

TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Thais Fernanda Misturini 
Universidade Estadual de Maringá
misturini12@gmail.com

Joao Arthur S. Oliveira 
Universidade Estadual de Maringá
joaoarthur_oliveira@hotmail.com

Resumo

Os microrganismos endofíticos colonizam o interior dos tecidos das plantas sem causar danos ao seu hospedeiro. A interação endófito-planta pode originar vias de síntese de metabólitos de interesse biotecnológico, contudo, para sua utilização é necessário que esses compostos sejam identificados quimicamente. Dentre as técnicas instrumentais mais utilizadas estão a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia a gás capilar (CG), cromatografia a gás capilar acoplada a espectrometria de massas (CG/MS), cromatografia de fluido supercrítico (CFS) e eletroforese capilar (EC). Desta forma, realizamos uma revisão da literatura abordando estas técnicas de identificação de metabólitos secundários de interesse biotecnológico produzidos por microrganismos endofíticos. A pesquisa revelou que estas técnicas instrumentais permitiram a identificação de coclioquinonas, isocloquinonas, dicetopiperazinas, ácido tartárico, ácido cítrico, butirilneosolaniol e outros compostos, produzidos por endófitos. Estas técnicas instrumentais para identificação e quantificação de metabólitos são amplamente utilizadas e aperfeiçoadas. É possível destacar que para cada característica de amostra e sua finalidade, alguns dos métodos se tornam mais eficientes e precisos. Esses métodos para análise de metabólitos devem continuar evoluindo a fim de descobrir novas moléculas e também gerar uma maior robustez para a identificação e quantificação destes compostos de origem microbiana, contribuindo para o avanço dos produtos naturais.

Palavras-chave: Endófitos; interesse biotecnológico; compostos microbianos; produtos naturais.

TECHNIQUES FOR CHEMICAL IDENTIFICATION OF METABOLITES PRODUCED BY ENDOPHYTIC MICROORGANISMS**Abstract**

Endophytic microorganisms colonize the interior of plant tissues without causing any harm to their host. The endophyte-plant interaction may originate pathways for the synthesis of metabolites of biotechnological interest, however, for their use it is necessary that these compounds to be chemically identified. Among the most used instrumental techniques are the High-Performance liquid chromatography (HPLC), Thin Layer Chromatography (TLC), Capillary Gas Chromatography (CG), Capillary Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (CG/MS), Supercritical Fluid (CSF), and Capillary Electrophoresis (CE). We carried out a literature review addressing these techniques for identifying secondary metabolites of biotechnological interest produced by endophytic microorganisms. Our research revealed that these instrumental techniques allowed the identification of coclioquinones, isocloquinones, diketopiperazines, tartaric acid, citric acid, butyrylneosalaniol, and other compounds produced by endophytes. These instrumental techniques for identification and quantification of metabolites are widely used and improved. It is possible to highlight that for each sample characteristic and its purpose, some of the methods become more efficient and accurate. These methods for analyzing metabolites must continue to evolve to discover new molecules and also generate greater robustness for the identification and quantification of these compounds of microbial origin, contributing to the advancement of natural products.

Keywords: Endophytes; biotechnological interest; microbial compounds; natural products.

1. INTRODUÇÃO

Por definição, os microrganismos endofíticos, são fungos e bactérias que passam pelo menos uma parte de seu ciclo de vida colonizando inter ou intracelularmente os tecidos de plantas, não causando sintomas de doença ao seu hospedeiro (ZHAO et al. 2011; BERTANI et al. 2016; CHAUHAN et al. 2019). Estes microrganismos têm ganhado destaque por suas aplicações biotecnológicas (ZHAO et al. 2011), especialmente na agricultura (OLIVEIRA et al. 2020; EMMER et al. 2021; OLIVEIRA et al. 2021; RIBEIRO et al. 2021), medicina e indústria com a produção de metabólitos bioativos (STROBEL, 2018; GOLIAS et al. 2019; POLLI et al. 2020; SILVA et al. 2020; SILVA et al. 2021) e/ou enzimas (DA SILVA RIBEIRO et al. 2018; FELBER et al. 2019; SANTOS et al. 2019), além de atuarem como biorremediadores de locais contaminados com substâncias recalcitrantes e xenobióticas (BULLA et al. 2017).

A interação endófito-planta pode originar vias de síntese de metabólitos de interesse biotecnológico (CALDERANI; ORLANDELLI; PAMPHILE, 2016) como o Taxol, um dos mais conhecidos diterpenoides que apresenta atividade antitumoral (LI; ZHENG; LI, 2022), isolada inicialmente da planta *Taxus brevifolia* (Pinales: Taxaceae), e também relatada produzida pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (RIBEIRO, 2015).

Estes metabólitos são produzidos pelos endófitos na parte extracelular da planta, em especial os fungos endofíticos filamentosos são capazes de produzir uma diversidade de classes químicas de metabólitos secundários (SPECIAN et al. 2014) que podem apresentar diferentes propriedades biológicas (RIBEIRO, 2015). A elucidação química desses compostos, pode ser

realizada por meio de técnicas de separação e caracterização como cromatografias, eletroforese capilar, espectrometria de massas, entre outras (PRATA; MOGOLLÓN; AUGUSTO, 2016). Uma das grandes vantagens de se estudar os metabólitos produzidos por microrganismos, notadamente os endofíticos, está relacionado com as formas de manutenção e produção em larga escala, podendo-se obter essas moléculas de interesse em um curto espaço de tempo e com um número baixo de células microbianas.

Para a obtenção dos metabólitos, de modo geral, os microrganismos são cultivados em meios de cultura apropriados para seu crescimento, como BD (Bata Dextrose) para fungos e TSB (Triptona de soja) para bactérias, e incubados para seu crescimento. O crescimento pode ocorrer em fase estacionária, ou seja, sem agitação, ou sob agitação em Shaker, incubados em temperatura variável entre 25 à 37 °C durante 24 ou 48h para bactérias e 7 a 21 dias para fungos.

Após a obtenção do caldo fermentado, realiza-se a separação das células microbianas do caldo fermentado por centrifugação e/ou filtração e, do caldo fermentado resultante ocorre a extração dos metabólitos secundários empregando solventes orgânico adequados. O principal solvente empregado neste processo de extração é o Acetato de Etila (POLONIO et al. 2016; SANTOS et al. 2017; GOLIAS et al. 2019; POLLI et al. 2020; BALBINOT et al. 2021; OLIVEIRA et al. 2020; SILVA et al. 2021). O solvente resultante da extração contendo os metabólitos secundários passa pelo processo de evaporação para a concentração dos metabólitos. Por fim, o concentrado metabólito pode ser eluído em metanol, ou outro solvente, e avaliado quanto suas atividades biológicas e caracterização química. A Figura 1, apresenta um resumo esquemático das etapas descritas anteriormente.

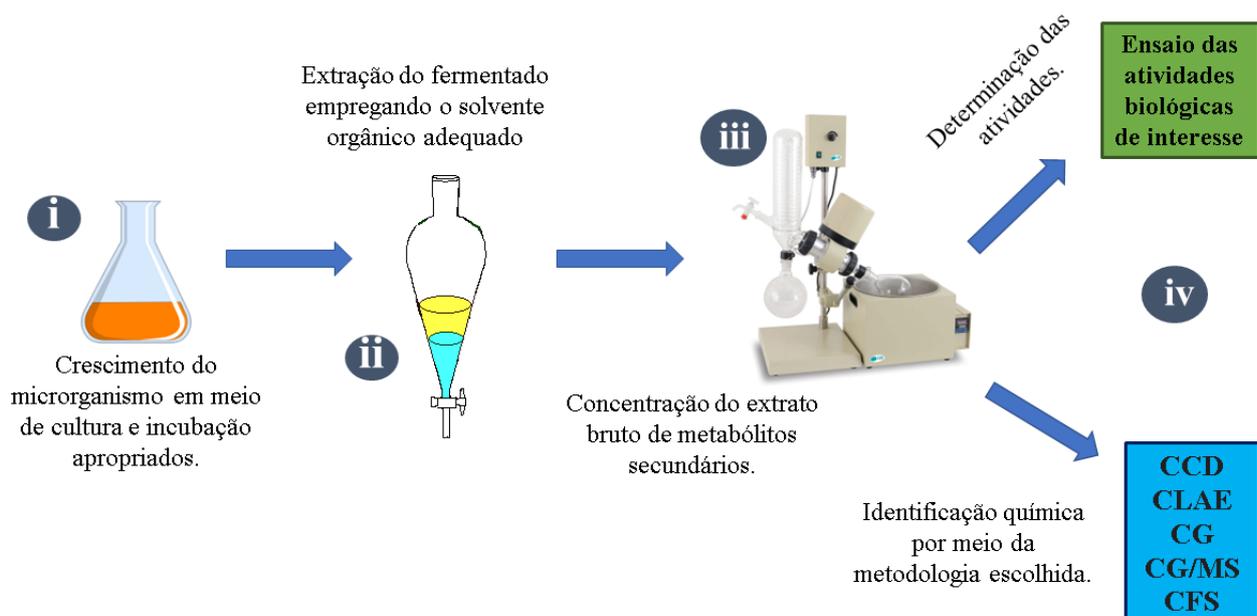


Figura 1: Etapas para a obtenção e estudos de metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos.
Fonte: Autores, 2022.

Considerando o potencial dos microrganismos endofíticos como fontes promissoras de metabólitos secundários bioativos, neste trabalho, realizamos uma revisão da literatura abordando algumas técnicas para identificação química de metabólitos secundários de interesse biotecnológico produzidos por fungos ou bactérias endofíticas. Este trabalho torna-se de relevância uma vez que os microrganismos endofíticos são capazes de produzir uma imensa diversidade de compostos químicos de diferentes classes (MENG et al. 2012; YANG et al. 2013; YE et al. 2014; CHAGAS et al. 2016) com variadas atividades biológicas (DZOYEM et al. 2017; LI et al. 2018; RAJIVGANDHI et al. 2018), no entanto, na maioria dos casos, a elucidação e discriminação dessas moléculas de origem microbiana têm sido um ponto fraco nos estudos de produtos naturais (MACIÁ-VICENTE et al. 2018; POLONIO et al. 2022). Assim, esperamos que este trabalho possa contribuir para um melhor entendimento e aplicação de algumas técnicas para identificação de moléculas microbianas de interesse biotecnológico, notadamente aquelas produzidas por microrganismos endofíticos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada por meio de busca *online* utilizando as plataformas Google Acadêmico, SciELO e Portal da CAPES. O levantamento bibliográfico considerou artigos científicos em português e/ou inglês, além de dissertações e teses, priorizando os anos entre 2015 à 2021. Alguns trabalhos anteriores a este período que abordavam a temática escolhida também foram inseridos.

Foram empregados os descritores em português e inglês: microrganismos endofíticos (*endophytic microorganisms*) OR fungos endofíticos (*endophytic fungi*) OR bactérias endofíticas (*endophytic bacteria*) AND metabólitos secundários (*secondary metabolites*), metabólitos secundários (*secondary metabolites*) AND endófito (*endophyte*) AND caracterização química (*chemical characterization*), metabólitos de endófitos (*metabolites from endophytes*) AND aplicações biotecnológicas (*biotechnological applications*).

Após a leitura do título, resumo e metodologia, trabalhos que abordavam o isolamento e/ou identificação química (CCD, CLAE, CG, CG/MS ou CFS) de compostos bioativos (antimicrobianos, antioxidantes, leishmanicida ou outros) produzidos por bactérias e/ou fungos endofíticos foram selecionados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até 2016, mais de 200 mil metabólitos secundários foram identificados a partir de organismos vivos, principalmente produzidos por plantas e microrganismos (PRATA; MOGOLLÓN; AUGUSTO, 2016). Acredita-se que esse número tenha aumentado considerando o avanço das técnicas instrumentais utilizadas para sua identificação.

Dentre as principais técnicas para a identificação de metabólitos, podemos destacar a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em camada delgada (CCD),⁵⁵ cromatografia a gás capilar (CG), cromatografia a gás capilar acoplada a espectrometria de massas (CG/MS), cromatografia de fluido supercrítico (CFS) e eletroforese capilar (EC), das quais têm sido amplamente utilizadas e apresentando resultados satisfatórios (PRATA; MOGOLLÓN; AUGUSTO, 2016). A seguir, além de apresentarmos o funcionamento destas técnicas, elencamos alguns metabólitos produzidos por microrganismos endofíticos. A figura 2, ilustra alguns destes metabólitos caracterizados empregando estas técnicas químicas.

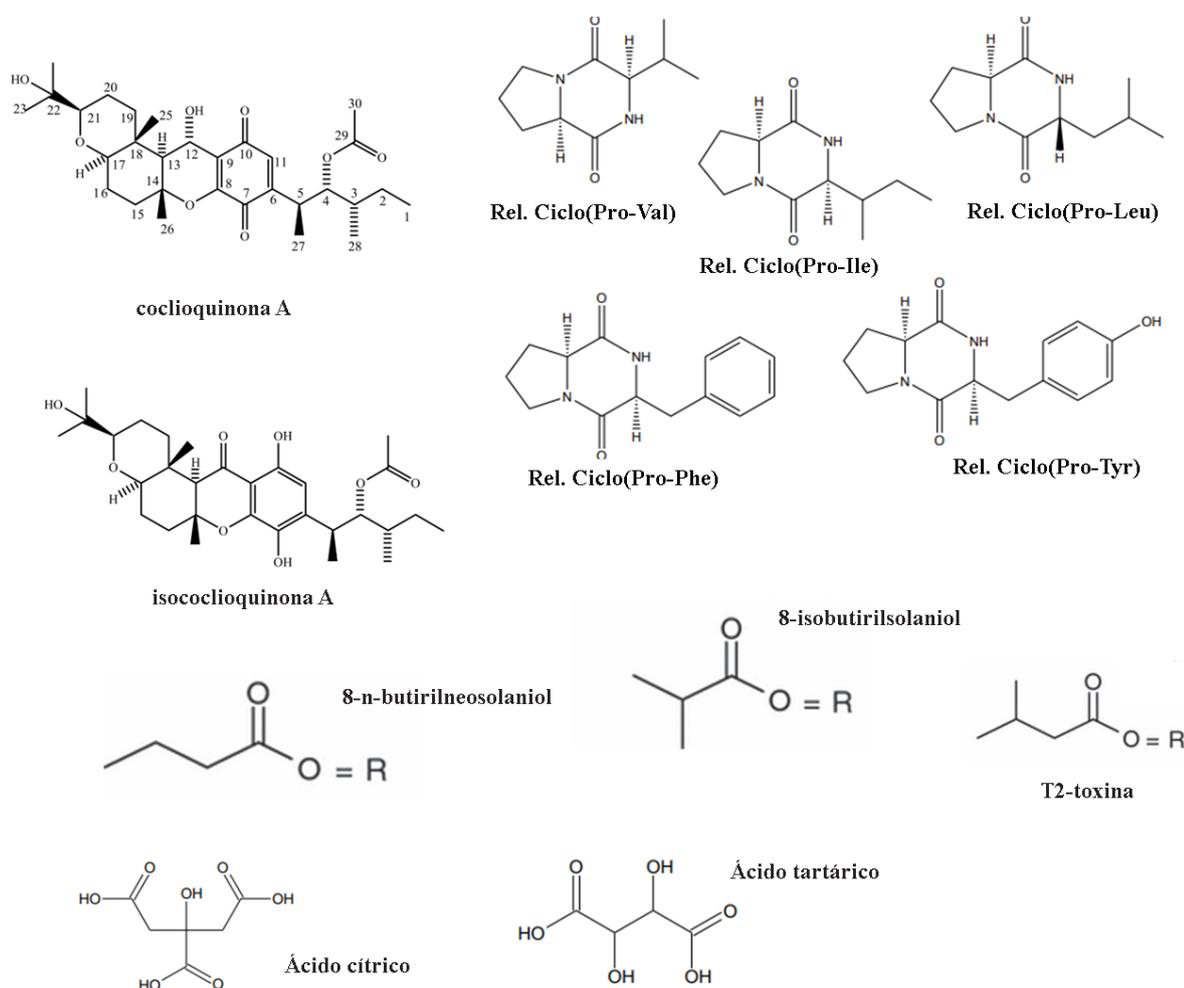


Figura 2: Metabólitos secundários isolados e identificados produzidos por microrganismos endofíticos. Fonte: coclioquinona A e isococlioquinona A (CAMPOS et al. 2008); Dicotopiperazinas *Rel. Ciclo* (SOMENSI, 2012); Ácidos cítrico e tartárico (ARAUJO, 2010); T2-toxina, 8-n-butirilneosolaniol e 8-isobutirilsolaniol (CAMPOS et al. 2010).

Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Essa técnica emprega análises de substâncias complexas comparadas com valores de fator de retenção já conhecidos/estabelecidos. A CCD possui facilidade no seu preparo, baixo custo e não requer a utilização de equipamentos sofisticados (FUMAGALI, 2008). Esta técnica permite ensaios qualitativos por métodos *in situ* e indiretos. Os métodos *in situ* são aqueles que detectam as substâncias por densitometria, já nos métodos indiretos, as manchas obtidas são extraídas passando por um método de detecção, como os métodos eletroquímicos, por exemplo (GONÇALVES, 2010)

Campos (2017) realizou a caracterização química empregando a CCD de metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Preussia minima* (Pleosporales: Sporormiaceae) isolado como endófito da planta *Vellozia nanuzae* (Liliales: Velloziaceae). Para a caracterização dos metabólitos, os autores empregaram os reagentes de revelação Dragendorff, Liebermann-Burchard, difenilboriloxetilamina (1 % em metanol) e polietilenoglicol (4000 a 5% em etanol), seguido de exposição a luz ultravioleta. Utilizando esta técnica, Campos (2017), detectou a presença de compostos nitrogenados, alcaloides, esteroides e flavonoides no extrato metabólito obtido de *P. minima* extraído com o solvente orgânico acetato de etila. O autor sugere que estas classes de metabólitos podem estar associadas a capacidade deste endófito no processo de germinação e crescimento de seu hospedeiro (*V. nanuzae*).

Santos et al. (2017) também utilizaram a técnica de CCD para caracterizar metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos. Estes autores caracterizaram a presença de esteroides e triterpenóides no extrato metabólito em acetato de etila dos fungos endofíticos *Phyllosticta* sp. (Botryosphaerales: Botryosphaeriaceae) e *Cercospora beticola* (Capnodiales: Mycosphaerellaceae), o que torna esses metabólitos interessantes produtos para fins terapêuticos, notadamente atuando contra *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhi* e *Streptococcus pyogenes*.

Nascimento Junior et al. (2019), detectaram por meio de CCD 36 compostos oriundos de fungos isolados de *Lippia origanoides* (Lamiales: Verbenaceae). Desses compostos, 72% (26), apresentaram atividade antibacteriana contra a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*, 47% (17) com atividade antifúngica contra *Candida albicans* e 77% (28) apresentaram atividade antioxidante. Dentre as classes majoritárias de compostos detectadas por Nascimento Junior et al. (2019), compostos fenólicos, terpenos e esteroides destacaram-se. Com base nos achados desses autores, e nos citados anteriormente, podemos destacar a importância da técnica de CCD na elucidação de compostos ativos produzidos pelos microrganismos endofíticos.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/ HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência CLAE ou HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) é uma técnica muito utilizada para separação, identificação e quantificação de compostos presentes em uma mistura (SILVA, 2016). Além da facilidade de preparação do analito,

não sendo necessário a volatilização do mesmo, a CLAE possui uma coluna que proporciona uma melhor separação dos compostos em relação a cromatografia líquida clássica (SOUZA, 2013).

A CLAE tem alto poder de resolução, tempo de corrida relativamente rápido, grande variedade de fase estacionária e resultados reprodutíveis, porém, é uma técnica que demanda maiores gastos devido à alta pureza dos reagentes utilizados e ao elevado custo de manutenção do equipamento, além de gerar resíduos que precisam ser tratados posteriormente (SILVA, 2016). 57

Ao aplicar a cromatografia de alta eficiência na identificação de metabólitos, nota-se que sua eficiência de separação é menor em relação a técnica de cromatografia a gás capilar (CG). Em sistemas de HPLC é possível abranger uma grande variedade de metabólitos exigindo apenas que o analito seja solúvel na fase móvel possibilitando a análise de diversos compostos (PRATA; MOGOLLÓN; AUGUSTO, 2016).

Metabólitos de interesse biotecnológico já foram identificados empregando esta técnica. Campos et al. (2008), fracionaram os metabólitos produzidos pelo fungo endofítico *Cochliobolus* sp. (Pleosporales: Pleosporaceae) por meio da técnica CLAE. Estes autores isolaram a Coclioquinona A e Isococlioquinona A, que são substâncias ativas responsáveis por exercer um efeito leishmanicida. Já Campos et al. (2010), identificaram três micotoxinas (T2-toxina, uma mistura de 8-n-butirilneosolaniol e 8-isobutirilsolaniol) produzidas pelo fungo *Fusarium* sp. (Hypocreales: Nectriaceae) isolado como endófito de *Piptadenia adiantoides* (Fabales: Fabaceae). Os achados de Campos et al. (2010) são importantes pois podem contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos com moléculas bioativas para o tratamento de micoses humanas, como a paracoccidioidomicose (PCM) causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae).

Algumas substâncias apresentam alta importância farmacêutica, como o Taxol. O Taxol, ou paclitaxel, é uma molécula utilizada para o tratamento de alguns tipos de cânceres, uma vez que essa molécula é um potente agente que impede a divisão (multiplicação) e crescimento das células, inviabilizando assim a proliferação de células tumorais (LI; ZHENG; LI, 2022). Em 2018, Andrade et al. (2018), identificaram por CLAE propriedades químicas semelhantes ao paclitaxel, como o tempo de retenção ($2,62 \pm 0,02$ min) e massa molecular (852,32 g/mol), no extrato metabólico do fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides* (Phyllachorales: Glomerellaceae).

Além do Taxol, outros compostos de interesse terapêutico, como atividade antioxidante e imunossupressoras, também já foram identificadas por CLAE. Os fungos endofíticos *Fusarium* sp. e *Cladosporium* sp. (Capnodiales: Davidiellaceae) são capazes de produzir o ácido protocatéquico, ácido p-hidroxibenzoico, nakijimol, cloranfenicol, ortosporina, cloranfenicol, cítrido-hibridinol, nidulalina e o ácido asterrico, todos são potenciais moléculas de interesse biotecnológico para área da saúde (UJAM et al. 2021).

Cromatografia a Gás Capilar (CG)

A cromatografia gasosa é definida como um processo de separação onde a fase móvel é um gás, e a fase estacionária é um sólido ou um líquido. A CG pode ser classificada pela velocidade de análise como rápida “*Fast-CG*”, muito rápida “*very fast CG*” e ultrarrápida “*ultra fast-CG*”, e também pelo tipo de coluna empregada (cromatografia gasosa [CG] e cromatografia gasosa de alta resolução [CGAR]) (NASCIMENTO et al. 2018).

Devido a característica da análise, para realização da identificação por CG é preciso que os compostos sejam voláteis, de média e baixa polaridade e baixo peso molecular. Como emprega-se altas temperaturas, a amostra e seus componentes devem ser termoestáveis, desta forma, dependendo das características das amostras esse método nem sempre é viável (PEDROSA, 2018).

As colunas CG possuem um número de pratos teóricos maior que colunas usados em sistemas de CLAE, desta forma atuam na identificação de metabólitos secundários como uma maior resolução dos picos (PRATA; MOGOLLÓN; AUGUSTO, 2016). Outra característica importante é que a CG é uma das técnicas mais sensíveis, sendo capaz de detectar metabólitos de baixa massa molecular voláteis na ordem de 10–12g, enquanto a técnica CLAE detecta constituintes na ordem de 10–9g (PEDROSA, 2018).

Por estas características, Somensi (2012) utilizou a CG de alta resolução para identificar metabólitos do fungo endofítico *Phomopsis stipata* (Diaporthales: Diaporthaceae). Esta autora identificou algumas dicetopiperazinas (Pro-Val, Pro-Leu, Pro-Phe, Pro-Ile e Pro-Tyr) das quais podem apresentar diversas atividades biológicas, e uma mistura de acilglicerídeos. A separação e identificação da mistura de acilglicerídeos foi possível por meio da técnica de CGAR, culminando no fracionamento de monoacilglicerídeos.

Metabólitos antifúngicos empregando CG já foram identificados, como Butanal, 3-metil-, Propeno, 2-buteno, 2-heptanona, 6-metil-5-metileno- e 6-oxabicyclo produzidos por bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* sp. (Bacillales: Bacillaceae) (ERJAE et al. 2019). Por suas vantagens em relação em relação a algumas técnicas de identificação química e fracionamento, a CG têm sido cada vez mais utilizada.

Cromatografia a Gás Capilar Acoplada a Espectrometria de Massas (CG/MS)

Existe a possibilidade de combinar a cromatografia com diferentes sistemas de detecção. O mais utilizado é o acoplamento com o espectrômetro de massas, apresentando as vantagens da cromatografia a gás (alta seletividade, resolução e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção da informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (CHIARADIA; COLLIN5S; JARDIM, 2008).

Ao submeter as amostras a análise, os componentes presentes no analito são separados pela CG e após são introduzidos no espectrômetro de massas, por esse motivo a CG é considerada uma forma ideal de introdução de misturas. Sendo possível então o espectrômetro de massas medir razão massa/carga (m/z) de íons que são gerados pela amostra por meio da ionização das amostras (PEDROSA, 2018). A técnica de CG/MS apresenta um grande potencial, porém, alguns metabólitos secundários não são passíveis de serem analisados, como exemplo terpenos com mai 59 de 30 carbonos, vários polifenóis, alcaloides e aqueles que são instáveis termicamente a altas temperaturas, impedindo com que essas amostras sejam volatizadas (PRATA; MOGOLLÓN; AUGUSTO, 2016).

Diferentes classes químicas podem ser identificadas por CG/MS, como sesquiterpenos (oxigenados ou não), álcoois (isobutanol, isopentílico, 2-metilbutan-1-ol, feniletílico, entre outros) e cetonas, todos produzidos por microrganismos endofíticos (OLIVEIRA et al. 2015). Por exemplo, *C. coccodes* é capaz de produzir geranilgeraniol, farnesol e esqualeno, já *Phyllosticta capitalensis* (Botryosphaerales: Botryosphaeriaceae) produz 1-Octacosanol. Estes compostos produzidos por ambos endófitos apresentaram ação antimicrobiana e antioxidante (TALUKDAR et.al. 2020).

Cromatografia de Fluido Supercrítico (CFS)

A cromatografia de fluido supercrítico (CFS) é uma técnica de separação de compostos de uma mistura que utiliza como fase móvel um fluido que apresenta pressão e temperatura acima dos limites críticos, sendo intermediária da CG e da CLAE (SILVA, 2013).

Devido a essa característica de fluidos supercríticos, os cromatógrafos operam em condições de pressão muito elevadas, sendo necessário um maior cuidado sobre o sistema de bombeamento e pressurização da fase móvel. A temperatura também se torna um ponto crítico nessa técnica, pois pode ocorrer uma variação na densidade do fluido interferindo diretamente na volatilização dos analitos e na seletividade do método (SILVA, 2013).

A CFS tem se mostrado uma técnica muito vantajosa pois apresenta menor consumo de solvente orgânico, maior estabilidade dos analitos termicamente instáveis, pois existe a possibilidade de utilizar baixas temperaturas (utilização de CO₂), além de apresentar um tempo curto de análise devido à baixa viscosidade e a possibilidade do aumento das vazões da fase móvel (BRUHN, 2018).

Essa técnica é muito eficiente na separação de compostos apolares, polares e ionizáveis, podendo ser utilizadas colunas de CLAE que existe uma ampla variedade, permitindo também a separação de compostos quirais (SILVA, 2013).

Eletroforese Capilar (EC)

Podemos definir a Eletroforese Capilar como uma técnica de separação que ocorre por meio da migração diferencial de espécies iônicas ou ionizáveis em um campo elétrico (CIESLAROVÁ, 2016). A técnica de EC é caracterizada pela simplicidade instrumental e operacional. Sendo composta por um sistema de injeção, uma coluna capilar onde ocorre a separação, uma fonte de alta tensão, um par de eletrodos, um detector e um computador (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

A EC tem se tornado uma eficiente ferramenta de separação e identificação de uma ampla gama de moléculas. Apresenta alta resolução e eficiência, baixo custo operacional, pouca quantidade de solventes orgânicos, e volumes baixos de analitos quando comparado a CLAE, por exemplo (ASSUNÇÃO et al. 2008).

Araújo (2010) caracterizou o ácido oxálico, cítrico, tartárico produzidos pelo fungo endofítico *Aspergillus niger* (Eurotiales: Trichocomaceae) isolado da mangabeira (*Hancornia speciosa*; Gentianales: Apocynaceae). A EC foi escolhida pelo autor devido as substâncias serem polares, de baixo coeficiente de partição fazendo com que os processos de extração não sejam eficientes. Desta forma foi possível analisa-los através dos caldos fermentados e compara-los com padrões, realizando-se então a identificação dos compostos presentes nos fermentados.

4. CONCLUSÃO

Não é de hoje que a humanidade emprega substâncias, muitas vezes em forma de extratos e chás, como método terapêutico. Muitas dessas substâncias já tiveram o seu efeito cientificamente comprovado, como o Taxol (Paclitaxel) extraído de *Taxus brevifolia*, abrindo assim um enorme leque de possibilidade de exploração de mais moléculas bioativas oriundas de plantas e microrganismos. Empregar diferentes metodologias de isolamento e identificação química ainda permite a síntese laboratorial das moléculas efetivamente bioativas, dispensando assim o uso das células microbianas propriamente ditas.

No geral, nesta revisão destacamos alguns metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos com potencial biotecnológico. As técnicas instrumentais utilizadas para identificação e quantificação desses metabólitos secundários são amplamente utilizadas e vem sendo aprimoradas a cada dia sendo possível a utilização do acoplamento de diversas técnicas. Destacamos que para cada característica de amostra e sua finalidade alguns dos métodos se tornam mais eficientes e precisos.

Embora exista muita informação disponível nos bancos de dados químicos de produtos naturais, ainda há uma grande defasagem no que tange as informações para identificação química dessas substâncias, muitas vezes dificultando inferir com clareza a anotação das moléculas alvo. Esses métodos devem continuar evoluindo a fim de descobrir novas substâncias e também dar uma

maior robustez para a identificação destes metabólitos, que podem ser empregados nos mais diversos setores, notadamente na área da saúde, agrícola ou ambiental.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, H. F.; ARAÚJO, L. C. A.; DOS SANTOS, B. S.; PAIVA, P. M.; NAPOLEÃO, T. H. 61
DOS SANTOS CORREIA, M. T.; DE OLIVEIRA, M. B. M.; DE SOUZA LIMA, G. M.,
XIMENES, R. M.; DA SILVA, T. D.; DA DILVA, G. R.; DA SILVA, M. V. Screening of
endophytic fungi stored in a culture collection for taxol production. **Brazilian Journal of
Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 59-63, 2018.

ARAÚJO, N. C. **Estudo da variação do meio de cultura na produção de metabólitos secundários pelo fungo endofítico *Aspergillus niger***. 2010. Dissertação de Mestrado.

ASSUNÇÃO, N. A.; BECHARA, E. J. H.; SIMIONATO, A. V. C.; TAVARES, M. F. M.;
CARRILHO, E. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS): vinte anos de
desenvolvimento. **Química Nova**, v. 31, n. 8 p. 2124-2133, 2008.

BALBINOT, R. B.; OLIVEIRA, J. A. M.; BERNARDI, D. I.; POLLI, A. D.; POLONIO, J. C.;
CABRAL, M. R. P.; ZANQUETA, E. B.; ENDO, E. H.; MENEGUELLO, J. E.; CARDOSO, R. F.;
AZEVEDO, J. L.; DIAS FILHO, B. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; CARMO, M. R. B.;
SARRAGIOTTO, M. H.; PAMPHILE, J. A.; BALDOQUI, D. C. *Chromolaena laevigata*
(Asteraceae) as a source of endophytic non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus*: chemical profile in
different culture conditions and biological applications. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52,
n. 3, p. 1201-1214., 2021.

BERTANI, I.; ABBRUSCATO, P.; PIFFANELLI, P.; SUBRAMONI, S.; VENTURI, V. Rice
bacterial endophytes: isolation of a collection, identification of beneficial strains and microbiome
analysis. **Environmental Microbiology Reports**, v. 8, p. 388–398, 2016.

BRUHN, F. H. P. **Estudo da retenção de vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis empregando cromatografia com fluido supercrítico de ultra alta eficiência e desenvolvimento de métodos de acordo com os conceitos de *Analytical Quality by Design***. 2018. Dissertação de Mestrado.

BULLA, L. M. C.; POLONIO, J. C.; CASTRO, A. L. B. P.; KAVA, V.; AZEVEDO, J.L.;
PAMPHILE, J. A. Activity of the endophytic fungi *Phlebia* sp. and *Paecilomyces formosus* in
decolourisation and the reduction of reactive dyes' cytotoxicity in fish erythrocytes.
Environmental Monitoring and Assessment, v. 189, n. 2, p. 88, 2017.

CALDERANI, F. A.; ORLANDELLI, R. C.; PAMPHILE, J. A. Compostos bioativos com
propriedades antitumorais produzidos por fungos endofíticos. **Revista UNINGÁ Review**, v. 25, n.
2, p.79-86, 2016.

CAMPOS, F. F.; JOHANN, S.; COTA, B. B.; ALMEIDA ALVES, T. M.; ROSA, L. H.;
CALIGIORNE, R. B.; CISALPINO, P. S.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Antifungal activity of
trichothecenes from *Fusarium* sp. against clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*.
Mycoses, v.54, p.e122–e129, 2010.

CAMPOS, F. F.; ROSA, L. H.; COTA, B. B.; CALIGIORNE, R. B.; RABELLO, A. L. T.; ALVES, T. M. A.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Leishmanicidal Metabolites from *Cochliobolus* sp., um fungo endofítico isolado de *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.2, n.12, p. 1-11, 2008.

CAMPOS, M. F. **Isolamento, ensaios de germinabilidade de sementes e caracterização química preliminar de metabólitos secundários de *Preussia minima*, fungo endofítico de *Vellozia nanuzae*, planta endêmica da Serra do Cipó – MG**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso.

CHAGAS, F.O.; DIAS, L.G.; PUPO, M.T. New perylenequinone derivatives from the endophytic fungus *Alternaria tenuissima* SS77. **Tetrahedron Letters**, v. 57, p. 3185–3189, 2016. ⁶²

CHAUHAN, N. M.; GUTAMA, A. D.; AYSA, A. Endophytic fungal diversity isolated from different agro-ecosystem of Enset (*Ensete ventericosum*) in Gedeo zone, SNNPRS. Ethiopia. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 172, 2019.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CIESLAROVÁ, Z. **Investigação de homocisteína e seus metabólitos por eletroforese capilar como potenciais biomarcadores de esclerose lateral amiotrófica**. 2016. Tese de Doutorado.

DA SILVA RIBEIRO, A.; 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.

DZOYEM, J.P.; MELONG, R.; TSAMO, A.T.; MAFFO, T.; KAPCHE, D.G.; NGADJUI, B.T.; MCGAW, L.J.; ELOFF, J.N. Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity of four compounds produced by an endophytic fungus *Epicoccum nigrum* associated with *Entada abyssinica*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 27, 251–253, 2017.

EMMER, A.; OLIVEIRA, J. A. S.; POLLI, A. D.; POLONIO, J. C.; ALVES, L. H.; FAVARO-POLONIO, C. Z.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Plant growth-promoting activity in bean plants of endophytic bacteria isolated from ornamental plant *Echeveria laui*. **Acta Brasiliensis**, v. 5, p. 65-71, 2021.

ERJAE, Z.; SHEKARFOROUSH, S. S.; HOSSEINZADEH, S. Identification of endophytic bacteria in medicinal plants and their antifungal activities against food spoilage fungi. **Journal of Food Science and Technology**, v.56, p. 5262–5270, 2019.

FELBER, A. C.; SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; COSTA, A. T.; POLONIO, J. C.; MOURAO, K. S. M.; PAMPHILE, J. A. Endoglucanase production by endophytic fungi isolated from *Vitis labrusca* L. with peanut hull and sawdust as substrates. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 3, p. 933-940, 2019.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; DE OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GOLIAS, H. C.; POLONIO, J. C.; RIBEIRO, M. A. S.; POLLI, A. D.; SILVA, A. A.; BULLA, A. M.; VOLPATO, H.; NAKAMURA, C. V.; MEURER, E. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. *Tibouchina granulosa* (Vell.) Cogn (Melastomataceae) as source of endophytic fungi: isolation, identification, and antiprotozoal activity of metabolites from *Phyllosticta capitalensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 557-569, 2019.

GONÇALVES, D. **Cromatografia em camada delgada acoplada a voltametrias cíclicas e de pulso diferencial na análise de ácido rosmarínico de *Rosmarinus officinalis* Linné (Alecrim)**. 2010. Dissertação de Mestrado.

LI, C.; SAROTTI, A.M.; YOSHIDA, W.; CAO, S. Two new polyketides from Hawaiian endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. FT172. **Tetrahedron Letters**, v. 59, p. 42–45, 2018. 63

LI, Z.; ZHENG, J.; LI, W. D. Z. Diverse strategic approaches en route to Taxol total synthesis. **Chinese Chemical Letters**, v. 33, n. 12, p. 4957-4968, 2022.

MACIÁ-VICENTE, J.G.; SHI, Y.N.; CHEIKH-ALI, Z.; GRÜN, P.; GLYNOU, K.; KIA, S.H.; PIEPEBRING, M.; BODE, H.B. Metabolomics-based chemotaxonomy of root endophytic fungi for natural products discovery. **Environmental Microbiology**, v. 20, p. 1253–1270, 2018.

MENG, X.; MAO, Z.; LOU, J.; XU, L.; ZHONG, L.; PENG, Y.; ZHOU, L.; WANG, M. Benzopyranones from the endophytic fungus *Hyalodendriella* sp. Ponipodef12 and their bioactivities. **Molecules**, v. 17, p. 11303–11314, 2012.

NASCIMENTO JUNIOR, H. F.; DE REITAS, A. E.; LUCHESE, A. M.; LEITE, H. A. Isolamento e avaliação da atividade biológica de fungos endofíticos isolados de *Lippia origanoides*. In. **XXIII Seminário de Iniciação Científica**, n. 23, p. 1-4, 2019.

NASCIMENTO, R. F.; DE LIMA, A. C. A.; BARBOSA, P. G. A.; DA SILVA, V. P. A. Cromatografia gasosa: Aspectos teóricos e práticos. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2018. 334 p.

OLIVEIRA, F. C.; BARBOSA, F. G.; MAFEZOLI, J.; OLIVEIRA, M. C. F.; CAMELO, A. L. M.; LONGHINOTTI, E.; LIMA, A. C. A.; CÂMARA, M. P. S.; GONÇALVES, F. J. T.; FREIRE, F. C. O. Volatile Organic Compounds from Filamentous Fungi: a Chemotaxonomic Tool of the Botryosphaeriaceae Family. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 1, p. 2189-2194, 2015.

OLIVEIRA, J. A. S.; FERREIRA, A. P.; POLLI, A. D.; SILVA, A. A.; RIBEIRO, A. S.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Plant growth-promoting activity of wild-type and bromate-resistant mutant of the endophytic fungus *Colletotrichum karstii*. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 43, p. e55457, 2021.

OLIVEIRA, J. A. S.; POLLI, A. D.; POLONIO, J. C.; ORLANDELLI, R. C.; CONTE, H.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Bioprospection and molecular phylogeny of culturable endophytic fungi associated with yellow passion fruit. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 42, p. e48321, 2020.

PEDROSA, F. C. **Cromatografia Gasosa aplicada em Estudos de Metabolômica**. 2018. Trabalho de conclusão de curso.

- POLLI, A. D.; RIBEIRO, M. A. S.; GARCIA, A.; POLONIO, J. C.; SANTOS, C. M.; SILVA, A. A.; ORLANDELLI, R. C.; CASTRO, J. C.; ABREU-FILHO, B. A.; CABRAL, M. R. P.; SARRAGIOTTO, M. H.; PAMPHILE, J. A.; AZEVEDO, J. L. Secondary metabolites of *Curvularia* sp. G6-32, an endophyte of *Sapindus saponaria*, with antioxidant and anticholinesterasic properties. **Natural Product Research**, v. 35, n. 21, p. 4148-4153, 2020.
- POLONIO, J. C.; RIBEIRO, M. A. S.; RHODEN, S. A.; SARRAGIOTTO, M. H.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. 3-Nitropropionic acid production by the endophytic *Diaporthe citri*: Molecular taxonomy, chemical characterization, and quantification under pH variation. **Fungal Biology**, v. 120, p. 1600-1608, 2016.
- POLONIO, J. C.; DOS SANTOS RIBEIRO, M. A.; FÁVARO-POLONIO, C. Z.; MEURER, E. C.; AZEVEDO, J. L.; GOLIAS, H. C.; PAMPHILE, J. A. Differential Chemical Profile of Metabolite Extracts Produced by the *Diaporthe citri* (G-01) Endophyte Mediated by Varying the Fermentation 64 Broth pH. **Metabolites**, v. 12, n. 8, p. 692, 2022.
- PRATA, P. S.; MOGOLLÓN, N. G. S. R.; AUGUSTO, F. Técnicas Cromatográficas Multidimensionais na Investigação de Metabólitos Secundários. **Scientia Chromatographica**, v. 8, n. 4, p. 209-229, 2016.
- RAJIVGANDHI, G.; MUNESWARAN, T.; MARUTHUPANDY, M.; RAMAKRITINAN, C.M.; SARAVANAN, K.; RAVIKUMAR, V.; MANOHARAN, N. Antibacterial and anticancer potential of marine endophytic actinomycetes *Streptomyces coeruleorubidus* GRG 4 (KY457708) compound against colistin resistant uropathogens and A549 lung cancer cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 125, p. 325–335, 2018.
- RIBEIRO, A. S.; POLLI, A. D.; OLIVEIRA, A.; OLIVEIRA, J. A. S.; EMMER, A.; ALVES, L. H.; PEREIRA, O. C. N.; PAMPHILE, J. A. Ornamental plant *Pachystachys lutea* as a source of promising endophytes for plant growth and phytoprotective activity. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 43, p. e51737, 2021.
- RIBEIRO, S. F. L. **Bioprospecção da atividade antimicrobiana de extratos brutos de fungos endofíticos isolados da espécie *Oryctanthus alveolatus* (Kunth)Kuijt.** 2015. Dissertação de Mestrado.
- SANTOS, C. M.; RIBEIRO, A. S.; GARCIA, A.; POLLI, A. D.; POLONIO, J. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Enzymatic and Antagonist Activity of Endophytic Fungi from *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). **Acta biológica colombiana**, v. 24, p. 322-330, 2019.
- SANTOS, M. S.; ORLANDELLI, R. C.; POLONIO, J. C.; RIBEIRO, M. A. S.; SARRAGIOTTO, M. H.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Endophytes isolated from passion fruit plants: molecular identification, chemical characterization and antibacterial activity of secondary metabolites. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, p. 38-43, 2017.
- SILVA, A. A.; POLONIO, J. C.; OLIVEIRA, J. A. S.; BULLA, A. M.; GOLIAS, H. C.; POLLI, A. D.; SOARES, L. C.; VICENTINI, V. E. P.; OLIVEIRA, A. J. B.; GONCALVES, J. E.; CORREIA-GONCALVES, R. A.; AZEVEDO, J. L.; ABREU FILHO, B. A.; PAMPHILE, J. A. Multilocus sequence analysis of endophytic fungi from *Justicia brandegeana* with the culture-dependent method and their bioprospection for health field. **South African Journal of Botany**, v. 134, p. 359-368, 2020.

SILVA, A. A.; POLONIO, J. C.; POLLI, A. D.; OLIVEIRA, J. A. S.; SOARES, L. C.; OLIVEIRA JUNIOR, V. A.; VICENTINI, V. E. P.; OLIVEIRA, A. J. B.; GONCALVES, J. E.; CORREIA-GONCALVES, R. A.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A.; ABREU FILHO, B. A. Metabolic extract of the endophytic fungus *Flavodon flavus* isolated from *Justicia brandegeana* in the control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in commercial orange juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 338, p. 109019, 2021.

SILVA, A. F. A; **Validação de Métodos Analíticos para controle de Qualidade de um Medicamento por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**. 2016. Dissertação de Mestrado.

SILVA, C. G. A. **Desenvolvimento de fases estacionárias C18 termicamente imobilizadas sobre sílica e sílicas metalizadas e suas caracterizações químicas, físicas e cromatográficas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia com fluido supercrítico (CFS)**. 2013. Tese de Doutorado. 65

SOMENSI, A. **Desreplicação dos metabólitos secundários produzidos por *Phomopsis stipata*, um endófito de *Styrax camporum* (Styracaceae)**. 2012. Dissertação de Mestrado.

SOUZA, I. T. **Isolamento, quantificação e desenvolvimento de método na determinação de compostos em extratos vegetais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**. 2013. Dissertação de Mestrado.

SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; FELBER, A. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Científica. Ciências biológicas e da saúde**, v. 16, n. 4, p. 345-351, 2014.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G.A. Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287-297, 2012.

STROBEL, G. The emergence of endophytic microbes and their biological promise. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 57-76, 2018.

TALUKDAR R.; WARY, S.; MILI, C.; ROY, S.; TAYUNG, K. Antimicrobial secondary metabolites obtained from endophytic fungi inhabiting healthy leaf tissues of *Houttuynia cordata* Thunb., an ethnomedicinal plant of Northeast India. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. v. 10, n. 9, p. 099106, 2020.

UJAM, N. T.; AJAGHAKU, D. L.; OKOYE, F. B. C.; ESIMONE, C. O. Antioxidant and immunosuppressive activities of extracts of endophytic fungi isolated from *Psidium guajava* and *Newbouldia laevis*, **Phytomedicine Plus**, v1, n. 2, p. 1-7, 2021.

YANG, H.Y.; GAO, Y.H.; NIU, D.Y.; YANG, L.Y.; GAO, X.M.; DU, G.; HU, Q.-F. Xanthone derivatives from the fermentation products of an endophytic fungus *Phomopsis* sp. **Fitoterapia**, v. 91, p. 189–193, 2013.

YE, Y.-Q.; XIA, C.-F.; YANG, J.-X.; QIN, Y.; ZHOU, M.; GAO, X.-M.; YANG, H.-Y.; LI, X.-M.; HU, Q.-F. Isocoumarins from the fermentation products of an endophytic fungus of *Aspergillus versicolor*. **Phytochemistry Letters**, v. 10, p. 215–218, 2014.

ZHAO, J.; SHAN, T.; MOU, Y.; ZHOU, L. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 2, p. 159-168, 2011.

