



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL
EM BIOTECNOLOGIA

**ESTEROIDE, ALCALOIDES E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Palicourea corymbifera* (RUBIACEAE)**

MANAUS- AM
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL
EM BIOTECNOLOGIA

Weison Lima da Silva

**ESTEROIDE, ALCALOIDES E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Palicourea corymbifera* (RUBIACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação multi-institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Cecilia Veronica Nunez,

MANAUS-AM
2020

Ficha Catalográfica

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

S586e Silva, Weison Lima da
Esteroides, alcaloides e atividade biológica de fungos endofíticos de *Palicourea corymbifera* (Rubiaceae) / Weison Lima da Silva . 2020
132 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Cecilia Veronica Nunez
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Palicourea corymbifera*. 2. *Xylaria* sp.1. 3. *Xylaria* sp.2. 4. *Colletotrichum dianesei*. 5. potencialidade biotecnológica. I. Nunez, Cecilia Veronica. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Dedico este trabalho a meu pai Eudes Cunha da Silva (In
memorian) minha vó Maria Ramos da Silva (In memorian). A
minha família em especial minha mãe Maria Francisca Sergio Lima*

Agradecimentos A Deus, fonte de amor e sabedoria.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (PPGBiotec-UFAM).

A fundação de Amparo à Pesquisa do Estado Amazonas (FAPEAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa e financiamento do projeto.

A Dra. Cecilia Veronica Nunez pela orientação e repasse de conhecimento.

A todos os colegas do LABB (Cristine, Júlio Cezar, Maria Carolina, Maria Tereza, Manoel, Vanessa, David, Paula, Kalynne, Luana, André, Patrícia, Priscila, Noemi, Josy, Carolina, Ormezinda, Andrei, Lana, Ana Luiza, Stephania, Jorge, Laísley) pela amizade, convivência e aprendizagem.

A minha família (Maria Francisca, Abedelak, Keiwia, Kevin Willen, Aquiles, tios, tias e avós) pelo apoio e confiança.

A tia Francinete e Antônio Feitosa (*in memoriam*).

A todos docentes que me ajudaram na caminhada para chegar até aqui.

**“A CIÊNCIA E A VIDA COTIDIANA NÃO PODEM E NÃO DEVEM SER
SEPARADAS”**

Rosalind Franklin

RESUMO

Este trabalho descreve a triagem realizada com 32 fungos endofíticos de folhas da espécie vegetal *Palicourea corymbifera* a fim de selecionar fungos de interesse para a produção de substâncias com aplicações biotecnológicas. Foram isolados 17 morfotipos crescidos em ágar sabouraud (AS) e 15 em ágar batata dextrose (AB). Em um primeiro momento foi realizada uma seleção química quanto a presença de metabólitos relevantes. Os fungos crescidos em AS foram cultivados em meio líquido sabouraud e aqueles isolados em AB foram cultivados em meio líquido de batata, ambos meios acrescidos com 0,2% de extrato de levedura (EL). Os extratos dos micélios e caldos foram avaliados quimicamente por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H). A partir do resultado da triagem química foram selecionados 3 fungos codificados como SBPC15, SBPC16 e BDPC15. Com intuito de serem identificados e para se ter aumento na produção de biomassa. Esses três fungos foram cultivados em condições de temperatura (30 °C), tempo (20 dias) e agitação (agitador orbital 120 rpm) iguais. Onde a diferença foi quanto aos meios de cultura utilizados. O fungo SBPC15 foi cultivado em caldo sabouraud acrescido de 0,2% de extrato de levedura. O fungo SBPC16 foi cultivado em caldo sabouraud acrescido de 0,2% de extrato de levedura, e em meio líquido contendo glicose, extrato de levedura e peptona. O fungo BDPC15 foi cultivado em caldo de batata acrescido com 0,2% de extrato de levedura e caldo sabouraud acrescido de 0,2% de extrato de levedura. O extrato AcOEt de caldo do fungo (SBPC15) foi fracionado e foram obtidas as substâncias: tiramina (I) e ciclo prolina tirosina (II). Para o fungo BDPC15 cultivado em meio líquido de batata, tanto do fracionamento do extrato DCM de oriundo do caldo quanto o extrato DCM de micélio foi obtida a substância citocalasina D (III). Ainda do fungo supracitado cultivado em meio líquido sabouraud, do fracionamento do extrato AcOEt de micélio foi obtida também a citocalasina D (III). Para o fungo SBPC16 do cultivo realizado em sabouraud, do fracionamento do extrato AcOEt de micélio foi obtida a substância 1H-indol-3-acetamida (IV). Ainda do SBPC 15 cultivado em meio líquido contendo glicose, extrato de levedura e peptona, o extrato MeOH de micélio foi submetido a uma partição líquido/líquido, do fracionamento da fase AcOEt foi obtida a substância ergosterol (V). Parte dos extratos dos micélios (DCM, AcOEt e MeOH) e extratos dos caldos (DCM e AcOEt) assim como as substâncias isoladas foram submetidos a bioensaios quanto as atividades: antimicrobiana por microdiluição em caldo, ensaio angiogênico pelo método da membrana corioalantoica e de fitotoxicidade. Os fungos selecionados foram

identificados quanto sua taxonomia como sendo: *Xylaria* sp. 1 (SBPC15), *Xylaria* sp. 2 (BDPC15) e *Colletotrichum dianesei* (SBPC15). No ensaio antimicrobiano os extratos do fungo *Xylaria* sp. 1 quatro bactérias foram sensíveis; *Acinetobacter baumani*, *Edwardsiella tarda*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, e um fungo: *Candida albicans*. Para o fungo *Colletotrichum dianesei* os extratos apresentaram atividade contra cinco bactérias patogênicas: *Acinetobacter baumani*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*. Para o teste antimicrobiano com as substâncias: citocalasina D e ergosterol, nenhuma apresentou atividade inibitória de crescimento contra as cepas avaliadas. No ensaio de fitotoxicidade os extratos do fungo *Xylaria* sp. 1, promoveram uma redução na velocidade de germinação e no crescimento de *Lactuca sativa*. Na abordagem utilizando substâncias, a citocalasina D provocou necrose radicular em *L. sativa*. No ensaio de atividade de angiogênese a indol acetamida apresentou atividade antiangiogênica. Os resultados desta pesquisa reforçam a potencialidade biotecnológica dos fungos endofíticos da Amazônia. Fato comprovado através da obtenção de substâncias, algumas com realidade comercial já estabelecida e outras que podem ser moléculas protótipas para produção de outras estruturas químicas com possível bioatividade.

Palavras chaves: *Palicourea corymbifera*, *Xylaria* sp.1, *Xylaria* sp.2, *Colletotrichum dianesei*, potencialidade biotecnológica.

Abstract

This work describes the screening performed with 32 endophytic fungi from leaves of the plant species *Palicourea corymbifera* in order to select fungi of interest for the production of substances with biotechnological applications. Seventeen morphotypes grown on Sabouraud agar (AS) and 15 on potato dextrose agar (AB) were isolated. At first, a chemical selection was performed for the presence of relevant metabolites. Fungi grown in AS were grown in Sabouraud liquid medium and those isolated in AB were grown in potato liquid medium, both media added with 0.2% yeast extract (EL). Mycelia extracts and broths were chemically evaluated by comparative thin layer chromatography (TLC) and by hydrogen nuclear magnetic resonance (^1H NMR). From the result of the chemical screening, 3 fungi coded as SBPC15, SBPC16 and BDPC15 were selected. In order to be identified and to increase the production of biomass. These three fungi were cultivated under the same conditions of temperature (30 °C), time (20 days) and agitation (orbital shaker 120 rpm). Where the difference was in terms of the culture media used. The SBPC15 fungus was grown in Sabouraud broth with 0.2% yeast extract. The SBPC16 fungus was grown in Sabouraud broth with 0.2% yeast extract, and in a liquid medium containing glucose, yeast extract and peptone. The BDPC15 fungus was cultivated in potato broth added with 0.2% yeast extract and Sabouraud broth added with 0.2% yeast extract. The EtOAc extract from the fungus broth (SBPC15) was fractionated and the substances were obtained; tyramine (I) and cycle Proline Tyrosine (II). For the fungus BDPC15 cultivated in liquid potato medium, both the fractionation of the DCM extract from the broth and the mycelium DCM extract resulted in the substance cytochalasin D (III). cytochalasin D (III) was also obtained from the aforementioned fungus cultivated in Sabouraud liquid medium. For the SBPC16 fungus cultivated in Sabouraud, fractionation of the EtOAc extract of mycelium resulted in the substance indole acetamide (IV). Still from SBPC 15 cultivated in liquid medium containing glucose, yeast extract and peptone, the MeOH extract of mycelium was submitted to a liquid/liquid partition, from the fractionation of the EtOAc phase the substance ergosterol (V) was obtained. Part of the mycelia extracts (DCM, EtOAc and MeOH) and broth extracts (DCM and EtOAc) as well as the isolated substances were submitted to bioassays regarding activities; antimicrobial by microdilution in broth, angiogenic assay by the chorioallantoic membrane method and phytotoxicity. The selected fungi were identified as to their taxonomy as being: *Xylaria* sp. 1 (SBPC15), *Xylaria* sp. 2 (BDPC15) and *Colletotrichum dianesei* (SBPC15). In the

antimicrobial assay, the extracts of the fungus *Xylaria* sp.1 four bacteria were sensitive; *Acinetobacter baumani*, *Edwardsiella tarda*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, and a fungus; *Candida albicans*. For the fungus *Colletotrichum dianesei*, the extracts showed activity against five pathogenic bacteria: *Acinetobacter baumani*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*. For antimicrobial testing with substances: cytochalasin D and ergosterol, none showed growth inhibitory activity against the evaluated strains. In the phytotoxicity test, the extracts of the fungus *Xylaria* sp. 1, promoted a reduction in the speed of germination and growth of *Lactuca sativa*. In the approach using substances, cytochalasin D caused root necrosis in *L. sativa*. In the angiogenesis activity assay, indole acetamide showed antiangiogenic activity. The results of this research reinforce the biotechnological potential of endophytic fungi from the Amazon. This fact has been proven by obtaining substances, some with commercial reality already established and others that can be prototype molecules for the production of other chemical structures with possible bioactivity.

Keywords: *Palicourea corymbifera*, *Xylaria* sp.1, *Xylaria* sp.2, *Colletotrichum dianesei*, biotechnological potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas para pesquisa envolvendo fungos endofíticos	25
Figura 2: Metabólitos secundários encontrados em algumas espécies de <i>Palicourea</i> ...	36
Figura 3: Publicações relacionadas ao gênero <i>Palicourea</i> na última década	37
Figura 4: <i>Palicourea corymbifera</i>	37
Figura 5: Área de coleta; reserva florestal Adolpho Ducke	38
Figura 6: Fluxograma para obtenção dos extratos dos micélios.....	41
Figura 7: Fluxograma para obtenção de extratos dos caldos fermentados	41
Figura 8: Fluxograma de fracionamento para obtenção das substâncias I e II.....	43
Figura 9: Fluxograma do fracionamento para obtenção da substância III	44
Figura 10: Fluxograma do fracionamento para obtenção da substância III	46
Figura 11: Fluxograma do fracionamento para obtenção da substância III	48
Figura 12: Fluxograma de fracionamento para obtenção da substância IV	50
Figura 13: Fluxograma de fracionamento para obtenção da substância V	51
Figura 14: Espectro de RMN de ^1H da substância I em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).....	57
Figura 15: Expansão da região aromática do espectro de RMN de ^1H de da substância I em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).	58
Figura 16: Espectro de RMN de ^{13}C da substância I em $\text{DMSO-}d_6$ (75 MHz).....	59
Figura 17: Mapa de correlação HSQCedit da substância I.....	60
Figura 18: Mapa de correlação HMBC da substância I.....	60
Figura 19: Expansão do mapa de correlação HMBC da substância I.	61
Figura 20: Mapa de correlação COSY da substância I.....	61
Figura 21: Cromatograma e espectro de massas ESI modo negativo da fração SBPC15 FA 22-24 B4 P4 que contém a substância I.....	62
Figura 22: Estrutura química da substância I denominada tiramina	63
Figura 23: Correlações COSY e HMBC da substância I.....	64
Figura 24:Espectro de RMN de ^1H da substância II em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).....	66
Figura 25: Expansão da região aromática do espectro de RMN de ^1H de da substância II em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).	67
Figura 26: Mapa de correlação HSQC editado da substância II.....	68
Figura 27: Mapa de correlação HMBC da substância II.	68
Figura 28: Mapa de correlação COSY da substância II.	69

Figura 29: Espectro de massas de baixa resolução ESI positivo da fração SBPC15 FA 37-39 B1 P4 que contém a substância II.	70
Figura 30: Estrutura química da substância II denominada ciclo (prolina tirosina).....	72
Figura 31: Principais correlações COSY e HMBC da substância II.....	72
Figura 32: Análise de RMN de ^1H das frações; A) SBXEA13-14B5P3 em $\text{DMSO}-d_6$ (300 MHz). B) BDPC15_30 FD_F10-F12 e BDPC15_30_ED_F25-F14 em CDCl_3 (300 MHz).....	74
Figura 33: Expansão do espectro de RMN de ^1H na região de δ_{H} 0,9 a 3.....	75
Figura 34: Expansão do espectro de RMN de ^1H na região de δ_{H} 3,1 a 5,7.....	76
Figura 35: Expansão do espectro de RMN de ^1H na região de δ_{H} 6,1 a 7,3.....	77
Figura 36: Mapa de correlação HSQC editado da substância III.	78
Figura 37: Expansão do mapa de correlação HSQC editado da substância III.	78
Figura 38: Mapa de correlação HMBC da substância III.	79
Figura 39: Expansão do mapa de correlação HMBC da substância III.....	79
Figura 40: Mapa de correlação COSY substância III.....	80
Figura 41: Espectro de massas de baixa resolução ESI positivo da fração BDPC15 ED F25 F14 que contém a substância III.....	81
Figura 42: Estrutura química da substância III denominada citocalasina D	84
Figura 43: Principais correlações COSY e HMBC da substância III.....	84
Figura 44: Espectro de RMN de ^1H da substância IV em $\text{DMSO}-d_6$ (300 MHz).	87
Figura 45: Expansão da região aromática do Espectro de RMN de ^1H de da substância IV em $\text{DMSO}-d_6$	88
Figura 46: Mapa de correlação HSQC editado da substância IV.	89
Figura 47: Mapa de correlação HMBC da substância IV.....	89
Figura 48: Expansão do mapa de correlação HMBC da substância IV.....	90
Figura 49: Mapa de correlação COSY da substância IV.....	90
Figura 50: Expansão do mapa de correlação COSY da substância IV.....	91
Figura 51: Espectro de massas de baixa resolução ESI positivo da fração SBPC16 EA 23-26 B1 P6 que contém a substância IV.....	92
Figura 52: Estrutura da substância IV denominada 1H-indol-3-acetamida	93
Figura 53: Correlações COSY e HMBC da substância IV.....	93
Figura 54: Análise de RMN de ^1H da substância V em CDCl_3 (300 MHz)	96
Figura 55: Expansão na região de δ_{H} 0,5 a δ_{H} 2,5	97
Figura 56: Espectro de RMN de DEPT 135° da substância V em CDCl_3 (75 MHz).....	98

Figura 57: Mapa de correlação HSQC da substância V	99
Figura 58: Expansão do mapa de correlação HSQC da substância V	99
Figura 59: Mapa de correlação HMBC da substância V	100
Figura 60: Expansão do mapa de correlação HMBC da substância V	100
Figura 61: Mapa de correlação COSY da substância V	101
Figura 62: Estrutura química da substância V denominada ergosterol	102
Figura 63: Principais correlações observadas em COSY e HMBC da substância V ...	103
Figura 64: Gráficos com a média de absorbância para as diferentes concentrações ± Desvio padrão de citocalasina D testada frente aos microrganismos testes	108
Figura 65: Gráficos com a média de absorbância para as diferentes concentrações ± Desvio padrão de ergosterol testado frente aos microrganismos testes	109
Figura 66: Porcentagem de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> sob influência do extrato metanólico de <i>Xylaria</i> sp.1 e <i>C. dianesei</i>	110
Figura 67: Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de <i>Lactuca sativa</i> sob influência do extrato metanólico de <i>Xylaria</i> sp.1 e <i>C. dianesei</i>	110
Figura 68: Crescimento radicular e da parte aérea de plântulas de <i>Lactuca sativa</i>	110
Figura 69: Interferência dos extratos sobre o crescimento de <i>Lactuca sativa</i>	111
Figura 70: Crescimento de <i>Lactuca sativa</i> sob interferência da substância	112
Figura 71: Plântulas de <i>L. sativa</i> observadas em lupa (Aumento de 1.5x)	113
Figura 72: Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pela indol acetamida	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Substâncias fitotóxicas isoladas de fungos endofíticos	28
Tabela 2: Substâncias antibióticas isoladas de fungos endofíticos.....	31
Tabela 3: Substâncias anti angiogênicas isoladas de fungos endofíticos associados a algas	35
Tabela 4: Sistemas de eluição e frações obtidas da coluna cromatográfica do extrato AcOEt do caldo fermentado (<i>Xylaria</i> sp.1)	43
Tabela 5: Sistemas de eluição e frações obtidas do extrato DCM do caldo fermentado (<i>Xylaria</i> sp.2).....	45
Tabela 6: Sistemas de eluição e frações obtidas da fração 10 do extrato DCM (<i>Xylaria</i> sp2).	45
Tabela 7: Sistemas de eluição e frações obtidas do extrato DCM de micélio (<i>Xylaria</i> sp.2)	46
Tabela 8: Sistemas de eluição e frações obtidas da fração 25 do extrato DCM de micélio	47
Tabela 9: Sistemas de eluição e frações obtidas do extrato AcOEt de micélio (<i>Xylaria</i> sp. 2)	48
Tabela 10: Sistemas de eluição e frações obtidas das frações12-13 extrato AcOEt de micélio (<i>Xylaria</i> sp. 2).....	49
Tabela 11: Sistemas de eluição e frações obtidas das frações 11-12 extrato AcOEt de micélio (<i>Xylaria</i> sp. 2).....	49
Tabela 12: Sistemas de eluição e frações obtidas para o extrato AcOEt de micélio (<i>C. dianesei</i>)	50
Tabela 13: Sistemas de eluição e frações obtidas para a fase AcOEt de extrato metanólico de micélio (<i>C. dianesei</i>)	52
Tabela 14: Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C HSQC, HMBC e COSY da substância I (em DMSO- <i>d</i> ₆ : 300 MHz (H) 75 MHz (C)). Dados da literatura obtidos (em CD ₃ OD: 500 MHz (H) 125 MHz (C)).	63
Tabela 15: Dados de RMN de ¹ H, HSQC, HMBC e COSY da substância II (em DMSO- <i>d</i> ₆ : 300 MHz (H) 75 MHz (C)). Dados da literatura ciclo (Pro-Tir) de acordo com *JAYATILAKE et al., (1996) CDCl ₃ : 360 MHz (H) 90 MHz (C)).....	71

Tabela 16: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C HSQC, HMBC e COSY da substância III (em CDCl_3 : 300 MHz (H) 75 MHz (C)). Dados da literatura obtidos (em CDCl_3 : 500 MHz (H) 125 MHz (C)).....	82
Tabela 18: Dados de RMN de ^1H , HSQC, HMBC e COSY da substância IV (em $\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C). Dados da literatura FACHIN-ESPINAR (2019) IV (em $\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C).	91
Tabela 19: Dados de RMN de ^{13}C da substância V (em CDCl_3 75 MHz (C)) comparados na literatura. Dados da literatura em CDCl_3 : 50 MHz (C)).....	101
Tabela 20: Extratos e fases que apresentaram atividade antimicrobiana	106
Tabela 21: Porcentagem e velocidade de germinação de <i>Lactuca sativa</i>	112

Lista de quadros

Quadro 1: Substâncias bioativas obtidas de fungos	22
Quadro 2: doenças associadas a processo de angiogênese	33
Quadro 3: Fungos isolados de folhas de <i>Palicourea corymbifera</i>	55

Lista de Siglas

AcOEt – acetato de etila

BDA – Batata dextrose ágar

BDL – Batata dextrose caldo e extrato de levedura.

CC – Cromatografia em coluna

CCDC – Cromatografia em camada delgada comparativa

CDCl₃ – clorofórmio deuterado

CL₅₀ – Concentração letal de 50% dos indivíduos

Ø – Diâmetro

d – Dubleto

DCM – diclorometano

DMSO – dimetilsulfóxido

DMSO-*d*₆ – dimetilsulfóxido deuterado

h – Altura

Hex – hexano

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

HTS – *High Throughput Screening*

Hz – Hertz

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

J – Constante de acoplamento

nm – nanômetro

pH– Potencial hidrogeniônico

ppm – partes por milhão

RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SB – Ágar Sabouraud

SBL – Sabouraud dextrose caldo e extrato de levedura

s – Singleto

t – Tripleto

TMS – Tetrametilsilano

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Produtos naturais de fungos	20
2.2 Fungos endofíticos	23
2.3 Potencialidades biotecnológicas dos fungos endofíticos	25
2.3.1 Fitotoxicidade	27
2.3.2 Antibacterianos.....	29
2.3.3 Angiogênese.....	32
2.4 Planta hospedeira <i>Palicourea corymbifera</i>	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Coleta do material vegetal	38
4.2. Isolamento dos fungos endofíticos	39
4.3. Triagem química dos fungos de interesse	39
4.4 Cultivo com maior número de repetições	40
4.5. Obtenção dos extratos orgânicos	40
4.5.1 Extração dos micélios.....	40
4.5.2 Extração dos caldos.....	40
4.6 Análises químicas	41
4.6.1. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).....	41
4.7 Análises espectroscópicas	42
4.7.1 Ressonância magnética nuclear	42
4.7.2 Espectrometria de massas	42
4.7.3 Fracionamento dos extratos	42
4.8 Ensaio biológicos	52
4.8.1 Ensaio da Atividade antibacteriana por diluição em caldo.....	52
4.8.2 Ensaio da membrana corioalantoica (CAM)	53
4.8.3 Avaliação da Atividade fitotóxica	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Isolamento, seleção e identificação de fungos	55
5.2 Caracterização Química	56
5.2.1 identificação estrutural da substância I produzida por <i>Xylaria</i> sp. 1.....	56
5.2.2 identificação estrutural da substância II produzida por <i>Xylaria</i> sp. 1	65

5.2.3 identificação estrutural da substância III produzida por <i>Xylaria</i> sp. 2 ..	73
5.2.5 Identificação estrutural da substância IV produzida por <i>C. dianesei</i>	86
5.2.6 Identificação estrutural da substância V produzida por <i>C. dianesei</i>.....	94
6.2 Ensaio biológico	104
6.2.1 Antimicrobiano.....	104
6.2.2 Bioensaio antimicrobiano com citocalasina D e ergosterol	107
6.2.3 Ensaio fitotóxico dos extratos.....	109
6.2.4 Fitotoxicidade de citocalasina D.....	112
6.2.5 Avaliação da atividade angiogênica da indol acetamida	113
7. CONCLUSÃO.....	116
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

1. INTRODUÇÃO

Bioprospecção é a pesquisa realizada com a biodiversidade para obter novos recursos de valor social e comercial (BEATTIE et al., 2011). Tal ferramenta é indispensável para a investigação científica, já que sucessos históricos na descoberta de medicamentos, tendo como base produtos naturais, apoiam o contínuo desenvolvimento em programas de substâncias terapêuticas (HARVEY, 2008).

Uma das características marcantes de produtos naturais é a alta diversidade química, associada à semelhança estrutural de proteínas alvo em muitas espécies. Tal vantagem justifica suas bioatividades, tornando as moléculas naturais importantes recursos terapêuticos para benefício da saúde humana, principalmente para o tratamento de doenças infecciosas (CRAGG & NEWMAN, 2013).

Dentre as fontes de substâncias naturais, os micro-organismos são considerados bio-fábricas na produção de moléculas que podem ser insumos para o desenvolvimento de produtos com potencial aplicação na agricultura, medicina, indústria alimentar, farmacêutica ou agroquímica (STROBEL et al., 2004; VERMA et al., 2009). Segundo Takahashi & Lucas (2008) é vantajoso realizar a prospecção química de metabólitos fúngicos em relação às demais fontes, pois podem ser cultivados em larga escala, não gerando prejuízos ao ecossistema. Minimizam-se também problemas éticos como os que podem advir da prospecção de metabólitos bioativos a partir de espécies animais (PEIXOTO NETO et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2011).

Nesse contexto, uma atenção especial deve ser direcionada aos fungos que vivem no interior de vegetais, denominados endofíticos. Fungos endofíticos produzem diversos metabólitos secundários amplamente distribuídos, sendo eles; terpenos, alcaloides, compostos fenólicos, esteroides, xantonas e cumarinas (CHAPLA et al., 2013).

Estes metabólitos possuem ampla gama de atividades tais como: antimicrobianas, antiangiogênicas, antitumorais, sendo úteis para diversos aspectos clínicos. Além de tal potencialidade, há também endófitos que produzem metabólitos com atividade fitotóxica, se tornando material de grande interesse agrícola na busca de bioherbicidas (JALGAONWALA et al., 2011; ALY et al., 2011). Existem ainda fungos que sintetizam pigmentos, com grande valor comercial para a indústria (TEIXEIRA et al., 2011).

A manutenção do bioma amazônico é justificada por sua riqueza biológica, do ponto de vista biotecnológico tal riqueza pode ser explorada visando a obtenção de produtos e processos que tragam benefícios bilaterais para sociedade e a natureza. Por

essa razão são dedicados esforços para bioprospecção dos recursos biológicos que estão inseridos na Amazônia.

Na literatura o gênero *Palicourea* está dentro da família Rubiaceae, diversas produções bibliográficas destacam espécies desse gênero como detentoras de metabólitos secundários com atividades biológicas distintas, ressaltando alguns com ocorrência inédita. Com relação a *P. corymbifera* é relatada a ocorrência de alcaloides, terpenos, substâncias fenólicas entre outras classes químicas. Considerando também a atividade citotóxica *P. corymbifera* aliada ao fato que na literatura é dito que espécies de *Palicourea* são boas candidatas para a prospecção de antitumorais. Devido a essas características trata-se de uma excelente planta para isolamento de fungos endofíticos e posterior bioprospecção de moléculas bioativas que possam se tornar produtos biotecnológicos de interesse médico e/ou agrícola.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produtos naturais de fungos

Biodiversidade é definida como distinção entre os seres vivos, incluindo a variação genética, número de espécies e as diferenças entre os ecossistemas que as abrigam (SWINGLAND, 2001). Nesse contexto, uma das maneiras de se extrair valor econômico da biodiversidade é através da bioprospecção. Esta consiste na busca sistemática por organismos, genes, enzimas, substâncias, processos e partes provenientes de seres vivos em geral, que possam apresentar potencial e consequentemente levar ao desenvolvimento de produtos (PUSHPANGADAN, et al., 2018).

Na natureza, os metabólitos secundários microbianos são uma fonte tremenda de novas estruturas químicas bioativas para a descoberta de medicamentos. (BARAL et al., 2018). Do ponto de vista extracelular essas moléculas são extraordinárias para a humanidade, pois apresentam ampla utilidade tais como: drogas (antibimicrobianos, agentes anti-câncer, imunossuppressores), agrotóxicos (pesticidas, inseticidas, antifúngico), biocombustíveis (esqualeno, oleoresina) e aditivos alimentares (carotenoides, flavonoides, óleos essenciais), os tornando comercialmente explorados (MARRONE, 1999; NGUYEN et al., 2012; CHALLINOR & BODE, 2015).

Assim como plantas e animais o reino dos fungos constitui um conjunto a parte, caracterizado por uma ampla distribuição taxonômica e geográfica se destacando por ser um grupo mega diverso (PEAY, 2016). Além desses microrganismos desempenharem

funções ecológicas cruciais na natureza, são utilizados por humanos desde tempos antigos, sendo estes empregados como; alimentos, na fabricação de bebidas e principalmente como remédios. Assim sendo, uma série de doenças potencialmente fatais são tratadas todos os anos ao redor mundo com substâncias terapêuticas produzidos por fungos, tornando tais moléculas extremamente valiosas tanto do ponto de vista humanitário quanto de mercado.

A pesquisa de Alexander Fleming na descoberta do antibiótico penicilina (penicilina F) e seu desenvolvimento em um medicamento (penicilina G), foi o que despertou a atenção aos metabólitos secundários fúngicos. A partir de então, outros estudos científicos foram realizados e culminaram na descoberta de vários fármacos importantes incluindo antibióticos (tetraciclinas, macrolídeos, β -lactâmicos) redutores de colesterol (estatinas) e antitumorais. Por exemplo: um estudo da literatura sobre 1500 metabólitos secundários fúngicos isolados e caracterizados entre 1993 e 2001 mostrou que mais da metade desses compostos tinha atividade antibacteriana, antifúngica ou antitumoral e que 38% de substâncias bioativas microbianas derivam de fungos filamentosos (KELLER et al., 2005; SHARMA et al., 2014).

No cenário de bioeconomias diversas empresas do ramo biotecnológico fazem uso dos fungos filamentosos pela destacada produção de substâncias de interesse, e pela versatilidade metabólica quando comparado a leveduras e bactérias (MEYER et al., 2016). Esses microrganismos ganham notado destaque no setor industrial, como produtores efetivos de diversas substâncias que beneficiam a saúde humana e geram ganho econômico (quadro 1).

Algumas características viabilizam a utilização dos fungos para a produção em escala industrial, como rápido crescimento, fácil adaptação, e reutilização de células. Do ponto de vista industrial e ambiental esses seres vivos são produtores desejáveis, uma vez que podem crescer em fermentadores - pequenos a grandes - para suficiente fornecimento de substâncias de interesse (TAKAHASHI & LUCAS, 2008).

Quadro1: Substâncias bioativas obtidas de fungos e seus valores comerciais

Substância	Produto derivado	Fungo produtor	Aplicação	Vendas projetadas anualmente (US\$, 2017)
compactina	Mevastatina	<i>Penicillium compactum</i>	Agente redutor do colesterol	
mevacor	Lovastatina	<i>Aspergillus terreus</i>	Agente redutor do colesterol	1 Bilhão
pravastatina	Pravacol	<i>Penicillium compactum</i>	Agente redutor do colesterol	1.3 Bilhão
penicilinas	Penicilinas	<i>Penicillium notatum</i>	Infecções bacterianas	8.2 Bilhões
co-amoxiclav	Augmentina	(<i>Actinomycetes</i>)	Infecções bacterianas	1 Bilhão
cefalosporina	Cefalosporina	<i>Cephalosporium</i>	Infecções bacterianas	9.9 Bilhões
ácido fusídico	Fucidina	<i>Fusidium coccineum</i>	Infecções bacterianas	
psilocibina	Psilocibina	<i>Psilocybe Mexicana</i>	Doença terminal: (Sintomas de depressão e ansiedade)	
ácido lisérgico	LSD	<i>Claviceps purpurea</i>	Doença terminal: (Sintomas de depressão e ansiedade)	
ciclosporina A	Ciclosporina A	<i>Tolypocladium inflatum</i>	Transplante de órgão	1 Bilhão
ácido micofenólico	Ácido Micofenólico	<i>Penicillium stoloniferum</i>	Transplante de órgão	306.8 Milhões
casposfungina	Cancidas	<i>Glarea lozoyensis</i>	Infeções fúngicas	611 Milhões
Fingolimod	Gilenya	<i>Isaria sinclairii</i>	Esclerose múltipla	2.5 Bilhões
Cogumelo shiitake	Lentinan	<i>Letinula edodes</i>	Tratamento e prevenção de câncer, agente redutor do colesterol, imunostimulação, agente anti-infeccioso	75 Milhões
Ergot	Ergotamina	<i>Claviceps purpurea</i>	Enxaqueca	
Estrobilurinas	Estrobilurinas	<i>Stobilurus tenacellus</i>	Fungicida agrícola	3.8 Bilhões

Fonte: Adaptado de Langdon & Pearce, 2017

É consolidado o fato que os fungos possuem uma plasticidade fenotípica admirável fazendo com que os mesmos sejam excelentes biofábricas para produção de

determinadas substâncias. As habilidades bioquímicas que esses microrganismos detêm variam em função dos nichos ecológicos de onde os mesmos são isolados. Fungos que colonizam plantas têm ganhado notado destaque em relação as suas potencialidades biotecnológicas.

2.2 Fungos endofíticos

O termo endofítico foi utilizado pela primeira por Petrini em 1991 referindo-se a microrganismos que vivem no interior de vegetais sem lhes causar danos ou alterações morfológicas. Existem quase 300.000 espécies de plantas na Terra e cada planta individual hospeda um ou mais endófitos, e muitos deles podem colonizar apenas certos hospedeiros. Estima-se que possa haver até um milhão de fungos endofíticos diferentes, portanto, os endófitos podem ser mega-diversos (STROBEL & DAISY, 2003).

Em relação a distribuição, fungos endofíticos são encontrados em todos os tipos de plantas (árvores, gramíneas, herbáceas, algas), diferindo quanto a composição de espécies e distribuição. Pelos estudos realizados conclui-se que são grupos polifiléticos; pertencendo principalmente aos ascomicetos (ALY et al., 2011; HOFFMAN & ARNOLD, 2008). Em um estudo acerca da descrição global de endófito, o continente sul-americano correspondeu a 12% das novas espécies descobertas (WILLIS, 2018). No Brasil foram descritas 5.719 espécies, distribuídas em 1.246 gêneros, 102 ordens e 13 divisões, com predomínio dos Basidiomycota (2.741 espécies) e Ascomycota (1.881 espécies), com destaque para a Amazônia possuindo o segundo maior número de espécies (1.050) (FORZZA et al., 2010; MAIA et al., 2015).

Apesar de pesquisas com fungos endofíticos serem recentes, alguns estudos verificaram que a existência desses microrganismos data tempos bem mais antigos. Tecidos fossilizados de caules e folhas de plantas foram analisados e constatou-se que a relação endófitos-planta pode ter evoluído a partir do mesmo momento que as plantas superiores apareceram pela primeira vez na terra, datando está co-evolução cerca de 400 milhões de anos (REDECKER; et al., 2000; KRINGS et al., 2007).

Para colonizar as plantas hospedeiras os fungos endofíticos estrategicamente utilizam vias distintas, através de ranhuras ocorridas pelo atrito com o solo, aberturas naturais tais como estômatos e hidatódios (WAGNER & LEWIS, 2000). No interior dos vegetais a colonização pode ser intracelular, intercelular e sistêmica (STONE et al., 2000). Araújo e colaboradores (2010) afirmam que os mais distintos órgãos vegetais

como folhas, ramos, caules, raízes, estames, polén, ovários, anteras podem ser colonizados. Em geral, nas comunidades endofíticas ocorre dominância de algumas poucas espécies em um determinado hospedeiro, havendo também, certo grau de especificidade endofítico-hospedeiro (AZEVEDO, 1998). A composição de espécies da microbiota interna é distinta para vários hospedeiros, órgãos e tecidos, embora algumas espécies de infecções endofíticas também possam ser encontradas na microbiota epifítica ou rizosfera (SAIKKONEN et al., 2004).

Com relação a transmissão nota-se duas maneiras distintas, tendo influência principalmente no comportamento sexual desses microrganismos. Os endófitos transmitidos verticalmente geralmente são assexuais, comumente apresentando-se como anamorfos. Por outro lado, os endófitos fúngicos transmitidos horizontalmente são sexuais e transmite através de esporos que podem se espalhar pelo vento e / ou vetores de insetos (SELOSSE et al., 2004).

Baseada na relação taxonômica, evolucionária, na planta hospedeira e nas funções ecológicas, os fungos endofíticos classificam-se em dois grupos principais: os clavicipícios, que infectam algumas gramíneas; e os endófitos não clavicipídeos, que podem ser recuperados de tecidos assintomáticos de plantas não-vasculares (BACON et al., 1977; RODRIGUEZ et al., 2009). Além dos grupos mencionados existem quatro classes. Classe I, são endófitos de gramíneas relatados pela primeira vez no final do século 19 a partir de diversas sementes do gênero *Lolium* (RODRIGUEZ et al., 2009); classe II consistem em uma diversidade de espécies que colonizam todas as partes da planta, relacionados ao grupo dos Dikaryomycota (Ascomycota ou Basidiomycota); classe III, estes fungos são diferenciados com base na sua ocorrência, sendo hiper-diversos e associados com folhas de árvores tropicais, sendo os fungos dessa classe membros de Dikaryomycota; a classe IV, é constituída por espécies frequentemente encontradas como fungos micorrízicos, recebendo a denominação de pseudomicorrízicos (MERLIN, 1922; ARNOLD et al., 2001; GAMBOA & BAYMAN, 2001).

Os fungos endofíticos produzem substâncias que ajudam a planta hospedeira a resistir a estresses bióticos e abióticos beneficiando assim a sua sobrevivência, e podendo acentuar a resposta imunológica das plantas para combater patógenos invasores (SAIKKONEN et al., 2004; MELOTTO et al., 2008). Esses microrganismos comumente aumentam a biomassa das plantas sob condições estressantes, mas os mecanismos celulares envolvidos na tolerância ao estresse e no aumento do crescimento são pouco caracterizados (RAJAMANIKYAM et al., 2017). Além disso, no estágio de morte da

planta hospedeira os fungos endofíticos desempenham um papel importante para iniciar a degradação biológica e posterior reciclagem de nutrientes (SCHULZ & BOYLE, 2005).

Em uma abordagem química, a interação entre fungos e plantas sob determinada circunstância estimula obrigatoriamente ou facultativamente a produção de inúmeras substâncias, dessa forma as moléculas produzidas por fungos endofíticos podem ser aproveitadas com outro propósito visando a exploração das potencialidades desses microrganismos.

2.3 Potencialidades biotecnológicas dos fungos endofíticos

Os microrganismos endofíticos mais frequentemente isolados são fungos. Para o estudo biológico e químico desses seres vivos, pode-se estabelecer várias etapas importantes. Strobel & Strobel (2007) sugeriram um roteiro (figura 1) com etapas definidas que vão desde a elaboração do projeto até a obtenção de biomoléculas. Esses parâmetros podem auxiliar o direcionamento na bioprospecção para produção de substâncias de interesse industrial.

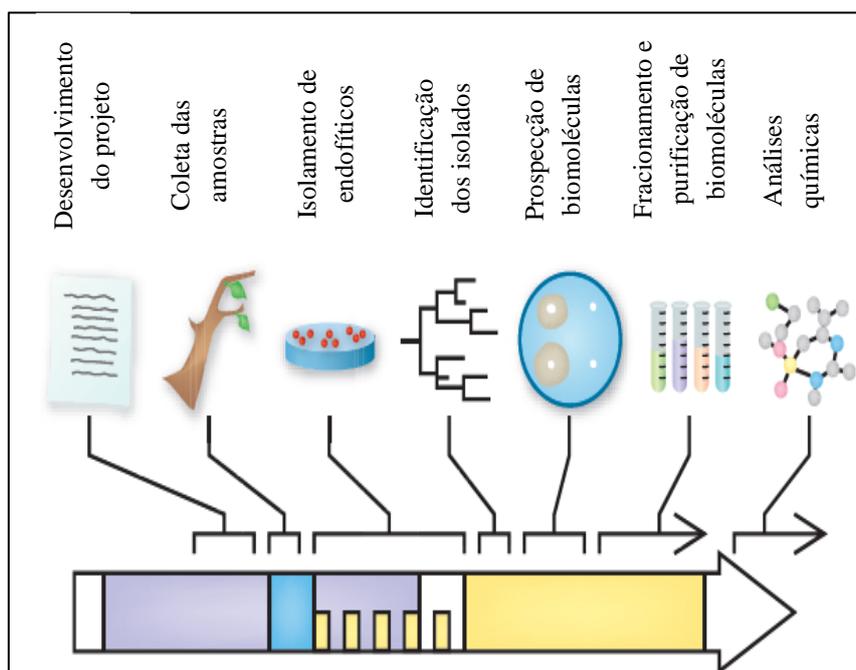


Figura 1: Etapas para pesquisa envolvendo fungos endofíticos

No campo científico, o acúmulo de informações a respeito da interação planta/fungos se reflete no aumento da produção de artigos científicos e patentes, tendo como objetivo isolamento e identificação de metabólitos secundários (PATIL et al., 2016; RATNAWEERA et al., 2017; BRAMHACHARI et al., 2019).

Como resultado da interação bioquímica fungo/planta, os endófitos produzem diversos grupos de metabólitos como esteroides, xantonas, fenóis, isocumarinas, derivados de perileno-quinonas, furandionas, terpenos, citocalasinas, policetídeos, alcaloides, peptídeos, proteínas, lipídios, glicosídeos, apresentando essas classes químicas abrangentes atividades biológicas. Do ponto de vista biotecnológico as atividades conferidas a essas moléculas podem desempenhar um amplo aproveitamento tais como: antibióticos, agentes anti-câncer, anti oxidantes, agrotóxicos, biocombustíveis e aditivos alimentares sendo essas substâncias comercialmente exploradas (VASUNDHARA et al., 2019; TOGHUEO & BOYOM, 2019).

A interação evolutiva de fungos e plantas sugerem mudanças em genótipos e fenótipos. A adaptação ao microambiente no interior da planta possibilitou a variação genética gradual e troca de segmentos de DNA de maneira bilateral entre os dois organismos, de forma a modificar o genoma de ambos (TIWARI & BAE, 2020).

Assim, espécies vegetais que sintetizam alguma substância com possível utilização farmacológica, podem ter a produção desse produto acentuada, se o mesmo ocorrer em algum indivíduo da sua população endofítica (STIERLE, et al., 1993; ZHANG et al., 2006; ROOPA et al., 2015). No trabalho realizado por Maehara e colaboradores (2013), constatou-se que todos os fungos endófitos associados com *Cinchona ledgeriana* (Rubiaceae) produziram o mesmo alcaloide que o hospedeiro. Os exemplos clássicos são as produções de moléculas com propriedades anticâncer tais como; vimblastina, vincristina, taxol e camptotecina, substâncias com expressivo valor e importantes no tratamento de neoplasias (KUMAR et al., 2013; UZMA et al., 2018).

A habilidade de biotransformação também é outro recurso conferido aos fungos endofíticos, pois metabólitos tóxicos produzidos pela planta hospedeira são biotransformados por endófitos que fazem a desintoxicação, e com efeito geram novos metabólitos bioativos (ZIKMUNDOVA et al., 2002; SAUNDERS & KOHN, 2009).

A interação metabólica de um endofítico com seu hospedeiro pode levar a síntese de uma variedade de produtos naturais bioativos, com propriedades farmacológicas (STROBEL & DAISY, 2003). Apesar de muitos estudos evidenciarem a relevância dos fungos endofíticos para a biotecnologia, estes ainda são um grupo de microrganismos pouco investigados, e representam uma fonte abundante e confiável de substâncias com estruturas inéditas com vastas bioatividades, que são úteis para medicina, indústria e agricultura (OWEN & HUNDLEY, 2004; SOARES et al., 2017).

2.3.1 Fitotoxicidade

Fitotoxicidade é definida como uma reação negativa de uma substância sobre aspectos do desenvolvimento de plantas. Dentre os efeitos observados pode-se destacar o atraso na germinação das sementes, inibição do crescimento das plantas ou qualquer outro efeito adverso causado por substâncias específicas ou condições de crescimento (REAL CCS, 2014). Efeitos fitotóxicos são exibidos por alguns aleloquímicos, refletindo a alteração de vários processos fisiológicos, influenciando nos padrões de crescimento de vegetais (PARVEZ et al., 2003; KIL & SHIM, 2006).

A ação dessas substâncias pode afetar processos biológicos e alvos fundamentais tais como: fotossíntese, atividade enzimática, abertura estomática, níveis hormonais, disponibilidade mineral, divisão e alongamento celular, permeabilidade das membranas e paredes celulares (REIGOSA et al., 1999; MACÍAS et al., 2006). Assim moléculas fitotóxicas são de grande interesse para o biocontrole de espécies vegetais não desejadas, uma vez que essas podem comprometer o cultivo de plantas economicamente estratégicas (LEGHARI et al., 2015).

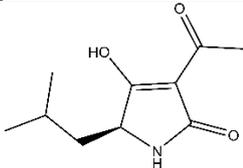
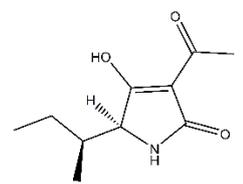
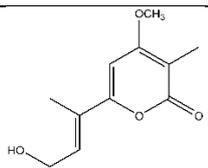
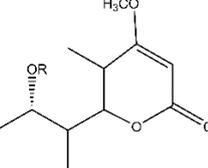
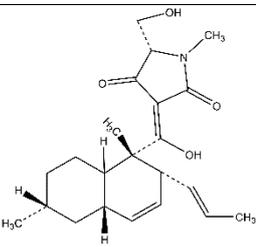
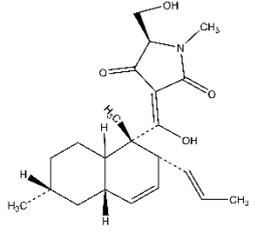
Geralmente o controle de espécies indesejadas é feito com aplicação de herbicidas de origem sintética, entretanto o uso desses produtos, podem acarretar efeitos nocivos ao meio ambiente e oferecer riscos para saúde humana (BERNARDES et al., 2015; MUSTAPHA et al., 2017). Adicionado a esse fato, continuamente ervas daninhas tem adquirido resistência a herbicidas convencionais, além de uma diminuição no número de produtos para controle de pragas devido a preocupações e regulamentos de saúde (DAYAN et al., 2009; CANTRELL et al., 2012).

Diante dessa problemática cabe ao setor agrícola encontrar alternativas através de biotecnologias para solucionar tal desafio. A busca por moléculas fitotóxicas de origem natural para uso no biocronrole de ervas daninhas é uma estratégia necessária, considerando que atualmente estão disponíveis no mercado treze bioherbicidas derivados de fontes naturais (CORDEAU et al., 2016).

Com esse enfoque, a bioprospecção por bioherbicidas, juntamente com o histórico de moléculas fitotóxicas (Tabela 1) produzidas por fungos endofíticos destacam esses microrganismos como fontes promissoras na exploração de substâncias para o controle de plantas daninhas (BIASETTO et al., 2019). Os endófitos excretam substâncias biologicamente ativas que podem estar envolvidas em uma associação simbiótica com uma planta hospedeira, essas substâncias pertencem as mais distintas classes químicas; compostos fenólicos, terpenos, alcaloides (PUSZTAHELYI & HOLB, 2015). Fungos

endofíticos podem produzir isoladamente substâncias que inibam o crescimento de uma planta concorrente a de sua hospedeira, bem como também podem estimular a produção de aleloquímicos pela própria planta hospedeira (HAO et al., 2015; BAO et al., 2015).

Tabela 1: Substâncias fitotóxicas isoladas de fungos endofíticos

Fungo endofítico	Substância	Planta hospedeira	Autor
<i>Alternaria J46</i>	 <p>vivotoxina II</p>	<i>Platyclusus orientalis</i>	(HAO et al., 2015)
	 <p>ácido tenuazônico</p>		
<i>Diaporthe gulyae</i>	 <p>gulipirona B</p>	<i>Carthamus lanatus</i>	(ANDOLFI et al., 2015)
	 <p>gulipirona A</p>		
<i>Fusarium equiseti</i> e <i>F. pallidroseum</i>	 <p>equisetina</p>	<i>Gossypium</i>	(WHEELER et al., 1999)
	 <p>epi-equisetina</p>		

<p><i>Xylaria</i> sp.</p>	 <p>faseolinona</p> <p>fomenona</p>	<p><i>Piper aduncum</i></p>	<p>(NICOLETTI & FIORENTINO, 2015)</p>
---------------------------	--	-----------------------------	---

Para rastreio preliminar de moléculas fitotóxicas o bioensaio adequado é importante. O ensaio utilizando *Lactuca sativa* é um bioindicador confiável, sobretudo por ser simples, barato e requerer uma quantidade relativamente pequena de amostra (PRIAC et al., 2017). No experimento são considerados os seguintes parâmetros: taxa de germinação e o alongamento radicular em sementes (DI SALVATORE et al., 2008).

2.3.2 Antibacterianos

A expectativa de vida humana foi prolongada pelo uso de antibióticos, tanto que doenças frequentemente debilitantes e fatais puderam ser tratadas com êxito (GOTTFRIED, 2005). A era de moléculas antibióticas promoveu notáveis avanços nas áreas médicas auxiliando em diversas práticas tais como: quimioterapia, cirurgias invasivas, transplantes de órgãos, partos (WHO, 2019). Além da inestimada contribuição na saúde pública, os antibióticos viabilizaram significativamente a produção de alimentos sendo empregados no controle de doenças, na saúde animal e na produtividade agrícola (McMANUS et al., 2002).

O uso vantajoso e abusivo de antibióticos acabou acarretando sérios problemas, sendo o principal, a resistências dos microrganismos às moléculas ativas. É importante ressaltar que a resistência aos antibióticos é um fenômeno natural observado desde a introdução da penicilina em 1940, mas pela ação antrópica o surgimento da resistência antimicrobiana passou a ser mais frequente (LOBANOVSKA & PILLA, 2017).

A relativa facilidade de disponibilização dos primeiros programas de descoberta de antibióticos e as recompensas financeiras que se seguiram criaram um uso desnecessário e acrítico de antibióticos sem considerar adequadamente as consequências sociais e clínicas (PODOLSK, 2015). Nas últimas décadas, ficou evidente a pronunciada desvantagem para os humanos entre o desenvolvimento de novos antibióticos e a velocidade do surgimento de cepas resistentes e multirresistentes (BUCKLAND, 2017).

Tal fato resultou na continua preocupação quanto ao paradigma do uso dos antibióticos, mortalidades e crise mundial na saúde; enfatizando especialmente países em desenvolvimento, pois essas nações tendem a experimentar níveis altos de resistência antimicrobiana podendo ter um efeito global devastador, através de viagens intercontinentais com rápida disseminação (CARS et al., 2008; LAWS et al., 2019). Estima-se que até o ano de 2050 as denominadas "superbactérias" possam causar até 10 milhões de mortes e custar a economia global cerca de US\$ 100 trilhões (WHO, 2017).

A organização mundial de saúde sumarizou uma lista prioritária de microrganismos para os quais são urgentes novos antibióticos; sendo estes *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Salmonella* spp., microrganismos que frequentemente apresentam resistência a antimicrobianos (WHO, 2017; BREIJYEH et al., 2020).

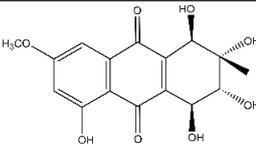
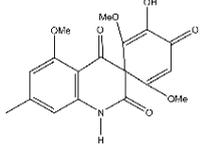
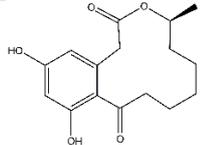
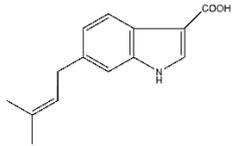
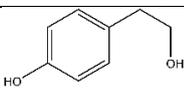
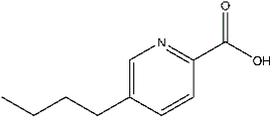
A resistência aos antimicrobianos não se limita somente às bactérias, mas também abrange fungos patogênicos. Leveduras do gênero *Candida* são tidos como importantes causadores de infecções invasivas e oportunistas, afetando principalmente pacientes imuno deprimidos, hospitalizados e com doenças crônicas. Dentre as espécies comumente pesquisadas, infecções por *Candida albicans* representam um problema clínico justificado pela resistência aos antibióticos disponíveis, assim o tratamento das candidemias prolongam a hospitalização e contribui para o aumento da taxa de mortalidades (SIDRIM et al., 2016; AITKEN-SAAVEDRA et al., 2018).

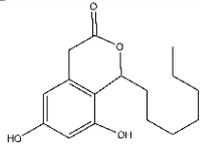
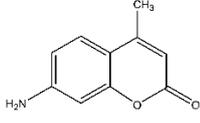
O surgimento de cepas resistentes obriga a tomada de medidas urgentes em escala internacional para a manutenção do paradigma moderno de tratamento com antibióticos (O'NEILL, 2014). Como resposta o G20 renovou seus compromissos com P&D em antibióticos no ano de 2019. O Grupo de Coordenação Interinstitucional sobre Resistência Antimicrobiana, convocado pelo Secretário-Geral das Nações Unidas, em seu relatório final, também identificou a necessidade de maior investimento em pesquisa e desenvolvimento de antibióticos e de se basear nos modelos alternativos existentes para desenvolver novos antibióticos (WHO, 2019). O desafio consiste na descoberta de novos agentes antibióticos não tóxicos a partir de fontes naturais.

A exemplo do que ocorreu na descoberta da penicilina, os fungos são excelentes candidatos para esse objetivo, principalmente aqueles que são pouco explorados. O crescente número de artigos em estudos com fungos endofíticos evidenciaram que os mesmos são produtores de antibióticos (tabela 2) contra vários microrganismos patogênicos, sobretudo aqueles que apresentam resistência. Comumente o protocolo

estabelecido na rotina laboratorial para encontrar novos antibióticos consiste na extração, isolamento, avaliação da atividade antibacteriana, purificação e determinação estrutural da molécula ativa. (DENG & YU, 2018). Como método avaliativo da atividade antibiótica, se utilizam várias técnicas dentre elas a microdiluição em caldo.

Tabela 2: Substâncias antibióticas isoladas de fungos endofíticos

Fungo	Estrutura	Planta hospedeira	Autor
<i>Ampelomyces</i> sp.	 <p>altersolanol A</p>	<i>Urospermum picroides</i>	ALY et al., 2008
<i>Aspergillus fumigatus</i>	 <p>asperfumoide</p>	<i>Cynodon dactylon</i>	LIU et al., 2004
<i>Cochliobolus</i> sp.	 <p>curvularina</p>	<i>Sapindus saponária</i>	ATAIDES et al., 2018
<i>Colletotrichum</i> sp.	 <p>ácido 6-isoprenil indol 3-carboxílico</p>	<i>Artemisia annua</i>	LU et al., 2000
<i>Diaporthe helianthi</i>	 <p>tirosol</p>	<i>Luehea divaricata</i>	SPECIAN et al., 2012
<i>Fusarium fujikuroi</i>	 <p>ácido fusárico</p>	<i>Paepalanthus chiquitensis</i>	HILÁRIO et al., 2017

<i>Phomopsis</i> sp.	 <i>citosporona c</i>	<i>Excoecaria</i> <i>Agallocha</i>	HUANG et al., 2008
<i>Xylaria</i> sp.	 7-amino-4- metilcumarina	<i>Ginkgo biloba</i>	LIU et al., 2008

2.3.3 Angiogênese

O processo de formação de novos vasos sanguíneos oriundos de vasos pré-existentes é chamado de angiogênese (TELEANU et al., 2020). O crescimento angiogênico do sistema vascular é um exemplo de coordenação rigorosa dos processos de proliferação, diferenciação, migração, adesão à matriz e sinalização célula-célula. O componente relevante desse sistema são as células endoteliais, as mesmas revestem a superfície interna dos vasos para apoiar o crescimento e o reparo dos tecidos (POTENTE et al., 2011). Assim os processos angiogênicos são regulados por estímulos quimiotáticos, haptotáticos e mecanotáticos, e envolve a degradação da matriz extracelular para permitir a progressão das células migratórias (LAMALICE et al., 2007).

O crescimento dos vasos é iniciado por um gradiente de fatores de crescimento pró-angiogênico, sendo o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) o mais caracterizado, este fator quando liberado em microambientes privados de oxigênio e nutrientes, acionam células endoteliais inativas para serem ativadas. Uma vez restaurada a vascularização tecidual, os níveis de fatores pró-angiogênicos diminuem e as células endoteliais restabelecem seu fenótipo quiescente. As células endoteliais quiescentes tornam-se altamente interconectadas através de proteínas de junção que fortalecem mecanicamente a parede dos vasos e criam uma barreira permeável (ARROYO & IRUELA-ARISPE, 2010; EELEN et al., 2020).

Por outro lado, a angiogênese patológica está intimamente associada a quase todas as principais doenças que afetam a vida humana (SLEVIN 2011). A manutenção malsucedida em relação a diminuição ou crescimento excessivo dos vasos podem resultar em graves problemas de saúde. No trabalho feito por Fallah e colaboradores (2019) foram listadas diversas doenças dependentes da angiogênese (quadro 2).

Anormalidade	Doença
Múltiplos órgãos	Câncer, doenças infecciosas, doenças auto-imunes
Vasos sanguíneos	Más formações vasculares, síndrome de DiGeorge, HHT, hemangioma cavernosa aterosclerose, arteriopatia de transplante
Tecido adiposo	Obesidade, perda de peso por inibidores de angiogênese
Pele	Psoríase, verrugas, dermatite alérgica, queiloide de cicatrizes, granulomas piogênicos, doença vesical, sarcoma de Kaposi em pacientes com AIDS
Ocular	Síndrome vítrea hiperplásica persistente, retinopatia diabética, retinopatia da prematuridade, neovascularização coroide
Pulmonar	Hipertensão pulmonar primária, asma pólipos nasais
Intestinal	Doença inflamatória intestinal e periodontal, ascite, aderências peritoneais
Sistema reprodutivo	Endometriose, sangramento uterino, cistos ovarianos, hiperestimulação ovariana
Óssea e articular	Artrite, sinovite, osteomielite, formação de osteófitos

Quadro 2: doenças associadas a processo de angiogênese

O entendimento da angiogênese despertou esperanças no desenvolvimento de soluções terapêuticas (FOLKMAN, 1971). Com isso diversas terapias direcionadas a interferir no processo anti-angiogênico e pró-angiogênico foram elaboradas especialmente tendo como alvo a descoberta de novos medicamentos (FOLKMAN, 2007). Mas ainda assim a necessidade de moléculas que interfiram nesses processos é o foco de muitas pesquisas e investimentos em todo o mundo (FERRARA & KERBEL, 2005).

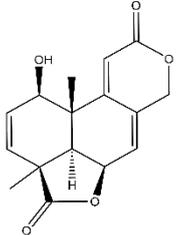
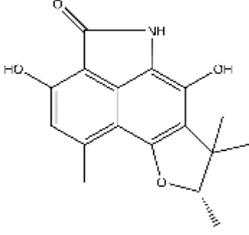
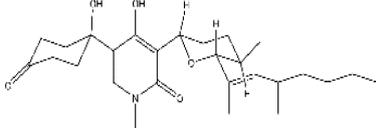
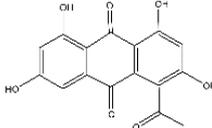
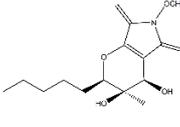
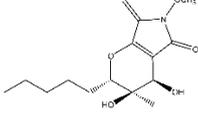
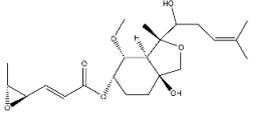
Pesquisas focadas na prospecção de produtos naturais como inibidores são estrategicamente atraentes e eficazes para suprimir a progressão neoplásica representando uma alternativa de combate ao câncer (KHALID et al., 2016). Mais de 300 moléculas antiangiogênicas foram relatadas. Porém, a maioria dessas moléculas tem baixa eficácia e alta toxicidade, aumentando assim a demanda por estruturas que tenha maior segurança terapêutica (HULIKERE et al., 2016).

As bioatividades exibidas por substâncias naturais são reconhecidas como soluções terapêuticas de grande valor para tratamento e cura de doenças. Nas últimas décadas os fungos endofíticos, até então um grupo microbiano pouco explorado, demonstrou competência biotecnológica para produção de moléculas bioativas. Com enfoque angiogênico ainda se nota poucos estudos, entretanto algumas pesquisas confirmam o potencial desses microrganismos através de ensaios com extratos e substâncias (Tabela 3), o que torna esses microrganismos indispensáveis para a prospecção de moléculas com atividade anti ou pró angiogênica.

O rastreamento e avaliação *in vitro* da atividade anti ou pró angiogênica lança mão de diversas metodologias, variando de acordo com objetivo do estudo. Dentre essas técnicas está incluso o ensaio com membrana corioalantoica (CAM). Este ensaio tem suas vantagens focadas na: (I) natureza altamente vascularizada promovendo muito a eficiência do enxerto de células tumorais; (II) alta reprodutibilidade; (III) simplicidade e relação custo-benefício (IV) Ensaio de um sistema fechado (THAMILARASHI et al., 2014).

A membrana corioalantoica é constituída por um epitélio multicamada; pelo ectoderma na interface aérea, e mesoderma e endoderme na interface com o saco alantóico (VALDES et al., 2002). Além do mais a membrana contém proteínas da matriz extracelular, como fibronectinas, lamininas, colágeno tipo I e integrina $\alpha\beta_3$ (GIANNOPOULOU et al., 2001). A presença dessas proteínas da matriz extracelular imita o ambiente fisiológico das células cancerígenas (LOKMAN et al., 2012).

Tabela 3: Substâncias anti angiogênicas isoladas de fungos endofíticos associados a algas

Fungo	Estrutura	Autor
<i>Asperolide wentii</i>	 <p data-bbox="703 607 879 640">asperolide A</p>	LV et al., 2013
<i>Coniothyrium cereale</i>	 <p data-bbox="703 904 879 938">cereolactama</p>	ELSEBAI et al., 2011
<i>Fusarium oxysporum</i>	<p data-bbox="703 1005 879 1039">beauvericina</p>  <p data-bbox="692 1196 901 1229">oxisporidinona</p>  <p data-bbox="667 1386 911 1420">rodolamprometrina</p>	ZHAN et al., 2007
<i>Phaeosphaeria avenaria</i>	 <p data-bbox="687 1572 900 1606">feosphaerides A</p>  <p data-bbox="687 1740 900 1774">feosphaerides B</p>	MALONEY et al., 2006
<i>Phoma</i> sp.	 <p data-bbox="683 1908 900 1942">phomacetideo D</p>	LEE et al., 2016

2.4 Planta hospedeira *Palicourea corymbifera*

Rubiaceae é uma das cinco famílias de plantas com maior número de espécies, possui 3 subfamílias, 65 tribos, 611 gêneros e aproximadamente 13.150 espécies. No Brasil existem cerca de 1.400 espécies divididas em 126 gêneros, dentre os quais o gênero *Palicourea* está inserido.

O Gênero *Palicourea* Aubl., consiste em cerca de 250 espécies de arbustos e árvores pequenas, cuja ocorrência abrange desde a América do Sul, América Central até o sul do México. No Brasil são encontradas 106 espécies, das quais 34 são endêmicas, com distribuição em todas as regiões no território nacional.

São relatadas propriedades tóxicas e medicinais em algumas espécies desse gênero, características que motivaram diversos estudos. Cragg e colaboradores (2006), em seu levantamento bibliográfico qualificaram a potencialidade de espécies do gênero *Palicourea* como “hot” para atividade anticancerígena, sendo conferida tal classificação devido a presença de substâncias bioativas. Outros estudos comprovaram a ocorrência de distintos metabólitos secundários tais como alcaloides, cumarinas e flavonoides.

O estudo realizado por Moraes (2017) verificou que dentre os distintos metabólitos (figura 2) isolados do gênero *Palicourea*, majoritariamente os alcaloides são mais frequentes (37%) sendo eles pirroloindólicos e principalmente os indólicos monoterpênicos que representam 33% do total das estruturas isoladas. Em seguida estão os ésteres aromáticos (11%), terpenos (9%), ácidos aromáticos (9%), flavonoides (6%), cumarinas (5%), ciclotídeos (4%), esteroides (4%), substâncias fluoradas (4%), e demais substâncias (11%).

Nos últimos dez anos de acordo com a plataforma de pesquisa *Scifinder* foram publicados cerca de 70 trabalhos com espécies do gênero *Palicourea* (figura 3).

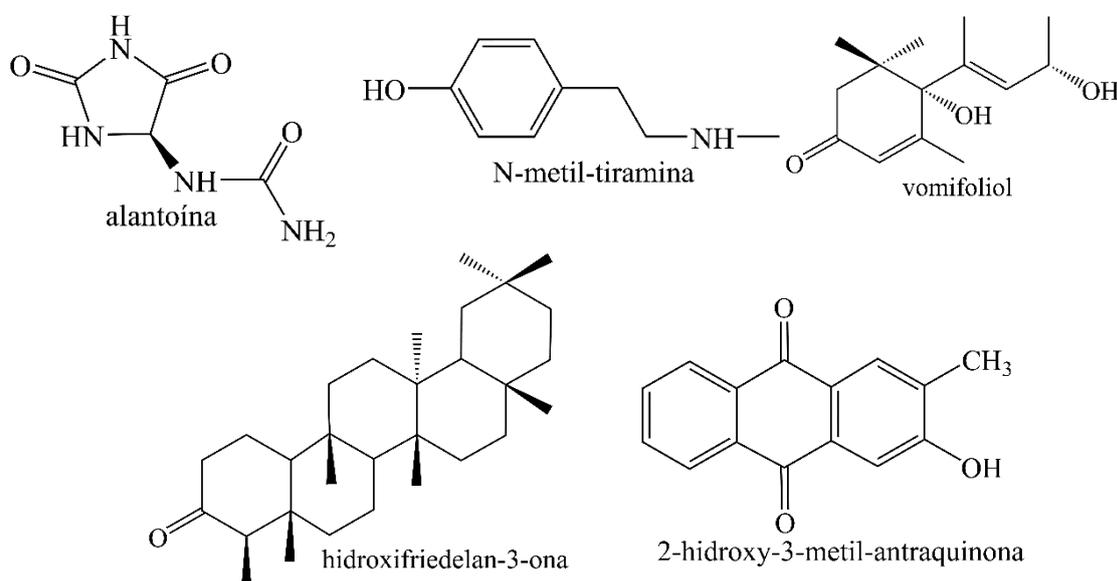


Figura 2: Metabólitos secundários encontrados em algumas espécies de *Palicourea* 36

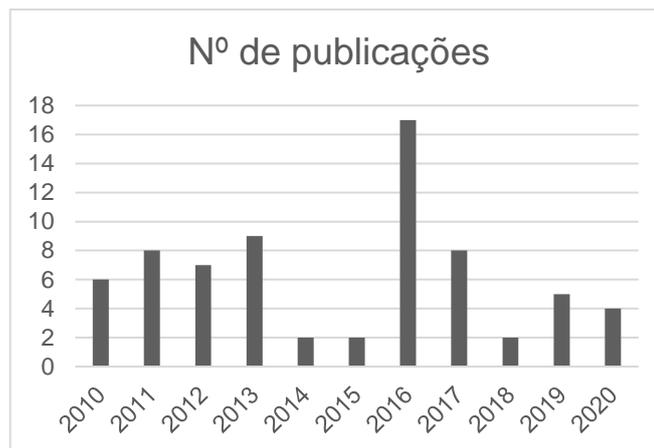


Figura 3: Publicações relacionadas ao gênero *Palicourea* na última década

As substâncias presentes no gênero *Palicourea* demonstram atividades biológicas relevantes, com potenciais soluções de problemas de saúde, exibindo propriedades antiproliferativas, antineoplásicas e antimicrobianas. As espécies do gênero *Palicourea* consistem em possíveis fábricas biológicas de metabólitos secundários com possível aplicação biotecnológica.

Quando se tem a pretensão de trabalhar com fungos endófitos, o histórico químico e as atividades biológicas da planta hospedeira são fatores cruciais. A exemplo disso, a espécie *Palicourea corymbifera* (figura 4) apresentou notória toxicidade para animais em testes *in vivo*, e vários metabólitos secundários com potencial farmacológico já foram relatados, tais como: terpenos e alcaloides (DE ASSIS et al., 2006; DIAS SOUZA et al., 2013). Tais características tornam essa espécie química e biologicamente interessante, e motivam o isolamento de fungos endofíticos para bioprospecção de moléculas bioativas. Visando principalmente transformar potencialidade biotecnológica em realidade e assim fortalecer ainda mais o setor biotecnológico na região amazônica. Essa pesquisa visa obter substâncias com aplicação clínica e agrícola.

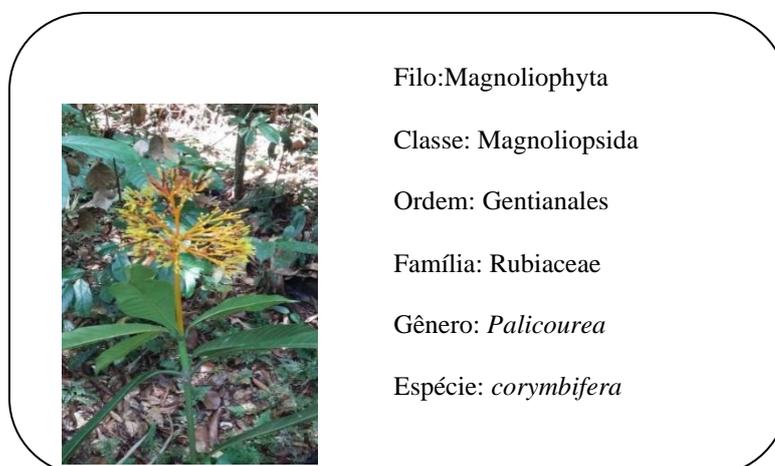


Figura 4: *Palicourea corymbifera*

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar o potencial biotecnológico dos fungos endofíticos isolados de *Palicourea corymbifera* quanto a produção de substâncias bioativas.

3.2 Objetivos específicos

- Obter os fungos endofíticos de *Palicourea corymbifera*;
- Identificar e cultivar fungos que produzem extratos contendo componentes químicos de interesse
- Obter extratos e avaliar composição química dos mesmos;
- Descobrir extratos e substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade antimicrobiana, antiangiogênica e fitotóxica
- Isolar, identificar ou elucidar as estruturas de substâncias bioativas;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material vegetal

A coleta do material vegetal de *Palicourea corymbifera* foi realizada em setembro de 2015 ($2^{\circ}56'58.2''S$ $59^{\circ}57'43.1''W$), na Reserva Florestal Adolpho Ducke (figura 5) localizada no Km 26 da Estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010). Foram coletadas folhas saudáveis e de boa qualidade fitossanitária, as mesmas foram transportadas até o Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia vinculado ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) para serem processadas. As exsiccatas foram depositadas no herbário do INPA, com número de depósito: 277853. O estudo foi registrado no SISGEN sob o número: AD747A7.



Figura 5: Área de coleta; reserva florestal Adolpho Ducke

4.2. Isolamento dos fungos endofíticos

Para o isolamento foram preparados meios de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e Ágar Sabouraud (SB). Os meios juntamente com outros materiais (cabos de bisturi, pinças, béqueres, placas de Petri) foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Antes do procedimento de desinfestação, as folhas foram submetidas a uma pré-desinfestação sendo lavadas com sabão neutro em água corrente. Posteriormente iniciou-se a etapa de desinfestação, realizada em cabine de segurança biológica. As etapas de desinfestação foram: Imersão em álcool 70% (1 minuto), hipoclorito 2,5% (4 minutos), álcool 70% (1 minuto), e por fim as folhas foram lavadas 3 vezes em água destilada estéril.

Após a desinfestação as folhas foram cortadas com auxílio de bisturi e pinça em pequenos fragmentos. Os fragmentos obtidos foram inoculados em placas de Petri contendo meio BDA e SB acrescidas de antibiótico oxitetraciclina [125 µg/mL], sendo posteriormente incubados em estufa de crescimento microbiano a 30 °C.

Passadas 48 horas de inoculação dos fragmentos, foi possível iniciar o isolamento das colônias que cresciam. Individualmente estas foram repicadas para novos meios de cultura (BDA ou SB) a fim de realizar a purificação dos morfotipos. O tempo total de isolamento foram sete dias, posteriormente os isolados foram conservados através de duas metodologias distintas:

Método Castelani: pequenos blocos da associação de micélio/Agar foram colocados em frascos de vidro contendo água destilada estéril, estes foram mantidos em recipiente adequado a temperatura ambiente.

Criopreservação: um fragmento do micélio de cada fungo foi transferido para uma solução contendo caldo nutriente e glicerol a 20% v/v, e mantidos em ultrafreezer a -80 °C.

4.3. Triagem química dos fungos de interesse

Os fungos isolados foram cultivados em dois meios de cultura distintos, para os fungos crescidos em BDA foram inoculados em batata dextrose caldo, acrescido de 0,2% de extrato de levedura (BDL), e para os fungos isolados em SB foram inoculados em sabouraud dextrose caldo, também com 0,2% de extrato de levedura (SBL). Para cada fungo, utilizou-se Erlenmeyer de 500 mL, contendo 300 mL de meio de cultura. Os erlenmeyers foram acondicionados em incubadora de bancada a 30 °C com agitação, de 120 rpm, por um período de 20 dias.

Após o período de crescimento estabelecido, os caldos fermentados foram separados da massa micelial por filtração a vácuo, para posterior realização das extrações. Os procedimentos estão descritos no item 4.5.

O critério de escolha dos fungos de interesse foi baseado nas análises químicas dos extratos tanto dos micélios como dos caldos, através de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H). Os parâmetros observados nos dois métodos supracitados se referem a presença de metabólitos secundários nos extratos sendo eles; alcaloides, terpenos, esteroides, substâncias fenólicas. Somente os fungos produtores dessas classes químicas foram selecionados para o aumento de biomassas e também para identificação taxonômica, realizada pela Fundação Oswaldo Cruz.

4.4 Cultivo com maior número de repetições

Para obtenção de maior quantidade de biomassa dos fungos selecionados foi realizado o cultivo com maiores números de repetições usando os meios líquidos: caldo sabouraud com 0,2% de extrato de levedura (SBL), caldo de batata com 0,2% de extrato de levedura (BDL) e GYP modificado (glicose 0,2%, extrato de levedura 0,5%, peptona 1%). Foram utilizados 12 frascos erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL de meios de cultura, os frascos foram acondicionados em incubadora orbital *shaker* a 30 °C, com agitação de 120 rpm durante 20 dias. Após o tempo de crescimento foi realizada a obtenção dos extratos de micélio e caldos fermentados.

4.5. Obtenção dos extratos orgânicos

4.5.1 Extração dos micélios

A massa micelial de cada fungo foi seca, posteriormente para a obtenção dos extratos, seguiu-se a extração em banho ultrassom por vinte minutos com solventes orgânicos em ordem de polaridade crescente (diclorometano, acetato de etila e metanol) as extrações foram repetidas três vezes para cada solvente (figura 6).

4.5.2 Extração dos caldos

Os caldos foram liofilizados a fim de diminuir o volume, posteriormente foram submetidos à partição líquido-líquido utilizando solventes orgânicos (diclorometano e acetato de etila) em ordem de polaridade crescente na proporção de 1:1 v/v. A extração foi feita em funil de separação (1000 mL) e repetida três vezes para cada solvente (figura 7). Os extratos orgânicos tanto dos caldos quanto dos micélios foram concentrados em rota evaporador e posteriormente secos em capela de exaustão de gases.

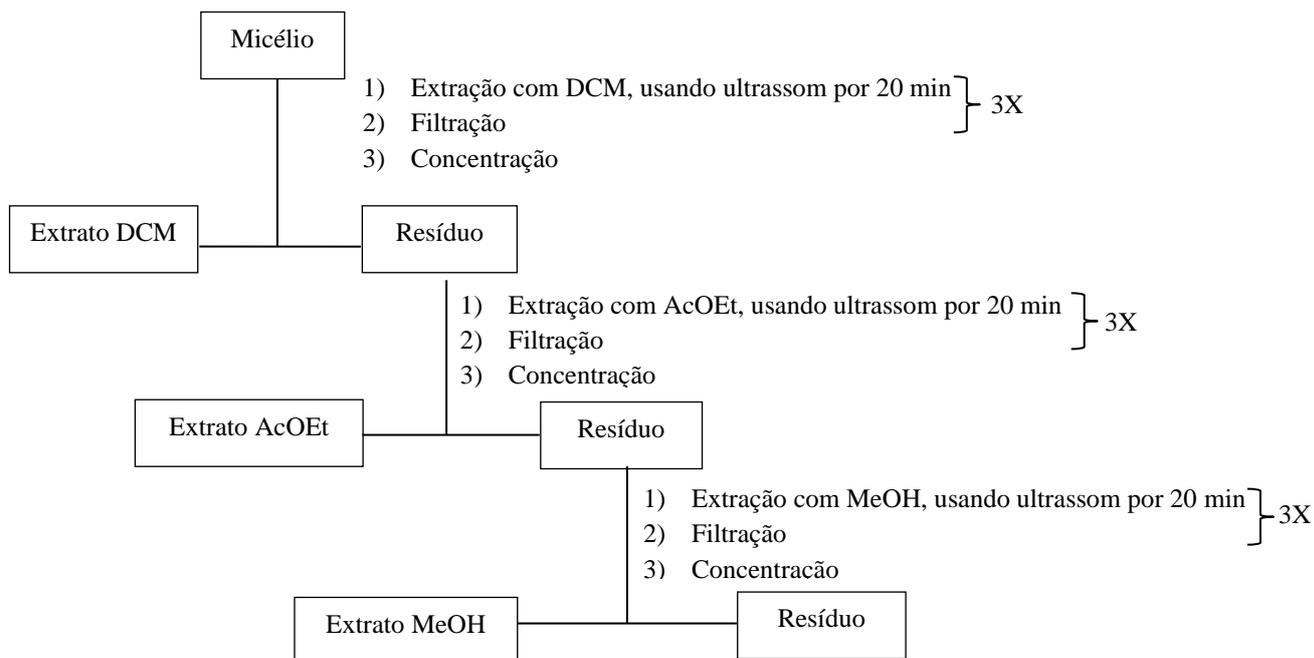


Figura 6: Fluxograma para obtenção dos extratos dos micélios

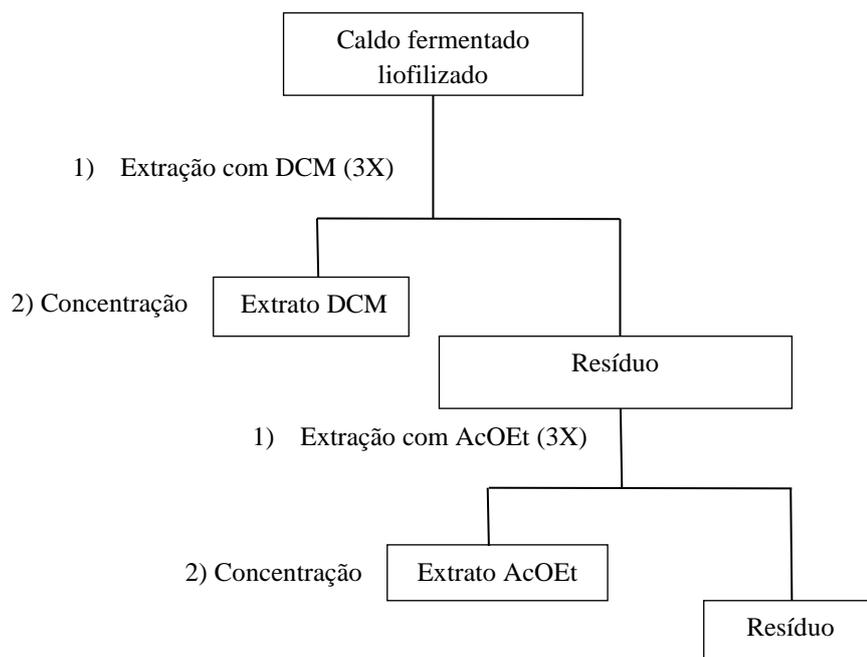


Figura 7: Fluxograma para obtenção de extratos dos caldos fermentados

4.6 Análises químicas

4.6.1. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

As análises químicas iniciais dos extratos foram realizadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), empregando cromatofolhas de alumínio com sílica

gel impregnado com indicador de fluorescência UV₂₅₄ (Alugram SIL G/UV₂₅₄). As amostras foram aplicadas nas cromatoplasas e eluídas com solventes orgânicos em diferentes proporções de acordo com a polaridade das amostras. Foram utilizados reveladores físicos: luz ultravioleta (λ 254 e 365 nm), e reveladores químicos: iodo ressublimado, sulfato cérico, cloreto férrico, cloreto de alumínio, anisaldeído sulfúrico e reagente de Dragendorff.

As análises em CCDC serviram de base para a escolha do método cromatográfico de fracionamento, quanto à fase estacionária e dos eluentes mais eficientes na separação dos extratos. Tais análises também auxiliaram na observação quanto a classe de metabólitos secundários de interesse; alcaloides, terpenos, substâncias fenólicas, esteroides.

4.7 Análises espectroscópicas

4.7.1 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ¹H, ¹³C uni e bidimensionais foram realizados no espectrômetro Bruker Fourier 300, operando em 300 MHz para o núcleo de ¹H e em 75 MHz para o núcleo de ¹³C. Solvente deuterado foi utilizado para dissolver as amostras e como padrão interno foi utilizado o tetrametilsilano (TMS). As análises foram realizadas na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN) do INPA.

4.7.2 Espectrometria de massas

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas modelo UltrOTOFG (ESI-TOF Mass Spectrometer, Bruker Daltonics), operando no modo positivo ou negativo.

4.7.3 Fracionamento dos extratos

Extrato AcOEt de caldo do Fungo *Xylaria* sp. 1 cultivado em SBL

Fracionamento do Fungo *Xylaria* sp. 1 cultivado em meio líquido sabouraud (3,6 litros) acrescido com extrato de levedura (0,2%). Na figura 10 é apresentada as etapas de fracionamento para obtenção das substâncias 1 e 2. Os sistemas de eluição assim como as frações coletadas estão demonstradas na tabela 4.

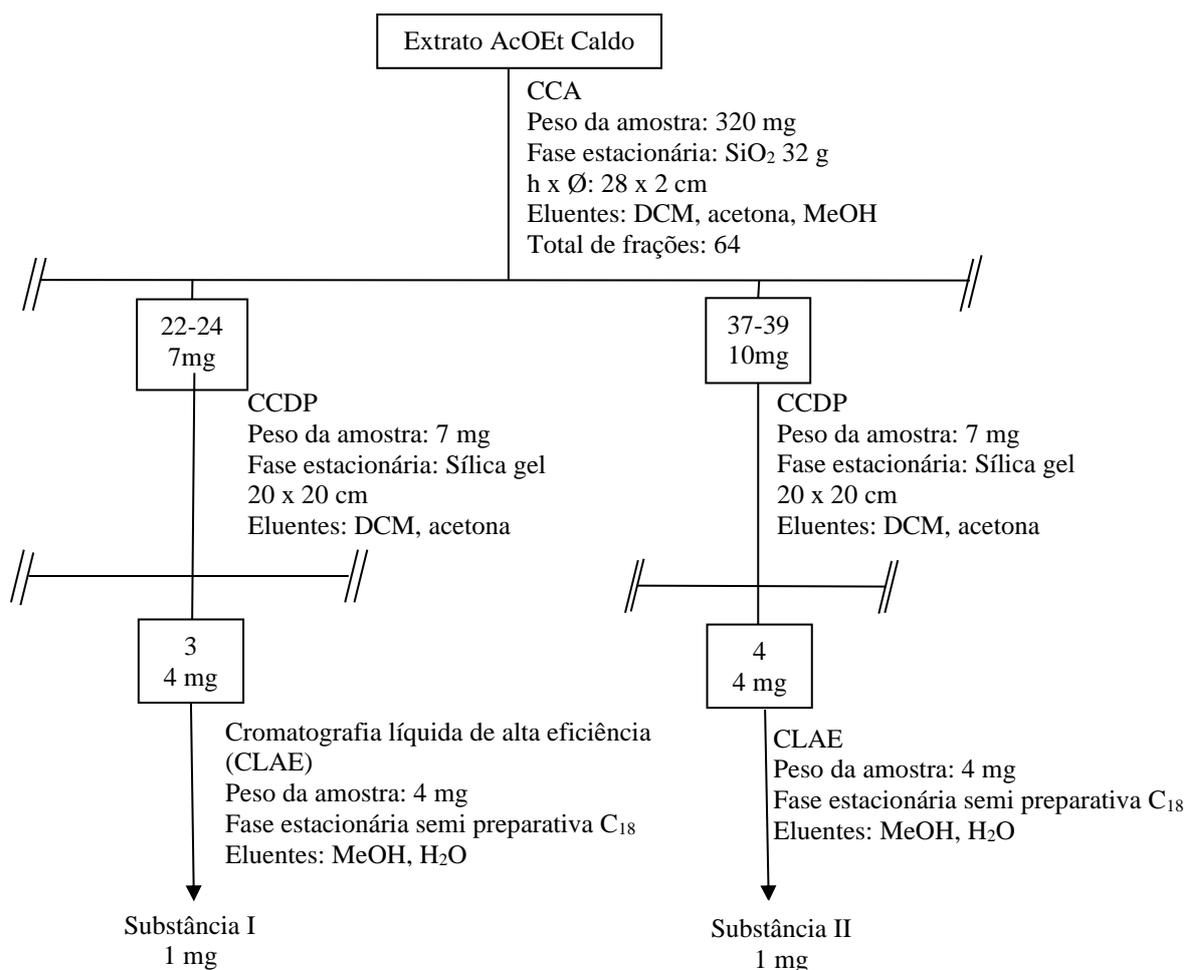


Figura 8: Fluxograma de fracionamento para obtenção das substâncias I e II

Tabela 4: Sistemas de eluição e frações obtidas da coluna cromatográfica do extrato AcOEt do caldo fermentado (*Xylaria* sp.1)

Cromatografia em coluna aberta	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM 100%	1-6
DCM/ acetona 9:1	7-21
DCM/ acetona 8:2	22-25
DCM/ acetona 7:3	26-32
DCM/ acetona 6:4	33-37
DCM/ acetona 1:1	38-42
DCM/ acetona 1:9	43-45
acetona 100%	46-48
MeOH/ acetona 9:1	49-51
DCM/ acetona 1:1	52-61
MeOH 100%	62-64

As frações 22-24 foram reunidas e refractionadas em cromatografia em camada delgada preparativa, utilizando o sistema de eluição DCM/acetona 95:5 (co-eluída 3

vezes) e revelada em ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm. Foram coletadas 3 frações (considerando da porção superior a inferior da placa). Sendo a fração 3 submetida a cromatografia líquida de alta eficiência, para isolamento da substância 1.

As frações 37-39 foram reunidas e refractionadas em cromatografia em camada delgada preparativa, utilizando o sistema de eluição DCM/acetona 95:5 (co-eluída 3 vezes) e revelada em ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm. Foram coletadas 4 frações (considerando da porção superior a inferior da placa). Sendo a fração 4 submetida purificação via cromatografia líquida de alta eficiência, para a obtenção da substância 2.

Extrato DCM de micélio do fungo *Xylaria* sp. 2 cultivado em meio BDL

Fracionamento fungo *Xylaria* sp. 2 cultivo em meio líquido batata dextrose (300 mL) acrescido com extrato de levedura (0,2%). Na figura 11 são apresentadas as etapas de fracionamento para obtenção da substância 3. Os sistemas de eluição assim como as frações coletadas estão demonstradas na tabela 5.

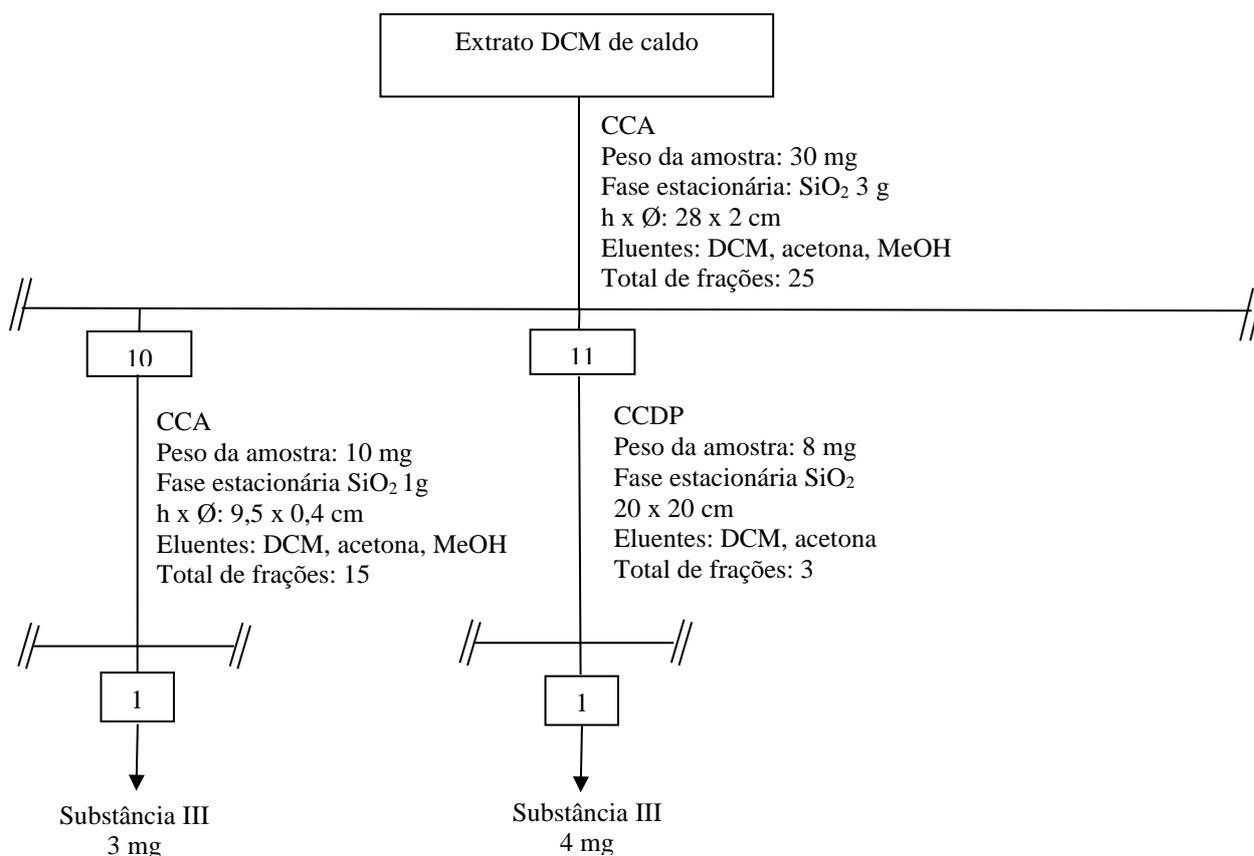


Figura 9: Fluxograma do fracionamento para obtenção da substância III

Tabela 5: Sistemas de eluição e frações obtidas do extrato DCM do caldo fermentado (*Xylaria* sp.2)

Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM 100%	1-3
DCM/ MeOH 98:2	4-5
DCM/ MeOH 95:5	6-11
DCM/ MeOH 9:1	12-18
DCM/ MeOH 85:15	19-21
DCM/ MeOH 8:2	22
DCM/ MeOH 1:1	23-24
MeOH 100%	25

Após as análises das frações por CCDC concluiu-se que as frações 10 e 11 foram interessantes, a fração 10 foi refrações nos sistemas de eluição utilizados e as frações coletadas estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Sistemas de eluição e frações obtidas da fração 10 do extrato DCM (*Xylaria* sp2).

Cromatografia em coluna aberta (F10)	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM 100%	1-3
DCM/Acetona 98:2	4-8
DCM/Acetona 96:4	9-10
DCM/Acetona 9:1	11-12
DCM/Acetona 8:2	13-4
DCM/Acetona 7:3	14-15

A fração 11 foi refrações em cromatografia em camada delgada preparativa, utilizando o sistema de eluição DCM/MeOH 98:2 (co-eluída 3 vezes) e revelada em ultravioleta com comprimento de onda de 365 nm. Foram coletadas 3 frações (considerando da porção superior a inferior da placa), sendo a primeira fração referente a substância 3.

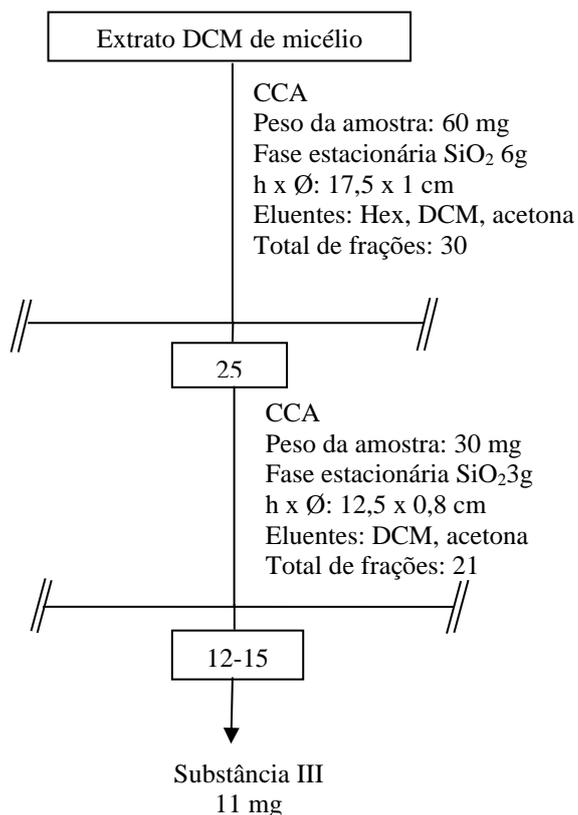


Figura 10: Fluxograma do fracionamento para obtenção da substância III

Tabela 7: Sistemas de eluição e frações obtidas do extrato DCM de micélio (*Xylaria* sp.2)

Cromatografia em coluna aberta	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
Hex/DCM 3:7	1-12
Hex/DCM 2:8	13-14
Hex/DCM 1:9	15-16
DCM 100%	17-22
DCM/acetona 95:5	23-27
DCM/acetona 9:1	28
DCM/acetona 8:2	29
DCM/acetona 7:3	30

Tabela 8: Sistemas de eluição e frações obtidas da fração 25 do extrato DCM de micélio

Cromatografia em coluna aberta (F25)	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM 100%	1-3
DCM/acetona 98:2	4-7
DCM/acetona 96:4	8-11
DCM/acetona 94:6	12-14
DCM/acetona 92:8	15-18
DCM/acetona 9:1	19
DCM/acetona 8:2	20
DCM/acetona 7:3	21

Extrato AcOEt de micélio do fungo *Xylaria* sp. 2 cultivado em meio SBL

Fracionamento: *Xylaria* sp. 2 cultivado em meio líquido sabouraud acrescido (3, 6 litros) com extrato de levedura (0,2%). A figura 13 demonstra as etapas de fracionamento para obtenção da substância 3. Os sistemas de eluição assim como as frações coletadas estão demonstradas na tabela 9.

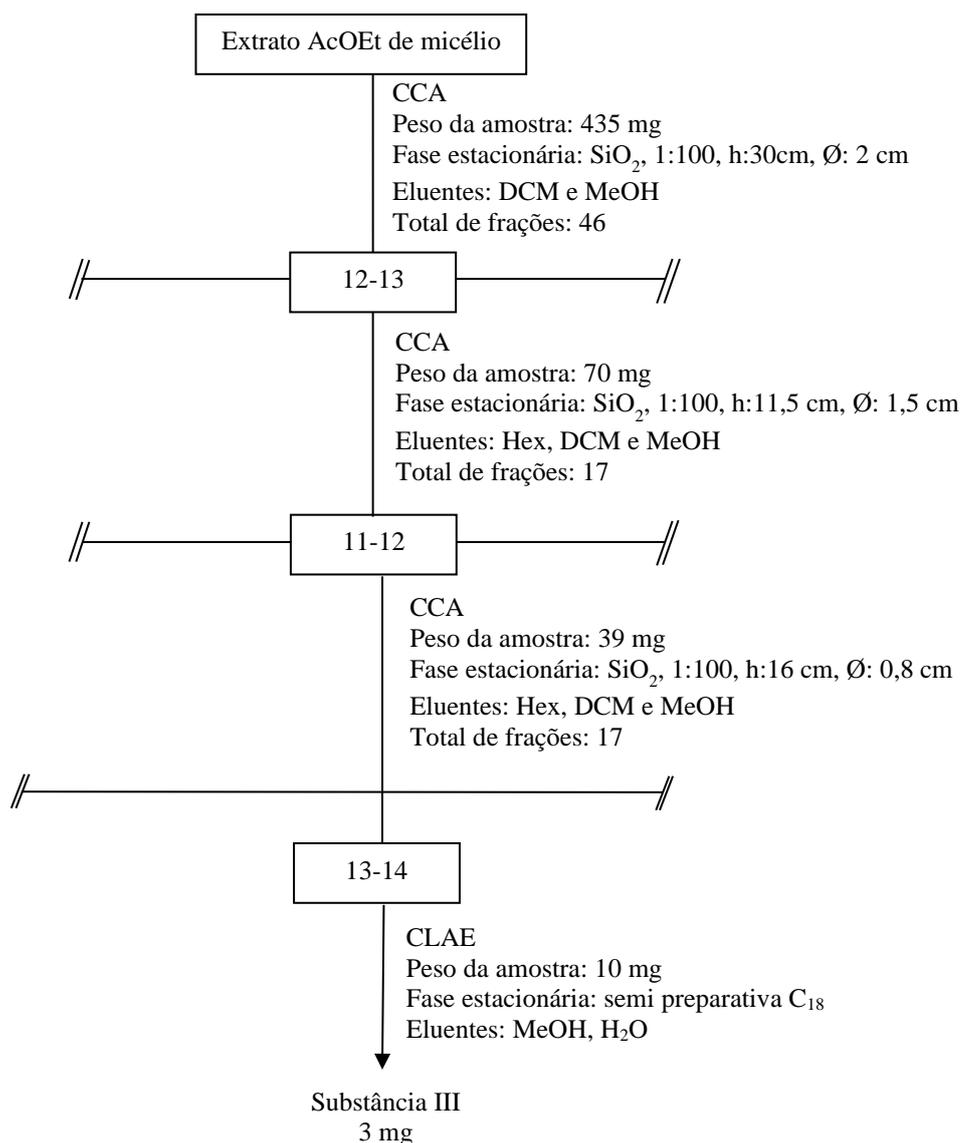


Figura 11: Fluxograma do fracionamento para obtenção da substância III

Tabela 9: Sistemas de eluição e frações obtidas do extrato AcOEt de micélio (*Xylaria* sp. 2)

Cromatografia em coluna aberta	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM 100%	1-3
DCM/MeOH 95:5	4-20
DCM/MeOH 9:1	21-26
DCM/MeOH 8:2	27-35
DCM/MeOH 7:3	36-41
DCM/MeOH 1:1	42-43
MeOH 100%	44-46

As frações 12-13 se demonstraram interessantes e foram refracionadas, os sistemas de eluição e as frações obtidas estão apresentadas na tabela 10.

Tabela 10: Sistemas de eluição e frações obtidas das frações 12-13 extrato AcOEt de micélio (*Xylaria* sp. 2)

Cromatografia em coluna aberta (F12-13)	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
Hex/DCM 2:8	1-3
Hex/DCM 1:9	4-6
DCM 100%	7-9
DCM/MeOH 98:2	10-14
DCM/MeOH 95:5	15-16
MeOH 100%	17

As frações 11-12 resultante do refracionamento das frações (12-13), foram interessantes, então foram reunidas e refracionadas, dando origem as frações 13-16 estas foram submetidas a purificação em CLAE, onde foi obtida a substância 3. Os sistemas de eluição assim como as frações coletadas estão apresentadas na tabela 11.

Tabela 11: Sistemas de eluição e frações obtidas das frações 11-12 extrato AcOEt de micélio (*Xylaria* sp. 2)

Cromatografia em coluna aberta (F11-12)	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
Hex/DCM 1:9	1-2
DCM 100%	3-8
DCM/MeOH 98:2	9-16
MeOH 100%	17

Extrato AcOEt de micélio do Fungo *Coletotrichum dianesei* cultivado SBL

Fracionamento do extrato AcOEt de micélio de *C. dianesei* cultivado em meio líquido (3,6 litros) sabouraud acrescido com extrato de levedura (0,2%). A figura 12 demonstra as etapas de fracionamento para a obtenção da substância 5. Os sistemas de eluição, assim como as frações coletadas estão apresentadas na tabela 12

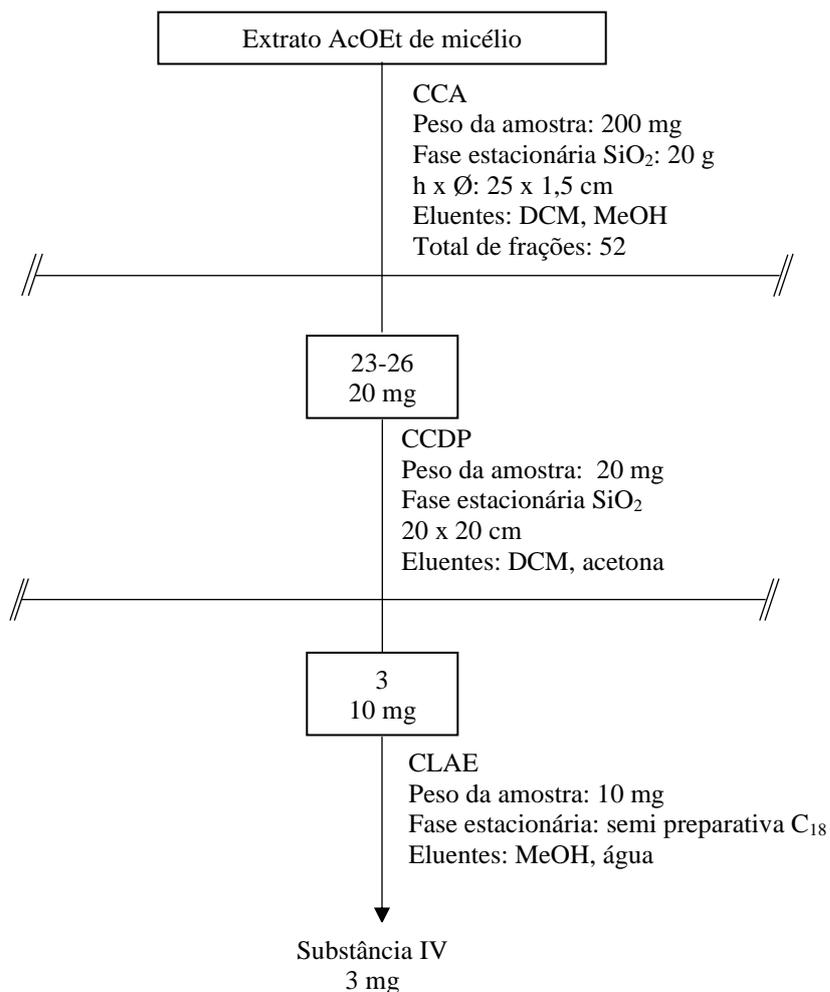


Figura 12: Fluxograma de fracionamento para obtenção da substância IV

Tabela 12: Sistemas de eluição e frações obtidas para o extrato AcOEt de micélio (*C. dianesei*)

Cromatografia em coluna aberta	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
Hex/DCM 100%	1-9
DCM/MeOH 98:2	10-20
DCM/MeOH 96:4	21-22
DCM/MeOH 94:6	23-26
DCM/MeOH 92:8	27-29
DCM/MeOH 9:1	30-32
DCM/MeOH 8:2	33-35
DCM/MeOH 7:3	36-38
DCM/MeOH 6:4	39-40
DCM/MeOH 1:1	41-47
MeOH 100%	48-52

As frações 23-26 foram reunidas e refractionadas em cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando o sistema de eluição DCM/acetona 95:5 (co-eluída 4 vezes) e revelada em ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm. Foram coletadas 3 frações (considerando da porção superior a inferior da placa). A fração 3 três foi purificada em CLAE e foi obtida a substância 4.

Fase AcOEt do extrato MeOH de micélio do fungo *C. dianesei* cultivado em GYP

Do fungo *C. dianesei* cultivado em meio líquido GYP modificado (3,6 litros) foi obtido o extrato MeOH (0,717 g) este foi solubilizado em uma solução hidrometanólica 1:1 v/v (1 grama de amostra para 50 mL de solução) posteriormente a solução foi transferida para um funil de separação onde se utilizou AcOEt para realizar a extração na proporção de 1:1 v/v. extração repetida 3 vezes. A figura 15 demonstra as etapas de fracionamentos para a obtenção da substância 5. Os sistemas de eluição utilizados assim como as frações coletadas estão apresentados na tabela 13.

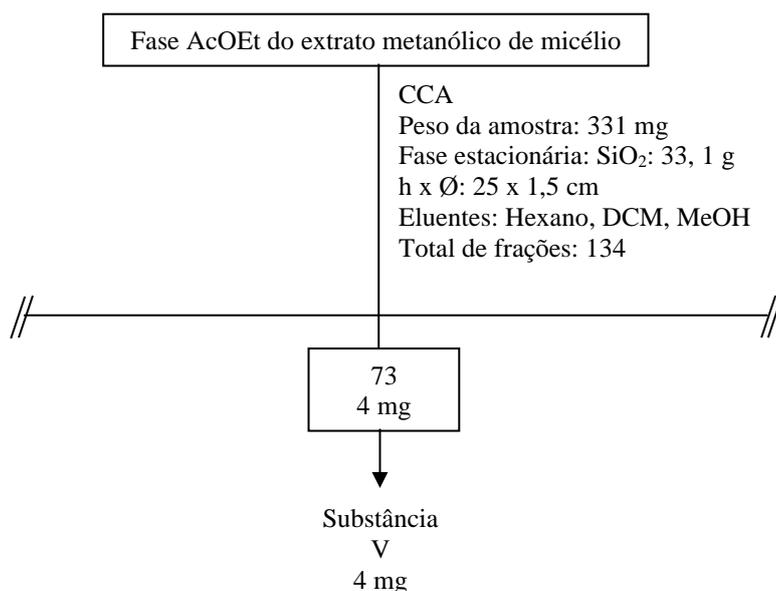


Figura 13: Fluxograma de fracionamento para obtenção da substância V

Tabela 13: Sistemas de eluição e frações obtidas para a fase AcOEt de extrato metanólico de micélio (*C. dianesei*)

Cromatografia em coluna aberta	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
Hex/DCM 2:8	1-19
Hex/DCM 1:9	20-33
DCM 100%	34-62
DCM/MeOH 98:2	63-73
DCM/MeOH 95:5	74-97
DCM/MeOH 9:1	98-103
DCM/MeOH 8:2	104-110
DCM/MeOH 7:3	111-123
DCM/MeOH 1:1	124-129
DCM/MeOH 3:7	130-134

4.8 Ensaios biológicos

4.8.1 Ensaio da Atividade antibacteriana por diluição em caldo

Para a avaliação do potencial antimicrobiano, os extratos, fases e substâncias foram testados frente às seguintes cepas: *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Citrobacter freundii* (ATCC 13316), *Edwardsiella tarda* (ATCC 15947), *Escherichia coli* (ATCC 00310), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Morganella morgani* (ATCC 8019), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Serratia marcescens* (ATCC 13880), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990). As cepas foram escolhidas de acordo com sua importância clínica. O ensaio foi realizado segundo metodologia descrita por CLSI (2003).

As cepas utilizadas no ensaio foram cultivadas em meio líquido Mueller-Hinton e posteriormente diluídas no próprio meio até a concentração de 0,5 na escala de McFarland. Os extratos foram diluídos em dimetilssulfóxido (DMSO) nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL, e as substâncias nas concentrações de 125, 62,5, 31,2, 15,6, 7,8 µg/mL. Os micro-organismos foram inoculados em microplacas de 96 poços, em triplicata, juntamente com as diferentes diluições dos extratos/substâncias, posteriormente foi realizada a leitura inicial em espectrofotômetro tipo ELISA e depois as microplacas foram mantidas em estufa de crescimento microbiano a 30 ou 37 °C.

Passadas 24 horas foi realizada a leitura final e adicionado junto aos poços, 40 µL de revelador (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazóleo) aguardando 30 minutos em temperatura ambiente. Foi feita a seguinte observação: onde houve crescimento bacteriano os poços foram revelados em vermelho, e onde não houve crescimento, os poços permaneceram incolores. Foi feito o controle negativo (DMSO + micro-organismo), controle positivo (antibiótico + micro-organismo) e um controle de esterilidade do caldo (3 poços contendo apenas o caldo).

A medida da absorbância final foi diminuída pela inicial, e os valores obtidos submetidos a análise de variância simples (ANOVA) e comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Todas as análises foram executadas pelo programa GraphPad Prism (PRISM, 1994).

4.8.2 Ensaio da membrana corioalantoica (CAM)

A avaliação da atividade angiogênica dos extratos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Nguyen, Shing e Folkman (1994).

Ovos fertilizados da espécie *Gallus domesticus* foram incubados em uma incubadora automática e digital Chocmaster®, na posição horizontal, em temperatura de 37°C e sob umidade relativa do ar de 33%. Após 48 h de incubação (idade embrionária E2), uma pequena janela de 5 mm de diâmetro foi aberta na casca, na região onde a câmara de ar do ovo estará localizada e assim uma quantidade de cerca de 5 mL de clara foi retirada a fim de evitar a aderência dos embriões nas membranas ovulares.

Concomitantemente, outra janela foi aberta com aproximadamente 15 mm de diâmetro na região localizada acima da membrana corioalantoica. Com fita adesiva e fita isolante as janelas foram fechadas para minimizar a perda de umidade. Assim, os embriões foram incubados por mais 72 h para que alcançassem a fase embrionária de 6 dias (E6). Nesta fase, nos ovos abertos foram implantados os discos de metilcelulose adsorvidos com os extratos ou fases em estudo, exatamente no terço externo da membrana corioalantoica.

Novamente foi fechado o espaço aberto para implantar o disco, e a incubação continuou por mais 48 h, até que chegasse à idade embrionária de 8 dias (E8) de experimento, quando a avaliação da atividade angiogênica foi realizada.

Uma câmera fotográfica registrou imagens de cada ovo em triplicata. As imagens foram utilizadas para a contagem de vasos sanguíneos que interceptaram o disco e vasos

presentes em uma área de 0,9 cm. Os resultados foram expressos como percentual de vasos \pm desvio-padrão da média.

4.8.3 Avaliação da Atividade fitotóxica

Para este ensaio utilizou-se sementes de *Lactuca sativa* (alface). O experimento foi realizado em quadruplicata, e o teste foi conduzido em placas de Petri, onde cada placa recebeu 25 sementes (pré-esterilizadas, selecionadas por uniformidade de tamanho e distribuídas de maneira uniforme) da espécie alvo *L. sativa* com percentual médio de germinação de 97%. Foram utilizadas 4 placas com 25 sementes cada, totalizando 100 sementes por tratamento (BRASIL, 2009).

Para extratos utilizou-se [1000 $\mu\text{g/mL}$] e para substâncias [125 $\mu\text{g/mL}$]. Como substrato utilizou-se discos duplos de papel filtro, sendo a estes adicionado 2 mL da amostra solubilizada em água destilada estéril (SIMÕES et al., 2013). Como controle positivo foi utilizado 2,4 diclorofenoxiacético [125 $\mu\text{g/mL}$], controle negativo utilizou-se solvente de solubilização (MeOH) mais água.

As placas foram acondicionadas em sala de germinação com fotoperíodo de 16:8 horas dia/noite sob temperatura de 26 ± 2 ° C. A leitura para avaliação do percentual de germinação foi realizada diariamente e o critério utilizado foi a presença de protrusão radicular visível. Sendo o experimento concluído após três dias consecutivos sem ocorrer germinação.

Do total de sementes germinadas em cada placa de Petri, foram selecionados aleatoriamente 10 sementes. Três dias após a protusão radicular, foram efetuadas as medidas do comprimento radicular e da parte aérea de cada plântula.

Foi avaliado: PG - porcentagem de germinação (porcentagem de sementes germinadas em cada tratamento), IVG - índice de velocidade de germinação (número médio de sementes germinadas por dia em cada tratamento, expresso pela seguinte fórmula: $IVG = (G1 / N1) + (G2 / N2) + \dots + (Gn / Nn)$, onde: G1 = número de sementes germinadas na primeira contagem, N1 = número de dias decorridos até a primeira contagem, G2 = número de sementes germinadas na segunda contagem, N2 = número de dias decorridos até a segunda contagem, n = última contagem), e crescimento de parte aérea (hipocótilo/coleótilo) e radícula (MAGUIRE, 1962).

Os dados de germinação foram analisados pelo teste t ($p < 0,05$), e as medidas de crescimento foram geradas através da análise de variância simples (ANOVA) e

comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Todas as análises foram executadas pelo programa GraphPad Prism (PRISM, 1994).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento, seleção e identificação de fungos

Foram isolados 32 morfotipos, sendo 15 no meio de cultura batata dextrose ágar, e 17 no meio ágar sabouraud. Todos os fungos foram organizados e agrupados de acordo com as características macroscópicas exibidas pelas colônias.

Dos fungos submetidos a triagem química na qual foi considerada a presença de metabólitos secundários de interesse, foram selecionadas três cepas, sendo elas codificadas como: SB PC16, SB PC15, BD PC 15.

Os resultados da identificação taxonômica pelo método molecular feito pela análise de ITS realizado pela fundação Osvaldo Cruz. A partir das análises foi possível verificar que os fungos foram classificados como: *Colletotrichum dianesei* (SB PC16), *Xylaria* sp. (1) (SB PC 15) e *Xylaria* sp. (2) (BD PC 15). Em outros trabalhos na literatura esses gêneros já foram relatados, estabelecendo condição tanto endofítica como fitopatogena.

Morfotipos isolados em Ágar Sabouraud	Morfotipos isolados em Batata dextrose Ágar	Temperatura de crescimento
SB PC 1	BD PC 1	30 °C
SB PC 2	BD PC 2	30 °C
SB PC 3	BD PC 3	30 °C
SB PC 4	BD PC 4	30 °C
SB PC 5	BD PC 5	30 °C
SB PC 6	BD PC 6	30 °C
SB PC 7	BD PC 7	30 °C
SB PC 8	BD PC 8	30 °C
SB PC 9	BD PC 9	30 °C
SB PC 10	BD PC 10	30 °C
SB PC 11	BD PC 11	30 °C
SB PC 12	BD PC 12	30 °C
SB PC 13	BD PC 13	30 °C
SB PC 14	BD PC 14	30 °C
SB PC 15	BD PC 15	30 °C
SB PC 16		30 °C
SB PC 17		30 °C

Quadro 3: Fungos isolados de folhas de *Palicourea corymbifera*

Tabela: Massas das biomassas extraídas dos fungos endofíticos selecionados

Fungo	Massa dos metabólitos extraídos					
	Meio de cultivo	Extratos de micélio			Extratos dos caldos	
		DCM	AcOEt	MeOH	DCM	AcOEt
<i>C. dianesei</i>	SBL	0,431 g	0,845 g	1,698 g	0,201 g	0,4 g
	GYP	0,316 g	-	0,717 g (fase AcOEt 0,331 g)	-	0,331 g
<i>Xylaria</i> sp.1	SBL	0,269 g	0,210 g	3,698 g	0,301 g	0,320 g
<i>Xylaria</i> sp. 2	BDL	0,06 g	0,057 g	0,367	0,03 g	0,112 g
	SBL	0,803 g	0,435 g	3,6 g	-	-

5.2 Caracterização Química

5.2.1 identificação estrutural da substância I produzida por *Xylaria* sp. 1

A partir do fracionamento da fase AcOEt do caldo foi possível o isolamento da substância I via CLAE (Luna 5 μ C18, 100 A, 250 x 10 mm, volume de injeção 50 μ L, vazão 4,7 mL/minuto) utilizando metanol 30%, pH = 5, modo isocrático. A molécula apresentou tempo de retenção de 11 minutos, absorvendo nos comprimentos de onda de λ 280 nm e 254 nm, com rendimento de 1 mg. O espectro de RMN de ^1H é apresentado na figura 14.

O espectro de RMN de ^1H evidenciou deslocamentos na região dos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,65 (2H, *d*, $J = 8,3$ Hz) e δ_{H} 6,98 (2H, *d*, $J = 8,3$ Hz) (Figura 15) estando esses *ortho*-acoplados. Na região de hidrogênios metilênicos foram evidenciados sinais em δ_{H} 2,59 (2H, *t*, $J = 7,3$ Hz) e δ_{H} 3,51 (2H, *dd*, $J = 12,4$ e 7,3 Hz). Foi possível notar um sinal em δ_{H} 9,16, referente à hidroxila, além disso também foi notório um deslocamento químico em δ_{H} 4,6 (*t*, $J = 5,0$ Hz), referente ao grupo NH_2 .

No espectro de ^{13}C -RMN (figura 16) foi possível identificar a presença de oito carbonos, sendo atribuíveis a seis carbonos aromáticos e dois carbonos metilênicos. Os carbonos em δ_{C} 115,37; δ_{C} 130,13 e δ_{C} 156,88 e os hidrogênios na região de δ_{H} 6,65 e δ_{H} 6,98 sugerem a presença de um fenol isolado na molécula. Os carbonos evidenciados pelo RMN de ^{13}C foram confirmados pelos mapas de correlação HSQC e HMBC (Figura 17, 18 e 19). As correlações entre os hidrogênios são apresentadas pelo COSY na figura 20.

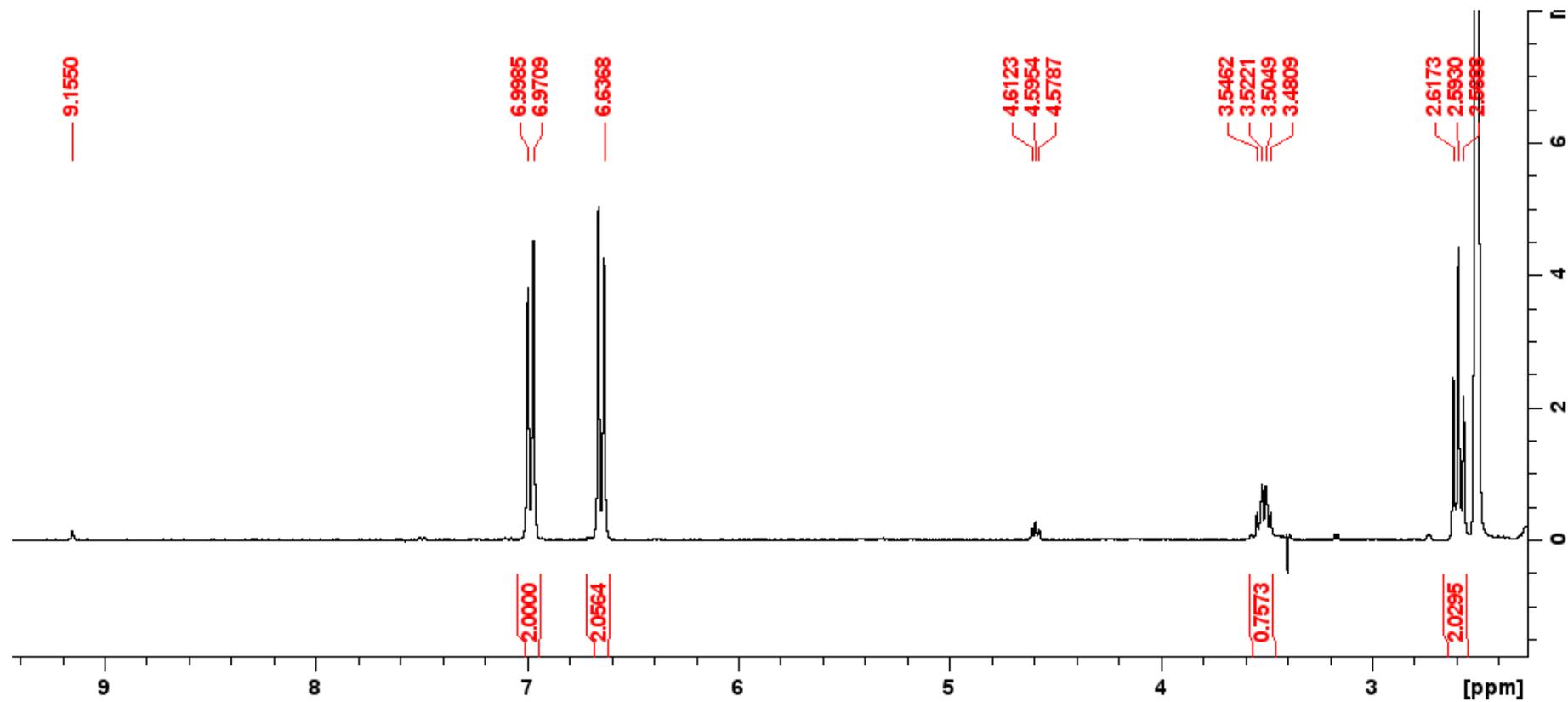


Figura 14: Espectro de RMN de ^1H da substância I em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).

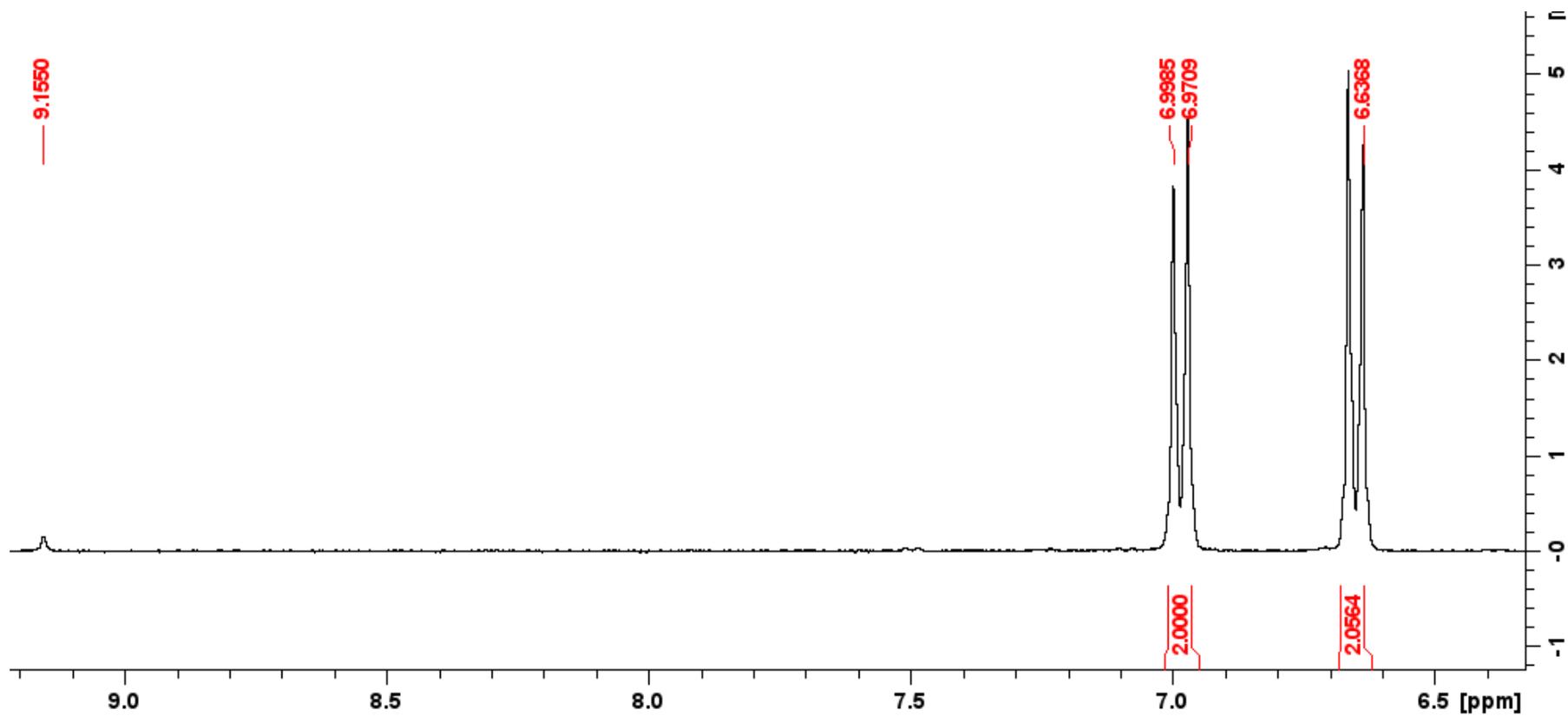


Figura 15: Expansão da região aromática do espectro de RMN de ^1H de da substância I em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).

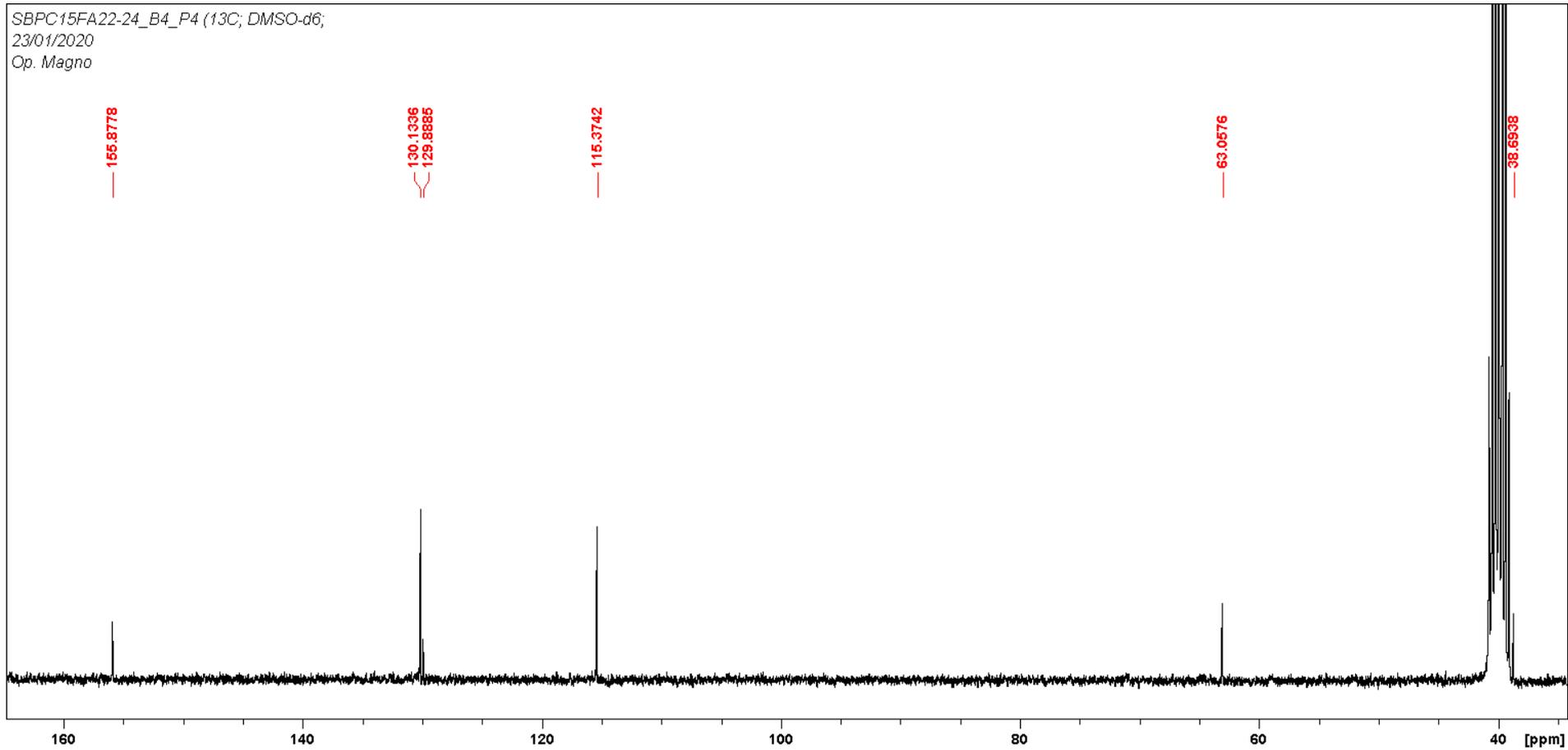


Figura 16: Espectro de RMN de ^{13}C da substância I em $\text{DMSO-}d_6$ (75 MHz).

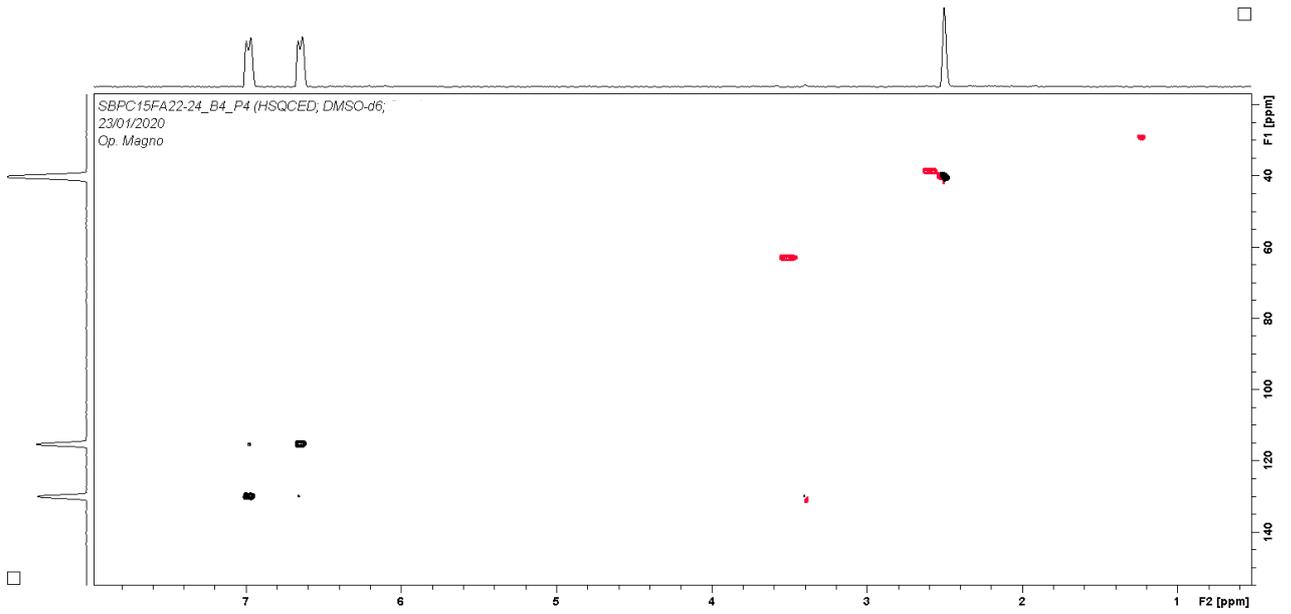


Figura 17: Mapa de correlação HSQCedit da substância I.

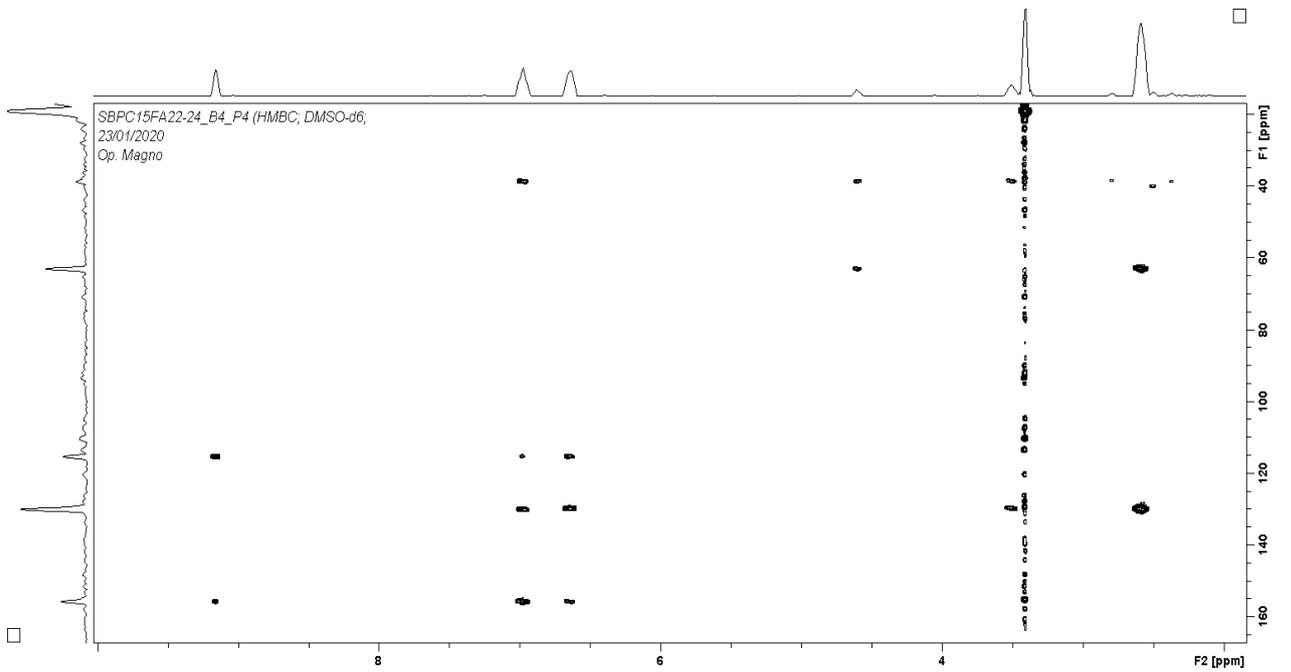


Figura 18: Mapa de correlação HMBC da substância I.

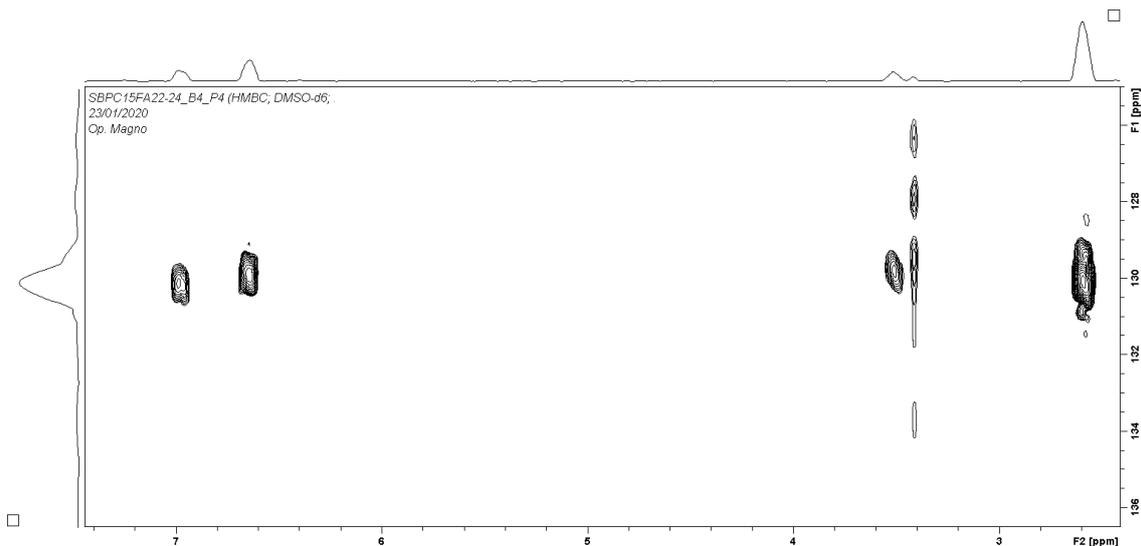


Figura 19: Expansão do mapa de correlação HMBC da substância I.

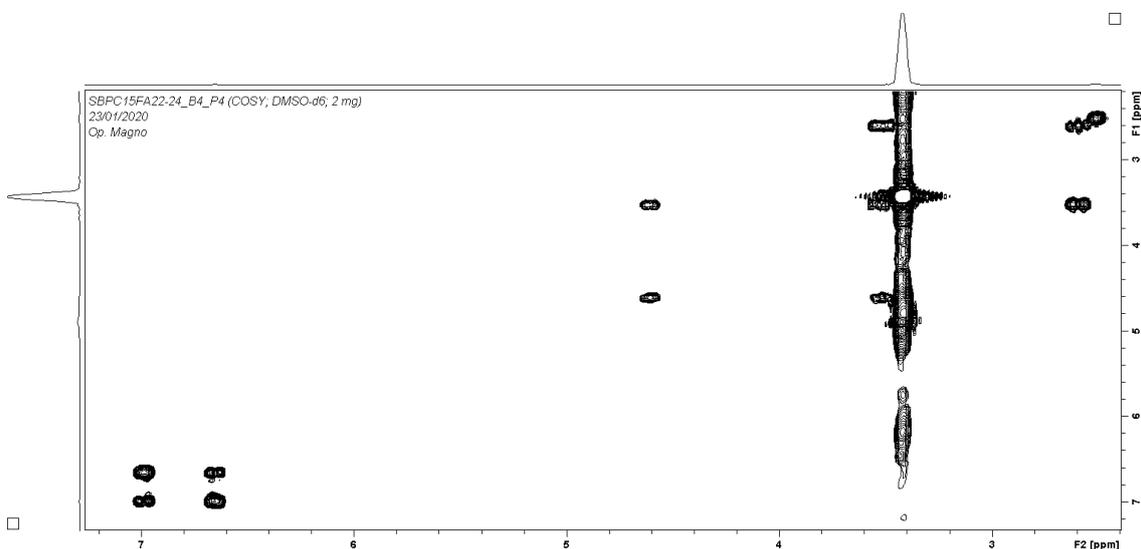


Figura 20: Mapa de correlação COSY da substância I.

A análise de espectrometria de massas de baixa resolução apresentou valor de m/z 270 no modo negativo (Figura 21), porém o peso molecular da tiramina é m/z 137,17. A fórmula molecular da tiramina é $C_8H_{11}NO$. Não foi possível explicar essa diferença na massa molecular apresentada.

Analysis Info Acquisition Date 9/16/2020 1:45:02 PM
 Analysis Name D:\Data\2020\Cecilia\Alunos\Weison\LC-MS\10-09-2020\ODS_ESI+-SBPC15FA22-24B4_2uL-B_1-56_01_1974.d
 Method 1974.m
 Sample Name ODS_ESI+-SBPC15FA22-24B4_2uL-B Instrument amaZon speed
 Comment XR-ODS 2X5
 A(H2O0.1%AcFormico)/B(MEOH)
 Fluxo: 0.25 mL/min Split de 0,045 mL(MS)/0,255mL(desc); P:2184psi
 V.inj: 2 uL; C = 1,25 mg/mL (MeOH); Forno:35C;Inj: MeOH
 0-5min: 20-50%
 5-10min:50-100%
 10-12min:100%
 12-14min:100-20%
 14-16min: 20%

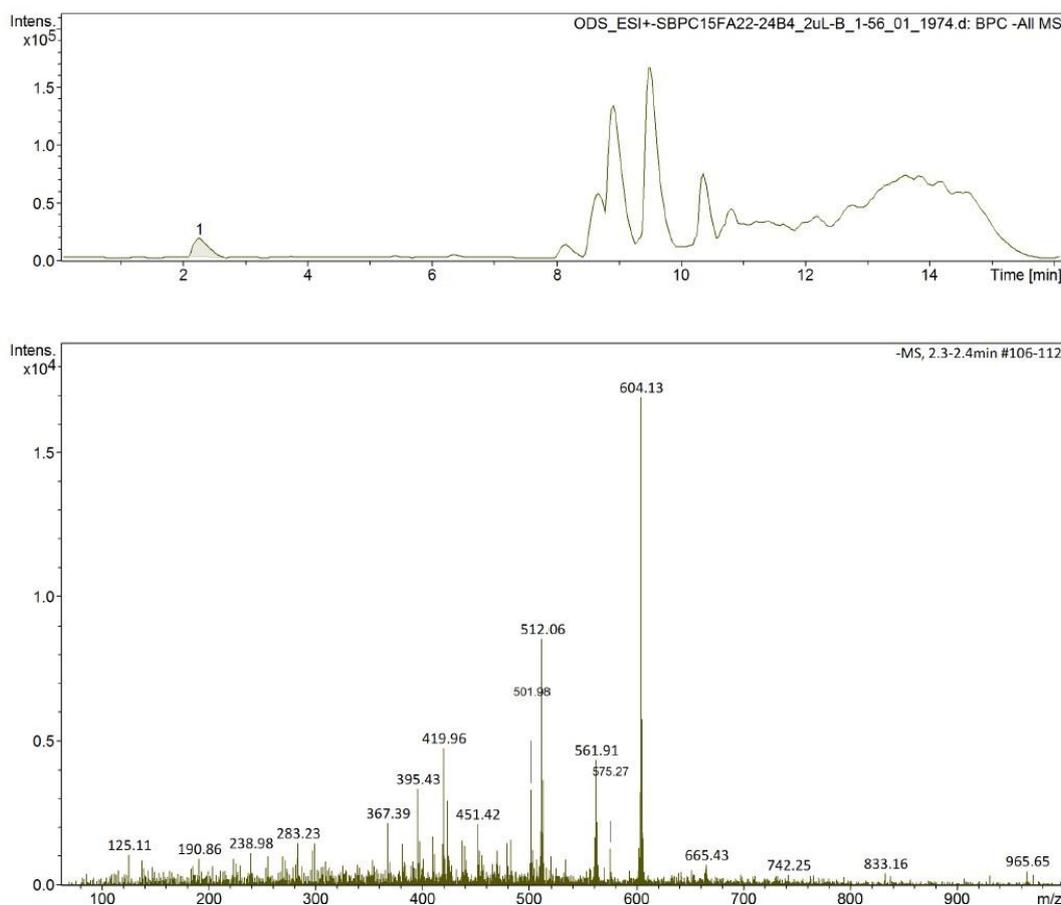


Figura 21: Cromatograma e espectro de massas ESI modo negativo da fração SBPC15 FA 22-24 B4 P4 que contém a substância I.

A partir das análises obtidas e do levantamento bibliográfico realizado foi proposto que a substância se trata do alcaloide tiramina (Figura 22), sendo esta substância numerada utilizando como referência o alcaloide *N*-acetiltiramina isolado no trabalho de Ivanova e colaboradores (2003). Os sinais estão de acordo com a referência utilizadas, diferindo a tiramina da *N*-acetiltiramina pela ausência da carbonila (C10) e da metila (C11). As correlações de COSY e HMBC são apresentadas na estrutura química da tiramina apresentadas na figura 23.

A tabela 14 apresenta as informações obtidas através dos espectros uni e bidimensionais de ^1H e ^{13}C , comparando com os dados disponíveis na literatura.

Tabela 14: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C HSQC, HMBC e COSY da substância I (em $\text{DMSO-}d_6$: 300 MHz (H) 75 MHz (C)). Dados da literatura *Ivanova et al., (2003) obtidos (em CD_3OD : 500 MHz (H) 125 MHz (C)).

Posição	^1H (ppm)	Dados observados			Dados da literatura*	
		^{13}C (ppm)	HMBC	COSY	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
1	-	129,89	H-6,65, H-3,51		131,0	-
2, 6	6,98 <i>d</i> (8,3 Hz) 2H	130,13	H-6,98, H-2,59	H-6,65	130,5	7,02
3, 5	6,65 <i>d</i> (8,3 Hz) 2H	115,37	H-9,16, H-6,98, H-6,65	H-6,98	116,2	6,71
4	-	155,88	H-9,16, H-6,98, H-6,65		156,6	-
4-OH	9,16					7,86
7	2,59 <i>t</i> (7,3 Hz) 2H	38,8	H-6,98, H-4,6, H-3,5,	H-3,51	35,7	2,13
8	3,51 <i>dd</i> (12,4 e 7,3 Hz) 2H	63,06	H-4,6, H-2,59	H-4,6, H-2,59	42,3	2,67
NH₂	4,6 <i>t</i> (5,0 Hz)			H-3,51		5,72

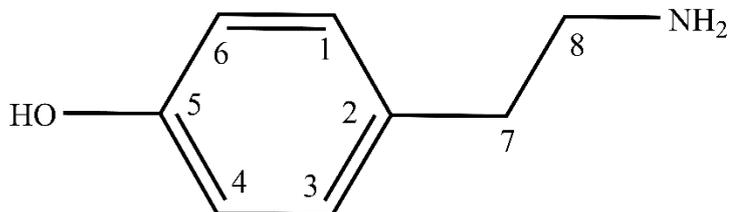


Figura 22: Estrutura química da substância I denominada tiramina

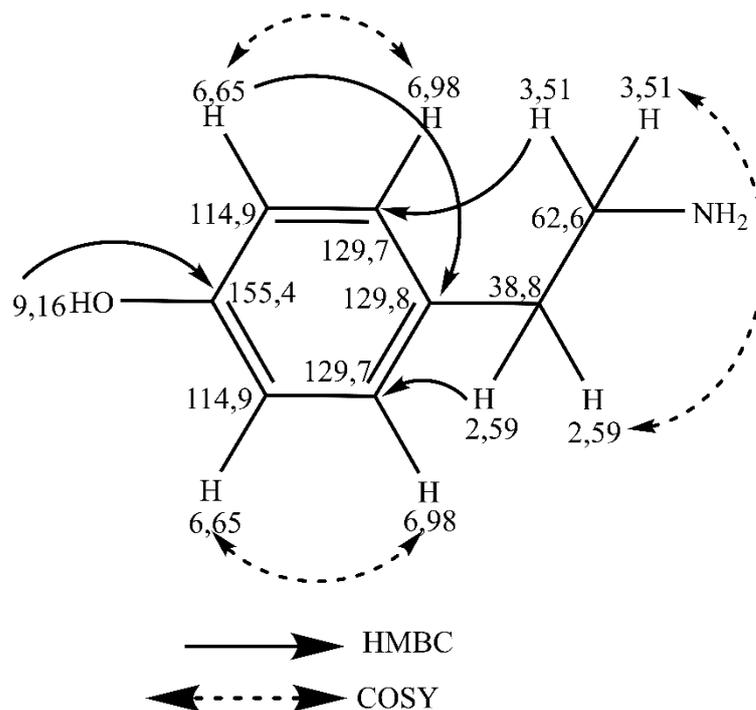


Figura 23: Correlações COSY e HMBC da substância I

A tiramina é uma monoamina produzida em substratos fermentados. O pré-requisito é a disponibilidade de tirosina livre no meio (FINBERG & GILLMAN, 2011). Nas condições de cultivo desta pesquisa utilizou-se o meio sabouraud caldo suplementado com 0,2% de extrato de levedura, segundo informações do fabricante no extrato levedura contém vitaminas do complexo B, peptídeos e aminoácidos livres, possivelmente seja justificativa da produção de tiramina pelo fungo endofítico *Xylaria* sp. O rendimento da substância foi de 1 mg para 3,6 litros de meio.

No levantamento bibliográfico realizado os relatos sobre a produção de tiramina por fungos endofíticos são escassos. Porém no trabalho feito por Indriani (2007) foi cultivado o fungo *Fusarium equiseti* isolado de alga marinha, sendo cultivado em 300 mL de meio Wickerham com adição de 24,4 g/L de sal marinho em um Erlenmeyer de 500 mL em condições estéreis e incubado por 21 a 28 dias em temperatura ambiente (20 °C), o rendimento foi de 1 mg de tiramina, nota-se um rendimento maior quando comparado ao obtidos no presente estudo.

Importante ressaltar a tiramina sendo uma amina biogênica que possui várias reações fisiológicas, como aumento da pressão arterial e vasoconstrição (ANWAR et al., 2012), assim a mesma poderia ser utilizada visando efeito benéfico para saúde humana.

Considerando que as aminas aromáticas estão envolvidas na biossíntese de muitos metabólitos secundários de plantas, outra aplicação relevante da tiramina pode ser o uso para produção moléculas alcaloídicas. No trabalho feito por Facchini (1998) foi utilizada tiramina exógena em cultura de calo de opium, como substrato para a produção de saguarina um alcaloide com propriedades antibióticas. Os calos de cultura assimilaram com êxito a tiramina com a posterior conversão no alcaloide de interesse.

Os resultados obtidos nessa pesquisa demonstraram a competência do fungo *Xylaria* sp. 1 para a produção de tiramina um produto biotecnológico e com realidade comercial estabelecida.

5.2.2 identificação estrutural da substância II produzida por *Xylaria* sp. 1

A partir do fracionamento da fase AcOEt do caldo foi possível o isolamento da substância 2 via CLAE (Luna 5 μ C18, 100 A, 250 x 10 mm, volume de injeção 50 μ L, vazão 4,7 mL/minuto) utilizando metanol 30%, pH = 5, modo isocrático, a substância apresentou tempo de retenção de 8 minutos, absorvendo nos comprimentos de onda de λ 280 nm e 254 nm, com rendimento de 1 mg. O espectro de RMN de ^1H é apresentado na figura 24.

Na expansão da região aromática do espectro (Figura 25) foi possível observar um sinal em δ_{H} 9,21, referente ao hidrogênio ligado à hidroxila, foi observado também um hidrogênio em δ_{H} 7,89 (s), referente ao hidrogênio ligado ao heteroátomo (N).

O mapa de correlação HSQCedit (Figura 26) permitiu relacionar os carbonos aos seus respectivos hidrogênios e mostra os CH/CH₃ numa fase (cor preta) e os CH₂ na outra fase (cor vermelha). Na figura 27 o mapa de correlação HMBC auxiliou na visualização de outros acoplamentos entre carbonos e hidrogênios. As correlações entre os hidrogênios são apresentadas no COSY na figura 28.

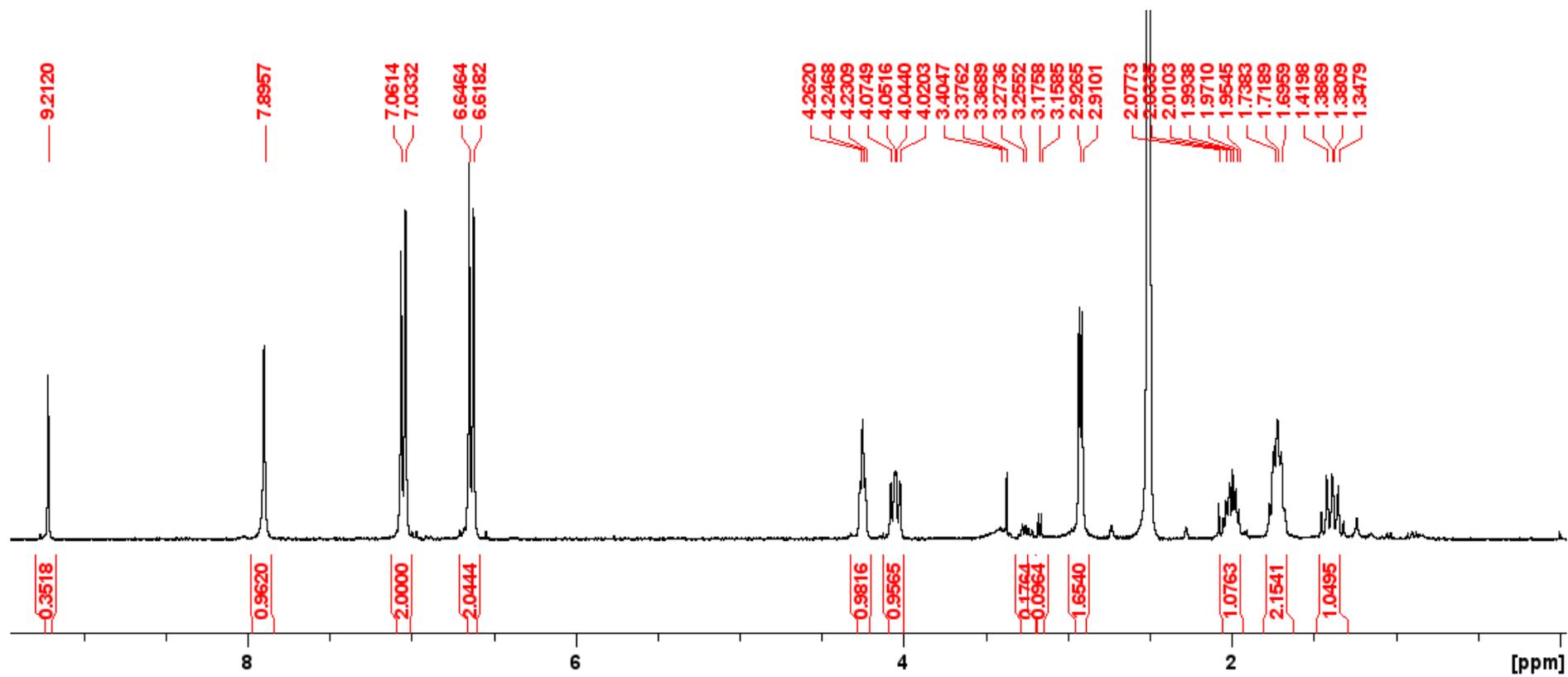


Figura 24: Espectro de RMN de ^1H da substância II em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).

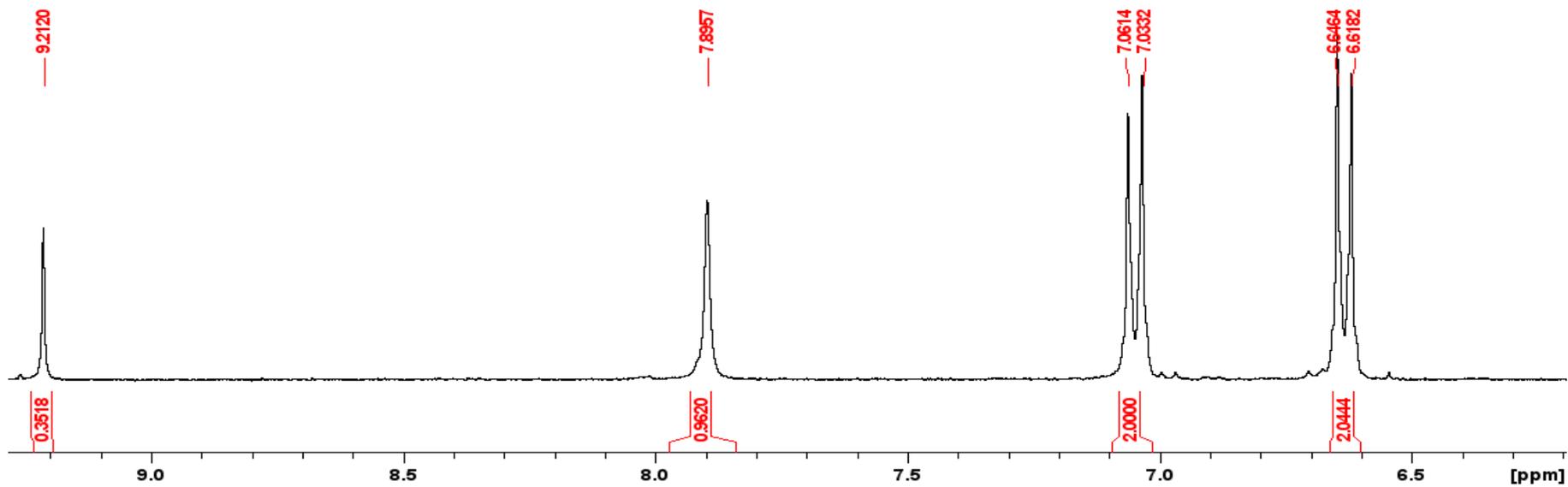


Figura 25: Expansão da região aromática do espectro de RMN de ¹H de da substância II em DMSO-*d*₆ (300 MHz).

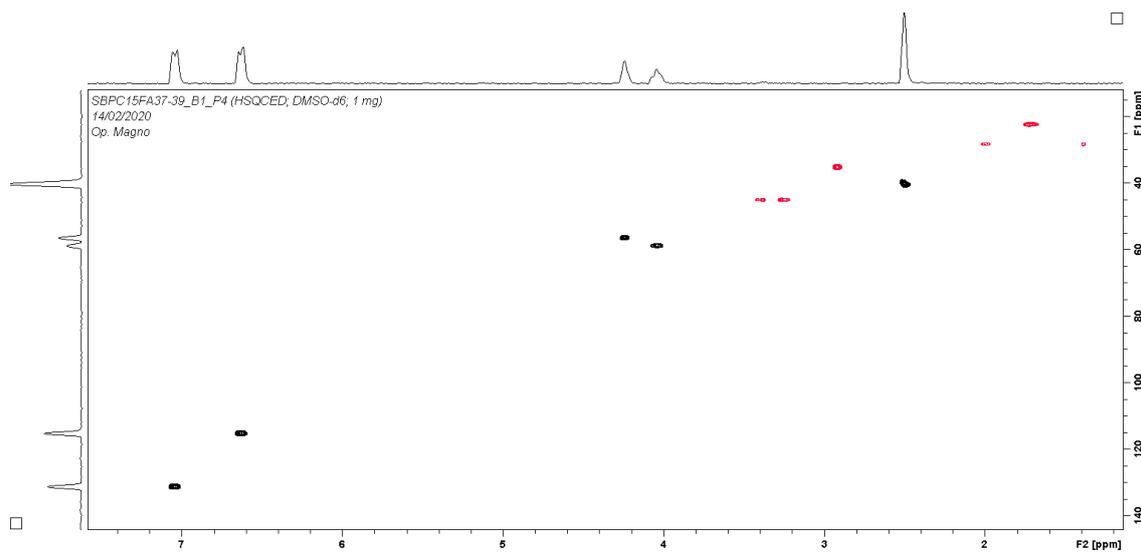


Figura 26: Mapa de correlação HSQC editado da substância II.

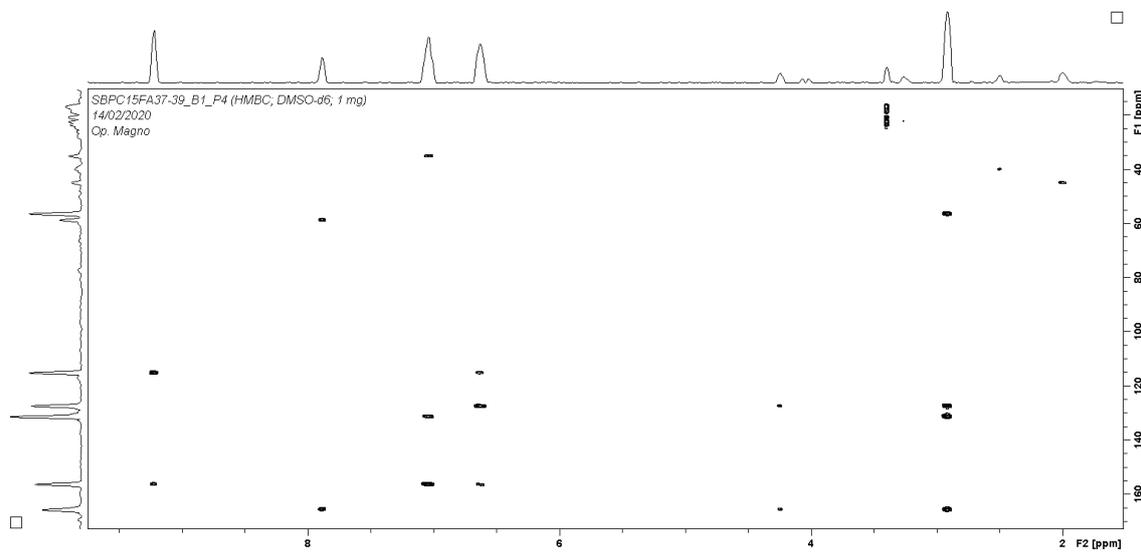


Figura 27: Mapa de correlação HMBC da substância II.

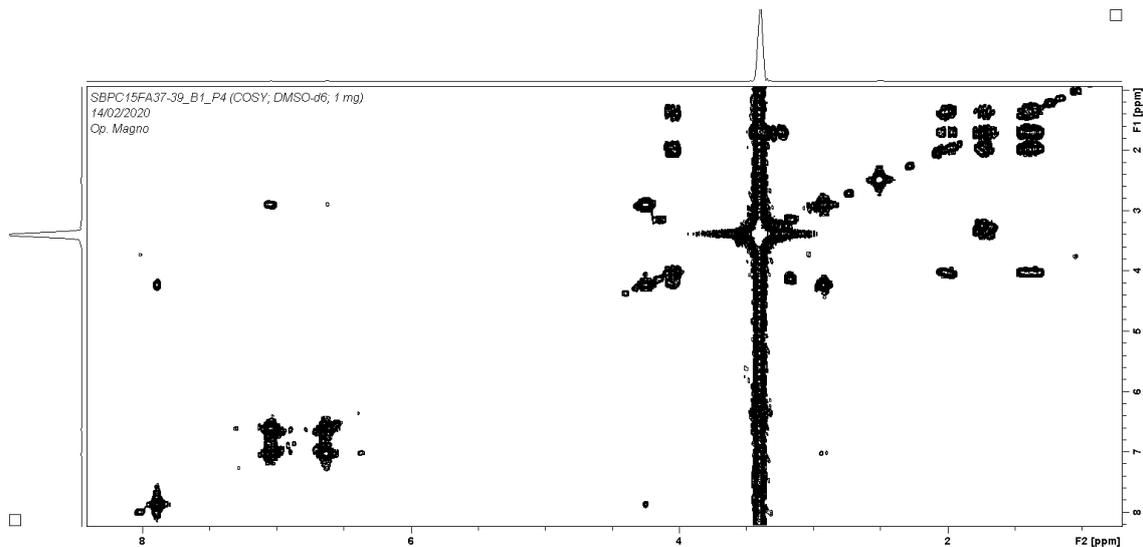


Figura 28: Mapa de correlação COSY da substância II.

Na análise espectrométrica de massas de baixa resolução (ESI+) (Figura 29), foi possível constatar o pico de m/z 261, sendo a massa molecular calculada em 260. Associando todos os dados obtidos foi possível determinar a fórmula molecular $C_{14}H_{16}N_2O_3$, referente a estrutura da ciclo (prolina-tirosina) (Figura 30) as principais correlações observadas na molécula estão apresentadas na figura 31. Na tabela 15 estão apresentadas as informações obtidas através dos espectros uni e bidimensionais, comparando com os dados disponíveis na literatura.

Analysis Info Acquisition Date 6/14/2020 1:49:43 PM
Analysis Name D:\Data\2020\Cecilia\Alunos\Weison\LC-MS\10-09-2020\ODS_ESI+-SBPC16FA37-39B1P4_2uL_1-55_01_1969.d
Method 1969.m
Sample Name ODS_ESI+-SBPC16FA37-39B1P4_2uL Instrument amaZon speed
Comment XR-ODS 2X5
A(H2O:0.1%AcFormic)/B(MEOH)
Fluxo: 0.25 mL/min Split de 0.045 mL(MS)/0.255mL(desc); P:2565psi
V.inj: 2 uL; C = 1.25 mg/mL (MeOH); Forno:35C; Inj: MeOH
0-5min: 50-80%
5-8min: 80-100%
8-8min: 100%
8-10min: 100-50%
10-12min: 50%

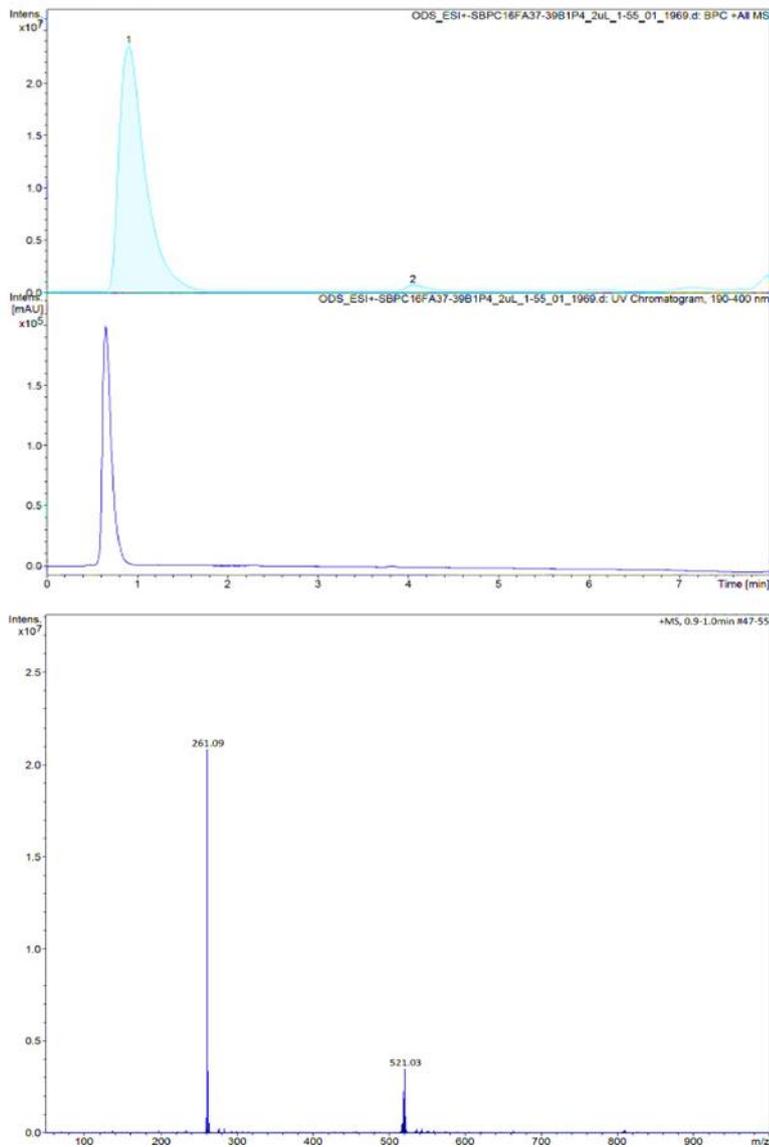


Figura 29: Espectro de massas de baixa resolução ESI positivo da fração SBPC15 FA 37-39 B1 P4 que contém a substância II.

Tabela 15: Dados de RMN de ^1H , HSQC, HMBC e COSY da substância II (em DMSO- d_6 : 300 MHz (H) 75 MHz (C)). Dados da literatura ciclo (Pro-Tir) de acordo com *JAYATILAKE et al., (1996) CDCl_3 : 360 MHz (H) 90 MHz (C)).

Posição	Dados observados				Dados da literatura	
	δ_C	δ_H	HMBC	COSY	* δ_C	* δ_H
1	165,5		H-7,89, H-4,25, H-2,91		165.48	
2N	-	-	-	-	-	-
3	45,07	3,38 <i>m</i> (1 H) e 3,25 <i>d</i> (5,3)1 H	H-1,99, H-1,72	H-1,72	45.65	3,57 <i>m</i> (2H)
4	22,31	1,72 <i>m</i> (2 H)	H-3,25, H-1,38	H-1,38, H-1,99, H-3,25	22.64	1,85 <i>m</i> (2H)
5	28,22	1,99 <i>m</i> (1 H) e 1,38 <i>m</i> (1 H)	H-4,05, H-3,25, H-1,72	H-1,38, H-1,72, H-4,05, H-1,99	28.54	2,32 <i>m</i> (1H) e 1,96 <i>m</i> (1H)
6	58,82	4,05 <i>t</i> (7)1H	H-7,89, H-1,99; H-1,38	H-1,38, H-1,99, H-7,89	59.36	4,07 <i>t</i> (7,6)1H
7	169,47		H-7,89, H-4,05, H-1,38		169.95	
8NH	-	7,89 <i>s</i> (1H)		H-4,29,	-	6,11 <i>s</i> (1H)
9	56,44	4,25 <i>t</i> (4,5)1H	H-7,89, H-2,91,	H-2,9, H-7,89	56.51	4,22 <i>dd</i> (2,9 e 9,6)1H
10	35,2	2,9 <i>d</i> (5) 2H	H-7,89, H-7,05, H-4,25	H-4,25, H-7,05	36.17	3,42 <i>dd</i> (11 e 14) 1H 2,78 <i>dd</i> (, 9,6, e 14,4)1H
1'	127,4		H-6,63, H-4,25, H-2,91		126.93	
2' e 6'	131,12	7,05 <i>d</i> (8,5) 2H	H-7,05, H-2,91	H-2,9, H-6,63	130.58	7.03 <i>d</i> (8,3)2H
3' e 5'	115,19	6,63 <i>d</i> (8,5) 2H	H-9,21, H-7,05, H-6,63	H-2,9, H-7,05	116.32	6.77 <i>d</i> (8.3) 2H
4'	156,37		H-9,21, H-7,05, H-6,63		156.05	
OH	-	9,21 <i>s</i> (1H)			-	-

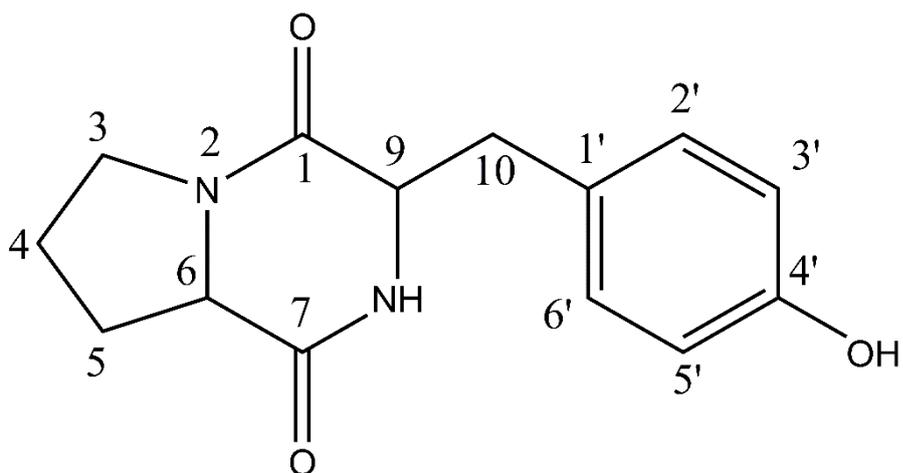


Figura 30: Estrutura química da substância II denominada ciclo (prolina tirosina)

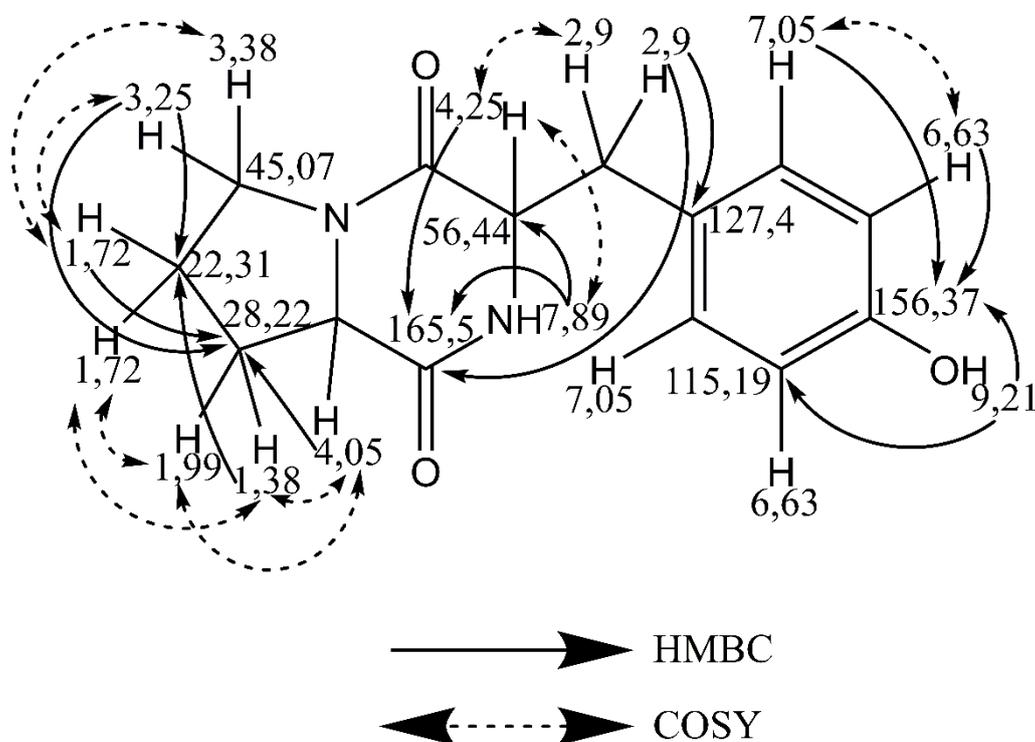


Figura 31: Principais correlações COSY e HMBC da substância II

A substância ciclo (pro tir) pertence a classes dos alcaloides incluídas também no grupo denominado dicetopiperazina, tais moléculas notadamente são conhecidas por possuírem relevantes atividades biológicas incluindo antiviral, antimicrobiana, antitumoral, alelopática (MARTINS & CARVALHO, 2007; ZHANG et al., 2013). Diversos estudos relatam o isolamento desse alcaloide ocorrendo tanto em bactérias como em fungos.

Conforme apresenta o quadro 5 os rendimentos alternam em função dos substratos, condições de cultivo e o organismo produtor, porém comparado ao rendimento obtido no presente trabalho todos os valores apresentados são superiores. Considerando que o rendimento foi de 1 mg para 3,6 litros de meio, obteve-se pouco, todavia essa quantidade pode ser melhorada com investigação e combinação de diversos parâmetros, tais como: oferta de substrato, pH, temperatura, salinidade, entre outros.

Organismo produtor	Meio de cultura	Rendimento	Autor
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LB	11,5 mg	Jayatilake et al., (1996)
<i>Xylaria cubensis</i>	PDB	2,9 mg	Biasetto et al., (2019)
rhizobium N003	YMB	7,0 mg	Wang et al., (2012)

Quadro 4: produção de ciclo prolina tirosina por distintos microrganismos

É importante ressaltar que na literatura consultada esta é a primeira vez que a substância ciclo (Pro-Tir) é relatada em um fungo endofítico do gênero *Xylaria* de ambiente amazônico.

5.2.3 identificação estrutural da substância III produzida por *Xylaria* sp. 2

A substância 3 foi isolada de frações distintas uma oriunda de micélio; SBXEA13-14 (BDPC15 ED F25 F14) e outra do caldo fermentado (BDPC15FD 10-12). A substância 3 apresentou-se como cristal branco. As análises em CCDC evidenciaram coloração laranja quando reveladas com reagente de Dragendorff (eluída com DCM/MeOH 9:1 com Rf de 0,62. Somando o rendimento de ambas obteve-se 17 mg. As análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Figura 33) e suas ampliações (Figura 34 a 36) evidenciam que as amostras se tratam da mesma substância

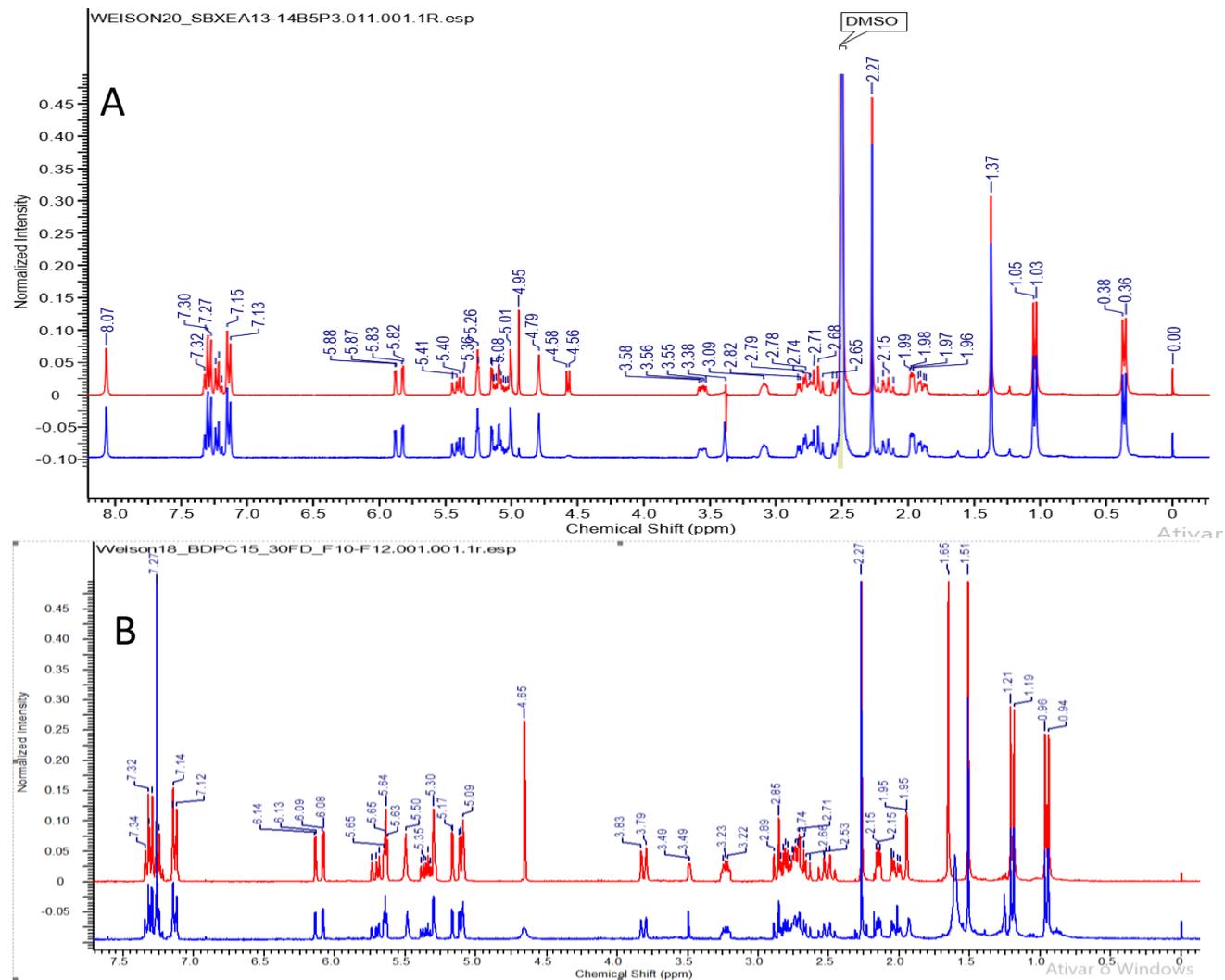


Figura 32: Análise de RMN de ^1H das frações; A) SBXE13-14B5P3 em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz). B) BDPC15_30 FD_F10-F12 e BDPC15_30_ED_F25-F14 em CDCl_3 (300 MHz)

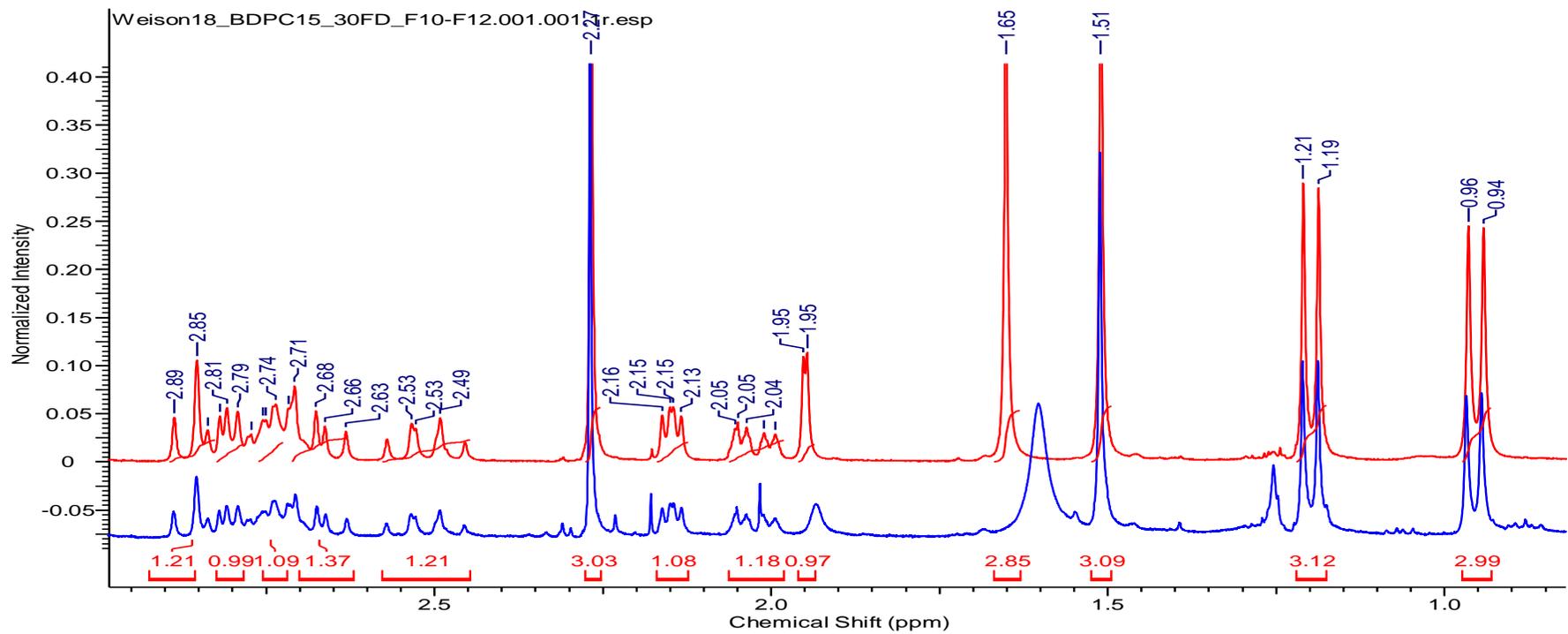


Figura 33: Expansão do espectro de RMN de ^1H na região de δ_{H} 0,9 a 3

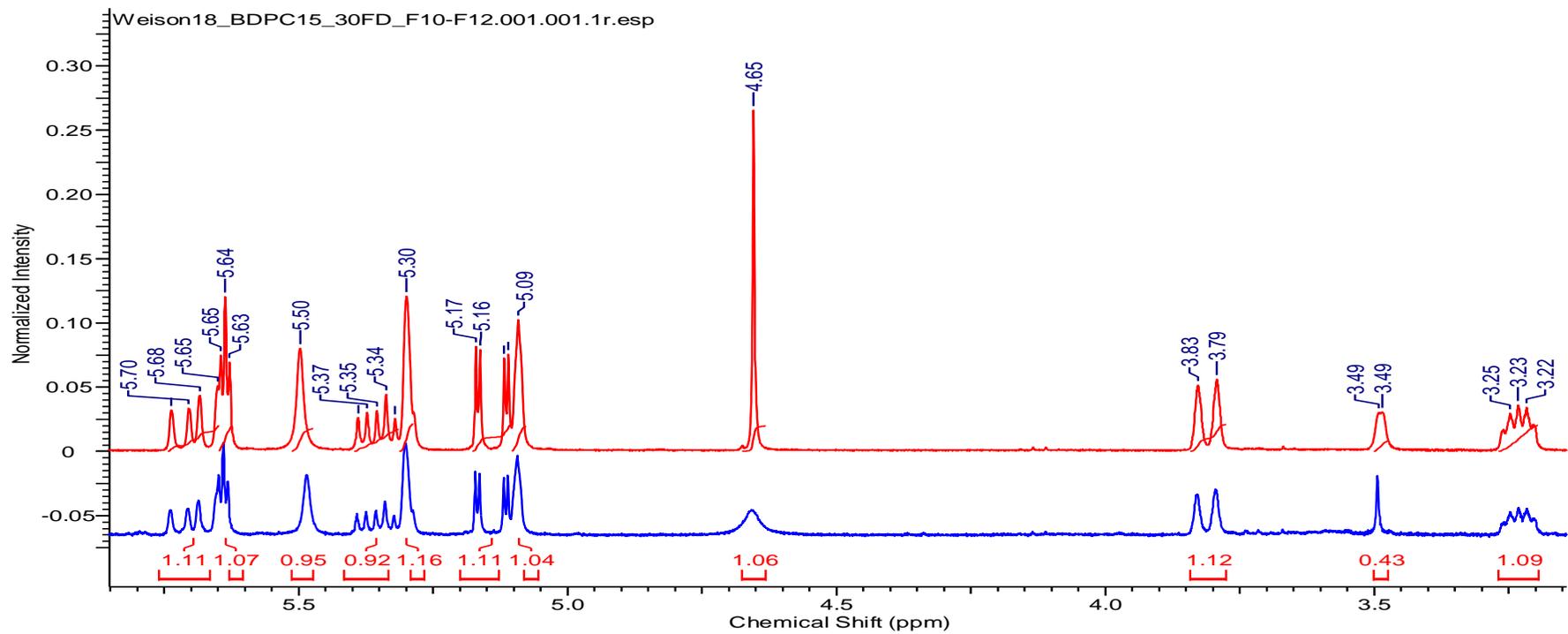


Figura 34: Expansão do espectro de RMN de ^1H na região de δ_{H} 3,1 a 5,7

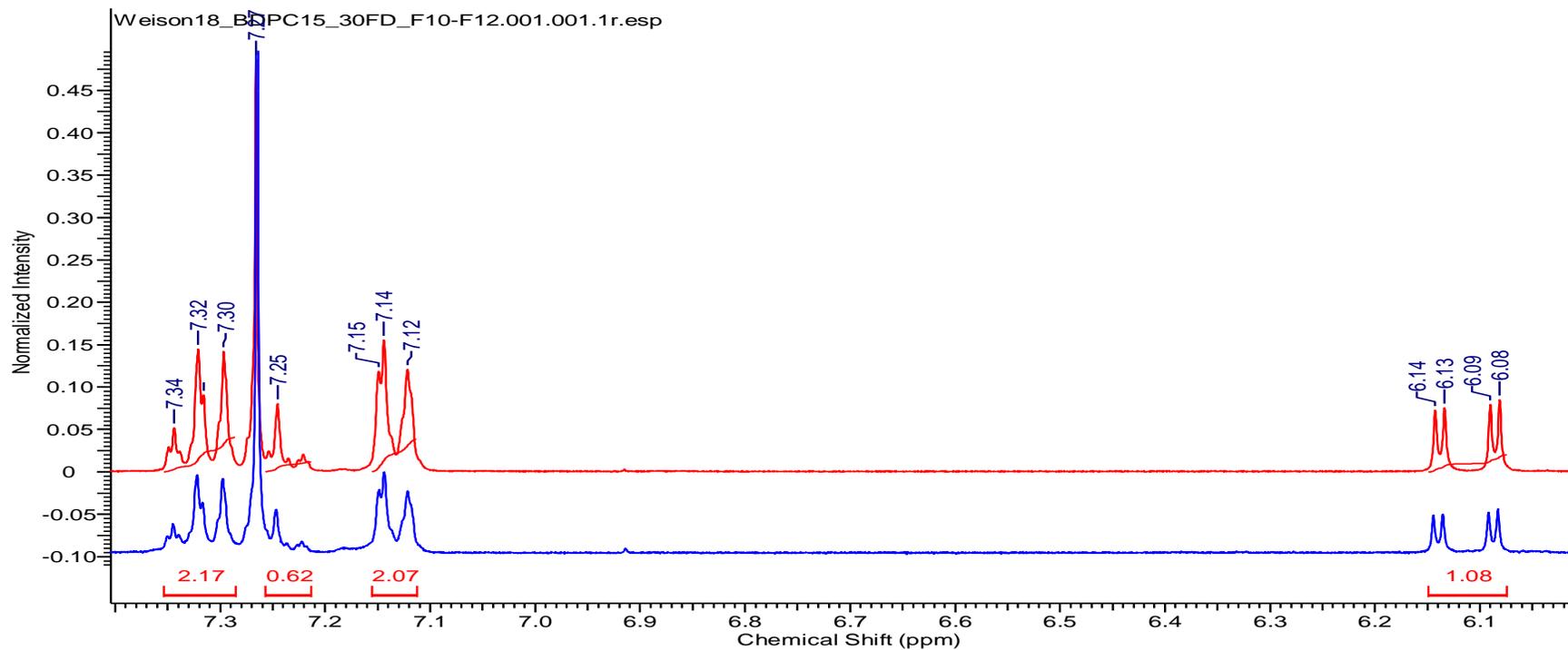


Figura 35: Expansão do espectro de RMN de ^1H na região de δ_{H} 6,1 a 7,3

As análises dos espectros bidimensionais foram realizadas através dos experimentos de HSQC (Figuras 37 e 38) e HMBC (Figuras 39 e 40). A partir das análises dos espectros (uni e bidimensionais) foi possível verificar a presença metilas em δ_H 0,9, 1,20 1,51 e 2,26 (Figura 2), sendo a metila em δ_H 2,26 considerada “típica de citocalasinas com um grupo acetato na forma de radical” (CAFÊU et al., 2005). Os hidrogênios em δ_H 7,14, 7,24 e 7,31 são característicos de anel aromático, estando estes ligados aos carbonos δ_C 129,0, 127,02 e 128,9, respectivamente.

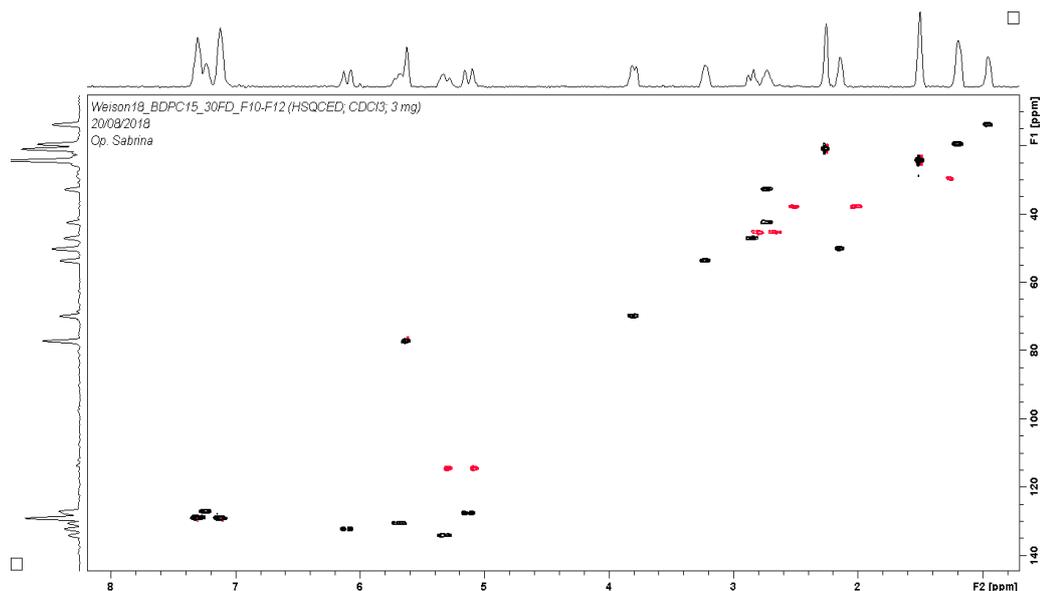


Figura 36: Mapa de correlação HSQC editado da substância III.

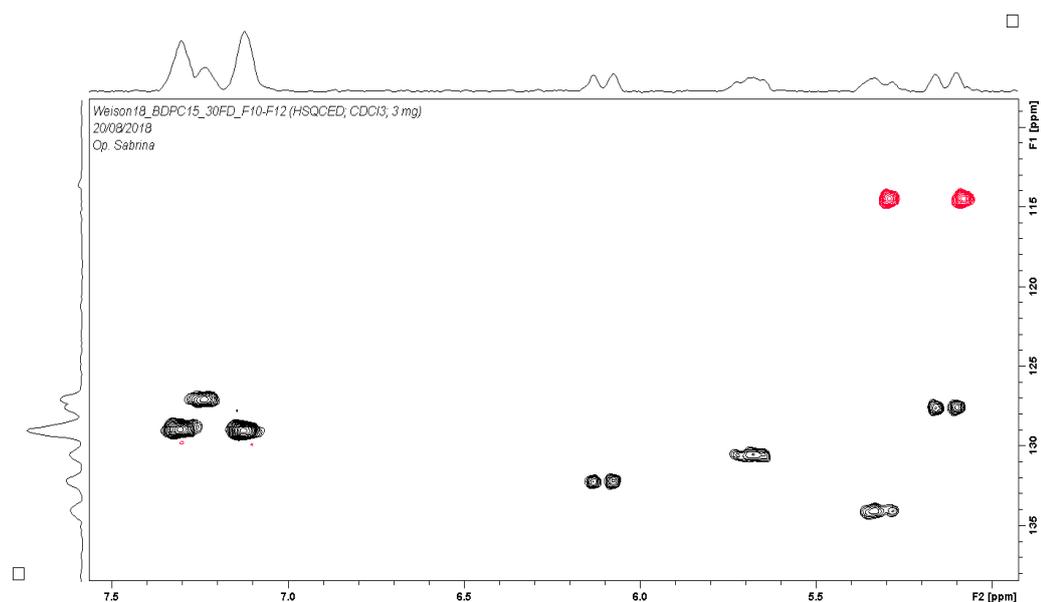


Figura 37: Expansão do mapa de correlação HSQC editado da substância III.

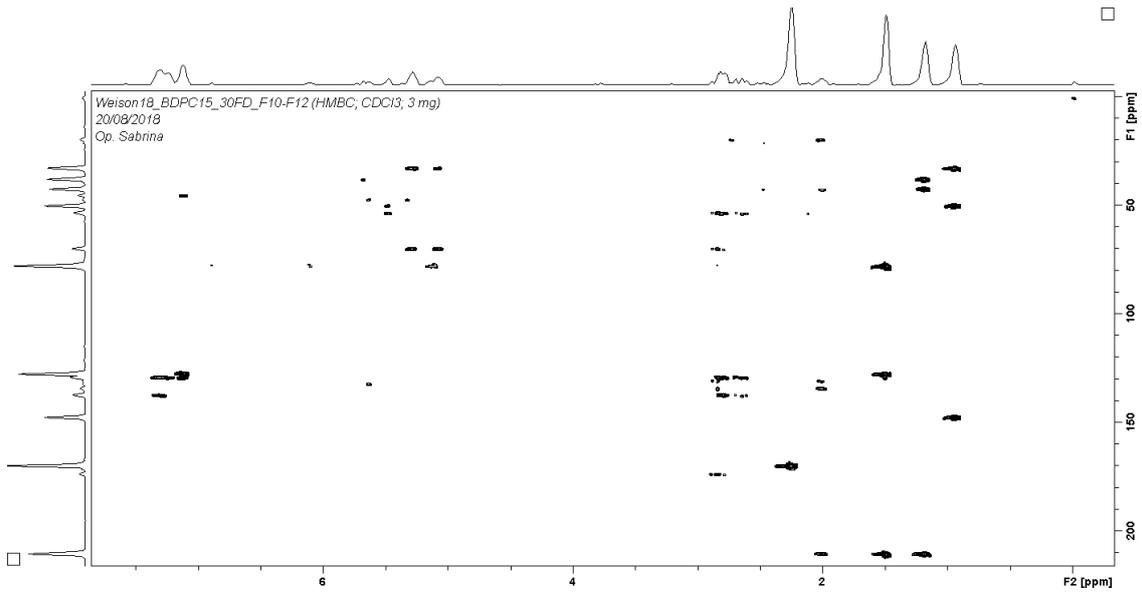


Figura 38: Mapa de correlação HMBC da substância III.

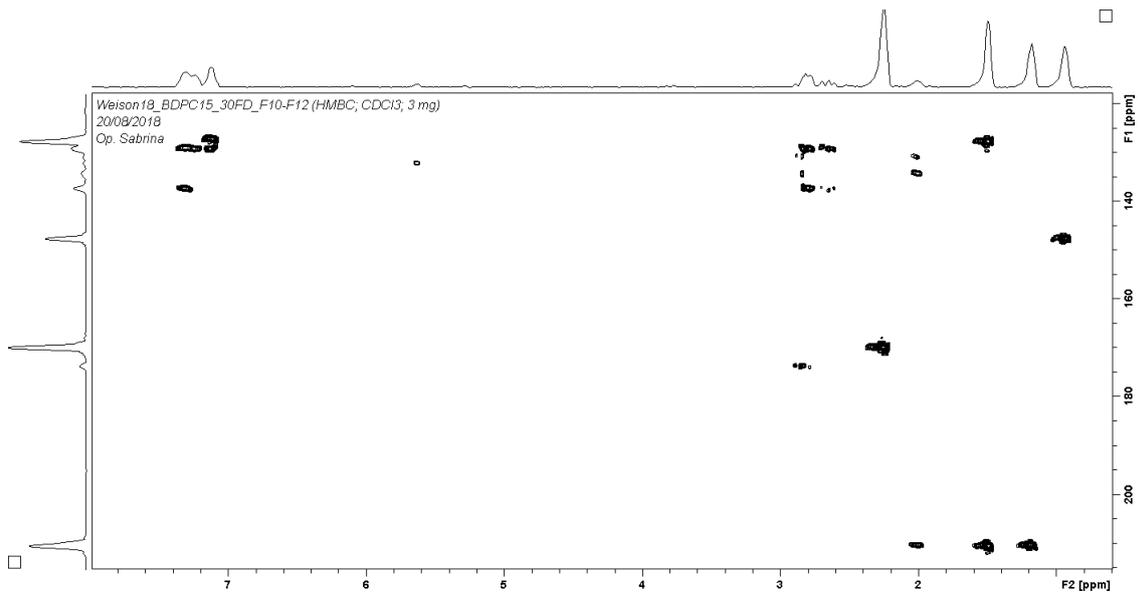


Figura 39: Expansão do mapa de correlação HMBC da substância III.

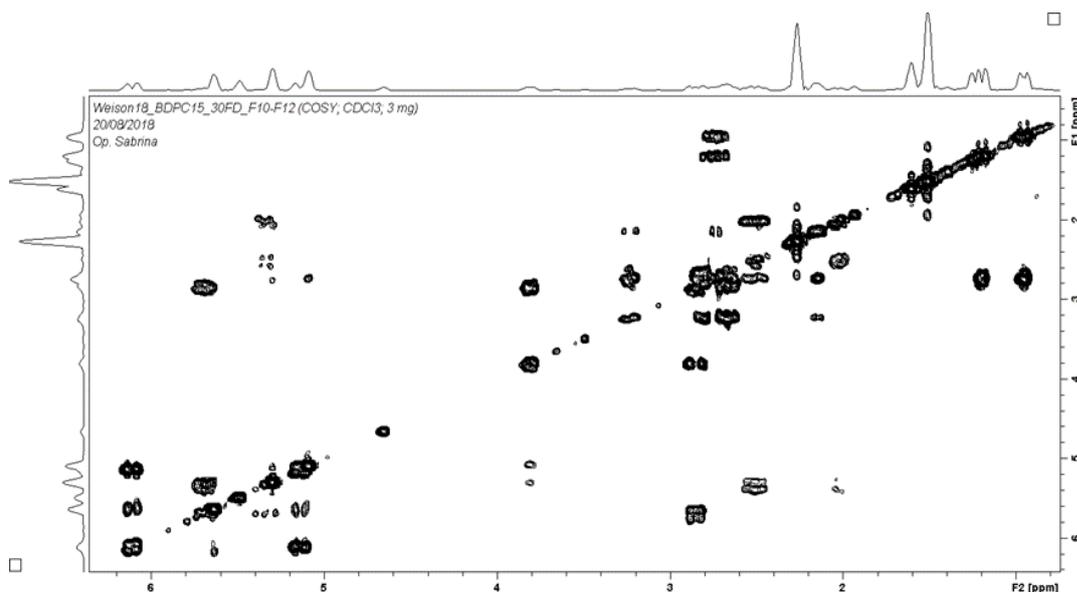


Figura 40: Mapa de correlação COSY substância III.

Na análise por espectrometria de massas de baixa resolução (ESI+) (Figura 42), foi possível constatar o pico de m/z 508,15, sendo a massa molecular calculada em 507,15. Foi evidenciado duas fragmentações de m/z 490,21 (correspondente à perda de água) e 448,20 (perda do ácido acético) (AMARAL et al., 2017). Associando todos os dados obtidos foi possível determinar a fórmula molecular $C_{30}H_{37}NO_6$, referente a estrutura da citocalasina D (Figura 43) as principais correlações observadas na molécula estão apresentadas na figura 44.

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\2020\Cecilia\Alunos\Weison\LC-MS\10-09-2020\ODS_ESI+_BDPC15EDF25-15_2uL-C_1-52_01_1960.d Acquisition Date 9/10/2020 3:42:34 PM
Method 1960.m Operator BDAL@DE
Sample Name ODS_ESI+_BDPC15EDF25-15_2uL-C Instrument amaZon speed
Comment XR-ODS 2X5
A(H2O:0.1%AcFormico)/B(MEOH)
Fluxo: 0.25 mL/min Split de 0,045 mL(MS)/0,255mL(desc); P:2578psi
V.inj: 2 uL; C = 1,25 mg/mL (MeOH); Forno:35C;Inj: MeOH
0-5min: 50-80%
5-6min: 80-100%
6-8min: 100%
8-10min: 100-50%
10-12min: 50%

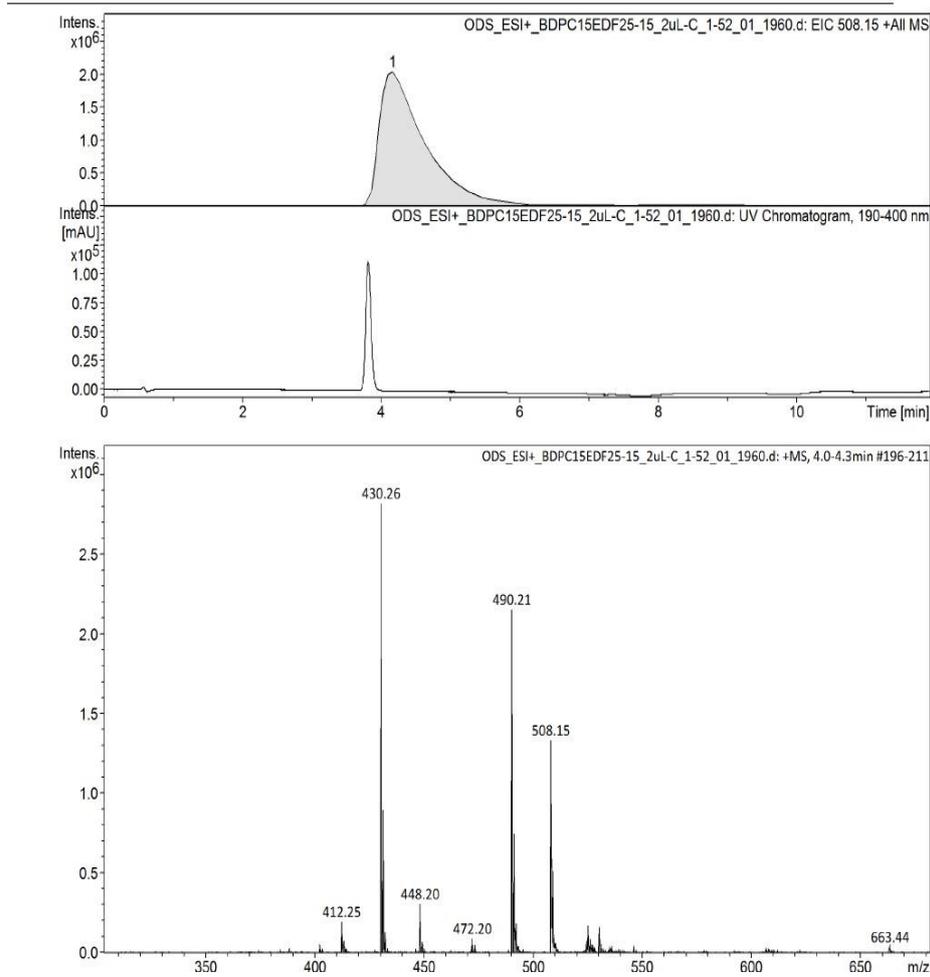


Figura 41: Espectro de massas de baixa resolução ESI positivo da fração BDPC15 ED F25 F14 que contém a substância III

Tabela 16: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C HSQC, HMBC e COSY da substância III (em CDCl_3 : 300 MHz (H) 75 MHz (C)). Dados da literatura obtidos (em CDCl_3 : 500 MHz (H) 125 MHz (C))

Posição	Dados apresentados		HMBC	COSY	Dados da literatura	
	δ_{C}	δ_{H}			δ_{C}	δ_{H}
1	173,5	-	-	-	173,8	-
2 NH	-	5,52 <i>s</i> , 1H	C 50,0; C 53,3	H- 2,15; H- 2,67; H- 2,82	-	5,43 <i>s</i> , 1H
3	53,3	3,23 <i>m</i> , 1H	C 32,6; C 50,0	H- 2,74; H- 3,23	53,4	3,23 <i>m</i> , 1H
4	50,0	2,15 <i>dd</i> , (4,9 e 3,45) 1H	C 45,2; C 53,3	H- 0,94; H- 2,15; H- 5,09; H- 5,30	50,2	2,14 <i>dd</i> (4,4 e 3,9) 1H
5	32,6	2,74 <i>m</i> , 1H		-	32,8	2,72 (<i>m</i> , 1H)
6	147,5	-		H- 2,85; H- 5,09; H- 5,30	147,7	-
7	69,8	3,81 <i>d</i> (10,5) 1H	C 32,6; C 114,4; C 130,5; C 147,5	H- 3,82; H- 5,69	70,0	3,81 <i>d</i> (10,4) 1H
8	46,13	2,85 <i>t</i> , (10,1) 1H	C 53,3; C 69,8; C 128,9; C 173,5		47,1	2,85 <i>t</i> (10,4 e 9,1) 1H
9	53,2	-			53,7	-
10a	45,2	2,67 <i>dd</i> (13,4 e 9,4) 1H	C 53,2; C 128,9; C 137,5	H- 2,82; H- 3,23		2,67 <i>dd</i> (13,3 e 9,1) 1H
10b		2,82 <i>dd</i> , (13,4 e 8,6) 1H	C 53,3; C 69,8; C 128,9; C 137,2; C 147,5; C 173,5	H- 2,67; H- 3,23	45,5	2,82 <i>dd</i> (13,6 e 5,2) 1H
11	13,6	0,94 <i>d</i> (6,71) 3H	C 32,6; C 50,0 C 147,5	H 2,74	13,8	0,96 <i>d</i> (6,5) 3H
12a	114,4	5,09 <i>sl</i> , 1H	C 32,6; C 69,8; C 132,2; C 147,5	H- 3,82; H- 2,74; H- 3,82; H- 5,63; H- 6,11	114,7	5,09 <i>s</i> , 1H
12b		5,30 <i>sl</i> , 1H	C 32,6; C 37,7	H- 2,74; H- 3,82		5,29 <i>s</i> , 1H
13	130,5	5,69 <i>dd</i> , (15,6 e 10,0) 1H	C 37,7; C 46,9; C 53,3	H- 2,85; H- 5,35	127,8	5,14 <i>dd</i> (15,6 e 2,6) 1H
14	134,0	5,35 <i>ddd</i> (15,6; 10,8 e 5,4) 1H	C 46,9; C 69,7	H- 2,02; H- 2,51; H- 5,69	130,8	5,69 <i>dd</i> (15,6 e 9,8) 1H
15a	37,7	2,02 <i>dd</i> (12,8 e 5,2) 1H	C 19,3; C 42,3; C 130,5; C 134,0; C 210,2	H- 2,51; H- 5,35	37,9	2,02 <i>dd</i> (12,9 e 5,2) 1H
15b		2,51 <i>dd</i> , (23,7 e 11,0) 1H	C 130,5; C 134,0; C 210,2	H- 2,02; H- 2,74; H- 5,35		2,51 <i>dd</i> (12,95 e 11,05) 1H
16	42,3	2,74 <i>m</i> , 1H	C 19,3; C 147,5	H- 1,20; H- 2,51	42,5	2,74 (<i>m</i> , 1H)
17	210,2	-			210,4	-

18	77,6	-			77,8	-
19	127,5	5,14 <i>dd</i> (15,7 e 2,3)1H	C 24,1; C 77,6; C 132,2	H- 5,63; H- 6,11	134,3	5,34 <i>ddd</i> (15,5;10,5 e 5,2) 1H
20	132,2	6,11 <i>dd</i> (15,7 e 2,6) 1H	C 77,6	H- 5,09; H- 5,14; H- 5,63	132,5	6,11 <i>dd</i> (15,6 e 2,6) 1H
21	77,6	5,63 <i>t</i> (2,5) 1H	C 37,7; C 46,9; C 53,3; C 127,5; C 132,2; C 134,0; C 169,7	H- 5,09; H- 5,14; H- 6,11	77,2	5,63 <i>t</i> (2,6) 1H
22	19,3	1,20 <i>d</i> (6,8) 3H	C 37,7; C 42,3; C 210,2	H- 2,74	19,5	1,19 <i>d</i> (7,2) 3H
23	24,16	1,51 <i>s</i> , 3H	C 77,6; C 127,5; C 210,2		24,3	1,51 <i>s</i> , 3H
24	169,7	-	-	-	169,9	-
25	20,8	2,27 <i>s</i> , 3H	C 169,7	-	21,0	2,26 <i>s</i> , 3H
1'	137,2	-	-	-	137,4	-
2' e 6'	129,0	7,13 <i>ddl</i> (7,3; 1,5) 2H	C 45,2; C 127,0; C 128,9	H- 7,13; H-7,24	129,3	7,12 <i>d</i> (7,1) 2H
3' e 5'	128,9	7,30 <i>ddl</i> (7,3 e 1,5) 2H	C 128,9; C 137,5; C 129,0	H- 7,24; H- 7,31	129,1	7,31 <i>t</i> (7,1) 2H
4'	127,0	7,24 <i>m</i> , 1H	C 128,9	H- 7,13; H- 7,31	127,3	7,25 <i>t</i> (7,8) 1H
7OH		1,93 <i>sl</i> , 1H			-	1,91 <i>s</i> , 1H
18 OH		4,65 <i>sl</i> , 1H			-	4,65 <i>s</i> , 1H

*Dados obtidos de Fathoni & Agusta (2019). Deslocamento químico em ppm, constantes de acoplamento em Hz. s (singleto), d (dubleto), t (triplete) dd (duplo dubleto), m (multiplete).

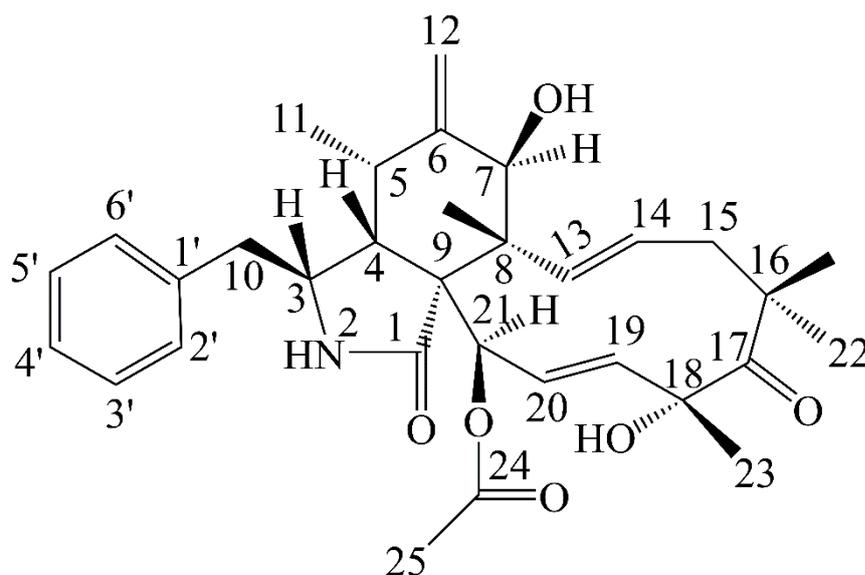


Figura 42: Estrutura química da substância III denominada citocalasina D

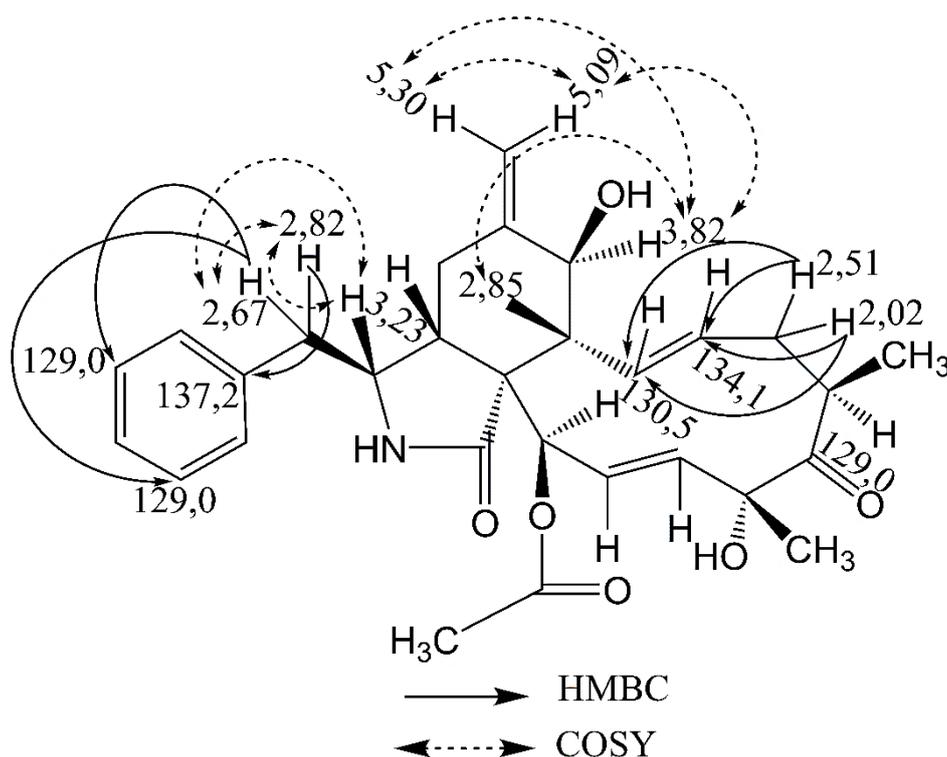


Figura 43: Principais correlações COSY e HMBC da substância III

A citocalasina D foi isolada primeiramente a partir de *Metarhizium anisopliae* (ALDRIDGE et al., 1967). Porém, essa molécula ocorre em outros gêneros e espécies fúngicas tais como: *Phomopsis*, *Xylaria. arbuscula*, *Engleromyces goetzii*, *Hypoxylon*

terrícola (EDWARDS et al., 1989; JIKAI et al., 2002; JOUDA et al., 2016; AMARAL et al., 2017).

A citocalasina D é capaz de se ligar aos filamentos de actina e bloquear a polimerização alterando a morfologia da célula, inibindo processos celulares, como a divisão, e/ou até mesmo induzir apoptose (COOPER, 1987). Essas características cooperam para que a citocalasina D seja amplamente utilizada em pesquisas que estudem estágios e mecanismos moleculares específicos na célula. Tanto que várias atividades são reportadas na literatura como um antitumoral, antiviral, antianafilático, (HUANG et al., 2012; ROSENTHAL et al., 1985; SHIN et al., 1997).

No presente trabalho o fungo cultivado em caldo de batata acrescido de extrato de levedura resultou na produção de 12 mg de citocalasina D. Porém no trabalho realizado por Fathoni & Augusta (2019) utilizando também caldo de batata o rendimento obtido foi de 0,05 g/L. ainda no mesmo trabalho esses autores elaboraram uma tabela comparativa entre a bioprodução de citocalasina D, conforme mostra o quadro 5. É possível verificar que os meios têm influência direta na capacidade produtiva dos fungos. O que remete a ideia para este trabalho outras condições e meios poderiam ser avaliadas visando o aumento da produção da citocalasina D.

Fonte	Meio de cultivo	Capacidade de bioprodução (g/L)
<i>Xylaria arbuscula</i>	Trigo em água destilada (1.333 g / l)	0,52733
<i>Xylaria</i> sp. BT05	Arroz em água do mar (1.000 g / l)	0,00085
<i>Xylaria</i> sp. DAP KRI-5	PDB em água esterilizada (24 g / l)	0,05763
<i>Xylaria</i> sp. SCSIO 156	2% de manitol, 2% de extrato de malte, 1% de glicose, 1% de glutamato de sódio, 0,05% de KH ₂ PO ₄ , 0,03% MgSO ₄ · 7H ₂ O, 0,1% de farinha de milho, 0,3% de extrato de levedura e 3% de sal marinho em água destilada (pH = 6,5)	0,00126
<i>Zygosporium mansonii</i>	3% de glicose, 2% de peptona e 0,5% de sódio, cloreto em água esterilizada (pH = 6,8)	

Quadro 5: Capacidade de bioprodução da citocalasina D isolada de alguns fungos.

Adaptado de (FATHONI & AGUSTA 2019)

5.2.5 Identificação estrutural da substância IV produzida por *C. dianesei*

A substância V produzida pelo *C. dianesei*, foi isolada por CLAE (Luna 5 μ C18, 100 A, 250 x 10 mm, volume de injeção 50 μ L, vazão 4,7 mL/minuto) utilizando metanol 45%, pH = 5, modo isocrático, a molécula apresentou tempo de retenção de 14,6 minutos, absorvendo nos comprimentos de onda de λ 254 nm e 280 nm, com rendimento de 3 mg. O espectro de RMN de ^1H é apresentado na figura 45 e expansão de hidrogênios aromáticos na figura 46.

Na região dos hidrogênios aromáticos foi possível verificar sinais em δ_{H} 10,91 (s, 1H), referente a hidrogênio ligado a heteroátomo, característico de hidrogênio do anel indólico. Ainda na região de aromática foi possível verificar sinais em δ_{H} 7,49 e δ_{H} 7,35 sendo ambos dubletos ($J = 7,92$ Hz, 1H), observou-se também em δ_{H} 7,06 e δ_{H} 6,97 dois tripletos ($J = 7,9$ e 1,0 Hz, 1H); e em δ_{H} 7,22 (d, $J = 2,33$ Hz, 1H). Foi notório um sinal na região alifática em δ_{H} 3,62 (s, com integral para 2H).

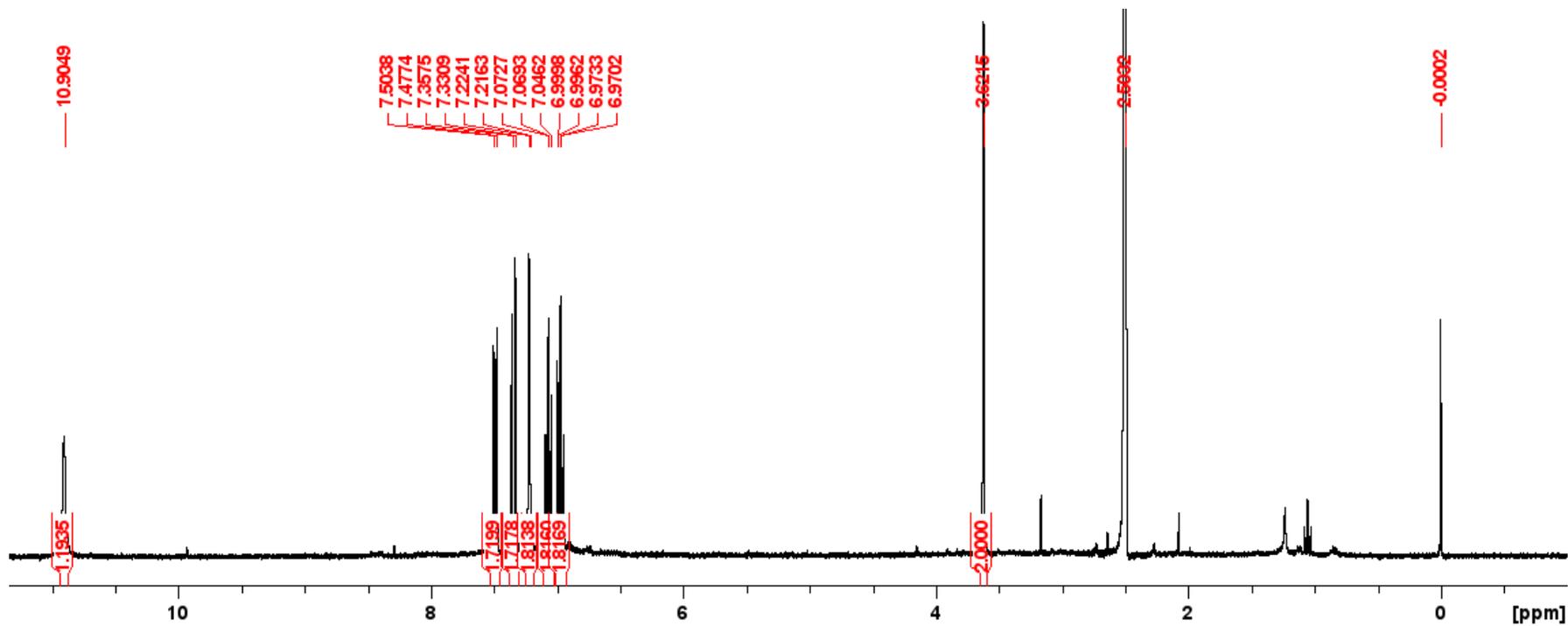


Figura 44: Espectro de RMN de ^1H da substância IV em $\text{DMSO-}d_6$ (300 MHz).

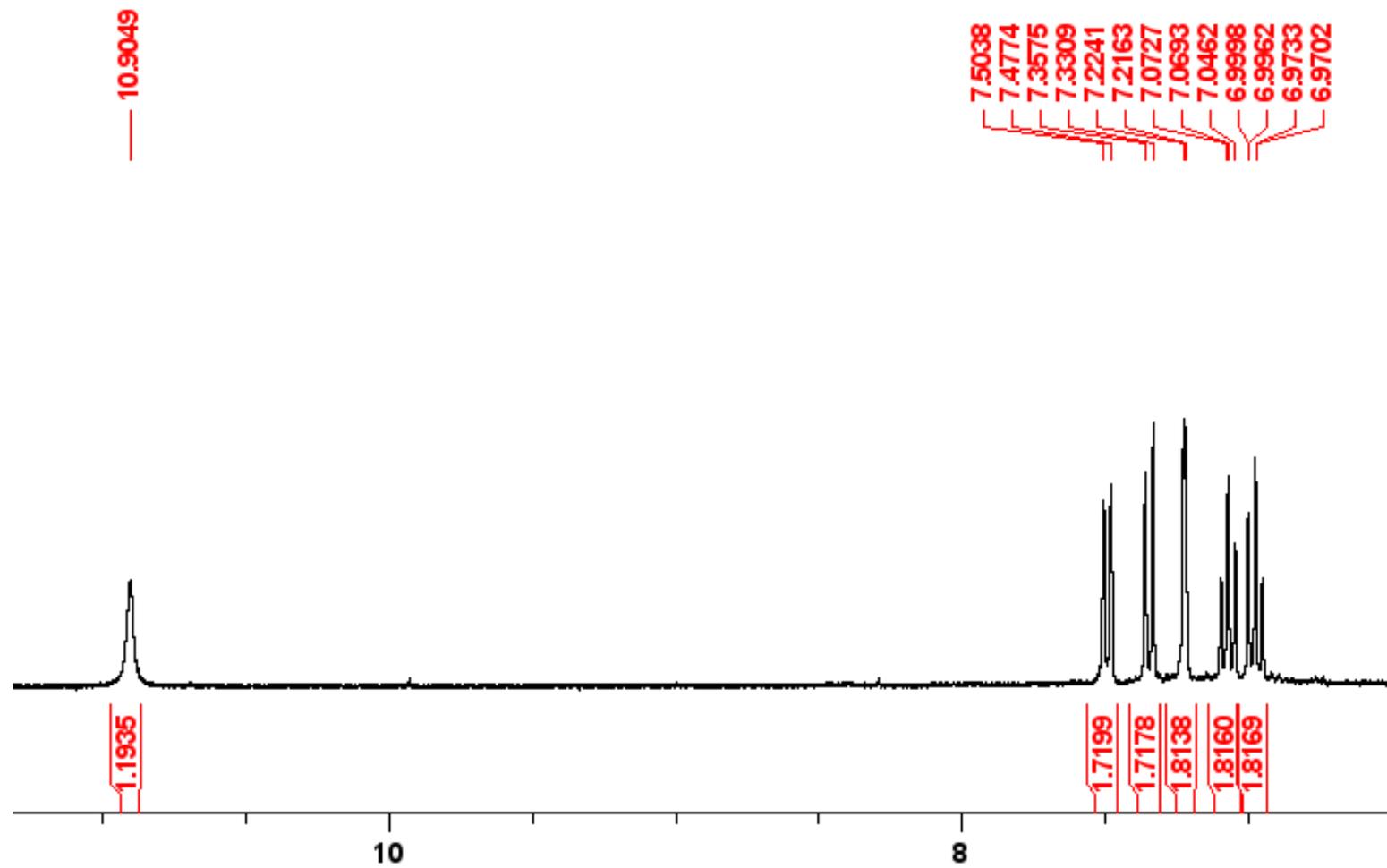


Figura 45: Expansão da região aromática do Espectro de RMN de ¹H de da substância IV em DMSO-d₆.

Os deslocamentos que correlacionam os hidrogênios com seus respectivos átomos de carbono foram obtidos pelo mapa de correlação bidimensional HSQC e são apresentados na figura 47, bem como os dados do HMBC na figura 47. A correlação dos hidrogênios é apresentada pelo COSY na figura 48.

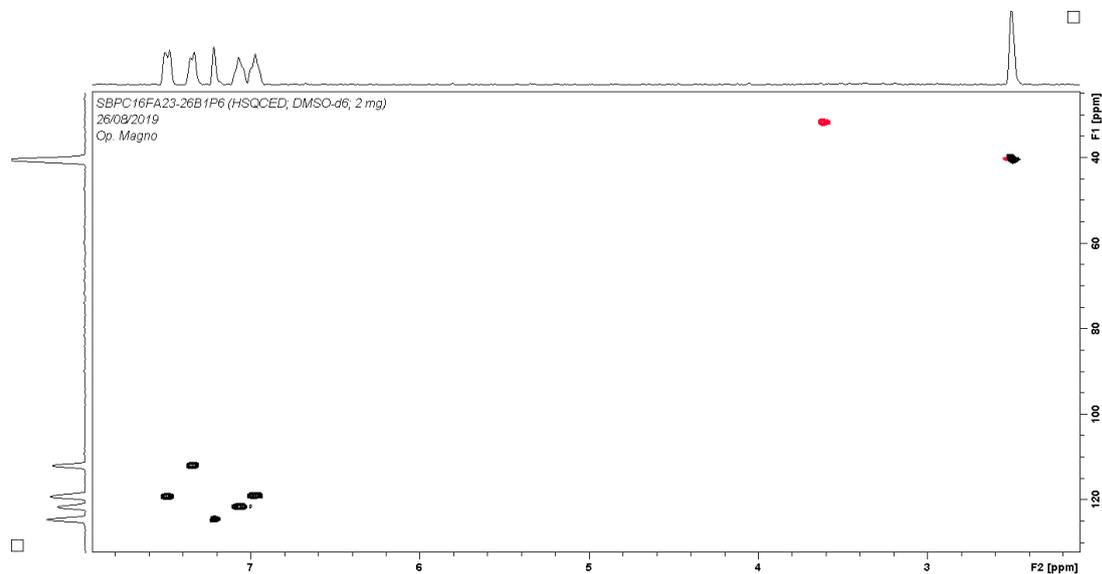


Figura 46: Mapa de correlação HSQC editado da substância IV.

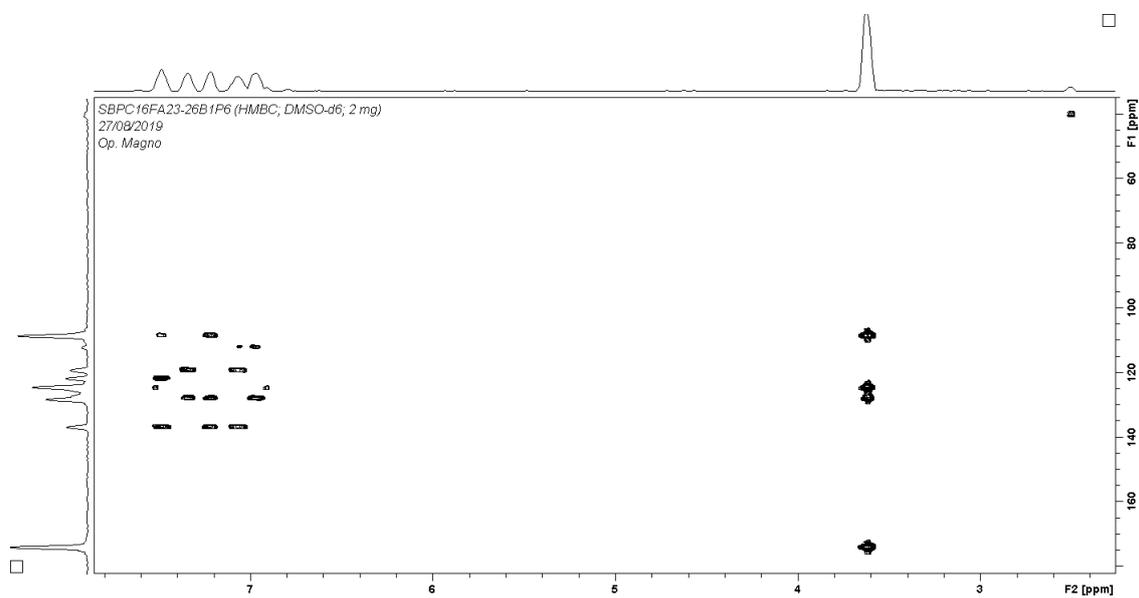


Figura 47: Mapa de correlação HMBC da substância IV.

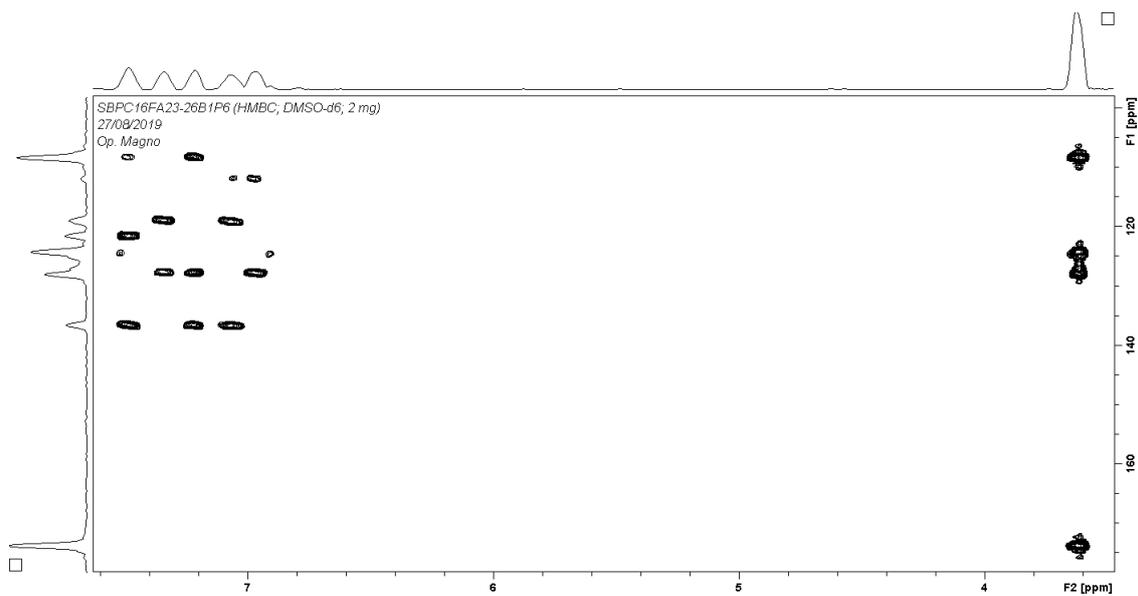


Figura 48: Expansão do mapa de correlação HMBC da substância IV.

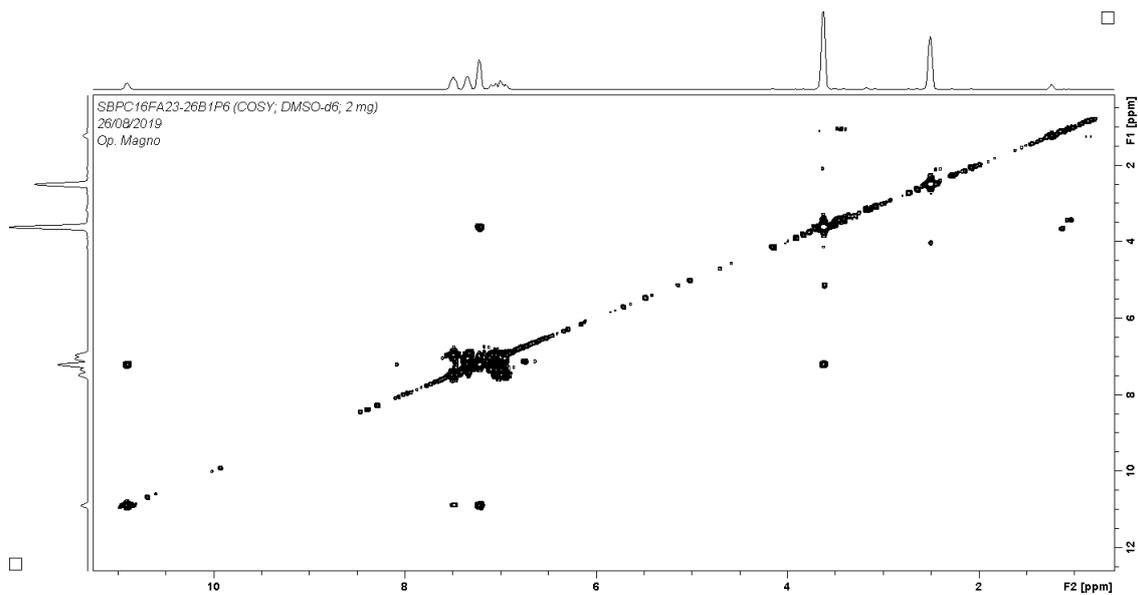


Figura 49: Mapa de correlação COSY da substância IV.

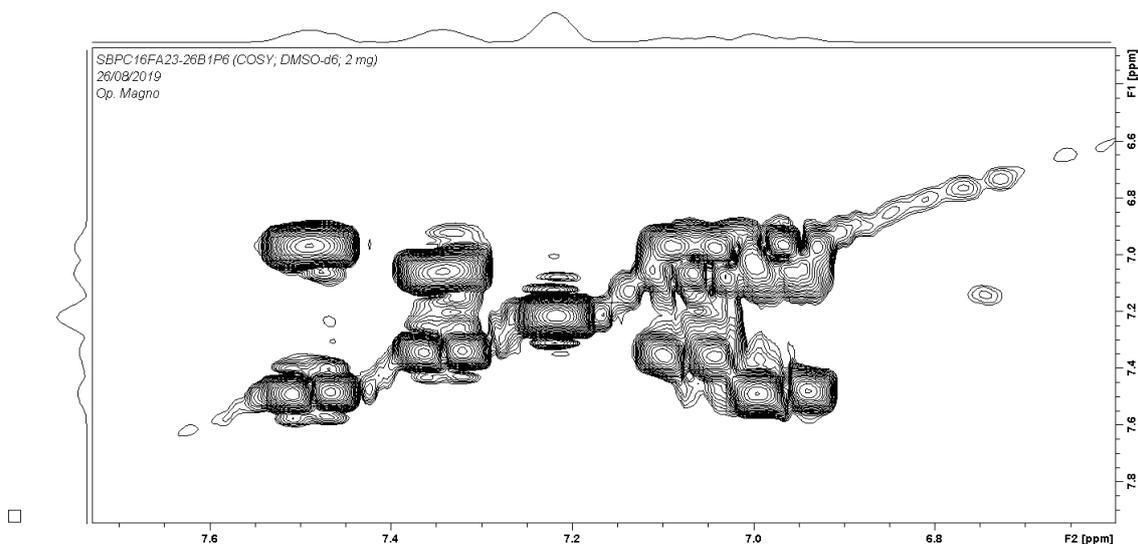


Figura 50: Expansão do mapa de correlação COSY da substância IV.

A tabela 18 apresenta as informações obtidas através dos espectros, comparando com os dados disponíveis na literatura. A partir das análises e do levantamento bibliográfico realizado, foi proposto que a substância se trata do alcaloide indólico 1H-indol-3-acetamida, sendo esta substância numerada utilizando como referência o triptamina.

Tabela 17: Dados de RMN de ^1H , HSQC, HMBC e COSY da substância IV (em $\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C). Dados da literatura *FACHIN-ESPINAR (2019) IV (em $\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C).

Posição	Dados apresentados				Dados da literatura	
	δ_{C}	δ_{H}	HMBC	COSY	* δ_{C}	* δ_{H}
1-NH		10,91 s (1H)	-	-	-	10,98 (s)
2	124,2	7,22 d (2,3) 1H	H-3,62, H-7,49	H-7,22	122,9	7,20 (s)
3	108,2	-	H-3,62, H-7,22, H-7,49	H-3,62	110,4	-
4	118,9	7,49 d (7,9) 1H	H-7,06, H-7,35	-	118,0	7,56 d (7,6) 1H
5	118,7	6,97 t (7,9 e 1,0) 1H	-	H-6,97	118,2	7,00 dd (8,5 e 7,6) 1H
6	121,3	7,06 t (7,9 e 1,0) 1H	H-7,35, H-7,49	H-7,49	120,9	7,09 dd (8,5 e 7,6) 1H
7	111,7	7,35 d (7,9) 1H	H-6,97, H-7,06	H_7,35	111,4	7,38 d (7,6) 1H
8	136,5	-	H-7,06, H-7,22, H-7,49	H-7,06	136,1	-

9	127,7	-	H-3,62, H-6,97, H-7,22, H-7,35	-	126,8	-
3'	31,6	3,62 s (1H)	-		24,9	2,97 (4H, m)
3''	173,68		H-3,62	H-7,22	40,1	2,97 (4H, m)

A análise por espectrometria de massas de baixa resolução apresentou valor de m/z de 174 (Figura 52) no modo positivo sugerindo a fórmula molecular $C_{10}H_{10}N_2O$, confirmando ser a 1H-indol-3-acetamida. Os demais picos intensos são referentes a adutos formados: $174 \times 2 + Na (23) = m/z 371$; $174 - NH_2CO (44) = m/z 130$.

Analysis Info Acquisition Date 10/23/2020 2:47:24 PM
 Analysis Name D:\Data\2020\Cecilia\Alunos\Weison\LC-MS\23-10-2020\ODS_ESI+-IndolAcetamida_1-2_01_2043.d
 Method 2043.m
 Sample Name ODS_ESI+-IndolAcetamida Instrument amaZon speed
 Comment XR-ODS 2X5
 A(H2O0.1%AcFormico)/B(MEOH)
 Fluxo:0.25 mL/minSplitde 0,045 mL(MS)/0,255mL(desc); P:2434psi
 V.inj: 3uL; C = 1 mg/mL (MeOH); Forno:35C;Inj: MeOH
 0-12min: 30-100%
 12-14min: 100%
 14-16min: 100-30%
 16-18min:30%

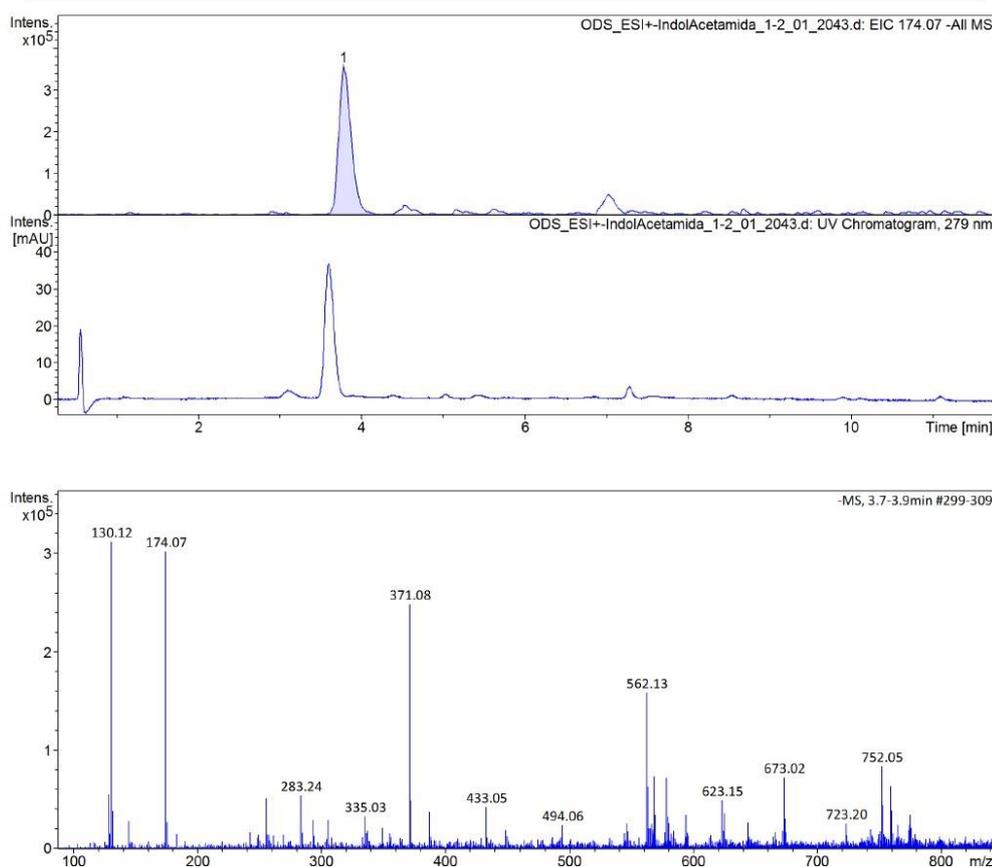


Figura 51: Espectro de massas de baixa resolução ESI positivo da fração SBPC16 EA 23-26 B1 P6 que contém a substância IV

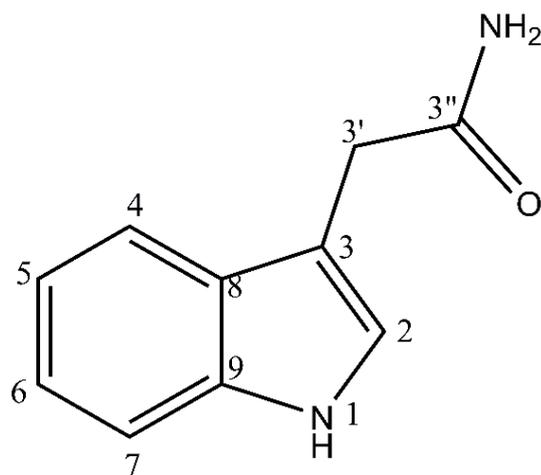


Figura 52: Estrutura da substância IV denominada 1H-indol-3-acetamida

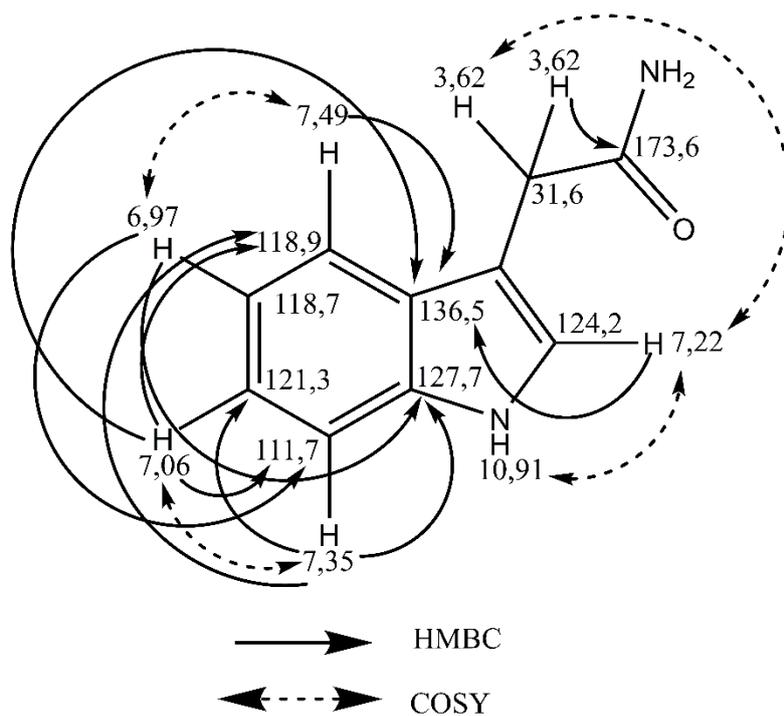


Figura 53: Correlações COSY e HMBC da substância IV

A 1H-indol-3-acetamida (IAM) é uma importante molécula que participa no processo de crescimento de plantas, sendo precursora na rota bioquímica, para produção de ácido indol acético (IAA), um importante fitohormônio vegetal (LEHMANN et al.,

2010). Na literatura diversos trabalhos abordam a produção de IAA por microrganismos endofíticos incluindo fungos. Nesse contexto também é evidenciada a ocorrência de IAA em distintas espécies no gênero *Colletotrichum* (CHUNG et al., 2003; MAOR et al., 2004). No trabalho realizado por Robinson e colaboradores (1998) verificaram Indol-3-acetamida foi a principal via utilizada pelo fungo para produzir ácido indol-3-acético em cultura *in vitro* (agitação e na ausência de luz) demonstrando assim a relevância da mesma para obtenção da auxina IAA, principalmente pela cepa *Colletotrichum gloeosporioides*. Ainda no mesmo trabalho foi perceptível que a produção e acúmulo de IAM ocorria nas primeiras 36 a 48 horas, em seguida, seu nível diminuía isso considerando 72 horas. Em outro trabalho feito por Numponsak et al. (2018) a produção de IAA via IAM foi expressiva, sendo que dos microrganismos endofíticos testados o único que teve sucesso na síntese *in vitro* foi o *Colletotrichum fruticola* o experimento foi conduzido com caldo de batata suplementado em modo agitado e no escuro.

A condição incomum nos dois trabalhos citados anteriormente foi a adição de triptofano nos meios de cultura, aqui nessa pesquisa utilizou-se extrato de levedura. Trata-se de um componente rico em proteínas e vitaminas do complexo B. Possivelmente a presença de aminoácidos indólicos nesse suplemento e pode ter influenciado na produção da indol acetamida.

A importância dessa substância não se limita apenas como intermediário para produção de IAA, como também indiretamente pode ser utilizada como agente indutor para biossíntese de metabólitos secundários. Estruturalmente a indol acetamida é semelhante com a triptamina, está teve sua utilização voltada para indução de alcaloides indólicos. Considerando a natureza indólica da IAM possivelmente a mesma poderia ser utilizada com esse propósito.

Os resultados obtidos nessa pesquisa confirmam o potencial biotecnológico do *C. dianesei* como candidato para produção de indol acetamida *in vitro*. Porém são necessárias testar outras condições experimentais que visem o aumento na produção da substância.

5.2.6 Identificação estrutural da substância V produzida por *C. dianesei*

A substância V foi isolada de coluna cromatográfica aberta, com rendimento de 4 mg. A análise por RMN de ¹H (figura 51) sugeriu um padrão espectral de esteroides,

apresentado sinais de metilas em δ 0,63 (*s*, 3H); δ 0,83 (*dd*, $J= 6,71\text{Hz}$, 4,56 Hz, 6H); δ 0,92 (*d*, $J= 6,89$ Hz, 3H) δ 0,96 (*s*, 3H); δ 1,04 (*d*, $J= 6,61\text{Hz}$, 3H); δ 1,47 (*m*, 3H).

A partir do espectro de ^{13}C (figura 55) e do mapa de correlação HSQC foi possível verificar 28 carbonos, sendo 6 C de metilas (δ 12,05; δ 16,28; δ 17,61; δ 19,65; δ 21,11; e δ 33,09), 7 metilênicos (δ 21,11; δ 22,99; δ 28,30; δ 31,99; δ 38,37; δ 39,07; δ 40,8), 11 metínicos (δ 70,4; δ 119,58; δ 116,28; δ 46,24; δ 54,56; δ 55,71; δ 40,44; δ 135,57; δ 131,97; δ 42,82; δ 33,09), e 4 quaternários (δ 42,82; δ 37,02; δ 141,39; δ 139,79) (Figura 4 e 5). Todas as informações obtidas condizem com os dados apresentados na literatura para o esteroide ergosterol (Tabela 19).

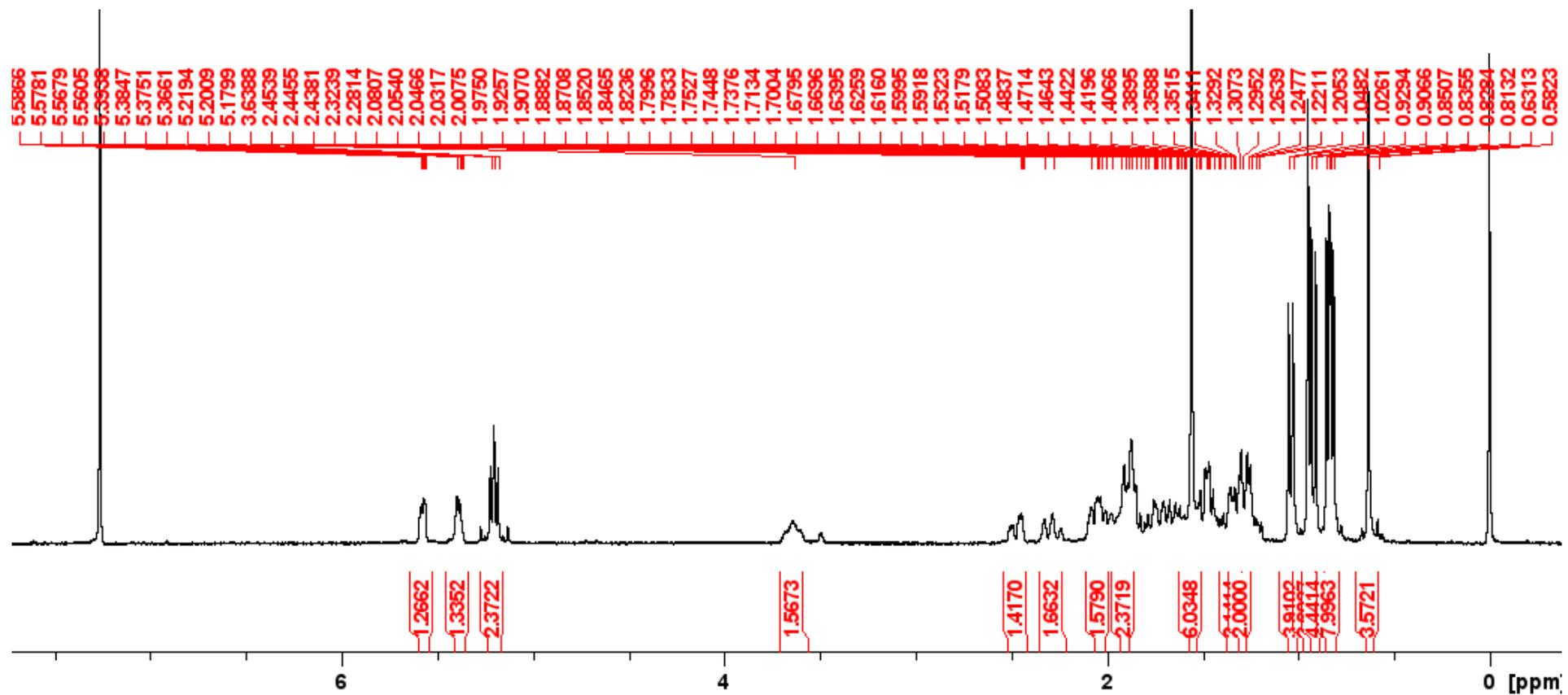


Figura 54: Análise de RMN de ^1H da substância V em CDCl_3 (300 MHz)

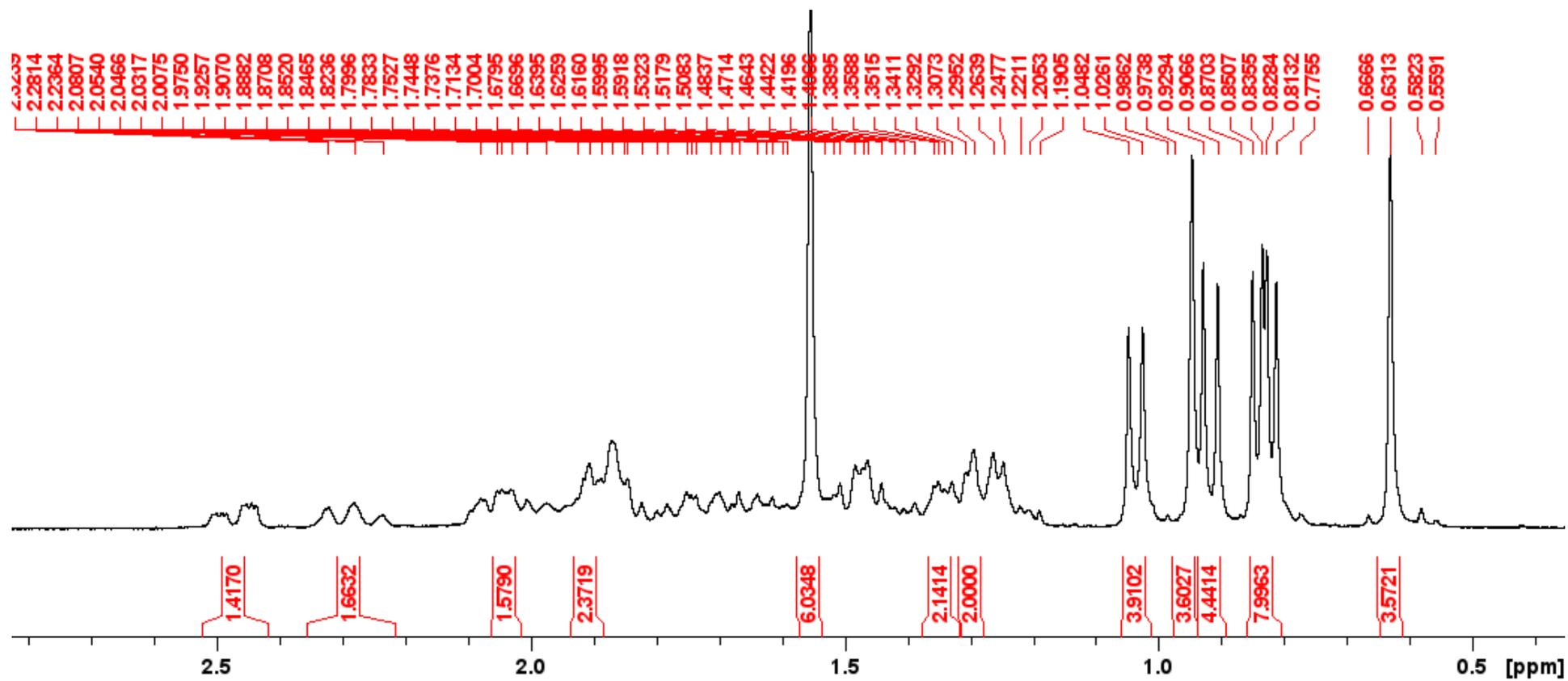


Figura 55: Expansão na região de $\delta_H 0,5$ a $\delta_H 2,5$

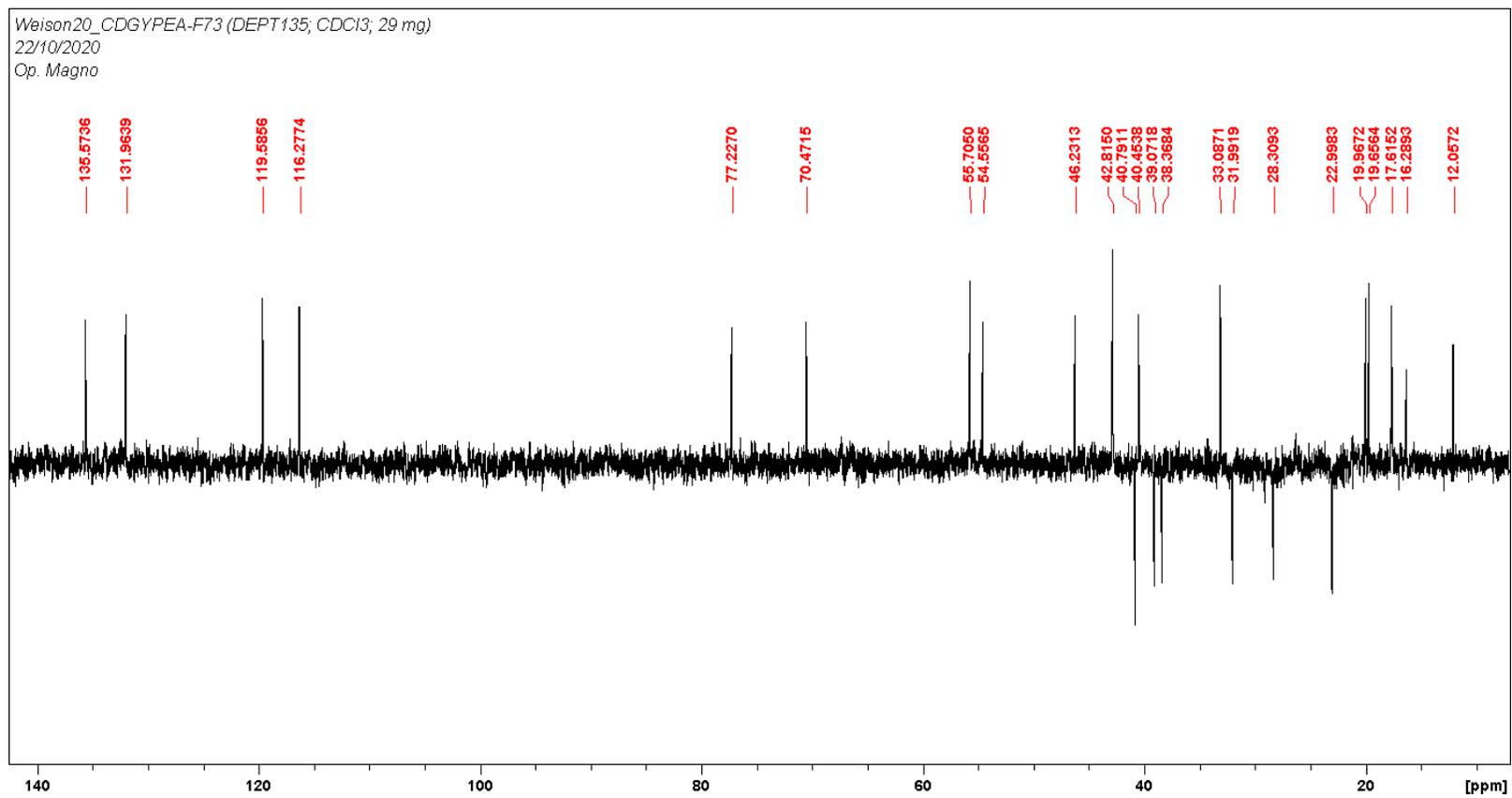


Figura 56: Espectro de RMN de DEPT 135° da substância V em CDCl₃ (75 MHz)

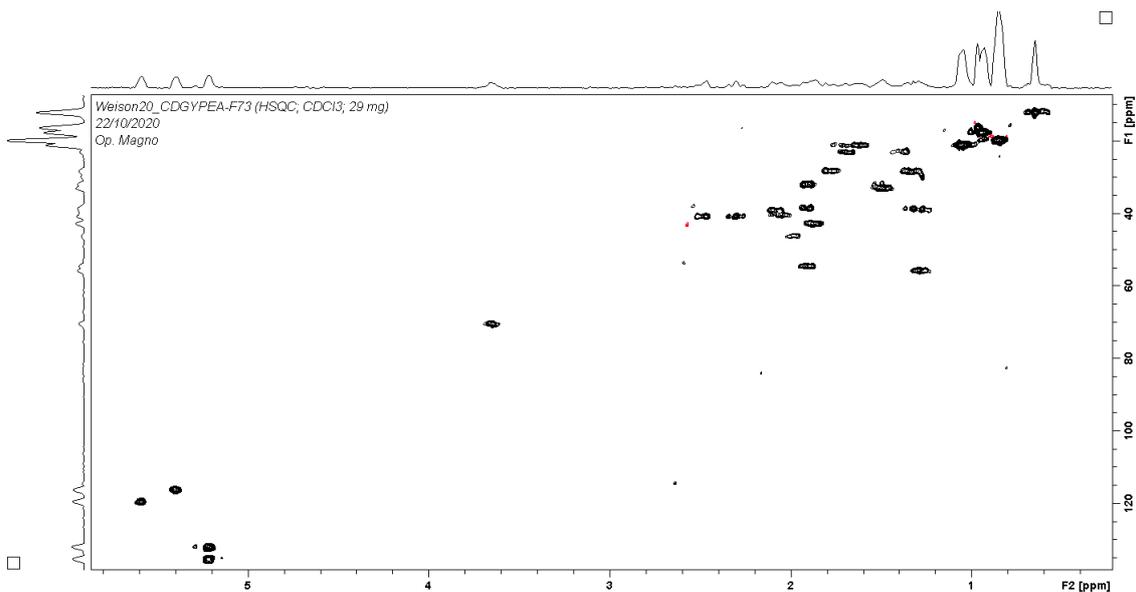


Figura 57: Mapa de correlação HSQC da substância V

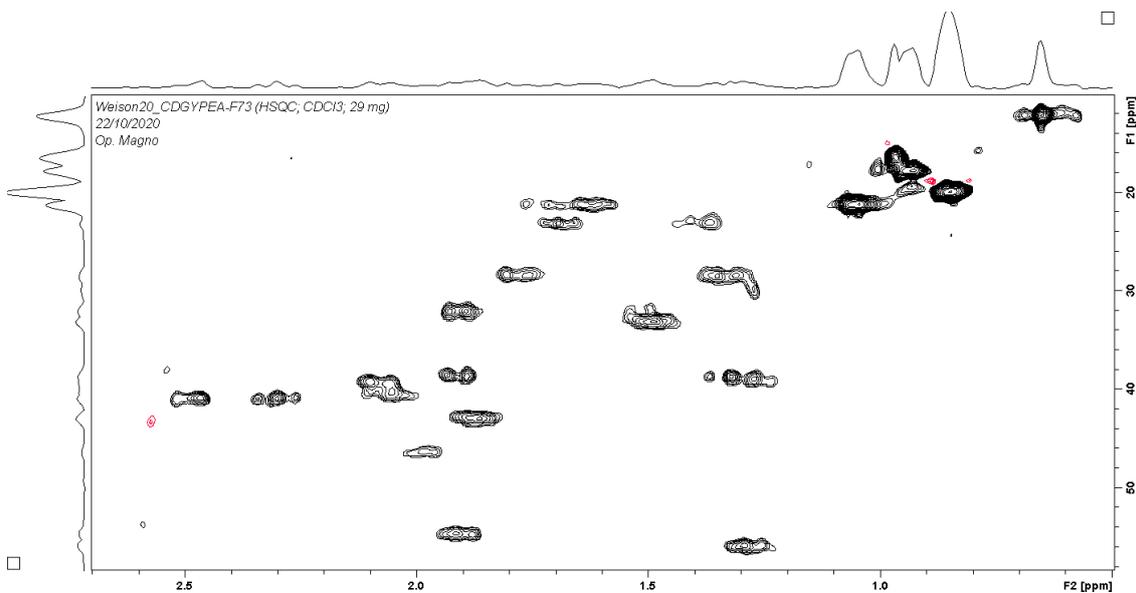


Figura 58: Expansão do mapa de correlação HSQC da substância V

As correlações dos hidrogênios com carbonos a longa distância foram evidenciadas pelo mapa de correlação HMBC (Figura 76 a 78), e as correlações dos hidrogênios a longa distância verificada pelo COSY (Figura 79).

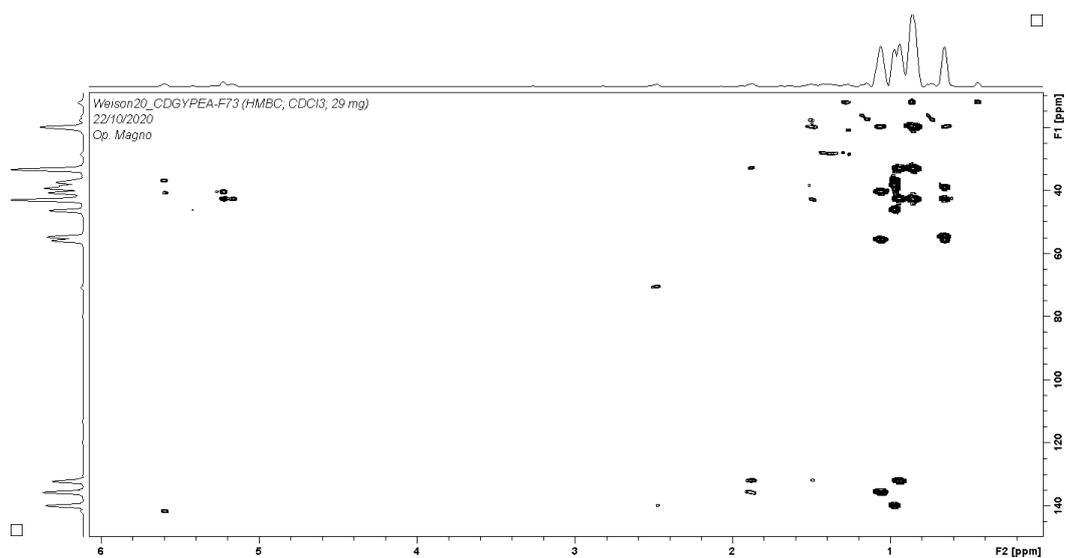


Figura 59: Mapa de correlação HMBC da substância V



Figura 60: Expansão do mapa de correlação HMBC da substância V

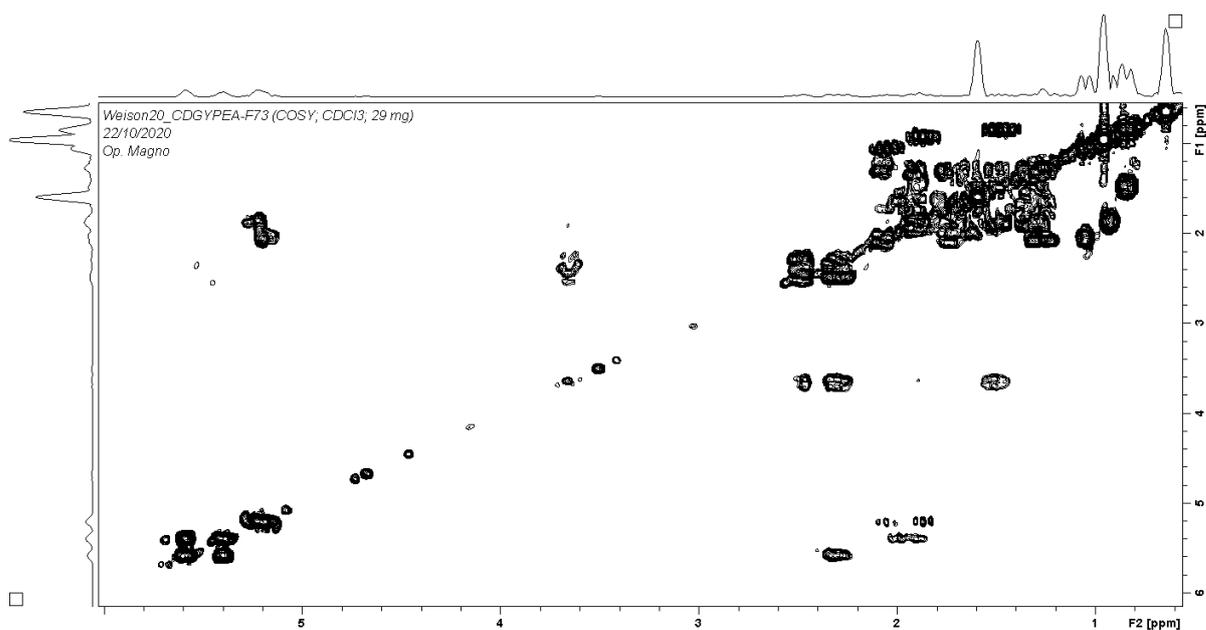


Figura 61: Mapa de correlação COSY da substância V

Tabela 18: Dados de RMN de ^{13}C da substância V (em CDCl_3 75 MHz (C)) comparados na literatura. Dados da literatura em CDCl_3 : 50 MHz (C))

Posição	Apresentados δc	*Literatura δc	Tipos de carbono
1	38,36	38,3	CH_2
2	31,99	31,9	CH_2
3	70,4	70,4	CH
4	40,8	40,7	CH_2
5	141,38	141,3	
6	119,58	119,6	CH
7	116,28	116,3	CH
8	139,7	139,7	
9	46,23	46,2	CH
10	37,02	37,0	
11	21,11	21,1	CH_2
12	28,3	28,2	CH_2
13	42,8	42,8	
14	54,5	54,5	CH
15	22,99	23,0	CH_2
16	39,07	39,1	CH_2
17	55,71	55,7	CH
18	12,05	12,0	CH_3
19	17,61	16,2	CH_3
20	40,44	40,3	CH
21	19,6	19,6	CH_3
22	135,57	135,5	CH
23	131,97	132,0	CH

24	42,8	132,0	CH
25	33,08	42,8	CH
26	19,64	33,0	CH ₃
27	19,96	17,5	CH ₃
28	16,28	19,9	CH ₃

*Marinho (2005)

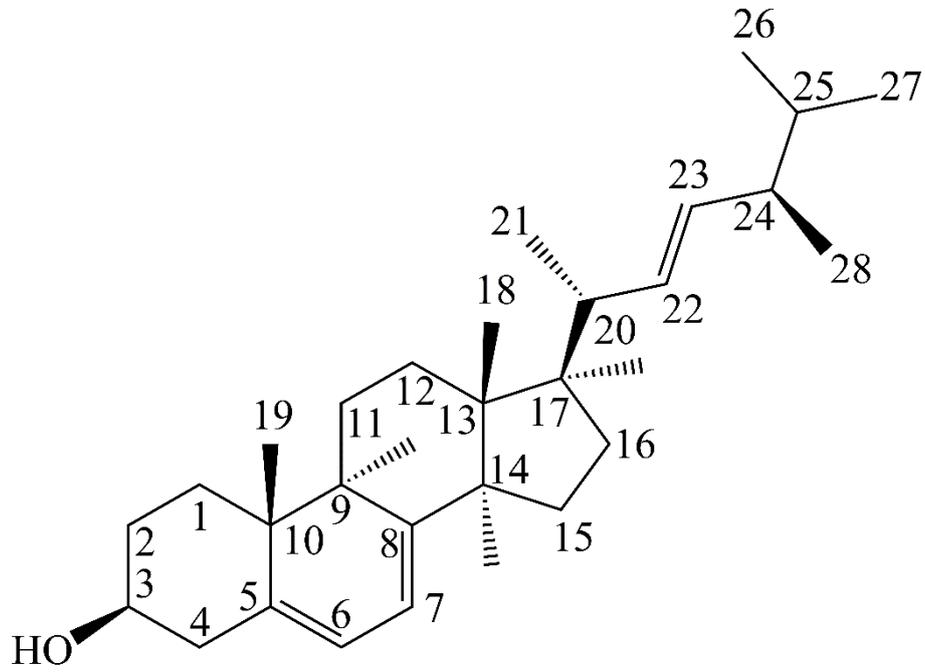


Figura 62: Estrutura química da substância V denominada ergosterol

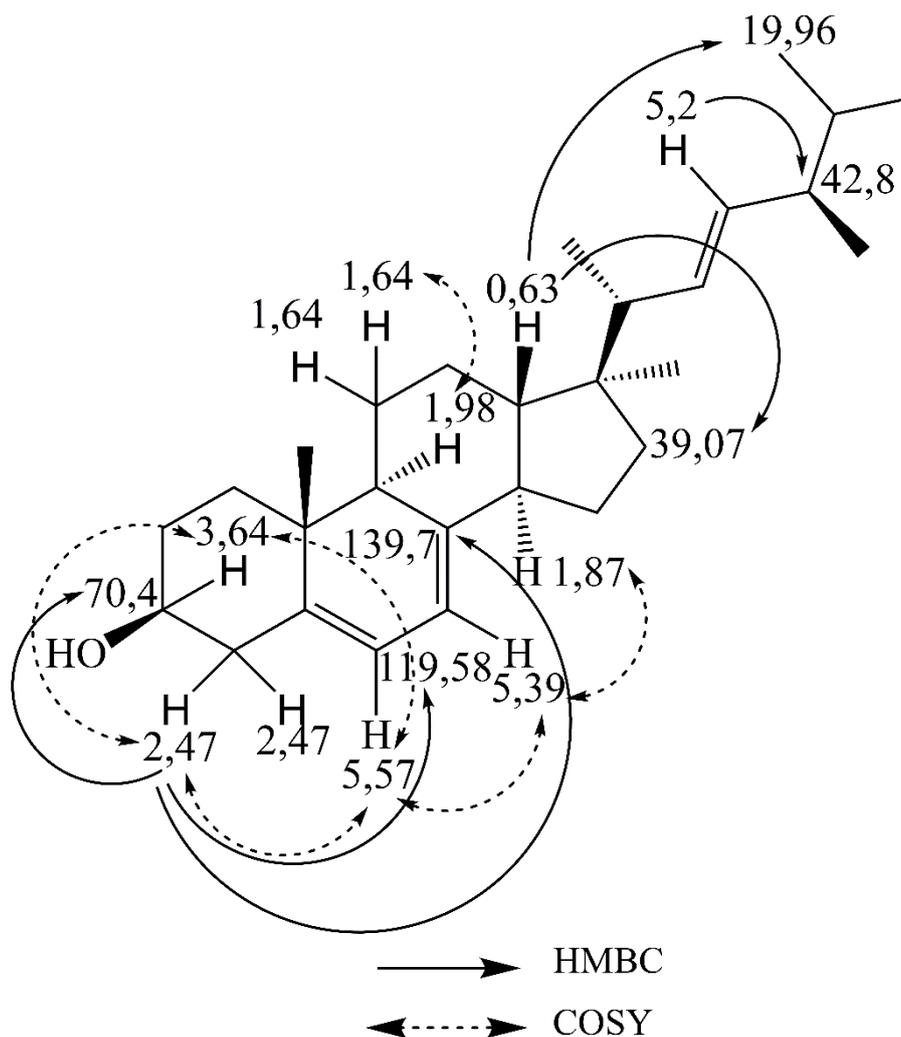


Figura 63: Principais correlações observadas em COSY e HMBC da substância V

A substância V (figura 76 e 77) produzida pelo fungo *C. dianesei*, trata-se do ergosterol, um esteroide presente na membrana plasmática de fungos, sendo uma molécula primordial para estabilidade da bicamada lipídica (KÖGEL-KNABER & AMELUNG, 2014). Tanto que em fungos patogênicos a via biossintética do ergosterol é alvo para várias drogas, ou até mesmo o próprio ergosterol (HATA et al., 2010). Além da importância médica, o ergosterol é utilizado para quantificação da biomassa fúngica, sendo relevante para determinar o crescimento micológico (GALVÃO et al., 2003).

Com enfoque biotecnológico o ergosterol serve como precursor na derivação de substâncias bioativas. No trabalho feito por Liu et al., (2018) verificou-se que duas novas moléculas derivadas de ergosterol demonstraram atividade germicida com amplo espectro de ação. Em outro trabalho envolvendo influenza, a substância derivada exibiu

atenuação de efeitos pró inflamatórios, sendo uma droga potencial no uso adjunto com antivirais (ZHOU et al., 2019).

Diante da importância biotecnológica do ergosterol as atividades biológicas apresentadas motivam novas abordagens seja como uso da mesma como molécula elicitora em experimentos *in vitro* ou em experimentos de semi síntese.

6.2 Ensaio biológico

6.2.1 Antimicrobiano

As inibições do crescimento microbiano sugeriram atividade antibiótica na maioria dos extratos e fases avaliados. De maneira geral os extratos AcOEt foram os que mais apresentaram inibições quando comparado aos outros. Isso pode ser justificado por se tratar de um solvente de polaridade intermediária interagindo com substâncias apolares e polares, Garcia et al., (2012) verificou em sua pesquisa que a extração com AcOEt proporcionou a obtenção de resultados satisfatórios em ensaios antimicrobianos.

Para o fungo *Xylaria* sp1. dos doze microrganismos testados cinco foram sensíveis (*S. aureus*, *S. enteritidis*, *A. baumani*, *C. albicans* e *E. tarda*) conforme evidenciado na tabela 20. Das bactérias que demonstraram sensibilidade a maioria são gram-negativas, fato relevante pois as mesmas são destacadas na lista da OMS como prioritárias por frequentemente exibirem mecanismos de resistência aos antibióticos usuais.

Na literatura diversos trabalhos confirmam a potencialidade da atividade antimicrobiana de espécies de *Xylaria*. Na pesquisa feita por Hacioglu et al., (2011) com *Xylaria polymorpha*, constatou-se que os extratos apresentaram atividade contra *S. aureus*, *C. albicans*. Em outro trabalho feito por Canli et al., (2016) também encontraram sensibilidade nos mesmos microrganismos onde o extrato de *Xylaria hypoxylon* inibiu o crescimento de *S. aureus*. Em outra pesquisa foi notória ampla atividade dos extratos de *Xylaria* contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (ORACHAIPUNLAP et al., 2015).

É importante ressaltar os resultados referentes à atividade inibitória do extrato AcOEt obtido de *Xylaria* sp. 1 frente a *C. albicans* é relevante. Pois esse fungo apesar de fazer parte da microbiota humana, quando assume um aspecto patológico causam candidíases oportunistas e sistêmicas, que afetam principalmente pacientes imunodeprimidos e exibem complexos mecanismos de resistência, dificultando o tratamento deste tipo de infecção (LEITE JÚNIOR et al., 2011; FARMAKIOTIS & KONTOYIANNIS, 2017).

Também foi constada atividade antibiótica para os extratos e fases do fungo *C. dianesei*. Das cepas testadas, cinco tiveram seu crescimento comprometido (*P. fluorescens*, *S. aureus*, *S. enteritidis*, *A. baumani*, *E. tarda*), principalmente a cepa *S. aureus*, pois demonstrou sensibilidade para mais de um extrato (Tabela 20).

No levantamento bibliográfico realizado para o gênero *Colletotrichum* o volume de trabalhos publicados com enfoque antimicrobiano é menor quando comparado a *Xylaria*. e para o fungo *C. dianesei* não foram encontradas publicações em relação atividade antibiótica, entretanto em outras espécies de *Colletotrichum* foram constatadas atividades antibióticas frente aos mesmos microrganismos testados nessa pesquisa (ARIVUDAINAMBI et al., 2011; PACKIARAJ et al., 2016).

Anteriormente no trabalho realizado por Souza e colaboradores (2004) fungos dos gêneros *Xylaria* e *Colletotrichum* haviam sido isolados de *Palicourea longiflora* foi possível verificar que os extratos obtidos desses fungos apresentaram atividade antibiótica contra *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

As atividades antimicrobianas apresentadas nesta pesquisa, com fungos endofíticos isolados de *Palicourea corymbifera*, podem ser atribuídas tanto pontualmente a presença de um único metabólito secundário como também pela sinergia entre duas ou mais moléculas, sendo necessário assim estudos subsequentes a fim de esclarecer tais atividades.

Tabela 19: Extratos e fases que apresentaram atividade antimicrobiana

Extrato	<i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>E. tarda</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>A. baumani</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. freundii</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	CIM em mg/mL											
<i>Xylaria</i> sp.1. Extrato DCM	-	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xylaria</i> sp.1Ext AcOEt	-	-	-	-	-	-	1000	-	500	500	-	-
<i>Xylaria</i> sp.1Fase DCM	-	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xylaria</i> sp.1Extrato MeOH	-	-	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Xylaria</i> sp.1 Extr MeOH	-	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. dianesei</i> Extr AcOEt	-	500	1000	-	1000	-	500	-	-	-	-	-
<i>C. dianesei</i> Extr DCM	-	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. dianesei</i> Extr MeOH	-	500	-	-	-	-	-	-	1000	-	-	-
<i>C. dianesei</i> Fase AcOEt	-	-	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-

6.2.2 Bioensaio antimicrobiano com citocalasina D e ergosterol

Considerando a susceptibilidade de patógenos aos antimicrobianos, eventualmente determinada substância pode exibir atividade antibiótica seletiva ou nenhuma atividade. As substâncias citocalasina D e ergosterol avaliadas no ensaio, não inibiram o crescimento das bactérias e leveduras testadas. Em todos os gráficos é perceptível valores superiores de crescimento, quando comparado ao controle negativo, conforme evidencia a média das absorbâncias nas figuras 60, 61 e 62. Destacando principalmente a bactéria *S. marcescens*, que apresentou crescimento superior aos outros microrganismos.

Em aspectos bioquímicos as substâncias podem influenciar o crescimento de microrganismos de duas maneiras; inibindo o desenvolvimento celular consequentemente causando a morte, ou as substâncias podem estimular, sendo úteis como co-fatores ou diretamente ser utilizadas como fonte de carbono (PANDE & KOST, 2017; TORTORA et al., 2017). A princípio os resultados observados sugerem que todas as moléculas avaliadas podem ter sido utilizadas como fonte de carbono e energia garantindo assim o crescimento de todos os microrganismos testes.

Em uma outra abordagem visando a obtenção de moléculas antibióticas, existe a possibilidade em oportunidades futuras de realizar alterações estruturais nas substâncias, através de semi síntese por exemplo, técnica satisfatória apresentada em alguns trabalhos (SOARES et al., 2019; OLSUFYEVA & YANKOVSKAYA, 2020).

Apesar de nessa pesquisa as substâncias não terem atividade antimicrobiana, as moléculas citocalasina D e ergosterol podem ser testadas ainda contra outras cepas patogênicas.

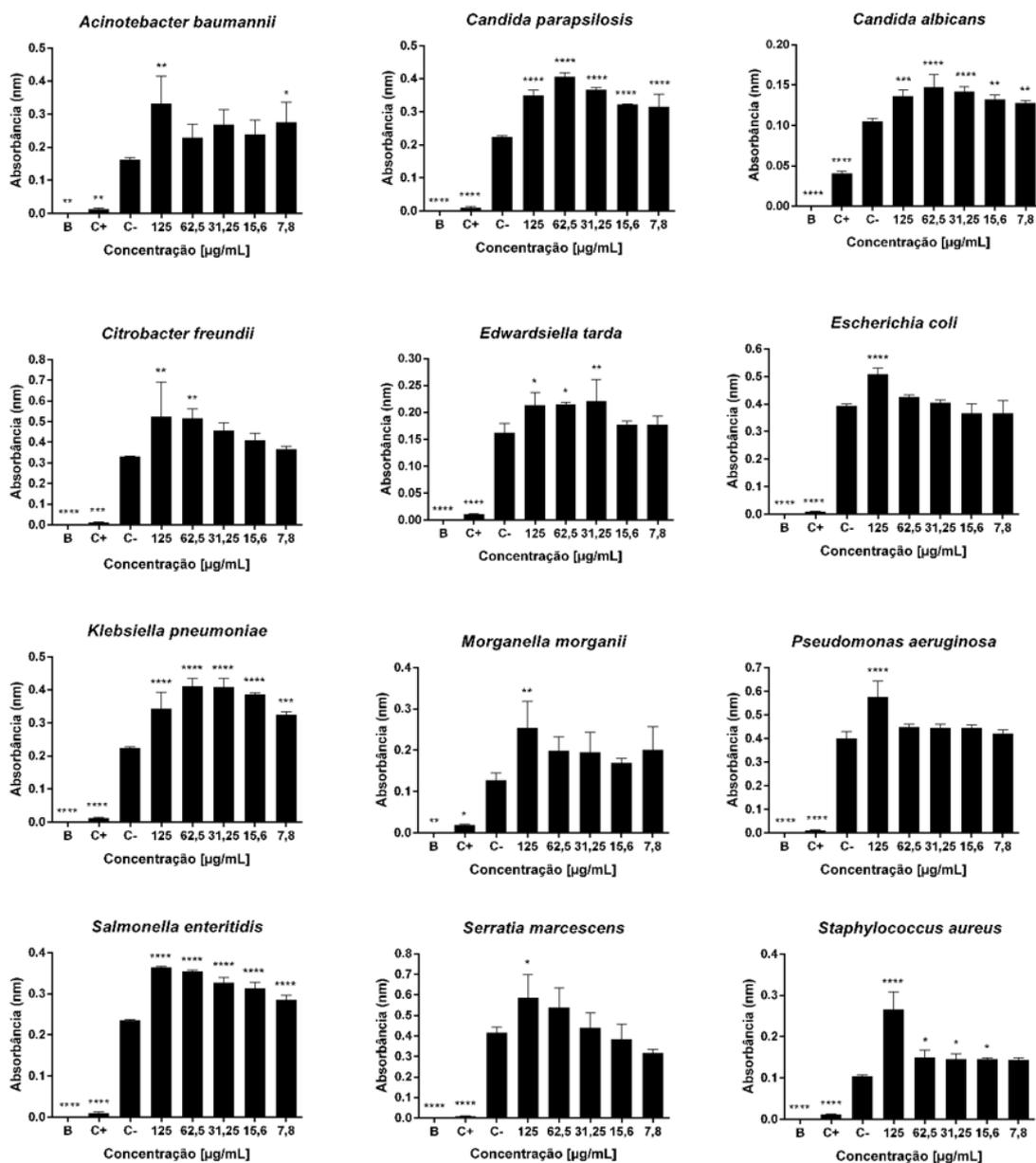


Figura 64: Gráficos com a média de absorbância para as diferentes concentrações ± Desvio padrão de citocalasina D testada frente aos microrganismos testes

Legenda: B- meio de cultura, C+ Controle positivo, C- Controle negativo. Nível de significância em relação ao controle negativo representado por: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$), *** ($p < 0,0001$), **** ($p < 0,00001$).

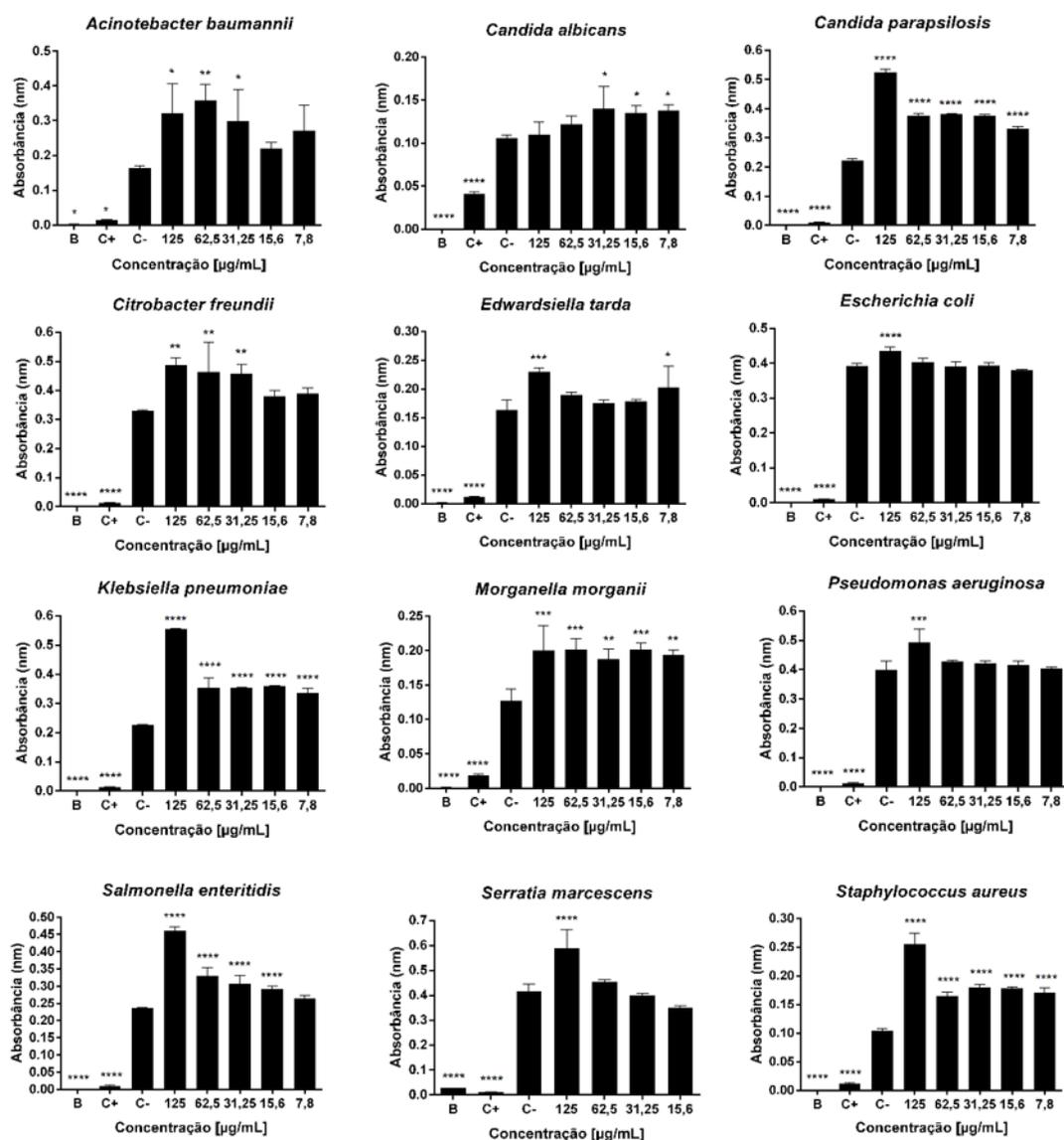


Figura 65: Gráficos com a média de absorbância para as diferentes concentrações ± Desvio padrão de ergosterol testado frente aos microrganismos testes

Legenda: B- meio de cultura, C+ Controle positivo, C- Controle negativo. Nível de significância em relação ao controle negativo representado por: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$), *** ($p < 0,0001$), **** ($p < 0,00001$).

6.2.3 Ensaio fitotóxico dos extratos

No ensaio de fitotoxicidade foi verificado uma redução de 36 % na porcentagem de germinação quando as sementes foram submetidas ao extrato de *Colletotrichum dianesei* (Figura 65). A velocidade de germinação sofreu um atraso de 63,8 % para *C. dianesei* e 43,9 % para *Xylaria* sp. 1 (Figura 66).

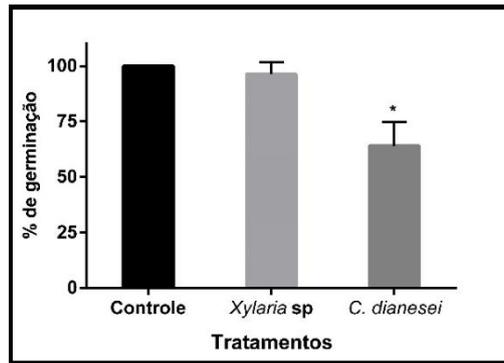


Figura 66: Porcentagem de germinação de sementes de *Lactuca sativa* sob influência do extrato metanólico de *Xylaria sp.1* e *C. dianesei*

Legenda: ** ($p < 0,001$)

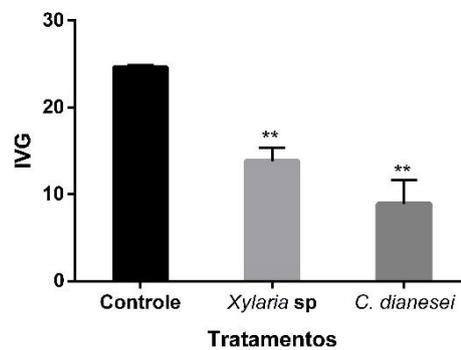


Figura 67: Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Lactuca sativa* sob influência do extrato metanólico de *Xylaria sp.1* e *C. dianesei*

Legenda: ** ($p < 0,001$)

Os extratos metanólicos dos dois fungos testados interferiram negativamente no crescimento radicular e da parte aérea (hipocótilo + coleótilo) de *L. sativa* (Figura 67). A interferência no crescimento pôde ser qualitativamente determinada, sendo inclusive notório a presença de início de necrose em algumas plântulas (Figura 68).

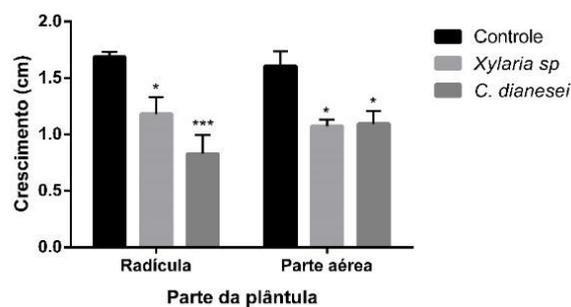


Figura 68: Crescimento radicular e da parte aérea de plântulas de *Lactuca sativa*

Legenda: * ($p < 0,5$), *** ($p < 0,0001$).

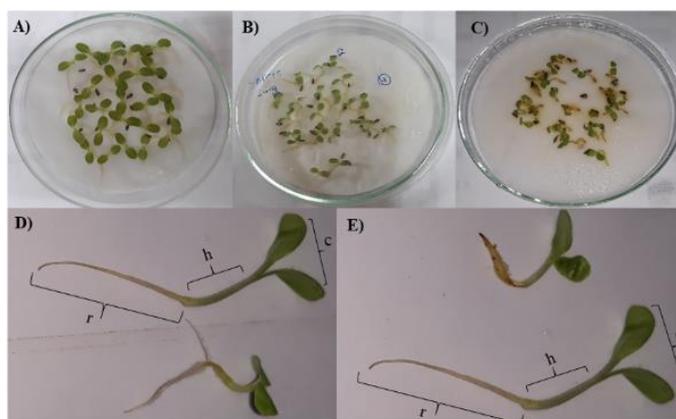


Figura 69: Interferência dos extratos sobre o crescimento de *Lactuca sativa*

Legenda: A) Placa controle. B) Sementes submetidas ao extrato metanólico de *Xylaria* sp. C) Sementes submetidas ao extrato metanólico de *C. dianesei*. D) Comparação entre o controle e fungo *Xylaria* sp. E) Comparação entre *C. dianesei* e controle. As letras nas plântulas controles correspondem a: r - radícula, h - hipocótilo e c - coleóptilo.

Dentre os parâmetros avaliados na atividade alelopática, a germinação tem se mostrado menos sensível a aleloquímicos, estando em alguns casos maiores interferências evidenciadas sobre a velocidade de germinação e o crescimento (BRASIL, 2009). O que corrobora com o teste realizado nesse trabalho, em que não houve interferência na germinação das sementes submetidas ao extrato de *Xylaria* sp., mas foi notório uma influência negativa sobre a velocidade de germinação e o crescimento.

Outras avaliações fitotóxicas já foram realizadas com espécies do gênero *Xylaria* e *Colletotrichum*. O extrato AcOEt do filtrado de cultura, sem células, de *Colletotrichum dematium*, apresentou ação fitotóxica frente *Parthenium hysterophorus* L. (MAGUIRE, 1962).

Considerando a inibição ou estímulo de 50 % como padrão satisfatório na avaliação de atividades fitotóxicas, resultados interessantes foram evidenciados para o extrato metanólico de *C. dianesei*. Em que a velocidade de germinação de *L. sativa* foi reduzida em 63,8 %; e o crescimento radicular inibido em 51,1 % nas plântulas de alface.

Dentre algumas das classes químicas com grande interferência em processos do desenvolvimento vegetal estão as substâncias fenólicas, que atuam sobre enzimas coordenadoras de diversos processos fisiológicos, e os terpenos, que apresentam inibição na germinação e no crescimento de plantas (SINGH et al., 2010).

6.2.4 Fitotoxicidade de citocalasina D

No ensaio de fitotoxicidade com a citocalasina D não houve diferenças significativas quanto a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação (tabela 21). A substância testada reduziu o crescimento de *L. sativa* causando efeito mais intenso sobre a radícula (figura 69).

Tabela 20: Porcentagem e velocidade de germinação de *Lactuca sativa*

Tratamento	Concentração $\mu\text{g/mL}$	Germinação (%) \pm SD	IVG \pm SD
Controle	0 $\mu\text{g/mL}$	91 \pm 3.7	11,33 \pm 0.4
citocalasina D	125 $\mu\text{g/mL}$	94 \pm 2.5	11,75 \pm 0.3

Legenda: SD- Desvio padrão

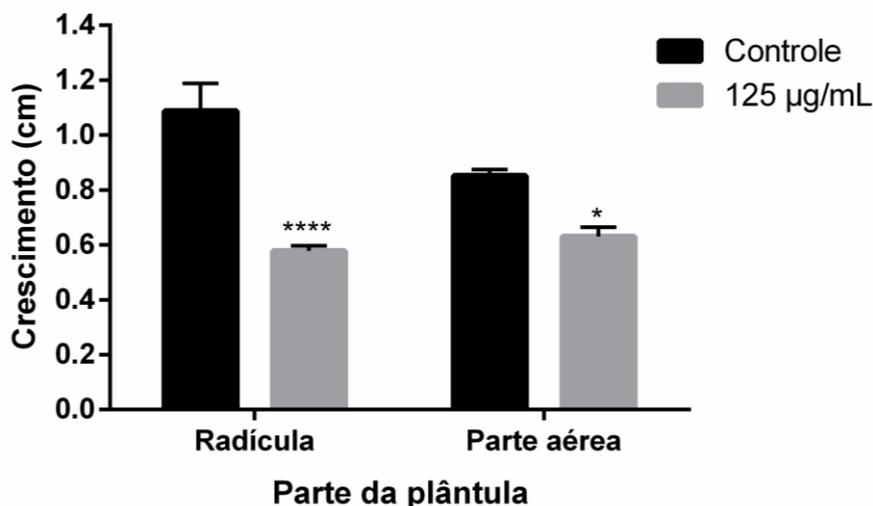


Figura 70: Crescimento de *Lactuca sativa* sob interferência da substância

Resultados significativos são seguidos por: * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

Assim, minuciosas alterações possivelmente por intermédio da citocalasina D foram observadas nas plântulas, como diminuição de coleótilo (Figura 70 a); ausência de pelos radiculares nas plântulas (Figura 70 b); e dificuldade em visualmente diferenciar transição entre radícula e hipocótilo na plântula submetidas a substância (Figura 70 c).

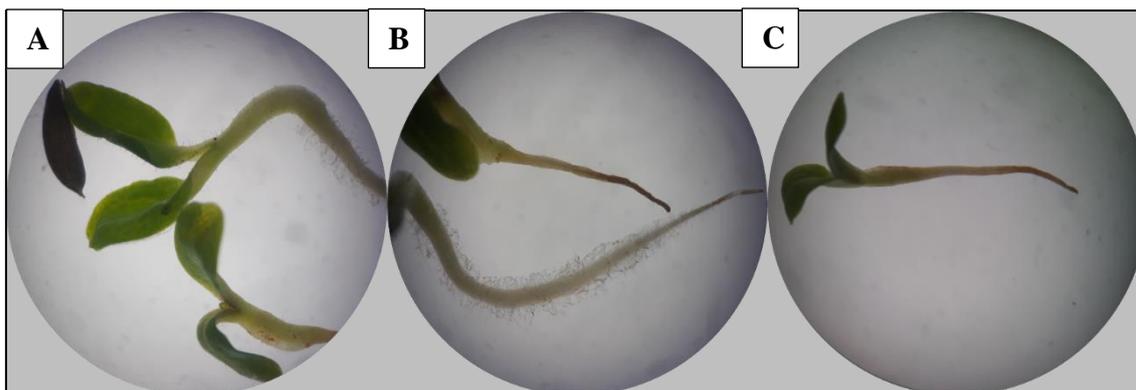


Figura 71: Plântulas de *L. sativa* observadas em lupa (Aumento de 1.5x)

Legenda: A. Comparação da parte aérea, B. Comparação da radícula, C. Aspecto geral da plântula submetida a 125 µg/mL de citocalasina D

Outro detalhe observável foi em relação ao volume de água, pois foi adicionado a mesma quantidade de água (3 mL), em todas as placas. Porém nas placas que continha a substância a quantidade de água no fim do experimento visualmente era maior do que a quantidade de água nas placas controle. Sugerindo que a substância pode ter influenciado a absorção de água pelas plântulas de *L. sativa*.

Os resultados dessa pesquisa estão de acordo com o que é mencionado na literatura. No trabalho feito por Biasetto e colaboradores (2019) investigaram a atividade fitotóxica de citocalasina D [0.8, 0.4 e 0.2 mg mL⁻¹] frente a *Triticuma estivum* (coleotipo de trigo). Em todas as concentrações testadas houve pronunciada inibição, principalmente quando comparado ao herbicida comercial GOAL® (controle positivo). De fato, a citocalasina D se estabelece como produto biotecnológico que pode ter aplicabilidade, porém mais estudos são requeridos a respeito de suas atividades e segurança biológica de utilização.

6.2.5 Avaliação da atividade angiogênica da indol acetamida

No bioensaio foi verificado que a porcentagem de inibição na formação de novos vasos sanguíneos ocorreu de maneira dependente da dose *in vivo* utilizada conforme apresentado na figura 69. Houve inibição da neovascularização de 30% na concentração de 10 µg/mL, 40% em 50 µg/mL e 85% na concentração de 100 µg/mL.

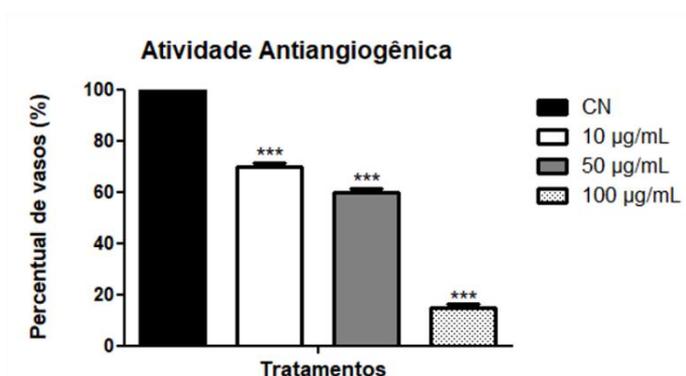
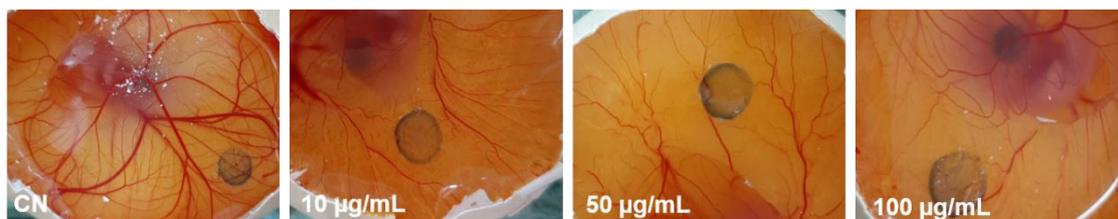


Figura 72: Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pela indol acetamida

Legenda: Resultados expressos como média \pm desvio Padrão, $n=3$. (***) representa diferença estatística significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo controle negativo (CN)

Neste trabalho verificou-se o efeito farmacológico inédito da indol-3-acetamida confirmado com a inibição da angiogênese no ensaio HET-CAM. A literatura relata distintas classes de alcaloides como efetivos inibidores angiogênicos utilizando ensaio de HET-CAM, demonstrando também variações de inibição dependendo da molécula testada.

No trabalho de Wan et al., (2019) um extrato rico em alcaloides foi testado nas concentrações 100, 50 e 10 $\mu\text{g/mL}$, a inibição dos vasos apresentada foi de 45%, 29% e 10% respectivamente, valores que são inferiores quando comparados as porcentagens de inibição da indol-3-acetamida. Por outro lado, o trabalho feito por ZHANG et al., (2011) verificou que o alcaloide indolico indirubina inibiu a formação de vasos no ensaio de HET-CAM onde 10 $\mu\text{g/mL}$ inibiu em 50% a formação de vasos e 5 $\mu\text{g/mL}$ inibiu em 20%.

Outros alcaloides em diversos trabalhos demonstraram inibições significativas em concentrações inferiores tais como: taspina (0.5, 1.0, 2.0 μg) sanguinarina (1, 10, 100 ng) capsaicina (6,3,1.5, 0,75 μg) (ZHANG et al., 2008; EUN & KOH, 2004; MIN et al., 2004).

Os resultados dessa pesquisa complementam o conhecimento da indol-3-acetamida em relação a sua propriedade anti-angiogênica o que tem grande relevância

para o setor farmacêutico. Pois substâncias que influenciam o processo anti angiogênico são promissoras para uso preventivo da inflamação e crescimento neoplásico. É crescente o interesse por novos inibidores a partir de fontes naturais principalmente se essas fontes permitirem condições de controle para a produção *in vitro* visando maiores rendimentos da substância de interesse. Diante dessa exigência o fungo endofítico (*C. dianesei*) trabalhado nessa pesquisa apresenta considerável potencial.

7. CONCLUSÃO

- Este trabalho permitiu o isolamento de 32 morfotipos de fungos endofíticos de folhas da espécie vegetal *Palicourea corymbifera* coletada na floresta amazônica;
- As cepas identificadas como *Colletotrichum dianesei*, *Xylaria* sp.1, *Xylaria* sp. 2 compuseram a micoteca do laboratório de biotecnologia e bioprospecção situado no Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia;
- Os dados químicos e biológicos destas linhagens evidenciaram estes microrganismos como uma fonte promissora de substâncias potencialmente bioativas;
- Os extratos testados exibiram atividades antimicrobianas e fitotóxica;
- O fungo *Xylaria* sp. 1 cultivado em SBL produziu tiramina e ciclo prolina tirosina;
- O fungo *Xylaria* sp. 2 cultivado em BDL e SBL produziu citocalasina D;
- O fungo *Colletotrichum dianesei* cultivado em SBL produziu indol acetamida, porém quando cultivado em GYP produziu o esteroide ergosterol;
- A citocalasina D apresentou atividade fitotóxica;
- A indol acetamida apresentou atividade antiangiogênica;
- As substâncias citocalasina D e o ergosterol não apresentaram atividade antibacteriana;
- Os resultados obtidos nessa pesquisa são relevantes pois demonstram que os fungos endofíticos amazônicos são de fato fontes de substâncias inéditas e bioativas, justificando a necessidade do estudo químico desta classe de microrganismos. Deve-se ressaltar que durante este trabalho foram isoladas substâncias de interesse comercial, tal como citocalasina D, ciclo (Pro Tir) indol acetamida, tiramina e ergosterol.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN-SAAVEDRA, J., LUND, R. G., GONZÁLEZ, J., HUENCHUNAO, R., PEREZ-VALLESPÍR, I., MORALES-BOZO, I., MOLINA-BERRÍOS, A. Diversity, frequency and antifungal resistance of *Candida* species in patients with type 2 diabetes mellitus. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 76, n. 8, p. 580-586, 2018.
- ALDRIDGE, D. C., ARMSTRONG, J. J., SPEAKE, R. N., TURNER, W. B. The structures of cytochalasins A and B. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, p. 1667-1676, 1967.
- ALY, A. H., EDRADA-EBEL, R., WRAY, V., MÜLLER, W. E., KOZYTSKA, S., HENTSCHEL, U., EBEL, R. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1716-1725, 2008.
- ALY, A. H., DEBBAB, A., PROKSCH, P. Fungal Endophytes: Unique plant inhabitants with great promises. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.
- ANDOLFI, A., BOARI, A., EVIDENTE, M., CIMMINO, A., VURRO, M., ASH, G., EVIDENTE, A. Gulypyrones A and B and Phomentrioloxins B and C produced by *Diaporthe gulyae*, a potential mycoherbicide for saffron thistle (*Carthamus lanatus*). **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 4, p. 623-629, 2015.
- AMARAL, L. D. S., FILL, T. P., SANTOS, L. F. A., RODRIGUES-FILHO, E. Biosynthesis and mass spectral fragmentation pathways of ¹³C and ¹⁵N labeled cytochalasin D produced by *Xylaria arbuscula*. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, n. 4, p. 239-247, 2017.
- ANWAR, M. A., FORD, W. R., BROADLEY, K. J., HERBERT, A. A. Vasoconstrictor and vasodilator responses to tryptamine of rat-isolated perfused mesentery: comparison with tyramine and β-phenylethylamine. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 7, p. 2191-2202, 2012.
- ARAÚJO, W. D., LACAVAL, P. T., MARCON, J., LIMA, A. D. S., SOBRAL, J. K., PIZZIRANI-KLEINER, A. A., AZEVEDO, J. L. Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. Piracicaba: Calo, p. 167, 2010.
- ARIVUDAINAMBI, U.S. E., ANAND, T. D., SHANMUGAIAH, V., KARUNAKARAN, C., RAJENDRAN, A. Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. v. 61, n. 3, p. 340–345, 2011.
- ARNOLD, A. E., MAYNARD, Z., GILBERT, G. S. Fungal endophytes in dicotyledonous trees: patterns of abundance and diversity. **Mycological Research**, v. 5, n. 2, p. 1502-1507, 2001.
- ARROYO, A. G., IRUELA-ARISPE, M. L. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. **Cardiovascular Research**, v. 86, n. 2, p. 226-235, 2010.

- ATAIDES, D., PAMPHILE, J. A., GARCIA, A., DOS SANTOS RIBEIRO, M. A., POLONIO, J. C., SARRAGIOTTO, M. H., CLEMENTE, E. (2018). Curvularin produced by endophytic *Cochliobolus* sp. G2-20 isolated from *Sapindus saponaria* L. and evaluation of biological activity. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 12, p. 032-037, 2018.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. *Ecologia microbiana*, p. 117-137, 1998.
- BACON, C. W., PORTER, J. K., ROBBINS, J. D., LUTTRELL, E. S. *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 576-581, 1977.
- BAO, G., SAIKKONEN, K., WANG, H., ZHOU, L., CHEN, S., LI, C., NAN, Z. Does endophyte symbiosis resist allelopathic effects of an invasive plant in degraded grassland? **Fungal Ecology**, v. 17, p. 114-125, 2015.
- BARAL, B., AKHGARI, A., METSÄ-KETELÄ, M. Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 163-178, 2018.
- BEATTIE, A. J., HAY, M., MAGNUSSON, B., NYS, R., SMEATHERS, J., VINCENT, J. F. V. Ecology and bioprospecting. **Austral Ecology**, v. 36, n. 3, p. 341-356, 2011.
- BERNARDES, M. F. F., PAZIN, M., PEREIRA, L. C., DORTA, D. J. Impact of pesticides on environmental and human health. **Toxicology Studies-Cells, Drugs and Environment**, p. 195-233, 2015.
- BIASETTO, C. R., SOMENSI, A., ABDALLA, V. D. C., ABREU, L. M. D., GUALTIERI, S. C., PFENNING, L. H., ARAUJO, A. R. *Xylaria cubensis* ASSOCIATED WITH *Eugenia brasiliensis*. **Química Nova**, v. 42, n. 5, p. 485-488, 2019.
- BRAMHACHARI, P. V., ANJU, S., SHEELA, G. M., KOMARAIHAH, T. R., VENKATAIAH, D., PRATHYUSHA, A. M. V. N. Secondary Metabolites from Marine Endophytic Fungi: Emphasis on Recent Advances in Natural Product Research. In: **Advances in Endophytic Fungal Research**. Springer, Cham, p. 339-350, 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília. 2009: 365.
- BREIJYEH, Z., JUBEH, B., KARAMAN, R. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1340, 2020.
- BUCKLAND, D. Antimicrobial resistance and the race to find new antibiotics. **Prescriber**, v. 28, n. 1, p. 12-15, 2017.
- CAFÊU, Mariana Carrara. **Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae)**. 2007. 253 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2007. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/105831>>.

- CANLI, K., AKATA, I., ALTUNER, E. M. In vitro antimicrobial activity screening of *Xylaria hypoxylon*. **Afr J Tradit Complement Altern Med**, v. 13, n. 4, p. 42-46, 2016.
- CANTRELL, C. L., DAYAN, F. E., DUKE, S. O. Natural products as sources for new pesticides. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 6, p. 1231-1242, 2012.
- CARS, O., HÖGBERG, L. D., MURRAY, M., NORDBERG, O., SIVARAMAN, S., LUNDBORG, C. S., TOMSON, G. Meeting the challenge of antibiotic resistance. **Bmj**, v. 337, 2008.
- CORDEAU, S., TRIOLET, M., WAYMAN, S., STEINBERG, C., GUILLEMIN, J. P. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. **Crop Protection**, v. 87, p. 44-49, 2016.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, p. 421-437, 2013.
- CHALLINOR, V. L., BODE, H. B. Bioactive natural products from novel microbial sources. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1354, n. 1, p. 82-97, 2015.
- CHUNG, K. R., SHILTS, T., ERTÜRK, Ü., TIMMER, L. W., UENG, P. P. Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. **FEMS Microbiology Letters**, v. 226, n. 1, p. 23-30, 2003.
- COOPER, J.A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. **The Journal of cell biology**, v. 105, n. 4, p. 1473-1478, 1987.
- CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J., YANG, S. S. Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 488-498, 2006.
- CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.
- DAYAN, F. E., CANTRELL, C. L., DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 4022-4034, 2009.
- DEMAIN A. L., FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, vol. 69, p. 1-39, 2000.
- DENG, H., YU, H. New Antibiotics: Where Are They?. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 10, n. 1, p. 1-3, 2018.
- DE ASSIS, J. R., SUFFREDINI, I. B., MORENO, P. R. H., YOUNG, M. C., VARELLA, A. D., YOUNES, R. N., BERNARDI, M. M. Analysis of the toxic potential of *Palicourea corymbifera* (Müll. Arg.) Standl. in laboratory animals. **Research in**

- Veterinary Science**, v. 80, n. 2, p. 209-217, 2006.
- DIAS SOUZA, R. K., ALCANTARA MORAIS MENDONÇA, A. C., PESSOA DA SILVA, M. A. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos y farmacológicos de espécies de Rubiaceae en Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 18, n. 1, p. 140-156, 2013.
- DI SALVATORE, M., CARAFA, A. M., CARRATÙ, G. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: a comparison of two growth substrates. **Chemosphere**, v. 73, n. 9, p. 1461-1464, 2008.
- EDWARDS, R. L., MAITLAND, D.J., WHALLEY, A.J.S. Metabolites of the higher fungi. Part 24. Cytochalasin N, O, P, Q, and R. New cytochalasins from the fungus *Hypoxylon terricola* Mill. **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions 1, n. 1, p. 57-65, 1989.
- EELLEN, G., TREPS, L., LI, X., CARMELIET, P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. **Circulation Research**, v. 127, n. 2, p. 310-329, 2020.
- ELSEBAI, M. F., NATESAN, L., KEHRAUS, S., MOHAMED, I.E., SCHNAKENBURG, G., SASSE, F., SHAABAN, S., GUTSCHOW, M., KONING, G.M. HLE-inhibitory alkaloids with a polyketide skeleton from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereale*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 10, p. 2282-2285, 2011.
- EUN, J-P., KOH, G. Y. Suppression of angiogenesis by the plant alkaloid, sanguinarine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 317, n. 2, p. 618-624, 2004.
- FACCHINI, P. J. Temporal Correlation of Tyramine Metabolism with Alkaloid and Amide Biosynthesis in Elicited *Opium Poppy* Cell Cultures: In Honour of Professor GH Neil Towers 75th Birthday. **Phytochemistry**, v. 49, n. 2, p. 481-490, 1998.
- FACHIN-ESPINAR, M.T. **Estudo Químico e Biológico de *Warszewiczia Schwackei* (Rubiaceae)**. Orientador; Cecilia Veronica Nunez. 2019. Tese (doutorado)-Programa de Pós graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas. 2019. Disponível em: Tese_MariaTeresaEspinari_PPGBIOTEC.pdf (ufam.edu.br).
- FALLAH, A., SADEGHINIA, A., KAHROBA, H., SAMADI, A., HEIDARI, H. R., BRADARAN, B., MOLAVI, O. Therapeutic targeting of angiogenesis molecular pathways in angiogenesis-dependent diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 775-785, 2019.
- FARMAKIOTIS, D., KONTOYIANNIS, P.D. Epidemiology of antifungal resistance in human pathogenic yeasts: current viewpoint and practical recommendations for management. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 3, p. 318-324, 2017.
- FATHONI, A., AGUSTA, A. Bioproduction of cytochalasin D by endophytic fungus *Xylaria* sp. DAP KRI-5. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 9, n. 03, p. 105-110, 2019.

- FERRARA, N., KERBEL, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 967-974, 2005.
- FINBERG, J. P., GILLMAN, K. Selective inhibitors of monoamine oxidase type B and the “cheese effect”. In: International review of neurobiology. **Academic Press**, 2011. p. 169-190.
- FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **New England Journal of Medicine**, v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971.
- FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine*, v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971. GAMBOA, M. A.; BAYMAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). **Biotropica**, v. 33, n. 2, p. 352-360, 2001.
- FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 4, p. 273-286, 2007.
- FORZZA, R. C., LEITMAN, P. M., COSTA, A., CARVALHO JR, A. A. D., PEIXOTO, A. L., WALTER, B. M. T., MARTINELLI, G. Catálogo de plantas e fungos do Brasil-Vol. 2. JBRJ, 2010.
- GALVÃO, J. G., GUERREIRO, M. C., SOUZA, J. A. D., & COURA, S. M. D. C. Uso do fungo *Fusarium oxysporum* como indicador de ametrina, através da medida de biomassa, pela quantificação do ergosterol. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 4, p. 840-845, 2003.
- GAMBOA, M. A., BAYMAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae) 1. **Biotropica**, v. 33, n. 2, p. 352-360, 2001.
- GARCIA, A., RHODEN S.A., BERNARDI-WENZEL, J., ORLANDELLI R, C., AZEVEDO, J.L., PAMPHILE, J.A. Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant *Sapindus saponaria* L. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n.10, p. 35-40, 2012.
- GIANNOPOULOU, E., KATSORIS, P., HATZIAPOSTOLOU, M., KARDAMAKIS, D., KOTSAKI, E., POLYTARCHOU, C., PARTHYMOU, A., PAPAIOANNOU, S., PAPADIMITRIOU, E. X-rays modulate extracellular matrix in vivo. **International Journal of Cancer**, v. 94, n. 5, p. 690-698, 2001.
- GOTTFRIED, Joseph. History Repeating? Avoiding a Return to the Pre-Antibiotic Age. 2005.
- HAO, S. H., WEI, Y., WANG, J., ZHOU, Y. M. Allelopathy and the active metabolites of the endophytic fungus, *Alternaria* J 46, from *Platyclusus orientalis*. **Weed Biology and Management**, v. 15, n. 3, p. 95-101, 2015.
- HACIOGLU, N., AKATA, I., DULGER, B. Antimicrobial potential of *Xylaria polymorpha* (Pers.) Grev. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 6, p. 728-730, 2011.

- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 894-900, 2008.
- HATA, M., ISHII, Y., WATANABE, E., UOTO, K., KOBAYASHI, S., YOSHIDA, K. I., ANDO, A. (2010). Inhibition of ergosterol synthesis by novel antifungal compounds targeting C-14 reductase. **Medical Mycology**, v. 48, n. 4, p. 613-621, 2010.
- HILÁRIO, F., CHAPLA, V. M., ARAUJO, A. R., SANO, P. T., BAUAB, T. M., & SANTOS, L. C. D. Antimicrobial screening of endophytic fungi isolated from the aerial parts of *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae) led to the isolation of secondary metabolites produced by *Fusarium fujikuroi*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 8, p. 1389-1395, 2017.
- HOFFMAN, M. T., ARNOLD, A. E. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. **Mycological Research**, v. 112, n. 3, p. 331-344, 2008.
- HUANG, Z., CAI, X., SHAO, C., SHE, Z., XIA, X., CHEN, Y., LIN, Y. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. **Phytochemistry**, v. 69, n. 7, p. 1604-1608, 2008.
- HUANG, F. Y., LI, Y. N., MEI, W. L., DAI, H. F., ZHOU, P., TAN, G. H. Cytochalasin D, a tropical fungal metabolite, inhibits CT26 tumor growth and angiogenesis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 3, p. 169-174, 2012.
- HULIKERE, M. M., JOSHI, C. G., NIVVYA, T., ANANDA, D., & RAJU, N. G. (2016). Antiangiogenic and antioxidant activity of endophytic fungus isolated from seaweed (*Sargassum wightii*). **Asian J Biochemistry**, v. 11, n. 4, p. 168-176, 2016.
- INDRIANI, I.D. Biodiversity of marine-derived fungi and identification of their metabolites, Dissertação, 2007.
- IVANOVA, V., GRAEFE, U., SCHLEGEL, R., SCHLEGEL, B., GUSTEROVA, A., KOLAROVA, M., ALEKSIEVA, K. Isolation and structure elucidation of tyramine and indole alkaloids from antarctic strain *Microbispora aerata* imbas-11A. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 17, n. 2, p. 128-133, 2003.
- JAYATILAKE, G. S., THORNTON, M. P., LEONARD, A. C., GRIMWADE, J. E., & BAKER, B. J. Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 3, p. 293-296, 1996.
- JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v.1, n. 2, p. 21-32, 2011.
- JIKAI, L., JIANWEN, T., ZEJUN, D., ZHIHUI, D., XIANGHUA, W., PEIGUI, L. Neoengleromycin, a novel compound from *Engleromyces goetzii*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 85, n. 5, p. 1439-1442, 2002.

- JOUDA, J. B., MBAZOA, C. D., DOUALA-MELI, C., SARKAR, P., BAG, P. K., & WANDJI, J. Antibacterial and cytotoxic cytochalasins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. harbored in *Garcinia kola* (Heckel) nut. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2016.
- KELLER, N. P., TURNER, G., BENNETT, J. W. Fungal Secondary Metabolism From Biochemistry To Genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 937-947, 2005.
- KHALID, E. L. B., HESHU, S. R., AYMAN, EL-M. EL-K., GUAADAOU, A., NAJDA, A. (2016). Natural products against cancer angiogenesis. **Tumor Biology**, v. 37, n. 11, p. 14513-14536, 2016.
- KIL, Ji-H; SHIM, K-C. Allelopathic effects of *Tagetes minuta* L. and *Eupatorium rugosum* Houtt. Aqueous extracts on seedling growth of some plants. **Allelopathy Journal**, v. 18, n. 2, p. 315-321, 2006.
- KÖGEL-KNABER, K. K., AMELUNG, W. Dynamics, chemistry, and preservation of organic matter in soils (M). **Treatise on Geochemistry**. 2014.
- KRINGS, M., TAYLOR, T. N., HASS, H., KERP, H., DOTZLER, N., & HERMSEN, E. J. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. **New Phytologist**, v. 174, n. 3, p. 648-657, 2007.
- KUMAR, A., PATIL, D., RAJAMOCHANAN, P. R., AHMAD, A. Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. **PloS One**, v. 8, n. 9, p. e71805, 2013.
- LANGDON, S., CEDRIC, J. P. The Microbial Pharmacy: FDA Approved Medicines From Fungi. **Mycosynthetix**, 2017.
- LAMALICE, L., LE BOEUF, F., HUOT, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. **Circulation Research**, v. 100, n. 6, p. 782-794, 2007.
- LAWS, M., SHAABAN, A., & RAHMAN, K. M. (2019). Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 5, p. 490-516, 2019.
- LEE, M.S.; WANG, S.W., WANG, G.J., PANG, K.L., LEE, C.K., KUO, Y.H., CHA, H.J., LIN, R.K., LEE, T.H. Angiogenesis inhibitors and anti-inflammatory agents from *Phoma* sp. NTOU4195. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 12, p. 2983-2990, 2016.
- LEHMANN, T., HOFFMANN, M., HENTRICH, M., POLLMANN, S. Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: a widely distributed way of indole-3-acetic acid production?. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, n. 12, p. 895-905, 2010.
- LEITE JÚNIOR, D. P., YAMAMOTO, A.C.A., MARTINS, E.R., TEIXEIRA, A.F.R., HAHN, R. C. Leveduras do gênero *Candida* isoladas de sítios anatomicamente distintos de profissionais militares em Cuiabá (MT). **Brasil. Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 675-680, 2011.

- LEGHARI, S. J., LEGHARI, U. A., LAGHARI, G. M., BURIRO, M., SOOMRO, F. A. 'An Overview on Various Weed Control Practices Affecting Crop Yield. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 59-69, 2015.
- LIU, J. Y., SONG, Y. C., ZHANG, Z., WANG, L., GUO, Z. J., ZOU, W. X., TAN, R. X. (2004). *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v. 114, n. 3, p. 279-287, 2004.
- LIU, X., DONG, M., CHEN, X., JIANG, M., LV, X., ZHOU, J. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 241-247, 2008.
- LIU, H. Q., GAO, J. Y., LV, B. Y., YANG, Q. Q., LIU, K., & YIN, W. P. Anti-pathogens constituents and novel ergosterol derivatives with the broad-spectrum germicidal substances from earthworm, *Pheretima aspergillum*. **Tetrahedron**, v. 74, n. 42, p. 6079-6087, 2018.
- LOBANOVSKA, M., PILLA, G. Focus: drug development: penicillin's discovery and antibiotic resistance: lessons for the future?. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, n. 1, p. 135, 2017.
- LOKMAN, N. A., ELDER, A. S., RICCIARDELLI, C., & OEHLER, M. K. (2012). Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 8, p. 9959-9970, 2012.
- LU, H., ZOU, W. X., MENG, J. C., HU, J., TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v. 151, n. 1, p. 67-73, 2000.
- LV, C., SUN, W., SUN, H., WEI, S., CHEN, R., WANG, B., & HUANG, C. Asperolide A, a marine-derived tetranorditerpenoid, induces G2/M arrest in human NCI-H460 lung carcinoma cells, is mediated by p53-p21 stabilization and modulated by Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway. **Marine Drugs**, v. 11, n. 2, p. 316-331, 2013.
- MAIA, L. C., CARVALHO JÚNIOR, A. A., CAVALCANTI, L. H., GUGLIOTTA, A. M.; DRECHSLER-SANTOS, E. R., SANTIAGO, A. L. M. A., CÁCERES, M. E. S., GIBERTONI, T. B., APTROOT, A., GIACHINI, A. J.; SOARES, A. M. S., SILVA, A. C. G., MAGNAGO, A. C., GOTO, B. T., DE LIRA, C. R. S., MONTOYA, C. A. S., PIRES-ZOTTARELLI, C. L. A., DA SILVA, D. K. A., SOARES, D. J., REZENDE, D. H. C., LUZ, E. D. M. N., GUMBOSKI, E. L., WARTCHOW, F., KARSTEDT, F., FREIRE, F. M., COUTINHO, F. P.; DE MELO, G. S. N., SOTÃO, H. M. P., BASEIA, I. G., PEREIRA, J., DE OLIVEIRA, J. J. S., SOUZA, J. F., BEZERRA, J. L., NETA, L. S. A., PFENNING, L. H.; GUSMÃO, L. F. P.; NEVES, M. A.; CAPELARI, M.; JAEGER, M. C. W., PULGARÍN, M. P., MENOLLI JUNIOR, N., DE MEDEIROS, P. S., FRIEDRICH, R. C. S., CHIKOWSKI, R. S., PIRES, R. M., MELO, R. F., DA SILVEIRA, R. M. B., URREA-VALENCIA, S., CORTEZ, V. G.; DA SILVA, V. F. Diversity of brazilian fungi. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 4, p. 1033-1045, 2015.

- MACÍAS, F.A., MARÍN, D., OLIVEROS-BASTIDA, A., CASTELLANO, D., SIMONET, A.M., MOLINILLO, J.M.G. Structure-activity Phytochem Rev 123 relationship (SAR) studies of benzoxazinones, their degradation products, and analogues. Phytotoxicity on problematic weeds *Avena fatua* L. and *Lolium rigidum* Gaud. **J Agric Food Chem** 54, p. 1040–1048, 2006.
- MAEHARA, S., SIMANJUNTAK, P., MAETANI, Y., KITAMURA, C., OHASHI, K., SHIBUYA, H. Ability of endophytic filamentous fungi associated with *Cinchona ledgeriana* to produce Cinchona alkaloids. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n. 2, p. 421-423, 2013.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination—Aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor 1. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.
- MALONEY, K. N., HAO, W., XU, J., GIBBONS, J., HUCUL, J., ROLL, D., BRADY, S.F., SCHROEDER F.C., CLARDY, J. Phaeosphaeride A, an inhibitor of STAT3-dependent signaling isolated from an endophytic fungus. **Organic Letters**, v. 8, n. 18, p. 4067-4070, 2006.
- MAOR, R., HASKIN, S., LEVI-KEDMI, H., SHARON, A. In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1852-1854, 2004.
- MARINHO, A. M. D. R. Metabolismo secundário de fungos endofíticos do gênero *Penicillium* associados às plantas *Murraya paniculata* (Rutaceae) e *Melia azedarach* (Meliaceae). Orientador Edson Rodrigues Filho 2005. (Tese Doutorado) -Programa de Pós graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos. 2005. Disponível em: Microsoft Word - 1capa.doc (ufscar.br).
- MARRONE, P. G. Microbial pesticides and natural products as alternatives. **Outlook on Agriculture**, v. 28, n. 3, p. 149-154, 1999.
- MARTINS, M. B., ARVALHO, I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis. **Tetrahedron**, v. 63, n. 40, p. 9923-9932, 2007.
- MCMANUS, P. S., STOCKWELL, V. O., SUNDIN, G. W., & JONES, A. L. Antibiotic use in plant agriculture. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 443-465, 2002
- MELOTTO, M., UNDERWOOD, W., HE, S. Y. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 101-122, 2008.
- MERLIN, E. On the mycorrhizas of *Pinus silvestris* L. and *Picea abies* Karst: a preliminary note. **Journal of Ecology**, v. 9, n. 2, p. 254-257, 1922.
- MEYER, V., ANDERSEN, M. R., BRAKHAGE, A. A., BRAUS, G. H., CADDICK, M. X., CAIRNS, T. C., VRIES, R. P., HAARMANN, T., HANSEN, K., HERTZ-FOWLER, C., KRAPPMANN, S., MORTENSEN, U. H., PEÑALVA, M. A., RAM, A. F. J., HEAD, R. M. Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 6, 2016.

- MIN, J. K., HAN, K. Y., KIM, E. C., KIM, Y. M., LEE, S. W., KIM, O. H., KWON, Y. G. Capsaicin inhibits in vitro and in vivo angiogenesis. **Cancer Research**, v. 64, n. 2, p. 644-651, 2004.
- MORAES, A. P. **Estudo fitoquímico de *Palicourea officinalis* e distribuição espacial dos metabólitos secundários das folhas de espécies de *Psychotria* e *Palicourea* por DESI-MS direto e indireto.** 2017. 213 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.
- MUSTAPHA, F. J. A., ADAM, D., MOHAMMED, S. A. Environmental and human health impacts of pesticide use in agriculture. 2017.
- NICOLETTI, R., FIORENTINO, A. Plant bioactive metabolites and drugs produced by endophytic fungi of *Spermatophyta*. **Agriculture**, v. 5, n. 4, p. 918-970, 2015.
- NGUYEN, M., SHING, Y. FOLKMAN, J. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick-embryo chorioallantoic membrane. **Microvascular Research**, v.47, n.1, p.31-40, 1994.
- NGUYEN, Q. T., MERLO, M. E., MEDEMA, M. H., JANKEVICS, A., BREITLING, R., TAKANO, E. Metabolomics methods for the synthetic biology of secondary metabolism. **FEBS letters**, v. 586, n. 15, p. 2177-2183, 2012.
- NUMPONSAN, T., KUMLA, J., SUWANNARACH, N., MATSUI, K., LUMYONG, S. Biosynthetic pathway and optimal conditions for the production of indole-3-acetic acid by an endophytic fungus, *Colletotrichum fructicola* CMU-A109. **PloS one**, v. 13, n. 10, p. e0205070, 2018.
- OLSUFYEVA, E. N., YANKOVSKAYA, V. S. Main trends in the design of semi-synthetic antibiotics of a new generation. **Russian Chemical Reviews**, v. 89, n. 3, p. 339, 2020.
- O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance. [S. l.: s. n.], 2014. Disponível em: https://amrreview.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf. Acesso em: 15 jun. 2020.
- ORACHAIPUNLAP, K., SUWANNASAI, N., WHALLEY, A.J., ROENGSUMRAN, S., SIHANONTH, P. Antibacterial and Anticancer Activity of Stromatic *Xylaria* spp. from Tropical Forest Thailand. **Current Applied Science and Technology**, v.15, n.1, p. 1-9, 2015.
- OWEN, N. L., HUNDLEY, N. Endophytes—the chemical synthesizers inside plants. **Science Progress**, v. 87, n. 2, p. 79-99, 2004.
- PACKIARAJ, R., JEYAKUMAR, S., AYYAPPAN, N., ADHIRAJAN, N., PREMKUMAR, G., RAJARATHINAM, K., MUTHURAMKUMAR, S.

- Antimicrobial and cytotoxic activities of endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from endemic tree *Cinnamomum malabattrum*. **Stud Fungi**, v.1, n. 1, p.104-11, 2016.
- PANDE, S., KOST, C. Bacterial unculturability and the formation of intercellular metabolic networks. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 349-361, 2017.
- PARVEZ, S. S., PARVEZ, M. M., FUJII, Y., GEMMA, H. Allelopathic competence of *Tamarindus indica* L. root involved in plant growth regulation. **Plant Growth Regulation**, v. 41, n. 2, p. 139-148, 2003.
- PATIL, R. H., PATIL, M. P., MAHESHWARI, V. L. Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi: a review of biotechnological production and their potential applications. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. Elsevier, p. 189-205, 2016.
- PEAY, K. G., KENNEDY, P. G., TALBOT, J. M. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 434, 2016.
- PEIXOTO NETO, P. A. S., AZEVEDO, J. L., ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-77, 2002.
- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves, **Microbial Ecology of Leaves**, p. 179-187, 1991.
- PRIAC, A., BADOT, P.M, CRINI, G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 3, p. 188-194, 2017.
- PODOLSKY, S. H. The antibiotic era: reform, resistance, and the pursuit of a rational therapeutics. JHU Press 2015.
- POTENTE, M., GERHARDT, H., CARMELIET, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 873-887, 2011.
- RAJAMANIKYAM, M., VADLAPUDI, V., UPADHYAYULA, S. M. Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, 2017.
- RATNAWEERA, P. B., DE SILVA, E. D. Endophytic fungi: A remarkable source of biologically active secondary metabolites. In: **Endophytes: Crop Productivity and Protection**. Springer, Champ, 191-212, 2017.
- REAL CCS. Methods for Testing Plant Response to Composted Material and Its Contamination by Weed Seeds and Propagules. Method Code: OFW004-006, Version: 3.1. REAL CCS, London, UK. 2014.
- REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L. E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**, v. 289, n. 5486, p. 1920-1921, 2000.
- REIGOSA, M. J., SÁNCHEZ-MOREIRAS, A., GONZÁLEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 5, p. 577-608, 1999.

- ROBINSON, M., RIOV, J., SHARON, A. Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis in *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 5030-5032, 1998.
- RODRIGUEZ, R. J., WHITE, J. J. F., ARNOLD, A. E., REDMAN, R. S. Fungal endophytes diversity and functional roles. **The New Phytologist**, London, v.182, p.314-330, 2009.
- ROOPA, G., MADHUSUDHAN, M. C., SUNIL, K. C. R., LISA, N., CALVIN, R., POORNIMA, R., GEETHA, N. Identification of Taxol-producing endophytic fungi isolated from *Salacia oblonga* through genomic mining approach. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 119-127, 2015.
- ROSENTHAL, K.S., PEREZ, R., HODNICHAK, C. Inhibition of herpes simplex virus type 1 penetration by cytochalasins B and D. **Journal of General Virology**, v. 66, n. 7, p. 1601-1605, 1985.
- PUSZTAHELYI, T., HOLB, I. J., PÓCSI, I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 573, 2015.
- PUSHPANGADAN, P., GEORGE, V., IJINU, T. P., CHITHRA, M. A. Biodiversity, Bioprospecting, Traditional Knowledge. Sustainable Development and Value Added Products: A Review. **Journal of Traditional Medicine & Clinical Naturopathy**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2018.
- SACCARO JR, N. L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. **Ambiente & Sociedade**, v. 14, n. 1, p. 229-244, 2011.
- SAIKKONEN, K., WÄLI, P., HELANDER, M., STANLEY, H. F. Evolution of endophyte – plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.
- SAUNDERS, M., KOHN, M. L. Evidence for alteration of fungal endophyte community assembly by host defense compounds. **New Phytologist**, v. 182, n. 1, p. 229–238, 2009.
- SELOSSE, M-A., BAUDOIN, E., VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, n. 7, p. 639-648, 2004.
- SIDRIM, J. J. C., CARVALHO, V. L., DE SOUZA COLLARES MAIA CASTELOBRANCO, D., BRILHANTE, R. S. N., DE MELO GUEDES, G. M., BARBOSA, G. R., ROCHA, M. F. G. Antifungal resistance and virulence among *Candida* spp. from captive Amazonian manatees and West Indian manatees: potential impacts on animal and environmental health. **EcoHealth**, v. 13, p. 328-338, 2016.
- SIMÕES, M. S., MADAIL, R. H., BARBOSA, S., DE LIMA NOGUEIRA, M. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e tóxicos ambientais utilizando alface. **Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 29-36, 2013.

- SOUZA, A.Q.L., DE SOUZA, A.D.L., ASTOLFI, S.F., 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**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.
- SCHULZ, B., BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.
- SHARMA, A., KUMARI, N., MENGHANI, E. Bioactive secondary metabolites: an overview. **International Journal of Scientific and Engineering Research**, v. 5, n. 4, 2014.
- SHIN, H. Y., LEE, E. H., SHIN, T. Y., KIM, H. M. Effect of cytochalasin D on systemic and local anaphylaxis in a murine model. **Pharmacological Research**, v. 36, n. 2, p. 141-146, 1997.
- SINGH, J., QUERESHI, S., BANERJEE, N., PANDEY, A. K. Production and extraction of phytotoxins from *Colletotrichum dematium* FGCC 20 effective against *Parthenium hysterophorus* L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 669-678, 2010.
- SLEVIN, M. Therapeutic angiogenesis for vascular diseases molecular mechanisms and targeted clinical approaches for the treatment of angiogenic disease. Springer, London, 2011.
- SOARES, D. A., ROSA, L. H., DA SILVA, J. F. M., PIMENTA, R. S. AA review of bioactive compounds produced by endophytic fungi associated with medicinal plants. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais**, v. 12, n. 3, p. 331-352, 2017.
- SOARES, A. C. F., MATOS, P. M., SILVA, K. F. D., MARTINS, C. H., VENEZIANI, R., AMBRÓSIO, S. R., HELENO, V. C. Antimicrobial potential of natural and semi-synthetic ent-kaurane and ent-pimarane diterpenes against clinically isolated gram-positive multidrug-resistant bacteria. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 2, p. 333-341, 2019.
- SPECIAN, V., SARRAGIOTTO, M. H., PAMPHILE, J. A., CLEMENTE, E. Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* isolated from *Luehea divaricata*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1174-1182, 2012.
- STIERLE, A., STROBEL, G., STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.
- STONE, J. K., BACON, C. W., WHITE, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. **Microbial Endophytes**, v. 3, p. 29-33, 2000.

- STROBEL, G., DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.
- STROBEL, G., DAISY, B., CASTILLO, U., HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.
- STROBEL, S. A., STROBEL, G. A. Plant endophytes as a platform for discovery-based undergraduate science education. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 356-359, 2007.
- SWINGLAND, I. R. Biodiversity, definition of. **Encyclopedia of Biodiversity**, v. 1, p. 377-391, 2001.
- TAKAHASHI, A. J., LUCAS E. E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.
- TEIXEIRA, M. F. S., SILVA, T. A., PALHETA, R. A., CARNEIRO, A. L. B., ATAYDE, M. H. **Fungos da Amazônia uma Riqueza inexplorada: Aplicações Biotecnológicas**. Manaus: EDUA, 2011.
- TELEANU, R. I., CHIRCOV, C., GRUMEZESCU, A. M., TELEANU, D. M. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic strategies for cancer treatment. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 1, p. 84, 2020.
- TIWARI, P., BAE, H. Horizontal Gene Transfer and Endophytes: An Implication for the Acquisition of Novel Traits. **Plants**, v. 9, n. 3, p. 305, 2020.
- THAMILARASHI, A.N., MANGALAGOWRI, A., WINKINS, SANTOSH. Anti-Angiogenic activity of natural flavonoid myricetin on chick chorioallantoic membrane (CAM) in vivo. **International Journal of Pharmacy**; v. 4, n. 3, p.160-165, 2014.
- TOGHUEO, R. M. K., BOYOM, F. F. Endophytes from ethno-pharmacological plants: Sources of novel antioxidants-A systematic review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101430, 2019.
- TORTORA, G. J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. *Microbiologia*. 12^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2017. ISBN 978-85-8271-354-9.
- UZMA, F., MOHAN, C. D., HASHEM, A., KONAPPA, N. M., RANGAPPA, S., KAMATH, P. V., CHOWDAPPA, S. Endophytic fungi—alternative sources of cytotoxic compounds: a review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 309, 2018.
- VALDES, T.I., KREUTZER, D., MOUSSY, F. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 62, n. 2, p. 273-282, 2002.
- VASUNDHARA, M., REDDY, M. S., KUMAR, A. Secondary metabolites from endophytic fungi and their biological activities. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 237-258, 2019.

- VERMA, V. C., KHARWARA, R. N., STROBEL, G. A. Chemical and Functional Diversity of Natural Products from Plant Associated Endophytic Fungi. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 11, p. 1511-1532, 2009.
- WAGNER, B. L., LEWIS, L. C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3468-3473, 2000.
- WAN, L., ZHAO, Y., ZHANG, Q., GAO, G., ZHANG, S., GAO, Y., QIAN, X. Alkaloid extract of *Corydalis yanhusuo* inhibits angiogenesis via targeting vascular endothelial growth factor receptor signaling. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 359, 2019.
- WANG, L., ZHENG, C. D., LI, X. J., GAO, J. M., ZHANG, X. C., & WEI, G. H. Cyclo (pro-tyr) from an endophytic rhizobium isolated from *Glycyrrhiza uralensis*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, p. 1040-1042, 2012.
- WILLIS, K. J. State of the World's Fungi. **Royal Botanic Gardens Kew**, 2018. Disponível em: <<https://stateoftheworldsfungi.org/>>, acesso em 16 de maio de 2019.
- WHEELER, M. H., STIPANOVIC, R. D., PUCKHABER, L. S. Phytotoxicity of equisetin and epi-equisetin isolated from *Fusarium equiseti* and *F. pallidoroseum*. **Mycological Research**, v. 103, n. 8, p. 967-973, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics. WHO 2017. Disponível em:< http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPLShort_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1. > Acesso em: 15 de junho 2020.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2019 antibacterial agents in clinical development; an analysis of the antibacterial clinical development pipeline. WHO 2019. Disponível em: < <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330420>.> Acesso em: 15 de junho 2020.
- ZIKMUNDOVA. M., DRANDAROV, K., BIGLER, L., HESSE, M., WERNER, C. Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 2-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-one by fungi isolated from *Aphelandra tetragona*. **Applied an Enviromental Microbiology**, v. 68, p. 4863-4870, 2002.
- ZHANG, H. W., SONG, Y. C., TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.
- ZHANG, Y., HE, L., MENG, L., LUO, W., XU, X. Suppression of tumor-induced angiogenesis by taspine isolated from *Radix et Rhizoma Leonticis* and its mechanism of action in vitro. **Cancer Letters**, v. 262, n. 1, p. 103-113, 2008.
- ZHANG, X., SONG, Y., WU, Y., DONG, Y., LAI, L., ZHANG, J., YI, Z. Indirubin inhibits tumor growth by antitumor angiogenesis via blocking VEGFR2-mediated JAK/STAT3 signaling in endothelial cell. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 10, p. 2502-2511, 2011.

- ZHANG, Q., WANG, S. Q., TANG, H. Y., LI, X. J., ZHANG, L., XIAO, J., GAO, J. M. Potential allelopathic indole diketopiperazines produced by the plant endophytic *Aspergillus fumigatus* using the one strain–many compounds method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 47, p. 11447-11452, 2013.
- ZHAN, J., BURNS, A. M., LIU, M. X., FAETH, S. H., GUNATILAKA, A. L. Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 2, p. 227-232, 2007.
- ZHOU, B., LIANG, X., FENG, Q., LI, J., PAN, X., XIE, P., YANG, Z. Ergosterol peroxide suppresses influenza a virus-induced pro-inflammatory response and apoptosis by blocking RIG-I signaling. **European Journal of Pharmacology**, v. 860, p. 172543, 2019.