

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

The logo of the Universidade Federal do Amazonas is a circular emblem. It features a central figure of a person with arms raised, surrounded by a green laurel wreath. Above the wreath are three pink flowers. The text "UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS" is written along the top inner edge of the circle, and "IN UNIVERSA SCIENTIA VERITAS" is written along the bottom inner edge. Two small black dots are positioned on the left and right sides of the circle.

ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DE *Gustavia* sp.

TESE DE DOUTORADO

Maria de Fátima Oliveira Almeida

JULHO/2014
Manaus - AM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Maria de Fátima Oliveira Almeida

ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DE *Gustavia* sp.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor na área de Química.

Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza
Orientador

Profa. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza
Co-Orientadora

Manaus – AM
JULHO/2014

Ficha Catalográfica

(Ficha catalográfica gerada automaticamente pela autora)

A447e Almeida, Maria de Fátima Oliveira
Estudos Químicos e Biológicos de Fungos endofíticos de
Gustavia sp./ Maira de Fátima Oliveira Almeida. 2014.
195f.: il. color; 29,7 cm

Orientador: Afonso Duarte Leão de Souza
Coorientadora: Antonia Queiroz Lima de Souza
Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do
Amazonas.

1. Gustavia. 2. Fungos endofíticos. 3. Bisorbicilinoídes. 4. Esterigmatocistina. I. Souza, Afonso Duarte Leão de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus pais que embora não estejam mais entre nós tenho certeza que ficariam felizes por mais esta minha conquista;

Aos meus orientadores, prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza e prof^a. Dra. Antonia Queiroz de Souza Lima, agradeço não apenas pela orientação mais também pela amizade, aos anos de convivência e conhecimentos, meu profundo respeito;

Aos membros do grupo de pesquisa em RMN do Departamento de Química da UFPR, aos professores Dr. Andersson Barison, Dra. Francinete Campos e Mestranda Angelita Nepal, pela colaboração e obtenções dos espectros de RMN;

Ao professor Dr. Paulo Couceiro, amigo e companheiro pela colaboração, incentivo e compreensão da importância deste momento;

À Profa. Cláudia Pessoa e ao Prof. Dr. Francisco Washington Araújo Barros, pela colaboração nos ensaios citotóxicos.

Ao Programa de Pós Graduação em Química, aos professores, colegas e membros do grupo GEMMA, pela convivência, amizade e nossas confraternizações;

Meu especial agradecimento aos alunos de Pibic: Felipe Ângelo, Leilane e Thais Nobre que tiveram seus projetos vinculados a este trabalho, agradeço pela colaboração, amizade e companheirismo;

Ao CNPq pela bolsa de estudo e a todos os colegas e companheiros de curso que direta ou indiretamente me acompanharam na elaboração e colaboração desse trabalho, meus agradecimentos.

RESUMO

ESTUDOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Gustavia* sp. Fungos e bactérias endofíticas são os que vivem nos espaços intercelulares das plantas, pelo menos por um período de seu ciclo de vida, habitando todas as partes aéreas, mas também as raízes, sem lhes causar nenhum sintoma aparente. Para isolar os metabólitos de fungos endofíticos neste trabalho, foram realizados preliminarmente procedimentos de coleta, isolamento, purificação, identificação (pelo menos o gênero) e conservação dos mesmos. A partir de 384 fragmentos dos tecidos vegetais (folha, galho, caule e raiz) de *Gustavia* sp. foram isolados 93 fungos endofíticos dos quais foram conservados 67 linhagens pertencentes a sete gêneros (*Fusarium*, *Xylaria*, *Pestalotiopsis*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum* (*Glomerella*)) e linhagens de Ascomycetos. Os estudos químicos iniciaram com a prospecção química de 21 linhagens representantes de cada um dos sete gêneros identificados. Com base nos resultados de ensaios biológicos dos extratos obtidos nos screening, foram selecionadas quatro linhagens de fungos visando a obtenção de metabólitos bioativos. Por sequenciamento do rDNA foram identificadas três das quatro linhagens selecionadas: **400** (*Nectria setofusariae*), **401** (*Penicillium chrysogenum*) e **447** (*Xylaria adscendens*). Os estudos químicos dos extratos das quatro linhagens 400, 447, 455 e *Aspergillus* sp. resultaram na identificação de diversos constituintes: uma mistura do ácido pilifórmico e a 5-carboximeleina obtidos de *X. adscendens*; os peróxidos de ergosterol nas formas *endo* e *exo*, uma mistura dos bisorbicilinoídeos (trichodimerol, dihidrotrichodimerol e tetrahidrotrichodimerol) e a esterigmatocistina (STC), além de uma mistura de ácidos graxos, de *P. chrysogenum*; uma mistura dos ácidos fenilacético e 4-metoxifenilacético, de *Aspergillus* sp.; e os ácidos fusárico e fenilacético, de *N. setofusariae*. Além disso, estudos por espectrometria de massas revelaram outros componentes da classe dos sorbicilinoídeos em amostra oriunda do *P. chrysogenum*. Os constituintes foram identificados por RMN 1D e 2D e espectrometria de massas e por comparação com os dados da literatura. Ensaios de extratos, frações e substâncias indicaram elevado potencial citotóxico frente a três linhagens de células tumorais para uma fração de *N. setofusariae* e a STC obtidos de *P. chrysogenum*. Este trabalho proporcionou a descoberta de uma linhagem de *P. chrysogenum* produtora de metabólitos da classe dos sorbicilinoídeos. Este é o primeiro relato dessas substâncias em estudos de fungos no Brasil e revelam a importância do referido trabalho e de se continuar a exploração desta linhagem.

ABSTRACT

CHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON FUNGI endophytic from *Gustavia* sp. Endophytic fungi and bacteria are those living at least a period of their live into the intercellular spaces of plants colonizing all vegetal tissues without causing any apparent symptom. In order to obtain fungal metabolites in this work, the fungi were, first of all, collected, isolated, purified, identified (at least their genera) and preserved. From 384 plant-tissues fragments (leaf, stem, trunk and root) of *Gustavia* sp. 93 endophytic fungi had been isolated and 67 strains were preserved. Those strains were from seven genera (*Fusarium*, *Xylaria*, *Pestalotiopsis*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Aspergillus* and *Colletotrichum* (*Glomerella*)) and some were ascomycetes. Chemical study began by chemical screening of 21 extracts of endophytic fungi representing each group isolated. On base in the bioassays of the extracts, four strains were selected to isolate bioactive metabolites. Three of those strains, *Nectria setofusariae* (400), *Penicillium chrysogenum* (401) and *Xylaria adscendens* (447), have been identified by rDNA sequencing. From their extracts, several chemical constituents have been isolated: a mixture of piliformic acid and 5-carboxymelein from *X. adscendens*; the ergosterol peroxides in the *endo* and *exo* forms, a mixture of the bisorbicillinoids trichodimerol, dihydrotrichodimerol e tetrahydrotrichodimerol and the sterigmatocistin (STC), as well a mixture of fatty acids from *P. chrysogenum*; a mixture of the phenylacetic and 4-methoxyphenylacetic acids from *Aspergillus* sp.; and the fusaric and phenylacetic acids from *N. setofusariae*. Besides, mass spectrometry analysis have shown other sorbicillinoids components in an extract fraction from *P. chrysogenum*. 1D and 2D NMR spectroscopy and mass spectrometry have been used together with literature data for identify the metabolites. Citotoxic bioassays of the extracts, fractions and substances have shown high citotoxic potential against three tumoral strains form a fraction from *N. setofusariae* and the substance STC from *P. chrysogenum*. This work resulted in the discovery of a strain of *P. chrysogenum* producing metabolites of the class of bisorbicillinoids. This is the first report of these substances in studies of fungi from Brazilian Amazon and reveals the importance of such work to continue to operate this line.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica de <i>Gustavia</i> spp. de Vera Cruz no México ao Brasil Meridional. Adaptado de PRANCE e MORI (1979).	19
Figura 2. Substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Gustavia</i> sp.....	23
Figura 3. Representação da estrutura e composição da parede celular de (a) de planta e (b) de fungo (Fonte: Santos, 2003).	28
Figura 4. Estrutura molecular da Quitina (a) e da Celulose (b).	28
Figura 5. Corpo de frutificação (peritécio) de <i>Xylaria Polymorpha</i>	33
Figura 6. Corpo de frutificação de <i>Penicillium</i> sp.1 - hifa; 2 - conidióforo; 3 - fiálide; 4 - conídio; 5 – septo.	36
Figura 7. Formas distintas do corpo de frutificação de <i>Fusarium</i>	39
Figura 8. Corpo de frutificação de <i>Aspergillus</i>	42
Figura 9. Substâncias isoladas de <i>Edemia gomezpompae</i> com potencial herbicida.....	45
Figura 10. Estriamento em placa de Petri e microscopia eletrônica de <i>S. aureus</i>	46
Figura 11. Estriamento em placa de Petri e microscopia eletrônica de <i>P. aeruginosa</i> . ..	47
Figura 12. Esquema analítico das etapas de isolamento dos endofíticos de <i>Gustavia</i> sp.	51
Figura 13. Resumo dos procedimentos para uma das formas de obtenção de linhagens puras de fungos endofíticos.	52
Figura 14. Fermentação em pequena escala: (a) inóculo no meio de cultura líquido; (b) meio de cultura fermentado; (c) líquido fermentado filtrado e (d) maceração do micélio.	54
Figura 15. Esquema analítico para obtenção dos extratos de 21 linhagens de fungos endofíticos de <i>Gustavia</i> sp. para ensaios biológicos.	55
Figura 16. Esquema analítico para obtenção dos extratos e fracionamento da linhagem 447	63
Figura 17. Estudo químico do extrato PC3 da linhagem de 401 fermentado em CY. ..	66
Figura 18. Estudo químico dos extratos da linhagem de 401. fermentado em ISP2.	69
Figura 19. Esquema analítico do extrato A3 da linhagem 455.	71
Figura 20. Estudo químico para obtenção dos extratos e fracionamento da linhagem 400.	73
Figura 21. Gráfico do percentual de fungos endofíticos isolados em relação aos meios de cultura utilizados.	74

Figura 22. Imagens de microcultivo de fungos endofíticos isolados de <i>Gustavia</i> sp. <i>Pestalotiopsis</i> sp. (a), <i>Colletotrichum</i> sp. (b), <i>Aspergillus</i> sp. (c) e <i>Penicillium</i> sp. (d). Observação de a, b, e c em objetivas de 20x e 40x.	75
Figura 23. Distribuição de fungos endofíticos isolados dos tecidos vegetais de <i>Gustavia</i> sp.....	76
Figura 24. Diversidade de fungos endofíticos isolados por tecidos em geral nas amostras de <i>Gustavia</i> sp. NI (não identificada).....	76
Figura 25. Formas de conservação das linhagens de fungo endofíticos de <i>Gustavia</i> sp.: tubo de ensaio com meio de cultura inclinado, coberto com óleo mineral (a); palito em tubo de ensaio dentro de tubo Falcon (b); tubo criogênico com 20 % glicerol (c); método de Castellani (d) e em placa de plástico (e).	77
Figura 26. Perfil eletroforético do DNA genômico das linhagens 401, 455, 447 e 400 em gel de agarose a 0,8 %.	78
Figura 27. Ensaio de atividade em placa de Elisa contendo extratos e frações de <i>Nectria setofusariae</i> e <i>Xylaria adscendens</i> frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (a) e quadro com códigos das amostras em triplicata (b).	83
Figura 28. Ensaio de atividade antimicrobiana das frações de <i>Netria setofusariae</i> frente a <i>Candida albicans</i> (a) e dados tabelados da média de três repetições.	83
Figura 29. Avaliação citotóxica dos extratos de <i>Penicillium</i> spp. E1(AcOEt); E2 (AcOEt/I-prOH (7:3)); E3 (EtOH/MeOH (1:1)).	85
Figura 30. Avaliação citotóxica dos extratos de <i>Aspergillus</i> sp., <i>Actinomiceto</i> , <i>Xylaria adscendens</i> e <i>Nectria setofusariae</i>	86
Figura 31. Avaliação citotóxica dos extratos de <i>Pestalotiopsis</i> sp., <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Cephalosporium</i> sp., NI = não identificado frente as linhagem tumorais de Leucemia, Glioblastoma e Melanoma.	87
Figura 32. Avaliação citotóxica dos extratos de três linhagens de <i>Ascomicetos</i> frente as linhagens de células tumorais de Leucemia, Glioblastoma e Melanoma.	87
Figura 33. Resultado dos ensaios de atividade alelopática.	90
Figura 34. Espectro de massas por ESI-ITMS ³ do íon em m/z 213 ([M-H] ⁻) da substância majoritária da amostra X12cF8.	92
Figura 35. RMN de ¹ H da amostra X12c F8 a 600 MHz, em CDCl ₃	93
Figura 36. RMN de ¹³ C da amostra X12cF8 a 125 MHz, em CDCl ₃	94
Figura 37. DEPT 135 da amostra X12cF8 X12cF8 a 125 MHz, em CDCl ₃	94

Figura 38. Regiões ampliadas do espectro de RMN de ^1H e do mapa de correlações de HSQC e espectro de COSY da amostra X12cF8 destacando os átomos de hidrogênio em δ 1,36 e 3,66.	95
Figura 39. Regiões ampliadas do mapa de correlações de HMBC e da amostra X12cF8 destacando os átomos de hidrogênio em δ 1,36 e 3,66.....	96
Figura 40. Regiões ampliadas do espectro de RMN de ^1H e dos mapas de correlações de HMBC, HSQC e COSY da amostra X12cF8, destacando os H em δ 7,02 e 2,23. ...	97
Figura 41. RMN de ^1H e regiões ampliadas dos mapas de correlações de HSQC e HMBC da amostra X12cF8, destacando o hidrogênio em δ 2,23.	98
Figura 42. Regiões ampliadas dos mapas de correlações de HMBC e HSQC e do espectro de RMN de ^1H , destacando as correlações dos sinais de hidrogênio em δ 1,49, 1,33 e δ 0,89 da amostra X12cF8.	99
Figura 43. Sugestão de fragmentação parcial da estrutura do ácido pilifórmico.	100
Figura 44. Ácido pilifórmico ($\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_4$)	100
Figura 45. Regiões ampliadas do mapa de correlações de HMBC e do RMN de ^{13}C da amostra X12cF8, destacando as correlações do hidrogênio em δ 11,9.	102
Figura 46. Regiões ampliadas dos mapas de correlações de HMBC e HSQC, espectro de RMN de ^{13}C da amostra X12cF8 e a respectiva estrutura parcial.	103
Figura 47. Regiões ampliadas dos mapas de correlações de HMBC e HSQC, do RMN de ^{13}C da amostra X12cF8, destacando a identificação da parcial alifática da estrutura.	104
Figura 48. Constituintes da amostra X12cF8, ácido pilifórmico ($\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_4$) (a) e 5-carboximeleina ($\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$) (b)	106
Figura 49. Espectro de RMN de ^1H da amostra F2 (71), a 600 MHz em CDCl_3	107
Figura 50. Espectro de massas da amostra F8 (1) por ESI-ITMS no modo negativo.	108
Figura 51. RMN de ^1H da amostra F8 (1), a 400 MHz em CDCl_3	109
Figura 52. Regiões ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra F8 (1).	109
Figura 53. RMN de ^{13}C e DEPT 135 da amostra F8(1), a 100 MHz em CDCl_3	110
Figura 54. Amostra F8(1) - Peróxido de ergosterol ($\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{O}_3$).....	112
Figura 55. Cromatograma (a) e espectro de massas (b) da amostra F8 (2) obtidos por LC/APCI-MS.....	113
Figura 56. RMN de ^1H da amostra 401 PC3 F8(2) e regiões ampliadas (CDCl_3 , 600 MHz).....	114

Figura 57. Regiões ampliadas do mapa de correlações de HMBC da amostra 401 PC3 F8(2) destacando a multiplicidade dos sinais.	115
Figura 58. Regiões ampliadas espectro de RMN de ^1H e do mapa de correlações de HMBC da amostra F8(2), destacando a multiplicidade e as correlações dos sinais de hidrogênio.	116
Figura 59. Estruturas parciais a partir dos dados do mapa de correlações de HMBC da amostra F8(2), destacando os hidrogênios em δ 4,81, 5,45 e 6,45.	117
Figura 60. Esterigmatocistina – ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_6$)	118
Figura 61. Espectro de RMN de ^1H da amostra PC3 F10-13 (81).	119
Figura 62. Regiões ampliadas dos mapas de correlações de HSQC e HMBC da amostra PC3 F10-13 (81).	120
Figura 63. Regiões ampliadas dos mapas de correlações de HSQC e HMBC da amostra PC3 F10 (81).	121
Figura 64. Monoglicerídeos identificados na amostra 401PC3 F10 (81).	122
Figura 65. Espectro de massas da amostra 401 EI1 L2c (46) por ESI no modo positivo.	123
Figura 66. Íons fragmentos MS^2 dos picos em m/z 497 (a), 499 (b) e 501 (c) da amostra L2c (46) por ESI no modo positivo.	124
Figura 67. RMN de ^1H de 600 MHz da amostra 401 PI1 L2c (46) e regiões ampliadas.	125
Figura 68. Região ampliada espectro de RMN de ^1H da amostra L2c(46) destacando sinais dos hidrogênios acima de 16,00 ppm.	125
Figura 69. Regiões ampliadas do mapa de correlações de HMBC da amostra L2c(46), apresentando as correlações dos sinais de hidrogênio em δ 16,53 e 16,37 ppm.	126
Figura 70. Regiões ampliadas dos mapas de correlações de HSQC e HMBC da amostra L2c(46) destacando sinais dos hidrogênios em δ 1,65, 2,28; 5,50 e 5,42.	128
Figura 71. Regiões ampliadas dos mapas de correlações de HSQC e HMBC da amostra L2c(46) destacando sinais dos hidrogênios em δ 1,89, 6,14, 6,19 e 7,32.	129
Figura 72. Estrutura molecular do bisorbicilinoide dihidrotrichodimerol.	130
Figura 73. Estrutura de ressonância do sistema de conjugação β -ceto-enólicas da molécula.	130
Figura 74. Dihydrotrichodimerol - ($\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_8$), (MM = 498)	133
Figura 75. Trichodimerol- ($\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_8$) (MM = 496)	134
Figura 76. Tetrahydrotrichodimerol - ($\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_8$), (MM = 500)	135

Figura 77. Sorbicillina, precursor comum de diferentes bisorbicilinoses (GRAVEL & POUPON, 2008).....	135
Figura 78. Proposta da rota biossintética para formação do trichodimerol a partir da sorbicillina. Adaptado de (NICOLAOU, 1999).	136
Figura 79. Cromatograma da amostra L2c (48).	137
Figura 80. RMN de ^1H de 600 MHz em CDCl_3 e regiões ampliadas da amostra L2c (48).	138
Figura 81. Perfis dos espectros de massas da amostra L2c(48), contendo sugestão de membros da subfamília sorbicilinoses.	139
Figura 82. Espectro de RMN de ^1H em 600 MHz da amostra PI3F7 (62) e regiões ampliadas.	140
Figura 83. RMN de ^1H da amostra A3b36_3P em MeOD e regiões ampliadas.	141
Figura 84. Regiões ampliadas dos mapas de correlações de HSQC e HMBC da amostra 36_F3P destacando as correlações dos sinais de hidrogênio.....	142
Figura 85. Espectro de RMN de ^1H e ampliações dos mapas de correlações de HSQC e HMBC da amostra 36_F3P, destacando o sinal de hidrogênio em δ 3,76.	143
Figura 86. Substâncias identificadas na amostra 36_F3P, ácido fenil acético (a) e ácido 4-metoxi fenilacético (b)	144
Figura 87. Espectro de RMN de ^1H da amostra 15 e regiões ampliadas dos mapas de correlações de HMBC e HSQC.	145
Figura 88. Espectro de RMN de ^1H da amostra N1C (16_2P) da linhagem <i>N. Setofurariae</i> em MeOD.	146
Figura 89. Ampliações dos mapas de correlações de HMQC e HMBC da amostra N1C (16_2P) da indicando as correlações dos sinais de hidrogênio do anel aromático.....	147
Figura 90. Ampliações dos mapas de correlações de HMQC e HMBC da amostra N1C (16_2P), indicando as correlações dos sinais de hidrogênio da cadeia lateral.	148
Figura 91. Ácido fusarico (5-butil piridinocarboxílico)	149

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Subdivisões da família Lecythydaceae.....	20
Tabela 2. Substâncias isoladas de espécies de <i>Gustavia</i>	22
Tabela 3. Exemplos metabólitos isolados de fungos endofíticos.	30
Tabela 4. Exemplos de metabólitos produzidos e isolados de <i>Xylaria</i> spp.....	34
Tabela 5. Exemplos de metabólitos produzidos e isolados de <i>Penicillium</i> spp.....	37
Tabela 6. Exemplos de metabólitos produzidos e isolados de <i>Fusarium</i> spp.	40
Tabela 7. Exemplos de metabólitos produzidos e isolados de <i>Aspergillus</i> spp.....	43
Tabela 8. Tempo de imersão dos tecidos vegetais nas soluções de hipoclorito.	51
Tabela 9. Resultados dos sequenciamentos das regiões <i>Its1</i> e <i>Its2</i> do rDNA das amostras de fungos endofíticos de <i>Gustavia</i> sp.....	80
Tabela 10. Resultados de atividade antimicrobiana em placa de Elisa dos extratos de fungos endofíticos de <i>Gustavia</i> sp. obtidos em escala analítica e revelada com TTC...	82
Tabela 11. Resultado da avaliação citotóxica das frações dos extratos de fungos endofíticos de <i>Gustavia</i> sp. frente três linhagem de células tumorais <i>in vitro</i>	88
Tabela 12. Percentual de inibição de três amostras isoladas dos extratos de fungos endofíticos de <i>Gustavia</i> sp. frente a quatro linhagem de células tumorais <i>in vitro</i>	89
Tabela 13. Rendimento dos extratos das linhagens de fungos endofíticos.....	91
Tabela 14. Atribuições de ^{13}C e ^1H em comparação com os dados da literatura para a substância ácido pilifórmico.....	100
Tabela 15. Atribuições de ^{13}C e ^1H da substância 5-carboximeleína em comparação com os dados da literatura.	106
Tabela 16. Comparação entre os dados de RMN da substância majoritária da amostra F8(1) e do peróxido de ergosterol.....	112
Tabela 17. Comparação entre os dados de RMN da amostra F8(2) e da esterigmatocistina.	118
Tabela 18. Atribuições de ^{13}C e ^1H e comparação com os dados da literatura para a substância Dihidrotrichodimerol.	132
Tabela 19. Atribuições de ^{13}C e ^1H e comparação com os dados da literatura para a substância Trichodimerol.	133
Tabela 20. Atribuições de ^{13}C e ^1H e comparação com os dados da literatura para a substância Tetrahidrotrichodimerol.....	134
Tabela 21. Atribuições de ^{13}C e ^1H em comparação com os dados da literatura para as substâncias, ácido fenil acético e ácido 4-metóxfenil acético.	144
Tabela 22. Atribuições de ^{13}C e ^1H em comparação com os dados da literatura para a substância ácido fusarico.....	149

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1D	- Unidimensional
2D	- Bidimensional
J	- Constante de acoplamento
COSY	- Correlated Spectroscopy
CC	- Cromatografia em Coluna
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	- Cromatografia de Camada Delgada Preparativa
CL-EM	- Cromatografia Líquida acoplado a Espectrometria de Massas
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
δ	- Deslocamento químico
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DEPT	- Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
d	- Dupleto
dd	- Duplo dupleto
ddd	- Duplo duplo dupleto
ddt	- Duplo duplo tripleto
dq	- Duplo quadrupeto
dt	- Duplo tripleto
ESI	- Electrospray ionization
Hz	- Hertz
HMBC	- Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	- Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
m	- Multipeto
RMN ¹³ C	- Ressonância magnética nuclear de ¹³ C
RMN ¹ H	- Ressonância magnética nuclear de ¹ H
s	- Simpleto
TMS	- Tetrametilsilano
t	- Tripleto
BHI	- Brain Heart Infusion
CTT	- 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (1%), solúvel em água
NBT	- Cloreto tetrazólio Nitroazul (1%), solúvel em álcool 70%
MTT	- 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
TMV	- Virus mosaico do tabaco
DBO	- Demanda Biológica de Oxigênio

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELA	12
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	13
SUMÁRIO	14
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. Hospedeira.....	18
2.2. Estudos químicos de espécies de <i>Gustavia</i>	21
2.3. Produtos naturais	25
2.4. Características dos fungos	27
2.5. Fungos endofíticos.....	28
2.5.1. Características e estudos químico e biológico de <i>Xylaria</i> spp.....	31
2.5.2. Características e estudos químico e biológico <i>Penicillium chrysogenum</i>	35
2.5.3. Características e estudos químico e biológico de <i>Fusarium</i> spp.	38
2.5.4. Características e estudos químico e biológico de <i>Aspergillus</i> sp.	41
2.6. Herbicidas naturais	44
2.6.1. Potencial herbicida de metabólitos de Fungos Endofíticos	44
2.7. Micro-organismos patogênicos usados nos ensaios antimicrobianos.....	46
2.7.1. Gênero <i>Staphylococcus</i>	46
2.7.2. Gênero <i>Pseudomonas</i>	47
3. OBJETIVOS	48
3.1. Geral	48
3.2. Específicos.....	48
4. PARTE EXPERIMENTAL	49
4.1. Coleta do material botânico.....	49
4.2. Isolamento e purificação dos microrganismos	49
4.2.1. Soluções utilizadas na esterilização e inoculação do material botânico.....	49
4.2.2. Preparo dos Meios de culturas	50
4.2.3. Isolamento dos micro-organismos.....	50
4.3. Identificação e conservação dos fungos endofíticos de <i>Gustavia</i> sp.....	52

4.4. Fermentação em pequena escala para obtenção dos extratos	53
4.5. Teste de atividades biológicas	55
4.5.1. Teste de atividade antimicrobiana	55
4.5.2. Teste de atividade citotóxica <i>in vitro</i>	56
4.5.3. Teste de atividade alelopática.....	57
4.6. Extração do DNA para identificação das espécies dos fungos.....	58
4.6.1. Reação de Polimerização em Cadeia - PCR.....	59
4.7. Fermentação das linhagens em escala laboratorial.....	60
4.7.1. Fermentação da linhagem 447	60
4.7.1.1. Fracionamento dos extratos da linhagem 447	62
4.7.2. Fermentação da linhagem 401	63
4.7.2.1. Fermentação da linhagem 401 no meio de cultura CY	63
4.7.2.2. Fracionamento do extrato do micélio da linhagem 401 em CY.....	64
4.7.3. Fermentação da linhagem 401 no meio de cultura ISP2	66
4.7.3.1. Fracionamento dos extratos da linhagem 401 fermentada em ISP2.....	67
4.7.4. Fermentação da linhagem 455	69
4.7.4.1. Fracionamento dos extratos da linhagem 455	70
4.7.5. Fermentação da linhagem 400.....	71
4.7.5.1. Fracionamento dos extratos da linhagem 400	72
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	74
5.1. Isolamento, Preservação e Identificação morfológica dos fungos endofíticos isolados de <i>Gustavia</i> sp.	74
5.2. Identificação molecular das linhagens selecionadas para o estudo químico	77
5.3. Extratos dos fungos endofíticos em escala analítica	80
5.4. Teste de atividade antimicrobiana dos extratos.....	81
5.4.1. Teste de atividade antimicrobiana das frações	82
5.5. Testes de citotoxicidade <i>in vitro</i>	85
5.5.1. Resultados da avaliação citotóxica dos extratos brutos.....	85
5.5.2. Resultados da avaliação citotóxica das frações	88
5.5.3. Resultados da avaliação citotóxica dos constituintes isolados	88
5.6. Teste de atividade alelopática.....	89
5.7. Rendimentos dos extratos obtidos em escala laboratorial.....	91
5.8. Identificação dos constituintes isolados dos extratos	92
5.8.1. Linhagem 447 <i>X. adscendens</i>	92
5.8.2. Identificação da substância majoritária da amostra X12cF8.....	94
5.8.3. Identificação do segundo constituinte da amostra X12c F8	101
5.9. Linhagem 401 <i>P. chrysogenum</i> – fermentação em CY	107

5.9.1. Amostra F2 (71)	107
5.9.2. Amostra F8 (1)	108
5.9.3. Amostra F8(2)	113
5.9.4. Amostra F10-13(81)	119
5.10. Linhagem 401 <i>P. chrysogenum</i> – fermentação em ISP2.....	122
5.10.1. Amostra L2c (46)	122
5.10.2. Amostra L2c (48)	137
5.11. Linhagem 455 de <i>Aspergillus</i> sp.	141
5.11.1. Amostra A3b36_3P	141
5.12. Linhagem 400 de <i>N. setofusareae</i>	145
5.12.1. Amostra N1a (15)	145
5.12.2. Amostra N1C (16_2P).....	145
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	150
8. REFERÊNCIAS	152
9. ANEXO.....	167

1. INTRODUÇÃO

A hospedeira escolhida para estes estudos pertence ao gênero *Gustavia* que compõem a família Lecythidaceae, são grupos de árvores e arbustos distribuída de Vera Cruz, no México ao Brasil Meridional (PRANCE; MORI, 1979).

O gênero *Gustavia* possui cerca de 40 espécies distribuída principalmente de Norte a Sul dos Andes e ao extremo Sul da Amazônia, com ocorrência predominantemente nas florestas primárias em torno da cidade de Manaus. Espécies desse Gênero possuem diversas aplicações na medicina tradicional cabocla e indígena da região, com os frutos, cascas, raízes, folhas e sementes (GRENAND; MORETTI; JACQUEMIN, 1987 e PRANCE; MORI, 1979).

Sabe-se que os produtos naturais de origem vegetal são os que mais contribuíram para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (MONTANARI & BOLZANI, 2001; PINTO; ZHANG; BOLZANI, 2002). No entanto, os produtos naturais são compostos derivados não somente de plantas, mas também de animais e micro-organismos.

As plantas servem como um reservatório de um número incalculável de micro-organismos conhecidos como endófitos. Os endófitos vivem nos espaços inter e intracelulares das plantas envolvidos em uma relação com o hospedeiro, principalmente como forma de proteção. As interações metabólicas dos endófitos com seu hospedeiro podem favorecer a biossíntese de diferentes produtos naturais bioativos, os quais têm atraído o interesse da comunidade científica na busca de novas fontes metabólitos bioativos com aplicações clínicas. No entanto, os endófitos de florestas tropicais e subtropicais do mundo, ainda são pouco estudados (STROBEL, 2003; BORGES & BORGES, 2009).

Sendo assim, com base no potencial dos fungos endofíticos e da riqueza microbiana da floresta amazônica, este trabalho visou colaborar com o conhecimento químico e microbiológico dos metabólitos secundários, associados a quatro linhagens de fungos endofíticos, de uma espécie Amazônica, pela importância de mais estudos voltados para essa área de conhecimento. Para isso, foram realizados os procedimentos de isolamento, identificação e conservação das linhagens, produzidos os extratos em pequena escala, realizados os ensaios biológicos preliminares para seleção das linhagens e produção dos extratos em escala laboratorial e por fim, partir para o isolamento e identificação dos metabólitos de cada extrato produzido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Hospedeira

A hospedeira escolhida para estes estudos pertence a família Lecythidaceae, a qual é composta de cerca de 25 gêneros, 400 espécies, amplamente distribuída na região norte. São grupo de árvores e arbustos de maior abundância e importância ecológica nas planícies tropicais, distribuída de Vera Cruz, no México, ao Brasil Meridional (RIBEIRO *et al.*, 1999; MORI e PRANCE, 1981) (Figura 1).



Figura 1. Distribuição geográfica de *Gustavia* spp. de Vera Cruz no México ao Brasil Meridional. Adaptado de PRANCE e MORI (1979).

A família Lecythidaceae apresenta grande diversidade de espécies em matas localizadas abaixo de 100 m de altitude, ocorrendo predominantemente nas florestas primárias em torno da cidade de Manaus (PRANCE e MORI, 1979).

A classificação mais aceita para a família Lecythidaceae foi estabelecida por (CRONQUIST, 1968), na qual a inclui na ordem das Lecythidaceae criada por ele, em 1957 (Tabela 1).

Tabela 1. Subdivisões da família Lecythidaceae.

Subfamília/Gênero	No. de espécies	Distribuição
Planchonioideae	59	
<i>Abdulmajidia</i>	2	Malásia
<i>Barringtonia</i>	41	Leste africano, Madag., Ásia tropical
<i>Careya</i>	4	Ásia tropical
<i>Chydenanthus</i>	2	Java e Sumatra
<i>Petersianthus</i>	2	Oeste africano tropical e ilhas Filipinas
<i>Planchonia</i>	8	Ilhas Andaman ao norte australiano
Lecythidoideae	199	
<i>Allantoma</i>	1	Venezuela e Brasil
<i>Grias</i>	6	Panamá ao Peru
<i>Gustavia</i>	41	América tropical e oeste índico
<i>Cariniana</i>	15	Sul da América tropical
<i>Bertholletia</i>	1	Sul da América tropical
<i>Corythophora</i>	4	Brasil
<i>Couratari</i>	19	Sul da América tropical
<i>Couroupita</i>	3	América tropical e oeste índico
<i>Eschweilera</i>	83	América tropical
<i>Lecythis</i>	26	América tropical
Foetidioideae	17	
<i>Foetidia</i>	17	Madagascar, Maurício e leste africano
Napoleonaeoideae	12	
<i>Asteranthos</i>	1	Norte do Brasil
<i>Crateranthus</i>	3	Oeste africano tropical
<i>Napoleonaea</i>	8	Oeste africano tropical

Conforme a introdução da obra de TSOU (1994), baseada em PRANCE & MORI (1979).

O gênero *Gustavia* possui cerca de 40 espécies distribuída principalmente de Norte a Sul dos Andes e ao extremo Sul da Amazônia (Figura 1). Cinco espécies de *Gustavia* ocorrem no Oeste da Amazônia: *G. augusta*, *G. hexapetala*, *G. macarenensis*, *G. poeppigiana* e *G. elliptica* (MORI, PRANCE; 1990).

Os índios de Cuna utilizam duas espécies *Lecythis* (*L. ampla* e *L. tuyrana*) na medicina popular, no qual o pó das sementes é utilizado no tratamento de dores do fígado, os frutos no tratamento de desarranjo intestinal. Sementes de *G. hexapetala* e casca de *Barringtonia* sp. são usadas como veneno na pesca (PRANCE, MORI, 1979); (GRENAND, MORETTI, JACQUEMIN, 1987).

2.2. Estudos químicos de espécies de *Gustavia*

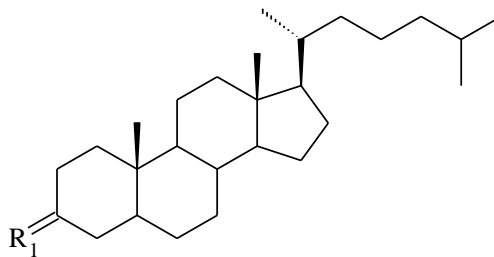
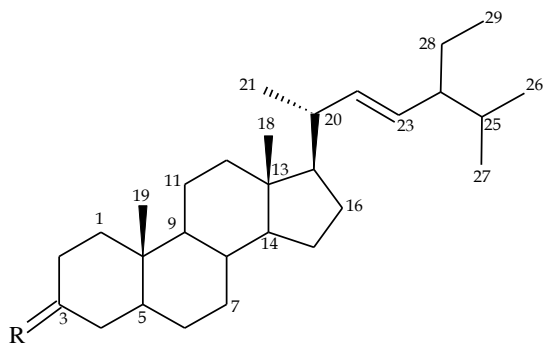
Apesar de existirem pouco mais de 40 espécies do gênero *Gustavia*, apenas 4 receberam ao longo dos anos, estudos químicos e/ou biológicos, relatados na literatura científica: *G. augusta* (SOUZA *et al.*, 2001), *G. longifolia* (EL-SEEDI *et al.*, 1999), *G. elliptica* (MELO, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2011) e *G. Hexapela* (PETTIT *et al.*, 2004).

Na Tabela 2 estão relacionadas os constituintes isolados ou identificados dos estudos de espécies de *Gustavia* e suas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 2.

Estudos químicos realizados na casca dos caules e galhos de *G. hexapetala* conduziram a um inibidor de linhagens de células tumorais denominada gustastatina (25). Esta substância apresentou resultado citotóxico promissor contra leucemia e foi divulgado por Pettit e colaboradores (2004).

Tabela 2. Substâncias isoladas de espécies de *Gustavia*.

Espécie	Substância	Tecido Estudado	Solvente de Extração	Referências
<i>G. augusta</i>	espinasterona (1) estigmasterol (2) espinasterol (3) acetato de condriasterol (4) acetato de espinasterol (5) 3 – colestanona (6) 3 β -O-acetilcolestanol (7) taraxerona (8) epitaraxerol (9) isomircadiol (10) taraxerol (11) α - amirina (12) β - amirina (13) epilupeol (14) lupeol (15) ác. betulínico (16)	casca do caule	EtOH	(SOUZA <i>et al.</i> , 2001)
<i>G. longifolia</i>	(2), (12), (13), (15) esqualeno (17) éster ác. palmítico (18) éster ác. mirístico (19) éster ác. linoleico (20) éster ác. esteárico (21) éster ác. oleico (22)	casca do caule	Éter de petróleo	(EL-SEEDI <i>et al.</i> , 1999)
<i>G. hexapetala</i>	(12), xantiletina (23) liquexantona (24) gustastatina (25) portentol (26)	casca do caule e galhos	DCM	(PETTIT;ZHANG; PENILLA, 2004)
<i>G. elliptica</i>	(12), (13) <i>trans</i> -cariofileno (27) α -humuleno (28) hidnocarpato de etila (29) linoleato de etila, (30) oleato de etila (31) estearato de etila (32) palmitato de etila (33) epifriedelanol (34) friedelanol (35) morentenol (36) friedelina (37) ursa-9(11),12-dien-3-ol (38) blumenol B (39) epiblumenol B (40)	casca do caule e folhas	CHCl ₃ , DCM e MeOH	(MELO, 2003) (ALMEIDA <i>et al.</i> , 2011)

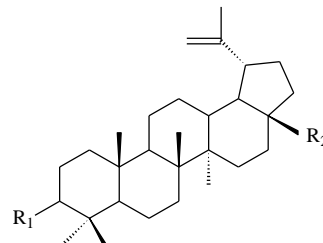
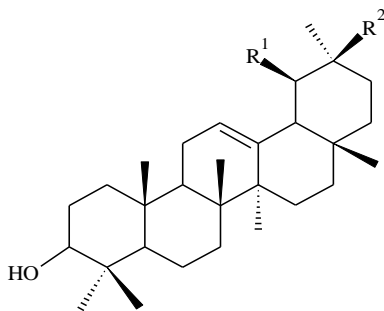
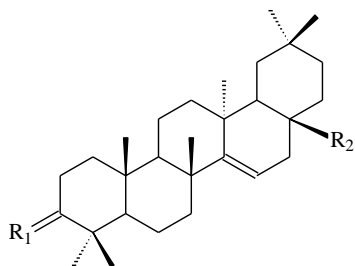


R

- (1) O; Δ^7 ; 24 S/ α
- (2) H, β OH; Δ^5 ; 24S/ α
- (3) H, β OH; Δ^7 ; 24S/ α
- (4) H, β OAc; Δ^7 ; 24R/ β
- (5) H, β OAc; Δ^7 ; 24S/ α

R₁

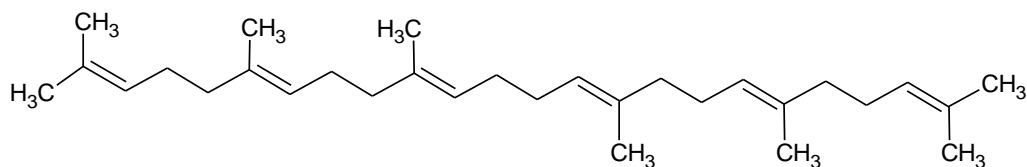
- (6) O
- (7) H, β OAc



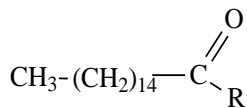
- | R₁ | R₂ |
|----------------------|----------------------|
| (8) O | CH ₃ |
| (9) H, α OH | CH ₃ |
| (10) H, α OH | CH ₂ OH |
| (11) H, β OH | CH ₃ |

- | R₁ | R₂ |
|----------------------|----------------------|
| (12) CH ₃ | H |
| (13) H | CH ₃ |

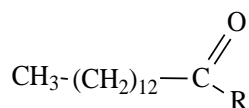
- | R₁ | R₂ |
|----------------------|----------------------|
| (14) α OH | CH ₃ |
| (15) β OH | CH ₃ |
| (16) β OH | COOH |



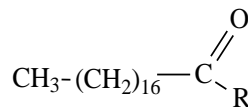
(17)



(18)



(19)



(20)

R = CH₃

Figura 2. Substâncias isoladas de espécies do gênero *Gustavia* sp.

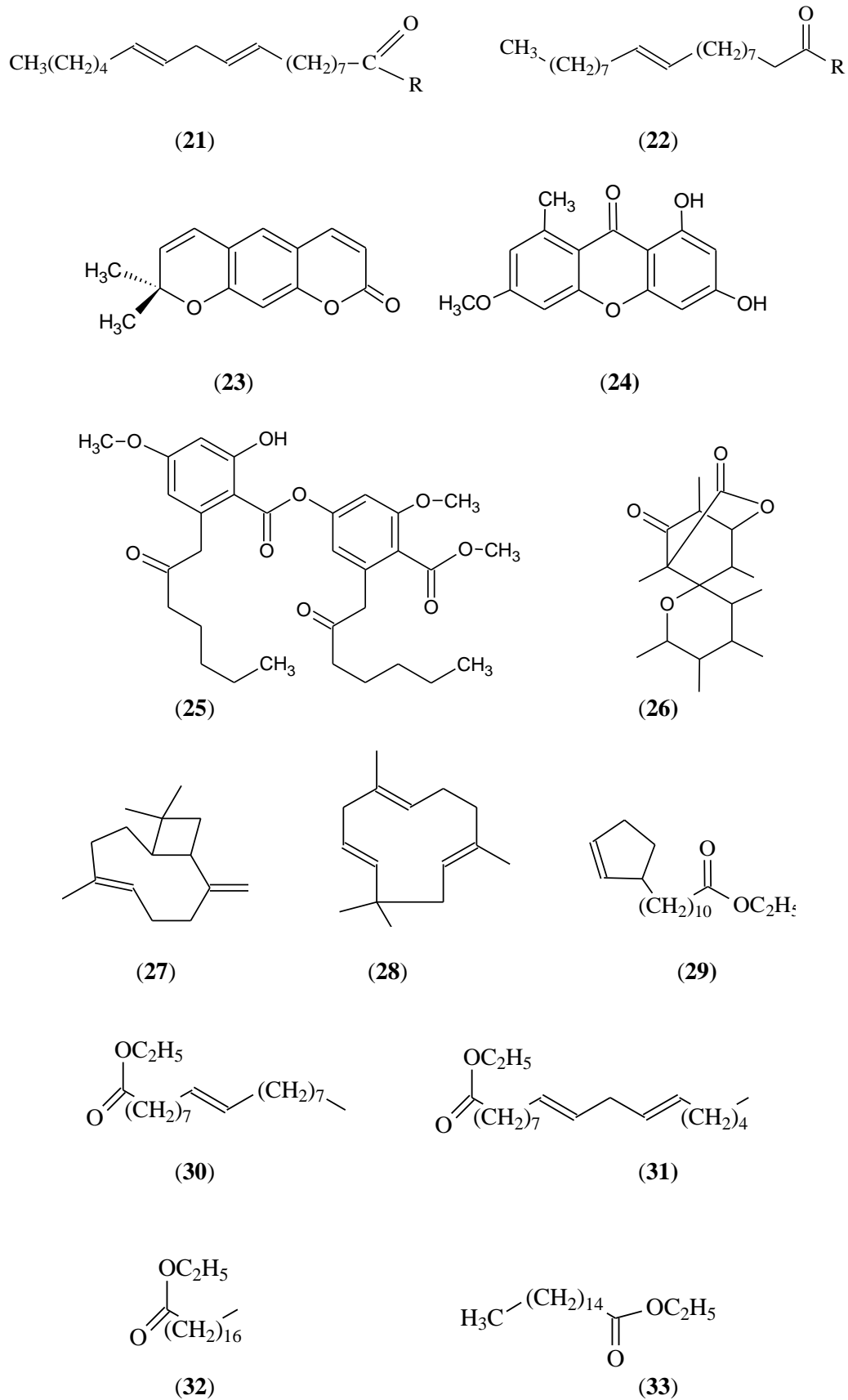


Figura 2. Substâncias isoladas de espécies do gênero *Gustavia* sp. (continuação).

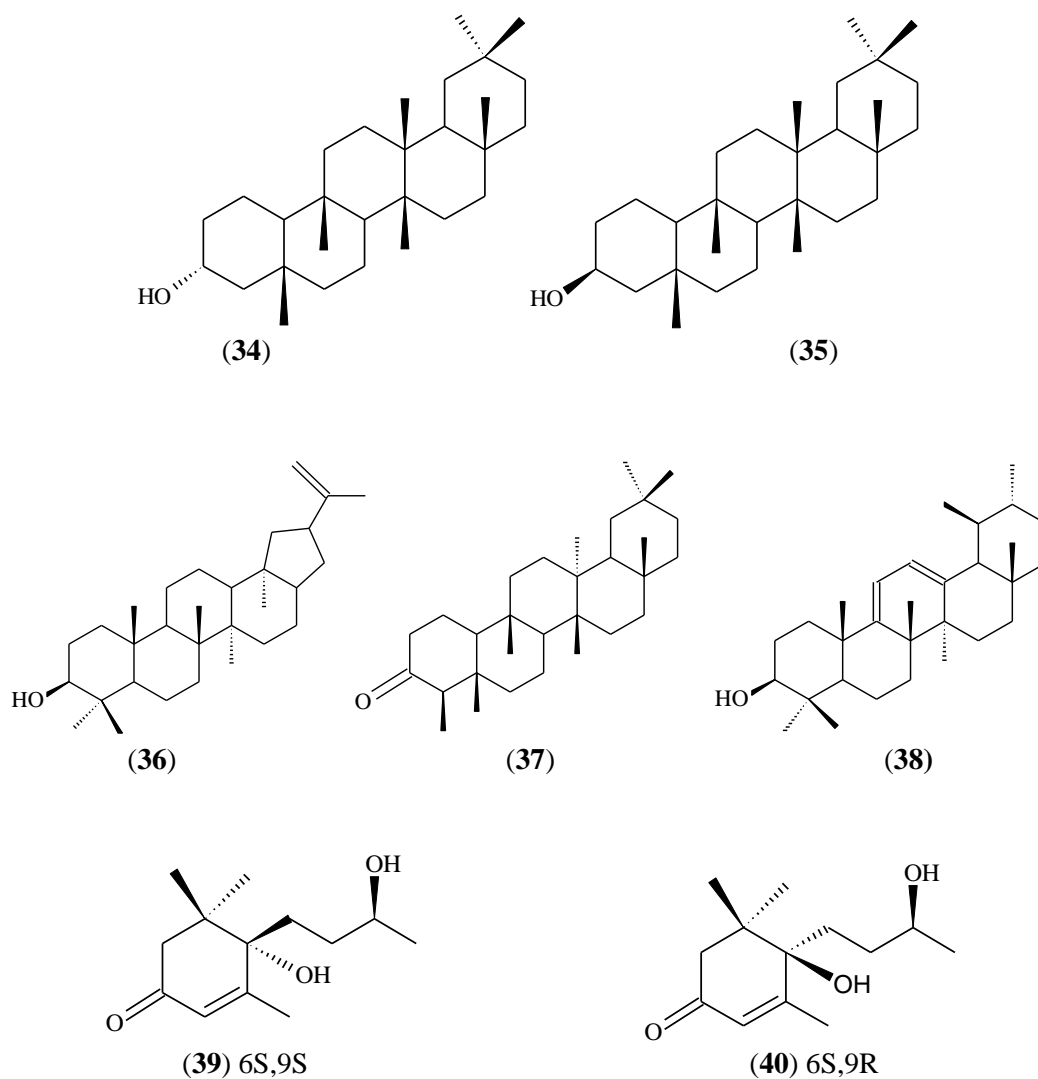


Figura 2. Substâncias isoladas de espécies do gênero *Gustavia* sp. (continuação)

2.3. Produtos naturais

A busca por substâncias bioativas de plantas é uma das atividades mais antigas de nossa civilização. De forma geral, a natureza tem produzido a maior quantidade das substâncias orgânicas conhecidas, sendo assim, o reino vegetal é o que tem mais contribuído para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (MONTANARI & BOLZANI, 2001; PINTO; SILVA; BOLZANI, 2002).

Até a metade do século XX, os produtos naturais proporcionaram um ganho considerável à indústria farmacêutica com numerosas classes de fármacos de fontes

naturais. Porém, durante 15 (1997-2012) anos as grandes empresas farmacêuticas, diminuíram as pesquisas em produtos naturais, voltando seus interesses em favor dos compostos sintéticos. Durante este período foram registradas 175 pequenas moléculas sendo 131 (74 %) moléculas sintéticas e 85 (48,6%) produtos naturais ou derivados. apenas um novo fármaco foi aprovado e tornou-se de domínio público, o antitumoral conhecido como sorafenibe (Nexavar®) da Bayer, utilizado no tratamento de células renais, e em 2007 outro fármaco foi aprovado para o tratamento de câncer de fígado (NEWMAN & CRAGG, 2007; BAKER *et al.*, 2007); NEWMAN & CRAGG, 2012).

Os produtos naturais são compostos derivados não somente de plantas, mas também de animais e micro-organismos. Estes constituem atualmente, umas das principais fontes de produtos naturais com desejáveis propriedades bioativas. Exemplo disso são os mais de 130 medicamentos de origem microbiana usados nos mais diversos tipos de doenças, como agentes antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários, antiviral, anti-inflamatório, anticâncer, neurológico, cardiovascular e em doenças imunológicas. Ainda assim, há uma escassez de medicamentos especialmente nas áreas terapêuticas, como oncologia e de doença de imunossupressão (LAM, 2007); (BUTLER, 2008).

Com o desenvolvimento de novas tecnologias, a prospecção dos produtos naturais, vem se estabelecendo como principal fonte para a descoberta de novas drogas, principalmente de micro-organismos. (BUTLER, 2008). Assim, esta área de recursos naturais é considerada em plena expansão.

Dentre as fontes de produtos naturais destacam-se os de micro-organismo de fungos. Estes estão entre os mais importantes grupos de organismos eucarióticos que atualmente são explorados na busca de metabólitos, principalmente com aplicações clínicas. Uma grande vantagem da prospecção química de metabólitos de fungos em relação às demais fontes é o fato que os micro-organismos podem ser cultivados em larga escala em fermentadores, não havendo prejuízo ao ecossistema, como pode

ocorrer com a retirada de plantas e algas de áreas naturais (TAKAHASHI & LUCAS, 2008).

Os micro-organismos foram os primeiros seres vivos a colonizar a Terra, eles ocupam praticamente todos os ambientes do planeta, sendo encontrados até mesmo em locais inóspitos a outros seres vivos como em fontes hidrotermais, desertos, regiões polares, lagos alcalinos, subsolo, interior de rochas e ambiente marinhos, entre outros; (STROBEL, 2003); (MANFIO, 2006).

Dentre os micro-organismos, destacam-se os fungos, estes são organismos muito diversificados que exercem o papel fundamental na ciclagem de nutrientes e na manutenção das florestas e do planeta, porém dotados de um imenso potencial biotecnológico e farmacológico (BRAGA-NETO; LUIZÃO; MAGNUSSON, 2008); (WENZEL, 2012); (LAM, 2007).

2.4. Características dos fungos

Os fungos são o segundo maior grupo de micro-organismos no mundo após os insetos e ao contrário das plantas, os fungos não produzem clorofila (heterotróficos), são organismos eucariontes, unicelulares (leveduriformes) ou multicelulares (filamentosos), haplóides (homo ou heterocarióticos), capazes de desenvolver uma relação simbiótica com seus hospedeiros. Sua parede celular é constituída de quitina ao invés de celulose, como ocorre nas plantas (NWE *et al.*, 2008; BORGES & BORGES, 2009) (Figura 3).

A quitina é um polímero linear no qual a unidade repetitiva é o dissacarídeo formado por 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose, unidos por ligação glicosídica do tipo β -1,4. Sua estrutura é semelhante à fibra vegetal denominada celulose (Figura 4). A diferença estrutural entre as duas fibras se deve aos grupos hidroxila localizados na posição 2, que na quitina foram substituídos por grupos acetamino (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; MANFRINI *et al.*, 2008).

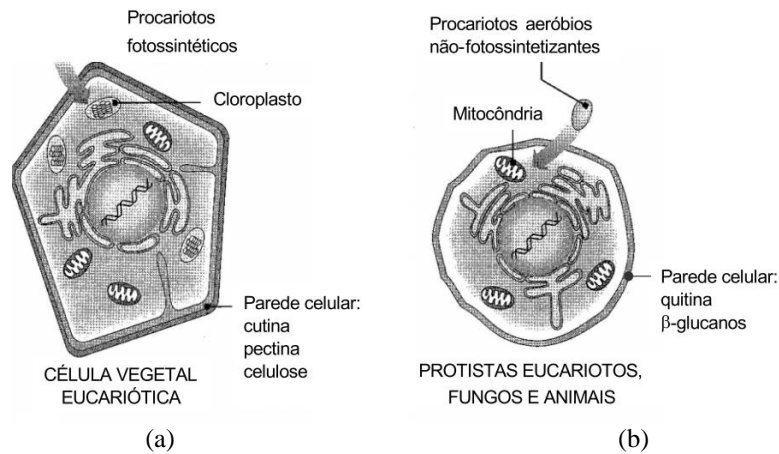


Figura 3. Representação da estrutura e composição da parede celular de (a) de planta e (b) de fungo (Fonte: Santos, 2003).

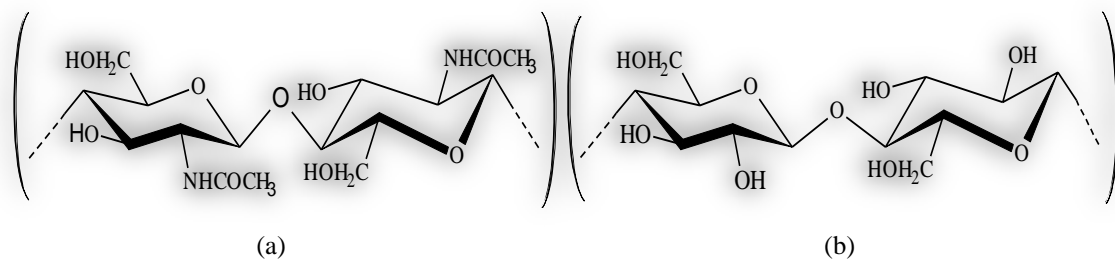


Figura 4. Estrutura molecular da Quitina (a) e da Celulose (b).

2.5. Fungos endofíticos

Nos últimos anos os micro-organismos endofíticos têm sido intensivamente estudados como fonte de produtos naturais bioativos com grande potencial de aplicações na agricultura, na indústria de alimentos e na medicina (ZHAO *et al.*, 2010). E mais recentemente, estes também têm recebido especial atenção como biocatalisadores na transformação química de produtos naturais. No entanto, os endófitos de florestas tropicais e subtropicais do mundo, ainda são pouco estudados (STROBEL, 2003; BORGES & BORGES, 2009).

Os micro-organismos endofíticos são fungos e bactérias que vivem nos espaços inter e intra celular das plantas, pelo menos por um período de seu ciclo de vida, habitando de modo geral as partes aéreas como folhas e caules, mas também as raízes, sem lhes causar nenhum sintoma aparente. Muitos micro-organismos endofíticos são

conhecidos por produzirem substâncias biologicamente ativas com aplicações na agricultura (azadirachtin - *Eupenicillium parvum*) e na farmacologia (taxol) (AZEVEDO, 1999; STROBEL & DAISY., 2004; BORGES & BORGES, 2009; KUSARI *et al.*, 2012).

Esses micro-organismos ao longo de centenas de anos desenvolveram associações com suas hospedeiras, estas associações evoluíram de relações antagonistas (oposição, competição), mutualistas (ambos são beneficiados), levando finalmente a simbiose (relação em que ambos precisam um do outro para sobreviver).

Os primeiros estudos sobre micro-organismos associados a plantas datam do século XIX desenvolvido por De Bary (1866, citato por Azevedo, 1999). De Bary observou por microscopia óptica que havia micro-organismos na superfície dos tecidos vegetais e no interior destes, os quais foram identificados por ele como epifíticos e endofíticos, respectivamente. Somente no final dos anos 70 descobriu-se que os micro-organismos habitantes do interior dos vegetais, possuem propriedades de interesse, como proteção contra patógenos e herbívoros. Os endófitos adentram as plantas por aberturas naturais ou feridas (transmissão horizontal) e ainda pelas sementes (transmissão vertical), atingindo os tecidos vegetais, de onde normalmente podem ser isolados centenas de endófitos, sendo pelo menos um específico ao hospedeiro (TAN; ZOU, 2001; ZHANG; SONG; TAN, 2006).

Na tabela 3 estão relacionados alguns exemplos do potencial e aplicações dos metabólitos de fungos endofíticos com suas atividades avaliadas.

1 **Tabela 3.** Exemplos metabólitos isolados de fungos endofíticos.

Fungo endofítico	Hospedeira	Substância	Atividade	Ref.
<i>Diaporthe</i> sp.	NI	Diaportheina B	Inibidor de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
<i>Periconia</i> sp.	<i>Taxus cuspidata</i>	Periconicina A e B	Antimicrobiano	2
ND	<i>Nothapodytes foetida</i>	Camptotecina	Anticancerígeno	3
<i>Phialocephala fortinii</i>	<i>Podophyllum peltatum</i>	Podofillotoxina	Anticancerígeno	4
<i>Eutypella scoparia</i>	<i>Garcinia dulcis</i>	Scoparasina B	Antimicrobiano	5
<i>Fusarium</i> sp.	NI	Neofusapirona	Antifúngico	6
<i>Phomopsis cassiae</i>	<i>Cassia spectabilis</i>	3,9,12-trihidroxicalamenenes 3,12-dihidroxicalamenene, 3,12-dihidroxicadale e 3,11,12-trihidroxicadale	Antifúngico Citotóxico	7 7
<i>Xylaria</i> sp.	<i>Sandoricum koetjape</i>	2-cloro-5-metoxi-3-metilciclohexa-2,5-dieno-1,4-dione e Xilariaquinona	Antimalárico e citotóxico	8
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Colpomenia sinuosa</i>	Nigerasperona A, B e C	Antifúngico e antioxidante	9
<i>Xylaria</i> sp.	<i>Torreya jackii</i>	Xilarenonas A e ácido Xilarenico	Citotóxica e bactericida	10
ND	<i>Hypericum perforatum</i>	Hipericina Emodina	Antimicrobiano e anti-inflamatório Antioxidante	11 11
<i>Edenia gomezpompae</i>	<i>Callicarpa acuminata</i>	Preussomerins EG1, EG2 e EG3	Antifúngico	12
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Laurus azorica</i>	Cicloepoxilactona, cicloepoxitriol B	Inibidor de crescimento de fungo e alga	13
ND	<i>Camptotheca acuminata</i>	Camptotecina, 9-metoxicamptotecina e 10-hidroxicamptotecina	Citotóxico	14
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	ND	Bislongiquinolide	Citotóxica	15
<i>Phoma cava</i>	ND	Dihidrotrichodimerol	Citotóxica	15
<i>F. semitectum</i>	ND	Cavoxina e Fusapirona	Citotóxica	15
<i>Xylaria</i> sp.	<i>Piper aduncum</i>	Fomenona	Antifúngico	16
<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Paris polyphylla</i>	Ácido helvolico	Bactericida	17
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Alga marinha</i>	Penicisteroide A	Antifúngico	18

2 **Legenda:** ND - não divulgado. NI - não identificada. . Ref. - Referências. 1. DETTRAKUL; KITTAKOOP; ISAKA., 2003; 2. KIM *et al.*, 2004; 3. PURI; VERMA; AMNA, 2005; 4.
3 EYBERGER; DONDAPATI; PORTER, 2006; 5. PONGCHAROEN *et al.*, 2006; 6 . HIRAMATSU & MIYAJIMA, 2006; 7. SILVA *et al.*, 2006; 8. TANSUWAN, 2007; 9. ZHANG, LI e WANG,
4 2007; 10. HU *et al.*, 2008; 11. KUSARI & LAMSHÖFT., 2008; 12. MACÍAS-RUBALCAVA *et al.*, 2008; 13. HUSSAIN & AKHTAR, 2009; 14. KUSARI; ZUHLKE; SPITELLER, 2009; 15 -
5 BALDE *et al.*, 2010; 16. SILVA *et al.*, 2010a; 17. ZHAO *et al.*, 2010; 18. GAO *et al.*, 2011.

1 **2.5.1. Características e estudos químico e biológico de *Xylaria* spp.**

2 A Xylariaceae é uma grande família de ascomicetos composta de 35 gêneros, no
3 qual o gênero *Xylaria* apresentam fungos filamentosos com cerca de 600 espécies
4 descritas, com ocorrência em todo o mundo a partir do ártico, com máxima diversidade
5 em regiões tropicais ocupando diversos habitats ecológicos (HSIEH; LIN; FANG, 2010;
6 RAMESH & THALAVAIPANDIAN, 2012; ISAKA *et al.*, 2012).

7 O gênero *Xylaria* são macrofungos conhecidos popularmente como “dedo
8 morto” (Figura 5). Consiste de espécies de fungos de compositores de madeira ou resto
9 de plantas que se tornam escuro quando maduro. São encontrados principalmente em
10 madeira, mas também em serragem, folha, esterco ou solo. Sua reprodução pode ser
11 sexuada e assexuada. Quando maturos produzem esporos em bolsões de minúsculos
12 ascos (peritécio), nesta fase a reprodução é sexuada. Na fase imatura a reprodução é
13 assexuada (divisão mitótica), reproduzem-se por conídeos (THIRUMALESH;
14 THIPPESWAMY; KRISHNAPPA, 2014; PERSON *et al.*, 2009; RAMESH &
15 THALAVAIPANDIAN, 2012).

16 Fungos associados à plantas são produtores notáveis de metabólitos secundários
17 bioativos (TAN & ZOU, 2001;. ZHANG; SONG;TAN, 2006). Em particular, os fungos
18 pertencentes ao gênero *Xylaria* são fonte de griseofulvins, citocalasinas, sesquiterpenos,
19 xylaramides, xantonas, ácidos graxos, furanopiranois e derivados xylocetais (SILVA *et*
20 *al.*, 2010)

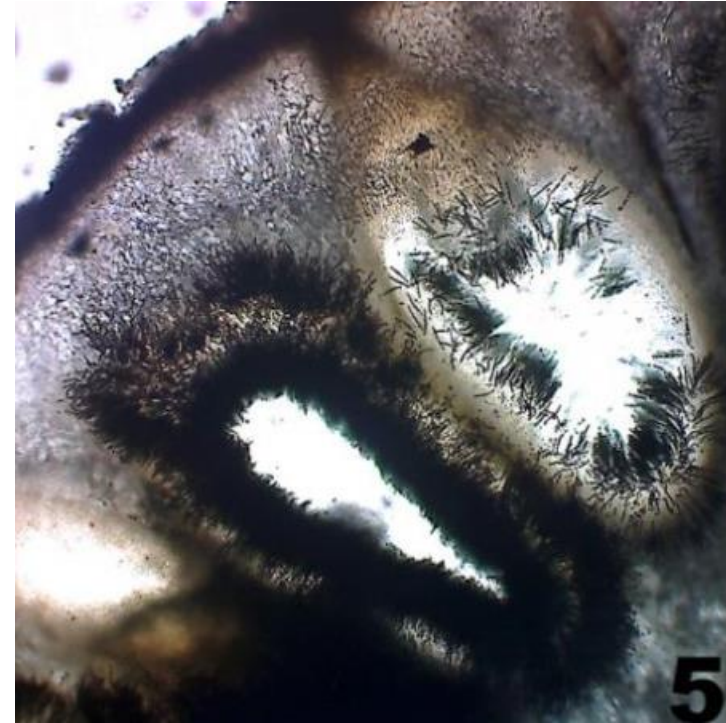
21 Estudos recentes revelaram este gênero como uma fonte rica de metabólitos
22 secundários farmacologicamente ativos, incluindo atividade citotóxica (DAVIS;
23 WATTERS; HEALY, 2005), antimicrobiana (XU *et al.*, 2008b ; HEALY *et al.*, 2004),
24 Anti-HIV (SING *et al.*, 1990), e antioxidante (LIU *et al.*, 2006). A Tabela 4 a seguir

- 1 apresenta alguns exemplos do potencial químico e biológico dos metabólitos isolados de
- 2 *Xylaria* spp.

1



Fonte: www.ijbpr.com



Fonte: Ramesh & Thalavaipandian, 2012

2

3

Figura 5. Corpo de frutificação (peritécio) de *Xylaria Polymorpha*.

1 **Tabela 4. Exemplos de metabólitos produzidos e isolados de *Xylaria* spp.**

Espécie	Hospedeira	Substância	Atividades	Ref.
<i>X. mellissi</i>	Sedimento marinho	Melisol, 1,8-dihidroxi-naftol-1- <i>O</i> - α - glucopiranosídeo	Antiviral e citotóxica	1
<i>X. polymorpha</i>	Cogumelo selvagem (Japão)	Espiropolina A	Frente cepa multante <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	2
<i>Xylaria</i> sp.	<i>Alibertia macrophylla</i>	Xylaranona C	Inibidor Enzimático Protease	3
<i>X. feejeensis</i>	Planta NI	Xyolida	Antifúngico - oomiceto	4
<i>Xylaria</i> sp.	<i>Piper aduncum</i>	Femenona e Faseolinona	Antifúngico e citotóxico	5
	<i>Garcinia dulcis</i>	Sordaricina	Antifúngico	6
<i>Xylaria plebeja</i>	<i>Garcinia hombroniana</i>	Sardaricina	antimicrobino	7
	<i>Melitodes squamata</i>	Dihidrocitrinona, Penicitrinona A, Ácido fenol A, 3R,4S-(+)-4-hidroxi-6-deoxiscitalone	Inibidor Enzimático	
			Catepsina B, IMPDH, PTP1B e SHP2	8
	<i>Piper aduncum</i>	Ácido (3R,4R)-3,4-dihidro-4,6-dihidroxi-3-metil-1-oxo-1H-isocromena-5-carboxílico	Antifúngico e inibidor de acetilcolinesterase	9
	<i>Azadirachta indica</i>	14 α ,16-Epoxi-18-norisopimar-7-en-4 α -ol, 16- <i>O</i> -Sulfo-18-norisopimar-7-en-4 α ,16-diol e 9-Deoxi-himatoxina A	Antimicrobiano e antifúngico	e 10
<i>Xylaria allantoides</i>		Xylalantina A e eremoxilarina C	Citotóxico e antimalárico	11
<i>Xylaria</i> sp.	<i>Palicourea marcgravii</i>	Ácido 2-hexil-3-metil-butanodioico e Citocalasina D	Antifúngico	12
	<i>Piper aduncum</i>	19,20 - citocalasina C, D, Q e R	Citotóxica	13
	<i>Sandoricum</i> (Tailândia)	<i>koetjape</i> 2-Cloro-5-metoxi-3-metilciclohexano-2,5-diena-1,4-diona e Xylariaquinone	Antimalárico e Citotóxico	15
	<i>Torreya jackii</i> (China)	Xylarenona B	Citotóxico	16

2 **Legenda:** NA - não avaliado. NI - não identificada. Ref. – Referências. **1.** PITTAYAKHAJONWUT *et al.*, 2005. **2.** SHIONO; MATSUI; IMAIZUMI, 2013. **3.** OLIVEIRA *et al.*, 2011. **4.**
3 BARABAN; MORIN; PHILLIPS, 2013. **5.** SILVA *et al.*, 2010. **6.** PONGCHAROEN & RUKACHAISIRIKUL., 2008. **7.** RUKACHAISIRIKUL & BUADAM., 2013. **8.** NONG *et al.*, 2013. **9.**
4 OLIVEIRA *et al.*, 2011. **10.** WU *et al.*, 2014. **11.** ISAKA, *et al.*, 2014. **12.** CAFÊU *et al.*, 2005. **13.** SILVA *et al.*, 2010. **14.** TANSUWAN, 2007. **15.** HU; LI; HUANG, 2008.

5
6
7
8

2.5.2. Características e estudos químico e biológico *Penicillium chrysogenum*

P. chrysogenum são fungos filamentosos amplamente distribuídos na natureza e frequentemente encontrados em alimentos e diferentes ambientes. É uma das espécies mais pesquisadas e conhecidas por produzir uma grande variedade de produtos naturais bioativos, dentre eles a penicilina e a cephalosporina. Suas colônias são de rápido crescimento, apresentando textura cotonosa, aveludada com cores variando nos tons verde, cinza e amarelo (MENG *et al.*, 2011;VEERAPAGU; JEYA; PONMURUGAN, 2008).

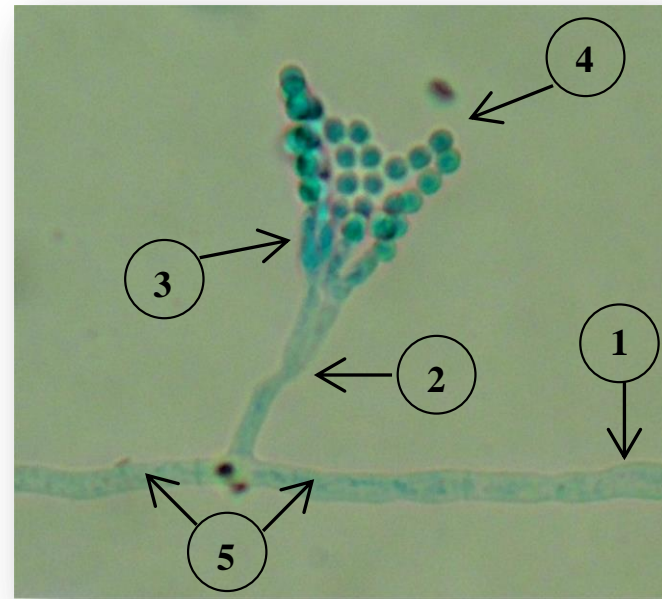
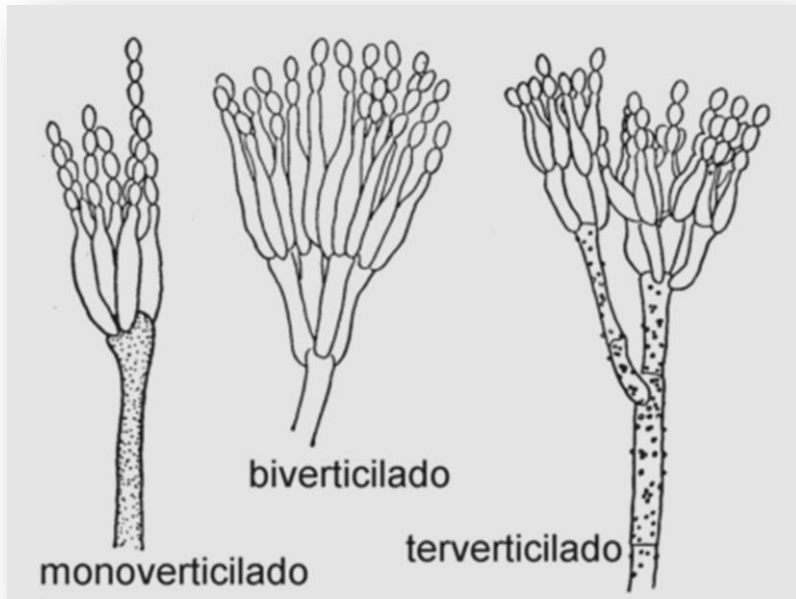
O género *Penicillium* produz uma estrutura (corpo de frutificação) típica do género designada de penicillus (ramificada semelhante a um pincel), onde são formados os esporos assexuais (conídios). As filiaes são estruturas conectadas aos verticilos, que se estreitam até o ápice onde são formados os conídios. Foram identificados três tipos de penicillus, o mais simples designam-se monoverticilado, biverticilado e terverticilado, sendo possível de serem observados com auxílio de um microscópio(CARRILLO, 2003).

Fungos filamentosos, como *Penicillium* continuam revelando notáveis descobertas, incluindo metabolitos produtores de diversos tipos de compostos biologicamente ativos, tais como: alcaloides, esteroides, terpenoides, derivados de cumarina, quinonas, fenois, lactonas e policetídeos (JIAO *et al.*, 2013 e referências citadas).

A tabela 5 relaciona alguns exemplos do potencial químico e biológico dos metabólitos isolados de *Penicillium chrysogenum* e suas atividades avaliadas.

A Figura 6 esquematiza estruturas o corpo de frutificação de *Penicillium* e ramificações.

1
2
3



Fonte: www.plantasyhongos.es

4 **Figura 6.** Corpo de frutificação de *Penicillium* sp. 1 - hifa; 2 - conidióforo; 3 - fiálide; 4 - conídio; 5 - septo.

1 **Tabela 5. Exemplos de metabólitos produzidos e isolados de *Penicillium* spp.**

Espécie	Hospedeira	Metabólito	Atividade	Ref.
<i>P. chrysogenum</i>	<i>Aegiceras cornulatum</i>	Leptosfaerona C e penicilone	Citotóxica	1
<i>P. chrysogenum</i>	<i>Fagonia cretica</i>	Hipocrelina B e C	Antifúngica	2
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Riccardia multifida</i>	6-hidroxil-deoxifunicona e 6-dimetilvermistatina	Alelopática	3
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Ircinia fasciculata</i>	Sorbicilactona A	Citotóxica e antiviral	4
<i>Penicillium</i> sp.	Alga <i>Laurencia</i> sp.	penicitida A e penicimonoterpeno	Citotóxica e antifúngica	5
<i>Penicillium</i> sp.	Mangue marinho	Iso-monodictifenona e Penicelida A e B	Citotóxica e antibacteriana	6
<i>Penicillium</i> sp.	Alga vermelha <i>Laurencia</i>	Penicisteroide A	Citotóxica	7
<i>P. citrinum</i>	<i>Ocimum tenuiflorum</i>	Éter, 5-metil alternariol, metil 8-hidroxi-6-metil-9-oxo-9H-xantona-1-carboxilato, perinadina A, alternariol e citrinina	Citotóxica	8
<i>P. chrysogenum</i>	Planta NI	Xantoviridicatinas E e F	Antiretroviral	9
<i>P. chrysogenum</i>	<i>Porteresia coarctata</i>	Citrinina	Antimicrobiana e antifúngica	10
<i>P. chrysogenum</i>	Alga <i>Sargassum. Palladium</i>	2-(4-hidroxifenil)quinazolina-4(3H)-one, N-[2-(4-hidroxifenil) acetil] formamida e N-[(2E)-(4-hidroxifenil) etenil] formamida	Citotóxica	11
<i>P. chrysogenum</i>	Esponja <i>Tethya aurantium</i>	Cilifuranona	Citotóxica, anti e inibitória enzimática	12
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Limonium tubiflorum</i>	11β-metoxicurvularina, 11α-metoxicurvularina, 5-cloro-6,8,10-trihidroxi-1-metoxi-3-metil-9,(10H)-antracenona, trichodimerol, trans-dihidrocurvularina, 1-cloro-2,4-dihidroxi-5-metoxi-7-metiltraquinona	Antitripanossoma e citotóxica	13
<i>Penicillium ochrochloron</i>	NI	2,3,4-triidroxibutanamida	antimicrobiana	14
<i>P. janthinellum</i>	<i>Evodia rutaecarpa</i>	10-hidroxi-evodiamina e 11-hidroxi-evodiamina	Citotóxico	15

2 **Legenda:** NI - não identificada. Ref. – Referências. **1.** LIN *et al.*, 2008. **2.** MENG *et al.*, 2011. **3.** JIAO *et al.*, 2013. **4.** BRINGMANN *et al.*, 2005. **5.** GAO *et al.*, 2011. **6.** LUO *et al.*, 2014. **7.**
3 GAO *et al.*, 2011. **8.** LAI *et al.*, 2013. **9.** SINGH *et al.*, 2003. **10.** DEVI & D'SOUZA, 2009. **11.** AN *et al.*, 2013. **12.** WIESE; OHLENDORF; BLUMEL, 2011. **13.** ALY *et al.*, 2011. **14.** RANCIC
4 *et al.*, 2006. **15.** LI *et al.*, 2006.

1 **2.5.3. Características e estudos químico e biológico de *Fusarium* spp.**

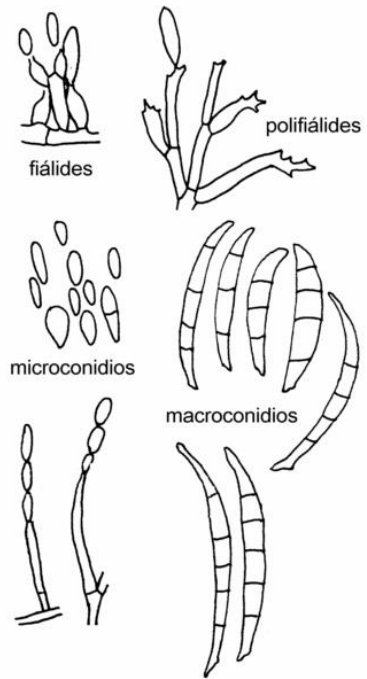
2 As colónias do gênero *Fusarium* são geralmente de crescimento rápido, pálido
3 ou colorido (dependendo da espécie) e pode ou não ter um micélio felpudo aéreo. A cor
4 do talo varia de tons de esbranquiçado a amarelo, marrom, rosa, lilás ou avermelhados.
5 Apresentam microconídios hialino, piriforme, fusiforme a ovóide, retas ou curvas
6 (Figura 7) (CARRILLO, 2003a).

7 *Nectria setofusariae* é o nome dado a fase telemorfita da espécie *Fusarium*
8 *setosum* (nome anamorfo-imperfeito) (GRÄFENHAN *et al.*, 2011). Fungos do gênero
9 *Fusarium* são descritos como produtores de uma variedade de micotoxinas com
10 diferentes princípios farmacológicos, que podem atuar sobre o organismo animal
11 prejudicando o seu desempenho e desenvolvendo alterações patológicas graves. As
12 micotoxinas têm recebido especial atenção devido às enormes perdas que vêm causando
13 na avicultura e na agricultura mundial (FLORES & BRUCKNER, 2014).

14 Espécies do gênero *Fusarium* metabolizam também, uma diversidade de
15 metabólitos secundários bioativos incluindo naftoquinonas, tais como: javanicina,
16 fusarubina, solaniol, marticina, nectraiafurona. Esta classe de compostos é de grande
17 interesse devido ao amplo número de actividades biológicas, tais como propriedade
18 antibacteriana, antifúngica, fitotóxica, inseticida e citotóxica (KORNSAKULKARN &
19 DOLSOPHON, 2011).

20 A Tabela 6 a seguir, apresenta alguns exemplos do potencial químico e biológico
21 dos metabólitos isolados de espécies de *Fusarium*.

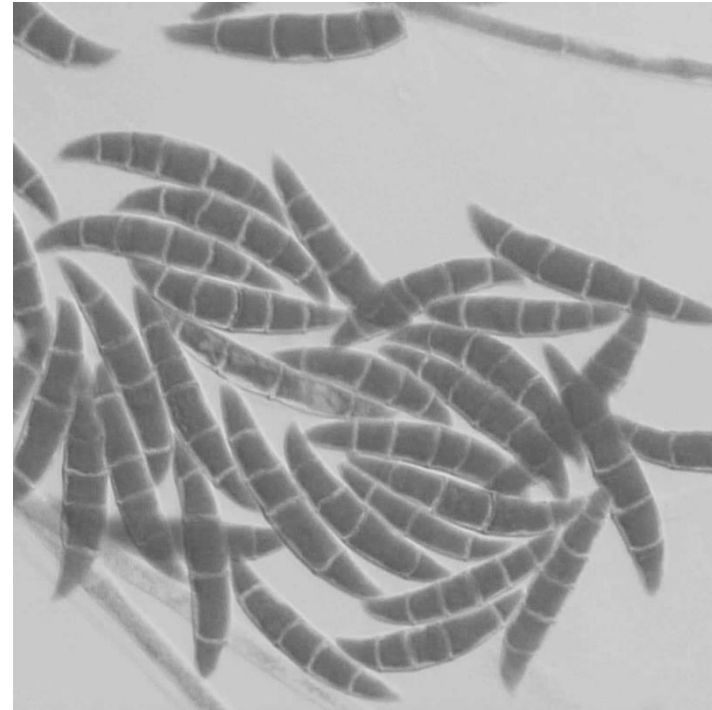
1



Fonte: www.mycologia.org

2 **Figura 7.** Formas distintas do corpo de frutificação de *Fusarium*.

3



Fonte: <http://fungi.myspecies.info/all-fungi/fusarium-culmorum>

1 **Tabela 6. Exemplos de metabólitos produzidos e isolados de *Fusarium* spp.**

Espécie	Hospedeira	Substância	Atividade	Ref.
<i>F. fujikuroi</i>	NI	Picidina F	Antimalárica	1
<i>F. incarnatum</i>	<i>Aegiceras corniculatum</i>	2-acetil-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolina, Fusamina e 3-(1-Aminoetilidena-6-metil-2H-pirano-2,4(3H)-diona	Citotóxica	2
<i>F. oxysporum</i>	<i>Cinnamomum kanehirae</i> (Taiwan)	Beauvercina	Antimicrobiana e citotóxica	3
<i>F. oxysporum</i>	<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgolide B	NA	4
<i>F. solani</i>	Solo (Tailândia)	Naftoquinona	citotóxico	5
<i>F. oxysporum</i>	NI	Bikaverina	Antimicrobiana	6
<i>Fusarium</i> sp.	NI	Enniatinas	Antimicrobiana	7
<i>Fusarium</i> sp.	Bambu (Tailândia)	Dihidronaftalenona, 5-Hidroxidihidrofusarubina A, B e C , isômero dihidronaftanona e derivados de metil éter	Antimicrobiana, antifúngica e citotóxica	8
	<i>Melia azedarach</i>	Aigialomicina D, Isocoumarina e Pochonina N	Citotóxica	9
	NI	Neofusapirona, fusapirona e deoxifusapirona	Antimicrobiana	10
<i>F. proliferatum</i>	NI	Beauvericina	Antimicrobiana	11
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Annella</i> sp.	9R-hidroxi-haloroselinia A, bostricina, nigrosporina B, Javanicina e anhidrofusarubina	Citotóxica, antimalárico, anti TB	12
<i>Fusarium</i> sp	NI	Pentahidroxiscirpeno	Citotóxica	13
<i>Fusarium oxysporum</i>	Rhizophora annamalayana	Taxol	Anticâncer	14
<i>Fusarium</i> sp	<i>Piper guineense</i> (Piperaceae).	Beauvericina e fusaproliferina	Citotóxica	15

2 **Legenda:** NA - não avaliada. NI - não identificada. Ref. – Referências. **1** - BARGEN, 2013. **2** - DING; DAHSE; HERTWECK, 2012. **3** - WANG *et al.*, 2011. **4** - CUI *et al.*, 2012. **5** TRISUWAN
3 & RUKACHAISIRIKUL, 2013. **6** – DESHMUKH; MATHEW; PUROHIT, 2014. **7**. ROIG *et al.*, 2014. **8** - KORNSAKULKARN & DOLSOPHON, 2011. **9** - YANG *et al.*, 2011. **10** –
4 HIRAMATSU & MIYAJIMA, 2006. **11**. OLA *et al.*, 2013. **12** – TRISUWAN, 2010. **13**. FRUHMANN & MIKULA, 2013. **14**. ELAVARASI; RATHNA.; KALAISELVAM, 2012. **15**. TATONG
5 *et al.*, 2014.
6

1 **2.5.4. Características e estudos químico e biológico de *Aspergillus* sp.**

2 *Aspergillus* são grupos de fungos filamentosos conhecidos pela sua importância
3 médica e comercial. Algumas espécies são patogênicas e apresentam perigo para
4 pacientes imunocomprometidos. Este gênero de fungo se reproduz de forma assexuada e
5 sexuada. Uma das espécies mais conhecidas desse gênero é o *A. fumigatus*, devido sua
6 patogenicidade (SUMMEBELL, 1998; SANCHEZ & SOMOZA, 2012).

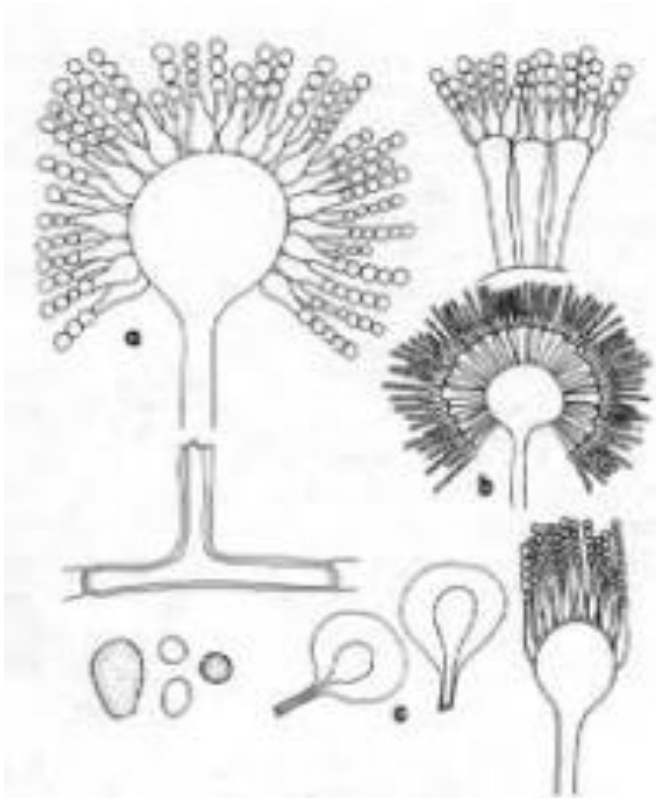
7 Os fungos do gênero *Aspergillus* têm sido subdivididos baseados em sua
8 morfologia, coloração conidial e mais recentemente pelos perfis de DNA e Químico.
9 Este gênero é caracterizado pela produção de um grande número de pequeno
10 conidiosporos, secos e unicelulares originados a partir de fiálides dispostas na vesícula
11 de um conidióforo (Figura 8), são frequentemente não septados e mais grosso que o
12 micélio, originando-se de uma “célula pé” (DEZOTTI, 1990).

13 Diversos gêneros de fungos filamentosos como no caso dos *Aspergillus*
14 constituem uma valiosa fonte de metabólitos secundários bioativos que podem levar a
15 descobertas de novos fármacos.

16 A tabela 7 apresenta a relação de alguns estudos recentes que levaram ao
17 isolamento, identificação e avaliação de atividade biológica de várias espécies de
18 *Aspergillus*.

19

1



Fonte: website.nbm-mnb.ca

2 **Figura 8.** Corpo de frutificação de *Aspergillus*.

Tabela 7. Exemplos de metabólitos produzidos e isolados de *Aspergillus* spp.

Espécie	Hospedeira	Substância	Atividades	Ref.
<i>A. versicolor</i>	<i>Anthocidaris crassispana</i>	Anticolorina B, C e D	Citotóxica	1
<i>A. flavipes</i>	Casca do arroz (Egito)	Ergosterol, Aspulvinona, ácido 6-metilsalicílico, 4,4' dihidroxipulvinona	Antimicrobiana	2
<i>A. terreus</i>	<i>Sinularia kavarattiensis</i>	Aspernolides A	Citotóxica	3
<i>A. tubingensis</i>	<i>Fallugia paradoxa</i>	Malformina A	Citotóxica	4
<i>A. versicolor</i>	<i>Sargassum thunbergii</i>	Brevianamida M, 6,8-di-O-Metilaverufina e, 6-O-Metilaverufina	Antimicrobiana e Citotóxica	5
<i>A. tamarii</i>	<i>Ficus carica</i> L.	Dicetopiperazina indolil (fumitremorgina B e C)	antifitopatogênica	6
<i>A. wentii</i>	<i>Gymnogongrus flabelliformis</i>	Yicatina B e C	Antimicrobiana	7
<i>Aspergillus</i> sp.	NI	Tropolactonas A, B e CD	Citotóxica	8
<i>A. sydowii</i>	<i>Scapania ciliata</i> S. Lac	Emodina, questina	Imunossupressora	9
<i>Aspergillus</i> sp	<i>Peltigera elisabethae</i> var. <i>mauritzii</i> .	Violaceo I e II	Anti A β ₄₂	10
	Água do mar	Asperbifenil e Asperxantona	Virus mosaico do tabaco -TMV	11
<i>A. wentii</i>	Alga marron <i>Sargassum</i>	Lactonas tetranorditerpenoides	Antimicrobiana, citotóxica	12
<i>A. wentii</i>	Alga marron <i>Sargassum</i>	Metil 4(3,4-dihidroxibenzamida)butanoato (2), 5-O-metilsulocina (3), metil 2-(2,6-dimetoxi-4-metilbenzoil)-3,5dihidroxibenzoato (4), metil-2-(2,6-dihidroxi-4-metilbenzoil)-3-hidroxi-5-metoxibenzoato (5) fisciona (6), ácido 4-(3,4dihidroxibenzamido)butanoico	Antioxidante	13
<i>A. flavipes</i>	<i>Acanthus ilicifolius</i>	Butirolactona aromática	Antimicrobiana e antibiofilme	14

Legenda: NA - não avaliada. NI - não identificada. Ref. – Referências. **1.** NAKANISHI *et al.*, 2013. **2.** NAGIA & EL-METWALLY., 2012. **3.** PARVATKAR *et al.*, 2009. **4.** ZHAN *et al.*, 2007. **5.** MIAO *et al.*, 2012. **6.** ZHANG *et al.*, 2012. **7.** SUN; R-R. *et al.*, 2012. **8.** CUETO *et al.*, 2006. **9.** SONG *et al.*, 2013. **10.** HUAN ZHAO *et al.*, 2014. **11.** WU; OUYANG; TAN, 2009. **12.** SUN, H-F. *et al.*, 2012. **13.** XIN LI *et al.*, 2014. **14.** BAI *et al.*, 2014.

2.6. Herbicidas naturais

O uso indiscriminado de herbicidas sintéticos, nas últimas décadas, causou aumento na incidência de resistência das espécies daninhas e consequentes danos à saúde animal, humana, além de causar poluição ambiental (SANTOS & VARAVALLO, 2011). Sendo assim, a busca por soluções alternativas para substituir o uso dos defensivos agrícolas químicos, levou o interesse de pesquisadores em conhecer melhor os herbicidas naturais, denominados aleloquímicos.

Aleloquímicos são metabólitos secundários produzidos por plantas e micro-organismos, que influenciam de maneira a estimular ou a inibir, o crescimento e o desenvolvimento de sistemas biológicos naturais (LIMA, 2011).

Desde os trabalhos pioneiros da década de 40, numerosos bioensaios, baratos e de fácil execução, têm sido desenvolvidos e utilizados para verificar a possível atividade alelopática de substâncias puras, extratos e frações. O ensaio mais comumente utilizado é aquele onde se coloca sementes para germinar em placas de Petri, com papel de filtro como suporte. A semente mais usada, dentre outras é a da alface, *Lactuca sativa*, de fácil germinação e alta sensibilidade (SANTOS & MORAES, 2011).

2.6.1. Potencial herbicida de metabólitos de Fungos Endofíticos

A busca por novos agentes agroquímicos tem encontrado nos produtos naturais originados de plantas e micro-organismos, fontes alternativas de interesse econômico e ecológico (SANTOS; OLIVEIRA; GUILHON, 2008).

Dentre os produtos naturais, atualmente destaca-se os metabólitos fungos endofíticos, que além de exercerem diversas funções de importância para o hospedeiro estão entre os produtos naturais como fontes potenciais de ação biológica por atuar no biocontrole e/ou

promoção de crescimento de plantas, favorecendo a preservação do meio ambiente (SANTOS & VARAVALLLO, 2011).

Estudos revelaram que oito substâncias isoladas do extrato do meio micelial de *Edemia gomezpompae*, um fungo endofítico associado a *Amaranthus hypochondriacus*, com atividades alelopática, são elas: palmarumicinas (2, 3 e 6), pressumerinas (4, 7 a 9) e um esteróide (ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one) (Figura 9), com inibição da germinação das sementes e do comprimento radicular das espécies *A. hypochondriacus* (grão nutritivo), *Solanum lycopersicum* (tomate), e *Echinochloa crusgalli* (capim), com valores de IC_{50} de < 200 mg mL⁻¹ (MACÍAS-RUBALCAVA *et al.*, 2014).

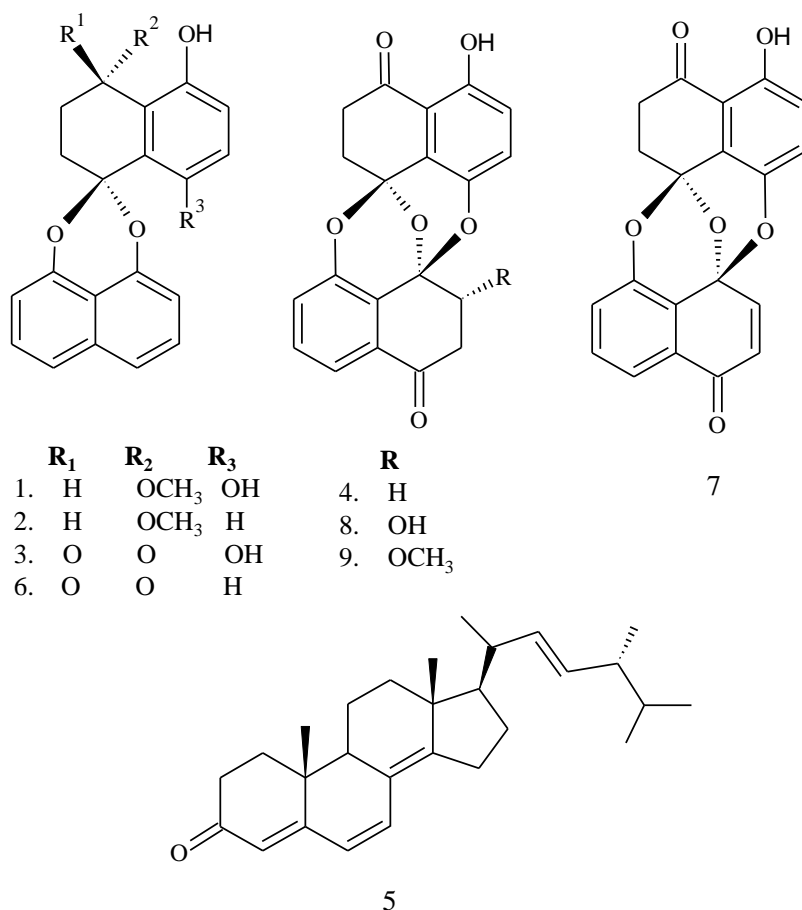


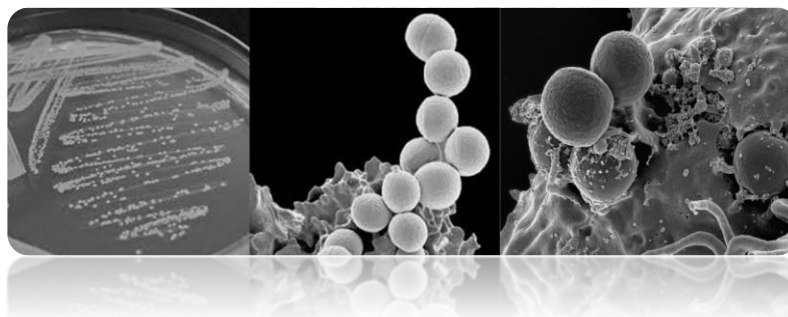
Figura 9. Substâncias isoladas de *Edemia gomezpompae* com potencial herbicida.

2.7. Micro-organismos patogênicos usados nos ensaios antimicrobianos

2.7.1. Gênero *Staphylococcus*

Staphylococcus aureus é um patógeno humano frequentemente encontrado na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. O Gênero possui 33 espécies, dos quais 17 fazem parte da microbiota da pele humana normal e de outros sítios anatômicos de onde podem ser isolados. *S. aureus* é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos Gram-positivos, significativo, que causa um amplo número de doenças sistêmicas letais. *S. aureus* foi descrita pela primeira vez por Alexandre Ogston em 1880, isolada de procedimento cirúrgico e atualmente é um dos micro-organismos mais comuns nas infecções em todo o mundo (SANTOS *et al.*, 2007; INGRAHAM & CATHERINE, 2010).

O nome *Staphylococcus* vem do grego e significa “cocos” semelhante a uvas (Figura 10). Este nome é apropriado, porque a disposição celular destes cocos assemelha-se a um cacho de uvas (SILVA; YANAGUITA; ARAUJO, 1992).



Fonte: www.iessierrasur.es; Methicillin-resistant_Staphylococcus_aureus

Figura 10. Estriamento em placa de Petri e microscopia eletrônica de *S. aureus*.

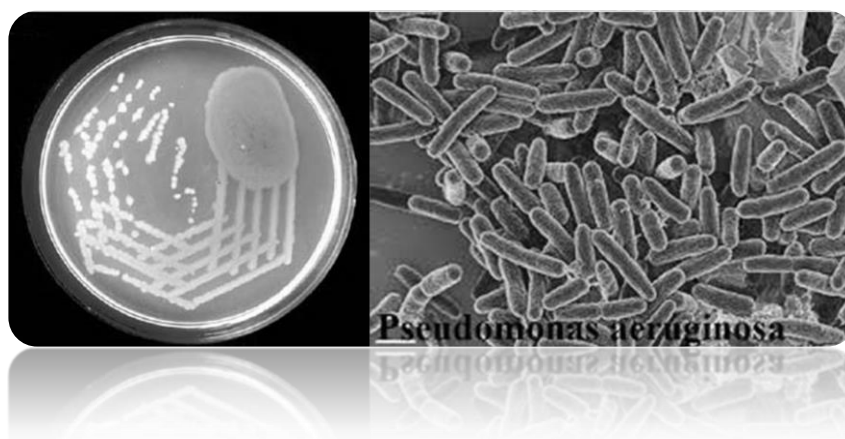
S. aureus é uma das espécies de maior interesse médico por estar frequentemente relacionada com diversas infecções das mais simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite e outras. *S. aureus* foi uma das primeiras bactérias a serem controladas com a descoberta dos antibióticos, mas devido à sua enorme capacidade de adaptação e resistência, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (SANTOS *et al.*, 2007).

2.7.2. Gênero *Pseudomonas*

A família Pseudomonadeaceae é uma mistura complexa de patógenos oportunistas de vegetais, animais e humanos. As *Pseudomonas* são organismos ubíquo encontrados no solo, matéria orgânica em decomposição, vegetais e água. Também são infelizmente, encontradas em todo o ambiente hospitalar, em reservatórios úmidos, como alimentos, pias, sanitários, esfregões e equipamentos de tratamento respiratório.

As *Pseudomonas* possuem vários fatores estruturais e toxinas que as tornam resistentes aos antibióticos mais comumente usados. No entanto as infecções por *Pseudomonas* são oportunistas, restritas a pacientes com imunidade baixa, por exemplo: com infecções pulmonares, de ouvido, queimaduras e outros (SILVA; YANAGUITA; ARAUJO, 1992).

O gênero *Pseudomonas* conta com 212 espécies e 18 subespécies, dentre elas *Pseudomonas aeruginosa* que se apresenta na forma de bastonetes de 0,5 a 0,8 μm de largura por 1,5 a 3,0 μm de comprimento (Figura 11). É um bacilo gram negativo, aeróbio, não-esporulado, não-fermentador de glicose e móvel devido à presença de um flagelo polar. As células de *P. aeruginosa* podem ser visualizadas ao microscópio como isoladas, aos pares ou em cadeias curtas (FERREIRA & LALA, 2010).



Fonte: www.jaypeejournals.com

Figura 11. Estriamento em placa de Petri e microscopia eletrônica de *P. aeruginosa*.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Contribuir com o conhecimento dos microrganismos endofíticos da Amazônia, através de estudos químicos e biológicos de fungos endofíticos associados a uma espécie de *Gustavia* sp. coletada no estado do Amazonas.

3.2. Específicos

- Isolar fungos endofíticos dos tecidos de *Gustavia* e identificar quanto ao gênero;
- Conservar os fungos isolados em condições viáveis para compor a micoteca do grupo GEMMA;
- Submeter a ensaios antimicrobianos, citotóxicos e alelopáticos extratos de linhagens representantes dos gêneros ou grupos de fungos endofíticos isolados;
- Identificar por técnicas morfológicas e moleculares as espécies das linhagens de fungos selecionadas para o estudo químico;
- Isolar e identificar por técnicas cromatográficas, espectrométricas (EM) e espectroscópicas (RMN 1D e 2D) metabólitos secundários das linhagens que apresentarem os melhores resultados nos testes de atividade biológica.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Coleta do material botânico

Os materiais botânicos, folhas, galhos, caule e raiz, da *Gustavia* sp. foram coletados na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), localizada no km 38 da BR-174, no estado do Amazonas, de coordenadas geográficas: 02° 30' 40.9" S e 60° 02' 56.9" O.

No local de coleta, os materiais botânicos foram lavados com água estéril e armazenados em sacos plásticos. Em seguida foram transportados para o Laboratório de Química e Microrganismos do Grupo de Estudo em Espectrometria de Massas e Microrganismo da Amazônia – GEMMA, da UFAM.

4.2. Isolamento e purificação dos microrganismos

Para os procedimentos de isolamentos dos microrganismos foram preparadas soluções de antibióticos e meios de culturas descritos abaixo.

4.2.1. Soluções utilizadas na esterilização e inoculação do material botânico

- Solução de etanol 70 %;
- Solução de hipoclorito de sódio a 3 %;
- Solução de hipoclorito de sódio a 4 % ;
- Solução de fluconazol – solubilizar comprimido de 200 mg em água estéril, para uma concentração de 50 mg.mL⁻¹;
- Solução de amoxicilina ou amplicilina - solubilizar uma cápsula (500 mg) em água estéril, para uma concentração de 50 mg.mL⁻¹;
- Solução de tetraciclina - solubilizar uma cápsula (500 mg) em álcool 70 % e água estéril (1:1), para uma concentração de 50 mg.mL⁻¹.

4.2.2. Preparo dos Meios de culturas

a) ISP2– para 1 L de água destilada, usar: 4,0 g de extrato de levedura, 4 g de dextrose, 10 g de amido e 10 g de extrato de malte.

b) AVEIA- para 1 L de água destilada, usar: 10 g de AVEIA, 10 g de malte, 4 g de extrato de levedura e 4 g de dextrose.

c) Batata Dextrose e Ágar (BDA) – para 1 L de água destilada, usar: 200 g de batata, 20 g de dextrose, 2 g de extrato de levedura e 15 g de ágar.

d) CY (Czapek yeast autolysate) - inicialmente preparou-se 100 mL da solução concentrada de Czapek pela dissolução de: 30 g de NaNO_3 , 5 g de KCl , 5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água destilada. Desta solução foram utilizados 10 mL para preparar 1 L de meio de cultura, acrescentando mais 1,0 g de K_2HPO_4 , 5,0 g de extrato de levedura e 30 g de dextrose avolumando-se para 1 L com água destilada.

Os meios de culturas foram autoclavados por 15 min. a 120 °C.

4.2.3. Isolamento dos micro-organismos

Cada material botânico foi, selecionado e lavado com água corrente em abundância para remover as impurezas superficiais e o excesso dos epifíticos. Em seguida, foram fragmentado e imersos nas soluções: **I.** álcool a 70 %; **II.** Hipoclorito a 3 % ou 4 % por 3 a 4 min (Tabela 8); **III.** Álcool a 70 % e **IV.** água destilada estéril. Da solução **IV** foi retirada uma alíquota de 50 µL para controle da esterelização. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar (SOUZA, 2006).

Adição do antibiótico ao meio de cultura:

- Para cada 1 L dos meios de culturas ISP2, AVEIA e BDA, foi adicionado 1 mL de cada uma das soluções antibiótico ampicilina (A) e tetraciclina (T);
- Para cada 1 L dos meios de culturas AVEIA e ISP2, foi adicionado 1mL de cada uma das soluções, cetoconazol (CT) e T.

Tabela 8. Tempo de imersão dos tecidos vegetais nas soluções de hipoclorito.

Tecidos Vegetais	[] Solução II	Período (min)
Casca da raiz	4 %	4
Casca do caule		
Casca dos galhos		
Caule	3 %	3
Folha		
Galhos		
Raiz		

Em condições estéril, no fluxo laminar foi transferido 25 mL de meio de cultura para cada placa de Petri, estas foram inoculadas com 4 fragmentos dos tecidos vegetais na forma de matriz (2 × 2), e monitorada nas temperatura 18, 26 e 32 °C em incubadora de DBO por 15 dias. A Figura 12 apresenta de forma resumida o esquema analítico para isolamento dos micro-organismos.

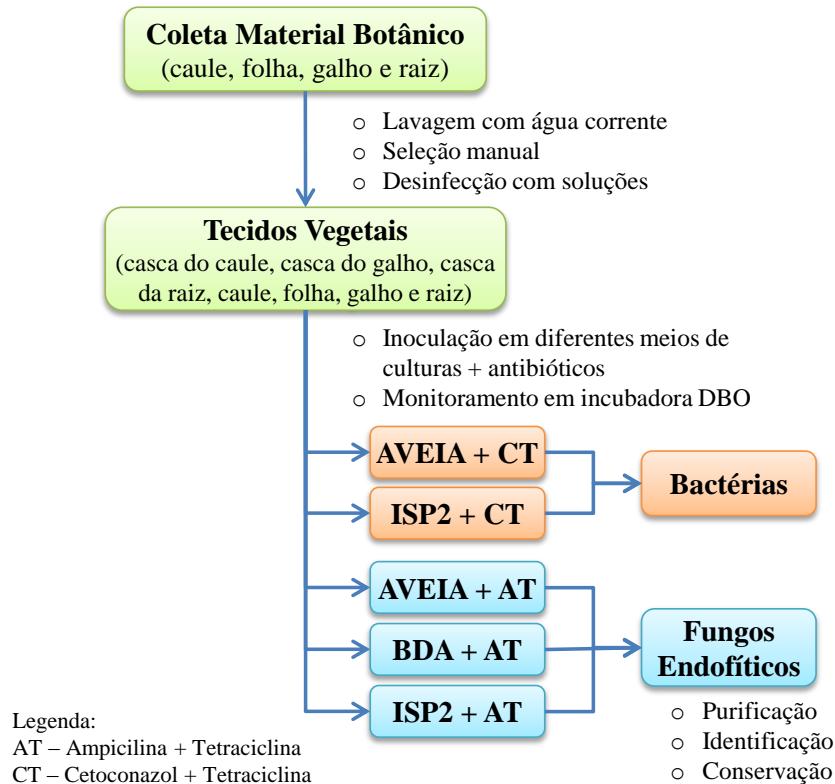


Figura 12. Esquema analítico das etapas de isolamento dos endofíticos de *Gustavia* sp.

As placas contendo os fragmentos foram monitoradas diariamente, após crescimento foi iniciado a etapa de purificação por repiques sucessivos e transferência das cepas para outras placas (Figura 13), com ou sem antibiótico, por técnicas de microcultivo e/ou por cultura monospórica (cultivo através de um único esporo), até obtenção das linhagens puras.

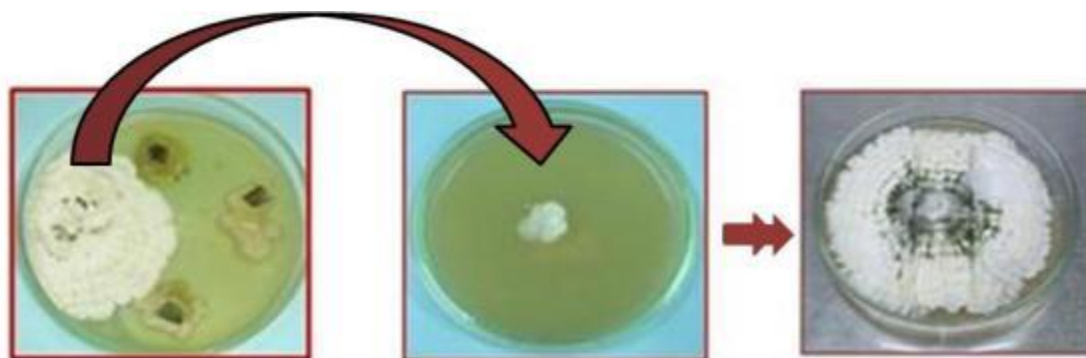


Figura 13. Resumo dos procedimentos para uma das formas de obtenção de linhagens puras de fungos endofíticos.

4.3. Identificação e conservação dos fungos endofíticos de *Gustavia* sp.

A identificação à nível de gênero foi feita por agrupamento macromorfológico através da observação característica de cada indivíduo, tais como: aspecto, forma, coloração e consistência das colônias. Para visualização das estruturas microscópicas foram confeccionadas lamínulas com microcultivo, utilizando corante azul de lactofenol (blue cotton) sobre as lâminas de microscopia. As imagens foram ampliadas de 200 a 400 vezes, e comparadas com as imagens de literaturas especializadas (GUERRERO & SILVEIRA, 2003; KIFFER & MORELET, 1999; BONONI, 1998; GILMAR, 1959).

As linhagens de fungos endofíticos de *Gustavia* sp. isoladas, foram identificadas (à nível de gênero), purificadas e conservadas em cinco formas distintas, para compor a micoteca do GEMMA.

4.4. Fermentação em pequena escala para obtenção dos extratos

Foram selecionadas 21 linhagens representativas dos diferentes grupos de fungos isolados de *Gustavia* sp. As linhagens foram cultivadas em erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL dos respectivos meios de culturas em que foram isolados. Em cada erlenmeyer foi inoculado com cinco fragmentos de cada fungo, colocados sob agitação a 120 rpm, em aparelho de Shaker.

A temperatura e o período de cultivo ideal foram estabelecidos conforme as necessidades fisiológicas de cada grupo de fungo. As amostras foram preparadas em triplicata, incluindo a amostra controle.

Após o período de cultivo das linhagens, que variou de 15 a 21 dias, conforme as características de cada linhagem, foi verificado o pH dos controles e dos líquidos fermentados, em seguida estes foram filtrados e transferidos para frascos âmbar de 1 L, com tampa. Os filtrados foram recobertos com 100 mL de acetato de etila (AcOEt), identificados e armazenados em geladeira para serem submetidos a extração por partição.

Foram obtidos os extratos tanto do meio micelial quanto do líquido fermentado, para estudo químico. O líquido fermentado foi submetido à partição em duas etapas, sendo a primeira com AcOEt, seguido da mistura de AcOEt/Isopropanol (iPr-OH) 7:3 volume/volume (V/V) (Figura 14). Estes extratos foram codificados como extratos **E1** e **E2**, respectivamente.

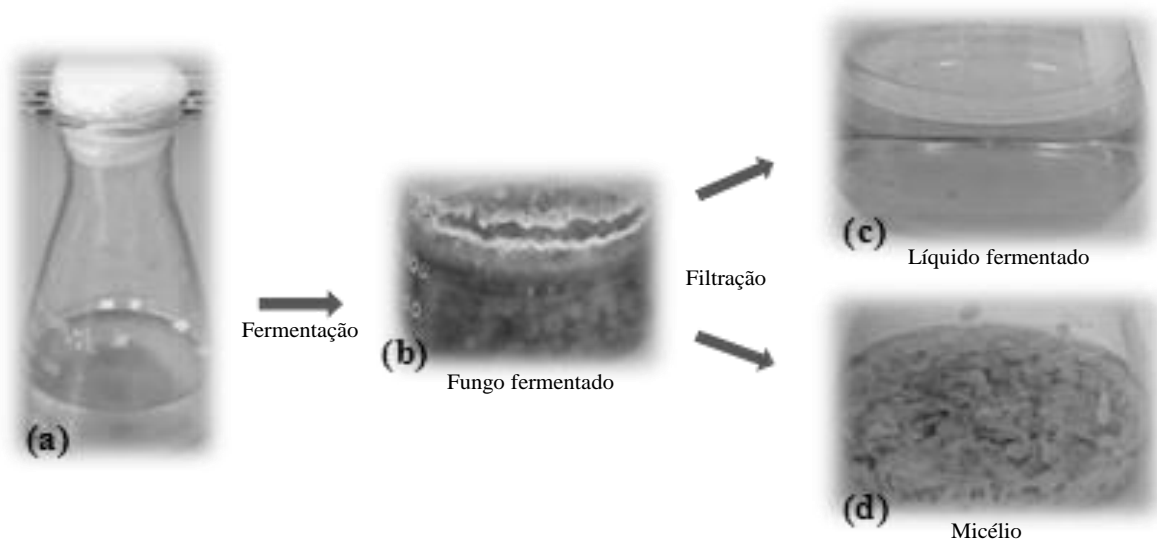


Figura 14. Fermentação em pequena escala: (a) inóculo no meio de cultura líquido; (b) meio de cultura fermentado; (c) líquido fermentado filtrado e (d) maceração do micélio.

Os micélios foram submetidos à extração por maceração com etanol (EtOH), após 24 h com metanol (MeOH). Os extratos foram reunidos e filtrados em funil de Buchner, identificados e armazenados em geladeira para serem concentrados. Os extratos do micélio foram codificados como extrato **E3**.

Todos os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo – Tecnal®, sob pressão reduzida com bomba de vácuo e mantidos em dessecador com sílica ativada ou armazenados em geladeira, aguardando outros procedimentos.

De cada linhagem foram obtidos três extratos (E1, E2 e E3), estes foram submetidos a ensaios de atividade antimicrobiana, citotóxica e alelopática. A Figura 16 apresenta de forma resumida a obtenção dos extratos de fungos em pequena escala.

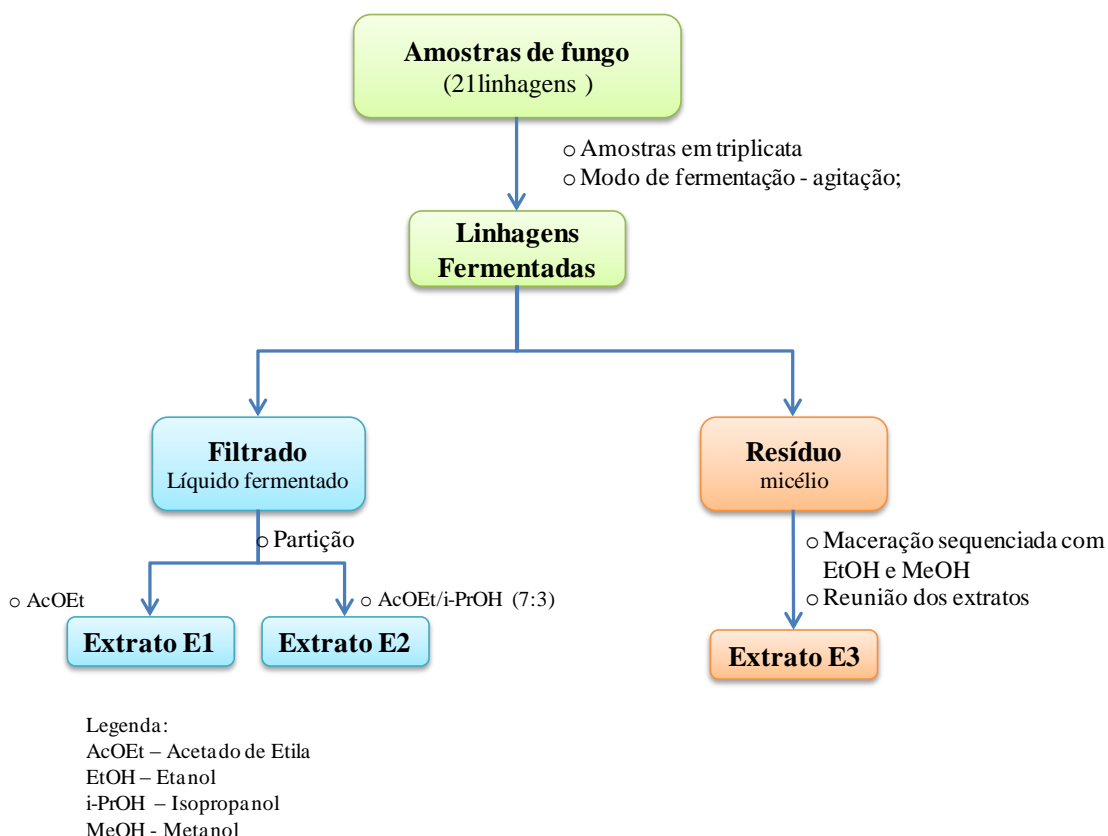


Figura 15. Esquema analítico para obtenção dos extratos de 21 linhagens de fungos endofíticos de *Gustavia* sp. para ensaios biológicos.

4.5. Teste de atividades biológicas

4.5.1. Teste de atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados no laboratório de Genética Aplicada a Saúde e a Biotecnologia da Universidade Estadual do Amazonas – UEA, conforme recomendação do US National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 1997. Os patógenos *C. albicans* (CFAM 1132), *S. aureus* (CBAM 026) e *P. aeruginosa* (CBAM 02450), foram cedidos da Coleção Biológica da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ – AM). As bactérias foram reativados em placas de Petri contendo Ágar Brain Heart Infusion (BHI) e *C. albicans* em Ágar Sabouraud (Sb), para depois serem repicadas para os mesmos meios de culturas líquidos respectivamente.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, estas foram preenchidas com: (i) 100 µL do meio de cultura na concentração dobrada (para levedura - Sb, para as bactérias -

BHI); (ii) 100 µL da solução da amostra e (iii), 5 µL da suspensão de células dos patógenos a serem avaliados (bactéria, $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) e (levedura, $4,5 \times 10^6$), seguido de incubação a 37 °C (24 h). As amostras (extratos e frações) foram solubilizadas na solução H₂O/dimetilsulfóxido (DMSO), a 9:1.

As soluções controles (Fluconazol, Ampicilina e tetraciclina) foram preparadas na mesma concentração das amostras, ou seja, 2 mg.mL⁻¹. Para controle negativo foi usado a solução em que as amostras foram solubilizadas.

A atividade de antibiose foi registrada conforme a mudança de coloração nos poços depois da adição de 10 µL dos reveladores. Para bactéria foi usado cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio - TTC a (2,0 % em água estéril), para levedura foi usado Nitro azul de tetrazólio – NBT a (1 % em etanol 70 %).

4.5.2. Teste de atividade citotóxica *in vitro*

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (UFC). Nos experimentos foram avaliados amostras de extratos, frações e substâncias em períodos distintos. Estas foram avaliadas contra as linhagens de células tumorais de **HL60** (leucemia-humano); **SF-295**(glioblastoma-humano) e **MDA-MB435** (melanoma-humano), **HCT116** (côlon retal) e **OVCAR-8** (ovário), cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA).

As amostras foram solubilizadas em DMSO na concentração estoque de 10 mg. mL⁻¹ e avaliadas pelo método do MTT (MOSMANN, 1983). As células foram distribuídas em placas com 96 poços nas seguintes densidades: $0,1 \times 10^6$ para **HL60**, **MDA-MB435**, **HCT116** e **OVCAR-8** e $0,7 \times 10^5$ para **SF-295**. As placas foram incubadas por 72 h em estufa com 5 % de CO₂ a 37 °C. Para cada ensaio, as amostras foram avaliadas em triplicata em dois experimentos independentes, nas concentrações, 50 µg mL⁻¹ para os extratos, 5 µg mL⁻¹ para frações e de (0,010 - 5 µg mL⁻¹) para substância. A Doxorrubicina

foi utilizada como controle positivo e para controle negativo o DMSO. As absorbâncias foram obtidas com o auxílio de um espectrofotômetro de ultravioleta para leitura de microplaca a 595 nm.

Foram realizados três experimentos, no primeiro foram avaliadas 49 amostras de extratos brutos, no segundo experimento foram avaliadas 32 frações e no terceiro experimento foram avaliadas três amostras. Em cada experimento foram utilizadas três ou quatro das seguintes células tumorais de **HL60** (leucemia - humano), **SF-295** (glioblastoma - humano), **MDA-MB435** (melanoma - humano); **HCT116** (côlon - humano), **SF-295** (glioblastoma - humano) e **OVCAR-8** (ovário - humano).

Os potenciais citotóxicos das amostras foram avaliados conforme a escala de intensidade e o crescimento celular que variou de 1 a 100 %, identificada como: sem atividade (**SA**), de 1 a 49,9 % pouca atividade, (**PA**); de 50 a 74,9 % atividade moderada (**MO**) e de 75 a 100 % alta atividade (**AA**).

4.5.3. Teste de atividade alelopática

A avaliação da atividade alelopática foi realizada com 21 amostras entre extratos e frações com metodologia adaptada de LIMA e colaboradores (LIMA *et al.*, 2011). As amostras foram solubilizadas em água para concentração final de 1 mg. mL⁻¹. Foram utilizadas placas de plástico de 90 mm de diâmetro, contendo 2 papéis de filtro Whatman n° 1, de 90 mm, umedecido com 3 mL das soluções testes e controle (água destilada). Cada placa foi semeada com 20 sementes de *Lactuca sativa* Var. *grands rapids* L (alface) da marca Isla, na forma de matriz de 4 × 5 sobre os papéis de filtro.

Os ensaios foram realizados em quintuplicata, as placas de Petri foram vedadas com filmito, incubadas em uma Câmara de Geminação da FANEM, modelo 247, mantidas sob iluminação com lâmpadas fluorescentes por 12 h, a 25 °C durante 5 dias. Em seguida as placas foram abertas para medir o comprimento total da raiz e comprimento da parte aérea.

Foram consideradas ativas as amostras que causaram inibição do crescimento das sementes e as que tiveram o crescimento além do controle, sendo que a atividade alelopática está relacionada com a inibição do crescimento. Os comprimentos da raiz e parte aérea foram registrados e analisados estatisticamente.

4.6. Extração do DNA para identificação das espécies dos fungos

As amostras de DNA dos fungos das linhagens **400, 447, 401 e 455** foram obtidas com auxílio do kit de extração - Life Science unlimetd - InnuPREP Plant DNA Kit.

Para a extração das amostras de DNA seguiram-se as seguintes etapas: **(i)** inoculação e fermentação dos fungos no meio de cultura (BD) por 24 h; **(ii)** separação do micélio por filtração em funil de Buchner com papel de filtro estéril; **(iii)** trituração do micélio em nitrogênio líquido, com auxílio de gral de ágata e pistilo. A partir deste ponto da pesquisa utilizou-se o kit de extração InnPREP Plant DNA, com pequenas modificações ao protocolo do fabricante. **(v)** 120 a 180 mg de cada amostra foram adicionados em tubos de 2 mL e adicionados os reagentes: Lises SLS (400 µL) e Proteinase K (25 µL). Em seguida, as soluções foram misturadas no Vortex por 5 s e incubadas em banho Maria a 50 °C, por 30 min. Estas foram transferidas para novos tubos de 2,0 mL, contendo colunas de pré-filtragem e centrifugadas por 1 min a 12.000 rpm. As colunas foram descartadas e aos filtrados foi adicionado 200 µL da solução SBS.

As misturas foram transferidas para novos tubos de 2,0 mL, contendo uma coluna do Spin filtro e centrifugadas por 2 min a 12.000 rpm. A coluna foi transferida para um tubo novo e adicionado 500 µL de HS (primeira solução lavagem), seguida de centrifugação por 1 min a 12.000 rpm, e adicionado 750 µL de MS (segunda solução de lavagem), novamente centrifugado por 1 min a 12.000 rpm.

O filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para outro tubo e novamente centrifugada por 2 min. na velocidade máxima do aparelho. A coluna contendo o DNA foi transferida para outro tubo e eluído lentamente com 100 µL de água purificada livre de DNA e deixada por 1 min a temperatura ambiente e novamente, centrifugado por 1 min a 8.000 rpm.

O resultado da extração de cada amostra foi analisado inicialmente em gel de agarose 0,8 %. As amostras continham 3 µl de DNA acrescidos de 3 µl de rede gel preparado com azul de bromofenol. O gel foi corrido em eletroforese, com tampão tris-ácido bórico EDTA (TBE), e observado na luz ultravioleta (260 nm) em aparelho transiluminador, utilizando marcador de massa molecular de 1 Kb da Invitrogen.

4.6.1. Reação de Polimerização em Cadeia - PCR

As amostras foram preparadas em tubos de 200 µL e o mix em tubos de 1.000 µL, utilizando marcador de massa molecular de 1 Kb e “primers” para a região *Its-1* e *Its-2* do rDNA, a qual foram amplificadas em aparelho termociclador, programado para 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 60 min; seguido de anelamento a 55 °C por 60 min e extensão a 72 °C por 40 min.

Os resultados das ampliações foram analisados novamente em gel de agarose 1,5 % como anteriormente citado.

O produto da PCR foi purificado com a enzima Exo SAP (GE) e submetido ao PCR de seqüenciamento e por fim, confrontadas por meio do programa de computador de alinhamento chamado de Basic Local Alignment Search Tool - BLAST, disponível em:<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>, com auxílio do banco de dados de seqüências depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.7. Fermentação das linhagens em escala laboratorial

Nesta etapa dos trabalhos foram obtidos os extratos de quatro linhagens de fungos (400, 401, 447 e 455) e para dar início ao processo de isolamento de metabólitos de amostras complexas é feito uma coluna filtrante do extrato bruto, as frações são analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD) e submetidas a outros fracionamentos, gerando assim, um grande número de amostras que foram analisadas por espectrometria de massas e/ou por LC/MS para isolamento dos metabólitos, para em fim obter os espectros de RMN.

Ao longo dos fracionamentos dos extratos foram gerando um grande número de novas frações. Situação esta que facilmente poderia fugir ao controle. Sendo assim, optou-se em adquirir, de uma grande parte das frações, ainda semi purificadas, os espectros de RMN de ^1H , como forma de selecionar as amostras promissoras. Dessa forma foram adquiridos os espectros de RMN de ^1H de 81 amostras, dentre extratos e frações para uma análise prévia dos sinais. As que apresentavam sinais com multiplicidades bem definidas foram obtidos os espectros de RMN 2D. As que apresentavam sinais pouco definidos foram separadas para serem purificadas por cromatografia de camada delgada preparativa – CCDP.

Como forma de simplificar os códigos e localizar mais rápido os espectros de RMN das amostras, seus códigos foram relacionados em tabelas e receberam um número de ordem (dados não divulgados, apenas como controle). Estas numerações foram mantidas junto aos códigos.

Nos esquemas analíticos de cada extrato foram descritos apenas as frações que deram origem a amostra contendo metabólitos isolados.

4.7.1. Fermentação da linhagem 447

A linhagem 447 de *X. sp.* foi isolada de folha de *Gustavia sp.* do meio de cultura ISP2 (item 4.2.2. Preparo dos Meios de culturas). Para fermentação em escala laboratorial e produção dos extratos, o fungo foi reativado em nove placas de Petri em ISP2 por três

semanas, fragmentado em cerca de 1 mm² e inoculado em 60 frascos erlenmeyers de 1 L contendo 300 mL de meio de cultura ISP2 estéril. Cada frasco foi inoculado com 8 fragmentos, fechados com tampões de algodão e gazes e incubado a 25 °C por 23 dias. Após este período foi registrado o pH do líquido fermentado, em seguida este foi separado do micélio e, em uma tentativa de eliminar o amido precipitado, o líquido fermentado foi filtrado consecutivamente em gazes, algodão ou papel de filtro qualitativo, em funil de Buchner e/ou funil comum, com e sem vácuo.

Dessa forma foram obtidos cerca de 13 L do líquido fermentado que foi armazenado em frasco âmbar e adicionado 100 a 150 mL de AcOEt para evitar contato com o ar, até o momento da extração.

Visando agilizar os procedimentos de extração por partição, devido ao grande volume do líquido fermentado, foi montado um sistema com três funis de separação em série, de forma que 900 mL do líquido fermentado fora extraídos três vezes consecutivas no mesmo solvente, AcOEt, porém no primeiro funil foi adicionado 600 mL do solvente de extração e nos dois últimos 700 mL.

Os extratos em AcOEt foram reunidos, concentrados e identificado como extrato **X1**.

A segunda extração do meio líquido por partição foi feita com a mistura dos solventes AcOEt/i-PrOH(7:3) 700 mL por funil, porém nesta etapa foram utilizados apenas dois funis de separação e o volume do caldo fermentado foi reduzido para 500 mL. Os extratos obtidos foram reunidos, concentrados e identificados como extrato **X2**.

O micélio foi submetido à extração por maceração a frio em períodos sucessivos de 24 h, primeiro com EtOH e em seguida, com MeOH. Os extratos foram reunidos, concentrados e identificados como **X3** e armazenado para procedimentos posteriores.

4.7.1.1. Fracionamento dos extratos da linhagem 447

Os extratos **X1** e **X2** da linhagem 447 tiveram baixos rendimentos. Após análise por CCD com sílica fase normal, usando várias combinações dos solventes hexano (Hex), AcOEt e MeOH, foram reunidos e identificados como **X12** (1,0 mg).

Ao longo do fracionamento de todos os extratos das quatro linhagens de fungos em estudos foram utilizados os mesmos solventes Hex, AcOEt e MeOH, em ordem de polaridade crescente.

O fracionamento do extrato **X12** iniciou por coluna filtrante em sílica gel, sob pressão reduzida, eluída com Hex:AcOEt:MeOH, em gradiente de polaridade crescente, na qual foram obtidas 4 frações: **X12a** (1:1:0), **X12b** (0:1:0), **X12c** (0:9:1) e **X12d** (0:0:1). Após análise por CCD a fração **X12c** (420 mg) foi fracionada por CC (25cm ×1,5 cm) em sílica gel, com os mesmos solventes acima citados em gradiente de polaridade crescente. As 16 frações coletadas foram analisadas por CCD e reunidas por semelhanças, resultando em 12 frações: X12c F1 e X12c F2 em (9:1:0), X12c F3 e X12c F4 em (8:2:0), X12c F5, X12c F6 e X12c F7 em (7:3:0), **X12c F8** e X12c F9 em (1:1:0), X12c F10 e (0:1:0), X12c F11 em (0:9:1), X12c F12 em (0:0:1).

A fração **X12c F8** apresentou um sólido amorfo de coloração bege que foi analisado por CCD, espectrometria de massas e espectros RMN 1D e 2D.

O esquema analítico (Figura16) apresenta de forma resumida as etapas realizadas para isolamento da amostra **X12c F8**.

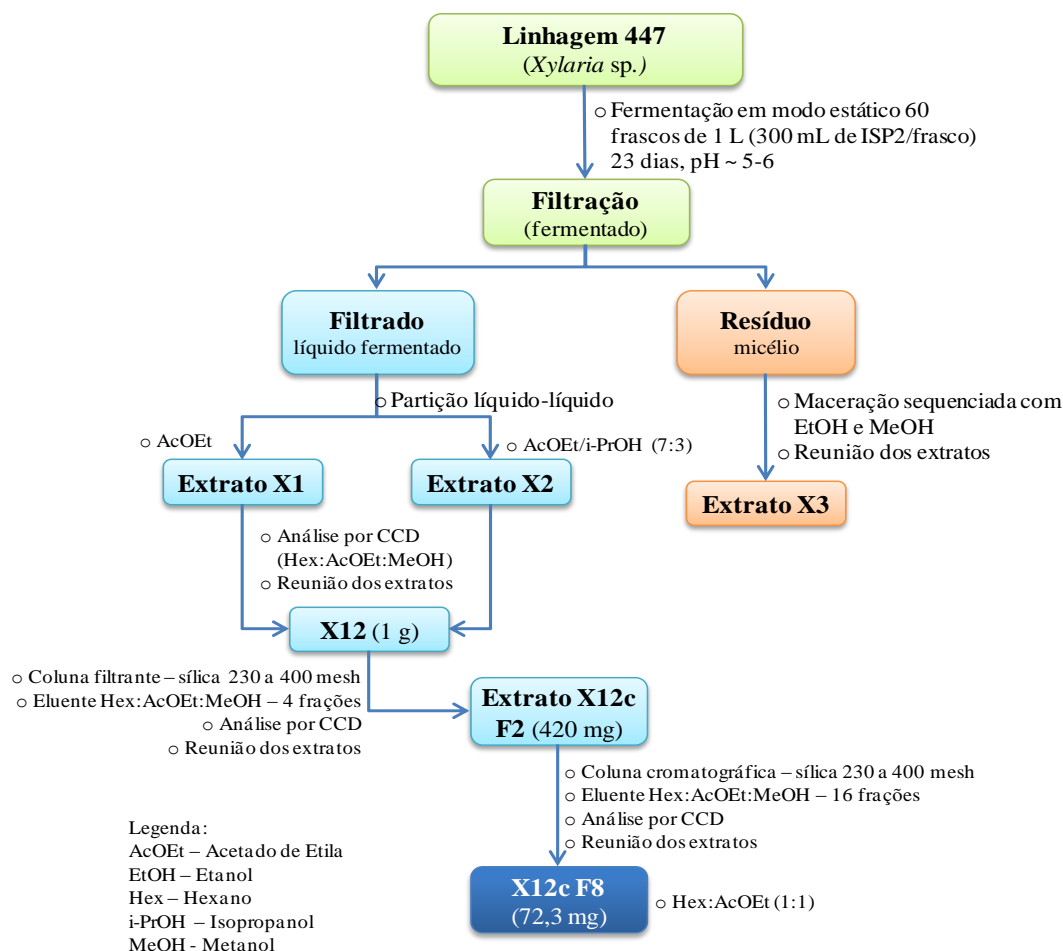


Figura 16. Esquema analítico para obtenção dos extratos e fracionamento da linhagem 447

4.7.2. Fermentação da linhagem 401

A linhagem de 401 foi isolada da casca da raiz de *Gustavia* sp. cultivada no meio de cultura ISP2 (item 4.2.2. Preparo dos Meios de culturas). Esta linhagem foi fermentada em dois meios de culturas distintos, CY e ISP2, relatados a seguir.

4.7.2.1. Fermentação da linhagem 401 no meio de cultura CY

Foram preparados 2,4 mL do meio de cultura CY, (item 4.2.2. Preparo dos Meios de culturas) distribuídos em 13 frascos erlenmeyers de 500 mL (170 mL), mais o controle.

Inoculação – da linhagem 401 foi reativada e cultivada por três semanas em duas placas de Petri com meio de cultura BDA. Uma alçada dos esporos foi transferido para dois tubos de ensaios com água autoclavada. Treze erlenmeyers e o controle foram inoculados

com 50 µL dos esporos em suspensão. Após a incubação no modo estático a 25 °C por 27 dias, o pH do líquido fermentado foi registrado, o micélio foi separado do líquido fermentado, filtrado em funil de Buchner com papel de filtro qualitativo, em sistema de vácuo.

Foram obtidos cerca de 1.900 mL do líquido fermentado que foi extraído em cartucho SPE (*Solid Phase Extration*) - cartucho do tipo seringa de injeção de 60 mL, descartável contendo 10 g fase fixa C18.

Para a extração do líquido fermentado, fez-se primeiro o condicionamento do cartucho SPE com H₂O:MeOH 5 % sob sistema de vácuo. Após o condicionamento, a cada ciclo de extração, cerca de 800 mL do caldo fermentado foi gradativamente filtrado e extraído, sob baixa pressão. Os analitos retidos foram extraídos, primeiro com 60 mL de acetona, seguidos de uma ou duas extrações com 60 mL de MeOH. Os extratos foram reunidos, concentrados e identificados como **PC1** e armazenados em dessecador até o fracionamento.

O micélio foi extraído por maceração por duas vezes a cada 24 h com a mistura EtOH:MeOH (1:1), os extratos foram reunidos, concentrados, identificados como **PC3** e armazenado no dessecador até o fracionamento.

4.7.2.2. Fracionamento do extrato do micélio da linhagem 401 em CY

O extrato **PC3** (1,4 g) da fermentação do micélio em CY foi solubilizado em água, ajustado o volume para 5 % de MeOH e submetido a procedimentos de partição líquido-líquido com Hex:AcOEt (8:2) e extraído por duas vezes consecutivas. Os extratos foram reunidos, concentrado em rota evaporador e identificado como **PC3a** (509,7g). Após análise por CCD, o extrato **PC3a** foi fracionado por coluna cromatográfica aberta com os solventes Hex:AcOEt:MeOH, em gradiente de polaridade crescente. Foram obtidas 14 frações, que

foram analisadas por CCD e reunidas conforme as semelhanças. A partir dessas análises foram feitos outros fracionamentos, obtendo assim, as quatro amostras a seguir.

- As frações de 1 a 3 foram reunidas, (337,9 mg) e submetidas a um novo fracionamento que resultou em sete novas frações. A **fração 2** (78,9 mg), obtida da eluição em Hex:AcOEt (9:1), foi identificada como **PC3a F2 (71)**, analisada por CCD.
- As frações 8 e 9, foram reunidas (70,0 mg) e purificada por HPLC preparativa, em coluna C18 (Phenomenex) 250 mm × 15 mm, com os solventes MeOH/H₂O (7:3), que resultou em duas frações identificadas como **PC3a F8 (1)**(2,7 mg) e **PC3a F8(2)**(0,5 mg), obtida em MeOH 100 %.
- As frações 11 e 12 foram reunidas, (39,9 mg) e submetidas a um novo fracionamento, que resultou em quinze novas frações. As frações de **10 a 13** obtidas a partir da eluição em Hex:AcOEt (7:3 a 1:1) foram reunidas e identificadas como **PC3aF10,13(81)**(3,1 mg), analisada por CCD.

O esquema analítico (Figura 17) apresenta, de forma resumida, as etapas realizadas para isolar as amostras **PC3a F2 (71)**, **PC3a F8(1)**, **PC3a F8(2)** e **PC3a F10,13 (81)**.

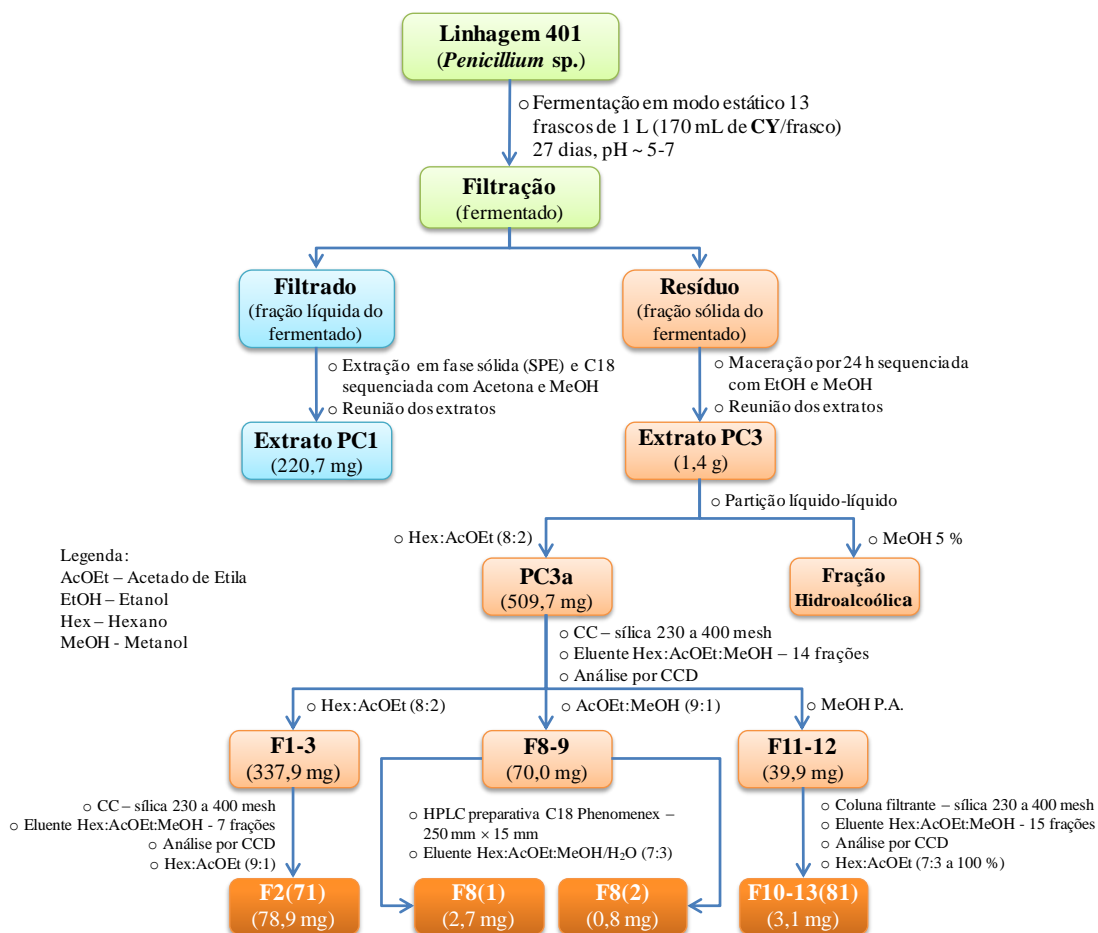


Figura 17. Estudo químico do extrato PC3 da linhagem de 401 fermentado em CY.

4.7.3. Fermentação da linhagem 401 no meio de cultura ISP2

A linhagem 401 foi reativada em 6 placas de Petri por três semanas. Os esporos foram raspados e transferidos para tubos criogênicos contendo água estéril e glicerol a 15 %. Cinquenta microlitros (50 µL) da suspensão de esporos foi inoculada em 51 frascos erlenmeyers de 1 L, contendo 300 mL do meio de cultura líquido ISP2. Estes foram fechados com tampões de algodão e gazes, incubados a 25 °C por 17 dias. O pH do líquido fermentado foi registrado, o micélio foi separado do líquido fermentado e filtrado consecutivamente em gazes, algodão, papel de filtro qualitativo em funil de Buchner em sistema de vácuo.

Foram obtidos cerca de 12,6 L do líquido fermentado que foi armazenado em frascos âmbar, aos quais adicionou-se 5 % de MeOH, para evitar um novo crescimento de fungo, até o momento da extração.

Para extração por partição líquido-líquido iria ser utilizado cerca de 3 L de solvente AcOEt. Assim, com o objetivo de reduzir o volume do solvente AcOEt usado nos procedimentos de extração por partição, fez-se a substituição desse método para extração em fase sólida, SPE contendo 10 g fase fixa C18.

Para a extração do líquido fermentado, fez-se primeiro o condicionamento do cartucho SPE com H₂O:MeOH 5 % sob sistema de vácuo. Após o condicionamento, cerca de 1 L do caldo fermentado foi gradativamente filtrado e extraído com 60 mL de acetona, seguidos de uma ou duas extrações com 60 mL de MeOH. Os extratos foram reunidos, concentrados e identificados como **PII** e armazenados em dessecador até o fracionamento.

Para obtenção do extrato do micélio do meio de cultura ISP2 foram seguidos os mesmos procedimentos para obter os extratos dos micélios das linhagens anteriormente descritas, o qual foi identificado como **PI3** e armazenado em dessecador até o fracionamento.

4.7.3.1. Fracionamento dos extratos da linhagem 401 fermentada em ISP2

O extrato **PII** foi analisado por CCD em sílica gel com várias combinações dos solventes Hex:AcOEt:MeOH, após análise por CCD foi submetido a uma coluna filtrante em sílica gel, sob pressão reduzida, em gradiente de polaridade crescente. Foram geradas 3 frações: **L1** em (1:1:0), **L2** em (0:9:1) e **L3** em (0:0:1). Após analisadas por CCD, a fração **L2** foi novamente fracionada em coluna cromatográfica aberta, com os mesmos solventes, gerando nove frações identificadas como **L2a** (8:2:0), **L2b** (7:3:0), **L2c** (6:4:0), **L2d** e **L2e** (1:1:0), **L2f** (0:1:0), **L2g** (0:9:1), **L2h** e **L2i** (0:0:1) . Foram adquiridos os espectros de RMN

de ^1H de todas as amostras para análise, porém somente da amostra **L2c** (46) (5,2 mg) foram adquiridos os espectros de 2D.

A amostra **L2e** (48) (7,9 mg) foi analisada por LC/MS, no qual foi usada coluna Luna C18 (fase reversa), 5 μ , tamanho 150 mm \times 4,60 mm – Phenomenex, com eluentes: MeOH (A) grau HPLC e água (B) Milli-Q com 1 % de ácido fórmico (HCOOH), com gradiente de eluição de MeOH:H₂O (1:1), por 30 min. iniciando com (A) a 100 % até 50 %, aguardando um tempo de 15 min. para estabilização da coluna. As análises foram feitas com fluxo de 1 mL.min⁻¹, com injeção contínua.

Como os extratos de micélio dos fungos contém bastantes polissacarídeos como produto da parede celular, para o fracionamento do extrato **PI3**, optou-se em submeter parte dele a procedimento de extração por partição com AcOEt.

Sendo assim, o extrato **PI3**(4,14 mg) foi solubilizado em água com MeOH 5 % e particionado com AcOEt. Após seco o extrato **PI3**(1,44 mg) foi submetido análise por CCD de sílica gel com várias combinações dos solventes Hex:AcOEt:MeOH e submetido a uma coluna filtrante em sílica gel, eluída sob pressão reduzida, com gradiente de polaridade crescente. Foram geradas 4 frações: **PI3a** (9:1:0), **PI3b** em (1:1:0), **PI3c** (0:1:0) e **PI3d** (0:0:1). A fração, **PI3c** (353 mg) foi novamente fracionada gerando 11 novas frações: **PI3c F1** (9,5:0,5:0), **PI3c F2** e **PI3c F3** (9:1:0), **PI3c F4** e **PI3c F5** (8:2:0), **PI3c F6** e **PI3c F7** (7:3:0), **PI3c F8** e **PI3c F9** (1:1:0), **PI3c F10** (2:8:0), **PI3c F11** (0:0:1). A fração, **PI3c F7**(12,4 mg) apresentou um sólido branco com resíduo de graxa, que foi lavado com Hexano, recristalizado e analisado por CCD. Foram adquiridos os espectros de RMN 1D e 2D para elucidação da amostra.

O esquema analítico (Figura 18) apresenta de forma resumida, as etapas realizadas para o isolamento as amostras **L2c**(46), **L2e**(48) e **PI3c F7**.

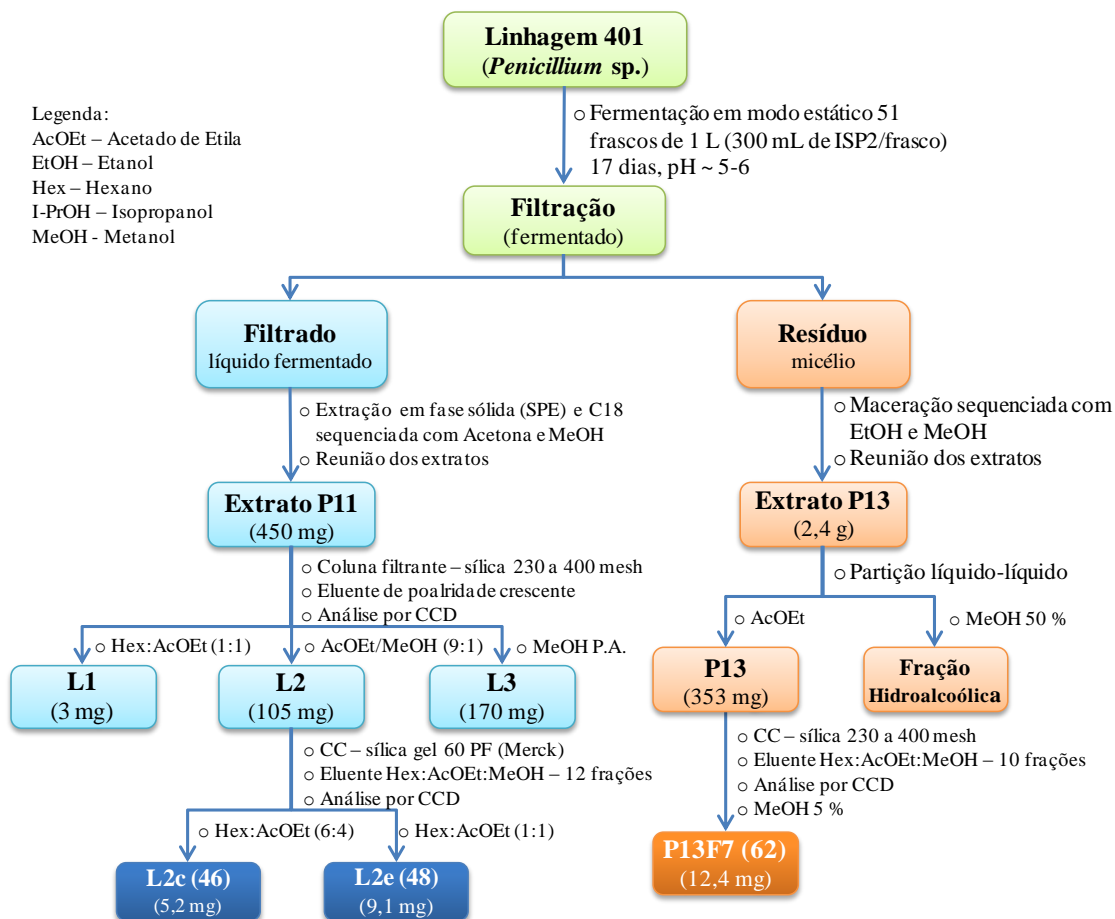


Figura 18. Estudo químico dos extratos da linhagem de 401. fermentado em ISP2.

4.7.4. Fermentação da linhagem 455

A cepa de 455 foi isolada da casca dos galhos de *Gustavia* sp. cultivada em meio de cultura BDA. Para a fermentação, o fungo foi reativado em 6 placas de Petri e cultivado por três semanas. Os esporos foram raspados e suspensos em tubos criogênicos contendo água estéril e glicerol a 15 %. Esta suspensão foi inoculada em 49 frascos erlenmeyers de 1 L contendo 300 ml do meio de cultura líquido BDL. Cada frasco foi inoculado com 50 µL da suspensão de esporos, fechados com tampão de algodão e gases, mantidos à temperatura ambiente e cultivados por 21 dias. Após este período registrou-se o pH do caldo fermentado, este foi separado do micélio e filtrado em funil de Buchner com papel de filtro qualitativo. Foram obtidos 13 L do líquido fermentado que foram armazenados em frascos âmbar, aos quais foram adicionados 5 % de MeOH até o momento da extração.

A extração do líquido fermentado foi feita em cartucho de SPE seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente para obtenção do extrato Acetona:MeOH (1:1). Os extratos obtidos foram reunidos e identificados como **A1** e armazenado em dessecador para procedimentos posteriores.

Para obtenção do extrato do micélio da linhagem 455 foram seguidos os mesmos procedimentos para obter os extratos dos micélios das linhagens anteriormente descritas. O extrato do micélio foi identificado como **A3** e armazenados em dessecador para procedimentos posteriores.

4.7.4.1. Fracionamento dos extratos da linhagem 455

Após análise por CCD, o extrato **A3** da linhagem 455 foi submetido a uma coluna filtrante em sílica gel, sob pressão reduzida, em gradiente de polaridade crescente. Foram geradas 3 frações: **A3a** em Hex:AcOEt:MeOH (1:1:0), **A3b** em Hex:AcOEt:MeOH (0:1:0), **A3c** em Hex:AcOEt:MeOH (0:1:1). Foram obtidos e analisados os espectros de RMN ^1H das três frações **A3a-c**. O espectro de RMN ^1H da fração **A3b** (72,3 mg), codificada como **A3b 36** foi avaliado e submetido a purificação por CCDP. A amostra foi eluída em $(\text{CHCl}_3):\text{MeOH}$ (9:1), na qual foram geradas 3 frações, P1, P2 e P3. Estas tiveram seus espectros de RMN de ^1H adquiridos e analisados, porém somente da amostra **A3b 36_P3** (9,4 mg) foram adquiridos os espectros de RMN 1D e 2D.

O esquema analítico (Figura 19) apresenta, de forma resumida, as etapas realizadas para isolar a amostra **A3c 36_P3**.

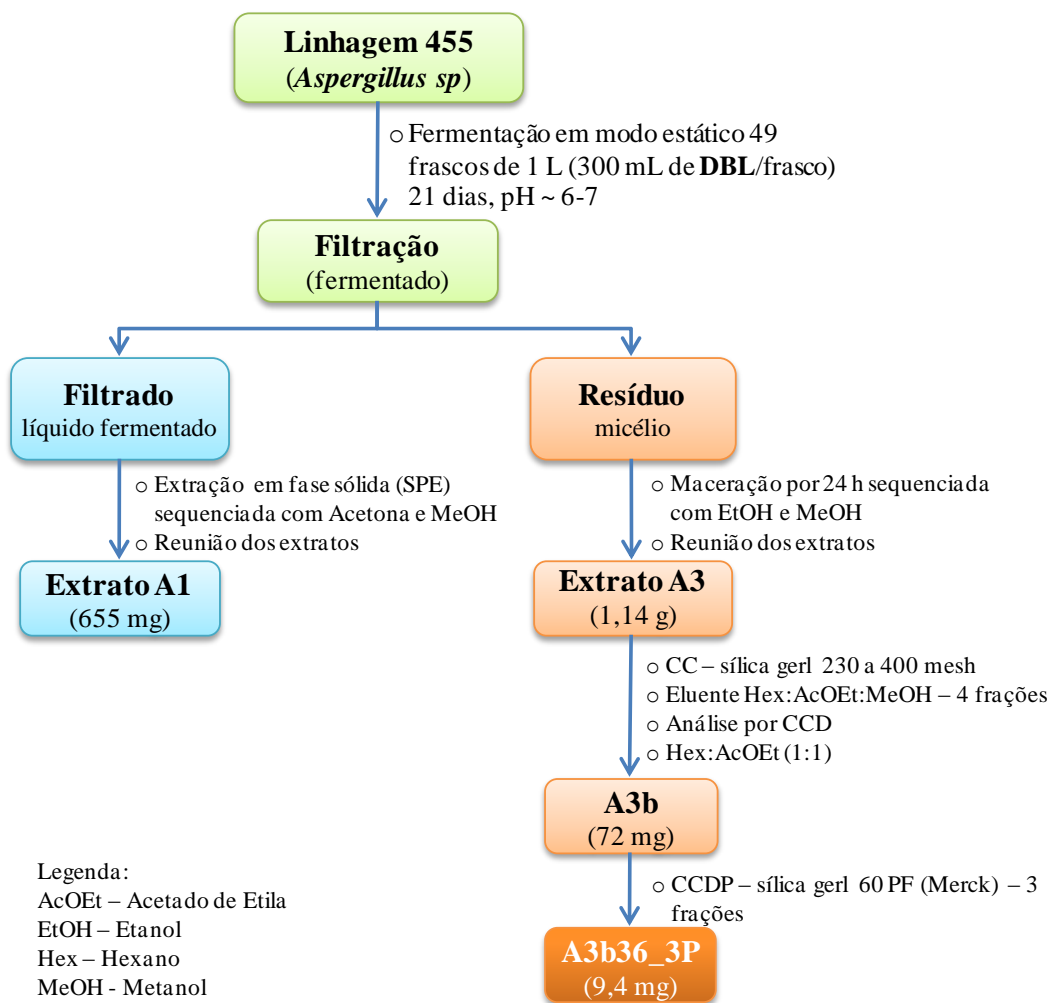


Figura 19. Esquema analítico do extrato **A3** da linhagem 455.

4.7.5. Fermentação da linhagem 400

A linhagem de 400 foi isolada da casca dos galhos de *Gustavia* sp. cultivada no meio de cultura ISP2. Para fermentação da linhagem 400 foram utilizados 60 frascos erlenmeyers de 1 L contendo 300 mL de meio de cultura ISP2 estéril, inoculado com 8 fragmentos e incubado à 25 °C por 23 dias. Em seguida, o líquido fermentado foi filtrado por gravidade, extraído por partição, concentrados e identificados como: **N1** em AcOEt a 100 % e **N2** em AcOEt:i-PrOH (7:3).

O micélio foi extraído por maceração por duas vezes a cada 24 h com a mistura AcOEt:MeOH (1:1), os extratos foram reunidos, concentrados, identificados como **N3** e armazenado no dessecador até o fracionamento.

4.7.5.1. Fracionamento dos extratos da linhagem 400

Os extratos **N1** e **N2** da linhagem 400 após analisados por CCD em fase normal com as várias combinações dos solventes Hex:AcOEt:MeOH. Separadamente, estes extratos foram fracionados em colunas filtrantes em sílica gel, sob pressão reduzida, eluída com os mesmos solventes, em gradiente de polaridade crescente.

Do extrato N1 foram geradas 4 frações: N1a (9:1:0), N1b (1:1:0), N1c (0:1:0), N1d (0:0:1). Após análise por CCD, foram adquiridos os espectros de RMN de ^1H de todas as frações para uma análise preliminar dos sinais. Após a análise exploratório dos sinais do espectro de RMN de ^1H , a amostra N1b foi fracionada por CCDP, eluída com a mistura CHCl_3 :MeOH (8:2), da qual foi isolada a amostra N1b(17_4P). A amostra N1c foi fracionada por CCDP, eluída com a mistura CHCl_3 :MeOH (9:1), da qual foi isolada a amostra N1c(16_2P).

Assim, com base nos espectros de RMN de ^1H foram obtidos os espectros de RMN 2D das amostras N1a (15), N1b(17_4P) e N1c(16_2P) para serem elucidados.

O esquema analítico (Figura 20) apresenta de forma resumida, as etapas realizadas para isolar as amostras **N1a-c**.

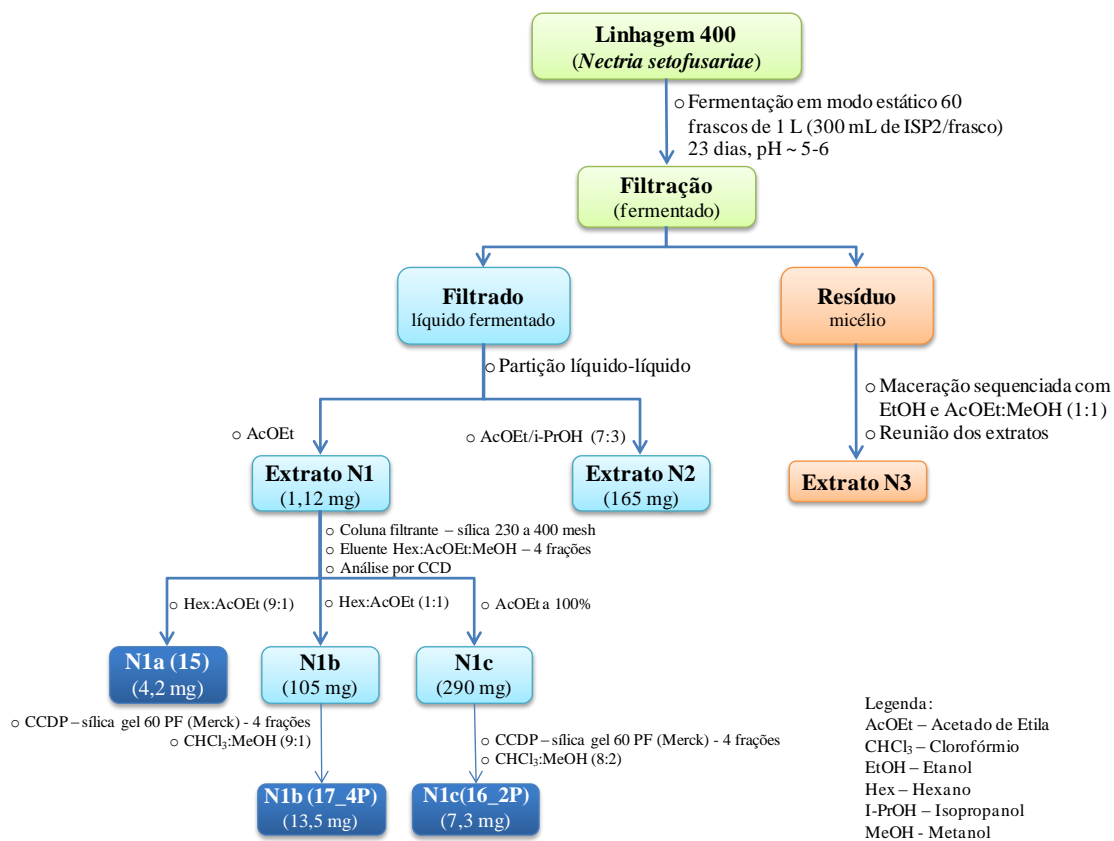


Figura 20. Estudo químico para obtenção dos extratos e fracionamento da linhagem 400.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Isolamento, Preservação e Identificação morfológica dos fungos endofíticos isolados de *Gustavia* sp.

A partir de 384 fragmentos dos tecidos vegetais saudáveis de *Gustavia* sp. inoculados, foram isolados 93 fungos endofíticos (24,21 %), com destaque para o meio de cultura BDA, o qual apresentou o maior percentual de isolados, seguido do meio de cultura ISP2 (Figura 21). A taxa de colonização de fungos endofíticos cultiváveis encontrada nesta pesquisa é bem mais baixa que as descritas para *Palicourea longiflora* (Rubiaceae) que foi de 62,1 %, *Strychnos cogens* (Loganiaceae) com 36,8 %, *Annona squamosa* L. com 66,14 %, *Annona muricata* L com 70,93 % e (ambas Annonaceae), *Myrcia guianensis* (Mirtaceae) com 76,6 % (BANHOS *et al*, 2014; SILVA *et al*, 2006; SOUZA *et al*, 2004). Este resultado pode estar relacionado com o porte da hospedeira que é uma árvore emergente (árvore de grande porte) na floresta, mas tais suposições necessitam serem melhor investigadas.

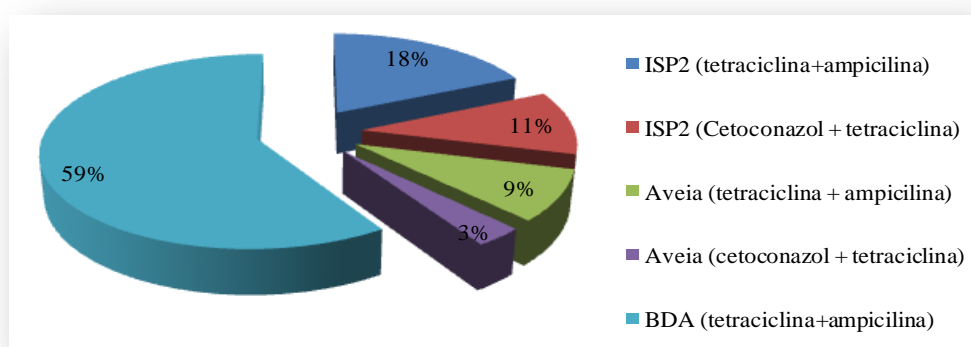


Figura 21. Gráfico do percentual de fungos endofíticos isolados em relação aos meios de cultura utilizados.

Dos meios de cultura (ISP2, Aveia e BDA) que continham os antibióticos tetraciclina e ampicilina foram isolados 80 (86 %) fungos, de acordo com o esperado, pois os antibióticos utilizados eram bactericidas para bactérias Gram positivas e Gram negativas. Entretanto dos meios de cultura (ISP2 e Aveia) que continham cetoconazol e tetraciclina

para a inibição de bactérias Gram negativas e fungos foram isolados ainda 13 (14 %) fungos e sete bactérias Gram positivas o que indica uma resistência por parte destes aos antibióticos usados, ou mesmo a degradação destes antibióticos.

Pelas análises macro e micro-morfológicas foram identificados sete gêneros: (*Fusarium*, *Xylaria*, *Pestalotiopsis*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum* (fase sexuada *Glomerella*) (Figura 22) e dois grupos não identificados.

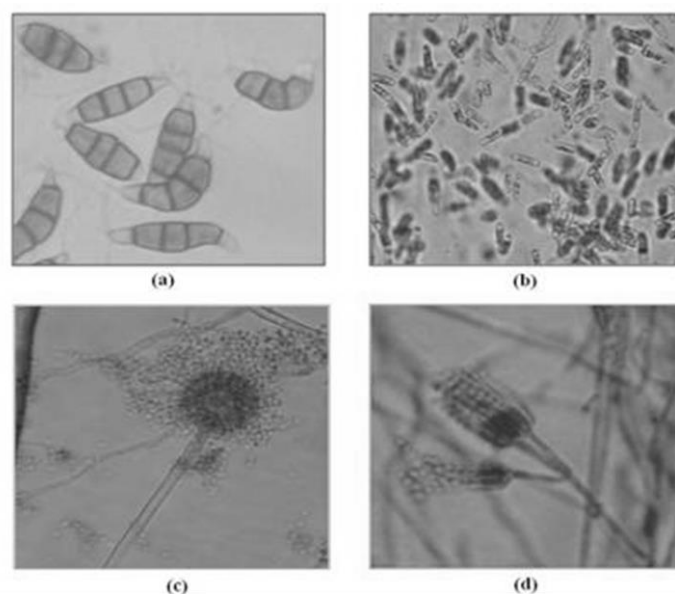


Figura 22. Imagens de microcultivo de fungos endofíticos isolados de *Gustavia* sp. *Pestalotiopsis* sp. (a), *Colletotrichum* sp. (b), *Aspergillus* sp. (c) e *Penicillium* sp. (d). Observação de a, b, e c em objetivas de 20x e 40x.

O maior número de isolados foi identificado na casca da raiz (23 %), contudo a maior diversidade de isolados por tecidos foram identificados na casca do caule e do galho, ambos com 7 grupos, dentre estes inclui-se os ascomicetos (8 %) que não foram identificados, além do grupo *Mycelia sterilia* (24 %), também agrupados a parte como não identificados (Figuras 24 e 25). A raiz foi o tecido menos diverso de fungos, no qual foram identificados, apenas três grupos, *Penicillium*, *Cephalosporium* e *M. sterilia* e do caule não se isolou nenhum fungo.

A figura 23 e 24 apresentam os gráficos da ocorrência e diversidade de fungos endofíticos associados a *Gustavia* sp. identificados pela observação das estruturas macro e

micro-morfológicas, no qual observou-se maiores percentuais dos gêneros, *Penicillium* (22 %), *Cephalosporium* (16 %) e *Xylaria* (10 %), sendo os dois primeiros com ocorrência em cinco do sete tecidos vegetais selecionados para estudo. É possível que o número de isolados nos tecidos vegetais possa variar conforme o período de chuva na região, porém o acompanhamento da sazonalidade não era escopo deste trabalho e deve ser investigada futuramente.

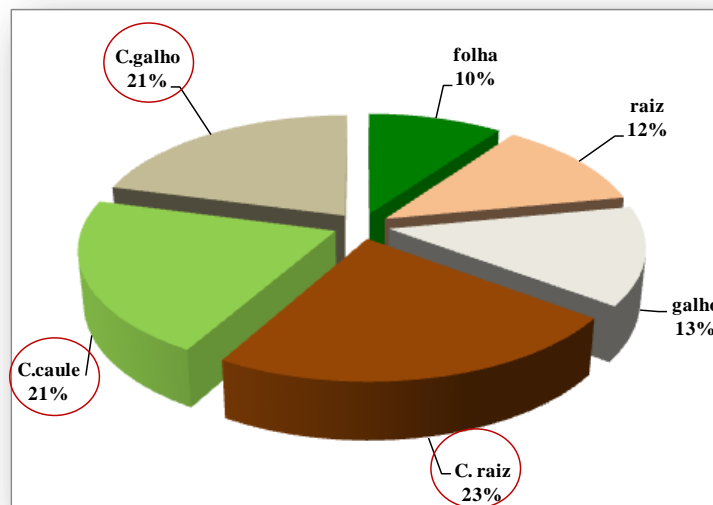


Figura 23. Distribuição de fungos endofíticos isolados dos tecidos vegetais de *Gustavia* sp.

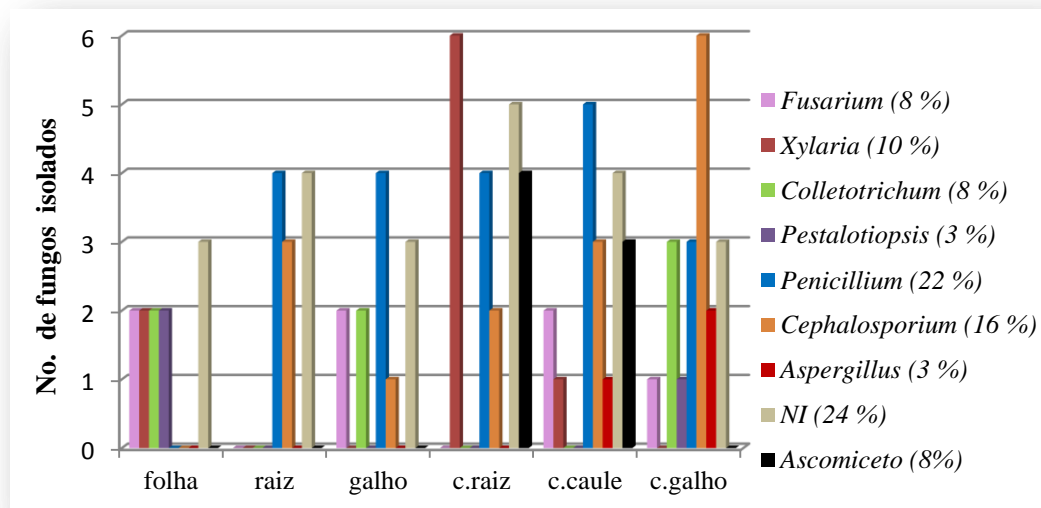


Figura 24. Diversidade de fungos endofíticos isolados por tecidos em geral nas amostras de *Gustavia* sp. NI (não identificada)

Foram catalogadas e preservadas (Figura 25) 67 linhagens de fungos endofíticos de *Gustavia* sp. na coleção de fungos do GEMMA. Estes recursos naturais são de grande importância para o conhecimento e a conservação da biodiversidade microbiana de florestas tropicais, bem como uma riquíssima fonte de produtos naturais que poderam ser utilizados em pesquisas futuras.

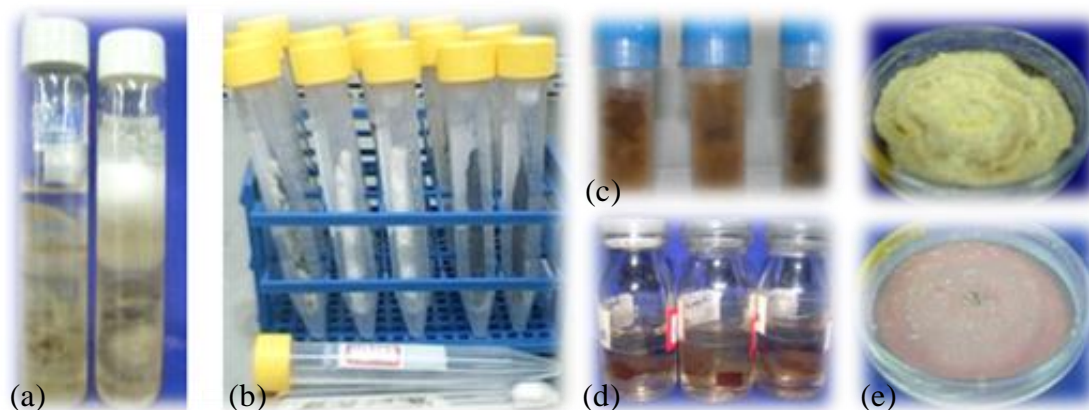


Figura 25. Formas de conservação das linhagens de fungo endofíticos de *Gustavia* sp.: tubo de ensaio com meio de cultura inclinado, coberto com óleo mineral (a); palito em tubo de ensaio dentro de tubo Falcon (b); tubo criogênico com 20 % glicerol (c); método de Castellani (d) e em placa de plástico (e).

5.2. Identificação molecular das linhagens selecionadas para o estudo químico

Quatro linhagens de fungos endofíticos (*Fusarium* sp. – 400, *Penicillium* sp. – 401, *Xylaria* sp. – 447 e *Aspergillus* sp. – 455) foram selecionados com base nos resultados dos ensaios biológicos para o estudo químico, e estas tiveram seus DNAs extraídos de acordo com o item 4.8. Três destes foram extraídos de modo satisfatório. Como se tratava de linhagens distintas, o período de cultivo variou conforme as características de cada fungo. Sendo assim, as linhagens como 455 e 401 foram as primeiras a crescer e tiveram seus DNAs extraídos antes de esporular, com tempo de cultivo de 24 a 72 h. As linhagens de 447 e 400 tiveram o tempo de cultivos maior, 12 dias. O rendimento do peso seco do micélio foi cerca de 6 a 10 g, muito acima da quantidade necessária para extração com o Kit, que era de no máximo 200 a 400 mg de amostra (folhas) (Figura 26).

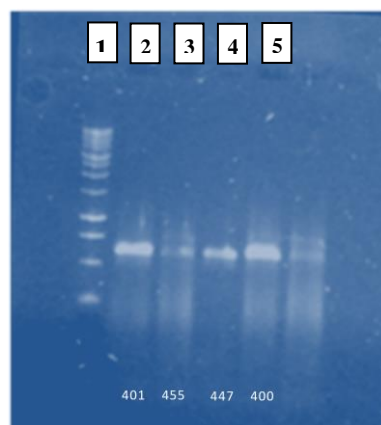


Figura 26. Perfil eletroforético do DNA genômico das linhagens 401, 455, 447 e 400 em gel de agarose a 0,8 %.

A linhagem **455** teve seu DNA extraído (figura 26), mas apresentou contaminação e não amplificou nas etapas seguintes, por isso a identificação ficou apenas a nível morfológico como *Aspergillus* sp. Sabe-se pelas características macroscópicas que ele pertence ao grupo *flavus* por apresentar colônias tipicamente verde-amarela, às vezes tornando-se verde-oliva marrom nas colônias (com mais de 2 semanas), crescimento rápido a 28 ° C, com conidióforos unisseriados e muitas vezes em mistura com vesículas menores que são as primeiras a aparecerem e depois maiores que são as últimas a aparecerem. A vesícula é redonda e os conídios redondos apresentam uma radiação uniforme (figura 23c).

Estes dados observados estão de acordo com Summerbell (1998) que fez uma revisão dos grupos de *Aspergillus* de importância médica e descreve o Grupo *flavus* como importante causador de fibrose cística, alergias bronco-pulmonares, sinusites, além da produção das conhecidas aflotoxinas que causam hepatotoxicidade e hepatocarcinogênese (SUMMERBELL, 1998; GEISER *et al*, 2001). De acordo com esses autores o Grupo *flavus* é de grande importância na produção de metabólitos secundários com atividade inosupressora e merece estudos mais detalhados na identificação de novas espécies e na classificação taxonômica. Futuramente será feita a identificação molecular desta linhagem (455) pelo sequenciamento do rDNA e também pelo perfil de metabólitos secundários e de proteínas ribossomais.

A linhagem **400** foi identificada como *Nectria setofusariae* Samuels & Nirenberg 1989, espécie descrita dentro do Grupo *Fusarium*. Este Grupo teve uma revisão taxonômica, apoiada na filogenia, em dados históricos e morfológicos por Gräfenhan e colaboradores (2011) fortemente confirmada pelas análises estatísticas filogenéticas. A análise filogenética combinada mostra que o atual conceito de *Fusarium* não é um grupo monofilético e que o gênero se divide em dois grandes grupos, um basal na família, o outro terminal, separados por um grande grupo de espécies classificadas em gêneros como *Calonectria*, *Neonectria* e *Volutella*. Sem importância médica para infecções, mas de grande importância agrônômica, pois é um dos mais importantes fitopatógenos. Reconhecido mundialmente por provocar perdas na produção agrícola antes e pós colheita, como produtor de micotoxinas: ex. as Zearelonas que causam intoxicação alimentar em humanos e outros animais (NIRENBERG & SAMUELS, 2000; DESJARDINS & PROCTOR, 2007; GRÄFENHAN *et al*, 2011).

A linhagem **447** foi identificada como *Xylaria adscendens* Fr. 1851 (Tabela 15). Um gênero de Ascomycetos reconhecidos primeiramente em regiões temperadas e que a partir da década de 80 começam a ser descritos como endófitos e com sua maior diversidade descrita nos últimos anos em regiões tropicais (MEDEL *et al*, 2008; BAYMAN *et al*, 1998; FRÓHLICH; HYDE, PETRINI, 2000, BRUNNER & PETRINI, 1992). As linhagens **400** e **447** apresentaram índice de similaridade de 99 % com sequências depositadas no banco de sequências nucleotídicas do NCBI.

A linhagem **401** foi identificada como *Penicillium chrysogenum*, com índice de similaridade de 100 %. Este alto índice de similaridade é o reflexo da importância dos estudos do Gênero *Penicillium* que tem nesta espécie, um dos seus mais importantes representantes na produção biotecnológica de diferentes metabólitos. Van Den Berg e colaboradores (2008) publicaram o sequenciamento e a análise do genoma completo desta espécie com 32.19 Mb, demonstrando a presença de 12.943 genes, destes 57 % (7.703) relacionados a proteínas desconhecidas. Identificaram numerosos genes responsáveis por

etapas-chave na produção de penicilina. Análises de microarrays de DNA foram utilizadas para comparar os transcriptomas da cepa sequenciada a uma cepa melhorada para a produção de penicilina G, ambas cultivadas na presença e na ausência do ácido fenilacético, precursor de cadeia lateral. A transcrição de genes envolvidos na biossíntese de valina, cisteína e um ácido aminoadípico, precursores para a biossíntese de penicilina, assim como os genes que codificam micro proteínas de adesão, foram aumentadas na cepa melhorada. Alguns produtos de genes mostraram-se controlar diretamente a saída dos β -lactâmicos.

Muitos processos-chave de transporte celular envolvendo as penicilinas e intermediários continuam a ser caracterizados ao nível molecular. Genes previstos para codificar transportadores foram fortemente expressos entre os genes transcricionalmente responsáveis pela regulação da produção da penicilina G, potencialmente ilustrando o futuro da genômica orientada pela engenharia metabólica (VAN DEN BERG *et al.*, 2008).

Tabela 9. Resultados dos sequenciamentos das regiões *Its1* e *Its2* do rDNA das amostras de fungos endofíticos de *Gustavia* sp.

Coleção	Índice de similaridade (%)	Sequência blast – julho de 2012
400	99	<i>Nectria setofusariae</i>
401	100	<i>Penicillium chrysogenum</i>
447	99	<i>Xylaria adscendens</i>
455	-----	-----

5.3. Extratos dos fungos endofíticos em escala analítica

Foram obtidos 63 extratos em escala analítica, sendo: 21 oriundos das extrações por maceração do micélio; 21 da primeira extração por partição do líquido fermentado e 21 da segunda extração por partição do líquido fermentado. Porém, algumas amostras não tiveram rendimentos suficientes ($\geq 40,0$ mg) para serem submetidos a todos os ensaios biológicos. Os extratos que apresentaram bons rendimentos foram submetidos aos ensaios de atividades, antimicrobiana contra bactérias Gram (+) e Gram (-) e uma levedura, citotoxicidade *in vitro* e alelopática, no qual os resultados serão discutidos nos próximos tópicos.

5.4. Teste de atividade antimicrobiana dos extratos

De 38 amostras de extratos ensaiados quanto a atividades antimicrobianas, 28 % foram ativas contra pelo menos um dos patógenos avaliados: seis apresentaram atividade contra *P. aeruginosa*, uma contra *S. aureus* e quatro contra *C. albicans* (Tabela 10, Figura 27).

Dentre os extratos das linhagens avaliadas contra os três patógenos, os melhores resultados se concentraram nos extratos da linhagem **400** (*N. setofusariae*) no qual o extrato AcOEt (**E1**) indicou potencial contra os três patógenos avaliados e os extratos E1, E2 e E3 indicaram potencial contra *C. albicans*. Outras amostras que se destacaram nos resultados dos ensaios antimicrobianos foram as relacionadas aos extratos das linhagens **401** (*P. chrysogenum*) e **447** (*X. adscendens*), as quais apresentaram atividade contra *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Banhos (2014), ao avaliar a capacidade antimicrobiana de fungos endofíticos de *M. guianensis* não encontrou boa atividade antibacteriana, entretanto encontrou uma boa atividade anticandida para a linhagem de *N. haematococca*, espécie também relacionada com o grupo *Fusarium*. Não foi encontrado artigos relacionados a ensaios biológicos de *X. adscendens*, no entanto estudos recentes revelaram este gênero como uma fonte rica de metabólitos secundários farmacologicamente ativos, incluindo atividade citotóxica e antimalárico (ISAKA, *et al.*, 2014), antimicrobiana (WU, S-H *et al.*, 2014), antifúngico (SILVA, G. H *et al.*, 2010), e inibidor enzimático (NONG *et al.*, 2013).

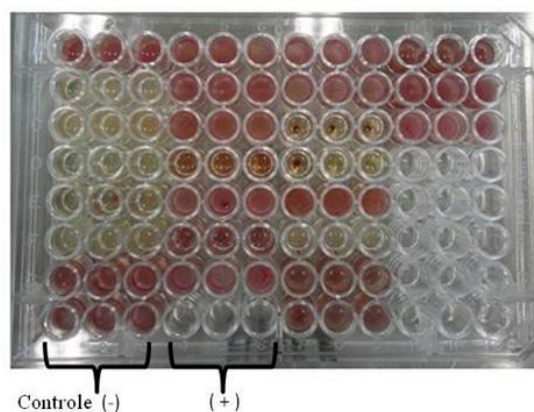
Tabela 10. Resultados de atividade antimicrobiana em placa de Elisa dos extratos de fungos endofíticos de *Gustavia* sp. obtidos em escala analítica e revelada com TTC.

Tecido	Meio cultura	Linhagem	Gênero	Extrato	<i>P.a</i>	<i>S.a</i>	<i>C.a</i>
C. galho	ISP2	400	<i>Nectria</i>	E1	+	+	+
				E2	-	-	+
				E3	-	-	+
	BDA	435	<i>Ascomiceto</i>	E2	-	-	-
	AVEIA	423	<i>Ascomiceto</i>	E2	+	-	-
Galho	ISP2	401	<i>Penicillium</i>	E1	+	-	-
				E2	+	-	-
Folha	ISP2	447	<i>Xylaria</i>	E2	+	-	-
				E3	-	-	+
C. caule	ISP2	395	<i>Penicillium</i>	E1	-	-	-
C. raiz	ISP2	404	<i>Penicillium</i>	E2	+	-	-

E1= Ext. líquido fermentado (AcOEt); E2 = líquido fermentado (AcOEt/i-PrOH) (7:3); E3 = Ext. do micélio EtOH/MeOH 1:1 (V/V) na concentração de 1 mg . mL⁻¹.

5.4.1. Teste de atividade antimicrobiana das frações

A avaliação da atividade antimicrobiana das frações contra os patógenos *C. albicans*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, indicou 21 amostras ativas. Dentre as 21 amostras, 15 foram ativas contra *P. aeruginosa* sendo, cinco de *Nectria setofusariae* (linhagem **400**), oito de *Penicillium chrysogenum* (**401**) e duas de *Xylaria adscendens* (**447**) e seis amostras foram ativas contra *C. albicans*, sendo cinco da linhagem **400** e uma de **447**. As frações e extratos da linhagem **455** (*Aspergillus* sp.) não foram avaliadas nestes ensaios (Figuras 27 e 28). Os dados obtidos para *P. chrysogenum* estão de acordo com a literatura que o descreve como produtor de substâncias β -lactâmicas de amplo espectro bactericida, mais a frente. Contudo não encontramos dados para as outras duas espécies avaliadas, exceto poucos relatos para o gênero *Nectria* e *Xylaria* (BANHOS *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2010).



a

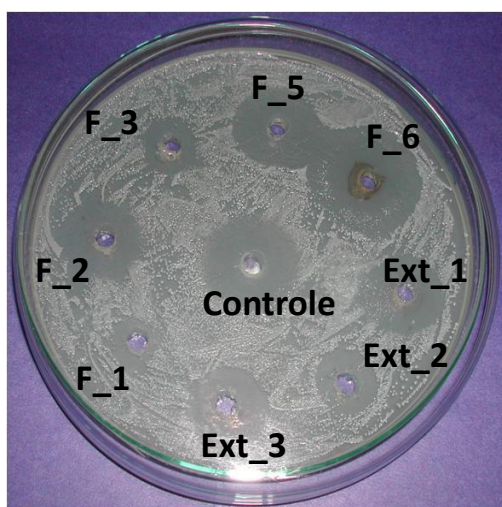
Ensaio realizado 18/01/2012 Placa de Elisa – *Pseudomonas aeruginosa* (-)

	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	Ext.3 CF2 F1a - F1a			Ext.3 CF1 F3			Ext.1,2 CF2 - F8			Ext.3 Fusarium		
B	Ext.3 CF2 F1a - F2			Ext.1,2 CF1 - F1			Ext.1,2 CF2 - F9			Ext.3 Xilaria		
C	Ext.3 CF2 F1a - F3			Ext.1,2 CF1 - F3			Ext.1,2 CF2 - F10,11			Ext.1,2 F2 Xilaria		
D	Ext.3 CF2 F1a - F4			Ext.1,2 CF1 - F4			Ext.1,2 CF2 - F12,13					
E	Ext.3 CF2 F1a - F5			Ext.1,2 CF2 - F1			Ext.1,2 CF2 - F14					
F	Ext.3 CF2 F2 -F2a,b			Ext.1,2 CF2 - F6			Ext.1 Fusarium					
G	Ext.3 CF2 F2 -F2c			Ext.1,2 CF2 - F7			Ext.2 Fusarium					
H	Controle (-)			Controle (+)			Controle (-)					

O grau de turbidez (escala de Mc Farland) para *P.a* e *S.a* foi de 3×10^8

b

Figura 27. Ensaio de atividade em placa de Elisa contendo extratos e frações de *Nectria setofusariae* e *Xylaria adscendens* frente a *Pseudomonas aeruginosa* (a) e quadro com códigos das amostras em triplicata (b).



AMOSTRAS de 400	HALO (mm)	MÉDIA
Extrato 1	24	24,7
Extrato 2	18	18,0
Extrato 3	25	24,7
F_1 Ext_1	14	14,3
F_2 Ext_1	25	26,3
F_3,4 Ext_1	18	19,0
F_5 Ext_1	24	26,7
F_6 Ext_1	35	35,3
Controle (+)	19	18,3

Figura 28. Ensaio de atividade antimicrobiana das frações de *Netria setofusariae* frente a *Candida albicans* (a) e dados tabelados da média de três repetições.

A atividade antifúngica das frações de *Netria setofusariae* foi igual ou superior para a maioria destas, exceto para fração 1 do extrato 1 (Figura 28). Considerando que os extratos de micro-organismos contêm menos substâncias que os de plantas, o fracionamento resulta em misturas menos complexas. Portanto esta acentuada atividade pode estar relacionada a uma substância em especial ou a sinergia de algumas poucas substâncias presentes nestas frações. CAFEU; SILVA; TELES (2005) ao realizar um estudo biomonitorado de metabólitos de fungos endofíticos de *P. marcgravii* contra fitopatógenos isolou cinco substâncias (ácido 2-hexil-3-metil-butanodioico, citocalasin D, 7-declorogriseofulvin, citocalasin B e griseofulvin e destas apenas as substâncias 1 e 2 apresentaram atividade fungicida. O que corrobora com a hipótese que as frações de *Netria setofusariae* continham poucas substâncias.

Souza *et al.* (2004), ao avaliar a atividade candidida de 79 fungos endofíticos isolados de *P. marcgravii* e de *S. cogens* não detectou essa atividade no meio de cultura fermentado. Barbosa (2009), ao avaliar 106 extratos de fungos endofíticos de várias hospedeiras também não encontrou resultados relevantes com atividade candidida. Entretanto Oliveira (2013), ao estudar a biodiversidade e o potencial antimicrobiano dos fungos endofíticos de *Duguetia flagellaris* comparou o resultado da bioatividade presente no meio de cultura de líquido fermentado e de extratos e percebeu que a avaliação apenas com o meio de cultura fermentado pode deixar passar despercebidas moléculas bioativas, pois estas estariam em baixa concentração. Em continuidade ao trabalho de Oliveira, Queiroz (2014) investigou o potencial antimicrobiano de *Phaezelomyces lilacinus* com bons resultados contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Os ensaios de bioautografia revelam a sinergia de 2 a 3 moléculas por frações avaliadas. Estes resultados corroboram com a importância dos estudos de fungos endofíticos de regiões tropicais como o que estamos desenvolvendo neste trabalho.

5.5. Testes de citotoxicidade *in vitro*

5.5.1. Resultados da avaliação citotóxica dos extratos brutos

Quarenta e nove amostras de extratos de fungos endofíticos foram avaliados frente as linhagens de células tumorais de HL60 (Leucemia), SF-295 (Glioblastoma) e MDA-MB435 (Melanoma). Os resultados de inibição do crescimento celular são apresentados a seguir plotados em quatro gráficos, e no texto são destacados os melhores resultados.

O gráfico da figura 29 apresenta os resultados citotóxicos de 18 extratos de seis linhagens de *Penicillium*, no qual foram observados 12 extratos com atividades entre 50 a 100 %, frente às três linhagens de células tumorais avaliadas. Dentre estes resultados estaca-se o extrato E1 da linhagem de *Penicillium chrysogenum* frente às três linhagens de células avaliadas, o qual indicou inibição proliferativa das células tumorais entre 71 a 100 %. Outro extrato desta mesma linhagem que se destaca é o E3, o qual indicou 72 % de inibição das células tumorais de Glioblastoma. Foi observado também, uma maior concentração de extratos ativos frente a linhagem tumoral de Glioblastoma, com 8 resultados, sendo estes extratos: dois de cada linhagem dos *Penicillium* 1, 2, 5 e 6 (*P. chrysogenum*), todos com alta atividade.

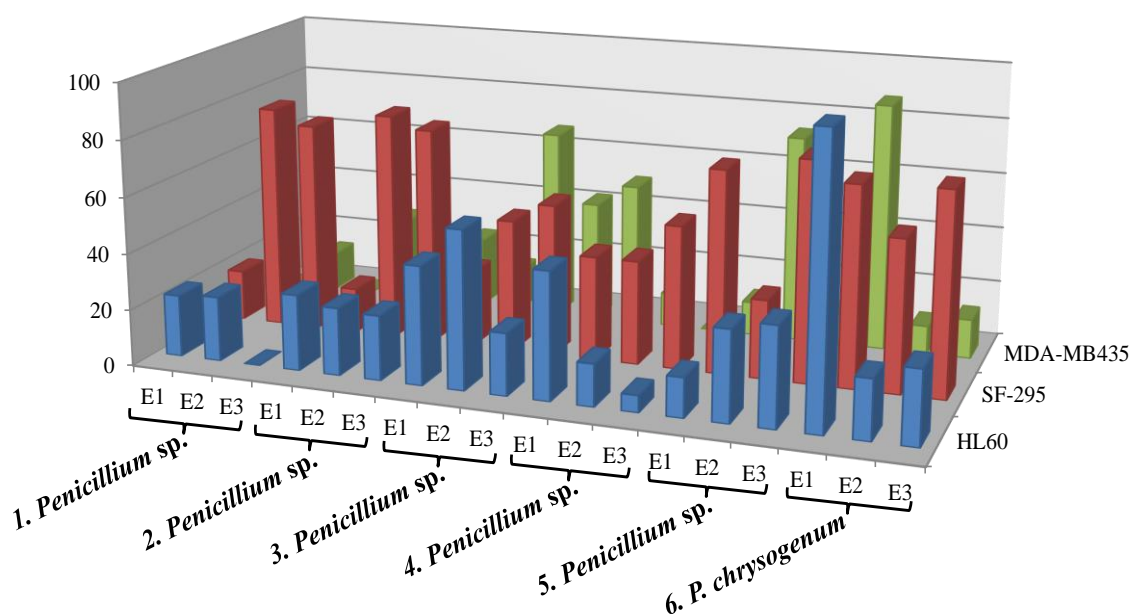


Figura 29. Avaliação citotóxica dos extratos de *Penicillium* spp. E1(AcOEt); E2 (AcOEt/I-prOH (7:3)); E3 (EtOH/MeOH (1:1)).

O gráfico da figura 30 apresenta os resultados citotóxicos de 12 extratos de quatro linhagens de fungos (*Aspergillus* sp., *Actinomiceto*, *Xylaria adscendens* e *Nectria setofusariae*), no qual foram observados 18 resultados com atividades promissoras. Dentre estes destacam-se os extratos da linhagem de *Aspergillus* sp., considerado até aqui, o melhor resultado dentre os demais extratos avaliados. Com exceção do extrato E3 de *Aspergillus* sp, frente a linhagem de Melanoma, os demais extratos desta linhagem indicaram alta atividade com inibição proliferativa entre 76 a 100 % frente as três linhagens de células tumorais avaliadas. Foram observados também uma maior concentração de extratos ativos frentes as linhagens de Leucemia e Glioblastoma com 14 extratos ativos, sendo quatro de *N. setofusariae*, quatro de *Actinomiceto* e seis de *Aspergillus* sp., todos com alta atividade.

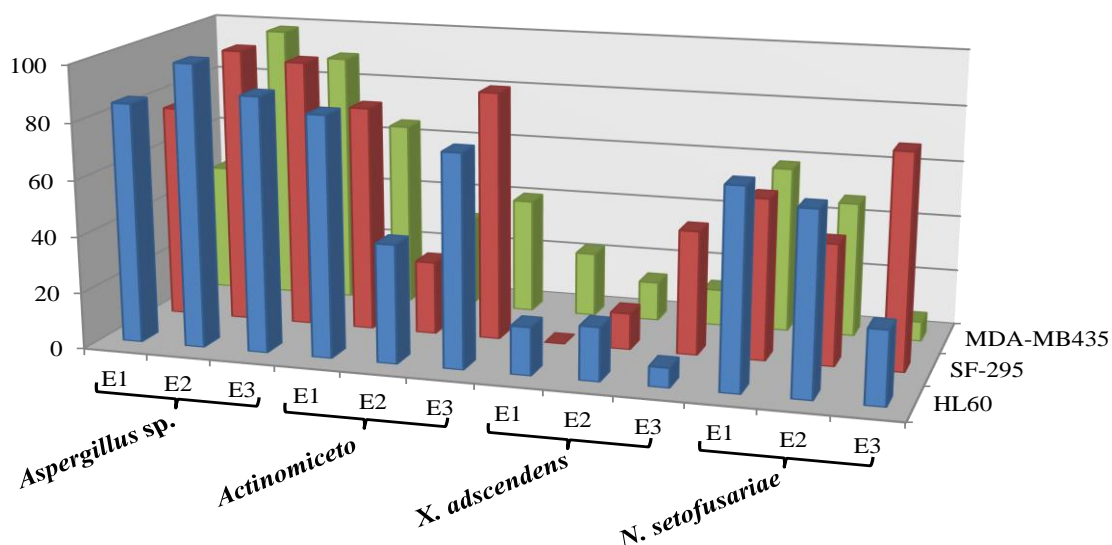


Figura 30. Avaliação citotóxica dos extratos de *Aspergillus* sp., *Actinomiceto*, *Xylaria adscendens* e *Nectria setofusariae*.

No gráfico da figura 31 estão apresentados os resultados citotóxicos de 12 extratos de quatro linhagens de fungos (*Pestalotiopsis* sp., *Colletrotrichum* sp., *Cephalosporium* sp. e uma linhagem não identificada), no qual foram observados 6 resultados com alta atividades frente às três linhagens tumorais avaliadas. A como nos dois gráficos anteriores foi observado também uma maior concentração de extratos ativos frente a linhagem tumoral

de Glioblastoma com 4 extratos ativos, sendo um da linhagem não identificada (NI), um de *Colletotrichum* sp. e dois de *Pestalotiopsis* sp.

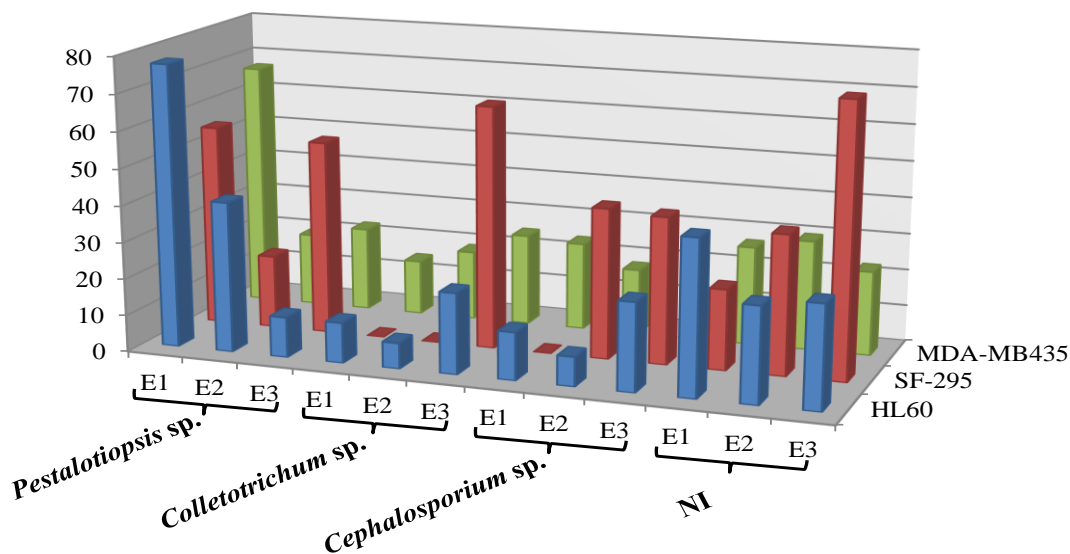


Figura 31. Avaliação citotóxica dos extratos de *Pestalotiopsis* sp., *Colletotrichum* sp., *Cephalosporium* sp., NI = não identificado frente as linhagem tumorais de Leucemia, Glioblastoma e Melanoma.

No gráfico da figura 32 são apresentados os resultados citotóxicos de 7 extratos de três linhagens de fungos *Ascomicetos*, no qual foram observados 3 resultados com alta atividades frente a linhagem tumoral de Glioblastoma com três extratos ativos, sendo dois do *Ascomicetos* 1 e um do *Ascomiceto* 3.

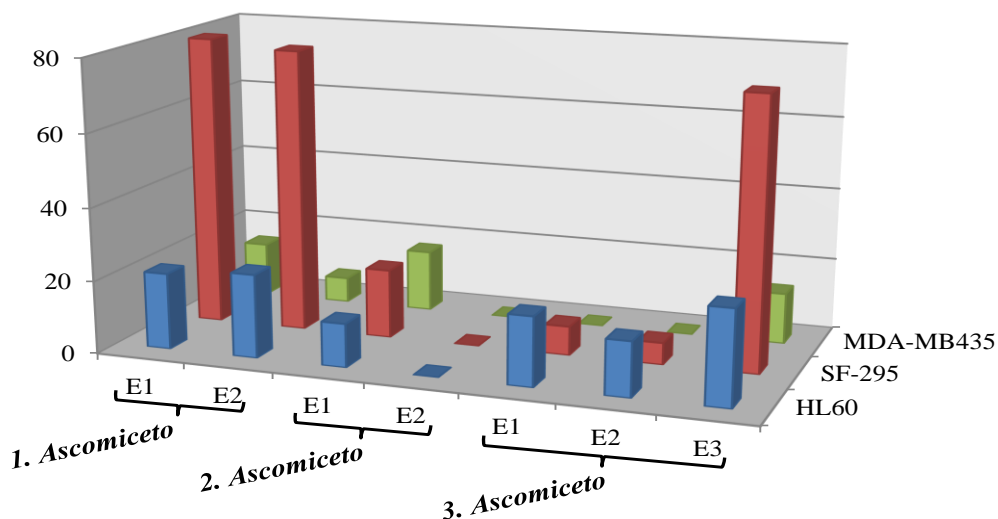


Figura 32. Avaliação citotóxica dos extratos de três linhagens de *Ascomicetos* frente as linhagens de células tumorais de Leucemia, Glioblastoma e Melanoma.

1 5.5.2. Resultados da avaliação citotóxica das frações

2 A avaliação citotóxica de 32 frações, sendo 8 da linhagem 400; 8 da linhagem 401;
3 10 da linhagem 447 e 6 da linhagem 455. Duas dessas amostras indicaram resultados
4 promissores inibindo a proliferação das três linhagens de células tumorais com percentual de
5 inibição entre 50 a 100 %, ou seja, de moderada a alta atividade. A amostra 400 (3) de *N.*
6 *setofusariae* (N3) que apresentou 100 % de inibição proliferativa das linhagens de células
7 tumorais de cólon e ovário. A amostra 455 (6) de *Aspergillus* sp. que apresentou atividade
8 contra as três linhagens de células avaliadas, sendo o melhor resultado com alta atividade
9 (94,22 %) contra as células tumorais de ovário.

10 A tabela 11 apresenta apenas os resultados das frações ativas frente as três linhagens
11 de células tumorais, no qual os valores correspondem ao percentual de inibição IC.

12 **Tabela 11.** Resultado da avaliação citotóxica das frações dos extratos de fungos endofíticos de
13 *Gustavia* sp. frente três linhagem de células tumorais *in vitro*.

AMOSTRA	Percentual de inibição		
	Cólon	Glioblastoma	Ovário
400 N3F3	100	3,36	100
455 A1 F2	74,48	55,15	94,22

14 5.5.3. Resultados da avaliação citotóxica dos constituintes isolados

15 Três amostras contendo seis constituintes (descritas a seguir) foram submetidas à
16 avaliação citotóxica frente a quatro linhagens de células tumorais. As amostras 1 [F8(1)] e 2
17 [F8(2)] correspondem aos constituintes isolados do extrato do micélio da fermentação de *P.*
18 *chrysogenum* (401) em CY, identificados no item 6.2.2 - 6.2.3. A amostra 3 (L2c (46)
19 corresponde aos constituintes isolados do extrato do meio líquido da fermentação deste *P.*
20 *chrysogenum* cultivado em ISP2, identificado no item 6.2.3 (Tabela 12). A amostra 1 é uma
21 mistura dos constituintes (peróxido de ergosterol nas formas endo e exo), a amostra 2 é uma
22 substância (Esterigmatocistina) e a amostra 3 é uma mistura de três constituintes
23 (trichodimerol, dihydrotrichodimerol e tetrahydrotrichodimerol) identificados no item 5.10.1

1 da pág. 120. Os experimentos indicaram resultados promissores principalmente para as
 2 amostras 1 e 2, frente as linhagens de células tumorais de ovário com concentração próxima
 3 ao controle ($CI_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$).

4 **Tabela 12.** Percentual de inibição de três amostras isoladas dos extratos de fungos endofíticos de
 5 *Gustavia* sp. frente a quatro linhagem de células tumorais *in vitro*.

Amostra	Código	Leucemia	Ovário	Cólon	Glioblastoma
1	F8 (1)	1,11	0,77	1,95	3,07
		0,85-1,15	0,64-0,93	0,45-2,62	2,19-4,30
2	F8 (2)	0,72	0,32	0,73	2,01
		0,58-0,88	0,23-0,40	0,48-1,11	1,64-2,46
3	F2(L2C4)	>5	>5	>5	>5
4	Dox ^b	0,01	0,34	0,02	0,24
		0,01-0,03	0,22-0,41	0,01-0,04	0,15-0,29

6 Dox = Doxorubicina (controle)

7 Silva *et. al.*, (2006), isolou cinco sesquiterpenoides de *Phomopsis cassiae*, um fungo
 8 endofítico associado com *Cassia spectabilis* (Leguminosae). Na qual a avaliação citotóxica
 9 dos metabólitos frente a HeLa (linhagem de células tumorais de câncer de cólon), tendo
 10 como controle Cisplatina, indicou apenas o metabólito, 3,12-dihidroxicadalenol ativo, porém
 11 a menor concentração ativa foi de IC_{50} ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$). Sendo assim, os dados da tabela 12 em
 12 comparação com os resultados obtidos por Silva *et al.* (2006), são mais promissores para as
 13 amostra 1 e 2 frente a linhagem de células tumorais de ovário. A origem do micro-
 14 organismo endofítico e o ambiente da planta hospedeira estão diretamente relacionados com
 15 as atividades biológicas detectadas para estes.

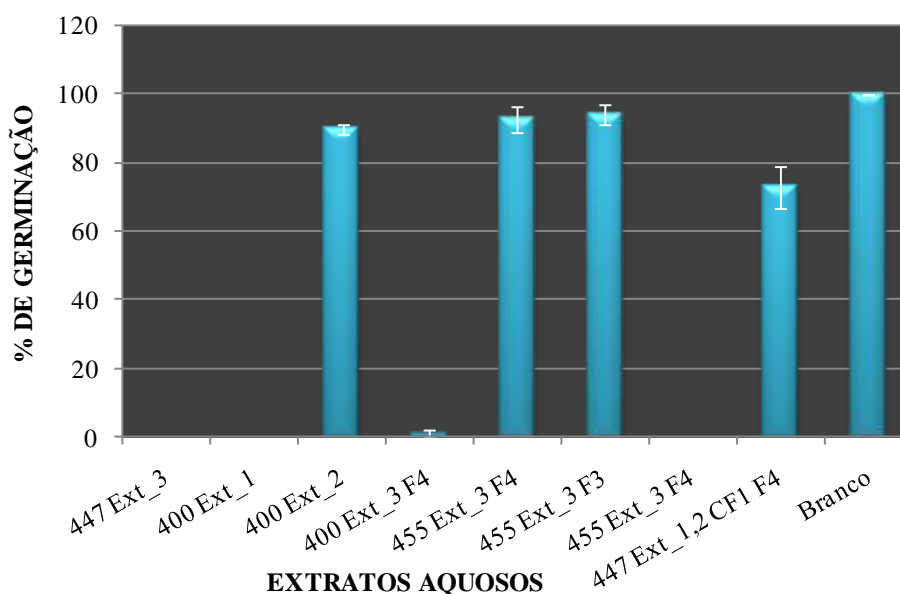
16 5.6. Teste de atividade alelopática

17 Foram avaliadas as atividades alelopáticas de 52 amostras, entre extratos e frações,
 18 sendo 12 dos extratos em pequena escala e 30 das quatro linhagens escolhidas para estudo
 19 químico. Os resultados indicaram quatro amostras com potencial alelopático (inibindo o
 20 crescimento das sementes) e quatro que favoreceram o crescimento das radículas (Figura
 21 29).

22 Das quatro amostras que inibiram o crescimento das sementes, 2 são de *N.*
 23 *setofusariae* (400), 1 de *X. adscendens* (447) e 1 de *Aspergillus* sp. (455). Das quatro

1 amostras que favoreceram o crescimento das plântulas, 2 são da linhagem de **455**, 1 da
2 linhagem de **400** e outra de **447** (Figura 33). Estas amostras apresentaram resultados
3 semelhante a de fito-homônio de crescimento, isto é, favoreceram o crescimento das
4 radículas. Os fito-hormônios são substâncias que atuam sobre a balança hormonal dos
5 vegetais, nos processos metabólicos e de crescimento, aumentam a produtividade total de
6 plantas e melhoram sua resistência em condições climáticas adversas (GÁRATE;
7 MAGALHÃES; ROMEIRO, 1998; ZULLO & ADAM, 2002).

8 Ambos os resultados são promissores e podem servir como alternativa para o
9 controle de plantas invasoras e para aumento da produtividade na agricultura, uma vez que
10 substâncias provenientes do metabolismo secundário tanto de plantas e/ou micro-organismos
11 podem inibir ou estimular o crescimento e desenvolvimento de outras espécies. É certo que
12 para isso serão necessários outros estudos.



13 **Figura 33.** Resultado dos ensaios de atividade alelopática.
14
15

16 Biomoléculas denominadas aleloquímicos, produzidas por plantas ou micro-
17 organismos, quando lançadas no ambiente podem influenciar, de modo a favorecer ou
18 prejudicar o crescimento de outras espécies. Oferecendo assim, novas oportunidades para

1 diversificar o controle de pragas na agricultura e na prática agrícola, e, nesse sentido, os
2 fungos podem contribuir de forma positiva.

3 Os aleloquímicos têm sido estudados como alternativa ao uso de defensivos agrícolas
4 seja como herbicida, inseticida ou nematicida. Essas substâncias são geralmente isoladas do
5 metabolismo secundário das plantas, podendo também ser de fungos associados à planta,
6 como os fungos endofíticos. Dentre a infinidade das classes de substâncias com potencial
7 alelopático descritos, destacam-se os fenóis, terpenos, poliacetilenos, ácidos graxos,
8 peptídeos glicosídeos, taninos, alcalóides, cianogênicos, sesquiterpenos, flavonóides e
9 ácidos fenólicos (ZULLO & ADAM, 2002; MACÍAS-RUBALCAVA *et al.*, 2010).

10 **5.7. Rendimentos dos extratos obtidos em escala laboratorial.**

11 Os rendimentos dos extratos obtidos do líquido fermentado e do micélio em escala
12 laboratorial estão relacionados na tabela 13. Em todas as linhagens observou-se um maior
13 rendimento dos extratos do meio micelial, possivelmente devido a presença de
14 polissacarídeos que são extraídos da parede celular, juntamente com os metabólitos do meio
15 intracelular dos fungos, que para este estudo tornou-se um interferente.

16 **Tabela 13.** Rendimento dos extratos das linhagens de fungos endofíticos.

Linhagem	Extrato	Extração	Massa (mg)
447	X12	partição	1.019
	X3	maceração	5.403
	N1	partição	1.350
400	N2	partição	185
	N3	maceração	6.241
	P1	SPE	1.605
401 (ISP2)	P3	maceração	4.140
	C1	SPE	270,7
401 (CY)	C3	maceração	1.510
	A1	SPE	705
455	A3	maceração	2.068

1 5.8. Identificação dos constituintes isolados dos extratos

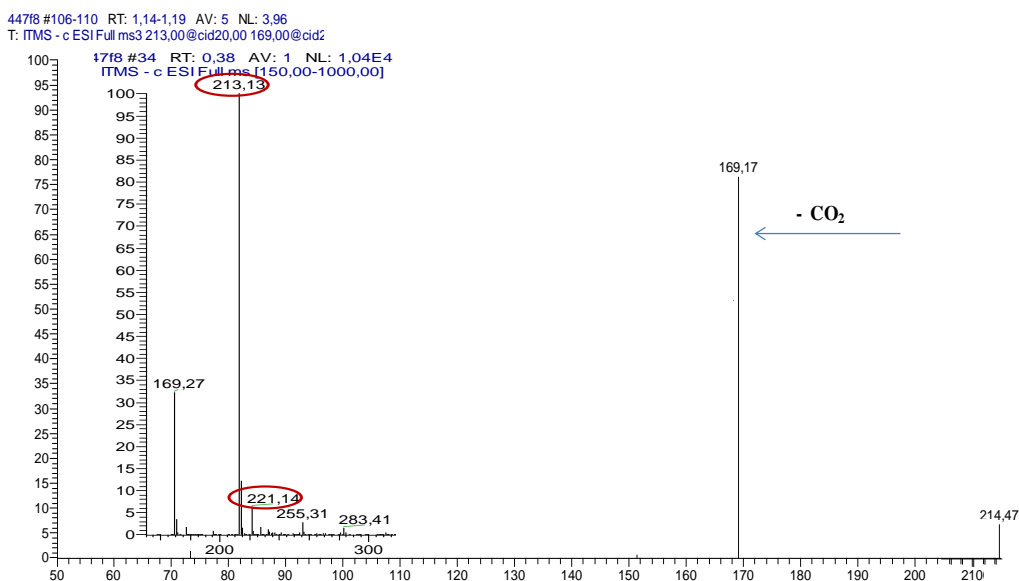
2

3 Os espectros de RMN 1D e 2D completos de todas as amostras isoladas e
4 identificadas, estão em anexo.

5 5.8.1. Linhagem 447 *X. adscendens*

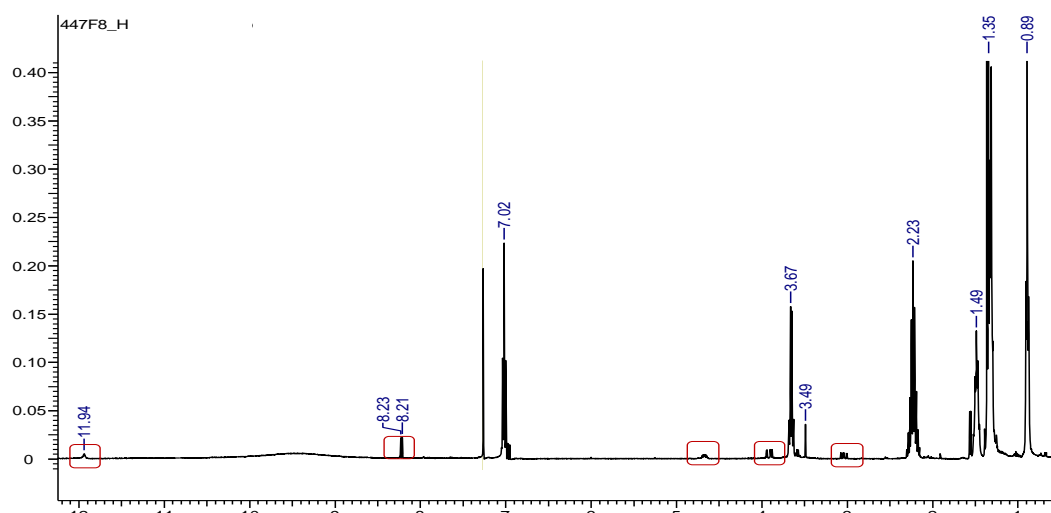
6 A amostra X12c F8, um sólido amorfo com coloração bege, isolada do meio líquido
7 fermentado de *X. adscendens*, e revelou uma mancha na análise por CCD com os eluentes
8 Hex:AcOEt (1:1), porém pela análise de seus espectros de massas e de RMN 1D e 2D e foi
9 constatado que esta amostra é uma mistura de duas substâncias que são discutidas a seguir.

10 No espectro de íons totais de **X12cF8** no modo negativo, com ionização por
11 eletrospray, foi observado um pico intenso em m/z 213 ($[M-H]^-$), correspondente a
12 substância majoritária de massa 214 u, e outro bem menos intenso em m/z 221 ($[M-H]^-$) que
13 corresponde a segunda substância identificada, de massa 222 u. A fragmentação seriada do
14 íon em m/z 213 (MS^3) da amostra **X12cF8** apresentou apenas um fragmento de m/z 169,
15 relativos à perda de CO_2 , indicando assim, a presença de uma substância carboxilada na
16 amostra (Figura 34).



17 **Figura 34.** Espectro de massas por ESI-ITMS³ do íon em m/z 213 ($[M-H]^-$) da substância majoritária
18 da amostra X12cF8.
19
20

1 No espectro de RMN de ^1H da amostra **X12cF8**, obtido em CHCl_3 foram observados
2 sinais de baixa e de alta intensidades, porém bem definidos, sem sobreposições, passíveis de
3 serem identificados (Figura 35). Dentre os sinais de baixa intensidade foi observado um com
4 deslocamento químico em δ 11,94, podendo ser de H de ácido carboxílico ou H de
5 hidroxilas queladas. Outros sinais foram observados na região característica de H olefínicos
6 e aromáticos, entre δ 6,5 e 8,5, e na região de H alifáticos, entre δ 0,85 e 2,35. Estes sinais
7 serão discutidos adiante.



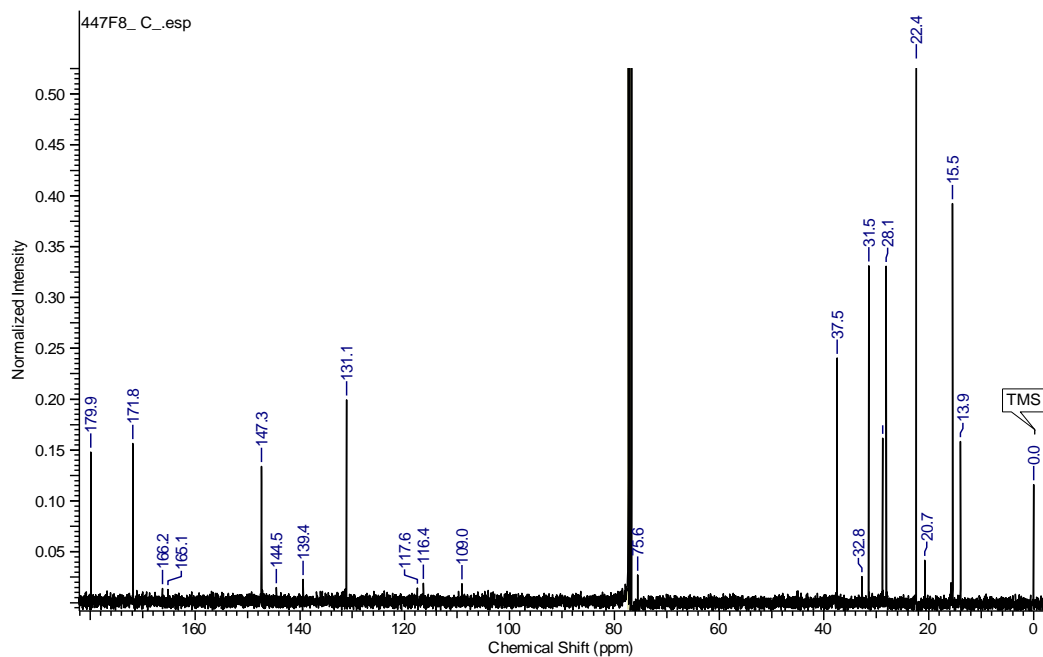
8
9 **Figura 35.** Espectro de RMN de ^1H da amostra X12c F8 a 600 MHz, em CDCl_3 .

10

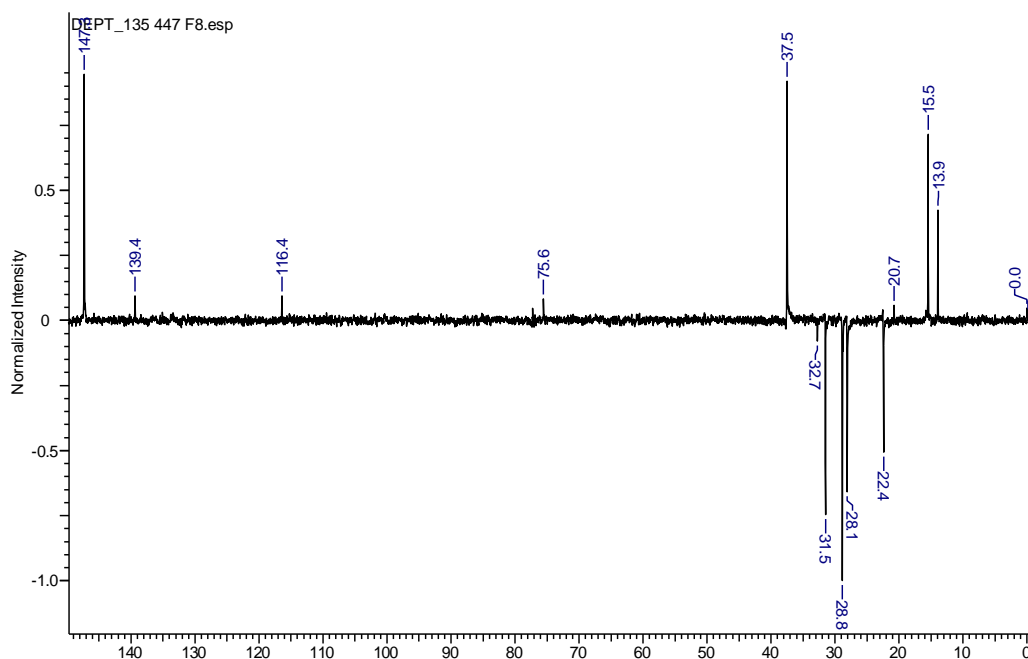
11 No espectro de RMN de ^{13}C obtido em 100 MHz foram observados sinais intensos,
12 os quais foram atribuídos a substância majoritária e sinais bem menos intensos, da
13 substância minoritária. Também foi considerada a possibilidade de sobreposição de alguns
14 sinais da substância minoritária com os da substância majoritária.

15 Pela análise combinadas dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135 (Figuras 36 e 37)
16 e considerando a intensidade dos sinais foram feitas as atribuições dos sinais dos átomos de
17 carbono da substância majoritária (**1**): metílicos em δ 13,9 e 15,22; metilênicos em δ 22,4,
18 28,1, 28,8 e 31,5; metínicos em δ 37,5 e 147,3 e carbono quaternário em δ 131,1, 171,8 e
19 179,9. Os sinais de carbono minoritários também foram analisados, conforme será
20 apresentado mais a frente.

1



2
3
4
Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C da amostra X12cF8 a 125 MHz, em CDCl_3 .



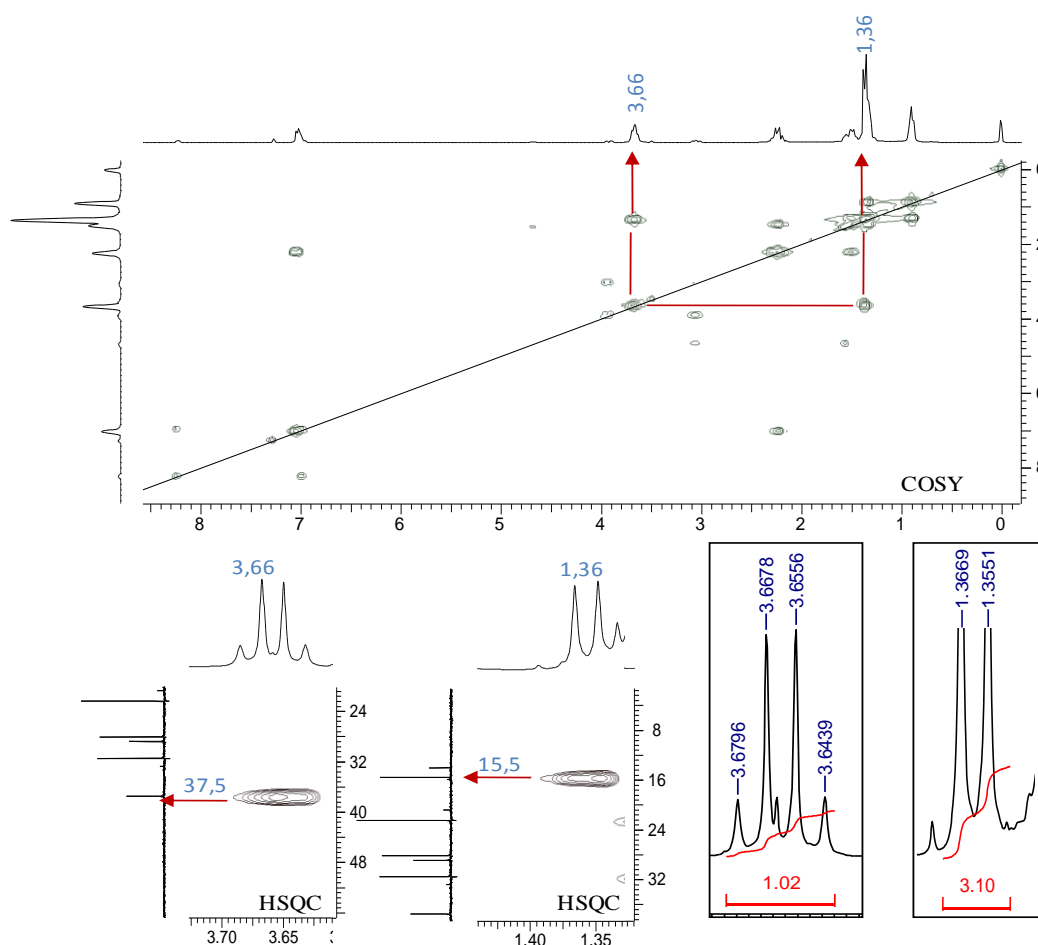
5
6
Figura 37. DEPT 135 da amostra X12cF8 X12cF8 a 125 MHz, em CDCl_3 .

7 5.8.2. Identificação da substância majoritária da amostra X12cF8

8 Na análise para a identificação da substância majoritária os sinais de RMN de ^{13}C em
9 δ 171,8 e 179,9 foram atribuídos a átomos de carbono de grupos carboxilas, coerente com a
10 perda de CO_2 observada no espectro de massas. Por sua vez, os sinais em δ 131,1
11 (tetrassubstituído) e 147,3 (metínico) foram atribuídos a uma dupla conjugada com uma das

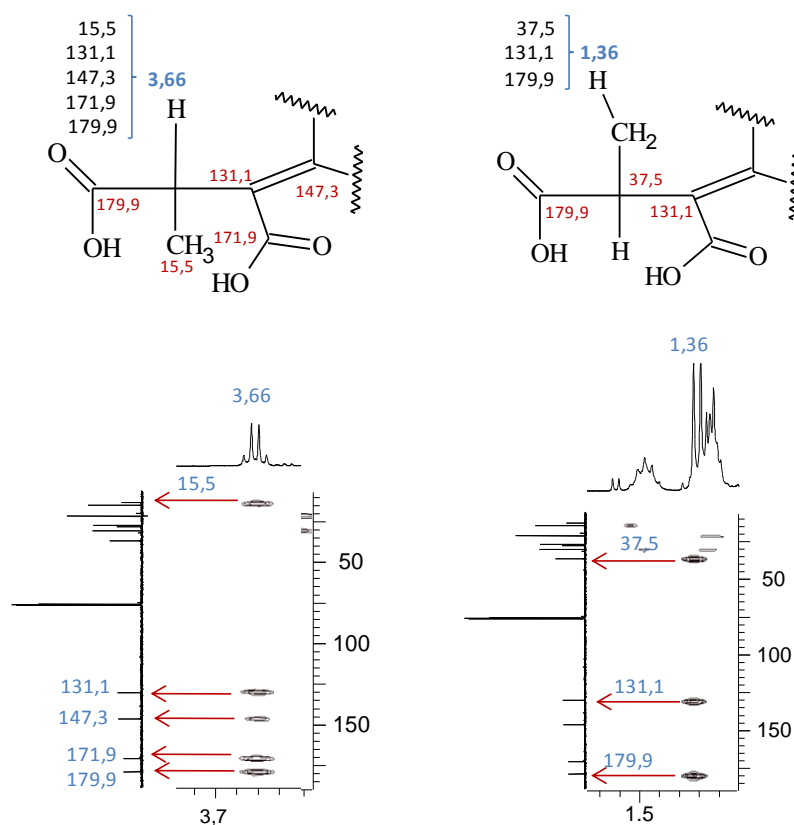
1 carboxilas, considerando-se a diferença de deslocamento químico e o grau de hidrogenação
2 dos mesmos.

3 No espectro de RMN de ^1H e correlações de HSQC é possível observar a presença de
4 um quarteto metínico em δ 3,66 (C-37,5), com ($J = 7,1$ Hz), cuja multiplicidade e constante
5 de acoplamento sugerem a presença de uma metila vicinal. Esta é confirmada através da
6 observação de um dubleto em δ 1,36 (C-15,5), com o mesmo valor de J e conforme
7 observação em COSY (Figura 38). O hidrogênio em δ 3,66 apresentou no HMBC
8 correlações com os átomos de carbono em: δ 179,9, 171,8, 131,1, 147,3 e 15,5. O
9 hidrogênio em δ 1,36 apresentou correlações no HMBC com os átomos de carbono em: δ
10 179,9, 131,1 e 37,5. Estas informações são coerentes com a estrutura parcial da substância
11 apresentada na Figura 39.



12
13 **Figura 38.** Regiões ampliadas do espectro de RMN de ^1H e do mapa de correlações de HSQC e
14 espectro de COSY da amostra X12CF8 destacando os átomos de hidrogênio em δ 1,36 e 3,66.

1



2

3 **Figura 39.** Regiões ampliadas do mapa de correlações de HMBC e da amostra X12cF8 destacando
4 os átomos de hidrogênio em δ 1,36 e 3,66.

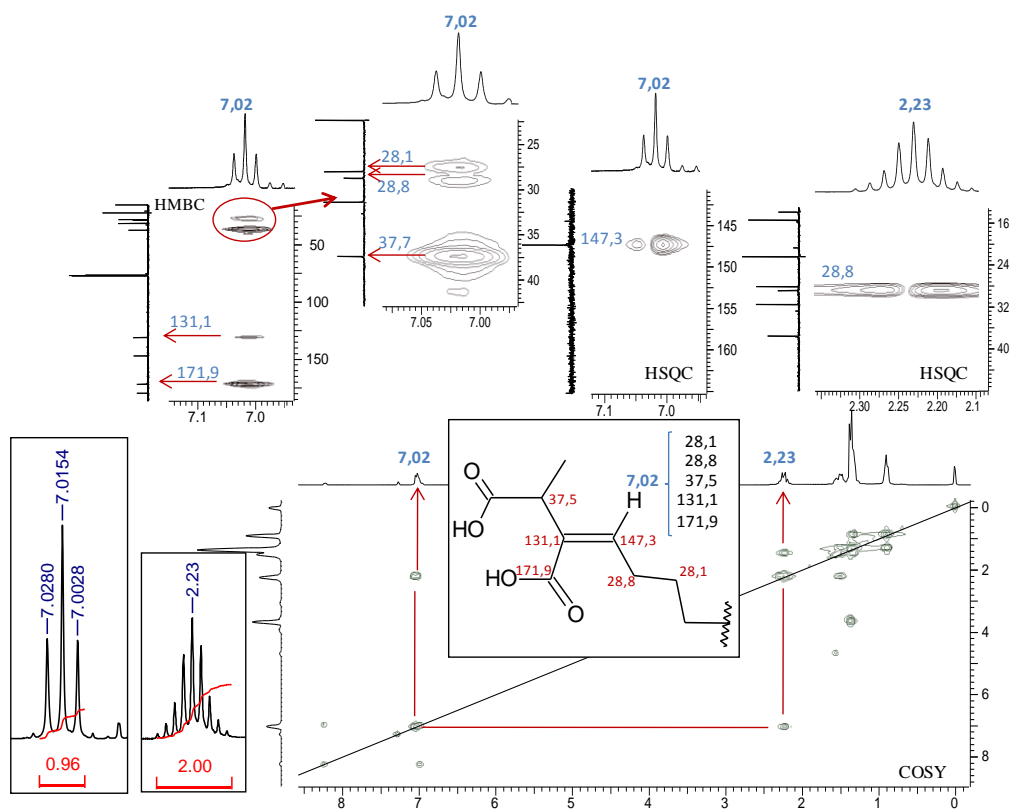
5

6 No HSQC o sinal do carbono em δ 147,3 foi observado em correlação com um sinal
7 de hidrogênio em δ 7,02 cuja multiplicidade aparenta a de um tripleto ($J = 7,6$ Hz). Este
8 sinal apresenta correlações à longa distância em 3J com os carbonos em δ 37,5 e 171,9, além
9 das correlações com os átomos de carbono em δ 28,1, 28,8 e 131,1. Este hidrogênio em δ
10 7,02 também acopla com um multipletto em δ 2,23 que corresponde a dois átomos de
11 hidrogênio conectados ao carbono em δ 28,8, observados do mapa de correlações de COSY.
12 Desta forma é possível sugerir uma segunda estrutura parcial para a substância majoritária
13 da amostra **X12cF8** (Figura 40).

14

15

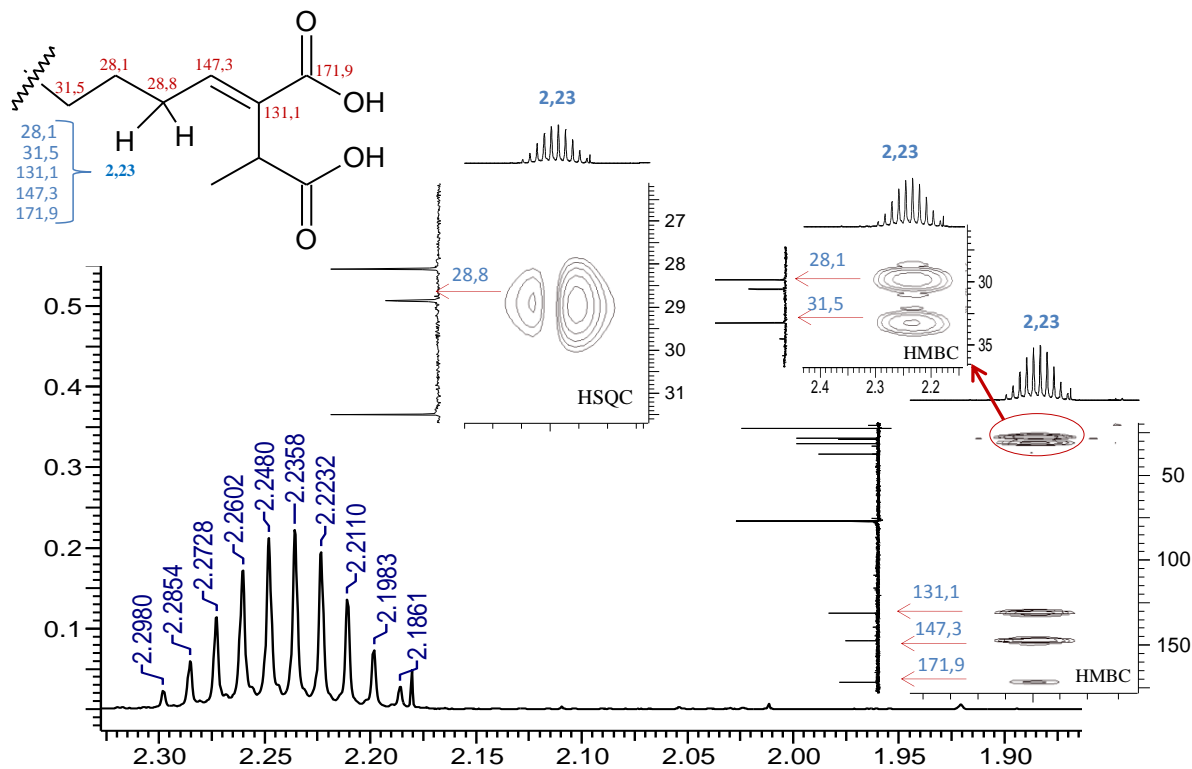
16



1
 2 **Figura 40.** Regiões ampliadas do espectro de RMN de ^1H e dos mapas de correlações de HMBC,
 3 HSQC e COSY da amostra X12cF8, destacando os H em δ 7,02 e 2,23.

4 O multipeto em δ 2,23 corresponde a dois átomos de hidrogênio conectados
 5 diretamente ao carbono em δ 28,8 e em correlação com os átomos de carbono em 28,1 e
 6 31,5 (metilênicos) e em δ 131,1. Esse multipeto não apresenta características de sinal de
 7 primeira ordem, como pode ser deduzido a partir do número de picos e das variações das
 8 distâncias entre eles (Figura 41). Considerando a semi-estrutura em que os dois hidrogênios
 9 correspondentes a esse sinal são apresentados, se poderia esperar um duplo-tripletto em caso
 10 da equivalência de ambos ou dois duplo-duplo-tripletos em caso de não equivalência. No
 11 entanto, o que se tem é um sinal com dez picos. Tem-se portanto, um sistema em que os dois
 12 hidrogênios não são equivalentes porém, por apresentarem deslocamentos químicos quase
 13 coincidentes entre si, formam com os átomos de hidrogênio adjacentes um típico sistema
 14 AMNX. Embora o centro estereogênico no carbono em δ 37,5 os faça quimicamente
 15 diferentes, o ambiente químico muito semelhante de ambos os faz pouco diferentes

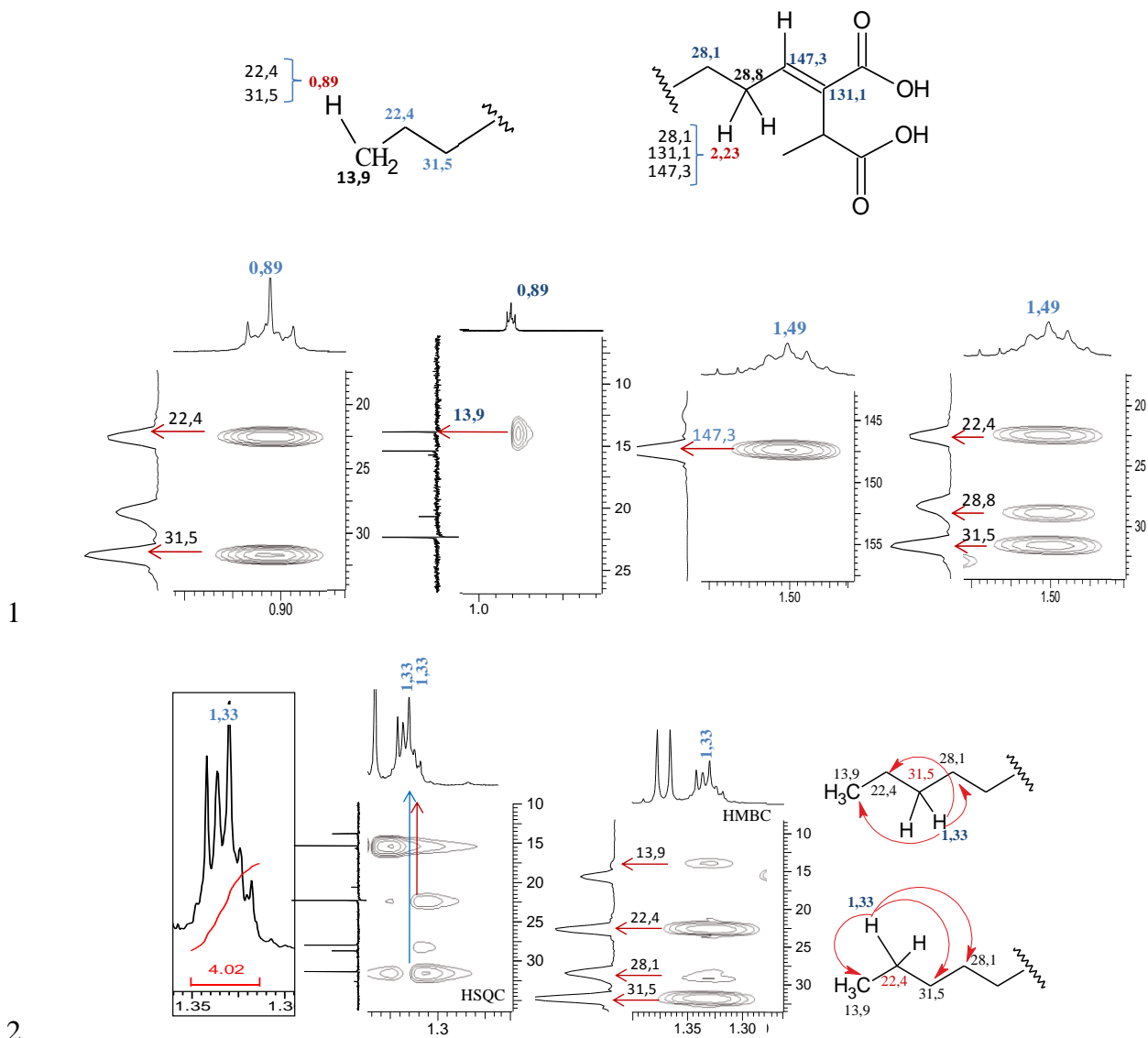
1 magneticamente. Nestas condições, pode-se afirmar também que o sinal do hidrogênio
2 vizinho em δ 7,02 (Figura 40), apesar da aparência de tripleto é um duplo-dupletto que
3 acopla com J_s coincidentes com os átomos de hidrogênio em δ 2,23.



4
5 **Figura 41.** Espectro de RMN de ^1H e regiões ampliadas dos mapas de correlações de HSQC e
6 HMBC da amostra X12cF8, destacando o hidrogênio em δ 2,23.

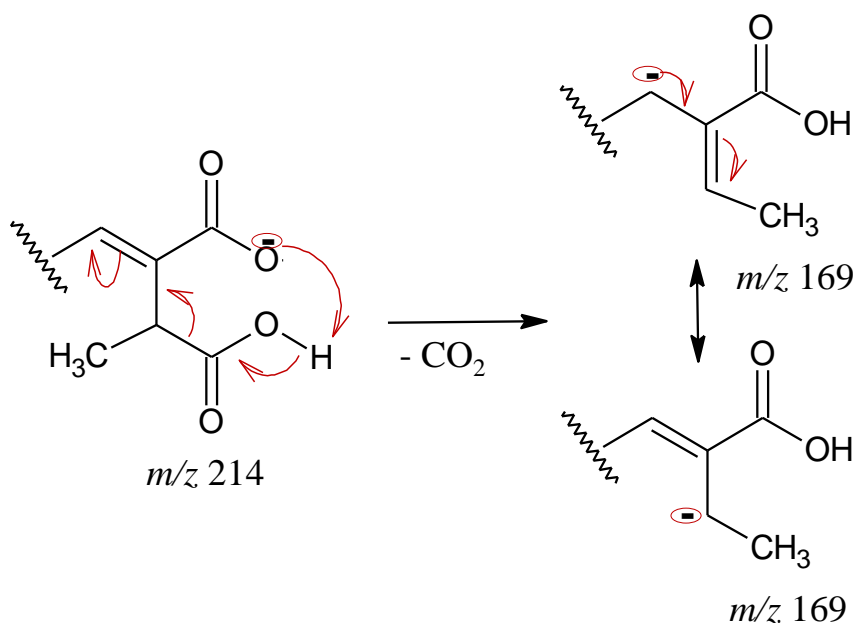
7
8 O multipletto em δ 1,49, correspondente a dois hidrogênios, acopla com os
9 multiplettos em δ 2,23 e 1,33, apresenta correlação direta com o sinal δ 28,1 (Figuras COSY
10 e HSQC) e correlações com os sinais em δ 147,3, 31,5, 28,8 e 22,4. Dois destes sinais, os
11 metilênicos em δ 31,5 e 22,4, também estão em correlação com o tripleto em δ 0,89,
12 conectado ao carbono em δ 13,9, característico de metila terminal de cadeia alifática
13 (HMBC; Figura 42), completando-se assim a determinação da estrutura molecular em
14 questão.

15



1
2
3 **Figura 42.** Regiões ampliadas dos mapas de correlações de HMBC e HSQC e do espectro de RMN
4 de ^1H , destacando as correlações dos sinais de hidrogênio em δ 1,49, 1,33 e δ 0,89 da amostra
5 X12cF8.

6 Assim, de acordo com os dados dos espectros de massas e RMN 1D e 2D, verificou-
7 se que a substância majoritária da amostra **X12cF8** possui a fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_4$
8 (213 u; Figura 44), coerente com a estrutura do ácido 2-Hexil-3-metil-butanodióico, também
9 denominado ácido 2-Hexildieno-3-metilsuccinico ou simplesmente ácido pilifórmico, um
10 produto natural isolado de fungos endofíticos do gênero *Xylaria* (Tabela 14; Figura 44
11 CAFÊU *et al.*, 2005a). O fragmento do íon em m/z 213 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) observado para a
12 substância majoritária da amostra **X12cF8** também são coerentes com o ácido pilifórmico
13 (Figuras 35 e 43).



1

2

Figura 43. Sugestão de fragmentação parcial da estrutura do ácido pilifórmico.

3 **Tabela 14.** Atribuições de ^{13}C e ^1H em comparação com os dados da literatura para a substância
4 ácido pilifórmico.

X12cF8 ¹				ácido pilifórmico ²		
C	$\delta^{13}\text{C}$	δ_{H} (mult. <i>J</i> Hz)	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$	δ_{H} (mult. <i>J</i> Hz)	HMBC
1	171,9			172		
2	131,1			131		
3	37,5	3,66 1H (q,7,1)	C-1; C-2; C-4; C-5; C-11	37	3,6 (q, 7,1)	C-1; C-2; C-4; C-5; C-11
4	179,9			182		
5	147,3	7,02 1H (dd,7,6;7,6)	C-1; C-2; C-3; C-6; C-7	146	6,98 (t, 7,4)	C-1; C-2; C-3; C-6
6	28,8	2,23 2H (m,)	C-1; C-2; C-5; C-7; C-8	32	2,22 (m)	C-2; C-5; C-7; C-8
7	28,1	1,49 2H (m)	C-5; C-6; C-8; C-9	29	1,42 (m)	C-5; C-6; C-8
8	31,5	1,33 2H (m)	C-6; C-9; C-10	33	1,32 (m)	C-7; C-9; C-10
9	22,4	1,33 2H (m)	C-7; C-8; C-19	23	1,32 (m)	C-7; C-8; C-10
10	13,9	0,89 3H (t,7,0)	C-8; C-9	15	0,90 (t)	C-8; C-9
11	15,5	1,36 3H (d,7,1)	C-2; C-3; C-4	16	1,31 (m)	C-2; C-3; C-4

5 ¹Espectrometro Bruker de 600 MHz em Clorifórmio -d

6 ²(CHESTERS; O'HAGAN, 1997); (SANTOS, 2006)

7 ²Bruker ARX-200 para espectro de 1D; Bruker AVANCE DRX-400 para espectro de 2D em Clorifórmio -d

8

9

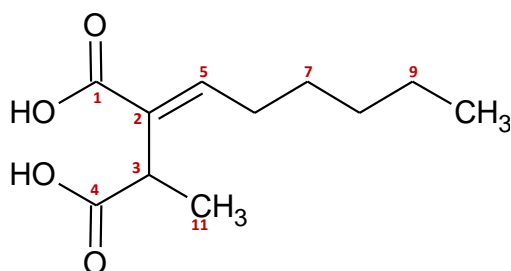


Figura 44. Ácido pilifórmico ($\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_4$)

10

11

12

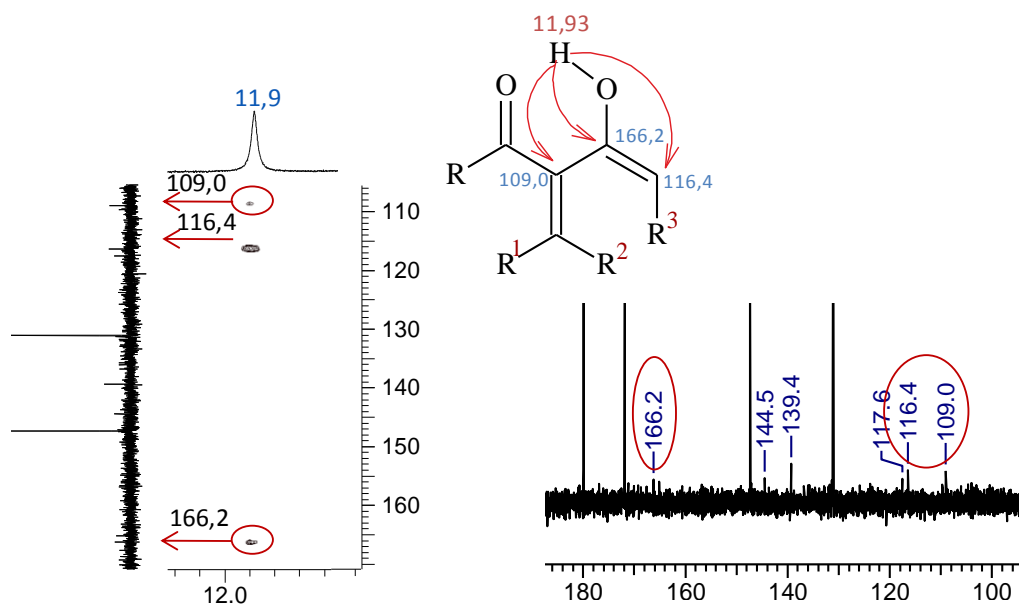
1 O ácido pilifórmico foi isolado pela primeira vez dos fungos endofíticos *X. malie* *X.*
2 *longipes*, mas também foi encontrado em outras cinco espécies de *Xylaria* e em fungos de
3 outros gêneros da família *Xylariaceae* como *Hypoxylom* e *Peronea*, dos quais foi isolado em
4 maior quantidade (ANDERSON; EDWARDS; WHALLEY, 1985). Considerando os dados
5 da literatura recentemente consultados, esta é primeira vez que ocorre o isolamento do ácido
6 pilifórmico de *X. adscendens*.

7 Este ácido ocorre na natureza na forma racêmica (\pm) em ambas conformações E e Z.
8 A conformação em E foi obtida por síntese, a literatura relata que na forma Z, os sinais dos
9 hidrogênios vinílico e do metileno alílico aparecem em δ 6,23 e 2,63
10 (MANGALESWARAN; & ARGADE, 2000). Embora a conformação em E tem sido obtido
11 por síntese, os dados obtidos no presente trabalho indicam o composto na conformação E.

12 Dados da literatura indicam que o ácido pilifórmico apresenta moderada atividade
13 frente às linhagens de câncer de mama e de pele (CHINWORRUNGSEE *et al.*, 2001), no
14 entanto este artigo não informa qual a conformação que foi ativa. O ácido pilifórmico
15 também indicou atividade frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioidese*
16 *Cladosporioides* sp. e *Haerospermum* (CAFÊU *et al.*, 2005). Destacando assim a
17 importância desse estudo.

18 **5.8.3. Identificação do segundo constituinte da amostra X12c F8**

19 Para a identificação da segunda substância da amostra 447 X12c F8, foi observado
20 inicialmente no espectro de RMN de ^1H um sinal com deslocamento químico em δ 11,93,
21 característico de hidrogênio de hidroxila quelada e cujas correlações no mapa de contornos
22 de HMBC com carbono em δ 109,0; 116,4 e 166,2 permitiram propor uma primeira
23 estrutura parcial para a molécula (Figura 45).



1
2 **Figura 45.** Regiões ampliadas do mapa de correlações de HMBC e do RMN de ^{13}C da amostra
3 X12cF8, destacando as correlações do hidrogênio em δ 11,9.
4

5 O carbono em δ 116,4, está correlacionado a um hidrogênio em δ 6,96 (dbr $J= 9,0:0,6$
6 Hz), que apresenta acoplamento orto com outro hidrogênio em 8,22 (d $J = 9,0$ Hz) e
7 correlações com três átomos de carbono em δ 109,0; 117,6 e 166,4. Igualmente coerente em
8 uma estrutura parcial aromática. O hidrogênio em 8,22 foi registrado no HSQC ligado ao
9 carbono 139,4 e em correlações com os átomos de carbonos em δ 144,5, 166,2, 171,8, sendo
10 este atribuído a um carbono acil-carboxílico, uma vez que não foi observado qualquer outro
11 sinal de hidrogênio correlacionado a ele (Figura 46).

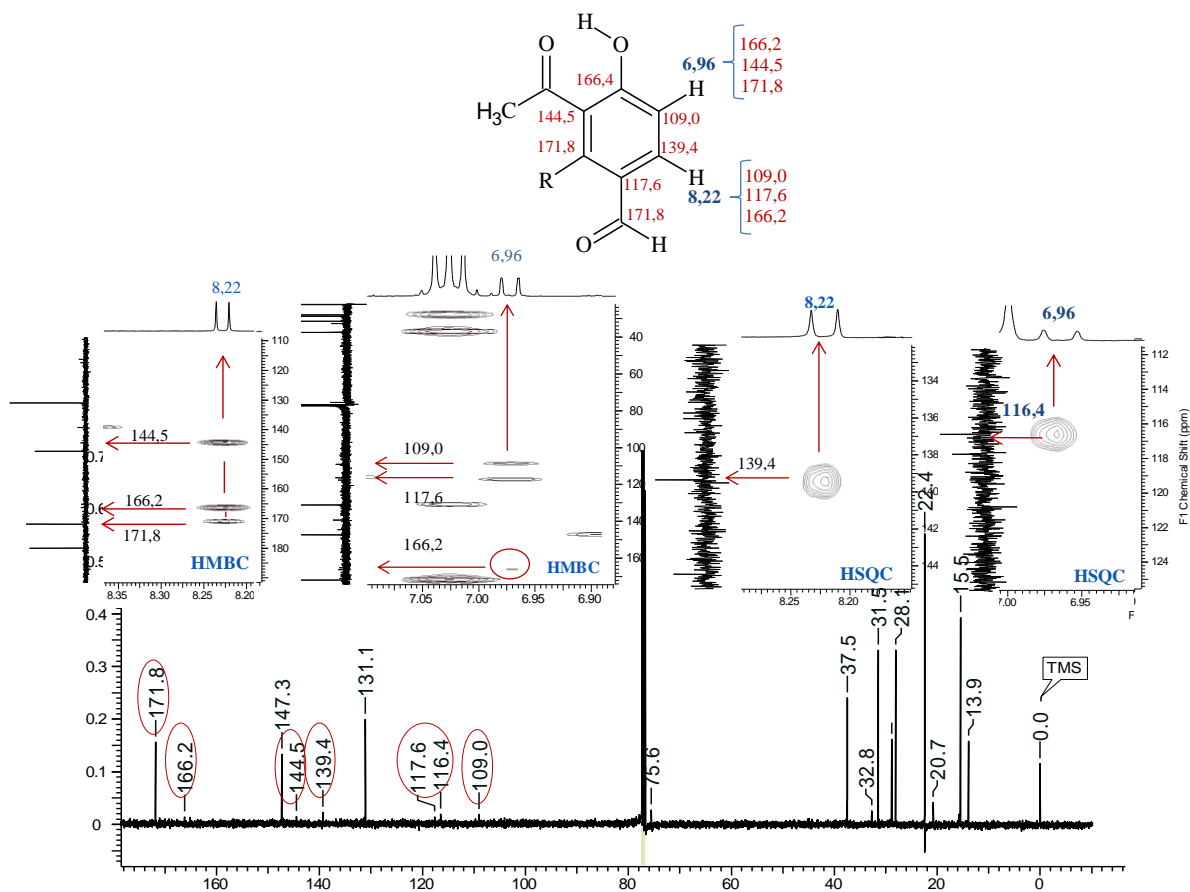
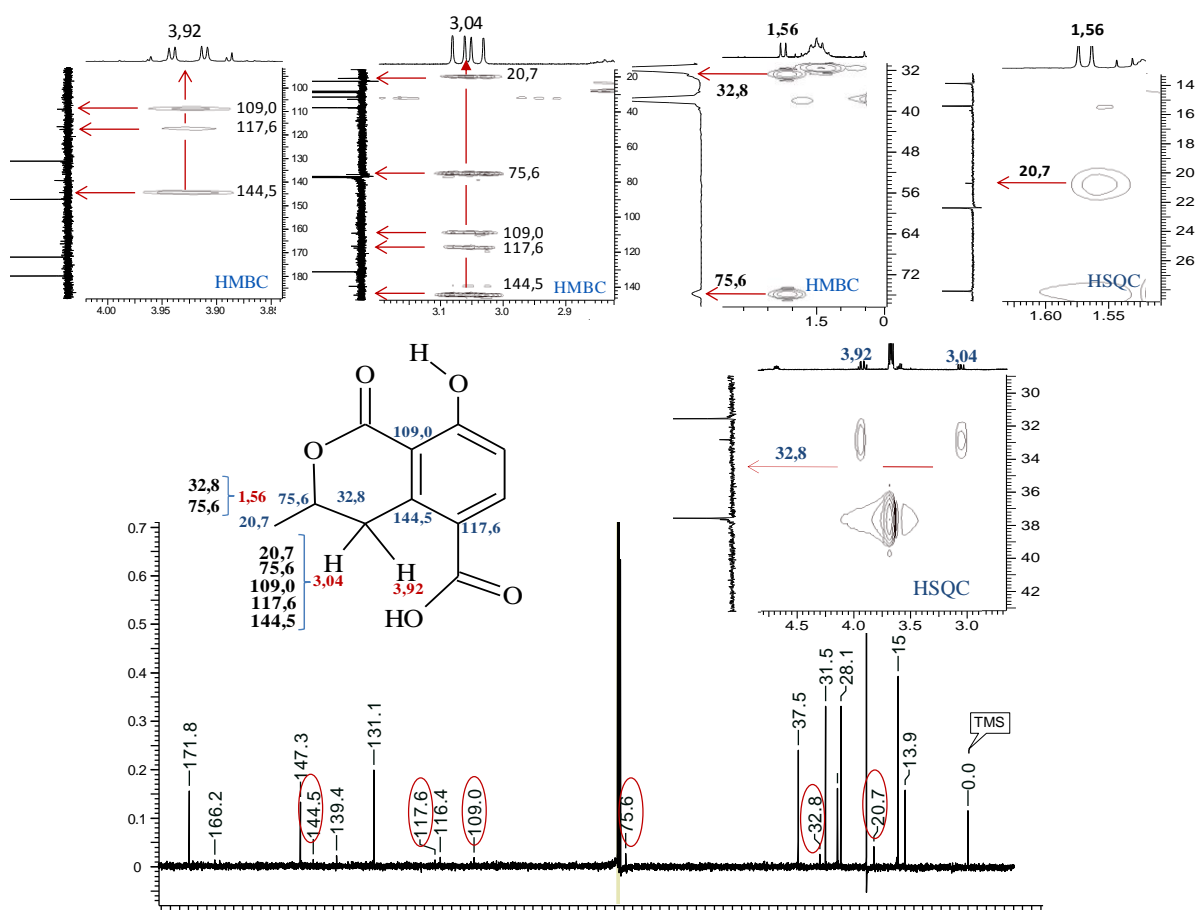


Figura 46. Regiões ampliadas dos mapas de correlações de HMBC e HSQC, espectro de RMN de ^{13}C da amostra X12cF8 e a respectiva estrutura parcial.

Para a identificação dos outros ligantes do anel aromático, foi observado hidrogênio diastereotópico em δ 3,04 (dd $J = 18,0:11,8$ Hz), ligados a um carbono metilênico em δ 32,8 e em correlações com carbono em δ 109,0, 117,6 e 144,5. O hidrogênio em δ 3,04 também apresenta correlações com os carbonos em δ 20,7 (metílico) e 75,6 (metínico ligado a oxigênio). Os átomos de hidrogênio dos carbonos em δ 32,8 e 20,7 apresentam acoplamento com um hidrogênio metínico em δ 4,67 (dq $J = 11,8: 6,4: 3,2$ Hz) conectado ao carbono em δ 75,6, característico de carbono ligado a oxigênio, que sugere a presença de um anel de lactona fundido ao anel aromático. Por fim, o hidrogênio metílico em δ 1,56 aparecem ligados ao carbono em δ 20,7 e apresenta correlações com os átomos de carbono em δ 32,8 e 75,6, completando os dados para determinar a estrutura parcial alifática cíclica do anel lactona ligada ao anel aromático (Figura 47).



1
2 **Figura 47.** Regiões ampliadas dos mapas de correlações de HMBC e HSQC, do RMN de ^{13}C da
3 amostra X12cF8, destacando a identificação da parcial alifática da estrutura.
4

5 O pico observado em 221 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) no espectro de massas (Figura 35 e 48) pressupõe
6 uma substância de massa 220 u, a qual se ajusta a estrutura da 5-carboximeleína, isolada
7 pela primeira vez por Anderson e colaboradores em 1985 do fungo *Hypoxyton illitium*,
8 pertencente à família *Xylariaceae* (Tabela 15; Figura 43b).

9 Ensaios de atividade alelopática desenvolvidos nos estudos de Okuno e
10 colaboradores (1986) indicaram o 5-carboxi-meleína como uma substância bastante tóxica,
11 pela inibição do crescimento de sementes de alface, sendo este resultado de grande
12 importância para a agricultura, quando aplicado como uma alternativa no controle de ervas
13 daninha (OKUNO; OIKAWA; GOTO, 1986).

14 O 5-carboximeleína e o ácido pilifórmico, juntamente com outros metabólitos foram
15 isolados do fungo marinho *Halorosellinia oceânica*, no qual foram avaliadas as atividades

1 citotóxicas, anti-microbiana e antimalárica. Nos estudos de Chinworrungsee e colaboradores
2 em 2001, ambas substâncias exibiram moderada atividade contra células de câncer de pele
3 com IC₅₀ de 13 e 3 µg.mL⁻¹, respectivamente. O 5-carboximeleína exibiu moderada
4 atividade antimalárica (CHINWORRUNGSEE *et al.*, 2001).

5 Embora as substâncias, ácido pilifórmico e 5-carboximeleína, aqui identificados
6 sejam metabólitos fúngicos bem conhecidos de ocorrência na família *Xilareaceae*, esta é a
7 primeira vez que ocorre o isolamento do 5-carboximeleína de *X. adscendens*.

Tabela 15. Atribuições de ^{13}C e ^1H da substância 5-carboximeleína em comparação com os dados da literatura.

C	$\delta^1\text{H}$ (mult. J/Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	X12cF8 ¹		$\delta^{13}\text{C}$		
			HMBC	I) $\delta^1\text{H}$ (mult. J/Hz)	I	II	III
1	-----	171,8	-----		169,2 (s)	170,35	169,5
2	-----	-----	-----				
3	4,67 1H, (dq, 11,8, 6,4, 3,2)	75,6	-----	4,72 1H (m)	75,1 (d)	75,68	75,4
4	3,04 1H (dd, 11,8, 3,2)	32,8	C-3, C-4a, C-5, C-6, C-8a,	2,96 1H (dd, 18,0, 12,0)	32,0 (t)	32,93	32,2
	3,92 1H (ddd, 18,0, 11,8, 0,6)		C-9, C-4a, C-5, C-8a	3,82 1H (dd, 18,0, 3,0)			
4a	-----	144,5	-----		143,2 (s)		143,4
5	-----	117,6	-----		119,4 (s)	139,11	109,1
6	8,22 1H (d, 9,0)	139,4	C-4a, C-8, C-10	8,15 1H (dd, 9,6)	138,6 (d)	115,85	138,4
7	6,96 1H (dd, 9,0, 0,6)	116,4	C-5, C-8a, C-8	6,94 1H (dd, 9,6)	115,3 (d)	165,15	115,5
8	-----	166,2	-----		163,7 (s)	109,30	163,9
8a	-----	109,0	-----		108,8 (s)	143,65	120,1
9	1,56 3H (d, 6,4)	20,7	C-3, C-4	1,44 3H (d, 6,0)	20,1 (q)	20,43	20,4
10	-----	171,8	-----			168,47	167,2
OH	11,93 1H (s)	-----	C-7, C-8a, C-8	11,61 1H (s)			
OH				12,94 1H (s)			

¹ Espectrometro 600/150 MHz, em CDCl_3 .

I = (OKUNO; OIKAWA; GOTO, 1986), (RMN ^1H de 60 MHz, em CDCl_3 e DMSO-d_6), **II** = (OPPONG *et al.*, 2009), **III** = (CHINWORRUNGSEE *et al.*, 2001), (400 MHz, DMSO d_6)

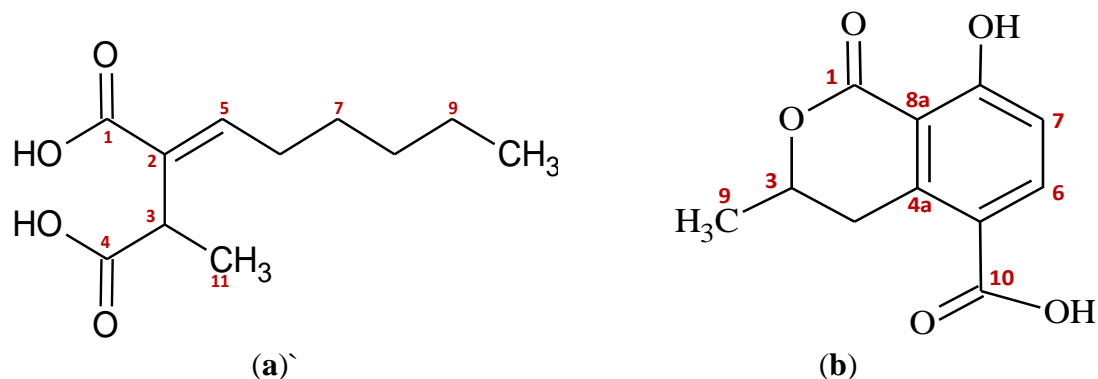


Figura 48. Constituintes da amostra X12cF8, ácido pilifórmico ($\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_4$) (a) e 5-carboximeleina ($\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$) (b)

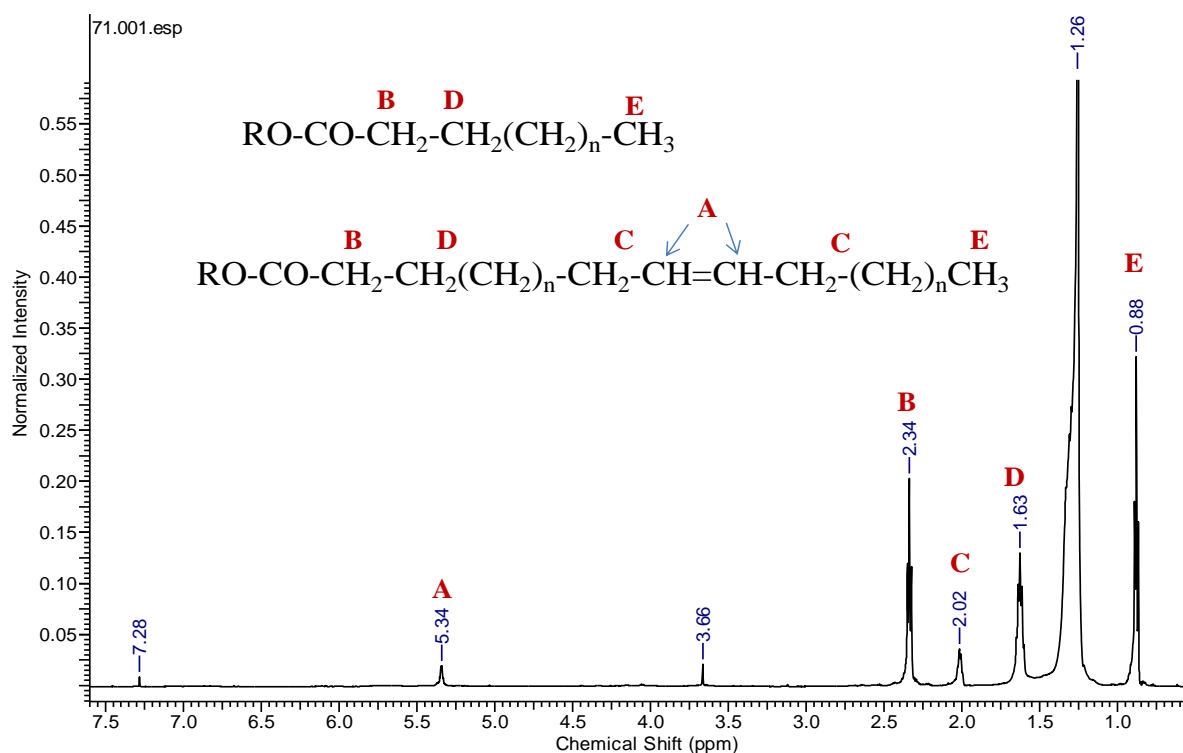
1 5.9. Linhagem 401 *P. chrysogenum* – fermentação em CY

2 O fracionamento do extrato do micélio, EC3 da linhagem 401 em CY levou ao
3 isolamento de quatro amostras que receberam os seguintes códigos: F2 (71), F8(1) e F8(2)
4 e F10-13(81). Estas serão discutidas nos tópicos a seguir.

5 5.9.1. Amostra F2 (71)

6 A amostra F2 (71) apresentou aspecto de óleo, pouco viscoso de coloração branca.
7 O espectro de RMN de ^1H dessa amostra indicou presença de poucos sinais, com destaque
8 para o sinal de simpleto em δ 9,74, característico de hidrogênio de ácidos carboxílicos e
9 um multipletto em δ 5,33, característico de hidrogênio olefínico. Os demais sinais
10 encontram-se na região de campo alto δ 0,8 e 2,4 (Figura 49).

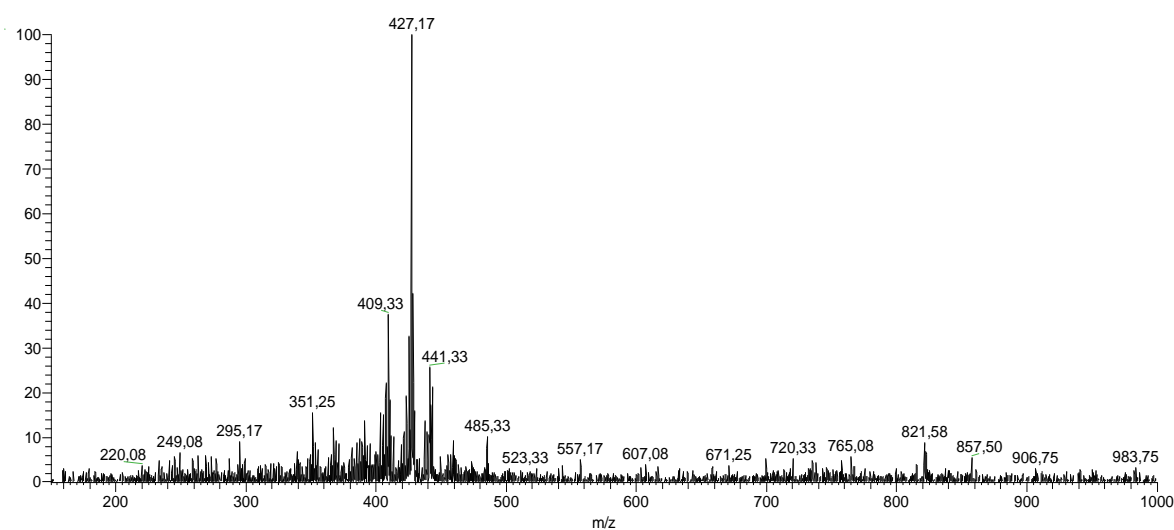
11 A integração dos sinais A, B e E do espectro de RMN de ^1H permitiu a
12 identificação da amostra como uma mistura de ácidos graxos saturados e mono-
13 insaturados, em que estes representam entre 10% e 15% da amostra (BARISON *et al.*,
14 2010).



15 **Figura 49.** Espectro de RMN de ^1H da amostra F2 (71), a 600 MHz em CDCl_3 .
16

1 5.9.2. Amostra F8 (1)

2 A amostra **F8 (1)** apresentou aspecto de sólido cristalino, cuja análise por CCD com
3 Hex:AcOEt (1:1), indicou apenas uma mancha na placa. Na análise da amostra por
4 espectrometria de massas foi observado um pico majoritário em m/z 427 ($[M-H]^-$) no modo
5 negativo, compatível com uma substância de massa 428 u. Também foi observado um pico
6 em m/z 409, referente a perda de uma molécula de água, por ionização na fonte, típica de
7 alcoóis (Figura 50).

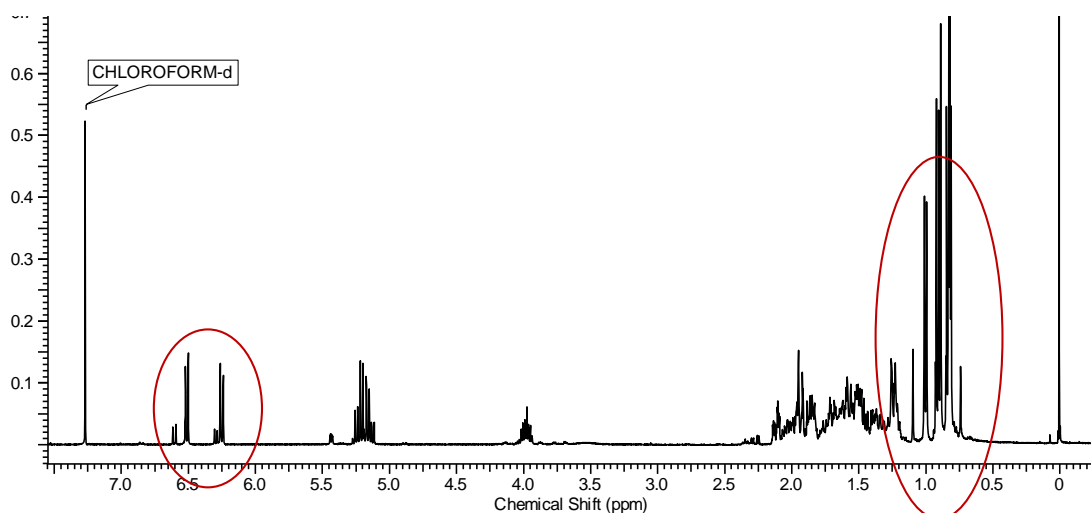


8 **Figura 50.** Espectro de massas da amostra F8 (1) por ESI-ITMS no modo negativo.

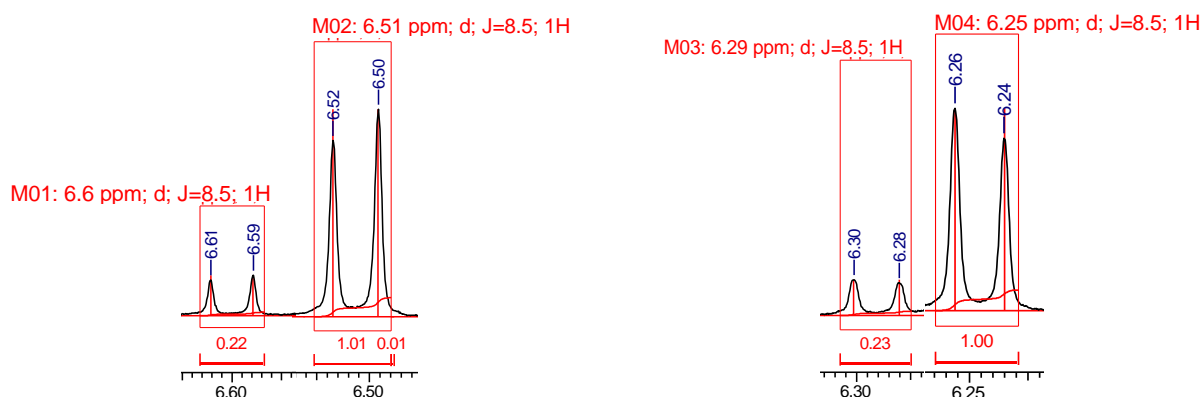
9

10

11 No espectro de RMN de ^1H foi observada a presença de sinais de dupletos com
12 deslocamento químico entre δ 6,22 e 6,67, característicos de hidrogênio olefínicos e
13 diversos sinais de metilas com deslocamento entre δ 0,80 e 1,10, típicos de esqueleto
14 esteroidal (Figura 51). A ampliação da região entre δ 6,22 e 6,67 revelou dois pares de
15 dupletos, um par com menor intensidade em δ 6,60 e 6,29 e outro cerca de cinco vezes
16 mais intenso em δ 6,51 e 6,25, porém ambos com o mesmo valor de J (8,5 Hz), revelando
17 a mistura de duas substâncias com o mesmo sistema olefínico e em quantidades bem
18 diferentes (Figura 52). Em outras regiões do espectro também foram observados sinais que
19 confirmam uma substância minoritária na amostra.



1
2 **Figura 51.** Espectro de RMN de ^1H da amostra F8 (1), a 400 MHz em CDCl_3 .
3

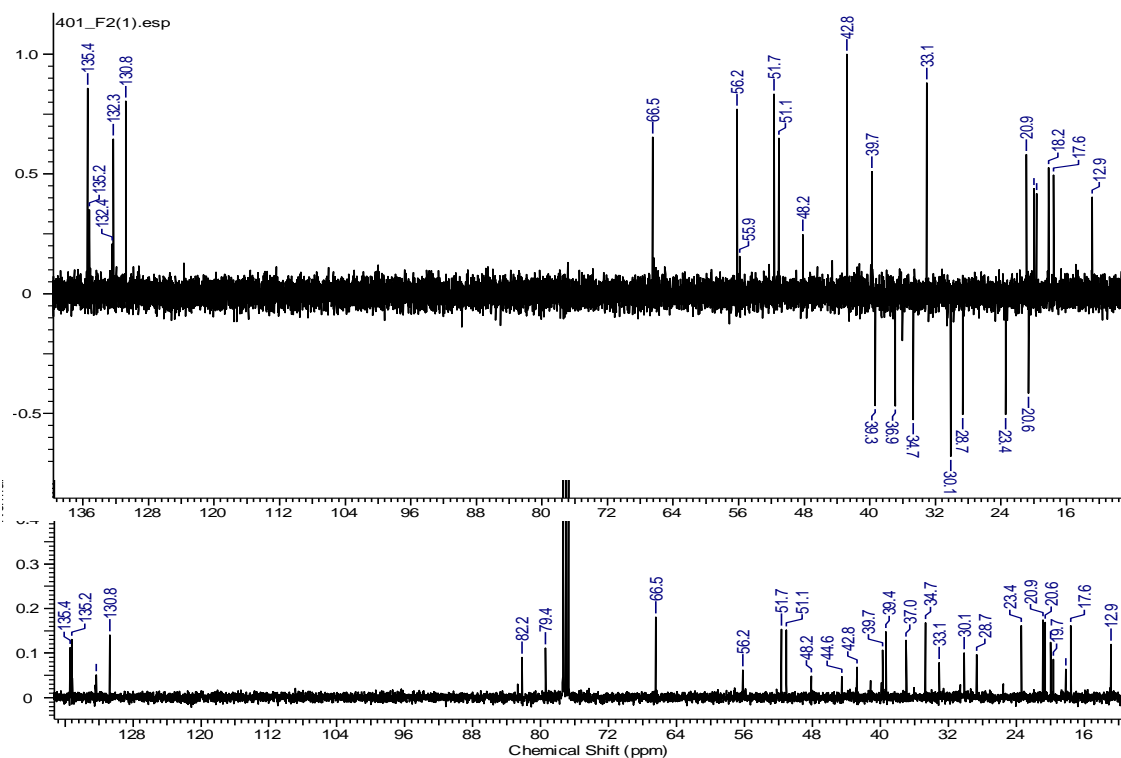


7 **Figura 52.** Regiões ampliações do espectro de RMN de ^1H da amostra F8 (1).
8
9
10
11
12
13
14

15 A análise do espectro de RMN de ^{13}C revelou a presença de 28 sinais mais intensos
16 com deslocamentos em: δ 12,9, 17,6, 18,2, 19,7, 20,0, 20,6, 20,9, 23,4, 28,7, 30,1, 33,1,
34,7, 36,9, 37,0, 39,4, 39,4, 42,8, 44,6, 51,1, 51,7, 56,2, 66,5, 79,4, 82,2, 130,8, 132,3,
135,2, 135,4 (Figura 53). Através do DEPT 135 estes sinais foram identificados como sete
de carbonos metilênicos, seis de metílicos, onze de metínicos e quatro átomos de carbono
quaternários. Os sinais em δ 130,8, 132,3, 135,2, 135,4 confirmam carbonos olefínicos e os
sinais em δ 66,5, 79,4, 82,2 confirmam carbonos carbinólicos na substância principal da
amostra.

A análise combinada dos espectros de massas e de RMN, e a comparação com
dados da literatura permitiram a identificação da substância majoritária da amostra

1 **PI3F8(1)** como sendo o peróxido de ergosterol, um produto da oxidação do ergosterol,
2 comumente isolado de fungos Tabela 16 (SHIN; TAMAI; TERAZAWA, 2001; YUE *et al.*,
3 2001).



4 **Figura 53.** Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135 da amostra F8(1), a 100 MHz em CDCl_3 .

5
6
7 Numa nova análise dos dois pares de dupletos em δ 6,51 e 6,25 e em δ 6,60 e 6,29
8 (Figura 52), verifica-se que ambos correspondem aos átomos de hidrogênio ligados aos
9 carbonos 6 e 7 do peróxido de ergosterol. Os mais intensos, em δ 6,51 e 6,25, estão
10 relacionados ao $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-22E-ergosta-6,22-dien-3 β -ol, forma *endo* e os menos
11 intensos, em δ 6,60 e 6,29, estão relacionados ao $5\beta,8\beta$ -epidioxi-22E-ergosta-6,22-dien-3 β -
12 ol, forma *exo* (YUE *et al.*, 2001). Tem-se portanto a mistura do peróxido de ergosterol nas
13 formas *endo* e *exo* na amostra PI3 F8(1), com predominância da forma *endo* ($5\alpha,8\alpha$).

14 Estudos biológicos indicaram o peróxido de ergosterol ($5\alpha,8\alpha$) um inibidor seletivo
15 contra a enzima fosfolipase A_2 PLA $_2$ presente em veneno de cobra (*Crotalus adamanteus*)
16 além apresentar moderada atividade anti-inflamatória e antitumoral contra câncer de
17 próstata (GAO *et al.*, 2007; RUSSO *et al.*, 2010;

1 O peróxido de ergosterol (5α , 8α) teve recentemente seu potencial antifibrótico
2 avaliado em rim de ratos, e foi indicado como um possível agente terapêutico no
3 tratamento para prevenção da fibrose renal (ZHU *et al.*, 2014). Com base nos dados das
4 referências acima citadas, pode-se sugerir que o peróxido de ergosterol (Figura 54)
5 apresenta grande potencial farmacológico, sendo os fungos endofíticos a principal fonte
6 desse metabólito.

7 É importante ressaltar que até o momento não foi divulgado ensaios biológicos com
8 o peróxido de ergosterol na forma exo (5β , 8β), que seria um dado importante para
9 identificar a estrutura mais ativa da molécula.

10

11

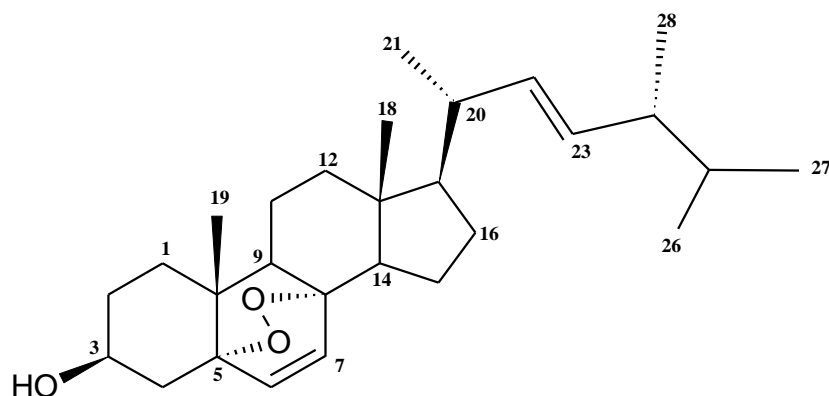
1 **Tabela 16.** Comparação entre os dados de RMN da substância majoritária da amostra F8(1) e do
 2 peróxido de ergosterol.

C	F8(1) ¹		Peróxido de ergosterol ²	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H mult., J Hz}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H mult., J Hz}$
1	39,7		39,3	
2	30,1		30,1	
3	66,5	3,97 1H (m)	66,4	3,921H, (m)
4	34,7		34,7	
5	79,4		79,4	
6	130,8	6,25 e 6,29 2H (d, 8,5)	130,6	6,22 1H, (d, 8,4)
7	135,2	6,51 e 6,60 2H (d, 8,5)	135,3	6,48 1H, (d, 8,4)
8	82,2		82,1	
9	51,1		51,1	
10	37,0		37,0	
11	20,6		20,7	
12	39,4		39,3	
13	44,6		44,6	
14	51,7		51,7	
15	28,7		28,7	
16	23,4		23,4	
17	56,2		56,2	
18	12,9	0,73 3H(s)	12,9	0,77, 3H (s)
19	18,2	0,84 1H (s)	18,2	0,84 3H, (s)
20	39,9		39,8	
21	19,7	0,99 3H (d, 6,6)	19,7	0,95 3H, (d, 6,4)
22	132,3	5,22 1H, (d, 15,1)	132,2	5,18 1H, (d, 15,1)
23	135,4	5,13 1H, (d, 15,1)	135,1	5,09 1H, (d, 15,1)
24	42,8		42,8	
25	33,1		33,1	
26	19,7	0,89 3H, (d, 6,9)	20,0	0,79 3H, (d, 6,6)
27	20,0	0,82 3H, (d, 6,6)	20,9	0,77 3H, (d, 6,6)
28	17,6	0,88 3H, (d, 6,9)	17,6	0,86 3H, (d, 7,2)

3 ¹ Espectrometro de 400/100 MHz em CDCl₃

4 ² Espectrometro de 400/100 MHz para ¹³C (KIM *et al.*, 2005).

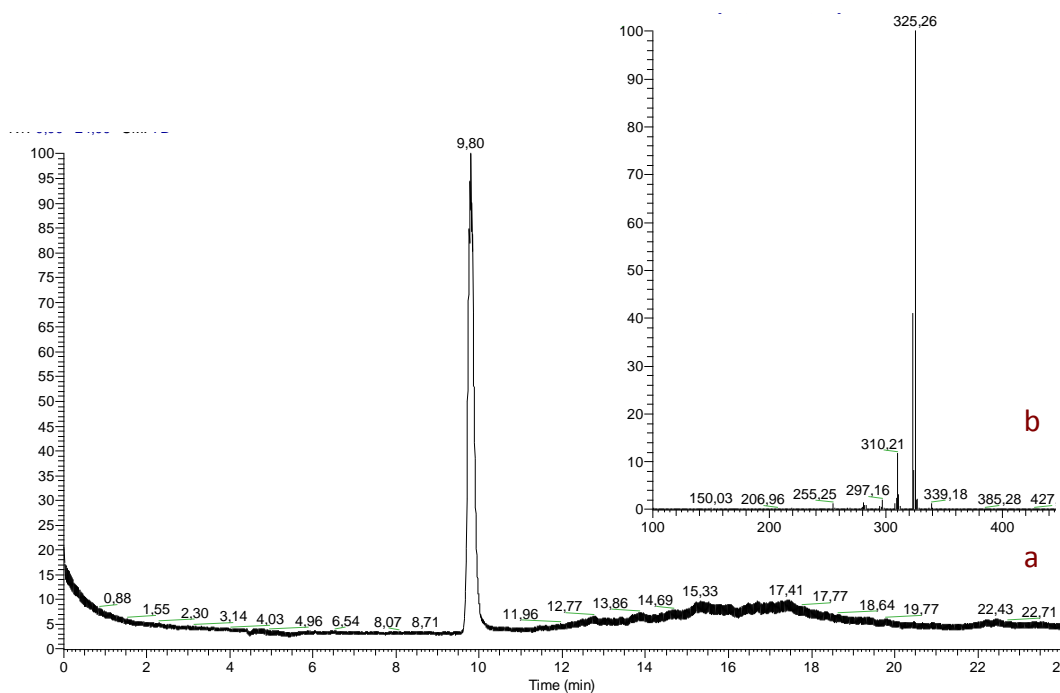
5
6



7 **Figura 54.** Amostra F8(1) - Peróxido de ergosterol (C₂₈H₃₉O₃)
8
9

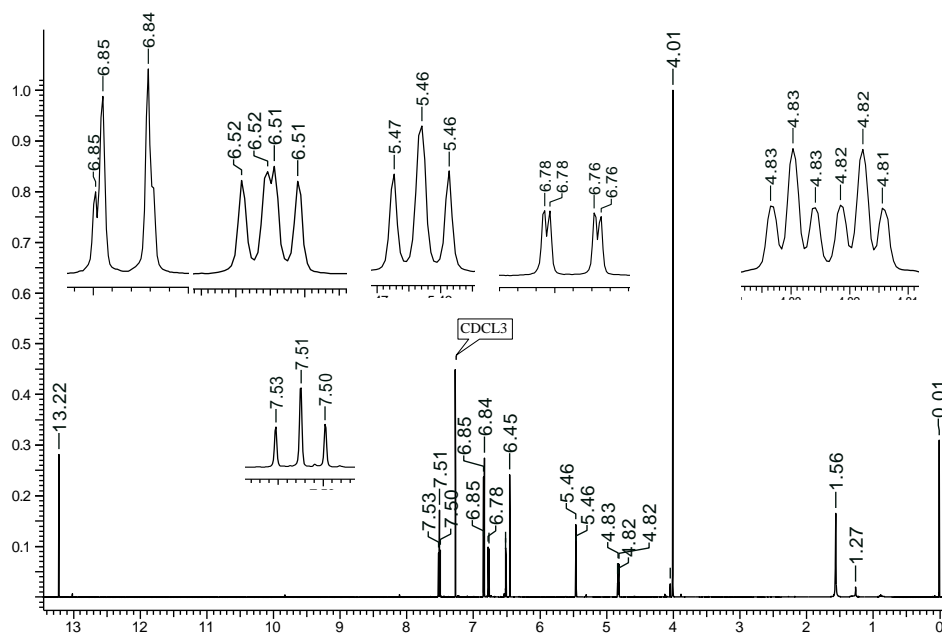
1 5.9.3. Amostra F8(2)

2 A amostra **F8(2)** apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarelo forte.
3 A figura 55 mostra o cromatograma e o espectro de massa da amostra F8(2) obtido em
4 modo positivo. No qual é observado um único pico intenso em m/z 325 ($[M+H]^+$),
5 correspondendo a uma substância de massa 324.



6 **Figura 55.** Cromatograma (a) e espectro de massas (b) da amostra F8 (2) obtidos por LC/APCI-MS.
7
8

9 No espectro de RMN de ^1H da amostra **F8(2)** foi observado um simpleto em δ
10 13,22, característico de hidrogênio quelado e diversos sinais na região entre δ 7,60 e 6,4,
11 indicando substância aromática. Foi também observado um simpleto intenso em δ 4,01, de
12 grupo metoxila, além de sinais na região entre δ 4,83 a 5,46, de ligações duplas (Figura
13 56).



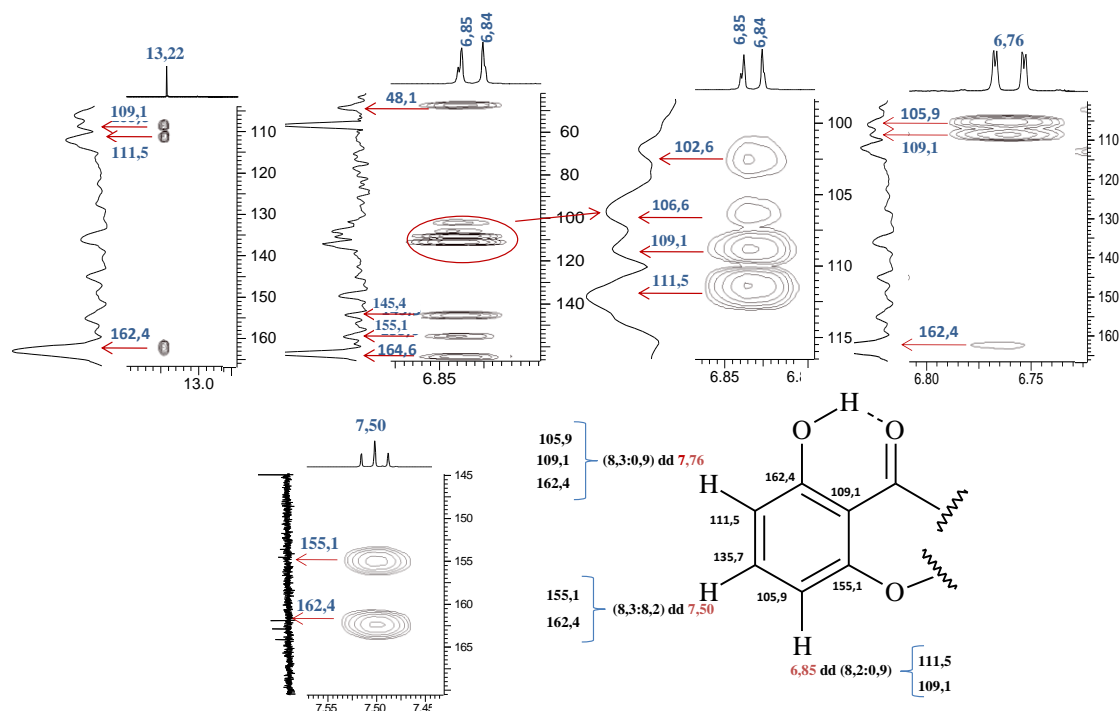
1
2 **Figura 56.** Espectro de RMN de ^1H da amostra 401 PC3 F8(2) e regiões ampliadas (CDCl_3 , 600
3 MHz).

4 No HSQC o simpleto em δ 13,22 não apresenta nenhuma correlação, porém no
5 HMBC apresenta correlações com três sinais de carbono aromáticos em δ 109,1, 162,4 e
6 111,5. Conectado ao carbono em δ 111,5 foi observado um hidrogênio em δ 6,76 (dd $J =$
7 8,3:0,9 Hz), o qual apresentou fortes correlações com carbonos em δ 105,9, 109,1 e fraca
8 com o carbono em δ 162,4. Correlacionados pelos valores das constantes de acoplamentos
9 com o hidrogênio em δ 6,76, o hidrogênio em δ 7,51 (dd $J = 8,3:8,2$ Hz, registrado como
10 um falso tripleto) e 6,85 (dd $J = 8,2:0,9$ Hz) estão conectados respectivamente carbonos
11 em δ 135,7 e 105,9.

12 O sinal em δ 7,51 apresentou correlação fraca com o carbono em δ 109,1 e forte
13 com carbono em δ 155,0 e 162,4.

14 O sinal do hidrogênio em δ 6,85 aparece parcialmente superposto com um duplete
15 em δ 6,84. Relacionadas a posição de ambos aparecem no HMBC correlações fortes com
16 carbono em δ 48,1, 109,1, 111,5, 145,4 e 164,6 e fracas com carbono em δ 102,6, 106,6,
17 155,0. Os dados até aqui apresentados sugerem uma estrutura parcial formada por um anel

1 aromático trissubstituído, contendo três hidrogênio em carbono vizinhos e dois carbono
 2 conectados a oxigênio, tendo um destes oxigênios a formação de uma hidroxila quelada
 3 com um carbono acílico ou carbonílico, o qual está conectado ao sexto carbono do anel
 4 aromático (Figura 57).



5

6 **Figura 57.** Regiões ampliadas do mapa de correlações de HMBC da amostra 401 PC3 F8(2)
 7 destacando a multiplicidade dos sinais.

8

9

O duplete em δ 6,84 é o único sinal que não pertence a estrutura parcial sugerida no

10 parágrafo anterior. No mapa de correlação de HSQC o hidrogênio em δ 6,84 mostra

11 correlação com o carbono em δ 113,3, esse hidrogênio tem o valor da constante de

12 acoplamento (7,1 Hz) em comum com uma das constantes de outro sinal em δ 4,81 (ddd J

13 = 7,1:2,6:2,2 Hz), que correlaciona com o carbono em δ 48,1 e com a aparência de um

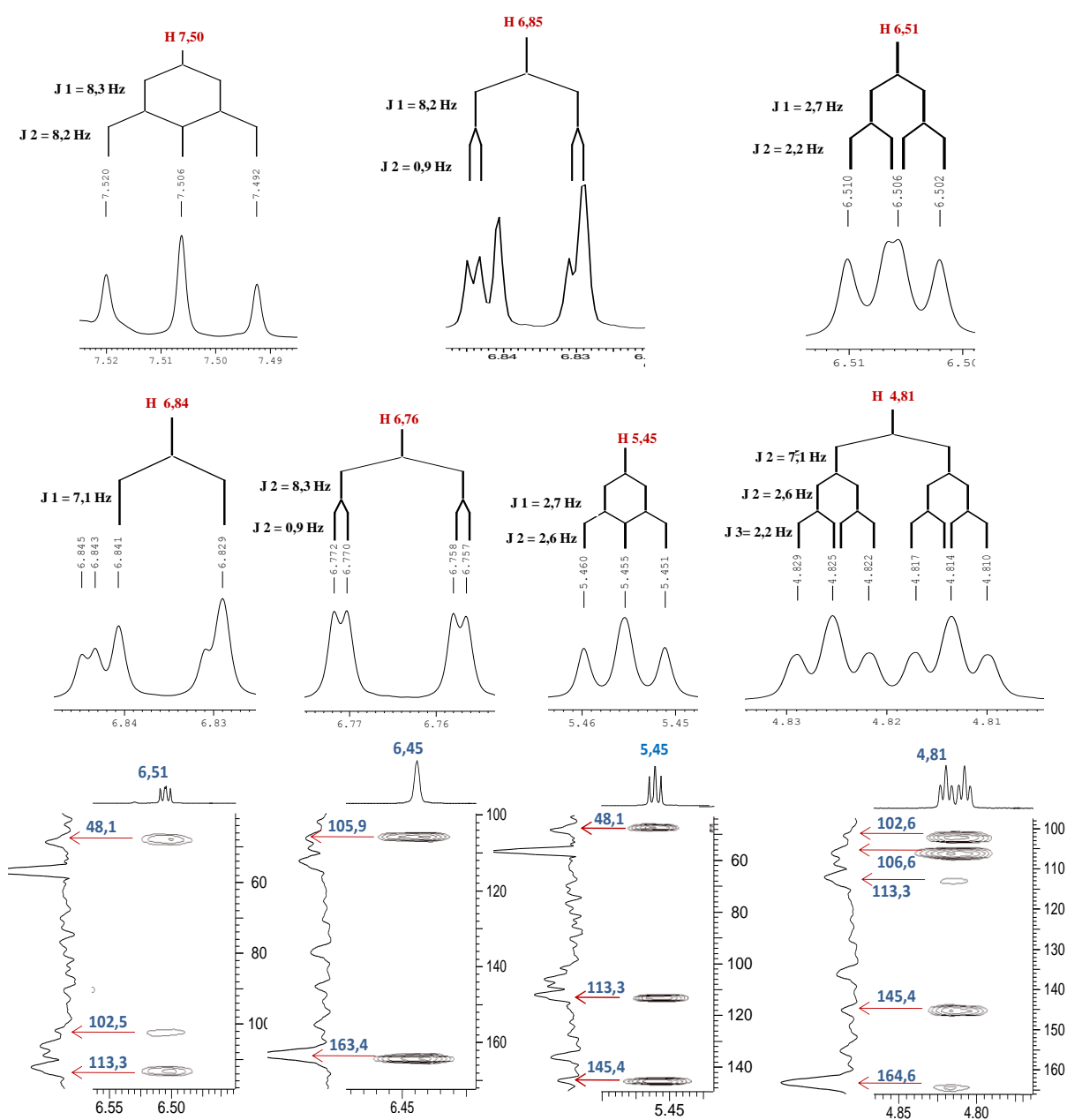
14 duplo tripleto. Este hidrogênio em δ 4,81 apresentou 5 correlações, sendo com carbono em

15 δ 102,6, 106,4 e 145,4, e correlações fracas com carbono em δ 113,3 e 162,4. Os dois

16 carbono (δ 102,6 e 145,4), estão correlacionados respectivamente aos hidrogênio em δ 5,45

17 (dd J = 2,7:2,6 Hz) e em δ 6,51 (dd J = 2,7:2,2 Hz) que de acordo com suas respectivas

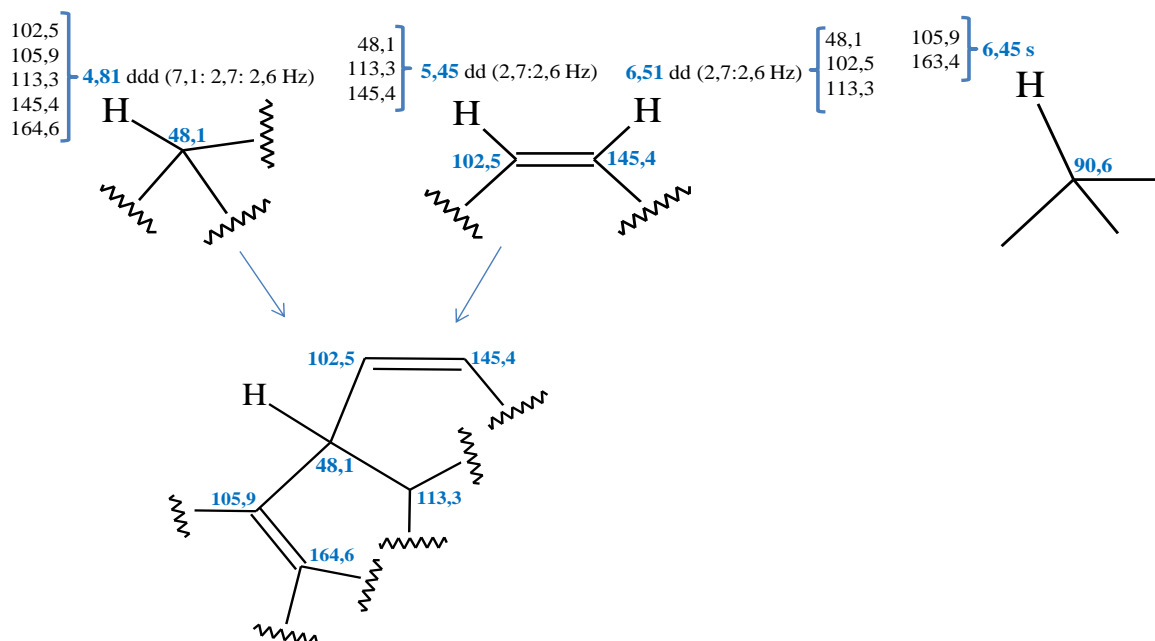
1 constantes de acoplamento, acoplam entre si e com o hidrogênio em δ 4,81. No mapa de
 2 correlações de HMBC o hidrogênio em δ 5,45 apresenta correlações com os carbonos em δ
 3 48,1, 113,3 e 145,4, e o hidrogênio em δ 6,51 apresenta correlações com carbono em δ
 4 48,1, 102,6 e 113,3. Um singlete com deslocamento em δ 6,45, no mapa de correlação de
 5 HSQC apresenta conexão com o carbono em δ 90,6, e no HSQC apresenta correlações
 6 com carbono em δ 105,9 e 163,4 (Figura 58).



7

8
9

10 **Figura 58.** Regiões ampliadas espectro de RMN de ^1H e do mapa de correlações de HMBC da
 11 amostra F8(2), destacando a multiplicidade e as correlações dos sinais de hidrogênio.
 12



1
2 **Figura 59.** Estruturas parciais a partir dos dados do mapa de correlações de HMBC da amostra
3 F8(2), destacando os hidrogênios em δ 4,81, 5,45 e 6,45.
4

5 Os dados dos espectros de RMN 1D e 2D acima discutidos (Tabela 17), juntamente
6 com os dados do espectro de massas, bem como a comparação com dados da literatura
7 (PACHLER *et al.*, 1976, SAKAI; OHTE; OHSHIRO, 2008) permitiram a identificação da
8 amostra **F8(2)**, como sendo esterigmatocistina (STC), (3a*R*,12c*S*)-8-hydroxy-6-methoxy-
9 3a,12c-dihydro-7*H*-furo[3',2':4,5]furo[2,3-*c*]xanthen-7-one) (Figura 60), uma
10 bifuranoxantona.

11 STC é uma micotoxina mutagênica e carcinogênica em animais e humanos, com
12 ocorrência em diferentes espécies de fungos, mas principalmente em espécies do gênero
13 *Aspergillus* (ZHANG *et al.*, 2013), tendo sido isolada de alimentos como grãos, sementes,
14 queijo e outros (VERŠILOVSKIS; BARTKEVIČS; MIKĒLSONE, 2008). A STC é
15 precursora da aflotoxina B₁ (AFB₁) de maior toxicidade. Ambas têm estrutura angular,
16 porém STC é menos tóxica do que AFB₁.

17 Estudos recentes usando substâncias de origem de micro-organismos indicaram o
18 STC como uma substância promissora no combate a doença esterosclerótica (acúmulo de
19 gordura de baixa densidade em diversos tecidos) principalmente no fígado e no intestino.

1 STC age na inibição da ACAT2 (Acetyl-CoA-acetiltransferase), enzima que atua na
 2 esterificação no processo de síntese e acúmulo de éster de colesterol (BUHMAN *et al.*,
 3 2000; OHSIRO *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2013). A atividade inibitória de STC em relação a
 4 ACAT2 é comparável ao da substância Piripiropeno A, também produzido por fungo, o
 5 qual possui estrutura angular (SAKAI ; OHTE; OHSHIRO, 2008).

6 Este é o primeiro relato de esterigmatocistina isolado do fungo *P. chrysogenum*.

7 **Tabela 17.** Comparação entre os dados de RMN da amostra **F8(2)** e da esterigmatocistina.

F8(2) ¹				a ²	B ³
C	δ ¹³ C	δ ¹ H (mult., J em Hz)	HMBC	δ ¹³ C	δ ¹ H
OH		13,21 1H (s)	C-2; C-3, C-4		13,25
1	181,4			180,9	
2	109,1			108,8	
3	162,4			162,1	
4	111,5	6,76 1H (dd, 8,3 e 0,9)	C-2; C-3; C-6	111,0	6,76
5	135,7	7,50 1H (dd, 8,3 e 8,2)	C-3 e C-7	135,4	7,54
6	105,9	6,85 1H (dd, 8,2 e 0,9)	C-2; C-4; C-7;	105,9	6,84
7	155,1			154,7	
8	154,1			153,7	
9	105,9			106,4	
10	164,6			164,3	
11	90,6	6,45 1H (s)	C-9; C-10; C-12; C-13	90,4	6,44
12	163,4			163,0	
13	106,1			105,7	
14	113,3	6,84 1H (d, 7,1)	C-10; C-15; C-16; C-17	113,1	6,81
15	48,1	4,81 1H (ddd, 7,1;2,6 e 2,2)	C-9; C-10; C-14; C-16; C-17	47,9	4,82
16	102,5	5,46 1H (dd, 2,7 e 2,6)	C-14; C-15; C-17	102,4	5,46
17	145,4	6,51 1H (dd, 2,7 e 2,2)	C-14; C-15; C-16	145,1	6,52
OCH ₃	56,8	4,01 3H (s)		56,6	4,00

8 ¹Espectrometro de 600 MHz em CDCl₃

9 ²(PACHLER *et al.*, 1976); ³(SAKAI; OHTE; OHSHIRO, 2008)

10
11

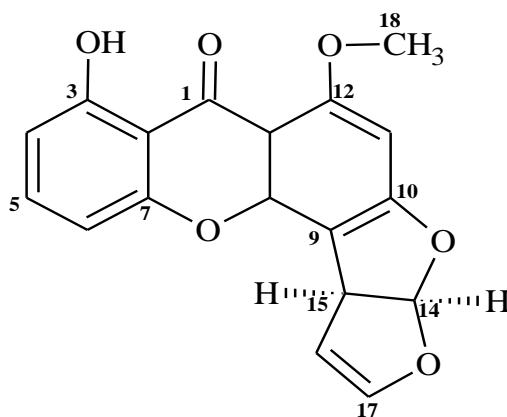
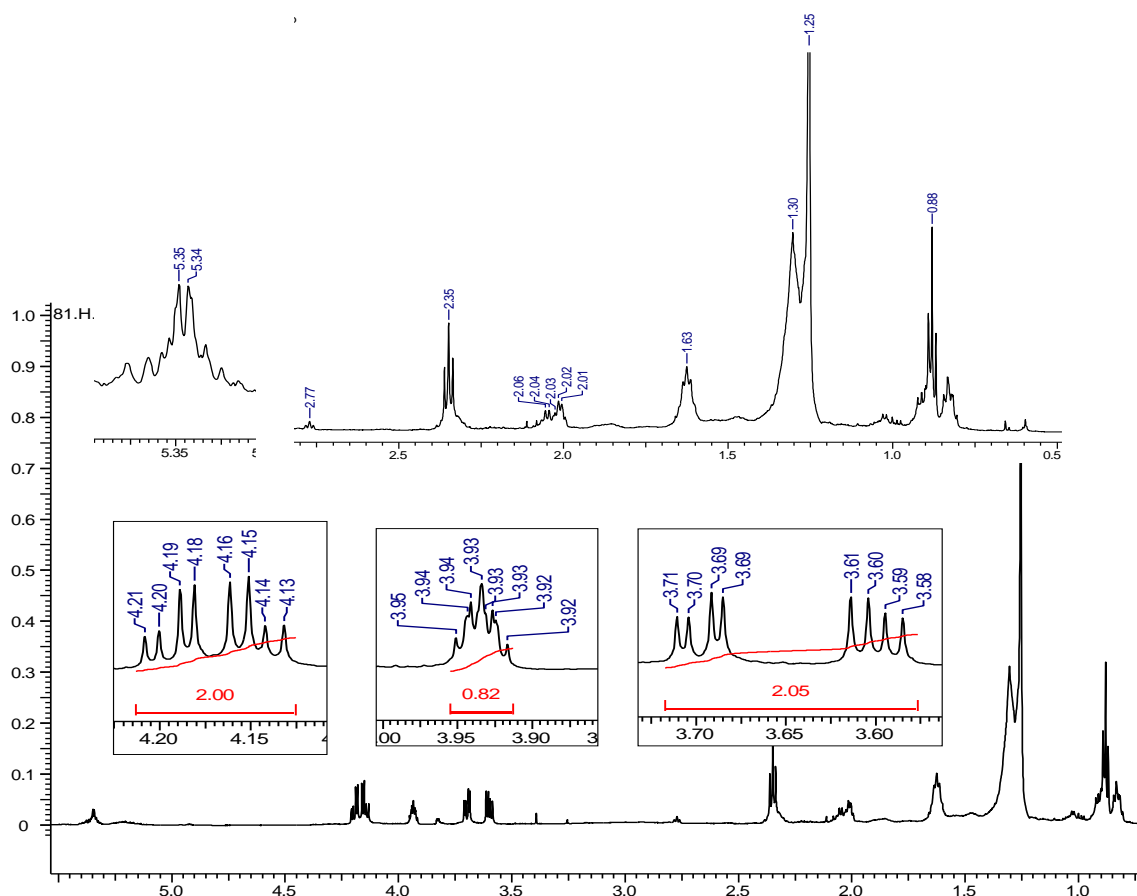


Figura 60. Esterigmatocistina – (C₁₈H₁₂O₆)

12
13
14

1 5.9.4. Amostra F10-13(81)

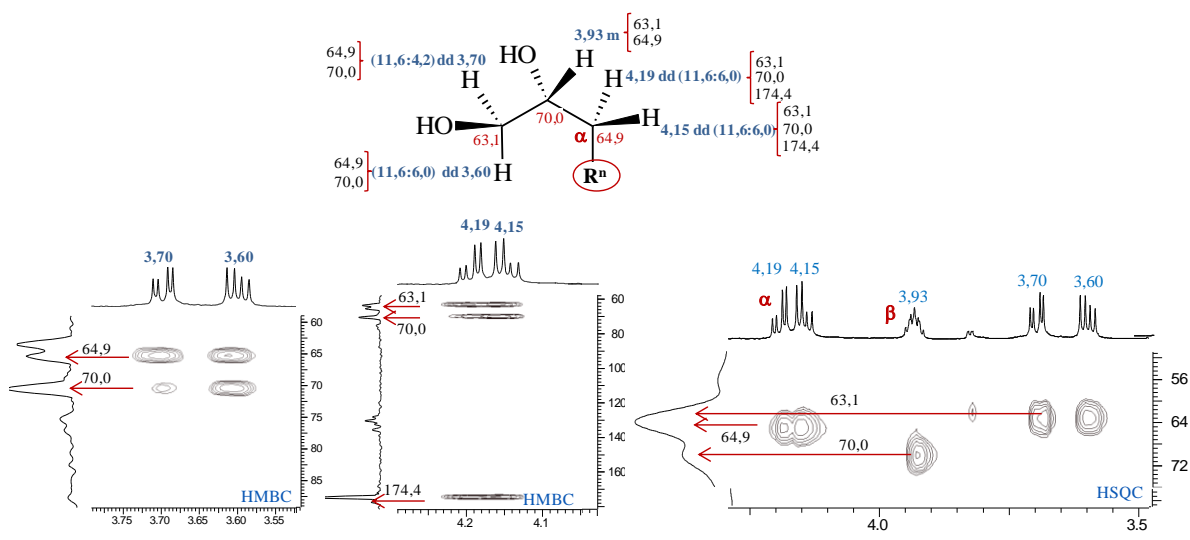
2 No espectro de RMN de ^1H da amostra **401 PC3 F10 (81)**, um óleo pouco viscoso
3 de coloração laranja, foram observados os sinais característicos dos hidrogênios α e β dos
4 glicerídeos em δ 4,15 (1H dd, 11,4:6,0 Hz) e 4,19 (1H dd, 11,4:6,0 Hz) e em δ 3,70 (1H
5 dd, 11,4:4,2 Hz) e 3,60 (1H dd, 11,4:6,0 Hz), além de um multipeto em δ 3,93. Foram
6 observados diversos sinais com deslocamento entre δ 0,88 a 5,35 que são característicos de
7 átomos de hidrogênio de metilas, metilenos e metinos que compõem as cadeias de ácidos
8 graxos (Figura 61).



9
10 **Figura 61** . Espectro de RMN de ^1H da amostra PC3 F10-13 (81).
11

12 A análise das correlações dos sinais de hidrogênio da estrutura do glicerídeo, nos
13 mapas de correlações de HSQC e HMBC revelou as correlações dos sinais de hidrogênio
14 em δ 3,60 e 3,70 em conexão diretamente com o carbono em δ 63,1, e múltiplas
15 correlação com os sinais de carbono em δ 64,9 e 70,0. Os sinais de hidrogênio em δ 4,19 e

1 4,15 apresentou correlação diretamente com o carbono em δ 64,9, e correlação múltiplas
 2 com os sinais de carbono em δ 63,1, 70,0 e 174,4. Assim como, o multipeto em δ 3,93 no
 3 mapa de correlações de HSQC apresentou conexão direta com o sinal de carbono em δ
 4 70,0 e correlações múltiplas com os sinais de carbono em δ 64,9 e 63,1. Os dados acima
 5 são coerentes com a semi-estrutura típica de monoglicerídeos (Figura 62).



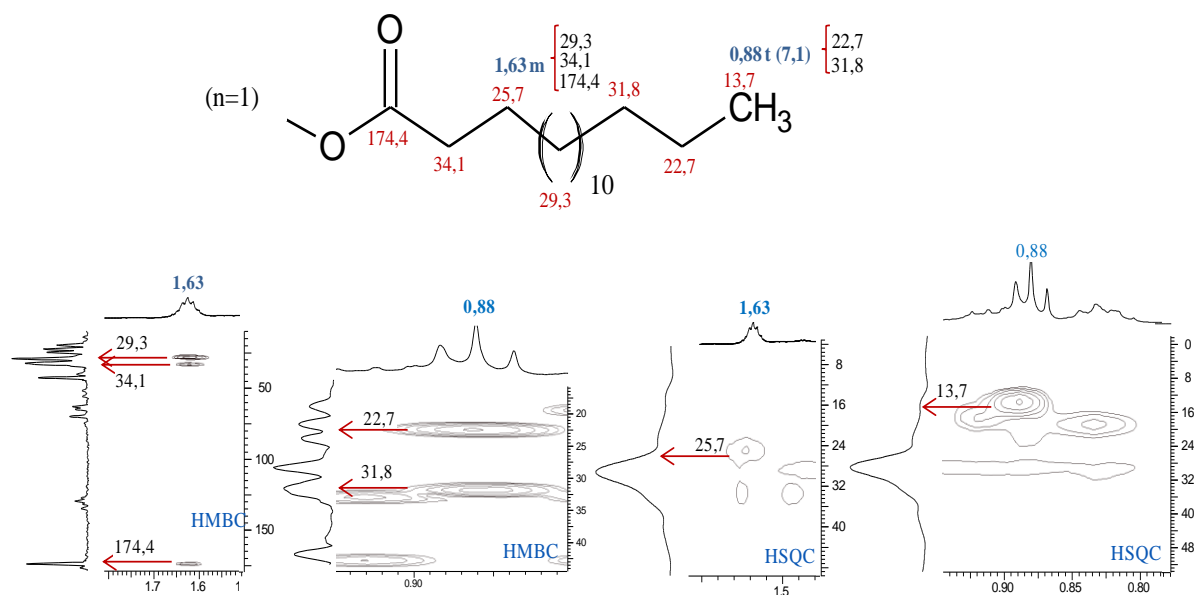
6

7 **Figura 62.** Regiões ampliadas dos mapas de correlações de HSQC e HMBC da amostra PC3 F10-
 8 13 (81).

9

10 A exploração do mapa de correlações de HSQC e HMBC da amostra F10-13 (81)
 11 revelou também as correlações dos sinais da cadeia de éster alifático ligada ao
 12 monoglicerídeo. O HSQC mostra correlação do sinal de tripleto em δ 0,88, atribuído a
 13 átomos de hidrogênio metilênico, com o carbono em δ 13,7, com J de 7,1 Hz. No mapa de
 14 correlação de HMBC mostra correlação deste sinal com dois sinais de carbono metilênicos
 15 em δ 22,7 e 31,8. O HSQC mostrou o sinal de multipeto em δ 1,36, atribuído a hidrogênio
 16 metilênico, em correlação direta com o carbono em δ 25,7, que no HMBC apresenta
 17 correlações com os sinais de carbono metilênicos em δ 29,3 e 34,1 e carboxílico em δ
 18 174,4. Estas correlações podem corresponder a presença de um éster saturado, como o
 19 ácido palmítico, na posição α do monoglicerídeo (Figura 63).

20

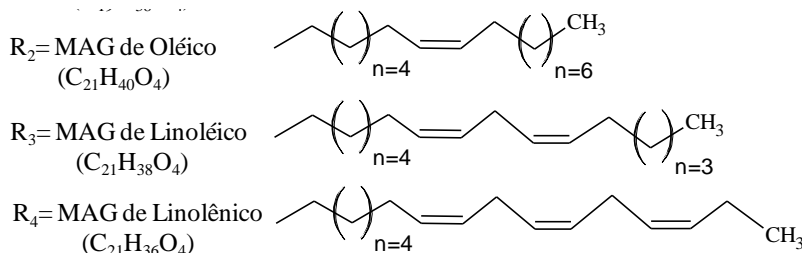
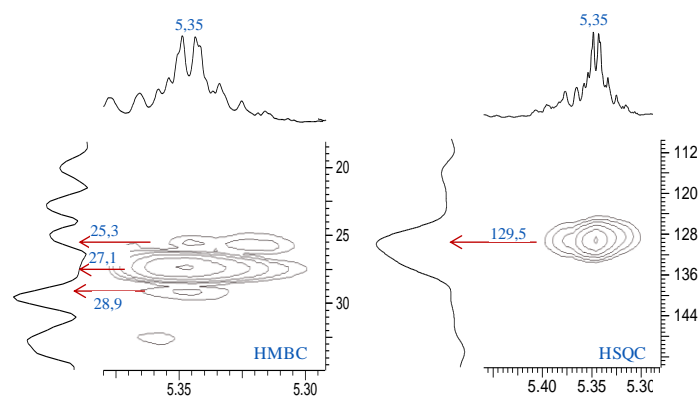


1

2 **Figura 63.** Regiões ampliadas dos mapas de correlações de HSQC e HMBC da amostra PC3 F10
 3 (81).

4 Foi observado também no HSQC um pequeno sinal de multipletto em δ 5,35,
 5 característico de hidrogênio olefínico, ligado diretamente ao carbono em δ 129,5. No
 6 HMBC este hidrogênio apresenta correlação com os sinais de carbono metilênicos em δ
 7 25,3, 27,1 e 28,9, indicando ligações duplas em cadeia alifática típica de ácidos graxos
 8 insaturados, como o linolênico, o linoleico e o oleico (Figura 64).

9 Portanto, a amostra **401 PC3 F10 (81)** é uma mistura de monoglicerídeos de pelo
 10 menos um ácido graxo saturado e um ácido graxo insaturado, em menor quantidade. Sendo
 11 necessário a esterificação da amostra e análise no espectro de massas para confirmação da
 12 presença dos ácidos graxos na mesma.



1

2

Figura 64. Monoglicerídeos identificados na amostra 401PC3 F10 (81).

3

5.10. Linhagem 401 *P. chrysogenum* – fermentação em ISP2

4

5.10.1. Amostra L2c (46)

5

A amostra **L2c (46)** apresentou características de sólido amorfo de coloração

6

amarela intensa e apenas uma mancha na análise por CCD. No espectro de massas da

7

amostra no modo positivo ionizada por eletrospray foram observados dois grupos de picos

8

em m/z 497, 499 e 501 ($[M+H]^+$; Grupo 1 e em m/z 519, 521 e 523 ($[M+Na]^+$; Grupo 2).

9

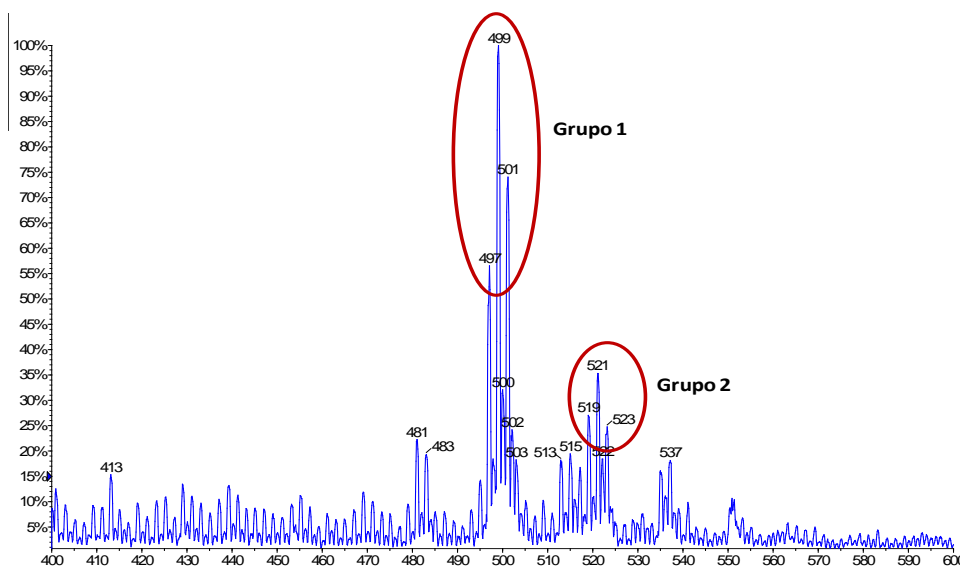
Estes picos são coerentes com uma série de substâncias da classe dos bisorbicilinoídeos que

10

se diferenciam entre si apenas pelo grau de instauração, com as massas respectivas de 496,

11

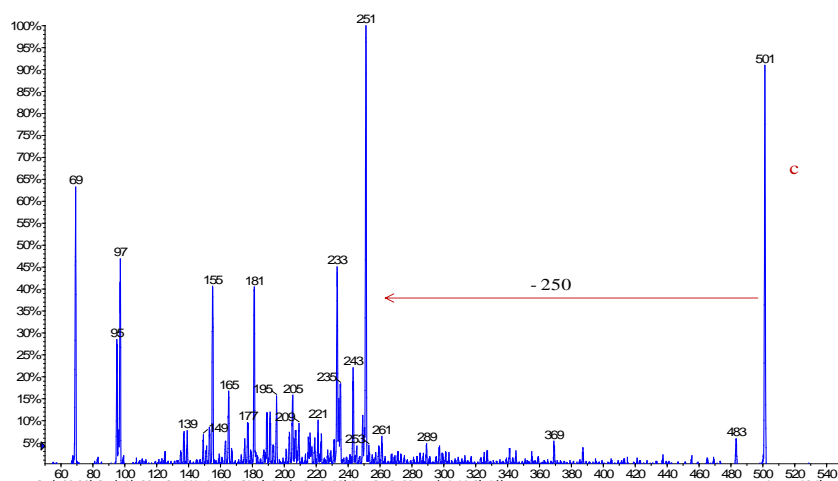
498 e 500 u (Figura 65).



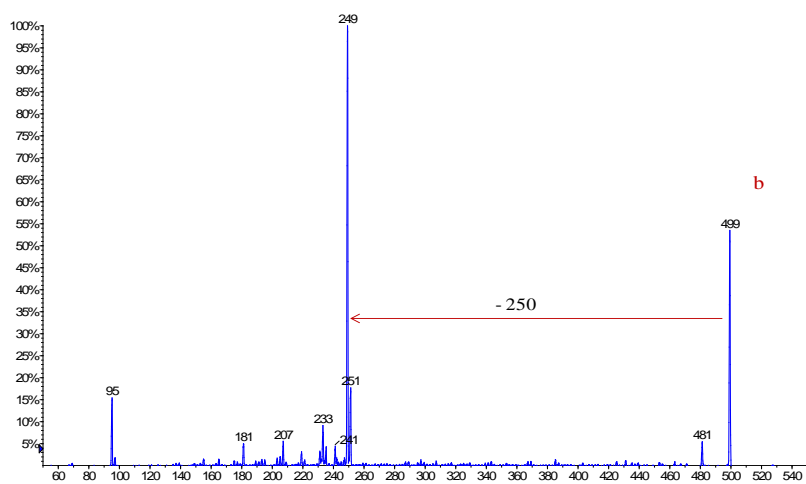
1
2 **Figura 65.** Espectro de massas da amostra 401 EI1 L2c (46) por ESI no modo positivo.
3

4 A semelhança entre essas substâncias foi retificada pela análise de seus espectros de
5 fragmentação que apresentaram íons intensos com valores de m/z iguais ou
6 aproximadamente a metade do valor da massa fragmentada. Os íons de m/z 497 e m/z 499
7 apresentaram separadamente, um mesmo fragmento intenso de m/z 249, indicando perda
8 de massa de 248 e 250, respectivamente. O íon de m/z 501 apresentou um fragmento
9 intenso de m/z 251, com perda de massa de 250, isto é, as massas dos fragmentos dessas
10 substâncias também se diferenciam por apenas duas unidades (Figura 66).

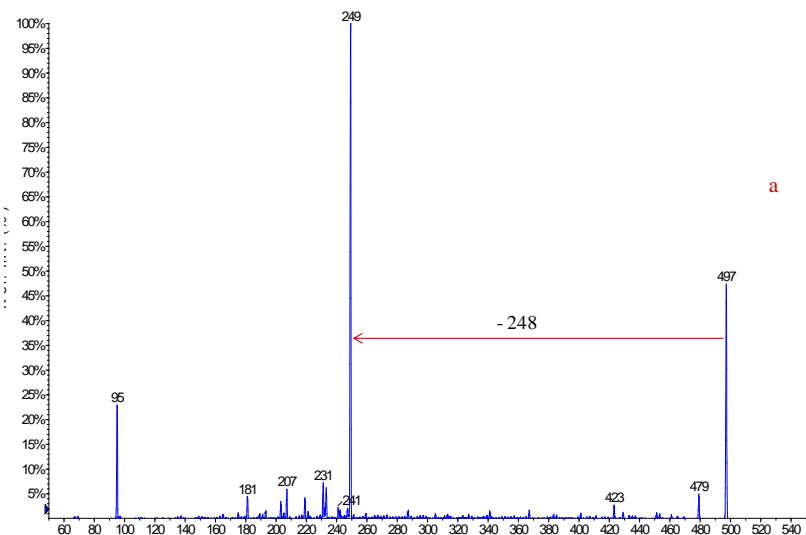
1



2



3



4

Figura 66. Íons fragmentos MS^2 dos picos em m/z 497 (a), 499 (b) e 501 (c) da amostra L2c (46) por ESI no modo positivo.

5

6

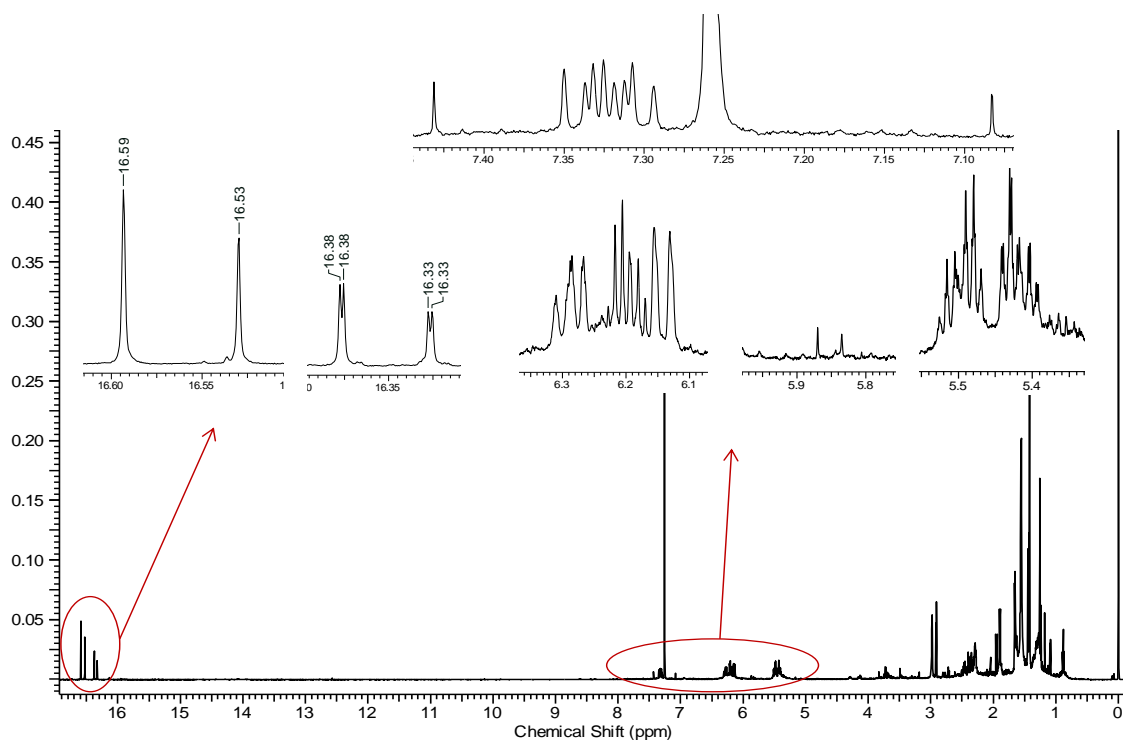
7

O espectro de RMN de 1H da amostra L2c (46) registrou sinais com deslocamento

8

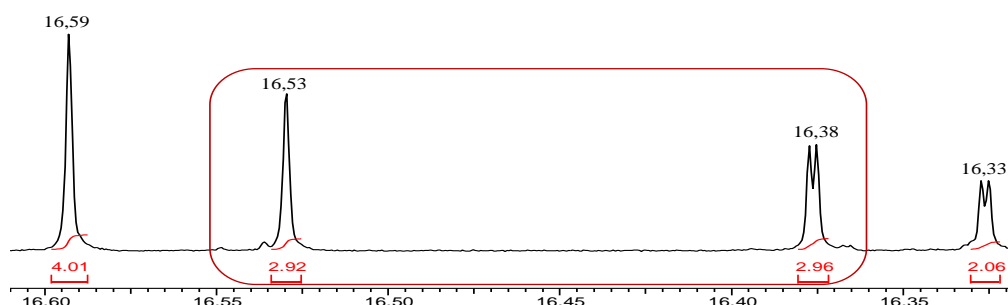
químico na região acima de 16 ppm, característicos de hidrogênio fortemente quelados.

- 1 Apresentou também diversos sinais na região entre δ 7,28 e 5,25, característicos de H
- 2 olefínicos, e sinais na região de metilas, metilenos e metinos (Figura 67).



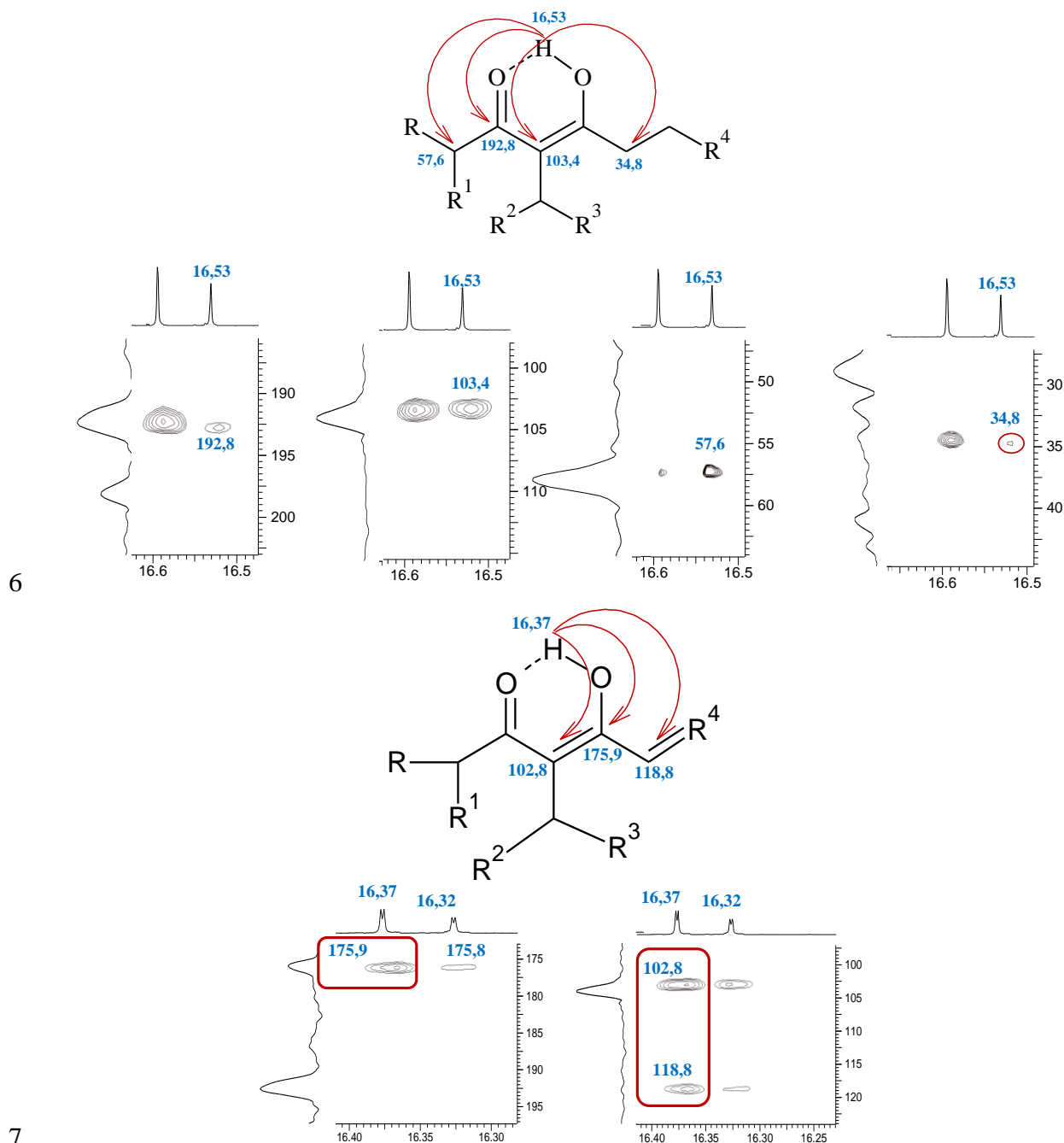
3
4 **Figura 67.** Espectro de RMN de ^1H de 600 MHz da amostra 401 PI1 L2c (46) e regiões ampliadas.

5 Os sinais de hidrogênio com deslocamento acima de 16 ppm não apresentam
6 correlação direta com nenhum sinal de carbono observado no mapa de correlações de
7 HSQC, por outro lado, a integração destes sinais indicam que há pelo menos uma
8 substância majoritária na amostra, na qual pode-se estimar as quantidades relativas na
9 ordem de 4:3:2, no qual os sinais em δ 16,53 e 16,38 correspondem a uma mesma
10 substância (Figura 68). Ao longo da discussão dos dados veremos exatamente quais são
11 estas substâncias.
12



13
14 **Figura 68.** Região ampliada espectro de RMN de ^1H da amostra L2c(46) destacando sinais dos
15 hidrogênios acima de 16,00 ppm.

1 Para cada um dos sinais de hidrogênio acima de 16 ppm foram observadas as
 2 correlações no mapa de correlações de HMBC, por exemplo: para o simpleto em δ 16,53
 3 foram observadas as correlações com os sinais de carbono em δ 34,8, 57,6, 103,4 e 192,8
 4 (Figura 69). Assim como para o simpleto em δ 16,37 no HMBC foram observadas as
 5 correlações com os sinais de carbono em δ 102,8, 175,9 e 118,8 (Figura 69).

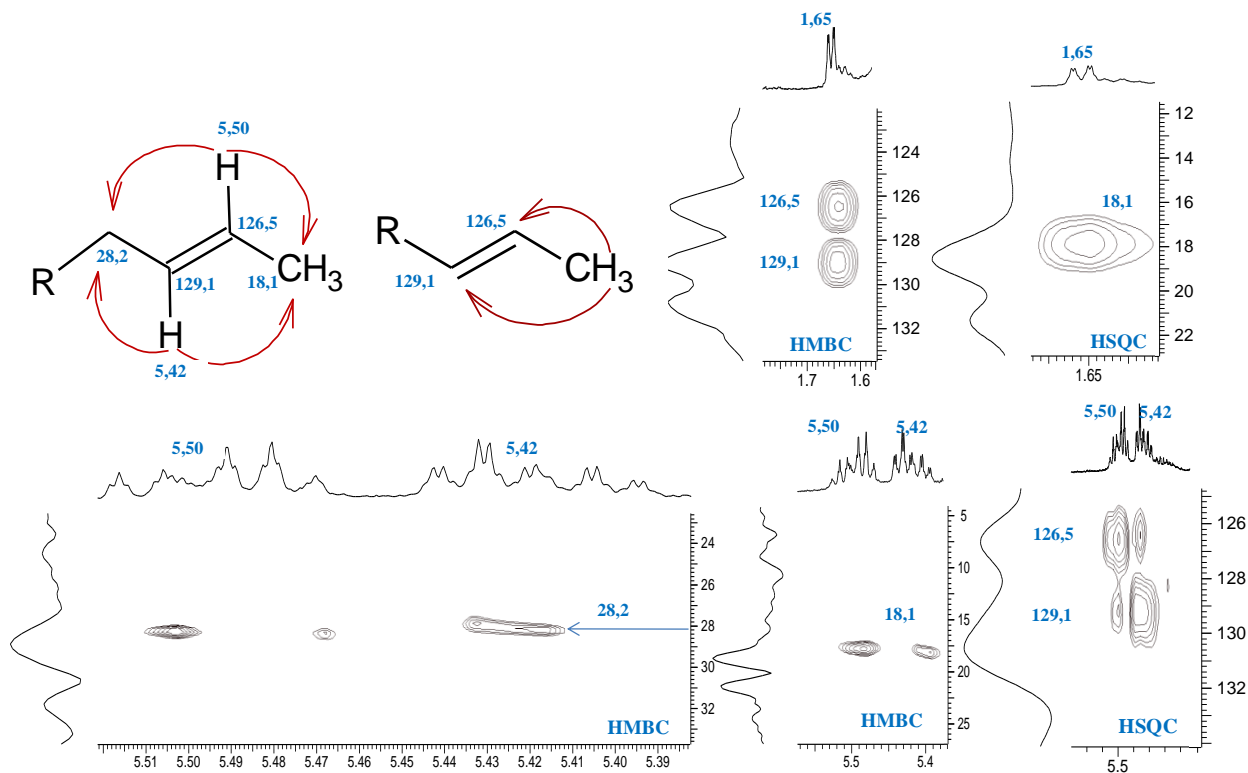


9 **Figura 69.** Regiões ampliadas do mapa de correlações de HMBC da amostra L2c(46),
 10 apresentando as correlações dos sinais de hidrogênio em δ 16,53 e 16,37 ppm.

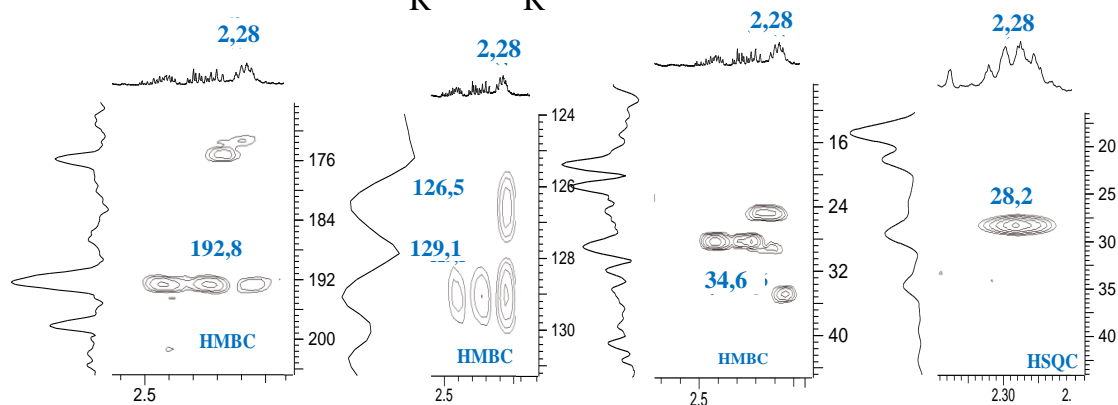
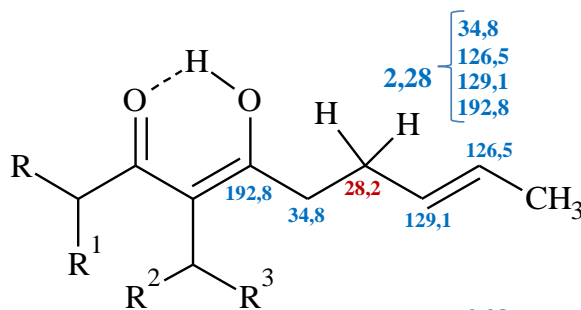
1 No espectro de RMN de ^1H da amostra L2c (46) também foram observados sinais
2 típicos de hidrogênio de metilas ligadas a carbono olefínicos. Um desses sinais, um duplete
3 em δ 1,65 (d, 6,2 Hz) que no HSQC mostrou conexão com o carbono em δ 18,1, e no
4 HMBC apresentou correlações com os sinais de carbono em δ 129,1 e 126,5. O HSQC
5 mostrou as correlações dos sinais de hidrogênio em δ 5,42 (m) e 5,50 conectados,
6 respectivamente aos sinais de carbono olefínicos em δ 129,1 e 126,5 e no HMBC foi
7 observado as correlações destes sinais de hidrogênio com os sinais de carbono em δ 18,1 e
8 28,2. Este carbono em δ 28,2 por sua vez, foi observado no HSQC em conexão direta com
9 sinais de hidrogênio metilênicos em δ 2,28 (m). Foram observados outros sinais de
10 hidrogênio multipletos em δ 2,38 e 2,46, que no HSQC estão conectado ao carbono em δ
11 34,6. No HMBC estes sinais em δ 2,38 e 2,46 correlacionam com os sinais de carbono em
12 δ 192,8, 129,1 e 28,2 (Figura 70). O carbono em δ 192,8 coincide com aquele observado
13 nas correlações do hidrogênio quelado em δ 16,53 (Figura 69), o qual também apresenta
14 correlação com o carbono em δ 103,4, indicando assim, as correlações entre estas
15 estruturas.

16 Para a identificação da outra parte da molécula que possui uma insaturação foi
17 observado no mapa de correlação de HSQC, o sinal de hidrogênio com deslocamento em δ
18 1,89 ligado ao carbono metilênico em δ 19,0 no HMBC apresentou correlação com os
19 sinais de carbono em δ 131,0 e 140,3. No HSQC o carbono em δ 140,3 mostrou correlação
20 com o hidrogênio em δ 6,19 e no MHBC correlações com os sinais de carbono em δ 143,7
21 e 19,0. No HSQC o carbono em δ 143,7 apresentou correlação direta com o hidrogênio em
22 δ 7,32, este por sua vez no HMBC apresentou correlação com os sinais de carbono em δ
23 140,3 e 175,9, (Figura 71). O carbono em δ 175 coincide com aquele observado nas
24 correlações do hidrogênio quelado em δ 16, 37 (Figura 69), o qual também apresenta

- 1 correlação com o carbono em δ 102,8, indicando assim, as correlações entre estas
- 2 estruturas.



3

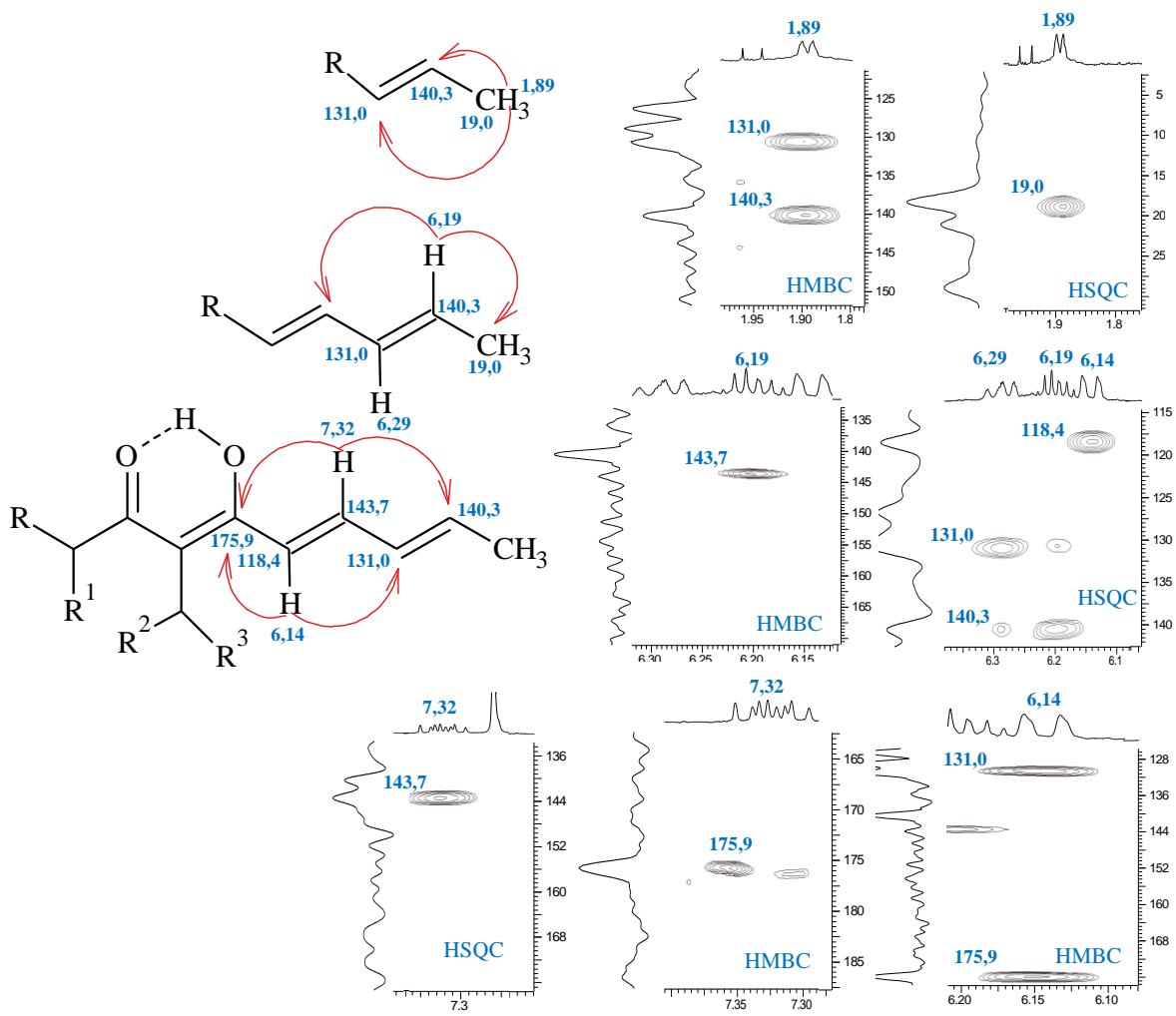


4

5 **Figura 70.** Regiões ampliadas dos mapas de correlações de HSQC e HMBC da amostra L2c(46)
 6 destacando sinais dos hidrogênios em δ 1,65, 2,28; 5,50 e 5,42.

7

8

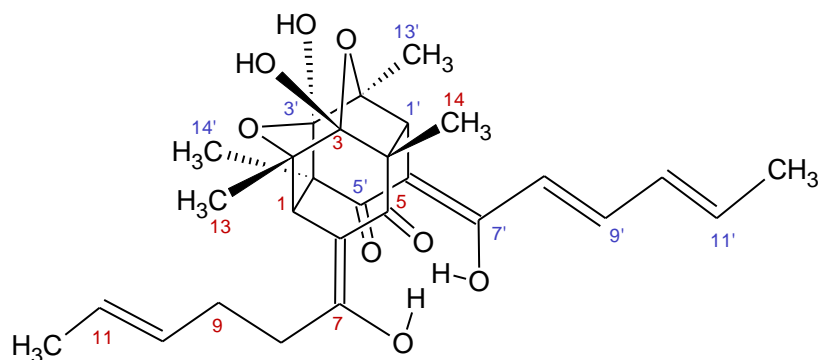


1

2 **Figura 71.** Regiões ampliadas dos mapas de correlações de HSQC e HMBC da amostra L2c(46)
 3 destacando sinais dos hidrogênios em δ 1,89, 6,14, 6,19 e 7,32.

4

5 As análises dos dados até aqui, juntamente com a busca na literatura, para esta
 6 amostra, **L2c(46)** revelou tratar-se de mistura de três substâncias pertencentes à classe dos
 7 bisorbicilinoídes (dihidrotrichodimerol, tetrahidrotrichodimerol e trichodimerol), no qual
 8 vale a pena uma reflexão sobre os altos valores de deslocamento químico dos sinais de
 9 hidrogênio enólicos e dos sinais de carbono nas posições 7/7' desses bisorbicilinoídes
 10 (Figura72). Como exemplo, vamos considerar o dihidrotrichodimerol que possui uma
 11 cadeia lateral conjugada com o sistema β -cetoenólico e a outra não conjugada.



1

2

Figura 72. Estrutura molecular do bisorbicilinoide dihidrotrichodimerol.

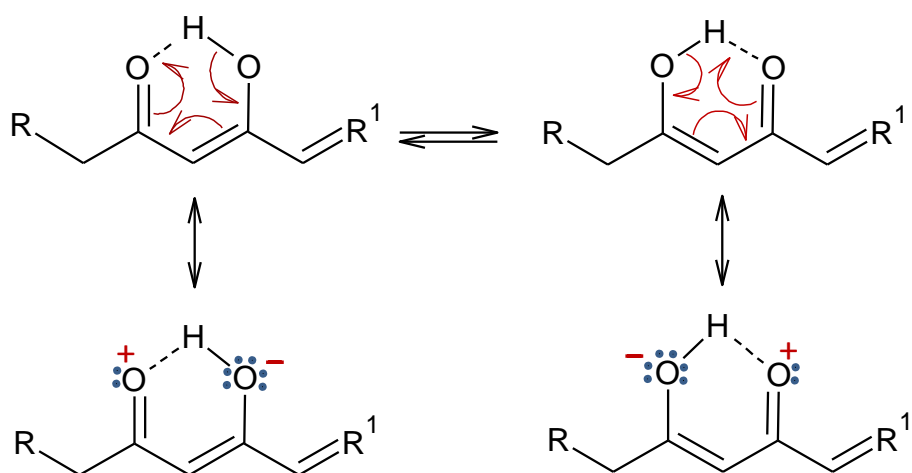
3

4

Os valores acima de 16 ppm para os hidrogênios enólicos indicam que eles estão muito deficientes de densidade eletrônica, o que pode ser justificado tanto pelo equilíbrio químico quanto pela forte conjugação envolvendo as respectivas estruturas β -ceto-enólicas da molécula (Figura 73).

5

6



7

8

Figura 73. Estrutura de ressonância do sistema de conjugação β -ceto-enólicas da molécula.

9

10

11

12

13

14

15

A conjugação deixa os oxigênios enólicos com uma carga parcial positiva, aumentando mais ainda seu efeito indutivo retirador de elétrons sobre os hidrogênios conectados, e assim as desblindagens destes. Note-se que esta desblindagem é maior para o hidrogênio enólico do dihidrotrichodimerol próximo a cadeia lateral que não está conjugada com o sistema β -cetoenólico. Também neste lado da molécula observa-se o maior deslocamento químico para o carbono enólico (C-7/7'), em torno de 192 ppm contra 176 ppm para o outro carbono enólico. Esse deslocamento, mais comumente encontrados para

1 carbonilas conjugadas pode ser explicado considerando-se um equilíbrio químico tal que
2 ambas as estruturas ceto-enólicas possam coexistir em quantidades consideráveis, fazendo
3 ambos os carbonos registrarem um sinal típico de cetonas conjugadas. Além disso, uma
4 forte conjugação envolvendo os pares de elétrons livres dos oxigênios enólicos, acentua o
5 caráter carbonílico dos carbonos ligados a eles e diminui seu caráter enólico. Quanto a
6 significância do equilíbrio químico, basta considerar as correlações dos hidrogênios
7 enólicos em ambos os lados dos sistemas β -ceto-enólicos (Tabela 18, figura 74).

8 Em relação a conjugação de ambas as estruturas ceto-enólicas em equilíbrio,
9 **observou-se os menores deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios enólicos**
10 **próximos a cadeia lateral conjugada com o sistema β -ceto-enólico**, fato esperado pela
11 contribuição dessa cadeia lateral para o aumento da densidade eletrônica na parte central da
12 molécula. Tanto o equilíbrio químico β -ceto-enólico em discussão, quanto a
13 presumivelmente forte conjugação das respectivas estruturas podem ser atribuídos a forte
14 planaridade típica de toda a parte central dos bisorbicilinoídes.

15 A mesma sequencia de correlações foi observada iniciando-se com o sinal da metila
16 em δ 1,89 (d, 6,2 Hz), porém observando-se no lugar dos carbonos sp^3 em δ 28,2 e 34,8 e
17 de seus respectivos hidrogênios, sinais correspondentes a uma dupla ligação. Outros sinais
18 e respectivas correlações dos espectros de RMN 1D e 2D, juntamente com as análises dos
19 espectros de massas e a comparação com dados da literatura (LEE *et al.*, 2005; LIU *et*
20 *al.*,2005a) permitiram identificar a substância correspondente aos dados discutidos acima
21 como o dihidrotrichodimerol (Tabela 18; Figura 74). Permitiram também a identificação na
22 amostra **L2c (46)** outras duas substâncias igualmente pertencentes a classe dos
23 bisorbicilinoídes: o trichodimerol (Tabela 19; Figura 75) e o tetrahidrotrichodimerol
24 (Tabela 20; Figura 76).

1 A diferença entre estas substâncias encontra-se nos carbonos 8 e 9 e/ou 8' e 9', para
 2 os quais no trichodimerol há duas ligações duplas, uma em cada cadeia lateral alifática da
 3 molécula; no dihidrotrichodimerol há apenas uma ligação dupla nesses carbonos, em uma
 4 das cadeias laterais; e no tetrahidrotrichodimerol as duas cadeias laterais não contém as
 5 respectivas duplas.

6 **Tabela 18.** Atribuições de ^{13}C e ^1H e comparação com os dados da literatura para a
 7 substância Dihidrotrichodimerol.

L2c (46) ^a				Dihidrotrichodimerol ^b	
C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J em Hz)	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	57,8	2,92 1H (s)	13', 4', 2', 6, 3, 5, 7	57,8	2,92 1H (s)
2	78,9			79,0	
3	104,1			104,1	
4	57,5			57,4	
5	192,8			191,4	
6	103,4			103,3	
7	193,1			192,8	
8	34,8	2,46 1H (m) 2,38 1H (m)	9, 10, 7 9, 10, 7	34,7	2,38 m 2,45 m
9	28,2	2,28 2H (m)	11, 10, 7	28,2	2,27 m
10	129,1	5,42 1H (m)	12, 9	129,0	5,42m
11	126,5	5,50 1H (m)	12, 9	126,4	5,49 m
12	18,1	1,65 3H (d, 6,2)	11, 10	17,8	1,64d (6,0)
13	21,3	1,42 3H (s)	1, 2, 3'	21,2	1,42 s
14	18,7	1,43 3H (s)	1', 4, 3, 5	18,6	1,44 s
OH		16,53 1H (s)	6, 8, 7		16,54 s
1'	57,8	2,98 1H (s)	14, 13', 4, 2', 6', 3', 5'	57,6	2,98 s
2'	78,9			78,9	
3'	103,8			104,2	
4'	57,5			58,7	
5'	192,8			198,3	
6'	103,4			102,8	
7'	175,9			176,0	
8'	118,6	6,14 1H (d, 14,8)	10', 7'	118,4	6,14 d (14,4)
9'	143,7	7,32 2H (ddd, 14,8: 10,9: 7,9)	11', 7'	143,6	7,32 dd (10,8:15,0)
10'	131,0	6,29 1H (m)	12'	130,8	6,29 m
11'	140,3	6,19 1H (m)	9', 12'	140,4	6,20m
12'	19,0	1,89 3H (dd, 6,8)	11', 10'	18,8	1,88d (6,6)
13'	24,1	1,42 3H (s)	1', 2', 3'	21,3	1,42 s
14'	19,0	1,44 3H (s)	1, 3', 4', 5'	19,1	1,43 s
OH		16,37 1H (s)	6', 7', 8'		16,39 s

8 ^aEspectrômetro 600 MHz para ^1H e para ^{13}C 150 MHz em CDCl_3 e TMS como padrão interno.
 9 (LEE *et al.*, 2005)^b 400 e 600 MHz em CDCl_3 e TMS como padrão interno.

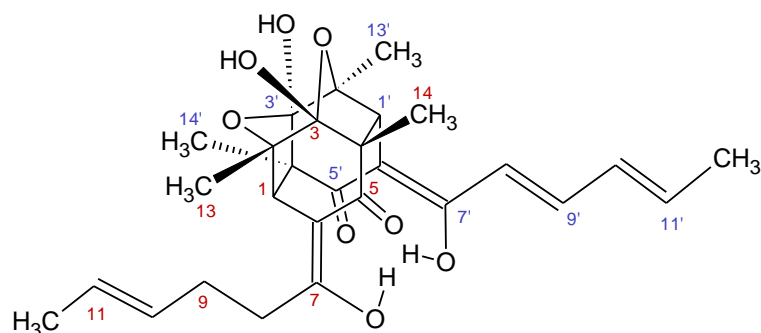


Figura 74. Dihydrotrichodimerol $-(C_{28}H_{34}O_8)$, (MM = 498)

Tabela 19. Atribuições de ^{13}C e 1H e comparação com os dados da literatura para a substância Trichodimerol.

C	L2c(46) ^a			Trichodimerol ^b	
	$\delta^{13}C$	δ^1H (mult., J em Hz)	HMBC	$\delta^{13}C$	δ^1H
1	57,5	2,98 1H (s)	2, 3', 4', 5, 7, 13, 14'	57,5	2,99 1H (s)
2	78,9			78,9	
3	104,1			104,1	
4	59,2			58,8	
5	198,1			198,0	
6	102,7			102,7	
7	175,8			175,9	
8	118,9	6,14 1H (d, 14,8)	7, 10	118,5	6,13 1H (d, 15,0)
9	143,7	7,32 1H (ddd, 14,8: 10,9: 7,9)	7, 11	143,6	7,31 1H (dd, 14,7: 10,2)
10	131,0	6,29 1H (m)	12	130,9	6,28 1H (m)
11	140,3	6,19 1H (m)	9, 12	140,4	6,22 1H (m)
12	19,0	1,89 3H (d, 6,2)	10, 11	18,7	1,88 3H (d, 5,7)
13	21,1	1,42 3H (s)	1, 2, 3	21,3	1,42 3H (s)
14	18,7	1,45 3H (s)	1', 3, 4, 5	18,9	1,45 3H (s)
OH		16,32 1H (s)	6, 7, 8		16,34 1H (s)
1'	57,5	2,98 1H (s)		57,6	
2'	78,9			78,9	
3'	104,1			104,2	
4'	59,1			58,7	
5'	198,1			198,3	
6'	102,7			102,8	
7'	175,8			176,0	
8'	118,9	6,11 1H (d, 14,8)	7', 10'	118,4	6,13 1H (d, 15,0)
9'	143,7	7,32 1H (ddd, 14,8: 10,9: 7,9)	7', 11'	143,6	7,31 1H (dd, 14,7: 10,2)
10'	131,0	6,29 1H (s)	12'	130,8	6,28 1H (m)
11'	140,3	6,19 1H (m)	9', 12'	140,4	6,22 1H (m)
12'	19,0	1,89 3H (d, 6,8)	10', 11'	18,8	1,88 3H (d, 5,7)
13'	21,1	1,42 3H (s)	1', 2', 3'	21,3	1,42 3H (s)
14'	19,7	1,45 3H (s)	1, 3', 4', 5'	18,9	1,45 3H (s)
OH		16,32 1H (s)	6', 7', 8'		16,34 1H (s)

^aEspectrômetro 600 MHz para 1H e para ^{13}C 150 MHz em $CDCl_3$ e TMS como padrão interno. (LEE *et al.*, 2005)^b (LEE *et al.*, 2005)^b 400 e 600 MHz em $CDCl_3$ e TMS como padrão interno.

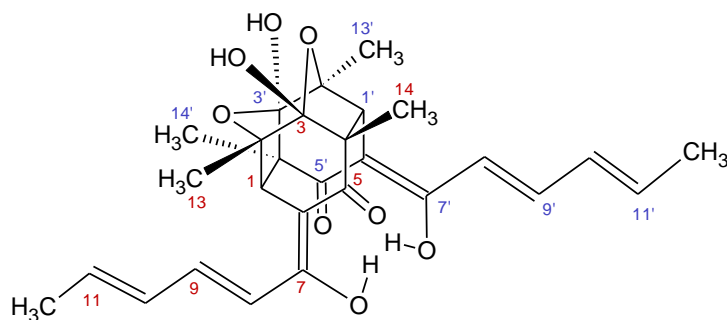


Figura 75. Trichodimerol- ($C_{28}H_{32}O_8$) (MM = 496)

Tabela 20. Atribuições de ^{13}C e 1H e comparação com os dados da literatura para a substância Tetrahydrotrichodimerol.

C	L2c (46) ^a			Tetrahydrotrichodimerol ^b	
	$\delta^{13}C$	δ^1H (mult., J em Hz)	HMBC	$\delta^{13}C$	δ^1H
1	59,2	2,91 1H (s)	2, 3, 4', 2,6, 3, 5, 7	58,7	3,02 1H (s)
2	78,9			79,5	
3	103,8			105,0	
4	57,6			58,7	
5	192,4			192,3	
6	104,5			104,8	
7	192,4			193,8	
8	34,5	2,45 1H (m)	7, 9, 10	35,1	2,41 1H (dt, 14,9: 7,4)
		2,39 1H (m)	7, 9, 10		2,57 1H (dt, 15,4: 7,7)
9	28,2	2,28 2H (m)	7, 10, 11	29,0	2,25 2H (m)
10	129,1	5,42 1H (m)	9, 12	130,4	5,45 1H (m)
11	126,5	5,50 1H (m)	9, 12	126,5	5,49 1H (m)
12	18,0	1,65 3H (m)	10, 11	18,0	1,61 3H (br d, 5,0)
13	21,6	1,42 3H (s)	1, 2, 3	21,9	1,35 3H (s)
14	21,5	1,42 3H (s)	3, 4, 5	19,9	1,38 3H (s)
OH		16,59 1 H (s)	6, 7, 8		16,61 1H (s)
1'	59,2	2,91 1H (s)	2', 3', 4, 5', 6', 7', 13', 14	58,7	3,02 1H (s)
2'	78,9			79,5	
3'	104,5			105,0	
4'	57,6			58,7	
5'	192,4			192,3	
6'	103,8			104,8	
7'	192,4			193,8	
8'	34,5	2,45 1H (m)	7', 9', 10'	35,1	2,41 1H (dt, 14,9: 7,4)
		2,39 1H (m)	7', 9', 10'		2,57 1H (dt, 15,4: 7,7)
9'	28,2	2,28 2H (m)	7', 9, 10', 11'	29,0	2,25 2H (m)
10'	129,1	5,42 1H (m)	9', 12'	130,4	5,45 1H (m)
11'	126,5	5,50 1H (m)	9', 12'	126,5	5,49 1H (m)
12'	18,0	1,65 3H (m)	10', 11'	18,0	1,61 3H (br d, 5,0)
13'	21,5	1,42 3H (s)	1', 2', 3'	21,9	1,35 3H (s)
14'	19,1	1,42 3H (s)	3', 4', 5'	19,9	1,38 3H (s)
OH		16,59 1H (s)	6', 7', 8'		16,61 1H (s)

^aEspectrômetro 600 MHz para 1H e para ^{13}C 150 MHz, com uso de TMS como padrão interno e para a amostra $CDCl_3$.

(LIU *et al.*, 2005a)^bEspectrômetro 600 MHz para 1H e 150 MHz para ^{13}C , com uso de TMS como padrão interno, e acetona delterada.

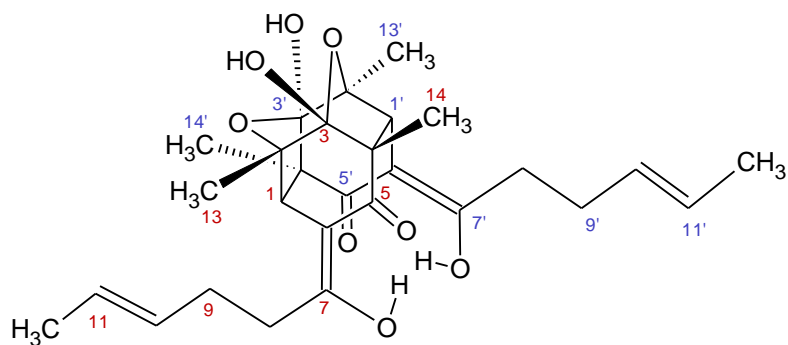


Figura 76. Tetrahydrotrichodimerol - ($C_{28}H_{36}O_8$), (MM = 500)

As primeiras substâncias da classe dos sorbicillina foram isoladas como contaminantes no processo de produção da penicilina do fungo *Penicillium notatum* em 1948, por Cram e Tishler (BRINGMANN *et al.*, 2010). Em 1981 foi isolado novamente e nos anos seguintes, membros dessa família têm sido isolados de cepas de diversos ambientes diferentes (HARNED; VOLP, 2011).

Os bisorbicilinoídeos são derivados de um mesmo precursor policetídeo simples, a sorbicillina (Figura 77), que segundo hipótese de proposta biogenética, a sorbicillina é primeiramente ativado por oxidação e subsequentes reações de dimerização seguidas por reações intramolecular. (GRAVEL & POUPON, 2008). As moléculas formadas foram classificadas por Nicolau (1999), como sorbicilinoídeos (monômero) e bisorbicilinoídeos (dímeros) (LI *et al.*, 2010).

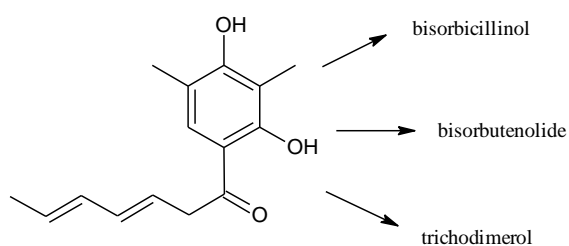
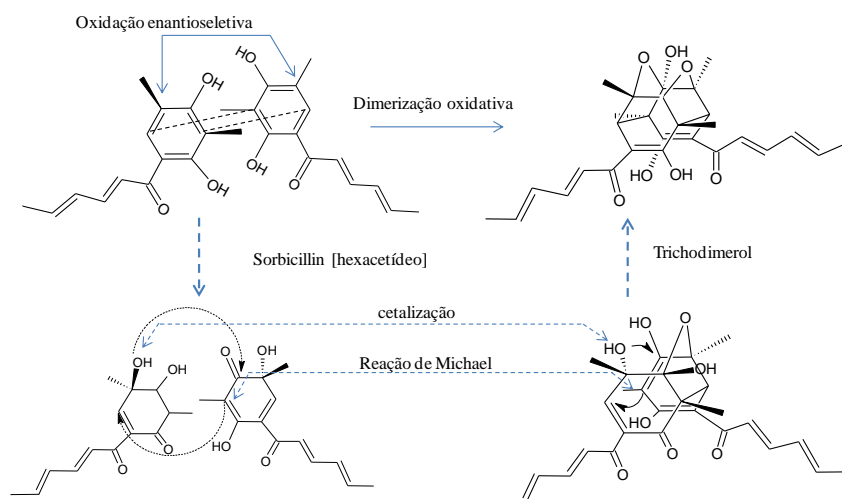


Figura 77. Sorbicillina, precursor comum de diferentes bisorbicilinoídeos (GRAVEL & POUPON, 2008).

Os sorbicilinoídeos são produtos naturais, altamente oxigenados, de moléculas bioativas que têm sido isolados não somente de *Penicillium*, mas esporadicamente de fungos *Tricoderma*, *Verticillium* e *Acremonium*, de sedimentos de fontes terrestres ou

1 marinha (HARNED, VOLP, 2011; MA *et al.*, 2011; EVIDENTE *et al.*, 2009; KONTANI;
2 SAKAPMI; MARUMO, 1994; TRIFONOV *et al.*, 1986). A maioria dos sorbicilinoídes
3 pertence a classe dos bisorbicilinoídes, os quais possuem uma característica marcante e
4 intrigante que são suas estruturas no formato de gaiola.

5 Os bisorbicillinoídes, são formados a partir de duas moléculas de sorbicilina ou outra
6 espécie de sorbicilina oxidativamente ativada, seja por ciclo adição de Diels Alder ou por
7 sequência de reação de Michael (Figura 78), levando a diferentes compostos de interesse
8 (GRAVEL & POUPON, 2008; NICOLAOU, 1999b).



9
10 **Figura 78.** Proposta da rota biossintética para formação do trichodimerol a partir da sorbicillina.
11 Adaptado de (NICOLAOU, 1999).

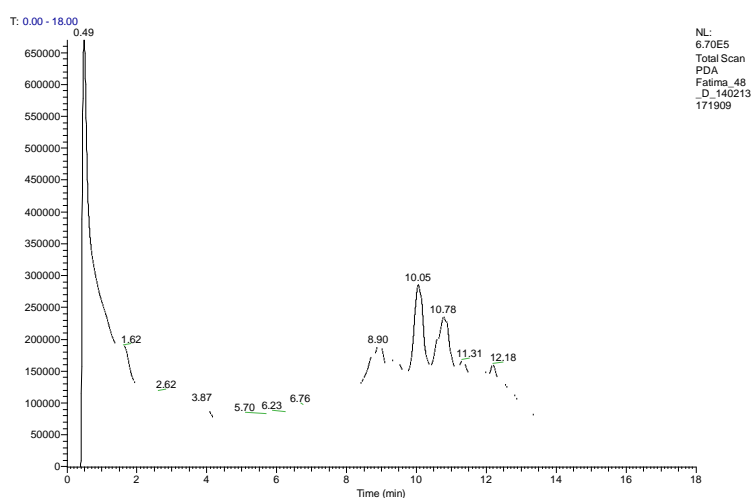
12
13 Trichodimerol, dihidrotrichodimerol e tetrahidrotrichodimerol são produtos naturais
14 pentacíclicos, altamente oxigenados pertencentes ao grupo dos bisorbicilinoídes, que
15 apresentam diversas atividades biológicas, tais como Glioblastoma, melanoma e câncer de
16 esôfago, antitripanossomal e inibidor TGF- β e TNF- α (fator regulador de células
17 cancerígenas) (ALY *et al.*, 2011; SERWE; ANKE; ERKEL, 2009; LEE *et al.*, 2005; GAO
18 *et al.*, 1995 e BALDE *et al.*, 2010).

19 No geral, os sorbicilinoídes aqui isolados têm sido registrados na literatura, isolados
20 de fungos de fontes de sedimentos marinhos ou espécies de esponjas marinhas ou
21 oceânicas. Apenas o trichodimerol foi isolado e divulgado de *P.chrysogenum* (GAO;

1 LEET; THOMAS, 1995), este é o primeiro relato da mistura dos três bisorbicilinoídes
2 Trichodimerol, dihidrotrichodimerol e tetrahidrotrichodimerol) isolados de fungo
3 endofíticos *P. chrysogenum* associado a *Gustavia* sp. coletada na floresta amazônica.

4 5.10.2. Amostra L2c (48)

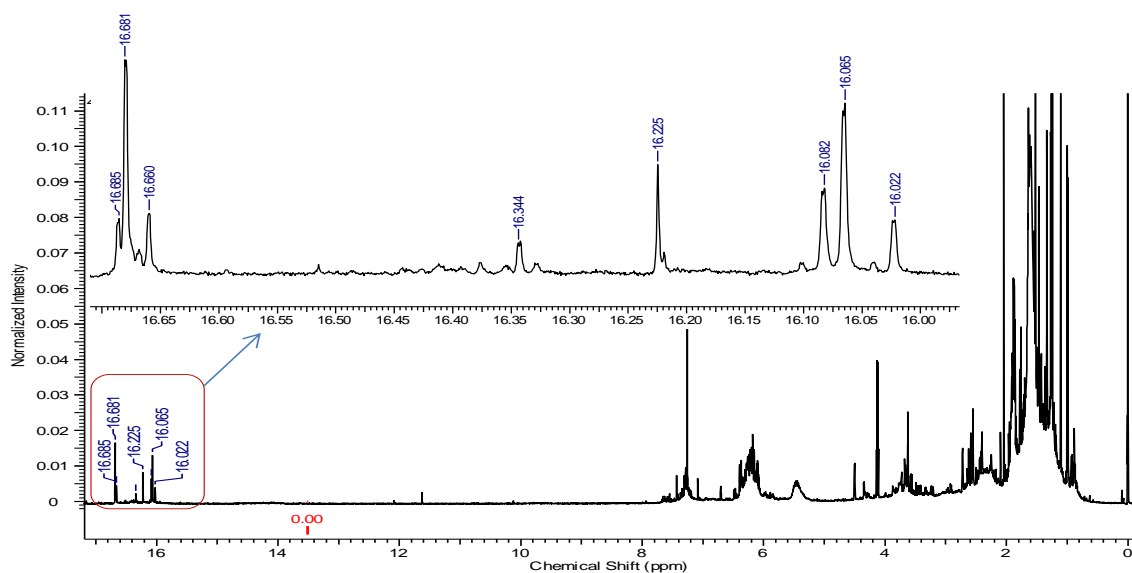
5 A análise exploratória por LC/MS da amostra L2c (48) indicou diversos picos com
6 tempo de retenção entre 8,9 a 12,18, sendo o pico em 10,05 o majoritário (Figura 79).



7
8 **Figura 79.** Cromatograma da amostra L2c (48).
9

10 A análise de cada tempo de retenção por espectrometria de massas revelou as
11 seguintes m/z 517, 499, 513, 514, 515 e 497 $[M+H]^+$ juntamente com suas respectivas
12 massas com aduto de sódio $[M+Na]^+$.

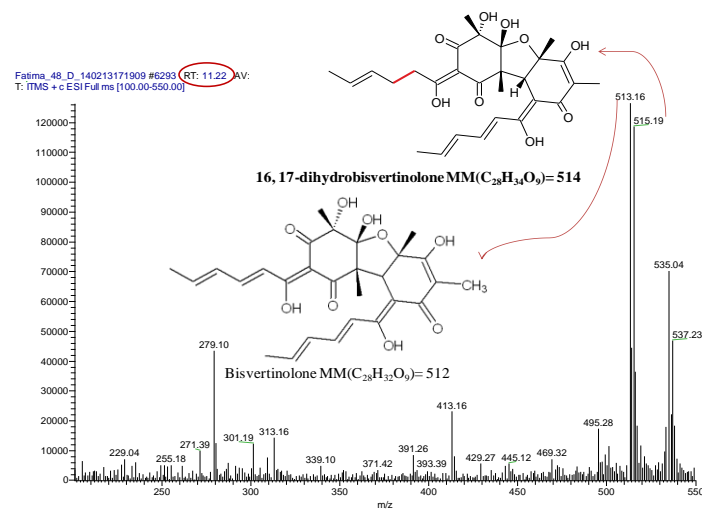
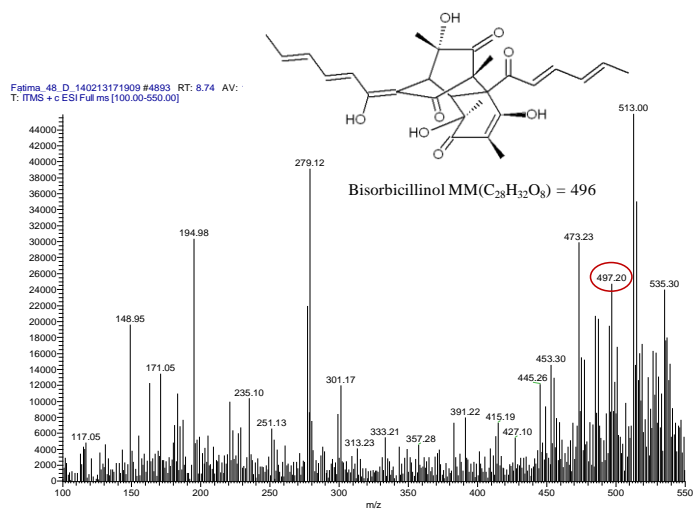
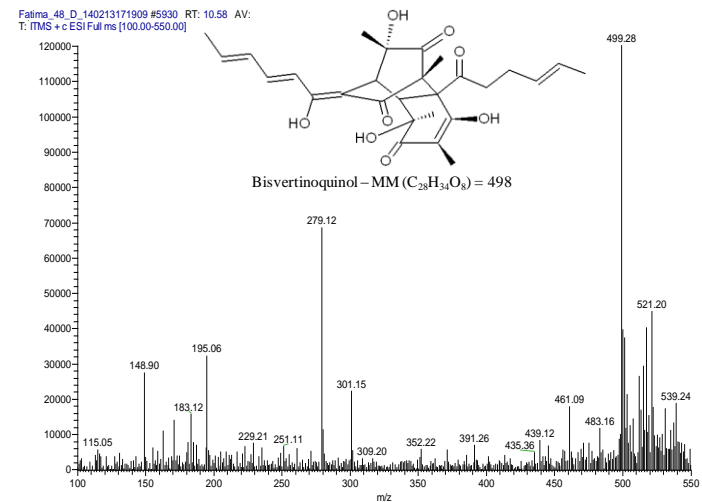
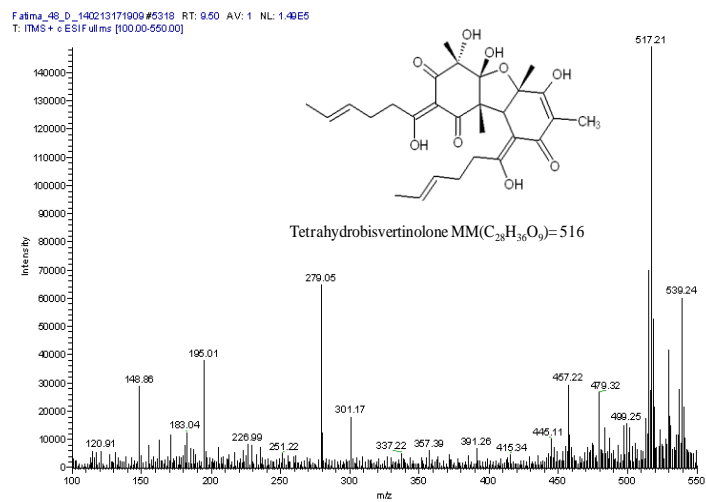
13 O espectro de RMN de 1H da amostra L2c (48) registrou sinais com deslocamento
14 químico na região acima de 16 ppm, característicos de hidrogênios fortemente quelados,
15 além de diversos sinais na região entre δ 7,80 e 5,20, característicos de H olefínicos, e
16 sinais na região de metilas, metilenos e metinos. Sinais estes similares aos encontrados na
17 amostra L2c(46) (Figura 80).



1
2
3 **Figura 80.** Espectro de RMN de ^1H de 600 MHz em CDCl_3 e regiões ampliadas da amostra L2c
4 (48).
5

6 A figura 81 apresenta os espectros de massas, juntamente com as sugestões de
7 possíveis estruturas das substâncias relacionadas com as massas encontradas para amostra
8 **L2c (48)** em comparação com a literatura (HARNED; VOLP, 2011).

9 O sinal intenso de m/z 517 corresponde a mesma massa da substância
10 tetrahydrobisvertinolona, assim como o sinal de m/z 499 para a substância bisvertinoquinol.
11 O mesmo ocorre para os sinais de m/z 497 e 515 que correspondem as substâncias
12 bisorbicilinol e 16,17-dihidrobisvertinolona, respectivamente. O sinal que corresponde a
13 m/z 513, é relativo a massa do bisvertinolona contendo as duas ligações duplas das cadeias
14 laterais da molécula do 16,17-dihidrobisvertinolona, figura a seguir.
15



1 **Figura 81.** Perfis dos espectros de massas da amostra L2c(48), contendo sugestão de membros da subfamília sorbicilinoídes.

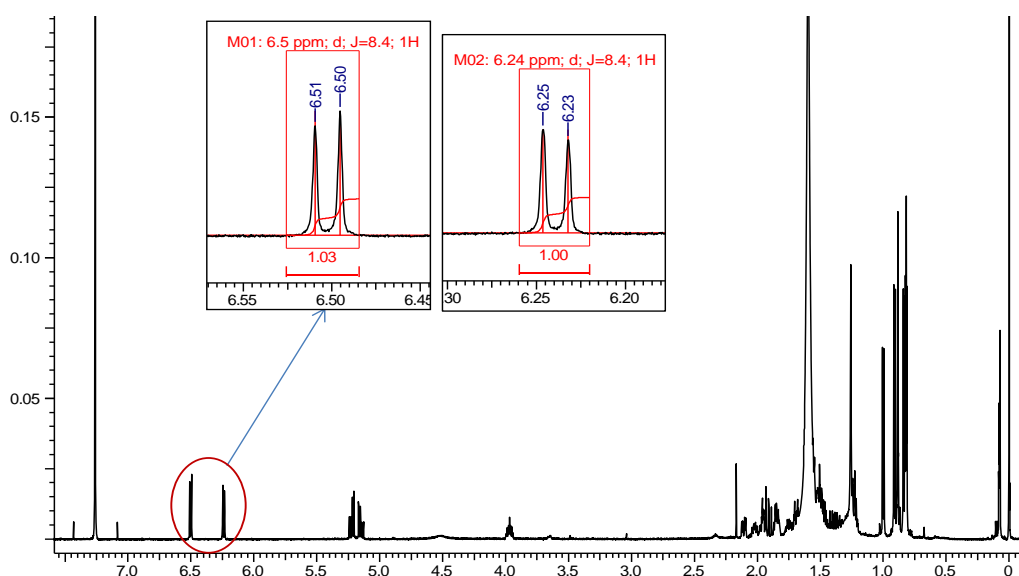
1 Sendo assim, com base nos resultados da amostra anterior (L2c (46), juntamente
2 com as buscas na literatura permitiu inferir que as substâncias presentes na amostra
3 L2c(48) sejam de substâncias membros da subfamília dos sorbicilinoídes, conhecidos
4 como bisvertinolídes, produtos naturais bioativos isolados de diversos gêneros de fungos,
5 tais como *Acremonium*, *Trichoderma*, *Verticillium*, e também de *Penicillium*
6 (BRINGMANN *et al.*, 2005; MASKEY; GRÜN-WOLLNY; LAATSCH, 2005; LIU *et al.*,
7 2005c; HARNED; VOLP, 2011). É importante ressaltar que este é primeiro relatado dessa
8 classe de substância como produto de *P. chrysogenum* associado a *Gustavia* sp. coletada na
9 floresta amazônica.

10

11 5.10.3. Amostra PI3F7 (62)

12 A amostra PI3F7 (62) apresentou-se como um sólido cristalino, na qual as análises
13 dos dados dos espectros de massas e de RMN ¹H (Figura 82) são exatamente coincidentes
14 com os dados descritos para o peróxido de ergosterol (página 110, tabela 16 e figura 54),
15 sendo que a amostra PI3 F7 (62) corresponde apenas a forma endo da substância. Portanto,
16 esta substância foi isolada do extrato do micélio da linhagem de *P. chrysogenum* nos dois
17 meios de cultura ISP2 e CY.

18

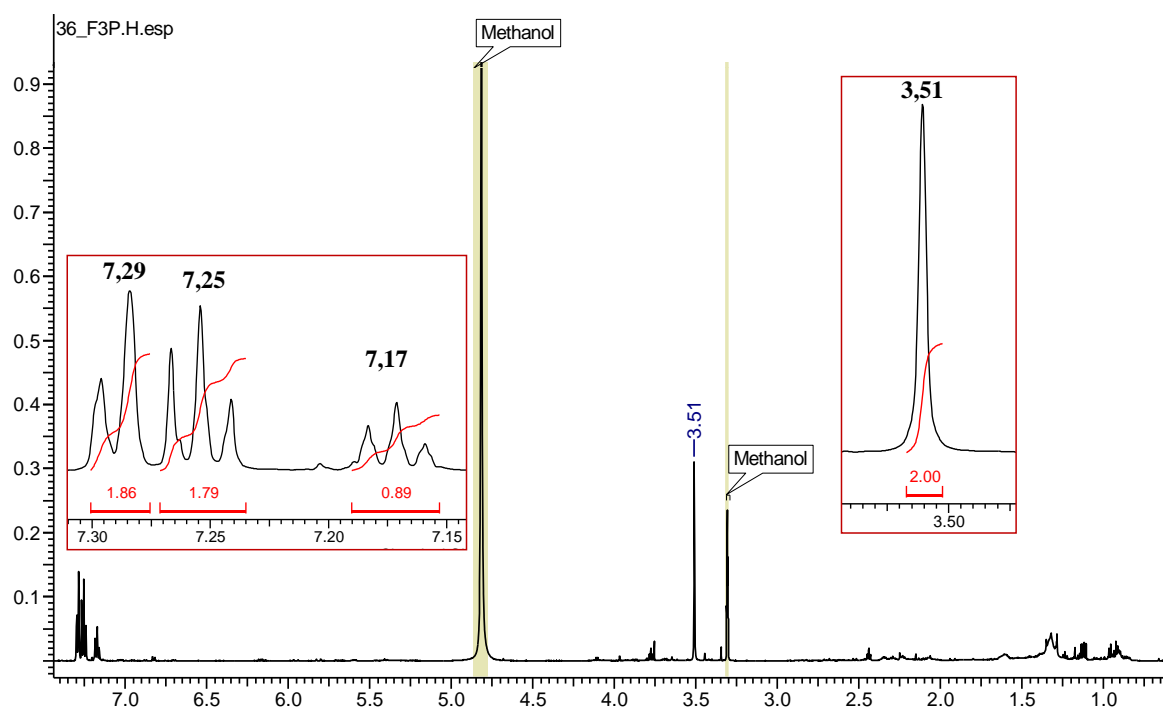


19 **Figura 82.** Espectro de RMN de ¹H em 600 MHz da amostra **PI3F7 (62)** e regiões ampliadas.

1 5.11. Linhagem 455 de *Aspergillus* sp.

2 5.11.1. Amostra A3b36_3P

3 A amostra 36_3P foi isolada como um sólido branco, que com base nas análises do
4 espectro de RMN de ^1H foi caracterizado como uma mistura de pelo menos duas
5 substâncias, no qual foram observados diversos sinais entre δ 7,15 a 7,31, sinalizando pelo
6 menos uma substância aromática (Figura 83).

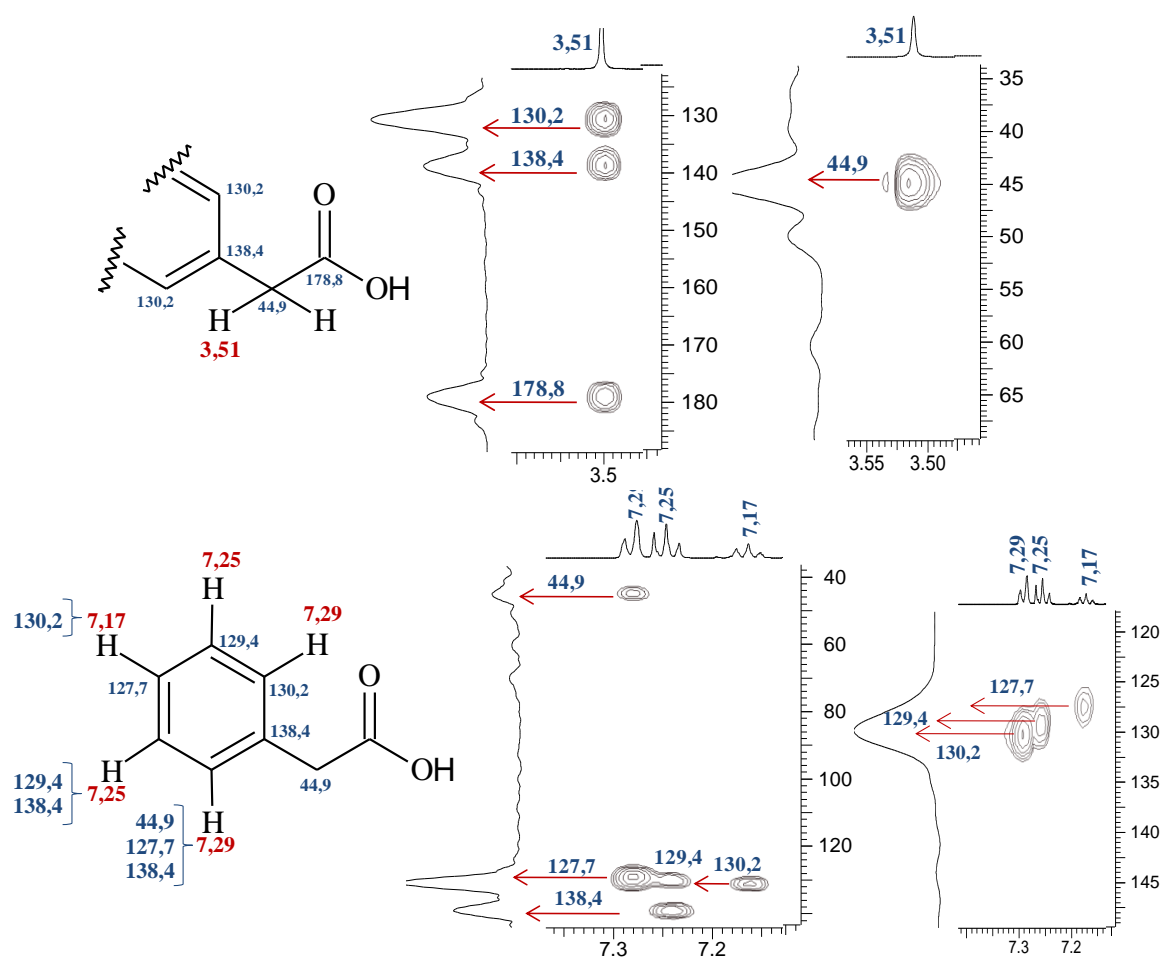


7
8 **Figura 83.** Espectro de RMN de ^1H da amostra A3b36_3P em MeOD e regiões ampliadas.

9
10 No mapa de correlação de HSQC, o sinal registrado em δ 3,51 atribuído a átomos
11 de hidrogênio metilênicos, mostra correlação direta com o carbono em δ 44,9. No HMBC
12 este sinal em δ 3,51 apresenta correlações múltiplas com os sinais de carbonos em δ 130,2,
13 138,4 e 178,8. Dessa forma, pode-se inferir que o metileno separa um grupo aromático de
14 um grupo ácido carboxílico ou éster.

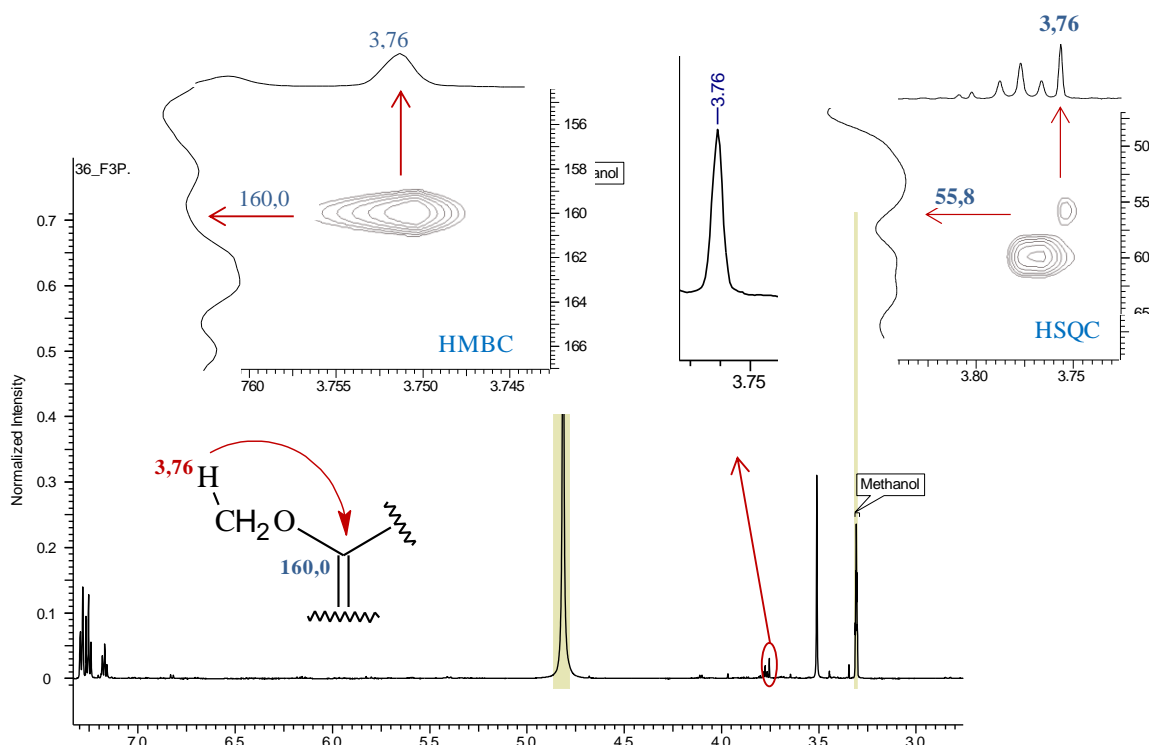
15 Os sinais de hidrogênio em δ 7,17, 7,25 e 7,29 no mapa de correlação de HSQC
16 apresentam, respectivamente, correlação direta com os sinais de carbono em δ 127,7, 129,7

1 e 130,2. No mapa de correlações de HMBC o hidrogênio em δ 7,17 apresentou correlação
2 com o sinal do carbono em δ 130,2, o hidrogênio em δ 7,25 apresentou correlações com os
3 sinais de carbono em δ 129,4 e 138,4 e o hidrogênio em δ 7,29 apresentou correlações com
4 os sinais de carbono em δ 44,9, 127,7 e 130,2. Nenhuma outra correlação foi observada
5 para os sinais discutidos neste parágrafo, indicando que na amostra 36_F3P estava presente
6 o ácido fenilacético (PAA) (Figura 84).



7
8 **Figura 84.** Regiões ampliadas dos mapas de correlações de HSQC e HMBC da amostra 36_F3P
9 destacando as correlações dos sinais de hidrogênio.

10
11 A outra substância presente na amostra em quantidade bem menor foi o ácido 4-
12 metoxifenilacético, revelado pelas ampliações dos sinais na região aromática. As
13 correlações de sua metoxila estão apresentadas na figura 85 e sua estrutura, com todas as
14 correlações observadas são apresentadas na figura 86.



1

2 **Figura 85.** Espectro de RMN de ^1H e ampliações dos mapas de correlações de HSQC e HMBC da
 3 amostra 36_F3P, destacando o sinal de hidrogênio em δ 3,76.

4

5 O ácido fenilacético (PAA) é um sólido branco com odor desagradável, que
 6 conjugado com a glutamina são constituintes normais da urina do ser humano. É
 7 encontrado na forma de acetato em fluidos biológicos de pacientes com nefrite e/ou
 8 hepatite, bem como pacientes com fenilcetonúria (doença que provoca o retardo mental)
 9 (WIGHTMAN & LIGHTY, 1982; MONTEIRO & CÂNDIDO, 2006).

10

O PAA é produzido naturalmente pela glândula metapleurial da maior parte das
 11 espécies de formigas, o qual é e utilizado como um agente antimicrobiano, e também na
 12 produção de substâncias ilícitas, como metanfetaminas (TSUJIKAWA & KUWAYAMA,
 13 2013).

14

O ácido 4-metoxifenil acético é um metabólito isolado de fungo e de planta.
 15 Estudos biológicos indicaram este ácido como um metabólito potencial no tratamento de
 16 câncer em uso direto ou indireto, como componente na síntese de compostos inorgânicos
 17 aplicados no tratamento da quimioterapia de câncer ou como agente inibidor de enzima
 18 que catalisa o metabolismo oxidativo de compostos químicos de origem exógena e

1 endógena (drogas, toxinas, esteroides, prostaglandina e outros) (EL-BEIH *et al.*, 2006;
 2 GÓMEZ-RUIZ & KALUDEROVIC, 2008; KIM *et al.*, 2011).

3 Na tabela 21 são apresentadas as atribuições dos sinais observados nos espectros de
 4 RMN 1D e 2D, em comparação com os dados da literatura para identificação dos
 5 constituintes contidos na amostra 36 F3P.

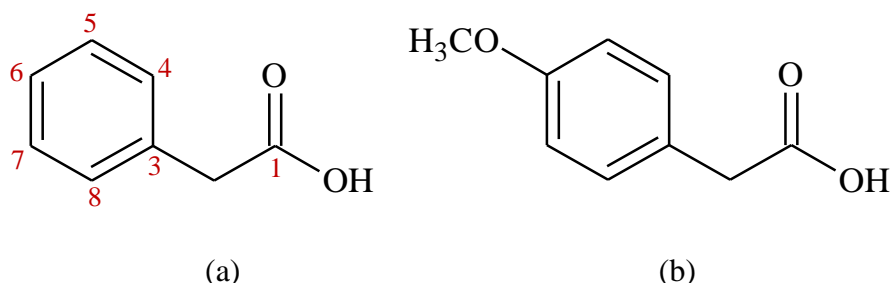
6 **Tabela 21.** Atribuições de ^{13}C e ^1H em comparação com os dados da literatura para as substâncias,
 7 ácido fenil acético e ácido 4-metóxi fenil acético.

A3b36_3P ^a				(MCNULTY; DAS, 2009) ^b	
C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J em Hz)	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	178,3	-----		177,9	
2	44,9	3,51 2H (s)	C-1, C-3, C-4	41,4	3,61
3	138,4	-----			
4	130,2	7,29 2H (m)	C-2, C-6, C-7	133,0	7,39
5	129,4	7,25 2H (m)	C-3, C-7	129,5	
6	127,7	7,17 1H (m)	C-4, C-8	128,5	7,18
7	129,4	7,25 2H (m)	C-3, C-5	127,0	
8	130,2	7,29 2H (m)	C-2, C-6, C-7	129,5	7,39

Ácido 4-metoxi fenil acético ^a					
C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J em Hz)	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	178,7	-----		178,2	
2	43,2	3,43 2H (s)	C-1, C-3	40,1	3,36
3	125,9	-----		125,6	
4	130,3	7,19 2H (m)	C-2, C-3, C-5, C-6	130,4	7,22
5	114,9	6,83 2H (m)	C-3, C-7	114,5	6,83
6	160,0	-----		159,0	3,77
7	114,9	6,83 2H (m)	C-5, C-3	114,5	6,83
8	130,3	7,19 2H (m)	C-3, C-5	130,4	7,22
9	55,8	3,76 3H (s)	C-9	56,2	

8 ^a Espectrometro Bruker 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , com TMS como padrão interno e MeOD
 9 para amostra.

10 ^b Espectrometro Bruker 200 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C , com TMS como padrão interno e CDCl_3
 11 para amostra.



13 **Figura 86.** Substâncias identificadas na amostra 36_F3P, ácido fenil acético (a) e ácido 4-metoxi
 14 fenilacético (b)

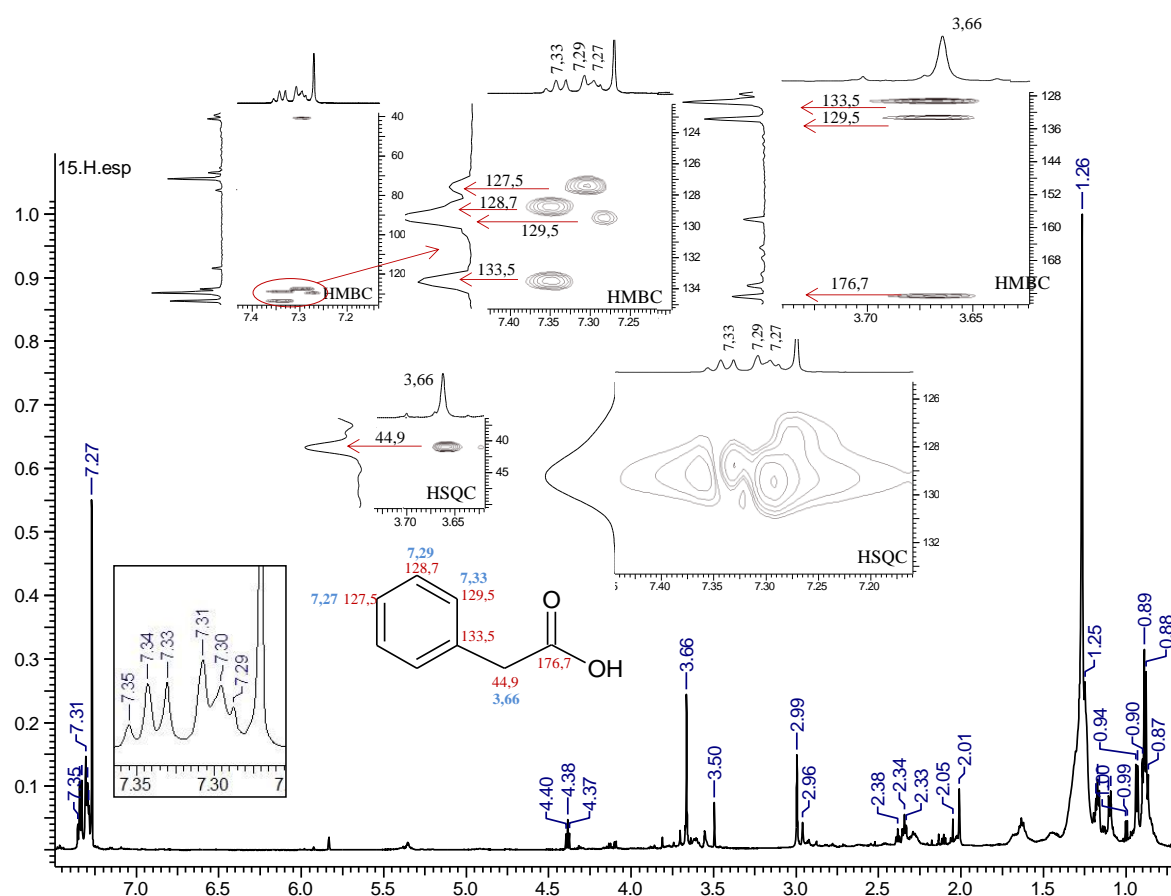
15

16

1 5.12. Linhagem 400 de *N. setofusareae*

2 5.12.1. Amostra N1a (15)

3 Os dados de RMN 1D e 2D para a amostra 15, apesar de terem sido obtidos em
4 CDCl₃ deuterado e não em metanol deuterado, apresentaram coerência com os descritos na
5 identificação da amostra A3b36F_3P. Logo a amostra 15 foi identificada como sendo o
6 ácido fenilacético. A figura 87 apresenta o espectro de RMN de ¹H e ampliações dos
7 mapas de correlações destacando os sinais identificados.

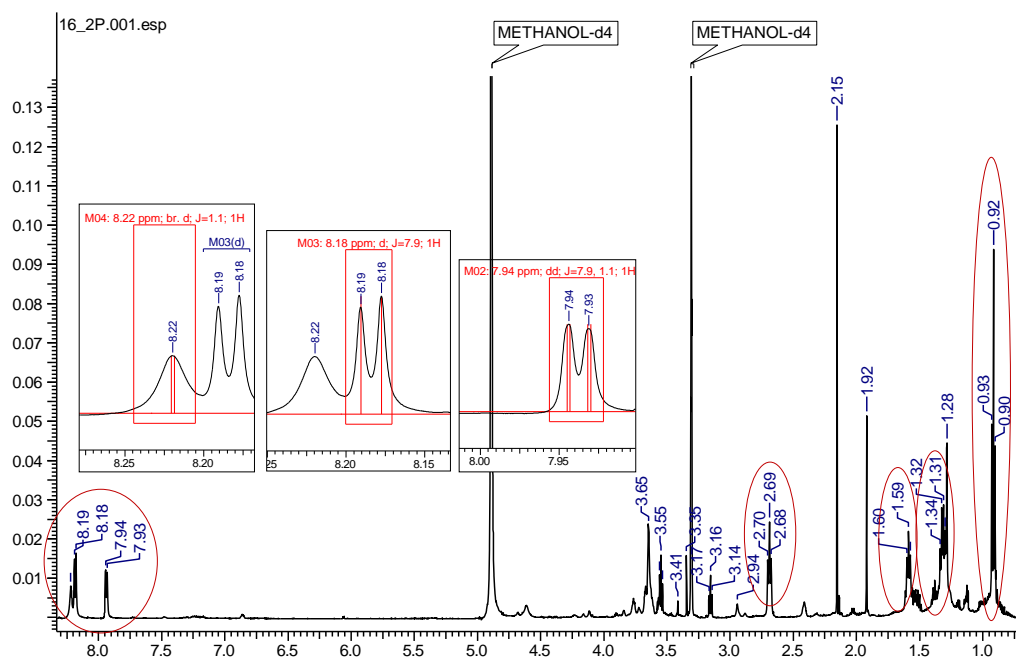


8
9 **Figura 87.** Espectro de RMN de ¹H da amostra 15 e regiões ampliadas dos mapas de correlações
10 de HMBC e HSQC.
11

12 5.12.2. Amostra N1C (16_2P)

13 A amostra 16_2P apresentou aspecto semi-sólido de coloração marrom e, no
14 espectro de RMN de ¹H, a presença de sinais na região entre δ 7,90 a 8,25, característico de

1 átomos de hidrogênio aromáticos, e diversos sinais na região relativa a hidrogênio
2 metilênico, metínico e metílico (Figura 88).

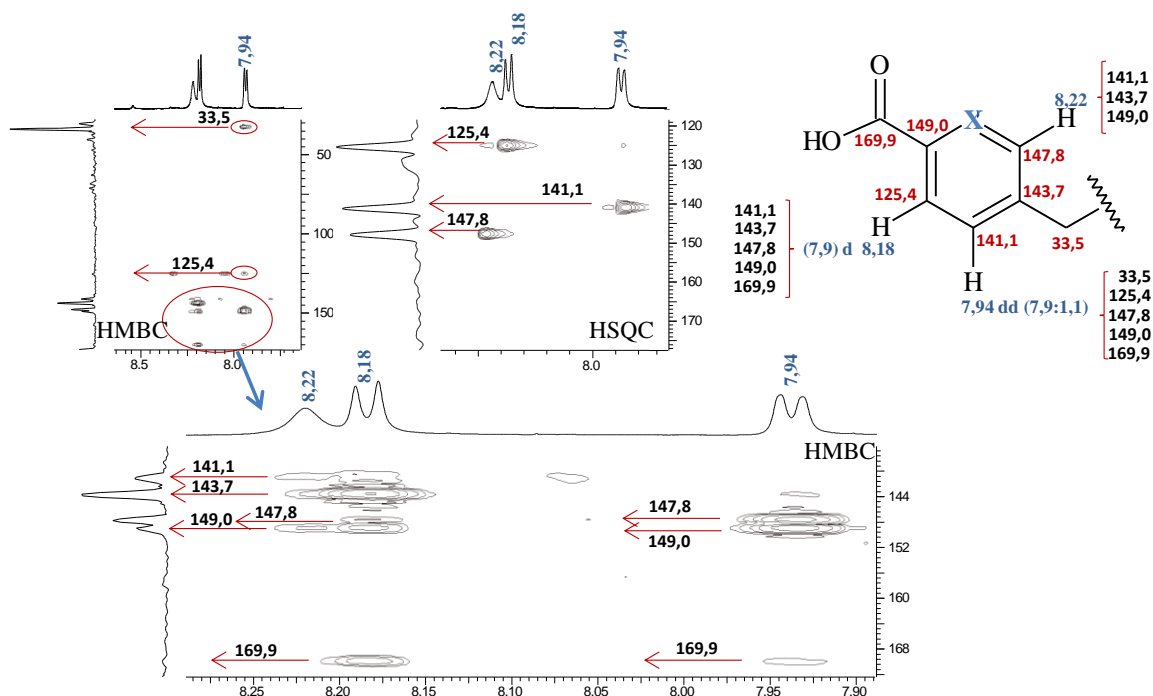


3
4
5 **Figura 88.** Espectro de RMN de ^1H da amostra N1C (16_2P) da linhagem *N. Setofurariae* em
6 MeOD.
7

8 No mapa de correlação de HSQC foi observado um sinal alargado em δ 8,22, este
9 apresentou conexão direta com o carbono em δ 147,8 e no HMBC mostrou correlações
10 com os sinais de carbono em δ 141,1 (metínico aromático), 143,7 e 149,0 (quaternário). O
11 hidrogênio em δ 7,94 ($d J = 7,9$ Hz), no HSQC apresentou correlação direta com o carbono
12 em δ 141,1 e no HMBC mostrou correlações com sinais de carbono em δ 33,5
13 (metilênico), 125,4 (metínico olefínico), 147,8, 149,0 e 169,9, sendo este atribuído a um
14 carbono carboxílico. Comparando os valores das constantes de acoplamento dos sinais de
15 hidrogênio, foi observado que o hidrogênio em δ 8,18 ($d J = 7,9$ Hz), acopla em orto com o
16 hidrogênio em δ 7,94, e no HMBC o sinal em δ 8,18 apresenta correlação com os sinais de
17 carbono em δ 143,7, 147,8, 149,0 e 169,9. Na descrição foram contabilizados três carbonos
18 hidrogenados e dois carbonos não hidrogenados para o sistema aromático, sugerindo

1 assim, a presença de um heteroátomo na estrutura anelar, podendo ser um oxigênio ou um
2 nitrogênio. Estes dados permitem propor uma estrutura parcial da molécula (Figura 89).

3



4

5 **Figura 89.** Ampliações dos mapas de correlações de HMQC e HMBC da amostra N1C (16_2P) da
6 indicando as correlações dos sinais de hidrogênio do anel aromático.

7

8 Para a identificação dos outros ligantes do anel aromático, observou-se inicialmente

9 que o carbono em δ 33,5 apresenta correlação direta com o sinal de tripleto em δ 2,69 ($J =$

10 7,1 Hz), o qual no mapa de correlações de HMBC mostrou correlações com os sinais de

11 carbono metilênicos em δ 23,3 e 34,1 e com os sinais de carbono aromáticos em δ 141,1,

12 143,7 e 147,8. No mapa de correlação de HSQC foi observado que o sinal do hidrogênio

13 em δ 1,31 apresentou correlação direta com o carbono metilênico em δ 23,3 e no HMBC

14 mostrou correlações com um carbono metílico em δ 14,2 e com o metilênico em δ 34,1. No

15 HSQC o sinal de hidrogênio em δ 1,59, apresentou correlação direta com o sinal do

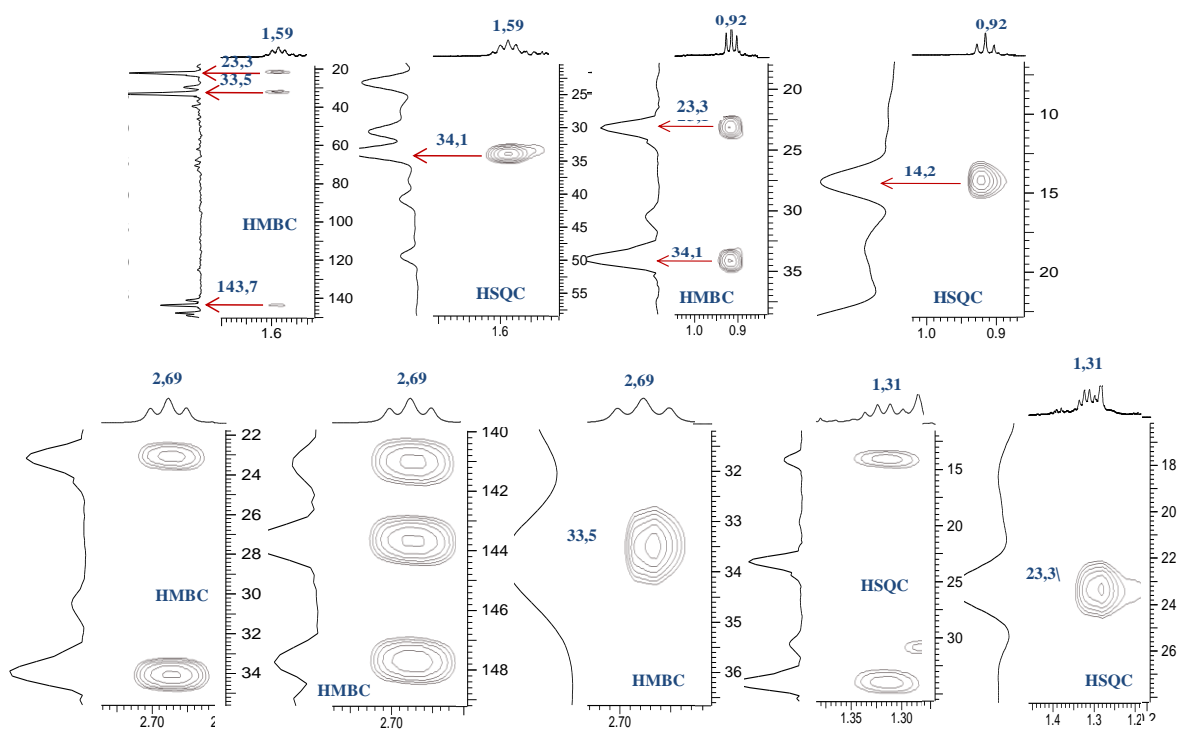
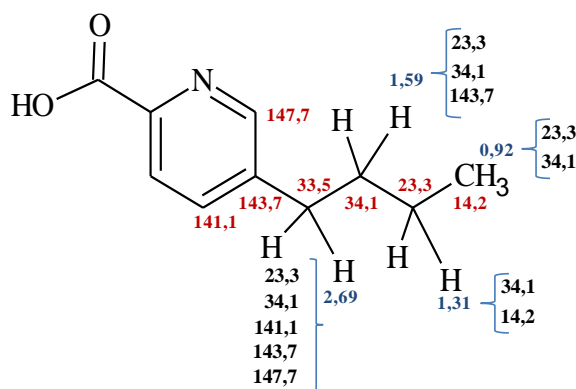
16 carbono em δ 34,1 e correlações a longa distância com os sinais de carbono em δ 23,3,

17 33,5 e 143,7. O carbono em δ 14,2 apresentou no HSQC correlação direta com um

18 hidrogênio metílico em δ 0,92 ($J = 7,3$ Hz), e correlações a longa distância com os sinais

19 de carbono em δ 23,1 e 34,1.

1 Para definir o heteroátomo do anel aromático, foram considerados os
 2 deslocamentos químicos dos sinais de carbono desta parte da molécula, especialmente
 3 daqueles conectados a ele, os carbonos em δ 149,0 e 147,8. Estes valores são compatíveis a
 4 vizinhança de um nitrogênio e muito baixos para a vizinhança de um oxigênio, o qual seria
 5 necessariamente carregado positivamente na estrutura aromática proposta. Dessa forma
 6 pode-se inferir que trata-se de um anel piridínico. A revisão da literatura sobre o gênero do
 7 fungo *Nectria setofusareae* permitiu identificar a substância como sendo o ácido fusárico
 8 (AF) ou ácido 5-butilpiridínicocarboxílico (Figura 90).



11 **Figura 90.** Ampliações dos mapas de correlações de HMQC e HMBC da amostra N1C (16_2P),
 12 indicando as correlações dos sinais de hidrogênio da cadeia lateral.
 13
 14

1 O AF foi isolado pela primeira vez em 1937, do fungo *Fusarium heterosporum*. É
 2 uma micotoxina com baixa toxicidade, porém junto com outras micotoxinas, que ocorrem
 3 naturalmente no fungo, torna-se potencialmente mais tóxica para animais e plantas
 4 (BACON; PORTER; 1996).

5 Esta substância apresenta potencial para o desenvolvimento de agentes virucida.
 6 Estudos revelaram seu potencial para o tratamento de HIV, além do efeito de seus ésteres
 7 como herbicidas naturais no controle de ervas daninhas (CAPASSO; EVIDENTE;
 8 CUTIGNANO, 1996; LI *et al.*, 2014; RAMAUTAR & MABANDLA, 2012). Este é o
 9 primeiro relato da ocorrência do AF em *Nectria setofusariae* associado a *Gustavia* sp.

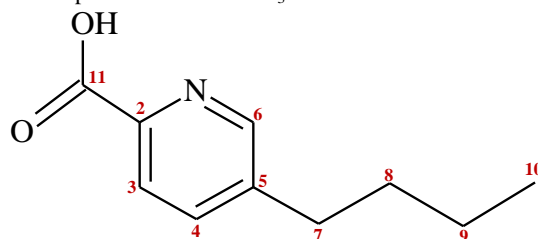
10 A tabela 22 apresenta as atribuições dos sinais de carbono e hidrogênio observados
 11 nos espectros de RMN 1D e 2D. A figura 91 apresenta a estrutura do ácido fusarico,
 12 identificado da amostra N1C (16_2P).

13 **Tabela 22.** Atribuições de ^{13}C e ^1H em comparação com os dados da literatura para a substância
 14 ácido fusarico.

N1C (16_2P) ¹				Ácido fusarico ²	
C	$\delta^{13}\text{C}$	δ_{IH} (mult., J em Hz)	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1		-----	-----	-----	-----
2	149,0	-----	-----	144,9	-----
3	125,3	8,18 1H (d, 7,9)	C-2, C-4, C-5, C-6, C-11	124,5	8,17
4	141,1	7,94 1H (dd, 7,9:1,1)	C-2, C-3, C-6, C-7, C-11	138,5	7,75
5	143,7	-----	-----	143,1	-----
6	147,7	8,22 1H (br)	C-2, C-4, C-5,	147,6	8,70
7	33,5	2,69 2H (t, 7,1)	C-4, C-5, C-6, C-8, C-9	32,7	2,71
8	34,1	1,59 2H (m)	C-5, C-7, C-9	32,9	1,62
9	23,3	1,31 2H (m)	C-8, C-10	22,2	1,34
10	14,2	0,92 3H (t, 7,3)	C-8, C-9	13,7	0,90
11	169,9	-----	-----	165,2	-----

15 ¹ Espectrômetro Bruker 600 MHz para ^1H e para ^{13}C 125 MHz, em MeOD com TMS como padrão interno.

16 ² (STIPANOVIC, 2011) Espectrômetro Bruker AVANCE 300 e 500 MHz para ^1H e para ^{13}C 75 e 125 MHz, com
 17 uso de TMS como padrão interno e para a amostra CDCl_3



18

19

Figura 91. Ácido fusarico (5-butil piridinicocarboxílico)

1 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

2 Este trabalho teve como objetivo realizar estudos químicos e biológicos de fungos
3 endofíticos associados a uma espécie de *Gustavia* coletada no Amazonas. Para isso, foram
4 isolados 93 fungos endofíticos dos tecidos vegetais de *Gustavia* sp., dos quais foram
5 conservadas 67 linhagens.

6 Por meios de técnicas macromorfológicas e de microcultivo dos fungos foram
7 identificados em sete gêneros: *Fusarium*, *Xylaria*, *Pestalotiopsis*, *Penicillium*,
8 *Cephalosporium*, *Aspergillus* e *Colletotrichum*. Alguns desses fungos foram identificados
9 como ascomicetos. O gênero *Penicillium* foi o de maior ocorrência, com a maior
10 incidência de isolados na casca da raiz.

11 A atividade antimicrobiana dos extratos contra os patógenos (bactérias *Gram*
12 negativas, *Gram* positivas e uma levedura), indicou potencial para os extratos de *Nectria*
13 *setufusariae* (linhagem 400). Frações dessa linhagem e de *Penicillium chrysogenum*
14 (linhagem 401) mostraram-se as mais promissoras contra os patógenos *P. aeruginosa* e *C.*
15 *albicans*, com 21 amostras ativas.

16 As atividades citotóxicas *in vitro* dos extratos dos fungos exibiram excelentes
17 resultados, com 46,9% das amostras indicando alta atividade (75% a 100% de inibição)
18 contra as linhagens de células tumorais de Leucemia, Glioblastoma e Melanoma,
19 destacando-se linhagens de *Aspergillus* e *Penicillium chrysogenum* (linhagem 401) como
20 as mais promissoras - 100 % de inibição. As atividades citotóxicas *in vitro* das frações dos
21 extratos com os melhores resultados positivos, também exibiram resultados promissores,
22 com percentual de inibição entre 50% e 100 % contra linhagens células tumorais de Cólon
23 e Ovário, destacando amostras das linhagens de *Nectria setufusariae* (linhagem 400) e
24 *Aspergillus* sp.

1 A substância esterigmatocistina isolada do meio líquido e a mistura do peróxido de
2 ergosterol na forma endo e exo, isoladas do meio micelial e *P. chrysogenum* apresentaram
3 resultados promissores de inibição proliferativa das linhagens de células tumorais de
4 leucemia, ovário e cólon, com concentração inibitória próxima a do controle positivo, CI_{50}
5 $< 1 \mu\text{g/mL}$.

6 A atividade alelopática dos extratos e frações indicou potencial para as amostras
7 das linhagens de *X. adscendens* (447), *N. setofusariae* (400) e *Aspergillus* sp. (455),
8 inibindo ou favorecendo o crescimento das radículas em quase 100 %. Os resultados
9 favoráveis assemelham-se aos de fito-homônio de crescimento. Estes resultados mostraram
10 o potencial dos extratos de fungo endofíticos como alternativa para o controle de plantas
11 invasoras e/ou para aumento da produtividade na agricultura.

12 Dentre os metabólitos identificados nas quatro linhagens (ácido fenil acético e
13 ácido fusárico do fungo *Nectria setofusariae*, ácido pilifórmico e 5-carboximeleina do
14 fungo *Xylaria adscendens*, ácido 4-metoxi fenil acético e ácido fenil acético do fungo
15 *Aspergillus* sp., peróxido de ergosterol, mistura de monoglicerídeos, estrigmatocistina,
16 mistura do trichodimerol, tetrahydrotrichodimerol e dihidrotrichodimerol) estudadas
17 quimicamente, além da esterigmatocistina isolada de *P. chrysogenum* chamam atenção os
18 bisorbicilinoídes da mesma linhagem, uma classe interessante não apenas por suas
19 estruturas únicas, mais também pelas atividades biológicas relatadas na literatura. A
20 presença da esterigmatocistina e dos bisorbicilinoídes, e a detecção por espectrometria de
21 massas de outros sorbicilinoídes nessa linhagem a tornam um alvo promissor para novas
22 investigações químicas e de atividades biológicas.

23

24

25

8. REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P. (2004). Spectral assignments and reference data. *Magn Reson Chem*, 44, 966–968. doi:10.1002/mrc.
- ALMEIDA, M.; MELO, A. C. R. DE; PINHEIRO, M. (2011). Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (lecythidaceae). *Quim. Nova*, 34(7), 1182–1187. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/qn/v34n7/v34n7a15.pdf>.
- ALY, A. H.; DEBBAD, A.; CLEMENTS, C.; EDRADA-EBEL, R.; ORLIKOVA, B.; DIEDERICH, M.; WRAY, V.; LI, W.; PROKSCH, P. (2011). NF kappa B inhibitors and antitrypanosomal metabolites from endophytic fungus *Penicillium* sp. isolated from *Limonium tubiflorum*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 19, n. 1, p. 414–21.
- AN, C.; LI, X.; LI, C.; GAO, S. (2013). Triazoles and Other N-Containing Metabolites from the Marine-Derived Endophytic Fungus *Penicillium chrysogenum* EN-118. *Helvetica Chimica Acta*, 96, 682–687. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hlca.201200433/abstract>.
- ANDERSON, J. R.; EDWARDS, R. L.; WHALLEY, A. J. S. (1985). Metabólitos of the Higher fungi. Part 22(1) 2-butyl-3-methylsuccinic acid and 2-hexylidene-3 methylsuccinic acid from *Xylarioceous* Fungi. *J. CHEM. SOC. PERKIN TRANS. I*, v. 34, p. 1481–1485.
- AZEVEDO, J. L. (1999). Botânica : uma ciência básica ou aplicada? *Revista Brasileira de Botânica*, v. 22, n. 2, p. 225–229.
- BACON, C.; PORTER, J. (1996). Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11). Retrieved from <http://aem.asm.org/content/62/11/4039.short>.
- BAI, Z-Q.; LIN, X.; WANG, Y.; WANG, J.; ZHOU, X.; YANG, B. ; LIU, J. ; YANG, X.; WANG, Y.; LIU, Y. (2014). New phenyl derivatives from endophytic fungus *Aspergillus flavipes* AIL8 derived of mangrove plant *Acanthus ilicifolius*. *Fitoterapia*, 95, 194-202. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2014.03.021>.
- BAYMAN, P.; ANGULO-SANDOVAL, P.; BÁEZ-ORTIZ, Z.; LODGE, D- J. (1998). Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico, *Mycological Research*, v. 102, Issue 8,p. 944–948.
- BAKER, D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. (2007). The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural Product Reports*, 24(6), 1225–44. doi:10.1039/b602241n.
- BALDE, E. S.; ANDOLFI, A.; BRUYÈRE, C.; CIMMINO, A.; LAMORAL-THEYS, D.; VURRO, M.; DAMME, M. V.; ALTOMARE, C.; MATHIEU, V.; KISS, R. (2010). Investigations of fungal secondary metabolites with potential anticancer activity. *Journal of natural products*, v. 73, n. 5, p. 969–71, 28 maio.
- BANHOS, E. F. D.; SOUZA, A. Q. L. D.; ANDRADE, J. C. D.; SOUZA, A. D. L. D.; KOOLEN, H. H. F.; Albuquerque, P. M. (2014). Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: distribution and bioactivity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 153-162.
- BARABAN, E. MORIN, J.; PHILLIPS, G. (2013). Xyolide, a bioactive nonenolide from an Amazonian endophytic fungus, *Xylaria feejeensis*. *Tetrahedron Letters*, 54(31), 4058–4060. doi:10.1016/j.tetlet.2013.05.093.
- BARBOSA, R. S. S. (2009). Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos de fungos endofíticos frente a cepas presentes nas endodônticas. 59p. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical). Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM.

- BARGEN, K. VON. (2013). Structure Elucidation and Antimalarial Activity of Apicidin F: An Apicidin-like Compound Produced by *Fusarium fujikuroi*. *Journal of Natural Products*, 76, 2136–2140. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np4006053>.
- BARISON, A.; SILVA C. W. P. DA; CAMPOS, F. R.; SIMONELLI, F.; LENZ, C. A.; FERREIRA, A. G. (2010). A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through ¹H NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48(8), 642–50. doi:10.1002/mrc.2629.
- BONONI, V. L. R.; GRANDI, R. A. P. (1998) Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: Noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, S. Paulo, 184 p.
- BORGES, W.; BORGES, K. (2009). Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. *Current Organic Chemistry*, 13(12), 1137–1163. doi:10.2174/138527209788921783.
- BRAGA-NETO, R.; LUIZÃO, R.; MAGNUSSON, W. E. (2008) Reserva Ducke – A biodiversidade Amazônica através de uma grade. Attema Design Editorial Ltda. Manaus, Amazonas, p. 31-38.
- BRINGMANN, G.; LANG, G.; GULDER, T. M.; TSURUTA, H.; MÜHLBACHER, J.; MAKSIMENKA, K.; STEFFENS, S.; SCHAUMANN, K.; STÖHR, R.; WIESE, J.; IMHOFF, J. F.; PEROVIC-OTTSTADT, S.; BOREIKO, O.; MÜLLER, W. E.G. (2005). The first sorbicillinoid alkaloids, the antileukemic sorbicillactones A and B, from a sponge-derived *Penicillium chrysogenum* strain. *Tetrahedron*, v. 61, n. 30, p. 7252–7265, jul.
- BRINGMANN, G.; LANG, G.; BRUHN, T.; SCHÄFFLER, K. (2010). Sorbifuranones A–C, sorbicillinoid metabolites from *Penicillium* strains isolated from Mediterranean sponges. *Tetrahedron*, 66(52), 9894–9901. doi:10.1016/j.tet.2010.10.057.
- BUHMAN, K. K.; ACCAD, M.; NOVAK, S.; CHOI, R. S.; WONG, J. S.; HAMILTON, R. L.; TURLEY, S.; FARESE, R. V. (2000). Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nature medicine*, v. 6, n. 12, p. 1341–7, dez.
- BUTLER, M. (2008). Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports*, 22, 162. Retrieved from <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2008/np/b514294f>.
- BRUNNER, F.; PETRINI, O. (1992). Taxonomy of some *Xylaria* species and xylariaceous endophytes by isozyme electrophoresis, *Mycological Research*, v. 96, Issue 9, September, 723–733.
- CAFÊU, M.; SILVA, G.; TELES, H. (2005). Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Quim. Nova.*, 28(6), 991–995.
- CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITO, D. DE; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; RODRIGO, L. CAMPANA-FILHO, S. P. (2007). Extração, estrutura e propriedades de α - e β - quintina. *Quim. Nova*, v. 30, n. 3, p. 644–650.
- CAPASSO, R.; EVIDENTE, A.; CUTIGNANO, A. (1996). Fusaric and 9, 10-dehydrofusaric acids and their methyl esters from *Fusarium nygamai*. *Phytochemistry*, 41(4), 1035–1039. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942295007164>.
- CARRILLO, L. (2003). Contenido 5. *Penicillium*. Morfología. Identificación. Cultivos. Ambiente. Micotoxinas: ocratoxina A, patulina, citrinina, ácido penicílico, otras toxinas. 61–69. Retrieved from <http://uniciencia.ambientalex.info/infoCT/Honaliforpen.pdf>.

- CARRILLO, L. (2003a). Contenido 6. Fusarium. Morfología. Cultivos. Identificación. Ambiente. Micotoxinas: tricotecenos, zearalenona, fumonisinas, otras toxinas. 70-80. Retrieved from <http://unicencia.ambientalex.info/infoCT/Honaliforfus.pdf>.
- CHESTERS, N.; O'HAGAN, D. (1997). Biosynthesis of the fungal metabolite, piliformic acid (2-hexylidene-3-methylsuccinic acid). *Journal of the Chemical Society, Perkin*, v. 1, n. 6, p. 827–834.
- CHINWORRUNGSEE, M.; KITTA KOOP, P.; ISAKA, M.; RUNGROD, A.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. (2001). Antimalarial halorosellinic acid from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 11, n. 15, p. 1965–9.
- CRONQUIST, A. (1968). The evolution and classification of flowering plants. Houghton Mifflin Company. Boston. p. 396..
- CUETO, M.; MACMILLAN, J.; JENSEN, P.; FENICAL, W. (2006). Tropolactones A–D, four meroterpenoids from a marine-derived fungus of the genus *Aspergillus*. *Phytochemistry*, 67, 1826–1831. doi:10.1016/j.phytochem.2006.01.008.
- CUI, Y.; YI, D.; BAI, X.; SUN, B.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y. (2012). Ginkgolide B produced endophytic fungus (*Fusarium oxysporum*) isolated from Ginkgo biloba. *Fitoterapia*, 83(5), 913–920. doi:10.1016/j.fitote.2012.04.009.
- DAVIS, R. A.; WATTERS, D.; HEALY, P. C. (2005) The isolation and synthesis of 3-chloro-4-hydroxy- phenylacetamide produced by a plant-associated microfungus of the genus *Xylaria*. *Tetrahedron Letters*, v. 46, p. 919–921.
- DESHMUKH, R.; MATHEW, A.; PUROHIT, H. J. (2014). Characterization of antibacterial activity of bikaverin from *Fusarium* sp. HKF15. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 117 n. 4, 443e448, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.09.017>.
- DESJARDINS, A. E.; PROCTOR, R.H. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 119 (2007) 47–50. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.024.
- DETTRAKUL, S.; KITTA KOOP, P.; ISAKA, M. (2003). Antimycobacterial pimarane diterpenes from the Fungus *Diaporthe* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13, 1253–1255. doi:10.1016/S0960-894X(03)00111-2.
- DEVI, P.; D'SOUZA, L. (2009). Batch culture fermentation of *Penicillium chrysogenum* and a report on the isolation, purification, identification and antibiotic activity of citrinin. *Indian Journal of Marine Science*, 38(1), 38–44. Retrieved from <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/4242>.
- DEZOTTI, N. (1999). Estudo genético da produção de esterigmatocistina em *Aspergillus nidulans*., 146. Retrieved from <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-21102008-192615/en.php>.
- DING, L.; DAHSE, H.; HERTWECK, C. (2012). Cytotoxic alkaloids from *Fusarium incarnatum* associated with the mangrove tree *Aegiceras corniculatum*. *Journal of Natural Products*, 75, 617–621. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np2008544>.
- ELAVARASI, A.; RATHNA, G. S.; KALAISELVAM, M. (2012). Taxol producing mangrove endophytic fungi *Fusarium oxysporum* from *Rhizophora annamalayana*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S1081-S1085.
- EL-BEIH, A.; KATO, H.; TSUKAMOTO, S.; & OHTA, T. (2007). CYP3A4 inhibitors isolated from a marine derived fungus *Penicillium* species. *Journal of Natural Medicines*, 61(2), 175–177. doi:10.1007/s11418-006-0102-y.

- EL-SEEDI, H. (1999). Triterpenes from *Gustavia longifolia*. *Revista Latinoamericana de Quimica*, 27(1999), 134837. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Triterpenes+from+Gustavia+longifolia#0>.
- EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; CIMMINO, A.; GANASSI, S.; ALTOMARE, C.; FAVILLA, M.; CRISTOFARO, A. DE; VITAGLIANO, S.; SABATINI, M. A. (2009). Bisorbicillinoids Produced by the Fungus *Trichoderma citrinoviride* Affect Feeding Preference of the *AphidSchizaphis graminum*. *J Chem Ecol* (2009) 35:533–541. doi: 10.1007/s10886-009-9632-6.
- EYBERGER, A.; DONDAPATI, R.; PORTER, J. (2006). Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *Journal of Natural Products*, 69(8), 1121–1123. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np060174f>.
- FERREIRA, H.; LALA, E. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*: um alerta aos profissionais de saúde. *Revista Panamericana de Infectologia*, 12(2), 44–50. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Pseudomonas+aeruginosa:+Um+alerta+aos+profissionais+de+saúde#0>.
- FLORES, P. S.; BRUCKNER, C. H. (2014). Raios gama na sobrevivência de plantas de maracujazeiro amarelo inoculadas com *Fusarium oxysporum* f sp. Passiflorae. *Ciências Rurais*, Santa Maria, .v. 44, n. 4, 639-644.
- FRÓHLICH, J.; HYDE, K. D.; PETRINI, O. (2000). Endophytic fungi associated with palms, *Mycological Research*, v.104, Issue 10, p. 1202–1212.
- FRUHMANN, P.; MIKULA, H. (2013). Isolation and structure elucidation of pentahydroxyscirpene, a trichothecene *Fusarium* mycotoxin. *Journal of Natural Products*, (Figure 2). Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np4008365>.
- GAO, J-M.; WANG, M.; LIU, L-P.; WEI, G-H.; ZHANG, A-L.; DRAGHICI, C.; KONISHI, Y. (2007). Ergosterol peroxides as phospholipase A(2) inhibitors from the fungus *Lactarius hatsudake*. *Phytomedicine : international Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, v. 14, n. 12, p. 821–4, dez.
- GAO, Q.; LEET, J.; THOMAS, S. (1995). Crystal structure of trichodimerol. *Journal of Natural Products*, 58(12), 1817–1821. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50126a003>.
- GAO, S.; LI, X.; LI, C.; PROKSCH, P.; WANG, B. (2011). Penicisteroids A and B, antifungal and cytotoxic polyoxygenated steroids from the marine alga-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. *Bioorganic & Medicinal*, 21(10), 2894–2897. doi:10.1016/j.bmcl.2011.03.076.
- GAO, S-S.; LI, X-M.; DU, F-Y.; LI, C-S.; PROKSCH, P.; WANG, B-G. (2011). Secondary Metabolites from a Marine-Derived Endophytic Fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. *Marine Drugs*, 9, 59-70; doi:10.3390/md9010059.
- GÁRATE, J. L. M.; MAGALHÃES, G. C. DE; ROMEIRO, L. A. S. (1998). Síntese de Análogo de Brassinoesteróide a Partir de Vepertilina. *Quim. Nova.*, v. 21, n. 6, p. 726–730,
- GEISER, D. M.; DORNER, J. W.; HORN, B. W.; TAYLOR, J. W. (2000). The Phylogenetics of Mycotoxin and Sclerotium Production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*, *Fungal Genetics and Biology*, v. 31, 169–179.
- GILMAR, J. C. A. (1959). *Manual of Soil Fungi*, 2ª ed. Iowa: U.S.A., 432 p.

- GÓMEZ-RUIZ, S.; KALUĐEROVIĆ, G. (2008). Study of the cytotoxic activity of di and triphenyltin (IV) carboxylate complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102(12), 2087–96. doi:10.1016/j.jinorgbio.2008.07.009.
- GRÄFENHAN, T.; SCHROERS, H.-J.; NIRENBERG, H.I.; SEIFERT, K. A. (2011) An overview of the taxonomy, phylogeny, and typification of nectriaceous fungi in *Cosmospora*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Stilbella*, and *Volutella*, *Studies in Mycology*, v. 68, pages 79–113. doi:10.3114/sim.2011.68.04.
- GRAVEL, E.; POUPON, E. (2008). Biogenesis and Biomimetic Chemistry: Can Complex Natural Products Be Assembled Spontaneously? *European Journal of Organic Chemistry*, v. 2008, n. 1, p. 27–42.
- GRENAND, P.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H. (1967) Pharmacopés traditionnelles en Guyane. (Créoles, Palikur, Wayãpi). Ed. de l'ORSTOM. Institut François de Recherche Scientifique Pour Le Développement em Coopération, 569 p.
- GUERRERO, R. T.; SILVEIRA, R. M B DA. (2003). Glossário Ilustrado de fungos: termos e conceitos aplicados à micologia. 2ed. Ed. Universidade/UFRGS, Porto Alegre, 117 p.
- HARNED, A. M.; VOLP, K. A. (2011). The sorbicillinoid family of natural products: isolation, biosynthesis, and synthetic studies. *Natural product reports*, v. 28, n. 11, p. 1790–810.
- HEALY, P.; HOCKING, A.; TRAN-DINH, N.; PITT, J. (2004). Xanthones from a microfungus of the genus *Xylaria*. *Phytochemistry*, 65, 2373–2378. doi:10.1016/j.phytochem.2004.07.019.
- HIRAMATSU, F.; MIYAJIMA, T. (2006). Isolation and structure elucidation of neofusapyrone from a marine-derived *Fusarium* species, and structural revision of fusapyrone and deoxyfusapyrone. *The Journal of Antibiotics*, 59(11), 704–709. Retrieved from <http://www.nature.com/ja/journal/v59/n11/abs/ja200694a.html>.
- HSIEH, H., LIN, C.; FANG, M. (2010). Phylogenetic status of *Xylaria* subgenus *Pseudoxylaria* among taxa of the subfamily Xylarioideae (Xylariaceae) and phylogeny of the taxa involved in. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(3), 957–969. doi:10.1016/j.ympcv.2009.12.015.
- HU, Z., LI, Y.; HUANG, Y. (2008). Three new sesquiterpenoids from *Xylaria* sp. NCY2. *Helvetica Chimica Acta*, 91, 46–52. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hlca.200890011/full>.
- HUSSAIN, H.; AKHTAR, N. (2009). New Bioactive 2, 3-Epoxy cyclohexenes and Isocoumarins from the Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. from *Laurus Azorica*. *European Journal of Organic Chemistry*, 749–756. doi:10.1002/ejoc.200801052.
- ISAKA, M.; YANGCHUM, A.; SUPOTHINA, S.; CHANTHAKET, R.; SRIKTIKULCHAI, P. (2014). Isopimaranes and eremophilanes from the wood -decay fungus *Xylaria allantoidea* BCC 23163. *Phytochemistry Letters* 8, 59–64. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2014.01.011>.
- JIAO, Y.; ZHANG, X.; WANG, L.; LI, G.; ZHOU, J.-C.; LOU, H.-X. (2013). Metabolites from *Penicillium* sp., an endophytic fungus from the liverwort *Riccardia multifida* (L.) S. Gray. *Phytochemistry Letters* 6, 14–17. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2012.10.005>.
- KIFFER, E; MORELET, M. The Deuteromycetes – Mitosporic fungi – Classification and Generic Keys, Science Publishers, USA, 1999, 273 p.
- KIM, D.-H.; JUNG, S. J.; CHUNG, I.-S.; LEE, Y.-H.; KIM, D.-K.; KIM, S.-H.; KWON, B.-M.; JEONG, T.-S.; PARK, M.-H.; SEOUNG, N.-S.; BAEK, N. (2005). Ergosterol peroxide from

- flowers of *Erigeron annuus* L. as an anti-atherosclerosis agent. *Archives of Pharmacal Research*, v. 28, n. 5, p. 541–5.
- KIM, K.; MOON, E.; CHOI, S.; KIM, S.; LEE, K. (2011). Biological evaluation of phenolic constituents from the trunk of *Berberis koreana*. *Bioorganic & Medicinal*, 21(8), 2270–3. doi:10.1016/j.bmcl.2011.02.104.
- KIM, S.; SHIN, D.; LEE, T.; OH, K. (2004). Periconicins, two new fusicoccane diterpenes produced by an endophytic fungus *Periconia* sp. with antibacterial activity. *Journal of Natural Products*, 67, 448–450. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np030384h>.
- KONTANI, M.; SAKAGAMI, Y.; MARUMO, S. (1994). First β -1, 6-glucan biosynthesis inhibitor, bisvertinolone isolated from fungus, *Acremonium strictum* and its absolute stereochemistry. *Tetrahedron Letters*, 35(16), 2577–2580. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403900771759>.
- KORNSAKULKARN, J.; DOLSOPHON, K. (2011). Dihydronaphthalenones from endophytic fungus *Fusarium* sp. BCC14842. *Tetrahedron*, 67(39), 7540–7547. doi:10.1016/j.tet.2011.07.078.
- KUSARI, S.; LAMSHÖFT, M. (2008). An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *Journal of Natural Products*, 71(2), 159–161. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np070669k>.
- KUSARI, S.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. (2009). An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. *Journal of Natural Products*, 72, 2–7. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np800455b>.
- KUSARI, S.; VERMA, V. C.; LAMSHOEFT, M.; SPITELLER, M. (2012). An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1287–1294. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22805849>
- LAI, D.; BRÖTZ-OESTERHELT, H.; MÜLLER, W. E. G.; WRAY, V.; PROKSCH, P. (2013). Bioactive polyketides and alkaloids from *Penicillium citrinum*, a fungal endophyte isolated from *Ocimum tenuiflorum*. *Fitoterapia*, 91, 100–106.
- LAM, K. S. (2007). New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in microbiology*, v. 15, n. 6, p. 279–89, jun.
- LEE, D.; LEE, J.; CAI, X.; SHIN, J. (2005). Fungal metabolites, sorbicillinoid polyketides and their effects on the activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *The Journal of Antibiotics*, 58(10), 615–620. Retrieved from <http://www.nature.com/ja/journal/v58/n10/abs/ja200584a.html>.
- LEE, K.; CHO, S. H.; LEE, J. H.; GOO, J.; LEE, S. Y.; BOOVANAHALLI, S. K.; YEO, S. K.; LEE, S.-J.; KIM, Y. K.; KIM, D. H.; CHOI, Y.; SONG, G.-Y. (2013). Synthesis of a novel series of 2-alkylthio substituted naphthoquinones as potent acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 62, p. 515–25.
- LI, D.; CAI, S.; ZHU, T.; WANG, F.; XIAO, X.; GU, Q. (2010). Three new sorbicillin trimers, trisorbicillinones B, C, and D, from a deep ocean sediment derived fungus, *Phialocephala* sp. FL30r. *Tetrahedron*, v. 66, n. 27-28, p. 5101–5106.
- LI, J.; SUN, W.; GUO, Z.; LU, C.; SHEN, Y. (2014). Fusaric acid modulates Type Three Secretion System of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1–5. doi:10.1016/j.bbrc.2014.05.044.
- LI, L.; LIU, R.; YEA, M.; HUA, X.; WANG, Q.; BIB, K.; GUO, D. Microbial metabolism of evodiamine by *Penicillium janthinellum* and its application for metabolite identification in rat

- urine. *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006) 561–567. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.029.
- LI, X.; LI, X.-M.; XU, G.-M.; LI, C.-S.; WANG, B.-G. (2014). Antioxidant metabolites from marine alga-derived fungus *Aspergillus wentii* EN-48. *Phytochemistry Letters*, 7, 120-123. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2013.11.008>.
- LIMA, C. P.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. (2011). Efeito dos extratos de duas plantas medicinais do gênero *Bidens* sobre o crescimento de plântulas de. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 32, n. 1, p. 83–87.
- LIN, Z.; ZHU, T.; FANG, Y.; GU, Q.; ZHU, W. (2008). Polyketides from *Penicillium* sp. JP-1, an endophytic fungus associated with the mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry*, v. 69, p. 1273–1278.
- LIU, W.; GU, Q.; ZHU, W.; CUI, C.; FAN, G. (2005a). Dihydrotrichodimerol and Tetrahydrotrichodimerol, Two New Bisorbicillinoids, from a Marine-derived *Penicillium terrestre*. *The Journal of Antibiotics*, v. 58, n. 10, p. 621–624.
- LIU, W.; GU, Q.; ZHU, W.; CUI, C.; FAN, G.; ZHU, T.; LIU, H.; FANG, Y. (2005b). Penicillones A and B, two novel polyketides with tricyclo [5.3.1.03,8] undecane skeleton, from a marine-derived fungus *Penicillium terrestre*. *Tetrahedron Letters*, v. 46, n. 30, p. 4993–4996.
- LIU, W.; GU, Q.; ZHU, W.; CUI, C.; FAN, G. (2005c). Two new benzoquinone derivatives and two new bisorbicillinoids were isolated from a marine-derived fungus *Penicillium terrestre*. *The Journal of antibiotics*, v. 58, n. 7, p. 441–6.
- LIU, X.; XU, F.; ZHANG, Y.; LIU, L.; HUANG, H.; CAI, X.; LIN, Y.; CHAN, W. (2006). Xyloketal H from the mangrove endophytic fungus *Xylaria* sp. 2508. *Russian Chemical Bulletin*, v. 55, n. 6, p. 1091–1092.
- LUO, H.; LI, X.-M.; LI, C.-S.; WANG, B.-G. Diphenyl ether and benzophenone derivatives from the marine mangrove-derived fungus *Penicillium* sp. MA-37. *Phytochemistry Letters* 9, 22–25. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2014.03.012>.
- MA, L.; LIU, W.; HUANG, Y.; RONG, X. (2011). Two acid sorbicillin analogues from saline lands-derived fungus *Trichoderma* sp. *The Journal of antibiotics*, v. 64, n. 9, p. 645–7.
- MACÍAS-RUBALCAVA, M. L. HERNANDEZ-BAUTISTA, B. E.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; GONZALEZ, M.C.; GLENN, A. E.; HANLIN, R. T.; HERNANDEZ-ORTEGA, S.; SAUCEDO-GARCIA, A.; MURIA-GONZALEZ, J. M.; ANAYA, A. L. (2008). Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry*, 69, 1185–1196. doi:10.1016/j.phytochem.2007.12.006.
- MACÍAS-RUBALCAVA, M. L.; HERNANDEZ-BAUTISTA, B. E.; OROPEZA, F.; DUARTE, G.; GONZÁLEZ, M. C.; GLENN, A. E.; HANLIN, R. T.; ANAYA, A. L. (2010). Allelochemical effects of volatile compounds and organic extracts from *Muscodor yucatanensis*, a tropical endophytic fungus from *Bursera simaruba*. *Journal of Chemical Ecology*, 36(10), 1122–31. doi:10.1007/s10886-010-9848-5.
- MACÍAS-RUBALCAVA, M. L.; RUIZ-VELASCO SOBRINO, M. E.; MELÉNDEZ-GONZÁLEZ, C.; HERNÁNDEZ-ORTEGA, S. (2014). Naphthoquinone Spiroketal and Organic Extracts from the Endophytic Fungus *Edenia gomezpompae* as Potential Herbicides. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 62, n. 16, p. 3553–62. 3553–62. doi:10.1021/jf500965k.
- MANFIO, G. P. (2006). Avaliação do Estado do Conhecimento da Diversidade Biológica do Brasil - Ministério do Meio Ambiente. p. 1-88.

- MANFRINI, R. M.; FIGUEIREDO, R. C.; D'ANGELIS, A. F.; PRADO, M. A. F.; NUNAM, E. DE A.; MARTINS, G. A.; ALVES, R. J. (2008). Síntese de β -N-Acetilglicosaminídeos de Arila Modificados em C-6 como potenciais agentes Antimicrobianos. *Quim. Nova.*, v. 31, n. 2, p. 326–329.
- MANGALESWARAN, S.; ARGADE, N. (2000). An efficient synthesis of (\pm)-piliformic acid. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1*, (6593), 3290–3291. doi:10.1039/b004115g.
- MASKEY, R. P.; GRÜN-WOLLNY, I.; LAATSCH, H. (2005). Sorbicillin analogues and related dimeric compounds from *Penicillium notatum*. *Journal of Natural Products*, v. 68, n. 6, p. 865–70.
- MCNULTY, J.; DAS, P. (2009). Development of a one-pot method for the homologation of aldehydes to carboxylic acids. *Tetrahedron*, 65(37), 7794–7800. doi:10.1016/j.tet.2009.07.032.
- MIAO, F-P.; LI, X-D.; LIU, X-H.; CICHEWICZ, R. H.; JI, N-Y. (2012). Secondary Metabolites from an Algicolous *Aspergillus versicolor* Strain. *Marine Drugs*. 10, 131-139; doi:10.3390/md10010131.
- MEDEL, ROSARIO; CASTILLO, RANULFO; GUZMAN, GASTÓN. Las especies de Xylaria (Ascomycota, Xylariaceae) conocidas de Veracruz, México y discusión de nuevos registros. *Rev. Mex. Mic, Xalapa*, v. 28, dic. 2008. Disponible en <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802008000300013&lng=es&nrm=iso>. accedido en 06 jul. 2014.
- MELO, A. C. R. (2003). Estudo Fitoquímico e Avaliação in vitro da atividade Leishmanicida de *Gustavia elliptica* M. (Lecythidaceae). Dissertação (Mestrado em Química), Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas, 99p.
- MENG, L.; SUN, P.; TANG, H.; LI, L. (2011). Endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, a new source of hypocrellins. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(2), 163–165. doi:10.1016/j.bse.2011.02.003.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. DA S. (2001). Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. *Quím. Nova*, v. 24, n. 1, p. 105–111.
- MONTEIRO, L.; CÂNDIDO, L. (2006). Fenilcetonúria no Brasil: evolução e casos. *Rev. Nutr.* 19(3), 381–387. Retrieved from <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=431758&indexSearch=ID>.
- MORI, S. A.; PRANCE, G. T. (1981). Relações entre a classificação genética de Lecythidaceae do Novo Mundo e seus polinizadores e dispersadores. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 4, p. 31–37.
- MORI, S. A.; PRANCE, G. T.; H., Z. C. (1990). Lecythidaceae. *Ann. Missouri Botanical Garden.*, v. 74, 321 p.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175983903034>.
- NAGIA, M.; EL-METWALLY, M. (2012). Four butyrolactones and diverse bioactive secondary metabolites from terrestrial *Aspergillus flavipes* MM2: isolation and structure determination. *Organic and Medicinal Chemistry*, 2(1), 9. doi:10.1186/2191-2858-2-9.
- NAKANISHI, K.; DOI M.; USAMI, Y.; AMAGATA, T.; MINOURA, K.; TANAKA, R.; NUMATA, A.; YAMADA, T. (2013). Anthcolorins A e F, novel cytotoxic metabolites from a

- sea urchin-derived *Aspergillus versicolor*. *Tetrahedron*, 69, 4617-4623. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2013.04.011>.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, v. 70, n. 3, p. 461–77.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, v. 75, n. 3, p. 311–35.
- NICOLAOU, K. (1999). Biomimetic explorations Towards the Bisorbicillinoids: Total Synthesis of Bisorbicillinol, Bisorbibutenolide, and Trichodimerol. *Angewandte Chemistry - A European Journal*, (23), 3555–3559. Retrieved from [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19991203\)38:23%3C3555::AID-ANIE3555%3E3.0.CO;2-Z/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1521-3773(19991203)38:23%3C3555::AID-ANIE3555%3E3.0.CO;2-Z/abstract).
- NIRENBERG, H. I.; SAMUELS, G. J. (2000). *Nectria* and *Fusarium*. II. *Cosmospora zealandica* comb.nov. and its anamorph, *Fusarium zealandicum* sp.nov. *Canadian Journal of Botany*, 2000, v. 78, n. 11, pp. 1482-1487
- NONG, X.; ZHENG, Z.; ZHANG, X.; LU, X.; QI, S. (2013). Polyketides from a marine-derived fungus Xylariaceae sp. *Marine Drugs*, 11, 1718–1727. doi:10.3390/md11051718.
- NWE, N.; STEVENS, W. F.; TOKURA, S.; TAMURA, H. (2008). Characterization of chitosan and chitosan–glucan complex extracted from the cell wall of fungus *Gongronella butleri* USDB 0201 by enzymatic method. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 242–251. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.10.001.
- OHSHIRO, T.; RUDEL, L.; OMURA, S.; TOMODA, H. (2007). Selectivity of microbial acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitors toward isozymes. *Journal of Antibiotics*, 60(1), 43–51. Retrieved from http://www.researchgate.net/publication/6417747_Selectivity_of_microbial_acyl-CoA_cholesterol_acyltransferase_inhibitors_toward_isozymes/file/d912f509c0e46f3421.pdf derived fungus Xylariaceae sp. *Marine Drugs*, 11, 1718–1727. doi:10.3390/md11051718.
- OKUNO, T.; OIKAWA, S.; GOTO, T. (1986). Structures and phytotoxicity of metabolites from *Valsa ceratosperma*. *Agricultural and Biol. Chem.*, v. 50, n. 4, p. 997–1001.
- OLA, A. R. B.; THOMY, D.; LAI, D.; PROKSCH, P. (2013). Inducing Secondary Metabolite Production by the Endophytic Fungus *Fusarium tricinctum* through Coculture with *Bacillus subtilis*. *Journal of Natural Products*, 76, 2094–2099.
- OLIVEIRA, C. M. DE; SILVA, G. H.; REGASINI, L. O.; FLAUSINO-JR, O.; LÓPEZ, S. N.; ABISSI, B. M.; ARAUJO, A. R. (2011). Xylarenones C a E from an Endophytic Fungus Isolated from *Alibertia macrophylla*. *Journal of Natural Products*, 74, 1353–1357.
- OLIVEIRA, J. G. De S. Estudo da biodiversidade de fungos endofíticos, potencial citotóxico e antimicrobiano de *Duguetia flagellaris* Huber. 70p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, AM, 2013.
- OPPONG, E. K.; EDWARDS, R. L.; MAITLAND, D. J.; WHALLEY, A. J. S.; AMEYAW, Y. (2009). Secondary Metabolites from Static Cultures of the Fungus *Rosellinia Arcuata*. *International Journal of Applied Chemistry*, v. 5, n. 3, p. 145–156.
- PACHLER, K. G. R.; STEYN, P. S.; VLEGGAAR, R.; WESSELS, P. L.; SCOTT, DE B. (1976). Carbon-13 nuclear magnetic resonance assignments and biosynthesis of aflatoxin B 1 and sterigmatocystin. *Journal of the Chemical Society*, (1182). Retrieved from <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/1976/p1/p19760001182>.

- PARVATKAR, R. R.; SOUZA, C. D.; TRIPATHI, A.; NAIK, C. G. (2009). Phytochemistry Aspernolides A and B , butenolides from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus*. *Phytochemistry*, v. 70, n. 1, p. 128–132.
- PERSOH, D.; MELCHER, M.; KATRIN ,G.; FOURNIER J.; STADLER, M.; RAMBOLD, G.; Molecular and morphological evidence for the delimitation of *Xylaria hypoxylon*. *Mycologia*, 101(2), 2009, pp. 256–268. DOI: 10.3852/08-108.
- PETTIT, G.; ZHANG, Q.; PINILLA, V. (2004). Isolation and Structure of Gustastatin from the Brazilian Nut Tree *Gustavia hexapetala*, 1. *Journal of Natural Products*, 983–985. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np030509i>.
- PINTO, A.; SILVA, D.; BOLZANI, V. (2002). Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova.*, 25, 45–61. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/qn/v25s1/9413.pdf>.
- PITTAYAKHAJONWUT, P.; SUVANNAKAD, R.; THIENHIRUN, S.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P.; TANTICHAROEN, M. (2005). An anti-herpes simplex virus-type 1 agent from *Xylaria mellisii* (BCC1005). *Tetrahedron Letters* 46 1341–1344. doi:10.1016/j.tetlet.2004.12.110.
- PONGCHAROEN, W.; RUKACHAISIRIKUL, V. (2008). Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14. *Phytochemistry*, 69, 1900–1902. doi:10.1016/j.phytochem.2008.04.003.
- PONGCHAROEN, W.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S.; RUNGJINDAMAI N.;d SAKAYAROJ, J. (2006). Pimarane Diterpene and Cytochalasin Derivatives from the Endophytic Fungus *Eutypella scoparia* PSU-D44. *Journal of Natural Products*, 69, 856-858. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np0600649>.
- PURI, S.; VERMA, V.; AMNA, T. (2005). An Endophytic Fungus from *Nothapodytes foetida* that Produces Campthotecin. *Journal of Natural Products*, 68(12), 1717–1718. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np0502802>.
- PRANCE, G. T.; MORI, S. A. (1979). Lecythidaceae – Part I. The actinomorphic-flowered New Lecythidaceae (*Asteranthos*, *Gustavia*, *Grias*, *Allantoma* & *Cariniana*). *Flora Neotropical*, v. 21, p. 1–271.
- QUEIROZ, F. F. Avaliação da atividade antimicrobiana do fungo endofítico *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, frente a patógenos presentes em infecção endodôntica, 77p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade do Estado do Amazonas. Manaus, AM, 2014.
- RAMAUTAR, A.; MABANDLA, M. (2012). Inhibition of HIV-1 tat-induced transactivation and apoptosis by the divalent metal chelators, fusaric acid and picolinic acid—implications for HIV-1 dementia. *Neuroscience Research*, 74(1), 59–63. doi:10.1016/j.neures.2012.05.014.
- RAMESH, V.; THALAVAIPANDIAN, A. (2012). Identification and comparison of *Xylaria curta* and *Xylaria* sp. from Western Ghats-Courtallum Hills, India. *Mycosphere*, 607–615. doi:10.5943/mycosphere/3/5/8.
- RANCIC, A.; SOKOVIC, M.; KARIOTI, A.; VUKOJEVIC, J.; SKAL TSA, H. (2006). Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium chrochloron* with antimicrobial activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 22, 80–84. doi:10.1016/j.etap.2005.12.003.
- RIBEIRO, J.E.L. DA S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M. A. DA S.; BRITO, J.M. DE; SOUZA, M.A.D. DE; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PERREIRA, E. DA C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. (1999). Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus/AM, INPA, 816p.

- SUMMERBELL, R. C., *Immunology and Allergy Clinics of North America*, v. 18, n. 3, August 1998, pages 549-573.
- ROIG, M.; MECA, G., MARÍN, R.; FERRER, E.; MAÑES, J. (2014). Antibacterial activity of the emerging *Fusarium* mycotoxins enniatins A, A1, A2, B, B1, and B4 on probiotic microorganisms. *Toxicon* 8, 1–4. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.04.007>.
- RUKACHAISIRIKUL, V.; BUADAM, S. (2013). Indanone and mellein derivatives from the Garcinia-derived fungus *Xylaria* sp. PSU-G12. *Phytochemistry Letters*, 6(1), 135–138. doi:10.1016/j.phytol.2012.11.007.
- RUSSO, A., CARDILE, V., PIOVANO, M., CAGGIA, S., ESPINOZA, C. L., GARBARINO, J. A. (2010). Pro-apoptotic activity of ergosterol peroxide and (22E)-ergosta-7,22-dien-5 α -hydroxy-3,6-dione in human prostate cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, v. 184, n. 3, p. 352–8, 30.
- SAKAI, K.; OHTE, S.; OHSHIRO, T. (2008). Selective inhibition of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase 2 isozyme by flavasperone and sterigmatocystin from *Aspergillus* species. *The Journal of Antibiotics*, 61(9), 568–572. Retrieved from <http://www.nature.com/ja/journal/v61/n9/abs/ja200876a.html>.
- SAMUELS, G. J.; NIRENBERG, H.I. (1989.) *Nectria* and *Fusarium*. 1. *Nectria setofusariae* and its anamorph *Fusarium setosum*. In: *Canadian Journal of Botany*, 1989, 67(11): 3372-3377, doi: 10.1139/b89-409.
- SANCHEZ, J.; SOMOZA, A. (2012). Advances in *Aspergillus* secondary metabolite research in the post-genomic era. *Natural Product Reports*, 29(3), 351–71. doi:10.1039/c2np00084a.
- SANTOS, R. M. G. DOS. Metabolismo secundário dos fungos de *Penicillium* sp. e *Fusarium moliniforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae) (2003), 453 f. Tese (Doutorado em Ciências). Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de S. Carlos-SP.
- SANTOS, D. O.; LEAL, B.; FERREIRA, A.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. (2007). *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Journal Brasileiro de Patologia Medi Lab*, v. 43, p. 413–423.
- SANTOS, T. T. DOS; VARAVALLO, M. A. (2011). Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 32, n. 2, p. 199–212.
- SANTOS, L. F. A. (2006). Contribuição ao estudo do metabolismo micromolecular de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Sapindus saponaria* 2003, 453 f. Tese (Doutorado em Ciências). Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de S.Carlos-SP.
- SANTOS, L.; OLIVEIRA, M.; GUILHON, G. (2008). Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. 26 (3), 539–548. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/pd/v26n3/a09v26n3>.
- SANTOS, S.; MORAES, M. (2011). Potencial alelopático e identificação de compostos secundários em extratos de calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) utilizando eletroforese capilar. *Eclética*, v. 36, p. 51–68.
- SERWE, A.; ANKE, T.; ERKEL, G. (2009). The fungal secondary metabolite trichodimerol inhibits TGF- β dependent cellular effects and tube formation of MDA-MB-231 cells. *Investigational new drugs*, v. 27, n. 6, p. 491–502.
- SHIN, Y.; TAMAI, Y.; TERAZAWA, M. (2001). Chemical constituents of *Inonotus obliquus*, 4: Triterpene and steroids from cultured mycelia. *Eurasian Journal of Forest Research*, v. 2, p. 27–30.

- SHIONO, Y.; MATSUI, N.; IMAIZUMI, T. (2013). An unusual spirocyclic isopimarane diterpenoid and other isopimarane diterpenoids from fruiting bodies of *Xylaria polymorpha*. *Phytochemistry Letters*, 6(3), 439–443. doi:10.1016/j.phytol.2013.05.008.
- SILVA, G. H.; TELES, H. L.; ZANARDI, L. M.; MARX YOUNG, M. C.; EBERLIN, M. N.; HADAD, R.; ARAÚJO, Â. R. (2006). Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). *Phytochemistry*, 67(17), 1964–1969. doi:10.1016/j.phytochem.2006.06.004.
- SILVA, G.; OLIVEIRA, C. DE; TELES, H. (2010). Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*, 3, 164–167. doi:10.1016/j.phytol.2010.07.001.
- SILVA, G.; OLIVEIRA, C. DE; TELES, H. (2010a). Citocalasinas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico de *Piper aduncum* (piperaceae). *Quim. Nova*, 33(10), 2038–2041. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n10/06.pdf>.
- SILVA, L. A.; YANAGUITA, R. M.; ARAUJO, C. L. C. DE. (1992). *Microbiologia médica*. Única ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.a., p. 513.
- SINGH, B.; ZINK, D. L.; GUAN, Z.; COLLADO, J.; PELAEZ, F.; FELOCK, P. J.; HAZUDA, D. J. (2003). Isolation, Structure, and HIV-1 Integrase Inhibitory Activity of Xanthoviridicatin E and F, Two Novel Fungal Metabolites Produced by *Penicillium chrysogenum*. *Helvetica Chimica Acta*, 86, 3380–3385. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hlca.200390281/abstract>.
- SONG, X-Q; ZHANG, XIN; HAN, Q-J.; LI, X-B.; LI, G.; LI, R-J.; JIAO, Y.; ZHOU, J-C.; LOU, H-X. (2012). Xanthone derivatives from *Aspergillus sydowii*, an endophytic fungus from the liverwort *Scapania ciliata* S. Lac and their immunosuppressive activities. *Phytochemistry Letters*, 6, 318–321. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2013.03.012>.
- SOUZA, A. DE; ROCHA, A. I. DA.; PINHEIRO, M. L. B., ANDRADE, C. H. DE S.; GALOTTA, A. L. DE A. Q.; SANTOS, M. DO P. S. S. DOS. (2001). Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L.(Lecythidaceae). *Quim. Nova*, 24(4), 439–442. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/qn/v24n4/a02v24n4.pdf>.
- SOUZA, A. Q. L. DE; SOUZA, A. D. L. DE; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; MARIA SARQUIS, I. DE M.; PEREIRA, J. O. (2004). Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonia*, v. 34 (2), 185 - 195.
- SOUZA, A. Q. L. DE. (2006). Potencial Genético e Químico dos endofíticos de *Murraya peniculata* L (Jack). Tese de Doutorado, Centro de Ciências Biológica, Universidade Federal de São Carlos.
- STIPANOVIC, R. (2011). Nuclear magnetic resonance (NMR) studies on the biosynthesis of fusaric acid from *Fusarium oxysporum* F. sp. vasinfectum. *Journal of Agricultural*, 59(10), 5351–6. doi:10.1021/jf200628r.
- STROBEL, G.; DAISY, B. (2004). Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67(2), 257–68. doi:10.1021/np030397v.
- STROBEL, G. A. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, v. 5, n. 6, p. 535–44.
- SUMMERBELL, R. (1998). Taxonomy and ecology of aspergillus species associated with colonizing infections of the respiratory tract. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 18(3), 549–573. doi:10.1016/S0889-8561(05)70022-9.

- SUN, H-F.; LI, X-M.; MENG, L.; CUI, C-M.; GAO, S-S.; LI, C-S.; HUANG, C-G.; WANG, B-G. (2012). Asperolides A–C, Tetranorlabdane Diterpenoids from the Marine Alga-Derived Endophytic Fungus *Aspergillus wentii* EN-48. *Journal of Natural Products*, 75, 148–152. dx.doi.org/10.1021/np2006742.
- SUN, R-R.; MIAO, F.; ZHANG, J. (2012). Three new xanthone derivatives from an algicolous isolate of *Aspergillus wentii*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v 51, 65–68. [doi:10.1002/mrc.3903](http://dx.doi.org/10.1002/mrc.3903).
- TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. (2008). Ocorrência e Diversidade Estrutural de Metabólitos Fúngicos com Atividade Antibiótica. *Quím. Nova*, v. 31, n. 7, p. 1807–1813.
- TAN, R. X.; ZOU, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, v. 18, n. 4, p. 448–59.
- TANSUWAN, S. (2007). Antimalarial benzoquinones from an endophytic fungus, *Xylaria* sp. *Journal of Natural Products*, v.70, 1620–1623. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np0701069>.
- TATONG, M. D. K.; TALONTSI, F. M.; RAHIM, H. M. D. A.; ISLAM, Md. T.; OSWALD R.B.; LAATSCH, H. (2014). Banchromene and other secondary metabolites from the endophytic fungus *Fusarium* sp. obtained from *Piper guineense* inhibit the motility of phytopathogenic *Plasmopara viticola* zoospores. *Tetrahedron Letters* 55, 4057–4061. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.06.001>.
- THIRUMALESH, B. V.; THIPPESWAMY, B.; KRISHNAPPA M. (2014). Antibacterial activity of xylaria species in vitro against xanthomonas campestris pv. Mangiferaeindicacae isolated from bacterial black spot of mango fruit. *International Journal of life sciences biotechnology and Pharma Research*, v. 3 n. 2, 124 - 130.
- TRIFONOV, L. S.; HILPERT, H.; FLOERSHEIM, P.; DREIDING, A. S.; RAST, D. M.; SKRIVANOVA, R., HOESCH, L. (1986). Bisvertinolos: A new Group of Dimeric Vertinoids from *Verticillium intertextum*. *Tetrahedron*, v. 42, n. ii, p. 3157–3159.
- TRISUWAN, K. (2010). Anthraquinone, cyclopentanone, and naphthoquinone derivatives from the sea fan-derived fungi *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135. *Journal of Natural Products*, 73, 1507–1511. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np100282k>.
- TRISUWAN, K.; RUKACHAISIRIKUL, V. (2013). Pyrone derivatives from the soil fungus *Fusarium solani* PSU-RSPG37. *Phytochemistry Letters*, 6(3), 495–497. [doi:10.1016/j.phytol.2013.06.008](http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2013.06.008).
- TSUJIKAWA, K.; KUWAYAMA, K. (2013). Chemical profiling of seized methamphetamine putatively synthesized from phenylacetic acid derivatives. *Forensic Science*, 227(1-3), 42–4. [doi:10.1016/j.forsciint.2012.08.036](http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.08.036).
- VAN DEN BERG, M. A.; ALBANG, R.; ALBERMANN, K.; BADGER, J. H.; DARAN, J-M.; DRIESSEN, A. J. M.; GARCIA-ESTRADA, C.; FEDOROVA, N. D.; HARRIS, D. M.; HEIJNE, W. H. M.; JOARDAR, V.; KIEL, J. A. K. W.; KOVALCHUK, A.; MARTIN, J. F.; NIERMAN, W. C.; NIJLAND, J.; PRONK, J. T.; ROUBOS, J. A.; VAN DER KLEI, I. J.; VAN PEIJ, N. N. M. E.; VEENHUIS, M.; DÖHREN, H. V. (2008). Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*, *Nature Biotechnology*, v. 26, n. 10, pages 1161 – 1168.
- VEERAPAGU, M.; JEYA, K.; PONMURUGAN, K. (2008). Mutational effect of *Penicillium chrysogenum* on Antibiotic Production. *Advanced Biotech*, (July), 16–19. Retrieved from http://www.researchgate.net/publication/224952358_Mutational_effect_of_Penicillium_chrysogenum_on_Antibiotic_Production/file/d912f50d36d95472d8.pdf.

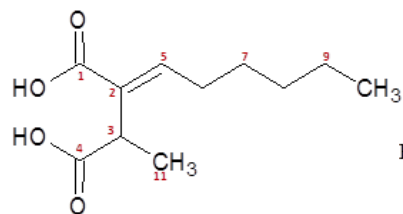
- VERŠILOVSKIS, A.; BARTKEVIČS, V.; MIKELSONE, V. (2008). Sterigmatocystin presence in typical Latvian grains. *Food Chemistry*, v. 109, n. 1, p. 243–248.
- WANG, Q.; LI, S.; ZHAO, F.; DAI, H.; BAO, L.; DING, R. (2011). Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum*. *Fitoterapia*, 82(5), 777–781. doi:10.1016/j.fitote.2011.04.002.
- WENZEL, J. (2012). Isolamento e atividade antagonística de fungos endofíticos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *SaBios-Revista de Saúde E Biologia*, 7(3), 86–96. Retrieved from <http://www.revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/viewArticle/1343>.
- WIESE, J.; OHLENDORF, B.; BLÜMEL, M. (2011). Phylogenetic identification of fungi isolated from the marine sponge *Tethya aurantium* and identification of their secondary metabolites. *Marine Drugs*, 9, 561–585. doi:10.3390/md9040561.
- WIGHTMAN, F.; LIGHTY, D. (1982). Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoots of higher plants. *Physiologia Plantarum*, v. 55, n. 1, p. 17–24.
- WU, Z-J.; OUYANG, M.; TAN, Q. (2009). New asperxanthone and asperbiphenyl from the marine fungus *Aspergillus* sp. *Pest Management Science*, 65, 60–65. doi:10.1002/ps.1645.
- WU, S-H.; HE, J.; LI, X-N.; HUANG, R.; SONG, F.; CHEN, Y-W.; MIAO, C-P. (2014). Guaiane sesquiterpenes and isopimarane diterpenes from an endophytic fungus *Xylaria* sp. *Phytochemistry* 105, 197–204, <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.04.016>.
- XU, F.; ZHANG, Y.; WANG, J.; PANG, J. (2008). Benzofuran derivatives from the mangrove endophytic fungus *Xylaria* sp.(# 2508). *Journal of Natural Products*, 71(7), 1251–3. doi:10.1021/np070602x.
- YANG, S.; GAO, J.; ZHANG, Q.; LAATSCH, H. (2011). Toxic polyketides produced by *Fusarium* sp., an endophytic fungus isolated from *Melia azedarach*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(6), 1887–1889. doi:10.1016/j.bmcl.2010.12.043.
- YUE, J.; CHEN, S.; LIN, Z.; SUN, H. (2001). Sterols from the fungus *Lactarium volemus*. *Phytochemistry*, 56(8), 801–6. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200004908>
- ZHAN, J.; GUNATHERATH, G.; WIJERATNE, E.; GUNATILAKA, A. (2007). Asperpyrone D and other metabolites of the plant-associated fungal strain *Aspergillus tubingensis*. *Phytochemistry*, 68, 368–372. doi:10.1016/j.phytochem.2006.09.038.
- ZHANG, D.; CUI, Y.; SHEN, H.; XING, L.; CUI, J.; WANG, J.; ZHANG, X. (2013). Sterigmatocystin-induced DNA damage triggers G2 arrest via an ATM/p53-related pathway in human gastric epithelium GES-1 cells in vitro. *PLoS One*, v. 8, n. 5, p. e65044.
- ZHANG, H.; SONG, Y.; TAN, R. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*. doi:10.1039/b609472b.
- ZHANG, H-C.; MA, Y-M.; LIU, R.; ZHOU F. (2012). Endophytic fungus *Aspergillus tamarii* from *Ficus carica* L., a new source of indolyl diketopiperazines. *Biochemical Systematics and Ecology*, 45, 31-33. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2012.07.020>.
- ZHANG, Y.; LI, X.; WANG, B. (2007). Nigerasperones A~ C, New Monomeric and Dimeric Naphtho- γ -pyrones from a Marine Alga-derived Endophytic Fungus *Aspergillus niger* EN-13. *The Journal of Antibiotics*, 60(3), 204–210. Retrieved from <http://www.nature.com/ja/journal/v60/n3/abs/ja200724a.html>.
- ZHAO, J.; MOU, Y.; SHAN, T.; LI, Y.; ZHOU, L.; WANG, M.; WANG, J. (2010). Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Molecules*, 15, 7961–7970. doi:10.3390/molecules15117961.

ZHAO, H.; WANG, G-Q; TONG, X-P.; CHEN, G-D; HUANG, Y-F.; CUI, J-Y.; KONG, M-Z.; GUO, L-D.; ZHENG, Y-Z.; YAO, X-S.; GAO, H. (2014). Diphenyl ethers from *Aspergillus* sp. and their anti-A β 42 aggregation activities. *Fitoterapia* 98 77–83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2014.07.007>.

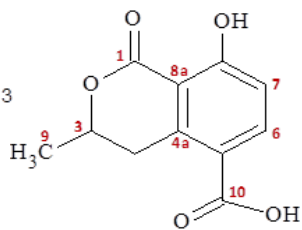
ZHU, R.; ZHENG, R.; DENG, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, S. (2014). Ergosterol peroxide from *Cordyceps cicadae* ameliorates TGF- β 1-induced activation of kidney fibroblasts. *Phytomedicine*, 21(3), 372–378. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2013.08.022>.

ZULLO, M. A. T.; ADAM, G. (2002). Brassinosteroid phytohormones - structure, bioactivity and applications. *Braz. J. Plant Physiol.*, 14(3):143-181.

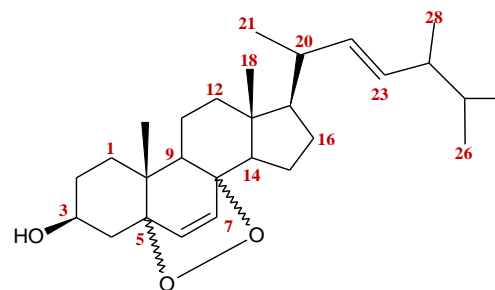
9. ANEXO



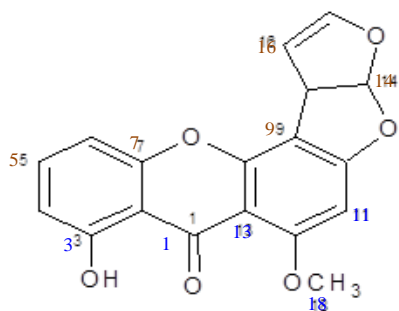
ácido pilifórmico ($C_{11}H_{17}O_4$)



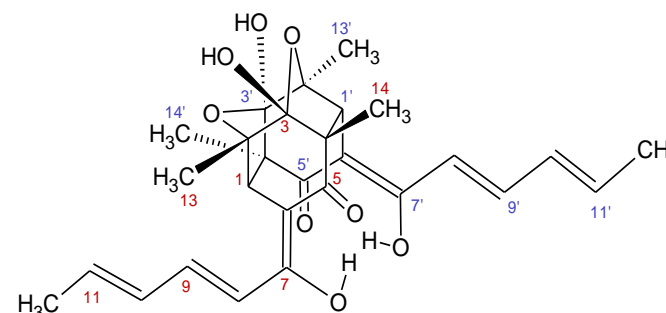
5-carboximeleina ($C_{11}H_{10}O_5$)



peróxido de ergosterol ($C_{28}H_{39}O_3$) ($5\alpha, 8\alpha$ e $5\beta, 8\beta$)



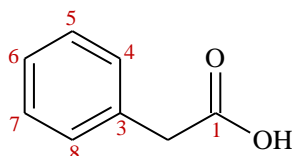
esterigmatocistina ($C_{18}H_{12}O_6$)



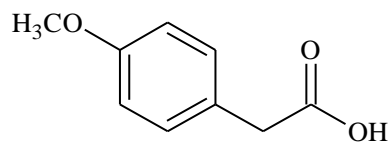
trichodimerol - ($C_{28}H_{38}O_8$), (MM = 500)

8,9-dihidrotrichodimerol - ($C_{28}H_{34}O_8$), (MM = 498)

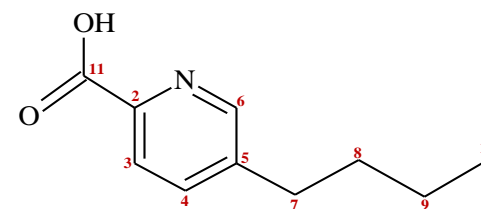
8,9 e 8', 9'- tetrahidrotrichodimerol - ($C_{28}H_{36}O_8$), (MM = 496)



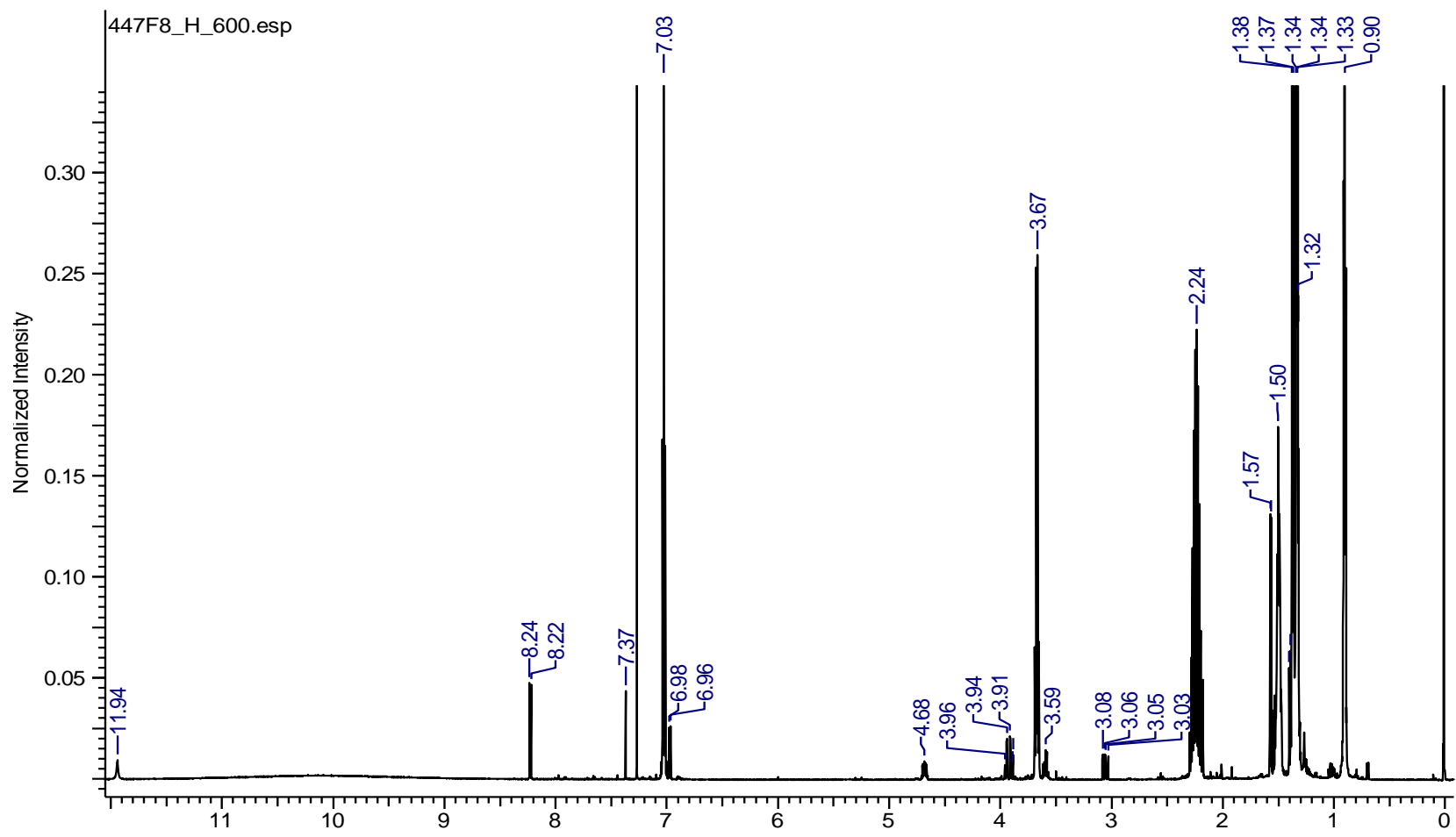
ácido fenil acético



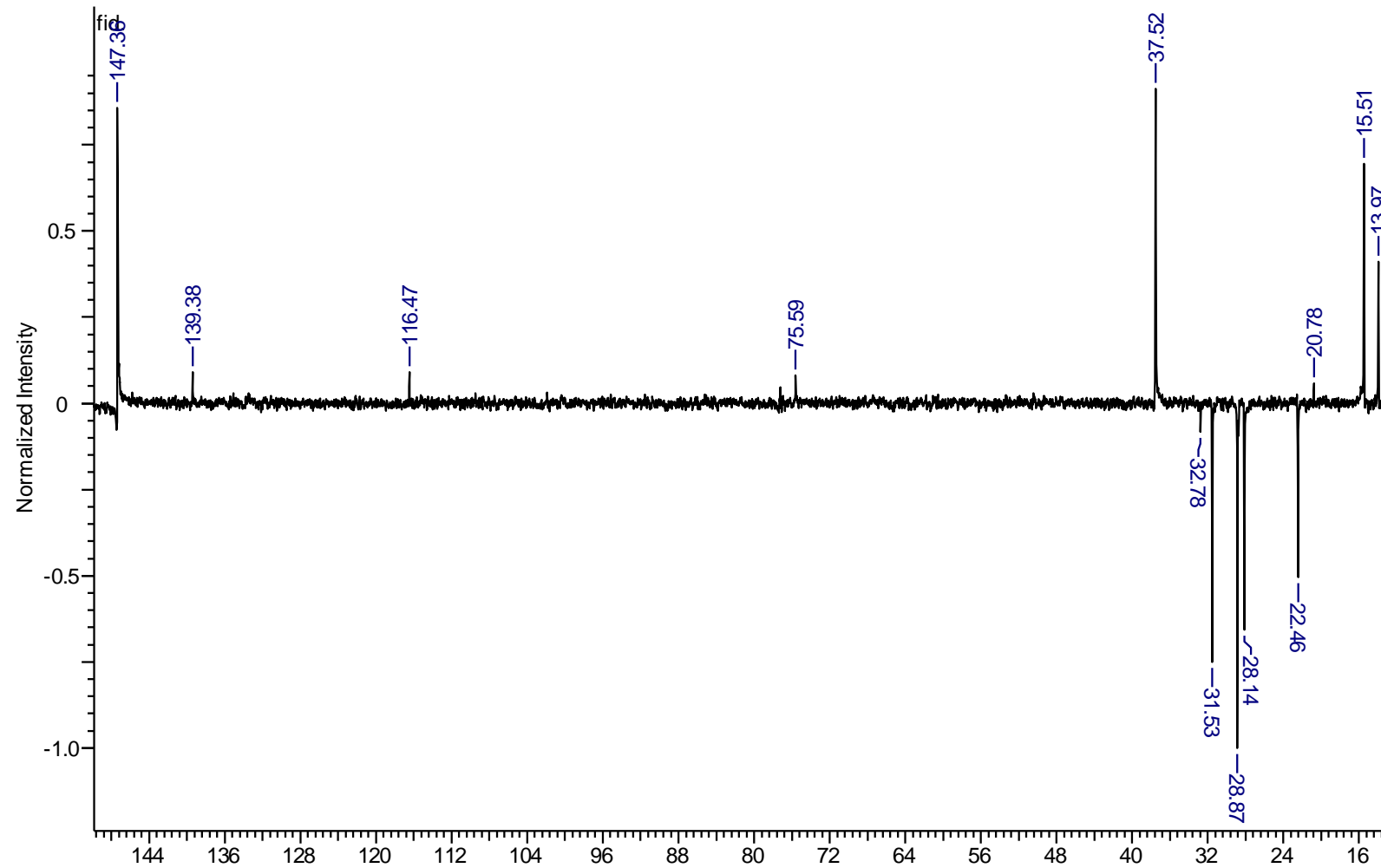
ácido 4-metoxi fenil acético



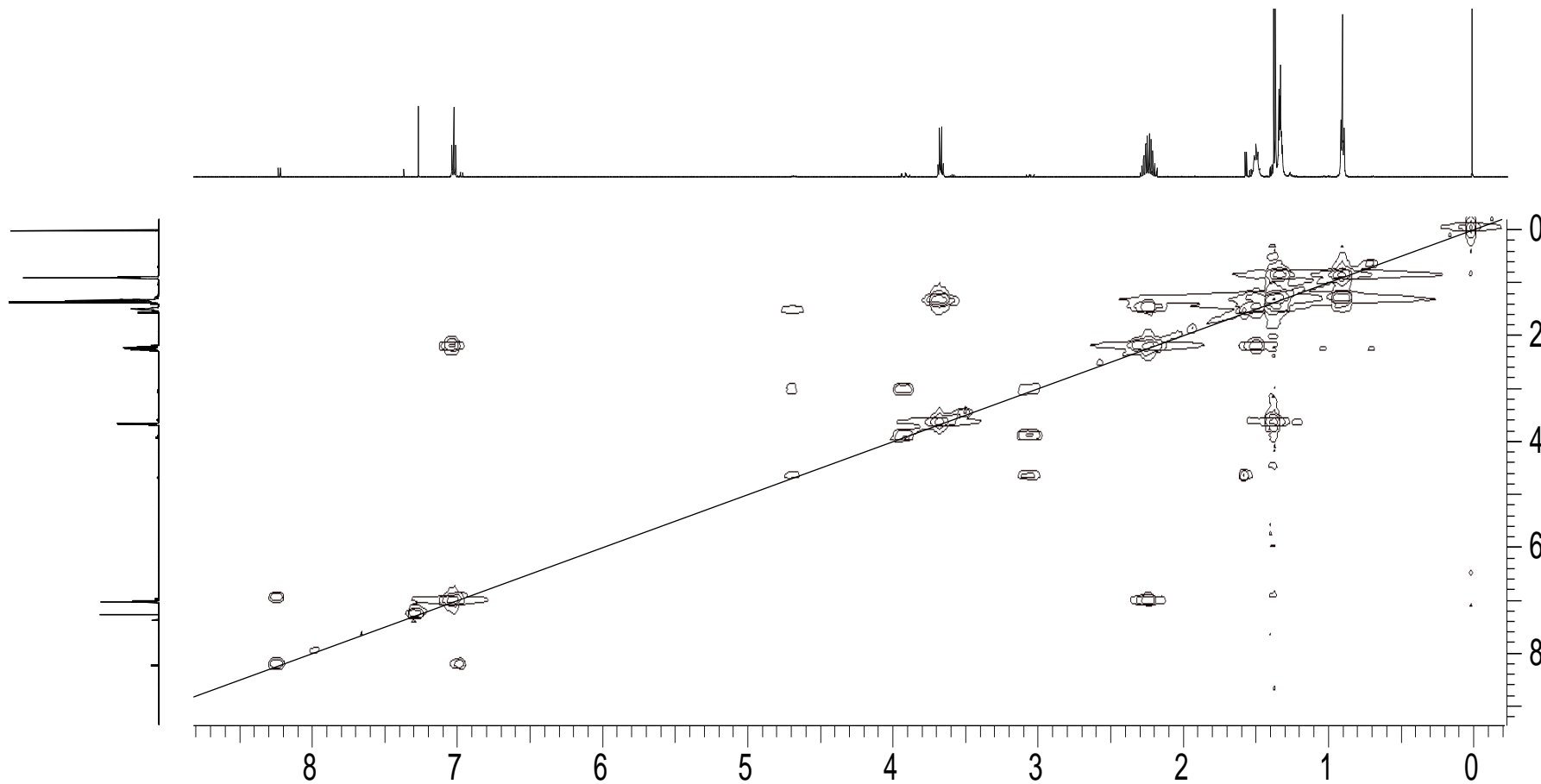
ácido fusárico ($C_{11}H_{13}O_2$)



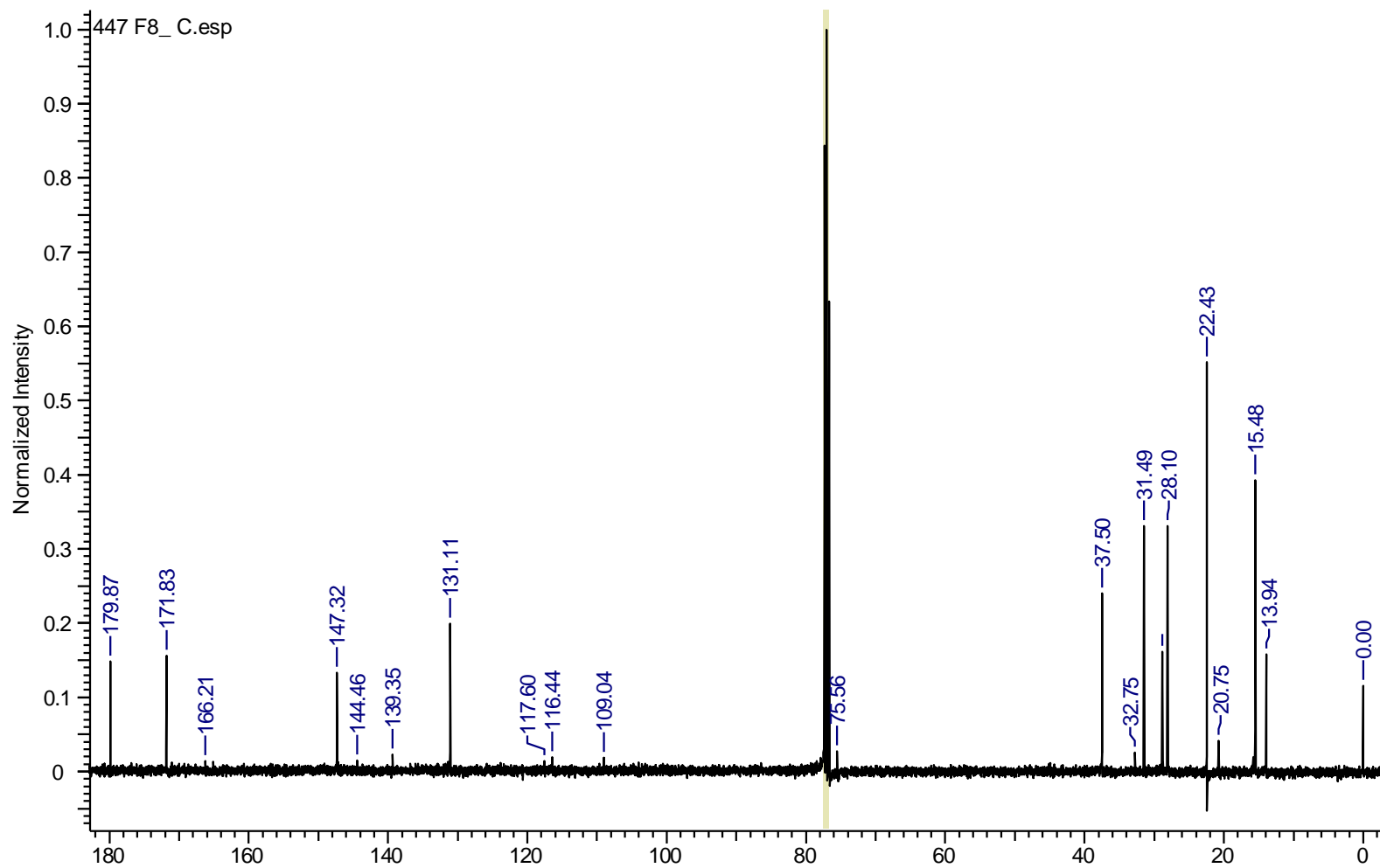
Espectro de RMN de ^1H da amostra 447 X12c F8 (600 MHz, CDCl_3)



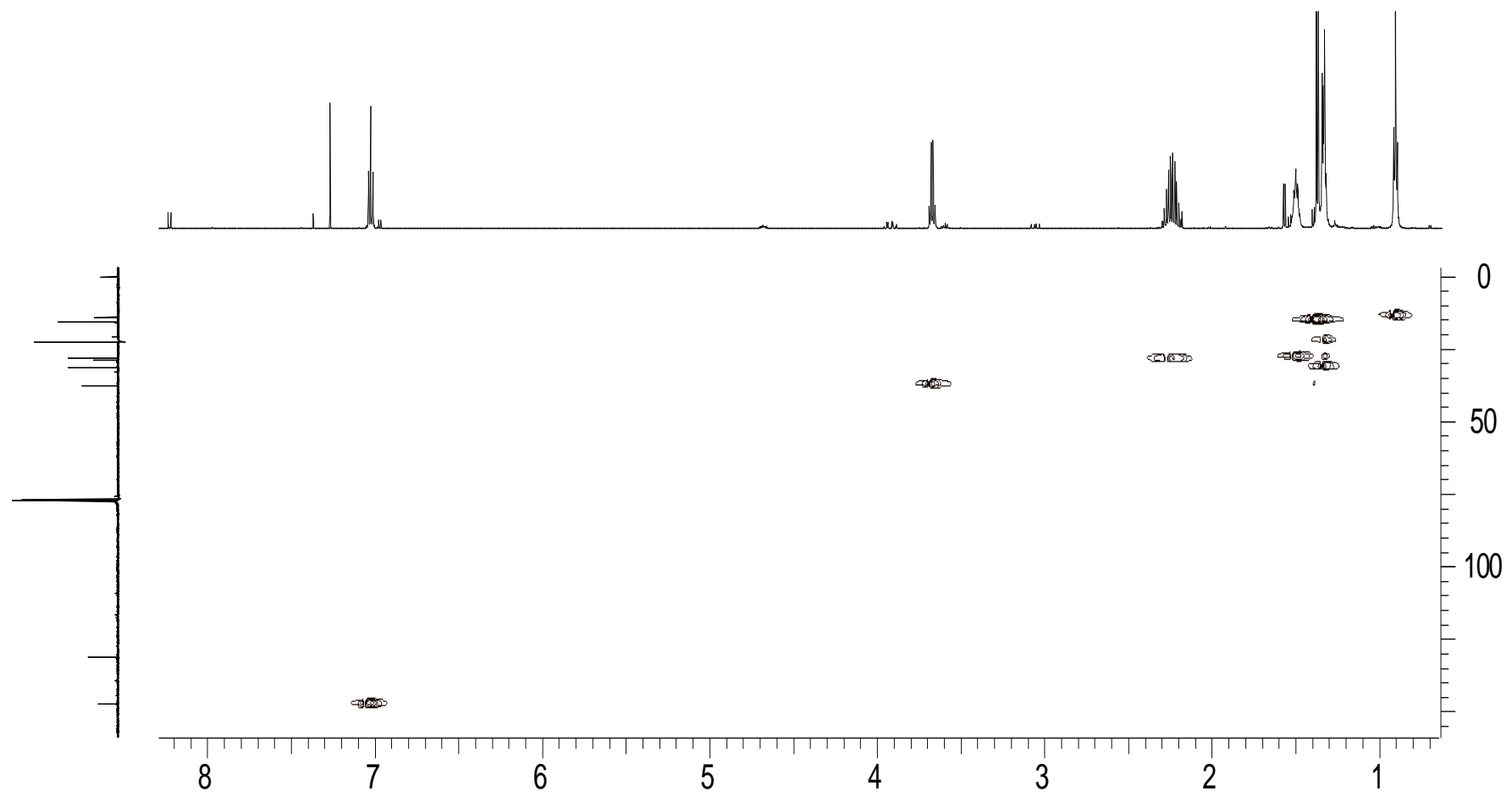
Espectro de DEPT da amostra 447 X12c F8 (500 MHz, CDCl_3)



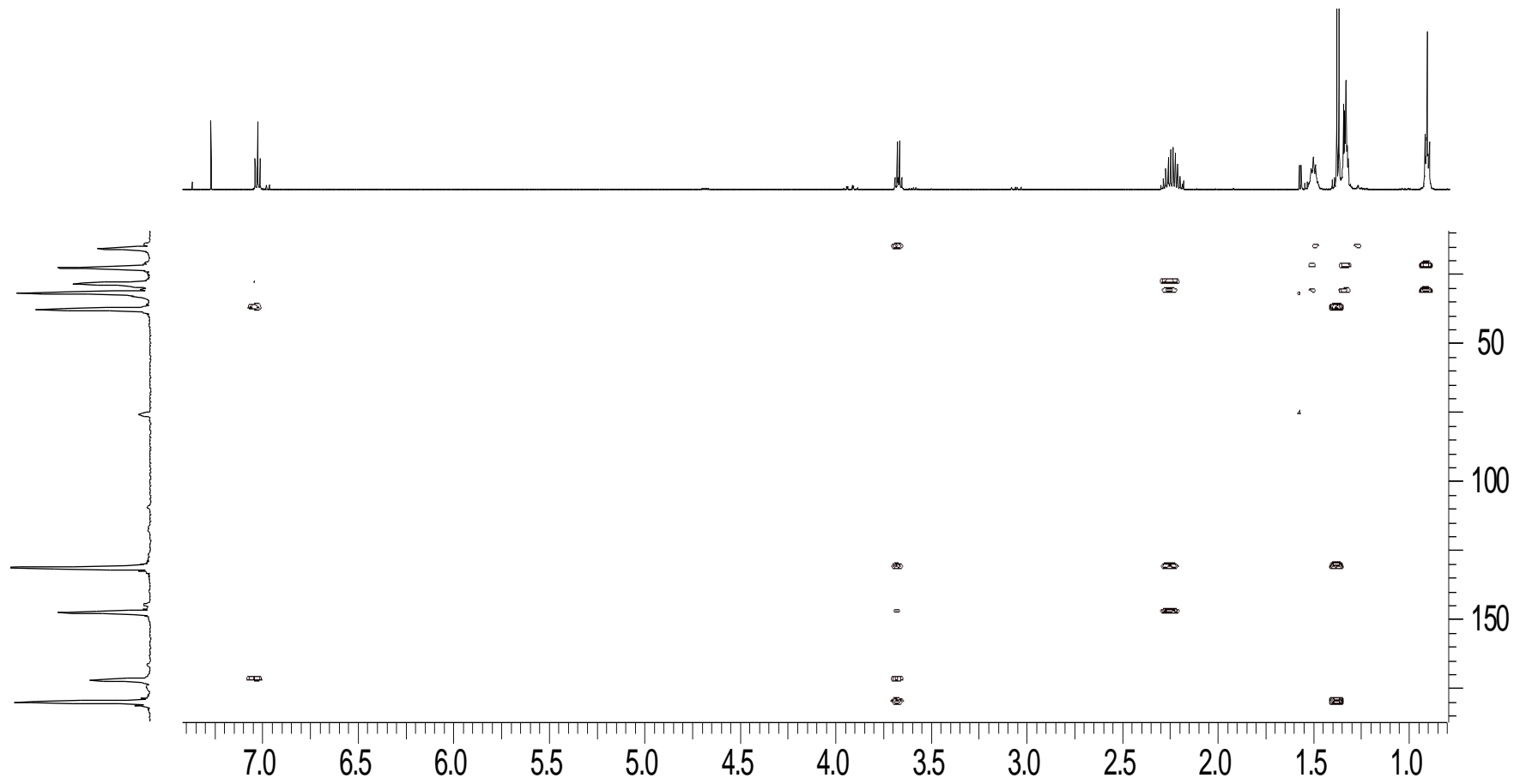
Espectro de COSY da amostra 447 X12c F8 (600 MHz, CDCl₃)



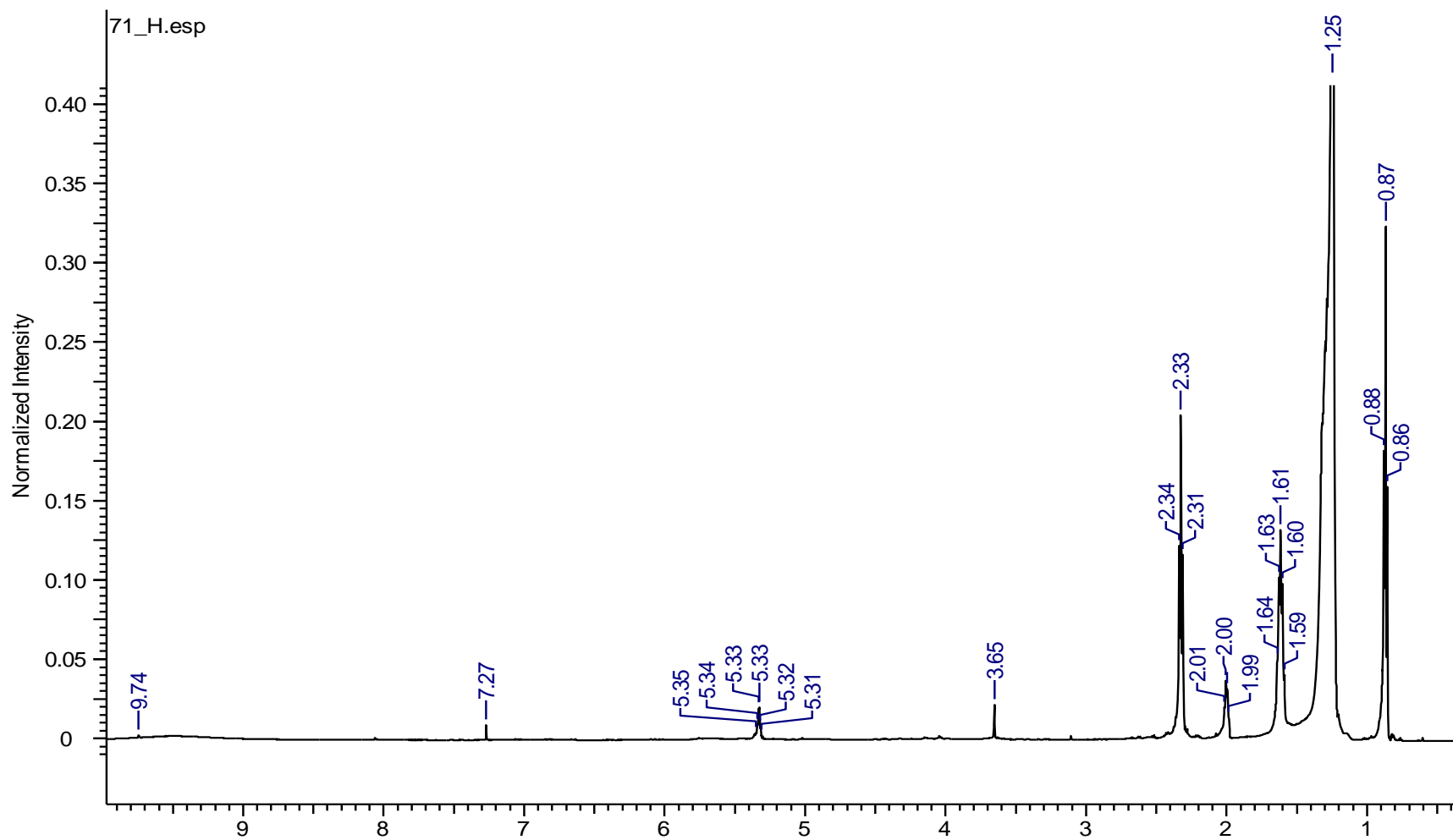
Espectro de RMN de ^{13}C da amostra 447 X12c F8 (100 MHz, CDCl_3)



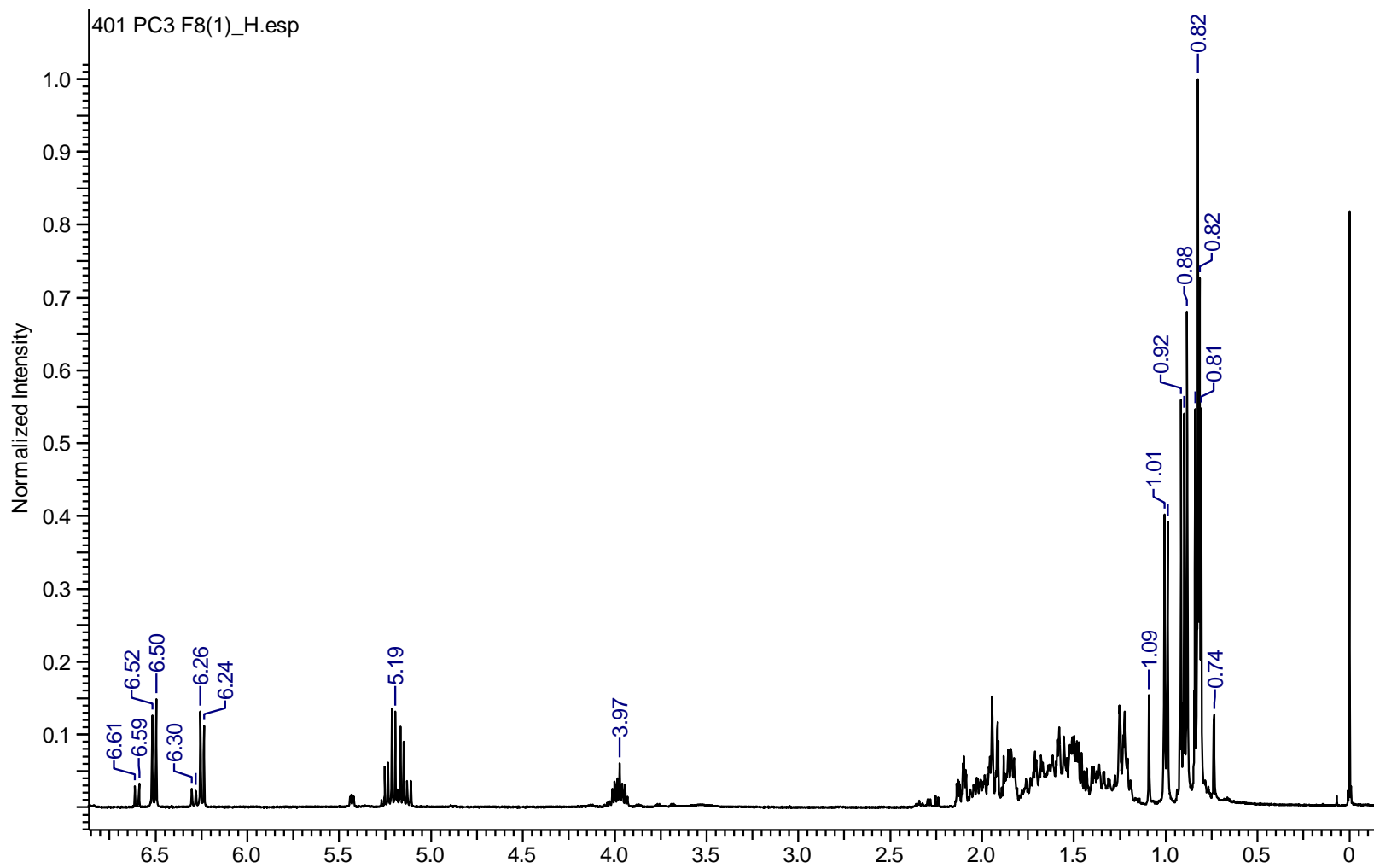
Mapa de correlações de HSQC da amostra 447 X12c F8 (600 MHz, CDCl_3)



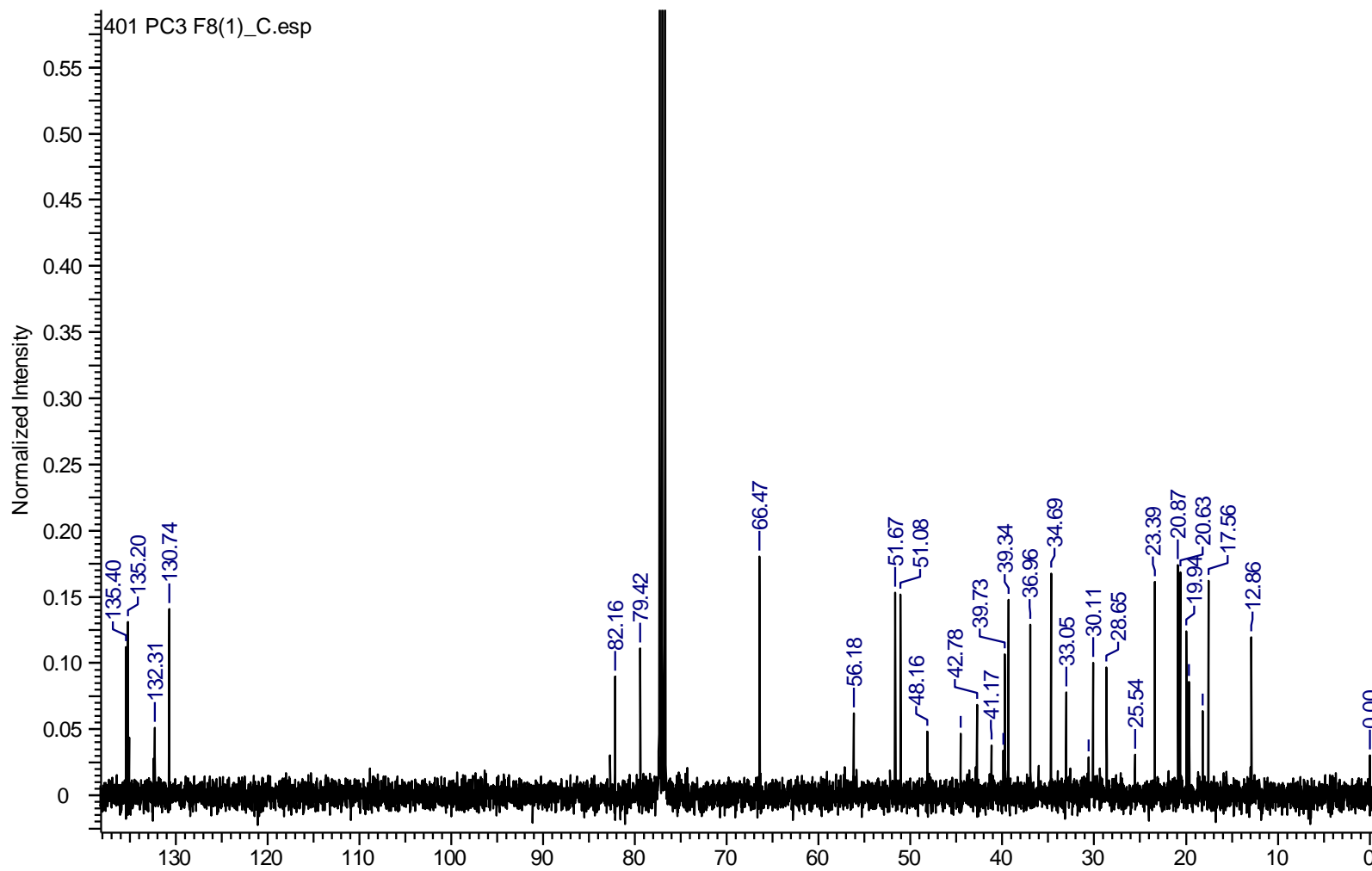
Mapa de correlações de HMBC da amostra 447 X12c F8 (600 MHz, CDCl₃)



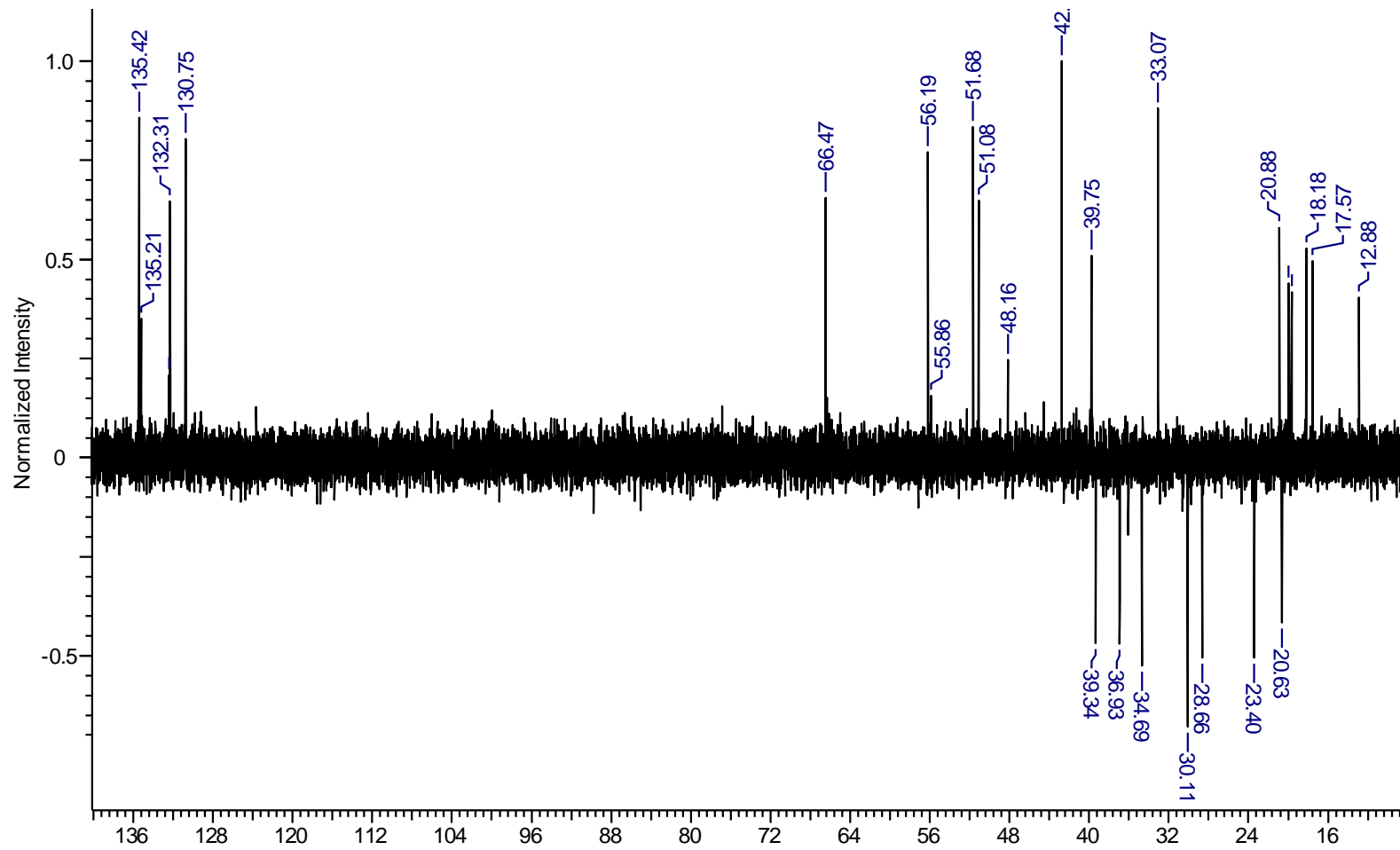
Espectro de RMN de ^1H da amostra PC3 F2(71) (600 MHz, CDCl_3)



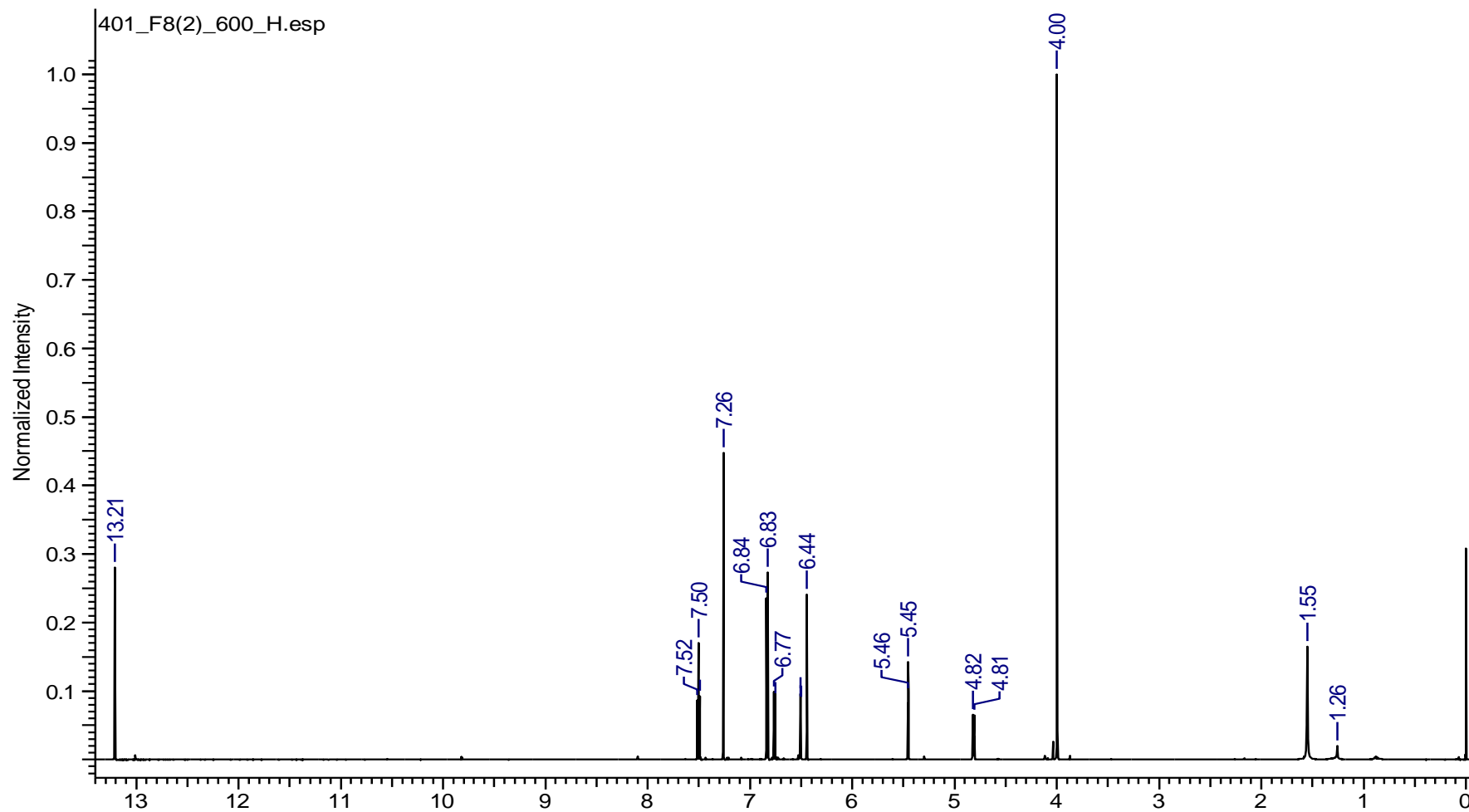
Espectro de RMN de ^1H da amostra PC3 F8(1) (400 MHz, CDCl_3)



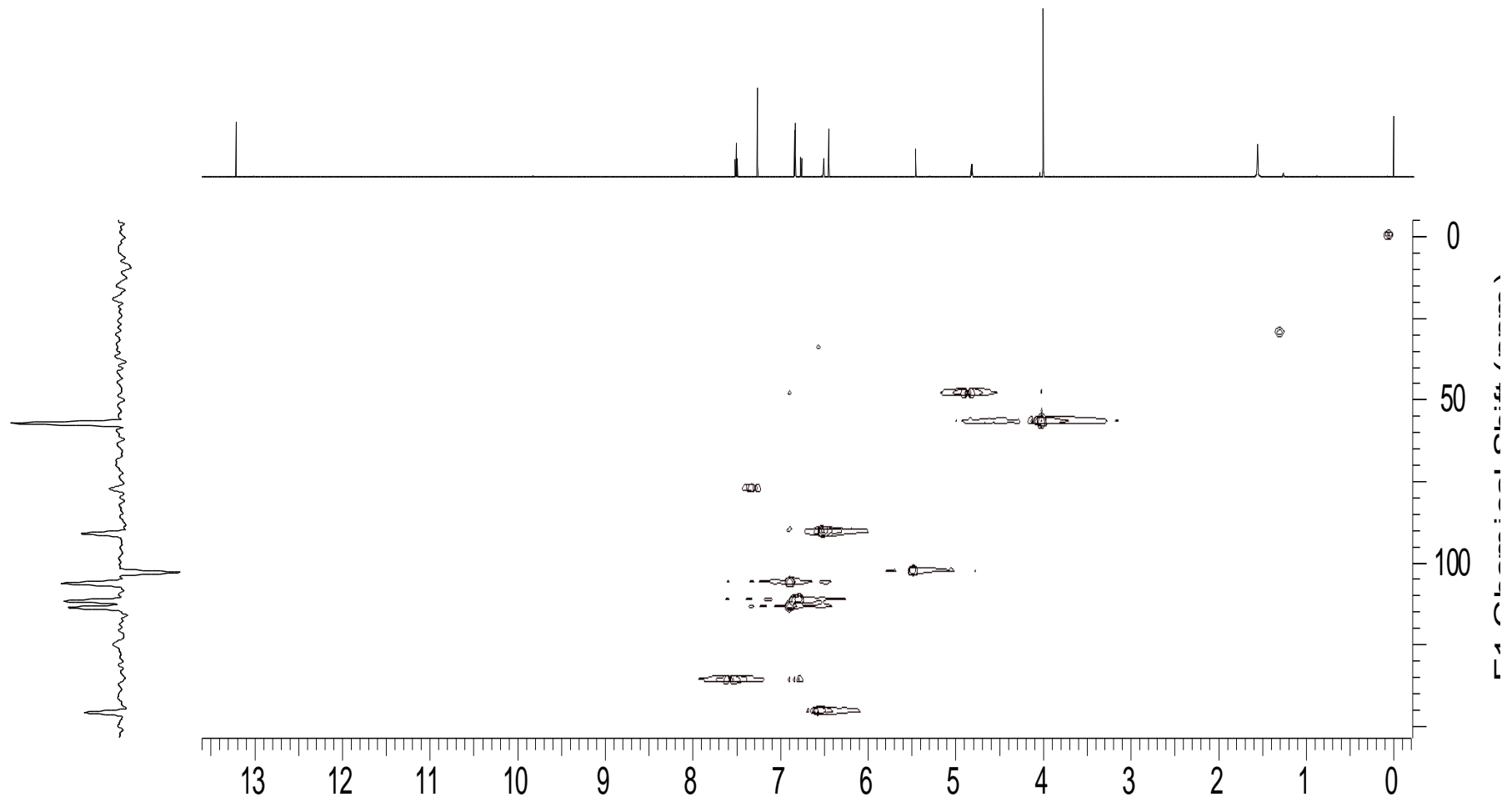
Espectro de RMN de ^{13}C da amostra PC3 F8(1) (100 MHz, CDCl_3)



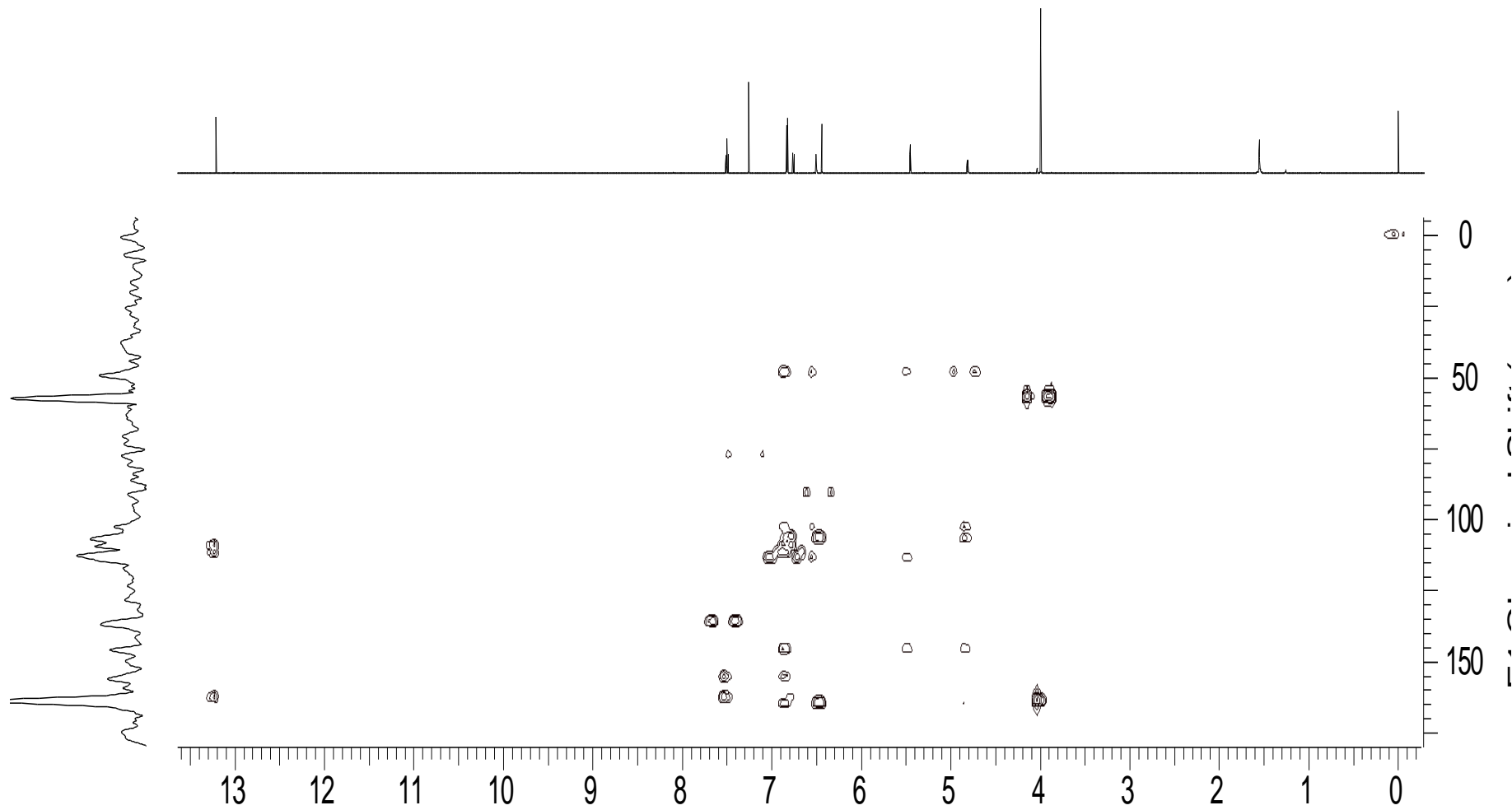
Espectro de DEPT da amostra PC3 F8(1) (100 MHz, CDCl₃)



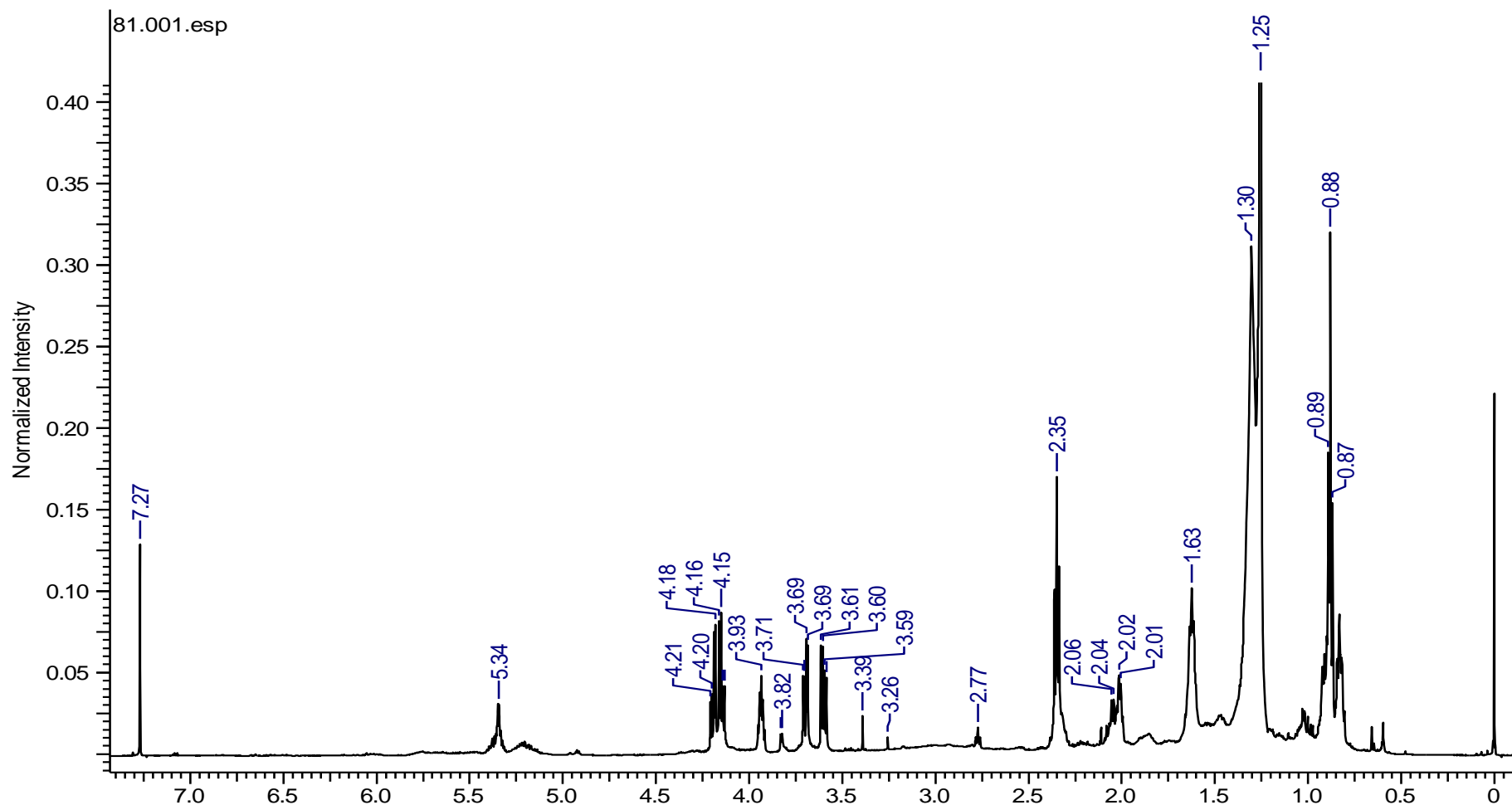
Espectro de RMN de ^1H da amostra 401 PC3 F8(2) (600 MHz, CDCl_3)



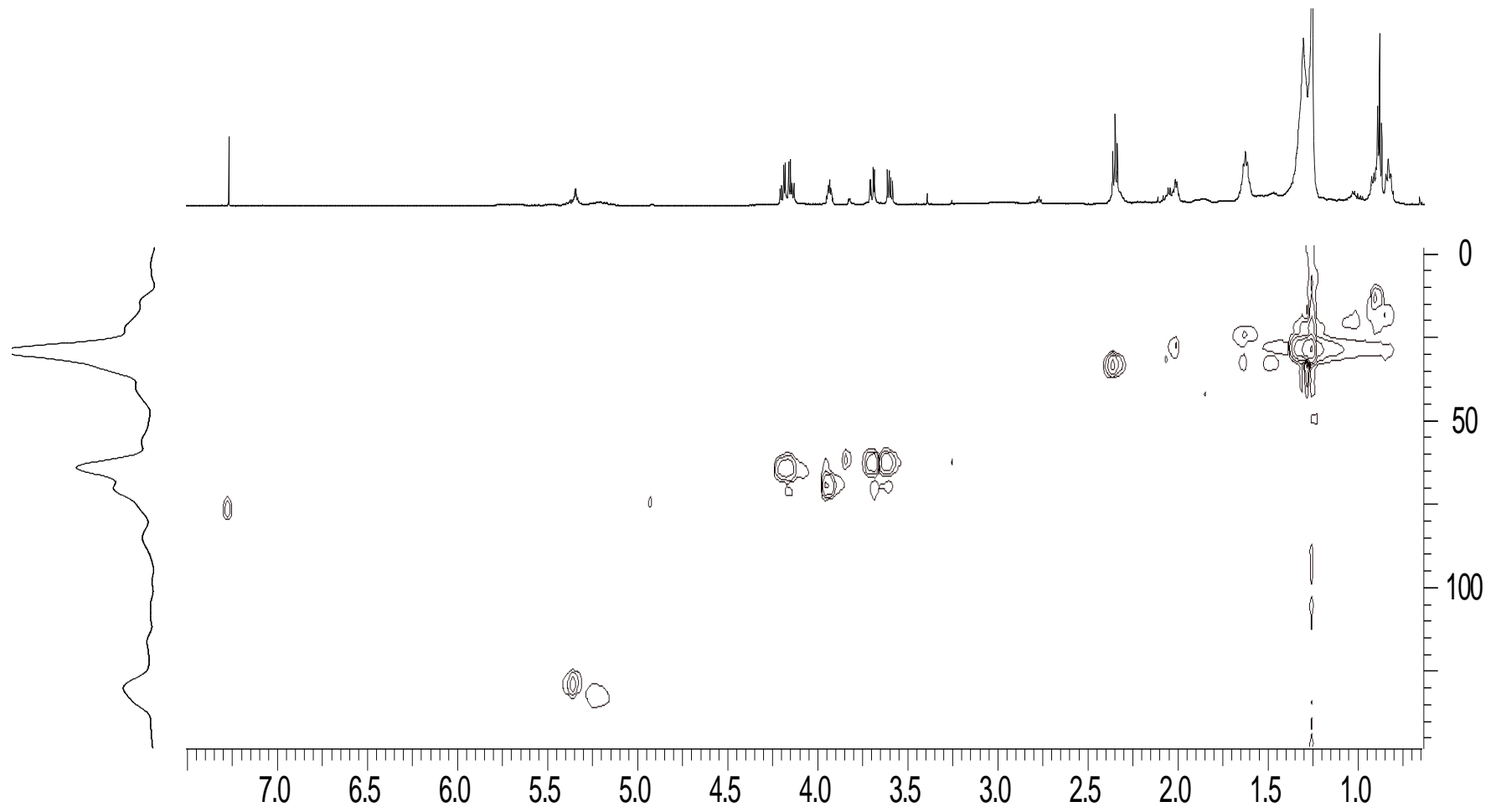
Mapa de correlações de HSQC da amostra 401 PC3 F8(2) (600 MHz, CDCl_3)



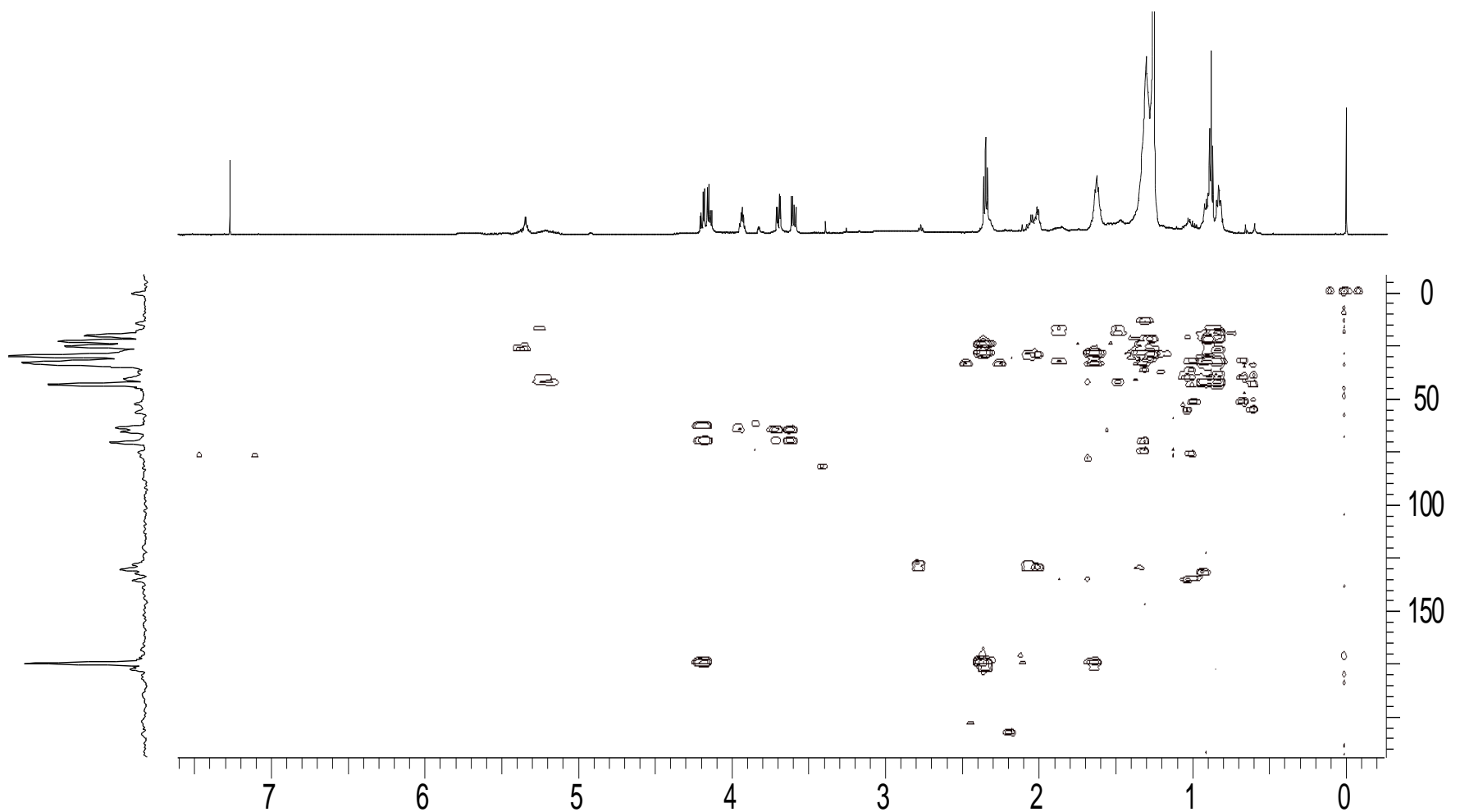
Mapa de correlações de HMBC da amostra 401 PC3 F8(2) (600 MHz, CDCl_3)



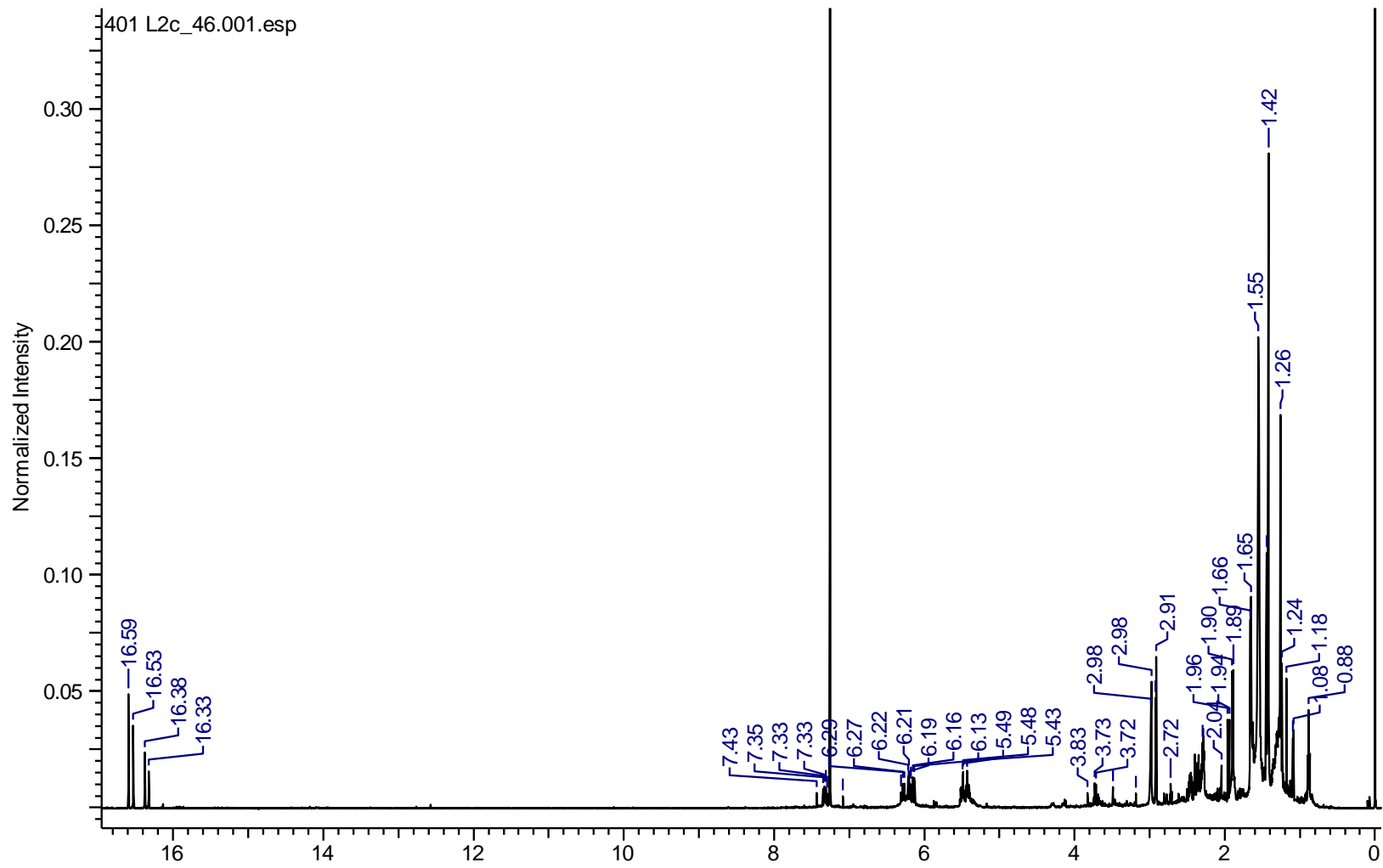
Espectro de RMN de ^1H da amostra 81 (600 MHz, CDCl_3)



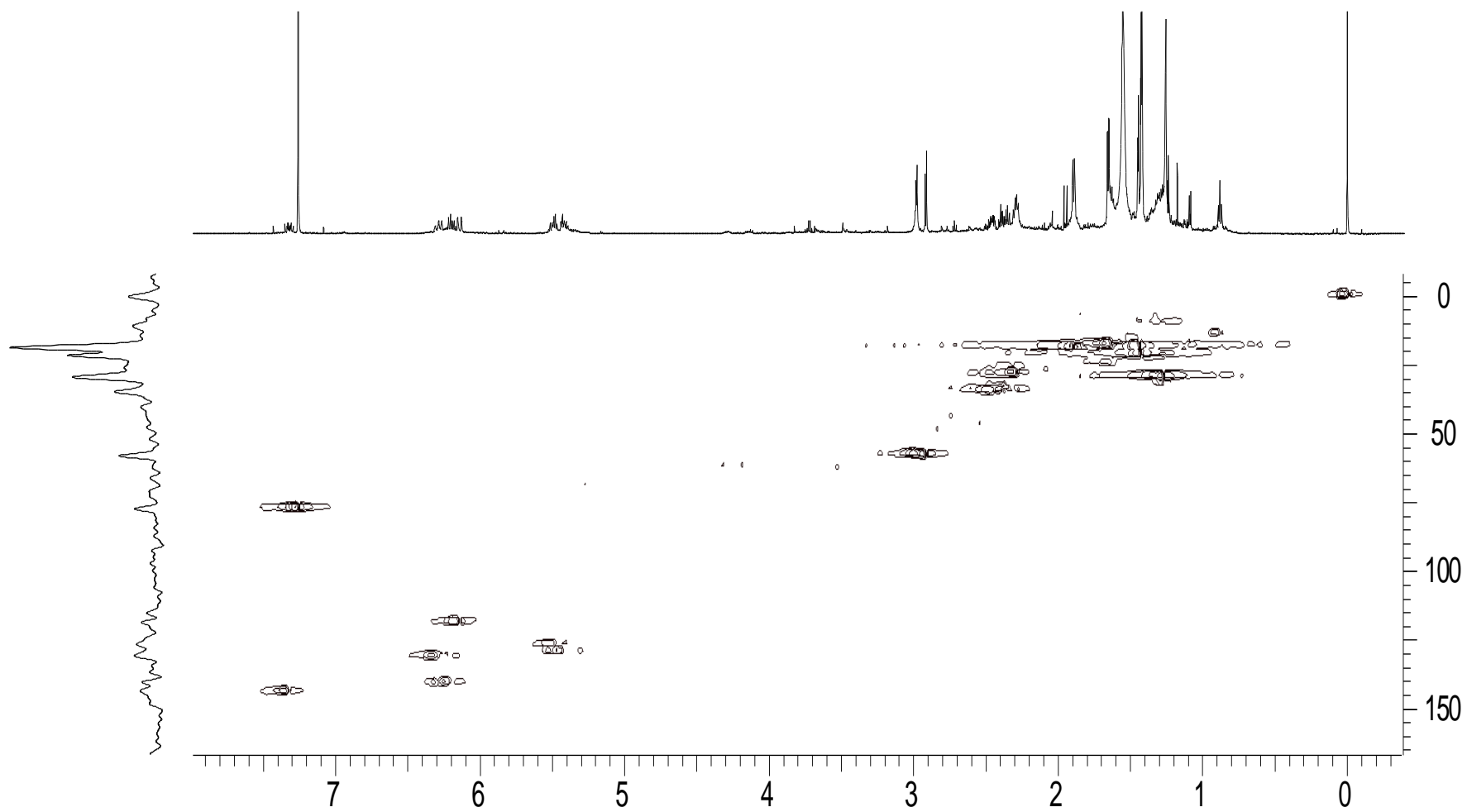
Mapa de correlações de HSQC da amostra 81 (600 MHz, CDCl₃)



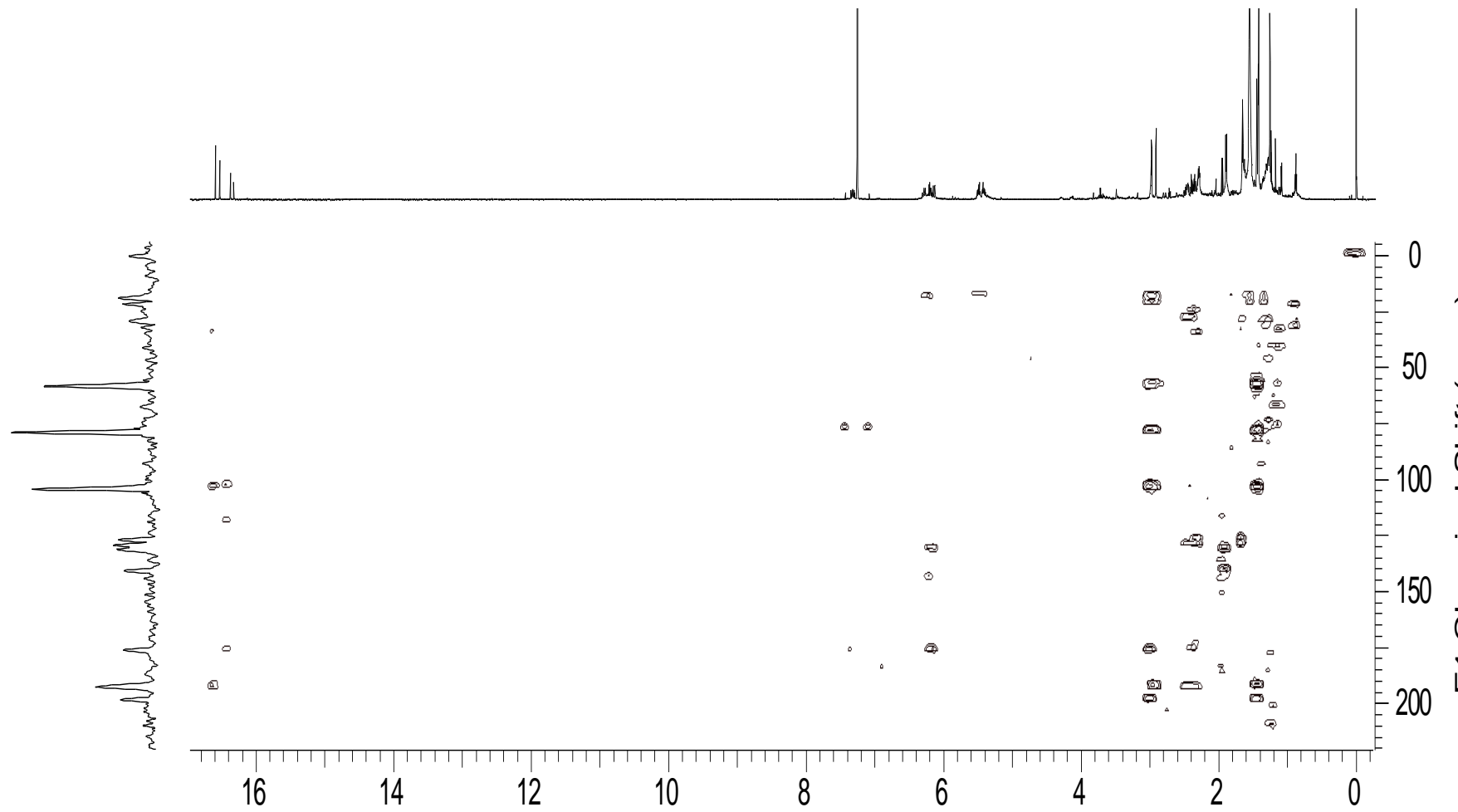
Mapa de correlações de HMBC da amostra 81 (600 MHz, CDCl₃)



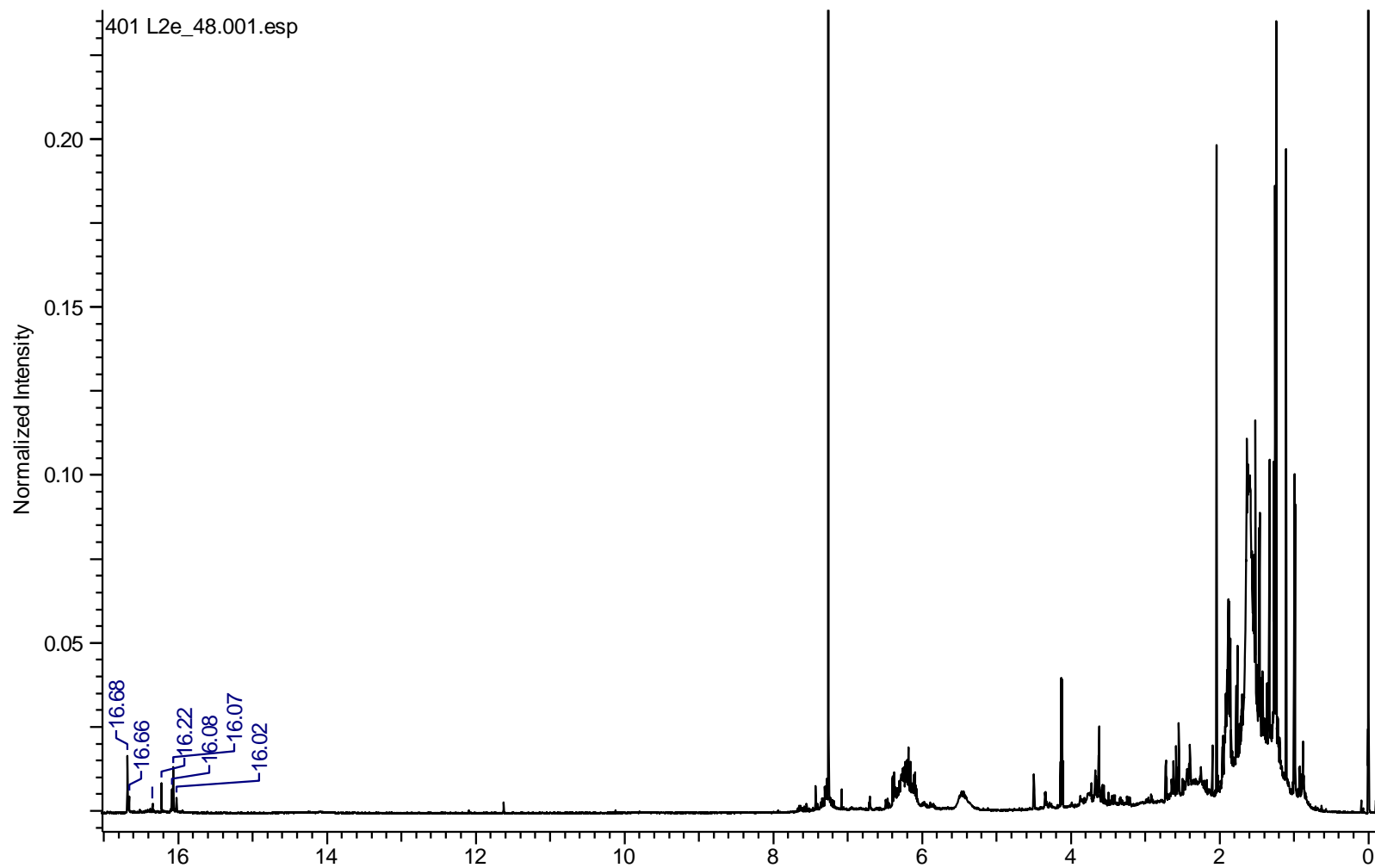
Espectro de RMN de ^1H a amostra L2c_46 (600 MHz, CDCl_3)



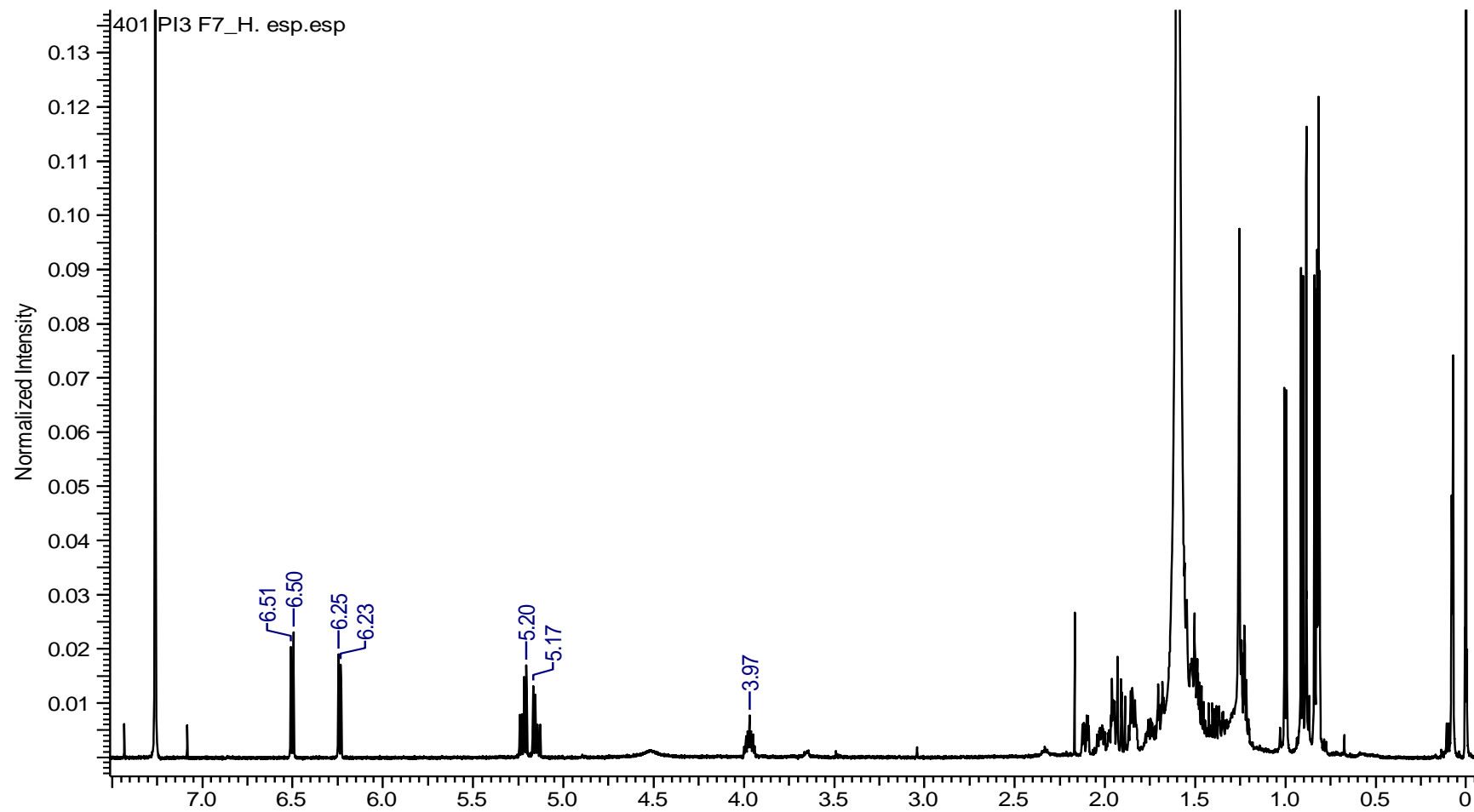
Mapa de correlações de HSQC L2c_46 (600 MHz, CDCl_3)



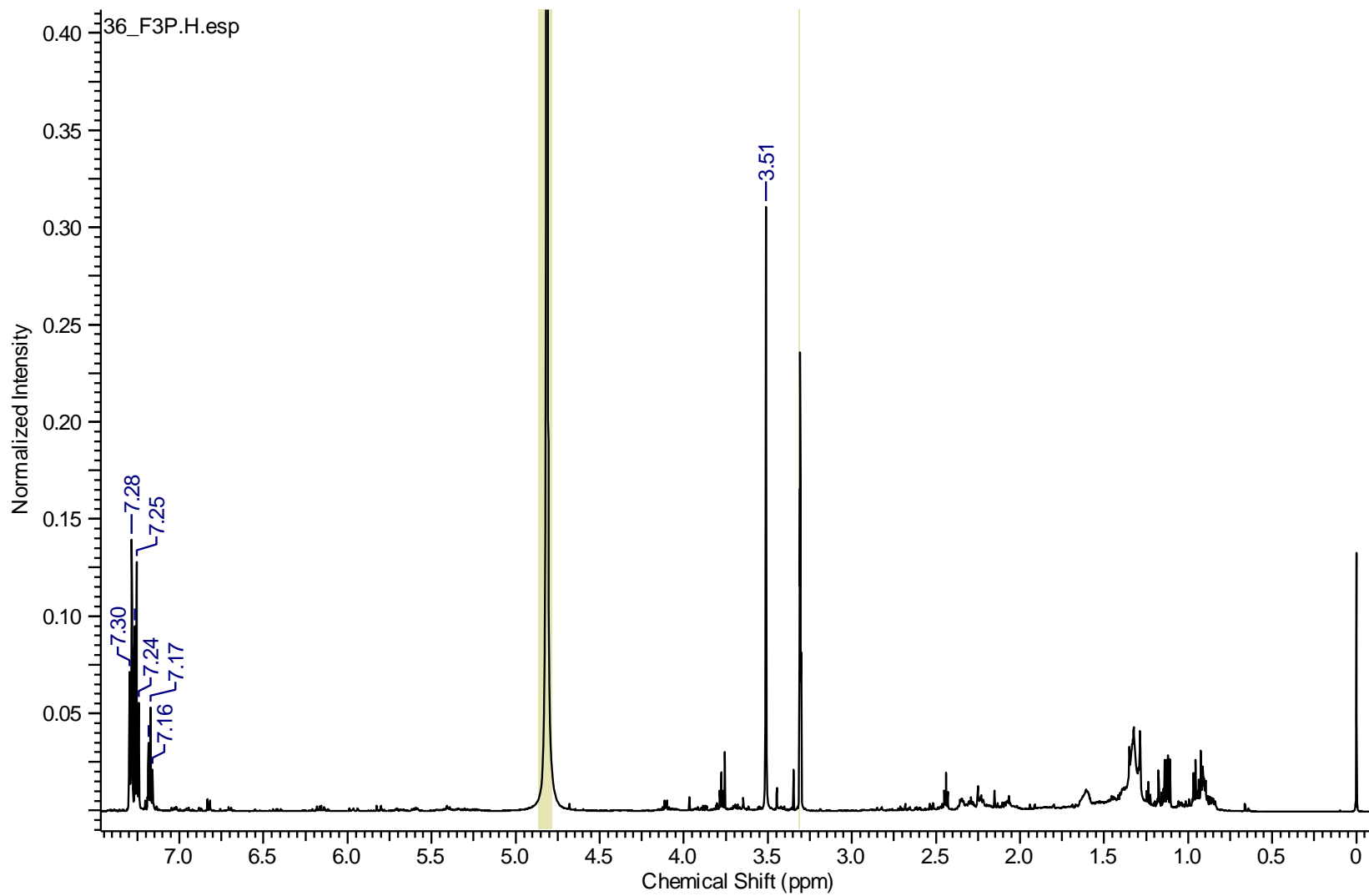
Mapa de correlações de HMBC L2c_46 (600 MHz, CDCl_3)



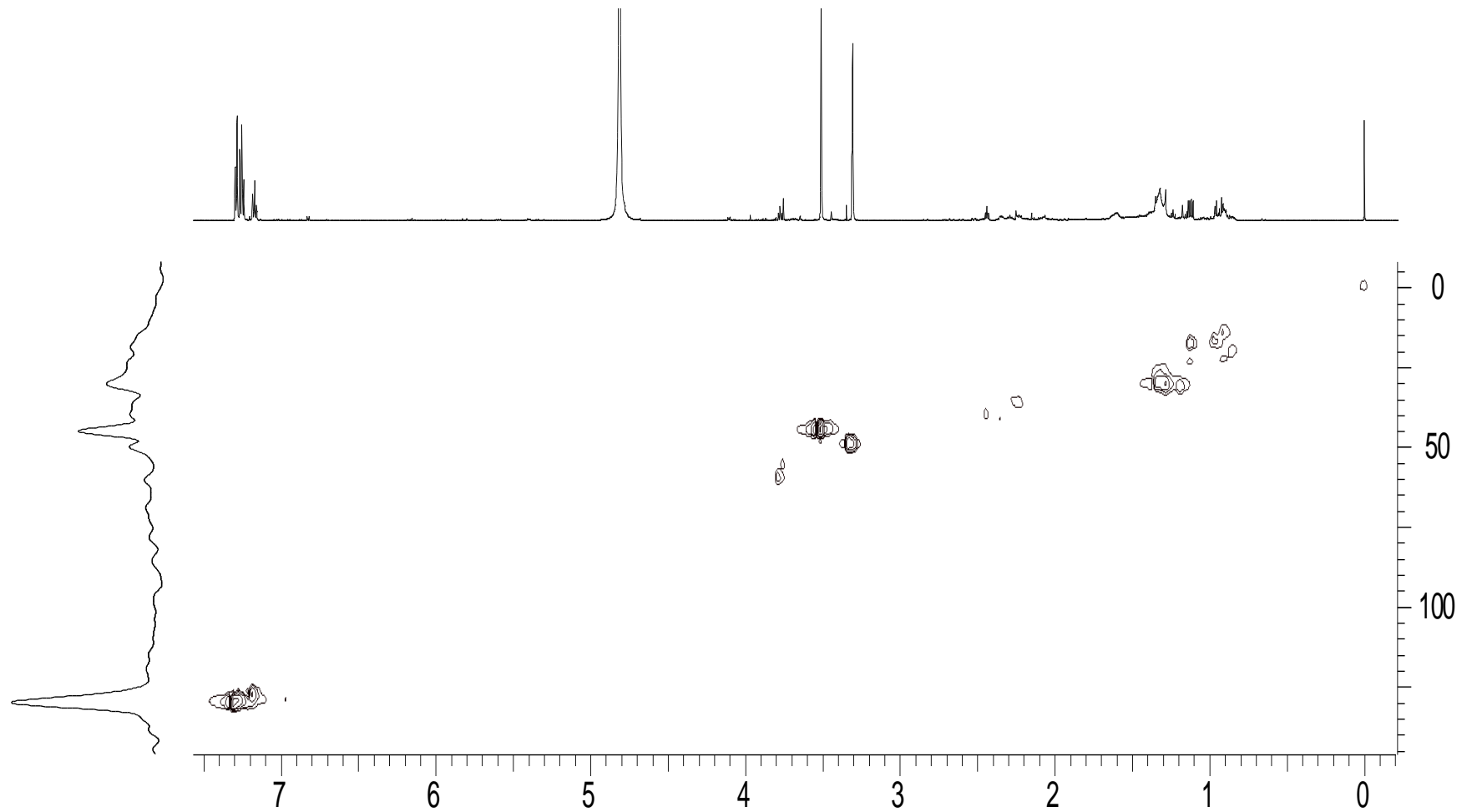
Espectro de RMN ^1H da amostra L2e_48 (600 MHz, CDCl_3)



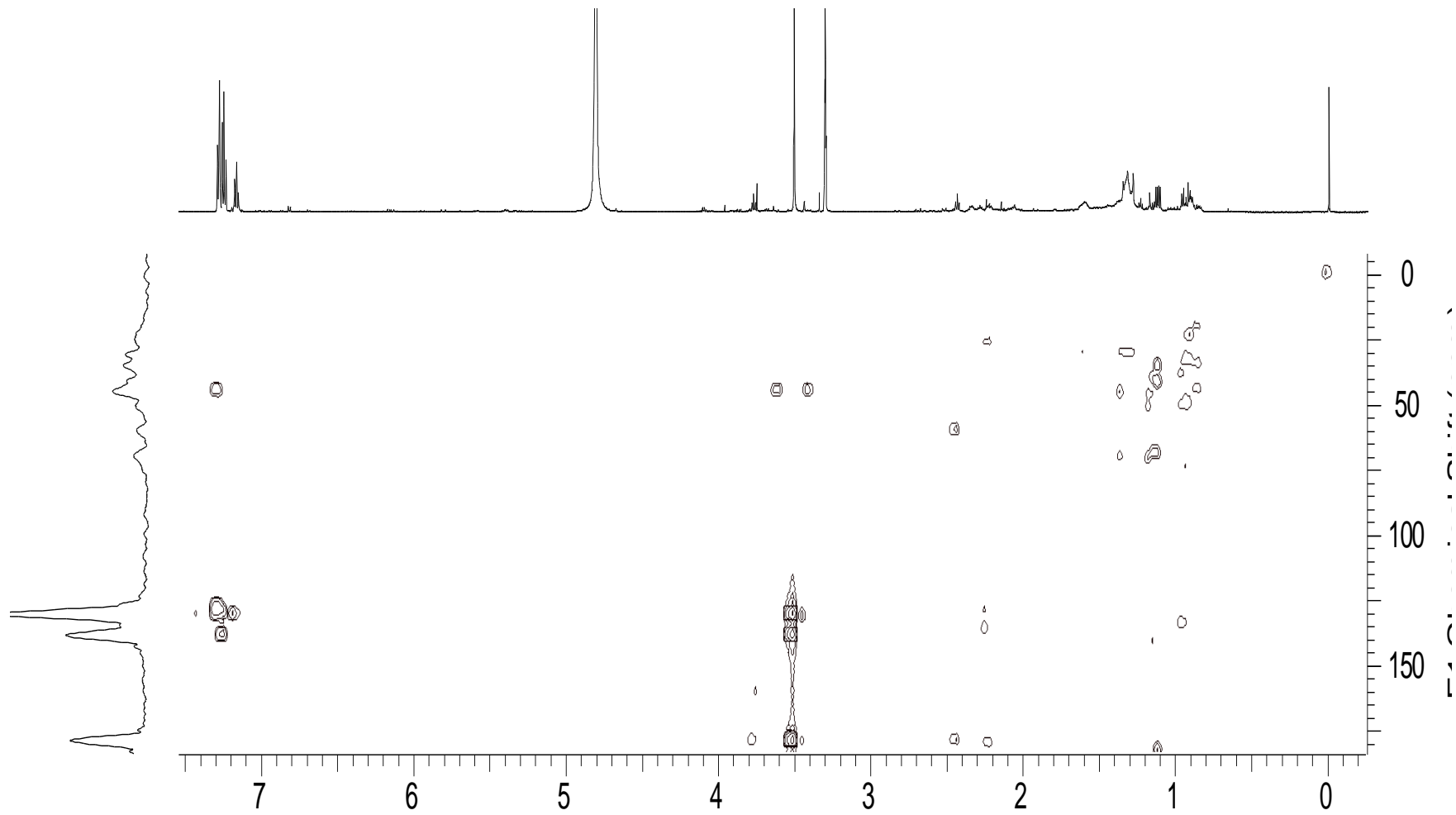
Mapa de correlação de HMBC a amostra PI3 F7 (600 MHz, CDCl₃)



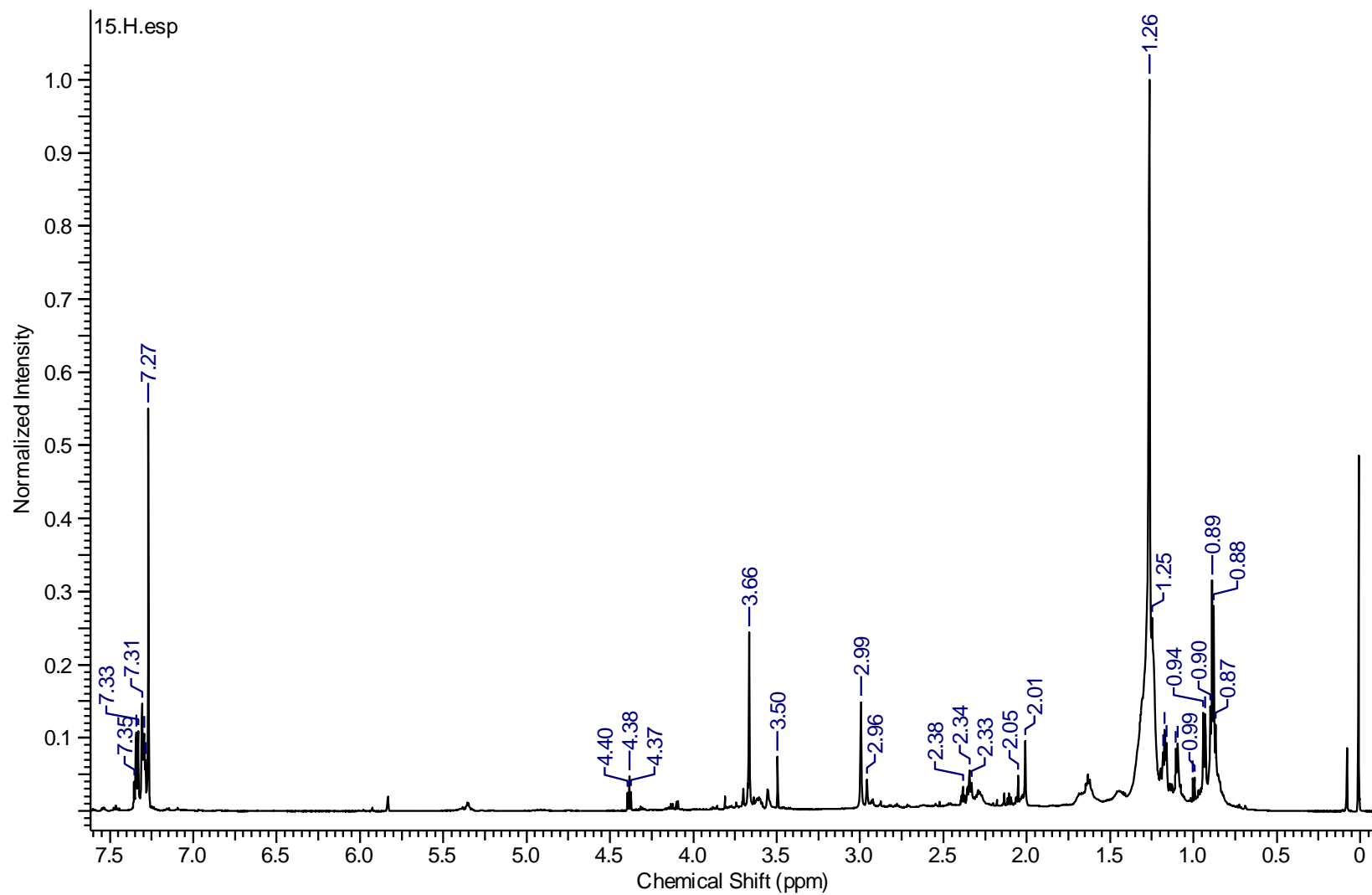
Espectro de RMN ^1H da amostra A3b36_3P (600 MHz, MeOD)



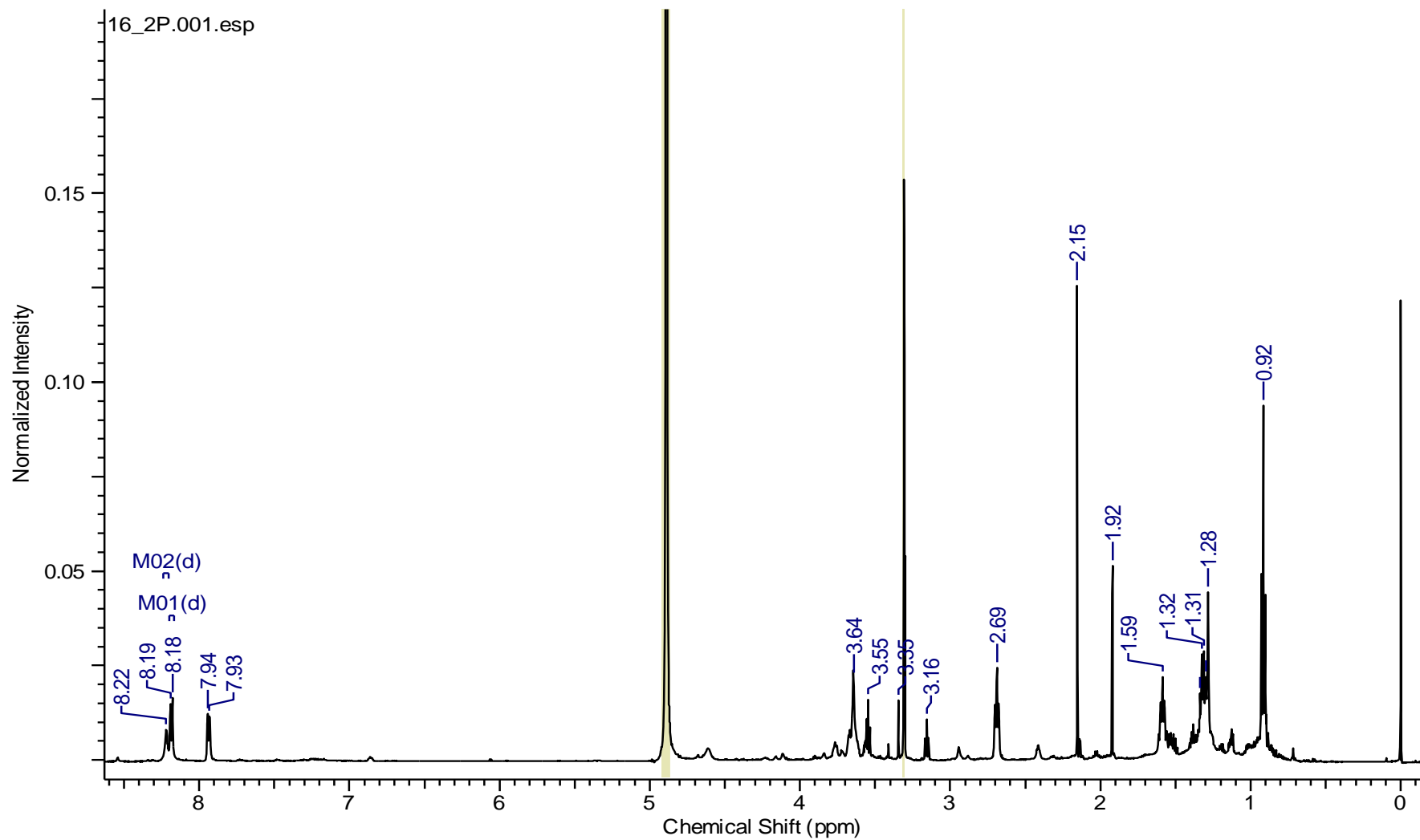
Mapa de correlações de HSQC A3b36_3P (600 MHz, MeOD)



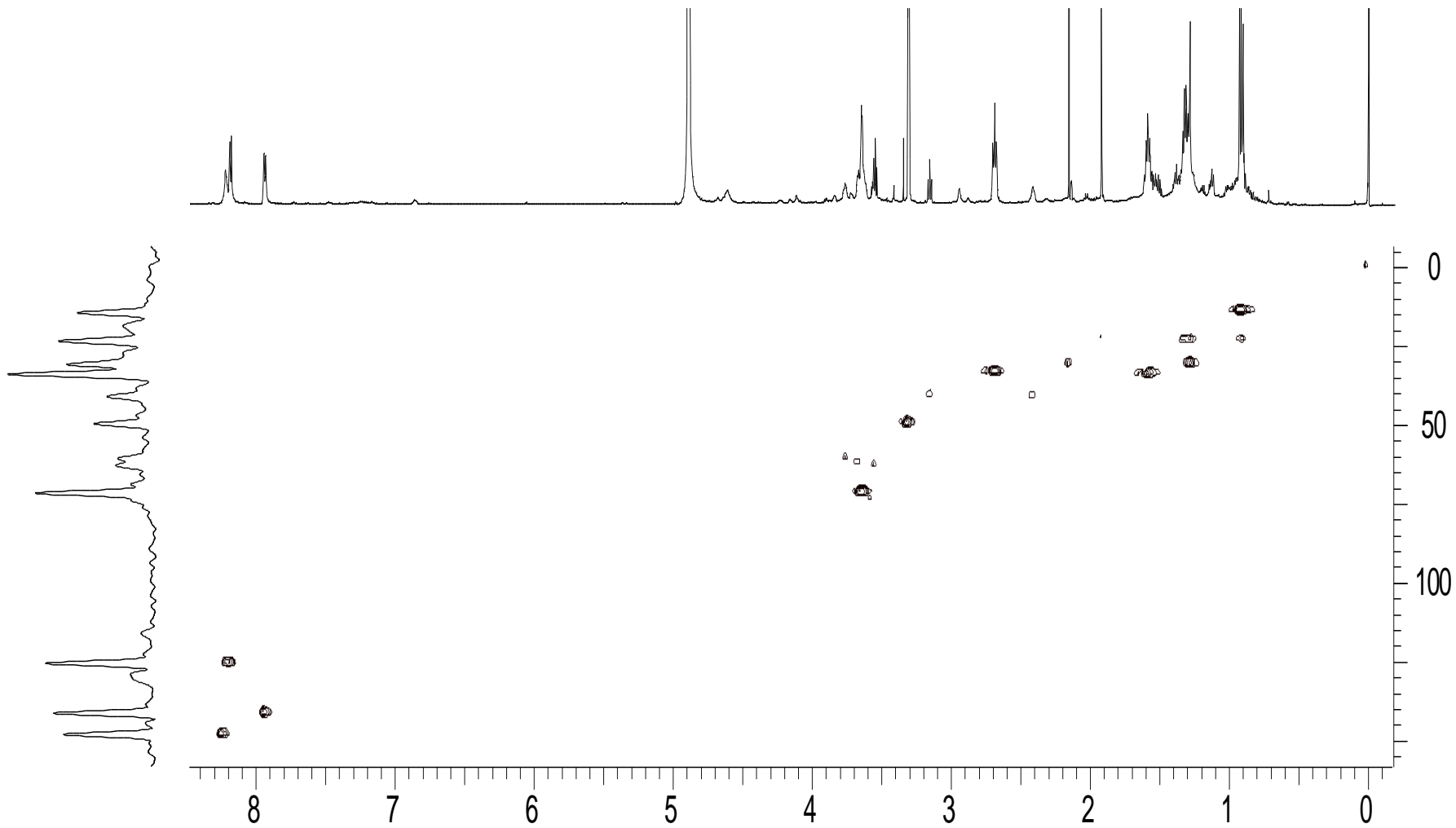
Mapa de correlações de HMBC A3b 36_F3P (600 MHz, MeOD)



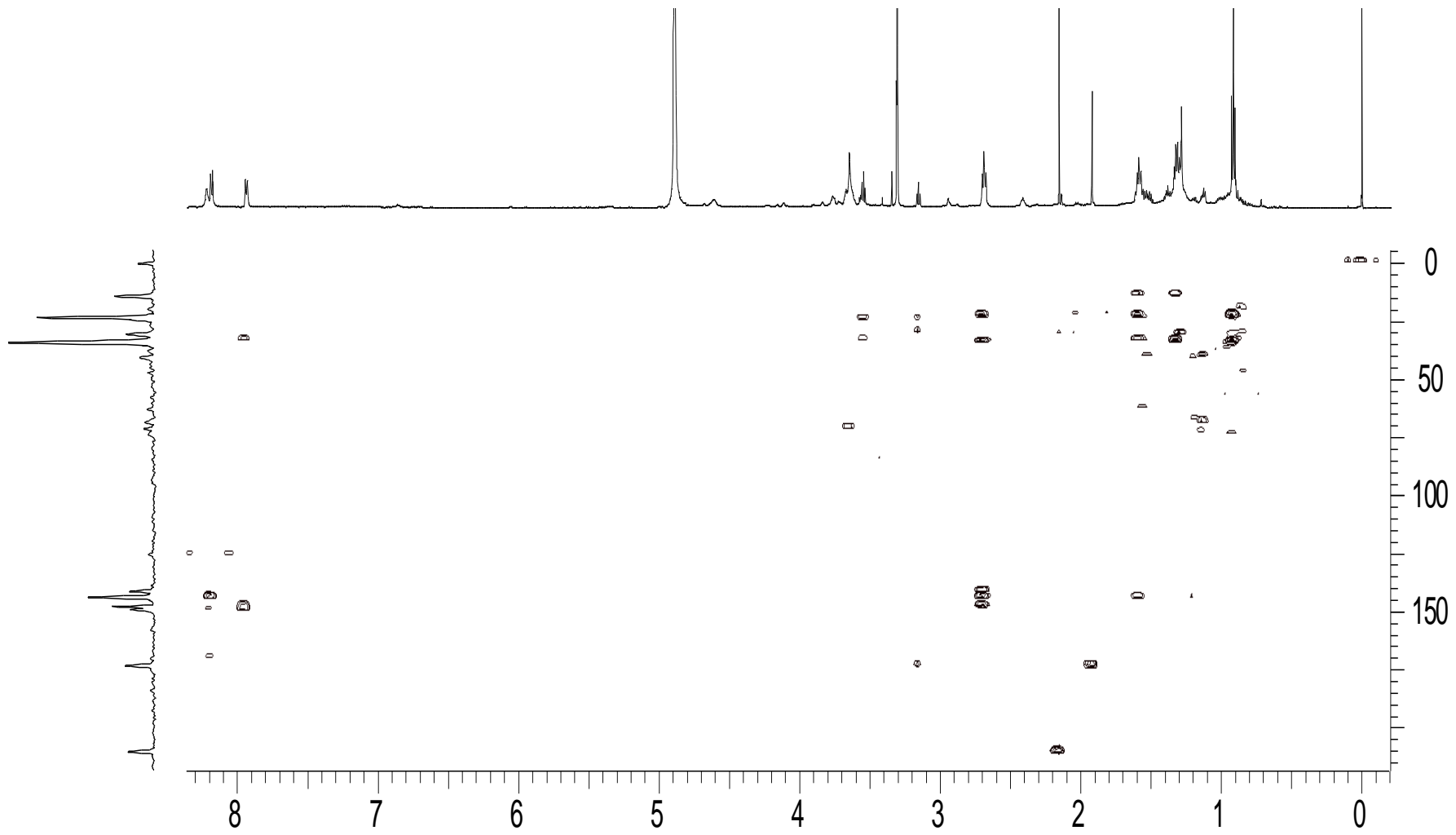
Espectro de RMN ^{13}C de N1a (15) (600 MHz, CDCl_3)



Espectro de RMN ^1H da amostra N1C (16_2P) (600 MHz, MeOD)



Mapa de correlações de HSQC da amostra N1C (16_2P) (600 MHz, MeOD)



Mapa de correlações de HMBC da amostra N1C (16_2P) (600 MHz, MeOD)