

UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE
ESCOLA DE ENGENHARIA – CURSO DE QUÍMICA

Relatório Final

**ANÁLISE DE EXTRATOS BRUTOS PRODUZIDOS POR FUNGOS
ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Pentacalia desiderabilis*
(ASTERACEAE)**

Prof^a. Dr^a. Paulete Romoff
Pesquisadora Líder do projeto

Pesquisadores Colaboradores da Equipe:
Prof^a Dr^a Anamaria Dias Pereira Alexiou
Prof^a. Dr^a. Ana Paula Pimentel Costa
Prof. Dr. Marcelo J. Pena Ferreira
Prof^a. Dr^a. Oriana A. Fávero

São Paulo – 2017

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	4
1.1. Asteraceae.....	4
1.2. Microrganismos endofíticos	5
1.3. Fungos endofíticos isolados de espécies de Asteraceae	8
1.4. A espécie <i>Pentacalia desiderabilis</i> (Vell.) Cuatrec.	11
II. OBJETIVOS	12
III. METODOLOGIA.....	13
3.1. Coleta e identificação do material vegetal	13
3.2. Isolamento dos fungos endofíticos.....	13
3.3. Preservação dos endófitos.....	13
3.4. Obtenção dos extratos brutos dos endófitos e triagem química	14
3.5. Identificação dos endófitos isolados	15
3.5.1. Extração do material genético (DNA)	15
3.5.2. Reação de PCR.....	16
3.5.3. Purificação, quantificação e sequenciamento das sequências de DNA...	17
3.5.4. Análise das sequências de DNA.....	17
3.6. Triagem de bioatividades dos extratos brutos produzidos pelos endófitos	19
3.6.1. Avaliação da atividade antifúngica	19
3.6.2. Ensaio para avaliação da atividade antirradicalar.....	21
3.6.3. Ensaio para avaliação in-vitro da atividade anti-inflamatória	21
3.6.4. Ensaio para avaliação da atividade citotóxica	22
3.7. Cultivo em larga escala e obtenção de maior massa de um extrato bioativo.	22
3.8. Fracionamento cromatográfico e análise dos grupos.....	23
3.8.1. Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	23
3.8.2. Análise em cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).....	23
3.9. Separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência semipreparativa	24
3.10. Identificação estrutural dos metabólitos	24
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. Identificação dos endófitos	25
4.2. Obtenção e triagem química dos extratos brutos	38
4.3. Triagem de bioatividades dos extratos brutos produzidos pelos endófitos	42
4.4. Identificação dos metabólitos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	45
V. CONCLUSÕES.....	53
VI. FORMAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS E PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	54
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

RESUMO

O presente projeto tem como objetivo analisar o potencial químico e biológico de extratos brutos de fungos endofíticos associados à *Pentacalia desiderabilis* (Asteraceae) encontrada em regiões de Campos de Altitude do estado de São Paulo, bioma bastante ameaçado do domínio da Mata Atlântica no estado. Para tanto, inicialmente foi realizado o isolamento dos fungos endofíticos associados às folhas e galhos de *P. desiderabilis*, que permitiu a obtenção de 51 isolados. Posteriormente, o material genético (DNA total) desses microrganismos foi extraído e as regiões do ITS1 e ITS4, consideradas regiões de DNA barcoding, foram amplificadas e sequenciadas. A partir desse procedimento, 28 isolados foram identificados em diferentes níveis hierárquicos. Os endófitos identificados foram cultivados em pequena escala, empregando-se meio sólido, para obtenção dos extratos brutos. Esses extratos foram submetidos à avaliação das atividades antirradicalar, antifúngica e citotóxica. Posteriormente, um dos fungos endofíticos (*Colletotrichum gloeosporioides*) foi selecionado para cultivo em maior escala e seu respectivo extrato bruto fracionado, através de técnicas cromatográficas, para purificação das substâncias. Desse procedimento, foram identificados doze componentes pertencentes as classes dos ácidos graxos e seus derivados, n-alcanos e policetídeos. Os policetídeos isolados já foram identificados em uma espécie não caracterizada de *Colletotrichum* obtida como endófito de *Ludwigia prostrata* (Onagraceae). No entanto, esse é o primeiro relato da ocorrência desses policetídeos em *C. gloeosporioides* e o segundo relato desses metabólitos em endófitos de Asteraceae.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Asteraceae

Asteraceae pertence à ordem Asterales e representa um dos mais importantes grupos taxonômicos dentro das Eudicotiledôneas (KADEREIT, 2007). Esse grupo é extremamente estudado dos pontos de vista botânico, químico e farmacológico (SEAMAN, 1982; ZDERO & BOHLMANN, 1990; BREMER, 1994; FUNK et al., 2009). O uso de espécies de Asteraceae para fins econômicos e medicinais foi recentemente revisto e, sobretudo, têm sido amplamente estudadas as atividades citotóxica, antiinflamatória e antifúngica de algumas classes de metabólitos especiais sintetizados pelas espécies da família (BEEKMANN et al., 1996; RÜNGELER, 1999).

A produção de mais de 7.000 substâncias químicas (CALABRIA et al., 2007) tem sido relatada para a família, onde todas as classes químicas têm no mínimo algumas centenas de metabólitos isolados (BOHM & STUESSY, 2001; CALABRIA et al., 2007; FUNK et al., 2009), sendo esse o principal motivo atribuído ao sucesso evolucionário e a distribuição cosmopolita dos seus indivíduos (ALMEIDA-CORTEZ et al., 1999).

Inúmeras espécies de Asteraceae possuem importância econômica sendo usadas como alimentos, bebidas, especiarias, adoçantes, inseticidas, medicamentos, corantes, além de plantas ornamentais. Indubitavelmente, o principal produto alimentício de Asteraceae é a alface (*Lactuca sativa* L.) cuja produção anual e mundial ultrapassa os 22 milhões de toneladas. No entanto, outros vegetais como a chicória (*Cichorium intybus* L.), a escarola (*Cichorium endivia* L.) e a alcachofra (*Cynara scolymus* L.) também apresentam destaque. O óleo de girassol (*Helianthus annuus* L.) ocupa o quarto lugar no ranking mundial de óleos comestíveis e possui elevado valor agregado devido sua constituição com cerca de 90% de ácidos graxos insaturados, tais como o ácido oléico e linoléico (SIMPSON, 2009).

Várias espécies da família têm sido empregadas como bebidas, por exemplo, a camomila (*Matricaria recutita* L.) utilizada em chás, e o absinto um licor preparado a partir da espécie *Artemisia absinthium* L., cujo sabor é decorrente da presença do absintin, mas as propriedades psicoativas são atribuídas à α -tujona, um monoterpene que atua como antagonista do receptor GABA_A ocasionando convulsões. A espécie *Stevia rebaudiana* Bertoni, popularmente conhecida como estévia, contém em suas folhas diterpenos

glicosídicos, tais como o esteviosídeo e vários rebaudiosídeos, que são cerca de 100-450 vezes tão doces quanto à sucrose. Essas substâncias não são metabolizadas no organismo sendo, portanto, empregadas como adoçantes.

As asteráceas também interagem com várias espécies de insetos, sendo essa uma das poucas fontes vegetais de inseticidas comerciais efetivos. Essas substâncias designadas de piretróides compõem, atualmente, muitos produtos comerciais, os quais são constituídos através da associação de quatro dessas substâncias, as piretrinas I e II e as cinerinas I e II, extraídas de *Tanacetum cinerariifolium* (Trev.) Sch. Bip. No entanto, um dos principais usos de espécies da família tem sido o emprego como fitoterápicos na medicina popular. A Tabela 1 lista espécies e seus respectivos usos como ervas medicinais aprovadas na Alemanha, sendo muito empregadas também no Brasil (FUNK et al., 2009). No entanto, apesar da elevada diversidade e da considerável importância da família para fins econômicos e medicinais, a microbiota associada às espécies de Asteraceae tem sido pouco estudada.

1.2. Microrganismos endofíticos

Entre todos os organismos produtores de micromoléculas naturais designadas como produtos naturais, microrganismos representam uma fonte rica de metabólitos biologicamente ativos que podem apresentar amplas aplicações como agentes agrotóxicos, antibióticos, imunossuppressores, antiparasitários e antitumorais. Ao contrário de outros organismos, os microrganismos ocupam todos os nichos vivos e não-vivos da Terra, incluindo o Ártico, a Antártida, regiões alpinas, desertos, sedimentos de rochas profundas e ambientes marinhos. Microrganismos, comumente isolados de solo, também podem ser encontrados em plantas vivas e, nesse caso, são designados de microrganismos endofíticos (ZHANG, SONG & TAN, 2006).

Os fungos são estimados em 1,5 milhões de espécies (HAWKSWORTH, 2001) distribuídos principalmente entre fungos micoparasitas, coprófilos, de solo, de água doce, epifíticos e endofíticos. Os fungos endofíticos são microrganismos que podem viver parte, ou todo o ciclo de vida no interior dos tecidos de organismos hospedeiros aparentemente saudáveis (TAN & ZOU, 2001). Essa relação pode variar de patogênica a simbiótica, porém a coexistência simbiótica e assintomática é a que pode conferir a ambos os organismos diversas vantagens

Tabela 1. Espécies de Asteraceae empregadas na medicina popular para diversas finalidades

Nome usual*	Nome científico	Parte da planta	Usos
Arnica	<i>Arnica montana</i> <i>A. chamissonis</i>	Flores secas em tinturas	Inflamações e feridas
Alcachofra	<i>Cynara scoymus</i>	Folhas secas	Dispepsia
Bardana	<i>Arctium lappa</i>	Raízes	Diurético, tratamentos de artrite, gastrointestinal e psoríase
Butterbur ^a	<i>Petasites hybridus</i>	Folhas e rizomas	Alergias respiratórias – rinite; Enxaqueca
Calendula	<i>Calendula officinalis</i>	Infusões das partes aéreas	Feridas externas e inflamações da boca e garganta
Camomila	<i>Matricaria recutita</i>	Chás das partes aéreas	Inflamações e espasmos gastrointestinais
Cardomariano	<i>Silybum marianum</i>	Infusões das sementes	Dispepsia e desordens biliares
Chicória	<i>Cichorium intybus</i>	Chás das partes aéreas	Perda de apetite e dispepsia
Dente-de-leão	<i>Taraxacum officinale</i>	Infusões da erva	Perda de apetite, flatulência e distúrbios da bile
Equinácea	<i>Echinacea purpurea</i>	Chá da erva ou das raízes	Infecções respiratórias e urinárias, e cicatrização
Helénio	<i>Inula helenium</i>	Raízes e rizomas	Pneumonia e asma
Losna	<i>Artemisia absinthium</i>	Folhas secas em infusões	Perda de apetite e dispepsia
Matricária	<i>Tanacetum parthenium</i>	Folhas e flores	Febres, dores de cabeça e reumatismo
Mal-me-quer do campo	<i>Grindelia robusta</i>	Tintura das folhas e flores	Inflamação do trato respiratório
Mil-folhas	<i>Achillea millefolium</i>	Partes aéreas secas	Desordens gastrointestinais
Tussilagem	<i>Tussilago farfara</i>	Chá das folhas secas	Tosse, rouquidão e inflamação bucal
Vara-dourada	<i>Solidago virgaurea</i>	Decocção das partes aéreas	Inflamações do trato urinário

*As espécies relatadas podem apresentar outros nomes usuais; ^aEspécie europeia ainda sem tradução para o português, comercializada como o fitoterápico Antilerg® pelo laboratório Aché.

adaptativas, como o aumento da absorção de nutrientes, aumento da tolerância ao estresse, a herbivoria, ao calor, a salinidade e a seca (DAVITT, CHEN & RUDGERS, 2011; MENG et al., 2011; RODRIGUEZ & REDMAN, 2008). Nessa relação simbiótica, os fungos endofíticos são capazes de sequestrar os metabólitos produzidos pelas plantas e utilizá-los como defesa química ou, por outro lado, podem produzir tais componentes em resposta à pressão exercida por outros microrganismos endofíticos, por fitopatógenos ou, até mesmo, por predadores (WEIB et al., 2011; AZEVEDO, 1998; ANDREWS & HIRANO, 1990).

Os fungos endofíticos são encontrados em todos os órgãos e tecidos vegetais de todas as espécies vegetais já examinadas. No entanto, a diversidade e quantidade desses microrganismos variam de planta para planta. Algumas espécies de endofíticos apresentam alta especificidade de hospedeiros, sendo encontrados com maior frequência em plantas de um grupo taxonômico particular. Existem, ainda, algumas espécies em que essa especificidade é limitada a apenas um hospedeiro (ARNOLD, 2007). A diversidade de espécies entre os tecidos vegetais pode ser explicada pela habilidade de cada microrganismo em usar diferentes substratos no seu metabolismo. A proliferação de endofíticos em tecidos especializados tem sido considerada como estratégia para melhor utilização dos recursos encontrados no vegetal. Conseqüentemente, esse comportamento reduz a concorrência entre eles, e impede o crescimento excessivo da população desses microrganismos em determinados órgãos (GIMÉNEZ et al., 2007).

Estudos laboratoriais e de campo têm demonstrado que espécies de plantas selvagens necessitam de microrganismos endofíticos para tolerância ao estresse e sobrevivência (RODRIGUEZ & REDMAN, 2008). A competição pela sobrevivência e pressões ambientais pode impulsionar uma evolução no modo de ataque, defesa e diversidade de sinalizações que, por sua vez, dão origem a uma variedade de substâncias que apresentam grande diversidade química e biológica, exploradas na descoberta de novas drogas (SINGH & MACDONALD, 2010). Aproximadamente um quarto de todos os produtos naturais biologicamente ativos conhecidos tem sido produzido por fungos (KONGSAEREE et al., 2003). Cerca de 60% dos medicamentos encontrados no mercado são provenientes de produtos naturais e destes, 40% são derivados de fontes microbianas (SINGH & MACDONALD, 2010). Tais componentes apresentam diversas propriedades biológicas como, por exemplo, atividade citotóxica, antiviral, antiparasitária, antimicrobiana, anti-inflamatória, entre outras.

Apesar da produção de metabólitos especiais biologicamente ativos e do fornecimento de ampla variedade de estruturas químicas oriundas de diversas vias biossintéticas, tais microrganismos ainda são pouco explorados (CHANDRA, 2012; KHARWAR et al., 2011; ZHANG, SONG & TAN, 2006; GUNATILAKA, 2006; TAN & ZOU, 2001).

1.3. Fungos endofíticos isolados de espécies de Asteraceae

Considerando o grande número e a diversidade de espécies presentes na flora mundial, tem sido sugerido que as plantas de inimitáveis nichos ecológicos, especialmente aqueles com uma morfologia incomum ou que as espécies possuam estratégias incomuns para a subsistência, são muito adequadas para o estudo de seus endofíticos (KUSARI & SPITELLER, 2011).

Nesse sentido, as asteráceas que crescem em todos os habitat terrestres, exceto a Antártida, possuem adaptações morfológicas e fisiológicas que garantem a sobrevivência e o sucesso evolucionário das espécies (FUNK et al., 2009). Desta forma, a investigação dos metabólitos especiais de fungos endofíticos associados a tais espécies podem aumentar a probabilidade de isolamento de novos constituintes químicos com atividades biológicas diversas.

Na literatura tem sido relatado o isolamento de vários metabólitos especiais bioativos produzidos por diversos fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae (Tabela 2). A Figura 1 apresenta alguns exemplos de substâncias produzidas por fungos endofíticos isolados dessas espécies.

A elevada diversidade de fungos endofíticos oriunda da flora de Asteraceae também tem sido descrita em literatura. Lv e colaboradores (2010) relataram o isolamento de 49 fungos endofíticos associados a *Saussurea involucreta* dos quais 12 espécies apresentaram atividade antimicrobiana. Por outro lado, Liu e colaboradores (2001) descrevem o isolamento de 39 fungos endofíticos de *Artemisia annua* dos quais 21 produziram *in vitro* substâncias com atividade frente a fungos fitopatogênicos. A partir de *Viguiera arenaria* e *Tithonia diversifolia*, Guimarães e colaboradores (2008) descreveram o isolamento de 39 fungos endofíticos dos quais todos os extratos foram bioativos em pelo menos um dos ensaios realizados de atividade antitumoral, antimicrobiana e antiparasitária, enquanto Rosa e colaboradores (2010) obtiveram 8 extratos de fungos isolados de *Ageratum myriadenia* e 5 de *Trixis vauthieri* com atividades antitumoral, leishmanicida e/ou tripanocida.

Tabela 2. Exemplos de bioatividade de classes químicas isoladas de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae

Espécie vegetal	Fungo endofítico	Classes químicas isoladas	Bioatividade	Referência
<i>Artemisia annua</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	alcalóides	citotóxica	Zhang et al., 2010
<i>Artemisia annua</i>	<i>Colleototrichum</i> sp.	esteróides	antimicrobiana	Lu et al., 2000
<i>Artemisia annua</i>	<i>Hypoxyylon truncatum</i>	benzo[j]fluorantenos	citotóxica	Gu et al., 2007
<i>Artemisia annua</i>	<i>Leptosphaeria</i> sp.	sesquiterpenos	-	Liu et al., 2003
<i>Artemisia annua</i>	<i>Myrothecium roridum</i>	tricotecenos	citotóxica	Shen et al., 2006; 2010
<i>Artemisia annua</i>	<i>Paraphaeosphaeria nolinae</i>	xantonas	não significativa ^a	Ge et al., 2006
<i>Artemisia mongolica</i>	<i>Colleototrichum gloeosporioides</i>	derivados de ácido benzóico	antimicrobiana	Zou et al., 2000
<i>Artemisia vulgaris</i>	<i>Chalara</i> sp.	cromonas e xantonas	antimicrobiana	Lösger et al., 2008
<i>Baccharis coridifolia</i>	<i>Ceratopycnidium baccharidicola</i>	tricotecenos	-	Rizzo et al., 1997
<i>Bidens pilosa</i>	<i>Botryosphaeria rhodina</i>	depsidonas	antifúngica e citotóxica	Abdou et al., 2010
<i>Cirsium arvense</i>	<i>Mycelia sterila</i>	isocumarinas e benzofurano	-	Krohn et al., 2001
<i>Eupatorium arnottianum</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	depsidonas	-	Meister et al., 2007
<i>Laggera alata</i>	<i>Podospora</i> sp.	xantonas e antraquinona	larvicida	Matasyoh et al., 2011
<i>Pyrethrum cinerariifolium</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	isocromenos e fenóis	antimicrobiana	Li et al., 2010
<i>Smallanthus sonchifolius</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i>	isocumarina e esteróide	-	Gallo et al., 2009
<i>Smallanthus sonchifolius</i>	<i>Papulaspora immersa</i>	esteróides e cromonas	citotóxica	Gallo et al., 2010
<i>Smallanthus sonchifolius</i>	<i>Phoma betae</i>	esteróide e diterpeno	-	Gallo et al., 2009
<i>Tithonia diversifolia</i>	<i>Phoma sorghina</i>	antraquinonas	-	Borges e Pupo, 2006
<i>Trixis vauthieri</i>	<i>Alternaria</i> sp.	bifenilas	antiparasitária	Cota et al., 2008
<i>Viguiera arenaria</i>	<i>Fusarium</i> sp.	diketopiperazinas	não significativa ^b	Guimarães et al., 2010
<i>Viguiera arenaria</i>	<i>Glomerella cingulata</i>	pirona	citotóxica	Guimarães et al., 2008
<i>Viguiera arenaria</i>	<i>Guignardia mangiferae</i>	meroterpenos	não significativa ^c	Guimarães et al., 2012

<i>Viguiera robusta</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	azafilonas	não significativa ^b	Borges et al., 2011
<i>Viguiera robusta</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	alcalóides	citotóxica e antibiótica	Momesso et al., 2008

Tabela 2. Continuação

Espécie vegetal	Fungo endofítico	Classes químicas isoladas	Bioatividade	Referência
<i>Viguiera robusta</i>	<i>Colleototrichum gloeosporioides</i>	dicetopiperazinas	não significativa ^b	Guimarães et al., 2010
<i>Viguiera robusta</i>	<i>Penicillium crustosum</i>	dicetopiperazinas	não significativa ^b	Guimarães et al., 2010

^aatividade citotóxica; ^batividade antibacteriana *in vivo* usando o nemátodo *Caenorhabditis elegans* infectado com o patógeno humano *Enterococcus faecalis*; ^catividades antiparasitária, antimicrobiana e citotóxica.

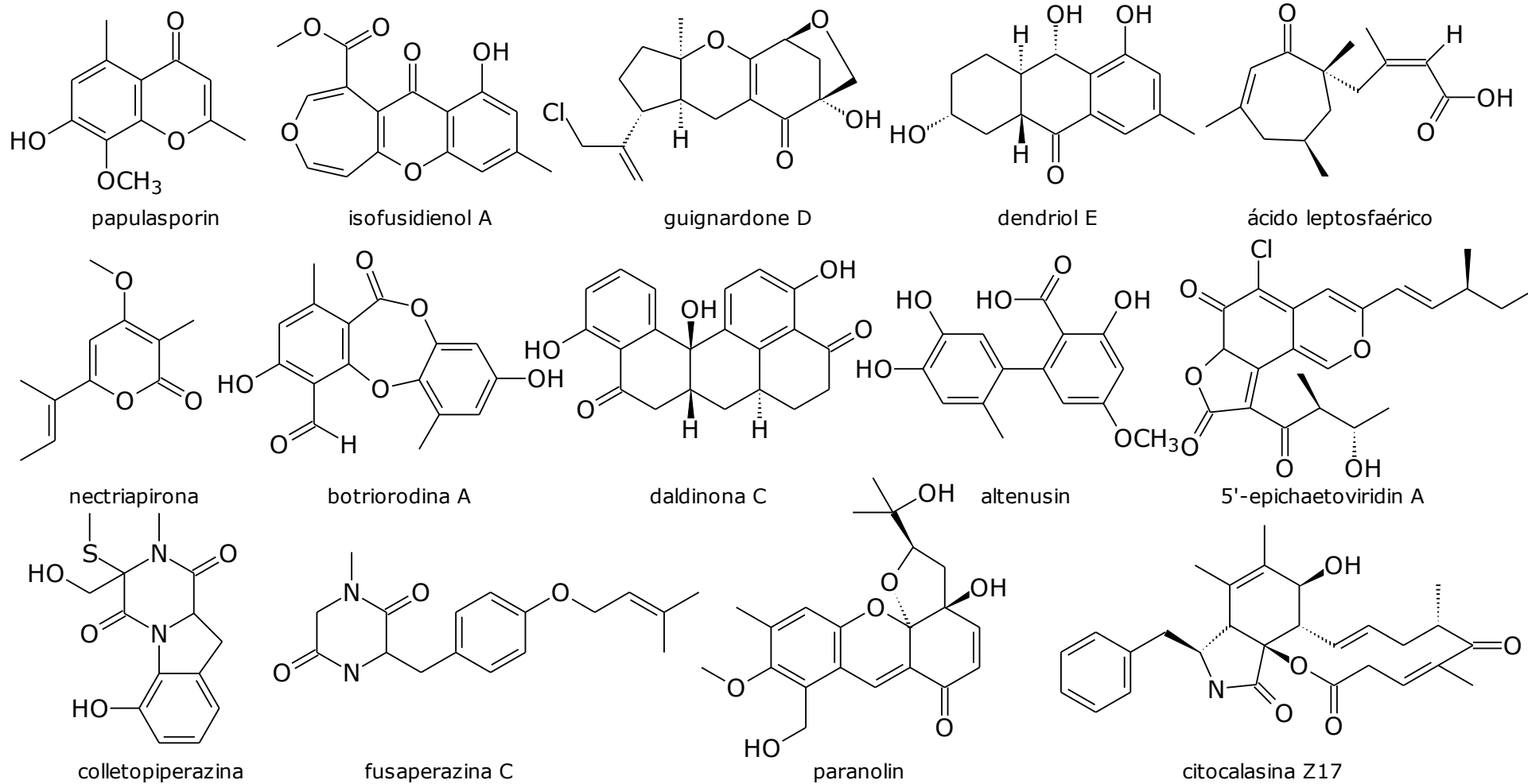


Figura 1. Metabólitos especiais produzidos por fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae

1.4. A espécie *Pentacalia desiderabilis* (Vell.) Cuatrec.

Entre os vários gêneros de Asteraceae, *Pentacalia* Cass. pertence a tribo Senecioneae, a maior tribo da família, sendo constituído por mais de 205 espécies distribuídas na região tropical do continente americano. No Brasil são descritas duas espécies: *P. desiderabilis* localizada, principalmente, na região sul e sudeste, e *P. tropicalis* encontrada somente na região sudeste, mais especificamente nos estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro. A espécie *P. desiderabilis* é comum nas bordas da Floresta Atlântica em altitudes que variam de 400 a 2400m (TELES & STEHMANN, 2008).

As plantas do gênero são normalmente lianas escandentes, isto é, plantas de crescimento trepador cujo caule estreito e maleável, cresce e enrosca-se rapidamente sobre árvores, para atingir a luz abundante no topo das árvores da floresta. A espécie *P. desiderabilis* é uma liana atrativa que exibe folhas carnudas e possui flores amarelo-vibrante. Por outro lado, algumas espécies de *Pentacalia* são reconhecidamente tóxicas, tendo sido relatados casos de morte por envenenamento de bovinos e ovinos através da ingestão de suas folhas (TOKARNIA et al., 1990).

A composição química de *Pentacalia* tem sido pouco descrita na literatura. Entre esses relatos podem ser destacados o isolamento de sesquiterpenos, triterpenos e fenilpropanóides de *P. ephiphytica*, *P. andicola*, *P. firmipes* e *P. archieri* (BOHLMANN & ZIESCHE, 1979; BOHLMANN et al. 1984). O estudo da espécie *P. corymbosa* resultou na identificação de esteróides, triterpenos, cumarinas e flavonóides (TORRENEGRA et al., 2000) e das espécies *P. ledifolia* e *P. corymbosa* foram isolados dois quinóides (PEDROZO et al., 2006). Recentemente, dois artigos em literatura do nosso grupo de pesquisas, os quais são resultados provenientes do estudo fitoquímico com a espécie *P. desiderabilis*, relatam o isolamento do quinóide jacaranona e suas respectivas atividades leishmanicida, tripanocida, antimalárica (MORAIS et al., 2012) e citotóxica (MASSAOKA et al., 2012). Dessa espécie foram identificados também outros quinóides, flavonóides, esteróides e derivados do ácido quínico.

No entanto, entre as espécies vegetais que ocorrem nos Campos de Altitude da Mata Atlântica do estado de São Paulo, não há artigos científicos que relatam a avaliação de atividades biológicas em extratos brutos ou o isolamento de metabólitos especiais produzidos por fungos endofíticos associados a espécies desse bioma.

II. OBJETIVOS

Objetivos gerais

Esse projeto teve como objetivo a obtenção e seleção de extratos brutos oriundos de fungos endofíticos associados à espécie *Pentacalia desiderabilis* (Asteraceae) presente em Campos de Altitude de áreas remanescentes do bioma Mata Atlântica em São Paulo, que possuam atividade antiinflamatória, antirradicalar e/ou antifúngica. Após seleção dos extratos, foram realizados o isolamento e a identificação das substâncias responsáveis pela bioatividade.

Objetivos específicos

Esse projeto apresentava os seguintes objetivos específicos:

1. Isolar, caracterizar e preservar os fungos endofíticos associados com a espécie *Pentacalia desiderabilis* (Asteraceae), coletada na região de Campos do Jordão, São Paulo.
2. Cultivar os fungos endofíticos isolados em meio de cultura sólido para obtenção dos respectivos extratos brutos.
3. Selecionar os extratos brutos obtidos a partir dos fungos endofíticos de *P. desiderabilis* visando reconhecer potencial atividade anti-inflamatória, antirradicalar e antifúngica.
4. Realizar o fracionamento cromatográfico biomonitorado e a purificação das substâncias presentes nos extratos bioativos, através de diferentes procedimentos cromatográficos (Cromatografia em camada delgada, Cromatografia em coluna e Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)) para isolamento do(s) componente(s) responsável(is) pela atividade.
5. Caracterização e/ou determinação estrutural das substâncias bioativas isoladas através de análises espectroscópicas e espectrométricas, tais como: espectroscopia no infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas (EM).
6. Avaliar o potencial anti-inflamatório, antirradicalar e antifúngico das substâncias isoladas.

III. METODOLOGIA

3.1. Coleta e identificação do material vegetal

A espécie *Pentacalia desiderabilis* (Vell.) Cuatrec. (Asteraceae) foi coletada na região do condomínio Umuarama, pertencente à Universidade Presbiteriana Mackenzie, que se encontra a cerca de 1700m de altitude na Serra da Mantiqueira, próximo às coordenadas 22 46'24"S e 45 33'45"W, no município de Campos do Jordão, à 170Km da capital paulista, no extremo leste do Estado de São Paulo. A identificação da espécie foi realizada pela Prof^a. Dr^a. Oriana A. Fávero e a respectiva exsicata depositada no herbário do Instituto Florestal de São Paulo sob o voucher SPSF 37596.

3.2. Isolamento dos fungos endofíticos

A metodologia empregada para o isolamento dos fungos endofíticos foi baseada em procedimentos descritos na literatura (MOMESSO et al., 2008). Dessa forma, o material vegetal (folhas e ramos), após coleta, foi submetido ao procedimento de esterilização: Após a lavagem com água, foi imerso em etanol 70% (3 minutos), hipoclorito de sódio a 5% (5 minutos) e, novamente, em etanol 70% (1 minuto). A água estéril da segunda lavagem foi plaqueada, garantindo, portanto a ausência de fungos não-endofíticos.

Após a esterilização, o material vegetal foi cortado assepticamente em fragmentos pequenos, e estes inseridos em placas de Petri contendo meio de cultura sólido (batata, dextrose e ágar – (BDA)), preparados com ampicilina na concentração de 100 μ g.mL⁻¹. As placas foram mantidas em estufa microbiológica a 25°C e sucessivos repiques foram realizados até a obtenção de linhagens puras.

3.3. Preservação dos endófitos

Todos os morfotipos isolados (51 morfotipos) foram preservados em meio ágar extrato de malte (AEM). Após a imersão de cerca de 5 discos de ágar sólido (batata, dextrose e ágar – (BDA)) com cada endófito em AEM, os mesmos foram mantidos em estufa a 25°C por 5 dias até apresentarem crescimento, transferidos para a geladeira (8°C) por 2 horas, em seguida para o freezer (-20°C) por 2 horas e, por fim, para preservação em ultrafreezer a -80°C.

3.4. Obtenção dos extratos brutos dos endófitos e triagem química

Cada fungo endofítico isolado foi cultivado em placa de Petri contendo meio de cultura BDA a 25°C, por 21 e 28 dias (RADU & KQUEEN, 2002; LI et al., 2005) a fim de se identificar diferenças na produção de metabólitos, relativas a tempo de cultivo. O controle negativo foi realizado através de uma placa de Petri, contendo apenas meio BDA, submetida às mesmas condições de cultivo. Após esse período, o ágar foi cortado, macerado, e mantido sob agitação com acetato de etila (grau P.A., Synth) durante pelo menos 3 dias. As soluções foram filtradas e, após remoção do solvente, foram obtidos os extratos brutos.

Para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram usados solventes grau CLAE da marca T. J. Baker. As análises por CLAE foram feitas em um Cromatógrafo Agilent 1260 equipado com detector por varredura de espectro no Ultravioleta por arranjo de fotodiodos com célula de fluxo de 60 mm. Como fase estacionária para as análises em escala analítica foi utilizada uma coluna Zorbax Eclipse plus de fase reversa C₁₈ (4,6 x 150 mm) e 3,5µm de diâmetro de partícula e um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. O sistema de eluição das amostras foi em modo gradiente iniciado com uma mistura de 90% de H₂O acidificada com 0,1% de ácido acético e 10% de acetonitrila (ACN) até 6 min., até 7 min. 10 a 15% de ACN, de 7 a 22 min. 15% de ACN, de 22 a 23 min 15 a 20% de ACN, 23 a 33 min. 20% de ACN, 33 a 34 min. 20 a 25% de ACN, 34 a 44 min. 25% de ACN, 44 a 54 min. 25 a 50% de ACN, 54 a 60 min. 50 a 100% de ACN.

Os extratos foram dissolvidos em metanol grau CLAE e preparados numa concentração de 2 mg.mL⁻¹. Através dessa análise foi possível detectar a produção metabólica de cada endófito e a complexidade da mistura de constituintes químicos presentes nas amostras, o que permitiu uma pré-seleção de extratos fúngicos para a realização das análises posteriores.

3.5. Identificação dos endófitos isolados

Na sistemática microbiana, para realizar a identificação de fungos filamentosos, tradicionalmente eram utilizadas apenas características morfológicas, microscópicas e macroscópicas. Porém, esta metodologia nem sempre origina dados e resultados precisos, podendo resultar em um falso diagnóstico além de demandar muito tempo e esforço. Por isso, métodos baseados na biologia molecular estão sendo cada vez mais empregados, devido sua praticidade, rapidez e alta precisão nos resultados utilizando-se pequena quantidade de DNA e resultando na possível identificação de espécimes em diferentes amostras ambientais e sem a necessidade de cultivar os organismos estudados (WACULICZ-ANDRADE, 2009). Dessa forma, esse foi o método de escolha, empregado nesse trabalho, para a identificação dos endófitos isolados.

3.5.1. Extração do material genético (DNA)

A extração de DNA foi realizada conforme método descrito por Rodrigues (2010). Após o crescimento do fungo, o micélio foi filtrado em papel filtro, lavado com água purificada, seco em papel toalha para retirada do excesso de meio de cultura líquido e submetido ao protocolo de extração. O material foi armazenado em microtubos e acrescidos de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCL 0,05M; EDTA 0,005M; NaCl 0,1M; SDS 1%). Em seguida, foram incubados por 15 minutos em congelador a -20°C, ou até seu conteúdo congelar totalmente.

Após o congelamento do material, ocorreu a trituração do micélio congelado com o auxílio de um pistilo até provocar a homogeneização total do conteúdo. Em seguida, foram adicionados 5 µL de Proteinase K (50 µg/mL), seguida de homogeneização total da amostra e incubação a 60°C por 30 minutos em banho-maria. Posteriormente, foram acrescidos 162 µL de CTAB de Hoog (Tris 2M; NaCl 8,2%; EDTA 2M; CTAB 0,2%), seguido novamente de homogeneização e incubação a 65°C por 10 minutos (RODRIGUES, 2010).

Após a incubação, foram adicionados 570 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), misturado por inversão até homogeneização total do conteúdo e, posteriormente, incubado por 30 minutos em gelo. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 15929 x g por 15 minutos. Nessa etapa, foi possível observar a fase aquosa (superior) e esta foi transferida para um novo microtubo. Posteriormente, foram adicionados 10% do volume de acetato de sódio 3M. Em seguida, o tubo foi invertido até ocorrer a homogeneização completa e incubado

a 0°C por 30 minutos. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 15929 x g por 15 minutos (RODRIGUES, 2010).

O sobrenadante resultante da centrifugação foi transferido para um novo microtubo e, em seguida, adicionado 50% do volume obtido de isopropanol. O tubo foi invertido repetidamente. Após, ocorreu a centrifugação a 15929 x g por 10 minutos. Nessa etapa, o sobrenadante foi desprezado e, em seguida, foi adicionado 200 µL de etanol 70% a 4°C, promovendo uma gentil suspensão do material precipitado com o auxílio de uma pipeta para não danificar o DNA. Após essa etapa, a amostra foi centrifugada por 15929 x g por 5 minutos. Em seguida, a etapa na qual ocorreu a adição de etanol 70% foi repetida mais uma vez para melhores resultados. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e a amostra permaneceu aberta, por cerca de 1 hora, para ocorrer a evaporação total do etanol. Por fim, foram acrescentados 100µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M; EDTA 0,001M) na amostra (RODRIGUES, 2010). Conforme necessário, as amostras foram congeladas (-20 °C) até a sua utilização.

As amostras de DNA obtidas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% para quantificação, utilizando marcadores de concentração (λ DNA, Invitrogen).

3.5.2. Reação de PCR

As amostras de DNA genômico foram submetidas a técnica de PCR para a amplificação do rDNA. Os oligonucleotídeos iniciadores aplicados foram o ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') para estudo da região ITS conforme descrito por Rodrigues (2010), com algumas modificações.

Cada reação de PCR apresentou um volume final de 50 µL contendo de 5-10ng DNA; 10 µL de tampão de PCR 5x; 2,5 µL de primer ITS-1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') a 100 pm; 2,5 µL de primer ITS-4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') a 100 pm; 2 µL de dNTPs a 10 pm; 7 µL de MgCl₂ 25 mM; 1 µL de enzima Taq Polimerase. As condições da PCR foram: desnaturação por 5 minutos a 94°C, seguido de 24 ciclos (desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C durante 1 minuto e alongação a 72°C por 1 minuto) e extensão final de 72°C durante 5 minutos (RODRIGUES, 2010). Conforme necessário, as amostras foram congeladas (-20°C) até a sua utilização.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2%, sendo utilizado marcador de concentração (1 kp DNA ladder Biolabs).

3.5.3. Purificação, quantificação e sequenciamento das sequências de DNA

O produto de reação da PCR foi submetido à purificação através do kit Invisorb® Fragment CleanUp da Invitex, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Para a confirmação do material, as amostras foram submetidas à eletroforese com gel 1,2% de agarose.

Em seguida, as amostras foram quantificadas. Para tal, foi utilizado o aparelho Quantus™ Fluorometer da Promega, seguindo o protocolo manual para QuantiFluor® dsDNA System fornecido pelo fabricante. Os dados obtidos foram alojados em forma de tabela para uso posterior.

Para a realização do sequenciamento das amostras, as amostras foram enviadas para a empresa Helixxa Pesquisa (Campinas, SP), onde foi utilizada a plataforma Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer, sendo também enviados os dados de quantificação de cada amostra.

3.5.4. Análise das sequências de DNA

Depois de realizado o sequenciamento, as sequências obtidas se encontraram em arquivos com formato "Arquivo AB1", sendo um arquivo para a sequência forward (sentido 3' para 5') e um outro arquivo para a sequência reverse (5' para 3') para uma mesma amostra de DNA. Essas sequências foram visualizadas com o programa BioEdit (Biological sequence alignment editor – versão 7.2.5).

Posteriormente, ambos os arquivos de cada amostra de DNA foram alinhados para a obtenção de um *contig*, que é a junção de segmentos de DNA sobrepostos que, em conjunto, representam uma região consensual de DNA. Para tal, os arquivos foram convertidos em formato ".zip" e encaminhados para o programa Electropherogram quality analysis desenvolvido pela Embrapa: Genetic Resources and Biotechnology (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Em seguida foi obtida a tabela de qualidade das amostras.

A tabela informa o número total de bases, quantidade de bases com qualidade superior a 20%, quantidade de bases com qualidade superior a 30% e

se a sequência apresentou mais de 100 bases com qualidade superior a 20% da sequência forward e da sequência reverse. As sequências que apresentaram o último item como "Ok" foram analisadas posteriormente e as que obtiveram "No" foram descartadas devido uma má qualidade de uma ou ambas as sequências.

Em seguida, ambas as sequências com boa qualidade foram selecionadas em "Read number" e foi selecionada a opção "cluster sequences using CAP3 for checked reads" na parte inferior da tabela. Quando necessário esse último passo foi refeito até o surgimento da opção "contig list" na nova página carregada. Por fim, nessa opção foi obtido o *contig*, que foi armazenado em arquivo word para posterior análise.

Para a identificação dos isolados, os contigs foram depositados separadamente no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o programa BLAST Nucleotide (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide) desenvolvido pela National Center for Biothecnology. O contig foi armazenado em "Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)" e, em seguida, foi selecionada a opção "BLAST" em azul no final da página.

Posteriormente, o site demonstrou a distribuição dos 100 melhores BLASTs de 100 sequências armazenadas no site e sequências que produziram alinhamentos significativos. Neste último, foi dado a descrição e o nome da sequência armazenada, sendo o começo do nome, na maioria das vezes, o nome científico do organismo estudado, juntamente com seu *max score*, *total score*, *query cover*, *e-value*, identidade e accession (Query ID). São fundamentais para este estudo o *max score*, *e-value* e identidade. Esses três foram armazenados em forma de tabela.

Em caso de obtenção de duas ou mais sequências com nomes diferentes, mas com *max score* e identidade muito parecidas, foi realizado uma comparação com a morfologia obtida com a literatura para poder diferenciar essas sequências e para uma melhor identificação dos isolados. Posteriormente, os nomes que possuíam altas diferenças morfológicas foram descartados.

Após obtenção do nome científico ou gênero de cada fungo, a literatura foi consultada para descobrir qual nicho o isolado estudado pertence e informações gerais e específicas dos mesmos.

3.6. *Triagem de bioatividades dos extratos brutos produzidos pelos endófitos*

3.6.1. Avaliação da atividade antifúngica

Esse ensaio, no projeto original, foi proposto com o fungo *Aspergillus flavus*, causador de perdas agrícolas devido a produção de aflatoxinas em culturas como o milho. Entretanto, devido a dificuldade de obtenção da cepa, dada a aposentadoria da pesquisadora externa que nos forneceria a mesma, os ensaios de atividade antifúngica foram realizados com o fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum*. Esse fungo também causa perdas significativas na agricultura, em especial, em culturas como o feijão, a banana, o algodão, entre outros. A doença causada, a fusariose, causa a murcha e/ou amarelecimento das folhas e a consequente perda da produtividade e morte da planta.

O método desenvolvido utilizou o ensaio de cultura dupla empregando os fungos endofíticos e o fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Nessa avaliação os isolados endofíticos foram contrastados com o fitopatógeno conforme ensaio estruturado proposto por Campanile et al., 2007. Em placas de Petri de 90mm de diâmetro, contendo 10mL do meio BDA, um disco de micélio (6 mm de diâmetro) do fitopatógeno e do endófito em análise, foi posicionado com a distância de 22,5mm da borda da placa e 45mm entre si. A placa controle foi feita com um disco de micélio do fitopatógeno e em seu lado oposto, um disco ágar-água sem fungo. As placas foram incubadas à temperatura de 25°C.

Os resultados das interações fungo endofítico x fitopatógeno (Figura 2) foram inicialmente registrados de maneira qualitativa, recebendo uma classificação simbólica: [(-) negativo], quando o isolado endofítico não apresentou atividade antagônica e [(+) positivo], quando o isolado endofítico apresentou alguma atividade antagônica. A atividade antagônica apresentada pelos fungos endofíticos foi registrada seguindo a classificação proposta por Mejía et al. (2008): "antibiose", quando a inibição do crescimento do fitopatógeno foi determinada pela presença de uma zona de inibição, ou "competição pelo substrato", quando houve maior crescimento do fungo endofítico em relação ao patógeno, sem a presença de uma zona de inibição.

Os fungos endofíticos que apresentaram interações positivas com o fungo fitopatogênico, tiveram seus halos de inibição medidos através do programa ImageJ (RASBAND, 2016). Foram feitas cinco medições: a 0° de inclinação, 45°, 90°, 135° e 180° (Figura 3), em relação ao disco central do endófito para uma análise quantitativa. As placas foram incubadas a 25°C, por tempo suficiente

para que a placa controle fosse inteiramente recoberta pelo fitopatógeno (entre 13 e 14 dias).

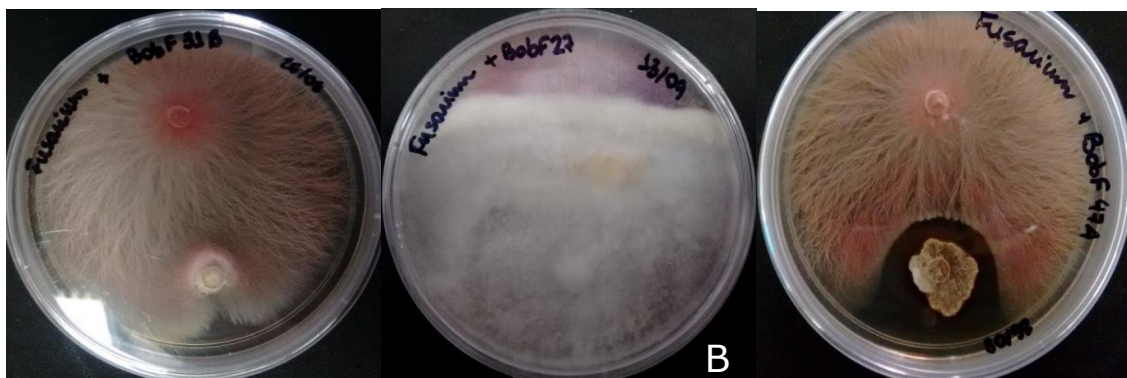
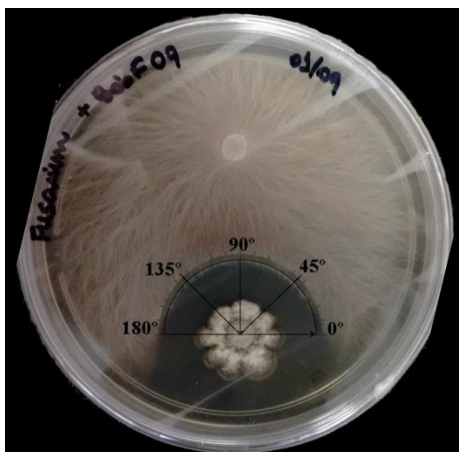


Figura 2 – Duplo plaqueamento entre *Fusarium oxysporum* (posicionado na região superior da placa) e diferentes endófitos de *Pentacalia desiderabilis* (posição inferior na placa). A: Ensaio classificado como negativo, isto é, sem atividade antagônica; B: Ensaio classificado como positivo, isto é, com atividade antagônica do tipo competição pelo substrato; e C: Ensaio classificado como positivo, portanto com atividade antagônica do tipo antibiose (detalhe para a presença de halo de inibição).

Figura 3. Representação da metodologia de medição de halos de inibição.



3.6.2. Ensaios para avaliação da atividade antirradicalar

Os extratos brutos obtidos dos fungos endofíticos foram avaliados quanto a sua atividade antirradicalar através da reação com o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila), conforme procedimento descrito em literatura (OLIVEIRA et al., 2014).

A solução de DPPH foi preparada a partir de 3,5 a 3,9 mg de DPPH em 50 mL de metanol. A concentração exata da solução de DPPH foi determinada pela absorbância máxima em 515 nm considerando o $\epsilon_{\text{DPPH}} = 1,25 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. A solução do antirradical trolox foi preparado com 1,25 mg em 2,5 mL metanol. As soluções preparadas permaneceram por 5 minutos no sonicador para total solubilização.

As análises foram realizadas em placas de ELISA para absorbância com caminho óptico de 5 mm, com volume total de 220 μL . As medidas foram iniciadas pela adição de 200 μL DPPH em 20 μL da solução do antirradical. A cinética da reação foi observada pela variação da absorbância da solução de DPPH em 515 nm. Todos os ensaios cinéticos foram realizados em triplicata em medidas independentes e os resultados tratados e representados com média \pm desvio padrão no programa Origin Pro 8.5, para obtenção das curvas cinéticas.

A variação da absorbância ($\Delta \text{Abs.}$) entre T_0 e T_{50} ($\text{AbsT}_{\text{inicial}} - \text{AbsT}_{\text{final}}$) mostra uma correlação linear com a concentração do antirradical. Para o cálculo da atividade antirradicalar dos extratos foram utilizados os coeficientes angulares das correlações das concentrações do antirradical e do padrão Trolox em função da variação da absorbância. Desta maneira, obtém-se o valor correspondente da capacidade antirradicalar em porcentagem de trolox (%T), conforme a equação 1 (OLIVEIRA, et al., 2014).

$$\%T = (\alpha A / \alpha T) \cdot 100 \text{ (equação 1)}$$

3.6.3. Ensaio para avaliação in-vitro da atividade anti-inflamatória

O ensaio para avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos brutos obtidos dos fungos endofíticos associados à *Pentacalia desiderabilis* não foi efetuado. A docente responsável pelo ensaio, e colaboradora no projeto, foi desligada da Universidade Presbiteriana Mackenzie, no semestre da aprovação desse projeto comprometendo, assim, a execução dessa etapa.

3.6.4. Ensaio para avaliação da atividade citotóxica

O ensaio para detecção de extratos e/ou substâncias com atividade citotóxica não estava previsto no projeto original, mas foi realizado em colaboração com a Prof^a Dr^a Leticia V. C. Lotufo do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.

O ensaio se baseia na mensuração da absorbância do formazan formado após a metabolização do sal de MTT pelas células tumorais viáveis (MOSMANN, 1983). Nessa triagem inicial foi empregada apenas uma linhagem celular de média resistência. Células tumorais de adenocarcinoma de cólon (HCT-116) cultivadas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, foram cultivadas em placas de 96 poços e expostas às amostras por 72 horas. Três horas antes do término do tempo de incubação, o sal de MTT ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) foi adicionado e a absorbância mensurada a 595 nm. A porcentagem de inibição da proliferação celular (GI%) foi calculada utilizando o GraphPad Prism 5.0 (Intuitive Software for Science). Os extratos foram testados nas concentrações de 5,0 e 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.7. Cultivo em larga escala e obtenção de maior massa de um extrato bioativo

O fungo selecionado (L65A) foi repicado e cultivado em 150 placas de Petri contendo meio de cultura sólido (batata, dextrose e ágar – (BDA)) a 25°C, por 28 dias. Optou-se por manter rigorosamente nas mesmas condições o cultivo em placa de Petri contendo BDA para que não houvesse alteração no meio de cultura, o que poderia ocasionar mudanças metabólicas, conforme abordagem já descrita em literatura (OSMAC – one strain, many compounds; BODE *et al.*, 2002). O tempo de cultivo foi determinado com base no melhor desempenho do extrato bruto nos testes de bioatividade. O controle negativo foi realizado através de uma placa de Petri, contendo apenas meio BDA, submetida às mesmas condições de cultivo.

Após esse período, o ágar foi cortado, macerado, e mantido sob agitação com acetato de etila (grau P.A., Synth) até o esgotamento, durante pelo menos 7 dias. A solução foi filtrada e, após remoção do solvente, em evaporador rotatório, foi obtido o extrato bruto (351,3 mg).

3.8. Fracionamento cromatográfico e análise dos grupos

O extrato bruto do L65A foi submetido à uma coluna de Sephadex LH-20, tendo como eluente o clorofórmio, seguido por uma mistura de clorofórmio:metanol (1:1) e, posteriormente metanol. As frações obtidas foram agrupadas pela semelhança de suas composições observadas por meio de cromatografia de camada delgada (CCD) em placa de sílica reveladas à luz U.V., utilizando como eluente uma solução de diclorometano:acetato de etila (3:7). Os quatro grupos obtidos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

3.8.1. Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises dos grupos obtidos através do fracionamento cromatográfico utilizaram os procedimentos descritos no item 3.4. Através dessa análise foi possível detectar a produção metabólica do extrato bruto fúngico selecionado e dos respectivos grupos.

3.8.2. Análise em cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

As análises em Cromatografia à gás foram realizadas visando a identificação de componentes que não absorvem no U.V. Para tanto, foi utilizado um equipamento Agilent CG 6850 acoplado a um espectrômetro de massas Agilent 5975C contendo coluna HP-5MS de comprimento 30m x 0,25mm e filme de 0,25µm. O método empregado foi iniciado com temperatura do forno a 100°C, mantida por 5 minutos, e taxa de aquecimento de 5°C.min⁻¹ até atingir a temperatura de 325°C a qual foi mantida ao final do aquecimento por mais 8min. As temperaturas do injetor, do quadrupolo e da fonte de íons foram, respectivamente, 320°C, 180°C e 280°C. Para facilitar a volatilização das substâncias, as amostras foram derivatizadas com N,O-Bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) em piridina, e a reação foi realizada a 80°C em banho seco por 1 hora.

3.9. Separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência semipreparativa (CLAE semipreparativo)

Um dos grupos obtido através do fracionamento cromatográfico (Grupo 4) foi submetido a cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa (CLAE semipreparativo) para purificação dos componentes produzidos pelo endófito.

Para purificação das substâncias desse grupo foram utilizados solventes grau CLAE da marca T.J.Baker. e as amostras foram dissolvidas em metanol. As análises por CLAE semipreparativo foram feitas em um Cromatógrafo Agilent 1200 equipado com detector por varredura de espectro no Ultravioleta por arranjo de fotodiodos com célula de fluxo de 10 mm. Como fase estacionária para essas separações foi utilizada uma coluna Zorbax Eclipse plus LC-18 de fase reversa C18 (9,6 x 250 mm) e 5,0 μ m de diâmetro de partícula e um fluxo de 4,2 mL.min⁻¹. O sistema de eluição das amostras foi em modo gradiente iniciado com uma mistura de 90% de H₂O acidificada com 0,1% de ácido acético e 10% de acetonitrila (ACN) até 30% de ACN em 2 minutos, de 2 a 12 min. atingindo 50% de ACN, de 12 a 20 min. atingindo 100% de ACN, o qual foi mantido por mais cinco minutos (20 a 25 min. 100% de ACN).

3.10. Identificação estrutural dos metabólitos

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio-1 (RMN ¹H) e de Carbono-13 (RMN ¹³C) foram registrados em espectrômetro Bruker AIII 300 MHz e Bruker AIII 500 MHz, operando a 300 e 500MHz para RMN ¹H e 75 e 125 MHz para RMN ¹³C, respectivamente, enquanto os espectros de correlação HMBC, HMQC e COSY foram obtidos somente no espectrômetro Bruker AIII 500 MHz operando a 500 MHz para RMN ¹H e 125 MHz para RMN ¹³C, ambos no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Para obtenção dos espectros de RMN, as substâncias foram dissolvidas em clorofórmio deuterado da Sigma-Aldrich.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação dos endófitos

A partir dos fungos inicialmente isolados, 51 apresentaram significativo crescimento e não possuíam contaminação. Para todos esses endófitos foi realizada a extração de DNA. Na Figura 4 pode-se observar os resultados obtidos com a eletroforese em gel de agarose de amostras de DNA extraídas dos isolados.

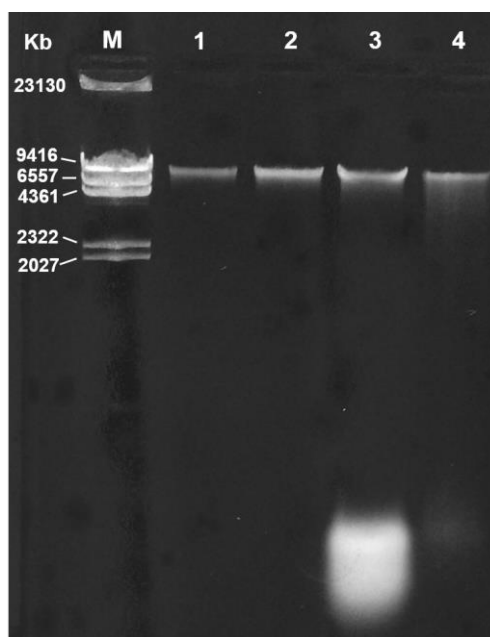


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da extração de DNA obtida de 4 diferentes isolados de fungos presentes em *P. desiderabilis*. Kb: tamanhos das bases do marcador utilizado. M: marcador λ *Hind*III DNA da BioLabs®, onde não foi possível a visualização das bandas de tamanho 564 pb e 125 pb; 1 a 4: DNA de fungos com cerca de 9416 pb. Amostra 3 com pequeno rastro, mas com a presença de grande quantidade de RNA na parte inferior da figura. Amostra 4 com rastro significativo e pouco RNA.

Com a utilização de eletroforese em gel de agarose para verificar as amostras, foi possível estimar a concentração de DNA obtido na extração de DNA de cada isolado. De acordo com o manual do marcador, a banda de tamanho de 2027 pb possui concentração de $20,9 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e a banda 4361 pb possui $45 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Em vista disso, as amostras foram comparadas com o marcador para se obter uma estimativa da concentração de DNA das amostras.

Para a realização da técnica de PCR, é preciso de no mínimo $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de DNA e no máximo $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Entretanto, nem todas as amostras possuíram essa concentração. Porém, sabe-se que mesmo com uma baixa concentração de

DNA é possível realizar a reação de amplificação, visto que esta técnica vai promover a multiplicação do DNA, aumentando milhões de vezes o DNA inicial.

Também foi possível avaliar a qualidade do DNA obtido através da eletroforese. Algumas amostras possuíam um rastro na banda de 9416 pb e este rastro pode prejudicar na amplificação da região a ser estudada, uma vez que sinaliza degradação do DNA. Porém, em alguns casos, a degradação ocorrida pode não ter afetado a região a ser estudada, não interferindo, assim, na amplificação por PCR. Também foi visualizado que grande parte das amostras possuíam RNA, entretanto esse não interfere na amplificação, uma vez que os *primers* vão apenas se alinhar à molécula de DNA.

Para a extração de DNA, diversos autores, como Filho (2013) e Barichello et al. (2010), descrevem a utilização do nitrogênio líquido na extração de DNA como sendo o método mais apropriado, porém mesmo sem sua utilização, a extração empregada neste estudo se mostrou efetiva e de baixo custo.

Também foi realizada a amplificação por PCR das 51 amostras de DNA extraídas. Todas as amostras apresentaram uma banda de 500 pares de base, assim como descrito por Araújo et al. (2010). Algumas destas amostras estão representadas na Figura 5. De acordo com o manual do marcador 1kp DNA ladder Biolabs® utilizado, a banda de 3000 pb apresenta $125 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de concentração. Com isso, pode-se estimar que todas as amostras possuíam uma concentração superior a $125 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

A Figura 5 exemplifica os produtos de amplificação por PCR de 4 diferentes isolados em gel de agarose 1,2%. Percebe-se que as amostras apresentaram um rastro entre as bandas de 1000 pb e 500 pb que pode interferir no sequenciamento. Já na região inferior da figura, há a presença de excessos de *primers*, DNA e reagentes que também podem causar interferência.

Dessa forma, todas as amostras foram purificadas para evitar problemas no sequenciamento. A purificação se mostrou eficiente para a remoção tanto dos rastros da banda de 1000 pb, quanto de excessos de *primers*, DNA e outros componentes da reação de PCR. Como mostrado na Figura 6, mesmo após a purificação, as amostras continuaram apresentando mais de $125 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de concentração.

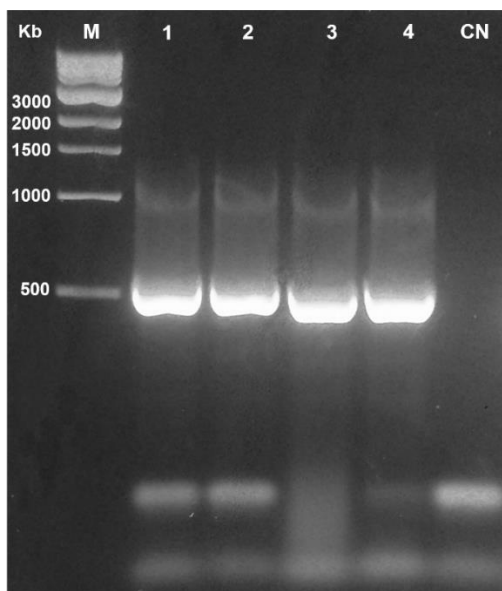


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos de amplificação por PCR obtidos de 4 diferentes isolados presentes em *P. desiderabilis* utilizando os *primers* ITS 1 e ITS 4. Kb: tamanhos dos pares de bases do marcador utilizado. M: marcador 1 kp DNA ladder (Biolabs®); 1 a 4: produto de PCR de diferentes isolados apresentando banda de 500 pb com alta concentração; CN: controle negativo da reação de PCR apresentando apenas excesso de componentes da reação, sem nenhuma banda aparente, demonstrando que não houve contaminação na reação. Região inferior da foto demonstrando excesso de *primers*, DNA e outros componentes da reação.

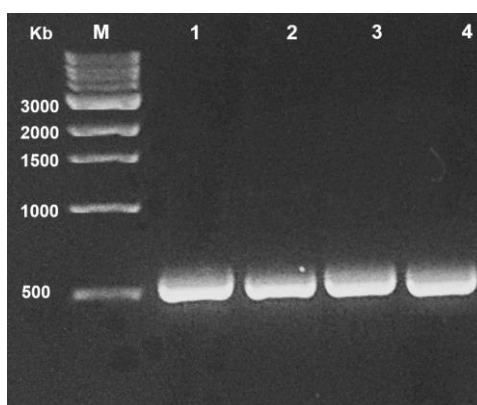


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos de amplificação purificados de 4 diferentes isolados fúngicos de *Pentacalia desiderabilis*. Kb: tamanhos dos pares de bases do marcador utilizado. M: marcador 1 kp DNA ladder (Biolabs®); 1 a 4: produto de PCR de diferentes isolados apresentando banda de 500 pb com alta concentração. Todas amostras demonstraram possuir apenas a banda de 500 pb, sem rastros.

A quantificação foi realizada em todas as amostras e foi concluído que possuíam cerca de 72 a 194 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de concentração, com uma média de $139 \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Tal fato, confirma a concentração estimada com o uso do marcador. Posteriormente, todas as amostras foram enviadas para sequenciamento.

Foram sequenciados 51 diferentes produtos de amplificação, cada um correspondente a região ITS1 e ITS4 do rDNA de diferentes isolados. O resultado

obtido de cada isolado foi analisado com o programa *Electropherogram quality analysis*. Este programa é a interface de um programa *phrap* que permite a montagem de contigs, gera informações sobre eles, permite a manipulação de diversas sequências ao mesmo tempo, dentre outras funções (FORMIGHIERI, 2004).

As amostras que foram avaliadas como "Ok" pelo programa apresentaram uma quantidade superior de 100 pares de bases com qualidade acima de 20% do total da sequência (Tabela 3). A amostra exemplificada na Tabela 3 apresentou 1025 bases ao todo com qualidade acima de 20, indicando que 89% da sequência apresentou boa qualidade. Já as avaliadas como "No" não cumpriram essas características e, por isso, foram descartadas (Tabela 4). A amostra exemplificada na Tabela 4 apresentou 149 bases ao todo com qualidade acima de 20, indicando que somente 11% das sequências se demonstrou com boa qualidade. De todas as amostras sequenciadas, foram obtidas 28 sequências de boa qualidade, segundo análise realizada com o programa.

Tabela 3. Resultado obtido através do programa *Electropherogram quality analysis*, exemplificando a região ITS1 e ITS4 do isolado L69A, que foi classificado como "Ok".

Read number	Total of bases	# Bases with quality > 20	# Bases with quality > 30	% Vector	> 100 bases & quality > 20
<input checked="" type="checkbox"/> ITS1_10.ab1	583	515 (88%)	496 (85%)		Ok
<input checked="" type="checkbox"/> ITS4_10.ab1	573	510 (89%)	493 (86%)		Ok
Total	1156	1025 (89%)	989 (86%)		No: 0 Ok: 2

Tabela 4. Resultado obtido através do programa *Electropherogram quality analysis*, exemplificando a região ITS1 e ITS4 do isolado P22 que foi classificado como "No".

Read number	Total of bases	# Bases with quality > 20	# Bases with quality > 30	% Vector	> 100 bases & quality > 20
<input type="checkbox"/> ITS1_57.ab1	381	79 (21%)	15 (4%)		No
<input type="checkbox"/> ITS4_57.ab1	965	70 (7%)	11 (1%)		No
Total	1346	149 (11%)	26 (2%)		No: 2 Ok: 0

Em alguns casos, pode-se obter uma sequência forward definida como "Ok", porém uma sequência reverse definida como "No", ou vice-versa. Nestes casos, a obtenção de uma sequência "No" acaba desqualificando a outra sequência, uma vez que é necessário de ambas para formar o contig (Tabela 5). A amostra exemplificada na Tabela 5 apresentou 365 bases ao todo com qualidade acima

de 20, indicando que 24% das sequências se demonstrou com boa qualidade. A sequência forward se demonstrou como "Ok" por possuir 291 bases com qualidade acima de 20, porém a reverse se demonstrou como "No" por possuir 74 bases com qualidade acima de 20.

Tabela 5. Resultado obtido através do programa *Electropherogram quality analysis*, exemplificando a região ITS1 e ITS4 do isolado P20A que foi classificada como "No".

Read number	Total of bases	# Bases with quality > 20	# Bases with quality > 30	% Vector	> 100 bases & quality > 20
<input checked="" type="checkbox"/> ITS1_55.ab1	949	291 (31%)	182 (19%)		Ok
<input type="checkbox"/> ITS4_55.ab1	580	74 (13%)	19 (3%)		No
Total	1529	365 (24%)	201 (13%)		No: 1 Ok: 1

Em outros casos, pode ocorrer uma quebra do DNA na região a ser sequenciada. Tal ocorrência, pode resultar em uma fita incompleta ou fragmentada com poucos trechos sequenciados, apresentando baixa quantidade de pares de bases com qualidade acima de 20%, resultando em uma sequência qualificada como "No". Uma possível explicação para a obtenção de sequências qualificadas como "No" seria a utilização de *primers* antigos na realização da amplificação por PCR, que poderiam estar degradados.

Para confirmação, as amostras foram visualizadas com o programa BioEdit que é um programa *phred* que permite a aferição da qualidade de cada base obtida, leitura de cromatogramas, visualização e edição dos contigs, dentre outras funções (FORMIGHIERI, 2004).

Nos cromatogramas das amostras analisadas, o programa atribuiu bases a cada pico observado e valores que indicam a qualidade de cada base. Quanto maior o pico, maior a chance da base indicada no cromatograma ser a correta, portanto, picos baixos podem indicar uma imprecisão na base indicada. O programa aplica uma cor para cada base para melhor identificação. A base T apresenta coloração vermelha, a base C possui coloração azul, a base G possui cor preta, a base A possui coloração verde e as bases indefinidas com outras letras do alfabeto é de cor roxa. Quanto menor a quantidade de bases indefinidas, melhor a sequência para realizar a identificação de indivíduos corretamente. O programa também demonstra, logo em cima das bases obtidas, a região da sequência que está sendo observada.

A Figura 7 exemplifica a sequência forward da amostra P2B que apresentou alta qualidade devido a picos estáveis e únicos em cada região da sequência,

apresentando essas características por toda a sequência. É comum que a região inicial e a final da sequência apresentem picos muito baixos e bases incertas. Já a Figura 8 exemplifica a sequência forward do isolado P22 que foi descartado. Esta foi avaliada como uma sequência de baixa qualidade devido a picos muito baixos em grande parte da sequência, principalmente na região central, demonstrando grande quantidade de bases imprecisas. As poucas regiões que apresentaram picos mais altos demonstraram ser muito instáveis com diversas ocorrências de sobreposição entre os picos.

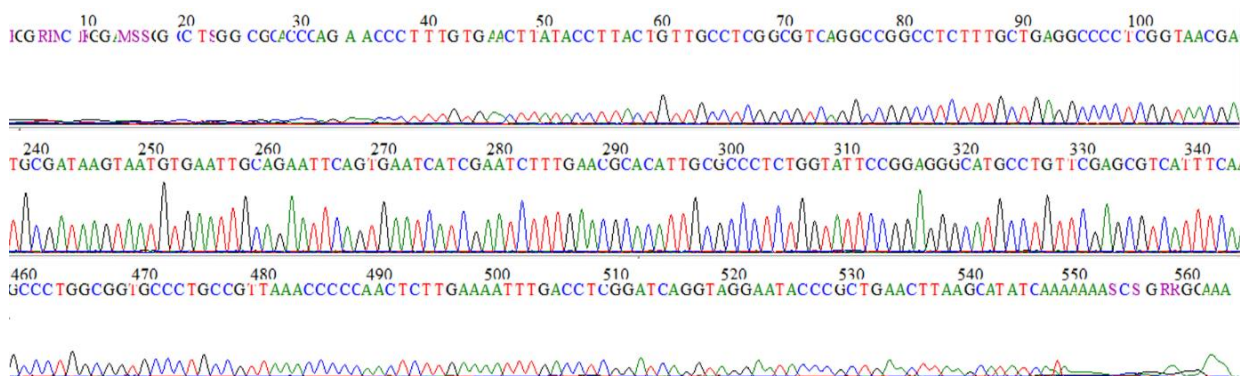


Figura 7. Sequência forward do isolado P2B visualizada no programa BioEdit. Primeira linha representa o começo da sequência com as primeiras bases obtidas. Segunda linha representa a região central da sequência apresentando uma ótima qualidade. Terceira linha representa a região final da sequência, com as últimas bases obtidas.

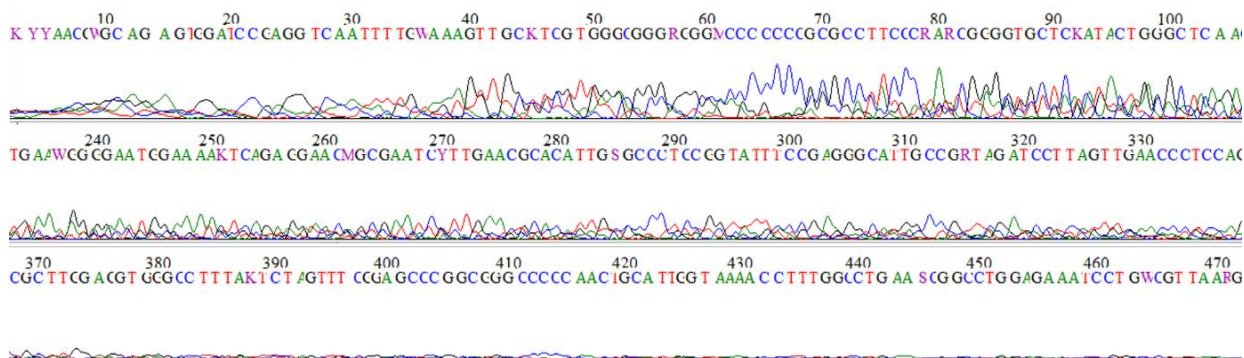


Figura 8. Sequência forward do isolado P22 visualizada no programa BioEdit. Primeira linha representa o começo da sequência com as primeiras bases obtidas. Segunda linha representa a região central da sequência apresentando uma baixa qualidade. Terceira linha representa a região final da sequência, com as últimas bases obtidas.

Não foi utilizado um programa unicamente *consed*, uma vez que não houve edição dos contigs e o programa *phrap* utilizado e o BLASTn já permitiram a visualização dos alinhamentos.

O programa BLASTn permite a comparação de uma sequência de nucleotídeos de entrada com um banco de dados de sequências de nucleotídeos.

Com sua utilização é possível obter os parâmetros mais importantes para este estudo: o *score*, identidade e *e-value*. O *score* é uma nota que foi atribuída pelo algoritmo criado pelo programa e pela quantidade de pareamentos perfeitos e imperfeitos entre a sequência que vai ser estudada com uma sequência já depositada no GenBank. Quanto maior o *score*, melhor o pareamento, porém o *score* não pode ser analisado individualmente, devendo ser acompanhado de outros valores.

O *e-value* representa a probabilidade de que o alinhamento realizado pelo site seja correto ou errôneo (falso positivo). Pode ser considerado como a quantidade de sequências errôneas que apresentariam *score* bastante similar à sequência correta. Quanto menor seu valor, menor a chance de se obter um falso positivo e, portanto, maior sua confiabilidade. Estatisticamente, o *e-value* pode representar um valor significativo de ser um falso-positivo, porém, biologicamente, em alguns casos, o valor obtido pode não ser significativo e se encontrar na faixa ideal. O *e-value* pode ser representado como 0,0, 0,12 ou $3e-25$. Neste último, esse valor pode apresentar-se com outros números e em forma abreviada de notação científica. Também é importante ressaltar que sequências curtas podem apresentar alta similaridade, porém *e-value* alto, uma vez que há maiores chances de sequências pequenas apresentarem um resultado falso positivo.

Identidade é a quantidade de bases com pareamento perfeito identificados no alinhamento da sequência estudada e da sequência armazenada no banco de dados. É expresso em porcentagem e a similaridade entre as sequências é baseada em seu valor. A partir destes parâmetros obtidos pelo BLASTn, foram escolhidas como certas as sequências que apresentaram maior valor de *score*, maior identidade e menor *e-value* possível.

Segundo Moreira (2013), fungos pertencentes ao filo Ascomycota, podem apresentar problemas em sua identificação caso suas sequências sejam obtidas a partir da região ITS. Para tal, é necessário realizar uma interpretação específica para estas sequências. As sequências com identidade de 99% devem ser consideradas como a mesma espécie, igual a 98% como pertencentes à mesma espécie ou gênero devendo haver sempre uma comparação com sua morfologia, entre 95% e 97% devem ser consideradas apenas o mesmo gênero e as abaixo de 95% como pertencentes à mesma família, classe ou como inconclusiva.

Das 28 sequências, foram obtidos os gêneros *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Epicoccum*, *Ophioceras*, *Paraphaeosphaeria*, *Pestalotiopsis* e *Phaeosphaeria*. A

maioria dos fungos pertencem ao gênero *Diaporthe*, sendo as espécies mais frequentes *Diaporthe passiflorae* e *Diaporthe phaseolorum*. Todos os fungos identificados pertencem ao filo Ascomycota e os dados obtidos no banco de dados NCBI se apresentam na Tabela 6.

Nas figuras 9 e 10 é possível observar a morfologia de cada um dos isolados sequenciados após crescimento de 10 a 20 dias.

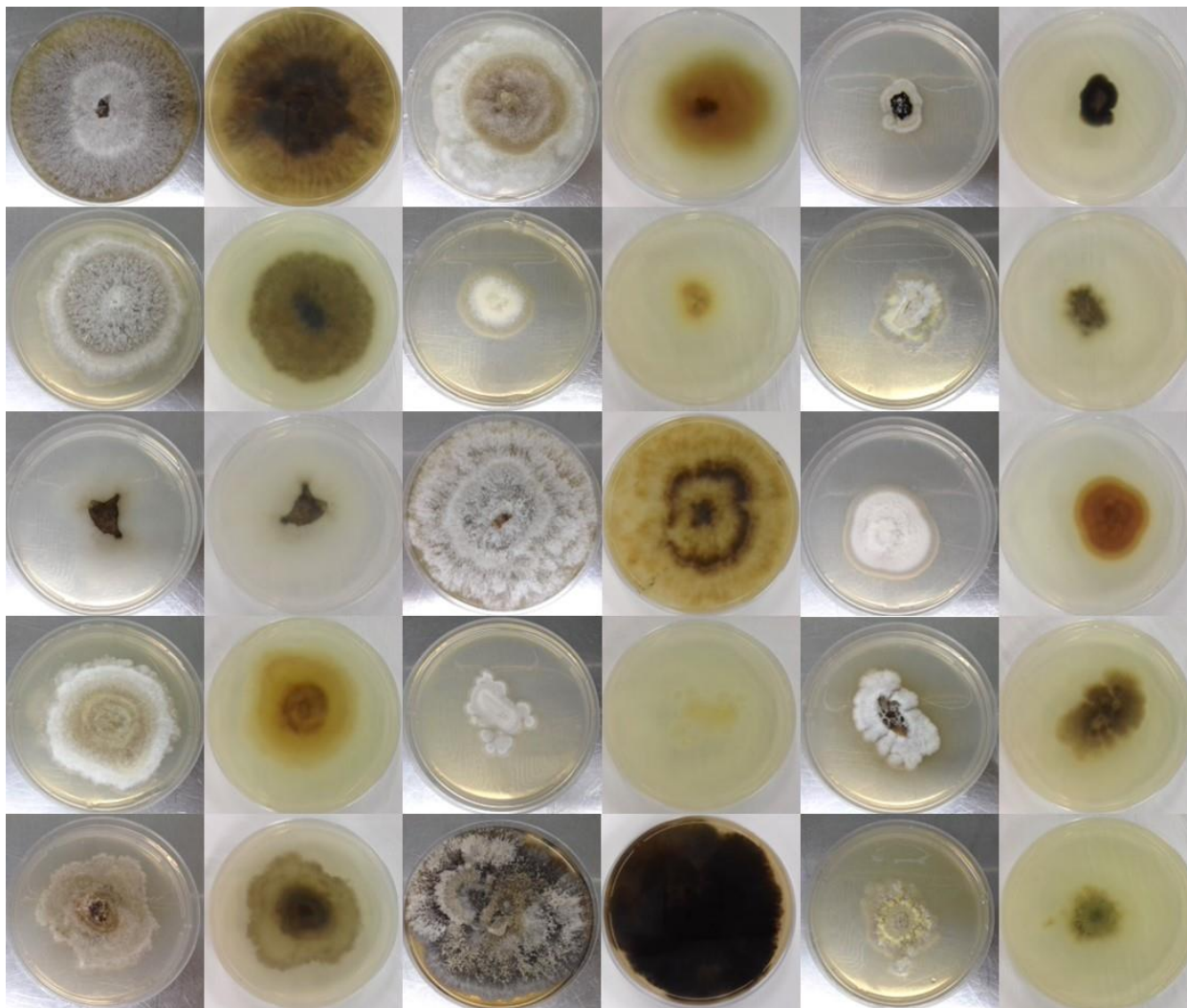


Figura 9. Alguns dos isolados sequenciados. Cima para baixo, frente e verso, da esquerda para a direita: P2A1, P2B, P3, P8, P9, P18, P22A, P22B1, P23, P28C2, L44, L46A, L46B, L48 e L49.

Tabela 6. Resultados da identificação dos fungos endofíticos através da comparação das sequências obtidas com o banco de dados do NCBI.

Código do Fungo	Nome científico	Score (ident)	E value
P2A1	<i>Diaporthe passiflorae</i>	710 (93%)	0.0
	<i>Diaporthe sp.</i>	704 (93%)	0.0
P2B	<i>Diaporthe passiflorae</i>	1000 (98%)	0.0
P3	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	806 (94%)	0.0
P8	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	1035 (99%)	0.0
P9	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	773 (93%)	0.0
P18	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	966 (98%)	0.0
P22A	<i>Diaporthe sp.</i>	723 (92%)	0.0
	<i>Diaporthe passiflorae</i>	721 (92%)	0.0
P22B1	<i>Phomopsis sp.</i>	586 (96%)	1e-163
	<i>Diaporthe passiflorae</i>	583 (96%)	2e-162
P23	<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i>	1037 (99%)	0.0
	<i>Paraconiothyrium sporulosum</i>	1037 (99%)	0.0
P28C2	<i>Diaporthe passiflorae</i>	1029 (99%)	0.0
L44	<i>Ophioceras leptosporum</i>	929 (98%)	0.0
L46A	<i>Diaporthe sp.</i>	983 (98%)	0.0
L46B	<i>Diaporthe sp.</i>	760 (93%)	0.0
	<i>Phomopsis sp.</i>	754 (93%)	0.0
L48	<i>Diaporthe sp.</i>	981 (99%)	0.0
	<i>Diaporthe passiflorae</i>	970 (99%)	0.0
L49	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	1014 (99%)	0.0
L50A	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	941(99%)	0.0
L56	<i>Xylariaceae sp.</i>	571 (86%)	6e-159
	<i>Sordariomycetidae</i>	545 (91%)	4e-151
L58A	<i>Diaporthe passiflorae</i>	1013 (99%)	0.0
L62A1	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	946 (98%)	0.0
L62A2	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	968 (99%)	0.0
L63	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	992 (99%)	0.0
	<i>Diaporthe passiflorae</i>	981 (99%)	0.0
L64	<i>Phaeosphaeria poagena</i>	547 (96%)	8e-152
L65A	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	1101 (99%)	0.0
	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	1096 (99%)	0.0
L67	<i>Diaporthe passiflorae</i>	935 (97%)	0.0
	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	926 (97%)	0.0
L69A	<i>Fungo endofítico</i>	1044 (99%)	0.0
	<i>Pestalotiopsis sp</i>	1038 (99%)	0.0
	<i>Pestalotiopsis vismiae</i>	1038 (99%)	0.0
	<i>Pestalotiopsis carveri</i>	1038 (99%)	0.0
L69B	<i>Fungo endofítico</i>	1044 (99%)	0.0
	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	1038 (99%)	0.0
	<i>Pestalotiopsis neglecta</i>	1038 (99%)	0.0
L70B	<i>Epicoccum nigrum</i>	885 (99%)	0.0
11B	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	793 (95%)	0.0
	<i>Diaporthe passiflorae</i>	776 (95%)	0.0

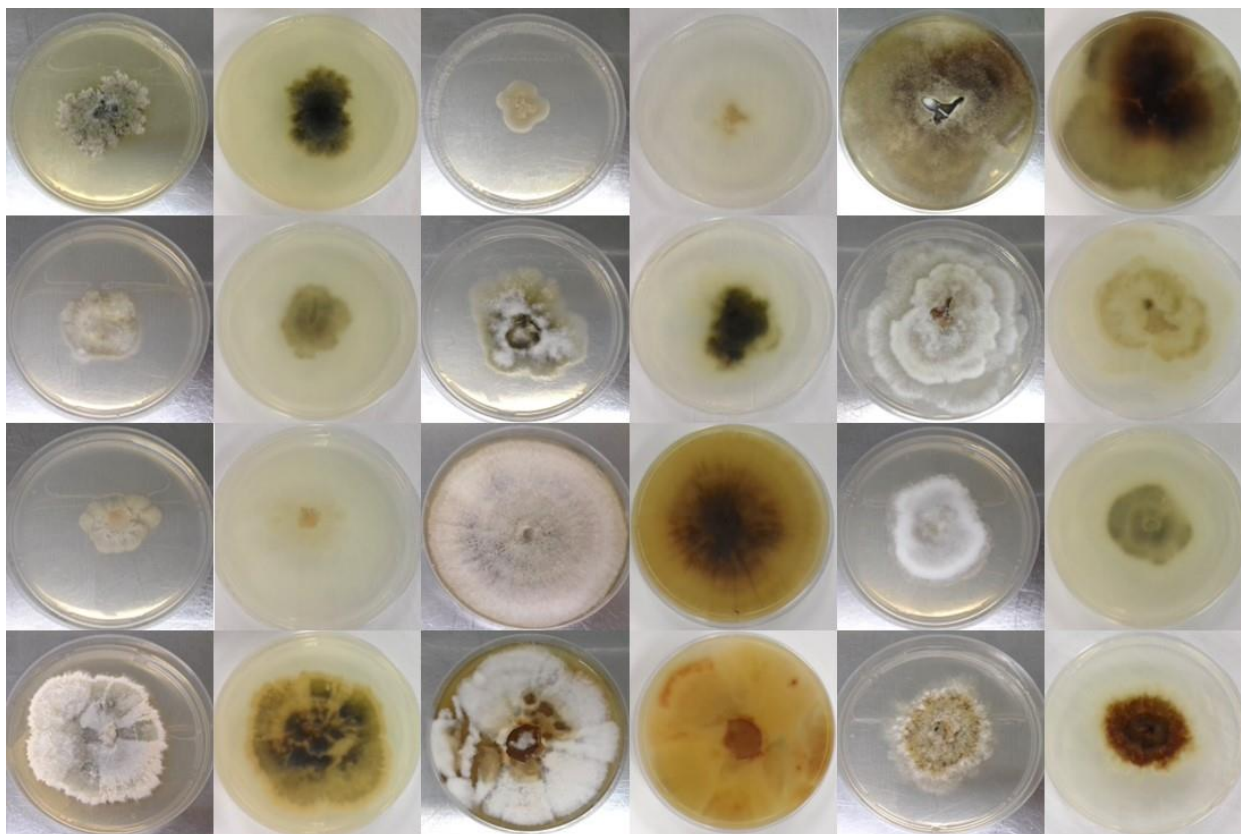


Figura 10. Alguns dos Isolados sequenciados. Cima para baixo, frente e verso, da esquerda para a direita: L50A, L56, L58A, L62A1, L62A2, L63, L64, L65A, L67, L69A, L70B e 11B.

O Filo Ascomycota apresenta cerca de 30 mil espécies de fungos unicamente terrestres, sendo o maior grupo do reino Fungi compreendendo cerca de 75% de todos os fungos descritos. Sua principal característica é a presença de ascos, célula sexual produtora de esporos destes fungos, que contém ascosporos. Esses microrganismos podem apresentar tanto reprodução sexuada como reprodução assexuada, compreendem espécies cosmopolitas e possuem natureza saprofítica, fitopatogena, endofítica e patogena de humanos. Vários representantes deste filo apresentam papel fundamental na indústria alimentícia e biotecnológica (MAMEDE, 2012; SILVA & COELHO, 2006).

Os isolados P2A1, P3, P9, L46B e P22A foram classificadas como pertencentes à família Diaporthaceae por apresentarem valor de identidade entre 92 a 94%, 0,0 e-value e mediano score.

Diaporthaceae foi definida por Hohnel e Wehmeyer no ano de 1926. A forma dos indivíduos da família é alterada de acordo com a maturidade. As paredes do asco são delicadas e podem quebrar facilmente em água. Apresentam esporos com diversos formatos, como hialino, septado, alantoide, dentre outros. Apresenta 24 gêneros, sendo um deles o gênero *Diaporthe* (IMA, 2016; WEHMEYER, 1926). Foram identificados como *Diaporthe* sp. as amostras P28A2, L46A, L67 e 11B por apresentar de 98% a 99% de similaridade com *Diaporthe* sp. apresentando alto score e baixo e-value ou por apresentar similaridade entre 95% e 97% com alguma espécie do gênero *Diaporthe* apresentando 0.0 de e-value e score de mediano a alto. Enquanto isso, o isolado P22B1 apresentou identidade de 96% e foi identificado como *Diaporthe* sp., porém demonstrou um e-value de 1×10^{-163} , tal fato é explicado por este isolado ter apresentando uma pequena sequência, como discutido anteriormente.

Diaporthe foi definido por Nitschke no ano de 1970. O gênero apresenta distribuição global e possui cerca de 800 espécies, incluindo um grande número de espécies nomeadas, sendo que muitas são sinônimas entre si. Seus esporos se apresentam como hialinos e seus ascos são escuros e longos. O único caráter constante é o formato de seu esporo. Acredita-se que sua forma simples tenha sido originada a partir do gênero *Gnomonia* (IMA, 2016; ELFAR et al., 2013; WEHMEYER, 1926; RODRIGUES, 2010). Espécies do gênero já foram obtidas como endofítico, saprofítico, fitopatígeno e patógenos de humanos. Há diversos relatos de espécies de *Diaporthe* que causam câncer em caules e ramos, deterioração de galho, podridão de frutos e sementes, queima da haste e da vagem, mancha foliar e ferrugem em uma ampla gama de vegetais hospedeiros. Podem estar presentes em vegetais de interesse econômico como amêndoa, abacate, azeitona, pistache, girassol, limão, soja e morango. Em alguns desses casos pode ser classificado como fitopatígeno fraco, causando danos não muito significativos no vegetal. Entretanto, *Diaporthe* tem sido reportado como um dos fungos endofíticos mais frequentemente encontrados (CHEN et al., 2014; GOMES et al., 2013; ELFAR et al., 2013)

Diversas espécies de *Diaporthe* têm sido reconhecidas pela produção de enzimas e metabólitos secundários com atividade antibiótica e antitumoral. Já foram utilizados para atividades lignocelulolíticas, para deter herbivoria e como bioherbicida. Seu nicho ecológico vai depender do meio onde este se encontra (GOMES et al., 2013; CHEN et al., 2014; RODRIGUES, 2010). O complexo enzimático celulolítico é produzido por diversos microrganismos para uso

industrial das celulases. Sabe-se que o etanol combustível pode ser fabricado a partir de materiais lignocelulósicos ao ter a conversão de açúcar em etanol. Esse modo de produção auxilia na obtenção de preparações enzimáticas de baixo custo, com altos níveis de atividade enzimática e estabilidade (BONOMI et al., 2008).

A amostra L63 apresentou a mesma identidade de 99% para *Diaporthe phaseolorum* e *Diaporthe passiflorae* e mesmo e-value de 0,0, porém o primeiro obteve 992 de score enquanto que o segundo teve 981 de score. Portanto, essa amostra foi identificada como *D. phaseolorum*. O mesmo caso se apresentou no isolado L48, igual identidade de 99% para *Diaporthe sp.* e *Diaporthe passiflorae* e igual e-value de 0,0, porém *Diaporthe sp.* apresentou 981 de score, enquanto que *D. passiflorae* obteve 970. Este isolado foi identificado como *Diaporthe sp.* A partir do alinhamento com sequências previamente depositadas no *GenBank*, os isolados P2B, P28C2 e L58A foram identificados como *Diaporthe passiflorae*, pois apresentaram identidade máxima de respectivamente 98%, 99% e 99%, e-value 0.0 e alto score. Os fungos P8, P18, L49, L50A, L62A1 e L62A2 foram identificadas como *Diaporthe phaseolorum*, uma vez que apresentaram identidade de 98% a 99%, e-value 0.0 e score alto.

A espécie *Diaporthe phaseolorum* foi descrita por Saccardo em 1870, apresenta 7 subespécies e sua taxonomia vem sendo considerada difícil e controversa, porém técnicas moleculares estão sendo aplicadas para auxiliar em uma melhor classificação deste microrganismo. Pode ser fitopatógeno em plantações de feijão, porém em alguns mangues pode ser endofítico. Em estudo realizado, foi visto que este fungo produziu derivados dicetopiperazinas (GOMES et al., 2013; FERNÁNDEZ; HANLIN, 1996; BORGES, 2008).

O fungo *Diaporthe passiflorae* foi descrito primeiramente por Crous e Lombard no ano de 2012. Apresenta crescimento em temperaturas entre 10°C e 30°C, possuindo crescimento excelente de seus micélios em 20°C. Portanto, possui preferência em regiões tropicais e subtropicais. Segundo estudos, este fungo possui crescimento rápido, correspondendo ao resultado observado nos isolados deste estudo identificados como *D. passiflorae* (ELFAR et al., 2013; IMA, 2016). Estudos de Elfar et al. (2013) descreveram o primeiro relato deste espécime atuando como agente altamente fitopatogênico em plantações de mirtilo. Não foram encontrados estudos sobre sua composição química.

O gênero *Phomopsis* (anamorfo de *Diaporthe*) foi definido em 1905 por Saccardo e contém mais de 1.000 espécies. Atualmente, as técnicas moleculares

para identificação deste gênero se demonstram eficazes e credíveis. Essas técnicas também auxiliaram na separação do estado anamórfico e teleomórfico através de sequências moleculares independentemente da presença de estruturas sexuadas ou assexuadas. Já foi encontrado em algumas leguminosas e rubiáceas e apresenta o mesmo nicho ecológico de *Diaporthe* sp. Além disso, outros estudos afirmaram que este gênero se demonstrou como efetivo produtor de metabólitos novos e bioativos, havendo relatos de *Phomopsis* apresentando alta atividade antimicobacteriana (CHEN et al., 2014; RODRIGUES, 2010; IMA, 2016).

Em estudos anteriores foi relatado que espécies de *Phomopsis* produziram phomopsidinas inibidoras de microtúbulos, phomoxantonas com atividade antimalárica e antituberculose, phomolactonas com inibição de citoquinas, phomopsichalasinina antimicrobiana e citocalasin H sendo reguladora de crescimento de vegetais. Também teve a produção de phomoxantona A e phomodol, sesquiterpenos da classe dos cadinanos, benzopirranonas e lovastatina, sendo que alguns destes demonstraram atividade antifúngica e atividade citotóxica (BIASETTO, 2016; BORGES, 2008; PES, 2015; SEBASTIANES, 2010).

O isolado L65A foi o que apresentou menor concentração de DNA de todas as amostras "Ok" e apresentou uma similaridade de 99%. Neste, obteve-se duas sequências com a mesma identidade, porém o fungo foi devidamente identificado como *Colletotrichum gloeosporioides* devido à morfologia comparada com estudos de Waculicz-Andrade (2009). Esse fungo já foi descrito como endofítico de algumas plantas medicinais, porém também já foi encontrado como saprofítico. É o agente causador de diversas doenças como antracnose, podridão de pedúnculo e varicela. A antracnose afeta gravemente frutos em pós-colheita e é considerada uma doença de elevada importância econômica em algumas regiões brasileiras. Pode afetar maracujá, goiaba, mangueira e diversas outras plantas economicamente importantes. A espécie possui capacidade de produzir dicetopiperazinas, substâncias N-(2-feniletil)-acetamida, N-acetil-triptamina, ácido colletotrico, que apresenta bioatividade contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, e pela produção do alcaloide piperina. As substâncias e extratos apresentam atividade antimicrobiana, antidepressiva, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral (IMA, 2016; BORGES, 2008; BIASETTO, 2016; MOREIRA, 2013; MARTINS et al., 2005; SILVA et al., 2006; WACULICZ-ANDRADE, 2009).

4.2. Obtenção e triagem química dos extratos brutos

Através de diferentes tempos de cultivo (21 e 28 dias) dos 28 endófitos identificados pode-se observar três comportamentos distintos dos microrganismos:

1 – *Morfotipos que apresentam maior diversidade metabólica aos 21 dias:* existem casos em que o cultivo por 21 dias se torna mais adequado, ou seja, há uma maior diversidade metabólica nesse período, enquanto que o mesmo fungo quando cultivado por 28 dias, superexpressa um componente e acaba consumindo parte dos outros metabólitos (Figura 11). Para esse caso, se o objetivo for obter a maior diversidade metabólica do microrganismo, o cultivo por 21 dias é mais adequado. Por outro lado, se o objetivo for determinar qual metabólito é superexpressado ao longo do tempo, o cultivo por 28 dias é mais indicado.

2 – *Morfotipos que apresentam maior produção metabólica aos 28 dias:* existem casos em que o cultivo por 28 dias se torna mais adequado, pois há uma maior produção metabólica nesse período, expressa por uma maior abundância relativa dos componentes (Figura 12). É importante salientar que nesses casos, a diversidade metabólica foi mantida (mesmo número de componentes no cromatograma) quando comparado os cultivos em 21 e 28 dias.

3 – *Morfotipos que apresentam produção metabólica independente do tempo de cultivo:* há casos em que não há diferenças químicas significativas resultantes do tempo de cultivo do microrganismo, como exposto na Figura 13.

Assim, como na literatura, em que se encontram trabalhos com ambos os tempos de cultivo (RADU & KQUEEN, 2002; LI et al., 2005) e, até mesmo, sem especificação (KHIRALLA, et al., 2016), pode-se inferir que não é possível determinar um único tempo de cultivo ideal para todos os morfotipos.

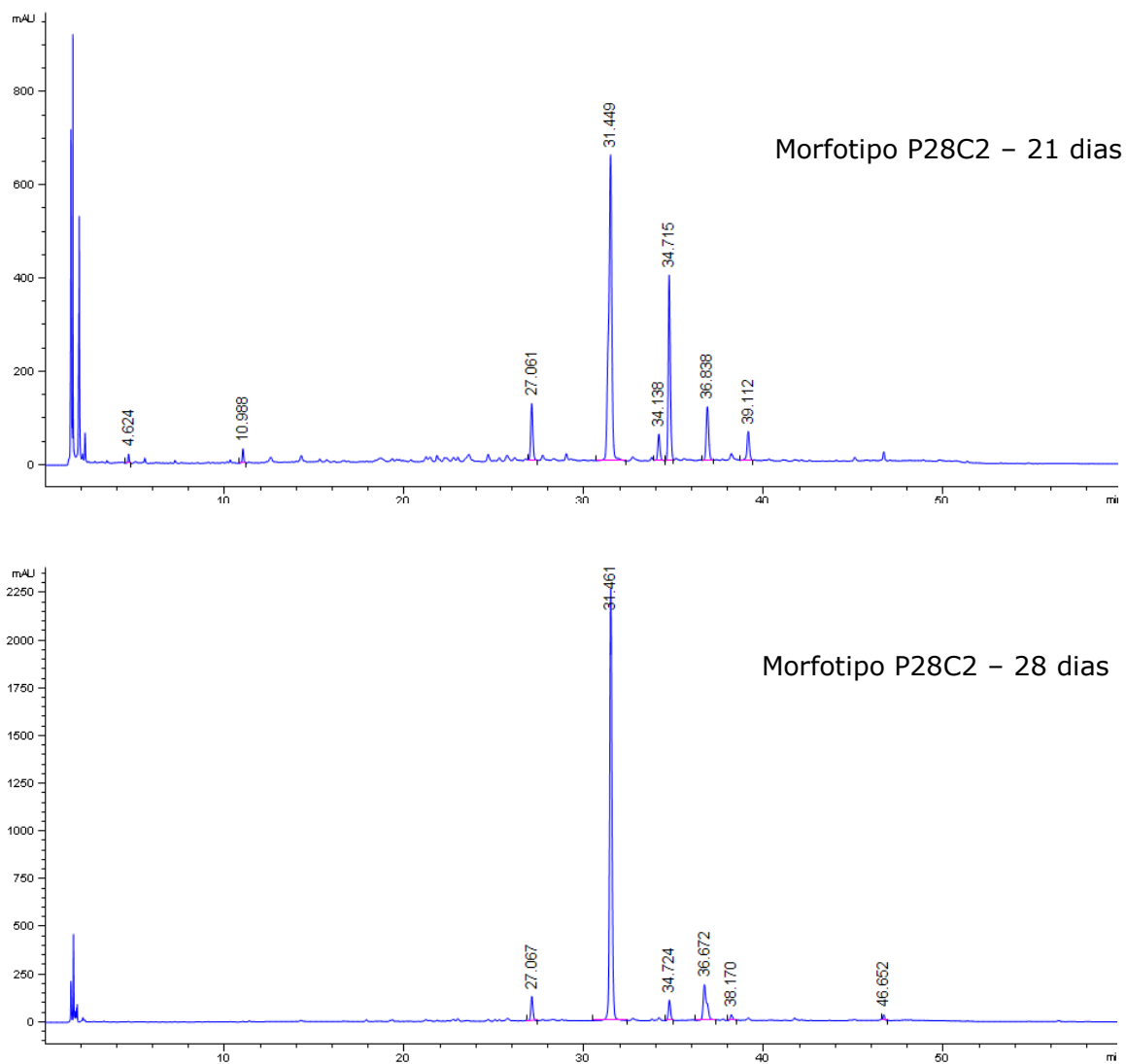


Figura 11. Exemplo de cromatogramas de extratos brutos cultivados a 21 e 28 dias. Para esse fungo (*P28C2 – Diaporthe phaseolorum*) pode-se notar que o cultivo em 21 dias apresenta maior diversidade e abundância metabólica. Em 28 dias, a abundância do componente com tempo de retenção 31,4 min. é aumentada, embora haja a diminuição da abundância dos outros metabólitos.

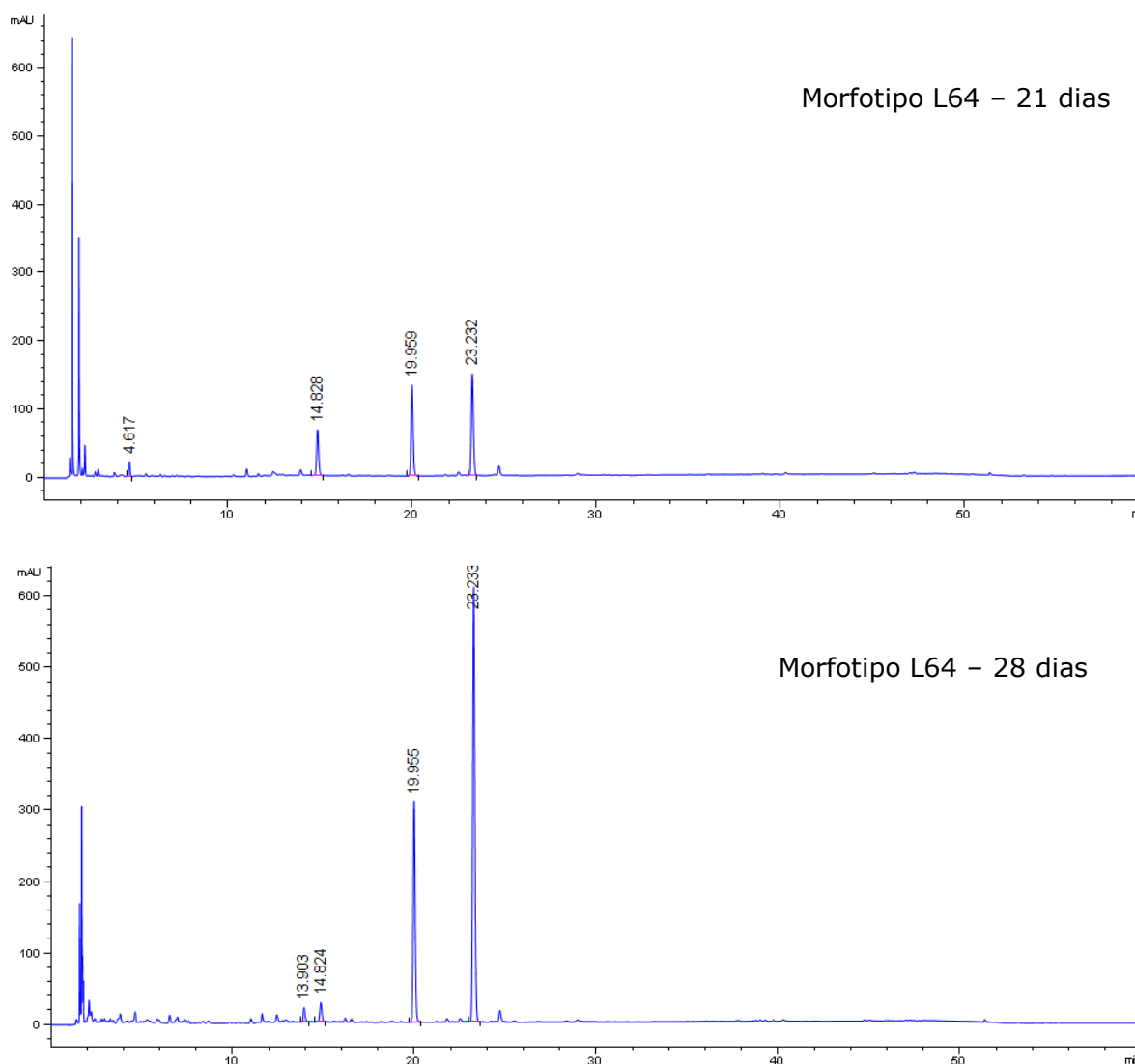


Figura 12. Exemplo de cromatogramas de extratos brutos cultivados a 21 e 28 dias. Para esse fungo (L64 – *Phaeosphaeria poagens*) pode-se notar que o cultivo em 28 dias apresenta maior abundância metabólica, observada nos tempos de retenção de 19,95 min. e 23,23min..

No total foram obtidos 56 extratos brutos, sendo a triagem química fundamental para a seleção de extratos a seguirem para as análises de bioatividades. Tal triagem química ocorreu através da análise dos 56 cromatogramas obtidos por CLAE e pela escolha da condição ideal de cultivo de cada endófito. Nessa etapa foram selecionados os extratos que apresentaram a maior diversidade e abundância metabólica.

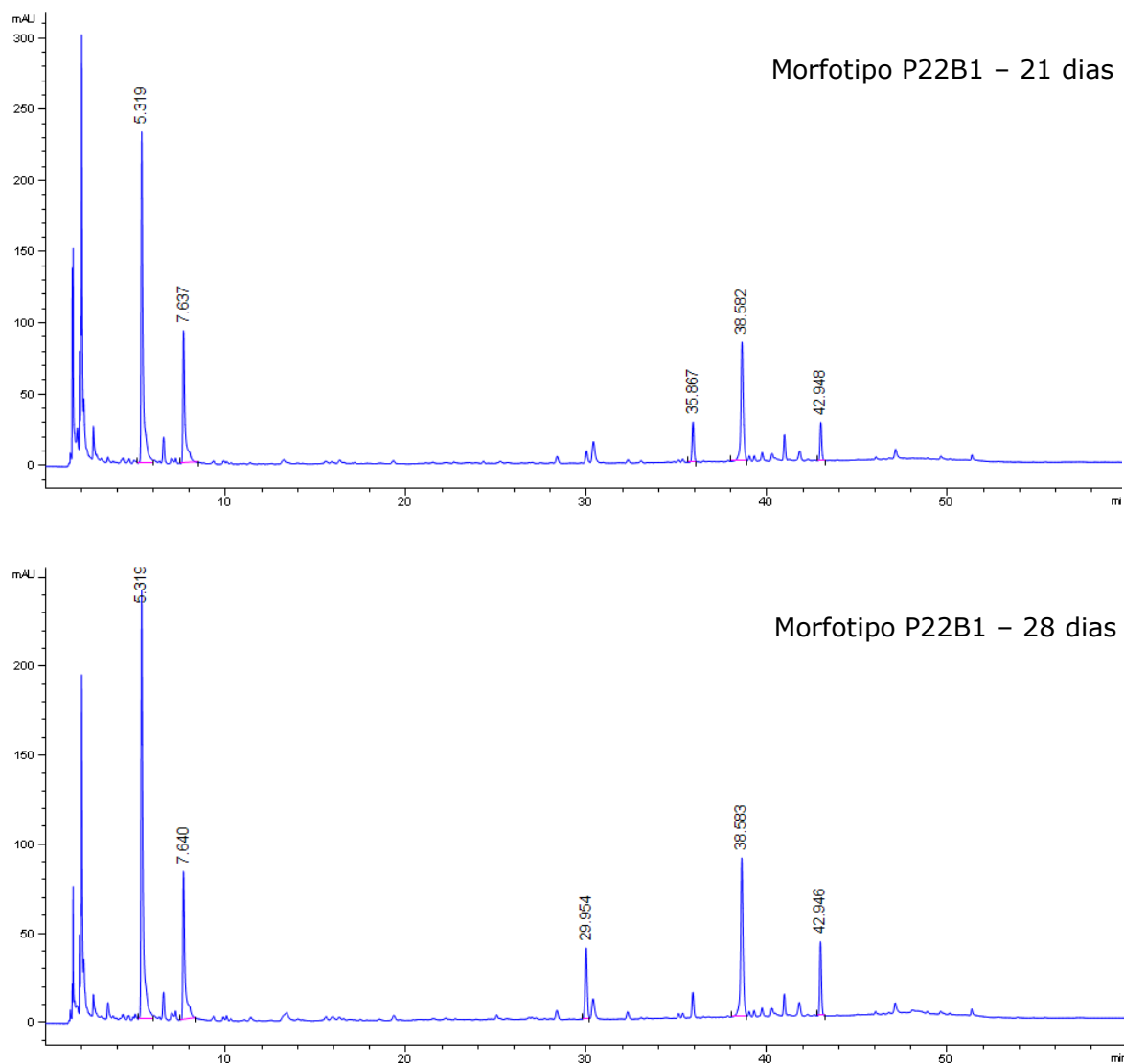


Figura 13. Exemplo de cromatogramas de extratos brutos cultivados a 21 e 28 dias. Para esse fungo (P22B1 - *Phomopsis* sp.) pode-se notar que o cultivo em 21 ou 28 dias não apresenta diferenças significativas na abundância metabólica.

4.3. Triagem de bioatividades dos extratos brutos produzidos pelos endófitos

O ensaio antirradicalar foi realizado com 28 extratos brutos dos fungos identificados. Na Tabela 7 são apresentados os dados de atividade antirradicalar expresso em % de Trolox. Entre essas amostras, dois extratos possuem a maior atividade antirradicalar (destaque em negrito). Esses resultados corroboram a observação dos respectivos cromatogramas que apresentam picos intensos, detectados a 280nm, indicativos da presença de substâncias fenólicas. Embora muitos cromatogramas apresentem esse perfil, a atividade antirradicalar nesses extratos é considerada baixa. Assim, pode-se suspeitar que tais grupamentos fenólicos estão substituídos por metoxilas, glicosídeos, entre outros.

Tendo em vista que o duplo plaqueamento pode provocar a produção de novas substâncias químicas proveniente do endófito desafiado, o ensaio de atividade antifúngica foi realizado com todos os 28 fungos identificados frente ao fitopatógeno *F. oxysporum*. Os resultados da análise qualitativa desse ensaio estão sumarizados na Tabela 7. Sete amostras apresentaram as maiores atividades (destaque em negrito), sendo selecionados apenas os halos de inibição superiores a 50 mm. Das interações classificadas como positivas, 96,4% foram consideradas como antibiose e 3,6% competição pelo substrato. Das classificadas como antibiose, 85,7% apresentaram halo de inibição com diâmetro médio maior que 20 mm. Dessa forma, 24 endófitos mostraram atividade inibitória positiva. Quanto ao diâmetro do halo de inibição, um alto valor de desvio padrão é observado devido a forma em elipse dos mesmos (Figura 2).

Os extratos brutos foram testados em relação a atividade citotóxica frente as células tumorais de adenocarcinoma de cólon (HCT-116) e os resultados obtidos (valores percentuais de inibição celular nas duas concentrações de extratos investigadas) são apresentados na Tabela 7. De acordo com esses resultados, 13 das 28 amostras demonstraram inibição da proliferação celular tumoral (>70%) na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e, portanto, são consideradas citotóxicas. Entre essas amostras, 11 extratos (destacados em negrito) inibiram mais do que 50% da proliferação celular na concentração de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, logo, a CI_{50} destes extratos estão abaixo desse valor, o que demonstra maior citotoxicidade que as demais. Por outro lado, para os extratos que inibiram cerca de 50% da proliferação celular, pode-se inferir que o valor de CI_{50} está próximo da respectiva concentração testada.

Tabela 7. Resumo das bioatividades dos extratos brutos dos endófitos identificados de *Pentacalia desiderabilis*.

Fungo endofítico	Código	Tempo de cultivo (dias)	Rendimento (mg) ^A	Atividade antirradicalar (% Trolox) ^B	Atividade citotóxica ^C		Antifúngico (mm) ^D
					5µg.mL ⁻¹	50µg.mL ⁻¹	
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	L65A	28	2,3	14,00	91,54	100,00	56,6 ± 18,9
<i>Diaporthe passiflorae</i>	P2A1	28	2,1	15,08	85,06	100,00	25,0 ± 16,3
<i>Diaporthe passiflorae</i>	P2B	28	0,8	8,17	66,58	100,00	23,7 ± 15,2
<i>Diaporthe passiflorae</i>	P28C2	21	3,5	7,47	100,00	100,00	25,0 ± 15,4
<i>Diaporthe passiflorae</i>	L58A	21	2,9	7,84	57,16	54,52	18,9 ± 10,9
<i>Diaporthe passiflorae</i>	L67	21	3,2	22,55	57,82	47,15	13,7 ± 15,4
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	11B	28	1,5	10,75	34,78	42,37	46,8 ± 28,9
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	P3	28	2,0	10,80	84,25	99,54	80,3 ± 24,6
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	P8	28	5,7	12,61	38,42	65,26	40,5 ± 39,2
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	P9	21	0,8	10,55	36,08	46,54	62,1 ± 19,0
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	P18	21	0,5	13,98	36,93	60,86	33,5 ± 3,2
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	L49	21	3,5	17,85	36,07	59,38	20,4 ± 17,5
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	L50A	21	4,2	15,59	51,76	100,00	22,1 ± 7,7
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	L62A1	28	3,5	19,42	33,34	52,73	33,8 ± 6,9
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	L62A2	28	2,2	18,21	80,45	97,17	52,1 ± 17,6
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	L63	28	0,2	19,53	19,56	40,71	46,6 ± 18,9
<i>Diaporthe sp.</i>	P22A	21	1,3	19,48	64,94	90,03	25,1 ± 19,6
<i>Diaporthe sp.</i>	L46A	21	0,4	65,35	17,29	34,21	21,9 ± 14,0
<i>Diaporthe sp.</i>	L46B	21	1,3	13,42	25,72	63,97	29,1 ± 22,7
<i>Diaporthe sp.</i>	L48	21	2,2	12,65	82,77	100,00	31,1 ± 24,7

<i>Epicoccum nigrum</i>	L70B	21	4,0	14,02	45,02	100,00	14,3 ± 4,7
-------------------------	------	----	-----	-------	-------	--------	------------

Tabela 7. Continuação.

Fungo endofítico	Código	Tempo de cultivo (dias)	Rendimento (mg) ^A	Atividade antirradicalar (% Trolox) ^B	Atividade citotóxica ^C		Antifúngico (mm) ^D
					5µg.mL ⁻¹	50µg.mL ⁻¹	
<i>Ophioceras leptosporum</i>	L44	21	4,5	2,12	37,99	54,68	49,9 ± 4,9
<i>Paraphaeosphaeria neglecta</i>	P23	21	1,5	14,79	67,30	100,00	69,8 ± 13,8
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	L69B	21	2,4	12,36	22,05	40,05	41,0 ± 16,0
<i>Pestalotiopsis vismiae</i>	L69A	21	2,8	12,45	27,43	95,51	79,7 ± 10,0
<i>Phaeosphaeria poagena</i>	L64	28	3,2	21,93	37,33	100,00	45,8 ± 18,6
<i>Phomopsis</i> sp.	P22B1	21	3,3	38,65	20,76	62,39	19,7 ± 16,7
Xylariaceae sp.	L56	21	4,2	71,56	79,70	98,32	69,7 ± 9,4

^A Rendimento do extrato (em mg) obtido a partir do cultivo do microrganismo em BDA utilizando uma placa de Petri 90 x 150 mm.

^B os destaques foram demarcados para atividades antirradicalares superiores a 50% da atividade do Trolox.

^C % da inibição tumoral; os destaques foram demarcados para atividades superiores a 70% e 50% nas concentrações de 50 e 5 µg.mL⁻¹, respectivamente.

^D Diâmetro médio do halo de inibição ± Desvio Padrão (mm); os destaques foram demarcados para halos de inibição superiores a 50 mm.

Como pode ser observado na Tabela 7 apenas um endófito (L56) apresentou valores relevantes e superiores aos previamente estipulados para as três atividades avaliadas. Embora esse endófito fosse a melhor escolha para cultivo em larga escala e obtenção dos metabólitos produzidos, o microrganismo foi, até o momento, identificado apenas no nível de família (Xylariaceae). O sequenciamento de outras regiões do DNA permitirá, em futuro próximo, definir gênero e/ou espécie, o que nos permitirá investir tempo e recursos para obtenção e descrição dos metabólitos.

Desta forma, efetuando a seleção apenas pelas atividades citotóxica e antifúngica, haja visto que outros endófitos apresentaram atividade antirradicalar discreta, o fungo L65A (*Colletotrichum gloeosporioides*) foi selecionado por apresentar a maior atividade citotóxica (91,54% de inibição) na menor concentração testada ($5\mu\text{g.mL}^{-1}$) e ainda apresentou um importante halo de inibição frente ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum*.

4.4. Identificação dos metabólitos produzidos por *Colletotrichum gloeosporioides*

O extrato bruto em maior escala de *Colletotrichum gloeosporioides* (351,3 mg) apresentou três picos majoritários ($t_R = 8,89\text{min.}$, $9,17\text{min.}$ e $16,30\text{min.}$) e dois picos minoritários ($t_R = 13,96\text{min.}$ e $17,50\text{min.}$) no cromatograma obtido por CLAE (Figura 14).

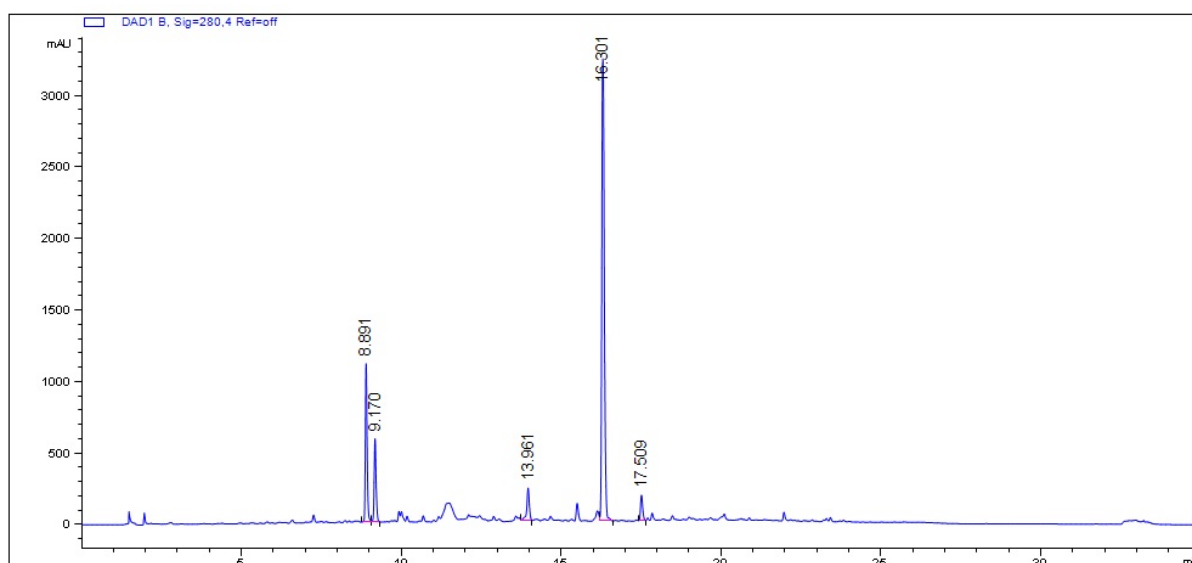


Figura 14. Cromatograma do extrato bruto de *Colletotrichum gloeosporioides* cultivado em meio BDA e larga escala por 28 dias.

Após fracionamento cromatográfico em coluna de Sephadex LH-20 foram obtidos 4 grupos cromatográficos. Através da análise por CG-EM e CLAE, pode-se observar que o grupo 2 (60,3 mg) era formado por uma mistura dos componentes presentes nos grupos 1 e 3. Por outro lado, o grupo 4 (14,8 mg) possuía os componentes minoritários presentes no cromatograma do extrato bruto (Figura 14). Devido a baixa quantidade de massa desse grupo o mesmo não foi estudado, uma vez que a pequena disponibilidade de material, possivelmente, inviabilizaria a obtenção dos componentes em quantidades suficientes para obtenção dos espectros.

A análise do grupo 1 (189,7 mg) por CLAE não apresentou componentes detectáveis por UV-DAD. A análise por CG-EM permitiu verificar a presença de um pico majoritário em ~18,8min. e diversos picos de menor intensidade e maior tempo de retenção (Figura 15).

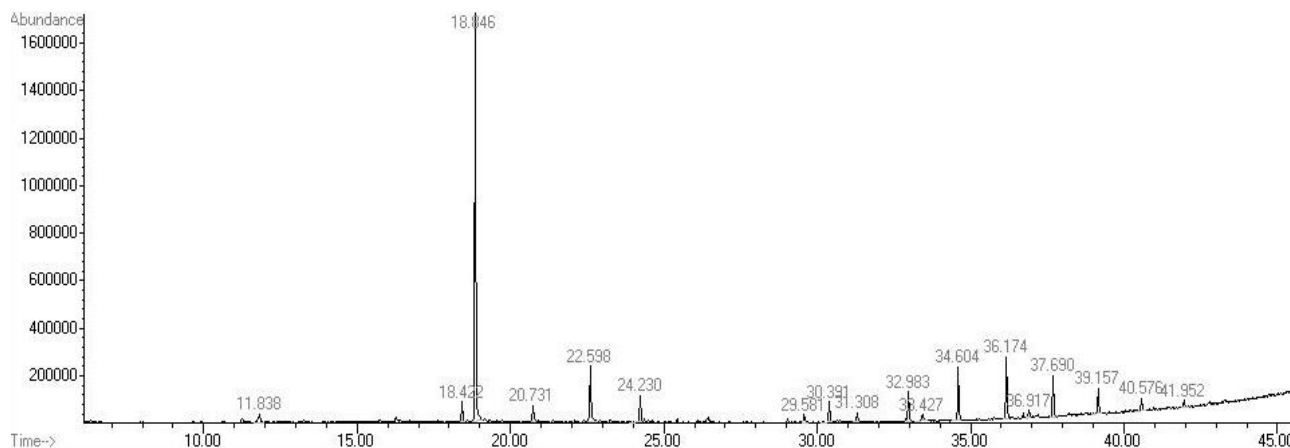


Figura 15. Cromatograma em CG do grupo 1 obtido a partir do fracionamento cromatográfico do extrato bruto de *Colletotrichum gloeosporioides*

Através da comparação com a literatura e confrontação dos espectros de massas experimentais com os espectros de massas da base de dados NIST foi possível identificar nove componentes presentes no cromatograma obtido por CG. Tais componentes foram confirmados, também, pela similaridade dos tempos de retenção de padrões comerciais das substâncias. Na tabela 8 são apresentados os componentes identificados e seus percentuais relativos no grupo 1 do extrato bruto do endófito.

Os componentes identificados são pertencentes a classe dos n-alcenos e ácidos graxos e seus derivados. Esses componentes totalizam, pelo menos, 54% da composição química do extrato bruto produzido pelo microrganismo. A produção dessas classes de substâncias tem sido descrita para fungos (SINHA et

al., 2015) e mais recentemente estudada como uma alternativa para a produção de biocombustíveis (KUMAR & KAUSHIK, 2013), tanto que em 2008 o termo micodiesel foi lançado em literatura (STROBEL et al., 2008).

Tabela 8. Substâncias identificadas, seus respectivos tempos de retenção e percentual relativo de cada componente na amostra.

Componente*	Tempo de retenção (min)	% relativo na amostra
Ácido palmítico	18,846	45,9
Palmitato de metila	22,598	9,9
Ácido esteárico	31,308	2,4
Estearato de metila	32,983	4,9
Octadecano	34,604	7,1
Eicosano	36,174	8,1
Docosano	37,69	5,8
Tetracosano	39,157	3,8
Hexacosano	40,576	1,9
Total identificado		89,8

* Com exceção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos identificados apenas por EM, os outros componentes foram identificados também pelo tempo de retenção de padrões comerciais.

O grupo 3 (86,5 mg), constituído pelos três picos majoritários presentes no cromatograma da Figura 14, foi separado por CLAE-semipreparativo para obtenção dos componentes isolados. Esses componentes apresentam o mesmo espectro de absorção de UV (Figura 16) e, provavelmente, apresentam alta similaridade estrutural.

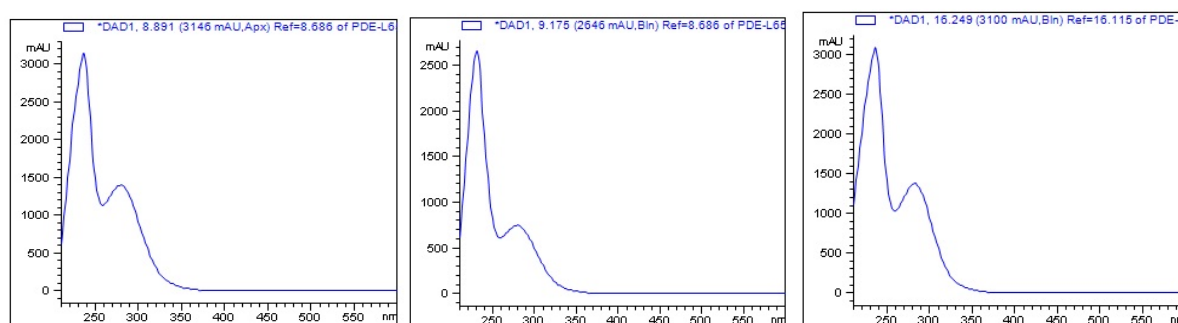


Figura 16. Espectros de absorção no UV dos componentes com tempos de retenção de 8,89min., 9,17min. e 16,30min., respectivamente.

O componente I (40,2 mg), que possui tempo de retenção de 16,30 min., apresentou em seu espectro de RMN ^1H três simpletos, dois integrando para três hidrogênios, em δ 2,18 e δ 3,80 referente, respectivamente, a um grupo metila ligado a insaturação e uma metoxila, e um em δ 5,43 (1H) referente a hidrogênio ligado a carbono insaturado. Um multiplete em δ 5,36, integrando para dois hidrogênios, sugeriu a presença de uma insaturação. Essa ligação dupla encontra-se ligada a um grupo metilênico e um grupo metílico devido a presença, respectivamente, de dois dupletos em δ 2,98 (2H, $J= 4,0$ Hz) e δ 1,63 (3H, $J= 5,0$ Hz). Esses sinais e sugestões foram confirmados através do espectro de RMN ^{13}C e DEPT-135 que indicaram a presença de uma metoxila (δ 56,0), dois grupamentos metílicos (δ 17,0 e δ 17,7), um metileno (δ 26,6) e três carbonos metínicos insaturados (δ 127,2, δ 126,0 e δ 88,1). Adicionalmente, esses espectros apresentaram o sinal de uma carboxila (δ 164,8) e três carbonos quaternários insaturados em δ 170,6, δ 158,7 e δ 109,5. A confirmação inequívoca da estrutura foi efetuada com a obtenção dos espectros bidimensionais da substância. Na Tabela 9 são apresentados os sinais atribuídos do componente I e na Figura 17 sua estrutura, um policetídeo já descrito em literatura e identificado como nova-zelandina A.

Tabela 9. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C , experimentais e de literatura, atribuídos para o componente I, o policetídeo nova-zelandina A.

Posição	Experimental		Literatura*	
	RMN ^1H ; δ m ($J = \text{Hz}$)	RMN ^{13}C	RMN ^1H ; δ m ($J = \text{Hz}$)	RMN ^{13}C
2		164,8		164,7
3	5,43 s	88,1	5,44 s	87,8
4		170,8		170,6
5		109,5		109,9
6		158,7		158,7
7	2,98 d (4,0)	26,6	2,99 d (4,0)	26,8
8	5,36 m	126,0	5,38 m	126,1
9	5,36 m	127,2	5,38 m	127,0
10	1,63 d (5,0)	17,7	1,63 d (5,0)	17,8
11	3,80 s	56,0	3,80 s	56,1
12	2,18 s	17,0	2,19 s	17,1

*Christensen et al., 2005.

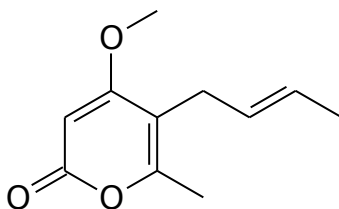


Figura 17. Estrutura química do componente I ($t_R = 16,30$ min.), um policetídeo nomeado como nova-zelandina A.

O componente II (8,3 mg), que possui tempo de retenção de 9,17 min., apresentou os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C muito similares ao da nova-zelandina A, exceto pela ausência dos sinais dos hidrogênios metilênicos e, conseqüentemente, do carbono metilênico. Esses sinais foram substituídos por um carbono carbonílico de cetona α,β -insaturada em δ 190,5. O espectro de RMN ^1H apresentou três simpletos, dois integrando para três hidrogênios, em δ 2,17 e δ 3,81 referente, respectivamente, a um grupo metila ligado a insaturação e uma metoxila, e um em δ 5,44 (1H) referente a hidrogênio ligado a carbono insaturado. Essas sugestões foram confirmadas através do espectro de RMN ^{13}C e DEPT-135 que indicaram a presença de um grupo metílico (δ 18,0), uma metoxila (δ 56,3) e um carbono metínico insaturado (δ 87,6). Um multipletto em δ 6,74 (1H) e um dupletto em δ 6,23 (1H, $J = 16,0$ Hz) indicaram a presença de dois hidrogênios com estereoquímica *trans* ligados a uma insaturação, que foi confirmada pelos sinais de RMN ^{13}C em δ 147,2 e δ 133,0. Um grupo metílico ligado a insaturação foi inferido devido a presença de um dupletto em δ 1,96 (3H, $J = 7,0$ Hz) e do sinal em δ 18,5. Adicionalmente, esses espectros apresentaram o sinal de uma carboxila (δ 163,1) e três carbonos quaternários insaturados em δ 168,5, δ 161,2 e δ 114,3. A confirmação inequívoca da estrutura foi efetuada com a obtenção dos espectros bidimensionais da substância. Na Tabela 10 são apresentados os sinais atribuídos do componente II e na Figura 18 sua estrutura, um policetídeo já descrito em literatura e identificado como pirenocina A.

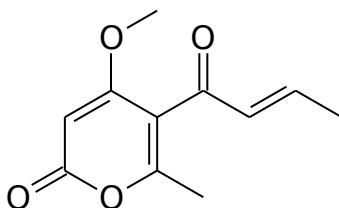


Figura 18. Estrutura química do componente II ($t_R = 9,17$ min.), um policetídeo nomeado como pirenocina A.

Tabela 10. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C , experimentais e de literatura, atribuídos para o componente II, o policetídeo pirenocina A.

Posição	Experimental		Literatura*	
	RMN ^1H ; δ m ($J = \text{Hz}$)	RMN ^{13}C	RMN ^1H ; δ m ($J = \text{Hz}$)	RMN ^{13}C
2		163,1		163,0
3	5,44 s	87,6	5,44 s	87,7
4		168,5		168,7
5		114,3		114,4
6		161,2		161,4
7		190,5		190,5
8	6,23 d (16,0)	133,0	6,25 dq	133,1
9	6,74 m	147,2	6,76 m	147,3
10	1,96 d (7,0)	18,5	1,97 d (5,0)	18,5
11	3,81 s	56,3	3,80 s	56,4
12	2,17 s	18,0	2,18 s	18,2

*Sato et al., 1981.

O componente III (18,7 mg), que possui tempo de retenção de 8,89 min., apresentou os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C muito similares ao da pirenocina A, exceto pela ausência dos sinais dos hidrogênios metínicos insaturados. Esses sinais foram substituídos por um carbono metilênico e um carbono metínico oxigenado em, respectivamente, δ 52,5 e δ 64,8. O espectro de RMN ^1H apresentou três simpletos, dois integrando para três hidrogênios, em δ 2,16 e δ 3,82 referente, respectivamente, a um grupo metila ligado a insaturação e uma metoxila, e um em δ 5,44 (1H) referente a hidrogênio ligado a carbono insaturado. Essas sugestões foram confirmadas através do espectro de RMN ^{13}C e DEPT-135 que indicaram a presença de um grupo metílico (δ 18,1), uma metoxila (δ 56,3) e um carbono metínico insaturado (δ 88,3). Esses espectros apresentaram o sinal de uma carboxila (δ 163,5), uma carbonila de cetona (δ 201,5) e três carbonos quaternários insaturados em δ 168,5, δ 162,3 e δ 114,7.

Um multiplete em δ 5,30 (1H) associado ao δ 64,8 foi atribuído ao hidrogênio e ao carbono carbinólico, respectivamente. Um duplete em δ 2,51 (2H, $J = 6,5$ Hz) associado ao carbono δ 52,5 foi atribuído ao grupo metilênico em posição alfa à carbonila. Um grupo metílico foi inferido devido a presença de um duplete em δ 1,25 (3H, $J = 7,0$ Hz) e do sinal em δ 23,3. A confirmação

inequívoca da estrutura foi efetuada com a obtenção dos espectros bidimensionais da substância. Na Tabela 11 são apresentados os sinais atribuídos do componente III e na Figura 19 sua estrutura, um policetídeo já descrito em literatura e identificado como pirenocina B.

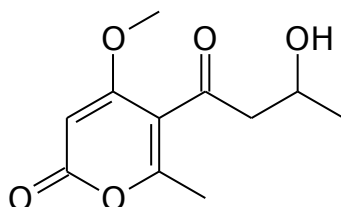


Figura 19. Estrutura química do componente III ($t_R = 8,89\text{min.}$), um policetídeo nomeado como pirenocina B.

Tabela 11. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C , experimentais e de literatura, atribuídos para o componente III, o policetídeo pirenocina B.

Posição	Experimental		Literatura*
	RMN ^1H ; δ m ($J = \text{Hz}$)	RMN ^{13}C	RMN ^{13}C
2		163,5	163,8
3	5,44 s	88,3	87,8
4		168,5	168,3
5		114,7	115,4
6		162,3	162,4
7		201,5	201,0
8	2,5 d (6,5)	52,5	52,9
9	5,3 m	64,8	64,3
10	1,25 d (7,0)	23,3	22,8
11	3,82 s	56,3	56,5
12	2,16 s	18,1	18,6

*Em literatura não foram apresentados os dados de RMN ^1H ; Sato et al., 1981.

Entre os policetídeos isolados, a nova-zelandina A já foi identificada em espécies endofíticas de *Alternaria*, como *A. infectoria* e *A. phragmospora* (CHRISTENSEN et al., 2005; METWALY et al., 2014), em uma espécie não caracterizada de *Colletotrichum* (YANG et al., 2014) e no endófito *Lewia infectoria* (CASELLA et al., 2013), além de uma espécie não identificada de fungo (KROHN et al., 2008). Em nenhum dos casos o metabólito foi obtido a partir de um endófito isolado de uma espécie de Asteraceae.

A pirenocina A foi isolada de alguns espécies endofíticas, tais como, *Colletotrichum* sp. (YANG et al., 2014), *Curvularia inaequalis* (KIM et al., 2000), *Lewia infectoria* (CASELLA et al., 2013), *Penicillium paxilli* (RUKACHAISIRIKUL et al., 2007), *Pyrenochaeta terrestris* (SATO et al., 1981), e de duas espécies não identificadas de fungo, uma delas obtida a partir da alga *Sargassum* (AMAGATA et al., 1998; KROHN et al., 2008). O metabólito também foi obtido do fungo entomopatogênico *Verticillium hemipterigenum* (NILONTA et al., 2003), do fungo marinho *Penicillium paxilli* (TOLEDO et al., 2014) e do fungo de solo *Curvularia affinis* (ZHANG et al., 2012).

A pirenocina B foi isolada dos fungos endofíticos *Colletotrichum* sp. (YANG et al., 2014), *Curvularia inaequalis* (KIM et al., 2000), *Penicillium paxilli* (RUKACHAISIRIKUL et al., 2007), *Pyrenochaeta terrestris* (SATO et al., 1981) e do endófito não identificado obtido da alga *Sargassum* (AMAGATA et al., 1998). O metabólito também foi obtido do fungo entomopatogênico *Verticillium hemipterigenum* (NILONTA et al., 2003).

Conseqüentemente, os três policetídeos isolados já foram identificados em uma espécie não identificada de *Colletotrichum* obtida como endófito de *Ludwigia prostrata* – Onagraceae (YANG et al., 2014). Por outro lado, as pirenocinas A e B já foram isoladas do endófito *Alternaria* sp. obtido de *Helianthus tuberosus* – Asteraceae (TAL & ROBESON, 1986). Desta forma, esse é o primeiro relato da ocorrência desses policetídeos em *C. gloeosporioides* e o segundo relato das pirenocinas em espécies endofíticas de Asteraceae.

As bioatividades dos isolados estão, atualmente, em progresso visto que esses policetídeos não foram investigados, ainda, em relação às atividades citotóxica e antirradicalar. Por outro lado, esses componentes já foram avaliados em relação a atividade antibiótica frente a diversos patógenos. A pirenocina B inibiu ligeiramente o crescimento do fungo *Microsporum gypseum* com um CI_{50} de 32 mg.mL^{-1} (RUKACHAISIRIKUL et al., 2007) e mostrou pouca atividade antibacteriana. Por outro lado, a pirenocina A inibiu o crescimento micelial linear de *Fusarium oxysporum* com CI_{50} de $54 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. Bactérias gram-positivas como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* também foram mais suscetíveis à pirenocina A do que às bactérias gram-negativas. O componente atua como um agente bioestático e não biocida com todos os organismos testados (SPARACE et al., 1987).

V. CONCLUSÕES

Esse estudo permitiu a obtenção de 51 fungos endofíticos associados às folhas e galhos de *P. desiderabilis* (Asteraceae), uma espécie nativa da Mata Atlântica. O material genético desses isolados foi extraído, possibilitando a identificação de 28 microrganismos em níveis hierárquicos diferentes. Os endófitos caracterizados foram cultivados em pequena escala, e os extratos brutos foram submetidos à avaliação das atividades antirradicalar, antifúngica e citotóxica.

O endófito *Colletotrichum gloeosporioides* foi selecionado para cultivo em maior escala, e desse extrato foram identificados doze componentes, pertencentes às classes dos ácidos e ésteres graxos, n-alcanos e policetídeos. Os três policetídeos isolados foram descritos, em literatura, para uma espécie não caracterizada de *Colletotrichum*, obtida como endófito de *Ludwigia prostrata* (Onagraceae). Dois desses metabólitos foram descritos para o endófito *Alternaria* sp., obtido de *Helianthus tuberosus* (Asteraceae). No entanto, esse é o primeiro relato da ocorrência desses policetídeos em *C. gloeosporioides* e o segundo relato desses policetídeos em endófitos de Asteraceae. A avaliação das bioatividades dos componentes isolados encontra-se em desenvolvimento.

Outros endófitos identificados e produtores de metabólitos serão investigados, futuramente, uma vez que seu perfil metabólico e bioativo foi devidamente caracterizado no âmbito desse projeto.

VI. FORMAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS E PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

A formação de recursos humanos abaixo designada refere-se a atividades de orientação de alunos de Iniciação Científica desenvolvidas no âmbito desse projeto e conduzidas por um dos membros do projeto. Todos os alunos relacionados foram bolsistas do projeto financiado pelo Mackpesquisa.

Alunos de Iniciação Científica

1. Andréa Paula Soares de Arruda – Curso – Química, 3º semestre.
2. Diego Morgado – Curso – Farmácia, 6º semestre.
3. Leonardo Romão Alves Silva – Curso – Química, 6º semestre.
4. Letícia de Lima Rossi – Curso – Química, 3º semestre.
5. Luiza Ferreira Sobrinho – Curso – Química, 5º semestre.

Trabalho de Graduação Interdisciplinar

1. MORAES, G.M. (2017). Identificação molecular baseada no sequenciamento de rDNA de fungos endofíticos associados à *Pentacalia desiderabilis* (Vell.) Cuatrec. (Asteraceae) presente em Campos do Jordão (São Paulo, Brasil). Trabalho de Graduação Interdisciplinar do curso de Ciências Biológicas (Bacharelado) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo.
2. MORGADO, D. (2017). Investigação da diversidade de fungos endofíticos associados à *Pentacalia desiderabilis* (Asteraceae). Trabalho de Graduação Interdisciplinar do curso de Farmácia (Bacharelado) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, R.; SCHERLACH, K.; DAHSE, H.-M.; SATTLER, I.; HERTWECK, C. (2010). Botryorhodines A–D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*. *Phytochemistry* **71**: 110-116.

ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; SHIPLEY, B.; ARNASON, J.T. (1999). Do plant species with high relative growth rates have poorer chemical defences? *Funct. Ecol.* **13**: 819-827.

AMAGATA, T.; MINOURA, K.; NUMATA, A. (1998). Cytotoxic metabolites produced by a fungal strain from a *Sargassum* alga. *J. Antibiot.* **51**: 432-434.

ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. *Microbial ecology of leaves*. New York: Springer-Verlag, 1990.

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

ARNOLD, A.E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fung. Biol. Rev.* **2**: 51-66.

AZEVEDO, J.L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA. p. 116-137, 1998.

BARICHELLO, D.; CONSOLI, L.; PEREIRA, J.F. (2010). Otimização do processo de maceração visando a extração de DNA em larga escala. VI Mostra de Iniciação Científica da Embrapa Trigo, 123.

BEEKMANN, A.C.; WOERDENBAG, H.J.; KAMPINGA, H.H.; KONINGS, A.W.T. (1996). Cytotoxicity of artemisinin, a dimer of dihydroartemisinin, artemisitene and eupatoriopicrin as evaluated by the MTT and clonogenic assay. *Phytother. Res.* **10**: 140-144.

BIASETTO, C.R. (2016). Fungos endofíticos em *Eugenia brasiliensis*: prospecção química, biológica, enzimática e avaliação do co-cultivo e epigenética em *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. Tese de Doutorado em Química – Instituto de Química Júlio de Mesquita Filho, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

BODE, H.B.; BETHE, B.; HOF, R.; ZEECK, A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*. **3**: 619-627.

BOHLMANN, F.; CASTRO, V.; ZIESCHE, J. (1984). New sesquiterpenes from *Pentacalia* species. *Rev. Latinoamer. Quím.* **14**: 103-106.

BOHLMANN, F.; ZIESCHE, J. (1979). Neue germacrene-derivate aus *Senecio*-arten. *Phytochemistry* **18**: 1489-1494.

BOHM, B.A.; STUESSY, T.F. (2001). Flavonoids of the sunflower family. SpringerWien, New York.

BONOMI, A.; MAIORANO, A.E.; FILOMENA, M.A.R. (2008). Técnica aproveita lignocelulose da cana para produzir etanol. *Visão Agrícola* **8**: 29-33.

BORGES, W.S. (2008). Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações. Doutorado em Ciências, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

BORGES, W.S.; MANCILLA, G.; GUIMARÃES, D.O.; DURÁN-PATRÓN, R.; COLLADO, I.G.; PUPO, M.T. (2011). Azaphilones from the endophyte *Chaetomium globosum*. *J. Nat. Prod.* **74**: 1182-1187.

BORGES, W.S.; PUPO, M.T. (2006). Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophyte found in association with the medicinal plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **17**: 929-934.

BREMER, K. (1994). *Asteraceae. Cladistics and classification*. Timber Press, Portland, OR.

CALABRIA, L.M.; EMERENCIANO, V.P.; FERREIRA, M.J.P.; SCOTTI, M.T.; MABRY, T.J. (2007). A phylogenetic analysis of tribes of the Asteraceae based on phytochemical data. *Nat. Prod. Commun.* **2**: 277-285.

CASELLA, T.M.; EPARVIER, V.; MANDAVID, H.; BENDELAC, A.; ODONNE, G.; DAYAN, L.; DUPLAIS, C.; ESPINDOLA, L.S.; STEIN, D. (2013). Antimicrobial and cytotoxic secondary metabolites from tropical leaf endophytes: Isolation of antibacterial agent pyrrocidine C from *Lewia infectoria* SNB-GTC2402. *Phytochemistry* **96**: 370-377.

CHANDRA, S. (2012). Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**: 47-59.

CHEN, S.F.; MORGAN, D.P.; HASEY, J.K.; ANDERSON, K.; MICHAILIDES, T.J. (2014). Phylogeny, morphology, distribution, and pathogenicity of

Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from English walnut in California. *Plant Disease* **98**: 636-652.

CHRISTENSEN, K.B.; KLINK, J.W.V.; WEAVERS, R.T.; LARSEN, T.O.; ANDERSEN, B.; PHIPPS, R.K. (2005). Novel chemotaxonomic markers of the *Alternaria infectoria* species-group. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 9431-9435.

COTA, B.B.; ROSA, L.H.; CALIGIORNE, R.B.; RABELLO, A.L.T.; ALVES, T.M.A.; ROSA, C.A.; ZANI, C.L. (2008). Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp., inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.* **285**: 177-182.

DAVITT, A.J.; CHEN, C.; RUDGERS, J.A. (2011). Understanding context-dependency in plant-microbe symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of symbiont transmission. *Environ. Exp. Bot.* **71**: 137-145.

ELFAR, K.; TORRES, R.; DIAZ, G.A.; LATORRE, B.A. (2013). Characterization of *Diaporthe australafricana* and *Diaporthe* spp. associated with stem canker of blueberry in Chile. *Plant Disease* **97**: 1042-1050.

FERNÁNDEZ, F.A.; HANLIN, R.T. (1996). Morphological and ARPD analyses of *Diaporthe phaseolorum* from soybean. *Mycologia* **88**: 425-440.

FILHO, M.R.C. (2013). Identificação e relações filogenéticas, potencial de uso de isolados de *Trichoderma* no controle do mofo branco e como promotores de crescimento do feijoeiro. Tese de Doutorado em Fitopatologia – Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília.

FORMIGHIERI, E.F. (2004). Phred phrap consed. Laboratório de Genômica e Expressão da UNICAMP. 28 p.

FUNK, V.A.; SUSANNA, A.; STUESSY, T.F.; BAYER, R.J. (2009). Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae. IAPT, Vienna, Austria.

GALLO, M.B.C.; CAVALCANTI, B.C.; BARROS, F.W.A.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; BASTOS, J.K.; PUPO, M.T. (2010). Chemical constituents of *Papulaspora immersa*, an endophyte from *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae), and their cytotoxic activity. *Chem. & Biodiv.* **7**: 2941-2950.

GALLO, M.B.C.; CHAGAS, F.O.; ALMEIDA, M.O.; MACEDO, C.C.; CAVALCANTI, B.C.; BARROS, F.W.A.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; BASTOS, J.K.; PUPO, M.T. (2009). Endophytic fungi found in

association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. *J. Bas. Microbiol.* **49**: 142-151.

GE, H.M.; SONG, Y.C.; CHEN, J.R.; HU, S.; WU, J.Y.; TAN, R.X. (2006). Paranolin: a new xanthene-based metabolite from *Paraphaeosphaeria nolinae*. *Helv. Chim. Acta* **89**: 502-506.

GIMÉNEZ, C.; CABRERA, R.; REINA, M.; GONZÁLES COLOMA, A. (2007). Fungal endophytes and their role in plant protection. *Curr. Org. Chem.* **11**: 707-720.

GOMES, R.R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S.I.R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. (2013). *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia* **31**: 1-41.

GU, W.; GE, H.M.; SONG, Y.C.; DING, H.; ZHU, H.L.; ZHAO, X.A.; TAN, R.X. (2007). Cytotoxic benzo[*j*]fluoranthene metabolites from *Hypoxylon truncatum* IFB-18, an endophyte of *Artemisia annua*. *J. Nat. Prod.* **70**: 114-117.

GUIMARÃES, D.O.; BORGES, W.S.; KAWANO, C.Y.; RIBEIRO, P.H.; GOLDMAN, G.H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O.H.; OLIVA, G.; LOPES, N.P.; PUPO, M.T. (2008). Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52**: 134-144.

GUIMARÃES, D.O.; BORGES, W.S.; VIEIRA, N.J.; OLIVEIRA, L.F.; DA SILVA, C.H.T.P.; LOPES, N.P.; L.G.; DURÁN-PATRÓN, R.; COLLADO, I.G.; PUPO, M.T. (2010). Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species. *Phytochemistry* **71**: 1423-1429.

GUIMARÃES, D.O.; LOPES, N.P.; PUPO, M.T. (2012). Meroterpenes isolated from the endophytic fungus *Guignardia mangiferae*. *Phytochem. Lett.* **5**: 519-523.

GUNATILAKA, A.A.L. (2006). Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *J. Nat. Prod.* **69**: 509-526.

HAWKSWORTH, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* **105**: 1422-1432.

IMA. (2016). International Mycological Association. Mycobank.

KADEREIT, J.W. (2007). *The families and genera of vascular plants. Flowering plants. Eudicots: Asterales*. Vol. VIII. Springer-Verlag, Berlin.

KHARWAR, R.N.; MISHRA, A.; GOND, S.K.; STIERLE, A.; STIERLE, D. (2011). Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Nat. Prod. Rep.* **28**: 1208-1228.

KHIRALLA, A. (2016). Endophytic fungi associated with Sudanese medicinal plants show cytotoxic and antibiotic potential. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**: fnw089.

KIM, J.-C.; CHOI, G.J.; KIM, H.T.; KIM, H.-J.; CHO, K.Y. (2000). Pathogenicity and pyrenocine production of *Curvularia inaequalis* isolated from *Zoysia* grass. *Plant Disease* **84**: 684-688.

KONGSAEREE, P.; PRABPAI, S.; SRIUBOLMAS, N.; CHANIKA, V. (2003). Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotrichum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides*. *J. Nat. Prod.* **66**: 709-711.

KROHN, K.; FLORKE, U.; RAO, M.S.; STEINGROVER, K.; AUST, H.J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. (2001). Metabolites from fungi. 15. New isocoumarins from an endophytic fungus isolated from the Canadian thistle *Cirsium arvense*. *Nat. Prod. Lett.* **15**: 353-361.

KROHN, K.; SOHRAB, M.H.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. (2008). New pyrenocines from an endophytic fungus. *Nat. Prod. Commun.* **3**: 1689-1692.

KUMAR, S.; KAUSHIK, N. (2013). Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. *Plos One* **8**: e56202.

KUSARI, S.; SPITELLER, M. (2011). Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? *Nat. Prod. Rep.* **28**: 1203-1207.

LI, G.-H.; WANG, X.-B.; LIU, F.-F.; DANG, L.-Z.; LI, L.; YANG, Z.-S.; XIN, X.; ZHANG, K.-Q. (2010). The chemical constituents of endophytic fungus *Trichoderma* sp. MFF-1. *Chem. & Biodiv.* **7**: 1790-1795.

LI, H.; QING, C.; ZHANG, Y.; ZHAO, Z. (2005). Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. *World J. Microbiol. Biotech.* **21**: 1515-1519.

LIU, C.H.; ZOU, W.X.; LU, H.; TAN, R.X. (2001). Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *J. Biotechnol.* **88**: 277- 282.

LIU, J.-Y.; LIU, C.-H.; ZOU, W.-X.; TAN, R.-X. (2003). Leptosphaeric acid, a metabolite with a novel carbon skeleton from *Leptosphaeria* sp. IV403, an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Helv. Chim. Acta* **86**: 657-660.

LÖSGEN, S.; MAGULL, J.; SCHULZ, B.; DRAEGER, S.; ZEECK, A. (2008). Isofusidienols: Novel chromone-3-oxepines produced by the endophytic fungus *Chalara* sp. *Eur. J. Org. Chem.* **4**: 698–703.

LU, H.; ZOU, W.X.; MENG, J.C.; HU, J.; TAN, R.X. (2000) New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Sci.* **151**: 67-73.

LV, Y.-L.; ZHANG, F.-S.; CHEN, J.; CUI, J.-L.; XING, Y.-M.; LI, X.-D.; GUO, S.-X. (2010). Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with the alpine plant *Saussurea involucreata*. *Biol. Pharm. Bull.* **33**: 1300-1306.

MAMEDE, A.C.P.B. (2012). Avaliação da atividade antibacteriana de fungos do filo ascomycota e basidiomycota sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Dissertação em Ciências Biológicas – Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MARTINS, I.; MELLO, S.C.M.; ÁVILA, Z.R.; PÁDUA, R.R.; PEIXOTO, J.R. (2005). Produção de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio líquido. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Circular técnica, 1 ed..

MASSAOKA, M.H., MATSUO, A.L., FIGUEIREDO, C.R., FARIAS, C.F., GIROLA, N., ARRUDA, D.C., SCUTTI, J.A.B., ROMOFF, P., FÁVERO, O.A., FERREIRA, M.J.P., LAGO, J.H.G., TRAVASSOS, L.R. (2012). Jacaranone induces apoptosis in melanoma cells via ROS-mediated downregulation of Akt and p38 MAPK activation and displays antitumor activity in vivo. *PLOS One* **7**: e38698.

MATASYOH, J.C.; DITTRICH, B.; SCHUEFFLER, A.; LAATSCH, H. (2011). Larvicidal activity of metabolites from the endophytic *Podospora* sp. against the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Parasitol. Res.* **108**: 561-566.

MEISTER, J.; WEBER, D.; MARTINO, V.; STERNER, O.; ANKE, T. (2007). Phomopsidone, a novel depsidone from an endophyte of the medicinal plant *Eupatorium arnotianum*. *Z. Naturforsch. C* **62**: 11-15.

MEJÍA, L.C.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z.; BAEL, S.V.; ARNOLD, A.E.; HEBBAR, P.; SAMUELS, G.J.; ROBBINS, N.; HERRE, E.A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biol. Control* **46**: 4–14.

MENG, L.; SUN, P.; TANG, H.; LI, L.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; KROHN, K.; HUSSAIN, H.; ZHANG, W.; YI, Y. (2011). Endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, a new source of hypocrellins. *Biochem. Syst. Ecol.* **39**: 163-165.

METWALY, A.M.; FRONCZEK, F.R.; MA, G.; KADRY, H.A.; EL-HELA, A.A.; MOHAMMAD, A.-E.; CUTLER, S.J.; ROSS, S.A. (2014). Antileukemic α -pyrone derivatives from the endophytic fungus *Alternaria phragmospora*. *Tetrah. Lett.* **55**: 3478-3481.

MOMESSO, L.S.; KAWANO, C.Y.; RIBEIRO, P.H.; NOMIZO, A.; GOLDMAN, G.H.; PUPO, M.T. (2008). Chaetoglobosinas produzidas por *Chaetomium globosum*, fungo endofítico associado à *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae). *Quim. Nova* **31**: 1680-1685.

MORAIS, T.R., ROMOFF, P., FÁVERO, O.A., REIMÃO, J.Q., LOURENÇO, W.C., TEMPONE, A.G., HRISTOV, A.D., SANTI, S.M., LAGO, J.H.G., SARTORELLI, P., FERREIRA, M.J.P. (2012). Anti-malarial, anti-trypanosomal, and anti-leishmanial activities of jacaranone isolated from *Pentacalia desiderabilis* (Vell.) Cuatrec. (Asteraceae). *Parasitol. Res.* **110**: 95-101.

MOREIRA, M.G. (2013). Diversidade e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze. Dissertação em Biotecnologia – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto.

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival – Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**: 55-63.

NILANONTA, C.; ISAKA, M.; KITTAKOOP, P.; SAENBOONRUENG, J.; RUKACHAISIRIKUL, V.; KONGSAEREE, P.; THEBTARANONTH, Y. (2003). New diketopiperazines from the entomopathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum* BCC 1449. *J. Antibiot.* **56**: 647-651.

OLIVEIRA, S.F.; BOCAUYVA, M.F.; VELOSO, T.G.R.; BAZZOLLI, D.M.S.; SILVA, C.C.; PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M. (2014). Endophytic and mycorrhizal fungi associated with roots of endangered native orchids from the Atlantic Forest, Brazil. *Mycorrhiza* **24**: 55-64.

PEDROZO, J.A.; TORRENEGRA, R.D.; TÉLLEZ, A.N.; GRANADOS, A. (2006). Nueva fuente de quinoles, la superfi cie foliar de *Pentacalia ledifolia* y *Pentacalia corymbosa* y sus propiedades antifúngicas. *Rev. Bras. Farmacog.* **16**(Supl.): 591-595.

PES, M.P. (2015). Metabólitos secundários obtidos de *Diaporthe* sp. aplicados para o controle de plantas daninhas. Mestrado em Engenharia Agrícola – Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

RADU, S., & KQUEEN, C. Y. (2002). Preliminary screening of endophytic fungi from medicinal plants in Malaysia for antimicrobial and antitumor activity.

RASBAND, W., ImageJ documentation. Disponível em: <https://imagej.nih.gov>, acesso em: 21/10/2016.

RIZZO, I.; VARSAVKY, E.; HAIDUKOWSKI, M.; FRADE, H. (1997). Macrocyclic trichothecenes in *Baccharis coridifolia* plants and endophytes and *Baccharis artemisioides* plants. *Toxicon* **35**: 753-757.

RODRIGUES, R.L. (2010). Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. Ex Schult F. (Velloziaceae) presente em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins. Dissertação em Ecologia de Biomas Tropicais – Programa de Pós-graduação em Ecologia de Biomas Tropicais, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. (2008). More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *J. Exp. Bot.* **59**: 1109-1114.

ROSA, L.H.; GONÇALVES, V.N.; CALIGIORNE, R.B.; ALVES, T.M.A.; RABELLO, A.; SALES, P.A.; ROMANHA, A.J.; SOBRAL, M.E.G.; ROSA, C.A.; ZANI, C.L. (2010). Leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* **41**: 420-430.

RUKACHAISIRIKUL, V.; KAEOBAMRUNG, J.; PANWIRIYARAT, W.; SAITAI, P.; SUKPODMA, Y.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J. (2007). A new pyrone derivative from the endophytic fungus *Penicillium paxilli* PSU-A71. *Chem. Pharm. Bull.* **55**: 1383-1384.

RÜNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GÖREN, N.; VICHNEWSKI, W.; PAHL, H.L.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T. J. (1999). Inhibition of transcription factor NF-kappa B by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. *Bioorg. Med. Chem.* **7**: 2343-2352.

SATO, H.; KONOMA, K.; SAKAMURA, S.; FURUSAKI, A.; MATSUMOTO, T.; MATSUZAKI, T. (1981). X-Ray crystal structure of pyrenocine A, a phytotoxin from *Pyrenochaeta terrestris*. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 795-797.

SEAMAN, F.C. (1982). Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *Bot. Rev.* **48**: 123-551.

SEBASTIANES, F.L.S. (2010). Diversidade genética e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de manguezais do estado de São Paulo. Tese de Doutorado em Ciências – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SHEN, L.; JIAO, R.H.; YE, Y.H.; WANG, X.T.; XU, C.; SONG, Y.C.; ZHU, H.L.; TAN, R.X. (2006). Absolute configuration of new cytotoxic and other bioactive trichothecene macrolides. *Chem. Eur. J.* **12**: 5596-5602.

SHEN, L.; SHOUWANG, J.; SHEN, H.J.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. (2010). A new cytotoxic trichothecene macrolide from the endophyte *Myrothecium roridum*. *Planta Med.* **76**: 1004-1006.

SILVA, K.S.; REBOUÇAS, T.N.H.; LEMOS, O.L.; BOMFIM, M.P.; BOMFIM, A.A.; ESQUIVEL, G.L.; BARRETO, A.P.P.; JOSÉ, A.R.; DIAS, N.O.; TAVARES, G.M. (2006). Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) em diferentes espécies frutíferas. *Rev. Bras. Frutic.* **28**: 131-133.

SILVA, R.R.; COELHO, G.D. (2006). Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas. Instituto de Botânica, São Paulo, 1-20.

SIMPSON, B.B. (2009). Economic importance of Compositae. In: Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae. IAPT, Vienna, Austria.

SINGH, B.K.; MACDONALD, C.A. (2010). Drug discovery from uncultivable microorganisms. *Drug Discov. Today* **15**: 792-799.

SINHA, M.; SORENSEN, A.; AHAMED, A.; AHRING, B.K. (2015). Production of hydrocarbons by *Aspergillus carbonarius* ITEM 5010. *Fungal Biol.* **119**: 274-282.

SPARACE, S.A.; REELEDER, R.D.; KHANIZADEH, S. (1987). Antibiotic activity of the pyrenocines. *Can. J. Microbiol.* **33**: 327-330.

STROBEL, G.A.; KNIGHTON, B.; KLUCK, K.; REN, Y.; LIVINGHOUSE, T.; GRIFFIN, M.; SPAKOWICZ, D.; SEARS, J. (2008). The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). *Microbiology* **154**: 3319-3328.

TAL, B.; ROBESON, D.J. (1986). The production of pyrenocins A and B by a novel *Alternaria* species. *Z. Naturforsch. C* **41**: 1032-1036.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **18**: 448-459.

TELES, A.M.; STEHMANN, J.R. (2008). Plantae, Magnoliophyta, Asterales, Asteraceae, Senecioneae, *Pentacalia desiderabilis* and *Senecio macrotis*: Distribution extensions and first records for Bahia, Brazil. *Check List* **4**: 62-64.

TOKARNIA, C.H.; GAVA, A.; PEIXOTO, P.V.; STOLF, L.; CONSORTE, L.B.; DÖBEREINER, J. (1990). Intoxicação experimental por *Senecio desiderabilis* (Compositae) em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* **10**: 35-42.

TOLEDO, T.R.; DEJANI, N.N.; MONNAZZI, L.G.S.; KOSSUGA, M.H.; BERLINCK, R.G.S.; SETTE, L.D.; MEDEIROS, A.I. (2014). Potent anti-inflammatory activity of pyrenocine A isolated from the marine-derived fungus *Penicillium paxilli* Ma(G)K. *Med. Inflamm.* **2014**: 767061.

TORRENEGRA, R.D.; PEDROZO, J.A.; TÉLLEZ, A.N.; CABEZA, G.; GRANADOS, A.; MÉNDEZ, D. (2000). Química y actividad antifúngica de *Pentacalia corymbosa* (Asteraceae-Senecioneae). *Rev. Latinoamer. Quím.* **28**: 31-34.

WACULICZ-ANDRADE, C.E. (2009). Variabilidade genética de fungos do gênero *Colletotrichum* de plantas cítricas e da vegetação espontânea. Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

WEHMEYER, L.E. (1926). A biologic and phylogenetic study of stromatic *Sphaeriales*. *Amer. J. Bot.* **13**: 574-645.

WEIB, M.; SÝKOROVÁ, Z.; GARNICA, S.; RIESS, K.; MARTOS, F.; KRAUSE, C.; OBERWINKLER, F.; BAUER, R.; REDECKER, D. (2011). Sebacinales everywhere: previously overlooked ubiquitous fungal endophytes. *PLoS ONE* **6**: e16793.

YANG, Z.; BAO, L.X.; YIN, Y.; DING, G.; GE, M.; CHEN, D.; QIAN, X. (2014). Pyrenocines N-O: Two novel pyrones from *Colletotrichum* sp. HCCB03289. *J. Antibiot.* **67**: 791-793.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F. (1990). Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist. *Plant. Syst. Evol.* **171**: 1-14.

ZHANG, H.; MAO, L.-L.; QIAN, P.-T.; SHAN, W.-G.; WANG, J.-D.; BAI, H. (2012). Two new metabolites from a soil fungus *Curvularia affinis* strain HS-FG-196. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **14**: 1078-1083.

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Nat. Prod. Rep.* **23**: 753-771.

ZHANG, H.-W.; ZHANG, J.; HU, S.; ZHANG, Z.-J.; ZHU, C.-J.; NG, S.W.; TAN, R.X. (2010). Ardeemins and cytochalasins from *Aspergillus terreus* residing in *Artemisia annua*. *Planta Med.* **76**: 1616-1621.

ZOU, W.X.; MENG, J.C.; LU, H.; CHEN, G.X.; SHI, G.X.; ZHANG, T.Y.; TAN, R.X. (2000). Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *J. Nat. Prod.* **63**: 1529-1530.