

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Caroline Medeiros dos Reis

**PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ANTIFÚNGICOS E
ANTIBACTERIANOS A PARTIR DO FUNGO *Diaporthe schini***

Santa Maria, RS
2018

Caroline Medeiros dos Reis

**PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ANTIFÚNGICOS E ANTIBACTERIANOS A
PARTIR DO FUNGO *Diaporthe schini***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raquel Cristine Kuhn
Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Jahn

Santa Maria, RS
2018

Reis, Caroline

Produção de metabólitos antifúngicos e antibacterianos a partir do fungo *Diaporthe schini* / Caroline Reis.- 2018.

50 p.; 30 cm

Orientadora: Raquel Cristine Kuhn

Coorientador: Sérgio Luiz Jahn

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, RS, 2018

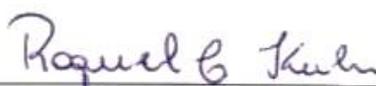
1. Fermentação submersa 2. *Diaporthe schini* 3. Antifúngico 4. Antibacteriano I. Kuhn, Raquel Cristine II. Jahn, Sérgio Luiz III. Título.

Caroline Medeiros dos Reis

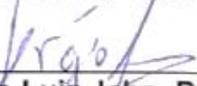
**PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ANTIFÚNGICOS E ANTIBACTERIANOS A
PARTIR DO FUNGO *Diaporthe schini***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**.

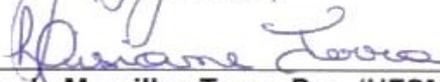
Aprovado em 23 de agosto de 2018:



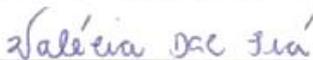
Raquel Cristine Kuhn, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Sérgio Luiz Jahn, Dr. (UFSM)
(Coorientador)



Lisiane de Marsillac Terra, Dra. (UFSM)



Valéria Dal Prá, Dra.

Santa Maria, RS
2018

Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível.

(Charles Chaplin)

RESUMO

PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ANTIFÚNGICOS E ANTIBACTERIANOS A PARTIR DO FUNGO *Diaporthe schini*

AUTORA: Caroline Medeiros dos Reis
ORIENTADORA: Dra. Raquel Cristine Kuhn

Devido ao surgimento de resistência aos medicamentos usados no tratamento de doenças causadas por fungos e por bactérias, há uma necessidade crescente da identificação de novos compostos que possam ser utilizados em medicamentos. Os compostos produzidos por fungos endófitos são uma fonte promissora na produção de metabólitos com ação antifúngica e antibacteriana. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi a produção de metabólitos a partir de fermentação submersa do fungo *Diaporthe schini*, avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* do extrato proveniente da fermentação, separação e caracterização desses metabólitos. Dentre os microrganismos testados, os extratos apresentaram maior ação inibitória sobre a bactéria gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* e as gram-negativas *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae* e sobre o fungo *Candida krusei*. O extrato proveniente da extração com hexano foi separado em frações por cromatografia em coluna e as principais substâncias com efeito biológico caracterizadas por GC-MS foram: 13-Docosenamida, (Z); 2-Hexadeceno, 3,7,11,15-tetrametil; 9-Octadecenamida e 11-Octadecenoico ácido, metil éster. Até o presente momento não se tem relatos da literatura relacionados a identificação de metabólitos antibacterianos e antifúngicos produzidos por fermentação submersa de *Diaporthe schini*. Este trabalho é um estudo inicial onde as condições do processo podem ser otimizadas buscando a produção de um composto em específico, podendo ser uma fonte promissora para a obtenção de novos medicamentos.

Palavras-chave: Fermentação submersa. *Diaporthe schini*. Antifúngico. Antibacteriano.

ABSTRACT

PRODUCTION OF ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL METABOLITES FROM *Diaporthe Schini*

AUTHOR: Caroline Medeiros dos Reis
ADVISOR: Dr. Raquel Cristine Kuhn

Due to the emergence of resistance to the drugs used to treat diseases caused by fungi and bacteria, there is a growing need to identify new compounds that can be used in medicines. The compounds produced by endophytic fungi are a promising source in the production of metabolites with antifungal and antibacterial action. Thus, the objective of this work was the production of metabolites from the submerged fermentation of the fungus *Diaporthe schini*, evaluation of the in vitro antibacterial and antifungal activity of the extract from the fermentation and separation and characterization of these metabolites. Among the microorganisms tested, the extracts had a greater inhibitory action on the gram-positive bacteria *Staphylococcus epidermidis* and the gram-negative *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* and on the fungus *Candida krusei*. The extract from the hexane extraction was separated into fractions by column chromatography and the main biologically active substances characterized by GC-MS were: 13-Docosenamide, (Z); 2-Hexadecene, 3,7,11,15-tetramethyl; 9-Octadecenamide and 11-Octadecenoic acid, methyl ester. Until now, there is no reports on literature related to the identification of antibacterial and antifungal metabolites produced by submerged fermentation of *Diaporthe schini*. This work is an initial study where the conditions of the process can be optimized through of the production of a specific compound and can be a promising source for new drugs.

Keywords: Submerged fermentation. *Diaporthe schini*. Antifungal. Antibacterial.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos indicadores avaliados.....	24
Tabela 2 - Meios de cultura para repique e cultivo dos microrganismos.....	25
Tabela 3 - Concentrações mínimas inibitórias e letais para bactérias de diferentes frações de extrato do caldo da fermentação de <i>Diaporthe schini</i>	30
Tabela 4 - Concentrações mínimas inibitórias e letais para fungos de diferentes frações de extrato do caldo da fermentação de <i>Diaporthe schini</i>	31
Tabela 5 - Caracterização química da fração eluída no sistema de solventes Hexano:AcOEt (65:35)	33
Tabela 6 - Caracterização química da fração eluída no sistema de solventes Hexano:AcOEt (50:50)	33
Tabela 7 - Caracterização química da fração eluída no sistema de solvente AcOEt (100%).....	34
Tabela 8 - Caracterização química da fração eluída no sistema de solventes AcOEt:MeOH (80:20)	35
Tabela 9 - Caracterização química da fração eluída no sistema de solventes AcOEt:MeOH (75:25)	36
Tabela 10 - Caracterização química da fração eluída no sistema de solventes AcOEt:MeOH (70:30)	36
Tabela 11 - Caracterização química da fração eluída no sistema de solventes AcOEt:MeOH (65:35)	38
Tabela 12 - Compostos com atividades biológicas extraídos de microrganismos.....	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 BIOMA PAMPA	11
3.2 FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	12
3.3 METABÓLITOS PRODUZIDOS POR FUNGOS.....	13
3.4 O GÊNERO <i>Diaporthe</i>	15
3.5 ATIVIDADE MICROBIANA	16
3.5.1 Microrganismos patogênicos	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 MICRORGANISMO	19
4.1.1 Identificação do Microrganismo	19
4.1.2 Manutenção do microrganismo.....	20
4.2 PRÉ-INÓCULO	20
4.3 FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	21
4.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS	21
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIANA “ <i>in vitro</i> ”.....	23
4.5.3 Preparo dos inóculos e determinação da CIM pelo método de microdiluição	25
4.5.4 Determinação da Concentração Letal Mínima (CLM)	26
4.5.5 Análise de dados	26
4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS	26
4.6.1 Cromatografia em coluna (CC)	27
4.6.2 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	27
4.7 Cromatografia gasosa (GC-MS).....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
5.1 Avaliação <i>in vitro</i> das atividades antifúngica e antibacteriana	28
5.2 Caracterização química	32
5.2.1 Cromatografia gasosa (GC-MS)	32
6 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos constituem uma das formas mais importantes de vida que fornecem ferramentas biotecnológicas para transformar matéria orgânica em produtos bioquímicos (IOCA; ALLARD; BERLINCK, 2014). O “screening” de novos compostos bioativos envolve um vasto estudo de microrganismos, seu habitat natural, e seus ciclos de vida. Esses procedimentos representam uma fonte potencial de desenvolvimento de novos medicamentos (BASKARAN et al., 2015). Tradicionalmente, compostos antimicrobianos têm sido selecionados e identificados por sua capacidade de inibir diretamente o crescimento microbiano (microbiostático) ou matar os microrganismos (microbicida) (COLEMAN; MYLONAKIS, 2012).

Nesse contexto, destacam-se os fungos endófitos que são organismos que habitam as plantas, vivendo de forma assintomática nos tecidos vegetais. A maioria destes microrganismos é capaz de sintetizar compostos bioativos que podem ser utilizados pela planta para sua defesa contra fungos patogênicos, bactérias e herbívoros (RAJ; SHETTY, 2009). O número de metabólitos secundários produzidos pelos fungos endófitos é maior que o de qualquer outra classe de microrganismos endófitos (ZHANG et al., 2006).

Recentemente, como a resistência dos patógenos bacterianos e fúngicos tem se tornado cada vez mais grave, existindo uma demanda crescente por novos compostos antibacterianos e antifúngicos. Produtos naturais a partir de fungos são considerados uma fonte importante de novos compostos antibacterianos e antifúngicos devido a sua abundante diversidade de espécies e, seus variados metabólitos secundários (XU et al., 2015).

Existem ótimas possibilidades para explorar fungos endófitos para produzir novos e já conhecidos metabólitos secundários biologicamente ativos (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012), dessa forma, o “screening” de fungos endófitos com atividade antimicrobiana é valioso para o descobrimento de novos compostos antimicrobianos (FOUDA et al., 2015).

O gênero *Diaporthe* compreende um grupo de fungos estudados extensivamente pela sua capacidade de produzir metabólitos para várias aplicações (FLORES et al., 2013). Tem sido estudado para a produção de moléculas com atividade antibacteriana (SEBASTIANES et al., 2012; SPECIAN et al., 2012; SOUSA

et al., 2016; TANAPICHATSAKUL et al., 2018), bioherbicida (SOUZA et al., 2015; PES et al., 2016) e antifúngica (HUANG et al., 2008; PRADA et al., 2009; TANNEY, et al., 2016; YENN et al., 2017).

O fungo endófito *Diaporthe schini* avaliado neste estudo foi previamente isolado a partir de tecidos infectados de plantas daninhas de arroz irrigado e pastagens do bioma Pampa (SOUZA et al., 2017). Não há relatos na literatura sobre a caracterização química dos metabólitos produzidos pela espécie *Diaporthe schini* com atividade antifúngica ou antibacteriana. Portanto, devido à ausência de informação sobre a atividade dos metabólitos produzidos por este microrganismo, existe a possibilidade de avaliarmos os compostos produzidos através de fermentação submersa (FS) e sua aplicação na inibição do crescimento de fungos e bactérias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo tem como principal objetivo produzir metabólitos através de fermentação submersa de *Diaporthe schini* e avaliar o potencial antifúngico e antibacteriano destes metabólitos.

2.2 Objetivos específicos

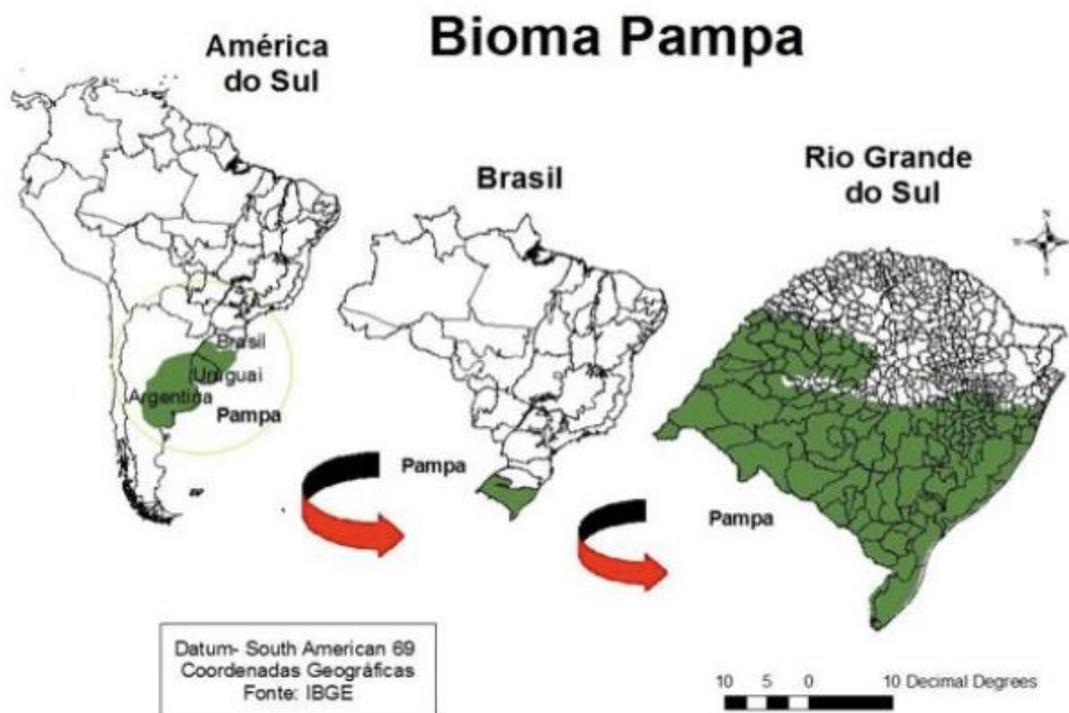
- ✓ Produzir metabólitos a partir de fermentação submersa do fungo *Diaporthe schini*;
- ✓ Avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana dos metabólitos produzidos;
- ✓ Avaliar a atividade antifúngica dos metabólitos produzidos na fermentação;
- ✓ Separar os metabólitos através de cromatografia em coluna;
- ✓ Caracterizar os metabólitos produzidos através de cromatografia gasosa (CG-MS).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOMA PAMPA

O bioma Pampa cobre uma área de aproximadamente 700.000 km², compartilhada pela Argentina, Brasil, Uruguai e Paraguai. No Brasil, o bioma cobre 176.496 km² e está restrito ao estado do Rio Grande do Sul (Fig. 1), representando 2,07% do território nacional e aproximadamente 63% da área desse estado (IBGE, 2004).

Figura 1- Representação do Bioma Pampa, delimitando sua área na América do Sul, no Brasil e no Rio Grande do Sul



Fonte: AZEVEDO, 2013, p. 169.

O bioma Pampa apresenta grande heterogeneidade biológica a qual se deve, em especial, a diversidade de solos procedentes da grande variabilidade geológica, topografia, distribuição da pluviosidade, temperatura e disponibilidade de água. A topografia associada à hidrografia, formada por rios e lagoas, constitui uma grande

variedade de ambientes que sustentam uma grande diversidade biológica (BOLDRINI, 2009).

Em relação a biodiversidade, o bioma Pampa é o mais desconhecido dos biomas brasileiros (LUPATINI, 2013) e é claro que, para manter a dinâmica dos ecossistemas e gerenciar o uso da terra de forma sustentável, é crucial entender a biodiversidade biológica e funcional do sistema. A diversidade biológica é um recurso importante, não só para os serviços ambientais que atualmente fornece, mas também pelo seu potencial como recurso no desenvolvimento de ferramentas de gerenciamento de ecossistemas novos e sustentáveis e oportunidades de bioprospecção. O grande desafio para o uso racional da biodiversidade brasileira é, sem dúvida, como transformar uma enorme herança genética natural em riqueza biotecnológica (PYLRO et al., 2014).

Os estudos relacionados a diversidade de microrganismos no bioma Pampa são escassos. Souza et al. (2016) isolaram 39 fungos do bioma Pampa, dentre os quais está o *Diaporthe schini*, com o objetivo de selecionar e identificar fungos que produzem metabólitos secundários com atividade herbicida. Dessa forma demonstraram que o bioma Pampa é um recurso potencial para o desenvolvimento de compostos químicos novos e sustentáveis. Evidências de que fontes biológicas podem fornecer produtos naturais com atividade fitotóxica abre uma nova perspectiva para a preservação de espécies microbianas no bioma Pampa (SOUZA, 2015).

3.2 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Os processos fermentativos se dividem em fermentação submersa (FS) e fermentação no estado sólido (FES). Na FES o conteúdo de água no substrato sólido pode ser mantido na faixa de 12 - 80%, geralmente em torno de 60%. Já na fermentação submersa, o conteúdo de água é superior a 95% (CHEN, 2013). Esse fator faz com que a FS tenha vantagens sobre a FES, pois, uma vez que o conteúdo está submerso no meio líquido, as transferências de calor e massa são mais eficientes, a modelagem do processo é mais fácil (RAO, 2010).

As tentativas de comparar os dois principais tipos de sistemas de fermentação em termos de rendimento são muito difíceis, pois existem grandes diferenças no desempenho dos fungos nas diferentes configurações. Além disso, não é possível

manter os respectivos parâmetros idênticos nos processos submerso e de estado sólido (SILVA, 2016).

Apesar de algumas desvantagens da FS em relação à FES, como maior geração de resíduos líquidos, menor concentração de produtos no meio após o fim da fermentação e maior custo de matérias – primas, a FS possui várias vantagens, dentre elas: fácil controle de temperatura, maior homogeneidade do meio e microrganismos distribuídos uniformemente no sistema de cultura (CHEN; XU, 2004). A FS é comumente utilizada porque é mais econômico bombear líquidos do que mover sólidos e é mais fácil esterilizar uma grande quantidade de líquido do que sólido (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006).

Além disso, uma das principais vantagens da FS é a base tecnológica bem estabelecida para o aumento de escala dos processos para produção industrial, a qual se deve ao controle extensivo bem desenvolvido de pH, temperatura, oxigênio e disponibilidade de nutrientes. Outra vantagem da FS é a facilidade na etapa de recuperação de produtos (SILVA, 2016).

3.3 METABÓLITOS PRODUZIDOS POR FUNGOS

Os fungos endófitos são aqueles que vivem no interior de plantas geralmente colonizando suas partes aéreas, como hastes e folhas, sem causar danos aparentes aos seus hospedeiros. Eles se distinguem dos fitopatógenos que causam doenças em plantas e dos epifíticos que vivem na superfície das plantas (ASSAKURA et al., 2009).

Os produtos do metabolismo microbiano (metabólitos) podem ser compostos muito grandes, tais como proteínas, ácidos nucleicos, polímeros de carboidratos ou mesmo células. Também podem ser moléculas menores que geralmente dividimos em metabólitos essenciais para o crescimento vegetativo e os metabólitos não essenciais, isto é, primários e secundários, respectivamente (DEMAIN; ADRIO, 2007).

Os metabólitos primários são as moléculas de todas as células vivas que são intermediários ou produtos das vias do metabolismo intermediário, ou são blocos de construção de macromoléculas essenciais ou são convertidos em coenzimas (DEMAIN; ADRIO, 2007).

Metabólitos secundários podem ser definidos como compostos que não têm papel reconhecido na manutenção de processos vitais fundamentais nos organismos que os sintetizam (BELL, 1981). Estes compostos servem para satisfazer os requisitos secundários dos organismos produtores. Eles os capacitam para sobreviver à competição entre espécies, fornecer mecanismos defensivos e facilitar os processos reprodutivos. Fontes bem conhecidas de metabólitos secundários são plantas, bactérias, fungos e organismos marinhos. Muitos metabólitos secundários provaram ser inestimáveis agentes antibacteriano e antifúngico, drogas anticancerígenas, agentes redutores de colesterol, imunossupressores, agentes antiparasitários e herbicidas. Alguns destes têm desempenhado um papel fundamental no tratamento ou na prevenção de muitos transtornos biológicos, muitos dos quais não tiveram cura até que esses produtos fossem descobertos (VAISHNAV; DEMAIN, 2010). Os endófitos são atualmente considerados como uma fonte de novos metabólitos secundários que oferecem potencial para exploração médica, agrícola e industrial (STROBEL et al., 2004).

O estudo sistemático de metabólitos secundários de fungos começou no ano de 1922 sob a liderança de Harold Raistrick, que caracterizou mais de 200 metabólitos de mofo (RAISTRICK, 1950). No entanto, não foi até a descoberta e desenvolvimento da penicilina, em 1928, que a atenção generalizada se concentrou nos metabólitos fúngicos. A pesquisa de metabólitos secundários bioativos continuou ininterruptamente, e foram descobertos milhares de compostos que inibem o crescimento de bactérias, fungos, protozoários, parasitas, insetos, vírus e até mesmo células tumorais humanas (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005).

Segundo DONADIO et al. (2002) os metabólitos secundários estão sendo obtidos após algumas décadas de extensivas pesquisas envolvendo provavelmente milhões de microrganismos. Esses compostos representam uma gama enorme de engenhosas estruturas e com potentes atividades biológicas. Entretanto, diferentes isolados geralmente produzem diferentes compostos. Assim, novos metabólitos bioativos continuam sendo identificados.

A produção quali e quantitativa de metabólitos secundários depende da capacidade biossintética do microrganismo e das condições de fermentação. Assim, a manipulação dos parâmetros do processo fermentativo pode alterar a expressão dos metabólitos secundários produzidos. Os fungos, em particular, são importantes fontes de novos metabólitos com pronunciada atividade antibacteriana, antifúngica e

antiviral. Uma grande vantagem da prospecção química de metabólitos fúngicos, em relação às demais fontes, é o fato de que microrganismos podem ser cultivados em larga escala em fermentadores, não havendo prejuízo ao ecossistema, como pode ocorrer com a retirada de plantas e algas de áreas naturais, nem problemas éticos como os que podem advir da prospecção de metabólitos bioativos a partir de insetos, anfíbios e outras espécies animais (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

A fermentação microbiana como meio de produção de substâncias bioativas tem várias vantagens, como a possibilidade de reprodução e produtividade segura, já que o microrganismo cultivado em tanques de fermentação se torna uma fonte potencialmente inesgotável. O aumento na produção é relativamente fácil, sendo que mudanças nas condições de cultura podem ser exploradas, a fim de se otimizar as várias vias biossintéticas que podem levar à produção de compostos ainda mais eficazes. Além disso, microrganismos respondem favoravelmente a técnicas rotineiras de cultura, enquanto culturas de tecidos ou o crescimento das plantas requerem técnicas especializadas ou meses de crescimento antes da coleta (TEJESVI et al., 2007).

3.4 O GÊNERO *Diaporthe*

As espécies do gênero *Diaporthe*, teleomorfo de *Phomopsis*, são endófitos, sapróbios e patógenos em uma ampla gama de hospedeiros e são responsáveis por várias doenças, algumas das quais de importância econômica (SANTOS et al., 2011). As relações do *Diaporthe* com as plantas hospedeiras podem variar, várias espécies isoladas como patógenos de culturas podem ser isoladas também como endófitos de tecidos saudáveis de hospedeiros iguais ou diferentes ou como sapróbios de material morto (PROMPUTTHA et al., 2007; UDAYANGA et al., 2011).

Algumas espécies do gênero *Diaporthe*, podem causar prejuízo ao infectar plantas de interesse econômico, causando cancrios, necrose, manchas nas folhas, podridão e ferrugem, dentre outras patologias (ÚRBEZ-TORRES et al., 2009; SANTOS et al., 2011). Por outro lado, o *Diaporthe* (incluindo sua forma *Phomopsis*) tem sido reportado como um dos gêneros mais frequentemente encontrados como endófito em diversas plantas hospedeiras em diferentes regiões (MURALI et al., 2006; GONZÁLEZ e TELLO, 2011; BOTELLA e DIEZ, 2011). A colonização dos hospedeiros por fungos endófitos leva à produção de metabólitos bioativos e ao

desenvolvimento de resistência induzida nos hospedeiros, os quais são responsáveis pela proteção direta ou indireta e promoção do crescimento dos mesmos (MAHESHWARI, 2017).

Diaporthe tem sido relatado como um gênero com potencial para o uso na biotecnologia com várias descobertas importantes, incluindo novos metabólitos fúngicos estruturalmente significativos e fisiologicamente ativos (GOMES, 2012). De acordo com Tanapichatsakul et al. (2017), o gênero *Diaporthe* é uma fonte potencial de metabólitos que podem ser usados em uma variedade de aplicações e apresentou notáveis atividades antibacteriana e antioxidante. Lin et al. (2005) identificaram metabólitos citotóxicos e antimicrobianos a partir de *Diaporthe* sp. Sousa et al. (2016) relataram efeito antibacteriano a partir de compostos produzidos pelo fungo endófito *Diaporthe* sp.. Tanney et al. (2016) encontraram efeito antifúngico do endófito *Diaporthe marítima* sp. sobre o patógeno *Microbotryum violaceum*. Santos et al. (2016) também encontraram efeito antifúngico de *D. endophytica* e *D. terebinthifolii* isolados de plantas medicinais para o controle de *Phyllosticta citricarpa* em citrus. Rukachaisirikul et al. (2008) verificaram elevada atividade antibacteriana do extrato de *Phomopsis* sp. sobre *Mycobacterium tuberculosis*.

Os metabólitos do fungo *Diaporthe* sp. também possuem efeito no controle de plantas daninhas. Ash et al. (2010) verificaram o potencial herbicida de isolados de *Phomopsis* sp. no controle de plantas daninhas da família *Asteraceae*. Souza et al. (2017) e Bastos et al. (2017) relataram atividade herbicida de metabólitos do fungo *Diaporthe* sp. em *Cucumis Sativus* L.

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Há uma necessidade geral por novos antibióticos, agentes quimioterapêuticos e agroquímicos que sejam altamente eficientes, possuam baixa toxicidade e tenham menor impacto ambiental. Essa busca ocorre devido ao desenvolvimento de microrganismos infecciosos resistentes a drogas existentes e pela presença ameaçadora de microrganismos naturalmente resistentes (STROBEL et al., 2004). A resistência microbiana ameaça a saúde, uma vez que as doenças infecciosas antigas e novas continuam sendo uma ameaça para a saúde pública (ZHANG et al., 2006).

Muitas das drogas usadas clinicamente são derivadas de produtos naturais e são originadas de espécies microbianas. O impulso atual para encontrar novas terapias para combater a resistência bacteriana a drogas estimula o interesse por novas fontes de produtos naturais (SILVER, 2015). Portanto, a descoberta de novos agentes antibacterianos naturais para o tratamento de doenças infecciosas é essencial para prevenir a propagação de doenças e melhorar seu tratamento (VU et al., 2017).

A bioprospecção de novos compostos tem como objetivo isolar compostos que sejam seguros e eficazes para uso humano. Mecanismos de triagem eficientes são cruciais para direcionar compostos ativos potenciais. A elucidação da estrutura dos produtos químicos isolados e a caracterização de suas vias biossintéticas fornecem uma base para que esses novos compostos sejam investigados em ensaios clínicos e para fins comerciais. O potencial de descoberta de fármacos antimicrobacterianos a partir de endófitos de plantas medicinais tradicionais é imenso (ALVIN; MILLER; NEILAN, 2014).

Na pesquisa clínica, inúmeros métodos são utilizados para avaliar a suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*. Esses métodos são estabelecidos por diferentes órgãos, como o Comitê Nacional para Normas de Laboratório Clínico (CNNLC, do inglês National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS). Os métodos utilizados para avaliação do potencial antimicrobiano são de difusão e diluição. No método disco-difusão em ágar, as placas de ágar são inoculadas com um inóculo padronizado do microrganismo de teste. Em seguida, os discos de papel de filtro, contendo o composto de teste a uma concentração desejada, são colocados na superfície do ágar. As placas de Petri são incubadas sob condições adequadas. Geralmente, o agente antimicrobiano se difunde no ágar e inibe a germinação e o crescimento do microrganismo de teste e, em seguida, os diâmetros das zonas de crescimento de inibição são medidos (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Os métodos de diluição são utilizados para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração testada em que não ocorre crescimento microbiano em um meio de nutriente num determinado período. A concentração letal mínima (CLM) também pode ser medida, indicando a concentração de determinada substância capaz de matar os microrganismos (PANDA, 2012).

3.5.1 Microrganismos patogênicos

Os estafilococos são bactérias gram-positivas não esporuladas que mais resistem no meio ambiente, são resistentes ao calor e podem aguentar uma concentração aumentada de sal. Apesar dos compostos antimicrobianos existentes, esse microrganismo continua a ser um dos mais importantes patógenos para o homem. Indivíduos saudáveis são colonizados intermitentemente por *Staphylococcus aureus*, o qual pode ocasionar infecções letais por conta dos fatores de virulência ou através de resistência aos antimicrobianos atualmente utilizados. Além disso, o *S. epidermidis* é conhecido como causador de infecções de cateteres e próteses, e é o mais frequente microrganismo encontrado em hemoculturas (ANVISA, 2013).

Os enterococos apresentam importância crescente como causadores de infecção, pelo aparecimento de resistência quase total aos antibióticos tradicionalmente utilizados para tratamento dessas infecções. Os Enterococos mais comumente isolados são: *Enterococcus faecalis* (90% dos casos) e *Enterococcus faecium* (ANVISA, 2013).

Os microrganismos do gênero *Bacillus* são encontrados principalmente no solo, água, matéria orgânica animal e vegetal, em condições ambientais variadas, temperatura, umidade, salinidade, pH. Dentre as principais espécies de *Bacillus* relacionadas com quadros de infecções humanas está o *B. cereus*, como causa de intoxicação alimentar, necrose ou gangrena, infecções pulmonares, meningite, entre outras (ANVISA, 2013).

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por um grande grupo de bacilos gram-negativos. As enterobactérias estão amplamente distribuídas na natureza e são encontradas no solo, água, frutas, vegetais e produtos de origem animal, como carne e ovos. Muitas espécies são patogênicas para o homem causando várias doenças, sendo responsáveis por cerca de 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias. Algumas espécies são enteropatogênicas, por causarem preferencialmente infecções gastrointestinais, normalmente transmitidas por água ou alimentos contaminados, como a *Salmonella*, *Shigella* spp., e categorias diarreio-gênicas de *Escherichia coli*. Nas infecções relacionadas a assistência à saúde, os gêneros e espécies predominantemente isolados, representando 99% das enterobactérias de importância clínica, são: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Proteus* spp., *Morganella*

morgannii, *Citrobacter* spp., e *Providencia* spp. Também são comuns as infecções urinárias causadas por *E. coli*, *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp. (ANVISA, 2013).

Além das bactérias, os fungos patógenos têm assumido um papel importante no aumento das doenças humanas nas últimas três décadas (TABOADA; GROOTERS, 2018). *Candida* é claramente o mais importante grupo de patógenos fúngicos. Entre as muitas espécies de *Candida* que podem acometer o homem, *C. albicans* é o agente mais comum nas várias formas clínicas dessa infecção. As infecções nas áreas genital, cutânea e oral quase sempre envolvem *C. albicans* (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

Fungos leveduriformes como *Cryptococcus neoformans* e *C. grubii* causam criptococose. Os fungos inalados se multiplicam em indivíduos que apresentam o sistema imune comprometido, como pacientes com Aids, disseminam-se para o sistema nervoso central e causam meningite, que possui uma alta taxa de mortalidade (TORTORA; CASE; FUNKE, 2017).

O gênero *Saccharomyces* constitui um grupo de leveduras de vasto conhecimento humano, sendo a *Saccharomyces cerevisiae* quando associada com *Candida* pode provocar a morte (SILVA et al., 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

O fungo *Diaporthe* sp. foi isolado a partir da planta *Solanum americanum* Mill. no bioma Pampa (Souza et al. 2015). A espécie do microrganismo foi identificada através do sequenciamento da região ITS (internal transcribed spacer) e mostrou 100% de similaridade com o fungo *Diaporthe schini*.

4.1.1 Identificação do Microrganismo

A identificação da espécie do fungo do gênero *Diaporthe* foi realizada pelo Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, São Paulo - SP, Brasil. O reagente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) foi utilizado para a extração do DNA fúngico, conforme Doyle e Doyle (1987), a partir do micélio cultivado em meio batata-dextrose e triturado em microtubos com auxílio de pistilo. Depois da

extração do DNA genômico, este foi submetido à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação da região ITS, usando os primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o fator alongação foram EF-1 e EF-2 (O'DONNELL e CIGELNIK, 1997). Os produtos amplificados foram purificados através da precipitação com polietilenoglicol (SCHMITZ e RIESNER, 2006). Na sequência, estes foram submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia, utilizando-se o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems). A análise foi realizada em sequenciador capilar automático 3500 XL (Applied Biosystems). Os fragmentos sequenciados obtidos foram comparados com sequências de espécimes autênticos depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information) através da ferramenta Blastn.

4.1.2 Manutenção do microrganismo

O microrganismo foi mantido em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) a 4°C em placas de Petri. Para a propagação do fungo foi utilizado o meio BDA, previamente autoclavado a 120°C e vertido em placas de Petri. As placas foram transferidas para estufa e mantidas a 28°C por 7 dias. A repicagem, a partir das placas, foi realizada em tubos Falcon contendo meio BDA, estes tubos foram mantidos em estufa a 28°C por 7 dias, para que ocorresse o crescimento, e posteriormente armazenados a 4°C.

4.2 PRÉ-INÓCULO

Para a preparação do pré-inóculo, o microrganismo contido no tubo Falcon foi incubado por 24h a 28°C. Após, o fungo foi transferido para outro tubo Falcon contendo 10 mL de um meio contendo 200 g.L⁻¹ de batata, 20 g.L⁻¹ de dextrose, 20 g.L⁻¹ de sacarose, 2,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), 1,0 g.L⁻¹ de sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄.7H₂O), 1,0 g.L⁻¹ de sulfato de manganês monohidratado (MnSO₄.H₂O) e 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O), o qual foi mantido por mais 24h a 28°C (Souza et al., 2015). Na sequência, o pré-inóculo foi transferido para um Erlenmeyer contendo 90 mL do meio com a mesma composição e foi mantido em agitador orbital (Inova 44R, New Brunswick) a 120 rpm por 2 dias, a uma temperatura de 28°C.

4.3 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

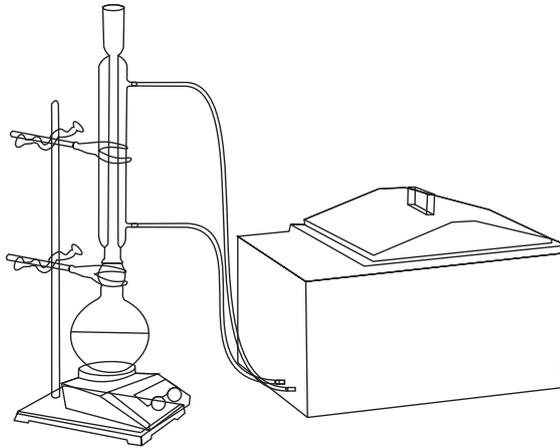
Na fermentação submersa foram utilizados frascos Erlenmeyers de 150 mL, com 10 % (v/v) de inóculo. O meio era composto por 17,05 % de água de maceração de milho (AMM) (p/v), 20 g.L⁻¹ de sacarose (açúcar cristal), 2,0 g.L⁻¹ de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), 1,0 g.L⁻¹ de sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄.7H₂O), 1,0 g.L⁻¹ de sulfato de manganês monohidratado (MnSO₄.H₂O) e 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) e o pH inicial foi ajustado para 6,0. Os frascos contendo o meio de fermentação foram mantidos em agitador orbital (Inova 44R, New Brunswick) a 120 rpm por 7 dias, a uma temperatura de 28°C (Souza et al., 2015).

Após cada fermentação, realizou-se a separação da biomassa e do caldo fermentado por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos (Centrifuge 5804R, Eppendorf). A biomassa foi esterilizada e descartada e o caldo fermentação foi armazenado em refrigerador a 4°C, para posterior extração dos compostos.

4.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS

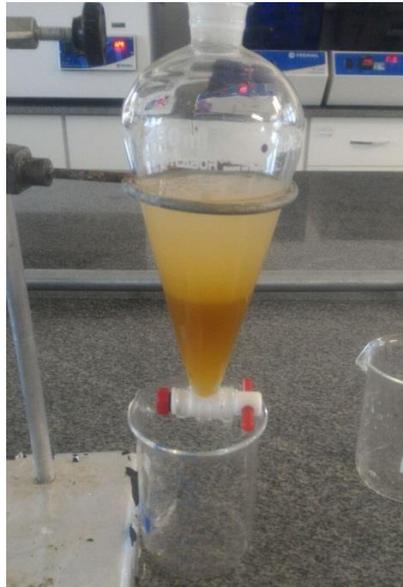
Após a fermentação, foram realizadas extrações líquido-líquido na proporção 1:2 (caldo:solvente). Foram utilizados solventes com diferentes polaridades: metanol (CH₃OH), diclorometano (CH₂Cl₂) e hexano (C₆H₁₄). Para cada solvente foi feita uma extração de 24 h, seguida de uma re-extração, na mesma proporção de 1:2, por mais 24h. Cada extração foi feita em balão de fundo redondo de 250 mL, com agitação magnética, conectado a um condensador refrigerado por um banho termostático a 10°C para que não degradasse nenhum composto, conforme o esquema da Figura 2.

Figura 2- Sistema para extração líquido-líquido dos compostos



Após as extrações, as misturas foram transferidas para funis de separação durante o período de 1 h, conforme a Figura 3.

Figura 3 - Separação de fases após a extração líquido-líquido



A fase contendo o solvente orgânico foi, posteriormente, evaporada em rotaevaporador (Fisatom 802) a 40°C e 120 rpm. Após a evaporação do solvente, ainda restaram partículas de água que foram secas em estufa a 40°C por 24h, restando apenas moléculas isentas tanto de água quanto de solvente, cujas atividades antibacteriana e antifúngica foram testadas.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA “*in vitro*”

Os testes de determinação da atividade antimicrobiana foram realizados no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em Santa Maria - RS.

Os métodos utilizados para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e as concentrações letais mínimas (CLM) foram de microdiluição em caldo padronizados M7-A6 (Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico) e M27-A2 (Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica) pelo CLSI (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) (NCCLS, 2003; NCCLS, 2002).

Os metabólitos extraídos do caldo de fermentação tiveram sua atividade antimicrobiana testada com os microrganismos catalogados na coleção “American

Type Culture Collection” (ATCC), incluindo bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos (Tabela 1).

Os microrganismos foram repicados e cultivados em meios específicos para cultivo de bactérias e fungos conforme Tabela 2. Nos ensaios os padrões utilizados foram cloranfenicol e ampicilina para bactérias e fluconazol para fungos (FDA, 1991).

Tabela 1 - Microrganismos indicadores avaliados

Grupo	Microrganismos
Bactérias gram-positivas	<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 33019)
	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 35984)
Bactérias gram-negativas	<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048)
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (isolado clínico)
	<i>Morganella morganii</i> (ATCC 25829)
	<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933)
	<i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC 13076)
Fungos	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)
	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)
	<i>Candida dubliensis</i> (ATCC MYA-577)
	<i>Candida glabrata</i> (ATCC 2001)
	<i>Candida krusei</i> (ATCC 6258)
	<i>Candida parapslosis</i> (ATCC 22019)
	<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 750)
	<i>Cryptococcus gatti</i> (ATCC 56990)
	<i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC 28952)
<i>Sacharomyces cervisiae</i> (ATCC 2601)	

Tabela 2 - Meios de cultura para repique e cultivo dos microrganismos

Meio de Cultura	Composição	Quantidade (g/L)
Repique de bactérias		
Meio Ágar nutriente	Cloreto de sódio	8,0
	Extrato de carne	3,0
	Peptona de gelatina	5,0
	Ágar bacteriológico	15,0
Repique de fungos		
Meio Ágar Sabouraud dextrosado	Dextrose	40,0
	Peptona de carne	5,0
	Peptona de caseína	5,0
	Ágar	15,0
Cultivo de bactérias		
Meio caldo de caseína de soja	Dextrose	2,5
	Cloreto de sódio	5,0
	Fosfato dibásico de potássio	2,5
	Peptona de caseína	17,0
	Peptona de soja	3,0
Cultivo de fungos		
Meio caldo Sabouraud dextrosado	Peptona de caseína	40,0
	Peptona de carne	5,0
	Dextrose	5,0

4.5.3 Preparo dos inóculos e determinação da CIM pelo método de microdiluição

As culturas dos microrganismos indicadores foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina 0,8 % com o auxílio de uma alça de platina. Os inóculos foram padronizados ao serem comparados com o tubo padrão 0,5 da escala nefelométrica de McFarland, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ (Unidades formadoras de colônia por mL).

As amostras a serem testadas foram diluídas em meio líquido (1 mg.mL⁻¹) e diluídas novamente em placas de cultura estéreis de 96 poços, nas concentrações de 500 a 3,12 µg.mL⁻¹. Cada poço foi inoculado com os microrganismos (1×10^6 células viáveis) e homogeneizados, sendo então, as microplacas incubadas por 24 horas a 35°C para bactérias e 48h a 27°C para fungos. Após o período de

incubação, o crescimento microbiano foi visualizado pela turvação, podendo ser determinada a CIM 50, ou seja, 50% da capacidade de inibir o crescimento do microrganismo em específico.

A leitura foi realizada através de densidade ótica em um espectrofotômetro (Molecular Devices modelo SpectraMax M2). A microplaca de 96 poços foi colocada em um Spectra Max M2 espectrofotômetro de microplacas (Molecular Devices Corp) programado para realizar as medições a 23°C. As densidades óticas das culturas celulares foram lidas utilizando um comprimento de onda de 620 nm (LEHTINEN et al., 2006).

4.5.4 Determinação da Concentração Letal Mínima (CLM)

Nos poços que não apresentaram crescimento de microrganismos foram realizados repiques das diluições para placa de Petri contendo ágar Müller-Hinton para bactérias e Sabourand para fungos. Após o período de incubação (24 h para bactérias e 48 h para fungos), foi possível determinar a menor concentração capaz de causar a morte dos microrganismos, determinando assim a CLM. Todos os testes foram realizados em triplicata, realizando-se a análise dos padrões simultaneamente.

4.5.5 Análise de dados

Os efeitos das diferentes concentrações das amostras testadas, do cloranfenicol e da ampicilina usados como controle positivo na proliferação de bactérias e do fluconazol usado como controle positivo para fungos, foram determinados usando análise de variância (ANOVA), com $p < 0,05$.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

A identificação dos compostos foi realizada com as amostras extraídas com hexano que apresentaram atividade antimicrobiana. Métodos cromatográficos foram utilizados na tentativa de identificar os compostos com maior efeito frente aos microrganismos.

4.6.1 Cromatografia em coluna (CC)

Visando uma separação inicial dos compostos, realizou-se a cromatografia em coluna com sílica gel (MERCK) (230-400 mesh). Foram inseridos 4g de amostra, previamente triturados com auxílio de um pistilo, no topo da coluna. A eluição foi realizada por solventes puros e sistemas de gradientes, ou seja, com aumento da polaridade da fase móvel devido a retenção da amostra pela fase estacionária. O sistema de eluentes utilizado foi hexano, acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) com polaridades crescentes, o qual começou com hexano puro, seguido do sistema hexano-AcOEt em que se aumentaram as proporções de AcOEt de 5 em 5% até ser utilizado AcOEt 100%. Na sequência, utilizou-se o sistema de solventes AcOEt-MeOH, também aumentando a proporção de MeOH de 5 em 5% até utilizar MeOH 100%.

4.6.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada do tipo ascendente foi realizada em cromatoplasmas comerciais de sílica gel 60 GF254 com 0,20 mm de espessura, sobre alumínio como fase estacionária, foi utilizada para acompanhamento das reações e avaliação do grau de pureza dos produtos.

As fases móveis corresponderam às frações eluídas com as misturas de solventes na cromatografia em coluna. A revelação na placa CCD foi realizada com luz UV ($\lambda=254$ nm e 365 nm) e, também, através da borrifação de solução etanol/ácido sulfúrico a 5% na placa. Após a exposição à solução reveladora, a CCD foi aquecida com um soprador térmico até que as substâncias orgânicas se oxidassem e fossem reveladas como pontos na placa.

A CCD foi utilizada para avaliar se as frações separadas na cromatografia em coluna eram semelhantes. As frações semelhantes foram reunidas, já as diferentes permaneceram separadas.

Após o fracionamento por CC dos extratos que tiveram suas atividades *in vitro* comprovadas e junção das frações em que os compostos eram iguais, as mesmas foram analisadas por cromatografia gasosa (GC-MS).

4.7 Cromatografia gasosa (GC-MS)

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em um cromatógrafo gasoso GC-2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Kyoto, Japão) com um injetor automático da série AOC-20is (Shimadzu, Kyoto, Japão). A coluna usada foi de sílica fundida Rtx®-5ms GC (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de espessura de filme) com 5 % difenil e 95% dimetil polissiloxano (Restek Corporation, Bellefonte, PA, EUA). O hélio foi o gás de transporte a uma vazão de 1,39 mL.min⁻¹. A temperatura do injetor foi mantida a 300°C. Um volume de 1 µL de amostra foi injetado com uma razão de divisão de 1:30. A temperatura do forno foi aumentada de 90°C para 210°C a uma taxa de 10°C.min⁻¹, depois de 210°C para 310°C a uma taxa de 3 °C.min⁻¹, onde foi mantida por 15 minutos. A temperatura da interface e a temperatura da fonte de íons foram mantidas a 300°C. Para a fragmentação dos compostos foi utilizada uma energia de 70 eV no espectrômetro de massas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Avaliação *in vitro* das atividades antifúngica e antibacteriana

Os resultados obtidos a partir do “*screening*”, para verificar a atividade antifúngica e antibacteriana, são apresentados nas Tabelas 3 e 4. As frações I, descritas nas tabelas, são provenientes da primeira extração com cada solvente e as frações II são provenientes da re-extração. Os valores de CIM e CLM de cada uma das frações testadas foram comparados com controles positivos.

As frações de extrato exibiram uma atividade inibitória significativa contra algumas das bactérias testadas, com valores de CIMs entre 7,81 e 500 µg.mL⁻¹, conforme os valores apresentados na Tabela 3, sendo a bactéria gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* (CIMs entre 7,81 e 250 µg.mL⁻¹) e as gram-negativas *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae* (CIMs entre 125 e 250 µg.mL⁻¹) as mais sensíveis. Todos os extratos apresentaram potencial antifúngico, inibindo o crescimento dos fungos testados, com CIMs entre 3,9 e 500 µg.mL⁻¹, sendo para a *Candida krusei* (CIMs entre 3,9 e 250 µg.mL⁻¹) o mais sensível.

As frações de metanol e hexano apresentaram um grande potencial bacteriostático contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* (CIMs entre 7,81 e 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) comparado com o controle positivo cloranfenicol (CIM de 1,56 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Além do potencial bacteriostático demonstrado pelas frações testadas, a fração hexano II exibiu potencial bactericida sobre *Klebsiella pneumoniae* (CLM de 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) comparada com a ampicilina (CLM > 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Conforme os resultados apresentados na Tabela 4, as frações avaliadas demonstraram atividade inibidora potencial contra *Candida krusei* com CIM de 3,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para metanol, CIM entre 3,9 e 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para hexano e CIM entre 31,25 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para diclorometano, comparado com o controle positivo fluconazol (CIM de 3,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Para os microrganismos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti*, as frações apresentaram concentração inibitória mínima de 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para todas frações de solventes e o fluconazol apresentou CIM de 1,56 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ambos os fungos.

Produtos fitoquímicos que apresentam concentração inibitória mínima entre 100 - 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em testes de susceptibilidade *in vitro* podem ser classificados como antimicrobianos (SIMÕES et al., 2009), portanto, os extratos avaliados neste estudo podem ser considerados substâncias com potencial antimicrobiano (CIM $\leq 500 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Dentre as cepas testadas, a *Candida krusei* foi a mais sensível para todas as frações de solventes.

Na Tabela 3, contrariando os outros resultados, para algumas bactérias como *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, observa-se que as frações Hexano II apresentaram uma CIM maior que as frações Hexano I. Como a extração dos metabólitos depende da afinidade com os solventes, no caso do hexano a extração dos compostos apolares, algum metabólito com efeito antibacteriano pode ter sido extraído em maior quantidade na primeira extração, ou a sinergia dos compostos extraídos nas frações Hexano I ocasionaram uma menor CIM. Em algumas situações, estas diferenças nas CIM entre as frações da extração e da re-extração podem estar relacionadas a sinergia dos compostos de uma mistura onde a interação entre essas substâncias pode ter maior efeito sobre um determinado microrganismo do que o composto na sua forma pura.

Tabela 3 - Concentrações mínimas inibitórias e letais para bactérias de diferentes frações de extrato do caldo da fermentação de *Diaporthe schini*

Bactérias	Frações (CIM 50/CLM µg.mL ⁻¹)															
	Metanol I ^a		Metanol II ^b		Hexano I ^a		Hexano II ^b		Diclorometano I ^a		Diclorometano II ^b		Cloranfenicol		Ampicilina	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
Gram positivas																
<i>Enterococcus faecalis</i>	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	3,12	25	1,56	12,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7,81	>500	7,81	>500	62,5	>500	125	>500	125	>500	250	>500	1,56	1,56	50	200
<i>Staphylococcus aureus</i>	125	>500	125	>500	125	>500	125	>500	125	>500	125	>500	3,12	12,5	200	>200
<i>Bacillus cereus</i>	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	250	>500	500	>500	1,56	12,5	200	>200
Gram negativas																
<i>Salmonella typhimurium</i>	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	250	>500	125	>500	3,12	12,5	200	>200
<i>Proteus mirabilis</i>	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	3,12	100	25	200
<i>Escherichia coli</i>	500	>500	500	>500	250	>500	500	>500	250	>500	250	>500	3,12	100	200	>200
<i>Salmonella enteritidis</i>	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	1,56	12,5	3,12	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	250	>500	125	>500	125	>500	250	125	125	>500	125	>500	3,12	50	100	>200
<i>Morganella morganii</i>	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	125	>500	125	>500	3,12	50	200	>200
<i>Enterobacter aerogenes</i>	125	>500	125	>500	125	>500	125	>500	250	>500	250	>500	3,12	12,5	200	>200

CIM 50 (concentração mínima inibitória em µg/mL capaz de inibir 50% do crescimento do microrganismo) e CLM (concentração letal mínima em µg/mL). Em negrito estão destacados os melhores resultados.

I^a: Primeira extração

II^b: Re-extração

Tabela 4 - Concentrações mínimas inibitórias e letais para fungos de diferentes frações de extrato do caldo da fermentação de *Diaporthe schini*

Fungos	Frações (CIM 50/CLM µg/mL)													
	Metanol I ^a		Metanol II ^b		Hexano I ^a		Hexano II ^b		Diclorometano I ^a		Diclorometano II ^b		Fluconazol	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<i>Candida albicans</i>	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	1,56	>200
<i>Candida tropicalis</i>	500	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	500	100	200
<i>Candida krusei</i>	3,9	>500	3,9	500	62,5	500	3,9	500	250	500	31,25	500	3,12	100
<i>Candida parapslosis</i>	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	250	>500	125	>500	1,56	12,5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	125	125	125	250	125	250	125	500	125	>500	125	>500	1,56	12,5
<i>Cryptococcus gatti</i>	125	250	125	250	125	125	125	>500	125	250	125	>500	1,56	50
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	500	500	250	500	500	>500	500	>500	500	>500	500	>500	3,12	50
<i>Candida dubliensis</i>	500	>500	250	>500	250	>500	500	>500	250	>500	500	>500	6,25	>200
<i>Candida glabrata</i>	500	500	250	500	250	>500	500	500	250	500	250	500	50	>200

CIM 50 (concentração mínima inibitória em µg/mL capaz de inibir 50% do crescimento do microrganismo) e CLM (concentração letal mínima em µg/mL).

Em negrito estão destacados os melhores resultados.

I^a: Primeira extração

II^b: Re-extração

5.2 Caracterização química

5.2.1 Cromatografia gasosa (CG-MS)

A fração extraída com hexano (Hexano 1) foi eluída por cromatografia em coluna utilizando o sistema eluente hexano-AcOEt-MeOH e foram caracterizadas por CG-MS. Nas Tabelas 5 a 11 estão descritos os principais compostos que foram identificados nestas frações. A fração eluída com Hexano:AcOEt (65:35) (Tabela 5) apresentou como compostos principais: 13-Docosenamida, (Z)- (37,52%) e 1,2-Benzenedicarboxílico ácido, bis(2-ethylhexyl) (30,20%).

Alguns dos compostos identificados na cromatografia gasosa já foram identificados em trabalhos na literatura devido a suas atividades antibacteriana e antifúngica. Zhang et al. (2018) identificaram a substância 13-Docosenamida, (Z), produzida por *Trichoderma longibrachiatum* T6, como uma das substâncias responsáveis pela potencial atividade inibidora contra fungos fitopatogênicos como *Valsa mali*, *Rhizoctonia solani* e *Alternaria mali*. Além disso, Pradheesh et al. (2017) identificaram 13-Docosenamida, (Z) como uma das substâncias presentes no extrato etanólico da planta medicinal *Pisonia grandis* R. Br, a qual apresentou efeito antibacteriano contra *S. aureus* e efeito antifúngico contra *A. niger*.

O segundo composto majoritário (1,2-Benzenedicarboxílico ácido, bis(2-ethylhexyl)) também apresentou atividade biológica no estudo de Habib e Karim (2009) que isolaram o composto da flor de *Calotropis gigantea* (Linn.), tendo observado atividade contra o fungo *Aspergillus flavus*, e antibacteriana contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, e *Sarcina lutea*) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella shiga* e *Shigella dysenteriae*).

Tabela 5 - Caracterização química da fração eluída no sistema de solventes Hexano:AcOEt (65:35)

Pico	TR	Composto	Fórmula Molecular	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	Área do pico (%)
1	7,117	4-Oxononanal	C ₉ H ₁₆ O ₂	156,225	6,12
2	7,307	2-Decenal, (E)-	C ₁₀ H ₁₈ O	154,253	4,87
3	8,457	Octadecanoic acid, 2-oxo-, methyl ester	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	312,487	7,24
4	8,611	2-Undecenal	C ₁₁ H ₂₀ O	168,280	4,58
5	15,534	Triacotanoic acid, methyl ester	C ₃₁ H ₆₂ O ₂	466,823	3,36
6	16,642	Decane, 1-bromo-2-methyl-	C ₁₁ H ₂₃ Br	235,209	3,10
7	18,445	13-Docosenoic acid, methyl ester, (Z)-	C ₂₃ H ₄₄ O ₂	352,594	3,01
8	27,727	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl)	C₂₄H₃₈O₄	390,556	30,20
9	32,961	13-Docosenamide, (Z)-	C₂₂H₄₃NO	337,583	37,52

TR- Tempo de retenção

A fração proveniente do sistema de solventes Hexano:AcOEt (50:50) (Tabela 6) foi composta majoritariamente por 9-octadecenamide (85,77%), a qual também se destacou na fração eluída com o solvente AcOEt (100%) (Tabela 7) compondo 75,83% da mesma.

Hameed, Altameme e Mohammed (2016) observaram que o composto 9-octadecenamide, identificado no extrato metanólico de *Cinnamon bark* possui atividades antifúngica e antibacteriana frente a *Aspergillus flavus* e a *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente. Premjanu e Jaynthy (2014) relataram a produção deste composto pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* com atividade antibacteriana, principalmente, contra bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus*. Estes resultados estão de acordo com o observado neste estudo frente ao *S. Aureus*.

Tabela 6 - Caracterização química da fração eluída no sistema de solventes Hexano:AcOEt (50:50)

Pico	TR	Composto	Fórmula Molecular	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	Área do pico (%)
1	18,819	Dodecanamide	C ₁₂ H ₂₅ NO	199,338	4,81
2	28,060	1,2-Benzenedicarboxylic acid, 3-nitro-	C ₈ H ₅ NO ₆	211,128	9,42
3	33,302	9- Octadecenamide	C₁₈H₃₅NO	281,477	85,77

TR- Tempo de retenção.

Tabela 7 - Caracterização química da fração eluída no sistema de solvente AcOEt (100%)

Pico	TR	Composto	Fórmula Molecular	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	Área do Pico (%)
1	15,947	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	276,370	1,75
2	16,793	Hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	226,441	1,65
3	18,759	Decanamide	C ₁₀ H ₂₁ NO	171,279	2,21
4	20,236	Hexadecanamide	C ₁₆ H ₃₃ NO	255,439	1,74
5	20,361	Heneicosane	C ₂₁ H ₄₄	296,574	2,00
6	23,992	(Z)-9- Octadecenamide	C ₁₈ H ₃₅ NO	281,477	2,28
7	24,472	1,3-Propanediol, ethyl tetradecyl ether	C ₁₉ H ₄₀ O ₂	300,519	3,42
8	27,974	1,2-Benzenedicarboxylic acid, 3-nitro-	C ₈ H ₅ NO ₆	211,128	9,13
9	33,216	9- Octadecenamide	C₁₈H₃₅NO	281,477	75,83

TR- Tempo de retenção.

No sistema AcOEt:MeOH (80:20) (Tabela 8) as substâncias majoritárias foram 5,10-diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a;1',2'-d]pyrazine (37,16%), 1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutyl bicyclo[4.3.0]nonane (25,41%). Ambas substâncias possuem ação antimicrobiana descrita na literatura.

A substância 5,10-diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a;1',2'-d]pyrazine, produzida por *Lactobacillus casei* AST18, foi relatada como potencial antifúngica contra *Penicillium sp.* (LI et al., 2012). Gohar et al. (2010) relatou que a presença do composto químico 1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutyl bicyclo[4.3.0]nonane produzido por *Burkholderia cepacian* pode ser responsável pela atividade antibacteriana contra *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* e *Vibrio ordalli*.

Nesta fração o composto 1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis (2-ethylhexyl) não foi majoritário, entretanto esta presente podendo ser responsável pela atividade antibacteriana desta fração, como foi observado por Habib e Karim (2009).

Tabela 8 - Caracterização química da fração eluída no sistema de solventes AcOEt:MeOH (80:20)

Pico	TR	Composto	Fórmula Molecular	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	Área do Pico (%)
1	10,670	3,6-Dimethylpiperazine-2,5-dione	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	142,156	9,80
2	11,611	2,6-Dimethyl-3-propylpyrazine	C ₉ H ₁₄ N ₂	150,221	4,72
3	12,541	Cycloglycylserine	C ₅ H ₈ N ₂ O ₃	144,053	2,68
4	13,133	3-Methyl-1,4-diazabicyclo[4.3.0]nonan-2,5-dione,	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₃	210,229	10,13
5	13,416	3-Pyrrolidin-2-yl-propionic acid	C ₇ H ₁₃ NO ₂	143,186	0,82
6	13,811	3-Hydroxymethyl-piperazine-2,5-dione	C ₅ H ₈ N ₂ O ₃	144,130	0,74
7	15,028	Ornithine- containing lipid	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	132,163	1,69
8	16,050	1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutyl bicyclo[4.3.0]nonane	C₁₁H₁₈N₂O₂	210,000	25,41
9	16,435	5,10-Diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a:1',2'-d]pyrazine	C₁₄H₂₂N₂O₂	250,337	37,16
10	17,144	Glycyl-L-proline	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₃	172,182	1,12
11	18,485	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294,472	0,47
12	18.569	Methyl 9-acetylhydroxypalmitate	C ₁₉ H ₃₆ O ₄	328.000	0.04
13	20.015	2-benzyl-3,6-dioxo-5-methylpiperazine	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	218.252	0.94
14	20.305	2-ethyl-2-methyltridecan-1-ol	C ₁₆ H ₃₄ O	242.447	0.14
15	20.530	2,5-Piperazinedione, 3-(phenylmethyl)-	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.225	0.89
16	24.391	1-Iodohexadecane	C ₁₆ H ₃₃ I	352.344	0.52
17	27.908	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl)	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390.564	1.86
18	29.559	Tricosanoic acid, methyl ester	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	368.6367	0.86

TR- Tempo de retenção.

As substâncias 2-Hexadecene,3,7,11,15-tetramethyl (71,70%) e 5,10-Diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a;1',2'-d]pyrazine (17,54%) foram obtidas majoritariamente na fração eluída com AcOEt:MeOH (75:25) (Tabela 9). O composto 5,10-Diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a;1',2'-d]pyrazine, também presente na fração eluída com AcOEt:MeOH (80:20) (Tabela 8) teve potencial antifúngico anteriormente relatado por Li et al. (2012).

Senthilkumar, Sambath e Vasanthara (2013), ao testar extrato metanólico de folhas de *Ruellia tuberosa* contendo 2-Hexadecene, 3,7,11,15-tetramethyl, relataram significativa atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus subtilis* e *Proteus mirabilis*, e atividade antifúngica contra *Aspergillus sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.* e *Fusarium sp.*

Tabela 9 - Caracterização química da fração eluída no sistema de solventes AcOEt:MeOH (75:25)

Pico	TR	Composto	Fórmula Molecular	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	Área do Pico (%)
1	10,580	3,6-Dimethylpiperazine-2,5-dione	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	142,156	1,55
2	10,969	3-Methyldioxopiperazine	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	128,000	4,98
3	11,560	2,6-Dimethyl-3-propylpyrazine	C ₉ H ₁₄ N ₂	150,221	4,23
4	16,006	2-Hexadecene, 3,7,11,15-tetramethyl	C₂₀H₄₀	280,54	71,70
5	16,361	5,10-Diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a:1',2'-d]pyrazine	C₁₄H₂₂N₂O₂	250,337	17,54

TR- Tempo de retenção

Na fração eluída com AcOEt:MeOH (70:30) (Tabela 10) os compostos predominantes foram: heptadecanoic acid, heptadecyl ester (47,54%), Undec-10-ynoic acid, undecyl ester (12,89%) e Di-(9-octadecenoyl)-glycerol (10,94%).

Tabela 10 - Caracterização química da fração eluída no sistema de solventes AcOEt:MeOH (70:30)

Pico	TR	Composto	Fórmula Molecular	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	Área do Pico (%)
1	7,231	Heptadecanoic acid, heptadecyl ester	C₃₄H₆₈O₂	508,916	47,54
2	9,651	(Z)-10-Tetradecen-1-ol acetate	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254,414	9,15
3	10,460	Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	C ₁₄ H ₂₂ O	206,324	4,82
4	10,550	Di-(9-octadecenoyl)-glycerol	C₃₉H₇₂O₅	621,000	10,94
5	11,446	Undec-10-ynoic acid, undecyl ester	C₂₂H₄₀O₂	336,551	12,89
6	11,836	9-Octadecenoic acid (Z)-2-Cyclohexyl-4-	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,461	6,36
7	14,859	hydroxymethyl-1-oxa-2-aza-spiro[5.5]undecane-3-carbonitrile	C ₁₇ H ₂₈ N ₂ O	292,000	3,60
8	15,469	Hexadecanoic acid, methyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270,450	1,59
9	17,414	Glutaric acid, tridec-2-yn-1-yl 2,4-dimethylpent-3-yl ester	C ₂₅ H ₄₄ O ₄	408,614	1,49
10	27,646	1,2-Benzenedicarboxylic acid, 3-nitro-	C ₈ H ₅ NO ₆	211,128	1,61

TR- Tempo de retenção.

Na fração de AcOEt:MeOH (65:35) (Tabela 11) foram obtidas majoritariamente as substâncias: 11-Octadecenoic acid, methyl ester (52,98%), 9-Octadecenoic acid (Z)- (14,29%) e Hexadecanoic acid, methyl ester (13,37%).

A substância Hexadecanoic acid, methyl ester, também conhecida como ácido palmítico, possui propriedades antifúngicas. De acordo com Agoramoorthy et al. (2007), ésteres metílicos de ácidos graxos de *Excoecaria agallocha*, rica em ésteres metílicos de ácido palmítico (56,02%), suprimiram o crescimento de quatro espécies de *Candida*, são elas: *C. Albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Além disso, Abubacker e Deepalakshmi (2013) relataram o potencial antifúngico *in vitro* do Hexadecanoic Acid, methyl ester isolado de folhas de *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) contra os fungos *Alternaria solani* e *A. erithrocephalus*. Chandrasekaran et al. (2011) descreveram a capacidade antifúngica e antibacteriana tanto de Hexadecanoic Acid, methyl ester quanto de 9-Octadecenoic acid (Z), também denominado ácido oleico, contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus pumilus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* e contra o fungo *Candida Albicans*. O composto 11-Octadecenoic acid, methyl ester obtido a partir de *Lenzites quercina* apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 35218), Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Salmonella typhi*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (OGIDI; OYETAYO; AKINYELE, 2015).

Tabela 11 - Caracterização química da fração eluída no sistema de solventes AcOEt:MeOH (65:35)

Pico	TR	Nome do composto	Fórmula Molecular	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	Área do Pico (%)
1	10,485	9-Octadecenoic acid (Z)-	C₁₈H₃₄O₂	282,461	14,29
2	11,401	9-Octadecenal, (Z)-	C ₁₈ H ₃₄ O	266,462	4,31
3	13,835	Boraneamine, N-ethyl-1,1-dipropyl-	C ₈ H ₂₀ BN	141,062	1,73
4	15,191	9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268,435	1,14
5	15,451	Hexadecanoic acid, methyl ester	C₁₇H₃₄O₂	270,451	13,37
6	16,212	3,9-diazatricyclo[7.3.0.0(3,7)]dodecan-2,8-dione	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O	194,000	3,61
7	18,017	.gamma.-Linolenic acid, methyl ester	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292,500	1,23
8	18,300	(5E,7Z)-5,7-dodecadien-1-ol	C ₁₂ H ₂₂ O	182,307	3,93
9	18,348	11-Octadecenoic acid, methyl ester	C₁₉H₃₆O₂	296,488	52,98
10	18,756	Methyl stearate	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298,511	3,41

TR- Tempo de retenção.

A Tabela 12 apresenta uma comparação dos principais compostos identificados neste trabalho fazendo uma comparação com alguns trabalhos da literatura que observaram estes metabólitos e sua atividade biológica.

Tabela 12 - Compostos com atividades biológicas extraídos de microrganismos

Nome do composto	Atividades biológicas	Microrganismos indicadores	Referências
13-Docosenamida, (Z)-	Antifúngico	<i>Valsa mali</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Alternaria mali</i>	Zhang et al. (2018)
13-Docosenamida, (Z)-	Antifúngico	<i>A. niger</i>	Pradheesh et al. (2017)
13-Docosenamida, (Z)-	Antibacteriano	<i>S. aureus</i>	Pradheesh et al. (2017)
13-Docosenamida, (Z)-	Antibacteriano	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este trabalho
13-Docosenamida, (Z)-	Antifúngico	<i>Candida krusei</i>	Este trabalho
1,2-Benzenedicarboxílico ácido, bis (2-etilhexil)	Antifúngico	<i>Aspergillus flavus</i> ;	Habib e Karim (2009)
1,2-Benzenedicarboxílico ácido, bis (2-etilhexil)	Antibacteriano	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Sarcina lutea</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Shigella shiga</i> e <i>Shigella dysenteriae</i>	Habib e Karim (2009)
1,2-Benzenedicarboxílico ácido, bis (2-etilhexil)	Antibacteriano	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este trabalho
1,2-Benzenedicarboxílico ácido, bis (2-etilhexil)	Antifúngico	<i>Candida krusei</i>	Este trabalho
9-octadecenamida	Antibacteriano	<i>Staphylococcus aureus</i>	Premjanu e Jaynthy (2014)
9-octadecenamida	Antibacteriano	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hameed, Altameme e Mohammed (2016)
9-octadecenamida	Antifúngico	<i>Staphylococcus aureus</i>	Hameed, Altameme e Mohammed (2016)
9-octadecenamida	Antibacteriano	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este trabalho
9-octadecenamida	Antifúngico	<i>Candida krusei</i>	Este trabalho
5,10-diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a;1',2'-d]pirazina	Antifúngico	<i>Penicillium sp.</i>	Li et al. (2012)

5,10-diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a;1',2'-d]pyrazine	Antibacteriano	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este trabalho
5,10-diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a;1',2'-d]pyrazine	Antifúngico	<i>Candida krusei</i>	Este trabalho
1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutyl bicyclo[4.3.0]nonane	Antibacteriano	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> e <i>Vibrio ordalii</i>	Gohar et al. (2010)
1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutyl bicyclo[4.3.0]nonane	Antibacteriano	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este trabalho
1,4-diaza-2,5-dioxo-3-isobutyl bicyclo[4.3.0]nonane	Antifúngico	<i>Candida krusei</i>	Este trabalho
Hexadecanoic acid, methyl ester	Antifúngico	<i>C. Albicans</i> , <i>C.krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. Parapsolosis</i>	Agoramoorthy et al. (2007);
Hexadecanoic acid, methyl ester	Antifúngico	<i>Alternaria solani</i> e <i>A. erithrocephalus</i>	Abubacker e Deepalakshmi (2013);
Hexadecanoic acid, methyl ester	Antifúngico	<i>Candida Albicans</i>	Chandrasekaran et al. (2011)
Hexadecanoic acid, methyl ester	Antibacteriano	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Chandrasekaran et al. (2011)
Hexadecanoic acid, methyl ester	Antibacteriano	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Este trabalho
Hexadecanoic acid, methyl ester	Antifúngico	<i>Candida krusei</i>	Este trabalho
9-Octadecenoic acid (Z) (ácido oleico)	Antifúngico	<i>Candida Albicans</i>	Chandrasekaran et al. (2011)
9-Octadecenoic acid (Z) (ácido	Antibacteriano	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> ,	Chandrasekaran et al. (2011)

oleico)		<i>Staphylococcus aureus, Bacillus pumilus, Klebsiella pneumoniae e Pseudomonas aeruginosa.</i>	
9-Octadecenoic acid (Z) (ácido oleico)	Antibacteriano	<i>Staphylococcus epidermidis Enterobacter aerogenes and Klebsiella pneumoniae</i>	Este trabalho
9-Octadecenoic acid (Z) (ácido oleico)	Antifúngico	<i>Candida krusei</i>	Este trabalho
11-Octadecenoic acid, methyl ester	Antibacteriano	<i>Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Methicillin Resistant Staphylococcus aureus, Salmonella typhi, Bacillus cereus e Enterococcus faecalis</i>	Ogidi, Oyetayo e Akinyele (2015)
11-Octadecenoic acid, methyl ester	Antifúngico	<i>Candida albicans, e Aspergillus niger</i>	Ogidi, Oyetayo e Akinyele (2015)
11-Octadecenoic acid, methyl ester	Antibacteriano	<i>Staphylococcus epidermidis Enterobacter aerogenes and Klebsiella pneumoniae</i>	Este trabalho
11-Octadecenoic acid, methyl ester	Antifúngico	<i>Candida krusei</i>	Este trabalho
2-Hexadecene, 3,7,11,15-tetramethyl	Antibacteriano	<i>Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumonia, Bacillus subtilis e Proteus mirabilis</i>	Senthilkumar, Sambath e Vasanthara (2013)
2-Hexadecene, 3,7,11,15-tetramethyl	Antifúngico	<i>Aspergillus sp., Mucor sp., Penicillium sp. e Fusarium sp.</i>	Senthilkumar, Sambath e Vasanthara (2013)
2-Hexadecene, 3,7,11,15-tetramethyl	Antibacteriano	<i>Staphylococcus epidermidis Enterobacter aerogenes and Klebsiella pneumoniae</i>	Este trabalho
2-Hexadecene, 3,7,11,15-tetramethyl	Antifúngico	<i>Candida krusei</i>	Este trabalho

6 CONCLUSÃO

Os metabólitos produzidos por fermentação submersa de *Diaporthe schini* apresentaram atividades antifúngica e antibacteriana promissoras frente aos microrganismos avaliados. Embora as frações testadas tenham sido menos ativas do que os controles positivos, considerando que as frações são extratos, e não metabólitos isolados, os metabólitos endofíticos de *Diaporthe schini* podem ser candidatos a agentes antibacterianos e antifúngicos alternativos para cepas resistentes.

Os principais compostos identificados foram: 13-Docosenamida, (Z); 2-Hexadeceno, 3,7,11,15-tetrametil; 9-Octadecenamida e 11-Octadecenoico ácido, metil éster, compostos estes que já possuem atividade biológica previamente descrita na literatura, confirmando a ação dos extratos testados. Este estudo possibilitou uma investigação mais aprofundada frente a atividade biológica destes metabólitos produzidos, sendo que as condições do processo possam ser otimizadas buscando produzir um composto específico.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar qual molécula é responsável pela atividade antifúngica e antibacteriana, ou se a sinergia entre as moléculas possui maior efeito sobre os microrganismos em relação aos compostos aplicados isoladamente;
- Separar por cromatografia em coluna os extratos provenientes das extrações feitas com os outros solventes (metanol e diclorometano) e caracterizar as frações obtidas para verificar se existem substâncias diferentes das que já foram caracterizadas;
- Avaliar em cromatografia de coluna outras resinas que poderiam ser aplicadas na separação dos compostos produzidos pelo fungo.

REFERÊNCIAS

- ABUBACKER, M. N.; DEEPALAKSHMI, T. *In vitro* Antifungal Potentials of Bioactive Compound Methyl Ester of Hexadecanoic Acid Isolated from *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) Leaves. **Biosciences Biotechnology Research Asia**. v. 10(2), p. 879-884, 2013.
- AGORAMOORTHY, G. et al. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, p. 739-742, 2007.
- ALVIN, A.; MILLER, K. I.; NEILAN, B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiological Research**. v.169, p.483-495, 2014.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde: Detecção e identificação de bactérias de importância médica**. Brasília, 154 p., 2013.
- ASH, G. J. et al. Genetic characterization of a novel *Phomopsis* sp., a putative biocontrol agent for *Carthamus lanatus*. **Mycologia**, v. 102, p. 54–61, 2010.
- ASSAKURA, A. H., et al. Obtenção de metabólitos do fungo endofítico 3-10.1.2 isolado de *Trichilia elegans* e seu uso potencial no controle de fitopatógenos. In: VI EPCC - ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, 2009, Maringá. **Anais...** Maringá: CESUMAR, 2009. Disponível em: < https://www.unicesumar.edu.br/epcc-2009/wp-content/uploads/sites/77/2016/07/andre_hitoshi_assakura.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2018.
- AZEVEDO, L. F. **SABERES E PRÁTICAS TRADICIONAIS: uma análise do modo de apropriação da natureza pelos pecuaristas familiares da Serra do Sudeste/RS**. 2013. Dissertação (Mestrado em extensão rural) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013. Pg.169.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA; S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. v. 6, p.71-79, 2016.
- BASTOS, B. O. et al. Solid-state fermentation for production of a bioherbicide from *Diaporthe* sp. and its formulation to enhance the efficacy. **3 Biotech**, v. 7, 2017.
- BASKARAN, R. et al. Screening of microbial metabolites and bioactive components. In: Harzevili, F.D.; Chen, H. **Microbial Biotechnology: Progress and Trends**. 1. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2015. cap. 2, p: 9-32.
- BELL, E.A. The Physiological Role(s) of Secondary (Natural) Products. In: CONN, E.E.; STUMPF, P.K. **The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise**. 1 ed. Academic Press, 1981, v.7, p.1-19.

BOLDRINI, I.I. A flora dos campos do Rio Grande do Sul. In: Pillar, V.P. et al. **Campos sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília, Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2009, p. 63-77.

BOTELLA, L.; DIEZ, J. J. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. **Fungal Diversity**, v. 47, p. 9-18, 2011.

CHANDRASEKARAN, M. et al. Antibacterial and antifungal efficacy of fatty acid methyl esters from the leaves of *Sesuvium portulacastrum* L. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. v.15, p. 775-780, 2011.

CHEN, H. **Modern Solid State Fermentation: Theory and Practice**. New York: Springer, 2013. 324 p.

CHEN, H. Z.; XU, J. **Principle and application of modern solid-state fermentation**. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.

COLEMAN, J.J.; MYLONAKIS, E. *In Vivo* High-throughput Antimicrobial Discovery Screens Utilizing *Caenorhabditis elegans* as an Alternative Host. In: Tegos, G.; Mylonakis, E. **Antimicrobial Drug Discovery: Emerging Strategies**. 1. ed. Wallingford, UK: CABI, 2012. cap. 18, p: 292-299.

DEMAIN, A.L.; ADRIO, J.L. Contributions of Microorganisms to Industrial Biology. **Molecular Biotechnology**, v. 38, p.41-55, 2007.

DONADIO, S. et al. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v.99, p. 187-198, 2002.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p. 11-15, 1987.

FDA. Food and Drugs Administration. **Code of Federal Regulations**, cap. 21, 300p., 1991.

FLORES, A. C. et al. Production of 3-nitropropionic acid by endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from *Trichilia elegans* A. JUSS ssp. *elegans* and evaluation of biological activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 29, 5 ed., p. 923-932, 2013.

FOUDA et al. Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). **Annals of Agricultural Science**, v. 60, p. 95-104, 2015.

GOHAR, Y.M. et al. Characterization of marine *Burkholderia cepacia* antibacterial agents. **Journal of Natural Products**, v. 3, p. 86-94, 2010.

GOMES, R. R. **Filogenia e taxonomia do gênero *Diaporthe* e a sua aplicação no controle biológico da mancha preta dos citros**. (Doutorado em Genética) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

- GONZÁLEZ, V.; TELLO, M. L. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. **Fungal Diversity**, v. 47, p.29-42, 2011.
- HABIB, M. R.; KARIM, M. R. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate and Anhy-drosophoradiol-3-acetate Isolated from *Calotropis gigantean* (Linn.) Flower. **Mycobiology**, v. 37, p.31-36, 2009.
- HAMEED, I. H.; ALTAMEME, H. J.; MOHAMMED, G. J. Evaluation of Antifungal and Antibacterial Activity and Analysis of Bioactive Phytochemical Compounds of *Cinnamomum zeylanicum* (Cinnamon bark) using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Oriental Journal of Chemistry**, v.32(4), p. 1769-1788, 2016.
- HUANG, Z. et al. Chemistry and weak antimicrobial activities of *Phomopsis* produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1604-1608, 2008.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapas de biomas e vegetação**. 2004. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169. Acesso em: 02 mar. 2018.
- IOCA, L. P.; ALLARD, P.M.; BERLINCK, R. G. S. Thinking big about small beings – the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil. **Natural Product Reports** v. 31, p. 646-675, 2014.
- KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal Secondary Metabolism - From Biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 937-947, 2005.
- KUSARI S., HERTWECK C., SPITELLER M. Chemical Ecology and Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 792-798, 2012.
- LEHTINEN, J., et al. Real-time monitoring of antimicrobial activity with the multiparameter microplate assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 381–389, 2006.
- LI, H. et al. Identification of Antifungal Compounds Produced by *Lactobacillus casei* AST18. **Current Microbiology**, v. 65, p.156-161, 2012.
- LUPATINI, M. et al. Land-use change and soil type are divers of fungal and archeal communities in the Pampa biome. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.223-233, 2013.
- MAHESHWARI, D. K. **Endophytes: Biology and Biotechnology**. Haridwar: Springer, 2017. 341 p.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**. Berlim: Springer, p.4, 2006.

MURALI, T. T.; SURYANARAYANAN, T. S.; GEETA, R. Endophytic species: host range and implications for diversity estimates. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 673-680, 2006.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M. **A. Microbiologia médica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition**. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Second Edition**. NCCLS document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.

O'DONNELL, K. e CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, p. 103-116, 1997.

OGIDI, O.C.; OYETAYO, V. O.; AKINYELE, B. J. *In Vitro* Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Extracts Obtained from Raw and Fermented Wild Macrofungus, *Lenzites quercina*. **International Journal of Microbiology**, 2015.

PANDA, S. K. Screening methods in the study of antimicrobial properties of medicinal plants. **International Journal of Biotechnology and Research**, v. 2, p. 1-35, 2012.

PES, M. P. et al. Bioherbicide based on *Diaporthe* sp. secondary metabolites in the control of three tough weeds. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, p. 4242-4249, 2016.

PRADA H, et al. Caracterización morfológica y molecular del antagonismo entre el endófito *Diaporthe* sp. aislado de frailejón (*Espeletia* sp.) y el fitopatógeno *Phytophthora infestans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, p. 198–201, 2009.

PRADHEESH, G. et al. Antimicrobial activity and identification of potential ethanolic antimicrobial compounds from the medicinal plant *Pisonia grandis* R.Br. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 1686-1700, 2017.

PREMJANU, N.; JAYTHY, C. Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Lannea corammendalica*. **International Journal of Chemtech Research**, v.7, p. 369-374, 2014.

PROMPUTTHA I. et al. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 579–590, 2007.

PYLRO, V. S. et al. Brazilian Microbiome Project: Revealing the Unexplored Microbial Diversity – Challenges and Prospects. **Microbial Ecology**, v. 67, p. 237-241, 2014.

RAISTRICK, H. A region of biosynthesis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. v. 136, p.481-508, 1950.

RAJ, S.N.; SHETTY, H. S. Endophytic Fungi: Mutualism, Bioactive Metabolites and Bioprospecting. In: SRIDAR, K. R.(ed). **Frontiers in Fungal Ecology, Diversity and Metabolites**. 1 ed. Mangalore, India: IK International Publishing, 2009. cap 12, p. 169.

RAO, D. G. Fermentation. In: **Introduction to Biochemical Engineering**. 2. Ed. New Delhi: Tata McGraw Hill, 2010. cap. 5, p. 84-115.

RUKACHAISIRIKUL, V. et al. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. **Phytochemistry**, v. 69, p. 783-787, 2008.

SANTOS, J. M. et al. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. **Persoonia**, v. 27, p.9-19, 2011.

SANTOS, P. J. C. et al. *Diaporthe endophytica* and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa*. **Microbiological Research**, v. 186–187, p. 153–160, 2016.

SEBASTIANES, F. L. S. et al. 3-Hydroxypropionic Acid as an Antibacterial Agent from Endophytic Fungi *Diaporthe phaseolorum*. **Current Microbiology**, v. 65, p. 622-632, 2012.

SENTHILKUMAR, P.; SAMBATH, R.; VASANTHARAJ, S. Antimicrobial Potential and Screening of Antimicrobial compounds of *Ruellia tuberosa* Using GC-MS. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 20, p. 184-188, 2013.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, p. 311-313, 2006.

SILVA, F. H. A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* infection – an unusual pathogen in the ICU. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, p.108-111, 2011.

SILVA, R. N. Mycology: Current and Future Developments: Fungal Biotechnology for Biofuel Production. **Bentham Science Publishers**, v.1, p. 351, 2016.

SILVER, L. L. Natural Products as a source of drugs leads to overcome drug resistance. **Future Microbiology**, vol. 10, p. 1711-1718, 2015.

SIMÕES, M., BENNETT, R.N., ROSA, E.A.S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 746-757, 2009.

SOUSA, J. P. B. et al. Chemical constituents and their antibacterial activity from the tropical endophytic fungus *Diaporthe* sp. F2934. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, p. 1501-1508, 2016.

SOUZA, A.R.C. et al., 2015. Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. isolated from the Brazilian Pampa biome. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.4, p. 575-578, 2015.

SOUZA, A. R. C. et al. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 101-108, 2017.

SPECIAN, V. et al. Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* isolated from *Luehea divaricate*. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1174-1182, 2012.

STROBEL, G. et al. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, 2004.

TABOADA, J.; GROOTERS, A. M. Systemic antifungal therapy. In: **Small Animal Clinical Pharmacology**, v. 2, p. 186-197, 2008.

TANAPICHATSAKUL, C. et al. Antibacterial and Antioxidant Metabolites of *Diaporthe* sp. Isolated from Flowers of *Melodorum fruticosum*. **Current Microbiology**, v. 75, p.476-483, 2017.

TANNEY, J. B. et al. Production of antifungal and antiinsectan metabolites by the *Picea* endophyte *Diaporthe marítima* sp. nov. **Fungal Biology**, v.120, p. 1448-1457, 2016.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n.7, p. 1807-1813, 2008.

TEJESVI, M. V. et al. New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. **Boletín de la Sociedad Química de México**, v. 1, p. 19-26, 2007.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 964 p.

UDAYANGA, D. et al. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. **Fungal Diversity**, v. 50, p. 189-225, 2011.

ÚRBEZ-TORRES J. R. et al. *Phomopsis* dieback: a grapevine trunk disease caused by *Phomopsis viticola* in California. **Plant Disease**, v. 97, p. 1571–1579, 2013.

VAISHNAV, P.; DEMAIN, A. L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 223-229, 2010.

VU, T. T. et al. Antibacterial activity of tannins isolated from *Sapium baccatum* extract and use for control of tomato bacterial wilt. **PLoS ONE**, v. 12(7), 2017.

XU, L. et al. Antibacterial and Antifungal Compounds from Marine Fungi. **Marine Drugs**, v. 13, p. 3479-3513, 2015.

WHITE, T. J. et al. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: INNIS, M. A. et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press, Inc., 1990. p. 315-322.

YENN et al. Endophytic *Diaporthe* sp. ED2 Produces a novel Anti-Candidal Ketone Derivative. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p.1065-1070, 2017.

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

ZHANG, S. et al. Identification of the antifungal activity of *Trichoderma longibrachiatum* T6 and assessment of bioactive substances in controlling phytopathogens. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 59-66, 2018.