEST, M.; BROADBENT, P.; TAN, M. K. Morphological and pathological characterization of species of *Elsinoe* causing scab diseases of citrus. **Phytopathology**, Berlin, v. 86, n. 10, p. 1032-1038, Jul. 1996.

TRIPATHI, S.; KAMAL, S.; SHERAMATI, I.; OELMULLER, R.; VARMA, A. Mycorrhizal fungi and other root endophytes as biocontrol agents against root pathogens. **Mycorrhiza**, Berlin, 3ed, p. 281-306, 2008.

VERMA, V. C.; KHARWAR, R. N.; STROBEL, G. A. Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. **Natural Product Communications**, Varanashi, n. 4, p. 1511–1532, Nov. 2009.

WANG, Y. T.; LO, H. S.; WANG, P. H. Endophytic fungi from *Taxus mairei* in Taiwan: first report of *Colletotrichum gloeosporioides* as an endophyte of *Taxus mairei*. **Botanical Studies**, Taiwan, n.49, p. 39–43, Aug, 2008.

WANG, F. W.; HOU, Z. M.; WANG, C. R.; LI, P.; SHI, D. H. Bioactive metabolites from *Penicillium* sp., an endophytic fungus residing in *Hopea hainanensis*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**. China, v. 24, p. 2143–2147, mar 2008.