



UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ - UNIFESSPA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
FACULDADE DE QUÍMICA

DEISIANE DE SOUZA SILVA

**ESTUDO DO POTENCIAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS AO BABAÇU**

MARABÁ-PARÁ
2022

DEISIANE DE SOUZA SILVA

**ESTUDO DO POTENCIAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS AO BABAÇU**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado à Faculdade de Química do
Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal do Sul e Sudeste do
Pará, como requisito parcial para obtenção
do grau de Licenciatura Plena em Química

Orientadora: Profa. Dra. Marilene Nunes
Oliveira.

MARABÁ-PARÁ
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará
Biblioteca Setorial II da UNIFESSPA

M586a Silva, Deisiane de Souza
Avaliação do potencial de controle biológico de fitopatógenos por endofíticos do Babaçu / Deisiane de Souza Silva. — 2022.
73 f.: il. color.

Orientador (a): Marilene Nunes Oliveira.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Instituto de Ciências Exatas, Faculdade de Química, Curso de Licenciatura Plena em Química, Marabá, 2022.

1. Fungos endofíticos. 2. Controle biológico - fungos. 3. Babaçu. I. Oliveira, Marilene Nunes, orient. II. Título.

CDD: 22. ed.: 572.3

DEISIANE DE SOUZA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CONTROLE BIOLÓGICO DE
FITOPATÓGENOS POR ENDOFÍTICOS DO BABAÇU**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado à Faculdade de Química do
Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal do Sul e Sudeste do
Pará, como requisito parcial para obtenção
do grau de Licenciatura Plena em Química.

Data de aprovação: Marabá (PA), 24 de junho de 2022.

Banca examinadora

Prof.^a Dr.^a. Marilene Nunes Oliveira
Orientadora – FAQUIM/Unifesspa

Prof.^a Dr.^a. SIMONE YASUE SIMOTE SILVA/ FAQUIM/Unifesspa
Membro Interno

Prof. Dr. ULISSES BRIGATTO ALBINO/ FAQUIM/Unifesspa
Membro Interno

Dedico este trabalho ao meu avô Valdemar
Vieira (*in memoriam*), com gratidão, amor e
muitas saudades.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor por seu infinito amor e misericórdia. Por me fortalecer em todos os momentos e mostrar que nunca estive sozinha. É tudo Dele, para Ele e por Ele.

Ao meu pai Antônio por acreditar em mim e demonstrar por meio de seu olhar e palavras o orgulho em ver um de seus filhos formados, isso faz tudo valer a pena. Em especial a minha mãe Raimunda, sempre companheira e amiga, meu coração fora do peito, meu colo e refúgio quando a saudade aperta. Sou grata por seu apoio, orações e principalmente por sempre ter uma palavra de consolo e incentivo para eu não desistir. A eles todo meu amor e gratidão.

Aos meus irmãos Anderson e Tatiana, pela parceria e amizade de sempre. Meu coração transborda de alegria em ver que estamos alcançando o que sempre sonhamos. O apoio de vocês foi muito importante nessa caminhada. Aos meus sobrinhos Naylla, Eduardo e Ana, por trazerem alegria e luz para a minha vida. Titia ama vocês minhas estrelinhas.

Ao meu esposo Ernesto Sampaio, por trazer calma e serenidade nos dias de cansaço e dúvidas de que iria conseguir terminar o curso e a pesquisa. Por seu apoio e paciência em ajudar com meus trabalhos, ouvindo minhas explicações ou nas madrugadas de estudos preparando o café. Suas palavras de incentivo foram importantes nessa caminhada. Obrigada por não soltar a minha mão e acreditar em mim. Grata por compartilharmos a vida e sonhos.

A minha orientadora prof.^a Dr^a. Marilene Oliveira, não apenas pela oportunidade para que eu pudesse conhecer e entrar no mundo da pesquisa científica, mas por seu apoio e orientações na realização da pesquisa. Das poucas vezes em que me senti acolhida dentro da universidade, foi através dela, com o seu jeito mãezona de ser, que acaricia, repreende e acolhe ao mesmo tempo. A ela todo meu respeito e gratidão.

Aos professores Dr. Sebastião Cruz, Dr^a Simone Simote, Dr. Ulisses Brigatto, Dr^a Edith Cibelle Moreira e Dr. Darlison de Alexandria, pelas contribuições e orientações para a realização dos experimentos e tratamento de dados.

Aos queridos Anderson Rodrigues e Paulo Diniz, meus parceiros de projeto. Tivemos um casamento científico muito bom, do qual surgiu amizade e afeto. Sou grata pela paciência, apoio, companheirismo e alegria em todos os momentos dentro e fora da pesquisa. Amo vocês.

Aos amigos que a Química me deu Wendel e Fernanda pelo companheirismo e parceria no decorrer dos quase cinco anos de curso, criamos uma relação de amizade que foi apoio e incentivo para não desistirmos e que amenizou dias difíceis e conturbados. Vocês estão em meu coração. Obrigada amigos por tudo.

Aos meus colegas de turma Maria Vitória, Rafael, Bruna e Elivelton pela parceria, ajuda e risos durante o curso. Vocês fizeram os dias de cansaço e de ônibus lotadíssimos se tornarem suportáveis. Acredito nos laços de amizade que foram criados e que serão para a vida. Grata a vocês queridos.

Ao prof. Dr. Sebastião Cruz por sua humanidade em ouvir nossos anseios e perspectivas, por sua disponibilidade em explicar e ajudar com nossos trabalhos, quantas vezes fossem necessárias. Espero, que ao assumir sala de aula, consiga ser exemplo e incentivo como foi pra todos da turma. Obrigada professor.

Aos professores regentes de estágio pela atenção, compreensão e dicas sobre estudos e práticas em sala de aula. Aos professores da Faculdade de Química, os quais tive contado e que realmente fizeram a diferença, obrigada pelos ensinamentos e troca que tivemos. Por fim, a todos que ajudaram durante a graduação e pesquisa, compartilhando conhecimentos, experiências e materiais.

RESUMO

Baseado no potencial para novas descobertas a partir da exploração do metabolismo secundário de fungos endofíticos e dos escassos estudos da microbiota de *Attalea speciosa* (babaçu), o presente trabalho teve como objetivo prospectar fungos endofíticos da referida espécie, bem como avaliar o potencial biotecnológico dos isolados fúngicos por meio de testes de antagonismo. As amostras de babaçu, fruto em diferentes estágios de maturação e folha, foram coletados no Campus II da Unifesspa, submetidos a um processo de esterilização e inoculados em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) para a prospecção e isolamento das colônias fúngicas. Para identificação dos endofíticos procedeu-se a extração de DNA utilizando o protocolo de extração clorofórmio:álcool isoamílico. O material gênico dos isolados foi amplificado, dos quais seis foram sequenciados. Para avaliação do potencial antagonístico dos endofíticos, cada isolado foi confrontado com os fitopatógenos *Colletotrichum* (C2) e *Lasiodiplodia pontae* (L18). A competição entre os microrganismos foi avaliada com medições diárias do crescimento dos fungos pareados e a análise dos dados foi realizada pelo programa Excel e Paleontological Statistics (PAST). A partir dos procedimentos de prospecção foram isolados 12 fungos endofíticos, dos quais seis foram identificados como *Curvularia luneta* (AMP), *Daldinia eschscholtzii* (FB2M), *Curvularia aérea* (FB1V), *Xilaria feejeensis* (F1), *Fusarium solani* (FB3V) e *Hipoxylon anthochroum* (CA1M). A partir da avaliação dos testes de antagonismo foi possível destacar uma atividade inibitória promissora (65, 75% e 62,37%) associada ao endofítico *D. eschscholtzii* (FB2M) frente à ambos os fitopatógenos, *L. pontae* (L18) e *Colletotricum* sp (C2), nesta ordem. Estudos do perfil metabólico a partir de extratos obtidos das culturas pareadas levaram a hipóteses de que a inibição observada é devida a uma barreira física ou associada ao metabolismo primário do endofítico. Apesar de preliminares, os resultados obtidos são promissores e motivam a continuidade da pesquisa, uma vez que este é o primeiro registro do perfil de fungos endofíticos associados ao babaçu, bem como noções preliminares do potencial biotecnológico desses isolados.

Palavras-chave: Babaçu. Fungos endofíticos. Controle biológico.

ABSTRACT

Based on the potential for new discoveries from the exploration of secondary metabolism of endophytic fungi and the scarce studies of the microbiota of *Attalea speciosa* (babassu), the present work aimed to prospect endophytic fungi of this species, as well as to evaluate the biotechnological potential of fungal isolates through antagonism tests. The babassu samples, fruit in different stages of maturation and leaf, were collected at Campus II of Unifesspa, submitted to a sterilization process and inoculated in batata dextrose agar (BDA) culture medium for the prospection and isolation of fungal colonies. DNA extraction using the chloroform:isoamyl alcohol extraction protocol was performed to identify the endophytes. The gene material of the isolates was amplified, from which six were sequenced. To evaluate the antagonistic potential of the endophytes, each isolate was confronted with the phytopathogens *Colletotrichum* (C2) and *Lasiodiplodia pontae* (L18). Competition between the microorganisms was evaluated with daily measurements of the growth of the paired fungi and data analysis was performed by Excel and Paleontological Statistics (PAST) program. From the prospecting procedures 12 endophytic fungi were isolated, of which six were identified as *Curvularia luneta* (AMP), *Daldinia eschscholtzii* (FB2M), *Curvularia aërialis* (FB1V), *Xilaria feejeensis* (F1), *Fusarium solani* (FB3V) and *Hipoxylon anthochroum* (CA1M). From the evaluation of antagonism tests it was possible to highlight a promising inhibitory activity (65, 75% and 62.37%) associated with the endophytic *D. eschscholtzii* (FB2M) against both phytopathogens, *L. pontae* (L18) and *Colletotrichum* sp (C2), in this order. Metabolic profiling studies from extracts obtained from the paired cultures led to hypotheses that the observed inhibition is due to a physical barrier or associated with the primary metabolism of the endophyte. Although preliminary, the results obtained are promising and motivate the continuity of the research, since this is the first record of the profile of endophytic fungi associated with babassu, as well as preliminary notions of the biotechnological potential of these isolates.

Keywords: Babassu. Endophytic fungi. Biological control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Áreas de ocorrência do Babaçu.....	19
Figura 2 – Composição estrutural do fruto do babaçu:(A) epicarpo, (B) mesocarpo, (C), endocarpo e (D) amêndoa.....	20
Figura 3 - Bioativos isolados de microrganismos endofíticos e seus respectivos hospedeiros.....	23
Figura 4 - Amostras do coco babaçu utilizadas no processo de prospecção dos fungos endofíticos: (a) coco verde, (b) coco maduro, (c) coco pós colheita e (d) folhas.....	26
Figura 5 – Produção das mantas miceliais em a, secagem das mantas em b e em c as mantas secas e guardadas.....	27
Figura 6 - a) Pareamento do endofítico FB1P (no lado esquerdo da placa) frente ao fitopatógeno <i>L. pontae</i> (L18) (no lado direito da placa) e b) encontro micelial entre fungos.....	29
Figura 7 - Fungos isolados do babaçu.....	31
Figura 8 - DNA extraído.....	32
Figura 9 - Gel de agarose (1%) mostrando as 12 amostras de DNA extraídas.....	32
Figura 10 - Cromatograma das 11 amostras de fungos amplificadas.....	33
Figura 11 - Desenvolvimento do fungo <i>F. solani</i> frente ao fitopatógeno <i>L. pontae</i> (L18) ao longo dos dias de crescimento.....	38
Figura 12 - Encontro dos micélios no pareamento do <i>F. solani</i> x L18.....	38
Figura 13 - Desenvolvimento do fungo <i>F. solani</i> frente ao fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> (C2) ao longo dos dias de crescimento.....	39
Figura 14 - Encontro dos micélios no pareamento do <i>F. solani</i> x C2.....	39
Figura 15 - Desenvolvimento do fungo FB1P frente ao fitopatógeno <i>L. pontae</i> (L18) ao longo dos dias de crescimento.....	40
Figura 16 - Encontro dos micélios no pareamento do FB1P x L18.....	40
Figura 17 - Desenvolvimento do fungo FB1P frente ao fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> (C2) ao longo dos dias de crescimento.....	41

Figura 18 - Provável inibição química no pareamento do FB1P x C2.....	41
Figura 19 - Desenvolvimento do fungo CA3V frente ao fitopatógeno <i>L. pontae</i> (L18) ao longo dos dias de crescimento.....	42
Figura 20 - Encontro dos micélios no pareamento do CA3V x L18.....	42
Figura 21 - Desenvolvimento do fungo CA3V frente ao fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> (C2) ao longo dos dias de crescimento.....	43
Figura 22 - Provável inibição química no pareamento do CA3V x C2.....	43
Figura 23 - Desenvolvimento do fungo <i>D. eschscholtzii</i> frente ao fitopatógeno <i>L. pontae</i> (L18) ao longo dos dias de crescimento.....	44
Figura 24 - Encontro dos micélios no pareamento do <i>D. eschscholtzii</i> x L18.....	44
Figura 25 - Desenvolvimento do fungo <i>D. eschscholtzii</i> frente ao fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> (C2) ao longo dos dias de crescimento.....	45
Figura 26 - Encontro dos micélios no pareamento do <i>D. eschscholtzii</i> x C2.....	45
Figura 27 - Desenvolvimento do fungo <i>H. anthochroum</i> frente ao fitopatógeno <i>L. pontae</i> (L18) ao longo dos dias de crescimento.....	46
Figura 28 - Encontro dos micélios no pareamento do <i>H. anthochroum</i> x L18.....	46
Figura 29 - Desenvolvimento do fungo <i>H. anthochroum</i> frente ao fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> (C2) ao longo dos dias de crescimento.....	47
Figura 30 - Encontro dos micélios no pareamento do <i>H. anthochroum</i> x C2.....	47
Figura 31 - Desenvolvimento do fungo CA2P frente ao fitopatógeno <i>L. pontae</i> (L18) ao longo dos dias de crescimento.....	48
Figura 32 - Encontro dos micélios no pareamento do CA2P x L18.....	48
Figura 33 - Desenvolvimento do fungo CA2P frente ao fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> (C2) ao longo dos dias de crescimento.....	49
Figura 34 - Encontro dos micélios no pareamento do CA2P x C2.....	49
Figura 35 - Desenvolvimento do fungo F2 frente ao fitopatógeno <i>L. pontae</i> (L18) ao longo dos dias de crescimento.....	50
Figura 36 - Encontro dos micélios no pareamento do F2 x L18.....	50

Figura 37 - Desenvolvimento do fungo F2 frente ao fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> (C2) ao longo dos dias de crescimento.....	51
FIGURA 38 - Encontro dos micélios no pareamento do F2 x C2.....	51
Figura 39 - Desenvolvimento do fungo <i>X. feejeensis</i> frente ao fitopatógeno <i>L. pontae</i> (L18) ao longo dos dias de crescimento.....	52
Figura 40 - Encontro dos micélios no pareamento do <i>X. feejeensis</i> x L18.....	52
Figura 41 - Desenvolvimento do fungo <i>X. feejeensis</i> frente ao fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> (C2) ao longo dos dias de crescimento.....	53
Figura 42 - Encontro dos micélios no pareamento do <i>X. feejeensis</i> x C2.....	53
Figura 43 - Desenvolvimento do fungo <i>C. lunata</i> frente ao fitopatógeno <i>L. pontae</i> (L18) ao longo dos dias de crescimento.....	54
Figura 44 - Encontro dos micélios no pareamento do <i>C. lunata</i> x L18.....	54
Figura 45 - Desenvolvimento do fungo <i>C. lunata</i> frente ao fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> (C2) ao longo dos dias de crescimento.....	55
Figura 46 - Encontro dos micélios no pareamento do <i>C. lunata</i> x C2.....	55
Figura 47 - Desenvolvimento do fungo FB2V frente ao fitopatógeno <i>L. pontae</i> (L18) ao longo dos dias de crescimento.....	56
Figura 48 - Encontro dos micélios no pareamento do FB2V x L18.....	56
FIGURA 49 - Desenvolvimento do fungo FB2V frente ao fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> (C2) ao longo dos dias de crescimento.....	57
FIGURA 50 - Encontro dos micélios no pareamento do FB2V x C2.....	57
Figura 51 - Desenvolvimento do fungo <i>C. aérea</i> frente ao fitopatógeno <i>L. pontae</i> (L18) ao longo dos dias de crescimento.....	58
Figura 52 - Encontro dos micélios no pareamento do <i>C. aérea</i> x L18.....	58
Figura 53 - Desenvolvimento do fungo <i>C. aérea</i> frente ao fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> (C2) ao longo dos dias de crescimento.....	59
Figura 54 - Encontro dos micélios no pareamento do <i>C. aérea</i> x C2.....	59

FIGURA 55: Análise comparativa do perfil metabólico via espectros de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) do extrato hexânico do co-cultivo (<i>D. eschscholtzii</i> - FB2C2 e <i>Colletotrichum</i> - C2) e dos extratos das cepas cultivadas isoladamente.....	64
FIGURA 56: Análise comparativa do perfil metabólico via espectros de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) do extrato hexânico do co-cultivo (<i>D. eschscholtzii</i> - FB2C2 e <i>L. pontae</i> L18.) e dos extratos das cepas cultivadas isoladamente.....	64
FIGURA 57: Análise comparativa do perfil metabólico via espectros de RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz) do extrato metanólico do co-cultivo (<i>D. eschscholtzii</i> - FB2C2 e <i>Colletotrichum</i> -C2) e dos extratos das cepas cultivadas isoladamente.....	65
FIGURA 58: Análise comparativa do perfil metabólico via espectros de RMN ¹ H (DMSO-d ₆ , 400 MHz) do extrato metanólico do co-cultivo (<i>D. eschscholtzii</i> - FB2C2 e <i>L. pontae</i> L18.) e dos extratos das cepas cultivadas isoladamente.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fungos isolados do babaçu e as partes da espécie vegetal em que foram encontrados.....	32
Tabela 2 - Comprimento das sequencias geradas no sequenciamento em pares de bases (pb) com os primers ITS1, ITS4 e da região consenso obtida usando o programa Bioedit.....	34
Tabela 3 - Resultado da pesquisa de homologia dos fungos isolados com os parâmetros considerados para identificação usando Blastn.....	34
Tabela 4 - Média das medições do crescimento dos fungos pareados e de seus controles.....	60
Tabela 5 - Taxa de inibição promovida pelas cepas durante o pareamento e taxas de crescimento superior dos endófitos em relação a seus respectivos controles.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SÍMBOLOS

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
%	Porcentagem
Km ²	Quilômetro Quadrado
BDA	Batata, Dextrose e Ágar
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
BD	Batata-dextrose
s	Segundos
mg	Miligrama
pH	Potencial Hidrogeniônico
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
PVP	Polivinilpirrolidona
rpm	Rotações por Minuto
CE	Ceará
PA	Pará
M	Molar
°C	Grau Centígrado
PCR	Polimerase Chain Reaction
ppm	Partes por Milhão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
m	Metro
L	Litro
g	Gramas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
3.1 Babaçu (<i>Attalea speciosa</i>).....	19
3.2 Fungos Endofíticos.....	21
3.3 Os impactos causados por fungos fitopatogênicos.....	24
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 Coleta do material botânico.....	26
4.2. Prospecção dos fungos endofíticos.....	26
4.3 Identificação dos isolados fúngicos.....	27
4.3.1 Produção da Manta Micelial.....	27
4.3.2 Extração de DNA.....	27
4.3.3 Amplificação e Sequenciamento.....	28
4.3.4 Busca por homologia em Bancos de dados biológicos.....	28
4.4 Teste de antagonismo.....	29
4.5 Estudo do perfil metabólico dos microrganismos pareados.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 Fungos Endofíticos do Babaçu.....	31
5.2 Identificação Molecular.....	32
5.2.1 Busca por homologia em Bancos de dados biológicos.....	33
5.3 Potencial Antagônico Frente a Fitopatógenos.....	37
5.3.1 Confronto <i>F. solani</i> x Fitopatógenos	37
5.3.2 Confronto FB1P x Fitopatógenos.....	40
5.3.3 Confronto CA3V x Fitopatógenos.....	41
5.3.4 Confronto <i>D. eschscholtzii</i> x Fitopatógenos.....	43

5.3.5 Confronto <i>H. anthochroum</i> x Fitopatógenos.....	45
5.3.6 Confronto CA2P x Fitopatógenos.....	47
5.3.7 Confronto F2 x Fitopatógenos.....	49
5.3.8 Confronto <i>X. feejeensis</i> x Fitopatógenos.....	51
5.3.9 Confronto <i>C. lunata</i> x Fitopatógenos.....	53
5.3.10 Confronto FB2V x Fitopatógenos.....	55
5.3.11 Confronto <i>C. aérea</i> x Fitopatógenos.....	57
5.4 Avaliação do perfil metabólico dos isolados antagônicos.....	62
6 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é rico em sua biodiversidade, destacando-se entre países do mundo inteiro (PIRES *et al.*, 2017). Desta forma não se pode abdicar da vocação de explorar esse recurso natural buscando cada vez mais identificar fontes com potencial para aplicações biotecnológicas diversas. Das aproximadamente 300 mil espécies de plantas existentes, cada uma é hospedeira de pelo menos um microrganismo endofítico e, poucas foram as espécies vegetais estudadas em relação a sua biologia endofítica, o que representa uma grande oportunidade de novas descobertas (SANTOS, *et al.*, 2013).

Os fungos fazem parte de um enorme grupo de microrganismos e dentre as mais diversas espécies fúngicas, destaca-se os fungos endofíticos que vivem no interior de tecidos vegetais sem causar-lhes, por um certo período de suas vidas, danos aparentes (PETRINI, 1991; PEREIRA 2006; AMORIM, *et al.*, 2019). Ocorrem em todo o planeta, em comunidades naturais ou criadas/modificadas pela ação humana, colonizando plantas em regiões frias como o Ártico e Antártica, nos desertos, em regiões oceânicas, em áreas florestais e de mangues (JALGAONWALA, *et al.*, 2011). Diferentes e diversos endófitos podem ser isolados de uma só planta (TAN e ZOU, 2001; PAMPHILE *et al.*, 2014; BEZERRA, 2020).

Os fungos endofíticos representam uma fonte pouco explorada de novos produtos bioativos, com mais de 10000 substâncias descritas, sendo que, destas, 51% apresentam estruturas inéditas e 80% atividade biológica (STROBEL e DAISY, 2003). Nas últimas décadas, os fungos endofíticos têm sido estudados e considerados como uma fonte importantíssima para a obtenção de metabólitos secundários (compostos bioativos), com vasta possibilidade de utilização, desde a indústria farmacêutica até o setor agrícola (NEWMAN, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2018). Muitos metabólitos produzidos por microrganismos endofíticos podem atuar como poderosas drogas contra patógenos humanos e de plantas. Nesse contexto, e motivados pela escassez de dados referentes à microbiota de *Attalea speciosa* Mart ex Spreng, popularmente conhecida como babaçu, o presente trabalho se dedicou à busca e investigação do potencial biotecnológico de endofíticos associados a esta espécie. O babaçu tem reconhecido valor social e econômico (PAIXÃO *et al.*, 2019) e o conhecimento a respeito de sua microbiota irá contribuir ainda mais para agregar valor à espécie, bem como para sua preservação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados ao babaçu (*A. speciosa*) visando o controle biológico de fitopatógenos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Realização da coleta do material botânico;
- b) Isolamento de fungos endofíticos;
- c) Identificação dos isolados fúngicos;
- d) Realização de testes de antagonismo, visando, o controle biológico dos fitopatógenos *Colletotrichum sp.* (C2) e *Lasiodiplodia pontae* (L18).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Babaçu (*Attalea speciosa*)

O Babaçu (*Attalea speciosa*) é o nome popular de uma palmeira oleaginosa pertencente à família Arecaceae. Tal palmeira se faz presente em países da América Latina, no Brasil cobrem cerca de 196 mil km² territorial, distribuída em vários biomas, com concentração na região correspondente a Mata dos Cocais (transição entre Caatinga, Cerrado e Amazônia), abrangendo vários estados brasileiros (Figura 1) (CARRAZZA, *et al.* 2012; ARAÚJO *et al.*, 2016; PORRO, 2021).

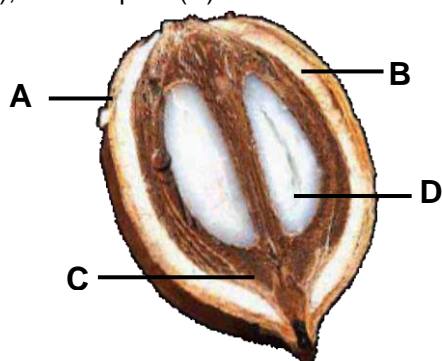
Figura 1- Áreas de ocorrência do babaçu



Fonte: NASCIMENTO, 2004.

A palmeira do babaçu cresce até 20 m de altura, frutificando a partir do oitavo ano, alcançando grande produção após 15 anos (CARRAZZA, *et al.* 2012). O período de frutificação do babaçu ocorre durante todo o ano, com destaque para os meses de agosto a janeiro, o período em que a produção é maior. O fruto do babaçu cresce em cachos de 300 a 500 cocos, quatro vezes por ano, com massa de 90-280 g cada, podendo ter entre duas à seis amêndoas em cada coco (DESER, 2007). De maneira estrutural, o fruto do babaçu é composto de 11% de epicarpo (camada externa e fibrosa), 23% de mesocarpo (rico em amido), 59% de endocarpo (camada de maior resistência) e 7% de amêndoa (Figura 2) p.20 (ARARUNA *et al.*, 2020).

Figura 2 – Composição estrutural do fruto do babaçu:(A) epicarpo, (B) mesocarpo, (C), endocarpo e (D) amêndoa.



Fonte: FERREIRA, 2005

A *A. speciosa* é muito conhecida e utilizada pelas populações tradicionais brasileiras. Sua cadeia produtiva possui grande representatividade no extrativismo vegetal do país, em razão de sua abrangência e por seu potencial nutricional, econômico, social e cultural (SARAIVA, 2018; PAIXÃO *et al.*, 2019).

A grande importância do babaçu se dá pela variedade de produtos que podem ser obtidos de partes da palmeira: frutos, folhas, raízes, caule e fruto, ou seja, a planta é aproveitada em sua totalidade (CARVALHO, 2007; PIRES *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2020)). A parte correspondente ao epicarpo é utilizado na fabricação de estofados de bancos e adubo orgânico; o mesocarpo tem aplicações na alimentação animal e humana, sendo também utilizado como farinha na preparação de bolos e mingaus (PORRO, 2021); o endocarpo é utilizado na agricultura e diversos setores industriais (alimentícia, veterinária, farmacêutica, química, etc.), artesanatos diversos e na como carvão (CARRAZZA, *et al.* 2012).

Estudos atuais indicam um crescimento expressivo na utilização do carvão proveniente do endocarpo da *A. speciosa*, o qual contribui com 45% da renda de famílias e no cozimento de alimentos (PORRO, 2021), em razão de sua pureza e ausência de substâncias que prejudicam o meio ambiente (ZYLBERSZTAJN, 2000), ganhando assim, valor de mercado. Em relação as folhas e talos, são empregados como matéria-prima na confecção de artesanatos e na construção de casas, principalmente de comunidades tradicionais que moram nas chamadas áreas de babaçuais e sobrevivem das atividades de subsistência e exploração da palmeira (PORRO, 2021). Até mesmo o tronco da árvore do babaçu em estado de decomposição é utilizado na adubação de plantações.

Outro produto obtido do babaçu, de grande destaque são os frutos, sendo a amêndoa do babaçu composta por mais de 60% de óleo rico em ácido láurico, utilizado na indústria cosmética e produtos de limpeza (sabonetes, shampoos, sabões etc.) e em diferentes indústrias. A amêndoa é usada ainda na alimentação humana principalmente na fabricação do azeite e do leite (STAUFENBERG; GRAUPNER; MÜSSIG, 2015).

Do ponto de vista farmacológico, a *A. speciosa*, se destaca por suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, sendo bastante utilizado no tratamento de dores abdominais, leucemia, reumatismo, inflamações no útero e ovários e, artrite. O mesocarpo por exemplo, é empregado no tratamento de feridas e queimaduras, úlceras e tumores (BARROQUEIRO *et al.*, 2011). Já o óleo extraído da amêndoa é uma ótima fonte de proteínas (SOUZA, *et al.*, 2011). Assim, estudos ressaltam a utilização de todas as partes do babaçu para fins medicinais.

Diante do exposto, é perceptível e de grande relevância, conhecer e compreender todo o contexto envolvendo o babaçueiro, sua importância em termos econômicos no fortalecimento de comércio e renda, desempenhando importante papel socioambiental e cultural, em especial para as populações extrativistas (CARRAZZA, *et al.* 2012; PORRO 2021). Assim, o conhecimento de sua microbiota endofítica contribuirá ainda mais para agregar valor ao babaçu, uma palmeira nativa da região amazônica.

3.2 Fungos Endofíticos

Os fungos são eucarióticos, heterotróficos, encontrados nos mais diversos ambientes do planeta (BONONI *et al.*, 1999 *apud* MORAIS *et al.*, 2014). Tais organismos participam ativamente do equilíbrio ambiental, realizam a decomposição de matéria orgânica, transportam nutrientes, auxiliam no desenvolvimento e proteção de vegetais (ABREU *et al.*, 2015). Os microrganismos possuem altíssimo potencial biotecnológico e desempenham importantes funções nos mais variados segmentos e meios, controlam e combatem pragas, são fontes promissoras na produção de produtos economicamente viáveis e benéficos ao homem (MUELLER *et al.*, 2004 *apud* MORAIS *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas, principalmente em razão da busca por fontes alternativas de produção de princípios ativos, os fungos endofíticos vem ganhando notoriedade. Tais microrganismos colonizam o interior de plantas, sem lhes causar danos aparentes (PETRINI 1991; 1997; GUNATILAKA, 2006; AZEVEDO, 2014). A porta de entrada dos endofíticos em vegetais ocorre nas folhas, raízes, folhas, sementes por meio das chamadas aberturas naturais e também por meio de feridas ocasionadas por fatores externos como a ação de predadores ou práticas agrícolas (AZEVEDO, 1998).

A biodiversidade do Brasil é extensa, estimando-se a provável existência de endofíticos ainda não conhecidos e estudados em alguma espécie vegetal, com grande potencial e propriedades de interesse ao ambiente como um todo (NETO *et al.* 2002).

Os fungos endofíticos utilizam diferentes substâncias do seu hospedeiro, adaptando-se a diversas regiões e climas, podendo colonizar o vegetal durante toda a sua vida ou por um período determinado (CHAPLA, 2003). A relação de endofíticos com seus hospedeiros varia de um hospedeiro para outro, sendo as interações entre eles pouco compreendidas (PAMPHILE *et al.*, 2018).

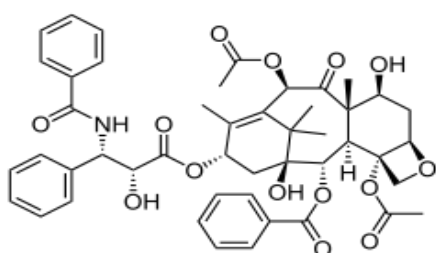
As interações entre endofítico e planta vem despertando o interesse biotecnológico para o enorme potencial dos microrganismos endofíticos como controle biológico, pois auxiliam no processo de adaptação das plantas as mais variadas condições ambientais (CHAPLA *et al.*, 2013; FARHAT *et al.*, 2019), aumentando a capacidade de resistência do vegetal a ataque de insetos, a ação de fitopatógenos e tolerância do vegetal à substâncias nocivas provenientes do solo (TAN; ZOU, 2001; ZHANG *et al.*, 2006; MAIA *et al.*, 2020). A relação simbiótica entre fungo e planta beneficia o endofítico, o qual atua como biossintetizador de metabólitos antes produzidos exclusivamente pela planta (SOBREIRA *et al.*, 2018), assim, nessa relação entre planta-endofítico onde ocorre a produção de compostos químicos, o fungo ao proteger a planta, protege a si mesmo (SILVA, 2017).

Na relação do endofítico com a planta, tais microrganismos atuam através da produção de substâncias que irão combater as ações nocivas principalmente de fitopatógenos, assim, o endofítico, exerce papel importantíssimo na produção de

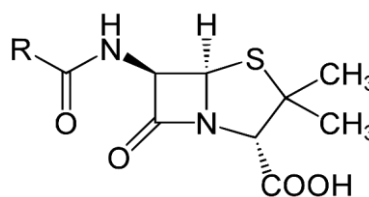
compostos bioativos que podem alterar de maneira morfológica e bioquímica a planta, proporcionando resistência a diversos estresses do meio (JOHNSON et al., 2014).

Os compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos possuem ampla ação biológica, contribuem na biossíntese de substâncias com ação terapêutica tais como antimicrobiana, antiparasitária, antioxidante, antiviral, citotóxica, imunossupressora, entre outras, encontrando, portanto, aplicação nos diversos setores da indústria (SILVA, 2010; CHAPLA *et al.*, 2013). Diversos fármacos de frequente uso são de origem microbiana e uma variedade estão sendo desenvolvidos (PAMPHILE et al., 2014). Alguns princípios ativos isolados de fungos endofíticos, com suas respectivas atividades biológicas podem ser observados na figura 3.

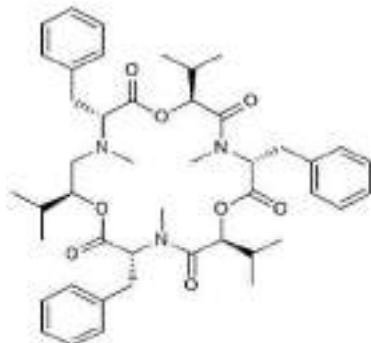
Figura 3 - Bioativos isolados de microrganismos endofíticos e seus respectivos hospedeiros.



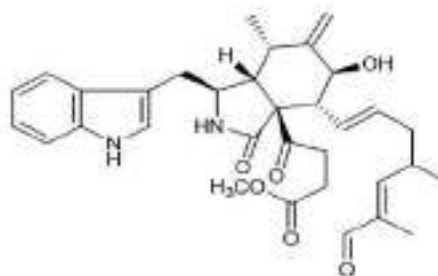
Endofítico: *Taxomyces andreaeae*
 Bioproduto: Taxol
 Hospedeiro: *Taxus Brevifolia*
 Propriedades: Antitumoral
 Fonte: Morais, Yoshimoto *et al.*, 2014



Endofítico: *Penicillium*
 Bioproduto: Penicilina
 Hospedeiro: *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze
 Propriedades: Antibiótico
 Fonte: Quim. Nova, 2008.



Hospedeiro: *Entada abyssinica*
 Endofítico: *Epicoccum nigrum*
 Bioproduto: Beauvericina
 Bioatividade: Antibacteriana
 Fonte: Dzoyem, *et al.*, 2016.



Hospedeiro: *Dioscorea opposita*
 Endofítico: *Chaetomium globosum*
 Bioproduto: Yamchaetoglobosina A
 Bioatividade: Citotóxica
 Fonte: LI, *et al.*, 2018.

Com o aumento do número de casos de resistência microbiana aos agentes de controle, bem como, o surgimento de novas doenças e a retirada de produtos agrícolas sintéticos do mercado, cria-se cada vez mais a necessidade pela procura de métodos alternativos no controle de pragas e doenças (NEWMAN, 2000; TALAAT,

2019), que não sejam poluentes, não causem desequilíbrios aos ecossistemas e que tenha baixa toxicidade para o meio ambiente (ALVES; ALMEIDA, 1997; TALAAT, 2019).

3.3 Os Impactos Causados por Fungos Fitopatogênicos

Fungos fitopatogênicos são microrganismos que colonizam os tecidos das plantas de modo sintomático, causando doenças nos vegetais (BOMFIM *et al.*, 2013). A ação dos fitopatógenos ocorre em razão do estado das plantas em termos fisiológicos e como, o mesmo, interage com o seu hospedeiro. (CASELA; FERREIRA, 1998; STROBEL *et al.*, 2004). Estes fungos, prejudicam o metabolismo celular dos vegetais, secretam além de enzimas, toxinas que retiram os nutrientes necessários para o desenvolvimento da planta, causando o seu enfraquecimento e/ou até a morte (CALIGIORNE *et al.*, 2010).

A atividade dos fungos fitopatogênicos está ligada as condições bióticas e abióticas do ambiente em que vive, como temperatura e umidade por exemplo. Tais condições, propiciam a multiplicação e sobrevivência de patógenos que contribuem para o surgimento de inúmeras doenças (MICHEREFF, 2001; BOMFIM *et al.*, 2013).

Os danos provocados pelos patógenos às plantas geram inúmeros e significativos impactos econômicos. Acarreta danos na área agrícola, prejudicando o crescimento e desenvolvimento de plantas, reduzindo a produção e qualidade de sementes e grãos, dizimando as chamadas culturas tradicionais, sendo considerados um dos principais problemas para culturas agrícolas no mundo e responsáveis por cerca de 10% de perda na produção alimentícia do planeta (MICHEREFF *et al.*, 2005, CORREIA; MICHEREFF, 2018; AGÁPTO *et al.*, 2021). No Brasil, a ação de patógenos se faz presente em importantes culturas do país, como do tomate (*Lycopersicon esculentum*) acometido por *Pythium* *ssp* (TOMAZONI *et al.*, 2013), da mandioca (*Manihot* *spp.*) muitas vezes atacada por *Colletotrichum gloeosporioides* (WONG *et al.*, 2011) e da uva (*Vitis* *spp.*) que quando acometida por *Lasiodiplodia theobromae*, este provoca a murcha e seca de brotos e folhas, e a conseqüente morte da planta (CAMARGO *et al.*, 2011).

Entre os fitopatógenos citados, *Colletotrichum* *spp.* é reconhecido como o oitavo mais importante gênero fúngico patogênico no mundo, devido à grande variedade de espécies vegetais que acomete e portanto, as perdas econômicas que

causa. Espécies deste gênero podem causar doenças nos estágios pré e pós-colheita (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

No Brasil, o gênero *Lasiodiplodia* merece destaque, não somente pela complexidade que tem apresentado na identificação de suas espécies, mas também em função do grande número de associações a várias espécies de plantas de importância econômica, principalmente nos estados do nordeste brasileiro acometendo uma variedade de frutíferas (COUTINHO et al., 2017).

Uma preocupação crescente que surge nesse cenário está associada à demanda na produção agrícola, que gera aumento no uso de agrotóxicos para conter o avanço das doenças nas plantações (YING, 2018). Para o controle de doenças fúngicas os principais ingredientes ativos utilizados são o oxicloreto de cobre, tiofanato-metílico, mancozebe, carbedazin e tebuconazol. O uso indiscriminado desses fungicidas pode acarretar problemas ecológicos graves, principalmente para a micro, meso e macrofauna (MEDRADO, 2019). Dados do IBAMA (2016) apontam que em 2014 mais de 27 mil toneladas de fungicidas foram utilizados, um aumento de mais de 4 mil toneladas, comparado ao ano de 2013. Atualmente esse valor pode ser muito maior tendo em vista que anualmente a produção agrícola apresenta expansão das áreas de plantio.

Uma das culturas que mais afeta o ambiente pela aplicação em larga escala de agrotóxicos é a soja (MENDONÇA, 2006; BELO *et al.*, 2012). Ela está sujeita a uma das doenças mais severas causadas por fungos, o mofo branco-da-soja, que tem como agente etiológico *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Essa patologia se caracteriza pela necrose e tombamento da planta, uma vez que o microrganismo coloniza a haste da espécie vegetal, além de sobreviver no solo através da produção de estruturas de resistência (escleródios), caracterizando-a como uma doença de difícil controle através de métodos químicos (GÖRGEN *et al.*, 2009).

Nesse cenário estudos de controle biológico através de antagonistas naturais ganham destaque representando uma possibilidade de redução dos prejuízos ambientais e econômicos causados pelos fungos fitopatogênicos, um dos objetivos do presente trabalho.

4 METODOLOGIA

4.1. Coleta do material botânico

Para o isolamento dos fungos endofíticos, foram realizadas coletas do coco babaçu em diferentes estágios de desenvolvimento, além das folhas (Figura 4). A coleta foi realizada no Campus II da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará- UNIFESSPA, localizada na folha 17, Quadra 04, Lote especial, Nova Marabá, Pará.

Figura 4 - Amostras do coco babaçu utilizadas no processo de prospecção dos fungos endofíticos: (a) coco verde, (b) coco maduro, (c) coco pós colheita e (d) folhas.



Fonte: A autora

4.2 Prospecção dos fungos endofíticos

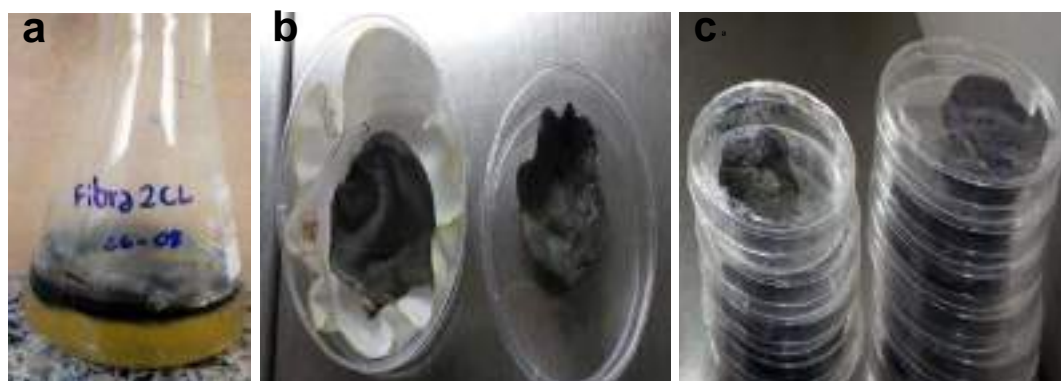
De cada fase de desenvolvimento do babaçu, foram utilizados fragmentos da fibra, da casca, do fruto e pedaços da folha. De início, para eliminar possíveis contaminantes, o material botânico foi submetido ao seguinte processo de assepsia: lavagem com água e sabão, seguida de imersões em álcool 70% (1 min), em solução de hipoclorito de sódio 3% (4 min) e água estéril (20 s). Após o procedimento de esterilização, os fragmentos foram dispostos em placas de Petri (03 fragmentos) em meio BDA (batata, dextrose e ágar) e antibiótico tetraciclina (500 mg L^{-1}). Todo procedimento mencionado anteriormente, foi realizado em capela de fluxo laminar. Após o inóculo, as placas foram armazenadas em incubadora do tipo BOD a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A partir do surgimento das colônias fúngicas, repiques sucessivos foram feitos para a obtenção de culturas puras, seguida da preservação dos isolados conforme metodologia descrita por Castellani (1939).

4.3 Identificação dos isolados fúngicos

4.3.1 Produção da Manta Micelial

Para a produção das mantas miceliais, os isolados fúngicos foram cultivados em Erlenmeyer com meio líquido BD (batata-dextrose). O procedimento foi feito em duplicata para cada fungo. Após dez dias de cultivo, as mantas formadas foram transferidas para placas de Petri estéreis e submetidas à secagem sob ventilação em capela de fluxo laminar. As mantas secas foram armazenadas à -20 °C (Figura 5).

Figura 5 – a) Produção das mantas miceliais, b) secagem das mantas e em c) as mantas secas.



Fonte: A autora.

4.3.2 Extração de DNA

Aproximadamente 75 mg da massa micelial seca foi submetida à maceração em nitrogênio líquido com o auxílio de pistilo e almofariz de porcelana. O DNA genômico foi extraído conforme o protocolo clorofórmio: álcool isoamílico, que consiste das seguintes etapas: após maceração do micélio em nitrogênio líquido, este foi transferido para um tubo de Eppendorf (2,0mL), seguida da adição de 700µL de solução tampão de extração (NaCl 1,4 M, Tris-HCl 0,1 M, pH = 8,0, CTAB 2% + PVP 2%), a mistura foi então agitada com o auxílio de vórtex. Após o procedimento de agitação os tubos Eppendorf foram submetidos a aquecimento em banho maria a 65 °C por 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se 700 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), seguida das etapas de homogeneização e centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de Eppendorf (1,5mL) e o volume da mistura foi completado com isopropanol para 1,5mL; centrifugou-se novamente sob as mesmas condições. Logo

após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao pellet formado adicionou-se 500µL de álcool etílico 70% para lavagem do mesmo, sendo a mistura centrifugada por cinco minutos a 13.000 rpm; descartou-se o sobrenadante e uma segunda lavagem foi realizada utilizando 500µL de álcool etílico 100%; centrifugou-se novamente por cinco minutos a 13.000 rpm, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi submetido à secagem mantendo o tubo aberto em capela de fluxo à temperatura ambiente ou à 60 °C em dessecador à vácuo. Após o processo de secagem, ressuspendeu-se o DNA em 50µL de TE (Tris-base 1 M, pH = 8,0, EDTA 0,5 M, pH = 8,0) + RNase e em seguida o material genômico foi aquecido à temperatura de 37 °C por um período que variou de 15 a 20 minutos. O procedimento de extração foi feito em duplicata para cada amostra..

4.3.3 Amplificação e Sequenciamento

Após a obtenção do DNA genômico, o mesmo foi usado em uma reação de PCR para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS4 do rDNA em volume total de 50 µL. Para isso, utilizaram-se os iniciadores ITS1 (5'TTC CGT AGG TGAACC TGC GG 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TATGC 3'). A reação continha 6,25 µL de DNA, 10 µL de Buffer, 19,25 µL de água ultrapura, 1 µL de dNTP, 10mM, 3 µL de MgCl₂, 25 µM, 5 µL de cada Primer, 10 µM, 0,5 µL de Taq Polimerase, 5 U/µL. As reações foram realizadas em termociclador Amplitherm - TX96PLUS, sob as seguintes condições térmicas: 96 °C por 1 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 1 min, 72 °C por 1 min e 30 s e 72 °C por 10min. Ao final, o produto foi mantido a -4 °C. As amostras amplificadas foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 1X. As etapas de purificação e sequenciamento das amostras amplificadas foram realizadas pela empresa ACTgene – Análises Moleculares.

4.3.4 Busca por homologia em Bancos de dados biológicos

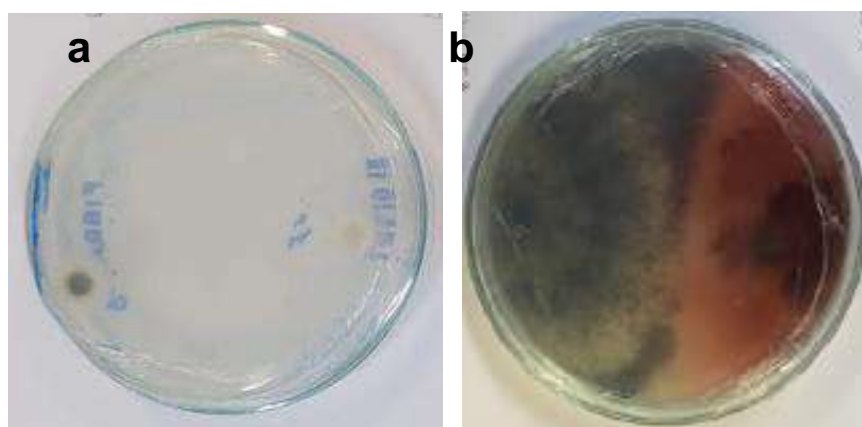
As sequências de cada primer ITS1 (forward) e ITS4 (reverso) foram editadas e usadas para gerar uma região consenso utilizando-se o programa Bioedit (HALL, 1999). As sequências consenso geradas foram comparadas com as sequências

depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information website), utilizando o programa BLASTn.

4.4 Teste de antagonismo

Para avaliar o potencial fungicida dos endófitos da *A. speciosa*, fez-se o pareamento de culturas utilizando nove fungos endófitos isolados frente a dois fitopatógenos, sendo um pertencente ao gênero *Colletotrichum* (C2) e o outro ao *Lasiodiplodia pontae* (L18), cedidos pelo Instituto Federal do Pará campus Castanhal/PA e pela Embrapa Agroindústria Tropical- Fortaleza/CE, respectivamente. Após oito dias de crescimento dos endófitos e fitopatógenos em placas individualizadas, discos miceliais dos microrganismos foram colocados pareados em placas de Petri em meio BDA (Figura 6). O controle foi baseado no desenvolvimento de culturas individuais de cada microrganismo pareado. O experimento foi realizado em triplicata e em capela de fluxo laminar. Após o inóculo, os fungos pareados foram armazenados em ambiente estéril a 25 °C. A competição entre os microrganismos foi avaliada com medições diárias do crescimento dos fungos pareados durante quinze dias com o auxílio de um paquímetro e a análise dos dados foi realizada no programa Excel juntamente com o software Paleontological Statistics (PAST).

Figura 6 – a) Pareamento do endófito FB1P (no lado esquerdo da placa) frente ao fitopatógeno *L. pontae* (L18) (no lado direito da placa) e b) encontro micelial entre fungos



Fonte: A autora.

4.5 Estudo do perfil metabólico dos microrganismos pareados

A partir dos resultados promissores observados nos testes de pareamento, visando o controle biológico dos fitopatógenos *Colletotrichum* e *Lasiodiplodia*, os isolados, endofítico (FB2M) e fitopatógenos (C2 e L18), foram cultivados em placas de Petri bipartidas para verificar se a inibição observada era devida a componentes voláteis ou fixos. Em seguida, fungo endofítico e fitopatógenos (FB2M e C2; FB2M e L18) foram submetidos à técnica de co-cultivo em Erlenmeyers de 500mL contendo 100 g de arroz cada e 30mL de água para fins de produção de extratos microbianos. Os co-cultivos foram desenvolvidos em um período de 30 dias e em triplicata. Paralelamente ao co-cultivo foram desenvolvidos cultivos individualizados de cada isolado microbiano, nas mesmas condições do co-cultivo, utilizados como controles.

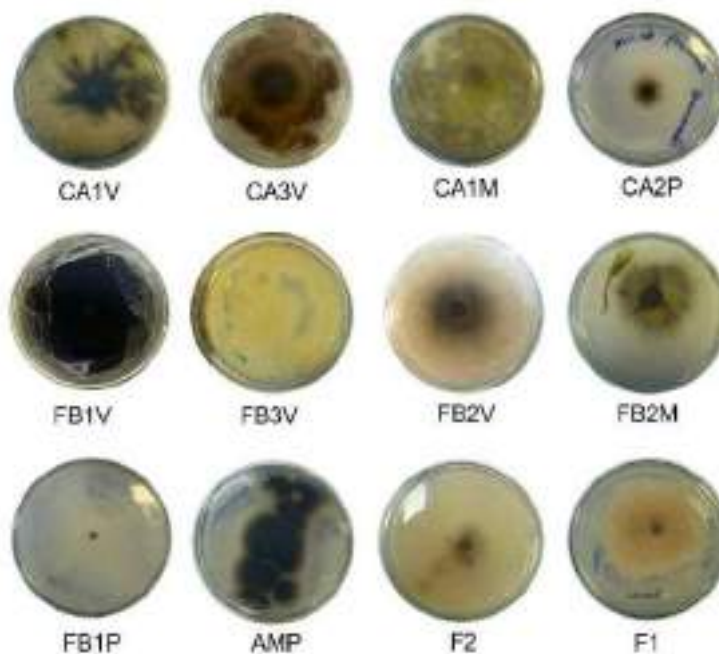
Após os 30 dias de cultivo, cada sistema foi submetido a extração usando hexano e metanol, nesta ordem. As extrações foram realizadas utilizando 300 mL de cada solvente extrator divididos em três repetições, por 2 horas cada. Após concentração em evaporador rotativo à vácuo, 15 mg de cada extrato foi analisado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio, na perspectiva de caracterizar possíveis alterações metabólicas a partir da interação dos microrganismos pareados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fungos Endofíticos do Babaçu

A partir das amostras de babaçu foram obtidos 12 isolados fúngicos endofíticos (Figura 7), sendo dois deles provenientes da casca do coco na fase inicial de crescimento (CA1V e CA3V), um da casca na fase média de maturação (CA1M), um da casca na fase pós-colheita (CA2P), três da parte da fibra na fase inicial de crescimento (FB1V, FB3V e FB2V), um da fibra na fase média de crescimento (FB2M), um da fibra na fase pós-colheita (FB1P), um da amêndoa do coco pós-colheita (AMP), e dois fungos distintos das folhas do babaçueiro (F1 e F2). Para seleção dos isolados tomou-se como base a repetição dos isolados nas diferentes matrizes. Atualmente, os isolados estão em fase de identificação molecular e preservados no Laboratório de Biologia multidisciplinar da Faculdade de Química/Unifesspa. A Tabela 1 (p.32) presume os dados descritos anteriormente.

Figura 7 - Fungos isolados do babaçu



Fonte: A autora

Tabela 1 - Fungos isolados do babaçu e as partes da espécie vegetal em que foram encontrados.

	Epicarpo	Endocarpo	Amêndoa	Folhas
Coco Verde	CA1V	FB1V		
	CA3V	FB3V		
		FB2V		
Coco com maturação Média	CA1M	FB2M		
Coco pós colheita	CA2P	FB1P	AMP	
Folhas				F1 F2

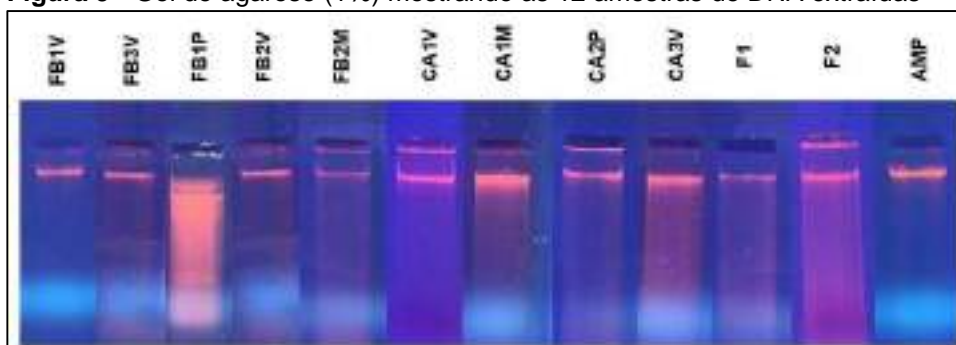
CA1, CA2 e CA3 = isolados da casca do coco; V, M e P = fases de maturação do coco; FB1, FB2 e FB3 = isolados da fibra do coco; AM= isolado da amêndoa; F1 e F2 = isolados das folhas.

5.2 Identificação Molecular

Foram extraídos o DNA dos 12 isolados fúngicos do babaçu (Figura 8) revelando no cromatograma bandas de forte intensidade o que caracteriza uma boa extração (Figura 9). Com o DNA extraído foi realizada a etapa de amplificação de 10 amostras, obtendo bandas únicas e de boa intensidade o que denota sucesso nesta etapa de identificação molecular (Figura 10) p.33.

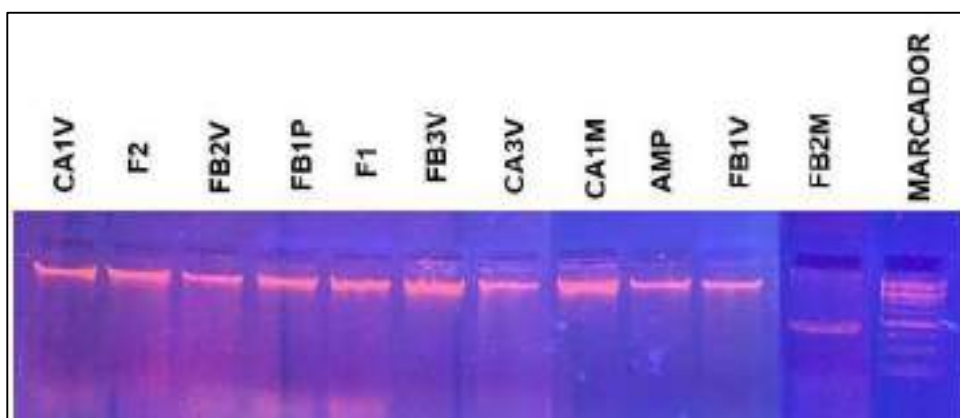
Figura 8 - DNA extraído

Fonte: A autora

Figura 9 - Gel de agarose (1%) mostrando as 12 amostras de DNA extraídas

Fonte: A autora

Figura 10 - Cromatograma das 11 amostras de fungos amplificadas.



Fonte: A autora

Das onze amostras de DNA amplificadas, seis foram enviadas para purificação e sequenciamento realizados pela empresa ACTgene. As amostras enviadas foram extraídas dos isolados F1, FB3V, FB2M, CA1M, AMP e FB1V.

A partir das sequências obtidas com número de nucleotídeos que variou entre 965 à 536, a identificação dos isolados se deu por meio de consultas comparativas com outras sequências depositadas no NCBI por meio do programa BLASTn. A identificação foi baseada em percentual de similaridade.

Os marcadores ITS1 e ITS4 foram utilizados nas etapas de PCR e sequenciamento, em que sua escolha se deu por serem regiões gênicas de organismos eucariontes que permanecem por um longo período sem sofrerem alterações, o que leva a uma maior exatidão na identificação molecular (KORABECNA, 2007).

5.2.1 Busca por homologia em Bancos de dados biológicos

As sequências obtidas no sequenciamento foram editadas e usadas para obtenção de uma região consenso. O comprimento em pares de bases, obtido após a edição e tratamento das sequências com o programa bioedit são sumarizados abaixo (Tabela 2) p.35.

Tabela 2 - Comprimento das sequencias geradas no sequenciamento em pares de bases (pb) com os primers ITS1, ITS4 e da região consenso obtida usando o programa Bioedit.

Isolado	ITS1	ITS4	Consenso
F1	479	533	582
FB3V	520	526	571
FB2M	522	530	573
CA1M	498	499	537
AMP	523	530	566
FB1V	512	530	561

A identificação das espécies foi determinada baseada nos melhores valores obtido quanto à similaridade, cobertura e evaluate segundo o resultado do Blastn. Os resultados obtidos para identificação por homologia usando a região consenso para comparação com programa Blastn estão sumarizados na tabela 3.

Tabela 3 - Homologia dos fungos isolados com os parâmetros considerados para identificação usando Blastn.

Isolado	Identificação Blastn	% Cobertura	% Identidade	Nº Acesso
F1	<i>Xylaria feejeensis</i>	99%	99,83%	GU322452.1
FB3V	<i>Fusarium solani</i>	99%	100%	KT184398.1
FB2M	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	100%	99,13%	MH779468.1
CA1M	<i>Hypoxylon anthochroum</i>	99%	99,63%	MF663790.1
AMP	<i>Curvularia lunata</i>	100%	99,64%	GQ169765.1
FB1V	<i>Curvularia aérea</i>	100%	99,64%	MH384819.1

De acordo com a análise dos parâmetros citados anteriormente o isolado F1 foi identificado como *Xylaria feejeensis*. O gênero *Xylaria* é pertencente à família

Xylaracea da divisão de fungos denominados de ascomicetos. As espécies pertencentes a esse gênero têm como principal característica morfológica a produção de estromas carbonáceos escuros, ascomata, ascos cilíndricos com anel apical e ascósporos pigmentados com fenda germinativa (CRUZ *et al.*, 2015). De acordo com a literatura, a espécie *X. feejeensis* destaca-se pela produção de propriedades com atividades biológicas do tipo inibitória da osteoclastogênese (WANG *et al.*, 2018), antioxidante (REBBAPRAGADA *et al.*, 2016), antipatogênica (BRAHMACHARI, 2019) e fitotóxica (RUBALCAVA *et al.*, 2017).

O isolado FB3V, foi identificado como o fungo *Fusarium solani*. *Fusarium* é um gênero pertencente a classe Sordaromicetos que está inserido no subfilo Pezizomycotina (Ascomycota) são agrupados a espécies que se caracterizam por serem filamentosos, reunindo um total de cerca de 200 a 300 espécies pertencentes a complexos de 20 a 30 espécies (HOMA *et al.*, 2018). É reportado na literatura que *F. solani* possui uma vasta atividade biológica, concentrada em atividade antimicrobiana (TAYUNG *et al.*, 2011), antibacteriana (KYEKYEKU *et al.*, 2017), antinematodal (FARHAT *et al.*, 2019), bio-sorção de íons prata (EL SAYED, 2020) entre outros.

O isolado FB2M foi identificado como sendo da espécie *Daldinia eschscholtzii*. *Daldinia* é um gênero que pertence a divisão dos ascomicetos caracterizados por serem pirenomicetos que reúnem mais de 40 espécies conhecidas até o momento (LI *et al.*, 2021a). Em termos morfológicos a espécie possui estromas placentiformes com zonas internas conspícuas, sendo que as zonas mais claras são até 2-3 vezes mais largas que as mais escuras, peritéciostubulares dispostos em uma camada densa, cujo os ostíolos estão no mesmonível (ou um pouco abaixo) da superfície do estroma, e conidióforos e conídios cujo tamanho e forma reais dificilmente podem ser determinados (STADLER *et al.*, 2014).

É mencionado que a espécie *D. eschscholtzii* é responsável pela produção de várias substâncias que possuem atividade biológica, alguns exemplos são ciclopentanonas com atividade anti-inflamatória (ZHEN-ZHEN *et al.*, 2019), citocalasina com atividade antibacteriana (YANG *et al.*, 2017), híbridobenzopirano-naftaleno com atividade anti-acetilcolinesterase e 8-hidroxi-helicacolide A com atividade antimicrobiana (WANG *et al.*, 2019) e daldinol A com atividade imunossupressora contra proliferação de linfócitos B e T (LIN *et al.*, 2021b). Essa

espécie apresenta também propriedades antifúngicas (HONG-XIN *et al.*, 2017), corroborando com o observado em nosso estudo que mostram que este isolado possui potencial para inibição de crescimento de fungo fitopatogênico.

O isolado CA1M foi identificada como sendo da espécie *Hypoxylon anthochroum*. A família Hypoxylaceae é compreendida em 360 espécies e 18 gêneros sendo *Hypoxylon* um dos gêneros pertencentes a essa família que possui características semelhantes a seu anamorfo *Nodulisporium* (CEDEÑO-SANCHEZ *et al.*, 2020). A espécie *H. anthochroum* é encontrada principalmente em regiões tropicais, com aparência pulverulenta, a coloração da colônia varia de dourada a marrom-clara e produz numerosos conídios elipsoides a ovoides (MISHRA *et al.*, 2019). É responsável pela produção de compostos químicos com bioatividade revelada, entre eles destacam-se a hipoxivermelhotina A e C com atividades citotóxica e antimicrobiana moderada (KUHNER *et al.*, 2014), mistura de COV's com atividade fitotóxica e antimicrobiana (ULLOA-BENÍTEZ *et al.*, 2016) e isobenzofuranonas com atividade antifúngica e antiomicetona (SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2020).

A amostra AMP foi identificada como sendo da espécie *Curvularia lunata*. O gênero dessa espécie tem características morfológicas de fácil identificação que é denotado pela presença de conidióforos eretos com coloração marrom, podendo ser simples ou ramificados, em linha reta ou curva, apresentando conídios na parte apical e lateral do conidióforo, 3 a 4 células com duas células centrais, coloração marrom, curva maior nas penúltimas células, e hilo presente na maioria das vezes (MOURÃO *et al.*, 2017).

Além da morfologia dessa espécie a literatura reporta atividades biológicas de metabólitos secundários produzidos por *C. lunata*, entre elas destacam-se, curcubitacina-E-glicosídeo com atividades anti-inflamatória, antipirética e citotoxicidade moderada (ABDELKHALEK *et al.*, 2017), radcinina, radcinol e 3-epiradicino com atividade fitotóxica (SRIVASTAVA *et al.*, 2020), policetídeos-peptídeos com atividade antifúngica e sinérgica (CRUZ, 2013) e lactamas espirocíclicos e derivados do ácido curvulínico com atividades antibacteriana e antifúngicas (HILARIO *et al.*, 2020).

O Isolado FB1V foi identificada como sendo da espécie *Curvularia aérea*. A

espécie *C. aérea* é considerada uma variedade da espécie *C. lunata* também isolada no presente trabalho do fruto do babaçueiro, porém em partes diferentes do fruto (endocarpo e amêndoa respectivamente), podendo até mesmo ser denominada como *Curvularia lunata* var. *aérea* (HOCKING *et al.*, 2009).

A semelhança morfológica das espécies é nítida, tanto que por muito tempo eram consideradas uma espécie única, sendo que a descoberta da *C. aérea* só foi possível através de avaliação do padrão genômico das espécies e observação da principal diferença morfológica das duas espécies que está principalmente na forma dos seus conídios. Em *C. aérea* eles se apresentam solitários, 2(3)-septados, raramente 4-septados, um ou mais septos por vezes mais espesso e escuro que os demais, retos ou curvos, elipsoidais, ovoides ou clavados (LIMA *et al.*, 2007).

Há poucos relatos na literatura em relação a compostos com bioatividade produzidos por *C. aérea*, entre os relatos destacam-se, atividade antifúngica por extratos de micélios de *C. aérea* (SAHANI *et al.*, 2019) e a avaliação de metabólitos secundários isolados via CGMS, sendo um deles com potencial atividade anticancerígena (SAHANI *et al.*, 2019).

Esse é o primeiro registro de fungos endofíticos associados ao babaçu o que destaca a relevância deste trabalho.

5.3 Potencial Antagônico Frente a Fitopatógenos

No teste de cultura pareada foi possível observar interações entre alguns dos endofíticos isolados do babaçu e os fitopatógenos *Colletotrichum* (C2) e *L. pontae* (L18), sendo que dentre essas interações notou-se através de análises gráficas e de variância que alguns endofíticos inibiram o crescimento dos fitopatógenos analisados em alguns dias de crescimento. Os dados de crescimento médio das cepas no confronto e de seus controles, bem como os percentuais descritos a seguir podem ser observados na tabela 4 e 5.

5.3.1 Confronto *F. solani* x Fitopatógenos

Na análise gráfica do confronto da cepa endofítica *F. solani* frente ao fungo *L. pontae* (L18) foi observada uma inibição mútua, predominando a inibição do endofítico em relação ao fitopatógeno tomando como base a média do crescimento dos fungos

nas três placas. Ao sétimo dia o controle do endofítico teve um crescimento de 90,00 mm, enquanto no confronto o fungo *F. solani* apresentou média de crescimento nas triplicatas de 51,92 mm o que representa uma inibição de 42,3%, considerada significativa de acordo com a análise de variância. De início o endofítico segue crescendo mais rápido até o terceiro dia (Figura 11); as barras de erro padrão mostram uma vantagem real no segundo dia. Os diâmetros de colônias se equiparam no quarto dia e então o L18 passa a crescer mais rapidamente até o sétimo dia quando se encontram. Houve o encontro dos micélios dos dois fungos (Figura 12). A análise de variância não mostrou diferença significativa entre as médias dos diâmetros das colônias ao sétimo dia ($p= 0,2745$) (Figura 11) p.39.

Figura 11 - Desenvolvimento do fungo *F. solani* frente ao fitopatógeno *L. pontae* (L18) ao longo dos dias de crescimento.

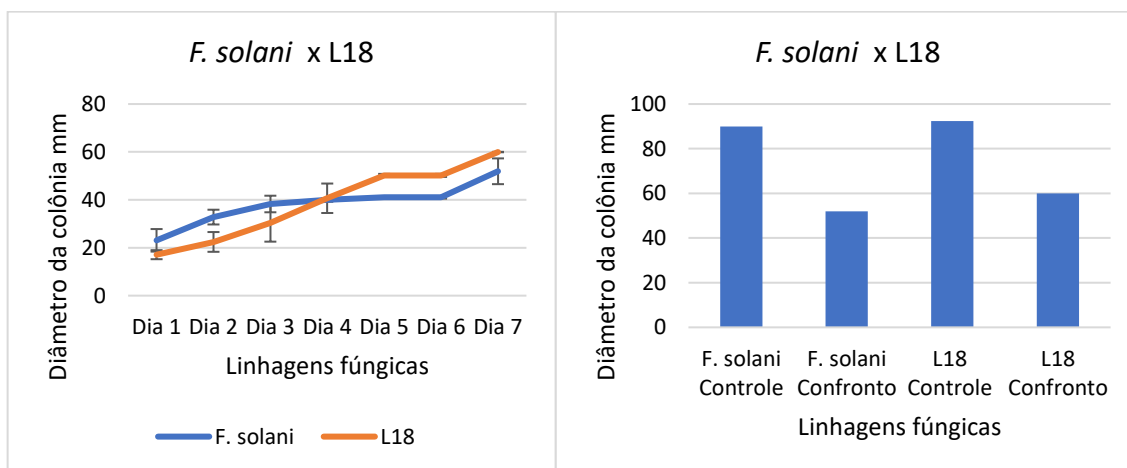


Figura 12 - Encontro dos micélios no pareamento do *F. solani* x L18.



Fonte: A autora

Na cultura pareada do *F. solani* frente ao fungo *Colletotrichum* (C2), foi observada a inibição do crescimento do endofítico em 25,23%, com um claro crescimento do endofítico a partir do quinto dia de cultura, sendo que ao término do sétimo dia comprovou-se um crescimento mais elevado do endofítico frente ao C2.

Apesar do endofítico ter o diâmetro de sua colônia maior que a do C2, o percentual de inibição imprimida ao fitopatógeno pelo endofítico fica comprometida, já que a cepa de *Colletotrichum* cresceu no confronto muito mais que quando cultivado sozinho (controle), o que impossibilita a determinação de potencial de inibição de seu crescimento. Essa análise é notável através das barras de erro desencontradas apontando para uma diferença significativa confirmada pela análise de variância ($p=0,05843$) (Figura 13). Devido ao encontro micelial das duas cepas não é possível inferir que a inibição seja química (Figura 14).

Figura 13 - Desenvolvimento do fungo *F. solani* frente ao fitopatógeno *Colletotrichum* (C2) ao longo dos dias de crescimento.

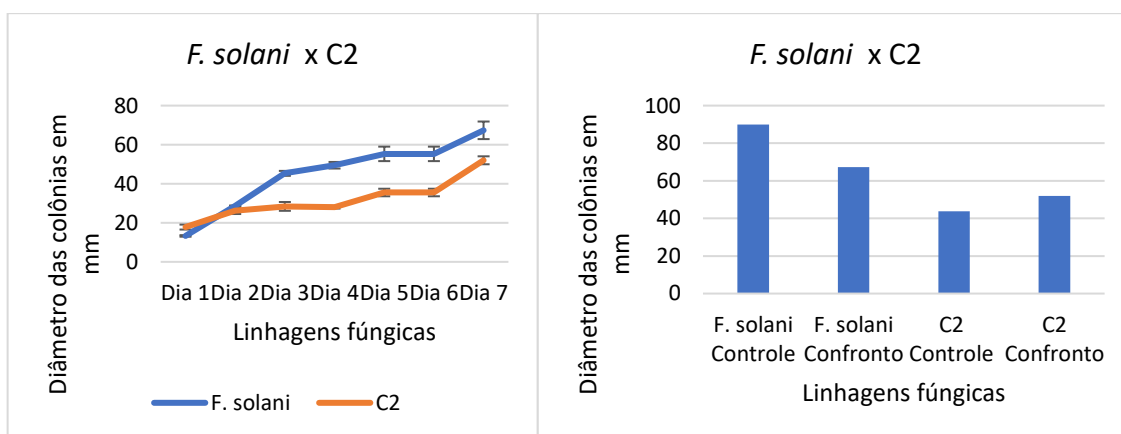


Figura 14 - Encontro dos micélios no pareamento do *F. solani* x C2.



Fonte: A autora

5.3.2 Confronto FB1P x Fitopatógenos

Na análise gráfica do confronto do isolado FB1P frente ao fungo *L. pontae* (L18) foi observada a inibição do desenvolvimento do fitopatógeno causada pelo endofítico no estudo da média do crescimento dos fungos. Já nos primeiros dias é possível observar que o isolado FB1P tem um crescimento majoritário frente ao L18. Durante todo o experimento o endofítico mantém seu desenvolvimento superior ao

fitopatígeno, o que pode ser comprovado através das barras de erro (Figura 15). Na avaliação do crescimento do FB1P no confronto e em relação ao seu controle se nota um desenvolvimento superior de 1,25% no confronto que pode ser justificado pela liberação de substâncias conhecidas como promotoras de crescimento. Além disso, também é verificado que o endofítico inibe o crescimento do fitopatígeno em um percentual de 59,83% o que denota uma repressão positiva do desenvolvimento do fitopatígeno, isso é comprovado pela análise de variância que não mostrou diferença significativa entre as médias dos diâmetros das colônias ao sétimo dia ($p= 0,05621$) (Figura 15). O encontro dos micélios das cepas analisadas não nos permite afirmar que a inibição ocorre quimicamente (Figura 16).

Figura 15 - Desenvolvimento do fungo FB1P frente ao fitopatígeno *L. pontae* (L18) ao longo dos dias de crescimento.

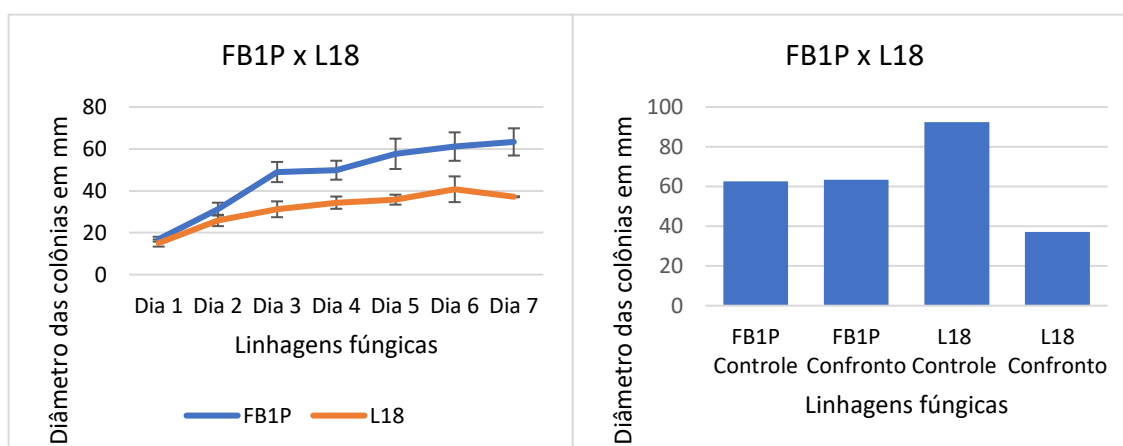


Figura 16 - Encontro dos micélios no pareamento do FB1P x L18.



Fonte: A autora

Na cultura pareada do FB1P frente ao fungo *Colletotrichum* (C2), foi observada a inibição do crescimento do fitopatígeno com um claro crescimento do endofítico a partir do quinto dia de cultura, sendo que ao término do sétimo dia

comprovou-se uma variância altamente significativa do endofítico frente ao C2. Quando se avalia o crescimento do FB1P em relação ao seu controle se nota um desenvolvimento superior de 1,69% a mais que o seu controle, que pode ser justificado pela liberação de substâncias promotoras de crescimento. Além disso, também foi verificado a inibição de 13,84% do crescimento do fitopatógeno no confronto com endofítico. Isso é notável através das linhas do gráfico desencontradas apontando para uma alta diferença de desenvolvimento confirmada pela análise de variância ($p= 0,01997$) (Figura 17). Como os micélios não se encontraram (Figura 18) p.42, é provável que esta inibição seja química e este seja um bom fungo para prospecção de compostos com potencial para o controle biológico do fitopatógeno sob investigação.

Figura 17 - Desenvolvimento do fungo FB1P frente ao fitopatógeno *Colletotrichum* (C2) ao longo dos dias de crescimento.

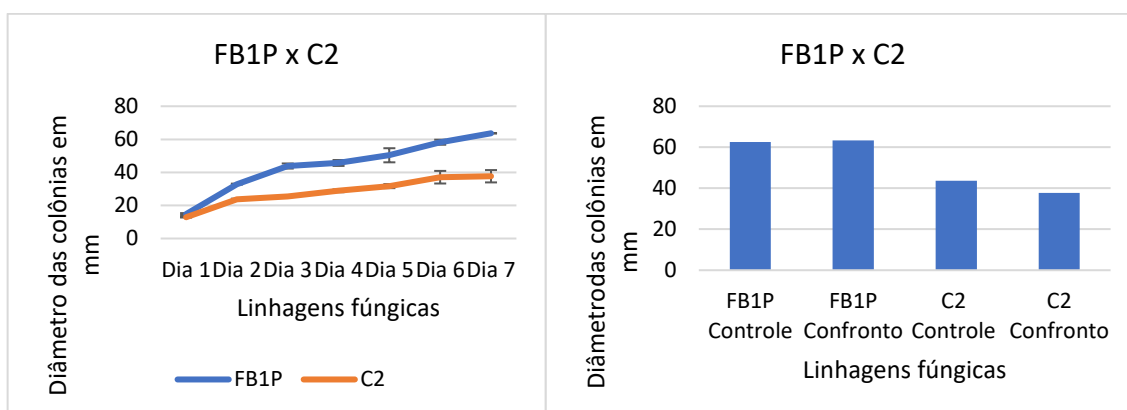


Figura 18 - Provável inibição química no pareamento do FB1P x C2.



Fonte: A autora

5.3.3 Confronto CA3V x Fitopatógenos

Na análise gráfica do confronto da cepa CA3V frente ao fungo *L. pontae* (L18) foi observada a inibição do fitopatógeno em relação ao endofítico no estudo da média do crescimento dos fungos. Nos primeiros dias é possível observar que o CA3V e o L18 crescem quase que na mesma proporção até o terceiro dia, entre o terceiro e o quarto dia o L18 tem um leve crescimento maior que o endofítico, porém entre o quarto e quinto dia esse crescimento é inibido pelo CA3V que cresce majoritariamente no quinto dia. Na avaliação do crescimento do L18 no confronto (61,54 mm) em relação ao seu controle (84,10 mm), foi observado uma inibição de 26,88% do seu crescimento causado pelo endofítico, como mostra o gráfico em barras (Figura 19). A análise de variância corrobora para a percepção da baixa inibição do fitopatógeno pelo endofítico ($p= 0,05746$). O encontro micelial das cepas avaliadas próximo a metade da placa (Figura 20), autentica a impossibilidade de inibição significativa.

Figura 19 - Desenvolvimento do fungo CA3V frente ao fitopatógeno *L. pontae* (L18) ao longo dos dias de crescimento.

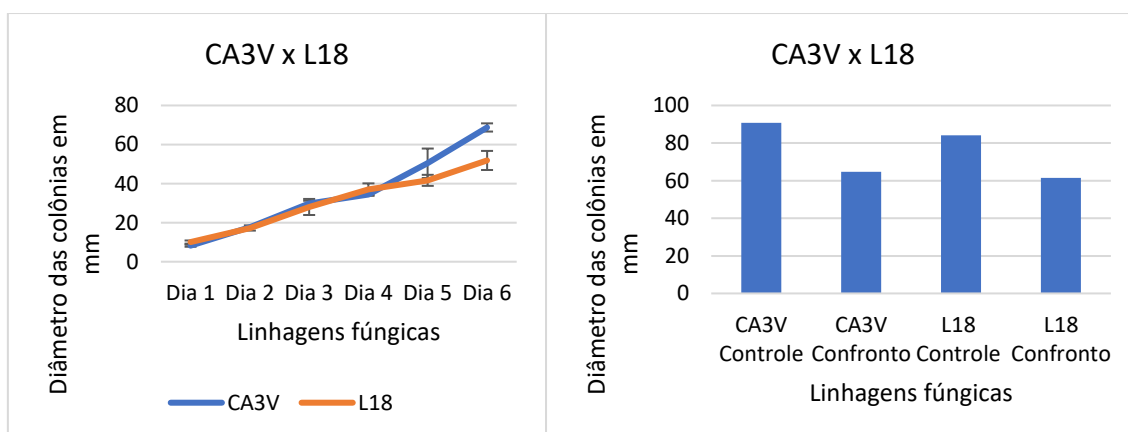
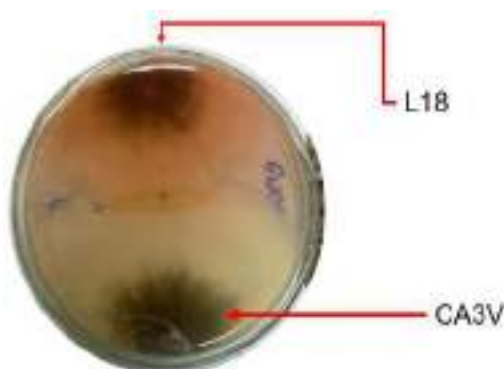


Figura 20 - Encontro dos micélios no pareamento do CA3V x L18.



Fonte: A autora

No pareamento do CA3V frente ao fungo *Colletotrichum* (C2), foi observado um crescimento diretamente proporcional para os dois fungos até o terceiro dia, sendo que o endofítico teve um leve crescimento maior que o fitopatógeno nesse dia. Nos

dias seguintes se nota um crescimento muito maior do isolado fúngico do babaçueiro em relação ao C2, constituindo, portanto, uma maior inibição do crescimento do fitopatógeno no quinto dia. Avaliando os dados, verifica-se que o crescimento do C2 no confronto (31,59 mm) em relação ao seu crescimento no controle (37,1 mm), representa uma inibição no desenvolvimento da colônia do fitopatógeno numa taxa de 15,01% causada pela cepa CA3V, considerada significativa de acordo com a análise de variância ($p= 0,1685$) (Figura 21). Como os micélios não se encontraram (Figura 22), é provável que esta inibição seja química e este seja um bom fungo para prospecção de compostos com propriedades de controle biológico.

Figura 21 - Desenvolvimento do fungo CA3V frente ao fitopatógeno *Colletotrichum* (C2) ao longo dos dias de crescimento.

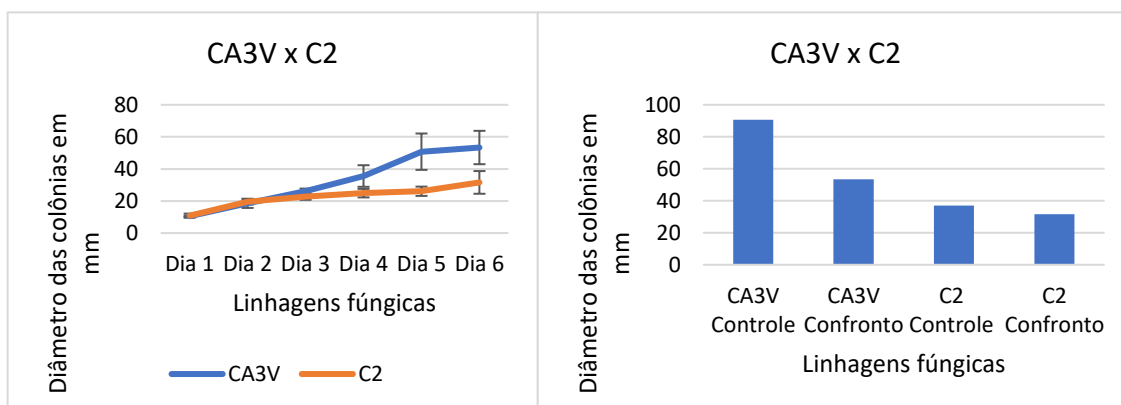
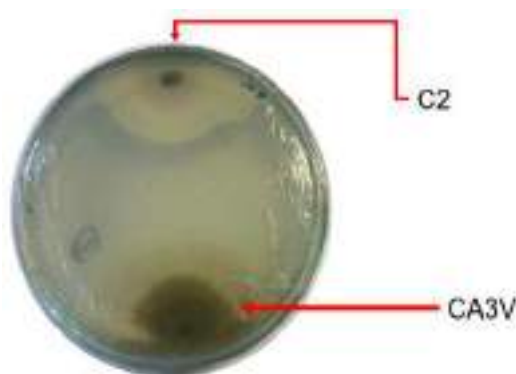


Figura 22 - Provável inibição química no pareamento do CA3V x C2.



Fonte: A autora

5.3.4 Confronto *D. eschscholtzii* x Fitopatógenos

Na análise do confronto da cepa *D. eschscholtzii* frente ao fungo *L. pontae* (L18) foi observada a inibição do fitopatógeno em relação ao endofítico logo nos primeiros dias de pareamento, sendo que o endofítico segue crescendo de forma majoritária nos dias seguintes, destacando-se os dias 2 e 5 em que se nota uma taxa maior de crescimento de *D. eschscholtzii* frente ao L18. Ao avaliar o crescimento do

fitopatógono no pareamento (13,26 mm) em relação ao controle (38,73 mm) se observa uma taxa de inibição de 65,75% no desenvolvimento da colônia do L18, um valor significativo às análises de variância. Como houve o encontro micelial entre as cepas é improvável que a inibição seja química (Figura 23). A baixa taxa na variação dos dados confirma a inibição do crescimento do fitopatógono ($p= 0,004193$) (Figura 24).

Figura 23 - Desenvolvimento do fungo *D. eschscholtzii* frente ao fitopatógono *L. pontae* (L18) ao longo dos dias de crescimento.

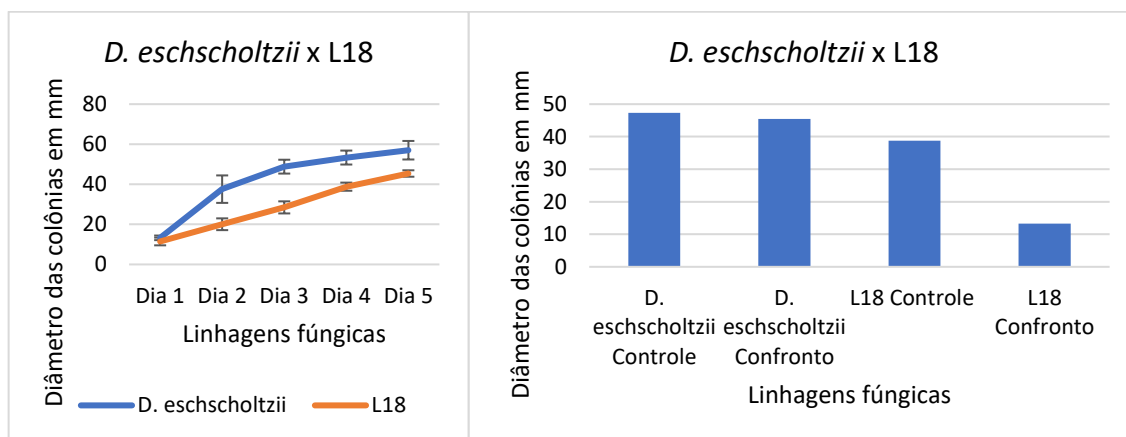


Figura 24 - Encontro dos micélios no pareamento do *D. eschscholtzii* x L18.



Fonte: A autora

No pareamento do *D. eschscholtzii* frente ao fitopatógono *Colletotrichum* (C2), foi observado um crescimento predominante do endofítico em relação ao fitopatógono nos primeiros dias de inoculação; a maior taxa de crescimento se deu no segundo dia, sendo que após esse dia, *D. eschscholtzii* segue se desenvolvendo de forma mais lenta, porém ainda majoritariamente comparado ao C2, ocupando por completo a placa. Avaliando o desenvolvimento do fitopatógono (9,74 mm) em relação ao seu controle (25,92 mm) foi observado uma taxa de inibição de 62,37%, resultando num valor de repressão significativa à análise de variância ($p= 0,0009598$) (Figura 25) p.45;

como houve encontro micelial no término do confronto é improvável que a inibição seja química (Figura 26).

Figura 25 - Desenvolvimento do fungo *D. eschscholtzii* frente ao fitopatógeno *Colletotrichum* (C2) ao longo dos dias de crescimento.

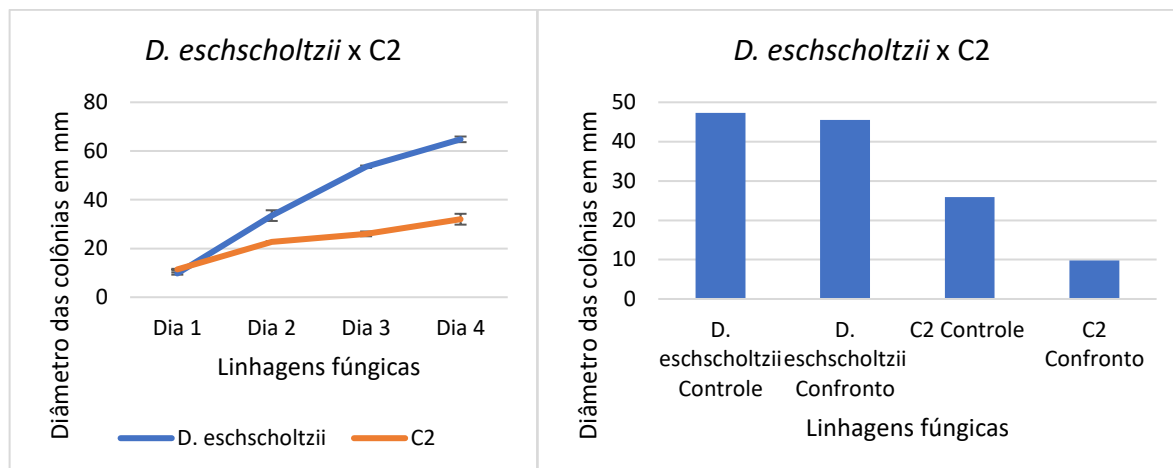


Figura 26 - Encontro dos micélios no pareamento do *D. eschscholtzii* x C2.



Fonte: A autora

5.3.5 Confronto *H. anthochroum* x Fitopatógenos

Na observação dos gráficos do confronto do fungo *H. anthochroum* frente a cepa *L. pontae* (L18) foi observada a inibição do crescimento do fitopatógeno em relação ao endofítico já nos primeiros dias de inoculação; o desenvolvimento do *H. anthochroum* é crescente até o sexto dia em que a placa é tomada de forma predominante pelo endofítico. Na avaliação dos dados do crescimento do fitopatógeno no confronto (37,60 mm) em relação ao seu controle (52,48 mm) se nota uma taxa de inibição de 28,48% do desenvolvimento da cepa L18, significativa à análise de variância ($p= 0,1207$) (Figura 27) p.46. Devido ao encontro micelial das cepas avaliadas não é provável que a inibição seja química (Figura 28) p.46.

Figura 27 - Desenvolvimento do fungo *H. anthochroum* frente ao fitopatógeno *L. pontae* (L18) ao longo dos dias de crescimento.

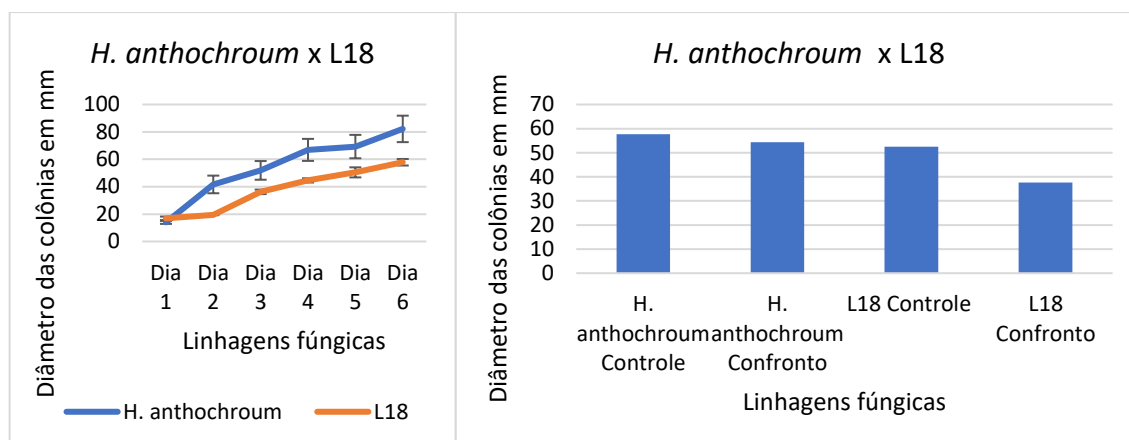


Figura 28 - Encontro dos micélios no pareamento do *H. anthochroum* x L18.



Fonte: A autora

No confronto do *H. anthochroum* frente ao fungo *Colletotrichum* (C2), foi observado um crescimento gradativo do endofítico em maior proporção que o fitopatógeno do primeiro até o quinto dia. No sexto dia a cepa isolada do babaçu teve uma alta taxa de crescimento em detrimento ao C2, evidenciando dessa forma a inibição do desenvolvimento do *Colletotrichum*. Quando foi observado os dados do crescimento do fitopatógeno no confronto (23,45 mm) em relação ao seu controle (38,73 mm) ficou evidente um a taxa de inibição de 39,56%, significativa à análise de variância ($p= 0,1207$) (Figura 29) p.47. A observação do encontro micelial entre as cepas pareadas nos permite afirmar que é improvável que a inibição seja química (Figura 30) p.47.

Figura 29 - Desenvolvimento do fungo *H. anthochroum* frente ao fitopatógeno *Colletotrichum* (C2) ao longo dos dias de crescimento.

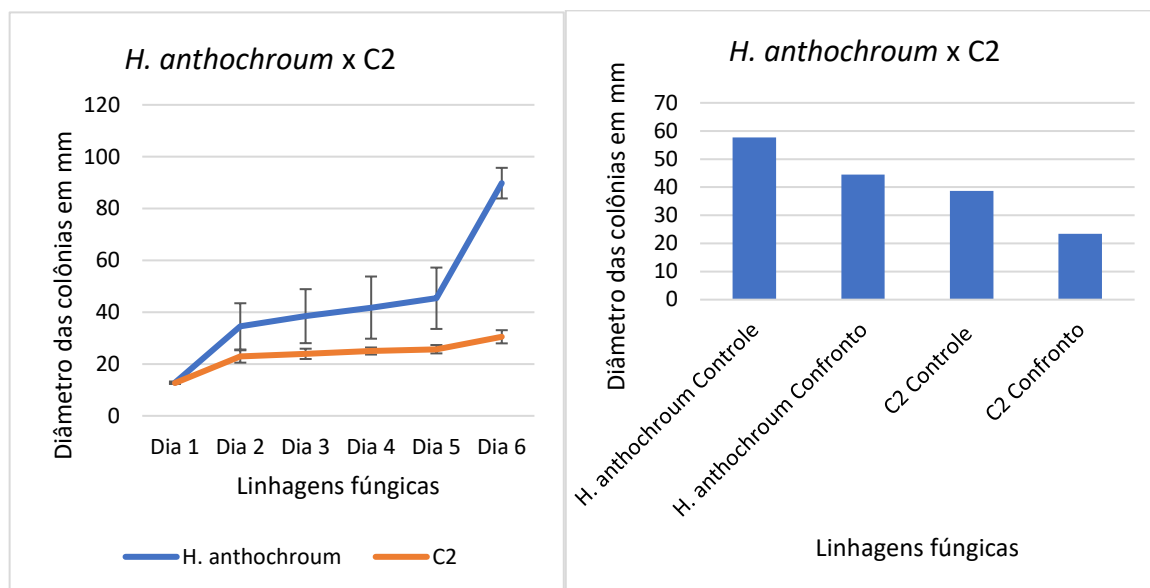


Figura 30 - Encontro dos micélios no pareamento do *H. anthochroum* x C2.



Fonte: A autora

5.3.6 Confronto CA2P x Fitopatógenos

Na avaliação do crescimento do fungo CA2P frente a cepa *L. pontae* (L18) foi observada uma taxa de crescimento praticamente linear entre os dias quatro e nove do endofítico em relação ao fitopatógeno, no décimo dia se nota um crescimento muito maior da cepa isolada do fruto babaçueiro, caracterizando a inibição do desenvolvimento do L18. Quando se avalia os dados de desenvolvimento do fitopatógeno no confronto (37,73 mm) em relação ao seu controle (58,19 mm) uma taxa de inibição de 35,19% é observada. É evidenciado também que o endofítico se desenvolveu 77,69% a mais durante o pareamento que o seu controle, isso pode ser justificado pela liberação de substâncias capazes de ajudar no desenvolvimento da colônia do CA2P. A análise dos dados descritos é significativa à análise de variância

o que confirma a inibição do desenvolvimento do L18 ($p= 0,05288$) (Figura 31). Devido ao encontro micelial durante o confronto das cepas é improvável que a inibição seja química (Figura 32).

Figura 31 - Desenvolvimento do fungo CA2P frente ao fitopatógeno *L. pontae* (L18) ao longo dos dias de crescimento.

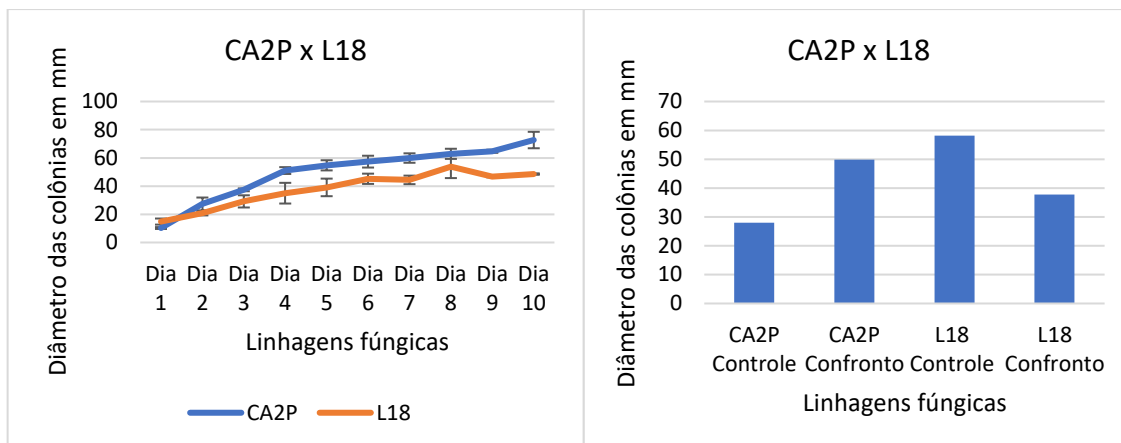


Figura 32 - Encontro dos micélios no pareamento do CA2P x L18.



Fonte: A autora

No confronto do CA2P frente ao fungo *Colletotrichum* (C2), foi observado um crescimento majoritário do endofítico em relação ao fitopatógeno, sendo que entre os dias quatro e seis se nota as maiores taxas de crescimento do CA2P. Avaliando os dados do desenvolvimento do fitopatógeno no pareamento (31,57 mm) em relação ao seu controle (36,86 mm) é observada uma taxa de inibição no desenvolvimento de sua colônia de 14,34%, também é verificado que o endofítico cresce 61,80% a mais que o seu controle durante o confronto, esse acréscimo pode ser esclarecido através do ambiente de estresse em que os fungos são inseridos, fazendo com que o CA2P ou fitopatógeno liberem substâncias capazes de favorecer o seu crescimento. O exame dos dados descritos é significativo a análise de variância ($p= 0,0001127$)

(Figura 33). Como houve encontro dos micélios é provável que a inibição não seja química (Figura 34).

Figura 33 - Desenvolvimento do fungo CA2P frente ao fitopatógeno *Colletotrichum* (C2) ao longo dos dias de crescimento.

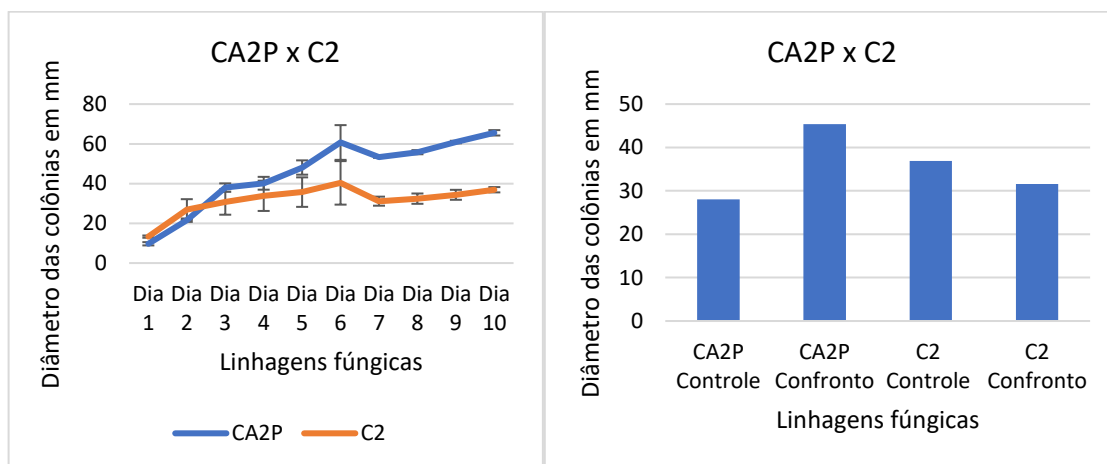


Figura 34 - Encontro dos micélios no pareamento do CA2P x C2.



Fonte: A autora

5.3.7 Confronto F2 x Fitopatógenos

Na observação do confronto do fungo F2 frente a cepa *L. pontae* (L18) foi observada a inibição do crescimento do fitopatógeno em relação ao endofítico, já que a taxa média diária do desenvolvimento do F2 foi maior em praticamente todo o experimento, com destaque no aumento médio da colônia do isolado das folhas do babaqueiro entre os dias quatro e seis que foi muito superior que nos dias anteriores de experimento. Quando se avalia o crescimento do fitopatógeno no pareamento (32,30 mm) em relação ao seu controle (58,19 mm) se nota uma taxa de repressão no desenvolvimento do L18 de 44,52%, significativa à análise de variância ($p=$

0,04237) (Figura 35). Devido ao encontro dos micélios durante o confronto fica impossibilitada a probabilidade inibição química entre as cepas pareadas (Figura 36).

Figura 35 - Desenvolvimento do fungo F2 frente ao fitopatógeno *L. pontae* (L18) ao longo dos dias de crescimento.

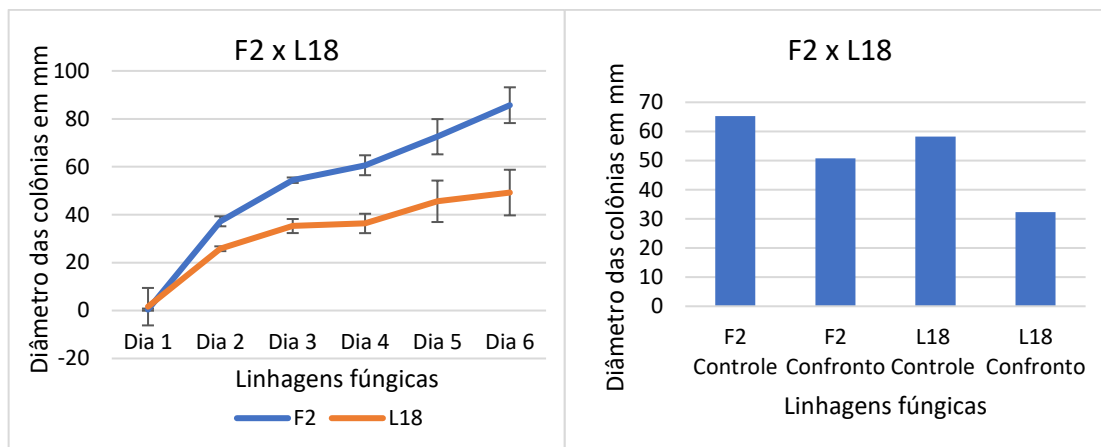


Figura 36 - Encontro dos micélios no pareamento do F2 x L18.



Fonte: A autora

Na análise de colônias pareadas do F2 frente ao fungo *Colletotrichum* (C2), foi observado um crescimento gradual da massa micelial do endofítico em relação ao fitopatógeno entre o segundo e o quinto dia. As linhas do gráfico desencontradas denotam um desenvolvimento maior da cepa F2, porém não é possível afirmar uma repressão significativa, pois a cepa C2 teve o tamanho da sua colônia na placa do confronto bem próximo a área da mesma cepa no seu controle, isso denota que praticamente o fitopatógeno cresceu no confronto da mesma forma que cresce quando cultivado de forma isolada. As observações descritas anteriormente se confirmam quando se avalia os dados do desenvolvimento do C2 no confronto (29,87 mm) em relação ao seu controle (31,17 mm) que denota uma taxa de inibição de 4,15%, significativa à análise de variância ($p = 0,09879$) (Figura 37) p.51. Como houve

encontro micelial entre as cepas pareadas é provável que a inibição não ocorra de forma química (Figura 38).

Figura 37 - Desenvolvimento do fungo F2 frente ao fitopatógeno *Colletotrichum* (C2) ao longo dos dias de crescimento.

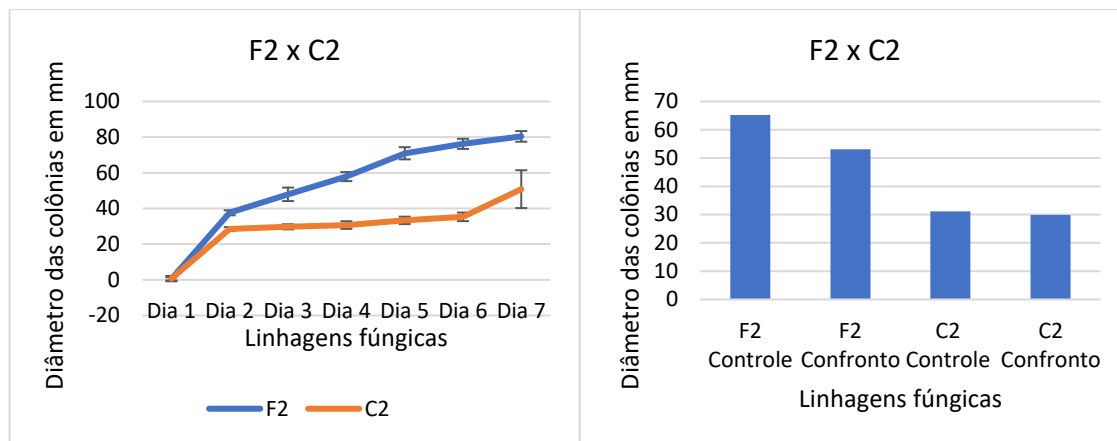


FIGURA 38 - Encontro dos micélios no pareamento do F2 x C2.



Fonte: A autora

5.3.8 Confronto *X. feejeensis* x Fitopatógenos

Na observação do confronto do fungo *X. feejeensis* frente a cepa *L. pontae* (L18) foi observada a inibição do crescimento do endofítico em relação ao fitopatógeno, já que a taxa média diária do desenvolvimento do L18 foi maior em praticamente todo o experimento, isso é apontado pelas linhas do gráfico desencontradas, com uma taxa de crescimento maior no aumento da colônia do *L. pontae* entre os dias três e quatro que foi superior aos demais dias de observação. Quando se faz uma avaliação dos dados do desenvolvimento do endofítico no confronto (20,28 mm) em relação ao seu controle (45,35 mm) foi observado uma inibição de 55,30%. A análise de variância não mostrou diferença significativa entre as médias dos diâmetros das colônias ($p = 0,04072$) (Figura 39) p.52. Devido ao

encontro dos micélios das duas cepas fica improvável que a inibição do L18 seja química (Figura 40) p.52.

Figura 39 - Desenvolvimento do fungo *X. feejeensis* frente ao fitopatógeno *L. pontae* (L18) ao longo dos dias de crescimento.

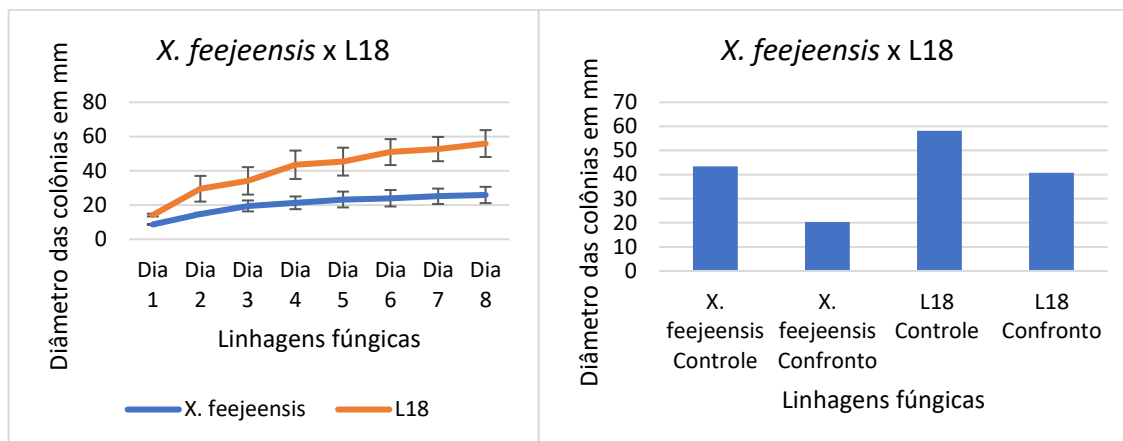


Figura 40 - Encontro dos micélios no pareamento do *X. feejeensis* x L18.



Fonte: A autora

Na análise de colônias pareadas do *X. feejeensis* frente ao fungo *Colletotrichum* (C2), foi observado um crescimento majoritário do fitopatógeno em relação ao endófito, com maior taxa de desenvolvimento entre os dias cinco e seis. As linhas do gráfico desencontradas denotam uma ampliação maior da colônia da cepa *Colletotrichum*, em consequência disso entendemos que o fitopatógeno inibe o crescimento do endófito. A avaliação dos dados relacionando o desenvolvimento do fitopatógeno no confronto (39,23 mm) em relação ao seu controle (36,86 mm) denotam um aumento da colônia do C2 durante o pareamento numa taxa de 6,74% superior ao crescimento do controle, que pode ser explicado pela liberação de substâncias facilitadoras ao crescimento do C2. Dessa forma os valores levantados na análise caracterizam uma vantagem do *Colletotrichum* na cultura pareada com o endófito, que teve uma inibição do seu desenvolvimento em 34,05%. A análise da

variância corrobora para uma repressão da cepa *X. feejeensis* através dos dados coletados ($p= 0,3118$) (Figura 41). Como ocorreu o encontro micelial das cepas pareadas não é possível afirmar que a inibição seja química (Figura 42).

Figura 41 - Desenvolvimento do fungo *X. feejeensis* frente ao fitopatógeno *Colletotrichum* (C2) ao longo dos dias de crescimento.

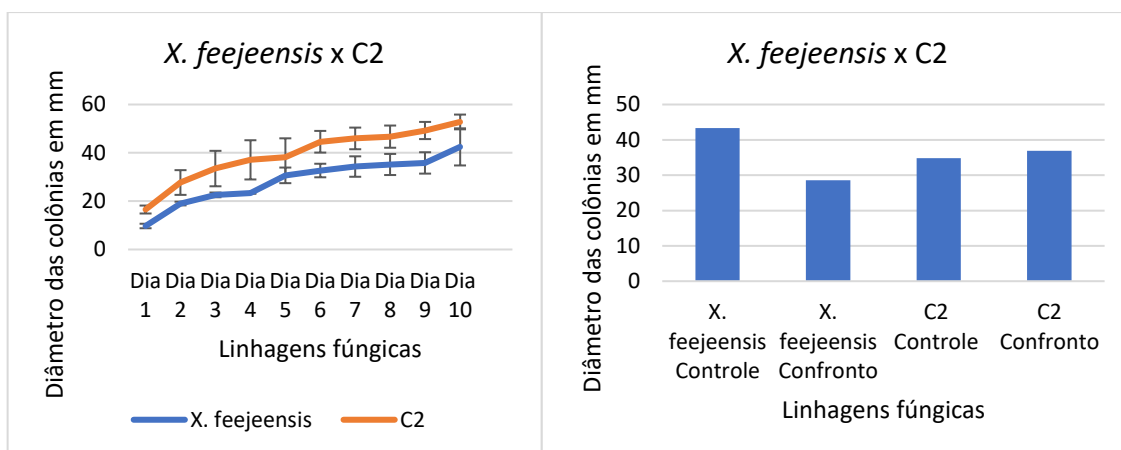


Figura 42 - Encontro dos micélios no pareamento do *X. feejeensis* x C2.



Fonte: A autora

5.3.9 Confronto *C. lunata* x Fitopatógenos

Na análise do desenvolvimento do fungo *C. lunata* frente a cepa *L. pontae* (L18) foi difícil a determinação da inibição do crescimento das cepas pareadas, ainda que se observe o aumento da taxa média diária de crescimento da colônia do L18 que foi maior logo nos primeiros dias de experimentação, e isso é apontado pelas linhas do gráfico em patamares distintos, denotando um crescimento maior no aumento da colônia do *L. pontae* entre os dias um e quatro que foi superior que nos outros dias de observação. As análises acima são ressaltadas quando se avalia o crescimento das cepas pareadas em relação ao seu controle, verifica-se um desenvolvimento superior dos dois fungos confrontados com taxas de 21,46% para o endofítico e de 1,95% para o fitopatógeno, esse incremento pode ser justificado pela liberação de substâncias

que promovam a expansão das colônias durante o confronto, embora se verifique que a taxa de aumento da colônia relacionada ao *C. lunata* seja superior a do L18, esta não se mostrou suficiente para que a cepa isolada do babaçueiro se desenvolvesse de forma significativa em relação ao *L. Pontae*. Em decorrência do crescimento superior das cepas no confronto em relação ao seu crescimento de forma isolada, fica impossibilitada a determinação do percentual de inibição. A análise de variância não mostrou diferença significativa entre as médias dos diâmetros das colônias ($p=0,0003266$) (Figura 43). Ao observar o encontro dos micélios das colônias confrontadas é provável que a inibição não seja química (Figura 44).

Figura 43 - Desenvolvimento do fungo *C. lunata* frente ao fitopatógeno *L. pontae* (L18) ao longo dos dias de crescimento.

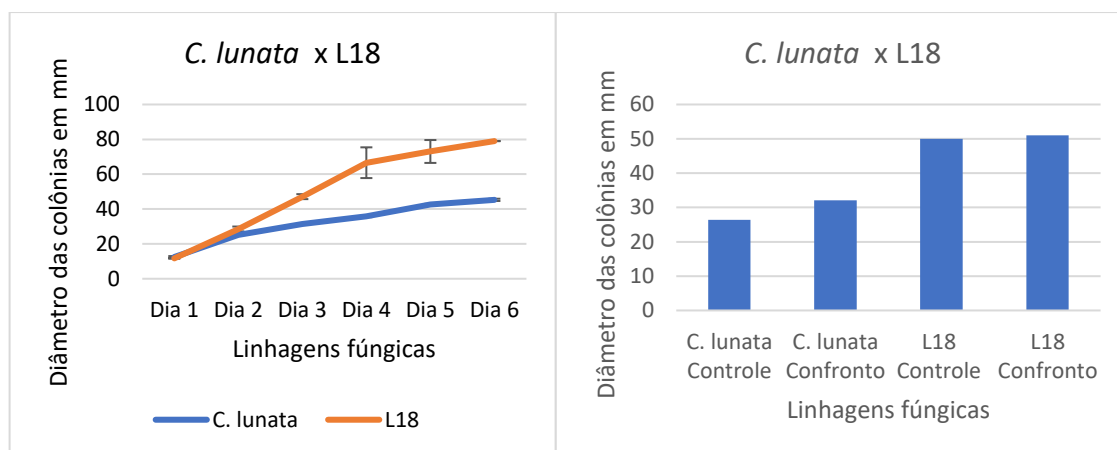


Figura 44 - Encontro dos micélios no pareamento do *C. lunata* x L18.



Fonte: A autora

Na análise de colônias pareadas de *C. lunata* frente ao fungo *Colletotrichum* (C2), foi observado um crescimento maior do fitopatógeno em relação ao endofítico, com um desenvolvimento crescente entre o primeiro e o segundo dia dos dois fungos. As linhas do gráfico desconstruídas denotam um aumento maior da colônia do *Colletotrichum*, que ocupou a maior parte da placa encerrando o experimento logo no

terceiro dia de observação. A estimativa dos dados relacionado ao crescimento do fitopatógeno (26,43 mm) em relação ao seu controle (51,77 mm) denotam uma taxa de inibição do desenvolvimento do C2 em 49,04%. Ainda que se observe que a colônia do fitopatógeno seja maior que de *C. lunata*, a análise dos dados do desenvolvimento das duas cepas pareadas relacionadas ao seu controle, nos permite inferir que o endofítico inibe o *Colletotrichum* num percentual maior que a inibição do fitopatógeno em relação ao endofítico. Estas informações são significativas à análise de variância ($p= 0,1145$) (Figura 45). O encontro dos micélios dos fungos pareados nos permite inferir que a possibilidade de inibição química é mínima (Figura 46).

Figura 45 - Desenvolvimento do fungo *C. lunata* frente ao fitopatógeno *Colletotrichum* (C2) ao longo dos dias de crescimento.

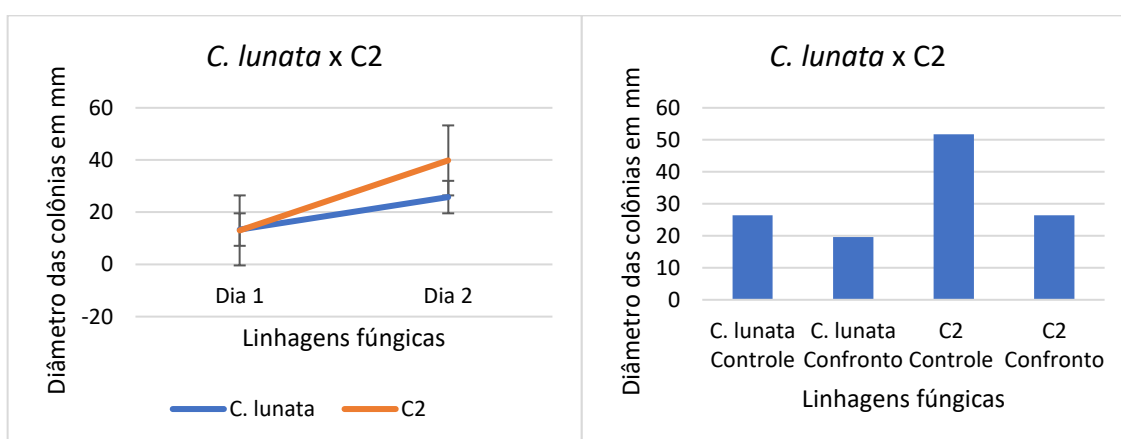


Figura 46 - Encontro dos micélios no pareamento do *C. lunata* x C2.



Fonte: A autora

5.3.10 Confronto FB2V x Fitopatógenos

Na análise do desenvolvimento do fungo FB2V frente a cepa *L. pontae* (L18) foi observada a inibição do crescimento do fitopatógeno em relação ao endofítico, pois é possível notar um crescimento majoritário do FB2V durante todo experimento, com destaque para o desenvolvimento ocorrido entre o primeiro e segundo dia, em que foi

observado uma taxa de desenvolvimento mais alta da colônia do isolado do endocarpo do fruto do babaçueiro. Ainda que se observe nos últimos dias de experimentação um aumento do crescimento da cepa *L. pontae*, esse avanço não supera os diâmetros já alcançados pelo endofítico, confirmando dessa forma a inibição do fungo fitopatogênico. A inibição do fitopatógeno alcançou uma taxa de 23,58% quando se avalia o desenvolvimento do L18 no pareamento (32,73 mm) em relação ao seu controle (42,78 mm). A análise de variância não mostrou diferença significativa entre as médias dos diâmetros das colônias ($p= 0,1002$) (Figura 47). Como os micélios das colônias confrontadas se encontraram durante o experimento, fica improvável a possibilidade de inibição química (Figura 48).

Figura 47 - Desenvolvimento do fungo FB2V frente ao fitopatógeno *L. pontae* (L18) ao longo dos dias de crescimento.

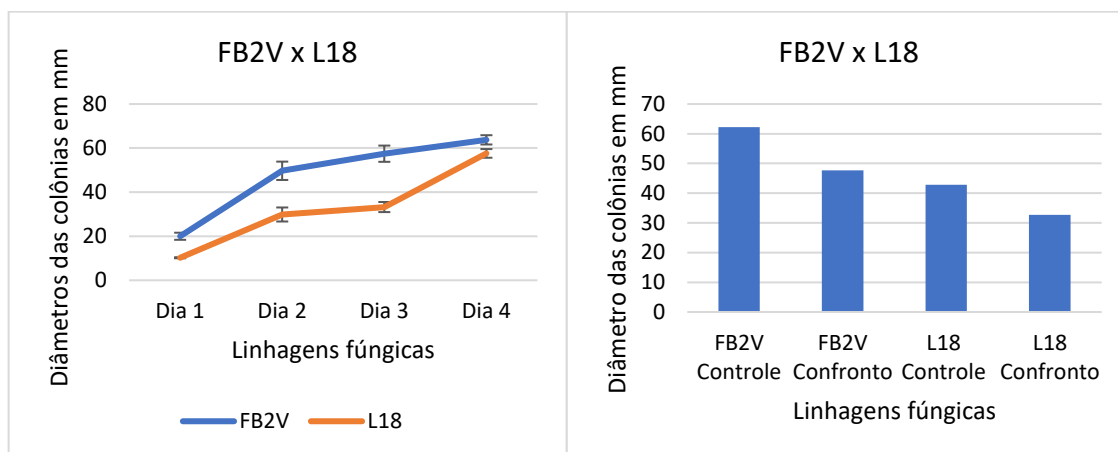


Figura 48 - Encontro dos micélios no pareamento do FB2V x L18.



Fonte: A autora

Na análise de colônias pareadas do FB2V frente ao fungo *Colletotrichum* (C2), foi observado uma alta taxa de desenvolvimento do endofítico logo no primeiro dia de crescimento, enquanto que o fitopatógeno teve o aumento de sua colônia inibido pelo FB2V em todos os dias de análise, esse julgamento é feito visualizando a barra de

erro padrão que denota no primeiro dia uma vantagem maior da cepa FB2V. Uma taxa de inibição de 58,35% é denotada quando se avalia o desenvolvimento do C2 no confronto (17,89 mm) e seu controle (42,95 mm). A análise de variância confirma a inibição através dos dados coletados ($p= 0,008729$) (Figura 49) p.57. A notoriedade do encontro micelial das cepas confrontadas dão possibilidade para que a inibição não seja química (Figura 50).

FIGURA 49 - Desenvolvimento do fungo FB2V frente ao fitopatógeno *Colletotrichum* (C2) ao longo dos dias de crescimento.

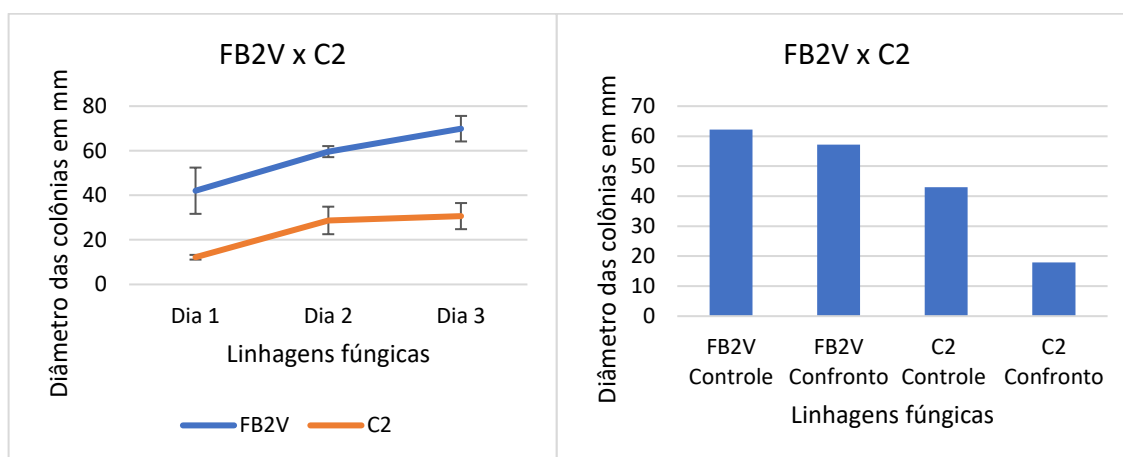


FIGURA 50 - Encontro dos micélios no pareamento do FB2V x C2.



Fonte: A autora

5.3.11 Confronto *C. aérea* x Fitopatógenos

Na observação dos gráficos do confronto do fungo *C. aérea* frente à cepa *L. pontae* (L18) foi observada a inibição do crescimento do endofítico em relação ao fitopatógeno já nos primeiros dias de inoculação; o desenvolvimento do L18 ultrapassa a colônia de *C. aérea* entre os dias um e dois e segue em crescimento acentuado até o fim do experimento no quinto dia, caracterizando a repressão ao crescimento da colônia do endofítico. A avaliação dos dados do aumento da colônia do isolado do

babaçueiro (27,42 mm) em relação ao desenvolvimento do seu controle (40,30 mm) demonstram uma taxa de inibição de 31,96%, significativa às análises de variância ($p= 0,01013$) (Figura 51) p.58. O encontro micelial dos fungos durante o confronto indicam que a inibição provavelmente não seja química (Figura 52) p.58.

Figura 51 - Desenvolvimento do fungo *C. aérea* frente ao fitopatógeno *L. pontae* (L18) ao longo dos dias de crescimento.

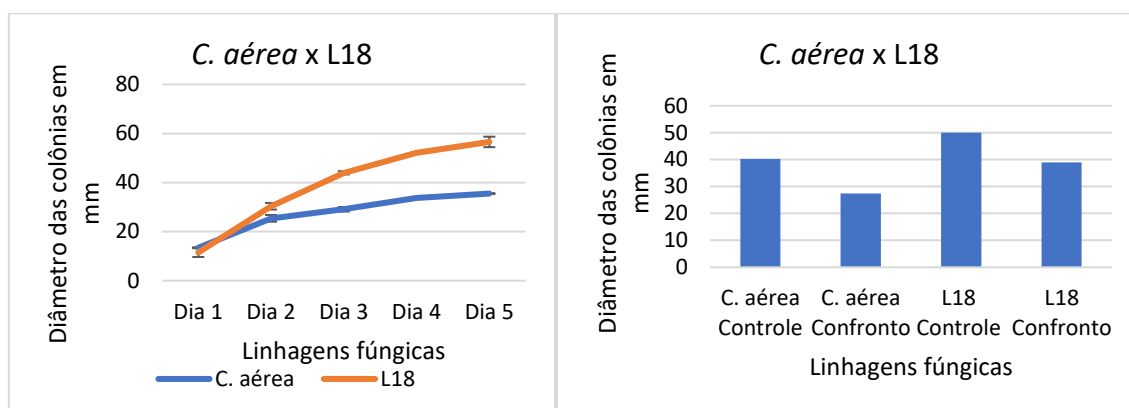


Figura 52 - Encontro dos micélios no pareamento do *C. aérea* x L18.



Fonte: A autora

Na análise de colônias pareadas do *C. aérea* frente ao fungo *Colletotrichum* (C2), não foi observado inibição relevante por parte das duas cepas pareadas, já que a análise gráfica denota crescimento em proporções quase que idênticas, com uma pequena vantagem do endofítico em relação ao fitopatógeno entre o segundo e terceiro dia, porém essa variação no crescimento não é significativa para avaliação de um possível antagonismo de uma cepa em detrimento a outra. Quando se avalia o desenvolvimento do endofítico (23,70 mm) e do fitopatógeno (22,01 mm) durante o enfrentamento em relação aos controles (40,30 mm e 47,72 mm, respectivamente), se nota que o *C. aérea* inibe o crescimento do fitopatógeno num percentual de 54,54%, enquanto que o C2 inibe o aumento da colônia do endofítico numa taxa percentual de 41,85%, a diferença nos percentuais de inibição entre as cepas confrontadas é

pequena, o que corrobora para a impossibilidade de se determinar potencial antagônico entre os fungos pareados. A análise de variância dos dados coletados confirma a incapacidade dos fungos pareados em reprimir o crescimento do outro de forma significativa ($p= 0,6744$) (Figura 53). O encontro dos micélios dos fungos durante o confronto pode ser observado na Figura 54.

Figura 53 - Desenvolvimento do fungo *C. aérea* frente ao fitopatógeno *Colletotrichum* (C2) ao longo dos dias de crescimento.

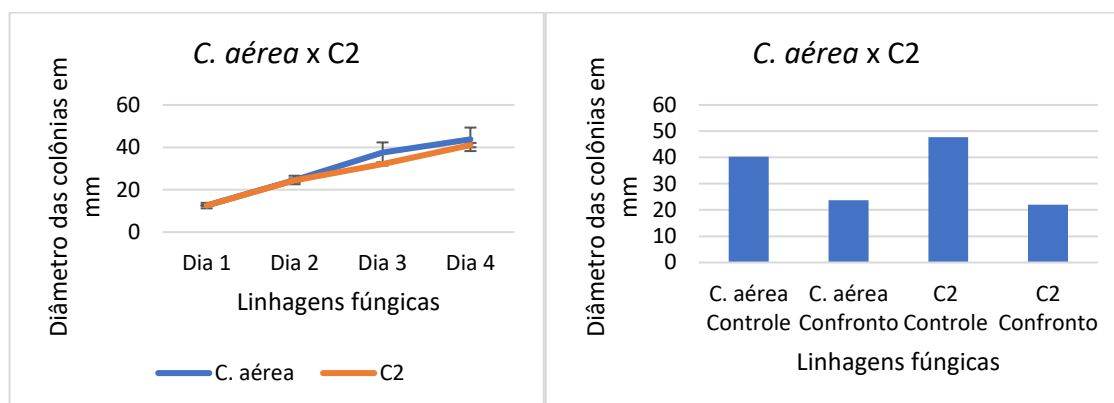


Figura 54 - Encontro dos micélios no pareamento do *C. aérea* x C2.



Fonte: A autora

Dessa forma, foi verificado as maiores taxas de inibição do desenvolvimento dos fitopatógenos nos confrontos de *D. eschscholtzii* x *L. pontae* e *D. eschscholtzii* x *Colletotrichum*, sendo esses valores 65,75% e 62,37% respectivamente, enquanto que as menores taxas de repressão ao crescimento das colônias *L. pontae* e *Colletotrichum* foram observadas nas disputas das cepas endofíticas *X. feejeensis* (19,98%) e FB1P (13,84%).

Os dados das médias de crescimento das cepas pareadas são encontrados na tabela 4 (p.60). Um resumo dos dados observados no que se refere a inibição do crescimento dos fitopatógenos analisados em relação aos endofíticos isolados do fruto e da folha do babaçu é mostrado na tabela 5 (p.61).

Tabela 4 - Média das medições do crescimento dos fungos pareados e de seus controles (continua).

Endofíticos isolados do babaçu e Fitopatógenos	Média do controle dos endofíticos em mm	Média do crescimento dos endofíticos frente ao L18 em mm	Média do controle do L18 em mm	Média do crescimento do L18 frente aos endofíticos em mm
<i>F. solani</i>	90,00	51,92	92,40	59,95
FB1P	62,60	62,35	92,40	37,16
CA3V	90,69	64,77	84,10	61,54
<i>D. eschscholtzii</i>	47,32	45,50	38,73	13,26
<i>H. anthochroum</i>	57,68	54,31	52,48	37,60
CA2P	28,04	49,82	58,19	37,73
F2	65,22	50,81	58,19	32,30
<i>X. feejeensis</i>	45,35	20,28	50,91	40,76
<i>C. lunata</i>	26,43	32,11	50,02	51,00
FB2C1	62,2	47,72	42,78	32,73
<i>C. aérea</i>	40,3	27,42	50,02	38,89

Tabela 4 - Média das medições do crescimento dos fungos pareados e de seus controles (continuação).

Endofíticos isolados do babaçu e Fitopatógenos	Média do controle dos endofíticos em mm	Média do crescimento dos endofíticos frente ao C2 em mm	Média do controle do C2 em mm	Média do crescimento do C2 frente aos endofíticos em mm
<i>F. solani</i>	90,00	67,34	43,7	52,00
FB1P	62,60	63,65	43,7	37,16
CA3V	90,69	53,36	37,10	31,59

<i>D. eschscholtzii</i>	47,32	45,50	25,92	9,75
<i>H. anthochroum</i>	57,68	44,49	38,73	23,45
CA2P	28,04	45,37	36,86	31,57
F2	65,22	53,09	31,17	29,87
<i>X. feejeensis</i>	43,35	28,58	36,86	39,23
<i>C. luneta</i>	26,43	19,57	51,77	26,43
FB2C1	62,20	57,18	42,95	17,89
<i>C. aérea</i>	40,30	23,70	47,72	22,01

Tabela 5 - Taxa de inibição promovida pelas cepas durante o pareamento e taxas de crescimento superior dos endófitos em relação a seus respectivos controles.

Endofíticos isolados do babaçu e Fitopatógenos	Taxa de inibição %		Taxa de crescimento superior do endofítico x controle em %	
	L18	C2	L18	C2
<i>F. solani</i>	(-) 42,30	(-) 25,23	-	-
FB1P	(+) 59,83	(+) 13,84	1,25	1,69
CA3V	(+) 26,88	(+) 15,01	-	-
<i>D. eschscholtzii</i>	(+) 65,75	(+) 62,37	-	-
<i>H. anthochroum</i>	(+) 28,48	(+) 39,56	-	-
CA2P	(+) 35,19	(+) 14,34	77,69	61,80
F2	(+) 44,52	(+) 4,15	-	-
<i>X. feejeensis</i>	(-) 55,30	(-) 34,05	-	-

<i>C. luneta</i>	*	(+) 49,04	21,46	-
FB2C1	(+) 23,58	(+) 58,35	-	-
<i>C. aérea</i>	(-) 31,96	*	-	-

(-) Inibição do crescimento do endofítico promovida pelo fitopatógeno.
 (+) Inibição do crescimento do fitopatógeno promovida pelo endofítico.
 * Taxa de inibição impossível de ser determinada.

5.4 Avaliação do perfil metabólico dos isolados antagônicos

A partir dos testes de antagonismo e da observação que a relação antagônica mais promissora estava associada à interação da espécie *D. eschscholtzii* e os fitopatógenos *Colletotrichum* sp. e *L. pontae*, estes inicialmente foram cultivados pareadamente em placas bipartidas para avaliação do efeito de compostos voláteis, porém as culturas pareadas tiveram crescimento micelial semelhante aos controles, indicando que o efeito inibitório observado não se devia a produção de compostos voláteis, fato que direcionou a pesquisa no sentido de explorar o perfil metabólico de compostos fixos produzidos nos testes de antagonismo. Os isolados endofíticos e fitopatógenos foram co-cultivados em meio de cultura sólido para produção de extratos. Foram produzidos 10 extratos, sendo 5 extratos hexânicos (3 controles e 2 co-cultivos) e 5 extratos metanólicos (3 controles e 2 co-cultivos).

Todos os extratos foram submetidos à análise espectroscópica via RMN ¹H. A análise do espectro de RMN ¹H obtido a partir do extrato hexânico associado ao cultivo isoladamente de *Colletotrichum* sp. (C2) evidencia a produção de compostos lipofílicos, como triacilglicerol, muito comum nos extratos fúngicos, em função das características celulares desse tipo de microrganismo (HOSSEINZADEH-BANDBAFHA *et al.*, 2020). O espectro de RMN ¹H do extrato metanólico deixa em evidência a produção de compostos hidroxilados, dada a riqueza de sinais na região entre 3,0 e 4,0 ppm. Ao analisar os espectros adquiridos para os extratos obtidos do cultivo isoladamente associados ao fitopatógeno *L. pontae* (L18), as mesmas evidências são observadas, ou seja, perfil lipídico no extrato hexânico e compostos hidroxilados no extrato metanólico.

Diferentemente dos espectros comentados anteriormente, o espectro de RMN ¹H do extrato hexânico do endofítico *D. eschscholtzii* possui uma riqueza de sinais,

tais como, sinais de metila alifática em torno de 1,50 ppm, metoxilas aromáticas, caracterizadas pelos sinais próximo a 4,00 ppm, sinais de hidrogênios aromáticos na região entre 6,25 ppm e 7,50 ppm, sinal típico de hidrogênio de aldeído em 9,32 ppm e hidroxila quelada em 11,70 ppm. A análise do espectro permite ainda destacar sinais típicos de substâncias lipofílicas como triacilgliceróis, dados os sinais na região de 1,5 a 3,0 ppm, próximo a 4,3 ppm e 5,5 ppm.

Por sua vez, a partir da análise do espectro de RMN ^1H do extrato hexânico obtido no co-cultivo (Figura 55 e 56) p.64, do endofítico com ambos os fitopatógenos, observa-se que não há evidências de alteração do perfil metabólico de ambos os microrganismos associados quando cultivados isoladamente. Este fato associado à observação feita no teste de antagonismo, de que as cepas se desenvolvem ao ponto de se tocarem, leva a sugerir que a inibição observada no pareamento talvez esteja associada à criação de uma barreira física, não descartando a hipótese de uma inibição associada ao mesmo perfil metabólico livre da presença do fitopatógeno, ou ainda que a inibição seja causada por substâncias associadas ao metabolismo primário, como aquele associado a atividade de peptídeos antimicrobianos (CARVALHO e MACHINI, 2013).

De modo semelhante aos extratos metanólicos dos fitopatógenos, o extrato metanólico do endofítico *D. eschscholtzii* é rico em substâncias hidroxiladas. Da mesma forma, o extrato metanólico do co-cultivo de ambos os sistemas (*D. eschscholtzii* e *Colletotrichum* sp; *D. eschscholtzii* e *L. pontae*) não produziu evidências da alteração do perfil metabólico. Os espectros dos extratos metanólicos podem ser visualizados nas figuras de 57 e 58 (p.65), de modo associado.

FIGURA 55: Análise comparativa do perfil metabólico via espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do extrato hexânico do co-cultivo (*D. eschscholtzii* - FB2C2 e *Colletotrichum*- C2) e dos extratos das cepas cultivadas isoladamente

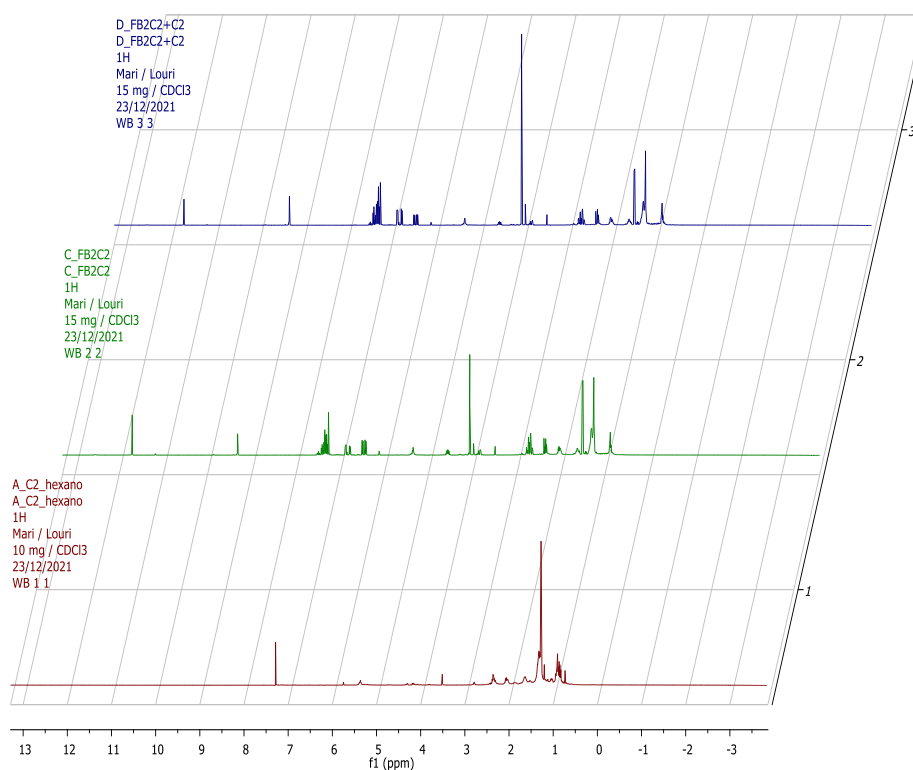


FIGURA 56: Análise comparativa do perfil metabólico via espectros de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do extrato hexânico do co-cultivo (*D. eschscholtzii* - FB2C2 e *L. pontae* L18.) e dos extratos das cepas cultivadas isoladamente.

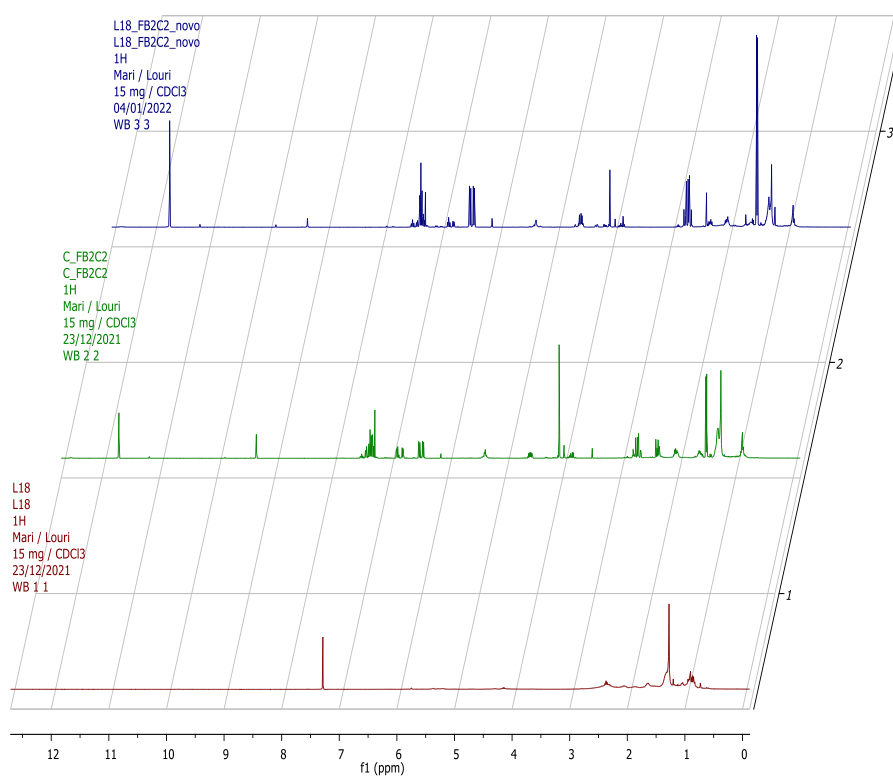


FIGURA 57: Análise comparativa do perfil metabólico via espectros de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) do extrato metanólico do co-cultivo (*D. eschscholtzii* - FB2C2 e *Colletotrichum* -C2) e dos extratos das cepas cultivadas isoladamente.

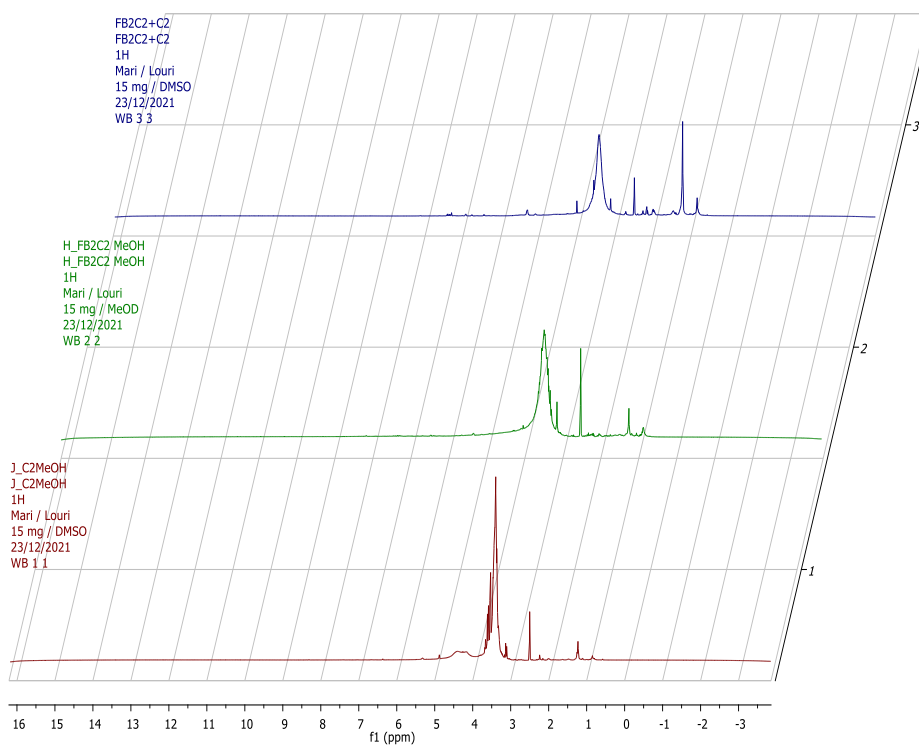
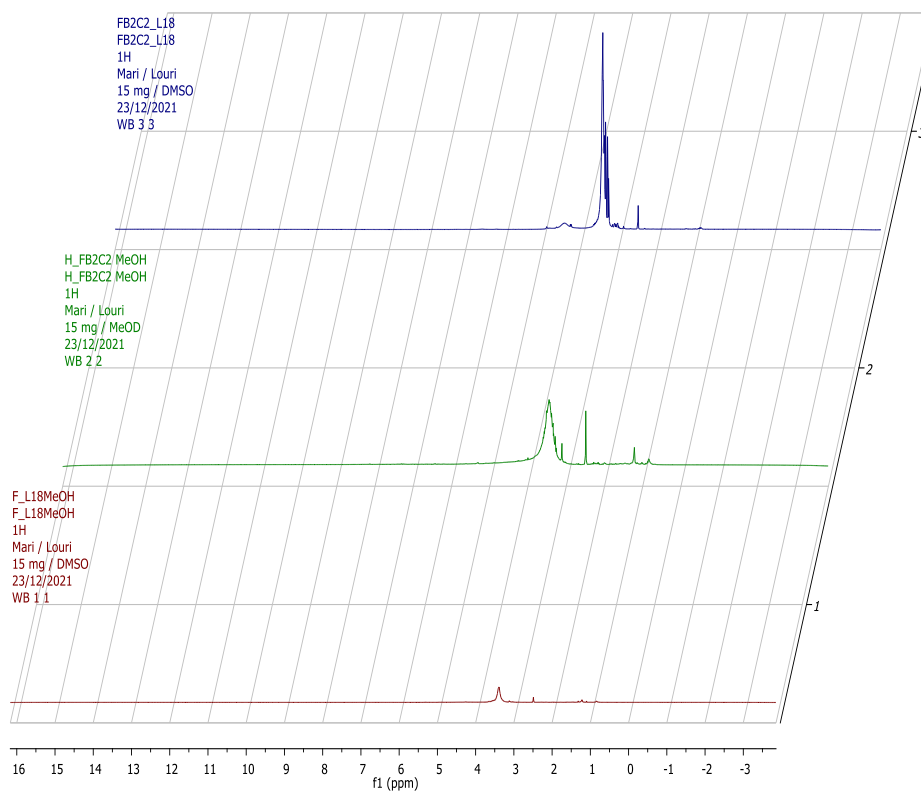


FIGURA 58: Análise comparativa do perfil metabólico via espectros de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) do extrato metanólico do co-cultivo (*D. eschscholtzii* - FB2C2 e *L. pontae* L18.) e dos extratos das cepas cultivadas isoladamente.



6 CONCLUSÃO

Os estudos de prospecção de fungos endofíticos de *A. speciosa* levaram ao isolamento de 12 cepas endofíticas, sendo 4 isoladas a partir da casca do coco, 5 a partir das fibras, 1 da amêndoa e 2 cepas a partir das folhas do babaçueiro. Amostras das cepas foram submetidas ao protocolo de extração de DNA clorofórmio: álcool isoamílico, amplificação e sequenciamento para identificação molecular. Das 12 cepas isoladas, 6 foram identificadas como *C. luneta* (AMP), *D. eschscholtzii* (FB2M), *C. aérea* (FB1V), *X. feejeensis* (F1), *F. solani* (FB3V) e *H. anthochroum* (CA1M).

As cepas endofíticas foram ainda avaliadas quanto ao seu potencial biotecnológico visando à inibição do desenvolvimento dos fitopatógenos *Colletotrichum* (C2) e *L. pontae* (L18) por meio de testes de antagonismo. A partir da avaliação dos testes de antagonismo foi possível destacar uma atividade inibitória promissora associada ao endofítico *D. eschscholtzii* frente à ambos os fitopatógenos, *L. pontae* (65,75%) e *Colletotricum* sp (62,37%). A análise dos espectros de RMN ¹H dos extratos hexânicos e metanólicos obtidos a partir do co-cultivo de endofítico versus fitopatógeno não permitiu inferir sobre mudanças no perfil metabólico de ambos os microrganismos quando pareados, sugerindo haver uma inibição por meio de uma barreira física ou ainda por meio da ação do metabolismo primário. Além do efeito inibitório, em alguns casos, fitopatógenos e endofíticos apresentaram um desenvolvimento micelial superior ao controle o que leva a hipótese da produção de substâncias promotoras de crescimento.

O conjunto de resultados preliminares obtidos permite afirmar que os isolados fúngicos do babaçu têm potencial para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos. Além disso, soma-se à relevância desses resultados o fato de que até o momento não foram encontrados na literatura registros do perfil de fungos endofíticos associados ao babaçu.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas. Universidade Estadual de Maringá- UEM, **Revista UNINGÁ Review**, v.21, n.1, p.55-59, jan./mar. 2015.
- AGÁPTO, J. P.; DELFORNO, T. P.; FERRAZ, J. M. G.; DUARTE, I. C. S. Fungos Fitopatogênicos de Solo em Sistemas Agroflorestais: revisão de literatura. **Diversitas Journal**, Santana do Ipanema/AL. v.6, n.3, p.3052-3079, jul./set. 2021. Disponível em: https://periodicos.ifal.edu.br/diversitas_journal/. Acesso em: 25 maio. 2021.
- AMORIM, A. O.; ORLANDELLI, R. C.; PAMPHILE, J. A. Control of cocoa Plant (*Theobroma cacao* L.) Pathogens by fungal endophytes from genera *Trichoderma* and *Clonostachys*. **UNINGÁ Review**, Maringá, v.34, n.1, p.1-10, jan./mar. 2019.
- ARARUNA, F. B.; ARARUNA, F. O. S.; PEREIRA, L. P. L. A.; BRITO, M.C.A.; QUELEMES, P. V.; ARAÚJO-NOBRE, A. R.; DE OLIVEIRA, T. M.; DA SILVA, D. A.; LEITE J. R. S. A.; COUTINHO, D. F.; BORGES, M. O. R.; BORGES, A. C. R. Green syntheses of silver nanoparticles using babassu mesocarpstarch (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng.) and their antimicrobial applications. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**. v.13, n.100281, 2020.
- ARAÚJO, F. R.; GONZÁLES-PÉREZ, S. E.; LOPES, M. A.; VIÉGAS, J. M. Ethnobotany of babaçu palm (*Attalea speciosa* Mart.) in Tucuruí Lake Protected Areas Mosaic – eastern Amazon. **Acta Botânica Brasilica**, Pará, v.30, n.2, p.193-204, abr./jun. 2016.
- ARNOLD, A. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v.21, p.51- 66, 2007.
- AZEVEDO, J. L.; JÚNIOR, W.M.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Eletronic Journal of Biotechnology**, v.1, p.40-65, 1998.
- AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from Brazilian tropical hosts and their biotechnological applications. In: *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. Springer, New Delhi, p.17-22, 2014.
- BARROQUEIRO, Elisabeth S. B.; BARROQUEIRO, Fernanda S. B., PINHEIRO Mayara T.; MACIEL, Márcia C. G.; BARCELLOS, Priscila S.; SILVA, Lucilene A.; LOPES, Adelson S.; NASCIMENTO, Flávia R. F.; GUERRA, Rosane N. M. Evaluation of acute toxicity of babaçu mesocarp in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.21, n.4, p.710-714, 2011.
- BRAHMACHARI, G. Xyolide. **Total Synthesis of Bioactive Natural Products**. Cap. 06, p.317-323, 2019.
- BELO, M. S. S. P. PIGNATI, W.; DORES, E. F. G. DE C.; MOREIRA, J. C.; PERES, F. Uso de agrotóxicos na produção de soja do estado do Mato Grosso: um

estudo preliminar de riscos ocupacionais e ambientais. **Rev. Bras. Saúde Ocup.** v.3 (125), p.78-88, 2012.

BEZERRA, G. de A. MUSSI, V. D.; DOS SANTOS, P. H. D.; CARVALHO, B. M.; POLTRONIERE, T. P. DE S.; SILVEIRA, S. F. Fungos endofíticos associados a bromélias de restingas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro – Brasil. **Research, Society and Development**, v.9, n.7, mai. 2020.

BOMFIM, A.G.J.; ALBUQUERQUE, G.M.R.; BEZERRA, J.D.P.; SILVA, D.C.V.; SVEDESE, V.M.; Paiva, L.M.; SOUZA-MOTTA, C.M. Fungos fitopatogênicos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Cultivada em área de floresta tropical seca no Brasil. **Bol. Soc. Latin. Carib. Cact. Suc.** v.10, n.2, p. 27-33, maio. /agosto. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Rotulagem nutricional obrigatória: manual de orientação aos consumidores: educação para o consumo saudável. Brasília, DF, 2011.

CALIGIORNE, R. B.; RESENDE, M. A.; OLIVEIRA, R. C. B. W.; CORDEIRO, R.A.; AZEVEDO, V. Fungos dematiáceos. **Rev Biotec Ciên e Desenvolvimento.** v.11. p.22-25, 2010

CAMARGO R. B.; PEIXOTO A. R. D.; TERA O. O.; CAVALCANTI L. S. Fungos causadores de podridões pós-colheita em uvas apirênicas no pólo agrícola de Juazeiro-BA e Petrolina-PE. **Rev. Caatinga.** Mossoró, v.24, n.1, p.15-19, jan./mar. 2011.

CAMPOS, J. L. A.; SILVA, T. L. L.; ALBUQUERQUE, U. P.; PERONI, N.; ARAÚJO E. L.; Knowledge, Use, and Management of the Babassu Palm (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng) in the Araripe Region (Northeastern Brazil). **Economic Botany.** v.69(3), p.240–250, 2015.

CARRAZZA, L. R.; SILVA, M. L. da.; ÁVILA, J. C. C. Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral do Fruto do Babaçu. Brasília, DF. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN). Brasil, 2012.

CARVALHO, J. D'A. V. Cultivo de Babaçu e Extração do Óleo. Dossiê Técnico. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília – CDT/UnB, Brasília, DF, 2007.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S. Antracnose do sorgo (*Colletotrichum graminicola*). Sete Lagoas: EMBRAPA_CNPMS. Circular técnica, v.28. 1998.

CASTELLANI, A. Viability of mold culture off ungi in destiled water. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** v.42, p.225, 1939.

CAVALLARI, M. M.; TOLEDO, M. M. What is the name of the babassu? A note on the confusing use of scientific names for this important palm tree. **Rodriguésia.** v.67(2), p.533-538, 2016.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Rev. Virtual Quim.**, v.5, n.3, p.421-437, 2013.

CLAY, K. Fungal endophytes of grasses a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, v.69: n.1, p.10-16, 1988.

CORREIA, K. C.; MICHEREFF, S. J. Desafios do manejo de doenças radiculares causadas por fungos. 1 ed. Recife: EDUFRPE, v.1, p.1-16, 2018.

COUTINHO, I. B. L. *et al.* Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**. v.66, p.90–104, 2017.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de novos fármacos. In: Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Ed. Itajaí, Universidade do Vale de Itajaí, p. 66-68, 2007.

CRUZ, Kelly da S. **Xylariaceae (Ascomycota) no Parque Estadual de São Camilo, Palotina, PR**. Dissertação de mestrado – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

DESER – Departamento de Estudos Socioeconômicos Rurais. A Cadeia Produtiva Do Babaçu – Estudo Exploratório. Curitiba, 2007.

FARHAT, H. *et al.* Evaluation of antimicrobial potential of endophytic fungi associated with healthy plants and characterization of compounds produced by endophytic *Cephalosporium* and *Fusarium solani*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.18, n.1, 2019.

GÖRGEN, C. A.; NETO, A. N. da S.; CARNEIRO, L. C.; RAGAGNIN V.; JUNIOR, M. L. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.44, n.12, p.1583-1590, dez. 20.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.69, p.509-526, 2006

HOMA, M. GALGÓCZY L.; MANIKANDAN P.; NARENDRAN V.; SINKA R.; CSERNETICS Á, VÁGVÖLGYI, C.; KREDICS, L.; PAPP, T. SouthSouth Indian Isolates of the *Fusarium solani* Species Complex From Clinical and Environmental Samples: Identification, Antifungal Susceptibilities, and Virulence. **Frontiers in Microbiology**. v.9, n.105, may. 2018.

JALGAONWALA, R. B.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. J. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **J Microbiol Biotechnol Res**; v. 1(2), p. 21-32. 2011.

JOHNSON, J. M.; ALEX, T.; OELMÜLLER, R. *Piriformospora indica*: the versatile and multifunctional root endophytic fungus for enhanced yield and tolerance to biotic and

abiotic stress in crop plants. **Journal of Tropical Agriculture**, v. 52, n. 2, p. 103- 122. 2014.

KYEKYEKU, J. O.; KUSARI, S.; ADOSRAKU, R. K.; BULLACH, A.; GOLZ, C.; STROHMANN, C.; SPITELLER, M. Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Fusarium solani* JK10. **Fitoterapia**. v.119, p. 108–114, 2017.

KORABECNA, M. The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**. p.783-787, 2007.

LI, Shou-Jie.; ZHANG, X.; WANG, Xiang-Hua.; ZHAO, Chang-Qi. Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.156, p.316-343, 2018.

LIN, S.; ZHANG, X.; SHEN, L.; MO, S.; LIU, J.; WANG, J.; ... & ZHANG, Y. A new abietane-type diterpenoid and a new long-chain alkenone from fungus *Daldinia* sp. TJ403-LS1. **Natural Product Research**. v.36(2), p.531-538, 2020.

LIN, S.; YAN, S.; LIU, Y.; ZHANG, X.; CAO, F.; HE, Y.; ... & ZHANG, Y. New secondary metabolites with immunosuppressive and BChE inhibitory activities from an endophytic fungus *Daldinia* sp. TJ403-LS1. **Bioorganic Chemistry**. v.114, n.105091, 2021.

LIN, Y.-Y. LIN, Y. Y.; ZHAO, S.; LIN, X.; ZHANG, T.; LI, C. X.; LUO, X. M.; & FENG, J. X. Improvement of cellulase and xylanase production in *Penicillium oxalicum* under solid-state fermentation by flippase recombination enzyme/ recognition target-mediated genetic engineering of transcription repressors. **Bioresource Technology**. v.337, 2021.

MAIA, V. R. O.; OLIVEIRA, J. A. DOS S.; GOLIAS, H. C.; PAMPHILE, J. A.; POLONIO, J. C. Endophytic fungi as promoters of resistance to water and salt stress: the case of *Piriformospora indica*. **Braz. Ap. Sci. Rev.**, Curitiba, v. 4, n. 2, p.621-633 mar./abr. 2020.

MEDRADO, P. H. S. Fungos de solo no controle biológico de fitopatógenos. Universidade Federal de Santa Catarina. 2019.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E.G.T.; PERUCH, L. A. M.; MENEZES, M. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.). *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais*. Recife: Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. p.1-18, 2005.

MIRANDA, L. R. L. S.; DE SOUZA, L. F. N.; DE SALES CARNEIRO, V.; DA SILVA, A. F.; ROBL, D.; & OLIVEIRA, E. C. A. M. Enzymatic potential of endophytic fungi in biofuels production. **Revista UNINGÁ Review**, v.36, 2021.

MORAIS, Janicéle F.; YOSHIMOTO, Mariana; RHODEN, Sandro; PAMPHILE, João A. Bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **Revista UNINGÁ**. v. 17, n. 1, p. 27-34, 2014.

NETO P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnol Ciênc Desenvol**, n.29, p. 62-76. 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. (2000) The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, 17: 215-234.

PAIXÃO, L. C.; BORBA, E. R. de C.; SOUSA, I. C.; FILHO, A. K. D. B.; COUTINHO, D. F.; JUNIOR, L. M. C.; ...& Borges, A. C. R Aplicações farmacêuticas e bioprodutos do babaçu (*Attalea speciosa* Mart.ex x Spreng): revisão. Pharmaceutical applications and bioproducts of babassu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng): **review. Ciênc. Saúde**, São Luís, v.21, n.2, 2019.

PAMPHILE, J. A.; COSTA, A. T.; ROSSETO, P.; POLONIO, J. C.; PEREIRA, J. O.; & AZEVEDO, J. L. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. **REVISTA UNINGÁ**, v.53, n.1, 2018.

PEREIRA, J. O. Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*. São Paulo, Brasil. 105p. (Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba). 1993.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews, J.; Hirano, S.S. (eds). *Microbia ecology of leaves*. Spring Verlang, New York, USA. p.179-197, 1991.

PIRES, L. K. S.; GRISOTTO, M. G.; GRISOTTO, R. F. O uso de plantas da Amazônia na produção de bioprodutos para tratamentos de pele. **Revista de Investigação Biomédica**. v.9, 2017.

PORRO, R. A economia invisível do babaçu e sua importância para meios de vida em comunidades agroextrativistas no Maranhão. In: CUNHA, M. C. da; MAGALHÃES, S. B.; ADAMS, C. (org.). *Povos tradicionais e biodiversidade no Brasil: contribuições dos povos indígenas, quilombolas e comunidades tradicionais para a biodiversidade, políticas e ameaças*. São Paulo: SBPC, p. 151-156, 2021.

REBBAPRAGADA, D.; KALYANARAMAN, R. Evaluation and Optimization of Antioxidant Potentiality of *Xylaria Feejeensis* Hmjau22039. **Asian J Pharm Clin Res**. v. 9, p. 269-273, 2016.

RIBEIRO, A. da S.; POLONIO, J. C.; COSTA, A. T.; DOS SANTOS, C. M.; RHODEN, S. A.; AZEVEDO, J. L.; & PAMPHILE, J. A. Bioprospection of culturable endophytic fungi associated with the ornamental plant *Pachystachys lutea*. **Current Microbiology**, v.75, n.5, p.588-596, 2018.

RUBALCAVA, M. L. M; GARCÍA-MÉNDEZ, M. C.; KING-DÍAZ, B.; & MACÍAS-RUVALCABA, N. A. Effect of phytotoxic secondary metabolites and semisynthetic compounds from endophytic fungus *Xylaria feejeensis* strain SM3e-1b on spinach

chloroplast photosynthesis. **Journal of Photochemistry & Photobiology**. v.166, p. 35-43, 2017.

SANTOS, F. D. R. P.; BELFORT, M.G. S.; LUCENA, V. B.; VIANA, M. B.; DE CASTRO, A. A. Uso do óleo de coco babaçu (*Attalea speciosa*) como emoliente em formulação fitocosmética com ação hidratante. **Revista Cereus**., vol. 12. n. 4. 2020.

SANTOS, L. S.; RHODEN, S. A.; BARROS, I. T.; TONINI, R. C. G.; MARQUES, R. M.; SOUZA, V. H. E.; PAMPHILE, J. A. A interação harmônica entre fungos e plantas: aspectos da relação endófito/hospedeiro. **Rev. Saúde e Biologia**., v.8, n.1, p.92-101, 2013.

SARAIVA A. F. da S.; OLIVEIRA N. M. DE.; FILHO, M. X. P.; LOPES, W. S. Cadeia produtiva do babaçu em Cidelândia-MA: uma análise a partir da abordagem de cadeia global de valor. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional G&DR**. Taubaté, SP, v.15, n.2, Ed. Esp., p.13-23, mar. 2019.

SILVA, E. O. Otimização das condições de cultivo e investigação das atividades citotóxicas e antimicrobiana de metabólitos secundários do fungo endofítico *Drechslera ravenelii*. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2010.

SILVA, P. H. F. Bioprospecção de fungos endofíticos contra células de melanoma e patógenos humanos. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2017.

SOBREIRA, A. C. M.; PINTO, F. das C. L.; FLORENCIO, K. G. D.; WILKE, D. V.; STAATS, C. C.; STREIT, R. de A. S.; FREIRE, F. das C. O.; PESSOA, O. D. L.; TRINDADE-SILVA, A. E.; CANUTO, K. M. Endophytic fungus *Pseudofusicoccum stromaticum* produces cyclopeptides and plant-related bioactive rotenoids. **RSC Adv.**, v.8, p.35575–35586, 2018.

SOUZA M. H. S. L., MONTEIRO C. A., FIGUEREDO P. M. S., NASCIMENTO F. R. F., GUERRA R. N. M. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil. **J Ethnopharmacol** v.133, p.1-5, 2011.

STADLER, M.; LÆSSØE, T.; FOURNIER, J.; DECOCK, C.; SCHMIESCHEK, B.; TICHY, H. V.; & PERŠOH, D. A polyphasic taxonomy of *Daldinia* (Xylariaceae). **Studies in Mycology**. v.77, p.1-143, 2014.

STAUFENBERG, Gerrit.; GRAUPNER, Nina.; MÜSSIG, Jörg. Impact and hardness optimisation of composite materials inspired by the babassu nut (*Orbignya speciosa*). **Bioinspiration & Biomimetics**, v. 10(5), 2015.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and molecular biology reviews*, vol.67; p.491–502., Dec. 2003

STROBEL, G., DAISY, B., CASTILLO, U., HARPER, J. Natural Products From Endohytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v.67, p.257-268, 2004.

TALAAT, N. B. Effective microorganisms: an innovative tool for inducing common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) salt-tolerance by regulating photosynthetic rate and endogenous phytohormones production. **Scientia Horticulturae**, v.250, p.254-265, 2019.

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

TAYUNG, K.; BARIK, B. P.; JHA, D. K.; DEKA, D. C. Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Fusarium solani* isolated from bark of Himalayan yew. **Mycosphere**. v. 2, n. 3, p. 203-213, 2011.

TOMAZONI, EZ., GIANI, SG., RIBEIRO, RTS., PAULETTI, G., SCHWAMBACH, J. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Ness sobre fungos fitopatogênicos do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Resumos do VIII Congresso Brasileiro de Agroecologia – Porto Alegre/RS, 2013.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p.115–180, 2012.

WONG, L. C.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. Sobrevivência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Raça 2 submetido a técnica da solarização associada à incorporação de folhas de mandioca. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.2, p.129-133, 2011.

YANG, Lu-Jia. *et al.* One new cytochalasin metabolite isolated from a mangrove-derived fungus *Daldinia eschscholtzii* HJ001. **Natural Product Research**. v.32, n.2, p.208-213, 2018.

YING, G. G. Ecological risk assessment of pesticides used in agriculture. In B. Maestroni & A. Cannavan (Eds.), *Integrated analytical approaches for pesticide management*. Cambridge, UK: Academic Press, p.67-79, 2018.

ZHANG, K.; LI, Z.; JAISWAL, M.; BAYAT, V.; XIONG, B.; SANDOVAL, H.; ... & BELLEN, H. J. The C8ORF38 homologue Sicily is a cytosolic chaperone for a mitochondrial complex I subunit. **J. Cell Biol.** v.200(6), p.807-820, 2013.

ZHEN-ZHEN, Z. H. O. U.; HONG-JIE, Z. H. U.; CHENG-LONG, Y. A. N. G.; YAN-JUN, L. I. U.; JIANG, N.; YONG-SHENG, X. I. A. O.; ... & REN-XIANG, T. A. N. Dalestones A and B, two anti-inflammatory cyclopentenones from *Daldinia eschscholtzii* with an edited strong promoter for the global regulator LaeA-like gene. **Chin J Nat Med**. n.17, v.5, p.387–393, 2019.

ZYLBERSZTAJN, D. Reorganização do agronegócio do babaçu no estado do Maranhão. São Paulo: PENSA/FIA/USP, 2000.