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

**Potencial metabólico de fungos endofíticos de plantas do gênero
Anthurium da Ilha de Alcatrazes**

Sérgio Birello Sartori

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

**Piracicaba
2016**

Sérgio Birello Sartori
Biólogo

Potencial metabólico de fungos endofíticos de plantas do gênero
***Anthurium* da Ilha de Alcatrazes**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2016

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

Sartori, Sérgio Birello

Potencial metabólico de fungos endofíticos de plantas do gênero *Anthurium* da Ilha de Alcatrazes / Sérgio Birello Sartori. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
218 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Produtos naturais 2. Fitopatógenos 3. MS-MALDI-TOF 4. Leishmaniose
5. *Aureobasidium* 6. *Penicillium* I. Título

CDD 635.93464
S251p

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

Dedico aos meus grandes amigos Gustavo (*in memoriam*), Renata, Coy, Juliane, Rafael, Milene, Giovane, Michelle, Darcio, Fernanda, Fini, Gabriela, Leonardo, Larissa, Guilherme, Gaby, Danilo, Tati, Gabizinha e Luiz Guilherme, pela amizade, paciência, apoio e por sempre estarem presente em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) pela formação profissional e pela infraestrutura disponibilizada.

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade, suporte e conhecimento adquirido durante a realização deste trabalho.

A minha orientadora Profa. Dra. Simone Possedente de Lira pela orientação, paciência e principalmente pela confiança depositada para a realização deste trabalho. Agradeço pela amizade, conselhos e por toda contribuição intelectual, pessoal e profissional durante esses anos, os quais levarei por toda vida.

Ao CNPq (processo nº 142160-2012), ao BIOprospeTA FAPESP (Projeto temático - 2013/50228-8) e FAPESP (Projeto regular - 2014/15760-3) pela bolsa concedida e apoio financeiro à pesquisa.

A Marinha do Brasil por fornecer transporte à ilha de Alcatrazes.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio-MMA), a Estação Ecológica Tupinambás, aos funcionários da estação Kelen Leite, Alexandre Costa e Edilson Esteves e pelo transporte e auxílio durante a coleta na ilha de Alcatrazes.

Ao Carlos Alberto Chagas pelo auxílio durante as coletas na ilha.

Ao Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMAR-São Sebastião) e seus funcionários pelas acomodações e infraestrutura disponibilizada.

Ao Prof. Dr. Roberto de Souza Gomes Berlinck (IQSC-USP São Carlos) por disponibilizar materiais e os equipamentos HPLC-UV-MS-ELS e UPLC-MS para as análises químicas, ao aluno Mário F. C. Santon e as técnicas Fabiana T. Rodrigues e Karim F. B. de Camargo pela ajuda na utilização dos equipamentos.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho (LaBioMMi, UFSCAR) por disponibilizar o equipamento para análises por MS-MALDI-TOF.

Ao Prof. Dr. Douglas Ferreira pela ajuda nas análises por MS-MALDI-TOF e pelos conselhos para elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira e a técnica Lucina Vizotto (Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear-UFSCAR) pelas análises de RMN.

Ao Prof. Dr. André Rodrigues (Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos – UNESP Rio Claro) e aos alunos Quimi V. Montoya e Ana Maria L. Correia pela identificação morfológica e molecular dos micro-organismos estudados.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio de Assis (Instituto de biociências – UNESP Rio Claro) e a aluna Letícia P. Poli pela ajuda na coleta e identificação das plantas.

Aos Profs. Dr. João Lúcio Azevedo, Dra. Liliane D. Teixeira e Dra. Aline P. Kleiner (*in memoriam*) (ESALQ-USP) por cederem as linhagens de fitopatógenos.

Ao Prof. Dr. André G. Tempone (Laboratório de novos fármacos-doenças negligenciadas - Instituto Adolfo Lutz-SP) pelo ensaio de atividade antileishmaniose.

Aos Profs. do Departamento de Química da ESALQ, Dr. Marcos Y. Kamogawa, Dra. Wanessa M. Mattos, Dr. Arquimedes Lavorenti e Dr. Marcelo E. Alves e aos funcionários Beto, Felipe, Lenita, Janaína, Rita, Gertrudes, Helen e Nádia pelo companheirismo, ensinamentos e por toda ajuda.

Aos meus pais pelo amor, confiança e pela educação que me proporcionaram. Agradeço por serem exemplos de dedicação e perseverança.

Aos amigos Luciana, Flávio, Jeane, Joze, Diana, Gislaine, Tâmara, Fernando, Georgia, Marcos (Pipoca), Marina, Débora, Amanda, Ana Claudia, Marquinhos, Natália, Daniela, Cleiton, Luciana J., Ana Paula, Fernanda, Higor, Richtier, Luiz Claudio e André pela amizade e incentivo, pelos momentos de risadas e descontração e por toda ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

A amiga Luciana por ter me incentivado a iniciar o doutorado no laboratório. Agradeço pela amizade, conversas, risadas, por todo ensinamento, ajuda e, enfim, por ser uma pessoa incrível e uma grande amiga.

Aos amigos Jeane e Felipe por serem grandes amigos, pelo apoio, risadas, conselhos, churrascos e por toda ajuda durante estes anos.

A amiga Diana pelas correções, dedicação e paciência. Sua ajuda, principalmente na reta final, foi de grande importância para a realização deste trabalho.

Ao amigo Flávio pela amizade, ajuda, e ensinamentos durante estes anos.

Ao amigo Luiz Humberto pelos ensinamentos, amizade e apoio para a conclusão deste trabalho.

Ao amigo Higor pela ajuda em laboratório e por ter colaborado na obtenção dos resultados.

Enfim, agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho e da minha formação e que por ventura tiveram seus nomes esquecidos, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 A busca por novos produtos naturais	23
2.2 Ambientes pouco explorados: Arquipélago de Alcatrazes	24
2.2.1 Plantas do gênero <i>Anthurium</i>	27
2.3 Os fungos.....	29
2.3.1 Fungos endofíticos	30
2.4 Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos	32
2.4.1 A importância da leishmaniose.....	33
2.4.1.1 Atividade anti-leishmaniose de metabólitos secundários de fungos endofíticos	36
2.4.2 Fitopatógenos de importância agrônoma.....	39
2.4.2.1 Fungos fitopatogênicos do gênero <i>Colletotrichum</i>	39
2.4.2.2 Fungos fitopatogênicos do gênero <i>Fusarium</i>	41
2.4.2.3 Fungos fitopatogênicos do complexo <i>Diaporthe/Phomopsis</i>	43
2.4.2.4 Atividade anti-fitopatogênica de metabólitos secundários de fungos endofíticos.....	44
3 OBJETIVOS	49
3.1 Objetivos específicos	49
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 Fluxograma da metodologia	51
4.2 Coleta de material vegetal.....	51
4.3 Identificação taxonômica das plantas coletadas	52
4.4 Isolamento e purificação dos fungos endofíticos.....	52
4.5 Preservação dos fungos endofíticos isolados	54
4.6 Priorização dos fungos endofíticos.....	55
4.6.1 Análise do perfil espectral por <i>MALDI-TOF-MS</i>	55
4.6.2 Cultivo dos fungos selecionados e obtenção da fração acetato de etila	56
4.6.3 Ensaio de atividade antifúngica da fração acetato de etila.....	56
4.7 Identificação dos fungos endofíticos	57
4.8 Isolamento e purificação dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos...59	
4.8.1 Separação dos metabólitos secundários.....	59
4.8.1.1 Separação dos metabólitos secundários do endófito cód. P2MSF2F3	60

4.8.1.2 Separação dos metabólitos secundários do endófito cód. P210 ⁻⁴ F2	60
4.8.1.3 Separação dos metabólitos secundários do endófito cód. P7AF2F3	61
4.8.2 Monitoramento químico dos metabólitos secundários	61
4.8.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	62
4.9 Elucidação estrutural dos compostos isolados	62
4.9.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a UV-EM	62
4.9.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a EM de alta resolução	63
4.9.3 Ressonância magnética nuclear	64
4.10 Ensaios biológicos com as frações obtidas dos fungos selecionados	64
4.10.1 Ensaio de atividade antifúngica à fitopatógenos	64
4.10.1.1 Ensaio de atividade antifúngica por difusão em disco de papel	64
4.10.1.2 Ensaio de atividade antifúngica por microdiluição	65
4.10.2 Ensaio de atividade antileishmaniose	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 Coleta e identificação taxonômica das plantas coletadas	67
5.2 Isolamento dos fungos endofíticos	70
5.3 Seleção dos isolados endofíticos	73
5.3.1 Análise do perfil espectral por <i>MALDI-TOF-MS</i>	73
5.3.2 Avaliação da atividade antifúngica das frações AcOEt	79
5.4 Estudo do fungo endofítico cód. P2MSF2F3	81
5.4.1 Identificação taxonômica	81
5.4.2 Metabólito(s) secundário(s) com atividade antifúngica à fitopatógenos	84
5.4.2.1 Avaliação antifúngica por ensaio de difusão em disco de papel	90
5.4.2.2 Avaliação antifúngica por ensaio de microdiluição	92
5.4.3 Metabólito(s) secundário(s) com atividade antileishmaniose	103
5.5 Estudo do fungo endofítico cód. P210 ⁻⁴ F2	110
5.5.1 Identificação taxonômica	110
5.5.2 Metabólitos secundários com atividade antileishmaniose	112
5.6 Estudo do fungo endofítico cód. P7AF2F3	134
5.6.1 Identificação taxonômica	134
5.6.2 Metabólitos secundários com atividade antileishmaniose	137
6 CONCLUSÕES	153
REFERÊNCIAS	155
ANEXOS	185

RESUMO

Potencial metabólico de fungos endofíticos de plantas do gênero *Anthurium* da Ilha de Alcatrazes

Fungos endofíticos estão presentes em plantas de diversos ambientes e produzem compostos com amplas propriedades químicas e aplicações, tanto na área médico-farmacológica quanto na agrônômica. Entretanto, ainda há muito a ser investigado sobre seu potencial biotecnológico, principalmente em locais pouco explorados. As ilhas apresentam um ambiente particular e altamente vulnerável, tornando-as locais promissores na busca de organismos pouco comuns ou ainda endêmicos. Sendo assim, neste trabalho foi realizado o isolamento e estudo químico e biológico de fungos endofíticos isolados de 2 espécies plantas do gênero *Anthurium* da Ilha de Alcatrazes-SP. Para isto, fragmentos foliares das plantas *A. loefgrenii* (HRCB 46467) e *A. alcatrazense* (HRCB 46465 - endêmica da ilha) foram inoculados em 10 meios de cultivo com diferentes composições, resultando no isolamento de 106 fungos endofíticos. Por meio de análises químicas por MALDI-TOF-MS e ensaio biológico contra fitopatógenos, foram selecionados 3 fungos para estudo. Estes foram identificados por técnicas morfológicas e moleculares como sendo *Penicillium citrinum* (P2MSF2F3), *Penicillium simplicissimum* (P210⁻⁴F2) e *Aureobasidium melanogenum* (P7AF2F3). No estudo dos metabólitos secundários de *P. citrinum* foi isolado o composto citrinina, o qual apresentou atividade inibitória do crescimento micelial dos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* (MIC= 125 µg mL⁻¹), *Colletotrichum lindemuthianum* (MIC= 0,48 µg mL⁻¹), *Phomopsis sojae* (MIC= 250 µg mL⁻¹) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (MIC= 125 µg mL⁻¹). Outras frações obtidas do meio metabólico de *P. citrinum* (fração F3a3 e citrinina) apresentaram atividade inibitória (100% de inibição) à formas promastigotas de *Leishmania infantum*. No estudo dos metabólitos secundários de *P. simplicissimum* foi obtida a fração F2b, ativa contra *L. infantum* (100% de inibição), da qual foram isolados os compostos andrastina A e penicisoquinolina, sendo o primeiro relato de sua produção por esta espécie, além de outros 5 compostos ainda não identificados. No estudo dos metabólitos secundários de *A. melanogenum* foi isolado o composto metil-orselinato, relatado pela primeira vez para este fungo. Do mesmo fungo foi obtida a fração F1d2l ativa contra *L. infantum* (100% inibição), da qual foram isolados 2 compostos ainda não identificados. Este é o primeiro relato de fungos isolados de antúrios da ilha de Alcatrazes, bem como do estudo de seus metabólitos secundários. Este trabalho apresenta contribuição no conhecimento sobre fungos endofíticos e seu potencial metabólico, com aplicações nas áreas agrônômica e médico-farmacológica.

Palavras-chave: Produtos naturais; Fitopatógenos; MS-MALDI-TOF; Leishmaniose; *Aureobasidium*; *Penicillium*

ABSTRACT

Metabolic potential of endophytic fungi of plants of the genus *Anthurium* from Alcatrazes Island

Endophytic fungi are present in plants in various environments and produce compounds with wide chemical properties and applications, both in the medical and in agronomic field. However, much remains to be investigated about their biotechnological potential, especially in unexplored places. Islands have a particular and highly vulnerable environment, making them promising sites in search of unusual or endemic organisms. Thus, this work represents the isolation and chemical and biological study of endophytic fungi isolated from 2 species of plants of the genus *Anthurium* of Alcatrazes island-SP. For this, leaf fragments from plants *A. loefgrenii* (HRCB 46467) and *A. alcatrazense* (HRCB 46465 - endemic plant from the Island) were inoculated onto 10 culture media with different composition, resulting in the isolation of 106 endophytic fungi. Three strains were selected to be studied through chemical analysis by MALDI-TOF-MS and bioassay against phytopathogens. These were identified by morphological and molecular techniques as *Penicillium citrinum* (P2MSF2F3), *Penicillium simplicissimum* (P210⁻⁴F2) and *Aureobasidium melanogenum* (P7AF2F3). In the study of secondary metabolites of *P. citrinum* it was isolated the compound citrinin, which showed inhibitory activity against the plant pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* (MIC= 125 µg mL⁻¹), *Colletotrichum lindemuthianum* (MIC= 0.48 µg mL⁻¹), *Phomopsis sojae* (MIC= 250 µg mL⁻¹) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (MIC= 125 µg mL⁻¹). Other fraction obtained from the metabolic extract of *P. citrinum* (F3a3 fraction and citrinin), showed inhibitory activity (100% inhibition) to *Leishmania infantum* promastigotes. In the study of secondary metabolites of *P. simplicissimum* it was obtained F2b fraction, active against *L. infantum* (100% inhibition), which were isolated andrastin A and penicisoquinoline compounds, the first report of its production for this species, as well 5 unidentified compounds. In the study of secondary metabolites from *A. melanogenum* was isolated the methyl-orsellinate compound, first reported for this fungus. From the same strain was obtained F1d2l fraction, active against *L. infantum* (100% inhibition), from which were isolated 2 unidentified compounds. This is the first report of fungi isolated from Alcatrazes Island anthuriums and the study of their secondary metabolites. This study presents contribution to knowledge of endophytic fungi and their metabolic potential with applications in the medical and agronomic fields.

Keywords: Natural products; Plant pathogens; Leishmaniose; MS-MALDI-TOF; *Penicillium*; *Aureobasidium*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Arquipélago de Alcatrazes, São Sebastião – SP. Distância entre o continente e a ilha de Alcatrazes (36 km da cidade de São Sebastião) (a); Ilha de Alcatrazes (b).....	26
Figura 2 - Ciclo de vida de protozoários de <i>Leishmania</i> . Adaptado de CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças	34
Figura 3 - Estruturas químicas dos compostos citados no item 2.4.1.1 (1-15).....	38
Figura 4 - Estruturas químicas dos compostos citados no item 2.4.2.4 (16-27).....	47
Figura 5 - Fluxograma resumindo as etapas metodológicas realizadas	51
Figura 6 - Sistema de atribuição de códigos dados aos fungos endofíticos isolados	54
Figura 7 - Ficha de informações de coleta da planta P2 (<i>A. loefgrenii</i>) coletada na ilha de Alcatrazes.	68
Figura 8 - Ficha de informações de coleta da planta P7 (<i>A. alcatrazense</i>) coletada na ilha de Alcatrazes. (Fotos: Sartori, S.B.).....	69
Figura 9 - Dendrograma de similaridade do perfil protéico por EM-MALDI-TOF de 106 isolados das plantas <i>A. loefgrenii</i> (P2) e <i>A. alcatrazense</i> (P7).	75
Figura 10 - Agrupamento das linhagens de <i>Cladosporium</i> sp. de acordo com a intensidade dos picos obtidos no espectro em relação à m/z (a); espectros obtidos para os MSP's (Main Spectral Projection) das linhagens do gênero <i>Cladosporium</i> sp. agrupadas na mesma sub-chave do dendrograma de MSP (b)	77
Figura 11 - Imagem (verso e reverso da colônia) do endófito P2MSF2F3 cultivado em meio de extrato de malte (2%) (a); microscopia óptica (1000x) evidenciando as estruturas: conidióforos (1) e conídios (2) (b). (Fotos: Sartori, S.B.)	82
Figura 12 - Comparação da sequência do marcador beta-tubulina obtida do isolado P2MSF2F3 com àquelas depositadas no banco de dados GenBank (ident: porcentagem de identidade) (a); Árvore filogenética baseada no marcador beta-tubulina demonstrando a posição do isolado P2MSF2F3 (b)	82
Figura 13 - Ensaio de difusão em disco da fração acetato de etila do fungo <i>Penicillium citrinum</i> (P2MSF2F3) contra fungos fitopatogênicos em ensaio de difusão em disco (1mg).	84
Figura 14 - Ensaio de difusão em disco das frações F3a→F3f contra o fungo fitopatogênico <i>P. sojae</i> em ensaio de difusão em disco (1mg).....	85

Figura 15 - Ensaio de difusão em disco das frações F3a1→F3a3 contra o fungo fitopatogênico <i>P. sojae</i> em ensaio de difusão em disco (1mg).	86
Figura 16 - Cromatograma da fração F3a1 monitorado no $\lambda = 312$ nm (a); Espectro de UV da fração F3a1 (b); Espectro de massas de baixa resolução da fração F3a1 em modo positivo (c) e negativo (d);	86
Figura 17 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração F3a1b.	87
Figura 18 - Estrutura química do composto citrinina (CAS: 518-75-2).	89
Figura 19 – Fluxograma do estudo químico da fração ativa de <i>P. citrinum</i> (P2MSF2F2).	89
Figura 20 - Ensaio por difusão em disco da fração F3a1b (1 mg) contra fungos fitopatogênicos em ensaio de difusão em disco.	91
Figura 21 - Avaliação de crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> na presença da citrinina e dos fungifugas comerciais na concentração de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$	93
Figura 22 - Avaliação de crescimento micelial de <i>C. lindemuthianum</i> na presença da citrinina e dos fungifugas comerciais na concentração de $0,48 \mu\text{g mL}^{-1}$	93
Figura 23 - Avaliação de crescimento micelial de <i>P. sojae</i> na presença da citrinina e dos fungifugas comerciais na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$	94
Figura 24 - Avaliação de crescimento micelial de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> na presença da citrinina e dos fungifugas comerciais na concentração de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$	95
Figura 25 - Estrutura química do princípio ativo difenoconazol (Score®) e do grupo dos triazóis.	95
Figura 26 - Estrutura química do princípio ativo piraclostrobina (Comet®) e do grupo das estrobilurinas.	97
Figura 27 - Estrutura química do princípio ativo captana (Captan SC®) e do grupo das ftalimidas.	98
Figura 28 - Estrutura química do princípio ativo mancozeb (Dithane NT®) e do grupo dos ditiocarbamatos.	99
Figura 29 - Cromatograma da fração F3a3 monitorado em $\lambda = 254$ nm.	104
Figura 30 - Cromatograma da fração F3a3f monitorado em $\lambda = 250$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas da fração F3a1 em modo positivo (c) e negativo (d).	105

Figura 31 - Cromatograma da fração F3a3j monitorado em $\lambda = 250$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c) e negativo (d); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (e).....	107
Figura 32 - Fluxograma do estudo químico do fungo endofítico <i>P. citrinum</i> (P2MSF2F3) com atividade antileishmaniose	108
Figura 33 - a) Endófito P210 ⁻⁴ F2 (verso e reverso da colônia) cultivado em meio de extrato de malte (2%); b) microscopia óptica (1000x) evidenciando o conidióforo (1).....	110
Figura 34 - Comparação da sequência ITS obtida do isolado P210 ⁻⁴ F2 com àquelas depositadas no banco de dados GenBank (ident: porcentagem de identidade); b) Árvore filogenética baseada no marcador ITS e beta-tubulina demonstrando a posição filogenética do isolado P210 ⁻⁴ F2	111
Figura 35 - Cromatograma da fração F2b2 monitorado no $\lambda = 220$ nm.....	113
Figura 36 - Cromatograma da fração F2b2j monitorado no $\lambda = 250$ nm (a); Espectro de UV da fração F2b2j (b); Espectro de massas de baixa resolução da fração F3a1 em modo positivo (c) e negativo (d)	114
Figura 37 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração F2b2j	115
Figura 38 - Estrutura química do composto F2b2j com esquema de correlações HSQC e HMBC.....	117
Figura 39 - Estrutura química da andrastina A (CAS: 174232-42-9)	118
Figura 40 - Cromatograma da fração F2b1 monitorada em $\lambda = 220$ e 254 nm.....	120
Figura 41 - Cromatograma da fração F2b1i monitorado em $\lambda = 300$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c) e negativo (d); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (e).....	121
Figura 42 – Estrutura química dos compostos citocinina B e N ⁹ -benzil-adenina.....	122
Figura 43 - Cromatograma da fração F2b1n monitorado em $\lambda = 300$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c) e negativo (d); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (e).....	123
Figura 44 – Estrutura química da penicisoquinolina (CAS: 1236802-53-1)	125
Figura 45 - Cromatograma da fração F2b1p monitorado em $\lambda = 254$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c) e negativo (d); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (e).....	126
Figura 46 – Estrutura química do composto penicisochroman J	127

Figura 47 - Cromatograma da fração F2b3 monitorada em $\lambda = 220$ nm	127
Figura 48 - Cromatograma da fração F2b3g monitorado em $\lambda = 225$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c) e negativo (d); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (e)	128
Figura 49 - Cromatograma da fração F2b5 monitorada em $\lambda = 254$ nm	129
Figura 50 - Cromatograma da fração F2b5f monitorado em $\lambda = 230$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (d)	130
Figura 51 – Estrutura química da neoechinulina B	131
Figura 52 - Cromatograma da fração F2b5i monitorado em $\lambda = 290$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (d)	132
Figura 53 - Fluxograma do estudo químico do fungo endofítico <i>P. simplicissimum</i> (P210 ⁻⁴ F2) com atividade antileishmaniose	133
Figura 54 - a) Endófito P7AF2F3 (verso e reverso da colônia) cultivado em meio de extrato de malte (2%); b) microscopia óptica (400x) evidenciando hifas (1) e os blastoconídios (2)	135
Figura 55 - a) Comparação da sequência ITS obtido isolado P7AF2F3 com àquelas depositadas no banco de dados GenBank (ident: porcentagem de identidade); b) Árvore filogenética baseada no marcador ITS demonstrando a posição filogenética do isolado P7AF2F3	135
Figura 56 - Cromatograma da fração F1d2o monitorada em $\lambda = 254$ nm	137
Figura 57 - Cromatograma da fração F1d2o2 monitorado em $\lambda = 225$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c) e negativo (d).....	138
Figura 58 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração F1d2o2.....	139
Figura 59 – Estrutura química do composto metil-orselinato (CAS: 3187-58-4)	140
Figura 60 - Cromatograma da fração F1d2l monitorada em $\lambda = 310$ nm	142
Figura 61 - Cromatograma da fração F1d2l10 monitorado em $\lambda = 296$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (d)	143
Figura 62 – Estruturas químicas dos composto oncinotina-11-ona e oncinotina-12-ona	144

- Figura 63 - Cromatograma da fração F1d2l11 monitorado em $\lambda = 263$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c) e negativo (d); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (e) 145
- Figura 64 – Estrutura química do composto 14,15-secocurvularina..... 146
- Figura 65 - Cromatograma da fração F1d2n3 monitorado em $\lambda = 250$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c) e negativo (d); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (e)..... 147
- Figura 66 - Estrutura química do composto 1,3-Dihidro-4,5,6-trihidroxi-7-metil-1,3-dimetoxiisobenzofurano..... 148
- Figura 67 - Cromatograma da fração F1d2g1 (a); espectro de maasas da fração F1d2g1 (b); espectro de massas em modo positivo (c); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (d) 149
- Figura 68 - Fluxograma do estudo químico do fungo endofítico *A. melanogenum* (P7AF2F3) com atividade antileishmaniose 150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fitopatógenos utilizados nos ensaios de inibição “ <i>in vitro</i> ”.....	57
Tabela 2 - Número de linhagens de fungos endofíticos isolados das plantas do gênero <i>Anthurium</i>	70
Tabela 3 - Porcentagem de inibição micelial de 60 frações acetato de etila contra 4 fitopatógenos, por ensaio de difusão em disco de papel	79
Tabela 4 – Comparação de dados de RMN ¹ H do composto F3a1b (DMSO- _{d6} / 600 MHz) e da citrinina (CDCl ₃ / 400 MHz).....	88
Tabela 5 - Informações sobre os fungicidas comerciais utilizados.....	100
Tabela 6 - Porcentagem de atividade antileishmaniose de oito frações de <i>P. citrinum</i>	104
Tabela 7 - Porcentagem de atividade antileishmaniose de oito frações de <i>P. simplicissimum</i>	112
Tabela 8 – Comparação dos dados de RMN ¹ H (600 MHz) e ¹³ C (150 MHz) do composto F2b2j (DMSO- _{d6}) e andrastina A (MeOH- _{d4} / 270 e 67,8 MHz) ...	116
Tabela 9 – Comparação de dados de RMN ¹ H do composto F2b1n (DMSO- _{d6} / 600 MHz) e penicisoquinolina (CDCl ₃ / 300 MHz)	124
Tabela 10 – Comparação dos dados de RMN ¹ H do composto F1d2o2 (DMSO- _{d6} / 600 MHz) e do metil-orselinato (Acetona- _{d6} / 500 MHz)	139
Tabela 11 - Porcentagem de atividade antileishmaniose de 24 frações de <i>A. melanogenum</i>	141

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são compostos químicos com grande diversidade estrutural e atividades biológicas com potencial para o desenvolvimento de novos produtos (DEMAIN, 2014).

A busca por novas opções de compostos ativos se faz necessária por diversos motivos, dentre eles o uso indiscriminado de medicamentos, a ineficácia de alguns medicamentos por resistência ao patógeno, pela toxicidade dos agroquímicos, entre outros (MURI et al. 2009; SUNGTHONG; NAKAEW 2014; BOZDOGAN, 2014), tornando-se necessária a busca por compostos em micro e macroambientes pouco explorados (TANVIR; SAJID; HASNAIN, 2014).

Um microambiente relativamente pouco estudado, mas biologicamente importante, são os tecidos internos das plantas superiores (QIN et al., 2009), pois acredita-se que todas as espécies de plantas que vivem em ecossistemas naturais estabelecem algum tipo de associação simbiótica com micro-organismos que habitam os tecidos vegetais sem causar danos ao seu hospedeiro. Dependendo da sua localização nos tecidos, são classificados como epífitos, rizosféricos ou endófitos (RODRIGUEZ et al., 2009; ARAÚJO et al., 2010).

Fungos endofíticos vivem, a princípio, em interação de mutualismo, podendo produzir compostos que diminuem a herbivoria sobre os tecidos vegetais ou que induzem a resistência à fitopatógenos, além da produção de fitorreguladores, que podem aumentar o desenvolvimento vegetal, atuando diretamente sobre a planta com a qual está associado. Em contrapartida, os endófitos recebem nutrientes e proteção da planta hospedeira (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004).

Os metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos apresentam grande variedade estrutural e, devido às suas propriedades químicas e biológicas, estes compostos têm emergido como uma nova fonte de recursos, permitindo o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças (DEMAIN, 1999; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Além disso, na tentativa de substituir o uso de fungicidas sintéticos, muitos pesquisadores vêm buscando nos fungos endofíticos diferentes alternativas de controle que prejudiquem menos o meio ambiente.

As ilhas podem ser consideradas macroambientes que apresentam uma biodiversidade bastante particular, podendo apresentar espécies endêmicas. Estas

espécies apresentam maior grau de vulnerabilidade em relação às do continente devido ao seu espaço geográfico restrito e à especificidade de suas interações com o ambiente biótico e abiótico (WALTER, 2004; FONSECA et al., 2006), o que torna os organismos que habitam as ilhas extremamente interessantes para a busca de fontes de produtos naturais com potencial de aplicação.

O Arquipélago de Alcatrazes, localizado no litoral norte do estado de São Paulo, é formado principalmente pela Ilha de Alcatrazes, a maior e mais estudada quanto à sua fauna e flora. Contudo, não existem estudos sobre a comunidade microbiana associadas às plantas desta ilha.

Deste modo, o presente estudo visou isolar fungos endofíticos de 2 espécies de plantas do gênero *Anthurium* presentes na Ilha de Alcatrazes, contribuindo no conhecimento sobre a diversidade microbiana endofítica e avaliar seu potencial metabólico em ensaios de atividade nas áreas agrônoma e médico-farmacológica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A busca por novos produtos naturais

A descoberta de novos produtos naturais com aplicação medicinal ou agroquímica têm conferido grandes benefícios à humanidade, permitindo o aumento da expectativa de vida populacional, a extinção e controle de doenças humanas (BÉRDY, 2012) e o combate a doenças agrícolas (GERWICK; SPARKS, 2014). Estes compostos são metabólitos secundários produzidos por um grupo limitado, seja um determinado gênero, ordem ou até mesmo filo, e possuem um alto poder de diferenciação química (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008).

A biossíntese destes compostos ocorre durante a fase estacionária do crescimento do organismo, quando grandes quantidades de precursores de metabólitos primários, tais como aminoácidos, acetato, piruvato e outros, são acumulados. Os metabólitos secundários não são considerados essenciais para o desenvolvimento do organismo, sua produção varia dependendo das condições ambientais e são codificados por conjuntos de genes não essenciais (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005; NIGAM, 2009). Estes genes são usualmente organizados em *clusters* responsáveis não somente pela produção de enzimas biossintéticas e proteínas regulatórias, mas também pela resistência à ação tóxica de seus metabólitos secundários e pela secreção destes metabólitos (MARTÍN et al., 2005).

No geral, os metabólitos secundários de fungos são classificados em cinco grupos: derivados de aminoácidos, peptídeos não ribossomais, policetídeos, derivados de ácidos graxos e híbridos de policetídeos-peptídeos (KEMPKEN; ROHLFS, 2010; ROZE; CHANDA; LINZ, 2011). Na natureza, têm sua importância como hormônios, ionóforos, compostos nocivos à bactérias, fungos, amebas, insetos e plantas, agentes de simbiose, efetores de diferenciação, entre outras funções (DEMAIN; ADRIO, 2008).

Os produtos naturais têm um papel importante na descoberta, desenvolvimento e síntese de novos fármacos (QIN et al., 2011), tendo como maiores interesses a produção de antibióticos, agentes anticâncer, agentes de controle biológico e outros compostos com diferentes papéis funcionais (GUO et al., 2006). Entre os anos de 1981 e 2010, foram aprovados cerca de 1130 novos

fármacos, sendo, dentre estes, 50 produtos de fontes naturais, 247 derivados produzidos a partir de produtos naturais e 166 compostos sintéticos baseados em produtos naturais, possuindo diversas atividades como antibacteriana, anticancerígena, anticoagulante, anti-inflamatória, entre outras (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Na área agrônômica, estes produtos naturais podem ser utilizados diretamente ou como modelo para o desenvolvimento de novos defensivos no controle de doenças agrícolas (GERWICK; SPARKS, 2014). Entre 1997 e 2010, foram registrados 277 novos ingredientes ativos como defensivos químicos pela Agência de Controle Ambiental dos Estados Unidos. Destes, 35,7% são produtos naturais isolados de diversos organismos e 6,1% são produtos sintéticos baseados em produtos naturais, o que evidencia a importância dos produtos naturais no combate às doenças agrícolas (CANTRELL; DAYAN; DUKE, 2012).

2.2 Ambientes pouco explorados: Arquipélago de Alcatrazes

Ilhas oceânicas são formações que se erguem do leito do oceano profundo, fora da plataforma continental e longe da influência direta do continente, podendo formar arquipélagos (SUGUIO, 1992). O isolamento e limitação geográfica, muitas vezes, faz com que a biota se diversifique *in situ*, o que torna as ilhas oceânicas locais extremamente interessantes para estudos taxonômicos, ecológicos, biogeográficos, evolutivos e de biologia da conservação (MACARTHUR; WILSON, 1967; CASE; CODY, 1987; PAULAY, 1994).

Estes ambientes apresentam uma biodiversidade bastante particular representando cerca de 5% da cobertura terrestre do planeta. Em seu estado natural, ilhas oceânicas normalmente suportam uma proporção substancial de espécies endêmicas de plantas, mamíferos, aves e anfíbios, sendo que muitas destas estão ameaçadas de extinção (FONSECA et al., 2006). A vulnerabilidade destas espécies é maior em relação às do continente devido ao seu espaço geográfico restrito e à especificidade de suas interações com o ambiente biótico e abiótico (WALTER, 2004; FONSECA et al., 2006). Ainda, a baixa disponibilidade de nutrientes do solo e limitações dos processos bióticos na ciclagem de vários nutrientes (VITOUSEK, 2004; KUEFFER et al., 2010) tornam a vegetação de ilhas

oceânicas especialmente sensível a pequenas mudanças de nutrientes (HUGHES; DENSLOW, 2005).

Apesar dos riscos representados pelas mudanças climáticas, a introdução de espécies exóticas e a perda de habitat causada pela antropização podem ser consideradas como as principais ameaças de curto prazo à biodiversidade das ilhas oceânicas brasileiras (KINGSFORD et al., 2009; MOONEY; CLELAND, 2001). Das 80 espécies de plantas documentadas como extintas nos últimos 400 anos, cerca de 50 eram espécies insulares (SAX; GAINES, 2008).

A dinâmica de colonização e extinção de espécies contribui para a alteração na estrutura e composição da biodiversidade, com implicações diretas na adaptação da biota às mudanças ambientais (JACKSON; SAX, 2009), tornando as ilhas oceânicas áreas extremamente importantes para estudo e preservação das espécies brasileiras.

Dentre as Unidades de Conservação criadas em 1987 (Decreto Federal nº 94.656) encontra-se a Estação Ecológica Tupinambás, localizada nos municípios de Ubatuba e São Sebastião, e administrada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). A Estação ecológica abrange 2 conjuntos de ilhas. O primeiro conjunto se distancia de 3 a 6 km da costa de Ubatuba e engloba as ilhas de Palmas e Cabras. Já o segundo, formado por ilhas, ilhotas, parciais e lajes, se distancia a 36 km da costa do município de São Sebastião e está inserido no Arquipélago de Alcatrazes e na Área Delta de Segurança da Marinha do Brasil (MB) (POMPÉIA, et al. 1993; SMA, 2005).

O Arquipélago de Alcatrazes (24°10' S, 45°70' W) encontra-se localizado na região norte do litoral, a 36 quilômetros da costa, no município de São Sebastião, no estado de São Paulo (Figura 1). É formado por cinco ilhas maiores: Alcatrazes, Amigo ou Sapata, Paredão, Porto ou do Farol e Oratório, além de cinco ilhas menores não nominadas. Ainda possui três lajes (Trinta-Reis, Nordeste e Sudoeste) e dois parciais (Nordeste e Sudoeste) (ÂNGELO, 1989; POMPÉIA, et al. 1993; KODJA et al., 2012). Sua área total é de 170 hectares, sendo que somente a Ilha de Alcatrazes atinge 135,2 hectares e seu ponto mais alto, o pico da Boa Vista, alcança 316 metros de altura (KODJA et al., 2012).

Figura 1 - Arquipélago de Alcatrazes, São Sebastião – SP. Distância entre o continente e a ilha de Alcatrazes (36 km da cidade de São Sebastião) (a); Ilha de Alcatrazes (b).
(Foto: Sartori, S.B.)

Apesar de ser uma estação ecológica desde 1987, a Marinha Brasileira possuía alvos pintados nas rochas na região do Saco do Funil (Ilha de Alcatrazes) para a realização de exercícios de tiro, o que acabava colocando em risco a flora e fauna local. Porém, a ação de ambientalistas e a descoberta de espécies endêmicas fizeram com que a Marinha Brasileira mudasse o local de treinamento de tiro do Saco do Funil para a Ponta do Farol, situado num local distante das ilhas principais (SÃO PAULO, 2014; ROCHA; BONNET, 2009). Além disto, há riscos advindos de atividades pesqueiras ilegais nos arredores e da atividade portuária, devido à proximidade com o porto de São Sebastião e do Terminal Marítimo Almirante Barroso – TEBAR (POMPÉIA et al., 1993).

Por estes motivos vêm-se tentando transformar o Arquipélago em Parque Nacional Marinho dos Alcatrazes desde 2010. Esta modalidade, prevista no Sistema Nacional de Unidades de Conservação, só existe em dois locais no Brasil: o arquipélago de Fernando de Noronha e o arquipélago de Abrolhos, ambos administrados pelo ICMBio (SÃO PAULO, 2014).

O arquipélago é local de refúgio, alimentação e reprodução de mamíferos marinhos como baleias e golfinhos, inclui mais de 150 espécies de peixes, além de abrigar o maior ninhal de aves marinhas do sudeste brasileiro (MERCADANTE; MOURA, 2005; NARVAES, 2007). Estudos recentes identificaram um total de 82

espécies de aves marinhas no arquipélago, entre elas a maior colônia de Fragatas (*Fregata magnificens*) do Atlântico-Sul e uma espécie ameaçada de extinção, o Trinta-réis-real (*Thalasseus maximus*) (MUSCAT et al., 2014).

Dentre as espécies de répteis, os mais comuns são lagartos, lagartixas e serpentes, sendo algumas endêmicas, como a jararaca-de-Alcatrazes (*Bothrops alcatraz*), a perereca-de-Alcatrazes (*Scinax alcatraz*) e a rã-achatada-de-Alcatrazes-de-Fausto (*Cycloramphus faustoi*) (KODJA et al., 2012). Novas espécies endêmicas marinhas também foram descritas, como a esponja calcárea *Clathrina alcatraziensis* (LANNA et al., 2007) e do anelídeo *Eunice insularis* (NOGUEIRA; STEINER; AMARAL, 2001). Não há relatos da existência de mamíferos terrestres na ilha, com exceção de morcegos (MARQUES; MARTINS; SAZIMA, 2002).

A ilha possui uma vegetação típica de Mata Atlântica com estrato arbóreo e sub-bosque composto de *Guapira opposita* (Vell.) Reitz (Nyctaginaceae) e pelas lianas lenhosas *Capparis* cf. *flexuosa* L. (Capparidaceae) (POMPÉIA, 1991). Apresenta também, em sua porção inferior, vegetação arbórea e nas porções mais altas, plantas capoeiras (gramíneas, árvores e arbustos esparsamente distribuídos) e herbáceas. Pode-se encontrar cerca de 170 espécies de plantas, sendo algumas consideradas endêmicas da ilha, como o antúrio negro (*Anthurium alcatrazense*) (KODJA et al., 2012).

Mesmo apresentando espécies animais e vegetais endêmicas, são poucos os estudos realizados sobre a biota do arquipélago. Ainda, não existem estudos relacionados à comunidade microbiana associada a plantas do gênero *Anthurium*.

2.2.1 Plantas do gênero *Anthurium*

A família Aracea é uma das mais diversificadas dentro do grupo das monocotiledôneas (Ordem Alismatales), sendo constituída de 117 gêneros e aproximadamente 4.000 espécies (HAIGH et al., 2009). São características principais desta família a presença de uma espádice com flores uni ou bissexuais, subentendida por uma espata, ambas apoiadas num pedúnculo longo ou curto.

A maior diversidade destas espécies se encontra na América tropical (CROAT, 1988). O Brasil possui cerca de 400 espécies distribuídas em 30 gêneros, dentre esses os gêneros endêmicos *Bognera*, *Dracontiodides*, *Gearum* e *Zomicarpa*,

além de outros com distribuição mais ampla como *Philodendron* e *Anthurium* (COELHO, 2007).

O gênero *Anthurium* é o maior e provavelmente o mais complexo ao nível taxonômico na família Araceae (COELHO; MAYO, 2007). Este compreende cerca de 1.000 espécies descritas, número que aumentou notavelmente nos últimos anos (NADRUZ-COELHO; MAYO; WAECHTER, 2009; CROAT; VANNINI, 2010). As plantas deste gênero podem ser epífitas *sensu-strictu*, hemi-epífitas, terrestres ou rupícolas (CROAT, 1988).

Antúrios são bissexuais e protogínicos, ou seja, a espádice produz primeiro uma fase feminina seguida por uma fase masculina um mês depois, o que reduz a frequência de autopolinização e induz a polinização cruzada com uma frequência elevada (CALLOTTE, 2004). As sementes são frequentemente heterogêneas, o que pode resultar em cor, qualidade, rendimento e tempo para a primeira primeira floração não uniformes (JAHAN et al., 2009).

Novas espécies de antúrio foram relatadas nos últimos anos, principalmente nas regiões de Mata Atlântica. Dentre as espécies endêmicas no litoral de São Paulo, podemos citar *Anthurium alcatrazense*, da Ilha de Alcatrazes, e *Anthurium navicularis*, da Estação Ecológica Juréia-Itatins, município de Peruíbe. Ambas ocorrem em áreas rochosas litorâneas (COELHO; CATHARINO, 2008). No Parque Nacional da Serra do Cipó (Minas Gerais) foi descrita a espécie endêmica *Anthurium cipoense* Temponi, enquanto que no estado do Rio de Janeiro foram descritas as espécies *Anthurium polynervium* Temponi & Nadruz (TEMPONI; COELHO, 2011), *Anthurium cronembergerae* e *A. sakuraguianum*, as quais ocorrem em áreas úmidas na Floresta Atlântica (TEMPONI; COELHO, 2014). No estado do Espírito Santo foi descrita a espécie *A. macropodium* E. G. Gonç. encontrada somente em uma localidade próxima da vila de Vargem Alta (GONÇALVES, 2012).

Além da grande diversidade, estudos mostram que algumas plantas do gênero *Anthurium* são potenciais fontes de produtos naturais com utilidade médico-farmacológica. É possível, ainda, que vários dos metabólitos isolados de plantas sejam, na verdade, compostos biossintetizados pelos micro-organismos associados a essas plantas (KUSARI; HERTECK; SPITELLER, 2012).

2.3 Os fungos

Os fungos (Domínio Eukarya) constituem um grupo de micro-organismos eucariotos localizados em todos os nichos ecológicos. São organismos heterotróficos que se alimentam por absorção de nutrientes oriundos da matéria orgânica presente no ambiente, que pode ser o solo, a água do mar, a água doce, animal ou planta (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Estima-se que existam cerca de 1,5 milhão de espécies e destas apenas cerca de 74 mil foram descritas (MENDES; REIS JÚNIOR, 2010), sendo a maioria benéfica ao homem (menos de 50 espécies causam 90% das infecções fúngicas em seres humanos e animais) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

São organismos presentes em todos os ambientes podendo ser filamentosos, constituídos por filamentos longos e ramificados denominados hifas; leveduriformes, constituídos por células individuais que se reproduzem por brotamento ou fissão binária; ou dimórficos, podendo ser filamentoso ou leveduriforme dependendo das condições ambientais, principalmente da temperatura (ARAUJO et al., 2010; ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Sua dispersão na natureza pode ocorrer por meio de animais, homens, insetos, água e, principalmente, pelo ar (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A maior parte dos fungos constitui-se de um corpo vegetativo filamentoso conhecido como micélio que se ramifica em hifas. As hifas podem, ou não, apresentar partições delimitadas pelas transversais chamadas septos (septadas ou asseptadas) (CARVALHO, 2010).

A reprodução dos fungos se dá por meio de esporos, sendo estas estruturas reprodutivas constituídas de uma ou mais células. Quanto à estrutura, os esporos se formam assexuadamente, podendo se apresentar sob a forma de conídios, esporângios, clamidósporos ou artrósporos (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Por não sintetizarem clorofila, esses organismos sobrevivem em estado de parasitismo, saprofitismo ou simbiose no meio ambiente. Os fungos saprófitos vivem em substratos contendo matéria orgânica, muitas delas em decomposição, na água e no solo. Os parasitas vivem no interior e na superfície de vegetais e animais, nutrindo-se de substâncias provenientes de células vivas, já os simbiontes se associam a outros organismos e vivem em perfeita harmonia, sendo ambos

beneficiados (TRABULSI, 2004). Do total de espécies de fungos descritas, estima-se que 2/3 destas estabelecem relações íntimas com outros organismos vivos, sendo que um grande número dessas espécies vive em associação com os vegetais (BARBIERI; CARVALHO, 2001), podendo ser rizosféricos, epifíticos ou endofíticos de acordo com a localização que habitam na planta (ARAÚJO et al., 2010).

2.3.1 Fungos endofíticos

Micro-organismos endofíticos, principalmente fungos e bactérias, são aqueles que vivem no interior das plantas, habitando de modo geral suas partes aéreas, como folhas e caules, sem causar aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros (AZEVEDO, 1998; ASSUMPÇÃO et al., 2009).

A colonização assintomática por micro-organismos endofíticos pode ser explicada pela hipótese do "antagonismo balanceado" (SCHULZ et al., 1999), onde o endófito é capaz de inibir a produção de metabólitos tóxicos pelo hospedeiro e se desenvolver dentro do mesmo sem causar manifestação visível de infecção ou doença (SCHULZ; BOYLE, 2006). Esta interação só pode ser observada devido ao equilíbrio da relação antagonista entre hospedeiro e endófito. Na ausência deste equilíbrio, verifica-se que muitos endófitos podem se tornar patógenos (que estavam na forma latente), podendo ser influenciados por fatores intrínsecos ou ambientais e levando a expressão da patogenicidade (KUSARI et al., 2012).

Evidências de micro-organismos associados a plantas encontrados em tecidos fossilizados do caule e folhas revelaram que esta associação endófito-hospedeiro possa ter surgido a partir do momento em que as primeiras plantas superiores apareceram na Terra (ANDRZEJ, 2002). Durante a co-evolução dos endófitos e seus hospedeiros, estes se adaptaram ao microambiente formado no interior das plantas por variação genética, incluindo a aquisição de partes do DNA das plantas em seu próprio genoma (GERMAINE et al., 2004). Este fato pode ser a explicação da capacidade de alguns endófitos de biossintetizar alguns compostos químicos que originalmente eram atribuídos somente à planta hospedeira (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

Fungos endofíticos evoluíram a partir de dois modos de transmissão. A transmissão vertical consiste na transferência de esporos através das sementes da planta hospedeira, enquanto que na transmissão horizontal ocorre a transferência

sexual ou assexual de esporos da planta hospedeira para outras plantas (SAIKKONEM et al., 2004). Endófitos podem ser encontrados em plantas crescendo em florestas tropicais, temperadas e boreais; em plantas herbáceas de ambientes extremos como ambientes ártico, alpino (FISHER et al., 1995) e xérico (MUSHIN; ZWAIN, 1989). Fungos endofíticos tem sido encontrado em musgos e plantas hepáticas (LIGRONE; POCOCK; DUCKETT, 1993), samambaias (SCHMID; OBERWINKLER, 1993), numerosas gimnospermas e angiospermas (HIDE; TAYLOR; FROLICH, 2000), além de muitas outras plantas. É possível isolar centenas de espécies endofíticas de uma única planta onde pelo menos uma espécie demonstra especificidade pelo hospedeiro (TAN; ZOU, 2001). Entretanto, muitos destes micro-organismos ainda não são conhecidos, e podem constituir novos gêneros e espécies (AZEVEDO et al., 2000; STROBEL, 2002).

Os fungos endofíticos podem produzir compostos que diminuem a herbivoria sobre os tecidos vegetais ou conferem resistência a fitopatógenos, além da produção de fitorreguladores que podem aumentar o desenvolvimento vegetal atuando, assim, diretamente sobre a planta com a qual está associado. Os endófitos, por sua vez, encontram na planta um habitat com nutrientes e com menor competição com outros micro-organismos (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004).

A produção de compostos bioativos por fungos endofíticos é importante não só do ponto de vista ecológico, como também, bioquímico e molecular (KUSARI et al., 2012). A produtividade desses metabólitos por endofíticos pode ser explicada por diversos fatores, sendo os principais o alto nível de “stress” ambiental e as interações com outros organismos. Micro-organismos submetidos a um ou mais desses fatores estão mais suscetíveis a produzirem uma maior variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos (DREYFUSS; CHAPELA, 1994).

A biossíntese de metabólitos secundários pode garantir ao fungo vantagem em habitats no qual este necessita competir com outros micro-organismos. Portanto, muitos desses metabólitos podem apresentar efeitos tóxicos ou inibitórios de crescimento e desenvolvimento em outros organismos, além de outras atividades biológicas (KHALDI et al., 2010).

2.4 Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos

Uma grande quantidade de fungos endofíticos isolados de plantas vêm sendo caracterizada e têm apresentado considerável potencial para descoberta de novas moléculas bioativas (STROBEL et al., 2004).

As condições abióticas as quais os fungos são submetidos são essenciais para a obtenção de metabólitos secundários. A quantidade de carbono, nitrogênio e elementos traço (ferro, manganês, zinco), bem como a temperatura, tempo de crescimento e pH do meio de cultura são fundamentais para a produção de novos metabólitos secundários. Para explorar o potencial dos micro-organismos, as condições de crescimento utilizadas para gerar extratos precisam ser diversificadas (KNIGHT et al., 2003).

Há relatos na literatura sobre a produção de metabólitos secundários comuns entre a planta hospedeira e seus micro-organismos endofíticos. Este fato atribui-se a uma transferência lateral de genes que pode ter ocorrido durante o processo de evolução (STROBEL, 2002; WINK, 2008). Como exemplo pode-se citar o taxol, um diterpenóide com atividade anticancerígena, produzido pela planta *Taxus brevifolia* e também pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* isolado da mesma planta (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

Estudos mostram que o taxol não foi produzido somente por este fungo, mas também a partir de outros fungos endofíticos como o *Phyllosticta citricarpa* (KUMARAN; MUTHUMARY; HUR, 2008), *Aspergillus candidus* (ZHANG; ZHOU; YU, 2009) e *Chaetomella raphigera* (GANGADEVI; MUTHUMARY, 2009) isolados das plantas *Citrus medica*, *Taxus media* e *Terminalia arjuna*, respectivamente. É possível, ainda, que vários metabólitos isolados de plantas sejam, na verdade, compostos biossintetizados pelos micro-organismos associados a essas plantas (KUSARI et al., 2012).

Devido às suas propriedades químicas e biológicas, muitos destes metabólitos têm sido aplicados para o uso farmacêutico como antibióticos, inibidores tumorais e imunossupressores (DEMAIN, 1999). Na área agrônômica, visando substituir os fungicidas, muitos pesquisadores vêm buscando alternativas mais eficientes nos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos.

2.4.1 A importância da leishmaniose

As doenças parasitárias se mantêm dentre os problemas de saúde pública mais relevantes, com milhões de pessoas infectadas anualmente, resultando em consequências sociais e econômicas e no aumento significativo da mortalidade mundial (RENSLO; McKERROW, 2006; HOTEZ et al., 2007). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a leishmaniose integra o grupo das seis doenças mundiais consideradas prioritárias, juntamente com a malária, doença de Chagas, tuberculose, tripanossomíase africana e a dengue (WHO, 2012).

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (BASANO; CAMARGO, 2004). Compreendem um espectro de doenças distribuídas mundialmente em regiões tropicais e subtropicais, com a capacidade de se adaptar a diferentes ecossistemas e infectar diversas espécies de mamíferos (WHO, 2012; NUNES et al., 2010). A doença é endêmica em 98 países, com incidência global de 0,9 a 1,6 milhões de casos ocorrendo a cada ano. O Brasil está entre os 10 países com o maior incidente da doença (ALVAR et al., 2012). Somente no ano de 2013, foram relatados no Brasil 18.226 casos de leishmaniose tegumentar e 3.253 casos de leishmaniose visceral, com maiores focos nas regiões norte, nordeste e centro-oeste (WHO, 2015).

A doença tem como vetor um mosquito flebotomíneo fêmea com hábito hematófago conhecido popularmente como tatuquira, mosquito-palha, birigui, etc. (BRASIL, 2007). Das 300 espécies descritas nas Américas, apenas dois gêneros são realmente importantes, sendo eles a *Lutzomyia*, vetor de leishmanioses das Américas, e o *Phlebotomus*, onde estão todos os transmissores de leishmanioses da África, Europa e Ásia (REY, 2008).

O ciclo de vida da *Leishmania* se completa em duas etapas. O flebotomíneo, ao realizar o repasto sanguíneo, ingere a forma amastigota da *Leishmania* que, no seu trato digestivo, desenvolve-se para a forma promastigota. Os promastigotas se multiplicam e migram para as probóscides até o momento de um novo repasto sanguíneo. Uma vez no interior do hospedeiro, o parasito é internalizado por células fagocíticas, e em seguida convertido na forma amastigota (aflagelada e arredondada), reiniciando o ciclo do parasita (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; CARVALHO et al., 2008) (Figura 2).

Figura 2 - Ciclo de vida de protozoários de *Leishmania*. Adaptado de CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças
(Fonte: <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> acessado em 16/06/2015).

Diversas espécies de *Leishmania* podem causar leishmaniose, sendo que a combinação de fatores intrínsecos ao parasito e a resposta imune montada pelo hospedeiro (influenciada pela idade, estado nutricional, dentre outros fatores) resultam nas diferentes manifestações clínicas da doença (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). Pode-se classificar a leishmaniose em dois grandes tipos básicos, de acordo com os sinais e sintomas apresentados: leishmaniose tegumentar americana (LTA) ou “úlcer de Bauru” e leishmaniose visceral americana (LVA) ou “calazar” (BORIES et al., 2008). No caso da LTA, existem as formas cutâneas, muco-cutânea e difusa (DAVID; CRAFT, 2009).

As 3 principais espécies do parasito responsáveis pela transmissão da LTA ao homem no Brasil são: *L. (Viannia) braziliensis* (agente etiológico mais presente na leishmaniose muco cutânea) transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos como *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia intermedia*, dentre outras; *L. (Viannia) guyanensis* (agente da leishmaniose cutânea), transmitida por *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia anduzei* e *Lutzomyia whitman*; e *L. (Leishmania) amazonensis* (diretamente relacionada às formas cutânea e cutânea difusa), transmitida por *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia olmeca* (SHAWN; LAINSON,

1975; LAINSON; SHAW, 1987; FRANÇA-COSTA et al., 2012). A forma mucocutânea leva o paciente a sofrer ulcerações destrutivas que progressivamente se estendem para as mucosas do nariz e boca, podendo atingir laringe e faringe (SANTOS et al., 2008). Já as lesões provocadas pela forma cutânea costumam persistir por vários meses ou anos e suas características podem variar de acordo com a espécie (LUCAS et al., 2010). Ao contrário da forma cutânea, na forma difusa (que tem como vetor mais importante o mosquito *Lutzomyia flacustellata*) não ocorre ulceração, ocorrendo disseminação hematogênica do parasito após meses ou anos, com aparecimento de lesões em várias partes do corpo, como face e membros (BARRAL-NETTO et al., 1995; COSTA, 2005).

A leishmaniose visceral americana (LVA) é uma doença infecciosa sistêmica grave, altamente letal se não tratada e que apresenta aspectos clínicos e epidemiológicos bastante característicos em cada região geográfica onde ocorre. Apresenta como agente etiológico a *Leishmania infantum chagasi* (CUNHA; CHAGAS, 1937), protozoário da família Trypanosomatidae transmitido pelas fêmeas infectadas do díptero flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (GRIMALDI; TESH; MCMAHON-PRATT, 1989). Pode causar febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia (aumento no tamanho do fígado e baço), hipergamaglobulinemia (aumento excessivo dos níveis de imunoglobulina na corrente sanguínea), chegando a ser fatal, se não for tratada (MODABBER, 1993). Áreas de congestão e de infarto esplênico podem ocorrer, inclusive com ruptura do órgão (GONTIJO; MELO, 2004; NASCIMENTO et al., 2005).

A falta de novos medicamentos destinados a doenças parasitárias que afetam as pessoas nos países em desenvolvimento tornou-se uma preocupação global (CHIRAC; TORREELE, 2006). Pelo fato de haver várias espécies de *Leishmania* que estão relacionadas às diferentes manifestações clínicas da doença, é quase impossível a obtenção de um único enfoque capaz de controlar e combater a leishmaniose em geral. Uma medida profilática simples parece ser o controle do vetor. No entanto, medidas de controle como estas requerem uma infraestrutura que a maior parte dos países não consegue manter (MODABBER, 1993).

No Brasil, os antimoniais pentavalentes, como a N-metil glucamina, são os fármacos de escolha utilizadas no tratamento da Leishmaniose humana em virtude de sua eficiência terapêutica (SANTOS et al., 2002). A anfotericina B é o fármaco leishmanicida mais potente disponível comercialmente, atuando nas formas

promastigotas e amastigotas (CARVALHO, 2000). Outros fármacos são empregados no tratamento da leishmaniose, entre as quais se destacam a pentamidina, miltefosine e a paromomicina (RATH et al., 2003). Existem também os tratamentos suportes com o uso de antibióticos, devido ao fato de que pacientes com LVA são caracteristicamente neutropênicos (baixa produção de neutrófilos) e, portanto, estão mais predispostos a apresentar infecção estabelecida ou oculta (BRASIL, 2005).

Apesar de eficazes, os melhores medicamentos no tratamento da leishmaniose são os que possuem efeitos tóxicos mais acentuados e também os de sistema posológico mais complexo (HERWALDT, 1999). A resistência aos antimoniais também parece ser um fenômeno crescente em todas as formas de leishmaniose (GROGL; THOMASON; FRANKE, 1992). Além disto, as dificuldades quanto à administração e a duração do tratamento (aplicações diárias durante aproximadamente 20 dias), paralelamente aos efeitos colaterais, tem estimulado pesquisas visando buscar fontes alternativas para o tratamento (ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ et al., 2007).

2.4.1.1 Atividade anti-leishmaniose de metabólitos secundários de fungos endofíticos

Por apresentar diferentes papéis funcionais, os produtos naturais de maior interesse isolados de fungos endofíticos são para produção de antibióticos, agentes anticâncer, agentes de controle biológico e outros (GUO et al., 2006). O mesmo acontece no controle de doenças parasitárias, como a leishmaniose, por compostos produzidos por fungos endofíticos.

Um fungo endofítico isolado da planta medicinal *Spermacoce vericullata* L. (Rubiaceae) nativa da América do sul, produziu compostos com atividade antileishmania. Foram obtidos os compostos austidiol (**1**), um novo dímero de austidiol (**2**) e o austidiol diacetato (**3**) a partir da acetilação do primeiro composto. Estes compostos apresentaram atividade promissora contra *L. Major* com IC₅₀ de 0,52, 0,13 e 0,28 µM em relação ao controle positivo geneticina (G418) (IC₅₀ = 3,43 µM) (ANDRIOLI et al., 2010).

As frações acetato de etila de 82 fungos endofíticos isolados de caule e casca da espécie brasileira *Caeslapina echinata* Lam. (Fabaceae) foram testadas em diversos ensaios biológicos. As frações obtidas dos fungos *Fusarium* sp. (WC9),

Xylaria sp. (WC11), *N. pseudotrichia* (WC33) e *Fusarium* sp. (WC58) foram capazes de inibir o crescimento de formas amastigotas de *T. cruzi* e *L. amazonensis* entre 45 a 77%. Do extrato de *Fusarium* sp. (WC58) foi isolado o composto beauvericina (**4**), que apresentou atividade contra *T. cruzi* (IC_{50} = 2,44 μ M) (CAMPOS et al., 2015). O mesmo composto foi isolado de uma linhagem de *Fusarium* sp. marinho por Nascimento et al. (2012) e apresentou atividade inibitória à *L. braziliensis* (IC_{50} = 1,85 μ M).

Já no estudo realizado por Nascimento et al. (2015), foram isolados 16 fungos endofíticos das folhas de *Vernonia polyanthes*. O extrato etanólico obtido destes endófitos foi avaliado em ensaio contra *L. amazonensis*, sendo o extrato de *Cochliobolus sativus* o mais ativo (IC_{50} 59,5 μ g mL⁻¹). A partir deste extrato, foi obtida uma mistura dos compostos cochlioquinona A (**5**) e isocochlioquinona A (**6**) e, também, o composto anidrocochlioquinona A (**7**). Tanto a mistura quanto o composto isolado apresentaram atividade antileishmaniose (10,16 e 50,53 μ g mL⁻¹, respectivamente).

As frações obtidas a partir do extrato do fungo *Edenia* sp. foram avaliadas contra *Leishmania donovani*. Foram isolados cinco metabólitos secundários, CJ-12,371, preussomerina EG1, palmarumicina CP2, palmarumicina CP17 (**8**) e palmarumicina CP18 (**9**), sendo que os dois últimos apresentaram atividade contra *L. donovani* na forma amastigota com valores de IC_{50} de 1,34 e 0,62 μ M, respectivamente (MARTÍNEZ-LUIS et al., 2008). Os compostos produzidos pelo endófito *Nigrospora sphaerica*, isolado de folhas de *Vinca rosea* (Apocynaceae), foram avaliados em ensaio antileishmaniose. Dos 11 compostos isolados, os compostos ergosta-7,22-dieno-3 β -ol (**10**), ergosta-4,6,8,22-tetraeno-3 β -ol (**11**) e ergosta-5,7,22-trieno-3 β -ol (**12**) apresentaram moderada atividade com IC_{50} de 30,2; 26,4 e 36,4 μ g mL⁻¹, respectivamente (METWALE et al., 2013).

Elkhayat et al. (2016) isolaram um novo derivado butenolídeo do fungo endofítico *Aspergillus terreus*. O composto, Terrenolida S (**13**), apresenta atividade antileishmaniose contra *L. donovani* com IC_{50} de 27,27 μ M e IC_{90} de 167,03 μ M. Dois novos triterpenóides tetracíclicos, o integracida F (**14**) e integracida G (**15**), foram isolados de *Fusarium* sp. obtido de folhas de *Mentha longifolia* L. (Labiatae). Ambos os compostos apresentaram significativa atividade contra *L. donovani* com IC_{50} de 3,74 e 2,53 μ g mL⁻¹ e IC_{90} de 5,11 e 8,89 μ g mL⁻¹, respectivamente (IBRAHIM; MOHAMED; ROSS, 2016).

Figura 3 - Estruturas químicas dos compostos citados no item 2.4.1.1 (1-15)

Apesar de todos os estudos realizados, não existe uma vacina licenciada contra leishmaniose. Ainda, cada espécie de *Leishmania* é distinta, com ciclos de vida complexos, diferente localização intracelular e juntamente com uma interação complexa de imunidade do hospedeiro (CHOUHAN et al., 2015). Embora haja diversos estudos utilizando extratos, frações e compostos derivados de plantas, novas fontes como algas, invertebrados marinhos e micro-organismos devem ser exploradas na busca de compostos com atividade leishmanicida.

2.4.2 Fitopatógenos de importância agrônômica

Dentre os maiores problemas na produção agrícola de culturas estão os fungos fitopatogênicos, organismos que apresentam potencial para causar doenças em plantas. Estes micro-organismos possuem um período de latência rápido, isto é, o tempo entre a infecção e a produção de outros propágulos infecciosos (esporos) pode ser de apenas alguns dias. Muitos destes micro-organismos são capazes de produzir grandes quantidades de esporos, que são transportados pela água ou ar, infectando plantios inteiros rapidamente. Podem biossintetizar fitotoxinas e enzimas capazes de desestabilizar os mecanismos de defesa e afetar os tecidos das plantas e, também, absorver nutrientes de regiões economicamente importantes, como sementes e frutos, causando perdas no rendimento da cultura (STRANGE, 2003; STRANGE; SCOTT, 2005).

Com a expansão da agricultura e o cultivo de grandes áreas, os problemas causados por fitopatógenos, concomitantemente, têm aumentado. Inúmeros patógenos têm causado prejuízos à agricultura, diminuindo a produção e elevando os gastos com produtos químicos para a prevenção e controle das doenças (FINATTI; APARECIDO, 2009). Dentre os fitopatógenos que causam grandes perdas nas culturas pode-se citar os fungos do gênero *Colletotrichum*, *Fusarium*, complexo *Diaporthe/Phomopsis*, entre outros.

2.4.2.1 Fungos fitopatogênicos do gênero *Colletotrichum*

Fungos fitopatogênicos do gênero *Colletotrichum* são causadores da antracnose, uma doença que ataca todos os órgãos da parte aérea, causando apodrecimento (nas folhas, frutos e órgãos reprodutivos) ou crestamento (folhas e ramos) (FISCHER; KIMATI; RESENDE, 2005). Este gênero foi recentemente eleito o oitavo grupo mais importante de fungos patogênicos de plantas no mundo, baseado na importância econômica das antracnoses (CANNON et al., 2012; DEAN et al., 2012).

Os fungos do gênero *Colletotrichum* pertencem ao Filo Ascomycota e são encontrados especialmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo capazes de atacar diversas espécies de plantas das famílias Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Dioscoreaceae, Leguminosae, Malvaceae, Solanaceae, Rosaceae,

entre outras (BAILEY; JEGER, 1992; PICCINI; PASCHOLATI, 1997). Diferentes espécies ou genótipos de *Colletotrichum* podem infectar diversas partes da mesma planta hospedeira, causando doenças distintas, que ocorrem sucessivamente durante o desenvolvimento da cultura (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998). Ainda, diversas plantas hospedeiras podem ser infectadas por uma única espécie de *Colletotrichum*, como o *C. gloeosporioides*, que causa doenças em laranja, café, abacate, manga, mamão, pêssego, morango, entre outras (PHOULIVONG et al., 2010).

Espécies de *Colletotrichum* empregam estratégias para a penetração no hospedeiro, desenvolvendo uma série de estruturas de infecção especializadas como tubos germinativos, apressórios, vesículas de infecção, hifas primárias e hifas secundárias (PEREIRA et al., 2005). Os apressórios formados por espécies do gênero *Colletotrichum* aparecem diretamente do conídio, mas podem formar-se na extremidade de tubos germinativos ou de ramificações de hifas (BAILEY et al., 1992). O apressório tem a função de permitir a penetração do fungo na cutícula do hospedeiro e na parede celular epidérmica por meio do peg de penetração que emerge da sua base. Em consequência deste processo, a hifa desenvolve-se intra (hemibiotrófico) e/ou intercelularmente (subcuticular intramural) e pode permanecer latente até condições favoráveis (BAILEY et al., 1992; AGRIOS, 2005).

Os sintomas nos frutos variam de acordo com a espécie, mas, de maneira geral, iniciam-se por pequenas pontuações de coloração marrom a preta, com formato circular, evoluem para manchas necróticas de coloração escura, com bordos definidos e formato irregular, seguidas de podridão de frutos, com formação de massa alaranjada que contém os esporos do fungo (FERRARI et al., 2011). As plantas podem ser afetadas pela doença tanto na época de desenvolvimento no campo, quanto na época de pós-colheita, estando sujeitas à doença em todas as fases do seu desenvolvimento (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998). Frequentemente há a necessidade de tratamento pós-colheita. Alta severidade da antracnose ocorre em locais ou épocas onde há chuvas frequentes e predominância de alta umidade relativa (COSTA et al., 2010).

O método ideal para o controle da antracnose é o uso de cultivares resistentes. Entretanto, o trabalho de melhoramento genético pode ser demorado e apresentar características agrônômicas inferiores aos suscetíveis, principalmente considerando o potencial produtivo. Dessa forma, uma das principais medidas é a

aplicação de fungicidas (ITO et al., 2002). No estágio de pré-colheita, os fungicidas são utilizados para diminuir a infestação do patógeno, enquanto que no estágio de pós-colheita, são usados fungicidas para controlar infestações já estabelecidas ou proteger contra infestações que podem ocorrer durante o processo de armazenamento e transporte (BAUTISTA-BAÑOS, 2014).

2.4.2.2 Fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium*

A murcha do *Fusarium* é uma doença vascular primeiramente descrita no Vale do Sacramento, Califórnia (EUA), em 1929 por Harter. No Brasil, o primeiro relato da doença foi realizado no estado de São Paulo em plantas de feijão (KIMATI; MASCARENHAS, 1967). A doença foi caracterizada por apresentar murcha das plantas, amarelecimento, queda de folhas e completa invasão vascular pelo fungo *Fusarium oxysporum* (FRAVEL et al., 2003).

Os fungos do gênero *Fusarium* Link (1809) ex Fries pertencem ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Nectriaceae. Compreendem espécies filamentosas de ampla distribuição geográfica, com grande importância econômica, comumente encontrados como fitopatógenos, saprófitas do solo e matéria orgânica e uma minoria patogênica de animais e seres humanos (GÓMEZ; RAMÍREZ, 2008). A maioria das espécies produz tanto macroconídios quanto microconídios, podendo produzir, também, clamidósporos (CAVALCANTI; COELHO; PERES, 2002).

As espécies de *Fusarium* que causam murchas vasculares são todas classificadas como *Fusarium oxysporum*, as quais formam um complexo de fungos de solo, compostos por patótipos classificados em várias *formae speciales* (f. sp.), com base em seu critério patogênico.

O conceito de f. sp. foi aplicado por Snyder e Hansen (1954) para reconhecer isolados patogênicos que foram morfológicamente semelhantes a isolados saprófitos de mesma espécie, mas que se diferenciam em sua habilidade para parasitar hospedeiros específicos. Cada grupo de f. sp. é patogênico a uma espécie ou a um grupo de plantas em particular, demonstrando o elevado grau de especificidade do hospedeiro, sendo responsáveis por causar doenças em mais de 120 espécies de plantas (NELSON et al., 1983; OLIVEIRA; COSTA, 2002).

A infecção da planta se inicia quando os tubos germinativos dos esporos ou o micélio penetram na raiz diretamente, através de ferimentos ou em pontos de formação de raízes secundárias. Enquanto nos vasos, o micélio se ramifica e produz microconídios que germinam e penetram na parede superior do vaso. O micélio também avança lateralmente penetrando através dos poros dos vasos. A combinação desses processos provoca o entupimento dos vasos por micélio e esporos, o que leva a interrupção do fluxo de água da planta infectada, o fechamento dos estômatos e, conseqüentemente, a murcha foliar, causando a morte do hospedeiro. O fungo, em seguida, invade todos os tecidos da planta extensivamente, atingindo a superfície da planta morta e esporula (AGRIOS, 2005).

Os sintomas se caracterizam pela queda de pecíolos, raques e folíolos. As folhas inferiores apresentam clorose se tornando amareladas e, por fim, secam (SINGH et al., 2007). Plântulas afetadas apresentam, primeiramente, inclinação das folhas e, em seguida, entram em colapso. Os tecidos vasculares das raízes mostram descoloração marrom à preta que se estende aos caules e ramos (GAUR et al., 2010). Quando a doença atinge plantas jovens, observam-se redução no desenvolvimento e nanismo, podendo levar à morte da planta (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 1997). Sementes provenientes de plantas infectadas podem transportar o patógeno para novas áreas onde a doença pode se estabelecer (PANDE; RAO; SHARMA, 2007).

Devido à complexidade, à variabilidade genética existente no gênero e à capacidade destes patógenos em sobreviver no solo e restos de culturas, as doenças causadas por estes fungos são consideradas de difícil controle (MOHAMMADI; BANIHASHEMI, 2006). O método de controle mais utilizado e mais economicamente eficiente tem sido o uso de cultivares resistentes (BAKHSH et al., 2007), embora a efetividade destes cultivares possa ser reduzida pela variabilidade patogênica dos fungos do gênero *Fusarium* (JIMENEZ-GASCO et al., 2005). Outras medidas de controle, como rotação de culturas, solarização do solo, uso de sementes livres de patógenos, remoção de restos de plantas infestadas e uso de fungicidas (como carbendazim, thiram + benomyl e thiram + captan) podem ser adotadas na tentativa de diminuir a infecção (SINGH et al., 2007; NENE et al., 2012), embora nenhuma delas seja totalmente eficiente no controle da infecção e colonização das raízes (DUBEY; SURESH; SINGH, 2007).

2.4.2.3 Fungos fitopatogênicos do complexo *Diaporthe/Phomopsis*

A cultura da soja (*Glycine max*) pode ser afetada no campo por um grande número de doenças fúngicas, sendo a seca da haste e da vagem, causada por *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* uma das principais doenças limitantes da produtividade da cultura da soja (PEDERSEN; GRAU, 2010).

O complexo *Diaporthe/Phomopsis* está associado a doenças como a seca da haste e da vagem, o cancro da haste e a podridão da semente (MORGAN-JONES, 1992). Espécies deste complexo pertencem ao filo Ascomycota, ordem Diaporthales e família Diaporthaceae (KIRK et al., 2008). As conexões entre as fases teleomórfica e anamórfica foram descritas apenas para aproximadamente 20% das espécies do gênero *Diaporthe*, o que torna a identificação ao nível de espécie neste gênero muito difícil (PHILLIPS, 2006; REHNER; UECKER, 1994).

A seca das hastes e das vagens foi a primeira doença do complexo a ser descrita, por Wolf e Lehman, em 1920 e é a principal doença que ocorre sobre as hastes e vagens próximas a maturação, afetando também pecíolos, folhas, sementes e raízes. Os danos por esta doença ainda são incertos, sendo estimados em até 15% e evidenciados pela má qualidade das sementes (CARMONA; SCADIANI; LUQUE, 2012).

No campo, a doença aparece inicialmente em pecíolos e ramos quebrados das partes inferiores das plantas, com menor incidência em hastes, vagens, sementes e folhas. Posteriormente, os sintomas da doença se manifestam sob a forma de lesões escuras restritas a um dos lados das hastes de soja (HENNING et al., 2014; ATHOW; CALDWELL, 1954). A senescência prematura de plantas de soja ocasiona redução na produtividade quando ocorre antes do completo enchimento de grãos, podendo ainda aumentar a infecção de hastes e sementes por *Phomopsis* spp., já que a senescência geralmente ocorre sob condições ambientais ótimas ao desenvolvimento da doença (McGEE, 1992; MERILES et al., 2004).

A infecção das sementes por *Phomopsis sojae* é similar ao *Colletotrichum dematium* f. sp. *truncata*, outro fitopatógeno da cultura de soja. A infecção se inicia através das paredes da vagem enquanto ainda estão verdes, chegando às sementes geralmente após o início da maturação da vagem (DRINGRA; ACUNA, 1997). Estudos histológicos mostraram que o micélio do fungo se encontra nas camadas de revestimento da semente, na epiderme, na hipoderme e na endoderme

(MANANDHAR et al., 1985). Somente infecções que se iniciam nas vagens resultam em deterioração das sementes (ALMEIDA et al., 2005).

Após a infecção pelo fungo, as vagens ficam murchas ou apodrecem e adquirem coloração esbranquiçada a castanho clara. Sob condições de alta umidade, o fungo desenvolve frutificações assexuais negras chamadas picnídios, dispostas de forma linear (KULIC; SINCLAIR, 1999). Sementes apresentam enrugamento e rachaduras do tegumento, ficam sem brilho e cobertas com micélio. Sementes infectadas superficialmente por *Phomopsis sojae*, quando semeadas em solos úmidos, geralmente chegam a emergir, porém o fungo desenvolvido no tegumento não permite que os cotilédones se abram, impedindo a expansão das folhas primárias. O fungo sobrevive como micélio dormente em restos de culturas ou sementes infectadas, podendo sobreviver na forma de picnídio em restos de cultura (ALMEIDA et al., 2005).

Como método de controle à seca da haste e vagem recomenda-se o uso de sementes saudáveis, tratamento de semente, rotação de cultura e manejo adequado do solo, principalmente com relação à adubação potássica. Durante a armazenagem da semente em condição ambiente, *Phomopsis* spp. perdem viabilidade rapidamente. O tratamento de semente com fungicidas sistêmicos, especialmente os benzimidazóis, é eficaz para a erradicação do fungo (HENNING et al., 2014).

Embora os métodos convencionais de controle de fitopatógenos apresentem resultados positivos, os fungos endofíticos são importantes candidatos ao controle destas doenças, pelo fato de colonizarem um nicho semelhante ao ocupado pelos patógenos, pela produção de compostos antagonistas e pela indução de resistência na planta (ARAÚJO et al., 2010; GAO; DAI; LIU, 2010)

2.4.2.4 Atividade anti-fitopatogênica de metabólitos secundários de fungos endofíticos

Como alternativa aos produtos químicos, estudos mostram que fungos endofíticos produzem compostos bioativos capazes de proteger seus hospedeiros de doenças e limitar o dano causado por micro-organismos patogênicos (ARNOLD et al., 2003; MEJIA; ROJAS; MAYNARD, 2008).

Cinco compostos antifúngicos foram isolados de *Xylaria* sp., um endófito de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). Dois dos compostos isolados, ácido 2-hexil-3-

metil-butanodióico **(16)** e citocalasina D **(17)**, apresentaram atividade contra *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* na concentração de 25 µg mL⁻¹ em ensaios de bioautografia (CAFÊU et al., 2005).

Novos presilfiperfolanos sesquiterpenos foram isolados do extrato acetato de etila de *Xylaria* sp, fungo endofítico obtido, também, de folhas de *Piper aduncum*. Ainda foram isolados 2 eremofilanos sesquiterpenos já conhecidos: faseolinona **(18)** e fomenona **(19)**. Os compostos foram testados para atividades citotóxica e antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. Entretanto, somente os já conhecidos (18 e 19) apresentaram atividade citotóxica moderada (20 e 200 µM, respectivamente) e o composto fomenona apresentou atividade antifúngica na concentração de 100 µg mL⁻¹ nas duas espécies de *Cladosporium* avaliadas (SILVA et al., 2010).

Trinta e nove metabólitos fúngicos, incluindo 2 novos alcalóides, 12β-hidroxi-13α-metoxiverruculogeno TR-2 e 3-hidroxfumiquinazolina A, foram isolados do extrato de *Aspergillus umigatus* LN-4, um fungo endofítico da casca do caule de *Melia azedarach*. Estes compostos foram avaliados para atividade antifúngica “*in vitro*” contra os fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, e *Gibberella saubinetii*. Dezesesseis compostos apresentaram potencial antifúngico contra os fitopatógenos e 4 deles, 12β-hidroxi-13α-metoxiverruculogeno TR-2 **(20)**, fumitremorgina B **(21)**, verruculogeno **(22)** e ácido helvólico **(23)**, exibiram atividade semelhante aos fungicidas comerciais Cabendazim Nortox® e Himexazol (LI et al., 2012).

Recentemente, a comunidade endofítica do cactus *Opuntia umifusa* foi avaliada quanto à produção de compostos com atividade antifúngica. Dos 108 fungos isolados, o fungo *Biscogniauxia mediterrânea* Ohu 19B apresentou maior atividade e teve seus compostos isolados. Foi obtido o composto ativo 5-metilmeleína **(24)**, com atividade contra os fitopatógenos *Phomopsis obscurans* (63,5%) e *Fusarium oxysporum* (20,1%), através de ensaio de microdiluição “*in vitro*” (SILVA-HUGHES et al., 2015).

O fungo endofítico *Epichloe bromicola*, isolado do caule da planta *Elymus tantutorum*, produziu o composto ciclosporina T **(25)** que apresentou atividade contra os fungos *Alternaria alternata*, *Fusarium avenaceum*, *Bipolaris sorokiniana* e *Curvularia luneta* em ensaio de difusão em meio, com valores entre 0,7 e 5,3 µM

(SONG et al., 2015). Do extrato produzido pelo fungo endofítico *Lophodermium nitens*, isolado do pinheiro branco (*Pinus strobus*), foram obtidos 8 compostos da classe dos sesquiterpenos e macrolídeos. Destes, o composto pirenoforina (**26**) foi capaz de reduzir com crescimento de *Microbotryum violaceum* e *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 5 mM (McMULLIN; GREEN; MILLER, 2015).

Os metabólitos secundários de 40 fungos endofíticos isolados de plantas de ginseng (*Panax ginseng*) foram avaliados contra *Alternaria panax*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum panacicola*, *Cylindrocarpon destructans*, *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora cactorum*. Seis frações apresentaram atividade contra todos ou algum dos patógenos, sendo que a fração obtida de *Phoma terrestris* apresentou maior atividade nos ensaios de inibição por difusão em disco (52,2 a 82,5%) e difusão em meio (42,8 a 80,2%) na concentração de 10 µg µL⁻¹ (PARK et al., 2015).

Em um estudo realizado com o fungo endofítico *Penicillium raciborskii* isolado de *Rhododendron tomentosum*, foram isolados 3 novos epitioidiquetopiperazinas, a outovirina A, outovirina B e outovirina C. O composto outovirina C (**27**) foi capaz de inibir todos os fungos fitopatogênicos na concentração de 0,38 mM (207 µg mL⁻¹), sendo mais ativo contra *Botrytis cinerea* (57% de inibição) e menos ativo contra *Verticillium dahliae* (45% de inibição) (KAJULA et al., 2016).

Figura 4 - Estruturas químicas dos compostos citados no item 2.4.2.4 (16-27)

Apesar do avanço da síntese de compostos orgânicos e da química combinatória continuarem a desempenhar um papel importante no processo de desenvolvimento de novos fármacos e defensivos agrícolas, o uso negligenciado do produto leva à seleção de organismos patogênicos resistentes, sendo necessário buscar novas fontes de compostos ativos (CLARDY; FISHBACH; WALSH, 2006; GERWICK; SPARKS, 2014). Para isso, podem ser adotadas algumas estratégias na pesquisa em produtos naturais, tais como utilizar organismos que habitem biótopos únicos como florestas tropicais, desertos, oceanos e ilhas (PETTIT, 2011).

Os organismos provenientes destes ambientes ainda são pouco estudados e são considerados uma das fontes pouco explorada e promissora para a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o estudo do potencial químico e biológico dos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de duas espécies de plantas do gênero *Anthurium* pertencentes a Ilha de Alcatrazes (São Sebastião - SP).

3.1 Objetivos específicos

- Isolar fungos endofíticos de plantas do gênero *Anthurium* da Ilha de Alcatrazes;
- Selecionar isolados endofíticos para investigação mais aprofundada por comparação dos perfis espectrais obtidos por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF e por ensaio biológico contra fitopatógenos;
- Isolar os metabólitos secundários de interesse utilizando-se de técnicas cromatográficas e caracterizá-los por técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- Avaliar extratos brutos, frações e compostos puros em ensaios de atividade biológica contra fitopatógenos e contra o protozoário *Leishmania* (L.) *infantum*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fluxograma da metodologia

Figura 5 - Fluxograma resumindo as etapas metodológicas realizadas

4.2 Coleta de material vegetal

A coleta do material biológico foi realizada no dia 05 de setembro de 2013 na Ilha de Alcatrazes, pertencente ao Arquipélago de Alcatrazes (24°10'S, 45°70'W), município de São Sebastião-SP. Foram coletadas exemplares de 2 plantas e registradas as informações relevantes como localização, ambiente, entre outras. O material vegetal foi acondicionado em sacos plásticos identificados e transportado imediatamente para o laboratório do Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar/USP).

Um exemplar inteiro (caule, folhas e flores, quando presente) de cada planta foi utilizado para montagem de exsicata e posterior confirmação morfológica das espécies e depósito em herbário.

4.3 Identificação taxonômica das plantas coletadas

O material botânico coletado foi herborizado e depositado no herbário HRCB (Herbário Rioclarense) do Instituto de Biociências (UNESP/Rio Claro), acrônimo de acordo com o *Index Herbariorum* – (THIERS, 2016), sob colaboração do Prof. Dr. Marco Antônio de Assis e da Ms. Letícia Peres Poli, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP-Rio Claro). A identificação taxonômica foi realizada com o auxílio da literatura (COELHO; WAECHTER; MAYO, 2009; COELHO, 2012; MAMEDE et al., 2012) e consulta a especialistas da área.

4.4 Isolamento e purificação dos fungos endofíticos

As amostras de folhas foram processadas cerca de 3 horas após a coleta, no laboratório do Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMar/USP). Para o isolamento dos fungos endofíticos, as folhas passaram por um processo de limpeza superficial, sendo lavadas em água corrente para a retirada de resíduos de poeira e solo. Em seguida, foram desinfetadas de acordo com Petrini (1991), com algumas modificações, em um processo composto por 6 lavagens. Na primeira lavagem, a amostra foi submersa por 1 minuto em água destilada estéril; na segunda em solução de etanol 70% por 1 minuto; na terceira em hipoclorito de sódio 2,5% por 2 minutos; na quarta em etanol 70% por 1 segundo; na quinta e na sexta em água destilada estéril durante 1 minuto. Uma alíquota de 100 μ L da água proveniente da sexta lavagem foi inoculada em placa contendo meio sólido BDA (batata-dextrose-ágar) para confirmar a eficácia do método.

Após este processo, as folhas foram cortadas com bisturi estéril em fragmentos de aproximadamente 8-12 mm, e 3 destes fragmentos foram dispostos em cada placa de Petri contendo diferentes meios de cultivo, com exceção dos meios "2" e "5", onde vários fragmentos foram incorporados ao meio de cultivo. Os meios de cultivo utilizados foram:

- 1) **Meio malte enriquecido (M)** - Extrato de malte (18,0 g L⁻¹), extrato de levedura (5,0 g L⁻¹) e dextrose (20,0 g L⁻¹);

- 2) **Meio malte enriquecido + folha (MF)** - Extrato de malte (18,0 g L⁻¹), extrato de levedura (5,0 g L⁻¹), dextrose (20,0 g L⁻¹) e adição de fragmentos de folhas enquanto o meio foi vertido nas placas;
- 3) **Meio batata-dextrose-ágar (BDA)** - Meio BDA sintético (40,0 g L⁻¹);
- 4) **Meio mínimo de sais (MS)** - K₂HPO₄ (18,8 g L⁻¹); KH₂PO₄ (6,0 g L⁻¹); MgSO₄ (5,0 g L⁻¹) e glicerol (10,0 g L⁻¹);
- 5) **Meio mínimo de sais + folha (MSF)** - K₂HPO₄ (18,8 g L⁻¹); KH₂PO₄ (6,0 g L⁻¹); MgSO₄ (5,0 g L⁻¹), Glicerol (10,0 g L⁻¹) e adição de fragmentos de folhas enquanto o meio foi vertido nas placas;
- 6) **Meio água-ágar + folha (AF)** - folhas das plantas estudadas trituradas em liquidificador com água estéril (fonte de nutriente) e incorporação em meio de água-ágar (20,0 g L⁻¹);
- 7) **Meio água marinha (AM)** - CaCl₂ (1,36 g L⁻¹); MgCl₂ (9,68 g L⁻¹); KCl (0,61 g L⁻¹); NaCl (30,0 g L⁻¹); NaH₂PO₄ (0,14 mg L⁻¹); Na₂SO₄ (3,47 g L⁻¹); NaHCO₃ (170 mg L⁻¹); KBr (100 mg L⁻¹); SrCl₂ (40 mg L⁻¹); Ácido bórico (30 mg L⁻¹); extrato de levedura (1,0 g L⁻¹); peptona (5,0 g L⁻¹); dextrose (1,0 g L⁻¹);
- 8) **Meio ácido húmico + vit. B10 (AH)** - Ácido húmico (1,0 g em 10 mL de NaOH 0,2 M); Na₂HPO₄ (0,5 g L⁻¹); KCl (1,7 g L⁻¹); FeSO₄.7H₂O (0,01 g L⁻¹); CaCO₃ (0,01 g L⁻¹) e vitamina B10 (10 mg L⁻¹);
- 9) **Meio malte enriquecido + fungicida (MAC)** - Extrato de malte (18,0 g L⁻¹), extrato de levedura (5,0 g L⁻¹) e dextrose (20,0 g L⁻¹);

Para todos os meios de cultivo acrescentou-se 2% de ágar, com exceção do meio 3. Os meios 1 a 7 foram acrescidos dos antibióticos Tetraciclina (100 mg L⁻¹) e Streptomicina (20 mg L⁻¹). Já os meios 8 e 9, foram acrescidos com os fungicidas Nistatina (100 mg L⁻¹) e Dithane NT (200 mg L⁻¹) com intuito de se isolar actinobactérias. Para ambas as plantas foram utilizadas 3 placas de cada meio de cultivo.

Também, fragmentos de folha foram armazenados em tubos falcon contendo solução salina 0,85% para posterior diluição seriada seguindo o seguinte processo: as folhas presentes na solução salina foram trituradas e colocadas em eppendorffs; em seguida, foram maceradas com ajuda de um bastão de vidro; foi adicionado 1 mL de solução salina do próprio tubo falcon ao eppendorff; a solução foi agitada em vórtex; 0,1 mL da solução foi transferida para novo eppendorff contendo 0,9 mL de

solução salina 0,85% estéril, seguindo a diluição até 10^{-6} . Por fim, foi inoculado, com alça de Drigalsky, 50 μ L da solução em placas de Petri contendo meio de malte enriquecido e antibiótico.

As placas foram levadas ao Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais da ESALQ/USP, onde foram acondicionadas em incubadora do tipo B.O.D. a 28 °C. Foram realizadas inspeções periódicas e à medida que foi observado o crescimento de fungos endofíticos nas placas, estes foram transferidos para novas placas e codificados conforme a figura 6. Independentemente do meio inicial nos quais os fungos foram isolados, estes foram transferidos para nova placa contendo meio de extrato de malte (MEA) sem antibiótico para purificação das linhagens.

Figura 6 - Sistema de atribuição de códigos dados aos fungos endofíticos isolados

4.5 Preservação dos fungos endofíticos isolados

Os fungos isolados foram preservados utilizando-se 2 métodos: criopreservação e Castellani. A criopreservação consiste na manutenção de uma variedade de tipos celulares em glicerol 15% sob baixas temperaturas (freezers a -80 °C), tendo como principal objetivo a redução de injúrias aos materiais biológicos (WOLFE; BRYANT, 2001; COSTA et al., 2009); O método Castellani consiste na preservação em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939; PIMENTEL; FIGUEIREDO, 1989). O uso de diferentes metodologias de preservação visou garantir maiores chances de reativação dos micro-organismos isolados.

4.6 Priorização dos fungos endofíticos

4.6.1 Análise do perfil espectral por *MALDI-TOF-MS*

As análises realizadas por espectrometria de massas (MS) do tipo *MALDI-TOF* (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization on Time-Of-Flight) foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR-São Carlos), sob colaboração do Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho e do Dr. Douglas Ferreira.

Para análise, os isolados foram crescidos em meio aveia-água (60 g aveia/L), em triplicata, durante 7 dias e, em seguida, aplicados em placa de aço MTP384 “ground steel TF target plate” (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) específica para espectrômetro de massas do tipo *MALDI-TOF*. As amostras foram sobrepostas por 1,5 µL de matriz (20 mg mL⁻¹ de ácido α-cyano-4-hidroxicinâmico (CHCA) em solução de acetonitrila 0,2% : ácido trifluoroacético aquoso (1:1) sonificada por 15-20 minutos. Cada amostra (em triplicata) foi aplicada em 6 pontos da placa de aço, sendo realizado por 2 analistas. Desta forma, para cada isolado, obteve-se um total de 36 amostragens geradores de espectro.

O equipamento utilizado foi o espectrômetro "Autoflex Speed" (Bruker Daltonics, Bremen-Germany) equipado com laser smartbeam II, 1 kHz (335 nm)" em uma faixa de leitura de 2- 20 KDa onde cada amostragem da placa foi lida em modo randômico gerando 36 espectros por isolado.

Os espectros obtidos foram, primeiramente, analisados utilizando o programa FLEX-Analysis 3.3, programa que permite a comparação e análise de múltiplos espectros da mesma linhagem. Em seguida, os espectros foram carregados no programa MALDI Biotyper software 3.1 e pré-processados usando algoritmos padrão para subtração, alisamento e normalização da linha de base. Os espectros de cada linhagem foram agrupados gerando, para os 36 espectros obtidos, um único espectro principal chamado MSP's (Main Spectral Projection). Os MSP's foram, então, comparados entre si de acordo com as informações sobre a média de *m/z* em relação à intensidade dos picos e assim, gerando um dendrograma de similaridade entre os isolados.

Foram adicionadas ao dendrograma 17 linhagens já identificadas e certificadas (por técnicas moleculares e morfológicas) para comparação com os

isolados. Ainda, 20 dos isolados das plantas coletadas foram identificados à nível de gênero (por técnicas morfológicas), sendo utilizados, também, para comparação.

A partir do dendrograma de similaridade foram selecionados isolados com perfis proteicos distintos para terem seus metabólitos secundários extraídos e avaliados em ensaio de atividade contra fitopatógenos.

4.6.2 Cultivo dos fungos selecionados e obtenção da fração acetato de etila

Os 60 fungos selecionados foram cultivados em meio líquido, utilizando-se de 4 plugs com 7 mm de diâmetro das bordas recém-repicadas das linhagens e transferidos para Erlenmeyers de 250 mL, contendo 150 mL de meio de extrato de malte, durante 7 a 14 dias em agitação constante de 150 rpm, a 28 °C (Incubator Shaker Series-Innova 40-New Brunswick Scientific).

Após o crescimento dos fungos, o meio metabólito foi filtrado e submetido à partição líquido-líquido com o solvente orgânico acetato de etila (1 : 1), obtendo-se duas frações: a fração aquosa e a fração acetato de etila (AcOEt). A fração aquosa foi descartada e a fração acetato de etila foi concentrada em um evaporador rotativo (MA 120–Marconi) para a retirada de todo o solvente presente na amostra. As frações acetato de etila foram codificadas, pesadas e armazenadas em geladeira (4 °C).

4.6.3 Ensaio de atividade antifúngica da fração acetato de etila

A atividade antifúngica “*in vitro*” foi avaliada através de ensaio por difusão em disco de papel filtro (CAVALIERI et al., 2005) com modificações.

O ensaio consistiu em colocar discos de papel filtro esterilizados (6 mm de diâmetro) contendo 1 mg da fração AcOEt diluída em MeOH sobre meio de cultura de MEA. Ao lado oposto ao papel filtro, foi inoculado um plug do fitopatógeno (7 mm de diâmetro) retirado de uma placa recém-repicada.

As frações acetato de etila foram analisadas em bioensaios contra 4 fitopatógenos: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Phomopsis sojae* (Tabela 1).

Tabela 1 - Fitopatógenos utilizados nos ensaios de inibição “*in vitro*”

Fitopatógeno	Filo	Isolado da planta	Doença causada
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Ascomycota	Guaraná	Antracnose
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Ascomycota	Feijão	Antracnose
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	Ascomycota	Feijão	Mancha do fusarium
<i>Phomopsis sojae</i>	Ascomycota	Soja	Podridão seca

A linhagem do fungo *C. gloeosporioides* foi cedido pelo grupo da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, do Departamento de Genética (ESALQ/USP). O fungo *C. lindemuthianum* foi cedido pela Dra. Liliane de Diana Teixeira, da Clínica Fitopatológica "Prof. Hiroshi Kimati" (ESALQ/USP). Os fungos *F. oxysporum* e *P. sojae* foram cedidos pela Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani Kleiner, do Departamento de Genética (ESALQ/USP).

Para cada bioensaio, foram utilizados 2 controles. Um controle consistiu em uma placa de Petri contendo somente o patógeno, e o outro consistiu em uma placa de Petri contendo o patógeno e ao lado oposto um plug de papel filtro esterilizado e inoculado com o solvente metanol.

As placas de Petri foram mantidas em B.O.D. a 28 °C até a colonização total pelos patógenos nas placas controle. Após este período, as placas foram fotodocumentadas e as porcentagens de inibição foram calculadas através da área do crescimento micelial pela área total da placa, utilizando-se o programa de análise ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*).

4.7 Identificação dos fungos endofíticos

Os fungos endofíticos selecionados para o estudo foram identificados através de técnicas morfológicas e moleculares. Estas foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. André Rodrigues, responsável pelo Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP-Rio Claro) e a Msc. Ana Maria Lima Correia.

Os fungos foram crescidos em meio MEA durante 5 a 7 dias em B.O.D. a 25 °C. As placas foram observadas em estereoscópio para verificar a presença de esporos e/ou estruturas específicas. Posteriormente, foram preparadas lâminas e

analisadas em microscópio óptico para observação de estruturas de reprodução características como esporos e conidióforos, visando uma triagem de gêneros. Este procedimento foi realizado seguindo a chave taxonômica de Domsch, Gams e Anderson (1980).

Para a análise molecular, o DNA dos isolados fúngicos foi extraído pelo método CTAB (cetiltrimetil brometo de amônio) modificado de Moller et al. (1992) e Palazzo et al. (2004). Para checar a integridade do DNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% com GelRed™ (1:1) (Biotium) e, em seguida, a visualização das bandas foi realizada sob luz UV, em fotodocumentador.

A região amplificada pela técnica de PCR foi a ITS, utilizando-se os iniciadores ITS4 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (SCHOCH et al., 2012); B-t2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') e b-t2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (GLASS; DONALDSON, 1995). Para ambos os marcadores, as reações de amplificação foram realizadas utilizando 5,0 µL de tampão 5X, 0,2 µL de Taq DNA Polymerase (5 U µL⁻¹), 1,0 µL de cada iniciador numa concentração final de 10 µM, 4,0 µL de cada dNTP numa concentração de 1,25 mM cada, 2,0 µL de MgCl₂ a 25 mM, 1,0 µL de BSA (10 mg mL⁻¹), 2,0 µL de DNA genômico (1:10) e 8,8 µL de água ultrapura esterilizada, para um volume final de 25 µL. O ciclo utilizado para a amplificação da região ITS foi de 94 °C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto e 72 °C durante 2 minutos. Já para a amplificação do gene que codifica para beta-tubulina, as condições foram: 0,2 mM de cada dNTP, tampão KCl 5x, MgCl₂ 1,5 mM, 0,5 µM de cada primer e 1U da enzima Taq polimerase em volume final de 25 µL. Para checar a formação dos amplicons foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, conforme as condições já citadas. Em seguida os produtos de amplificação foram purificados utilizando o Wizard PCR Purification Kit (Promega).

Para a reação de sequenciamento, os amplicons purificados foram quantificados em Nanodrop (Thermo). Foram utilizados 0,3 µL de Big Dye Terminator v. 3.1, 2,0 µL de Buffer 5X e 0,32 µL de iniciador numa concentração final de 10 µM, 1,0 µL de DNA (20 ng) e 6,38 µL de água ultrapura esterilizada para um volume final de 10 µL. Os produtos obtidos foram purificados com a utilização de EDTA 125 mM, acetato de sódio 3M, etanol 100% e etanol 70%, sendo

posteriormente aplicados no Sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems). As sequências forward e reverse geradas foram reunidas em contigs. Estes foram comparados com as sequências depositadas no banco de dados público GenBank, do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), utilizando-se a ferramenta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST).

Com intuito de auxiliar na identificação taxonômica, realizou-se análises filogenéticas considerando as sequências ITS de cada isolado examinado, bem como as sequências de outros fungos geradas em vários estudos e depositadas no GenBank (ARZANLOU, 2014; WANG; YU; WANG, 2014). Essas sequências foram selecionadas com base na autenticidade dos isolados, examinados por especialistas em cada grupo de fungos. As sequências foram alinhadas no software MAFFT. Para a inferência filogenética foi utilizado o algoritmo de neighbor joining, utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros e 1000 pseudoréplicas de bootstrap.

4.8 Isolamento e purificação dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos

Os isolados foram cultivados em maior volume (1 a 3 L) e as frações acetato de etila foram obtidas seguindo a metodologia do item 4.6.2. O solvente n-Butanol foi utilizado para a partição líquido-líquido quando não foi observada uma extração eficiente com o solvente acetato de etila, como por exemplo formação de emulsão ou ausência da formação de fases de diferentes polaridades. As frações obtidas foram fracionadas por técnicas cromatográficas dependendo da natureza dos compostos presentes.

4.8.1 Separação dos metabólitos secundários

Para a separação de compostos, dependendo das características da amostra, foram realizadas cromatografias em colunas pré-empacotadas do tipo Sep-Pak (marca Phenomenex Strata®) de diferentes dimensões (2g, 5g ou 10g) e com diferentes fases estacionárias, tais como: sílica-gel, sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano ou cianopropila.

Como fase móvel foram utilizadas diferentes proporções em modo gradiente dos solventes orgânicos da marca Synth[®] (grau P.A.): hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetonitrila e metanol. Para separações pelo princípio de separação por exclusão de tamanho ou peso molecular, foi utilizado a cromatografia de permeação em gel, com fase estacionária de Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech[®]) e fase móvel com MeOH grau P.A. As condições cromatográficas utilizadas para cada micro-organismo são apresentadas a seguir.

4.8.1.1 Separação dos metabólitos secundários do endófito cód. P2MSF2F3

Para a separação dos compostos presentes na fração AcOEt foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas:

- **Condição 1:** Cromatografia em colunas pré-empacotadas do tipo Sep-Pak (Phenomenex Strata[®]) de 5 g com fase estacionária de sílica e fase móvel gradiente entre diclorometano, acetato de etila e metanol (proporção inicial de 100% diclorometano e final de 100% metanol).
- **Condição 2:** Cromatografia em colunas pré-empacotadas do tipo Sep-Pak (Phenomenex Strata[®]) de 5 g com fase estacionária de sílica e fase móvel gradiente e acidificada (0,01% ácido acético) entre diclorometano, acetato de etila e metanol (proporção inicial de diclorometano : Acetato de etila (8 : 1) e final de 100% metanol).

4.8.1.2 Separação dos metabólitos secundários do endófito cód. P210⁴F2

Para a separação dos compostos presentes na fração AcOEt foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas:

- **Condição 3:** Cromatografia em colunas pré-empacotadas do tipo Sep-Pak (Phenomenex Strata[®]) de 10 g com fase estacionária de sílica e fase móvel gradiente entre hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol (proporção inicial de hexano : diclorometano (3 : 7) e final de 100% metanol).
- **Condição 4:** Cromatografia em colunas pré-empacotadas do tipo Sep-Pak (Phenomenex Strata[®]) de 2 g com fase estacionária de sílica e fase móvel gradiente entre diclorometano, acetato de etila e metanol (proporção inicial de 100% diclorometano e final de 100% metanol).

4.8.1.3 Separação dos metabólitos secundários do endófito cód. P7AF2F3

Para a separação dos compostos presentes na fração butanólica foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas:

- **Condição 5:** Cromatografia em colunas pré-empacotadas do tipo Sep-Pak (Phenomenex Strata®) de 10 g com fase estacionária de sílica e fase móvel gradiente entre hexano, diclorometano e metanol (proporção inicial de hexano : diclorometano (2 : 8) e final de 100% metanol).
- **Condição 6:** Cromatografia em colunas pré-empacotadas do tipo Sep-Pak (Phenomenex Strata®) de 5 g com fase estacionária de cianopropila e fase móvel gradiente entre hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol (proporção inicial de hexano : diclorometano (3 : 7) e final de 100% metanol).
- **Condição 7:** Cromatografia de permeação em gel, com fase estacionária de Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech®) e fase móvel com MeOH grau P.A.

4.8.2 Monitoramento químico dos metabólitos secundários

Para reunir as frações segundo similaridade química foram realizadas cromatografias em cromatofolhas de sílica-gel 60 sobre poliéster com indicador ultravioleta F₂₅₄ 20 x 20 cm (Macherey-Nagel®). Foram utilizadas diferentes misturas de solventes orgânicos para eluição dependendo das características químicas das frações: Eluição 1: Hexano : Diclorometano : Metanol (1 : 8 : 1); Eluição 2: Diclorometano : Metanol (9 : 1); Eluição 3: Clorofórmio : Metanol (95 : 5).

As cromatofolhas foram inspecionadas sob luz ultravioleta (UV) com emissão nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm, além de serem usados reveladores específicos para compostos nitrogenados **(1)**, esteróis e derivados de lipídeos **(2)** e aminoácidos, aminas e aminoaçúcares **(3)**:

- 1) Dragendorff** - Solução A: Bi(NO₃)₃.5H₂O (17 g L⁻¹), CH₃COOH (200 mL L⁻¹); Solução B: KI (266,6 g L⁻¹). Soluções na proporção 1:1;
- 2) Ácido fosfomolibdico** - H₃P(Mo₃O₁₀)₄ (50 g L⁻¹ de etanol);
- 3) Ninidrina** - ninidrina (2 g L⁻¹ de etanol);

Quando as frações apresentaram poucos compostos em sua composição, observados em CCD, estas foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para isolamento e purificação dos compostos presentes.

4.8.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para a separação dos compostos, as frações foram eluídas em solvente metanol grau HPLC (99,9 %) na concentração de $\sim 15 \text{ mg mL}^{-1}$, sendo injetados 30 μL por corrida cromatográfica.

As frações foram purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência no equipamento HPLC Agilent® 1100 Series UV/Vis com bomba quaternária, acoplado a um detector de ultravioleta MWD (*Multiple Wavelength Detector*). Foi utilizada como fase estacionária uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil (Phenomenex® Kinetex 5 μ C₁₈ 100A, 250 X 4,6 mm). Como fase móvel foram utilizados os solventes metanol, acetonitrila (grau HPLC) e água ultrapura, em modo gradiente de 40 minutos (proporção inicial de H₂O : MeOH : ACN (90 : 5 : 5) e MeOH : ACN (1 : 1) após 30 minutos), vazão de 1 mL min^{-1} e temperatura de 30 °C. Os comprimentos de onda utilizados no detector UV/vis para visualização dos compostos foram 220, 254, 280, 310 e 365 nm.

Foi utilizado, também, cromatógrafo de alta eficiência preparativo com bomba quaternária (Waters® Flex Inject, modelo 2535), acoplado a um detector de UV/Vis (Waters®, modelo 2489). Como fase estacionária foi utilizada uma coluna de sílica derivatizada com grupos alquila octil (Waters® C-8 Preparative Intent Sustain 5 μm , 20 x 250 mm) e fase móvel em modo isocrático de 80 minutos, entre H₂O (0,1% de CH₂O₂) : MeOH : ACN (65 : 20 : 15) e vazão de 10 mL min^{-1} .

4.9 Elucidação estrutural dos compostos isolados

Para a elucidação de suas estruturas, os compostos purificados foram submetidos a técnicas espectrométricas como espectrometria de massas (EM) e espectroscópicas, como ressonância magnética nuclear (RMN).

4.9.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a UV-EM

As análises de HPLC-UV-EM foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Roberto G. Berlinck, responsável pelo Laboratório de Química Orgânica de Sistemas Biológicos do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP).

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência com bomba quaternária (Waters®, modelo Alliance 2695) acoplado a 2 detectores. Um detector de arranjo de fotodiodo com varredura no UV-visível entre 200-800 nm (Waters®, modelo 2996) e outro detector, um espectrômetro de massas (Waters®, modelo ZQ 2000) com ionização eletrospray e analisador do tipo quadrupolo com faixa de detecção entre 100 e 1500 Da, energia de ionização de 30 eV e operado pela plataforma Empower 2.0.

A fase estacionária consistiu em coluna de sílica gel derivatizada com grupos octadecil (Waters® X-Terra MS-C₁₈, 3,5 µm, 50 x 2,1 mm) e fase móvel em modo gradiente de H₂O (0,01% ácido fórmico) em MeOH/ACN, sendo a proporção inicial de H₂O : MeOH : ACN (90 : 5 : 5) e após 16 minutos MeOH : ACN (1 : 1) até 20 minutos, com vazão de 0,5 mL min⁻¹.

Para análise dos compostos purificados, estes foram solubilizados em solvente metanol grau HPLC na concentração de 1,0-1,5 mg mL⁻¹, sendo injetados 20 µL da amostra.

4.9.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a EM de alta resolução

As análises de UPLC-HRMS foram realizadas, também, em colaboração com o Prof. Dr. Roberto G. Berlinck, responsável pelo Laboratório de Química Orgânica de Sistemas Biológicos do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP).

Os compostos purificados foram analisados UPLC-HRMS para a determinação de suas massas moleculares. As amostras foram eluídas em metanol e H₂O grau ULC-MS (9 : 1) na concentração de 0,01 mg mL⁻¹, sendo injetado 10 µL da amostra.

Foi utilizado cromatógrafo de ultra eficiência com bomba quaternária (Waters® XEVO G2-Xs QToF) em modo positivo com detector ZSpray (ESI/APCI/ESCI®) com faixa de detecção entre 100 e 1000 Da e energia de ionização de 30 V. Como fase estacionária foi utilizada coluna de sílica derivatizada com grupos octadesil (Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈, 1,7 µm, 2,1 x 50 m) e fase móvel em gradiente de 10 minutos (proporção inicial de H₂O : ACN (98 : 2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão de 0,5 mL min⁻¹ e temperatura de 4 °C.

4.9.3 Ressonância magnética nuclear

As análises de RMN foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira, responsável pelo Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar/São Carlos).

As amostras foram preparadas utilizando-se o solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) e como referência interna para a análise foi utilizado o padrão trimetilsilano (TMS). A análise foi realizada em equipamento da marca Bruker AVANCEIII, operando a 600,00 MHz na frequência do hidrogênio (¹H) e a 150,00 MHz na frequência do carbono (¹³C). Assim, foram obtidos os espectros unidimensionais de RMN ¹H e RMN ¹³C e bidimensionais de COSY ¹H-¹H (*correlation spectroscopy*), HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*) e HMBC (*heteronuclear multiple bond coherence*).

4.10 Ensaios biológicos com as frações obtidas dos fungos selecionados

Os fungos selecionados para estudo através das análises por *MALDI-TOF-MS* e/ou por análise de inibição de fitopatógenos, tiveram suas frações e compostos isolados avaliados nos respectivos ensaios de atividade biológica nos quais se mostraram promissores.

4.10.1 Ensaio de atividade antifúngica à fitopatógenos

4.10.1.1 Ensaio de atividade antifúngica por difusão em disco de papel

A fração acetato de etila que apresentou maior atividade teve seus compostos isolados e purificados por técnicas cromatográficas. Todas as etapas de separação foram monitoradas através de ensaio por difusão em disco (CAVALIERI et al., 2005), utilizando o fitopatógeno *P. sojae* como micro-organismo alvo.

Após o isolamento e purificação do composto ativo, este foi submetido a ensaio de difusão em disco contra os 4 fitopatógenos (*C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *P. sojae*) em uma concentração de 1 mg por papel filtro (6 mm).

Como controle positivo, foram utilizados os fungicidas Comet[®], Score[®], Captan SC[®] e Dithane NT[®] na concentração de 1 mg do princípio ativo por papel filtro (6 mm).

O ensaio foi realizado em duplicata e a porcentagem de inibição foi calculada através da área do crescimento micelial pela área total da placa, utilizando-se o programa de análise ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*). Os resultados foram trabalhados em Microsoft Office Excel 2007 e submetidos à comparação das médias pelo teste de Tukey (5%) com o auxílio do programa Sistema para Análise e Separação de Médias em Experimentos Agrícolas - SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

4.10.1.2 Ensaio de atividade antifúngica por microdiluição

O composto puro foi avaliado quanto a sua atividade inibitória ao crescimento micelial dos 4 fitopatógenos pelo método de microdiluição de fungos filamentosos determinado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002), com modificações. Para obtenção da suspensão micelial, foi adicionado solução salina 0,85% sobre as placas de Petri contendo os fitopatógenos. A suspensão foi homogeneizada e a determinação do número aproximado de células foi avaliado por câmara de Neubauer.

Em uma microplaca de 96 poços previamente acrescidos de 20 µL de DMSO, adicionou-se na primeira fileira 1 mg do composto diluído em 20 µL de DMSO. Deste volume, 20 µL foi retirado do primeiro poço e diluído em série até as concentrações finais (para 100 µL) de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,8; 3,9; 1,95; 0,97; 0,48 e 0,24 µg mL⁻¹. Aos poços contendo o composto, foram adicionados 80 µL de uma suspensão de micélio dos patógenos diluído em meio de cultivo ME enriquecido (2% de malte, 0,5% de extrato de levedura e 2% de dextrose) na concentração final de 10⁵ células mL⁻¹. A microplaca foi coberta com filme plástico transparente, mantida em estufa B.O.D. a 28 °C.

Para avaliar o desenvolvimento micelial, foram feitas avaliações a cada 4 h durante 48 h e, em seguida a cada 12 horas. Foi quantificada a densidade óptica dos poços por meio de leitor de absorbância de microplaca da marca TECAN, modelo SUNRISE e operado pelo software Magellan v7.1, no comprimento de onda de 620 nm. Desta medição obtiveram-se os valores de leitura de absorbância

relativa ao crescimento micelial dos fitopatógenos, sendo realizadas leituras até 96 horas de incubação.

Foram utilizados como controles positivos os fungicidas Comet[®], Score[®], Captan SC[®] e Dithane NT[®] diluídos em água ultra-pura esterilizada, nas mesmas concentrações (do princípio ativo) que o composto isolado. Como controle negativo foram utilizados água ultra-pura esterilizada e DMSO diluídos em 90 µL de meio de cultivo contendo micélios na mesma concentração do ensaio.

4.10.2 Ensaio de atividade antileishmaniose

Os ensaios biológicos de atividade antileishmaniose foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. André G. Tempone, responsável pelo Laboratório de Novos Fármacos - Doenças Negligenciadas do Instituto Adolfo Lutz-SP.

Formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD) foram cultivadas em meio M-199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,25% de hemina a 24 °C sem adição de antibióticos. Amastigotas de *L. (L.) infantum* foram obtidas por meio da centrifugação diferencial de baço de hamster previamente infectado e o número de parasitas determinado pelo método de Stauber (1958). Os Macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c (fêmeas) por meio de lavagem com meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidos em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

As frações obtidas foram incubadas com as formas promastigotas do parasita, para a triagem da atividade biológica. Estas foram eluídas em dimetilsulfóxido (DMSO), diluídas em meio de cultura e incubadas com os parasitas a 500 µg mL⁻¹ por 24 horas. Macrófagos (1x10⁵/poço) foram adicionados em placas de 16 poços (NUNC[®]), permanecendo em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período, amastigotas de *L. (L.) infantum* foram adicionadas aos macrófagos na proporção de 10:1 (amastigotas/macrófago) e incubadas a 37 °C por um período de 120 horas. Após um período de 48 horas, a viabilidade dos promastigotas foi verificada por microscopia óptica através da morfologia dos parasitas, como também pela atividade oxidativa mitocondrial utilizando-se o ensaio com o cromógeno MTT à 570 nm (TADA et al., 1986). Assim, foi avaliado o número de macrófagos infectados, utilizando-se como controle negativo macrófagos não tratados (100% infectado) e o fármaco Glucantime[®] como controle positivo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta e identificação taxonômica das plantas coletadas

Foram coletados 2 exemplares de plantas do gênero *Anthurium* codificadas P2 e P7, na Ilha de Alcatrazes, com o objetivo de isolar seus fungos endofíticos.

As plantas foram identificadas pelo Prof. Dr. Marco Antônio de Assis da UNESP/Rio Claro. Após confirmação, exsicatas foram depositadas no Herbário Rioclarense (HRCB) do Instituto de Biociências (UNESP/Rio Claro) gerando um número de voucher. Pela análise morfológica da parte aérea das plantas e comparação com a literatura, as plantas foram identificadas como P2: *A. loefgrenii* Engl. e P7: *A. alcatrazense* Nadruz & Cath.

As plantas do gênero *Anthurium* pertencem à classe das Magnoliopsida, ordem Alismatales e família Araceae. Este gênero é o maior e provavelmente o mais complexo a nível taxonômico na família Araceae, compreendendo cerca de 1.000 espécies (COELHO; MAYO, 2007) as quais estão divididas entre 18 seções de acordo com os caracteres morfológicos foliares.

A espécie *A. loefgrenii* Engl. pertence a seção *Urospadix* Engler. e subseção *Flavesccentiviridia* Engler. (ENGLER, 1905; COELHO; WAECHTER; MAYO, 2009). A figura 7 apresenta a ficha de informações do espécime P2: *A. loefgrenii*, coletado na Ilha de Alcatrazes-SP.

Planta 2		
Identificação:	<i>Anthurium loefgrenii</i> Engl.
Inf. GPS:	S 24° 06.073' W 45° 41.849' Elevação: 31 metros	
Dados do local de coleta:	Parte baixa da ilha, próximo ao nível do mar; Luminosidade: baixa; Ambiente: rochoso; Frequência: abundante; Presença de plantas rasteiras e árvores de médio porte.	
Voucher:	HRCB 64647	

Figura 7 - Ficha de informações de coleta da planta P2 (*A. loefgrenii*) coletada na ilha de Alcatrazes. (Fotos: Sartori, S.B.)

Esta espécie possui distribuição nos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina. É aparentemente abundante nas áreas de ocorrência de formações florestais de restinga e terras baixas, se apresentando, geralmente, como terrícola ou saxícola, podendo haver indivíduos epífitos ou escandentes (ROCHA, et al. 2014). Cresce em ambiente úmido e sombreado, alcançando altitudes entre 900 e 1200 m. A espécie pode ser reconhecida pelo caule semidecumbente (pouco inclinado) e pela base cuneada (estreita e aguda) da lâmina foliar. Floresce o ano todo, frutificando entre julho e novembro e no mês de janeiro (COELHO; WAECHTER; MAYO, 2009).

A outra espécie coletada, P7: *A. alcatrazense* Nadruz & Cath pertence à seção *Urospadix* Engler. e subseção *Obscureviridia* Engl. (ENGLER, 1905; COELHO; WAECHTER; MAYO, 2009). A figura 8 apresenta a ficha de informações do espécime coletado na Ilha de Alcatrazes-SP.

Planta 7		
Identificação:	<i>Anthurium alcatrazense</i> Nadruz & Cath
Inf. GPS:	S 24° 06.027' W 45° 41.640' Elevação: 56 metros	
Dados do local de coleta:	Parte alta da ilha, sobre paredão rochoso; Luminosidade: alta; Ambiente: rochoso; Frequência: escassa; Presença de poucas plantas saxícolas	
Voucher:	HRCB 64645	

Figura 8 - Ficha de informações de coleta da planta P7 (*A. alcatrazense*) coletada na ilha de Alcatrazes. (Fotos: Sartori, S.B.)

A espécie *A. alcatrazense* foi relatada por Coelho e Catharino (2008). É uma planta endêmica da Ilha de Alcatrazes (Estação Ecológica Tupinambás), município de São Sebastião-SP, com distribuição insular, de ocorrência pontual e com populações pequenas (menos de 1.000 indivíduos maduros), sendo considerada vulnerável (VU) pelos critérios da IUCN (IUCN Standards and Petitions Working Group 2008), ou seja, enfrenta um risco elevado de extinção na natureza em um futuro bem próximo, a menos que as circunstâncias que ameaçam a sua sobrevivência e reprodução melhorem (COELHO; CATHARINO, 2008).

Possui grande plasticidade ambiental, o que pode levar a interpretações equivocadas. As populações mais esparsas vivem sob florestas, mesmo que bem iluminadas, apresentando-se como plantas estioladas, ou seja, que possuem caules com entrenós mais longos devido a falta de incidência de luz, além de folhas e pecíolos normalmente maiores, enquanto que as populações tipicamente heliófilas vivem a pleno sol, sobre costões rochosos, geralmente em amplas touceiras de plantas agrupadas (COELHO; CATHARINO, 2008). É reconhecida pela lâmina foliar cartácea, elíptica a lanceolada e pela inflorescência diminuta (COELHO, 2012).

Tanto *A. loefgrenii* quanto *A. alcatrazense* são plantas bem caracterizadas taxonomicamente, entretanto, não existem estudos sobre os fungos endofíticos destas plantas.

5.2 Isolamento dos fungos endofíticos

As folhas das 2 espécies de *Anthurium*, após desinfecção, foram inoculadas em placas de Petri contendo 9 meios de cultivo diferentes além de inoculação por diluição seriada, conforme o item 4.4. A tabela 2, a seguir, apresenta o número de fungos endofíticos isolados por meio de cultivo. As fotos dos fungos endofíticos isolados podem ser observadas no ANEXO 1.

Tabela 2 - Número de linhagens de fungos endofíticos isolados das plantas do gênero *Anthurium*

Plantas	Meios de cultivo									Diluição	Total
	M	MF	BDA	MS	MSF	AF	AM	AH	MAC		
P2	5	8	6	4	10	8	6	3	1	3	54
P7	5	8	7	6	6	7	6	2	5	0	52
Total	10	16	13	10	16	15	12	5	6	3	106

M= Meio extrato de malte enriquecido; MF= Meio extrato de malte enriquecido + fragmentos de folhas; BDA= Meio batata-dextrose-ágar; MS= Meio mínimo de sais; MSF= Meio mínimo de sais+ fragmentos de folhas; AF= Meio água-ágar + folhas trituradas e autoclavadas; AM= Meio água marinha; AH= Meio ácido húmico + vit. B10; MAC= Meio extrato de malte+ fungicida; Diluição seriada (10^{-6}) inoculada em meio extrato de malte.

Foram isolados 106 fungos endofíticos, sendo 54 da planta P2 (*A. loefgrenii*) e 52 da planta P7 (*A. alcatrazense*).

Com excessão dos meios de cultivo contendo fungicida (AH e MAC) e meio por diluição seriada, não foram observadas diferenças significativas entre o número de fungos isolados. Entretanto, os meios de cultivo que apresentaram maior número de isolados endófitos foram os meio MF (16 isolados), MSF (16 isolados) e AF (15 isolados). Este resultado indica que a utilização dos fragmentos das folhas infundidos no meio de cultivo permite à comunidade endofítica utilizar os nutrientes da própria folha como fonte nutritiva e migrar mais rapidamente para o meio de cultivo. Assim, foi possível acessar uma maior quantidade de micro-organismos isolados por planta. Ainda, foi observada a presença de isolados com características morfológicas únicas, indicando que a utilização de diversos meios aumenta as chances de isolamento de uma maior variedade de fungos endofíticos.

Segundo a literatura, os meios de extrato de malte (M) e batata-dextrose-água (BDA) são os mais utilizados para o isolamento de fungos endofíticos. Entretanto, a utilização somente de meios de cultivo considerados ricos, ou seja, meios que apresentam uma reserva de nutrientes essenciais e de fácil metabolismo, pode levar ao isolamento de espécies cosmopolitas e que apresentam rápido crescimento e colonização do nicho que habitam.

Este fato foi observado por Verma et al. (2011), que buscaram analisar a microbiota endofítica de raízes e frutos da planta indiana *Azadirachta indica* A. Juss, e o impacto do meio de cultura no isolamento destes fungos. Os autores utilizaram 4 meios de cultura para o isolamento, sendo eles: Meio malte-água + extrato de levedura (MYA), meio água micológico (MCA), meio batata-dextrose-água (BDA) e meio água nutriente (NA). Utilizando vários meios foram isoladas, a partir de 400 fragmentos da planta, 272 linhagens, as quais foram agrupadas em 29 espécies.

Outra hipótese levantada foi quanto ao tamanho e quantidade de fragmentos utilizados aumentar a taxa de fungos endofíticos isolados. Com o objetivo de se testar esta hipótese, os isolados dos meios M e MF (com adição de fragmentos de folhas enquanto o meio foi vertido nas placas de Petri) foram comparados. A introdução de uma maior quantidade de fragmentos menores de folhas entre o meio de cultivo proporcionou o isolamento de um número maior de isolados (meio MF = 16 isolados) em relação à inoculação sobre o meio (meio M = 10 isolados) e, ainda, foi possível isolar fungos com características morfológicas diferentes em relação aos isolados no meio M. Resultados semelhantes quanto a quantidade e tamanho dos fragmentos de folhas foram obtidos comparando os meios de cultivo MS (10 isolados) e MS+F (16 isolados). Este fato confirma que o tamanho, quantidade e disposição (sobre ou entre o meio de cultivo) dos fragmentos refletem no isolamento de fungos.

Estudos sugerem que o tamanho do fragmento amostrado é importante, podendo interferir no número de endófitos isolados, ou seja, se o fragmento amostrado for grande, os micro-organismos das bordas podem impedir o crescimento dos mais distantes (que estão no centro dos fragmentos), sendo ideal a inoculação de fragmentos menores (CANNON; SIMMONS, 2002).

Outro trabalho na literatura também avaliou a importância do tamanho dos fragmentos. Fungos endofíticos de plantas tropicais foram isolados de fragmentos de folhas de 400 mm², sendo estes divididos em fragmentos menores, totalizando 4

tratamentos: a) inoculação de um fragmento inteiro; b) inoculação de um fragmento dividido em quatro partes iguais; c) inoculação de um fragmento dividido em 16 partes; d) inoculação de um fragmento dividido em 64 partes. O corte dos fragmentos em pedaços menores aumentou significativamente o número de morfoespécies fúngicas isoladas, sendo que no tratamento "d" foram isoladas 6 vezes mais morfoespécies que no tratamento "a" ($11,7 \pm 3,4$ e $2 \pm 0,7$, respectivamente). Há dois prováveis mecanismos pelos quais a diminuição dos fragmentos levou ao maior número de espécies isoladas. Primeiro, a redução do tamanho do fragmento de folha pode ter reduzido a competição entre os fungos. Segundo, fragmentos menores possuem maior borda, ou seja, maior área para que o fungo saia para o meio de cultura. Assim, os autores concluíram que esta estratégia poderia ajudar a estimar valores reais da diversidade de fungos endofíticos cultiváveis (GAMBOA; LAUREANO; BAYMAN, 2002).

Sabendo que o ambiente de ilha pode estar restrito à quantidade de nutrientes, surgiu a hipótese de se verificar a especificidade dos fungos endofíticos em relação à planta e levando em conta o baixo ou restrito acesso a nutrientes do solo (já que muitas plantas se fixam diretamente em rochas). Sendo assim, utilizou-se um meio contendo somente a própria folha como fonte de nutrientes para os fungos (Meio AF). Neste foi possível isolar 15 endófitos, sendo que pelo menos 3 destes não foram isolados em meios mais ricos, o que pode indicar um bom meio para acessar espécies que possuam maior especificidade com a planta hospedeira.

Buscando acessar espécies de fungos endofíticos que migrem tardiamente para o meio de cultivo e/ou que possuem baixo nível de crescimento em relação aos outros, utilizaram-se fragmentos triturados das folhas em um método de diluição seriada (10^{-6}). Foi possível isolar 3 fungos endofíticos com características distintas em relação às linhagens isoladas em outros meios, o que indica que esta metodologia permitiu acessar linhagens fúngicas que levariam mais tempo para migrar do fragmento para o meio de cultivo.

Assim, foi possível demonstrar que o uso de uma grande variedade de meios de cultivo para o isolamento permite acessar não só uma maior quantidade, mas também uma maior diversidade de fungos endofíticos.

5.3 Seleção dos isolados endofíticos

Devido ao número elevado de isolados e também à semelhança morfológica entre alguns isolados, buscou-se técnicas para a priorização e seleção destes.

Desta forma, os 106 isolados foram analisados por espectrometria de massas por MALDI-TOF, com o intuito de priorizar o estudo de fungos de diferentes gêneros.

5.3.1 Análise do perfil espectral por *MALDI-TOF-MS*

O espectrômetro de massas (MS) por MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization on Time-Of-Flight) é considerado uma ferramenta analítica rápida e amplamente usada para análise de biomoléculas como peptídeos, proteínas e muitas outras. O nome do analisador "Time-of-flight" (TOF) é devido a massa da amostra ser determinada baseado na aceleração de íons (LEWIS; WEI; SIUZIDAK, 2000).

O *MALDI-TOF-MS* vem sendo utilizado para comparação com métodos de análise bioquímicos e genômicos (MURRAY, 2010), e tem sido uma ferramenta na seleção de linhagens baseando-se no perfil químico de suas proteínas, agrupando as linhagens similares a partir dessas informações.

De acordo com a literatura, entre os vários métodos de preparo de amostras para se obter melhores resultados em análises por *MALDI-TOF-MS*, a técnica da "célula intacta", a qual porções do micélio, conídios e esporos da cultura fúngica são misturados à uma matriz e aplicado na placa de MALDI, vêm sendo muito usada para fungos filamentosos (VALENTINE et al., 2002; SANTOS et al., 2010).

Desta forma, os 106 isolados fúngicos foram submetidos à análise espectrométrica por MALDI-TOF utilizando a técnica da "célula intacta". Nesta análise, para cada isolado foram obtidos 36 espectros, gerando os MSP's (Main Spectral Projection) individuais. Os MSP's individuais dos 106 isolados foram comparados e agrupados por sua similaridade química de biomoléculas (2 a 20 kDa), gerando assim, um dendrograma. Dezesesseis isolados foram identificados a nível de gênero por técnicas moleculares. Foram utilizadas 17 amostras fúngicas certificadas (identificadas por técnicas morfológicas e moleculares) para comparação com os isolados analisados (FIGURA 9).

Figura 9 - Dendrograma de similaridade do perfil protéico por EM-MALDI-TOF de 106 isolados das plantas *A. loefgrenii* (P2) e *A. alcatrazense* (P7).
Códigos em vermelho: linhagens fúngicas certificadas por técnicas morfológicas e moleculares;
Códigos em preto: Isolados identificados à nível de gênero por técnica morfológica

Foram geradas muitas chaves de similaridade, o que ainda dificulta a interpretação dos dados obtidos. Entretanto, foi observado que as linhagens certificadas e os isolados identificados morfolologicamente foram agrupados corretamente de acordo com os gêneros e espécies. Como exemplo, a chave formada por linhagens do gênero *Talaromyces* (cód. 473, 479, 472 e 507), onde se pôde observar uma similaridade de 50% do perfil proteico, enquanto que as linhagens da mesma espécie (*T. pinophilus*) apresentaram similaridade de 90%.

Assim, foi possível observar a robustez da técnica para se obter informações dos possíveis gêneros dos endófitos isolados quando comparados com linhagens já conhecidas, sendo que os gêneros mais comuns observados foram *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Xylaria* e *Aspergillus*.

O agrupamento gerado pelo dendrograma de MSP é feito segundo a presença e intensidade dos picos em relação à m/z , ou seja, fungos que apresentam um perfil proteico semelhante apresentaram íons moleculares em maior intensidade em determinadas m/z , o que faz com que estes fungos sejam agrupados próximos. Como exemplo, foi usada a chave onde foram agrupados 9 isolados, sendo 5 destes identificados morfolologicamente, como fungos do gênero *Cladosporium* (FIGURA 10).

Figura 10 - Agrupamento das linhagens de *Cladosporium* sp. de acordo com a intensidade dos picos obtidos no espectro em relação à m/z (a); espectros obtidos para os MSP's (Main Spectral Projection) das linhagens do gênero *Cladosporium* sp. agrupadas na mesma sub-chave do dendrograma de MSP (b)

Na figura 10-a é possível observar que dentre os 9 isolados agrupados, 8 apresentam similaridade maior que 96%, enquanto que somente 1 apresenta 61% de diferença das demais. No entanto, este isolado também foi identificado morfologicamente como sendo do gênero *Cladosporium*. Este fato também pode ser explicado pela figura 10-b, a qual apresenta os MSP's formados para este grupo. Analisando os espectros dos MSP's destes isolados, foi observado um pico intenso em m/z 8280,93 (com intensidade de 99,64%) para todos os fungos desta chave. Entretanto, para o isolado P7MF2F2, foi observado um segundo pico intenso em m/z 8452,65 (com intensidade de 87,98%), indicando que este fungo apresenta um perfil proteico distinto dos outros isolados deste gênero, pertencendo, provavelmente, a outra espécie de *Cladosporium* sp.

Estudos relatados na literatura se utilizam desta mesma relação entre a frequência e intensidade dos picos nos MPS's, para se obter informações complementares às taxonômicas.

Os conídios de linhagens de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus sojae* crescidos em meio BDA foram analisados, buscando diferenciar as linhagens toxigênicas das usadas para a produção de molho de soja. Analisando os picos do espectro e suas massas, os autores puderam constatar que o pico com m/z de 7292 Da estava presente em todas as linhagens de *Aspergillus* e que este pico pode ser usado para distinguir este gênero de outros. O espectro para linhagens aflatoxigênicas mostraram-se similares entre si e entre uma linhagem não aflatoxigênica (ATCC 10124) (LI et al., 2000).

Os conídios de *Penicillium expansum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* e *Penicillium pinophilum* foram analisados por MALDI-TOF-MS. Através do espectro de massas, foi possível identificar íons característicos para cada espécie e também íons comuns a este gênero (2662, 2880, 3267, 4823, 5676 e 7242 m/z). Ainda, muitas linhagens de *P. chrysogenum* foram analisadas e obtiveram em todos os espectros valores (m/z 3140 e 5173) que podem ser usados como biomarcadores para esta espécie (CHEN; CHEN, 2005).

Entretanto, os picos citados na literatura como biomarcadores não foram observados em nossos isolados, o que pode ser explicado pela diferença dos meios de cultivo utilizados, já que foi constatado que o meio de cultivo afeta diretamente o crescimento, formação de estruturas características e a produção de esporos.

As informações obtidas a partir do dendrograma de MSP permitiram priorizar a seleção de isolados que apresentaram pouca similaridade com fungos endofíticos pertencentes a gêneros comumente estudados. Foi possível, também, evitar selecionar isolados que apresentaram alta similaridade proteica ($\geq 98\%$), sendo provavelmente a mesma espécie.

Assim, foram selecionados isolados que ficaram em chaves distantes das já identificadas. Foram selecionados os isolados P210⁻²F2 e P7AF2F3, pois estes ficaram em chaves com 1 ou no máximo 2 isolados, demonstrando, provavelmente, serem os menos abundantes dentre os isolados. Ainda, estes 2 isolados apresentaram características morfológicas únicas dentre todos os demais.

5.3.2 Avaliação da atividade antifúngica das frações AcOEt

A partir do dendrograma de similaridade (Figura 9) foram selecionados 60 isolados para cultivo em meio líquido. Os metabólitos secundários contidos na fração acetato de etila foram avaliadas no ensaio “*in vitro*” de atividade inibitória ao crescimento de 4 fitopatógenos. A tabela 3 apresenta os resultados observados nos ensaios de inibição aos seguintes fitopatógenos: *Colletotrichum gloeosporioides* (isolado do guaranazeiro), *Colletotrichum lindemuthianum* (isolado do feijoeiro), *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (isolado do feijoeiro) e *Phomopsis sojae* (isolado da soja).

Tabela 3 - Porcentagem de inibição micelial de 60 frações acetato de etila contra 4 fitopatógenos, por ensaio de difusão em disco de papel

Código dos isolados	Porcentagem de inibição dos fitopatógenos (%)			
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	<i>Phomopsis sojae</i>
P2MF3F1	0,00	0,00	3,56	0,00
P2AH1F1	14,33	15,15	5,59	0,00
P2MS1F3	14,62	14,53	0,00	5,12
P2M3F1	5,25	15,73	0,00	0,00
P2BDA2F1	3,60	26,05	7,67	4,30
P2MSF2F4	6,50	7,31	0,00	0,00
P2BDA2F3	8,06	0,00	0,00	0,00
P2M2F1	44,40	23,02	11,85	11,05
P2AM3F1	9,37	0,00	0,00	0,00
P2MS1F2	5,61	8,22	9,29	15,36
P2AF3F3	24,58	0,00	6,33	10,09
P2MS1F1	13,90	16,97	8,54	0,00
P2AM1F1	0,00	7,53	3,67	0,00
P2MSF2F3	28,04	41,12	25,64	41,53
P2AF1F1	0,00	12,09	0,00	0,00
P2MF2F3	3,42	2,50	4,12	8,89
P2BDA1F1	29,16	4,29	16,15	39,95
P2MSF1F1	5,15	0,00	0,00	0,00
P2BDA2F2	3,06	0,00	6,40	14,63
P2MF1F1	12,14	0,00	6,27	7,09
P2MSF2F2	6,22	6,62	5,91	4,81
P2MSF2F5	22,98	19,13	16,12	27,37
P2AH3F1	3,20	0,00	9,05	12,21
P210 ⁻⁴ F2	12,69	16,41	3,81	20,18
P2MF1F2	20,31	11,42	11,80	31,10

P2AF2F2	0,00	0,00	0,00	0,00
P2AM1F2	0,00	0,00	0,00	0,00
P2BDA1F2	3,11	6,01	0,00	0,00
P2MSF3F3	6,95	0,00	11,22	4,60
P2I0-4F1	0,00	0,00	0,00	0,00
P2MF3F3	13,66	35,26	17,59	27,39
P2MSF1F2	0,00	0,00	0,00	0,00
P2MSF2F1	0,00	0,00	0,00	0,00
P7AM1F1	11,35	14,90	14,72	16,61
P7MF1F1	8,11	12,83	11,59	14,66
P7MSF3F1	12,78	10,47	10,59	3,55
P7AM1F2	8,45	0,00	0,00	0,00
P7MF2F2	0,00	15,72	10,42	7,11
P7MS3F2	4,38	30,35	0,00	0,00
P7BDA3F2	3,70	13,85	4,12	0,00
P7MF2F3	4,33	33,01	4,81	0,00
P7MAC3F1	5,43	10,80	0,00	3,78
P7AF1F2	7,96	0,00	0,00	9,84
P7MAC2F1	2,31	14,84	0,00	0,00
P7AH3F1	32,12	16,46	24,42	37,15
P7AM2F1	4,91	0,00	0,00	8,04
P7MSF2F1	14,91	10,90	10,88	3,27
P7MF3F3	10,57	9,81	18,16	4,38
P7BDA1F2	5,48	7,69	3,42	4,38
P7MF1F2	7,91	11,30	7,98	0,00
P7AF2F3	12,11	7,99	3,18	0,00
P7MF3F1	0,00	1,59	3,89	0,00
P7BDA3F1	1,68	0,00	0,00	0,00
P7AF3F1	4,64	1,52	2,86	0,00
P7MAC2F2	0,00	0,00	0,00	0,00
P7MS1F3	0,00	0,00	4,00	0,00
P7AF3F2	0,00	3,15	0,00	0,00
P7M1F1	0,00	0,00	0,00	0,00
P7MF3F2	0,00	0,00	0,00	0,00
P7M3F2	0,00	8,98	0,00	37,60
Controle M	0,00	0,00	0,00	0,00
Controle	0,00	0,00	0,00	0,00

Ensaio de difusão em disco (1mg da fração AcOEt) com duração de 5 dias à 28° C. Controle: fungos fitopatogênicos; Controle MeOH: fungos fitopatogênicos frente ao solvente metanol.

Diversas frações apresentaram atividade promissora contra um ou mais dos fitopatógenos alvo. Dentre as 60 frações avaliadas, somente 8 frações não apresentaram qualquer atividade aos patógenos.

Dentre as frações avaliadas, 19 demonstraram baixa (< 15%) inibição ao crescimento micelial dos 4 patógenos avaliados. Algumas frações apresentaram atividade específica para determinados fungos. As frações P7BDA3F1 (1,68%), P7AM1F2 (8,45%), P2MA3F1 (9,37%), P2BDA2F3 (8,06%) e P2MSF1F1 (5,15%) foram ativas somente contra *C. gloeosporioides*. As frações P2AF1F1 (12,09%), P7AF3F2 (3,15%) e P7AM3F2 (8,98%) apresentaram atividade contra *C. lindemuthianum* e frações P2MF3F1 (3,56%) e P2MS1F3 (4,00%) inibiram somente o crescimento de *F. oxysporum*. Embora estas frações tenham apresentado atividade específica à um fitopatógeno, a porcentagem de inibição foi baixa para todos os casos, não sendo priorizado o estudo químico e biológico destes isolados.

As atividades mais promissoras para cada fitopatógeno foram contra o *C. gloeosporioides*, as frações P2M2F1 (44,4%), P7AH3F1 (32,12%), P2BDA1F1 (29,16%) e P2MSF2F3 (28,04%). Para *C. lindemuthianum* foi observado maiores valores para as frações P2MSF2F3 (41,12%), P2MF3F3 (35,26%), P7MS3F2 (30,35%) e P7MF2F3 (33,01%). No ensaio contra *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, as frações P2MSF2F3 (25,64%) e P7AH3F1 (24,42%) foram as mais ativas, e para *P. sojae* as frações mais ativas foram P2MSF2F3 (41,53%), P2BDA1F1 (39,95%), P7M3F2 (37,60%) e P7AH3F1 (37,15%).

Embora muitas frações tenham apresentado atividade promissora contra um ou mais patógenos, a fração acetato de etila do isolado P2MSF2F3 apresentou atividade de inibição do crescimento micelial de todos os fitopatógenos. Sendo assim, este (P2MSF2F3) foi selecionado para o estudo químico de isolamento do composto ativo guiado por ensaio biológico.

5.4 Estudo do fungo endofítico cód. P2MSF2F3

5.4.1 Identificação taxonômica

O endófito de código P2MSF2F3 foi isolado de folhas de *A. loefgrenii* utilizando o meio de cultivo MSF (meio mínimo de sais + folha). A análise morfológica permitiu observar estruturas como conidióforos ramificados (biverticilados) e conídios esféricos, características de fungos do gênero *Penicillium* (Figura 11).

Figura 11 - Imagem (verso e reverso da colônia) do endófito P2MSF2F3 cultivado em meio de extrato de malte (2%) (a); microscopia óptica (1000x) evidenciando as estruturas: conidióforos (1) e conídios (2) (b). (Fotos: Sartori, S.B.)

A comparação da sequência do marcador beta-tubulina resultou em 100% de identidade com sequências de fungos da espécie *Penicillium citrinum* depositadas no GenBank. A árvore filogenética gerada baseada nesse mesmo marcador também suportou o resultado obtido (Figura 12).

Figura 12 - Comparação da sequência do marcador beta-tubulina obtida do isolado P2MSF2F3 com àquelas depositadas no banco de dados GenBank (ident: porcentagem de identidade) (a); Árvore filogenética baseada no marcador beta-tubulina demonstrando a posição do isolado P2MSF2F3 (b)

O fungo filamentoso *Penicillium citrinum* THOM (1910) é um ascomiceto pertencente à classe dos Eurotyomicetes, ordem dos Eurotiales e família Trichocomaceae (Catalogue of Life, 2016). É um fungo com distribuição mundial

sendo isolado principalmente de solos tropicais e sub-tropicais, mas também de ambientes internos como casas, de alimentos e como endófitos de raízes, caules e folhas (HOUBRAKEN, FRISVAD, SAMSOM, 2010).

As colônias de *Penicillium citrinum* são lisas, filamentosas e aveludadas, lanosas ou felpudas. São inicialmente brancas e se tornam verde-azuladas, verde-acinzentadas, cinza-oliva, amarelas ou rosas com o tempo. O lado posterior da placa apresenta uma colônia geralmente pálido-amarelada (LARONE, 1995; ST-GERMAN; SUMMERBELL, 1996; SUTTON et al., 1998; de HOOG et al., 2000). O ápice do conidióforo é ramificado e em seu final apresenta células conidiogênicas agrupadas e ramificadas na forma de fiálides. Os conídios são geralmente unicelulares, esféricos ou ovóides, hialinos ou coloridos (quando agrupados) e são produzidos nas fiálides, as quais são dispostas em uma ramificação terminal do conidióforo lembrando o aspecto de uma vassoura (KIMATI et al., 1978).

Esta espécie é conhecida pela produção de alguns compostos tóxicos e contaminantes de sementes e alimentos (PITT; HOCKING, 2009). Entretanto, este micro-organismo tem a capacidade de produzir uma grande variedade de compostos biologicamente ativos, que podem ser aplicados em diversos setores da ciência. Estudos reportam seu uso na produção de enzimas como as nucleases (OKADO et al., 2016), celulasas (DUTTA et al., 2008), xilanases (GHOSHAL; BANERGEE; SHIVHARE, 2015), fosfatases (GAWAS-SAKHALKAR et al., 2012); hormônio de crescimento de plantas como a giberelina (AFZAL-KHAN, et al. 2008); e, principalmente, metabólitos secundários com diversas atividades biológicas como antibiótica (ZHENG et al., 2016; KHAMTHONG et al., 2012), antifúngica (PARK et al., 2014), antitumoral (LIU et al., 2015; LAI et al., 2013, LI et al., 2013), antioxidante (SAMANTHI et al., 2015; ARORA; CHANDRA, 2011), dentre outras.

P. citrinum é um fungo amplamente estudado, entretanto são poucos os trabalhos que relatam compostos produzidos por este micro-organismo com atividade contra fitopatógenos.

5.4.2 Metabólito(s) secundário(s) com atividade antifúngica à fitopatógenos

O fungo endofítico *P. citrinum* (cód. P2MSF2F3) foi selecionado e sua fração acetato de etila foi avaliada em ensaio “*in vitro*” ao crescimento micelial à 4 fungos fitopatogênicos (Figura 13).

Fitopatógenos				
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. lindemuthianum</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	<i>P. sojae</i>
P2MSF2F3
Inibição (%)	28,04%	41,12%	25,64%	41,53%
Controle
Inibição (%)	0%	0%	0%	0%
Controle MeOH
Inibição (%)	0%	0%	0%	0%

Figura 13 - Ensaio de difusão em disco da fração acetato de etila do fungo *Penicillium citrinum* (P2MSF2F3) contra fungos fitopatogênicos em ensaio de difusão em disco (1mg).
Controle: fungos fitopatogênicos; Controle MeOH: fungos fitopatogênicos frente ao solvente metanol

A fração acetato de etila foi ativa aos 4 fitopatógenos avaliados, apresentando maior atividade para o fungo *P. sojae* (41,53%). Este fitopatógeno foi utilizado nos ensaios que monitoraram o estudo de isolamento do composto ativo.

O endófito foi cultivado em maior volume (1,05 L) e particionado com acetato de etila gerando duas frações, aquosa e acetato de etila. A fração acetato de etila (F3) foi submetida à uma separação cromatográfica segundo a condição 1 (descrita no item 4.8.1.1), onde foram obtidas seis frações (F3a → F3f), que foram avaliadas em ensaio “*in vitro*” de inibição do crescimento micelial de *P. sojae* (Figura 14).

Frações						
	F3a	F3b	F3c	F3d	F3e	F3f

Inibição (%)	53,23%	21,69%	42,03%	49,15%	3,23%	12,89%
			Controle	Controle MeOH

Inibição (%)			0%	0%		

Figura 14 - Ensaio de difusão em disco das frações F3a→F3f contra o fungo fitopatogênico *P. sojae* em ensaio de difusão em disco (1mg).

Controle: fungo fitopatogênico *P. sojae*; Controle MeOH: fungo fitopatogênico frente ao solvente metanol

Neste ensaio a fração que apresentou maior atividade foi F3a (53,23%). Entretanto, como observado na figura 14, as frações subsequentes também apresentaram inibição significativa ao patógeno, como por exemplo, as frações F3c e F3d (42,03% e 49,15%, respectivamente).

As quatro frações ativas foram analisadas por HPLC-UV-MS visando verificar a similaridade química dos compostos presentes. Foi observado no cromatograma de todas as frações a presença de um pico largo referente a um composto com tempo de retenção de 6,6 minutos. Analisando o espectro de massas deste composto, foram observados, para todas as frações, os mesmos íons tanto em modo positivo (m/z 233,2; 251,3; 265,2 e 273,2) quanto em modo negativo (m/z 205,4; 249,4 e 281,4). Verificou-se que a fração F3a foi a que apresentou maior porcentagem de atividade e menor número de compostos observados no cromatograma.

A F3a foi submetida à cromatografia em coluna segundo a condição 2 (descrita no item 4.8.1.1). Nesta, foram obtidas 3 frações (F3a1→F3a3), as quais foram avaliadas em bioensaio (Figura 15).

Frações			
	F3a1	F3a2	F3a3

Inibição (%)	59,20 %	7,37 %	16,64%
Controle		Controle MeOH

Inibição (%)	0 %		0 %

Figura 15 - Ensaio de difusão em disco das frações F3a1→F3a3 contra o fungo fitopatogênico *P. sojae* em ensaio de difusão em disco (1mg).
Controle: fungo *P. sojae*; Controle MeOH: fungo fitopatogênico frente ao solvente MeOH.

A fração F3a1 teve atividade inibitória de 59,20% e foi submetida à análise por HPLC-UV-MS. O cromatograma obtido pelo HPLC e os espectros podem ser observados na figura 16.

Figura 16 - Cromatograma da fração F3a1 monitorado no $\lambda = 312$ nm (a); Espectro de UV da fração F3a1 (b); Espectro de massas de baixa resolução da fração F3a1 em modo positivo (c) e negativo (d);
Condições de análise: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (50x2,1 mm; 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 16 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹, por 20 minutos

Pela análise constatou-se que esta fração apresentava bom grau de pureza com a presença de um pico intenso (referente a um composto) com tempo de retenção em 6,6 minutos. No espectro de absorção na região do UV, foram observadas bandas de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) em 215,4; 250,7 e 320,8 nm. Na análise do espectro de massas em modo positivo foi possível observar sinais em m/z 251,2 e 273,2. A diferença nas unidades de m/z observadas nos dois espectros sugere que o primeiro apresenta a massa molar do composto protonada $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$. No modo negativo, um sinal em m/z 249,4, referente à massa molar desprotonada $[M-H]^-$, sugerindo que a massa molar deste composto seja provavelmente de 250 Da.

A partir destas informações, foi realizada uma busca no banco de dados “Dictionary of Natural Products” (DNP), disponível no endereço “<http://dnp.chemnetbase.com>”, utilizando-se como palavras-chave de busca a massa do composto (250 Da) e a fonte biológica (*Penicillium*). O resultado da busca foi compatível com 18 compostos. Dentre os possíveis compostos conhecidos somente os compostos citrinina (CAS: 518-75-2) e penicitrinol F-1,15-Diepimer, O-de-Me (CRC- QTO18-X) são descritos como sendo produzidos por *Penicillium citrinum*.

Para confirmar a identidade do composto ativo, a fração F3a1, foi purificada em HPLC preparativo com detector de ultravioleta (UV), sendo obtida a fração F3a1b. Esta foi submetida à análise por UPLC-HRMS XEVO G2-XS QTof (Waters®) com detector de ZSpray ESI/APCI/ESCI (Figura 17).

Figura 17 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração F3a1b.

Condições de análise: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 m; 1,7 μ m) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ à 4° C, por 10 minutos.

Analisando o espectro de massas de alta resolução em modo positivo, foram observados sinais em m/z 251,1018 referente a $[M+H]^+$ e 273,0755 referente a $[M+Na]^+$, corroborando com os dados obtidos através do espectro de massas de baixa resolução. Ainda, foi possível obter a massa calculada encontrada do composto de 250,0938 Da.

A fração foi, então, submetida à análise de ressonância magnética nuclear de 1H (RMN- 1H). Foi possível obter os dados sobre os valores de deslocamento de hidrogênios do composto F3a1b em DMSO- d_6 (600 MHz), o qual foi comparado com o da literatura de Barber et al. (1981) e Do Rosario Marinho et al. (2005) em $CDCl_3$ (400 MHz) (Tabela 4). O espectro de RMN de 1H pode ser observado no ANEXO 2.

Tabela 4 – Comparação de dados de RMN 1H do composto F3a1b (DMSO- d_6 / 600 MHz) e da citrinina ($CDCl_3$ / 400 MHz)

Posição do H	F3a1b	Citrinina - δ_H , multiplicidade e J (Hz)	
		Barber et al. (1981)	Do Rosario Marinho et al. (2005)
1	8,61 s	8,24 s	8,25 s
3	4,99 q (6,58)	4,78 q (6,8)	4,80 q (6,7)
4	3,21 q (7,0)	2,99 q (7,3)	2,98 q (7,1)
9 (CH ₃)	1,26 d (6,6)	1,35 d (6,8)	1,35 d (6,7)
10 (CH ₃)	1,13 d (7,0)	1,23 d (7,3)	1,23 d (7,3)
11 (CH ₃)	1,97 s	2,02 s	2,02 s

s: singleto; d: duplete; q: quadruplete. δ_H : deslocamento de hidrogênios; J: constante de acoplamento.

Pelo espectro de RMN 1H , foi possível verificar os valores de deslocamento químico dos hidrogênios referem-se às 3 metilas em δ 1,13 (d, J = 7,0 Hz, 10-CH₃), δ 1,26 (d, J = 6,6 Hz, 9-CH₃) e δ 1,97 (s, 11-CH₃) e pelo deslocamento de hidrogênios nos carbonos de posição 1, 3 e 4, com valores em δ 3,21 (q, J = 7,0 Hz, 4-H), δ 4,99 (q, J = 6,58 Hz, 3-H) e δ 8,61 (s, 1-H).

Os valores de massa molecular e de deslocamento químico, multiplicidade e constante de acoplamento foram compatíveis e, portanto, não foram necessárias análises adicionais. Assim, foi confirmado que o composto F3a1b produzido por *P. citrinum* refere-se ao composto citrinina (Figura 18).

Figura 18 - Estrutura química do composto citrinina (CAS: 518-75-2)

A citrinina ou (3R, 4S)-4,6-dihidro-8-hidroxi-3, 4, 5-trimetil-6-oxo-3H-2-benzopirano-7-ácido carboxílico (CAS No.: 518-75-2) é um pentacetídeo, biossintetizado a partir de cinco unidades de Acetil-CoA, que pertence à classe dos benzopiranos. Possui fórmula molecular $C_{13}H_{14}O_5$, com máxima absorção ultravioleta em 250 nm e 333 nm e apresenta-se como um cristal ácido com coloração amarelo-limão (BARBER et al., 1981; XU et al., 2006).

O fluxograma a seguir sumariza o estudo de isolamento químico do composto ativo citrinina (Figura 19).

Figura 19 – Fluxograma do estudo químico da fração ativa de *P. citrinum* (P2MSF2F2).

m= massa da fração; Fração em destaque= fração ativa

Este metabólito secundário foi isolado primeiramente de *Penicillium citrinum* Thom (HETHERINGTON; RAISTRICK, 1931), sendo isolado, também, de espécies de *Aspergillus* (DERUITER et al., 1992; HAJJAJ et al., 1999) e *Monascus* (BLANC; LORET; GOMA, 1995). A citrinina apresenta atividade antibiótica e antibacteriana e, posteriormente, estudos relataram outras atividades, como contra bacteriófagos, sarcomas, protozoários, células animais e vegetais (BERNDT, 1990; CHAGAS et al., 1995).

Muitos estudos apontaram a citrinina como uma substância tóxica crônica, responsável por causar problemas hepáticos e renais (KNASMÜLLER et al., 2004), além de ser considerada uma substância contaminante de cereais como milho, arroz e trigo (ABRAMSON et al., 1999; JANARDHANA, et al., 1999), em queijo (BAILLY et al., 2002) e em frutas apodrecidas (SCHNEWEIS et al., 2001; AZIZ; MOUSSA, 2002).

No Brasil existe resolução (nº 34/76) para algumas micotoxinas, por exemplo para as aflatoxinas (produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*), que são tóxicas nos limites máximos de 30 µg kg⁻¹ em alimentos. Para o composto isolado, citrinina, não há limites máximos previsto na legislação brasileira (ANVISA, 2002).

A citrinina pura isolada foi submetida à avaliação antifúngica por 2 métodos: ensaio por difusão em disco de papel e microdiluição.

5.4.2.1 Avaliação antifúngica por ensaio de difusão em disco de papel

O composto citrinina (F3a1b) foi submetido a um ensaio final contra os fitopatógenos: *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *P. sojae*. Neste ensaio foi determinada a porcentagem de inibição de crescimento micelial em comparação com 4 fungicidas comerciais (Figura 20). As fotos do ensaio completo podem ser observadas no ANEXO 3.

Figura 20 - Ensaio por difusão em disco da fração F3a1b (1 mg) contra fungos fitopatogênicos em ensaio de difusão em disco
Controle positivo: Fungicidas comerciais (1 mg de composto ativo);

No ensaio de difusão em disco contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*, o composto citrinina (F3a1b) apresentou atividade inibitória de 53,01%. Dentre os fungicidas, o Score® apresentou maior atividade inibitória de 70,25%. Os fungicidas Comet®, Captan SC® e Dithane NT® apresentaram atividade inibitória inferior ao composto isolado (46,06; 9,84 e 1,52%, respectivamente).

Para o fitopatógeno *C. lindemuthianum*, o composto citrinina apresentou estatisticamente a mesma inibição que o fungicida Score® (66,10 e 65,20 %, respectivamente). Os fungicidas Captan SC® e Dithane NT® apresentaram baixa atividade de inibição (9,51 e 2,71 %, respectivamente).

Para o fitopatógeno *F. oxysporum f. sp. phaseoli*, o composto citrinina apresentou atividade de 47,60%. A maior inibição foi verificada para o fungicida Score® (57,79%). Comet® apresentou 37,31% e Captan SC® 7,21% de atividade inibitória. O fungicida Dithane NT® não apresentou inibição ao fitopatógeno.

O fungicida Score® apresentou maior atividade para o fitopatógeno *P. sojae*. O composto citrinina e o fungicida Comet® apresentaram atividade semelhante (56,10 e 57,95%, respectivamente). Já os fungicidas Captan SC® e Dithane NT® não foram ativos ao *P. sojae*.

Dentre os 4 fungicidas utilizados, o Score® apresentou as melhores atividades inibitórias para os 4 fitopatógenos. Já o composto isolado se mostrou mais ativo que os fungicidas para o fitopatógeno *C. lindemuthianum*. Para os demais fitopatógenos, a citrinina apresentou melhores atividades que os fungicidas Comet®, Captan SC® e Dithane NT®.

5.4.2.2 Avaliação antifúngica por ensaio de microdiluição

A determinação da concentração mínima inibitória do composto isolado e dos fungicidas comerciais foi realizada pelo método de ensaio por microdiluição.

Neste experimento foram avaliados o crescimento de 4 fitopatógenos (por leitura de densidade óptica) em 12 concentrações (do composto citrinina e dos 4 fungicidas comerciais), durante 96 horas (com leituras a cada 4 horas até 48 horas e após, a cada 12 horas). Os resultados obtidos neste ensaio são apresentados na íntegra no ANEXO 4.

Especialmente para o fungicida comercial Comet®, as concentrações mais altas de 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de composto ativo não foram consideradas neste estudo pois apresentaram cor (devido a outros componentes inertes do fungicida) que interferiram na leitura de densidade óptica.

No ensaio contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides*, a citrinina inibiu 100% do crescimento micelial na concentração de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os fungicidas Score® e Comet® foram capazes de inibir em concentrações menores (MIC = 0,48 e 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Captan SC® inibiu o crescimento na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o fungicida Dithane NT® não causou inibição nas concentrações avaliadas (ANEXO 4a).

Como a maior inibição da citrinina ao fitopatógeno *C. gloeosporioides* ocorreu na concentração de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, este foi comparado aos fungicidas comerciais nesta mesma concentração (Figura 21).

Figura 21 - Avaliação de crescimento micelial de *C. gloeosporioides* na presença da citrinina e dos fungicidas comerciais na concentração de 125 µg mL⁻¹

Neste experimento foi possível observar que o composto isolado apresenta atividade inibitória maior que os fungicidas Captan SC® e Dithane NT®.

Na avaliação do fitopatógeno *C. lindemuthianum*, a citrinina apresentou MIC de 0,48 µg mL⁻¹. Score® foi o único fungicida que apresentou MIC menor que a citrinina (0,24 µg mL⁻¹). Para o fungicida Comet®, o MIC foi de 3,9 µg mL⁻¹. Já o Captan SC® e Dithane NT® inibiram o fungo somente na concentração de 500 µg mL⁻¹ (ANEXO 4b).

O melhor resultado obtido para a citrinina (0,48 µg mL⁻¹) foi comparado aos fungicidas (Figura 22).

Figura 22 - Avaliação de crescimento micelial de *C. lindemuthianum* na presença da citrinina e dos fungicidas comerciais na concentração de 0,48 µg mL⁻¹

Na concentração de 0,48 µg mL⁻¹ a citrinina apresentou atividade inibitória melhor que os fungicidas Comet®, Captan SC® e Dithane NT®.

Os resultados obtidos neste ensaio demonstram possivelmente alguma especificidade da citrinina aos fitopatógenos, pelo fato de inibir com concentrações diferentes fungos do mesmo gênero (*Colletotrichum*).

Para *P. sojae*, a concentração mais ativa de citrinina foi de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Tanto o fungicida Score® quanto o Comet® se mostraram eficientes (MIC de 0,24 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 3,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). Captan SC® inibiu o crescimento na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e Dithane NT® não apresentou atividade ao fitopatógeno (ANEXO 4c).

A menor concentração ativa de citrinina (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi comparada aos fungicidas (Figura 23).

Figura 23 - Avaliação de crescimento micelial de *P. sojae* na presença da citrinina e dos fungicidas comerciais na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$

A citrinina, na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, teve melhor atividade inibitória que os fungicidas Captan SC® e Dithane NT®.

Para o fungo *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, a citrinina apresentou MIC de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O fungicida Comet® se mostrou o mais ativo com MIC de 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os fungicidas Score®, Captan SC® e Dithane NT® não apresentaram atividade inibitória nas concentrações avaliadas (ANEXO 4d).

O resultado da melhor concentração de citrinina (125 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi comparada com os fungicidas (Figura 24).

Figura 24 - Avaliação de crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* na presença da citrinina e dos fungicidas comerciais na concentração de 125 µg mL⁻¹

Comparando a citrinina com os fungicidas, na mesma concentração (125 µg mL⁻¹), observa-se que o composto isolado tem melhor atividade inibitória que os fungicidas comerciais Score®, Captan SC® e Dithane NT®.

Mesmo que a citrinina não tenha apresentado atividade mínima inibitória nas mesmas concentrações que alguns dos fungicidas, os resultados mostraram que este composto foi capaz de inibir o crescimento micelial dos 4 fitopatógenos durante todo o ensaio.

Nos ensaios de atividade inibitória por difusão em disco e por microdiluição foram utilizados 4 fungicidas comerciais como controle positivo. São fungicidas que agem sobre um amplo espectro de fitopatógenos de diversas culturas, entretanto, cada um possui um mecanismo de ação específico na célula do fungo.

O fungicida Score® tem como ingrediente ativo o difenoconazol (C₁₉H₁₇Cl₂N₃O₃) de nome químico cis-trans-3-cloro-4-[4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il]fenil 4-clorofenil-éter, um composto pertencente ao grupo dos triazóis (Figura 25) que agem na membrana celular dos fungos.

Figura 25 - Estrutura química do princípio ativo difenoconazol (Score®) e do grupo dos triazóis

Os compostos do grupo dos triazóis são responsáveis pela inibição da biossíntese de esteróis da membrana. Esteróis são componentes funcionais da manutenção da membrana formados por lipídeos, sendo um dos principais o lipídeo ergosterol, característico de fungos ascomicetos e basidiomicetos. Os fungicidas que atuam através da inibição do esteroide podem ser divididos em dois grupos: os inibidores da demetilação do C14, do qual os triazóis fazem parte, e os inibidores de $\Delta 8,7$ isomerase e $\Delta 14$ redutase (FISHEL; DEWDNEY, 2013).

Os triazóis inibem a enzima esteroide-C14 demetilase (citocromo P-450) impedindo a demetilação do lanosterol, um precursor do ergosterol. Os esteróis formados não conseguem executar funções específicas, o que leva a um desequilíbrio entre os lipídios das membranas, com inibição de fosfolipídios e acúmulo de ácidos graxos livres, que chegam a níveis tóxicos para os fungos. A falta de ações específicas dos esteróis demetilados, mais o desequilíbrio lipídico, levam os fungos à morte. Com doses elevadas de fungicida observa-se dano direto sobre a membrana assim como alterações morfológicas. Estas alterações se caracterizam por inchamento das células, vacuolização excessiva, septação incompleta, aparecimento de vesículas entre a membrana e a parede celular e a formação de inclusões membranosas (FORCELINI, 1994; TOMLIN, 2002). A maioria dos triazóis é de ação sistêmica, sendo absorvidos e translocados pela planta, podendo atuar como protetores ou curativos. Apresentam elevada fungitoxicidade, rápida penetração e translocação nos tecidos vegetais (EHR; KEMMITT, 2002).

O difenoconazol é o princípio ativo presente em fungicidas utilizados em pulverização foliar e tratamento de sementes. Pode ser aplicado em diversas culturas, como abacate, amendoim, banana, berinjela, café, citros, feijão, mamão, manga, melão, morango, soja, tomate, uva, dentre outros; e atuam no controle de fungos como *C. gloeosporioides*, *Mycosphaerella musicola*, *Alternaria solani*, *Phomopsis sojae*, *Cercospora beticola*, etc. (MAPA, 2016).

O princípio ativo do fungicida Comet[®] é a piraclostrobina (C₁₉H₁₈ClN₃O₄), nome químico metil *N*-{2-[1-(4-clorofenil)-1*H*-pirazol-3-iloximetil]fenil}(Nmetoxi) carbamato, e faz parte do grupo das estrobilurinas (Figura 26) que agem na respiração mitocondrial.

Figura 26 - Estrutura química do princípio ativo piraclostrobina (Comet®) e do grupo das estrobilurinas

Os inibidores de respiração mitocondrial privam o organismo de seu principal produto, o ATP. A cadeia transportadora de elétrons é uma das etapas respiratórias para produção de ATP e pode ser fracionada em quatro componentes, cada um associado com uma atividade característica: Complexo I: NADH Coenzima Q; Complexo II: Succinato Coenzima Q; Complexo III: Coenzima Q Citocromos (b c1 c) e Complexo IV: Citocromos (b c1 c) Citocromos (a a3) O₂ (VENÂNCIO et al, 1999).

O grupo das estrobilurinas atua na inibição do complexo III da cadeia de elétrons. Uma coenzima liga-se aos elétrons que estão no complexo I e no complexo II e os transporta para o complexo III; o citocromo *c* faz o transporte do complexo III para o complexo IV, o último da cadeia de transporte. (GUTIERREZ; TRUMPOWER, 2002). As estrobilurinas bloqueiam a transferência de elétrons entre o citocromo *b* (complexo III) e o citocromo *c1* (complexo IV), no sítio Qo, interrompendo a síntese de ATP e levando as células à morte. Estes fungicidas são sistêmicos, inibindo a germinação de esporos e o desenvolvimento dos fungos nos estágios iniciais de pós-germinação, com atividade antiesporulante. As moléculas são absorvidas pelas folhas de forma gradual e constante, conferindo uma proteção na superfície por tempo mais prolongado e difundindo-se pela folha. São eficientes contra um grande número de fitopatógenos, em todas as classes de fungos a baixas concentrações, permitindo um maior intervalo entre as aplicações (VENÂNCIO et al., 1999).

Fungicidas que apresentam piraclostrobinas em sua composição, como o Comet®, são utilizados no controle de *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *Alternaria porri*, *Pseudocercospora personata*, *Septoria glycines*, *Plasmopara viticola*, dentre outros patógenos (MAPA, 2016).

Os fungicidas Captan SC® e Dithane NT® possuem princípios ativos que atuam como interferentes generalizados das funções celulares (atividade multi-sítio).

Estes compostos causam desregulações simultâneas na célula fúngica, provocadas pela ação múltipla dos compostos em diferentes grupos enzimáticos e passos metabólicos vitais. Os efeitos observados afetam a respiração celular, a permeabilidade da membrana e, principalmente, na atuação das enzimas (FISHEL; DEWDNEY, 2013). São caracterizados por compostos não-sistêmicos que formam uma superfície protetora contra infecções, atuam de forma curativa ou erradicante contra colônias fúngicas já estabelecidas.

Captan SC® tem como princípio ativo a captana ($C_9H_8Cl_3NO_2S$), de nome químico *N*-(triclóro metiltio)ciclohex-4-eno-1,2-dicarboximida, pertencente ao grupo das ftalimidas (figura 27).

Figura 27 - Estrutura química do princípio ativo captana (Captan SC®) e do grupo das ftalimidas

Quando no interior das células fúngicas, as ftalimidas reagem preferencialmente com enzimas que contêm grupos sulfidríla, podendo também reagir com grupos de aminoácidos. Estes fungicidas podem também inibir a síntese de enzimas que não possuam grupos sulfidríla. Os compostos deste grupo reagem com o tiol, com glutatonas e sulfenil. Podem ocorrer estruturas de formação de gás do tipo sulfito de hidrogênio, cloreto de hidrogênio e sulfito de carbono. A reatividade que causa a adição de tióis e a formação de estruturas de trialotio é reconhecida por ser a base da fungitoxidade (DELEN; TOSUN, 2003). Os fungicidas à base de enxofre, como o Captan, promovem efeito protetor inibindo a germinação de conídios devido ao enxofre atuar em diversos sítios bioquímicos (TOMLIN, 2002). Podem inibir a respiração celular através de seus produtos de redução, como sulfito de hidrogênio, interferir na síntese de proteínas e formar quelatos com metais pesados na célula do fungo.

O Captan SC[®] é utilizado, principalmente, em culturas de batata, cebola, maçã, uva, feijão, milho, soja, algodão e tomate. É capaz de inibir fungos como *Botrytis cinerea*, *Elsinoe ampelina*, *Colletotrichum gossypii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis sojae*, dentre outros (MAPA, 2016).

O fungicida Dithane NT[®] possui em sua composição o princípio ativo mancozeb (C₈H₁₉O₂PS₃), de nome químico complexo polimérico (ditiocarbamato) com sais de zinco e manganês, que faz parte do grupo dos ditiocarbamatos (Figura 28).

Figura 28 - Estrutura química do princípio ativo mancozeb (Dithane NT[®]) e do grupo dos ditiocarbamatos

Os fungicidas ditiocarbamatos, de um modo geral, são compostos que interferem na produção de energia, podendo ser considerados inibidores específicos (thiram) ou não específicos de ação múltipla (mancozeb, maneb) (AZEVEDO, 2003). São potentes agentes quelantes que privam a célula das necessidades de metais (fixação a complexo de metais; fixação e união a proteínas).

Todos os compostos do grupo dos ditiocarbamatos são derivados do ácido carbâmico, um composto sintético. Este grupo pode ser classificado em 5 sub-grupos: bissulfitos de tetrametiltiuram (tiram), dimetilditiocarbamatos metálicos (ferbam, ziram), etilenobisditio carbamatos metálicos (zinebe, manebe, mancozeb), propineb bisditiocarbamato metálico (propineb) e N-metilcarbamato de sódio (metam-sódio). Estes compostos formam radicais livres que podem inibir um grande número de enzimas e, portanto, interferir em muitos processos metabólicos além dos específicos, como na respiração celular interrompendo o ciclo de Krebs.

O sub-grupo ao qual o mancozeb faz parte contém protetores de amplo espectro, utilizados no tratamento foliar, tratamento de solo e tratamento de sementes (TOMLIN, 2002) contra os fungos *C. gloesporioides*, *C. lindemuthianum*,

diversas espécies de *Alternaria*, *Diaporthe citri*, *Botrytis gladiolorum*, *Phomopsis viticola*, dentre outros (MAPA, 2016).

Embora sejam fungicidas amplamente utilizados, segundo o MAPA (2016) todos são classificados como Classe II (Produto muito perigoso ao meio ambiente), de acordo também com a portaria normativa Ibama nº 84 (IBAMA, 1996). A aplicação aérea destes produtos é proibida em áreas situadas a uma distância inferior a 500 metros de povoação e de mananciais de captação de água para abastecimento público, e de 250 metros de mananciais de água, moradias isoladas, agrupamentos de animais e culturas suscetíveis a danos. Em relação à saúde humana, os fungicidas Score®, Dithane NT® e Captan SC® são classificados como extremamente tóxico (Classe I) e o Comet®, classificado como altamente tóxico (Classe II) (Tabela 5).

Tabela 5 - Informações sobre os fungicidas comerciais utilizados

Fungicida	Doses usadas nas culturas	Dados agudos		Dados crônicos
		Dose (mg kg ⁻¹) ou (mg L ⁻¹)*	Sintoma	Sintoma
Score®	14 a 50 mL/100 L água	DL ₅₀ = 2470 (via oral) DL ₅₀ = 4000 (via cutânea)	Irritante e inflamatório aos olhos	Sobrecarga funcional do fígado
Comet®	10 a 40 mL/100 L água	DL ₅₀ = 200 (via oral) DL ₅₀ = 4000 (via cutânea)	Dispneia; apatia; diarreia; irritante aos olhos e pele	Toxicidade no fígado; perda de peso.
Captan SC®	250 a 300 mL/100 L água	DL ₅₀ = 5000 (via oral) DL ₅₀ = 5000 (via cutânea) DL ₅₀ = 2,14 (via inalatória – pó)*	Irritante aos olhos	Carcinogênico e teratogênico
Dithane NT®	150 a 350 mL/100 L água	DL ₅₀ = 5000 (via oral) DL ₅₀ = 5000 (via cutânea) DL ₅₀ = 1,11 (via inalatória – pó)* DL ₅₀ = 5,14 (via inalatória- aerossol)*	Irritante aos olhos e pele;	Queda do nível de hormônios da tireóide

Dados obtidos do MAPA (2016). Doses avaliadas em roedores. DL = Dose letal.

Os dados apresentados na tabela 5 mostram que são necessárias doses entre 200 a 5000 mg kg⁻¹ dos fungicidas para que seja observado sintomas agudos em roedores. Este cálculo foi desenvolvido levando em consideração a formulação do fungicida e não somente do princípio ativo.

O uso de fungicidas sintéticos apresenta desvantagens, como persistência no ambiente, potencial de bioacumulação e mobilidade quando solúveis em água, levando a contaminação da água e do solo, intoxicação dos seres humanos,

aparecimento de pragas resistentes, entre muitos outros problemas (LUCHINI; ANDRÉA, 2000; COSTA; SILVA; FIUZA, 2004).

Estudos na literatura mostram que a citrinina apresenta como principal mecanismo de ação a alteração da permeabilidade da membrana das mitocôndrias e inibição de diversas enzimas relacionadas à cadeia respiratória, afetando a produção de ATP, em testes realizados com roedores (CHAGAS et al., 1995).

Em nosso estudo foi possível observar que muito provavelmente a citrinina apresenta um mecanismo de ação semelhante ao apresentado pelo fungicida Comet[®], o que explica as porcentagens similares de inibição do crescimento micelial aos fitopatógenos.

Apesar de relatos sobre a toxicidade da citrinina, diversos estudos na literatura mostram que para se chegar a uma dose letal deveria ser consumida uma grande quantidade de alimento com este composto.

Por exemplo, em estudos realizados com citrinina produzida por espécies de *Monascus* em arroz vermelho, os autores relatam que são consideradas como doses letais valores entre 10 e 100 mg kg⁻¹ de massa corporal, determinadas em camundongos e ratos. Os autores ainda ressaltam que, tomando-se por referência uma pessoa de 60 kg, a dosagem máxima de corante produzido por *Monascus* sp. permitida pela legislação (0,01%), a dose mínima letal de citrinina (10 mg kg⁻¹), e ainda, o teor de citrinina freqüentemente encontrado nos extratos importados (0,03 mg g⁻¹), seria necessário o consumo de 200 kg de alimento colorido com extrato de *Monascus* para a ocorrência do efeito letal (RENHE et al., 2006).

Estudos sobre a metabolização da citrinina no organismo de roedores indicam que aproximadamente 75% do composto é eliminado pelo sistema renal (REDDY; WALLACE; BERNDT, 1982). Lee, Lee e Pan (2010) estudaram os efeitos crônicos de diferentes concentrações de citrinina misturadas em arroz (1, 2, 10, 20 e 200 mg kg⁻¹) usando ratos. Mesmo nas maiores doses testadas, não foram observadas alterações toxicológicas significativas durante 90 dias. As concentrações de citrinina reportadas em alimentos variam de 420 a 998 µg kg⁻¹ em grãos usados na alimentação. Foram encontrados valores aproximados de citrinina em derivados de grãos (42 µg kg⁻¹), ervas (355 µg kg⁻¹), sucos e vegetais (0,2 µg kg⁻¹) e outros alimentos (EFSA, 2012). Baseando-se nestes e em outros estudos, a EFSA (2012) concluiu que não há preocupação com a nefrotoxicidade da citrinina em humanos com um nível de exposição de 0,2 µg kg⁻¹ do peso corpóreo por dia, embora,

baseando-se nos dados disponíveis, não possa ser descartada a preocupação com a genotoxicidade e carcinogenicidade do composto.

Mesmo sendo considerada um metabólito secundário tóxico, estudos apontam a capacidade da citrinina em inibir o crescimento de bactérias, fungos e outros patógenos nocivos aos seres humanos, em concentrações menores à considerada tóxica ao ser humano.

A atividade antimicrobiana da citrinina foi relatada em um estudo feito com o fungo *Penicillium* sp. (FF001) isolado da esponja marinha *Melophlus* sp. A concentração mínima inibitória (CMI) foi avaliada em ensaio de antibiose contra bactérias resistentes a alguns antibióticos. A citrinina apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina ($3,90 \mu\text{g mL}^{-1}$), *S. aureus* resistente à rifampinica ($0,97 \mu\text{g mL}^{-1}$), uma cepa selvagem de *S. aureus* ($1,95 \mu\text{g mL}^{-1}$), *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina ($7,81 \mu\text{g mL}^{-1}$). Além disto, apresentou atividade contra a levedura patogênica *Cryptococcus neoformans* ($3,90 \mu\text{g mL}^{-1}$) (SUBRAMANI et al., 2013).

Ainda com atividade antimicrobiana, a citrinina isolada do fungo *Monascus purpureus* TISTR 3541 também foi ativa contra várias bactérias patogênicas no trabalho de Sroykesorn, Wanleeluk e Kongruang (2011). Neste, foi avaliado o halo de inibição formado (mm) por $50 \mu\text{L}$ (1mg mL^{-1}) de citrinina pura contra *Bacillus subtilis* (3,8 mm), *Escherichia coli* (1,7 mm) *Pseudomonas aeruginosa* (3,8 mm), *Salmonella typhimurium* (2,0 mm) e *S. aureus* (3,4 mm).

No trabalho de Prabha Devi et al. (2009), o potencial de inibição da citrinina produzida por *P. chrysogenum* isolado da planta *Porteresia coarctata* (Roxb.), foi avaliado contra bactérias e fungos patogênicos pelo ensaio de difusão em disco de papel contendo $250 \mu\text{g}$ e $300 \mu\text{g}$ de citrinina por disco para bactérias e fungos, respectivamente. Streptomicina ($100 \mu\text{g disco}^{-1}$) e nistatina ($100 \mu\text{g disco}^{-1}$) foram usados como controle positivo. A citrinina foi capaz de inibir o crescimento das bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Shigella flexneri* e *Vibrio cholerae* igualmente à streptomicina (~ 5 mm de inibição). No caso dos fungos, a citrinina inibiu o crescimento de *Fusarium* sp. (13 mm), *F. nivale* (12 mm) e *A. niveus* (6 mm), não sendo observado inibição pela nistatina.

Quanto à atividade à fitopatógenos, a citrinina também isolada de *P. citrinum* obtido da rizosfera da planta *Cicer arietinum* (grão-de-bico) foi avaliada contra o fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Após inoculação do patógeno na planta de grão-de-

bico, 8 ppm de citrinina foi pulverizada e avaliada durante 72 horas. A atividade foi avaliada em uma escala de 1 a 6, onde 1 significa que não foi observado contaminação e 6 indica contaminação em mais de 70% da planta. A citrinina apresentou escala de 0,7 a 2,0 nas primeiras horas de ensaio, observando-se aumento da contaminação da planta a partir de 24 horas, o que indica que a citrinina foi capaz de retardar a infecção da planta, mas não causou a morte do patógeno. Entretanto, não foram observados efeitos tóxicos na planta (SREEVIFYA et al., 2015).

Mesmo existindo estudos da atividade antimicrobiana da citrinina, são escassos os trabalhos sobre o seu potencial como fungicida à fitopatógenos. No melhor de nosso entendimento, este é o primeiro relato da citrinina como agente antifúngico aos fitopatógenos *C. gloeosporioides*, *C. lindemuthianum*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *Phomopsis sojae*.

5.4.3 Metabólito(s) secundário(s) com atividade antileishmaniose

No decorrer do estudo dos metabólitos secundários de *P. citrinum* com atividade antifúngica, as frações foram avaliadas em outro ensaio biológico, o de atividade antileishmaniose.

Após o fracionamento por cromatografia em coluna da fração acetato de etila (F3) (Figura 19), foram obtidas oito frações que foram avaliadas em ensaio de atividade antileishmaniose. Os resultados podem ser observados na tabela 6.

Tabela 6 - Porcentagem de atividade antileishmaniose de oito frações de *P. citrinum*

Fração	Atividade antileishmaniose
	% de morte do parasita
F3a1	0
F3a2	0
F3a3	100
F3b	0
F3c	0
F3d	0
F3e	0
F3f	0

Ensaio realizado na concentração de 500 µg mL⁻¹.

Dentre as frações testadas, a fração F3a3 apresentou 100% de inibição das formas promastigotas do parasita *Leishmania infantum*. Esta foi então submetida a uma separação por HPLC e foram obtidas 14 frações (figura 29).

Figura 29 - Cromatograma da fração F3a3 monitorado em $\lambda = 254$ nm.

Condições de análise: coluna Phenomenex® Kinetex C₁₈ 100A (250 x 4,6 mm; 5 µm) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 30 minutos), vazão: 1 mL min⁻¹, por 40 minutos

Após separação, as 14 frações obtidas foram analisadas por HPLC para obtenção de seus perfis químicos. Doze destas frações (F3a3a, b, c, d, e, g, h, i, k, l, m e n) se apresentaram muito complexas, ou seja, com presença de muitos compostos, portanto precisariam de novas etapas de purificação.

As frações F3a3f e F3a3j, por se apresentarem menos complexas, foram analisadas quimicamente por HPLC-UV-MS. Para a fração F3a3f foi obtido o cromatograma e os seguintes espectros (Figura 30).

Figura 30 - Cromatograma da fração F3a3f monitorado em $\lambda = 250$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas da fração F3a1 em modo positivo (c) e negativo (d). Condições de análise: coluna Waters X-Terra MS- C_{18} (50x2,1 mm; 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H_2O em MeOH/ACN (proporção inicial de H_2O :MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 16 minutos), vazão: 0,5 mL min^{-1} , por 20 minutos

A análise da fração F3a3f mostrou um composto majoritário com λ_{max} . 244 nm. Foi observado no espectro de massas sinais em m/z 209,3 $[M+H]^+$, e 207,3 $[M-H]^-$, sugerindo que possivelmente a massa molar do composto seja 208,3 Da.

Os cromatogramas e os espectros de massas gerados forneceram informações para busca no banco de dados DPN, utilizou-se como palavras-chave de busca a fonte biológica "*Penicillium*" ou "fungus" e a massa do composto prioritário nas frações semi-puras.

Ainda, como método de comparação com a literatura, foram utilizadas informações dos processos de protonação e desprotonação dos íons moleculares dos compostos, onde substâncias que apresentam grupamentos básicos, principalmente aminas, amidas e ésteres, normalmente são analisadas no modo positivo, dada a relativa facilidade com que as mesmas são protonadas. Por outro lado, substâncias contendo funções ácidas, tais como, hidroxilas (OH) ácidos

carboxílicos (COOH) e fenóis (C₆H₆O) são mais facilmente desprotonadas e, consequentemente, são analisadas no modo negativo (CROTTI et al., 2006; VESTAL, 2001; COLE, 1997).

Seguindo esta metodologia para os dados obtidos para a fração F3a3f, foram encontrados 9 compostos no DPN, usando como palavras-chave a massa do composto, a fonte biológica e a absorção máxima. Todos os compostos encontrados são produzidos por espécies de *Penicillium* sp., possuem massa molecular similar variando de 208,12 a 208,3 Da. A absorção máxima foi em aproximadamente 245 nm e possuem grupamentos hidroxilas, ou seja, seus íons moleculares podem ser observados no espectro de massas em modo negativo, assim como composto da fração F3a3f. Alguns destes compostos possuem atividade inibitória do ciclo de células de mamíferos (CUI et al., 1996) e agem como substâncias tóxicas (COX et al., 1979).

Ao analisar o cromatograma da fração f3a3j, foi observado um bom grau de pureza, com apenas um pico intenso com $\lambda_{\text{máx.}}$ 235,4 nm (Figura 31).

Figura 31 - Cromatograma da fração F3a3j monitorado em $\lambda = 250$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c) e negativo (d); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (e).

Condições de análise: HPLC: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (50x2,1 mm; 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 16 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹, por 20 minutos; UPLC: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 m; 1,7 μ m) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ à 4° C, por 10 minutos

No espectro de massas foi observado os picos em m/z 377,3 [M+H]⁺ e 375,3 [M-H]⁻, mostrando que a massa do composto é, possivelmente, de 376,3 Da. Por apresentar um bom grau de pureza, a fração F3a3j foi analisada em UPLC-HRMS. O

espectro de massas de alta resolução em modo positivo foi de acordo com a informação obtida no espectro de massas de baixa resolução, onde foi observado o íon protonado em m/z 377,1957, sendo a possível massa calculada do composto de 376,1877 Da.

A partir das informações de massa deste composto, foi realizada uma busca no DNP. Não foram encontrados resultados compatíveis com a massa do composto com duas casas decimais (376,18 Da), usando como palavras-chave “*Penicillium*” e “fungus”. Quando buscado a massa sem utilizar informações de fontes biológicas, foram obtidos 133 resultados para esta massa molecular. Dentre as principais fontes biológicas descritas como produtoras deste composto estão um dinoflagelado marinho do gênero *Amphidinium* sp., uma linhagem de *Apergillus niger*, *Streptomyces* sp., algumas plantas do gênero *Zingiber*, *Curcuma*, *Mikania*, *Sinularia*, *Lingauria*, *Sauvia*, dentre outros. Foram descritas algumas atividades biológicas para os compostos com esta massa molecular, como citotóxica, antileucêmica e inibidora da HGM-CoA redutase (DPN, 2016).

O fluxograma abaixo sumariza o estudo dos metabólitos secundários de *P. citrinum* com atividade antileishmaniose (Figura 32).

Figura 32 - Fluxograma do estudo químico do fungo endofítico *P. citrinum* (P2MSF2F3) com atividade antileishmaniose
m= massa da fração; fração em destaque= fração ativa; frações em negrito= semi-puras

As duas frações (F3a3f e F3a3j) que foram obtidas com melhor grau de pureza ainda necessitam de purificações, para posteriormente serem obtidos os espectros de RMN e ser feita a identificação inequívoca dos compostos. Devido à pequena quantidade de massa estas não foram avaliadas no ensaio antileishmaniose.

Muitos são os compostos produzidos por fungos do gênero *Penicillium* que apresentam potencial atividade biológica para serem usados no tratamento de diversas doenças humanas. Alguns destes compostos apresentaram atividade contra a leishmaniose.

Em 1972, o composto vermiculina foi isolado de *P. vermiculatum* obtido do solo. Este composto foi avaliado contra *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* e algumas bactérias gram-positiva em ensaios de difusão em ágar. O composto apresentou atividade contra bactérias em concentrações variáveis de 10 a 500 µg e foi ativo contra *T. cruzi* e *L. braziliensis* nas concentrações de 10 e 0,5 µg, respectivamente. Embora tenha se mostrado ativo, a vermiculina mostrou efeito citotóxico com 420 mg kg⁻¹ (FUSKA; NEMEC; KUHR, 1972).

Em um estudo feito com promastigotas de *Leishmania braziliensis* expostos às micotoxinas aflatoxina (0,5 mg mL⁻¹), fumonisina (0,025 µg mL⁻¹) e citrinina (10 mg mL⁻¹), foi observado uma redução de 15-30% na capacidade de infecção de macrófagos pelo parasita. Ainda, foi observado que a citrinina causou um aumento na proliferação dos parasitas, induzindo as formas promastigotas a sofrerem mitose e como consequência disto, a sofrerem apoptose (SOUZA, et al., 2000).

O fungo *Penicillium janthinellum*, isolado dos frutos de *Melia azedarach*, foi cultivado por 20 dias, onde os policetídeos conhecidos citrinina, emodina, 1,6,8-triidróxi-3-hidroximetilantraquinona, e uma nova antraquinona modificada, denominada janthinona, foram produzidos. A citrinina foi usada pela primeira vez contra *Leishmania* e inibiu em 100% o crescimento dos parasitas a uma concentração de 40 µg mL⁻¹ (do ROSARIO MARINHO et al. 2005). Posteriormente, cinco policetídeos foram isolados de *P. herquei*, endófito de *Melia azedarach*. O composto emodina inibiu 50% dos parasitas a uma concentração de 320 µg mL⁻¹, enquanto que os compostos citreoserina e janthinona inibiram aproximadamente 20% e 22% dos parasitas (do ROSARIO MARINHO; MARINHO, 2011).

Diversos estudos apontaram que a citrinina apresenta atividade antileishmaniose. Sendo assim, o composto citrinina isolado no presente estudo foi

avaliado em ensaio de atividade contra formas promastigotas de *L. infantum*. A citrinina apresentou atividade inibitória de 100 % na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

5.5 Estudo do fungo endofítico cód. P210⁻⁴F2

5.5.1 Identificação taxonômica

O fungo endofítico sob o código P210⁻⁴F2 foi isolado da folha triturada de *A. loefgrenii* em solução salina (0,85%). Foi selecionado para estudo por apresentar um perfil espectral por *MALDI-TOF-MS* distinto e por apresentar características morfológicas únicas dentre todos os isolados.

Pela análise morfológica pode-se observar a presença de conidióforo ramificado e a presença de fiálides, característico do gênero *Penicillium* (Figura 33).

Figura 33 - a) Endófito P210⁻⁴F2 (verso e reverso da colônia) cultivado em meio de extrato de malte (2%); b) microscopia óptica (1000x) evidenciando o conidióforo (1).

As sequências ITS e beta-tubulina desse isolado foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados do GenBank, obtendo-se 100% de identidade com sequências de fungos da espécie *Penicillium simplicissimum*. A análise filogenética baseada no mesmo marcador revelou que o isolado em questão está próximo de *P. simplicissimum* (Figura 34).

Figura 34 - Comparação da sequência ITS obtida do isolado P210-4F2 com àquelas depositadas no banco de dados GenBank (ident: porcentagem de identidade); b) Árvore filogenética baseada no marcador ITS e beta-tubulina demonstrando a posição filogenética do isolado P210-4F2

O fungo ascomiceto *P. simplicissimum* (Oudemans) Thom pertence à classe dos Eurotyomicetes, ordem dos Eurotiales e família Trichocomaceae (Catalogue of Life, 2016). As colônias de *P. simplicissimum* são aveludadas à flocosas, geralmente possuindo coloração branca ou levemente amarelada, com micélios densos e sulcados, podendo apresentar pigmentos solúveis avermelhados. Apresenta conidióforos relativamente curtos, filíades ampuliformes e seus conídios podem ser elipsoidal ou esférico (PITT; HOCKING, 2009).

Este fungo é comumente encontrado em vegetação em decomposição e no solo. Existem ocorrências deste micro-organismo como contaminante em alimentos como presunto curado (MONTE; VILLANUEVA; DOMÍNGUES, 1986), castanhas de caju, amendoins e brotos de feijão (PITT, 1993). Algumas toxinas como fumitremogênio B, ácido penicílico e viridicatumtoxina (EL-BANNA et al., 1987; PITT; LEISTNER, 1991) foram reportadas, embora sua produção natural e sua ação em seres humanos e animais não tenham sido demonstrada (PITT; HOCKING, 2009).

Atualmente, fungos desta espécie são utilizados como produtores de compostos com diversas aplicações tecnológicas e ambientais, como exemplo na biotransformação de esteróides (YANG et al., 2014), hidrólise de celulose (YUAN et al., 2012), bioissorção e degradação de corantes e plásticos (CHEN; TING, 2015; BERGSTEN-TORRALBA et al., 2009; YAMADA-ONODERA et al., 2001). São produtores de enzimas importantes como lacase (ZENG et al., 2006), lipase (GUTARRA et al., 2009) e galactotransferase (CRUZ et al., 1999). Seus metabólitos secundários isolados têm apresentado atividade antifúngica (LI et al., 2014; KOMAI

et al., 2006), inseticida (HAYASHI et al., 1989), antibiótica (IGARASHI et al., 2000), dentre outras.

Embora esta espécie de fungo seja amplamente distribuída e com muitas utilidades biotecnológicas, não foram encontrados estudos de metabólitos secundários produzidos por *P. simplicissimum* com atividade a doenças parasitárias, como a leishmaniose.

5.5.2 Metabólitos secundários com atividade antileishmaniose

O endófito foi cultivado em maior volume e particionado com acetato de etila gerando duas frações, aquosa e acetato de etila. A fração aquosa foi descartada e a fração acetato de etila (cód. F2) utilizada nas etapas cromatográficas.

A fração F2 foi submetida à cromatografia em coluna de acordo com a condição 3 (item 4.8.1.2), sendo obtidas oito frações (F2a-F2h) as quais foram enviadas para ensaio de atividade antileishmaniose (Tabela 7).

Tabela 7 - Porcentagem de atividade antileishmaniose de oito frações de *P. simplicissimum*

Fração	Atividade leishmanicida
	% de morte do parasita
F2a	0
F2b	100
F2c	0
F2d	0
F2e	0
F2f	0
F2g	0
F2h	0

Ensaio realizado na concentração de 500 µg mL⁻¹.

Neste ensaio a fração F2b apresentou 100% de inibição das formas promastigotas do parasita *Leishmania infantum*. Esta fração foi, então, submetida a cromatografia em coluna de acordo com a condição 4 (item 4.8.1.2), resultando em 6 novas frações (F2b1-F2b6). Os perfis químicos das 6 frações foram analisados e seus compostos foram isolados por HPLC de acordo com a condição descrita no item 4.8.3.

A partir da fração F2b2 foram obtidas 11 frações, constituídas de picos e intervalos conforme cromatograma abaixo (Figura 35).

Figura 35 - Cromatograma da fração F2b2 monitorado no $\lambda = 220$ nm

Condições de análise: coluna Phenomenex® Kinetex C₁₈ 100A (250 x 4,6 mm; 5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 30 minutos), vazão: 1 mL min⁻¹, por 40 minutos.

As 11 frações foram analisadas por HPLC para obtenção de seus perfis químicos. Destas, as frações F2b2a, b, c, d, e, f, g, h, i e k, por estarem muito complexas, ou seja, com presença de muitos compostos, precisariam de novas etapas de purificação.

A fração F2b2j, com tempo de retenção em 24,07 min, apresentou bom grau de pureza e foi analisada por HPLC-UV-MS (Figura 36).

Figura 36 - Cromatograma da fração F2b2j monitorado no $\lambda = 250$ nm (a); Espectro de UV da fração F2b2j (b); Espectro de massas de baixa resolução da fração F3a1 em modo positivo (c) e negativo (d)

Condições de análise: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (50x2,1 mm; 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 16 minutos, vazão: 0,5 mL min⁻¹, por 20 minutos.

Pela análise, constatou-se que esta fração apresentava um bom grau de pureza. No espectro de absorção na região do UV, foram observadas $\lambda_{\text{máx.}}$ em 235,4 e 279,1 nm. Na análise do espectro de massas de baixa resolução em modo positivo, foram observados sinais em m/z 487,4; 509,3 e 973,9, referentes à massa do composto protonada $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ e $[2M+H]^+$, respectivamente. No espectro de massas em modo negativo, foram observados os sinais em m/z 485,5 e 972,0, referentes à massa do composto desprotonada $[M-H]^-$ e $[2M-H]^-$. Sendo assim, sugere-se que possivelmente a massa molar do composto seja de 486 Da.

Com base nestas informações, foi realizada uma busca no banco de dados DPN, utilizando-se como palavras-chave a massa do composto e a fonte biológica "*Penicillium*". O resultado desta busca foi compatível com 4 compostos. Dentre os possíveis compostos encontrados na literatura, ambos possuem $\lambda_{\text{máx.}}$ e massa molecular semelhante ao composto presente na fração F2b2j. Para confirmar a

identificação do composto, a fração foi analisada em UPLC-HRMS, sendo obtido seu espectro de massas de alta resolução em modo positivo (Figura 37).

Figura 37 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração F2b2j
Condições de análise: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 m; 1,7 µm) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ à 4º C, por 10 minutos

A análise do espectro de massas de alta resolução em modo positivo confirmou os íons moleculares em m/z 487,2788 referente a $[M+H]^+$, 509,2538 referente a $[M+Na]^+$ e 973,5313 $[2M+H]^+$ referente a $[2M+H]^+$, confirmando os sinais obtidos no espectro de massas de baixa resolução. Assim, foi possível encontrar a massa do composto de 486,2608 Da. Ao se comparar o valor da massa molecular da fração F2b2j com os compostos da literatura, pode-se pressupor que se trata do composto andrastina A (massa exata = 486,261755 Da).

A fração F2b2j foi, então, submetida a análises de RMN uni e bidimensionais de ¹H (600 MHz) e ¹³C (150 MHz) para comparação com os resultados de RMN de ¹H (270 MHz) e ¹³C (67,8 MHz) do composto andrastina A isolado no estudo de UCHIDA et al. (1996) (Tabela 8). Os espectros de RMN referentes ao composto isolado estão no ANEXO 5.

Tabela 8 – Comparação dos dados de RMN ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) do composto F2b2j ($\text{DMSO-}d_6$) e andrastina A ($\text{MeOH-}d_4$ / 270 e 67,8 MHz)

Posição do ^1H e ^{13}C	Fração F2b2j	Andrastina A		UCHIDA et al. (1996)
		UCHIDA et al. (1996)	Fração F2b2j	
	^1H (δ ; multip.; J)	^1H (δ ; multip.; J)	^{13}C (δ)	^{13}C (δ)
1	0,91 m; 2,15 m	0,91 m; 2,227 m	27,80	28,9
2	1,23 m; 2,04	1,59 m; 2,05 m	23,38	24,3
3	4,50 t (2,4; 2,4)	4,62 t (2,3; 2,3)	77,18	79,1
4	-	-	36,96	38,0
5	1,57 dd (2,7; 13,2)	1,84 dd (2,4; 15,7)	48,25	49,9
6	1,46 m; 2,02 m	1,70 m; 2,07 m	16,85	17,9
7	2,17 m; 3,00*	2,25 m; 3,02 td (3,9; 12,9)	32,20	33,5
8	-	-	41,39	42,9
9	2,00 s	2,13 br. s	53,21	54,8
10	-	-	52,09	53,5
11	5,21 s	5,38 br. s	121,36	123,4
12	-	-	136,0**	137,1
13	-	-	56,04**	57,8
14	-	-	67,36**	68,8
15	-	-	?	188,8
16	-	-	111,28**	114,2
17	-	-	?	200,5
18	-	-	171,57	172,3
19	1,91 s	2,05 s	21,36	21,1
20	0,86 s	0,95 s	26,77	27,1
21	0,78 s	0,87 s	21,47	21,5
22	1,12 s	1,24 s	19,49	19,8
23	10,09 s	10,18 s	206,2	207,0
24	1,66 s	1,75 br. s	19,49	20,0
25	1,02 s	1,16 s	16,02	16,1
26	-	-	170,39	172,2
27	3,49 s	3,58 s	51,90	52,1
28	1,50 s	1,59 s	7,75	6,5

s: singlete; d: duplete; m: multipeto. δ_{H} : deslocamento de hidrogênios; J: constante de acoplamento.

* deslocamento observado no espectro de HSQC; ** deslocamento observado no espectro de HMBC.

Pelo espectro de RMN ^1H e ^{13}C , observou-se correlação da fração F2b2j com o composto andrastina A, pelos deslocamentos químicos dos hidrogênios de 8 metilas ($-\text{CH}_3$) em δ 1,91 (s, CH_3 -19), δ 0,86 (s, CH_3 -20), δ 0,78 (s, CH_3 -21), δ 1,12 (s, CH_3 -22), δ 1,66 (s, CH_3 -24), δ 1,02 (s, CH_3 -25), δ 3,49 (s, CH_3 -27), δ 1,50 (s, CH_3 -28).

Foi verificado a presença de 5 metinas ($-\text{CH}$) devido à correlação direta H-C, pelo espectro de RMN bidimensional por HSQC, de δ_{H} 4,50 (t, CH) com δ_{C} 77,18 (CH-3); δ_{H} 1,57 (dd, CH) com δ_{C} 48,25 (CH-5); δ_{H} 2,00 (s, CH) com δ_{C} 53,21 (CH-9); δ_{H} 5,21 (s, CH) com δ_{C} 121,36 (CH-11) e δ_{H} 10,09 (s, CO) com δ_{C} 206,2 (CHO-23). Foi observado, ainda por HSQC, 4 metilenos de δ_{H} 0,91 e 2,05 (m, CH_2) com δ_{C} 27,80 (CH_2 -1); δ_{H} 1,23 e 2,04 (m, CH_2) com δ_{C} 23,38 (CH_2 -2); δ_{H} 1,46 e 2,02 (m, CH_2) com δ_{C} 16,85 (CH_2 -6) e δ_{H} 2,17 e 3,00 (m, CH_2) com δ_{C} 32,20 (CH_2 -7).

Pela análise bidimensional de longa distância entre H-C (HMBC), foram verificados 9 carbonos quaternários: δ_H 3,49 (H₃-19) com δ_C 171,57 (COO-18); δ_H 4,51 (H-3), 0,86 (s, H₃-20), 0,78 (s, H₃-21) com δ_C 36,96 (C-4); δ_H 1,12 (s, H₃-22) com δ_C 41,39 (C-8); δ_H 10,09 (s, H-23) com δ_C 52,09 (C-10); δ_H 1,66 (s, H₃-24) com δ_C 136,0 (C-12); δ_H 1,02 (s, H₃-25) com δ_C 56,04 (C-13) e 67,36 (C-14); δ_H 1,50 (s, H₃-28) com δ_C 111,28 (C-16) e δ_H 3,49 (s, H₃-27) com δ_C 170,39 (C-26).

A figura 38 ilustra as correlações encontradas nos espectros de RMN obtidos.

Figura 38 - Estrutura química do composto F2b2j com esquema de correlações HSQC e HMBC. Números em azul indicam valores de deslocamento de hidrogênio; números em vermelho indicam valores de deslocamento de carbono; setas verdes indicam correlações por HMBC. * ocorrência de tautomerismo ceto-enólico

Embora grande parte dos átomos de H e C do composto F2b2j tenha apresentado correlação com a molécula andrastina A, não foram observados os carbonos de posição 15 e 17 na molécula (sinalizados com (*)) na Figura 38). O fato destes carbonos não serem observados nos espectros de RMN pode se dar pela ocorrência de tautomerismo ceto-enólico nesta região da molécula.

O tautomerismo ceto-enólico é a interconversão de cetonas em íons enolato. Este mecanismo de enolação envolve duas etapas distintas de transferência de próton, sendo estas catalisadas por traços de ácidos ou bases. Quando o mecanismo é catalisado por bases, como exemplo um íon hidróxido (OH⁻), ocorre a perda de um próton do carbono vizinho ao carbono que apresenta o grupo cetona,

resultando em uma ligação conjugada entre estes carbonos. A formação desta ligação conjugada causa a formação de um ânion enolato (CO^-). Uma molécula de água age como ácido, transferindo um hidrogênio para o ânion enolato, formando um enol (COH). A transferência de um próton do solvente para o carbono vizinho reverte a reação, formando novamente o grupamento cetona. Quando o mecanismo é catalisado por ácidos, por exemplo um íon hidrônio (H_3O^+), um próton é transferido para o grupo cetona, formando um cátion enolato (COH^+). Uma molécula de água age como base, retirando um próton do carbono vizinho, resultando em uma ligação conjugada e na formação do enol. Para compostos monocarboníla simples, tais como acetona, a quantidade da forma enol presente no equilíbrio é pequena (menor que 1%) (SOLOMON; FRYHLE, 2002; CAREY, 2011;).

Em outro estudo onde foi isolado o composto andrastina A, o tautomerismo foi confirmado pela adição de bromo (Br) na reação de síntese desta molécula. Foi observado a formação de 2 derivados *p*-bromo benzoil: 15-(*p*-bromobenzoil)-andrastina A e 17-(*p*-bromobenzoil)-andrastina A, sendo então, elucidada a estrutura planar do composto andrastina (Figura 39).

Figura 39 - Estrutura química da andrastina A (CAS: 174232-42-9)

A andrastina A (CAS: 174232-42-9) é um meroterpenóide (apresenta estrutura parcial de um terpenóide), com nome químico Metil-3-(acetiloxi)-4,4,8,12,16-pentametil-15,17,19-trioxoandro-11-eno-14-carboxylato, tem como fórmula química $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_7$, com $\lambda_{\text{máx.}}$ em 286 (MeOH); 209, 258 (MeOH/HCl) e 286 (MeOH/NaOH).

Este composto foi isolado primeiramente do fungo *Penicillium* sp. F-3929, juntamente com os compostos andrastina B e C. Os compostos isolados

apresentaram atividade inibitória da proteína RAS farnesiltransferase (UCHIDA et al., 1996). A enzima proteína farnesiltransferase liga grupos farnesil ao aminoácido cisteína no final de cadeias proteicas, tais como de proteínas RAS. A cadeia farnesil é essencial para o funcionamento da proteína RAS, uma vez que RAS é intimamente envolvida com a transferência de sinais de crescimento na superfície da célula. As células cancerígenas que apresentam mutações na proteína RAS, também contam com essa cadeia farnesil para ligar as formas hiperativas da proteína à membrana celular. A inibição desta enzima pode impedir a produção da proteína RAS, diminuindo o crescimento de células cancerígenas (GOODSELL, 2003).

A produção da andrastina A por linhagens de *Penicillium roqueforti* foi quantificada no estudo de Nielsen et al. (2005). Neste estudo, o composto foi quantificado diretamente de amostras de 23 tipos de queijo azul produzidos na Europa. Foram encontradas concentrações consistentes do composto em todos os queijos entre 0,1 e 3,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ de queijo. Em outro estudo, 5 linhagens de *P. roqueforti* foram isoladas de 6 variedades de queijo azul produzidos na Espanha. Foi observada a produção do composto por todas as linhagens em concentrações entre 0,01 a 0,15 $\mu\text{g g}^{-1}$ de micélio seco. Foi observado, também, concentrações de andrastina A em todos os queijos azuis analisados ($\sim 18,26 \mu\text{g g}^{-1}$ de queijo) (FERNÁNDEZ-BODEGA et al., 2009).

Outros estudos relatam, também, a produção da andrastina A por outras espécies de *Penicillium*, como *P. albocoremium* (OVERY et al., 2005) e *P. crustosum* (SONJAK; FRISVAD; GUNDE-CIMERMAN, 2005).

Entretanto, não foram encontrados estudos que relatem a produção deste composto por *Penicillium simplicissimum*.

No estudo da fração F2b1, esta foi separada por HPLC onde foram obtidas 18 frações, coletadas segundo a figura 40.

Figura 40 - Cromatograma da fração F2b1 monitorada em $\lambda = 220$ e 254 nm

Condições de análise: coluna Phenomenex® Kinetex C₁₈ 100A (250 x 4,6 mm; 5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 30 minutos), vazão: 1 mL min⁻¹, por 40 minutos.

As frações foram analisadas em HPLC para obtenção de seus perfis químicos. Das 18 frações obtidas, as frações **i** (15,147 min), **n** (18,648 min) e **p** (20,772 min) foram selecionadas para serem estudadas por estarem aparentemente puras. As demais frações se mostraram complexas e não foram priorizadas.

A fração F2b1i apresentou bom grau de pureza e foi analisada por HPLC-UV-MS (Figura 41).

Figura 41 - Cromatograma da fração F2b1i monitorado em $\lambda = 300$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c) e negativo (d); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (e)

Condições de análise: HPLC: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (50x2,1 mm; 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 16 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹, por 20 minutos; UPLC: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 m; 1,7 μ m) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ à 4° C, por 10 minutos

Na fração F2b1i foi observado um pico referente a um composto com $\lambda_{\text{máx.}}$ em 296,9 e 370,7 nm. Na análise do espectro de massas em modo negativo, foi observado um íon molecular em m/z 224,4. Já no espectro em modo positivo, foi observado somente um íon correspondente protonado com sódio em m/z 248,2, o qual foi observado, também, no espectro de massas de alta resolução em modo

positivo (m/z 248,0904). Assim, a possível massa molecular do composto presente na fração é de 225,1014 Da.

Pela busca feita no DPN não foram encontrados compostos utilizando as palavras-chave “*Penicillium*” ou “fungus”. Na busca utilizando somente a massa do composto, foram obtidos 2 compostos derivados do aminoácido adenina: a citocinina B (CAS: 1214-39-7) e N⁹-benzil-adenina (CAS: 4261-14-7), ambos produzidos por plantas (Figura 42).

Figura 42 – Estrutura química dos compostos citocinina B e N⁹-benzil-adenina

Foi obtido o espectro de RMN de ¹H para este composto (Anexo 6), entretanto os valores de deslocamentos não foram compatíveis com os possíveis compostos encontrados. Sendo assim, para a elucidação deste composto serão necessários adquirir os espectros bidimensionais.

No estudo da fração F2b1n foi realizada a análise por HPLC-UV-MS (Figura 43).

Figura 43 - Cromatograma da fração F2b1n monitorado em $\lambda = 300$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c) e negativo (d); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (e)

Condições de análise: HPLC: coluna Waters X-Terra MS- C_{18} (50x2,1 mm; 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H_2O em MeOH/ACN (proporção inicial de H_2O :MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 16 minutos), vazão: 0,5 mL min^{-1} , por 20 minutos; UPLC: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C_{18} (2,1 x 50 m; 1,7 μ m) com fase móvel em gradiente de H_2O em ACN (proporção inicial de H_2O :ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min^{-1} à 4° C, por 10 minutos

Para esta fração foi observado 1 composto com λ_{max} em 298,1 nm. O espectro de massas desta fração apresentou íons moleculares em m/z 274,3 $[M+H]^+$, 296,3 $[M+Na]^+$ e 272,3 $[M-H]^-$. O íon molecular protonado com Na^+ foi observado, também, no espectro de massas de alta resolução em m/z 296,0605, sendo a possível massa molar deste composto de 273,1015 Da.

De acordo com a busca feita no DPN utilizando a massa e o gênero do endófito como palavras-chave, foi encontrado o composto penicisoquinolina (CAS: 1236802-53-1), um composto isolado de uma linhagem de *Penicillium* sp. PSU-F40 (obtida do mar da Tailândia) (TRISUWAN et al., 2010).

Foi obtido o espectro de RMN de ^1H para este composto (Anexo 7), e os valores de deslocamento de ^1H (600 MHz) foram comparados com o composto penicisoquinolina (300 MHz) isolado no estudo de Trisuwana et al. (2010) (Tabela 9).

Tabela 9 – Comparação de dados de RMN ^1H do composto F2b1n (DMSO- d_6 / 600 MHz) e penicisoquinolina (CDCl $_3$ / 300 MHz)

Posição do H	Penicisoquinolina - δ_{H} , multiplicidade e J (Hz)	
	F2b1n	Trisuwana et al. (2010)
4	7,06 d (7,9)	7,72 d (8,4)
5	6,87 d (8,0)	7,36 d (8,4)
6	7,08 s	7,79 s
9	8,55 s	9,48 s
10	4,09 s	4,89 s
11	2,38 m	2,36 m
12 (CH $_3$)	0,85 s	0,97 br s
13 (CH $_3$)	1,23 s	1,19 br s

s: singlete; d: duplete; m: multiplete. δ_{H} : deslocamento de hidrogênios; J : constante de acoplamento.

Pelo espectro de RMN ^1H observou-se correlação da fração F2b1n com o composto penicisoquinolina, pelos deslocamentos químicos dos hidrogênios de 2 metilas (-CH $_3$) em δ 0,85 (s, CH $_3$ -12) e δ 1,23 (s, CH $_3$ -13), 1 metileno (-CH $_2$) em δ 4,09 (s, CH $_2$ -10) e 5 metinas (-CH) com δ 7,06 (d, J = 7,9; CH-4), δ 6,87 (d, J = 8,0; CH-5), δ 7,08 (s, CH-6), δ 8,55 (s, CH-8) e δ 2,38 (m, CH-11).

Os valores de massa molecular e deslocamento químico, multiplicidade e constante de acoplamento foram compatíveis e, portanto, não foram necessárias análises adicionais. Assim, foi confirmado que o composto F2b1n produzido por *P. simplicissimum* refere-se ao composto penicisoquinolina (Figura 44).

Figura 44 – Estrutura química da penicisoquinolina (CAS: 1236802-53-1)

A penicisoquinolina é um alcaloide heterocíclico do grupo das quinolinas, formados por um anel benzeno ligado à um anel piridina. O composto isolado possui nome químico 2,10-Dihidro-7-metil-2-(1-metiletil)furo[3,2-*h*]isoquinolin-3-ona e fórmula química $C_{15}H_{15}NO_4$.

Este composto foi isolado de uma linhagem de *Penicillium* sp. PSU-F40, obtida no mar da Tailândia. A penicisoquinolina foi avaliada em ensaio de atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, entretanto não se mostrou ativo na concentração de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ (TRISUWAN et al., 2010).

Não foram encontrados outros estudos na literatura relatando o isolamento deste composto, sendo relatado pela primeira vez para o fungo *Penicillium simplicissimum*.

No estudo da fração F2b1p, foi realizada análise por HPLC-UV-MS para obtenção de seu perfil químico (Figura 45).

Figura 45 - Cromatograma da fração F2b1p monitorado em $\lambda = 254$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c) e negativo (d); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (e)

Condições de análise: HPLC: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (50x2,1 mm; 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 16 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹, por 20 minutos; UPLC: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 m; 1,7 μ m) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ à 4^o C, por 10 minutos

Para a fração F2b1p foi observado somente um composto com $\lambda_{\text{máx.}}$ 223,6; 267,3 e 310,0 nm. No espectro de massas deste composto foram observados os íons moleculares em m/z 179,3 [M+H]⁺ e 177,4 [M-H]⁻. No espectro de massas de alta resolução em modo positivo, foi observado o íon molecular em m/z 197,0702, assim, a possível massa molar para este composto é de 178,0622 Da.

Utilizando estes dados para comparação no banco de dados, foi encontrado o composto penicisochroman J (CRC: RGF47-K) (Figura 46) isolado primeiramente de *Penicillium* sp. BCC18034, obtido do solo por Bunbamrung et al. (2014).

Figura 46 – Estrutura química do composto penicisochroman J

Foi obtido o espectro de RMN de ^1H (Anexo 8) para este composto. Entretanto os valores de deslocamentos não foram compatíveis com o composto de mesma massa molar encontrada no banco de dados DPN. Por exemplo, não são observados no espectro de RMN adquirido para o composto isolado valores de deslocamentos químicos na região de 7 ppm, típico de deslocamentos de hidrogênio de anéis aromáticos. Sendo assim, para a elucidação deste composto serão necessários adquirir os espectros bidimensionais.

A partir da fração F2b3, a qual teve seus compostos separados por HPLC, foram obtidas 8 frações (Figura 45).

Figura 47 - Cromatograma da fração F2b3 monitorada em $\lambda = 220$ nm

Condições de análise: coluna Phenomenex® Kinetex C₁₈ 100A (250 x 4,6 mm; 5 μm) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 30 minutos), vazão 1 mL min⁻¹, por 40 minutos.

As 9 frações obtidas foram analisadas por HPLC e foram obtidos seus perfis químicos. As frações F2b3a, b, c, d, e, f, h e i, por estarem muito complexas, não foram priorizadas.

A fração F2b3g, a qual se apresentou, aparentemente, pura, teve seus dados analisados por HPLC-UV-MS (Figura 48).

Figura 48 - Cromatograma da fração F2b3g monitorado em $\lambda = 225$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c) e negativo (d); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (e)

Condições de análise: HPLC: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (50x2,1 mm; 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 16 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹, por 20 minutos; UPLC: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 m; 1,7 μ m) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ à 4° C, por 10 minutos

Foi observado para a fração F2b3g uma $\lambda_{\text{máx.}}$ em 215,4; 249,6; 293,4 e 370,7 nm. No espectro de massas em modo positivo, foi observado os íons moleculares em m/z 222,3 e 244,2, referentes à massa do composto protonadas $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$. No espectro de massas em modo negativo foi observado o íon molecular em m/z 220,3, referente à massa do composto desprotonada $[M-H]^-$. No espectro de massas de alta resolução em modo positivo, foram observados os íons moleculares em m/z 222,0760 $[M+H]^+$ e 244,0582 $[M+Na]^+$, sendo a possível massa do composto de 221,0680 Da.

Não foram encontrados compostos já citados na literatura através da busca no DPN, utilizando como palavras-chave a massa do composto e “*Penicillium*”. Quando realizada uma busca no DPN utilizando-se somente da massa do composto (221,06 Da), foram obtidos 22 resultados de compostos isolados de diversos organismos como o composto cappamensina A (CRC: NOX51-F), isolado de raízes da planta *Capparis sikkimensis* ssp. *formosana*, que apresentou atividade anticancerígena com $IC_{50} = 4 \text{ mg mL}^{-1}$ (WU et al., 2003); o composto streptovercillinona (CAS: 941687-54-3) isolado de *Streptomyces morookaense* (SC1169) apresentou atividade inibitória ao fungo *Peronophythora litchii* na concentração de $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ no estudo de Feng et al. (2007); o antibiótico NP25301 (CRC: OBD42-F) isolado, também, de *Streptomyces* sp. (UMA-044) (ZHANG et al., 2003), dentre outros compostos.

No estudo químico da fração F2b5, foi realizada separação por HPLC, obtendo-se 11 frações, sendo estas coletadas de acordo com a figura 49.

Figura 49 - Cromatograma da fração F2b5 monitorada em $\lambda = 254 \text{ nm}$

Condições de análise: coluna Phenomenex® Kinetex C₁₈ 100A (250 x 4,6 mm; 5 μm) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 30 minutos), vazão 1 mL min^{-1} , por 40 minutos.

Os perfis químicos das 11 frações foram obtidos por HPLC. As frações F2b5a, b, c, d, e, g, h, j e k, por se apresentarem muito complexas, não foram priorizadas.

A fração F2b5f foi analisada por HPLC-UV-MS para obtenção de seu perfil químico (Figura 50).

Figura 50 - Cromatograma da fração F2b5f monitorado em $\lambda = 230$ nm (a); espectro de absorção UV (b); espectro de massas em modo positivo (c); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (d)

Condições de análise: HPLC: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (50x2,1 mm; 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 16 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹, por 20 minutos; UPLC: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 m; 1,7 μ m) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ à 4° C, por 10 minutos

Para a fração F2b5f foi observado um composto com $\lambda_{\text{máx.}}$ 215,4 e 270,8 nm e, em seu espectro de massas, foram observados os íons moleculares em m/z 322,3 e 344,2, referentes à massa protonada $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, respectivamente. No espectro de massas de alta resolução em modo positivo, foi observado o íon em m/z 322,1547. Assim, pressupõe-se que a possível massa molar do composto seja de 321,1467 Da (Figura 50).

Buscando a massa do composto e utilizando a palavra-chave “*Penicillium*” no DPN, foi obtido o composto neoechinulina B (CAS: 55179-53-8) (Figura 51), isolado de *Penicillium griseofulvum*. Este composto foi primeiramente isolado de *Eurotium* sp. SF-5989, obtido de corais da Antártica, e é descrito como um potente inibidor de vírus *influenza* (KIM et al., 2013).

Figura 51 – Estrutura química da neoechinulina B

Foi obtido o espectro de RMN de ^1H (Anexo 9) para este composto. Entretanto os valores de deslocamentos não foram compatíveis com o composto de mesma massa molar encontrada no banco de dados DPN. Sendo assim, para a elucidação deste composto serão necessários adquirir os espectros bidimensionais.

No estudo da fração F2b5i seu perfil químico foi analisado por HPLC-UV-MS (Figura 52).

Figura 52 - Cromatograma da fração F2b5i monitorado em $\lambda = 290$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (d)

Condições de análise: HPLC: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (50x2,1 mm; 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 16 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹, por 20 minutos; UPLC: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 m; 1,7 μ m) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ à 4° C, por 10 minutos

O composto observado na fração F2b5i apresenta $\lambda_{\text{máx.}}$ em 206,0; 285,1; 369,5 e 388,7 nm. Foi observado no espectro de massas em modo positivo um íon molecular intenso em m/z 282,4 $[M+H]^+$, o qual foi observado, também, no espectro

Dos compostos descritos no DPN, alguns apresentam alguma atividade biológica, como os compostos decarestrictinas E-M, isolados de *P. simplicissimum* (FH-A 6090) e apresentaram atividade contra a biossíntese do colesterol (GRABLEY et al., 1992). O composto xantoe pocina, isolado da linhagem IFO5762, que apresentou atividade inibitória à *Bacillus subtilis* e *Stapylococcus aureus* (MIC= 0,78-1,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$), atividade inibitória à *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (MIC= 3,13-25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e atividade citotóxica à células tumorais (IC₅₀= 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (IGARASHI et al., 2000). Os alcalóides peniprequinolina, penigequinolona A e 3-metoxi-4,6-diidroxi-4-(4'-metoxifenil)quinolinona apresentaram atividade contra o nematoide *Pratulenchus penetrans* (patógeno de raízes) em 82,4%, 69,2% e 57,7% respectivamente, na concentração de 1g L⁻¹ (KUSANO et al., 2000).

Embora estudos relatem a atividade biológica de compostos produzidos por *P. simplicissimum*, não foram encontrados estudos na literatura sobre a atividade antileishmaniose de metabólitos secundários produzidos por este micro-organismo. Assim, a elucidação, identificação e, posterior ensaio biológico dos compostos isolados no presente estudo podem contribuir para a descoberta de novas moléculas ativas.

5.6 Estudo do fungo endofítico cód. P7AF2F3

5.6.1 Identificação taxonômica

O endófito P7AF2F3 foi isolado de folhas de *A. alcatrazense* utilizando-se o meio AF, um meio composto somente por nutrientes presentes nas folhas da mesma planta. Foi selecionado para estudo por apresentar um perfil espectral por *MALDI-TOF-MS* distinto e por apresentar características morfológicas únicas dentre todos os isolados.

A análise morfológica revelou colônias de aspecto leveduriforme de coloração escura apresentando micélios septados e conídios elipsoidais, de tamanhos variados. A partir das características morfológicas observadas, foi possível presumir que este isolado pertence ao gênero *Aureobasidium* (Figura 54).

Figura 54 - a) Endófito P7AF2F3 (verso e reverso da colônia) cultivado em meio de extrato de malte (2%); b) microscopia óptica (400x) evidenciando hifas (1) e os blastoconídios (2)

A sequência ITS obtida desse isolado foi comparada com outras sequências depositadas no banco de dados do GenBank onde foi obtido 100% de identidade com a espécie *Aureobasidium pullulans* (Figura 55a). Entretanto, a análise filogenética baseada com sequências de referência desse gênero revelou que o isolado P7AF2F3 agrupou-se com outros isolados identificados como *A. melanogenum* (Figura 55b).

Figura 55 - a) Comparação da sequência ITS obtido do isolado P7AF2F3 com aquelas depositadas no banco de dados GenBank (ident: porcentagem de identidade); b) Árvore filogenética baseada no marcador ITS demonstrando a posição filogenética do isolado P7AF2F3

Este gênero é formado por fungos com características leveduriformes (yeast-like fungi), cosmopolitas e popularmente conhecidos com leveduras negras devido a

sua produção de melanina (de HOOG, 1993). São fungos encontrados principalmente no solo, incluindo solos da Antártica, água, rochas, madeira e como epifíticos e endofíticos de plantas (OLSTORPE; SCHNURER; PASSOTH, 2010; URZI et al, 1999). Nos últimos anos, eles também foram encontrados amplamente distribuídos em habitats hipersalinos, águas costeiras, em alto mar, sedimentos marinhos da Antártida e sistemas de mangue (CHI et al, 2012; GUNDE-CIMERMAN, et al. 2000; ZHANG, et al. 2012).

O gênero *Aureobasidium* compreende 27 táxons (espécies e variedades), sendo *A. pullulans* o mais estudado destes. Embora a distinção entre variedades de *A. pullulans* tenha sido sugerida, este ainda é usado como principal fungo do gênero para busca em banco de dados (GOSTINCAR, et al. 2014).

Na tentativa de se chegar a uma taxonomia e filogenia mais precisa deste gênero, diversos loci já foram sequenciados como o ITS (internal transcribed spacer), espaço intergênico 1, tradução do fator-1 α de elongação, β -tubulina e RNA polimerase II (ZALAR, et al. 2008; CROUS, et al. 2011; PETERSON; MANITCHOTPSITI; LEATHERS, 2013; MANITCHOTPSITI, et al. 2009). Baseado nestas análises multilocus de uma seleção mundial de isolados de *A. pullulans*, foi confirmado que fungos antes descritos como uma variedade desta espécie, como exemplo *A. pullulans* var. *melanogenum*, são na realidade uma espécie distinta denominada *A. melanogenum* (GOSTINCAR, et al. 2014). Embora fosse necessário o sequenciamento de outras regiões do DNA para total confirmação à nível de espécie, o isolado P7AF2F3 teve como identificação a espécie *A. melanogenum* baseando-se na filogenia e na literatura.

A espécie *A. melanogenum* é um ascomiceto pertencente à classe Dothideomycetes, ordem Dothideales e família Dothioraceae (THAMBULAGA et al., 2014). Suas colônias são lisas, de crescimento rápido e cobertas por massas viscosas de conídios de coloração inicial creme tornando-se marrom ou preta. Suas hifas são hialinas e septadas, podendo apresentar coloração com a idade e adquirindo paredes espessas. Os conídios são hialinos de paredes lisas, elipsoidais, podendo apresentar tamanhos variáveis (RUSSEL; PATERSON; LIMA, 2016).

São fungos com distribuição mundial e diversas utilizações biotecnológicas. Recentemente são utilizados na produção de óleos para biodiesel (WANG et al., 2014), biodegradação enzimática de hidrocarbonetos poliaromáticos (LEELARUJI et al., 2014) e na produção de pululana, um polissacarídeo amplamente usado como

agente de revestimento, formador de biofilmes, usado na produção de cápsulas para suplementos alimentares, substituinte da gelatina, entre outros (LAZARIDOU et al., 2002). Mesmo sendo um fungo com diversas utilidades na indústria e biorremediação de ambientes, não existem estudos de seus metabólitos secundários como agente leishmanicida.

5.6.2 Metabólitos secundários com atividade antileishmaniose

O endófito *A. melanogenum* foi cultivado em maior volume (3,15 L) e particionado com o solvente n-butanol, gerando a fração butanólica (F1). A fração F1 foi submetida à cromatografia em coluna na condição 5 (item. 4.8.1.3), sendo obtidas 6 frações (F1a-F1f).

Através de análise química por CCD, foi observada na fração F1d a presença de compostos nitrogenados que reagiram com o revelador Dragendorff e, portanto, esta fração foi selecionada para a continuidade do estudo. Esta foi então submetida a cromatografia em coluna segundo a condição 6 (item 4.8.1.3), onde foram obtidas 3 frações (F1d1-F1d3). A análise química por CCD mostrou a presença dos compostos nitrogenados na fração F1d2. Esta fração foi fracionada por cromatografia de permeação em gel de acordo com a condição 7 (item 4.8.1.3), gerando 17 frações (F1d2a-q).

As 17 frações obtidas foram analisadas em HPLC para obtenção de seus perfis químicos. Dentre estas, a fração F1d2o se apresentou menos complexa, ou seja, com menor número de compostos. Nesta fração foi observado um pico intenso referente a um composto com tempo de retenção em 17,009 min (Figura 56).

Figura 56 - Cromatograma da fração F1d2o monitorada em $\lambda = 254$ nm

Condições de análise: coluna Phenomenex® Kinetex C₁₈ 100A (250 x 4,6 mm; 5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 30 minutos), vazão 1 mL min⁻¹, por 40 minutos.

A fração F1d2o foi, então, purificada em HPLC para obtenção do composto puro F1d2o2, o qual teve seu perfil químico analisado por HPLC-UV-MS (Figura 57).

Figura 57 - Cromatograma da fração F1d2o2 monitorado em $\lambda = 225$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c) e negativo (d)
Condições de análise: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (50x2,1 mm; 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 16 minutos), vazão 0,5 mL min⁻¹, por 20 minutos.

Pela análise dos dados obtidos, foi observado sinais em m/z 183,3 no espectro de massas em modo positivo e m/z 181,4 no espectro de massas em modo negativo, referentes à massa do composto protonada $[M+H]^+$ e desprotonada $[M-H]^-$. Assim, foi realizado uma busca no DPN por compostos com massa molecular de 182,3 Da e utilizado como palavras-chave “*Aureobasidium*” ou “fungus”. Entretanto, não foram encontrados compostos compatíveis na busca.

Visando identificar este composto, foi realizada uma análise por UPLC-HRMS, sendo obtido o espectro de massas de alta resolução em modo positivo (Figura 58).

Figura 58 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração F1d2o2.

Condições de análise: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 m; 1,7 µm) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ à 4° C, por 10 minutos

No espectro de massas de alta resolução foi observado o sinal em m/z 183,0657 $[M+H]^+$, corroborando o íon molecular encontrado previamente para este composto no espectro de massas de baixa resolução. Sendo assim, a possível massa do composto foi determinada como 182,0577 Da.

Como não foram encontrados compostos na literatura utilizando-se de palavras-chave, foi realizada nova busca utilizando como palavra-chave a massa do composto (182,05 Da) produzida por diferentes fontes biológicas. Foram obtidos 150 resultados de possíveis compostos para a massa analisada.

A fração F1d2o2 foi, então, submetida à análise de RMN de 1H (ANEXO 10). Comparando os valores de deslocamento de hidrogênio do composto isolado com a literatura foi compatível com o composto metil-orsellinato. Os valores de RMN 1H foram comparados com o estudo de Li et al. (2006) (Tabela 10).

Tabela 10 – Comparação dos dados de RMN 1H do composto F1d2o2 (DMSO- d_6 / 600 MHz) e do metil-orsellinato (Acetona- d_6 / 500 MHz)

Metil-orsellinato - δ_H , multiplicidade e J (Hz)		
Posição do H	F1d2o2	Li et al. (2006)
3	6,16 d (1,73)	6,23 d (1,8)
5	6,17 d (2,34)	6,29 d (2,35)
8 (CH ₃)	2,28 s	2,45 s
9 (CH ₃)	3,80 s	3,91 s

s: singleto; d: dupletto.

δ_H : deslocamento de hidrogênios; J : constante de acoplamento.

Pela análise do espectro de RMN ^1H foi possível verificar os valores de deslocamento químico dos hidrogênios de 2 metilas em δ 2,28 (s, $\text{CH}_3\text{-8}$) e δ 3,80 (s, $\text{CH}_3\text{-9}$) e pelos deslocamentos de hidrogênios nos carbonos 3 e 5, com valores em δ 6,16 (d, $J=1,73$ Hz, H-3) e δ 6,17 (d, $J=2,34$ Hz, H-5).

Os valores de massa molecular e de deslocamento químico, multiplicidade e constante de acoplamento foram compatíveis com o composto da literatura e, portanto, não foram necessárias análises adicionais. Assim, foi confirmado que o composto F1d2o2 produzido por *A. melanogenum*, isolado de *A. alcatrazense* refere-se ao composto Metil-orsellinato (CAS: 3187-58-4) (Figura 59).

Figura 59 – Estrutura química do composto metil-orselinato (CAS: 3187-58-4)

O composto metil-orselinato é um metabólito secundário formado por um orcinol, ou seja, apresenta em sua estrutura um fenol que ocorre geralmente em líquens. Possui o nome químico metil-2,4-dihidroxi-6-metilbenzoato, fórmula estrutural $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$ e $\lambda_{\text{máx.}}$ em 203, 217, 263 e 300 nm.

De acordo com a literatura, o composto metil-orselinato é comumente isolado de várias espécies de líquens coletados em diversos ambientes. Relatos apontam sua produção pelo líquen *Stereocaulon alpinum*, coletado na Antártica (SEO et al. 2009); *Parmotrema tsavoense*, coletado no Vietnã (DUONG et al., 2015); *Peltigera leucophlebia* e *Peltigera aphthosa*, coletados na Islândia (INGÓLFSDÓTTIR et al. 1985; 2002); *Pseudocyphellaria nudata*, uma espécie endêmica da América do Sul (CUELLAR et al., 2008). Outros organismos são capazes de produzir este composto como o musgo *Plagiochila killarniensis* (RYCROFT et al., 1999), a planta *Rhododendron primulaeflorum* (LI et al., 2008) e o fungo basidiomiceto *Sparassis crispa* (WOODWARD et al., 1993).

Alguns estudos apontam o potencial biológico do metil-orselinato. Em um estudo onde esse composto foi isolado da parte aérea de *Flourensia cernua*, foi

constatada sua atividade fitotóxica contra plantas da *Amaranthus hypochondriacus* ($IC_{50}= 9,2 \cdot 10^{-4}$ M) e *Echinochloa crus-galli* ($IC_{50}= 3,1 \cdot 10^{-4}$ M) utilizando-se teste em placas de Petri (MATA et al., 2003). As propriedades fitotóxicas deste composto já haviam sido demonstradas no estudo de Rojas et al. (2000). Sua atividade foi constatada também no estudo de Seo et al. (2009), onde o metil-orselinato isolado do líquen *Umbilicaria antartica* apresentou atividade inibitória ($IC_{50} = 277,6 \mu\text{M}$) à proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), uma proteína relacionada com a diabetes tipo 2 e obesidade.

O metil-orselinato isolado do líquen *Parmotrema tinctorum* apresentou atividade antioxidante pelo teste do DPPH com $IC_{50}=167,25$ mM (LOPES et al., 2008). Este composto, isolado da mesma espécie de líquen, apresentou atividade contra células de carcinoma em valores de $IC_{50} \geq 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (BOGO et al., 2010).

Com excessão do basidiomiceto *Sparassis crispa* (citado acima), não foram encontrados estudos que apontem a produção do metil-orselinato por outros micro-organismos, sendo relatado pela primeira vez como um metabólito secundário de *Aureobasidium melanogem* no presente estudo.

As frações **F1a, b, c, e, f; F1d1, 3 e F1d2a-q**, obtidas nas etapas cromatográficas foram avaliadas ensaio de atividade antileishmaniose e os resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Porcentagem de atividade antileishmaniose de 24 frações de *A. melanogenum*

Fração	Atividade leishmanicida % de morte do parasita	Fração	Atividade leishmanicida % de morte do parasita
F1a	0	F1d2f	0
F1b	0	F1d2g	0
F1c	0	F1d2h	0
F1e	0	F1d2i	0
F1f	0	F1d2j	0
F1d1	0	F1d2k	0
F1d3	0	F1d2l	100
F1d2a	0	F1d2m	0
F1d2b	0	F1d2n	0
F1d2c	0	F1d2o	0
F1d2d	0	F1d2p	0
F1d2e	0	F1d2q	0

Ensaio realizado na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$

Das 24 frações enviadas para ensaio antileishmaniose somente a fração F1d2I apresentou composto(s) capazes de causar 100% de inibição de *L. infantum*. Esta fração foi separada por HPLC, sendo geradas 15 frações (Figura 60).

Figura 60 - Cromatograma da fração F1d2I monitorada em $\lambda = 310$ nm

Condições de análise: coluna Phenomenex® Kinetex C₁₈ 100A (250 x 4,6 mm; 5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 30 minutos), vazão 1 mL min⁻¹, por 40 minutos.

As 15 frações foram analisadas por HPLC para obtenção de seus perfis químicos. Destas, as frações F1d2I10 e F1d2I11 apresentaram, aparentemente, apenas 1 composto. As demais frações (F1d2I1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14 e 15) se apresentaram muito complexas e, portanto, não foram priorizadas.

No estudo da fração F1d2I10 foi realizada análise por HPLC-UV-MS para obtenção de seu perfil químico (Figura 61).

Figura 61 - Cromatograma da fração F1d2I10 monitorado em $\lambda = 296$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (d)

Condições de análise: HPLC: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (50x2,1 mm; 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 16 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹, por 20 minutos; UPLC: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 mm; 1,7 μ m) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ à 4° C, por 10 minutos

A fração F1d2I10 apresentou um composto com λ_{max} em 206 e 287,4 nm. No espectro de massas em modo positivo foi observado um sinal em m/z 394,4 [M+H]⁺. Este sinal também foi observado no espectro de massas de alta resolução em modo

positivo (394,347 [M+H]⁺), sendo a possível massa molar do composto de 393,3391 Da.

Quando realizada uma busca no DPN utilizando-se somente da massa do composto (393,33 Da), foram obtidos 2 resultados de compostos, a oncinotina-11-ona (CAS: 181486-83-9) e a oncinotina-12-ona (CAS: 181486-84-0) (Figura 62). Estes compostos são alcaloides isolados de folhas de *Oncinotes tenuiloba* por Doll; Guggisberg; Hesse (1996). Não foram encontrados relatos de compostos com esta massa produzidos por micro-organismos.

Figura 62 – Estruturas químicas dos composto oncinotina-11-ona e oncinotina-12-ona

Foi obtido o espectro de RMN de ¹H (Anexo 11) para este composto. Entretanto os valores de deslocamentos não foram compatíveis com os compostos de mesma massa molar encontrada no banco de dados DPN. Sendo assim, para a elucidação deste composto serão necessários adquirir os espectros bidimensionais.

Para o estudo da fração F2d2l11, esta foi analisada por HPLC-UV-MS (Figura 63).

Figura 63 - Cromatograma da fração F1d2l11 monitorado em $\lambda = 263$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c) e negativo (d); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (e)

Condições de análise: HPLC: coluna Waters X-Terra MS- C_{18} (50x2,1 mm; 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H_2O em MeOH/ACN (proporção inicial de H_2O :MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 16 minutos), vazão: 0,5 mL min^{-1} , por 20 minutos; UPLC: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C_{18} (2,1 x 50 m; 1,7 μ m) com fase móvel em gradiente de H_2O em ACN (proporção inicial de H_2O :ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min^{-1} à 4° C, por 10 minutos.

A fração F1d2l11 apresentou um composto com λ_{max} em 217,7; 264,9 e 300,5 nm. No espectro de massas em modo positivo foram observados os sinais em m/z 295,3 $[M+H]^+$ e 317,3 $[M+Na]^+$, 589,4 $[2M+H]^+$ e 611,4 $[2M+Na]^+$. No espectro de massas em modo negativo foi observado o sinal em m/z 293,4 $[M-H]^-$. No espectro

de massas de alta resolução em modo positivo foi observado somente o íon molecular em m/z 295,1551 $[M+H]^+$, sendo assim, a possível massa molar do composto é de 294,1471 Da.

Quando realizada uma busca no DPN utilizando-se a massa do composto (294,14 Da) e a palavra-chave “Fungus”, foi obtido como resultado o composto 14,15-secocurvularina (CRC: BOW67-H), um composto isolado de um fungo não identificado obtido da esponja marinha *Spirastrela vagabunda* (ABRELL et al., 1996) (Figura 64).

Figura 64 – Estrutura química do composto 14,15-secocurvularina

Foi obtido o espectro de RMN de 1H (Anexo 12) para este composto. Entretanto os valores de deslocamentos não foram compatíveis com os compostos de mesma massa molar encontrada no banco de dados DPN. Sendo assim, para a elucidação deste composto serão necessários adquirir os espectros bidimensionais.

Além dos compostos F1d2l10 e F1d2l11 isolados a partir da fração com atividade antileishmaniose, outras 2 frações foram purificadas e apresentaram apenas um composto.

No estudo da fração F1d2n3, seu perfil químico foi obtido por HPLC-UV-MS (Figura 65).

Figura 65 - Cromatograma da fração F1d2n3 monitorado em $\lambda = 250$ nm (a); espectro de absorção do UV (b); espectro de massas em modo positivo (c) e negativo (d); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (e)

Condições de análise: HPLC: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (50x2,1 mm; 3,5 μ m) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 16 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹, por 20 minutos; UPLC: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 m; 1,7 μ m) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ à 4° C, por 10 minutos

Esta fração apresenta um composto com λ_{max} em 220,1; 259 e 3518 nm. No espectro de massas em modo positivo, foram observados os íons moleculares em m/z 243,2 [M+H]⁺, 265,3 [M+Na]⁺ e 485,3 [2M+H]⁺. No espectro de massas em modo

negativo foi observado o íon molecular em m/z 241,5 $[M-H]^-$. No espectro de massas de alta resolução em modo positivo foi observado o íon molecular em m/z 243,087 $[M+H]^+$, sendo a possível massa do composto de 242,0792 Da.

Quando realizada uma busca no DPN utilizando-se a massa do composto (294,14 Da) e a palavra-chave “Fungus”, foi obtido como resultado o composto 1,3-Dihidro-4,5,6-trihidroxi-7-metil-1,3-dimetoxiisobenzofurano (CAS: 151325-14-3) (Figura 66), com λ_{max} em 208; 230 e 268 nm, isolado de um fungo não identificado (cód. F-124), com atividade inibitória à enzima peroxidase (KOBAYASHI et al., 1993).

Figura 66 - Estrutura química do composto 1,3-Dihidro-4,5,6-trihidroxi-7-metil-1,3-dimetoxiisobenzofurano

Foi obtido o espectro de RMN de 1H (Anexo 13) para este composto. Entretanto os valores de deslocamentos não foram compatíveis com o composto de mesma massa molar encontrada no banco de dados DPN. Por exemplo, não são observados no espectro de RMN adquirido para o composto isolado valores de deslocamentos químicos na região de 7 ppm, típico de deslocamentos de hidrogênio de anéis aromáticos.

No estudo da fração F1d2g1 foram obtidos os cromatogramas e espectros para análise do perfil químico (Figura 67).

Figura 67 - Cromatograma da fração F1d2g1 (a); espectro de massas da fração F1d2g1 (b); espectro de massas em modo positivo (c); espectro de massas de alta resolução em modo positivo (d)

Condições de análise: HPLC: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (50x2,1 mm; 3,5 µm) com eluição em modo gradiente de H₂O em MeOH/ACN (proporção inicial de H₂O:MeOH:ACN (90:5:5) e MeOH:ACN (1:1) após 16 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹, por 20 minutos; UPLC: coluna Waters® ACQ UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 50 m; 1,7 µm) com fase móvel em gradiente de H₂O em ACN (proporção inicial de H₂O:ACN (98:2) e ACN (100%) após 9 minutos), vazão: 0,5 mL min⁻¹ à 4° C, por 10 minutos

O composto presente na fração F1d2g1 não possui absorbância no UV, entretanto reage com o revelador de Dragendorff, indicando que este composto pode ser um alcalóide ou um composto nitrogenado. No espectro de massas foi possível observar um composto com tempo de retenção em 4,65 min. Foi observado um sinal em m/z 186,4, referente a massa protonada $[M+H]^+$. No espectro de

massas alta resolução em modo positivo foi observado o íon molecular em m/z 186,2260, referente à massa do composto protonada $[M+H]^+$, sendo a possível massa do composto de 185,2180 Da.

Por meio de buscas no banco de dados do DNP e na literatura, não foi encontrado nenhum composto com essa massa molecular. A massa encontrada para este composto indica a presença de nitrogênio na molécula, o que corrobora o resultado da análise química por CCD. Análises adicionais poderão ajudar a elucidar a estrutura deste composto.

O fluxograma abaixo sumariza o estudo dos metabólitos secundários de *A. melanogenum* com potencial atividade antileishmaniose (Figura 68).

Figura 68 - Fluxograma do estudo químico do fungo endofítico *A. melanogenum* (P7AF2F3) com atividade antileishmaniose
m= massa da fração; fração em destaque apresentou 100% de atividade; Frações em negrito = puras.

Fungos do gênero *Aureobasidium*, com destaque para a espécie *A. pullulans*, são utilizados na indústria por produzirem o polissacarídeo pululana. Entretanto, de acordo com uma busca feita no DPN, foram encontrados somente 17 compostos identificados produzidos por fungos deste gênero. Dentre estes, pode-se citar a aureobasidina (CAS: 1158821-31-8), um composto anti-incrustante isolado de *Aureobasidium* sp. de origem marinha e que também apresentou atividade antimicrobiana (ABDEL-LATEFF et al., 2009) e a aureoquinona (CRC: JTH42-S), um novo inibidor enzimático que apresenta atividade à diversas proteases como tripsina, papaína, termolisina, colegenase e zinco-protease (BERG et al., 2000).

No presente estudo, as frações obtidas deste micro-organismo apresentam potencial atividade antileishmaniose, entretanto é necessária a elucidação dos compostos puros e posterior ensaio biológico para determinar quais compostos são responsáveis pela atividade. Embora existam alguns estudos demonstrando a capacidade de fungos do gênero *Aurobasidium* em produzir compostos ativos, não foi encontrado na literatura compostos isolados, sendo que este é o primeiro relato do isolamento de compostos de *A. melanogenum*.

6 CONCLUSÕES

No presente estudo foi realizado o isolamento de fungos endofíticos de plantas do gênero *Anthurium*: *A. loefgrenii* (cód. P2), nativa da Mata Atlântica e *Anthurium alcatrazense* (cód. P7), endêmica da Ilha de Alcatrazes.

Para o isolamento dos fungos endofíticos foram utilizados 10 meios de cultivo com diferentes composições nutritivas, o que permitiu o isolamento de uma maior quantidade e variedade de fungos endofíticos, totalizando 106 isolados. O maior número de isolados foi obtido dos meios de cultivo que continham fragmentos da folha infundidas.

Estes isolados foram analisados por espectrometria de massas por MALDI-TOF, onde foi possível agrupá-lo de acordo com seu perfil espectral, gerando um dendrograma de MSP. Foi possível inserir nesta análise linhagens certificadas (identificadas por técnicas morfológicas e moleculares) para comparar com os isolados. Com isso, algumas chaves agruparam isolados que apresentaram alta similaridade com gêneros comuns de endófitos, como *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Xylaria*.

Com base no dendrograma gerado foram priorizados 2 isolados (cód. P210⁴F2 e P7AF2F3) para estudo químico, pelo fato de terem apresentado apenas 1 ou no máximo 2 isolados na mesma chave. Além disto, foram observadas características morfológicas diferenciadas.

Dentre os 106 isolados, foram selecionados 60 para avaliação biológica antifúngica de seus metabólitos secundários. Após a obtenção da fração AcOEt, estas foram avaliadas em ensaio “*in vitro*” pelo método de difusão em disco contra 4 fitopatógenos de revelância na agricultura. Neste estudo, o isolado P2MSF2F3 se destacou por produzir compostos que inibiram os 4 fitopatógenos: *Phomopsis sojae* (41,53%), *Colletotrichum lindemuthianum* (41,12%), *Colletotrichum gloeosporioides* (28,04%), e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (25,64%).

Ao todo, foi realizado o estudo de 3 fungos que foram identificados por técnicas morfológicas e moleculares como sendo *Penicillium citrinum* (cód. P2MSF2F3), *Penicillium simplicissimum* (cód. P210⁴F2) e *Aureobasidium melanogenum* (cód. P7AF2F3).

No estudo com os metabólitos secundários de *P. citrinum*, foi isolado o composto citrinina que apresentou atividade inibitória superior ou igual aos

fungicidas comerciais Score[®], Captan SC[®] e Dithane NT[®] em ensaio por difusão em disco (1mg de composto ativo). As concentrações mínimas inibitórias do composto citrinina foram de 125 µg mL⁻¹ (*C. gloeosporioides* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*), 0,48 µg mL⁻¹ (*C. lindemuthianum*) e 250 µg mL⁻¹ (*P. sojae*). No melhor de nosso entendimento, este é o primeiro estudo relatando a atividade inibitória da citrinina contra estas espécies de fitopatógenos.

Outras frações obtidas do meio metabólico de *P. citrinum* (frações F3a3 e citrinina) apresentaram atividade inibitória (100% de inibição) à formas promastigotas de *Leishmania infantum*.

No estudo dos metabólitos secundários de *P. simplicissimum* foi obtida a fração F2b que apresentou atividade inibitória à *L. infantum* (100% de inibição). Desta foram isolados os compostos andrastina A e penicisoquinolina, sendo este o primeiro relato da produção destes compostos por *P. simplicissimum*.

Ainda, foram isolados da fração F2b de *P. simplicissimum* 5 compostos não identificados até o momento.

No estudo dos metabólitos secundários de *A. melanogenum* foi isolado o composto metil-orselinato, um composto geralmente produzido por líquens, sendo este o primeiro relato de sua produção por esta espécie de fungo.

A fração F1d2I, isolado de *Aureobasidium melanogenum*, apresentou atividade antileishmaniose (100% de inibição), sendo isolado desta os compostos F1d2I10 e F1d2I11, ainda não identificados.

Foram isolados, ainda, do meio metabólico de *A. melanogenum* os compostos F1d2n3 e F1d2g1, ainda não identificados.

As frações ainda não identificadas estão em processo de elucidação estrutural sendo, possivelmente, compostos inéditos e/ou nunca descritos para estes micro-organismos.

Estudos químicos e biológicos de fungos endofíticos isolados de plantas de ilhas são escassos no Brasil, sendo este o primeiro relato de metabólitos secundários obtidos de fungos endofíticos de antúrios da ilha de Alcatrazes. Este trabalho apresenta contribuição no conhecimento sobre fungos endofíticos e seu potencial metabólico com aplicações nas áreas agrônoma e médico-farmacológica.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-LATEFF, A.; ELKHAYAT, E.S.; FOUAD, M.A.; OKINO, T. Aureobasidin, new antifouling metabolite from marinederived fungus *Aureobasidium* sp. **Natural Product Communications**, Westerville, v.4, n.3, p.389-394, 2009.
- ABRAMSON, D.; HULASARE, R.; WHITE, N.D.G.; JAYAS, D.S.; MARQUARDT, R.R. Mycotoxin formation in hulless barley during granary storage at 15 and 19% moisture content. **Journal of Stored Products Research**, Long Island, v.35, p.297-305, 1999.
- ABRELL, L.M.; BROGESON, B.; CREWS, P. A new polyketide, secocurvularin, from the salt water culture of a sponge derived fungus. *Tetrahedron*, Oxford, v.37, n.50, p.8983-8984, 1996.
- AFZAL-KHAN, S.; HAMAYUN, M.; YOON, H.; KIM, H.Y.; SUH, S.J.; HWANG, S. K.; KIM, J.M.; LEE, I. J.; CHOO, Y.S.; YOON, U.H.; KONG, W.S.; LEE, B.M.; KIM, J.G. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. **BMC Microbiology**, London, v.8, p.231-241, 2008.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. San Diego: Academic Press, 2005. 952p.
- ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.F.V.; GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 581p.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. Who Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, San Francisco, v.7, p.5, 2012.
- ANDRIOLI, W.; CONTI, R.; MANFRIM, V.; TOLEDO, J.; CRUZ, A.; NANAYAKKARA, D.; ARAÚJO, J.; PUPO, M.; BASTOS, J. Antileishmania activity of isochromenes from an unidentified endophytic fungus isolated from *Spermacoce verticillata* L. **Planta Medica**, Stuttgart, v.76, p.438-443, 2010.
- ANDRZEJ, C. Coexistence and coevolution: various levels of interactions I. Internal fungi (endophytes) and their biological significance in coevolution. **Wiadomosci Botaniczne**, Kraków, v.46, p.35, 2002.
- ÂNGELO, S. **Ilhas do Litoral Paulista**. São Paulo –SP: Secretaria do Meio Ambiente, 1989. ISSN 0103-264X49p. (Série Documentos)
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 274 de 15 do outubro de 2002**, publicada no Diário Oficial da União, de 16/10/2002. Acesso em: 10 ago. 2008. Online. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 05 jun. 2016.

ARAÚJO, W.L.; LACAVA, P.T.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; KUKLIMSKYSOBRAL, J.; KLEINER-PIZZIRANI, A.A.; AZEVEDO, J.L. (Coord.). **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2010. 167p.

ARNOLD, A.E.; MEJÍA, L.C.; KYLLO, D.; ROJAS, EL.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E.A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.100, p.15649-15654, 2003.

ARORA, D.S.; CHANDRA, P. In vitro antioxidant potential of some soil fungi: screening of functional compounds and their purification from *Penicillium citrinum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.165, n.2, p.639-651, 2011.

ARZANLOU, M. Molecular characterization of *Aureobasidium* species in Iran. **Research in Molecular Medicine**, Manhasset, v.2, n.2, p.28-33, 2014.

ASSUMPÇÃO, L.C.; LAÇA, P.T.; DIAS, A.C.F.; AZEVEDO, J.L.; MENTEN, J.O.M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.5, p.503-510, 2009.

ATHOW, K.L.; CALDWELL, R.M. A comparative study of *Diaporthe* stem canker and pod and stem blight of soybean. **Phytopathology**, Ithaca, v.44, p.319-325, 1954.

AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v.119, p. 238-258, 2004.

AZEVEDO, J.L. Micro-organismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p.117-137.

AZEVEDO, J.L.; JUNIOR, W.M.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Environmental Biotechnology**, Gronity, v.3, n.1, p.40-64, 2000.

AZEVEDO, L.A.S. **Fungicidas protetores** – fundamentos para uso racional. Campinas: Emopi Edit. e Graf., 2003. 320p.

AZIZ, N.H.; MOUSSA, L.A.A. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. **Food Control**, Guildford, v.13, p.281-288, 2002.

BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J.A.; JEGGER, M.J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p.88-120.

BAILLY, J.D.; QUERIN, A.; LE BARS-BAILLY, S.; BENARD, G.; GUERRE, P. Citrinin production and stability in cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v.65, n.8, p.1317-1321, 2002.

BAKHSH, A.; IQBAL, S.M.; HAQ, I.K. Evolution of chickpea germplasm for wilt resistance, **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v.39, n.2, p.583-593, 2007.

BARBER, J.; CARTER, R.H.; GARSON, M.J.; STAUNTON, J. The biosynthesis of citrinin by *Penicillium citrinum*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, London, v.1, p.2577-2583, 1981.

BARBIERI, R.; CARVALHO, I.F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, p.79-83, 2001.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E.M.; REED, S.G. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v.17, p.21-28, 1995.

BASANO, S.A; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, n.3, p.328-337, 2004.

BAUTISTA-BAÑOS, S. **Postharvest Decay. Control Strategies**. Local:Academic Press/Elsevier, 2014. 373 p.

BÉRDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. **The Journal of antibiotics**, Tokyo, v.65, n.8, p.385-395, 2012.

BERG, A.; GORLS, H.; DÖRFELT, H.; WALTHER, G.; SCHLEGEL, B.; GRAFE, U. Aureoquinone, a New Protease Inhibitor from *Aureobasidium* sp. **The Journal of antibiotics**, Tokyo, v.53, n.2, p.1293-1295, 2000.

BERGSTEN-TORRALBA, L.R.; NISHIKAWA, M.M.; BAPTISTA, D.F.; MAGALHÃES, D.P.; DA SILVA, M. Decolorization of different textile dyes by *Penicillium simplicissimum* and toxicity evaluation after fungal treatment. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v.40, p.808-817, 2009.

BERNDT, W.O. Ochratoxin–citrinin as nephrotoxins. In: LLEWELLYN, G.C. REAR, P.C.O (Ed.), **Biodegradation Research**, New York, v.3, p.55–56, 1990.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. v.2, 774p.

BLANC, P.J.; LORET, M.O.; GOMA, G. Production of citrinin by various species of *Monascus*. **Biotechnology Letters**, Kew, v.17, n.3, p. 291-294, 1995.

BOGO, D.; MATOS, M.F.C.; HONDA, N.K.; PONTES, E.C.; OGUMA, P.M.; SANTOS, E.C.S.; CARVALHO, J.E.; NOMIZO, A. *In vitro* antitumour activity of orsellinates. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Tübingen, v.65, p.43-48, 2010.

BORIES, C.; COJEAN, S.; HUTEAU, F.; LOISEAU, P.M. Selection and phenotype characterization of sitamaquine-resistant promastigotes of *Leishmania donovani*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, New York, v.62, p.164–167, 2008.

BOZDOGAN, A.M. Assessment of total risk on non-target organisms in fungicide application for agricultural sustainability. **Sustainability**, Basel, v.6, p.1046-1058, 2014.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 182 p.

BUNBAMRUNG, N.; INTARAUDOM, C.; BOONYUEN, N.; RACHTAWEE, P.; LAKSANACHAROEN, P.; PITTAYAKHAJONWUT, P. Penicisochromans from the endophytic fungus *Penicillium* sp. BCC18043. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v.10, p.13-18, 2014.

CAFÊU, M.C.; SILVA, G.H.; TELES, H.L.; BOLZANI, V.S.; ARAÚJO, Â.R.; YOUNG, M.C.M.; PFENNING, L.H. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n.6, p.991-995, 2005.

CALLOTTE, V. *Anthurium* aristocracy. **New Zealand Garden Journal**, Wellington, v.7, n.1, p.3-5, 2004.

CAMPOS, F.F.; SALES JUNIOR, P.A.; ROMANHA, A.J.; ARAÚJO, M.S.S.; SIQUEIRA, E.P.; RESENDE, J.M.; ALVES, T.M.A.; MARTINS-FILHO, O.A.; SANTOS, V.L.; ROSA, C.A.; ZANI, C.L.; COTA, B.B. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.110, n.1, p.65-74, 2015.

CANNON, P.F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P.R.; WEIR, B.S. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, Baarn, v.73, p.181–213, 2012.

CANNON, P.F.; SIMMONS, C.M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, Lancaster, v.94, p.210-220, 2002.

CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v.1, n.2, p.18-24, 2001.

CANTRELL, C.L.; DAYAN, F.E.; DUKE, S.O. Natural products as sources for new pesticides. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.75, n.6, p. 1231-1242, 2012.

CAREY, F.A. **Química Orgânica**. 7.ed. São Paulo: Editora McGraw Hill, 2011. v.1, 764p.

CARMONA, M.A.; SCADIANI, M.M.; LUQUE, A.G. **A seca da haste e da vagem**. In: REIS, E. M.; CASA, R.T. Doenças da soja: etiologia, sintomatologia, diagnose e manejo integrado. Passo Fundo: Berthier, 2012. p.243-255.

CARVALHO, G.M.L.; ANDRADE FILHO, J.D.; FALCÃO, A.L.; LIMA, A.C.V.M.; GONTIJO, C.M.F. Naturally infected *Lutzomyia* sand flies in a *Leishmania*-endemic area of Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v.8, p.407-414, 2008.

CARVALHO, I.T. **Microbiologia dos alimentos**. Recife: EDUFRPE, 2010. 84p.

CARVALHO, S.F.G. **Utilização de baixas doses de desoxicolato de anfotericina B no tratamento da Leishmaniose Visceral em crianças e adolescentes**. Montes Claros: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, 2000. 107p.

CASE, T.J.; CODY, M.L. Testing theories of island biogeography. **American Scientist**, New Haven, v.75, n.4, p.402-411, 1987.

CASTELLANI, A. Viability of Mold Culture of Fungi in Distilled Water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v.42, p.225, 1939.

CATALOGUE OF LIFE. Disponível em: <http://www.catalogueoflife.org/> Acesso em: 23 jan. 2016.

CAVALCANTI, L.S.; COELHO, R.S.B.; PEREZ, J.O. Utilização de dois métodos de inoculação na avaliação da resistência de cultivares e linhagens de feijoeiro a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.1-5, 2002.

CAVALIERI, S.J.; HARBECK, R.J.; McCARTER, Y.S.; ORTEZ, J.H.; RANKIN, I.D.; SAUTTER, R.L.; SHARP, S.E.; SPIEGEL, C.A. **Manual of antimicrobial susceptibility testing**. Seattle: American Society for Microbiology, 2005. 236p.

CHEN, H.Y.; CHEN, Y.C. Characterization of intact *Penicillium* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, Chichester, v.19, p.3564–3568, 2005.

CHEN, S.H.; TING, A.S.Y. Biosorption and biodegradation potential of triphenylmethane dyes by newly discovered *Penicillium simplicissimum* isolated from indoor wastewater sample. **International Biodeterioration & Biodegradation**, cidade, v. 103, p.1-7, 2015.

CHI, Z.M.; WANG, F.; CHI, Z.; YUE, L.; LIU, G.; ZHANG, T. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.82, n.5, p.793-804, 2012.

CHIRAC, P.; TORREELE, E. Global framework on essential health R&D. **Lancet**, London, v.367, p.1560-1561, 2006.

CHOUHAN, G.; OZBAK, H.A.; HEMEG, H.A.; AFRIN, F. Leishmanicidal compounds of natural origin: their prospective mantle in antileishmanial therapy. In: MÉNDEZ, A. -VILAS, (Ed.). **The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs** p.174-184, 2015.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M.A.; WALSH, C.T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature Biotechnology**, New York, v.24, n.12, p.1541-1550, 2006.

COELHO, M.A.N. Araceae do estado de São Paulo. In: MAMEDE, M.C.H.; SOUZA, V.C.; PRADO, J.; BARROS, F.; WANDERLEY, M.G.L.; RANDO, J.G. (Ed.). **Livro vermelho das espécies vegetais ameaçadas do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2007. p.53-56.

COELHO, M.A.N. *Anthurium*. In: WANDERLEY et al. (Ed.). **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2012. 74 p.

COELHO, M.A.N.; CATHARINO, E.L.M. Duas espécies novas de *Anthurium* (araceae) endêmicas do litoral de São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.59, n.4, p.829-833, 2008.

COELHO, M.A.N.; MAYO, S.J. Typifications of names of Brazilian taxa of *Anthurium* sect. *Urospadix* (Araceae). **Taxon**, Utrecht, v.56, p. 211-225, 2007.

COELHO, M.A.N.; WAECHTER, J.L.; MAYO, S.J. Revisão Taxonômica das Espécies de *Anthurium* (Araceae) sect. *Urospadix* subsect. *Flavescentiviridia*. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.60, p. 799-864, 2009.

COSTA, E.C.; TEIXEIRA, M.F.S.; DANTAS, T.V.M.; MELO, V.S.P.; ARAUJO, S.A. C.; ROLIM, B.N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, Goiânia, v.19, n. 2, p.111-122, 2009.

COSTA, E.L.N.; SILVA, R.F.P.; FIUZA, L.M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v.26, n.2, p.173-85, 2004.

COSTA, M.L.J. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v.75, n.1, p.3-17, 2005.

COSTA, R.V.; COTA, L.V.; PARREIRA, D.F.; SILVA, D.D.; GUIMARAES, P.E.O.; GUIMARÃES, L.J.M.; PARENTONI, S.N.; PACHECO, C.A.P. **Desenvolvimento de metodologia para inoculação de *Colletotrichum graminicola* em colmo de milho**. EMBRAPA Milho e Sorgo, 2010. 8p. (Circular técnica 139),

COX, R.H.; HERNANDEZ, O.; DORNER, J.W.; COLE, R.J.; FENNELL, D.I. A new isochroman mycotoxin isolated from *Penicillium steckii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.27, n.5, p.999-1001, 1979.

CROAT, T.B. Ecology and life forms of Araceae. **Aroideana**, Miami, v.11, p.4-56, 1988.

CROAT, T.B.; VANNINI, J.P.A Reexamination of *Anthurium dressleri* Croat (Araceae) and a Description of a New Species of *Anthurium* Schott from Panama. **Aroideana**, Miami, v.33, p.161-167, 2010.

CROTTI, A.E.M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.2, p.287-292, 2006.

CROUS, P.W.; SUMMERELL, B.A.; SWART, L.; DENMAN, S.; TAYLOR, J.E.; BEZUIDENHOUT, C.M.; PALM, M.E.; MARINCOWITZ, S.; GROENEWALD, J.Z. Fungal pathogens of *Proteaceae*. Molecular phylogeny and evolution of fungi. **Persoonia**, Leiden v.27, n.26, p.20-45, 2011.

CRUZ, R.; CRUZ, V.D.A.; BELOTE, J.G.; KHENAYFES, M.O.; DORTA, C.; OLIVEIRA, L.H.S.; ARDILES, E.; GALL, A. Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. **Bioresource Technology**, Barking, v.70, n.2, p.165-171, 1999.

CUELLAR, M.; QUILHOT, W.; RUBIO, C.; SOTO, C.; ESPINOZA, L.; CARRASCO, H. Phenolics, depsides and triterpenes from the chilean lichen *Pseudocyphellaria nudata* (Zahlbr.) D.J. GALLOWAY. **Journal of the Chilean Chemical Society**, Misión, v.53, n.3, p. 1624-1625, 2008.

CUI, C.B.; UBUKATA, M.; KAKEYA, H.; ONOSE, R.; OKADA, G.; TAKAHASHI, I.; ISONO, K.; OSADA, H. Acetophthalidin, a novel inhibitor of mammalian cell cycle, produced by a fungus isolated from a sea sediment. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.49, n.2, p.216-219, 1996.

CUNHA, A.M.; CHAGAS, E. **Nova espécie de protozoário do gênero Leishmania patogênico para o homem**. *Leishmania chagasi* n.sp. Nota prévia. Hospital (Rio J), v.11, p.3-9, 1937.

DAVID, C.V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatology Therapy**, Copenhagen, v.22, n.6, p.491-502, 2009.

DEAN, R.; VAN KAN, J.A.L.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; DI PIETRO, A. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.13, p. 414-430, 2012.

de HOOG, G.S.; Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v.63, n.2, p.105-109, 1993.

de HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M.J. **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. v.1, 2000.

DELEN, N.; TOSUN, N. Fungicidas: mecanismo de ação e resistência. Parte 1: fungicidas com mecanismo de ação não-específica. In: Luz, W.C.; Fernandes, J.M.; Prestes, A.M.; Picinini, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Brasília, v.11, p.43-69, 2003.

DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.52, n.4, p.455-463, 1999.

DEMAIN, A.L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v.41, p.185-201, 2014.

DEMAIN, A.L.; ADRIO, J.L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v.38, p.41-55, 2008.

DERUITER, J.; JACYNO, J.M.; DAVIS, R.A.; CUTLER, H.G. Studies on aldose reductase inhibitors from fungi. I. Citrinin and related benzopyran derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition**, Chur, v.6, n.3, p.201-210, 1992.

DICTIONARY OF NATURAL PRODUCTS (DNP). Disponível em: <http://dnp.chemnetbase.com>. Acesso: 2016.

DOLL, M.K.H.; GUGGISBERG, A.; HESSE, M. Oncinotine-type spermidine alkaloids from *Oncinotis tenuiloba* – transformation of *N*-acetyltoncinotin-12-one to *N,N'*-diacetyltoncinotin-12-one. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v.79, p.973-981, 1996.

DOMSH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. v.1: **Compendium of soil fungi**, London: Academic Press, 1980. 860p.

DO ROSARIO MARINHO, A.M.; MARINHO, P.S.B.; RODRIGUES FILHO, E.; FERREIRA, I.C.P. Policetídeos isolados de *Penicillium herquei*. **Eclética Química**, São Paulo, v.36, p.38-45, 2011.

DO ROSÁRIO MARINHO, A.M.; RODRIGUES-FILHO, E.; MOITINHO, M.L. R.; SANTOS, L.S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.16, n.2, p.280-283, 2005.

DREYFUSS, M.M.; CHAPELA, I.H. **Potential of fungi in the discovery of novel low-molecular weight pharmaceuticals**. In: GULLO, V.P. **The discovery of natural products with therapeutic potential**. Boston: Butterworth-Heinemann, cap.3, p.49-80, 1994.

DRINGRA, O.D.; ACUNA, R.S. **Patologia de sementes de soja**. Viçosa: Ed. UFV, 1997. 119p.

DUBEY, S.C.; SURESH, M.; SINGH, B. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* for integrated management of chickpea wilt. **Biological control**, San Diego, v.40, n.1, p.118-127, 2007.

DUONG, T.H.; CHAVASIRI, W.; BOUSTIE, J.; NGUYEN, K.P.P. New meta-depsidones and diphenyl ethers from the lichen *Parmotrema tsavoense* (Krog & Swinscow) Krog & Swinscow, Parmeliaceae. **Tetrahedron**, Oxford, v.71, n.52, p.9684-9691, 2015.

DUTTA, T.; SAHOO, R.; SENGUPTA, R.; RAY, S.S.; BHATTACHARJEE, A.; GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium*

citrinum: production and characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v.35, p.275-282, 2008.

EFSA. The European Food Safety Authority. Scientific opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. **EFSA Journal**, Parma, v.10, n.3, p.2605, 2012.

EHR, R.J.; KEMMITT, G. **Periodic table of the fungicides**. Indianapolis: Dow Agrosciences, 2002. 1 p.

ELKHAYAT, E.S.; IBRAHIM, S.R.M.; MOHAMED, G.A.; ROSS, S.A. Terrenolide S, a new antileishmanial butenolide from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*. **Natural Product Research**, Milton Park, v.30, n.7, p.814-820, 2016.

EL-BANNA, A.A.; PITT, J.I.; LEISTNER, L. Production of mycotoxins by *Penicillium* species. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.10, p.42-46, 1987.

ENGLER, A. **Araceae-Pothoideae**:– In: ENGLER, A. (Ed.) Das Pflanzenreich IV.23 B (Heft 21). – Berlin, 1905. p.1–330.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. de. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2nd ed. Revisada. Caxias do Sul: Educ, 2010. 638 p.

FENG, N.; YE, W.; WU, P.; HUANG, Y.; XIE, H.; WEI, X. Two new antifungal alkaloids produced by *Streptovericillium morookaense*. **The Journal of the Antibiotics**, Tokyo, v.60, n.3, p.179-183, 2007

FERNÁNDEZ-BODEGA, M.A.; MAURIZ, E.; GÓMEZ, A.; MARTÍN, J.F. Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, Valdeón and Bejes–Tresviso local varieties of blue-veined cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.136, p.18-25, 2009.

FERRARI, J.T.; DOMINGUES, R.J.; TÖFOLI, J.G.; NOGUEIRA, E.M.C. **Antracnose associada às fruteiras**. 2011. Artigo em Hipertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2011_4/antracnose/index.htm>. Acesso em: 21dez. 2015.

FINATTI, D.; APARECIDO, C.C.; Caracterização fisiológica e comparação de diferentes métodos na preservação em laboratório de isolados do gênero *Verticillium*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.4, p.715-720, 2009.

FISCHER, I.H.; KIMATI, H.; RESENDE, J.A.M. Doenças do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas** – 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.467-474.

FISHEL, F.M.; DEWDNEY, M.M. **Fungicide Resistance Action Committee's (FRAC) Classification Scheme of Fungicides According to Mode of Action**. IFAS Extensio, University of Florida, 2013. 8p.

FISHER, P.J.; GRAF, F.; PETRINI, L.E.; SUTTON, B.C.; WOOKEY, P.A. Fungal endophytes of *Dryas octopetala* from a high polar semidesert and from the Swiss Alps. **Mycologia**, Lancaster, v.87, p.319-323, 1995.

FONSECA, G.A.B. da; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G. **Conservation of island biodiversity – importance, challenges and opportunities**. Center for Applied Biodiversity Sciences, Conservation International, Washington, 2006. 16p.

FORCELINI, C.A. Fungicidas inibidores da síntese de esteróis. I. triazoles. **Revisão anual de patologia de plantas**, Brasília, v.2, p.335-355, 1994.

FRANÇA-COSTA, J.; WANDERLEY, J.L.M.; DEOLINDO, P.; ZARATTINI, J.B.; COSTA, J.; SOONG, L.; BARCINSKI, M.A.; BARRAL, A.; BORGES, V.M. Exposure of Phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. **PLoS ONE**, San Francisco, v.7, n.5, p.1-10, 2012.

FRAVEL, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. **New Phytologist**, London, v.157, p.493-502, 2003.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, n.6, p.596-605, 1998.

FRISVAD, J.C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v.112, p.231-240, 2008.

FUSKA, J.; NEMEC, P.; KUHR, I. Vermiculine, a new antiprotozoal antibiotic from *Penicillium vermiculatum*. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.25, n.4, p.208-211, 1972.

GAMBOA, M.A.; LAUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? **Mycopathologia**, Dordrecht, v.156, p.41-45, 2002.

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. A novel endophytic taxol-producing fungus *Chaetomella raphigera* isolated from a medicinal plant, *Terminalia arjuna*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.158, n.3, p.675-684, 2009.

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

GAUR, P.M.; TRIPATHI, S.; GOWDA, C.L.L.; RANGA RAO, G.V.; SHARMA, H.C.; PANDE, S.; SHARMA, M. **Chickpea Seed Production Manual**. India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 2010. 28p.

GAWAS-SAKHALKAR, P.; SINGH, S.M.; NAIK, S.; RAVINDRA, R. High-temperature optima phosphatases from the cold-tolerant Arctic fungus *Penicillium citrinum*. **Polar Research**, Oslo, v.31, p.11105, 2012.

GENBANK - NCBI. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank

GERMAINE, K.; KEOGH, E.; GARCIA-CABELLOS, G.; BORREMANS, B.; LELIE, D.; BARAC, T.; OEYEN, L.; VANGRONSVELD, J.; MOORE, F.P.; MOORE, E.R.B.; CAMPBELL, C.D.; RYAN, D.; DOWNLING, D.N. Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. **FEMS microbiology ecology**, Amsterdam, v.48, p. 109-118, 2004.

GERWICK, B.C.; SPARKS, T.C. Natural products for pest control: an analysis of their role, value and future. **Pest Management Science**, West Sussex, v.70, n.8, p.1169-1185, 2014.

GHOSHAL, G.; BANERJEE, U.C.; SHIVHARE, U.S. Isolation, Screening and Optimization of Xylanase Production in Submerged Fermentation Using *P. citrinum*. **Journal of scientific and Industrial Research**, New Delhi, v.74, n.7, p.400-405, 2015.

GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1323-1330, 1995.

GÓMEZ; J.A.G.; RAMÍREZ, C.M. Evaluación preliminar de modelos de infección cruzada por *Fusarium* sp., aislados de procesos patológicos, en plantas, animales y humanos. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, 2008. 184 p.

GONÇALVES, E.G. *Anthurium macropodum*: a remarkable new species of Araceae from Brazil. **Kew Bulletin**, London, v.67, p.1-4, 2012.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, n.3, p.338-349, 2004.

GOODSELL, D.S. The molecular perspective: protein farnesyltransferase. **The Oncologist**, Dayton, v.8, p.597-598, 2003.

GOSTINCAR, C.; OHM, R.A.; KOGEJ, T.; SONJAK, S.; TURK, M. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. **BMC Genomics**, London, v.15, p.549-559, 2014.

GRABLEY, S.; HAMMANN, P.; KIRSCH, K.H.R.; KLUGE, H.; THIERICKE, R. Secondary metabolites by chemical screening. 20f decarestrictines, a new family of inhibitors of cholesterol biosynthesis from *Penicillium*: iii. decarestrictines E to M. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.45, n.7, p.1176-118, 1992.

GRIMALDI, G.; TESH, R.; MCMAHON-PRATT, D. A review of geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.41, p.687-772, 1989.

GROGL, M.; THOMASON, T.N.; FRANKE, E.D. Drug resistance in leishmaniasis: its implications in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.47, p.117-126, 1992.

GUNDE-CIMERMAN, N.; ZALAR, P.; DE HOOG, G.S.; PLEMENITAS, A. Hypersaline water in salterns: natural ecological niches for halophilic black yeasts. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.32, p.235-240, 2000.

GUO, B.H.; WANG, Y.C.; ZHOU, X.W.; HU, K.; TAN, F.; MIAO, Z.Q.; TANG, K.X. An endophytic taxol-producing fungus BT2 isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.5, p. 875-877, 2006.

GUTARRA, M.L.E.; GODOY, M.G.; SILVA, J.N.; GUEDES, I.A.; LINS, U.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Lipase production and *Penicillium simplicissimum* morphology in solid-state and submerged fermentations. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v.4, p.1450-1459, 2009.

GUTIERREZ-CIRLOS, E.B.; TRUPOWER, B.L. Inhibitory analogs of ubiquinol act anticooperatively on the yeast cytochrome bc1 complex. **The Journal of Biological Chemistry**, São Paulo, v.277, n.2, p.1195-202, 2002.

HAJJAJ, H.; KLAEBE, A.; LORET, M.O.; GOMA, G.; BLANC, P.J.; FRANÇOIS, J. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.1, p.311-314, 1999.

HAIGH, A.; CLARK, B.; REYNOLDS, L.; MAYO, S.J.; CROAT, T.B.; LAY, L.; BOYCE, P.C.; MORA, M.; BOGNER, J.; SELLARO, M.; WONG, S.Y.; KOSTELAC, C.; GRAYUM, M.H.; KEATING, R.C.; RUCKERT, G.; NAYLOR, M. F.; HAY, A. **CATE Araceae**. 2009. Disponível em: <http://araceae.e-monocot.org/taxonomy/term/157>. Acesso em: 27 jun. 2016.

HAYASHI, H.; TAKIUCHI, K.; MURAO, S.; ARAI, M. Structure and insecticidal activity of new indole alkaloids, Okaromines A and B. from *Penicillium simplicissimum* AK-40. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.53, p.461-469, 1989.

HENNING, A.A.; ALMEIDA, A.M.R.; GODOY, C.V.; SEIXAS, C.D.S.; YORINORI, J.T.; COSTAMILAN, L.M.; FERREIRA, L.P.; MEYER, M.C.; SOARES, R.M.; DIAS, W.P. **Manual de identificação de doenças de soja**. 5.ed. Londrina: EMBRAPA-SOJA, 2014. 78p. (Documento, 256).

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, London, v.354, p.1191-1199, 1999.

HETHERINGTON, A.; RAISTRICK, H. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum*

Thom. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, v.220, p.269-295, 1931.

HIDE, K.D.; TAYLOR, J.E.; FROLICH, J. **Genera of Ascomycetes from Palms**. Hong Kong: University of Hong Kong Press, 2000. 247 p.

HOTEZ, P.J.; MOLYNEUX, D.H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S.E.; SACHS, J.D.; SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v.357, p.1018-1027, 2007.

HOUBRAKEN, J.A.M.P.; FRISVAD, J.C.; SAMSOM, R.A. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.44, p.117-133, 2010.

HUGHES, R.F.; DENSLOW, J.S. Invasion by an N₂-fixing tree, *Falcataria moluccana*, alters function, composition, and structure of wet lowland forests of Hawai'i. **Ecological Applications**, Washington, v.15, p.1615-1628, 2005.

IBAMA. **Portaria normative IBAMA nº 84, de 15 de outubro de 1996**. 1996. 32p.

IBRAHIM, S.R.; ABDALLAH, H.M.; MOHAMED, G.A.; ROSS, S.A. Integracides H-J: New tetracyclic triterpenoids from the endophytic fungus *Fusarium* sp. **Fitoterapia**, Milano, v.7, n.112, p.161-167, 2016.

IGARASHI, Y.; KUWAMORI, Y.; TAKAGI, K.; ANDO, T.; FUDOU, R.; FURUMAI, T.; OKIC, T. Xanthoepocin, a New Antibiotic from *Penicillium simplicissimum* IFO5762. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.53, n.9, p.928-933, 2000.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; GUDMUNDSDÓTTIR, G.F.; ÖGMUNDSDÓTTIR, H.M.; PAULUS, L.; HARALDSDÓTTIR, S.; KRISTINSSON, H.; BAUER, R. Effects of tenuiorin and methyl orsellinate from the lichen *Peltigera leucophlebia* on 5-/15-lipoxygenases and proliferation of malignant cell lines *in vitro*. **Phytomedicine**, Stuttgart, v.9, p.654-658, 2002.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; SALLY, T.; BLOOMFIELD, F.; HYLANDS, P.J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v.28, n.2, p.289-292, 1985.

ITO, M.F.; CASTRO, J.L.; SANTINI, A.; ITO, M.A. Controle químico de antracnose, mancha-de-alternaria e mancha-angular do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 27 (Suplemento): S121, 2002.

JACKSON, S.T.; SAX, D.F. Balancing biodiversity in a changing environment: extinction debt, immigration credit and species turnover. **Trends in Ecology and Evolution**, Barking, v.25, n.3, p.153-160, 2009.

JAHAN, M.T.; ISLAM, M.R.; RUSELI KHAN, A.N.K.; MAMUN, G.; AHMED, L. In vitro clonal propagation of anthurium (*Anthurium andraeanum* L.) using callus culture. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Jaipur, v.19, p.61-69, 2009.

JANARDHANA, G.R.; RAVEESHA, K.A.; SHEKARSHETTY, H. Mycotoxin contamination of maize grains grown in Karnataka (India). **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v.37, p.863-868, 1999.

JIMÉNEZ-GASCO, M.M.; NAVAS-CORTES, J.; JIMÉNEZ-DIAZ, R.M. Evolucion de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, el agente de la Fusariosis vascular del garbanzo, en razas patogenicas y patotipos. **Boletin de Sanidad Vegetal Plagas**, Madrid, v.31, p.59-69, 2005.

KAJULA, M.; WARD, J.M.; TURPEINEN, A.; TEJESVI, M.V.; HOKKANEN, J.; TOLONEN, A.; HAKKANEN, H.; PICART, P.; IHALAINEN, J.; SAHL, H.G.; PIRTTILA, A.M.; BRIDGED, M.S. Epipolythiodiketopiperazines from *Penicillium raciborskii*, an Endophytic Fungus of *Rhododendron tomentosum* Harmaja. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.79, p.685-690, 2016.

KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNETT, J. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.3, p.937-947, 2005.

KEMPKEN, F.; ROHLFS, M. Fungal secondary metabolite biosynthesis – a chemical defense strategy against antagonistic animals? **Fungal Ecology**, Oxford, v.3, p.107-114, 2010.

KHALDI, N.; SEIFUDDIN, F.T.; TURNER, G.; HAFT, D.; NIERMAN, W.C.; WOLFE, K.H.; FEDOROVA, N.D. SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v.47, p.736-741, 2010.

KHAMTHONG, N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S.; PREEDANON, S.; SAKAYAROJ, J. Bioactive polyketides from the sea fan-derived fungus *Penicillium citrinum* PSU-F51. **Tetrahedron**, Oxford, v.68, p.8245-8250, 2012.

KIM, K-S.; CUI, X.; LEE, D-S.; SOHN, J.H.; YIM, J.H.; KIM, Y-C.; OH, H. Anti-Inflammatory Effect of Neoechinulin A from the Marine Fungus *Eurotium* sp. SF-5989 through the Suppression of NF-Kb and p38 MAPK Pathways in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Macrophages. **Molecules**, Basel, v.18, p.13245-13259, 2013.

KIMATI, H. **Fungos**. In: GALLI, F.; TOKESHI, H.; CARVALHO, P.C.T.; BALMER, T. L.; CARDOSO, C.O.N.; SALGADO, C.L.; KUGNER, T.L.; CARDOSO, E.J.V.B.; BERGAMIM Filho, A.(Ed.). **Manual de Fitopatologia**. 2 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1978. 663 p.

KIMATI, H.; MASCARENHAS, H.A.A. Incidência de doenças em ensaios de variedades de feijoeiro na cultura das águas no estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v.26, n.25, p. 17-25, 1967.

KINGSFORD, R.T.; WATSON, J.E.M.; LUNDQUIST, C.J.; VENTER, O.; HUGHES, L.; JOHNSTON, E.L.; ATHERTON, J.; GAWEL, M.; KEITH, D.A.; MACKEY, B.G.; MORLEY, C.; POSSINGHAM, H.P.; RAYNOR, B.; RECHER, H.F.; WILSON, K.A. Major conservation policy issues for biodiversity in Oceania. **Conservation Biology**, London, v.23, p.834-840, 2009.

KNASMÜLLER, S.; CAVIN, C.; CHAKRABORTY, A.; DARROUDI, F.; MAJER, B.J.; HUBER, W.W.; EHRLICH, V.A. Structurally related mycotoxins ochratoxin A, ochratoxin B, and citrinin differ in their genotoxic activities and in their mode of action in human-derived liver (HepG2) cells: implications for risk assessment. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v.50, p.190-197, 2004.

KNIGHT, V.; SANGLIER, J.J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drugs discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.62, p.446-458, 2003.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPES, J. A. **Dictionary of Fungi**. 10ed. United Kingdom: Cabi Europe, 2008. 771p.

KOBAYASHI, A.; KOGUCHI, Y.; TAKAHASHI, S.; KANZAKI, H.; KAWAZU, K. ST-1, a novel radical scavenger from fungus F-124. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Tokyo, v.57, n.6, p.1034-1036, 1993.

KODJA, G.; GIBRAN, F.Z.; LEITE, K.L.; MOURA, R.L.; FRANCINI-FILHO, R.B. **Alcatrazes**. São Paulo: Ed. Cultura Sub, 2012. 208p.

KOMAI, C.; HOSOE, T.; ITABASHI, T.; NOZAWA, K.; YAGUCHI, T.; FUKUSHIMA, K.; KAWAI, E. New penicillide derivatives isolated from *Penicillium simplicissimum*. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v.60, p.185-190, 2006.

KUEFFER, C.; DAEHLER, C.C.; TORRES-SANTANA, C.W.; LAVERGNE, C.; MEYER, J.Y.; OTTO, R.; SILVA, L. A global comparison of plant invasions on oceanic islands. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Jena, v.12, p.145-161, 2010.

KULIK, M.M.; SINCLAIR, J.B. **Phomopsis seed decay and pod and stem blight**. In: HARTMAN, GL.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. (Ed.). **Compendium of Soybean Diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 1999. p.31-33.

KUMARAN, R.S.; MUTHUMARY, J.; HUR, B.K. Production of taxol from *Phyllosticta spinarum*, an endophytic fungus of *Cupressus* sp. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v.8, p.438-446, 2008.

KUSANO, M.; KOSHINO, H.; UZAWA, J.; FUJIOKA, S.; KAWANO, T.; KIMURA, Y. Nematicidal alkaloids and related compounds produced by the fungus *Penicillium* cf. *simplicissimum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.64, p.2559-2568, 2000.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry & Biology**, London, v.19, p. 792-798, 2012.

LAI, D.; BRÖTZ-OESTERHELT, H.; MÜLLER, W.E.G.; WRAY, V.; PROKSCH, P. Bioactive polyketides and alkaloids from *Penicillium citrinum*, a fungal endophyte isolated from *Ocimum tenuiflorum*. **Fitoterapia**, Milano, v.91, p.100-106, 2013.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.) **The leishmaniases in Biology and Medicine**, London: Academic Press, 1987. v.1, p.1-120.

LANNA, E.; ROSSI, A.L.; CAVALCANTI, F.F.; HAJDU, E.; KLAUTAU, M. Calcareous sponges from São Paulo state, Brazil (Porifera: Calcarea: Calcinea) with the description of two new species. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Cambridge, v.87, n.6, p.1553-1561, 2007.

LARONE, D.H. **Medically Important Fungi - A Guide to Identification**. 3.ed. Washington: ASM Press, 1995. 156 p.

LAZARIDOU, A.; ROUKAS, T.; BILIADERIS, C.G.; VAIKOUSI, H. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.31, p.22-132, 2002.

LEE, C.H.; LEE, C.L.; PAN, T.M. A 90-d toxicity study of monascus-fermented products including high citrinin level. **Journal of Food Science**, Malden, v.75, p.91-97, 2010.

LEELARUJI, W.; BUATHONG, P.; KANNGAN, P.; PIAMTONGKAM, R.; CHULALAKSANANUKUL, S.; WATTAYAKORN, G.; CHULALAKSANANUKUL, W. Potential of laccase produced from microfungus *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons. **European Chemical Bulletin**, Budapest, v.3, n.3, p.269-272, 2014.

LEWIS, J.K; WEI, J.; SIUZIDAK, G. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in peptide and protein analysis. In: **Enciclopedia of Analytical Chemistry**. R.A. Meyers (Ed.). Chischester: John Wiley, 2000. p.5880-5894,

LI, G-H.; LI, L.; DUAN, M.; ZHANG, K-Q. The Chemical Constituents of the Fungus *Stereum* sp. **Chemistry & Biodiversity**, Zurich, v.3, p.210-216, 2006.

LI, P.; ZHANG, Z.; HU, X.; ZHANG, Q. Advanced hyphenated chromatographic-mass spectrometry in mycotoxin determination: current status and prospects. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v.32, p.420-452, 2013.

LI, T.Y.; LIU, B.-H.; CHEN, Y.C. Characterization of *Aspergillus* spores by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrom**, Chichester, v. 14, p. 2393-2400, 2000.

LI, X-F.; JIN, H-Z.; YANG, M.; CHEN, G.; ZHANG, W-D. A New Methyl Orsellinate Glycoside from the Aerial Part of *Rhododendron primulaeflorum*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, Beijing, v.6, n.5, p.336-338, 2008.

LI, X.J.; ZHANG, Q.; ZHANG, A.L.; GAO, J.M. Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach* and their antifungal, antifeedant and toxic activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.60, p.3424-3431, 2012.

LI, Z-F.; WANG, L-F.; FENG, Z-L.; ZHAO, L-H.; SHI, Y-Q.; ZHU, H-Q. Diversity of endophytic fungi from different verticillium-wilt-resistant *Gossypium hirsutum* and evaluation of antifungal activity against *Verticillium dahliae* In Vitro. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v.24, n.9, p.1149-1161, 2014.

LIGRONE, R.; POCOCCO, K.; DUCKETT, J.G. A comparative ultrastructure study of the endophytic basidiomycetes in parasitic hepatic *Cryptothallus mirabilis* and de closely allied photosynthetic species *Aneura pinguis* (Metzgeriales). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.71, p.666-679, 1993.

LIU, Q.Y.; ZHOU, T.; ZHAO, Y.Y.; CHEN, L.; GONG, M.W.; XIA, Q.W.; YING, M.G.; ZHENG, Q.H.; ZHANG, Q.Q. Antitumor Effects and Related Mechanisms of Penicitrinine A, a Novel Alkaloid with a Unique Spiro Skeleton from the Marine Fungus *Penicillium citrinum*. **Marine Drugs**, Basel, v.13, p.4733-4753, 2015.

LOPES, T.I.B.; COELHO, R.G.; YOSHIDA, N.C.; HONDA, N.K. Radical-scavenging activity of orsellinates. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.56, p.1551-1554, 2008.

LUCAS, T.; WAISMAN, A.; RANJAN, R.; ROES, J.; KRIEG, T. Differential roles of macrophages in diverse phages of skin repair. **Journal of immunology**, Baltimore, v.184, p.3964-3977, 2010.

LUCHINI, L.C.; ANDRÉA, M.M. **Dinâmica de Agrotóxicos no Ambiente**. In: AMBIENTE, Ministério do Meio; AGRICULTURA, Fórum Nacional de Secretários de. (Org.). Programa de Defesa Ambiental Rural - Textos Orientadores, Brasília, 2002. p. 27-44,

MACARTHUR, R.H.; WILSON, E.O. **The theory of island biogeography**. Princeton: Princeton University Press, 1967. 224p.

MAMEDE, M.C.H.; SILVA, S.J.G.; JACQUES, E.L.; ARENQUE, B.C. In **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2012. 132 p.

MANANDHAR, J.B.; KUNWAR, I.K.; SINGH, T.; HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B. Penetration and infection of soybean leaf tissues by *Colletotrichum truncatum* and *Glomerella glycines*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.75, p.704-708, 1985.

MANITCHOTPISIT, P.; LEATHERS, T.D.; PETERSON, S.W.; KURTZMAN, C.P.; LI, X.L.; EVELEIGH, D.E.; LOTRAKUL, P.; PRASONGSUK, S.; DUNLAP, C.A.; VERMILLION, K.E.; PUNNAPAYAK, H. Multilocus phylogenetic analyses, pullulan production and xylanase activity of tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. **Mycological Research**, Cambridge, v.113, p.1107-1120, 2009.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuário e Abastecimento. **Agrofit, Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 15 maio 2016.

MARQUES, O.A.V.; MARTINS, M.; SAZIMA, I. A new insular species of pitviper from Brazil, with comments on evolutionary biology and conservation of the *Bothrops jararaca* group (Serpentes, Viperidae). **Herpetologica**, Austin, v.58, n.3, p.303-312, 2002.

MARTÍN, J.F.; CASQUEIRO, J.; LIRA, P. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.8, p.282-293, 2005.

MARTÍNEZ-LUIS, S.; DELLA-TOGNA, G.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A.; GERWICK, W.H.; CUBILLA-RIOS, L. Antileishmanial Constituents of the Panamanian Endophytic Fungus *Edenia* sp. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.71, n.12, p.2011-2014, 2008.

MATA, R.; BYE, R.; LINARES, E.; MACÍAS, M.; RIVERO-CRUZ, I.; PÉREZ, O.; TIMMERMAN, B.N. Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. **Phytochemistry**, London, v.64, p.285-291, 2003.

McGEE, D.C. **Soybean diseases**: a reference source for seed technologists. Saint Paul: Society Press, 1992. 151p.

MCMULLIN, D.R.; GREEN, B.D.; MILLER, J.D. Antifungal sesquiterpenoids and macrolides from an endophytic Lophodermium species of *Pinus strobus*. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v.14, p.148-152, 2015.

MEJÍA, L.C.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, Atlanta, v.46, p.4-14, 2008.

MENDES, I.C.; REIS JUNIOR, F.B. **O uso dos micro-organismos como bioindicadores para avaliar qualidade dos solos agrícolas**. 33 ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010.54 p.

MERCADANTE, O.A.; MOURA, L.F.H.A. **Serpentes ilhoas**: em Alcatrazes e Queimada Grande. Island serpents: in Alcatrazes and Queimada Grande. São Paulo: Magma Editora Cultural, 2005. 160 p.

MERILES, J.M.; LAMARQUE, A.L.; LABUCKAS, D.O.; MAESTRI, D.M. Effect of fungal damage by *Fusarium* spp. and *Diaporthe/Phomopsis* complex on protein quantity and quality of soybean seed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.84, p.1594-1598, 2004.

METWALY, A.M.; KADRY, H.A.; EL-HELA, A.A.; MOHAMMAD, A.; MA, G.; CUTLER, S.J.; ROSS, S.A. Antileukemic, antileishmanial and antifungal activities of secondary metabolites from the endophytic fungus *Nigrospora sphaerica*. **Planta Medica**, Stuttgart, v.79, p.52, 2013.

MODABBER, F. Leishmaniasis. In: **Tropical Diseases Research Progress 1991-1992**. Geneve: World Health Organization. 1993. p.77-87.

MOHAMMADI, H.; BANIHASHEMI, Z. Distribution, pathogenicity and survival of *Fusarium* sp. the causal agents of chickpea wilt and root rot in the fars province of Iran. **Journal of Plant Pathogen**, Iran, v.41, p.687-708, 2006.

MÖLLER, E.M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, p.6115-6116, 1992.

MONTE, E.; VILLANUEVA, J.; DOMÍNGUEZ, A. Fungal profiles of Spanish country-cured hams. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.3, p.355-359, 1986.

MOONEY, H.A.; CLELAND, E.E. The evolutionary impact of invasive species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.98, n.10, p.5446-5451, 2001.

MORGAN-JONES, G. The *Diaporthe Phaseolorum* complex of soybean. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.17, p.359-367, 1992.

MUHSIN, T.M.; ZWAIN, K.H. A fungal endophyte associated with desert parasitic plant. **Kavaka**, Madras, v.17, p.1-5, 1989.

MURI, S.D.; VAN DER VOET, H.; BOON, P.E.; VAN KLAVEREN, J.D.; BRUSCHWEILER, B.J. Comparison of human health risks resulting from exposure to fungicides and mycotoxins via food. **Food Chemistry Toxicology**, Oxford, v.47, p.2963-2974, 2009.

MURRAY, P.R. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v.16, n.11, p.1626-1630, 2010.

MUSCAT, E.; SAVIOLLI, J.Y.; COSTA, A.; CHAGAS, C.A.; EUGÊNIO, M.; ROTENBERG, E.L.; OLMOS, F. Birds of the Alcatrazes archipelago and surrounding waters, São Paulo, southeastern Brazil. **Check List**, São Paulo, v.10, n.4, p.729-738, 2014.

NADRUZ-COELHO, M.A.; MAYO, S.J.; WAECHTER, J.L. Revisão Taxonômica das Espécies de *Anthurium* (Araceae) seção Urospadix subseção Flavescentiviridia. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v.60, p.799-864, 2009.

NARVAES, L.V.P. **Isolamento e caracterização de toxinas do veneno de *Bothrops alcatraz*, Marques, Martins e Sazima, 2002 e aspectos coevolutivos com a dieta**. 2007. 135 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

NASCIMENTO, A.M.; CONTI, R.; TURATTI, I.C.C.; CAVALCANTI, B.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; MANFRIM, V.; TOLEDO, J.S.; CRUZ, A.K.; PUPO, M.T. Bioactive extracts and chemical constituents of two endophytic

strains of *Fusarium oxysporum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.22, p.1276-1281, 2012.

NASCIMENTO, M.D.S.B.; SOUSA, E.C.; SILVA, L.M.; LEAL, P.C.; CANTANHEDE, K.L.; BEZERRA, G.F.B.; VIANA, G.M.C. Prevalência de infecção por *Leishmania chagasi* utilizando os métodos de ELISA (rK39 e CRUDE) e intradermoreação de Montenegro em área endêmica do Maranhão, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21, p.1801-1807, 2005.

NASCIMENTO, V.V.; MELLO, E.O.; CARVALHO, L.P.; DE MELO, E.J.T.; CARVALHO, A.O.; FERNANDES, K.V.S.; GOMES, V.M. PvD1 defensin, a plant antimicrobial peptide with inhibitory activity against *Leishmania amazonenses*. **Bioscience Reports**, London, v.35, p.1-7, 2015.

NCCLS (CLSI) – Clinical Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**: Approved Standard – M38-A, v.22, n.16, 2002.

NELSON, P.E.; TOUSON, T.A.; MARASSAS, W.F.O. **Fusarium species, an illustrated manual for identification**. University Park: Pennsylvania State University Press, 1983. 193p.

NENE, Y.L.; REDDY, M.V.; HAWARE, M.P.; GHANEKAR, A.M.; AMIN, K.S.; PANDE, S.; SHARMA, M. **Field Diagnosis of Chickpea Diseases and their Control**. International Crops Research Institute for the Semi - Arid Tropics, 2012. 30 p. Information Bulletin No. 28 (revised).

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.66, p.1022, 2003.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.75, n.3, p.311-335, 2012.

NIELSEN, K.F.; DALSFAR, P.W.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, O. Andrastins A~D, *Penicillium roqueforti* Metabolites Consistently Produced in Blue-Mold-Ripened Cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.53, p.2908-2913, 2005.

NIGAM, P.S. Production of bioactive secondary metabolites. In: NIGAM, P.S.; PANDEY, A. (Ed.). **Biotechnology for agro-industrial residues utilization**. Netherlands: Springer, 2009. p.129-145.

NOGUEIRA, J.M.; STEINER, M.T.M.; AMARAL, A.C.Z. Description of Two New Species of Eunice Cuvier, 1817 (Polychaeta: Eunicidae) from Islands of the Coast of São Paulo State, Brazil. **Scientia Marina**, Barcelona, v.65, p.47-57, 2001.

NUNES, C.M.; PIRES, M.M.; DA SILVA, K.M.; ASSIS, F.D.; GONÇALVES FILHO, J.; PERRI, S.H. Relationship between dog culling and incidence of human visceral

leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.28, n.170, p.131-133, 2010.

OKADO, N.; HASEGAWA, K.; MIZUHASHI, F.; LYNCH, B.S.; VO, T.D.; ROBERTS, A. S. Safety evaluation of nuclease P1 from *Penicillium citrinum*. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.88, p.21-31, 2016.

OLIVEIRA, V.C.; COSTA, J.L.S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.631-634, 2002.

OLSTORPE, M.; SCHNURER, J.; PASSOTH, V. Microbial changes during storage of moist crimped cereal barley grain under Swedish farm conditions. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v.156, p.37-46, 2010.

ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ, L.; ESPADA-FERNÁNDEZ, R.; DEA-AYUELA, M.A.; TORRADO, J.J.; BOLÁS-FERNÁNDEZ, F.; ALUNDA, J.M. In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. **Internacional Journal Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.30, p.325-329, 2007.

OVERY, D.P.; LARSEN, T.O.; DALSGAARD, P.W.; FRYDENVANG, K.; PHIPPS, R.; MUNRO, M.H.G.; CHRISTOPHERSEN, C. Andrastin A and barceloneic acid metabolites, protein farnesyl transferase inhibitors from *Penicillium albocoremium*: chemotaxonomic significance and pathological implications. **Mycological Research**, Cambridge, v.109, n.11, p.1243-1249, 2005.

PANDE, S.; RAO, J.N; SHARMA, M. Establishment of the chickpea wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in the soil through seed transmission. **Plant Pathology Journal**, Faisalabad, v.23, n.1, p.3-6, 2007.

PALAZZO, G.; CARBONE, L.; COLAFEMMINA, G.; ANGELICO, R.; CEGLIE, A.M. The role of the cosurfactant in the CTAB/water/n-pentanol/n-hexane system: Pentanol effect on the phase equilibria and mesophase structure. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v.6, p.1423-1429, 2004.

PARK, M.S.; FONG, J.J.; OH, S.Y.; KWON, K.K.; SOHN, J.H.; LIM, Y.W. Marine-derived *Penicillium* in Korea: diversity, enzyme activity, and antifungal properties. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v.106, p.331-345, 2014.

PARK, Y.H.; CHUNG, J.Y.; AHN, D.J.; KWON, T.R.; LEE, S.K.; BAE, I.; YUN, H.K.; BAE, H. Screening and characterization of endophytic fungi of *Panax ginseng* Meyer for biocontrol activity against ginseng pathogens. **Biological Control**, Atlanta, v.91, p.71-81, 2015.

PAULAY, G. Biodiversity on oceanic islands: its origin and extinction. **American Zoologist**, Utica, v.34, p.134-144, 1994.

PEDERSEN, P.; GRAU, C.R. Effect of Agronomic Practices and Soybean Growth Stage on the Colonization of Basal Stems and Taproots by var. **Crop Science**, Madison, v.50, p.718-722, 2010.

PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; CAETANO, L.C. Micro-organismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v.3, n.4, p.69-72, 2004.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**, v.1. São Paulo: Makron Books, 1997. 524 p.

PEREIRA, I.S.; ABREU, M.S.; FERREIRA, J.B.; ALVES, E. **Pré-infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em hipocótilos de cafeeiro inoculados artificialmente**. 2005. Disponível em <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/1398>. Acesso em: 20 maio 2016.

PETERSON, S.W.; MANITCHOTPISIT, P.; LEATHERS, T.D. *Aureobasidium thailandense* sp. nov. isolated from leaves and wooden surfaces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.63, p.790-795, 2013.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDRENA, J.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p.179-197,

PETTIT, R.K. Culturability and secondary metabolite diversity of extreme microbes: expanding contribution of deep sea and deep-sea vent microbes to natural product discovery. **Marine Biotechnology**, New York, v.13, p.1-11, 2011.

PHILLIPS, A.J.L. Morfological characterization of *Diaporthe foeniculacea* and its *Phomopsis* anamorph on *Foeniculum vulgare*. **Sydowia**, Horn, v.55, p.274-285, 2006.

PHOULIVONG, S.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E.H.C.; ABDELSALAM, K. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.44, p.33-43, 2010.

PICCINI, E.; PASCHOLATI, S.F. **Doenças da goiabeira (*Psidium guajava*)**. In: KIMAT, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J. A.M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. Doenças de Plantas Cultivadas. São Paulo - SP. Agronômica Ceres, 1997. p.451-455.

PIMENTEL, C.P.V.; FIGUEIREDO, M.B. Métodos de preservação de fungos em meio de cultura. **Biológico**, São Paulo, v.55, n.1/2, p.27-33, 1989.

PITT, J.I. A modified creative sucrose medium for differentiation of species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.75, p.559-563, 1993.

PITT, J.J.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 3. ed. New York: Springer, 2009. 503 p.

PITT, J.I.; LEISTNER, L. Toxigenic *Penicillium* species. In: SMITH, J.E.; HEMDERSON, R.S. (Ed.). **Mycotoxins and animal foods**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.81-99,

POMPÉIA, S.L.; AIDAR, M.P.M.; MORAES, R.P.; ROSSI, L.; SANTOS, R.P. **Arquipélago dos Alcatrazes**: aspectos ambientais e a degradação da vegetação. São Paulo: CETESB/SMA, 1991. 15p.

POMPÉIA, S.L.; FERREIRA, A.; ROSSI, L.; AIDAR, M.P.M.; MORAES, R.P.; SANTOS, R.P. **A vegetação da Ilha dos Alcatrazes**, in: SIMPÓSIO DE ECOSSISTEMAS DA COSTA BRASILEIRA, 1993. São Paulo. **Anais: Simpósio de ecossistemas da costa brasileira**, São Paulo: ACIESP, 1993, p.54–67.

PRABHA DEVI, L.D.; KAMAT, T.; RODRIGUES, C.; NAIK, C.G. Batch culture fermentation of *Penicillium* chrysogenum and a report on the isolation, purification, identification and antibiotic activity of citrinin. **Indian Journal of Marine Sciences**, New Dheli, v.38, n.1, p.38-44, 2009.

QIN, S.; LI, J.; CHEN, H.H.; ZHAO, G.Z.; ZHU, W.Y.; JIANG, C.L. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.75, p.6176-6186, 2009.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.-H.; XU, L.-H.; LI, W.-J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.89, p.457-473, 2011.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESÚS, M.N.; MARZAL, P.C.; JUNIOR, H.F.A.; TEMPONE, A.G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, São Paulo, v.26, p. 550-555, 2003.

REDDY, R.V.; WALLACE, A.H.; BERNDT, W.O. Disposition and metabolism of [^{14}C] Citrinin in pregnant rats. **Toxicology**, Amsterdam, v.25, p.161-174, 1982.

REHNER, S.A.; UECKER, F.A. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.72, p.1666-1674, 1994.

RENHE, I.R.T.; VOLP, A.C.P.; VIDIGAL, J.G.; STRINGHETA, P.C. Monascus na nutrição e saúde. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.17, n.3, p.337-343, 2006.

RENSLO, A.R.; MCKERROW, J.H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nature Chemical Biology**, New York, v.2, n.12, p.701-10, 2006.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008. p. 330-337.

ROCHA, L.C.F.; SMIDT, E.C.; COELHO, M.A.N.; TEMPONI, L.G. The genus *Anthurium* (Araceae) in Paraná State – Brazil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.65, n.4, p.917-937, 2014.

ROCHA, R.M.; BONNET, N.Y.K. Ascídias (Tunicata, Ascidiacea) introduzidas no Arquipélago de Alcatrazes, São Paulo. **Iheringia-Série Zoologia**, Porto Alegre, v.99, n.1, p.27-35, 2009.

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

ROJAS, I.S.; LOTINA-HENNSEN, B.; MATA, R. Effect of lichen metabolites on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.63, p.1396-1399, 2000.

ROZE, L.V.; CHANDA, A.; LINZ, J.E. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: A new understanding of established cellular processes. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v.48, p.35-48, 2011.

RUSSEL, R.; PATERSON, M.; LIMA, N. **Molecular biology of food and water borne mycotoxigenic and mycotic fungi**. London: CRC Press, 2016. 597p.

RYCROFT, D.S.; COLE, W.J.; ASLAM, N.; LAMONT, Y.M.; GABRIEL, R. Killarniensolide\ methyl orsellinates and 9-10 dihydrophenanthrenes from the liverwort *Plagiochila killarniensis* from Scotland and the Azores. **Phytochemistry**, London, v.50, p.1167-1173, 1999.

SAMANTHI, K.A.U.; WICKRAMAARACHCHI, S.; WIJERATNE, E.M.K.; PARANAGAMA, P.A. Two new antioxidant active polyketides from *Penicillium citrinum*, an endolichenic fungus isolated from *Parmotrema* species in Sri Lanka. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, Sri Lankam, v.43, p.119-126, 2015.

SANTOS, C.; PATERSON, R.R.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.108, p.375-385, 2010.

SANTOS, M.A.; MARQUES, R.C.; FARIAS, C.A.; VASCONCELOS, D.M.; STEWART, J.M.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.35, p.629-633, 2002.

SANTOS, M.E.S.M.; NOGUEIRA, E.F.C.; LOPES, P.H.S.; TORRES, B.C.A. Leishmaniose mucocutânea facial: desafios do diagnóstico ao tratamento. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial**, Camaragibe, v.13, n.2, p.15-20, 2008.

SAIKKONEN, K.; WALI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S.H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.9, p.275-280, 2004.

SÃO PAULO. Assembleia Legislativa. **Arquipélago dos Alcatrazes pode ser o mais novo parque nacional marinho do estado**. 2014. Disponível em: <http://www.al.sp.gov.br/noticia/?id=359529>. Acesso em: 18 maio 2016.

SAX, D.F.; GAINES, S.D. Species invasions and extinction: The future of native biodiversity on islands. **PNAS**, Washington, v.105, n.1, p.11490-11497, 2008.

SCHMID, E.; OBERWINKLER, F. Mycorrhiza-like interaction between the achlorophyllous gametophyte of *Lycopodium clavatum* L. and its fungal endophyte studied by light and electron microscopy. **The New Phytologist**, Oxford, v.124, p.69-81, 1993.

SCHNEWEIS, I.; MEYER, K.; HÖRMANSDORFER, S.; BAUER, J. Metabolites of *Monascus ruber* in silages. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v.85, p.38-44, 2001.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUFNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, A.; CHEN, W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.109, p.6241-6246, 2012.

SCHULZ, B.; ROMMERT, A-K.; DAMMANN, U.; AUST, H-J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. **Mycological Research**, Cambridge, v.103, p.1275-1283, 1999.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. Microbial root endophytes. In: SIEBER T.N. (Ed) **What are endophytes?** Springer, Berlin, v.9, p.1-13, 2006.

SEO, C.; SOHN, J.H.; AHN, J.S.; YIM, J.H.; LEE, H.K. OH, H. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory effects of depsidone and pseudodepsidone metabolites from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.19, p.2801-2803, 2009.

SHAW, J.J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.69, p.323-335, 1975.

SILVA, G.H.; OLIVEIRA, C.M.; TELES, H.L.; PAULETTI, P.M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; COSTA-NETO, C.M.; PFENNING, L.H.; BERLINCK, R.G.S.; ARAUJO, A.R. Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v.3, n.3, p.164-167, 2010.

SILVA-HUGHES, A.F.; WEDGE, D.E.; CANTRELL, C.L.; CARVALHO, C.R.; PAN, Z.; MORAES, R.M.; MADDOX, V.L.; ROSA, L.H. Diversity and antifungal activity of the

endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. **Microbiological Research**, Pavia, v.175, p.67-77, 2015.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – a Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.99, p.239-251, 2004.

SINGH, G.; CHEN, W.; RUBIALES, D.; MOORE, K.; SHARMA, Y.R.; GAN, Y. Diseases and their management. In: **Chickpea Breeding and Management**. Wallingford: CAB International, 2007. p.497-519.

SMA. Ilha de Alcatrazes-SP. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2005.1 p.

SNYDER, W.C.; HANSEN, H.N. Species concept, genetics and pathogenicity in *Hypomyces solani*. **Phytopathology**, Saint. Paul, v.44, p.338-342, 1954.

SOLOMONS, T.W.; FRYHLE, G. **Organic Chemistry**. 7th ed. New York: John Wiley, 2002. 1288 p.

SONG, Q.Y.; NAN, Z.B.; GAO, K.; SONG, H.; TIAN, P.; ZHANG, X.X.; LI, C.J.; XU, W.B.; LI, X.Z. Antifungal, Phytotoxic, and Cytotoxic activities of metabolites from *Epichloë bromicola*, a fungus obtained from *Elymus tangutorum* grass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.63, p.8787-8792, 2015.

SONJAK, S.; FRISVAD, J.C.; GUNDE-CIMERMAN, N. Genetic variation among *Penicillium crustosum* isolates from arctic and other ecological niches. **Microbial Ecology**, New York, v.54, p.298-305, 2007.

SOUZA, M.M.S.; FREIRE, R.B.; QUEIROZ, R.P.C.; WIENEN, L.P. Avaliação da capacidade infectiva de formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* tratadas com micotoxinas. **Revista da Universidade Rural–Série Ciências da Vida**, Bagé, v.22, p.29-32, 2000.

SREEVIDYA, M.; GOPALAKRISHNAN, S.; MELØ, T.M.; SIMIC, N.; BRUHEIM, P.; SHARMA, M.; SRINIVAS, V.; ALEKHIA, G. Biological control of *Botrytis cinerea* and plant growth promotion potential by *Penicillium citrinum* in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Biocontrol Science and Technology**, Abingdom, v.25, n.7, p.739-755, 2015.

SROYKESORN, K.; WANLEELUK, A.; KONGRUANG, S. Food Borne Pathogen Inhibition by Citrinin from *Monascus purpureus*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOSCIENCE, BIOCHEMISTRY AND BIOINFORMATICS, 2011. Singapore. **Proceedings...** Singapore: IACSIT Press, 2011. v.5.

STAUBER, L.A.; FRANCHINO, E.M.; GRUN, J. An 8-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the Golden Hamster. **The Journal of Protozoology**, New York, v.5, p.269-273, 1958.

ST-GERMAIN, G.; SUMMERBELL, R. **Identifying Filamentous Fungi - A Clinical Laboratory Handbook**. Belmont: Star Publishing, 1996. 377 p.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, New York, v.260, p.214-216, 1993.

STRANGE, R.N. **Introduction to Plant Pathology**. Chichester: Wiley, 2003. 464p.

STRANGE, R.N.; SCOTT, P.R. Plant disease: a threat to global food security. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.83-116, 2005.

STROBEL, G.A. Rainforest endophytes and Bioactive Products. **Critical Reviews of Biotechnology**, London, v.22, n.4, p.315-333, 2002.

STROBEL G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.67, p.257-268, 2004.

SUBRAMANI, R.; KUMAR, R.; PRASAD, P.; AALBERSBERG, W. Cytotoxic and antibacterial substances against multi-drug resistant pathogens from marine sponge symbiont: Citrinin, a secondary metabolite of *Penicillium* sp. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v.3, n.4, p.291-296, 2013.

SUGUIO, K. Dicionário de geologia marinha: Com termos correspondentes em inglês, francês e espanhol. São Paulo: T.A. Queiroz. **Biblioteca de ciências naturais**, cidade, v. 15, 171p, 1992.

SUNGTHONG, R.; NAKAEW, N. The genus *Nonomuraea*: A review of a rare actinomycete taxon for novel metabolites. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.55, n.5, p.554-565, 2014.

SUTTON, D.A.; FOTHERGILL, A.W.; RINALDI, M.G. **Guide to Clinically Significant Fungi**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. 471 p.

TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, M. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.93, p.157-165, 1986.

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

TANVIR, R.; SAJID, I.; HASNAIN, S. Biotechnological potential of endophytic actinomycetes associated with *Asteraceae* plants: isolation, biodiversity and bioactivities. **Biotechnology Letters**, Kew, v.36, p.767-773, 2014.

TEMPONI, L.G.; COELHO, M.A.N. Two new species of *Anthurium* sect. *Urospadix* (Araceae) for Brazil. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v.62, n.2, p.315-320, 2011.

TEMPONI, L.G.; COELHO, M.A.N. Two new species of *Anthurium* (Araceae) endemic to Rio de Janeiro state, Brazil. **Phytotaxa**, Auckland, v.188, n.3, p.162-168, 2014.

THAMBUGALA, K.M.; ARIYAWANSA, H.A.; LI, Y-M.; BOONMEE, S.; HONGSANAN, S.; TIAN, Q.; SINGTRIPOP, C.; BHAT, D. J.; CAMPORESI, E.; JAYAWARDENA, R.; LIU, Z-Y.; XU, J-C.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K.D. Dothideales. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.68, p.105-158, 2014.

THIERS, B., **Index herbariorum**: A global directory of public herbaria and associated staff. New York: Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponível em: <http://sweetgum.nybg.org/ih/>. Acesso em: 28 abril 2016.

TOMLIN, C.D.S. **The pesticide manual**: a world compendium. 12 ed. Surrey: British Crop Protection Council, 2002. 1141 p.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 894 p.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. 760 p.

TRISUWAN, K.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SUKPODMA, Y.; PHONGPAICHIT, S.; PREEDANON, S.; SAKAYAROJ, J. Furo[3,2-h]isochroman,furo[3,2-h]isoquinoline, isochroman, phenol, pyranone and pyrone derivatives from the sea fan-derived fungus *Penicillium* sp. PSU-F40. **Tetrahedron**, Oxford, v. 66, p.4484-4489, 2010.

UCHIDA, K. S.; JUNJI, I.; TOSHIKI, S.; HARUO, T.; YUZURU, I.; HIROAKI, T.; SATOSHI, O. Andrastins A ~ C, new protein farnesyltransferase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FO-3929 II. Structure elucidation and biosynthesis. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.49, p.418-423, 1996.

URZÌ, C.; de LEO, F.; LO PASSO, C.; CRISEO, G. Intra-specific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains isolated from rocks and other habitats assessed by physiological methods and by random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.36, p.95-105, 1999.

VALENTINE, N.B.; WAHL, J.H.; KINGSLEY, M.T.; WAHL, K.L. Direct surface analysis of fungal species by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, London, v.16, p.1352-1357, 2002.

VERMA, V.C.; GOND, S.K.; KUMAR, A.; KHARWAR, R.N.; BOULANGER, L.A.; STROBEL, G.A. Endophytic fungal flora from roots and fruits of an indian neem plant *Azadirachta indica* A. Juss., and impact of culture media on their isolation. **Indian Journal of Microbiology**, Calcutta, v.51, n.4, p.469-476, 2011.

VESTAL, M.L. Methods of ion generation. **Chemical Reviews**, Easton, v.101, p.361-375, 2001.

VITOUSEK, P.M. **Nutrient cycling and limitation, Hawaii as a model system.**, Princeton: Princeton University Press, 2004. 360 p.

XU, B-J.; JIA, X-Q.; GU, L-J.; SUNG, C-K. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. **Food Control**, Guildford, v.17, p.271-285, 2006.

WALTER, H.S. The mismeasure of islands: implications for biogeographical theory and the conservation of nature. **Journal of Biogeography**, Oxford, v.31, n.2, p.177-197, 2004.

WANG, B. YU, Y. WANG, L. *Penicillium fusisporum* and *P. zhuangii*, Two New Monoverticillate Species with Apical-Swelling Stipes of Section *Aspergilloides* Isolated from Plant Leaves in China. **PLoS ONE**, San Francisco, v.9, n.7, p.1-12, 2014.

WANG, P.; KONG, F.; WEI, J.; WANG, Y.; WANG, W.; HONG, K.; ZHU, W. Alkaloids from the mangrove-derived actinomycete *Jishengella endophytica* 161111. **Marine Drugs**, Basel, v.12, p.477-490, 2014.

WINK, M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in Phytomedicine. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v.9, n.10, p.996-1009, 2008.

WHO (World Health Organization). **World health statistics-2012**. Switzerland; WHO Press, 2012. 180p.

WHO (World Health Organization). **World health statistics-2015**. Switzerland; WHO Press, 2015. 164p.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, Surrey, v. 24, p. 438-450, 2001.

WOODWARD, S.; SULTAN, H.Y.; BARRET, D.K. PEAR, R.B. Two new antifungal metabolites produced by *Sparassis crispa* in culture and in decayed trees. **Journal of General Microbiology**, London, v.139, p.153-159, 1993.

WU, J-H.; CHANG, F.R.; HAYASHI, K-I.; SHIRAKI, H.; LIAW, C-C.; NAKANISHI, Y.; BASTOW, L.F.; YU, D.; CHEN, I-S.; LEE, K-H. Antitumor agents. Part 218: Cappamensin A, a new in vitro anticancer principle, from *Capparis sikkimensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.13, p.2223-2225, 2003.

YAMADA-ONODERA, K.H.; MUKUMOTO, Y.; KATSUYAYA, Y.; SAIGANJI, A.; TANI, Y. Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. **Polymer. Degradation and. Stability**, London, v.72, p.323-327, 2001.

YANG, B.; WANG, Y.; CHEN, X.; FENG, J.; WU, Q.; ZHU, D.; MA, Y. Biotransformations of steroids to testololactone by a multifunctional strain *Penicillium simplicissimum* WY134-2. **Tetrahedron**, Oxford, v.70, p.41-46, 2014.

YUAN, L.; CHEN, Z.; ZHU, Y.; LIU, X.; LIAO, H.; CHEN, D. Hydrolysis of birch wood by simultaneous ball milling, dilute citric acid, and fungus *Penicillium simplicissimum* treatment at room temperature. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, p.3338-3345, 2013.

ZALAR, P.; GOSTINČAR, C.; de HOOG, G. S.; URŠIČ, V, SUDHADHAM, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. **Studies in Mycology**, Baarn, v.61, p.21–38, 2008.

ZENG, G.M.; YU, H.Y.; HUANG, H.L.; HUANG, D.L.; CHEN, Y.; HUANG, G.H.; LI, J. B.Laccase activities of a soil fungus *Penicillium simplicissimum* in relation to lignin degradation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.22, p.317-324, 2006.

ZHANG, Q.; SCHRADER, K.K; ELSOHLY, H.N.; TAKAMATSU, S. New cell-cell adhesion inhibitors from *Streptomyces* sp. UMA-044. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.56, n.8, p.673-681, 2003.

ZHANG, P.; ZHOU, P.-P.; YU, L.-J. An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus x media*, *Aspergillus candidus* MD3. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.293, p.155-159, 2009.

ZHANG, X.; HUA, M.X.; SONG, C.L.; CHI, Z.M. Occurrence and diversity of marine yeasts in Antarctica environments. **Journal of Ocean University of China**, Qingdao, v.11, p.70-74, 2012.

ZHENG, C-J.; HUANG, G-L.; XU, Y.; SONG, X-M.; YAO, J.; LIU, H.; WANG, R-P.; SUN. X-P. A new benzopyrans derivatives from a mangrove-derived fungus *Penicillium citrinum* from the South China Sea. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, Milton, v. 30, n.7, p. 821-825, 2016.

ANEXOS

Anexo 1a - Fungos endofíticos (verso e reverso das colônias) isolados da planta 2 (*A. loefgrenii*)

P2M1F1

Gênero: n.i.

P2M1F2

Gênero: n. i.

P2M2F1

Gênero: *Xylaria* sp.

P2M2F2

Gênero: n.i.

P2M3F1

Gênero: *Fusarium* sp.

P2MF1F1

Gênero: n.i.

P2MF1F2

Gênero: n.i.

P2MF2F1

Gênero: n.i.

*n.i. - gêneros não identificados até o momento.

P2MF2F2

Gênero: n.i.

P2MF2F3

Gênero: n.i.

P2MF3F1Gênero: *Fusarium* sp. **P2MF3F2**

Gênero: n.i.

P2MF3F3

Gênero: n.i.

P2BDA1F1

Gênero: n.i.

P2BDA1F2

Gênero: n.i.

P2BDA1F3

Gênero: n.i.

P2BDA2F1Gênero: *Colletotrichum* sp. **P2BDA2F2**

Gênero: n.i.

P2BDA2F3Gênero: *Cladosporium* sp. **P2MS1F1**Gênero: *Cladosporium* sp. **P2MS1F2**Gênero: *Fusarium* sp. **P2MS1F3**

Gênero: n.i.

P2MS3F1

Gênero: n.i.

P2MSF1F1

Gênero: n.i.

P2MSF1F2

Gênero: n.i.

P2MSF2F1

Gênero: n.i.

P2MSF2F2

Gênero: n.i.

P2MSF2F3Gênero: *Penicillium citrinum* **P2MSF2F4**

Gênero: n.i.

P2MSF2F5

Gênero: n.i.

P2MSF3F1

Gênero: n.i.

P2MSF3F2Gênero: *Penicillium* sp.

P2MSF3F3

Gênero: n.i.

P2AF1F1

Gênero: n.i.

P2AF2F1

Gênero: n.i.

P2AF2F2

Gênero: n.i.

P2AF2F3

Gênero: n.i.

P2AF2F4

Gênero: n.i.

P2AF3F1

Gênero: n.i.

P2AF3F2

Gênero: n.i.

P2AF3F3Gênero: *Aspergillus* sp. **P2AM1F1**Gênero: *Fusarium* sp. **P2AM1F2**

Gênero: n.i.

P2AM2F1

Gênero: n.i.

P2AM2F2

Gênero: n.i.

P2AM3F1Gênero: *Fusarium* sp. **P2AM3F2**

Gênero: n.i.

P2AH1F1Gênero: *Cladosporium* sp.

P2AH2F1

Gênero: n.i.

P2AH3F1

Gênero: n.i.

P2MAC3F1

Gênero: n.i.

P210-3F1

Gênero: n.i.

P210-4F1Gênero: *Engyodontium album* **P210-4F2**Gênero: *Penicillium simplicissimum*

Anexo 1b - Fungos endofíticos (verso e reverso das colônias) isolados da planta 7 (*A. alcatrazense*)**P7M1F1**

Gênero: n.i.

P7M2F1

Gênero: n.i.

P7M2F2

Gênero: n.i.

P7M3F1

Gênero: n.i.

P7M3F2

Gênero: n.i.

P7MF1F1Gênero: *Penicillium* sp. **P7MF1F2**

Gênero: n.i.

P7MF2F1

Gênero: n.i.

P7MF2F2Gênero: *Cladosporium* sp. **P7MF2F3**Gênero: *Cladosporium* sp. **P7MF3F1**Gênero: *Peniophora* sp. **P7MF3F2**

Gênero: n.i.

P7MF3F3

Gênero: n.i.

P7BDA1F1

Gênero: n.i.

P7BDA1F2Gênero: *Hymenochaete*-like **P7BDA1F3**

Gênero: n.i.

P7BDA2F1

Gênero: n.i.

P7BDA2F2

Gênero: n.i.

P7BDA3F1

Gênero: n.i.

P7BDA3F2

Gênero: n.i.

P7MS1F1

Gênero: n.i.

P7MS1F2

Gênero: n.i.

P7MS1F3

Gênero: n.i.

P7MS2F1

Gênero: n.i.

P7MS3F1

Gênero: n.i.

P7MS3F2

Gênero: n.i.

P7MSF1F1

Gênero: n.i.

P7MSF2F1

Gênero: n.i.

P7MSF2F2

Gênero: n.i.

P7MSF2F3

Gênero: n.i.

P7MSF3F1Gênero: *Colletotrichum* sp. **P7MSF3F2**

Gênero: n.i.

P7AF1F1

Gênero: n.i.

P7AF1F2

Gênero: n.i.

P7AF2F1

Gênero: n.i.

P7AF2F2

Gênero: n.i.

P7AF2F3Gênero: *Aureobasidium melanogenum* **P7AF3F1**

Gênero: n.i.

P7AF3F2

Gênero: n.i.

P7AM1F1Gênero: *Colletotrichum* sp.

P7AM1F2

Gênero: n.i.

P7AM2F1

Gênero: n.i.

P7AM2F2

Gênero: n.i.

P7AM3F1

Gênero: n.i.

P7AM3F2

Gênero: n.i.

P7AH1F1

Gênero: n.i.

P7AH3F1

Gênero: n.i.

P7MAC1F1

Gênero: n.i.

P7MAC2F1

Gênero: n.i.

P7MAC2F2

Gênero: n.i.

P7MAC3F1Gênero: *Colletotrichum* sp. **P7MAC3F2**

Gênero: n.i.

Anexo 2 - Espectro de RMN ^1H do composto citrinina (F2a1b) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz)

SpinWorks 4: F3a1b

Anexo 3 - Ensaio de difusão em disco da fração F3a1b contra o fungo fitopatogênico *P. sojae* em ensaio de difusão em disco (1mg)

Compostos analisados	Fitopatógenos			
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. lindemuthianum</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	<i>P. sojae</i>
Fração F3a1b
Inibição	53,01%	66,10%	47,60%	56,10%
Comet®
Inibição	46,06%	52,93%	37,31%	57,95%
Score®
Inibição	70,25%	65,20%	57,79%	71,45%
Captan SC®
Inibição	9,84%	9,51%	7,21%	0%
Dithane NT®
Inibição	1,52%	2,71%	0%	0%
Controle
Inibição	0%	0%	0%	0%
Controle MeOH
Inibição	0%	0%	0%	0%

Controle positivo: Fungicidas comerciais (1 mg de composto ativo);

Controle negativo: fungos fitopatogênicos; Controle MeOH: fungos fitopatogênicos frente ao solvente metanol.

Anexo 4a - Curva de crescimento micelial (Abs) de *Colletotrichum gloeosporioides* em relação aos compostos avaliados em 12 diferentes concentrações, durante 96 horas

Anexo 4b - Curva de crescimento micelial (Abs) de *Colletotrichum lindemuthianum* em relação aos compostos avaliados em 12 diferentes concentrações, durante 96 horas

Anexo 4c - Curva de crescimento micelial (Abs) de *Phomopsis sojae* em relação aos compostos avaliados em 12 diferentes concentrações, durante 96 horas

Anexo 4d - Curva de crescimento micelial (Abs) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em relação aos compostos avaliados em 12 diferentes concentrações, durante 96 horas

Anexo 5a - Espectro de RMN ^1H do composto Andrastina A (F2b2j) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz)

SpinWorks 4: F2b2j

Anexo 5b - Espectro de RMN ^{13}C do composto Andrastina A (F2b2j) em $\text{DMSO-}d_6$ (150 MHz)

SpinWorks 4: F2b2j

Anexo 5c - Espectro de RMN HSQC ^1H - ^{13}C do composto Andrastina A (F2b2j) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 e 150 MHz)

SpinWorks 4: F2b2j

Anexo 5d - Espectro de RMN HMBC ^1H - ^{13}C do composto Andrastina A (F2b2j) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 e 150 MHz)

SpinWorks 4: F2b2j

Anexo 6 - Espectro de RMN ^1H da fração F2b1i em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz)

SpinWorks 4: F2b1i

SpinWorks 4: F2b1n

Anexo 8 - Espectro de RMN ^1H da fração F2d1p em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz)

SpinWorks 4: F2b1p

Anexo 9 - Espectro de RMN ^1H da fração F2b5f em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz).

SpinWorks 4: F2b5f

Anexo 10 - Espectro de RMN ^1H do composto Metil-orselinato (F1d2o2) em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz)

SpinWorks 4: F1d2o2

Anexo 11 - Espectro de RMN ^1H da fração F1d2l10 em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz)

SpinWorks 4: F1d2l10

Anexo 12 - Espectro de RMN ^1H da fração F1d2l11 em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz)

SpinWorks 4: F1d2l11

Anexo 13 - Espectro de RMN ^1H da fração F1d2n3 em $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz)

SpinWorks 4: F1d2n3