



UFRR

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

GILMARA PRADO DE SOUSA

**PRODUÇÃO DE METABÓLITOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Annona jahnii* Saff. DO LAVRADO DE
RORAIMA**

BOA VISTA, RR

2018

GILMARA PRADO DE SOUSA

**PRODUÇÃO DE METABÓLITOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Annona jahnii* Saff. DO LAVRADO DE
RORAIMA**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais. Área de concentração: Bioprospecção.

Orientador: Profa. Dra. Adriana Flach

Coorientador: Prof. Dr. Marcos J. S. Vital

BOA VISTA, RR

2018

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

S725p Sousa, Gilmar Prado de.

Produção de metabólitos e atividades biológicas de fungos endofíticos associados à *Annona jahnii* Saff. do lavrado de Roraima / Gilmar Prado de Sousa. – Boa Vista, 2018.

102 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Flach.

Coorientador: Prof. Dr. Marcos J. S. Vital.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais - PRONAT.

1 - Microrganismo endofítico. 2 - Annonaceae. 3 - Metabólitos bioativos. I - Título. II - Flach, Adriana (orientadora). III - Vital, Marcos J. S. (coorientador).

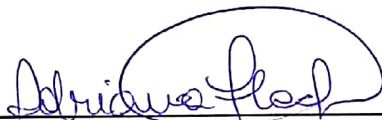
CDU - 547.913(811.4)

Ficha Catalográfica elaborada pela Bibliotecária/Documentalista:
Maria de Fátima Andrade Costa - CRB-11/453-AM

GILMARA PRADO DE SOUSA

**PRODUÇÃO DE METABÓLITOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FUNGOS
ENDÓFITOS ASSOCIADOS À *Annona jahnii* Saff DO LAVRADO DE
RORAIMA**

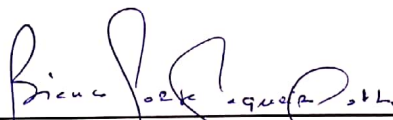
Dissertação apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Mestrado em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, defendida em 18 de setembro de 2018 e avaliada pela seguinte Banca Examinadora:



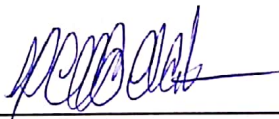
Prof. Dra. Adriana Flach
Orientadora - Universidade Federal de Roraima



Prof. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza
Membro - Universidade Federal do Amazonas



Prof. Dra. Bianca Jorge Sequeira
Membro - Universidade Federal de Roraima



Prof. Dr. Luiz Antonio Mendonça Alves da Costa
Membro - Universidade Federal de Roraima

Dedico à Deus que me guiou até aqui e me deu a oportunidade de realizar este trabalho. Aos meus pais Gidean e Maria Valdilene, meus maiores incentivadores que não mediram esforços e me ensinaram desde cedo o valor da educação. E aos meus irmãos, por compartilharem comigo esses momentos de aprendizagem.

AGRADECIMENTOS

À DEUS que ao longo desta caminhada me proporcionou força e coragem nos momentos mais difíceis, me fazendo prosseguir e superar os obstáculos sem pensar em desistir.

Aos meus pais, Maria Valdilene e Gidean Ribeiro, pela confiança, compreensão, amor, paciência e por sempre apostar em meu sucesso. Aos meus irmãos Gilmar, Gilvana e Lillya Beatriz por estarem sempre presentes na partilha das minhas conquistas. A você Gilmar pela paciência, conselhos, orientação e por me incentivar a seguir a área da pesquisa. A família Feitosa, em especial ao Jelson Feitosa pela companhia, compreensão e desabafos.

Aos meus orientadores profa. Dra. Adriana Flach, prof. Dr. Luiz Antonio e Prof. Dr. Marcos Vital pela oportunidade concedida a mim em fazer parte de seus grupos de pesquisa, por acreditarem e investirem em minha formação profissional. Obrigada por cada orientação e contribuição durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

A professa Dra. Fabiana Granja, Raissa e Clediane pela colaboração para realização das análises moleculares. A professora Dra. Vanderly Andrade-Souza, pelo apoio, dedicação prestada e pelas contribuições durante as análises de biologia molecular.

A todos do LABCEM, LABMICRA, LAEQ, NMR-LAB e central analítica da UFAM. Ao Prof. Dr. Afonso Duarte e a Dra Antonia Queiroz pelo apoio logístico na realização das análises químicas e identificação dos fungos e pela oportunidade de crescimento profissional.

As minhas amigas “chiquinhas” Elzalina Soares e Bruna Ribeiro que não mediram esforços para me ensinar, ajudar e contribuir com seus conhecimentos e experiências na etapa final deste trabalho, vocês são incríveis meninas. Agradeço também ao pesquisador e amigo Richardson pelas caronas, apoio e contribuição na etapa de caracterização química. A Família Ribeiro Soares por me receberem tão bem em sua casa durante a minha estadia em Manaus, pelos cuidados, e boas risadas.

Às amigas de laboratório: Letícia, Darlison, Andreia, Cecilia, Edineide e Felipe pela torcida e ajuda nesses dois anos de trabalho. Aos amigos dos Cursos de Mestrado e Doutorado em Recursos Naturais, a caminhada foi mais divertida com vocês.

A CAPES pela concessão da bolsa de pós-graduação. E ao Programa Pró-Amazônia: Biodiversidade e Sustentabilidade - Edital Nº 047 / 2012 – CAPES pelo financiamento desse trabalho. A Universidade Federal de Roraima pela infraestrutura disponibilizada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais por oferecer formação pública de qualidade. E a todos os professores do programa que de alguma maneira, contribuíram para a minha formação. Obrigada a todos!

O Senhor é minha luz e minha
salvação; de quem terei temor?

(Salmo 27.1)

RESUMO

Os fungos endofíticos são microrganismos que podem viver em associação com espécies vegetais, habitando o interior dos tecidos e órgãos sem causar danos ao hospedeiro. Esses microrganismos são considerados uma fonte alternativa e promissora na descoberta de novos produtos naturais, pois possuem alta capacidade de sintetizar metabólitos secundários com propriedades químicas e atividades biológicas de interesse biotecnológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção metabólica e o potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos de fungos endofíticos isolados de *Annona jahnii*. A partir da coleção de microrganismos do grupo GBQF, foram selecionados três isolados fúngicos. As cepas foram reativadas, purificadas e conservadas. Além disso, foram caracterizadas morfológicamente e identificadas através de técnicas moleculares. Para a obtenção dos extratos as cepas foram cultivadas em meio líquido BDL, ISP2 e AVEIA, e incubadas em shaker a 130rpm nas temperaturas de 18° e 26 °C por 15 dias. Após o período, o líquido fermentado foi extraído com acetato de etila por meio da técnica de extração líquido-líquido. Os extratos foram caracterizados quimicamente por CCD, espectrometria de massas com fonte de ionização química a pressão atmosférica (APCI-EM) e por cromatografia líquida de alta eficiência até fragmentação MSⁿ (CLAE-APCI-MS/MS). O potencial antioxidante dos extratos foi avaliado por ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e pela inibição da auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. A atividade antimicrobiana foi determinada por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em placas Elisa, contra os patógenos clínicos *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *C. albicans*. Os endofíticos selecionados foram identificados como *Trichoderma harzianum*, *Penicillium* sp e *Aspergillus* sp. Com relação aos extratos, observou-se que os isolados produziram mais biomassa quando cultivados em meio BDL sob a temperatura de 26°C, sendo os extratos mais promissores EFASP (390,2mg) e EFPEN (348,3mg) respectivamente. A prospecção preliminar por CCD dos extratos brutos revelou a presença de compostos pertencentes à classe dos alcaloides, terpenos e flavonoides em todos os extratos. A análise dos extratos por APCI-MS no modo [M-H]⁺ revelou que os extratos possuem perfis distintos. As análises cromatográficas e espectrométricas das frações FR4 e FR17, obtidas do extrato EFASP apresentaram perfis similares característicos de mistura e sugerem a presença de compostos isoméricos pertencentes a classe de metabólitos das citocalasinas. Quanto a atividade antioxidante, o método DPPH revelou que os extratos EFASP (0,005mg/mL) e EFPEN (0,012mg/mL) apresentaram a melhor ação antioxidante. Enquanto que, no método auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, o melhor potencial foi observado no extrato EFPEN (45,94%). Em relação a atividade antimicrobiana, verificou-se que os extratos foram ativos contra os patógenos testados. Os dados obtidos nesse estudo evidenciam a potencialidade dos extratos fúngicos e destacam a importância do estudo dos fungos endofíticos, que podem ser fonte para novas substâncias bioativas. Além disso, esses resultados são inéditos para a espécie *A. jahnii*.

Palavras chaves: Microrganismo endofítico. Annonaceae. Metabólitos bioativos.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that can live in association with plant species, inhabiting the interior of tissues and organs without causing damage to the host. These microorganisms are considered an alternative and promising source in the discovery of new natural products, since they have high capacity to synthesize secondary metabolites with chemical properties and biological activities of biotechnological interest. The objective of this work was to evaluate the metabolic production and antioxidant and antimicrobial potential of the extracts of endophytic fungi isolated from *Annona jahnii*. From the collection of microorganisms from the GBQF group, three fungal isolates were selected. The strains were reactivated, purified and preserved. In addition, they were characterized morphologically and identified by molecular techniques. To obtain the extracts the strains were cultured in liquid medium BDL, ISP2 and AVEIA, and incubated in shaker at 130rpm at temperatures of 18 ° and 26 ° C for 15 days. After the period, the fermented liquid was extracted with ethyl acetate using the liquid-liquid extraction technique. The extracts were chemically characterized by CCD, mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization (APCI-EM) and high performance liquid chromatography until MSn fragmentation (CLAE-APCI-MS / MS). The antioxidant potential of the extracts was evaluated by the sequestering action of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and by inhibiting the auto-oxidation of the β -carotene / linoleic acid system. The antimicrobial activity was determined by means of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in Elisa plaques against the clinical pathogens *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* and *C. albicans*. The selected endophytes were identified as *Trichoderma harzianum*, *Penicillium sp* and *Aspergillus sp*. Regarding the extracts, it was observed that the isolates produced more biomass when cultivated in BDL medium under the temperature of 26 ° C, with the most promising extracts EFASP (390.2mg) and EFPEN (348.3mg) respectively. Preliminary CCD prospecting of crude extracts revealed the presence of alkaloid, terpene and flavonoid compounds in all extracts. Analysis of extracts by APCI-MS in [M-H] + mode revealed that the extracts had distinct profiles. The chromatographic and spectrometric analyzes of the FR4 and FR17 fractions obtained from the EFASP extract presented similar profiles characteristic of the mixture and suggest the presence of isomeric compounds belonging to the class of cytochalasins. Regarding antioxidant activity, the DPPH method showed that the extracts EFASP (0.005mg / mL) and EFPEN (0.012mg / mL) presented the best antioxidant action. While in the auto-oxidation method of the β -carotene / linoleic acid system, the best potential was observed in the EFPEN extract (45.94%). In relation to the antimicrobial activity, it was verified that the extracts were active against the pathogens tested. The data obtained in this study show the potentiality of fungal extracts and highlight the importance of the study of endophytic fungi, which may be the source of new bioactive substances. In addition, these results are unprecedented for *A. jahnii* species.

Key words: Endophytic microorganism. Annonaceae. Bioactive metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da classe das penicilinas isolada do fungo <i>Penicilium</i>	17
Figura 2 – Estrutura química do antibiótico cefalosporina obtida de microrganismos.	18
Figura 3 – Exemplos de metabolitos bioativos produzidos por fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras.	21
Figura 4 – Exemplos de alcaloides produzidos por fungos endofíticos.	21
Figura 5 – Alcaloides produzidos pelo fungo endofítico <i>Penicillium</i> sp. de <i>A. squamosa</i> L.	22
Figura 6 – Citocalasinas produzidas pelo fungo endofítico <i>Aspergillus flavipes</i>	22
Figura 7– Esquema reacional entre o radical livre DPPH e uma molécula antioxidante.	24
Figura 8 – Esquema reacional da formação da solução de sistema β -caroteno/ácido linoleico	24
Figura 9– Esquema da diluição em série da Concentração Inibitória Mínima.	26
Figura 10– Espécie hospedeira <i>Annona jahnii</i> Saff.	29
Figura 11– Esquema geral das atividades realizadas para o estudo dos fungos endofíticos isolados de <i>A. jahnii</i>	31
Figura 12 – Métodos de conservação dos fungos endofíticos. A) Castellani; B) Glicerol 20%; C) Tubo inclinado.	32
Figura 13 – Cultivo em microescala dos fungos endofíticos em incubadora do tipo Shaker.	37
Figura 14 – Fungos endofíticos cultivados em escala laboratorial após 15 dias de incubação	38
Figura 15 – Esquema ilustrativo da análise por CCD dos extratos fúngicos.	39
Figura 16 – Esquema ilustrativo do ensaio qualitativo DPPH.	41
Figura 17 – Ensaio de atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos.	44
Figura 18 – Características macro e micromorfológicas do fungo endofítico F168. Em A) cultura em placa de Petri em meio BDA+L. B) observação dos conídios, fiáldes e conidióforos. Em C e D destaque das cadeias de conídios (setas amarelas) (40x).	47
Figura 19 – Características macro e micromorfológicas do fungo endofítico F303. Em A) aspectos da cultura em placa de Petri cultivada em meio ISP2. B) hifas com conidióforos (40x). C) conidióforos em tríade (40x) e D) detalhes dos esporos encapsulados (100x).	48
Figura 20 – Características macro e micromorfológicas do fungo endofítico F407. A) colônia em placa de Petri cultivada em meio BDA+ L. B) conidióforos e haste alongada sustentando a estrutura (40x). C) presença da célula pé. D) detalhes do conidióforo com conídio.	49
Figura 21 – Gel de agarose da extração do DNA genômico dos fungos endofíticos isolados de <i>A. jahnii</i> . λ : DNA Lambda, F: Fungo seguido do código dos isolados.	50

Figura 22 – Amplificação por PCR da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de fungos endofíticos de <i>A. jahnii</i> . M: marcador 100pb. C-: Controle negativo da reação.....	51
Figura 23 – Placa cromatográfica revelada com NP-PEG e observada sob luz ultravioleta a 365 nm.	58
Figura 24 – Placas cromatográficas após revelação com reativo Dragendorff.	58
Figura 25 – Placa cromatográfica revelada com vanilina sulfúrica ácida.	59
Figura 26 – Espectro de massas (APCI-MS no modo [M-H] ⁺) dos extratos fúngicos EFTRIC, EFPEN e EFASP de <i>A. jahnii</i>	60
Figura 27 – Cromatogramas de CLAE-APCI-EM dos extratos fúngicos EFTRIC, EFPEN e EFASP de <i>A. jahnii</i>	61
Figura 28 – Cromatogramas de CLAE-APCI-MS das frações FR4 e FR17.	63
Figura 29 – Espectro de massas das frações FR4 e FR17.	63
Figura 30 – Perfil de MS/MS das amostras FR17 e FR4.	64
Figura 31 – Análise qualitativa DPPH dos extratos fúngicos após 2 minutos de reação.	65
Figura 32 – Análise do extrato EFASP após 30 minutos de reação com DPPH indicando a concentração das soluções em mg/mL.	65
Figura 33 – Curva de calibração do extrato EFASP.....	67
Figura 34 – Cinética da Reação dos extratos dos fungos endofíticos estudados.....	69
Figura 35 – Teste antibacteriano frente a bactéria gram-negativa <i>E.coli</i> . A) Frente da placa e B) Verso da placa.	71
Figura 36 – Teste antibacteriano frente a bactéria gram-negativa <i>P. aeruginosa</i> . A) Frente da placa e B) Verso da placa	72
Figura 37 – Teste antibacteriano frente a bactéria gram-positiva <i>S. aureus</i> . A) Frente da placa e B) Verso da placa.	72
Figura 38 – Teste antibacteriano frente a bactéria gram-positiva <i>E. faecalis</i> . A) Frente da placa e B) dorso da placa.	73
Figura 39 – Teste antifúngico frente a levedura <i>C. albicans</i>	73
Figura 40 – Placas Elisa com as diluições dos controles positivos e negativos após revelação. A) Ampicilina. B) Fluconazol e C) Meios de cultura.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Codificação dos extratos fúngicos obtidos após extração líquido-líquido.	37
Tabela 2 – Esquema geral das diluições sucessivas utilizadas no ensaio CIM.	45
Tabela 3 – Fungos endofíticos selecionados da coleção do grupo de pesquisa.	46
Tabela 4- Identificação molecular dos isolados de fungos endofíticos de <i>A. jahnii</i>	53
Tabela 5- Massa obtida (mg) dos extratos brutos nas temperaturas 18° e 26° C. Onde EF significa extrato fúngico seguido do código da cepa.....	56
Tabela 6- Massa obtida (mg) de fungos endofíticos de <i>A. jahnii</i> após cultivo em escala laboratorial.....	57
Tabela 7 – Classes de compostos presentes nos extratos de fungos endofíticos isolados de <i>A. jahnii</i>	59
Tabela 8- Frações obtidas pela análise em CLAE em escala semipreparativa do extrato EFASP	62
Tabela 9- Dados em triplicata do ensaio da atividade antioxidante do extrato EFASP.	66
Tabela 10- Percentual de atividade antioxidante do extrato EFASP.	66
Tabela 11- Concentração inibitória (IC ₅₀) dos extratos brutos (1mg/mL) de fungos endofíticos.	67
Tabela 12 - Percentual de inibição da auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico dos extratos brutos dos isolados de <i>A. jahnii</i>	69
Tabela 13- Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos fúngicos de <i>A. jahnii</i>	74

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%AA	Percentual de Atividade Antioxidante
±	Relação de significância mais ou menos
Abs	Absorbância
AcOEt	Acetato de Etila
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
ATCC	American Type Culture Collection
ATCC 00531	Código da cepa <i>Enterococcus faecalis</i> 2
ATCC 10231	Código da cepa <i>Candida albicans</i>
ATCC 13863	Código da cepa <i>Escherichia coli</i>
ATCC 15442	Código da cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ATCC 43300	Código da cepa <i>Staphylococcus aureus</i>
BDA+L	Batata dextrose ágar e extrato de levedura
BHI	Meio de cultura <i>Brain Heart Infusion</i>
BHT	di- <i>tert</i> -butilmetilfenol
BLASTn	Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local
CAM	Centro de Apoio Multidisciplinar – Central Analítica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTAB	Brometo de cetil-trimetilamônio
CTT	2,3,5-cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFASP	Extrato fúngico do isolado <i>Aspergillus</i>
EFPEN	Extrato fúngico do isolado <i>Penicillium</i>
EFTRIC	Extrato fúngico do isolado <i>Trichoderma</i>
GBQF	Grupo de Biotecnologia e Química Fina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	Concentração Inibitória Capaz de Capturar 50% dos Radicais
ISP2	Ámido extrato de levedura malte e ágar
ITS	Espaçador Transcrito Interno
LABCEM	Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas
ln	Logaritmo Natural
M	Massa molar
m/z	Relação massa carga
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NBT	Nitroazul de Tetrazólio
NCBI	Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

ng	Nanograma
nm	Nanômetro (unidade de medida)
NP-PEG	Difenilboriloxietilamina
NUPENERG	Núcleo de Pesquisas Energéticas
°C	Grau Celsius
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDA	Detector de arranjo de diodos
PEG	Polietilenoglicol
ppm	Medida de concentração partes por milhão
rDNA	DNA ribossomal
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
SB	Meio de cultura Sabouraud
SDS	Dodecilsulfato de sódio
β	Beta
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TRIS-HCL	Tris-hidroximetilaminometano
TROLOX	(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico)
UV	Ultravioleta
V	Unidade de tensão elétrica
VAS	Vanilina Sulfúrica Ácida
α	Alfa
λ	Lambda
μ M	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.2	FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	18
2.3	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	19
2.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	22
2.4.1	Avaliação da atividade antioxidante	22
2.4.2	Ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)	23
2.4.3	Auto oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico	24
2.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	25
2.5.1	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	26
2.6	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMILIA ANONNACEAE	27
2.6.1	Gênero <i>Annona</i>	27
2.6.2	Espécie <i>Annona jahnii</i> Saff.	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	SELEÇÃO DOS ISOLADOS.....	31
4.2	REATIVAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	32
4.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGIA	32
4.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	33
4.4.1	Condições de cultivo	33
4.4.2	Extração de DNA	33
4.4.3	Análise do DNA por eletroforese	34
4.4.4	Quantificação do DNA	35
4.4.5	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	35
4.4.6	Purificação e sequenciamento das amostras	36
4.4.7	Análise das sequências	36
4.5	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	36
4.6	CULTIVO DOS FUNGOS ENDOFITICOS EM ESCALA PREPARATIVA	38
4.7	ANÁLISES QUÍMICAS	38
4.7.1	Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	38
4.7.2	Análise por Espectrometria de Massas	39
4.7.3	Perfil químico dos extratos por Espectrometria de Massas.	39
4.7.4	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).	40
4.7.5	Fracionamento dos extratos por CLAE - semipreparativo.	40
4.8	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	40
4.8.1	Avaliação da Atividade Antioxidante dos Extratos	41
4.8.2	Ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)	41
4.8.3	Auto-oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico	42
4.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS FÚNGICOS	43

4.9.1	Reativação e cultivo dos microrganismos teste	Erro!	Indicador	não
	definido.			
4.9.2	Preparo das amostras			44
4.9.3	Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM)			44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO			46
5.1	OBTENÇÃO DOS ISOLADOS			46
5.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS FÚNGICOS			46
5.3	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR			50
5.3.1	Extração e análise do DNA genômico			50
5.3.2	Amplificação por PCR da região <i>ITS1-5.8S-ITS2</i>			51
5.3.3	Identificação molecular dos isolados			52
5.4	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS FÚNGICOS			56
5.5	CULTIVO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS EM ESCALA PREPARATIVA			57
5.6	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)			58
5.6.1	Teste para flavonoides			58
5.6.2	Teste para alcaloides			58
5.6.3	Teste para terpenos			59
5.7	ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS			60
5.7.1	Perfil químico dos extratos por Espectrometria de Massas			60
5.8	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE) EM ESCALA SEMIPREPARATIVA			61
5.8.1	Caracterização estrutural por CLAE-APCI-MS/MS das frações obtidas em escala semipreparativa de EFASP			62
5.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE			64
5.9.1	Ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)			64
5.9.2	Auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico			68
5.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA			71
6	CONCLUSÕES			77
	REFERÊNCIAS			78
	APÊNDICES			90

1 INTRODUÇÃO

As plantas são fonte importante de substâncias naturais, representando um grande potencial de compostos bioativos. Isto se deve não apenas pela quantidade de espécies vegetais existentes, mas principalmente, pela variedade de metabólitos sintetizados por elas.

O desenvolvimento nas pesquisas em busca de novos produtos naturais tem sido contínuo, principalmente, pelo interesse em obter compostos com potencial biológico para desenvolver novos fármacos, que proporcionem benefícios ao nosso organismo.

A família Annonaceae possui uma variedade de espécies com distribuição tropical, sendo o gênero *Annona* o mais estudado e considerado o mais importante economicamente. No entanto, apesar de ser um gênero bastante explorado do ponto de vista químico e biológico, existem espécies poucas estudadas, como é o caso da espécie *Annona jahnii* Saff, amplamente encontrada nas áreas de savanas do Estado de Roraima. Os estudos com essa planta resumem-se ao isolamento de acetogeninas com boa atividade citotóxica frente à células tumorais. Em se tratando de fungos endofíticos não existem estudos relatando a microbiota associada a espécie.

Os fungos endofíticos vivem em associação simbiótica com muitas espécies vegetais, proporcionando benefícios como defesa ao vegetal contra o ataque de patógenos, herbívoros e pragas, resistência a condições de estresse e estimulam o crescimento do hospedeiro. Além disso, são considerados fonte alternativa e inexplorada de metabólitos secundários com importantes atividades biológicas, tais como antioxidante e antimicrobiana entre outras.

Diante disso e motivados pela carência de estudos envolvendo fungos endofíticos associados a espécie *A. jahnii*, este trabalho tem como objetivo avaliar a produção metabólica e o potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos fúngicos. Dessa forma, selecionou-se três fungos endofíticos, os quais foram caracterizados morfolologicamente e identificados por meio de técnicas moleculares. Determinou-se o melhor meio de cultura bem como a temperatura ideal para obtenção dos extratos fúngicos. Além disso, obteve-se o perfil químico, caracterizou-se a presença de compostos das classes de metabolitos secundários e avaliou-se o potencial biológico dos extratos dos fungos estudados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Nesta seção serão apresentadas considerações gerais sobre fungos, uma abordagem sobre fungos endofíticos sua relação com a planta hospedeira, sua importância química e biológica e ainda uma visão geral sobre a espécie *Annona jahnii*.

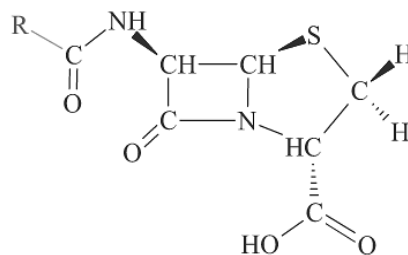
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE FUNGOS

Os microrganismos compreendem uma grande biodiversidade, inclui fungos, bactérias, vírus, protozoários e algas unicelulares que podem ser encontrados nos mais variados tipos de habitats como nas plantas, na água, no solo, nas regiões árticas, nos desertos entre outros. Esses organismos desempenham funções importantes ao meio ambiente, pois atuam na decomposição da matéria orgânica promovendo a ciclagem dos nutrientes que se tornam disponíveis para outros seres vivos (CONTI; GUIMARÃES; PUPO, 2012).

Os fungos são organismos eucariontes, unicelulares (leveduras) ou pluricelulares, estes últimos caracterizados pela formação de estruturas filamentosas, denominadas hifas que constituem o micélio. Os fungos filamentosos constituem a maioria dos fungos microscópicos, onde na fase reprodutiva, o micélio forma estruturas assexuadas e/ou sexuadas que originam os esporos, os quais são responsáveis pela propagação das espécies (MOREIRA; SIQUEIRA et al., 2006). Além disso, as estruturas de reprodução sexuais são fundamentais para a identificação dos isolados, especialmente no método clássico de identificação, que exige extenso treinamento, enquanto metodologias moleculares permitem de modo relativamente simples a identificação a nível específico (TAKAHASHI et al., 2017).

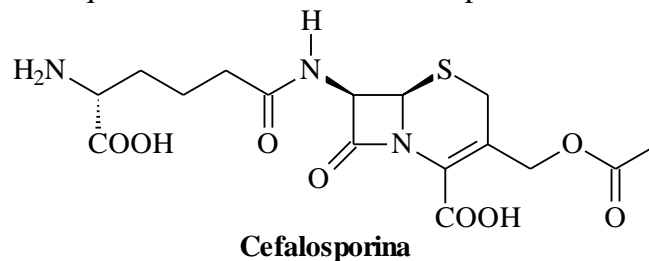
Em geral, os fungos filamentosos apresentam alta capacidade de produzir vários metabólitos secundários de interesse biotecnológico. Os produtos das rotas metabólicas incluem importantes fármacos como a penicilina isolada do fungo *Penicillium* (Figura 1) e descrita por Alexander Fleming em 1928 (GUIMARÃES et al., 2010; JBPML, 2015).

Figura 1 – Estrutura química da classe das penicilinas isolada do fungo *Penicillium*.



A comprovação do potencial terapêutico da penicilina, foi a motivação inicial na procura por novas substâncias sintetizadas por microrganismos. Em virtude disso, muitas pesquisas em busca de metabólitos bioativos foram realizadas e levaram a descoberta de novos antibióticos obtidos de fungos e bactérias do meio ambiente, como por exemplo, o composto cefalosporina (Figura 2) entre outros (FERNANDES, 2006).

Figura 2 – Estrutura química do antibiótico cefalosporina obtida de microrganismos.



Fonte: Fernandes (2006).

2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos endofíticos são definidos por sua ocorrência assintomática dentro dos tecidos vegetais, de modo geral suas partes aéreas como folhas, galhos e caules. Estes organismos colonizam vários habitats e organismos vivos, sendo isolados principalmente nas plantas tropicais das quais abrigam uma variedade de endófitos (RODRIGUEZ et al., 2009). A biodiversidade dos fungos endofíticos é composta principalmente por representantes dos filos Zygomycota, Basidiomycota e Ascomycota, neste último encontram-se a maioria dos fungos endofíticos, muitos ainda não estudados e que surgem como alternativa para descoberta de novos produtos naturais (ARNOLD et al., 2007; KUSARI; PANDEY; SPITELLER, 2013).

As plantas podem hospedar diversos microrganismos endofíticos, sendo possível o isolamento de uma grande quantidade de espécies a partir de uma única planta. Entretanto estudos demonstram que em cada hospedeiro vive associado um conjunto característico de endofíticos e que estes lhe são comumente específicos (MUSSI-DIAS et al., 2012).

As interações dos endófitos com a planta hospedeira ainda não são bem compreendidas, mas sabe-se que de uma hospedeira para outra, pode variar de simbiótica (mutualismo e comensalismo) a antagônica. Nas relações mutualísticas os endófitos são capazes de sintetizar metabólitos bioativos que proporcionam vantagens a planta hospedeira, em contrapartida os endófitos são protegidos pela planta hospedeira e recebem nutrientes necessários para concluir o seu ciclo de vida (SANTOS et al., 2013).

Em geral, os endofíticos instalam-se na planta hospedeira por meio de aberturas naturais como estômatos ou raízes secundárias, ou por meio de lesões causadas por insetos ou pela prática agrícola que facilitam sua penetração (AZEVEDO, 2014). No entanto, alguns fatores como a idade da planta, o modo de transmissão e condições ambientais influenciam nas interações endofítico-planta (CONTI; GUIMARÃES; PUPO, 2012).

Considerando as partes da planta, o caule e as folhas são considerados os mais habitados por fungos endofíticos. Porém, a frequência e composição destes endófitos nos tecidos podem variar de acordo com a espécie hospedeira, tipo de solo, idade da planta, distribuição geográfica entre outros (AZOFEIFA et al., 2012; BANHOS et al., 2014).

Esses microrganismos apresentam grande habilidade em produzir metabólitos secundários que servem de base para fabricação de diversas substâncias como antibióticos, toxinas, enzimas e outros produtos de interesse biotecnológico. Além disso, desempenham funções importantes para sobrevivência e desenvolvimento do hospedeiro, tais como, resistência as condições de estresse, proteção contra pragas e patógenos, promovem o crescimento através da produção de fitohormônios entre outros (SANTOS; VARAVALLO, 2011).

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de conhecer a diversidade de compostos bioativos produzidos por esses microrganismos e sua utilização na agricultura e na indústria farmacêutica. Na agricultura os fungos endofíticos vem sendo utilizados como promotores de crescimento e como agentes no controle de pragas, possibilitando assim solucionar os problemas ocorrentes no campo de forma econômica e sustentável (MUSSI-DIAS et al., 2012).

Uma das vantagens de se trabalhar com esse grupo de microrganismos é que eles podem ser cultivados em meios de cultura de baixo custo ou com resíduos industriais alimentícios, em laboratórios e em fermentadores industriais, não havendo assim, prejuízo ao ecossistema. (CONTI; GUIMARÃES; PUPO, 2012). Além disso, as condições clássicas de cultivo como pH, temperatura componentes nutricionais e luminosidade podem ser ajustadas para modificar as vias biossintéticas, conduzindo assim, a produção de metabólitos secundários (TAKAHASHI et al., 2017).

2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS.

Os fungos endofíticos constituem uma fonte rica e pouco explorada de metabólitos secundários descritas na literatura, sendo responsáveis pela síntese de uma variedade de

compostos, incluindo alcaloides (YUNianto et al., 2014), esteroides (MARINHO; MARINHO; FILHO, 2009), terpenoides (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013), flavonoides (LI et al., 2015) com diferentes propriedades e atividades biológicas como antioxidante (ZHAO et al., 2014), citotóxica e antimicrobiana entre outras (WANG et al., 2011). No quadro 1, são apresentados alguns metabólitos secundários com propriedades bioativas, produzidos por fungos endofíticos.

Quadro 1 – Exemplos de metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos.

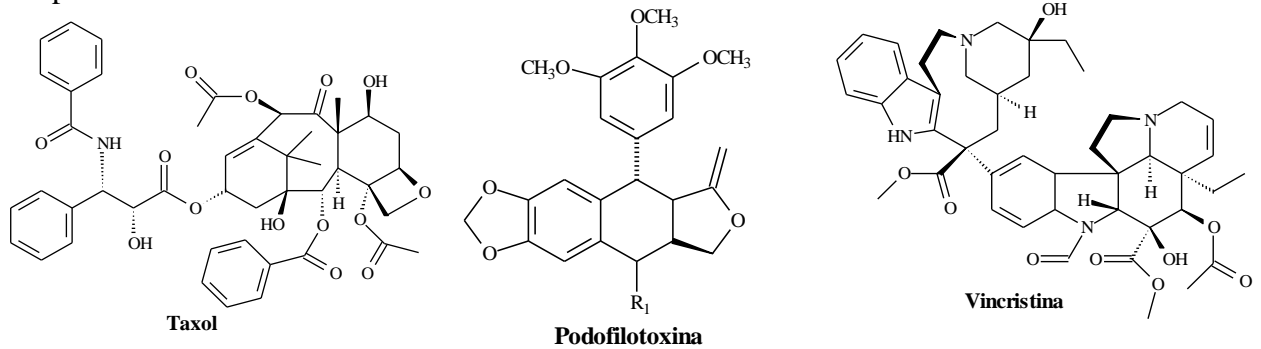
FUNGO ENDOFÍTICO	PLANTA HOSPEDEIRA	METABÓLITO	ATIVIDADE BIOLÓGICA
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Terminalia morobensis</i>	Pestacina e isopesticina	Antimicrobiana Antioxidante
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Hurpezia serrata</i>	Hurpezina A	Enzimática
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Erythrina cristagalli</i>	Phomol	Citotóxica
<i>Eupenicillium</i> spp.	<i>Murraya paniculata</i>	Alantrifenona	Inseticida
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Catharanthus roseus</i>	Vinblastina	Anticancerígena

Fonte: Adaptado de Specian et al., (2014).

Pode-se ainda inferir que os fungos endofíticos são capazes de produzir compostos bioativos similares aos sintetizados pela planta hospedeira (FREIRE; VASCONCELOS; COUTINHO, 2014). Um bom exemplo é o taxol, um diterpenoide utilizado no tratamento de câncer de ovário e de mama, originalmente isolado da planta *Taxus brevifolia*, mas que também pode ser sintetizado pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* associado a esta espécie. (STROBEL; DAISY, 2003).

Outra substância bioativa é a podofilotoxina um anticancerígeno, produzido pelo fungo *Trametes hirsuta* isolado da planta *Podophyllum hexandrum*, que também produz esse composto (PURI et al., 2006). A vincristina é outro anticancerígeno extraído da planta *Catharanthus roseus*, mas que também pode ser obtido a partir do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* associado a esta espécie vegetal (KUMAR et al., 2013). A estrutura química desses compostos pode ser observada na Figura 3.

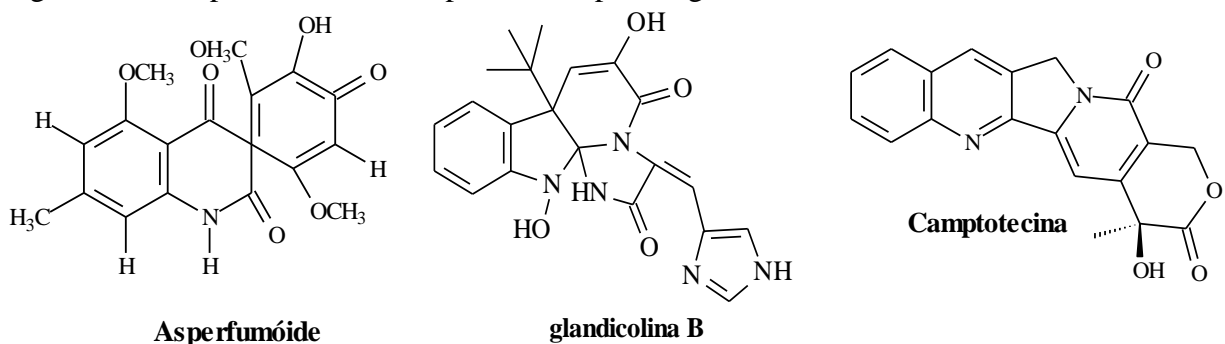
Figura 3— Exemplos de metabolitos bioativos produzidos por fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras.



Fonte: Adaptada de Specian et al. (2014).

Estudos recentes têm demonstrado a produção das principais classes de alcaloides, os quais exibem excelentes atividades biológicas tais como antimicrobiana (YU et al., 2010), citotóxicas (YUNianto et al., 2014), como o alcaloide asperfumoide produzido pelo endófito *Aspergillus fumigatus* isolado de *Cynodon dactylon*, que apresentou atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* (ZHANG et al., 2012). A glandicolina B obtido a partir do fungo endofítico *Penicillium* sp. associado à planta *Mauritia flexuosa*, com moderada ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli* (KOOLEN et al., 2012). Outro exemplo de alcaloide é a camptotecina, isolada do fungo endofítico *Fusarium* sp. associado à *Nothapodytes foetida*, com atividade citotóxica frente a células de câncer humano (SPECIAN et al., 2014). A estrutura química desses alcaloides pode ser observada na Figura 4.

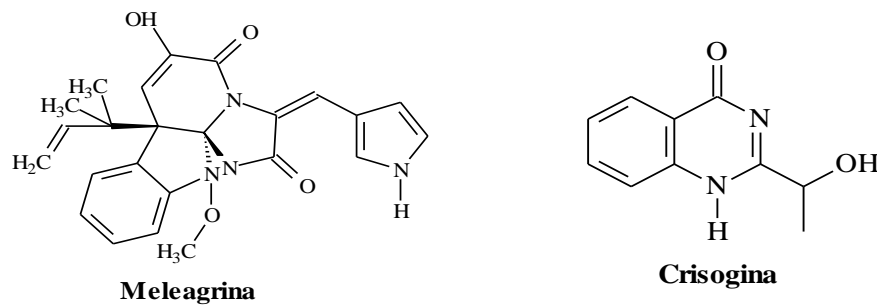
Figura 4— Exemplos de alcaloides produzidos por fungos endofíticos.



Fonte: Adaptado de Zhang et al. (2012).

Na família Annonaceae ainda são incipientes os estudos químicos e biológicos de alcaloides provenientes de fungos endofíticos. Na literatura, há apenas um trabalho realizado por Yunianto et al. (2014), que descrevem o isolamento dos alcaloides meleagrine e chrysogine (Figura 5) obtidos do fungo endofítico *Penicillium* sp. associado a *Annona squamosa* L.

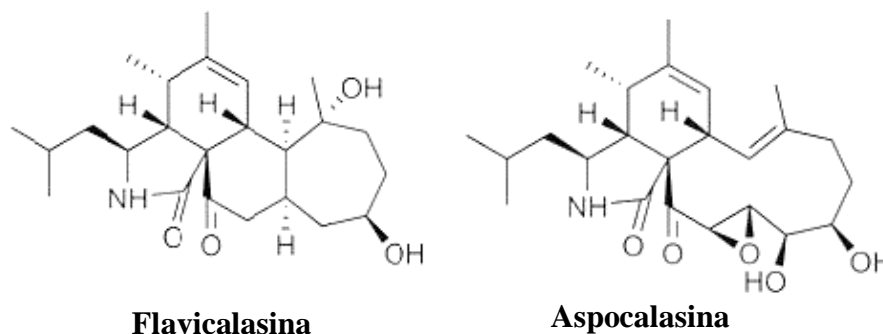
Figura 5 – Alcaloides produzidos pelo fungo endofítico *Penicillium* sp. de *A. squamosa* L.



Fonte: Adaptado de Yunianto et al. (2014).

No acervo de substâncias bioativas oriundas de fungos endofíticos destacam-se também a classe das citocalasinas, um grupo de micotoxinas com potencial bioativo contra células cancerígenas, fungos, vírus e bactérias, sendo estas amplamente produzidas pelos gêneros *Aspergillus* sp, *Acremonium* sp., *Chaetomium* sp., *Phomopsis* sp. entre outros (WANG et al., 2018). Wei et al. (2017) em seu estudo sobre o fungo *A. flavipes* isolaram uma série de citocalasinas pertencentes ao grupo das flavicalasinas e apocalasinas do extrato, bem como da cultura sólida de *A. flavipes* (Figura 6).

Figura 6 – Citocalasinas produzidas pelo fungo endofítico *Aspergillus flavipes*.



Fonte: Adaptado de Wei et al. (2017).

2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A seguir serão abordadas considerações gerais sobre as atividades biológicas, tais como antioxidante e antimicrobiana realizadas com extratos obtidos de fungos endofíticos.

2.4.1 Avaliação da atividade antioxidante

A propriedade antioxidante está relacionada a vários mecanismos de ação incluindo a captura dos radicais livres, que em excesso provocam o chamado estresse oxidativo, causando

um desequilíbrio nos processos fisiológicos do corpo humano, muitas vezes associados ao envelhecimento precoce e doenças de caráter degenerativo como o câncer, doenças cardíacas, entre outras (ALVES et al., 2010). Os fungos endofíticos, por sua vez produzem metabólitos que vêm sendo estudados como alternativa para combater o processo oxidativo (SPECIAN et al., 2014).

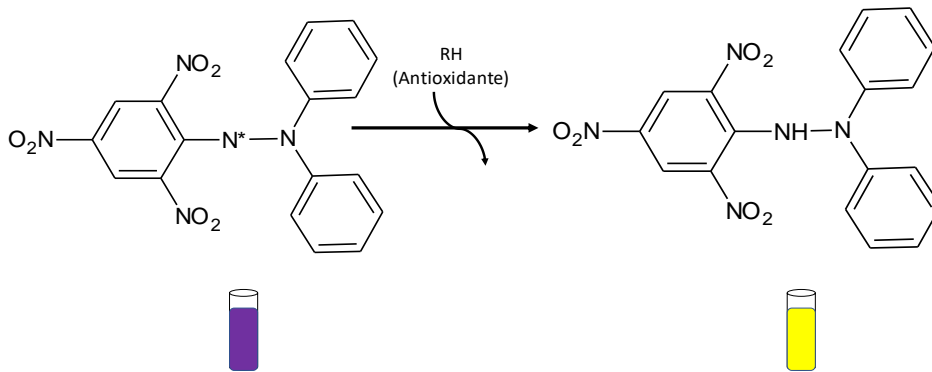
Alguns estudos têm demonstrado o efeito antioxidante de metabólitos produzidos por fungos endofíticos como o realizado por Yadav et al. (2014) que avaliaram a atividade antioxidante dos extratos dos endófitos *Chaetomium* sp., *Aspergillus* sp., *Aspergillus peyronelii* e *Aspergillus niger* associados a espécie vegetal *Eugenia jambolana* Lam, e verificaram que os mesmos apresentaram excelente atividade antioxidante quando avaliados pelo método DPPH. Vasundhara, Baranwal e Kumar (2016) obtiveram resultado similar, ao avaliar o potencial antioxidante do fungo endofítico *Fusarium tricinctum*, através do método DPPH. Do mesmo modo, Prihantini e Tachibana (2016) isolaram e demonstraram que os compostos ácido túrico e ácido 6-metil-salicílico produzidos por fungos endofíticos do gênero *Pseudocercospora* apresentaram boa atividade antioxidante, quando realizada pelo método DPPH e β caroteno/ácido linoleico.

Devido à grande variedade química existente entre os compostos, diversos ensaios *in vitro* têm sido utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de um determinado composto ou amostras. Dentre os métodos espectrofotométricos *in vitro*, destacam-se os ensaios: avaliação da ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e auto oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico entre outros (ALVES et al., 2010; SUCUPIRA et al., 2012).

2.4.2 Ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

Entre os métodos mais utilizados para analisar o potencial antioxidante, o radical DPPH é um dos mais aplicados em estudos com compostos naturais, inclusive de extratos de fungos endofíticos. Este método baseia-se na teoria de que um doador de hidrogênio é um antioxidante, desta forma o radical livre estável DPPH, o qual possui absorção máxima a 515-520 nm, ao capturar um radical hidrogênio da molécula antioxidante, apresenta um decaimento na absorbância e conseqüentemente na coloração, passando da cor violeta para amarelo, conforme representado na Figura 7 (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). De acordo com Sucupira et al. (2012) esse ensaio é considerado rápido, prático e com boa estabilidade que não envolve condições elevadas de temperatura e oxigenação.

Figura 7– Esquema reacional entre o radical livre DPPH e uma molécula antioxidante.



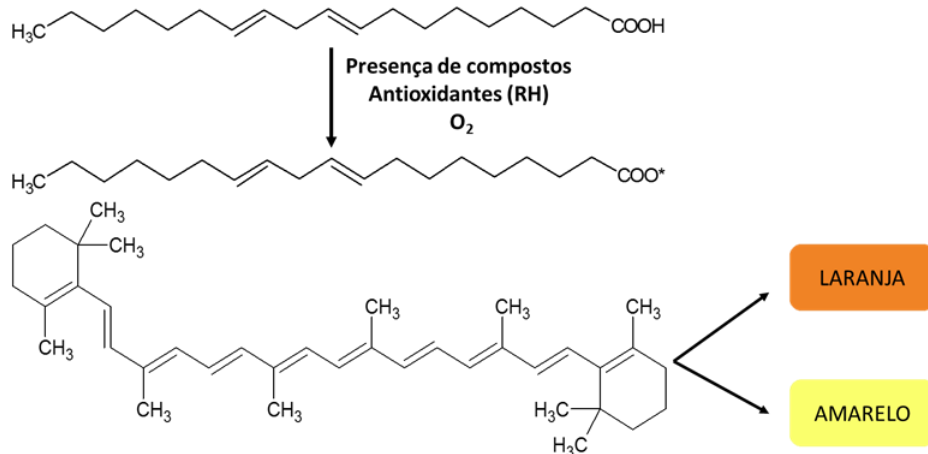
Fonte: Adaptado de Liang e Kitts (2014).

Os resultados são expressos de diversas formas, sendo a concentração inibitória de 50% (IC_{50}), definida como a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração de DPPH. Logo, quanto maior o consumo de DPPH menor será o IC_{50} e maior a atividade antioxidante, ou seja, maior a capacidade do composto em neutralizar os radicais livres (BORGES et al., 2011).

2.4.3 Auto oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante por este método está relacionada com a capacidade de alguns compostos em proteger ou diminuir a oxidação do β -caroteno. Essa oxidação é provocada pelos radicais livres formados durante a peroxidação do ácido linoleico que atacam o cromóforo do β -caroteno resultando no clareamento da emulsão (solução-sistema), passando de amarelo intenso para amarelo claro, como ilustrado na Figura 8 (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Figura 8– Esquema reacional da formação da solução de sistema β -caroteno/ácido linoleico.



Fonte: Adaptado de Silva, Borges e Ferreira (1999).

Ao adicionar uma amostra contendo compostos antioxidantes, origina-se uma competição entre estas com o radical peroxil, contribuindo assim para retardar ou inibir a diminuição da absorvância do β -caroteno (ALVES et al, 2010). Este método *in vitro* é muito utilizado para avaliar a atividade antioxidante, pois não recorre a altas temperaturas permitindo assim a determinação de compostos termossensíveis. Entretanto, apresenta algumas desvantagens como a dificuldade de interpretação dos dados devido a interação do β -caroteno com o oxigênio e a reprodutibilidade dos valores de absorvâncias médias (MIGUEL, 2010).

2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O potencial antimicrobiano de compostos naturais é medido por meio da exposição de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo de interesse clínico, utilizado como teste (OSTROSKY et al., 2008).

Dados literários revelam que os fungos endofíticos apresentam compostos com ação inibitória contra microrganismos patogênicos, como descrito por Zhao et al. (2012) que avaliaram o potencial antimicrobiano dos metabólitos ergosta-5,7,22-trien-3-ol, 2,3-di-hidro-5-hidroxi- α e α -dimetil-2-benzofuranometanol isolados do fungo endofítico *Gliomastix murorum*, associado à espécie *Paris polyphylla* frente as bactérias *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas lachrymans*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus haemolyticus* e constataram por meio dos ensaios de concentração mínima inibitória (CIM), que os metabólitos deste fungo endofítico possui boa atividade antimicrobiana.

Desale e Bodhankar (2013) verificaram a capacidade de inibição do endofítico *Phomopsis* sp. obtido de *Vitex negundo* contra bactérias patogênicas *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. cereus*, *B. subtilis* e *S. aureus*, das quais o resultado foi mais significativo contra *E. coli* e *S. typhimurium* com halo de inibição com cerca de 24 e 22 mm respectivamente. Banhos et al. (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana dos isolados endofíticos de *Myrcia guianensis*, contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans* e *Penicillium avellaneum* e constataram que os fungos endofíticos do gênero *Pestalotiopsis*, *Nectria haematococca* e *Phomopsis* apresentaram boa ação antimicrobiana.

Dentre os métodos utilizados para investigar a atividade antimicrobiana de extratos ou frações, destacam-se os métodos *in vitro* de difusão em ágar considerados qualitativos, pois revelam apenas a presença ou ausência de substâncias com potencial antimicrobiano e os

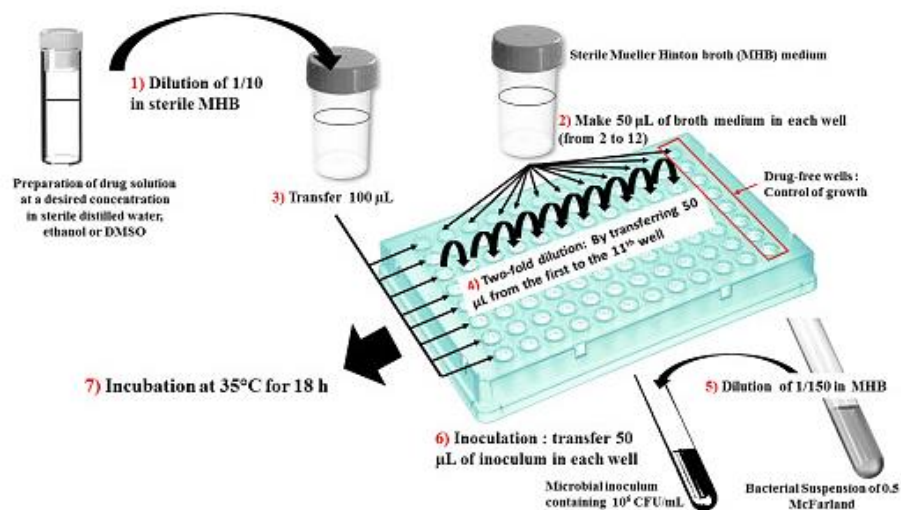
métodos de microdiluição, os quais são semiquantitativos e determinam a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras (SILVEIRA et al., 2009).

2.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Neste método os testes são realizados em meio de cultura líquido, onde são relacionados a proporção de crescimento do microrganismo e a concentração da substância testada. A avaliação é realizada comparando os resultados com um padrão biológico de referência (OSTROSKY et al., 2008). Como controle positivo é utilizado no meio líquido uma substância com potencial antimicrobiano (padrão) e como negativo o meio de cultura usado no ensaio e na suspensão microbiana (BONA et al., 2014). Duas metodologias são utilizadas neste método, a macro e microdiluição, também conhecida como Concentração Inibitória Mínima (CIM).

A CIM corresponde à menor concentração do agente capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo teste (MADIGAN et al., 2010). Este ensaio consiste em preparar diluições sucessivas do antimicrobiano teste (Figura 9) em meios de cultura líquido, cultivar o microrganismo e após incubação, avaliar a menor concentração do antimicrobiano que inibiu o crescimento do patógeno. De modo geral os ensaios são realizados em microplacas, utilizando o volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Figura 9– Esquema da diluição em série para determinação da Concentração Inibitória Mínima.



Fonte: Balouiri, Sadiki, e Ibnsouda, 2016.

De acordo com Silveira et al. (2009), o crescimento do microrganismo é determinado por meio da observação direta ou pelo uso de espectrofotômetro em comprimento de onda específico, após as amostras serem coradas com reveladores específicos. As vantagens deste método são: fornece resultados quantitativos, requer uma quantidade mínima de amostra, baixo custo e sensibilidade em comparação a outros métodos descritos na literatura (OSTROSKY et al., 2008).

2.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA ANNONACEAE

Em meio a diversidade biológica existente na Amazônia, um grupo de plantas pertencentes a família Annonaceae destaca-se por sua importância econômica. Essa família abrange aproximadamente 135 gêneros e 2500 espécies, sendo os gêneros *Annona* (150 espécies), *Duguetia* (95) e *Guatteria* (265) os maiores. As espécies dessa família são caracterizadas como árvores e arbustos, com distribuição tropical encontradas principalmente na América do Sul e Ásia (SMITH et al., 2004).

A importância econômica de algumas espécies de Annonaceae está relacionada a produção de frutos comestíveis, bem como sua utilização na indústria como matéria prima para a produção de cosméticos e como plantas ornamentais (SOUZA; LORENZI, 2008). Além disso, várias espécies dessa família são utilizadas na medicina popular no tratamento de inúmeras doenças, como é o caso do chá das folhas de *Duguetia furfuracea* usado como recurso terapêutico para o reumatismo (FENNER et al., 2006) e o uso das raízes e folhas de *Uvaria caffra* que ajudam a minimizar a tosse (MULAUDZI et al., 2012).

A família Annonaceae se destaca pela produção de vários metabólitos secundários, responsáveis com excelentes atividades biológicas (DI STASI et al., 2002; LEBOEUF et al., 1982). A discretamina, a squamocina L., o Canferol-3-*O*-arabinosídeo e o ácido 8(17), 12,14-labdatrieno-18-oico são exemplos de moléculas bioativas isoladas de diferentes partes de plantas desta família (FECHINE et al., 2002; LIMA; PIMENTA; BOAVENTURA, 2010; RIBEIRO et al., 2007; SANTOS, SALATINO 2000).

2.6.1 Gênero *Annona*

O gênero *Annona* pertence à família Annonaceae e compreende cerca de 150 espécies de árvores e arbustos. No Brasil é distribuído principalmente na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal, destacando-se na família por possuir espécies economicamente

importantes que produzem frutos comestíveis, amplamente cultivados e comercializados no país, tais como: *A. squamosa* L. (fruta do conde ou pinha), *A. muricata* L. (graviola), *A. reticulata* L. (fruta da condessa) entre outras (LORENZI; MATOS 2008; MAAS; LOBÃO; RAINER 2016). De acordo com dados disponíveis no herbário virtual INCT-Herbário Virtual da Flora e dos Fungos (2016), o gênero possui cerca de 19 espécies registradas no estado de Roraima, dentre as quais as de maior ocorrência são: *A. Jahonii* Saff, *A. hipoglauca* Mart e *A. denticoma* Mart, respectivamente.

Do ponto de vista fitoquímico, estudos revelam que o gênero *Annona* tem sido muito estudado por ser fonte promissora de compostos das classes de alcaloides (TELES et al., 2015), acetogeninas (SUN et al., 2016), flavonoides (VEGA et al., 2007) e terpenoides (NHIEM et al., 2015). No que se refere as atividades biológicas, dados literários mostram que suas espécies evidenciam várias, como por exemplo, a atividade antioxidante relatada por Benites (2015) aos extratos dos frutos de *A. coriaceae* *A. sylvatica*; atividade antimicrobiana dos extratos das folhas de *A. verpretorum* (ALMEIDA et al., 2014); atividade leshimanicida e citotóxica dos extratos das folhas e sementes de *A. mucosa* (LIMA et al., 2012); atividade anti-inflamatória dos extratos das folhas de *A. dioica* (FORMAGIO et al., 2013) e antidiabética dos extratos das folhas de *A. muricata* (FLORENCE et al., 2014).

Em se tratando de trabalhos envolvendo fungos endofíticos como matéria prima para o isolamento de novas moléculas bioativas, e sobre sua constituição química, ainda são poucos os estudos, considerando o número de espécies existente no gênero. Na literatura, são reportados alguns trabalhos que descrevem o isolamento de metabolitos obtidos de fungos endofíticos isolados apenas da espécie *A. squamosa*. No estudo de Lin et al. (2011) com a espécie, foram isolados três novos triterpenos do fungo *Xylarialean* sp. com moderada atividade citotóxica obtida mediante ensaios *in vivo* com linhagem celular de tumor humano HepG2. Também foram isolados lactona, antraquinona e sesquiterpenos de *Phomopsis* sp. (LIN; LU; SHEN, 2008) e alcaloide de *Penicillium* sp. (YUNIANTO et al., 2014).

2.6.2 Espécie *Annona jahonii* Saff.

A espécie *A. jahonii* é difundida na América do Sul, em países como Colômbia, Venezuela e Brasil (Figura 10). No Brasil há 39 registros da espécie, com distribuição nos estados do Amazonas (1), Mato Grosso (2), Pará (1), Rondônia (3) e Roraima, sendo neste a maior ocorrência da espécie com cerca de 30 registros (REDE SPECIES LINK, 2016).

Figura 10– Espécie *Annona jahnii* Saff.



Fonte: Adaptada de Barlo (2015).

Esta árvore de pequeno porte é encontrada em áreas de savana e florestas. Possui fruto com amadurecimento rápido, sabor doce e textura semelhante à graviola (BARLO, 2015). É conhecida popularmente na Venezuela como guanábano de monte, manirito, pepuro e pepino de rebalse. No Brasil mais especificamente no estado de Roraima, seus nomes populares são desconhecidos, mas a espécie é conhecida por duas sinónimas: *A. ulei* e *A. guaricensis* (GBIF, 2018).

Em relação aos estudos químicos e biológicos realizados com a espécie, ainda são poucos os trabalhos descritos na literatura, sendo relatados apenas três trabalhos, os quais descrevem o isolamento de acetogeninas isoladas de galhos, com potencial citotóxico frente a linhagens de células tumorais (COLMAN-SAIZARBITORIA et al. 1998, 1999, 2008).

3 OBJETIVOS

Visando solucionar as questões desse trabalho foram traçados os seguintes objetivos:

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a produção metabólica e o potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos de fungos endofíticos isolados de *Annona jahnii* Saff.

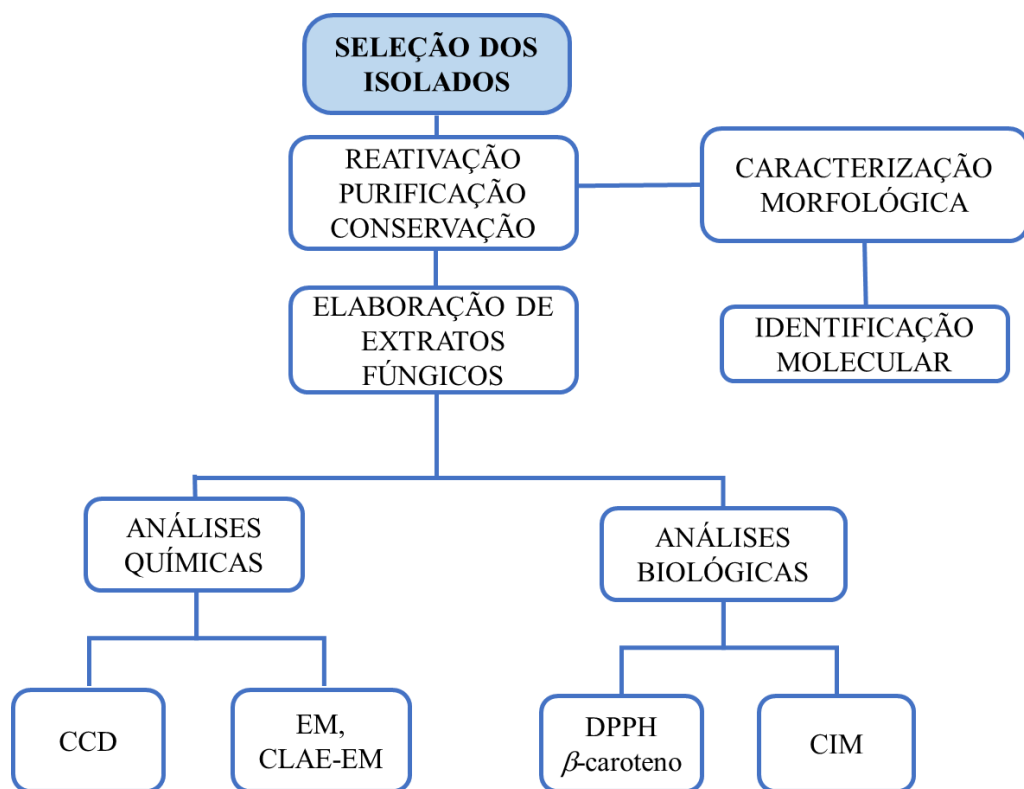
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar isolados da coleção de microrganismo para produção de metabólitos secundários
- Caracterizar morfológicamente os fungos selecionados;
- Identificar molecularmente os fungos selecionados;
- Determinar o melhor meio de cultura e temperatura para a produção de extratos dos fungos selecionados;
- Avaliar o perfil químico dos extratos fúngicos selecionados com base no rendimento;
- Avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos fúngicos selecionados com base no rendimento;
- Realizar o estudo químico dos extratos dos extratos de um dos fungos selecionados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção estão apresentadas as atividades desenvolvidas durante esta pesquisa (Figura 11). As análises foram realizadas nos laboratórios do Núcleo de Pesquisas Energéticas (NUPENERG) e do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais (PRONAT), da Universidade Federal de Roraima (UFRR), e nos laboratórios da central analítica pertencentes ao Centro de apoio multidisciplinar – CAM da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Figura 11– Esquema geral das atividades realizadas para o estudo dos fungos endofíticos isolados de *A. jahnii*.



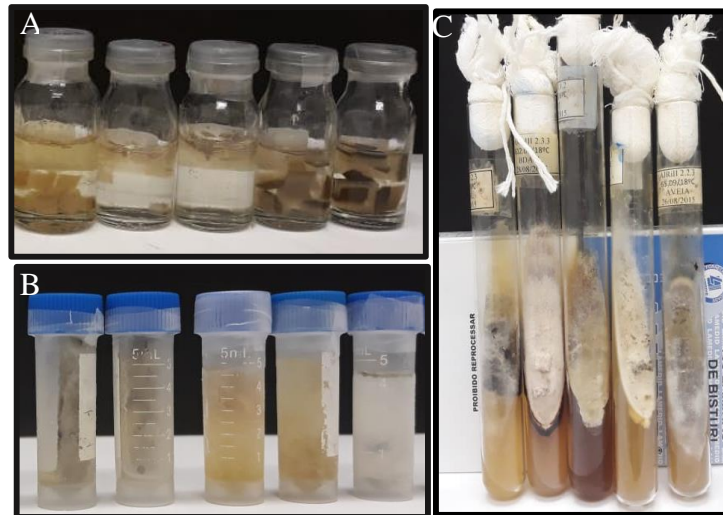
4.1 SELEÇÃO DOS ISOLADOS

A partir da coleção de microrganismos do Grupo de Biotecnologia e Química Fina (GBQF) da UFRR, foram selecionados três fungos endofíticos isolados de *A. jahnii* pertencentes a grupos morfológicos pré caracterizados a nível de gênero. As cepas foram escolhidas adotando como critérios os aspectos macro morfológicos como coloração do micélio, textura, tamanho e pigmentação difusa produzida pelas colônias.

4.2 REATIVAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos selecionados foram reativados em placas de Petri contendo os meios de isolamento BDA+L preparado com 100g de batata inglesa, 10g de Dextrose, 1g de Extrato de levedura e 7,5g de Ágar. E o meio ISP2 foi preparado com 5g de Amido de milho, 2g de Extrato de levedura, 5g de Extrato de malte, 20g de Dextrose e 7,5g de Ágar. As massas foram dissolvidas em 500 mL de água destilada e a mistura foi esterilizada em autoclave a 120 °C por 20 min. Depois de resfriado os meios foram distribuídos em placas de petri (10 a 15 mL por placa) em condições assépticas. As linhagens selecionadas foram cultivadas sob a temperatura de 25°C. Após o crescimento dos microrganismos, foi realizada a purificação das linhagens utilizando o método de diluição seriada e quando necessário sucessivos repiques. Depois de purificadas as colônias foram conservadas em Castellani, glicerol (20%) e em tubo inclinado (Figura 12), a fim de manter a integridade das colônias (BANHOS et al., 2014).

Figura 12 – Métodos de conservação dos fungos endofíticos. A) Castellani; B) Glicerol 20%; C) Tubo inclinado.



4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A caracterização dos fungos endofíticos foi realizada por meio da análise das estruturas macroscópicas e microscópicas, em que foram observados os tipos de micélios, textura, cor, relevo tipo de borda e pigmentação difusa. E para melhor observação das estruturas vegetativas e reprodutivas dos isolados foi utilizada a técnica de microcultivo. Para tanto, os sistemas de microcultivo foram preparados com placas de Petri, sobre a qual suportes sustentaram lâminas

e lamínulas. Também foram adicionados chumaços de algodão. Após montados, os sistemas foram esterilizados em autoclave.

Posteriormente, sobre a lâmina foi depositado um fragmento de meio de cultura (BDA, ISP2) contendo micélio em seus vértices, sendo coberto em seguida com lamínula. Para manter a umidade necessária para o desenvolvimento dos fungos, o algodão foi umedecido com água destilada estéril. As placas foram vedadas e incubadas à temperatura ambiente por 7 dias, ou até que fosse observado o desenvolvimento do fungo na lâmina e lamínula. Após o período de crescimento, o micélio aderido à lâmina e lamínula foi corado com azul de lactofenol. Por fim as estruturas reprodutivas foram visualizadas em microscópio óptico, e comparadas com chaves taxonômicas permitindo a identificação dos gêneros (BARNETT; HUNTER, 1972).

4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Os fungos endofíticos foram identificados utilizando o espaçador transcrito interno 1 (ITS1), subunidade 5.8S do gene ribossomal e o espaçador transcrito interno 2 (ITS2) do rDNA, a fim de complementar a identificação convencional. Para isso, o DNA foi extraído, o fragmento amplificado via PCR e posteriormente sequenciado.

4.4.1 Condições de Cultivo

As cepas de fungos endofíticos foram cultivadas em triplicata, em erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido BDL a 130 rpm durante 7 dias a 26°C. Após o período, o micélio foi separado do meio por filtração a vácuo. Em seguida, duas alçadas do micélio foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, e estes acondicionados no freezer -80°C até o momento da realização dos procedimentos de extração de DNA.

4.4.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o método descrito por De Hoog et al. (2007) com modificações na concentração dos reagentes, volumes de algumas soluções e velocidade de centrifugação. É importante destacar que as alterações do protocolo foram realizadas a partir de experimentos anteriormente desenvolvidos no laboratório de Biologia Molecular do PRONAT.

Foram adicionados ao tubo com o material fúngico 400 µL de tampão de lise 1 (Tris-HCl 0,05M, EDTA 0,005 M, NaCl 0,1M e SDS a 1%) e o conteúdo transferido para almofariz,

previamente refrigerado em freezer -80°C onde com auxílio de pistilo os micélios foram macerados. Após maceração, os fragmentos foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e adicionou-se $5\mu\text{L}$ de proteinase K ($50\mu\text{g}/\text{mL}$), sendo as amostras homogeneizadas em vórtex e incubadas em banho-maria a 60°C por 30 min. Em seguida, foram adicionados $162\mu\text{L}$ de tampão de lise 2 (Tris-HCl $0,1\text{M}$, NaCl $1,4\text{M}$, EDTA $0,2\text{M}$ e CTAB $0,2\%$), após homogeneização em vórtex as amostras foram incubadas por 10 min a 65°C . Essas etapas promoveram o rompimento das membranas celulares e a degradação das proteínas para liberação do material genético, bem como inibir a ação de enzimas que degradam o DNA.

Posteriormente foram acrescentados $600\mu\text{L}$ de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), o conteúdo foi homogeneizado em vórtex e incubado por 30 min a -20°C . Após centrifugação por 10 min a 11.000 rpm , o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 10% do volume da solução de acetato de sódio 3M . Depois de fazer a homogeneização suave a solução foi incubada em freezer -20°C por 30 min, em seguida centrifugada a 11.000 rpm por 10 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O clorofórmio/álcool isoamílico aliado a centrifugação promove a formação de fases nas amostras, uma inferior onde se depositam os compostos orgânicos, e outra superior onde o DNA está disperso.

Em seguida, o sobrenadante foi transferido para novo tubo, onde foram adicionados 50% do volume (da amostra) de isopropanol a -20°C , este reagente leva à desidratação da molécula de DNA, de modo que esta forma um precipitado (*pellet*). Para a precipitação do DNA, os tubos foram incubados a 4°C por 10 min e centrifugados a 11.000 rpm por 5 min. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com $200\mu\text{L}$ de etanol 70% gelado. Depois os tubos foram homogeneizados, centrifugados por 5 min a 11.000 rpm e o sobrenadante descartado por inversão. Após secagem em temperatura ambiente, o DNA foi hidratado com $50\mu\text{L}$ de água ultrapura e mantido a 4°C por até 12h para reidratação completa do DNA. Para eliminar o RNA presente nas amostras, foram adicionados $5\mu\text{L}$ de RNase ($10\text{ mg}/\text{mL}$) e as mesmas incubadas a 37°C por 30 min. Após esse período os tubos foram mantidos a -20°C .

4.4.3 Análise do DNA por eletroforese

Para observar se houve extração de DNA, as amostras foram submetidas a uma corrida eletroforética em gel de agarose $0,8\%$ preparado com TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). Para isso, foi preparado um mix de cada amostra, contendo $7\mu\text{L}$ de DNA extraído, $2\mu\text{L}$ de azul de bromofenol (6X) e $1\mu\text{L}$ de GelRed (1:500). Como padrão de peso molecular foi aplicado $3\mu\text{L}$

do DNA Lambda na concentração de 50 ng/ μ L. A eletroforese foi realizada a 100V por 30 min. Após a corrida, o gel foi visualizado e registrado em fotodocumentador digital EasyDoc 200 sob luz UV.

4.4.4 Quantificação do DNA

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro, para isto foram adicionados 3 μ L de DNA em cubeta de quartzo circular. As amostras foram analisadas nos comprimentos de onda de 260nm, 280nm, 230nm e 320nm, sendo utilizada a relação entre as absorvâncias A260/A280 para determinação da qualidade do DNA. O fator de pureza das amostras deve estar entre 1,8 e 2,0 (OLIVEIRA et al., 2007).

4.4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras de DNA genômico extraído dos fungos filamentosos foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguindo o protocolo de White e colaboradores (1990), com modificações. Os fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene do rDNA foram amplificados utilizando os iniciadores ITS1 (direto - 5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3') e ITS4 (reverso - 5'-tcctcccgttattgatatgc-3'). As reações da PCR foram realizadas em volume total de 25 PL nas seguintes concentrações finais, contendo tampão 2,5 PL (1X), 1 PL de dNTP (0,2 mM), 0,75 PL de MgCl₂ (1,5 mM), 2,5 PL de cada *primer* (1 PM), 0,8 PL de Taq DNA polimerase (0,2 unidade/PL), 2 PL de DNA e completou-se o volume com água ultrapura. A reação foi realizada em termociclador GenCycler (BIOSYSTEMS) previamente programado para executar 35 ciclos após desnaturação inicial de 95 °C por 3 min. Cada ciclo de amplificação consistiu em três etapas com condições distintas: desnaturação (95 °C por 45 seg), anelamento (58 °C por 45 seg) e extensão (72 °C por 1 min) e por fim extensão final a 72 °C durante 10 min. A confirmação da amplificação e do tamanho dos fragmentos foram observados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2%, conforme descrito anteriormente, sendo utilizados 2PI de cada produto amplificado. Como padrão foi usado o marcador ladder de 100pb (Ludwig Biotec®). A corrida eletroforética foi realizada a 74V por 40 min e os fragmentos foram visualizados em fotodocumentador digital EasyDoc 200 com emissão de luz UV.

4.4.6 Purificação e sequenciamento das amostras

Para garantir maior qualidade no sequenciamento, os produtos da PCR foram purificados com Polietilenoglicol (PEG 8000 20% e NaCl 2,5M) conforme o método descrito por Sambrook e colaboradores (2001). Ao produto amplificado acrescentou-se a solução PEG na proporção de 1:1 e incubou-se a 37° C por 15 min. Depois o conteúdo foi transferido para microtubos de 0,6 mL e estes centrifugados a 14.000 rpm por 15 min.

Após retirada do sobrenadante com pipeta e descarte, adicionou-se 125 µL de Etanol 80% gelado e centrifugou-se a 14.000 por 2 min. Por fim o sobrenadante foi descartado e os microtubos incubados em banho-seco a 37 °C por 15 min para evaporação completa do Etanol residual. Logo após esse período, adicionou-se 15 µL de água ultrapura para ressuspensão do produto purificado e este foi mantido em refrigerador por aproximadamente 16 h, posteriormente armazenado a -20 °C. A concentração do produto da PCR purificado foi estimada em gel de agarose 1,2%, seguindo as condições já descritas.

Após purificação os produtos da PCR foram enviados ao laboratório Myleus Biotecnologia (Belo Horizonte – MG), onde as amostras foram sequenciadas por meio de eletroforese capilar em sequenciador ABI3730 utilizando o polímero POP7 e o kit BigDye Terminator v3.1 (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific). O sequenciamento foi realizado em ambas as direções (direta e reversa) utilizando os mesmos iniciadores empregados na PCR.

4.4.7 Análise das sequências

As sequências obtidas foram alinhadas e editadas manualmente utilizando os programas BioEdit (HALL, 1999) e MEGA 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Em seguida as sequências consensos geradas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando a ferramenta BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1997). Como critério para a identificação a nível específico foram os utilizados *hits* com E-value 0.0, e a similaridade de > 98% em relação às sequências depositadas no GenBank (ROSA et al., 2010).

4.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

O cultivo e preparação dos extratos fúngicos foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Bucker et al. (2013) e Souza et al. (2004).

Para a otimização das condições de cultivo as culturas fúngicas foram submetidas a um cultivo em microescala para a obtenção dos extratos brutos. Para tanto, as cepas foram inoculadas em triplicata em erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido BDL, ISP2 e AVEIA em condições estéreis. As culturas foram cultivadas em incubadora do tipo *Shaker* a 130 rpm, sob temperaturas controladas de 18° e 26 °C durante 15 dias (Figura 13). Como controle negativo, foram utilizados apenas os meios de cultura, os quais foram incubados sob as mesmas condições.

Figura 13 – Cultivo em escala analítica dos fungos endofíticos em incubadora do tipo Shaker.



Após o período de fermentação, o líquido fermentado foi separado do micélio por meio de filtração a vácuo esterilizada utilizando papel filtro qualitativo de 14 µm. O líquido fermentado foi extraído três vezes com 25 mL de acetato de etila (AcOEt), utilizando a técnica de extração líquido-líquido. Ao término dos procedimentos de extração, as soluções foram secas com Na₂SO₄, filtradas e concentradas em evaporador rotativo. Após a evaporação total do solvente, os extratos foram pesados para obtenção da massa resultante e armazenados a 4 °C. Por fim, os extratos obtidos foram codificados e estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Codificação dos extratos fúngicos obtidos após extração líquido-líquido.

Amostra	Extratos	Codificação
1	Extrato acetato de etila da linhagem <i>Trichoderma</i> sp.	EFTRIC
2	Extrato acetato de etila da linhagem <i>Penicillium</i> sp.	EFPEN
3	Extrato acetato de etila da linhagem <i>Aspergillus</i> sp.	EFASP

4.6 CULTIVO DOS FUNGOS ENDOFITICOS EM ESCALA PREPARATIVA

Após o primeiro cultivo os extratos obtidos em ambas as temperaturas, foram avaliados e posteriormente selecionados com base na produção de biomassa e na melhor temperatura de crescimento. As cepas selecionadas, foram cultivadas em triplicata em escala laboratorial seguindo o método descrito no item 4.5, porém, utilizando um volume de 250 mL de meio líquido (Figura 14). O cultivo dos fungos foi realizado afim de obter extrato suficiente para realização dos ensaios químicos e biológicos.

Figura 14 – Fungos endofíticos cultivados em escala laboratorial após o período de incubação.



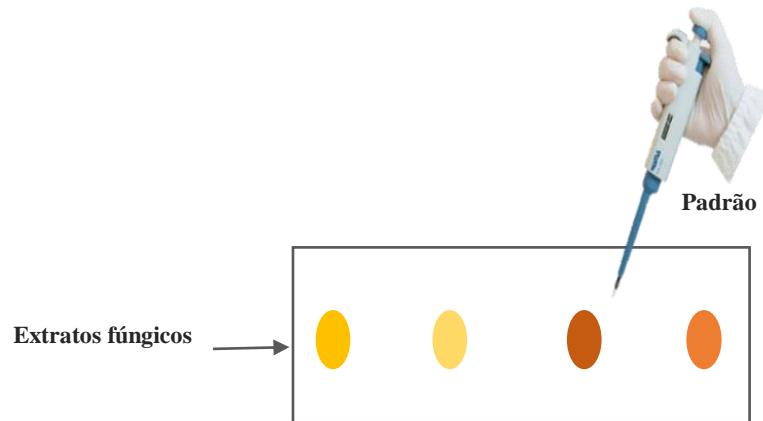
4.7 ANÁLISES QUÍMICAS

As análises químicas foram realizadas visando avaliar a presença de metabólitos secundários produzidos pelas linhagens em estudo. Para isso, nesta seção serão apresentados os métodos utilizados para avaliar quimicamente os extratos de fungos endofíticos.

4.7.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises por CCD foram realizadas conforme a metodologia descrita por Rodrigues et al., (2009) para a detecção das principais classes de substâncias presentes nos extratos. Para evidenciar as principais classes nos extratos, aplicou-se 20 μ L da solução estoque (1 mg/mL) de cada extrato na origem de placas cromatográficas contendo sílica gel, conforme ilustrado na Figura 15. Em seguida, observou-se sob luz ultravioleta (UV) a 365 e 254 nm as manchas e por fim revelou-se as cromatoplasmas com soluções reveladoras específicas de cada classe.

Figura 15 – Esquema ilustrativo da análise por CCD dos extratos fúngicos.



Para detecção de flavonoides foi usado a solução reveladora de NP-PEG (difetilboriloxietilamina 1,0% em metanol, seguida de polietilenoglicol 4000 5,0% em etanol). O surgimento de manchas verde, amarela ou laranja dará indicativo da presença de flavonoides quando visualizadas sob luz ultravioleta a 365 nm. Para a classe de alcaloides foi utilizado o reativo de Dragendorff que evidencia através do surgimento de manchas laranja-marrom a presença desta classe nas amostras. E para os terpenoides utilizou-se a solução de VAS (vanilina sulfúrica ácida) como revelador, em que a coloração amarela-marrom indica a presença do composto.

4.7.2 Análise por Espectrometria de Massas

As análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) no Centro de apoio multidisciplinar - Central Analítica – CAM, localizado no setor norte da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

4.7.3 Perfil químico dos extratos por Espectrometria de Massas.

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro do tipo *Ion-Trap*, modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific) equipado com fonte de ionização química a pressão atmosférica (APCI), operando no modo positivo de aquisição com uma faixa de monitoramento de m/z 100 -1000. Para a análise por inserção direta 1mg dos extratos foram dissolvidos em metanol grau HPLC (1 mg/mL). Das amostras, retirou-se uma alíquota de 20 μ L na qual foi diluída em metanol grau HPLC para obtenção de uma solução de 20 ppm. Após análises, os íons com boa intensidade foram selecionados para obtenção da fragmentação, visando obter um perfil

químico dos extratos. Os espectros de fragmentação foram obtidos com a fonte APCI no modo positivo e energia de colisão entre 15 e 25%.

4.7.4 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Para aquisição das análises cromatográficas, a solução estoque de cada extrato foi preparada na proporção de 1 mg/mL em metanol grau HPLC. 10 µL de cada amostra foi injetada automaticamente em um sistema CLAE Accela (Thermo scientific, CA, EUA), usando uma coluna phenomenex LUNA C18 (5 µm, 150 mm x 4,6 mm i.d.) (Torrance, CA, EUA). Foram usadas duas fases móveis: água (A) e metanol (B). O sistema ocorreu utilizando um fluxo de 1 mL/min em modo isocrático de 36% de A e 64% de B, durante 25 min. Os espectros da região do UV foram registrados com varredura de 200 nm a 400 nm com detector de arranjo de diodos (PDA). A saída do detector foi conectada por meio de uma válvula de divisão com fluxo de 300 uL, sendo essa conectada diretamente a fonte do espectrômetro de massa LCQ Fleet. A ionização foi realizada com fonte APCI operando em modo positivo de aquisição.

4.7.5 Fracionamento dos extratos por CLAE semipreparativo.

Após escalonamento adequado do método analítico, cerca de 218 mg do extrato EFASP foi solubilizado em 1 mL de metanol grau HPLC (10 injeções em um loop de 100 µL) e analisados em um cromatógrafo modelo Shimadzu (CBM-20A) nos comprimentos de onda de 202 e 210 nm. Para as análises foi utilizada uma coluna C18 (5 µm, 250mm x 10mm i.d.) com um fluxo de 5 mL/min em modo isocrático, sendo 36% de A e 64% de B durante 45 min. A duração total da corrida foi de 60 min, desconsiderando o tempo de limpeza e o tempo de volta. As frações foram coletadas manualmente em tubos falcons previamente pesados. As frações obtidas foram analisadas por espectrometria de massas, sendo posteriormente, encaminhadas as mais promissoras para análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D e 2D.

4.8 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Nesta seção serão apresentados os procedimentos adotados para avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos de fungos endofíticos.

4.8.1 Avaliação da Atividade Antioxidante dos Extratos

O potencial antioxidante dos extratos fúngicos foi avaliado por dois métodos: ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e auto oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, respectivamente como descrito a seguir.

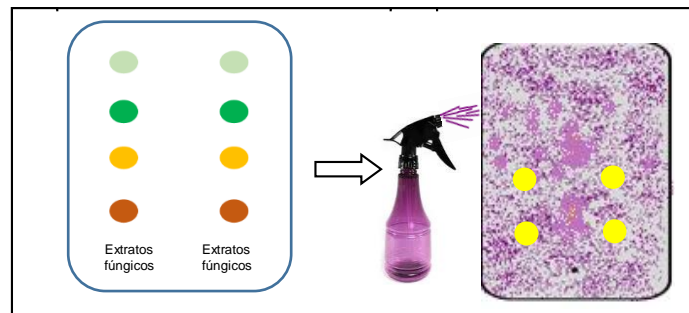
4.8.2 Ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

O potencial antioxidante dos extratos, foi investigado por meio da análise qualitativa e quantitativa descritos a seguir.

4.8.2.1 Análise qualitativa

Aplicou-se de forma sistemática 50 μ L dos extratos fúngicos em placas cromatográficas (Figura 16). Em seguida, uma solução saturada do reativo DPPH foi borrifada, até o surgimento de manchas amareladas sob fundo de coloração púrpura. Esta característica indicou os extratos com atividade antioxidante que foram submetidos posteriormente ao ensaio quantitativo para obtenção da concentração inibitória.

Figura 16 – Esquema ilustrativo do ensaio qualitativo DPPH.



4.8.2.2 Análise quantitativa

O ensaio para a determinação do potencial antioxidante dos extratos foi realizado de acordo com o método descrito por Mensor et al. (2001) com modificações (PONTIS et al., 2014). Soluções metanólicas dos extratos a 1mg/mL foram preparadas. A partir destas, foram retiradas alíquotas crescentes as quais foram misturadas com 1,5 mL do reativo DPPH (0,1mM) no volume de 5 mL. O branco foi constituído das alíquotas dos extratos e metanol. Por fim realizou-se o controle contendo apenas 1,5 mL de DPPH e metanol destilado.

Após 30 minutos de reação ao abrigo da luz, as absorbâncias das soluções foram medidas em espectrofotômetro UV-Visível, marca Shimadzu, modelo UV-mini 1240 a $\lambda=516$

nm. O percentual de atividade antioxidante (%AA) em cada amostra foi calculado por meio da equação abaixo.

$$\%AA = \frac{100 - [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100]}{Abs_{controle}}$$

Onde:

%AA: Percentual de atividade.

Abs = Absorbâncias (amostra, branco e controle).

As análises foram realizadas em triplicata e os valores de IC₅₀, definido como concentração de antioxidante requerida para sequestrar 50% dos radicais DPPH, foram calculados a partir da regressão linear dos gráficos (software Origin 6.0) em que o eixo das abscissas representou a concentração dos extratos e o eixo das ordenadas a atividade antioxidante.

4.8.3 Auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

A medida da atividade antioxidante pela oxidação acoplada do β -caroteno e do ácido linoleico foi realizada de acordo com o método de Emmons, Peterson e Paul (1999), com algumas modificações de Rufino et al. (2006).

4.8.3.1 Preparo da emulsão reativa

Adicionou-se 40 μ L de ácido linoleico, 265 μ L de Tween 40, 50 μ L da solução de β -caroteno a 10 mg/mL em clorofórmio e 1 mL de clorofórmio em erlenmeyer de 250 mL. Posteriormente, a mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio sob nitrogênio e o resíduo obtido foi redissolvido em cerca de 150 mL de água previamente aerada por 30 min até obter absorvância entre 0,6 e 0,7 a 470 nm. A emulsão foi mantida sob abrigo da luz e prontamente utilizada.

4.8.3.2 Ensaio β -caroteno/ácido linoleico

Em tubos de ensaio foi misturado uma alíquota de 5 mL da emulsão a 300 μ L de cada extrato a 1mg/mL. Logo depois, as soluções foram homogeneizadas em agitador vórtex e

incubadas em banho-maria a 40 °C. A oxidação da solução sistema foi monitorada em espectrofotômetro UV-Visível, marca Shimadzu, modelo UV-mini 1240 a $\lambda=470$ nm, no tempo inicial e em intervalos de 15 minutos durante 2 horas. Como controle positivo foram utilizados 300 μ L dos padrões Trolox e BHT a 1mg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A atividade antioxidante (AA) foi expressa como percentual de inibição relativa comparada a degradação da emulsão após 120 minutos, utilizando-se a equação abaixo.

$$\%AA = \left[\frac{(DRc - DRs) \times 100}{DRc} \right]$$

Onde:

DRc = taxa de degradação do controle $\left[\frac{\ln\left(\frac{a}{b}\right)}{120} \right]$

DRs = taxa de degradação na presença do padrão ou extrato $\left[\frac{\ln\left(\frac{a}{b}\right)}{120} \right]$

“a” e “b” são as absorbâncias no tempo inicial (0 min) e no tempo final (120 min) respectivamente.

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS FÚNGICOS

O potencial antimicrobiano dos extratos fúngicos foram avaliados através dos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM), conforme descrito a seguir.

4.9.1 Reativação e cultivo dos microrganismos teste

Para determinação da atividade antimicrobiana seguiu-se o método padrão recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (2012). Seis cepas de microrganismos foram recebidas em forma de doação pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), a saber: as bactérias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 00531) *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300); as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 13863), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231).

As bactérias foram reativadas em Brain Heart Infusion (BHI) ágar (ágar infusão de cérebro e coração) (HIMEDIA®) e as leveduras em Sabouraud (SB) ágar (HIMEDIA®), e

mantidas a 36 ± 1 °C por 24 horas e 36 horas, respectivamente, conforme o protocolo estabelecido pela Fiocruz. Após reativação dos patógenos, uma colônia isolada foi transferida com o auxílio de swab estéril, para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina à 0,09%. Em seguida, 200 µL da solução foram aplicados em 10 mL de caldo BHI, para bactérias, e caldo SB para leveduras. A concentração de inoculação das colônias no presente estudo foi correspondente ao número 0,5 na escala de Mc Farland para as bactérias e 2 para as leveduras.

4.9.2 Preparo das amostras

Soluções a 2 mg/mL dos extratos fúngicos foram preparadas com dimetilsulfóxido (DMSO) 10% e água destilada autoclavada (1:9). Como controle positivo foram preparadas soluções a 2 mg/mL de ampicilina para as bactérias e fluconazol para as leveduras. O controle negativo foi realizado com a substituição das amostras pela mesma solução que as mesmas foram solubilizadas, DMSO 10%.

4.9.3 Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Em placas Elisa de 96 poços foram adicionados 100 µL da suspensão de células do patógeno testado e 100 µL da amostra do extrato fúngico (2 mg/mL). As amostras foram introduzidas em duplicata na placa (Figura 17), sendo três placas para cada patógeno testado. Após aplicados, os extratos foram submetidos ao ensaio CIM de acordo com o esquema de diluição apresentado na Tabela 2 e incubadas a 36 ± 1 °C por 24 h.

Figura 17 – Ensaio de atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos.



Tabela 2 – Esquema geral das diluições sucessivas utilizadas no ensaio CIM.

Poços	Concentração
A ○○○	1 mg/mL = 1000 µg/mL
B ○○○	0,5 mg/mL = 500 µg/mL
C ○○○	0,25 mg/mL = 250 µg/mL
D ○○○	0,125 mg/mL = 125 µg/mL
E ○○○	0,0625 mg/mL = 62,5 µg/mL
E ○○○	0,03125 mg/mL = 31,25 µg /mL
G ○○○	0,015625 mg/mL = 15,62 µg/mL
H ○○○	0,00781 mg/mL = 7,81 µg/mL

Após o período de incubação, foram adicionados 50 µL do revelador NBT (nitroazul de tetrazólio) a 1% nos poços com inóculo de levedura. E nos poços com inóculo bacteriano foram aplicados 50 µL do revelador CTT (2,3,5-cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio) na mesma concentração. As placas foram novamente incubadas por 2h e avaliadas posteriormente. A partir da mudança de coloração nos poços contendo os reveladores, evidenciou-se o crescimento microbiano e determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM). As soluções com NBT apresentaram coloração azulada e as com CTT coloração avermelhada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da coleção de microrganismos desenvolvida no grupo de pesquisa GBQF, foram obtidos isolados fúngicos associados a espécie *A. jahnii*, e esses foram utilizados para o desenvolvimento desse estudo. Após a obtenção, os fungos foram identificados por meio de técnicas convencionais e por biologia molecular. Depois de caracterizados, foram produzidos os extratos brutos das linhagens, os quais foram avaliados qualitativamente (*screening*) quanto a produção de biomassa e a presença das principais classes de metabólitos secundários. E quantitativamente quanto ao seu potencial antioxidante e antimicrobiano, de modo que foi possível alcançar os seguintes resultados.

5.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados fúngicos de *A. jahnii* disponíveis na coleção de microrganismos do grupo de pesquisa, foram analisados por meio da observação das características macromorfológicas contrastantes como cor, tamanho e pigmentação difusa de cada colônia. Além disso, foram realizados testes preliminares qualitativos e quantitativos para observar o rendimento e a produção metabólica das linhagens. A partir das análises e observações prévias realizadas, foram escolhidas três linhagens de fungos endofíticos, sendo cada um destes representante de um grupo morfológico preliminarmente caracterizados na coleção. Na tabela 3 estão listadas as informações referentes ao isolamento das linhagens selecionadas.

Tabela 3 – Fungos endofíticos selecionados da coleção do grupo de pesquisa.

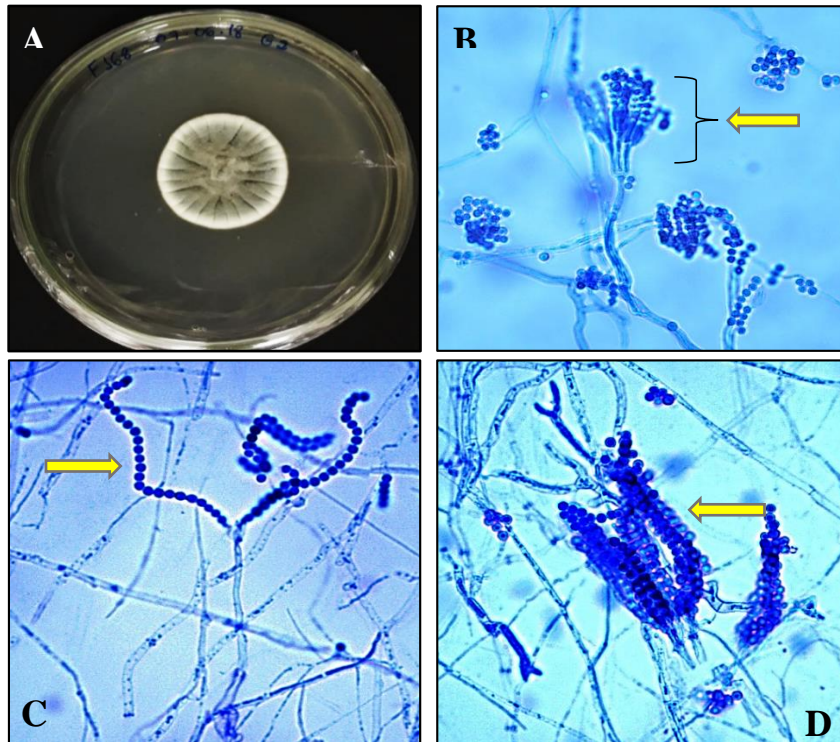
N° do Fungo	Meio de isolamento	Temperatura de isolamento	Tecido de isolamento	Grupo morfológico
303	ISP2	18 °C	Caule	G1: <i>Trichoderma</i>
168	BDA+ L	26 °C	Raiz	G2: <i>Penicillium</i>
407	BDA+ L	26 °C	Raiz	G3: <i>Aspergillus</i>

5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Com base nas observações das estruturas macro e micromorfológicas de cada colônia, foi possível identificar as linhagens de fungos endofíticos como pertencentes aos gêneros

Penicillium (isolado F168), *Trichoderma* (isolado F303) e *Aspergillus* (isolado F407). Os resultados da identificação morfológica estão apresentados nas Figuras 18, 19 e 20. Após o crescimento em meio sólido BDA+L, o fungo F168 apresentou micélio pulverulento, de coloração verde, bordas regulares brancas, sem formação de exsudatos e relevo irregular evidenciando pela presença de fissuras ao longo da colônia.

Figura 18 – Características macro e micromorfológicas do fungo endofítico F168. Em A) cultura em placa de Petri em meio BDA+L. B) observação dos conídios, fiálides e conidióforos. Em C e D destaque das cadeias de conídios (setas amarelas) (40x).

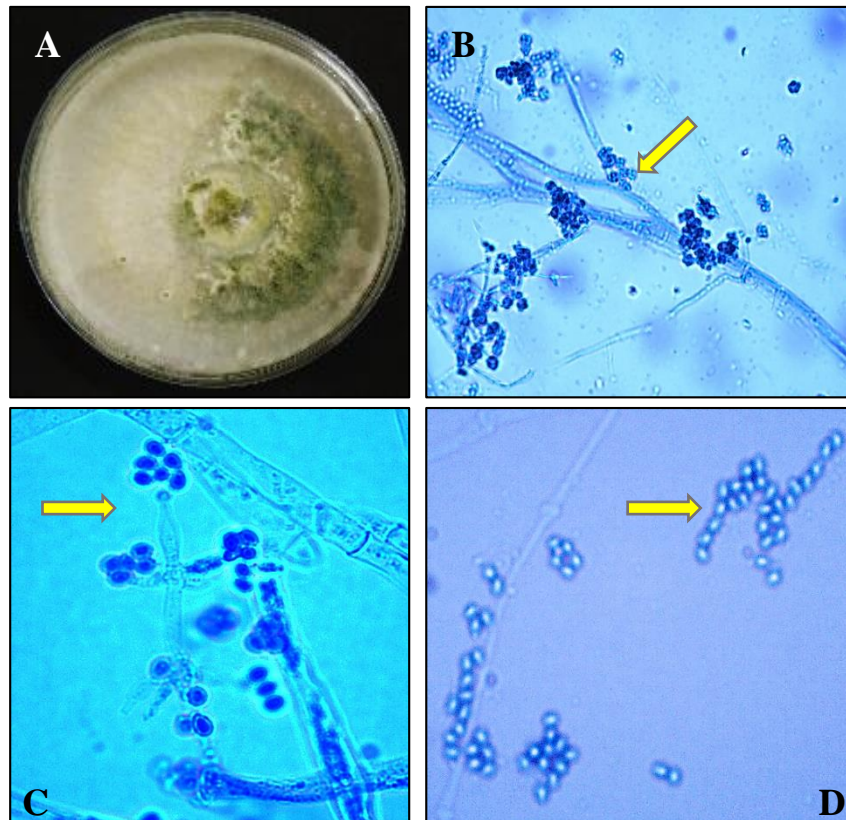


Em relação as características microscópicas, observou-se conídios cilíndricos distribuídos sobre as fiálides, hifas cenocíticas delimitando o conidióforo, e ramificação de forma verticilada (BARNETT; HUNTER, 1972). Tais características permitiram identificar o isolado como *Penicillium* sp. A maioria das colônias do gênero *Penicillium* apresentam textura pulverulenta, variando do verde claro ao escuro. Além disso, algumas apresentam morfologia convexa com borda plana (SARI; SETYANINGSIH; WIBOWO, 2017).

O fungo F303 identificado como *Trichoderma* sp. apresentou após o cultivo em meio ISP2, colônia com textura algodoadosa, micélios de coloração branca passando a verde claro após o 5º dia de crescimento. Bordas irregulares e relevo crateriforme sem desenvolvimento de exsudatos. Também foram observados no reverso a produção de pigmentos amarelos. Quanto

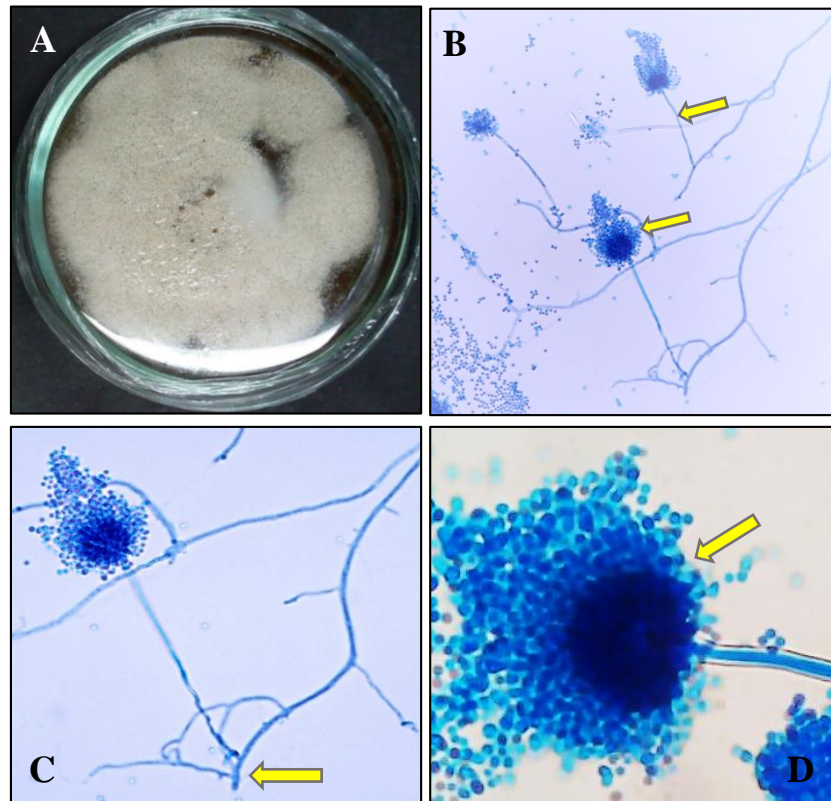
aos aspectos microscópicos, observou-se hifas septadas, conidióforos ramificados em forma de tríade e conídios esféricos (BARNETT; HUNTER, 1972).

Figura 19 – Características macro e micromorfológicas do fungo endofítico F303. Em A) aspectos da cultura em placa de Petri cultivada em meio ISP2. B) hifas com conidióforos (40x). C) conidióforos em tríade (40x) e D) detalhes dos esporos encapsulados (100x).



O gênero *Trichoderma* apresenta um crescimento rápido em meio de cultura. Suas colônias podem ser dispersas e em flocos ou compactadas com tufos; os conídios e conidióforos possuem forma e tamanho variados (KREDICS et al., 2014). Segundo Howell (2003) a pigmentação dos conídios determina a coloração das colônias que podem ser verdes, amarelas, verde-amareladas ou incolores e os conídios formam-se nas extremidades das fiálides a partir de hifas diferenciadas.

Figura 20 – Características macro e micromorfológicas do fungo endofítico F407. A) colônia em placa de Petri cultivada em meio BDA+ L. B) conidióforos e haste alongada sustentando a estrutura (40x). C) presença da célula pé. D) detalhes do conidióforo com conídio



O fungo F407 quando cultivado em meio BDA+L apresentou micélio de coloração marrom claro, aspecto aveludado, bordas e relevo irregular, bem como superfície lisa com formação de exsudatos. Nessa colônia também foram observados a formação de pigmentos difusos em tons escuros. Em relação as características microscópicas, observou-se hifas eretas proveniente da célula pé (figura 20C). Além disso, verificou-se a expansão do conidióforo dando origem a vesícula arredondada, onde encontram-se os conídios cilíndricos (BARNETT; HUNTER, 1972).

A partir dessas observações foi possível identificar o isolado como *Aspergillus* sp. Características similares foram observadas por Sari, Setyaningsih, Wibowo (2017) ao descrever fungos isolados de folhas de palmeiras, que após análise molecular identificou o isolado como *A. flavus*. O método clássico de identificação de fungos se faz através da observação das características morfológicas, especialmente as estruturas reprodutivas (sexuais e assexuais) observadas nos preparos microscópicos. O conhecimento das características micro e

macroscópicas permite agrupar a maioria dos fungos filamentosos em níveis taxonômicos (MELO; REIS; DA SILVA, 2011).

Nesse sentido, é importante destacar que a identificação baseada apenas nos aspectos morfológicos, embora seja muito utilizada pode levar a resultados equivocados, principalmente pelo fato de que as características dos fungos em desenvolvimento podem mudar consideravelmente dependendo do substrato e das condições que estão expostos. Por isso, faz-se necessário associar o método convencional de identificação com técnicas moleculares para se chegar a um resultado mais preciso na caracterização de fungos filamentosos (MOURÃO et al., 2017).

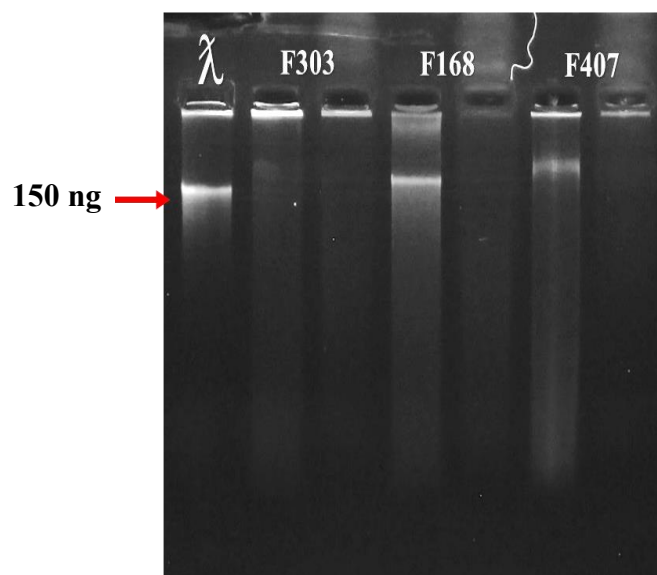
5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Após realização dos procedimentos de extração, amplificação e sequenciamento, foram obtidos os resultados descritos abaixo.

5.3.1 Extração e análise do DNA genômico

Para a identificação molecular, os fungos endofíticos foram inicialmente submetidos a extração de DNA, seguindo o protocolo de extração proposto por De Hoog (2007) com modificações, o qual demonstrou ser eficiente no isolamento do DNA genômico dos fungos endofíticos estudados. Após os procedimentos de extração, o DNA dos isolados foi quantificado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% durante 30 min (Figura 21).

Figura 21 – Perfil eletroforético do DNA genômico extraído dos fungos endofíticos isolados de *A. jahni*. λ : DNA Lambda, F: Fungo seguido do código dos isolados.



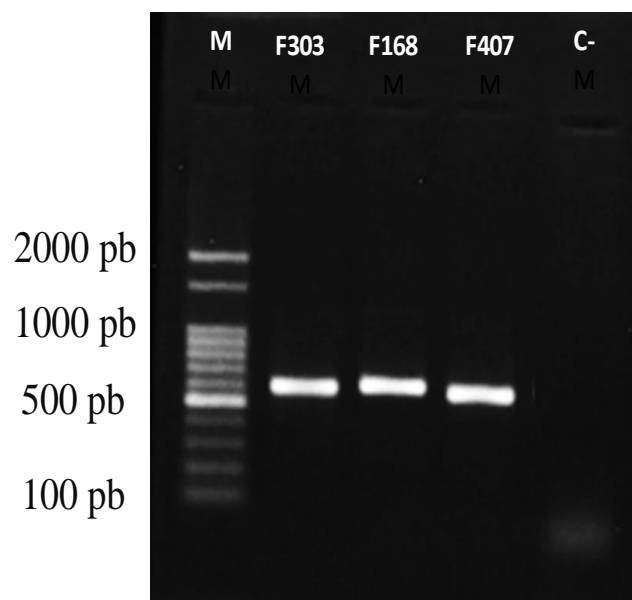
De modo geral o protocolo de extração utilizado mostrou ser eficiente, pois possibilitou o isolamento do DNA genômico de todas as amostras avaliadas. Analisando cada amostra observou-se que os isolados F168 e F407 apresentaram bandas fortes, demonstrando possuir DNA em quantidades necessárias para PCR, quando comparados com o marcador de peso molecular. Por outro lado, o DNA do isolado F303 ficou retido no poço. Em relação a concentração do DNA extraído quantificado em espectrofotômetro a 260/280 nm, notou-se uma variação de 789,12 ng/ μ L a 1022,39 ng/ μ L. E a razão de pureza para os comprimentos de onda de 260/280 nm apresentaram média igual a 1,9.

Segundo Oliveira, Carvalho e Carvalho (2013) uma amostra é considerada pura, isto é, com menor contaminação por proteínas ou resíduos de reagentes oriundos do processo de extração, quando as absorbâncias medidas a 260/280 nm estiver entre 1,7 e 2,0. Baseados nisso, verificou-se após quantificação por espectrofotometria que as extrações realizadas exibiram níveis de pureza dentro do recomendado.

5.3.2 Amplificação por PCR da região *ITS1-5.8S-ITS2*

A amplificação da região *ITS1-5.8S-ITS2* do rDNA dos fungos endofíticos obtida a partir do DNA genômico extraído, inclusive da amostra F303 que não foi vista banda no gel de extração, foi confirmada em gel de agarose 1,2%. De todas as linhagens foram obtidos fragmentos em torno de 600pb. A figura 22 mostra as bandas de amplificação da região *ITS1-5.8S-ITS2* do rDNA dos fungos endofíticos estudados.

Figura 22 – Perfil eletroforético da região *ITS1-5.8S-ITS2* do rDNA de fungos endofíticos de *A. jahni*. M: marcador 100pb. C-: Controle negativo da reação.



Os resultados apresentados estão de acordo com os encontrados na literatura que mostram variação no tamanho do fragmento da região *ITS* obtida de fungos filamentosos. Estudos como o de Shu et al. (2014) utilizaram as regiões *ITS1-5.8S-ITS2* para identificar molecularmente isolados de fungos endofíticos associados a *Hurpezia serrata*. Como resultado da amplificação, obtiveram fragmentos com tamanhos aproximadamente de 600 pb, os quais foram sequenciados e agrupados por similaridade com a espécie *P. notatum*. Da mesma forma Murali et al. (2017) amplificaram a região *ITS* do endofítico *Aspergillus* sp. isolado da planta medicinal *Sida acuta* e observaram a partir do produto de amplificação, bandas em torno de 550 e 600 pb.

De acordo com Rao et al. (2015) as regiões *ITS* dispõem de características interessantes para a identificação de fungos filamentosos em nível molecular. Pois trata-se de uma região que separa os genes 18S e 28S do rDNA e, que pode ser amplificada utilizando iniciadores universais para fungos. Além disso, segundo os autores essas regiões são altamente conservadas entre organismos da mesma espécie, mas variável entre espécies distintas o que possibilita distinção ao nível específico. No entanto, alguns estudos indicam que esta região apenas não tem resolução suficiente identificação em nível específico de alguns gêneros (RAJA et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2016).

5.3.3 Identificação molecular dos isolados

A partir das sequências senso e antisense, as quais foram analisadas e alinhadas, a fim de obter a sequência consenso da região *ITS1-5.8S-ITS2* do rDNA, foi feita identificação molecular dos isolados F168, F303, e F407, destes obteve-se fragmentos de 549 pb, 580 pb, e 528 pb, respectivamente.

Após essa análise, cada sequência consenso foi comparada com sequências depositadas no GenBank utilizando a ferramenta BLASTn. Com base nos resultados obtidos foi possível identificar todos os isolados a nível de espécie, conforme apresentado na tabela 4. Os alinhamentos dos melhores *hits* das comparações entre as sequências obtidas e os dados disponíveis no GenBank, são apresentados no APÊNDICES A-J.

Tabela 4- Identificação molecular dos isolados de fungos endofíticos de *A. jahnii*.

Código dos isolados	Identificação morfológica	Identificação molecular	Percentual de identidade	Número de Acesso no GenBank
F303	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma harzianum</i>	99%	MF408400
F168	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium crustosum</i>	100%	KY906186
		<i>Penicillium commune</i>	100%	KX674626
		<i>Penicillium expansum</i>	100%	KX243326
		<i>Penicillium griseofulvum</i>	100%	KX243323
		<i>Penicillium griseoroseum</i>	100%	AY425983
F407	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus flavipes</i>	99%	JX232270
		<i>Aspergillus micronesiensis</i>	99%	KP987080
		<i>Aspergillus frequens</i>	99%	NR_137473
		<i>Aspergillus neoflavipes</i>	99%	EF669614

As linhagens de fungos endofíticos estudadas foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus*, apresentando percentuais de similaridade igual ou acima de 99%, corroborando assim com as observações macro e micromorfológicas dos isolados.

A sequência do isolado F303 apresentou 99% de similaridade com a espécie *Trichoderma harzianum* (MF408400). De acordo com Saravanakumar et al. (2016) esta espécie pode ocorrer amplamente em solos sob vegetação em zonas climáticas diferentes e demonstram ter alta capacidade de se adaptar a vários nichos ecológicos. Os autores em seu estudo sobre diversidade, isolaram espécies de *T. harzianum* de amostras de solo e de rizosfera em diferentes localidades. Da mesma forma Marques et al. (2016) isolaram e identificaram 23 fungos obtidos de solos de cultivo orgânico e vegetação nativa como *T. harzianum*.

O gênero *Trichoderma* compreende fungos de vida livre, encontrados com frequência em solos e em associação com espécies vegetais de clima temperado e tropical (KREDICS et al., 2014). Dentre as linhagens do gênero, a espécie *T. harzianum* tem sido amplamente estudada, devido a sua importância econômica nos setores da indústria e da agricultura, sendo muito utilizada no controle de pragas, na promoção de crescimento vegetal e indução de resistência e produtividade de plantas (JUNGES et al., 2016; MARTINI; ETHUR; DORNELES, 2014). Além disso, estudos relatam o potencial dessa espécie em sintetizar metabólitos secundários com ação antimicrobiana e antifúngica, como no estudo de Guimarães (2016) que avaliaram a ação de metabólitos voláteis e não voláteis de *T. harzianum* sobre o crescimento do fungo patogênico *Cladosporium herbarum*. E após os testes os autores

verificaram que os isolados possuem potencial antifúngico contra este patógeno e podem atuar como agentes de controle biológico.

Jeerapong et al. (2015) isolaram a substância trichoharzianol, a partir de *T. harzianum* e observaram que o composto apresentou atividade antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Por outro lado, Gellen et al. (2014) analisando o potencial farmacindustrial do endófito *T. harzianum*, constataram que a espécie produz substâncias com ação antimicrobiana e antifúngica frente a *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*.

A sequência nucleotídica do isolado F168 apresentou 100% de identidade com as espécies de *P. crustosum* (KY906186), *P. commune* (KX674626), *P. expansum* (KX243326), *P. griseofulvum* (KX243323) e *P. griseoroseum* (AY425983). O fungo *P. crustosum* já foi anteriormente isolado da planta medicinal *Teucrium polium* (HASSAM., 2017) e de bagas de uvas (GUHFFAR et al., 2018). Já as espécies *P. expansum* e *P. griseoroseum* foram isoladas de sementes de árvores florestais (CARDOSO et al., 2007). No entanto, a partir das análises macro e micro morfológicos da colônia, o isolado F168 apresenta características morfológicas com as espécies *P. crustosum* e a *P. commune*, embora esta última espécie seja considerada um patógeno frequentemente isolado do ar (DEMIREL et al., 2017).

O *P. crustosum* é uma espécie de fungo frequentemente encontrado em alimentos, podendo ser isolado de frutas, nozes, queijo e raízes de vegetais (SONJAK et al., 2005). Segundo Santini et al. (2014) a espécie foi descrita pela primeira vez em 1930 por Thom, sendo denominada *P. crustosum*, devido a presença de conídios globosos e a formação de crosta sobre o meio de cultura, após 7 dias ou mais de crescimento. Uma das suas principais características é a produção de metabólitos secundários, entre eles micotoxinas do tipo penitreno, as quais exibem efeitos tóxicos a saúde humana e animal, por meio da ingestão de alimentos contaminados (ANAYA et al., 2012). Alguns estudos têm sido realizados com a espécie, na busca por metabólitos secundários, bem como para biotransformação de produtos naturais. Zeng et al. (2014) em seu estudo de biotransformação, observaram que o endofítico *P. crustosum* foi capaz de biotransformar o composto gentiopicrosídeo um glucosídeo secoiridoide, comum em plantas medicinais. E com isso conseguiram isolar cinco metabólitos com potencial atividade contra células do hepatócito humano.

Fontaine et al. (2015) evidenciaram a produção por *P. crustosum* e por outras espécies do gênero, do composto roquefortina C uma micotoxina encontrada em queijos, mas com baixa toxicidade em células do intestino humano. Outro metabólito secundário identificado foi o 5-hidroxi-7-metoxi-4- metilftalida, sintetizado por uma cultura de *P. crustosum* isolada de grãos de café (VALENTE et al., 2013).

O isolado F407 foi identificado com 99% de similaridade com as espécies *Aspergillus flavipes* (JX232270), *A. micronesiensis* (KP987080), *A. frequens* (NR137473) e *A. neoflavipes* (EF669614), quando comparado com as sequências disponíveis no GenBank. Morfologicamente o isolado F407 é similar a *A. flavipes* e *A. frequens*, estas espécies produzem conídios marrom claro e conidióforos típicos do gênero. Além disso, são observadas vesículas radiadas, hifas hialinas e a produção de pigmentos amarelo difusos no meio e ainda exsudatos ao longo da colônia (HUBKA et al., 2015).

O gênero *Aspergillus* é considerado cosmopolita amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado habitando várias espécies de plantas (EL-SAYED; YASSIN; ALI., 2015). Além disso, várias aplicações biotecnológicas têm sido propostas com espécies do gênero, devido ao seu potencial em produzir metabólitos secundários com atividades biológicas tais como enzimas, micotoxinas, ácidos orgânicos e compostos antimicrobianos (SAMSON et al., 2014). Wei et al. (2017) isolaram a partir de extratos e da cultura sólida de *A. flavipes*, treze novos compostos do grupo das citocalasinas e flavichalasininas. Estes compostos foram avaliados quanto as suas atividades citotóxicas e os autores observaram que os mesmos exibiram ação inibitória moderada, contra células cancerígenas.

Apesar da identificação molecular ter se mostrado uma importante ferramenta para a identificação de fungos filamentosos, algumas adaptações na metodologia são necessárias, como por exemplo o uso de outros marcadores moleculares para diversificar os loci gênicos úteis na caracterização dos táxons, como observado na identificação dos *Aspergillus* e *Penicillium*, que a partir do sequenciamento da região *ITS* não foi possível confirmar as espécies.

Siqueira e colaboradores (2016) mostraram que a região *ITS* não é indicada para identificação em nível específico de *Aspergillus* de importância médica e comercial, ressaltando que é necessária a utilização de outros marcadores no estudo deste grupo. Raja et al. (2017) também mencionam que esta não é adequada para gêneros especiosos, como *Aspergillus* e *Penicillium*, devido à ausência ou mínimo *gap barcode* (limite entre variação intraespecífica máxima e interespecífica mínima) em suas regiões *ITS*.

Apesar da região *ITS* ser reconhecida como um barcode eficiente do subreino Dikarya, há maior sucesso na identificação dos Basidiomycota do que nos Ascomycota (SCHOCH et al., 2012). Nilsson et al. (2008) em seu estudo concluíram que esse filo apresenta baixa variabilidade intraespecífica no locus *ITS* do que a encontrada nos fungos basais. Além disso, os autores sugerem novas abordagens moleculares utilizando outros genes como a subunidade I do gene citocromo oxidase (*COI*) do DNA mitocondrial, para complementar a análise do *ITS* em alguns grupos de fungos. Outros marcadores também são sugeridos, como o fator de

elongação da tradução (*tef1*), subunidade I da RNA polymerase II (RPB1) e Calmodulina (*CaM*) (RAJA et al. (2016).

A partir da revisão de literatura realizada na base de dados Science Finder, ainda não existem estudos relatando o isolamento de fungos endofíticos associados à *A. jahnii*. Por outro lado, no gênero *Annona* são encontrados alguns trabalhos, os quais descrevem o isolamento de fungos endofíticos dos mesmos gêneros estudados. Como no estudo de Silva et al. (2006) que descrevem o isolamento de espécies dos gêneros *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus* de *A. squamosa*. Da mesma forma, Sousa et al. (2013) obtiveram isolados endofíticos de *A. muricata*, sendo identificados como espécies de *A. niger* e *P. italicum*.

5.4 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS FÚNGICOS

Os rendimentos dos extratos obtidas após o primeiro cultivo, variaram entre os meios de cultura e em ambas as temperaturas utilizadas. Vale ressaltar que as temperaturas utilizadas nesse estudo foram escolhidas com base nas condições em que os microrganismos foram isolados. Na tabela 5 estão apresentados os resultados para cada fungo endofítico.

Tabela 5- Rendimento obtido (mg) dos extratos brutos do meio líquido nas temperaturas 18° e 26° C. Onde EF significa extrato fúngico seguido do código da cepa.

Temperatura	Meio de cultura	EFTRIC	EFPEN	EFASP
Extratos 26° C	BDL	99,0 ^{cd}	133,6 ^b	216,7 ^a
	ISP2	122,8 ^{bc}	108,2 ^{bcd}	115,9 ^{bcd}
	AVEIA	72,7 ^{ef}	45,6 ^g	94,7 ^d
	Meio de cultura	EFTRIC	EFPEN	EFASP
Extratos 18° C	BDL	68,3 ^f	12,2 ^j	14,4 ⁱ
	ISP2	88,6 ^{de}	9,9 ^k	19,7 ^h
	AVEIA	2,5 ^l	2,1 ^l	11,7 ^j

As médias dos rendimentos diferiram significativamente pelo teste de Tukey, para $p < 0,05$ (BioEstat 5,0). Letras iguais representam diferenças não significativas entre as médias e letras diferentes representam diferenças significativas entre as médias.

Ao comparar as duas temperaturas podemos observar que os extratos obtidos a 26° C forneceram maiores rendimentos em relação aos extratos à 18° C. De acordo com a literatura isso pode estar relacionado ao fato de que cada microrganismo requer diferentes condições para se desenvolver, por isso a temperatura e o substrato podem ter influenciado na quantidade de biomassa produzida pelos isolados (KUSARI; SPINTELLER, 2011).

Em relação aos extratos, os mais promissores, ou seja, os que produziram maiores rendimentos foram o EFASP (216,7mg) e EFPEN (133,6mg) ambos cultivados em BDL, seguido do EFTRIC (112,8mg) em meio ISP2. Quanto aos meios de cultura nota-se que o meio BDL demonstrou ser o mais eficiente para o cultivo desses fungos endofíticos. No entanto, o meio ISP2 pode ser adotado como um meio intermediário para o cultivo dos mesmos. Por outro lado, o meio AVEIA pode ser considerado o substrato menos indicado para o crescimento desses microrganismos nessas condições de crescimento. Em estudos similares, Shan et al. (2014) utilizaram diferentes meios de cultura para otimizar as condições de cultivo de fungos endofíticos, e constataram que o meio BDL a 25°C foi o mais eficiente para obtenção de metabólitos secundários. Do mesmo modo, Wijeratne et al. (2014) cultivaram fungos endofíticos sob condições controladas para ampliar a busca por compostos bioativos e observaram que os endófitos cultivados no meio BDL produziram mais biomassa e compostos antimicrobianos.

5.5 CULTIVO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS EM ESCALA PREPARATIVA

Após determinação das melhores condições de crescimento, as linhagens em estudo foram submetidas a um segundo cultivo, afim de obter massa suficiente para realização das análises químicas e biológicas (Tabela 6).

Tabela 6- Rendimento obtido (mg) de fungos endofíticos de *A. jahnii* após cultivo em escala preparativa.

Extratos	Meio de cultura	Massa obtida (mg)
EFTRIC	BDL	260,1
EFPEN	ISP2	348,3
EFASP	BDL	390,2

Analisando a tabela 6 podemos observar que os extratos obtidos após o cultivo em escala preparativa forneceram rendimentos satisfatórios, tendo em vista o volume de meio de cultura utilizado. Dentre os extratos o EFASP (390,2 mg) foi o que produziu mais biomassa em relação aos demais.

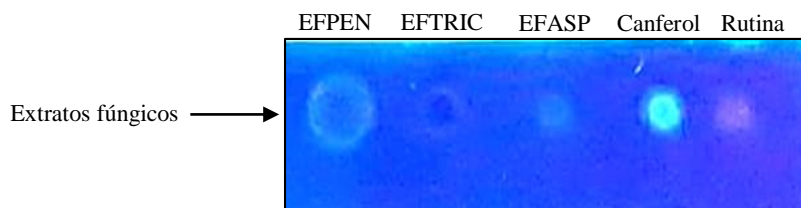
5.6 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A análise por CCD foi realizada com o intuito de avaliar a presença das principais classes de metabólitos secundários nos extratos de fungos endofíticos.

5.6.1 Teste para flavonoides

Após revelação com o reagente NP/PEG, foi possível observar sob luz ultravioleta a 365 nm, algumas manchas com colorações variadas nos extratos (Figura 23).

Figura 23 – Placa cromatográfica revelada com NP-PEG e observada sob luz ultravioleta a 365 nm.

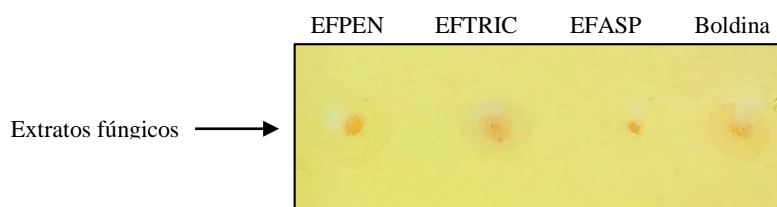


Analisando os resultados adquiridos e comparando-os com os padrões da classe de flavonoides rutina (coloração laranja) e canferol (coloração verde), pode-se observar presença leve desta classe nos extratos EFPEN e EFASP respectivamente.

5.6.2 Teste para alcaloides

A presença da classe de alcaloides nos extratos foi investigada através da revelação com o reagente Dragendorff e comparação com o padrão boldina (Figura 24).

Figura 24 – Placas cromatográficas após revelação com reativo Dragendorff.

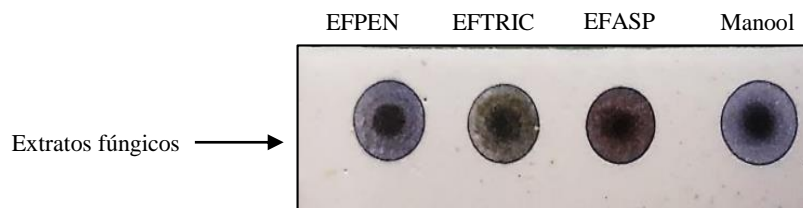


Ao revelar as placas, observou-se a presença de manchas com coloração característica da classe de alcaloides (laranja-marrom) em todos os extratos, variando apenas a intensidade de cor. Os extratos EFPEN e EFTRIC foram os que apresentaram coloração mais intensa indicativa da presença de alcaloides.

5.6.3 Teste para terpenos

A ocorrência da classe de terpenos nos extratos foi analisada após revelação com vanilina sulfúrica ácida, seguida de tratamento térmico e comparação com o padrão manool (Figura 25). Após a revelação química da placa cromatográfica, observou-se que todos os extratos, apresentaram manchas de coloração violeta características da presença forte de terpenos, quando comparados ao padrão de referência.

Figura 25 – Placa cromatográfica revelada com vanilina sulfúrica ácida.



Assim, por meio da análise por CCD, foi possível verificar que os extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de *A. jahnii* possuem potencial em produzir as principais classes de metabolitos secundários. Na Tabela 7 estão listados os resultados de forma organizada.

Tabela 7 – Classes de compostos presentes nos extratos de fungos endofíticos isolados de *A. jahnii*.

Extratos	Flavonoides	Alcaloides	Terpenos
EFTRIC	-	++	+++
EFPEN	+++	++	+++
EFASP	++	+	+++

Presença: leve (+); moderada (++); forte (+++); ausente (-)

A literatura relata a presença de várias classes de compostos em extratos brutos de fungos endofíticos, tais como, alcaloides (LIU et al., 2010), flavonoides (CHENG et al., 2013) e terpenos (SAXENA; MESHRAM; KAPOOR, 2015).

Astuti et al. (2014) analisaram extratos brutos de fungos endofíticos isolados de *Coleus amboinicus* Lour, e verificaram a presença de terpenoides, fenólicos e alcaloides. Bhardwaj et al, (2015) obtiveram resultados similares analisando extratos brutos em acetato de etila com outras espécies do gênero *P. frequentans* associado a *Pinus roxburghii*. A avaliação preliminar

por CCD de extratos em acetato de etila realizada por Patil et al. (2015), revelaram que o fungo endofítico *A. flavus* isolado das folhas de *Aelgle marmelos* sintetizam compostos da classe de flavonoides. Do mesmo modo, El-Moslamy et al. (2017) realizaram uma triagem fitoquímica em extratos de fungos endofíticos do gênero *Trichoderma* sp. e constataram a presença das classes de alcaloides, terpenos, flavonoides, fenóis e taninos sintetizados por essa linhagem.

De acordo com Devi et al. (2012) diferentes endófitos são capazes de produzir diferentes metabólitos secundários, e assim exercem funções distintas na planta hospedeira. Além disso, a produção e a qualidade de compostos sintetizados por fungos endofíticos depende das condições da associação influenciadas pelos fatores bióticos e abióticos da natureza, do meio de cultura utilizado e das condições de cultivo submetidas.

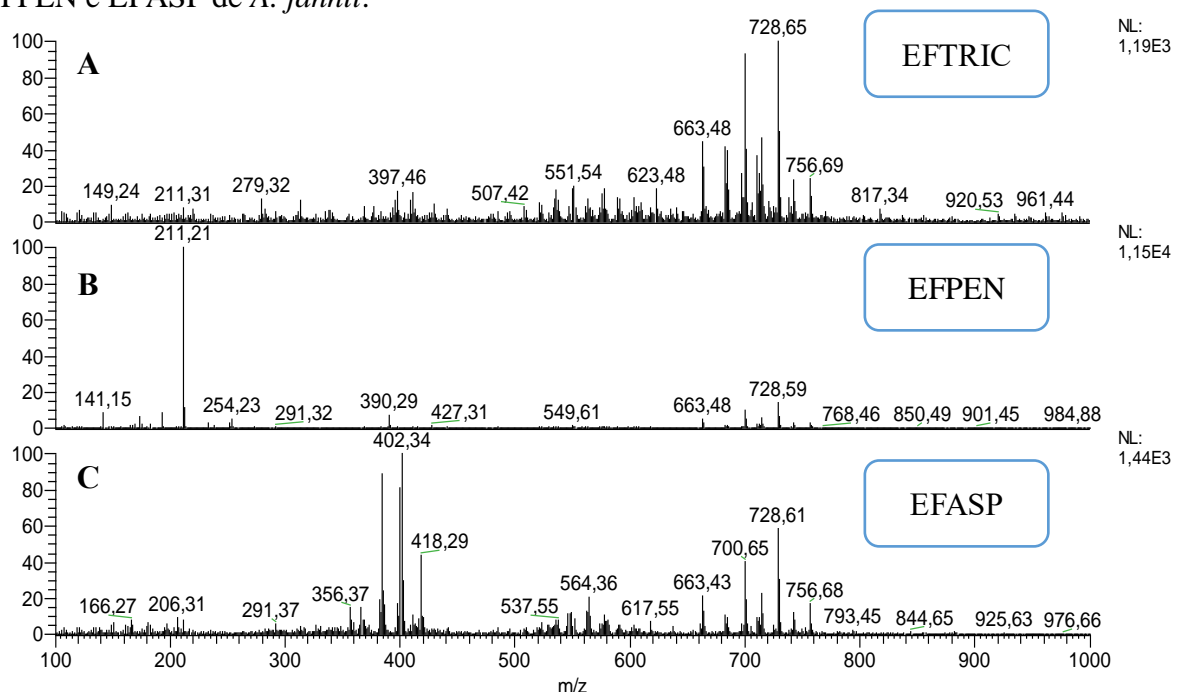
5.7 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os perfis dos extratos fúngicos de *A. jahnii* obtidos por inserção direta por APCI no modo positivo de aquisição estão apresentados a seguir.

5.7.1 Perfil químico dos extratos por Espectrometria de Massas

Analisando os espectros de íons totais dos extratos fúngicos foram verificados perfis distintos entre as amostras. Ao comparar os espectros de massas pode-se observar que o extrato EFASP apresentou uma variedade de íons com boa intensidade em relação aos demais extratos, como apresentado na Figura 26.

Figura 26 – Espectro de massas (APCI-MS no modo [M-H]⁺) dos extratos fúngicos EFTRIC, EFPEN e EFASP de *A. jahnii*.

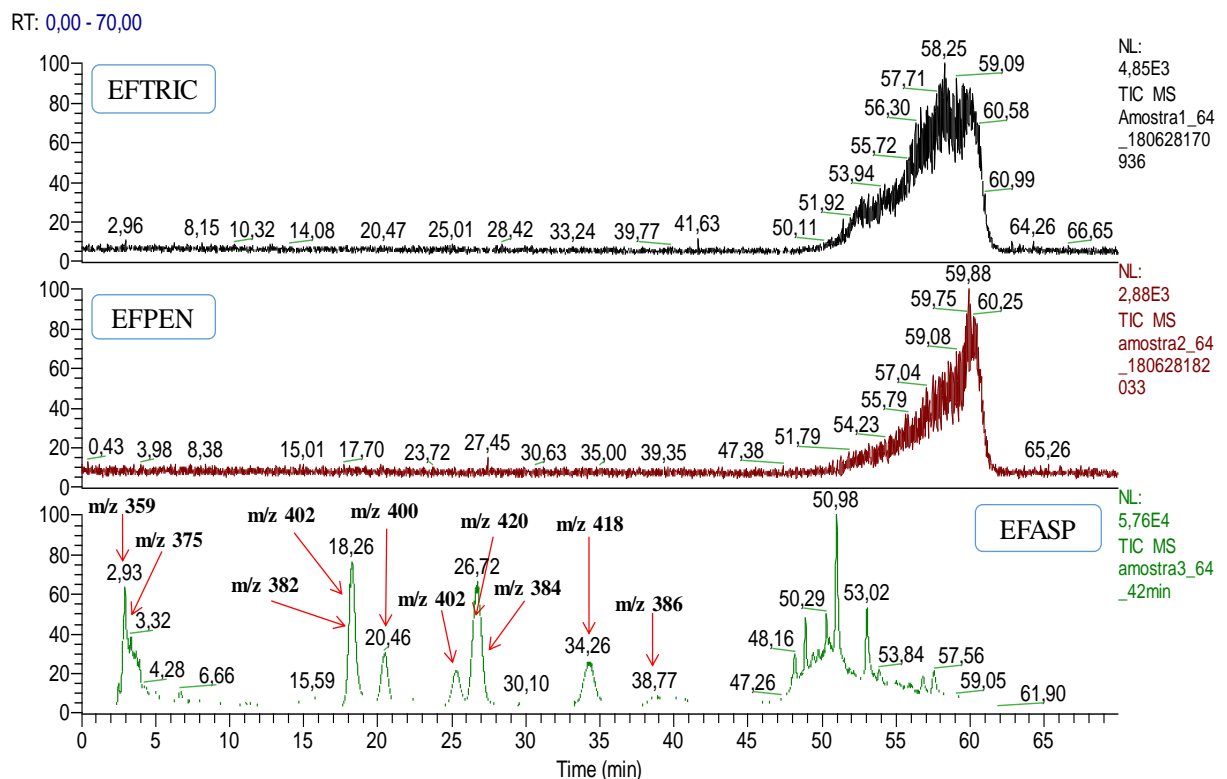


Os resultados da análise dos extratos fúngicos por APCI-MS no modo $[M-H]^+$ revelaram a presença de íons de m/z 756, 728, 700, 663, 564, 418, 402 e 384 no extrato EFASP (Figura 25C), e apenas o íon de m/z 211 com 100% de abundância é observado no extrato EFPEN (Figura 25B). Os íons de m/z 756, 728, 700 e 663 são considerados em comum nos extratos EFTRIC e EFASP, pois são observados variando apenas a abundância em cada extrato. Com o intuito de selecionar o melhor perfil e realizar a purificação, as amostras foram submetidas a análises de CLAE-EM.

5.8 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE) EM ESCALA SEMIPREPARATIVA

A análise dos cromatogramas por CLAE-APCI-EM permitiu observar uma melhor separação para o extrato EFASP em relação aos demais que não exibiram separação efetiva de íons. No cromatograma desta amostra podemos visualizar a separação dos picos os quais estão distribuídos por todo o cromatograma. Analisando a massa carga obtida destes picos obteve-se a presença dos íons majoritários m/z 384, 400, 402, 418 e 420. Os dados cromatográficos confirmam que o extrato EFASP apresenta o melhor perfil de metabolitos secundários em relação aos demais nas condições em que foi realizado, justificando assim o seu fracionamento em escala semipreparativa (Figura 27).

Figura 27 – Cromatogramas de CLAE-APCI-EM dos extratos fúngicos EFTRIC, EFPEN e EFASP de *A. jahnii*.



Com adequação do método em escala semipreparativa foram obtidas 19 frações, cujas codificações estão apresentadas na tabela 8.

Tabela 8- Frações obtidas pela análise em CLAE em escala semipreparativa do extrato EFASP.

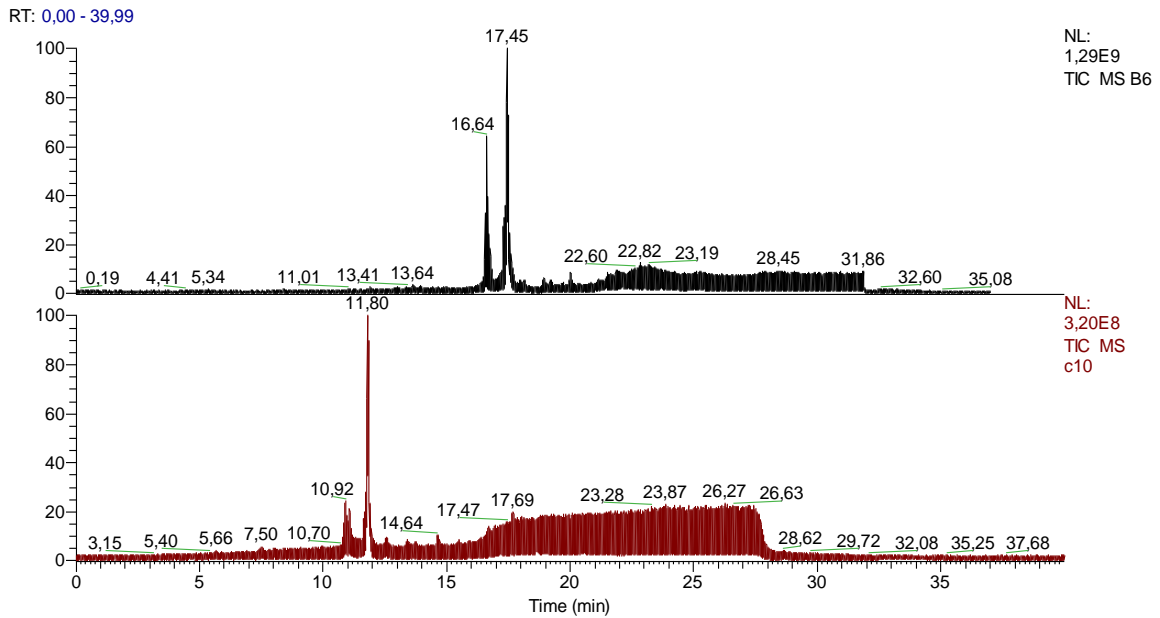
Tempo de retenção (min)	Código	Rendimento (mg)
1,20	Fr1	3,4
2,63	Fr2	3,5
3,60	Fr3	2,0
5,02	Fr4	3,1
6,22	Fr5	0,2
7,18	Fr6	0,9
8,17	Fr7	0,8
9,33	Fr8	6,1
10,12	Fr9	6,8
11,00	Fr10	1,4
11,93	Fr11	1,0
12,86	Fr12	2,5
14,28	Fr13	0,5
15,11	Fr14	1,6
16,06	Fr15	0,8
16,90	Fr16	1,9
16,99	Fr17	3,2
18,49	Fr18	2,1
19,30	Fr19	3,0

Após as análises espectrométricas por *fullscan*, as frações que apresentaram maiores massas (FR1, FR2, FR4, FR8, FR9, FR17, FR18 e FR19) foram submetidas a investigação por CLAE-APCI-EM. Com base nos resultados verificou-se que as frações FR4 e FR17 apresentaram melhor grau de pureza, sendo, portanto, caracterizadas por CLAE-APCI-MS/MS.

5.8.1 Caracterização estrutural por CLAE-APCI-MS/MS das frações obtidas em escala semipreparativa de EFASP

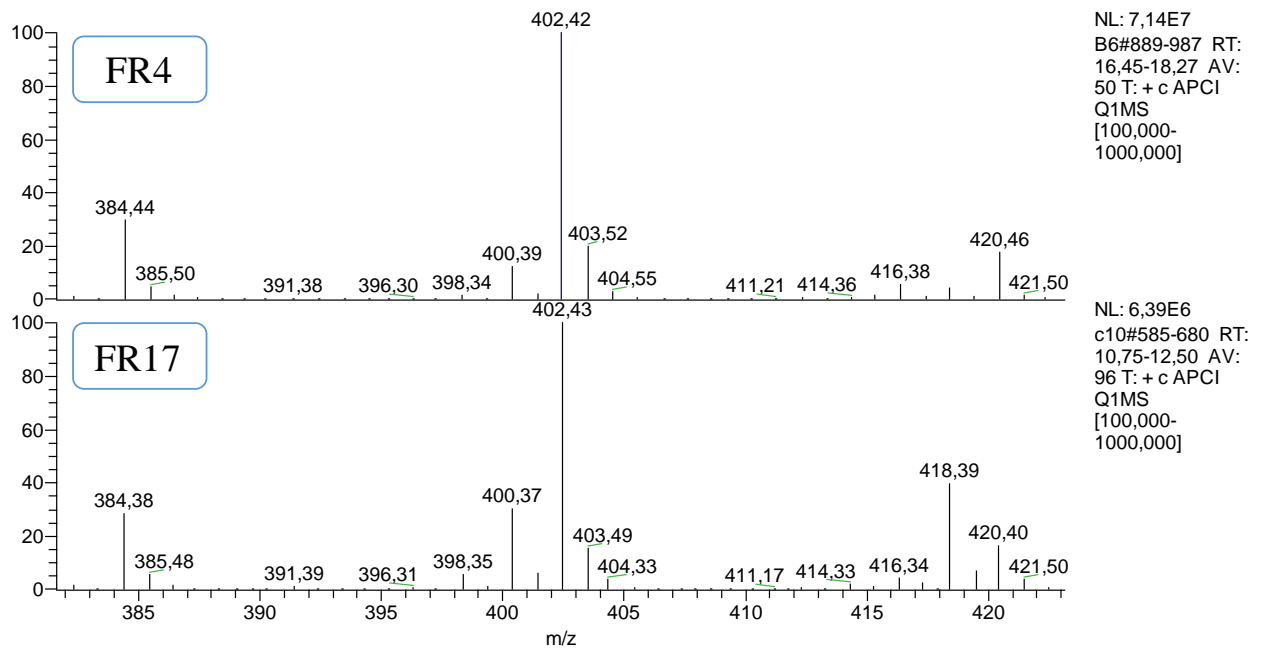
As amostras codificadas FR4 (3,1 mg) e FR17 (3,2 mg) apresentaram-se como um sólido amorfo. As análises por CLAE-APCI-MS demonstraram a presença de dois picos em ambas as amostras evidenciando assim a existência de mistura (Figura 28).

Figura 28 – Cromatogramas de CLAE-APCI-MS das frações FR4 e FR17.



Além disso, foram observados íons com m/z par, em ambas as amostras indicando a possível presença de compostos isoméricos contendo nitrogênio em sua estrutura, destacando os íons m/z 384, 402 e 420 ($[M+H]^+$), conforme apresentado na Figura 29.

Figura 29 – Espectro de massas das frações FR4 e FR17.

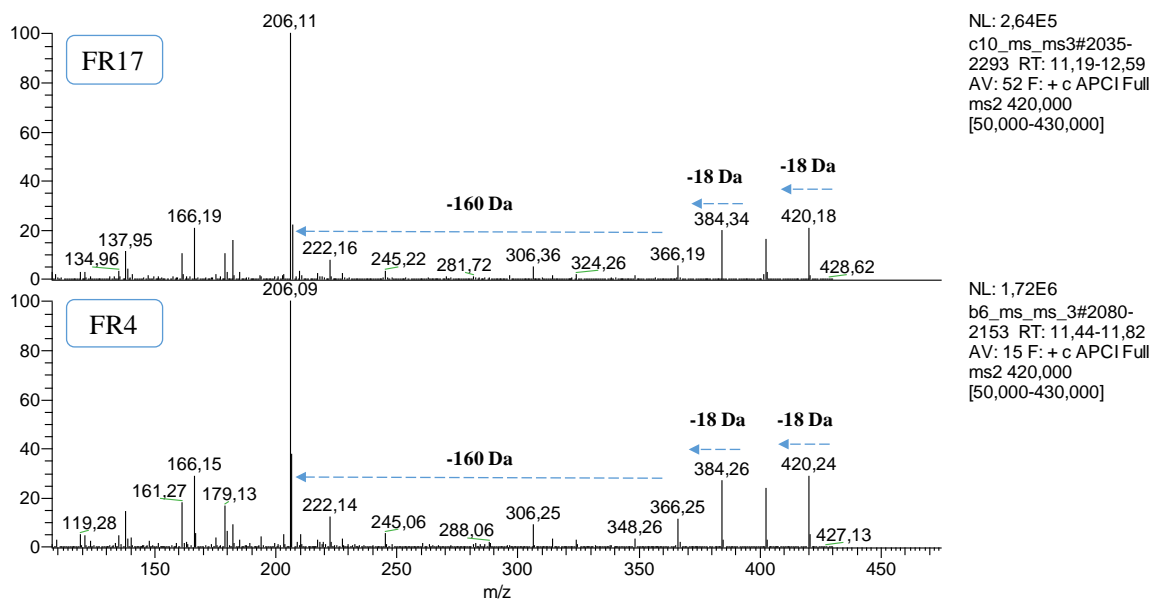


Na literatura o gênero *Aspergillus*, sobretudo a espécie *A. flavipes* tem sido reportado como produtor de compostos nitrogenados, com destaque para as citocalasinas uma importante

classe de metabólitos secundários, com amplas atividades biológicas as quais têm sido isoladas e sintetizadas por esse grupo de organismos (WEI et al., 2017).

Quando submetidas ao experimento de MS/MS, as frações FR4 e FR17 revelaram o mesmo perfil de fragmentação com perdas sequenciais de 18 Da. Normalmente compostos hidroxilados quando submetidos a estudos de fragmentação apresentam perdas de 18 Da, sugerindo a saída de H₂O, seguida de uma elevada perda de 160 Da, resultado no pico *m/z* 206 (Figura 30). Amaral e colaboradores (2017) em seu estudo de fragmentação da substância citocalasina D também observaram perdas iniciais de H₂O.

Figura 30 – Perfil de MS/MS das amostras FR17 e FR4.



Após a caracterização por CLAE-MS/MS, as amostras foram encaminhadas para análise por RMN 1D e 2D para determinação estrutural e está em fase de conclusão.

5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

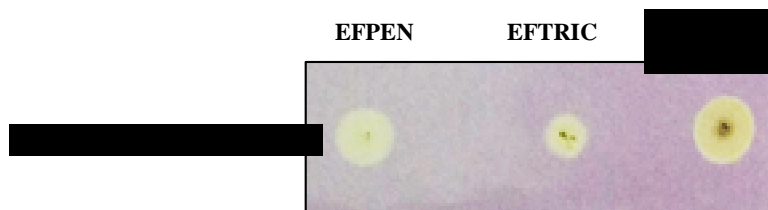
Nesta seção serão apresentados os resultados da atividade antioxidante realizada pelos métodos *in vitro*: sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e pela oxidação do sistema *E*-caroteno/ácido linoleico.

5.9.1 Ação sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).

Por meio da análise qualitativa, foi possível observar que os três extratos fúngicos investigados, exibiram manchas amareladas, características de compostos antioxidantes (Figura

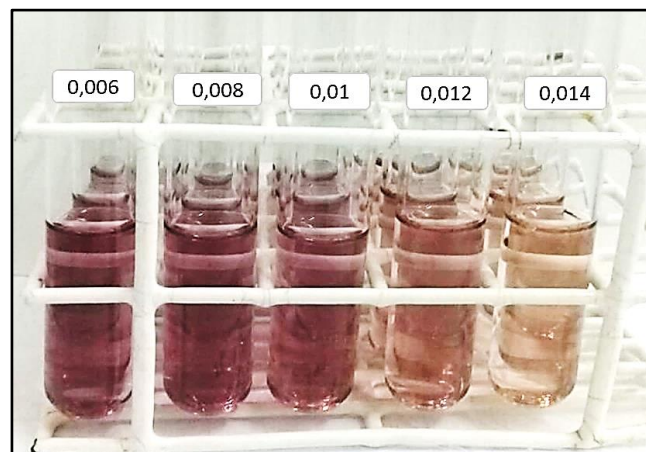
31). Diante do resultado positivo em CCD, as amostras foram submetidas a análise quantitativa para obtenção de seus IC_{50} .

Figura 31 – Análise qualitativa DPPH dos extratos fúngicos após 2 minutos de reação.



Em relação a análise quantitativa, foi possível observar após o período reacional de 40 min o decaimento da coloração do radical DPPH proporcionada pelos extratos fúngicos, evidenciando assim a presença de substâncias antioxidantes. Na Figura 32 é demonstrada a mudança de coloração no extrato EFASP após 30 min de reação.

Figura 32 – Análise do extrato EFASP após 30 minutos de reação com DPPH indicando a concentração das soluções em mg/mL.



As medidas das absorbâncias das soluções amostra, branco e controle, foram medidas em espectrofotômetro a 516 nm, os dados referentes a estas soluções estão organizados na Tabela 9 para o extrato EFASP. Os resultados obtidos para os demais extratos podem ser visualizados nos APÊNDICES K e L respectivamente.

Tabela 9- Dados em triplicata do ensaio da atividade antioxidante do extrato EFASP.

Doseamento do Extrato EFASP com o reativo DPPH					
Volume Pipetado	Concentrações Finais	Absorbâncias 516 nm			Média (Abs ± DP)
30 µL	0,006 mg/mL	0,182	0,168	0,173	0,174 ± 0,007
40 µL	0,008 mg/mL	0,162	0,155	0,156	0,157 ± 0,003
50 µL	0,01 mg/mL	0,133	0,150	0,151	0,144 ± 0,010
60 µL	0,012 mg/mL	0,120	0,123	0,130	0,124 ± 0,005
70 µL	0,014 mg/mL	0,112	0,115	0,101	0,109 ± 0,007
Absorbâncias do Branco					
30 µL	0,006 mg/mL	0,044	0,043	0,044	0,043 ± 0,001
40 µL	0,008 mg/mL	0,043	0,044	0,043	0,043 ± 0,001
50 µL	0,01 mg/mL	0,055	0,046	0,055	0,052 ± 0,005
60 µL	0,012 mg/mL	0,044	0,047	0,044	0,045 ± 0,001
70 µL	0,014 mg/mL	0,056	0,050	0,056	0,054 ± 0,003
Absorbâncias do Controle-DPPH					
	0,244	0,235	0,232		0,237 ± 0,006

*DP = desvio padrão

Com os resultados adquiridos no ensaio foram realizados os cálculos do percentual de atividade antioxidante (%AA) de cada ponto da triplicata (Tabela 10), por meio da fórmula descrita na metodologia de Mensor et al., (2001).

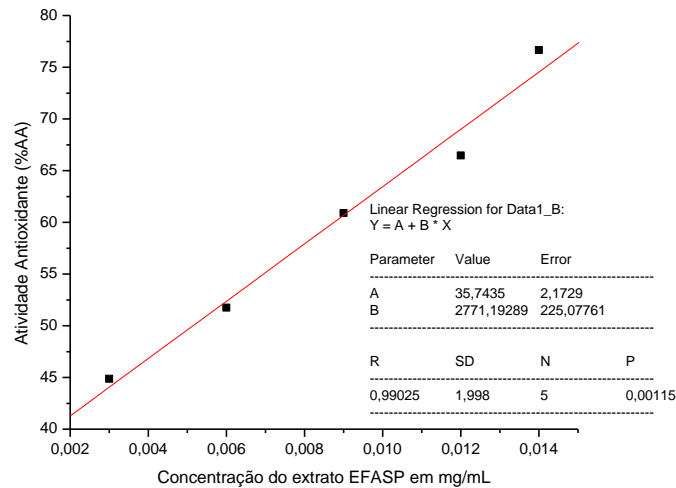
Tabela 10- Percentual de atividade antioxidante do extrato EFASP.

% Atividade Antioxidante					
Volume Pipetado	Concentrações Finais	Percentual de Atividade Antioxidante (%AA)			Média (%AA) (Abs ± DP)
30 µL	0,003 mg/mL	43,44	46,80	44,39	44,87 ^d ± 1,732
40 µL	0,006 mg/mL	51,22	52,76	51,29	51,75 ^{cd} ± 0,869
50 µL	0,009 mg/mL	68,03	55,74	58,93	60,90 ^{bc} ± 6,377
60 µL	0,012 mg/mL	68,85	67,65	62,93	66,47 ^b ± 3,129
70 µL	0,014 mg/mL	77,04	72,34	80,60	76,66 ^a ± 4,143

As médias das atividades antioxidantes diferiram significativamente pelo teste de Tukey, para $p < 0,05$ (BioEstat 5,0). Letras iguais representam diferenças não significativas entre as médias e letras diferentes representam diferenças significativas entre as médias. *DP = desvio padrão.

Por fim, uma curva de calibração foi construída através dos parâmetros concentração (mg/mL) e o percentual de atividade antioxidante (%AA), como ilustrado na Figura 30.

Figura 33 – Curva de calibração do extrato EFASP.



Os resultados para este ensaio são expressos de diversas maneiras, dentre eles o IC₅₀, o qual tem sido muito utilizado, representando a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% (ATMANI et al., 2009). Na Tabela 11 encontram-se os valores da concentração inibitória (IC₅₀) de cada extrato avaliado, bem como os dos padrões de referência utilizados.

Tabela 11- Concentração inibitória (IC₅₀) dos extratos brutos (1mg/mL) de fungos endofíticos.

Extratos fúngicos	DPPH IC ₅₀ (mg/mL)
EFTRIC	0,099 ^a
EFPEN	0,012 ^b
EFASP	0,005 ^c
Padrões	
Trolox	0,011 ^b
BHT	0,006 ^c

As médias da concentração inibitória (IC₅₀) dos extratos brutos diferiram significativamente pelo teste de Tukey, para p<0,05 (BioEstat 5,0). Letras iguais representam diferenças não significativas entre as médias e letras diferentes representam diferenças significativas entre as médias.

Pelo método do sequestro do radical livre (DPPH) nota-se que os extratos apresentaram uma variação em termos de valores de concentração inibitória. Dentre os extratos,

o EFASP e o EFPEN exibiram melhor ação antioxidante, com IC₅₀ igual à 0,005 e 0,012 mg/mL respectivamente, quando comparados ao padrão de referência BHT e Trolox. Ao comparar os resultados obtidos com a literatura, observou-se que o potencial antioxidante proporcionado pelos endófitos de *A. jahnii* são superiores aos encontrados em outros trabalhos.

Khiralla et al. (2015) ao realizarem um estudo sobre o potencial antioxidante de fungos endofíticos associados a plantas medicinais, constataram que o extrato bruto de *Aspergillus* sp exibiu boa ação antioxidante em relação aos demais isolados exibindo IC₅₀ igual a 0,118 mg/mL. Resultados similares foram relatados por Goutam et al. (2017) que determinaram a atividade antioxidante da terreína isolada do endófito *A. terreus*, e constataram que o composto exibiu moderada ação antioxidante com IC₅₀ de 0,112 mg/ml.

Zou et al. (2018), isolaram cinco novas substâncias denominadas aza-epicoccone derivadas do fungo *A. flavipes*, e avaliaram a atividade antioxidante dos compostos pelo método DPPH. Após as análises, os autores relataram que os compostos exibiram significativa ação antioxidante com valores de IC₅₀ igual a 0,04 mg/mL e 0,024 mg/mL respectivamente, quando comparados ao controle positivo Trolox. Do mesmo modo, Dong et al. (2014) isolaram e demonstraram a atividade antioxidante, por DPPH da substância hurpezina A, produzida pelo endófito *T. harzianum* isolado de *Hurpezia serrata*, a qual exibiu em percentuais 50,09% de ação antioxidante.

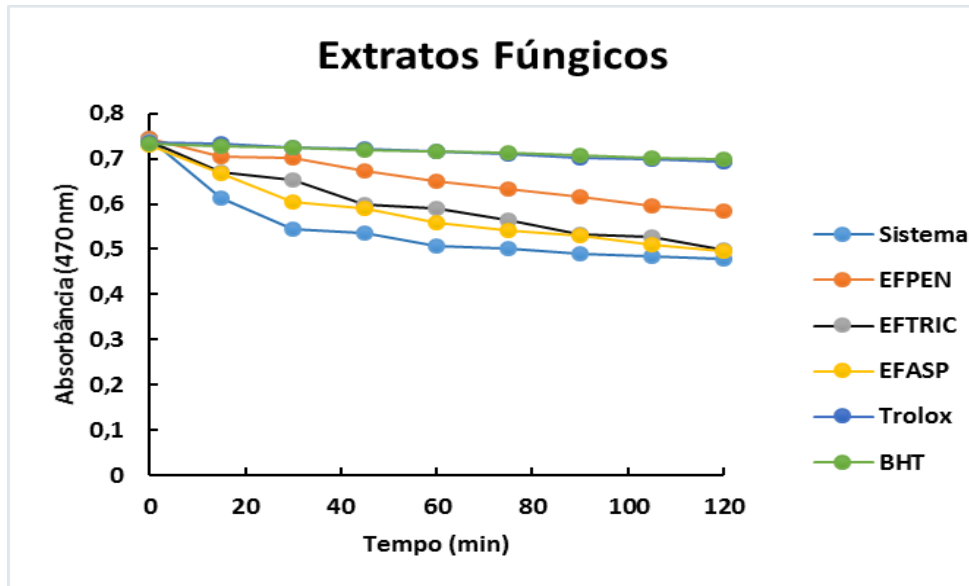
A investigação realizada por Hulikere et al. (2016) revelou que o extrato em acetato de etila da espécie *P. citrinum* associado a macroalga *Sargassum wightii*, exibiu boa atividade antioxidante atribuída ao conteúdo de fenólicos e de flavonoides presentes no extrato com IC₅₀ igual a 0,79 mg/ml. Govindappa et al. (2013) determinaram a atividade antioxidante através de diferentes métodos *in vitro* e observaram que os endófitos *A. niger*, *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp. isolados da hospedeira *Tabebuia argentea*, apresentaram potencial antioxidante com IC₅₀ igual a 2,114 mg/ml, 2,007 mg/ml e 1,899 mg/ml respectivamente em comparação ao controle BHT. Além disso, os autores constaram que esses endofíticos são uma importante fonte de compostos fenólicos com efeito antioxidante via sequestro dos radicais livre DPPH.

5.9.2 Auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante por este método está relacionada com a capacidade de alguns compostos em protegerem ou diminuir a oxidação do β -caroteno. Essa oxidação é provocada pelos radicais livres formados durante a peroxidação do ácido linoleico que atacam o cromóforo

do β -caroteno resultando no clareamento da emulsão reacional (ALVES et al., 2010). Na Figura 33 está apresentada as cinéticas de inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico monitorados em intervalos de 15 min durante 2 horas.

Figura 34 – Cinética da reação da auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico dos extratos dos fungos endofíticos estudados.



O gráfico revela o decaimento da absorbância do sistema pela ausência de substâncias antioxidantes por este método. No entanto para as amostras e padrões observou-se que os mesmos bloquearam a auto-oxidação do β -caroteno, tendo destaque o extrato EFPEN, quando comparado a solução sistema.

O percentual da atividade antioxidante foi calculado conforme a fórmula descrita no item 8.1.2.2, utilizando os valores das absorbâncias em função do tempo de análise. Na tabela 12 estão listados os resultados obtidos dos extratos investigados.

Tabela 12 - Percentual de inibição da auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico dos extratos brutos dos isolados de *A. jahnii*.

Extratos fúngicos	β -caroteno/ácido Linoleico (%)
EFTRIC	10,81
EFPEN	45,94
EFASP	12,95
Padrões	
Trolox	86,74
BHT	89,61

De modo geral, observa-se que as linhagens de fungos endofíticos isoladas de *A. jahnii*, apresentaram uma variação na porcentagem de inibição do sistema β -caroteno/ácido linoleico. Em função desta porcentagem, o extrato EFPEN demonstrou melhor potencial antioxidante com percentual de atividade de 45,94%.

A atividade encontrada no extrato EFPEN, pode estar relacionada a presença de compostos lipofílicos capazes de proteger um substrato lipídico da oxidação, pois segundo Duarte-Almeida et al. (2006) a atividade antioxidante por este método é muito útil especialmente na investigação de antioxidantes com características lipofílicas.

Na literatura alguns trabalhos envolvendo outras espécies de fungos endofíticos dos gêneros estudados, descrevem a atividade antioxidante de extratos utilizando o método β -caroteno/ácido linoleico. No entanto, o potencial antioxidante descritos na literatura são superiores aos obtidos no presente estudo.

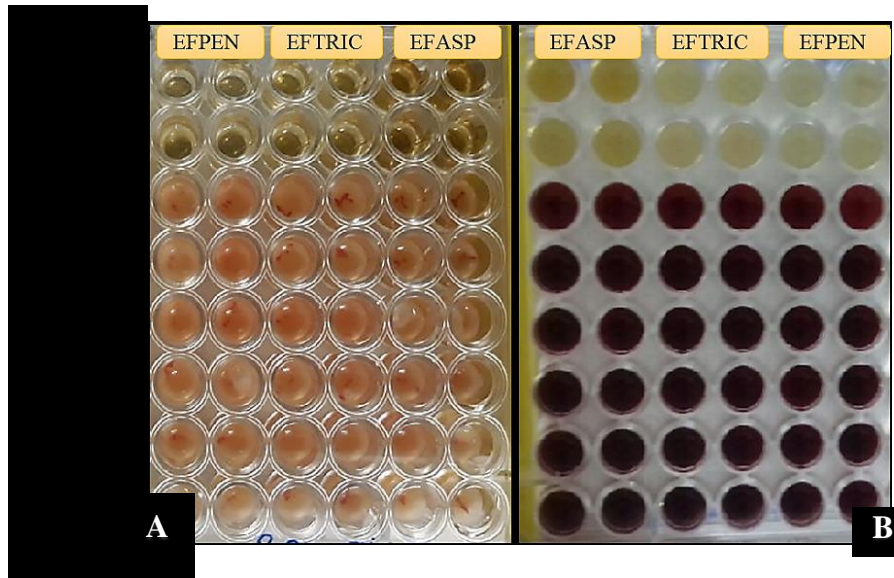
Sadrati et al. (2013) avaliaram a capacidade antioxidante dos fungos endofíticos associados a espécie *Triticum durum*, e observaram que os extratos dos isolados *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. apresentaram potencial antioxidante, com percentuais de inibição de 73,9% e 65,7% respectivamente. Nos estudos de Ramadan et al. (2015) com três diferentes cepas de *Trichoderma*, o percentual de inibição foi igual a 58,96%, 44,85% e 79,55% respectivamente. Do mesmo modo Harikesh et al. (2010) relataram que o extrato de *T. harzianum*, presente em sementes de soja exibiram atividade antioxidante com percentual de 74,61%.

Ravindran et al. (2013) analisaram a atividade antioxidante do fungo endofítico *A. flavus* isolado de três espécies diferentes de plantas, e observaram que os extratos brutos em acetato de etila dessa linhagem de endofítico apresentou boa ação antioxidante expressos em percentuais de 66%, 73%, e 67% respectivamente. Yadav et al. (2014) avaliaram o potencial antioxidante do fungo *A. terreus* isolado de *Eugenia jambolana* e determinaram que o extrato apresenta 63% de potencial antioxidante. Do mesmo modo Sadrati et al. (2013) avaliaram a capacidade antioxidante dos fungos endofíticos associados a espécie *Triticum durum*, e observaram que os extratos dos isolados *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. apresentaram potencial antioxidante, com percentuais de inibição de 73,9% e 65,7% respectivamente.

É importante destacar, os resultados obtidos no método auto-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, embora tenham sido inferiores aos encontrados na literatura, os mesmos contribuem para demonstrar que os extratos dos fungos estudados sintetizam compostos com potencial antioxidante quando avaliados pelos dois métodos empregados.

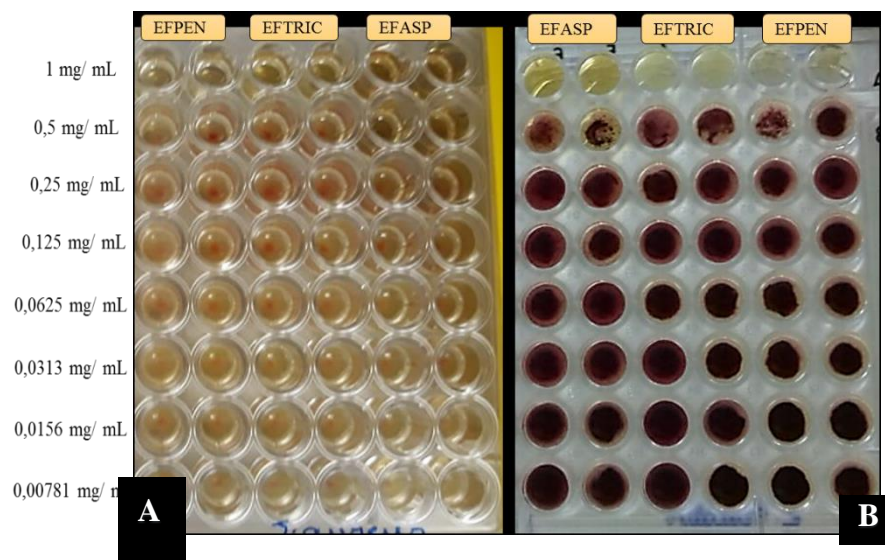
Por outro lado, contra a bactéria *P. aeruginosa* foi possível observar que todos os extratos foram capazes de inibir o crescimento do microrganismo teste, revelando CIM igual a $0,5 \text{ mg/mL}^{-1}$ (Figura 36).

Figura 36 – Teste antibacteriano frente a bactéria gram-negativa *P. aeruginosa*. A) Frente da placa e B) Verso da placa



Na Figura 37 observa-se que os extratos foram ativos contra o patógeno clínico *S. aureus*, sendo a menor concentração observada igual a 1 mg/mL^{-1} .

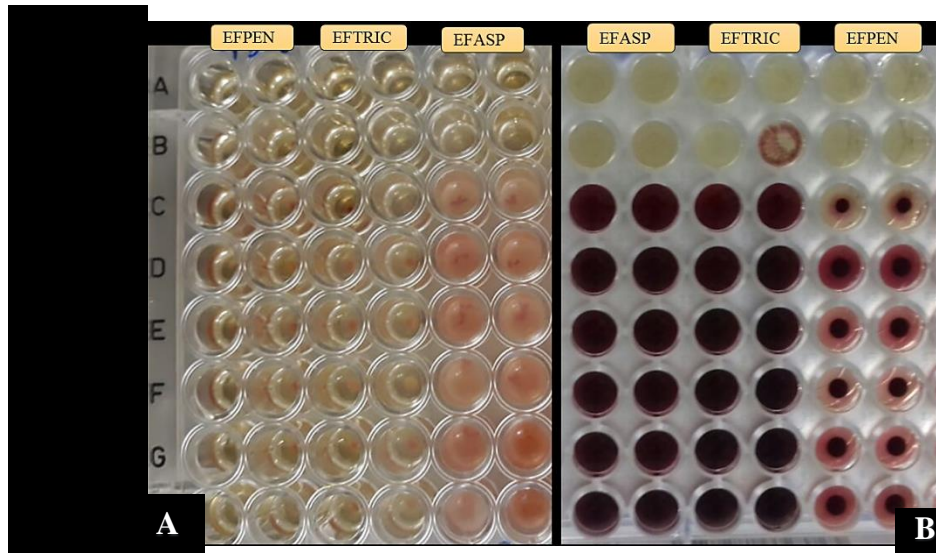
Figura 37 – Teste antibacteriano frente a bactéria gram-positiva *S. aureus*. A) Frente da placa e B) Verso da placa.



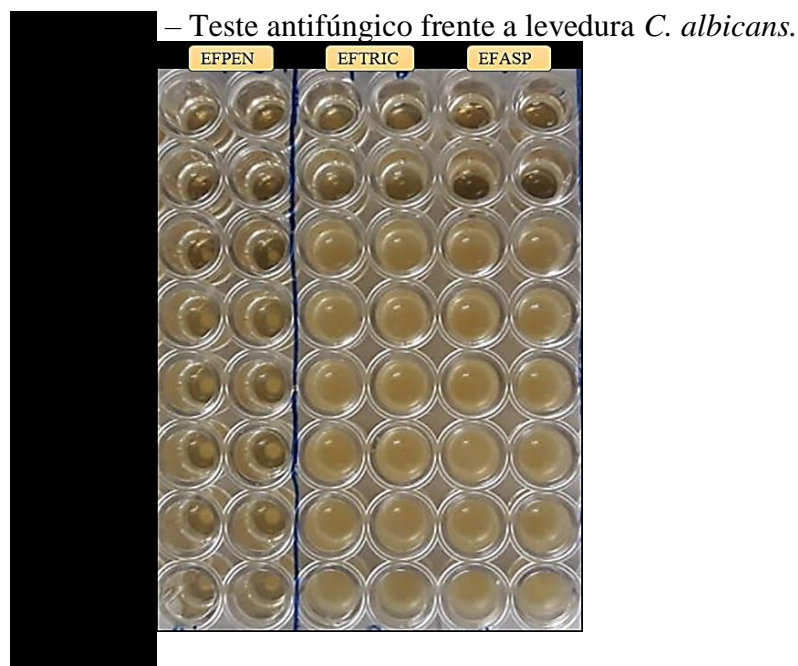
Analisando a figura 38 notou-se que a bactéria gram-positiva *E. faecalis* apresentou sensibilidade a todos os extratos, com destaque para o EFASP e EFPEN que exibiram melhor

ação antimicrobiana na concentração de $0,5 \text{ mg/mL}^{-1}$. Por outro lado, o extrato EFTRIC apresentou ação antimicrobiana com CIM igual 1 mg/mL^{-1} , tendo em vista que em um dos poços na concentração de $0,5 \text{ mg/mL}^{-1}$ houve crescimento microbiano.

Figura 38 – Teste antibacteriano frente a bactéria gram-positiva *E. faecalis*. A) Frente da placa e B) dorso da placa.



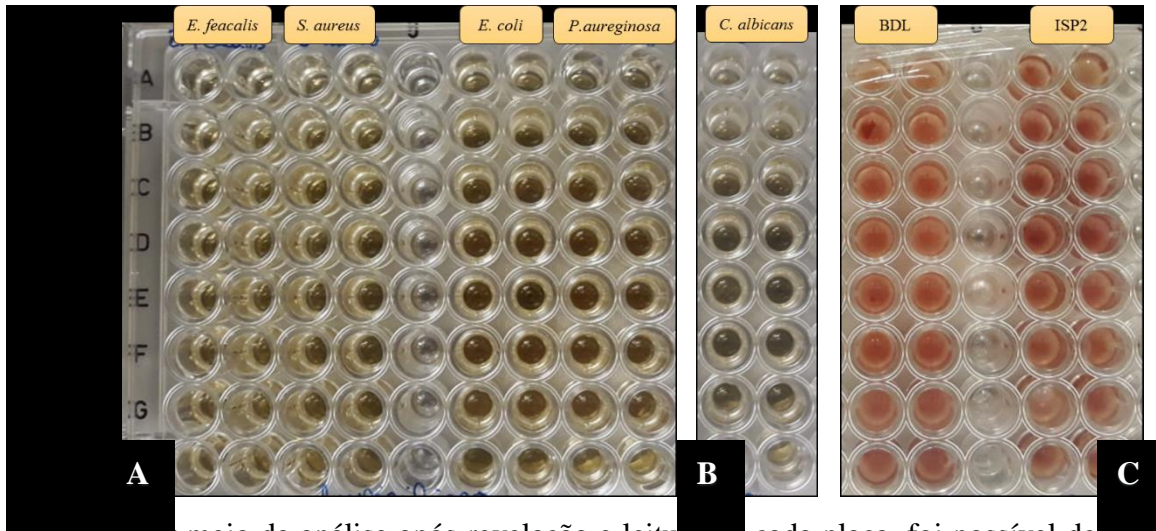
Em relação à análise da atividade contra *C. albicans*, observou-se que os extratos brutos foram capazes de inibir o crescimento do patógeno demonstrando CIM igual a $0,5 \text{ mg/mL}^{-1}$, conforme apresentado na figura 39.



Analisando o desempenho dos antimicrobianos comerciais (ampicilina e fluconazol) utilizados como controles positivos, constatou-se que todos os extratos foram capazes de inibir

o crescimento microbiano em baixas concentrações. Além disso, os meios de cultura e o solvente DMSO 10%), utilizados como controles negativos, não exibiram atividade antimicrobiana, validando assim o teste (Figura 36).

Figura 40 – Placas Elisa com as diluições dos controles positivos e negativos após revelação. A) Ampicilina. B) Fluconazol e C) Meios de cultura.



Por meio da análise após revelação e leitura de cada placa, foi possível determinar a concentração inibitória mínima de cada extrato. Para melhor compreensão, os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 13.

Tabela 13- Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos fúngicos de *A. janhii*.

	<i>E. coli</i>	<i>P. aureginosa</i>	<i>E. feacalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Extratos	CIM (mg.mL ⁻¹)				
EFPEN	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5
EFTRIC	1,0	0,5	1,0	1,0	0,5
EFASP	0,5	0,5	0,5	1,0	0,5
Ampicilina	0,0071	0,0071	0,0071	0,0071	-
Fluconazol	-	-	-	-	0,0071
Meio de cultivo	-	-	-	-	-
DMSO 10%	-	-	-	-	-

(-): Não detectada atividade.

De modo geral os extratos mostraram-se ativos contra os microrganismos testados variando apenas os valores de CIM. Analisando a tabela 13, podemos observar que a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, revelada pelos extratos fúngicos foi de 0,5 mg. mL⁻¹. Em relação aos extratos EFASP demonstrou ser o mais eficiente em relação aos

demais, quando verificado a sua atividade frente ao grupo de bactérias (*E. Coli*, *P. aureginosa*, *E. feacalis*) e levedura (*C. albicans*) com exceção apenas para *S. aureus*, onde a menor concentração observada foi de 1 mg/mL^{-1} semelhante aos outros extratos.

Os critérios para discussão de resultados como valores de referência para o desempenho de antimicrobianos naturais não é consenso entre os pesquisadores, pois alguns consideram somente resultados comparados aos antibióticos padrões, enquanto outros consideram como bom potencial aqueles com níveis de inibição superiores. Ascêncio et al. (2014) utilizaram os seguintes parâmetros para classificação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos. Os extratos que apresentarem CIM com concentrações abaixo de $0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$ são considerados bons inibidores, os que apresentarem CIM entre $0,1$ a $0,5 \text{ mg. mL}^{-1}$, são moderadamente ativos. Já os extratos que exibirem CIM entre $0,5$ e 1 mg. mL^{-1} podem ser interpretados como fracos em termos de potencial de inibição. Baseados nisso, e considerando como referência os valores de CIM encontrados para os fungos endofíticos, podemos inferir que os extratos estudados exibiram fraca atividade antimicrobiana, pois os mesmos exibiram CIM maior ou igual a $0,5 \text{ mg. mL}^{-1}$.

Os dados observados corroboram com os obtidos por Sette (2006) que ao avaliar a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de *Coffea arabica*, e testando-os contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, verificaram que os extratos advindos dos endófitos *T. harzianum* e *A. versicolor* apresentaram fraca ação antimicrobiana com CIM entre $0,5$ e 1 mg. mL^{-1} . Wu et al. (2018) obtiveram resultados similares, ao investigar a capacidade inibitória dos metabólitos secundários do fungo endofítico *P. cataractum* isolado de *Ginkgo biloba* contra *S. aureus*, *P. aureginosa*, *E. coli* e *C. albicans*. Não obstante, Sahani (2017) relataram que os extratos produzidos pelo endófito *Penicillium* sp. isolado de plantas medicinais apresentaram moderada atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *P. aeruginosa*.

A fraca atividade antimicrobiana revelada pelos extratos fúngicos estudados, pode estar relacionada às características diferenciadas de cada patógeno analisado, bem como alterações morfológicas e genéticas ocasionadas por sucessivos repiques. Além disso, em alguns casos os compostos presentes nos extratos ao invés de inibir o crescimento microbiano, proporcionam maior propagação dos mesmos (SOUZA et al., 2004).

Outro fator que dever ser considerado nas análises é o fato de alguns microrganismos apresentarem resistência aos agentes antimicrobianos existentes. Por esse motivo, a busca por novos antimicrobianos naturais, tornou-se o objetivo exclusivamente importante de muitos pesquisadores (PAMPHILE et al., 2017; SPECIAN et al., 2012). Nesse sentido, os compostos produzidos pelo metabolismo secundário de fungos endofíticos são considerados uma fonte

alternativa na busca de novos produtos naturais com ação antimicrobiana (PAMPHILE et al., 2017; SPECIAN et al., 2012).

Portanto, embora os extratos estudados tenham exibido fraca ação antimicrobiana, os compostos produzidos pelo metabolismo secundário dos isolados podem ser considerados uma fonte alternativa na busca de novos produtos naturais, tendo em vista que os mesmos foram capazes de inibir bactérias patogênicas multirresistentes.

6 CONCLUSÕES

Os objetivos propostos neste trabalho foram alcançados e a partir deles foi possível chegar nas seguintes conclusões:

Dos isolados fúngicos de *A. jahnii* estudados apenas o isolado F303 foi identificado a nível específico como *Trichoderma harzianum* (F303). E os isolados F168 e F407 foram identificados a nível de gênero como *Penicillium* sp e *Aspergillus* sp respectivamente.

Em relação a obtenção dos extratos, foi observado que as cepas produziram maiores massas quando cultivados no meio BDL sob a temperatura de 26°C, sendo o extrato EFASP o mais promissor em termos de rendimento.

A investigação por CCD dos extratos brutos revelou a presença de metabolitos secundários pertencentes à classe dos alcaloides, terpenos e flavonoides em todos os extratos avaliados.

A análise por APCI-MS no modo positivo evidenciou que os extratos possuem perfis distintos, sendo o extrato EFASP o que apresentou maior variedade de íons em relação aos demais. As frações oriundas do fracionamento do extrato EFASP realizada por cromatografia líquida em escala semipreparativa levou o isolamento de duas substâncias com características isoméricas e contendo nitrogênio em sua estrutura, devido a presença de íons com carga massa par, indicando pertencer a classe das citocalasinas. No entanto, as substâncias isoladas estão em fase de elucidação por RMN para determinação estrutural.

Quanto a avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH, os extratos EFASP e EFPEN foram os que apresentaram a melhor capacidade em sequestrar o radical livre DPPH. Enquanto que, no método auto-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, apenas o extrato EFPEN exibiu melhor potencial antioxidante.

Em relação a atividade antimicrobiana, constatou-se através dos ensaios que os extratos foram ativos contra as linhagens patogênicas avaliadas, com destaque para o extrato EFASP que apresentou ação antifúngica frente a levedura *C. albicans* e contra os grupos de bactérias com exceção apenas para a cepa *S. aureus*.

Portanto, o estudo de fungos endofíticos associados a espécie *A. jahnii* é de grande importância, pois, contribui para o conhecimento dos microrganismos associados a espécie, e a capacidade que estes têm em produzir metabólitos bioativos de interesse biotecnológico. Logo, os resultados obtidos nesse trabalho são inéditos para seus endófitos e para a espécie *A. jahnii*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA J. R. G. S. et al. Atividade Antioxidante, Citotóxica e Antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, São Paulo, v. 36, n.1, p.258-264, 2014.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMARAL, L. S. Biosynthesis and mass spectral fragmentation pathways of ¹³C and ¹⁵N labeled cytochalasin D produced by *Xylaria arbuscula*. **Journal of mass spectrometry**, Nashville, v. 52, n. 4, p. 239-247, 2017.
- ANAYA, A. M. et al. Neurotoxicity of *Penicillium crustosum* secondary metabolites: tremorgenic activity of orally administered penitrem A and thomitrem A and E in mice. **Journal Toxicon**, Queensland, v. 60, n. 8, p. 1428-1435, 2012.
- ARNOLD, A. E. et al. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. **Mycologia**, Arizona, v. 99, n. 2, p. 185-206, 2007.
- ASCÊNCIO, P. G. M. Chemical Assessment and Antimicrobial and Antioxidant Activities of Endophytic Fungi Extracts Isolated from *Costus spiralis* Roscoe (Costaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 1, [s.n], p. 1-10, 2014.
- ASTUTI, P. et al. Endophytic fungi isolated from *Coleus amboinicus* Lour exhibited antimicrobial activity. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, Teerã, v. 4, n. 2, p. 599-605, 2014.
- ATMANI, D. et al. Antioxidant capacity and phenol content of selected algerian medicinal plants. **Food Chemistry**, Munique, v.112, n.2, p. 303-309, 2009.
- AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from Brazilian tropical host and their biotechnological applications. In: KHARWAR, R. N. **Microbial Diversity and Biotechnology**. India: Springer, 2014. p. 17-22.
- AZOFEIFA, A. S. et al. Relationships between endophyte diversity and leaf optical properties. **Trees**, Heidelberg, v. 26, n. 2, p. 291-299, 2012.
- BALOUIRI, M; SADIKI, M; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. Xi'na, v. 6, n. 1, p. 71-79, 2016.
- BANHOS, E. F. et al. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: Distribution and bioactivity. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n.1, p.153-161, 2014.
- BARLO, V. M. **Árvore Manirito (*Annona jahni*)**. Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/barloventomago/2801067989/>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3. ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1972. 241p.
- BENITES, RSR. Contents of constituents and antioxidant activity of seed and pulp extracts of *Annona coriacea* and *Annona sylvatica*. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 75, n. 3, p. 685-691, 2015.
- BHARDWAJ, A. et al. Antimicrobial and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from spikes of *Pinus roxburghii*. **Archives of Clinical Microbiology**, Londres, v. 6, n. 3, p. 1-9, 2015.
- BONA, E. A. M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.
- BORGES, L. L. et al. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 12, p. 1-20, 2011.
- BÜCKER, A. et al. Larvicidal effects of endophytic and basidiomycete fungus extracts on *Aedes* and *Anopheles* larvae (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 46, n. 4, p.411-419, 2013.
- CALIXTO, C. M. F.; CAVALHEIRO, E. T. G. Penicilina: Efeito do Acaso e Momento Histórico no Desenvolvimento Científico. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 118-123, 2012.
- CARDOSO, P. G. et al. Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungi *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 1, 71-77, 2007.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.
- CHENG, M. J. et al. Secondary metabolites from the endophytic fungus of *Annulohyphoxylon ilanense*. **Chemistry of Natural Compounds**, Nova York, v. 49, n. 3, p. 523-535, 2013.
- CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: CLSI; 2012.
- COLMAN-SAIZARBITORIA, T. et al. Annojahnin from *Annona jahnii*: a possible Precursor of mono-tetrahydrofuran acetogenins. **Phytochemistry**, New York, v. 49, n. 6, p.1609-1616, 1998.
- COLMAN-SAIZARBITORIA, T. et al. Jahonin and asimicin acetogenins from *Annona jahnii* (Annonaceae) Jahonin y Asimicin Acetogenins de *Annona jahnii* (Annonaceae). **Revista Facultad de Farmácia**, Mérida, v. 71, n. 1, p. 48-52, 2008.

- COLMAN-SAZARBITORIA T. et al. nonacin new bioactive nontetrahydrofuran Annona – ceous Acetogenins from the twigs of *Annona Jahni*. **Natural Product Letters**, Philadelphia, v. 14, [s.n.], p.65-75, 1999.
- CONTI, R.; GUIMARAES, D.O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 64, n.3, p.43-47, 2012.
- DE HOOG, G. S. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 58, n. 1, p. 219-234, 2007.
- DEMIREL, R. et al. Indoor airborne fungal pollution in newborn units in Turkey. **Environmental Monitoring and Assessment**, Maine, v. 7, n. 1, p. 189-362, 2017.
- DESALE. M. G.; BODHANKAR, M. G. Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Isolated From *Vitex negundo*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, [S.l.], v. 2, n.12, p.389-395, 2013.
- DEVI, N. N. et al. Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from *Centella asiatica*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Haikou, v. 1, n. 1, p. 1280-1284, 2012.
- DI STASI, L.C. et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, [S.l.], v. 73. n. 1, p.69-91, 2002.
- DONG. LI-HUI. Et al. Identificação de fungos endofíticos produtores de huperzina A isolados de *Huperzia serrata*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Holanda, v. 30, p.1011-1017, 2014.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- EI-MOSLAMY, S. H. et al. Applying Taguchi design and large-scale strategy for mycosynthesis of nano-silver from endophytic *Trichoderma harzianum* SYA.F4 and its application against phytopathogens. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 4, p. 1-23, 2017.
- EL-SAYED, A. S. A. et al. Transcriptional and Proteomic Profiling of *Aspergillus flavipes* in Response to Sulfur Starvation. **Plos One**, Califórnia, v. 10, n. 12, p. 1-21, 2015.
- EMMONS, C. L.; PETERSON, D. M.; PAUL, G. L. Antioxidant capacity of Oat (*Avena sativa* L.) Extracts. 2. In Vitro Antioxidants Activity and Contents of Phenolic and Tocol Antioxidants. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Munique, v.47, n. 2, p.4894-4898, 1999.
- FECHINE, I. M. et al. Alcalóides de *Duguetia trunciflora* Maas (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 12, [s.n.], p.17-19, 2002.

- FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 42, n. 3, p.370-394, 2006.
- FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development-the failure of success? **Nature Biotechnology**, New York, v.24, p.1497-503, 2006.
- FLORENCE, N. T. et al. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 151, n. 2, p.784-790, 2014.
- FONTAINE, K. et al. Occurrence of roquefortine C, mycophenolic acid and aflatoxin M1 mycotoxins in blue-veined cheeses. **Food Control**, Reino Unido, v. 47, n. 1, p. 634-640, 2015.
- FORMAGIO A. S. N. et al. Composition and Evaluation of the Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of the Essential Oil from *Annona sylvatica* A. St.-Hil. **Journal of Medicinal Food**, New York, v. 16, n.1, p.20-25, 2013.
- FREIRE, F. C. O.; VASCONCELOS, F. R.; COUTINHO, I. B. L. Fungos endofíticos: uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade. **Essentia**, Sobral, v. 16, n. 1, p.61-102, 2014.
- GABRIELSON, J. et al. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.] v. 50, n. 1, p. 63-73, 2002.
- GBIF. **O Global Biodiversity Information Facility: GBIF Backbone Taxonomia**, 2013/07/01. Disponível em: <<http://www.gbif.org/species/5407283>>. Acesso em: 09 jan. 2018.
- GELLEN, L. F. A. et al. Potencial Farmacoindustrial de *Trichoderma harzianum* para fins Farmacoterapêuticos. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 4, n. 4, p. 91-96, 2014.
- GOUTAM, J. et al. Isolation and Characterization of “Terrein” an antimicrobial and antitumor compound from endophytic fungus *Aspergillus terreus* (JAS-2) associated from *Achyranthus aspera* Varanasi, India. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. 2, p. 1-12, 2017.
- GOVINDAPPA, M. et al. Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of Crude Endophytes Extracts of *Tabebuia argentea* Bur. & K. Sch. **American Journal of Plant Sciences**, Hubei, v. 4, n. 1, p. 1641-1652, 2013.
- GUHFFAR, S. et al. First Report of Two *Penicillium* spp. Causing Postharvest Fruit Rot of Grapes in Pakistan. **Plant Disease**, Ames, v. 102, n. 5, p. 1-10, 2018.
- GUIMARÃES, D. O. et al. ANTIBIÓTICOS: Importância Terapêutica e Perspectivas Para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- GUIMARÃES, G. R. Ação de metabólitos voláteis e não voláteis de *Trichoderma harzianum* sobre o crescimento de *Cladosporium herbarum*. **Pesquisa Agropecuária**, v. 21, n. 1, p. 7-11, 2016.

HALL, T. A. BioEdit. A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95-98, 1999.

HARIKESH, B. S. et al. Solid-state cultivation of *Trichoderma harzianum* NBRI-1055 for modulating natural antioxidants in soybean seed matrix. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, n. 1, p.6444-6443, 2010.

HASSAM, S. E. Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. **Journal of Advanced Research**, Cairo, v. 8, n. 6, p. 687-695, 2017.

HOWELL, C. R. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, Ames, v. 8, n. 1, p. 4-7, 2013.

HUBKA, V. et al. Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section *Jani* sect. nov. *Mycologia*, Lawrence, v. 107, n. 1, p. 169-208, 2015.

HULIKERE, M. M. et al. Antiangiogenic and antioxidant activity of endophytic fungus isolated from seaweed (*Sargassum wightii*). **Asian Journal of Biochemistry**, Dubai, v. 11, n. 4, p. 168-176, 2016.

INCT- **Herbário Virtual da Flora e do Fungo**. Disponível em: <<http://inct.florabrasil.net/>>. Acesso em: 28 nov. 2016.

JBPML. **Alexander Fleming e a descoberta da penicilina**. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v45n5/v45n5a01.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2016.

JEERAPONG, C. et al. Trichoharzianol, a new antifungal from *Trichoderma harzianum* F031. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Munique, v. 63, n. 14, p. 3704-3708, 2015.

JUNGES, E. et al. *Trichoderma* spp. na Produção de Mudanças de Espécies Florestais. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 237-244, 2016.

KHIRALLA, A. et al. A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants, **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Medellín, v.8, n. 9, p. 701-704, 2015.

KOOLEN, H. H. F. et al. An Antimicrobial Alkaloid and Other Metabolites Produced By *Penicillium* sp. an Endophytic Fungus Isolated From *Mauritia flexuosa* L. f. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 771-774, 2012.

KREDICS, L. et al. Biodiversity of the Genus *Hypocrea*/*Trichoderma* in Different Habitats. In: GUPTA et al. **Biotechnology and Biology of Trichoderma**. Hungary: Elsevier, 2014. p. 1-24.

KUMAR, A. et al. Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. **Plos One**, Austria, v. 8, n. 9, p.1-10, 2013.

- KUMAR, S; STECHER, G; TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**. Oxford, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.
- KUSARI, S. SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Product Reports**, [s.l], v. 28, n. 1, p. 1203–1207, 2011.
- KUSARI, S.; PANDEY, S. P.; SPITELLER, M. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. **Phytochemistry**, New York, v. 91, [s.n.], p.81-87, 2013.
- LEBOEUF, M. et al. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, New York, v. 21, n. 12, p.2783-2813, 1982.
- LI, Y. L. et al. The endophytic fungi of *Salvia miltiorrhiza* Bge. f. alba are a potential source of natural antioxidants. **Botanical Studies**, Taiwan, v. 56, n. 5, p.1-7, 2015.
- LIANG, N.; KITTS, D. D. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. **Molecules**, v.19, p.19180-19208, 2014.
- LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S. BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Chemistry**, Munique, v. 122, n. 3, p.1129-1138, 2010.
- LIMA, L.A.R.S. et al. Avaliação da atividade citotóxica das sementes de *Annona cornifolia* A. St.-Hil. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Planta Medicinai**s, Botucatu, v. 14, n. 4, p.629-634, 2012.
- LIN, T. et al. Three New Triterpenes from *Xylarialean* sp. A45, an Endophytic Fungus from *Annona squamosa* L. **Helvetica Chimica Acta**, Berna, v. 94. n. 2, p.301-305. 2011.
- LIN, X.; LU, C.; SHEN, Y. One New Ten-membered Lactone from *Phomopsis* sp. B27, an Endophytic Fungus of *Annona squamosa* L. **Chinese Journal of Natural Medicines**, Yunnan, v. 6, n. 5, p.391-394. 2008.
- LIU, K. et al. 10-Hydroxycamptothecin produced by a new endophytic *Xylaria* sp., M20, from *Camptotheca acuminata*. **Biotechnology Letters**, Heidelberg, v. 32, n. 1, p. 689-693, 2010.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinai**s no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas. Nova Odessa: Iantaram, 2008.
- MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110235>>. Acesso em: 30 nov. 2016.
- MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**, 12ª ed. São Paulo: Artmed, 2010. 1128 p.

MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; FILHO, E. R. Esteroides produzidos por *Penicillium herquei*, um fungo endofítico isolado dos frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 7, p.1710-1712, 2009.

MARQUES, E. et al. New isolates of *Trichoderma* antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 1-7, 2016.

MARTINI, L. B; ETHUR, L. Z; DORNELES, K. R. Influência de metabólitos secundários de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pelas sementes e na germinação de sementes de Arroz. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 86-91, 2014.

MELLO, S. C. M.; REIS, A.; SILVA, J. B. T. da. **Manual de curadores de germoplasma-micro-organismos: fungos filamentosos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 25 p.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, Naples, v.15, n. 2, p.127-130, 2001.

MIGUEL, M.G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. **Molecules**, Beijing, v.15, p. 9252-9287, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

MOURÃO, D. S. C. et al. Identificação morfológica e molecular de *Curvularia* sp. Agente causal da mancha foliar do milho. **Revista de Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2017.

MULAUDZI, R. B. et al. Pharmacological properties and protein binding capacity of phenolic extracts of some Venda medicinal plants used against cough and fever. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 143, n. 1, p.185-193, 2012.

MURALLI, M. et al. Molecular profiling and bioactive potential of an endophytic fungus *Aspergillus sulphureus* isolated from *Sida acuta*: a medicinal plant. **Pharmaceutical Biology**, Virgínia, v. 55, n. 1, p. 1623-1630, 2017.

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

NHIEM, N. X. et al. New ent-kauranes from the fruits of *Annona glabra* and their inhibitory nitric oxide production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Pennsylvania, v. 25, [s.n.], p.254-258, 2015.

NILSSON, R. H. et al. Intraspecific *ITS* Variability in the Kingdom *Fungi* as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identifi cation. **Evolutionary Bioinformatics**, [S. l], v. 4, n.1, p. 193–201, 2008.

OLIVEIRA, J. S.F; CARVALHO, K. B. A; CARVALHO, E. A. **Protocolo Modificado Para a Extração de DNA de Fungos do Gênero *Pestalotiopsis***. Belém: Embrapa, 2013.

OLIVEIRA, M, C, S. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 38p.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba v.18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PAMPHILE, J.A. et al. Aplicações Biotecnológicas de metabólitos Secundários Extraídos de Fungos Endofíticos: O caso do *Colletotrichum* sp. **Revista Uningá**, Maringá, v. 53, n.1, p. 113-119, 2017.

PATIL, R. H. et al. Isolation and HPTLC Densitometric Analysis of Rutin in the Broth Extract of Endophytic *Aspergillus flavus* from Aegle marmelos. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, Abingdon, v. 4, n. 5, p. 371-376, 2015.

PONTIS, J. A. et al. Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. **Food Science Technology**, [S.l.], v. 34, n.1, p. 69-73, 2014.

PRIHANTINI, A. I.; TACHIBANA, S. Antioxidant compounds produced by *Pseudocercospora* sp. ESL 02, an endophytic fungus isolated from *Elaeocarpus sylvestris*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Hainan, v. 6, n. 12, p.1691-1700, 2016.

PURI, S. C. et al. The endophytic fungus *Trametes hirsute* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralinlignans. **Jornal of Biotechnology**, Buenos Aires, v. 122, n. 4, p.494-510, 2006.

RAJA, S. et al. Differential methods of localisation of fungal endophytes in the seagrasses. **Mycology**. Utrecht, v. 7, n. 3, p. 112-123, 2017.

RAMADAN, M. M. et al. Biotechnological production of volatile and non-volatile antioxidant compounds from fermented soy bean meal with *Trichoderma* sp. Research **Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, [s.l.], v. 5, n. 6, p. 537-547, 2013.

RAO, H. C. Y. et al. Molecular profiling and antimicrobial potential of endophytic *Gliomastix polychroma* CLB32 inhabiting *Combretum latifolium* Blume. **Mycology**, Utrecht, v. 6. n. 3, p. 176-181, 2015.

RAVINDRAN, C. et al. Antioxidants in mangrove plants and endophytic fungal associations. **Botânica Marina**, Berlin, v. 55, n. 1, p. 269-279, 2012.

REDE SPECIES LINK. Disponível em: <<http://inct.splink.org.br/>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

RIBEIRO, L. A. A. et al. O Ácido (8)17,12E,14-labdatrieno-18-óico (labdano302), diterpeno tipo labdano isolado de *Xylopiya langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxa a traquéia isolada de cobaia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17 n. 2, p.197-203, 2007.

RODRIGUES, I. M. C. et al. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. **Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 507-513, 2009.

RODRIGUEZ, R. J. et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, Cambridge, v. 182, n. 2, p. 314-330, 2009.

ROSA, L. H. et al. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. **FEMS Microbiology Ecology**. Wrexham, v. 73, n. 1, p. 178–189, 2010.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas no Sistema β -caroteno/Ácido Linoleico. **Comunicado Técnico on line Embrapa**, 2006.

SADRATI, N. et al. Screening of Antimicrobial and Antioxidant Secondary Metabolites from Endophytic Fungi Isolated from Wheat (*Triticum Durum*). **Journal of Plant Protection Research**, [s.l], v. 53, n. 2, p. 128-136, 2013.

SAHANI, K. Antibacterial Activity of Endophytes from Selected Medicinal Plants. **International Journal of Advanced Research**, Vishakhapatnam, v. 5, n. 3, p. 2076-2086, 2017.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2. Ed New York: Cold Spring Harbor Press, 2001. 2344 p.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 78, n. 1, p. 141-173, 2014.

SANTINI, A. et al. *Penicillium* strains isolated from Slovak grape berries taxonomy assessment by secondary metabolite profile. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 30, n. 4, p. 213-220, 2014.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALANTINO, M. L. F. Foliar flavanoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, New York, v. 55, n. 6, p.567-557, 2000.

SANTOS, L. S et al. A interação harmônica entre fungos e plantas: Aspectos da relação endófito/hospedeiro. **SaBios: Revista Saúde e Biologia** v.8, n.1, p.92-101, 2013.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 2, p.199-212, 2011.

SARAVANAKUMAR, K. et al. Biodiversity of *Trichoderma* Community in the Tidal Flats and Wetland of Southeastern China. **Plos One**, Califórnia, v. 21, n. 12, p. 1-18, 2016.

SARI, S. L. A.; SETYANINGSIH, R.; WIBOWO, N. F. A. Isolation and screening of cellulolytic fungi from *Salacca zalacca* leaf litter. **Biodiversitas**, Surakarta, v. 18, n. 3, p. 1282-1288, 2017.

SAXENA, S; MESHRA, V. KAPOOR, N. *Muscodor tigerii* sp. nov.-Volatile antibiotic producing endophytic fungus from the Northeastern Himalayas. **Annals of Microbiology**, Milão, v. 65, n. 1, p. 47-57, 2015.

SCHOCH, C. L. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi Conrad L. **PNAS**, [S. l], v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012.

SETTE, L. D. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Holanda, v. 22, n. 1, p. 1185-1195, 2006.

SHU, S. et al. Identification of a novel endophytic fungus from *Huperzia serrata* which produces huperzine A. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Holanda, v. 30, n.12, p. 3101-3109, 2014.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVA, R. L. O. et al. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilica**. Campus Pampulha, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SILVEIRA, L. M. S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 9. n. 2, p. 49-01, 2009.

SIMONETTI, E. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Campinas, v.18, n.1, p.9-18, 2016.

SIQUEIRA, J. P. et al. Species diversity of *Aspergillus* section *Versicolores* in clinical samples and antifungal susceptibility. **Fungal Biology**. Oxford v. 120, n. 11, p. 1458-1467, 2016.

SMITH, N. et al. **Flowering plants of the Neotropics**. Princeton: Princeton University Press, 2004. 18 p.

SONJAK, S. et al. Comparison of secondary metabolite production by *Penicillium crustosum* strains, isolated from Arctic and other various ecological niches. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 53, n. 1, p. 51-60, 2005.

SOUSA, K. A. O. et al. Estudo do Potencial de Fungos Endofíticos No Controle Do Agente Causal da Fusariose Em Tomateiro. **Agroecossistemas**, [s.l], v. 5, n. 1, p. 50-55, 2013.

SOUZA, A. Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnoscogens bentham*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34. n. 2. p.185-195. 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2008. 703 p.

SPECIAN, V. et al. Chemical Characterization of Bioactive From the Endophytic Fungus *Diaporthe helianthi* Isolated From *Luehea divaricata*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 2, n.1, p. 1174-1182, 2012.

SPECIAN, V. et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Paraná, v. 16, n. 4, p. 345-351, 2014.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 4, p.491-502, 2003.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para a determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Paraná, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

SUN, S. et al. Isolation of three new annonaceous acetogenins from Graviola fruit (*Annona muricata*) and their anti-proliferation on human prostate cancer cell PC-3. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Pennsylvania, v. 26, n.17, p.4382–4385, 2016.

TAKAHASHI, J. A. et al. Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos, Novos Aliados. **Revista Virtual de Química**, São Paulo, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

TELES, M. N. O. et al. Alkaloids from leaves of *Annona salzmannii* and *Annona vepretorum* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 61, [s.n.], p.465-469, 2015.

VALENTE, A. M. et al. Production of 5-hydroxy-7-methoxy-4-methylphthalide in a culture of *Penicillium crustosum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 2, p. 487-496, 2013.

VASUNDHARA, M.; BARANWAL, M.; KUMAR, A. *Fusarium tricinctum*, an endophytic fungus exhibits cell growth inhibition and antioxidant activity. **Indian Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 56, n. 4, p.433-438, 2016.

VEGA, M. R. G. et al. Flavonoids from *Annona dioica* leaves and their effects in Ehrlich carcinoma cells, DNA-topoisomerase I and II. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 18, n. 8, p.1554-1559, 2007.

WANG, Q. X. et al. Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum*. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 82, n. 5, p.777-81, 2011.

WANG, W. et al. Cytochalasins Produced by the Coculture of *Aspergillus flavipes* and *Chaetomium globosum*. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 81, n. 7, p. 1578-1587, 2018.

WEI, G. et al. Flavichalasin A–M, cytochalasin alkaloids from *Aspergillus flavipes*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. IN: INIS, M. A (ed). **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WIJERATNE, E. M. et al. Thielavialides A-E, nor-spiro-azaphilones, and a bis-spiro-azaphilone from *Thielavia* sp. PA0001, an endophytic fungus isolated from aeroponically grown *Physalis alkekengi*. **Journal of Natural Products**, [s.l], v. 77, n. 1, p. 1467-1472, 2014.

WU, Y. Y. et al. An endophytic Fungi of *Ginkgo biloba* L. produces antimicrobial metabolites as potential inhibitors of FtsZ of *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**, [S.l.], v. 128. n. 2, p.265-271, 2018.

YADAV, M. et al. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Medellin, v. 7, n. 1, p.256-S261, 2014.

YU, H. et al. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, Umbria, v. 165, [s.n.], p. 437-449. 2010.

YUNianto, P. et al. Alkaloid (Meleagrine and Chrysogine) from endophytic fungi *Penicillium* sp. of *Annona squamosa* L. **Pakistan Journal of Biological Science**, Faisalabad, v. 17. n. 5, p.667-674. 2014.

ZENG, W. L. et al. Microbial Biotransformation of Gentiopicroside by the Endophytic Fungus *Penicillium crustosum* 2T01Y01. **Applied and Environmental Microbiology**, Bayreuth, v. 80, n. 1, p. 184-192, 2014.

ZHANG, Y. et al. Alkaloids Produced by Endophytic Fungi: A Review. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 7, n. 7, p. 963-968, 2012.

ZHAO, J. et al. Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Gliomastix murorum* associated with the medicinal plant *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, Beijing, v. 6, n. 11, p. 2100-2104, 2012.

ZHAO, J. et al. In vitro antioxidant activities and antioxidant enzyme activities in HepG2 cells and main active compounds of endophytic fungus from *Pigeon pea* [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Food Research International**, Amsterdam, v. 56, [s.n.], p.243-251, 2014.

ZOU, S. et al. Azacoccones A-E, five new aza-epicoccone derivatives from *Aspergillus flavipes*. **Fitoterapia**, [s.l], v. 124, n. 1, p. 127-131, 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE A – BLASTN com o “Query” do isolado F168.

Penicillium crustosum strain Tp.3F small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. Length: 604, Score: 1007 bits, Expect: 0.0, Identities: 545/545 (100%), Gaps: 0/545 (0%).

```

Query 2      TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTG 61
          |||
Sbjct 38      TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTG 97

Query 62     TTTATTTTACCTTGTTGCTTcggcgggcccgcccttaactggcgccggggggcttacgcc 121
          |||
Sbjct 98     TTTATTTTACCTTGTTGCTTcggcgggcccgcccttaactggcgccggggggcttacgcc 157

Query 122    cccgggcccgcgcccgcgAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTG 181
          |||
Sbjct 158    CCCGGGCCCGCGCCCGCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTG 217

Query 182    AAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGA 241
          |||
Sbjct 218    AAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGA 277

Query 242    ACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA 301
          |||
Sbjct 278    ACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA 337

Query 302    ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCC 361
          |||
Sbjct 338    ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCC 397

Query 362    TCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGG 421
          |||
Sbjct 398    TCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGG 457

Query 422    CAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGC 481
          |||
Sbjct 458    CAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGC 517

Query 482    CCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG 541
          |||
Sbjct 518    CCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG 577

Query 542    GATAC 546
          |||
Sbjct 578    GATAC 582

```

APÊNDICE B – BLASTN com o “Query” do isolado F168.

Penicillium commune strain 2.5.4.5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Length: 819, Score: 1007 bits, Expect: 0.0, Identities: 545/545 (100%), Gaps: 0/545 (0%).

```

Query  2      TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTG  61
      |||
Sbjct  83      TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTG  142

Query  62      TTTATTTTACCTTGTTGCTTcggcgggcccgcccttaactggcgcgccccgggcttacgcc  121
      |||
Sbjct  143     TTTATTTTACCTTGTTGCTTCCGGCGGGCCCGCCTTAAGTGGCCGCGGGGGGCTTACGCC  202

Query  122     cccgggcccgcgcccgcgAAGACACCCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTG  181
      |||
Sbjct  203     CCCGGGCCCGCGCCCGCGAAGACACCCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTG  262

Query  182     AAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCCGGCATCGATGAAGA  241
      |||
Sbjct  263     AAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCCGGCATCGATGAAGA  322

Query  242     ACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA  301
      |||
Sbjct  323     ACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA  382

Query  302     ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC  361
      |||
Sbjct  383     ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCC  442

Query  362     TCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCGATCTCCGGGGACGGGCCCGAAAGG  421
      |||
Sbjct  443     TCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCGATCTCCGGGGACGGGCCCGAAAGG  502

Query  422     CAGCGGCGGCACCGGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGC  481
      |||
Sbjct  503     CAGCGGCGGCACCGGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGC  562

Query  482     CCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG  541
      |||
Sbjct  563     CCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG  622

Query  542     GATAC   546
      ||||
Sbjct  623     GATAC   627

```

APÊNDICE C – BLASTN com o “Query” do isolado F168.

Penicillium expansum isolate G10 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. Length: 624, Score: 1007 bits, Expect: 0.0, Identities: 545/545 (100%), Gaps: 0/545 (0%).

```

Query  2   TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTG  61
      |||
Sbjct  47   TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTG  106

Query  62   TTTATTTTACCTTGTGCTTcggcgggcccgcccttaactggcgcgccccgggcttacgcc  121
      |||
Sbjct  107  TTTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAAGTGGCCCGGGGGCTTACGCC  166

Query  122  cccgggcccgcgcccgcgAAGACACCCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTG  181
      |||
Sbjct  167  CCCGGGCCCGCGCCCGGAAGACACCCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTG  226

Query  182  AAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGA  241
      |||
Sbjct  227  AAAATATAAATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGA  286

Query  242  ACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA  301
      |||
Sbjct  287  ACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA  346

Query  302  ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCC  361
      |||
Sbjct  347  ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCC  406

Query  362  TCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGG  421
      |||
Sbjct  407  TCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGG  466

Query  422  CAGCGGCGGCACCGCTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGC  481
      |||
Sbjct  467  CAGCGGCGGCACCGCTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGC  526

Query  482  CCGGCCGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG  541
      |||
Sbjct  527  CCGGCCGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG  586

Query  542  GATAC  546
      |||
Sbjct  587  GATAC  591

```

APÊNDICE D – BLASTN com o “Query” do isolado F168.

Penicillium griseofulvum isolate 2159A internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. Length: 578, Score: 1007 bits, Expect: 0.0, Identities: 545/545 (100%), Gaps: 0/545 (0%).

```

Query 2   TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTG 61
          |||
Sbjct 1   TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTG 60

Query 62  TTTATTTTACCTTGTTGCTTcggcgggcccgcccttaactggccgccccgggggcttacgcc 121
          |||
Sbjct 61  TTTATTTTACCTTGTTGCTTcggcgggcccgcccttaactggccgccccgggggcttacgcc 120

Query 122 cccgggcccgcgcccgcgAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTG 181
          |||
Sbjct 121 CCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTG 180

Query 182 AAAATATAAATTATTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCCGGCATCGATGAAGA 241
          |||
Sbjct 181 AAAATATAAATTATTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCCGGCATCGATGAAGA 240

Query 242 ACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA 301
          |||
Sbjct 241 ACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA 300

Query 302 ACGCACATGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCC 361
          |||
Sbjct 301 ACGCACATGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCC 360

Query 362 TCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCGATCTCCGGGGACGGGCCCGAAAGG 421
          |||
Sbjct 361 TCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCGATCTCCGGGGACGGGCCCGAAAGG 420

Query 422 CAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGC 481
          |||
Sbjct 421 CAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGC 480

Query 482 CCGGCCGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG 541
          |||
Sbjct 481 CCGGCCGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG 540

Query 542 GATAC 546
          |||
Sbjct 541 GATAC 545

```

APÊNDICE E – BLASTN com o “Query” do isolado F168.

Penicillium griseoroseum strain VIC 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Length: 594, Score: 1007 bits, Expect: 0.0, Identities: 545/545 (100%), Gaps: 0/545 (0%).

```

Query 2      TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTG 61
          |||
Sbjct 13     TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTG 72

Query 62     TTTATTTTACCTTGTTGCTTcggcgggcccgcccttaactggccgccccggggggttacgcc 121
          |||
Sbjct 73     TTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCGGGGGGCTTACGCC 132

Query 122    cccgggcccgcgcccgcgAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTG 181
          |||
Sbjct 133    CCCGGGCCCGCGCCCGCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTG 192

Query 182    AAAATATAAATTATTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCCGGCATCGATGAAGA 241
          |||
Sbjct 193    AAAATATAAATTATTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCCGGCATCGATGAAGA 252

Query 242    ACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA 301
          |||
Sbjct 253    ACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGA 312

Query 302    ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCC 361
          |||
Sbjct 313    ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCC 372

Query 362    TCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGG 421
          |||
Sbjct 373    TCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCCGAAAGG 432

Query 422    CAGCGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGC 481
          |||
Sbjct 433    CAGCGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGC 492

Query 482    CCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG 541
          |||
Sbjct 493    CCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG 552

Query 542    GATAC 546
          |||
Sbjct 553    GATAC 557

```


APÊNDICE F – BLASTN com o “Query” do isolado F303.

Trichoderma harzianum isolate CTCCSJ-A-GS23109 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, complete sequence. Length: 581, Score: 992 bits, Expect: 0.0, Identities: 543/546 (99%), Gaps: 0/546 (0%).

```

Query  32  CTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGT  91
      |||
Sbjct  13  CTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGT  72

Query  92  GCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCTAAAACCTTATTGTATA  151
      |||
Sbjct  73  GCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCTAAAACCTTATTGTATA  132

Query  152  CCCCCTCGCGGGtTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAA  211
      |||
Sbjct  133  CCCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAA  192

Query  212  AATGAATCAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCG  271
      |||
Sbjct  193  AATGAATCAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCG  252

Query  272  AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA  331
      |||
Sbjct  253  AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA  312

Query  332  TTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACC  391
      |||
Sbjct  313  TTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACC  372

Query  392  CCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATA  451
      |||
Sbjct  373  CCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATA  432

Query  452  CAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTATTTGCACACTCGCATCGGGAGCG  511
      |||
Sbjct  433  CAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGGAGCG  492

Query  512  CGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAAGTAGG  571
      |||
Sbjct  493  CGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGG  552

Query  572  AATACC  577
      |||
Sbjct  553  AATACC  558

```

APÊNDICE G – BLASTN com o “Query” do isolado F407.

Aspergillus flavipes strain SGE23 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Length: 559, Score: 977 bits, Expect: 0.0, Identities: 538/542 (99%), Gaps: 0/542 (0%).

```

Query 1      CGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGTCCTCGTGGCCCAACCTCCCACCCGTGACTACTGT 60
          |||
Sbjct 1      CGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGTCCTCGTGGCCCAACCTCCCACCCGTGACTACTGT 60

Query 61     ACCACTGTTGCTTcggcgggcccgcagcctagctggccgcgggggcttctgccccg 120
          |||
Sbjct 61     ACCACTGTTGCTTCCGGCGGGCCCGCCAGCCTAGCTGGCCGCCGGGGGGCTTCTGCCCCCG 120

Query 121    ggccccgcgcccgcggAGACCCCAACACGAACACTGTTTCTGAAAGCCTGTATGAATCCG 180
          |||
Sbjct 121    GGCCCCGCGCCCGCGGAGACCCCAACACGAACACTGTTTCTGAAAGCCTGTATGAATCCG 180

Query 181    ATTCTTTGTAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAG 240
          |||
Sbjct 181    ATTCTTTGTAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAG 240

Query 241    AACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTT 300
          |||
Sbjct 241    AACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTT 300

Query 301    GAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTACTGC 360
          |||
Sbjct 301    GAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTACTGC 360

Query 361    CCTCAAGCCCGGCTTGTATTGGGTCCCTCGTCCCCCGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGG 420
          |||
Sbjct 361    CCTCAAGCCCGGCTTGTATTGGGTCCCTCGTCCCCCGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGG 420

Query 421    CGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGCAGGCCCGGCC 480
          |||
Sbjct 421    CGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCC 480

Query 481    GGCGCCAGCCCACGCAGATCATCcttttttCAGG-TGACCTCGGATCACGTAGGGAT-C 538
          |||
Sbjct 481    GGCGCCAGCCCACGCAGATCATCCTTTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAC 540

Query 539    CC 540
          ||
Sbjct 541    CC 542

```

APÊNDICE H – BLASTN com o “Query” do isolado F407.

Aspergillus micronesiensis strain DTO 266-D3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Length: 731, Score: 977 bits, Expect: 0.0, Identities: 538/542 (99%), Gaps: 2/542 (0%).

```

Query 1   CGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGTCCTCGTGGCCCAACCTCCCACCCGTGACTACTGT 60
          |||
Sbjct 66   CGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGTCCTCGTGGCCCAACCTCCCACCCGTGACTACTGT 125

Query 61  ACCACTGTTGCTTcggcgggcccgccagcctagctggccgccccgggggcttctgcccccg 120
          |||
Sbjct 126  ACCACTGTTGCTTCCGGCGGGCCCGCCAGCCTAGCTGGCCCGGGGGGCTTCTGCCCCCG 185

Query 121  ggccccgcgccccgcggAGACCCCAACACGAACACTGTTTCTGAAAGCCTGTATGAATCCG 180
          |||
Sbjct 186  GGCCCGCGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTTTCTGAAAGCCTGTATGAATCCG 245

Query 181  ATTCTTTGTAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAG 240
          |||
Sbjct 246  ATTCTTTGTAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAG 305

Query 241  AACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTT 300
          |||
Sbjct 306  AACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTT 365

Query 301  GAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTACTGC 360
          |||
Sbjct 366  GAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTACTGC 425

Query 361  CCTCAAGCCCGGCTTGTATTGGGTCCCTCGTCCCCCGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGG 420
          |||
Sbjct 426  CCTCAAGCCCGGCTTGTATTGGGTCCCTCGTCCCCCGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGG 485

Query 421  CGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGCAGGCCCGGCC 480
          |||
Sbjct 486  CGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCC 545

Query 481  GGCGCCAGCCACGCAGATCATCcttttttCAGG-TGACCTCGGATCACGTAGGGAT-C 538
          |||
Sbjct 546  GGCGCCAGCCACGCAGATCATCCTTTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAC 605

Query 539  CC 540
          ||
Sbjct 606  CC 607

```

APÊNDICE I – BLASTN com o “Query” do isolado F407.

Aspergillus frequens NRRL 4578 ITS region; from TYPE material. Length: 598, Score: 950 bits, Expect: 0.0, Identities: 523/527 (99%), Gaps: 2/527 (0%).

```

Query 16  CGAGTGAGGGTCCTCGTGGCCCAACCTCCCACCCGTGACTACTGTACCACTGTTGCTTcg 75
          |||
Sbjct 1   CGAGTGAGGGTCCTCGTGGCCCAACCTCCCACCCGTGACTACTGTACCACTGTTGCTTCG 60

Query 76  gcgggccccgcagcctagctggccgccccgggggcttctgccccgggccccgcgccccgcg 135
          |||
Sbjct 61  GCGGGCCCCGCGCAGCCTAGCTGGCCGCCGGGGGGCTTCTGCCCCGGGCCCCGCGCCCGCCG 120

Query 136  gAGACCCCAACACGAACACTGTTTCTGAAAGCCTGTATGAATCCGATTCTTTGTAATCAG 195
          |||
Sbjct 121  GAGACCCCAACACGAACACTGTTTCTGAAAGCCTGTATGAATCCGATTCTTTGTAATCAG 180

Query 196  TTAAAAC TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC 255
          |||
Sbjct 181  TTAAAAC TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC 240

Query 256  GATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGC 315
          |||
Sbjct 241  GATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGC 300

Query 316  CCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTACTGCCCTCAAGCCCGGCTT 375
          |||
Sbjct 301  CCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTACTGCCCTCAAGCCCGGCTT 360

Query 376  GTATTGGGTCTCTCGTCCCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGG 435
          |||
Sbjct 361  GTATTGGGTCTCTCGTCCCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGG 420

Query 436  TCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAACCCGCTCTGCAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCCACGC 495
          |||
Sbjct 421  TCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCCACGC 480

Query 496  AGATCATCctttttttCAGG-TGACCTCGGATCACGTAGGGAT-CCC 540
          |||
Sbjct 481  AGATCATCCTTTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACC 527

```

APÊNDICE J – BLASTN com o “Query” do isolado F407.

Aspergillus neoflavipes isolate NRRL 5504 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence. Length: 1133, Score: 942 bits, Expect: 0.0, Identities: 523/527 (99%), Gaps: 3/527 (0%).

```

Query  16  CGAGTGAGGGTCCTCGTGGCCCAACCTCCCACCCGTGACTACTGTACCACTGTTGCTTcg  75
      |||
Sbjct  1    CGAGTGAGGGTCCTCGTGGCCCAACCTCCCACCCGTGACTACTGTACCACTGTTGCTTCC  60

Query  76  gcgggccccccagcctagctggccgccccgggggcttctgccccgggccccgcgccgcg  135
      |||
Sbjct  61  GCGGGCCCCCAGCCT-GCTGGCCGCCGGGGGCTTCTGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCG  119

Query  136  gAGACCCCAACACGAACACTGTTTCTGAAAGCCTGTATGAATCCGATTCTTTGTAATCAG  195
      |||
Sbjct  120  GAGACCCCAACACGAACACTGTTTCTGAAAGCCTGTATGAATCCGATTCTTTGTAATCAG  179

Query  196  TTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC  255
      |||
Sbjct  180  TTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC  239

Query  256  GATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGC  315
      |||
Sbjct  240  GATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGC  299

Query  316  CCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTACTGCCCTCAAGCCCGGCTT  375
      |||
Sbjct  300  CCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTACTGCCCTCAAGCCCGGCTT  359

Query  376  GTATTGGGTCTCTCGTCCCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGG  435
      |||
Sbjct  360  GTATTGGGTCTCTCGTCCCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGG  419

Query  436  TCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGCAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCCACGC  495
      |||
Sbjct  420  TCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCCAGCCCACGC  479

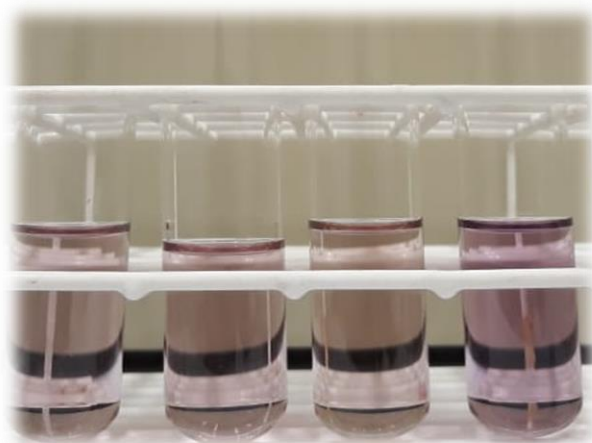
Query  496  AGATCATCctttttttCAGG-TGACCTCGGATCACGTAGGGAT-CCC  540
      |||
Sbjct  480  AGATCATCCTTTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCC  526

```

APÊNDICE K

➤ Análise Quantitativa DPPH – Extrato Fúngico *Trichoderma harzianum* - EFTRIC (1mg/mL)

Ensaio do EFTRIC após 30 minutos (concentração em mg/mL)

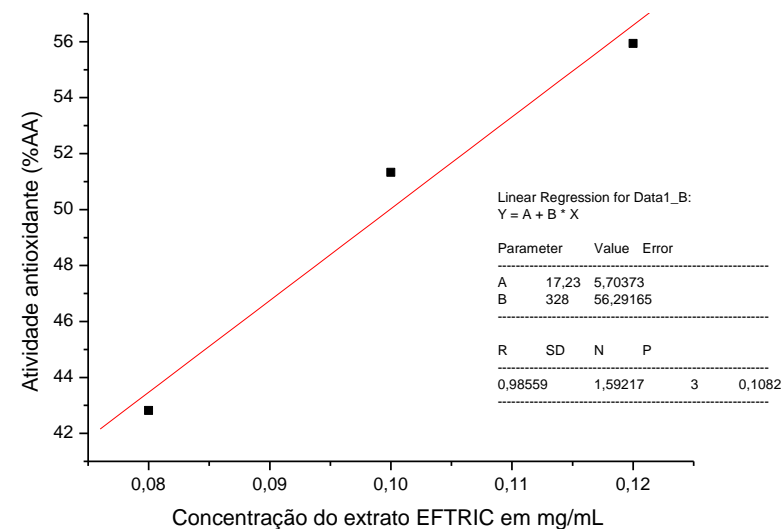


% Atividade Antioxidante					
Volume Pipetado	Concentrações Finais	Percentual de Atividade Antioxidante (%AA)			Média (%AA) (Abs ± DP)
400 µL	0,08 mg/mL	44,15	43,48	42,82	42,82 ^c ± 0,660
500 µL	0,10 mg/mL	51,33	51,77	51,33	51,33 ^b ± 0,250
600 µL	0,12 mg/mL	57,04	56,82	55,94	55,94 ^a ± 0,580

As médias das atividades antioxidantes diferiram significativamente pelo teste de Tukey, para $p < 0,05$ (BioEstat 5,0). Letras iguais representam diferenças não significativas entre as médias e letras diferentes representam diferenças significativas entre as médias.

Doseamento do Extrato EFTRIC com o reativo DPPH

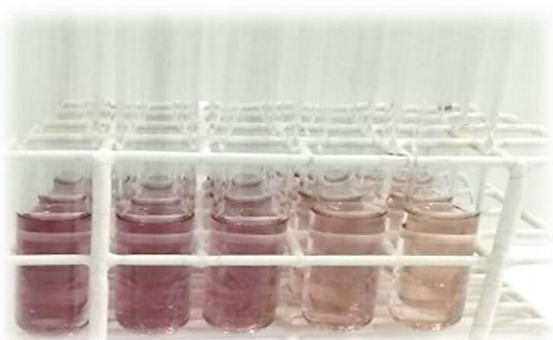
Volume Pipetado	Concentrações Finais	Absorbâncias 516 nm			Média (Abs ± DP)
400 µL	0,08 mg/mL	0,304	0,307	0,310	0,307 ± 0,003
500 µL	0,10 mg/mL	0,273	0,270	0,271	0,271 ± 0,002
600 µL	0,12 mg/mL	0,249	0,250	0,253	0,251 ± 0,002
Absorbâncias do Branco					
400 µL	0,08 mg/mL	0,051	0,053	0,051	0,052 ± 0,001
500 µL	0,10 mg/mL	0,054	0,053	0,052	0,053 ± 0,001
600 µL	0,12 mg/mL	0,054	0,054	0,053	0,054 ± 0,001
Absorbâncias do Controle-DPPH					
		0,453	0,450	0,454	0,452 ± 0,002



APÊNDICE L

➤ Análise Quantitativa DPPH – Extrato Fúngico *Penicilium* sp - EFPEN (1mg/mL)

Ensaio do EFPEN após 30 minutos (concentração em mg/mL)



Doseamento do Extrato EFPEN com o reativo DPPH

Volume Pipetado	Concentrações Finais	Absorbâncias			Média (Abs ± DP)
		516 nm			
25 µL	0,025 mg/mL	0,236	0,210	0,249	0,232 ± 0,019
50 µL	0,010 mg/mL	0,187	0,201	0,197	0,195 ± 0,007
75 µL	0,015 mg/mL	0,146	0,153	0,149	0,149 ± 0,003
100 µL	0,020 mg/mL	0,142	0,151	0,122	0,138 ± 0,014
125 µL	0,025 mg/mL	0,082	0,091	0,082	0,085 ± 0,005
Absorbâncias do Branco					
25 µL	0,025 mg/mL	0,047	0,047	0,048	0,047 ± 0,001
50 µL	0,010 mg/mL	0,044	0,060	0,060	0,060 ± 0,001
75 µL	0,015 mg/mL	0,047	0,046	0,047	0,047 ± 0,001
100 µL	0,020 mg/mL	0,053	0,047	0,045	0,048 ± 0,004
125 µL	0,025 mg/mL	0,047	0,044	0,045	0,047 ± 0,001
Absorbâncias do Controle-DPPH					
		0,260	0,264	0,260	0,261 ± 0,002

% Atividade Antioxidante					
Volume Pipetado	Concentrações Finais	Percentual de Atividade Antioxidante (%AA)			Média (%AA) (Abs ± DP)
25 µL	0,025 mg/mL	27,30	38,25	22,30	29,28 ^d ± 8,157
50 µL	0,010 mg/mL	45,0	46,59	47,30	46,29 ^c ± 1,177
75 µL	0,015 mg/mL	61,92	60,46	60,76	61,04 ^b ± 0,771
100 µL	0,020 mg/mL	65,76	60,60	70,38	65,58 ^b ± 4,489
125 µL	0,025 mg/mL	86,53	82,19	85,76	84,82 ^a ± 2,315

As médias das atividades antioxidantes diferiram significativamente pelo teste de Tukey, para $p < 0,05$ (BioEstat 5,0). Letras iguais representam diferenças não significativas entre as médias e letras diferentes representam diferenças significativas entre as médias.

