



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PERFIL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DO LIOFILIZADO DO MEIO INTRA E
EXTRACELULAR DO FUNGO ENDOFITICO *CYTOSPORA SP.* ISOLADO DE
*P.aduncum***

Kaio Murilo Monteiro Espíndola

Belém – PA
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**PERFIL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DO LIOFILIZADO DO MEIO INTRA E
EXTRACELULAR DO FUNGO ENDOFITICO *CYTOSPORA SP.* ISOLADO DE
*P.aduncum***

Autor: Kaio Murilo Monteiro Espíndola

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Chagas Monteiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará

Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

E77 Espíndola, Kaio Murilo Monteiro.
PERFIL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DO LIOFILIZADO DO MEIO INTRA E EXTRACELULAR DO FUNGO ENDOFITICO CYTOSPORA SP. ISOLADO DE P.aduncum / Kaio Murilo Monteiro Espíndola. — 2021.
85 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Marta Chagas Monteiro
Coorientador(a): Prof. Dr. -
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2021.

1. Fungos endofíticos. 2. Piper aduncum L. . 3.
Cytospora Sp.. 4. atividade antioxidante . 5. atividade
antimicrobiana. I. Título.

CDD 579.5

FOLHA DE APROVAÇÃO

Kaio Murilo Monteiro Espíndola

PERFIL ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO DO LIOFILIZADO DO MEIO INTRA E EXTRACELULAR DO FUNGO ENDOFITICO *CYTOSPORA SP.* ISOLADO DE *P. aduncum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro (Orientadora)
Instituição: Instituto de Ciências da Saúde/UFPA

Prof. Dr. Nélio Teixeira Machado
Instituição: Instituto de Ciência e Tecnologia/ UFPA

Dr. Roseane Guimarães Ferreira
Instituição: Instituto de Ciências da Saúde/UFPA

Belém – PA

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus acima de tudo.

Aos meus pais por todo o apoio e dedicação a minha educação e a dos meus irmãos.

Ao meu avô que fez parte disso tudo e da contribuição pra eu chegar até aqui.

Aos meus irmãos por sempre me incentivarem e ajudarem sempre que possível, e o meu sobrinho, Rafael, por mudar nossa família a cada simples aprendizado.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a Marta Chagas Monteiro, pela orientação, pelo apoio dado durante todo o processo.

A Carla Mendonça, por todo apoio, incentivo e amizade e toda equipe do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, em especial Amanda Caroline, Wenddy Graziela, Davi Moura, Luan Jaste, Pricila, Kelly e Ana Ligia.

A minha amiga Roseane Guimarães, por todo o esforço, companheirismo, firmeza, cuidado, pelos ensinamentos!

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar este curso.

A todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

EPÍGRAFE

“A maior dádiva que podes dar ao mundo, é aquela da tua própria auto transformação!”

(Lao Tzu)

RESUMO

Os fungos endofíticos tem sido o foco no processo, visto que são fontes de metabólitos primários e secundários com elevada atividade farmacológica e a indústria farmacêutica tem grande interesse na obtenção de compostos bioativos provenientes de microrganismos endofíticos. Esses fungos adentram raízes, caules e folhas de plantas e colonizam os espaços intra e/ou intercelulares, sem causar danos aparentes e iniciam uma relação sinérgica ou mutualística com o hospedeiro que resulta na indução ou na produção de metabólitos primários ou secundários que atuarão no desenvolvimento e na manutenção da planta, aumento da tolerância a metais pesados, no sistema imunológico e no combate a fatores do estresse biótico e abiótico. Nesse contexto o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar fungos endófitos associados a espécie *P. aduncum*, realizar uma caracterização química preliminar e avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana do liofilizado obtido dos meios intra e extracelular. O isolamento dos fungos endofíticos foi feito a partir do caule de *P.aduncum* em ágar Sabouraud (ASD). Após o crescimento as cepas foram purificadas, isoladas e identificadas pela morfologia e por biologia celular, sendo escolhido o fungo PAC 119 (*Cytospora Sp.*) para demais testes. Foi construída a curva de crescimento e a partir dela estabelecido os dias de coleta dos meios extracelular e o meio intracelular liofilizados para a realização dos testes biológicos. Os resultados mostraram que o meio extracelular obteve atividade frente a bactéria *E. faecalis*, atividade antioxidante do meio extracelular representando 80% e 20% do meio intracelular, 7% de inibição do DPPH· dos dois meios, 0,5mg de polifenóis totais a cada 20mg de amostra dos meios intra e extracelular. Sendo assim, este estudo contribuiu para o conhecimento em relação aos fungos endofíticos que vivem na planta *P. aduncum*, e ainda demonstrar a capacidade antioxidante e antimicrobiana do fungo *Cytospora Sp.*(PAC119).

Palavras-Chave: Fungos endofíticos, *Piper aduncum L.* , *Cytospora Sp.*, curva de crescimento, sobrenadante liofilizado, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Endophytic fungi have been the focus of the process, as they are sources of primary and secondary metabolites with high pharmacological activity and the pharmaceutical industry has a great interest in collecting bioactive compounds from endophytic microorganisms. These fungi enter plant roots, stems and leaves and colonize intra and / or intercellular spaces, without causing apparent damage and start a synergistic or mutualistic relationship with the host that results in the induction or production of primary or secondary metabolites that will act in development and in plant maintenance, increased tolerance to heavy metals, in the immune system and in combating biotic and abiotic stress factors. In this context, the objective of this work was to isolate and identify endophytic fungi associated with *P. aduncum* species, carry out a preliminary chemical characterization and evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of the lyophilized product from intra and extracellular media. Isolation of endophytic fungi was carried out from the stem of *P. aduncum* in Sabouraud agar (ASD). After growth, the strains were purified, identified and identified by morphology and cell biology, with the fungus PAC 119 (*Cytospora Sp.*) being chosen for other tests. A growth curve was constructed and the days of collection of extracellular media and intracellular lyophilized media for the performance of biological tests were established. The results were lower than the medium extracellular activity against *E. faecalis* bacteria, antioxidant activity of the extracellular medium representing 80% and 20% of the intracellular medium, 7% inhibition of DPPH · of the two mediums, 0.5mg of total polyphenols each 20mg of sample from intra and extracellular media. Therefore, this study contributed to the knowledge regarding the endophytic fungi that live in the *P. aduncum* plant, and also to demonstrate the antioxidant and antimicrobial capacity of the fungus *Cytospora Sp.* (PAC119).

Keywords: Endophytic fungi, *Piper aduncum*, *Cytospora Sp.*, Growth curve, lyophilized supernatant, antioxidant activity and antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Localização das espécies de Piper nas regiões tropicais e subtropicais

Figura 2. *Piper aduncum* L. conhecida como “aperta-ruão”, “pimenta-de-fruto-ganchoso”, “pimenta-de-macaco”, “pimenta-longa.

Figura 3. Localização dos Fungos endofíticos nas plantas

Figura 4. Entrada e colonização de fungos endofíticos de plantas.

Figura 5. Relação planta - endófito e fatores que influenciam em qual tipo de relação será desenvolvida.

Figura 6. Mecanismo de produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos.

Figura 7. Exsicata e descrição da espécie *Piper aduncum*, registrada no herbário da EMBRAPA.

Figura 8. Processo de isolamento e purificação das colônias fúngicas.

Figura 9. Técnica de microcultivo de fungos filamentosos

Figura 10. Representação metodológica da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical ABTS+.

Figura 12. Representação metodológica da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH•.

Figura 13. Esquema metodológico da Microdiluição para identificação de CIM e CBM. Técnica realizada conforme Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

Figura 14. Fluxograma das espécies de fungos isolados, selecionados e identificados da planta *P. aduncum*

Figura 15. Curva de crescimento do Fungo PAC 119 em até 14 dias, apresentando a massa de peso seco (mg) a cada dia de cultivo do fungo. A) Lag – acelerada divisão celular, crescimento exponencial e grande produção de metabólitos de interesse. B) fase de declínio.

Figura 16. Formação de precipitado pelos reagentes de Bouchardt, mayer e Dragendorff

Figura 17. Resultado negativo da microdiluição intracelular do PAC 119. Os poços em rosa indicam a presença de células viáveis e os poços em azul são o controle positivo (cloranfenicol).

Figura 18. Placa de microdiluição do meio extracelular (7^o dia de cultivo) PAC 119 frente as bactérias *S. aureus*, *S. Epidermidis* e *S. Typhi* (CIM 0,125mg/ml).

Figura 19. Placa de microdiluição do meio extracelular (7^o dia de cultivo) PAC 119 frente as bactérias *P. aeruginosa* e *P. mirabilis* (CIM 0,25mg/ml)

Figura 20. Placa de microdiluição do meio extracelular (7^o dia de cultivo) do PAC 119 frente as bactérias *E. coli* e *E. Faecalis* (CIM 0,50mg/ml).

Figura 21. Placa de microdiluição do meio extracelular (10^o dia de cultivo) do PAC 119 frente as bactérias *E. coli* e *E. Faecalis* (CIM 0,50mg/ml).

Figura 22. Inibição do ABTS+ dos meios intra e extracelular, em conjunto, com a curva de crescimento.

Figura 23. Inibição do DPPH. dos meios intra e extracelular, em conjunto, com a curva de crescimento.

Figura 24. Teor de compostos fenólicos presente nos meios intra e extracelular.

Figura 25. Cinética de crescimento do fungo PAC119 em função do tempo

Figura 26. Crescimento do fungo PAC 119 no período de 0 a 14 dias em Caldo Sabouraud.

Figura 27. Atividade antioxidante em relação ao tempo de cultivo para todas as concentrações avaliadas.

Figura 28. Atividade antioxidante em relação ao tempo de cultivo para todas as concentrações do meio extracelular avaliadas.

Lista de Quadros

Quadro 1. *P. aduncum* e atividades biológicas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise fitoquímica dos metabólitos secundários do gênero Piper.

Tabela 2. Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos.

Tabela 3. Identificação taxonômica dos fungos endofíticos isolados da planta *P.*

Tabela 4. Curva de crescimento do Fungo PAC 119 em até 14 dias, apresentando a massa de peso seco (g) a cada dia de cultivo do fungo.

Tabela 5. Triagem preliminar para identificação dos metabólitos secundários intracelular.

Tabela 6. Triagem preliminar para identificação dos metabólitos secundários extracelular.

Tabela 7. Resultado da microdiluição do meio intracelular do fungo PAC 119.

Tabela 8. Resultado da microdiluição do meio extracelular do fungo PAC 119.

Tabela 9. Atividade antioxidante (TEAC e DPPH) do meio intracelular do PAC 119.

Tabela 10. Atividade antioxidante (TEAC e DPPH) do meio extracelular do PAC 119.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFPA	Universidade Federal do Pará
<i>P. aduncum</i>	<i>Piper aduncum</i>
PAC 119	<i>Piper aduncum</i> Caule nº 119
TEAC	Trolox Equivalent. Antioxidant Capacity
DPPH	Radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FDA	Food and Drug Administration
CyA	Ciclosporina A
pH	Potencial Hidrogeniônico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
UFC	Unidade Formadora de Colônias
RPM	Rotações por Minuto
(NH ₄)SO ₄	Sulfato de Amônia
Radical ABTS	(2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico])
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. Typhi</i>	<i>Salmonella Typhi</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Cândida albicans</i>

Sumário

1.	Introdução.....	15
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1.	<i>Piper (Piperáceas)</i>	17
2.2.	<i>Piper Aduncum</i>	19
2.3	Fungos Endofíticos.....	23
2.3.1.	Fungos endofíticos e a produção de metabólitos secundários.	28
2.4	Gênero <i>Cytospora</i>	29
2.4.1.	Antimicrobiano.....	31
2.4.2.	Antioxidante.....	32
3.	OBJETIVOS	34
3.1.	Objetivo geral	34
3.2.	Objetivo específico	34
4.	Material e Método.....	35
4.1.	Material Vegetal.....	35
4.2.	Esterilização do Material e Isolamento dos Endófitos	36
4.3.	Purificação dos isolados.....	36
4.5.	Conservação dos Isolados	37
4.6.	Construção da curva de crescimento do fungo selecionado	37
4.7.	Obtenção do liofilizado obtido do meio extra e intracelular.....	38
4.8.	Determinação preliminar dos metabólitos secundários presentes nos liofilizados dos meios intra e extracelular.....	38
4.8.1.	Triagem Fitoquímica Preliminar para Identificação de metabólitos secundários.....	38
4.8.1.1.	Alcaloides	39
4.8.1.2.	Polissacarídeos	39
4.8.1.3.	Fenóis e Taninos	39
4.8.1.4.	Flavonoides	39
4.9.	Atividades Biológicas.....	40
4.9.1.	Atividade antioxidante	40
4.9.1.1.	Avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical ABTS ^{•+} 40	
4.9.1.2.	Avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH [•] 41	
4.9.1.3.	Determinação do teor de Polifenóis totais	42
4.9.1.4.	Atividade Antimicrobiana	42
4.9.1.5.	Preparo dos meios de cultura.....	43
4.9.1.6.	Micro-organismos utilizados e manutenção das cepas	43
4.9.1.7.	Preparação do inóculo bacteriano	44

4.9.1.8. Técnica de microdiluição	44
4.9.1.9. Concentração inibitória mínima (CIM)	45
4.9.1.10. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	45
5. Resultados.....	47
5.1. Isolamento e identificação dos fungos endofíticos da planta <i>P. aducum</i>	47
5.2. Curva de Crescimento do fungo endofítico PAC 119.	49
5.3. Obtenção do Material contido no meio intra e extracelular.....	50
5.4. Caracterização química e Atividade Biológica.....	51
5.4.1. Triagem Fitoquímica do material intra e extracelular preliminar para identificação dos metabolitos secundários.	51
5.5. Atividade antimicrobiana	52
5.6. Atividade antioxidante	56
5.6.1. Avaliação da atividade antioxidante pelo método TEAC	56
5.6.2. Avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•.	57
5.6.3. Determinação do Teor de Polifenóis.	60
5.7. Cinética de Crescimento Fúngico.....	61
6. Discussão.....	65
7. Conclusão.....	71
8. Anexo I	85
9. Anexo II	86

1. Introdução

A indústria farmacêutica tem grande interesse na obtenção de compostos bioativos provenientes de microrganismos endofíticos, sendo assim, os fungos endofíticos tem sido o foco nesse processo, visto que são fontes de metabólitos primários e secundários com elevada atividade farmacológica (ZHAO e colab., 2010; CHEN, Ling e colab., 2014; CHEN, Senhua e colab., 2018;). Esses fungos adentram raízes, caules e folhas de plantas e colonizam os espaços intra e/ou intercelulares, sem causar danos aparentes e iniciam uma relação sinérgica ou mutualística com o hospedeiro (PEREIRA e colab., 2015; SINGH, Gurpreet e colab., 2017), que resulta na indução ou na produção de metabólitos primários ou secundários que atuarão no desenvolvimento e na manutenção da planta, aumento da tolerância a metais pesados, no sistema imunológico e no combate a fatores do estresse biótico e abiótico(ARNOLD, A Elizabeth e colab., 2003; SINGH e colab., 2017; DUROFIL e colab., 2021).

Por esse motivo, se faz necessário a bioprospecção de novos produtos de organismos endófitos que apresentam um grande potencial farmacológico e industrial. Nesse cenário, a indústria farmacêutica baseada em vantagens técnicas, econômicas, energéticas e ambientais, tem focado no isolamento de compostos bioativos provenientes de fungos endófitos em consequência da elevada variabilidade de espécies fúngicas e o perigo de extinção de espécies vegetais que são coletadas para a extração de produtos medicinais(FERRARA, 2006; MUSSI-DIAS e colab., 2012a; ALY, A. H. e colab., 2013; SPECIAN e CASAROTTI e colab., 2014).

Os fungos endofíticos são responsáveis por produzir uma ampla variedade de metabólitos, tais como: alcalóides, esteróides, terpenos, isocumarinas, quinonas, ácidos fenólicos e macrolídeos(ALY, Amal Hassan e colab., 2011; CHEN, Ling e colab., 2014). Adicionalmente, tem sido atribuído a esses metabólitos diversas atividades biológicas como antimicrobiana, antioxidante, antineoplásica, antileishmania, e atividade antiproliferativa e citotoxicidade(POLLI e colab., 2012; LIU e LIU, 2018; RANA e colab.,2019; MENGISTU, 2020). Além disso, já existem compostos de grande importância industrial, a exemplo da criptocina, isolada do fungo endofítico *Cryptosporiopsis quercina*, que possui atividade antimicótica e o *Taxomyces andreanae* isolado da planta *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) e produz o Taxol[®], utilizado no combate ao câncer(LI e colab., 2000; MUSSI-DIAS e colab., 2012a; STROBEL e colab., 1996; VERMA e colab., 2011; CHEN, Huiqin e colab., 2015).

Portanto, a espécie *Piper aduncum* L conhecida popularmente na Amazônia como "pimenta-de-macaco", foi selecionada para o estudo (MAIA e colab., 2001 FAZOLIN e colab.,

2007) . A espécie do gênero *Piper* é alvo de inúmeros estudos pela sua rica variedade de metabólitos bioativos (SOUSA e colab., 2008; MORANDIM e colab., 2009; SANTOS e colab., 2013; THAO e colab., 2016) . Essa espécie é muito utilizada também pela medicina popular para o tratamento de patologias, dentre elas, dores no estômago, anti-inflamatória, anti-hemorrágica, úlceras crônica e como laxante(POHLIT e colab., 2006; SOUSA e colab., 2008 ;DE ALMEIDA e colab., 2009; GUERRINI e colab., 2009; THAO e colab., 2016). Adicionalmente, a *P. Aduncum* L possui atividades biológicas comprovadas como anti-inflamatória , analgésica, citotóxica, antimicrobiana, antifúngica, larvicida e inseticida(NAVICKIENE e colab., 2006; DE ALMEIDA e colab., 2009; GUERRINI e colab., 2009; LIVEIRA e colab., 2013; BRAZÃO, MARIA ANGÉLICA B; BRAZÃO, FABIO V; MAIA, JOSÉ GUILHERME S; MONTEIRO, 2014; THAO e colab., 2016; LUCENA e colab., 2017).

Sendo a espécie de *P. aduncum* relacionada a diversos metabólitos secundários descritos, e tendo sua biologia endofítica pouco explorada, a bioprospecção desses fungos endofíticos relacionados a espécie presente na espécie de *P. aduncum* se faz de necessária para identificar substâncias com potencial bioativo antimicrobiano e antioxidante uteis na aplicação industrial ou farmacêutica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Piper* (Piperáceas)

As Piperáceas é a família mais primitiva entre as angiospermas, e é subdividida em três grandes subfamílias: *Verhuellioideae*, *Piperoideae* e *Zippelideae*. Existem cerca de 3600 espécies dos 4 principais gêneros: *Piper*, *Peperomia*, *Sarchorhachis* e *Ottonia*, e estão distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. O gênero *Piper* é o mais conhecido por sua adaptabilidade em diferentes regiões do planeta (Figura 1), são encontradas cerca de 1300 espécies em regiões tropicais, 600 na Ásia e 100 espécies no Pacífico Sul, especificamente no Brasil, são localizadas em até 2000 metros acima do nível do mar, e principalmente na Amazônica(FAZOLIN, 2006; BOTTIA e colab., 2007; DAL PICOLO e colab., 2014a; PERIGO e colab., 2016; DUROFIL e colab., 2021).

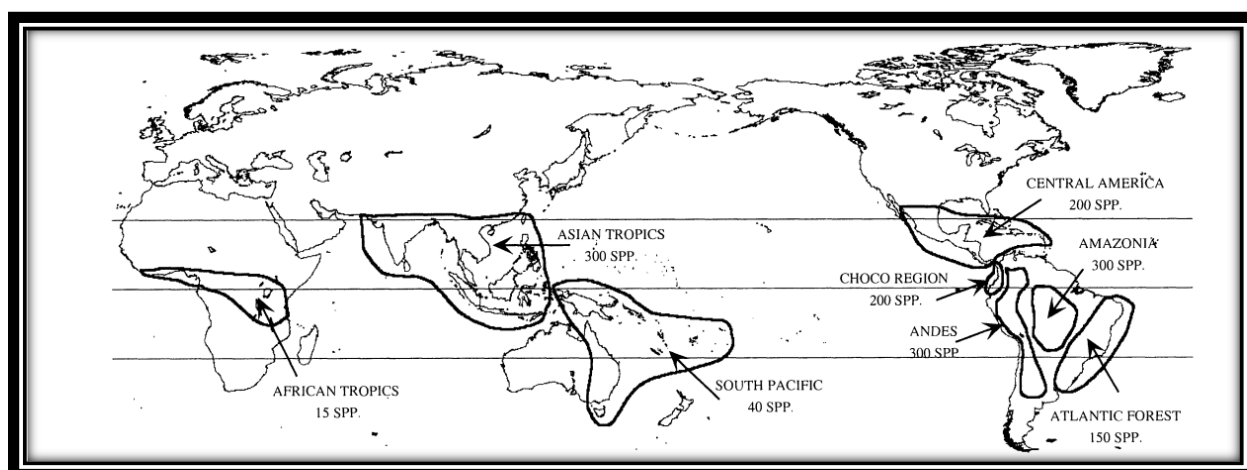


Figura 1: Localização das espécies de *Piper* nas regiões tropicais e subtropicais. (fonte: JARAMILLO, 2001)

As plantas do gênero são reconhecidas em campo por sua aromaticidade “picante”, pontas de inflorescência e brotos nodosos. Além disso, possuem um crescimento de diferentes formas como videiras, ervas, arbustos e pequenas árvores, estando presentes nos mais diferentes habitats e em sua maioria encontram-se entre 0m a 2500m de altitude, sendo raramente encontradas acima de 3000m (QUIJANO-ABRIL e CALLEJAS-POSADA, 2006; CHAVEERACH e colab., 2006; JARAMILLO e colab., 2008; ; CONNAHS, H e colab., 2009; LEE e colab., 2016;CHEN, Ling e colab., 2016; BISPO e colab., 2017). As folhas das espécies de *Piper* têm um cheiro naturalmente forte, com flores pequenas, dispostas em espigas e sem o perianto, seus frutos são polpudos com 2 a 6 estames, ovário unicelular com óvulo ortotrópico, ou seja, crescem em linha reta e na extremidade oposta ao caule(QUIJANO-ABRIL e CALLEJAS-POSADA, 2006; CHAVEERACH e colab., 2006; JARAMILLO

e colab., 2008; ; CONNAHS, H e colab., 2009; LEE e colab., 2016; CHEN, Ling e colab., 2016; BISPO e colab., 2017) .

O gênero é conhecido por sua alta adaptabilidade em diferentes climas e locais e pela resistência das plantas, essas características são consequência da produção de metabólitos secundários que agem na intensificação dos mecanismos de defesa e sinalização, além da adequação ao meio ambiente (NAVICKIENE e colab., 2006; FAZOLIN, 2006; GERSHENZON e DUDAREVA, 2007; SOUSA e colab., 2008; VÁSQUEZ, 2015; DURANT-ARCHIBOLD e colab., 2018; SOUZA e colab., 2019). A variedade na produção de metabólitos secundários pelo gênero *Piper*, é proveniente principalmente da rota de biossíntese mista (chiquimato/acetato), e composta por taninos, terpenos, flavonoides, saponinas, esteroides, carotenoides (Tabela 1), que possuem atividades biológicas como antimicrobiana, moluscicida, inseticida e anti-inflamatória. As plantas de *Piper* são amplamente conhecidas na medicina popular como antiulcerativas, purgativas, alívio da dor e possuem importância econômica, além do seu óleo essencial(NAVICKIENE e colab., 2006; FAZOLIN, 2006; GERSHENZON e DUDAREVA, 2007; SOUSA e colab., 2008; VÁSQUEZ, 2015; DURANT-ARCHIBOLD e colab., 2018; SOUZA e colab., 2019).

Tabela 2: Análise fitoquímica dos metabólitos secundários do gênero *Piper*

Compostos isolados de Piper	
Composto	Quantidade
Alcalóides/Amidas	28%
Lignanas/Neolignanas	18%
Terpenos	14%
Propenilfenóis	6%
Flavonas/Flavanonas	3%
Cavapironas	3%
Chalconas/Diidrochalconas	3%
Esteróides	2%
Piperolídeos	1%
Compostos variados	22%

Fonte: REIGADA, 2009 adaptado de CARDOSO, 2018

2.2. Piper Aduncum

A *Piper aduncum* L., também conhecida como “Falso jaborandi”, “matico”, “erva-de-jaboti”, “jaborandi-do-mato”, “pimenta-de-fruto-ganchoso” ou “pimenta-de-macaco” é frequentemente encontrada na América do Sul e Central, cresce naturalmente na Amazônia, na Mata Atlântica do Brasil e também existem registros da espécie na Ásia e na Oceania (SIGES e colab., 2005; MORANDIM e colab., 2009; PASSOS e colab., 2012; SANTOS, Maximillan Leite e colab., 2013; DAL PICOLO e colab., 2014). A planta é um arbusto de até 5-8 metros de altura, meio nodosos. As folhas apresentam pecíolo de 0,3 a 0,8 cm de comprimento, base assimétrica, espigas curvas medindo de 7 a 14 cm de comprimento e 0,2 a 0,3 cm de diâmetro e o pedúnculo da espiga pode medir de 1 a 2 cm de comprimento (FAZOLIN, 2006; MORANDIM e colab., 2009; MONZOTE e colab., 2019; DUROFIL e colab., 2021) (FIGURA 2).



Figura 2: Piper aduncum L. conhecida como “aperta-ruão”, “pimenta-de-fruto-ganchoso”, “pimenta-de-macaco”, “pimenta-longa. fonte: autor

Popularmente o chá do “matico” é utilizado como diurético, antiblenorrágico, problemas gastrointestinais, para doenças do fígado, tratamento de úlceras crônica e cicatrização de feridas. As cascas são frequentemente utilizadas para o tratamento de dor de dente, diarreia, disenteria, sarna, cortes, tosse e infecções fúngicas. As raízes, por outro lado, são utilizadas para doenças estomacais e respiratórias, feridas na pele, disenteria e as

frutas são utilizadas no tratamento de dores de dente(FAZOLIN, 2006; BOTTIA e colab., 2007; PASSOS e colab., 2012; DAL PICOLO e colab., 2014; DURANT-ARCHIBOLD e colab., 2018). A planta tem uma série de atividades biológicas que são atribuídas ao óleo essencial e uma variedade de compostos químicos farmacologicamente ativos, por isso, é uma espécie com grande potencial bioquímico por suas atividades biológicas já descritas (FAZOLIN, 2006; BOTTIA e colab., 2007; PASSOS e colab., 2012; DAL PICOLO e colab., 2014; DURANT-ARCHIBOLD e colab., 2018).

A *P. aduncum* possui um óleo essencial (OE) de composição química variada, constituído principalmente de fenilpropanóides e terpenos. O principal composto desse OE é o dilapiol, um fenilpropanóide, resultante da via do ácido chiquimico, com um grupo metil no anel aromático e um grupo alquil na cadeia lateral, esses grupos químicos são relacionados diretamente as atividades biológicas atribuídas ao dilapiol e também na amplificação da ação de outros compostos quando em sinergismo(FAZOLIN e colab., 2005; DUROFIL e colab., 2021).O dilapiol, compõe cerca de 70% do OE de *P. aduncum*, entretanto, outras substâncias como monolignólides como o apiol, miristicina, eugenol, safrol, dímeros de fenilpropanóides também são encontradas em menor quantidade(FAZOLIN e colab., 2005; DUROFIL e colab., 2021).

Os metabólitos secundários associados a espécie de *P. aduncum* são diversos, e já foram descritas amidas, fenilpropanóides, terpenos, chalconas e dihidrochalconas, flavonas, ácidos fortes, antocianidinas, fenóis, piperazinas, saponinas e taninos(SOUSA e colab., 2008; MORANDIM e colab., 2009). A presença desses metabólitos na espécie, estão associados com as atividades biológicas que incluem inseticida do dilapiol frente a *ribolium casteneum*, *Cerotoma tingomarianus*, *Choristoneura rosaceana*(FAZOLIN e colab., 2005), antioxidante do meio hidroalcolóico(RAMOS e colab., 2003), antibacteriana do meio etanólico frente a *E. faecalis* e *S. epidermidis* e do meio alcoólico frente à *E. coli* e *S. aureus*, do meio hidroalcoólico diante de *N. gonorrhoeae* e do dilapiol em associação a miristicina frente a bactérias multirresistentes (ORJALA e colab., 1994;KLOUCEK e colab., 2005; DUROFIL e colab., 2021;), moluscicida do meio de éter de petróleo frente a *B. glabrata*(SANTOS e colab., 1998; DUROFIL e colab., 2021), antitumoral frente ao *S. cerevisiae*(MORANDIM e colab., 2009) e inibição do crescimento de *Leishmania amazonensis* e atividade antitripanocida(MORANDIM e colab., 2009; PASSOS e colab., 2012; SANTOS, M. R A e colab., 2013) (Quadro 1).

Quadro 1: *P. aduncum* e atividades biológicas

ATIVIDADE BIOLÓGICA	ORGANISMOS AVALIADOS	DERIVADO AVALIADO	REFERÊNCIAS
Atividade Antibacteriana	<i>Actinobacillus actinomycescomitans</i>	Extrato alcoólico	LENTZ e colab., 1998
	<i>Bacillus cereus</i>	Extrato etanólico	KLOUCEK e colab., 2005
	<i>Bacillus subtilis</i>	Extrato alcoólico, extrato diclorometano, extrato éter de petróleo,	KLOUCEK e colab., 2005
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Extrato etanólico	KLOUCEK e colab., 2005
	<i>Escherichia coli</i>	Extrato alcoólico, extrato de éter de petróleo, extrato de diclorometano	LENTZ e colab., 1998
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Extrato alcoólico	LENTZ e colab., 1998
	<i>Micrococcus luteus</i>	Extrato de éter de petróleo, extrato de diclorometano,	ORJALA e colab., 1994
	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	Extrato alcoólico	LENTZ e colab., 1998;
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Extrato hidroalcoólico	KLOUCEK e colab., 2005
	<i>Prevotella intermedia</i>	Extrato alcoólico	LENTZ e colab., 1998;
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Extrato alcoólico	KLOUCEK e colab., 2005
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Extrato etanólico	KLOUCEK e colab., 2005	
Atividade Antifúngica	<i>Aspergillus flavus</i>	Extrato alcoólico	LENTZ e colab., 1998
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Extrato alcoólico	LENTZ e colab., 1998
	<i>Candida albicans</i>	Extrato alcoólico	LENTZ e colab., 1998
	<i>Colletotrichum musae</i>	Óleo essencial	BASTOS e ALBUQUERQUE, 2004
	<i>Crinipellis perniciososa</i>	Óleo essencial	SANTOS e colab., 1998
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Extrato alcoólico	LENTZ e colab., 1998
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Extrato alcoólico	LENTZ e colab., 1998
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Extrato alcoólico	LENTZ e colab., 1998
Antioxidante	DPPH	Extrato Hidroalcoólico	RAMOS e colab., 2003

Autor: (POHLIT e colab., 2006).

A biologia endofítica da espécie *P.aduncum* ainda é pouco relatada e até o presente momento, existem relatos sobre o isolamento do fungo endofítico *Xylaria sp.* As espécies de *Xylaria* são endófitas, frequentemente encontradas em plantas tropicais e decompositores de madeira. Além da associação com plantas e líquens desenvolvendo uma relação endofítica, esses fungos podem ser encontrados associados a cupins e são isolados de plantas vasculares (coníferas, monocotiledôneas, dicotiledôneas, samambaias e licopsídeos) e de plantas não vasculares (mosto de fígado)(YAN e colab., 2011; SONG e colab., 2014; HAN e colab., 2019). Em relação ao perfil químico das substâncias presentes nesse gênero, são encontrados frequentemente: terpenóides, citocalasinas, alcalóides, policetídeos, compostos aromáticos e compostos orgânicos voláteis, incluindo sesquiterpenóides, ésteres e álcoois, esses metabólitos são relacionados a atividades biológicas como citotóxicas, antibacterianas, antimaláricas e inibitórias da α -glucosidase (YAN e colab., 2011; SONG e colab., 2014; HAN e colab., 2019).

2.3 Fungos Endofíticos

O termo endófito, vem do grego *Endon*(dentro) e *phyton*(planta) e foi introduzido por Barry em 1866, para denominar qualquer microrganismo que estivesse em tecidos vegetais, com exceção dos fungos epifíticos, aqueles que colonizam a superfície dos vegetais e os patogênicos, que causam doenças. Sendo assim, fungos endofíticos são microrganismos que, em alguma parte da sua vida, colonizam tecidos vegetais intra (simplastos) ou intercelulares (aplopastos) sem causar doenças ou danos aparentes (PETRINI, 1991; GUPTA e colab., 2020; MENGISTU, 2020)(Figura 3). Esses microrganismos buscam nutrição e proteção dentro das células vegetais e produzem ou induzem a síntese de metabólitos primários e secundários biologicamente ativos, aumentando da tolerância a estresses bióticos e abióticos, diminuição da herbivoria e ataque de insetos, supressão de patógenos, crescimento da planta, aumento da produção de fito-hormônios e aumento da resistência da planta a metais pesados(LIU e LIU, 2018; RANA e colab., 2019; MENGISTU, 2020; GUPTA e colab., 2020;).

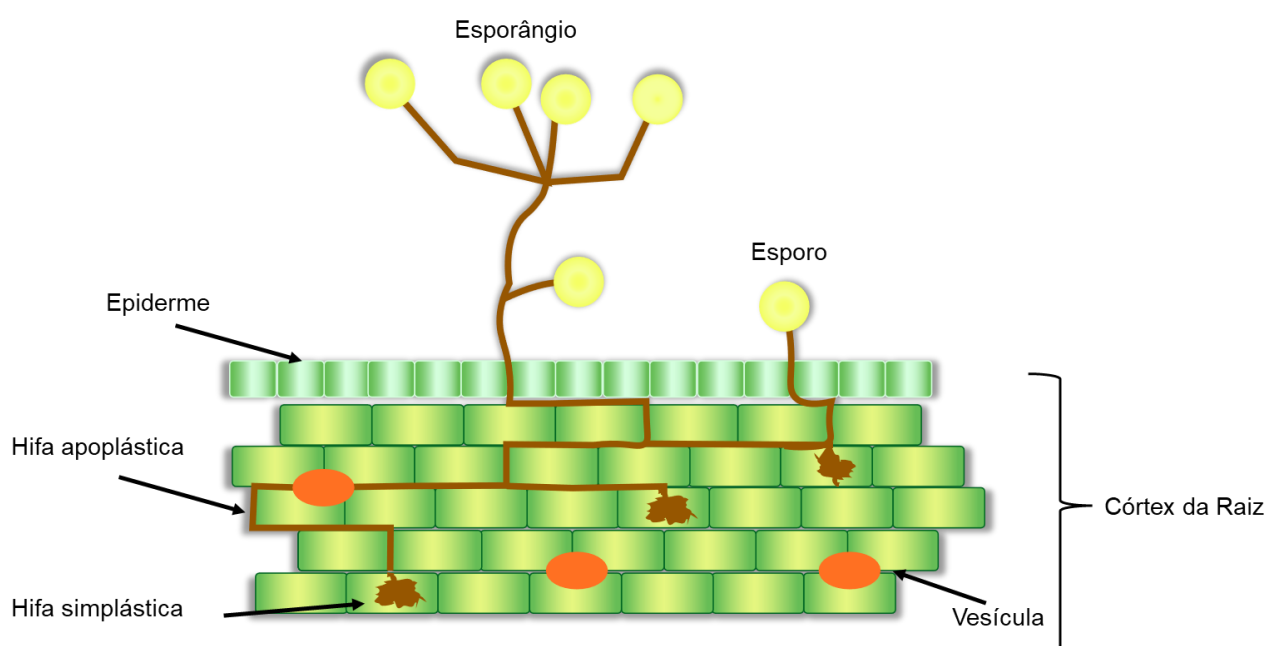


Figura 3: Localização dos Fungos endofíticos nas plantas. Fonte: Autor

Estima-se que os fungos endofíticos desenvolvem uma relação de simbiose com as plantas há aproximadamente 400 milhões de anos, por isso, acredita-se que com o passar do tempo, a planta e o fungo desenvolvem uma similaridade nas informações genéticas, resultando em um sistema genético complementar, por isso, são microrganismos isolados briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas e em diferentes ecossistemas, incluindo desertos quentes, tundra ártica, manguezais, florestas temperadas e tropicais, pastagens e savanas, terras agrícolas, ambientes árticos, alpinos, xéricos extremos e em

todo o território terrestre, nas comunidades naturais e antrópicas(KHARWAR e colab., 2011; ALY, Amal Hassan e colab., 2011; SOARES e colab., 2017; CHOWDHURY e colab., 2019; FA, 2019).

Os fungos endofíticos são, principalmente, ascomicetos, basidiomicetos, zigomicetos e oomicetos, e segundo as diferenças evolutivas, de taxonomia, plantas hospedeiras e funções ecológicas, podem ser divididos em clavipitáceos (C-endofíticos), que habitam algumas gramíneas e não-clavipitáceos (NC-endofíticos) que colonizam samambaias, coníferas e angiospermas. Além disso, os NC-endofíticos podem ser classificados também segundo o: modo de reprodução(sexuada ou assexuada); modo de transmissão(Vertical ou horizontal); fonte de nutrição (necrotróficos ou biotróficos) e o tipo de infecção causada no hospedeiro (sintomática ou assintomática) (SUDHA e colab., 2016; FA, 2019; LIU e LIU, 2018; GUPTA e colab., 2020; RANA e colab., 2019; VASUNDHARA e colab., 2019).

Esses endófitos fúngicos podem ser transmitidos de forma horizontal (não sistêmica) ou vertical(sistêmica). A transmissão horizontal ou não sistêmica, os esporos fúngicos são transmitidos através da ação do vento, da água da chuva ou pela ação de vetores e tendem a ser mais antagônicos ao hospedeiro, na transmissão vertical ou sistêmica, os fungos endofíticos são transmitidos da planta-mãe para a descendência através das sementes e tendem a ser mutualistas. A colonização desses endófitos pode se dá pela a rizosfera, região na qual a raiz está em contato com o solo, rica em nutrientes e microbiota diversa, pelos estômatos, lenticelas, hidátodos ou através de pequenas fissuras(FA, 2019;; YAN, Lu e colab., 2019; GUPTA e colab., 2020)(FIGURA 4).

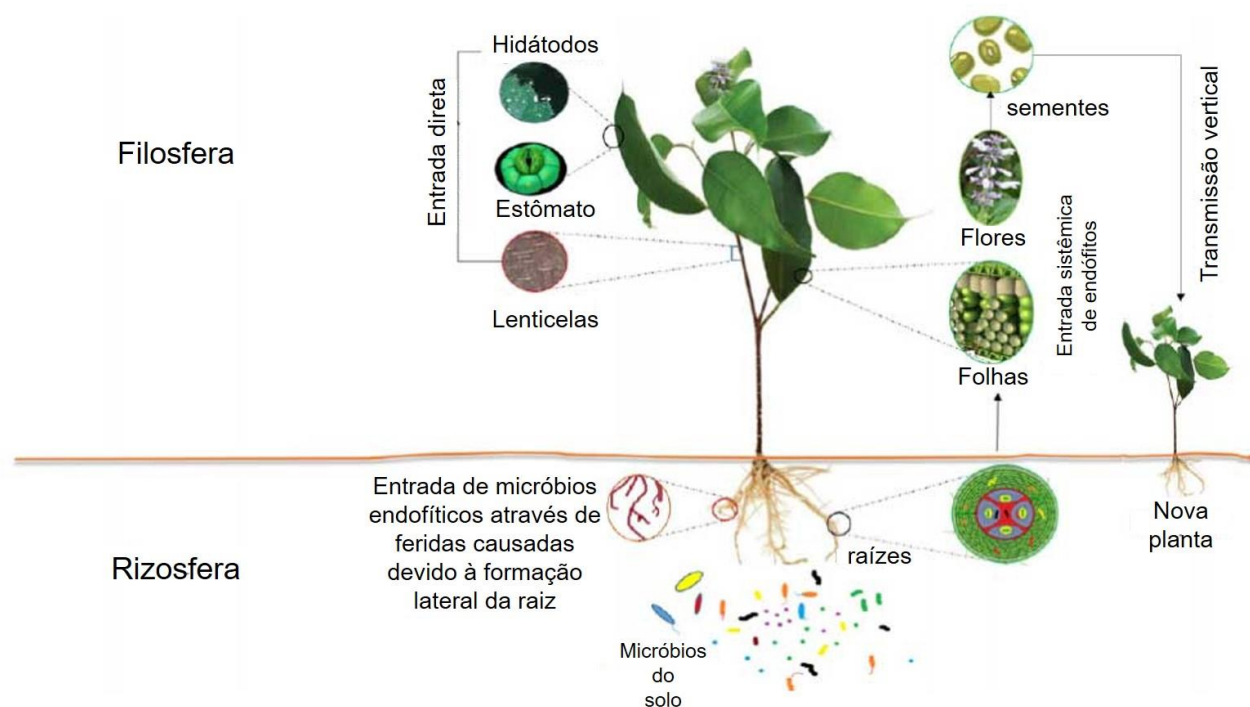


Figura 4: Entrada e colonização de fungos endofíticos de plantas.

Fonte: Lata, 2018.

A relação planta – endófito é extremamente flexível, podendo variar entre um mutualismo/simbiose e patogenia, porém a definição do tipo de relação que será desenvolvida, é definida por fatores como estresse da planta, idade avançada, tipo de transmissão, o desequilíbrio na troca de nutrientes, fatores genéticos e alterações ambientais podem afetar o tipo de interação. Além disso, a genética do hospedeiro e o estilo de vida do endófito também podem ser relacionados ao tipo de interação entre o endófito e a planta ((SAIKKONEN e colab., 2010; ALY, Amal Hassan e colab., 2011; SOARES e colab., 2017; CHENG e colab., 2018; WHITAKER e colab., 2019; MENGISTU, 2020)(FIGURA 5).

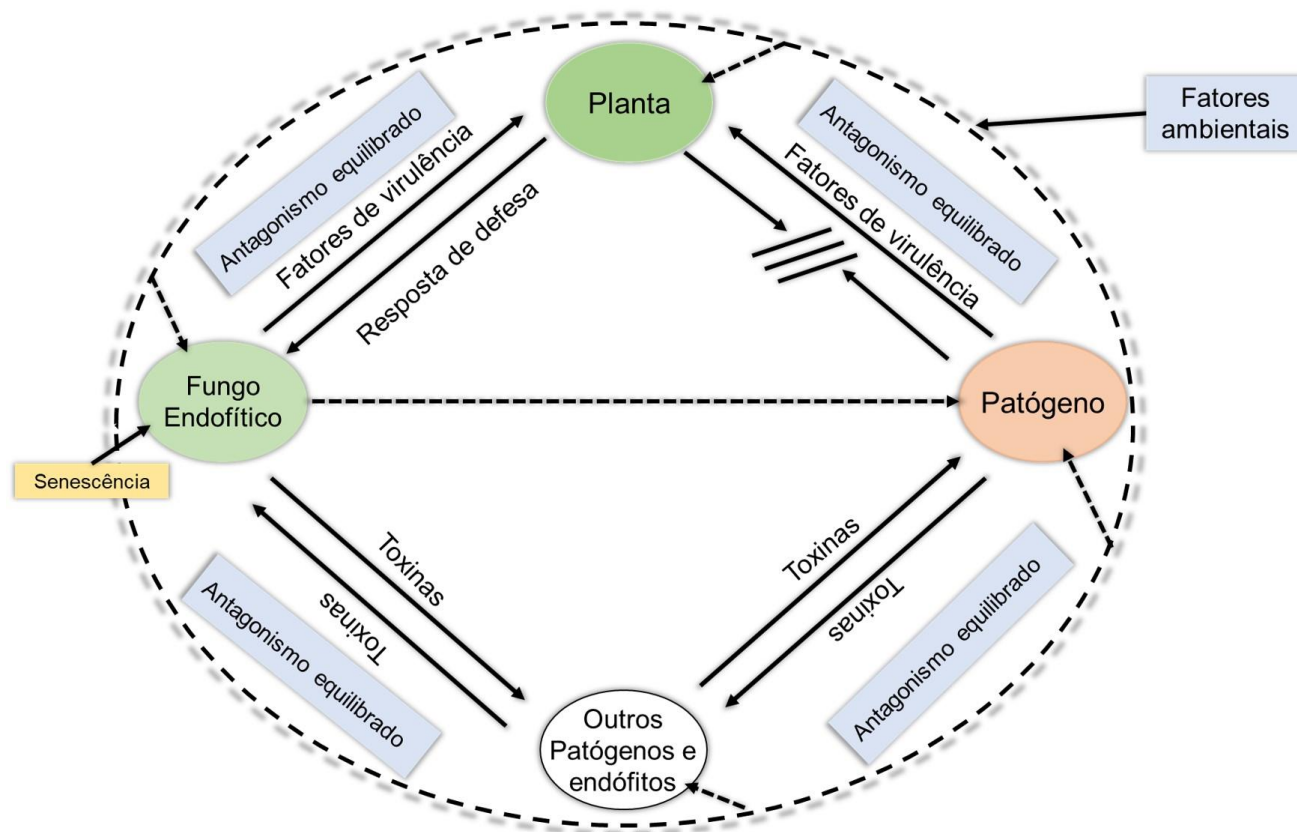


Figura 5: Relação planta - endófito e fatores que influenciam em qual tipo de relação será desenvolvida.
Fonte: adaptado de (shultz,2015)

A bioprospecção é a exploração e investigação de micro-organismos para identificar substâncias com potencial bioativo úteis e os fungos endofíticos são produtores de uma diversidade desses compostos químicos como: terpenos, flavonóides, alcalóides, quininos, ciclohexanos e hidrocarbonetos e que possuem atividades antimicrobiana, antioxidante, antineoplásica, antidiabética, antiviral antileishmania, e atividade antiproliferativa e citotoxicidade(SOARES e colab., 2017; POLLI e colab., 2012; LIU e LIU, 2018; RANA e colab., 2019; MENGISTU, 2020) (Tabela 2).

Tabela 2: Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos

Composto bioativo	Aplicação	Fungo endofítico	Referências
Taxol	Anticancer	<i>Taxomyces andreanae</i>	Stierle et al. (1993)
Camptotecina	Anticancer	<i>Fusarium solani</i>	Kusari et al. (2009)
Ergoflavina	Anticâncer	Sterile mycelium	Deshmukh et al. (2009)
Fenilpropanoides	Anticâncer	<i>Penicillium brasilianum</i>	Fill et al. (2010)
Podofilotoxina	Anticâncer	<i>Trametes hirsute</i>	Puri et al. (2006)
Citocalasinas	Anticâncer	<i>Rhinoctadiella</i> sp.	Wagenaar et al. (2000)
Citosquirina	Anticâncer	<i>Cytospora</i> sp. CR200	Singh et al. (2007)
Fomoxantonas A and B	Anticâncer	<i>Phomopsis</i> species	Isaka et al. (2001)
7-amino-4-metilcoumarina	Antimicrobiana	<i>Xylaria</i> sp. YX-28	Liu et al. (2008)
Griseofulvina	Antimicrobiana	<i>Xylaria</i> sp.	Park et al. (2005)
Chaetomugilina A and D	Antimicrobiana	<i>Chaetomium globosum</i>	Qin et al. (2009)
(-)-micorrizina A (+)-criptosporiopsina	Antimicrobiana	<i>Pezizula</i>	Schulz et al. (1995)
Hipericina	Antimicrobiana	<i>Aspergillus niger</i> and <i>Candida albicans</i>	Kusari et al. (2008)
Pestacin	Antioxidante	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Harper et al. (2003)
Grafislactone A	Antioxidante	<i>Cephalosporium</i> sp. IFB-E001	Song et al. (2005)

Fonte: KUMAR e colab., 2019

A variabilidade de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos está associada a um grande potencial biotecnológico de interesse da indústria farmacêutica. Apesar disso, os estudos envolvendo fungos endofíticos ainda são escassos quando comparados a pesquisas que envolvem metabólitos proveniente de plantas, segundo a literatura, estima-se que existam 1 milhão de espécies colonizando plantas e até líquens, entretanto, somente 100.000 espécies fúngicas foram descritas. Dentre essas, o exemplo mais conhecido de um produto de originado por esses microrganismos é o Taxol®, utilizado no combate ao câncer e que foi isolado a partir do fungo *Taxomyces andreana* (GONÇALVES e colab., 2013; HUSSAIN e colab., 2014; SAGITA e colab., 2021). A Camptotecina, isolados dos fungos *Taxomyces andreana* e do fungo *Fusarium Solani*, respectivamente e o antifúngico ciclosporina, isolado do fungo *Trichoderma polysporum* (GONÇALVES e colab., 2013; VENUGOPALAN e colab., 2016; RAN e colab., 2017).

2.3.1. Fungos endofíticos e a produção de metabólitos secundários.

Metabólitos secundários são substâncias químicas produzidas por fungos endofíticos como uma resposta fisiológica a fatores de estresse bióticos e abióticos como herbivoria, nematoides, fungos patogênicos, falta de nutriente, salinidade e a variação extrema de pH e temperatura. Esses metabólitos são produzidos por fungos filamentosos, e se caracterizam como substâncias químicas heterogêneas, de baixo peso molecular e não essenciais para o desenvolvimento e reprodução fúngica *in vitro* e pertencem as classes Pezizomicotina, Ascomycetos e vários Basidiomicetos(; MACHELEIDT e colab., 2016; SINGH e colab., 2017; KELLER, 2019).

Esses compostos produzidos pelos fungos em relações simbióticas, servem como mediadores da comunicação entre o hospedeiro e o meio ambiente, na defesa contra competidores, na absorção de nutrientes. Entretanto, a partir do século 20, esses compostos entraram em foco devido sua adequação ao tratamento de doenças in infecciosas, câncer, como imunossupressores e, finalmente, como uma fonte persistente de novos e inovadores agentes terapêuticos(YU e KELLER, 2005;BRAKHAGE e SCHROECKH, 2011; POLLI e colab., 2012; LIU e LIU, 2018 MACHELEIDT e colab., 2016; RANA e colab., 2019; VASUNDHARA e colab., 2019; MENGISTU, 2020). Esses compostos químicos são pertencentes a diversas classes como: terpenos, flavonóides, alcalóides, quinonas, ciclohexanos e hidrocarbonetos, e são associados a atividades biológicas, dentre elas: antimicrobiana, antioxidante, antineoplásica, antileishmania, antiproliferativa e citotoxicidade(YU e KELLER, 2005;BRAKHAGE e SCHROECKH, 2011; POLLI e colab., 2012; LIU e LIU, 2018 MACHELEIDT e colab., 2016; RANA e colab., 2019; VASUNDHARA e colab., 2019; MENGISTU, 2020).

A produção desses metabólitos secundários ocorre principalmente durante a fase lag, ou de maior divisão celular. Esses metabólitos podem ser resíduos do metabolismo primário, além disso, podem fazer parte do metabolismo primário servindo como energia ou substratos para as enzimas e também na fixação de novos traços genéticos. A síntese desses metabólitos, envolve enzimas polimerizadas chamadas de enzimas de base ou de núcleo, e são essas enzimas quem define a classe química do metabólito secundário gerado(HENKE KRAEMER e colab., 2000; MACHELEIDT e colab., 2016; ROZE e colab., 2011).

As enzimas de base são as sintases de peptídeo não ribossomal (SPNR), sintases de policetídeo (PSs), enzimas SPNR-PS híbridas, preniltransferases (PNTs) e ciclases de terpeno (CTs) e produzem, respectivamente, respectivamente, à produção das cinco classes de SM: peptídeos não ribossômicos, policetídeos, híbridos NRPS-PKS, alcalóides indólicos e terpenos(YU e KELLER, 2005; KHALDI e colab., 2010; MACHELEIDT e colab., 2016;

KELLER, 2019). Diferentemente dos genes que participam do metabolismo fúngico primário, os quais ficam espalhados pelo genoma fúngico, os genes que codificam enzimas para produção de metabólitos secundários ficam organizados de forma contígua como um agrupamento de genes sintéticos (AGB). Os produtos intermediários formados pelas enzimas de base podem ainda sofrer alterações adicionais catalisadas por enzimas "decorativas", como a acetil-CoA. Esses AGB's são regulados de forma coordenada por um fator de transcrição Zn2Cys6 específico e / ou pelo regulador global do metabolismo secundário, a metiltransferase putativa LaeA (YU e KELLER, 2005; KHALDI e colab., 2010; MACHELEIDT e colab., 2016; KELLER, 2019) (Figura 6).

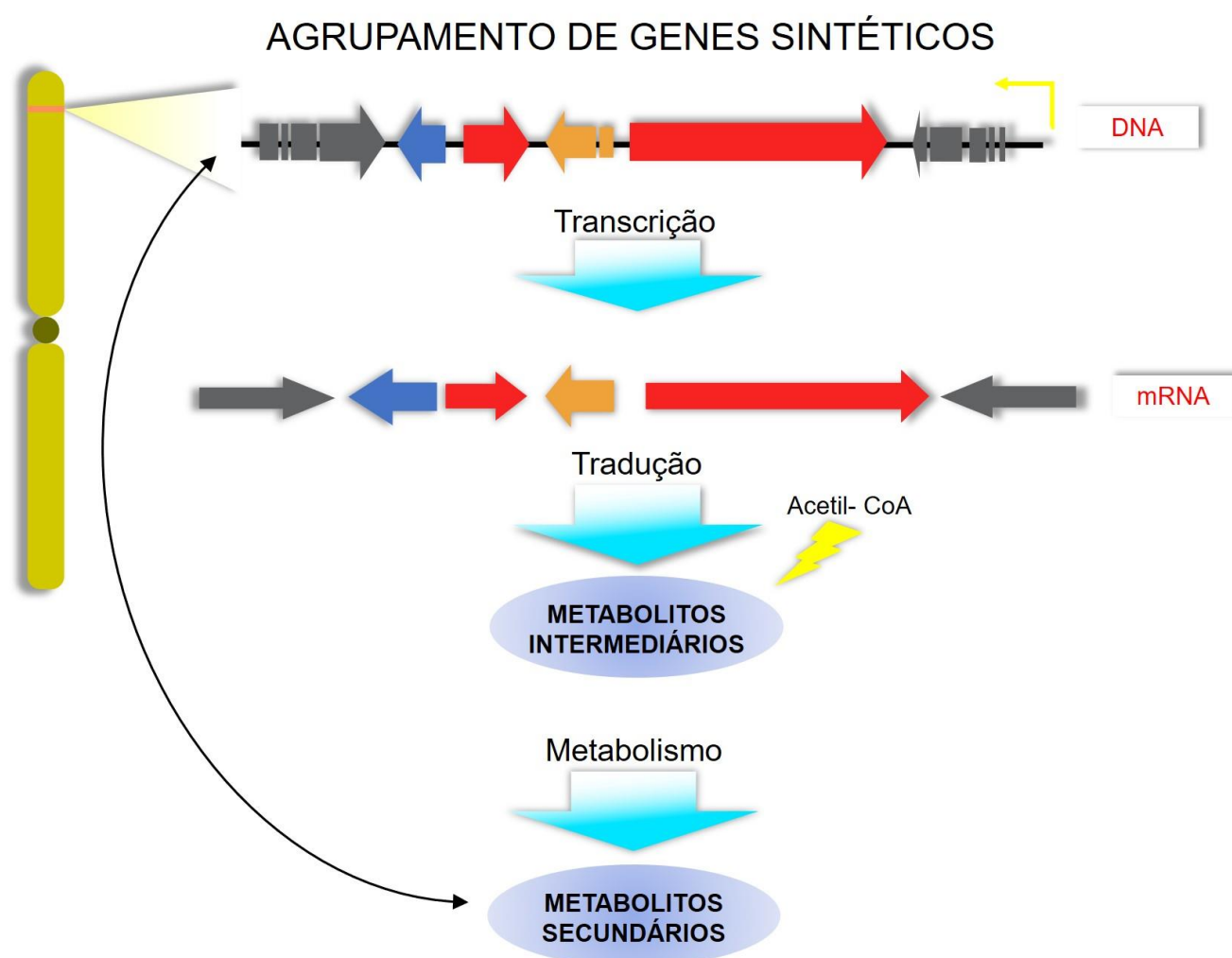


Figura 6: Mecanismo de produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos. Fonte: Google imagens (adaptado).

2.4 Gênero *Cytospora*

O gênero *Cytospora* são compostos por fungos ascomicetos anamórficos(assexuado), aqueles que estão na fase teleomórficas (sexuada) são conhecidas como *Valsa* e *leucostroma*. Fungos do gênero *Cytospora*, são fungos

filamentosos, ascomicetos, pluricelulares, saprófitos ou patogênicos, que foram descritos pela primeira vez por Eherenberg (1818) e posteriormente Tulasne e Tulasne, postularam que *Valsa* e *Cytospora* eram duas formas do mesmo organismo. Este gênero integra o filo ascomyceto, da classe dos Sordariomycetos, da ordem dos Diaporthales e da família Cytosporaceae (ADAMS e colab., 2006; FAN e colab., 2014; LAWRENCE e colab., 2017; NORPHANPHOUN e colab., 2017; JAMI e colab., 2018; ZHU e colab., 2018).

A caracterização morfológica dos fungos deste gênero é feita com base nos conidiomas e/ou ascomas, nos picnídios/pertiécios, na forma de organização do lóculo, nas dimensões dos esporos e pelo arranjo dos tecidos estomático, esse gênero caracteriza-se por apresentar estroma isolado, peritécios reunidos com rostros convergentes em direção à casca, abaixo de um ectostroma cônico e sem linha escura sob o estroma. Possui ascos sésseis com anel apical refrativo à luz, não amilóide, paráfises evanescentes na maturidade, normalmente oito ascósporos unicelulares. Produzem micélios frutificados e assexuados, conidióforos filamentosos e conídios alantoides hialinos, em ambientes úmidos, apresenta conídios formando gavinhas gelatinosas amarelas, laranja a vermelha (ADAMS e colab., 2006; FAN, Xinlei e colab., 2015; WANG e colab., 2015; LAWRENCE e colab., 2017).

O gênero fúngico já foi isolado de caules, raízes e do xilema e é considerado patogênico, sendo associado ao cancro e doenças mortais em árvores lenhosas. Além do *Cytospora*, as espécies teleomórficas associadas também estão relacionadas dentre os fungos causadores de cancro e morte mais comuns principalmente, em coníferas, sendo pouco comum em plantas herbáceas. Apesar das características patogênicas, o *Cytospora* e as espécies teleomórficas são relacionadas a produção de uma variedade de metabólitos biologicamente ativos (CHAPELA, 1989; ADAMS e colab., 2006; FOTOUHIFAR e colab., 2010; NORPHANPHOUN e colab., 2017; JAMI e colab., 2018).

As espécies encontradas na casca e folhas, mas principalmente no xilema também desenvolvem com o hospedeiro uma relação endofítica, Chapela et al. (1989) denomina esses endófitos de xilotrópicos, pois crescem no xilema secundários e contribuem para a produção de metabólitos secundários com efeitos antimicrobianos, citotoxicidade contra as linhas de células de fibroblastos de camundongo e carcinoma cervical KB-3-1, dentre outras. O gênero *Cyostora* tem sido considerado uma excelente fonte de metabólitos estruturalmente versáteis e biologicamente significativos, e tem sido considerado produtor de metabólitos promissores para a aplicação farmacêutica (SINGH, Maya P e colab., 2007; CHAPELA, 1989; ADAMS e colab., 2006; FOTOUHIFAR e colab., 2010; LI, Yan e colab., 2010; JAMI e colab., 2018; YOUSIF e colab., 2018; LIU, Zhaoming e colab., 2019).

Estudos relacionam o gênero *Cytopospora* com a produção de diversos metabólitos e atividades biológicas. KOKUBUN e colab. et al. (2003) isolou cinco dihidroisocumarinas e um derivado de tetralona, um hidrocarboneto bicílico, do fungo *C. eucalypticola*. Os compostos isolados apresentaram leve atividade antifúngica e antibacteriana frente a bactérias gram-positivas e um composto conhecido como 5-hidroximetilmelleína, mostrou atividade moderada contra os ataques de *Spodoptera littoralis*. LI, Yan e colab. et. al. (2012), isolou três novos sesquiterpenóides cariofileno, denominados citosporinóis de culturas solidas do fungo *Cytopospora sp.* Outros estudos também isolaram derivados de cariofileno de um outro fungo do mesmo gênero, o extrato acetato demonstrou atividade frente as bactérias *S. aureus* e *S. pneumoniae* e atividade citotóxica(LI, Yan e colab., 2010; LIU, Xin e colab., 2017). Nesse sentido, é de grande interesse continuar investigando as atividades antimicrobiana e antioxidantes de extratos obtidos a partir do fungo *Cytopospora*.

2.4.1. Antimicrobiano

A resistência bacteriana, apesar de ser um processo evolutivo normal das bactérias, tem tido últimas de décadas uma expressiva elevação no número de infecções causados por esses microrganismos(RAJAMANIKYAM e colab., 2017; YAN, Lu e colab., 2019; ALVES e colab., 2019; ; GUPTA e colab., 2020; CARUSO e colab., 2020). O uso contínuo e repetitivo desses medicamentos aceleram resistência desses patógenos através da inativação dos antibióticos, alterações nos alvos bacterianos e entrada restrita de antibióticos por transportadores de medicamentos menos permeáveis. Por isso, a bioprospecção de compostos eficazes contra microrganismos resistentes a antibióticos tornou-se uma grande prioridade nos últimos anos(RAJAMANIKYAM e colab., 2017; YAN, Lu e colab., 2019; ALVES e colab., 2019; ; GUPTA e colab., 2020; CARUSO e colab., 2020).

Os fungos endofíticos servem com fonte para busca de novas moléculas com potencial antibiótico, esses endófitos têm uma variedade de espécies e produzem de inúmeros metabolitos secundários. Nas plantas, os fungos endofíticos xilotrópicos (que vivem em associação com órgãos de plantas lenhosas) são melhores produtores de compostos antimicrobianos e aumentam a capacidade de suas plantas hospedeiras de resistir a patógenos, essa resposta acontece através de estimulação por eliciadores, como produtos químicos derivados de patógenos ou outros residentes dentro de suas plantas hospedeiras, desempenhando um papel importante na defesa, por outro lado, essas substâncias antibióticas possuem atividade frente a bactérias patogênicas que afetam humanos também possuem atividade e apresentam atividade de amplo espectro e menor toxicidade quando

comparados aos produtos sintéticos(RAJAMANIKYAM e colab., 2017; YAN, Lu e colab., 2019; ALVES e colab., 2019; ; GUPTA e colab., 2020; CARUSO e colab., 2020).

2.4.2. Antioxidante

Radicais livres, são espécies químicas formadas quando uma ligação covalente é desfeita e cada átomo recém-formado permanece com elétron. Os radicais são extremamente reativos devido a um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital externo, espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) estão geralmente envolvidos na fisiologia humana e sua produção é essencial para o metabolismo normal do nosso corpo(ISCHIROPOULOS e colab., 2005; SARKAR e colab., 2013; RAJAMANIKYAM e colab., 2017; CHANDRA e colab., 2020; VITALE e colab., 2020). O acúmulo dessas espécies leva a desregulação na produção desses radicais e conseqüentemente, ao ataque de lipídios, proteínas, enzimas e DNA da membrana, causando estresse oxidativo e, por fim, morte celular. Além disso, espécies reativas são responsáveis por algumas patologias como distúrbios neurodegenerativos, câncer, doença de Alzheimer, envelhecimento, doença de Parkinson, diabetes mellitus, aterosclerose e doenças inflamatórias(ISCHIROPOULOS e colab., 2005; SARKAR e colab., 2013; RAJAMANIKYAM e colab., 2017; CHANDRA e colab., 2020; VITALE e colab., 2020).

Em uma reação de oxidação uma molécula antioxidante, uma molécula estável, transfere um elétron para um radical livre e finaliza a reação em cadeia antes que as moléculas causem dano celular. O citosol e os componentes enzimáticos: catalase, superóxido dismutase, GSH peroxidase, GSH redutase fazem parte dos mecanismos antioxidantes celulares, enquanto que sistemas não enzimáticos tem se por: GSH, vitamina A, vitamina C, vitamina E , vários quelantes de ferro, melatonina(ISCHIROPOULOS e colab., 2005; SARKAR e colab., 2013; RAJAMANIKYAM e colab., 2017; CHANDRA e colab., 2020; VITALE e colab., 2020).

Antioxidantes naturais, são vistos como agentes quimiopreventivos contra vários tipos de câncer, diminuem o risco de doenças causadas por danos oxidativos, além disso, podem possuir atividade antiinflamatória, antitumoral, antimutagênica ou anticarcinogênica. Metabólitos proveniente de fungos, são fontes significativas na produção desses compostos e podem apresentar inúmeras aplicações biológicas, dentre eles, estão os compostos fenólicos(ISCHIROPOULOS e colab., 2005; SARKAR e colab., 2013; RAJAMANIKYAM e colab., 2017; CHANDRA e colab., 2020; VITALE e colab., 2020).

Os compostos fenólicos obtidos de fontes naturais são melhores fontes de antioxidantes. A fermentação microbiana tem potencial para a produção de tais compostos e

várias cepas de fungos produzem ácido gálico, ácido ferúlico e ácido elágico. Todos esses ácidos orgânicos têm de dois a quatro grupos hidroxila reativos disponíveis, que podem ser correlacionados com seu potencial antioxidante. Alguns compostos como zeaxantina e astaxantina têm uma estrutura de cadeia longa contendo grupos hidroxila reativos. Essas moléculas também foram produzidas e isoladas de várias fontes microbianas e radicais livres eliminados, demonstrando, assim, efeito antioxidante significativo (ISCHIROPOULOS e colab., 2005; SARKAR e colab., 2013; RAJAMANIKYAM e colab., 2017; CHANDRA e colab., 2020; VITALE e colab., 2020).

Desta forma, este trabalho visa realizar uma caracterização química preliminar e avaliar atividades antimicrobiana e antioxidantes do liofilizado obtido do meio intracelular e extracelular do cultivo fúngico.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Isolar e identificar fungos endófitos associados a espécie *P. aduncum*, realizar uma caracterização química preliminar e avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana do liofilizado obtido dos meios intra e extracelular

3.2. Objetivo específico

- Coletar e isolar fungos endofíticos associados à espécie *P. aduncum*;
- Identificar espécies de fungos endofíticos do *P. aduncum* e selecionar pelo menos um fungo filamentosos para avaliação dos testes biológicos;
- Avaliar a curva de crescimento do fungo PAC 119 em caldo sabouraud;
- Cultivar e obter material liofilizado proveniente dos meios intra e extracelular do endófito PAC 119 para avaliação em testes biológicos;
- Avaliar e comparar a capacidade antioxidante do liofilizado dos meios intra e extracelular do fungo PAC 119 através dos ensaios de TEAC, DPPH e teor de polifenóis;
- Avaliar e comparar a atividade antimicrobiana do liofilizado dos meios intra e extracelular do fungo PAC 119 frente às bactérias gram-positivas, gram-negativas por microdiluição para identificação de CIM e CBM.
- Analisar a cinética do crescimento fúngico e da atividade antioxidante.

4. Material e Método

4.1. Material Vegetal

P. aduncum foi coletada no Município de Ananindeua (PA), em águas lindas reserva do Utinga (Latitude: 01° 21' 59" S, Longitude: 48° 22' 20" W, Altitude de 17m e a área de 539,9 Km²). Esta espécie é conhecida na região como pimenta-de-macaco. Exemplares de *P. aduncum* estão depositados no Herbário da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Belém, Pará), sob o registro 192687 (Figura 3). Para o isolamento dos fungos endofíticos foi realizada uma coleta, de dois indivíduos da mesma espécie, do qual foram utilizados fragmentos de folhas e do caule, sendo produzida a exsicata da planta.



Figura 6: Exsicata e descrição da espécie *Piper aduncum*, registrada no herbário da EMBRAPA. Fonte: Autor.

4.2. Esterilização do Material e Isolamento dos Endófitos

As folhas, os caules e as raízes da espécie vegetal foram cortadas em pedaços, colocados em sacos de plástico individuais esterilizados, e armazenados durante 24 h a 5 °C. Após a coleta, as amostras foram lavadas em água corrente e detergente neutro para retirar o excesso de epifíticos. Em seguida, o material foi imerso em álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito 3% por 3 minutos e água destilada por 2 minutos (Chapla et al., 1993).

Depois da desinfecção superficial, as extremidades dos tecidos foram desprezadas e o material vegetal cortado em pequenos fragmentos (10 cm aproximadamente) e inoculados em placas de Petri (5 fragmentos em cada placa) contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (ACUMEDIA) preparado no laboratório e autoclavado, acrescido de cloranfenicol (100mg.L^{-1}) (BLAU FARMACÊUTICA) para evitar o crescimento de bactérias endofíticas. As placas foram incubadas e estufa (SOLIDSTEEL) a temperatura de 25°C por 7 a 14 dias, conforme observação macroscópica do crescimento dos fungos (Chapla et al., 2013).

4.3. Purificação dos isolados

A purificação dos isolados foi feita por esgotamento em placas de Petri contendo o meio de cultura ASD. Em seguida, as placas foram incubadas por 7 a 14 dias a 25°C, onde a partir do crescimento de colônias isoladas foram feitos repiques sucessivos com a finalidade de purificar essas colônias, até que fosse possível a identificação das características de cada fungo (Chapla et al., 2013).

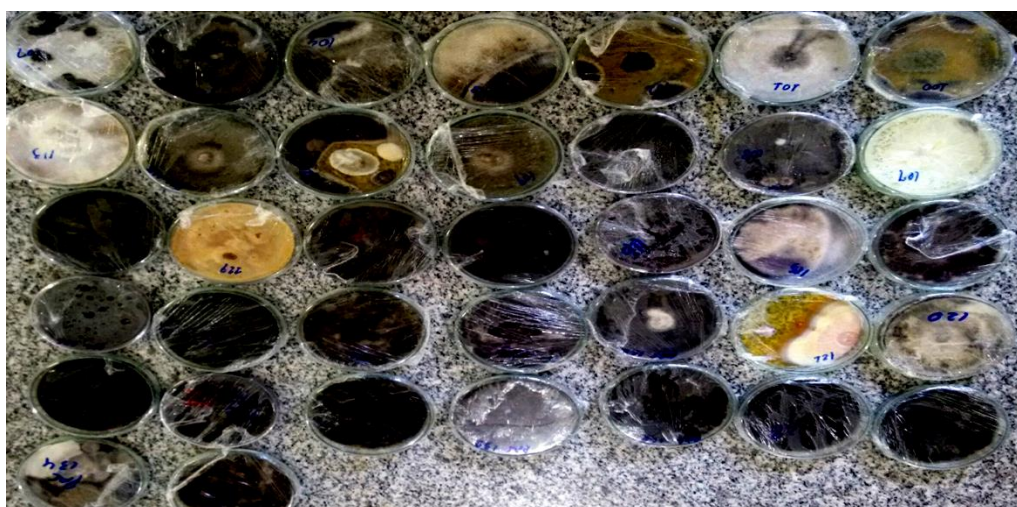


Figura 7: Processo de isolamento e purificação das colônias fúngicas. Fonte: Autor

4.4. Caracterização Morfológica dos Isolados

A identificação dos fungos foi realizada através da análise macroscópica e microscópica (micro cultivo) das características dos fungos, sendo observadas cor, textura, topografia, pigmento difuso, cor do verso e topografia das colônias, estruturas reprodutivas, estruturas de resistência e morfologia das hifas (Chapla et al., 2013). A confirmação da identidade das espécies fúngicas foi realizada em parceria com a Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco em nome da Curadora Cristina Maria de Souza Motta, por taxonomia e biologia molecular, através da amplificação e purificação de DNA (ácido desoxirribonucleico) em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Técnica de microcultivo para análise microscópica de fungos filamentosos

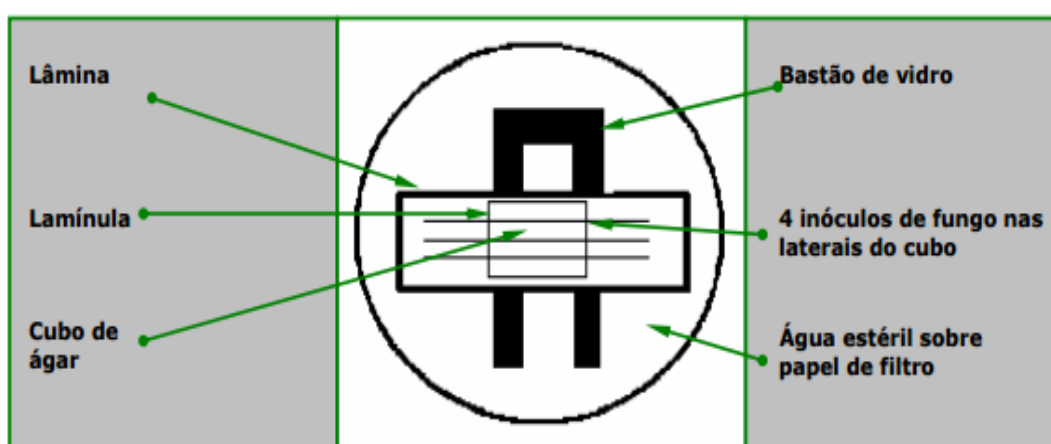


Figura 8: Técnica de microcultivo de fungos filamentosos.

Fonte: Autor

4.5. Conservação dos Isolados

Os fungos endofíticos isolados de *P. aduncum* foram armazenados utilizando-se dois métodos: tubo inclinado com meio de cultura submerso em óleo mineral e pelo método de Castellani (1939), no qual o fragmento da colônia com meio é colocado em água estéril dentro de frascos fechados. Os tubos e frascos com os isolados foram identificados e armazenamento a temperatura ambiente.

4.6. Construção da curva de crescimento do fungo selecionado

O fungo isolado PAC 119 foi escolhido para técnica com o intuito de analisar qual o melhor dia de seu crescimento. Esta metodologia foi desenvolvida segundo TANIWAKI *et al.* (2006), com modificações. Para determinar a cinética de crescimento dos fungos filamentosos e o período aproximado de maior produção de metabólitos de interesses, foi construída uma curva de crescimento através da determinação da massa seca. Foi

preparado um inóculo fúngico na concentração de 10^6 UFC/ml⁻¹ cultivados em erlenmeyers de 250 ml em meio caldo sabouraud, acrescido de cloranfenicol (250 mg/ml) e meio de levedura 2%. O caldo de fermentação foi então deixado a temperatura ambiente em agitador orbital SK - O (L) 180 e 330 – Pro a 120 rpm. No total foram colocados 5 erlenmeyers, sendo analisados por 14 dias. Ao final de cada tempo de análise, o micélio foi filtrado com papel de filtro whatman nº 1, lavado com água e seco em estufa a 60 °C até peso constante. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.7. Obtenção do liofilizado obtido do meio extra e intracelular

O sobrenadante fúngico foi obtido por metodologia semelhante à utilizada para a construção da curva de crescimento, variando apenas quanto ao volume de meio de cultura utilizado. Dessa forma, em um frasco com tampa de 2 L foram inoculados 100 ml de inóculo fúngico em 1 litro de meio de cultura (foram feitos frascos com meio maltose e meio suplementado com os diferentes dias de cultivo), seguidos de incubação em estufa a 25°C sob agitação em agitador orbital a 120 rpm. Após o período de incubação determinado, o micélio (parte intracelular) foi separado do sobrenadante armazenado com PBS 1X para a sonicação no freezer (ELETROLUX) em tubo falcon 50ml acrescidos com solução de PBS 1x (salina tamponado com fosfato) (Taniwaki et al., 2006).

O sobrenadante fúngico (parte extracelular) foi centrifugado (CENTRILAB) por 10 minutos a 3000rpm, seguido de filtração com filtro de seringa de 0,22mm (KASVI) e armazenamento em tubos falcon de 50 ml que foram congelados em freezer para serem liofilizados e posteriormente testados nas atividades enzimáticas e biológicas (Taniwaki et al., 2006).

4.8. Determinação preliminar dos metabólitos secundários presentes nos liofilizados dos meios intra e extracelular.

4.8.1. Triagem Fitoquímica Preliminar para Identificação de metabólitos secundários.

4.8.1.1. Alcaloides

Para esse teste foram dissolvidos 25mg das amostras intra e extracelular do fungo PAC 119 em 5mL de solução de HCl a 5%. Em seguidas foram separadas três porções de 1mL em tubos de ensaio com duas gotas dos respectivos reativos: reativo de Bouchardat, reativo de Dragendorff e reativo de Mayer. O reativo de Bouchardat indica positividade para alcaloides com a formação de precipitado laranja avermelhado, em contrapartida o reativo de Dragendorff indica a presença de alcaloides com o aparecimento de coloração vermelho tijolo e por último o reativo de Mayer indica reação positiva com o surgimento de precipitado branco (COSTA, 2000).

4.8.1.2. Polissacarídeos

As amostras intra e extracelular liofilizadas do fungo PAC 119 foram dissolvidas (25mg) em 5mL de água destilada, seguida de adicionar de duas gotas de lugol. O resultado foi considerado positivo com o aparecimento de coloração azul (COSTA, 2000).

4.8.1.3. Fenóis e Taninos

Nesta técnica foram pesadas e dissolvidas 25 mg das amostras intra e extracelular do fungo PAC 119 em 5mL de água destilada, seguida da adição de duas gotas de solução alcoólica de FeCl₃ a 1% (cloreto férrico). A reação foi considerada positiva com qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado quando comparado com o teste em branco (água + Solução de FeCl₃). Na interpretação dos resultados, a coloração inicial entre o azul e o vermelho é indicativo da presença de fenóis, a formação de precipitado escuro de tonalidade azul, indica presença de taninos hidrolisáveis e verde, presença de taninos (COSTA, 2000).

4.8.1.4. Flavonoides

O ensaio inicia-se com a pesagem de 50mg das amostras intra e extracelular do fungo PAC 119. Em seguida, essas amostras foram dissolvidas em 10 mL de metanol, acrescidas de 5 gotas de HCl concentrado (ácido clorídrico) e raspas de magnésio. A reação foi considerada positiva com o surgimento de uma coloração rósea (COSTA, 2000)

4.9. Atividades Biológicas

4.9.1. Atividade antioxidante

4.9.1.1. Avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical ABTS^{•+}

O método de avaliação da atividade antioxidante foi baseado no sequestro do radical livre ABTS^{•+} (Re et al, 1999). Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (Sigma Aldrich A1888) com persulfato de potássio (K₂S₂O₈; Sigma-Aldrich 60490), produzindo diretamente o radical cátion ABTS^{•+}, cromóforo de coloração verde/azul. A adição de antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, em escala dependente da capacidade antioxidante. Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorbância lida a 734nm durante cinco minutos (Re et al., 1999).

Em um tubo de ensaio foram adicionados 2970 µL da solução de trabalho ABTS^{•+} e 30 µL das amostras testadas em diferentes concentrações (5mg, 10mg, 50mg e 100mg), seguido de agitador em aparelho vórtex, vedação do sistema em ambiente escuro por 5 minutos a temperatura ambiente. Após este período, realizou-se a leitura da absorbância da coloração da mistura resultante em espectrofotômetro UV-Vis (SHIMATZU UV-160 1PC), no comprimento de onda de 734 nm (Re et al, 1999). Ao final, calculou-se o percentual de inibição do radical de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Inibição do ABTS}^{\bullet+} (\%) = [(\text{Abs.cont.} - \text{Abs.amostra})/\text{Abs.cont.}] \times 100$$

Onde:

Abs.cont: absorbância do branco

Abs.amostra: absorbância de cada amostra

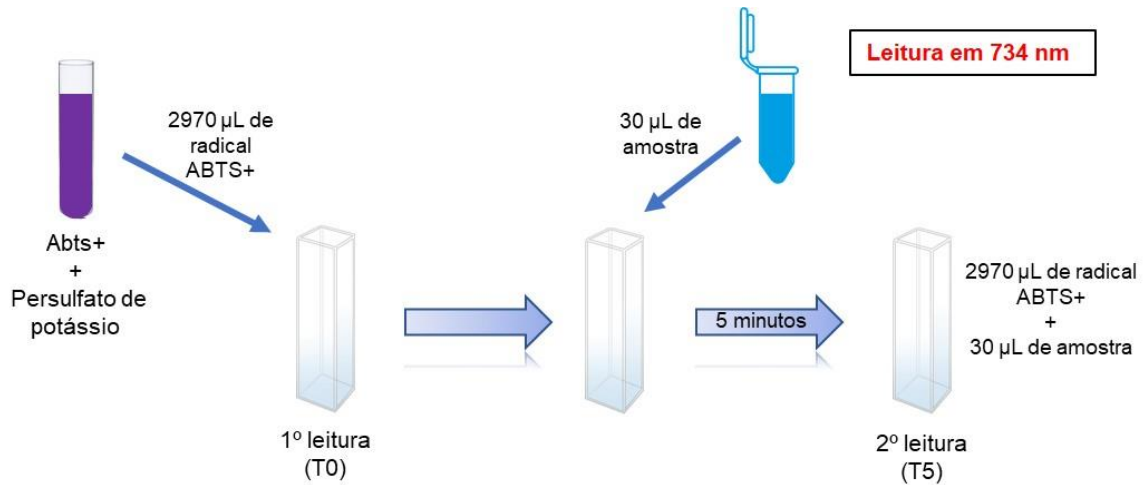


Figura 9: Representação do metodológica da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical ABTS+. Fonte: Autor

4.9.1.2. Avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH[•]

Este ensaio foi realizado de acordo com metodologia descrita por Brand-Williams et al. (1995), com algumas modificações. O radical livre DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um composto estável que apresenta coloração violácea e que, na presença de compostos antioxidantes, sofre redução ao aceitar um elétron ou hidrogênio destes compostos o que ocasiona diminuição da sua coloração. A diminuição desta coloração é diretamente proporcional à concentração de antioxidantes no meio e pode ser mensurada espectrofotometricamente.

Em um tubo de ensaio foram transferidos 3900 µL de solução de DPPH[•] (6×10^{-5} mol/L) e 100 µL das amostras testadas em diferentes concentrações (5mg, 10mg, 50mg e 100mg), seguida de homogeneização em vórtex e repouso no escuro a temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, realizou-se a leitura da absorbância da coloração da mistura resultante em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 515 nm. O percentual de inibição do radical foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Inibição do DPPH}^{\bullet} (\%) = \frac{[(\text{Abs. branco.} - \text{Abs. amostra}) / \text{Abs. branco}] \times 100}{1}$$

Onde:

Abs.branco: absorvância do branco

Abs.amostra: absorvância de cada amostra

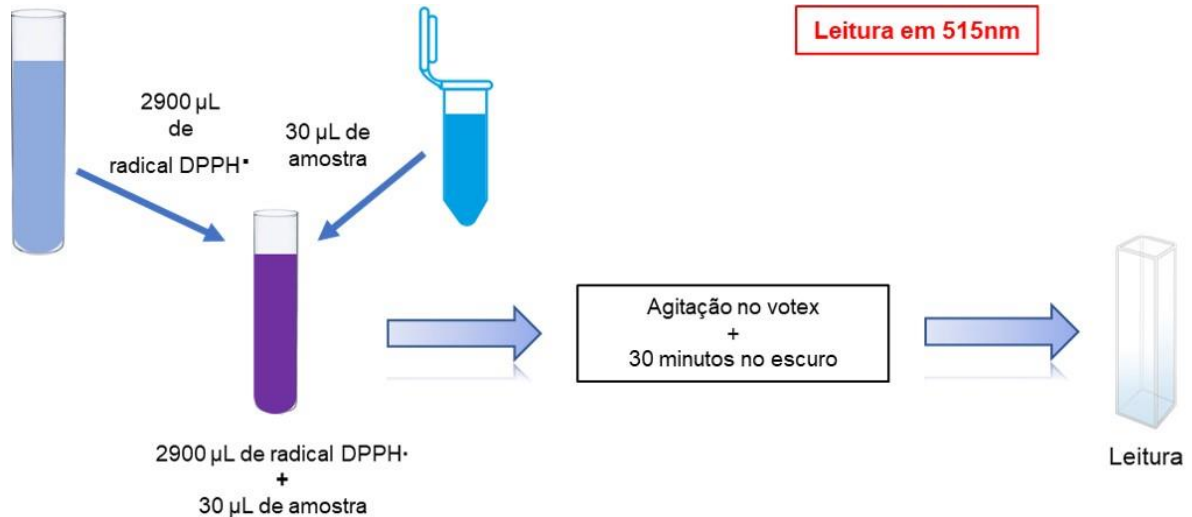


Figura 10: Representação metodológica da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH•. Fonte: Autor

4.9.1.3. Determinação do teor de Polifenóis totais

O teor de polifenóis totais foi mensurado através do método de Folin-Ciocalteu de acordo com metodologia descrita por Rebelo et al. (2008) com modificações. Em um tubo de ensaio foram adicionados 20 µL de cada amostra (4 mg, 10mg, 20mg) com 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 580 µL de água destilada. Este sistema permaneceu em repouso por 8 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 300µl de carbonato de sódio a 20% e 1000µl de água destilada, seguidos de agitação do sistema em vórtex e incubação no escuro a temperatura ambiente por 2 horas. Depois disso, as absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro (comprimento de onda 760 nm).

4.9.1.4. Atividade Antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada através método de microdiluição, utilizando as amostras liofilizadas nas concentrações de 4, 10 e 20 mg/mL

4.9.1.5. Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram caldo Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar cetrimide (HIMEDIA, Índia), ágar manitol (HIMEDIA, Índia), ágar macconkey (HIMEDIA, Índia), ágar sabouraud dextrose (HIMEDIA, Alemanha), caldo sabouraud dextrose (MERCK, Alemanha) e ágar sangue (HIMEDIA, Índia). Esses meios foram preparados a partir de uma base desidratada disponível comercialmente e conforme as instruções do fabricante.

4.9.1.6. Micro-organismos utilizados e manutenção das cepas

Para a atividade antibacteriana foram usadas cepas de referência American Type Culture Collection (ATCC), bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853) e para a atividade antifúngica a levedura (*Candida albicans* ATCC 10231) obtidas a partir da coleção do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ – Rio de Janeiro). As cepas de bactérias foram mantidas em ágar nutriente e a cepa fúngica, em ágar sabouraud à temperatura ambiente, no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

Todas as bactérias foram previamente semeadas em placas de Petri contendo meio não seletivo (ágar Mueller-Hinton), assim como em meio seletivo para cada uma delas, como forma de garantir a identificação das espécies. O *E. faecalis* foi semeado em ágar sangue; *S. aureus* em ágar Manitol, *E. coli* em ágar macconkey e *P. aeruginosa* em ágar cetrimide. Em seguida, todas as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em estufa para verificação do crescimento e posterior preparação dos inóculos.

4.9.1.7. Preparação do inóculo bacteriano

A obtenção dos inóculos seguiu a norma M7-A9 vol. 32 nº 2 da “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de crescimento Aeróbico” (2012). Após o período de incubação, 3 a 4 colônias dessas bactérias foram selecionadas e transferidas para tubo estéril contendo 1 ml de meio caldo Mueller-Hinton. Quando necessário, realizou-se ajustes para o alcance da concentração desejada de aproximadamente 1×10^8 UFC/ml⁻¹, sendo compatível com a escala 0,5 de Mc Farland. Em seguida, realizou-se a incubação dos tubos, cada um contendo a concentração do inóculo 1×10^8 UFC/ml⁻¹ por 1 hora para alcançar o crescimento exponencial das bactérias. Após esse tempo, diluições seriadas foram realizadas até a obtenção do inóculo 1×10^3 UFC/ml (figura 11).

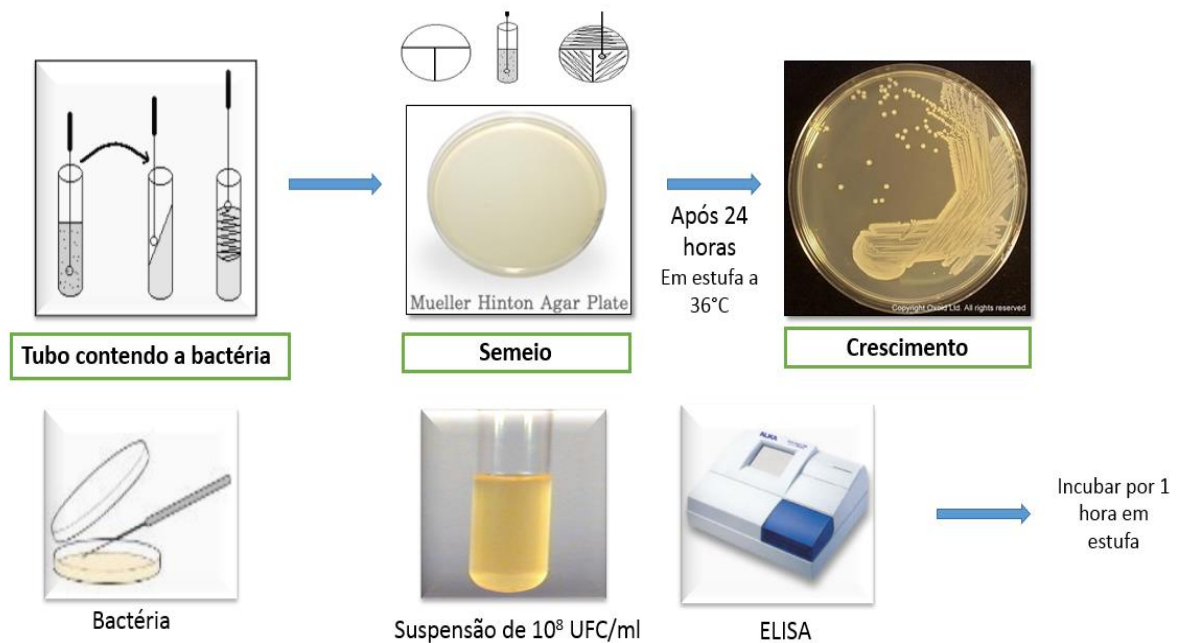


Figura 12: Preparação do inóculo bacteriano. Fonte: Autor

4.9.1.8. Técnica de microdiluição

Na placa de microdiluição de 96 poços foram distribuídos 100 µl do inóculo (1×10^3 UFC/ml) em todos os poços inclusive nos controles: positivo, negativo e inóculo. Em seguida, acrescentou-se aos poços 100 µl das amostras liofilizadas nas

concentrações previamente estabelecidas. Os poços de controle positivo receberam 100 µl do antimicrobiano cloranfenicol (250 µg/ml, bactéria Gram positiva) ou 100µl de penicilina-estreptolisina (10000unit/10mg, bactéria Gram negativa); o controle negativo recebeu 100µl do solvente DMSO (10%) utilizado para solubilizar a solução padrão e o poço do inóculo recebeu 100 µl do meio ágar Mueller Hinton, totalizando 200µl em cada poço. As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas (figura 12). O teste foi realizado em triplicata (CLSI M7-A9, 2012).

4.9.1.9. Concentração inibitória mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um micro-organismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo (CLSI M7-A9, 2012).

. Para a obtenção de CIM deve ser utilizado o parâmetro da mudança de coloração obtida no teste colorimétrico utilizando a resazurina. Sendo assim, fica estabelecido que o valor da CIM é definido como a menor concentração encontrada que impediu a mudança de cor, total ou parcial do meio na microplaca analisada. Para isso, após o término do tempo de incubação, foram acrescentados 15µL de resazurina a 0,01% em cada poço utilizado na microplaca, sendo necessário um período de 3 horas de incubação, para então se realizar a leitura da CIM (CLSI M7-A9, 2012).

A resazurina é um corante de coloração azul, utilizado como indicador por sofrer reação de óxido-redução passando de resazurina a resofurina, indicando a presença de células viáveis através da mudança de cor (CLSI M7-A9, 2012). Em seguida, foi realizada a leitura visual para identificação da CIM, considerando-se a manutenção da coloração azul como ausência de crescimento (CLSI M7-A9, 2012).

4.9.1.10. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Para a obtenção do CBM, 10µL de cada poço da placa de microdiluição foram semeados em placas de Petri contendo ágar Miller Hinton (AMH), em seguida as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C para posterior leitura das Unidades

Formadoras de colônias (UFC), na qual a CBM foi considerada a menor concentração do composto que resulta em ausência de crescimento ou o aparecimento de menos de três colônias, eliminando 99,9% dos micro-organismos (QUADROS et al, 2011).

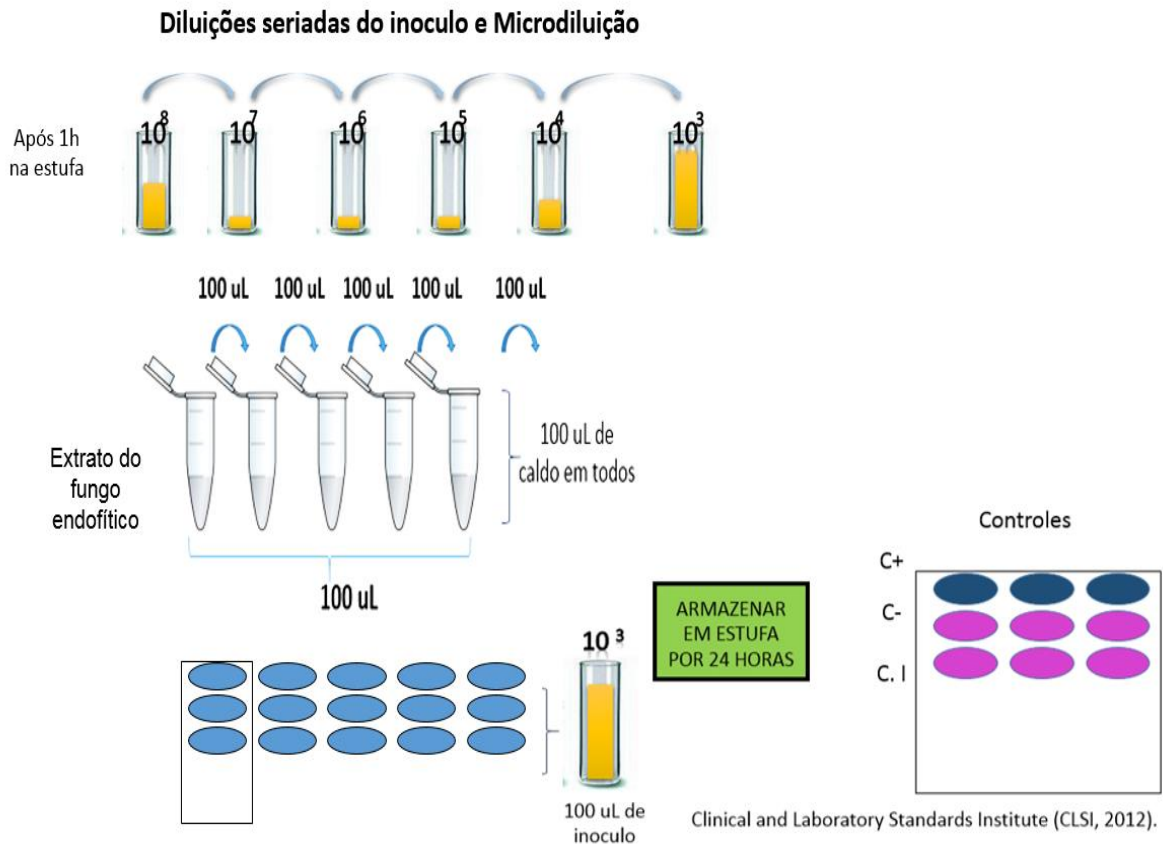


Figura 13:Esquema metodológico da Microdiluição para identificação de CIM e CBM. Técnica realizada conforme Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

5. Resultados

5.1. Isolamento e identificação dos fungos endofíticos da planta *P. aduncum*

Após a esterilização de caules e folhas da planta *P. aduncum* foram utilizadas técnicas de microcultivo para a observação de características morfológicas (macro e microscópicas) para o isolamento dos endófitos fúngicos. Ao total foram obtidas 44 espécies de fungos, sendo 37 dos gêneros *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Epicoccum sp.*, *Fusarium sp.* e *Mucor sp.*, que foram separados por serem produtores de micotoxinas e outros contaminantes, além de serem frequentemente descritos na literatura. 7 espécies de fungos foram selecionadas e 4 passaram por identificação morfológica e filogenética e os demais estão em processo de identificação.

A Figura 14 representa um fluxograma das espécies isoladas, caracterizadas e identificadas da planta *P. aduncum*.

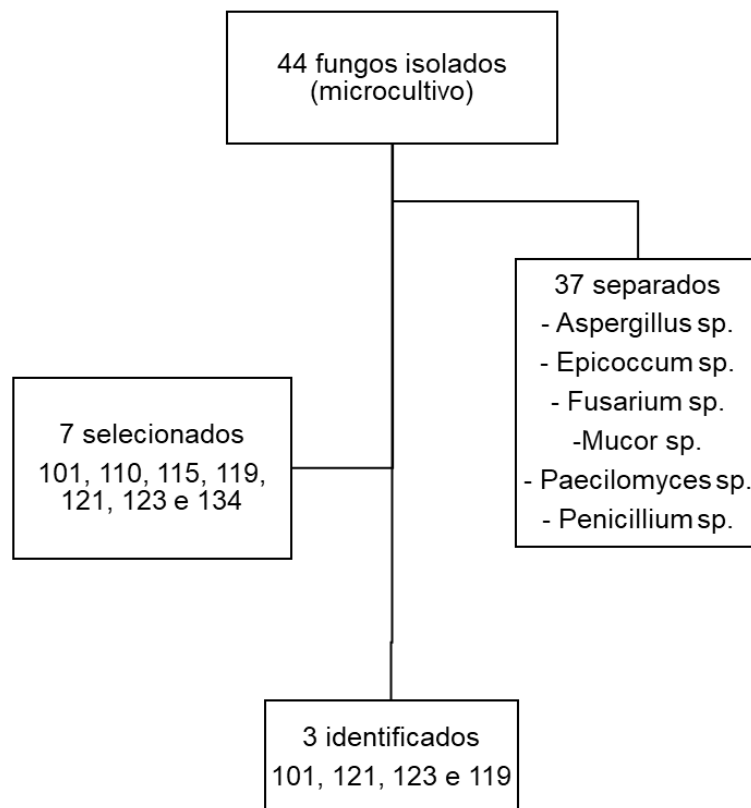


Figura 14: Fluxograma das espécies de fungos isolados, selecionados e identificados da planta *P. aduncum*.

A tabela a seguir mostra as identificações taxonômicas dos fungos endofíticos. Dos quais, 7 fungos endofíticos foram selecionados e 4 foram identificados através das características filogenéticas por técnica de biologia molecular.

Dos fungos identificados, este trabalho enfocou nas características químicas e biológicas do PAC 119 (*P. aduncum* caule fungo 119) que é pertencente ao gênero *Cytospora* sp. (sendo uma espécie nova que não foi possível identificar por RT-PCR, necessitando de técnicas mais aprimoradas). Mediante ao fato, do gênero ter poucos estudos sobre isolamento de componentes, no entanto os componentes identificados até o momento, foram de grande importância a indústria farmacêutica, por este motivo este fungo foi escolhido para este estudo. Outros fungos identificados, foram os fungos PAF 121 (*P. aduncum* folha fungo 121) e os PAC 101 e 123 que são espécies pouco estudadas.

Tabela 3. Identificação taxonômica dos fungos endofíticos isolados da planta *P. aduncum*.

Fungo (PAC e PAF)	Gênero (Taxonomia)
100,102, 103, 104, 106, 111, 113, 114, 118, 124, 125, 126, 127, 130, 131, 132, 136	<i>Aspergillus</i> sp.
129, 128, 141	<i>Epicoccum</i> sp.
105, 109, 120, 144	<i>Fusarium</i> sp.
111, 117, 122,	<i>Mucor</i> sp.
107, 142	<i>Paecilomyces</i> sp.
108, 116, 137, 138, 139, 140, 143	<i>Penicillium</i> sp.
112	Características de fungo Dimórfico
119	<i>Cytospora</i> sp. Espécie escolhida
121	<i>Espécie pouco estudada</i>
123	<i>Fusarium lateritium nees</i>
101, 110, 115 e 134	Em processamento

5.2. Curva de Crescimento do fungo endofítico PAC 119.

Para avaliar o crescimento do fungo PAC 119, inicialmente foi realizada uma curva de crescimento para determinar o melhor período para a realização das atividades biológicas. O fungo escolhido foi cultivado em Caldo Sabouraud por 14 dias e durante esse período foram coletadas as massas miceliais e o pH do meio.

Seguindo a figura abaixo, os dois primeiros dias não houve crescimento fúngico correspondendo ao período adaptativo do fungo ao meio de cultura, e a partir do 3º dia, inicia-se a fase Lag ou exponencial (A) onde ocorre uma acelerada divisão celular, crescimento exponencial, fase de grande atividade metabólica e produtora de compostos de interesse.

O 7º dia mostrou ser o melhor dia de crescimento do fungo PAC 119 (Figura 15), obtendo massa de 8,89g, como mostrado na tabela. A partir disso, se dá a fase de estabilidade e desaceleração do crescimento do fungo (B), onde ocorre baixa divisão celular e início da fase de declínio (Figura 15). O pH normal do meio foi avaliado durante todos os dias de cultivo, sendo que no período inicial se manteve em 5,55, e no 5º ao 7º dia, o valor de pH foi de 6,40 e 6,33, respectivamente, retornando a um pH próximo ao inicial na fase de declínio do crescimento.

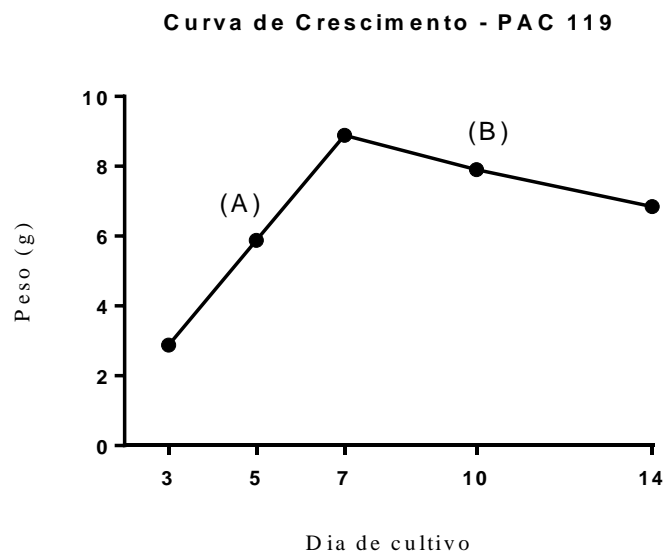


Figura 15. Curva de crescimento do Fungo PAC 119 em até 14 dias, apresentando a massa de peso seco (mg) a cada dia de cultivo do fungo. A) Lag – acelerada divisão celular, crescimento exponencial e grande produção de metabólitos de interesse. B) fase de declínio.

Tabela 4. Curva de crescimento do Fungo PAC 119 em até 14 dias, apresentando a massa de peso seco (g) a cada dia de cultivo do fungo.

CURVA CALDO SABOURAUD - (14 DIAS)			
PONTO DA CURVA	DIA DA COLETA DO MATERIAL	MASSA (g)	pH
1 ° PONTO	1° DIA	SEM CRESCIMENTO	5,55
2° PONTO	2° DIA	SEM CRESCIMENTO	5,55
3° PONTO	3 ° DIA	2,88g	5,55
4° PONTO	5° DIA	5,88g	6,40
6° PONTO	7° DIA	8,89g	6,33
7° PONTO	10° DIA	7,90 g	5,6
8° PONTO	14 ° DIA	6,85g	5,85

5.3. Obtenção do Material contido no meio intra e extracelular

A partir da análise da curva de crescimento do fungo e da cinética de crescimento, manteve-se a coleta das amostras nos seguintes dias de cultivo: 3°, 5°, 7°, 10° e 14° DIA. Em seguida, o sobrenadante do cultivo fúngico e o micélio foram coletados e separados por centrifugação, e os materiais obtidos foram liofilizados e denominados meios extracelular e intracelular, respectivamente, a usados na caracterização química e ensaios biológicos, descritos abaixo.

5.4. Caracterização química e Atividade Biológica

5.4.1. Triagem Fitoquímica do material intra e extracelular preliminar para identificação dos metabolitos secundários.

Os resultados das análises fitoquímicas mostraram que nas amostras do meio intracelular não foi possível identificar a presença dos metabolitos avaliados através dos métodos usando os reagentes de Bouchard, Dragendorff e Mayer. Em contrapartida, nas amostras extracelulares, os resultados foram positivos para alcaloides testadas frente aos reagentes de Bouchard, Dragendorff e Mayer, como representado nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Triagem preliminar para identificação dos metabolitos secundários intracelular

AMOSTRA	ALCALÓIDES			POLISSACARÍDEOS	FENÓIS E TANINOS	FLAVONÓIDES
	Bouchardat	Dragendorff	Mayer			
3 ^o	-	-	-	-	-	-
5 ^o	-	-	-	-	-	-
7 ^o	-	-	-	-	-	-
10 ^o	-	-	-	-	-	-
14 ^o	-	-	-	-	-	-

- = resultado negativo; + = resultado positivo

Tabela 6. Triagem preliminar para identificação dos metabolitos secundários extracelular

AMOSTRA	ALCALÓIDES			POLISSACARÍDEOS	FENÓIS E TANINOS	FLAVONÓIDES
	Bouchardat	Mayer	Dragendorff			
3 ^o	+	+	+	-	-	-
5 ^o	+	+	+	-	-	-
7 ^o	+	+	+	-	-	-
10 ^o	+	+	+	-	-	-
14 ^o	+	+	+	-	-	-

- = resultado negativo; + = resultado positivo



Figura 16. Formação de precipitado pelos reagentes de Bouchardt, mayer e Dragendorff. Fonte: Autor.

5.5. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada com os meios intra e extracelular para bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 23235, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Enterococcus faecalis* ATCC 51575) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619, *Salmonella typhi* ATCC 10749, *Protheus mirabilis* ATCC 25933). As tabelas abaixo mostram o CIM e o CBM das concentrações testadas (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1 mg/ml). Na figura 17, a cor rosa na placa de microdiluição indica presença de células viáveis ou crescimento bacteriano (negativo), enquanto a cor azul ausência de células viáveis ou ausência de crescimento bacteriano (positivo), como descrito na metodologia. O controle positivo (cloranfenicol) inibiu o crescimento do inóculo bacteriano e o controle negativo (DMSO) não interferiu no crescimento do mesmo.

Para o meio intracelular, todas as concentrações testadas frente as bactérias gram-positivas e gram-negativas não apresentaram atividade antimicrobiana (Figura 17). No entanto, o meio extracelular, as amostras coletadas nos 7º e 10º dias de cultivo apresentaram excelente atividade antimicrobiana frente as bactérias gram-positivas e gram-negativas. Para o 7º dia, o CIM obtido para as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. typhi* foi de 0,125 mg/ml (Figura 18), enquanto para as bactérias *P. aeruginosa* e *P. mirabilis* o CIM foi de 0,25 mg/ml (Figura 19) e para *E. coli* e *E. faecalis*

foi de 0,50 mg/ml (Figura 20). O CBM para todas as bactérias testadas ficou acima de 1 mg/ml. Em relação ao 10º dia de cultivo, o meio extracelular mostrou ação antimicrobiana frente as bactérias *S. typhi*, *E. epidermidis* e *S. aureus* apresentando o CIM de 0,50 mg/ml (Figura 21) e o CBM acima de 1 mg/ml.

Tabela 7. Resultado da microdiluição do meio intracelular do fungo PAC 119

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CEPAS ATCC CIM E CBM mg. mL ⁻¹										
CEPAS	PAC 119 – INTRACELULAR (mg/mL)									
	3 dias		5 dias		7 dias		10 dias		14 dias	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>S. aureus</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
<i>S. epidermidis</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
<i>E. faecalis</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
<i>E. coli</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
<i>P. aeruginosa</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
<i>S. typhi</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
<i>P. mirabilis</i>	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1

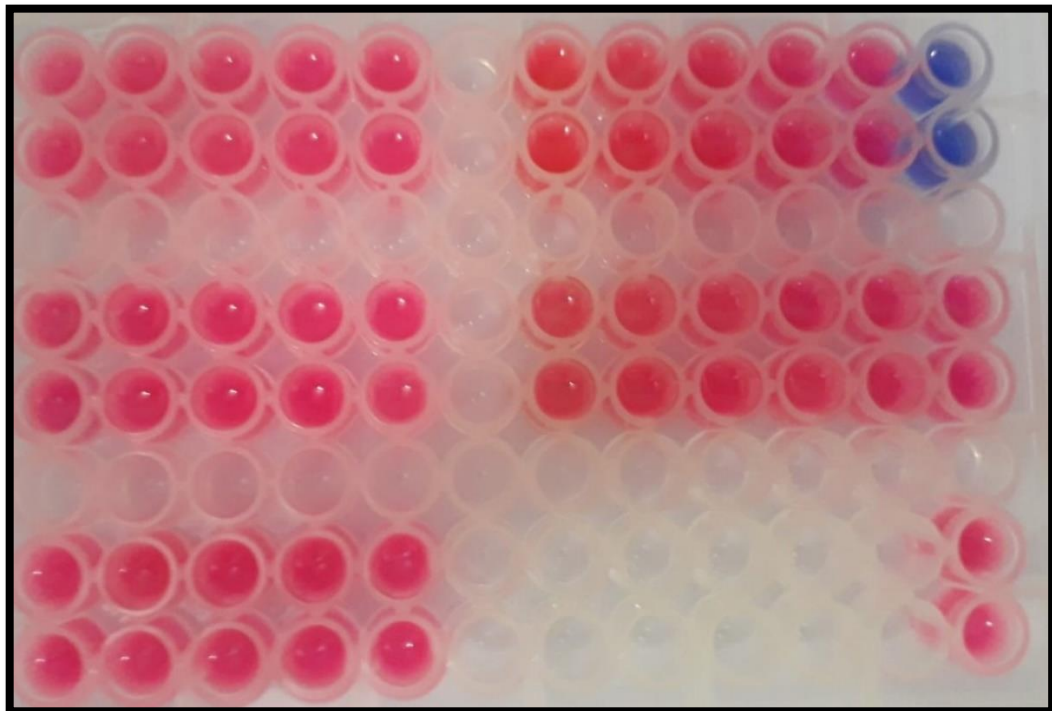
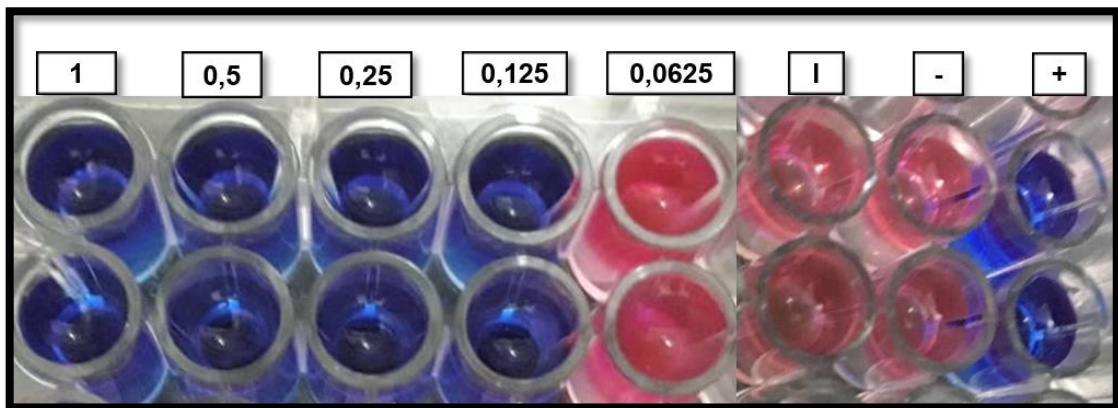


Figura 17. Resultado negativo da microdiluição intracelular do PAC 119. Os poços em rosa indicam a presença de células viáveis e os poços em azul são o controle positivo (cloranfenicol).

Tabela 8. Resultado da microdiluição do meio extracelular do fungo PAC 119

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CEPAS ATCC CIM E CBM MG. ML ⁻¹										
CEPAS	PAC 119									
	3 dias		5 dias		7 dias		10 dias		14dias	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>S. aureus</i>	>1	>1	>1	>1	0,125	>1	0,5	>1	>1	>1
<i>S. epidermidis</i>	>1	>1	>1	>1	0,125	>1	0,5	>1	>1	>1
<i>E. faecalis</i>	>1	>1	>1	>1	0,5	>1	>1	>1	>1	>1
<i>E. coli</i>	>1	>1	>1	>1	0,5	>1	>1	>1	>1	>1
<i>P. aeruginosa</i>	>1	>1	>1	>1	0,25	>1	>1	>1	>1	>1
<i>S. typhi</i>	>1	>1	>1	>1	0,125	>1	0,5	>1	>1	>1
<i>P. mirabilis</i>	>1	>1	>1	>1	0,25	>1	>1	>1	>1	>1

**Figura 18.** Placa de microdiluição do meio extracelular (7º dia de cultivo) PAC 119 frente as bactérias *S. aureus*, *S. Epidermidis* e *S. Typhi* (CIM 0,125mg/ml).

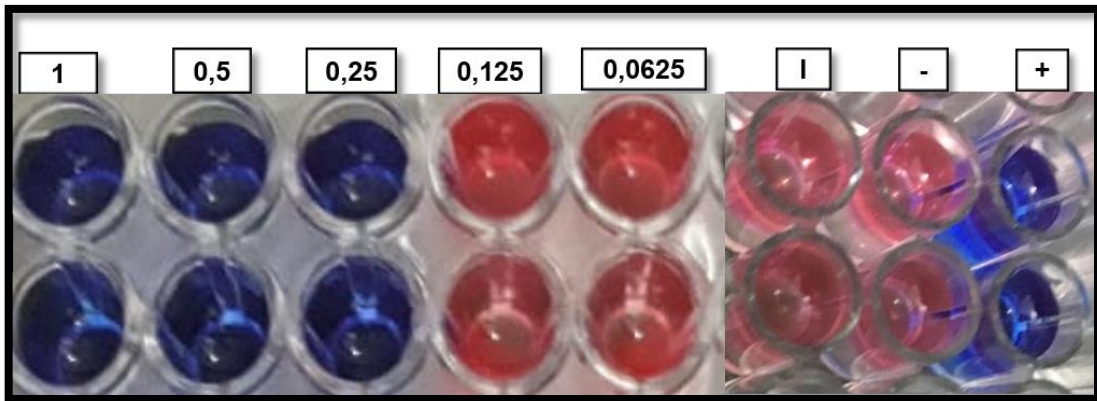


Figura 19. Placa de microdiluição do meio extracelular (7º dia de cultivo) PAC 119 frente as bactérias *P. aeruginosa* e *P. mirabilis* (CIM 0,25mg/ml)

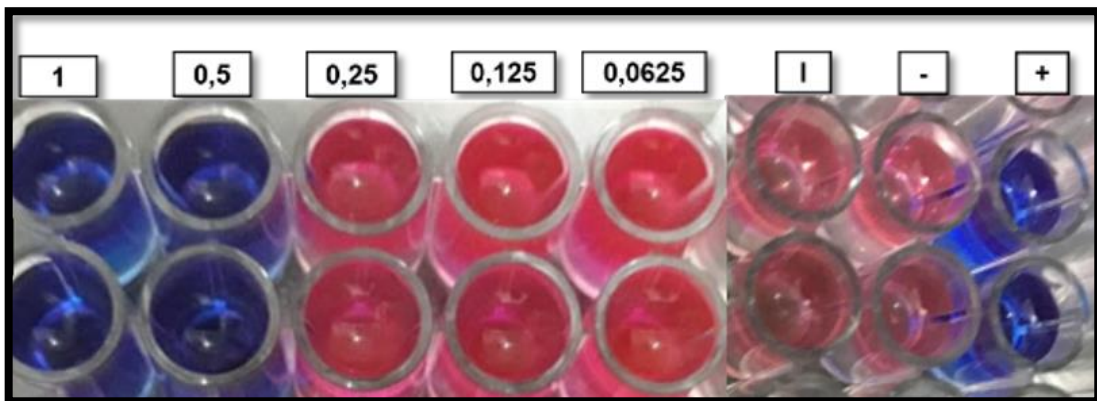


Figura 20. Placa de microdiluição do meio extracelular (7º dia de cultivo) do PAC 119 frente as bactérias *E. coli* e *E. Faecalis* (CIM 0,50mg/ml).

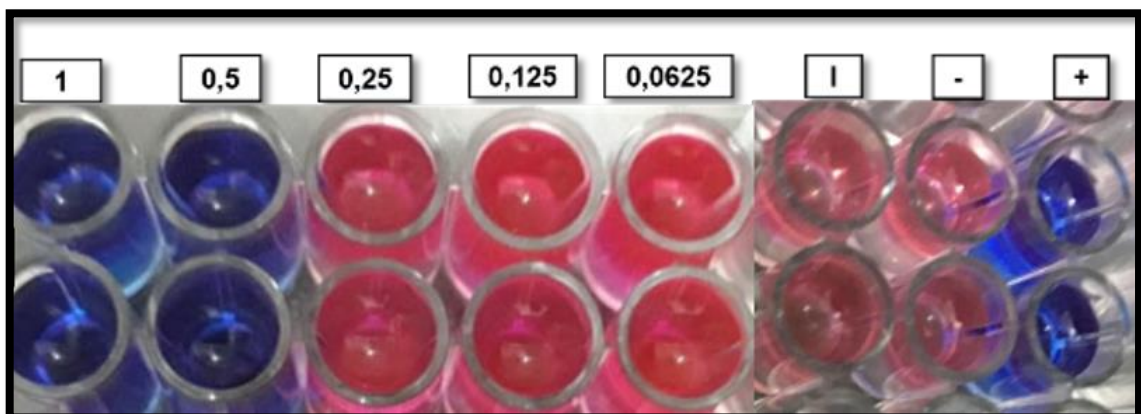


Figura 21: Placa de microdiluição do meio extracelular (10º dia de cultivo) do PAC 119 frente as bactérias *E. coli* e *E. Faecalis* (CIM 0,50mg/ml).

5.6. Atividade antioxidante

5.6.1. Avaliação da atividade antioxidante pelo método TEAC

A atividade antioxidante foi realizada com o material obtido dos meios intra e extracelular do fungo *Cytospora sp.* e com o ácido gálico (0,1; 0,05; 0,02; 0,01 e 0,005 mg/ml) como padrão (Figura 22). Segundo os resultados, o meio intracelular na concentração de 20mg/ml inibiu apenas 20% do radical $Abts^+$ no 10º dia de cultivo do fungo, diferentemente do meio extracelular que inibiu cerca de 80% do radical em seu 7º dia de cultivo, enquanto que o ácido gálico apresenta 98% de inibição na concentração de 0,1 mg/ml (Tabela 9).

O meio intracelular revela uma atividade antioxidante desde o 3º dia de cultivo, em que apresenta 20% de inibição do $Abts^+$ e se mantém até o 10º dia, atingindo o pico máximo de 30% de inibição. Em relação ao meio extracelular, a concentração de 20 mg/ml, no 3º dia apresenta uma inibição do radical em torno de 60%, seguido de um aumento até o 5º dia, fase em que corresponde ao crescimento exponencial do fungo segundo a curva de crescimento, e atinge o pico máximo de 80% de inibição do radical no 7º dia de cultivo. Após isso, ocorre o decrescimento dos índices de inibição em ambos os meios.

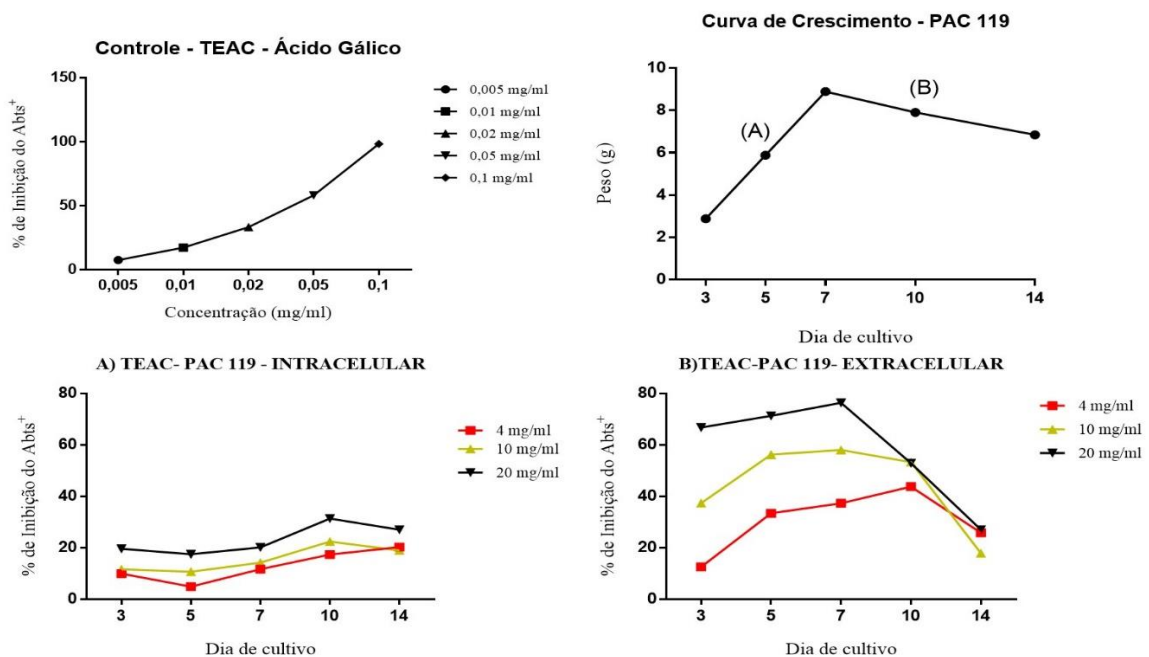


Figura 22. Inibição do $ABTS^+$ dos meios intra e extracelular, em conjunto, com a curva de crescimento.

5.6.2. Avaliação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•.

A atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH• também foi realizada nos meios intra e extracelular do fungo e com o ácido gálico (0,1; 0,05; 0,02; 0,01 e 0,005mg/ml) foi utilizado como padrão. Segundo os resultados obtidos, o ácido gálico inibiu 100% do radical DPPH•(Tabela X), o meio intracelular inibiu aproximadamente 10% do radical DPPH• em seu 10º dia de cultivo, diferindo da curva de crescimento onde que sinaliza o 7º dia (7% de inibição), como o pico do crescimento fúngico. Os resultados do meio extracelular obtidos mostram que o 10º e 14º dia obtiveram cerca de 10% de inibição do radical DPPH•, enquanto o 7º dia apresentou inibição de 7% (figura 23).

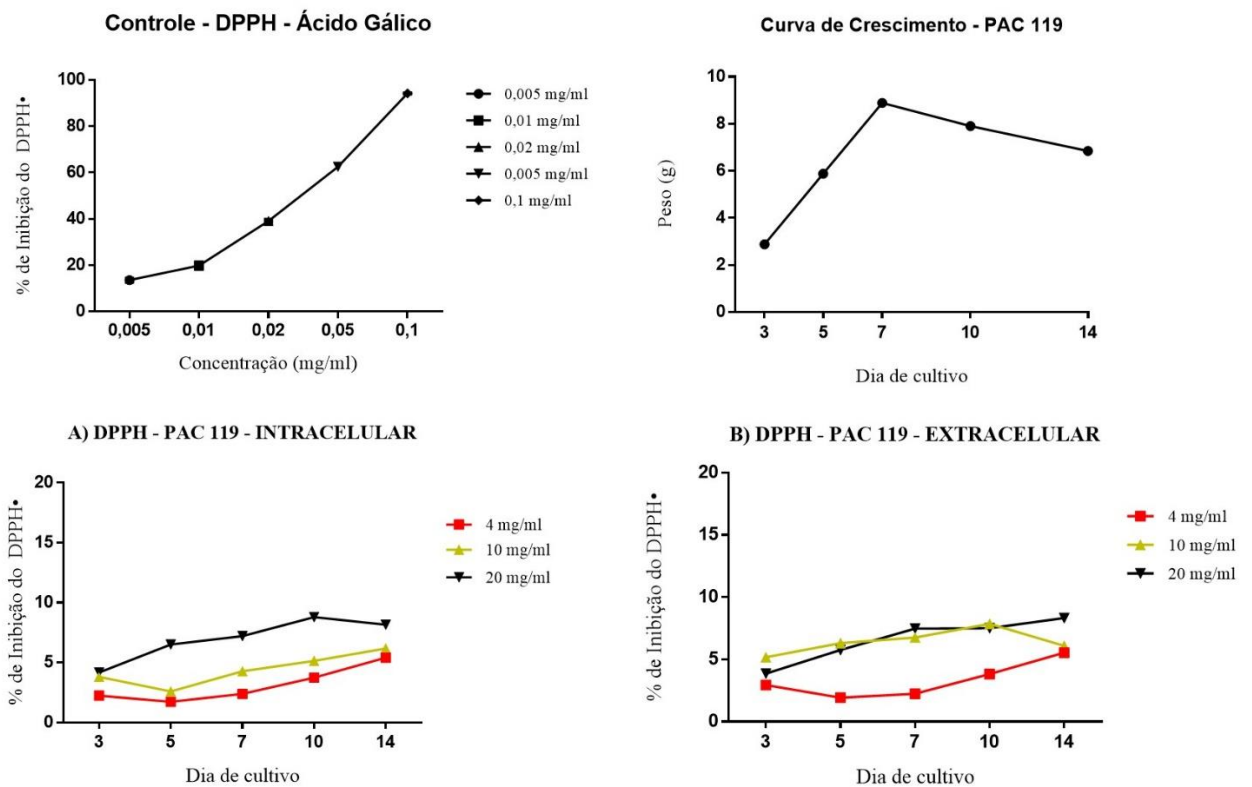


Figura 23. Inibição do ABTS+ dos meios intra e extracelular, em conjunto, com a curva de crescimento.

Tabela 9. Atividade antioxidante (TEAC e DPPH) do meio intracelular do PAC 119

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE		
AMOSTRAS mg/mL	INIBIÇÃO DE ABTS* (%) (TEAC)	DPPH
ÁCIDO GÁLICO		
0,005	7,64±0,25	13,58±0,76
0,01	17,42±0,36	19,87±1,53
0,02	33,41±2,28	39,13±0,65
0,05	58,26±2,96	62,5±3,40
0,1	98,48±0,49	94,17±0,10
3D	-	-
4	9,18±2,65	2,28±0,68
10	10,02±2,98	3,81±0,30
20	19,12±0,77	3,96±0,21
5D	-	-
4	4,95±0,34	1,82±0,17
10	10,73±3,10	1,52±2,11
20	15,10±4,83	5,79±1,72
7D	-	-
4	11,72±1,60	2,59±0,35
10	15,24±2,78	4,26±0,30
20	20,99±3,19	7,08±2,10
10D	-	-
4	16,02±6,07	9,60±3,84
10	22,39±2,88	5,14±0,26
20	30,20±3,07	9,14±3,23
14D	-	-
4	19,37±1,65	5,41 ± 0,07
10	18,12±1,54	6,36±0,69
20	24,18±5,37	8,11±2,56

Tabela 10. Atividade antioxidante (TEAC e DPPH) do meio extracelular do PAC 119

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE		
AMOSTRAS mg/mL	INIBIÇÃO DE ABTS⁺ (%) (TEAC)	DPPH
ÁCIDO GÁLICO		
0,005	7,64±0,25	13,58±0,76
0,01	17,42±0,36	19,87±1,53
0,02	33,41±2,28	39,13±0,65
0,05	58,26±2,96	62,5±3,40
0,1	98,48±0,49	94,17±0,10
3D	-	-
4	12,65±0,85	2,89±0,38
10	37,30±0,98	4,87±0,52
20	66,45±0,58	3,81±0,21
5D	-	-
4	32,31±2,35	1,82±0,31
10	56,32±0,34	6,40±0,31
20	71,47±0,51	5,71±0,16
7D	-	-
4	37,37±0,68	2,28±0,38
10	58,01±0,55	6,87±0,69
20	76,26±0,29	7,46±0,03
10D	-	-
4	43,66±0,20	3,88±0,21
10	53,38±0,24	7,81±0,49
20	52,63±1,50	6,92±0,02
14D	-	-
4	22,24±8,84	5,64 ± 0,31
10	18,12±2,98	6,40±0,66
20	24,18±5,37	8,65±0,03

5.6.3. Determinação do Teor de Polifenóis.

O teor de polifenóis foi determinado em mg e valores médios em relação ao ácido gálico (mg/ml). Em relação ao ácido gálico, o valor de compostos fenólicos obtidos foi em torno de 1,5 mg na concentração de 0,1 mg/ml. O meio intracelular não apresentou variação significativa, com todas as concentrações testadas em torno de 0,2 mg. Em contrapartida, o meio extracelular apresentou valores crescentes de compostos fenólicos, atingindo 0,6 mg em seu 14 dia de cultivo, seguindo de uma reta crescente.

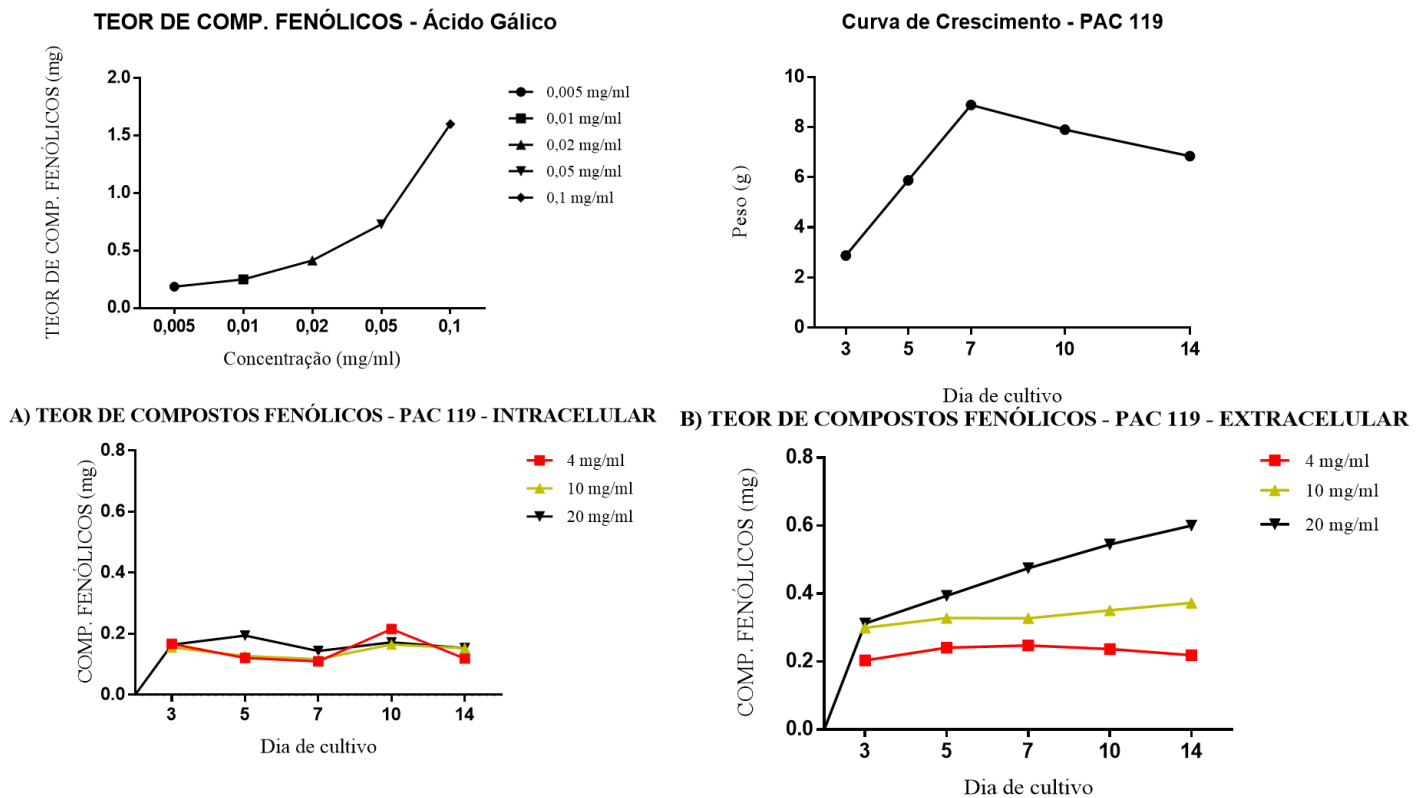


Figura 24. Teor de compostos fenólicos presente nos meios intra e extracelular

5.7. Cinética de Crescimento Fúngico

A figura 25 abaixo ilustra a cinética de crescimento do fungo PAC119 em função do tempo, no período de 0 a 7 dias de cultivo em Caldo Sabouraud. Os dados cinéticos mostram um crescimento exponencial do 1º ao 7º dia, sendo os dados correlacionados por uma função exponencial crescente de 1ª ordem, com $R^2 = 0,97$. Essa função exponencial valida a hipótese de crescimento neste tempo, conforme relatado em outros trabalhos (Figura 25).

No entanto, a figura 26 mostra o crescimento do fungo PAC 119 no período de 0 a 14 dias em Caldo Sabouraud. Observa-se nesse período, duas etapas distintas, na primeira entre 0 e 7 dias, caracterizada por um crescimento exponencial de primeira ordem, confirmando a fase Log e corroborando aos dados ilustrados na figura anterior (Figura 25). No período de 7 a 14 dias, observa-se um decaimento exponencial na cinética de crescimento fúngico, descrita por uma função exponencial decrescente de 1ª ordem com $R^2 = 1$. Esta inibição do crescimento pode estar associada a alteração do pH no meio ou ainda a produção de metabolitos secundários com potencial inibitório, representando a fase de declínio do crescimento (FIGURA 26).

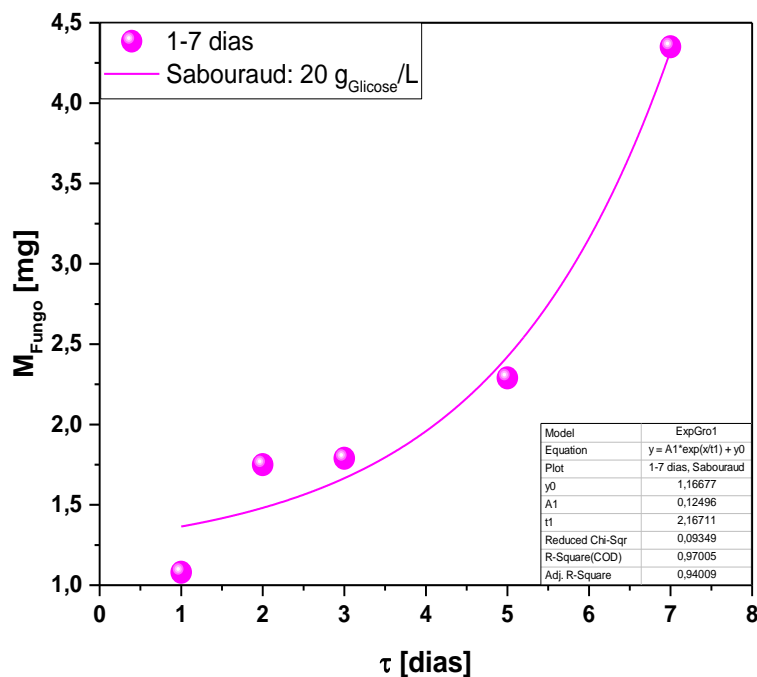


Figura 25. Cinética de crescimento do fungo PAC119 em função do tempo

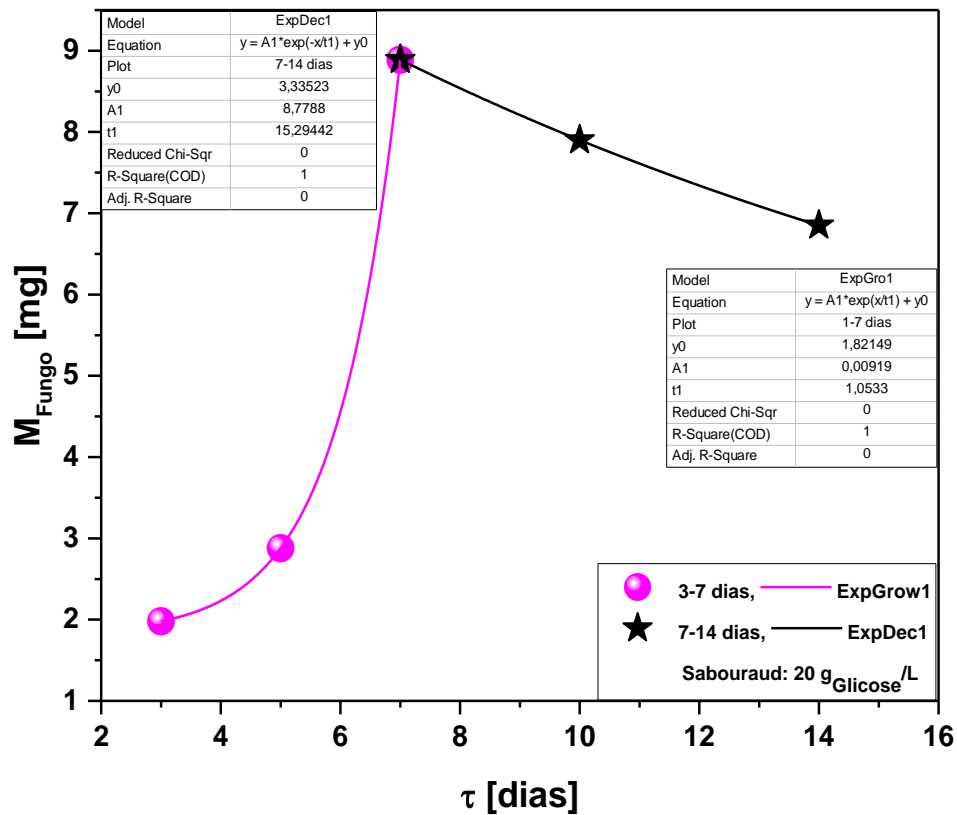


Figura 26. Crescimento do fungo PAC 119 no período de 0 a 14 dias em Caldo Sabouraud.

As figuras abaixo ilustram a Figura 27 mostra que no meio intracelular, a atividade antioxidante aumentou com o tempo de cultivo para todas as concentrações avaliadas, sendo que quanto maior a concentração de liofilizado, maior o potencial antioxidante. As cinéticas dos potenciais antioxidantes para as concentrações de 4, 10 e 20 mg/mL foram as seguintes equações: exponenciais crescentes de primeira ordem, equação linear e exponencial crescente de primeira ordem, respectivamente, com coeficiente de regressão $R^2=0,99$.

Em relação ao meio extracelular, observa-se uma tendência de crescimento da atividade antioxidante no período de 0 a 10 dias para as concentrações de 10 e 20 mg/mL, seguido de um decaimento entre o 10° e 14° dia. Entretanto, para a concentração de 4 mg/mL, observa-se uma tendência de crescimento no período de 0 a 14 dias, alcançando valores semelhantes aos obtidos nas concentrações 10 e 20 mg/ml. Nesse contexto, estes dados indicam a presença, entretanto em baixas

concentrações, de componentes com ação sequestradora de radicais livres tanto no meio intra e extracelular (FIGURA 28).

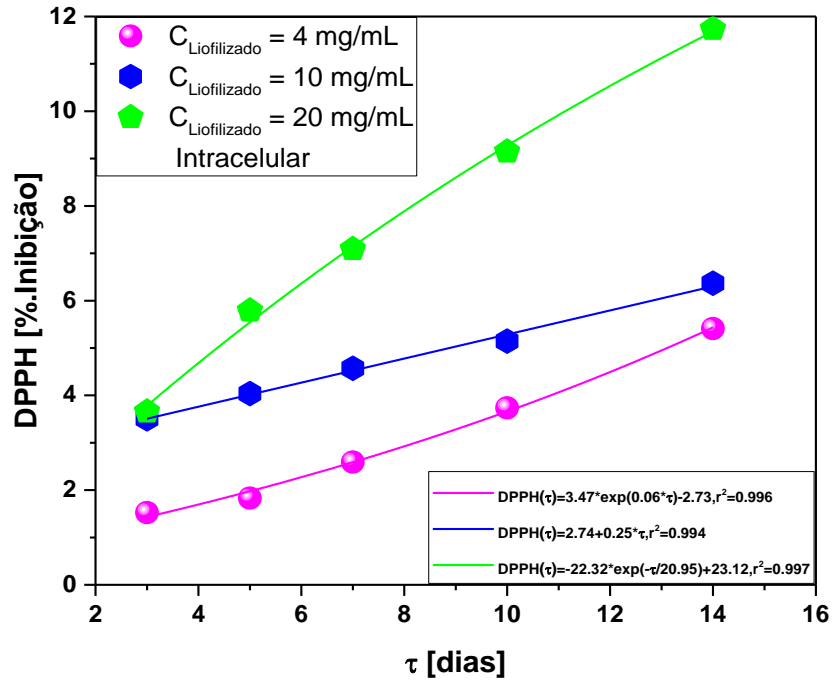


Figura 27. Atividade antioxidante em relação ao tempo de cultivo para todas as concentrações avaliadas.

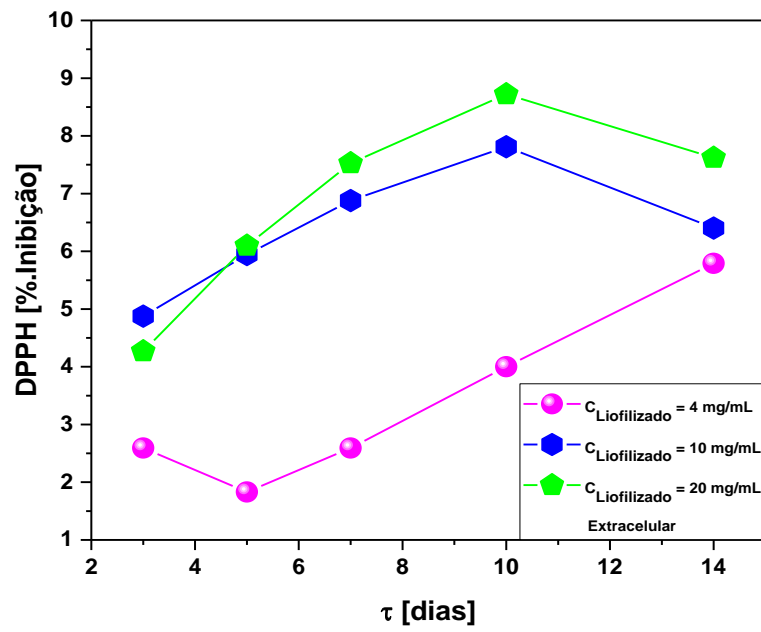


Figura 28. Atividade antioxidante em relação ao tempo de cultivo para todas as concentrações do meio extracelular avaliadas.

6. Discussão

A *P. aduncum* foi escolhida para este estudo por ser popularmente utilizada para o tratamento de diversas patologias, além de ser extremamente datada em relação a produção de metabólitos secundários e atividades biológicas. Entretanto, as informações sobre os fungos endofíticos relacionados a esta espécie de planta ainda são escassos, na literatura, até o momento, foram isolados e identificados apenas o fungo do gênero *Xylaria sp.* (Silva, 2010; Oliveira, 2010) e o fungo *Aspergillus versicolor* (gubiani, 2016).

O fungo *Xylaria sp.* e outras cinco linhagens fúngicas foram isoladas e identificadas a partir das folhas de *P. aduncum*. A linhagem fúngica codificada como PA – 01 foi identificada como gênero *Xylaria sp.*, apresentou atividade em seu meio bruto AcOEt frente a linhagem mutante de *Saccharomyces cerevisiae* RS 321 e aos fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Através da identificação fitoquímica foram encontrados citocalasinas das 19,20-epoxicitocalasina conhecidas D(2), C (3), N (4), Q (5) e (6) e uma citocalasina inédita (1) (Silva, 2010). Em outro estudo, o fungo *Xylaria sp.* também foi isolado das folhas de *P. aduncum* e a partir do meio bruto de AcOEt foram identificados a presença de seis citocalasinas e dois sesquiterpenos que apresentaram atividade antifúngica e anticancerígena (Silva, 2010a).

As espécies de *Xylaria* são endófitas, frequentemente encontradas em plantas tropicais, decompositores de madeira, em associação com plantas, líquens e podem ser encontrados associados a cupins. O perfil químico das substâncias presentes nesse gênero, são encontrados frequentemente: terpenóides, citocalasinas, alcalóides, policetídeos, compostos aromáticos e compostos orgânicos voláteis, incluindo sesquiterpenóides, ésteres e álcoois, esses metabólitos são relacionados a atividades biológicas como citotóxicas, antibacterianas, antimaláricas e inibitórias da α -glucosidase (Iiu, 2011; Song, 2014; Gao, 2019)

Oliveira e Colaboradores (2016), isolaram o fungo *Aspergillus versicolor* a partir das folhas de *P. aduncum* e do meio bruto de AcOEt identificaram de três peptídeos derivados: ciclo- (triptofil-fenilalanil) (2), dicetopiperazina dímero WIN 64821 (3) e 3-hidroxi-15H-triptofenalina (4), um derivado de adenina: 2-hidroxi-6-N-isopentenil-adenina (5), um derivado ftalídeo: 4-metoxiftalídeo (1) e um ácido benzóico derivado: ácido 3-hidroxi-4- (1-hidroxi-1,5-dimetil-hexil) benzóico (6).

O *Aspergillus* é um amplo gênero dos fungos filamentosos, e o fungo mais comum da terra, estima-se que existam mais de 250 espécies descritas. O *A. versicolor* é a espécie do gênero mais dispersa no ambiente, podendo ser isolada a partir de plantas, solo, algas, ambientes úmidos, frios e até da poeira do ar. Essa espécie também é descrita como a principal produtora de micotoxinas e potencial causadora de problemas respiratórios em humanos (Dean, 2005; Bergen, 2007; Klinch, 2009; Ebada, 2018; Mohamed, 2019). Entretanto, o *A. versicolor* é relacionado a produção de isocumarinas, sesquiterpenóides, butirolactonas, antraquinonas, polietídeos, xantonas, ésteres de nitrobenzólido, sesquiterpenóides, lipopeptídeos e isocumarinas com bioatividades diversas como antiproliferativa, antibacteriana e antifúngica (Lee, 2009; Ebada, 2018; Mohamed, 2020).

Em nossa pesquisa foram utilizados caules e folhas de *P. aduncum* e partir deles foram isoladas 44 espécies de fungos, sendo 37 dos gêneros *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Epicoccum sp.*, *Fusarium sp.* e *Mucor sp.*, uma espécie pouco estudada identificada com *Fusarium lateritium nees* e quatro espécies ainda em processo de identificação. Como descrito anteriormente, a planta *P. aduncum* ainda é pouco explorada em relação a sua biologia endofítica, por este motivo, o estudo das espécies fúngicas encontradas durante a bioprospecção contribuiu grandemente para o conhecimento sobre a planta, que é popularmente utilizada para o tratamento de doenças, conhecida pela variedade de atividades biológicas de metabolitos extraídos de folhas, caule, do seu óleo essencial.

Dentre as espécies identificadas, o PAC 119 foi escolhido para este estudo pelo seu ineditismo, posteriormente, foi identificado como sendo um fungo pertencente ao gênero *Cytospora sp.* Esse gênero pertence à família Cytosporaceae, são fitopatógenos ou saprófitos, amplamente distribuídos pelo globo terrestre, comumente encontrados em árvores lenhosas, como o eucalipto, e são associadas ao câncer e morte dessas espécies. Os fungos desse gênero são identificados morfológicamente através dos conidiomas e/ou ascomas, nos picnídios/peritécios, na forma de organização do lóculo, nas dimensões dos esporos e pelo arranjo dos tecidos estomáticos e produzem uns micélios frutificados e assexuados, conidióforos filamentosos e conídios alantóides hialinos (Adams, 2006; Tian, 2014; Wang, 2015; Baumgartner, 2017).

A curva de crescimento fúngico foi realizada para entender o comportamento fúngico, utilizamos o caldo sabouraud como fonte de nutrientes e cultivamos o endófito durante 14 dias. Durante os dois primeiros dias de cultivo, não foram observados crescimento da massa micelial, o que indica a fase adaptativa do fungo ao meio de cultivo. A partir do 3º dia (2,88g) temos a fase Lag, com o início e a aceleração da divisão celular até o pico de crescimento micelial no 7º dia (8,89g) de cultivo e a partir disso, temos o início da fase de declínio, onde houve diminuição da aceleração da divisão celular e morte do fungo.

Nosso estudo testou os meios intra e extracelulares foram testados frente as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Enterococcus faecalis* e gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Protheus mirabilis*. O meio intracelular não apresentou atividade frente a nenhuma das cepas testadas e, em relação ao meio extracelular, somente o 7º e o 10º dia apresentaram atividades antibacterianas.

Dentre as bactérias gram positivas, o *E. faecalis* se mostrou mais promissor em relação as *S. aureus* e *S. epidermidis*. Em seu estudo, Singh et al. 2007, isolou duas citosquirina (A-B) e cinco citosporonas (A-E) de um fungo do gênero *Cytospora sp.* A Citosquirina A obteve uma excelente atividade frente a bactérias gram positivas e frente a *E. Coli.*, a Citosquirina B não apresentou atividade diante das cepas testadas, em decorrência de diferenças de estruturas químicas que pode levar a dificuldade de o composto atravessar a membrana externa da bactéria. Em relação as citosporonas, somente a D e a E, apresentaram atividade frente as bactérias gram-positivas. Li et al. 2010, isolou três citosporolídios A-C de um fungo do mesmo gênero, e testou frente a bactérias gram-positivas e somente o Citosporolídio C, apresentou atividade significativa quando comparado ao controle positivo utilizado. Esses dados corroboram com os resultados encontrado pelo nosso grupo de pesquisa, entretanto, é necessário a elucidação de quais compostos estão presentes no meio extracelular. Em trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, evidenciamos que o óleo essencial de *Piper aduncum* apresenta potencial bacteriano frente a bactérias gram-positivas, segundo Brazão et al, 2014 que mostrar inibição de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* pelo óleo essencial rico em dilapiol.

A atividade antioxidante, no método de sequestro do radical ABTS, nossos resultados mostram no meio intracelular 20% (20mg/ml) de inibição do radical desde

o 3º dia de cultivo até o 10º dia de cultivo, em contra partida, o meio extracelular em seu 7º dia de cultivo fúngico, apresentou 80% de inibição do radical ABTS. O ensaio é baseado no sequestro do radical Abts, de coloração azul, e a atividade antioxidante total é medida através da mudança de coloração da solução contendo o radical ABTS. A adição de antioxidantes ao cátion radical pré-formado reduz o ABTS, em uma extensão e em uma escala de tempo dependendo da atividade antioxidante, da concentração do antioxidante e da duração da reação e é utilizado tanto em substâncias hidrossolúveis, quanto lipossolúveis (Re,1999).

Em relação ao método do DPPH, o meio intracelular apresentou inibição somente de 10% do radical, já no período desaceleração da divisão celular fúngica, igualmente ao meio extracelular que manteve os índices de 10% de inibição do radical no 10º e no 14º dia de cultivo. O mecanismo dessa atividade é através da captura ou o sequestro de radicais livres presentes na amostra com base em dois mecanismos o de transferência de elétrons (TE) e o outro na transferência de um átomo de hidrogênio (TAH)(SUCUPIRA *et al.*, 2014; OLIVEIRA, G. L.S., 2015). Segundo Liu *et al.* 2019, em seu estudo isolou duas novas policetonas, rizofóis A – B (1–2) que foram avaliados quanto a sua atividade antioxidante. Apenas o composto 1 apresentou atividade antioxidante pelo sequestro do radical dpph ($IC_{50} = 13.07 \pm 0.94 \mu M$), quando comparado ao padrão utilizado no teste ($IC_{50} = 25.53 \pm 0.21$), entretanto a metodologia utilizada pelo autor, foi diferente da que nos utilizamos.

Quanto a avaliação de polifenóis nos meios intra e extracelular, o meio intracelular não apresentou variação significativa, com todas as concentrações testadas em torno de 0,2 mg, em contrapartida, o meio extracelular apresentou valores crescentes de compostos fenólicos, atingindo 0,6 mg em seu 14 dia de cultivo, seguindo de uma reta crescente.

Os polifenóis são metabólitos secundários presente em plantas superiores, e também produzidos por fungos endofíticos, como resultado do seu endofitismo. Esses metabolitos são sequestradores de radicais livres que doam um elétron ou um átomo de hidrogênio, inibindo a formação ou desativação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e fazendo com que a reação em cadeia de peroxidação lipídica seja interrompida (MANACH *et al.*, 2004; DAGLIA, 2012; DE OLIVEIRA, ADRIANA MARIA FERNANDES *et al.*, 2012; MAREČEK *et al.*, 2017.;ali,2020).

Nas plantas, esses metabolitos atuam principalmente defesa contra patógenos, herbivoria e como resposta a várias condições de estresse abiótico, como chuva e radiação ultravioleta. Em humanos são associados a propriedades antioxidantes, redutores de enzimas e eliminadoras de radicais livres e quelantes de metais, além de interagir com vias de transdução de sinal e receptores celulares. Os polifenóis tem sido relacionados a prevenção de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose, diabetes mellitus e doenças neurodegenerativas. Substâncias antioxidantes podem inibir ou retardar o dano oxidativo, causado por radicais livres, através da captura um radical livre e alterar o mecanismo de oxidação que causa doenças degenerativas. (MANACH *et al.*, 2004; DAGLIA, 2012; DE OLIVEIRA, ADRIANA MARIA FERNANDES *et al.*, 2012; MAREČEK *et al.*, 2017).

Os polifenóis estão divididos em subclasses como flavonóis, flavonas, flavanonas, antocianidinas, flavonóis, isoflavonas e também podem ser relacionados a glicosídeos, a vários ácidos orgânicos ou como moléculas polimerizadas complexas com alto peso molecular, como taninos(DAGLIA, 2012; OTHMAN e colab., 2019). Dentre os polifenóis com maior atividade antimicrobiana estão os derivados de flavanos, flavonóis e taninos, essas classes são capazes de suprimir uma série de fatores de virulência microbiana (tais como inibição da formação de biofilme, redução da adesão de ligantes do hospedeiro e neutralização de toxinas bacterianas) e mostram sinergismo com antibióticos. Essas propriedades antimicrobianas podem ser explicadas pela formação de complexos entre esses metabolitos e proteínas extracelulares e solúveis, e até a parede celular bacteriana, levando ao rompimento celular se forem lipofílicos(DAGLIA, 2012; OTHMAN e colab., 2019).

Além desses, o fungo *Cytospora Sp.*, também é relacionado a produção de outros metabólitos secundários com atividade antimicrobiana.(DENG e colab., 2020), isolou um sesquiterpeno e oito substancias xilariterpenóide e exibiram uma modéstia atividade frente a patógenos vegetais e humanos. TAKANO e colab., 2014, também isolou uma citosporonas de um fungo do mesmo gênero, e apresentou atividade antimicrobiana frente ao fungo *Rafaellea quercivora*. Em relação a compostos antioxidantes, o fungo ainda é pouco relacionado ou testa do a este tipo de atividade. Sabe-se que o dano oxidativo causado por esses metabolitos estão associados a diversas patologias como câncer, inflamação, envelhecimento e doenças

neurodegenerativas. Segundo LIU, Zhaoming e colab., 2019, foram isolados de benzofenona, a partir do fungo *Cytospora Rhizophorae*, entretanto, somente o composto 1(Rizofol A), apresentou atividade antioxidante.

7. Conclusão

Diante do exposto, temos que:

- A curva de crescimento do fungo endofítico PAC 119 se mostrou de grande importância para mensurar o melhor dia de produção de metabólitos secundários; sendo o sétimo dia o melhor dia de produção de metabólitos.
- A descoberta de uma nova espécie de fungo, o *Cytospora Sp.*
- O meio extracelular mostrou excelente atividade antimicrobiana frente ao *E.faecalis*.
- O meio extracelular mostrou excelente atividade antioxidante total, através do mecanismo de sequestro de ABTS com até 80% de inibição do radical;
- Os meios intra e extracelulares, apresentaram baixa quantidade de polifenóis o que pode ser correlacionado com o baixo percentual de inibição do DPPH
- Este estudo contribuiu para ampliar o conhecimento sobre a biologia endofítica da planta *P. aduncum*, uma vez que vários fungos endofíticos foram isolados, como *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Epicoccum sp.*, *Fusarium sp.*, *Mucor sp.*, *Fusarium lateritium nees*.

8. Referências

- ADAMS, G. C. e ROUX, J. e WINGFIELD, M. J. **Cytospora species (Ascomycota , Diaporthales , Valsaceae) : introduced and native pathogens of trees in South Africa**. Australasian Plant Pathology, v. 35, n. 5, p. 521–528, 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1071/AP06058>>.
- ALVES, Nayara Sabrina F. e SETZER, William N. e DA SILVA, Joyce Kelly R. **The chemistry and biological activities of Peperomia pellucida (Piperaceae): A critical review**. Journal of Ethnopharmacology, v. 232, p. 90–102, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.021>>.
- ALY, A. H. e DEBBAB, A. e PROKSCH, P. **Fungal endophytes - secret producers of bioactive plant metabolites**. Die Pharmazie, v. 68, n. 7, p. 499–505, Jul 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23923629>>.
- ALY, Amal Hassan e DEBBAB, Abdessamad e PROKSCH, Peter. **Fungal endophytes: Unique plant inhabitants with great promises**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 90, n. 6, p. 1829–1845, 2011.
- ARNOLD, A Elizabeth e colab. **Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 100, n. 26, p. 15649–15654, 23 Dez 2003. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2533483100>>.
- BASTOS, Cleber N e ALBUQUERQUE, Paulo Sérgio B. **Efeito do Óleo de Piper aduncum no Controle em Pós-Colheita de Colletotricum musae em Banana**. Fitopatol. bras, v. 29, n. 5, p. 555–557, 2004.
- BISPO, VANDERSON S. e colab. **Reduction of the DNA damages, Hepatoprotective Effect and Antioxidant Potential of the Coconut Water, ascorbic and Caffeic Acids in Oxidative Stress Mediated by Ethanol**. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 89, n. 2, p. 1095–1109, 15 Maio 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28513780>>.
- BOTTIA, Edwin e colab. **Secundarios Volátiles De Cuatro Plantas De La Familia Piperaceae Obtenidos Por Destilación – Extracción Simultánea**. Scientia et Technica, n. 33, p. 193–195, 2007.
- BRAKHAGE, Axel A. e SCHROECKH, Volker. **Fungal secondary metabolites -**

Strategies to activate silent gene clusters. Fungal Genetics and Biology, v. 48, n. 1, p. 15–22, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2010.04.004>>.

BRAZÃO, MARIA ANGÉLICA B; BRAZÃO, FABIO V; MAIA, JOSÉ GUILHERME S; MONTEIRO, Marta C. **Antibacterial activity of the Piper aduncum oil and dillapiole, its main constituent, against multidrug-resistant strains.** Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, v. 13, n. 6, p. 517–526, 2014.

CARDOSO, M. V. **FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PIPER ADUNCUM: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS.** 2018. 224–234 f. Universidade Federal do Pará, 2018.

CARUSO, Gianluca e colab. **Linking endophytic fungi to medicinal plants therapeutic activity. A case study on asteraceae.** Agriculture (Switzerland), v. 10, n. 7, p. 1–23, 2020.

CHANDRA, Priyanka e SHARMA, Rakesh Kumar e ARORA, Daljit Singh. **Antioxidant compounds from microbial sources: A review.** [S.l.]: Elsevier Ltd, 2020. v. 129.

CHAPELA, I. H. **Fungi in healthy stems and branches of American beech and aspen: a comparative study.** New Phytologist, v. 113, n. 1, p. 65–75, 1989.

CHAVEERACH, Arunrat e colab. **Ethnobotany of the Genus *Piper* (Piperaceae) in Thailand.** Ethnobotany Research and Applications, v. 4, p. 223, 2006.

CHEN, Huiqin e colab. **A new cytotoxic cytochalasin from the endophytic fungus *Trichoderma harzianum*.** Natural product communications, v. 10, n. 4, p. 585–7, Abr 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25973482>>.

CHEN, Ling e colab. **Endophytic fungi with antitumor activities: Their occurrence and anticancer compounds.** Critical Reviews in Microbiology, v. 42, n. 3, p. 1–20, 24 Out 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2014.959892>>.

CHEN, Senhua e colab. **Anti-inflammatory meroterpenoids from the mangrove endophytic fungus *Talaromyces amestolkiae* YX1.** Phytochemistry, v. 146, p. 8–15, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.11.011>>.

CHENG, Xiaozhong e colab. **Diversity of endophytic fungi of *Paeonia lactiflora* Pallas and screening for fungal paeoniflorin producers.** FEMS Microbiology Letters, v. 365, n. 24, 1 Dez 2018. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/femsle/article/doi/10.1093/femsle/fny263/5184457>>.

CHOWDHURY, Sandip e colab. **Microbial Endophytes of Maize Seeds and Their Application in Crop Improvements. Seed Endophytes.** [S.l: s.n.], 2019. .

CONNAHS, H e colab. **Geographic variation in host-specificity and parasitoid pressure of an herbivore (Geometridae) associated with the tropical genus Piper (Piperaceae).** Journal of Insect Science, v. 9, n. 28, p. 1–11, 2009.

DAGLIA, Maria. **Polyphenols as antimicrobial agents.** Current Opinion in Biotechnology, v. 23, n. 2, p. 174–181, Abr 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>>.

DAL PICOLO, Camilla R. e colab. **Antileishmanial activity evaluation of adunchalcone, a new prenylated dihydrochalcone from Piper aduncum L.** Fitoterapia, v. 97, p. 28–33, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2014.05.009>>.

DE ALMEIDA, Roseli R. P. e colab. **Chemical Variation in Piper aduncum and Biological Properties of Its Dillapiole-Rich Essential Oil.** Chemistry & Biodiversity, v. 6, n. 9, p. 1427–1434, Set 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cbdv.200800212>>. Acesso em: 17 nov 2018.

DE OLIVEIRA, Adriana Maria Fernandes e colab. **Total phenolic content and antioxidant activity of some malvaceae family species.** Antioxidants, v. 1, n. 1, p. 33–43, 2012.

DENG, Qin e colab. **A new antimicrobial sesquiterpene isolated from endophytic fungus Cytospora sp. from the Chinese mangrove plant Ceriops tagal.** Natural Product Research, v. 34, n. 10, p. 1404–1408, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1512993>>.

DURANT-ARCHIBOLD, Armando A. e SANTANA, Ana I. e GUPTA, Mahabir P. **Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus Piper in Panama: A review.** Journal of Ethnopharmacology, v. 217, p. 63–82, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.008>>.

DUROFIL, Andrea e colab. **Piper aduncum essential oil: A promising insecticide, acaricide and antiparasitic. A review.** Parasite, v. 28, 2021.

FA, Abo Nouh. **Endophytic fungi for sustainable agriculture.** Microbial Biosystems, v. 4, n. 1, p. 31–44, 2019.

FAN, Xin-Lei e colab. **Morphological and phylogenetic studies of *Cytospora* (Valsaceae, Diaporthales) isolates from Chinese scholar tree, with description of a new species.** Mycoscience, v. 55, n. 4, p. 252–259, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2013.10.001>>.

FAN, Xinlei e colab. ***Cytospora* species associated with walnut canker disease in China, with description of a new species *C. gigalocus*.** Fungal Biology, v. 119, n. 5, p. 310–319, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.011>>.

FAZOLIN, Murilo. **Potencialidades da Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.): Características gerais e resultados de pesquisa.** 1. ed. Rio Branco, AC: [s.n.], 2006.

FAZOLIN, Murilo e colab. **Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758.** Ciência e Agrotecnologia, v. 31, n. 1, p. 113–120, Fev 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542007000100017&lng=pt&tlng=pt>.

FAZOLIN, Murilo e colab. **Toxicidade do Óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae).** Neotropical Entomology, v. 34, n. 3, p. 485–489, 2005.

FERRARA, M. A. **Fungos Endofíticos . Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas Endophytic F otential for the Production of Bioactive Substances.** Revista Fitos, v. 02, n. 1, p. 73–79, 2006. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/43/pdf>>.

FOTOUHIFAR, Khalil Berdi e HEDJAROUDE, Ghorban Ali e LEUCHTMANN, Adrian. **ITS rDNA phylogeny of Iranian strains of *Cytospora* and associated teleomorphs.** Mycologia, v. 102, n. 6, p. 1369–1382, 2010.

GERSHENZON, Jonathan e DUDAREVA, Natalia. **The function of terpene natural products in the natural world.** Nature Chemical Biology, v. 3, n. 7, p. 408–414, 2007.

GONÇALVES, Francisco José Teixeira e FREIRE, Francisco das Chagas Oliveira e LIMA, Joilson Silva. **Fungos Endofíticos E Seu Potencial Como Produtores De Compostos Bioativos.** Essentia, v. 15, n. 1, p. 71–92, 2013.

GUERRINI, Alessandra e colab. **Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper***

- obliquum Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador.** Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 27, n. 1, p. 39–48, 1 Jan 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138266890800121X>>. Acesso em: 17 nov 2018.
- GUPTA, Shubhpriya e colab. **A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi.** Biotechnology Advances, v. 39, 2020.
- HAN, Wen Bo e colab. **Cytochalasins and an Abietane-Type Diterpenoid with Allelopathic Activities from the Endophytic Fungus Xylaria Species.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 67, n. 13, p. 3643–3650, 2019.
- HENKE KRAEMER, Kátia e N. KÃMPF, Atelene e ESTEFÂNIA A. ÁQUILA, Maria. **Luz e temperatura na germinação de sementes de Tibouchina urvilleana.** Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, v. 6, n. 1, p. 170–176, 20 Maio 2000. Disponível em: <<http://rbho.emnuvens.com.br/rbho/article/view/61>>.
- HUSSAIN, Hidayat e colab. **Antimicrobial constituents from three endophytic fungi.** Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, v. 7, n. S1, p. S224–S227, 2014.
- ISCHIROPOULOS, Harry e MAZZULLI, Joseph e LIND, Summer. Reactive Oxygen and Nitrogen Species. [S.l.: s.n.], 2005. p. 107–119. Disponível em: <<http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420026559.ch5>>.
- JAMI, F. e colab. **A new Cytospora species pathogenic on Carpobrotus edulis in its native habitat.** Fungal Systematics and Evolution, v. 1, n. June, p. 13–22, 2018. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/10.3114/fuse.2018.02.03>>.
- JARAMILLO ALEJANDRA e MNOS, Paul. **Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus Piper (Piperaceae).** American Journal of Botany, v. 88, n. 4, p. 706–716, 2001.
- JARAMILLO, M. Alejandra e colab. **A Phylogeny of the Tropical Genus *Piper* Using ITS and the Chloroplast Intron *psbJ-petA*.** Systematic Botany, v. 33, n. 4, p. 647–660, 1 Out 2008. Disponível em: <<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0363-6445&volume=33&issue=4&spage=647>>.
- KELLER, Nancy P. **Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery.** Nature Reviews Microbiology, v. 17, n. 3, p. 167–180, 2019. Disponível

em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>>.

KHALDI, Nora e colab. **SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters**. *Fungal Genetics and Biology*, v. 47, n. 9, p. 736–741, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2010.06.003>>.

KHARWAR, Ravindra N. e colab. **Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges**. *Natural Product Reports*, v. 28, n. 7, p. 1208, 2011. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c1np00008j>>.

KLOUCEK, P. e colab. **Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, n. 2, p. 309–312, 2005.

KOKUBUN, Tetsuo e colab. **Dihydroisocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola***. *Phytochemistry*, v. 62, n. 5, p. 779–782, 2003.

KUMAR, Vinay e colab. **Endophytic Fungi: Recent Advances in Identification and Explorations**. p. 267–281, 2019.

LAWRENCE, D. P. e colab. **Characterization of *Cytospora* isolates from wood cankers of declining grapevine in North America, with the descriptions of two new *Cytospora* species**. *Plant Pathology*, v. 66, n. 5, p. 713–725, 2017.

LEE, Jung Hyun e colab. **The complete plastid genome of *Piper kadsura* (Piperaceae), an East Asian woody vine**. *Mitochondrial DNA*, v. 27, n. 5, p. 3555–3556, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/19401736.2015.1074216>>.

LENTZ, David L. e colab. **Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 63, n. 3, p. 253–263, 1998.

LI, J. Y. e colab. **Cryptocin, a Potent Tetramic Acid Antimycotic from the Endophytic Fungus *Cryptosporiopsis* cf. *q uercina***. *Organic Letters*, v. 2, n. 6, p. 767–770, Mar 2000. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ol000008d>>.

LI, Yan e colab. **Cytosporinols A-C, new caryophyllene sesquiterpenoids from *Cytospora* sp.** *Natural Products and Bioprospecting*, v. 2, n. 2, p. 70–75, 2012.

LI, Yan e colab. **Cytosporolides A-C, antimicrobial meroterpenoids with a unique peroxy lactone skeleton from *Cytospora* sp.** *Organic Letters*, v. 12, n. 14, p. 3144–3147, 2010.

LIU, Jiajia e LIU, Gang. **Analysis of secondary metabolites from plant endophytic**

fungi. *Methods in Molecular Biology*. [S.l.: s.n.], 2018. v. 1848. p. 25–38. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8724-5_3>.

LIU, Xin e colab. **Endophytic fungi from mangrove inhibit lung cancer cell growth and angiogenesis in vitro**. *Oncology Reports*, v. 37, n. 3, p. 1793–1803, 2017.

LIU, Zhaoming e colab. **Rhizophols A and B, antioxidant and axially chiral benzophenones from the endophytic fungus: *Cytospora rhizophorae***. *Organic and Biomolecular Chemistry*, v. 17, n. 47, p. 10009–10012, 2019.

LUCENA, DAIANE C. e colab. **Biological Activity of Piper aduncum extracts on *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Erebidae) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 89, n. 3, p. 1869–1879, 31 Ago 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652017000401869&lng=en&tlng=en>.

MACHELEIDT, Juliane e colab. **Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites**. *Annual Review of Genetics*, v. 50, n. September, p. 371–392, 2016.

MAIA, José Guilherme Soares. e colab. **Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais**. [S.l.]: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2001.

MANACH, Claudine e colab. **Polyphenols: food sources and bioavailability**. *The American journal of clinical nutrition*, v. 79, n. 5, p. 727–47, 14 Maio 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature05488>>.

MAREČEK, Vít e colab. **ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt**. *Journal of Cereal Science*, v. 73, p. 40–45, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2016.11.004>>.

MENGISTU, Anteneh Ademe. **Endophytes: Colonization, Behaviour, and Their Role in Defense Mechanism**. *International Journal of Microbiology*, v. 2020, 2020.

MONZOTE, Lianet e colab. **Evaluation of Antioxidant Activity and Chromatographic Profile of Extracts From the False Jaborandi (*Piper Aduncum*)**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 6, n. 1, p. 1248–1260, 1 Out 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.035>>. Acesso em: 17 nov 2018.

MORANDIM, Andreia De Araújo e colab. **Intraspecific variability of dihydrochalcone, chromenes and benzoic acid derivatives in leaves of *Piper aduncum* L. (Piperaceae)**. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 10, p. 2157–

2162, 2009.

MUSSI-DIAS, V. e colab. **Fungos endofíticos associados a plantas medicinais**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 14, n. 2, p. 261–266, 2012a. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000200002&lng=pt&tlng=pt.

NAVICKIENE, Hosana M. Deboni e colab. **Composition and antifungal activity of essential oils from Piper aduncum, Piper arboreum and Piper tuberculatum**. Química Nova, v. 29, n. 3, p. 467–470, Jun 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000300012&lng=en&nrm=iso&tlng=en.

NORPHANPHOUN, C. e colab. **Revisiting the genus Cytospora and allied species**. Mycosphere, v. 8, n. 1, p. 51–97, 2017.

OLIVEIRA, G. L.S. **Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph•: Estudo de revisão**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.

OLIVEIRA, GISELE L. e colab. **Chemical study and larvicidal activity against Aedes aegypti of essential oil of Piper aduncum L. (Piperaceae)**. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 85, n. 4, p. 1227–1234, 10 Nov 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652013000401227&lng=en&tlng=en.

ORJALA, Jimmy e colab. **Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from piper aduncum**. Journal of Natural Products, v. 57, n. 1, p. 18–26, 1994.

OTHMAN, Leen e SLEIMAN, Ahmad e ABDEL-MASSIH, Roula M. **Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants**. Frontiers in Microbiology, v. 10, n. MAY, 2019.

PASSOS, Ludimila e colab. **Evaluation of Antioxidant Activity and Chromatographic Profile of Extracts From the False Jaborandi (Piper Aduncum)**. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, v. 6, n. 6, p. 1248–1260, 2012.

PEREIRA, Cristiane B. e colab. **Endophytic fungal compounds active against Cryptococcus neoformans and C. gattii**. Journal of Antibiotics, v. 68, n. 7, p. 436–444, 2015.

PERIGO, Crislene Vaz e colab. **The chemical composition and antibacterial activity of eleven Piper species from distinct rainforest areas in Southeastern Brazil.** *Industrial Crops and Products*, v. 94, p. 528–539, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.028>>.

PETRINI, Orlando. *Fungal Endophytes of Tree Leaves*. [S.l: s.n.], 1991. p. 179–197. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4612-3168-4_9>.

POHLIT, AM e PINTO, ACS e MAUSE, R. **Piper aduncum L. : Planta Pluripotente e Fonte de Substâncias Fitoquímicas Importantes** *Piper aduncum L. : Pluripotente Plant.* *Revista Fitos*, v. 2, n. 01, p. 7–18, 15 Out 2006. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/37>>. Acesso em: 17 nov 2018.

POLLI, Anderson e colab. **Aspectos Da Interação Dos Microrganismos Endofíticos Com Plantas Hospedeiras E Sua Aplicação No Controle Biológico De Pragas Na Agricultura.** *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, v. 7, n. 2, 2012.

QUIJANO-ABRIL, Mario Alberto e CALLEJAS-POSADA, Ricardo. **Title: Distributional patterns and endemism areas of the Neotropical species of.** *Journal of aquatic animal health*, v. 33, n. 7, p. 1226–1278, 2006.

RAJAMANIKYAM, Maheshwari e colab. **Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 60, n. December, p. 1–26, 2017.

RAMOS, A. e colab. **Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 87, n. 2–3, p. 241–246, 2003.

RAN, Xueqin e colab. **Characterization and antitumor activity of camptothecin from endophytic fungus *Fusarium solani* isolated from *Camptotheca acuminata*.** *African Health Sciences*, v. 17, n. 2, p. 566–574, 2017.

RANA, Kusam Lata e colab. **Biodiversity of Endophytic Fungi from Diverse Niches and Their Biotechnological Applications.** [S.l: s.n.], 2019.

ROZE, Ludmila V. e CHANDA, Anindya e LINZ, John E. **Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: A new understanding of established cellular processes.** *Fungal Genetics and Biology*, v. 48, n. 1, p. 35–48, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2010.05.006>>.

SAGITA, Rosa e QUAX, Wim J. e HASLINGER, Kristina. **Current State and Future Directions of Genetics and Genomics of Endophytic Fungi for Bioprospecting Efforts**. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 9, n. March, 2021.

SAIKKONEN, Kari e SAARI, S. e HELANDER, M. **Defensive mutualism between plants and endophytic fungi?** *Fungal Diversity*, v. 41, n. 1, p. 101–113, 30 Mar 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13225-010-0023-7>>.

SANTOS, Alberdan S e colab. **Sesquiterpenes of Amazonian Piper species***. *Acta Amazonica*, v. 28, n. 2, p. 127–127, Jun 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59671998000200127&lng=en&tlng=en>.

SANTOS, M. R A e colab. **Composição química e atividade inseticida do extrato acetônico de Piper alatabaccum Trel & Yuncker (Piperaceae) sobre Hypothenemus hampei Ferrari**. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 15, n. 3, p. 332–336, 2013.

SANTOS, Maximillan Leite e colab. **Antifungal activity of extracts from Piper aduncum leaves prepared by different solvents and extraction techniques against dermatophytes Trichophyton rubrum and Trichophyton interdigitale**. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 4, p. 1275–1278, 2013.

SARKAR, Debjani e colab. **The antioxidant activity of allylpyrocatechol is mediated via decreased generation of free radicals along with escalation of antioxidant mechanisms**. *Phytotherapy Research*, v. 27, n. 3, p. 324–329, 2013.

SIGES, Thomas H. e colab. **The Invasive Shrub Piper aduncum and Rural Livelihoods in the Finschhafen Area of Papua New Guinea**. *Human Ecology*, v. 33, n. 6, p. 875–893, Dez 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10745-005-8214-7>>.

SINGH, Gurpreet e colab. **Bioactive and biocontrol potential of endophytic fungi associated with Brugmansia aurea Lagerh**. *FEMS Microbiology Letters*, v. 364, n. 21, 15 Nov 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsle/article/doi/10.1093/femsle/fnx194/4157277>>.

SINGH, Maya P e JANSO, Jeffrey E e BRADY, Sean F. **CR200: Taxonomy, Fermentation and Biological Activities**. *Biological Chemistry*, p. 71–84, 2007.

SOARES, D.A. e colab. **A review of bioactive compounds produced by endophytic**

fungi associated with medicinal plants. Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat. Belém, v. 12, n. 3, p. 331–352, 2017.

SONG, Fei e colab. **Secondary Metabolites from the Genus Xylaria and Their Bioactivities.** Chemistry & Biodiversity, v. 11, n. 5, p. 673–694, Maio 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.201200286>>.

SOUSA, Pergentino J. C. e colab. **Avaliação toxicológica do óleo essencial de Piper aduncum L.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, n. 2, p. 217–221, Jun 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000200013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

SOUZA, Pricianny Galdino e ALBINO, Alisson Martins e LIMA, Renato Abreu. **Identificação de metabólitos secundários no extrato etanólico das inflorescências de Piper arboreum Aubl. e seu potencial candidacida.** v. 9, n. 2, p. 32–34, 2019.

SPECIAN, Vânia e colab. **Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos Secondary Metabolites Produced by Endophytic Fungi of Pharmaceutical Interest.** Biologia, v. 16, n. 4, p. 345–352, 2014.

STROBEL, Gary e colab. **Taxol from Pestalotiopsis microspora, an endophytic fungus of Taxus wallachiana.** Microbiology, v. 142, n. 2, p. 435–440, 1 Feb 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8932715>>.

SUCUPIRA, Natália Rocha e colab. **Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos.** UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde, v. 14, n. 4, p. 263–269, 2014. Disponível em: <<http://revistas.unopar.br/index.php/biologicas/article/view/442>>.

SUDHA, Venkatesan e colab. **Biological properties of Endophytic Fungi.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 59, n. December, p. 1–7, 2016.

TAKANO, Tomoya e colab. **A new cytosporone derivative from the endophytic fungus Cytospora sp.** Natural Product Communications, v. 9, n. 7, p. 973–975, 2014.

TANIWAKI, Marta H. e colab. Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight, and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. [S.l.: s.n.], 2006. p. 49–67. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/0-387-28391-9_3>.

THAO, Nguyen e colab. **Anti-inflammatory Flavonoid C-Glycosides from Piper**

aduncum Leaves. *Planta Medica*, v. 82, n. 17, p. 1475–1481, 10 Jun 2016. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0042-108737>>.

VÁSQUEZ, Marilú Roxana Soto. Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. [S.l: s.n.], 2015. v. 6. p. 106–116.

VASUNDHARA, M. e SUDHAKARA REDDY, M. e KUMAR, Anil. **Secondary metabolites from endophytic fungi and their biological activities.** *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications*, p. 237–258, 2019.

VENUGOPALAN, Aarthi e colab. **Effect of fermentation parameters, elicitors and precursors on camptothecin production from the endophyte *Fusarium solani*.** *Bioresource Technology*, v. 206, p. 104–111, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.079>>.

VERMA, Vijay C e colab. **Piperine production by endophytic fungus *Periconia* sp. Isolated from *Piper longum* L.** *Journal of Antibiotics*, v. 64, n. 6, p. 427–431, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ja.2011.27>>.

VITALE, Giovanni Andrea e colab. **Antioxidant molecules from marine fungi: Methodologies and perspectives.** *Antioxidants*, v. 9, n. 12, p. 1–35, 2020.

WANG, Yan Li e colab. ***Cytospora* species from *Populus* and *Salix* in China with *C. davidiana* sp. nov.** *Fungal Biology*, v. 119, n. 5, p. 420–432, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2015.01.005>>.

WHITAKER, Briana K. e colab. **Fungal endophytes: Unique plant inhabitants with great promises.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 9, n. 2, p. 1829–1845, 1 Fev 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00018-9>>. Acesso em: 17 nov 2018.

YAN, Lu e colab. **Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, n. 8, p. 3327–3340, 2019.

YAN, Sha e colab. **Terpenoid and phenolic metabolites from the fungus *Xylaria* sp. associated with termite nests.** *Chemistry and Biodiversity*, v. 8, n. 9, p. 1689–1700, 2011.

YOUSIF, N e colab. **Metabolites of endophytic fungi from Australian native plants as potential anticancer agents.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 365, n. 9, p. 854–9, 1

Maio 2018. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168010215003053>>.



YU, Jae Hyuk e KELLER, Nancy. **Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi**. Annual Review of Phytopathology, v. 43, n. 114, p. 437–458, 2005.

ZHAO, J e colab. **Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants**. Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, v. 1, n. August 2015, p. 567–576, 2010. Disponível em:
<<https://www.researchgate.net/publication/229024535>>.

ZHOU, Xuanwei e colab. **Identificação de metabólitos secundários no extrato etanólico das inflorescências de**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 4, n. 1, p. 32–34, 1 Jun 2019. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1514364>>. Acesso em: 17 nov 2018.

ZHU, Hai Yan e TIAN, Cheng Ming e FAN, Xin Lei. **Multigene phylogeny and morphology reveal cytospora spiraeae sp. Nov. (diaporthales, ascomycota) in China**. Phytotaxa, v. 338, n. 1, p. 49–62, 2018.

8. Anexo I

 UFPE	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA COLEÇÃO DE CULTURAS - MICOTECA URM	<small>ADM-REG-019-01</small>  Micoteca URM UFPE
---	--	--

COMUNICADO DE IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRA(S)

Recife, 11 de maio de 2018

Comunicamos, para todos os fins, que a(s) amostra(s) abaixo foi(ram) identificada(s) pela Coleção de Culturas – Micoteca URM do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, conforme pedido registrado sob número 54/17.]

Nº	Código da Amostra	Resultado da Identificação
1	PAC 123	<i>Fusarium latentium</i> Nees
2	PAC 119	<i>Cytospora</i> sp.
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

Atenciosamente,


Prof. Cristina Maria de Souza Motta
Curadora da Micoteca URM

9. Anexo II



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
 Cadastro nº A74293F

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: A74293F
 Usuário: UFPA
 CPF/CNPJ: 04.821.748/0001-29
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético/CTA
 Finalidade do Acesso: Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Aspergillus sydowii
 Mucoor hiemalis
 Fusarium lateritium
 Cytospora abietis
 Fusarium lateritium
 fungos endofíticos da planta Piper aduncum

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: Estudo de Fungos endofíticos e seus produtos

Equipe

Martaohagas Chagas UFPA
 João Vitor da Silva e Silva FIOCRUZ