

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR – ENS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

LETÍCIA KIYOMI ALVES OKA

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DA AMAZÔNIA PRODUTORES DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS**

**MANAUS – AM
2021**

LETÍCIA KIYOMI ALVES OKA

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DA AMAZÔNIA PRODUTORES DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS**

Trabalho apresentado a Universidade do Estado do Amazonas (UEA) como requisito para obtenção do Título de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Rachid Pinto Zacarias Filho

Co-orientadora: Msc. Marta Rodrigues Oliveira

MANAUS – AM

2021

LETÍCIA KIYOMI ALVES OKA

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ISOLADOS DA AMAZÔNIA PRODUTORES DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS**


Relatório final, apresentado a Universidade do Estado do Amazonas (UEA) como parte das exigências para obtenção do Trabalho de Conclusão de Curso no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Manaus, 15 de julho de 2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rachid Pinto Zacarias Filho
Instituição: Escola Superior de Ciências da Saúde – ESA/UEA



Prof. Dra. Ieda Hortência Batista
Instituição: Escola Normal Superior – ENS/UEA



Prof. Dra. Carolina Rocha Augusto
Instituição: Escola Superior de Ciências da Saúde – ESA/UEA

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

041i Oka, Leticia Kiyomi Alves
Identificação de fungos isolados da Amazônia produtores de metabólitos secundários / Leticia Kiyomi Alves Oka.
Manaus : [s.n], 2021.
51 f.: color.; 21 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura
- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.
Inclui bibliografia
Orientador: Zacarias Filho, Pinto Rachid
Coorientador: Oliveira, Rodrigues Marta

1. fungo endofítico. 2. fungo aquático. 3. fitohormonio. 4. antimicrobiano . I. Zacarias Filho, Pinto Rachid (Orient.). II. Oliveira, Rodrigues Marta (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Identificação de fungos isolados da Amazônia produtores de metabólitos secundários

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu *avô materno Paulo Pereira* e minha *a avó paterna (batchan) Hideko Oka* por terem acompanhado a minha jornada desde 2016 e que infelizmente eles não puderam estar neste momento final, mas acredito que ambos estão olhando e torcendo lá de cima. Espero estar dando orgulho a vocês por mais uma conquista, muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

Existe uma música chamada *Florest* escrita por Han Seungwoo, essa música tem um trecho bem assim “*Eu serei sua floresta, para ser uma sombra para você. No meio de tantas dores, eu serei sua floresta. Quando os pensamentos estiverem trancados, eu serei sua floresta*”, ou seja, ela retrata a floresta (um alguém) para ser seu porto seguro. Eu não tive somente um alguém, eu tive vários alguém que foram as minhas árvores que formaram a minha floresta. Então foi graças a estas ‘árvores’ que eu pude ter a minha floresta, um local onde eu pude descansar em paz perante o que continuo lutando e tenho certeza de que irei vencer esta batalha. Reforço a todos que estiverem lendo, que jamais deixem de acreditar que coisas boas virão, por mais que os dias chuvosos sejam dolorosos, às vezes a chuva aparece para deixar que *as flores floresçam nessa terra seca* (Onewe, Rain To Be). Sendo assim, dias difíceis ensinam a termos dias melhores.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por estar me permitindo finalizar mais uma etapa importante na minha vida com saúde e por ele permitir que a minha família esteja bem assim como com saúde durante este período pandêmico. Gostaria de agradecer a minha *família Alexandra Alves* (mãe), *Jorge Oka* (pai), *Jossandra Alves* (irmã), *Laisa Oka* (irmã), *Emi Oka* (tia paterna), *Joana Alves* (avó materna), *Tibi & Sansão* (pets) por todo apoio, suporte e por continuarem confiando e acreditando que posso cada vez mais crescer. Sei que dei um trabalhinho para vocês e peço desculpa por isso, apenas espero continuar sendo mais um orgulho, pois vocês são o meu orgulho e minha inspiração, então obrigada por absolutamente tudo, afinal esta conquista é nossa.

As minhas *amigas de graduação Anne Souza, Natália Leão, Valdinelza Maia* por toda nossa luta durante estes cinco anos ou mais, por conta da pandemia. Gratidão é o que não falta pelos conselhos, ajudas, paciências e confortos durante os dias desesperadores, principalmente durante esse período pandêmico em que todas sabemos o como foi ralado e surreal cada momento vivenciado. Mas graças a vocês pude crescer, amadurecer e aprender, ainda acrescento que somos guerreiras por toda conquista durante a graduação e agora nesta apresentação final de TCC.

Gratidão aos meus amigos *Alexandre Mota, Alice Couto, Beatriz Silva, Beatriz Souza, D’ryane Pinheiro, Elizabeth Silva, Emanuely Lopes, Fernanda Lima, Filipe Perry, Gabriela Mendes, Izabela Zanin, Letícia Cristina, Maria Luisa, Mayara da Silva, Pollyana Fonseca, Rafaela Teixeira, Thalita Alves, Thayane Felicia* por todo apoio e toda confiança que

depositaram em mim. Estiveram ao meu lado durante os períodos mais difíceis de toda a minha vida e se não fossem vocês conversando, dando conselhos, dicas, fazendo os encontros no Rave, jogando ou apenas ficar em call falando sobre coisas aleatórias, eu não saberia o que teria sido de mim. Cada um preencheu um espaço num pequeno curto de prazo, ao ponto de dizer que vocês são meu grupo de apoio e eu não saberia agradecer e retribuir todo esse amor e suporte depositado em mim. Muito, muito obrigada do fundo do meu coração.

Claro, não poderia deixar de agradecer ao meu *psicólogo Rockson Pessoa*, porque ele não foi somente um psicólogo, mas um amigo que às vezes o considero como um terceiro pai pela forma como o senhor cuida tão bem de mim. Por você, não tenho palavras para explicar o quão sou grata por absolutamente tudo!! Com o senhor, eu pude voltar a vida e me achar novamente. O senhor sempre terá um carinho enorme por mim e pela minha família. Tu és iluminado e essa luz emana no coração das pessoas ao ponto de acharem seus caminhos, obrigada por me ajudar, a me encontrar e obrigada mais ainda por todo ensinamento que levo comigo para a vida.

As minhas *companheiras de laboratório Marta Rodrigues* por ter me adotado, cuidado e ensinado, meus sinceros obrigada, pois você sempre cuidou de mim com muito carinho e atenção e claro agradeço também por ter disponibilizado os dados dos fungos aquáticos; *Sarah Raquel* e *Alzira Frota* pelos ensinamentos, conselhos, paciência e por toda ajuda durante os meus primeiros dias como uma IC (iniciação científica) em 2017 até este momento final. Desculpa pelos momentos de deslizes e falta de atenção, mas a bióloga que sou hoje também é graça a todas vocês. Gratidão a *Kamila Rangel* por ter concedido os dados do *Trichoderma* assim como aos conselhos e conversas em que pude aprender e crescer, *Fransinaldo Araújo (Pingo)* pela disponibilização de dados dos *Pencillium* e a *todos os colegas do LABMICRA (UFAM)*.

A *Prof. Dra. Antônia Queiroz* por depositar sua confiança em mim devido aos bons reconhecimentos dados ao meu professor de biologia do ensino médio *Anderson Mota* que tenho a gratidão de dizer que o início de tudo é graças ao senhor, por isso muito obrigada. Ambos foram o pontapé inicial para desabrochar a Leticia Bióloga, se hoje floresci foi graças aos dois que plantaram a sementinha, novamente obrigada.

E por fim, deixo o meu enorme agradecimento ao meu *orientador Prof. Dr. Rachid Zacarias*, visto que o senhor além de orientador foi amigo, conselheiro e o meu segundo pai, afinal o senhor sempre cuidou e me protegeu como se fosse uma filha. Então não haveria motivos para dizer que o senhor é meu segundo pai, afinal de contas seu instinto paterno é com todos que o senhor tem muito carinho. Dessa forma, o senhor foi aquele que regou,

tirou/colocou no sol, ficou conversando para que pudesse florescer firme e forte, e quando pensou em murchar o senhor continuou cuidando, cultivando, podando e aqui estamos, vencendo e observando o desabrochar dessa flor. Obrigada, viu?! Eu o admiro como pessoa e como profissional, espero um dia chegar a ser igual ao senhor. Desculpa pelo trabalho que dei e espero estar lhe dando orgulho daqui para frente.

Starting from a small point, I spent an astronomical amount of time collecting things that were lost and creating my own universe.

*Onewe, **Cosmos**.*

RESUMO

A Amazônia Brasileira tem muito para ser explorada e conhecida, para todos os grupos de seres vivos. Dentre estes, a biodiversidade microbiana precisa de um olhar diferenciado para se conhecer e descobrir aplicabilidades úteis à sociedade, como os fitohormônios e os antimicrobianos. O estudo buscou identificar metabólitos secundários produzidos por fungos, sendo 20 de origem aquática e 20 endofíticos. Para a realização do teste fitohormonal foram utilizadas sementes de alface americana (*Lactuca sativa* L.) e malva (*Urena lobata* L.), e para atividade antimicrobiana foram testadas as cepas de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Na identificação destes fungos realizaram-se análises macro e micromorfológicas, e moleculares e os dados obtidos foram comparados com a literatura. Dos 40 fungos estudados, 23 apresentaram resultados no teste fitohormonal, sendo 03 aquáticos e 20 endofíticos. No teste antimicrobiano, 9 demonstraram resultados, sendo 03 aquáticos e 06 endofíticos. Os fungos do gênero *Trichoderma* tiveram melhores resultados como produtores de fitohormônio, sendo o *T. harzianum* o que obteve melhor desempenho. Os do gênero *Penicillium* foram eficazes no teste antimicrobiano frente aos patógenos *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, sendo as duas espécies do *P. oxalicum* obtiveram melhor atividade antimicrobiana. Ressalta-se a importância quanto a necessidade de estudos mais aprofundados que ampliem a amostragem e a identificação química destas substâncias já detectadas, seja para a produção de substâncias para crescimento vegetal ou a descoberta de uma nova substância para o uso em Odontologia.

Palavras-chave: Fungo Endofítico, Fungo aquático, Fitohormônio, Antimicrobiano.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados dos fungos aquáticos usados neste trabalho.....	23
Tabela 2 – Dados dos fungos endofíticos usados neste trabalho.....	24
Tabela 3 – Protocolo de assepsia.....	25
Tabela 4 – Teste fitohormonal com fungos aquáticos frente ao controle.....	28
Tabela 5 – Teste fitohormonal com fungos endofíticos frente ao controle.....	31
Tabela 6 – Teste de antibiose com fungos endofíticos frente ao controle.....	32
Tabela 7 – Identificação quanto a macro e microscopia assim como a identificação molecular dos fungos aquáticos.....	32
Tabela 8 – Identificação quanto as características macro e microscopia assim como identificação molecular dos fungos endofíticos.....	33
Tabela 9 – Identificação fenotípica e molecular dos fungos aquáticos.....	34
Tabela 10 - Identificação fenotípica e molecular dos fungos endofíticos.....	37
Tabela 11 – Fungos aquáticos e endofíticos que apresentaram resultados como produtores de metabolitos secundários com ação fitohormonal e antimicrobiana.....	38

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	12
2.1.Fungos endofíticos e aquáticos	15
2.2.Material vegetal	16
2.2.1.Alface americana (<i>Lactuca sativa</i> L.)	16
2.2.2.Malva (<i>Urena lobata</i> L.)	16
2.3.Microrganismos	17
2.3.1. <i>Enterococcus faecalis</i>	17
2.3.2. <i>Candida albicans</i>	18
2.4.Fungos produtores de metabólitos secundários	18
2.4.1.Compostos orgânicos voláteis (VOCs)	19
3.OBJETIVOS	21
3.1.Objetivo geral	21
3.2.Objetivo específico	21
4.MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1.Reativação dos fungos	22
4.2.Material vegetal e condições de crescimento	24
4.3.Triagem dos microrganismos produtores de metabólitos secundários com a ação fitohormonal e antimicrobiana	24
4.4.Identificação dos fungos	25
5.RESULTADOS	27
5.1.Triagem dos microrganismos produtores de metabolitos secundários com ação fitohormonal e antimicrobiana	27
5.2.Identificação dos fungos	29
6.DISCUSSÃO	40
7.CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

INTRODUÇÃO

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial, principalmente na floresta Amazônica a maior floresta tropical úmida do mundo, se destacando por suas enormes dimensões, elevada biodiversidade e valioso patrimônio sociocultural contendo fontes inestimáveis de matéria primas para os mais variados setores. Isso significa que, devido à alta biodiversidade existente nessa região possivelmente há inúmeras espécies de animais, plantas e microrganismos a serem descobertos (SOUZA et al., 2004; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2007; OLIVEIRA, 2013; BANHOS et al., 2014) que podem estar presentes na floresta assim como nos rios amazônicos.

Por isso, nos últimos anos, tem se dado uma grande importância na investigação destes microrganismos, tal como os fungos endofíticos, no qual podem estar adaptados no interior de diferentes tecidos das plantas sem causar danos aparente ao seu hospedeiro e os fungos aquáticos sendo estes conhecidos por possuírem um ciclo de vida adaptado ao ambiente aquático (SHEARER et al., 2007) e de possuir uma grande importância ecológica, mas a sua diversidade é desconhecida em várias regiões, incluindo a Amazônia (CORTEZ, 2016).

Os microrganismos endofíticos possuem importantes funções no processo de adaptação da planta, na proteção do hospedeiro contra herbívoros e patógenos, além de produzir uma infinidade de metabólitos de interesse econômico tanto primários quanto secundários. Esses metabólitos apresentam diferentes aplicações biotecnológicas como produção de vacinas, enzimas, antibióticos antifúngicos, anticancerígenos (AZEVEDO et al, 2005; RODRIGUES et al., 2009; SURYANARAYAN et al., 2009; PORRASAFARO & BAYMAN, 2011) assim como podem contribuir na agricultura promovendo crescimento em plantas através da produção de esteróides e hormônios de crescimento vegetal (SOTTERO, 2003; ANDRADE, 2011). Os microrganismos aquáticos são de suma importância ecológica, pois participam da decomposição do material vegetal submerso e servem de alimento para vertebrados e outros microrganismos, podendo ser participante da base da cadeia alimentar dos organismos existentes nos rios (SRI-INDRASUTDH et al., 2010; KRAUSS et al., 2011; JONES; PANG, 2012; WALKER, 2009) e também possuem um potencial biotecnológico na produção de antimicrobianos, enzimas e outras substâncias (CORTEZ, 2016) que podem ser de interesse medicinal e agrônomo.

Os metabólitos secundários são compostos extracelulares secretados no meio de cultura, durante o crescimento e diferenciação de um organismo vivo (DREFUSS; CHAPELA, 1994; STROBEL, 2003) sendo muito apreciados pela indústria, pois através dos estudos dos

metabólitos produzidos pelos microrganismos, mas especificamente os fungos, é possível trazer soluções aos problemas que o homem vem enfrentando nos últimos anos na medicina e na agricultura. Por isso os metabólitos secundários produzidos por fungos estão ganhando um espaço cada vez maior nos estudos biotecnológicos, uma vez que estão envolvidos no processamento industrial de mais de 10 dos 20 produtos mais rentáveis no início deste século (TEJESVI et al., 2007). Um exemplo desses metabólitos produzidos pelos fungos seriam os metabólitos voláteis, que representam uma parcela significativa no estudo da metabolômica dos fungos, desempenhando funções importantes no desenvolvimento, defesa, proteção contra estresse, comunicação e patogenicidade do mesmo (PARCERO et al., 2017). Estes metabólitos também possuem propriedades capazes de promover o crescimento de plantas pela síntese de fitohormônios, podendo modificar sua estrutura e a fisiologia, melhorando suas características, como na malva (*Urena lobata* L.) e na alface americana (*Lactuca sativa* L.) utilizada pelos ribeirinhos como forma de sustento.

A *Candida albicans* é uma espécie fúngica capaz de causar doenças em humanos, levando tanto a infecções superficiais como sistêmicas, sendo as infecções bucais as mais significativas e, às vezes, de difícil tratamento devido a frequente resistência aos antifúngicos convencionais. Clinicamente, a candidíase pode manifestar-se sob as formas agudas, crônicas ou mucocutâneas e seu diagnóstico é através de dados clínicos e exames laboratoriais. Fatores como xerostomia, uso de prótese total ou parcial removível desadaptadas, mal higienizadas ou uso de forma contínua não removendo-as à noite para dormir, são condições propícias para o aparecimento de candidíase na cavidade bucal (GARCIA-CUESTA et al., 2014).

Os microrganismos, principalmente bactérias e fungos, juntamente com seus produtos, estão estritamente relacionados com a etiologia das lesões pulpares e periapicais, podendo persistir no sistema de canais radiculares após o tratamento endodôntico e induzir uma reação inflamatória, sendo a bactéria anaeróbia *Escherichia coli* e a sua endotoxina frequentemente associada à estas lesões (VALERA et al., 2009; MAEKAWA et al., 2010). A infecção secundária que ocorre nos dentes tratados endodonticamente se origina de uma microbiota formada por micro-organismos que tiveram acesso ao sistema de canais radiculares durante o tratamento ou após a obturação, devido à quebra na cadeia asséptica, mau uso do isolamento absoluto, por instrumentos contaminados, dentes mantidos abertos para drenagem e fratura ou perda do material restaurador. Dependendo da fonte de micro-organismos, essa infecção pode possuir espécies orais e não orais, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* sp,

Escherichia coli e *Candida* sp. (SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2014), que podem ser combatidas com substâncias derivadas dos metabólitos fúngicos.

A Amazônia Brasileira, berço da maior biodiversidade mundial, tem muito para ser explorada e conhecida em todos os grupos de seres vivos. Entre estes, a biodiversidade microbiana precisa de um olhar diferenciado para se conhecer e descobrir aplicabilidades úteis à sociedade atual, uma vez que através da comprovação científica das propriedades medicinais das plantas e de seus microrganismos endofíticos, assim como os aquáticos, são de extrema importância para a biotecnologia. Por isso, ressalta-se a busca pelos metabólitos secundários, a partir de fungos oriundos da região Amazônica, como uma alternativa para obtenção de substâncias bioativas com potenciais de aplicação na indústria farmacêutica assim como na agricultura, visto que possuem um custo baixo e podem produzir um número muito grande de compostos.

A microbiota oral é composta por uma grande variedade de microrganismos, principalmente bactérias e fungos, e alguns podem provocar patologias devido a mudanças nas condições bucais ou na diminuição da imunidade do hospedeiro, dentre elas estão a cárie dentária e as doenças periodontais, que podem ser combatidas com substâncias derivadas dos metabólitos fúngicos. Estes metabólitos também possuem propriedades capazes de promover o crescimento de plantas pela síntese de fitohormônios, podendo modificar sua estrutura e a fisiologia, melhorando suas características, como na malva (*Urena lobata*) e na alface americana (*Lactuca sativa*) utilizada pelos ribeirinhos como forma de sustento.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Fungos endofíticos e aquáticos

Os fungos são organismos eucariontes, aclorofilados, heterotróficos e que se reproduzem de forma sexuada e assexuada. Além disso, os fungos por serem seres heterotróficos, a sua obtenção de alimento pode ocorrer na forma saprófita ou parasita. Na forma saprófita utilizam a matéria orgânica morta como forma de nutrição e na parasita estão na forma oportunista, nutrindo-se de matéria viva. A maioria dos fungos é constituída de espécies saprófitas que desempenham a importante função de decomposição na biosfera, degradando produtos orgânicos e desenvolvendo carbono, nitrogênio e outros componentes ao solo (MICHEREFF, 2001). Por possuírem uma alta capacidade adaptativa, os fungos estão presentes em diversos ambientes tal como no solo, nas plantas, na água e até mesmo em ambientes mais extremos, como os de baixas e altas temperaturas, os de alta salinidade (MACCHERONI JR; ARAÚJO; LIMA, 2004) podendo então despertar interesse na comunidade científica, em especial em pesquisas com substâncias naturais, pois para sobreviver em tantos ambientes é necessário uma alta capacidade adaptativa, o que resulta na produção de muitos compostos orgânicos diferentes (MARCON, 2013).

Os fungos denominados de endofíticos são fungos que habitam o interior dos tecidos aparentemente saudáveis de um hospedeiro vegetal podendo permanecer por um período do seu ciclo de vida, mas também pode se instalar em uma planta por toda sua vida (PETRINI et al., 1992; AZEVEDO, 1999; ZACARIAS FILHO, 2018) tendo assim, uma relação simbiótica, no qual os fungos podem desempenhar funções para as plantas, tal como proteção contra pragas e patógenos, aumentando o crescimento, enraizamento, resistência a estresses, além de produzir compostos químicos como enzimas, alcaloides, hormônios e antibióticos (PEIXOTO NETO, et al., 2002). Devido a essa alta capacidade de produção de substâncias, os fungos endofíticos podem exercer funções na aplicabilidade biotecnológica com a produção de substâncias bioativas como os fitohormônio que aumentam o crescimento e competitividade do hospedeiro na natureza (YUE et al., 2000; OLIVEIRA, 2013), mas também na saúde através de antibióticos, anticancerígenos, pigmentos e toxinas.

Os fungos aquáticos podem ser definidos como aqueles em que todo o seu ciclo de vida está completamente adaptado o ambiente aquático, incluindo a esporulação em substratos submersos, além disso são importantes ao meio ambiente, pois participam da decomposição do material vegetal submersa e servem de alimento para vertebrados, invertebrados e outros microrganismos (SHEARER et al., 2007; SRI-INDRASUTDHI et al., 2010; KRAUS et al.,

2011; JONES; PANG, 2012). Possuem uma ampla distribuição geográfica e são capazes de colonizar diversos substratos como caule, folhas mortas de plantas herbáceas e lenhosas, além de ambientes preservados e ou impactados (SCHOENLEIN-CRUSIUS, 2007; SHEARER et al., 2007; CORTEZ, 2016) dessa forma estes fungos possuem uma alta capacidade adaptativa, por estarem presentes em diversos locais. Os filos Chytridiomycota, Ascomycota e Basidiomycota são os organismos mais frequentes isolados de ambientes aquáticos (HIBBETT et al., 2007; SHEARER et al., 2007).

1.2. Material vegetal

1.2.1. Alface americana (*Lactuca sativa* L.)

A alface (*Lactuca sativa* L.) inserida no país pelos portugueses (século XVI) atualmente é a folhosa mais consumida pelos brasileiros. Apresentando um caule não muito curto, não ramificado. Suas raízes são do tipo pivotante com ramificações finas e curtas de acordo com Sottero (2006), as variedades cultivadas pertencem a diferentes tipos comerciais: com folhas lisas ou crespas sem fechamento de cabeça e com folhas grossas com fechamento de cabeça e possuem um ciclo reprodutivo após o desenvolvimento da cabeça em altas temperaturas e luminosidade com ciclo curto, de 45 a 60 dias. O plantio pode ser realizado o ano todo, porém resultados de melhor crescimento ocorrem em clima frio para ameno (NAGAI, 1993). A alface americana pode se diferenciar dos demais grupos por apresentar folhas externas de coloração verde-escura, folhas internas de coloração amarela ou branca, imbricadas, semelhantes ao repolho e crocantes. Além disso apresentam elevados teores de vitaminas e sais minerais e baixo teor de calorias (YURI et al., 2002; YURI et al., 2004).

1.2.2. Malva (*Urena lobata* L.)

A malva (*Urena lobata* L.) pertencente à família das Malváceas é uma planta que vem se destacando na produção de fibra no Brasil. Foi nas áreas de várzea do rio Amazonas que o cultivo comercial da malva e da juta (*Corchorus capsularis*) se desenvolveram em maior escala (BENTES, 2015). No estado do Amazonas, seu cultivo se dá mais precisamente nas calhas dos rios Amazonas e Solimões, especificamente nos municípios de Anamá, Anori, Beruri, Caapiranga, Coari, Codajás, Iranduba, Manacapuru e Parintins (SOUZA, 2012). A malva é uma planta destaque no setor produtivo de fibras brasileiras, constituindo uma importante fonte de renda para muitas famílias ribeirinhas no estado do Amazonas que vivem desta modalidade agrícola (MACIEL, 2015). É uma planta quase cosmopolita de acordo com Bentes (2015), então

pode ser encontrada por todos os países tropicais e de clima temperado. Comporta-se como arbusto de caule ereto, ramoso com até 4 m de altura, ramos alternados, cilíndricos, estrelado-pubescentes; folhas alternas, pecioladas, variáveis na forma e tamanho, 2-12 cm de comprimento e de largura, cordiforme na base; ovadas ou orbiculares, palmatífidas, angulosamente lobadas, 3-7 nervadas, destacando-se as três nervuras centrais; na base, como característica do gênero *Urena* aparecem glândulas chamadas “nectários extraflorais” que são visitados por formigas e até certo ponto podem desempenhar um papel como protetor contra a invasão de outros insetos; flores curto pediceladas, solitárias, roxa ou róseas; pétalas 5, de 12-15 mm, unidas entre si e com androceu; fruto cápsula (“carrapicho”) subglobosa, composta de 5 carpelos indeiscentes, secos e tomentosos, cobertos de espinhos moles e recurvados que aderem a roupa; semente lisas, cuneiformes de uma lado e arredondados do outro (BENTES, 2015).

1.3. Microrganismos

1.3.1. *Enterococcus faecalis*

A *Enterococcus faecalis* pertence a flora comensal de humanos e animais podendo ser encontrada em diversos alimentos, normalmente produtos crus de origem animal, mas também em locais com poucas condições de higiene, além disso a *E. faecalis* é responsável por inúmeras infecções através de feridas cirúrgicas, abscessos intra-abdominais, sepsis neonatal e hepatobiliar. A *E. faecalis* tem capacidade de produzir biofilme, no qual é fundamental em várias infecções, nomeadamente no trato urinário, em endodontia e em endocardites. Os biofilmes maduros podem tolerar antibióticos em altas concentrações, fazendo com que a bactéria se torne resistente sendo difícil de se erradicar. Com isso, estima-se que mais de 90% das infecções humanas provocadas por *Enterococcus* são causadas por *E. faecalis* (LEWIS, 2001; KLEIN, 2003; MARTIN, 2008; GÓMEZ-GIL et al., 2009). São bactérias do tipo Gram-positivas, anaeróbias facultativas com capacidade de sobreviver em grandes níveis de estresse e ambientes hostis assim como em altas concentrações de sais (6,5% NaCl) (BARROS, 2014; FISHER; PHILIPS, 2015). O gênero *Enterococcus* tem capacidade de crescimento entre os 5 e 50 °C com temperatura ótima 42,7°C em condições aeróbicas, a *E. faecalis* se desenvolve num intervalo de pH entre 4,6 e 9, sendo o seu ótimo 7,5. (NAKAJO et al., 2006; BARROS, 2014).

1.3.2. *Candida albicans*

O gênero *Candida* é um fungo leveduriforme, no qual pode ser encontrado em vários ecossistemas, como solo, alimentos, água e fazendo parte da microbiota de homens e animais. Possuem uma capacidade adaptativa de se desenvolver tanto na presença quanto na ausência de oxigênio. Estes microrganismos degradam proteínas e carboidratos para obtenção de carbono e nitrogênio, elementos esses essenciais para o seu desenvolvimento. Tal gênero é o principal entre as leveduras patogênicas, compreendendo aproximadamente 200 espécies (SIDRIM; ROCHA, 2004; GIOLO et al., 2010). São microrganismos comensais, que habitam primeiramente o trato gastrointestinal e regiões mucocutâneas, incluindo boca e vagina, no entanto também podem ser consideradas oportunistas, pois podem se tornar patogênicas a partir do comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro (idosos, diabéticos, pós-operados, imunodepressão) ou rompimento das barreiras anatômicas como queimaduras, cateteres ou cirurgias invasivas (ALONSO-VALLE et al., 2003; DIGNANI et al., 2003). A *Candida albicans* é uma levedura diplóide apresentando distintas morfologias, onde na fase unicelular leveduriforme pode gerar um broto e formar hifas verdadeiras e durante seu crescimento pode formar pseudo-hifas que são leveduras alongadas entre si. A mudança da sua morfologia de fase leveduriforme para filamentosa pode ser induzida por uma variedade de condições ambientais, como variação de temperatura e de pH, sendo sua temperatura ideal de 37 °C e pH igual superior a 7,0 (SUDBERY et al., 2004; SILVA, 2011).

1.4. Fungos produtores de metabólitos secundários

Os metabólitos secundários ou produtos naturais produzidos por organismos vivos são substâncias de peso molecular limitado, normalmente menores que 3.000 Da, que exercem funções nos organismos produtores como defesa (contra predadores, microorganismos e vírus), competição, atração, estimulação, como agentes de metais, como agentes de simbiose entre microrganismos e plantas, nematóides, insetos e animais superiores na forma de hormônio sexuais; como efetores de diferenciação e ainda agem contra estresses abióticos (DEMAIN; FANG, 2000; WINK, 2003; HARTMANN, 2007; ROQUE, 2011). Estes metabólitos não estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento dos organismos produtores, contudo desempenham papel como molécula de defesa, no qual são moléculas orgânicas que são classificadas como base na sua origem biossintética, além disso são produzidas na fase de crescimento e estacionária, sendo que, na ausência dessa síntese, o organismo produtor continua seu desenvolvimento (AGOSTINI-COSTA et al., 2012; FORTKAMP, 2018). Com isso,

metabólitos secundários agem principalmente como moléculas de adaptação, auxiliando na sobrevivência dos organismos produtores e ainda são produzidos por espécies e linhagens específicas, estando, assim, intimamente ligados com a ecologia dos organismos produtores. As principais classes destes metabólitos são alcaloides, terpenos, esteroides, quinonas, fenóis, entre outros (O'BRIEN; WRIGHT, 2011; ROQUE, 2011; KAUL et al., 2012).

Os produtos naturais (fitohormônios, antimicrobianos, fungicidas e herbicidas) são metabólitos de grande importância, com isto, fungos podem produzir compostos com importância farmacológica, mas também micotoxinas de interesse agrônoma. São classificados em quatro grupos principais baseados no núcleo de enzimas e precursores envolvidos em sua biossíntese: policetídeos, peptídeos não-ribossômicos, terpenos e alcalóides (KELLER et al., 2005; SCHULZ; BOYLE, 2005; STERGIPOULOS et al., 2013). Devido a esta alta propriedade, a busca por microrganismos que produzem determinados metabólitos secundários se faz necessária pelo fato de que muitas moléculas serem inviáveis de ser produzidas por síntese química total, além de que a obtenção de fontes naturais, como plantas, acarreta danos ao meio ambiente devido ao desmatamento (PURI et al., 2006; FORTKAMP, 2018). Com isso, a utilização de fungos é necessária, uma vez que podem produzir até 73% mais de metabólitos secundários quando comparadas à outras classes de microrganismos, evitando então, etapas de plantio, colheita e extração de plantas raras ou de crescimento lento, uma vez que estes compostos podem ser produzidos em processos fermentativos, que são mais rápidos, reduzem o valor do produto e ainda preservam a biodiversidade (DREYFUSS; CHAPELA, 1994; STROBEL et al., 2002).

1.4.1. Compostos orgânicos voláteis (VOCs)

Os metabólitos voláteis representam uma parcela significativa no estudo da metabolômica dos fungos, desempenhando funções importantes no desenvolvimento, defesa, proteção contra estresse, comunicação e patogenicidade dos mesmos (PARCERO et al., 2017). Existe uma grande importância de evidenciar e estudar o potencial dos fungos, e a produção de seus compostos voláteis (VOCs), na atualidade.

Os VOCs são substâncias de baixa massa molecular e geralmente compostos hidrofóbicos com alta pressão de vapor, isto é, evaporam-se facilmente à temperatura ambiente (HUNG et al., 2012). Estudos evidenciam que os VOCs podem ser letais para uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias (STROBEL et al., 2001). Além disso, Vejan et al. (2016) destacam que os VOCs podem influenciar no crescimento da planta via direta

envolvendo caminhos tanto fitohormonais quanto por ácidos orgânicos ou caminhos indiretos que envolvem a produção de antibióticos e sideróforos. Os estudos de antagonismos por compostos voláteis não são tão frequentes na literatura quando comparados aos testes de metabólitos difusíveis (PIMENTA et al., 2012), como também a investigação de fungos produtores de VOCs ainda são escassos no mundo principalmente entre linhagens fúngicas da região Amazônica.

OBJETIVOS

1.5. Objetivo geral

Identificar, pelo menos, um fungo endofítico ou aquático, como produtor de metabólitos secundários para hormônio de crescimento e antibiose.

1.6. Objetivo específico

- Analisar os metabólitos secundários com ação fitohormonal às sementes de alface americana (*Lactuca sativa* L.) e malva (*Urena lobata* L.);
- Avaliar os metabólitos secundários com ação antimicrobiana frente a microrganismos patogênicos *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*;
- Realizar identificação molecular dos fungos produtores de metabólitos secundários com ação fitohormonal e antimicrobiana.

MATERIAIS E MÉTODOS

1.7. Reativação dos fungos

Os microrganismos foram reativados da coleção pertencente ao laboratório de Bioensaios e Micro-organismos da Amazônia (LabMicra/UFAM) sendo 20 fungos aquáticos provenientes de amostras de lagos de rios, coletados em São Gabriel da Cachoeira e Coari, municípios do estado do Amazonas (Tabela 1) e 20 fungos endofíticos oriundos de diferentes espécies de plantas coletadas nos municípios de Manaus – AM (Tabela 2).

A reativação foi feita em placas de petri estéreis contendo o meio de cultura de isolamento, BDA (batata, dextrose e Ágar), Aveia (aveia, malte, dextrose e ágar), SDAY (dextrose, ágar, extrato de levedura, peptona) e ISP2 (amido, extrato de malte, extrato de levedura e ágar) em três pontos equidistantes e depois transferidos para outra placa de petri com ponto central, cultivados a 28 °C.

Após sucessivos repiques foram obtidas as culturas puras, em seguida realizou-se uma suspensão de esporos dos fungos através de inóculos em placas de petri em meio BDA para serem raspados com alça de platina e colocados em microtubos de 2 mL contendo uma solução de 1,5 mL de água destilada com glicerol estéril a 20% ajustando a concentração de 1×10^5 esporo/mL. Para os fungos que não esporulam foi retirado um pequeno fragmento do micélio e inoculados em placas contendo o seu meio de cultura de reativação. Todos foram feitos em triplicata e armazenados à 28 °C.

Tabela 1: Dados dos fungos aquáticos usados neste trabalho.

N	Código	Código de isolamento	Origem	Município de coleta	Meio de cultura
1	1083	M06	Aquático	COA	SDAY
2	1113	M36	Aquático	COA	ISP2
3	1125	M48	Aquático	COA	ISP2
4	1126	M49	Aquático	COA	ISP2
5	1127	M50	Aquático	SGC	BDA
6	1132	M55	Aquático	SGC	Aveia
7	1133	M56	Aquático	SGC	BDA
8	1135	M58	Aquático	COA	BDA
9	1203	M125	Aquático	SGC	Aveia
10	1205	M127	Aquático	COA	Aveia
11	1211	M133	Aquático	COA	BDA
12	1223	M145	Aquático	SGC	SDAY

13	1230	M152	Aquático	COA	ISP2
14	1238	M160	Aquático	SGC	SDAY
15	1240	M162	Aquático	SGC	SDAY
16	1241	M163	Aquático	SGC	SDAY
17	1244	M166	Aquático	SGC	BDA
18	1245	M167	Aquático	SGC	Aveia
19	1246	M202	Aquático	SGC	Aveia
20	1280	M205	Aquático	COA	ISP2

* COA = Coari; SGC= São Gabriel da Cachoeira. Fonte: Rodrigues, 2018.

Tabela 2: Dados dos fungos endofíticos usados neste trabalho.

N	Código	Código na coleção	Planta Hospedeira	Meio de cultura
1	P56	Anspg1.2.2	<i>Annona</i> sp.	BDA
2	P64	Vrf1.2.2	<i>Victoria amazonica</i>	BDA
3	P71	Vrc2.1.2	<i>Victoria amazonica</i>	BDA
4	P135	Pbr2.2.2	<i>Mauritia flexuosa</i>	BDA
5	P143	Vrc2.2.1c	<i>Victoria amazonica</i>	BDA
6	P149	Vrf2.2.3	<i>Victoria amazonica</i>	BDA
7	P154	Anspc2.2.1	<i>Annona</i> sp.	BDA
8	P408	Ghr2.1.2b	<i>Gustavia elliptica</i>	BDA
9	P409	Ghcc2.2.2a	<i>Gustavia elliptica</i>	BDA
10	P433	Ghcr1.1.1b	<i>Gustavia elliptica</i>	BDA
11	T42	AnspR1 2.1	<i>Rollinia</i> sp.	BDA
12	T69	Vrc2 2.2b	<i>Victoria amazonica</i>	BDA
13	T70	Vcr2 3.2	<i>Victoria amazonica</i>	BDA
14	T73	Trich. MpCe3 3.1	<i>Murraya paniculata</i>	BDA
15	T82	INPA 43	<i>Scleronema micranthum</i>	BDA
16	T122	INPA 45	<i>Scleronema micranthum</i>	BDA
17	T140	Trich. 158 b	<i>Hymenaea courbaril</i>	BDA
18	T145	VcrC 133 b	<i>Victoria amazonica</i>	BDA
19	T220	Trichoderma 114	Sem identificação	BDA
20	T234	Trichoderma 115	Sem identificação	BDA

Fonte: Dados da coleção do LabMicra – UFAM.

1.8. Material vegetal e condições de crescimento

Para os testes do material vegetal foram utilizadas sementes de alface americana (*Lactuca sativa* L.) compradas em loja de agricultura e as de malva (*Urena lobata* L.) disponibilizadas pelos ribeirinhos de Coari, sendo este o grupo externo (outgroup). As sementes passaram por um processo de assepsia (Tabela 3) de acordo com a metodologia de Souza (2004), no qual respeitam as condições favoráveis das sementes. Estas sementes foram armazenadas em estufa incubadora BOD com fotoperíodo de 16h claro e 8h escuro, em temperatura de 25 °C.

Tabela 3: Protocolo de assepsia.

	Material	Tempo
	Álcool 70%	30 segundos
	Solução de hipoclorito 2%	2 minutos
Assepsia	Álcool 70%	30 segundos
	Água destilada autoclavada	10 minutos
	Vortex	15 minutos

Fonte: Oka, 2020.

1.9. Triagem dos microrganismos produtores de metabólitos secundários com a ação fitohormonal e antimicrobiana

Os testes foram semi-quantitativos *in vitro*, realizados em triplicata para avaliar a produção dos metabólitos secundários frente as cepas de microrganismos da coleção Cefar Diagnóstica (CCCD): *Enterococcus faecalis* (E002), *Candida albicans* (CC001) e as sementes de alface americana (*Lactuca sativa* L.) e malva (*Urena lobata* L.). A metodologia utilizada para o teste antimicrobiano foi descrita por Mitchell et al. (2010) onde os microrganismos são cultivados juntos com os patógenos. Nesta pesquisa, eles ficaram separados em placas de petri com divisória (dois lados), sendo que um lado continha o meio de cultura respectivo de cada fungo e no outro, meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) para *E. faecalis* e Sabourand (SAB) para *C. albicans*, armazenadas em estufa incubadora BOD a 37 °C por 72h.

Para o teste de germinação foi utilizada a metodologia de Hung et al. (2013), no qual o microrganismo é cultivado separado da semente em tubos de ensaio. O crescimento se deu na mesma placa de petri contendo divisória (dois lados), sendo um lado com o meio Nutrient Agar (NA) para as sementes e do outro o respectivo meio de cultura de cada fungo. As sementes ficaram a 25 °C na estufa incubadora BOD, com fotoperíodo de 16 x 8 horas durante 15 dias.

Em ambos os experimentos foram feitas placas controle a fim de comparar os testes semi-quantitativos, verificando se estes microrganismos estão inibindo os patógenos ou influenciando no crescimento das sementes.

1.10. Identificação dos fungos

A identificação dos fungos foi realizada através de análises micro e macro morfológicas. Nas análises fenotípicas macroscópicas foram observadas características de cada cultura, como: cor, textura, bordas, topografia, pigmento difuso, e confrontadas com dados da literatura. Para a análise micromorfológica foram confeccionadas lâminas de microcultivo. Os fungos foram cultivados em pontos tripontuais em placas petri contendo o meio de cultura no qual foram isolados. Sobre dois pontos foram colocadas lamínulas e o outro utilizado como controle para verificar o crescimento da cultura pura. Após três a cinco dias de cultivo a 26 °C, as lamínulas foram transferidas para lâminas de microscopia e coradas com azul de lactofenol (blue cotton). As imagens foram visualizadas por microscópio óptico da ZEISS com aumento de 40 a 100 vezes. Os dados obtidos foram comparados com os da literatura específica à taxonomia de cada cultura (GILMAR, 1959; BONONI, 1998; KIFFER; MORELET, 1999; GUERREIRO; SILVEIRA, 2003).

1.11. Identificação molecular

As linhagens fúngicas foram cultivadas em Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio BDL (Batata, Dextrose, Extrato de Levedura) por 24 horas a 26 °C e 120 rpm. Após esse período, o cultivo foi filtrado a vácuo com papel Whatman, nº 4, sendo obtida a massa micelial para extração de DNA. O DNA total foi extraído com kit ZR Fungal/Bacterial DNA MicroPrep®, de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação do DNA genômico foi realizada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific) para padronizar o cálculo das diluições das concentrações dos DNAs. Uma alíquota de cada um dos DNAs foi diluída para uma concentração final de 10 ng/μL para a realização de PCR com iniciadores específicos para a identificação molecular das espécies. Os DNAs concentrados e diluídos, foram devidamente armazenados a -20 °C.

Após obtenção do DNA total, foi realizado à amplificação de um fragmento interno de aproximadamente 700 pb das regiões Its-1 e 2 do rDNA, utilizando os primers Its1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e Its4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990). As reações de amplificação terão o volume final de 25 μL (3 μL de MgCl₂ (25

mM), 2,5 µL de Tampão 10X, 3 µL de dNTP (1,25 mM), 0,4 µL de Taq DNA polimerase (5U) da Fermentas, 10,1 µL de H₂O milli-Q, 2 µL de DNA e 2 µL de cada Primer (10 pmol). A amplificação foi realizada em termociclador Thermal Cycler®. As amplificações da PCR consistiram em: um ciclo inicial a 94° C por 4 min. seguido por 35 ciclos de 94° C por 2 min., 55° C por 2 min. e 72° C por 2 min. Ao final mais um ciclo a 72° C por 10 min e para finalizar a 4° C, conforme Boichenko et al. (2000). A verificação do produto da PCR foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1% coradas com GelRed® e com o marcador será usado o Ladder de 1 Kb plus da Invitrogen®, após a corrida, o gel foi foto-documentado pelo Sistema de Fotodocumentação L-PixTouchLoccus®, posteriormente os amplicons seguiram para a etapa de sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado pelo método Sanger (1977), usando o kit Big DyeTerminator (Applied Biosystems, Foster City CA, EUA). As sequências obtidas foram analisadas com o Editor de Alinhamento de Sequência BioEdit (versão 7.2.5) e comparadas com sequências depositadas na base de dados do NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information). As sequências que compartilharam 98 - 100% de semelhanças foram identificadas como das mesmas espécies, se os dados forem de acordo com as análises morfológicas e literatura.

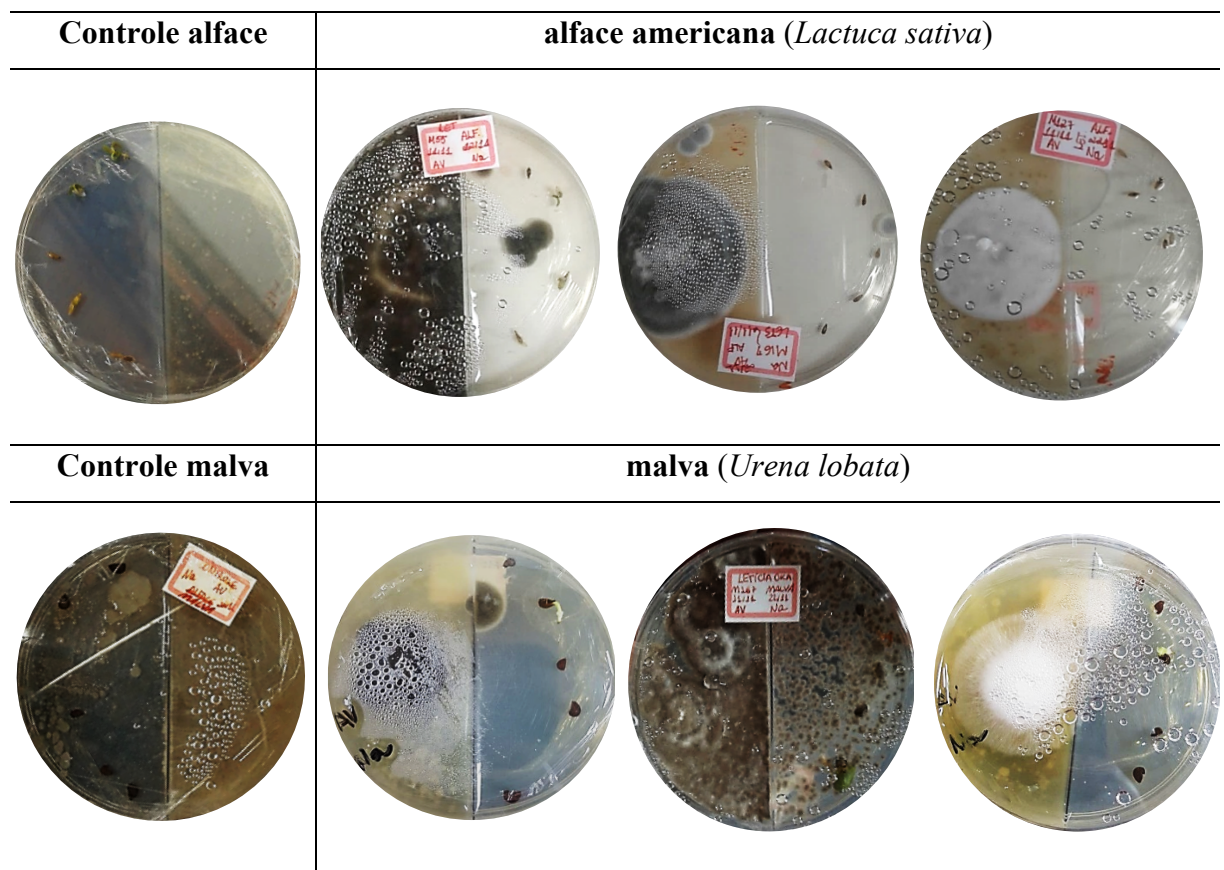
RESULTADOS

1.12. Triagem dos microrganismos produtores de metabolitos secundários com ação fitohormonal e antimicrobiana

Os fungos utilizados no presente trabalho foram testados frente sementes de alface americana (*Lactuca sativa*) e malva (*Urena lobata*) assim como os microrganismos *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*.


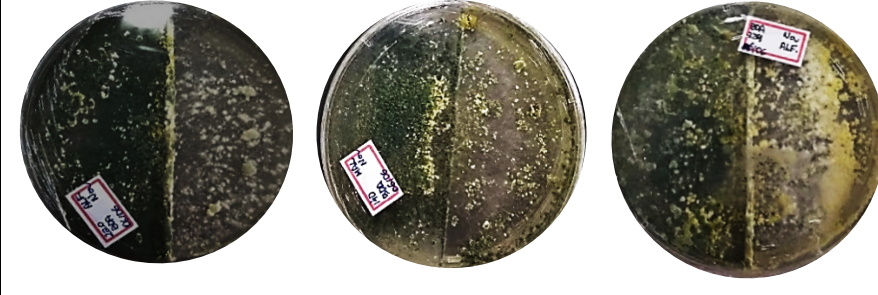

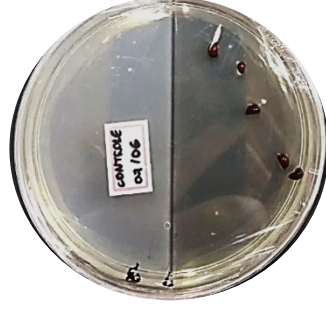



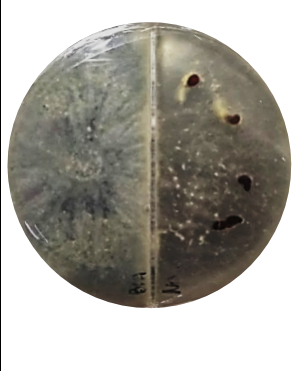
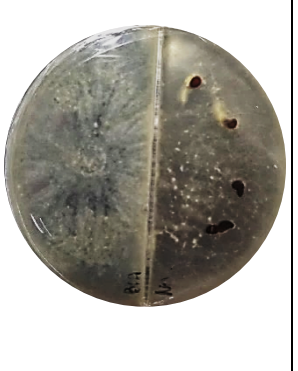
No teste fitohormonal dos 20 fungos aquáticos utilizados apenas 03 fungos (15%) apresentaram resultado frente ao controle (Tabela 4), enquanto dos 20 fungos endofíticos, 14 (70%) demonstraram resultado. Ressalta-se que as sementes de malva tiveram melhores resultados do que as sementes de alface americana, além disso, sendo que destes 14 fungos endofíticos que apresentaram resultado, 10 são do gênero *Trichoderma* (Tabela 5).

Tabela 4: Teste fitohormonal com fungos aquáticos frente ao controle.



Fonte: Oka, 2020.

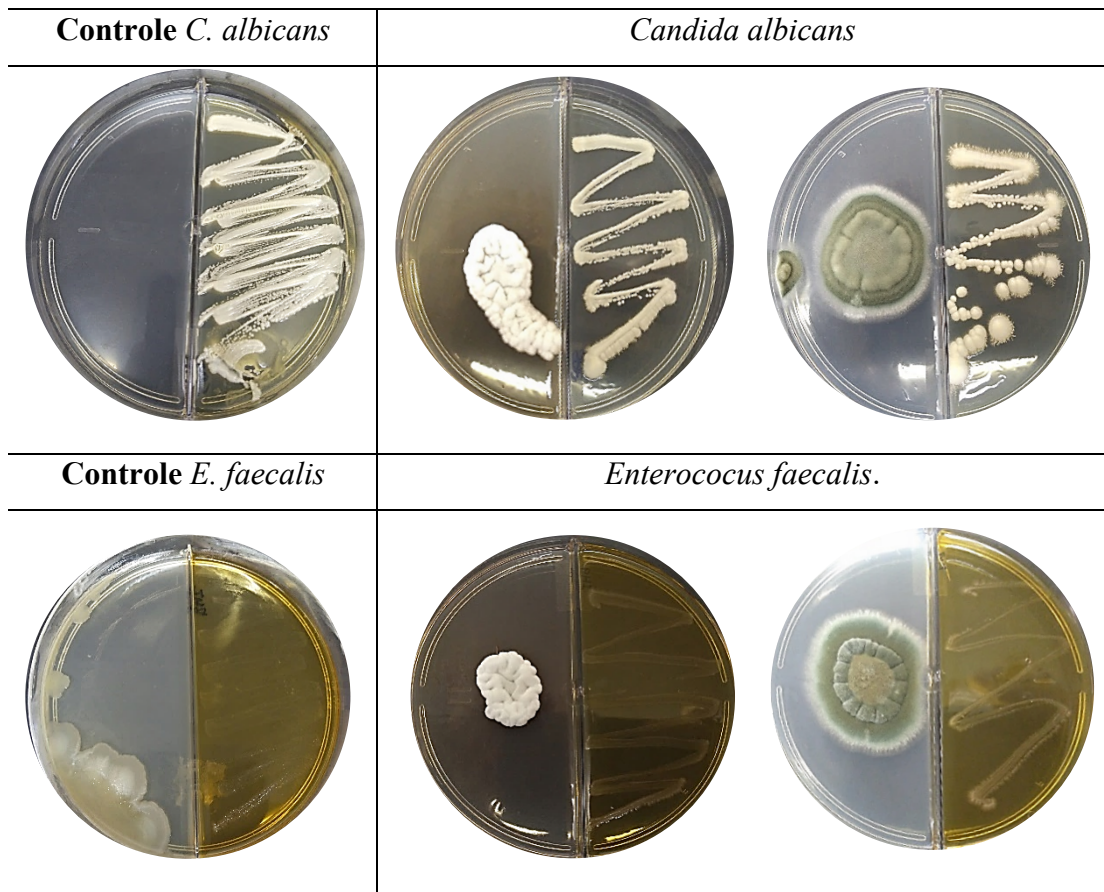
Tabela 5: Teste fitohormonal com fungos endofíticos frente ao controle.

Controle alface	alface americana (<i>Lactuca sativa</i>) – frente		
			
	alface americana (<i>Lactuca sativa</i>) – dorso		
			
Controle malva	malva (<i>Urena lobata</i>) – frente		
			
	malva (<i>Urena lobata</i>) – dorso		
			

Fonte: Oka, 2020.

No teste microbiológico, dos 20 fungos aquáticos, 03 (15%) apresentaram resultados de antibiose e dos 20 fungos endofíticos utilizados, 06 (30%) obtiveram resultados contra os patógenos testados (Tabela 6).

Tabela 6: Teste de antibiose com fungos endofíticos frente ao controle.



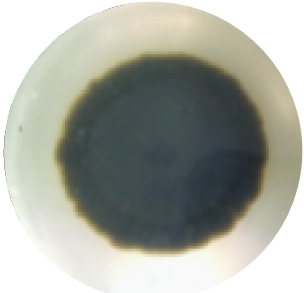
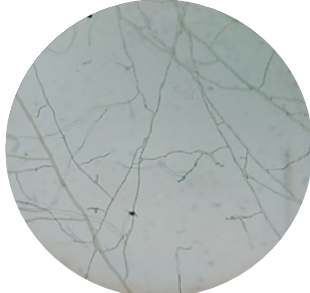

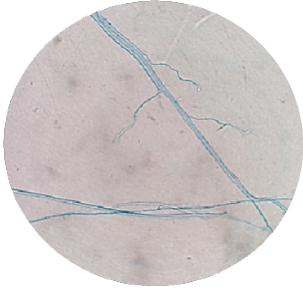
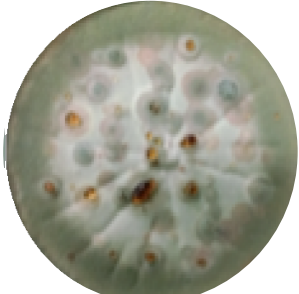
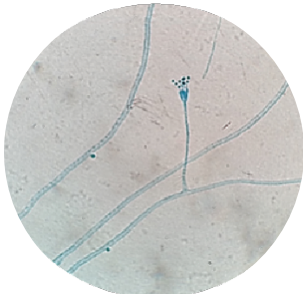


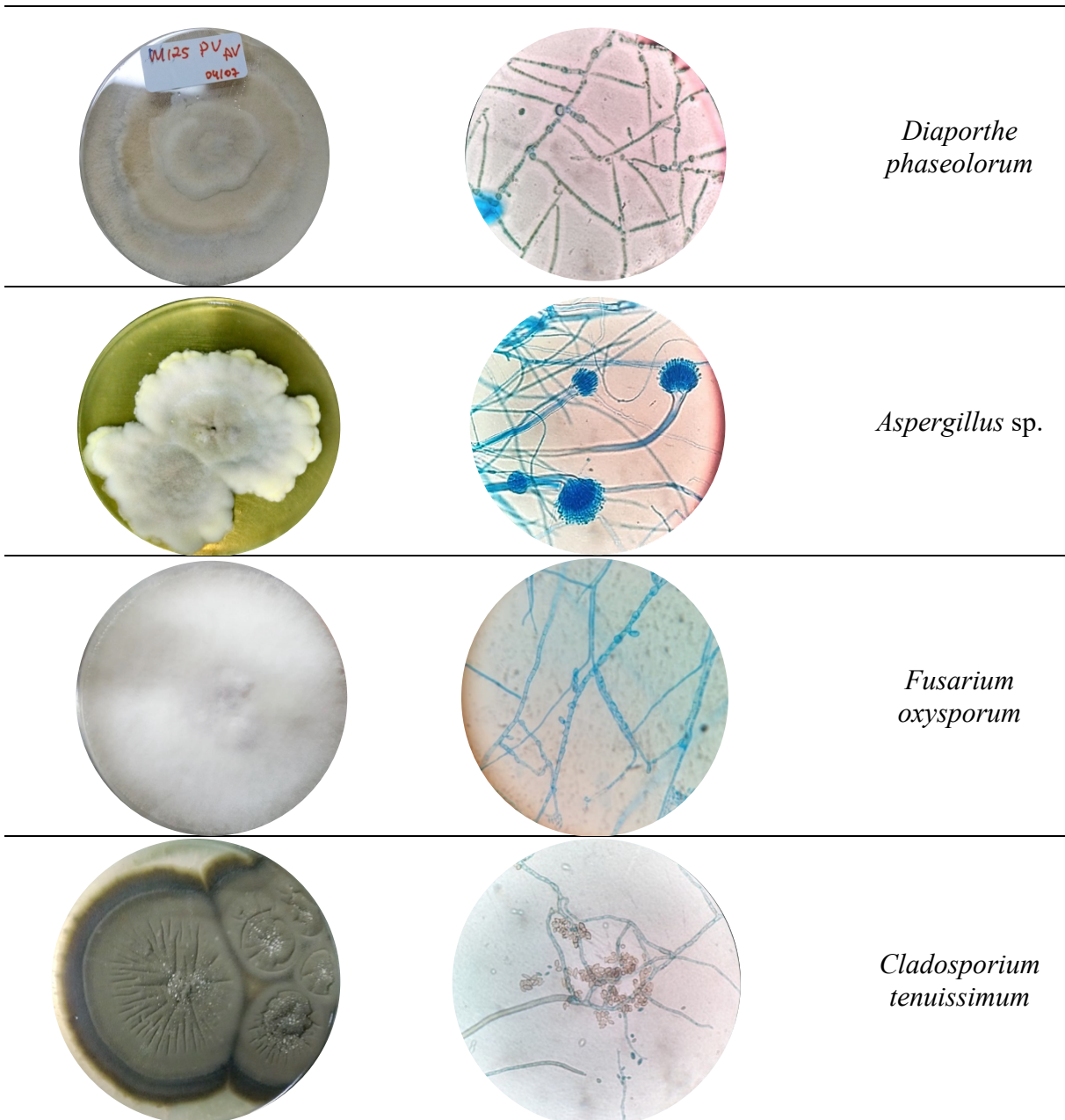
Fonte: Oka, 2020.

1.13. Identificação dos fungos

A identificação dos fungos aquáticos e endofíticos foi feita através caracterização taxonômica das estruturas macro e micromorfológica. A caracterização morfológica é uma característica importante para a diferenciação de espécies, entretanto, quando as diferenças entre as microestruturas são mínimas, faz-se necessário a utilização de outras ferramentas para uma identificação confiável e segura, como a identificação molecular. As sequências analisadas e comparadas com as depositadas na base de dados do NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information), com semelhanças de 98 - 100%. Dessa forma, nas tabelas 7 encontra-se a identificação dos fungos aquáticos, demonstrando que possuem uma ampla diversidade, uma vez que possuem uma alta capacidade adaptativa.

Tabela 7: Identificação quanto a macro e microscopia assim como a identificação molecular dos fungos aquáticos.

Macroscopia	Microscopia	Identificação molecular
		<i>Penicillium citreosulfuratum</i>
		<i>Ochronis sp.</i>
		<i>Talaromyces cinnabarinus</i>
		<i>Penicillium sp.</i>



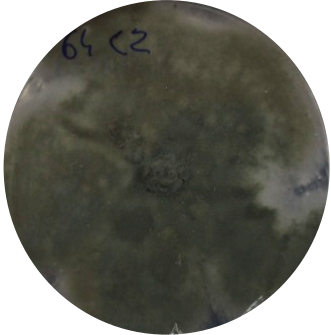
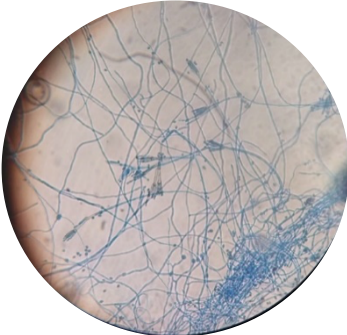
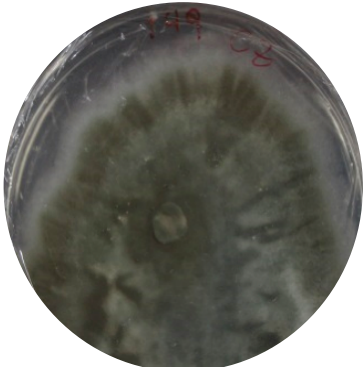
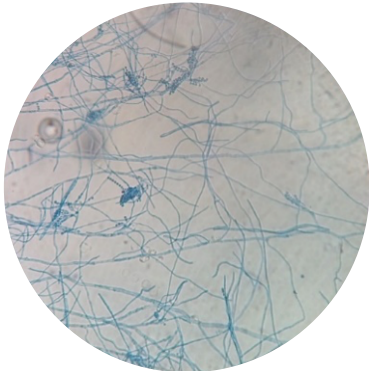

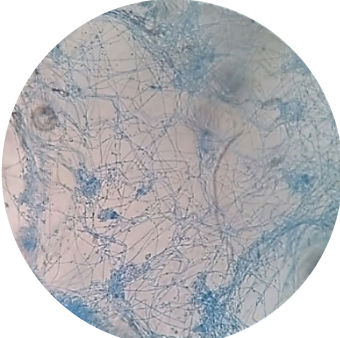


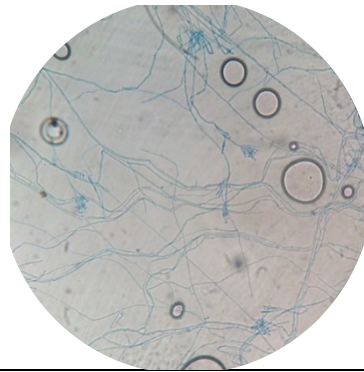
Fonte: Oliveira, 2020.

Dos 20 fungos endofíticos utilizados neste trabalho, 10 foram do gênero *Penicillium* com características básicas de possuírem micélio vegetativo abundante, irregularmente ramificado, septado, hialino ou de cores vivas, formando colônias de micélios densa e compacta com margens bem definidas, contendo colônias coloridas em tons de verde, raramente branca ou marrom (RAPER; THOM, 2002; HOUBRAKEN; SAMSON, 2011) e 10 do gênero *Trichoderma*, após 48h de cultivo aparecem pústulas ou círculos verdes, no qual se dão pela produção de esporos subhialinos, para posteriormente adquirem a cor verde em massa e ficarem com um aspecto granular ou pulverulento à colônia sendo fungos com a presença de

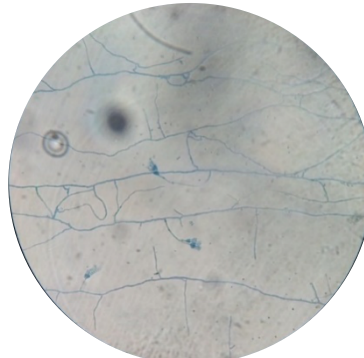
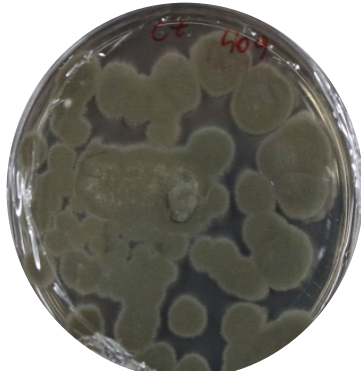
conidióforos arranjados em uma arquitetura mais ou menos piramidal, com diferentes padrões de ramificações (ABREU, L.; PFENNING, L., 2019) (tabela 8).

Tabela 8: Identificação quanto as características macro e microscopia assim como identificação molecular dos fungos endofíticos.

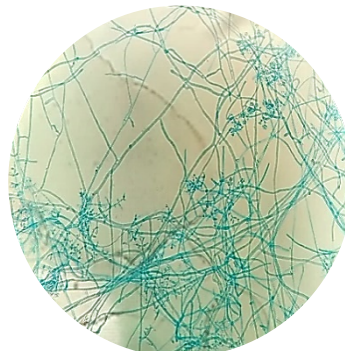
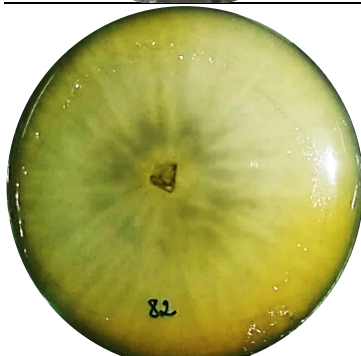
Macroscopia	Microscopia	Identificação molecular
		<i>Penicillium paxilli</i>
		<i>Penicillium oxalicum</i>
		<i>Penicillium oxalicum</i>
		<i>Penicillium chrysogenum</i>



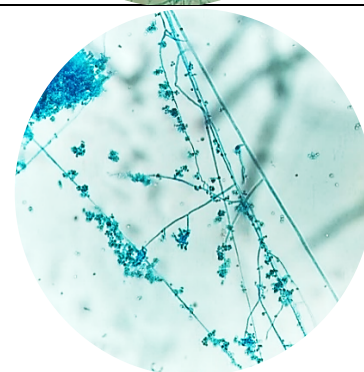
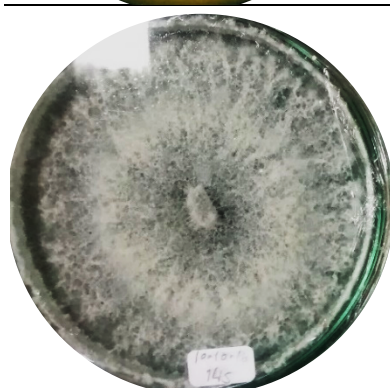
Penicillium rubens



Penicillium citrinum



Trichoderma harzianum






Trichoderma asperellum

Fonte: Araújo, 2018; Rangel, 2018.

Contudo, alguns fungos aquáticos eram ausentes de estrutura reprodutiva, dessa forma ao observar as análises microscópicas, apenas foi possível encontrar a presença de hifas. Além disso alguns fungos endofíticos assim como aquáticos, perdeu-se o tempo de observação, com isso, não foi possível visualizar as estruturas microscópicas como demonstrados na tabela 9 e

10, dessa forma teremos apenas a presença da macroscopia assim como a identificação molecular.

Tabela 9: Identificação fenotípica e molecular dos fungos aquáticos.

Macroscopia	Identificação molecular
	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>
	<i>Peniophora</i> sp.
	<i>Trichoderma atroviride</i>
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>



Hypoxylon sp.



Paraphaeosphaeria sp.

M145

Aspergillus sp.



Trichoderma sp.



Hypomontagnella sp.



Eutypella sp.

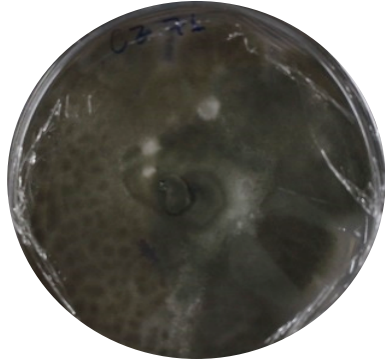
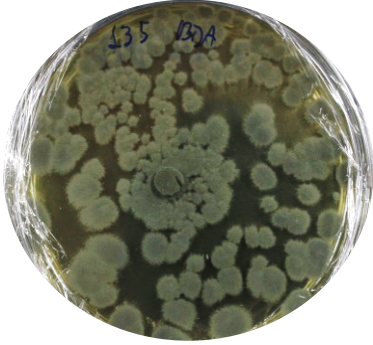

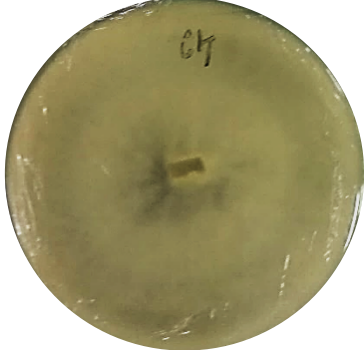


Trametes sp.



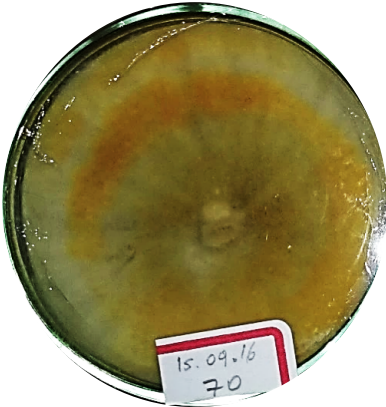
Penicillium sp.

Tabela 10: Identificação fenotípica e molecular dos fungos endofíticos.

Macroscopia	Identificação molecular
	<i>Penicillium oxalicum</i>
	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	<i>Penicillium oxalicum</i>
P408	<i>Penicillium glabrum</i>
	<i>Trichoderma viride</i>



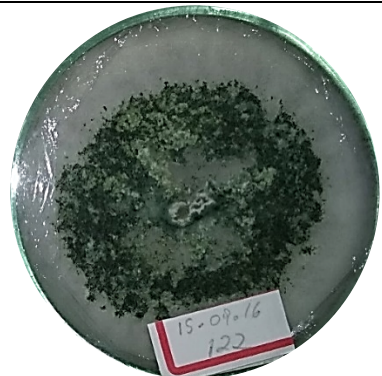
Hypocrea lixii- 92% ou *Trichoderma harzianum* 90%



Trichoderma harzianum



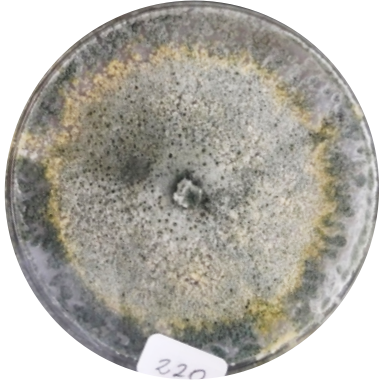
Trichoderma harzianum



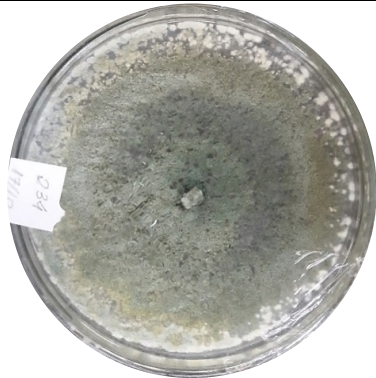
Trichoderma harzianum



Trichoderma asperellum



Trichoderma atroviride



Trichoderma atroviride

Fonte: Araújo, 2018; Rangel, 2018.

DISCUSSÃO

Os fungos aquáticos utilizados neste estudo foram provenientes de amostras de lagos dos rios, coletados em São Gabriel da Cachoeira e Coari, municípios do estado do Amazonas. Na identificação dos gêneros foi utilizada a base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), sendo constatado os gêneros *Trichoderma* e *Penicillium*, corroborando com Goh; Hyde (1996) e Crusius et al. (2015), em que os fungos aquáticos podem ser constituídos por diferentes grupos taxonômicos conídias, geralmente procedentes de ambientes externos da água, isto é, solo, ar ou substratos orgânicos que são carregados para o ambiente aquático apresentando tolerância ao novo ambiente. E também está de acordo com Batista et al. (2019), demonstrando que o *Penicillium* também pode ocorrer de forma generalizada em ambientes terrestres e inclusive em ambientes aquáticos. Através da identificação molecular foi possível identificar as espécies do gênero *Penicillium* e *Trichoderma* como demonstrado na tabela 11.

Tabela 11: Fungos aquáticos e endofíticos que apresentaram resultados como produtores de metabolitos secundários com ação fitohormonal e antimicrobiana.

Código	Ambiente	Teste	Identificação
M55		Ambos os testes	<i>Cladosporium tenuissimum</i> .
M127	Aquático	Fitohormonal	<i>Hypoxyylon</i> sp.
M166		Antimicrobiano	<i>Talaromyces cinnabarinus</i>
M167		Ambos os testes	<i>Penicillium citreosulfuratum</i>
P56		Fitohormonal	<i>Penicillium paxilli</i>
P64		Ambos os testes	<i>Penicillium oxalicum</i>
P71		Antimicrobiano	<i>Penicillium oxalicum</i>
P143		Antimicrobiano	<i>Penicillium oxalicum</i>
P154		Ambos os testes	<i>Penicillium chrysogenum</i>
P408	Endofítico	Fitohormonal	<i>Penicillium glabrum</i>
P409		Antimicrobiano	<i>Penicillium citrinum</i>
P433		Antimicrobiano	<i>Penicillium rubens</i>
T42		Fitohormonal	<i>Trichoderma viride</i>
T69		Fitohormonal	<i>Trichoderma harzianum</i>
T70		Fitohormonal	<i>Trichoderma harzianum</i>

T73	Fitohormonal	<i>Trichoderma harzianum</i>
T83	Fitohormonal	<i>Trichoderma harzianum</i>
T122	Fitohormonal	<i>Trichoderma harzianum</i>
T140	Fitohormonal	<i>Trichoderma asperellum</i>
T145	Fitohormonal	<i>Trichoderma asperellum</i>
T220	Fitohormonal	<i>Trichoderma atroviride</i>
T234	Fitohormonal	<i>Trichoderma atroviride</i>

Fonte: Oka, 2020.

O uso de metabólitos secundários fitopatogênicos produzidos por fungos é ecologicamente correto, ao invés da utilização de agroquímicos, que são prejudiciais ao meio ambiente, à saúde humana, além de causar resistência gênica interferindo na variabilidade genética. No combate de biofilmes, os metabólitos secundários fúngicos podem inibir a atividade microbiana, através da redução ou bloqueio destes microrganismos patogênicos, já que os patógenos estão se tornando resistentes aos fármacos comumente utilizados e a busca de produtos naturais sintetizados por fungos endofíticos podem ser uma solução para esta problemática, estando de acordo com os estudos de Hongsheng et al. (2010) e Fortkamp (2018).

Com relação aos resultados de crescimento vegetal das sementes estudadas, o gênero *Trichoderma* teve um resultado significativo em relação aos demais, estando de acordo com Siddiquee (2014) onde classifica este gênero como produtores de compostos naturais ou de metabólitos secundários, sendo que um destes compostos podem ser os VOCs. O teste antimicrobiano com este gênero não apresentou resultados satisfatórios contra os patógenos testados, apesar de também possuir capacidade medicinal, e, portanto, considera-se realizar novos testes a fim de reavaliar seus metabólitos.

No presente trabalho a espécie *T. harzianum* proporcionou um aumento do crescimento e desenvolvimento radicular nas sementes de malva, estando de acordo com os estudos de Harman (2000), Vargas et al. (2009) e Mastouri et al. (2010) onde relatam aceleração da germinação de sementes, aumento do vigor das mudas, melhora do estresse hídrico e osmótico das plantas, em virtude da presença de ácido harziânico produzido por esta espécie.

O gênero *Penicillium*, tanto endofítico quanto aquático, foi o que mais apresentou resultado no teste antimicrobiano, uma vez que este é conhecido por ser um grande produtor de metabólitos secundários para fins medicinais, estando de acordo com estudo de Santos (2003) sobre extratos de *Penicillium* sp. isolados de *Melia azedarachi* foi eficaz frente as bactérias testadas. Apesar deste trabalho não ter realizado a identificação química quanto estes compostos

já detectáveis é possível concluir que há uma produção de uma substância que inibiu o crescimento dos microrganismos patogênicos, uma vez que corrobora com a literatura.

A espécie *Penicillium oxalicum* foi uma das espécies que apresentaram resultados significativos para *Enterococcus faecalis* bem como para *Candida albicans*, em consonância com Abrol et al. (2021). No trabalho dos autores foi isolado os compostos naturais de *P. oxalicum* e puderam identificar que o filamento desta espécie produz uma variedade de metabolitos secundários com propriedades antibiótica e de micotoxinas. Neste trabalho é possível constatar o aparecimento de pseudo-hifas, uma mudança na estrutura da cepa *C. albicans* na placa de Petri que continha *P. oxalicum*. Apesar do aparecimento de pseudo-hifas ter relação a condições de temperatura, segundo Giolo (2010), observou-se que não houve aparecimento destas estruturas no controle, descartando o fato da temperatura, podendo-se especular que seja devido aos metabólitos do fungo ou de seus compostos orgânicos voláteis (VOCs).

CONCLUSÃO

- Encontrou-se uma diversidade de espécies de fungos aquáticos, uma vez que são fungos com alta capacidade adaptativa, podendo ser provenientes de diversos locais;
- Das 20 linhagens de fungos endofíticos usadas neste trabalho, 10 são do gênero *Penicillium* e 10 do gênero *Trichoderma*;
- Os fungos do gênero *Trichoderma* foram eficazes no teste fitohormônio frente as sementes de alface americana e malva;
- A espécie *T. harzianum* proporcionou o melhor crescimento e desenvolvimento radicular nas sementes de malva;
- Os fungos do gênero *Penicillium* foram eficazes no teste antimicrobiano frente aos patógenos testados *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, sendo as duas espécies do *P. oxalicum* tiveram melhor desempenho como antimicrobiano;
- Estudos mais aprofundados são necessários para a identificação química dos compostos apresentados por estes fungos, uma vez que é de suma importância o estudo de substâncias produzidas por fungos amazônicos, seja para a produção de substâncias para crescimento vegetal ou a descoberta de uma nova substância para o uso em Odontologia.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. M.; PFENNING, L., H. O gênero *Trichoderma*. In: MEYER, M.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (Org). ***Trichoderma* uso na agricultura**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2019. p. 163- 179.
- ABROL, V.; KUSHWAHA, M.; ARORA, D.; MALLUBHOTLA, S.; JAGLAN, S. Mutation, chemoprofiling, dereplication and isolation of natural products from *Penicillium oxalicum*. **Acs Omega Article ASAP**, p A-B, 2021.
- AGOSTINI-COSTA, T.S; VIEIRA, R.F; BIZZO, H.R; SILVEIRA, D.; GIMENES, M.A. Secondary Metabolites. In: Dhanarasu, S. (Ed.). **Chromatography and its Applications**. [s.1]: InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0357-8
- ALONSO-VALLE, H.; ACHA, O.; GARCÍA-PALOMO, D. G.; FARIÑAS-ALVAREZ, C.; FERNÁNDEZ-MAZARRASA, C.; FARIÑAS, C. M. Candidemia in terciary care hospital: epidemiology and factors influencing motality. **Europ Clin Microbiol Infect Dis**, v. 22, p. 254-7, 2003.
- ANDRADE, A. L. C. **Aspectos do crescimento e influência de parâmetros físicos na atividade da lacase do fungo amazônico *Trametes lactinea***. 116 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Biotecnologia e Recurso Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2010.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S. AZEVEDO J. L.; MARCON, J.; KUKLINSKY SOBRAL, J.; LACAIVA, P.T. **Manual isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p, 2002.
- AZEVEDO, J.L. **Microrganismos endofíticos**. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (eds). *Ecologia Microbiana*. EMBRAPA-CNPMA, Jaguariuma, Brasil, p.117-37, 1999.
- BANHOS, E.F.D.; SOUZA, A.Q.L.; ANDRADE, J. C. D.; SOUZA, A.D.L.D.; KOOLEN, H. H.F.; ALBURQUERQUE, P.M. Endopytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: distibution and bioactivity. **Braz J. Microbiol**, v. 45, n.1, p.153-61, 2014.
- BARROS, V. M. **Infeções Nosocomias por *Enterococcus faecalis***. 2014. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.
- BENTES, J. G. **Produção vegetal: Influência do espaçamento na produtividade de sementes de malva (*Urena lobata* L.) em terra firme no Amazonas**. 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical – PGATR), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

BONONI, V. L. R.; GRANDI, R. A. P. **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deutoromicetos: Noções de taxonomia e aplicações biotecnológicas.** Instituto de Botânica, Secretária do Estado do Meio Ambiente, S. Paulo, 184 p., 1998.

BATISTA, L. R.; SOUZA, C.S.; EVANGELISTA, S. R.; AZEVEDO, N. L. Identificação de fungos: genero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*. In: OLIVEIRA, L. A.; JESUS, M.A.; MATSURA JACKISCH, A. B.; GASPAROTTO, L.; OLIVEIRA, J. G.S.; LIMA-NETO, R.G.; ROCHA, L.C. **Conhecimento, conservação e uso de Fungos.** Manaus: Editora INPA, 2019, 1-10 p.

CORTEZ, A. C. A. **Influência da sazonalidade e do modo de coleta na diversidade de fungos decompositores de madeira submersa de ambientes aquáticos da Região Amazônica.** 2016. 89f. Tese (Doutorado em Biodiversidade da Amazônia Legal – BIONORTE), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

CRUSIUS, I.H.S.; MOREIRA, C.G.; GOMES, E.P. Riqueza dos fungos ingoldianos e dos fungos aquáticos facultativos do Parque Municipal de Aclimação, São Paulo, SP, Brasil. **Hoehnea** , v. 42, n. 2, p. 239-251, 2015.

DEMAIN, A. L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. In History of Modern Biotechnology I p. 1-39. **Springer Berlin Heidelberg.** 2000.

DIGNANI, M. C; SOLOMKIN J. S.; ANAISSIE, E. Candida. In: ANAISSIE, E.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. (Ed.). **Med mycology. 1. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone,** p. 195-239, 2003.

DREYFUSS, M. M., CHAPELA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel, lowmolecular weight pharmaceuticals. Gullo VP. **The discovery of natural products with therapeutic potential. Boston,** 1994.

FISHER, K.; PHILIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. **Microbiology**, v. 155, n. 6, p.1749-1757, 2009.

FORTKAMP, D. **Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de *Anthurium alcatrazense* e *Begonia* spp.** 2018; 184f. Tese (Doutorado em Ciências – área de concentração: Microbiologia Agrícola), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

GARCIA-CUESTA, C; SARRION-PÉREZ, M. G.; BAGAN, J. V. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. **Journal of Clinical and Experimental Denstistry**, Valencia, v. 6, n. 5, p.576-582, 2014.

GILMAR, J. C. A. **Manual of Soil Fungi**, 2^a ed. Iowa: U.S.A, 432 p., 1959.

GIOLO, M. P.; SVIDIZINSKI, T. I. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnostico laboratorial de candidemia. **Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GOH, T.K.; HYDE, K.D. 1996. Biodiversity of freshwater fungi. **Journal of Industrial Microbiology** 17: 328-345.

GÓMEZ-GIL, R.; GÓMEZ, R. P. M.; ARIAS, G. A.; UBEDA, G. M.; BUSSELO, S. M.; CISTERNA, R.; GUITIÉRREZ-ALTÉS, A.; MINGORANCE, J. Nosocomial outbreak of linezolid-resistance *Enterococcus faecalis* in a tertiary care hospital. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, n. 2, p. 175-179, 2009.

GUERREIRO, R. T.; SILVEIRA, R. M. D. DA. **Glossário ilustrado de fungos: termos e conceitos aplicados à micologia**. 2ed. Ed. Universidade/UFRGS, Porto Alegre, 177 p., 2003

HARMAN, G. E. Myths and Dogmas of Biocontrol – Changes in Perceptions Derived From Research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Dis.**, v. 84, p. 377-393, 2000.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty year research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, New York, v. 68, p. 2831-2846, 2007.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, G. J.; BLACKWELL, M. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, v. 111, n. 5, p. 509–47, 2007.

HONGSHENG, Y.; LEI, Z.; LIN, L.; CHENGJILAN, Z.; LEI, G.; WENCHAO, L.; PEIXIN, S.; LUPING, Q. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 437-499, 2010.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R.A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. **Studeis in Mycology**. The Netherlands. v. 10; p. 1-51. 2001.

HUNG, R.; LEE, S.; BENNETT, J. W. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. **Fungal Ecology**, v. 6, n. 1, p.19-26, fev. 2013.

JONES, E. B. G.; PANG, K-L. Tropical aquatic fungi. **Biodiversity and Conservation**, v. 21, n. 9, p. 2403-2423, 2012

KAUL, S.; GUPTA, S.; AHMED, M; DHAR, K.M. Endophytic fungi from medicinal plantas: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v.11, n.4, p.487-505, 2012.

KELLER, N.P; TURNER, G.; BENNET, J.W. Fungal secondary metabolism – from biotechnology to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, Lodon, v.3, p.937-947, 2005.

KIFFER, E.; MORELET, M. The Deuteromycetes – Mitosporic fungi – Classification and Generic Keys. **Science Publishers**, USA, 273 p., 1999.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and gastrointestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 123-13, 2003.

KRAUSS, G.-J.; SOLÉ, M.; KRAUSS, G.; SCHLOSSER, D.; WESENBERG, D.; BARLOCHER, F. Fungi in freshwaters: ecology, physiology and biochemical potential. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 4, p. 620–51, 2011.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 4, p.999–1007, 2001.

MACCHERONI JR, W.; ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S. **Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias**. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Org.). *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educ, 2004, p. 451-490, cap.13.

MAEKAWA, L.E; VALERA, M.C.; CARVALHO, C.A.T.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. In vitro evaluation of the action of irrigation solutions associated with intracanal medications on *Echerichia coli* and its endotoxins in root canals. **J Appl Oral Sci**, 2010.

MACIEL, C. A. **Tendências do cultivo da Malva (*Urena lobata* L.) por agricultores familiares em Manacapuru – AM**. 2015. 117 f. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical – PGATR), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015.

MARCON, E.L. **Fungos endofíticos de *Pothomorphe peltata* e *Peperomia pellucida*: caracterização, metabolitos secundários e atividades biológicas**. 2013. 96f. Tese (Doutorado em Química), Faculdade de Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

MARTIN, B. Corominas, L. Garriga, M. e Aymerich, T. Identification and tracing of *Enterococcus* spp. By RAPD-PCR in tradicional fermented sausages and meat environment. **Journal Appl Microbiology**, v. 106, n. 4, p.66-77, 2008.

MASTOURI, F.; BJORKMAN, T.; HARMAN, G. E.; Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. **Phytopathology**, v. 100, p. 1213-1221, 2010.

MICHEREFF, J. S. **Fundamentos de fitopatologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2001.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Áreas Prioritárias para Conservação, Uso Sustentável e Repartição dos Benefícios da Biodiversidade Brasileira: atualização – Portaria MMA nº 9, 23 de janeiro de 2007**. Secretária de biodiversidade e Florestas, Brasília. p.301.

MITCHELL, A. M.; STROBEL, G. A.; MOORE, E.; ROBISON, R.; SEARS, J. Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 270-277, 2009.

NAGAI, H. H.; VIÉGAS, G.P. (Eds) Melhoramento de Plantas no Instituto Agrônômico. **In: Furlani A.M.C.**, p.195-203, 1993.

NAKAJO, K.; KOMORI, R.; ISHIKAWA, S.; UENO, T.; SUZUKI, Y.; IWANI, Y.; TAKASHI, N. Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. **Oral Microbiol Immunol**, v. 21, n. 5, p.283-288, 2006.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, D.G. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.22, n.4, p.552-558, 2011.

OLIVEIRA, M.N.V. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffe arábica* from south Brazil. **Can J Microbiol**, v. 59, n.4, p. 221-30, 2013.

PARCERO, C. F.; SILVA, E.; SOUZA, J. R. B.; PORTO, C.; GONÇALVES, J. E.; GONÇALVES, R. A. C.; PILAU, E. J. **Análise de compostos voláteis produzidos por fungos filamentosos isolados de pele humana**. In: 26º Encontro Anual de Iniciação Científica, Maringá, junho 2017. 6º Encontro anual de iniciação científica júnior. Maringá, PR: Universidade Estadual de Maringá, p. 1-4, 2017.

PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; CAETANO, L.C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**, v.3, p.67-9, 2004.

PETRINI, O.; SIEBER, S. T.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production and substrate utilization in Endophytic fungi. **Nat toxins**, v.1, p.188-96, 1992.

PIMENTA, R. S.; SILVA, J. F. M.; BUYER, J. S.; JANIEWICZ, W. J. Endophytic Fungi from Plums (*Prunus domestica*) and Their Antifungal Activity against *Monilinia*. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 10, p. 1883-1889, 2012.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Annu Ver Phytopathol**, v. 49, p. 291-315, 2011.

PURI, C.S; NAZIR, A.; CHAWLA, R. ARORA, R.; RIYAZ-ULHASAN, S.; AMNA, T.; AHMED, B.; VERMA, V.; SINGH, S.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; SHARMA, R.K; QAZI, G.N. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.122, p.494-510, 2006.

ROQUE, F.N. **Substâncias orgânicas: estrutura e propriedades**. São Paulo Edusp, 320 p., 2011.

SANGER F, NICKLEN S, COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Dec;74 (12):5463-7, 1977.

SANTOS, R. M. G.D. **Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium* sp e *Fusarium minoliforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae)**. 453 f. Tese (Doutorado) – Doutorado em Ciências na área de Química Orgânica, Universidade Federal de São Carlos: Centro de ciências exatas e de tecnologia. 2003.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H. O papel dos fungos nos Ecossistemas Aquáticos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia**, v. 36, n. 1, p. 26–30, 2007.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; The endophytic continuum. **Mycological Research**, v.109, p. 661–686. 2005.

SIQUEIRA, J.F.; RÔÇAS, I.N.; Present status and future diretions in endodontic microbiology. **Endod topics**, v. 30, n.01, p. 3-22, 2014.

SHEARER, C.A; DESCALS, E.; KOHLMAYER, B.; KOHLMAYER, J. Fungal biodiversity in aquatic habitats. **Biodivers Conserv**, v. 16, p. 49-67, 2007.

SIDDIQUEE, S. Recente Advancements on the role and analysis of volatile compounds (VOCs) from *Trichoderma*. **Biotechnology and Biology of Trichoderma**, 139-174 p., 2014

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 21, 266, 2004.

SILVA, M. H. **Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes transplantados de medula óssea**. 2011. 54 f. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública), Universidade Federa de Goiás, Goiás, 2011.

SOTTERO, A. N. **Colonização radicular e promoção de crescimento vegetal por rizobactérias**. 62 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agrônômico, São Paulo, 2003.

SOTTERO, N.A.; FREITAS, S.D.S.; MARCHI, M.D.T; TRANI, E.P. Rizobactérias e alfaca: colonização rizosfera, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciências do solo**, v. 30, n. 2, 2006.

SOUZA, A.Q.L. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnosco gensbentham*. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185-95, 2004.

SOUZA, H. H. **AMBIENTE E SOCIEDADE: A cadeia produtiva da malva (*Urena lobata* L.) no médio Solimões: uma alternativa sustentável?** 2012. 108 f. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia – PPG-CASA), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

SRI-INDRASUTDHI, V.; BOONYUEN, N.; SUETRONG, S.; CHUASEEHAROONACHAI, C. Wood-inhabiting freshwater fungi from Thailand: *Ascothailandia grenadoidea* gen. et sp. nov., *Canalisporium grenadoidea* sp. nov. with a key to *Canalisporium* species (Sordariomycetes, Ascomycota). **Mycoscience**, v. 51, n.6, p. 411–420, 2010.

STERGIOPOULOS, I.; COLLEMARE, J.; MEHRABI, R.; DE WITT, P.J.E.M. Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic *Dothideomycete* fungi. **FEMS Microbiological Reviews**, Amsterdam, v.37, p. 67-93, 2013.

STROBEL, G. A. DIRKSE, E; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 147, n. 11, p. 2943-2950, 2001

STROBEL, G. A.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D.; FUNG, P. C. W.; CHAN, K. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis* microspora, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, v. 60, p.179-183, 2002.

SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M. B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T. S. **Fungal endophytes and bioprospecting. Fungal Biology Reviews**, v. 23, p. 9-19, 2009

TEJESVI, M.V.; NALINI, M.S.; MAHESH. B.; Prakash HS, Kini KR, SHETTY, H.S.; VEN, S. New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. **Bol Soc Quím Méx**, v. 1, n.1, p. 19-26, 2007

THOM, B. I.; RAPPER, K.B.A. A manual of the *Aspergilli*. In: KLICHM, M. A. **Identification of common Aspergilli**. Netherlands: Centraalbureauvoor Schimmelcultures, 2002. 116 p.

VALERA, M.C; SALVIA, A.C; MAEKAWA, L.E; CARVALHO, C.A.; KOGA-ITO, C.Y.; CAMARGO, C. H. R.; LIMA, R. P. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. **National Library of Medicina**, n. 17, v. 6, p. 555-559, 2009.

VARGAS, W. A.; MANDAWA, J. G.; KENERLEY, C. M. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and Maize Plants. **Plant Physiology**, v.151; n. 2; p. 792-808, 2009.

VEJAN, P.; ABDULLAH, R.; KHADIRAN, T.; ISMAIL, S.; BOYCE, A. N. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability – a review. **Molecular Diversity**, v. 21, n. 5, p. 573, 2016.

WALKER, I. Omnivory and resource – sharing in nutriente – deficiente Rio Negro Waters: Stabilization of biodiversity? Bacia do Rio Negro. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 3, p.617-626, 2009.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from na ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, New York, v. 63, p. 3-19, 2003.

YUE, Q.; MILLER, J. C.; WHITE, F. J.; RICHARDSON, D. M. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloe festucae*. **J Agric Food Chem**, v. 48, n. 10, p. 4687-92, 2000.

YURI, J.E.; RESENDE, G.M.; MOTA, J.H.; SOUZA, R.J.; FREITAS, S.A.C.; RODRIGUES JUNIOR, J.C. Comportamento de cultivares de alface americana em Santana da Vargem. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 249-252, 2004.

ZACARIAS FILHO, R. P. **Seleção e produção de exo e/ou polissacarídeo de origem microbiana da Amazônia para o uso em odontologia**. 2018. 113f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE), Universidade Federal Amazonas, Manaus, 2018.