UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

DAJARA MOANA BARBOSA MOREIRA

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SUBMERSO DO FUNGO *Lasiodiplodia* sp. PARA PRODUÇÃO DE EXTRATOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Alfenas/MG

2021

DAJARA MOANA BARBOSA MOREIRA

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SUBMERSO DO FUNGO *Lasiodiplodia* sp. PARA PRODUÇÃO DE EXTRATOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Alfenas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.
Orientadora: Profª. Drª. Jaine H. H. Luiz.

Alfenas/MG
2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Moreira, Dajara Moana Barbosa
M838o Otimização das condições de cultivo submerso do fungo *Lasiodiplodia sp.* para produção de extratos com atividade antimicrobiana / Dajara Moana Barbosa Moreira – Alfenas, MG, 2021.
87 f.: il. –

Orientadora: Jaine Honorata Hortolan Luiz.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Fungo endofítico. 2. Otimização de processo. 3. Atividade antimicrobiana. I. Luiz, Jaine Honorata Hortolan. II. Título.

CDD- 579

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735

DAJARA MOANA BARBOSA MOREIRA

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO DO FUNGO Lasiodiplodia sp. PARA PRODUÇÃO DE EXTRATOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 20 de agosto de 2021

Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Daniela Battaglia Hirata
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Yohandra Reyes Torres
Instituição: Universidade Estadual do Centro-Oeste

Documento assinado eletronicamente por **Jaine Honorata Hortolan Luiz**, **Professor do Magistério Superior**, em 20/08/2021, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Daniela Battaglia Hirata**, **Professor do Magistério Superior**, em 20/08/2021, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

Documento assinado eletronicamente por **Yohandra Reyes Torres**, **Usuário Externo**, em 20/08/2021, às 16:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0576875** e o código CRC **8216CF97**.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus, que sempre esteve comigo, ouvindo minhas orações, me amparando e possibilitando minhas conquistas. Sem Ele eu nada seria.

À minha família, meu pai e meus irmãos, por todo apoio. Em especial à minha mãe, que não mede esforços para me ver feliz. Amo vocês incondicionalmente.

Ao meu namorado, Carlos, pelo carinho e conselhos.

Um agradecimento mais que especial à minha orientadora, Profa. Dra. Jaine, que foi fundamental para minha conquista, pela orientação, competência, profissionalismo e amizade. Minha especial admiração e gratidão.

Aos professores do programa, que sempre estiveram disponíveis, compartilhando todos seus conhecimentos, contribuindo para o meu crescimento profissional. Em especial à Profa. Dra. Daniela que contribuiu para a realização desse trabalho.

Às minhas amigas de república, que me acolheram, me proporcionando momentos de lazer e distração. E aos amigos de outras caminhadas, que mesmo de longe sempre se fizeram presentes, tornando meus dias mais felizes. Em especial, ao meu amigo Omar, por todos os ensinamentos compartilhado durante o mestrado.

À UNIFAL/MG pela disponibilidade de suas instalações durante a realização da pesquisa e à FAPEMIG pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Pesquisas direcionadas ao descobrimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de produtos naturais apresentam grande relevância. A crescente frequência de infecções resistentes a antibióticos demonstra claramente que novas drogas são imprescindíveis para a medicina atual. Dentre os compostos com potencial terapêutico oriundos da natureza, os metabólitos secundários sintetizados por fungos endofíticos, têm atraído a atenção de pesquisadores em todo mundo. Estudos demonstraram a capacidade dos fungos endofíticos em produzir um grande número de compostos com diferentes atividades biológicas. Neste estudo, foram avaliados os extratos acetato de etila (EtOAc) obtidos após cultivo submerso do fungo endofítico *Lasiodilodia* sp., os quais apresentaram atividade antimicrobiana significativa. Para determinar as melhores condições de cultivo, o fungo foi cultivado inicialmente em meio Czapek, em modo estático e agitado, e amostras do caldo de cultivo foram retiradas em diferentes períodos para avaliar a produção de extrato EtOAc e seu potencial antimicrobiano frente a linhagens ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Escherichia coli*, através de ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM). O cultivo por 12 dias, em modo estático, foi selecionado por produzir maior massa de extrato EtOAc, rico em metabólitos secundários (154mg/300mL). A Metodologia da Superfície de Resposta (MSR) foi utilizada para maximizar a produção desse extrato, sendo realizado um Delineamento de Composto Central Rotacional 2^3, com seis pontos axiais e três repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios, no qual as variáveis independentes foram glicose, sacarose, $NaNO_3$, e a variável dependente foi a massa de extrato EtOAc, obtida após o cultivo. De acordo com o planejamento experimental realizado, as melhores condições de cultivo foram 15 $g.L^{-1}$ de glicose, 24 $g.L^{-1}$ sacarose e 0,85 $g.L^{-1}$ de $NaNO_3$. Foi possível aumentar a produção em massa de extrato EtOAc em 84%. A atividade antimicrobiana dos extratos mantiveram-se satisfatórias frente a *S. aureus* e *C. albicans,* sendo possível inferir que nas condições do estudo, *Lasiodiplodia* sp. produziu substâncias com características antimicrobianas de relevância biotecnológica.

Palavras-chave: Fungo endofítico; otimização de processo; atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Studies on discovering new antimicrobial agents from natural resources have great relevance. The increase in the frequency of resistant pathogens to commercial antibiotics clearly demonstrates that new drugs are necessary for current medicine. Among the compounds with therapeutic potential from nature, secondary metabolites produced by endophytic fungi have attracted a lot of attention. Literature has demonstrated that endophytic fungi have the ability to produce a plethora of compounds with various biological activities. In this study, ethyl acetate extracts (EtOAc) obtained after *Lasiodiplodia* endophyte cultivation, showed relevant antimicrobial activity. To determine the best fermentation conditions, *Lasiodiplodia* was cultivated in Czapek medium, in static and stirred mode, and broth samples were taken at different times of cultivation to evaluate the production of antimicrobial compounds from EtOAc extracts, which were evaluated against ATCC *Staphylococcus aureus, Candida albicans* and *Escherichia coli* strains, through the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Microbicide Concentration (MMC). The fermentation after 12 days in static mode was selected for producing larger EtOAc mass extract (154mg/300mL). The Response Surface Methodology (RSM) was used to maximize the production of this extract, a Central Composite Rotational Design 2^3 was performed, with six-star points and three repetitions at the central point, totaling 17 essays, whose the independent variables were glucose, sucrose, $NaNO_3$, and the dependent variable was EtOAc dry mass production. Regarding the experimental design, the optimum fermentation conditions were 15 $g.L^{-1}$ of glucose, 24 $g.L^{-1}$ of sucrose and 0.85 $g.L^{-1}$ of $NaNO_3$, yielding an improvement of 84% in EtOAc dry mass extract. The antimicrobial activity of the extracts remained satisfactory against *S. aureus* and *C. albicans*, and it is possible to suggest that under the conditions studied herein, *Lasiodiplodia* sp. is able to produce substances with antimicrobial properties which is biotechnologically relevant.

Keywords: Endophytic fungus; process optimization; antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia do ipê roxo – Handroanthus impetiginosus..... 20
Figura 2 - Fórmula estrutural do Taxol..... 25
Figura 3 - Estruturas de lasiodiplodinas..... 31
Figura 4 - Cultivo de *Lasiodiplodia* sp. em PDA..... 43
Figura 5 - Cultivo de *Lasiodiplodia* sp. em meio Czapek em estufa DBO..... 44
Figura 6 - Curva de crescimento do *Lasiodiplodia* sp. cultivado meio Czapek em estufa DBO e produção de extrato acetato etílico..... 47
Figura 7 - Cultivo de *Lasiodiplodia* sp. em meio Czapek em shaker..... 48
Figura 8 - Curva de crescimento do *Lasiodiplodia* sp. cultivado meio Czapek em shaker produção de extrato acetato etílico..... 48
Figura 9 - Histograma para extrato acetato etílico seco..... 55
Figura 10 - Diagrama de Pareto..... 56
Figura 11 - Resultados experimentais e preditos para a produção de massa seca do extrato..... 57
Figura 12 - Superfícies de resposta e curva de contorno para massa seca de extrato..... 58
Figura 13 - Curva de crescimento do *Lasiodiplodia* sp. cultivado em meio otimizado em estufa DBO..... 60
Figura 14 - Comparação da produção de extrato acetato etílico em meio Czapek e meio otimizado..... 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos isolados de fungos endofíticos e suas atividades biológicas..... 26
Tabela 2 - Etapas para otimização de processo..... 36
Tabela 3 - Valores e reais codificados, e níveis dos fatores estudados no planejamento..... 41
Tabela 4 - Massas seca dos micélios fúngicos e massas seca dos extratos acetato etílicos de *Lasiodiplodia* sp. cultivado em meio Czapek em estufa DBO..... 45
Tabela 5 - Massas seca dos micélios fúngicos e massas seca dos extratos acetato etílico de *Lasiodiplodia* sp. cultivado em meio Czapek em shaker..... 48
Tabela 6 - Atividade antimicrobiana dos extratos acetato etílico de *Lasiodiplodia* sp. cultivado em meio Czapek em estufa DBO..... 50
Tabela 7 - Atividade antimicrobiana dos extratos acetato-etílico de *Lasiodiplodia* sp. ultivado em meio Czapek em estufa em shaker... 51
Tabela 8 - Resultados do planejamento fatorial completo 23, com 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central..... 54
Tabela 9 - Coeficientes de regressão obtidos para o DCCR, usando um nível de significância de 5 %..... 55
Tabela 10 - ANOVA para o DCCR, utilizando somente os coeficientes de regressão estatisticamente significativos a 5 % de significância..... 57
Tabela 11 - Atividade antimicrobiana dos extratos acetato etílico de *Lasiodiplodia* sp..... 60
Tabela 12 - Condições de processo onde ocorre maior resposta para a produção de extrato..... 61
Tabela 13 - Massas dos extratos obtidos e atividades antimicrobianas para os ensaios 4, 12 e ponto ótimo..... 62
Tabela 14 - Massas seca do micélio fúngico e massas seca dos extratos acetato-etílico de Lasiodiplodia sp. cultivado em meio otimizado.... 63
Tabela 15 - Atividade antimicrobiana dos extratos acetato etílico de Lasiodiplodia sp. cultivado em meio otimizado..... 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	Extrato seco de acetato de etila
ALd	Extrato bruto de acetato de etila obtido em cultivo de modo agitado
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	do inglês, *American Type Culture Collection*
CDB	do inglês, *Czapek-Dox Broth*
CES	Cultivo em Estado Sólido
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	do inglês, *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CMM	Concentração Microbicida Mínima
CS	Cultivo Submerso
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DCCR	Delineamento de Composto Central Rotacional
DNA	do inglês, *Desoxyribonucleic Acid*
DOE	do inglês, *Design of Experiments*
ELd	Extrato bruto de acetato de etila obtido em cultivo de modo estático
EM	Espectrometria de massas
$FeSO_4.7H_2O$	Sulfato de ferro II hepta-hidratado
g	Grama
ICA	do inglês, *indole-3-carboxylic acid*
ITS	do inglês, *Internal Transcribed Spacers*
K_2HPO_4	Fosfato dipotassico
KCl	Cloreto de potássio
MEB	do inglês, *Malt Extract Broth*
mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
$MgSO_4.7H_2O$	Sulfato de magnésio hepta-hidratado
MH	Mueller Hinton
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
$NaNO_3$	Nitrato de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde

ONU	Organização das Nações Unidas
PB	Plackett-Burman
PDA	do inglês, *Potato Dextrose Agar*
PDB	do inglês, *Potato Dextrose Broth*
pH	Potencial Hidrogeniônico
POLd	Extrato bruto de acetato de etila obtido em meio otimizado
PYG	do inglês, *Peptone Yeast Glucose Broth*
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
RPMI	do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*
RSM	do inglês, *Response Surface Methodology*
TEF-1α	do inglês, *Translation Elongation Factor 1α*
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UNIFAL	Universidade Federal de Alfenas
v/v	Volume/volume
YpSs	do inglês, *Yeast Phosphate Soluble Starch*
µL	Microlitro
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**14**
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	**Objetivo Geral**	**15**
1.1.2	**Objetivos Específicos**	**15**
2	**REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO**	**17**
2.1	PLANTAS MEDICINAIS	17
2.2	IPÊ ROXO – *Handroanthus impetiginosus*	19
2.3	FUNGOS ENDOFÍTICOS	22
2.4	O GÊNERO *Lasiodiplodia*	27
2.5	CULTIVO SUBMERSO	32
2.6	OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS	35
3	**METODOLOGIA**	**38**
3.1	REPIQUE DO FUNGO	38
3.2	CULTIVO DO FUNGO	38
3.2.1	**Obtenção da biomassa seca**	**38**
3.2.2	**Obtenção dos extratos orgânicos secos**	**39**
3.3	TESTE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	39
3.3.1	**Microrganismos utilizados e preparo dos inóculos para ensaios antimicrobianos**	**39**
3.3.2	**Preparo das amostras**	**40**
3.3.3	**Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM)**	**40**
3.4	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	41
4	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**	**43**
4.1	REPIQUE DO FUNGO *Lasiodiplodia* sp.	43
4.2	CULTIVO EM MODO ESTÁTICO E EM MODO AGITADO DE *Lasiodiplodia* sp.	43
4.2.1	**Cultivo em modo estático**	**44**
4.2.2	**Cultivo em modo agitado**	**47**
4.3	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS	49
4.4	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	53

4.4.1 Cultivo em meio otimizado 62
5 CONCLUSÕES..... 67
6 PERSPECTIVAS FUTURAS..... 67
REFERÊNCIAS..... 68

1 INTRODUÇÃO

Abordagens inovadoras são necessárias para o desenvolvimento de novos medicamentos, em razão do frequente crescimento da resistência antimicrobiana adquirida por patógenos, do surgimento de novas doenças e da redução da eficiência de muitos medicamentos disponíveis para tratamento (PATIL; PATIL; MAHESHWARI, 2016; ROSSITER; FLETCHER; WUEST, 2017; XIE *et al*., 2015). Os produtos naturais, frequentemente definidos como compostos derivados de fontes naturais que possuem atividades biológicas, são valiosos recursos na síntese de substâncias com atividades biológicas, e apresentam uma importante vertente no desenvolvimento de novos medicamentos (RAHMAN; SARKER, 2020).

Dentre os compostos com potencial terapêutico oriundos da natureza, os metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos, microrganismos que colonizam tecidos saudáveis de plantas, têm atraído muita atenção (DESHMUKH *et al*., 2018; GOLINSKA *et al*., 2015). *Lasiodiplodia* é um gênero de fungos pertencentes a família Botryosphaeriaceae, que exibem diversos estilos de vida, inclusive o endofítico (DE SILVA *et al*., 2019). As espécies de *Lasiodiplodia* são relacionadas com a produção de compostos bioativos com diversas características, antibacterianas (DZOYEM *et al*., 2017; FÉLIX *et al*., 2018; MORON; LIM, 2018), antioxidantes (KUMAR *et al*., 2019; QIAN *et al*., 2014), anticancerígenas (DHAYANITHY; SUBBAN; CHELLIAH, 2019; PANDI *et al*., 2011; SAH; SUBBAN; CHELLIAH, 2017) entre outras. Os endófitos são capazes de sintetizar moléculas idênticas ao de sua planta hospedeira e por isso há grande tendência ao isolamento e uso de fungos endofíticos de plantas medicinais para obtenção de compostos bioativos (RANA *et al*., 2020; SINGH; DUBEY, 2015; UZMA *et al*., 2018).

A biossíntese de substâncias com potencial bioativo, pelo fungo endofítico, pode ocorrer por meio de processos de cultivo em estado sólido (CES) ou submerso (CS) (TABARAIE *et al*., 2020). Muitas vezes, os processos de obtenção de metabólitos secundários resultam em baixos rendimentos podendo não garantir o emprego racional da tecnologia em escala industrial. Neste sentido, técnicas de planejamento experimentais são empregadas para a otimização desses processos (SILVA *et al*., 2019; YUN *et al*., 2018).

O planejamento experimental traduzido do termo *Design of Experiments* (DOE), compreende um grande número de métodos usados para o estudo eficiente

e sistemático de sistemas e processos. Na execução do DOE, há a variação dos fatores controláveis de uma forma sistemática de modo que o impacto dos fatores, bem como o impacto de suas interações, na resposta possa ser distinguido, em algum grau, com a ajuda de métodos de análise de dados multivariados (AGBOGBO *et al*., 2020; VON STOSCH; WILLIS, 2017).

As principais vantagens desses delineamentos envolvem a análise simultânea de múltiplas variáveis, permitindo alcançar uma melhor combinação das variáveis no intuito de se otimizar o produto final ou o processo, através de maior precisão estatística possível na resposta, reduzindo o número de tentativas ou repetições e, consequentemente, diminuindo a mão de obra, o tempo e o custo final (BACO *et al*., 2019; NARENDERAN; MEYYANATHAN; KARRI, 2019; RODRIGUES; IEMMA, 2014; UHORANINGOGA *et al*., 2018).

Neste contexto, a presente pesquisa permitiu desenvolver o estudo para aumentar a produção de extratos obtidos no cultivo do fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp., isolado a partir de folhas da espécie vegetal *Handroanthus impetiginosus*, uma planta medicinal comumente conhecida como “ipê roxo” com reconhecidas propriedades curativas (MALANGE *et al*., 2019).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Otimizar as condições do meio de cultivo para o endófito *Lasiodiplodia* sp., visando maximizar a produção de extrato orgânico acetato de etila, com atividade antimicrobiana.

1.1.2 Objetivos específicos

a) Realizar uma curva de crescimento para *Lasiodiplodia* sp., cultivado de forma estática e agitada;
b) Determinar o tempo de cultivo submerso para obtenção de maiores massas de extratos acetato de etila secos e melhores atividades antimicrobianas;

c) Determinar o melhor modo de cultivo submerso, estático ou agitado, para melhorar o rendimento dos extratos secos e melhores atividades antimicrobianas;
d) Otimizar o meio de cultivo alterando as fontes de carbono e nitrogênio;
e) Validar o processo nas condições otimizadas;
f) Realizar uma curva de crescimento para *Lasiodiplodia* sp. com as condições otimizadas;
g) Determinar o tempo de cultivo submerso para maior obtenção de extrato seco e melhor atividade biológica, nas condições otimizadas.

2 REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Produtos naturais são substâncias provenientes do metabolismo secundário de plantas, animais, microrganismos, organismos marinhos ou insetos (PHAM *et al*., 2019). Esses produtos são utilizados há milhares de anos pelos humanos, devido as suas propriedades medicinais. Além disso, eles são quimicamente diversos com várias atividades biológicas e são as fontes mais valiosas de descoberta e desenvolvimento de fármacos (ABDEL-RAZEK *et al*., 2020). As plantas se destacam como a principal fonte de metabólitos utilizados na medicina tradicional (MORESKI; BUENO; DE SOUZA LEITE-MELLO, 2018; STROBEL; DAISY, 2003), pois sintetizam grande quantidade de compostos bioativos, como fenólicos e polifenóis, alcaloides, terpenoides e óleos essenciais, lectinas, entre outros (OTHMAN; SLEIMAN; ABDEL-MASSIH, 2019), que são aplicados em tratamentos de diversas enfermidades, em consequência de suas propriedades, baixo custo e muitas vezes por apresentarem menores efeitos indesejáveis a partir de sua administração (CARY; PETERLIN, 2018; CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013; VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006).

As plantas têm sido utilizadas como medicamentos há mais de 5000 anos. Segundo a OMS, cerca de 80% da população mundial ainda depende principalmente de medicamentos à base de plantas (URITU *et al*., 2018). O conjunto de efeitos terapêuticos associados às plantas medicinais engloba propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antitumorais, antimaláricas, analgésicas, entre outras (ANAND *et al*., 2019; AYE *et al*., 2019; ONAH, 2020a). Várias plantas são descritas na literatura de acordo com suas propriedades medicinais, podem-se citar exemplos como:

- A babosa, *Aloe vera,* pertencente à família Asphodelaceae é uma espécie de planta suculenta do gênero *Aloe,* que apresenta efeitos anti-inflamatórios e regenerativos, ela tem sido usada para fins terapêuticos por várias culturas devido aos seus efeitos cicatrizantes (KHOLIYA; GANGWAL; SHARMA, 2020; LORDANI *et al*., 2018; SINGH *et al*., 2020);
- Os frutos de *Aegle marmelos,* pertencente à família Rutaceae, são usados principalmente no tratamento de disenteria, úlcera, e como laxante (BALIGA

et al., 2011; DEBBARMA *et al*., 2017; RAKULINI; KALAICHELVI, 2019). Também apresentam atividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiproliferativa, antimalárica, analgésica, dentre outras (BHAR; MONDAL; SURESH, 2019; DEBBARMA *et al*., 2017);

- O gengibre, *Zingiber officinale,* pertence à família das Zingiberacea é considerado um tempero importante, com inúmeros benefícios à saúde. Seus rizomas têm sido usados no tratamento de problemas estomacais, náuseas, vômitos, diabetes, dores musculares, febre, cãibras, dor de dente, asma e doenças infecciosas (HANIADKA *et al*., 2013; ROGER *et al*., 2020; SHAHIDI; HOSSAIN, 2018);
- O orégano, *Origanum vulgare,* pertencente à família Lamiaceae, tem suas folhas e flores utilizados na medicina tradicional para o tratamento de resfriados, feridas, tosse, problemas de pele e gastrointestinais (DO NASCIMENTO *et al*., 2020; IBADULLAYEVA *et al*., 2012; URITU *et al*., 2018);
- A canela, *Cinnamomum verum*, pertencente à família Lauraceae, contém óleos essenciais, além de constituintes ativos, como ácido cinâmico, cinamaldeído e cinamato, associados a vários benefícios à saúde, ela exibe uma ampla gama de efeitos terapêuticos, como antioxidante, anti-inflamatório, anticâncer, antidiabético, antimicrobiano e também possui atividades contra distúrbios neurológicos (RAO; GAN, 2014; SHAHIDI; HOSSAIN, 2018; SINGH *et al*., 2020);
- O alho, *Allium sativum da* família Alliaceae contém uma alta concentração de aminoácidos sulfurados não protéicos responsáveis por suas características medicinais, com potencial antimicrobiano, antiprotozoário, antifúngico, antitrombótico, analgésico, coagulante, antiasmático, antipirético, anti-hipertensivo, anticoagulante, antiasmático, antioxidante e anticarcinogênico (MORALES-GONZÁLEZ *et al*., 2019; OVESNÁ; MITROVÁ; KUČERA, 2015).

O efeito terapêutico de alguns metabólitos secundários isolados de plantas medicinais é bem consolidado na literatura. Metabólitos como flavonoides, esteroides, alcaloides, terpenos, taninos e ligninas, demonstram diversas propriedades farmacológicas, dentre elas, notável potencial antimicrobiano quando usados isoladamente e como potenciais agentes modificadores de resistência (AIDI WANNES *et al*., 2017; ONAH, 2020b, 2020a; OTHMAN; SLEIMAN; ABDEL-MASSIH, 2019).

2.2 IPÊ ROXO – *Handroanthus impetiginosus*

Popularmente conhecida como ipê roxo ou pau d'arco, a *Handroanthus impetiginosus* (FIGURA 1), é uma árvore que pertence à família Bignoniaceae, comumente encontrada nas florestas tropicais de alguns países da América do Sul, incluindo Brasil, Paraguai e norte da Argentina (PARK *et al*., 2018; ZHANG *et al*., 2020a). É largamente utilizada, na indústria madeireira para produção de mobílias, e na medicina tradicional para o tratamento de diferentes tipos de câncer, obesidade, problemas cardíacos e estomacais, depressão, infecções bacteriana, fúngicas e virais, febre, anemia, conjuntivite e sintomas inflamatórios, como dor, artrite, colite, inflamações nos rins, pele e garganta e feridas (AHMAD *et al*., 2020; YADA *et al*., 2018; ZHANG *et al*., 2020a).

Os brasileiros têm tradicionalmente usado essa planta para fins terapêuticos, como anti-inflamatórios, analgésicos e antiofídicos contra veneno de cobra (MALANGE *et al*., 2019). Os curandeiros tradicionais no Brasil prescreveram o ipê roxo para o tratamento de câncer e prevenção ou tratamento de tumor. As cascas dos ipês são usadas na medicina tradicional, no preparo de infusões e tinturas, com finalidade analgésica, antitumoral e contra úlceras pépticas e diabetes (DE MELO *et al*., 2011). Seu uso extensivo tem motivado a realização de estudos científicos que levaram à determinação da presença de compostos bioativos, corroborando seu potencial fitoterápico (BORIOLLO *et al*., 2017; ZHANG *et al*., 2020a).

Figura 1 – Fotografia do ipê roxo – *Handroanthus impetiginosus*.

Fonte: DO AUTOR (2019).

Foram descritos na literatura compostos presentes no ipê, tais como as furanonaftoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas, cumarinas, ácido antraquinona-2-carboxílico, derivados do ciclopentano, derivados do benzaldeído, derivados do ácido benzoico, e compostos voláteis (GÓMEZ CASTELLANOS; PRIETO; HEINRICH, 2009; PARK *et al*., 2018; PIRES *et al*., 2015; ZHANG *et al*., 2020a).

Suas propriedades biológicas têm sido associadas principalmente à presença de naftoquinonas, que constituem o grupo químico ativo mais predominante na planta. A característica fundamental da química da quinona é sua facilidade de sofrer redução e, portanto, sua capacidade de atuar como um agente oxidante. Essa propriedade redox é impulsionada pela formação de um sistema totalmente aromático. Entre as naftoquinonas, o lapachol, que inibe a proliferação de células tumorais, e seu derivado, uma quinona, a β-lapachona, que exibe forte toxicidade em células murinas e humanas, são as duas substâncias que mais despertaram interesse, em razão da sua ação antitumoral (PINTO; DE CASTRO, 2009; PIRES *et al*., 2015; ZHANG *et al*., 2020a).

O lapachol foi isolado pela primeira vez do ipê em 1882, e foi inicialmente empregado por exibir atividades antimalárica, antitumoral, antifúngica, leishmanicida, bactericida e antiparasitária (STRAUCH *et al*., 2019). Lapachol, 2-hidroxi-3-(3-metil-

2-butenil-)-1,4-naftoquinona, $C_{15}H_{14}O_3$ (HUSSAIN; GREEN, 2017), é o composto quinônico mais abundante na família Bignoniaceae. Já a β-lapachona e seu isômero α-lapachona podem ser obtidos de forma natural, extraídos da casca do ipê, ou sintetizados a partir do lapachol. A esses compostos foram atribuídas várias atividades biológicas de interesse clínico (ARAÚJO; ALENCAR; ROLIM NETO, 2002; CARDOSO *et al*., 2013; MACEDO *et al*., 2013; PIRES *et al*., 2015).

Os primeiros efeitos anticâncer do lapachol foram avaliados em 1968 e ele demonstrou possuir potentes efeitos em relação a tumores em ratos (RAO; MCBRIDE; OLESON, 1968). Em 1980, foi relatada a cura de pacientes com diversos tipos de câncer, como de mama, próstata, fígado, rim e colo uterino, utilizando lapachol, (HUSSAIN; GREEN, 2017; SANTANA; SILVA, 1980). Análogos de lapachol foram preparados e incorporados no tratamento de câncer de mama, próstata, pulmão, melanoma, leucêmico, ovário, glioblastoma, cólon e rim (FIORITO *et al*., 2014; HUSSAIN; GREEN, 2017).

Foi estabelecido que o lapachol possui diversos efeitos biológicos, como anticancerígeno, antimalárico, analgésico, antiviral, antiparasitário, antipsoriático, antioxidante, antimicrobiano, antimetastático, leishmanicida, anti-inflamatório, anti-abscesso, anti-tripanosoma cruzi, antiendêmico, fungicida, cercaricida, bactericida, pesticida, termiticida, moluscicida, esquistossomicida e inseticida. Além disso, o lapachol demonstrou possuir efeitos antiangiogênicos quando coordenado ao bismuto (III) (AHMAD *et al*., 2020; HUSSAIN; GREEN, 2017).

Apesar dessas possibilidades terapêuticas, em 1974, o Instituto Nacional do Câncer concluiu que, devido às altas concentrações necessárias para que esse fármaco atuasse como um agente quimioterápico eficaz, infelizmente, resultou em efeitos colaterais muito tóxicos. Desta forma, o lapachol passou a ter um baixo potencial terapêutico devido aos seus efeitos adversos tóxicos (CASTRO; DE SOUZA; PEREIRA, 2020; HUSSAIN *et al*., 2007; MARQUES *et al*., 2020). No entanto, nenhum desses estudos considerou os efeitos do lapachol a nível molecular. Esta informação forma a base para desenvolver a síntese de novos e inovadores análogos de lapachol que podem ser usados como o ponto de partida em futuros desenvolvimentos desta molécula biológica potencialmente ativa (HUSSAIN *et al*., 2007).

Pesquisas anteriores indicaram vários efeitos farmacológicos de extratos brutos e compostos químicos do ipê roxo, em uma série de modelos *in vitro* e

animais. As atividades observadas foram antibacteriana, antioxidante, antifúngica, antinociceptiva, antidiabética, antiedema, anti-inflamatória e anticâncer em diferentes concentrações ou doses (ZHANG *et al*., 2020a). Devido ao espectro farmacológico exibido pelas plantas medicinais, várias espécies foram declaradas ameaçadas com risco de extinção devido à grande demanda pelos compostos bioativos e seus derivados. Alternativas adequadas para a biossíntese aprimorada desses compostos estão sendo investigadas, para maximizar sua produção e diminuir a exploração de plantas economicamente importantes (BIBI *et al*., 2020; SATHEESAN; SABU, 2020).

2.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os microrganismos que são definidos como endófitos compreendem, principalmente, fungos e bactérias que colonizam e habitam internamente as espécies vegetais de forma assintomática durante toda ou parte de sua vida (ZHANG *et al*., 2020b). Eles exibem uma associação simbiótica com os tecidos da maioria das plantas e às vezes podem ser patogênicos (FADIJI; BABALOLA, 2020). Eles se distinguem dos fitopatógenos, que acometem as plantas causando doenças, e dos epifíticos, que são encontrados na superfície dos órgãos e tecidos vegetais (AZEVEDO, 2014; HARDOIM *et al*., 2015; STIERLE; STIERLE, 2015).

Os endófitos podem produzir compostos biologicamente ativos, que são muito importantes para aumentar a sua adaptabilidade e de suas plantas hospedeiras, incluindo tolerância a estresses bióticos e abióticos (GOLINSKA *et al*., 2015; RAI *et al*., 2014). Eles também são capazes de sintetizar compostos biologicamente ativos que são, muitas vezes, semelhantes ou idênticos aos de plantas hospedeiras ou mesmo completamente diferentes, surgindo assim como uma alternativa a utilização de plantas medicinais (RANA *et al*., 2020; UZMA *et al*., 2018).

Dentre os microrganismos associados com plantas medicinais, os fungos endofíticos vêm despertando interesse no cenário mundial, como fontes para síntese de novos compostos bioativos, incluindo alcaloides, peptídeos, terpenoides, quinonas, flavonoides, compostos alifáticos e fenóis (DESHMUKH *et al*., 2018; GOLINSKA *et al*., 2015; KHARWAR *et al*., 2011; STROBEL; DAISY, 2003). A interação entre os endófitos e suas plantas hospedeiras é uma das melhores abordagens ambientalmente amigáveis para produção otimizada de compostos bioativos (SATHEESAN; SABU, 2020). Portanto, o isolamento de endófitos de

plantas medicinais pode fornecer novas oportunidades para biossíntese de novos compostos que podem ser aplicados na indústria farmacêutica, química, alimentícia, agricultura e na medicina (BIBI *et al*., 2020; DE MEDEIROS *et al*., 2018; DESHMUKH *et al*., 2018; JEEWON *et al*., 2019).

Os fungos endofíticos são fungos filamentosos, constituídos, em sua maioria, por hifas, estruturas microscópicas, que formam o micélio, estrutura macroscópica (CAFÊU *et al*., 2005). Sua transmissão pode ocorrer de forma horizontal, onde esporos, sexuados ou assexuados, transportados pelo ar, água ou insetos, penetram em estômatos, raízes ou até ferimentos em várias partes das plantas, ou de forma vertical, por meio de sementes (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; BAMISILE *et al*., 2018; CHANDRA, 2012; ZHANG; SONG; TAN, 2006).

A relação entre o fungo endofítico e o hospedeiro confere vários benefícios ao vegetal, melhoram o crescimento das plantas secretando fitormônios e, consequentemente, ajudam na melhoria da nutrição usando transferência bidirecional de nutrientes e melhoria da saúde das plantas e conferindo a prevenção de infecções por agentes patogênicos através da produção de compostos antibacterianos ou antifúngicos (ANDREOZZI *et al*., 2019; POLING *et al*., 2008; SHEN *et al*., 2019). A interação planta-endófito desencadeia a proteção de plantas contra condições prejudiciais do meio ambiente como a presença de metais pesados e seca (KHAN *et al*., 2020; KUSHWAHA *et al*., 2020).

Alguns microrganismos podem provocar alterações morfológicas na raiz da planta para melhorar a captação e o acúmulo de nutrientes; regulação osmótica e estomática; ativação rápida da resposta referente ao estresse hídrico; proteção contra herbívora; auxílio na aquisição de nutrientes e atuação na distribuição desses nutrientes (ARNOLD, 2007; BAMISILE *et al*., 2018; DUDEJA *et al*., 2012; RODRIGUEZ *et al*., 2009). Em geral, essas competências explicam as relações simbióticas entre endófitos e plantas hospedeiras, desenvolvendo resistência a fatores de estresse bióticos como, invasão por patógenos como bactérias, fungos, nematódeos e herbivoria por insetos, e abióticos como temperatura, pH, pressão osmótica e períodos de seca (HARDOIM *et al*., 2015; RODRIGUES-HEERKLOTZ *et al*., 2001; RODRIGUEZ *et al*., 2009). Em contrapartida, o fungo endofítico encontra-se protegido, pois, habita o interior do vegetal, além de ter à sua disponibilidade nutrientes para sua sobrevivência.

Geralmente, os endófitos fúngicos são conhecidos por serem benéficos para

as plantas cultivadas, enquanto apenas algumas espécies podem ser patogênicas, causando doenças ao hospedeiro após um período de incubação ou latência. Algumas espécies são neutras sem oferecer benefícios ou prejudicar seus hospedeiros (BAMISILE *et al*., 2018). Entre a virulência do fungo endofítico e a defesa da planta hospedeira há um equilíbrio, que quando perturbado, por um aumento acentuado da virulência do fungo ou por uma diminuição na defesa da planta, o estado de latência do fungo pode ser quebrado, podendo causar assim, uma possível doença na planta hospedeira (BAMISILE *et al*., 2018; CHANDRA, 2012; TAN; ZOU, 2001).

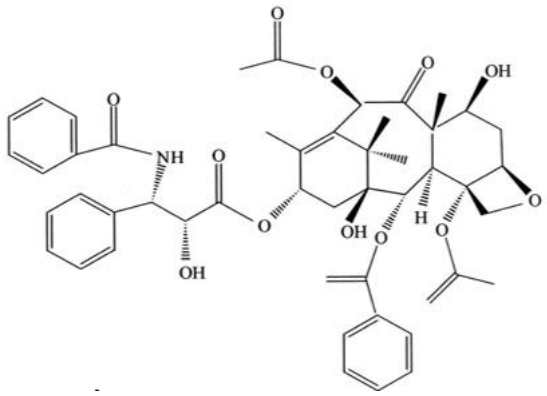
O fato de alguns fungos endofíticos serem capazes de produzir metabólitos secundários semelhantes ao que sua planta hospedeira produz é um indicativo que durante a coevolução do endófito e de seu hospedeiro, esses fungos se adaptaram aos seus microambientes especiais por variação genética, com alteração nos seus próprios genomas devido a absorção de partes do DNA do vegetal hospedeiro, e essa transferência de gene pode ter desenvolvido a capacidade de alguns endófitos em biossintetizar substâncias originalmente produzido pela planta hospedeira (CHANDRA, 2012; RODRIGUEZ *et al*., 2009; STROBEL *et al*., 1996; ZHANG; SONG; TAN, 2006).

O grande avanço na medicina, no combate aos microrganismos patogênicos, ocorreu com a descoberta da penicilina, por Fleming em 1928, fármaco isolado do fungo do gênero *Penicillium,* que apresenta atividade antibacteriana (FLEMING, 1944), fazendo ocorrer uma mudança significativa nas pesquisas com produtos naturais, substituindo plantas por microrganismos (CARY; PETERLIN, 2018; VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006). Essa descoberta mudou drasticamente a pesquisa de produtos naturais e posicionou os microrganismos como uma das alternativas mais importantes na descoberta de medicamentos devido à disponibilidade, variabilidade, grande biodiversidade e eficiência dos compostos (ABDEL-RAZEK *et al*., 2020). Desde então, compostos derivados de microrganismos têm sido utilizados na medicina, agricultura, indústria alimentícia e pesquisa científica (PHAM *et al*., 2019).

A partir da década de 90, houve um grande interesse científico por pesquisas com fungos endofíticos, devido ao trabalho desenvolvido por Stierle e colaboladores (1993) que relataram a produção do taxol (FIGURA 2) pelo endófito *Taxomyces andreanae*. O taxol é um importante fármaco anticancerígeno, isolado

originariamente da planta *Taxus brevifolia*, porém, seu isolamento a partir da planta tornou-se inviável devido ao baixo rendimento, longo tempo de desenvolvimento e pequeno tamanho populacional da planta (ABDALLA; MCGAW, 2018; GUPTA *et al*., 2020; PATIL; PATIL; MAHESHWARI, 2016; STROBEL; DAISY, 2003; UZMA *et al*., 2018). O comércio do taxol, colocou em risco a espécie *Taxus brevifolia* devido a seu corte ilegal (IQBAL; MEILAN; KHAN, 2020).

Figura 2 - Fórmula estrutural do Taxol



Fonte: STROBEL; DAISY (2003).

Uma variedade de compostos bioativos é sintetizada por fungos endofíticos, tais como flavonoides, alcaloides, benzopironas, ácidos fenólicos, esteroides, quinonas, xantonas, saponinas, taninos, terpenoides, tetralonas, peptídeos entre outros (ABDALLA; MCGAW, 2018; DESHMUKH *et al*., 2018; GOUDA *et al*., 2016; PINHEIRO *et al*., 2017; RAJAMANIKYAM *et al*., 2017; STROBEL *et al*., 2004; VASUNDHARA; KUMAR; REDDY, 2016; ZHENG *et al*., 2016).

A triagem de novos compostos com atividades biológicas sintetizadas por fungos endofíticos tornou-se um ponto de pesquisa imprescindível para descoberta e desenvolvimento de novas drogas (ZHENG *et al*., 2016). Existem muitos relatos na literatura sobre esses fungos, isolados de diferentes espécies vegetais, que produzem compostos bioativos e alguns são exemplificados na Tabela 1.

Tabela 1 - Compostos isolados de fungos endofíticos e suas atividades biológicas.

Composto	Endófito	Planta hospedeira	Atividade biológica	Fonte
Pestalona	*Pestalotiopsis* sp.	*Melia azedarach*	Antibacteriana	(SONG *et al*., 2017; XIE *et al*., 2015)
Fusaritioamida A e B	*Fusarium chlamydosporium*	*Anvillea garcinii*	Antibacteriana	(IBRAHIM *et al*., 2016a, 2018; TOGHUEO, 2020)
Eugenol	*Neopestalotiopsis* sp. *Diaporthe* sp.	*Cinnamomum loureiroi*	Antibacteriana e antioxidante	(TANAPICHATSAKUL *et al*., 2019)
Altertoxinas	*Alternaria tenuissima*	*Quercus emoryi*	Antiviral	(BASHYAL *et al*., 2014)
Emerimidina A e B	*Emericella* sp.	*Aegiceras corniculatum*	Antiviral	(ZHANG *et al*., 2011)
Chaetoglobosina A e D	*Chaetomium globosum*	*Ginkgo biloba*	Antifúngica	(ZHAO *et al*., 2017)
Fusaripeptídeo A	*Fusarium* sp.	*Mentha longifolia*	Antifúngica e antimalárica	(MOHAMED IBRAHIM *et al*., 2018)
Citocalasina Salidrosida Tirosol	*Lachnum* sp.	*Rhodiola crenulata*	Antioxidante	(CUI *et al*., 2015)
Pestacina Isopestacina	*Pestalotiopsis microspora*	*Terminalia morobensis*	Antioxidante	(GUPTA *et al*., 2020; STROBEL *et al*., 2004)
Camptotecina	*Fusarium solani*	*Camptotheca acuminata*	Antitumoral	(RAN *et al*., 2017; TOGHUEO, 2020; VENUGOPALAN *et al*., 2016)
Peniprolina A	*Penicillium decumbens*	*Cephalotaxus mannii*	Antitumoral	(WANG *et al*., 2017)
Tanshinona I e IIA	*Trichoderma atrovirida*	*Salvia miltiorrhiza*	Anti-inflamatória	(MING *et al*., 2012)
Fenilcumarina	*Streptomyces aureofaciens*	*Zingiber officinale*	Anti-inflamatória	(TOGHUEO, 2019)
Colutelina A	*Colletotrichum dematium*	*Pteromischum* sp.	Imunossupressora	(REN *et al*., 2008; STROBEL, 2018)
Designados por BS, GS e YS	*Pestalotiopsis leucothës*	*Tripterygium wilfordii*	Imunomoduladora	(KUMAR *et al*., 2005)
Peptídeo	*Aspergillus awamor*	*Acacia nilotica*	Antidiabética	(SINGH; KAUR, 2016)
Lectina	*Alternaria* sp.	*Viscum album*	Antidiabética	(GOVINDAPPA *et al*., 2015)
Epóxi-citocalasina H	*Diaporthe miriciae*	*Vellozia gigantea*	Antimalárica	(FERREIRA *et al*., 2017)

Tabela 2 - Compostos isolados de fungos endofíticos e suas atividades biológicas.

(continuação)

Composto	Endófito	Planta hospedeira	Atividade biológica	Fonte
Integracídeos	*Fusarium* sp.	*Mentha longifolia*	Antileishmanial	(IBRAHIM *et al*., 2016b; IBRAHIM; MOHAMED; ROSS, 2016)
Coclioquinona A Isococlioquinona A	*Cochliobolus* sp.	*Piptadenia adiantoides*	Antileishmanial	(TOGHUEO, 2019)
Beauvericina	*Fusarium* sp.	*Paubrasilia echinata*	Tripanocida	(CAMPOS *et al*., 2015; TOGHUEO, 2020)
Naftaleno	*Muscodor vitigenus*	*Paullina paullinioides*	Inseticida	(DAISY *et al*., 2002; STROBEL *et al*., 2004)
Derivados de cloranfenicol	*Acremonium vitellinum*	Alga marinha vermelha não identificada	Inseticida	(CHEN *et al*., 2018)

Fonte: DO AUTOR (2020).

É evidente que as plantas medicinais compõem uma fonte promissora de fungos endofíticos, para a produção de compostos naturais bioativos. Esta metodologia para obtenção desses produtos apresenta numerosas vantagens, visto que, muitos desses produtos já foram descritos e são conhecidos, e podem ser obtidos a partir dos fungos endofíticos isolados de plantas medicinais. Além do mais, esses fungos apresentam vasto potencial biotecnológico, e há a possibilidade de obter novas substâncias químicas, que nunca foram isoladas de tecidos vegetais (GÓMEZ; LUIZ, 2018).

2.4 O GÊNERO *Lasiodiplodia*

Lasiodiplodia é um gênero de fungos pertencentes a família Botryosphaeriaceae, encontrados especialmente em regiões tropicais e subtropicais, ocorrem em uma ampla variedade de hospedeiros monocotiledôneos, dicotiledôneos e gimnospermas. Eles exibem estilos de vida como endófitos, onde habitam diferentes tecidos vegetais de forma assintomática, como fitopatógenos causando doenças em seus hospedeiros vegetais, essas doenças podem ser cancro em

ramos, caules e raízes, lesões em estacas, folhas, frutos e sementes, além de incitar a morte de mudas e enxertos. Recentemente, foram descritos como patógenos oportunistas em humanos, causando infecções em diferentes níveis de gravidade (DE SILVA *et al*., 2019; SALVATORE; ALVES; ANDOLFI, 2020).

O gênero *Lasiodiplodia* foi identificado por Ellis em 1894; em 1896 Clendenin forneceu uma descrição do gênero e da espécie, atribuindo a identificação do gênero *Lasiodiplodia* a Ellis e Everhardt e especificado como *Lasiodiplodia theobromae* (PHILLIPS *et al*., 2013; TIBPROMMA *et al*., 2018). Acreditava-se que *Lasiodiplodia* poderia representar um possível sinônimo de *Diplodia*, no entanto, estudos filogenéticos demonstraram que ele se agrupa separadamente do *Diplodia*, devido às diferenças filogenéticas e morfológicas e, portanto, não há razão para considerar os dois gêneros como sinônimos (PHILLIPS *et al*., 2013).

As principais características que distinguem o gênero *Lasiodiplodia* de outros gêneros são a presença de paráfises picnidiais e estrias longitudinais em conídios, esporos maduros, formados por mitose responsáveis pela reprodução assexuada. No *Lasiodiplodia*, os conídios geralmente permanecem hialinos por um longo tempo após a formação, mas podem ficar pigmentados e septados enquanto estiverem dentro dos picnídios. Além disso, em *Lasiodiplodia*, os conídios constantemente assumem uma aparência estriada (PHILLIPS *et al*., 2013).

Até o momento, mais de 70 nomes de espécies de *Lasiodiplodia* foram registrados no MycoBank, um banco de dados on-line, que registra novos nomes e combinações micológicas. No entanto, os dados das culturas e da sequência de DNA não estão disponíveis para todas essas espécies. As espécies descritas são separadas com base nos dados da sequência ITS (*Internal Transcribed Spacers*) e TEF-1α (*Translation Elongation Factor* 1α), e com base na morfologia de conídios e parafísias (ABDOLLAHZADEH *et al*., 2010; DE SILVA *et al*., 2019). Algumas das espécies de *Lasiodiplodia* são:

Lasiodiplodia brasiliense: isolado pela primeira vez em Pernambuco, nordeste do Brasil, e por isso recebeu nome referente ao país. Filogeneticamente está intimamente relacionado à *Lasiodiplodia viticula* (DISSANAYAKE *et al*., 2016; MARTINS *et al*., 2018; NETTO *et al*., 2014). Em estudo realizado por Cimmino e colaboladores (2017) foi relatado a síntese de metabólitos lipídicos fitotóxicos produzidos em cultura líquida por *L. brasiliense*, responsável pela morte de videiras, foi citado como responsável pelo efeito citotóxico o ácido jasmônico e (3R, 4S)-4-

hidroxianilina.

Lasiodiplodia hormozganensis: isolado pela primeira vez na província de Hormozgan, no Irã, a partir de *Mangifera indica*, e desde então foi isolado em outras plantas em outros continentes. Filogeneticamente e morfologicamente, esta espécie está intimamente relacionada a *L. citricola*, *Lasiodiplodia egyptiacae*, *L. parva* e *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. (ABDOLLAHZADEH *et al*., 2010; DISSANAYAKE *et al*., 2016; NETTO *et al*., 2014; PHILLIPS *et al*., 2013). Em estudo, isolado da videira, *L. hormozganensis* foi cultivado em meio submerso, onde sintetizou metabolitos fitotóxicos, sendo eles o tirosol e ácido *p*-hidroxibenzóico (CIMMINO *et al*., 2017).

Lasiodiplodia pseudotheobromae: foi descrita pela primeira vez como espécie críptica em *L. theobromae*. Depois foi identificado devido ao tamanho de parafísias nos picnídios (SLIPPERS *et al*., 2014). Também é morfologicamente parecido com *L. crassispora*, mas as duas espécies diferem no fato de as pseudo-paráfises de *L. crassispora* serem septadas, enquanto em *L. pseudotheobromae* são asseptadas. *L. pseudotheobromae* isolado da flor *Illigera rhodantha* foi capaz de sintetizar substâncias bioativas com potencial antibacteriano contra cepas clínicas de *Streptococcus* sp., *Bacteroides vulgatus*, *Peptostreptococcus* sp. e *Veillonella parvula* (WEI *et al*., 2014). Kumar e colaboladores (2019) descreveram dois novos compostos isolados do extrato de clorofórmio do caldo de cultivo de *L. pseudotheobromae*, a lasdiplactona e ácido lasdiplóico, com ação inibitória frente a xantina oxidase.

Lasiodiplodia theobromae: foi originalmente descrito a partir de *Theobroma cacao* (cacaueiro) no Equador. Com a introdução da análise da sequência de DNA na delimitação de espécies em *Lasiodiplodia*, tornou-se aparente que *L. theobromae* representava um complexo de espécies crípticas. Assim, quaisquer relatórios sobre *L. theobromae* anteriores ao uso de sequenciamento de DNA para a identificação de isolados devem ser considerados com cautela, pois é possível que alguns possam de fato se referir a espécies crípticas intimamente relacionadas (DISSANAYAKE *et al*., 2016; PHILLIPS *et al*., 2013; SALVATORE; ALVES; ANDOLFI, 2020; SALVATORE; ANDOLFI; NICOLETTI, 2020).

L. theobromae é um fungo fitopatogênico comumente encontrado em regiões tropicais e subtropicais. Tem sido associado a diversos hospedeiros, causando doenças e sendo responsável por sérios danos em culturas economicamente

importantes (SALVATORE; ALVES; ANDOLFI, 2020).

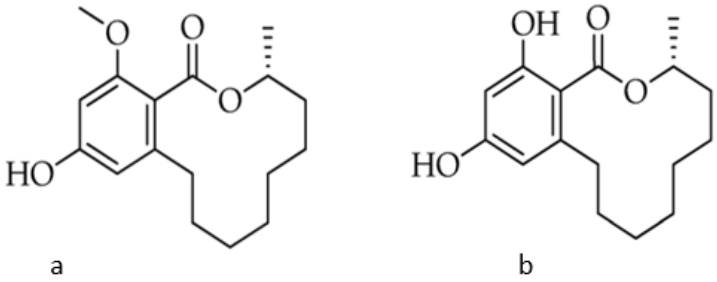
Esse fungo produz metabólitos com grande diversidade estrutural pertencentes a diferentes classes de produtos naturais, incluindo dicetopiperazinas, jasmonatos, lactonas, entre outros (SALVATORE; ALVES; ANDOLFI, 2020). O taxol foi obtido através do cultivo de *L. theobromae* isolado da planta medicinal *Morinda citrifolia,* que demonstrou toxicidade contra as linhagens celulares de câncer de mama (PANDI *et al*., 2011; SAH; SUBBAN; CHELLIAH, 2017). Kamal e colaboladores (2017) isolaram dois compostos conhecidos, a cladospirona B, desmetil-lasiodiplodina do fracionamento de extratos produzidos no cultivo de *L. theobromae* isolado das folhas da planta *Vitex pinnata*. Os dois compostos exibiram atividade antitripanossoma. De acordo com Chen e colaboradores (2016) algumas preussomerinas isoladas de *L. theobromae* exibiram atividades significativas contra *Staphylococcus aureus*. O ácido indol-3-carboxílico (ICA) foi isolado de *L. theobromae* e apresentou vários níveis de inibição bacteriana frente a *Bacillus cereus, Escherichia coli, Salmonella typhimurium* e *S. aureus* (DZOYEM *et al*., 2017; FÉLIX *et al*., 2018).

Extratos orgânicos produzidos por *L. theobromae* são apresentados na literatura, devido suas atividades biológicas. Essa espécie isolada da planta medicinal *Piper hispidum*, produziu extratos eficazes contra quatro bactérias patogênicas humanas (*Enterococcus hirae*, *E. coli*, *Micrococcus luteus* e *S. aureus*) (ORLANDELLI *et al*., 2012). Já o endófito isolado do mangue *Avicennia lanata* nas Filipinas, produziu extrato ativo contra a levedura *Saccharomyces cereviseae* (MORON; LIM, 2018). O extrato de cultura de *L. theobromae* isolado de *Catharanthus roseus* exibiu citotoxicidade contra células de adenocarcinoma cervical humano (DHAYANITHY; SUBBAN; CHELLIAH, 2019).

Relatos sugerem que compostos naturais produzidos por *L. theobromae* e incorporados às nanopartículas têm potencial como um novo agente quimioterápico (SALVATORE; ANDOLFI; NICOLETTI, 2020). *L. theobromae* isolado das folhas de *Psidium guajava* foi usado para a síntese biológica de nanopartículas de prata, que forneceu poderosa atividade antitumoral contra células de câncer de mama e pulmão (JANAKIRAMAN; GOVINDARAJAN; MAGESH, 2019). Nanopartículas de prata também foram preparadas usando *L. theobromae* isolada de *Catharanthus roseus*, induzindo apoptose em vários tipos de células cancerosas e promovendo a eliminação de radicais livres (AKTHER *et al*., 2019).

L. theobromae foi considerado um notável produtor de lasiodiplodinas (FIGURA 3), lactonas de benzenodiol de 12 membros (SALVATORE; ALVES; ANDOLFI, 2020). A primeira lasiodiplodina descrita foi (3R)-lasiodiplodina (a) foi isolada pela primeira vez de *L. theobromae*, juntamente com seu análogo (R)-des-O-metillasiodiplodina (b) (ALDRIDGE *et al*., 1971), sua estrutura e de seus análogos mostram uma ampla gama de atividades biológicas, como atividade antimicrobiana (YANG *et al*., 2006), antagonista do receptor de corticoide (JIANG *et al*., 2011) e citotóxico (HUANG *et al*., 2017; LI *et al*., 2016).

Figura 3 - Estruturas de lasiodiplodinas.



Fonte: adaptado de Salvatore et al (2020).

Extratos brutos obtidos do cultivo submerso de *Lasiodiplodia* sp. isolado de *Handroanthus impetiginosus* apresentaram um perfil antimicrobiano contra patógenos Gram-positivos e leveduras. Foi identificado nos extratos quatro compostos conhecidos com atividade antimicrobiana: (Z)-docos-13-enamida (1), metil-(Z)-octadec-9-enoato (2), (Z)-octadec-9-enamida (3) e dodecanamida (4) (GÓMEZ *et al*., 2021).

Rodríguez-Gálvez e colaboradores (2017) descreveram *Lasiodiplodia* sp. como um patógeno isolado da mangueira *Mangifera indica,* por causar necrose nas folhas, além de afetar os galhos, raízes e floração, levando à morte da planta. Morfologicamente o isolado fúngico, assemelhou-se a *L. parva* e apresentou dimensões conidiais idênticas. Na análise filogenética combinada de ITS e TEF1-α, o isolado foi colocado entre *L. citricola e L. parva*. Os pesquisadores levantaram a hipótese de que o fungo poderia ser um híbrido entre *L. citricola* e *L. parva*.

Lasiodiplodia sp. isolado da planta *Excoecaria agallocha* do mangue em Gaoqiao, na China, produziu quatro novas lasiodiplodinas, juntamente com três

análogos conhecidos, a partir do seu cultivo. Os compostos obtidos exibiram atividade citotóxicas em células cancerígenas (LI *et al*., 2016). Duas novas lasiodiplodinas foram isoladas, juntamente com três análogos conhecidos sintetizados por *Lasiodiplodia* sp. presente na planta *E. agallocha* e apresentaram atividades citotóxicas (HUANG *et al*., 2017).

Os metabólitos produzidos no cultivo do endófito *Lasiodiplodia* sp., isolados das flores da erva medicinal *Viscum coloratum*, são descritos na literatura como compostos aromáticos, incluindo ácido ciclo-(Trp-Ala), ácido indol-3-carboxílico (ICA), indol-3-carbaldeído e 2-feniletanol, todos esses compostos são valiosos para as indústrias farmacêutica e alimentícia, devido suas capacidades antioxidantes, antimicrobianas e antitumorais. *Lasiodiplodia* sp. foi um potente produtor de 2-feniletanol, um composto presente na composição de óleos essenciais florais (QIAN *et al*., 2014).

2.5 CULTIVO SUBMERSO

O cultivo submerso é um processo largamente empregado para a produção de diversos compostos economicamente importantes, muito aplicado na indústria alimentícia, química, farmacêutica, e na agricultura (SINGH *et al*., 2017). A fermentação é um processo metabólico onde há a conversão biológica de substratos complexos em compostos, para obtenção de energia, principalmente com o envolvimento de leveduras, fungos e bactérias (RAIMBAULT, 1998). Vários compostos são sintetizados nos cultivos, tanto metabólitos primários como secundários, os quais geralmente apresentam bioatividade e por isso são importantes para a indústria (TABARAIE *et al*., 2020).

O cultivo pode ser divido em três etapas, que envolvem preparação e inoculação da matéria-prima, o cultivo e recuperação do produto. O cultivo submerso (CS) e o cultivo em estado sólido (CES) são basicamente os dois tipos de processos utilizados (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

O CES se caracteriza por ser um processo que decorre em uma matriz sólida (suporte inerte/substrato) em ausência ou baixa presença de água livre, contudo o substrato requer umidade para favorecer o crescimento e a atividade metabólica dos microrganismos (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). O CES era usado tradicionalmente na produção de metabólitos, como enzimas, ácidos orgânicos e

antibióticos, mas atualmente tem despertado grande interesse para uma série de aplicações, como biorremediação, produção de lipídios, biocombustíveis (biodiesel, bioetanol, biobutanol, biohidrogênio), aromas e sabores para a indústria alimentícia, produção/extração de compostos bioativos, entre outros (LIZARDI-JIMÉNEZ; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, 2017).

O CS se caracteriza por ser um processo que ocorre em meio constituído basicamente por água e substratos (nutrientes) nela dissolvidos, essa técnica apresenta relativa facilidade de cultivo em grande escala, pois garante homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros do processo. O CS é amplamente utilizado para a produção de compostos bioativos, sendo, predominantemente, secretados no caldo de cultivo. Os substratos são consumidos rapidamente, precisando ser constantemente substituídos. Uma vantagem adicional dessa técnica é que a purificação de produtos é mais fácil (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

Em todos os processos, o cultivo é influenciado pelos nutrientes disponíveis no meio: fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, elementos traço como zinco, manganês, ferro, cobre e magnésio (ANASTASSIADIS *et al*., 2008; SOCCOL *et al*., 2006; VANDENBERGHE *et al*., 2017). A escolha correta do substrato é de fundamental importância, as técnicas de cultivo devem ser otimizadas para cada substrato, devido a forma diferente que o microrganismo reage frente a cada substrato. Alguns dos substratos comuns usados no CES são resíduos agroindustriais, já no CS são açúcares solúveis, melaço, meios líquidos, sucos de frutas e vegetais e esgotos/águas residuais (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

O cultivo para obtenção de substâncias bioativas é realizado em meio líquido ou sólido. Vários meios líquidos ou sólidos podem ser escolhidos para a cultura de fungos endofíticos. Para meios líquidos, o caldo Czapek-Dox Broth (CDB), o caldo de extrato de malte (MEB), o caldo de batata dextrose (PDB), o caldo de fosfato levedura amido solúvel (YpSs) e o caldo de extrato de levedura peptona dextrose (PYG) podem ser utilizados. O cultivo pode ocorrer a temperatura ambiente, sob uma condição estática ou agitada, por 6 a 28 dias (PU *et al*., 2013; SHARMA; PRAMANIK; AGRAWAL, 2016; VANDERMOLEN *et al*., 2013; ZHU *et al*., 2017).

A produção de metabólitos secundários por microrganismos é influenciada por vários fatores ambientais, como o meio de cultivo usado, método de cultivo, temperatura, o período de incubação, pH, luz e umidade (KIM; KIM, 2017; TYC *et al*.,

2017). Os meios de cultivo utilizados têm influência direta sobre o tipo e a quantidade de metabólitos produzidos durante a incubação, devido às diferenças no teor de nutrientes e nas vias metabólicas resultantes (HORAK *et al*., 2019).

Nesses processos um dos nutrientes fornecidos ao microrganismo é o carbono. A fonte de carbono não apenas fornece a base para a construção de biomassa, mas também fornece unidades de carbono para metabólitos secundários (PAN *et al*., 2019; SINGH *et al*., 2017). Em células microbianas, a glicose, geralmente é uma excelente fonte de carbono para o crescimento celular, porém, costuma interferir na produção de metabólitos secundários. Em meios contendo misturas de fontes de carbono usadas rápida e lentamente, primeiro a fonte de carbono é utilizada para produzir células, mas pouco ou nenhum metabólito secundário. Após o esgotamento desta primeira fonte de carbono, inicia-se a utilização de uma segunda fonte para ativar a rota metabólica secundária. Uma característica distinta do metabolismo secundário é sua relação com baixos níveis de crescimento celular, portanto, baixas concentrações de fontes de carbono no meio de cultura fornecem baixas velocidades de crescimento celular (DEMAIN, 1989; RUIZ *et al*., 2010).

A fonte de nitrogênio é necessária para a síntese de proteínas essenciais e ácidos nucléicos, e da mesma forma, fornece unidades contendo nitrogênio para metabólitos secundários (PAN *et al*., 2019). O tipo de fontes de carbono e nitrogênio usadas é conhecido por ter uma influência significativa no metabolismo secundário microbiano (RUIZ *et al*., 2010; SINGH *et al*., 2017). Assim, microrganismos cultivados em meio contendo diferentes componentes podem apresentar metabolismo adaptado de forma diferente e produzirem diferentes metabólitos (MA *et al*., 2009).

A extração de substâncias bioativas de fungos endofíticos cultivados em meios líquidos pode ser realizada utilizando solventes orgânicos. A eficácia da extração é um fator crítico para a avaliação das atividades biológicas de extratos de fungos endofíticos. No cultivo com meios líquidos, os caldos devem ser filtrados com papel filtro retirando os micélios, para posterior extração de substâncias bioativas, extracelulares. Volumes iguais de filtrado e solvente orgânicos são adicionados para extrair as substâncias do filtrado (VERMA; JOHRI; PRAKASH, 2014). Os micélios também podem ser submetidos à extração para determinação de compostos bioativos intracelulares (ZHANG; WEI; WANG, 2012).

O acetato de etila é amplamente utilizado na extração de culturas de fungos endofíticos (BHARDWAJ *et al*., 2015; MINARNI *et al*., 2017), por possuir polaridade média, sendo capaz de dissolver os compostos ativos moderadamente polares e não polares. Os solventes não interferem de forma direta no efeito sobre a atividade biológica de extratos, uma vez que são evaporados, para obtenção de extratos orgânicos secos (NURUNNABI *et al*., 2020).

Os produtos obtidos no cultivo devem apresentar um rendimento adequado, de acordo com a quantidade de substrato, para melhor aplicação do processo na indústria. Há vários relatos de microrganismos que produzem uma diversidade de metabólitos primários e secundários, mas em baixa quantidade. Para atender à demanda do mercado, várias técnicas de alto rendimento foram e estão sendo implementadas para o sucesso em vários processos (DUBEY; JAWED; HAQUE, 2011; RAJESWARI *et al*., 2014; SINGH *et al*., 2009).

Estudos de otimização de fatores físicos (temperatura, salinidade, valor de pH e luz) e químicos (componentes, precursores e inibidores) do meio de cultivo (MIAO; KWONG; QIAN, 2006) são geralmente realizados nas indústrias química, alimentícia e farmacêutica, para obtenção de maior rendimento e da atividade do produto desejado. Atualmente, há pouco conhecimento disponível sobre o papel dos fatores e seus níveis no controle da produção de metabólitos por diferentes cepas. Para aumentar a produtividade dos metabólitos, os pesquisadores investigam os requisitos nutricionais para a produção de metabólitos secundários (SHIH; VAN; CHANG, 2002; SINGH; RAI; TRIPATHI, 2012).

2.6 OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS

O planejamento experimental traduzido do termo *Design of Experiments* (DOE), é uma metodologia utilizada para estabelecer quais variáveis interferem na resposta de um processo ou produto e como utilizá-las a seu favor, permitindo alcançar uma melhor combinação das variáveis com o intuito de otimizar o produto final ou o processo, através de maior precisão estatística possível na resposta e menor custo (BACO *et al*., 2019; NARENDERAN; MEYYANATHAN; KARRI, 2019; UHORANINGOGA *et al*., 2018). Essa técnica tem sido aplicada para melhorar processos desde a década de 1940 nas indústrias e no setor militar. Mas só depois de mais de meio século o planejamento experimental tem exercido uma função

importante em outros setores em consequência das vantagens na otimização de variáveis individuais clássicas, que possibilita utilizar um número reduzido de experimentos, gerando grande quantidade de informações, além de viabilizar a avaliação do efeito de interação entre as variáveis na resposta, obtendo resultados mais confiáveis, com economia de tempo e dinheiro (NARENDERAN; MEYYANATHAN; KARRI, 2019).

A partir de um grande número de variáveis independentes que podem afetar a resposta desejada, o uso do DOE, desenvolvido por Plackett e Burman em 1946, oferece uma alternativa para uma avaliação preliminar dos principais efeitos dessas variáveis sobre a resposta, bem como para redefinir as faixas de valores estudadas, e para selecionar as variáveis que podem ser fixadas ou eliminadas em um outro planejamento fatorial completo, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), que envolve a construção de modelos preditivos para atingir as condições ótimas de processo (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005; PLACKETT; BURMAN, 1946; RODRIGUES; IEMMA, 2014; SILVA *et al*., 2019; YUN *et al*., 2018).

Para seleção do melhor projeto experimental, o pesquisador deve considerar vários aspectos, como objetivos definidos, as variáveis a serem estudadas, e eficácia de cada método. As metodologias de planejamento experimental podem ser aplicadas em dois tipos: 1) projetos de triagem, onde há a seleção das variáveis; e 2) projetos de otimização, onde há a melhora das condições (TABELA 2) (BACO *et al*., 2019; BEZERRA *et al*., 2008; POLITIS *et al*., 2017; RODRIGUES; IEMMA, 2014; VERA CANDIOTI *et al*., 2014).

Tabela 2 – Etapas para otimização de processos.

Etapas	**Objetivos**	**Situação**
Seleção de variáveis (Fatorial fracionado ou Plackett & Burman)	Identificar as variáveis mais importantes	Inúmeros fatores Pouco conhecimento do processo
Melhora de condições (Fatorial completo)	Construir os modelos preditivos	Poucos fatores Dentro de uma região ótima do processo
Validação das condições otimizadas	Confirmar experimentalmente os resultados obtidos pela análise da superfície de resposta	Condições otimizadas definidas

Fonte: adaptada de RODRIGUES; IEMMA (2014).

A principal vantagem dos projetos de otimização está na possibilidade de modelar superfícies de resposta de 2ª ordem, pois possuem de 3 a 5 níveis para cada fator de entrada. Em outras palavras, esses projetos permitem avaliar a curvatura da superfície de resposta (BACO *et al*., 2019). A metodologia de superfície de resposta (RSM – *Response Surface Methodology*) foi proposta por Box, fundamentada em fatorais, na década de 1950, mas seu emprego só foi acentuado a partir dos anos 1990, em virtude, principalmente, da crescente necessidade de otimização de processos e produtos, levando profissionais de diferentes áreas pesquisarem técnicas sistemáticas de planejamento experimental e otimização de processos (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Técnicas matemáticas e estatísticas são utilizadas pela metodologia de superfície de respostas, que são fundamentais para o desenvolvimento, melhoria e otimização de processos, onde há a influência de diversas variáveis sob a resposta de interesse (ASHOK; KUMAR, 2017; MÄKELÄ, 2017). Este planejamento determina o efeito de cada variável independente sozinha ou em combinações, permite o cálculo dos efeitos e a análise da superfície de resposta, gerando um modelo matemático que descreve os processos (BACO *et al*., 2019; RODRIGUES; IEMMA, 2014). O modelo matemático deve ser selecionado com base na aplicação da Análise de Variância (ANOVA). A ideia principal da ANOVA é comparar a variabilidade devido ao tratamento (variando o nível dos fatores de entrada) com a variabilidade devido ao erro residual. A partir dessa comparação, é possível avaliar a significância do modelo de regressão (BACO *et al*., 2019; BEZERRA *et al*., 2008; POLITIS *et al*., 2017; VERA CANDIOTI *et al*., 2014).

A otimização das condições do processo de cultivo, são fundamentais no desenvolvimento de todos processos, em razão do seu impacto nos custos e na efetividade do processo. A RSM é uma técnica muito utilizada para encontrar as condições ideais no processo de cultivo submerso, de modo que atendam às necessidades nutricionais de um microrganismo específico, evitando assim a adição desnecessária de componentes em excesso no meio de cultura, e eficiente na otimização com inúmeras variáveis requisitando um número mínimo de experimentos. As superfícies de resposta geradas por esta metodologia têm a finalidade de alcançar as condições ideais pretendidas (BACO *et al*., 2019; BOX; HUNTER; HUNTER, 2005; YUN *et al*., 2018).

3 METODOLOGIA

Foi utilizado o fungo endofítico do gênero *Lasiodiplodia* sp. isolado a partir de folhas sadias do ipê roxo (*Handroanthus impetiginosus*) coletado em Alfenas-MG, Brasil. O fungo foi identificado, por análise sequencial do DNA e análise filogenética (AGOSTINI, 2016).

3.1 REPIQUE DO FUNGO

Placas de Petri com ágar batata dextrose (PDA) foram utilizadas para o repique do fungo preservado segundo a metodologia de Castellani (DE CAPRILES; MATA; MIDDELVEEN, 1989), o fungo permaneceu em crescimento por 4 dias em temperatura ambiente.

3.2 CULTIVO DO FUNGO

Para o cultivo do fungo foi utilizado o caldo Czapek (Glicose: 30,0 g; $NaNO_3$: 2,0 g; K_2HPO_4: 1,0 g; $MgSO_4.7H_2O$: 0,5 g; KCl: 0,5 g; $FeSO_4.7H_2O$: 0,01 g; extrato de levedura: 1,0 g; água destilada: 1000 mL). Dois discos de 5 mm de PDA com o fungo crescido foram inoculados em erlenmeyers. Foram utilizados erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de caldo Czapek. O cultivo foi realizado em modo estático em estufa DBO, a 28^{o}C, por 27 dias e em modo agitado em shaker a 27°C e 250 rpm por 16 dias. Após 03, 06, 09, 12, 15, 18, 21, 24, e 27 dias de cultivo do fungo em modo estático, foram retirados três erlenmeyers por vez, para medida de biomassa, obtenção do extrato orgânico e avaliação da sua atividade biológica. E após 02, 04, 06, 08, 10, 12, 14, 16 dias de cultivo do fungo em modo agitado, foram retirados três erlenmeyers por vez, para medida de biomassa, obtenção do extrato orgânico e avaliação da sua atividade biológica.

3.2.1 Obtenção da biomassa seca

A biomassa, micélio fúngico, foi obtida após realização de processo de filtração à vácuo do caldo de cultivo, foi utilizado o papel de filtro Whatman n°1

previamente seco em estufa, em temperatura de 45°C por 24h, sua massa foi medida e anotada. A secagem da biomassa foi realizada em estufa com temperatura de 45°C, seu peso foi acompanhado a cada 24h, e a massa considerada foi aquela na qual não se notou variação até a segunda casa depois da vírgula. Para o cálculo da biomassa seca foi subtraída a massa obtida após a secagem pela massa do papel de filtro utilizado (SINGH; SINGH, 2006).

3.2.2 Obtenção dos extratos orgânicos secos

Os metabólitos secundários sintetizados por fungos endofíticos são majoritariamente extracelulares, liberados no meio de cultivo, por isso se faz necessário a extração com solventes orgânicos, para obtenção desses compostos (BUSTANUSSALAM *et al*., 2015).

O caldo de cultivo foi submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila como solvente orgânico, na proporção de 1:1 (v/v). As extrações foram efetuadas em três etapas. Os extratos obtidos no cultivo em modo estático foram identificados como ELd (01 a 09) e os obtidos no cultivo em modo agitado foram identificados como ALd (01 a 08). A fase orgânica foi evaporada, inicialmente em rotaevaporador e, depois, em capela de exaustão (SALINI *et al*., 2015).

3.3 TESTE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.3.1 Microrganismos utilizados e preparo dos inóculos para ensaios antimicrobianos

Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albican*s (ATCC 10238), disponíveis no banco de cepas do Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL-MG. Estas cepas foram previamente cultivadas (24 horas antes) e suas suspensões foram preparadas utilizando espectrofotômetro, a partir de solução salina (NaCl 0,9%) estéril de modo a fornecer $1,5x10^8$ UFC/mL (75% de transmitância em 660nm), correspondente com a escala 0,5 de McFarland. Para a realização destes ensaios foi adotado procedimento descrito por CLSI (2015, 2008), com algumas modificações.

A partir da suspensão pronta de cada microrganismo, foi transferido 1 mL de

cada suspensão para 9 mL de solução salina 0,9 %, da qual foram retirados 2 mL, transferidos para 10 mL de caldo Mueller Hinton (MH) para bactérias e caldo RPMI-1640 para leveduras. Desta última suspensão foram retiradas alíquotas de 20 µL de inóculo e adicionadas após diluição seriada do extrato teste e/ou antimicrobiano.

3.3.2 Preparo das amostras

A solução do extrato teste foi preparada dissolvendo 1 mg do extrato orgânico seco em 125µL de álcool etílico absoluto.

3.3.3 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM)

Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 100 µL de meio MH ou caldo RPMI-1640 em cada poço, de acordo com o microrganismo utilizado. A seguir, 20 µL da amostra solubilizada em etanol e 80µL de meio foram adicionados ao primeiro poço de cada fileira da placa. A diluição da amostra na microplaca começou a partir da transferência de 100 µL do primeiro poço para os poços consecutivos, até o último poço, onde 100 µL foram desprezados, para que todos os poços contenham 100 µL. Após a diluição, 80 µL de meio MH ou caldo RPMI-1640 e 20 µL do inóculo, previamente preparado, foram transferidos para todos os poços, exceto para os controles. O volume final em cada poço foi de 200 µL. Como controles positivos foram utilizadas a amoxicilina e estreptomicina (10 – 0,078 $\mu g.mL^{-1}$) para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente, e o fluconazol (80 – 0,625 $\mu g.mL^{-1}$) para leveduras. Além disso, o meio de cultura e os patógenos foram também empregados como controles.

O ensaio foi conduzido em triplicata, e as microplacas foram incubadas a 37ºC por 22 horas, após esse tempo foi adicionado 20 µL de revelador resazurina 0,2% por poço e a leitura foi realizada após 2 horas de incubação. A presença de coloração azul é indicativa de extrato com ação inibitória frente ao microrganismo testado, e a coloração rosa, evidencia que o microrganismo não foi inibido com as concentrações testadas dos extratos (até 400 $\mu g/mL^{-1}$) (SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007). A concentração mais baixa, na qual não houve mudança de cor foi tomada como o valor de CIM.

Para a avaliação da concentração microbicida mínima (CMM) foram utilizados, como inoculo, as soluções dos poços onde não houve crescimento microbiano no teste de CIM, para amostras e antimicrobianos. Foram retirados 25 µL de cada poço e inoculados em placa de Petri com ágar MH para bactérias ou ágar Sabouraud para levedura, e, posteriormente, as placas foram incubadas a 37ºC por 24 horas. O crescimento bacteriano ou fúngico na placa indica que o extrato não exerceu uma ação bactericida/fungicida. Caso contrário, a ausência de crescimento é um indicativo de ação bactericida/fungicida.

3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Tendo em vista uma avaliação mais precisa da influência dos parâmetros utilizados no processo de cultivo submerso de *Lasiodiplodia sp.*, foi utilizado o DCCR. Foi realizado um fatorial completo 2^3, incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios. As variáveis independentes foram a concentração de fonte de carbono (sacarose e glicose) e a concentração da fonte de nitrogênio ($NaNO_3$). E como variável dependente foi avaliada a massa de extrato seco (EtOAc) expressa em mg. Os níveis foram definidos baseados em estudos que visavam a biossíntese de metabolitos secundários a partir de fungos endofíticos (ARORA; KAUR, 2019; CHAICHANAN *et al*., 2014; ENG *et al*., 2016; LIU *et al*., 2015; QIAN *et al*., 2014). A Tabela 3 mostra os parâmetros utilizados no planejamento, em valores codificados e reais, para os níveis inferior, central, superior e pontos axiais.

Tabela 3 - Valores reais e codificados, e níveis dos fatores estudados no planejamento.

Variáveis	**Código**	**-1,68**	**-1**	**0**	**+1**	**+1,68**
Glicose (g/L)	x_1	0	6	15	24	30
Sacarose (g/L)	x_2	0	6	15	24	30
$NaNO_3$ (g/L)	x_3	0,30	0,85	1,65	2,45	3

Fonte: DO AUTOR (2021).

O DCCR teve por objetivo otimizar o meio de cultivo do endófito *Lasiodiplodia* e selecionar o experimento com maior produção do extrato orgânico acetato de etila, após secagem do solvente. Os cultivos submersos foram realizados em erlenmeyers

de 500 mL contendo 100 mL do meio Czapek, (K_2HPO_4: 1,0 g; $MgSO_4.7H_2O$: 0,5 g; KCl: 0,5 g; $FeSO_4.7H_2O$: 0,01 g; extrato de levedura: 1,0 g; água destilada: 1000 mL), variando as concentrações das variáveis independentes de acordo com a matriz do planejamento, e então distribuído em erlenmeyers, os quais foram autoclavados. Após atingir a temperatura ambiente, aos meios de cultivo foram inoculados dois discos de 5 mm de PDA com o fungo crescido e incubados em estufa DBO, a 28^{o}C, por 12 dias.

Para obtenção da variável dependente, EtOAc, o caldo obtido após o cultivo foi submetido a extração líquido-líquido com acetato de etila, como solvente orgânico. A massa obtida foi utilizada para prosseguimento no planejamento experimental.

Os resultados obtidos foram avaliados mediante a aplicação da ANOVA e foi utilizado um modelo de segunda ordem ($y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + e$). Utilizou-se o software Protimiza Experimental Design para as análises gráficas e de regressão. Os efeitos das variáveis independentes foram verificados, para um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A análise incluiu o teste F calculado, sua probabilidade associada p-valor (F), e coeficiente de determinação R^2, que mede o ajuste do modelo de regressão aos dados experimentais.

A partir dos modelos de predição obtidos pelo DCCR foram determinadas as melhores condições operacionais para a produção de extrato. Nestas condições, foram realizados ensaios, em triplicata, a fim de validar o modelo e determinar os desvios entre os resultados preditos e experimentais.

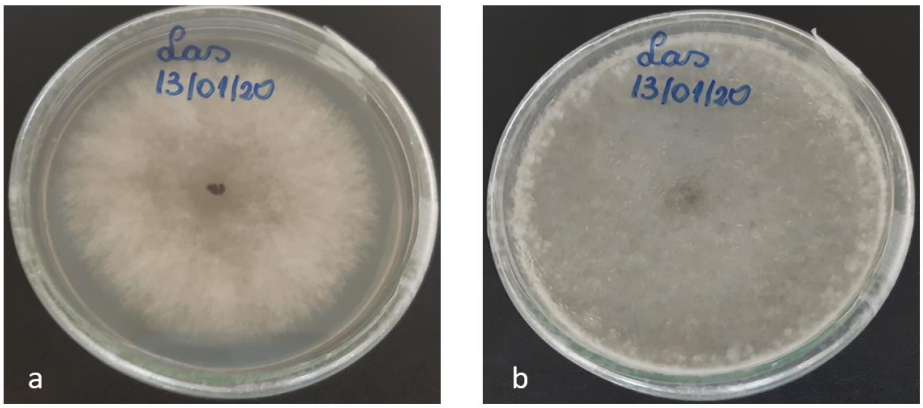
Uma nova curva de crescimento foi realizada na condição otimizada, para se determinar o melhor tempo de cultivo do fungo, para obtenção de maior quantidade de extrato acetato-etílico com melhor atividade antimicrobiana.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 REPIQUE DO FUNGO *Lasiodiplodia* sp.

O gênero *Lasiodiplodia* pode ser cultivado em meio ágar batata dextrose (PDA) onde cresce rapidamente entre 20 a 30 °C, com micélios aéreos moderadamente denso, de coloração branca (a) e após aproximadamente 4 dias com micélios aéreos espesso, de coloração cinza (b) (FIGURA 4). Em PDA, o crescimento micelial, a pigmentação e a produção de picnídio são amplamente afetadas pelas concentrações de dextrose no meio. Quanto maior a concentração de dextrose, maior a produção de pigmentos e menor a formação de picnídio (QIAN *et al.*, 2014; ZHANG, 2014).

Figura 4 - Cultivo de *Lasiodiplodia* sp. em PDA.



Fonte: DO AUTOR (2020).
Legenda: a) crescimento fúngico de *Lasiodiplodia sp.* em 02 dias em PDA.
b) crescimento fúngico de *Lasiodiplodia sp.* em 04 dias em PDA.

4.2 CULTIVO SUBMERSO EM MODO ESTÁTICO E AGITADO DE L*asiodiplodia* sp.

É imprescindível a utilização de metodologias confiáveis e convenientes para avaliar o crescimento fúngico. Entretanto, o crescimento de fungos endofíticos, diferente de leveduras e bactérias, se apresenta na forma de hifas e não como células isoladas, o que dificulta o emprego de técnicas usuais, como as contagens de células viáveis (BERTRANDA, 2019; CAFÊU *et al.*, 2005). Langvad (1999) descreve que o crescimento de fungos endofíticos em meio de cultura líquido pode

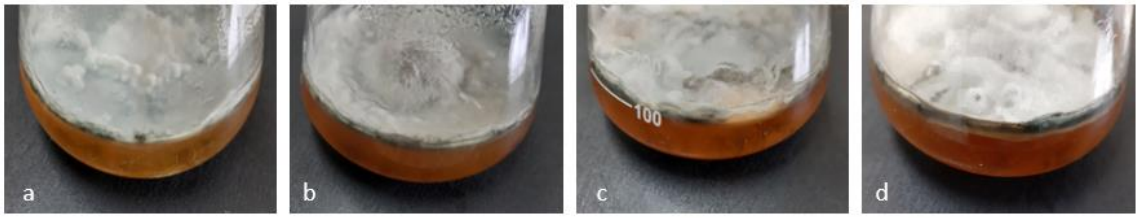
ser medido através do aumento da massa seca dos micélios cultivados em erlenmeyers tanto em modo agitado como estático.

4.2.1 Cultivo em modo estático

O cultivo do endófito *Lasiodiplodia* sp., em meio Czapek em modo estático em estufa DBO, foi registrado ao longo de 27 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata e foi possível observar que os micélios cresceram na superfície do meio nos erlenmeyers, formando uma camada espessa de hifas emaranhadas (FIGURA 5).

A produção de massa seca e a massa do extrato acetato de etila são apresentados na Tabela 4. Os resultados mostram que os maiores rendimentos, em massa seca de micélio fúngico, ocorreram entre o 9º e o 18º dia de cultivo e que a massa máxima obtida foi de 862 mg com 18 dias de cultivo para 300 mL de caldo de cultivo. No que se refere a produção de massa seca do extrato acetato-etílico a quantidade máxima foi de 154 mg com 12 dias de cultivo. Entretanto é importante ressaltar que nem sempre o aumento no rendimento da massa seca do extrato orgânico produzida é proporcional ao aumento da produção de metabólitos de interesse (GARYALI; KUMAR; REDDY, 2014).

Figura 5 - Cultivo de *Lasiodiplodia sp.* em meio Czapek em estufa DBO.



Fonte: DO AUTOR (2020).
Legenda: a) 9º dia de cultivo de *Lasiodiplodia sp.* em erlenmeyer estático.
b) 12º dia de cultivo de *Lasiodiplodia sp.* em erlenmeyer estático.
c) 15º dia de cultivo de *Lasiodiplodia sp.* em erlenmeyer estático.
d) 18º dia de cultivo de *Lasiodiplodia sp.* em erlenmeyer estático.

Tabela 4 - Massas seca dos micélios fúngicos e massas seca dos extratos acetato-etílicos de *Lasiodiplodia* sp. cultivado em meio Czapek em estufa DBO.

Tempo (dias)	Extrato	Volume de caldo de cultivo (ml)	Massa seca do micélio fúngico (mg)	Massa seca do extrato (mg)
03	ELd-1	300	390 ± 54*	16
06	ELd-2	300	615 ± 47*	58
09	ELd-3	300	835 ± 40*	84
12	ELd-4	300	844 ± 75*	154
15	ELd-5	300	860 ± 80*	108
18	ELd-6	300	862 ± 25*	89
21	ELd-7	300	701 ± 65*	67
24	ELd-8	300	686 ± 103*	61
27	ELd-9	300	480 ± 78*	69

Fonte: DO AUTOR (2020).
* Média ± desvio padrão para 3 repetições

Com os dados da Tabela 4, foi possível construir uma curva de crescimento do fungo *Lasiodiplodia* sp. baseado na massa seca do micélio. As curvas de crescimento descrevem a densidade das populações de células na cultura líquida ao longo do tempo (RAM *et al*., 2019). O formato de uma curva de crescimento é afetado, se não determinado, pela natureza do primeiro nutriente essencial esgotado e pela capacidade do organismo em lidar com sua restrição. Isso foi demonstrado por estudos sistemáticos envolvendo a bactéria *Klebsiella pneumoniae* (WANNER; EGLI, 1990) e o fungo *Gibberella fujikuroi* (BORROW *et al*., 1961; BORROW *et al*., 1964). Nos dois organismos, o primeiro nutriente empobrecido foi decisivo para o progresso adicional da curva de crescimento.

De acordo com a literatura vários fatores influenciam o progresso de crescimento microbiano, como a natureza e quantidade da fonte de carbono utilizada, a sequência de esgotamento dos nutrientes, a reutilização de metabólitos previamente excretados, nutrientes que cumpram funções metabólicas semelhantes (por exemplo, potássio e sódio ou fontes de carbono diferentes) que podem se substituir ou se complementarem, o estado fisiológico e morfológico do inoculo e a densidade celular (VRABL *et al*., 2019).

Uma curva de crescimento microbiano típica é composta basicamente pela fase lag, em que ocorre a adaptação do microrganismo no meio, não há um grande aumento populacional. A fase log, no qual há um aumento populacional logarítmico

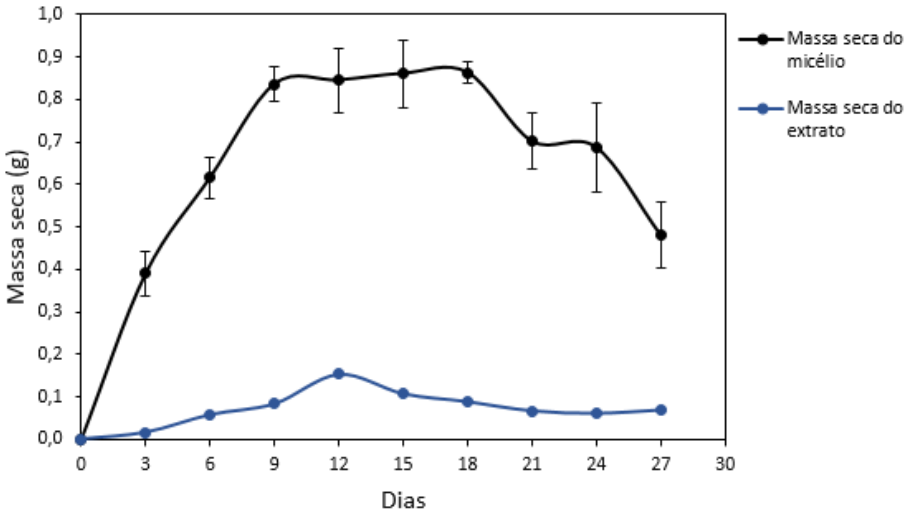
ou exponencial. A fase estacionária, na qual há um equilíbrio entre morte e produção celular, a interrupção do crescimento microbiano pode se dar pela cessação de nutrientes, mudanças no pH, produção de metabolitos tóxicos para a célula, dentre outros, e a fase de declínio, onde o número de células mortas ultrapassa o número de novas células (BERTRANDA, 2019; BUCHANAN, 1918; HAMILL *et al*., 2020; WANNER; EGLI, 1990).

A curva de crescimento do *Lasiodiplodia* sp. em meio estático (FIGURA 6) obtida, não apresenta visualmente a fase lag. A fase lag mínima, para germinação de conídios pode abranger algumas horas, se o fungo estiver em condições de estresse (HAMILL *et al*., 2020).

A partir da inoculação do fungo até o 9º dia (ELd-3) pode-se observar que a curva apresentou uma inclinação acentuada, no qual, o crescimento fúngico exponencial é atribuído a fatores e condições favoráveis, como a quantidade e a natureza da fonte de carbono e de nitrogênio e outros nutrientes disponíveis (VRABL *et al*., 2019), havendo também um acréscimo equiparável relacionado à massa do extrato acetato-etílico.

A fase estacionária pode ser observada do 9º (ELd-3) ao 18º dia (ELd-6) com o ápice de produção de massa seca do micélio fúngico. Nas condições do estudo pode-se sugerir que neste período, o fungo está apto a produzir maiores quantidades de massa seca de extrato acetato etílico na fase estacionária, alguns trabalhos reportam que os metabolitos secundários são produzidos frequentemente quando o crescimento diminui ou cessa, devido à exaustão de nutrientes (RUIZ *et al*., 2010; YIN *et al*., 2009; YIN; SUN, 2011). A partir do 18º dia, é possível observar um declínio do crescimento fúngico e da produção de extrato.

FIGURA 6 - Curva de crescimento do *Lasiodiplodia* sp. cultivado meio Czapek em estufa DBO e produção de extrato acetato etílico



Fonte: DO AUTOR (2020).

4.2.2 Cultivo em modo agitado

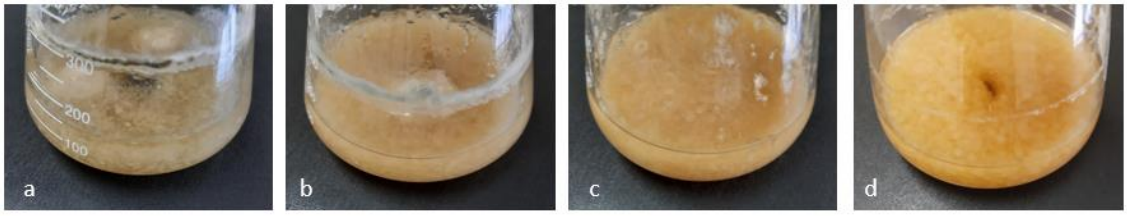
O cultivo do endófito *Lasiodiplodia* sp., em caldo Czapek, em modo agitado em shaker, foi registrado ao longo de 16 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata e foi possível observar que os micélios cresceram no meio de cultura em forma de grânulos (FIGURA 7) em vez de filamentos, observados no cultivo estático. Em cultivos submersos, a agitação dos frascos faz com que haja mais oxigênio disponível para as células, influenciando no tamanho e na estrutura dos micélios (IBRAHIM, 2015; SANKPAL; JOSHI; KULKARNI, 2001; VEITER; RAJAMANICKAM; HERWIG, 2018).

A produção de biomassa seca e a massa do extrato acetato de etila são apresentados na Tabela 5. Os resultados mostram que os maiores rendimentos, relacionados à massa seca de micélio fúngico foram do 4º ao 10º dia, e que a massa máxima obtida foi de 1403 mg com 8 dias de cultivo. No que se refere a produção de massa seca do extrato acetato-etílico a quantidade máxima foi de 101 mg com 10 dias de cultivo, o que não garante o aumento da produção de metabólitos de interesse (GARYALI; KUMAR; REDDY, 2014).

A agitação dos erlenmeyers onde os fungos foram inoculados possibilitou um maior crescimento fúngico em um menor intervalo de tempo, que pode ser observado nas massas secas do micélio, entretanto, essa agitação não influenciou

positivamente a produção de massa seca de extrato acetato-etílico.

Figura 7 - Cultivo de Lasiodiplodia sp. em meio Czapek em shaker.



.

Fonte: DO AUTOR (2020).
Legenda: a) 4º dia de cultivo de *Lasiodiplodia sp.* em erlenmeyer agitado.
b) 6º dia de cultivo de *Lasiodiplodia sp.* em erlenmeyer agitado.
c) 8º dia de cultivo de *Lasiodiplodia sp.* em erlenmeyer agitado.
d) 10º dia de cultivo de *Lasiodiplodia sp.* em erlenmeyer agitado.

Tabela 5 - Massas secas dos micélios fúngicos e massas seca dos extratos acetato-etílico de *Lasiodiplodia* sp. cultivado em meio Czapek em shaker.

Tempo (dias)	**Extrato**	**Volume de caldo de cultivo (ml)**	**Massa seca do micélio fúngico (mg)**	**Massa seca do extrato (mg)**
02	ALd-1	300	536 ± 88*	16
04	ALd-2	300	1302 ± 260*	31
06	ALd-3	300	1311 ± 189*	60
08	ALd-4	300	1403 ± 409*	94
10	ALd-5	300	1294 ± 127*	101
12	ALd-6	300	978 ± 177*	75
14	ALd-7	300	1096 ± 42*	64
16	ALd-8	300	967 ± 188*	47

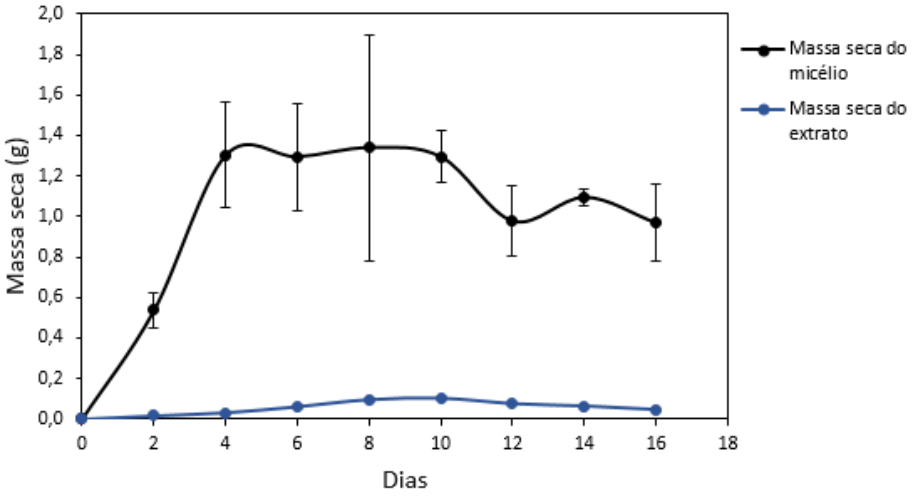
Fonte: DO AUTOR (2020).
* Média ± desvio padrão para 3 repetições

A curva de crescimento do *Lasiodiplodia* sp. cultivado em modo agitado (FIGURA 8), também não apresenta visualmente a fase lag. A partir da inoculação do fungo até o 4º dia (ALd-2) pode-se observar que a curva apresentou uma inclinação acentuada, que comprova estas observações. Havendo também um acréscimo equiparável relacionado à massa do extrato acetato-etílico.

A fase estacionária pode ser observada do 4º (ALd-2) ao 10º dia (ALd-5). Nas condições do estudo podemos determinar que o fungo está apto a produzir maiores quantidades de massa seca do extrato acetato-etílico na fase estacionária, em conformidade com estudos que demonstraram que metabólitos secundários são

produzidos frequentemente quando o crescimento do fungo diminui ou cessa (YIN *et al.*, 2009; YIN; SUN, 2011). Após o 10º dia de cultivo, observou-se um declínio do crescimento fúngico e da produção de extrato acetato-etílico.

FIGURA 8 - Curva de crescimento do Lasiodiplodia sp. cultivado meio Czapek em shaker produção de extrato acetato etílico.



Fonte: DO AUTOR (2020).

4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS

Os extratos acetato-etílicos obtidos após os cultivos foram analisados quanto seu potencial antimicrobiano, o qual foi comparado aos parâmetros estabelecidos por Holetz e colaboladores (2002) que se assemelham aos estabelecidos por Kuete (2010) e Kuete e Efferth (2010), que determinam a atividade antimicrobiana de um extrato vegetal como forte para CIM inferior a 100 µg.mL^{-1}, moderada para CIM entre 100 e 500 µg.mL^{-1}, fraca para CIM entre 500 e 1000 µg.mL^{-1} e inativa para CIM acima de 1000 µg.mL^{-1}.

Para o cultivo em modo estático não houve inibição satisfatória de todos os extratos frente a *Escherichia coli* (CIM > 400 µg.mL^{-1}). Contudo, os extratos ELd-1, ELd-2, e ELd-3 avaliados contra *Staphylococcus aureus* apresentaram consideráveis valores de CIM entre 50-100 µg.mL^{-1}, classificados como atividade antimicrobiana forte, de acordo com os critérios citados. Nas condições do estudo, a inibição do crescimento do patógeno foi devido ao efeito bacteriostático do extrato (CMM > 400 µg.mL^{-1}) (TABELA 6).

Em relação aos testes com levedura (*Candida albicans*), o extrato ELd-2 e EdE-3 apresentaram valores de CIM (12,5-25 µg.mL-^{1}) e CMM (25-50 µg.mL-^{1}) respectivamente, se destacando entre os extratos testados com um bom efeito fungicida (TABELA 6). Os extratos ELd-1 (CIM 50-100 µg.mL^{-1}) e ELd-4 e 5 com CIM entre 100-200 µg.mL^{-1} (atividade antimicrobiana moderada), também se mostraram promissores. Desta forma, os extratos ELd-2 (6º dia de cultivo) e ELd-3 (9º dia de cultivo), se destacaram, apresentando a maior atividade antimicrobiana frente aos patógenos testados.

Tabela 6 - Atividade antimicrobiana dos extratos acetato etílico de *Lasiodiplodia* sp. cultivado em meio Czapek em estufa DBO.

Amostras	**CIM (µg.mL^{-1})**			**CMM (µg.mL^{-1})**		
	S. aureus	*E. coli*	*C. albicans*	*S. aureus*	*E. coli*	*C. albicans*
ELd-1	50-100	>400	50-100	>400	>400	50-100
ELd-2	50-100	>400	12,5-25	>400	>400	25-50
ELd-3	50-100	>400	12,5-25	>400	>400	25-50
ELd-4	200-400	>400	100-200	>400	>400	200-400
ELd-5	200-400	>400	100-200	>400	>400	200-400
ELd-6	200-400	>400	200-400	>400	>400	>400
ELd-7	200-400	>400	>400	>400	>400	>400
ELd-8	>400	>400	>400	>400	>400	>400
ELd-9	200-400	>400	>400	>400	>400	>400
Antimicrobianos	0,078 -0,156	3,125-6,25	2,5-5	5-10	20-40	2,5-5

Fonte: DO AUTOR (2020).

É possível observar que as amostras que apresentaram os melhores valores para CIM (ELd-1, ELd-2, ELd-3), obtidas nos primeiros dias de cultivo do *Lasiodiplodia* sp., exibiram resultados opostos para massa de extrato acetato-etílico, com baixos valores, quando comparado aos demais. Entende-se então que, esse intervalo de tempo de cultivo, de até nove dias, é interessante para a obtenção de compostos com atividade antimicrobiana, porém, é necessário a otimização do meio de cultivo para obtenção de maior rendimento do extrato acetato-etílico, visto que sua atividade biológica se mostrou promissora, mas seu rendimento foi baixo.

Os extratos acetato-etílicos obtidos no cultivo em modo agitado, também foram analisados quanto a sua capacidade antimicrobiana. Os patógenos utilizados também foram *S. aureus, E. coli* e *C. albicans.* O extrato ALd-2, obtido no início do

cultivo, apresentou melhor valor de CIM (50-100) µg.mL^{-1} para a bactéria *S. aureus*, os demais extratos também apresentam inibição frente a bactéria com CIM variando na faixa de concentração de 100-400 µg.mL^{-1}. O resultado da CMM mostrou que a inibição ocorreu devido ao efeito bacteriostático dos extratos. O cultivo em modo agitado também não gerou extratos orgânicos com atividade relevante contra *E. coli* (CIM >400 µg.mL^{-1}), sugerindo que o fungo *Lasiodiplodia* sp. pode não estar produzindo substâncias capazes de inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas (TABELA 7).

No que se refere a *C. albicans*, ALd-1 e ALd-2 se destacaram, apresentando CIM e CMM entre 25-50 µg.mL^{-1}, com potencial atividade fungicida. Os extratos ALd-3 e ALd-4 com CIM e CMM variando na faixa de concentração de 100-400 µg.mL^{-1}, também se mostraram promissores. À vista disso, o extrato ALd-2 (4º dia de cultivo) se destacou, por apresentar a maior atividade antimicrobiana frente aos patógenos testados.

Tabela 7 - Atividade antimicrobiana dos extratos acetato-etílico de *Lasiodiplodia* sp. cultivado em meio Czapek em shaker.

Amostras	**CIM (µg.mL^{-1})**			**CMM (µg.mL^{-1})**		
	S. aureus	*E. coli*	*C. albicans*	*S. aureus*	*E. coli*	*C. albicans*
ALd-1	100-200	>400	25-50	>400	>400	25-50
ALd-2	50-100	>400	25-50	>400	>400	25-50
ALd-3	100-200	>400	100-200	>400	>400	100-200
ALd-4	200-400	>400	100-200	>400	>400	200-400
ALd-5	200-400	>400	200-400	>400	>400	>400
ALd-6	200-400	>400	200-400	>400	>400	>400
ALd-7	200-400	>400	200-400	>400	>400	>400
ALd-8	200-400	>400	>400	>400	>400	>400
Antimicrobianos	0,078-0,156	3,125-6,25	2,5-5	5-10	20-40	2,5-5

Fonte: DO AUTOR (2020).

Assim como os extratos obtidos no cultivo em modo estático, os extratos obtidos no cultivo em modo agitado, também apresentaram inibição sobre os patógenos *S. aureus* e *C. albicans*. É possível observar que as amostras que apresentaram os melhores valores para CIM (ALd-1, ALd-2, ALd-3), obtidas nos primeiros dias de cultivo do *Lasiodiplodia* sp., exibiram resultados opostos para

massas de extrato acetato-etílico, com baixos valores, quando comparado aos demais. Entende-se então que, esse intervalo de tempo de cultivo, entre seis e oito dias, é interessante para a obtenção de compostos com atividade antimicrobiana, contudo, similar ao cultivo em modo estático, também é necessário a otimização do processo para maximizar o rendimento do extrato acetato-etílico.

Os patógenos *S. aureus* e *C. albicans* apresentaram sensibilidade diante dos extratos acetato de etila. Este resultado é promissor, visto que estes patógenos são de grande importância clínica. *S. aureus* é o agente etiológico de uma ampla gama de infecções clínicas, e apresenta capacidade de adquirir resistência aos agentes antimicrobianos comumente usados (KONG; NEOH; NATHAN, 2016). A *C. albicans* é patógeno fúngico oportunista mais comumente encontrado na população em geral e pode causar infecções sistêmicas superficiais e potencialmente fatais (LI *et al*., 2018; RODRÍGUEZ-LEGUIZAMÓN *et al*., 2015), além disso, apresenta resistência a agentes antifúngicos, como azóis, polienos e equinocandinas, aumentando a dificuldade do tratamento (GONG *et al*., 2017).

Os extratos não apresentaram atividades relevantes contra *E. coli*, inferindo que, nas condições do estudo, o endófito *Lasiodiplodia* sp. pode não estar produzindo substâncias capazes de inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas, mesmo sendo cultivado sob agitação. Entretanto, deve-se considerar que, por se tratar de extratos, há mistura de substâncias que podem estar interagindo de forma antagonista ou sinérgica (CAESAR; CECH, 2019). Por este motivo, os extratos devem ser submetidos a fracionamentos para posterior purificação dos compostos, de forma que se possa avaliar com maior confiabilidade sua ação antimicrobiana.

Os extratos obtidos no cultivo em modo estático se destacaram com maiores massas de extratos orgânicos e melhores atividades antimicrobianas. Nessa forma de cultivo há escassez de oxigênio no meio de cultura, o que geralmente resulta em inibição de crescimento do microrganismo, e consequentemente, um aumento na produção de metabólitos secundários (CLARK; LANGLEY; BUSHELL, 1995), os quais são responsáveis pelas atividades observadas. Foi exatamente o que se pôde verificar através destes experimentos: o cultivo realizado em modo agitado possibilitou maior crescimento microbiano, enquanto, o cultivo realizado em modo estático forneceu menor crescimento do fungo, porém, as massas de extratos orgânicos foram sutilmente maiores, com melhores resultados contra os patógenos

avaliados. Gamboa-Suasnavart e colaboladores (2018) descrevem que quando há alta disponibilidade de oxigênio no meio de cultura, a fonte de carbono é utilizada principalmente para produção de biomassa, mas quando o oxigênio é limitado, a produção de metabólitos secundários se destaca.

Optou-se em dar continuidade ao trabalho realizando os cultivos dos fungos em modo estático, no intervalo de tempo onde houve bons resultados para produção de extrato orgânico e atividade antimicrobiana. Desta forma, foi selecionado o tempo de 12 dias de cultivo, onde a massa de extrato orgânico foi a maior (154mg/300mL caldo), e apesar de não ter sido a melhor atividade antimicrobiana detectada, tal extrato apresentou boa inibição frente aos patógenos. Esse período de 12 dias de cultivo é referente a fase estacionária do crescimento do *Lasiodiplodia* sp., e o metabolismo secundário do fungo é, frequentemente, ativado nessa fase, onde há esgotamento de nutrientes (AYED *et al*., 2015; HORAK *et al*., 2019; RUIZ *et al*., 2010; YIN *et al*., 2009; YIN; SUN, 2011).

As substâncias produzidas pelo fungo podem estar atuando de forma antagônica, isto é, ao estarem no mesmo meio, podem afetar a atividade de forma negativa (CAESAR; CECH, 2019). Ao se realizar a purificação ou enriquecimento dos compostos por técnicas de separação, existe a possibilidade de se restaurar, melhorar a atividade observada, em contrapartida, na pior das hipóteses, é possível também, perder a atividade biológica encontrada.

Deve-se levar em consideração também o cultivo em modo estático por 9 dias, onde houve a maior atividade antimicrobiana, e a massa do extrato orgânico obtida foi de 84mg/300mL caldo. Em geral, os resultados obtidos das massas dos extratos orgânicos foram baixos, esse baixo rendimento é comumente observado em extratos orgânicos (YIN; SUN, 2011), evidenciando a necessidade da otimização das condições do processo de cultivo para aumentar a produção do extrato acetato etílico.

4.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

As condições experimentais do planejamento fatorial completo com três fatores, seis pontos axiais e três repetições no ponto central, os resultados experimentais, preditos e os desvios relativos são apresentados na Tabela 8. Os pontos centrais fornecem graus adicionais de liberdade para estimativa de erro, o

que aumenta a eficiência ao testar a significância dos efeitos (ALVES *et al*., 2010).

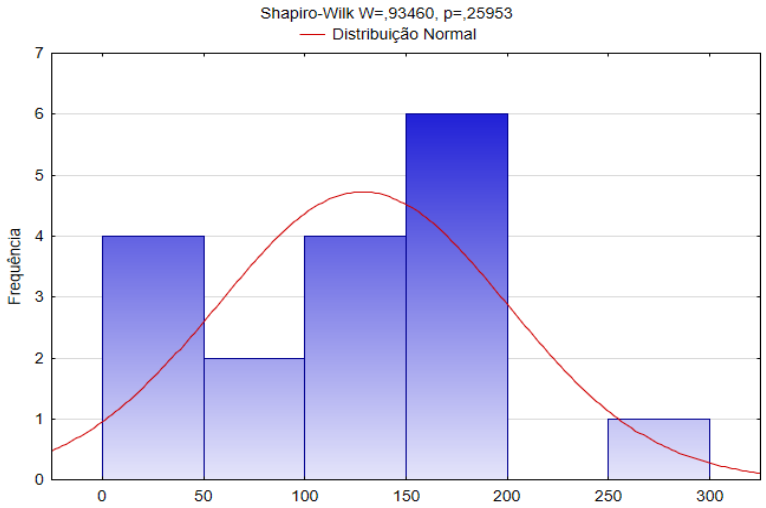
Tabela 8 - Resultados do planejamento fatorial completo 2^3, com 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central.

Ensaios	**Variáveis independentes (g/L)**			**Resposta (mg)**		**Desvios relativos**
	Glicose (x_1)	Sacarose (x_2)	$NaNO_3$ (x_3)	EtOAc (Y)	Valores Preditos	
1	-1(6)	-1(6)	-1(0,85)	35	78	22,6
2	+1(24)	-1(6)	-1(0,85)	154	123	22,7
3	-1(6)	+1(24)	-1(0,85)	135	162	22,7
4	+1(24)	+1(24)	-1(0,85)	182	207	22,7
5	-1(6)	-1(6)	+1(2,85)	31	21	22,7
6	+1(24)	-1(6)	+1(2,45)	72	66	22,6
7	-1(6)	+1(24)	+1(2,45)	124	105	22,7
8	+1(24)	+1(24)	+1(2,45)	139	150	22,7
9	-1,68(0)	0(15)	0(1,65)	40	21	30,8
10	+1,68(30)	0(15)	0(1,65)	91	96	30,7
11	0(15)	-1,68(0)	0(1,65)	30	37	30,7
12	0(15)	+1,68(30)	0(1,65)	200	179	30,7
13	0(15)	0(15)	-1,68(0)	290	236	18,9
14	0(15)	0(15)	+1,68(3)	140	140	18,9
15	0(15)	0(15)	0(1,65)	152	188	13,0
16	0(15)	0(15)	0(1,65)	184	188	13,0
17	0(15)	0(15)	0(1,65)	186	188	13,0

Fonte: DO AUTOR (2021).

O teste de Shapiro-Wilk foi usado para verificar a normalidade da variável resposta (EtOAc), e o valor obtido foi p=0,259 (FIGURA 9) indicando que não houve diferença significativa da curva apresentada pelos valores da variável resposta de uma curva de distribuição normal.

Figura 9 - Histograma para extrato acetato-etílico seco.



Fonte: DO AUTOR (2021).

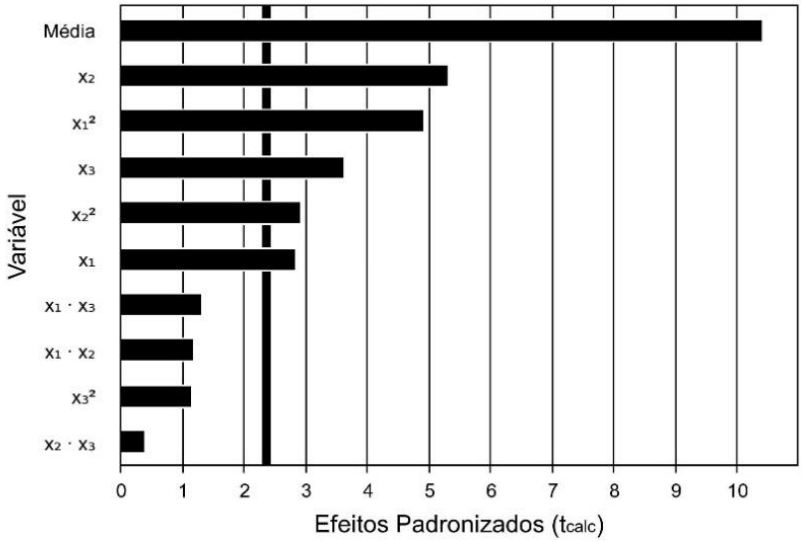
Com os resultados obtidos nos ensaios, os coeficientes de regressão foram calculados. Os termos lineares e quadráticos, exceto x_3^2, foram estatisticamente significativos para o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (TABELA 9). Os termos lineares de glicose e sacarose apresentam valores positivos, demonstrando que há um aumento no rendimento do processo com a mudança do menor nível para o maior nível, já seus termos quadráticos e o termo linear de $NaNO_3$ apresentaram valores negativos, demonstrando que há perda no rendimento do processo com a mudança do menor nível para o maior nível. O Diagrama de Pareto (FIGURA 10) ilustra os dados exibidos na Tabela 9.

Tabela 9 - Coeficientes de regressão obtidos para o DCCR, usando um nível de significância de 5 %.

	Coeficientes	**Erro padrão**	**p-valor**
Média	175,31	16,82	0,0000
x_1	22,54	7,90	0,0246
x_1^2	-42,86	8,69	0,0017
x_2	42,02	7,90	0,0011
x_2^2	-25,36	8,69	0,0224
x_3	-28,72	7,90	0,0083
x_3^2	9,99	8,69	0,2879
$x_1.x_2$	-12,25	10,32	0,2738
$x_1.x_3$	-13,75	10,32	0,2244
$x_2.x_3$	4,00	10,32	0,7098

Fonte: DO AUTOR (2021).

Figura 10 - Diagrama de Pareto.



Fonte: DO AUTOR (2021).

As interações que não apresentaram efeito significativo ($p > 0,05$) foram desconsideradas durante a regressão e eliminadas do modelo final. Os coeficientes foram então recalculados e o modelo gerado e a respectiva tabela de ANOVA são apresentados na Equação 1 e Tabela 10.

$$EtOAc\ (Y) = 188,08 + 22,54\ x_1 - 45,81\ x_1^2 + 42,02\ x_2 - 28,31\ x_2^2 - 28,72\ x_3 \qquad (Eq1)$$

Analisando a Tabela 10 verifica-se que a regressão foi significativa ($p<0,0002$). Quanto mais próximo o valor de R^2 estiver de 1,00, mais forte será o modelo e melhores serão as previsões de resposta. Neste estudo, obteve-se o valor de R^2 de 0,88, que descreve 88% dos dados experimentais, indicando que o modelo é significativo e se ajusta adequadamente aos dados experimentais. O valor obtido para o $F_{Calc.}$ (16,0) foi cinco vezes maior que o $F_{Tab.}$ (3,20), demonstrando que além de significativo o modelo também é preditivo, possibilitando a construção da superfície de resposta para a análise dos resultados por superfície.

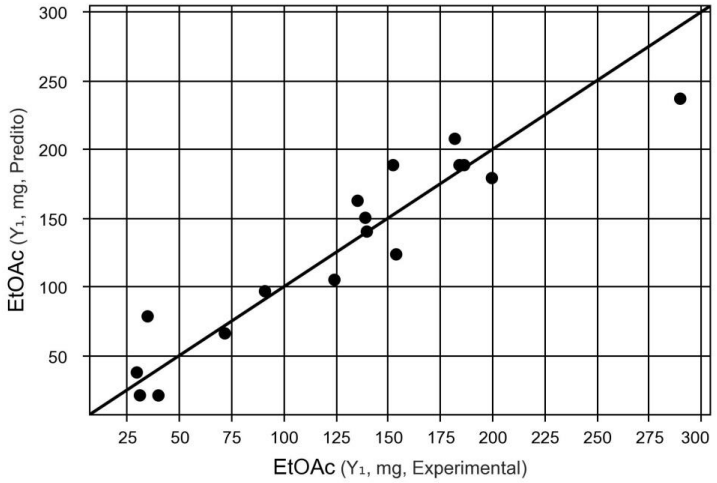
Tabela 10 - ANOVA para o DCCR, utilizando somente os coeficientes de regressão estatisticamente significativos a 5 % de significância.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{cal}	p-valor
Regressão	72403,8	5	14480,8	16,0	0,00010
Resíduos	9928,5	11	902,6		
Falta de Ajuste	9200,5	9	1022,3	2,8	0,29014
Erro puro	728,0	2	364,0		
Total	82332,2	16			

Fonte: DO AUTOR (2021).
% variação explicada (R^2) = 87,94% $F_{Tab;5;11;0,5}$ = 3,20

Os resultados experimentais do planejamento e os resultados preditos pelos modelos estatísticos são apresentados no Figura 11, possibilitando uma melhor visualização e comparação entre os dados de cada ensaio. Os experimentos que apresentaram maiores desvios relativo, em relação ao valor predito pelo modelo, foram os ensaios de número 9, 10, 11 e 12. Nestes pontos do planejamento, há variação na concentração de glicose (x_1) e sacarose (x_2), do menor para o maior nível, inferindo que as condições extremas de concentração das fontes de carbonos favoreceram os maiores desvios entre os resultados experimentais e preditos pelo modelo.

Figura 11 - Resultados experimentais e preditos para a produção de massa seca do extrato.

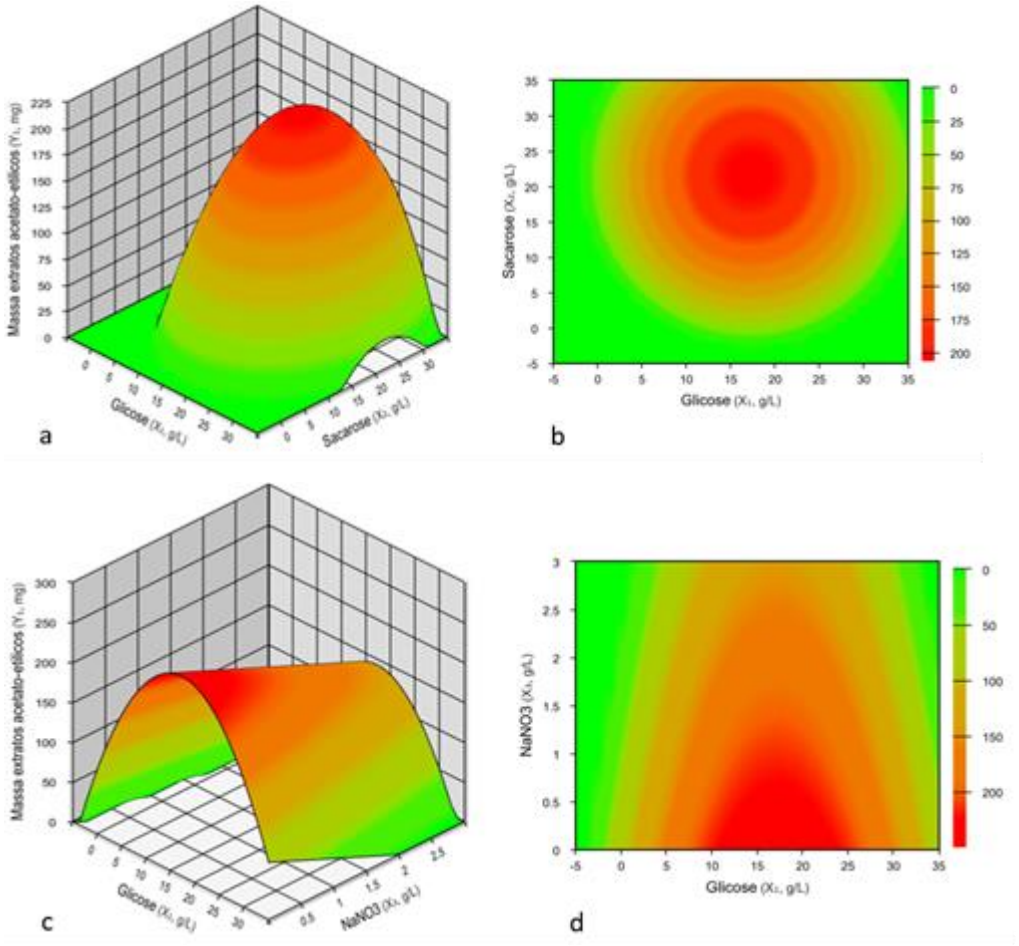


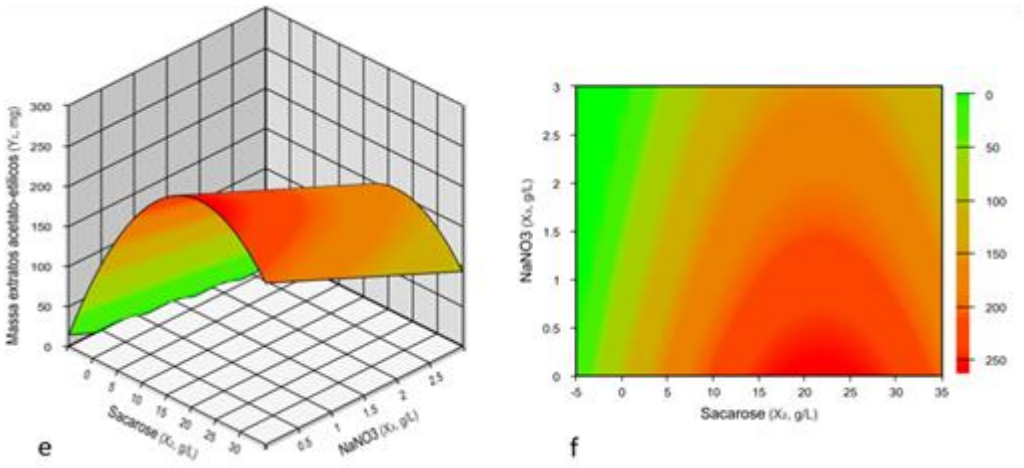
Fonte: DO AUTOR (2021).

O planejamento experimental possibilitou determinar as melhores concentrações das variáveis independentes para constituição do meio cultivo, permitindo a obtenção de uma maior quantidade de extrato seco acetato de etila. Para tal, foi utilizado análise de superfície de resposta, baseando-se na equação gerada pelo DCCR (Eq. 1). A figura 12 mostra as superfícies de resposta e as curvas de contorno para o modelo de produção de massa de extrato, levando em consideração as variáveis independentes (x_1, x_2 e x_3).

É possível verificar através das superfícies e curvas de contorno que a produção de massa seca de extrato é afetada pela concentração de glicose, com faixa ótima de 14 a 17 $g.L^{-1}$ e de sacarose com faixa ótima de 23 a 26 $g.L^{-1}$. A faixa ótima de concentração $NaNO_3$ esteve abaixo de 1 $g.L^{-1}$. Em baixas concentrações de sacarose e/ou glicose a produção do extrato é afetada negativamente, independente da concentração $NaNO_3$.

Figura 12 - Superfícies de resposta e curva de contorno para massa seca de extrato.





Fonte: DO AUTOR (2021).
Legenda: a) Superfícies de resposta função da concentração de glicose e sacarose.
b) Curva de contorno em função da concentração de glicose e sacarose.
c) Superfícies de resposta em função da concentração de glicose e $NaNO_3$.
d) Curva de contorno em função da concentração de glicose e $NaNO_3$.
e) Superfícies de resposta em função da concentração de sacarose e $NaNO_3$.
f) Curva de contorno em função da concentração sacarose e $NaNO_3$.

No presente estudo, buscou-se maximizar a produção dos extratos acetato de etila, com melhores atividades antimicrobianas, sintetizados pelo endófito *Lasiodiplodia* sp. A fonte de carbono e a fonte de nitrogênio desempenham papéis significativos na síntese de metabólitos secundários de diferentes fungos endofíticos. Seus tipos e concentrações têm efeito sobre a produção de metabólitos secundários (ZHANG *et al.*, 2017).

A influência da concentração da fonte de nitrogênio ($NaNO_3$) foi analisada e pôde-se observar que não afetou a produção de extrato, de modo efetivo. Esse resultado é contrastante a estudos que demonstram que a fonte de nitrogênio e sua concentração interfere de forma direta na produção de metabólitos secundários pela espécie *L. theobromae* (DHANDHUKIA; THAKKAR, 2008, 2007; ENG *et al.*, 2016). Porém, deve ser ressaltado que a influência de $NaNO_3$ pode não ter tido papel crucial na produção de extrato, devido a presença de extrato de levedura, outra fonte de nitrogênio, no meio de cultivo.

No que diz respeito a influência da concentração da fonte de carbono, a produção de extrato acetato de etila foi afetada diretamente. A sacarose foi acrescentada no meio de cultivo, e influenciou positivamente a produção de metabólitos pelo fungo, em concordância com o trabalho apresentado por Dhandhukia e Thakkar (2007) que descreveram um aumento na produção de metabólitos quando é adicionada sacarose ao meio de cultivo. Uma concentração

intermediária de glicose (comparada ao meio Czapek) favorece a produção de extrato. A maioria dos fungos filamentosos é capaz de metabolizar diferentes fontes de carbono, mas o açúcar preferido é a glicose, que fornece energia rápida para seu crescimento (ADNAN *et al.*, 2018). No entanto, altas concentrações podem afetar negativamente a produção de metabólitos secundários (BARBORÁKOVÁ *et al.*, 2012; DEMAIN, 1989; INOUE *et al.*, 2007; VERMA; LAL; DEBNATH DAS, 2017), uma vez que eles são produzidos em momentos de estresse.

Os ensaios também foram avaliados em relação a sua atividade antimicrobiana (TABELA 11) frente a cepas de *S. aureus* e *C. albicans*, essa resposta não foi analisada pelo software Protimiza, porém, também foi considerada para escolha das melhores condições de cultivo. O ensaio 4 apresentou elevado efeito fungicida frente a *C. albicans* apresentando valor de CIM e CMM 25-50 $\mu g.mL^{-1}$, também apresentou efeito bacteriostático com CIM de 100-200 $\mu g.mL^{-1}$, frente a *S. aureus*.

Tabela 11 - Atividade antimicrobiana dos extratos acetato-etílico de *Lasiodiplodia* sp.

Ensaio	**MIC ($\mu g.mL^{-1}$)**		**MMC ($\mu g.mL^{-1}$)**	
	S. aureus	*C. albicans*	*S. aureus*	*C. albicans*
1	200-400	100-200	>400	200-400
2	200-400	50-100	>400	50-100
3	200-400	25-50	>400	50-100
4	100-200	25-50	>400	25-50
5	100-200	100-200	>400	100-200
6	100-200	25-50	>400	50-100
7	200-400	50-100	>400	100-200
8	200-400	50-100	>400	50-100
9	200-400	200-400	>400	>400
10	100-200	100-200	>400	100-200
11	100-200	>400	>400	>400
12	100-200	50-100	>400	100-200
13	100-200	100-200	>400	100-200
14	200-400	50-100	>400	100-200
15	200-400	50-100	>400	100-200
16	200-400	50-100	>400	100-200
17	200-400	50-100	>400	100-200
Antimicrobianos	0,078-0,156	2,5-5	5-10	2,5-5

Fonte: DO AUTOR (2021).

Foi possível determinar, a partir das análises da superfície de resposta, as condições de cultivo em que se obtém uma maior massa de extrato acetato etílico. Tais condições são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Condições de processo onde ocorre maior resposta para a produção de extrato.

Variáveis	**Nível**
Glicose (g/L)	15,0
Sacarose (g/L)	24,0
$NaNO_3$ (g/L)	0,85
K_2HPO_4 (g/L)	1,0
$MgSO_4.7H_20$ (g/L)	0,5
KCL (g/L)	0,5
$FeSO_4$. $7H_20$ (g/L)	0,01
Extrato de levedura (g/L)	1,0

Fonte: DO AUTOR (2021).

O modelo estatístico e a equação de regressão foram validadas, por meio de ensaios experimentais realizados em triplicata, utilizando-se as condições de ponto ótimo preditas pelo modelo apresentados na Tabela 13. Os ensaios 4 e 12 também foram validados por apresentaram importantes atividades antimicrobianas. Os extratos obtidos nos ensaios 4, 12 e ponto ótimo foram analisados quanto a sua capacidade antimicrobiana (TABELA 13).

Em concordância com os resultados preditos, os resultados experimentais foram satisfatórios, apresentando boa produção de extrato, nas condições testadas, validando experimentalmente os resultados obtidos e demonstrando que o processo possui reprodutibilidade.

Os patógenos testados na atividade antimicrobiana foram *S. aureus* e *C. albicans*. De modo geral, todos os ensaios apresentaram satisfatória inibição frente a esses microrganismos, evidenciando a relevância do fungo *Lasiodiplodia* sp. para a produção de compostos com atividades antimicrobianas. Os ensaios exibiram efeito bacteriostático com valores de CIM entre 50-100 $\mu g.mL^{-1}$. E exibiram valores fungicida, com concentrações microbicidas variando de 50 a 200 $\mu g.mL^{-1}$, indicando ótimos resultados se considerarmos que são extratos, como citado anteriormente por Holetz e colaboladores (2002).

Tabela 13 - Massas dos extratos obtidos e atividades antimicrobianas para os ensaios 4, 12 e ponto ótimo.

Ensaios	Massa extrato (mg)	CIM (µg.mL^{-1})		CMM (µg.mL^{-1})	
		S. aureus	*C. albicans*	*S. aureus*	*C. albicans*
4	190±19*	50-100	50-100	>400	100-200
12	206±50*	50-100	50-100	>400	50-100
Ponto ótimo	251±48*	50-100	50-100	>400	100-200
Antimicrobianos		0,078-0,156	2,5-5	5-10	2,5-5

Fonte: DO AUTOR (2021).
* Média ± desvio padrão para 3 repetições

Uma variedade de metabolitos secundários de baixo peso molecular são produzidos por fungos, dentre os exemplos de metabólitos fúngicos biotecnologicamente relevantes incluem os antibióticos (BORUTA, 2018). A natureza de sua formação é certamente genética, mas a expressão pode ser muito influenciada por condições ambientais. A síntese de antibióticos é frequentemente provocada pela exaustão de um nutriente, adição de um indutor e/ou por uma diminuição na taxa de crescimento do microrganismo (BIBB, 2005; UPADHYAY; BHATTACHARYYA; RAY, 2020).

Os fungos sintetizam antibióticos em resposta a estresses fisiológicos, como limitação de nutrientes (fontes de carbono, nitrogênio, sais) (JAIN; GUPTA, 2012; PAPAGIANNI, 2004; SÁNCHEZ *et al*., 2010). Neste estudo, concentrações de fontes de carbono e de uma fonte de nitrogênio influenciaram a produção de extratos com atividades antimicrobianas. O ponto ótimo de cultivo de *Lasiodiplodia* sp., para produção de extrato, exibiu considerável atividade antimicrobiana frente aos patógenos testados. Esses resultados demonstram o grande potencial de produção de metabólitos bioativos nessas condições específicas. Dado que, os resultados da atividade são relatados para o extrato bruto, que podem ser aprimoradas com seu fracionamento.

4.4.1 Cultivo em meio otimizado

O cultivo do endófito *Lasiodiplodia* sp., em meio otimizado, foi realizado por

15 dias. Os ensaios foram feitos em triplicata e a produção de massa seca do micélio fúngico e do extrato acetato de etila são apresentados na Tabela 14. Os resultados mostram que os maiores rendimentos, relacionados à massa seca de micélio fúngico aparecem entre o 4º e o 8º dia, e que a massa máxima obtida foi de 699 mg com 8 dias de cultivo. No que se refere a produção de massa seca do extrato acetato-etílico a quantidade máxima foi de 284 mg com 12 dias de cultivo.

O fungo quando cultivado em meio de cultivo otimizado teve crescimento inferior ao observado no cultivo em meio Czapek padrão. Portanto, é possível inferir, que favorecendo o crescimento do fungo, através dos constituintes do meio, há uma menor biossíntese de metabolitos secundários.

Tabela 14 - Massas dos extratos acetato de etila e do micélio fúngico para as condições otimizadas.

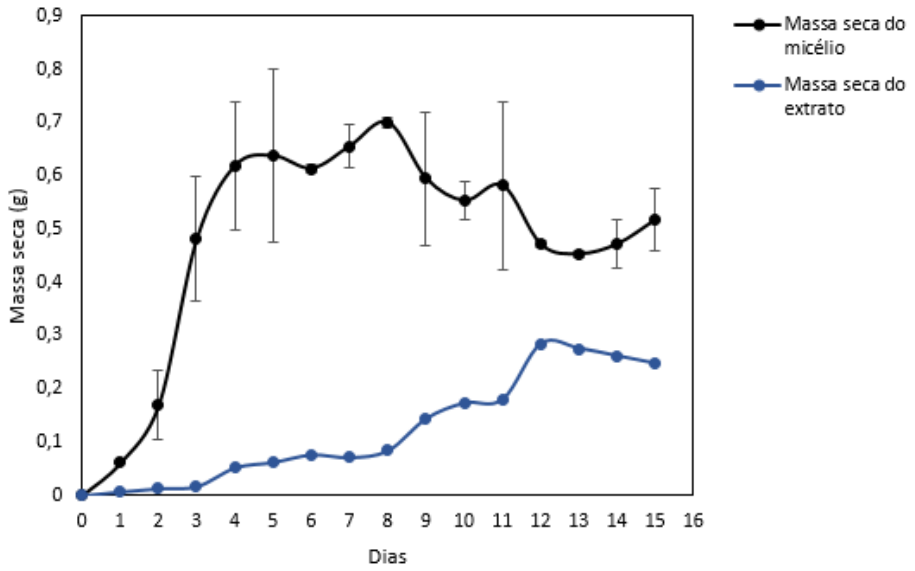
Tempo (dias)	Extrato	Volume de caldo de cultivo (ml)	Massa seca do micélio fúngico (mg)	Massa seca do extrato (mg)
01	POLd-1	300	61± 2*	7
02	POLd -2	300	169 ± 65*	13
03	POLd -3	300	482 ± 117*	17
04	POLd -4	300	618 ± 119*	52
05	POLd -5	300	636± 162*	62
06	POLd -6	300	613 ± 7*	76
07	POLd -7	300	655 ± 40*	71
08	POLd -8	300	699 ± 8*	84
09	POLd -9	300	593 ± 126*	144
10	POLd -10	300	522± 35*	173
11	POLd -11	300	581 ± 157*	180
12	POLd - 12	300	470 ± 6*	284
13	POLd - 13	300	453 ± 7*	275
14	POLd - 14	300	471 ± 45*	261
15	POLd - 15	300	517 ± 58*	247

Fonte: DO AUTOR (2021).
* Média ± desvio padrão para 3 repetições

A curva de crescimento do *Lasiodiplodia* sp. obtida em meio otimizado (FIGURA 13) apresenta a fase estacionária a partir do 4º (POLd-4) até 11º dia de cultivo (POLd-11). A quantidade de massa seca do extrato acetato-etílico produzida

nesse intervalo é aumentada. Depois do 11º dia de cultivo, foi possível observar um declínio do crescimento fúngico e um aumento acentuado da produção de extrato acetato-etílico.

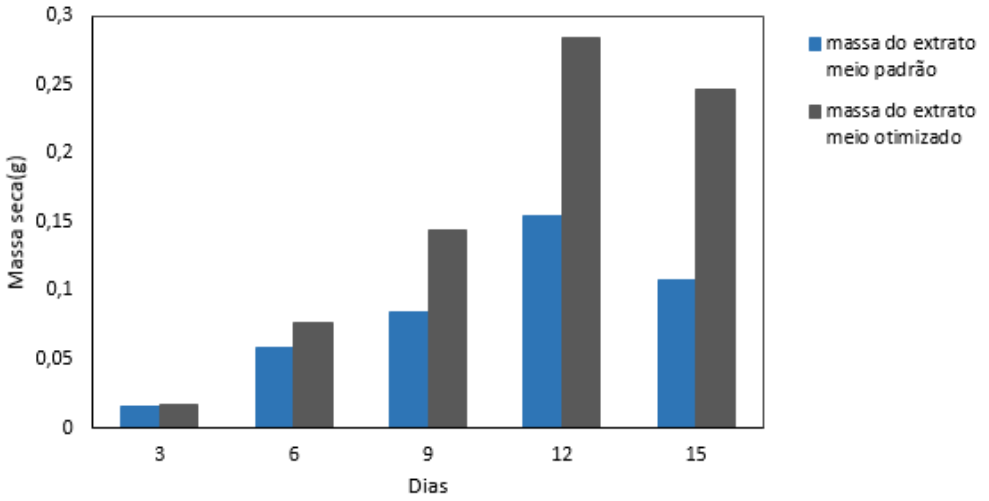
Figura 13 - Curva de crescimento do *Lasiodiplodia* sp. cultivado em meio otimizado em estufa DBO



Fonte: DO AUTOR (2021).

É evidente que as necessidades nutricionais apresentam importantes funções durante a biossíntese de metabólitos em microrganismos (YU *et al*., 2008). Dentre os nutrientes, as fontes de carbono e nitrogênio são consideradas importantes fatores do metabolismo. Há na literatura, relatos de otimização na produção de metabólitos secundários por meio da alteração das concentrações e dos constituintes do meio (BHATTACHARYYA; JHA, 2011; NOMILA MERLIN *et al*., 2013). Comparando a produção de extrato em dias iguais de cultivo do *Lasiodiplodia* sp. foi possível observar o aumento significativo no rendimento, após a otimização do processo (FIGURA 14). A massa do extrato obtido 12º dia de cultivo apresentou um aumento de 84% em seu rendimento, evidenciando a eficiência da metodologia de superfície de resposta, na otimização de processos.

Figura 14 - Comparação da produção de extrato acetato etílico em meio Czapek padrão e meio otimizado.



Fonte: DO AUTOR (2021).

Os extratos acetato-etílicos obtidos, foram analisados quanto a sua capacidade antimicrobiana. Os patógenos utilizados também foram *S. aureus* e *C. albicans* (TABELA 15). Os extratos POLd-4, POLd-5, POLd-6, POLd-7, POLd-8, POLd-10, POLd-11, POLd-12 e POLd-13 apresentaram melhores valores de CIM (50-100) $\mu g.mL^{-1}$ para a bactéria *S. aureus*, os demais extratos também apresentam inibição frente a bactéria com CIM variando na faixa de concentração de 100-400 $\mu g.mL^{-1}$. O resultado da CMM mostra que a inibição se deu devido ao efeito bacteriostático dos extratos.

Para *C. albicans*, POLd-5 e POLd-6 se destacaram com melhores valores de CIM (12,5-25 $\mu g.mL^{-1}$), a inibição foi devido ao efeito fungicida exibido por esse extrato (CMM de 25-50 $\mu g.mL^{-1}$) os demais extratos também apresentaram boa inibição no crescimento do patógeno, e apenas os extratos POLd-1 e POLd-2 não apresentaram efeito microbicida na faixa de concentração testada (CMM>400).

Esses resultados confirmam que o endófito *Lasiodiplodia* sp. isolado do ipê é um bom produtor de compostos com atividades antimicrobianas, indicando um potencial promissor contra patógenos Gram-positivos e leveduras.

Tabela 15 - Atividade antimicrobiana dos extratos acetato-etílico de *Lasiodiplodia* sp. cultivado em meio otimizado.

Amostras	**CIM (µg.mL^{-1})**		**CMM (µg.mL^{-1})**	
	S. aureus	*C. albicans*	*S. aureus*	*C. albicans*
POLd-1	200-400	200-400	>400	>400
POLd -2	200-400	200-400	>400	>400
POLd -3	200-400	50-100	>400	100-200
POLd -4	50-100	25-50	>400	50-100
POLd -5	50-100	12,5-25	>400	25-50
POLd -6	50-100	12,5-25	>400	25-50
POLd -7	50-100	25-50	>400	25-50
POLd -8	50-100	25-50	>400	25-50
POLd -9	100-200	25-50	>400	50-100
POLd -10	50-100	25-50	>400	50-100
POLd -11	50-100	25-50	>400	50-100
POLd - 12	50-100	50-100	>400	50-100
POLd - 13	50-100	50-100	>400	100-200
POLd - 14	100-200	100-200	>400	100-200
POLd - 15	100-200	100-200	>400	100-200
Antimicrobianos	0,078 -0,156	2,5-5	5-10	2,5-5

Fonte: DO AUTOR (2021).

Ao analisar a produção e a atividade antimicrobiana dos extratos acetato etílicos obtidos em meio de cultivo otimizado, ao decorrer de 15 dias é possível verificar que o aumento na produção do extrato não apresentou relevante interferência na atividade antimicrobiana dos mesmos. O fungo, em cultivo por 12 dias, continuou exibindo a maior massa de extrato orgânico (284mg/300mL caldo), e apesar de não ter sido a melhor atividade antimicrobiana observada, apresentou boa inibição frente aos patógenos. Ao se realizar a purificação ou enriquecimento dos compostos por técnicas de separação, existe a possibilidade de se restaurar, ou melhorar a atividade observada. Gómez e colaboradores (2021) apresentam resultados onde o fracionamento dos extratos brutos melhorou significativamente a atividade antibacteriana e antifúngica, destacando o fracionamento de extratos obtidos com acetato de etila. As substâncias produzidas pelo fungo podem estar atuando de forma antagônica, isto é, ao estarem no mesmo meio, podem afetar a atividade de forma negativa (CAESAR; CECH, 2019).

5 CONCLUSÕES

O modo de cultivo do endófito *Lasiodiplodia* sp. realizado em modo estático e em modo agitado possibilitou determinar que a obtenção de maior quantidade de massa de extrato acetato-etílico seco foi através do cultivo em modo estático por um período de 12 dias. Afim de aumentar a produção de extrato acetato-etílico seco a metodologia de superfície de resposta foi empregada na otimização das condições do meio de cultivo, e possibilitou aumento de 84% na produção de extrato, variando as concentrações da fonte de carbono e nitrogênio presentes no meio. Os extratos sintetizados pelo endófito *Lasiodiplodia* sp. isolado do ipê roxo apresentaram eficiente inibição no crescimento de *S. aureus* e *C. albicans* sugerindo a presença de substâncias com potencial atividade antimicrobiana para possíveis aplicações biotecnológicas.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos nesse trabalho possibilitam o desenvolvimento de futuras pesquisas como, por exemplo:

a) fracionamento dos extratos acetato etílico obtidos a partir dos diferentes meios de cultivo do endófito *Lasiodiplodia* sp.;
b) isolamento de substâncias presentes nos extratos;
c) comparação entre os metabólitos presentes em cada extrato através de técnicas espectroscópicas como RMN e EM;
d) avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias puras isoladas, após o fracionamento dos extratos acetato de etila;
e) otimização de outros componentes/variáveis do meio de cultivo do fungo, para verificar se haveriam outros fatores que influenciariam o rendimento de extratos orgânicos, como: pH, temperatura, concentração de componentes não avaliados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, M. A.; MCGAW, L. J. Bioprospecting of South African plants as a unique resource for bioactive endophytic microbes. **Frontiers in pharmacology**, Pretória, v. 9, p. 456, 2018.

ABDEL-RAZEK, A. S. et al. Microbial natural products in drug discovery**. Processes**, Giza, v. 8 n.4, p. 470, 2020.

ABDOLLAHZADEH, J. et al. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, Sanandaj, v. 25, p. 1-10, 2010.

ADNAN, M. et al. Carbon catabolite repression in filamentous Fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, Fuzhou, v. 19, n. 1, p. 1-23, 2018.

AGBOGBO, F. K. et al. Upstream development of *Escherichia coli* fermentation process with PhoA promoter using Design of Experiments (DoE). **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Oklahoma City, v. 47, p. 789-799, 2020.

AGOSTINI, S. B.N. **Prospecção de compostos bioativos no produto de fermentação de fungos endofíticos isolados de *Handroanthus impetiginosus***. 2016 12 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Alfenas. Alfenas.

AHMAD, F. et al. Naphthoquinones from *Handroanthus impetiginosus* promote skin wound healing through Sirt3 regulation. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, Islamabad; v. 23, n. 9, p. 1139, 2020.

AIDI WANNES, W. et al. Lipid and volatile composition of borage (*Borago officinalis L.*) leaf. **Trends in Phytochemical Research**, v. 1, n. 3, p. 143-148, 2017.

AKTHER, T. et al. Fungal-mediated synthesis of pharmaceutically active silver nanoparticles and anticancer property against A549 cells through apoptosis. **Environmental Science and Pollution Research**, Chennai, v. 26, n. 13, p. 13649-13657, 2019.

ALDRIDGE, D. C. et al. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*. **Journal of the Chemical Society C: Organic Chemistry**, p. 1623-1627, 1971.

ALVES, F. G. et al. Maximization of β-Galactosidase production: A simultaneous investigation of agitation and aeration effects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Rio Grande, v. 160, n. 5, p. 1528-1539, 2010.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: Unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Düsseldorf, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.

ANAND, U. et al. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: Potential avenues of biocompatible drug discovery. **Metabolites**,

Allahabad, v. 9, n. 11, p. 258, 2019.

ANASTASSIADIS, S. et al. Citric acid production patent review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 107-123, 2008.

ANDREOZZI, A. et al. Efficient colonization of the endophytes *Herbaspirillum huttiense* RCA24 and *Enterobacter cloacae* RCA25 influences the physiological parameters of Oryza sativa L. cv. Baldo rice. **Environmental Microbiology**, Naples, v. 21, n. 9, p. 3489-3504, 2019.

ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 12, p. 57-59, 2002.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, Tucson, v. 21, n. 2-3, p. 51-66, 2007.

ARORA, D. S.; KAUR, N. Antimicrobial potential of fungal endophytes from *Moringa oleifera*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Amritsar, v. 187, n. 2, p. 628-648, 2019.

ASHOK, A.; KUMAR, D. S. Different methodologies for sustainability of optimization techniques used in submerged and solid state fermentation. **3 Biotech**, Sangareddy, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2017.

AYE, M. M. et al. A review on the phytochemistry, medicinal properties and pharmacological activities of 15 selected myanmar medicinal plants. **Molecules**, Mandalay, v. 24, n. 2, p. 293, 2019.

AYED, H. BEN et al. Isolation and biochemical characterisation of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* An6. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, Sfax, v. 3, n. 4, p. 255-261, 2015.

AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from Brazilian tropical hosts and their biotechnological applications. In: **Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security**. Springer, Nova Delhi. p. 17-22, 2014.

BACO, S. B. et al. Design of experiments used in computer trials: A supportive method for product development. **Pesquisa Operacional**, v. 39, n. 2, p. 295-316, 2019.

BALIGA, M. S. et al. Phytochemistry and medicinal uses of the bael fruit (*Aegle marmelos Correa*): A concise review. **Food Research International**, Mangalore, v. 44, n.7, p. 1768-1775, 2011.

BAMISILE, B. S. et al. Fungal endophytes: beyond herbivore management. **Frontiers in microbiology**, Fuzhou, v. 9, p. 1-11, 2018.

BARBORÁKOVÁ, Zuzana et al. Effect of glucose concentration and growth

conditions on the fungal biomass, pH of media and production of fumagillin by a non-pathogenic strain *Penicillium scabrosum*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, Nitra, v.1, n. 4, p. 466-477, 2012.

BASHYAL, B. P. et al. Altertoxins with potent anti-HIV activity from *Alternaria tenuissima* QUE1Se, a fungal endophyte of *Quercus emoryi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Valencia, v. 22, n. 21, p. 6112-6116, 2014.

BERTRANDA, R. L. Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. **Journal of Bacteriology**, Winnipeg, v. 201, n. 7, 2019.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, Niterói, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BHAR, K.; MONDAL, S.; SURESH, P. An eye-catching review of *Aegle marmelos L*.(Golden Apple). **Pharmacognosy Journal**, Ibrahimpatnam, v. 11, n. 2, 2019.

BHARDWAJ, A. et al. Antimicrobial and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from spikes of *Pinus roxburghii* abstract screening of bioactive properties of fungal metabolites. **Archives of Clinical Microbiology**, Pauri, v. 6, n. 3, p. 1-9, 2015.

BHATTACHARYYA, P.; JHA, D. Optimization of Cultural conditions affecting growth and improved bioactive metabolite production by a subsurface *Aspergillus strain*. **Ijabpt.Com**, Guwahati, n. 4, p. 133-143, 2011.

BIBB, M. J. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. **Current Opinion in Microbiology**, Norwich, v. 8, n. 2, p. 208-215, 2005.

BIBI, S. N. et al. Fungal endophytes associated with mangroves–Chemistry and biopharmaceutical potential. **South African Journal of Botany**, Réduit, v. 134, p. 187-212, 2020.

BORIOLLO, M. F. G. et al. Reduction of doxorubicin-induced genotoxicity by *Handroanthus impetiginosus* in mouse bone marrow revealed by micronucleus assay. **Brazilian Journal of Biology**, Alfenas, v. 78, n. 1, p. 1-12, 2017.

BORROW, A. et al. The metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 227-276, 1961.

BORROW, A. et al. The kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 407-444, 1964

BORUTA, T. Uncovering the repertoire of fungal secondary metabolites: From fleming's laboratory to the international space station. **Bioengineered**, Lódz, v. 9, n. 1, p. 12-16, 2018.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery**. New York: Wiley-Interscience, 2ª ed. 2005.

BUCHANAN, R. E. Life phases in a bacterial culture. **Journal of Infectious Diseases**, Published by: Oxford University Press, V. 23, N. 2, p. 109-125, 1918.

BUSTANUSSALAM, R. F. et al. Screening for endophytic fungi from turmeric plant (*Curcuma longa L*.) of sukabumi and cibinong with potency as antioxidant compounds producer. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 1, p. 42-45, 2015.

CAESAR, L. K.; CECH, N. B. Synergy and antagonism in natural product extracts: When 1 + 1 does not equal 2**. Natural Product Reports**, Greensboro, v. 36, n. 6, p. 869-888, 2019.

CAFÊU, M. C. et al. Antifungal compounds of *Xylaria* sp., an endophytic fungus isolated from *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Quimica Nova**, Araraquara, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.

CAMPOS, F. F. et al. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata lam.* (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Belo Horizonte, v. 110, n. 1, p. 65-74, 2015.

CARDOSO, M. F. C. et al. A new approach for the synthesis of 3-substituted cytotoxic nor-β-lapachones. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, p. 12-16, 2013.

CARY, D. C.; PETERLIN, B. M. Natural Products and HIV/AIDS. **AIDS Research and Human Retroviruses**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 1, p. 31-38, 2018.

CASTRO, F. A. V.; DE SOUZA, G. F. M.; PEREIRA, M. D. Characterization of lapachol cytotoxicity: contribution of glutathione depletion for oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Folia Microbiologica**, Rio de Janeiro, v. 65, n. 1, p. 197-204, 2020.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: Novel sources of anticancer lead molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Ranchi, v. 95, n. 1, p. 47-59, 2012.

CHAICHANAN, J. et al. Optimization of zofimarin production by an endophytic fungus, *Xylaria* sp. Acra L38. **Brazilian Journal of Microbiology**, Bangkok, v. 45, n. 1, p. 287-293, 2014.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos pordutos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.

CHEN, D. et al. Insecticidal activities of chloramphenicol derivatives isolated from a marine alga-derived endophytic fungus, acremonium vitellinum, against the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Molecules**, Shenyang, v. 23, n. 11, p. 2995, 2018.

CHEN, S. et al. Cytotoxic and antibacterial preussomerins from the mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae* ZJ-HQ1. **Journal of Natural Products**, Guangzhou, v. 79, n. 9, p. 2397-2402, 2016.

CIMMINO, A. et al. Phytotoxic lipophilic metabolites produced by grapevine strains of *Lasiodiplodia* species in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Nápoles, v. 65, n. 6, p. 1102-1107, 2017.

CLARK, G. J.; LANGLEY, D.; BUSHELL, M. E. Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation: Investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. **Microbiology**, Guildford, v. 141, n. 3, p. 663-669, 1995.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; **Approved Standard-Tenth Edition**. CLSI DOCUMENTE M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 2015.

CLSI, C. AND L. S. I. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast - document M27–3A. In: **Approved standard**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 2008.

CUI, J. L. et al. Diversity and antioxidant activity of culturable endophytic fungi from alpine plants of *Rhodiola crenulata*, *R. angusta*, and *R. sachalinensis*. **PLoS ONE**, Taiyuan, v. 10, n. 3, p. 0118204, 2015.

DAISY, B. H. et al. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, Bozeman, v. 148, n. 11, p. 3737-3741, 2002.

DE CAPRILES, C. H.; MATA, S.; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, Caracas, v. 106, n. 2, p. 73-79, 1989.

DE MEDEIROS, A. G. et al. Bioprospecting of *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907 for antimicrobial compounds. **Folia Microbiologica**, Curitiba, v. 63, n. 4, p. 499-505, 2018.

DE MELO, J. G. et al. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: An ethnobotanical approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Recife, v. 2011 p. 1-14, 2011.

DE SILVA, N. I. et al. Phylogeny and morphology of *Lasiodiplodia* species associated with *Magnolia forest* plants. **Scientific Reports**, Chiang Mai, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

DEBBARMA, M. et al. Traditional knowledge of medicinal plants in tribes of tripura in northeast, India. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines** v. 14, n. 4, p. 156-168, 2017.

DEMAIN, A. L. Carbon source regulation of idiolite biosynthesis. In: **Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes**. CRC Press, 1ª ed. p. 1-8, 1989.

DESHMUKH, S. K. et al. Endophytic fungi: A source of potential antifungal compounds. **Journal of Fungi**, New Delhi, v. 4, n. 3, p. 77, 2018.

DHANDHUKIA, P. C.; THAKKAR, V. R. Response surface methodology to optimize the nutritional parameters for enhanced production of jasmonic acid by *Lasiodiplodia theobromae*. **Journal of Applied Microbiology**, Gujarat, v. 105, n. 3, p. 636-643, 2008.

DHANDHUKIA, P.; THAKKAR, V. Significant medium components for enhanced jasmonic acid production by *Lasiodiplodia theobromae* using Plackett-Burman Design. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, Gujarat, v. 1, p. 79-86, 2007.

DHAYANITHY, G.; SUBBAN, K.; CHELLIAH, J. Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with *Catharanthus roseus*. **BMC Microbiology**, Bangalore, v. 19, n. 1, p. 1-14, 2019.

DISSANAYAKE, A. J. et al. Botryosphaeriaceae: Current status of genera and species. **Mycosphere**, Beijing, v. 7, n. 7, p. 1001-1073, 2016.

DO NASCIMENTO, L. D. et al. Bioactive natural compounds and antioxidant activity of essential oils from spice plants: New findings and potential applications. **Biomolecules**, Belém, v. 10, n. 7, p. 988, 2020.

DUBEY, K. K.; JAWED, A.; HAQUE, S. Enhanced extraction of 3-demethylated colchicine from fermentation broth of *Bacillus megaterium*: Optimization of process parameters by statistical experimental design. **Engineering in Life Sciences**, Rohtak, v. 11, n. 6, p. 598-606, 2011.

DUDEJA, S. S. et al. Interaction of endophytic microbes with legumes. **Journal of Basic Microbiology**, Hisar, v. 52, n. 3, p. 248-260, 2012.

DZOYEM, J. P. et al. Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity of four compounds produced by an endophytic fungus *Epicoccum nigrum* associated with *Entada abyssinica*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Pretoria, v. 27, n. 2, p. 251-253, 2017.

ENG, F. et al. Optimized jasmonic acid production by *Lasiodiplodia theobromae* reveals formation of valuable plant secondary metabolites. **PLoS ONE**, Göttingen, v. 11, n. 12, p. 167627, 2016.

FADIJI, A. E.; BABALOLA, O. O. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Mmabatho, v. 8, p. 467, 2020.

FÉLIX, C. et al. Production of toxic metabolites by two strains of *Lasiodiplodia theobromae*, isolated from a coconut tree and a human patient. **Mycologia**, Aveiro, 2018.

FERREIRA, M. C. et al. Antimycobacterial and antimalarial activities of endophytic

fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Vellozia gigantea* from Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Belo Horizonte, v. 112, n. 10, p. 692-697, 2017.

FIORITO, S. et al. Growth inhibitory activity for cancer cell lines of lapachol and its natural and semi-synthetic derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Chieti Scalo, v. 24, n. 2, p. 454-457, 2014.

FLEMING, A. The discovery of penicillin. **British Medical Bulletin**, Albuquerque, v. 2, n. 1, p. 4-5, 1944.

GAMBOA-SUASNAVART, R. A. et al. The metabolic switch can be activated in a recombinant strain of *Streptomyces lividans* by a low oxygen transfer rate in shake flasks. **Microbial Cell Factories**, Ciudad de México, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2018.

GARYALI, S.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. Enhancement of taxol production from endophytic fungus *Fusarium redolens*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Patiala, v. 19, n. 5, p. 908-915, 2014.

GOLINSKA, P. et al. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: Diversity and bioactivity. **Antonie van Leeuwenhoek,** Torun, v. 108, n. 2, p. 267-289, 2015.

GÓMEZ CASTELLANOS, J. R.; PRIETO, J. M.; HEINRICH, M. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*)-A global ethnopharmacological commodity?. **Journal of Ethnopharmacology**, London, v. 121, n. 1, p. 1-13, 2009.

GÓMEZ, O. C.; LUIZ, Jaine H. H. Endophytic fungi isolated from medicinal plants: future prospects of bioactive natural products from T*abebuia/Handroanthus* endophytes. **Applied microbiology and biotechnology**, Alfenas, v. 102, n. 21, p. 9105-9119, 2018.

GÓMEZ, O. C. et al. Antimicrobial activity improvement after fractionating organic extracts from *Lasiodiplodia* sp. fermentation / Melhoria da atividade antimicrobiana após fracionamento de extratos orgânicos de *Lasiodiplodia* sp. fermentação. **Brazilian Journal of Development**, Alfenas, v. 7, n. 1, p. 3795–3816, 2021.

GONG, Y. et al. *Candida albicans* heat shock proteins and Hsps-associated signaling pathways as potential antifungal targets. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Jinan, v. 7, p. 520, 2017.

GOUDA, S. et al. Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. **Frontiers in Microbiology**, Noida, v. 7, p. 1538, 2016.

GOVINDAPPA, M. et al. In vitro and in vivo antidiabetic activity of lectin (N-acetylgalactosamine, 64 kDa) isolated from endophytic fungi, *Alternaria species* from *Viscum album* on alloxan induced diabetic rats. **Integrative Obesity and Diabetes**, Manipal, v. 1, n. 1, p. 11-19, 2015.

GUPTA, S. et al. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. **Biotechnology Advances**, Scottsville, v. 39, p. 107462, 2020

HAMILL, P. G. et al. Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. **Scientific Reports**, Belfast, v. 10, n. 1, p. 1-20, 2020.

HANIADKA, R. et al. A review of the gastroprotective effects of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*). **Food and Function**, Mangalore, v. 4, n. 6, p. 845-855, 2013.

HARDOIM, P. R. et al. The hidden world within plants : Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Faro, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Maringá, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HORAK, I. et al. Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides. **Journal of Applied Microbiology**, Potchefstroom, v. 127, n. 2, p. 326-343, 2019.

HUANG, J. et al. New lasiodiplodins from mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia* sp. 318#. **Natural Product Research**, Guangzhou, v. 31, n. 3, p. 326-332, 2017.

HUSSAIN, H. et al. Lapachol: An overview. **Arkivoc**, Paderborn, v. 2007, n. 2, p. 145-171, 2007.

HUSSAIN, H.; GREEN, I. R. Lapachol and lapachone analogs: a journey of two decades of patent research (1997-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, San Diego, v. 27, n. 10, p. 1111-1121, 2017.

IBADULLAYEVA, S. J. et al. Use of wild plants at dermatosis (skin deseases): Ethnobotany. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Baku, v. 2, n. 8, p. 64, 2012.

IBRAHIM, D. Effect of agitation speed on the morphology of *Aspergillus niger* HFD5A-1 hyphae and its pectinase production in submerged fermentation. **World Journal of Biological Chemistry**, Penang, v. 6, n. 3, p. 265, 2015.

IBRAHIM, S. R. M. et al. Fusarithioamide A, a new antimicrobial and cytotoxic benzamide derivative from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporium*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Medina, v. 479, n. 2, p. 211-216, 2016a.

IBRAHIM, S. R. M. et al. Integracides H-J: New tetracyclic triterpenoids from the endophytic fungus *Fusarium* sp. **Fitoterapia**, Medina, v. 112, p. 161-167, 2016b.

IBRAHIM, S. R. M. et al. Fusarithioamide B, a new benzamide derivative from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporium* with potent cytotoxic and antimicrobial activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Medina, v. 26, n. 3, p. 786-790, 2018.

IBRAHIM, S. R. M.; MOHAMED, G. A.; ROSS, S. A. Integracides F and G: New

tetracyclic triterpenoids from the endophytic fungus *Fusarium* sp. **Phytochemistry Letters**, Medina, v. 15, p. 125-130, 2016.

INOUE, O. O. et al. Carbon catabolite repression of retamycin production by *Streptomyces olindensis* ICB20. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 58-61, 2007.

IQBAL, J.; MEILAN, R.; KHAN, B. Assessment of risk, extinction, and threats to Himalayan yew in Pakistan. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Peshawar, v. 27, n. 2, p. 762-767, 2020.

JAIN, P.; GUPTA, S. Effect of carbon and nitrogen sources on antimicrobial metabolite production by endophytic fungus *Penicillum* sp. against human pathogens. **Section Title: Fermentation and Bioindustrial Chemistry**, Kurukshetra, v. 5, n. 8, p. 4325-4328, 2012.

JANAKIRAMAN, V.; GOVINDARAJAN, K.; MAGESH, C. R. Biosynthesis of silver nanoparticles from endophytic fungi, and its cytotoxic activity. **BioNanoScience**, Kattankulathur, v. 9, n. 3, p. 573-579, 2019.

JEEWON, R. et al. Pharmaceutical potential of marine fungal endophytes. **Endophytes and Secondary Metabolites, Reference Series in Phytochemistry**, Moka, p. 1-23, 2019.

JIANG, C. S. et al. Synthesis, modification, and evaluation of (R)-de-O-methyllasiodiplodin and analogs as nonsteroidal antagonists of mineralocorticoid receptor. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Shanghai, v. 21, n. 4, p. 1171-1175, 2011.

KAMAL, N. et al. Metabolomics-Guided isolation of anti-trypanosomal metabolites from the endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Planta Medica**, Glasgow, v. 83, p. 565-573, 2017.

KHAN, M. A. et al. Alleviation of salt stress response in soybean plants with the endophytic bacterial isolate *Curtobacterium* sp. SAK1. **Annals of Microbiology**, Daegu, v. 69, n. 8, p. 797-808, 2020.

KHARWAR, R. N. et al. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: Their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, Varanasi, v. 28, n. 7, p. 1208-1228, 2011.

KHOLIYA, S.; GANGWAL, J.; SHARMA, R. P. Composition and applications of *Aloevera* gel. **International Journal of Trend in Scientific Research and Development**, Pretoria, v. 4, n 3, p 1033-1035, 2020.

KIM, J.; KIM, K. H. Effects of minimal media vs. complex media on the metabolite profiles of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, Seoul, v. 57, p. 64-71, 2017.

KONG, C.; NEOH, H. M.; NATHAN, S. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: A

potential form of anti-virulence therapy. **Toxins**, Bangi, v. 8, n. 3, p. 72, 2016.

KUETE, V. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: A review. **Planta Medica**, Dschang, v. 76, n. 14, p. 1479-1491, 2010.

KUETE, V.; EFFERTH, T. Cameroonian medicinal plants: Pharmacology and derived natural products. **Frontiers in Pharmacology**, Dschang, v. 1, p. 123, 2010.

KUMAR, D. S. S. et al. Immunomodulatory compounds from *Pestalotiopsis leucothës*, an endophytic fungus from *Tripterygium wilfordii*. **Life Sciences**, Taiwan, 78, n. 2, p. 147-156, 2005.

KUMAR, S. et al. Xanthine oxidase inhibitors from an endophytic fungus *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. **Bioorganic Chemistry**, Nagar, v. 87, p. 851-856, 2019.

KUSHWAHA, P. et al. Functional characterization of endophytic bacilli from pearl millet (*Pennisetum glaucum*) and their possible role in multiple stress tolerance. **Plant Biosystems**, Lucknow, v. 154, n. 4, p. 503-514, 2020.

LANGVAD, F. A rapid and efficient method for growth measurement of filamentous fungi. **Journal of Microbiological Methods**, Bergen, v. 37, n. 1, p. 97-100, 1999.

LI, J. et al. Lasiodiplodins from mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia* sp. 318#. **Natural Product Research**, Guangzhou, v. 30, n. 7, p. 755-760, 2016.

LI, Y. et al. Promising antifungal targets against *Candida albicans* based on ion homeostasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Jinan, v. 8, p. 286, 2018.

LIU, Y. et al. Bioactive metabolites from mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. 16-5B. **Marine Drugs**, Guangzhou, v. 13, n. 5, p. 3091-3102, 2015.

LIZARDI-JIMÉNEZ, M. A.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. **3 Biotech**, Tierra Blanca, v. 7, n. 1, p. 44, 2017.

LORDANI, T. V. A. et al. Therapeutic effects of medicinal plants on cutaneous wound healing in humans: a systematic review. **Mediators of Inflammation**, Maringá, v. 18, p. 1-12, 2018.

MA, L. et al. Effect of culture conditions on cell growth and lipid accumulation of oleaginous microorganism. **Shengwu Gongcheng Xuebao/Chinese Journal of Biotechnology**, Changchun, v. 25, n. 1, p. 55-59, 2009.

MACEDO, L. et al. β-Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine**, Recife, v. 21, n. 1, p. 25-29, 2013.

MÄKELÄ, M. Experimental design and response surface methodology in energy

applications: A tutorial review. **Energy Conversion and Management**, Aalto, v. 151, p. 630-640, 2017.

MALANGE, K. F. et al. *Tabebuia aurea* decreases hyperalgesia and neuronal injury induced by snake venom. **Journal of Ethnopharmacology**, Campo Grande, v. 233, p. 131-140, 2019.

MARQUES, L. B. et al. Lapachol acetylglycosylation enhances its cytotoxic and pro-apoptotic activities in HL60 cells. **Toxicology in Vitro**, Belo Horizonte, v. 65, p. 104772, 2020.

MARTINS, M. V. V. et al. First report of *Lasiodiplodia brasiliense* causing disease in apple trees in Brazil. **Plant Disease**, Fortaleza,v. 102, n. 5, p. 1027-1027, 2018.

MIAO, L.; KWONG, T. F. N.; QIAN, P. Y. Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium c.f. saccharicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Kowloon, v. 72, n. 5, p. 1063-1073, 2006.

MINARNI et al. Anticancer activity test of ethyl acetate extract of endophytic fungi isolated from soursop leaf (*Annona muricata L.*). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Bogor, v. 10, n. 6, p. 566–571, 2017.

MING, Q. et al. Tanshinone IIA and tanshinone i production by *Trichoderma atroviride* D16, an endophytic fungus in *Salvia miltiorrhiza*. **Phytomedicine**, Shanghai, v. 19, n. 3-4, p. 330-333, 2012.

MOHAMED IBRAHIM, S. et al. Fusaristerol A: A new cytotoxic and antifungal ergosterol fatty acid ester from the endophytic fungus *Fusarium* sp. associated with *Mentha longifolia roots*. **Pharmacognosy Magazine**, Assiut, v. 14, n. 56, p. 308, 2018.

MORALES-GONZÁLEZ, J. A. et al. Garlic (*Allium sativum L.*): A brief review of its antigenotoxic effects. **Foods**, Ciudad de México, v. 8, n. 8, p. 343, 2019.

MORESKI, D. B.; BUENO, F. G.; DE SOUZA LEITE-MELLO, E. V. Ação cicatrizante de plantas medicinais: um estudo de revisão. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Umuarama, v. 22, n. 1, 2018.

MORON, L. S.; LIM, Y. Antimicrobial activities of crude culture extracts from mangrove fungal endophytes collected in Luzon Island, Philippines. **Philippine Science Letters**, Manila, v. 11, p. 28-36, 2018.

NARENDERAN, S. T.; MEYYANATHAN, S. N.; KARRI, V. V. S. R. Experimental design in pesticide extraction methods: A review. **Food Chemistry**, Tamil Nadu, v. 289, p. 384-395, 2019.

NETTO, M. S. B. et al. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, Recife, v. 67, n. 1, p. 127-141, 2014.

NOMILA MERLIN, J. et al. Optimization of growth and bioactive metabolite production: *Fusarium solani*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, Chennai, v. 6, n. SUPPL.3, p. 98–103, 2013.

NURUNNABI, T. R. et al. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from the mangrove plant *Sonneratia apetala* (Buch.-Ham) from the Sundarbans mangrove forest. **Advances in Traditional Medicine**, Liverpool, v. 20, n. 3, p. 419–425, 2020.

ONAH, E. Medicinal plants : Prospective drug candidates against the dreaded Coronavirus. **Iberoamerican Journal of Medicine**, v. 2, n. 4, p. 314-321, 2020a.

ONAH, E. α - amylase and α -glucosidase antidiabetic potential of ten essential oils from *Calophyllum inophyllum Linn*. **Iberoamerican Journal of Medicine**, Lagos, v. 2, n. 4, p. 253-260, 2020b.

ORLANDELLI, R. C. et al. In vitro antibacterial activity of crude extracts produced by endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* sw. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Maringá, v. 2, n. 10, p. 137-141, 2012.

OTHMAN, L.; SLEIMAN, A.; ABDEL-MASSIH, R. M. Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants. **Frontiers in Microbiology**, El-Koura, v. 10, p. 911, 2019.

OVESNÁ, J.; MITROVÁ, K.; KUČERA, L. Garlic (*A. sativum L.*) alliinase gene family polymorphism reflects bolting types and cysteine sulphoxides content. **BMC Genetics**, Praga, v. 16, n. 1, p. 53, 2015.

PAN, R. et al. Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. **Frontiers in Microbiology**, Hangzhou, v. 10, p. 294, 2019.

PANDI, M. et al. Isolation and detection of taxol, an anticancer drug produced from *Lasiodiplodia theobromae*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Morinda citrifolia*. **African Journal of Biotechnology**, Madurai, v. 10, n. 8, p. 1428-1435, 2011.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, Thessaloniki, v. 22, n. 3, p. 189–259, 2004.

PARK, J. G. et al. Tabetri™ (*Tabebuia avellanedae* ethanol extract) ameliorates atopic dermatitis symptoms in mice. **Mediators of Inflammation**, Suwon, v. 18, p. 9079527, 2018.

PATIL, R. H.; PATIL, M. P.; MAHESHWARI, V. L. Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi: A review of biotechnological production and their potential applications. In: **Studies in Natural Products Chemistry**, Shirpur, v. 49, p. 189-205, 2016.

PHAM, J. V. et al. A review of the microbial production of bioactive natural products

and biologics. **Frontiers in Microbiology**, Scranton, v. 10, p. 1404, 2019.

PHILLIPS, A. J. L. et al. The Botryosphaeriaceae: Genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, Caparica, v. 76, p. 51-167, 2013.

PINHEIRO, E. A. A. et al. Bioprospecting of antimicrobial activity of extracts of endophytic fungi from *Bauhinia guianensis*. **Revista Argentina de Microbiología**, Belém, v. 49, n. 1, p. 3-6, 2017.

PINTO, A. V.; DE CASTRO, S. L. The trypanocidal activity of naphthoquinones: A review. **Molecules**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 11, p. 4570-4590, 2009.

PIRES, T. C. S. P. et al. Bioactive properties of *Tabebuia impetiginosa*-based phytopreparations and phytoformulations: A comparison between extracts and dietary supplements. **Molecules**, Bragança, v. 20, n. 12, p. 22863-22871, 2015.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, Published By: Oxford University Press, v. 33, n. 4, p. 305-325, 1946.

POLING, S. M. et al. *Acremonium zeae*, a protective endophyte of maize, produces dihydroresorcylide and 7-hydroxydihydroresorcylides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Iowa City, v. 56, n. 9, p. 3006-3009, 2008.

POLITIS, S. N. et al. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Athens, v. 43, n. 6, p. 889-901, 2017.

PU, X. et al. Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: Isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Chengdu, v. 97, n. 21, p. 9365-9375, 2013.

QIAN, C. D. et al. *Lasiodiplodia* sp. ME4-2, an endophytic fungus from the floral parts of *Viscum coloratum*, produces indole-3-carboxylic acid and other aromatic metabolites. **BMC Microbiology**, Hangzhou, v. 14, n. 1, p. 297, 2014.

RAHMAN, M.; SARKER, S. D. Antimicrobial natural products. In: **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, London, v. 55, p. 77-113, 2020.

RAI, M. et al. Fungal growth promotor endophytes: A pragmatic approach towards sustainable food and agriculture. **Symbiosis**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 63-79, 2014.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, Montpellier, v. 1, n. 3, p. 26-27, 1998.

RAJAMANIKYAM, M. et al. Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Hyderabad, v. 60, 2017.

RAJESWARI, P. et al. Characterization of saltern based *Streptomyces* sp. and

statistical media optimization for its improved antibacterial activity. **Frontiers in Microbiology**, Madurai, v. 5, p. 753, 2014.

RAKULINI, R.; KALAICHELVI, S. A Review of anti – diarrheal activity of *Aegle marmelos*. **Journal of Complementary and Alternative Medical Research**, Jaffna, p. 1-10, 2019.

RAM, Y. et al. Predicting microbial growth in a mixed culture from growth curve data. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Tel Aviv, v. 116, n. 29, p. 14698-14707, 2019.

RAN, X. et al. Characterization and antitumor activity of camptothecin from endophytic fungus *Fusarium solani* isolated from *Camptotheca acuminate*. **African Health Sciences**, Guiyang, v. 17, n. 2, p. 566-574, 2017.

RANA, K. L. et al. Endophytic fungi from medicinal plants: biodiversity and biotechnological applications. In: **Microbial Endophytes**, Woodhead Publishing, p. 273-305, 2020.

RAO, P. V.; GAN, S. H. Cinnamon: A multifaceted medicinal plant. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Jeli, v. 14, p. 642942, 2014.

RAO, K. V.; MCBRIDE, T. J.; OLESON, J. J. Recognition and evaluation of lapachol as an antitumor agent. **Cancer Research**, Bethesda, v. 28, n. 10, p. 1952-1954, 1968.

REN, Y. et al. Colutellin A, an immunosuppressive peptide from *Colletotrichum dematium*. **Microbiology**, Bozeman, v. 154, n. 7, p. 1973-1979, 2008.

RODRIGUES-HEERKLOTZ, K. F. et al. Guignardic acid, a novel type of secondary metabolite produced by the endophytic fungus *Guignardia* sp.: Isolation, structure elucidation, and asymmetric synthesis. **Helvetica Chimica Acta**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 12, p. 3766-3772, 2001.

RODRIGUES; IEMMA, A. F. **Experimental design and process optimization**. CRC Press, New York, p. 1-304, 2014.

RODRÍGUEZ-GÁLVEZ, E. et al. Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. **Fungal Biology**, Piura, v. 121, n. 4, p. 452-465, 2017.

RODRÍGUEZ-LEGUIZAMÓN, G. et al. Characterising atypical *Candida albicans* clinical isolates from six third-level hospitals in Bogotá, Colombia. **BMC Microbiology**, Bogotá, v. 15, n. 1, p. 199, 2015.

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

ROGER, T. et al. Can antimalarial, antiviral and anti-respiratory infections Cameroonian medicinal plants be used as one of the potential ways to cure COVID-

19? Pharmacological and ethnomedicinal proof. **Journal of Medicinal Herbs and Ethnomedicine**, Dschang, v. 6, p. 61-85, 2020.

ROSSITER, S. E.; FLETCHER, M. H.; WUEST, W. M. Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance. **Chemical Reviews**, Atlanta, v. 117, n. 19, p. 12415-12474, 2017.

RUIZ, B. et al. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. **Critical Reviews in Microbiology**, Ciudad de México, v. 36, n. 2, p. 146-167, 2010.

SAH, B.; SUBBAN, K.; CHELLIAH, J. Cloning and sequence analysis of 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase gene and WRKY1 transcription factor from taxol-producing endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromea*. **FEMS Microbiology Letters**, Bangalore, v. 364, n. 24, p. 253, 2017.

SALINI, G. et al. Antibacterial and antioxidant potential of endophytic fungi isolated from mangroves. **Der Pharmacia Lettre**, Kollam, v. 7, n. 12, p. 53-57, 2015.

SALVATORE, M. M.; ALVES, A.; ANDOLFI, A. Secondary metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*: Distribution, chemical diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Toxins**, Naples, v. 12, n. 7, p. 457, 2020.

SALVATORE, M. M.; ANDOLFI, A.; NICOLETTI, R. The thin line between pathogenicity and endophytism: The case of *Lasiodiplodia theobromae*. **Agriculture**, Naples, v. 10, n. 10, p. 488, 2020.

SÁNCHEZ, S. et al. Carbon source regulation of antibiotic production. **Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 8, p. 442-459, Ciudad de México, 2010.

SANKPAL, N. V.; JOSHI, A. P.; KULKARNI, B. D. Citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils: Influence of morphology and fermenter conditions on productivity. **Process Biochemistry**, Pune, v. 36, n. 11, p. 1129-1139, 2001.

SANTANA, C. F.; SILVA, A. A. F. Primeiras observações com o emprego de lapachol em pacientes humanos portadores de neoplasias malignas. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 1, p. 20-61, 1980.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, Londonderry, v. 42, n. 4, p. 321-324, 2007.

SATHEESAN, J.; SABU, K. K. Endophytic fungi for a sustainable production of major plant bioactive compounds. In: **Plant-derived Bioactives**, Springer, Singapore, p. 195-207, 2020.

SHAHIDI, F.; HOSSAIN, A. Bioactives in spices, and spice oleoresins: Phytochemicals and their beneficial effects in food preservation and health

promotion. **Journal of Food Bioactives**, v. 3, p. 8-75, 2018.

SHARMA, D.; PRAMANIK, A.; AGRAWAL, P. K. Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D.Don. **3 Biotech**, Pauri, v. 6, n. 2, p. 210, 2016.

SHEN, F. T. et al. Screening of rice endophytic biofertilizers with fungicide tolerance and plant growth-promoting characteristics. **Sustainability (Switzerland)**, Taichung, v. 11, n. 4, p. 1133, 2019

SHIH, I. L.; VAN, Y. T.; CHANG, Y. N. Application of statistical experimental methods to optimize production of poly(γ-glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. **Enzyme and Microbial Technology**, Chang-Hwa, v. 31, n. 3, p. 213-220, 2002.

SILVA, R. W. V. DA et al. Uso da metodologia de superfície de resposta na otimização da extração de compostos fenólicos da casca dos frutos de *Hymenaea courbaril L.* (Jatobá). **Brazilian Journal of Food Technology**, Santarém, v. 22, p. 2018089, 2019.

SINGH, B.; KAUR, A. Antidiabetic potential of a peptide isolated from an endophytic *Aspergillus awamori.* **Journal of Applied Microbiology**, Amritsar, v. 120, n. 2, p. 301-311, 2016.

SINGH, N.; RAI, V.; TRIPATHI, C. K. M. Production and optimization of oxytetracycline by a new isolate *Streptomyces rimosus* using response surface methodology. **Medicinal Chemistry Research**, Raipur, v. 21, n. 10, p. 3140-3145, 2012.

SINGH, O. V.; SINGH, R. P. Bioconversion of grape must into modulated gluconic acid production by *Aspergillus niger* ORS-4· 410. **Journal of applied microbiology**, Roorkee, v. 100, n. 5, p. 1114-1122, 2006.

SINGH, R.; DUBEY, A. K. Endophytic actinomycetes as emerging source for therapeutic compounds. **Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences**, Dwarka, v. 5, n. 2, p. 106-116, 2015.

SINGH, S. et al. Medicinal plants used against various inflammatory biomarkers for the management of rheumatoid arthritis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Punjab, v. 72, n. 10, p. 1306-1327, 2020.

SINGH, V. et al. Optimization of actinomycin v production by *Streptomyces triostinicus* using artificial neural network and genetic algorithm. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Lucknow, v. 82, n. 2, p. 379-385, 2009.

SINGH, V. et al. Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. **Frontiers in Microbiology**, Lucknow, v. 7, p. 2087, 2017.

SLIPPERS, B. et al. Confronting the constraints of morphological taxonomy in the Botryosphaeriales. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, Pretoria, v. 33, p. 155, 2014.

SOCCOL, C. R. et al. New perspectives for citric acid production and application. **Food Technology and Biotechnology**, Curitiba, v. 44, n. 2, 2006.

SONG, R. Y. et al. Benzophenone derivatives from the plant endophytic fungus, *Pestalotiopsis* sp. **Phytochemistry Letters**, Nanjing, v. 22, p. 189-193, 2017.

STIERLE, A. A.; STIERLE, D. B. Bioactive secondary metabolites produced by the fungal endophytes of conifers. **Natural Product Communications**, Missoula, v. 10, n. 10, p 1671-1682, 2015.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Pacific yew*. **Science**, Bozeman, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

STRAUCH, M. A. et al. Lapachol and synthetic derivatives: In vitro and in vivo activities against *Bothrops snake* venoms. **PLoS ONE**, Niterói, v. 14, n. 1, p. 0211229, 2019.

STROBEL, G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, Montana, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G. The emergence of endophytic microbes and their biological promise. **Journal of Fungi**, Bozeman, v. 4, n. 2, p. 57, 2018.

STROBEL, G. A. et al. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Bozeman, v. 17, n. 5, p. 417-423, 1996.

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

SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Science and Nature**, Tamil Nadu, v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.

TABARAIE, B. et al. Comparative evalution of cephalosporin-c production in solid state fermentation and submerged liquid culture. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, Karaj, v. 9, n. 5, p. 83-94, 2020.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: A rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, Nanjing, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

TANAPICHATSAKUL, Chutima et al. Production of eugenol from fungal endophytes *Neopestalotiopsis* sp. and *Diaporth*e sp. isolated from *Cinnamomum loureiroi leaves*. **PeerJ**, Muang, v. 7, p. 6427, 2019.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Trivandrum, v. 81, p. 146-161,

2013.

TIBPROMMA, S. et al. Fungal diversity notes 840–928: micro-fungi associated with Pandanaceae. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 93, n. 1, p. 1-160, 2018.

TOGHUEO, R. M. K. Anti-leishmanial and anti-inflammatory agents from endophytes: A Review. **Natural Products and Bioprospecting**, Yaoundé, v. 33 p. 1-18, 2019.

TOGHUEO, R. M. K. Bioprospecting endophytic fungi from *Fusarium genus* as sources of bioactive metabolites. **Mycology**, Yaoundé, v. 11, n. 1, p. 1-21, 2020.

TYC, O. et al. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria.**Trends in Microbiology**, Wageningen, v. 25, n. 4, p. 280-292, 2017.

UHORANINGOGA, A. et al. The goldilocks approach: A review of employing design of experiments in prokaryotic recombinant protein production. **Bioengineering**, Dublin, v. 5, n. 4, p. 89, 2018.

UPADHYAY, A.; BHATTACHARYYA, B.; RAY, L. Value added secondary metabolites from microorganism. **Journal of Advanced Microbiology**, v. 4, p. 90-105, 2020.

URITU, C. M. et al. Medicinal plants of the family Lamiaceae in pain therapy: A review. **Pain Research and Management**, Iasi, v. 18, p. 7801543, 2018.

UZMA, F. et al. Endophytic fungi-alternative sources of cytotoxic compounds: A review. **Frontiers in Pharmacology**, Bangalore, v. 9, p. 309, 2018.

VANDENBERGHE, L. P. S. et al. **Production and application of citric acid.** In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products. Amsterdam, Elsevier, p. 557-575, 2017.

VANDERMOLEN, K. M. et al. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB Express**, Greensboro, v. 3, n. 1, p. 71, 2013.

VASUNDHARA, M.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. Molecular approaches to screen bioactive compounds from endophytic fungi. **Frontiers in Microbiology**, Patiala, v. 7, p. 1774, 2016.

VEITER, L.; RAJAMANICKAM, V.; HERWIG, C. The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vienna, v. 102, n. 7, p. 2997-3006, 2018.

VENUGOPALAN, A. et al. Reprint of: Effect of fermentation parameters, elicitors and precursors on camptothecin production from the endophyte *Fusarium solani*. **Bioresource Technology**, Chennai, v. 213, p. 311-318, 2016.

VERA CANDIOTI, L. et al. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, Santa Fe,

v. 124, p. 123-138, 2014.

VERMA, A.; JOHRI, B. N.; PRAKASH, A. Antagonistic evaluation of bioactive metabolite from endophytic fungus, *Aspergillus flavipes* KF671231. **Journal of Mycology**, Bhopal, v. 5, p. 1-5, 2014.

VERMA, S. K.; LAL, M.; DEBNATH DAS, M. Optimization of process parameters for production of antimicrobial metabolites by an endophytic fungus *Aspergillus* sp. CPR5 isolated from calotropis Procera root. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, Varanasi, v. 10, n. 4, 2017.

VIEGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Quimica Nova**, Araraquara, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VON STOSCH, M.; WILLIS, M. J. Intensified design of experiments for upstream bioreactors. **Engineering in Life Sciences**, Newcastle upon Tyne, v. 17, n. 11, p. 1173-1184, 2017.

VRABL, P. et al. Fungal growth in batch culture – What we could benefit if we start looking closer. **Frontiers in Microbiology**, Innsbruck, v. 10, p. 2391, 2019.

WANG, X. et al. Peniproline A, a new 1-phenylamino-2-pyrrolidone metabolite from the endophytic fungus Penicillium decumbens CP-4. **Natural Product Research**, Shanghai, v. 31, n. 15, p. 1772-1777, 2017.

WANNER, U.; EGLI, T. Dynamics of microbial growth and cell composition in batch culture. **FEMS Microbiology Letters**, Dübendorf, v. 75, n. 1, p. 19-43, 1990.

WEI, W. et al. An antibacterial metabolite from *Lasiodiplodia pseudotheobromae* F2. **Phytochemistry**, Nanjing, v. 100, p. 103-109, 2014.

XIE, T. et al. Review of natural product databases. **Cell Proliferation**, Chengdu, v. 48, n. 4, p. 398-404, 2015.

YADA, K. et al. Single dose administration of taheebo polyphenol enhances endurance capacity in mice. **Scientific Reports**, Tokorozawa, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

YANG, R. YUN et al. Lactones from a brown alga endophytic fungus (No. ZZF36) from the South China Sea and their antimicrobial activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Guangzhou, v. 16, n. 16, p. 4205-4208, 2006.

YIN, H. et al. Gentiopicrin-producing endophytic fungus isolated from *Gentiana macrophylla*. **Phytomedicine**, Xi'an, v. 16, n. 8, p. 793-797, 2009.

YIN, H.; SUN, Y. H. Vincamine-producing endophytic fungus isolated from *Vinca minor*. **Phytomedicine**, Xi'an, v. 18, n. 8-9, p. 802-805, 2011.

YU, J. et al. Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by

Streptomyces rimosus MY02. **Bioresource Technology**, Dalian, v. 99, n. 6, p. 2087-2091, 2008.

YUN, T. Y. et al. Optimization of fermentation conditions through response surface methodology for enhanced antibacterial metabolite production by *Streptomyces* sp. 1-14 from cassava rhizosphere. **PLoS ONE**, Haikou, v. 13, n. 11, p. e0206497, 2018.

ZHANG, G. et al. Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceras corniculatum*. **Phytochemistry**, Qingdao, v. 72, n. 11-12, p. 1436-1442, 2011.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, Nanjing, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.

ZHANG, J. *Lasiodiplodia theobromae* in *Citrus Fruit* (Diplodia Stem-End Rot). In: **Postharvest Decay: Control Strategies**, Lake Alfred, p. 309-335, 2014.

ZHANG, J. et al. *Tabebuia impetiginosa*: A comprehensive review on traditional uses, phytochemistry, and immunopharmacological properties. **Molecules**, Suwon, v. 25, n. 18, p. 4294, 2020a.

ZHANG, Q. et al. Optimization of submerged fermentation medium for matrine production by *Aspergillus terreus*, an endophytic fungus harboring seeds of Sophora flavescens, using response surface methodology. **Mycobiology**, Chengdu, v. 45, n. 2, p. 90-96, 2017.

ZHANG, X. G. et al. Diversity and bioactivity of endophytes from *Angelica sinensis* in China. **Frontiers in Microbiology**, Lanzhou, v. 11, p. 1489, 2020b.

ZHAO, S. S. et al. *Chaetomium globosum* CDW7, a potential biological control strain and its antifungal metabolites. **Microbiology Letters**, Nanjing, v. 364, n. 3, p. 287, 2017.

ZHENG, Y. K. et al. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. **Annals of Microbiology**, Kunming, v. 66, n. 2, p. 529-542, 2016.

ZHU, X. et al. Penochalasin K, a new unusual chaetoglobosin from the mangrove endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* V11 and its effective semi-synthesis. **Fitoterapia**, Guangzhou, v. 123, p. 23-28, 2017.