

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA NORMAL SUPERIOR
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Thiago Fernandes Sousa

**Caracterização morfológica, molecular e análise do perfil metabólico de duas
novas espécies de *Arcopilus* isoladas de *Paullinia cupana* (guaranazeiro)**

Manaus - AM

2018

THIAGO FERNANDES SOUSA

Caracterização morfológica, molecular e análise do perfil metabólico de duas novas espécies de *Arcopilus* isoladas de *Paullinia cupana* (guaranazeiro)

Monografia de conclusão de curso apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas, como requisito parcial à conclusão do curso.

Orientador: Professor. Dr(a). Hector Henrique Ferreira Koolen

Co-orientador: Dr. Gilvan Ferreira da Silva

Manaus - AM

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Thiago Fernandes Sousa

**Caracterização morfológica, molecular e análise do perfil metabólico de duas
novas espécies de *Arcopilus***

Monografia de conclusão de curso
apresentada ao Curso de Licenciatura em
Ciências Biológicas da Universidade do
Estado do Amazonas, como requisito
parcial à conclusão do curso.

Manaus - AM

2018



GOVERNO DO ESTADO DO
AMAZONAS

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO FINAL DO TCC IV (NOTA DA API)

ALUNO: <u>Thiago Fernandes Sousa</u>
TÍTULO DO TCC: <u>Caracterização morfológica, molecular e análise de moléculas produzidas durante o processo fermentativo de <i>Ancopites</i> sp. isolado do queimado.</u>

AVALIAÇÃO DA BANCA AVALIADORA

BANCA EXAMINADORA	NOTAS ATRIBUÍDAS
a) Professor orientador:	<u>10,0</u>
b) 1º avaliador(a): <u>Gilvan Fuzin de Souza</u>	<u>9,9</u>
c) 2º avaliador(a):	<u>9,9</u>
MÉDIA DA NOTA (a+b+c)/3	

MÉDIA DA NOTA: 9,9

Manaus, 28 de Novembro de 2018

ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA AVALIADORA

Rector Henrique
Orientador(a)

Gilvan Fuzin de Souza
1º Avaliador(a)

Aricleia de Moraes Catarino
2º Avaliador(a)

RESUMO

Arcopilus spp. são responsáveis pela produção de um arsenal de moléculas bioativas com atividade anticâncer, antiviral e antimicrobiana. Membros deste grupo, como *A. cupreus*, são amplamente utilizados no controle de patógenos de solo e de plantas. Este gênero foi proposto recentemente a partir de uma reestruturação taxonômica de *Chaetomium* e até momento conta com apenas cinco espécies. Durante a caracterização do microbioma de guaranazeiro foram isoladas nove linhagens de fungos produtores de pigmentos vermelhos que são capazes de difundir-se em meio sólido. O objetivo desse trabalho foi identificar estas linhagens por meio de análises filogenéticas com base nas regiões ITS, 28S (LSU), *rpb2* e *tub2*, realizar a caracterização morfológica (tamanho dos esporos, peritécio, asco com e sem apêndice, largura dos pelos terminais e laterais) e analisar o perfil metabólico. Os resultados indicam com alto suporte estatístico a ocorrência de duas novas espécies proximamente relacionadas, intituladas neste trabalho como *A. amazonicus* e *A. tupanensis*. Os dados de perfil metabólico demonstram diferenças quanto à produção de compostos majoritários entre as duas espécies. *A. tupanensis* produz como molécula majoritária, a oosporeina, enquanto *A. amazonicus* produz majoritariamente uma molécula não identificada de massa 291 [M-H]. Outros extrólitos identificados nessas espécies incluem molicelin C, rotiorinol C, chaetoviridina D, chaetoviridina B e ácido orselínico. Doze moléculas permanecem não identificadas indicando putativos novos compostos.

Palavras-chave: *Arcopilus*; Oosporeina; Guaranazeiro

ABSTRACT

Arcopilus spp. is responsible for the production of an arsenal of bioactive molecules with anticancer, antiviral and antimicrobial activity. Members of this group as *A. cupreus* are widely used in the control of soil and plant pathogens. This genus was recently proposed from a taxonomic restructuring of *Chaetomium* and until now has only five species. During the characterization of the guarana microbioma nine fungal lines were isolated from red pigment that diffuse in solid medium. The objective of this work was to identify these strains by means of phylogenetic analyzes based on the ITS, 28S (LSU), rpb2 and tub2 regions, and perform morphological characterization (spore size, perithecia, asco with and without appendix, terminal hair width and lateral) and metabolic profile analysis. The results indicate with high statistical support the occurrence of two new closely related species titled in this work as *A. amazonicus* and *A. tupanensis*. The metabolic profile data show differences in the production of major compounds between the two species, *A. tupanensis* produces as the major molecule oosporeina, while *A. amazonicus* produces mostly an unidentified mass 291 [M-H] -. Other extrolites identified in these species include molicelin C, rotiorinol C, chaetoviridin D, chaetoviridin B and orselinic acid. Twelve molecules remain unidentified indicating putative new compounds.

Keywords: *Arcopilus*; Oosporein; Guaranazeiro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	P. 1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	P. 2
2.1 O guaranazeiro como repositório de microrganismos de interesse biotecnológico	P. 2
2.2 Produtos do metabolismo secundário de <i>Arcopilus</i>	P. 3
2.3 Aplicação de <i>Arcopilus</i> spp. no controle biológico de fitopatógenos	P. 4
3 OBJETIVO (s)	P. 5
3.1 Objetivo Geral	P. 5
3.2 Objetivos específicos	P. 5
4 MATERIAL E MÉTODOS	P. 6
4.1 Isolados e condições de cultivo	P. 6
4.2 Extração de DNA	P. 6
4.3 Identificação molecular	P. 6
4.4 Sequenciamento e análises filogenéticas	P. 8
4.5 Caracterização morfológica	P. 9
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	P. 12
5.1 Isolados	P. 12
5.2 Filogenia	P. 12
5.3 Perfil metabólico	P. 14
5.4 Taxonomia	P. 17

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS----- P. 21

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----P. 23

8 APÊNDICES ----- P. 29

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Arcopilus* foi recentemente proposto a partir de uma reestruturação taxonômica de 145 isolados do gênero *Chaetomium* com base em aspectos morfológicos e nos dados de sequências das regiões ITS, 28S (LSU), sequências parciais da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*rpb2*) e β -tubulina (*tub2*). A reestruturação taxonômica redefiniu o conceito genérico de *Chaetomium*, suas relações filogenéticas e ampliou o número de gêneros e espécies na família Chaetomiaceae (WANG et al. 2016).

Representantes do antigo gênero *Chaetomium* são capazes de colonizar uma ampla gama de hospedeiros e substratos e são reconhecidos por seu arsenal de moléculas com mais de 200 diferentes metabólitos bioativos. Estes, possuem as mais variadas ações, tais como antibacterianas (Chaetocins B, chetracin A), antifúngicas (Cochliodinol, Chaetoviridin A and B), anti-câncer (Chaetochalasin A, ent-chaetocin) e anti-HIV (Isocochliodinol, neocochliodinol) (KANOKMEDHAKUL, et al 2006; ZHANG, 2012; KABBAJ et al 2015).

Atualmente, *Arcopilus* possui cinco espécies conhecidas: *A. aureus*, *A. cupreus*, *A. turgidopilosus*, *A. fusiformes* e *A. flavigenus*. A principal característica morfológica deste gênero é o arqueamento dos pelos terminais, ascósporos relativamente diversos (fusiforme, fusiforme alongado, limoniforme, semilunar e navicular), ascomas e produção de exsudado que resultam na coloração da colônia, variando de amarelo, laranja ou vermelho para ferrugem (WANG et al, 2016).

Espécies de *Arcopilus* identificadas em *Chaetomium* antes da reestruturação taxonômica já são reconhecidas pela sua aplicabilidade na agricultura para controle de fitopatógenos na forma de bioformulados ou produtos como (Ketomium®, BOKUPRUM™), isso se deve à produção de uma ampla gama de moléculas antifúngicas da classe das Azafilonas, como rotiorinol A e C, rotiorin e rubrorotiorin (MANANDHAR et al. 1998; KANOKMEDHAKUL, et al 2006; VILAVONG et al 2017; TANN, H. & SOYTONG, K. 2017; LIU, et al. 2018). Em adição, moléculas isoladas de representantes do gênero *Arcopilus* possuem atividades relatadas como

anticâncer, antivirais, antibacterianas e outras (TANIGUCHI et al. 1984; WAINWRIGHT et al. 1986; KABBAJ et al 2015)

Neste estudo foram realizados a caracterização morfológica, molecular e a análise do perfil metabólico de duas novas espécies do gênero *Arcopilus* isolados de raízes de uma planta nativa da Amazônia, *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaranazeiro) no estado do Amazonas. Os resultados contribuem para conhecimentos acerca da morfologia de *Arcopilus* e sugerem caracteres alvo para delimitação das espécies que compõem esse gênero.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – O guaranazeiro como repositório de microrganismos de interesse biotecnológico

O guaranazeiro [*Paullinia cupana* var. *sorbilis*, (Mart.) Ducke] é uma planta nativa da Amazônia que possui propriedades farmacológicas com atividades antioxidantes, antidepressivas, ansiolíticas entre outras, além do alto teor de cafeína em suas sementes, que é explorado pela indústria de soft drinks e energéticos (OTOBONE et al. 2007; RANGEL et al. 2013; PEIXOTO et al. 2017). Entre as propriedades farmacológicas o guaraná tem feito na prevenção ou tratamento dos distúrbios associados ao envelhecimento (ARANTES et al., 2018); na inibição de enzimas relacionadas à digestão de carboidratos, mostrando seu potencial como anti-hiperglicêmico (SILVA et al., 2018); na proteção contra doenças oculares e no tratamento de distúrbios visuais, a exemplo da degeneração macular relacionada à idade (ADM) (BONADIMAN et al., 2017); no tratamento da fadiga relacionada ao câncer, especialmente o câncer de mama (PEREIRA et al., 2018), na redução da neurotoxicidade da vincristina, um medicamento que causa vários efeitos colaterais (VELOSO et al., 2018), dentre outros benefícios (LIMA et al., 2018a; LIMA et al., 2018b; VENTURA et al., 2018; PEIXOTO et al., 2017; CADONÁ et al., 2017).

Além da sua vasta propriedade que deriva de seus fitoquímicos, o guaranazeiro possui um vasto repositório de microrganismos de interesse

biotecnológico. Foram identificados diversos micro-organismos endofíticos em guaranazeiro com potencial biotecnológico e a utilização de técnicas independentes de cultivo confirmam uma grande riqueza em termos de microbiota bacteriana e fúngica. Foram obtidas 6.349 Operational Taxonomic Units (OTUs) distribuídas em 33 filos, 116 classes, 227 ordens, 430 famílias, 818 gêneros e 1343 espécies. *P. cupana* é abundantemente colonizada por Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes, e especificamente com alta frequência relativa dos gêneros *Streptococcus* e *Acidothermus* em folhas e raízes, respectivamente (LIOTTI et al 2018).

Dos fungos obtidos a partir do guaranazeiro já foram identificados, isolados de *Trichoderma asperellum* e *Diaporthe phaseolorum* com atividade antibacteriana, antitumoral e genotóxica por meio de análises *in vitro*. Em conjunto, foram identificadas também oito espécies de fungos não relatados anteriormente como endófitos, algumas espécies de fungos capazes de inibir o crescimento de patógenos e com produção de antibióticos e compostos com atividade bacteriostática contra *Pseudomonas aeruginosa* em cepas hospedeiras suscetíveis e multirresistentes (SILVA et al 2018).

2.2 – Produtos do metabolismo secundário de *Arcopilus*

Fungos pertencentes ao antigo gênero *Chaetomium* representam uma excelente fonte de novas moléculas de importância biotecnológica e isso inclui mais de 200 metabólitos com atividades biológicas já relatadas. Dentre os produtos do metabolismo secundário deste grupo estão: Chaetoglobosinas, azafilonas, xantonas, antraquinonas, cromonas, terpenóides e esteróides (ZHANG et al, 2012).

O gênero *Arcopilus* foi proposto recentemente a partir da reestruturação taxômica do gênero *Chaetomium* (WANG et al, 2016). Espécies que compõem este gênero são reconhecidas pela sua habilidade no controle biológico devido à produção de moléculas como rotiorinol A-C, rotiorin, rubrorotiorin, chaetofusin A-B (moléculas antifúngicas que pertencem à classe das azafilonas) e oosporeina (inseticida), além de moléculas com efetiva atividade anticâncer como sclerotiorin (KANOKMEDHAKUL, et al 2006; PENG et al, 2012; FENG et al, 2015; KABBAJ et al 2015).

Oosporeina foi isolada pela primeira vez em 1960, a partir do fungo entomopatígeno *Beauveria bassiana* (Vining et al. 1962). Outros fungos como *Arcopilus aureus* e *A. cupreus*, bem como vários outros fungos incluindo espécies de basidiomicetos também são produtores desta molécula (LLOYD et al, 1955; TAKESHITA et al, 1965; MAO et al, 2010;). Sua eficácia como inseticida está relacionada com sua capacidade em deprimir o sistema imunológico de insetos e a seus efeitos antibacterianos. Isso confere vantagens para o microrganismo produtor, visto que facilita sua multiplicação, colonização e diminui a competição por nutrientes facilitando sua reprodução e dispersão (FENG et al, 2015; FAN et al, 2017). Além da sua capacidade inseticida e antibacteriana, oosporeina também apresenta atividade antiviral contra o vírus da herpes e ação antifúngica contra fitopatógenos de interesse agrícola (TERRY et al, 1992; MAO et al, 2010).

2.3 – Aplicação de *Arcopilus* spp. no controle biológico de fitopatógenos

Triagem de espécies de *Chaetomium* isoladas de solos para uso como agentes de controle biológico começaram na Tailândia em 1989. Testes *in vitro* demonstraram os efeitos antifúngicos das cepas de *A. cupreus* e *C. globosum* e relevaram a supressão de uma ampla gama de patógenos tais como: *Curvularia lunata*, *Pyricularia oryzae* e *Rhizoctonia oryzae* (Soytong, 1989). O Preparo de soluções de esporos de *Chaetomium* spp. se mostrou um método eficaz na redução da murcha de tomateiro causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em campo e em casa de vegetação (Soytong, 1990, 1992). A partir dessas informações, vinte e duas estirpes foram selecionadas por seus efeitos de inibição de fitopatógenos para a criação de um bioformulado (Soytong, 1997).

Ketomium®, BOKUPRUM™ são bioformulados à base de *Arcopilus cupreus*, e já são produtos amplamente comercializados para o controle de *Phytophthora palmivora* em *Durio zibethinus* (Dorião) e *piper nigrum* (pimentado-reino), *Phytophthora parasitica* em *Citrus reticulata* Blanco (Tangerina) e *Phytophthora cactorum* em *Fragaria* spp. (Morango). Em adição, o

bioformulado tem habilidade na promoção de crescimento e indução de resistência em plantas (SOYTONG et al, 2001).

Arcopilus cupreus também foi testado quanto a sua capacidade antagonista contra o gênero *Colletotrichum* no combate à antracnose em *Vitis vinifera* (Videira) e contra *Drechslera oryzae* agente causal da mancha foliar em arroz. Devido ao seu amplo espectro e diversidade de moléculas que variam até mesmo intraespecificamente, o isolado *A. cupreus* 3003 foi utilizado no biocontrole de antracnose do café causada por *Colletotrichum gleosporioides* (SOYTONG et al, 2001).

Apesar de *A. cupreus* ser de longe o representante mais utilizado e estudado em controle biológico, trabalhos acerca da química de *A. aureus* e *A. fusiforme* já revelaram a produção de moléculas antifúngicas que podem eventualmente ser testadas quanto ao seu antagonismo frente a fitopatógenos (GUO et. al, 2008, PORNSURIYA et al, 2010)

3 OBJETIVOS

3.1 – Geral:

Realizar caracterização morfológica, molecular e análise de perfil metabólico de *Arcopilus* spp. isolado de guaranazeiro

3.2 – Específicos:

Realizar caracterização morfológica e identificação filogenética com base nas regiões ITS, LSU, TUB e RPB2 dos diferentes genótipos obtidos

Comparar os isolados genotipicamente diferentes através de um perfil metabólico

Identificar moléculas majoritárias presentes no pigmento de *Arcopilus* spp. isolado de guaranazeiro

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Isolados e condições de cultivo

Raízes de guaranazeiro foram fragmentadas e submetidas à assepsia com álcool 70% (um minuto), hipoclorito de sódio (três minutos) e água autoclavada ultrapura (três minutos) e logo após incubadas em meio BDA (Batata dextrose ágar) a uma temperatura de 25°C por três dias. As colônias foram repicadas e purificadas através de cultivo monospórico.

4.2 – Extração de DNA

Os isolados monospóricos foram colocados para crescer em meio BD (Batata dextrose) a 25°C sob 125 rpm de agitação por três dias para obtenção da massa micelial. A extração do DNA foi realizada usando protocolo de extração com o detergente catiônico CTAB 2% (Doyle e Doyle, 1987). A concentração do DNA foi mensurada por espectrometria (NanoDrop1000) e a integridade visualizada em gel de agarose (0,8%).

4.3 Identificação molecular

Os diferentes isolados obtidos foram submetidos à identificação molecular por meio da amplificação e sequenciamento de quatro regiões: Segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2), beta tubulina (*tub2*), espaçador interno transcrito (ITS) e domínios D1/D2 da subunidade 28S (LSU) nrDNA (Tabela 1). As reações de PCR foram realizadas utilizando 100 ng do DNA total; 0,5 pmol de cada primer; 1X de tampão de reação (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C), 500 mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40); 2 mM de MgCl₂; 1 mM de dNTPs e uma unidade de Taq DNA Polimerase (DNA Express) para um volume final de 25 µL. As condições de PCR para todas as regiões foram: Desnaturação inicial de 94 °C/3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C/1 min, anelamento de acordo com cada primer (Tabela 1), extensão de 72 °C/1:30 min e extensão final a 72 °C/5 min. Os amplicons gerados foram

visualizados em gel de agarose com auxílio do marcador 1kb para confirmar a amplificação apenas da sequência alvo.

Tabela 1: Lista de primers utilizados para amplificação das regiões: II maior subunidade da RNA polimerase (RPB2), beta tubulina (*tub2*), espaçador interno transcrito (ITS) e domínios D1/D2 da subunidade 28S (LSU) nrDNA.

Locus	Primer/Sentido	Primer 5' para 3'	Referência	TM	Amplicom
<i>Nuclear ITS rDNA and domain D1/D2 of LSU 28s rDNA</i>	ITS1/F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al. (1990)	55°C	1050 pb~
	NL4/R	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Carbone e Kohn (1999)		
<i>RNA polymerase II second largest subunit</i>	RPB2AM-1bf/F	CCAAGGTBTTYGTSAACGG	Miller &Huhndorf (2005)	56°C	525 pb~
	RPB2AM-7R/R	GAATRTTGGCCATGGTRTCCA			
<i>β-tubulin</i>	T1/F	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	O'Donnell &Cigelnik (1997)	53°C	680 pb~
	Tub4RD/R	CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC	Groenewald et al. (2013)		

4.4 – Sequenciamento e análise filogenética

Os produtos de PCR foram tratados com Polietilenoglicol (PEG 20%) e sequenciadas usando o kit BigDye™ Terminator v3.1, no 3500 Genetic Analyzer (AppliedBiosystems™) conforme recomendações do fabricante. As sequências consenso para cada locus foram obtidas com base no sequenciamento das fitas F e R utilizando o programa DNA baser assembly (<http://www.dnabaser.com/>). Novas sequências geradas neste estudo foram depositados no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih>) com os números de acesso MH777083 - MH777091 (ITS), MH780043 - MH78051 (LSU), MH784457 - MH784465 (RPB2) e MH784466 - MH784474 (TUB) (Tabela 2).

Sequências para cada locus foram obtidas através da ferramenta PopSet (<http://www.Ncbi.nlm.nih>) e individualmente alinhadas com MUSCLE utilizando o programa MEGA 7 (Tamura et, al. 2013). Análises filogenéticas para cada locus foram realizadas por meio de Neighbor Joining (NJ) e para um alinhamento concatenado de quatro locus (ITS, LSU, *Rpb2*, *tub2*) utilizou-se Inferência Bayesiana (BI), Maximum Likelihood (ML) e Maximum parsimony (MP). O tratamento de gaps e dados faltantes para as análises de ML e MP foi por meio de deleção parcial com limite de corte de 95%, bootstrap não paramétrico foi realizado com 1000 replicatas e as árvores filogenéticas foram geradas e visualizadas com o programa MEGA 7.

Inferência bayesiana foi baseada no modelo testado por PAUP*4 e Mrmodeltest2 v2 (Nylander 2004) para as sequências de ITS, LSU, TUB2 e RPB2 incluindo todos os sites, a análise correu por 10.000.000 de gerações, com as primeiras 25% das árvores descartadas, utilizando a ferramenta MrBayes v. 3.6 disponível na plataforma CIPRES (<https://www.phylo.org/>). A probabilidade a posteriori (PP) e a topologia da árvore foram visualizadas com o programa Figtree v. 1.1.2 (Rambaut 2009).

4.5 – Caracterização morfológica

Os isolados cresceram a uma temperatura de 25°C por 9 a 21 dias em meio BDA ou até que suas estruturas reprodutivas estivessem maduras. Caracteres do ascomata, como tamanho, formato e largura dos pelos laterais e terminais, conforme descrito por Chivers (1915), Zopf's (1881) e Wang et al. (2016) foram observados em detalhe por meio de Microscópio Estereoscópico Binocular. O tamanho das estruturas foi determinado com auxílio de ferramentas de mensuração do microscópio Carl ZEISS Axiolmager v2. Características da colônia foram determinadas em Batata Dextrose Ágar (200g/L Batata; 20g/L Dextrose; 15g/L Ágar), Extrato de Malte Ágar (30g/L Extrato de malte; 5g/L Peptona; 15g/L Ágar), Aveia Agar (60g/L Aveia; 12,5 g/L Ágar) e Synthetic Nutriente-poor Ágar (1g/L KH₂PO₄; 1g/L KNO₃; 0,5g/L MgSO₄; 0,5g/L KCl; 0,2g/L Glicose; 0,2g/L Sacarose; 20g/L Ágar).

Tabela 2: Isolados e números de acesso para os quatro locus: ITS, LSU, RPB2 e TUB2

Espécies	ITS	LSU	RPB2	TUB2	Referência
<i>Arcopilus aureus</i> CBS 153.52	KX976582	KX976707	KX976806	KX976924	Wang et al. 2016
<i>A. aureus</i> CBS 538.73	KX976583	KX976708	KX976807	KX976925	Wang et al. 2016
<i>A. cupreus</i> CBS 560.80	KX976584	KX976709	KX976808	KX976926	Wang et al. 2016
<i>A. flavigenus</i> CBS 337.67	KX976587	KX976712	KX976811	KX976929	Wang et al. 2016
<i>A. fusiformes</i> CBS 484.85	KX976585	KX976710	KX976809	KX976927	Wang et al. 2016
<i>A. fusiformes</i> CBS 485.85	KX976586	KX976711	KX976810	KX976928	Wang et al. 2016
<i>A. turgidopilosus</i> CBS 169.52	KX976588	KX976713	KX976812	KX976930	Wang et al. 2016
<i>A. amazonicus</i> (2410)	MH777083	MH780043	MH784457	MH784466	Presente estudo
<i>A. amazonicus</i> (2411)	MH777084	MH780044	MH784458	MH784467	Presente estudo
<i>A. amazonicus</i> (2414)	MH777087	MH780047	MH784461	MH784470	Presente estudo
<i>A. amazonicus</i> (2416)	MH777089	MH780049	MH784463	MH784472	Presente estudo

<i>A. amazonicus</i> (2417)	MH777090	MH780050	MH784464	MH784473	Presente estudo
<i>A. amazonicus</i> (2418)	MH777091	MH780051	MH784465	MH784474	Presente estudo
<i>A. tupanensis</i> (2412)	MH777085	MH780045	MH784459	MH784468	Presente estudo
<i>A. tupanensis</i> (2413)	MH777086	MH780046	MH784460	MH784469	Presente estudo
<i>A. tupanensis</i> (2415)	MH777088	MH780048	MH784462	MH784471	Presente estudo
<i>Achaetomiumglobosum</i> CBS 332.67	KX976570	KX976695	KX976793	KX976911	Wang et al. 2016
<i>A. strumarium</i> CBS 333.67	AY681204	AY681170	KC503254	AY681238	Wang et al. 2016
<i>A. luteum</i> CBS 618.68	KX976571	KX976696	KX976794	KX976912	Wang et al. 2016
<i>A. luteum</i> CBS 544.83	KX976572	KX976697	KX976795	KX976913	Wang et al. 2016
<i>A. macrosporum</i> CBS 152.97	KX976573	KX976698	KX976796	KX976914	Wang et al. 2016
<i>A. macrosporum</i> CBS 532.94	KX976574	KX976699	KX976797	KX976915	Wang et al. 2016
<i>Collariellagracilis</i> CBS 146.60	KX976648	KX976743	KX976842	KX976990	Wang et al. 2016
<i>C. gracilis</i> CBS 249.75	KX976649	KX976744	KX976843	KX976991	Wang et al. 2016
<i>C. virescens</i> CBS 148.68	KX976654	KX976749	KX976848	KX976996	Wang et al. 2016
<i>C. virescens</i> CBS 547.75	KX976655	KX976750	KX976849	KX976997	Wang et al. 2016
<i>C. quadrangulata</i> CBS 142.58	KX976650	KX976745	KX976844	KX976992	Wang et al. 2016
<i>C. quadrangulata</i> CBS 152.59	KX976651	KX976746	KX976845	KX976993	Wang et al. 2016
<i>C. robusta</i> CBS 551.83	KX976652	KX976747	KX976846	KX976994	Wang et al. 2016
<i>C. robusta</i> CBS 508.84	KX976653	KX976748	KX976847	KX976995	Wang et al. 2016
<i>C. causiiformis</i> CBS 792.83	KX976646	KX976741	KX976840	KX976988	Wang et al. 2016
<i>C. carteri</i> CBS 128.85	KX976647	KX976742	KX976841	KX976989	Wang et al. 2016
<i>C. bostrychodes</i> CBS 163.73	KX976641	KX976738	KX976837	KX976983	Wang et al. 2016

<i>C. bostrychodes</i> CBS 586.83	KX976642	KX976739	KX976838	KX976984	Wang et al. 2016
<i>C. bostrychodes</i> DTO 324-H3	KX976644	KX976740	KX976839	KX976986	Wang et al. 2016
<i>Melanocarpustardus</i> CBS 541.76	KX976681	KX976775	KX976888	KX977023	Wang et al. 2016
<i>M. albomyces</i> CBS 638.94	KX976679	KX976773	KX976886	KX977021	Wang et al. 2016
<i>M. albomyces</i> CBS 747.70	KX976680	KX976774	KX976887	KX977022	Wang et al. 2016
<i>Ovatosporamedusarum</i> CBS 148.67	KX976684	KX976782	KX976897	KX977032	Wang et al. 2016
<i>O. unispora</i> CBS 109.83	KX976689	KX976787	KX976902	KX977037	Wang et al. 2016
<i>O. pseudomollicella</i> CBS 251.75	KX976686	KX976784	KX976899	KX977034	Wang et al. 2016
<i>O. mollicella</i> CBS 583.93	KX976685	KX976783	KX976898	KX977033	Wang et al. 2016
<i>O. brasiliensis</i> CBS 130174	KX976682	KX976780	KX976895	KX977030	Wang et al. 2016
<i>O. brasiliensis</i> CBS 140.50	KX976683	KX976781	KX976896	KX977031	Wang et al. 2016
<i>O. senegalensis</i> CBS 798.83	KX976688	KX976786	KX976901	KX977036	Wang et al. 2016
<i>O. senegalensis</i> CBS 728.84	KX976687	KX976785	KX976900	KX977035	Wang et al. 2016
<i>M. trigonosporus</i> CBS 218.31	LM652443	HG380436	DQ470908	LM652655	Wang et al. 2016

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Isolados

Os nove isolados foram inicialmente a uma análise de fingerprinting por meio do marcador Eric-PCR para verificar a ocorrência de clone. Os perfis de bandas obtidos indicam que todos representam genótipos diferentes e o sequenciamento da região ITS indicou que todos pertencem ao gênero *Arcopilus*, apresentando alta homologia com *A. aureus*. Uma investigação mais aprofundada foi realizada com análises morfológicas, molecular, incluindo

quatro regiões, e do perfil químico. A combinação destes dados revelam a ocorrência de duas novas espécies de *Arcopilus* proximamente relacionadas. Do gênero *Arcopilus* apenas *A. aureus* foi isolado no Brasil até o presente momento, sendo este o primeiro relato na região norte do Brasil, além de nunca antes ter sido identificado em *Paullinia cupana* (www.discoverlife.org; www.indexfungorum.org).

5.2 – Filogenia

As análises multigenes totalizaram 2521 caracteres incluindo gaps, sendo 605, 561, 833 e 522 caracteres para os genes ITS, LSU, Tub2 e rpb2 respectivamente. O melhor modelo evolucionário para explicar os dados de Inferência bayesiana foi GTR+I+G para os genes ITS, LSU e *rpb2* e HKY+I+G para betatubulina. A topologia da árvore apresentada (Fig1) derivou da análise de ML acrescidos dos valores de bootstrap e de probabilidade a posteriori. O uso dos quatro lócus permitiu gerar uma árvore filogenética com trinta e oito acessos e mais nove isolados de guaranazeiro representantes de cinco gêneros formando clados monofiléticos. Os nove isolados obtidos de guaranazeiro agruparam-se no clado do gênero *Arcopilus* que contém sete espécies filogenéticas bem suportadas, nas quais duas compreendem os isolados obtidos neste trabalho, propostas aqui como duas novas espécies.

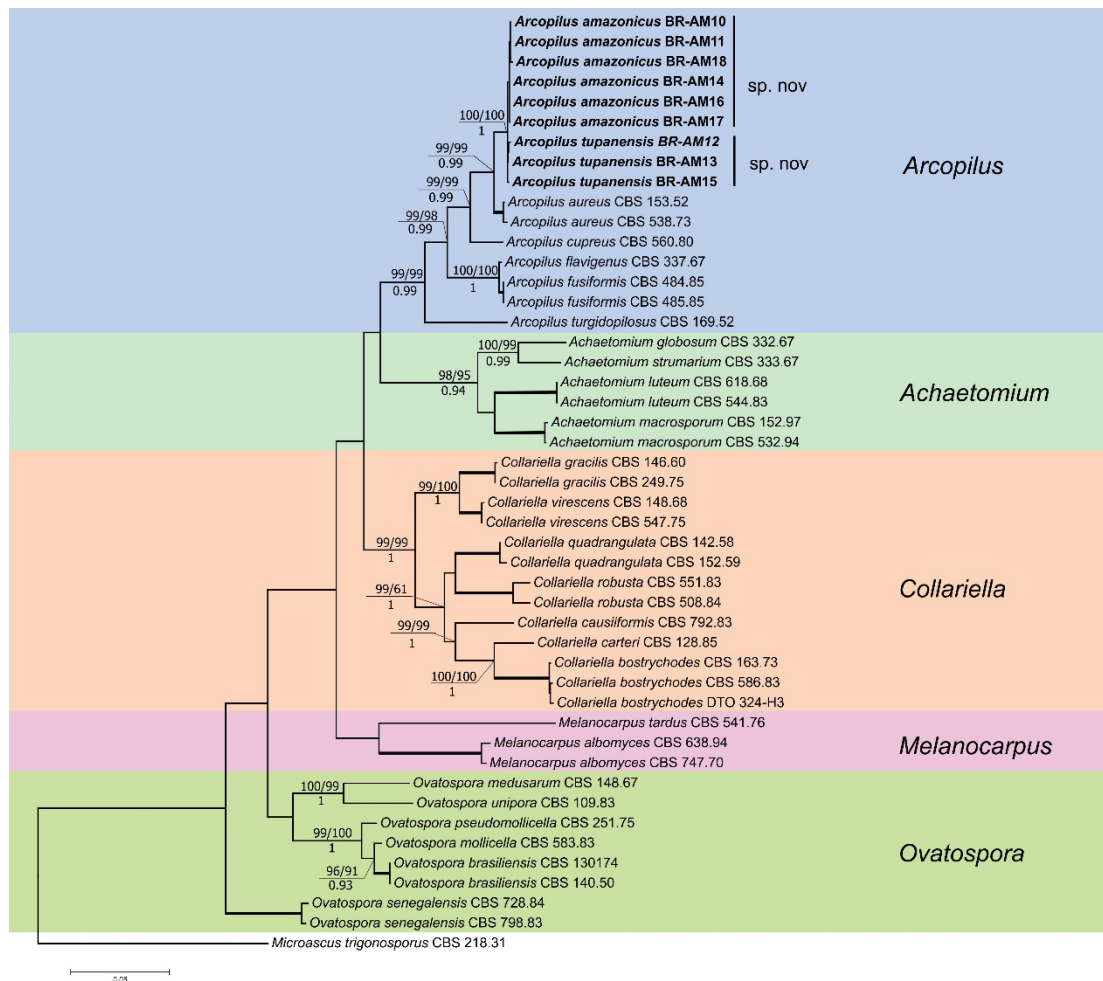


Figura 1: Inferência filogenética obtida da análise concatenada de quatro lócus: ITS, LSU, *tub2* e *rpb2*. Os números indicam o suporte dos ramos, PP (Probabilidade a posteriori), bootstrap gerado por ML (Maximum Likelihood) e valor de bootstrap gerado por MP (Maximum parsimony). Os ramos foram espessados para PP > 0.94; A topologia da árvore foi gerada pela análise de ML com os valores de bootstrap e PP gerados pela análise de MP e Bayesiana ($\frac{ML/MP}{PP}$).

As inferências filogenéticas com base apenas nos genes individuais revelam que apenas a região *rpb2* foi eficaz em resolver as relações filogenéticas entre os clados e em diferenciar as duas espécies aqui propostas (APÊNDICE 4). *Tub2* foi eficaz na resolução da árvore, no entanto não foi capaz de separar as linhagens isoladas de guaranazeiro de *Arcopilus aureus* CBS 538.73 (APÊNDICE 3). A região ITS resolveu a maioria dos clados, separando os isolados deste estudo do táxon *Arcopilus aureus*, no entanto foi ineficaz em resolver as relações de *Melanocarpus tardus* e *Ovatospora*

senegalensis com seus respectivos clados e em diferenciar as duas espécies propostas. Para este gene é possível notar a diferenciação do isolado *Arcopilus amazonicus* 2418 dos demais isolados de guaranazeiro (APÊNDICE 1). A região LSU se mostrou altamente conservada e foi ineficaz na resolução das relações entre representantes de todos os gêneros analisados (APÊNDICE 2). A concatenação dos genes Tub2 e rpb2 foram suficientes para gerar a mesma topologia com alto suporte de bootstrap nos ramos que a análise concatenada com todos os genes, o que corrobora com o estudo de Wang et al. 2016 (APÊNDICE 5).

5.3 – Perfil metabólico

No total foram identificados seis compostos conhecidos já relatados em outras espécies como Orsellinic acid, mollicelin C e Chateoviridin D presentes em *Chaetomium globosum*, rotiorinol A and C em *Arcopilus cupreus*, oosporein em *Beauveria bassiana* e *Arcopilus aureus* (Fig.2). Sendo mollicelin C e oosporein presentes em todos os isolados de ambas as espécies. Doze moléculas ainda permanecem não identificadas, sendo putativos novos compostos (Tabela3). A produção de orsellinic acid e molécula de massa 291 [M-H] foi observada apenas em *A. tupanensis*, sendo esta última um composto de produção majoritária (Fig.3).

Tabela 3:Tabela contendo 18 compostos produzidos pelos isolados de *Arcopilus* obtidos neste trabalho.

Número do pico	[M-H]⁺	Fragmentos	Identificação	Identificação já relatada
1	157	121, 85, 71, 57	Desconhecida	-
2	307	289, 233, 189, 161	Desconhecida	-
3	291	273, 201, 173, 153	Desconhecida	-
4	275	191, 177, 109, 95	Desconhecida	-
5	427	355, 217, 201, 137	Desconhecida	-
6	427	355, 217, 201, 137	Desconhecida	-
7	167	149, 123, 113, 105	Orsellinic acid	<i>Chaetomium globosum</i>
8	305	221, 205, 177, 149	Oosporein	<i>Beauveriaspp.</i>
9	411	393, 383, 329, 311	mollicelin C	<i>Chaetomium globosum</i>
10	413	351, 257, 193, 137	Desconhecida	-
11	259	244, 227, 216, 188	Desconhecida	-
12	259	244, 227, 216, 188	Desconhecida	-
13	287	271, 241, 197, 109	Desconhecida	-
14	467	449, 431, 413, 385	Chateoviridin D	<i>Chaetomium globosum</i>
15	289	217, 161, 137, 71	Desconhecida	-
16	397	379, 361, 355, 351,	Rotiorinol B or C	<i>Chaetomium cupreum</i>
17	397	379, 361, 355, 351,	Rotiorinol B or C	<i>Chaetomium cupreum</i>
18	325	261, 183, 119, 79	Desconhecida	-

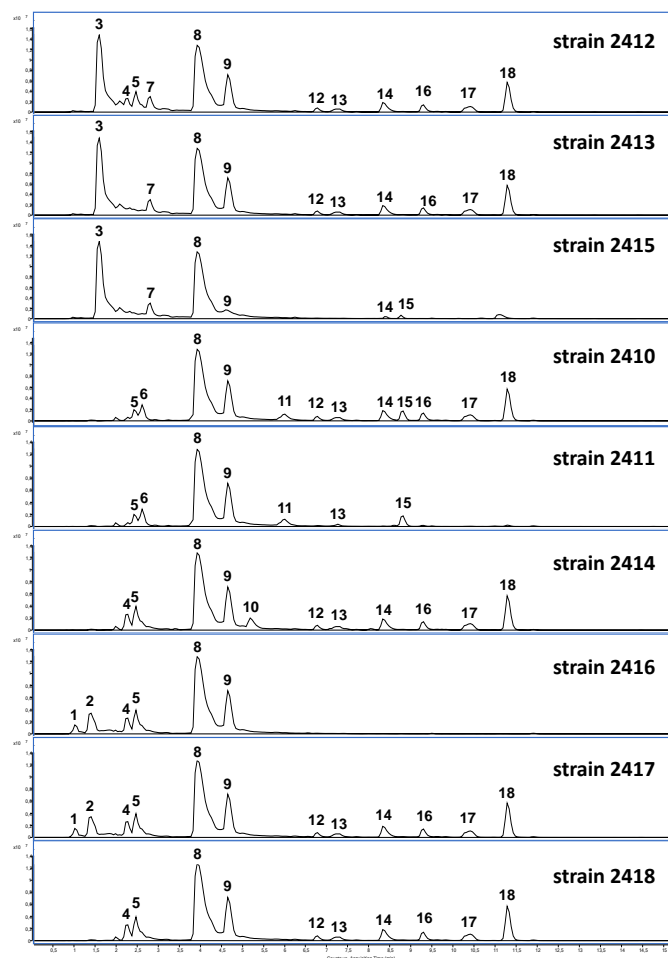


Figura2: Perfil metabólico dos nove isolados de *Arcopilus*

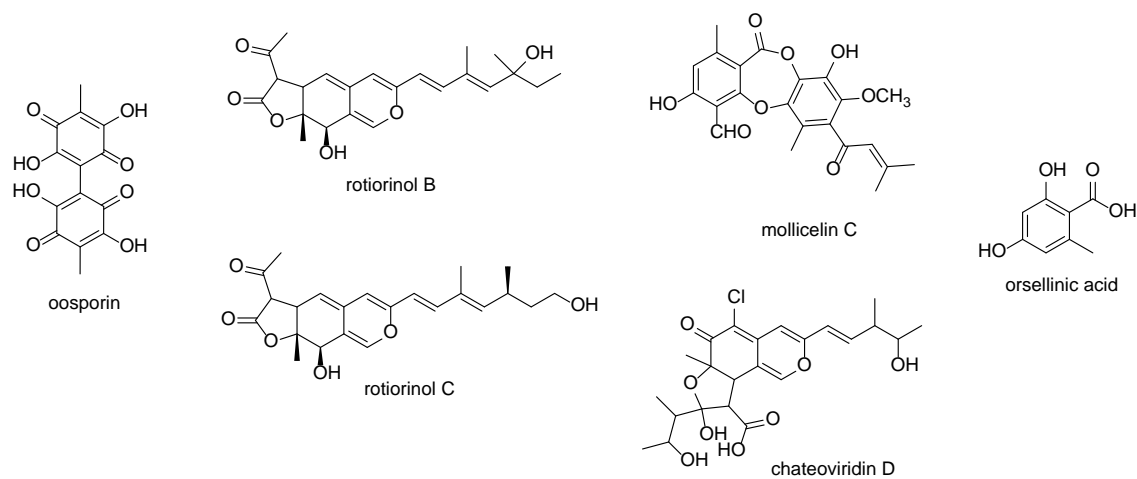


Figura 3: Visualização estrutural das moléculas já conhecidas secretadas em meio BD dos nove isolados de *Arcopilus*.

5.4 – Taxonomia

Arcopilus amazonicus T. Fernandes & G. Ferreira da Silva, *sp. nov.* (Fig. 6)

Etimologia: Refere-se à localidade tipo

Ascomata globoso superficial de coloração melanizada com pelos laterais e terminais translúcidos quando jovens e amarelos quando maduros, verde olivado ou marrom quando observado ao microscópio, medindo 83,2-98,7 μm x 73,1-93,6 μm (*M= 90 μm x 84 μm) suspenso por rizóides. Pelos terminais arqueados e maiores que os pelos laterais, ambos regularmente septados com largura de 2,2-4 μm (M=3,3) e 2,2-4,1 μm (M=3,16) na base respectivamente. Asco clavado medindo 25,1-35 μm x 8,8-11,4 μm (M= 28,7 μm x 10,1 μm), com parte contendo esporos medindo 20 μm , 8 ascósporos de formato semilunar, limoniforme e fusiforme com tamanho de 8,2-10,4 μm x 4,4-6 μm (M= 9,1 μm x 5,4 μm) (Tabela 4).

Características de cultivo: Colônias crescidas por seis dias em BDA medem 2,85 cm de diâmetro. Apresentam micélio com coloração levemente amarelada e branco nas bordas, exsudato de coloração vermelha que difunde-se no meio durante a fase estéril e melanização com o surgimento de seus ascomas. Colônias em MEA exibem micélio alaranjado no centro e branco nas bordas com produção de exsudato vermelho no centro do micélio e difundindo-se no meio. Colônias em OA apresentam micélio de coloração acinzentada no centro e branco em seu intermédio, hifas levemente translúcidas nas bordas com produção de exsudatos de coloração arroxeada difundindo-se no meio de cultura. Colônias em SNA não exibem exsudatos e apresentam micélio branco levemente translúcido nas bordas.

Nota: Difere-se de *A. aureus* pelo tamanho dos ascos, largura dos pelos terminais e tamanho dos ascósporos

Arcopilus tupanensis T. Fernandes & G. Ferreira da Silva, *sp. nov.* (Fig 5).

Etimologia: Faz alusão a uma lenda amazônica acerca de seu hospedeiro

Ascomata globoso superficial de coloração melanizada com pelos laterais e terminais translúcidos quando jovens e amarelos quando maduros, verde olivado marrom quando observado ao microscópio, medindo 70,7-102,6 μm x 70-93 μm (*M= 85,3 μm x 77,8 μm) suspenso por rizóides. Pelos terminais arqueados e maiores que os peloslaterais, ambos regularmente septados com largura de 1,4-4 μm (M=2,72) e 2,3-4,2 μm (M=3) na base respectivamente. Asco clavado medindo 28-35,1 μm x 8,7-11,4 μm (M= 31,1 μm x 10,2 μm), com parte contendo esporos medindo 22,7 μm , com 8 ascósporos de formato semilunar, limoniforme e fusiforme com tamanho de 8,2-10,9 μm x 4,4-6,6 μm (M= 9,2 μm x 5,3 μm) (Tabela 4).

Características de cultivo: Colônias crescidas por seis dias em BDA medem 2,6 cm de diâmetro. Apresentam micélio com coloração levemente amarelada e branco nas bordas, exsudato de coloração vermelha que difunde-se no meio durante a fase estéril e melanização com o surgimento de suas ascomas. Colônias em MEA exibem micélio alaranjado no centro e branco nas bordas com produção de exsudato vermelho no centro do micélio e difundindo-se no meio. Colônias em OA apresentam micélio de coloração acinzentada em seu intermédio e branco nas bordas, hifas levemente translúcidas nas bordas com pouca produção de exsudatos de coloração amarela ou roxa difundindo-se no meio de cultura. Colônias em SNA não exibem exsudatos e apresentam micélio branco levemente translúcido nas bordas.

Nota: Diferencia-se de *A. amazonicus* pelo tamanho do peritécio, produção de exsudato amarelo em meio OA.

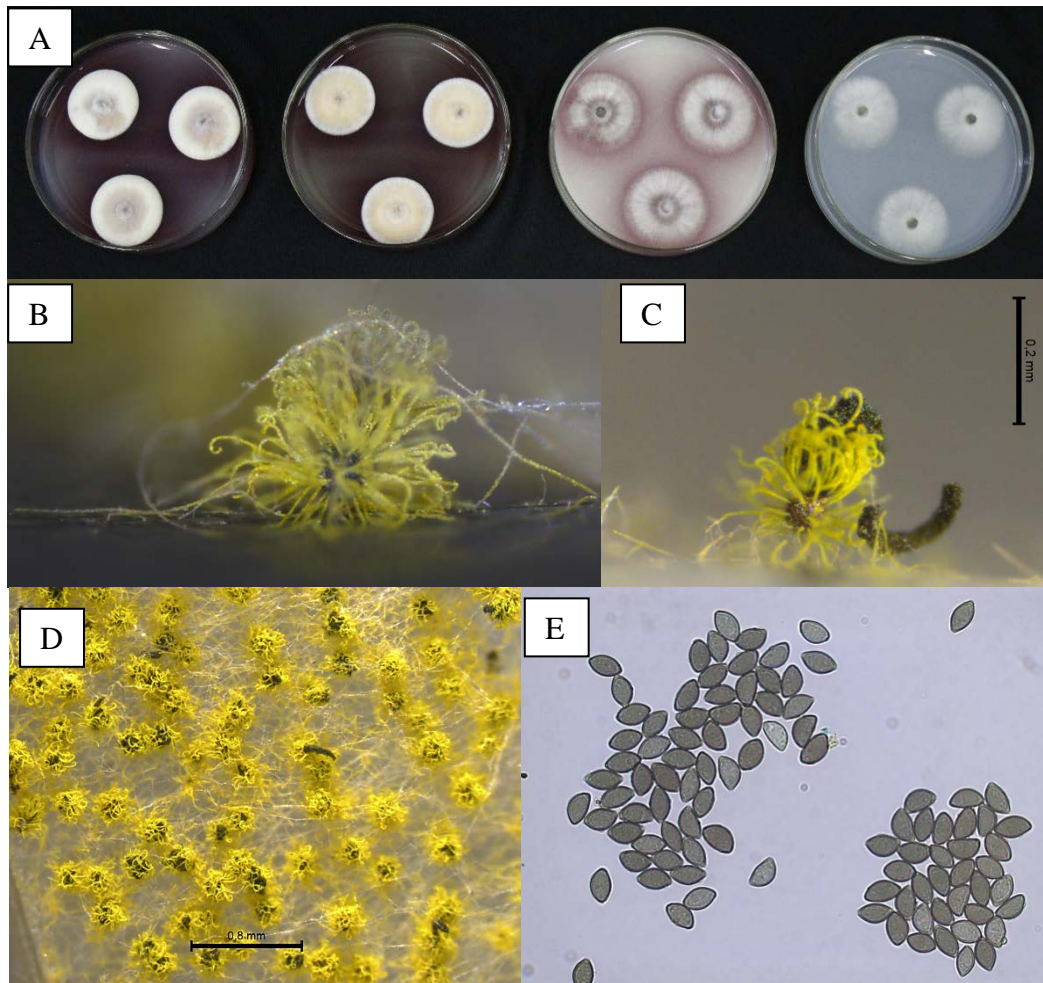


Figura4: A) Colônias de *Arcopilus amazonicus* isolado tipo 2410 nos meios BDA, MEA, OA, SNA da esquerda para a direita com seis dias de crescimento; B) Ascogônia com dezoito dias em meio BDA; C) Ascogônia com dezoito dias em meio SNA; D) Ascogônias vistos de cima em SNA; E) Ascósporos

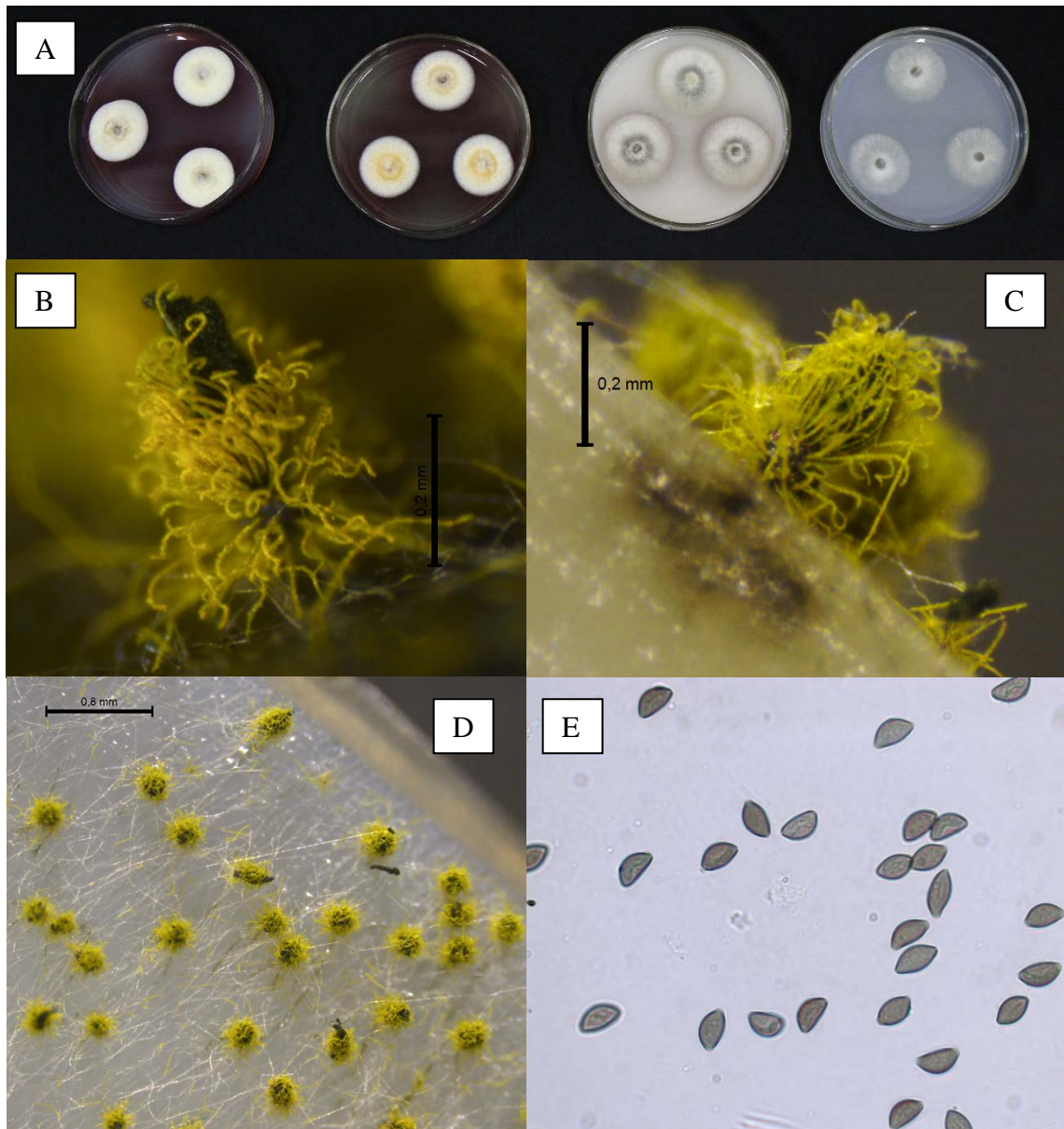


Figura 5: A) Colônias de *Arcopilus tupanensis* isolado tipo 2415 nos meios BDA, MEA, OA, SNA da esquerda para a direita com seis dias de crescimento; B) Ascomata com dezoito dias em meio BDA; C) Ascomata com dezoito dias em meio SNA; D) Ascomatas vistos de cima em meio SNA; E) Ascósporos

Tabela 4: Tabela comparativa de caracterização morfológica contendo sete espécies de *Arcopilus*. TE= Tamanho do esporo; TP= Tamanho do peritécio; APE= Asco parte com esporos; TA= Tamanho do asco; LPL= Largura do pelo lateral; LPT= Largura do pelo terminal.

Espécie	TE	TP	APE	TA	LPL	LPT
<i>Arcopilus aureus</i>	9.4-11 x 4.7-5.6 μm (M= 9.8 x 5.4 μm)	110-140 μm x 105-123 μm (M = 127 X 115 μm)	26 μm	42 x 10	3,5	3,8
<i>A. turgidopilosus</i>	M= 8-11 x 4.7 μm	120-140 x 115-135 μm	15 μm	20-22 x 9.5-11.5	-	-
<i>A. cupreus</i>	8.5-11.5 x 5-5.5 μm (M= 10 x 5.5 μm)	110-120 X 120-130 μm	27 μm	38 x 13	3-3.5	4.5-6
<i>A. fusiformes</i>	15-16 x 4-8.5 μm (M= 15.8 x 5.4 μm)	120 X 102 11 (116-123 X 101-125) μm	32 μm	48 x 11	2.5	3.7-4
<i>A. flavigenus</i>	8.5-14.0 x 5.6-8.5 μm	92-126 x 74-93 μm	-	38.0-47.0 x 14.0-14.7	2.5-3.5	2.5-3.5
<i>A. amazonicus</i>	8,2-10,4 x 4,4-6 μm (M= 9,1 x 5,4 μm)	83,2-98,7 μm x 73,1-93,6 μm (*M= 90 μm x 84 μm)	20 μm	25,1-35 μm x 8,8-11,4 μm (M= 28,7 μm x 10,1 μm)	2,2-4,1 μm (M=3,1 6)	2,2-4 μm (M=3,3)
<i>A. tupanensis</i>	8,2-10,9 x 4,4-6,6 μm (M= 9,2 x 5,3 μm)	70,7-102,6 μm x 70-93 μm (*M= 85,3 μm x 77,8 μm)	22.7 μm	28-35,1 μm x 8,7-11,4 μm (M= 31,1 μm x 10,2 μm)	2,3-4,2 μm (M=3)	1,4-4 μm (M=2,72)

6 CONCLUSÃO, PERSPECTIVAS E TRABALHOS EM ANDAMENTO

O gênero *Arcopilus* possui atualmente apenas cinco representantes e os dados aqui obtidos forneceram mais informações morfológicas e químicas para melhorar a compreensão da delimitação das espécies que compõem o gênero e seu potencial na produção de moléculas com aplicação biotecnológica. Este trabalho descreve duas novas espécies de *Arcopilus* em guaranazeiro, sendo este o primeiro relato do gênero nesta planta e no norte do Brasil. Os

resultados obtidos indicaram que os genes *rpb2* e *tub2* e os caracteres morfológicos tamanho do peritécio, largura do pelo terminal e tamanho do asco são os mais eficazes na resolução da relação entre as espécies desse gênero.

Visto a grande utilização biotecnológica das moléculas produzidas pelo gênero, o presente estudo traz também informações sobre o metaboloma das duas novas espécies descrevendo moléculas já conhecidas e que já possuem aplicações. No entanto, várias das moléculas produzidas por *A. amazonicus* e *A. tupanensis* ainda permanecem não identificadas o que representa uma excelente fonte a ser explorada em termos de diversidade de moléculas, caracterização e bioensaios para compreensão de suas atividades biológicas.

Neste contexto, este trabalho abre portas para a realização de estudos relacionados à identificação química de moléculas e ensaios biológicos voltados à determinação da função e aplicação biotecnológicas das moléculas produzidas por *A. amazonicus* e *A. tupanensis*. Bem como futura caracterização genômica por meio de identificação de genes e vias metabólicas relacionadas à produção de moléculas com efetivo valor comercial e aplicação farmacológica, industrial e agrícola.

A combinação das caracterizações química e genômica são importantes, visto que este casamento é o primeiro passo para transformar os fungos aqui descritos em biofábricas para a produção de moléculas de acordo com o mercado a que estas se destinam. Os estudos com genômica e sua correlação com a produção de metabólitos secundários são fatores indissociáveis para a agregação de valor, elaboração de novas metodologias e obtenção de patentes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANTES, L. P. et al. Mechanisms involved in anti-aging effects of guarana (Paulliniacupana) in *Caenorhabditis elegans*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 9, 2018.

BONADIMAN, Beatriz da Silva Rosa et al. Guarana (Paulliniacupana): Cytoprotective effects on age-related eye dysfunction. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 375-386, 2017.

CADONÁ, Francine C. et al. Guaraná, a Highly Caffeinated Food, Presents in vitro Antitumor Activity in Colorectal and Breast Cancer Cell Lines by Inhibiting AKT/mTOR/S6K and MAPKs Pathways. **Nutrition and cancer**, v. 69, n. 5, p. 800-810, 2017.

CARBONE, Ignazio; KOHN, Linda M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, p. 553-556, 1999.

CHIVERS, Arthur Houston. A monograph of the genera *Chaetomium* and *Ascotricha*. **Memoirs of the Torrey Botanical Club**, v. 14, n. 3, p. 155-240, 1915.

DA SILVA LIMA, Natália et al. The effect of Guarana (Paulliniacupana) on metabolic and inflammatory parameters in adult male mice programmed by maternal obesity. **European journal of nutrition**, p. 1-10, 2018.

DOYLE, Jeffrey. DNA protocols for plants. In: **Molecular techniques in taxonomy**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1991. p. 283-293.

FAN, Yanhua et al. Regulatory cascade and biological activity of Beauveria bassiana oosporein that limits bacterial growth after host death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 9, p. E1578-E1586, 2017.

FENG, Peng et al. Fungal biosynthesis of the bibenzoquinoneoosporein to evade insect immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 36, p. 11365-11370, 2015.

GROENEWALD, J. Z. et al. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology**, v. 75, p. 115-170, 2013.

GUO, Lei et al. Chemical composition, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Scapaniaverrucosa* Heeg. and its endophytic fungus *Chaetomium fusiforme*. **Molecules**, v. 13, n. 9, p. 2114-2125, 2008.

KABBAJ, Fatima Zahra et al. Bioactive metabolites from *Chaetomium aureum*: Structure elucidation and inhibition of the Hsp90 machine chaperoning activity. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 23, n. 1, p. 126-131, 2015.

KANOKMEDHAKUL, Somdej et al. Antifungal Azaphilones from the Fungus *Chaetomium cupreum* CC3003. **Journal of natural products**, v. 69, n. 6, p. 891-895, 2006.

LIMA, Natália da Silva et al. Guarana (*Paullinia cupana*) stimulates mitochondrial biogenesis in mice fed high-fat diet. **Nutrients**, v. 10, n. 2, p. 165, 2018.

LIU, Caiyun; CHANG, Z. Identification of the biocontrol strain LB-2 and determination of its antifungal effects on plant pathogenic fungi. **Journal of Plant Pathology**, p. 1-8, 2018.

LLOYD, G. et al. The chemistry of fungi. Part XXV. Oosporein, a metabolite of *Chaetomium aureum* Chivers. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 2163-2165, 1955.

MANANDHAR JB, Thapliyal N, Cavanaugh KJ (1998) Interaction between pathogenic and saprobic fungi isolated from soybean roots and seeds. **Mycopathologia**:69–75

MAO, BI-ZENG et al. Separation and determination of the bioactivity of oosporein from chaetomiumcupreum. **African journal of biotechnology**, V. 9, N. 36, 2010.

MILLER, Andrew N.; HUHNDORF, Sabine M. Multi-gene phylogenies indicate ascomal wall morphology is a better predictor of phylogenetic relationships than ascospore morphology in the Sordariales (Ascomycota, Fungi). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 35, n. 1, p. 60-75, 2005.

NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v2. **Program distributed by the author**, 2004.

O'DONNELL, Kerry; CIGELNIK, Elizabeth. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus fusarium arenonorthologous. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 7, n. 1, p. 103-116, 1997.

OTOBONE, F. J. et al. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [Paulliniacupana var. sorbilis (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 6, p. 531-535, 2007.

PECHPROME, S. and SOYTONG, K. (1997). Integrated biological control of Durian stem and root rot caused by Phytophthora palmivora. **Proceedings of the First International Symposium on Biopesticides**: 228-233.

PEIXOTO, Herbenya et al. Anti-aging and antioxidant potential of Paulliniacupana var. sorbilis: Findings in Caenorhabditis elegans indicate a new utilization for roasted seeds of guarana. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 61, 2017.

PENG, Wei et al. Two new azaphilone alkaloids dimers from endophyte *Chaetomium fusiforme* of the liverwort *Scapaniaverrucosa* Heeg. **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 45, p. 124-126, 2012.

PEREIRA, Paula Tâmara Vieira Teixeira et al. Dietary supplements and fatigue in patients with breast cancer: a systematic review. **Breast cancer research and treatment**, p. 1-12, 2018.

PORNSURIYA, C. et al. Efficacy of antifungal metabolites from some antagonistic fungi against *Pythium aphanidermatum*. **Journal of Agricultural Technology**, v. 6, n. 2, p. 299, 2010.

RAMBAUT, A. FigTree v1. 3.1: Tree figure drawing tool. 2009.

RANGEL, Marcel P.; MELLO, João Carlos P. de; AUDI, Elisabeth A. Evaluation of neurotransmitters involved in the anxiolytic and panicolytic effect of the aqueous fraction of *Paullinia cupana* (guaraná) in elevated T maze. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 358-365, 2013.

SILVA, C. P. et al. Polyphenols from guaraná after in vitro digestion: Evaluation of bioaccessibility and inhibition of activity of carbohydrate-hydrolyzing enzymes. **Food Chemistry**, v. 267, p. 405-409, 2018.

SOYTONG, K. (1989). Antagonism of *Chaetomium cupreum* to *Pyricularia oryzae*: a case study to biocontrol of rice blast disease. **Thai Phytopathology** 9: 28-33.

SOYTONG, K. (1990). A taxonomic study of *Chaetomium* spp. in Thailand. Abstracts, **4th International Mycological Congress, Regensburg, Germany**, August 28 - September 3, 1990

SOYTONG, K. (1992). Antagonism of chaetomiumcupreum to pyriculariaoryzae. **Journal of plant protection in the tropics** 9: 17-24.

SOYTONG, K. et al. Application of Chaetomium species (Ketomium) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control. **Fungal Divers**, v. 7, p. 1-15, 2001

TAKESHITA H, Anchel (1965) production of oosporein and its leuco form by basidiomycete species. **science** 147(3654):152–153

TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TANIGUCHI, Makoto et al. Antimicrobial and Respirationinhibitory Activities of Oosporein. *Agricultural and biological chemistry*, v. 48, n. 4, p. 1065-1067, 1984.

TANN, Huyly; SOYTONG, Kasem. Bioformulations and nano product from Chaetomiumcupreum CC3003 to control leaf spot of rice var. SenPidoa in Cambodia. **International Journal of Plant Biology**, v. 7, n. 1, 2017.

TERRY, BRIAN J. et al. Inhibition of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase by the natural product oosporein. **TheJournal of antibiotics**, v. 45, n. 2, p. 286-288, 1992.

VELOSO, C. F. et al. Neuroprotective Effects of Guarana (Paulliniacupana Mart.) against Vincristine in Vitro Exposure. **The journal of prevention of Alzheimer's disease**, v. 5, n. 1, p. 65-70, 2018.

VENTURA, Sandra et al. Effects of Paulliniacupana extract on lamotrigine pharmacokinetics in rats: A herb-drug interaction on the gastrointestinal tract with potential clinical impact. **Food and Chemical Toxicology**, v. 115, p. 170-177, 2018.

VILAVONG, Somlit et al. Application of Bio-Formulation of Chaetomium for Biocontrol of Colletotrichum gloeosporioides Causing Coffee Anthracnose in Arabica Variety in Laos. **International Journal of Agricultural Technology**, v. 12, n. 7.1, p. 1241-1247, 2016.

WAINWRIGHT, M.; BETTS, R. P.; TEALE, D. M. Antibiotic activity of oosporein from Verticillium psalliotae. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 86, n. 1, p. 168-170, 1986.

WANG, X. W. et al. Diversity and taxonomy of Chaetomium and chaetomium-like fungi from indoor environments. **Studies in mycology**, v. 84, p. 145-224, 2016.

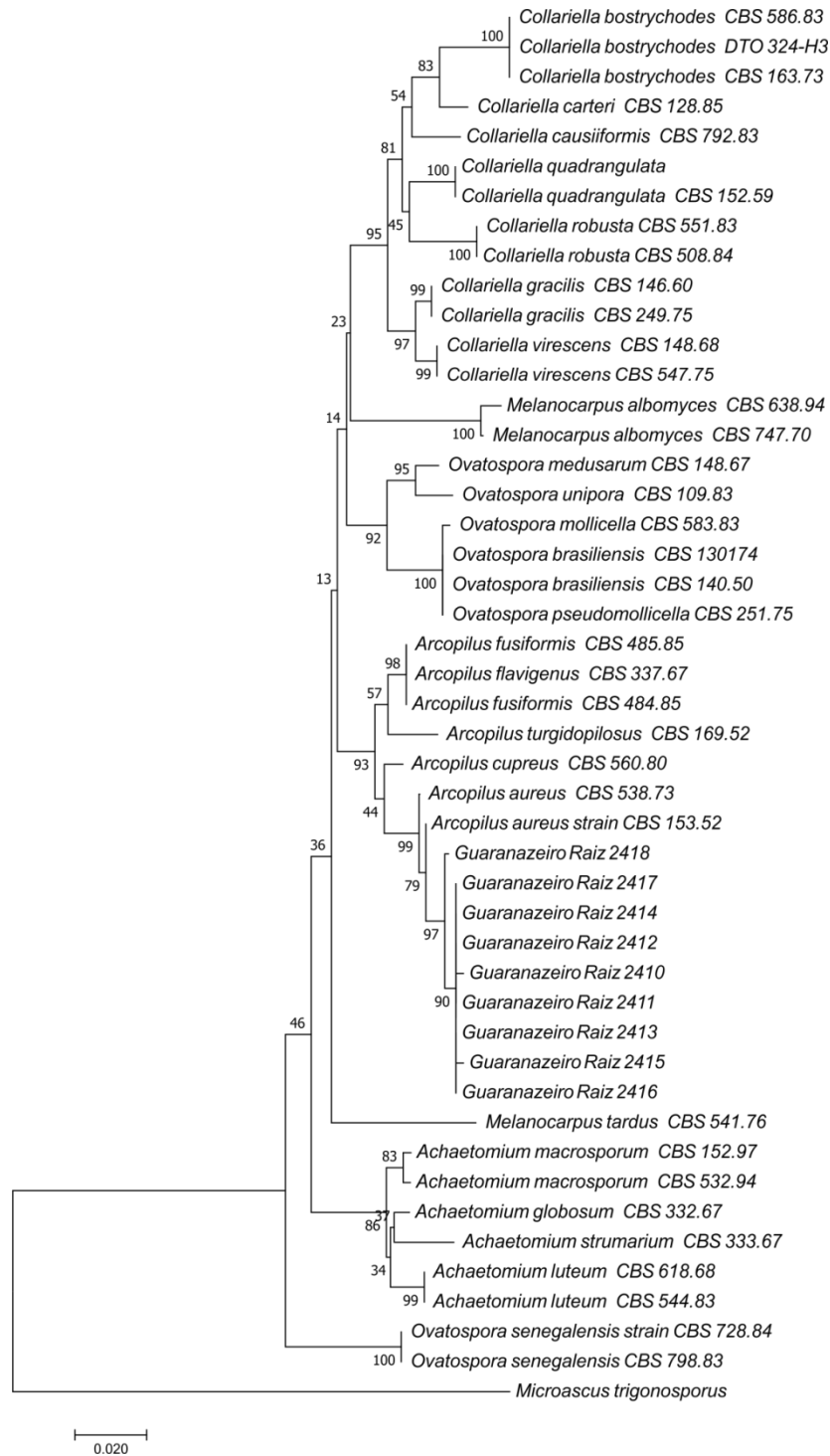
WHITE, Thomas J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

ZHANG, Qiang et al. Chemical and bioactive diversities of the genus Chaetomium secondary metabolites. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 12, n. 2, p. 127-148,

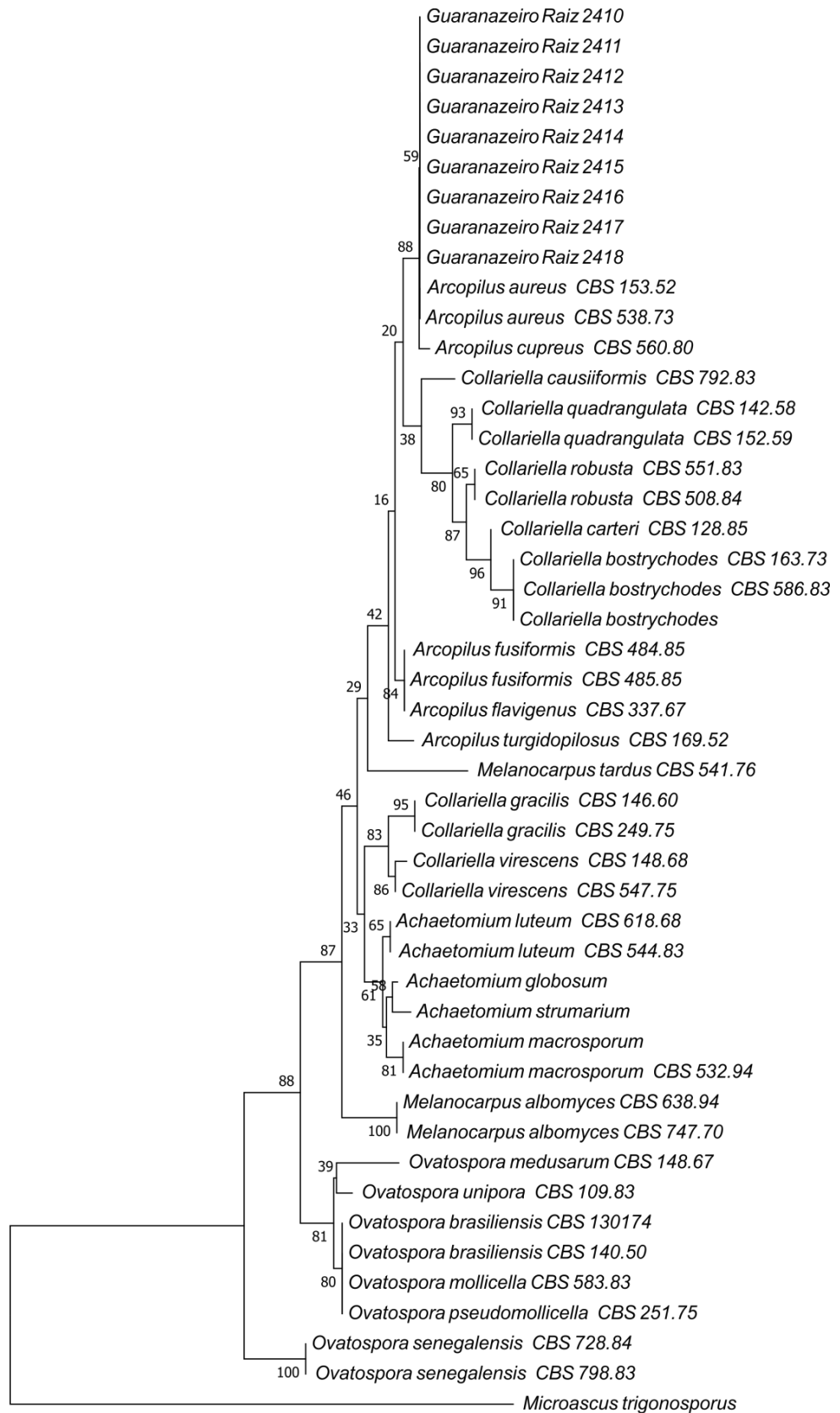
ZOPF, Wilhelm. **Zur Entwicklungsgeschichte der Ascomyceten: Chaetomium**. Druck von E. Blochmann & Sohn in Dresden, 1881.

8 APÊNDICES

APÊNDICE 1- Inferência filogenética baseada na região ITS/18S pelo método NeighborJoining (NJ)

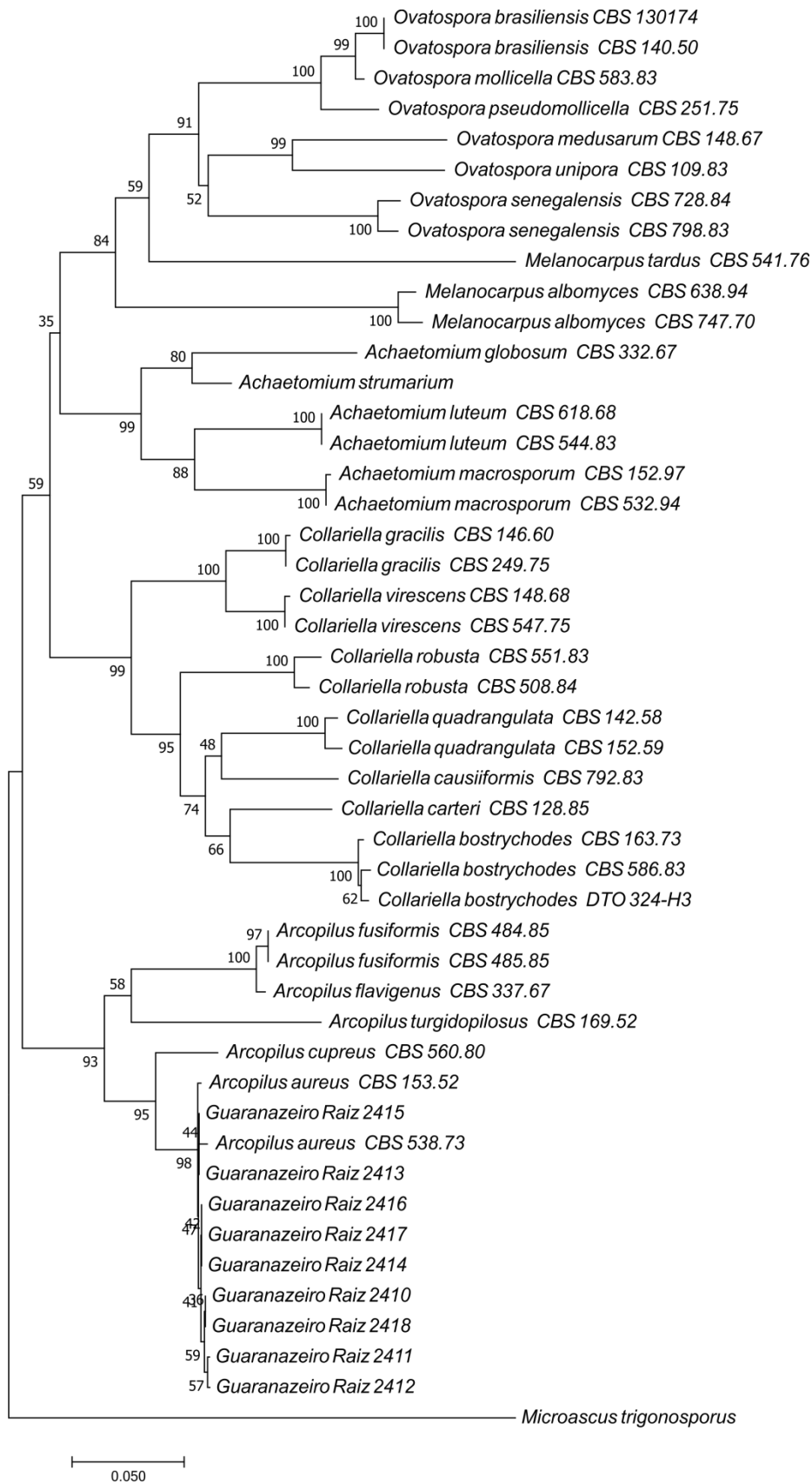


APÊNDICE 2-Inferência filogenética baseada na região LSU/28S pelo método NeighbourJoining (NJ)

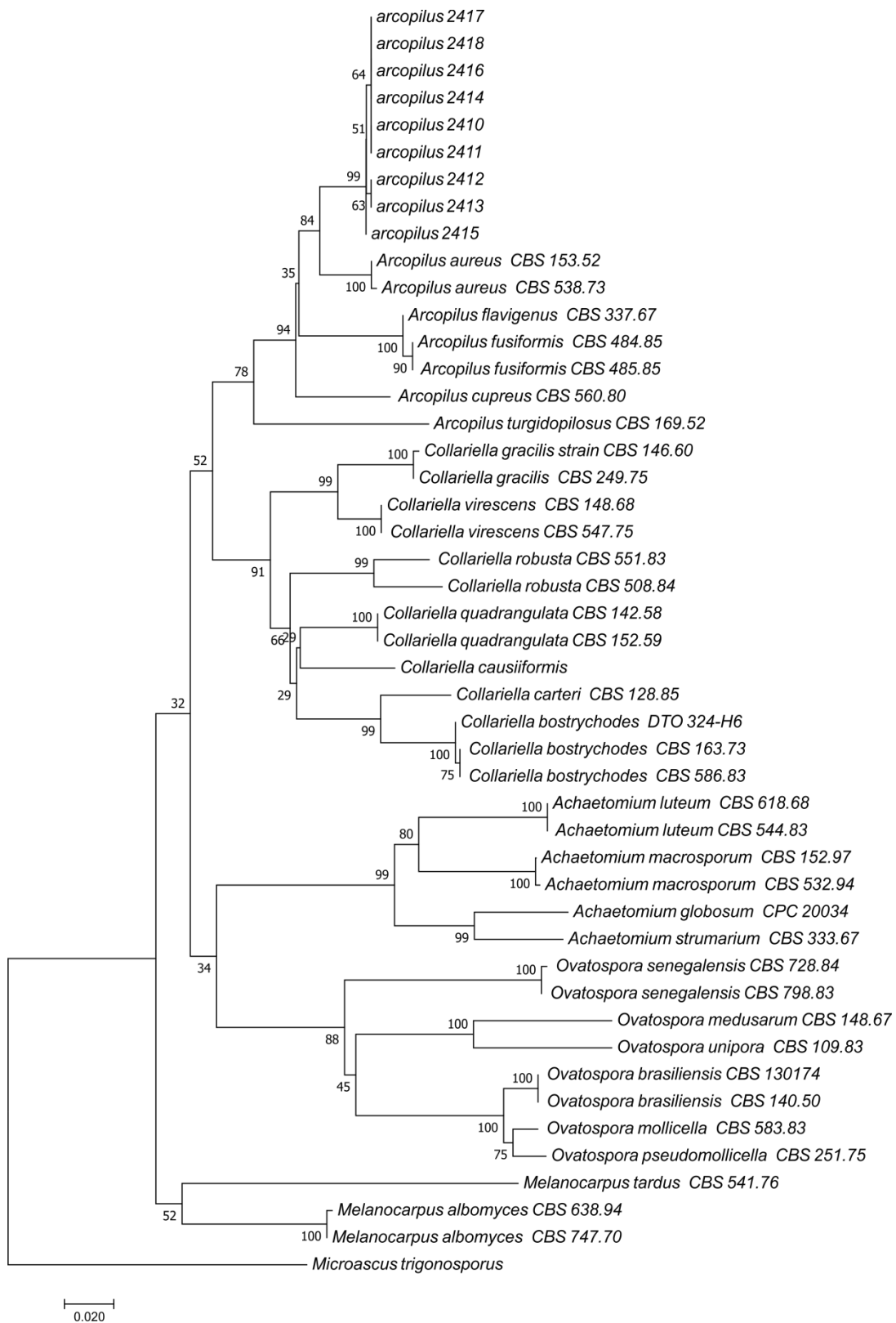


0.0100

APÊNDICE 3-Inferência filogenética baseada na região TUB2 pelo método NeighborJoining (NJ)



APÊNDICE 4-Inferência filogenética baseada na região RPB2 pelo método NeighbourJoining (NJ)



APÊNDICE 5-Inferência filogenética baseada na região TUB2 +RPB2 pelo método NeighbourJoining (NJ)

