



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO BIONORTE

ANÁLISES MOLECULARES DE LINHAGENS SELVAGENS E
MUTANTES DE *Pestalotiopsis* spp. ASSOCIADAS A PLANTAS
E BASIDIOMICETOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA.

Elissandro Fonseca dos Banhos

MANAUS
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO BIONORTE

Elissandro Fonseca dos Banhos

ANÁLISES MOLECULARES DE LINHAGENS SELVAGENS E
MUTANTES DE *Pestalotiopsis* spp. ASSOCIADAS A PLANTAS
E BASIDIOMICETOS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação –
BIONORTE da Universidade Federal do
Amazonas – UFAM, como parte dos requisitos
para obtenção do Título de Doutor na área de
Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza

Co-orientadora: Profª. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza

MANAUS
2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B216a Banhos, Elissandro Fonseca dos
Análises Moleculares de Linhagens selvagens e mutantes de
Pestalotiopsis spp. Associadas a plantas e basidiomicetos da
Amazônia Brasileira. / Elissandro Fonseca dos Banhos. 2016
122 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Afonso Duarte Leão de Souza
Coorientadora: Antonia Queiroz Lima de Souza
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Fungos endofíticos. 2. Pestalotiopsis. 3. Bioatividade. 4. fungo
Amazônico. I. Souza, Afonso Duarte Leão de II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título



63ª ATA DE DEFESA DE TESE

Aos vinte e seis dias do mês de julho de dois mil e dezesseis, às 14:30 horas, no Auditório da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, o doutorando **Elissandro Fonseca dos Banhos**, defendeu sua Tese de Doutorado intitulada **“Análises moleculares de linhagens selvagens e mutantes de Pestalotiopsis spp. associadas a basidiomicetos e plantas da Amazônia Brasileira”**.

Banca de Examinadores:

| Membros | Parecer | Assinatura |
|---|-------------------------------|------------|
| Dr. Afonso Duarte Leão de Souza (UFAM) CPF: 308.958.202-34 | Aprovado (x) Reprovado () | |
| Dr. Edmar Vaz de Andrade (UFAM) CPF: 469.573.751-53 | Aprovado (x) Reprovado () | |
| Dr. João Vicente Braga de Souza (INPA) CPF: 635.939.552-53 | Aprovado (x) Reprovado () | |
| Dr. José Odair Pereira (UFAM) CPF: 742.680.238-87 | Aprovado (x) Reprovado () | |
| Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro (UFAM) CPF: 005152642-53 | Aprovado (x) Reprovado () | |

Manaus (AM), 26 de julho de 2016.

Resultado Final: Aprovado (x)
 Reprovado ()

Prof. Dr. Jair Max Furtunato Maia
 Coordenador Estadual do PPG-BIONORTE/AMAZONAS

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho
 Coordenador Geral do PPG-BIONORTE

DEDICATÓRIA

A minha querida esposa Ariela, que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis de minha vida, e que sempre me incentivou a seguir em frente. E ao meu filho Henrique que me ensinou o sentido da verdadeira alegria e felicidade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza e a Profa. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza, pelo trabalho de orientação realizado, e principalmente por ter contribuído com minha formação enquanto pesquisador.

Aos colegas do Laboratório de Espectrometria de Massas da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Felipe Moura, Elzalina Soares, Richardson, Bruna Ribeiro e Hector Koolen, pelos vários momentos de auxílio e realização das análises e pelos momentos de cumplicidade vividos ao longo do percurso.

Aos colegas do Laboratório de Bioensaios e Microbiologia (LaBMicra) da Central Analítica da UFAM, Sarah Silveira, Adriana Spirotto, Greiciane Andrade, Rachid Filho, Paulo Henrique, Débora Guimarães, Ana Paula, pelos vários momentos de dificuldades que atravessamos juntos, pelo companheirismo demonstrado por várias vezes. Dentre os colaboradores do LaBMicra, um agradecimento especial a Dra. Fátima Almeida que contribuiu de forma decisiva para a execução do trabalho.

Aos colegas da Central Analítica da UFAM que em diferentes momentos me auxiliaram na execução dos variados procedimentos relacionados ao trabalho.

Ao prof. Dr. Spartaco Astolfi, prof. Dr. Edmar Andrade, a profa. Dra. Isabelle Cordeiro, e a Técnica Enedina do laboratório de proteômica da UFAM, que contribuíram de forma decisiva e incansável para a execução da parte do trabalho envolvendo biologia molecular e proteínas.

Aos colegas do programa BIONORTE, Dolores Pinheiro, Andreia Ferreira e Hilton Marcelo, pelos vários momentos de discussões acadêmicas e momentos de descontração ao longo do percurso acadêmico.

À colega Marta Rodrigues do laboratório de genética da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, que sempre contribuiu com as etapas do trabalho.

À profa. Dra. Izeni Pires e ao Técnico Mário Nunes do Laboratório de Evolução e Genética Animal – LEGAL da UFAM, pelo auxílio e pela enorme contribuição com o trabalho.

À Técnica Mila do Laboratório de Microrganismo da Faculdade de Alimentos – UFAM, pelo auxílio ao trabalho nos mais variados momentos.

Ao FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos e FAPEAM – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas, pela bolsa e outros auxílios que viabilizaram o desenvolvimento desse projeto de pesquisa.

RESUMO

Fungos do gênero *Pestalotiopsis* podem ser encontrados como parasitas ou endófitos, sendo bastante disseminados aos diversos habitats. A bioprospecção de *Pestalotiopsis* spp. têm demonstrado o potencial deste gênero na obtenção de compostos bioativos como anticancerígenos e antimicrobianos, isso por conta da diversidade de metabólitos secundários que são capazes de produzir. No trabalho ampliou-se o conhecimento a cerca da genômica, proteômica e metabolômica de linhagens de *Pestalotiopsis* isolados de ambientes Amazônicos. Foram reativadas 33 linhagens do gênero *Pestalotiopsis* da Coleção do LaBMicra da Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Foram avaliadas com relação a sua diversidade morfológica (estrutura de conídios), genética (*Its1* e *Its2/AFLP*), proteica (SDS-PAGE) e seus metabólitos secundários foram avaliados através do perfil químico obtido por espectrometria de massas (APCI-MS). Os metabólitos secundários foram ensaiados frente a células tumorais SKMEL-19, CAL-27, ACP02 e frente a cepa de *C. albicans* CFAM – 1342, associando os resultados ao perfil metabolômico. A linhagem mais promissora foi submetida a mutagênese por indução de luz ultravioleta (UVC). As 33 linhagens de *Pestalotiopsis* spp. foram isoladas de nove gêneros vegetais como *Euterpe* sp., *Gustavia* spp., *Myrcia* sp., *Duguetia* sp., *Rollinia* sp., *Arrabidaea* sp., *Victoria* sp., e *Pinus* sp., além de associadas a Basidiomycetes. As espécies mais representativas foram *P. mangiferae*, *P. microspora* e *P. clavispora*, com oito, sete e seis linhagens respectivamente. Os extratos das linhagens não apresentaram resultado promissor contra nenhuma das células tumorais e nove extratos apresentaram atividade frente a *C. albicans*. O perfil químico avaliado ao longo de 60 dias demonstrou que a linhagem *P. microspora* (P12/AnspCg1.1.3a) isolada de *Rollinia* sp. chega a fase estacionária de crescimento com 20 dias de cultivo, e que o melhor tempo de cultivo para a obtenção dos compostos bioativos é 30 dias. As análises da redução da fonte de carbono, crescimento da massa micelial e pH do meio fortaleceram os resultados do perfil proteico confirmando que a linhagem chega ao ápice metabólico com 25 dias. A produção de linhagens PX mutantes foi eficiente, mas as linhagens não apresentaram atividade anticandida em seus extratos. O perfil de proteínas secretadas também foi modificado com proteínas de 50 a 140kDa sendo expressas com maior intensidade. Através do cultivo em larga escala foi possível a avaliação positiva por bioautografia e por CCDP o isolamento de subfrações que analisadas por RMN de ^1H e ^{13}C revelaram a presença do ácido 3-fenil-propanóico, molécula conhecida por sua função ecológica na proteção da planta hospedeira contra patógenos.

ABSTRACT

Fungi genus *Pestalotiopsis* can be found as parasites or endophytes, being quite disseminated to the various habitats. Bioprospecting of *Pestalotiopsis* spp. have demonstrated the potential of this strains in obtaining bioactive compounds as anticancer or antimicrobial, that due the diversity of secondary metabolites are capable of producing. At work we have expanded knowledge about genomics, proteomics and metabolomics *Pestalotiopsis* strains isolated from Amazonian environments. They were reactivated 33 *Pestalotiopsis* strains of LaBMicra collection of the Federal University of Amazonas - UFAM. Were evaluated about their morphological diversity (conidia structure), genetic (*Its1* and *Its2* / AFLP), protein (SDS-PAGE) and they secondary metabolites were evaluated for chemical profile obtained by mass spectrometry (APCI-MS). Secondary metabolites were tested against tumor cells SKMEL-19, CAL-27, ACP02 and against strain of *C. albicans* CFAM - 1342, associating the results with yours metabolomic profile. The most promising strain was subjected to mutagenesis by UV (UVC) light induction. The 33 strains of *Pestalotiopsis* spp. were isolated from nine plant genera as *Euterpe* sp., *Gustavia* spp., *Myrcia* sp. *Duguetia* sp., *Rollinia* sp., *Arrabidaea* sp. *Victoria* sp., *Pinus* sp., and associated Basidiomycetes. The most representative species were *P. mangiferae*, *P. microspora* and *P. clavispora* with eight, seven and six strain respectively. The extracts did not showed promising results against any of the tumor cells and nine extracts showed activity against *C. Albicans*. The chemical profile assessed over 60 days showed that the strain *P. microspora* (P12 / AnspCg1.1.3a) isolated of *Rollinia* sp. initiates the stationary growth phase of 20 days of cultivation, and the cultivation time best for obtaining bioactive compounds is 30 days. The analyzes of the reduction of the carbon source, growth of mycelial mass and the pH of the fortified protein profile results confirmed that the strain arrive the metabolic apex with 25 days. The production of mutant strains PX was efficient, but the strains did not show anticandida activity in their extracts. The secreted protein profile was also modified proteins of 50 to 140 kDa being expressed with greater intensity. Through large-scale cultivation was possible positive evaluation by bioautography and CCDP isolation subfractions which analyzed by ¹H and ¹³C NMR showed the presence of 3-phenyl-propionic acid molecule known for its ecological role in protecting the host against plant pathogens.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Estrutura química da penicidona A, B e C. 29
- Figura 2-** Estrutura química do Taxol. 33
- Figura 3-** Produção, fracionamento e isolamento de metabólitos de *P. microspora* (P12/ AnspCg1.1.3a). 46
- Figura 4-** *P. mangiferae* P11 (AnspCg1.2.1). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa, e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual. 53
- Figura 5-** *P. microspora* P12 (AnspCg1.1.3a). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual. 53
- Figura 6-** *P. clavispora* P25 (MgRe3.1.1). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual. 54
- Figura 7-** *N. clavispora* P29 (MgCe3.2.3). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual. 54
- Figura 8-** *P. versicolor* P48 (EoR5.2.1 av). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual. 55
- Figura 9-** *P. disseminata* P10 (B5-3). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual. 55
- Figura 10-** *P. neglecta* P17 (EoR7.1.1av). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual. 56
- Figura 11-** *N. formicarum* P36 (Bas1a2.1B). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual. 56
- Figura 12-** *P. camelliae* P03 (GaF3.1.2). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual. 57
- Figura 13-** *P. adusta* P52 (Bas3a3.1). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual. 57

| | |
|--|----|
| Figura 14- Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% do DNA genômico de <i>Pestalotiopsis</i> spp. | 61 |
| Figura 15- Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5 %, com amplificação das regiões <i>Its</i> 1 e 2 de <i>Pestalotiopsis</i> spp. | 62 |
| Figura 16- Dendrograma de Máxima Parcimônia (MP) da relação filogenética para linhagens de <i>Pestalotiopsis</i> spp. | 65 |
| Figura 17- Perfil eletroforético da análise por AFLP de 30 linhagens de <i>Pestalotiopsis</i> spp. | 67 |
| Figura 18- Dendrograma do AFLP para linhagens de <i>Pestalotiopsis</i> spp. avaliadas pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, com coeficiente de Pearson. | 68 |
| Figura 19- Agrupamento das espécies de <i>Pestalotiopsis</i> spp. em função dos perfis de substâncias presentes nos extratos analisados por PCA. C – Resultado do meio de cultivo BDL. | 70 |
| Figura 20- Espectros de massas dos extratos de <i>P. microspora</i> (P12), <i>P. mangiferae</i> (P11) e <i>P. clavispora</i> (P18). Em destaque os sinais que mais influenciaram a separação das três espécies. | 71 |
| Figura 21- Metabólitos de linhagens de <i>Pestalotiopsis</i> cujos possíveis íons $[M+H]^+$ foram observados em linhagens do presente no trabalho. | 72 |
| Figura 22- Dendrograma obtido com a análise por HCA do perfil de substâncias produzidas por <i>Pestalotiopsis</i> spp. | 74 |
| Figura 23 Espectros de massa dos extratos de <i>P. microspora</i> (AnspCg1.1.3a) obtidos nos diferentes tempos de cultivo. | 84 |
| Figura 24 Cromatograma de P12L-3 e P12L-4, frações obtidas a partir do fracionamento do extrato do meio líquido (P12L). | 87 |
| Figura 25 Placa de Bioautografia da fração P12L-3 com halo de inibição frente a <i>C. albicans</i> . Ao lado placa CCD revelada em Luz UV 254, com <i>Rf</i> das zonas de inibição. | 88 |
| Figura 26 Placa de Bioautografia da fração P12M-2 com resultado negativo. Ao lado placa CCD revelada com vanilina ácida mostrando a separação de substâncias. | 89 |
| Figura 27 Espectro de massas da sub-fração P12L-3(3) analisada em modo positivo $[M+H]$ e modo negativo $[M-H]$, com sinais <i>m/z</i> 281 e 313, respectivamente. | 90 |
| Figura 28 Estrutura química do ácido 3-fenil-propanóico ($C_9H_{10}O_2$). | 91 |
| Figura 29 Perfil eletroforético em SDS-PAGE de proteínas secretadas pela linhagem <i>P. microspora</i> (P12/AnspCg1.1.3a) ao longo do tempo. | 92 |

- Figura 30** Perfil eletroforético em SDS-PAGE de proteínas secretadas por nove linhagens de *Pestalotiopsis* spp. 95
- Figura 31** A- Linhagem PX01 em placa contendo meio BDA. B- Microestruturas de conídios da linhagem. 97
- Figura 32** A- Linhagem PX02 em placa contendo meio BDA. B- Microestruturas de conídios da linhagem. 97
- Figura 33** A- Linhagem PX03 em placa contendo meio BDA. B- Microestruturas de conídios da linhagem. 98
- Figura 34** A- Linhagem PX04 em placa contendo meio BDA. B- Microestruturas de conídios da linhagem. 98
- Figura 35** A- Linhagem PX01 em placa contendo meio BDA. B- Microestruturas de conídios da linhagem. 98
- Figura 36** Dendrograma resultante do agrupamento hierárquico UPGMA para linhagens de *P. microspora* e PX, avaliadas por AFLP, com coeficiente de Pearson. 100
- Figura 37** Cromatogramas referentes aos extratos da linhagem selvagem (P12) e as linhagens PX01-PX05. 102
- Figura 38** Perfil eletroforético em SDS-PAGE de proteínas secretadas pelas linhagens PX01- 5 e pela linhagem selvagem *P. microspora* (P12). 104

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-** Box-Plot da análise de variância do (1) Comprimento total da célula mediana (μm). 58
- Gráfico 2-** Box-Plot da análise de variância da (2) Largura da célula mediana (μm). 59
- Gráfico 3-** Box-Plot da análise de variância do (3) Comprimento do apêndice apical (μm). 59
- Gráfico 4-** Box-Plot da análise de variância do (4) Comprimento do apêndice basal (μm). 60
- Gráfico 5-** Consumo de açúcar, pH e crescimento micelial da linhagem *P. microspora* (AnspCg1.1.3a), no tempo de 0 a 60 dias. 81
- Gráfico 6-** Decaimento no número de células viáveis em função do tempo de exposição a luz UV. 96
- Gráfico 7-** Variância da produção de extrato (mg) da linhagem selvagem e linhagens PX. 101

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Substâncias produzidas por diferentes espécies de fungos do gênero <i>Pestalotiopsis</i> . | 34 |
| Tabela 2 - Linhagens de fungos pertencentes a coleção do LaBMicra/UFAM selecionadas para a realização dos trabalhos de Tese. | 36 |
| Tabela - 3 Componentes da PCR e suas respectivas concentrações e quantidades. | 39 |
| Tabela 4 - Componentes da PCR de sequenciamento e suas respectivas concentrações e volumes. | 40 |
| Tabela 5 - Medições da micromorfológicas de conídios de 33 espécies <i>Pestalotiopsis</i> spp. | 52 |
| Tabela 6 - Linhagens do gênero <i>Pestalotiopsis</i> com identificação confirmada por biologia molecular. | 63 |
| Tabela 7 - Extratos de <i>Pestalotiopsis</i> spp., cultivadas sob agitação e no modo estático. | 75 |
| Tabela 8 - Concentrações mínimas inibitórias dos extratos de <i>Pestalotiopsis</i> spp. que apresentaram atividade frente a <i>C. albicans</i> . | 77 |
| Tabela 9 Atividade citotóxica dos extratos obtidos de 26 linhagens de <i>Pestalotiopsis</i> spp. | 79 |
| Tabela 10 CMI das frações dos extratos de <i>P. microspora</i> (AnspCg1.1.3a) | 86 |
| Tabela 11 Atribuições de ¹ H em comparação com os dados da literatura para a substância ácido 3-fenil-propanóico. | 91 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1D - Unidimensional
2D – Bidimensional
ACN – Acetonitrila
AcOEt – Acetato de Etila
AFLP – Amplified Restriction Fragment Polymorphism
APCI-MS – Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometer
BDA – Batata – Dextrose – Ágar
BDL – Batata – Dextrose – Extrato de Levedura
CAM – Centro de Apoio Multidisciplinar
CCD – Cromatografia em Camada Delgada
CCDP – Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMI – Concentração Mínima Inibitória
COSY – Homonuclear Correlation Spectroscopy
DMSO – Dimetilsulfóxido
dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
HCA – Hierarchical Cluster Analysis
HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
HSQC – Heteronuclear single-quantum correlation
Hz - Hertz
Its-1 – Internal transcribed spacer 1 of the ribosomal DNA
Its-2 – Internal transcribed spacer 2 of the ribosomal DNA
Kb – Quilo pares de bases
KDa – Quilodalton
LaBMicra – Laboratório de Bioensaios e Microrganismos
LC-UV – Liquid chromatography-ultraviolet
m/z – Massa carga
ME – Microscópio eletrônico
MeOH – Metanol
mg – Miligrama
mg/μL – Miligrama por microlitro

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
mL – Mililitro
mM – Milimolar
MP – Máxima Parcimônia
NBT – Cloreto tetrazólio Nitroazul
NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards
ng/μL – Nanograma por microlitro
pb – pares de base
PCA - Principal Component Analysis
PCR – Polymerase Chain Reaction
pg/μL – Picograma por microlitro
pH – Potencial de Hidrogênio
pM – Picomolar
RAPD – Randon Amplification of Polyphormic DNA
R_f – Ratio to from
RMN ¹³C – Ressonância magnética nuclear de ¹³C
RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de ¹H
rpm – Rotação por minutos
SDS – Sodium Dodecyl Sulfate
spp. – Species (plural)
TEMED – Tetramethylenediamine
TFA – Ácido Tri-fluoroacético
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UPGMA – Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average
UV – Ultravioleta
δ – Deslocamento químico

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| DEDICATÓRIA..... | 4 |
| AGRADECIMENTOS..... | 5 |
| RESUMO..... | 6 |
| ABSTRACT..... | 7 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 8 |
| LISTA DE GRÁFICOS..... | 11 |
| LISTA DE TABELAS..... | 12 |
| LISTA DE ABREVEATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS..... | 13 |
| SUMÁRIO..... | 15 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA..... | 18 |
| 2.1 Espécies vegetais hospedeiras..... | 18 |
| 2.2 A importância dos fungos..... | 22 |
| 2.3 Filogenia de fungos utilizando regiões <i>Its</i> | 23 |
| 2.4 AFLP (<i>Amplified Restriction Fragment Polymorphism</i>) de fungos..... | 24 |
| 2.5 Quimiotaxonomia de fungos..... | 25 |
| 2.6 Microrganismos endofíticos..... | 27 |
| 2.7 O gênero <i>Pestalotiopsis</i> | 29 |
| 2.8 Variabilidade genética do gênero <i>Pestalotiopsis</i> | 31 |
| 2.9 Potencialidades Biotecnológicas do gênero <i>Pestalotiopsis</i> | 32 |
| 3. OBJETIVOS..... | 35 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 35 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 35 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 36 |
| 4.1 Condições de cultivo para reativação das linhagens de <i>Pestalotiopsis</i> spp..... | 36 |
| 4.2 Caracterização macro e micro-morfológica..... | 37 |
| 4.3 Identificação por biologia molecular: Extração de DNA, PCR e Sequenciamento..... | 38 |
| 4.4 Análise filogenética das regiões <i>Its1</i> e <i>Its2</i> do rDNA..... | 40 |
| 4.5 Avaliação da diversidade genética pela técnica de AFLP..... | 40 |
| 4.6 Perfil químico geral das linhagens de <i>Pestalotiopsis</i> spp..... | 42 |
| 4.7 Obtenção dos extratos brutos das linhagens de <i>Pestalotiopsis</i> spp..... | 43 |
| 4.8 Testes para detecção das atividades biológicas..... | 43 |
| 4.8.1 Ensaio para atividade anticandida..... | 43 |
| 4.8.2 Ensaio para atividade citotóxica..... | 44 |
| 4.9 Perfil químico da linhagem de <i>P. microspora</i> (AnspCg1.1.3a)..... | 45 |
| 4.10 Estudo da bioatividade de metabólitos de <i>P. microspora</i> | 46 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.10.1 | Preparação de extratos em escala preparativa..... | 46 |
| 4.10.2 | Fracionamento dos extratos brutos..... | 47 |
| 4.10.3 | Testes de Bioautografia..... | 47 |
| 4.10.4 | Isolamento e identificação de compostos..... | 48 |
| 4.11 | Análises das proteínas de <i>Pestalotiopsis</i> spp. e eletroforese em gel SDS-PAGE..... | 49 |
| 4.12 | Produção dos mutantes de <i>P. microspora</i> (AnspCg1.1.3a)..... | 49 |
| 4.13 | Análises dos mutantes de <i>P. microspora</i> (AnspCg1.1.3a)..... | 50 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 51 |
| 5.1 | Reativação e caracterização macro e micromorfológica..... | 51 |
| 5.2 | Identificação das linhagens por biologia molecular..... | 61 |
| 5.3 | Análise filogenética das regiões <i>Its</i> | 64 |
| 5.4 | Diversidade genética de <i>Pestalotiopsis</i> com marcadores AFLP..... | 67 |
| 5.5 | Perfis químicos das linhagens de <i>Pestalotiopsis</i> spp..... | 69 |
| 5.6 | Ensaio biológico de <i>Pestalotiopsis</i> spp..... | 75 |
| 5.7 | Atividade anticandida..... | 76 |
| 5.8 | Atividade citotóxica..... | 78 |
| 5.9 | Análise do perfil químico de <i>P. microspora</i> (AnspCg1.1.3a)..... | 80 |
| 5.10 | Produção, fracionamento e identificação de compostos de <i>P. microspora</i> | 85 |
| 5.11 | Ensaio de Bioautografia..... | 87 |
| 5.12 | Isolamento das substâncias da fração P12L-3..... | 89 |
| 5.13 | Identificação das substâncias isoladas na fração P12L-3..... | 90 |
| 5.14 | Perfil de proteínas secretadas por linhagens de <i>Pestalotiopsis</i> spp..... | 92 |
| 5.15 | Avaliação da produção de linhagens mutantes..... | 96 |
| 6. | CONCLUSÕES..... | 106 |
| 7. | REFERÊNCIAS..... | 108 |
| 8. | ANEXOS..... | 123 |

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de produtos e/ou processos biotecnológicos ocorridos em um país está diretamente relacionado com sua biodiversidade, com a utilização de ferramentas técnico-científicas adequadas, assim como, com a formação de mão-de-obra qualificada para a produção e implementação desses produtos e processos de base biotecnológica. Neste sentido, a Amazônia brasileira se destaca, pela sua biodiversidade, sobretudo com a variedade de biomas que a compõem.

Quando se trata do universo microbiológico presente nos biomas amazônicos, o pouco conhecimento fica claro, com o incipiente conhecimento tanto sobre a diversidade genética quanto a diversidade metabólica dos microrganismos dessa região. Dessa forma, este é um campo aberto para pesquisa científica nesta região do Brasil, que pode de maneira rápida responder a anseios científicos latentes, como a obtenção de novos medicamentos advindos de microrganismos da floresta.

As diversas espécies de fungos que compõem a microbiota das regiões tropicais brasileiras podem ser encontradas nos mais variados ambientes: no solo, na água, associados a plantas, entre outros. É importante perceber que tais organismos eficientemente adaptados aos diversos ambientes Amazônicos são detentores de uma versatilidade bioquímica e, portanto, genética que lhes garantem vantagens ecológicas fundamentais a sua sobrevivência. Essa característica associada a forma de alimentação por absorção e ao ambiente competitivo onde residem tornam os fungos um grupo bastante rico do ponto de vista das informações genômicas, proteômicas e metabolômicas (AZEVEDO e ARAÚJO, 2007).

Considerando as questões acima o trabalho de tese envolveu o estudo genético e metabólico de fungos do gênero *Pestalotiopsis*. Esse gênero tem sido frequentemente isolado como endofítico de diversas plantas tropicais e tem sido utilizado também como organismo modelo em diversos estudos de pesquisa básica e aplicada (STROBEL *et al.*, 1996; PROKSCH *et al.*, 2009; HANADA *et al.*, 2010; BANHOS *et al.*, 2014).

Contudo, a utilização de qualquer microrganismo e, portanto, de fungos do gênero *Pestalotiopsis* em processos biotecnológicos está totalmente relacionada com a aquisição de conhecimento detalhado de sua biologia. Neste sentido, faz-se necessário o conhecimento da variabilidade morfológica e genética de fungos do gênero *Pestalotiopsis* isolados na região Amazônica, tanto para a identificação correta destes, quanto para a seleção de linhagens com potencialidades biotecnológicas.

Atualmente a biologia molecular possibilita o estudo não apenas das informações contidas no genoma, mas também permite a análise do que está sendo expresso (proteoma e metaboloma). Isto permite melhorar a compreensão da expressão de um conjunto de genes e das possíveis modificações pós-transcricionais em resposta as condições ambientais a que esses microrganismos estão submetidos.

Através desse estudo foi possível comparar linhagens de *Pestalotiopsis* spp. isoladas na Região Amazônica, em função de seus metabólitos secundários, seu material genético e suas proteínas secretadas visando aperfeiçoar o processo de identificação e de seleção de linhagens produtoras de compostos bioativos.

O referido trabalho partiu do princípio que um produto biotecnológico é, no fim do processo de investigação, a confirmação de que o microrganismo investigado possui em seu material gênico uma informação relevante (genoma), que essa informação sendo expressa (proteoma), pode levar a um produto final de interesse biotecnológico (metabolômica). Essas são resumidamente as etapas deste trabalho de tese, aperfeiçoando o conhecimento da genômica, proteômica e metabolômica de fungos do gênero *Pestalotiopsis*, na prospecção de compostos úteis a biotecnologia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Espécies vegetais hospedeiras

O Brasil se encontra em uma posição estratégica em relação a outros países, quando se trata de novos produtos de base biotecnológica, tudo por conta de sua megadiversidade. Mesmo com todo o desenvolvimento científico-tecnológico, a magnitude da biodiversidade não está nem perto de ser conhecida, tamanha a sua dimensão e complexidade (FEARNSIDE, 2003; SILVÉRIO, 2004).

Trata-se do país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350 – 550.000 espécies (GUERRA e NODARI, 1999). Essas espécies vegetais também demonstram toda sua importância pelo papel de hospedeiras de uma variedade de microrganismos endofíticos. O trabalho em questão fundamentou-se no conhecimento prévio dessas espécies vegetais, para selecionar as com maior potencial na obtenção de fungos com aplicabilidades biotecnológicas. Um breve relato de cada gênero vegetal utilizado no trabalho está apresentado a seguir.

Gênero *Gustavia*

O gênero *Gustavia* é componente da família Lecythidaceae, possui pouco mais de 40 espécies descritas, caracteriza-se por formar árvores e arbustos, sua distribuição vai de Vera Cruz no México até o meridional brasileiro. Na Região Amazônica se distribui de forma mais significativa no extremo sul da região, com maior ocorrência em florestas primárias próximas a cidade de Manaus (MORI e PRANCE, 1981; RIBEIRO *et al.*, 1999).

Espécies do gênero são descritas como úteis a medicina tradicional, com o aproveitamento de frutos, cascas, raízes, folhas e sementes. Trabalhos utilizando a casca do caule e folhas de *G. elliptica* coletadas na região Amazônica comprovaram a presença de terpenos e ácidos graxos característicos para o gênero, além de atestarem o potencial antileishmania desses extratos (ALMEIDA *et al.*, 2011).

São poucos os trabalhos de isolamento de endofíticos desse gênero, destacamos o realizado por Almeida 2014, que utilizando dois meios de cultura, isolou 93 linhagens de fungos endofíticos a partir de partes vegetais de *Gustavia* sp. O resultado apesar de não apresentar um grande número de linhagens revelou a presença de sete gêneros de fungos promissores para a biotecnologia como *Aspergillus* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Penicillium* sp. (ALMEIDA 2014).

Gênero *Rollinia*

Integrante da família Annonaceae o gênero *Rollinia* é formada por aproximadamente 65 espécies, sua distribuição ocorre principalmente na América do Sul, chegando até alguns países da América Central. Os integrantes dessa família são bastante conhecidos pelos estudos relacionados ao isolamento e identificação de alcalóides, o que torna esse gênero também bastante promissor para estudos com fungos endofíticos (BARROSO, 1978; LEBOUÉF *et al.*, 1982).

A quantidade de estudos relacionados a sua fitoquímica ainda é insipiente quando comparado a outros gêneros dessa família, o mesmo pode ser dito com relação ao isolamento e utilização de fungos endofíticos dessa espécie.

Gênero *Duguetia*

O gênero *Duguetia* também pertencente à família Anonaceae possui distribuição que vai das Guianas a Amazônia brasileira, com alguns representantes na região sudeste do Brasil e também no Paraguai. O gênero possui pouco mais de 80 espécies e tem

como aspecto fitoquímico marcante a presença de uma variedade de alcalóides (SCHULTES e RAFFAUF, 1990).

Alcalóides isolados de *D. glabriuscula* e *D. furfuracea* apresentaram atividade biológica interessante como antitumoral, leishmanicida e antitripomastigota, demonstrando a versatilidade metabólica, e a possibilidade de utilização dos extratos destas espécies com finalidade terapêutica (SIQUEIRA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2007).

Em trabalho realizado por Oliveira (2013) foi possível o isolamento de um total de 234 linhagens de fungos a partir dos galhos, folhas, e flagelos de *D. flagellaris* e com grupos mais frequentes de isolados com espécies de *Phomopsis* sp., *Fusarium* sp. e *Colletotrichum* sp.

Gênero *Euterpe*

O gênero *Euterpe* pertence à família Arecaceae composta por mais de 200 gêneros e aproximadamente 2.600 espécies, com ocorrência predominante nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Foram catalogadas mais de 39 gêneros dessa família da floresta Amazônica, o que demonstra sua importância ecológica para a região (JONES, 1995; KAHN, 1997).

A espécie mais representativa do gênero é a *E. oleracea* Mart, conhecida popularmente por açaizeiro, seu fruto açaí é hoje um produto de grande valor econômico para a região norte do Brasil, que já ultrapassou as fronteiras do país atingindo novos mercados principalmente na Europa e Estados Unidos, fato que tornou esse um dos principais produtos tipo exportação produzidos quase que exclusivamente na Região Amazônica (YAMAGUCHI *et al.*, 2015).

O suco da fruta açaí é rico em antocianinas, e uma importante fonte de lipídios, proteínas e uma série de minerais. Além disso, o açaí é formado por compostos fenólicos que possuem atividade antioxidante, que viabilizam o combate de radicais livres, estes relacionados a uma série de doenças como o câncer e doenças do coração (YAMAGUCHI *et al.*, 2015). As potencialidades dessa espécie justificam a investigação de seus endófitos para avaliação das mais variadas possibilidades biotecnológicas.

Gênero *Victoria*

O gênero *Victoria* pertence a família Nymphaeaceae que está distribuída por boa parte do mundo com seis gêneros e pouco mais de 60 espécies, seu gênero mais

representativo é o *Nymphaea*. A espécie *Victoria amazonica* é uma das mais simbólicas das áreas alagadas da Amazônia, por apresentar características ornamentais exóticas, bastante requisitadas para decoração de ambientes (SOUZA e LORENZI, 2005).

A *V. amazonica* conhecida popularmente como Vitória régia é uma herbácea de hábito aquático, com folhas flutuantes em águas calmas de temperatura entre 26 a 30°C. Sua distribuição também contempla além da Bacia do Rio Amazonas, a região do Pantanal e bacia do Paraguai (PRANCE, 1974; POTT e POTT, 2000).

O estudo fitoquímico dessa espécie em trabalho de Strack e colaboradores em 1992 já revelava a presença de antocianinas nos extratos obtidos nas folhas, essas substâncias são conhecidas pelas suas propriedades antioxidantes (STRACK *et al.*, 1992).

Gênero *Myrcia*

O gênero *Myrcia* é um dos gêneros mais representativos da família Myrtaceae, com distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, possui centros de diversidade na América tropical e até Austrália, com poucas espécies de ocorrência nas regiões temperadas (BARROSO, 1984).

A respeito dos metabólitos produzidos pelo gênero *Myrcia*, pode-se dizer que existem diferentes compostos produzidos por esse gênero, e que fatores como quantidade de chuvas e composição do solo são cruciais nesta produção (LIMBERGER *et al.*, 2004; CRUZ *et al.*, 2007). Além disso, alguns desses compostos possuem atividades biológicas de interesse farmacológico (LIMBERGER *et al.*, 2004; CRUZ *et al.*, 2007). Como bom exemplo tem-se a espécie *M. myrtiflora*, que teve comprovada sua atividade antimicrobiana (CRUZ *et al.*, 2007).

Em trabalho desenvolvido com *M. guianensis*, e utilizando galhos folhas e raízes foi possível o isolamento de um total de 156 linhagens de fungos endofíticos, no qual foi possível a identificação de linhagens de *Pestalotiopsis* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.. Além disso, nesse trabalho também foi confirmada a atividade antimicrobiana de fungos isolados das raízes de *M. guianensis* (BANHOS *et al.*, 2014).

Gênero *Arrabidaea*

O gênero *Arrabidaea* pertence a família Bignoniaceae, constituída por 113 gêneros e mais de 800 espécies vegetais, distribuídas nas regiões tropicais do mundo, e com várias espécies presentes na flora brasileira. Essa família se caracteriza por

apresentar formas arbustivas, arbóreas e trepadeiras, essa última contempla espécimes de *A. chica* conhecida popularmente por Crajirú, piranga e cipó cruz entre outros (LORENZI, 1988).

A espécie de *A. chica* possui relatos na medicina tradicional sendo usadas no tratamento dos mais variados tipos de males, desde inflamações uterinas, passando por males do fígado, estômago e intestino, indo até leucemias e anemias (KALIL *et al.*, 2000). Os trabalhos de prospecção química dessa espécie tem revelado a presença além de antocianinas, compostos que dão a coloração avermelhada aos suas infusões ou extratos, além de substâncias como terpenóides e cumarinas (ZORN *et al.*, 2001; ALVES *et al.*, 2010).

2.2 A importância dos fungos

Os fungos são seres eucarióticos, heterotróficos amplamente distribuídos pelo planeta integrando os ciclos biogeológicos de todos os ecossistemas (LOGUERCIO-LEITE, 2004). Possuem eficiente maquinário enzimático capaz de degradar substratos que vão desde gordura animal até troncos de árvores (SILVA e COELHO, 2006).

O reino Fungi é fundamental à vida porque devolve ao meio ambiente os nutrientes que antes formavam tecidos de diferentes seres vivos. Eles beneficiam espécies vegetais hospedeiras através do controle de patógenos, na absorção de nutrientes como o fósforo e a água, na produção de fitohormônios, entre outros. Seus metabólitos secundários proporcionam uma variedade de aptidões como aumento da resistência a herbívoros, parasitismo, estiagem, favorecendo o crescimento da planta (FIRÁKOVÁ *et al.*, 2007).

Na biotecnologia os fungos já são utilizados há séculos, desde a fermentação de bebidas alcoólicas no antigo Egito, também servindo de alimentos na Europa na idade média, na fabricação de pães e queijos na atualidade, até a produção de moléculas bioativas como antibióticos, através de sua capacidade metabólica, tendo como exemplo clássico a penicilina (BORZANI *et al.*, 2001).

Entre as enzimas fúngicas importantes para a indústria alimentícia destacam-se a amiloglucosidase, produzidas por linhagens de *Aspergillus* e *Rhizopus*; a α -amilase que transforma amido em dextrinas e oligossacarídeos e pode ser isolada por fermentação de linhagens de *Aspergillus niger* (PASTORES e MACEDO, 2004).

Nos últimos anos, os fungos endofíticos pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis* tem demonstrado potencial biotecnológico, sobretudo para a indústria farmacêutica, tanto da

obtenção de compostos antimicrobianos como demonstrado por Che e colaboradores (2008), isolando antifúngico de *P. adusta*, quanto na obtenção de compostos com atividade citotóxica frente a células tumorais humanas a partir de *P. photiniae* (STROBEL *et al.*, 1996; CHE *et al.*, 2009). Mais um exemplo das possibilidades biotecnológicas desse gênero voltado para a indústria farmacêutica foi a observação do efeito imunomodulatório de compostos isolados de *P. leucothes*, endófito de *Thipterygium wilfordii* (LAU *et al.*, 2005).

As potencialidades desse gênero justificam investigações pelos mais diferentes aspectos biológicos, com o intuito de aperfeiçoar os critérios de seleção na obtenção de linhagens com potencialidades biotecnológicas. De forma geral a utilização de critérios morfológicos, genéticos e metabólicos parece suficiente para execução dessa seleção.

2.3 Filogenia de fungos utilizando regiões *Its*

O reino dos fungos compreende uma variedade de espécies, uma das estimativas mais recentes revelou que são aproximadamente seis milhões de espécies distribuídas pelo mundo (TAYLOR, 2014). Uma das consequências dessa enorme variedade de espécies sempre foi a dificuldade de organização em seus referidos táxons (BALASUNDARAM *et al.*, 2015).

O reino Fungi, a exemplo do que acontece com o reino Animalia e Plantae, sempre foi organizado (taxonomia) em função das características morfológicas presentes nos diferentes grupos. Contudo determinados táxons pertencentes a esse reino, possuem peculiaridades que tornam a utilização de seus caracteres morfológicos não suficientemente robustos para sua organização (BALASUNDARAM *et al.*, 2015).

Existem gêneros em que os corpos de frutificação são estruturas morfolologicamente muito simples, não sendo assim uma característica útil à diferenciação que lhes permita separar dentre os gêneros mais próximos. Além disso, algumas estruturas reprodutivas se apresentam apenas em uma pequena parte do ciclo de vida do fungo, tornando difícil a utilização desse caráter fenotípico (EL-ENSHASY, 2007).

Neste sentido, a biologia molecular vem nas últimas décadas revolucionando os diversos aspectos da diversidade genéticos relacionada a fungos, dentre esses aspectos estão as diferentes relações de proximidade evolutiva intra e interespecífica (ANDERSON & CAIRNEY, 2004). O desenvolvimento da técnica da PCR, somada à evolução da etapa de sequenciamento, tem proporcionado um substancial

aprofundamento nos pontos-chaves relacionados a filogenética inclusive de fungos (KUBICEK, 2000; AKHTAR *et al.*, 2011). Um ponto que contribuiu significativamente para o avanço inicial no conhecimento da diversidade genética de eucariotos e, portanto de fungos, foi a utilização das regiões *Its* (*Internal Transcribed Spacer*). Essa região tem funcionado de forma bastante satisfatória como marcadora para as mais diferentes espécies, inclusive as pertencentes ao reino Fungi (SCHLÖTTERER *et al.*, 1994).

Atualmente boa parte das sequências depositadas em bancos de dados utilizadas para identificação de fungos são oriundas das regiões *Its1*, com gene 5.8S e *Its2*. Essa região é eficiente e robusta tanto para identificação, quanto para análises filogenéticas, isso devido ser bastante conservada entre as espécies, com regiões com altas taxas de divergência que viabilizam os estudos de diversidade intraespecíficos (SCHLÖTTERER *et al.*, 1994; MANAUT *et al.*, 2011).

Para realização de análise filogenética é fundamental a escolha apropriada das sequências comparativas, tendo em vista que a escolha de uma região muito conservada não expressará o número de diferenças suficientes para comparação. Da mesma forma, regiões muito variáveis, além de difíceis de alinhar, podem gerar alinhamentos questionáveis (SWOFFORD e OLSEN, 1990). As regiões *Its* são regiões de escolha para análises filogenéticas principalmente porque para maioria das espécies estudadas esta região possui similaridade superior a setenta e menor que cem por cento dos casos, o que garante robustez nos dados para comparação. Além disso, essa região evolui a taxas diferentes produzindo assim dados informativos importantes para a análise (HILLIS e DIXON, 1991).

2.4. AFLP (*Amplified Restriction Fragment Polymorphism*) de fungos

A técnica de AFLP teve seu desenvolvimento inicial direcionado a espécies vegetais, sobretudo aquelas com importância agrônômica, mas logo foi utilizada nos mais variados organismos. Essa é uma técnica que objetiva o desenvolvimento de marcadores do DNA, que a exemplo do RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) é baseada na PCR (*Polymerase chain reaction*) (VOS *et al.*, 1995).

Técnicas moleculares como o AFLP são chamadas também de técnicas de impressão digital do DNA, utilizada geralmente com o objetivo de mapeamento genético, de estudos de diversidade, de análise parental e para análise de características quantitativas. Esse arcabouço de possibilidade dá uma mostra da robustez da técnica,

atualmente utilizada também em trabalhos com fungos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; MAJER *et al.*, 1996; AL-HATMI, *et al.*, 2016).

A AFLP possui vantagens em relação a outros métodos de impressão digital do DNA, contudo a mais importante delas é a capacidade de analisar um genoma completo em relação a seus polimorfismos. Além disso, esta técnica também apresenta uma reprodutibilidade difícil de igualar utilizando outros métodos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Outra vantagem se baseia no fato de que, nesta técnica, se utiliza DNA genômico, material biológico comum a animais, plantas e fungos, o que a torna exequível a todos os organismos (VOS *et al.*, 1997).

As etapas básicas de execução do AFLP são: (1) digestão do DNA genômico com enzimas de restrição; (2) ligação dos adaptadores; (3) amplificação; (4) análise dos fragmentos através do gel. A análise dos polimorfismos genéticos é identificada no gel pela presença ou ausência de fragmentos “bandas” de DNA em cada amostra (VOS *et al.*, 1995 ; VOS *et al.*, 1997).

Atualmente, por conta de todas as vantagens citadas acima, a técnica de AFLP vem se firmando como método de escolha para trabalhos envolvendo uma variedade de espécies de fungos. De forma geral esses trabalhos estão relacionados a diversidade genética, estrutura de populações e filogenia (PIRONDI *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2015; AL-HATMI, *et al.*, 2016).

Na Região Amazônica Bentes e Costa-Neto, 2011 analisaram a variabilidade genética de espécimes de *Colletotrichum guaranicola*, espécie endêmica da Região Amazônica agente causador da antracnose em *Paullinia cupana*, o guaraná. A análise por AFLP demonstrou alta variabilidade entre espécimes de *Colletotrichum* oriundas de localidade diferentes, o que demonstra a complexidade genética do gênero. Os resultados confirmaram a viabilidade de se estudar esse importante gênero através dessa ferramenta molecular com a possibilidade de apontar genes relacionados a fitopatologia, a especificidade por hospedeiro e virulência.

2.5 Quimiotaxonomia de fungos

O início dos estudos relacionados a fungos foram, de certa forma, baseados nos estudos realizados e estabelecidos em plantas, isso porque durante muito tempo os táxons que formam do reino Fungi foram estudados como integrantes do reino Plantae (TAYLOR e KRINGS, 2015). Essa herança possibilitou o avanço nos estudos relacionados a morfologia de gêneros fúngicos atualmente bastante conhecidos,

principalmente os pertencentes ao filo Basidiomycota, que sempre estiveram em destaque por apresentar características morfológicas marcantes (TAYLOR & KRINGS, 2015).

A quimiotaonomia de fungos também é um exemplo de área que é herança dos trabalhos desenvolvidos em plantas. Com o desenvolvimento tecnológico, representado pelo aumento no número de equipamentos analíticos, a quimiotaonomia de plantas tornou-se uma das importantes subáreas dentro da área de produtos naturais (FRISVAD *et al.*, 2008; HAO *et al.*, 2015).

A percepção de que os membros do reino Fungi podem, através de seu metabolismo secundário, produzir muitos dos compostos também produzidos por plantas, viabilizou os estudos quimiotaonômicos desse reino, e assim como em plantas, o objetivo inicial foi estabelecer novos parâmetros de comparação para confirmação de agrupamentos ainda questionáveis (JEWETT *et al.*, 2006; FRISVAD *et al.*, 2008).

Atualmente esse tipo de avaliação tem contribuído de forma significativa para o aperfeiçoamento da caracterização química de uma variedade de gêneros, muitos deles, com grande dificuldade de identificação e de separação entre as diversas variantes, como é o caso dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (THRANE *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2013).

Em trabalho desenvolvido por Kang *et al.*, (2013) foi possível verificar a eficiência na separação de linhagens de três secções do gênero *Aspergillus*, secção Fumigati, Nigri e Flavi. Estas três secções são bem difíceis de se diferenciar, por vezes sendo necessário a utilização de métodos combinados (polifásicos). A parte analítica do trabalho foi desenvolvida utilizando cromatografia acoplada a espectrometria de massas (LC-ESI-MS-MS), sendo possível assim identificar as substâncias produzidas pelas linhagens como a gliotoxina G e fumigatina, ambas características do gênero (KANG *et al.*, 2013).

De forma geral essa área de estudo tem contribuído grandemente para a elucidação dos mais variados pontos de discussão em uma diversidade de gêneros fúngicos (JEWETT *et al.*, 2006; STADLER e KELLER, 2008; FRISVAD *et al.*, 2008).

O aprimoramento analítico tem viabilizado a identificação de compostos presentes em pequenas concentrações, com cada vez mais confiabilidade o que aumentou a capacidade de identificação de substâncias e que proporciona robustez nos resultados de comparação entre as linhagens (FRISVAD *et al.*, 2008; ZAIN *et al.*, 2012). Além disso, esse tipo de estudo também pode identificar quais linhagens de determinado gênero são

capazes de produzir compostos de interesse. Dessa forma é possível viabilizar a bioprospecção de linhagens de interesse cada vez mais rápido e de forma mais eficiente (FRISVAD *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2013).

2.6 Microrganismos endofíticos

Os primeiros relatos da presença de microrganismos endofíticos no interior de tecidos de plantas datam do final do século XIX (MUNDT e HINKLE, 1976). Em 1898 foi detectado um fungo endofítico em sementes de *Lolium temulentum* L., esta descoberta desencadeou uma série de estudos, por vários pesquisadores da época sobre novos fungos principalmente ascomicetos vivendo no interior de gramíneas sem, contudo, causar qualquer dano aparente (WHITE JR, MARTIN e CABRAL, 1996).

Trabalhos mais direcionados ao tema começaram a aparecer em número considerável a partir de 1940, com muitos relatos sobre microrganismos isolados de tecidos vegetais saudáveis. As investigações aumentaram consideravelmente no final da década de 70, com a verificação de que esses microrganismos endofíticos apresentam interações simbióticas com o hospedeiro, protegendo as plantas que os albergam contra o ataque de insetos, de doenças e de mamíferos herbívoros (AZEVEDO, 1999).

Na década de 90, as pesquisas focaram nos efeitos benéficos que a aplicação dos fungos endofitos poderiam gerar nas plantas, como por exemplo, o aumento da produção de grãos e a redução da severidade de várias doenças. Estudos também versaram sobre a diversidade de plantas servindo como reservatório de material genético, abrigando microrganismos endofíticos (CLAY, MARKS e CHEPLICK, 1993; McINROY e KLOEPPER, 1995).

O melhor conhecimento desses microrganismos e uma melhor compreensão de sua interrelação com seu hospedeiro têm permitido um aperfeiçoamento em seu conceito. Primeiramente podia-se adotar que fungos endofíticos são aqueles que podem ser isolados de material vegetal desinfestado superficialmente, e que não causam danos à planta (PETRINI, 1991). Também como microrganismos que habitam, ao menos em um período de seus ciclos de vida, o interior dos tecidos vegetais sem causar danos ou produzir estruturas externas (AZEVEDO *et al.*, 2000).

Uma das definições mais recentes, proposta por Azevedo e Araújo (2007) é aquela que chama de microrganismos endofíticos todos aqueles que podem ou não crescer em meios de cultura, ou seja, cultiváveis ou não, e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas

externas emergindo dos vegetais (AZEVEDO e ARAÚJO, 2007). Dessa maneira, podem estar incluídos como microrganismos endofíticos colonizadores com comportamento neutro ou simbiote, e ainda aqueles que transitam colonizando ora de forma endofítica ora de forma epifítica (AZEVEDO, 1999).

Os fungos endofíticos podem ser transmitidos de uma planta a outra de duas maneiras. A primeira chamada de transmissão vertical é aquela em que os microrganismos presentes na planta-mãe são transmitidos via semente, vivendo dessa forma todo o seu ciclo de vida dentro da planta. A segunda é denominada de transmissão horizontal em que esporos dos fungos são passados de uma planta a outra através da raiz, das folhas, através dos estômatos, ou por qualquer lesão existente na planta (AHLHOLM *et al.*, 2002).

A estrita relação entre microrganismos endofíticos e seus hospedeiros faz com que sejam candidatos naturais a serem usados como agentes de controle de doenças. Por ocuparem um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por patógenos, os endófitos apresentam potencial para o controle biológico (HALLMANN *et al.*, 1997).

Os fungos endofíticos se configuram como uma rica fonte de novas substâncias bioativas, com potencialidades para a indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (BASHYAL *et al.*, 2005; GUNATILAKA, 2006). Dessa forma, a busca por fungos endofíticos encontra-se motivada porque esses microrganismos possuem a capacidade de conferir maior resistência à planta contra herbivoria (CLAY, MARKS e CHEPLICK, 1993), podem também conferir maior tolerância à seca para a planta hospedeira (WHITE JR. *et al.*, 2002), aumentar o crescimento de raiz, produção de sementes e germinação (VILA-AIUB, GUNDEL & GERSA, 2005).

Todas essas possibilidades só existem porque fungos endofíticos produzem metabólitos ativos que podem ser utilizados tanto pelos fungos quanto pela própria planta hospedeira. Como resultado direto dessas funções que os metabólitos secundários bioativos exercem na natureza, ou por assim dizer, na espécie hospedeira, eles podem apresentar aplicações na medicina, na agricultura e na indústria (STROBEL, 2002; DING *et al.*, 2008; EBEL *et al.*, 2008; DEBBAB *et al.*, 2009).

As possibilidades biotecnológicas dos fungos endofíticos parecem estar totalmente ligadas a sua interrelação com a planta hospedeira, uma vez que esses microrganismos produzem compostos com função ecológica para as espécies vegetais. É o caso da produção de alcalóides, observado no trabalho de Tan *et al.* (2008). Neste trabalho foi relatado que a espécie de *Penicillium* sp. IFB-E022, isolada de *Quercus*

variabilis é capaz de produzir penicidonas (Figura 1), alcalóides com potencialidades farmacológicas (TAN *et al.*, 2008).

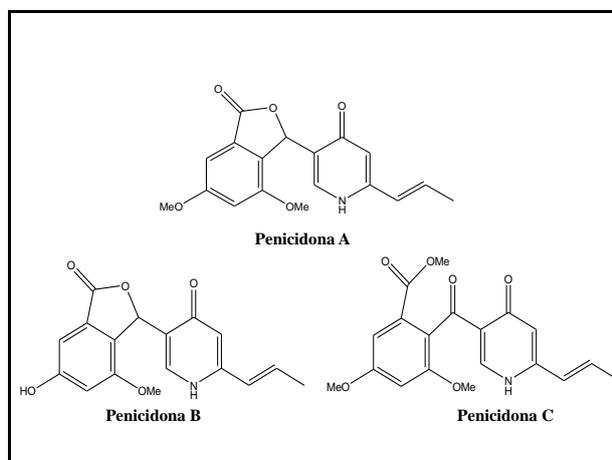


Figura 1: Estrutura química da penicidona A, B e C.

Com todas as potencialidades biotecnológicas, o estudo de fungos endofíticos no Brasil e, principalmente na Amazônia, necessita que os especialistas das áreas de taxonomia de fungos, geneticistas, ecologistas e químicos de produtos naturais trabalhem em conjunto no intuito de desenvolver estratégias mais eficientes, tanto de isolamento de fungos endofíticos, quanto de obtenção dos seus metabólitos de interesse.

2.7 O gênero *Pestalotiopsis*

O gênero *Pestalotiopsis* pertence à ordem Melaconiales, família Amphispinariaceae que caracteriza-se pela presença de conidióforo dentro do corpo de frutificação denominado acérvulo. Os conídios apresentam em geral cinco células, sendo três medianas de coloração marrom e duas células hialinas (apical e basal), com dois ou mais apêndices apicais (SUTTON, 1980; JEEWON *et al.*, 2002).

Esse gênero, antes incluído no gênero *Pestalotia*, foi revisado e separado para formar o gênero *Pestalotiopsis* por apresentar características morfológicas importantes diferentes dos de *Pestalotia*. Em função da morfologia de conídios o gênero foi subdividido em três outros: *Pestalotia*, *Pestalotiopsis* e *Truncatella* (STEYAERT, 1949).

Em seu trabalho Steyaert (1949) ainda subdividiu o gênero *Pestalotiopsis* em seções levando em consideração o número de apêndices apicais presentes nos conídios. Estas seções foram Monosetulatae, Bisetulatae, Trisetulatae e Multisetulatae e estes por sua vez ainda foram subdivididos. A contribuição dos trabalhos de Steyaert foi muito

importante, tendo em vista se tratar de um grupo complexo do ponto de vista morfológico e fisiológico.

Com o passar do tempo o surgimento de novas tecnologias proporcionou o desenvolvimento de meios de cultivo, de isolamento e de visualização ao microscópio eletrônico (ME) que possibilitaram melhores condições para comparação das estruturas micromorfológicas utilizadas para diferenciação em nível de espécie. Tal fato permitiu que alguns critérios utilizados para identificação fossem questionados e até deixados de lado, por não se tratarem de critérios estáveis o suficiente para viabilizarem uma identificação confiável em nível de espécie (EGGER, 1995; JEEWON *et al.*, 2003 ; HU *et al.*, 2007).

Jeewon *et al.*, (2003) propuseram que para identificação em nível de espécie de forma segura uma característica que pode ser usada é a deposição de grânulos de melanina dentro da matriz celular das células medianas, o que proporciona pigmentação a essas células. Essa informação foi ratificada pelos trabalhos de Tejesvi *et al.*, (2009) e Liu *et al.*, (2010) que mostraram que esse é um critério que possui valor taxonômico significativo para a identificação em nível de espécie para o gênero *Pestalotiopsis*.

Atualmente a morfologia de conídios é considerada o melhor marcador taxonômico morfológico para identificação em nível de espécies, sendo este o critério mais utilizado, sobretudo as diferenças de tamanho conidial. A largura e o comprimento dos conídios em espécies de *Pestalotiopsis* são significativamente estáveis, mesmo em diferentes meios de cultura, o que faz desses os critérios morfológicos bastante úteis e eficientes (HU *et al.*, 2007).

A pigmentação de células medianas ainda é uma característica morfológica bastante utilizada, pela sua estabilidade. Além disso, evidências moleculares apontam que se trata do melhor critério morfológico para determinação de *Pestalotiopsis* em nível de espécie (JEEWON *et al.*, 2003).

O comprimento e o número de apêndices apicais também são características utilizadas para identificação de espécies. Os apêndices apicais podem aparecer em diferentes posições nas células apicais hialinas e estas diferenças de posição podem também ser usadas para identificação em nível de espécie (JEEWON *et al.*, 2002).

Com relação à ecologia do gênero *Pestalotiopsis* pode-se afirmar que este é bastante disseminado e bem adaptado aos diversos habitats e microhabitats em que se apresenta. Há um número variado de espécies de *Pestalotiopsis* relacionadas com doenças em folhas e frutos, como a descrita por Cardoso, Maia e Pessoa (2002), em que

a espécie *P. psiddi* foi descrita como patógeno causando a doença conhecida como podridão no caule da goiabeira.

Esse gênero é encontrado comumente em espécies vegetais de clima temperado em várias partes do mundo (HYDE *et al.*, 2011). No Brasil esse gênero também tem sido bastante encontrado dentro de espécies tropicais. Este fato demonstra a capacidade de adaptação desse microrganismo e sua provável importância ecológica ao colonizar um número considerável de hospedeiros (HANADA *et al.*, 2010).

2.8 Variabilidade genética do gênero *Pestalotiopsis*

O estudo da variabilidade genética de fungos do gênero *Pestalotiopsis* tem aumentado em virtude de sua ampla distribuição geográfica, ora presente como parasita de plantas, ora como endofítico ou como saprófito de outras (HYDE *et al.*, 2011).

Além disso, esse gênero tem se destacado na produção de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas (LOU *et al.*, 2012). Uma das questões genéticas envolvendo esse gênero é justamente essa, como o *Pestalotiopsis microspora* adquiriu a capacidade de produzir o taxol? Embora a resposta a essa pergunta pareça estar longe de ser respondida por completo, alguns estudos genéticos envolvendo *P. microspora* indicam que esse é um dos fungos mais facilmente transformáveis geneticamente (LONG *et al.*, 1998).

Essa questão é importante para bioquímica desse gênero, pois explica parcialmente como esse microrganismo se adapta aos seus hospedeiros e sugere que o mesmo absorve o DNA da planta e o incorpora em seu genoma (STROBEL *et al.*, 1996). Contudo, essa capacidade também pode ser a causadora de vários problemas para a sua caracterização molecular intraespecífica, já que o mesmo possui essa capacidade de absorver DNA de seus hospedeiros.

Dessa forma, ferramentas da biologia molecular têm sido utilizadas com o objetivo de obter informações mais detalhadas a cerca da variabilidade genética desse gênero. Estas por sua vez podem auxiliar na seleção de indivíduos e, por conseguinte, na seleção de linhagens promissoras para a biotecnologia (HYDE *et al.*, 2007). Portanto, há a necessidade de uma caracterização molecular mais acurada para uma classificação taxonômica mais segura e fiel (PRAKASH *et al.*, 2007).

No caso da relação planta-endófito, o estudo da biologia molecular desse gênero também tem contribuído para uma melhor compreensão de como ocorre a distribuição desse microrganismo nas diferentes famílias vegetais, nos diferentes tecidos da planta

hospedeira e quais são suas particularidades e/ou necessidades com relação a seus microhabitats (HYDE *et al.*, 2011).

Como se pode perceber o gênero *Pestalotiopsis* é um gênero com muitos questionamentos a serem respondidos, do ponto de vista da sua taxonomia. Na verdade existem muitas dúvidas relacionadas a sua taxonomia tanto inter como intraespecífica. Os dados moleculares para diferenciação em nível de espécie depositados na base de dados do GenBank ainda são questionados e de acordo com Hyde *et al.*, (2011), muitos dados precisam ser revistos ou até refeitos para torná-los confiáveis.

Tendo em vista todas as dúvidas e questionamentos relacionados a identificação de fungos do gênero *Pestalotiopsis*, uma estratégia polifásica talvez possa contribuir de maneira decisiva a essa área da pesquisa microbiológica. A utilização da quimiotaxonomia em conjunto com a biologia molecular e a morfologia pode ser uma ferramenta útil e eficiente para a etapa de identificação de uma linhagem a nível de espécie.

A estratégia polifásica tem-se mostrado eficiente na identificação de alguns dos mais complexos gêneros de fungos, como dos *Aspergillus* por exemplo. Trabalhos utilizando estratégia polifásica têm aperfeiçoado o conhecimento em nível de espécie de secções complexas desse gênero (VARGA *et al.*, 2007; HOUBRAKEN *et al.*, 2007).

2.9 Potencialidades Biotecnológicas do gênero *Pestalotiopsis*

Na década de noventa, Strobel e colaboradores desenvolveram um trabalho que comprovou a produção de taxol pelo o fungo *P. microspora* (STROBEL *et al.*, 1996). Esta droga anticâncer (Figura 2), produzida por este fungo, movimenta milhões de dólares em todo o mundo, o que exemplifica muito bem o potencial dos metabólitos secundários do gênero *Pestalotiopsis* e como pode ser útil social e economicamente (STROBEL *et al.*, 2002; PROKSCH *et al.*, 2011).

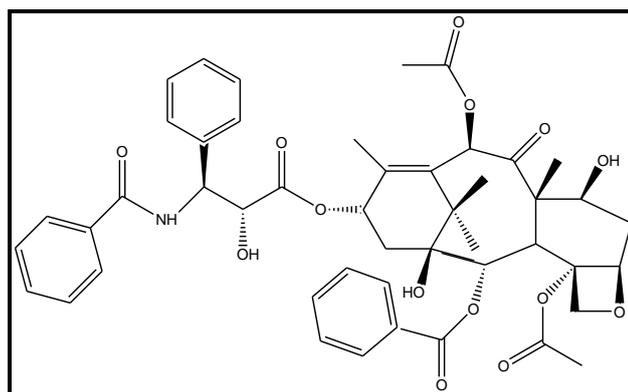


Figura 2: Estrutura química do Taxol.

Além disso, Strobel *et al.*, 2002 isolaram a isopestacina do *P. microspora*, antifúngico com atividade contra *Pythium ultimum*, oomiceto causador da podridão de raiz de espécies vegetais de importância agrícola. Magnani *et al.*, (2003), verificaram a produção de três sesquiterpenos tipo cariofilenos por *P. disseminata* isolados de *Pinus taeda*. Esses sesquiterpenos possuem atividade imunossupressora e os compostos foram nomeados Pestalotiopsolide A, Taedolidol e 6-epitaedolidol. Recentemente Proksch *et al.*, (2009), verificaram e identificaram cumarinas e alcalóides de linhagens de *Pestalotiopsis* isolados da *Rhizopora mucronata*.

A habilidade de produzir metabólitos secundários antes observados apenas em plantas demonstra a importância da interrelação da planta com o fungo hospedeiro e, por conta disso se faz necessário uma melhor compreensão de como esse processo acontece e como tal fato afeta a biologia desses microrganismos.

São mais de 196 compostos diferentes isolados a partir de espécies de *Pestalotiopsis* até poucos anos (YANG *et al.*, 2012). Destes 41 compostos identificados desse gênero fúngico com a espécie vegetal (hospedeiro) de onde ele foi isolado, assim como a atividade biológica, quando presente, e a massa molecular de cada composto isolado (Tabela 1).

Tabela 1: Substâncias produzidas por fungos do gênero *Pestalotiopsis* isoladas como endofíticas.

| Nº | ESPÉCIE | HOSPEDEIRO | MOLECULA | | CULTIVO | | ATIV. BIOL. | REFERÊNCIA | |
|----|----------------------------|--------------------------------|---|------------------|------------------|-----------|-------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | Substância | Massa | Meio | Tempo (d) | | | °C |
| 1 | <i>P. fici</i> | <i>C. sinensis (Theaceae)</i> | Pestaloficiol Q | 343.15 (M+Na) | arroz | 40 | 25 | Anticancer | Liu et. al, 2013 |
| 2 | <i>P. microspora</i> | <i>T. morobensis</i> | Isopestacina | 270.05 (M+Na) | MID | 35 | 23 | antifungico | Strobel et. al, 2002 |
| 3 | <i>P. zonata</i> | <i>C. lakka</i> | Bifenil | 285.11[M + H] | BD | 30 | 28 | antimicrobiano | Yang et. al, 2011 |
| 4 | <i>P. fici</i> | <i>C. cinensis (Theaceae)</i> | Pestalofona E | 627.21 (M+Na)+ | arroz | 40 | 25 | N | Che et. al, 2009a |
| 5 | <i>P. fici</i> | N | Pestaloficiol A | 301.14 (M + Na)+ | Malte modificado | 40 | 25 | anti-HIV | Che et. al, 2013 |
| 6 | <i>P. breviseta</i> | <i>E. divaricata</i> | Taxol | 856.23 (M + H)+ | MID | 30 | 25 | anticancer | Kathiravan & Raman, 2010 |
| 7 | <i>P. jesteri</i> | <i>F. bodenii</i> | Jesterona | 264.15 (M+H) | MID | 21 | 23 | antifungico | Strobel & Li, 2001 |
| 8 | <i>Pestalotiopsis sp</i> | <i>R. mucronata</i> | Pestalotiopirona B | 185.1 [M + H] | N | N | N | N | Wray et. al, 2011 |
| 9 | <i>P. fici</i> | N | chloropupekeanolide A | 665.17 (M+Na) | N | N | N | anticancer | Che et al, 2009c |
| | | | 20-hydroxy-60-hydroxymethyl-40-methylphenyl-2,6-dihydroxy- | | | | | | |
| 10 | <i>P. acaciae</i> | <i>T. andreanae</i> | 3-(2-isopentenyl)benzoate | 381.13 [M+Na]+ | N | N | N | N | Abe et al, 2013 |
| 11 | <i>Pestalotiopsis spp.</i> | <i>T. brevifolia</i> | Pestalotiopsina C | 355.21 [M+H] + | arroz modificado | 46 | 25 | N | Sugawara et.al, 1997 |
| 12 | <i>Pestalotiopsis spp.</i> | <i>T. brevifolia</i> | Pestalotiopsol A | 199.13 [M+H] | arroz modificado | 46 | 25 | N | Sugawara et.al, 1997 |
| 13 | <i>P. virgatula</i> | <i>S. caseolaris</i> | α -pyrone | 285.0968 [M+H]+ | N | N | N | N | Ali et. al, 2013 |
| 14 | <i>P. virgatula</i> | <i>S. caseolaris</i> | Pestalotiopirona J | 315.1 [M+H]+ | N | N | N | N | Ali et. al, 2013 |
| 15 | <i>P. fici</i> | N | Chloropestolide A | 665.17 [M+Na]+ | N | N | N | anticancer | Che et al, 2009c |
| 16 | <i>P. virgatula</i> | N | Virgatolide A | 457.14 [M + Na] | N | N | N | N | Che et al, 2011 |
| 17 | <i>P. pauciseta</i> | <i>T. pentaphylla</i> | Taxol | 856.23 (M + H)+ | MID | N | N | anticancer | Venilla & Muthumary, 2011 |
| | | | 7-hydroxy-5-methoxy-4,6-dimethyl-7-O-a-L-rhamnosyl-phthalide | 377.12 [M + Na] | arroz | 60 | 28 | N | Lou et. al, 2011 |
| | | | 7-hydroxy-5-methoxy-4,6-dimethyl-7-O-b-D-glucopyranosyl-phthalide | 393.11 [M +Na] | arroz | 60 | 28 | N | Lou et. al, 2011 |
| 19 | <i>P. heterocornis</i> | <i>B. gymnorhiza</i> | glucopyranosyl-phthalide | 393.11 [M +Na] | arroz | 60 | 28 | N | Lou et. al, 2011 |
| 20 | <i>Pestalotiopsis sp.</i> | <i>R. mucronata</i> | Pestalotiopsol A | 242.10 [M+H]+ | arroz | 39 | 24 | antimicrobiano | Wray et. al, 2011 |
| 21 | <i>Pestalotiopsis sp.</i> | N | Pestalotiopsol A | 301.2 [M + H]+ | BD | 60 | 28 | antimicrobiano/anticancer | |
| 22 | <i>Pestalotiopsis sp.</i> | N | 4-Hidroxiifeniletanol | 138.13 [M + H]+ | BD | 60 | 28 | N | Huang et. al, 2011 |
| 23 | <i>P. photiniae</i> | <i>Roystonea regia</i> | Photipyron B | 253.10 [M+Na] | arroz modificado | 40 | 24 | N | Ding et al, 2012 |
| 24 | <i>P. photiniae</i> | <i>R. regia</i> | Photipyron C | 253.10 [M+Na] | arroz modificado | 40 | 24 | N | Ding et al, 2012 |
| 25 | <i>P. fici</i> | <i>Camellia sinensis</i> | Pestalofone F | 647.21 [M + Na]+ | arroz modificado | 40 | 25 | anticancer | Liu et. al, 2011 |
| 26 | <i>P. fici</i> | <i>C. sinensis</i> | Pestalofone G | 649.22 [M + Na]+ | arroz modificado | 40 | 25 | anticancer | Liu et. al, 2011 |
| 27 | <i>P. fici</i> | <i>C. sinensis</i> | Pestalofone H | 649.22 [M + Na]+ | arroz modificado | 40 | 25 | anticancer | Liu et. al, 2011 |
| 28 | <i>P. vaccinii</i> | <i>Kandelia candel</i> | Pestalamine A | 410.15 [M+Na]+ | arroz modificado | 35 | 25 | anticancer | Liu et. al, 2014 |
| | | | 9-Hydroxybenzo[c]loxepin- | | | | | | |
| 29 | <i>P. virgatula</i> | <i>Terminalia chebula Retz</i> | 3[1H]-one | 199.03[M + Na]+ | MID | 21 | 23 | N | Jaroszewski et. al, 2009 |
| 30 | <i>P. theae</i> | <i>Turraeanthus longipes</i> | Cytosporin F | 398.25 [M+NH4] | Arroz | N | N | N | Lai et. al, 2013. |
| 31 | <i>Pestalotiopsis sp.</i> | <i>Pinus taeda</i> | Pestalotiopsina A | 295 [M+H]+ | Meio enriquecido | 52 | 25 | N | Koshino et.al, 1996 |
| 32 | <i>Pestalotiopsis sp.</i> | <i>P. taeda</i> | Taedololol | 281 [M+H]+ | Meio enriquecido | 52 | 25 | N | Koshino et.al, 1996 |
| 33 | <i>Pestalotiopsis sp.</i> | <i>P. taeda</i> | 6-Epitaedololol | 281 [M+H]+ | Meio enriquecido | 52 | 25 | N | Koshino et.al, 1996 |
| 34 | <i>P. foedan</i> | N | Pestafolide A | 305.13 (M + Na)+ | arroz modificado | 40 | 25 | <i>C. albicans</i> | Che et. al, 2008b |
| 35 | <i>P. foedan</i> | N | Pestaphthalide A | 247.05 (M + Na)+ | arroz modificado | 40 | 25 | <i>C. albicans</i> | Che et. al, 2008b |
| 36 | <i>P. disseminata</i> | N | 6-Hydroxypunctaporonina E | 267.15 [M - H]- | meio arroz | 30 | 25 | antimicrobiana | Gloer et. al, 2006 |
| 37 | <i>P. disseminata</i> | N | 6-Hydroxypunctaporonina B | 267.15 [M - H]- | meio arroz | 30 | 25 | antimicrobiana | Gloer et. al, 2006 |
| 38 | <i>P. theae</i> | <i>C. sinensis</i> | Pestalazina A | 653.12 [M+ Na]+ | meio arroz | 40 | 25 | N | Che et al, 2008a |
| 39 | <i>P. theae</i> | <i>C. sinensis</i> | Pestalamida B | 365.11 [M + Na]+ | meio arroz | 40 | 25 | Antifungico | Che et al, 2008a |
| 40 | <i>P. photiniae</i> | <i>R. regia</i> | Photinide A | 327.08 [M + Na]+ | Meio enriquecido | 40 | 25 | anticancer | Che et al, 2009a |
| 41 | <i>P. photiniae</i> | <i>R. regia</i> | Photinide F | 343.07 [M + Na]+ | Meio enriquecido | 40 | 25 | anticancer | Che et al, 2009a |

A diversidade de compostos produzidos por fungos desse gênero, como os apresentados no quadro acima, demonstra como esse gênero é rico do ponto de vista de seu metabolismo secundário, o que o coloca como uma fonte de recursos biológicos importantes para estudos relacionadas a busca de novos fármacos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Analisar os perfis genômico, proteômico e metabolômico de linhagens selvagens e mutantes de fungos do gênero *Pestalotiopsis*, associados a basidiomicetos e plantas da Amazônia para produção de substâncias de interesse farmacológico.

3.2 Objetivos Específicos:

- 1) Avaliar as linhagens de *Pestalotiopsis* associadas a basidiomicetos e plantas da Amazônia brasileira, quanto a produção de metabólitos anticâncer e anticandida;
- 2) Verificar a variabilidade genética interespecífica de linhagens de *Pestalotiopsis* spp., associadas a basidiomicetos e plantas da Amazônia brasileira;
- 3) Padronizar procedimentos de análise proteômica e metabolômica de *Pestalotiopsis* spp. para aperfeiçoamento da produção e obtenção dos metabólitos de interesse;
- 4) Desenvolver metodologia de análise e classificação taxonômica de *Pestalotiopsis* spp. através do perfil químico, visando aperfeiçoar estudos de diversidade e prospecção de metabólitos;
- 5) Isolar e identificar substâncias de linhagem de *Pestalotiopsis* sp. selecionada a partir dos ensaios biológicos para verificar a consistência dos dados de análises de perfis químicos;
- 6) Produzir mutantes de linhagens *Pestalotiopsis* selecionada pelos ensaios biológicos, verificando as modificações genéticas, morfológicas, e quanto a produção dos metabólitos de interesse;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condições de cultivo para reativação das linhagens de *Pestalotiopsis* spp.

Na etapa inicial do trabalho foram utilizadas 42 linhagens cujos aspectos morfológicos indicavam pertencerem ao gênero *Pestalotiopsis* (Tabela 2). A maioria das linhagens selecionadas foi isolada como endófito ou associadas a basidiomicetos da região Amazônica. Todas pertencentes a Coleção do Laboratório de Bioensaios e Microrganismos da Universidade Federal do Amazonas (LaBMicra/UFAM). Foram reativadas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e mantidas em placa de Petri a 24 °C.

Tabela 2. Linhagens de fungos pertencentes a coleção do LaBMicra/UFAM selecionadas para a realização dos trabalhos de Tese.

| Nº | Cod. | Id coleção | Hospedeiro | Parte da planta |
|----|------|--------------|------------------------------|-----------------|
| 01 | P01 | GhCg 3.2.2 | <i>Gustavia elliptica</i> | Casca do galho |
| 02 | P02 | GhCg3.2.1 | <i>G. elliptica</i> | Casca do galho |
| 03 | P03 | Ga F3.1.2 | <i>G. augusta</i> | Folha |
| 04 | P04 | GaFr1.1.2b | <i>G. augusta</i> | Fruto |
| 05 | P05 | GaFr3.2.3 | <i>G. augusta</i> | Fruto |
| 06 | P06 | GaFr1.2.3 | <i>G. augusta</i> | Fruto |
| 07 | P07 | GaC1.3.2a | <i>G. augusta</i> | Caule |
| 08 | P08 | GaC2.3.1 | <i>G. augusta</i> | Caule |
| 09 | P09 | GaC2.1.1 | <i>G. augusta</i> | Caule |
| 10 | P10 | B5-3 | <i>Pinus elliottii</i> | Espinho |
| 11 | P11 | AnspCg1.2.1 | <i>Rollinia</i> sp. | Casca do galho |
| 12 | P12 | AnspCg1.1.3a | <i>Rollinia</i> sp. | Casca do galho |
| 13 | P13 | DgCr1.3.3 | <i>Duguetia stelachantha</i> | Casca da raiz |
| 14 | P14 | VrC1.2.1 | <i>Victoria amazonica</i> | Caule |
| 15 | P16 | DgCr1.1.3a | <i>D. stelachantha</i> | Casca da raiz |
| 16 | P17 | EoR7.1.1 av | <i>Euterpe oleracea</i> | Raiz |
| 17 | P18 | EoR8.1.1C | <i>E. oleracea</i> | Raiz |
| 18 | P19 | EoR7.1.1b | <i>E. oleracea</i> | Raiz |
| 19 | P24 | MgCe2.1.2B | <i>Myrcia guianensis</i> | Caule |
| 20 | P23 | MgCe1.2.2 | <i>M. guianensis</i> | Caule |
| 21 | P25 | MgRe3.1.1 | <i>M. guianensis</i> | Raiz |
| 22 | P27 | MgF2.3.3 | <i>M. guianensis</i> | Folha |
| 23 | P28 | MgF2.1.3 | <i>M. guianensis</i> | Folha |
| 24 | P29 | MgCe3.2.3 | <i>M. guianensis</i> | Caule |
| 25 | P31 | Bas1a 3.1b | Basidiomiceto | Basidiocarpo |

| | | | | |
|----|-----|---------------|-------------------------|--------------|
| 26 | P33 | Bas1a 3.1a | Basidiomyceto | Basidiocarpo |
| 27 | P36 | Bas1a2.1B | Basidiomyceto | Basidiocarpo |
| 28 | P37 | Bas1a1.1 | Basidiomyceto | Basidiocarpo |
| 29 | P38 | Bas2b1.1 | Basidiomyceto | Basidiocarpo |
| 30 | P40 | GhF3.1.2 B | <i>G. elliptica</i> | Folha |
| 31 | P43 | CrajC3.2.2 | <i>Arrabidaea chica</i> | Caule |
| 32 | P44 | CrajF2.3.1 | <i>A. chica</i> | Folha |
| 33 | P47 | EoR6.2.1b | <i>E. oleracea</i> | Raiz |
| 34 | P46 | Bas 3a 1.1 | Basidiomyceto | Basidiocarpo |
| 35 | P48 | EoR5.2.1 av | <i>E. oleracea</i> | Raiz |
| 36 | P49 | EoR6.1.2 | <i>E. oleracea</i> | Raiz |
| 37 | P50 | EoR7.1.1c | <i>E. oleracea</i> | Raiz |
| 38 | P51 | EoR7.1.1 ISP2 | <i>E. oleracea</i> | Raiz |
| 39 | P52 | Bas 3a 3.1 | Basidiomyceto | Basidiocarpo |
| 40 | P53 | EoR71.1b | <i>E. oleracea</i> | Raiz |
| 41 | P54 | EoR1.2.1C av | <i>E. oleracea</i> | Raiz |
| 42 | P55 | Bas1a 2.1 | Basidiomyceto | Basidiocarpo |

4.2 Caracterização macro e micromorfológica

As linhagens tiveram primeiramente seu gênero confirmado pela caracterização taxonômica morfológica, através da análise das estruturas macro e micromorfológicas. Para isso foram cultivadas em meio BDA por 15 dias a temperatura de 24 °C.

Para análise fenotípica macroscópica foram consideradas características das culturas como: cor, textura, topografia, pigmento difuso, cor do verso e topografia do verso da colônia. As informações foram confrontadas com dados da literatura para esse gênero (SUTTON, 1980; NAG RAJ, 1993; HYDE *et al.*, 2011).

Para as análises micromorfológicas foram preparadas placas de Petri com meio BDA e repicados três fragmentos 2,0 mm x 2,0 mm de cada colônia isolada, colocadas na borda do repique três lamínulas 18,0 mm x 18,0 mm esterilizadas. Decorrido 15 dias a 24 °C as lamínulas foram transferidas para lâminas de microscopia e coradas com azul de lactofenol.

O conídio, principal estrutura utilizada na caracterização micromorfológica para o gênero *Pestalotiopsis*, foi descrito quanto ao comprimento e largura das células medianas, quanto ao número e o comprimento do apêndice apical e quanto ao comprimento do apêndice basal.

As medições foram realizadas de forma aleatória em 20 conídios para cada linhagem. Para isso utilizou-se de microscópio óptico da ZEISS com câmera acoplada para captura de imagem com aumento de 200x e 400x. Os dados obtidos foram comparados com a literatura específica e utilizados como informação complementar para identificação das espécies.

Os dados das medições das microestruturas foram analisados estatisticamente, utilizando para isso a análise de variância (ANOVA), em busca das características micromorfológicas mais significativas para diferenciação entre linhagens de diferentes espécies.

4.3 Identificação por biologia molecular: Extração de DNA, PCR e Sequenciamento

As linhagens de *Pestalotiopsis* spp. foram cultivadas em erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio Batata Dextrose (BD) por 3 dias a 24 °C e 120 rpm. O micélio foi filtrado e triturado com sílica para lise celular, e o DNA genômico foi extraído com kit ZR Fungal\Bacterial DNA microprep marca ZYMO RESEARCH, de acordo com o protocolo do fabricante (Anexo 1).

O produto da extração foi preparado com 3 µL do DNAg mais 3 µL de uma solução de GelRed 0,001 % e foi observado em gel de agarose a 0,8 % submetido a voltagem de 80 V por 30 min., e após a corrida eletroforética as bandas foram visualizadas em transluminador UV. O gel foi fotodocumentado e utilizado para conferir a pureza e a quantidade do DNA por comparação com marcador de peso molecular de 1 Kb *DNA ladder* (Invitrogen™).

O DNA genômico foi analisados por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) conforme descrito por Boichenko *et al.*, (2000) com adaptações de Souza *et al.*, (2008), para amplificação do fragmento interno *Its 1*, 5,8s e *Its 2* do rDNA foram utilizados os *primers* para a amplificação das regiões *Its 1* a *2* do rDNA, *primers* *Its1* (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e *Its4* (5'TCCTCCGCTTATTGATATG 3') Souza *et al.*, (2008).

A reação foi preparada conforme descrito na Tabela 3 e o resultado foi avaliado em gel de agarose 1,5 %. Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Genética Aplicada a Saúde e a Biotecnologia da UEA.

Tabela 3. Componentes da PCR e suas respectivas concentrações e quantidades.

| Reagentes | Concentração | Volume (μL) |
|-------------------|--------------|--------------------------|
| Água milli-q | - | 10,1 |
| Tampão | 10x | 2,5 |
| MgCl ₂ | 25mM | 3,0 |
| dNTP | 1,25mM | 3,0 |
| Primer Its1 | 10pMol | 2,0 |
| Primer Its4 | 10pMol | 2,0 |
| Taq polimerase | 5,0U | 0,4 |
| DNA genômico | - | 2,0 |
| Volume final | - | 25,0 |

As reações de amplificação foram submetidas ao termociclador em uma sequência com os passos: desnaturação inicial (94 °C por 4 minutos), seguida de 35 ciclos composta por etapa de desnaturação (94 °C durante 2 minutos), anelamento (55 °C durante 2 minutos), alongação (72 °C durante 2 minutos) e extensão final com 10 minutos a 72 °C.

Após a PCR 2,0 μL de cada amostra foi misturada a 2,0 μL de GelRed 0.001% e aplicada em gel de agarose 1,5 %. O marcador de peso molecular de 1 Kb DNA ladder foi colocado no primeiro poço do gel e a corrida eletroforética foi realizada com voltagem de 80 V por 20 min. Após a corrida as bandas foram visualizadas em transluminador de luz UV e o gel foi fotodocumentado.

Anteriormente à etapa de sequenciamento todas as amostras foram submetidas à etapa de purificação utilizando a enzima ExoSAP marca USB Affymetrix, uma exonuclease utilizada para degradar o excesso de *primer* oriundo da etapa de amplificação. Foram utilizados 3,0 μL de enzima para 5,0 μL de cada amostra, incubando a mistura a 37 °C por 15 minutos e depois a 80 °C por 15 minutos para inativação da enzima.

A etapa de sequenciamento dos amplicons foi realizada no Laboratório de genômica do Centro de Apoio Multidisciplinar da UFAM (CAM/UFAM) e para a etapa de sequenciamento todas as amostras foram diluídas 1/10 e utilizou-se 1,0 μL de cada amostra para o sequenciamento. O mix para reação de amplificação do sequenciamento foi preparado de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4. Componentes da PCR de sequenciamento e suas respectivas concentrações e volumes.

| Reagentes | Volume μL / amostra |
|----------------------------------|--------------------------------|
| Big Dye | 1,0 |
| Água milli-Q | 5,5 |
| Tampão | 2,0 |
| Primer <i>Its1</i> e <i>Its4</i> | 0,5 (10 pMol) |
| Produto da PCR | 1,0 |
| Volume final | 10 μL |

Após o PCR de sequenciamento as amostras foram precipitadas de acordo com o protocolo (Anexo 2) e foram então analisadas no sequenciador 3500 Genetic Analyser (*Life Technologies*).

Após a decodificação das sequências nucleotídicas, todas foram conferidas visualmente para verificação da qualidade das sequências, e em seguida contrastadas com os depósitos do *GenBank* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), por meio do *Blast_n* em busca de sequências semelhantes para a identificação das espécies.

4.4 Análise filogenética das regiões *Its1* e *Its2* do rDNA

As sequências obtidas foram montadas e alinhadas no programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>) utilizando ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) otimizando as sequências manualmente quando necessário. A análise filogenética foi realizada usando o programa MEGA6 (TAMURA *et al.*, 2013). Para avaliar as similaridades e/ou diferenças filogenéticas referentes às regiões *Its1* e 2 do rDNA das linhagens estudadas foi construída a árvore filogenética pelo método de Máxima Parcimônia (MP), com busca heurística pelo algoritmo TBR (“*Tree-Bisection-Reconnection*”), considerado o de maior eficiência e com *bootstrap* de 1000 repetições. Uma linhagem de *Aspergillus niger* (As18) foi utilizada como “*outgroup*” para controle externo.

4.5 Avaliação da diversidade genética pela técnica de AFLP

O DNA genômico de todas as linhagens, obtido na etapa de extração, foi submetido à técnica de AFLP (*Amplified Restriction Fragment Polymorphism*) conforme a metodologia descrita por Vos *et al.*, (1995):

1. Digestão do DNA genômico por endonucleases de restrição e ligação de adaptadores;
2. Amplificação dos fragmentos de restrição;
3. Análise em gel ou por capilaridade dos fragmentos amplificados.

Para realização desta técnica todas as amostras foram previamente avaliadas quanto a quantidade de DNA genômico em equipamento NanoDrop. Para a etapa de AFLP propriamente dita foi utilizado o Kit *AFLP[®] Analysis System for Microorganisms* da Invitrogen - Life Technologies. Foram seguidos os passos de acordo com o protocolo do fabricante (Anexo 3).

De forma geral foram realizadas as etapas de digestão do DNA genômico com as enzimas de restrição *EcoR I* e *Mse I*; ligação de adaptadores específicos aos terminais dos fragmentos amplificados gerados pela clivagem; pré-amplificação dos fragmentos de restrição utilizando os *primers EcoR I* (E-0) e *Mse I* (M-0), amplificação seletiva e dos fragmentos utilizando os *primers E-AC* e *M-A*, específicos para fungos filamentosos.

Após a reação final de PCR, e amplificação das regiões selecionadas, 3 µL de GelRed 0.001% foram adicionados a 5 µL de cada reação (amostra), e então aplicado em gel de agarose 2,5 %, com marcador de peso molecular de 1 Kb *DNA ladder* (InvitrogenTM). A cuba de eletroforese foi submetida a uma voltagem de 80 V durante 1 h e 20 min. Após a corrida as bandas foram visualizadas em transluminador de luz UV e o gel foi fotodocumentado.

Os perfis de bandas obtidos pelo AFLP foram transformados em variáveis binárias, com número 1 significando presença de banda e o número 0 ausência. A matriz resultante constituída pelos amplicons foi analisada pelo programa STATISTICA (data analysis software system), *StatSoft*, Inc. (2005), versão 7.1. www.statsoft.com. A partir desta matriz foram determinadas as similaridades das linhagens por meio do coeficiente de Pearson.

O programa utilizou os dados da matriz de similaridade para a construção do dendrograma de agrupamento hierárquico pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*).

4.6 Perfil químico geral das linhagens de *Pestalotiopsis* spp.

Para o estudo do perfil químico dos metabólitos secundários de *Pestalotiopsis* spp. as 33 linhagens foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 6,0 mL de meio de cultura BDL (Batata, Dextrose e extrato de Levedura 2 %) (SOUZA *et al.*, 2004) previamente esterelizados e inoculados com 10 μL de suspensão de conídios na concentração de 30×10^8 cels.mL⁻¹.

O experimento foi realizado em triplicata e mantido em modo estático a 24° C por 25 dias. Foram tratadas com o mesmo procedimento uma amostra contendo apenas o meio de cultivo como amostra testemunha, e outra com suspensão de esporos de *A. niger* (As18) como “outgrup” nas etapas de análise de dados.

Decorrido o tempo de cultivo os meios fermentados foram filtrados para separação do micélio. Foram retiradas alíquotas de 1,0 mL de cada amostra e congeladas para análise de perfil de proteínas secretadas. Ao restante do meio líquido fermentado foram adicionados 3,0 mL de Acetato de Etila (AcOEt) para a extração dos compostos de media e baixa polaridade. A mistura foi agitada em vortex por 3,0 minutos do meio congelado foi retirada a fase orgânica, seguindo-se a evaporação do solvente.

Para a análise por espectrometria de massas (APCI-MS), as amostras foram agitadas em vortex por 3,0 minutos com 150 μL de Metanol (MeOH) para promover a solubilização do extrato (solução-mãe). Da solução-mãe foram retirados 50 μL e adicionados a 500 μL de MeOH (solução de análise). As amostras foram analisadas por inserção direta em espectrômetro de massas da THERMO na faixa de massas de 100 a 1.000 em modo positivo.

Os resultados obtidos foram analisados sob dois aspectos: observando em cada amostra a presença de íons referentes a possíveis substâncias de interesse farmacológico, de acordo com a literatura, e através da análise estatística do conjunto de íons. Nesta análise foram considerados os íons na faixa de m/z 100 a 800, cujos valores e intensidades foram tabelados no programa Excel e transformados em matrix bidimensional dos valores de m/z x linhagem.

Foram considerados de valor numérico 1 todos os sinais abaixo de 10 % de abundância relativa. Foi então aplicada a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise Hierárquica de Cluster (HCA), ambas no programa STATISTICA (data analysis software system), StatSoft, Inc. (2005), versão 7.1. www.statsoft.com.

A PCA identifica dentro de um grande universo, neste caso, um grande número de íons formados, qual direção que contém o maior número de informações. Por meio de projeções dos resultados analíticos de cada amostra formados pelas novas componentes (components principais), é possível demonstrar diferenças entre as amostras utilizadas (dados de *scores*) determinando quais as principais variáveis envolvidas, portanto os principais íons responsáveis pelas diferenças entre as linhagens.

A HCA é uma análise exploratória que busca classificar diferentes amostras dentro de um grupo, de modo que o grau de associação entre dois ou mais objetos seja máximo se pertencerem ao mesmo grupo (*cluster*) ou mínimo se forem diferentes. Assim ambas se mostram eficientes para o tipo de análise proposta nesta parte do trabalho.

4.7 Obtenção dos extratos brutos das linhagens de *Pestalotiopsis* spp.

Para o cultivo das 33 linhagens de *Pestalotiopsis* spp. em maior escala, três fragmentos de 4,0 mm x 4,0 mm de cada linhagem com 15 dias de crescimento foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL em triplicata, contendo 100 mL de meio batata-dextrose acrescido de 0,2 % de extrato de levedura sob condições estéreis (SOUZA *et al.*, 2004). Os frascos foram incubados por 25 dias a 24 °C.

Após a fermentação, os meios de cultura, e os micélios foram separados por filtração. A extração do meio de cultura fermentado foi feita por partição com AcOEt, por 3 vezes. O micélio foi macerado com AcOEt:MeOH (1:1) por 48 h e depois filtrado. Todos os extratos foram submetidos à rotaevaporador, com pressão reduzida, para eliminação dos solventes, secos, pesados e armazenados a -4 °C para a realização dos testes biológicos de avaliação das atividades antifúngica e citotóxica.

4.8 Testes para detecção das atividades biológicas:

4.8.1 Ensaio para atividade anticândida

Todos os extratos foram testados frente à linhagem patogênica de *Candida albicans* obtida da coleção de microrganismos patogênicos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz – AM), código CFAM – 1342. Os testes foram determinados pelo método de diluições sucessivas em caldo, conforme recomendado pelo Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing do US *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1997).

O bioensaio foi realizado em placas de 96 poços com 100 µL de caldo Sabouraud 2X, 100 µL de solução dos extratos teste (2,0 mg.mL⁻¹), e 10 µL de suspensão fúngica (*C. albicans*) com 1.0 x 10⁷ UFC.mL⁻¹, seguido por incubação a 37 °C por 24 horas (COS *et al.*, 2006). Os extratos testes foram preparados solubilizando-os em dimetilsulfóxido (DMSO) 10 % (RODRIGUES-FILHO, 2007).

A bioatividade foi registrada como ausência de coloração nos poços depois da adição de 20 µL de revelador azul de nitrotetrazólio (NBT). O antibiótico nistatina (2.0 mg.mL⁻¹) foi usado como controle positivo, e o meio de cultivo Sabouraud, sem aditivos, foi usado como controle negativo.

Os extratos que apresentaram resultados positivos foram submetidos à avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI), por diluições sucessivas, partindo de 1,0 até 0.015 mg.mL⁻¹. As frações obtidas nas etapas subsequentes do trabalho foram testadas nas mesmas condições.

4.8.2 Ensaio para atividade citotóxica

A avaliação da atividade citotóxica dos extratos das linhagens de *Pestalotiopsis* spp. foi realizado utilizando o método Alamar Blue. Neste método o reagente Alamar Blue é usado como indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades de redox. Em células com proliferação o reagente é reduzido. A forma oxidada é azul e não fluorescente, indicando a presença de células não viáveis, e a forma reduzida é rosa e fluorescente, indicando a presença de células viáveis.

Dessa forma, o teste de Alamar Blue foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Ahmed *et al.*, (1994) com o intuito de se analisar a viabilidade das células MRC-5 – fibroblasto humano (normal), Melanoma SKMEL 19, Carcinoma escamoso de língua CAL-27 e Adenocarcinoma gástrico ACP02, na presença dos extratos de *Pestalotiopsis* spp.

As células foram cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM completo. Elas foram contadas em câmara de Neubauer e transferidas para placas de 96 poços, cada poço contendo 1 x 10⁴ células em 200 µL de meio de cultura. A placa foi então incubada por 24 h em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂. Após este tempo, as células foram tratadas com 100 µL dos extratos previamente solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e testados na concentração de 50 µg.mL⁻¹.

A Doxorrubicina foi usada como controle positivo. O grupo controle negativo recebeu no poço a mesma quantidade de DMSO utilizada nos extratos. Após 24 h de

tratamento, 10 µL da solução reveladora de Alamar Blue (solução estoque 0,4 % 1:5 em meio de cultura sem soro fetal bovino) foi adicionada em cada poço da placa, a qual foi incubada em estufa 30 °C por 3 h e analisada sob fluorescência em leitor de placas Elisa (marca Beckman e Coulter). Os dados foram analisados em relação ao controle negativo.

4.9 Perfil químico da linhagem de *P. microspora* (AnspCg1.1.3a)

Com base nos resultados de atividade biológica foi selecionada a linhagem de *P. microspora* (P12/ AnspCg1.1.3a) para avaliação de seu perfil químico. Inóculos com 20 µL da suspensão de conídios na concentração de 30×10^8 cels.mL⁻¹ foram aplicados em 35 erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio BDL, os quais foram incubados em B.O.D. temperatura de 24 °C.

Foram retiradas triplicatas dos cultivos a cada cinco dias do 5° ao 40°, e ainda no 50° e 60° dias. A cada amostragem os meios cultivados foram filtrados e os micélios foram secos e pesados. Durante esse período as amostras do meio cultivado foram avaliadas quanto a concentração de açúcar e quanto ao pH. Esses parâmetros foram utilizados para avaliar as etapas de crescimento da linhagem e produção de metabólitos secundários em comparação ao perfil de massas. Além disso, alíquotas de cada amostra foram congeladas para análise dos perfis de proteínas secretadas.

O meio líquido cultivado foi extraído em funil de separação de 100 mL, por agitação com AcOEt 100 % e os extratos obtidos foram secos e pesados. Todos os extratos foram então avaliados quanto à atividade anticandida, conforme descrito anteriormente, e também analisados por espectrometria de massas (APCI - MS).

Para a análise dos extratos por espectrometria de massas a amostra foi solubilizada em MeOH na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹ (solução-mãe), e dessa solução 20 µL foram diluídos em 1,0 mL de MeOH (solução de análise). O equipamento utilizado foi espectrômetro da THERMO, com o probe de *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* – APCI-MS, na faixa de massas de 100 a 500 m/z em modo positivo.

4.10 Estudo da bioatividade de metabólitos de *P. microspora*

4.10.1 Preparação de extratos em escala preparativa

A linhagem *P. microspora* (P12/ AnspCg1.1.3a) considerada a mais promissora em função de sua bioatividade foi cultivada em escala preparativa para isolamento e caracterização de compostos bioativos. Foram utilizados 111 frascos Erlenmeyers de 1000 mL com 300 mL de meio líquido batata-dextrose e 0,2 % de extrato de levedura (BDL) sob condições estéreis (SOUZA *et al.*, 2004), incubados por 35 dias a 24 °C.

Após o cultivo, o meio foi filtrado para retirada do micélio, particionado com AcOEt e a fração orgânica foi concentrada em rotaevaporador com pressão reduzida para eliminação do solvente, obtendo-se o extrato **P12L**. O micélio foi extraído com MeOH:AcOEt (1:1) durante 24 h por 3 vezes e após a evaporação do solvente sob pressão reduzida foi liofilizado, resultando no extrato **P12M**.

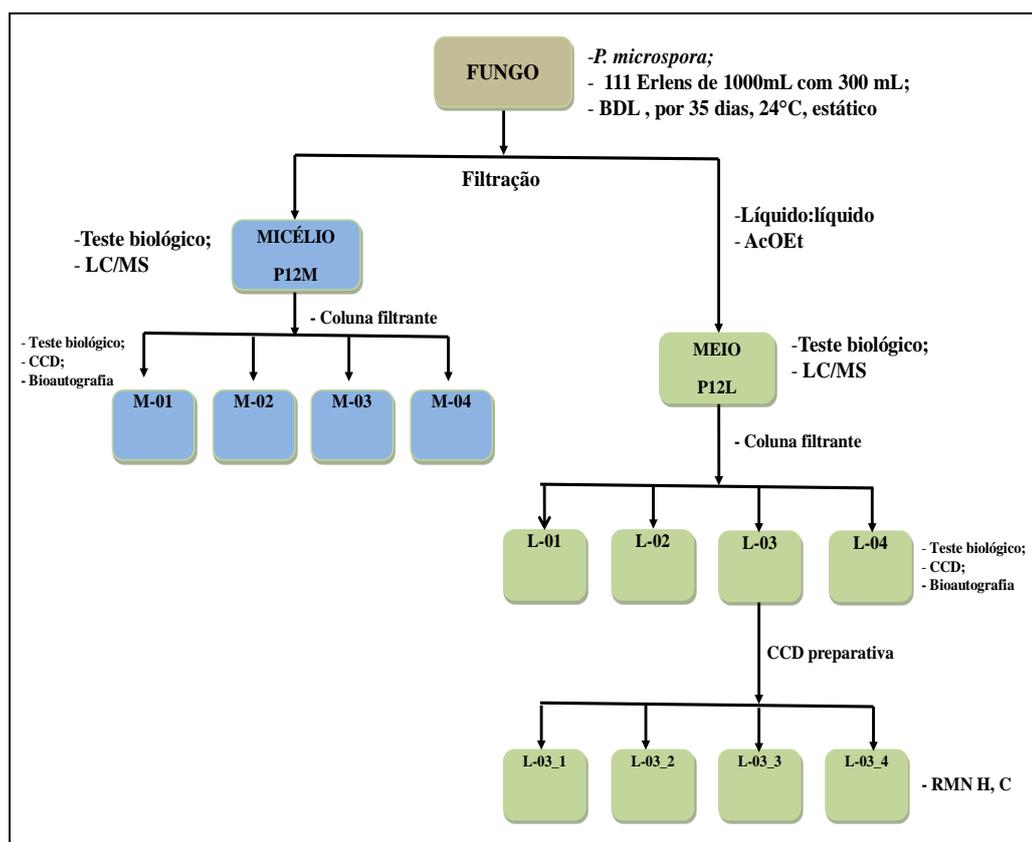


Figura 3. Produção, fracionamento e isolamento de metabólitos de *P. microspora* (P12/ AnspCg1.1.3a).

4.10.2 Fracionamento dos extratos brutos

O extrato **P12L** foi analisado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em sílica ALUGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄ para TLC (Macherey-Nagel) com várias combinações dos solventes Hex:AcOEt:MeOH, e após as análises foi submetido a coluna filtrante em sílica gel com combinações desses solventes, em gradiente de polaridade crescente, resultando em quatro frações: **P12L-1** (8:2:0), **P12L-2** (1:1:0), **P12L-3** (0: 9,5:0,5) e **P12L-4** (0:0:1). As frações foram secas, pesadas e testadas para avaliação da atividade anticândida. As frações que apresentaram a atividade foram novamente avaliadas por bioautografia em CCD conforme descrição no subitem 5.10.3

As frações de **P12L-3** e **P12L-4** foram analisadas em HPLC-DAD-MS em coluna C₁₈, da Phenomenex com analisador de espectrometria de massas ajustado para a faixa de 100 a 1000 e usando 10 µL em cada injeção. O modo de eluição gradiente linear consistiu de 60 % de água (A) e 40 % de acetonitrila (ACN) (B) até 100 % de ACN em 30 min. Utilizou-se o modificador orgânico 0,005 % de ácido trifluoroacético (TFA) na fase ACN.

O extrato **P12M** do micélio foi solubilizado em H₂O:MeOH 5 % e submetido a extração em fase sólida (SPE), em cartucho de C18 da Applied Separations com 10g. Após o acondicionamento do cartucho com H₂O:MeOH 5 % sob vácuo, a amostra foi gradativamente adicionada. Ao final o material retido foi extraído com 100 mL de MeOH e o extrato seco e pesado foi armazenado para posteriores testes biológicos e fracionamento.

O fracionamento do extrato **P12M** após análises por CCD foi submetido à coluna filtrante em sílica gel, eluída com Hexano:AcOEt:MeOH obtendo-se quatro frações: **P12M-1** (3:7:0), **P12M-2** (0:8:2), **P12L-3** (0: 1:1) e **P12L-4** (0:0:1). As frações secas, pesadas foram testadas para avaliação da atividade anticândida. As frações que apresentaram a atividade foram novamente avaliadas por bioautografia em CCD, conforme descrição no subitem 5.10.3.

4.10.3 Teste de Bioautografia

As frações **P12L-3** e **P12M-2** com atividades anticândidas e quantidades suficientes de amostra para se tentar o isolamento de substâncias foram ensaiadas por bioautografia. As frações foram eluídas com combinações de Hex:AcOEt:MeOH em pares de placas de sílica ALUGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel), aplicando-se 20

μL das frações solubilizadas em MeOH 100 % na concentração de aproximada de 10 mg.mL^{-1} .

As frações do extrato P12L foram eluídas em Hex:AcOEt:MeOH (3:6:1) e as frações de P12M foram eluídas em Hex:AcOEt:MeOH (3:5:2). Um par de cada placa foi revelado com luz UV de 254nm e/ou vanilina ácida para o registro do *R_f*, e o outro após a evaporação do eluente foi acondicionado em placas de Petri (150 x 20 mm) contendo aproximadamente 30 mL de meio de cultura sabouraud, e suspensão de *C. albicans* CFAM-1342 na concentração de 1.0×10^7 UFC.mL⁻¹.

As placas de Petri contendo as cromatoplas e o meio de cultura com o microrganismo teste foram incubadas a 37 °C por 48 horas e após aplicação do revelador NBT foram novamente incubadas por 20 minutos e então avaliadas.

4.10.4 Isolamento e análise de compostos

Com base nos *R_f*s das substâncias bioativas observados na bioautografia as frações dos extratos foram refractionados por Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) visando o isolamento dos compostos bioativos.

Para o preparo da placa de CCDP adicionou-se 10 g de sílica (sílica gel 60 preparativa com UV₂₅₄) marca Macherey-Nagel, em 30 mL de água destilada e após homogeneização, distribuiu-se uniformemente sobre placa de vidro de 10 cm x 20 cm. Após aproximadamente 12 horas de secagem em temperatura ambiente a placa de CCDP foi seca em estufa 90 °C por quatro horas para ativação da sílica.

A amostra solubilizada em 400 μL de MeOH foi aplicada de forma homogênea a 1,5 cm de uma das bordas da placa e eluída com Hex:AcOEt:MeOH (3:6:1). Decorrida a eluição e a evaporação do solvente, a placa foi revelada sob luz UV de 254 nm e as bandas foram retiradas da placa por raspagem da sílica contendo as amostras. As subfrações foram extraídas com MeOH grau HPLC secas, pesadas e armazenadas para caracterização e identificação de substâncias.

Todas as sub-frações foram analisadas em Espectrômetro de massas da THERMO, com *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* – APCI-MS operando na faixa de 100 a 500 m/z nos modos positivo e negativo.

Também foram analisadas em Espectrômetro de RMN marca Bruker AVANCE III HD, operando a 11.75 tesla, observando os núcleos de ¹H e ¹³C a 500,13 e 125 MHz, respectivamente, equipado com uma sonda multinuclear de 5 mm (BBFO Plus SmartProbe™) com gradiente de campo na direção Z.

4.11 Análise das proteínas de *Pestalotiopsis* spp. e eletroforese em gel SDS-PAGE

As amostras produzidas para os estudos do perfil químico geral das linhagens, perfil químico de *P. microspora* (P12/ AnspCg1.1.3a), e das linhagens mutantes foram analisadas para determinação dos perfis de proteínas secretadas no meio de cultura.

Nesta etapa de trabalho 400 µL das amostras congeladas a -6 °C foram liofilizadas e ressolubilizadas em 400 µL de tampão SDS 2x contendo (Tris-HCl 200mM/pH 6,8; SDS 4 % v/v; β-mercaptoetanol 4 % v/v; glicerol 20 % v/v; azul de bromofenol (0,1 % p/) e expostas a condições desnaturantes (SHAGGER, JAGOW, 1987).

Procedeu-se a análise em gel SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) contendo (3,3 mL de H₂O; 4,0 mL de acrylamide mix 30 %; 2,5 mL de Tris 1,5 M (pH 8.8); 0,1 mL de SDS (20 %); 0,1 mL de persulfato de amônia 10 %; 0,004 mL de TEMED).

4.12 Produção dos mutantes de *P. microspora* (AnspCg1.1.3a)

A linhagem de *P. microspora* (P12/ AnspCg1.1.3a) selecionada pelas atividades biológicas, foi submetida à produção de linhagens mutantes. Suspensão de conídios dessa linhagem na concentração de 30×10^8 cels.mL⁻¹ foram preparadas a partir de placa de Petri contendo o meio BDA com crescimento de 15 dias a 24° C. Essa amostra foi agitada em vortex e 1,0 mL foi transferido para um tubo de ensaio com 9,0 mL de solução salina 0,8% (solução-mãe). O mesmo foi realizado para um tubo controle para cálculo de células viáveis.

A solução-mãe foi transferida para placa de Petri estéril e submetida à radiação ultravioleta de 254 nm, a uma distância de 10 cm da fonte de radiação. A cada 2,0 minutos, até o 20° minuto, uma alíquota de 1,0 mL foi transferida para microtubo tipo eppendorf de 1,5 mL, protegido da luz.

Todas as alíquotas foram submetidas a diluições sucessivas em cinco tubos de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina 0,8%. Das últimas três diluições 100 µL foram plaqueados em BDA em triplicata, espalhados com alça de Drigalski, e incubadas a 24° C. As culturas foram regularmente avaliadas quanto a viabilidade celular dos conídios. Foram consideradas mutantes as amostras que apresentaram células viáveis no maior tempo de exposição.

4.13 Análises dos mutantes de *Pestalotiopsis* sp.

As linhagens mutantes obtidas foram submetidas à análise macro e micromorfológica conforme itens 4.2 e tiveram seu material genético extraído e amplificado conforme itens 4.3 e analisados pela técnica de AFLP conforme itens 4.5. Quanto a produção dos seus metabólitos secundários seguiu-se o procedimento descrito no item 4.10 (tempo de cultivo de 25 dias). O perfil de proteínas secretadas foi obtido de acordo com o itens 4.11.

5. RESULTADOS E DICUSSÃO

5.1 Reativação e caracterização macro e micromorfológica de *Pestalotiopsis* spp.

A análise macromorfológica do cultivo no meio de cultura (BDA) mostrou um crescimento peculiar para a maioria das linhagens, com micélio indo de ralo a cotonoso, de coloração branca algumas vezes amarelada nas bordas, apresentado no centro da placa uma coloração preta em virtude do grande número de acérvulos, estrutura típica para o gênero (SUTTON, 1980; HYDE *et al.*, 2014). As linhagens P01 (GhCg 3.2.2) e P02 (GhCg3.2.1) não apresentaram essas características e a observação das microestruturas mostrou não se tratar de fungos do gênero *Pestalotiopsis*. Ambas foram retiradas das etapas subsequentes do trabalho.

As estruturas micromorfológicas típicas para o gênero como conídios com cinco células, sendo três medianas de coloração marrom e duas células hialinas nas extremidades foram observadas em 36 linhagens confirmadas, portanto, como pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis* sp. Quatro outras linhagens também foram retiradas do grupo de trabalho, pois foram identificadas como *Fusarium* spp. (2) e *Phomopsis* spp. (2).

Os resultados obtidos com as medições das microestruturas do conídio nos permitiu propor um agrupamento das linhagens em nível de espécie, porém como a identificação levando em consideração apenas a micromorfologia não foi totalmente segura, confrontamos os resultados com os da biologia molecular. Os dados das medições das microestruturas dos conídios para 33 linhagens estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Medições da micromorfológicas de conídios de 33 espécies *Pestalotiopsis* spp.

| Espécies | Conídios (µm) | | | | Apêndices (µm) | |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------|----------------|------------|
| | 2 ^a cél. | 3 ^a cél. | 4 ^a cél. | diâmetro | basal | apical |
| <i>P. camelliae</i> (P03) | 5.46±0.48 | 5.30±0.44 | 5.44±0.74 | 6.51±0.23 | 4.52±0.24 | 17.64±2.14 |
| <i>N. clavispota</i> (P04) | 4.91±0.31 | 5.27±0.266 | 5.73±0.89 | 7.00±0.45 | 5.78±0.96 | 15.85±1.93 |
| <i>P. mangiferae</i> (P05) | 7.42±0.45 | 7.07±0.40 | 6.24±0.49 | 8.98±0.88 | 11.02±2.50 | 35.19±2.34 |
| <i>P. microspora</i> (P06) | 5.20±0.57 | 5.45±0.34 | 5.28±0.37 | 7.28±1.06 | 4.52±0.30 | 21.2±0.90 |
| <i>P. microspora</i> (P07) | 5.23±0.55 | 5.44±0.32 | 5.24±0.36 | 7.30±1.10 | 4.56±0.28 | 20.6±0.89 |
| <i>P. microspora</i> (P08) | 5.21±0.47 | 5.46±0.33 | 5.26±0.34 | 7.26±1.09 | 4.54±0.30 | 20.6±0.88 |
| <i>P. mangiferae</i> (P09) | 6.68±0.48 | 6.36±0.66 | 5.79±0.51 | 9.52±0.30 | 11.35±2.77 | 36.64±0.30 |
| <i>P. disseminata</i> (P10) | 5.48±0.49 | 5.32±0.45 | 5.48±0.78 | 6.66±0.28 | 4.42±0.34 | 17.84±2.12 |
| <i>P. mangiferae</i> (P11) | 5.69±0.62 | 5.39±0.45 | 5.64±0.94 | 6.90±0.38 | 9.06±1.91 | 21.10±1.84 |
| <i>P. microspora</i> (P12) | 5.21±0.57 | 5.46±0.36 | 5.26±0.37 | 7.30±1.09 | 4.50±0.28 | 20.6±0.90 |
| <i>P. neglecta</i> (P17) | 5.38±0.48 | 5.34±0.40 | 5.39±0.72 | 6.50±0.26 | 4.49±0.28 | 17.56±2.09 |
| <i>P. clavispota</i> (P18) | 5.41±0.33 | 5.31±0.47 | 5.44±0.78 | 6.59±0.29 | 4.40±0.34 | 17.81±2.10 |
| <i>P. clavispota</i> (P19) | 5.47±0.49 | 5.37±0.39 | 5.50±0.66 | 6.67±0.22 | 4.41±0.30 | 17.80±1.85 |
| <i>P. mangiferae</i> (P24) | 7.36±0.40 | 7.19±0.28 | 6.25±0.49 | 8.92±0.68 | 11.00±2.10 | 35.32±2.14 |
| <i>P. clavispota</i> (P25) | 5.44±0.45 | 5.35±0.36 | 5.48±0.63 | 6.61±0.28 | 4.39±0.35 | 17.90±1.65 |
| <i>P. mangiferae</i> (P27) | 5.59±0.42 | 5.45±0.35 | 5.31±0.34 | 7.08±0.25 | 9.32±1.50 | 25.5±2.77 |
| <i>P. versicolor</i> (P28) | 4.99±0.45 | 5.06±0.27 | 4.73±0.33 | 7.66±0.32 | 9.54±0.88 | 26.6±2.50 |
| <i>N. clavispota</i> (P29) | 5.53±0.27 | 5.63±0.46 | 6.04±0.90 | 7.66±0.32 | 4.65±0.83 | 28.4±3.94 |
| <i>P. mangiferae</i> (P31) | 5.50±0.83 | 5.74±0.31 | 5.48±0.63 | 6.93±0.70 | 6.98±2.17 | 23.0±3.50 |
| <i>P. clavispota</i> (P33) | 5.49±0.49 | 5.34±0.47 | 5.50±0.78 | 6.67±0.29 | 4.44±0.34 | 17.85±2.15 |
| <i>N. formicarum</i> (P36) | 5.49±0.18 | 5.58±0.41 | 6.11±0.62 | 7.65±0.34 | 4.65±0.62 | 27.88±2.86 |
| <i>P. disseminata</i> (P37) | 5.39±0.29 | 5.42±0.35 | 5.68±0.78 | 6.58±0.28 | 4.56±0.34 | 16.94±2.02 |
| <i>P. mangiferae</i> (P38) | 5.70±0.62 | 5.42±0.35 | 5.44±0.94 | 6.80±0.48 | 9.11±1.71 | 20.90±1.54 |
| <i>P. microspora</i> (P40) | 5.17±0.37 | 5.66±0.16 | 5.86±0.17 | 7.20±0.99 | 4.50±0.38 | 19.98±0.70 |
| <i>P. microspora</i> (P43) | 5.20±0.56 | 5.55±0.36 | 5.36±0.27 | 7.22±1.11 | 4.20±0.78 | 20.71±0.80 |
| <i>P. microspora</i> (P44) | 5.21±0.27 | 5.39±0.36 | 5.26±0.55 | 7.45±1.23 | 4.89±0.18 | 21.6±0.90 |
| <i>P. mangiferae</i> (P46) | 5.50±0.52 | 5.39±0.27 | 5.41±0.78 | 6.80±0.48 | 9.08±1.54 | 20.90±1.44 |
| <i>P. versicolor</i> (P47) | 4.78±0.70 | 5.04±0.17 | 4.55±0.73 | 7.78±0.30 | 9.58±0.98 | 25.3±1.90 |
| <i>P. versicolor</i> (P48) | 4.69±0.95 | 5.28±0.27 | 4.99±0.31 | 7.66±0.52 | 9.51±0.44 | 27.4±2.10 |
| <i>P. clavispota</i> (P51) | 5.26±0.35 | 5.29±0.46 | 5.28±0.53 | 6.41±0.18 | 4.69±0.27 | 18.20±1.77 |
| <i>P. adusta</i> (P52) | 5.29±0.88 | 5.39±0.32 | 5.49±0.52 | 6.40±0.46 | 4.59±0.88 | 16.96±1.89 |
| <i>P. clavispota</i> (P53) | 5.46±0.55 | 5.39±0.25 | 5.55±0.69 | 6.71±0.58 | 4.69±0.15 | 17.50±1.85 |
| <i>N. clavispota</i> (P55) | 5.54±0.28 | 5.64±0.44 | 6.02±0.92 | 7.67±0.34 | 4.67±0.82 | 28.58±3.96 |

Foram identificadas um total de 10 espécies de *Pestalotiopsis*. Ilustradas nas figuras 4 a 13, estão um exemplar de cada espécie mostrando a macromorfologia em placa, frente e verso, além da micromorfologia dos conídios.

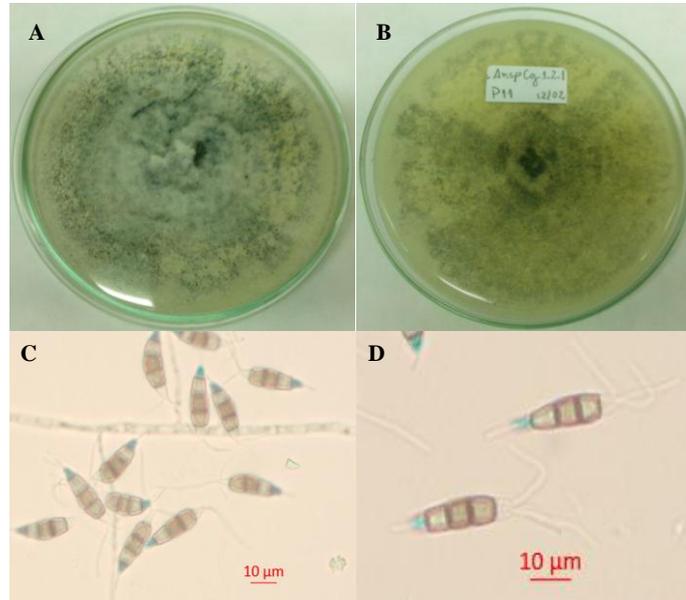


Figura 4. *P. mangiferae* P11 (AnspCg1.2.1). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa, e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual.

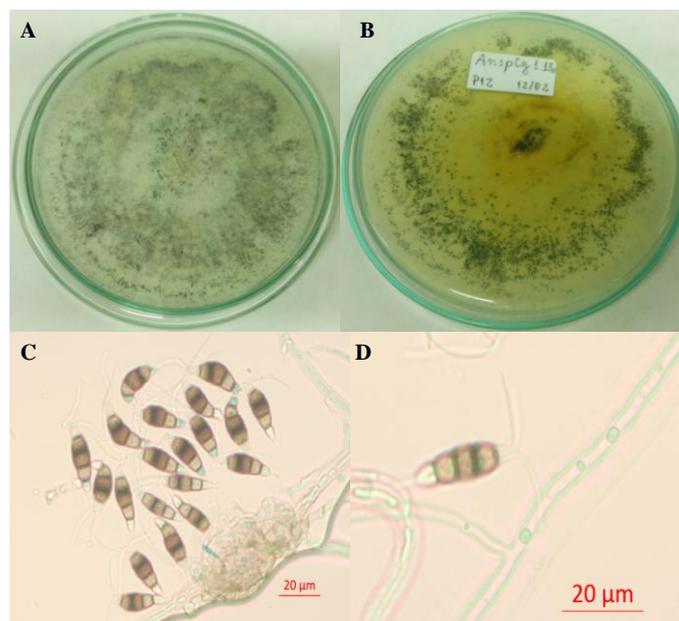


Figura 5. *P. microspora* P12 (AnspCg1.1.3a). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual.

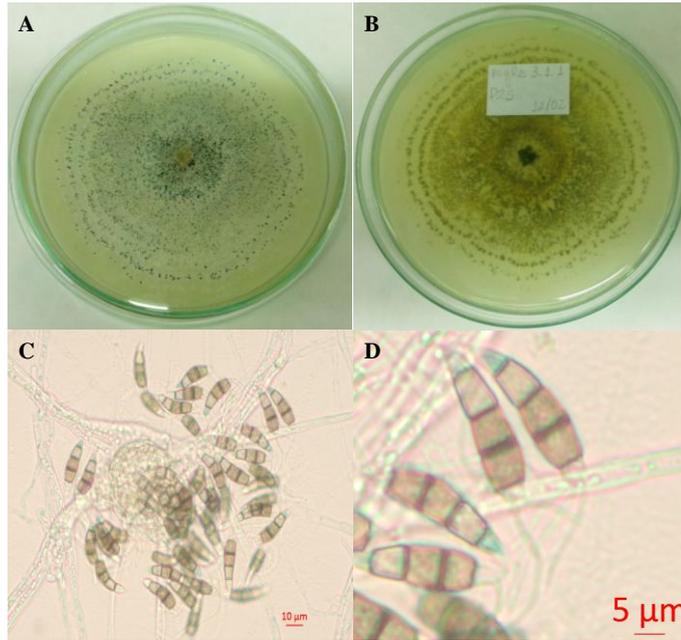


Figura 6. *P. clavispora* P25 (MgRe3.1.1). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual.

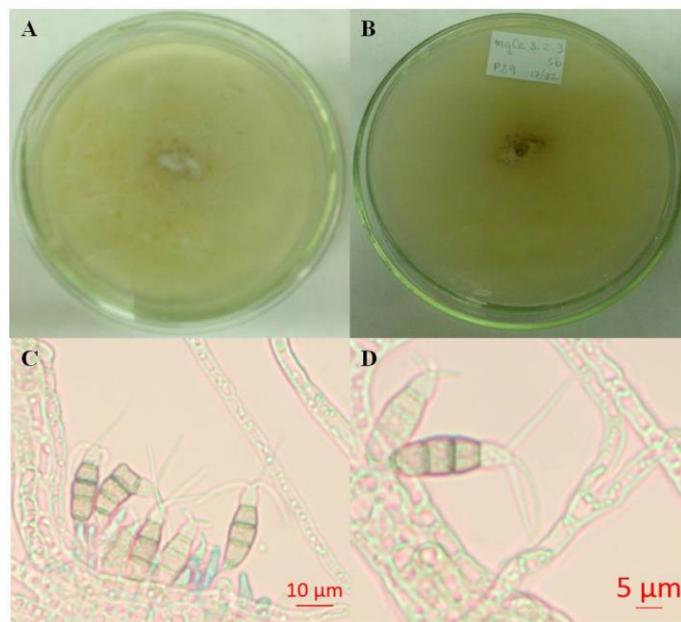


Figura 7. *N. clavispora* P29 (MgCe3.2.3). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual.

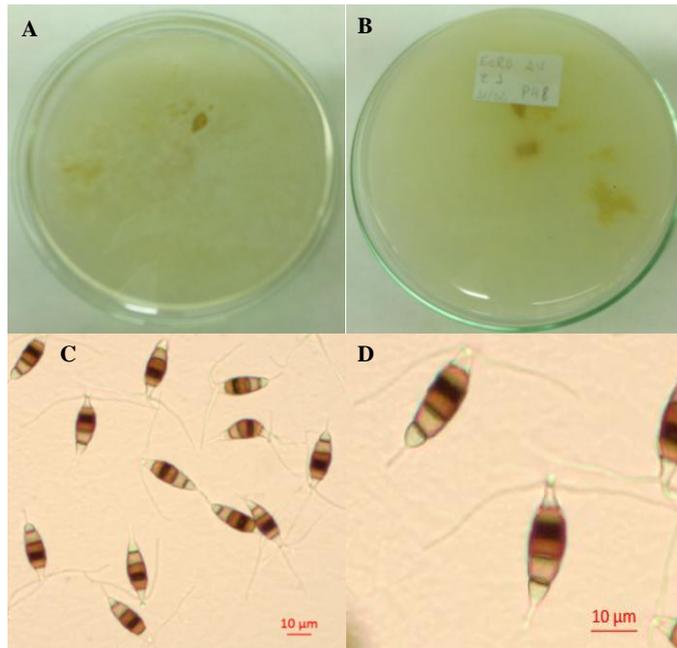


Figura 8. *P. versicolor* P48 (EoR5.2.1 av). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual.

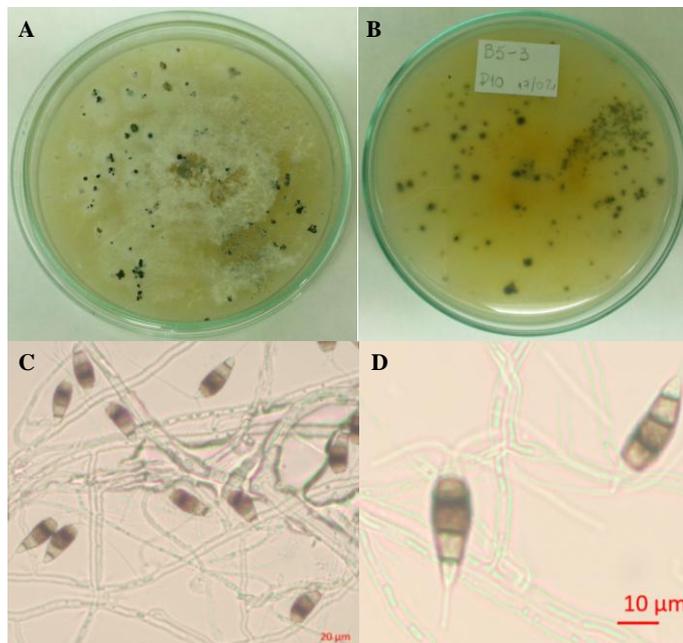


Figura 9. *P. disseminata* P10 (B5-3). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual.

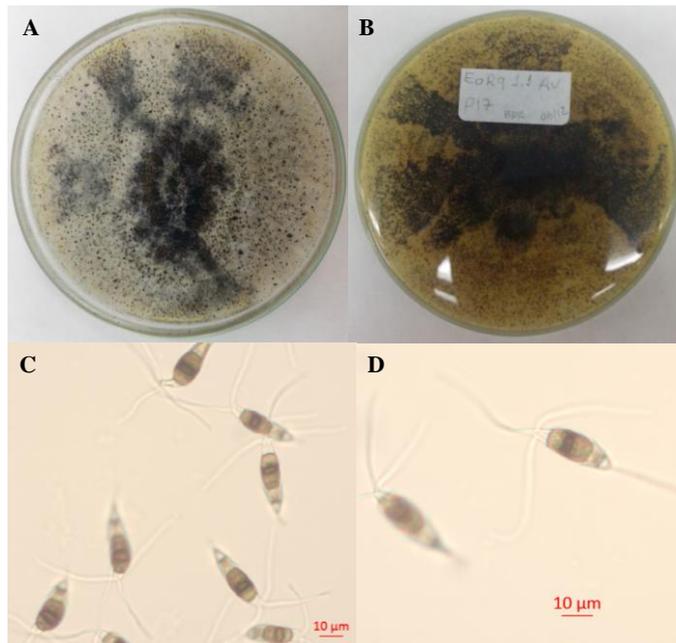


Figura 10. *P. neglecta* P17 (EoR7.1.1av). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual.

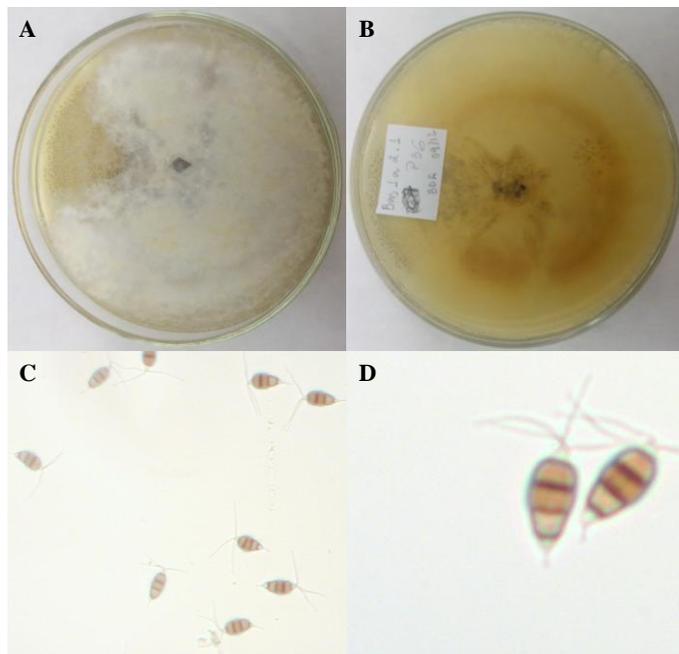


Figura 11. *N. formicarum* P36 (Bas1a2.1B). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual.

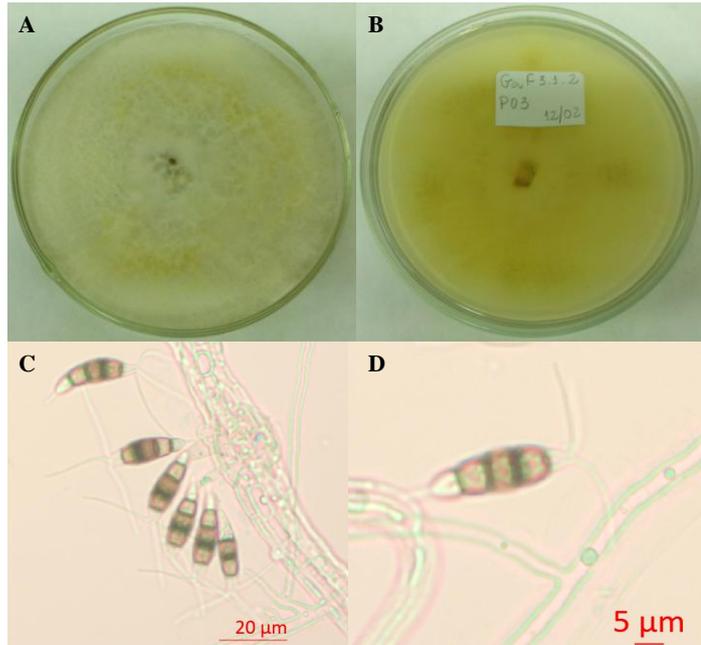


Figura 12. *P. camelliae* P03 (GaF3.1.2). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual.

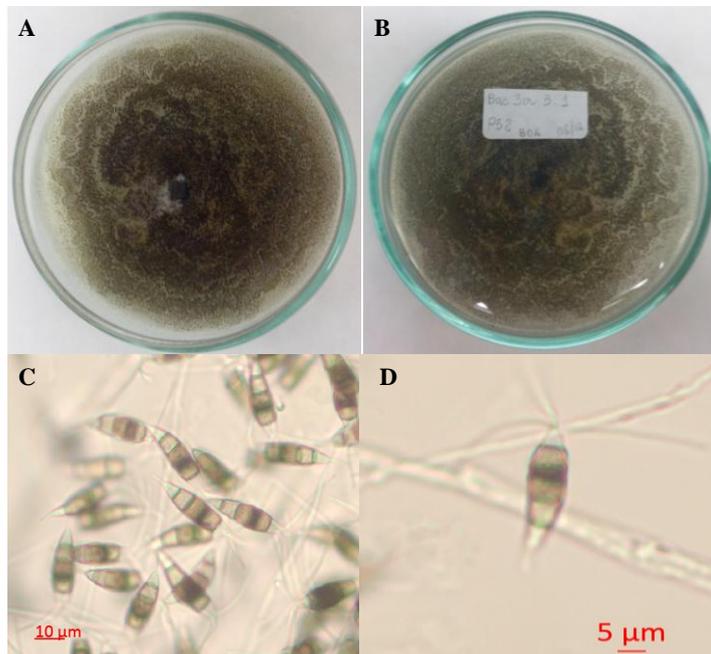


Figura 13. *P. adusta* P52 (Bas3a3.1). Na ordem: em A e B imagem da frente e verso da cultura em placa e em C e D imagem do conjunto de conídios e microestrutura de conídio individual.

Para a análise de variância das medidas das microestruturas foram selecionadas espécies que possuíam três espécimes representantes ou mais. Dessa forma, foram selecionadas cinco espécies, sendo elas: *P. mangiferae* (08 linhagens), *P. microspora* (07 linhagens), *P. clavispora* (06 linhagens), *Neopestalotiopsis clavispora* (03 linhagens) e *P. versicolor* (03 linhagens).

Os itens analisados estão relacionados ao corpo do conídio e a seus apêndices: (1) Comprimento total da célula mediana (Gráfico 1), (2) Largura da célula mediana (Gráfico 2), (3) Comprimento do apêndice apical (Gráfico 3) e (4) Comprimento do apêndice basal (Gráfico 4). Não foram utilizados os itens número de apêndices e coloração das células medianas.

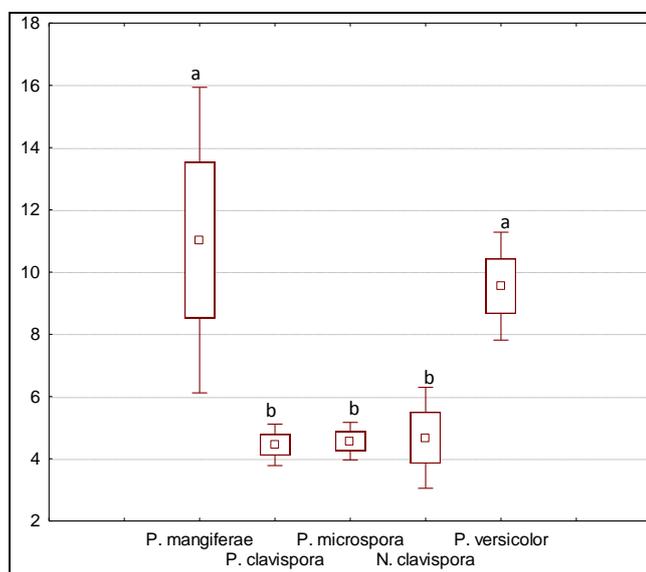


Gráfico 1. Box-Plot da análise de variância do (1) Comprimento total da célula mediana (μm).

Os resultados da análise do comprimento médio total das células medianas mostrou que é possível diferenciar a linhagem *P. mangiferae* das demais linhagens, exceção dada a *P. versicolor*. Ficou claro também que esse critério não é útil para diferenciar as espécies *P. clavispora*, *P. microspora* e *N. clavispora*.

O comprimento da célula mediana apesar de utilizado em trabalhos de estudos morfológicos para o gênero *Pestalotiopsis*, é tratado com cautela por apresentar pouca variação entre espécies distintas (JEEWON *et al.*, 2003), o que também foi observado neste trabalho, e portanto, não se configura como um bom critério para uma diferenciação a nível de espécie.

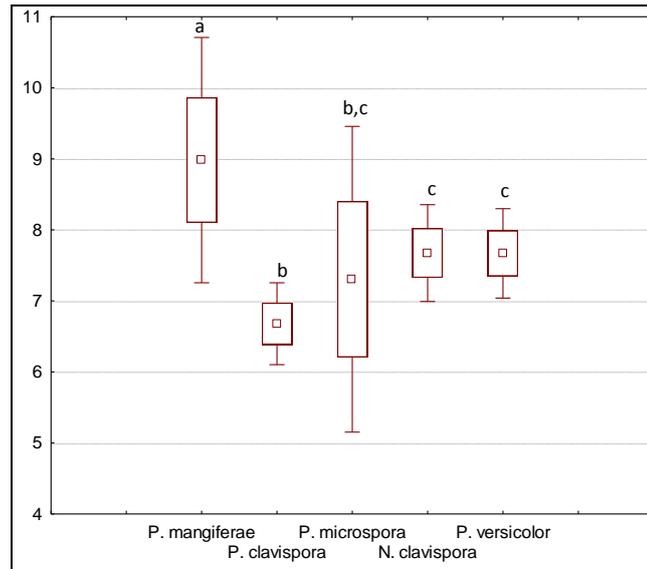


Gráfico 2. Box-Plot da análise de variância da (2) Largura da célula mediana (μm).

De acordo com a literatura específica a largura da célula mediana é um critério bastante útil para diferenciar espécies desse gênero. Trata-se de um critério relativamente constante dentro de cada espécie que pode ser utilizado na etapa de identificação morfológica (JEEWON *et al.*, 2003). Os resultados obtidos fortalecem essa ideia tendo em vista que foi possível separar as cinco espécies analisadas em três grupos (a,b,c) deixando clara a utilidade desse critério na diferenciação morfológica dessas espécies.

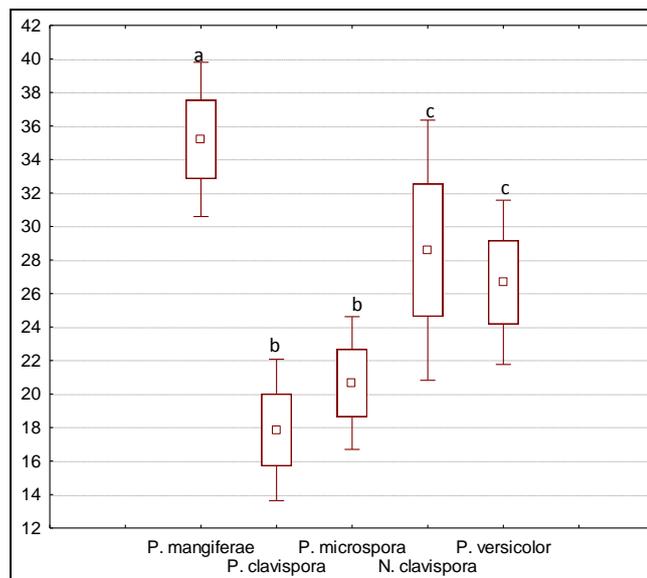


Gráfico 3. Box-Plot da análise de variância do (3) Comprimento do apêndice apical (μm).

A exemplo da largura da célula mediana, o comprimento do apêndice apical também é um critério descrito pela literatura científica como um dos mais significativos para diferenciação a nível de espécie para este gênero (HYDE *et al.*, 2011). Os resultados obtidos para as cinco espécies corroboram com essa afirmativa, uma vez que foi possível a formação de três grupos distintos utilizando esse critério.

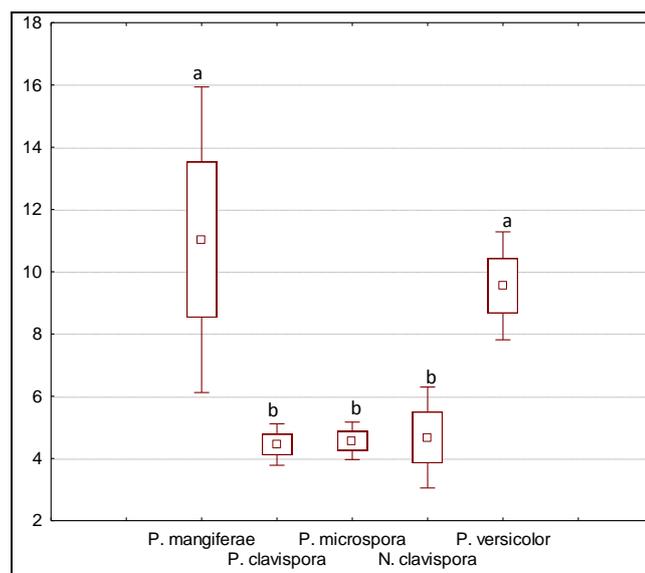


Gráfico 4. Box-Plot da análise de variância do (4) Comprimento do apêndice basal (μm).

Os comprimentos médios do apêndice basal foram bastante similares para as espécies *P. clavispora*, *P. microspora* e *N. clavispora*, demonstrando que esse não é um critério de escolha para a diferenciação micromorfológica deste gênero. Outros trabalhos questionam a eficiência desse critério como ferramenta de separação morfológica na etapa de identificação por conta de sua pouca variabilidade dentro do gênero (JEEWON *et al.*, 2003; HYDE *et al.*, 2011).

Os resultados demonstram que as microestruturas que apresentam maior distinção entre as espécies são: (2) Largura da célula mediana e (3) Comprimento do apêndice apical, informações que corroboram com os dados observados nos trabalhos de Jeewon *et al.*, 2003 e Hyde *et al.*, 2011.

Os dados indicam que as estruturas avaliadas não possuem o mesmo grau de relevância na definição de espécie. Essa informação aponta a necessidade de se determinar diferentes graus de significância entre os itens morfológicos, dessa forma, os itens mais relevantes seriam mais decisivos na definição da espécie tipo.

Precisamos ressaltar que a identificação utilizando a caracterização morfológica para o gênero *Pestalotiopsis* ocorre a partir da junção dos dados, mas acreditamos ser importante para o avanço da pesquisa nessa área perceber que itens morfológicos são verdadeiramente significativos para separar as linhagens em diferentes espécies.

A utilização de microestruturas para diferenciação a nível de espécie pode ser bastante útil e eficiente, principalmente para espécies bem distintas morfológicamente, como observado ao comparar os dados de *P. mangiferae* com os de *P. microspora*. Contudo é difícil utilizar esse método quando as diferenças entre as microestruturas são mínimas, como observado entre *P. clavispora* e *P. microspora*. Portanto, além do conjunto de dados morfológicos, faz-se necessário a utilização de outras ferramentas para uma identificação confiável e segura.

5.2 Identificação das linhagens por biologia molecular

Os DNAs genômicos das 36 linhagens de fungos endofíticos, previamente consideradas como *Pestalotiopsis* em gel de agarose a 0,8 % (Figura 14) foram obtidos em quantidades e qualidades satisfatórias, permitindo a amplificação das regiões *Its1* e *Its2* do rDNA. Essas regiões foram avaliadas em gel de agarose 1,5% (Figura 15), tendo sido observados fragmentos de aproximadamente 400pb, de acordo com a comparação com o marcador, adequados para a etapa de sequenciamento. Para algumas amostras a amplificação precisou ser repetida e em geral foi preciso realizar uma etapa de purificação com a enzima ExoSAP, antes da etapa de amplificação.

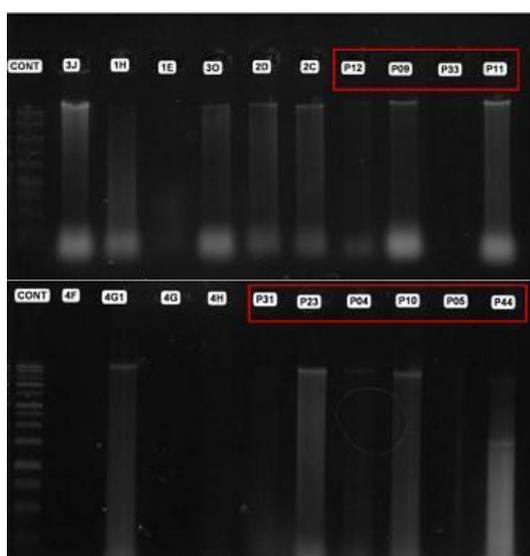


Figura 14. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% do DNA genômico de *Pestalotiopsis* spp.

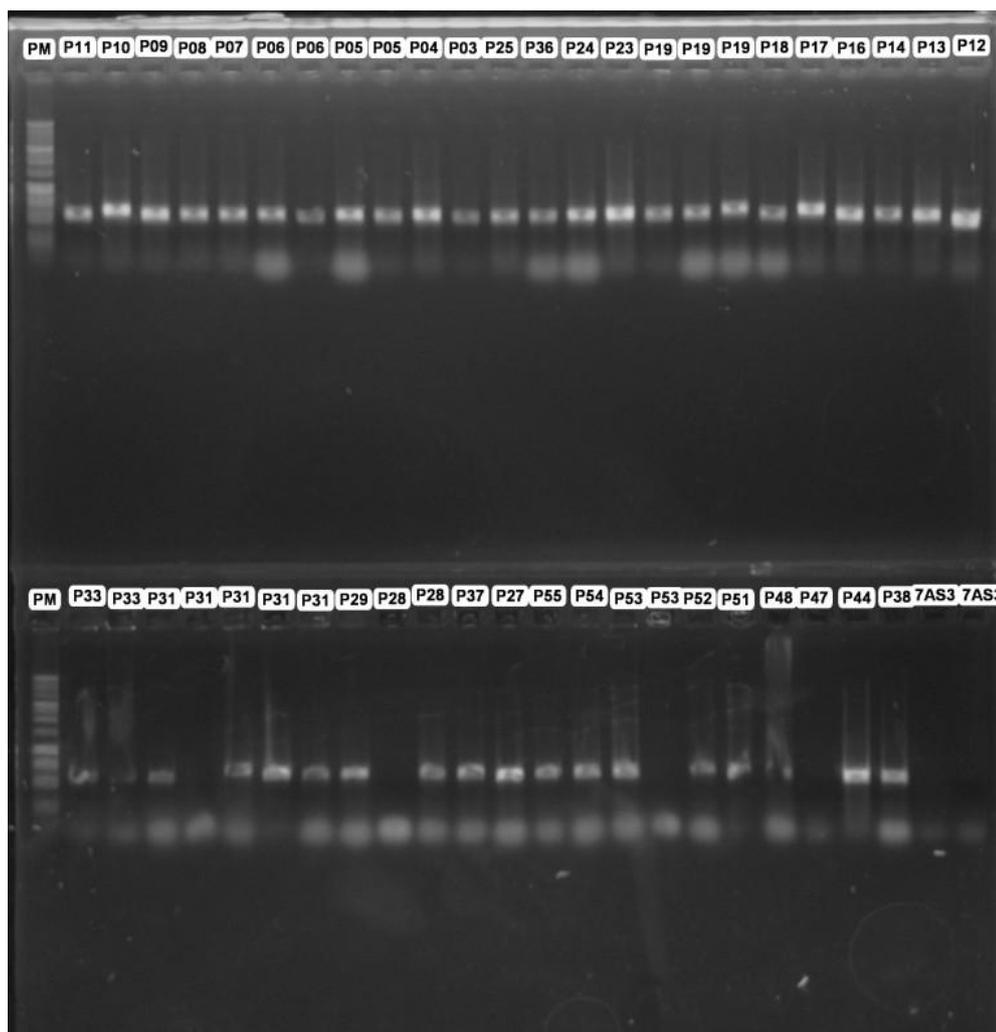


Figura 15. Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5 %, com amplificação das regiões *Its 1 e 2* de *Pestalotiopsis* spp.

Com auxílio da ferramenta de *blast_n* as sequências obtidas foram conferidas e alinhadas, e a partir de então confrontadas com as depositadas no banco genômico do NCBI para confirmação das linhagens pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis*, como observado na Tabela 6.

A taxa de identificação das sequências nucleotídicas decodificadas das linhagens em relação as mais semelhantes depositadas no banco genômico do NCBI permitiu confirmar aquelas pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis* e indicar algumas pertencentes ao gênero *Neopestalotiopsis* (Tabela 6), conforme discutiremos.

Tabela 6. Linhagens do gênero *Pestalotiopsis* com identificação confirmada por biologia molecular.

| N° | Cod. | Id coleção | Espécie | % identidade | Cod. Genbank |
|----|------|---------------|-----------------------|--------------|--------------|
| 01 | P03 | Ga F3.1.2 | <i>P. camelliae</i> | 96 | KM199336.1 |
| 02 | P04 | GaFr1.1.2b | <i>N. clavispora</i> | 98 | KM877471.1 |
| 03 | P05 | GaFr3.2.3 | <i>P. mangiferae</i> | 96 | KM998724.1 |
| 04 | P06 | GaFr1.2.3 | <i>P. microspora</i> | 98 | KM438014.1 |
| 05 | P07 | GaC1.3.2a | <i>P. microspora</i> | 97 | KM438014.1 |
| 06 | P08 | GaC2.3.1 | <i>P. microspora</i> | 96 | DQ456865.1 |
| 07 | P09 | GaC2.1.1 | <i>P. mangiferae</i> | 97 | JX857168.1 |
| 08 | P10 | B5-3 | <i>P. disseminata</i> | 99 | GU183121.1 |
| 09 | P11 | AnspCg1.2.1 | <i>P. mangiferae</i> | 97 | JX999998.1 |
| 10 | P12 | AnspCg1.1.3a | <i>P. microspora</i> | 97 | KM041703.1 |
| 11 | P17 | EoR7.1.1 av | <i>P. neglecta</i> | 98 | GU595050.1 |
| 12 | P18 | EoR8.1.1C | <i>P. clavispora</i> | 98 | KJ590132.1 |
| 13 | P19 | EoR7.1.1b | <i>P. clavispora</i> | 98 | GU362539.1 |
| 14 | P24 | MgCe2.1.2B | <i>P. mangiferae</i> | 100 | KM998724.1 |
| 15 | P25 | MgRe3.1.1 | <i>P. clavispora</i> | 98 | KJ590132.1 |
| 16 | P27 | MgF2.3.3 | <i>P. mangiferae</i> | 99 | KM998724.1 |
| 17 | P28 | MgF2.1.3 | <i>P. versicolor</i> | 99 | DQ334862.1 |
| 18 | P29 | MgCe3.2.3 | <i>N. clavispora</i> | 98 | KM877471.1 |
| 19 | P31 | Bas1a 3.1b | <i>P. mangiferae</i> | 97 | KM998724.1 |
| 20 | P33 | Bas1a 3.1a | <i>P. clavispora</i> | 96 | EU342211.1 |
| 21 | P36 | Bas1a2.1B | <i>N. formicarum</i> | 99 | KM199358.1 |
| 22 | P37 | Bas1a1.1 | <i>P. disseminata</i> | 99 | KP714294.1 |
| 23 | P38 | Bas2b1.1 | <i>P. mangiferae</i> | 98 | JX999998.1 |
| 24 | P40 | GhF3.1.2 B | <i>P. microspora</i> | 98 | KM438014.1 |
| 25 | P43 | CrajC3.2.2 | <i>P. microspora</i> | 99 | KM438014.1 |
| 26 | P44 | CrajF2.3.1 | <i>P. microspora</i> | 99 | KM438014.1 |
| 27 | P47 | EoR6.2.1b | <i>P. versicolor</i> | 98 | DQ812940.1 |
| 28 | P46 | Bas 3a 1.1 | <i>P. mangiferae</i> | 99 | KM998724.1 |
| 29 | P48 | EoR5.2.1 av | <i>P. versicolor</i> | 98 | DQ812940.1 |
| 30 | P51 | EoR7.1.1 ISP2 | <i>P. clavispora</i> | 97 | EU342211.1 |
| 31 | P52 | Bas 3a 3.1 | <i>P. adusta</i> | 89 | KP050563.1 |
| 32 | P53 | EoR71.1b | <i>P. clavispora</i> | 98 | KM402033.1 |
| 33 | P55 | Bas1a 2.1 | <i>N. clavispora</i> | 99 | KM199374.1 |

A identificação por biologia molecular utilizando as regiões *Its1* e *Its2* do rDNA, revelou a presença de dez espécies distintas do gênero *Pestalotiopsis*, com maior frequência das espécies *P. mangiferae* com 08 linhagens, *P. microspora* com 07 linhagens e *P. clavispora* com 06 linhagens.

A grande maioria das sequências apresentou percentual de identidade acima de 96%, quando comparada com a sequência depositada no Genbank. A única exceção foi a linhagem P52/Bas 3a3.1 identificada como *P. adusta*, com apenas 89% de identidade.

Quatro linhagens foram confirmadas como *Neopestalotiopsis*, embora alguns autores já considerem esse um novo gênero diferente do gênero *Pestalotiopsis* (MAHARACHCHIKUMBURA *et al.*, 2014). Para realização desse trabalho consideramos seus resultados, com intuito de contribuir com o acúmulo de dados que auxiliem na compreensão desse novo gênero.

Três linhagens foram identificadas como pertencentes ao gênero *Truncallella* e, portanto foram retiradas das etapas subsequentes do trabalho. Este gênero antes formava juntamente com os gêneros *Pestalotiopsis* um único gênero denominado de *Pestalotia*, que posteriormente foi reformulado e separado em três (SUTTON, 1980).

Dessa forma, 33 linhagens foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Pestalotiopsis*, e dessas, sete foram confirmadas como *P. microspora*, uma espécie comumente isolada como endófito de uma variedade de espécies vegetais, tanto de plantas de clima tropical quanto de clima temperado. Esta estirpe é bastante versátil do ponto de vista de seu metabolismo secundário produzindo compostos bioativos como o Taxol, Ácido torreiânico e Ácido ambuíco entre outros (STROBEL, 1996; LEE *et al.*, 1996; LI *et al.*, 2001).

Da mesma forma espécies identificadas no trabalho como *P. clavispora* e *P. mangiferae* são descritas também como produtoras de compostos bioativos com atividade anticâncer em trabalho como o de Ortega *et al.*, (2014) e Proksch *et al.*, (2016).

5.3. Análise filogenética das regiões *Its*

O conjunto de dados de sequência das regiões *Its1* e *Its2* depois de analisados pelo método estatístico de Máxima Parcimônia (MP) gerou árvore de consenso que explica as relações filogenéticas entre as linhagens estudadas (Figura 16).

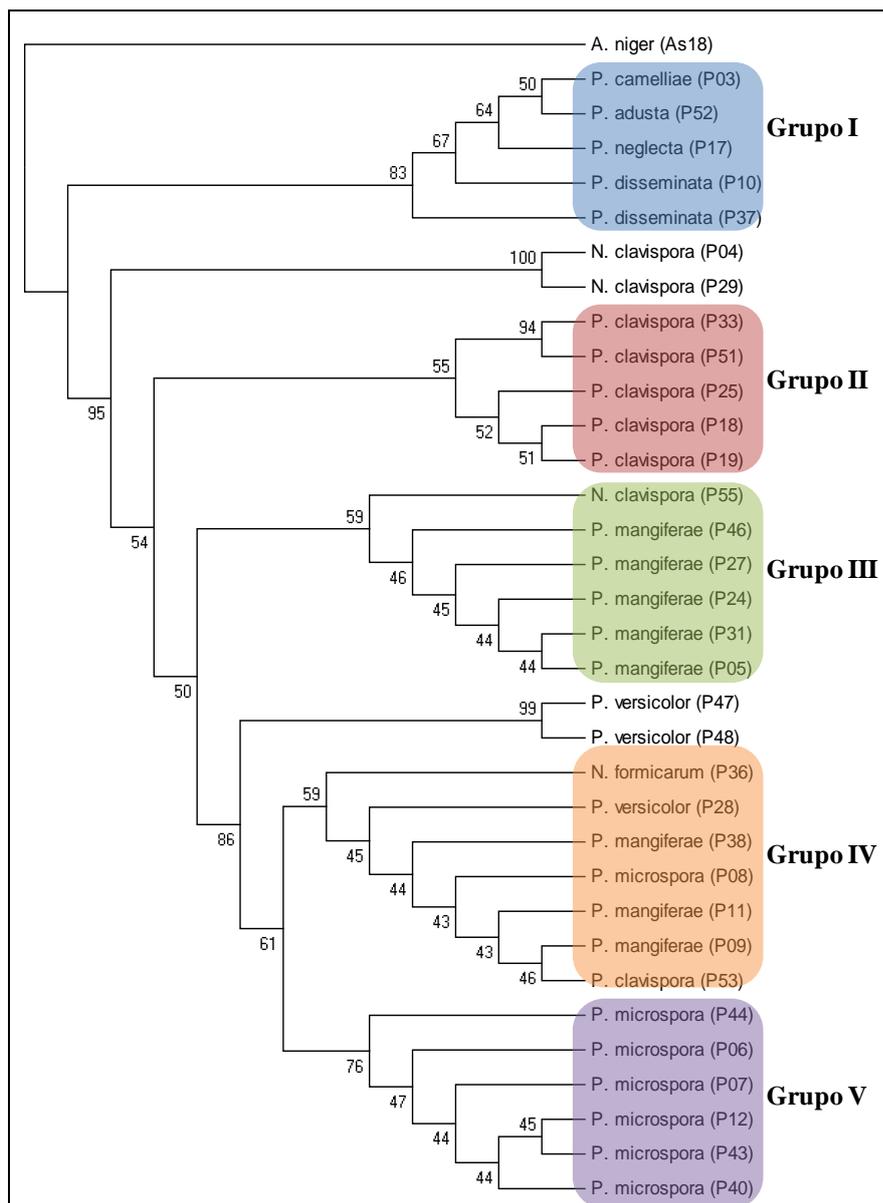


Figura 16. Dendrograma de Máxima Parcimônia (MP) da relação filogenética para linhagens de *Pestalotiopsis* spp.

A árvore mais parcimoniosa apresentou comprimento de 296. A análise incluiu um total de 434 caracteres, os índices de consistência (IC), de retenção (IR), o índice composto (RCI) e o índice de locais parcimônia-informativo foram respectivamente 0,82, 0,91, 0,85 e 0,76.

Os resultados ilustrados na árvore filogenética a partir da análise por MP indicaram a existência de sete clados distintos, suportados por valores de “*bootstrap*” acima de 65. Destacamos os grupos de I a V, os mais ilustrativos do grupo estudado.

De forma geral, foi possível agrupar a maioria das linhagens de mesma espécie, mostrando a eficiência da análise para separar as 10 diferentes espécies de

Pestalotiopsis estudadas, com destaque para as linhagens dos grupos II, III e V. Esses três grupos comportam as espécies de *P. clavispora*, *P. mangiferae* e *P. microspora*, e os resultados obtidos nessa análise aprimoram os dados observados nas análises morfológicas, em que a separação das espécies *P. clavispora* e *P. microspora* não foi tão nítida.

As diferenças genéticas significativas entre as espécies *P. clavispora*, *P. mangiferae* e *P. microspora* registradas na árvore filogenética permitem inferir que as informações das regiões *Its1* e *Its2*, utilizando ferramentas estatísticas adequadas, podem separar de forma eficiente essas três espécies bastante utilizadas em trabalhos de isolamento de substâncias bioativas.

Contendo componentes muito diversificados, o grupo I descreve a proximidade filogenética entre as espécies *P. neglecta*, *P. disseminata* e *P. adusta*, fato observado, também em outro trabalho (JEEWON *et al.*, 2003). A proximidade genética entre essas três espécies, apesar do pequeno número de espécimes analisados, também incluiu *P. camelliae*, agrupada no mesmo clado.

A formação do grupo I e do IV contendo linhagens de espécies diferentes, sendo este constituído principalmente de *P. mangiferae* juntamente de *P. microspora*, permite levantar questões relacionadas a etapa de identificação, e de análise filogenética.

Primeiramente, a taxonomia molecular de linhagens de fungos pode ficar ainda mais robusta e confiável utilizando-se mais do que uma região do genoma para a etapa de pesquisa no banco de dados. A utilização da região *Its* apesar de ser a mais utilizada e confiável, não é a única utilizada para esse fim. Atualmente os genes da β -tubulina e *tefl* têm sido úteis tanto para uma confirmação mais acurada da identificação via molecular, quanto avaliar a diversidade genética de fungos do gênero *Pestalotiopsis* (HYDE *et al.*, 2007, LI *et al.*, 2015). Isso porque a utilização de outras regiões conservadas do DNA aumentam os pontos de similaridades entre amostras da mesma espécie e de espécies distintas e, portanto aperfeiçoam os resultados da análise.

Segundo, faz-se necessário a compreensão de que o conhecimento genético disponível em um banco de dados, como o Genbank, é “alimentando” pelas sequências que são depositadas ao longo do tempo. Dessa forma, a construção do conhecimento genético de um grupo diverso quanto o *Pestalotiopsis*, passa por um processo de aperfeiçoamento, expresso pelo aumento no número de sequências depositadas, o que poderá levar inclusive à percepção de dados depositados com incorreções. Acreditamos

estar contribuindo, entre outras coisas, com o aprimoramento do conhecimento de espécies deste gênero, através do depósito de novas sequências.

5.4. Diversidade genética de *Pestalotiopsis* spp. avaliada por marcadores AFLP

Na análise do DNA genômico de 30 linhagens de *Pestalotiopsis* spp. por AFLP, foram obtidos de 4 a 12 fragmentos de 300 a 2000 pb de DNA gerados por perfil (Figura 17).

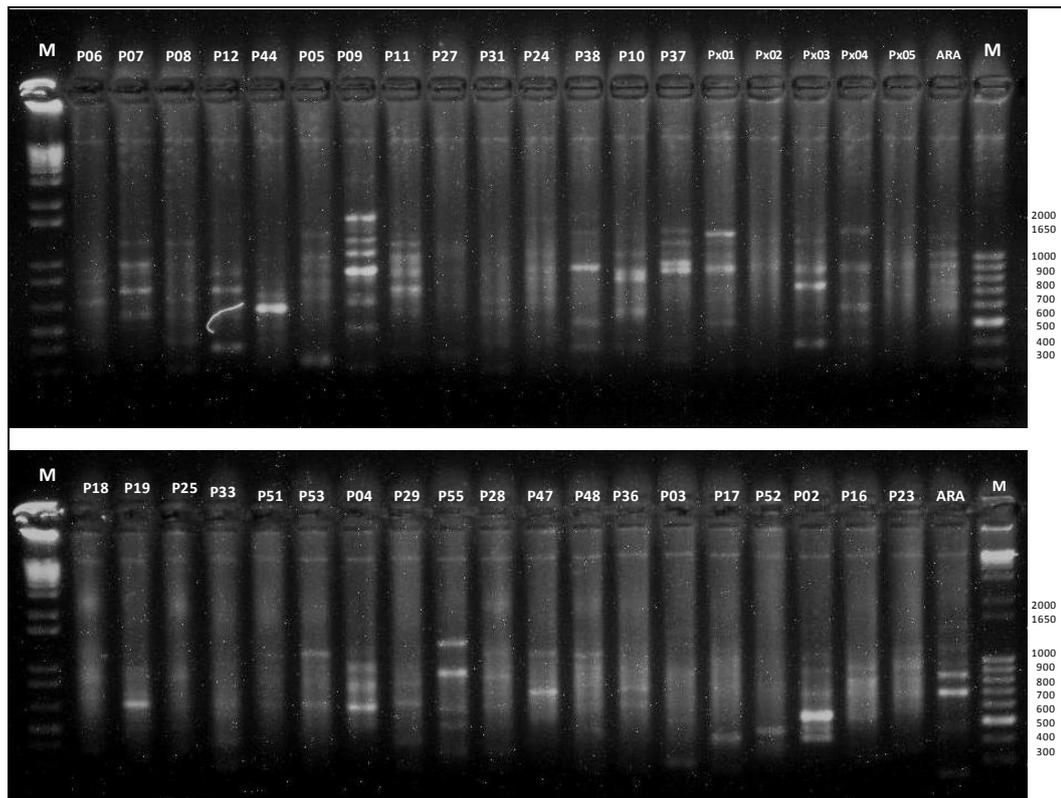


Figura 17. Perfil eletroforético da análise por AFLP de 30 linhagens de *Pestalotiopsis* spp.

Através da análise do dendrograma observamos um total de três grupos identificados como Grupos I, II e III. Os grupos são compostos por linhagens de diferentes espécies, o que indica que a técnica realizada não foi suficientemente robusta para separar as diferentes espécies de *Pestalotiopsis*.

A não observação de perfis que pudessem caracterizar cada espécie de *Pestalotiopsis* analisada ou que pudesse diferenciar linhagens de mesma espécie, de acordo com sua origem por exemplo, pode ser explicada pelo baixo número de fragmentos observados na maioria das amostras. O fator que pode ter colaborado para o número reduzido de bandas foi a utilização de apenas um par de *primers*, *EcoR* I (E-0) e

Mse I (M-0), na etapa final de amplificação, isto pode ter levado a um número reduzido de regiões amplificadas, e apenas essas foram observadas em gel.

É importante destacar que não foram encontrados relatos da utilização da técnica de AFLP para avaliar diversidade de fungos do gênero *Pestalotiopsis*, sendo esse provavelmente o primeiro trabalho utilizando essa técnica para este gênero, apesar de ser necessária uma nova abordagem que aperfeiçoe o uso da técnica para o estudo da diversidade genética desse gênero.

Mesmo com as limitações apontadas na abordagem realizada, foi possível observar que as espécies de *P. clavispora*, um dos grupos mais representativos, componentes majoritários do grupo III, diferiram quase que totalmente das espécies de *P. mangiferae* e *P. microspora*, o que é compatível tanto com os dados decorrentes da análise morfológica, quanto da análise filogenética, em que essa espécie difere significativamente de ambas.

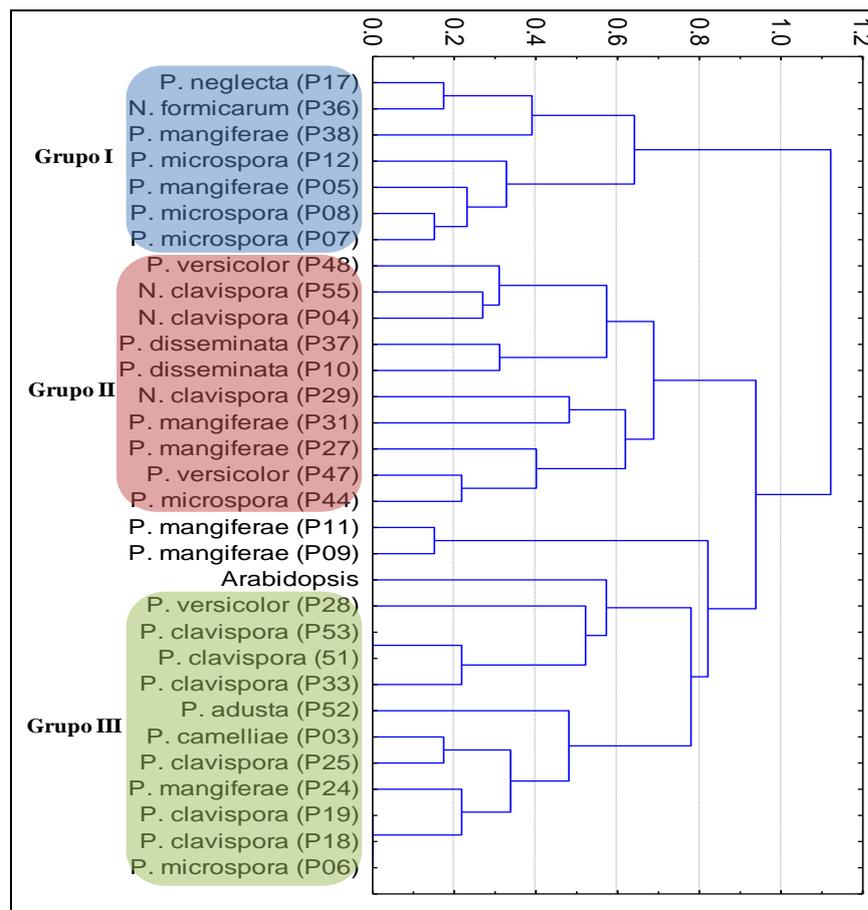


Figura 18. Dendrograma do AFLP para linhagens de *Pestalotiopsis* spp. avaliadas pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, com coeficiente de Pearson.

A utilização de AFLP para análise de diferentes gêneros de fungos tem demonstrado alta reprodutibilidade, o que é essencial em trabalhos de fingerprinting, além disso, tem a seu favor, a rapidez de execução, o baixo custo, a eficiência e a alta resolução que a tornam a técnica de escolha para trabalhos de diversidade como os apresentados aqui (MUELLER & WOLFENBARGER, 1999).

Através dessa técnica tem sido possível separar linhagens patogênicas de não patogênicas, ou linhagens produtoras de micotoxinas daquelas que não produzem esse tipo de compostos (LOPES *et al.*, 1999; KURE *et al.*, 2003). Foi possível também determinar a biogeografia de linhagens utilizando essa ferramenta, deixando bastante claro a eficiência e robustez da técnica (CAMEJO *et al.*, 2012).

Os trabalhos envolvendo a interrelação fungo-planta têm mostrado que essa relação vem ao longo do tempo alterando o modo de vida de algumas espécies de fungos, como por exemplo, a perda da patogenicidade de algumas espécies (SAIKKONEN *et al.*, 2004; SPITELLER *et al.*, 2012). Isso mostra que existe uma influência do hospedeiro nas diversas funcionalidades de seus endófitos, e espera-se que essas respostas tenham haver com alterações ocasionadas inclusive em nível genômico inclusive (SAIKKONEN *et al.*, 2004; SPITELLER *et al.*, 2012).

Contudo, mesmo utilizando a técnica de AFLP, não foi possível fazer distinção das linhagens em função de seus hospedeiros, talvez devido aos problemas de execução apresentados anteriormente. Mesmo não sendo possível demonstrar tal fato neste trabalho, acreditamos se tratar de uma linha de investigação promissora, que pode contribuir tanto para a compreensão da relação fungo-planta, quanto para ser utilizada como método de seleção de linhagens de interesse biotecnológico.

5.5 Perfis químicos das linhagens de *Pestalotiopsis* spp.

De acordo com a análise por PCA do perfil de substâncias produzidas por *Pestalotiopsis* spp. observamos a formação de três grupos (Figura 19). Esse tratamento compreende aproximadamente 50.00% dos dados, sendo 37.10% explicadas pelo fator 1 e 14.28% explicadas pelo fator 2.

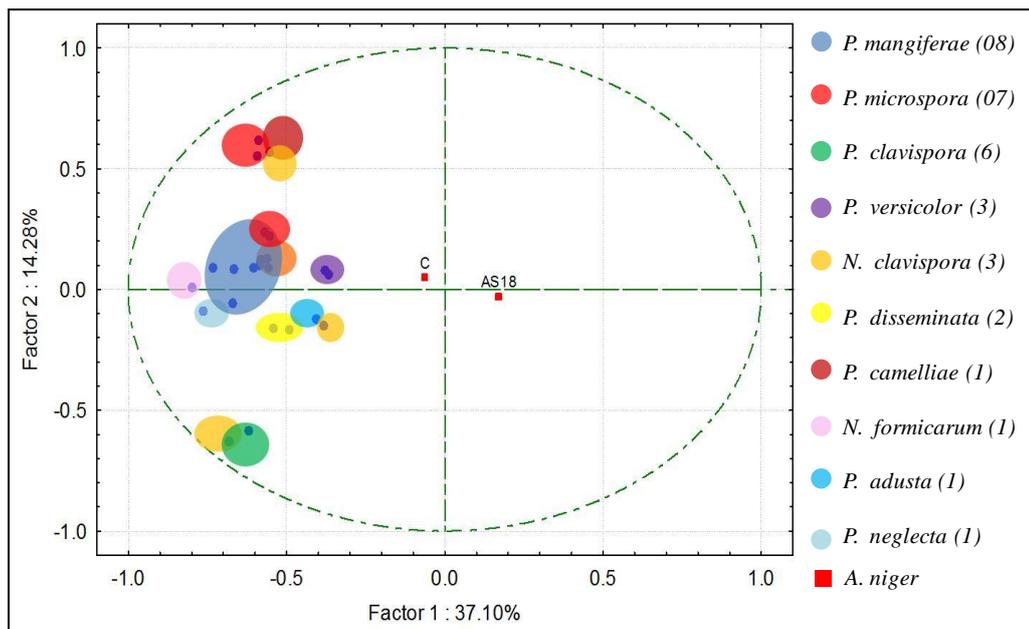


Figura 19. Agrupamento das espécies de *Pestalotiopsis* spp em função dos perfis de substâncias presentes nos extratos analisados por PCA. C – Resultado do meio de cultivo BDL.

Os resultados mostraram que o perfil químico das linhagens de *Pestalotiopsis* spp. difere do apresentado pela linhagem de *A. niger* utilizada como “outgrup”. Além disso, observamos que o resultado apresentado sofre pouca influência dos compostos presentes no meio de cultura BDL (C).

É possível observar a ocorrência de certa dispersão dos dados para duas espécies, sendo elas *P. microspora* e *N. clavispora*. A dispersão dos dados pode ser decorrente da versatilidade metabólica nesse gênero, cujas espécies produzem um variado número de compostos conhecidos e com significativas atividades biológicas (LUO *et al.*, 2012; HYDE *et al.*, 2011).

Ao analisar o resultado do agrupamento para as espécies mais representativas observamos que para as espécies de *P. mangiferae* e *P. clavispora* o agrupamento foi bastante eficiente, agrupando de forma clara essas duas espécies, embora a eficiência do agrupamento para a espécie de *P. microspora* não tenha sido a mesma, dada a similaridade do perfil de algumas de suas linhagens com o das espécies de *P. mangiferae*.

De acordo com os dados de scores, os íons que mais influenciaram a separação dessas três espécies foram de m/z 285, 321 e 601 presentes nos extratos de *P. clavispora*, m/z 365 e 637 presentes nos extratos de *P. mangiferae* e m/z 369, 384, 400 e 457 nos extratos de *P. microspora* (Figura 20).

Os resultados mostram ser possível separar com alguma eficiência essas três espécies de *Pestalotiopsis* em função de seus metabólitos secundários produzidos no meio BDL, nas condições de cultivo e parâmetros de equipamentos selecionados. Além disso, os íons mais importantes na diferenciação podem representar substâncias marcadoras das respectivas espécies, sinalizando o perfil químico de metabólitos secundários como uma ferramenta capaz de contribuir para a diferenciação de espécies morfologicamente similares, como *P. clavispora* e *P. microspora*.

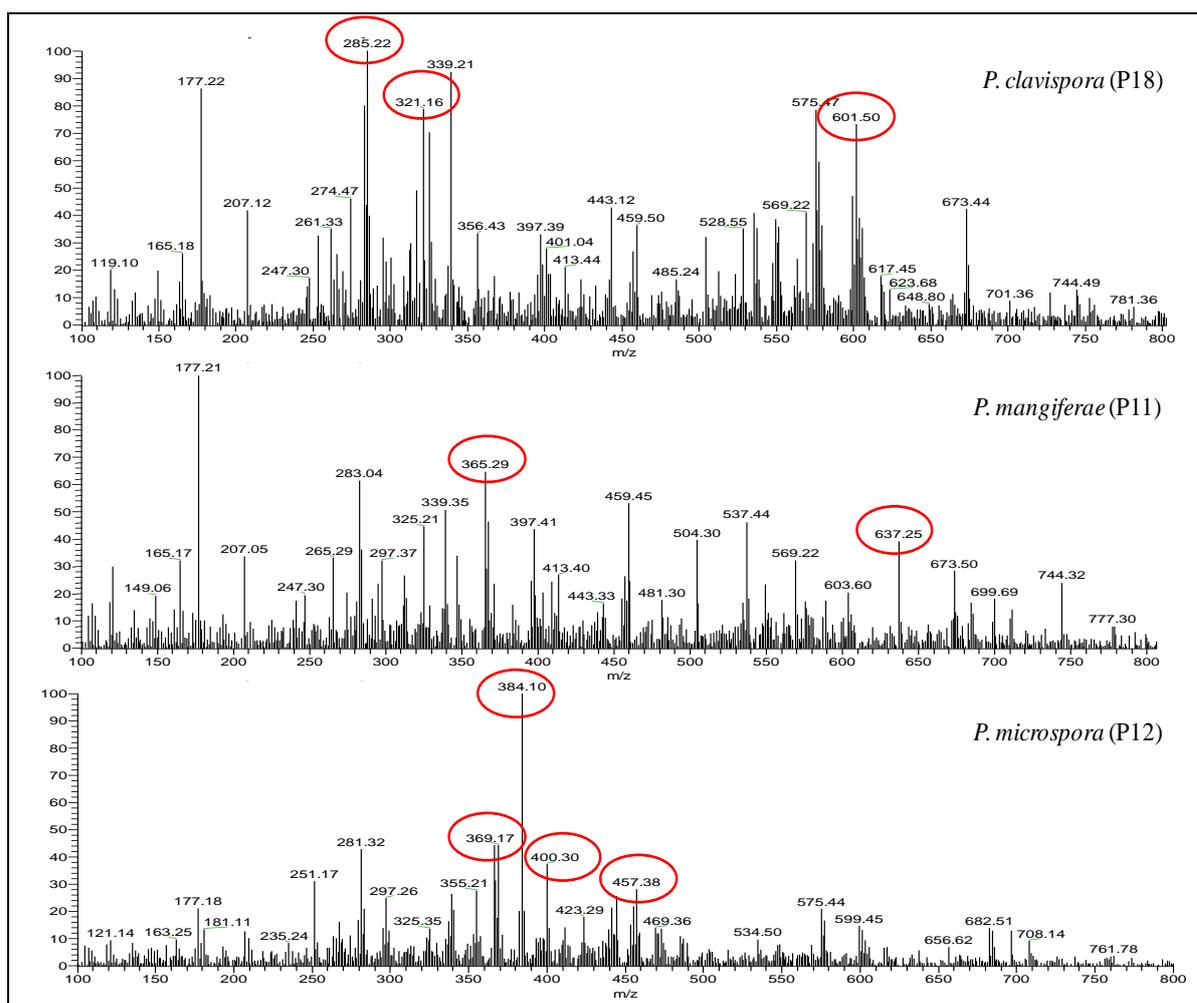


Figura 20. Espectros de massas dos extratos de *P. microspora* (P12), *P. mangiferae* (P11) e *P. clavispora* (P18). Em destaque os sinais que mais influenciaram a separação das três espécies.

A exemplo da identificação molecular, o perfil químico de metabólitos secundários configura-se como uma ferramenta robusta para a identificação porque utiliza um número grande de variáveis para confirmação da informação. Apesar da necessidade de melhorar a abordagem para o estudo dos perfis químicos de espécies de *Pestalotiopsis*, cujas variáveis de cultivo são difíceis de padronizar, é patente a

viabilidade da técnica para fins taxonômicos desse gênero. Além das variáveis de cultivo, os diferentes parâmetros de ionização e análise devem ser otimizados para a obtenção de espectros reprodutíveis e que levem ao maior número de íons detectados.

Normalmente os meios de cultura mais complexos, com quantidades elevadas de fontes de carbono, nitrogênio e sais, são os que possibilitam uma produção maior de substâncias, sendo esses meios os de escolha para trabalhos de quimiotaxonomia (SMEDSGAARD & FRISVAD, 1996; FRISVAD *et al.*, 2008). Contudo mesmo utilizando meio de cultura relativamente simples pudemos realizar o trabalho de diferenciação química de forma eficiente. Isto demonstra a robustez da técnica de perfis químicos por espectrometria de massas utilizada.

Os agrupamentos com base nos perfis dos extratos das outras espécies indicam que elas são semelhantes entre si e com *P. mangiferae*. Pelo grau de semelhança dos perfis desses fungos pode ser esperado que tenham produção comum de algumas substâncias da mesma forma que os respectivos graus de diferenças são indicativos da produção de substâncias diferentes.

Através da análise do perfil geral de substâncias produzidas pelas linhagens de *Pestalotiopsis*, e em comparação com a lista de substâncias produzidas por esse gênero foi possível inferir sobre a presença de substâncias descritas em outros trabalhos, conforme exemplos apresentados na Figura 21.

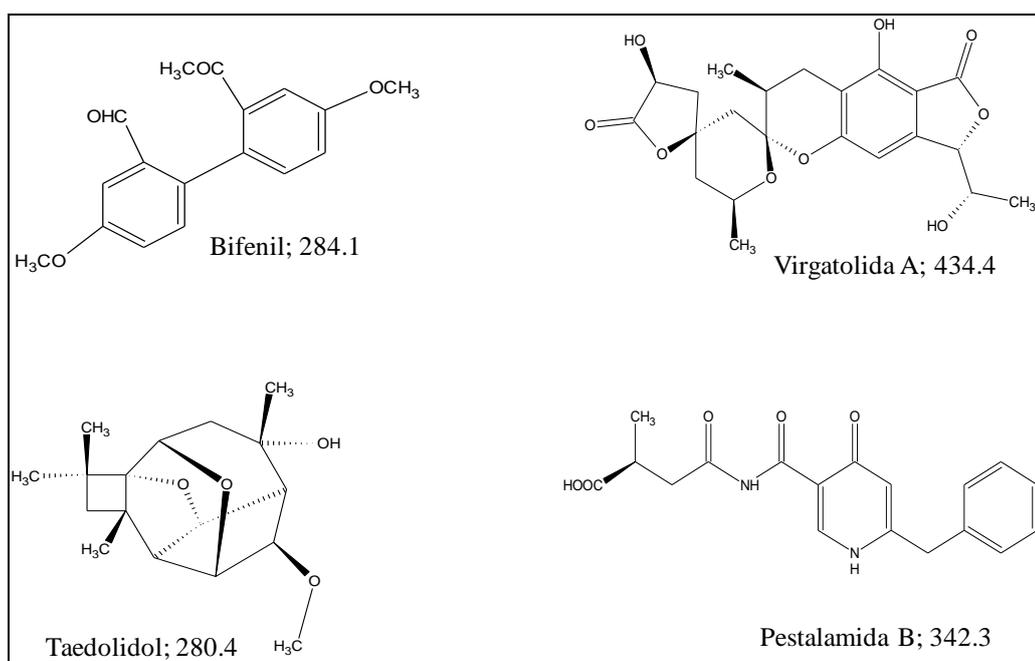


Figura 21. Metabólitos de linhagens de *Pestalotiopsis* cujos possíveis íons $[M+H]^+$ foram observados em linhagens do presente no trabalho.

A substância 1 da Figura 21 é um Bifenil de m/z 285 ($[M+H]^+$) isolado de *P. zonata*, endófito de *C. lakka*, a partir do cultivo em meio BD (Batata-Dextrose) por 30 dias a 28°C. Essa substância apresentou uma fraca atividade frente a cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (YANG *et al.*, 2011). No presente trabalho o sinal compatível com essa substância foi detectado na linhagem de *P. clavispota* (EoR7.1.1b/P19) isolada de *E. oleracea*.

A substância 2 denominada Virgatolida A possui m/z 457 ($[M+H]^+$) e foi encontrada nos extratos de *P. virgulata* (CHE *et al.*, 2011). A possível presença dessa substância foi observada no perfil da linhagem de *P. mangiferae* (MgCe2.1.2/P24) endofítica de *M. guianensis*.

A substância 3 taedolidol ou seu isômero 6-epitaedolidol, faz parte de um grupo de terpenóides produzidos por diferentes linhagens de *Pestalotiopsis* (KOSHINO *et al.*, 1996; GLOER *et al.*, 2006).

A linhagem de *P. disseminata* (B5-3/P10) da hospedeira *Pinus elliottii* é a única deste trabalho que não foi isolada como endófito de espécie Amazônica. Em estudo anterior foi possível identificar que ela produz o Taedolidol e o 6-Epitaedolidol (MAGNANI *et al.*, 2003). Apesar de passados muitos anos e do meio de cultivo diferente, no presente trabalho, essas substâncias foram detectadas nos extratos dessa linhagem.

Portanto, os resultados do estudo de perfis químicos por espectrometria de massas de diferentes espécies de *Pestalotiopsis* mostraram que essa abordagem pode ser bastante útil, tendo em vista não apenas a possibilidade de identificação de substâncias novas ou conhecidas, o que pode nortear trabalhos de desreplicação ou de isolamento de metabólitos dos fungos desse gênero, mas também pela aplicação dos perfis como “impressão digital” dessas espécies.

A outra forma de avaliar os perfis químicos, pela construção do dendrograma resultante da análise por HCA dos valores e intensidades dos sinais do espectro de massas das linhagens de *Pestalotiopsis* (Figura 22), indicou que a espécie *P. clavispota* é homogênea com relação às substâncias produzidas, pois apresenta um agrupamento bastante eficiente para as linhagens analisadas. Esse resultado reforça os obtidos nas análises filogenéticas e até por AFLP, que mostraram que *P. clavispota* é a mais conservada e constante do ponto de vista genético. Os resultados também indicam que essa espécie sofreu pouca influência em função de seu hospedeiro, tendo em vista que

as seis linhagens dessa espécie são de diferentes fontes e isso não mostrou alteração significativa nos resultados genéticos e metabólicos.

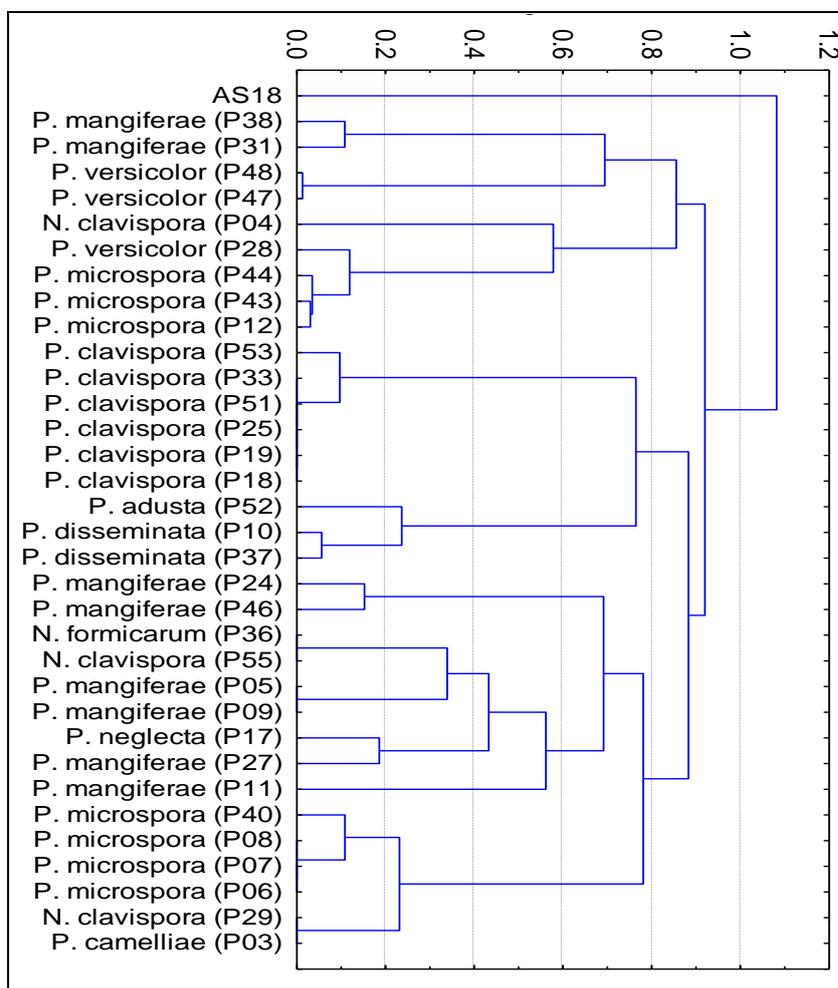


Figura 22. Dendrograma obtido com a análise por HCA do perfil de substâncias produzidas por *Pestalotiopsis* spp.

O contrário pode ser observado para as linhagens de espécie *P. mangiferae*, que apresentou maior dispersão na análise por HCA uma possível indicação que essa espécie possui maior versatilidade metabólica.

Não é possível afirmar se as diferenças químicas dessas linhagens estão relacionadas com sua origem, mesmo com os agrupamentos formados por P05 e P09 ambos oriundos de *G. augusta*, e P31 e P38 de basidiomicetes, pois os dados são insuficientes e existem outros dois grupos em que as linhagens têm origens diferentes.

Em relação a espécie *P. microspora*, a origem parece ter alguma influência, pois as linhagens P06, P07, P08 e P40 de espécies de *Gustavia* sp. formaram um agrupamento em separado de outras três linhagens de mesma espécie, mas de diferente hospedeira.

As informações morfológicas e genéticas não haviam mostrado nenhum tipo de alteração em função do hospedeiro, o que significa que essa alteração ocorre provavelmente em função do micro-ambiente em que as linhagens se apresentam, ou seja, na íntima relação fungo-planta. A possibilidade do tipo de hospedeiro influenciar no metabolismo de seu endófito é fonte de discussões e observações de trabalhos relevantes na área, havendo inclusive dados conclusivos de que a escolha adequada do hospedeiro é fundamental para o isolamento de linhagens com potencial biotecnológico (STROBEL *et al.*, 1996; SAIKKONEN *et al.*, 2004; SPITELLER *et al.*, 2012).

Contudo, o que está demonstrado neste trabalho é que a influência do hospedeiro no metabolismo de fungos do gênero *Pestalotiopsis* pode variar entre as diferentes espécies dentro do gênero. Aparentemente determinadas espécies possuem maior susceptibilidade ao seu hospedeiro do que outras. Neste trabalho *P. clavispora* demonstrou estar muito menos susceptível a alterações em seu metabolismo secundário do que as linhagens de *P. microspora* e *P. mangiferae*.

As informações obtidas podem nortear novas linhas de pesquisa relacionadas à seleção dessas linhagens de fungos em função de seu hospedeiro, assim como o estudo dos mecanismos relacionados a interação fungo-planta e o papel do hospedeiro na produção de substâncias por seus endófitos.

5.6 Ensaios biológicos de *Pestalotiopsis* spp.

Os 65 extratos das 33 linhagens de *Pestalotiopsis* cultivadas para os ensaios biológicos, 13 sob agitação a 120 rpm e 20 no modo estático estão apresentados na Tabela 7. Como esperado, os extratos de micélio apresentaram quantidades maiores que o secretado no meio.

Tabela 7. Extratos de *Pestalotiopsis* spp., cultivadas sob agitação e no modo estático.

| N° | Cod | Cultivo sob agitação | | Cultivo estático | |
|----|-----|----------------------|---------|------------------|---------|
| | | Meio | Micélio | Meio | Micélio |
| 01 | P03 | - | - | 4,0 | 28,0 |
| 02 | P04 | - | - | 8,0 | 195,0 |
| 03 | P05 | 39,0 | 297,0 | - | - |
| 04 | P06 | 11,0 | 856,0 | - | - |
| 05 | P07 | 41,0 | 213,0 | - | - |
| 06 | P08 | 6,0 | 226,0 | - | - |
| 07 | P09 | 5,0 | 216,0 | - | - |
| 08 | P10 | 40,0 | 747,0 | - | - |

| | | | | | |
|----|-----|------|---------|------|-------|
| 09 | P11 | 6,0 | 1.251,0 | - | - |
| 10 | P12 | 4,0 | 873,0 | - | - |
| 11 | P17 | 88,0 | 837,0 | - | - |
| 12 | P18 | - | - | 14,0 | 96,0 |
| 13 | P19 | 43,0 | 130,0 | - | - |
| 14 | P24 | - | - | 19,0 | 188,0 |
| 15 | P25 | - | - | 11,0 | 124,0 |
| 16 | P27 | - | - | 8,0 | 356,0 |
| 17 | P28 | - | - | 21,0 | 346,0 |
| 18 | P29 | - | - | 16,0 | 222,0 |
| 19 | P31 | - | - | 10,0 | 436,0 |
| 20 | P33 | 43,0 | 1.272,0 | - | - |
| 21 | P36 | - | - | 18,0 | 184,0 |
| 22 | P37 | - | - | 7,0 | 228,0 |
| 23 | P38 | - | - | 9,0 | 206,0 |
| 24 | P40 | - | - | 19,0 | 314,0 |
| 25 | P43 | 63,0 | N | - | - |
| 26 | P44 | - | - | 17,0 | 201,0 |
| 27 | P46 | 10,0 | 246,0 | - | - |
| 28 | P47 | - | - | 9,0 | 45,0 |
| 29 | P48 | - | - | 11,0 | 96,0 |
| 30 | P51 | - | - | 13,0 | 164,0 |
| 31 | P52 | - | - | 11,0 | 272,0 |
| 32 | P53 | - | - | 7,0 | 226,0 |
| 33 | P55 | - | - | 22,0 | 189,0 |

N – Amostra em que a extração não foi possível. Valores em miligramas

5.7 Ensaio para atividade anticandida

Das 33 linhagens avaliadas nove apresentaram resultados positivos frente a *Candida albicans*, sendo que *P. disseminata* (B5-3) e *P. mangiferae* (Bas 1a3.1b) apresentaram resultados tanto nos extratos obtidos do meio líquido, quanto do micélio. Apenas a linhagem de *P. mangiferae* (Bas 1a3.1b) associada a basidiomicetes demonstrou alguma atividade biológica (Tabela 8).

Tabela 8. Concentrações mínimas inibitórias dos extratos de *Pestalotiopsis* spp. que apresentaram atividade frente a *C. albicans*.

| Código da coleção | Espécie identificada | Extrato (2.0mg.mL ⁻¹) | CMI (mg.mL ⁻¹) |
|--|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| B5-3 | <i>P. disseminata</i> | B | 0.50 |
| | | M | 0.25 |
| AnspCg1.2.1 | <i>P. mangiferae</i> | M | 0.50 |
| AnspCg1.1.3a | <i>P. microspora</i> | B | 0.25 |
| Bas 1a3.1b | <i>P. mangiferae</i> | B | 0.50 |
| | | M | 0.50 |
| EoR71.1b AV | <i>P. clavispora</i> | M | 0.25 |
| GhF3.1.2 | <i>P. microspora</i> | B | 0.25 |
| MgCe 1.2.2 | <i>P. mangiferae</i> | M | N |
| CrajiruC 3.2.2 | <i>P. microspora</i> | B | N |
| EoR61.2 AV | <i>P. versicolor</i> | B | 0.50 |
| Nistatina (2.0mg.mL⁻¹) | - | - | 0.12 |

Apenas os extratos que apresentaram resultados preliminares positivos. B – Extrato do meio cultivado. M – Extrato do micélio. N – não apresentou resultado positivo na maior concentração.

O menor valor de CMI foi de 0,25 mg.mL⁻¹ dos extratos de micélio de *P. disseminata* (B5-3), e do extrato do meio líquido de *P. microspora* (AnspCg1.1.3a), *P. clavispora* (EoR71.1bAV) e *P. microspora* (GhF3.1.2), resultado superior ao CMI do padrão. Porém considerando que nesses extratos os metabólitos bioativos estão diluídos, têm-se a possibilidade de promissoras substâncias anticandidas. Por essa razão foi selecionada para novo estudo de perfil químico a linhagem *P. microspora* (AnspCg1.1.3a), isolada como endófito de uma espécie da família Anonacea do gênero *Rollinia* sp.

De forma geral vários trabalhos com esse gênero têm demonstrado que uma boa seleção do hospedeiro para o isolamento de *Pestalotiopsis* é importante para a obtenção de linhagens com potencial biotecnológico, porém, os presentes resultados indicaram uma diversidade de hospedeiros com diferentes linhagens de *Pestalotiopsis* que apresentaram a atividade biológica investigada. A ideia de que esse gênero possui uma versatilidade metabólica promovida pela interrelação com seu hospedeiro (STROBEL *et al.*, 1996), não pode ser avaliada pois seria necessário determinar os princípios ativos em cada extrato.

Outro dado importante é a quantidade de extratos com boa atividade anticandida, um exemplo da importância do estudo dos metabólitos intracelulares, também ilustrado

pelo isolamento de Pestalotiopsona, uma cromona presente no micélio de *Pestalotiopsis* sp., com atividade citotóxica moderada (WRAY *et al.*, 2011).

Das espécies que apresentaram atividade biológica podemos destacar a espécie *P. microspora*, comumente descrita como endófito de uma variedade de espécies vegetais, tanto plantas de clima tropical quanto temperado, versátil do ponto de vista metabólico, capaz de produzir compostos bioativos como o Taxol, Ácido torreiânico, Ácido ambuíco entre outros (STROBEL, 1996, LEE *et al.*, 1996; LI *et al.*, 2001). Podemos destacar também *P. disseminata* (B5-3) que apresentou resultados positivos tanto no extrato do meio líquido quanto do micélio. A capacidade de fungos dessa espécie em produzir sesquiterpenos, observada para o próprio B5-3 (MAGNANI *et al.*, 2003) foi relatada também por Gloer *et al.*, (2006), através do isolamento das 6-Hidroxi-punctaporonina A e B, sesquiterpenos em que a forma B apresentou atividade contra *S. aureus*.

5.8 Avaliação da atividade citotóxica

Os resultados dos testes de atividade citotóxica com os extratos do meio líquido e do micélio de 26 linhagens de *Pestalotiopsis* spp. estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Atividade citotóxica dos extratos obtidos de 26 linhagens de *Pestalotiopsis* spp.

| Espécies de <i>Pestalotiopsis</i> (Extratos) | Linhagens celulares | | | | |
|---|---------------------|----------|----------|-------|-----|
| | MRC-5 | SKMEL 19 | CAL – 27 | ACP02 | |
| <i>P. camelliae</i> (P03) | Meio | 84 | 95 | 100 | 100 |
| | Micélio | 97 | 99 | 100 | 100 |
| <i>P. mangiferae</i> (P05) | Meio | 95 | 99 | 100 | 100 |
| | Micélio | 58 | 75 | 81 | 77 |
| <i>P. microspora</i> (P06) | Meio | 91 | 98 | 100 | 100 |
| | Micélio | 94 | 95 | 98 | 100 |
| <i>P. microspora</i> (P07) | Meio | 89 | 100 | 100 | 100 |
| | Micélio | 95 | 95 | 100 | 100 |
| <i>P. microspora</i> (P08) | Meio | 91 | 100 | 100 | 100 |
| | Micélio | 100 | 100 | 100 | 100 |
| <i>P. microspora</i> (P09) | Meio | 77 | 97 | 81 | 95 |
| | Micélio | 82 | 100 | 100 | 100 |
| <i>P. disseminata</i> (P10) | Meio | 91 | 100 | 80 | 100 |
| | Micélio | 93 | 92 | 100 | 100 |
| <i>P. mangiferae</i> (P11) | Meio | 93 | 100 | 100 | 100 |
| | Micélio | 98 | 98 | 100 | 99 |
| <i>P. microspora</i> (P12) | Meio | 72 | 96 | 100 | 100 |
| | Micélio | 89 | 83 | 99 | 91 |
| <i>P. neglecta</i> (P17) | Meio | 92 | 100 | 100 | 100 |
| | Micélio | 100 | 100 | 100 | 100 |
| <i>P. clavispora</i> (P19) | Meio | 98 | 100 | 100 | 100 |
| | Micélio | 100 | 100 | 100 | 100 |
| <i>P. clavispora</i> (P25) | Meio | 95 | 100 | 100 | 100 |
| | Micélio | 90 | 90 | 100 | 98 |
| <i>P. mangiferae</i> (P27) | Meio | 84 | 90 | 100 | 100 |
| | Micélio | 89 | 85 | 100 | 91 |
| <i>P. mangiferae</i> (P31) | Meio | 94 | 100 | 100 | 98 |
| | Micélio | 79 | 89 | 77 | 97 |
| <i>P. clavispora</i> (P33) | Meio | 87 | 100 | 100 | 97 |
| | Micélio | 99 | 97 | 100 | 100 |
| <i>P. microspora</i> (P40) | Meio | 67 | 89 | 98 | 97 |
| | Micélio | 99 | 100 | 100 | 100 |
| <i>P. microspora</i> (P43) | Meio | 84 | 100 | 100 | 100 |
| | Micélio | 100 | 100 | 100 | 100 |
| <i>P. mangiferae</i> (P46) | Meio | 74 | 99 | 69 | 98 |
| | Micélio | 100 | 100 | 100 | 100 |
| <i>P. versicolor</i> (P47) | Meio | 94 | 100 | 100 | 100 |
| | Micélio | 95 | 98 | 100 | 100 |
| <i>P. versicolor</i> (P48) | Meio | 97 | 98 | 100 | 100 |
| | Micélio | 91 | 91 | 100 | 100 |
| <i>P. adusta</i> (P52) | Meio | 91 | 100 | 61 | 100 |
| | Micélio | 91 | 86 | 97 | 96 |
| <i>P. clavispora</i> (P53) | Meio | 93 | 100 | 100 | 100 |
| | Micélio | 94 | 89 | 97 | 97 |
| <i>P. clavispora</i> (P51) | Meio | 69 | 89 | 86 | 99 |
| | Micélio | 94 | 95 | 100 | 100 |

Os resultados expressam a viabilidade celular frente aos extratos.

Os valores de viabilidade celular tabelados indicam que os extratos de *P. mangiferae* (P46/ MgCe2.1.2 B) e *P. adusta* (P52/ Bas 3a 3.1), ambos do meio líquido, foram os dois melhores frente as células carcinoma escamoso de língua (CAL-27), as

quais apresentaram viabilidade celular de 69% e 61%, quando tratadas com os extratos de *P. mangiferae* e *P. adusta* respectivamente.

Contudo, esses valores devem ser vistos com cautela, pois os mesmos extratos apresentaram alguma capacidade de inibição contra células normais de fibroblasto humano (MRC-5), com viabilidade celular de 74% para *P. mangiferae* e de 91% para os extratos de *P. adusta*.

De forma geral pode-se dizer que os resultados de atividade citotóxica dos extratos das linhagens de *Pestalotiopsis* spp. não apresentaram potencial de inibição significativa. Isso por conta da alta viabilidade celular apresentada nas concentrações testadas, as substâncias que compõem os extratos fúngicos não induziram a morte em percentual inferior a 60% das células tumorais, dado observado inclusive nos dois melhores resultados apresentados acima, o que inviabilizou o cálculo da concentração inibitória a 50% (IC50).

Obviamente a não detecção da atividade citotóxica dos extratos ensaiados pode estar relacionada apenas a não produção de compostos com essa bioatividade, contudo como a literatura relata uma variedade de casos de produção de substâncias com essa potencialidade, nos cabe inferir quais seriam as possíveis causas desses resultados.

Neste sentido, o meio de cultura utilizado é uma das principais variáveis a ser questionada, tendo em vista sua simplicidade de composição, o que pode diminuir a produção de substâncias. Da mesma forma o tempo de cultivo e o método de extração precisam ser considerados, tendo em vista as dificuldades características no cultivo de fungos do gênero *Pestalotiopsis* e a baixa quantidade de material obtido em cada linhagem, sobretudo do meio líquido.

Os resultados pouco promissores para atividade citotóxica desses extratos inviabilizaram o prosseguimento dos estudos químicos pretendidos de linhagens de *Pestalotiopsis* promissoras nessa questão.

5.9 Análise do perfil químico de *P. microspora* (AnspCg1.1.3a)

A avaliação da atividade anticandida realizada com os extratos obtidos nos diferentes tempos de cultivo revelaram que a atividade biológica se apresenta a partir dos 30 dias, indicando que a(s) substância(s) responsável pela atividade esteja sendo produzida com neste período de tempo, ou que a concentração desta a partir desse período é suficiente para apresentar a atividade contra *C. albicans*.

A concentração de açúcar no cultivo da linhagem *P. microspora* (AnspCg1.1.3a) apresentou uma acentuada redução no tempo compreendido entre cinco e dez dias, e com redução um pouco menos acentuada até o 20º dia de crescimento, quando chega ao mínimo. Os resultados de pH mostraram um considerável aumento durante o crescimento do fungo, indo de 5 a 8 no fim do tempo de 60 dias. O crescimento micelial ocorreu nos primeiros 20 dias de cultivo. A linhagem apresentou um crescimento mais pronunciado no período compreendido entre cinco e dez dias, atingindo o ápice no período de 20 dias. A linhagem manteve a massa micelial relativamente constante até o período de 40 dias de cultivo, e a partir de então percebe-se uma tendência de queda observada nos períodos de 50 e 60 dias (Gráfico 5).

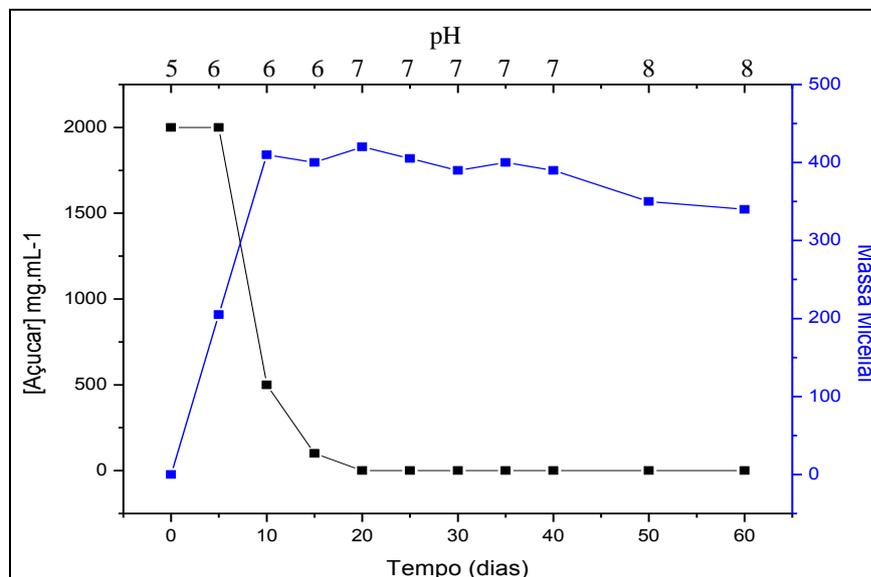


Gráfico 5. Consumo de açúcar, pH e crescimento micelial da linhagem *P. microspora* (AnspCg1.1.3a), no tempo de 0 a 60 dias.

As informações obtidas a partir dos resultados de crescimento micelial e do consumo de açúcar revelam que a fase de crescimento exponencial, conhecida como fase log, começa nos primeiros dias de cultivo indo até o 10º dia. Como nos primeiros cinco dias não se observou redução na concentração de açúcar, mas observa-se um aumento na massa micelial, podemos inferir que o período de latência, fase utilizada pelo microrganismo para adaptação ao meio de cultivo, ocorre antes dos primeiro cinco dias. Também podemos inferir que o fungo adaptou-se mais rapidamente aos amidos da batata que a dextrose como fontes de carbono. Neste caso se pode concluir que outro

tipo de açúcar ou mesmo nenhum deve ser utilizado em futuros crescimentos desse fungo.

Existe ainda um pequeno aumento no crescimento micelial até o tempo de 20 dias, quando a fonte de carbono avaliada apresenta números mínimos, e a partir daí a massa micelial se mostra relativamente constante, o que caracteriza a fase estacionária.

Os resultados mostram que a fase estacionária, fase em que ocorre a produção de metabólitos secundários, começa em torno do 20º dia de cultivo, porém, a atividade biológica investigado não foi observada neste tempo de cultivo, provavelmente porque neste período o(s) composto(s) bioativo(s) ainda estariam em baixas concentrações.

A avaliação da concentração do açúcar em paralelo ao crescimento micelial se mostraram bons parâmetros avaliativos, indiretamente relacionados as fases fisiológicas pelas quais a linhagem passa, principalmente levando em consideração a detecção do fim da fase log, e o início da fase estacionária, assim como o melhor período para isolamento de compostos bioativos (BORZANI *et al.*, 2001). Esses parâmetros foram importantes também para compreensão do perfil de massas obtidos em cada tempo de cultivo.

A avaliação do pH mostrou que ao longo do tempo as substâncias produzidas a partir desta linhagem tornam o pH do meio mais neutro, com valor de 7 a partir do 30º dia, indo até 8 a partir de 40 dias de cultivo. Isto significa que a linhagem de *P. microspora* (AnspCg1.1.3a) produz através do metabolismo substâncias alcalinizantes resultando, no final do processo medido.

Geralmente o pH para cultivo de fungos está compreendido entre 5 e 6, as principais enzimas envolvidas no metabolismo primário, da grande maioria organismos, atuam melhor nessa faixa de pH. O fato de ao longo do tempo a linhagem investigada alterar esse meio tornando-o neutro e depois alcalino, pode estar relacionado com o metabolismo relativamente lento apresentado pela linhagem, que atinge o ápice da fase estacionária somente com 30 dias (BORZANI *et al.*, 2001; PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

Dessa forma, esse resultado pode ser índice de que o pH neutro e tendendo para o alcalino, produzido pela própria linhagem, possa estar reduzindo sua capacidade metabólica. Em um ambiente menos favorável as enzimas relacionadas com as funções bioquímicas envolvidas com o metabolismo secundário, tornando assim esse metabolismo mais lento.

Neste caso o controle do pH do meio de cultivo, com adição de substâncias acidificantes poderia promover uma melhor condição de crescimento para esta

linhagens fazendo com que esta alcance a fase estacionária mais rapidamente para produção das substâncias desejadas.

O perfil metabólico da linhagem de *P. microspora* mostrou no tempo inicial sinais majoritários em m/z 211, 268 e 391, que são também observados no tempo de 05 dias, ao lado dos sinais de m/z 181 e 203. O perfil obtido com 10-15 e 20-25 dias mostrou a presença do sinal majoritários em m/z 384 e de outros minoritários em m/z 279, 311, 355, 369 e 400. A partir do 30º dia foi evidente o aumento de sinais antes minoritários em m/z 164, 279, 295, 311, 355 e 369, além do sinal 384. No tempo de 40 dias foi possível observar a redução dos sinais em m/z 355, 369 e 384, enquanto que no final do processo (50-60 dias) observou-se o aumento dos sinais m/z 164 e 313 (Figura 23).

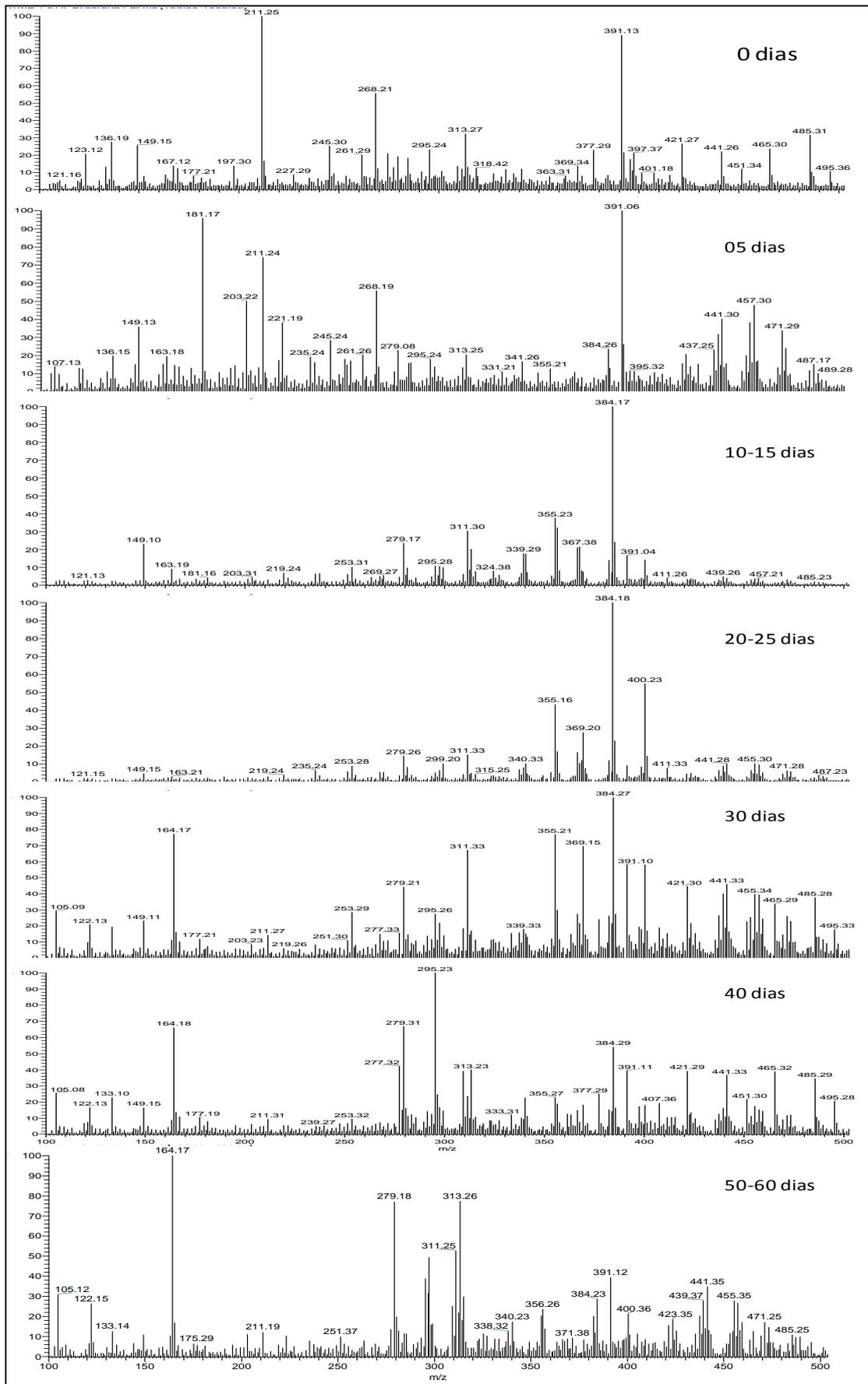


Figura 23. Espectros de massa dos extratos de *P. microspora* (AnspCg1.1.3a) obtidos nos diferentes tempos de cultivo.

Ao comparar o perfil químico dos extratos obtidos com tempo de 0 e 5 dias de crescimento pode-se afirmar que a linhagem não alterou significativamente o perfil químico do meio de cultura, apresentando a principal mudança pelo aparecimento dos sinais majoritários em m/z 181 e 203. Isto é coerente com o fato de que a linhagem está na fase inicial de crescimento adaptando-se ao meio de cultura e preparando seu “maquinário” molecular para consumo da fonte de carbono. Da mesma forma, os perfis avaliados nos períodos de 10-15 e 20-25 dias de cultivo indicam fases fisiológicas diferentes, coerente com os dados de consumo de açúcar e o crescimento micelial: final da fase exponencial de crescimento (10-15 dias) e início da fase estacionária (20-25 dias).

A alteração com 30 dias de cultivo, cujos sinais se mantêm até o 40º dia sem grande mudança, coerente com a fase estacionária e o aparecimento da atividade biológica. Assim, os novos sinais apresentados em intervalos de 30 e 40 dias podem ser utilizados como marcadores da fase estacionária para a linhagem *P. microspora* (AnspCg1.1.3a) e podem representar o princípio ativo dos extratos, o que requer mais investigação.

Este facto permite inferir que o acompanhamento por espectrometria de massas guarda um bom paralelo com as diversas fases de crescimento de fungos do gênero, com a vantagem de ser útil na observação dos sinais dos metabólitos microbianos, tornando o processo mais eficiente e possibilitando o aumento no rendimento de compostos bioativos pelo aperfeiçoamento da etapa de caracterização da produção.

Com o perfil químico obtido, não é possível afirmar quais compostos são responsáveis pela actividade biológica, por conta do grande número de sinais presentes, mas é clara a relação entre os íons moleculares formadas nos intervalos de 30 e 40 dias e o aparecimento da atividade anticandida. Este dado indica que os compostos bioativos estão sendo produzidos ao mesmo tempo ou são os próprios compostos detectados.

5.10. Produção, fracionamento e identificação de compostos de *P. microspora*

Os rendimentos dos extratos de *P. microspora* (AnspCg1.1.3a) foram de 673 mg do meio líquido e 1.536 mg do micélio. O rendimento do extrato do meio líquido foi considerado baixo, tendo em vista a utilização de aproximadamente 31L de meio líquido.

O rendimento do micélio é considerado normal, tendo em vista a grande quantidade de polissacarídeos e ácidos graxos extraídos da parede celular do fungo, juntamente a outros metabólitos do meio intracelular.

O extrato do meio líquido teve confirmada a atividade anticandida para então proceder seu fracionamento, com a finalidade de torná-lo menos complexo para a etapa de isolamento da(s) substância(s) bioativa(s). O extrato do micélio apesar de não apresentar a atividade biológica investigada, também foi fracionado e teve avaliada a atividade anticandida em suas frações, o resultados de CMI das frações estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. CMI das frações dos extratos de *P. microspora* (AnspCg1.1.3a)

| | Fração | Código | Hex:AcOEt:MeOH | Massa (mg) | CMI (mg.mL ⁻¹) |
|--------------|--------|--------|----------------|------------|-------------------------------|
| Meio líquido | 1 | P12L-1 | 8:2:0 | 9,0 | N |
| | 2 | P12L-2 | 1:1:0 | 37,0 | N |
| | 3 | P12L-3 | 0: 9,5:0,5 | 128,0 | 0.25 |
| | 4 | P12L-4 | 0:0:1 | 496,0 | N |
| Micélio | 1 | P12M-1 | 3:7:0 | 75,0 | 0.50 |
| | 2 | P12M-2 | 0:8:2 | 110,0 | 0.50 |
| | 3 | P12M-3 | 0: 1:1 | 246,0 | N |
| | 4 | P12M-4 | 0:0:1 | 348,0 | N |

As frações P12L-3 do meio líquido, P12M-1 e P12M-2 do micélio revelaram atividade inibitória frente a *C. albicans*. Como o extrato do micélio não havia apresentado atividade anteriormente, acreditávamos que a complexa composição desse extrato tivesse mascarado a bioatividade, contudo os resultados de bioautografia, mostrados a seguir, não confirmaram essa questão.

As frações P12L-3 e P12L-4 foram selecionadas para análise por HPLC, a primeira devido a presença da atividade biológica, enquanto que a segunda em função da sua quantidade de amostra (Figura 25). Devido ao número de frações, um total de oito, optou-se, a partir dessa etapa, por uma estratégia bioguiada, em que foram investigadas amostras que apresentassem a atividade biológica objetivo do trabalho.

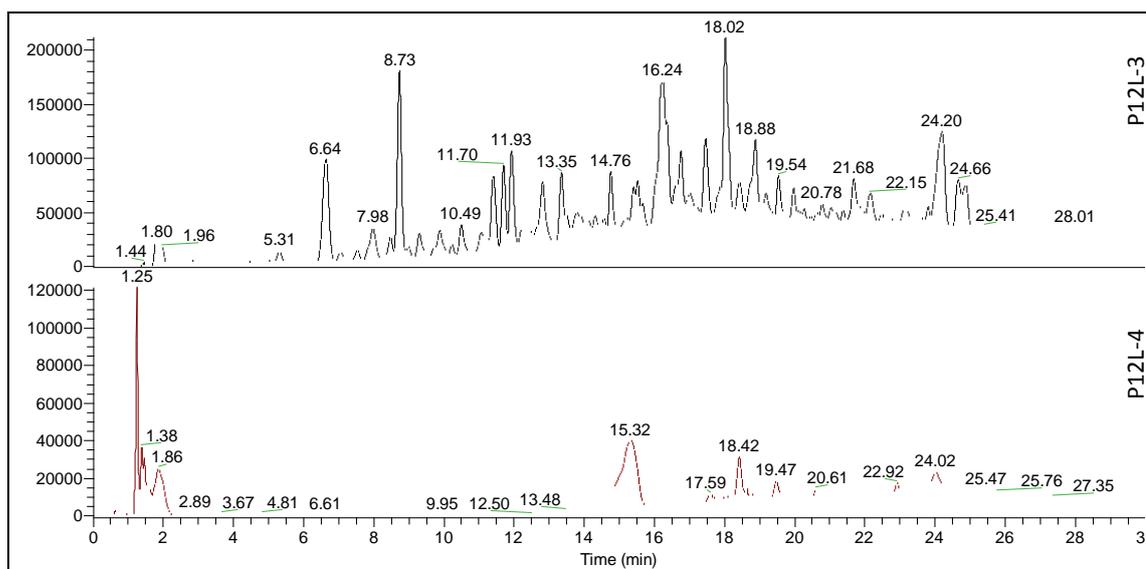


Figura 24. Cromatograma de P12L-3 e P12L-4, frações obtidas a partir do fracionamento do extrato do meio líquido (P12L).

O perfil cromatográfico mostrou que a fração P12L-3 era mais complexa do que a fração P12L-4, diferença expressa pela quantidade de picos presentes no cromatograma. Esse resultado indicava que o isolamento da(s) substância(s) com atividade anticandida poderia ser difícil devido também, a pouca quantidade de amostra na fração P12L-3.

A pouca eficiência verificada nos métodos de isolamento utilizando Cromatografia Líquida Preparativa, somado ao pouco rendimento da amostra nos fez optar pela bioautografia como método de caracterização química que nortearia o isolamento das substâncias de interesse através do método de Cromatografia Camada Delgada Preparativa – CCDP.

5.11 Ensaios de Bioautografia

Os testes de bioautografia realizados com a fração P12L-3 revelou zonas brancas em que não ocorreu crescimento de *C. albicans* na placa CCD, demonstrando a capacidade de inibição de substâncias nessa fração. O desenvolvimento prévio da condição de separação em CCD para a fração P12L-3 possibilitou a obtenção do *R_f* das substâncias que apresentaram a atividade. Dessa forma, as zonas de inibição da fração P12L-3 foram relacionados com substâncias com *R_f* 0,76 e 0,62 (Figura 25).

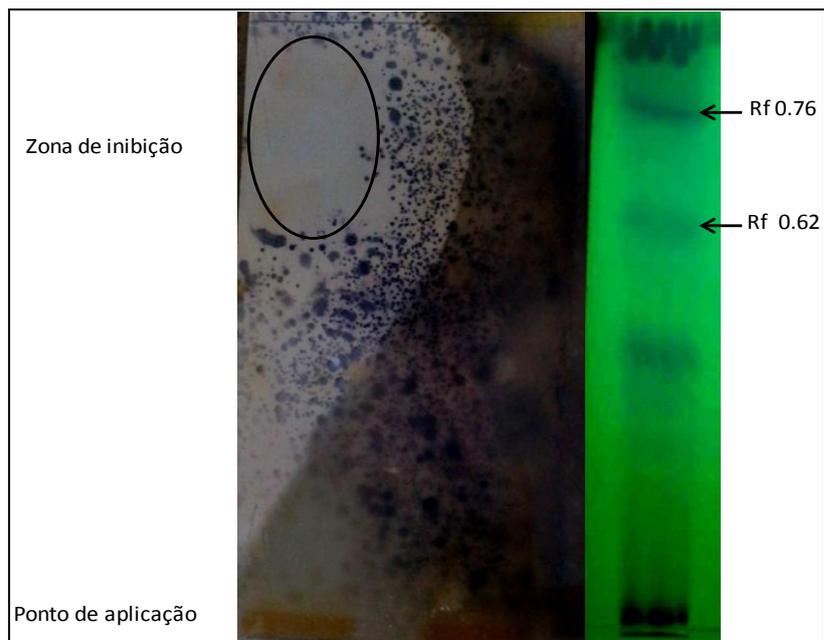


Figura 25. Placa de Bioautografia da fração P12L-3 com halo de inibição frente a *C. albicans*. Ao lado placa CCD revelada em Luz UV 254, com *Rf* das zonas de inibição.

Os resultados revelaram que são pelo menos duas as substâncias responsáveis pela atividade anticandida. Através desse método foi possível estabelecer a melhor condição de separação das substâncias alvo para a etapa de Cromatografia em Camada Delgada Preparativa CCDP.

Os trabalhos utilizando o método de bioautografia tem demonstrado que essa estratégia possui algumas vantagens no seu desenvolvimento, principalmente quando o trabalho envolve uma mistura de substâncias mais complexa, como extratos vegetais por exemplo. Através desse método é possível localizar com certa precisão quais são as substâncias envolvidas na atividade biológica investigada, facilitando a etapa de isolamento da mesma (NOSTRO *et al.*, 2000; ISLA *et al.*, 2012).

O resultado do teste de bioautografia realizado com a fração P12M-2 não apresentou halos de inibição que demonstre a atividade biológica das substâncias separadas frente a linhagem de *C. albicans* (Figura 26).

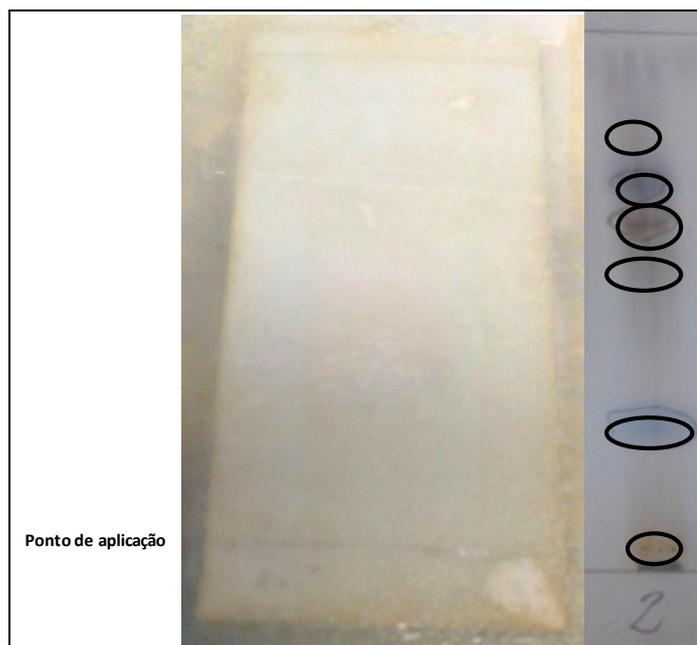


Figura 26. Placa de Bioautografia da fração P12M-2 com resultado negativo. Ao lado placa CCD revelada com vanilina ácida mostrando a separação de substâncias.

O resultado negativo pode ser indício que a atividade biológica apresentada por esta fração, esteja relacionada com o efeito sinérgico proporcionado pelas diferentes substâncias que a compõem. A explicação se fortalece principalmente pelo fato de que essa fração apresenta um perfil complexo avaliado em CCD, com pelo menos seis substâncias separadas. Além disso, pelas características do perfil da amostra em CCD é possível que o número de substâncias presentes na fração esteja subestimado.

5.12 Isolamento das substâncias da fração P12L-3

A etapa de isolamento das substâncias componentes da fração P12L-3 foi realizada utilizando as mesmas condições de corrida da técnica de bioautografia. Com o desenvolvimento da técnica foram selecionados para a retirada da placa, além dos dois pontos de R_f 0,76 e 0,62, outros dois pontos. Esses dois pontos foram selecionados devido ao perfil revelado em luz UV 254 nm, indicando se tratar de substâncias puras e presentes em quantidades significativas.

Após isolamento as quatro amostras foram identificadas como P12L-3(1), P12L-3(2), P12L-3(3), P12L-3(4), sendo que a ordem foi dada em função da polaridade das amostras, indo das menos para as mais polares. As subfrações foram testadas frente a *C. albicans* e P12L-3(1) e P12L-3(2) foram as que apresentaram a atividade biológica.

5.13 Identificação das substâncias isoladas na fração P12L-3

A amostra P12L-3(3) apresentou uma aspecto oleaginoso de coloração amarelada, e apesar da análise por CCD revelar apenas uma mancha os espectros de massas indicaram se tratar de uma mistura, com substâncias analisadas em modo positivo apresentando sinal intenso de m/z 281 $[M+H]$, e em modo negativo sinal de m/z 313 $[M-H]$ (Figura 27).

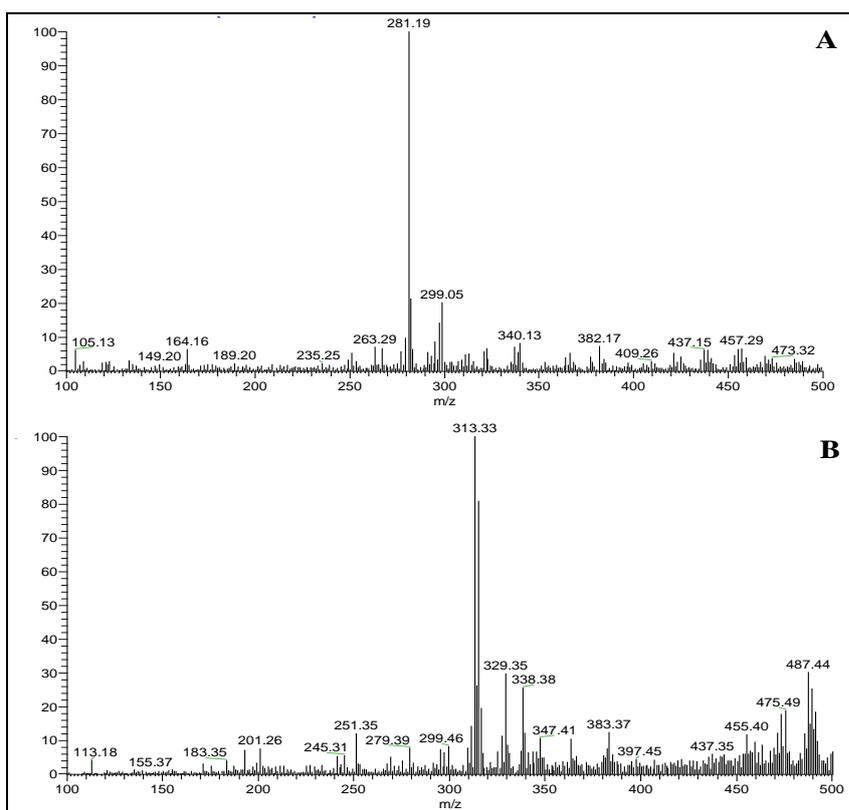


Figura 27. Espectro de massas da subfração P12L-3(3) analisada em modo positivo $[M+H]$ e modo negativo $[M-H]$, com sinais m/z 281 e 313, respectivamente.

De acordo com os dados dos espectros de RMN verificou-se que uma das substâncias da amostra P12L-3(3) possui fórmula molecular $C_9H_{10}O_2$ (Figura 28), coerente com a estrutura do ácido 3-fenil propanóico, também denominado de ácido β -fenilpropanóico ou ácido benzilacético. Estrutura ilustrada na Figura 28.

A molécula possui m/z 150, e por se tratar de um ácido, normal seria ser detectada com m/z 149 no modo negativo, fato este não observado (figura 27(B)). A não detecção da molécula pode ter sido promovida pela existência de outras moléculas na amostra

P12L03(3), essas por sua vez têm capacidade de ionização maior que o ácido β -fenilpropanóico, inviabilizando sua detecção via espectrometria de massas.

Este composto já relatado na literatura como constituinte de variadas espécies vegetais e também produzidos por microrganismos, pertence a classe dos fenilpropanóides e portanto de origem no aminoácido fenilalanina através da rota do ácido chiquímico (DEWICK, 2004).

Tabela 11. Atribuições de ^1H em comparação com os dados da literatura para a substância ácido 3-fenil-propanóico.

| P12L-3(3) | | |
|--------------------|---------------|--------------------|
| 1H | HSQC/DEPT-135 | HMBC |
| 7,27, tipo t, | 129,5, s | 140,5, 129,5 |
| 7,21, tipo d | 129,8, s | 127,4, 36,5 |
| 7,18, tipo t | 127,4, s | 129,8 |
| 3,38 (t ou dd), 2H | 42,1, d | 36,5, 140,5, 173,5 |
| 2,78 (t ou dd), 2H | 36,5, d | 42,1, 129,8, 140,5 |
| 2,27, t, | 35,1, d | - |
| 1,90, s, 2H | - | 173,5 |
| ~1,3 | - | - |
| ~0,9 | - | - |

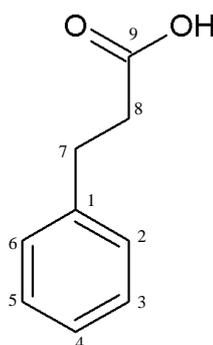


Figura 28. Estrutura química do ácido 3-fenil-propanóico ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$).

Apesar de se tratar de uma molécula relativamente simples, existe relato deste composto com atividade antimicrobiana (SÁNCHEZ-MALDONADO *et al.*, 2011). Contudo, neste trabalho a atividade anticandida não foi observada pela subfração que continha essa substância. Em outros trabalhos também foi observado que esse tipo de molécula pode atuar na planta como agente protetor contra alguns tipos de patógenos, demonstrando então a importância ecológica para esse composto (LI *et al.*, 2015).

Em função das atividades biológicas relatadas e por se tratar de um fungo endofítico, é provável que a produção dessa molécula pela linhagem *P. microspora* (P12/AnspCg1.1.3a) esteja envolvida na interrelação fungo-planta, neste caso a espécie de *Rollinia* sp. Nesta relação, por muitas vezes, a linhagem albergada produz substâncias que exercem alguma ação biológica favorável ecologicamente para a planta hospedeira (CLAY *et al.*, 1993; AZEVEDO *et al.*, 2000).

5.14 Perfil de proteínas secretadas por linhagens de *Pestalotiopsis* spp.

Para a avaliação do perfil de proteínas secretadas por *P. microspora* (P12/AnspCg1.1.3a), foi necessário determinar as melhores condições de análises relacionadas a quantidade (volume) de amostra, com o intuito de padronizar as condições para todas as amostras. O objetivo foi utilizar um método simples, e ao mesmo tempo eficiente na percepção das diferenças entre as amostras. Com relação a produção de bandas proteicas, as amostras analisadas nos tempos de 05 a 60 dias de cultivo demonstraram um perfil similar (Figura 29).

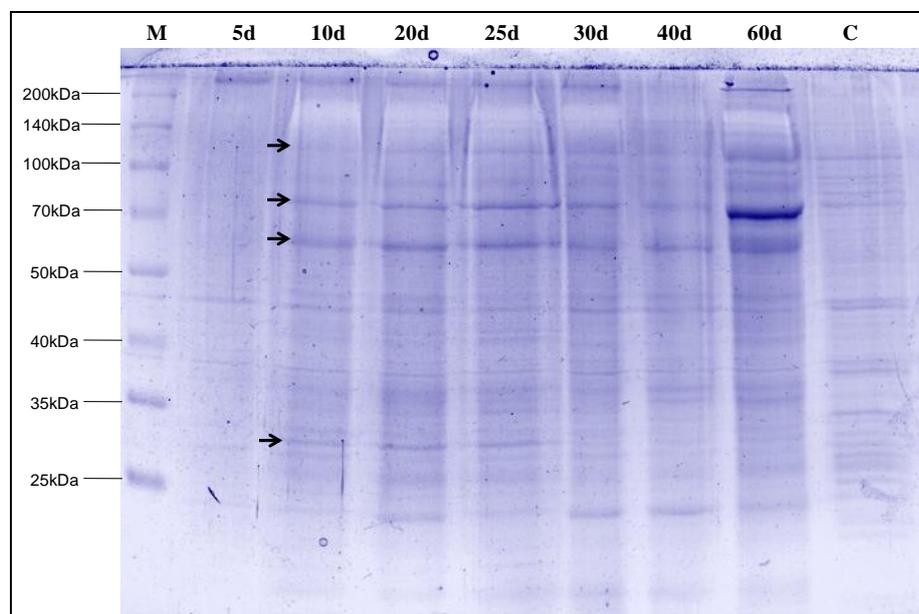


Figura 29. Perfil eletroforético em SDS-PAGE de proteínas secretadas pela linhagem *P. microspora* (P12/AnspCg1.1.3a) de 05 a 60 dias.

A amostra obtida com cinco dias de cultivo apresentou o perfil proteico mais pobre em comparação com as amostras com outros tempos de cultivo, com número de bandas proteicas bastante reduzido.

A amostra com 60 dias de cultivo apresentou sensível mudança em seu perfil em comparação as demais, com maior concentração de proteínas de 70kDa. Outra mudança relevante entre os perfis acontece nas proteínas de aproximadamente 30kDa, estas aparecem entre 10 e 25 dias, e desaparecem a partir de 30 dias permanecendo assim até o fim dos 60 dias.

O perfil eletroforético das amostras mostrou que as proteínas em maior concentração possuem tamanhos de aproximadamente 120kDa, 70kDa e 60kDa. A consulta a trabalhos relacionados ao mapeamento de proteínas secretadas por diferentes espécies de fungos indica que trata-se de uma variedade de amilases como α e β amilases, glucoamilases entre outras, e também glicosidases como glicose oxidases ou β -glicosidades envolvidas na metabolização da amilase e da glicose como fontes de carbono (FRANCISCO *et al.*, 2004; FRANCISCO *et al.*, 2005; MONTE *et al.*, 2005; IWASHITA *et al.*, 2006).

É importante lembrar que o meio de cultura utilizado para essa etapa do trabalho foi o BDL Batata e Dextrose suplementado com extrato de levedura, sendo assim o microrganismo precisa desenvolver maquinário molecular capaz de metabolizar tanto o amido vindo batada, quanto a dextrose (açúcares). Por conta disso observa-se uma maior concentração dessas proteínas no perfil.

O fato dessas proteínas não aparecerem na amostra com cinco dias de cultivo é coerente com a ideia de que nesse tempo de crescimento a linhagem não se encontra na fase “log” de crescimento e sim na fase inicial “lag”. O fato revela que a linhagem *P. microspora* (AnspCg1.1.3a) possui um metabolismo mais lento quando comparado com outras da literatura, que apresentam crescimento e mudanças no perfil de proteínas a partir do terceiro dia de cultivo por exemplo (FRANCISCO *et al.*, 2005).

É possível perceber um aumento gradual na concentração das proteínas com 120kDa, 70kDa e 60kDa a partir do tempo de 10 dias chegando ao ápice com 25 dias, e a partir de 30 dias esse perfil se mostra menos concentrado até 40 dias. O fato coerente com o perfil no consumo de açúcar (Gráfico 5) que revelou a concentração de açúcar indo ao mínimo com 20 dias, este fato resulta provavelmente em uma menor produção, ou mesmo a parada na produção das enzimas responsáveis pela metabolização dessas fontes de carbono.

De forma geral esse resultado está coerente com os apresentados no perfil químico de *P. microspora* (AnspCg1.1.3a), mostrando que no período compreendido entre 25 e

30 dias a linhagem chega a fase estacionária, fase em que os metabólitos secundários são produzidos.

Não foi possível explicar o perfil apresentado com 60 dias de cultivo, em que ocorre grande concentração de proteínas de aproximadamente 70kDa, mas é provável que essas proteínas tenham relação com etapas do catabolismo da linhagem, tendo em vista o elevado tempo de cultivo e as características morfológicas apresentadas pela linhagem neste período.

Também de acordo com a literatura é provável que as proteínas com aproximadamente 30kDa detectadas apenas nos tempos de 10, 20 e 25 dias, sejam proteases como aminopeptidases e proteases alcalinas, confirmadas em trabalhos de isolamento e identificação de proteínas secretadas por outros gêneros (FRANCISCO *et al.*, 2004; FRANCISCO *et al.*, 2005; IWASHITA *et al.*, 2006). A afirmação leva em consideração que no meio de cultivo foi utilizado o extrato de levedura como fonte de nitrogênio, sendo necessária a produção de enzimas para metabolização desse substrato. Dessa forma, o não aparecimento dessas proteínas nos tempos de 30, 40 e 60 dias pode ser explicado pelo consumo total desse substrato ao longo do tempo, reforçado pelo fato dele se apresentar em baixa concentração no meio de cultivo.

De forma geral o perfil de proteínas com 25 dias de cultivo apresentou os melhores resultados em uma possível avaliação 2D bidimensional, tendo em vista a variedade, e principalmente a concentração de proteínas na amostra.

Como esse tempo de cultivo tem demonstrado grande relevância para o início do metabolismo secundário dessa linhagem, uma avaliação bidimensional poderia trazer respostas mais objetivas, como por exemplo sobre a diversidade de proteínas presentes neste tempo, resposta importante para compreensão do metabolismo secundário da linhagem.

Para análise do perfil intraespecífico de proteínas extracelulares pelas linhagens de *Pestalotiopsis* spp. foram utilizadas amostras de nove espécies, sendo elas: *P. camelliae* (P03), *P. disseminata* (P10), *P. mangiferae* (P11), *P. microspora* (P12), *P. neglecta* (P17), *N. formicarum* (P36), *P. versicolor* (P47), *P. adusta* (P52) e *N. clavispota* (P55). O experimento foi realizado nas condições previamente estabelecidas, e os resultados estão ilustrados na Figura 30.

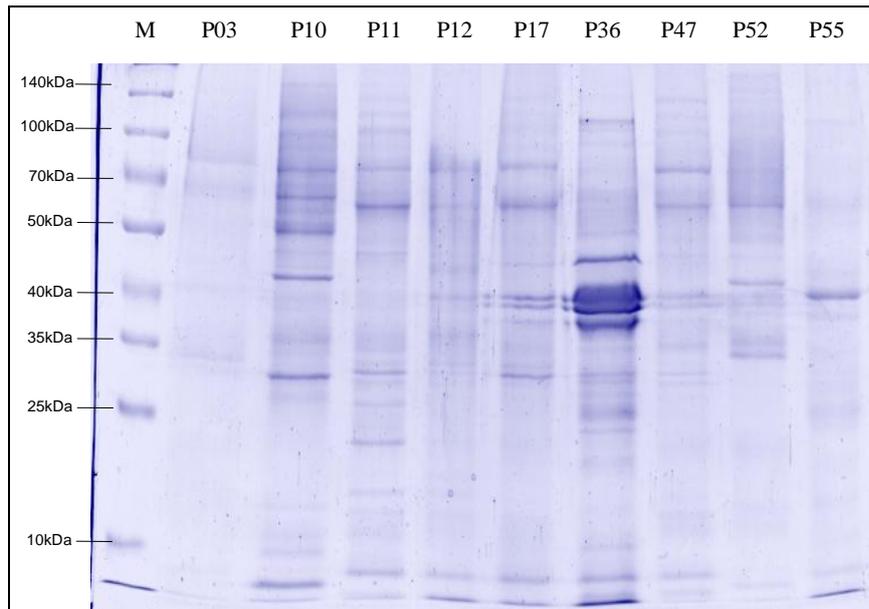


Figura 30. Perfil eletroforético em SDS-PAGE de proteínas secretadas por nove linhagens de *Pestalotiopsis* spp..

De forma geral as amostras apresentaram um resultado polimórfico levando em consideração, o número de bandas proteicas, a intensidade dessas proteínas, e a distribuição delas no gel. As amostras apresentaram um número de bandas proteicas que variou de quatro a dezesseis, entre essas, as que apresentaram o perfil mais pobre foram as amostras de *P. camelliae* (P03) e *N. clavisporea* (P55) com números de bandas de proteínas de quatro e seis respectivamente. A espécie de *N. formicarum* (P36) também chama atenção pela maior intensidade de proteínas de 40kDa.

As proteínas entre 50 e 100kDa foram as que se apresentaram com maior frequência entre as diferentes espécies de *Pestalotiopsis*. Como dissemos anteriormente trata-se provavelmente das proteínas responsáveis pela metabolização do amido advindo da água de batata no meio de cultivo e da dextrose.

A maioria das linhagens também apresentou proteínas com aproximadamente 30kDa, discutidas anteriormente como proteases responsáveis pela metabolização do extrato de levedura. Ambas as informações acima fortalecem a ideia de que realmente trata-se dessas proteínas, uma vez que a maior parte das linhagens comportou-se praticamente da mesma forma, com relação a produção dessas enzimas, e levando em consideração ainda que todas foram cultivadas em meio BDL.

Isso de certa forma explica o perfil químico relativamente similar apresentado entre as linhagens, mostrado na discussão sobre o perfil de substâncias produzidas. Aparentemente o meio de cultivo tem levado a produção de enzimas que conduzem a

um caminho metabólico padrão entre as linhagens, resultando em linhagens com perfis químicos aproximados. O desafio está na percepção das diferenças na expressão de proteínas que podem levar a caminhos metabólicos diferentes.

A linhagem de *N. formicarum* mostrou um perfil proteico mais diferente com produção intensa de proteínas de aproximadamente 40kDa. Não foi possível fazer proposição de proteínas nessa faixa de tamanho, primeiro por conta do número reduzido de trabalhos com perfil de proteínas de *Pestalotiopsis*, e pelo número reduzido de trabalhos de isolamento e identificação de proteínas extracelulares de fungos com essa faixa de tamanho.

5.15 Avaliação da produção de linhagens mutantes

Para se confirmar a produção de linhagens mutantes a partir da linhagem de *P. microspora* (AnspCg1.1.3a) utilizando luz UV, foi necessário avaliar a curva de sobrevivência de conídios para perceber a efetividade da luz UV como fator de modificação do DNA, causando erros genéticos (mutações) nas células viáveis sobreviventes. O Gráfico 6 mostra o decaimento no número de células viáveis, considerando como células viáveis aquelas capazes de apresentar crescimento em meio de cultivo, e após desenvolvimento são capazes de repassar sua informação genética (AZEVEDO, 1998).

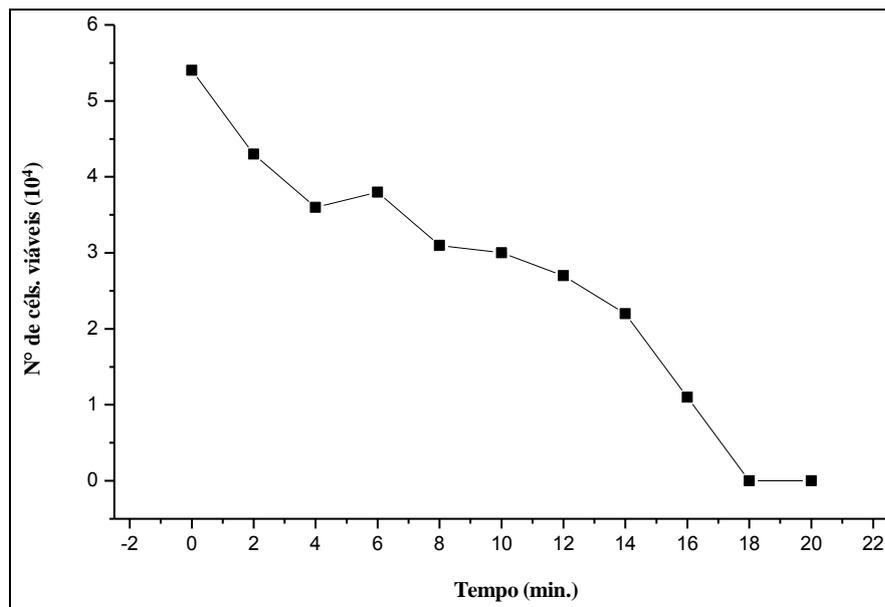


Gráfico 6. Decaimento no número de células viáveis em função do tempo de exposição a luz UV.

Os resultados mostraram um decaimento irregular, porém constante, no número de células viáveis, e que a partir de 18 minutos não apresentou mais células viáveis ao crescimento. Dessa forma, foram selecionadas como possíveis mutantes cinco linhagens que estiveram expostas a luz UV por 16 minutos, o último tempo em que se observou linhagens viáveis.

As cinco linhagens foram identificadas de PX01 a PX05, e avaliadas em relação a sua macro e micromorfologia, seu perfil genético, quanto ao perfil de seus metabólitos e também seu perfil de proteínas secretadas em comparação a linhagem parietal (Figura 31).



Figura 31. A- Linhagem PX01 em placa contendo meio BDA. B- Micro-estruturas de conídios da linhagem.

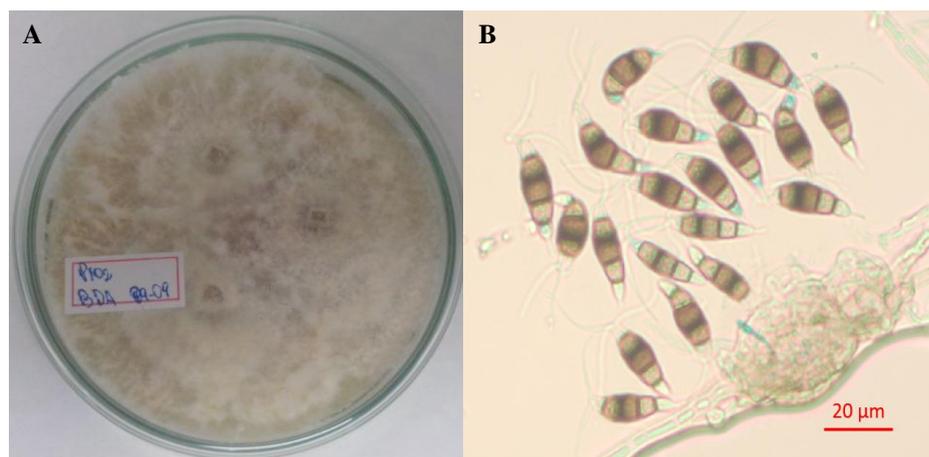


Figura 32. A- Linhagem PX02 em placa contendo meio BDA. B- Micro-estruturas de conídios da linhagem.

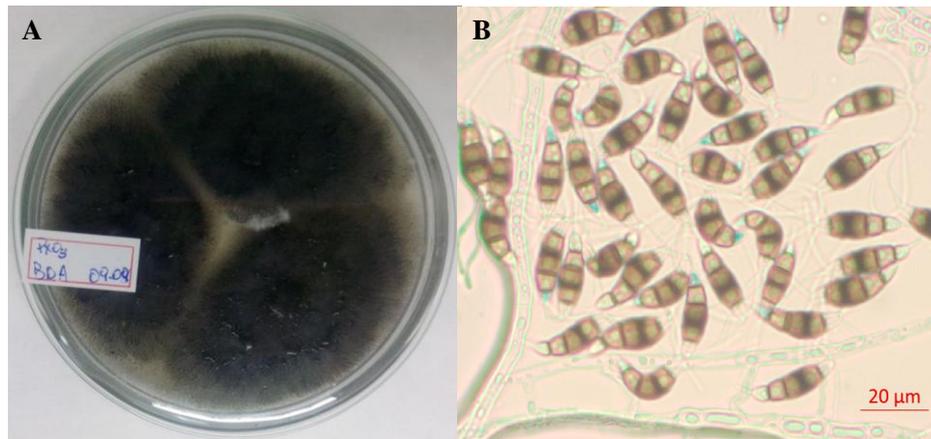


Figura 33. A- Linhagem PX03 em placa contendo meio BDA. B- Micro-estruturas de conídios da linhagem.

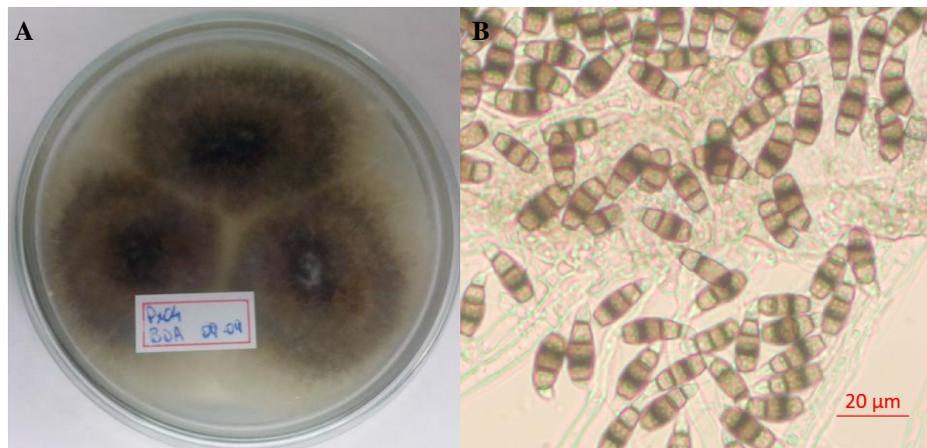


Figura 34. A- Linhagem PX04 em placa contendo meio BDA. B- Micro-estruturas de conídios da linhagem.

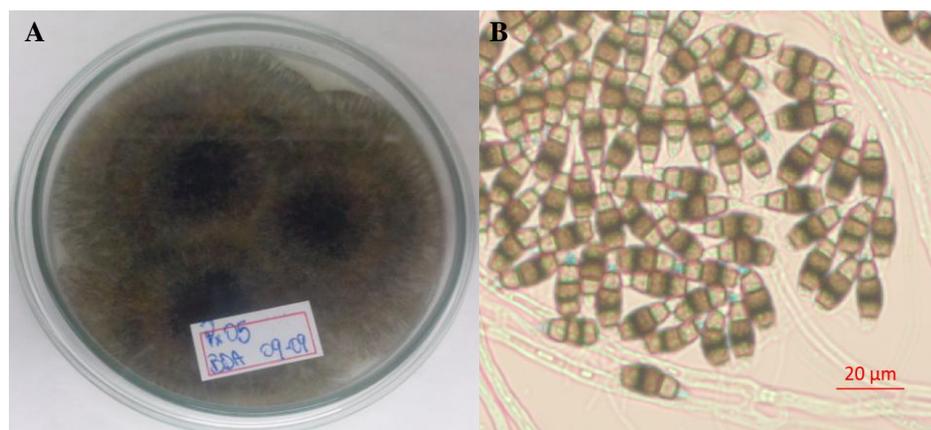


Figura 35. A- Linhagem PX01 em placa contendo meio BDA. B- Micro-estruturas de conídios da linhagem.

A análise da macromorfologia das linhagens revelou um considerável aumento na formação de conídios para quatro das cinco linhagens, o fato lhes deu um aspecto

enegrecido ao micélio, pelo excesso de conídios presentes em cada linhagem. A exceção a esse fato foi a linhagem PX02 que apresentou características de crescimento similares a linhagem selvagem.

A micromorfologia das cinco linhagens foram avaliadas e nenhuma apresentou diferença significativa com relação as dimensões das microestruturas de conídios. Para efeito de comparação com a linhagem selvagem, foram avaliadas o diâmetro do conídio e comprimento do apêndice apical.

A produção de linhagens mutantes utilizando luz UV como agente modificador, luz UVC (280-100nm), acontece devido a formação de dímeros de pirimidina, em geral de timina. O número excessivo desses dímeros inviabilizam a ação eficiente dos mecanismos de reparo, o que não causando a morte, pode causar a ativação e o silenciamento de genes alterando a bioquímica da linhagem selvagem (WEBB, 1977; AZEVEDO, 1989; EKER *et al.*, 2009).

É difícil determinar o melhor tempo de exposição para uma maior eficiência no processo de produção de mutantes, mas o conhecimento das microestruturas de resistências da linhagem, e os resultados de sobrevivência podem dar bons indícios para um processo mais eficiente (KAPLAN *et al.*, 1989; SZAKACS *et al.*, 2008).

Os conídios são as estruturas reprodutivas desse gênero e portanto, é fundamental para a manutenção da espécie que essa estrutura seja uma das mais conservadas, mesmo quando a linhagem passa por algum processo de indução para mutação genética (AZEVEDO, 1998). Isso explica o fato de não ser possível perceber nenhuma diferença nas micro-estruturas dos conídios da linhagens mutantes em comparação a linhagem parietal.

Ao ocorrer uma modificação genética induzida por diferentes agentes físicos ou químicos, ocorre um processo de reparo em que a grande maioria das modificações são corrigidas. Nesse processo uma mutação se estabelece quando ocorre uma falha na etapa de reparo, fazendo com que essa modificação se estabeleça no material genético do organismo (AZEVEDO, 1998).

O aumento na formação de conídios, presentes em quatro linhagens PX, é um efeito denominado de fotoindução da esporulação, já conhecido em diversas espécies esporulantes, consequência a uma alta exposição a luz UV. Esse processo promovido pelas denominadas fotoliasas, enzimas envolvidas no processo de reparo, ocorre como estratégia de sobrevivência do microrganismo (SAMETZ-BARON *et al.*, 1997; SZAKACS *et al.*, 2008).

A análise das linhagens PX por marcadores genéticos AFLP foi conduzido conjuntamente as demais amostras de *Pestalotiopsis* spp. (Figura 17). Das cinco possíveis mutantes duas não apresentaram um perfil capaz de ser analisado, assim a comparação do perfil de fragmentação da linhagem parietal (*P. microspora* / P12) foi realizado com as linhagens PX01, PX03 e PX04 (Figura 36).

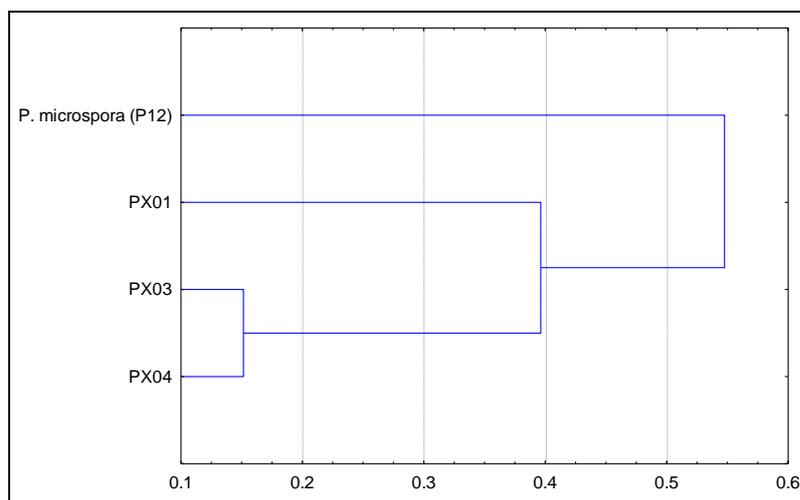


Figura 36. Dendrograma resultante do agrupamento hierárquico UPGMA para linhagens de *P. microspora* e PX, avaliadas por AFLP, com coeficiente de Pearson.

Apesar do baixo número de fragmentos obtidos, já discutido anteriormente, percebe-se um perfil de fragmentação diferente das linhagens mutantes em comparação a selvagem, o que viabilizou a construção do dendrograma a partir da UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) de agrupamento hierárquico.

Ao analisar o perfil apresentado em gel de agarose percebe-se que as principais modificações ocorridas nas linhagens PX em comparação a linhagem parietal, possibilitaram a formação de fragmentos de aproximadamente 1450 e 700 pb não observadas na linhagem selvagem. As diferenças no perfil genético comprovam a ocorrências de modificações nas linhagens PX induzidas pela luz UV.

As modificações ocorridas no DNA genômico das linhagens mutantes proporcionaram mudanças nos pontos de clivagem para ação das enzimas de restrição utilizadas no AFLP, ocasionando um novo perfil para essas linhagens. A similaridade de perfil apresentado entre as linhagens mutantes sugere pontos do genoma dessa linhagem mais susceptíveis a ocorrência de modificações.

Os extratos do meio líquido tanto da linhagem selvagem, quanto das linhagens mutantes foram analisados estatisticamente quanto a variação na quantidade de extrato em miligramas foram obtido em cada cultivo (Gráfico 7).

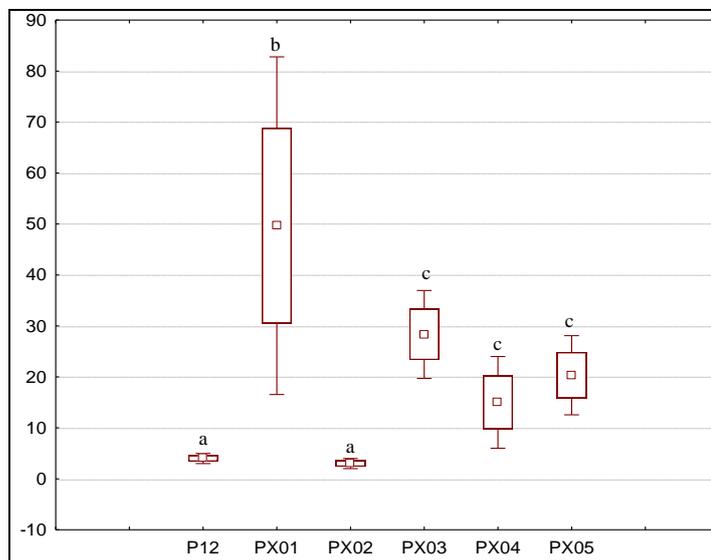


Gráfico 7. Variância da produção de extrato (mg) da linhagem selvagem e linhagens PX.

A análise estatística realizada mostrou diferença significativa na quantidade de extratos obtidos em quatro extratos das linhagens mutantes em comparação a linhagem selvagem. A única em que isso não foi observado foi a linhagem PX02 mantendo-se similar a linhagem selvagem.

Os extratos das linhagens mutantes apresentaram uma quantidade maior de material, utilizando extração líquido:líquido com AcOEt como método de extração, esse método de extração apesar de difícil padronização foi útil na detecção das diferenças iniciais do metabolismo das linhagens estudadas. Uma maior quantidade de extrato não garante uma maior quantidade das substâncias de interesse, mas é um primeiro indício de que as linhagens mutantes possuem um perfil metabólico diferente da linhagem selvagem.

Os extratos das linhagens mutantes e da linhagem selvagem foram testados frente a *C. albicans* para verificar se houve modificação na atividade biológica apresentada pela linhagem parietal. Apresentaram resultados positivos apenas os extratos da linhagem PX02 da linhagem selvagem ambas com CMI de 0.50 mg.mL^{-1} .

A perda da atividade biológica, por quatro das cinco linhagens PX, indicou que a modificação genética foi negativa para a produção do(s) composto(s) biativo(s),

reduzindo ou inviabilizando a sua produção. Como forma de caracterizar as alterações dos extratos das linhagens PX em comparação a linhagem selvagem foi realizado análise dos extratos em HPLC, cromatogramas apresentados na Figura 37.

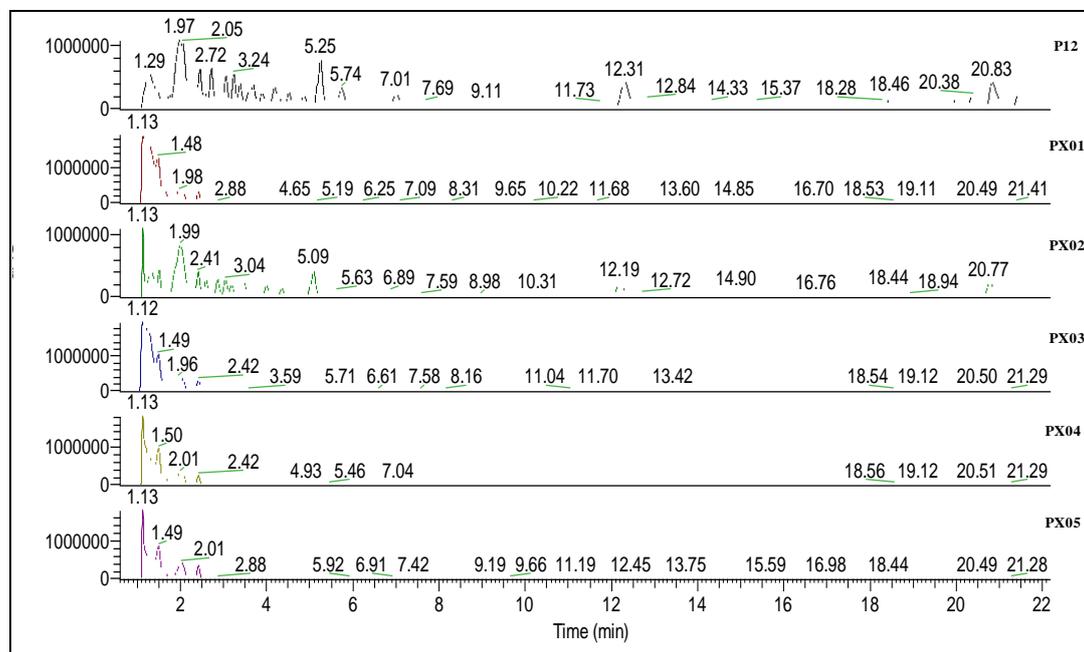


Figura 37. Cromatogramas referentes aos extratos da linhagem selvagem (P12) e as linhagens PX01-PX05.

Para o desenvolvimento da técnica de separação por HPLC dos extratos da linhagem selvagem e PX foram necessários novos testes nas condições de corrida, para encontrar um único método eficiente na separação de todas as amostras. Nesta etapa foi considerado como melhor resultado aquele que apresentou o maior número de picos por amostra.

Através dos resultados dos cromatogramas é possível afirmar que existem diferenças significativas entre o perfil de substâncias presentes no extrato da linhagem selvagem em comparação as linhagens PX01, PX03, PX04 e PX05, além disso, observa-se que o perfil da linhagem PX02 permaneceu similar a linhagem selvagem.

As linhagens PX01, PX03, PX04 e PX05 apresentaram um perfil cromatográfico bastante similar entre si, com sinais com tempos de retenção de 1.13, 1.49, 2.01 e 2.42 minutos. A linhagem selvagem e PX02 apresentaram um perfil mais rico com sinais majoritários em 1.29, 1.97, 2.72, 3.24, 5.25, 12.31, 20.83 minutos. A similaridade entre os extratos das linhagens PX, exceção feita a PX02, indica que as modificações

ocasionadas pela exposição a luz UV provocou alterações genéticas com as mesmas consequências metabólicas para essas linhagens.

A diferença no número de picos entre os dois grupos, indica que os extratos das linhagens mutantes, exceção feita a PX02, são mais pobres com relação ao número de substâncias presentes no extrato da linhagem selvagem. Este ponto somado ao fato da atividade biológica não aparecer em nenhum desses extratos, demonstra que a modificação mediada pela exposição a luz UV não se mostrou promissora para a obtenção de linhagens com atividade biológica frente a *C. albicans*.

Alguns trabalhos têm mostrado que a utilização de luz UV, como forma de ativação de genes de interesse, é uma estratégia viável para a obtenção de moléculas de interesse. Contudo, a maioria dos trabalhos visa o melhoramento da linhagem para obtenção de macromoléculas como enzimas (SZAKACS *et al.*, 2008). A utilização desse método para obtenção de novas substâncias (micromoléculas) com potencial biotecnológico, ou para aumentar a produção de substâncias específicas do metabolismo secundário parece ser tão simples, tendo em vista que a produção de tais moléculas acontece através de um variado número de passos mediados por diferentes enzimas (DEWICK, 2004).

Contudo, existe uma necessidade latente quando se investiga as reais possibilidades biotecnológicas voltadas à obtenção de substâncias do metabolismo secundário, que é a ativação do número máximo de genes envolvidos no processo de biossíntese dessas substâncias. Atualmente se sabe que uma grande parte dos genes envolvidos nas etapas do metabolismo secundário está silenciada, e por conta disso, vem se desenvolvendo as mais diferentes estratégias tanto para se estudar esses genes, quanto para acessá-los de forma efetiva (BRAKHAGE & SCHROECKH, 2011; YANG *et al.*, 2013).

Nesta etapa do trabalho se tentou acessar essas regiões “silenciadas” da linhagem selvagem, no sentido de ativar genes que modificassem positivamente o metabolismo secundário dessa linhagem, fosse para o aumento na produção de substâncias específicas ou na produção de novas substâncias com interesse farmacológico investigado.

A análise do perfil de proteínas extracelulares das linhagens PX foi realizada em gel SDS-PAGE onde foram aplicadas as cinco amostras selecionadas como possíveis mutantes além da linhagem selvagem (*P. microspora* / P12). Todo procedimento

obedeceu às condições pré-estabelecidas, e o gel resultante está apresentado na Figura 38.

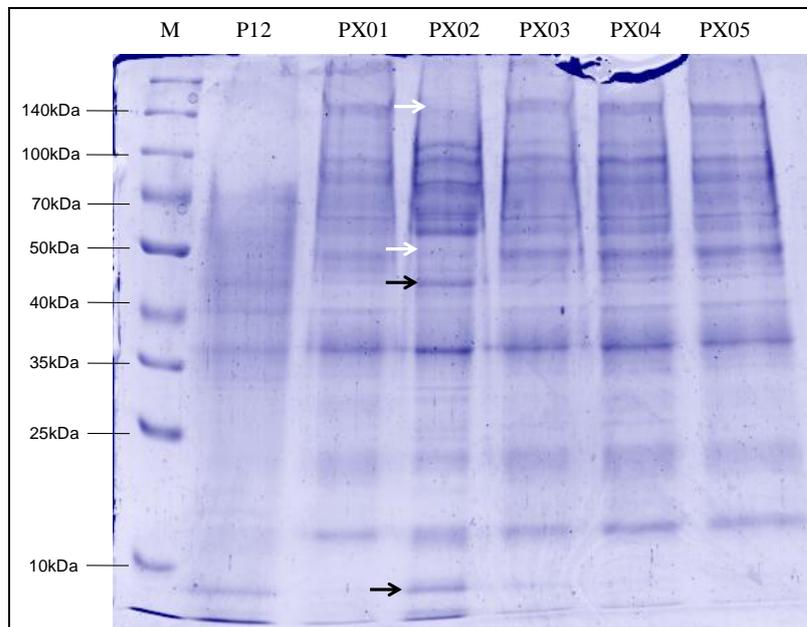


Figura 38. Perfil eletroforético em SDS-PAGE de proteínas secretadas pelas linhagens PX01- 5 e pela linhagem selvagem *P. microspora* (P12).

Como a amostra da linhagem selvagem (*P. microspora* /P12) se apresentou de forma inadequada para a análise, não foram considerados seus resultados neste gel para fins de comparação com o restante das amostras. Sendo assim, foram utilizadas para fim de comparação apenas as amostras das linhagens PX.

De forma geral as amostras das linhagens PX se mostraram similares em seus perfis de proteínas extracelulares secretadas, com bandas proteicas mais representativas compreendidas entre 50 e 140kDa. Apesar disso, a amostra da linhagem PX02 foi a que apresentou um número maior de pontos de discordância de perfil em comparação as demais, com ausência de bandas com 140 e 50kDa, e presença de bandas intensas com aproximadamente 45kDa e abaixo de 10kDa.

Os resultados expressos no gel de SDS-PAGE indicam que as linhagens PX tiveram seu perfil de proteínas alterado por conta da exposição a luz UV. O procedimento promoveu uma intensidade maior de proteínas produzidas, com tamanho compreendido entre 50 e 140kDa.

Como já discutimos anteriormente, essa faixa de tamanho de proteína compreende aquelas relacionadas a metabolização dos substratos para fonte de carbono, que neste

caso são o amido e da dextrose, componentes do meio de cultura BDL. Esse aumento na produção de enzimas com esse objetivo pode indicar que o metabolismo dessas linhagens foi alterado, tornando-o mais acelerado quanto a metabolização dessas fontes de carbono.

Para uma melhor compreensão de como esse tipo de manipulação pode modificar os caminhos metabólicos percorridos para obtenção de substâncias do metabolismo secundário, é importante lembrar que essa produção está totalmente relacionada com a biodisponibilidade e a capacidade de metabolização desses substratos, além disso, cada organismo “trabalha” com o menor gasto de energia possível, utilizando apenas o “maquinário” necessário de acordo com o ambiente e de acordo com as suas possibilidades enzimáticas (DEWICK, 2004).

Dessa forma é provável que a alteração promovida pela modificação genética tenha resultado numa maior produção de enzimas do metabolismo da glicose, fazendo com que esse processo fosse mais rápido e reduzindo o tempo de chegada a fase estacionária pelas linhagens PX. Assim é possível que o perfil químico observado na figura 38, seja na verdade o perfil do catabolismo que essas linhagens atingiram com o tempo de cultivo de 25 dias.

Para fim de confirmação desse ponto, faz-se necessário o estudo do perfil dessas linhagens ao longo do tempo, para observação das diferentes etapas metabólicas dessas linhagens.

A linhagem PX02 foi a linhagem modificada que apresentou o perfil químico mais diferente. Da mesma forma foi a linhagem que apresentou o maior número de bandas proteicas distintas. Mesmo não sendo possível afirmar quais são as proteínas ausentes e presentes no perfil de bandas da linhagem PX02 (apontadas na figura 39), foi possível indicar o tamanho dessas proteínas, apontando-as como possíveis alvos para trabalhos de isolamento e identificação de proteínas relacionadas a essas modificações no perfil químico.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho avançamos no conhecimento do gênero *Pestalotiopsis*, utilizando diferentes abordagens para analisar sua diversidade, verificando como essa diversidade pode ser sistematizada de forma a ser utilizada na seleção de linhagens para biotecnologia.

A micromorfologia foi útil para diferenciação em nível de gênero, e para prévia diferenciação de espécies como *P. mangiferae*. Além disso, a análise estatística revelou que é necessário definir níveis de relevância para os itens micromorfológicos avaliados, tendo em vista que microestruturas utilizadas em trabalhos de taxonomia mostraram pouca ou nenhuma eficiência na diferenciação.

A identificação molecular revelou oito espécies de *Pestalotiopsis* e duas de *Neopestalotiopsis*. Entre as *Pestalotiopsis* foi possível agrupar com certa eficiência as espécies mais numerosas como *P. mangiferae*, *P. microspora* e *P. clavispora*. A análise por AFLP demonstrou relativa eficiência principalmente na diferenciação de *P. clavispora*, contudo demonstrou a necessidade do aperfeiçoamento na técnica.

A análise por MS mostrou eficiência para fins taxonômicos, na separação em nível de espécie, como observado, por exemplo, entre *P. mangiferae* e *P. clavispora*. Foi possível apontar os íons moleculares como prováveis marcadores para as espécies mais representativas. Além disso, a técnica indicou a presença de substâncias de interesse farmacológico demonstrando a versatilidade do método utilizado.

Os testes biológicos demonstraram que os extratos de nove linhagens possuem atividade anticandida, contudo, o valor da CMI indica que os compostos bioativos estão presentes em pequenas concentrações. Os extratos também apresentaram baixa atividade frente às células tumorais.

A análise do perfil de *P. microspora* (P12/ AnspCg1.1.3a) revelou o metabolismo lento da linhagem, provavelmente em função das substâncias produzidas. Através da técnica escolhida foi possível definir as fases de crescimento de *P. microspora* (P12/ AnspCg1.1.3a), estabelecendo o período adequado para o isolamento das substâncias.

Foi possível identificar o ácido 3-fenilpropanóico substância que possui papel ecológico na proteção da planta hospedeira contra patógenos, demonstrando a importância ecológica da linhagem *P. microspora* (P12/ AnspCg1.1.3a) para o seu hospedeiro *Rollinia* sp. Não foi possível a identificação das moléculas responsáveis pela atividade anticandida.

O perfil de proteínas confirmou os resultados de perfil químico e indicou o melhor tempo de cultivo para o estudo das proteínas do metabolismo. O perfil de proteínas das diferentes espécies revelou um padrão de bandas constante das proteínas relacionadas ao metabolismo da glicose, provavelmente em função do meio de cultura utilizado.

O método utilizado na obtenção de linhagens mutantes se mostrou eficiente, contudo as alterações genéticas originadas não revelaram aumento das potencialidades biotecnológicas em comparação à linhagem parietal.

7. REFERÊNCIAS

- ABE I.; YANG, X.; AWAKAWA, T.; WAKIMOTO, T. Induced production of novel prenyldepside and coumarins in endophytic fungi *Pestalotiopsis acaciae*. **Tetrahedron Letters**. 54: 5814-5817. 2013.
- AHLHOLM, M. J. U.; HELANDER, M.; LEHTIMAKI, S.; WALI P.; SAIKKONEN, K. Vertically transmitted fungal endophytes: different responses of host-parasite systems to environmental conditions. **Oikos**. v. 99: 173-183. 2002.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**. v. 170(2): 211-224. 1994.
- AKHTAR, A.; FUCHS, E.; MITCHISON, T.; SHAW, R.J.; ST.JOHNSTON, D.; STRASSER, A.; TAYLOR, S.; WALCZAR, C.; ZERIAL, M. A decade of molecular cell biology achievements and challenges. **Nature**. 12: 669-674. 2011.
- AL-HATMI, A.M.S.; MIRABOLFATHY, M.; HAGE, F.; NORMAND, A.; STIELOW, J.B.; KARAMI-OSBO, R.; VAN DIEPENINGEN, A.D.; MEIS, J.F.; HOOG, G.S. DNA barcoding, MALDI-TOF, and AFLP data support *Fusarium ficicrescens* as a distinct species within the *Fusarium fujikuroi* species complex. **Fungal Biology**. 120(2): 265-278. 2016.
- ALMEIDA, M.F.O.; MELO, A.C.R.; PINHEIRO, M.L.B.; SILVA, J.R.A.; SOUZA, A.D.L.; CAMPOS, A.B.F.R.; MACHADO, G.M.C.; LEON, L.P.L. Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (LECYTHIDACEAE). *Química nova*. v. 34(7):1182-1187. 2011.
- ALMEIDA, M. F. O. Estudos químicos e biológicos de fungos endofíticos de *Gustavia* sp. Tese de Doutorado. Departamento de química. Universidade Federal do Amazonas. 2014.
- ALVES, M.S.M.; MENDES, P.C.; VIEIRA, J.G.P.; OZELA, E.F.; BARBOSA, W.L.R.; JÚNIOR, J.O.C.S. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb.& Bonpl) B. Verlt., Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 20(2): 215-221. 2010.
- ALY, A.H.; RONSBERG, D.; DEBBAB, A.; MÁNDI, A.; WRAY, V.; DAI, H.; KURTÁN, T.; PROKSCH, P. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula* isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*. **Tetrahedron Letters**. 54: 3256-3259. 2013.
- ANDERSON, I.C.; CAIRNEY, J.W. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**. 6(8): 769-779. 2004.

- AZEVEDO, J.L. **Genética de microrganismos**. Editora UFG, 2ª Edição . 1998.
- AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, suplement. 2, v. 22, p. 225-229, 1999.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. **Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects**. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. Fungi: multifaceted microbes. p. 189-207. 2007.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W. Jr.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganism: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**. v.3, n.1, 2000.
- BALASUNDARAM, S.V.; ENGH, I.B.; SKREDE, E.I.; KAUSERUD, H. How many DNA markers are needed to reveal cryptic fungal species? **Fungal Biology**. 119:940-945. 2015.
- BANHOS, E.F., SOUZA, A.Q.L., ANDRADE, J.C., SOUZA, A.D.L., KOOLEN, H.H.F., AND ALBUQUERQUE, P.M. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: Distribution and bioactivity. **Brazilian Journal of Microbiology**. 45(1): 153-161. 2014.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, v. 2. Imprensa Universitária: Viçosa, 377 p. 1984.
- BARROSO, G. M. **Sistamática de Angiosperma do Brasil**. LTC-Livros Técnicos e Científicos Ed S.A./Ed da Universidade de São Paulo, São Paulo. v.1: 28-33. 1978.
- BASHYAL, B. P.; WIJERATNE, E. M. K.; FAETH, S. H.; GUNATILAKA, A. A. L. Globosumones A-C, Cytotoxic Orsellinic Acid Esters from the Sonoran Desert Endophytic Fungus *Chaetomium globosum*. **Journal of Natural Products**, v. 68: 724-728. 2005.
- BOICHENKO, L. V.; BOICHENKO, D. M.; VINOKUROVA, N. G.; RESHETILOVA, T. A.; ARINBASAROV, M. U. Screening for Ergot Alkaloid Producers among Microscopic Fungi by Means of the Polymerase Chain Reaction. **Microbiology**. 70 (3): 306-310. 2001.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial**. Editora Blucher, vol. 1, 254p, 2001.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72: 248-254. 1976.
- BRAKHAGE, A. A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**. v. 48:15-22. 2011.

- CAMEJO, L.A.R.; MONTERO, A.Z.; ESCUDERO, M.L.; KENDAL, V.H.; BAYMAN, P. Phylogeography of the cosmopolitan fungus *Aspergillus flavus*: is everting everywhere? **Fungal Biology**. v. 116(3): 452-463.
- CARDOSO, J. E; MAIA, C. B.; PESSOA, M. N. G. Ocorrência de *Pestalotiopsis psidii* e *Lasiodiplodia theobromae* causando podridão no caule da goiabeira no Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27. 2002.
- CHE, Y.; DING, G.; ZHENG, Z.; LIU, S.; ZHANG, H.; GUO, L. Photinides A-F, Cytotoxic Benzofuranone-Derived γ - Lactones from the Plant endophytic Fungus *Pestalotiopsis photiniae*. **Journal Natural Products**. 72: 942-945. 2009a.
- CHE, Y.; LI, E.; JIANG, L.; GUO, L.; ZHANG, H. Pestalachlorides A-C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. 16: 7894-7899. 2008.
- CHE, Y.; LIU, L.; LIU, S.; CHEN, X.; GUO, L. Pestaloficiols A-E, bioactive cyclopropane derivates from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 16: 6021-6026. 2008.
- CHE, Y.; LIU, L.; LI, Y.; LIU, S.; ZHENG, Z.; CHEN, X.; ZHANG, H.; GUO, L. Chloropestolide A, an Antitumor Metabolite with an Unprecedented Spiroketal Skeleton from *Pestalotiopsis fici*. **Organic Letters**. 11(13): 2836-2839. 2009c.
- CHE, Y.; LIU, L.; LIU, S.; CHEN, X.; GUO, L. Pestalofones A-E, bioactive cyclohexanone derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 17: 606-613. 2009b.
- CHE, Y.; DING, G.; JIANG, L.; GUO, L.; CHEN, X.; ZHANG, H. Pestalazines and Pestalamides, Bioactive Metabolites from the Plant Pathogenic Fungus *Pestalotiopsis theae*. **Journal of Natural Products**. 71: 1861-1865. 2008a.
- CHE, Y.; LI, J.; LI, L.; SI, Y.; JIANG, X.; GUO, L. Virgatolides A-C, Benzannulated Spiroketals from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis virgatula*. **Organic Letters**. 13(10): 2670-2673. 2011.
- CHE, Y.; DING, G.; LIU, S.; GUO, L.; ZHOU, Y. Antifungal Metabolites from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis foedan*. **Journal of Natural Products**. 71: 615-618. 2008b.
- CLAY, K.; MARKS, S.; CHEPLICK, G. P. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. **Ecology**. v. 74 (6): 1767-1777. 1993.
- COS, P.; VLIETINCK, A. J ; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology** 106: 290-302. 2006.

- CRESTE, C.; NETO, T.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequence gels by silver staining. **Plant Molecular Biology**. 19: 219-306. 2001.
- CRUZ, F. G.; CERQUEIRA, M. D.; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. O.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L. S. Seasonal Variation and Antimicrobial Activity of *Myrcia myrtifolia* Essential Oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18(5): 998-1003. 2007.
- DEBBAB, A.; ALY A. H.; EDRADA-EBEL, R.; WRAY, V.; MULLER, W. E. G.; TOTZKE, F.; ZIRRGIEBEL, U.; SCHACHTELE, C.; KUBBUTAT, M. H. G.; LIN, W. H.; MOSADDAK, M.; HAKIKI, A.; PROKSCH, P.; EBEL, R. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum* isolated from *Mentha pulegium*. **Journal of Natural Products**. v.72 (4): 626-631. 2009.
- DEWICK, P.M. Medical Natural Products. New York, USA, John Wiley & Sons, II Ed. 466 p. 2004.
- DING, G.; LIU, S.; GUO, L.; ZHOU, Y.; CHE, Y. Antifungal Metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis foedan*. **Journal of Natural Products**, v. 71(4): 615-618, 2008.
- DING G.; QI Y.; LIU S.; GUO L.; CHEN X. Photopyrones A and B, new pyrone derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis photinia*. **Journal of Antibiotics**. 65: 271-273. 2012.
- EBEL, R.; ALY, A. H.; EDRADA-EBEL, R.; WRAY, V.; MULLER, W. E. G.; KOZYTSKA, S.; HENTSCHEL, U.; PROKSCH, P. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces sp.* isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. **Phytochemistry**. v. 69: 1716-1725. 2008.
- EL-ENSHASY, H.A. **Filamentous fungal cultures** – Process characteristics, products, and applications. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. Chapter 9. p. 225-261. 2007.
- EGGER, K.N. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. **Canadian Journal of Botany** 73:1415–1422. 1995.
- EKER, A.P.M.; QUAYLE C.; CHAVES, I.; VAN DER HORST, G.T. Direct DNA damage reversal elegant solution for nasty problems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66: 968-980. 2009.
- FEARNSIDE, P. M. **A Floresta Amazônica nas mudanças Globais – Manaus**. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). 134 p, 2003.
- FERREIRA, E.M.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3a ed. Brasília. Embrapa-Cenargen. 220 p. 1998.

- FIRÁKOVÁ, S.; ŠTURDÍKOVÁ, M.; MÚČKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia, Bratislava*. v. 62 (3) : 251-257. 2007.
- FRANCISCO, W.A.; MEDINA, M.L.; HAYNES, P.A.; BRECI, L. Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Proteomics*. v. 5: 3153-3161. 2005.
- FRANCISCO, W. A.; MEDINA, M.L.; KIERNAN, U.A. Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Fungal Genetics and Biology*. v. 41: 327-335. 2004.
- FRISVAD, J.C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological research* 112: 231-240. 2008.
- GLOER, J.B.; DEYRUP, S.T.; SWENSON, D.C.; WICKLOW, D.T. Caryophyllene Sesquiterpenoids from a Fungicolous Isolate of *Pestalotiopsis disseminata*. *Journal of Natural Products*. 69: 608-611.2006.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ L. A. PETROVICK P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora UFSC, 6^a Edição, cap. 1, p. 13-28, 1999.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural Products from plant-associated microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of their occurrence. *Journal of Natural Products*. v. 69(3) :509-526. 2006.
- HALLMANN, J., SIKORA, R. A. Toxicity of Fungal Endophyte Secondary Metabolites to Plant Parasitic Nematodes and soil-Borne Plant Pathogenic Fungi. *European Journal of Plant Pathology*. v. 102: 155-162. 1996.
- HANADA, R. E; POMELLA, A. W. V.; COSTA, H. S.; BEZERRA, J. L.; PEREIRA, J. O. Endophytic funga diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of Black-pod disease. *Fungal Biology*. v. 30: 1-10. 2010.
- HAO, D.; GU, X.J.; XIAO, P.G. Chemotaxonomy: a phylogeny-based approach. *Medicinal Plants*. 1-48. 2015.
- HILLIS, D.H.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: Molecular evolution and Phylogenetic Inference. *The quarterly Review of Biology*. v.66 (4): 411-453.1991.
- HOPKINS, K. L.; McQUILKEN, M. P. Characteristics of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK. *European Journal of Plant Pathology*. v. 106: 77-85. 2000.
- HOUBRAKEN, J.; DUE, M.; VARGA, J.; MEIJER, M.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Usti*. *Studies in Mycology*. 59: 107-128. 2007.

- HU, H.L.; JEEWON, R.; ZHOU, D.Q.; ZHOU, T.X.; HYDE, K.D. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and β -tubulin gene phylogenies. **Fungal Diversity**. 24:1–22. 2007.
- HYDE, K.D.; HU, H.; JEEWON, R.; ZHOU, D.; ZHOU, T. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and β -tubulin gene phylogenies. **Fungal Diversity**. 24:1-22. 2007.
- HYDE, K.D.; MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N.; GUO, L.D. CHUKEATIROTE, E. *Pestalotiopsis* – morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal Diversity**. 50: 167-187. 2011.
- HUANG, J.; ZHENG, Y.; CHEN, D.; LI, J. New Sesquiterpenoide from *Pestalotiopsis* sp. **Chinese Journal of Natural Medicines**. 9(6): 421-424. 2011.
- ISLA, M. I.; D'ALMEIDA R.E; ALBERTO, M.R.; QUISPE, C.; SCHMED-HIRSCHMANN, G. Antimicrobial phenylpropanoids from the Argentinean highland plant *Parastrephia lucida* (Meyen) Cabrera. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 142: 407-414. 2012.
- IWASHITA, K.; ODA, K.; KAKIZONO, D.; YAMADA, O.; IEFUJI, H.; AKITA, O. Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from *Aspergillus oryzae* Grown under submerged and Solid-State Culture Conditions. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72(5): 3448-3457.
- JEEWON, R.; LIU, A.; CHEN, S.C.; WU, S.Y.; XU, T.; GUO, L.D.; WEI, J.G. Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 57: 528-535. 2010.
- JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; HYDE, K. D. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. **Molecular Phylogenetic Evolution**. 25: 378–392, 2002.
- JEEWON, R.; LIEW, E.C.Y.; SIMPSON, J.A.; HODGKISS, I.J.; HYDE, K.D. Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. **Molecular Phylogenetic Evolution**. 27: 372–383. 2003.
- JEWETT, M.C.; HOFMAN, G.; NIELSEN, J. Fungal metabolite analysis in genomics and phenomics. **Current Opinion in Biotechnology**. 17: 191-197. 2006.
- JONES, D.L. **Palms: throughout the world**. Washington: Smithsonian Institution. 410p. 1995.
- KAHN, F. **Les palmiers de l'eldorado**. Paris: Éditions de l'Oprstom. 252p. 1997.
- KALIL FILHO, A. N.; KALIL, G. P. C.; & LUZ, A. I. R. **Conservação de germoplasma de plantas aromáticas e medicinais da amazônia brasileira para uso humano**. Embrapa Florestas. Comunicado Técnico 4. 50 p. 2000.

- KANG, D.; SON, G.H.; PARK, H.M.; KIM, J.; CHOI, J.N.; KIM, H.Y.; LEE, S.; HONG, S.B.; LEE, C.H. Culture condition-dependent metabolite profiling of *Aspergillus fumigatus* with antifungal activity. **Fungal Biology**. 117:211-219. 2013.
- KAPLAN, A.; RONEN-TARAZI, M.; ZER H.; SCHWARZ R.; TCHERNOV D.; BONFIL, D.J. The inorganic carbon-concentrating mechanism in cyanobacteria: induction and ecological significance. **Canadian Journal of Botany**. v. 76: 917-924. 1989.
- KATHIRAVAN, G.; RAMAN, V. S. In vitro TAXOL production, by *Pestalotiopsis breviseta* – A first report. **Fitoterapia**. 81: 557-564. 2010.
- KESTING, J.R.; STAERK, D.; TEJESVI, M.V.; KINI, K.R.; PRAKASH, H.S. JAROSZEWSKI, J.W. HPLC-SPE-NMR Identification of a Novel Metabolite Containing the Benzo[c]oxepin Skeleton from the Endophytic Fungus *Pestalotiopsis virgatula* Culture. **Planta Medica**. 75: 1104-1106. 2009.
- KIM, S.; SHIN, D.; LEE, T.; BONG, O. K. Periconicins, two new fusicoccane diterpenes produced by an endophytic fungus *Periconia sp.* with Antibacterial activity. **Journal of Natural Products**. V. 67(3): 448-450. 2004.
- KIM, H.J.; KUMARAN, R.S.; HUR, B. Taxol promising fungal endophyte, *Pestalotiopsis* species isolated from *Taxus cuspidata*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 110(5): 541-546. 2010.
- KIM, H.Y.; PARK, H.M.; LEE, C.H. Mass spectrometry-based chemotaxonomic classification of *Penicillium* species (*P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. solitum*, and *P. oxalicum*) and its correlation with antioxidant activity. **Journal of Microbiological Methods**. 90:327-335. 2012.
- KOSHINO, H.; PULICI, M.; SUGAWARA, F.; UZAWA, J.; YOSHIDA, S.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Pestalotiopsins A and B: New Caryophyllenes from an Endophytic Fungus of *Taxus brevifolia*. **Journal of Organic Chemistry**. 61: 2122-2124. 1996.
- KUBICEK, C.P. **Fungal Molecular Biology**. Biological Resource Management. Connecting Science and Policy. Springer Berlin Heidelberg. Part. IV: 219-228. 2000.
- KUMARAN, R.S.; KIM, H.J.; HUR, B.K. Taxol-producing fungal endophyte, *Pestalotiopsis* species isolated from *Taxus cuspidata*. **Journal Bioscience Bioeng.** 110(5): 541-546. 2010.
- KURE, C.F.; SKAAR, I.; HOLST-JENSEN, A.; ABELN, E.C.A. The use of AFLP to relate cheese-contaminating *Penicillium* strains to specific points in the production plants. **International Journal of Food Microbiology**. 83: 195-204. 2003.
- LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of proteins structures. **Journal Applied Crystallography**. 26: 283-291. 1993.

- LAI, D.; AKONE, S.H.; EL AMRANI, M.; LIN, W.; PROKSCH, P. Cytosporins F-D, new epoxyquinols from the endophytic fungus *Pestalotiopsis theae*. **Tetrahedron Letters**. 54: 6751-6754. 2013.
- LAU, C. S.; KUMAR, D. S. S.; WAN, J. M. F. YANG, D.; HYDE, K. D. Immunomodulatory compounds from *Pestalotiopsis leucothes*, an endophytic fungus from *Tripterygium wilfordii*. **Life Science**. 78: 147-156. 2005.
- LEBOUEF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKERJEE, B. MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry** 21: 2783-2813. 1982.
- LEE, J. C.; STROBEL, G. A.; LOBKOSKY, E.; CLARDY, J. C. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. **Journal of Organic Chemistry**. v. 61: 3232-3233. 1996.
- LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. M. Óleos voláteis de espécies de Myrcia nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**. v. 27. p. 6. 2004.
- LI, J. Y.; HARPER, J. K.; GRANT, D. M.; TOMBE, B. O.; BASHYAL, B.; HESS, W. M.; STROBEL, G. A. Ambuic Acid, a Highly Functionalized Cyclohexenone with Antifungal Activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. **Phytochemistry**, v. 56(5): 463-468. 2001.
- LI, X.H.; JAYAWARDENA, R.S.; ZHANG, W.; LIU, M.; MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N.; ZHOU, Y.; HUANG, J.; NILTHONG, S.; WANG, Z.Y.; HYDE, K.D.; YAN, J.Y. Identification and characterization of Pestalotiopsis-like fungi related to grapevine diseases in China. **Fungal Biology**. 119(5): 348-361. 2015.
- LI, X.; LIU, Y.; CAI, K.; CAI, L.; LU, N.; SHI, J. Identification of benzoic acid and 3-phenylpropanoic acid in tobacco root exudates and their role in the growth of rhizosphere microorganisms. **Applied Soil Ecology**. v. 93: 78-87. 2015.
- LIU, L.; LIU, C.; YE, X.; GUO, L. Cytotoxic Isoprenylated Epoxycyclohexanediols from the Plant Endophyte *Pestalotiopsis fici*. **Chinese Journal of Natural Medicines**. 9(5): 374-379. 2011.
- LIU, A.R.; CHEN, S.C.; WU, S.Y.; XU, T.; GUO, L.D.; JEEWON, R.; WEI, J.G. Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. **Molecular Phylogenetic Evolution**. 57: 528-535. 2010.
- LIU, L.; LIU, S.; GUO, L.; CHE, Y. Pestaloficiols Q-S from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. **Fitoterapia**. 85: 114-118. 2013.
- LIU, Y.; ZHOU, X.; LIN, X.; MA, W.; FANG, W.; CHEN, Z.; YANG, B. A new aromatic amine from fungus *Pestalotiopsis vaccinii*. **Phytochemistry letters**. 7: 35-37. 2014.

- LOGUERCIO-LEITE, C. **Taxonomia dos fungos**. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educ. cap. 2, p. 47-88. 2004.
- LONG, D.M.; SMIDANSKY, E.D.; ARCHER, A.J.; STROBEL, G.A. In vivo addition of telomeric repeats to foreign DNA generates extrachromosomal DNAs in the taxol-producing fungus *Pestalotopsis microsprora*. **Fungal Genetic Biology**. 24(3): 335-344. 1998.
- LOPES, M. B.; RAINIERI, S.; HENSCHKE, P. A.; LANGRIDGE, P. AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. **Internationa Journal of Systematic Bacteriology**. 49: 915-924. 1999.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras I**, Instituto Plantarum de Estudos da Flora. LTDA: Nova Odessa, 1988.
- LOU, D.; XING, J.; DENG, H. Two new compounds from na endophytic fungus *Pestalotiopsis heterocornis*. **Journal of Asian Natural Products Research**. 13(12): 1069-1073. 2011.
- MAGNANI, R.F, RODRIGUES-FILHO, E.; DAOLIO, C.; FERREIRA, A.G.; SOUZA, A.Q.L. Three Highly Oxygenated Caryophyllene Sesquiterpenes from *Pestalotiospsis* sp., a Fungus Isolated from Bark of *Pinus taeda*. **Zeitschrift für Naturforschung.C, A Journal of Biosciences**. 58: 319-324. 2003.
- MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.; HYDE, K.D.; GROENEWALD, J.Z.; XU, J.; CROUS, P.W. *Pestalotiopsis* revisited. **Studies in Mycology**. 79:121-186.
- MAJER, D.; MITHEN, R.; LEWIS, B.G.; VOS, P.; OLIVER, R. P. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. **Mycological Research**. v.100(9): 1007-1111. 1996.
- McINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v. 173(2): 337-342. 1995.
- MENEZES, J.C.; ALVES, T.P.; CARDOSO, J.P. **Biotechnologia Microbiana: A produção de Penicilina**. In: LIMA, N.; MOTA, M. Biotechnologia: Fundamentos e Aplicações. DIFEL: 2000. cap. 12, 15 p.
- MORI, S. A.; PRANCE, G. T. Relações entre a classificação genética de Lecythidaceae do Novo Mundo e seus polinizadores e dispersadores. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 4: 31-37. 1981.
- MONTE, E.; SUÁREZ, M.B.; SANZ, L.; CHAMORRO, M.I.; REY, M.; GONZÁLEZ, F.J.; LLOBELL, A. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum* Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. **Fungal Genetics and Biology**. v. 42: 924-934. 2005.
- MUELLER, U G.; WOLFENBARGER, L.L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in ecology & evolution**, 14(10): 389-394. 1999.

- MUNDT, J. O.; HINKLE, N. F. Bacteria within ovules and seeds. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 32: 694-69. 1976.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards; **Methods for dilution and antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**, NCCLS Approved Standard M7-A4. Wayne, P. A. 1997.
- NOSTRO, A.; GERMANÒ, M.P.; D'ANGELO V.; MARINO, A.; CANNATELLI, M.A. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. **Letter in Applied Microbiology**. v. 30: 379-384. 2000.
- ORTEGA, H.E.; SHEN, Y. Y.; TENDYKE, K.; RIOS, N.; CUBILLA-RÍOS, L. Polyhydroxylated macrolide isolated from the endophytic fungus *Pestalotiopsis mangiferae*. **Tetrahedron Letters**. 55: 2642-2645. 2014.
- OLIVEIRA, J.G.S. **Estudo da Biodiversidade de Fungos endofíticos, potencial citotóxico e antimicrobiano de *Duguetia flagellaris* Huber**. Trabalho de Dissertação. Mestrado em Biotecnologia. Universidade do Estado do Amazonas. 2013.
- PASTORE, G.L.; MACEDO, G. A. **Utilização dos fungos na indústria de alimentos**. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: Educs, 2004. cap. 10, p. 311-334.
- PATERSON, R. R. M. "Standardized one- and two-dimensional thin-layer chromatographic methods for the identification of secondary metabolites in *Penicillium* and other fungi". **Journal of Chromatography**. 368: 249, 1986.
- PEREIRA, Jr. N.; SILVA BOM E.P.; FERRARA M.A. **Séries em Biotecnologia – Tecnologia de Bioprocessos**. Vol II. 2008.
- PETRINI, O. **Fungal endophyte of tree leaves**. In: ANDREWS J.; HIRANO S. S. Microbial Ecology, p. 179-197, New York, 1991.
- PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, R.S. Produtos Naturais: Atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, sup. 1 especial, p. 45-51, jul. 2002.
- PIRONDI, A.; VELA-CORCÍA, D.; DONDINI, L.; BRUNELLI, A.; PÉREZ-GARCIA, A.; COLLINA, M. Genetic diversity analysis of the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera xanthii* suggests a clonal population structure. **Fungal Biology**. 119(9): 791-801. 2015.
- POTT, V.J.; POTT, A. **Aquatics plants of Pantanal**. Embrapa, Brasília. 404p. 2000.
- PRANCE, G.T. *Victoria amazonica* or *Victoria regia*? **Acta Amazonica**. v. 4: 5-8. 1974.

- PRAKASH H.S.; TEJESVI M.V.; KINI K.R.; VEM SUBBIAH H.S.; SHETTY H.S. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. **Fungal Diversity** 24: 37-54. 2007.
- PROKSCH, P.; HEMPHILL, C.F.P.; DALETOS, G.; LIU, Z.; LIN, W. Polyketides from the Mangrove-derived fungal endophyte *Pestalotiopsis clavispora*. **Tetrahedron Letters** 57(19): 2078-2083. 2016.
- PROKSCH P.; XU J.; KJER J.; SENDKER J.; WRAY V.; GUAN H.; EDRADA R.; MULLER W.E.G.; BAYER M.; LIN W.; WU J. Cytosporones, coumarins, and an alkaloid from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. Isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. 17: 7362-7367. 2009.
- PROKSCH P.; XU J.; AMAL H.A.; WRAY V. Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. Isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. **Tetrahedron Letters**. 52: 21-25. 2011.
- RIBEIRO, J.E.L. DA S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M. A. DA S.; BRITO, J.M. DE; SOUZA M.A.D. DE; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PERREIRA, E. DA C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. (1999). **Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus/AM, INPA, 816p.**
- ROCHA, C.M.L.; VELLICCE, G.R.; GARCÍA, M.G.; PARDO, E.M.; ROCEDO, J.; PEREIRA, M.F.; LUCIA, A.; GILLI, J.; BOGADO, N.; BONNECARRÈRE, V.; GERMAN, S.; MARCELINO, F.; LEDESMA, F.; REZNIKOV, S.; PLOPER, L.D.; WELIN, B.; CASTAGNARO, A.P. Use of AFLP markers to estimate molecular diversity of *Phakospora pachyrhizi*. **Electronic Journal of Biotechnology**. 18: 439-444. 2015.
- RODRIGUES-FILHO E.; PASTRE R.; MARINHO A.M.R.; SOUZA A.Q.L.; PEREIRA J.O. Diversidade de Policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. **Química Nova**. 30(8): 1867-1871. 2007.
- SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S.H. Evolution of endophyte- plant symbioses. **Trends in Plant Science**. 9(6): 275-280. 2004.
- SAMETZ-BARON.; BERROCAL, G.M.; AMIT, R.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B.A. Photoreactivation of UV-inactivated spores of *Trichoderma harzianum*. **Photochemistry and Photobiology**. v. 65(5), p. 849-854. 1997.
- SÁNCHEZ-MALDONADO, A.F.; SCHIEBER, A.; GÄNZLE, M.G. Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. 111:1176-1184. 2011.
- SCHULTES, R. E.; RAFFAUF, R. F. **The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of Northwest Amazonia**, Dioscorides Press. Portland. 57-58 p. 1990.

- SCHLÖTTERER, C.; HAUSER, M.T.; VON HAESELER, A.; TAUTZ, D. Comparative Evolutionary analysis of rDNA ITS Region in *Drosophila*. **Molecular Biology and Evolution**. 11(3): 513-522. 1994.
- SHAGGER H.; JAGOW G. V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDA. **Analytical Biochemistry**. 166: 368-379.1987.
- SHELDRIK, G. M.; SCHNEIDER, T. R. SHELXL: High resolution refinement. **Methods in Enzymology**. 277: 319-343. 1997.
- SHU, C. **Fungal Fermentation for Medical Products**. In YANG S. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. Chapter 17. Ed. Elsevier. 447p. 2007.
- SILVA, R. R.; COELHO, G. D. **Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas**. Instituto de Botânica. Jardim Botânico de São Paulo. São Paulo 2006.
- SILVA, D. B.; MATOS, M. F. C.; NAKASHITA, S. T.; MISU, C. K.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; FABRI, J. R.; MIGLIO, H. S.; SIQUEIRA, J. M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. **Química Nova**. 30 (8): 1809-1812. 2007.
- SIQUEIRA, J. M.; ZIMINIANI, M. G.; RESENDE, U. M.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscuka* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**. 24: 185-187. 2001.
- SILVÉRIO, M. B. **Análise econômica da biodiversidade na Amazônia brasileira**. Monografia (Bacharelado em Economia) – Departamento de Economia, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.
- SMEDSGAARD, J.; FRISVAD, J.C. Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts. **Journal of Microbiological Methods**. 25: 5-17. 1996.
- SOUZA, A.D.L.; RODRIGUES-FILHO, E.; SOUZA, A.Q.L.; PEREIRA, J.O.; CALGAROTTO, A.K.; MASO, V.; MARANGONI, S.; DA SILVA, S.L. Koninginins, phospholipase A2 inhibitors from endophytic fungus *Trichoderma koningii*. **Toxicon**. 51: 240-250. 2008.
- SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; FILHO, A. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**. 34(2): 185-195. 2004.
- SOUZA, V.C; LORENZI, H.. **Sistematic botany** (Illustrated guide for identification of families of angiosperms of the Brazilian flora, based on APG II). Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, São Paulo. 640 p. 2005.

- SPITELLER, M.; KUSARI, S.; HERTWECK, C. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry and Biology**. 19(17): 792-798. 2012.
- STADLER, M.; KELLER, N. Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. **Mycological research**. 112: 127-130. 2008.
- STRACK, D.; WRAY, V.; METZGER, J.W.; GROSSE, W. Two anthocyanins acylated with gallic acid from the leaves of *Victoria amazonica*. **Phytochemistry**. 31(3): 989-991. 1992.
- STROBEL, G. A.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R. S.; HESS, W. M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology**, 142: 435–440 1996.
- STROBEL, G.A.; LI, J. Y. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. **Phytochemistry**. 57: 261-265. 2001.
- STROBEL, G.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J.K.; ARIF, A.M.; GRANT, D.M.; FUNG, P.C.W.; CHAU, R.M.W. Isopestacin, na isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**. 60: 179-183. 2002.
- STEYAERT, R.L. Contributions à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et Monochaetia Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.). **Bulletin du Jardin Botanique de Bruxelles**. 19:285–354. 1949.
- SUGAWARA, F.; PULICI, M.; KOSHINO, H.; OKADA, G.; ESUMI, Y.; UZAWA, J.; YOSHIDA, S. Metabolites of *Pestalotiopsis* spp., endophytic fungi of *Taxus brevifolia*. **Phytochemistry**. 46(2): 313-319. 1997.
- SUTTON, B. C. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. **Kew: Common wealth Mycological Institute**. 960p. 1980.
- SVERGUN, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophysical Journal**. 76(6): 2879-2886. 1999.
- SWOFFORD, D.L.; OLSEN, G.J. **Phylogeny reconstruction**. In HILLIS, D.M; MORITZ, C. Molecular Systematics. Sinauer Associates, Sunderland. 41:1-501. 1990.
- SZAKACS, G.; KOVÁCS, K.; MEGYERI, L.; KUBICEK, C.P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulose and β -glucosidase on pretreated willow. **Enzyme and Microbial Technology**. 43: 48-55. 2008.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versin 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. 30:2725-2729. 2013.

- TAN, R. X.; GE, H. M.; SHEN, Y.; ZHU, C. H.; TAN, S. H.; DING, H.; SONG, Y. C. Penicidones A-C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp. **Phytochemistry**. 69; 571-576, 2008.
- TAYLOR, D.E.; HOLLINGSWORTH, T.N.; MCFARLAND, J.W.; LENNON, N.J.; NUSBAUM, C.; RUESS, R.W. A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. **Ecological Monographs**. 84: 3-20. 2014.
- TAYLOR, T.N.; KRINGS, M. Basidiomycota. In TAYLOR, L. Fossil Fungi. 173-199p. 2015.
- TEJESVI, M.V.; TAMHANKAR, S.A.; KINI, K.R.; RAO, V.S.; PRAKASH, H.S. Phylogenetic analysis of endophytic *Pestalotiopsis* species from ethnopharmacologically important medicinal trees. **Fungal Diversity**. 38:167–183. 2009.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. 22:4673-4680. 1994.
- THRANE, U.; ADLER, A.; CLASEN, P.; GALVANO, F.; LANGSETH, W.; LEW, H.; LOGRIECO, A.; NIELSEN, K.F.; RITIENI, A. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. **International Journal of Food Microbiology**. 95: 257-266. 2004.
- VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data. **Studies in Mycology**. 59: 75-88. 2007.
- VENNILA, R.; MUTHUMARY J. Taxol from *Pestalotiopsis pauciseta* VM1, an endophytic fungus of *Tabebuia pentaphylla*. **Biomedicine & Preventive Nutrition**. 1: 103-108. 2011.
- VON HIPPEL, P. H.; SCHLEICH, T. Structure and Stability of Biological Macromolecules. 2: 417-574. New York. 1969.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VANDELEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP – a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**. 23: 4407 – 4414. 1995.
- VOS, P.; KUIPER, M. **AFLP analysis**. In CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews. Ed. Wiley. p.115-131. 1997.
- VILA-AIUB, M.; GUNDEL, P. E.; GHERSA, C. M. Fungal endophyte infection changes growth attributes in *Lolium multiflorum* Lam. **Australian Ecology**. 30: 49-57. 2005.
- WEBB, R. Lethal and Mutagenic Effect of Near-Ultraviolet Radiation. **Photochemical and Photobiological Reviews**. 2 : 169-261. 1977.

- WHITE, Jr., J. F.; BELANGER, F.; MEYER, W.; SULLIVAN, R. F.; BISCHOFF, J. F.; LEWIS, E. A. Clavicipitalean fungal epibionts and endophytes – development of symbiotic interaction with plants. **Symbiosis**. 33: 201-213. 2002.
- WHITE, Jr. J. F.; MARTIN, T. I.; CABRAL, D. Endophyte-host associations in grasses. XXII. Conidia formation by *Acremonium* endophytes on the phyllplanes of *Agrostis hiemalis* and *Poa rigidifolia*. **Mycologia**. 88(2): 174-178. 1996.
- WRAY, V.; XU, J.; ALY, A.H.; PROKSCH, P. Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. Isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. **Tetrahedron Letters**. 52: 21-25. 2011.
- YANG, X.L.; ZHANG, S.; SONG, S.J.; ZHANG, Y.; LUO, D.Q. A New Biphenil from the Fermentation Broth of Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis zonata* isolated from *Cytotachys lakka*. **Chinese Journal of Natural Medicines**. 9(2):0101-0104. 2011.
- YANG, X.; LUO, D.; ZHANG, J. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. **Natural Product Reports**. 29: 622-641. 2012.
- YANG, J.; JIANG, D.; ZHU, W.; WANG, Y.; SUN, C.; ZANG K. Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi. Recent advances and new strategies. **Biotechnology Advances**. 31: 1562-1574. 2013.
- ZAIN, M.E.; BAHKALI, A.H. AL-OTHMAN MONERAH, R.; KHALIL, A.M. Advantage of Using Secondary Metabolites in Fungal Chemotaxonomy. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**. 6(13): 95-113. 2012.
- ZORN, B.; GARCIA-PIÑERES, A. J.; CASTRO, V.; MURILLO, R.; MORA, G. MERFORT, I. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry**, 56(8): 831-835. 2001.

Protocol

For optimal performance, add beta-mercaptoethanol (user supplied) to the Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer to a final dilution of 0.5%(v/v) i.e., 500 µl per 100 ml.

¹This equates to approximately 2x10⁸ bacterial cells, 2x10⁷ yeast cells or 2x10⁶ mammalian cells.

² Cap tube tightly to prevent leakage.

1. Add 10-20 mg (wet weight) fungal or bacterial cells¹ that have been resuspended in up to 200 µl of water or isotonic buffer (e.g., PBS) or up to 40 mg of tissue to a ZR BashingBead™ Lysis Tube (0.1 & 0.5 mm). Add 750 µl Lysis Solution to the tube².

2. Secure in a bead beater fitted with a 2 ml tube holder assembly and process at maximum speed for ≥ 5 minutes.

Note: Required processing time will vary depending on the device and application and therefore should be evaluated on a case by case basis.

For example, processing times may be as little as 3 minutes when using high-speed cell disrupters (e.g., the portable TerraLyzer™ Sample Processor, FastPrep® -24, or similar) or as long as 20 minutes when using lower speeds (e.g., Disruptor Genie™, or standard benchtop vortexes). See manufacturer's literature for operating information.

3. Centrifuge the ZR BashingBead™ Lysis Tube in a microcentrifuge at 10,000 x g for 1 minute.

4. Transfer up to 400 µl supernatant to a Zymo-Spin™ IV Spin Filter (Orange Top) in a Collection Tube and centrifuge at 7,000 x g for 1 minute.

Note: Snap off the base of the Zymo-Spin™ IV Spin Filter (Orange Top) prior to use.

5. Add 1,200 µl of Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer to the filtrate in the Collection Tube from Step 4.

6. Transfer 800 µl of the mixture from Step 5 to a Zymo-Spin™ IC Column³ in a Collection Tube and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.

7. Discard the flow through from the Collection Tube and repeat Step 6.

8. Add 200 µl DNA Pre-Wash Buffer to the Zymo-Spin™ IC Column in a new Collection Tube and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.

9. Add 500 µl Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer to the Zymo-Spin™ IC Column and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute.

10. Transfer the Zymo-Spin™ IC Column to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube and add 20 µl (10 µl minimum) DNA Elution Buffer directly to the column matrix. Wait 2-3 minutes and then centrifuge at 10,000 x g for 30 seconds to elute the DNA.

Ultra-pure DNA is now ready for use in your experiments.

³The Zymo-Spin™ IC Column has a maximum capacity of 800 µl.

Anexo 2

Protocolo para precipitação de placa em sequenciador ABI

1. Volume do produto de reação de sequenciamento em cada poço da placa deve ser de 10 μL .
2. Adicionar 2,5 μL de EDTA mM em cada poço.
3. Adicionar 30 μL de álcool etílico absoluto em cada poço.
4. Vortexar a placa.
5. Deixar a placa em repouso por 15 minutos.
6. Centrifugar por 30 minutos a 2500 rcf a 4 °C
7. Após a centrifugação, descobrir a placa e inverter em papel toalha. Centrifugar a placa invertida por um minuto a 100 rcf.
8. Adicionar 30 μL de álcool etílico diluído a 70 % em cada poço.
9. Centrifugar por 15 minutos a 1650 rcf.
10. Após a centrifugação, descobrir a placa e inverter em papel toalha. Centrifugar a placa invertida por um minuto a 100 rcf.
11. Secar a placa ao abrigo da luz, por uma hora a temperatura ambiente ou 15 minutos em fluxo de ar.
12. Ressuspender as amostras em 10 μL de formamida HiDi vortexar levemente.

PROTOCOLO DA REAÇÃO DE AFLP

A digestão de restrição do DNA genômico

1. Adicione o seguinte para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml:

| Componentes | controle | amostras |
|---|----------|----------|
| Tampão da reação 5X | 5µL | 5µL |
| DNA controle de <i>E. coli</i> (100ng / ul) | 2.5µL | — |
| DNA amostra (250ng em ≤ 18 ul) | — | ≤ 18µL |
| <i>EcoR I/Mse I</i> | 2 µL | 2 µL |
| Água destilada | 15.5 µL | p/ 25 µL |
| Volume total | 25 µL | 25 µL |

2. Misture delicadamente a reação por centrifugação breve. Incubar a mistura 2h a 37°C.

3. Incubar a mistura durante 15 min a 70 °C para inactivar a restrição endonucleases. Coloque o tubo em gelo e misture conteúdos por centrifugação breve.

Obs.: Precisamos verificar a concentração de DNA em cada amostra? Nanodrop? E padronizar todos na mesma concentração de DNA/µL.

Ligação de Adapters

1. Adicione o seguinte para o DNA digerido a partir da etapa 3 da Seção anterior:

| Componentes | Volume |
|-------------------------------|--------|
| Solução de ligação do adapter | 24 µL |
| T4 DNA ligase | 1 µL |

2. Misturar suavemente à temperatura ambiente, centrifugar para recolher rapidamente o conteúdo, e incubar a 20°C± 2°C durante 2 h.

3. Realizar uma diluição de 1:10 da mistura de ligação como se segue:

a. Tomar 10µL da mistura de reação e transferir para tubo 1,5 ml.

b. Adicionar 90µL de tampão TE e misture bem.

4. A parte não utilizada da mistura de reação pode ser armazenado a -20 °C.

Obs.: Possível ponto de parada do processo.

Reações Pré-amplificação (opcional)

1. Adicione o seguinte para um tubo de microcentrífuga 0,2- ou 0,5 ml de paredes finas:

| Componentes | Volume |
|---|---------|
| DNA modelo diluído (do passo 3 da Seção anterior) | 5µL |
| primer E-0 | 2.7µL |
| primer M-0 | 12 µL |
| Tampão de PCR 10X plus Mg | 5 µL |
| Taq DNA polymerase (5 units/µl) | 1 µL |
| Água destilada | 25.3 µL |
| Volume total | 51 µL |

2. Misturar suavemente e centrifuga-se rapidamente para ocorrer a reacção. Envolver com 2 a 3 gotas de óleo de silicone, se necessário. Realizar 20 ciclos em:

94°C for 30 s

56°C for 60 s

72°C for 60 s

Mantendo temperatura final de 4°C.

3. Realize uma diluição de 1:50 da seguinte forma: a transferência de 3 µL para tubo de 1,5 ml contendo 147 µL de tampão TE. Isto é suficiente para 30 amplificações de AFLP selectiva. Se necessário, as novas diluições podem ser feitas de a Pre-amplification reacções para dar padrão adicional para as amplificações de AFLP seletiva. Ambas as reacções diluída e não diluída podem ser armazenadas a -20 ° C.

Marcação dos Primers

A marcação dos primers é realizada por fosforilação das extremidade 5'dos primers de *EcoR* I com [γ -³²P ou γ -³³P] ATP e kinase de T4. Primers marcados com ³³P são preferidos porque eles dão uma melhor resolução dos produtos de PCR sobre os gels. Além disso, a reacção produtos são menos propensas à degradação devido à autoradiolysis.

Para o ³²P-marcado, adicione os seguintes componentes em tubo de 1,5mL:

| Componentes | Volume |
|--|--------|
| Primer <i>EcoR</i> I(selecione um) | 18µL |
| Tampão kinase 5X | 10 µL |
| [γ - ³² P]ATP (3,000 Ci/mmol) | 20 µL |
| T4 kinase | 2 µL |
| Volume total | 50 µL |

Para o ³³P-marcado, adicione os seguintes componentes em tubo de 1,5mL:

| Componentes | Volume |
|--|--------|
| Primer <i>EcoR</i> I(selecione um) | 18µL |
| Tampão kinase 5X | 10 µL |
| [γ - ³³ P]ATP (3,000 Ci/mmol) | 20 µL |
| T4 kinase | 2 µL |
| Volume total | 50 µL |

2. Misture delicadamente e centrifugue rapidamente para misturar o conteúdo do tubo. incubar reacção a 37 ° C durante 1 h.

3. Aquecer inactivar a enzima a 70 ° C durante 10 min. Centrifugar brevemente para recolher conteúdo da reacção.

Amplificação seletiva de AFLP

1. Para cada par de primers, adicione os seguintes componentes para um tubo de 1.5-ml identifique de "Mix 1".

| Componentes | Volume |
|---|------------|
| Primer marcado de EcoR I (do item anterior) | 5 μ L |
| Mse I primer (contendo dNTPs) | 45 μ L |
| volume total (suficiente para 10 reacções) | 50 μ L |

2. Adicione os seguintes componentes para outro tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e rotulá-la "MIX 2".

| Componentes | Volume |
|--|-------------|
| Água destilada | 79 μ L |
| Tampão de PCR 10X plus Mg | 20 μ L |
| Taq DNA polymerase (5 units/ μ L) | 1 μ L |
| volume total (suficiente para 10 reacções) | 100 μ L |

3. Cada amplificação de AFLP é montada através da combinação do seguinte numa 0,2- ou 0,5 ml tubo de microcentrífuga de paredes finas:

O DNA padrão é:

- 1) DNA da etapa 3 da Seção 3.6; ou na ausência de pré-amplificação,
- 2) DNA da etapa 3 da Seção 3.5

Obs.: pode usar o da pré-amplificação ou não (direto)

| Componentes | Volume |
|-----------------------------------|------------|
| DNA padrão | 5 μ L |
| Mix 1 (primers/dNTPs) | 5 μ L |
| Mix 2 (Taq DNA polymerase/buffer) | 10 μ L |
| Volume total | 20 μ L |

4. Misturar suavemente e centrifugar para recolher rapidamente reacção. Sobreposição com 2 a 3 gotas de óleo de silicone, se necessário.

Se estiver usando o Perkin-Elmer 9600 termociclador (ou similar autorizado térmica cycler):

A. Realizar um ciclo a 94 °C durante 30s; 65°C durante 30s; e 72°C durante 60s.

B. Abaixar a temperatura de anelamento em 0,7 °C em cada ciclo durante 12 ciclos. Este dá um toque para baixo fase de 13 ciclos.

C. Realizar 23 ciclos em:

94°C durante 30s;

56°C durante 30s; e

72°C durante 60s.

Tempo total: 2 h, 2 min.