



FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *PIPER PELTATUM* E *PEPEROMIA PELLUCIDA*: CARACTERIZAÇÃO, METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Edson Luís Marcon

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, PPGQ, da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadores: Afonso Duarte Leão de Souza  
Antônia Queiroz Lima de Souza

Manaus  
Junho de 2013

FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *PIPER PELTATUM* E *PEPEROMIA PELLUCIDA*: CARACTERIZAÇÃO, METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Edson Luís Marcon

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA (PPGQ) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM QUÍMICA.

Examinada por:

---

Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza,

---

Prof. Dr. Andersson Barison,

---

Prof. Dr. Adrian Martin Pohlit,

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Belém Pinheiro,

---

Prof. Dr. José Odair Pereira,

MANAUS, AM – BRASIL

JUNHO DE 2013

M321f

Marcon, Edson Luís

Fungos endofíticos de *Piper peltatum* e *Peperomia pellucida*: caracterização, metabólitos secundários e atividades biológicas / Edson Luís Marcon. - Manaus: UFAM, 2013.  
xxvii, 117 f.; il.

Tese (Doutorado em Química) — Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

Orientador: Afonso Duarte Leão de Souza

Orientadora: Antônia Queiroz Lima de Souza

1. Produtos naturais 2. Metabólitos secundários 3. Fungos endofíticos I. Souza, Afonso Duarte Leão de (Orient.) II. Souza, Antônia Queiroz Lima de III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU (2007): 542:633.841(043.3)

*À memória de minha mãe,  
Alda Maria Zat Marcon*

# Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos meus orientadores, pela paciência.

À Priscila, pela ajuda em parte do trabalho.

Aos alunos do laboratório de produtos naturais, pela ajuda e amizade.

Agradecimento especial aos colegas do LabGEMMA, por toda a ajuda durante esses anos de trabalho.

Ao grupo da Prof. Anderson Barison da UFPR, por realizar os testes de RMN.

Ao grupo da Prof<sup>a</sup>. Carmen L. Cardoso da USP de Ribeirão Preto, por realizar os testes de atividade antiacetilcolinesterase e antioxidante nas amostras.

Ao grupo da Prof<sup>a</sup>. Cláudia do Ó Pessoa, da UFC, por realizar os testes de citotoxicidade.

Ao grupo da Prof. Flávio Henrique-Silva da UFSCar, pelo auxílio nos testes genéticos.

À Capes pelo auxílio financeiro.

O software *Marvin* fornecido pela *ChemAxon* (<http://www.chemaxon.com>) foi utilizado para construir as estruturas das moléculas. *Marvin* 5.5.0.1 – 2011.

A todos, muito obrigado.

Resumo da Tese apresentada à PPGQ/UFAM como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Química

FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *PIPER PELTATUM* E *PEPEROMIA PELLUCIDA*: CARACTERIZAÇÃO, METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Edson Luís Marcon

Junho/2013

Orientadores: Afonso Duarte Leão de Souza  
Antônia Queiroz Lima de Souza

Programa de Pós Graduação em Química: PPGQ

Um total de 282 fungos endofíticos foram coletados nas duas plantas, que foram classificados em 19 grupos, de acordo com suas características morfológicas. Destes, 12 grupos tiveram o gênero identificado (*Penicillium*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Phomopsis*, *Cephalosporium*, *Bionectria*, *Xylaria*, *Aspergillus*, *Lirula*, *Trichoderma* e *Pestalotiopsis*). Cinco cepas (*Penicillium*, *Fusarium*, *Cephalosporium*, e duas *Xylaria*) foram selecionadas para cultura em larga escala, cujos extratos foram fracionados. Cinco substâncias isoladas foram identificadas (austdiol, 19-20 epoxi citocalasina Q, citocalasina D, 7-decloro griseofulvina e 5-metoxicarbonil-meleína), sendo que uma delas – austdiol – foi produzida em grande quantidade por um fungo do gênero *Fusarium*, sendo esta o primeiro relato desta substância sendo produzida por um fungo da classe *Hypocreales*. Os fungos endofíticos se mostraram uma boa fonte de substâncias com atividade biológica.

Abstract of Thesis presented to PPGQ/UFAM as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Chemistry

ENDOPHYTIC FUNGI OF *PIPER PELTATUM* AND *PEPEROMIA PELLUCIDA*: CHARACTERIZATION, SECONDARY METABOLITES AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Edson Luís Marcon

June/2013

Advisors: Afonso Duarte Leão de Souza

Antônia Queiroz Lima de Souza

Program of Post-Graduation in Chemistry: PPGQ

A total of 282 endophytic fungi were collected from these two plants, which were classified into 19 groups according to their morphological characteristics. Of these groups, 12 had their genus identified (*Penicillium*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Phomopsis*, *Cephalosporium*, *Bionectria*, *Xylaria*, *Aspergillus*, *Lirula*, *Pestalotiopsis* and *Trichoderma*). Five strains (*Penicillium*, *Fusarium*, *Cephalosporium*, and two *Xylaria*) were selected for large-scale culture, whose extracts were fractionated. Five isolated substances were identified (austdiol 19-20 epoxy cytochalasin Q, cytochalasin D, 7-dechloro griseofulvin and 5-methoxycarbonyl-melein), one of which – austdiol – was produced in large quantities by a fungus of the *Fusarium* genus, which is the first report of this substance being produced by a fungus of the *Hypocreales* class. The endophytic fungi proved be a good source of substances with biological activity.

# Sumário

<b>Lista de Figuras</b>	<b>xii</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xvii</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>xviii</b>
<b>Lista de Símbolos</b>	<b>xxi</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Introdução . . . . .	1
1.2 Fungos . . . . .	2
1.3 O reino Fungi . . . . .	2
1.4 Algumas características dos fungos . . . . .	5
1.5 Interações de fungos com outros organismos . . . . .	5
1.5.1 Algas e fungos . . . . .	6
1.5.2 Bactérias e fungos . . . . .	6
1.5.3 Plantas e fungos . . . . .	7
1.5.4 Animais superiores e fungos . . . . .	8
1.5.5 Insetos e fungos . . . . .	8
1.5.6 Nematóides e fungos . . . . .	9
1.5.7 Fungos com Fungos . . . . .	10
1.6 Fungos Endofíticos . . . . .	10
1.6.1 Definição . . . . .	10
1.6.2 Interações . . . . .	11
1.7 Biossíntese de compostos em fungos . . . . .	13
1.7.1 Produção de metabólitos secundários . . . . .	13
1.7.1.1 A via do acetato . . . . .	15
1.7.1.2 A via do chiquimato . . . . .	16
1.7.1.3 A via do ácido mevalônico e a via do 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato . . . . .	16
1.7.1.4 Metabólitos a partir de aminoácidos . . . . .	17
1.7.1.5 Alcalóides . . . . .	17

1.7.1.5.1	Alcalóides indólicos . . . . .	19
1.7.1.6	Peptídeos não-ribossomais . . . . .	19
1.8	Importância dos fungos . . . . .	21
1.8.1	Ecologia . . . . .	21
1.8.2	Agricultura . . . . .	21
1.8.3	Alimentação . . . . .	22
1.8.4	Tratamento de resíduos . . . . .	22
1.8.5	Produção de metabólitos bioativos . . . . .	22
1.9	As plantas hospedeiras . . . . .	24
<b>2</b>	<b>Objetivos</b> . . . . .	<b>27</b>
2.1	Geral . . . . .	27
2.2	Específicos . . . . .	27
<b>3</b>	<b>Materiais e métodos</b> . . . . .	<b>28</b>
3.1	Coleta de material vegetal . . . . .	28
3.2	Tratamento do material vegetal . . . . .	28
3.3	Meios de cultura de fungos . . . . .	29
3.4	Isolamento e purificação dos fungos . . . . .	30
3.4.1	Fungos com esporos . . . . .	31
3.4.2	Fungos sem esporos . . . . .	31
3.5	Identificação e preservação dos fungos . . . . .	32
3.6	Cultivo dos fungos . . . . .	33
3.6.1	Cultivo em pequena escala . . . . .	33
3.6.1.1	Fungos cultivados . . . . .	34
3.6.2	Cultivo em larga escala . . . . .	34
3.6.2.1	Fungos cultivados . . . . .	35
3.7	Obtenção de extratos . . . . .	37
3.7.1	Fracionamento preliminar dos extratos . . . . .	39
3.7.1.1	Fungo 232 <i>Fusarium solani</i> . . . . .	39
3.7.1.2	Fungo 325 <i>Xylaria</i> sp. . . . .	40
3.7.1.3	Fungo 331 <i>Xylaria</i> sp. . . . .	40
3.7.1.4	Fungo 353 <i>Cephalosporium</i> sp. – <i>shaker</i> . . . . .	41
3.7.1.5	Fungo 353 <i>Cephalosporium</i> sp. – <i>shaker</i> – micélio . . . . .	41
3.7.1.6	Fungo 353 <i>Cephalosporium</i> sp. cultivado em meio BDL . . . . .	42
3.7.2	Fracionamento em coluna cromatográfica . . . . .	42
3.7.2.1	Fungo 232 <i>Fusarium solani</i> . . . . .	43
3.7.2.2	Fungo 331 <i>Xylaria</i> sp. . . . .	43
3.7.2.3	Fungo 325 <i>Xylaria</i> sp. . . . .	44

3.7.2.3.1	Fração (2) do fungo 325 <i>Xylaria</i> sp. . . . .	44
3.7.3	HPLC . . . . .	44
3.7.3.1	331 <i>Xylaria</i> sp. . . . .	45
3.7.3.2	Fração (1) do fungo 325 <i>Xylaria</i> sp. . . . .	45
3.7.3.3	Fração (10) do fungo 325 <i>Xylaria</i> sp. . . . .	47
3.7.4	SPE . . . . .	48
3.7.4.1	Frações (8), (11) e (13) do fungo 325 <i>Xylaria</i> sp. . . . .	48
3.8	Espectrometria de massas . . . . .	49
3.9	Ensaio biológicos . . . . .	49
3.9.1	Atividade citotóxica . . . . .	49
3.9.2	Ensaio Anticândida . . . . .	50
3.9.3	Atividades anti-acetilcolinesterase e antioxidante . . . . .	50
3.9.4	Atividade antimicrobiana . . . . .	51
3.10	Sequenciamento genético . . . . .	51
<b>4</b>	<b>Resultados e discussão</b>	<b>52</b>
4.1	Fungos isolados . . . . .	52
4.1.1	Gêneros de fungos isolados . . . . .	53
4.1.2	Frequências dos gêneros fúngicos . . . . .	55
4.2	Ensaio biológicos com extratos brutos . . . . .	57
4.2.1	Atividade citotóxica . . . . .	57
4.2.2	Ensaio Anticândida . . . . .	58
4.2.3	Atividades anti-acetilcolinesterase e antioxidante . . . . .	58
4.3	Ensaio biológicos com frações . . . . .	59
4.3.1	Atividade Citotóxica . . . . .	59
4.3.2	Atividade antimicrobiana . . . . .	59
4.4	Identificação das substâncias isoladas . . . . .	61
4.4.1	Identificação de <i>Pp 01</i> . . . . .	61
4.4.2	Identificação <i>331F05</i> . . . . .	66
4.4.3	Identificação de <i>F0103</i> . . . . .	76
4.4.4	Identificação de <i>F1008</i> . . . . .	80
4.4.5	Identificação de <i>F1013</i> . . . . .	85
4.5	Identificação de substâncias por espectrometria de massas . . . . .	92
4.6	Ensaio biológicos com substâncias puras . . . . .	96
4.6.1	Ensaio antimicrobianos . . . . .	96
4.6.2	Atividades anti-AChE e antioxidante . . . . .	96
4.6.3	Atividades antitumoral . . . . .	96
<b>5</b>	<b>Conclusão</b>	<b>98</b>

<b>Referências</b>	<b>100</b>
<b>A – Figuras</b>	<b>109</b>

# Lista de Figuras

1.1	Zigósporo. Barra: 20 $\mu\text{m}$ . (GHERBAWY <i>et al.</i> , 2010) . . . . .	3
1.2	Zoósporo. (GARBELOTTO e FLORANCE, 2004) . . . . .	3
1.3	Ascos e ascósporos de <i>Morchella elata</i> (MERRITT COLLEGE, 2008)	3
1.4	Basídeos com esporos (CLARK) . . . . .	4
1.5	Classificação dos fungos: (A) Classificação tradicional; (B) Classificação segundo BLACKWELL e SPATAFORA (2004); (C) Classificação segundo HIBBETT <i>et al.</i> (2007). . . . .	5
1.6	Árvore filogenética dos fungos, segundo EBERSBERGER <i>et al.</i> (2012)	6
1.7	Bactérias no interior da hifa. Microscopia com luz branca e modo fluorescente; a barra de escala representa 30 $\mu\text{m}$ (PARTIDA-MARTINEZ <i>et al.</i> , 2007). . . . .	7
1.8	Insetos mortos por fungos endoparasitas do gênero <i>Cordyceps</i> (ATTENBOROUGH, 2008) . . . . .	9
1.9	Fungos endofíticos (indicados por setas) no interior de células das folhas. Esquerda: hifa do fungo <i>Rhodocladia parkeri</i> nas células de <i>Pseudotsuga taxifolia</i> . Direita: hifa do fungo <i>Phyllosticta abietis</i> nas células de <i>Abies grandis</i> . Aumento de 500 $\times$ (STONE <i>et al.</i> , 2004) . . . . .	11
1.10	Principais rotas metabólicas em fungos (adaptado de DEACON (2006), p. 123). . . . .	14
1.11	Aflatoxina B1 (esquerda), composto tóxico e carcinogênico, e a lovastatina, medicamento utilizado para reduzir o colesterol, ambos derivados da via do acetato. . . . .	16
1.12	Biosíntese de terpenos (adaptado de KELLER <i>et al.</i> (2005)). . . . .	17
1.13	Exemplos de alcalóides: (1) morfina; (2) coniina; (3) cafeína; (4) nicotina. . . . .	18
1.14	Da esquerda para a direita: ergotamina, ácido (+)-lisérgico e o LSD. . . . .	18
1.15	(A) triptofano; (B) serotonina; (C) fenilalanina. . . . .	19
1.16	Ciclosporina A (adaptado de METZLER (2005), p. 488). . . . .	20

1.17	Classificação dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos (adaptado de SUÁREZ e GUDIOL (2009)) e as estruturas da penicilina G (acima) e Cefalosporina C (abaixo). . . . .	21
1.18	(A) tetraciclina; (B) levofloxacina, uma fluoroquinolona; e (C) cefixima e (D) ceftriaxona, cefalosporinas de terceira geração. . . . .	23
1.19	Compostos 1 (A) e 2 (B) isolados por XU <i>et al.</i> (2006) em <i>Pe. pellucida</i> , e (C) peperomina E . . . . .	25
1.20	<i>Piper peltatum</i> (esquerda) e <i>Peperomia pellucida</i> . . . . .	26
3.1	Material vegetal de <i>Pi. peltatum</i> (esquerda) e <i>Pe. pellucida</i> . . . . .	29
3.2	Crescimento fúngico a partir do material vegetal das plantas . . . . .	31
3.3	Fungo crescendo a partir de um único esporo . . . . .	31
3.4	Da esquerda para a direita: fungos conservados pelo método de Castellani, em óleo mineral e em microtubos com água e glicerol a 20% . . . . .	33
3.5	Esquerda: fungo 216 (cinza) na placa de Petri. Direita: cristais precipitados pelo fungo 232 ( <i>Fusarium</i> ) ao microscópio; barra: 30 $\mu$ m . . . . .	34
3.6	O fungo 353 ( <i>Cephalosporium</i> sp.), cultivado de maneiras diferentes. Esquerda: sem agitação; direita: com agitação . . . . .	35
3.7	Fungo <i>Penicillium</i> sp. (216) e seu caldo fermentado . . . . .	35
3.8	Fungo <i>Fusarium solani</i> na placa de Petri, nos frascos de cultura e seu caldo fermentado . . . . .	36
3.9	Fungo <i>Xylaria</i> sp. (325) na placa de Petri e nos frascos, após cultura . . . . .	36
3.10	Fungo <i>Xylaria</i> sp. (331) na placa de Petri e nos frascos, após cultura . . . . .	37
3.11	Fungo <i>Cephalosporium</i> na placa de Petri, cultivado sem agitação (centro) e cultivado no <i>shaker</i> . . . . .	37
3.12	Filtração do meio fermentado com funil de Büchner (esquerda) e membrana microporosa (direita). . . . .	38
3.13	Fracionamento do extrato do fungo 232 ( <i>Fusarium solani</i> ) na coluna filtrante . . . . .	39
3.14	Fracionamento do extrato de micélio do fungo 232 ( <i>Fusarium solani</i> ) na coluna filtrante . . . . .	40
3.15	Fracionamento do extrato do caldo fermentado do fungo 325 <i>Xylaria</i> na coluna filtrante . . . . .	40
3.16	Fracionamento do extrato do caldo fermentado do fungo 331 <i>Xylaria</i> na coluna filtrante . . . . .	41
3.17	Fracionamento do extrato do caldo fermentado do fungo 353 cultivado no <i>shaker</i> em meio especial (ME). . . . .	41
3.18	Fracionamento do extrato do micélio do fungo 353 cultivado no <i>shaker</i> em meio especial (ME). . . . .	42

3.19	Fracionamento do extrato do caldo fermentado do fungo 353 cultivado em modo estático. . . . .	42
3.20	Obtenção das amostras <i>Pp02</i> , <i>Pp03</i> e <i>Pp04</i> . . . . .	43
3.21	Separação da fração (3) do extrato do caldo de cultura do fungo 331 <i>Xylaria</i> . . . . .	44
3.22	Cromatograma da separação por HPLC semi-preparativo da amostra (5) proveniente do extrato do fungo 325 ( <i>Xylaria</i> sp.) . . . . .	46
3.23	Esquema simplificado das etapas de separação do composto 331F05 . . . . .	46
3.24	Esquema de obtenção da amostra <i>F0103</i> . . . . .	46
3.25	Cromatograma da separação onde foi obtida a amostra <i>F0103</i> . . . . .	47
3.26	Cromatograma da separação da fração (10) em HPLC preparativa . . . . .	47
3.27	Equipamento para extração em fase sólida (SPE) . . . . .	48
3.28	Esquema simplificado da obtenção das amostras <i>F1008</i> , <i>F1011</i> e <i>F1013</i> . . . . .	48
3.29	Aparelhos de espectrometria de massas da <i>Thermo Scientific</i> : triplo-quadrupolo (esquerda) e <i>ion-trap</i> (direita). . . . .	49
4.1	Gêneros de fungos encontrados nas plantas hospedeiras . . . . .	53
4.2	Microscopia eletrônica de varredura mostrando o apressório (A) e o conídio colapsado (C) do fungo <i>Colletotrichum higginsianum</i> na superfície de uma folha. Barra: 5 $\mu\text{m}$ . fonte: KLEEMANN <i>et al.</i> (2012) . . . . .	56
4.3	Gêneros de fungos coletados por meio de cultura . . . . .	57
4.4	Da esquerda para a direita: fração (3) no teste contra <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> e <i>P. avellani</i> . . . . .	60
4.5	Espectro infravermelho do composto <i>Pp 01</i> . . . . .	62
4.6	Fragmentação do composto <i>Pp 01</i> ( $[\text{M}+\text{H}]^+ = 237$ ) no espectrômetro triplo-quadrupolo com fonte APCI e energia de colisão de 10 eV. . . . .	62
4.7	RMN de hidrogênio de <i>Pp 01</i> a 400 MHz em DMSO deuterado. . . . .	64
4.8	Algumas das correlações do composto <i>Pp 01</i> . . . . .	65
4.9	Estrutura do Austdiol e cristais ao microscópio . . . . .	66
4.10	Espectro de massas de <i>331F05</i> por ESI-ITMS . . . . .	66
4.11	Fragmentação do íon 524 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) . . . . .	67
4.12	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <i>331F05</i> em $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz. Os multipletos numerados podem ser vistos em maiores detalhes na figura 4.13. . . . .	68
4.13	Multipletos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <i>331F05</i> . Constantes de acoplamento <i>J</i> em Hertz. . . . .	69
4.14	COSY, HSQC, HMBC, acoplamentos e correlações para o hidrogênio em 0,83 ppm do composto <i>331F05</i> . . . . .	70

4.15	COSY, HMBC, acoplamentos e correlações para o hidrogênio em 1,62 ppm do composto <i>331F05</i> . . . . .	71
4.16	COSY, HSQC, HMBC, acoplamentos e correlações para os hidrogênios em 1,18 ppm e 2,72 ppm do composto <i>331F05</i> . . . . .	71
4.17	COSY, HSQC, HMBC, acoplamentos e correlações para o hidrogênio em 2,34 ppm do composto <i>331F05</i> . . . . .	72
4.18	COSY, HSQC, HMBC, acoplamentos e correlações para o hidrogênio em 2,21 ppm do composto <i>331F05</i> . . . . .	73
4.19	COSY, HSQC, HMBC, acoplamentos e correlações para os hidrogênios em 2,85 ppm, 3,60 ppm e na fenila do composto <i>331F05</i> . . . . .	74
4.20	Estrutura da 19,20-epoxicitocalasina Q . . . . .	76
4.21	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra <i>F0103</i> em $\text{CDCl}_3$ a 400 MHz. . . . .	77
4.22	Multipletos: ddq, dd e dd da amostra <i>F0103</i> . . . . .	78
4.23	Correlações HMBC da amostra <i>F0103</i> . . . . .	79
4.24	Estrutura da <i>5-metoxicarbonil-meleína</i> . . . . .	80
4.25	Fragmentação do composto <i>F1008</i> no triplo-quadrupolo com fonte APCI. . . . .	81
4.26	multipletos no RMN de $^1\text{H}$ do composto <i>F1008</i> . . . . .	81
4.27	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <i>F1008</i> em metanol deuterado, 400 MHz. . . . .	82
4.28	COSY (vermelho) e HMBC (verde) para o composto <i>F1008</i> . . . . .	83
4.29	Estrutura do composto <i>F1008</i> . . . . .	84
4.30	Estrutura 3D da 7-decloro griseofulvina. . . . .	85
4.31	Espectros de massas do composto <i>F1013</i> . . . . .	86
4.32	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <i>F1013</i> em metanol deuterado, 400 MHz. . . . .	87
4.33	Alguns multipletos do $^1\text{H}$ RMN de <i>F1013</i> . . . . .	88
4.34	Algumas correlações presentes no espectro COSY e HMBC de <i>F1013</i> . . . . .	89
4.35	Estrutura da Citocalasina D . . . . .	90
4.36	Espectros de massas obtidos no espectrômetro triplo-quadrupolo com a fragmentação do íon $m/z = 524$ encontrado nos extratos do caldo fermentado dos fungos 317, 324, 325 e 331. Energia de colisão: 27 eV, fonte APCI . . . . .	93
4.37	Espectros de massas obtidos no espectrômetro triplo-quadrupolo com a fragmentação do íon $m/z = 508$ encontrado nos extratos do caldo fermentado dos fungos 325, 331, 324 e 317. Energia de colisão: 27 eV, fonte APCI . . . . .	94

4.38	Espectros de massas obtidos no espectrômetro <i>ion-trap</i> com a fragmentação do íon $m/z = 319$ encontrado nos extratos do caldo fermentado dos fungos 325, 331, 324 e 317. Energia de colisão: 18 eV, fonte APCI . . . . .	95
A.1	Espectro HSQC de <i>Pp 01</i> a 400 MHz em DMSO deuterado. . . . .	110
A.2	Espectro HMBC de <i>Pp 01</i> a 400 MHz em DMSO deuterado. . . . .	111
A.3	Espectro de RMN de DEPT-135 (acima) e $^{13}\text{C}$ do composto <i>331F05</i> . . . . .	112
A.4	Espectro COSY do composto <i>331F05</i> . . . . .	113
A.5	Espectro HSQC do composto <i>331F05</i> . . . . .	114
A.6	Espectro HMBC do composto <i>331F05</i> . . . . .	115
A.7	Espectro COSY do composto <i>F1013</i> . . . . .	116
A.8	Espectro HMBC do composto <i>F1013</i> . . . . .	117

# Lista de Tabelas

3.1	Meio de cultura especial (ME)	30
4.1	Taxas de colonização por fungos (%) nos tecidos. Espaços em branco: nenhum fungo coletado	54
4.2	Generos de fungos presentes nos tecidos da planta	55
4.3	Atividade citotóxica de extratos fúngicos brutos – Inibição de Cres- cimento (%)	58
4.4	Extratos fúngicos brutos com atividade anticândida	59
4.5	Atividades Anti-AChE e antioxidante	60
4.6	Atividade citotóxica de frações dos extratos – IC (%)	61
4.7	Atividade antimicrobiana de frações da coluna filtrante do fungo 232	61
4.8	Dados de RMN de <i>Pp 01</i>	65
4.9	Dados de RMN de <i>331F05</i> – 19,20-epoxicitocalasina Q	75
4.10	Dados de RMN de <i>F0103</i>	79
4.11	Dados de RMN de <i>F1008</i>	84
4.12	Dados de RMN de <i>F1013</i>	91
4.13	Atividades Anti-AChE e antioxidante	96

# Lista de Abreviaturas

AChE	<i>acetylcholinesterase enzyme</i> , p. 50
APCI	<i>Atmospheric Chemical Pressure Ionization</i> – Ionização química à pressão atmosférica, p. 49
Aveia	Meio de cultura similar ao ISP2, trocando o amido por farinha de aveia, p. 29
BDA	Meio de cultura feito com Batata Dextrose Ágar, p. 29
BDL	Batata, Dextrose e extrato de Levedura, p. 35
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> , p. 51
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> – software para comparar informações de sequências de aminoácidos de proteínas ou nucleotídeos de sequência de DNA, p. 32
C18	Coluna cromatográfica preenchida com octadecilsilano, p. 47
C8	Coluna cromatográfica preenchida com octilsilano, p. 48
CCD	Cromatografia de Camada Delgada, p. 39
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, p. 43
COSY	CORrelation SpectroscopY, p. 70
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> , p. 70
DMAPP	Dimetilalil difosfato, p. 16
DMSO	Dimetilsulfóxido, um solvente, p. 50
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , p. 32
DPM	Desvio-padrão da média, p. 50
DPPH	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> , p. 51

ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i> – Ionização por <i>spray</i> de elétrons, p. <a href="#">49</a>
FCF	Fração do Caldo Fermentado, p. <a href="#">61</a>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> , p. <a href="#">74</a>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> , p. <a href="#">63</a>
HPLC	<i>High Performance Liquid chromatography</i> , p. <a href="#">43</a>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> , p. <a href="#">62</a>
IC (%)	Percentual de inibição do crescimento celular, p. <a href="#">58</a>
IPP	Isopentenil difosfato, p. <a href="#">16</a>
ISP2	Meio de cultura feito com amido, dextrose, extrato de malte, extrato de levedura e ágar, p. <a href="#">29</a>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> , p. <a href="#">32</a>
IV	Infravermelho, p. <a href="#">61</a>
LSD	lysergic acid diethylamine – dietilamina do ácido lisérgico, p. <a href="#">18</a>
ME	Meio de cultura especial desenvolvido para um fungo <i>Cephalosporium</i> , p. <a href="#">29</a>
MIC	Minimum Inhibitory Concentration – Concentração inibitória Mínima, p. <a href="#">85</a>
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , p. <a href="#">23</a>
MTT	Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium, p. <a href="#">49</a>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , p. <a href="#">32</a>
NCI	National Cancer Institute, p. <a href="#">50</a>
PES	<i>Polyethersulfone</i> , p. <a href="#">37</a>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> – extração em fase sólida, p. <a href="#">48</a>
Sabouraud	Meio de cultura, também chamado de Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), desenvolvido por Raimond Sabouraud (1864-1938), p. <a href="#">51</a>

TC	Taxas de Colonização, p. <a href="#">52</a>
UEA	Universidade do Estado do Amazonas, p. <a href="#">50</a>
UFC	Universidade Federal do Ceará, p. <a href="#">49</a>
UV	Ultravioleta, p. <a href="#">44</a>

# Lista de Símbolos

$\delta$	Deslocamento químico, em ppm (partes por milhão), p. 62
$^{13}\text{C}$	Carbono com seis prótons e sete nêutrons, p. 70
$^1\text{H}$	Hidrogênio, isótopo com um próton, p. 67
$\delta_C$	Deslocamento químico do carbono, em ppm, p. 70
$\delta_{H_{C20}}$	Deslocamento químico do hidrogênio ligado ao carbono número 20, p. 89
$\delta_H$	Deslocamento químico do hidrogênio, em ppm, p. 70
$J$	Constante de acoplamento, em Hz (Hertz), p. 62
$\mu\text{L}$	Microlitros, p. 28
$\mu\text{m}$	Micrômetros, p. 37
d	Dubleto, p. 67
dd	Duplo dubleto, p. 67
ddd	Duplo duplo dubleto, p. 67
ddq	duplo duplo quarteto, p. 76
dq	Duplo quarteto, p. 67
dqd	Duplo quarteto dubleto, p. 80
eV	Elétron-volt, p. 61
m/z	relação massa/carga do íon, p. 66
m	Multiplete, p. 67
nm	nanômetro, $10^{-9}$ metros., p. 50
q	Quarteto, p. 67

s	Singleto, p. <a href="#">67</a>
t	Tripleto, p. <a href="#">67</a>
v/v	Relação entre volumes, p. <a href="#">35</a>

# Seção 1

## Introdução

### 1.1 Introdução

O Brasil possui uma grande diversidade de espécies de mamíferos, peixes, anfíbios, aves, répteis e plantas superiores, conhecidas pela ciência. Estima-se ainda que haja várias espécies desconhecidas pela ciência nesses grupos, e mesmo muitas das conhecidas foram pouco estudadas. Grupos como nematóides e protozoários tem sua catalogação incompleta ou inexistente para o Brasil, e foram pouco estudados quimicamente. Muitas espécies são endêmicas, ou seja, só existem em uma determinada região do Brasil.

Outros grupos de organismos como fungos, vírus e bactérias, são conhecidos pelo público em geral como sendo causadores de doenças em humanos, animais e plantas, Mas são indispensáveis para a vida no planeta. Fungos e bactérias são utilizados para realizar transformações químicas em produtos naturais (fermentação) e são cada vez mais utilizados como fontes de substâncias naturais com atividade biológica.

Os fungos existentes no Brasil ainda são pouco estudados, especialmente na região norte.

“Destacam-se pelo maior número de espécies os estados de São Paulo (1.161 spp.), Pernambuco (937 spp.), Rio Grande do Sul (856 spp.), Bahia (584 spp.), Paraná (529 spp.), Santa Catarina (482 spp.), Rio de Janeiro (443 spp.), Amazonas (408 spp.), Minas Gerais (399 spp.) e Pará (302 spp.). A despeito dos dados referentes ao Amazonas e ao Pará, observa-se que a Região Norte carece de coletores e estudiosos de fungos pois, nos demais estados, o número de registros é extremamente baixo: Rondônia (116 spp.), Amapá (88 spp.), Roraima (75 spp.), Acre (61 spp.) e Tocantins (5 spp.). Além desses, destacam-se ainda a Região Centro-Oeste (Mato Grosso 135 spp., Goiás 104 spp., Mato Grosso do Sul 82 spp., Distrito Federal 77 spp.), o Maranhão e o Espírito Santo

como locais em que pouco se conhece acerca da diversidade micológica.”  
(FORZZA (2010), p. 46)

## 1.2 Fungos

Os fungos são organismos que não possuem clorofila, e portanto não são capazes de fotossintetizar seus nutrientes, necessitando obtê-los de outros organismos. Desse modo, fungos sempre são, de uma maneira ou outra, dependentes de outras formas de vida. Eles são capazes de sobreviver em praticamente todos os ambientes onde existam outros organismos que lhes forneçam as substâncias de que necessitam. Estão presentes no solo, nas plantas, em organismos em decomposição e na água, mas também ambientes mais extremos, como os de baixas temperaturas (próximos de 0°C), os muito quentes (de 45 a 55°C), os de alta salinidade ou mesmo os muito ácidos (MACCHERONI JR. *et al.*, 2004). Isso os torna muito atraentes para pesquisas com substâncias naturais, pois para sobreviverem em tantos ambientes é necessária alta capacidade adaptativa, o que resulta na produção de muitos compostos orgânicos diferentes.

## 1.3 O reino Fungi

Os fungos não produzem clorofila, não possuem celulose nas paredes das suas células e não armazenam amido, mas por outro lado as paredes de suas células possuem quitina e os fungos armazenam glicogênio (STEPHENSON, 2010). Isto os coloca mais próximo do reino Animalia do que do reino Plantae, no qual eram classificados até algumas décadas atrás. Estima-se que este reino possua mais de 1 milhão e meio de espécies, mas apenas 8% delas são conhecidas (HAWKSWORTH, 2001).

Até alguns anos atrás a divisão em filos era feita de acordo com as estruturas sexuais: os fungos que produziam zigotos estavam no filo *Zygomycota* (figura 1.1); os que produziam zoósporos – esporos dotados de flagelo para locomoção – estavam no filo *Chytridiomycota* (figura 1.2); os que produziam ascósporos – bolsas contendo esporos – estavam no filo *Ascomycota* (figura 1.3); e os que produziam basidiósporos – esporos sexuais formados na parte externa do fungo – estavam no filo *Basidiomycota* (figura 1.4) (LOGERCIO-LEITE, 2004). Existem também os fungos que não produzem estruturas sexuais, e são denominados mitospóricos. Alguns autores os colocam na divisão *Deuteromycota*, outros os colocam no filo *Ascomycota*. Os fungos mitospóricos são também chamados de “fungos imperfeitos”.

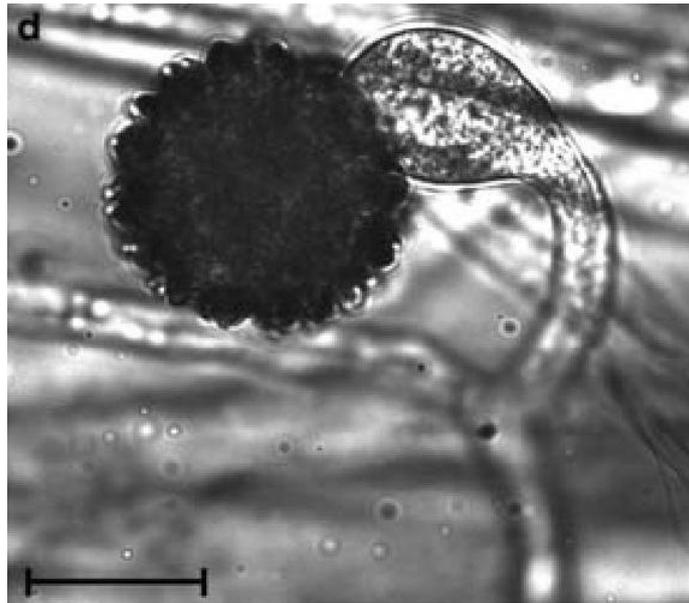


Figura 1.1: Zigósporo. Barra: 20  $\mu\text{m}$ . (GHERBAWY *et al.*, 2010)

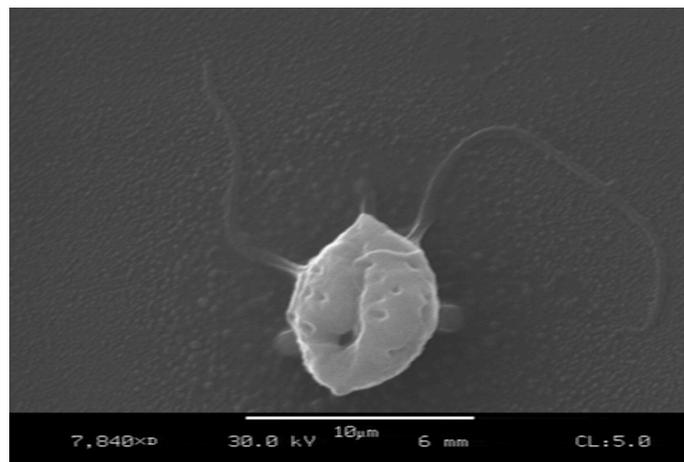


Figura 1.2: Zoósporo. (GARBELOTTO e FLORANCE, 2004)

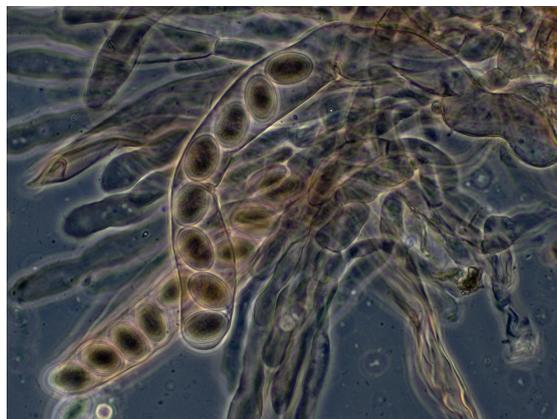


Figura 1.3: Ascos e ascósporos de *Morchella elata* (MERRITT COLLEGE, 2008)

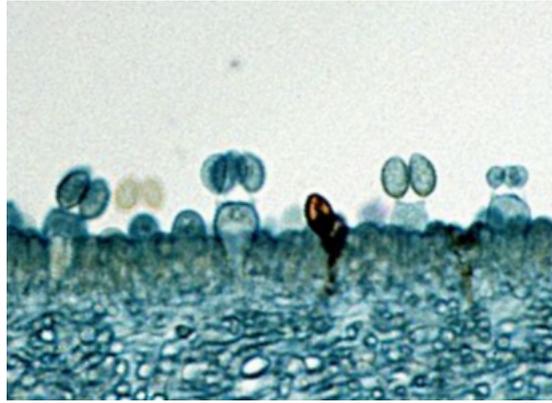


Figura 1.4: Basídeos com esporos (CLARK)

Em anos recentes ocorreram várias mudanças, devido principalmente às análises genéticas feitas agora de maneira muito mais fácil e rápido que antigamente. Verificou-se que os filós *Chytridiomycota* e *Zygomycota* não representam grupos homofiléticos, e estes grupos foram divididos. Um grupo de fungos que antes estava classificado como zigomiceto, os *Glomales*, foi colocado em um clado ao lado do clado *basidiomycota / ascomycota*. Estes três grupos formam o grupo dos fungos “verdadeiros”. Estima-se que 80% das espécies de plantas estão associados com fungos *Glomales*. O filo *Zygomycota* (sem os fungos *Glomales*) foi mantido. O filo *Chytridiomycota* foi dividido em três: *Chytridiomycota*, *Chytridiomycota* (*Monoblepharidales*) e *Chytridiomycota* (*Blastocladales*), todos fungos zoospóricos (BLACKWELL e SPATAFORA, 2004) (figura 1.5).

Um estudo mais recente assinado por vários autores (HIBBETT *et al.*, 2007) propôs um subreino *Dikarya* para reunir os *Ascomycota* e *Basidiomycota*, pois estes grupos possuem hifas com células dicarióticas (células com dois núcleos não fundidos). As maiores mudanças foram nos antigos grupos *Chytridiomycota* e *Zygomycota*. No primeiro foram colocados os *Blastocladiomycota* e *Neocallimastigomycota*, para agrupar os fungos flagelados. Taxa antes colocadas em *Zygomycota* foram distribuídos entre *Glomeromycota* e em vários subfilos com posição incerta (*Mucoromycotina*, *Entomophthoromycotina*, *Kickxellomycotina* e *Zoopagomycotina*). Os microsporídios foram incluídos nos *Fungi* (figura 1.5).

Estudos filogenéticos recentes (EBERSBERGER *et al.*, 2012), – “o primeiro estudo filogenômico de todo um reino eucariótico que utiliza um critério de consistência para fortalecer conclusões filogenéticas”, segundo os autores – colocaram *Nuclearia* e *Microsporidia* como os parentes mais próximos aos fungos, mas com posição ainda incerta. Os fungos mais antigos seriam os *Blastocladiomycota*, seguidos dos *Chytridiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Entomophthoromycotina*, *Glomeromycota*, *Mucoromycotina*, *Basidiomycota* e *Ascomycota* (figura 1.6).

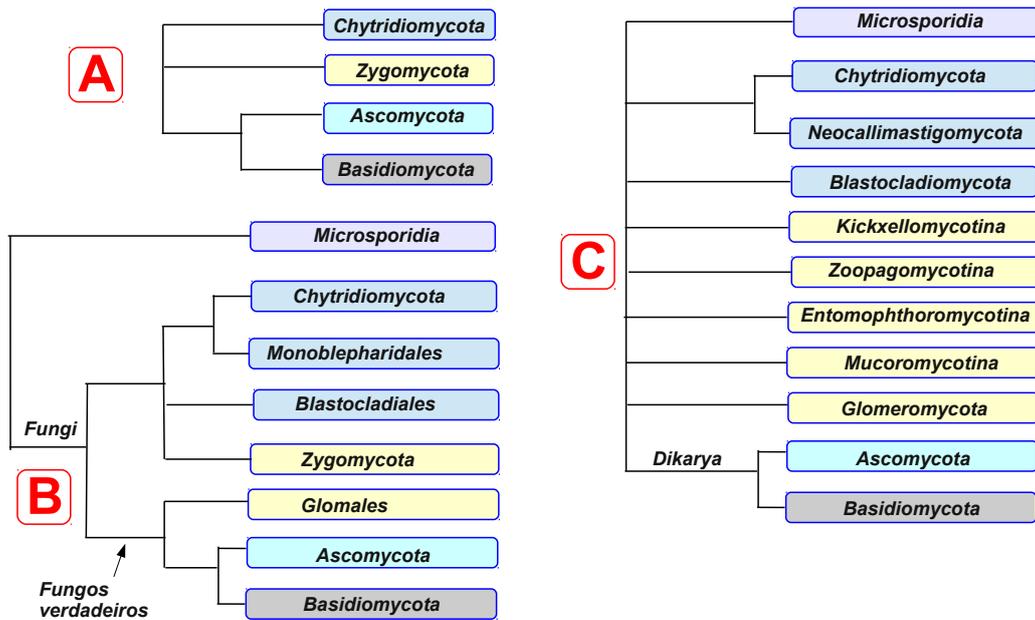


Figura 1.5: Classificação dos fungos: (A) Classificação tradicional; (B) Classificação segundo BLACKWELL e SPATAFORA (2004); (C) Classificação segundo HIBBETT *et al.* (2007).

## 1.4 Algumas características dos fungos

Os fungos são eucariotos, portanto possuem células com núcleo, o que os distingue das bactérias, que não possuem núcleo.

A maior parte do corpo de um fungo é composto por hifas, filamentos contendo várias células, ou um único longo filamento com vários núcleos celulares. São as hifas que conferem a aparência de algodão para certos fungos. Os fungos unicelulares são exceção. Ao conjunto de hifas de um fungo dá-se o nome de micélio. Nos fungos terrestres, a maior parte do micélio fica oculto sob o solo, e somente podemos ver os “corpos de frutificação”, que é a denominação técnica dos cogumelos na época reprodutiva, quando ocorre a liberação dos esporos. Os corpos de frutificação são portanto constituídos da união de muitas hifas.

Os fungos podem se reproduzir de forma sexuada e/ou assexuada. Na reprodução sexuada os esporos se formam por meiose e recebem os nomes de zoósporos, ascósporos ou basidiósporos. Na forma assexuada, os esporos se formam por mitose. Os fungos também podem crescer a partir de fragmentos do micélio (LOGERCIO-LEITE, 2004).

## 1.5 Interações de fungos com outros organismos

Como os fungos são incapazes de produzir seu próprio alimento, eles necessitam viver próximos de outros organismos vivos para obter os nutrientes de que precisam.

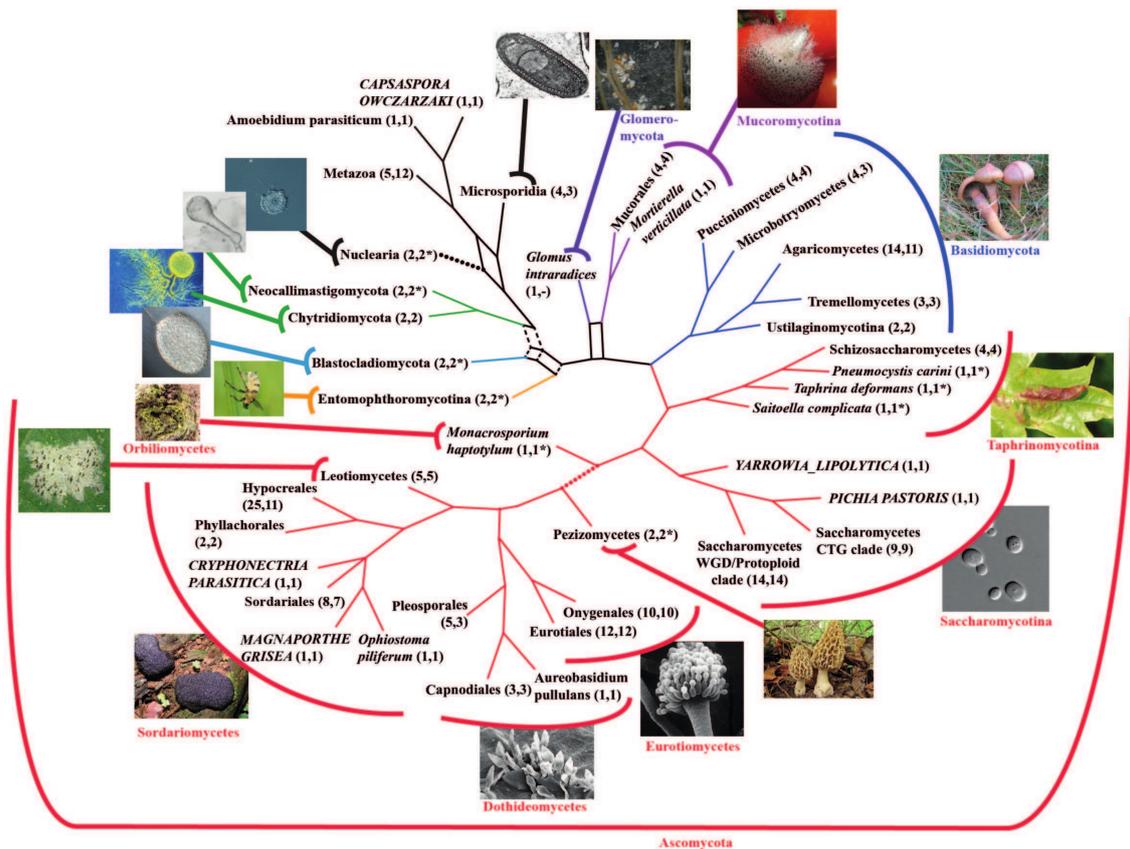


Figura 1.6: Árvore filogenética dos fungos, segundo [EBERSBERGER et al. \(2012\)](#)

Grande parte dos fungos são saprófitas, alimentando-se da matéria orgânica de indivíduos mortos. Mas também é comum casos de parasitismo e simbiose, e nesses casos os fungos interagem com organismos vivos, como algas, bactérias, plantas, animais, insetos, nematóides e mesmo outros fungos.

### 1.5.1 Algas e fungos

O exemplo mais conhecido desta interação são os líquens, uma simbiose entre uma alga verde unicelular ou filamentosa, ou uma cianobactéria, e um fungo, em geral um ascomiceto. A alga produz compostos de carbono que são repassados para o fungo, que os utiliza como fonte de energia para seu crescimento, mas também são transferidos outros compostos essenciais, como as vitaminas biotina e tiamina, que o fungo não é capaz de sintetizar. A alga recebe em troca um ambiente protegido contra a redução da umidade ambiental e alguns compostos produzidos pelo fungo a protegem do excesso de luz ([WILL-WOLF et al. \(2004\)](#), p. 173-174).

### 1.5.2 Bactérias e fungos

Fungos podem se alimentar de bactérias, especialmente no solo, mas também podem ser atacados por bactérias patogênicas. Como fungos e bactérias coexistem em

praticamente todos os ambientes, essas interações são frequentes. Também ocorre a associação entre bactérias e fungos, onde bactérias que capturam o nitrogênio do ar produzem compostos que são repassados ao fungo, que pode crescer mais rápido e decompor mais matéria orgânica, repassando parte dos compostos absorvidos para a bactéria (LIOUSSANNE, 2010). Existem casos de simbiose entre bactérias e fungos em que a bactéria se localiza dentro do citoplasma ou de organelas das células fúngicas (figura 1.7), e são chamadas de endossimbiontes. Estas bactérias influenciam a fisiologia do fungo hospedeiro a tal ponto que existem casos em que, na ausência de endossimbiontes, o hospedeiro não é capaz de reprodução vegetativa (PARTIDA-MARTINEZ *et al.*, 2007).

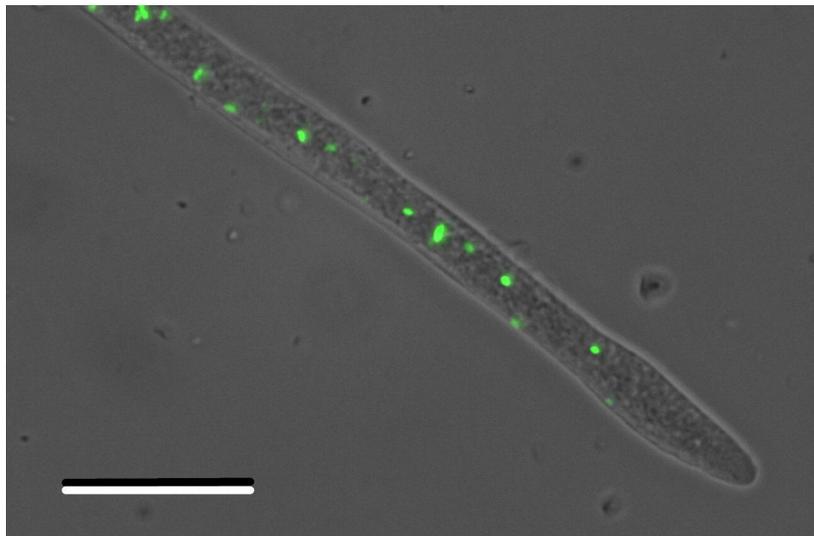


Figura 1.7: Bactérias no interior da hifa. Microscopia com luz branca e modo fluorescente; a barra de escala representa 30  $\mu\text{m}$  (PARTIDA-MARTINEZ *et al.*, 2007).

### 1.5.3 Plantas e fungos

Estes dois grupos de seres vivos interagem de todas as maneiras possíveis. Os fungos se alimentam de restos de vegetais mortos, sejam folhas, frutos, madeira ou raiz, decompondo o material vegetal e permitindo sua reutilização pelas plantas. Os fungos podem viver na superfície das plantas (fungos epifíticos), seja nas folhas, caule, tronco ou na raiz. Estes fungos podem produzir substâncias úteis para a planta ou impedir sua colonização por organismos patogênicos. As plantas possuem também fungos vivendo no seu interior (fungos endofíticos) que não lhes causam doenças. Estes fungos recebem compostos essenciais para sua sobrevivência e em troca podem, por exemplo, produzir alcalóides tóxicos que afetam os herbívoros que se alimentam da planta, protegendo-a (SCHARDL *et al.*, 2004). Existem evidências de que a presença de fungos endofíticos pode provocar um aumento da resistência

da planta a insetos, nematóides e bactérias (STEPHENSON (2010), p. 177).

Os fungos também podem ser patogênicos para plantas, causando sua morte ou retardo no desenvolvimento. Estes fungos necessitam de nutrientes que são obtidos de células vivas ou a partir de sua morte e degradação. Estes fungos podem ser parasitas necrotróficos – que obtêm os nutrientes a partir de células mortas – e podendo causar a morte de plantas, como por exemplo a antracnose, doença causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, e que é a principal doença do guaraná no Amazonas; ou biotróficos – que necessitam de nutrientes produzidos por células vivas – que convivem com as plantas por um longo período, absorvendo seus nutrientes, mas sem destruir seus tecidos (relação de parasitismo) (MACCHERONI JR. *et al.*, 2004). Os fungos são os mais amplamente distribuídos e destrutivos parasitas de plantas, enquanto as bactérias são os mais importantes patógenos em animais (STEPHENSON (2010), p. 178).

#### 1.5.4 Animais superiores e fungos

A relação entre animais e fungos é mais lembrada pelas doenças que estes causam, mas esta não é a única forma de interação existente entre ambos. Fungos anaeróbios participam do processo de digestão dos vegetais no rúmex dos herbívoros, juntamente com bactérias e protozoários, permitindo que os animais absorvam compostos de carbono provenientes da degradação microbiana dos vegetais. Os fungos também servem de alimento para várias espécies animais, inclusive o ser humano (GARCIA-VALLEVÉ *et al.*, 2000).

#### 1.5.5 Insetos e fungos

Os fungos dessas associações podem ser necrotróficos ou biotróficos; insetos podem usar fungos diretamente como alimento ou como fontes de enzimas; alguns fungos simplesmente usam artrópodes para se dispersarem nos seus ambientes (BENJAMIN *et al.*, 2004).

Os fungos podem habitar os insetos simplesmente vivendo no sistema digestivo deles, sem causar danos; podem ser ectoparasitas – se instalam na superfície do corpo do inseto – e viver de ceras secretadas; ou podem ser endoparasitas e se alimentar dos insetos a partir de dentro deles. Estes fungos produzem lipases, quitinases e proteases que rompem a carapaça dos insetos, permitindo a invasão. Dentro do inseto, o fungo se desenvolve em uma forma unicelular e produz metabólitos que atacam o sistema imunológico, modificam seu comportamento ou impedem a invasão por fungos concorrentes após a morte do inseto. Depois da morte, o fungo forma hifas e consome o corpo de inseto até restar somente o exoesqueleto. Os fungos patogênicos de insetos mais conhecidos são os do gênero *Cordyceps*, que podem

ser altamente especializados em determinada espécie de inseto: alguns são especializados em hemípteros (percevejos) (*Cordyceps nutans*), outros em vespas (*Cordyceps sphaecocephala*), e outros somente em algumas espécies de formigas (ISARA *et al.*, 2005).



Figura 1.8: Insetos mortos por fungos endoparasitas do gênero *Cordyceps* (ATTENBOROUGH, 2008)

Além disso, alguns insetos tais como borboletas, cupins, vespas, moscas, besouros e formigas, entre outros, utilizam os fungos como alimento. Os fungos podem reagir ao ataque produzindo metabólitos que os tornam menos atraentes aos insetos (ROHLFS e CHURCHILL, 2011).

Em alguns destes grupos, os fungos são a base da alimentação, pois estes insetos não possuem a capacidade de digerir matéria vegetal, e utilizam os fungos para fazer a conversão da matéria vegetal em micélio, que é consumido por eles. No caso das formigas que cortam folhas e cultivam “jardins” de fungos dentro do formigueiro, elas são capazes de reagir ao crescimento do micélio em diferentes tipos de folhas, aparentemente respondendo a algum de sinal bioquímico emitido pelo fungo. Se um determinado tipo de folha é tóxica para o fungo, a colônia não irá mais coletá-la (STEPHENSON, 2010).

### 1.5.6 Nematóides e fungos

Alguns fungos desenvolveram mecanismos para capturar protozoários e nematóides, e são conhecidos como fungos predadores. Fungos da ordem *Moliniales* desenvolveram redes de hifas pegajosas e laços de hifas, que incham e prendem suas presas. Outras espécies, como o cogumelo *Pleurotus ostreatus*, possuem células especializadas nas hifas, que produzem pequenas gotas contendo toxinas. Quando um nematóide entra em contato com essas gotas, as toxinas causam paralisia, mas não o matam. Em seguida, as hifas do cogumelo começam a crescer em direção ao nematóide, atraídas pelas substâncias liberadas pelo corpo dele (quimiotaxia). As hifas penetram no corpo do nematóide e começam a digeri-lo. Contudo, alguns dos fungos que se alimentam de protozoários e nematóides não são considerados predadores,

pois não os matam, apenas invadem suas células e os parasitam (MACCHERONI JR. *et al.*, 2004). Os principais fungos predadores de nematóides são *Cystopage*, *Stylopage*, *Rhopalomyces* (*Zygomycota*), *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella*, *Monacrosporium* (*Ascomycota* e fungos mitospóricos) e *Hohenbuehelia*, *Hyphoderma*, *Nematoctonus*, *Pleurotus* (*Basidiomycota*) (BARRON (2004), p. 447).

### 1.5.7 Fungos com Fungos

Os fungos fungícolas são espécies de fungos que estão associados a outros fungos, incluindo os fungos liquenícolas que crescem em líquens. O termo é usado mesmo quando a natureza biológica da associação e sua relação trófica não são claras. Os fungos podem interagir uns com os outros por saprofitismo, parasitismos ou simbioses. Um dos meios mais estudados é o microparasitismo, quando um fungo obtém alimento a partir dos tecidos de outro fungo. Existem fungos microparasitas que obtém seu alimento unicamente de outros fungos. Estas espécies são de grande interesse no controle biológico de doenças causadas por fungos nas plantações (GAMS *et al.*, 2004).

Os tipos de interações de fungos com outros organismos citados acima servem apenas como exemplos, pois essas interações são bem mais variadas e em geral bastante complexas. Mas ilustram bem a diversidade existente no reino Fungi.

## 1.6 Fungos Endofíticos

### 1.6.1 Definição

Os fungos endofíticos habitam o interior das plantas mas, em geral, este termo é aplicado somente para os fungos capazes de colonização assintomática de tecidos aparentemente saudáveis de uma planta (STONE *et al.*, 2004). O termo se refere apenas aos fungos no momento da detecção, sem levar em conta o futuro *status* da interação. Mas como alguns fungos patogênicos podem permanecer latentes no interior da planta antes de causarem doenças, e os fungos endofíticos podem estar presentes tanto nos tecidos saudáveis quanto nos doentes, fica ressaltada a incerteza dos limites separando endófitos, patógenos facultativos e patógenos latentes (STONE *et al.*, 2004). Outros autores adotam uma definição mais ampla, na qual fungos endofíticos são os que vivem toda sua vida, ou pelo menos uma parte significativa do seu ciclo de vida, internamente e assintomaticamente em partes da planta. Esta definição inclui uma ampla variedade de fungos, desde patógenos de plantas e fungos saprófitas que têm longos períodos de latência antes da doença ou sinais externos de infecção surgirem, até fungos especializados em gramíneas, que são con-

siderados mutualistas obrigatórios (SAIKKONEN *et al.*, 1998). Já BRUNDRETT (2004) distingue os fungos endofíticos dos fungos micorrizais – que auxiliam as maioria das plantas terrestres a obter nutrientes – pois estes fungos possuem interfaces para a troca de nutrientes localizadas em hifas especializadas, e possuem desenvolvimento sincronizado micorriza / planta. Os fungos micorrizais funcionam como uma interface entre as plantas e o solo, pois suas hifas muito finas absorvem melhor os nutrientes e os repassam às plantas, que fornece aos fungos compostos de carbono produzidos na fotossíntese.

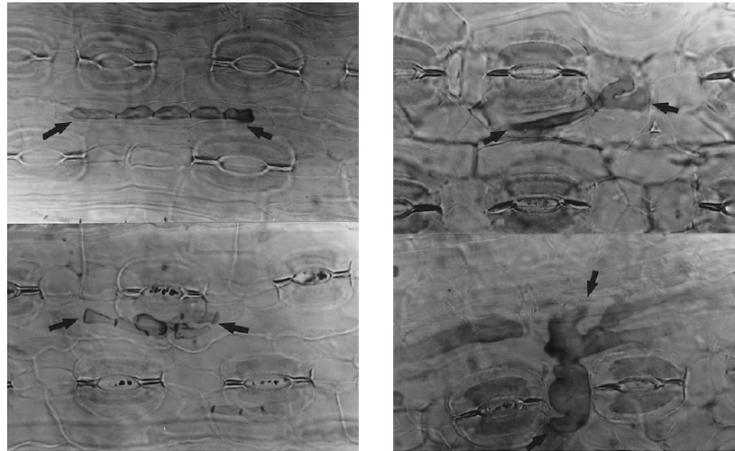


Figura 1.9: Fungos endofíticos (indicados por setas) no interior de células das folhas. Esquerda: hifa do fungo *Rhizoctonia parkeri* nas células de *Pseudotsuga taxifolia*. Direita: hifa do fungo *Phyllosticta abietis* nas células de *Abies grandis*. Aumento de 500 × (STONE *et al.*, 2004)

Como vimos, a definição do que é um fungo endofítico pode variar, e também ainda não se tem um completo entendimento de todas as formas de interação existentes entre os diversos organismos na natureza. Neste trabalho será utilizada a definição de que fungos endofíticos são aqueles que colonizam os tecidos da planta sem lhes causar doenças visíveis no momento da coleta.

## 1.6.2 Interações

A entrada de fungos na planta se dá por vias naturais, como os estômatos das folhas, ou através de ferimentos na planta, ou ainda os fungos podem secretar enzimas que rompem a camada externa da planta. Os fungos ocupam então os espaços intercelulares, os vasos condutores e também o interior das células vegetais. SCHULZ *et al.* (2002) observaram em testes de laboratório que a colonização por fungos endofíticos era pelos estômatos ou por dobras no tecido, já os patógenos também rompiam as paredes celulares para invadir as células. As interações planta-fungo tem sido mais estudadas nas últimas décadas, e essa interação se dá de diversas maneiras, bem resumidas por MACCHERONI JR. *et al.* (2004, p.464):

“Colonizando o interior da planta hospedeira, os fungos endofíticos competem por espaço e nutrientes com os patógenos, podendo reduzir desta forma o aparecimento de doenças. Além disso, várias espécies de fungos endofíticos apresentam a capacidade de sintetizar compostos que inibem a herbivoria ou que são antagonistas a patógenos. Outras espécies, as quais podem ser chamadas de oportunistas, colonizam a planta e, quando esta é atacada por pragas, infectam o inseto, reduzindo seus efeitos sobre a planta hospedeira. Tem sido descrito também que durante o processo de colonização da planta pelo endófito, ocorre ativação do sistema de defesa da planta, causando um aumento da resistência dessa planta contra patógenos. Outros fungos endofíticos produzem fitohormônios como as auxinas, o que induz ao aumento do sistema radicular e melhora o crescimento da planta hospedeira.”

Autores relatam que a inoculação dos fungos endofíticos *Cryptosporiopsis* sp. ou *Phialophora* sp. em uma espécie de gramínea resultou em significativo aumento no crescimento da planta, e em contrapartida o fungo recebeu alimentação e colonizou extensivamente as raízes da planta (SCHULZ *et al.*, 2002). As gramíneas se beneficiam da presença de fungos endofíticos e tem seu crescimento, resistência a patógenos e herbívoros e reprodução melhorados, e em contrapartida o fungo recebe alimento, refúgio e possibilidade de se propagar para outras plantas (SAIKKONEN *et al.*, 1998).

Fungos do filo ascomicota e que são também fungos endofíticos sistêmicos de gramíneas, como os fungos *Neotyphodium*, formam uma simbiose tão profunda com seus hospedeiros que se tornam dependentes um do outro, e o fungo é transferido para a descendência da planta por meio das sementes (transmissão vertical). Comparações filogenéticas de fungos e plantas sugerem que os endófitos sistêmicos de gramíneas são hospedeiro-específicos, ou seja, são fungos adaptados que são compatíveis somente com certos genótipos (SAIKKONEN *et al.*, 1998).

Como vimos antes, as interações entre fungo e hospedeiro não são neutras, e a interação entre fungo endofítico e seu hospedeiro deve manter um balanço mútuo do antagonismo. Mas não se sabe como esse balanço é regulado. As interações antagonistas balanceadas são maleáveis, dependendo do status momentâneo do hospedeiro e endófito, mas também de fatores ambientais e da tolerância desses organismos a esses fatores ambientais. Os fungos endofíticos possuem alto grau de variabilidade nas relações com o hospedeiro, o que significa que essas interações endofíticas tem potencial para o desenvolvimento evolucionário: a simbiose pode evoluir para um mutualismo mais especializado (SCHULZ e BOYLE, 2005).

## 1.7 Biossíntese de compostos em fungos

Todos os organismos vivos absorvem e transformam compostos químicos para viver, crescer e se reproduzir. Alguns processos metabólicos utilizados com estas finalidades são largamente distribuídos em todas as classes de seres vivos, e são chamados de metabolismo primário. Estes processos sintetizam, degradam ou convertem compostos que são comumente encontrados na natureza.

A expressão “metabolismo primário” é muito utilizada para se referir aos processos de fotossíntese, respiração e transporte de nutrientes nas plantas. Os compostos utilizados pelas plantas nesses processos – aminoácidos, nucleotídeos, lipídios, carboidratos e clorofila – possuem distribuição universal nelas. Mas outros processos, como a glicólise, essencial para os organismos obterem energia, também são classificados como pertencendo ao metabolismo primário. Plantas, animais e microorganismos realizam glicólise, e esse processo é basicamente o mesmo em todos os seres vivos. A quebra da glicose, por exemplo, foi investigada em leveduras e em células musculares de animais, e revelaram serem muito similares, com os mesmos intermediários químicos na reação. Outros estudos com diferentes organismos e processos bioquímicos confirmaram a generalidade da observação, que foi resumida por Jacques Monod como “o que é verdade para a *E. coli* é verdade para o elefante” (NELSON e COX, 2004). Os processos químicos essenciais para o crescimento e reprodução dos seres vivos são chamados de metabolismo primário e são o foco de estudo da bioquímica.

Existem porém compostos que não possuem uma distribuição universal, pois não são necessários para todas as formas de vida. Estes compostos são chamados metabólitos secundários, mas na maioria dos casos não se conhecem a função e benefícios para os organismos que os produzem (DEWICK (2009), p. 7-8). Os metabólitos secundários compartilham algumas propriedades enigmáticas, como a “dispensabilidade celular” – o organismo produtor pode crescer sem sintetizar esses metabólitos – e distribuição taxonômica restrita – somente um grupo de organismos produz cada metabólito (KELLER *et al.*, 2005).

### 1.7.1 Produção de metabólitos secundários

Os compostos utilizados como base nos processos de síntese de metabólitos secundários se originam no metabolismo primário. Na figura 1.10 vemos algumas das principais rotas metabólicas em fungos. Deve-se notar que os processos básicos que fornecem energia às células – a glicólise (na parte central da figura) e o ciclo do ácido cítrico – também fornecem os compostos que serão utilizados para formar os metabólitos secundários. Também deve-se notar que, apesar de os metabólitos secundários serem produzidos de vários precursores, o mais fundamental deles é a

acetil-CoA.

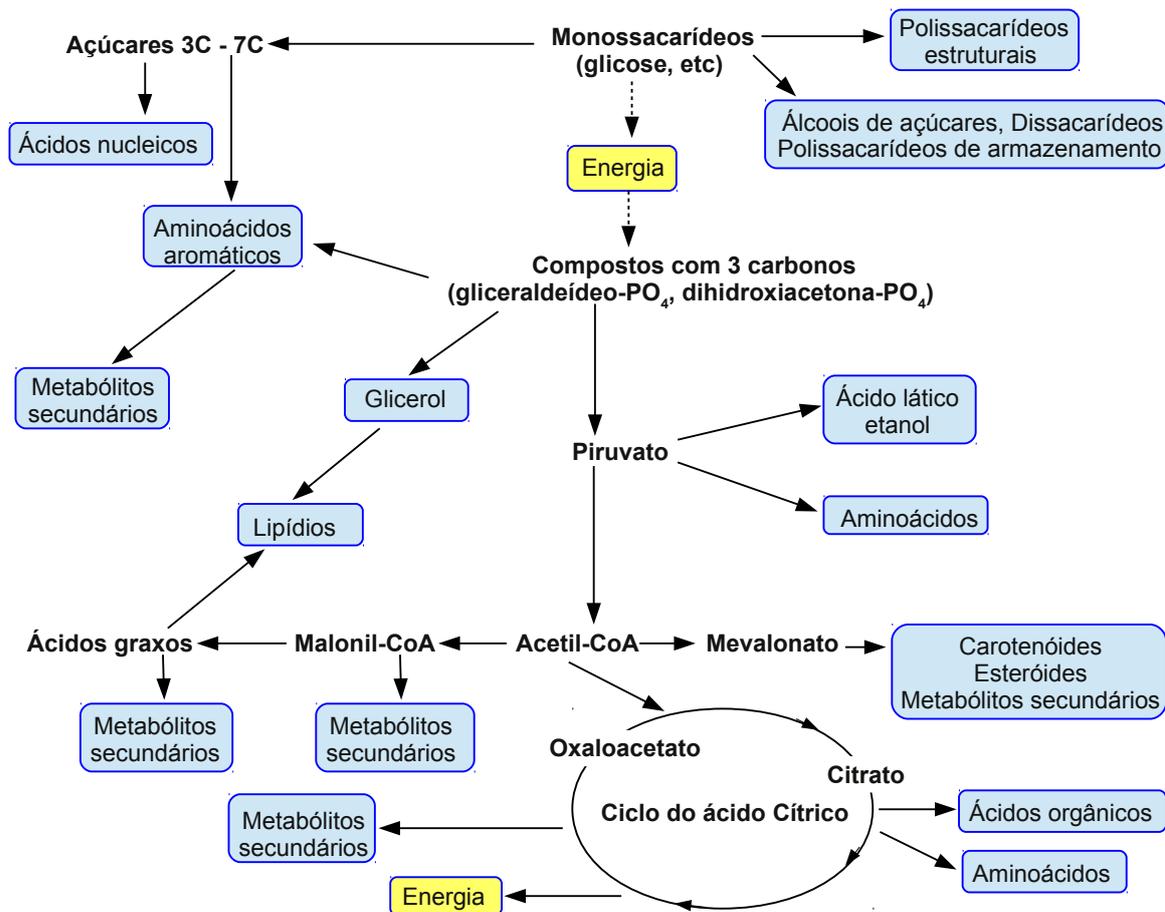


Figura 1.10: Principais rotas metabólicas em fungos (adaptado de DEACON (2006), p. 123).

O número de compostos básicos necessários para a formação de metabólitos secundários não é grande, e os mais importantes são a acetil-coenzima-A, o ácido chiquímico, o ácido mevalônico e 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato. Estes compostos são formados a partir de produtos ou intermediários da glicólise e do ciclo do ácido cítrico, ambos pertencentes ao metabolismo primário. Como estes processos são baseados na biotransformação da glicose, eles estão acessíveis a todos os seres vivos, pois os organismos vivos ou sintetizam a glicose em seu próprio corpo, ou a obtêm de outros organismos. A produção de metabólitos secundários é feita nos organismos vivos em “rotas de biossíntese” conhecidas como via do acetato, via do chiquimato, via do mevalonato e via do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato. Metabólitos secundários podem também ser produzidos a partir de aminoácidos formados no ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs (metabolismo primário) ou na via do chiquimato (aminoácidos aromáticos).

Todas estas rotas metabólicas estão disponíveis, mas nem todos os organismos

as utilizam da mesma maneira. A via do ácido chiquímico está presente em plantas, fungos e bactérias, mas não em animais. Por isso, os aminoácidos triptofano e fenilalanina, que são aminoácidos aromáticos produzidos pela via do ácido chiquímico, são considerados essenciais aos seres humanos. Os fungos não fazem um grande uso desta rota de biossíntese, e os compostos produzidos são principalmente corantes em macrofungos (HANSON, 2008). Os compostos conhecidos como flavonóides são produzidos pela via mista do chiquimato e do acetato, e são importantes em angiospermas, mas estão praticamente ausentes em fungos, algas, briófitas e pteridófitas.

Os fungos, como outros seres vivos, utilizam aminoácidos para sintetizar novos compostos. Mas os mamíferos, por exemplo, utilizam somente aminoácidos levógiros, enquanto os fungos podem usar também aminoácidos dextrógiros. Fungos também fazem aminoácidos com estruturas diferentes daquelas encontradas em mamíferos e em plantas superiores, e a descarboxilação de aminoácidos em fungos é muito menos comum. Por exemplo, a descarboxilação de fenilalanina ou tirosina para formar ariletilalanina é pouco comum em fungos, e portanto alcalóides formados a partir de unidades  $\beta$ -ariletilamina, como os alcalóides benzoisoquinolínicos são raros em fungos, mas muito comuns em plantas (HANSON, 2008).

Os terpenos e esteróides são formados a partir do isopentenil difosfato, o qual pode ser obtido tanto pela via do ácido mevalônico quanto a do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato, mas os fungos utilizam a rota do mevalonato como principal via de produção do isopentenil difosfato (HANSON, 2008).

Uma característica comum em metabólitos fúngicos é a formação de compostos obtidos pela combinação de várias rotas metabólicas (HANSON, 2008).

Todas essas diferenças na biossíntese de metabólitos secundários em fungos resulta em uma grande variedade de compostos químicos, e isto torna os fungos atraentes para a pesquisa de compostos com atividade biológica.

#### 1.7.1.1 A via do acetato

A via do acetato é a mais importante rota metabólica para a formação de metabólitos secundários em fungos. A base de todo o processo é a acetil-coenzima A (acetil-CoA), formada a partir do ácido pirúvico, um produto da reação de glicólise. A reação completa envolve várias etapas catalisadas por enzimas. Uma etapa importante é a formação de malonil-CoA, que é utilizada juntamente com a acetil-CoA na formação de cadeias carbônicas.

A formação de cadeias de acetato é semelhante a uma condensação de Claisen, mas intermediada por enzimas. A reação através de enzimas envolve muitas etapas de reação, mas tem a vantagem de formar compostos estereo-específicos, o que em geral é difícil em uma reação de laboratório.

Após a formação de cadeias carbônicas (poli- $\beta$ -ceto ésteres), a via do acetato

pode dar origem a compostos de cadeia aberta ou cíclicos, bem como ácidos graxos. Os compostos dessa via sintética podem ter estruturas muito variadas, dependendo de qual era o tamanho da cadeia de acetatos inicial, das reações de redução, se ocorre ciclização ou não, e de partes que são anexadas após a formação da cadeia principal.

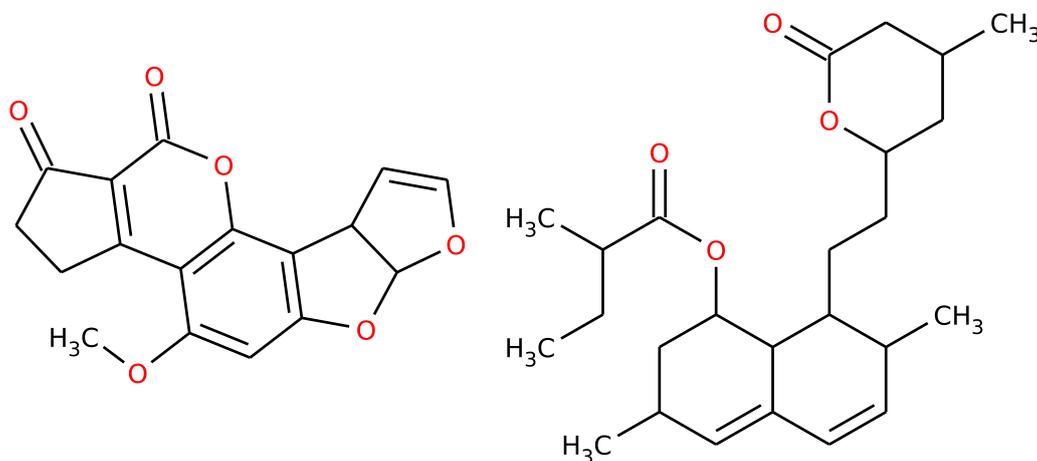


Figura 1.11: Aflatoxina B1 (esquerda), composto tóxico e carcinogênico, e a lovastatina, medicamento utilizado para reduzir o colesterol, ambos derivados da via do acetato.

### 1.7.1.2 A via do chiquimato

A via do chiquimato, apesar de ser menos utilizada em fungos, é uma alternativa à via do acetato para a produção de compostos aromáticos. Alguns dos compostos formados são pigmentos, ou possuem odor ([GUNATILAKA, 2006](#)).

### 1.7.1.3 A via do ácido mevalônico e a via do 1-deoxi-D-xilulose 5-fosfato

Estas duas vias sintéticas bem diferentes entre si originam o isopentenil difosfato (IPP), que é a base para a formação de terpenos e esteróides. As duas rotas existem nos fungos, mas a rota do mevalonato predomina. Esta rota inicia na acetil-CoA, que vai originar o ácido mevalônico e posteriormente o isopentenil difosfato.

Uma importante classe de metabólitos obtidos a partir do isopentenil difosfato (IPP) – conhecido como “unidade C5” – são os terpenos, que são classificados de acordo com o número de unidades IPP presentes na estrutura: monoterpênicos (C10), sesquiterpênicos (C15), diterpênicos (C20), sesterpênicos (C25), triterpênicos (C30), e carotenoides (C 40). O IPP e seu isômero, o dimetilalil difosfato (DMAPP), originam todos estes compostos, em reações intermediadas por enzimas. Modificações posteriores nos compostos formados geram uma grande variedade de produtos. O DMAPP pode também ser adicionado como cadeia lateral em compostos aromáticos ([KELLER \*et al.\*, 2005](#)).



(*Conium maculatum*) contémconiina, que foi utilizada para executar Sócrates em 399 A.C., e este foi o primeiro alcalóide a ser sintetizado. Outros alcalóides conhecidos são a cafeína, a nicotina e cocaína (figura 1.13) (CROTEAU *et al.*, 2000).

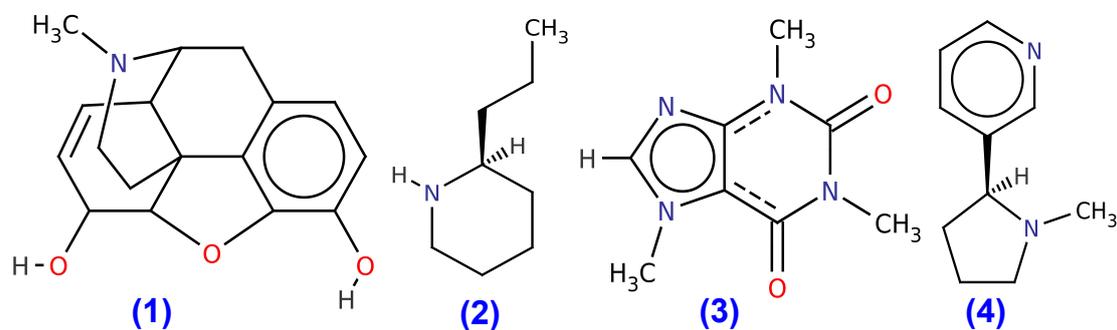


Figura 1.13: Exemplos de alcalóides: (1) morfina; (2) coniina; (3) cafeína; (4) nicotina.

Fungos produzem vários alcalóides importantes, em particular os alcalóides tóxicos, como os alcalóides tipo *ergot* produzidos por fungos *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* e especialmente *Claviceps*, que podem intoxicar pessoas que se alimentam de gramíneas – trigo e cevada, principalmente – infectados por estes fungos. Estes alcalóides são derivados do triptofano e podem ser utilizados para se obter a dietilamina do ácido lisérgico, o LSD, um poderoso alucinógeno usado para tratar esquizofrenia (ANISZEWSKI, 2007) (figura 1.14).

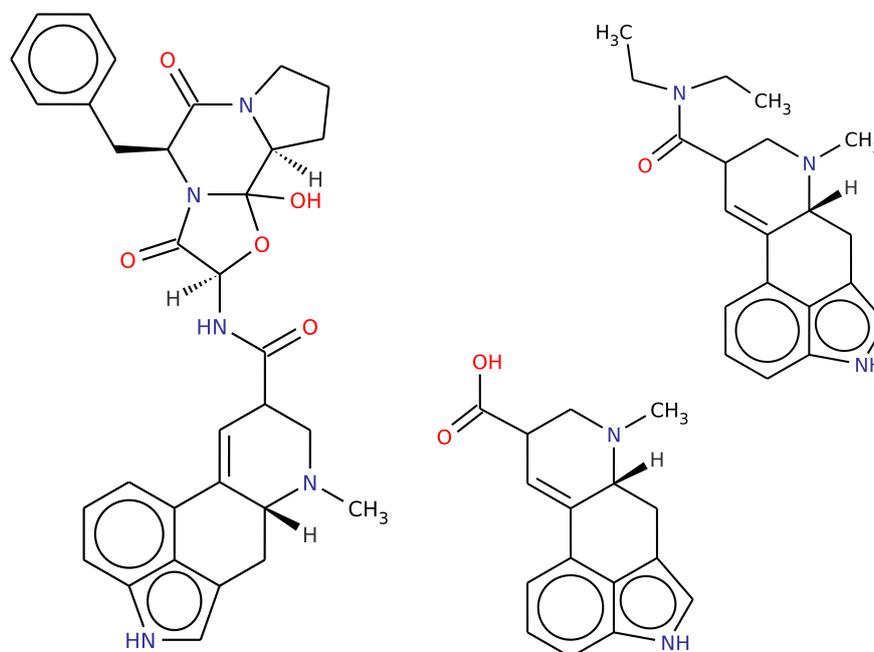


Figura 1.14: Da esquerda para a direita: ergotamina, ácido (+)-lisérgico e o LSD.

Os alcalóides são derivados dos aminoácidos e possuem um anel heterocíclico contendo nitrogênio, e são classificados de acordo com a estrutura que deu origem

ao alcalóide. Assim, temos alcalóides indólicos, isoquinolínicos, piperidínicos, etc. A estrutura original do aminoácido que deu origem ao alcalóide em geral se mantém intacta na estrutura final. Em fungos endofíticos, os alcalóides tem um importante papel na inibição do ataque às plantas por herbívoros e insetos. Os alcalóides de fungos endofíticos incluem aminas e amidas, derivados indólicos, pirrolizidinas e quinazolininas (ZHANG *et al.*, 2006).

**1.7.1.5.1 Alcalóides indólicos** Os alcalóides indólicos possuem uma estrutura básica formada por um anel benzênico geminado com um anel heterocíclico de 5 lados contendo nitrogênio, e são geralmente derivados do aminoácido triptofano. Nos seres humanos o triptofano é o precursor do neurotransmissor serotonina, portanto possuímos receptores para estruturas indólicas nos neurônios (figura 1.15). Não é de estranhar que alcalóides fúngicos derivados do triptofano tenham propriedades neurotóxicas, o que os torna especialmente importantes. Nas reações de formação destes alcalóides, o triptofano em geral perde o carbono ácido, e recebe a adição de unidades de isopreno (C5), como o dimetilalil difosfato (DMAPP), ou outros aminoácidos, bem como unidades vindas de outras rotas metabólicas. Por exemplo, o triptofano ou a fenilalanina podem se combinar com uma cadeia de poliacetato para formar citocalasinas, uma classe de substâncias em geral tóxicas, mas que possuem também propriedades antibióticas e antivirais (HANSON, 2008).

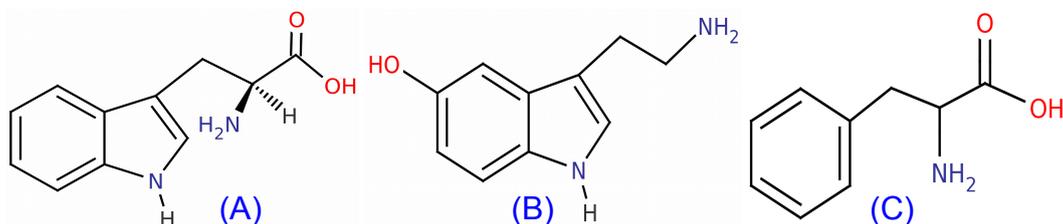


Figura 1.15: (A) triptofano; (B) serotonina; (C) fenilalanina.

### 1.7.1.6 Peptídeos não-ribossomais

Estes peptídeos são produzidos fora do ribossomo e, enquanto os peptídeos ribossomais utilizam somente aminoácidos proteinogênicos – aminoácidos que formam proteínas, que são levógiros – os peptídeos não-ribossomais podem utilizar também aminoácidos não-proteinogênicos – ou seja, dextrógiros. O ribossomo tem mecanismos de controle para construir moléculas sem defeitos, necessárias para o metabolismo primário, mas ele trabalha apenas com os aminoácidos essenciais (levógiros). O mecanismo não-ribossomal pode utilizar centenas de substâncias, e portanto gera grande diversidade estrutural (FINKING e MARAHIEL, 2004). A variedade de estruturas também aumenta com o tamanho da cadeia peptídica produzida, se houve ciclização, e com as funções adicionadas na cadeia principal.

Estes peptídeos são produzidos por bactérias, fungos e animais inferiores. Os peptídeos opióides dermorfina e deltoforina, encontrados na pele de algumas espécies de sapos da América do Sul, contém D-tirosina e D-alanina (MURRAY *et al.*, 2003); o fungo *Tolypocladium niveum* produz a ciclosporina, uma droga imunossupressora usada para tratar pacientes que receberam transplantes de órgãos (KELLER *et al.*, 2005). Na estrutura da ciclosporina vemos aminoácidos incomuns, como o 4-butenil-4,N-dimetil-treonina e o aminobutirato, e também D-alanina e L-alanina, e L-metil-leucina, entre outros (METZLER (2005), p. 488) (figura 1.16).

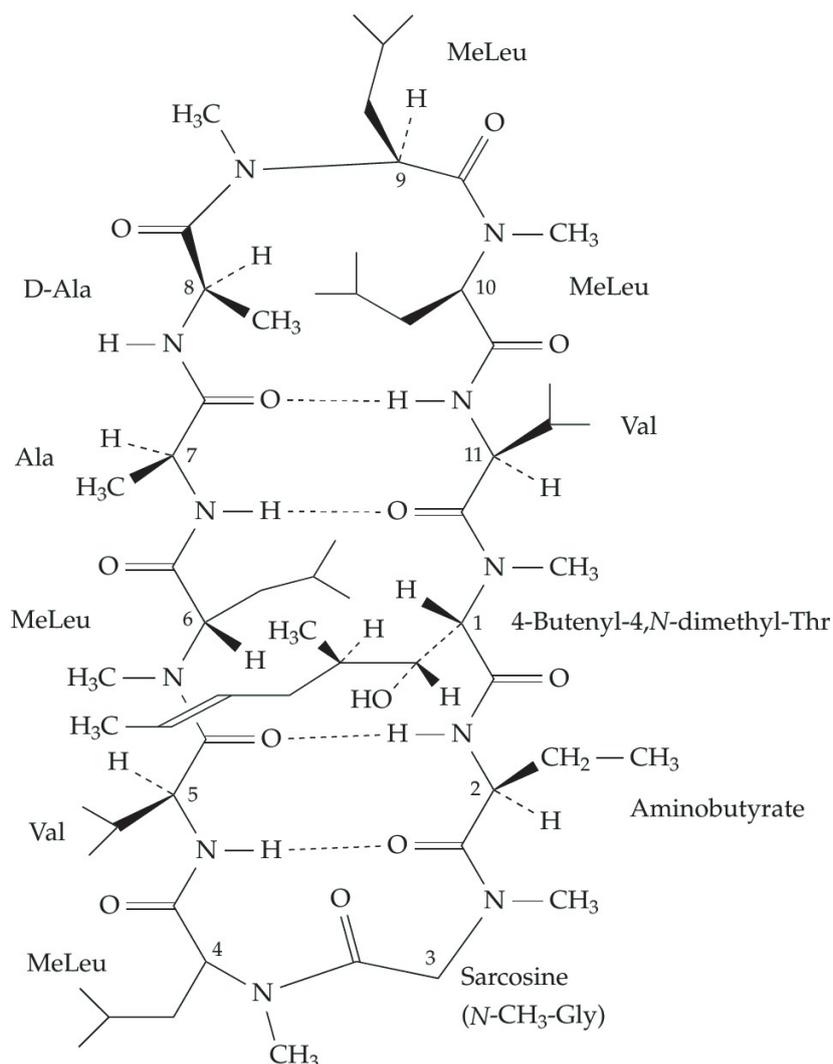


Figura 1.16: Ciclosporina A (adaptado de METZLER (2005), p. 488).

A penicilina e a cefalosporina (figura 1.17) também são sintetizadas pela via não-ribossomal (METZLER (2005), p. 1713). Estes antibióticos, especialmente a penicilina, provocaram uma revolução na medicina do século XX. Eles pertencem ao grupo dos antibióticos beta-lactâmicos e possuem – com exceção das monobactamas – um anel suplementar geminado ao anel beta-lactâmico (figura 1.17). As dezenas de penicilinas existentes diferem entre si pelos radicais ligados no núcleo central.

O mesmo ocorre com os outros antibióticos beta-lactâmicos (SUÁREZ e GUDIOL, 2009).

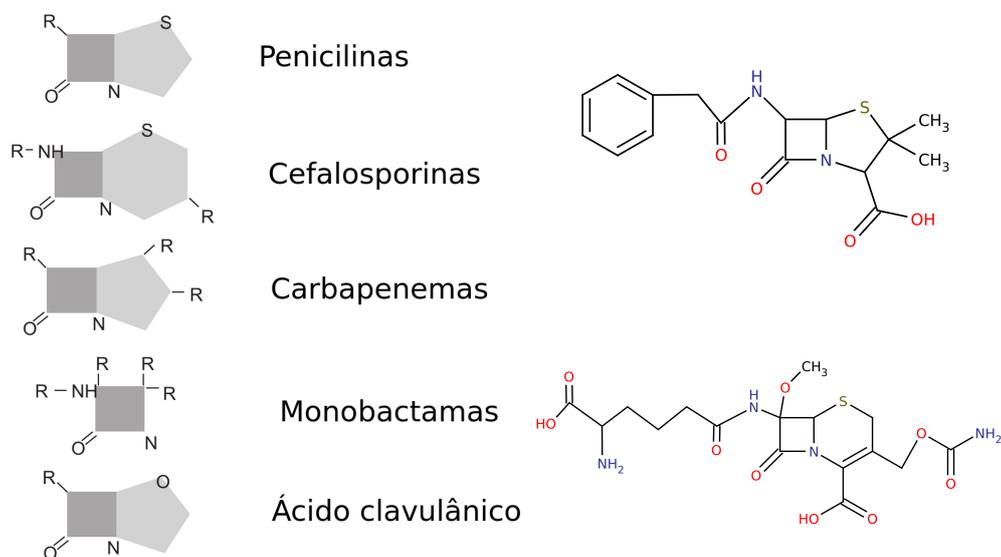


Figura 1.17: Classificação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (adaptado de SUÁREZ e GUDIOL (2009)) e as estruturas da penicilina G (acima) e Cefalosporina C (abaixo).

## 1.8 Importância dos fungos

### 1.8.1 Ecologia

Os fungos podem viver em praticamente todos os ambientes do planeta, e são parte importante dos ciclos vitais da terra. O solo é o principal local de ocorrência de fungos, e nele os fungos exercem a sua principal função na natureza: a de decompositores de matéria orgânica morta. Restos de vegetais e de animais caídos no solo são decompostos por fungos saprófitas, que se alimentam destes restos e são indispensáveis ao ciclo de vida no planeta. Os fungos endofíticos são importantes para as plantas hospedeiras, especialmente quando estas servem de alimento para animais, pois fungos podem produzir substâncias tóxicas que afastam herbívoros.

### 1.8.2 Agricultura

Os fungos micorrizais são especialmente importantes para a agricultura, pois melhoram a absorção de nutrientes pelas plantas, e a interação micorriza / planta é muito estudada.

Fungos fitopatogênicos podem causar doenças nas plantações e grandes prejuízos financeiros. O fungo *Mycosphaerella fijiensis*, causador da doença conhecida como sigatoka-negra, causou prejuízos às plantações de banana da região norte do Brasil

em anos recentes. Os fungos podem também crescer sobre alimentos estocados de forma inapropriada, tornando-os impróprios para o consumo ou, no pior dos casos, causando intoxicações em pessoas ou animais que ingerem estes alimentos, podendo causar mortes. O *ergot* ou *esporão-do-centeio* (*Claviceps purpurea*) produz dezenas de alcalóides tóxicos que podem causar a morte se ingeridos. Um caso bem conhecido de intoxicação por fungos ocorreu no início dos anos 1960, quando milhares de perus morreram em granjas perto de Londres depois de serem alimentados com farinha de amendoim vinda do Brasil. A farinha estava contaminada por fungos, especialmente *Aspergillus flavus*, e a nova classe de toxinas foi chamada de aflatoxinas, sendo que a principal delas, a aflatoxina B1, é considerado um dos mais tóxicos e carcinogênicos compostos já encontrados (figura 1.11) (KELLER *et al.*, 2005).

### 1.8.3 Alimentação

A classe de fungos mais importante na alimentação humana, e com grande importância econômica são as leveduras, responsáveis pelos processos que transformam açúcares em etanol, sendo utilizadas em panificação, cervejaria e indústrias vinícolas, entre outras. Outras aplicações de fungos na indústria alimentícia ocorrem na fabricação de alguns tipos de queijo, e pelo uso de alguns cogumelos na alimentação humana. Alguns corantes produzidos por fungos também são utilizados na indústria alimentícia (DURÁN *et al.*, 2004).

### 1.8.4 Tratamento de resíduos

Os fungos são decompositores por excelência, e algumas espécies são muito eficientes na degradação da madeira, possuindo enzimas que degradam a lignina. Devido a essas características, alguns fungos são utilizados para degradar a lignina nos rejeitos da indústria de celulose, evitando a poluição do meio ambiente (GALVAGNO e FORCHIASSIN, 2004).

### 1.8.5 Produção de metabólitos bioativos

Desde a descoberta da penicilina, os fungos vem sendo estudados como fontes de metabólitos bioativos, e várias classes de compostos utilizados como medicamentos foram obtidos inicialmente de fungos. Milhares de moléculas produzidas por fungos já foram testadas e apresentaram alguma atividade biológica, e algumas se tornaram produtos comerciais importantes.

**Antibióticos:** Esta foi uma das grandes descobertas da medicina do século XX, evitando milhões de mortes em todo o mundo. Uma classe importante de antibióticos são os  $\beta$ -lactâmicos, que foram isolados inicialmente de fungos *Penicillium*,

mas o surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos tradicionais tem tornado urgente a busca por novos compostos. Existem inúmeros patógenos resistentes aos antibióticos tradicionais, dos quais se destacam *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), patógenos respiratórios comuns, incluindo *Streptococcus pneumoniae* e *Mycobacterium tuberculosis*, e o aumento epidêmico de bactérias gram-negativas resistentes a múltiplas drogas (SPELLBERG *et al.*, 2008). Nas últimas décadas, surgiram cepas da bactéria *Neisseria gonorrhoeae* resistente às  $\beta$ -lactamas, tetraciclina, fluorquinolonas e a cefixima (figura 1.18). Agora surgiu uma cepa resistente à ceftriaxona que, como a cefixima, é uma cefalosporina de terceira geração (OHNISHI *et al.*, 2011).

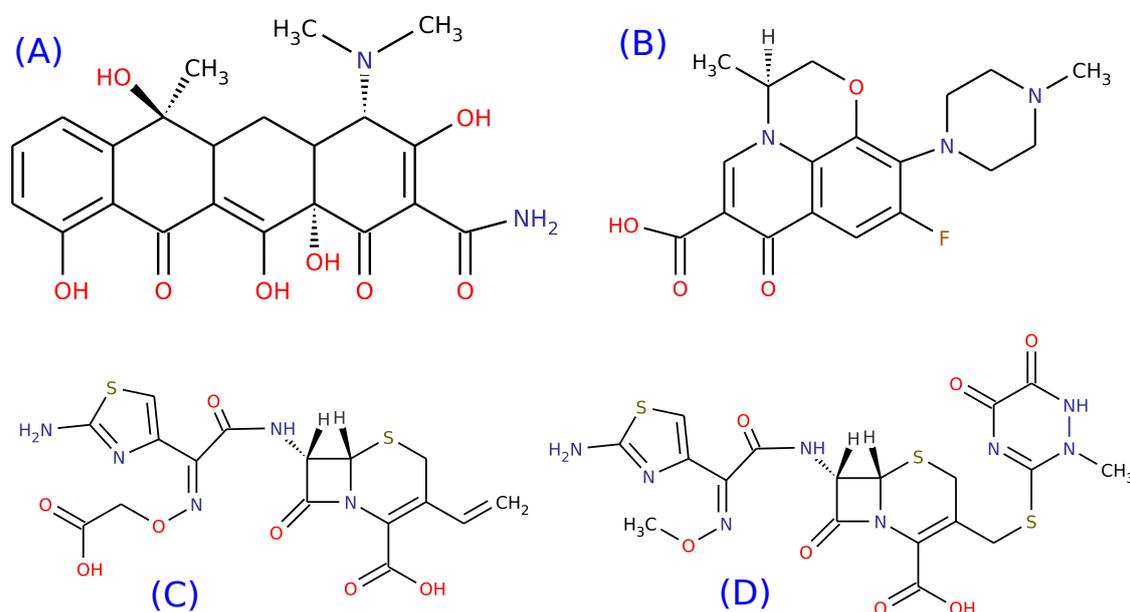


Figura 1.18: (A) tetraciclina; (B) levofloxacina, uma fluoroquinolona; e (C) cefixima e (D) ceftriaxona, cefalosporinas de terceira geração.

**Ciclosporina A:** Um imunossupressor que tornou possível um grande número de transplantes de órgãos, pois evita a rejeição destes pelo corpo do paciente (figura 1.16) (METZLER (2005), p. 488).

**Estatinas:** Uma classe de compostos que inibem a ação de uma enzima indispensável para a formação do colesterol, sendo então utilizada para reduzir os níveis deste esteróide no corpo. A estatina mais utilizada é a lovastatina (figura 1.11) (METZLER (2005), p. 1250).

**Alcalóides:** Em medicina, alcalóides fúngicos são mais conhecidos por sua toxicidade, mas alguns possuem utilidade como medicamento, como o LSD (figura ??), utilizado para tratar esquizofrenia, e a ergotmetrina e metil-ergotmetrina, utilizados como vasoconstrictores para evitar sangramento excessivo após o parto (KAVANAGH, 2005).

Os fungos são uma boa fonte para metabólitos com atividade biológica, pois podem sobreviver em vários ambientes, o que implica alta adaptabilidade e diversidade biológica, e conseqüentemente grande número de metabólitos; crescem rápido, o que é muito bom para a produção em grande escala; não exigem cuidados complexos; podem ser induzidos a mutações para se obterem cepas melhoradas.

Estas características e as anteriormente descritas tornam os fungos excelentes e indispensáveis fontes de metabólitos secundários, depositários de um arsenal enzimático fundamental para processos biotecnológicos diversos.

## 1.9 As plantas hospedeiras

A identificação das plantas hospedeiras foi feita pelo prof. Dr. Ari Hidalgo, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

As Piperáceas são uma família de plantas tropicais, em geral arbustos ou árvores sublenhosas, que fornecem uma grande variedade de pimentas utilizadas como alimento, especiarias, estimulantes, remédios populares, e muitas vezes são utilizadas como plantas ornamentais.

As espécies desta família estão atualmente divididas em cinco gêneros: *Verhuelia*, *Manekia*, *Zippelia*, *Piper* e *Peperomia*. O gênero *Pothomorphe* agora faz parte do gênero *Piper* (SAMAIN *et al.*, 2010).

Além das amidas responsáveis pelo sabor acentuado das pimentas, alcalóides de vários tipos, incluindo aporfínicos, foram encontrados nesta família. Mas segundo RAFFAUF (1996), não foram encontrados alcalóides nas duas plantas estudadas neste trabalho. Mas outros autores encontraram resultados que contestam seus resultados (ver abaixo).

*Piper peltatum* – antigamente chamada de *Pothomorphe peltata* – é conhecida no Brasil como *capeba*, *caapeba* ou *pariparoba* (figura 1.20), e está largamente distribuída nas Américas Central, do Sul e Caribe, e é utilizada por populações tradicionais para tratar várias doenças. MING *et al.* (1997) relatam o uso de *Pi. peltatum* para tratar doenças de pele causadas por fungos. EHRINGHAUS (1997) relata que os Kaxinawá do Acre usam as folhas de *Pi. peltatum* para tratar infecções de pele, dor de cabeça e picadas de insetos; em conjunto com outras plantas, essas folhas são utilizadas para aumentar as contrações do parto; a raiz de *Pi. peltatum* é usada para expulsar a placenta, tratar câibras e “nervosismo”. Em testes, EHRINGHAUS (1997) detectou a presença de monoterpenos, fenilpropanóis e substâncias fenólicas em *Pi. peltatum*, e os testes também deram positivo para alcalóides.

A atividade antiinflamatória de *Pi. peltatum* foi relatada por DESMARCHELIER *et al.* (2000), enquanto PINTO *et al.* (2006) estudaram efeitos citotóxicos de extratos

de *Pi. peltatum* e do composto 4-nerolidilcatecol desta planta, que apresentaram efeito contra câncer de mama, de cólon, melanoma e leucemia. [ANDRADE-NETO et al. \(2007\)](#) demonstraram que o 4-nerolidilcatecol também possui boa atividade contra o *Plasmodium falciparum*, um dos parasitas causadores da malária.

*Peperomia pellucida* é conhecida como *erva de jabuti* (figura 1.20), e é utilizada por populações tradicionais. Seus usos incluem o tratamento de diabetes, tosse, pressão alta, dor de garganta, resfriados, gripes, problemas de rins, hemorróidas, coceiras e contusões ([PEREIRA et al., 2007](#)). Estudos demonstraram que a planta possui boa atividade antibacteriana em um amplo espectro ([KHAN e OMOLOSO, 2002](#)), atividade analgésica ([ARRIGONI-BLANK et al., 2004](#); [AZIBA et al., 2001](#)) e atividade antiinflamatória ([ARRIGONI-BLANK et al., 2004](#)). Compostos bioativos foram isolados nesta planta por [XU et al. \(2006\)](#): composto **1** e peperomina E (ativos contra três linhagens de células tumorais), composto **2** (fraca atividade contra células tumorais HL-60) (figura 1.19) e 7,8-trans-8,8'-trans-7',8'-cis-7,7'-bis(5-metoxi-3,4-metilenedioxifenil)-8-acetoximetil-8'-hidroximetil tetrahidrofurano (mostrou propriedades parecidas com as do estrogênio). Uma análise das folhas indicou a presença de açúcares, alcalóides, carotenóides, esteróides, triterpenóides, saponinas e taninos, mas os compostos não foram identificados ([LAMEIRA et al., 2004](#)).

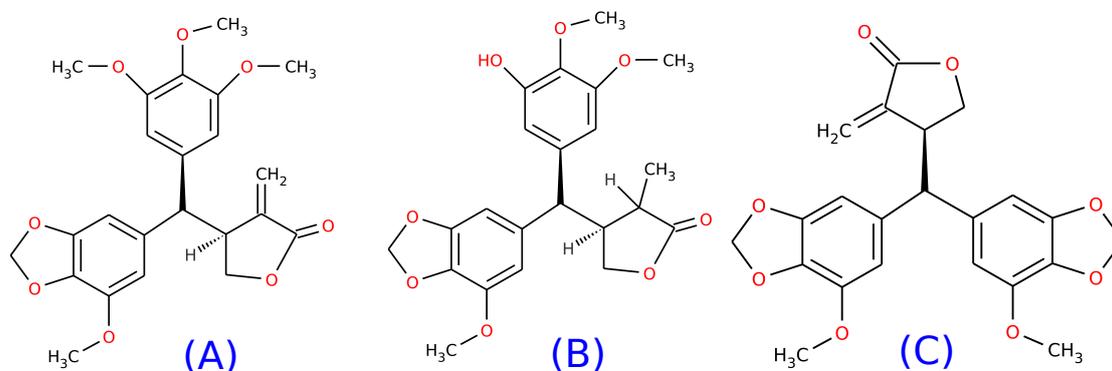


Figura 1.19: Compostos **1** (A) e **2** (B) isolados por [XU et al. \(2006\)](#) em *Pe. pellucida*, e (C) peperomina E



Figura 1.20: *Piper peltatum* (esquerda) e *Peperomia pellucida*

## Seção 2

# Objetivos

### 2.1 Geral

Estudar a diversidade, atividades biológicas e identificar compostos dos endófitos de *Piper peltatum* e *Peperomia pellucida*.

### 2.2 Específicos

1. Isolar, identificar e cultivar os fungos endofíticos de *Piper peltatum* e *Peperomia pellucida*.
2. Avaliar o potencial bioativo dos extratos dos fungos coletados.
3. Isolar e identificar substâncias com atividade biológica metabolizadas pelos fungos.

## Seção 3

# Materiais e métodos

### 3.1 Coleta de material vegetal

O material vegetal foi coletado no próprio *campus* da UFAM, colocado em sacos plásticos esterilizados e mantidos sob refrigeração até o momento de serem transferidos para as placas de Petri, período esse que não excedeu 4 horas.

### 3.2 Tratamento do material vegetal

Antes de ser levado para a câmara asséptica, o material vegetal foi lavado com água e detergente neutro, para eliminar resíduos e microrganismos da superfície externa da planta (figura 3.1). No interior da câmara, o material foi esterilizado com uma sequência de lavagens, com o objetivo de eliminar possíveis fungos ainda presentes na superfície do material. Primeiro, imersão em uma solução de etanol a 70% em volume durante um minuto, seguida de imersão em uma solução de hipoclorito de sódio a 3% por quatro minutos, imersão em outra solução de etanol a 70% por 30 segundos, com o objetivo de retirar o hipoclorito, e finalmente lavagem com água deionizada e esterilizada (DE SOUZA (2006), p. 20-21).

Após a assepsia superficial, os tecidos das plantas foram cortados com um bisturi esterilizado em pequenos pedaços de aproximadamente 4 mm×4 mm e colocados em placas de Petri com meio de cultura, quatro pedaços por placa, dispostos em uma matriz 2×2. Foram utilizados três meios de cultura: BDA, ISP2 e Aveia. As placas foram lacradas e colocadas na incubadora a 18°C, 26°C e 40°C, por um período de uma semana a cada temperatura.

Com o objetivo de verificar se a assepsia do material vegetal foi realizada corretamente, alíquotas de 50 µL da última água de lavagem foram espalhados em placas de Petri com meios de cultura sem antibióticos ou fungicidas.

De *Pi. peltatum* foram analisados cinco tecidos: caule, raiz, flor, folha e haste



Figura 3.1: Material vegetal de *Pi. peltatum* (esquerda) e *Pe. pellucida*

da folha. Para cada meio de cultura – BDA, ISP2 ou Aveia – 12 amostras de cada tecido foram colocadas em três placas de Petri, quatro amostras por placa, somando 60 amostras para cada meio de cultura, e 180 amostras no total. De *Pe. pellucida*, foram analisados caule, raiz, flor e folha, 12 amostras por tecido, 48 amostras por meio de cultura, 144 amostras no total.

### 3.3 Meios de cultura de fungos

Existem muitas formulações para meios de cultura, inclusive algumas totalmente sintéticas, e misturas prontas ou semiprontas para uso em laboratório. O importante é o meio possuir uma fonte de energia de fácil acesso e nutrientes essenciais. Os meios utilizados neste trabalho foram BDA suplementado com  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de extrato de levedura, ISP2 e Aveia. No meio BDA, tetraciclina e ampicilina ( $100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foram adicionadas para prevenir o crescimento de bactérias. Em ISP2 e aveia foram adicionados tetraciclina e cetoconazol ( $100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), com o objetivo de isolar actinomicetos, que foram repassados a outros membros do grupo, e evitar o crescimento de fungos.

Um meio líquido especial (ME) foi formulado para o cultivo de um fungo do gênero *Cephalosporium*, um conhecido produtor de substâncias com atividade antibiótica, em um *shaker* (tabela 3.1).

Tabela 3.1: Meio de cultura especial (ME)

Componente	Concentração
Sacarose	20 $g.L^{-1}$
Extrato de levedura	4 $g.L^{-1}$
Extrato de malte	4 $g.L^{-1}$
Castanha moída	5 $g.L^{-1}$
Óleo de soja	2 $mL.L^{-1}$
Solução-traço de sais contendo $Mn^{+2}$	2 $mL.L^{-1}$

### 3.4 Isolamento e purificação dos fungos

#### Materiais e equipamentos utilizados .

- Água destilada
- Glicerol P.A.
- Dextrose
- Extrato de levedura
- Extrato de malte
- Amido de milho
- Aveia
- Batata
- Alcool 70%
- Hipoclorito de Sódio 3%

#### Equipamentos

- Câmara de Fluxo Laminar – *Tecnal*
- Estufa Incubadora com agitação (*shaker*) – *Tecnal*
- Autoclave Vertical – *Stermax*
- Balança analítica AUY 220 – *Shimadzu*
- Agitador de tubos de ensaio – *Tecnal*
- Forno de microondas

Os fungos que cresceram a partir das amostras de tecidos das plantas (figura 3.2) foram transferidos para tubos de ensaio com meio de cultura inclinados, que foram fechados com tampões esterilizadas de algodão e gaze, para permitir a entrada de ar mas bloquear a passagem de microrganismos e evitar contaminações. Estes tubos foram colocados na incubadora a temperatura constante de 26°C.

Alguns dos tubos onde foram colocados os fungos que surgiram das amostras das plantas continham mais de um fungo, sendo necessária uma purificação. Foram

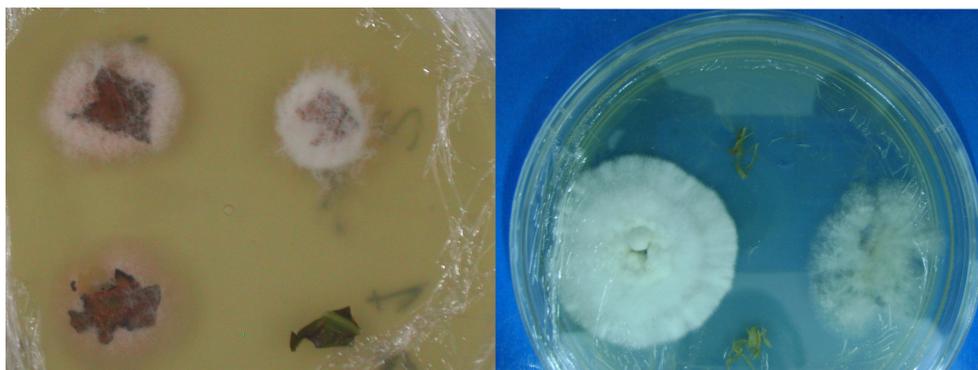


Figura 3.2: Crescimento fúngico a partir do material vegetal das plantas

aplicadas técnicas de isolamento de cepas fúngicas puras, diferentes para fungos com esporos e fungos sem esporos (Meióticos ou com reprodução sexuada).

### 3.4.1 Fungos com esporos

Para se conseguir cepas puras de fungos que produzem esporos, foram feitas culturas monospóricas pela técnica que utiliza *tween* (AZEVEDO e COSTA, 1973). Com essa técnica é possível obter um fungo oriundo de um único esporo, o que garante a pureza da cepa fúngica (figura 3.3).

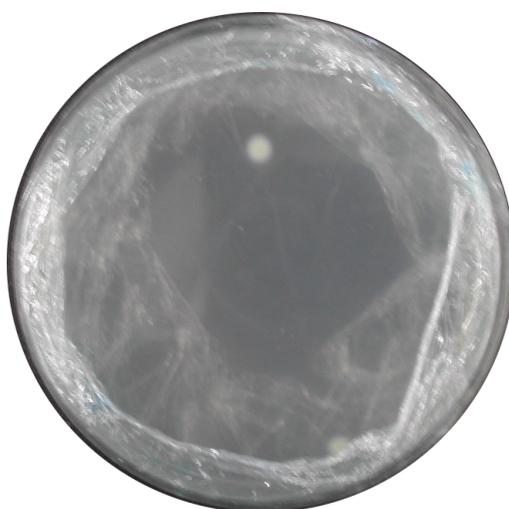


Figura 3.3: Fungo crescendo a partir de um único esporo

### 3.4.2 Fungos sem esporos

Para os fungos que não produzem esporos, foi utilizado o método de repicagem para a purificação das cepas, o qual consiste em transferir pequenos pedaços do micélio do fungo, cortados com um bisturi, para outra placa com meio de cultura esterilizado, e colocar a placa na incubadora. Se a nova cultura ainda não estiver pura, faz-se novas inoculações, até se obter uma cepa fúngica pura.

### 3.5 Identificação e preservação dos fungos

A identificação dos fungos endofíticos foi feita observando-se suas características macroscópicas, tais como morfologia, textura, cor e variações na pigmentação, e também características microscópicas, tais como a forma das hifas, do micélio e estruturas reprodutivas, que foram coradas com lactofenol ou outro corante apropriado. As observações foram comparadas com dados da literatura, incluindo chaves de classificação, para a identificação taxonômica dos fungos. Técnicas de microcultivo foram usadas para auxiliar na identificação de alguns fungos. Esta técnica consiste no cultivo do fungo sob lamínulas de microscópio esterilizadas e dispostas sobre o meio de cultura. Ela permite fazer um acompanhamento do desenvolvimento do fungo e, principalmente, obter os detalhes de suas estruturas reprodutivas sem alterar sua disposição natural, o que nos permite identificar com maior precisão o fungo.

Alguns fungos foram identificados através do sequenciamento das regiões ITS-1 a ITS-4 do rDNA (DNA ribossomal) (WHITE *et al.*, 1990), em laboratórios da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, e da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. A comparação das seqüências de bases nitrogenadas foi feita através do software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI.

Os fungos purificados foram preservados na coleção do grupo de pesquisa através de variados métodos. O método de preservação de CASTELLANI (1939) foi utilizado para os fungos produtores de esporos, por ser um método muito simples e barato. Ele consiste na transferência de pequenos pedaços de meio de cultura contendo os fungos (aproximadamente 5 mm × 5 mm) para pequenos frascos lacrados contendo água estéril (figura 3.4). As vantagens apresentadas pelo método são:

- I) Mantém a viabilidade das culturas por longos períodos de tempo sem necessidade de repicagens;
- II) Evita-se o problema de infecção por ácaros;
- III) Baixo custo do processo, uma vez que substitui meios de cultura dispendiosos por água destilada e não necessita de equipamento sofisticados;
- IV) Conserva as características morfológicas e fisiológicas dos fungos cultivados;

V) Pode ser empregado para preservação de um grande número de gêneros de fungos, em suas formas anamórficas ou teleomórficas (mono ou dicarióticas). Serve também para a preservação de bactérias fitopatogênicas.

Para os fungos que produzem esporos, também foram utilizadas as técnicas de preservação em óleo mineral em água com glicerol a 20%. Para a preservação em óleo mineral, os fungos foram cultivados em pequenos tubos de ensaio com meio de cultura inclinado os quais, depois de os fungos se desenvolverem, foram preenchidos com óleo mineral esterilizado e lacrados. Este método permite visualizar as características morfológicas do fungo (figura 3.4).

Para a preservação em água esterilizada com 20% de glicerol, esporos ou partes do micélio dos fungos foram colocados nessa solução, em microtubos (tubos crigênicos) de material polimérico de 2 mL de volume, lacrados e armazenados a  $-18^{\circ}\text{C}$  (figura 3.4). Para os fungos ascomicetos ou que não produzem esporos (*mycelia sterilia*), o método de Castellani foi substituído pela conservação em placas de petri de plástico de 60 mm  $\times$  15 mm e, após o tempo de cultivo necessário para o crescimento micelial em toda a superfície do meio, essas placas são mantidas em refrigerador e repicadas a cada quatro meses.



Figura 3.4: Da esquerda para a direita: fungos conservados pelo método de Castellani, em óleo mineral e em microtubos com água e glicerol a 20%

## 3.6 Cultivo dos fungos

O método de cultivo utilizado variou de acordo com o destino a ser dado aos extratos obtidos. Para obter extratos destinados a testes para verificar a existência de atividade biológica (*screening*) foram feitas culturas em pequena escala; para extratos destinados ao isolamento de substâncias, foram feitas culturas em larga escala.

### 3.6.1 Cultivo em pequena escala

Neste caso cada fungo foi cultivado em três frascos Erlenmeyer de 250 mL de volume, contendo 100 mL de meio de cultura líquido em cada um. O meio utilizado foi o

mesmo onde o fungo foi coletado, porém sem o ágar. A inoculação foi feita na câmara asséptica e o fungo cresceu sob agitação a 120 rpm até atingir o tempo adequado a cada tipo de fungo para a produção de metabólitos secundários (figura 3.6).

### 3.6.1.1 Fungos cultivados

Para os ensaios em pequena escala, foram cultivados os fungos 232, 301, e 297 (*Fusarium* spp.), 317, 324, 325, e 331 (*Xylaria* spp.), 222, 268, e 216 (*Penicillium* spp.), 233 (*Guignardia* sp.), 353 (*Cephalosporium* sp.), e o fungo de gênero desconhecido 371. A cultura foi feita como descrita na seção 3.6.1 e a extração como descrita na seção 3.7, e testes foram feitos com os extratos brutos.

Nos casos dos fungos 216 (*Penicillium*), 232 (*Fusarium*) e 353 (*Cephalosporium*), antes mesmo dos resultados dos testes de atividade biológica, foi decidido que seriam cultivados em larga escala. O fungo 216 (*Penicillium*) apresentou atividade antifúngica na placa de Petri, o fungo 232 (*Fusarium*) apresentou precipitação de cristais (ver figura 3.5 para ambos) e o fungo 353 pelo fato de ser um fungo do gênero *Cephalosporium*, conhecido por produzir compostos com atividade antibiótica.

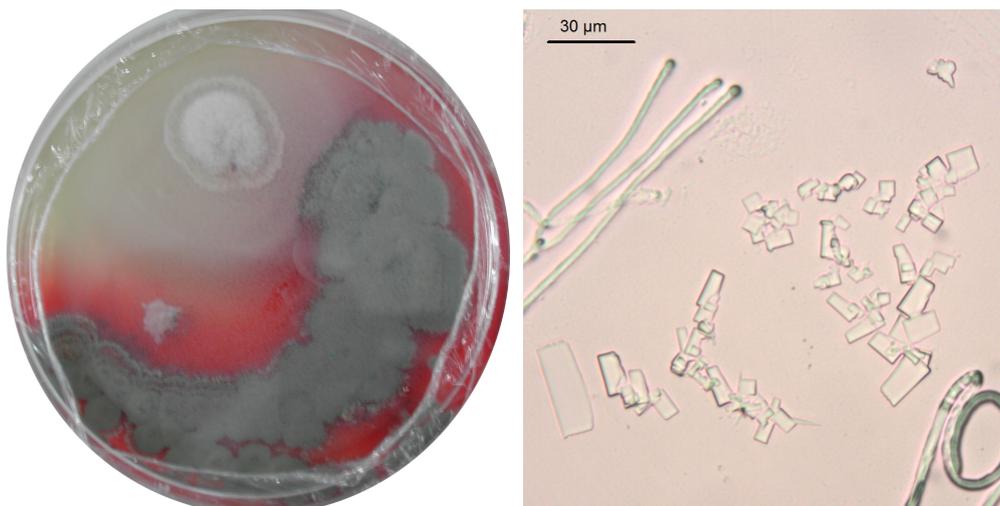


Figura 3.5: Esquerda: fungo 216 (cinza) na placa de Petri. Direita: cristais precipitados pelo fungo 232 (*Fusarium*) ao microscópio; barra: 30 µm

### 3.6.2 Cultivo em larga escala

Foram utilizados frascos Erlenmeyer de um litro cada um, com 300 mL de meio de cultura líquido acrescidos de 50 µL da suspensão de esporos. A partir do cultivo em pequena escala, foi feita uma estimativa do número de frascos com meio de cultura necessários para se obter ao menos uma grama de extrato bruto. A inoculação foi feita em câmara asséptica e o crescimento do fungo foi feito no modo estático, o que resultou em um tempo maior que o do modo agitado para o fungo produzir metabólitos..



Figura 3.6: O fungo 353 (*Cephalosporium* sp.), cultivado de maneiras diferentes. Esquerda: sem agitação; direita: com agitação

### 3.6.2.1 Fungos cultivados

Em larga escala foram cultivados os fungos 216 (*Penicillium* sp.), 232 (*Fusarium solani*) e 353 (*Cephalosporium* sp.), pelas razões expostas na seção 3.6.1.1, e também os fungos 325 e 331 (*Xylaria* spp.).

***Penicillium* (216)** – Foram inoculados um total de 14 frascos de 1 L contendo 300 mL de meio líquido BDL (água de batata, dextrose e extrato de levedura), e cultivados por uma semana. Uma filtração foi feita para separar o caldo fermentado do micélio, que foi macerado em etanol (figura 3.7).

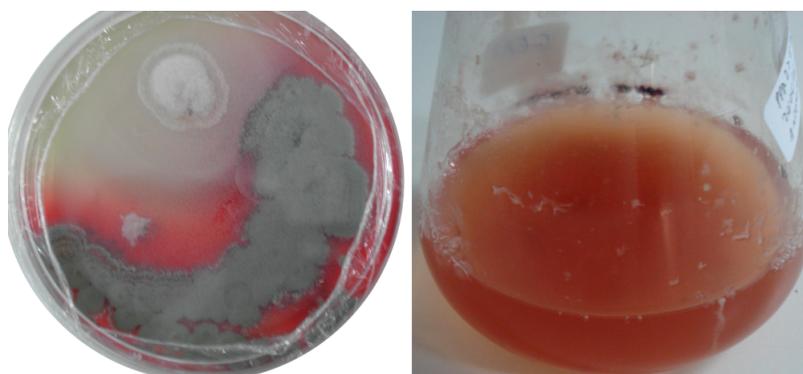


Figura 3.7: Fungo *Penicillium* sp. (216) e seu caldo fermentado

***Fusarium solani* (232)** – Foram inoculados 50 frascos de 1 L contendo 300 mL de meio ISP2 sem ágar, e quatro frascos foram mantidos sem inóculo, para controle. A inoculação foi feita adicionando-se 50  $\mu$ L de uma suspensão dos esporos em glicerol, e o tempo de cultura foi de 3 semanas, em local sem luz solar direta. Uma filtração separou o caldo fermentado do micélio, e o caldo fermentado foi particionado com acetato de etila três vezes e forneceu 8,5 g de extrato; e duas extrações com acetato de etila/isopropanol 8:2 (v/v) (figura 3.8).



Figura 3.8: Fungo *Fusarium solani* na placa de Petri, nos frascos de cultura e seu caldo fermentado

***Xylaria (325)*** – Foram inoculados 35 frascos de 1 L, com 300 mL de meio BDL por 18 dias. Uma filtração com funil Büchner separou o caldo fermentado do micélio, que foi macerado com acetato de etila/metanol 7:3 e forneceu 11,17 g de extrato. O caldo fermentado foi extraído com acetato de etila puro, fornecendo 1,5 g de extrato, e uma segunda extração com acetato de etila/isopropanol 7:3 rendeu 0,75 g de extrato (figura 3.9).



Figura 3.9: Fungo *Xylaria* sp. (325) na placa de Petri e nos frascos, após cultura

***Xylaria (331)*** – Foram inoculados 12 frascos de 1 L, com 300 mL de BDL por um mês. Após separação do caldo fermentado e do micélio por filtração, a extração do caldo com acetato de etila forneceu 1,33 gramas de extrato, e a extração com acetato de etila/isopropanol mais 0,42 gramas. A maceração do micélio forneceu 2,28 gramas (figura 3.10).

***Cephalosporium (353) (A)*** – Foram inoculados 40 frascos de 1 litro cada um, contendo 300 mL de meio BDL por 3 semanas. Após a filtração, a partição do caldo fermentado com acetato de etila puro rendeu 0,8 g e com acetato de etila/isopropanol mais 0,5 g; a maceração do micélio com acetato de etila/metanol rendeu 8,3 g (figura 3.11).

***Cephalosporium (353) (B)*** – Cultivado em meio especial (ME, ver tabela 3.1) em um *shaker* a 220 rpm. No *shaker* era possível acondicionar até 25 frascos de 250

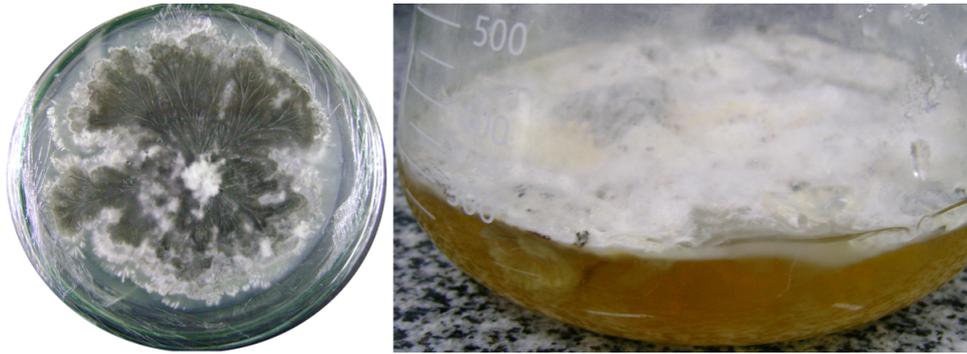


Figura 3.10: Fungo *Xylaria* sp. (331) na placa de Petri e nos frascos, após cultura

mL, contendo 100 mL de ME. Foram feitas várias culturas, para se obter uma boa quantidade de extrato. A temperatura foi ajustada para 29°C e o tempo de cultivo foi de 8 dias. A filtração foi feita em um membrana microporosa PES, com 0,22 µm de espessura e seus poros possuíam 0,22 µm de diâmetro. A partição do caldo fermentado com acetato de etila rendeu 0,45 g e com acetato de etila/isopropanol mais 0,55 g; a maceração do micélio com acetato de etila/metanol 7:3 forneceu 20,62 g (figura 3.11).



Figura 3.11: Fungo *Cephalosporium* na placa de Petri, cultivado sem agitação (centro) e cultivado no *shaker*

## 3.7 Obtenção de extratos

### Materiais e equipamentos utilizados .

- Placa cromatográfica de Sílica gel 60 Merck para cromatografia de camada delgada

- Sílica gel (*Flash*) 70-230 µm e 43-60 µm para cromatografia em coluna

### Solventes

Solventes de grau analítico e/ou comercial: hexano, acetato de etila, isopropanol, etanol e metanol.

### equipamentos

- Evaporador rotativo
- Lâmpada de U.V. 254 e 396 nm

- Bomba a vácuo
- Balança analítica AUY 220 – *Shimadzu*

O procedimento abaixo descrito para a obtenção dos extratos foi o mesmo, tanto para as culturas em larga escala quanto para as culturas em pequena escala. Inicialmente, a separação entre o micélio e o caldo fermentado foi feita por filtração a baixa pressão utilizando filtros de papel e, no caso de ensaios biológicos do meio fermentado *in natura*, foi necessária a remoção total das células, para a qual foi utilizado um sistema com membrana microporosa (figura 3.12).



Figura 3.12: Filtração do meio fermentado com funil de Büchner (esquerda) e membrana microporosa (direita).

O micélio foi macerado em uma mistura de acetato de etila e metanol 7:3 (v/v). Aqui o metanol tem também a função de destruir as células dos fungos, reduzindo a possibilidade de contaminações, pois a partir daqui os extratos foram processados fora da câmara asséptica.

A extração dos constituintes do meio de cultura fermentado foi realizada em funis de separação, primeiro com acetato de etila puro e depois com uma mistura de acetato de etila e isopropanol 7:3 (v/v). Os solventes de extração foram removidos com o auxílio de um evaporador rotativo trabalhando a pressão reduzida, tomando-se o cuidado de não utilizar temperaturas acima dos 50°C, para diminuir o risco de alteração dos compostos. Os “extratos brutos” obtidos para cada cultivo – dois originados do caldo fermentado e um do micélio – foram submetidos a testes de atividade biológica. Culturas em larga escala foram feitas somente para fungos considerados promissores nos ensaios biológicos, e tiveram também seus extratos

fracionados na tentativa de isolar e identificar seus metabólitos.

### 3.7.1 Fracionamento preliminar dos extratos

Durante os procedimentos de análises, os extratos e respectivas frações foram analisados em placas de cromatografia de camada delgada (CCD), com os objetivos de auxiliar na determinação da melhor mistura de solventes a ser utilizada nas colunas cromatográficas, de verificar se duas frações consecutivas eram muito similares e poderiam ser misturadas, e de estimar o grau de pureza das frações obtidas.

Todos os extratos estudados foram submetidos inicialmente a coluna filtrante com o objetivo de fazer apenas uma separação preliminar dos compostos do extrato bruto. Foi utilizada sílica gel com granulometria de 60-200  $\mu\text{m}$  em um sistema a baixa pressão, onde todo solvente era retirado antes de acrescentar o solvente seguinte, em ordem crescente de polaridade. Em geral, apenas quatro frações de cada extrato bruto foram obtidas por essa técnica.

#### 3.7.1.1 Fungo 232 *Fusarium solani*

Com este fungo houve diferenças em relação aos outros, pois durante a partição do caldo fermentado, foi observada a presença de um precipitado nos frascos. Estes cristais foram recolhidos e submetidos a um processo de recristalização, primeiro os dissolvendo em metanol aquecido e depois concentrando essa solução em banho-maria. A solução concentrada foi colocada sob refrigeração e formaram-se cristais, que foram separados do líquido, lavados com metanol várias vezes e colocados no dessecador para eliminar qualquer líquido ainda presente. Esta amostra recebeu o código temporário de **Pp 01**.

Também no fracionamento em coluna filtrante este fungo foi tratado de forma diferente. O extrato bruto feito com acetato de etila puro foi fracionado em oito partes, utilizando-se uma combinação de hexano/acetato de etila/metanol: 1:0:0 (1), 8,5:1,5:0 (2), 7:3:0 (3), 1:1:0 (4), 0:1:0 (5), 0:7:3 (6), 0:1:1 (7) e 0:0:1 (8). A sílica utilizada tinha de 60-200  $\mu\text{m}$  (figura 3.13).

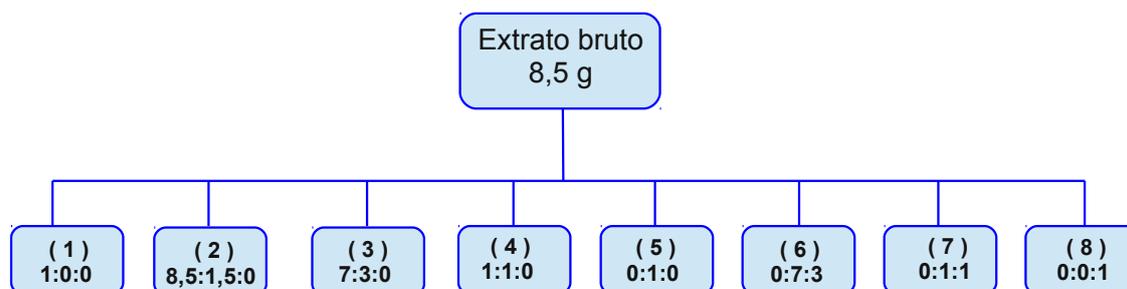


Figura 3.13: Fracionamento do extrato do fungo 232 (*Fusarium solani*) na coluna filtrante

O extrato bruto do micélio, que foi macerado em etanol, foi fracionado em uma coluna filtrante com sílica de 60-200  $\mu\text{m}$  utilizando-se hexano/acetato de etila e metanol. Foram feitas cinco frações (figura 3.14).

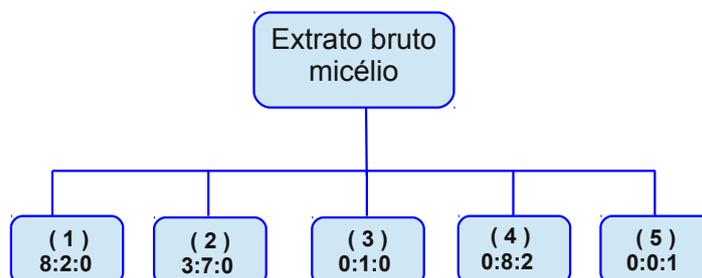


Figura 3.14: Fracionamento do extrato de micélio do fungo 232 (*Fusarium solani*) na coluna filtrante

### 3.7.1.2 Fungo 325 *Xylaria* sp.

Em testes com placas CCD verificou-se uma aparente similaridade entre as extrações do caldo fermentado com acetato de etila puro (1,54 g) e com acetato de etila/isopropanol (0,22 g), e as duas foram reunidas, e posteriormente fracionadas em uma coluna filtrante com sílica de 60-200  $\mu\text{m}$  e os eluentes utilizados foram combinações de hexano/acetato de etila/metanol em ordem crescente de polaridade (figura 3.15).

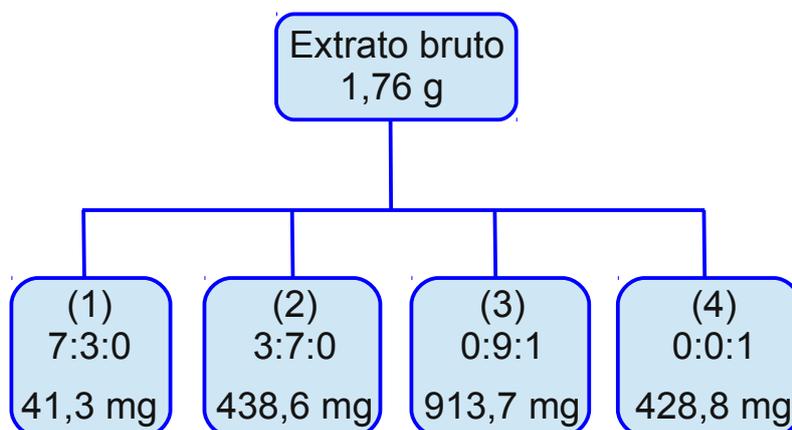


Figura 3.15: Fracionamento do extrato do caldo fermentado do fungo 325 *Xylaria* na coluna filtrante

### 3.7.1.3 Fungo 331 *Xylaria* sp.

Também neste caso fez-se a reunião das frações obtidas com acetato de etila puro (1,33 g) e acetato de etila/isopropanol 7:3 (0,44 g) e a mistura foi fracionada em uma

coluna filtrante com sílica de 60-200  $\mu\text{m}$  e, como no caso anterior, foram obtidas quatro frações de misturas de hexano/acetato de etila/metanol (figura 3.16).

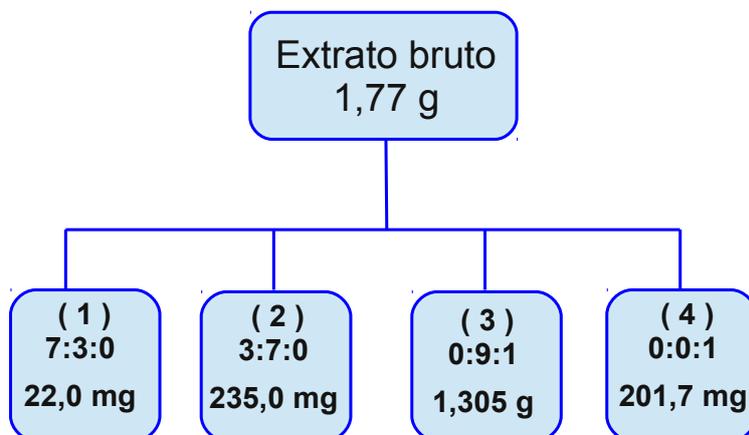


Figura 3.16: Fracionamento do extrato do caldo fermentado do fungo 331 *Xylaria* na coluna filtrante

#### 3.7.1.4 Fungo 353 *Cephalosporium* sp. – *shaker*

Também aqui as frações de acetato de etila puro (0,45 g) e acetato de etila/isopropanol 7:3 (0,55 g) foram reunidas e fracionadas em uma coluna filtrante com sílica de 60-200  $\mu\text{m}$ , com misturas de hexano/acetato de etila/ metanol como eluente (figura 3.17).

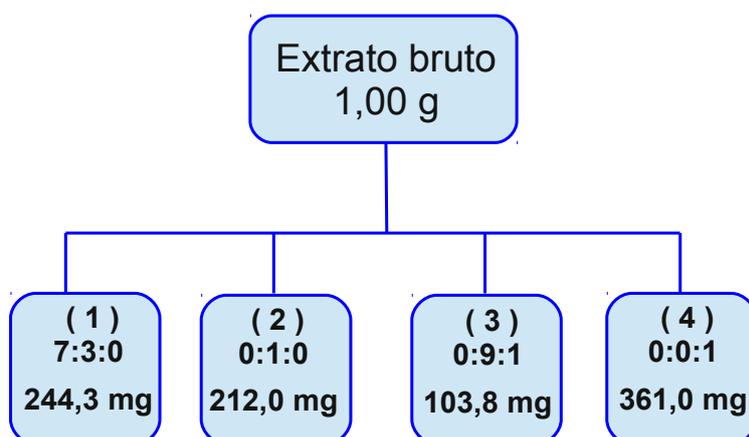


Figura 3.17: Fracionamento do extrato do caldo fermentado do fungo 353 cultivado no *shaker* em meio especial (ME).

#### 3.7.1.5 Fungo 353 *Cephalosporium* sp. – *shaker* – micélio

Uma amostra de 8,0 g do extrato do micélio foi fracionada na coluna filtrante com sílica 60-200  $\mu\text{m}$  e aqui fez-se uso de água na última eluição, para retirar

os açúcares presentes no extrato do micélio. Os eluentes eram uma combinação de hexano/acetato de etila/metanol/água (figura 3.18).

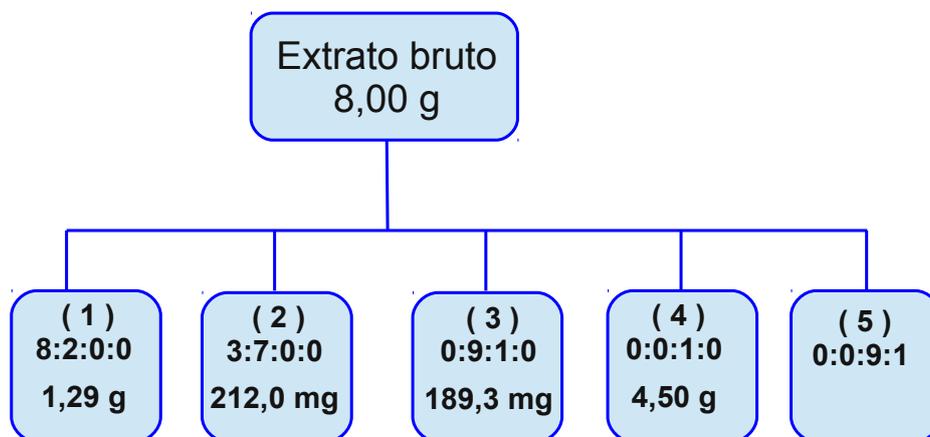


Figura 3.18: Fracionamento do extrato do micélio do fungo 353 cultivado no *shaker* em meio especial (ME).

### 3.7.1.6 Fungo 353 *Cephalosporium* sp. cultivado em meio BDL

Uma porção de 248 mg do extrato do caldo fermentado particionado com acetato de etila puro foi fracionada em uma coluna filtrante com sílica 60-200  $\mu\text{m}$  com hexano/acetato de etila/metanol (figura 3.19).

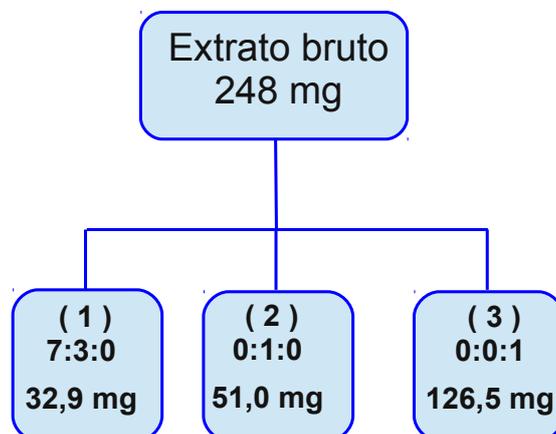


Figura 3.19: Fracionamento do extrato do caldo fermentado do fungo 353 cultivado em modo estático.

### 3.7.2 Fracionamento em coluna cromatográfica

As frações das colunas filtrantes foram submetidas a novos fracionamentos cromatográficos em sílica gel com granulometria entre 40-63  $\mu\text{m}$  com o objetivo de serem

obtidas substâncias puras. Para a obtenção de substâncias puras também foi feito o uso de CLAE, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, ou HPLC. O HPLC foi amplamente utilizado neste trabalho, tanto no modo analítico quanto no preparativo ou semi-preparativo.

### 3.7.2.1 Fungo 232 *Fusarium solani*

Das oito frações obtidas do extrato bruto do fungo 232 *Fusarium solani* (figura 3.13), as frações (2) e (6) foram submetidas a colunas cromatográficas com sílica normal de granulometria 43-60  $\mu\text{m}$  e o eluente foram misturas de hexano/acetato de etila/metanol, em graus crescentes de polaridade. Da coluna com a amostra (2) foram obtidas 43 frações, sendo que duas se mostraram puras, e foram chamadas de **Pp 02** e **Pp 04**. Da coluna com a amostra (6) foram obtidas 20 frações, sendo uma pura, **Pp 03** (figura 3.20).

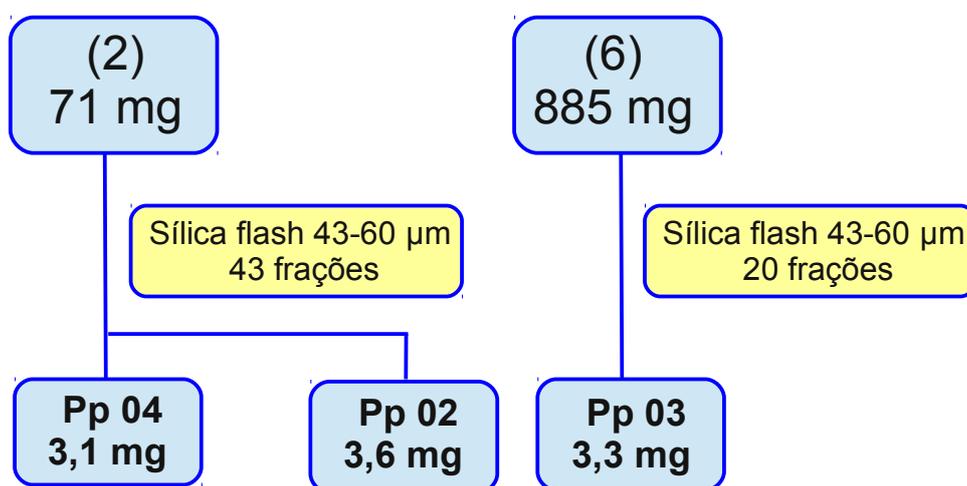


Figura 3.20: Obtenção das amostras *Pp02*, *Pp03* e *Pp04*

### 3.7.2.2 Fungo 331 *Xylaria* sp.

Das frações obtidas na coluna filtrante (ver figura 3.16), a fração (3) foi selecionada para um fracionamento posterior em uma coluna cromatográfica de sílica normal com granulometria 43-60  $\mu\text{m}$ , utilizando misturas de hexano/acetato de etila/metanol como eluente, em graus crescentes de polaridade. Foram recolhidas 12 frações de 50 mL, e após evaporação do solvente e testes com placas de CCD, as frações (2) e (3), (5) e (6), (8) e (9), (10) e (11) foram reunidas. Não havia frações puras (figura 3.21).

A fração (5), com 333,5 mg, foi novamente submetida a uma separação em coluna cromatográfica com sílica normal de granulometria 43-60  $\mu\text{m}$  mas, agora, o eluente utilizado era uma mistura de hexano/acetato de etila/isopropanol. Foram

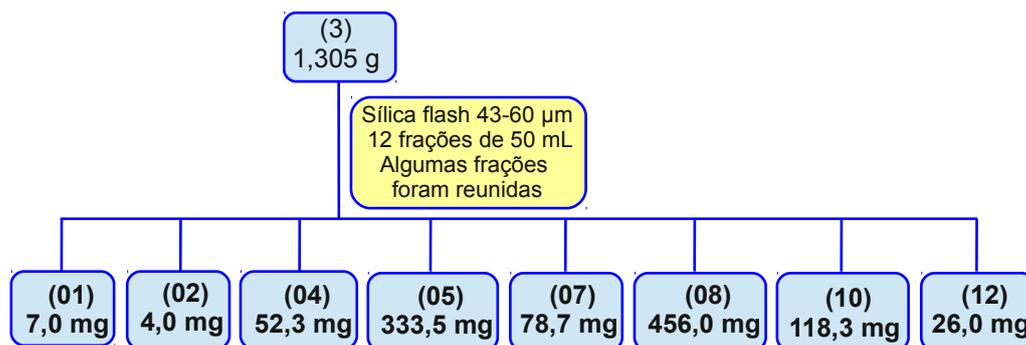


Figura 3.21: Separação da fração (3) do extrato do caldo de cultura do fungo 331 *Xylaria*

coletadas frações de 50 mL, totalizando 14 frações. Aqui também não foram isoladas substâncias puras.

### 3.7.2.3 Fungo 325 *Xylaria* sp.

Das frações obtidas na coluna filtrante (ver figura 3.15), as frações (1) e (2) foram melhor investigadas.

**3.7.2.3.1 Fração (2) do fungo 325 *Xylaria* sp.** A fração (2) do fungo 325 *Xylaria* sp. (ver seção 3.7.1.2) com 438,6 mg foi fracionada em uma coluna de sílica com granulometria de 70-230 µm utilizando-se como eluente uma mistura de hexano/acetato de etila/metanol com gradiente de polaridade crescente. Foram coletadas 18 frações de 50 mL. A fração número 10, coletada com acetato de etila puro como eluente, e com massa de 97,7 mg, após testes de CCD, foi examinada por HPLC.

## 3.7.3 HPLC

Os dois aparelhos HPLC disponíveis foram utilizados neste trabalho, tirando proveito das características distintas que possuem. O aparelho da *Thermo Scientific* possui um bom detector UV, capaz de varrer o espectro de 190 nm a 800 nm e foi utilizado para determinar, entre outras coisas, quais os comprimentos de onda mais adequados para acompanhar a eluição da mistura no aparelho da *Shimadzu*, já que este detecta a radiação UV em apenas dois canais. Neste aparelho, utilizando colunas analíticas, era buscada a melhor mistura de solventes para a separação dos compostos da amostra, mantendo a concentração dos solventes constante (modo isocrático). Determinada a mistura, a coluna era trocada por uma preparativa ou semi-preparativa, com o mesmo recheio da coluna analítica. Sendo estas colunas bem maiores que as analíticas, elas suportam uma carga de material e um fluxo de

solvente maior e, para determinar aproximadamente que valores utilizar, fez-se o cálculo de “escalonamento” das colunas, de acordo com CASS e DEGANI (2001):

$$S = \frac{R_p^2 \cdot L_p}{R_a^2 \cdot L_a}$$

onde **S** é o fator de escalonamento, **R** é o raio da coluna, **L** o seu comprimento e os índices **p** e **a** se referem à coluna preparativa (ou semi-preparativa) e analítica, respectivamente. Mas é preciso ter cuidado com o processo de escalonamento, já que este cálculo, ao ser aplicado ao fluxo de solvente, pode levar a pressões maiores do que a pressão máxima configurada para o aparelho.

### 3.7.3.1 331 *Xylaria* sp.

Nas placas CCD observou-se uma boa pureza na fração (5) (obtida na última coluna cromatográfica, seção 3.7.2.2), agora com 51,0 mg de massa. Um teste no HPLC analítico confirmou essa observação e, após alguns testes, foi obtida uma boa separação dos compostos da mistura utilizando-se uma coluna *Phenomenex* de sílica derivada phenyl-hexyl (fase reversa) com granulometria média de 5  $\mu\text{m}$  e tendo como eluente uma mistura de metanol/água 8:2. Os comprimentos de onda de 208 nm e 218 nm foram escolhidos para serem utilizados na separação feita no aparelho HPLC da marca *Shimadzu*, em uma coluna semi-preparativa do mesmo fabricante e com o mesmo recheio existente na coluna analítica, mas com dimensões de 250 mm  $\times$  10 mm. O fator de escala calculado foi  $S = 7,9$  o que nos forneceu um fluxo de 5,0 mL.min<sup>-1</sup>, a concentração utilizada foi de 7,0 mg.mL<sup>-1</sup> e utilizou-se um *loop* de 200  $\mu\text{L}$  sendo necessárias, portanto, várias injeções na coluna. O cromatograma do processo está na figura 3.22.

Novamente, foi a fração (5) – a do pico mais alto do cromatograma – que se revelou como a melhor, como esperado, e desta vez se obteve uma substância pura, que foi denominada 331F05. Um esquema simplificado de todo o processo de obtenção desta substância pode ser visto na figura 3.23. A massa coletada da substância, 15 mg, nos permite fazer um cálculo estimado de rendimento de 0,85%.

### 3.7.3.2 Fração (1) do fungo 325 *Xylaria* sp.

A fração (1) (ver seção 3.7.1.2), com apenas 41 mg, foi dissolvida em 700  $\mu\text{L}$  de solvente e foi injetada em uma coluna semi-preparativa de sílica derivada *phenomenex Luna NH<sub>2</sub>*, 250 mm  $\times$  10,0 mm, com diâmetro médio de partícula de 5  $\mu\text{m}$ . Foi utilizado um *loop* de 200  $\mu\text{L}$  e foram necessárias, portanto, quatro injeções. O solvente utilizado foi uma mistura de hexano/isopropanol 6:4, e foram recolhidas seis frações em cada etapa, mas testes posteriores mostraram que somente a terceira

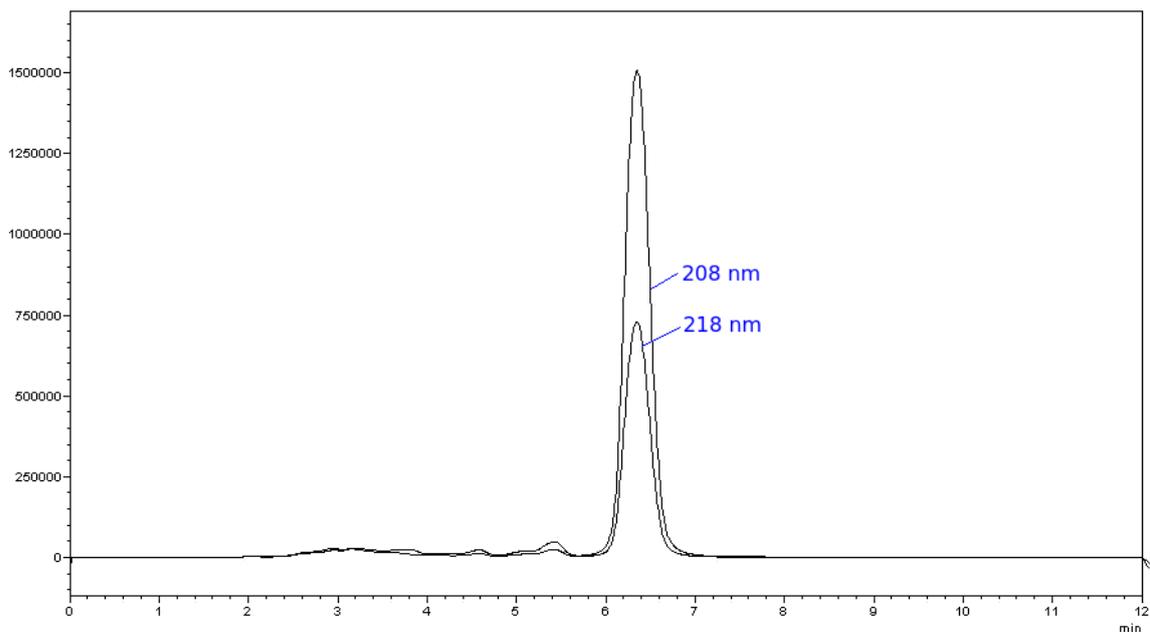


Figura 3.22: Cromatograma da separação por HPLC semi-preparativo da amostra (5) proveniente do extrato do fungo 325 (*Xylaria* sp.)

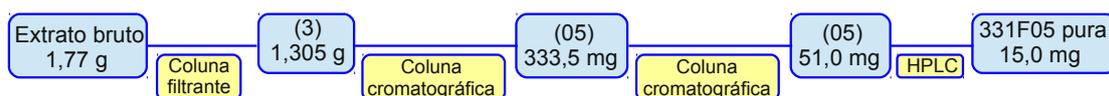


Figura 3.23: Esquema simplificado das etapas de separação do composto 331F05

fração coletada tinha boa pureza, e foi denominada *F0103*. Um esquema resumido da obtenção desta amostra pode ser visto em 3.24, e a figura 3.25 mostra o cromatograma obtido no aparelho HPLC da *Shimadzu*. Após evaporação do solvente, a massa da amostra foi determinada como 3,0 mg e foi enviada para análise de RMN. O rendimento estimado a partir da massa inicial do extrato foi de 0,17%.

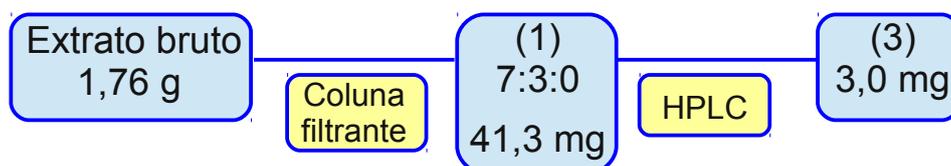


Figura 3.24: Esquema de obtenção da amostra *F0103*

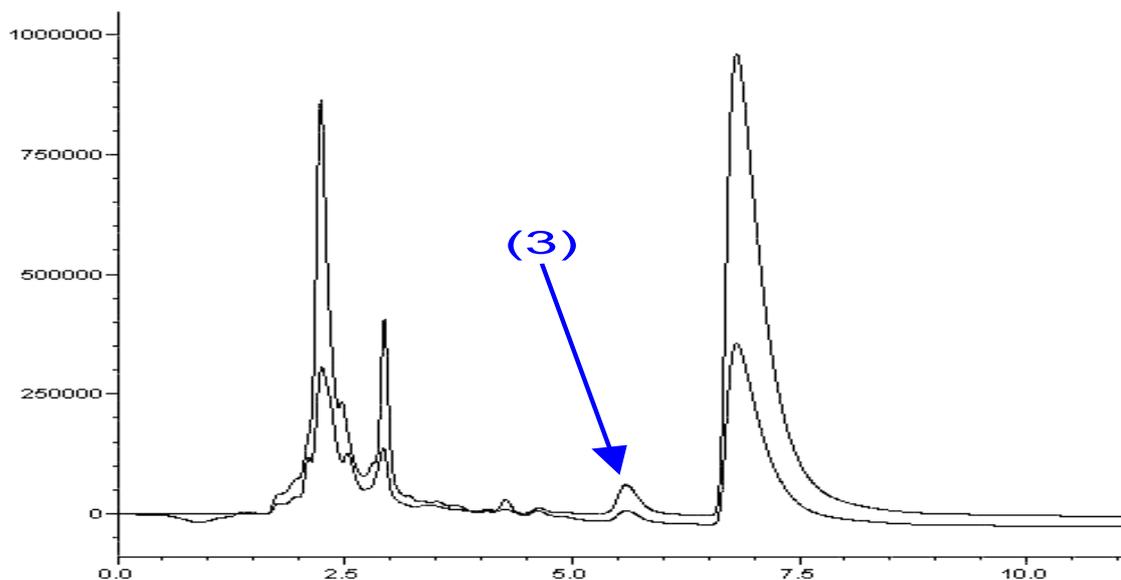


Figura 3.25: Cromatograma da separação onde foi obtida a amostra *F0103*

### 3.7.3.3 Fração (10) do fungo 325 *Xylaria* sp.

A fração número (10) (ver seção 3.7.2.3.1) foi analisada no HPLC analítico da *Thermo* e foi obtida uma boa separação dos componentes com uma coluna C18 e uma mistura metanol/água 1:1. Os comprimentos de onda de 210 nm e 260 nm foram escolhidos para serem observados no HPLC da empresa *Shimadzu*, no qual foi feita a separação dos componentes, utilizando-se uma coluna preparativa *Phenomenex Luna C18* com 250 mm × 21 mm. Do total de 97,7 mg, foram injetados 32 mg de material dissolvidos em 2 mL ( $16 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) utilizando-se um *loop* de 200  $\mu\text{L}$  e um fluxo de  $12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O cromatograma desta separação pode ser visto na figura 3.26. Foi dada mais atenção aos picos marcados como (8), (11) e (13).

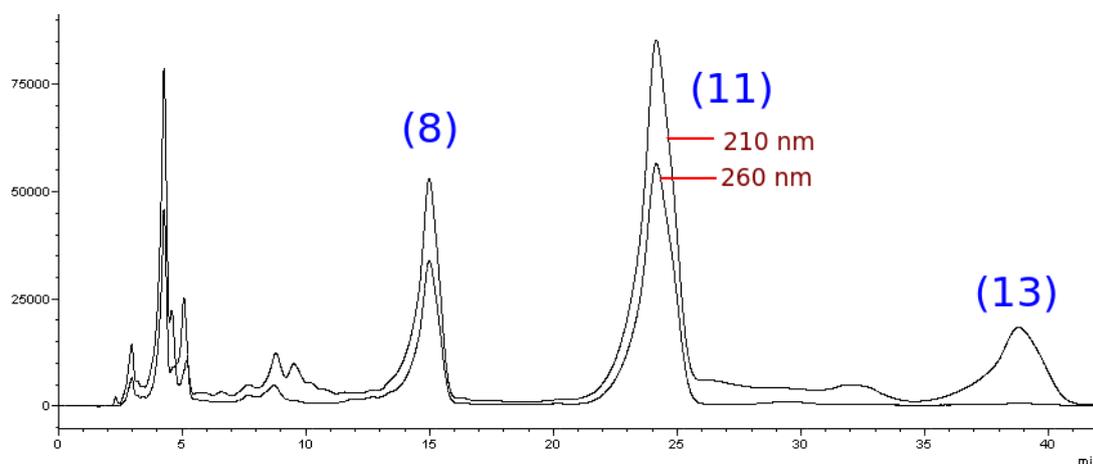


Figura 3.26: Cromatograma da separação da fração (10) em HPLC preparativa

### 3.7.4 SPE

A técnica de extração em fase sólida – *Solid Phase Extraction, SPE* – foi utilizada para separar o composto isolado do seu solvente, quando a mistura de solventes utilizada na cromatografia preparativa possuía uma grande quantidade de água. Os solventes mais voláteis foram retirados no evaporador rotativo, e a mistura de soluto e água foi separada em um equipamento SPE, utilizando-se sílica C8 para reter o soluto, e posteriormente o soluto foi retirado da sílica com o uso de metanol (figura 3.27).



Figura 3.27: Equipamento para extração em fase sólida (SPE)

#### 3.7.4.1 Frações (8), (11) e (13) do fungo 325 *Xylaria* sp.

O material coletado das frações (8), (11) e (13) (ver seção 3.7.3.3) continha uma mistura de água e metanol como solvente. Fez-se a eliminação do metanol em um evaporador rotativo, seguido de uma separação por *SPE* utilizando-se aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de sílica C8 condicionada com uma mistura de água/metanol 95:05. A retirada do material adsorvido na sílica foi feito com metanol puro. As amostras foram nomeadas *F1008*, *F1011* e *F1013* foram enviadas para testes de RMN. Um esquema simplificado da obtenção destas amostras está na figura 3.28. A partir da massa inicial do extrato, os rendimentos estimados foram de 0,17% (*F1008*), 0,40% (*F1011*) e 0,88% (*F1013*).

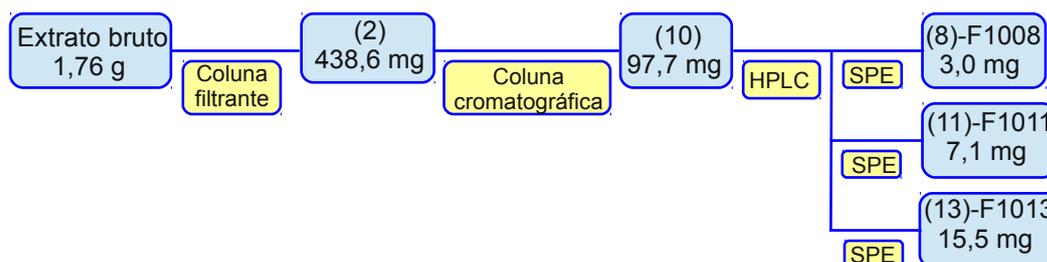


Figura 3.28: Esquema simplificado da obtenção das amostras *F1008*, *F1011* e *F1013*.

## 3.8 Espectrometria de massas

Existem dois destes aparelhos no laboratório, ambos da *Thermo Scientific*: um triplo-quadrupolo (*TSQ Quantum Access*) e um *ion-trap* (*LCQ Fleet*), ambos com fontes de ionização APCI (*Atmospheric Chemical Pressure Ionization*) e ESI (*ElectroSpray Ionization*). Estes métodos de ionização formam principalmente íons quase-moleculares (moléculas que ganharam ou perderam um próton, como  $[M+H]^+$  e  $[M-H]^-$ ) e íons pseudo-moleculares (como  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  e outros), portanto sem fragmentar a molécula que se quer estudar. A fragmentação, se desejada, pode ser feita posteriormente, e o *ion-trap* foi desenvolvido justamente para isso, pois ele permite capturar um íon, fragmenta-lo, capturar um dos novos íons formados, fazer nova fragmentação, e assim por diante, sucessivamente (figura 3.29).

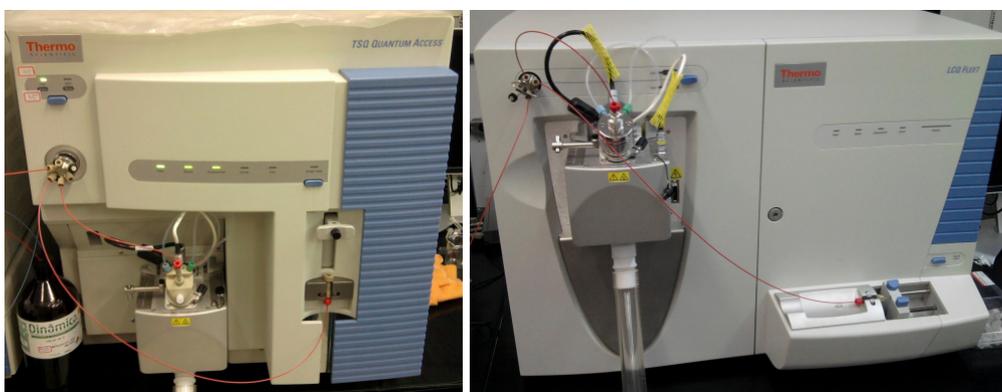


Figura 3.29: Aparelhos de espectrometria de massas da *Thermo Scientific*: triplo-quadrupolo (esquerda) e *ion-trap* (direita).

As análises nos espectrômetros de massas auxiliaram na elucidação da estrutura dos compostos isolados e permitiram uma busca por estes compostos em extratos de fungos do mesmo gênero a que pertencia o fungo onde o composto foi isolado.

## 3.9 Ensaios biológicos

Os microrganismos utilizados foram cedidos da coleção biológica da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ – AM) para o laboratório de genética da Universidade Estadual do Amazonas – UEA.

### 3.9.1 Atividade citotóxica

Os testes de atividade citotóxica foram feitos no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC pelo grupo da Prof<sup>ª</sup> Cláudia do Ó Pessoa. As atividades citotóxicas foram determinadas usando o método MTT (Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium) (MOSMAN, 1983). É uma análise colorimétrica

baseada na conversão do MTT em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. As amostras foram analisadas em busca de atividade citotóxica contra células das seguintes linhagens tumorais, cedidas pelo NCI – *National Cancer Institute* – dos Estados Unidos: MDA-MB435 (melanoma), HCT-8 e HCT116 (câncer colorretal), SF-295 (glioblastoma), HL-60 (leucemia) e OVCAR8 (câncer de ovário). Estas linhagens foram plaqueadas na concentração de  $0,1 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> e cresceram no meio de cultura de células *RPMI 1640* suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, e foram incubados a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT, e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. As amostras a serem testadas foram dissolvidas em DMSO puro esterilizado, e os extratos brutos foram testados na concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup>, as frações na concentração de 25 µg.mL<sup>-1</sup> e substâncias puras a 5 µg.mL<sup>-1</sup>. Os experimentos foram analisados e expressos de acordo com a média ± desvio padrão da média (DPM) da percentagem de inibição do crescimento celular.

### 3.9.2 Ensaio Anticândida

O teste de atividade contra *Candida albicans* foi feito pelo grupo da Prof<sup>a</sup> Antônia Queiroz Lima de Souza da UEA, utilizando o método de difusão em ágar em triplicata, com temperatura de incubação de 37°C e as placas foram avaliadas em 24, 48 e 72 horas. Os extratos foram dissolvidos a uma concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup> em uma solução de água/DMSO 14:1 (v/v). O controle foi feito com fluconazol na concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup>.

### 3.9.3 Atividades anti-acetilcolinesterase e antioxidante

A enzima acetilcolinesterase (*acetylcholinesterase enzyme* – *AChE*) reduz o neurotransmissor acetilcolina na sinapse dos neurônios, levando à perda da atividade colinérgica e causando problemas de percepção, atenção, memória e linguagem. Substâncias que bloqueiam a ação da AChE podem ser úteis em casos de doença de Alzheimer (GIACOBINI, 2000).

As amostras foram ensaiadas para verificar sua ação anti-AChE pelo método de ELLMAN (1961) adaptado para utilizar placas de cromatografia em camada delgada (CCD) (RHEE *et al.*, 2001) e o teste de Marston foi feito como descrito em MARSTON *et al.* (2002). Em ambos os casos a substância-padrão utilizada para comparação foi a galantamina. O teste de Ellman pode dar resultados falsos

se existem aldeídos ou aminas nas amostras (RHEE *et al.*, 2003), e fez-se então um teste falso-positivo.

Os ensaios de atividade antioxidante foram baseados na captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH na sigla em inglês) por moléculas antioxidantes, como descrito por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995), e os padrões de comparação utilizados foram a quercetina e a rutina.

### 3.9.4 Atividade antimicrobiana

O método utilizado neste ensaio foi o de difusão em ágar, como descrito na seção 3.9.2, seguindo a metodologia descrita em SOUZA *et al.* (2004). As amostras foram diluídas em solvente na concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup> e foram utilizadas três bactérias: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, e o fungo *Penicillium avellani*, modificado para se fazer *screening* em busca de substâncias com atividade citotóxica. Para o teste com as bactérias, foi adicionado 50 µL de uma suspensão de bactérias sobre o meio de cultura BHI; para o fungo, 20 mL de uma solução contendo 1 mL de suspensão de esporos e 19 mL do meio de cultura *Sabouraud* foi vertido sobre a placa de Petri. Foram feitos furos no meio de cultura, com 5 mm de diâmetro cada um, e uma amostra de 100 µL da solução a ser testada foi colocada em cada um dos furos. O controle foi feito com ampicilina para as bactérias Gram-positivas e streptomomicina para as Gram-negativas.

## 3.10 Sequenciamento genético

O sequenciamento das regiões ITS-1 a ITS-4 do rDNA dos fungos foi coordenado pela Prof<sup>a</sup> Antônia Queiroz Lima de Souza da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) com o auxílio do grupo do Prof. Flávio Henrique-Silva da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). A metodologia aplicada aos testes foi a mesma empregado por DE SOUZA (2006). A comparação das sequências de bases nitrogenadas foi feita através do software BLAST do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dos Estado Unidos.

## Seção 4

# Resultados e discussão

### 4.1 Fungos isolados

Como não foi verificado o aparecimento de fungos nas placas para controle de assepsia (ver seção 3.2), concluiu-se que a esterilização externa foi bem sucedida, e portanto todos os fungos coletados dos tecidos das plantas hospedeiras foram considerados endofíticos.

Ao mesmo tempo em que se coletaram os fungos, foram também coletadas várias cepas de bactérias, que foram repassadas para outros integrantes do grupo de pesquisa para conservação e estudos posteriores.

Um total de 132 cepas fúngicas foram coletadas de *Pi. peltatum*, e 150 de *Pe. pellucida*. Com relação ao meio de cultura, a maioria dos fungos foram obtidos a partir de meio BDA, como esperado, pois este meio não possuía agente fungicida (ver seção 3.3). Apesar do agente fungicida adicionado a eles, os meios ISP2 e Aveia forneceram uma parte significativa dos fungos coletados, tanto em quantidade quanto em gêneros de fungos.

Com relação à temperatura, quase 2/3 dos fungos coletados de cada planta hospedeira cresceram a 18°C – 66% para *Pi. peltatum* e 68% para *Pe. pellucida*. Poucos fungos cresceram a 40°C, mas aqui as diferenças entre as plantas hospedeiras foram maiores: 5% para *Pi. peltatum* e 2% para *Pe. pellucida* (tabela 4.1). Talvez essa diferença se deva ao fato de que *Pi. peltatum* seja comumente encontrada em locais mais abertos e ensolarados do que *Pe. pellucida*, que é mais facilmente encontrada em locais úmidos e sombreados. Mas, no geral, *Pe. pellucida* mostrou possuir uma maior quantidade de fungos em seus tecidos do que *Pi. peltatum*, com taxas de colonização (TC) totais de 104% e 73%, respectivamente (tabela 4.1). Talvez isso se deva aos fato de *Pe. pellucida* estar mais próxima ao chão do que *Pi. peltatum* – *Pe. pellucida* é uma erva, enquanto *Pi. peltatum* é um arbusto – e também pela diferença nos *habitats*. As taxas de colonização foram calculadas de acordo com

AZEVEDO (1998):

$$TC = \frac{\text{Total de fungos isolados}}{\text{total de pedacos da amostra}} \times 100$$

#### 4.1.1 Gêneros de fungos isolados

Um total de 12 gêneros de fungos foram identificados nas duas plantas hospedeiras, sendo que cinco destes gêneros são comuns a ambas (figura 4.1). Outros sete morfogrupos não puderam ser identificados, indicando que as hospedeiras possuíam 12 gêneros de fungos endofíticos cultiváveis em seu interior. Nenhum fungo encontrado na haste das folhas de *Pi. peltatum* teve seu gênero identificado. Os fungos identificados por sequenciamento das regiões ITS-1 a ITS-4 do DNA ribossomal e comparados com os dados do banco de genes do NCBI foram: o fungo 232 como *Fusarium solani* (cepa TGLS-1 do NCBI), o fungo 331 como *Xylaria* sp. (vega239), o fungo 292 como *Bionectria ochroleuca* (isolado E9500a), e o fungo 327 como *Lirula exigua* (isolado 475). Esta foi a primeira vez que um fungo do gênero *Lirula* foi isolado como endófito. Este gênero de fungo é comumente citado como um dos causadores de “ferrugem” e manchas nas agulhas de coníferas (CALLAN e CARRIS, 2004).

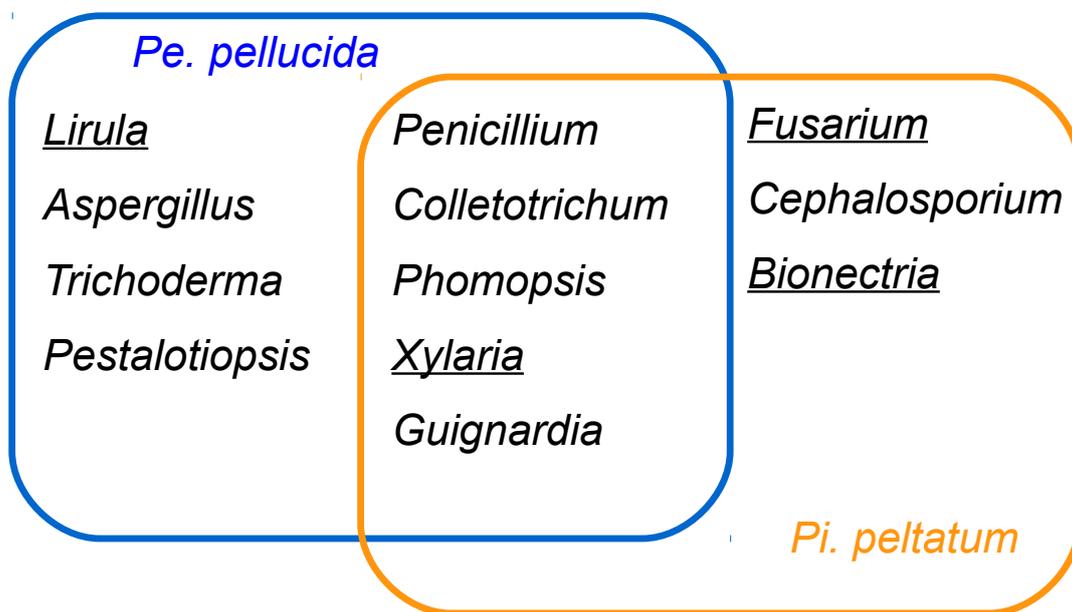


Figura 4.1: Gêneros de fungos encontrados nas plantas hospedeiras

Tabela 4.1: Taxas de colonização por fungos (%) nos tecidos. Espaços em branco: nenhum fungo coletado

		<i>Pi. peltatum</i>								<i>Pe. pellucida</i>							
Meio		18 °C		26 °C		40 °C		Total		18 °C		26 °C		40 °C		Total	
		N	TC	N	TC	N	TC	N	TC	N	TC	N	TC	N	TC	N	TC
BDA	C	19	158.3					19	158.3	12	100.0	4	33.3			16	133.3
	R	3	25.0	1	8.3			4	33.3	10	83.3	3	25.0			13	108.3
	F	15	125.0			1	8.3	16	133.3	88	66.7	2	16.7			10	83.3
	Fo	18	150.0					18	150.0	20	166.7	2	16.7			22	183.3
	H	4	33.3	2	16.7			6	50.0								
	<b>ST</b>	<b>59</b>	<b>98.3</b>	<b>3</b>	<b>5.0</b>	<b>1</b>	<b>1.7</b>	<b>63</b>	<b>105.0</b>	<b>50</b>	<b>104.2</b>	<b>11</b>	<b>22.9</b>			<b>61</b>	<b>127.1</b>
ISP2	C	4	33.3	9	75.0	1	8.3	14	116.7	5	41.7	4	33.3	2	16.7	11	91.7
	R			3	25.0	2	16.7	5	41.7	3	25.0	3	25.0			6	50.0
	F	1	8.3	4	33.3	1	8.3	6	50.0	4	33.3	5	41.7			9	75.0
	Fo	6	50.0					6	50.0	15	125.0	7	58.3			22	183.3
	H	1	8.3	3	25.0	2	16.7	6	50.0								
	<b>ST</b>	<b>12</b>	<b>20.0</b>	<b>19</b>	<b>31.7</b>	<b>6</b>	<b>10.0</b>	<b>37</b>	<b>61.7</b>	<b>27</b>	<b>56.2</b>	<b>19</b>	<b>39.6</b>	<b>2</b>	<b>4.2</b>	<b>48</b>	<b>100.0</b>
Aveia	C	7	58.3	1	8.3			8	66.7	3	25.0	7	58.3	1	8.3	11	91.7
	R	1	8.3	5	41.7			6	50.0	1	8.3	1	8.3			2	16.7
	F	1	8.3	5	41.7	1	8.3	7	58.3	7	58.3	4	33.3			11	91.7
	Fo	7	58.3	2	16.7			9	75.0	14	116.7	3	25.0			17	141.7
	H			2	16.7			2	16.7								
	<b>ST</b>	<b>16</b>	<b>26.7</b>	<b>15</b>	<b>25.0</b>	<b>1</b>	<b>1.7</b>	<b>32</b>	<b>53.3</b>	<b>25</b>	<b>52.1</b>	<b>15</b>	<b>31.2</b>	<b>1</b>	<b>2.1</b>	<b>41</b>	<b>85.4</b>
<b>Total</b>	<b>87</b>	<b>48.3</b>	<b>37</b>	<b>20.6</b>	<b>8</b>	<b>4.4</b>	<b>132</b>	<b>73.3</b>	<b>102</b>	<b>70.8</b>	<b>45</b>	<b>31.2</b>	<b>3</b>	<b>2.1</b>	<b>150</b>	<b>104.2</b>	

N - Número de fungos coletados; TC - Taxa de Colonização (%); Caule Raiz Flôr Folha Haste da folha ST - subtotal

## 4.1.2 Frequências dos gêneros fúngicos

Em *Pi. peltatum* os gêneros mais frequentes foram *Penicillium* e *Xylaria*, encontrados principalmente no caule e na raiz, e *Fusarium* no caule e nas flores; em *Pe. pellucida* os gêneros mais comuns foram *Colletotrichum*, concentrado na folhas, e *Xylaria*, encontrada em todos os tecidos da planta, possuindo portanto distribuição sistêmica (tabela 4.2).

Tabela 4.2: Generos de fungos presentes nos tecidos da planta

Gênero	<i>Pi. peltatum</i>				<i>Pe. pellucida</i>			
	C	R	F	Fo	C	R	F	Fo
<i>Penicillium</i>	▲	★◆			▲			
<i>Fusarium</i>	★◆		★◆					
<i>Colletotrichum</i>		★			◆		★◆▲	★◆▲
<i>Guignardia</i>			◆		★			
<i>Phomopsis</i>			★▲		◆		▲	
<i>Cephalosporium</i>				★				
<i>Bionectria</i>		◆						
<i>Xylaria</i>	◆▲	▲			★◆	★	★◆▲	★◆▲
<i>Aspergillus</i>							★	
<i>Lirula</i>					◆			
<i>Trichoderma</i>								▲
<i>Pestalotiopsis</i>					▲	★		

Caule Raiz Flôr Folha ★ BDA ◆ ISP2 ▲ Aveia

De todos os fungos do gênero *Colletotrichum* encontrados em *Pe. pellucida*, 79% foram isolados dos tecidos das folhas. Isto parece indicar que as folhas são a principal porta de entrada destes fungos em *Pe. pellucida*. Segundo DEACON (2006):

Muitos apressórios e almofadas de infecção desenvolvem uma parede melanizada, e isto permite ao fungo permanecer na superfície de planta até a resistência dela diminuir. Os exemplos clássicos disto são encontrados nos fungos *Colletotrichum* spp. que causam pontos escuros na folha e frutos, inclusive *C. musae*, que causa pequenas pintas marrons nas cascas de bananas maduras. Estes fungos são parasitas fracos, que infeccionam os tecidos da fruta só depois que o fruta amadureceu. Mas seus esporos dispersados podem aterrizar na superfície da planta hospedeira em qualquer momento e, tendo o esporo paredes finas e hialinas (sem cor), eles não podem sobreviver à perda de água ou exposição à radiação UV. Portanto, frequentemente os esporos germinam imediatamente e o germotubo produz um apressório melanizado, o qual persiste na superfície da planta até o início da senescência do hospedeiro.

Neste texto, chama a atenção o trecho “tendo o esporo paredes finas e hialinas

(sem cor), eles não podem sobreviver à perda de água ou exposição à radiação UV”. Verifica-se na literatura que uma característica dos fungos *Colletotrichum* é possuir esporos e conídios unicelulares e sem cor (AGRIOS, 2005) sendo portanto sensíveis à luz do sol. Talvez isto explique, ao menos em parte, o fato de encontrarmos mais fungos *Colletotrichum* em *Pe. pellucida* do que em *Pi. peltatum* já que a primeira é encontrada em ambientes mais úmidos se sombreados do que a segunda.

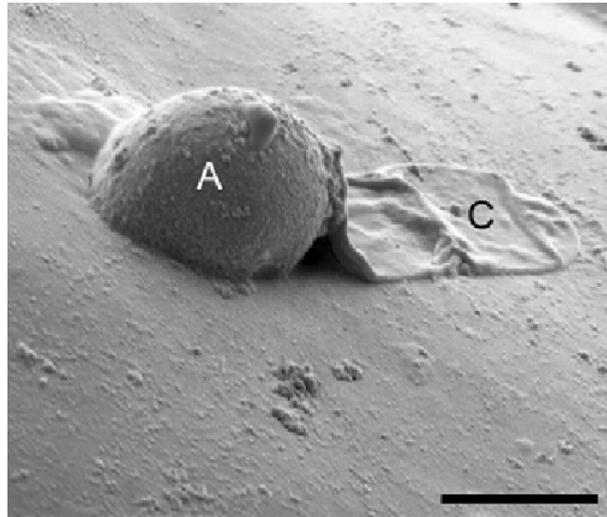


Figura 4.2: Microscopia eletrônica de varredura mostrando o apressório (A) e o conídio colapsado (C) do fungo *Colletotrichum higginsianum* na superfície de uma folha. Barra: 5  $\mu$ m. fonte: KLEEMANN *et al.* (2012)

Relatos sobre fungos do gênero *Xylaria* informam que eles são transmitidos pelas sementes (DAVIS *et al.*, 2003), mas sua presença em uma larga variedade de gêneros de plantas é um indicativo de que a transmissão de esporos pelo vento e água da chuva também devem ser considerados. Neste estudo, apesar de as duas plantas hospedeiras serem *Piperaceae*, elas possuem *habitats* e tamanhos diferentes, e essas diferenças podem estar interferindo diretamente na população de fungos endofíticos colonizando cada uma das plantas (figura 4.1, tabela 4.2), e isso inclui os fungos do gênero *Xylaria*, transmitidos ou não por sementes.

Outro dado digno de nota é que muitos gêneros fúngicos tenham pelo menos um exemplar surgido do meio Aveia ou ISP2, lembrando que estes meios continham o antifúngico cetoconazol (ver seção 3.2). De fato, considerando ambas as hospedeiras, apenas fungos *Cephalosporium* e *Aspergillus* não surgiram de um desses meios. O principal factor parece estar mais relacionado com a taxa de colonização de um fungo em particular do que a presença ou ausência de cetoconazol, já que fungos com alta taxa de colonização surgiram em todos os meios de cultura. Outros gêneros isolados de apenas um meio foram *Bionectria* e *Lirula* de ISP2, e *Trichoderma* de Aveia. Uma cepa de levedura também foi isolada a 40°C do meio ISP2. Em *Pi. peltatum*, o gênero *Fusarium* foi isolado em maior quantidade de Aveia do que de

BDA; em *Pe. pellucida*, 81% dos fungos *Xylaria* spp. e *Colletotrichum* spp. foram coletados a partir dos meios ISP2 e Aveia (figura 4.3). O agente antifúngico parece não ter qualquer efeito inibidor sobre esses três gêneros de fungos.

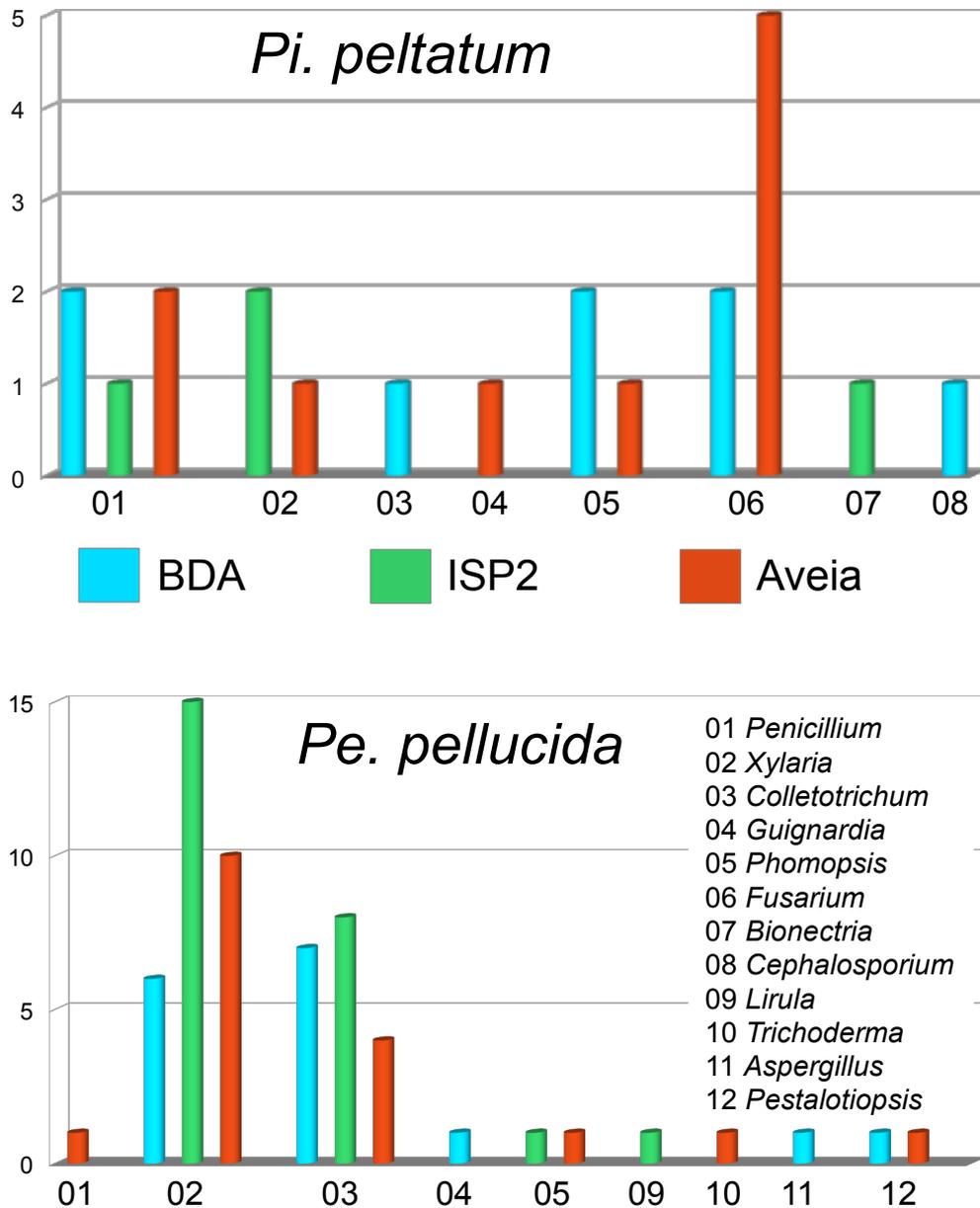


Figura 4.3: Gêneros de fungos coletados por meio de cultura

## 4.2 Ensaios biológicos com extratos brutos

### 4.2.1 Atividade citotóxica

Os extratos dos fungos 216 *Penicillium*, 232 *Fusarium* e 353 *Cephalosporium*, cada um ensaiado contra pelo menos três linhagens tumorais apresentaram resultados que

revelam seus bons potenciais citotóxicos. Foram considerados promissores as amostras cuja inibição foi maior que 70% em duas ou mais linhagens tumorais. Nenhuma amostra do fungo 216 chegou a este nível, porém os valores obtidos para as amostras de 232 *Fusarium* e 353 *Cephalosporium* foram bem promissores (tabela 4.3). Os fungos do gênero *Fusarium* são conhecidos causadores de doenças em plantações, especialmente cereais (ROSSMAN e PALM-HERNÁNDEZ, 2008), enquanto os fungos *Cephalosporium* são conhecidos produtores de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (cefalosporinas) (WEIL *et al.*, 1995).

Tabela 4.3: Atividade citotóxica de extratos fúngicos brutos – Inibição de Crescimento (%)

Fungo		SF295	HCT-8	HCT-116	OVCAR8
232	MyEt	76,7	92,7	-	80,8
232	CFH	86,5	97,7	-	72,9
353	CFI	45,8	-	62,2	100,0
353	CFEAc	81,8	-	87,2	100,0
353	MyMe*	75,6	-	77,4	58,6

MyEt: Micélio macerado em etanol

CFH: Caldo Fermentado (CF) particionado com hexano/acetato de etila 1:1 (v/v)

CFI: CF particionado com acetato de etila/isopropanol 7:3 (v/v)

CFEAc: CF particionado com acetato de etila

MyMe: Micélio macerado com acetato de etila/metanol 7:3 (v/v)

(\*) Fungo cresceu em um *shaker* a 220 rpm por uma semana

## 4.2.2 Ensaio Anticândida

Neste ensaio foram utilizadas 24 amostras de extratos brutos – extrato de micélio macerado em acetato de etila/metanol 7:3 (MyMe), caldo fermentado particionado com acetato de etila puro (CFEAc) e caldo fermentado particionado com acetato de etila/isopropanol 7:3 (CFI) – e entre as amostras ensaiadas, as dos fungos 216 e 268 (*Penicillium* spp.), 233 (*Guignardia* sp.) e 353 (*Cephalosporium* sp.) apresentaram resultados promissores contra este patógeno humano, e podem ser exploradas como uma alternativa no combate de linhagens resistentes aos antifúngicos existentes no mercado (tabela 4.4).

## 4.2.3 Atividades anti-acetilcolinesterase e antioxidante

Foram testados 18 extratos brutos dos seguintes fungos: 216, 222, e 268 (*Penicillium* spp.), 232 e 301 (*Fusarium* spp.), 317 e 331 (*Xylaria* spp.), 233 (*Guignardia* sp.), 353 (*Cephalosporium* sp.), e o fungo 371, de gênero desconhecido. No teste anti-AChE os melhores resultados foram encontrados nos extratos do fungo 216 (*Penicillium*

Tabela 4.4: Extratos fúngicos brutos com atividade anticândida

Fungo	Gênero	Extrato
216	<i>Penicillium</i>	CFI: CF particionado com acetato de etila/isopropanol 7:3 (v/v)
233	<i>Guignardia</i>	CFEAc: CF particionado com acetato de etila puro
268	<i>Penicillium</i>	CFI
353	<i>Cephalosporium</i>	CFEAc*
353	<i>Cephalosporium</i>	CFI*
353	<i>Cephalosporium</i>	MyMe*: Micélio macerado com acetato de etila/metanol 7:3 (v/v)

CF:Caldo Fermentado (\*) Fungo cresceu em um shaker a 220 rpm por uma semana

sp.), mas extratos dos fungos 301, 331 e 371 também tiveram bons resultados. Nos testes antioxidantes, os extratos dos fungos 216, 232 (o melhor neste teste) e 317 mostraram bons resultados (tabela 4.5).

## 4.3 Ensaios biológicos com frações

### 4.3.1 Atividade Citotóxica

Frações dos extratos dos fungos 325 e 331 (*Xylaria* spp.) e 353 (*Cephalosporium* sp.) foram testados para verificar a existência de atividade citotóxica com o mesmo procedimento descrito em 3.9.1; foram testadas 10 amostras dos três fungos, sete obtiveram bons resultados (tabela 4.6). Os extratos com os melhores resultados foram os do fungo 353 como esperado, pois os extratos brutos deste fungo também deram bons resultados (ver tabela 4.3). Os resultados dos testes com frações dos fungos 325 e 331, apesar de serem menos efetivos que os do fungo 353, inibiram o crescimento de mais de uma cepa de células cancerosas, neste ponto se igualando ao fungo 353, o que é bom, por indicar a existência de uma substância efetiva contra várias cepas de células cancerosas ou a existência de mais de uma substância com atividade citotóxica.

### 4.3.2 Atividade antimicrobiana

Foram testadas 14 amostras dos fungos 216 (*Penicillium* sp.) e 232 (*Fusarium solani*), de acordo com o método descrito na seção 3.9.4. Várias frações do fungo 232 mostraram bons resultados, especialmente a fração (3), que mostrou atividade contra todos os microrganismos testados, inclusive *P. avellani*, indicando a possível presença de substâncias com atividade citotóxica, indicada também pelos resultados mostrados na tabela 4.3. As frações que não mostraram nenhuma atividade foram excluídas da tabela 4.7 (ver também a figura 4.4).

Tabela 4.5: Atividades Anti-AChE e antioxidante

Fungo		Anti-AChE (1)			Antioxidante (2)
		Ellman (a)	F-P (b)	Marston	
	Padrão	++	-	++	++
216	MyMe	+	-	+	+
216	CFI	++	+	++	+
222	MyMe	+	+	-	-
232	MyMe	+	-	-	+
232	CFEAc	-	-	-	+
232	CFI	-	-	-	++
232	CFH	-	-	-	+
233	CFEAc	+	+	-	-
268	CFEAc	-	-	+	-
301	CFEAc	+	-	+	-
317	CFEAc	+	+	-	-
317	MyMe	-	-	-	+
331	MyMe	+	-	-	-
331	CFEAc	+	-	+	-
353	MyMe	+	+	-	-
353	CFEAc	+	+	-	-
371	CFI	+	-	+	-
371	MyMe	+	-	+	-

Padrões: (1) Galantamina; (2) Rutina e Quercetina

(a) (+) Atividade inibitória; (++) maior atividade inibitória; (-) sem inibição

(b) (+) falso-inibidor; (-) inibidor

MyMe: Micélio macerado com acetato de etila/metanol 7:3 (v/v)

CFEAc: Caldo fermentado particionado com acetato de etila puro

CFI: Caldo fermentado particionado com acetato de etila/isopropanol 7:3 (v/v)

CFH: Caldo fermentado particionado com hexano/acetato de etila 7:3 (v/v)

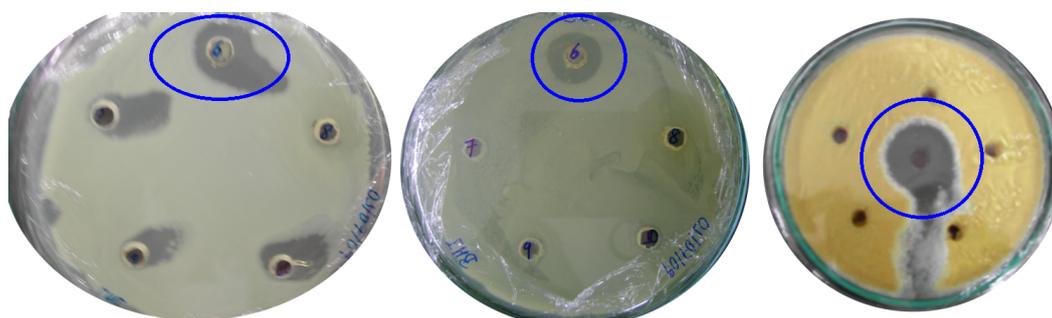


Figura 4.4: Da esquerda para a direita: fração (3) no teste contra *B. cereus*, *S. aureus* e *P. avellani*

Tabela 4.6: Atividade citotóxica de frações dos extratos – IC (%)

Fungo		SF295	HCT-8	HCT-116	MDA-MB435	HL-60	OVCAR8
331	F2 (1)	74,0	77,0			95,0	
331	F4 (1)	67,0	66,0			81,0	
325	F2 (2)	80,0	83,0		72,0		
325	F3 (2)	72,6		62,4			96,1
325	F4 (2)	66,0		68,8			54,3
353	F4 (3)	78,8		100			93,0
353	F3 (4)	100		68,4			98,0

(1) FCF – ver seção 3.7.1.3; (2) FCF – ver seção 3.7.1.2; (3) FCF – ver seção 3.7.1.4; (4) FCF – ver seção 3.7.1.6; FCF – Fração do Caldo Fermentado

Tabela 4.7: Atividade antimicrobiana de frações da coluna filtrante do fungo 232

	Fração	Diâmetro médio dos halos de inibição (mm)			
		<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>P. avellani</i>
(A)	(3)	16,0	11,0		
	(4)	10,0			
	(5)	8,5			
(B)	(1)	8,7	8,0		
	(2)	9,5	8,5		
	(3)	11,0	14,0	11,7	31,0
	(4)	8,0			

(A): Extratos do caldo fermentado; (B): Extratos do micélio

Para mais dados sobre os extratos, ver seção 3.7.1.1

## 4.4 Identificação das substâncias isoladas

### 4.4.1 Identificação de *Pp 01*

O precipitado obtido durante a partição do caldo fermentado do fungo 232 e denominado temporariamente *Pp 01* (seção 3.7.1.1) e as frações *Pp 02*, *Pp 03* e *Pp 04* (seção 3.7.2.1) apresentaram como principal constituinte um cristal de cor amarelo-claro, cuja solução em DMSO apresentava cor verde. Estas amostras foram enviadas para análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) na Universidade Federal do Paraná, e os testes revelaram que as amostras eram idênticas, e serão agora denominadas de *Pp 01*.

No espectro de infravermelho (IV) foram observadas bandas características de hidroxila em 3460 e 3387  $\text{cm}^{-1}$ , de carbonilas conjugadas em 1622  $\text{cm}^{-1}$ , e de olefinas e metilas (figura 4.5).

Na fragmentação de *Pp 01* no espectrômetro de massas triplo-quadrupolo com fonte APCI e energia de colisão de 10 eV podemos ver a saída de fragmentos com massa 18 Da (setas vermelhas), indicando a perda de água e a existência de hidroxilas; e 28 Da (seta azul), indicando a perda de CO, o que sugere a existência de

carbonilas(figura 4.6).

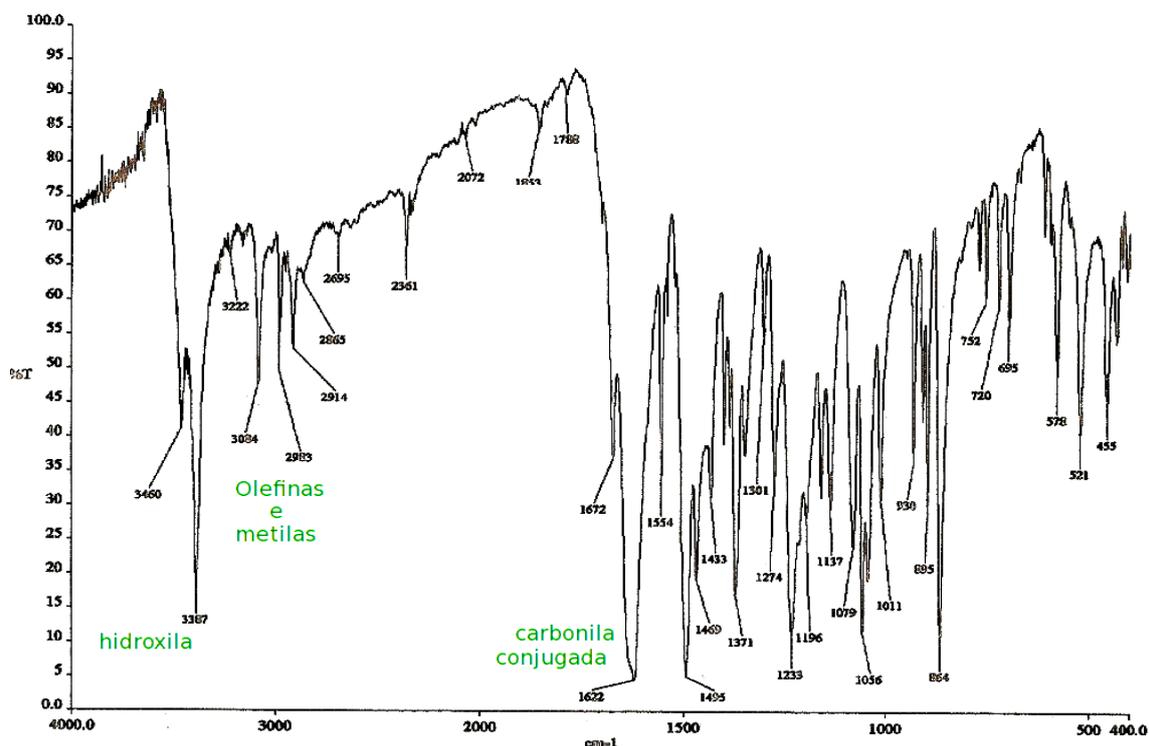


Figura 4.5: Espectro infravermelho do composto *Pp 01*

237\_austdiol #31-256 RT: 0.26-2.20 AV: 226 NL: 8.36E6  
T: + c APCI Full ms2 237.000 [100.000-240.000]

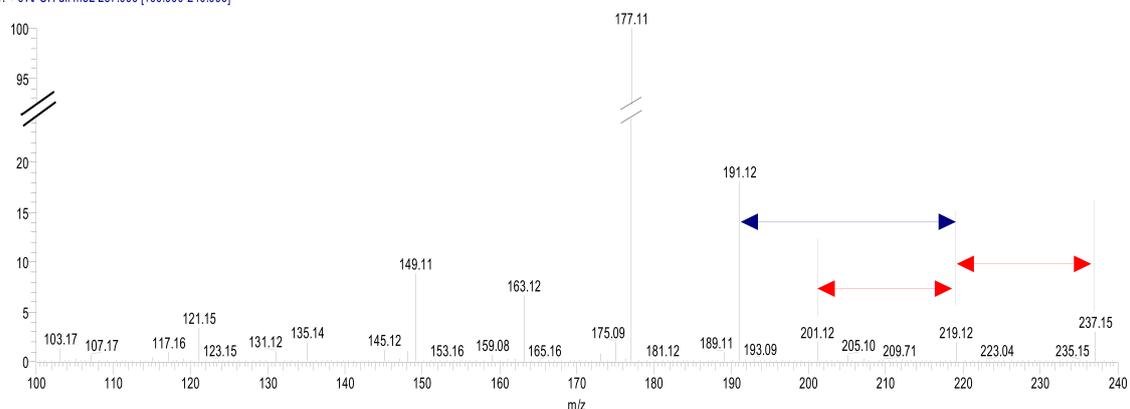


Figura 4.6: Fragmentação do composto *Pp 01* ( $[M+H]^+ = 237$ ) no espectrômetro triplo-quadrupolo com fonte APCI e energia de colisão de 10 eV.

No espectro de hidrogênio em DMSO deuterado (figuras 4.7) foram observados dois sinais de metilas em  $\delta$  1,14 (singlete) e  $\delta$  2,41 (singlete largo, possivelmente um acoplamento não resolvido pelo equipamento), três singletos em  $\delta$  8,30, 8,20 e 5,00 e dois dubletos em  $\delta$  4,31 ( $J = 4,2$  Hz) e 5,53 ( $J = 4,2$  Hz), todos com respectivas integrações relativas correspondentes a um hidrogênio (com exceção dos sinais das metilas), e um sinal típico de hidrogênio de aldeído em  $\delta$  9,98 (singlete). O sinal em  $\delta$  9,98 foi observado no HSQC em correlação direta com o sinal de

um carbono em  $\delta$  189,1, e no HMBC em correlações múltiplas com carbonos em  $\delta$  148,2, 121,8 e 108,1. Os deslocamentos químicos desses carbonos revelam na molécula a presença de um aldeído em um sistema conjugado, confirmando a análise de infravermelho. O hidrogênio em  $\delta$  8,30, conectado com um carbono em  $\delta$  152,0, e o hidrogênio em  $\delta$  8,20, conectado com um carbono em  $\delta$  106,3 (HSQC), também tem correlações múltiplas (HMBC) com os carbonos em  $\delta$  148,2 e 121,8 e em  $\delta$  121,8 e 108,1, respectivamente, indicando que fazem parte do sistema conjugado aldeídico. Além disso, o hidrogênio em  $\delta$  8,30 está correlacionado com um sinal típico de carbono olefínico ligado a oxigênio em  $\delta$  166,3 e a um sinal de carbono carbinólico em  $\delta$  71,5, enquanto o hidrogênio em  $\delta$  8,20 tem correlações com o mesmo carbono em  $\delta$  166,3 e com um carbono metílico em  $\delta$  19,6 (HMBC). Ao carbono carbinólico em  $\delta$  71,5 está conectado o hidrogênio em  $\delta$  4,31 (HSQC) que tem correlações múltiplas com carbonos em  $\delta$  198,2, 152,0, 148,2, 121,8, 74,4 e 21,8 (HMBC). Os hidrogênios metílicos em  $\delta$  2,41, conectados ao carbono em  $\delta$  19,6 (HSQC), tem correlações múltiplas com carbonos em  $\delta$  166,3 e 106,3 (HMBC), enquanto os hidrogênios metílicos em  $\delta$  1,14, conectados ao carbono em  $\delta$  21,8 (HSQC), têm correlações múltiplas com carbonos em  $\delta$  198,2, 74,4 e 71,5 (HMBC). Finalmente, os hidrogênios em  $\delta$  5,53 e 5,00 não apresentaram correlações a uma ligação de distância com quaisquer carbonos (HSQC) e foram caracterizados como hidroxílicos, principalmente por suas respectivas correlações múltiplas observadas no HMBC. O primeiro apresentou correlações com os carbonos em  $\delta$  121,8, 74,4 e 71,5, e o segundo tem correlações múltiplas com os carbonos em  $\delta$  198,2, 74,4, 71,5 e 21,8 (ver figuras [A.1](#), [A.2](#) e [4.8](#)). Os dados de RMN estão na tabela [4.8](#).

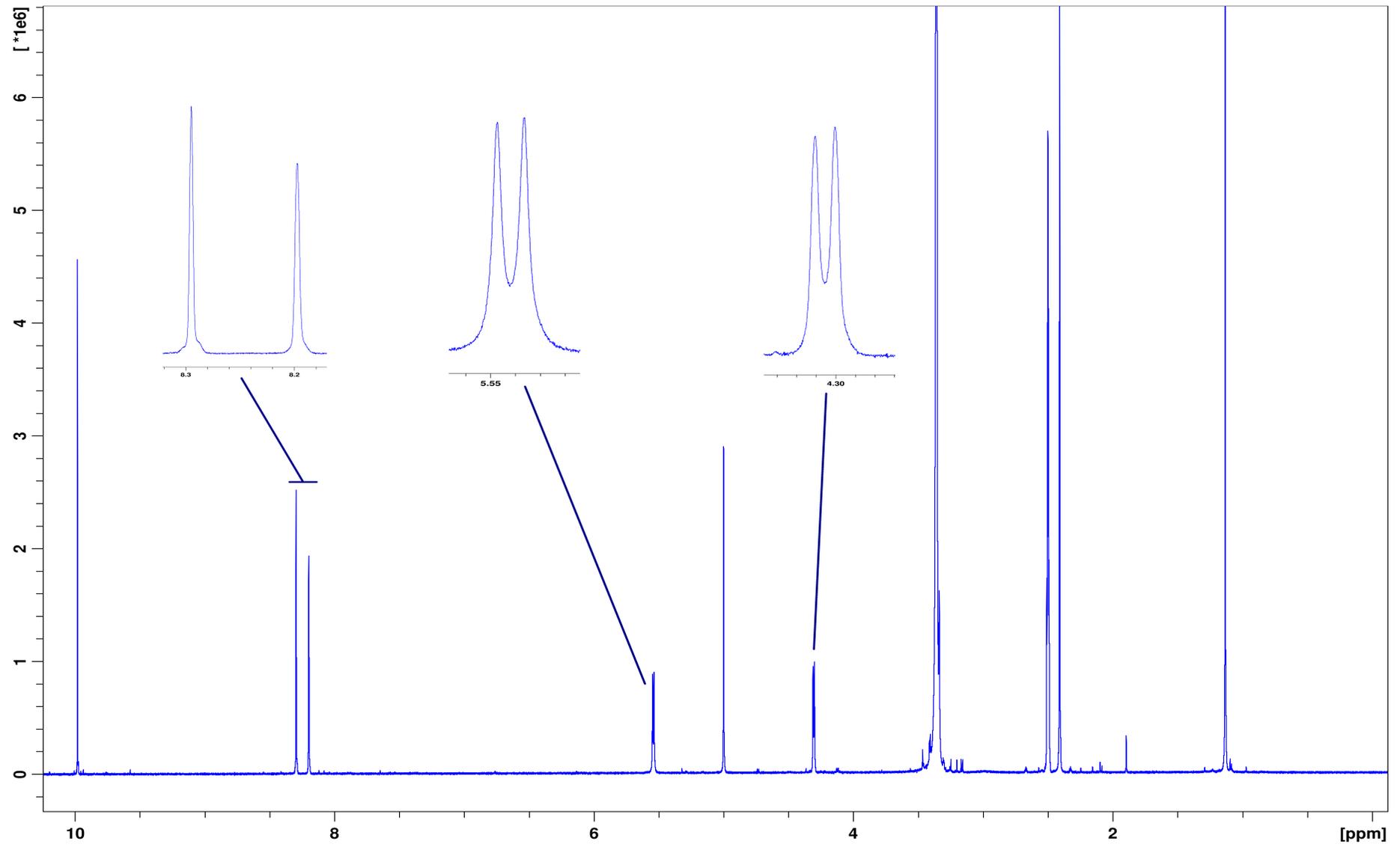


Figura 4.7: RMN de hidrogênio de *Pp 01* a 400 MHz em DMSO deuterado.

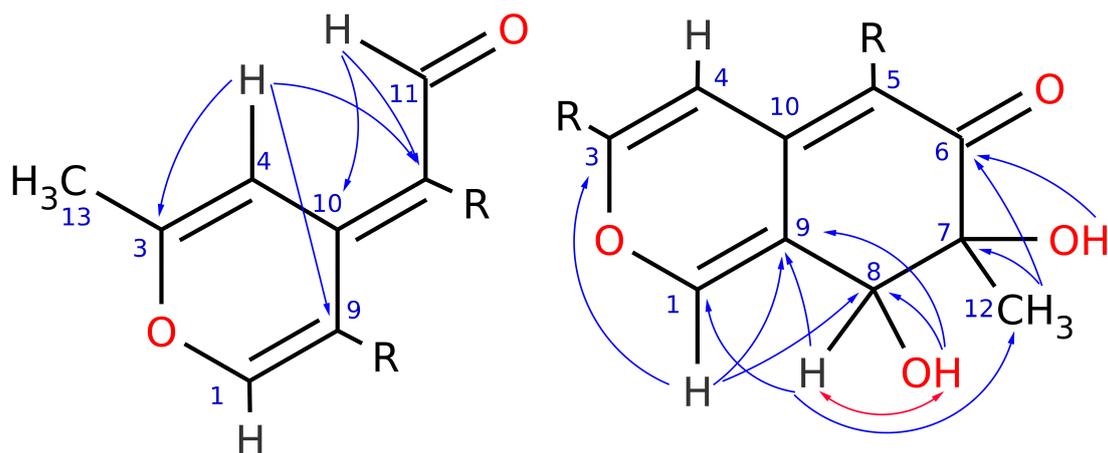


Figura 4.8: Algumas das correlações do composto *Pp 01*

Tabela 4.8: Dados de RMN de *Pp 01*

	$^1\text{H}$ (ppm, $J$ em Hz)	$^{13}\text{C}$ (ppm)	HMBC
<b>1</b>	8,3	152,0 CH	9, 10, 3, 8
<b>3</b>		166,3	
<b>4</b>	8,2	106,3 CH	5, 9, 3, 13
<b>5</b>		108,1	
<b>6</b>		198,2 CO	
<b>7</b>		74,4	
<b>8</b>	4,31 d (4,2)	71,5 CHOH	6, 1, 9, 10, 7, 12
<b>9</b>		121,8	
<b>10</b>		148,2	
<b>11</b>	9,98	189,1 CHO	5, 10, 9
<b>12</b>	1,14	21,8 CH <sub>3</sub>	6, 7, 8
<b>13</b>	2,41	19,6 CH <sub>3</sub>	3, 4
<b>8-OH</b>	5,53 d (4,2)	OH	9, 7, 8
<b>7-OH</b>	5,00	OH	6, 7, 8, 12

Esses dados são coerentes com a estrutura do austdiol (Figura 4.9), uma importante toxina isolada pela primeira vez de *Aspergillus ustus* (VLEGGAR *et al.*, 1974), mais tarde de *A. ellipticus* (SAMSON *et al.*, 2004), e recentemente de um fungo endofítico da classe *Dothideales* encontrado em *Tiliacora triandra*, uma planta utilizada na medicina tradicional da Tailândia (SENADEERA *et al.*, 2012). O fungo 232, produtor de austdiol, foi identificado por rDNA como *Fusarium solani*, e este é o primeiro relato da produção de austdiol em um fungo da classe *Hypocreales*.

Um fato digno de nota é a grande produção de austdiol por este fungo, ao ponto

de formar cristais que se precipitaram nos frascos de cultura. O rendimento estimado desta substância em relação a massa do extrato do meio fermentado foi de  $(25 \pm 3)\%$  (m/m) e em relação ao volume de meio cultivado foi de  $(200 \pm 20)$  mg/L. Nas placas de Petri, utilizando técnicas de microcultura, os cristais surgiram a partir do terceiro dia. (figura 4.9).

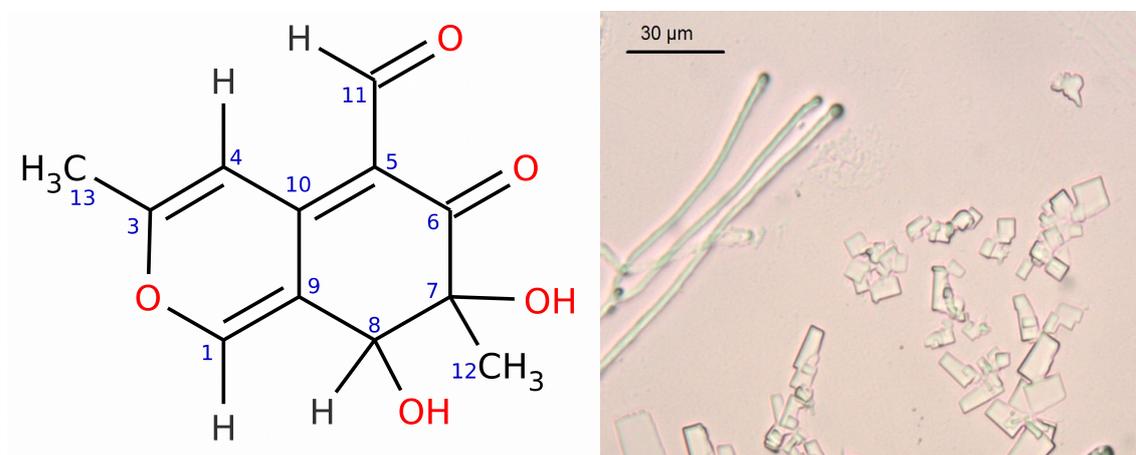


Figura 4.9: Estrutura do Austdiol e cristais ao microscópio

#### 4.4.2 Identificação 331F05

A amostra 331F05 foi obtida como um sólido branco amorfo (ver seção 3.7.3.1). No espectro de massas de 331F05, obtido por ESI em modo positivo, foram observados picos em  $m/z$  524 ( $[M+H]^+$ ), 546 ( $[M+Na]^+$ ) e 562 ( $[M+K]^+$ ), coerentes com uma molécula de massa 523 Da protonada e que também formou adutos de sódio e potássio nas condições da análise (figura 4.10). Por ser esta massa molecular ímpar, indicativa de um composto com número ímpar de átomos de nitrogênio, tornou-se evidente para o composto 331F05 uma possível natureza alcaloídica.

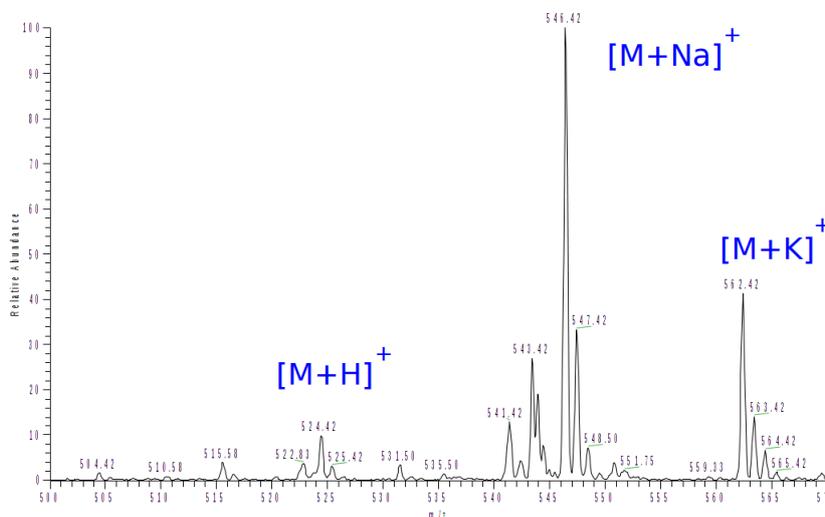


Figura 4.10: Espectro de massas de 331F05 por ESI-ITMS

A fragmentação de 331F05 em um espectrômetro triplo-quadrupolo com fonte APCI mostrou a perda de água (18 Da – setas vermelhas) e de ácido acético (60 Da – setas azuis) em vários pontos do espectro, indicando a presença de radicais hidroxila (ou também carbonilas e/ou epóxidos) e acetato no composto (figura 4.11). Mas a quantidade de setas não tem relação direta com a quantidade destes radicais presentes no composto, podendo indicar apenas rotas de fragmentação diferentes.

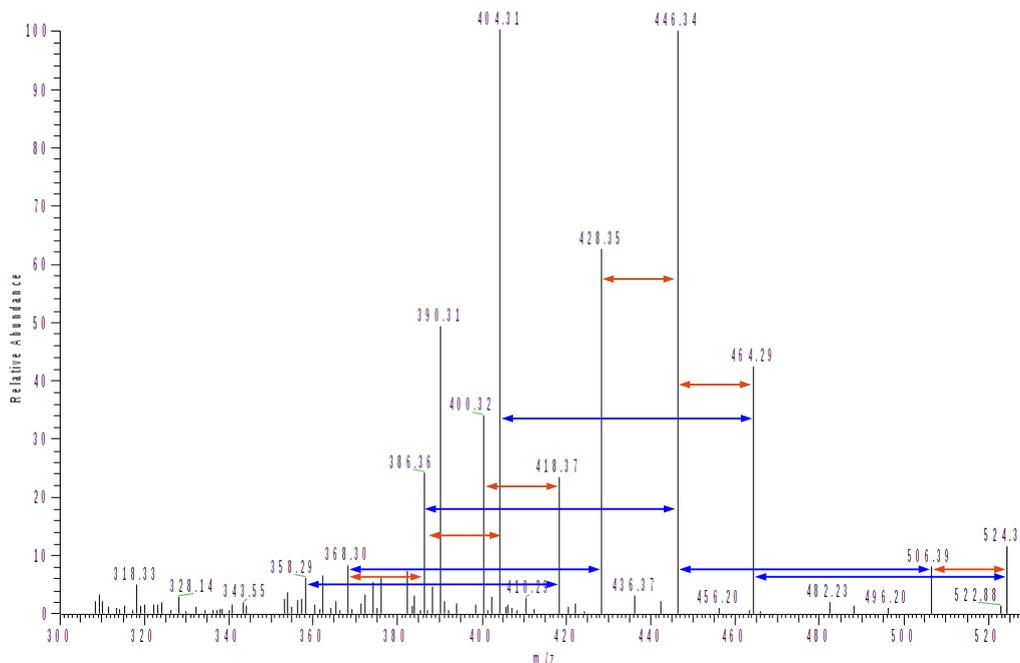


Figura 4.11: Fragmentação do íon 524 ( $[M+H]^+$ )

No espectro de RMN de  $^1H$  do composto 331F05 foram observados quatro sinais de metilas ligadas a carbonos  $sp^3$  em  $\delta$  0,83 (d 7,3), 1,18 (s), 1,21 (d 6,7) e 1,53 (s); um de metila ligada a carbono  $sp^2$  em  $\delta$  2,12 (s); um sinal de metileno ligado a carbono  $sp^2$  em  $\delta$  2,85 (d 1,2); onze sinais de hidrogênios metínicos em  $\delta$  1,62 (dq 7,3; 5,8), 2,09 (ddd 12,7; 5,8; 2,4), 2,21 (dd 5,7; 2,4), 2,34 (dd 10,0; 5,7), 2,62 (ddd 12,7; 12,3; 10,2), 2,72 (d 5,7), 3,17 (d 2,0), 3,22 (ddd 12,0; 6,7; 2,4), 3,53 (dd 2,1; 1,2), 3,60 (m) e 4,05 (s); quatro sinais de hidrogênios na região de alcenos, todos com integração unitária, em  $\delta$  5,63 (ddd 15,7; 10,0; 5,8), 5,65 (d 1,3), 5,9 (s) e 6,03 (dd 15,7; 10,0); e três sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,26 (m), integrado para um hidrogênio, e em  $\delta$  7,20 (m) e 7,34 (m), integrados para dois hidrogênios cada. Estes três últimos sinais, cujos respectivos desdobramentos não são de primeira ordem, são coerentes com a presença de um grupo fenila. A figura 4.12 mostra o espectro de  $^1H$  do composto 331F05, e os multipletos numerados são exibidos em destaque na figura 4.13.

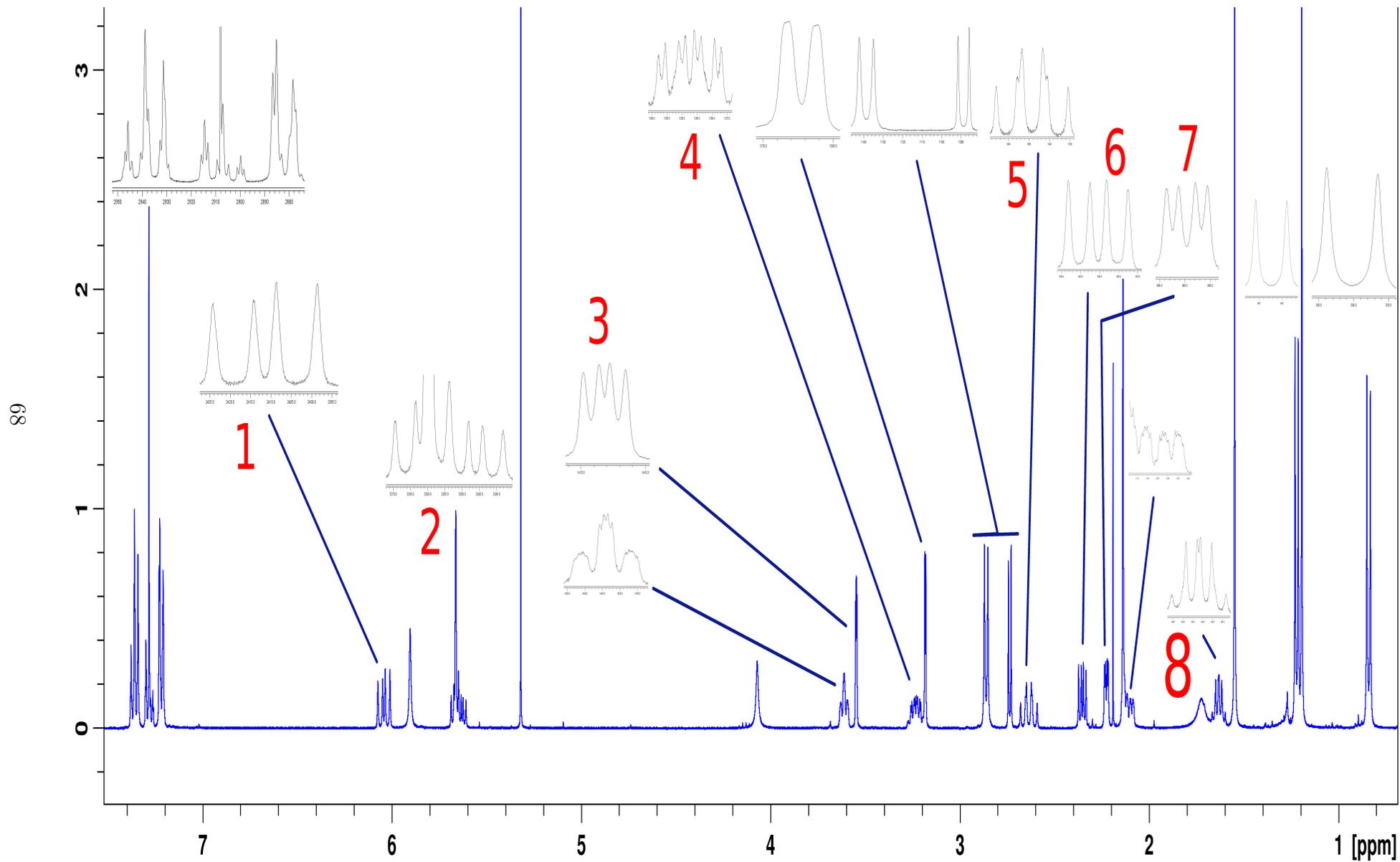


Figura 4.12: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto *331F05* em  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz. Os multipletos numerados podem ser vistos em maiores detalhes na figura 4.13.

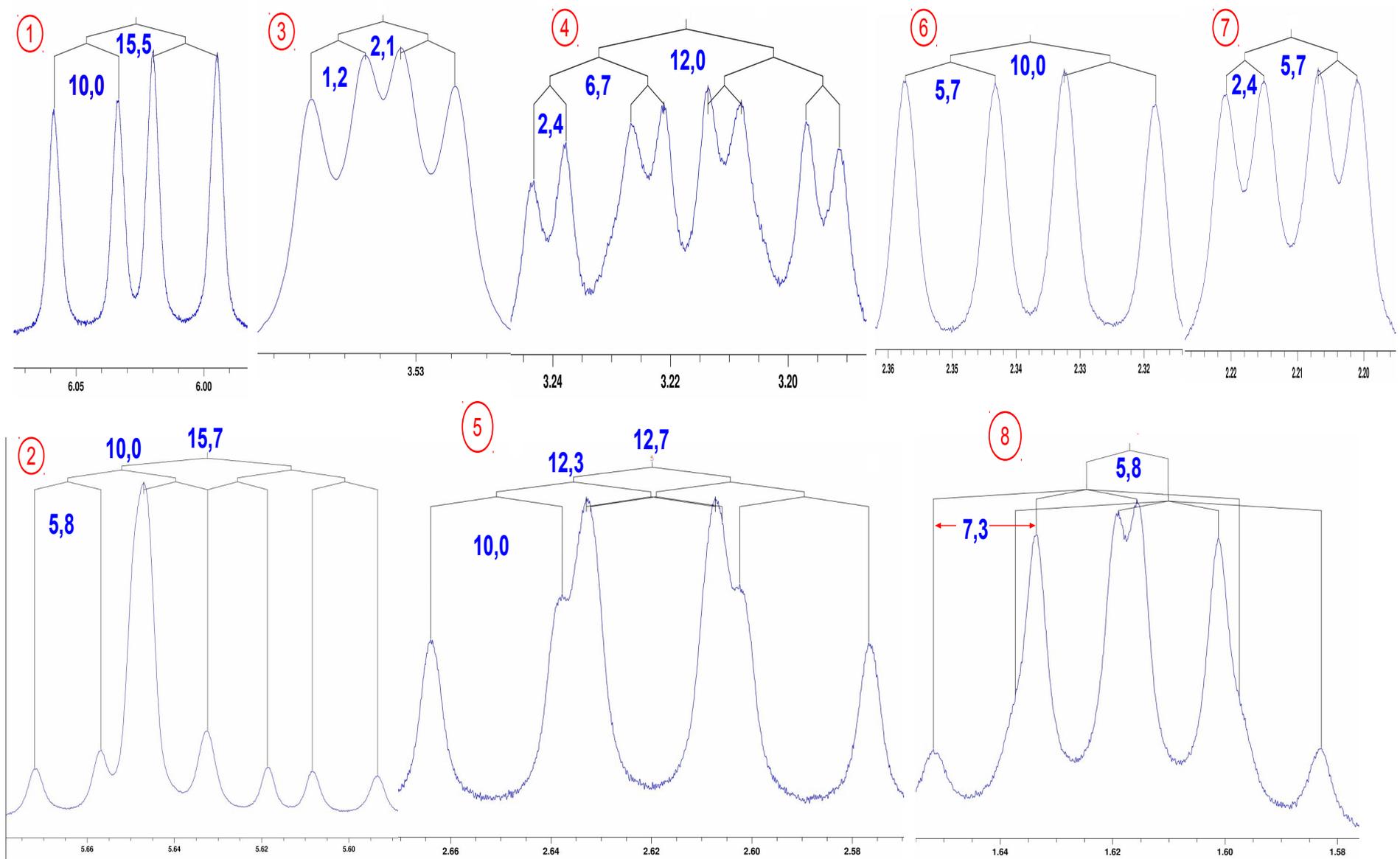


Figura 4.13: Multipletos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto *331F05*. Constantes de acoplamento  $J$  em Hertz.

Pela análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 foram identificados 30 sinais de carbonos: cinco metílicos em  $\delta$  12,4, 19,1, 19,6, 20,6, 21,9; dois metilênicos em  $\delta$  37,6 e 45,8; nove metínicos  $sp^3$  em  $\delta$  36,7, 41,9, 44,9, 51,4, 52,8, 54,5, 60,0, 62,4 e 72,8; em 76,4 temos um carbono tetrassubstituído, parcialmente sobreposto pelo sinal do solvente; sete metínicos na região de carbonos  $sp^2$  em  $\delta$  131,1, 131,4, 129,0 (2C), 129,3 (2C) e 127,2; dois  $sp^3$  tetrassubstituídos em  $\delta$  54,6 e 57,3; um olefínico não ligado a hidrogênio em  $\delta$  136,8; dois de ésteres, ácidos, amidas ou anidridos em  $\delta$  170,1 e 174,4; e um de carbonila de cetona em  $\delta$  215,5 (figura A.3).

O espectro HSQC do composto *331F05* mostra a conexão dos hidrogênios metílicos em  $\delta$  0,83 (d 7,3) com o carbono em  $\delta$  12,4; no espectro de COSY, o acoplamento entre eles e o hidrogênio em  $\delta$  1,62, e no espectro HMBC, suas correlações múltiplas com os carbonos metínicos em  $\delta$  36,7 e 51,4 e o tetrassubstituído em  $\delta$  57,3 (figura 4.14, figura A.4, A.5, A.6).

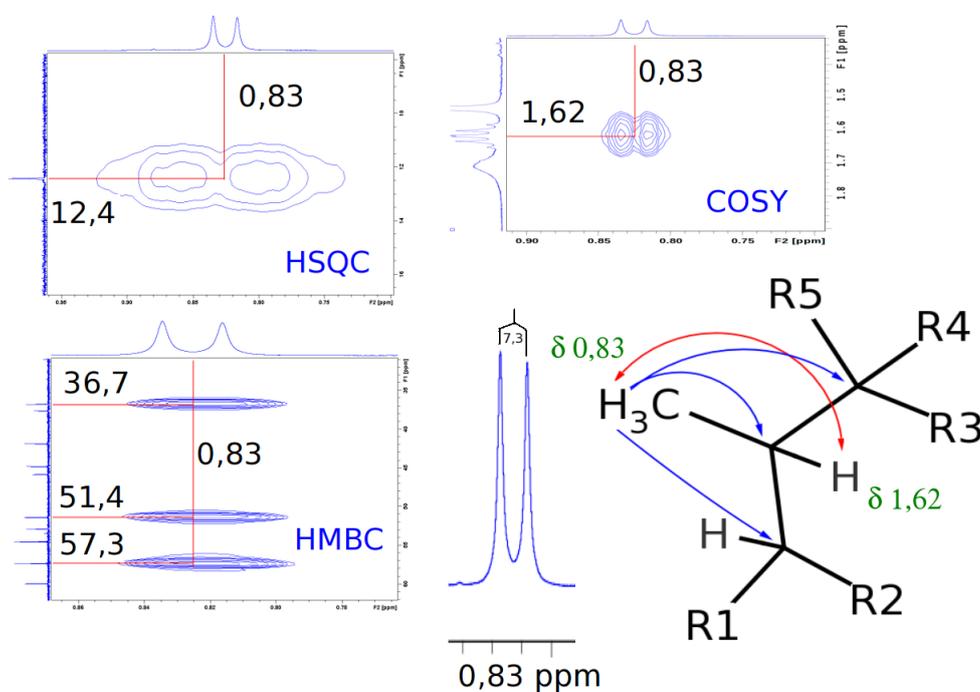


Figura 4.14: COSY, HSQC, HMBC, acoplamentos e correlações para o hidrogênio em 0,83 ppm do composto *331F05*

O hidrogênio metínico em  $\delta_H$  1,62 (dq 5,8; 7,3), também em acoplamento com o hidrogênio em  $\delta_H$  2,21 (COSY), está conectado com o carbono em  $\delta_C$  36,7 (HSQC) e apresenta correlações múltiplas com os carbonos em  $\delta_C$  12,4, 19,6, 51,4, 54,5, 54,6 e 57,3 (HMBC) (figura 4.15).

Os hidrogênios metílicos em  $\delta_H$  1,18 (s), conectados ao carbono em  $\delta_C$  19,6 (HSQC), tem correlações com os carbonos em  $\delta_C$  12,4 (fraca), 36,7, 57,3 e 62,4 (HMBC). Este carbono em  $\delta_C$  62,4 e o hidrogênio em  $\delta_H$  2,72 (d 5,7) a ele

conectado (HSQC) possuem deslocamentos químicos característicos de epóxidos. Este hidrogênio tem acoplamento com o hidrogênio metínico em  $\delta_H$  2,34, o qual correlaciona-se com os carbonos em  $\delta_C$  19,6, 57,3 e 131,4 (HMBC) (figura 4.16).

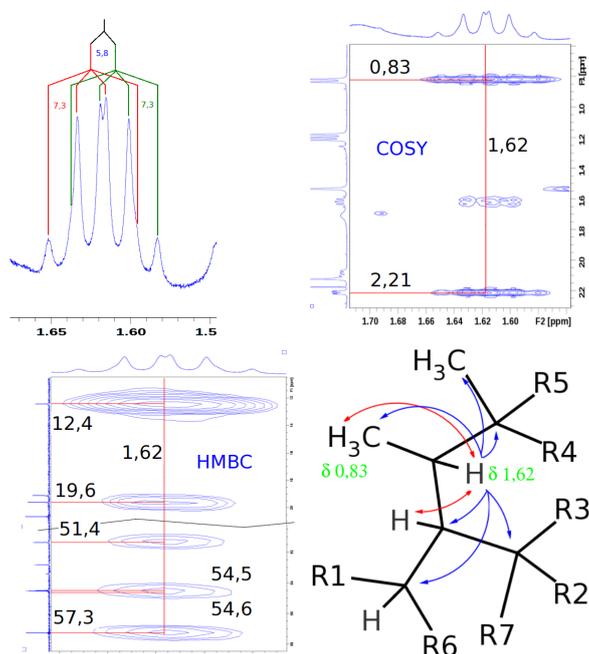


Figura 4.15: COSY, HMBC, acoplamentos e correlações para o hidrogênio em 1,62 ppm do composto *331F05*

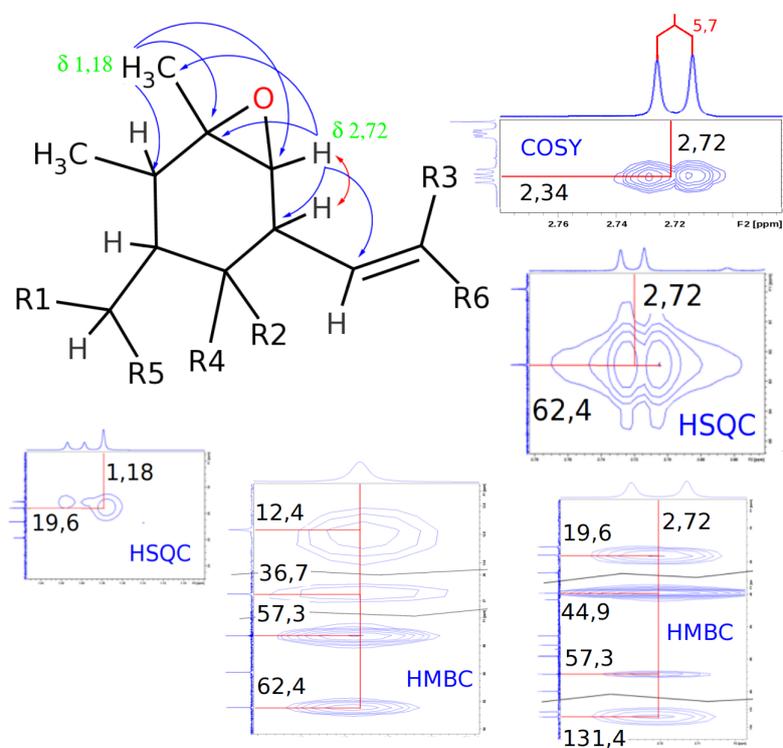


Figura 4.16: COSY, HSQC, HMBC, acoplamentos e correlações para os hidrogênios em 1,18 ppm e 2,72 ppm do composto *331F05*

O hidrogênio em  $\delta_H$  2,34 (dd 5,7; 10,0), conectado ao carbono em  $\delta_C$  44,9, acopla também com o hidrogênio em  $\delta_H$  6,03 e tem correlações com os carbonos em  $\delta_C$  51,4, 54,6, 62,4, 72,8, 131,1, 131,4 e 174,4 (HMBC) (figura 4.17). O hidrogênio em  $\delta_H$  2,21 (dd 2,4; 5,8), ligado ao carbono em  $\delta_C$  51,4 e visto anteriormente em acoplamento COSY com o hidrogênio em  $\delta_H$  1,62, também acopla com o hidrogênio em  $\delta_H$  3,60 e tem correlações com os carbonos em  $\delta_C$  12,4, 36,7, 45,8, 54,6, 57,3, 72,8 e 174,4 (HMBC) (figura 4.18).

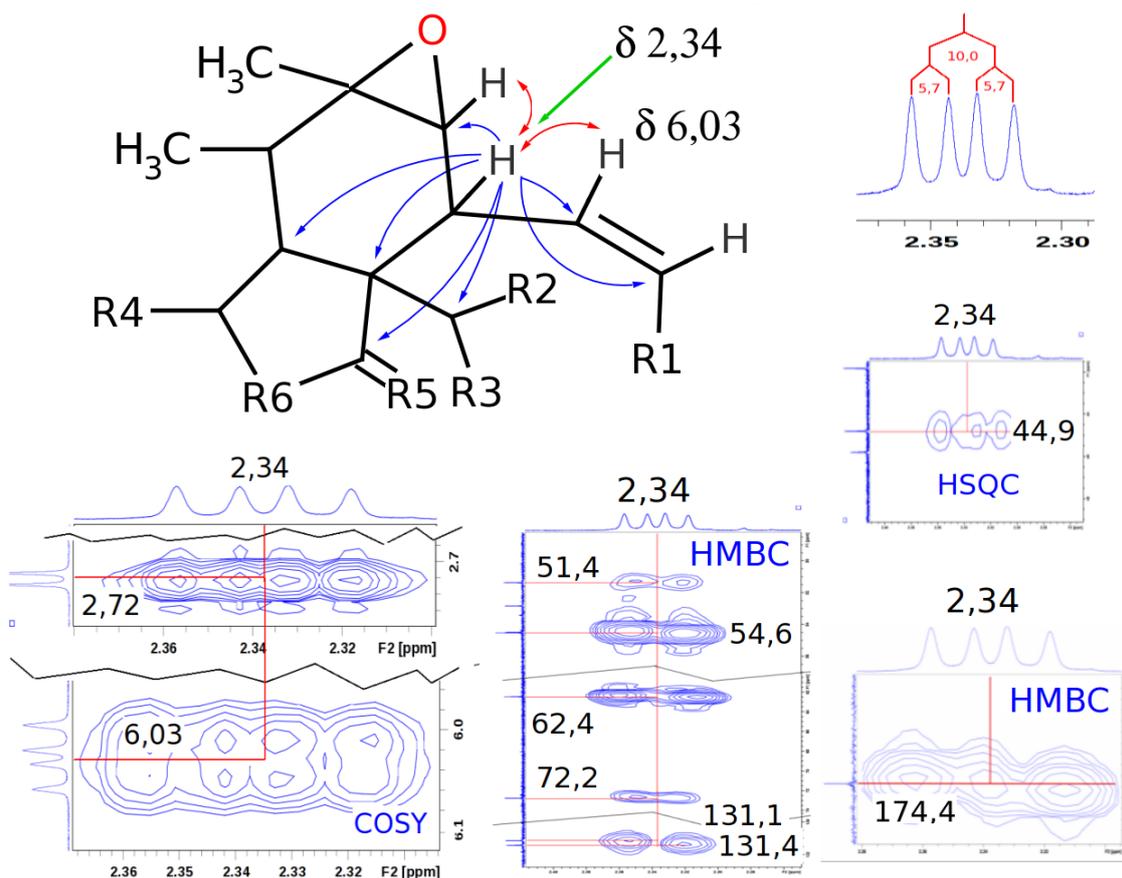


Figura 4.17: COSY, HSQC, HMBC, acoplamentos e correlações para o hidrogênio em 2,34 ppm do composto *331F05*

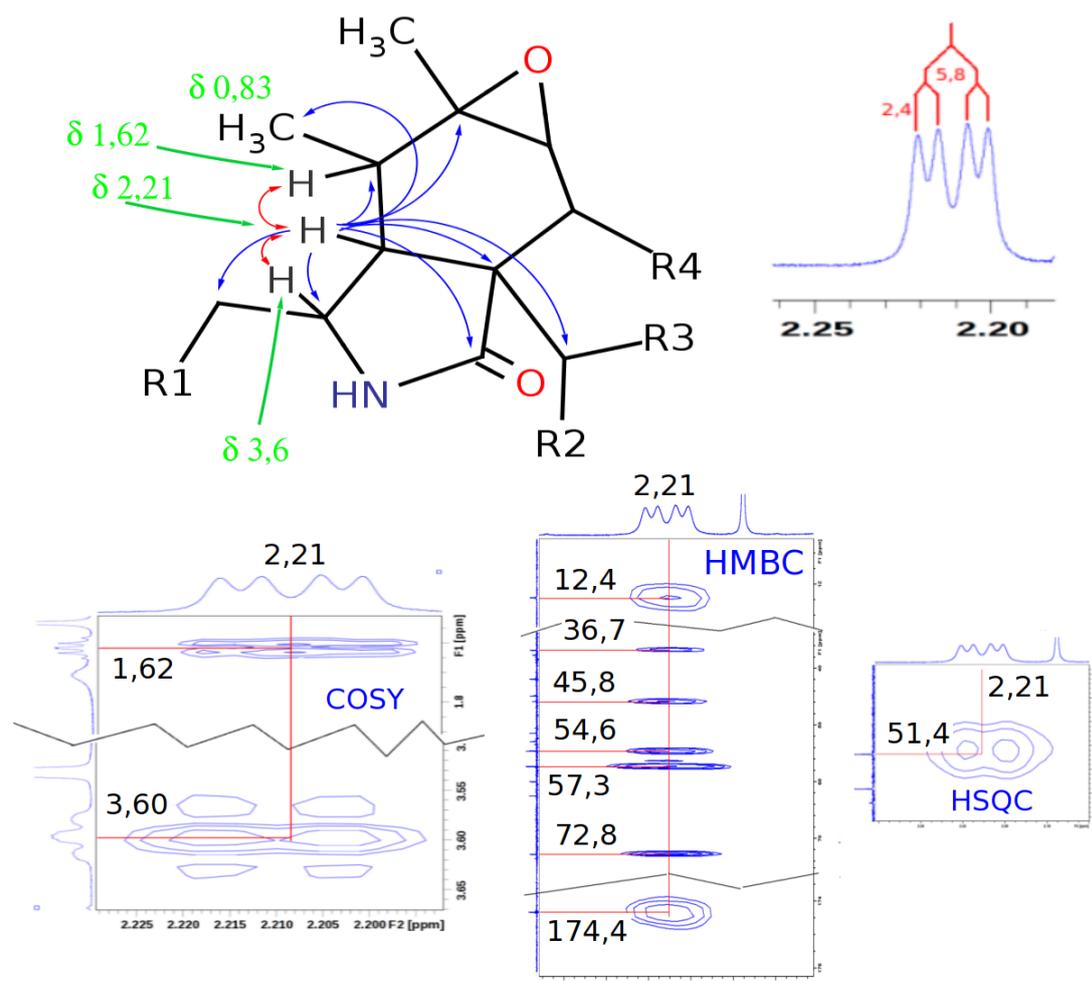


Figura 4.18: COSY, HSQC, HMBC, acoplamentos e correlações para o hidrogênio em 2,21 ppm do composto *331F05*

O hidrogênio em  $\delta_H$  3,60 (m) conectado ao carbono em  $\delta_C$  54,5, acopla também com o hidrogênio em  $\delta_H$  2,85 e tem correlações com os carbonos em  $\delta_C$  36,7, 51,4, 136,8 e 174,4 (HMBC). Os hidrogênios metilênicos em  $\delta_H$  2,85 (d 1,2), conectados ao carbono em  $\delta_C$  45,8, estão correlacionados por sua vez com os carbonos em  $\delta_C$  51,4, 136,8 e 129,3 (2C). Ligados aos carbonos em  $\delta_C$  129,3, os dois hidrogênios em  $\delta_H$  7,20 (m), formam com os outros em  $\delta_H$  7,26 (m) e  $\delta_H$  7,34 (m) um conjunto típico de grupo fenila. Os acoplamentos e as correlações dos sinais desses hidrogênios ratificam esta identificação.

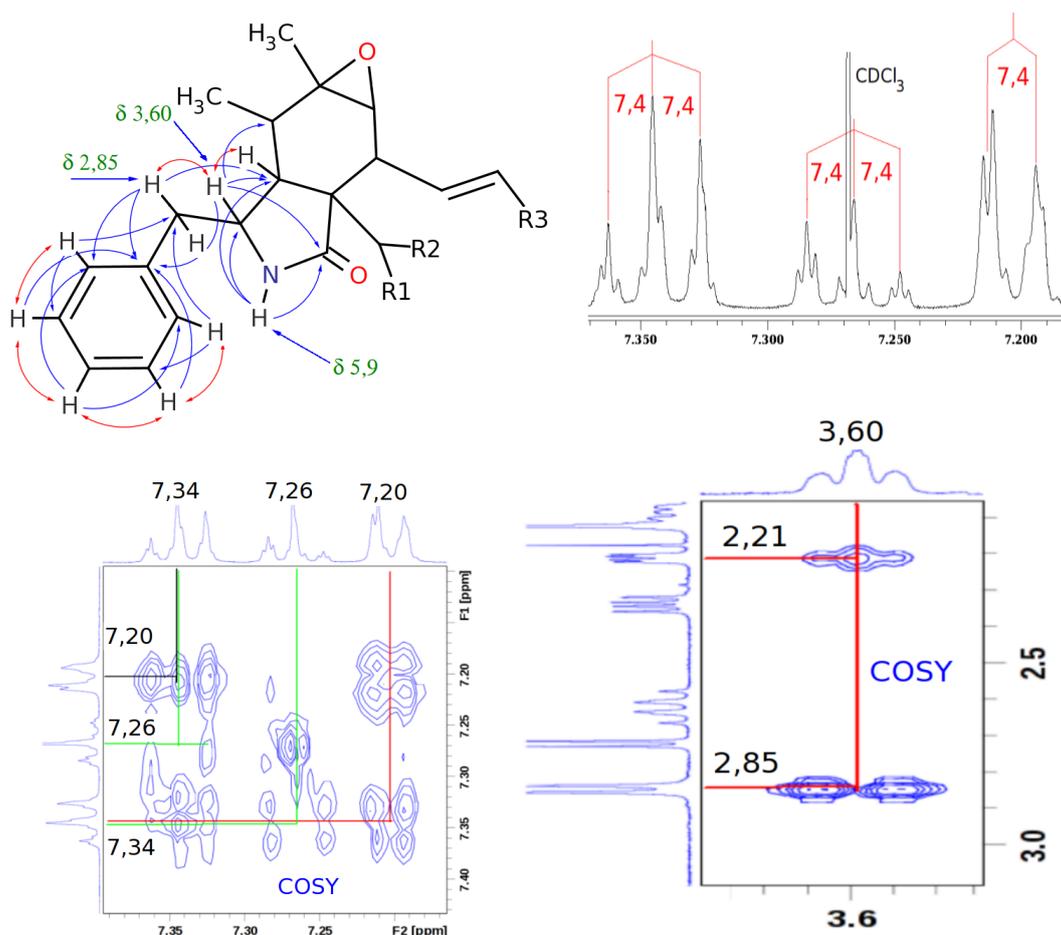


Figura 4.19: COSY, HSQC, HMBC, acoplamentos e correlações para os hidrogênios em 2,85 ppm, 3,60 ppm e na fenila do composto *331F05*

Os dados discutidos até aqui são coerentes com uma estrutura parcial constituída por um anel de seis membros, com uma função epóxido, em fusão de anel a uma  $\gamma$ -lactama, a qual está conectada um grupo benzílico (ver figura 4.20). Este anel lactâmico é confirmado pelo sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  5,9 (s), sem correlação que permita atribuir-lhe conexão a qualquer carbono (HSQC) e correlacionado no HMBC com os carbonos em  $\delta_C$  51,4, 54,5 e 174,4 (figura 4.19).

Seguindo este tipo de análise da cadeia de acoplamentos observada no espectro de COSY e das correlações registradas no espectro HMBC (tabela 4.9) e considerando-se os dados do experimento de massas, foi possível determinar para *331F05* a estrutura apresentada na figura 4.20. Por comparação com dados da literatura *331F05* foi identificada finalmente com a substância 19,20-epoxicitocalasina Q. Os dados de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  desta substância, para comparação, foram obtidos de [ESPADA et al. \(1997\)](#). Segundo os autores, citocalasinas são comuns em vários gêneros, tais como *Phomopsis*, *Chaetomium*, *Hypoxylon*, *Xylaria* e *Daldinia*. Estas substâncias apresentam marcante efeito citostático em cultura de células de mamíferos, inibição da protease do HIV-1, e atividades antibiótica e antitumoral.

Tabela 4.9: Dados de RMN de 331F05 – 19,20-epoxicitocalasina Q

	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	COSY	HMBC (*)
<b>1</b>		174,4		
<b>3</b>	3,60 <i>m</i>	54,5 CH	4, 10	5, 4, 1, 1'
<b>4</b>	2,21 <i>dd</i> (5,8; 2,4)	51,4 CH	3, 5	1, 3, 5, 6, 9, 10, 21, 11f
<b>5</b>	1,62 <i>dq</i> (7,3; 5,8)	36,7 CH	4, 11	3, 4, 6, 9, 11, 12
<b>6</b>		57,3		
<b>7</b>	2,72 <i>d</i> (5,7)	62,4 CH	8	6, 8, 12, 13
<b>8</b>	2,34 <i>dd</i> (10,0; 5,7)	44,9 CH	7, 13	1, 7, 9, 13, 14, 21, 4f
<b>9</b>		54,6		
<b>10</b>	2,85 <i>d</i> (7,2)	45,8 CH <sub>2</sub>	3	4, 1', 2', 6'
<b>11</b>	0,83 <i>d</i> (7,3)	12,4 CH <sub>3</sub>	5	4, 5, 6
<b>12</b>	1,18 <i>s</i>	19,6 CH <sub>3</sub>		5, 6, 7
<b>13</b>	6,03 <i>dd</i> (15,7; 10,0)	131,4 CH	8, 14	7, 14, 15, 16
<b>14</b>	5,63 <i>ddd</i> (15,7; 10,0; 5,8)	131,1 CH	13, 15a, 15b	15, 8, 13f
<b>15 – Ha</b>	2,62 <i>ddd</i> (12,7; 12,0; 10,0)	37,6 CHa	14, 15b, 16	13, 14, 16, 17
<b>15 – Hb</b>	2,09 <i>ddd</i> (12,7; 5,8; 2,4)	37,6 CHb	14, 15a, 16	13, 14, 16, 17, 22
<b>16</b>	3,22 <i>m</i> (12,0; 6,7; 2,4)	41,9 CH	15a, 15b, 22	14, 15, 17, 22
<b>17</b>		215,5		
<b>18</b>		76,4		
<b>19</b>	3,17 <i>d</i> (2,0)	60,0 CH	20	18, 20, 21, 23f
<b>20</b>	3,53 <i>dd</i> (2,0; 1,2)	52,8 CH	19, 21	18, 19, 21
<b>21</b>	5,65 <i>d</i> (1,2)	72,8 CH	20	8, 19, 20, 24, 4f
<b>22</b>	1,21 <i>d</i> (6,7)	19,1 CH <sub>3</sub>	16	15, 16, 17
<b>23</b>	1,53 <i>s</i>	21,9 CH <sub>3</sub>		17, 18, 19
<b>CH<sub>3</sub>CO</b>		170,1		
<b>CH<sub>3</sub>CO</b>	2,12 <i>s</i>	20,6 CH <sub>3</sub>		24, 21f
<b>1'</b>		136,8		
<b>2' 6'</b>	7,20 <i>m</i>	129,3 2CH	3', 5'	10, 3', 5'
<b>4'</b>	7,26 <i>m</i>	127,2 CH	3', 5'	2', 6'
<b>3' 5'</b>	7,34 <i>m</i>	129,00 2CH	2', 6', 4'	1'
<b>NH</b>	5,9 <i>s</i>	NH		1, 3, 4
<b>18-OH</b>	4,05 <i>s</i>	OH		17, 18, 19, 23

(\*) **f** = fraco      Deslcamentos em ppm, acoplamentos em Hertz

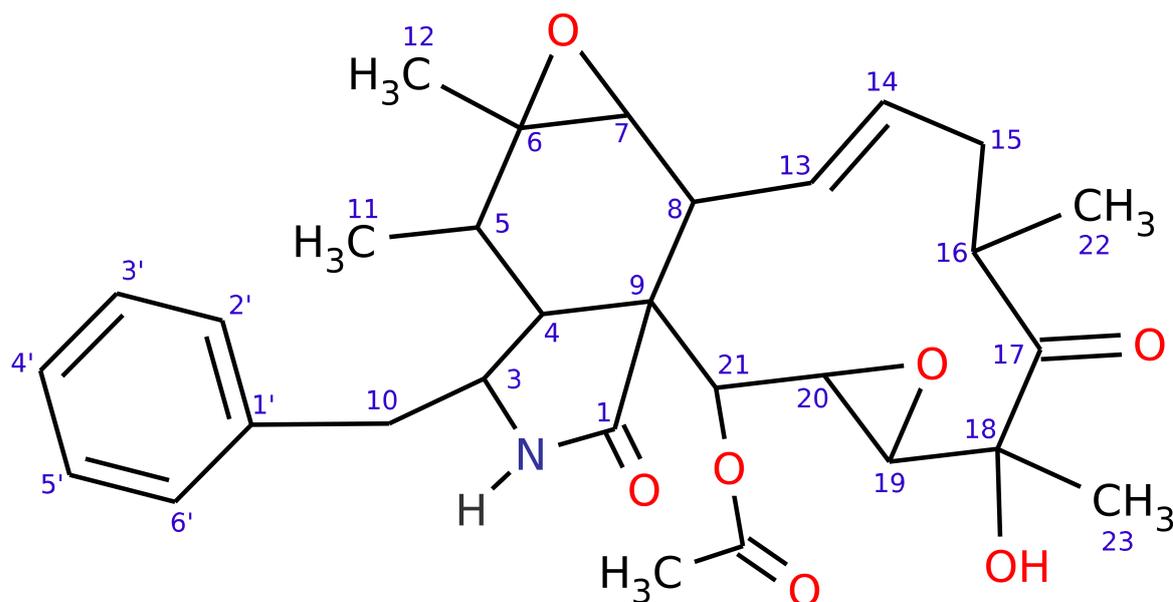


Figura 4.20: Estrutura da 19,20-epoxicitocalasina Q

#### 4.4.3 Identificação de *F0103*

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de *F0103* (ver seção 3.7.3.2) foram observados: um singlete em  $\delta$  11,83 (s) típico de hidrogênio hidroxílico quelado com carbonila; dois dubletos de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  8,13 ppm e 6,9 ppm, ambos com  $J$  igual a 9,0 Hz; um duplo-duplo-quarteto (ddq) em  $\delta$  4,67 ppm ( $J = 3,2; 11,8; 6,3$ ); dois duplo-dubletos em  $\delta$  3,89 ppm ( $J = 3,2; 17,8$ ) e em  $\delta$  3,05 ppm ( $J = 11,8; 17,8$ ); um singlete de metoxila em  $\delta$  3,88 ppm e um dubleto de metila em  $\delta$  1,56 ppm ( $J = 6,3$ ). A figura 4.22 mostra os três multipletos da molécula, bem como os valores das constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hertz.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram registrados sinais de carbonos carbonílicos em  $\delta$  170,0 e 166,1 ppm, carbonos aromáticos em  $\delta$  108,9; 116,2; 118,5; 138,4; 143,4 e 165,5 ppm. Em  $\delta$  75,6 ppm temos um carbono saturado, provavelmente ligado a oxigênio; e um carbono metoxílico em  $\delta$  52,0 ppm. Em  $\delta$  32,6 ppm vemos outro carbono saturado não ligado a átomos eletronegativos; e um carbono metílico em  $\delta$  20,7 ppm.

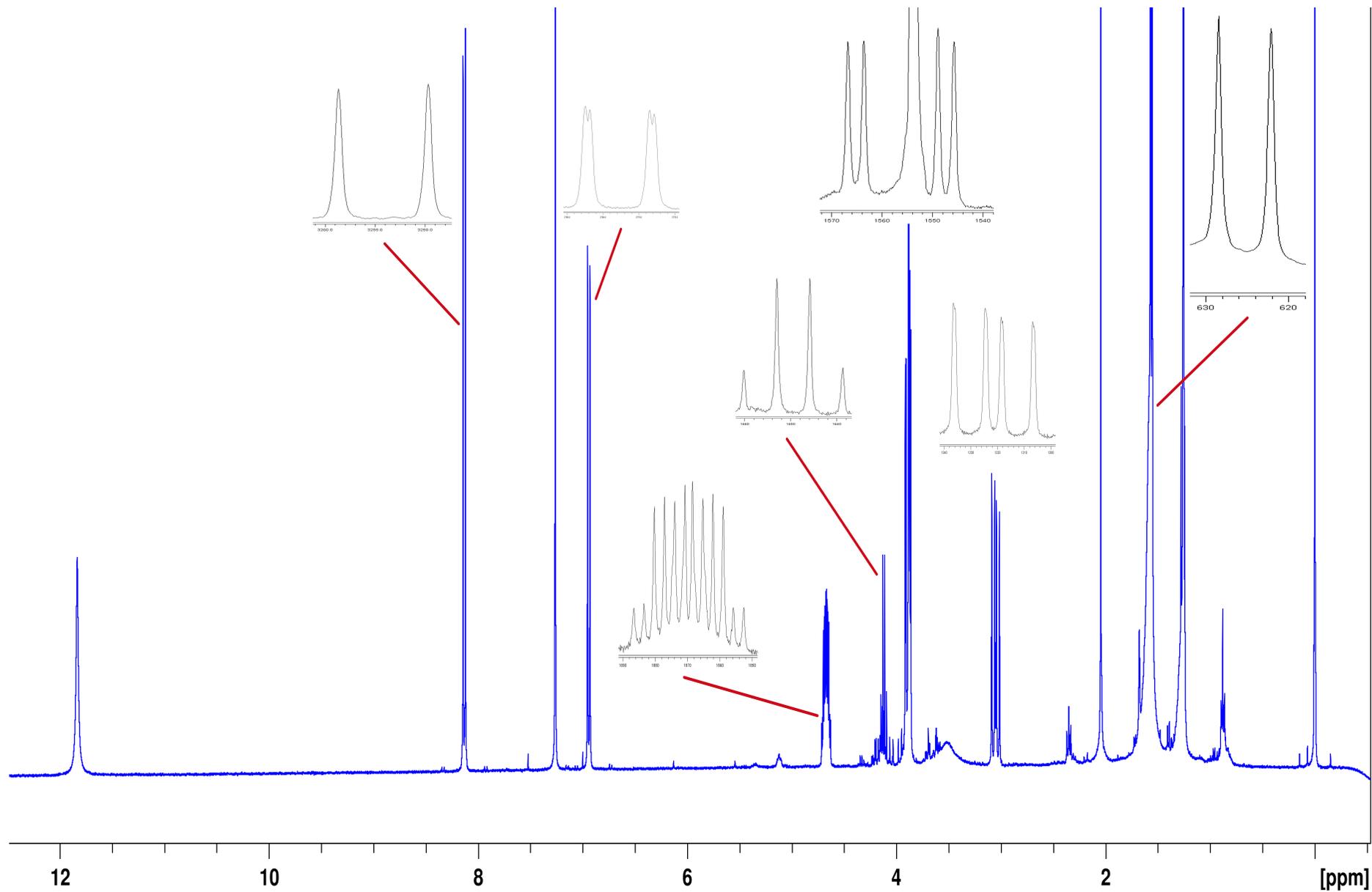


Figura 4.21: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra *F0103* em  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz.

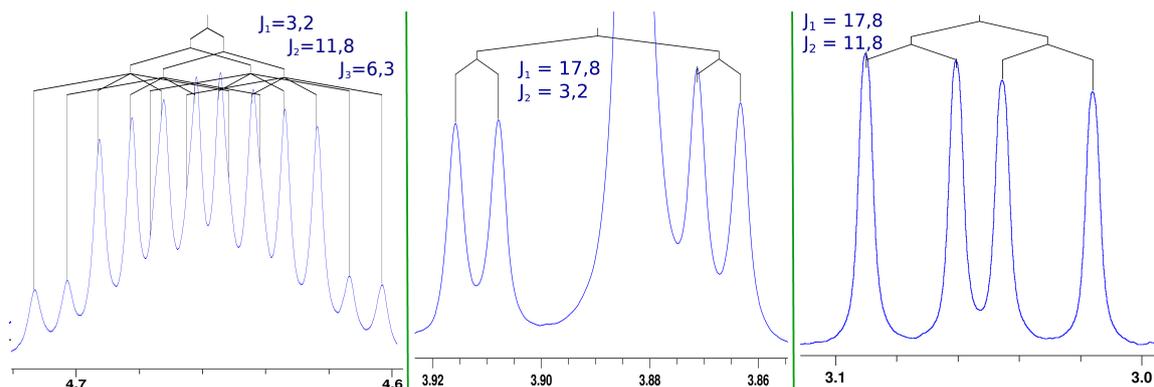


Figura 4.22: Multipletos: ddq, dd e dd da amostra *F0103*.

Pelo HSQC foram observadas as correlações diretas dos hidrogênios em  $\delta_H$  8,13 e 6,94 com os carbonos aromáticos em  $\delta_C$  138,4 e 116,2 respectivamente; do hidrogênio em  $\delta_H$  4,67 com o carbono em  $\delta_C$  75,6; os hidrogênios em  $\delta_H$  3,89 e em  $\delta_H$  3,05 estão ligados a um mesmo carbono em  $\delta_C$  32,6; os hidrogênios da metoxila ( $\delta_H$  3,88) estão ligados a um carbono em  $\delta_C$  52,0; os hidrogênios da metila em  $\delta_H$  1,56 estão ligados a um carbono em  $\delta_C$  20,7. O espectro de  $^{13}\text{C}$  mostrou também carbonos carbonílicos em  $\delta_C$  170,0 e 166,1; e carbonos aromáticos em  $\delta_C$  108,9; 118,5; 143,4 e 165,5 ppm.

Pelo HMBC foram observadas correlações do hidrogênio em  $\delta_H$  11,83 com os carbonos em  $\delta_C$  116,2 e  $\delta_C$  108,9; os hidrogênios em  $\delta_H$  8,13 e em  $\delta_H$  6,94 se correlacionam com carbonos aromáticos em  $\delta_C$  118,5; 165,5; 108,9 e 143,4; os hidrogênios da metoxila em  $\delta_H$  3,88 se correlacionam com o carbono em  $\delta_C$  166,1; os hidrogênios ligados ao carbono em  $\delta_C$  32,6 ppm estão em ambientes químicos diferentes, e o hidrogênio em  $\delta_H$  3,89 se correlaciona com os carbonos em  $\delta_C$  108,9; 143,4 e 118,5 ppm, enquanto o hidrogênio em  $\delta_H$  3,05 se correlaciona com os carbonos em  $\delta_C$  20,7; 75,6; 108,9; 143,4 e 118,5 ppm; e os hidrogênios da metila em  $\delta_H$  1,56 ppm se correlacionam com os carbonos em  $\delta_C$  32,6 e 75,6 (ver figura 4.23).

Os dados dos testes de RMN para *F0103* estão na tabela 4.10.

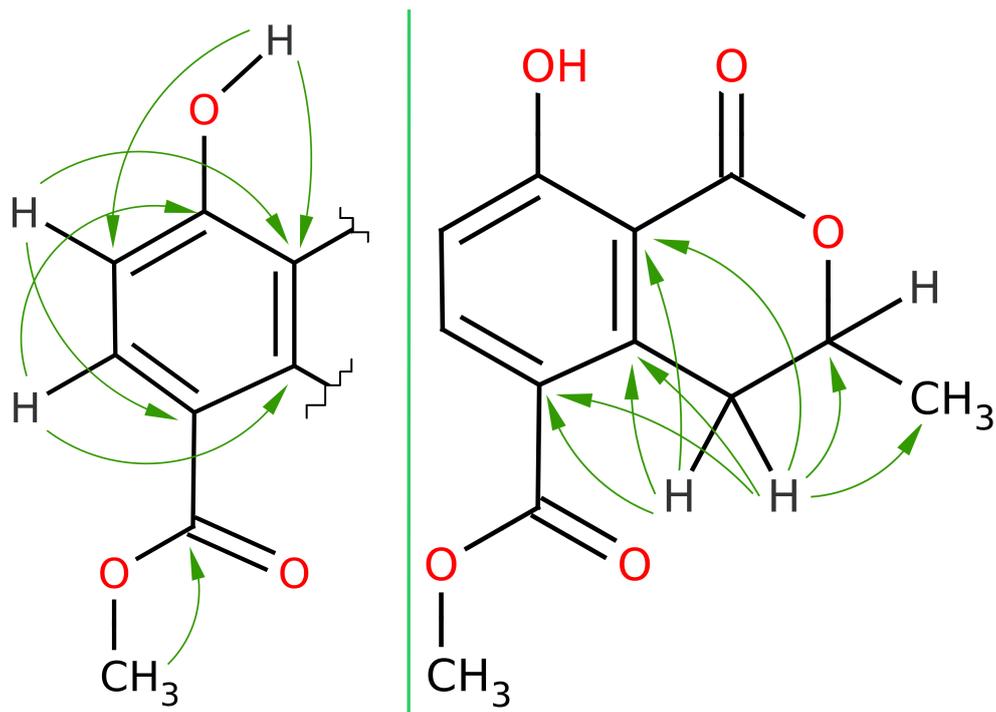


Figura 4.23: Correlações HMBC da amostra *F0103*

Tabela 4.10: Dados de RMN de *F0103*

	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	HMBC (*)
<b>1</b>		170,0	
<b>3</b>	4,67 <i>ddq</i> 3,2/11,8/6,3	75,6 CH	
<b>4 – Ha</b>	3,89 <i>dd</i> 3,2/17,8	32,6 CHa	10, 9, 5f
<b>4 – Hb</b>	3,05 <i>dd</i> 11,8/17,8	32,6 CHb	11, 3, 10, 9f, 5f
<b>5</b>		118,5	
<b>6</b>	8,13 <i>d</i> 9,0	138,4 CH	10, 8
<b>7</b>	6,94 <i>d</i> 9,0	116,2 CH	9, 5
<b>8</b>		165,5	
<b>9</b>		108,9	
<b>10</b>		143,4	
<b>11</b>	1,56 <i>d</i> 6,3	20,7 CH <sub>3</sub>	4, 3
CH <sub>3</sub> OCO		166,1	
CH <sub>3</sub> OCO	3,88 <i>s</i>	52,0 CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> OCO
<b>8-OH</b>	11,83 <i>s</i>	OH	7, 9f

(\*) f = fraco      Deslocamentos em ppm, acoplamentos em Hertz

Os dados permitem identificar a amostra *F0103* como *5-metoxicarbonil-meleína* (figura 4.24), que foi isolada do caldo fermentado de *Hypoxyton mammatum*, uma *Xylariaceae* responsável pelo doença do cancro em algumas árvores da família *Sal-*

*caceae* (álamos e faias) (ANDERSON *et al.*, 1983). Esta substância pertence à classe das dihidroisocumarinas, muito comuns em *Xylariaceae* dos gêneros *Biscogniauxia*, *Camillea*, *Hypoxylon* e, menos frequentemente *Xylaria* (WHALLEY e EDWARDS, 1997).

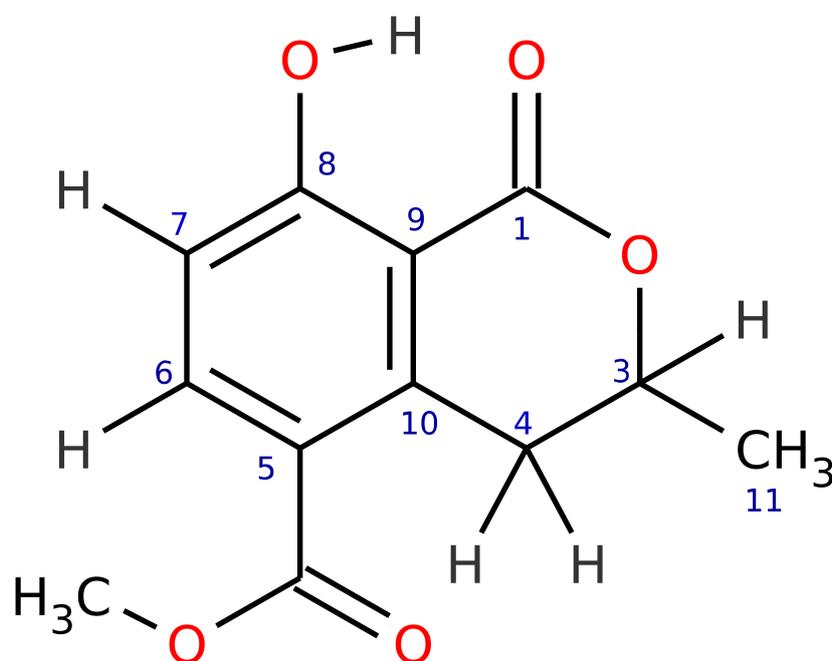


Figura 4.24: Estrutura da 5-metoxicarbonil-meleína

#### 4.4.4 Identificação de *F1008*

A substância *F1008* isolada de um fungo *Xylaria* (325) (ver seção 3.7.4.1) mostrou possuir uma massa de 318 Da (ver figura 4.25).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (figura 4.27) foram observados dois dubletos em  $\delta$  6,35 e 6,19 ppm, cujas constantes de acoplamento iguais a 1,8 Hz são coerentes com um anel aromático tetrassubstituído e com os dois hidrogênios em posição relativa meta um do outro. Também foram observados os seguintes sinais: um olefínico  $\delta$  5,60 (d 0,5), três metoxílicos em  $\delta$  3,92; 3,88; 3,68 ppm, dois metilênios de hidrogênios geminados em ambiente químico diferente em  $\delta$  2,90 (dd 13,3; 16,6) e 2,40 (ddd 16,6; 4,6; 0,5), um metílico em  $\delta$  0,92 (d 6,6) e um metínico em d 2,77 (dqd 13,3; 6,6; 4,6) cujas constantes de acoplamento são coerentes com sua vizinhança aos três anteriores. Os multipletos podem se vistos na figura 4.26.

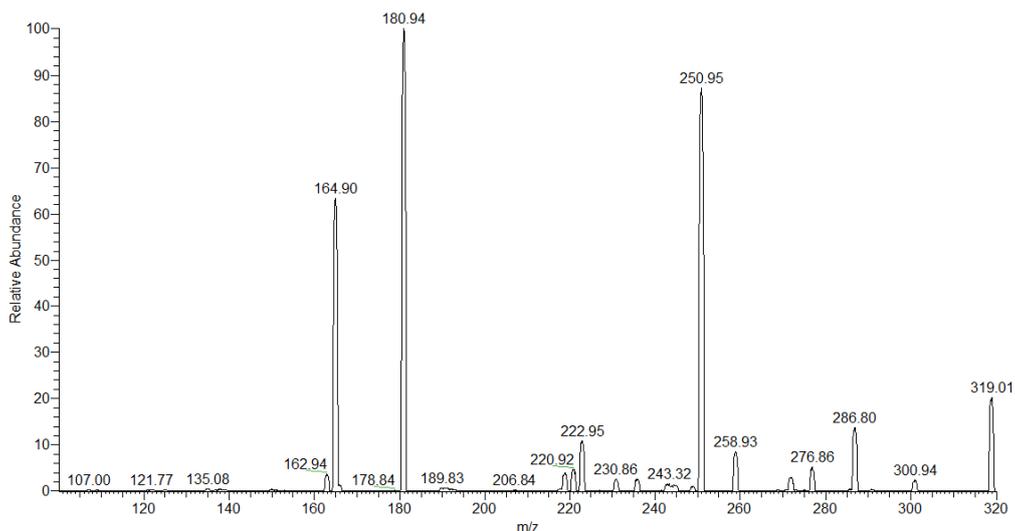


Figura 4.25: Fragmentação do composto *F1008* no triplo-quadrupolo com fonte APCI.

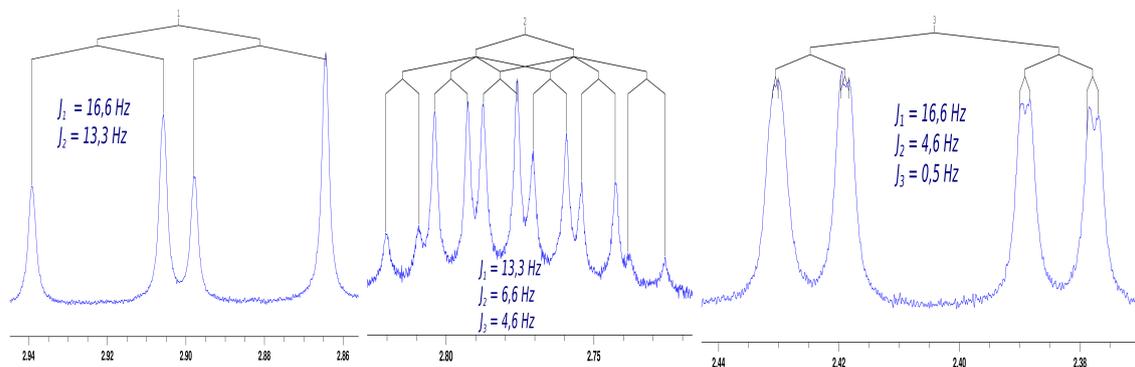


Figura 4.26: multipletos no RMN de  $^1\text{H}$  do composto *F1008*

Todos as correlações e as estruturas parciais propostas acima para esta amostra foram confirmados no COSY, onde foram observados os seguintes acoplamentos: o hidrogênio em  $\delta$  2,40 ppm (ddd) acopla com os hidrogênios em  $\delta$  2,77; 2,90 e 5,60 ppm; o hidrogênio em  $\delta$  2,77 ppm (dqd) acopla com os hidrogênios em  $\delta$  2,40; 2,90 e 0,92 ppm; o hidrogênio em  $\delta$  2,90 (dd) acopla com os hidrogênios em  $\delta$  2,40 e 2,77 ppm; o hidrogênio em  $\delta$  0,92 ppm (d) acopla somente com o hidrogênio em  $\delta$  2,77 ppm; e finalmente existe um acoplamento entre os dois hidrogênios aromáticos em  $\delta$  6,35 ppm e  $\delta$  6,19 ppm (figura 4.28).

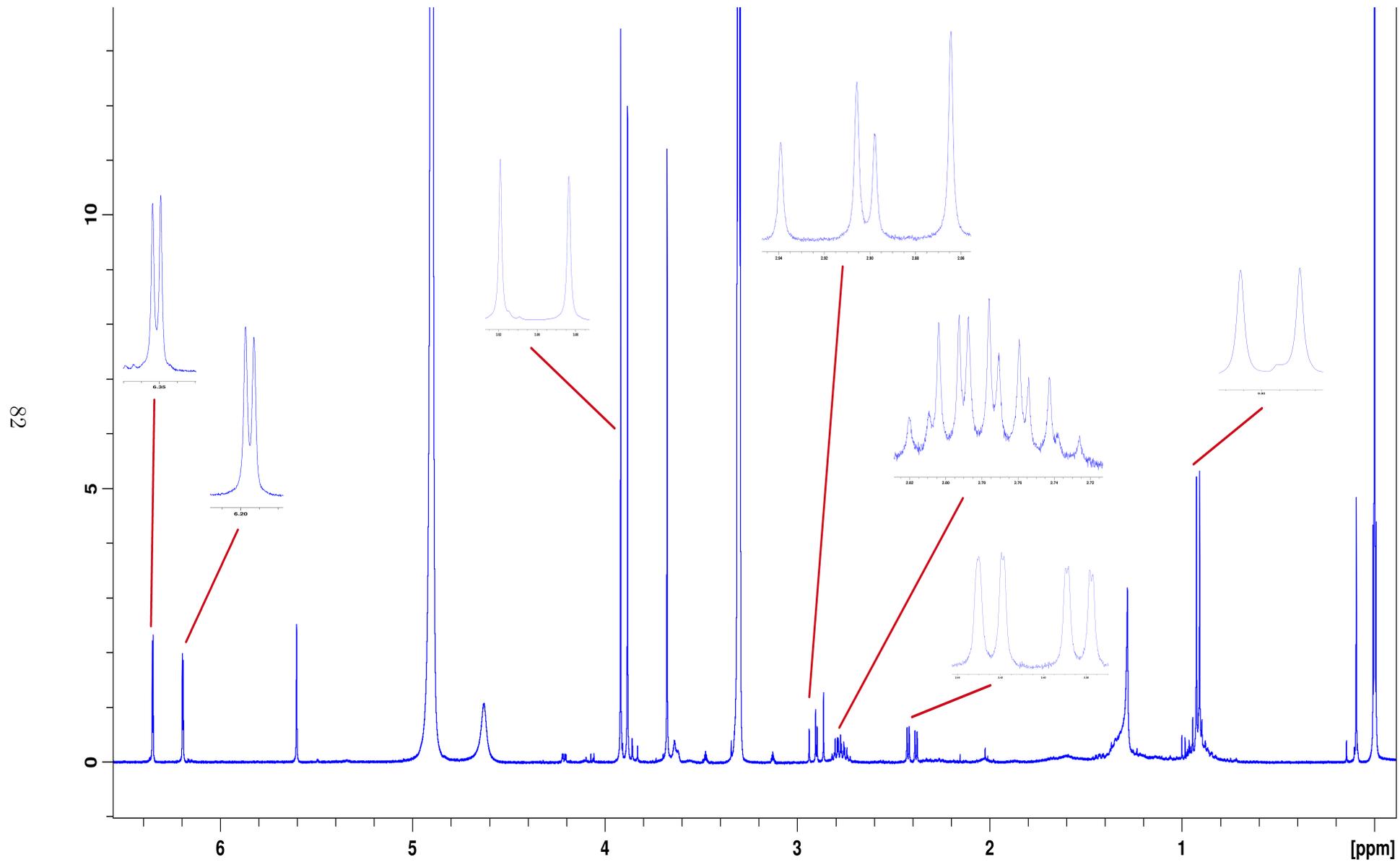


Figura 4.27: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto *F1008* em metanol deuterado, 400 MHz.

Os valores dos deslocamentos dos carbonos foram atribuídos com base nos mapas de correlação de HSQC e HMBC. Através do HSQC foi revelada a ligação dos hidrogênios geminados em  $\delta_H$  2,40 e 2,90 com um carbono em  $\delta_C$  40,8 ppm. O HMBC mostra que o hidrogênio em  $\delta_H$  2,40 se correlaciona com um carbono em  $\delta_C$  160,6, o qual também é detectado pelo hidrogênio em  $\delta_H$  5,60, que possui acoplamento com o hidrogênio em  $\delta_H$  2,40, estando portanto próximos. O hidrogênio em  $\delta_H$  5,60 possui correlações com o carbono em  $\delta_C$  174,5 – o qual é detectado também pelos hidrogênios metoxílicos em  $\delta_H$  3,68 – e com o carbono em  $\delta_C$  91,3. Novamente, o hidrogênio em  $\delta_H$  2,40 se correlaciona com o carbono em  $\delta_C$  3,76 ppm, o qual está ligado a uma metila  $\delta_H$  0,92. Estes hidrogênios se correlacionam com o carbono em  $\delta_C$  91,3, fechando assim um anel.

O espectro HMBC mostra também que duas das três metoxilas (em  $\delta_H$  3,92 e  $\delta_H$  3,88) se correlacionam com átomos de carbono do anel aromático (em  $\delta_C$  172,9 e  $\delta_C$  160,6, respectivamente), e o acoplamento entre os dois hidrogênios ligados diretamente ao anel aromático mostra que eles estão em posição relativa *meta*. As correlações do hidrogênio em  $\delta_H$  6,35 com  $\delta_C$  94,4; 177,9 e 105,1 e as do  $\delta_H$  6,19 com os carbonos em  $\delta_C$  90,1; 105,1; 160,6 e 172,9 nos permitem localizar o hidrogênio em  $\delta_H$  6,35 entre as duas metoxilas. A correlação do hidrogênio em  $\delta_H$  6,35 com o carbono em  $\delta_C$  105,1 e a do hidrogênio  $\delta_H$  6,19 com o carbono em  $\delta_C$  177,9 determinam a posição destes carbonos do anel aromático.

Não foram observadas correlações do hidrogênio em  $\delta_H$  2,77 com outros carbonos (figura 4.28 e tabela 4.11).

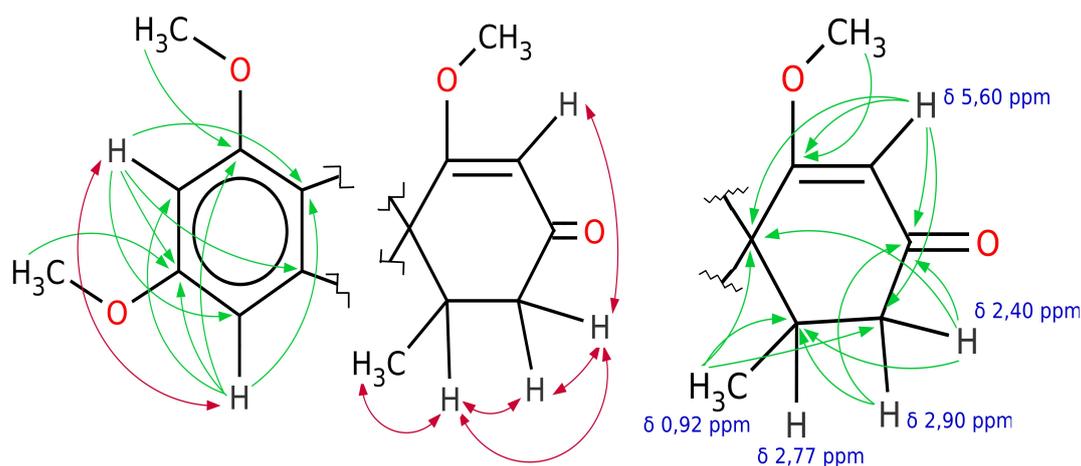


Figura 4.28: COSY (vermelho) e HMBC (verde) para o composto *F1008*

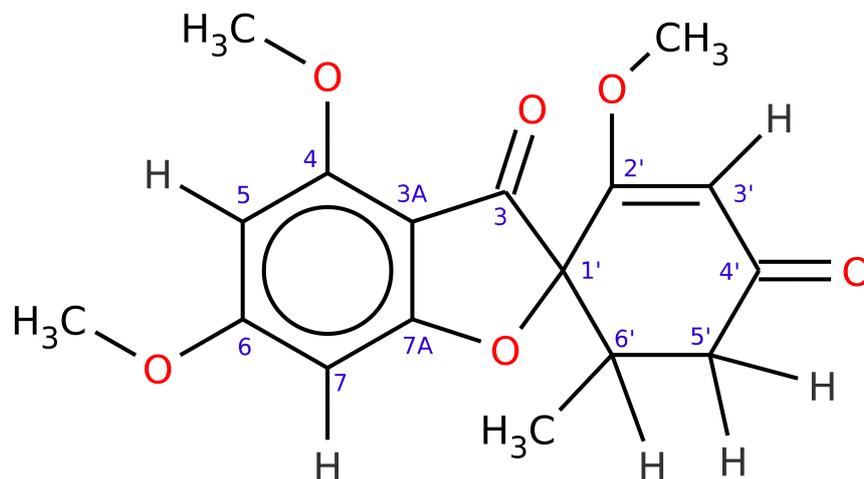
Considerando a massa molecular atribuída a partir do espectro de massas da amostra *F1008* e as estruturas parciais determinadas pelos dados de RMN, foi possível propor a estrutura da substância em análise (figura 4.29). Os deslocamentos químicos dos carbonos **3**, **3A** e **7A**, não detectados no HMBC em correlação com os hidrogênios do anel cetônico  $\beta$ -insaturado são coerentes com esta estrutura,

Tabela 4.11: Dados de RMN de *F1008*

	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	HMBC (*)	COSY
<b>4</b>		160,6		
<b>5</b>	6,35 <i>d</i> (1,8)	90,1 CH	7, 7A, 3A, 6(f)	7
<b>6</b>		172,9		
<b>7</b>	6,19 <i>d</i> (1,8)	94,4 CH	5, 3A, 4, 6	5
<b>7A</b>		177,9		
<b>3A</b>		105,1		
<b>4-OCH<sub>3</sub></b>	3,88 <i>s</i>	57,2 OCH <sub>3</sub>	4	
<b>6-OCH<sub>3</sub></b>	3,92 <i>s</i>	57,0 OCH <sub>3</sub>	6	
<b>3</b>		194,2		
<b>1'</b>		91,3		
<b>2'</b>		174,5		
<b>3'</b>	5,60 <i>d</i> (0,5)	105,6 CH	5', 1', 2', 4'	5'-Ha
<b>4'</b>		199,8		
<b>5' - Ha</b>	2,40 <i>ddd</i> (16,6; 4,6; 0,5)	40,8 CHa	4', 1', 6'	3', 6', 5'-Hb
<b>5' - Hb</b>	2,90 <i>dd</i> (16,6; 13,3)	40,8 CHb	4', 6'	6', 5'-Ha
<b>6'</b>	2,77 <i>dqd</i> (13,3; 6,6; 4,6)	37,6 CH		5'-Ha, 5'-Hb, 6'-CH <sub>3</sub>
<b>6'-CH<sub>3</sub></b>	0,92 <i>d</i> (6,6)	14,3 CH <sub>3</sub>	1', 6', 5'	6'
<b>2'-OCH<sub>3</sub></b>	3,68 <i>s</i>	57,9 OCH <sub>3</sub>	2'	

(\*) f = fraco      Deslocamentos em ppm, acoplamentos em Hertz

a qual foi identificada com a *7-decloro griseofulvina*. Os dados para comparação foram obtidos de CAFÊU *et al.* (2005).

Figura 4.29: Estrutura do composto *F1008*

A estrutura da griseofulvina é interessante por apresentar três anéis conectados, sendo que o anel cetônico está em posição praticamente perpendicular aos outros dois. Existem dois isômeros possíveis para esta estrutura, que são definidos pela posição relativa metila (ligada ao carbono **6'**), de um lado ou de outro do plano do anel cetônico ( ver figura 4.30).

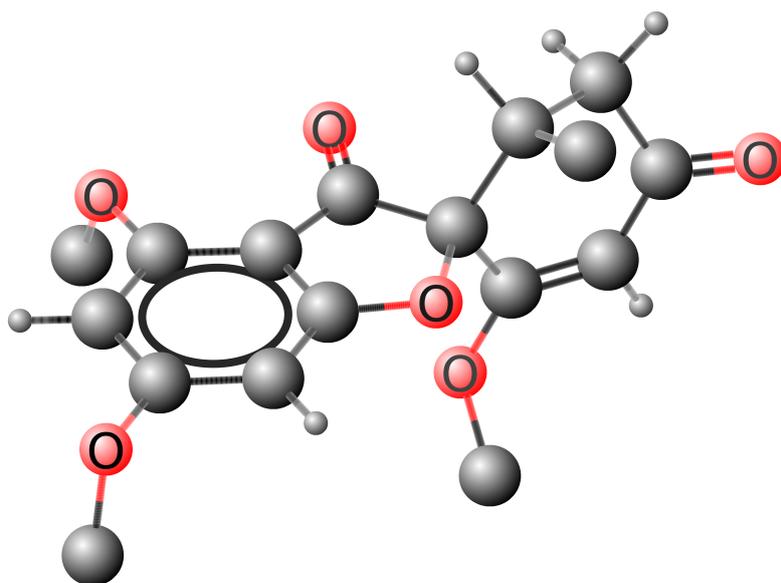


Figura 4.30: Estrutura 3D da 7-decloro griseofulvina.

A griseofulvina é produzida na rota do acetato (ver DEWICK (2009), página 115) e é utilizada principalmente como antifúngico de uso oral e é bem tolerado pelo organismo (DEWICK (2009), página 116). Segundo este autor, a griseofulvina impede a mitose das células fúngicas em doses baixas, insuficientes para prejudicar este processo nas células humanas. Ela foi isolada primeiramente em *Penicillium griseofulvum*, mas foi encontrada também em outros fungos deste e de outros gêneros, como *Xylaria* (CAFÊU *et al.*, 2005) e de um fungo marinho, *Nigrospora* sp. (SHANG *et al.*, 2012). Nestes dois artigos, os autores relatam terem encontrado tanto a griseofulvina quanto a 7-decloro griseofulvina, e testes realizados por SHANG *et al.* (2012) mostram que a 7-decloro griseofulvina possui menor atividade biológica contra fungos do que a griseofulvina (MIC de  $128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente, contra *Stemphylium solani*). Estes mesmos autores relatam não haver atividade citotóxica contra as células tumorais testadas (MCF-7 – Adenocarcinoma humano de peito; SW1990 – Câncer pancreático humano; HepG2 – Carcinoma hepatocelular de fígado humano; NCI-H460 – Câncer de pulmão humano de células grandes; HeLa – Carcinoma epitelial humano; DU145 – Carcinoma de próstata humano; SMMC7721 – Carcinoma hepatocelular de fígado humano), tanto da griseofulvina quanto da 7-decloro griseofulvina.

#### 4.4.5 Identificação de *F1013*

Nos experimentos de espectrometria de massas com fonte APCI com a substância *F1013*, isolada de um fungo *Xylaria* (325) (ver seção 3.7.4.1), foi observado um pico em  $m/z = 508 [M+H]^+$ , e testes com fonte ESI mostraram também picos em  $m/z = 530 [M+Na]^+$ ,  $m/z = 1037 [M+M+Na]^+$  e  $1544 [M+M+M+Na]^+$ , e portanto a

molécula possui massa de 507 Da, ver figura 4.31. Este valor para a massa, por ser um número ímpar, sugere a possibilidade de a molécula ser um alcalóide. No canto superior da mesma figura, temos a fragmentação do íon com  $m/z = 530$ , e podemos ver a perda de um fragmento de massa 60, que corresponde à saída de ácido acético.

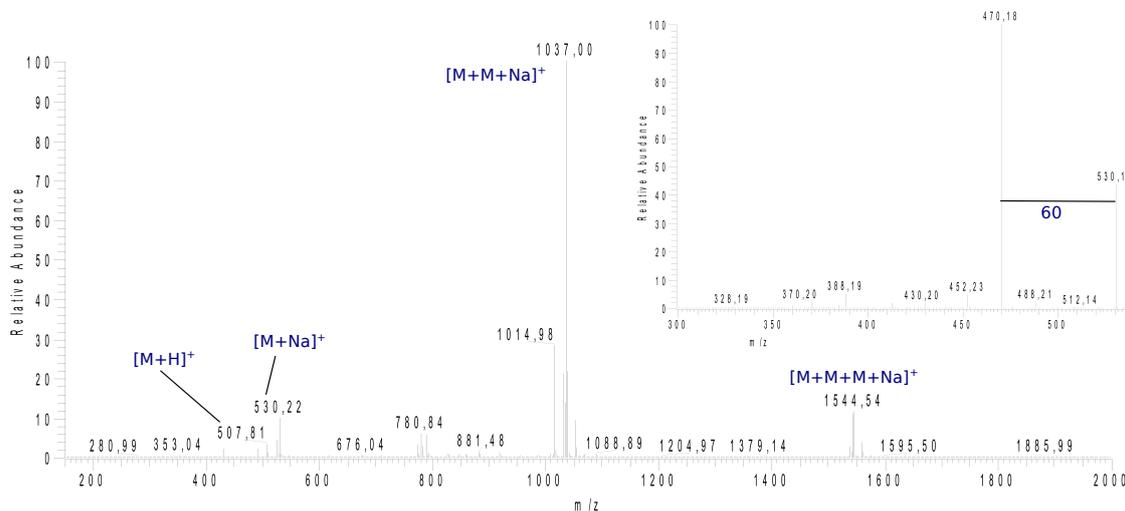


Figura 4.31: Espectros de massas do composto *F1013*

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H mostra multipletos em  $\delta$  7,29,  $\delta$  7,23 e  $\delta$  7,18 ppm (aromáticos), e a integração mostra que somam 5 hidrogênios, sendo portanto um radical fenila. Temos sete sinais de hidrogênio na região dos olefínicos:  $\delta$  5,98 (dd 16,0; 2,6), 5,54 (dd 15,5; 9,8), 5,40 (dd 2,5; 2,5), 5,27 (ddd 15,6; 10,5; 4,8), 5,24 (dd 15,8; 2,4), 5,17 (d 1,0) e 4,98 ppm (dd 1,0; 1,0). Na região dos hidrogênios alifáticos, temos sinais de CH em  $\delta$  3,75 (dd 10,2; 1,0), 3,28 (ddd 8,3; 5,4; 2,8), 2,88 (dd 13,4; 5,6), 2,85 (dd 10,2; 9,7), 2,82 (m), 2,70 (dd 13,0; 8,2), 2,62 (dd 6,8; 5,4), 2,37 (ddd 15,6; 10,5; 4,8), 2,16 (dd 5,4; 2,5), 2,00 (m), e sinais de metilas em  $\delta$  2,29 (s), 1,48 (s), 1,14 (d 2,9), 0,55 (d 6,8). Também temos três sinais de hidrogênios em  $\delta$  4,62; 1,60; 1,02, singletos, que o espectro HSQC mostrou não estarem ligados a átomos de carbono (figura 4.32). Alguns dos multipletos citados estão na figura 4.33.

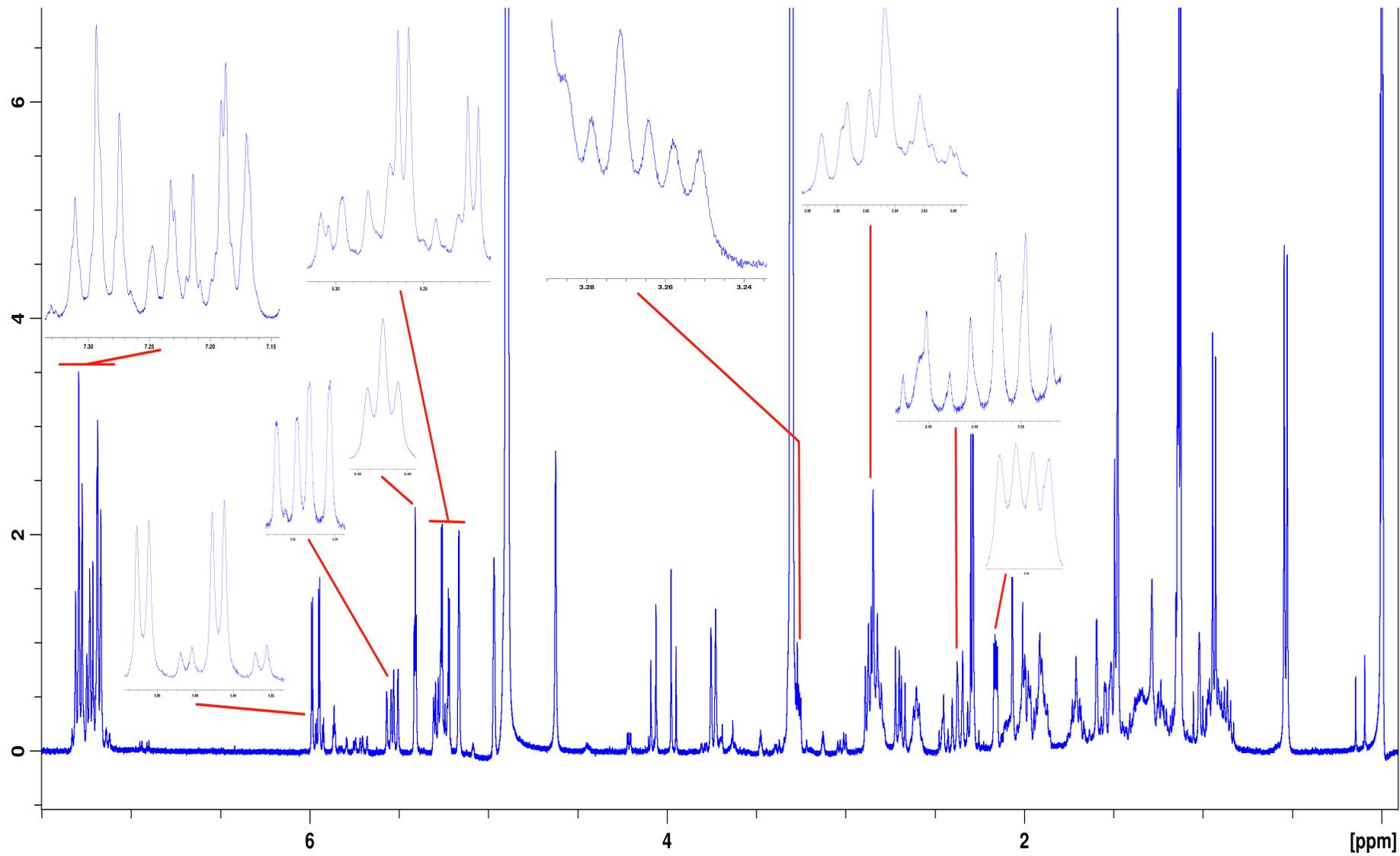


Figura 4.32: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto *F1013* em metanol deuterado, 400 MHz.

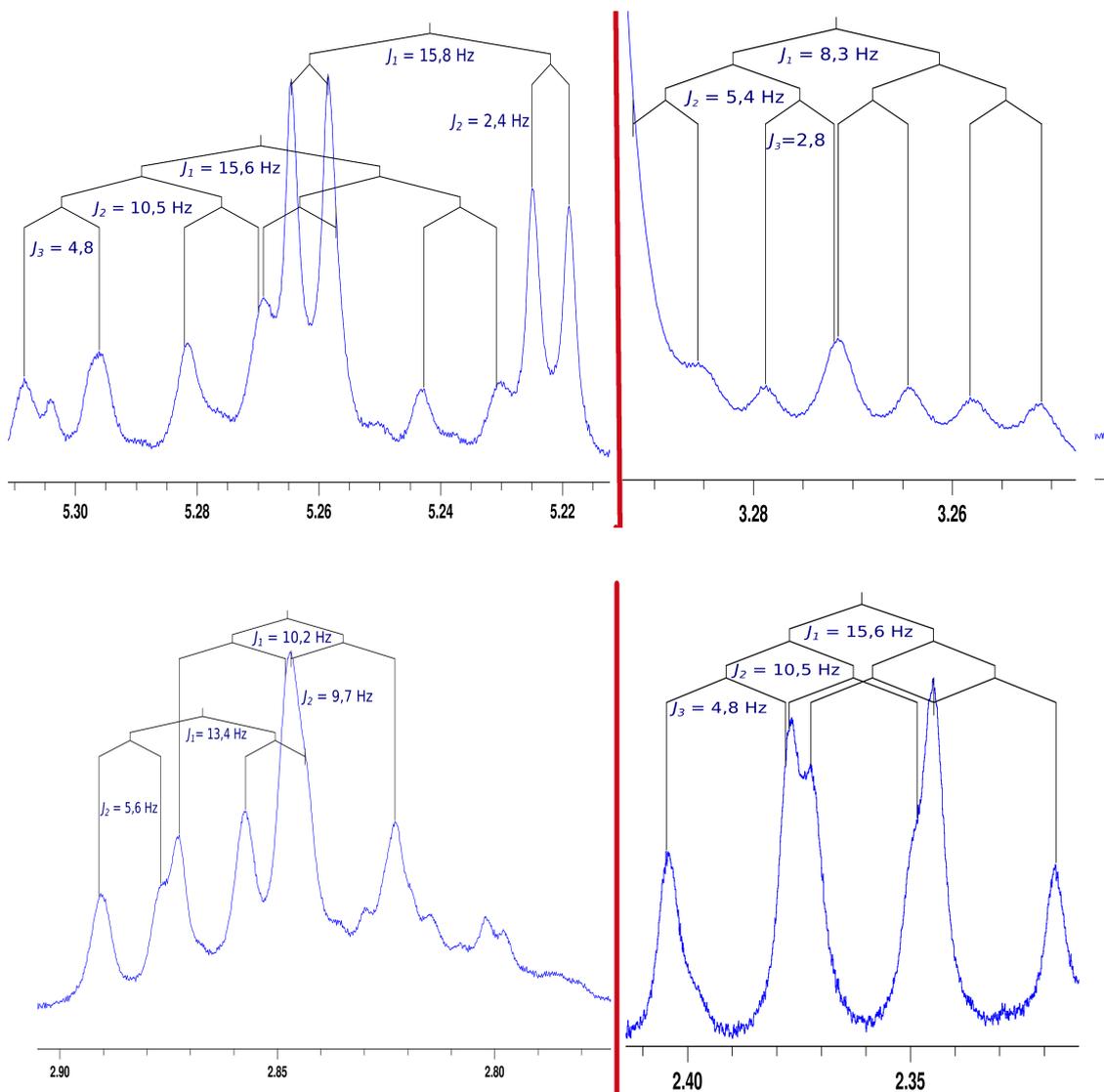


Figura 4.33: Alguns multipletos do  $^1\text{H}$  RMN de *F1013*

Para esta substância, o RMN de  $^{13}\text{C}$  não foi feito, e os deslocamentos foram obtidos a partir dos dados de HSQC. Neste espectro verificou-se também que os hidrogênios em  $\delta_H$  2,88 e  $\delta_H$  2,70 estão ligados ao mesmo carbono em  $\delta_C$  44,95, assim como os hidrogênios em  $\delta_H$  5,17 e  $\delta_H$  4,98 estão ligados ao carbono em  $\delta_C$  113,5, e os hidrogênios em  $\delta_H$  2,37 e  $\delta_H$  2,00 estão no carbono  $\delta_C$  39,3.

Com dados de COSY (figura A.7) e HMBC (figura A.8), vemos que o hidrogênio em  $\delta_H$  2,88 acopla com o hidrogênio em  $\delta_H$  3,28 (carbono em  $\delta_C$  54,8) com  $J = 5,6$  Hz, e se correlaciona com os carbonos em  $\delta_C$  49,5 e  $\delta_C$  138,4 (aromático). Ligado ao carbono em  $\delta_C$  49,5 temos o hidrogênio em  $\delta_H$  2,16, o qual se acopla com o hidrogênio em  $\delta_H$  2,62 (carbono em  $\delta_C$  33,4) com  $J = 5,4$  Hz, e se correlaciona com o carbonos em  $\delta_C$  151,0,  $\delta_C$  55,3 e  $\delta_C$  176,7 (uma carbonila). O hidrogênio em  $\delta_H$  2,62 possui também uma acoplamento com o hidrogênio em  $\delta_H$  0,55 (metila) com  $J = 6,8$  Hz; esta metila possui uma correlação com o carbono em  $\delta_C$  151,0. O

hidrogênio em  $\delta_H$  3,75 (carbono em  $\delta_C$  72,3) também se correlaciona com o carbono em  $\delta_C$  151,0, além de se correlacionar com os carbonos em  $\delta_C$  113,5 e  $\delta_C$  131,7, e este hidrogênio acopla com os hidrogênios em  $\delta_H$  2,85 com  $J = 10,2$  Hz e com  $\delta_H$  4,98, com  $J = 1,0$  Hz. O hidrogênio em  $\delta_H$  2,85 acopla também com o hidrogênio em  $\delta_H$  5,54 ( $J = 9,8$  Hz) e possui correlações com os carbonos em  $\delta_C$  176,7,  $\delta_C$  134,5,  $\delta_C$  72,3 e  $\delta_C$  55,3. Os deslocamentos sugerem uma ligação dupla entre  $\delta_C$  151,0 e  $\delta_C$  113,5, e a existência de uma hidroxila ligada ao carbono em  $\delta_C$  72,3. Com isso elucidamos uma grande parte da estrutura de *F1013* (ver figura 4.34).

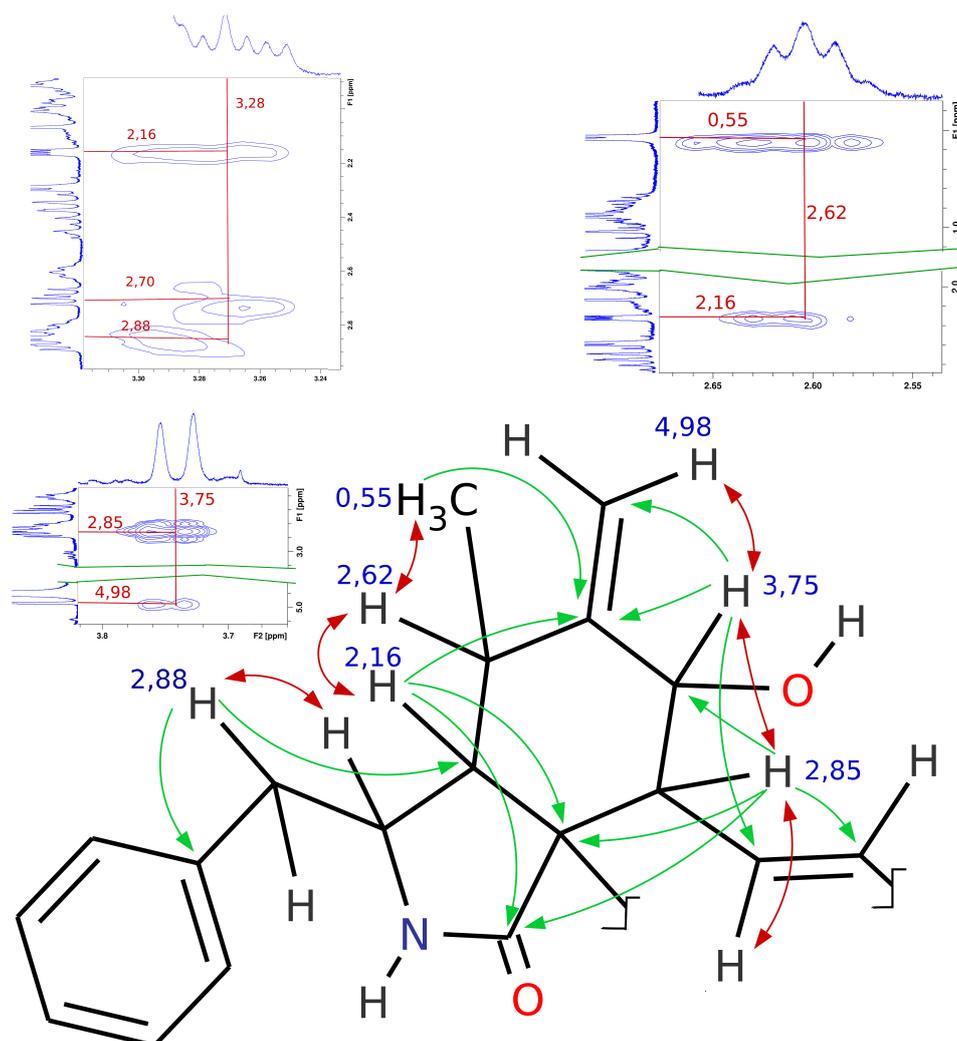


Figura 4.34: Algumas correlações presentes no espectro COSY e HMBC de *F1013*

Vemos que esta estrutura parcial é semelhante à da 19,20 epoxicitocalasina Q. Ao elucidarmos o restante da estrutura, verificou-se uma grande semelhança entre elas, sendo que a única diferença observada, nesta parte complementar da estrutura, é a ausência do anel epóxido entre os carbonos  $C_{19}$  e  $C_{20}$ , substituído por uma ligação dupla entre eles. Com isso, o deslocamento químico destes hidrogênios, que na 19,20 epoxicitocalasina Q era de  $\delta_{H_{C_{19}}}$  3,17 e  $\delta_{H_{C_{20}}}$  3,53, passou agora a ser  $\delta_{H_{C_{19}}}$  5,24

e  $\delta_{HC_{20}}$  5,98 (ver tabela 4.9 para a 19,20 epoxicitocalasina Q). Com isto podemos identificar o composto *F1013* como a *Citocalasina D* (figura 4.35, dados tabela 4.12). Como referência, foi utilizado o trabalho de CAFÊU *et al.* (2005).

As citocalasinas são compostos comumente encontrados em Xylareaceae dos gêneros *Kretzschmaria*, *Rosellinia* e *Xylaria* (WHALLEY e EDWARDS, 1997), mas a citocalasina D foi encontrada em fungos das espécies *Metarrhizium anisopliae*, *Zygosporium masonii*, *Coriolus vernicipes*, *Hypoxyylon terricola*, e *Engleromyces goetzii* (COLE e SCHWEIKERT, 2003) e, segundo estes autores, a citocalasina D é dez vezes mais potente que a citocalasina B em células de mamíferos, causando clivagem citoplasmática e inibição de movimentos; em doses mais elevadas causa extrusão nuclear, o que pode levar à enucleação total. Existem relatos de que a citocalasina D possui efeito antifúngico e altera o crescimento das hifas (BETINA *et al.*, 1972), e de efeito antitumoral (KATAGIRI e MATSUURA, 1971). Mas um importante uso das citocalasinas em geral é em testes com cultura de células, pois elas afetam o crescimento do citoesqueleto em células eucarióticas (PETERSON e MITCHISON, 2002).

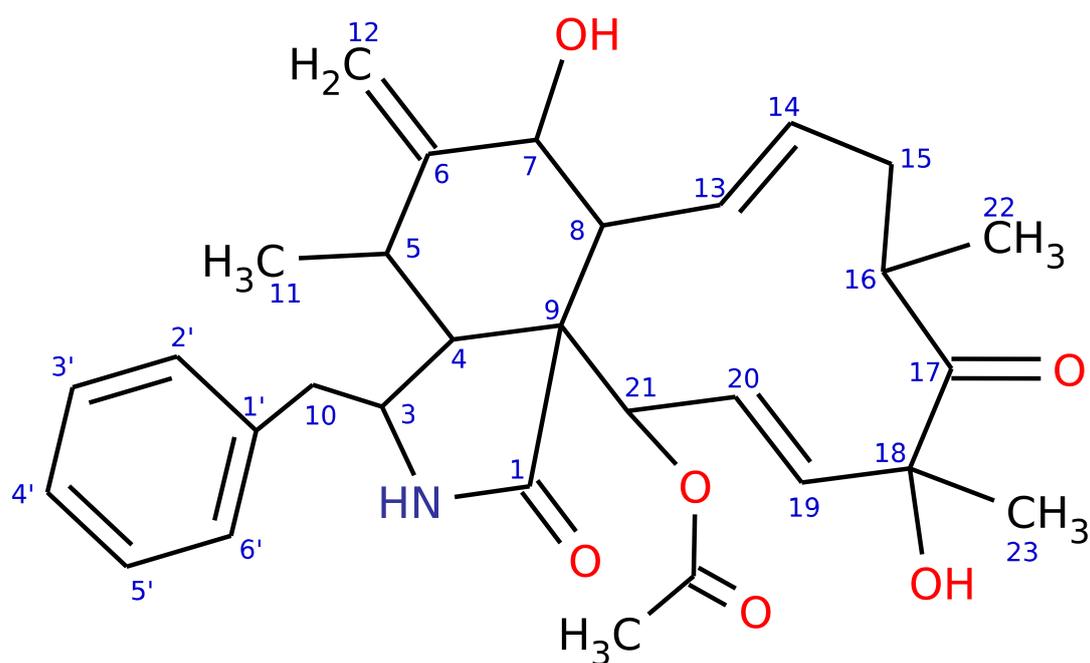


Figura 4.35: Estrutura da Citocalasina D

Tabela 4.12: Dados de RMN de *F1013*

	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	HMBC (*)	COSY
<b>1</b>		176,7 C=O		
<b>3</b>	3,28 <i>ddd</i> (8,3; 5,4; 2,8)	54,8 CH	5	4, 10a, 10b
<b>4</b>	2,16 <i>dd</i> (5,4; 2,5)	49,5 CH	21, 6, 9, 1f	5, 3
<b>5</b>	2,62 <i>dd</i> (6,8; 5,4)	33,4 CH	4f, 6f	11, 4
<b>6</b>		151,0		
<b>7</b>	3,75 <i>dd</i> (10,2; 1,0)	72,3 CH	12, 13, 6	8, 12b
<b>8</b>	2,85 <i>dd</i> (10,2; 9,7)	47,7 CH	1, 14, 7, 9	7, 13
<b>9</b>		55,3		
<b>10 – Ha</b>	2,88 <i>dd</i> (13,4; 5,6)	44,95 CHa	3, 4, 1'	3, 10b
<b>10 – Hb</b>	2,70 <i>dd</i> (13,0; 8,2)	44,95 CHb	3, 4	3, 10a
<b>11</b>	0,55 <i>d</i> (6,8)	13,3 CH <sub>3</sub>	4, 6	5
<b>12 – Ha</b>	5,17 <i>d</i> (1,0)	113,5 CHa	5, 7, 12f, 6f	7, 12b
<b>12 – Hb</b>	4,98 <i>dd</i> (1,0; 1,0)	113,5 CHb	5, 7, 12f, 6f	7, 12a
<b>13</b>	5,54 <i>dd</i> (15,5; 9,8)	131,7 CH	15, 8	8, 14
<b>14</b>	5,27 <i>ddd</i> (15,6; 10,5; 4,8)	134,5 CH	8f	13, 15a, 15b
<b>15 – Ha</b>	2,37 <i>ddd</i> (15,6; 10,5; 4,8)	39,3 CHa	16, 13, 14, 17	14, 15b, 16
<b>15 – Hb</b>	2,00 <i>m</i>	39,3 CHb	22, 16, 14, 17	15a, 14
<b>16</b>	2,82 <i>m</i>	43,5 CH	22	15a, 22
<b>17</b>		211,8 C=O		
<b>18</b>		79,3		
<b>19</b>	5,24 <i>dd</i> (15,8; 2,4)	128,8 CH	18	20, 21
<b>20</b>	5,98 <i>dd</i> (16,0; 2,6)	133,3 CH	18	19, 21
<b>21</b>	5,40 <i>dd</i> (2,5; 2,5)	78,2 CH	8, 9, 19, 20, 24	20, 19
<b>22</b>	1,14 <i>d</i> (2,9)	19,8 CH <sub>3</sub>	17, 16, 15	16
<b>23</b>	1,48 <i>s</i>	24,6 CH <sub>3</sub>	18, 19, 1	
<b>CH<sub>3</sub>CO</b>		171,8 C=O		
<b>CH<sub>3</sub>CO</b>	2,29 <i>s</i>	20,6 CH <sub>3</sub>	24	
<b>NH</b>	4,62 <i>s</i>	NH		
<b>1'</b>		138,4		
<b>2' 6'</b>	7,29 <i>m</i> 7,2	129,5 2CH	1'	3' 5'
<b>4'</b>	7,23 <i>m</i> 7,2/6,9	127,8 CH	3' 5'	2' 6' 3' 5'
<b>3' 5'</b>	7,18 <i>m</i> 7,1	131,0 2CH	10, 4'	2' 6'

(\*) f = fraco      Deslocamentos em ppm, acoplamentos em Hertz

## 4.5 Identificação de substâncias por espectrometria de massas

Como alguns dos fungos cultivados em pequena e/ou larga escala eram do gênero *Xylaria* (fungos 317, 324, 325 e 331) e estes fungos são conhecidos produtores de citocalasinas, fez-se uma busca nos extratos destes fungos para verificar se outros fungos produziam a 19,20 epoxicitocalasina Q, a citocalasina D e a 7-decloro griseofulvina.

Para a detecção da 19,20 epoxicitocalasina Q, utilizou-se o espectrômetro triplo-quadrupolo com fonte APCI e energia de colisão de 27 eV, e injetou-se amostras dos extratos brutos do caldo fermentado destes fungos, diluídos em metanol, selecionou-se o íon com  $m/z = 524 [M+H]^+$  que caracteriza a 19,20 epoxicitocalasina Q e fragmentou-se este íon, obtendo-se os espectros mostrados na figura 4.36. Uma amostra de 19,20 epoxicitocalasina Q foi utilizado como padrão (espectro 331 na figura). Os espectros obtidos dos extratos dos fungos 317, 324 e 325 possuem o mesmo padrão de fragmentação, e portanto também possuem a 19,20 epoxicitocalasina Q, revelando portanto que os mesmos produzem esta toxina.

Na Detecção da Citocalasina D o processo foi similar, selecionando-se o íon com  $m/z = 508 [M+H]^+$  que caracteriza a citocalasina D e utilizou-se uma amostra desta citocalasina como padrão (espectro 325). Mas desta vez os espectros de fragmentação do íon provenientes dos fungos 317, 324 e 331 se mostraram diferentes do padrão, e portanto somente o fungo 325 produz a citocalasina D (figura 4.37).

Na Detecção da 7-decloro griseofulvina, foi utilizado o espectrômetro tipo *ion-trap* com fonte APCI e energia de colisão de 18 eV. Selecionou-se o íon com  $m/z = 319 [M+H]^+$  e utilizou-se uma amostra da 7-decloro griseofulvina como padrão (espectro 325). Mas novamente os espectros de fragmentação do íon provenientes dos fungos 317, 324 e 331 se mostraram diferentes do padrão, e portanto somente o fungo 325 produz a 7-decloro griseofulvina (figura 4.38).

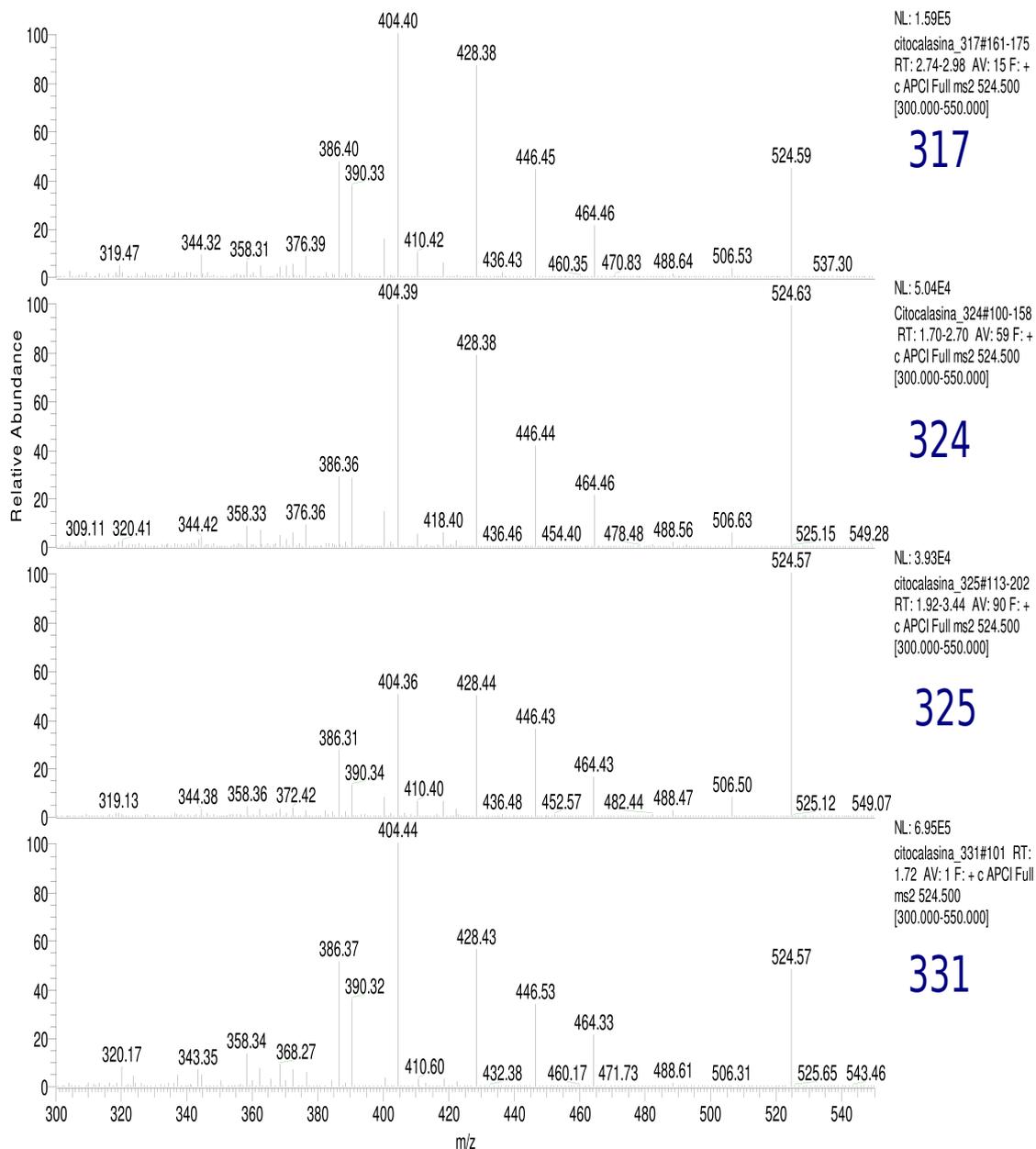


Figura 4.36: Espectros de massas obtidos no espectrômetro triplo-quadrupolo com a fragmentação do íon  $m/z = 524$  encontrado nos extratos do caldo fermentado dos fungos 317, 324, 325 e 331. Energia de colisão: 27 eV, fonte APCI

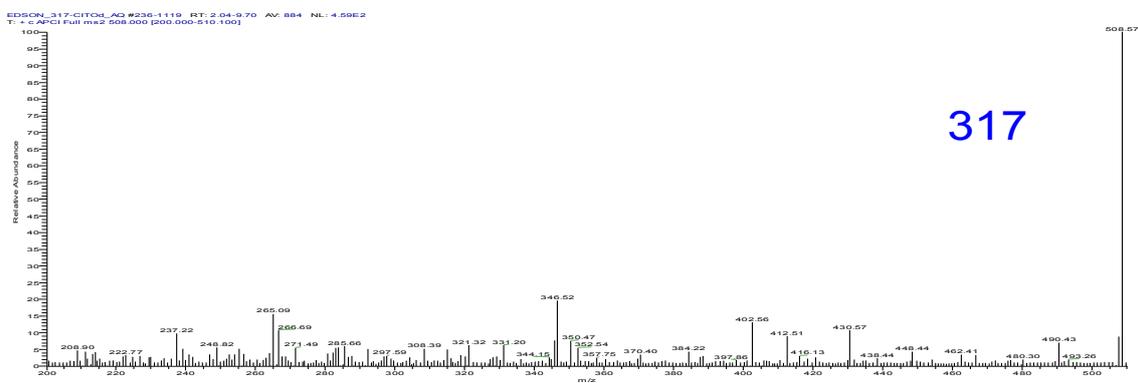
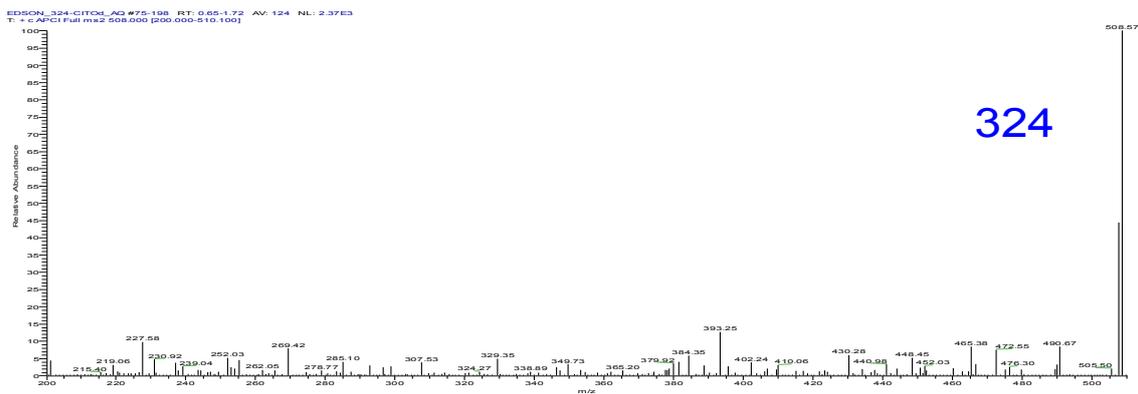
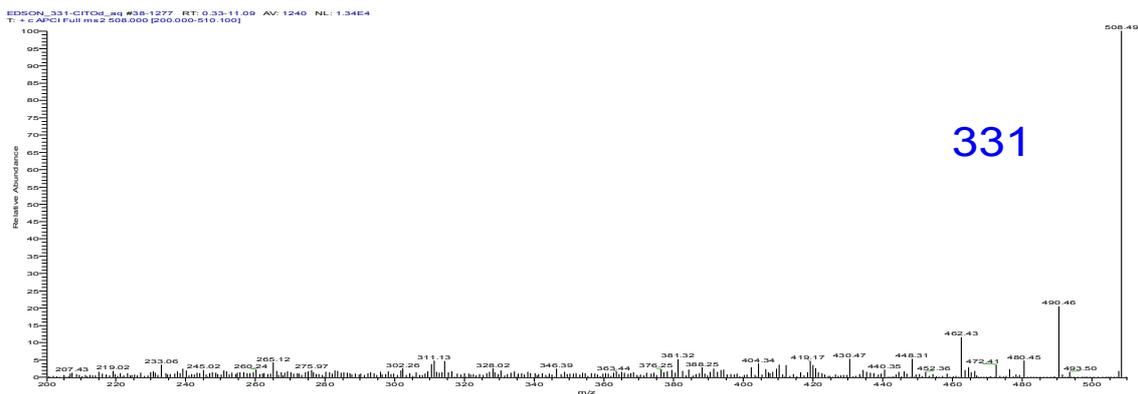
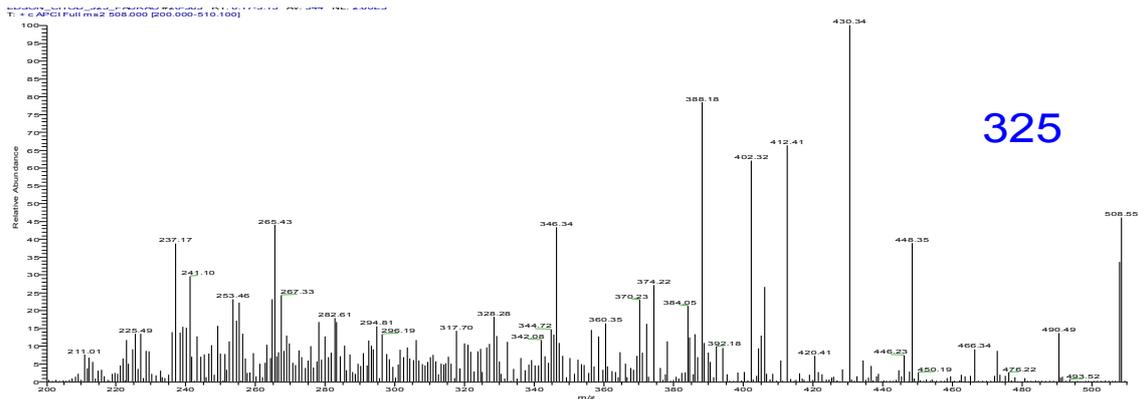


Figura 4.37: Espectros de massas obtidos no espectrômetro triplo-quadrupolo com a fragmentação do íon  $m/z = 508$  encontrado nos extratos do caldo fermentado dos fungos 325, 331, 324 e 317. Energia de colisão: 27 eV, fonte APCI

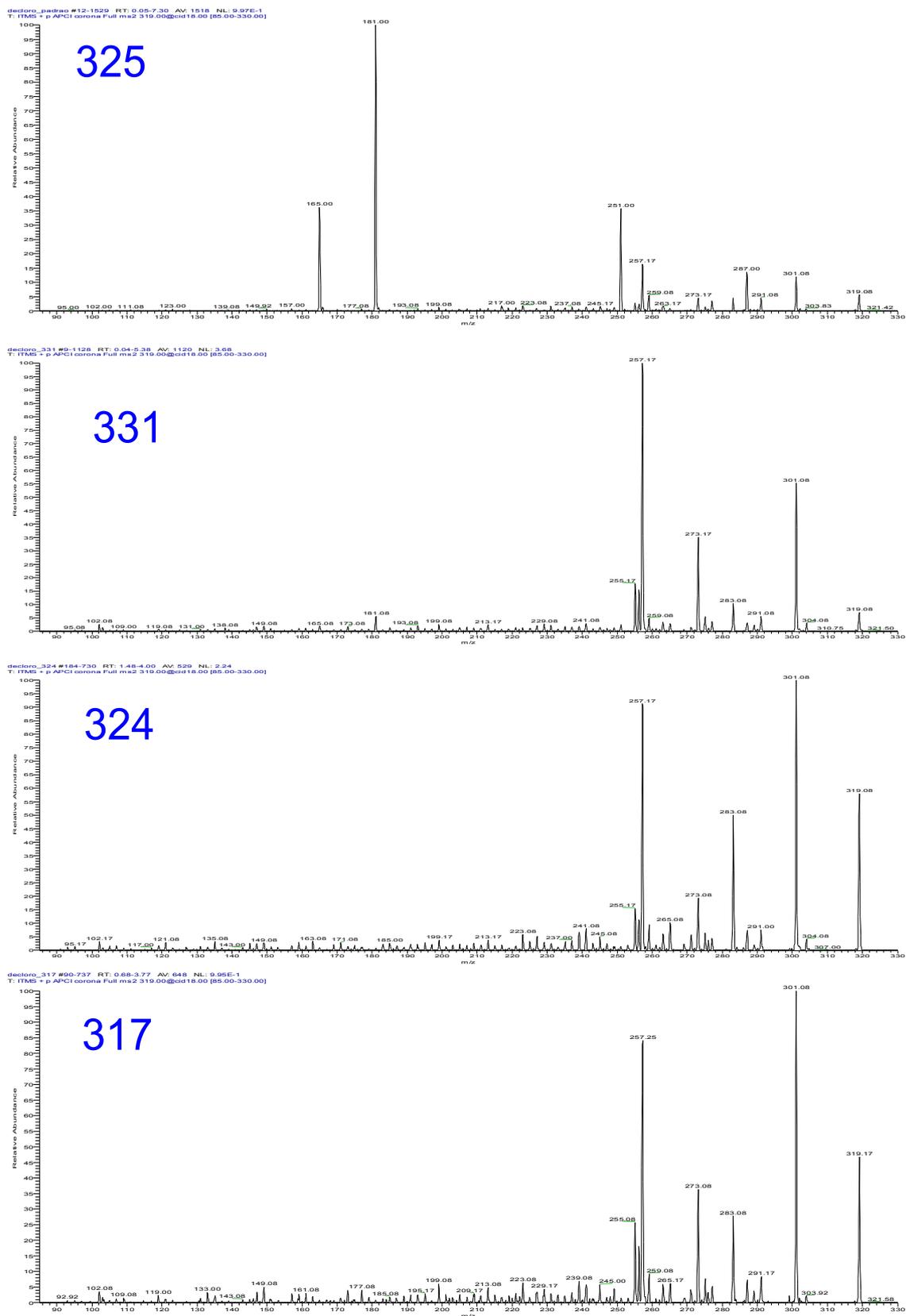


Figura 4.38: Espectros de massas obtidos no espectrômetro *ion-trap* com a fragmentação do íon  $m/z = 319$  encontrado nos extratos do caldo fermentado dos fungos 325, 331, 324 e 317. Energia de colisão: 18 eV, fonte APCI

## 4.6 Ensaios biológicos com substâncias puras

Das substâncias isoladas, somente o austdiol e a 19,20-epoxicitocalasina Q foram submetidas a testes para verificar a existência de atividade biológica, por terem sido isoladas em maior quantidade, possibilitando assim a realização dos testes.

### 4.6.1 Ensaios antimicrobianos

Como os testes antimicrobianos com o austdiol ( que foram feitos como descrito na seção 3.9.4) não mostraram qualquer atividade contra os microrganismos testados (três bactérias: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, e um fungo *Penicillium avellani*), podemos concluir existir outra ou outras substâncias presentes nos extratos do fungo 232 *Fusarium solani* responsáveis pela atividade biológica observada nos mesmos (ver tabela 4.7).

### 4.6.2 Atividades anti-AChE e antioxidante

Os testes anti-AChE e antioxidante foram feitos de acordo com o descrito na seção 3.9.3, as substâncias foram dissolvidas na concentração de 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , e os resultados mostraram que as duas substâncias possuem atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, mas não mostraram qualquer atividade antioxidante (tabela 4.13). Como os testes com extratos brutos (ver tabela 4.5) mostraram que os extratos do fungo 232 *Fusarium solani* possuíam atividade antioxidante. Pode-se concluir também que devem existir outras substâncias nos extratos brutos responsáveis por essa atividade.

Tabela 4.13: Atividades Anti-AChE e antioxidante

Subst.	Anti-AChE (1)			Antioxidante (2)
	Ellman (a)	F-P (b)	Marston	
Padrão	++	-	++	++
A	+	-	+	-
C	++	+	++	-

A: austdiol      C: 19,20-epoxicitocalasina Q

Padrões: (1) Galantamina; (2) Rutina e Quercetina

(a) (+) Atividade inibitória; (++) maior atividade inibitória; (-) sem inibição

(b) (+) falso-inibidor; (-) inibidor

### 4.6.3 Atividades antitumoral

Tanto o austdiol quanto a 19,20 epoxicitocalasina Q foram testadas para verificar possíveis atividades antitumorais. As substâncias foram testadas na concentração

de  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para as linhagens tumorais SF-295, OVCAR-8, HL-60 HCT-8, MDA-MB435 e HCT-116, e não mostraram atividade citotóxica nesta concentração. Mas testes com extratos brutos e frações (ver tabelas 4.3 e 4.6) mostraram que existem substâncias com atividade antitumoral nos extratos dos fungos 232 *Fusarium solani* e 331 *Xylaria* sp.

## Seção 5

# Conclusão

Da pesquisa realizada com as Piperaceae *Piper peltatum* e *Peperomia pellucida* com o objetivo de conhecer a biodiversidade de fungos endofíticos e buscar potenciais fontes de substâncias bioativas, podemos concluir:

- As plantas apresentaram uma população numerosa e diversificada de fungos endofíticos, como tem ocorrido com diversas outras plantas estudadas mundo afora.
- Análises macro e micro-morfológicas e do rDNA revelaram grande diversidade dentro dos grupos de fungos endofíticos encontrados.
- A maior taxa de colonização por fungos endofíticos foi encontrada em *Peperomia pellucida* em comparação com *Piper peltatum* (104,2% e 73,3% respectivamente).
- Alguns grupos apresentaram especificidade a determinados tecidos, enquanto outros possuem distribuição sistêmica (*Colletotrichum* sp. e *Xylaria* sp., respectivamente, ambos em *Peperomia pellucida*).
- Ensaios biológicos com extratos de fungos mostraram a presença de substâncias com atividade citotóxica, antimicrobiana, anticândida, antifúngica, antioxidante e antiacetilcolinesterase.
- Foram isoladas e identificadas cinco substâncias de estruturas relativamente complexas nos extratos fúngicos: austdiol, 19,20-epoxicitocalasina Q, citocalasina D, 5-metoxicarbonil meleína, 7-declorogriseofulvina. Estas substâncias podem estar relacionadas com algumas das atividades biológicas observadas.
- Foi observado, através de testes de espectroscopia de massas, a presença de citocalasinas em todos os fungos *Xylaria* sp. cultivados.

- Pela primeira vez foi obtida a toxina austdiol de um fungo pertencente à classe *Hypocreales*.

- Os fungos endofíticos se mostraram uma boa fonte de substâncias com atividade biológica e devem ser mais estudados.

# Referências

- AGRIOS, G. N., 2005, *Plant Pathology*. Elsevier. p.496. 56
- ANDERSON, J. R., EDWARDS, R. L., WHALLEY, A. J. S., 1983, “Metabolites of The Higher Fungi. Part 21. 3-Methyl-3,4-dihydroisocoumarins and Related Compounds from the Ascomycete Family Xylariaceae”, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, pp. 2185–2192. 80
- ANDRADE-NETO, V. F. A., POHLIT, A. M., PINTO, A. C. S., et al., 2007, “*In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants”, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 3. 25
- ANISZEWSKI, T., 2007, *Alkaloids – Secrets of Life*. Elsevier. 18
- ARRIGONI-BLANK, M. F., DMITRIEVA, E. G., FRANZOTTI, E. M., et al., 2004, “Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (*Piperaceae*)”, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 91, pp. 215–218. 25
- ATTENBOROUGH, D., 2008, *Cordyceps: attack of the killer fungi - Planet Earth - BBC wildlife*. [http://www.youtube.com/watch?feature=player\\_detailpage&v=XuKjBIBBAL8](http://www.youtube.com/watch?feature=player_detailpage&v=XuKjBIBBAL8), acessado em 20-Outubro-20012. xii, 9
- AZEVEDO, J. L., 1998, “Microorganismos endofíticos”. In: Melo, I. S., Azevedo, J. L. (Eds.), *Ecologia Microbiana*, EMBRAPA, Jaguariúna – SP. 53
- AZEVEDO, J. L., COSTA, S. O. P., 1973, *Exercícios Práticos de Genética*. São paulo, SP. 31
- AZIBA, P. I., ADEDEJI, A., EKOR, M., et al., 2001, “Analgesic activity of *Peperomia pellucida* aerial parts in mice”, *Fitoterapia*, v. 2, pp. 57–58. 25
- BARRON, G. L., 2004, “Fungal Parasites and Predators of Rotifers, Nematodes, and other Invertebrates”. In: Mueller, G. M., Bills, G. F., Foster, M. S. (Eds.), *Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods*, Elsevier, pp. 435–450. 10

- BENJAMIN, R. K., BLACKWELL, M., CHAPELA, I. H., et al., 2004, “Insect and Other Arthropod-Associated Fungi”. In: Mueller, G. M., Bills, G. F., Foster, M. S. (Eds.), *Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods*, Elsevier, pp. 395–433. 8
- BETINA, V., MICEKOVA, D., NEMEC, P., 1972, “Antimicrobial Properties of Cytochalasins and Their Alteration of Fungal Morphology”, *Journal of General Microbiology*, v. 71, pp. 343–349. 90
- BLACKWELL, M., SPATAFORA, J. W., 2004, “Fungi and Their Allies”. In: Mueller, G. M., Bills, G. F., Foster, M. S. (Eds.), *Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods*, Elsevier, pp. 7–21. xii, 4, 5
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C., 1995, “Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity”, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, v. 28, n. 1, pp. 25–30. 51
- BRUNDRETT, M., 2004, “Diversity and Classification of Mycorrhizal Associations”, *Biol. Rev.*, , n. 79, pp. 473–495. 11
- CAFÊU, M. C., SILVA, G. H., TELES, H. L., et al., 2005, “Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae)”, *Química Nova*, v. 28, n. 6, pp. 991–995. 84, 85, 90
- CALLAN, B. E., CARRIS, L. M., 2004, “Fungi on Living Plant Substrata, Including Fruits”. In: Mueller, G. M., Bills, G. F., Foster, M. S. (Eds.), *Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods*, Elsevier, cap. 7, p. 115. 53
- CASS, Q. B., DEGANI, A. L. G., 2001, *Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação*. EdUFSCar. 45
- CASTELLANI, A., 1939, “Viability of mold culture of fungi in distilled water”, *J. Trop. Med. Hyg.*, v. 42, pp. 225. 32
- CLARK, C. fonte: wikimedia commons. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Coprinus\\_basidia.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Coprinus_basidia.jpg), acessado em 10-Dezembro-20012. xii, 4
- COLE, R. J., SCHWEIKERT, M. A., 2003, *Handbook of Secondary Fungal Metabolites*, v. I, II, III. Academic Press. 90
- CROTEAU, R., KUTCHAN, T. M., LEWIS, N. G., 2000, “Natural Products – Secondary Metabolites”. In: Buchanan, B., Gruissen, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, pp. 1250–1318. 18

- DAVIS, E. C., FRANKLIN, J. B., SHAW, A. J., et al., 2003, “Endophytic *Xylaria* (*Xylariaceae*) Among Liverworts and Angiosperms: Phylogenetics, Distribution, and Symbiosis”, *American Journal of Botany*, v. 90, n. 11, pp. 1661–1667. [56](#)
- DE SOUZA, A. Q. L., 2006, *Potencial genético e químico dos endófitos de *Murraya paniculata* L.(Jack)*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos. [28](#), [51](#)
- DEACON, J. W., 2006, *Fungal Biology*. 4 ed. Oxford, UK, Blackwell Publishing. [xii](#), [14](#), [55](#)
- DESMARCHELIER, C., SLOWING, K., CICCIA, G., 2000, “Anti-inflammatory activity of *Pothomorphe peltata* leaf methanol extract”, *Fitoterapia*, v. 471, pp. 556–558. [24](#)
- DEWICK, P. M., 2009, *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 3 ed. Chichester, UK, John Wiley & Sons. [13](#), [85](#)
- DURÁN, N., TEIXEIRA, M. F. S., ESPOSITO, E., 2004, “Pigmentos Fúngicos e seu Potencial Biotecnológico”. In: Esposito, E., de Azevedo, J. L. (Eds.), *Fungos: Uma Introdução à biologia, bioquímica e Biotecnologia*, EDUCS, pp. 239–307, caxias do Sul, Brazil. [22](#)
- EBERSBERGER, I., DE MATOS SIMOES, R., KUPCZOK, A., et al., 2012, “A Consistent Phylogenetic Backbone for the Fungi”, *Mol. Biol. Evol.*, v. 29, n. 5, pp. 1319–1334. [xii](#), [4](#), [6](#)
- EHRINGHAUS, C., 1997, *Medicinal uses of *Piper* spp. (*Piperaceae*) by an indigenous Kaxinawá community in Acre, Brazil - Ethnobotany, ecology, phytochemistry and biological activity*. Tese de Mestrado, Florida International University. [24](#)
- ELLMAN, G. L., 1961, “A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity”, *Biochem. Pharmacol.*, v. 7, pp. 88–88. [50](#)
- ESPADA, A., RIVERA-SAGREDO, A., DE LA FUENTE, J., et al., 1997, “New Cytochalasins from the Fungus *Xylaria hypoxylon*”, *Tetrahedron*, v. 53, n. 18, pp. 6485–6492. [74](#)
- FINKING, R., MARAHIEL, M., 2004, “Biosynthesis of Nonribosomal Peptides”, *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 58, pp. 453–488. [19](#)
- FORZZA, R. C. (Ed.), 2010, *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*, v. 1. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [2](#)

- GALVAGNO, M. A., FORCHIASSIN, F., 2004, “Fisiologia dos Fungos: Nutrição e Metabolismo”. In: Esposito, E., de Azevedo, J. L. (Eds.), *Fungos: Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia*, EDUCS, pp. 125–169, Caxias do Sul. 22
- GAMS, W., DIEDERICH, P., OLDMAN, K. P., 2004, “Fungicolous Fungi”. In: Mueller, G. M., Bills, G. F., Foster, M. S. (Eds.), *Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods*, Elsevier, pp. 343–392. 10
- GARBELOTTO, M., FLORANCE, E. R., 2004, *This image or file is a work of a United States Department of Agriculture employee, taken or made during the course of an employee’s official duties. As a work of the U.S. federal government, the image is in the public domain.* USDA Forest Service Pacific Southwest Research Station in Albany, California, Fonte: wikimedia commons. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Zoospores\\_-\\_Reproductive\\_Structure\\_of\\_the\\_Phytophthora.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Zoospores_-_Reproductive_Structure_of_the_Phytophthora.png), acessado em 10-Dezembro-20012. xii, 3
- GARCIA-VALLVÉ, S., ROMEU, A., PALAU, J., 2000, “Horizontal Gene Transfer of Glycosyl Hydrolases of the Rumen Fungi”, *Mol. Biol. Evol.*, v. 17, n. 3, pp. 352–361. 8
- GHERBAWY, Y., KESSELBOTH, C., ELHARIRY, H., et al., 2010, “Molecular Barcoding of Microscopic Fungi with Emphasis on the Mucoralean Genera *Mucor* and *Rhizopus*”. In: Gherbawy, Y., Voigt, K. (Eds.), *Molecular Identification of Fungi*, Springer, cap. 11. p.225. xii, 3
- GIACOBINI, E., 2000, “Cholinesterase inhibitors: from the Calabar bean to Alzheimer therapy”. In: Giacobini, E. (Ed.), *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors*, Martin Dunitz, pp. 181–226, London. 50
- GUNATILAKA, A. A. L., 2006, “Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence”, *J. Nat. prod.*, , n. 69, pp. 509–526. 16
- HANSON, J. R., 2008, *The Chemistry of Fungi*. Cambridge, UK. 15, 19
- HAWKSWORTH, D. L., 2001, “The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited”, *mycol. Res.*, v. 105, n. 12, pp. 1422–1432. 2
- HIBBETT, D. S., BINDER, M., BISCHOFF, J. F., et al., 2007, “A higher-level phylogenetic classification of the Fungi”, *Mycological Research*, v. 111, n. 5, pp. 509–547. xii, 4, 5

- ISARA, M., KITTAKOOP, P., HYWEL-JONES, N. L., et al., 2005, “Bioactive Substances from Insect Pathogenic Fungi”, *Chemical Research*, v. 38, n. 10, pp. 813–823. [9](#)
- KATAGIRI, K., MATSUURA, S., 1971, “Antitumor activity of cytochalasin D”, *J. Antibiotics (Tokyo)*, v. 24, n. 10, pp. 722–723. [90](#)
- KAVANAGH, K., 2005, *Fungi: biology and Applications*. Chichester, England, John Wiley & Sons Ltd. [23](#)
- KELLER, N. P., TURNER, G., BENNET, J., 2005, “Fungal secondary metabolism - From Biochemistry To Genomics”, *Nature Reviews - Microbiology*, v. 3, pp. 937–947. [xii](#), [13](#), [16](#), [17](#), [20](#), [22](#)
- KHAN, M. R., OMOLOSO, A. D., 2002, “Antibacterial activity of *Hygrophila stricta* and *Peperomia pellucida*”, *Fitoterapia*, v. 73, pp. 251–254. [25](#)
- KLEEMANN, J., RINCON-RIVERA, L. J., TAKAHARA, H., et al., 2012, “Sequential Delivery of Host-Induced Virulence Effectors by Appressoria and Intracellular Hyphae of the Phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*”, *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 4, pp. e1002643. [xiv](#), [56](#)
- LAMEIRA, O. A., PAIVA, J. S., DE OLIVEIRA, E. C. P., et al., 2004, “Fenologia e Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais de Ocorrência na Amazônia”, *Horticultura Brasileira*, v. 22, n. 2, pp. suplemento CD-ROM. [25](#)
- LIOUSSANNE, L., 2010, “Review. The role of the arbuscular mycorrhiza-associated rhizobacteria in the biocontrol of soilborne phytopathogens”, *Spanish Journal of Agricultural Research*. [7](#)
- LOGERCIO-LEITE, C., 2004, “Taxonomia dos Fungos”. In: Esposito, E., de Azevedo, J. L. (Eds.), *Fungos: Uma Introdução à biologia, bioquímica e Biotecnologia*, EDUCS, cap. 2, pp. 47–88, Caxias do Sul. [2](#), [5](#)
- MACCHERONI JR., W., ARAÚJO, W. L., LIMA, A. O., 2004, “Ecologia: Habitat e Interações Fúngicas com Plantas, Animais, Fungos e Bactérias”. In: Esposito, E., de Azevedo, J. L. (Eds.), *Fungos: Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia*, EDUCS, pp. 451–490, Caxias do Sul. [2](#), [8](#), [10](#), [11](#)
- MARSTON, A., KISSLING, J., HOSTETTMANN, K., 2002, “A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants”, *Phytochemical Analysis*, v. 13, pp. 51–54. [50](#)

- MERRITT COLLEGE, 2008, *Oakland, CA*. 40x objective, phase contrast, Zeiss Axio Imager. A1 microscope, Zeiss AxioCam MRc CCD image, fonte: wikimedia commons. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Morelasci.jpg>, acessado em 10-Dezembro-20012. [xii](#), [3](#)
- METZLER, D., 2005, *Biochemistry – The Chemical Reactions of Living Cells*, v. 1 & 2. Elsevier. [xii](#), [17](#), [20](#), [23](#)
- MING, L. C., GAUDÊNCIO, P., SANTOS, V. P., 1997, *Plantas medicinais: uso popular na reserva extrativista “Chico Mendes” - Acre*. Botucatu - SP, UNESP. [24](#)
- MOSMAN, T., 1983, “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays”, *J. Immunol. Methods*, v. 65, pp. 55–63. [49](#)
- MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., et al., 2003, *Harper’s Illustrated Biochemistry*. McGraw-Hill. [20](#)
- NELSON, D., COX, M., 2004, *Lehninger - Principles of Biochemistry*. Sarvier. [13](#)
- OHNISHI, M., SAIKA, T., HOSHINA, S., et al., 2011, “Ceftriaxone-Resistant *Neisseria gonorrhoeae*, Japan”, *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 1, pp. 148–149. [23](#)
- PARTIDA-MARTINEZ, L. P., MONAJEMBASHI, S., GREULICH, K., et al., 2007, “Endosymbiont-Dependent Host Reproduction Maintains Bacterial-Fungal Mutualism”, *Current Biology*, v. 17, pp. 773–777. [xii](#), [7](#)
- PEREIRA, L. A., SILVA, R. B. L., GUIMARÃES, E. F., et al., 2007, “Plantas medicinais de uma comunidade quilombola na Amazônia Oriental: Aspectos utilitários de espécies das famílias *Piperaceae* e *Solanaceae*”, *Rev. Bras. de Agroecologia*, v. 2, n. 2, pp. 1385–1388. [25](#)
- PETERSON, J. R., MITCHISON, T. J., 2002, “Small Molecules, Big Impact: A History of Chemical Inhibitors and the Cytoskeleton”, *Chemistry & Biology*, v. 9, n. 12, pp. 1275–1285. [90](#)
- PINTO, A. C. S., PESSOA, C., LOTUFO, L. V. C., et al., 2006, “*In vitro* cytotoxicity of *Pothomorphe peltata* (L.) Miquel (*Piperaceae*), isolated 4-nerolidylcatechol and its semi-synthetic diacetyl derivative.” *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 8, pp. 205–211. [24](#)
- RAFFAUF, R. F., 1996, *Plant Alkaloids: A Guide to Their Discovery and Distribution*. 10 Alice Street, Binghamton, NY, The Haworth Press. [24](#)

- RHEE, I. K., VAN RIJN, R. M., VERPOORTE, R., 2003, “Qualitative Determination of False-positive Effects in the Acetylcholinesterase Assay using Thin Layer Chromatography”, *Phytochemical Analysis*, v. 14, pp. 127–131. [51](#)
- RHEE, I. K., VAN DE MEENT, M., INGKANINAN, K., et al., 2001, “Screening for acetylcholinesterase inhibitors from *Amaryllidaceae* using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining”, *Journal of Chromatography A*, v. 915, pp. 217–223. [50](#)
- ROHLFS, M., CHURCHILL, A. C., 2011, “Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods”, *Fungal Genetics and Biology*, v. 48, pp. 23–34. [9](#)
- ROSSMAN, A. Y., PALM-HERNÁNDEZ, M. E., 2008, “Systematics of Plant Pathogenic Fungi: Why It Matters”, *Plant Disease*, v. 92, n. 10, pp. 1376–1386. [58](#)
- SAIKKONEN, K., FAETH, H., HELANDER, M., et al., 1998, “Fungal Endophytes: A Continuum of Interactions with Host Plants”, *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, , n. 29. [11](#), [12](#)
- SAMAIN, M.-S., VRIJDAGHS, A., HESSE, M., et al., 2010, “*Verhuelia* is a segregate lineage in Piperaceae: more evidence from flower, fruit and pollen morphology, anatomy and development”, *Annals of Botany*, v. 105, pp. 677–688. [24](#)
- SAMSON, R. A., HOUBRAKEN, J. A. M. P., KUIJPERS, A. F. A., et al., 2004, “New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*”, *Studies in Mycology*, v. 50, pp. 45–61. [65](#)
- SCHARDL, C. L., LEUCHTMANN, A., SPIERING, M. J., 2004, “Symbiosis of Grasses with Seedborne Fungal Endophytes”, *Annu. Rev. Plant Biol.*, , n. 55, pp. 305–40. [7](#)
- SCHULZ, B., BOYLE, C., 2005, “The Endophytic Continuum”, *Mycol. Res.*, v. 109, n. 6 (Junho), pp. 661–686. [12](#)
- SCHULZ, B., BOYLE, C., DRAEGER, S., et al., 2002, “Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites”, *Mycol. Res.*, v. 106, n. 9, pp. 996–1004. [11](#), [12](#)
- SENADEERA, S. P. D., WIYAKRUTTA, S., MAHIDOL, C., et al., 2012, “A novel tricyclic polyketide and its biosynthetic precursor azaphilone derivatives

- from the endophytic fungus *Dothideomycete* sp.” *Organic Biomolecular Chemistry*, v. 10, pp. 7220–7226. [65](#)
- SHANG, Z., LI, X.-M., LI, C.-S., et al., 2012, “Diverse Secondary Metabolites Produced by Marine-Derived Fungus *Nigrospora* sp. MA75 on Various Culture Media”, *Helvetica Chimica Acta*, v. 9, pp. 1338–1348. [85](#)
- SOUZA, A. Q. L., SOUZA, A. D. L., ASTOLFI FILHO, S., et al., 2004, “Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham”, *Acta Amazonica*, v. 34, n. 2, pp. 185–195. [51](#)
- SPELLBERG, B., GUIDOS, R., GILBERT, D., et al., 2008, “The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America”, *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, pp. 155–164. [23](#)
- STEPHENSON, S. L., 2010, *The Kingdom Fungi*. portland, Oregon, USA, Timber Press, Inc. [2](#), [8](#), [9](#)
- STONE, J. K., POLISHOOK, J. D., WHITE, J. F., 2004, “Endophytic Fungi”. In: Mueller, G. M., Bills, G. F., Foster, M. S. (Eds.), *Biodiversity of Fungi - Inventory and Monitoring Methods*, Elsevier, pp. 241–270. [xii](#), [10](#), [11](#)
- SUÁREZ, C., GUDIOL, F., 2009, “Antibióticos betalactámicos”, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 27, n. 2, pp. 116–129. [xiii](#), [21](#)
- VLEGGAR, R., STEYN, P. S., NAGEL, D. W., 1974, “Constitution and Absolute Configuration of Austdiol, the Main Toxic Metabolite from *Aspergillus ustus*”, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, pp. 45–49. [65](#)
- WEIL, J., MIRAMONTI, J., LADISCH, M. R., 1995, “Cephalosporin C: Mode of action and biosynthetic pathway”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, pp. 85–87. [58](#)
- WHALLEY, A. J. S., EDWARDS, R. L., 1997, “The Xylariaceae: A Case Study in Biological and Chemical Diversity”. In: *International Conference on Biodiversity and Bioresources: Conservation and Utilization, 23-27 November*, Phuket, Thailand. [80](#), [90](#)
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., et al., 1990, “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics”. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Shinsky, J. J., et al. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp. 315–322. [32](#)

- WILL-WOLF, S., HAWKSWORTH, D. L., MCCUNE, B., et al., 2004, “Lichenized Fungi”. In: Mueller, G. M., Bills, G. F., Foster, M. S. (Eds.), *Biodiversity of Fungi Inventory and Monitoring Methods*, Elsevier, pp. 173–195. [6](#)
- XU, S., LI, N., NING, M. M., et al., 2006, “Bioactive Compounds from *Peperomia pellucida*”, *J. Nat. Prod.*, v. 69, pp. 247–250. [xiii](#), [25](#)
- ZHANG, H. W., SONG, Y. C., TAN, R. X., 2006, “Biology and Chemistry of endophytes”, *Nat. Prod. Rep.*, v. 23, pp. 753–771. [19](#)

# Apêndice A

## – Figuras

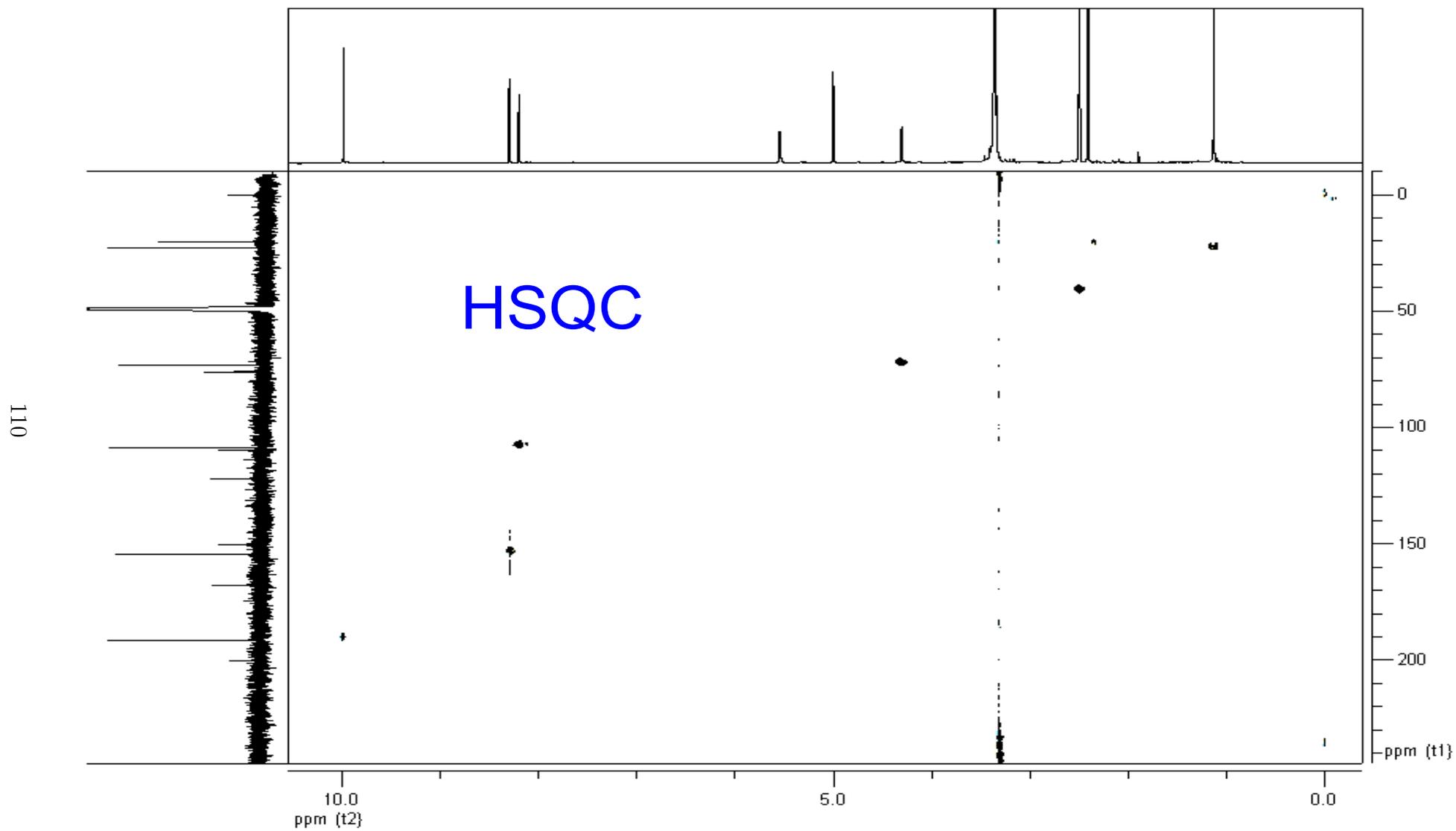


Figura A.1: Espectro HSQC de *Pp 01* a 400 MHz em DMSO deuterado.

VOLTAR

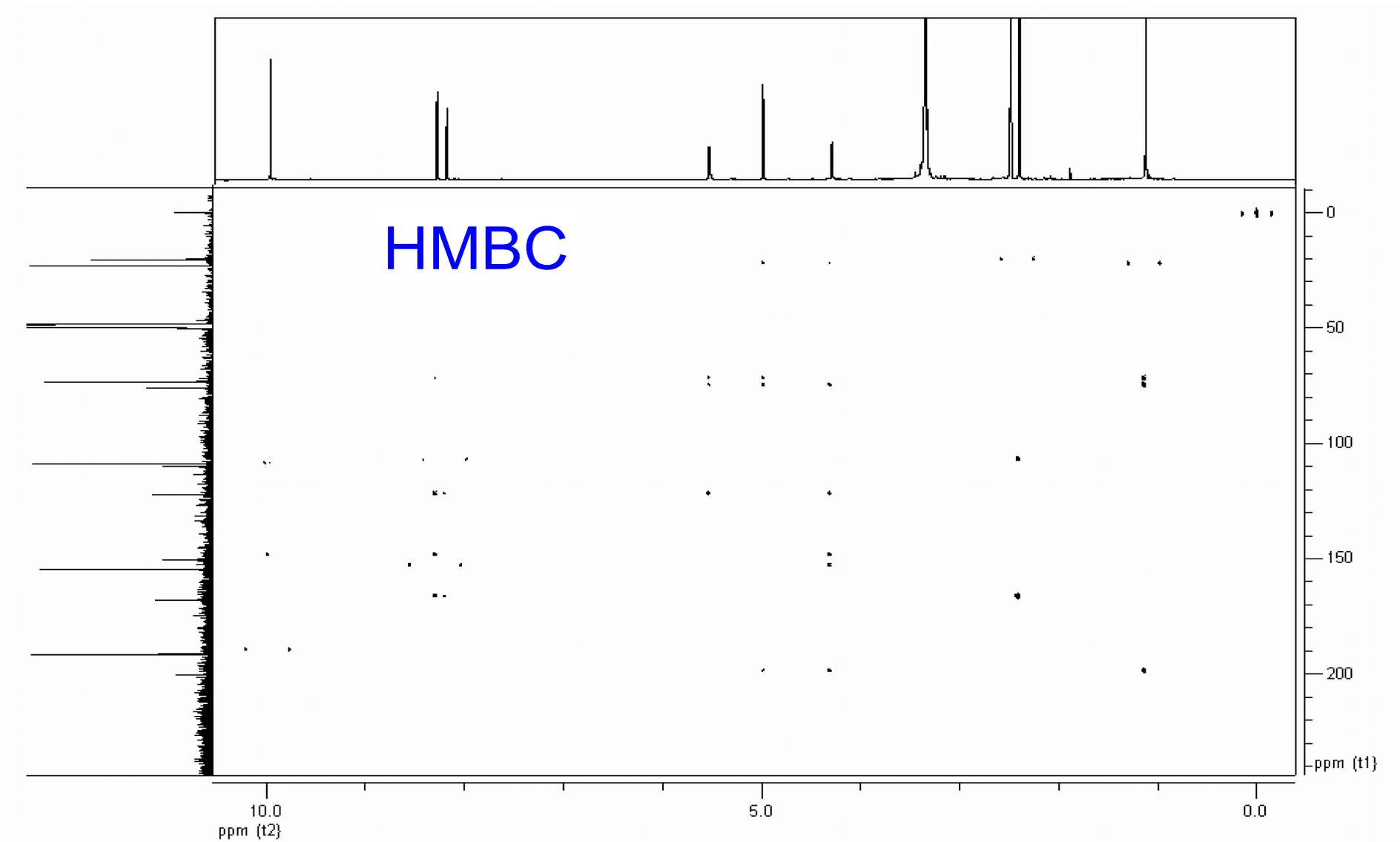


Figura A.2: Espectro HMBC de *Pp 01* a 400 MHz em DMSO deuterado.

VOLTAR

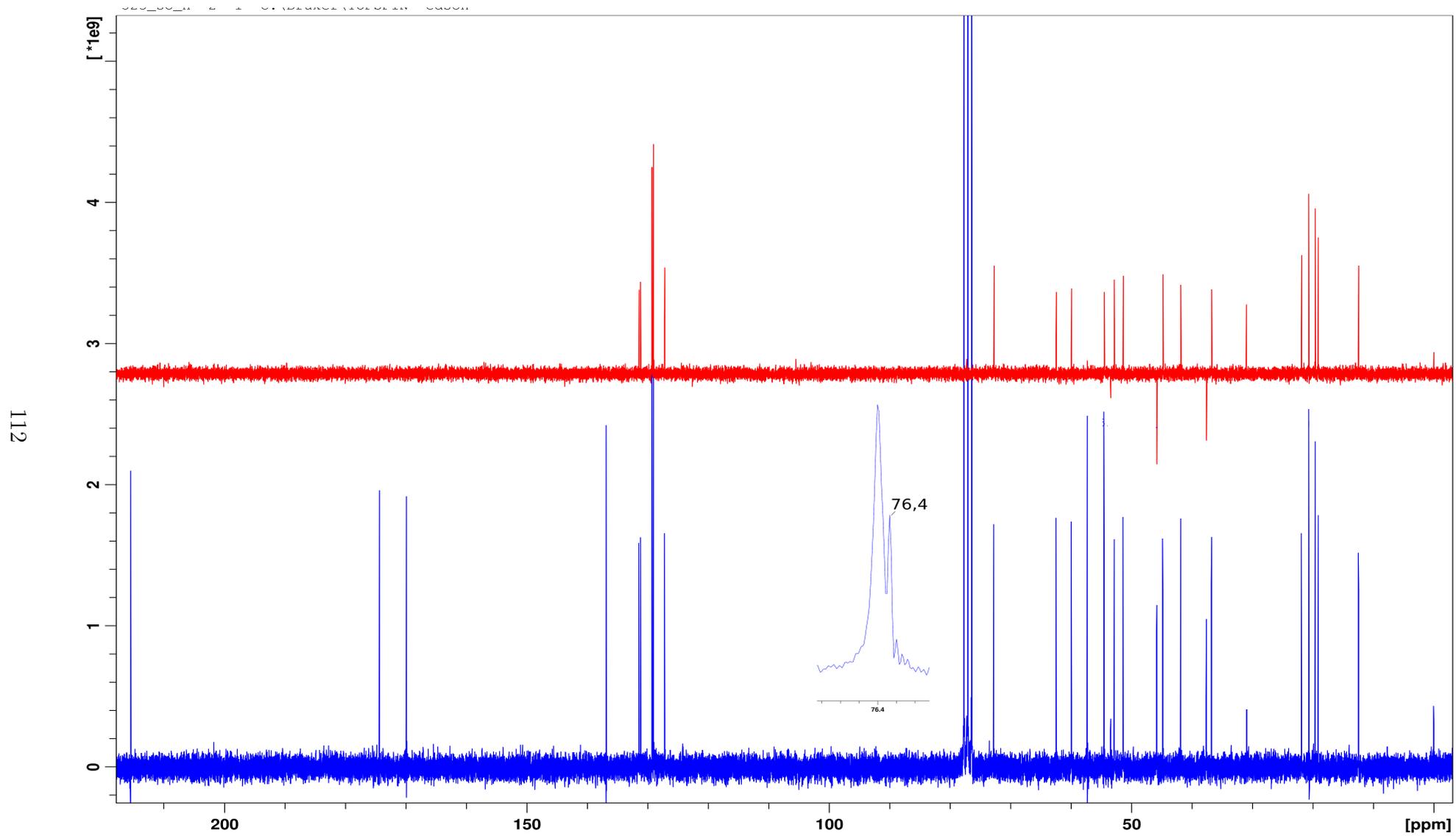


Figura A.3: Espectro de RMN de DEPT-135 (acima) e  $^{13}\text{C}$  do composto 331F05.

VOLTAR

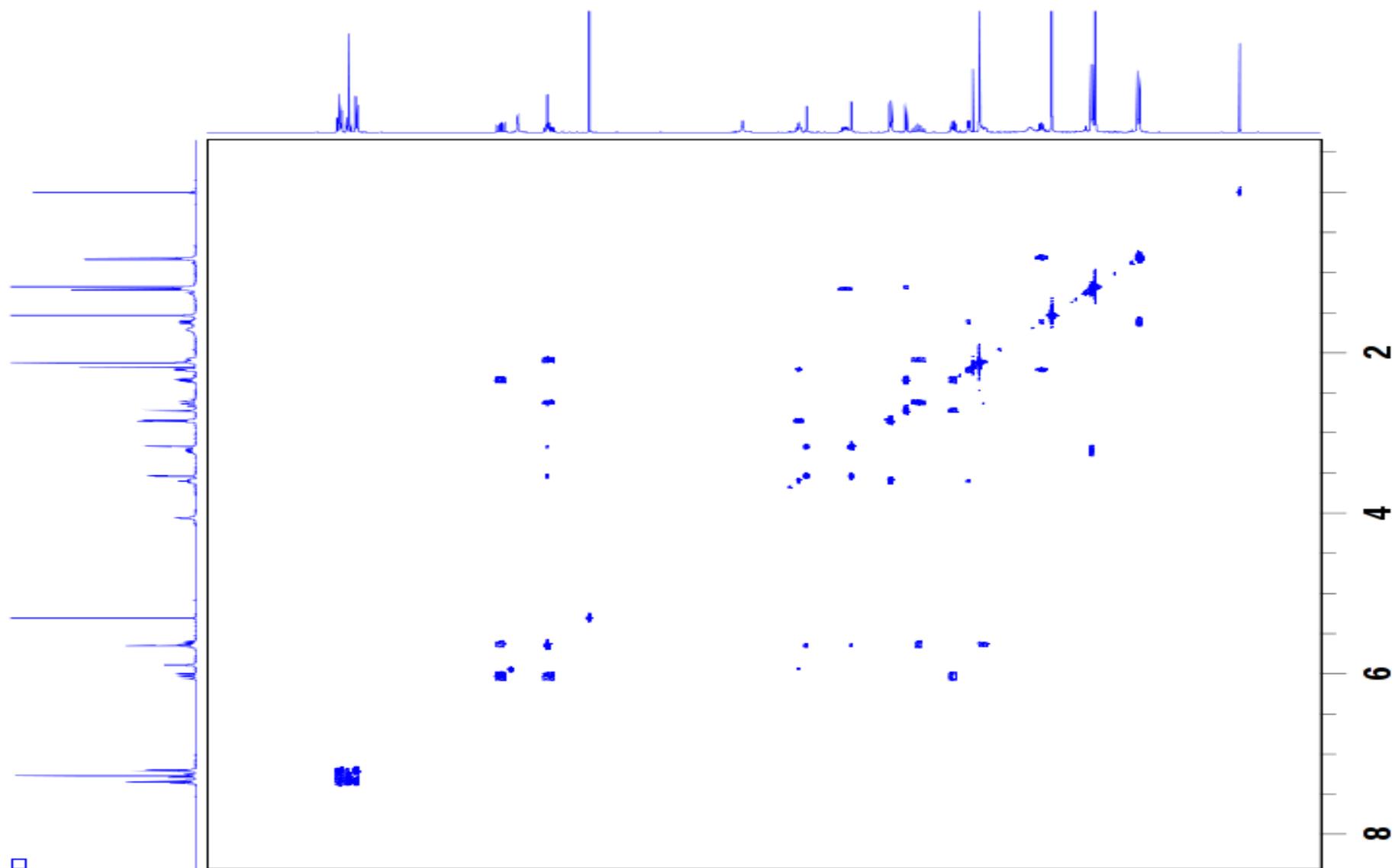
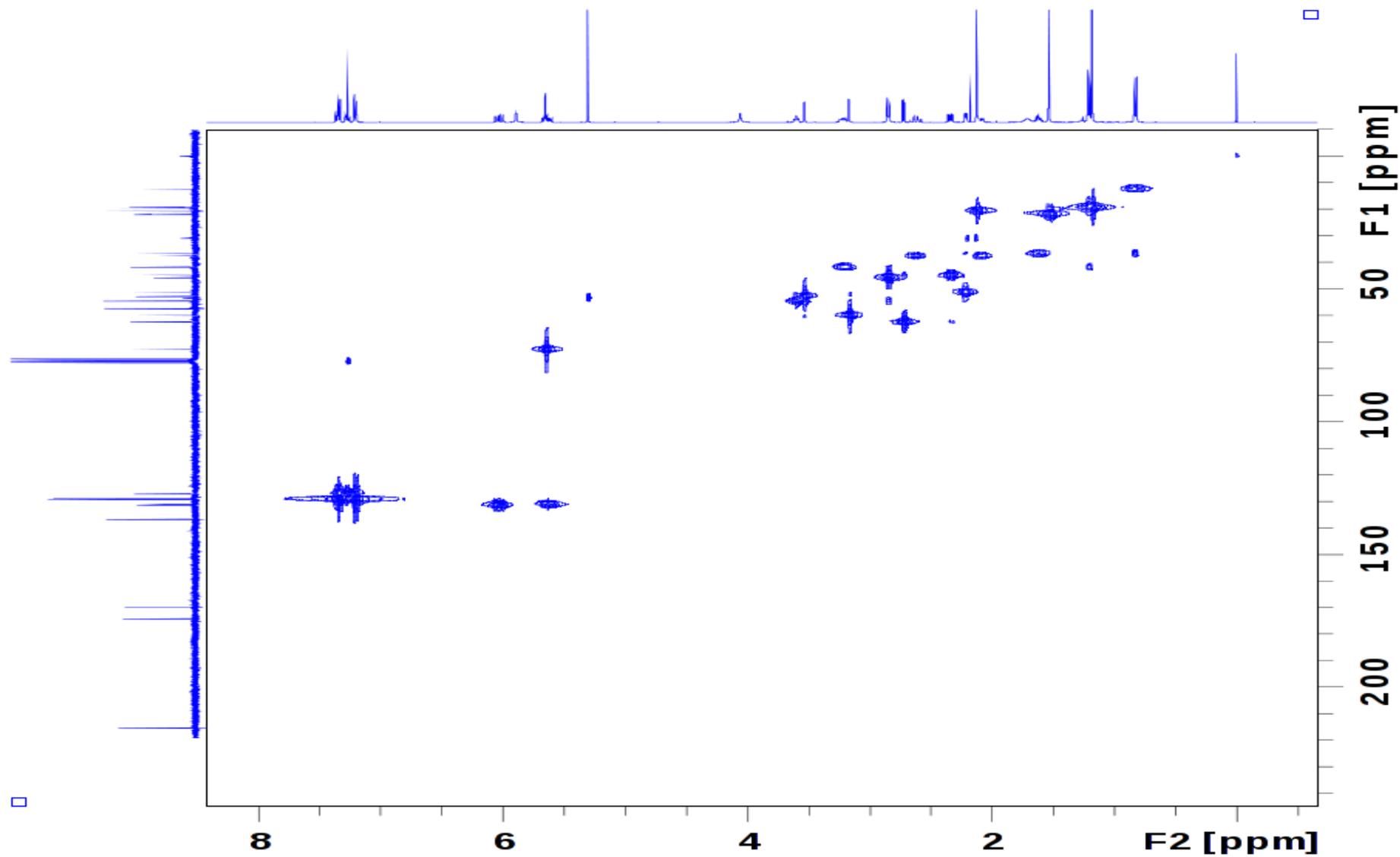
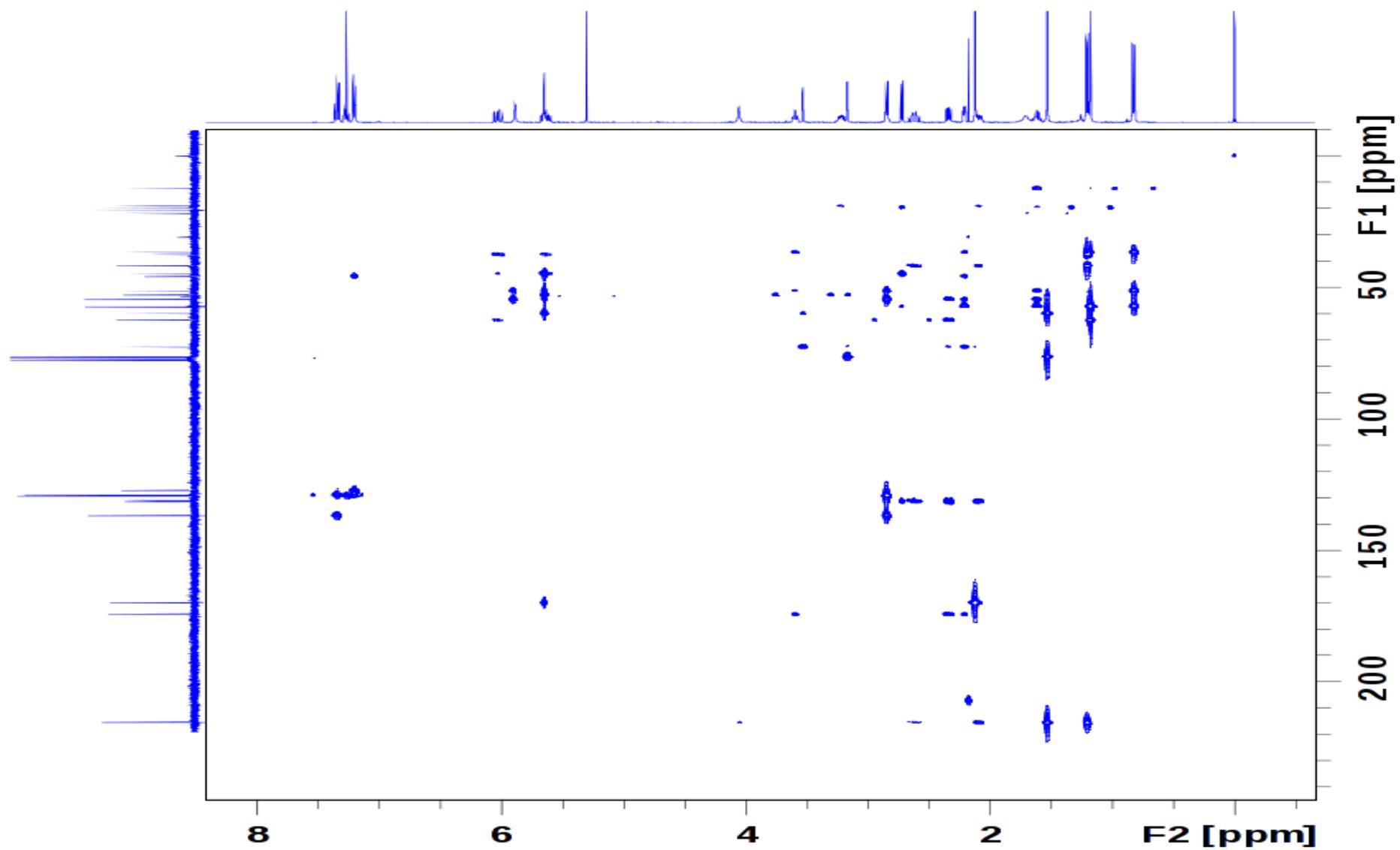


Figura A.4: Espectro COSY do composto *331F05*.

[VOLTAR](#)

Figura A.5: Espectro HSQC do composto *331F05*.[VOLTAR](#)

Figura A.6: Espectro HMBC do composto *331F05*.[VOLTAR](#)

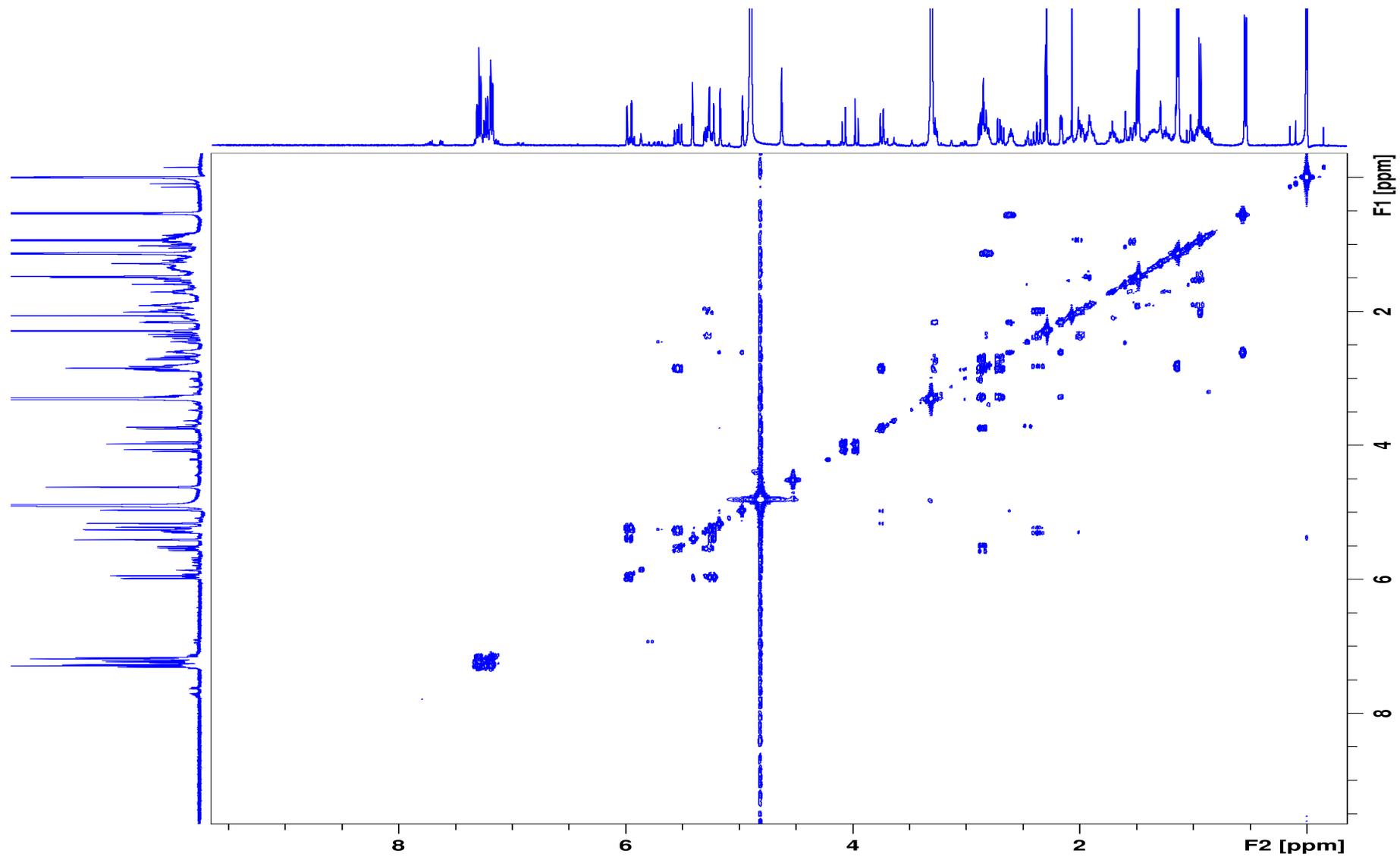
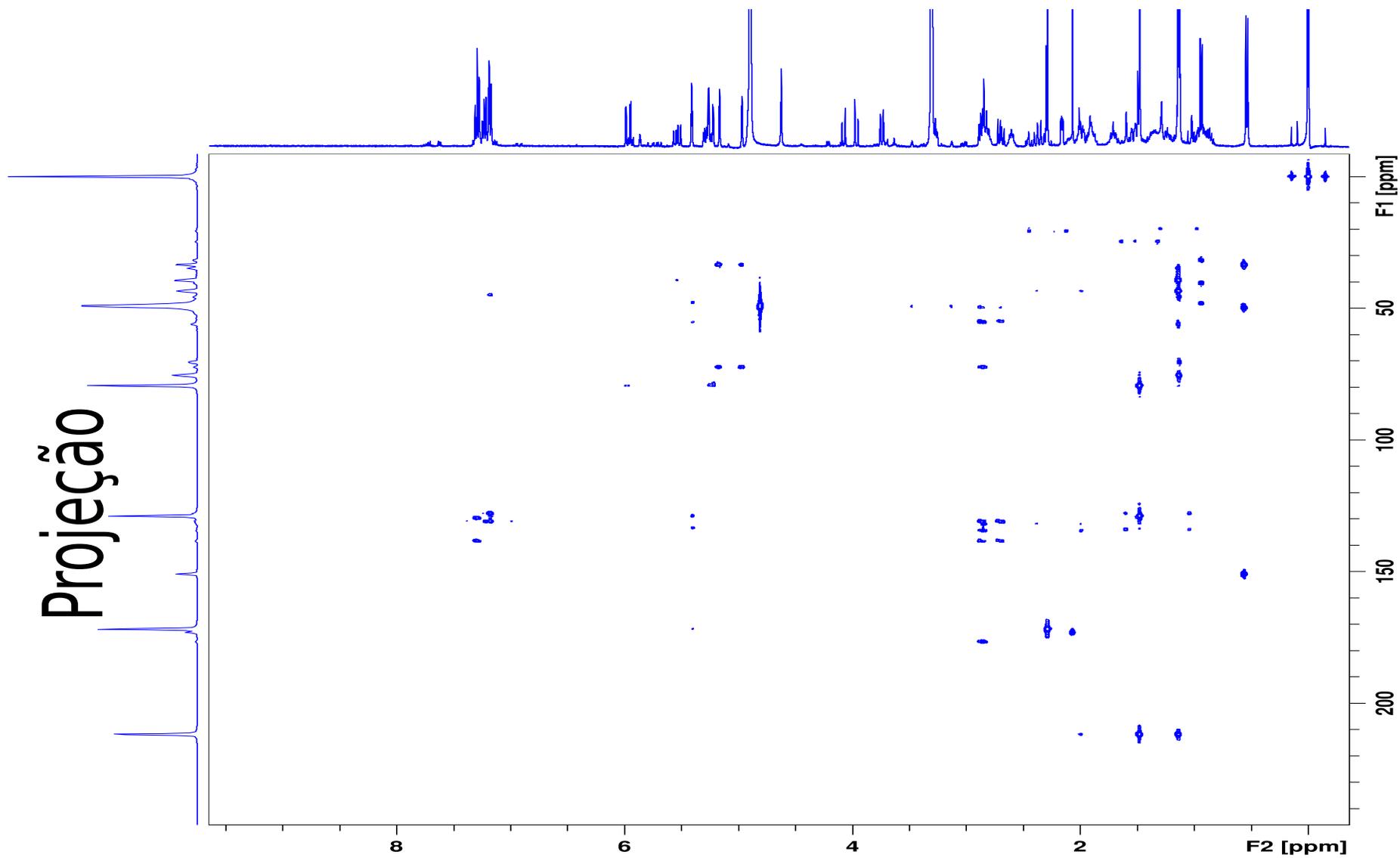


Figura A.7: Espectro COSY do composto *F1013*.

VOLTAR

Figura A.8: Espectro HMBC do composto *F1013*.

VOLTAR