



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química



NuBBE-Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais

Fungos endofíticos em *Eugenia brasiliensis*: prospecção química, biológica, enzimática e avaliação do co-cultivo e epigenética em *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp.

Carolina Rabal Biasetto

Araraquara
2016

CAROLINA RABAL BIASETTO

Fungos endofíticos em *Eugenia brasiliensis*: prospecção química, biológica,
enzimática e avaliação do co-cultivo e epigenética em *Xylaria cubensis*,
Diaporthe sp. e *Colletotrichum* sp.

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo
Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela A. Bocchini Martins

Araraquara
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

B576f Biassetto, Carolina Rabal
Fungos endofíticos em *Eugenia brasiliensis*: prospecção química, biológica, enzimática e avaliação do co-cultivo e epigenética em *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. / Carolina Rabal Biassetto. – Araraquara : [s.n.], 2016
225 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Angela Regina Araujo
Coorientador: Daniela Alonso Bocchini Martins

1. Fungos endofíticos. 2. Eugênia(Planta). 3. Ressonância magnética nuclear. 4. Compostos bioativos. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

CAROLINA RABAL BIASETTO

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Araraquara, 27 de abril de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araújo (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof^a. Dr^a. Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto



Prof^a. Dr^a. Taícia Pacheco Fill
Instituto de Química – UNICAMP, Campinas

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Carolina Rabal Biasetto

Filiação: Antonio Carlos Biasetto e Maria Cecília Rabal Biasetto

Nascimento: 17/04/1986 - Tabatinga-SP-Brasil.

Endereço Profissional

NuBBE “Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais”

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara - Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP, Araraquara - SP.

Endereço eletrônico: carolinarabal@yahoo.com.br

Formação Acadêmica

2008

Graduação: Licenciatura em Química

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP- Instituto de Química de Araraquara- SP.

2009-2011

Mestrado: Química, Área de Concentração - Química Orgânica

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP- Instituto de Química de Araraquara- SP.

Dissertação: Avaliação Química e Biológica do Fungo Endofítico *Schizophyllum commune* Isolado de *Alchornea glandulosa*.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Bolsa: FAPESP

2012-2016

Doutorado: Química, Área de Concentração - Química Orgânica

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP- Instituto de Química de Araraquara- SP.

Tese: Fungos endofíticos em *Eugenia brasiliensis*: prospecção química, biológica, enzimática e avaliação do co-cultivo e epigenética em *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini Martins

Bolsa: CNPq

Produção Bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

- a) PALOMINO GARCÍA, L. R. P.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R.; DEL BIANCHI, V. L. Enhanced extraction of phenolic compounds from coffee industry's residues through solid state fermentation by *Penicillium purpurogenum*. Food Science and Technology, v.35, n.4, p. 704-711, 2015.
- b) LISBOA, H. C. F.; BIASETTO, C. R.; MEDEIROS, J. B.; ARAUJO, A. R.; SILVA, D. H. S.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C. Endophytic fungi producing of esterases: evaluation *in vitro* of the enzymatic activity using pH indicator. Brazilian Journal of Microbiology, v. 44, n.3, p. 923-926, 2013.
- c) CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. Revista Virtual de Química, v. 5, p. 421-437, 2013.

Trabalhos recentes publicados em anais de eventos

- a) BIASETTO, C. R.; SOMENSI, A.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; ARAUJO, A. R. Metabolites of *Xylaria cubensis* and *Colletotrichum* sp., endophytic fungi from *Eugenia brasiliensis*. In: 5nd Brazilian Conference on Natural Products (5nd BCNP) and the XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXXI RESEM), 2015, Atibaia-SP, Brasil.
- b) LOPES, J. R.; ARAUJO, A. R.; BIASETTO, C. R. Fungo endofítico *Diaporthe* sp.: Prospecção química e biológica em meios sólidos. In: XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp (CIC), 2015, Araraquara-SP, Brasil.
- c) FOGUEL, M. V.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R.; ZANONI, M. V. B.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Physical-chemistry characterization of molecularly

- imprinted polymers (MIP) for dye Basic Red 9. In: XIV Brazilian MRS Meeting (SBPMat), 2015, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.
- d) BIASETTO, C. R.; SOMENSI, A.; MEDINA, R. P.; ARAUJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; YOUNG, M. C. M.; FERREIRA, P. M. P. Metabolites produced by *Diaporthe* sp., an endophytic fungus from *Eugenia brasiliensis* (Myrtaceae). In: 31nd Congresso Latinoamericano de Química (CLAQ-2014) and XXVII Congresso Peruano de Química, 2014, Lima-Peru.
- e) LOPES, J. R.; ARAUJO, A. R.; BIASETTO, C. R. Prospecção química em *Diaporthe* sp., um endófito de *Eugenia brasiliensis*. In: XXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp (CIC), 2014, Araraquara-SP, Brasil.
- f) PRECCARO, M.; MEDINA, R. P.; BIASETTO, C. R.; SOMENSI, A.; YOUNG, M.C.M.; YOKOYA, N. S.; LOPES, M. N.; ARAUJO, A. R.; SILVA, D. H. S. Bioprospecção de fungos endofíticos das algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* e *Pyropia spiralis*. In: 37^a Reunião Anual da SBQ, 2014, Natal-RN, Brasil.
- g) MEDINA, R.; BIASETTO, C.; SOMENSI, A.; YOKOYA, N.; LOPES, M.; ARAUJO, A.; SILVA, D. 5-Hydroxymethylmellein: an isocoumarin derivative from an endophytic fungus from red alga *Asparagopsis taxiformis*. In: 62^a International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), 2014, Guimarães-Portugal.
- h) BIASETTO, C. R.; SOMENSI, A.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; YOUNG, M. C. M.; ARAUJO, A. R. Endophytic fungi from *Eugenia brasiliensis*: a bioprospection. In: 4nd Brazilian Conference on Natural Products (4nd BCNP) and the XXX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXX RESEM), 2013, Natal-RN, Brasil.
- i) SOMENSI, A.; BIASETTO, C. R.; RUFINO, M. P.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; YOUNG, M. C. M.; ARAUJO, A. R. Dereplication of endophytic fungi using NMR virtual design and hyphenated techniques. In: 4nd Brazilian Conference on Natural Products (4nd BCNP) and the XXX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXX RESEM), 2013, Natal-RN, Brasil.
- j) BIASETTO, C. R.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; ARAUJO, A. R. Bioactive metabolites from *Schizophyllum commune*, an endophytic fungus residing in *Alchornea glandulosa*. In: São Paulo Advanced School on Bioorganic Chemistry (ESPCA), 2013, Araraquara-SP, Brasil.

Participações em Reuniões Científicas

- a) 5nd Brazilian Conference on Natural Products (5nd BCNP) and the XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXXI RESEM), 2015, Atibaia-SP, Brasil.
- b) First Brazilian Workshop on Bioinformatics/Chemometrics for Metabolomics, 2015, USP, Ribeirão Preto-SP, Brasil.
- c) 1^o Encontro Nacional de Química Biotecnológica e Agroindustrial, 2015, USP, Ribeirão Preto-SP, Brasil.
- d) VI Workshop do NuBBE, 2015, IQ/UNESP, Araraquara-SP, Brasil.
- e) 31nd Congreso Latinoamericano de Química (CLAQ-2014) and XXVII Congreso Peruano de Química, 2014, Lima-Peru.
- f) Workshop dos Programas de Pós-Graduação em Química e em Biotecnologia: Entrepreneurship for Graduate in Chemistry: a Glance for Brazilian Competitiveness Innovation & Development 2014, IQ/UNESP, Araraquara-SP, Brasil.
- g) Simpósio Recent Advances in NMR Spectroscopy: A Powerful Tool for Fundamental and Applied Research, 2014, IQ/UNESP, Araraquara-SP, Brasil.
- h) VIII Reunião de Avaliação do Programa BIOTA/FAPESP, 2014, São Pedro-SP.
- i) 4nd Brazilian Conference on Natural Products (4nd BCNP) and the XXX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXX RESEM), 2013, Natal-RN, Brasil.
- j) São Paulo Advanced School on Bioorganic Chemistry (ESPCA), 2013, Araraquara-SP, Brasil.
- k) V Workshop do NuBBE, 2012, IQ/UNESP, Araraquara-SP, Brasil.

Participações em cursos de curta duração

- a) Participação no curso: **“Planejamento Experimental e Otimização de Bioprocessos”** (Carga horária: 8h), 2015, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil.
- b) Participação no curso: **“Introduction to NMR and Metabolomics”**, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara-UNESP, 2014, SP, Brasil.

- c) Participação no curso: **“Introduction to metabolomics and chemometrics applied to natural product chemistry”**, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara-UNESP, 2014, SP, Brasil.
- d) Participação no curso: **“Aspectos práticos da interpretação de espectros de massas com ionização por electrospray e MALDi, e sua aplicação na análise do metabolismo de produtos naturais”** (Carga horária: 8h), 2014, BIOTA/FAPESP, São Pedro, SP, Brasil.

Supervisões

- a) Juliana Romano Lopes, graduanda em Química. Projeto: Fungos endofíticos: recursos renováveis na produção de metabólitos secundários novos e bioativos. Iniciação Científica desde 2014. IQ/Unesp, Araraquara-SP, CNPq.
- b) Amelie Sophie Schösser, aluna pelo programa IAESTE. Projeto: Prospecção química, biológica e enzimática em fungos endofíticos associados a *Eugenia brasiliensis* e avaliação da influência de moduladores epigenéticos. Estágio no período de 01/08/2013 a 30/09/2013. IQ/Unesp, Araraquara-SP.

Aos meus queridos pais, Antonio e Maria Cecília.

Meus exemplos de bondade, honestidade, respeito, caridade, perseverança e amor que servem e servirão de guia para toda minha vida. Se hoje escrevo esta tese de Doutorado, é que em todos os momentos da minha vida, recebi o apoio e um imenso incentivo para que me tornasse uma pessoa com qualidades e habilidades tanto profissional quanto pessoal. Eu tenho com certeza o melhor pai e a melhor mãe do mundo. Amo vocês.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Angela R. Araujo.

Pela amizade, paciência, competência, dedicação e pelo imenso carinho e respeito com seus alunos. Suas inúmeras qualidades contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada por tudo. A senhora e sua família sempre estarão em meu coração.

Ao meu querido esposo Vinicius.

Pelo amor, constante incentivo, companheirismo, paciência e pelas valiosas palavras sábias e de conforto. Obrigada pelas discussões, ideias e pelo imenso auxílio na elaboração desta Tese. Obrigada por tudo. Você é meu porto seguro. Amá-lo me faz muito feliz.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sua infinita sabedoria e benevolência que irradia e nos protege em todos os momentos.

Aos meus pais, pelo amor e carinho incondicional em todos os dias da minha vida. Muito obrigada pelas inúmeras renúncias que vocês fizeram para me proporcionar sempre o melhor. Mesmo com tantos obstáculos em nossas vidas pais, vocês conseguiram com muita garra e paciência superá-los e esses ensinamentos eu levarei para o resto da minha vida. Deus me presenteou com anjos, intitulados de pais. Quero agradecer a minha querida avó, Matilde (*in memoriam*) pela sabedoria e exemplo de força.

Ao amor da minha vida: Vinicius, pelo carinho, respeito, amor, incentivo e paciência em todos os momentos. Meu anjo da guarda.

À minha eterna orientadora Profa. Dra. Angela, pela amizade, pelas incontáveis conversas e ensinamentos. Obrigada pela oportunidade em participar de um grupo tão especial como o dos Fungos Endofíticos.

Aos meus eternos amigos do coração: Mônica e Ederson, Elaine e Higor, Carol e Josiel, Ju Castro, Marcos (Harry), Ju Brito e Miguel, Ju Holzbach e Maíke, Andressa (Blossom), Rebeca e Camila Cotrim pela grande amizade, que carregarei comigo para o resto da vida. São amigos carinhosos, inesquecíveis, amigos leais, especiais, esforçados. Admiro vocês!! Quero estar sempre perto de vocês. Sou muito privilegiada em ter amigos/irmãos tão verdadeiros e especiais como vocês.

As minhas amiguinhas: Andressa (Blossom) e Rebequinha, pela grande amizade, e pelas inúmeras conversas e conselhos sobre os erros e acertos da nossa pesquisa e vida pessoal.

Aos meus amigos do coração: Daniara, Marco, Adriana, Wiliam, Paty, Júnior, Alessandra, Marco, João, Sheila, Néia, Vanessa, Miller, pela amizade tão especial e verdadeira.

À minhas grandes amigas que mesmo à distância, são as minhas eternas amigas, Carol Factore e Aline Bozelli, pela amizade sincera e especial, essa que superou os limites de amizade e tornou-se laços de família.

À minha sogra Maria José, ao meu sogro Donizete, a minha querida cunhada Camila e meu cunhado Heire, pelo carinho, paciência e apoio nesta trajetória.

Aos amigos de grupo: Andressa, Maiara, Isabela, Mayra, Gislaine, Julia, Gustavo, Fernandinho, Yan, Juliana Romano, pela amizade, discussões, cumplicidade e pelos deliciosos jantares na casa da Profa. Angela.

A minha aluna de Iniciação Científica, Juliana Romano, pela amizade e dedicação.

Ao Dr. Nivaldo Borallo e a Lucineia, pela amizade e pelos espectros de RMN.

À Juliana Rodrigues, João Bronzel e ao Marquinho pela paciência e ensinamentos.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Daniela A. B. Martins e à doutoranda Natália pela amizade e colaboração nos ensaios enzimáticos.

À Profa. Dra. Maria Cláudia Young, Prof. Dr. Paulo Michel e Profa. Dra. Claudia Pessoa pelos ensaios biológicos.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho (Universidade Federal de São Carlos) e à Profa. Dra. Taicia Pacheco Fill (Universidade Estadual de Campinas) pela amizade e colaboração, pelas valiosas discussões e ensinamentos. Obrigada pela oportunidade de aprender novas metodologias e realizar análises em Espectrometria de Massas.

À Viviane de Cassia Pereira (UFSCAR), pelos ensaios herbicidas.

Aos amigos, professores e funcionários do Departamento de Química Orgânica.

Aos funcionários da biblioteca e da pós-graduação pela dedicação, competência e por serem sempre prestativos.

A todos os funcionários do Instituto de Química de Araraquara.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro.

“Aquilo que escuto eu esqueço, Aquilo que vejo eu lembro, Aquilo que faço eu aprendo.”

Confúcio

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

RESUMO

A capacidade biossintética dos fungos endofíticos, aliado aos estudos químico e biológicos relatados para *Eugenia brasiliensis*, motivou a idealização do projeto, a prospecção química, biológica e enzimática em fungos endofíticos associados a folhas, caules e frutos saudáveis de *Eugenia brasiliensis* e a avaliação do co-cultivo e epigenética em *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp., na obtenção de novas substâncias. O isolamento dos fungos endofíticos, resultou em dezessete linhagens de fungos endofíticos, sendo estes cultivados em escala reduzida em meio líquido de batata e dextrose (PDB) e Czapek, a 25 °C, sob modo estático para obtenção dos respectivos extratos brutos em AcOEt. A avaliação metabólica destes extratos foi realizada por CCDC, HPLC-DAD e RMN de ¹H, como também a potencialidade enzimática e biológica pela avaliação das atividades antifúngica, anticolinesterásica e citotóxica, sendo que estes extratos demonstraram ser promissores. A prospecção inicial conduziu a seleção de três fungos endofíticos identificados como *Xylaria cubensis* (Eb_caH_5), *Diaporthe* sp. (Eb_caS_4), e *Colletotrichum* sp. (Eb_frmH_1), os quais foram cultivados (escala ampliada) em PDB para isolamento e determinação/elucidação estrutural dos metabólitos secundários. O estudo de *Xylaria cubensis*, resultou no isolamento de 8 substâncias, sendo da classe dos nucleosídeos, dicetopirazinas, isocumarinas e citocalasinas. De *Diaporthe* sp. foi isolado e identificado 8 substâncias: duas dicetopiperazinas, ácido nitropropiónico, uracila, tirosol, zygosporina D, pirrolidona (inérita) e alternariol. *Colletotrichum* sp. resultou no isolamento de 6 substâncias, sendo três dicetopiperazinas, além das substâncias N-(2-feniletil)acetamida, N-acetilriptamina e metanoato de 2-hidroxibutila 3-indol (inérita). Todas as classes de substâncias produzidas por estes fungos endofíticos apresentam diversas atividades biológicas relatadas na literatura. Destaca-se a atividade fitotóxica da citocalasina D frente a coleótilos de trigo superior ao herbicida comercial GOAL[®]. Para verificar a influência na produção metabólica de *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp., utilizou-se estratégias como o co-cultivo em meio sólido (PDA) e líquido (PDB) e a epigenética (escala reduzida), nas quais os endófitos mostraram produção metabólica diferente em relação à produção das monoculturas e na ausência do modulador epigenético ácido hidroxâmico suberoilanilida (SAHA), respectivamente. As ferramentas estatísticas, como PCA (Análise de componentes principais) e PLS-DA (Análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais) permitiram uma rápida identificação e localização dos perfis metabólicos dos co-cultivos comparados às monoculturas. Estes dados contribuem para o conhecimento dos perfis metabólicos, biológicos e enzimáticos dos fungos endofíticos isolados de *Eugenia brasiliensis*, bem como suas interações com o hospedeiro.

Palavras-chave: Fungos endofíticos. *Xylaria cubensis*. *Diaporthe* sp. *Colletotrichum* sp. Co-cultivo. Epigenética.

ABSTRACT

The biosynthetic capacity of endophytic fungi, allied chemical and biological studies reported to *Eugenia brasiliensis* motivated the idealization of the project, prospection chemical, biological and enzymatic in endophytic fungi associated with healthy leaves, stems and fruits from *Eugenia brasiliensis* and evaluation co-culture and epigenetic in *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. and *Colletotrichum* sp., in obtaining new substances. The isolation of endophytic fungi resulted in seventeen endophytes fungi, these being cultivated in small scale on potato dextrose broth (PDB) and Czapek at 25 °C under static mode to obtain the corresponding crude extracts in AcOEt. The metabolic evaluation of these extracts was performed by CCDC, HPLC-DAD and ¹H NMR, also enzymatic and biological potential were performed by antifungal, cytotoxic, and anticholinesterase activities, and these extracts have shown promise. The preliminary prospection led to the selection of three endophytic fungi identified as *Xylaria cubensis* (Eb_caH_5), *Diaporthe* sp. (Eb_caS_4) and *Colletotrichum* sp. (Eb_frmad_1) which were cultivated (larger scale) in PDB for isolation and determination or structural elucidation of secondary metabolites. The study of *Xylaria cubensis* resulted in the isolation of eight substances, as follows: nucleoside, diketopiperazines, isocoumarins and cytochalasins class. From *Diaporthe* sp. was isolated and identified eight substances, as follows: two diketopiperazines, nitropropionic acid, uracil, tyrosol, zygosporin D, pyrrolidone (unpublished) and alternariol. *Colletotrichum* sp. resulted in the isolation of six substances, three diketopiperazines, besides the substances N-(2-phenylethyl) acetamide, Nβ-acetyltryptamine and 3-hydroxybutan-2-yl-1H-indol-3-ylacetate (unpublished). All classes of substances produced by these endophytic fungi present several biological activities reported in the literature. Noteworthy is the phytotoxic activity of cytochalasin D against wheat coleoptile higher than commercial herbicide GOAL®. To verify the influence on the metabolic production of *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. and *Colletotrichum* sp., used strategies such as the co-culture on solid (PDA) and liquid medium (PDB) and epigenetic (small scale), in which endophytes showed an interesting and different metabolic production when compared with the production of monocultures and the absence of epigenetic modulator SAHA, respectively. The statistical tools, such as PCA (Principal component analysis) and PLS-DA (discriminant analysis with multivariate calibration partial least squares) allowed quick identification and location of the metabolic profiles of the co-culture compared monocultures. These data will contribute to the knowledge of the metabolic profiles, biological and enzymatic of endophytic fungi isolated from *Eugenia brasiliensis* and their interactions with host.

Keywords: Endophytic fungi. *Xylaria cubensis*. *Diaporthe* sp. *Colletotrichum* sp. Co-culture. Epigenetic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de “crosstalk” entre espécies endófito-endófito. (A) “Crosstalk” entre fungos endofíticos; (B) “Crosstalk” entre fungos e bactérias endossimbiontes; (C) “Crosstalk” entre fungos e bactérias endofíticas.	37
Figura 2. <i>Eugenia brasiliensis</i> (a), frutos (b) e folhas (c).....	38
Figura 3. Substâncias bioativas isoladas de fungos endofíticos.	41
Figura 4. Esquema representativo da fibra de celulose.....	43
Figura 5. Fotos de <i>Xylaria cubensis</i> (a), <i>Diaporthe</i> sp. (b) e <i>Colletotrichum</i> sp. (c) cultivados em PDA em placa de Petri.....	45
Figura 6. Substâncias isoladas dos gêneros <i>Xylaria</i> , <i>Diaporthe</i> e <i>Colletotrichum</i>	46
Figura 7. Compostos isolados do co-cultivo de fungos.	48
Figura 8. Metilação da citosina do DNA.	49
Figura 9. Acetilação nos resíduos de lisina da histona.	50
Figura 10. Modificações na histona: cromatina “aberta” e “fechada”.....	51
Figura 11. Estruturas de moléculas utilizadas como moduladores epigenéticos.....	52
Figura 12. Compostos isolados do cultivo de fungos com moduladores epigenéticos..	53
Figura 13. Isolamento dos fungos endofíticos de <i>Eugenia brasiliensis</i>	61
Figura 14. Cultivo e obtenção dos extratos brutos em PDB e Czapek (escala reduzida).	62
Figura 15. Isolamentos dos metabólitos da fração Eb_Xyl-Fr1, produzidos por <i>Xylaria cubensis</i>	65
Figura 16. Isolamentos dos metabólitos da fração Eb_Xyl-Fr2, produzidos por <i>Xylaria cubensis</i>	65
Figura 17. Isolamentos dos metabólitos da fração Eb_Xyl_5-Fr3, produzidos por <i>Xylaria cubensis</i>	66
Figura 18. Isolamentos dos metabólitos da fração Eb_Diap_4-Fr1, produzidos por <i>Diaporthe</i> sp.	66
Figura 19. Isolamentos dos metabólitos da fração Eb_Diap_4-Fr3, produzidos por <i>Diaporthe</i> sp.	67
Figura 20. Fracionamento de Eb_Colle_1_Fr1 e isolamento dos metabólitos da fração Eb_Colle_1-Fr1.2, produzidos por <i>Colletotrichum</i> sp.....	68

Figura 21. Isolamentos dos metabólitos da fração Eb_Colle_1-Fr2, produzidos por <i>Colletotrichum</i> sp.....	69
Figura 22. Regiões de micro-extração dos co-cultivos.....	70
Figura 23. Micro-extração dos co-cultivos fúngicos.....	70
Figura 24. Cultivo e obtenção dos extratos brutos em PDB com moduladores epigenéticos.....	72
Figura 25. Isolamentos dos metabólitos do extrato Diap_SAHA_500 µM , produzidos por <i>Diaporthe</i> sp., com o modulador SAHA 500 µM.	72
Figura 26. Prospecção enzimática nos fungos endofíticos isolados de <i>Eugenia brasiliensis</i>	75
Figura 27. Fungos endofíticos isolados do caule de <i>Eugenia brasiliensis</i>	81
Figura 28. Fungos endofíticos isolados dos frutos maduros e das folhas de <i>Eugenia brasiliensis</i>	81
Figura 29. Cromatogramas dos extratos brutos obtidos em PDB e Czapek ($\lambda= 254$ nm) dos endófitos isolados dos frutos maduros: Eb_frmH_1 (a), Eb_frmH_2 (b), Eb_frmH_3 (c), Eb_frmH_4 (d), Eb_frmH_5 (e) e Eb_frmH_6 (f).	83
Figura 30. Cromatogramas dos extratos brutos obtidos em PDB e Czapek ($\lambda= 254$ nm) dos endófitos isolados de caules de <i>E. brasiliensis</i> : Eb_caH_1 (a), Eb_caH_3 (b), Eb_caH_4 (c), Eb_caH_5 (d), Eb_caH_6 (e), Eb_caH_7 (f), Eb_caS_1 (g), Eb_caS_2 (h), Eb_caS_3 (i) e Eb_caS_4 (j).....	84
Figura 31. Cromatograma do extrato bruto obtido em PDB e Czapek ($\lambda= 254$ nm) do endófito isolado de folhas de <i>E. brasiliensis</i> : Eb_fIH_1.....	85
Figura 32. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos obtidos em PDB e Czapek dos endófitos isolados de caules de <i>E. brasiliensis</i> : Eb_caH_1 (a), Eb_caH_3 (b), Eb_caH_4 (c), Eb_caH_5 (d), Eb_caH_6 (e), Eb_caH_7 (f), Eb_caS_1 (g), Eb_caS_2 (h), Eb_caS_3 (i) e Eb_caS_4 (j) (DMSO- d_6 , 300 MHz).	86
Figura 33. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos obtidos em PDB e Czapek dos endófitos isolados dos frutos maduros de <i>E. brasiliensis</i> : Eb_frmH_1 (a), Eb_frmH_2 (b), Eb_frmH_3 (c), Eb_frmH_4 (d), Eb_frmH_5 (e) e Eb_frmH_6 (f) (DMSO- d_6 , 300 MHz).	87
Figura 34. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos obtidos em PDB e Czapek do endófito isolado de folhas de <i>E. brasiliensis</i> : Eb_fIH_1 (DMSO- d_6 , 300 MHz).....	87
Figura 35. Estrutura do ácido nitropropiónico.	88

Figura 36. Produção de xilanase (a), β -xilosidase (b), endoglucanase (c), β -glicosidase (d), amilase (e) e pectinase (f) por diferentes isolados fúngicos, em FES, tendo bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como substratos (misturas a 1:1 m/m).....	92
Figura 37. Cromatogramas do extrato bruto de <i>Xylaria cubensis</i> em PDB (escala ampliada).....	95
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de <i>X. cubensis</i> em PDB (escala ampliada) (DMSO- d_6 , 300 MHz).	96
Figura 39. Cromatogramas do extrato bruto de <i>Colletotrichum</i> sp. em PDB (escala ampliada).....	96
Figura 40. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de <i>Colletotrichum</i> sp. em PDB (escala ampliada) (DMSO- d_6 , 300 MHz).....	96
Figura 41. Cromatogramas do extrato bruto de <i>Diaporthe</i> sp. em PDB (escala ampliada).....	97
Figura 42. . Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de <i>Diaporthe</i> sp. em PDB (escala ampliada) (DMSO- d_6 , 300 MHz).	97
Figura 43. Comparação dos cromatogramas dos extratos brutos de <i>Xylaria cubensis</i> , <i>Colletotrichum</i> sp. e <i>Diaporthe</i> sp. em PDB (escala ampliada) a $\lambda= 254$ nm.....	97
Figura 44. Comparação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos de <i>Xylaria cubensis</i> , <i>Colletotrichum</i> sp. e <i>Diaporthe</i> sp. em PDB (escala ampliada) (DMSO- d_6 , 300 MHz).	98
Figura 45. Inibição/estímulo do crescimento dos coleótilos de trigo sob a atividade dos extratos brutos em escala ampliada (PDB).	99
Figura 46. Substâncias produzidas pelo fungo endofítico <i>X. cubensis</i> cultivado em PDB.....	101
Figura 47. Estrutura da substância 1 (Adenosina).....	102
Figura 48. Principais correlações de HMBC da substância 1	103
Figura 49. Espectro de RMN de ^1H da substância 1 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	104
Figura 50. Mapa de contorno de HSQC da substância 1 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	105
Figura 51. Mapa de contorno de HMBC da substância 1 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	105
Figura 52. Mapa de contorno de COSY da substância 1 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	106
Figura 53. Espectro de Massas da substância 1	106
Figura 54. Estrutura da substância 2 (<i>ciclo</i> (Pro-Tyr)).	107
Figura 55. Principais correlações de COSY e HMBC da substância 2	108
Figura 56. Espectro de RMN de ^1H da substância 2 (DMSO- d_6 , 600 MHz).....	109

Figura 57. Mapa de contorno de HSQC da substância 2 (DMSO-d ₆ , 600 MHz).....	110
Figura 58. Mapa de contorno de HMBC da substância 2 (DMSO-d ₆ , 600 MHz).....	110
Figura 59. Mapa de contorno de COSY da substância 2 (DMSO-d ₆ , 600 MHz).....	111
Figura 60. Estrutura das substâncias 3 (<i>ciclo</i> (Pro-Val)) (a) e 4 (<i>ciclo</i> (Val-Tyr)) (b)..	111
Figura 61. Principais correlações de COSY e HMBC da substância 3	112
Figura 62. Principais correlações de COSY e HMBC da substância 4	113
Figura 63. Espectro de RMN de ¹ H da substância 3 e 4 (DMSO-d ₆ , 600 MHz).....	114
Figura 64. Mapa de contorno de HSQC da substância 3 e 4 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)..	115
Figura 65. Mapa de contorno de HMBC da substância 3 e 4 (DMSO-d ₆ , 600 MHz).	115
Figura 66. Mapa de contorno de COSY da substância 3 e 4 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)..	116
Figura 67. Estrutura da substância 5 (5-carbóxi-6-hidroxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina).	116
Figura 68. Principais correlações de COSY e HMBC da substância 5	117
Figura 69. Espectro de RMN de ¹ H das substâncias 5 (CH ₃ OH-d ₄ , 600 MHz).	119
Figura 70. Mapa de contorno de HSQC da substância 5 (CH ₃ OH-d ₄ , 600 MHz).....	120
Figura 71. Mapa de contorno de HMBC da substância 5 (CH ₃ OH-d ₄ , 600 MHz).....	120
Figura 72. Mapa de contorno de COSY da substância 5 (CH ₃ OH-d ₄ , 600 MHz).....	121
Figura 73. Estrutura da substância 6 (7-hidroximeleína).	121
Figura 74. Principais correlações de COSY e HMBC da substância 6	122
Figura 75. Espectro de RMN de ¹ H da substância 6 (CH ₃ OH-d ₄ , 600 MHz).....	123
Figura 76. Mapa de contorno de HSQC da substância 6 (CH ₃ OH-d ₄ , 600 MHz).....	124
Figura 77. Mapa de contorno de HMBC da substância 6 (CH ₃ OH-d ₄ , 600 MHz).	124
Figura 78. Mapa de contorno de COSY da substância 6 (CH ₃ OH-d ₄ , 600 MHz).....	125
Figura 79. Estrutura da substância 7 (citocalasina D).....	125
Figura 80. Principais correlações de COSY e HMBC da substância 7	126
Figura 81. Inibição/estímulo do crescimento dos coleóptilos de trigo sob a atividade da citocalasina D.	128
Figura 82. Espectro de RMN de ¹ H da substância 7 (CH ₃ OH-d ₄ , 300 MHz).	129
Figura 83. Espectro de RMN de ¹³ C da substância 7 (CH ₃ OH-d ₄ , 300 MHz).	130
Figura 84. Mapa de contorno de HMBC da substância 7 (CH ₃ OH-d ₄ , 300 MHz).	131
Figura 85. Mapa de contorno de HSQC da substância 7 (CH ₃ OH-d ₄ , 300 MHz).....	132
Figura 86. Mapa de contorno de COSY da substância 7 (CH ₃ OH-d ₄ , 300 MHz).....	132
Figura 87. Estrutura da substância 8 (citocalasina C).....	133
Figura 88. Principais correlações de COSY e HMBC da substância 8	133

Figura 89. Espectro de RMN de ^1H da substância 8 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	135
Figura 90. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 8 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	136
Figura 91. Mapa de contorno de HSQC da substância 8 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	137
Figura 92. Mapa de contorno de HMBC da substância 8 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	137
Figura 93. Mapa de contorno de COSY da substância 8 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	138
Figura 94. Espectro de Massas da substância 8	138
Figura 95. Substâncias produzidas pelo fungo endofítico <i>Diaporthe</i> sp. cultivado em PDB.	139
Figura 96. Estrutura da substância 9 (Uracila).	140
Figura 97. Espectro de RMN de ^1H da substância 9 (DMSO- d_6 , 300 MHz).	141
Figura 98. Estrutura da substância 10 (Tirosol).	141
Figura 99. Espectro de RMN de ^1H da substância 10 (DMSO- d_6 , 300 MHz).	142
Figura 100. Estrutura da substância 11 (Zygosporina D).	143
Figura 101. Principais correlações de COSY e HMBC da substância 11	143
Figura 102. Espectro de RMN de ^1H da substância 11 (CDCl_3 , 600 MHz).	145
Figura 103. Mapa de contorno de HMBC da substância 11 (CDCl_3 , 600 MHz).	146
Figura 104. Mapa de contorno de HSQC da substância 11 (CDCl_3 , 600 MHz).	147
Figura 105. Mapa de contorno de COSY da substância 11 (CDCl_3 , 600 MHz).	147
Figura 106. Espectro de Massas da substância 11	148
Figura 107. Estrutura da substância 12 (5-isobutil-3,4-dimetil-1H-pirrol-2(5H)-ona).	148
Figura 108. Estrutura parcial A	149
Figura 109. Estrutura parcial B	149
Figura 110. União das estruturas parciais A e B.	149
Figura 111. Principais correlações de COSY e HMBC da substância 12	150
Figura 112. Espectro de RMN de ^1H da substância 12 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	152
Figura 113. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 12 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	153
Figura 114. Mapa de contorno de HSQC da substância 12 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	154
Figura 115. Mapa de contorno de HMBC da substância 12 (DMSO- d_6 , 600 MHz)...	154
Figura 116. Mapa de contorno de COSY da substância 12 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	155
Figura 117. Espectro de Massas da substância 12	155
Figura 118. Estrutura da substância 13 (Alternariol).	156
Figura 119. Principais correlações de COSY e HMBC da substância 13	156
Figura 120. Espectro de RMN de ^1H da substância 13 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	158

Figura 121. Mapa de contorno de HSQC da substância 13 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)....	159
Figura 122. Mapa de contorno de HMBC da substância 13 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)...	159
Figura 123. Espectro de Massas da substância 13	160
Figura 124. Substâncias produzidas pelo fungo endofítico <i>Colletotrichum</i> sp. cultivado em PDB.	161
Figura 125. Estrutura da substância 14 <i>ciclo</i> (Pro-Ile).	162
Figura 126. Espectro de RMN de ¹ H da substância 14 (DMSO-d ₆ , 600 MHz).	163
Figura 127. Mapa de contorno de HSQC da substância 14 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)....	163
Figura 128. Estrutura da substância 15 <i>ciclo</i> (Pro-Leu).....	164
Figura 129. Principais correlações de COSY e HMBC da substância 15	164
Figura 130. Espectro de RMN de ¹ H da substância 15 (DMSO-d ₆ , 600 MHz).	166
Figura 131. Mapa de contorno de HSQC da substância 15 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)....	167
Figura 132. Mapa de contorno de HMBC da substância 15 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)...	167
Figura 133. Mapa de contorno de COSY da substância 15 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)....	168
Figura 134. Estrutura da substância 16 (N-(2-feniletíl) acetamida).	169
Figura 135. Principais correlações de COSY e HMBC da substância 16	170
Figura 136. Espectro de RMN de ¹ H da substância 16 (DMSO-d ₆ , 600 MHz).	171
Figura 137. Mapa de contorno de HSQC da substância 16 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)....	172
Figura 138. Mapa de contorno de HMBC da substância 16 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)...	172
Figura 139. Mapa de contorno de COSY da substância 16 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)....	173
Figura 140. Espectro de Massas da substância 16	173
Figura 141. Estrutura da substância 17 (N-acetilriptamina).	174
Figura 142. Principais correlações de COSY e HMBC da substância 17	175
Figura 143. Espectro de RMN de ¹ H da substância 17 (DMSO-d ₆ , 600 MHz).	176
Figura 144. Mapa de contorno de HSQC da substância 17 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)....	177
Figura 145. Mapa de contorno de HMBC da substância 17 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)...	177
Figura 146. Mapa de contorno de COSY da substância 17 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)....	178
Figura 147. Espectro de Massas da substância 17	178
Figura 148. Estrutura da substância 18 (metanoato de 2-hidroxibutíla 3-indol).....	179
Figura 149. Principais correlações de COSY e HMBC da substância 18	180
Figura 150. Espectro de RMN de ¹ H da substância 18 (DMSO-d ₆ , 600 MHz).	181
Figura 151. Mapa de contorno de HSQC da substância 18 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)....	182
Figura 152. Mapa de contorno de HMBC da substância 18 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)...	182
Figura 153. Mapa de contorno de COSY da substância 18 (DMSO-d ₆ , 600 MHz)....	183

Figura 154. Espectro de Massas: molécula protonada ($[M+H]^+$) e principais fragmentos da substância 18	183
Figura 155. Estrutura da substância 19 <i>ciclo</i> (Pro-Phe).....	184
Figura 156. Principais correlações de COSY e HMBC da substância 19	184
Figura 157. Espectro de RMN de 1H da substância 19 (DMSO- d_6 , 600 MHz).	186
Figura 158. Mapa de contorno de HSQC da substância 19 (DMSO- d_6 , 600 MHz)....	187
Figura 159. Mapa de contorno de HMBC da substância 19 (DMSO- d_6 , 600 MHz)...	187
Figura 160. Mapa de contorno de COSY da substância 19 (DMSO- d_6 , 600 MHz)....	188
Figura 161. Co-cultivos realizados entre: <i>Xylaria cubensis</i> , <i>Diaporthe</i> sp. e <i>Colletotrichum</i> sp.....	190
Figura 162. Cromatogramas dos extratos de: <i>Xylaria cubensis</i> (a), <i>Diaporthe</i> sp. (b) e co-cultivo (c).....	192
Figura 163. Cromatogramas de íons extraídos para m/z 497-498 (-) dos extratos de: <i>Xylaria cubensis</i> (a), <i>Diaporthe</i> sp. (b) e co-cultivo (c).....	192
Figura 164. Cromatogramas de íons extraídos para m/z 543-544 (-) dos extratos de: <i>Xylaria cubensis</i> (a), <i>Diaporthe</i> sp. (b) e co-cultivo (c).....	193
Figura 165. Espectro de massas (alta resolução), referente aos picos produzidos pelo co-cultivo e propostas de fórmulas moleculares.....	194
Figura 166. Propostas geradas pelo banco AntiBase aos metabólitos de m/z 497,2776 $[M-H]^-$	194
Figura 167. Propostas geradas pelo banco AntiBase aos metabólitos de m/z 543,2831 $[M-H]^-$	195
Figura 168. Fragmentação do metabólito de m/z 497,2776 $[M-H]^-$	196
Figura 169. Fragmentação do metabólito de m/z 543,2831 $[M-H]^-$	196
Figura 170. Propostas geradas pelo Dicionário de Produtos Naturais aos metabólitos com a massa molecular na faixa de 498 a 499 $g\ mol^{-1}$	197
Figura 171. Propostas geradas pelos Bancos de Dados Metlin e Massbank aos metabólitos de m/z 543,2831 $[M-H]^-$	198
Figura 172. Gráfico de <i>scores</i> da PLS-DA normalizado e centrado na média: PC1xPC2.	199
Figura 173. Gráfico de <i>scores</i> da PLS-DA normalizado e centrado na média: PC1xPC3.	199
Figura 174. Gráfico de <i>scores</i> da PLS-DA normalizado e centrado na média: PC1xPC2.	202

Figura 175. Gráfico de scores da PCA normalizado: PC1xPC2.	203
Figura 176: LC-MS (baixa resolução) dos extratos na presença do modulador SAHA: Diap_500 µM (a), do Diap_controle (b); m/z 265,2 [M+H] ⁺ (c) e m/z 271,2 [M+H] ⁺ (d).	206
Figura 177: LC-MS (alta resolução) dos extratos na presença do modulador SAHA: Diap_500 µM (a), do Diap_controle (b); m/z 265,0 [M+H] ⁺ (c) e m/z 271,0 [M+H] ⁺ (d).	207
Figura 178. Estrutura do ácido hidroxâmico suberoilânilida (SAHA).	207
Figura 179. Espectro de RMN de ¹ H do Pico 1_LC-SPE-TT (SAHA) (DMSO-d ₆ , 600 MHz).	208
Figura 180. Espectro de massas do Pico 1_LC-SPE-TT (SAHA).	208
Figura 181. Estrutura da substância 20 (N-feniloctanodiamida).	209
Figura 182. Espectro de RMN de ¹ H do Pico 2_LC-SPE-TT (DMSO-d ₆ , 600 MHz).	210
Figura 183. Espectros de comparação de RMN de ¹ H na região de 2,05-2,40 ppm, referente aos Pico 1_LC-SPE-TT e Pico 2_LC-SPE-TT (DMSO-d ₆ , 600 MHz).	210
Figura 184. Espectro de massas do Pico 2_LC-SPE-TT (Sub 20).	211

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Meios de cultura utilizados para o cultivo dos fungos endofíticos.....	57
Tabela 2. Equipamentos para o desenvolvimento do projeto.....	60
Tabela 3. Tempo de esterilização das folhas, frutos e ramos.	61
Tabela 4. Dados dos fracionamentos em coluna aberta dos extratos AcOEt (escala ampliada).....	64
Tabela 5. Massas das frações obtidas do fracionamento dos extratos AcOEt (escala ampliada).....	64
Tabela 6. Massa dos extratos brutos obtida do cultivo dos endófitos dos caules, folhas e frutos maduros em PDB e Czapek (escala reduzida).....	82
Tabela 7. Avaliação dos extratos brutos frente ao fitopatógeno <i>C. sphaerospermum</i> e inibição da AChE.....	89
Tabela 8. Avaliação dos extratos brutos em PDB frente às células tumorais.	90
Tabela 9. Avaliação dos extratos brutos em Czapek frente às células tumorais.	91
Tabela 10. Avaliação dos extratos brutos em escala ampliada (PDB) frente ao fitopatógeno <i>C. sphaerospermum</i> e inibição da AChE.....	98
Tabela 11. Avaliação dos extratos brutos em escala ampliada (PDB) frente às células tumorais.....	98
Tabela 12. Médias de crescimento dos coleóptilos sob o efeito dos extratos brutos de <i>Diaporthe</i> sp, <i>Colletotrichum</i> sp. e <i>X. cubensis</i> e do herbicida comercial GOAL®	100
Tabela 13. Dados de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) de 1 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).	103
Tabela 14. Dados de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) de 2 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).	108
Tabela 15. Dados de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ , 600 MHz) de 3 e 4 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).....	113
Tabela 16. Dados de RMN de ¹ H (CH ₃ OH-d ₄ , 600 MHz) de 5 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).	118
Tabela 17. Dados de RMN de ¹ H (CH ₃ OH-d ₄ , 600 MHz) de 6 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).	122
Tabela 18. Dados de RMN de ¹ H (CH ₃ OH-d ₄ , 300 MHz) de 7 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).	127

Tabela 19. Médias de crescimento dos coleóptilos sob o efeito da citocalasina D e do herbicida comercial GOAL®.	128
Tabela 20. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) de 8 (δ em ppm e J em Hz).	134
Tabela 21. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) de 9 (δ em ppm e J em Hz).	140
Tabela 22. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) de 10 (δ em ppm e J em Hz).	142
Tabela 23. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de 11 (δ em ppm e J em Hz)...	144
Tabela 24. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) de 12 (δ em ppm e J em Hz).	151
Tabela 25. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) de 13 (δ em ppm e J em Hz).	157
Tabela 26. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) de 14 (δ em ppm e J em Hz).	162
Tabela 27. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) de 15 (δ em ppm e J em Hz).	165
Tabela 28. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 600 MHz) de 16 (δ em ppm e J em Hz).....	170
Tabela 29. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 600 MHz) de 17 (δ em ppm e J em Hz).....	175
Tabela 30. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 600 MHz) de 18 (δ em ppm e J em Hz).....	180
Tabela 31. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) de 19 (δ em ppm e J em Hz).	185
Tabela 32. Massa dos extratos brutos obtida dos co-cultivos e monoculturas (PDA) dos endófitos <i>X. cubensis</i> , <i>Diaporthe</i> sp. e <i>Colletotrichum</i> sp.	191
Tabela 33. Massa dos extratos brutos obtida dos co-cultivos e monoculturas (PDB) dos endófitos <i>X. cubensis</i> , <i>Diaporthe</i> sp. e <i>Colletotrichum</i> sp.	200
Tabela 34. Avaliação dos extratos dos co-cultivos frente aos fitopatógenos <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i> (400 ug) e inibição da AChE.....	201
Tabela 35. Massa dos extratos brutos obtida do cultivo de <i>Xylaria cubensis</i> na presença dos moduladores SAHA e AZA e do controle.	205

Tabela 36. Massa dos extratos brutos obtida do cultivo de *Diaporthe* sp. na presença dos moduladores SAHA e AZA e do controle. 205

Tabela 37. Massa dos extratos brutos obtida do cultivo de *Colletotrichum* sp. na presença dos moduladores SAHA e AZA e do controle. 205

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e SÍMBOLOS

AChE	Enzima Acetilcolinesterase
HPLC	High performance liquid chromatography
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
UV	Ultravioleta
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
C18	Sílica gel de fase reversa tipo Octadecil silano
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
ESI-EM	Espectrometria de massas – Ionização por <i>electrospray</i>
LC-MS	Chromatography Liquid-Spectrometry Mass
TOF	Time of Flight (Tempo de voo)
SPE-TT	Solid Phase Extraction-Transfer Tube
Ext.	Extrato
grad.	Gradiente
min.	Minutos
nm	Nanômetro
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
HMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC	Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
COSY	Correlation Spectroscopy
HOMODEC	Homonuclear Decoupling
MHz/Hz	Megahertz / Hertz
ppm	Partes por milhão
TMS	Tetrametilsilano
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
pág.	Página
Phe	Fenilalanina
Tyr	Tirosina

Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Pro	Prolina
Val	Valina
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
Sub	Substância
SAHA	Ácido hidroxâmico suberoilânilida
AZA	5-azacitidina
FES	Fermentação em estado sólido
HAT	Histona acetiltransferase
HDAC	Histona desacetilase
DNMT	DNA metiltransferase
Xyl	<i>Xylaria cubensis</i>
Diap	<i>Diaporthe</i> sp.
Colle	<i>Colletotrichum</i> sp.
PCA	Análise de componentes principais
PLS-DA	Análise discriminante com calibração multivariada
PLS	Mínimos Quadrados Parciais
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
μ	Micro
$[\alpha]_D$	Rotação Óptica
$[M+H]^+$	Molécula protonada
$[M-H]^-$	Molécula desprotonada
$[M+Na]^+$	Molécula sodiada
J	Constante de acoplamento
s	Singleto
sl	Singleto Largo
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
t	Tripleto
m	Multipleto
m/z	Relação massa-carga

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	33
1.1 Fungos: uma visão geral	33
1.2 Fungos Endofíticos	34
1.3 Espécie vegetal hospedeira: <i>Eugenia brasiliensis</i>	37
1.4 Potencial biotecnológico dos endófitos	39
<i>1.4.1 Metabólitos bioativos</i>	<i>39</i>
<i>1.4.2 Enzimas</i>	<i>42</i>
1.5 Gêneros: <i>Xylaria</i>, <i>Diaporthe</i> e <i>Colletotrichum</i>	44
1.6 Co-cultivo	46
1.7 Epigenética	48
2. OBJETIVOS GERAIS.....	55
2.1 Objetivos Específicos.....	55
3. MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1 Materiais.....	57
<i>3.1.1 Meios de cultivo</i>	<i>57</i>
<i>3.1.2 Solventes</i>	<i>57</i>
<i>3.1.3 Reagentes.....</i>	<i>57</i>
<i>3.1.4 Cromatografia em Coluna.....</i>	<i>57</i>
<i>3.1.5 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).....</i>	<i>58</i>
<i>3.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD).....</i>	<i>58</i>
<i>3.1.7 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de ¹H e ¹³C)..</i>	<i>58</i>
<i>3.1.8 Espectrometria de Massas</i>	<i>58</i>
<i>3.1.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas.....</i>	<i>59</i>
<i>3.1.10 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a SPE-TT.....</i>	<i>59</i>
<i>3.1.11 Análise de rotação óptica [α]^D₂₅.....</i>	<i>59</i>
<i>3.1.12 Equipamentos.....</i>	<i>60</i>
3.2 Métodos	60
<i>3.2.1 Obtenção da linhagem fúngica</i>	<i>60</i>
<i>3.2.2 Obtenção dos extratos brutos dos endófitos em PDB e Czapek (escala reduzida)</i>	<i>62</i>

3.2.3 Obtenção dos extratos brutos de <i>Xylaria cubensis</i> , <i>Diaporthe</i> sp. e <i>Colletotrichum</i> sp. em PDB (escala ampliada)	63
3.2.4 Fracionamento dos extratos brutos em PDB (escala ampliada).....	63
3.2.5 Isolamento dos metabólitos produzidos por <i>Xylaria cubensis</i> (Eb_caH_5)	64
3.2.6 Isolamento dos metabólitos produzidos por <i>Diaporthe</i> sp. (Eb_caS_4).....	66
3.2.7 Isolamento dos metabólitos produzidos por <i>Colletotrichum</i> sp. (Eb_frmH_1)....	67
3.2.8 Co-cultivo	69
3.2.8.1 Co-cultivo em meio sólido (PDA)	69
3.2.8.2 Co-cultivo em meio líquido (PDB).....	70
3.2.9 Epigenética	71
3.2.10 Ensaio Biológico	73
3.3.10.1 Avaliação da atividade antifúngica ¹	73
3.3.10.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica ¹	73
3.3.10.3 Avaliação da atividade antitumoral (citotoxicidade) ²	73
3.3.10.4 Avaliação da atividade fitotóxica sobre o crescimento de coleótilos de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.) ³	74
3.2.11 Prospecção Enzimática	74
3.2.11.1 Xilanase	76
3.2.11.2 β -xilosidase	76
3.2.11.3 Endoglucanase	76
3.2.11.4 β -glicosidase	76
3.2.11.5 Pectinase	77
3.2.11.6 Amilase	77
RESULTADOS E DISCUSSÕES	78
4. Isolamento de fungos endofíticos associados à <i>Eugenia brasiliensis</i> e prospecção química, biológica e enzimática dos extratos brutos produzidos pelos fungos endofíticos isolados.....	80
4.1 Fungos isolados do caule, dos frutos maduros e das folhas	80
4.2. Prospecção química dos fungos endofíticos isolados.....	82
4.2.1 Rendimento dos extratos brutos obtidos pelo cultivo em escala reduzida	82
4.2.2 Perfil cromatográfico dos extratos brutos obtidos em PDB e Czapek (escala reduzida).....	83
4.2.3 Perfil químico (RMN de ¹ H) dos extratos brutos obtidos em PDB e Czapek (escala reduzida).....	85

4.2.4 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos (escala reduzida) produzidos pelos fungos endofíticos isolados dos caules, frutos maduros e folhas.....	88
4.2.4.1 Ensaio antifúngico e anticolinesterásico.....	88
4.2.4.2 Ensaio antitumoral.....	90
4.2.5 Prospecção enzimática.....	91
5. Estudo dos metabólitos de <i>Xylaria cubensis</i>, <i>Diaporthe</i> sp. e <i>Colletotrichum</i> sp..	95
5.1 Avaliação do perfil químico e cromatográfico dos extratos brutos de <i>X. cubensis</i>, <i>Diaporthe</i> sp. e <i>Colletotrichum</i> sp. em escala ampliada (PDB).....	95
5.2 Avaliação do perfil biológico dos extratos brutos de <i>X. cubensis</i>, <i>Diaporthe</i> sp. e <i>Colletotrichum</i> sp. em escala ampliada (PDB).....	98
5.2.1 Avaliação da atividade fitotóxica sobre o crescimento de coleóptilos de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.) ³	99
5.3 Identificação estrutural das substâncias produzidas por <i>Xylaria cubensis</i>	101
5.3.1 Identificação estrutural da substância 1.....	102
5.3.2 Identificação estrutural da substância 2.....	107
5.3.3 Identificação estrutural das substâncias 3 e 4.....	111
5.3.4 Identificação estrutural da substância 5.....	116
5.3.5 Identificação estrutural da substância 6.....	121
5.3.6 Identificação estrutural da substância 7.....	125
5.3.7 Identificação estrutural da substância 8.....	133
5.4 Identificação estrutural das substâncias produzidas por <i>Diaporthe</i> sp.....	139
5.4.1 Identificação estrutural da substância 9.....	140
5.4.2 Identificação estrutural da substância 10.....	141
5.4.3 Identificação estrutural da substância 11.....	143
5.4.4 Identificação estrutural da substância 12.....	148
5.4.5 Identificação estrutural da substância 13.....	156
5.5 Identificação estrutural das substâncias produzidas por <i>Colletotrichum</i> sp..	161
5.5.1 Identificação estrutural da substância 14.....	162
5.5.2 Identificação estrutural da substância 15.....	164
5.5.3 Identificação estrutural da substância 16.....	169
5.5.4 Identificação estrutural da substância 17.....	174
5.5.5 Identificação estrutural da substância 18.....	179
5.5.6 Identificação estrutural da substância 19.....	184

6. Co-cultivo e epigenética: <i>Xylaria cubensis</i>, <i>Diaporthe</i> sp. e <i>Colletotrichum</i> sp.	190
6.1 Co-cultivo: <i>Xylaria cubensis</i>, <i>Diaporthe</i> sp. e <i>Colletotrichum</i> sp.	190
6.1.1 Co-cultivo em meio sólido (PDA)	191
6.1.1.1 Análise multivariada dos dados de LC-MS do co-cultivo em PDA	198
6.1.2 Co-cultivo em meio líquido (PDB)	200
6.1.2.1 Atividade biológica do co-cultivo em meio líquido (PDB)	201
6.1.2.2 Análise multivariada dos dados de LC-MS do co-cultivo em PDB	201
6.1.2.3 Análise multivariada dos dados de RMN de ¹ H do co-cultivo em PDB	202
6.2 Epigenética: <i>Xylaria cubensis</i>, <i>Diaporthe</i> sp. e <i>Colletotrichum</i> sp.	204
6.2.1 Cultivo dos endófitos na presença dos moduladores	204
6.2.2 Isolamento dos metabólitos produzidos na presença do modulador SAHA	207
7. CONCLUSÕES	213
REFERÊNCIAS	215

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fungos: uma visão geral

Os fungos são organismos heterotróficos, ou seja, adquirem os nutrientes no meio ambiente, parasitando outros organismos vivos ou pela decomposição de matéria orgânica. Os fungos podem infectar diferentes hospedeiros, levando-os à morte ou desenvolvendo uma relação simbiótica com os mesmos (MAUSETH, 2003; SCHARDL, 2004). Os fungos constituem o segundo maior grupo de espécies sobre a Terra, estimados em 5,1 milhões de espécies existentes, sendo que apenas 98 mil foram descritas (BLACKWELL, 2011; MOORE; ROBSON; TRINCI, 2011). Os fungos habitam praticamente todos os nichos ecológicos da Terra e possuem a capacidade de utilizar vários substratos para o seu desenvolvimento. Fungos, durante o seu desenvolvimento, utilizam diferentes rotas biossintéticas que levam à produção de inúmeros metabólitos secundários, além da produção de enzimas de interesse comercial (ZAIN et al., 2014).

O estudo sistemático de metabólitos secundários oriundos de fungos iniciou-se em 1922 por Harold Raistrick, que caracterizou mais de 200 metabólitos fúngicos (RAISTRICK, 1950). No entanto, a atenção voltou-se aos metabólitos produzidos por fungos somente após a descoberta e desenvolvimento da penicilina. As indústrias farmacêuticas investiram em programas de triagem e por volta de 1950 descobriram-se valiosos produtos microbianos com aplicações farmacêuticas. Deste modo, a busca por metabólitos secundários bioativos continuou ininterruptamente, e milhares de compostos que inibem o crescimento de bactérias, fungos, protozoários, parasitas, insetos, vírus e células tumorais foram descobertos (ZAIN et al., 2014). Destes, dos que foram estudados do ponto de vista químico e biológico, foram isolados uma grande variedade de micromoléculas bioativas, que incluem desde substâncias tóxicas como aflatoxinas, ocratoxinas e citreoviridinas a substâncias com aplicações terapêuticas (GUNATILAKA, 2006; MILLER; TRENHOLM, 1991). Dentre os medicamentos de maior repercussão terapêutica para doenças infecciosas destacam-se os antibióticos β -lactâmicos das classes de penicilina e cefalosporina, como os exemplos mais conhecidos de produtos de fungos. A atorvastatina (Lipitor) é um dos medicamentos mais vendidos, um hipocolesterolêmico de origem microbiana, que vendeu mais de (US) \$ 11 bilhões em 2004 e, se incluirmos as vendas da Pfizer e Astellas Pharma no período de 2004 a 2014, as vendas estão na faixa de (US) \$12-14 bilhões de dólares dependendo do ano (NEWMAN; CRAGG, 2015).

Substâncias isoladas de fungos são empregadas também no combate de pragas, que consomem um grande percentual da produção agrícola mundial, calculado em bilhões de dólares em prejuízos. Esses metabólitos atuam como agroquímicos naturais, como por exemplo, os alcaloides indólicos, derivados de pirrolizidinas, quinazolininas e criptocina (antimicótico), que são inibidores de fitopatógenos (insetos, fungos, herbívoros) (ZHANG; SONG; TAN, 2006).

Várias vantagens são observadas quanto à utilização de fungos na obtenção de produtos naturais bioativos em relação a outras fontes naturais, pois são recursos renováveis e a sua produção em escala ampliada pode ser realizada usando a tecnologia existente, como variação do meio e otimização das condições de cultivo. Como exemplo, a manipulação no meio de cultura do *Penicillium notatum*, resultou em um aumento de 6000 vezes na produção da penicilina (DEMAIN, 2000). Outra vantagem está relacionada com a conservação ambiental uma vez que requerem uma única e pequena remoção de material vivo (BILLS, 1995).

Dentro deste contexto os fungos endofíticos representam um significativo reservatório de diversidade genética e uma fonte importante para a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos (GUNATILAKA, 2006).

1.2 Fungos Endofíticos

Os micro-organismos como fungos, bactérias e vírus tem atraído a atenção de pesquisadores durante séculos, pela percepção da importância destes para os humanos, animais e plantas, apesar dos efeitos negativos, os fungos são responsáveis pela produção de vitaminas, antibióticos, bem como utilizados em processos fermentativos e de biotransformação (IÓCA; ALLARD; BERLINCK, 2014). De 23.000 compostos ativos (antimicrobianos, citotóxicos, antivirais e imunossupressores) a partir de micro-organismos, 42% são produzidos por fungos e 32% por actinomicetos. 12% dos antibióticos são produzidos por bactérias não filamentosas e cerca de 20% são produzidos por fungos filamentosos (DEMAIN, 2014).

Produtos naturais bioativos isolados de fungos endófitos associados a plantas superiores estão atraindo a atenção de químicos e biólogos devido ao aumento constante de publicações dedicadas à este tema nos últimos anos (113 artigos de pesquisa sobre metabólitos secundários de fungos endófitos no período de 2008-2009, 69 em 2006-2007, 36 em 2004-2005, 14 em 2002 - 2003, e 18 em 2000-2001) (ALY et al., 2010).

Fungos endófitos (*endon* = no interior; *phyton* = planta) são micro-organismos que colonizam assintomaticamente o interior de plantas, sendo encontrados em órgãos vegetais como as folhas, caule, frutos, sementes e raízes, podendo habitar a planta por toda vida, sendo transmitidos, em alguns casos, para futuras gerações através da semente do hospedeiro (GUNATILAKA, 2006; RODRIGUEZ et al., 2009; TAN; ZOU, 2001; KUSARI; PANDEY; SPITELLER, 2013). Azevedo e Araújo (2007) definem como micro-organismos endófitos todos aqueles que são cultiváveis ou não e que habitam o interior de vegetais sem prejudicar o seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais.

Normalmente, os endófitos penetram nas plantas por aberturas naturais (estômatos e hidatódios), feridas, também pela produção de enzimas hidrolíticas, em especial as celulases, que facilitam sua penetração. Após a entrada na planta hospedeira, os endófitos podem colonizar os espaços inter ou intracelulares e em vasos condutores com xilema e floema (AZEVEDO; ESPOSITO, 2010).

As interações estabelecidas pelos endófitos podem variar desde o mutualismo (endófito e planta hospedeira obtém vantagens) até o parasitismo (somente o endófito é beneficiado). Na associação mutualística o endófito recebe nutrientes e proteção da planta hospedeira, enquanto o endófito sintetiza metabólitos bioativos, auxiliando nas respostas de defesa da planta, quer por inibição de enzimas ou por compostos de sinalização (BAE et al., 2009; KUSARI, 2015). A visão mutualística da interação fungo endofítico-planta tem sido associada à endofíticos de gramíneas de regiões temperadas. Esta visão foi sustentada principalmente por estudos com endofíticos do gênero *Neotyphodium*, os quais infectam gramíneas, protegendo-as contra herbívoros pela produção de alcaloides (BULTMAN; BELL, 2003). Alguns relatos sugerem um complexo sistema de comunicação envolvendo cruzamento de informações genéticas entre endófitos e sua planta hospedeira durante a formação da associação. Além disso, os genes podem regular a produção de metabólitos secundários bioativos pelos endófitos e essas interações podem induzir à expressão de genes que conferem resistência as plantas hospedeiras (BAILEY et al., 2006). Como citado, os fungos endofíticos podem influenciar direta ou indiretamente na fisiologia da planta hospedeira, reduzindo ou prevenindo o stress. Em plantas sensíveis a seca, os fungos endofíticos, além de armazenarem e secretarem açúcar e álcool, também reduzem a transpiração das folhas, evitando assim o stress hídrico da planta (ZHANG; SONG; TAN, 2006).

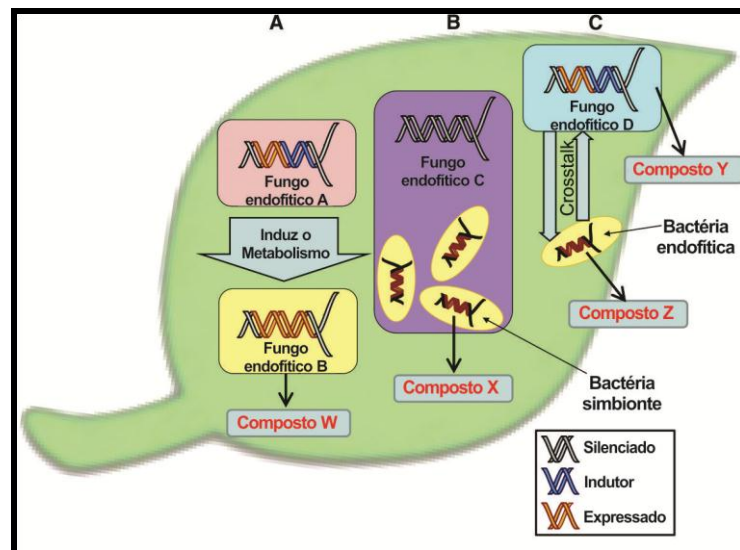
Uma pesquisa com endófitos isolados da planta *Vinca minor* identificou, em uma linhagem isolada do caule, o alcaloide vincamina, um estimulante cerebral e vasodilatador,

sendo este metabólito encontrado primeiramente no caule e folhas da planta hospedeira (YIN; SUN, 2011). Estes fatos evidenciam as interações endófito-hospedeiro e um possível cruzamento de informações genéticas entre os organismos envolvidos.

No entanto, este dogma de interação mutualística entre fungos endofíticos e plantas está sendo questionado, pois a adaptação em seu hospedeiro não depende somente da presença do endófito, mas também do genótipo da planta e do endófito, de vários fatores abióticos e de outras espécies que interagem com o hospedeiro direta ou indiretamente (FAETH, 2002; MULLER; KRAUSS, 2005). Pode-se citar algumas razões do questionamento deste dogma como conflitos entre o hospedeiro e a reprodução dos fungos endofíticos, os custos energéticos de abrigar o endófito e a supressão do sistema imunológico do hospedeiro para que o endófito sobreviva e com isso aumente a suscetibilidade a outros fungos patógenos. Estes fatores podem desestabilizar a simbiose e conduzir mudanças na reprodução do fungo e do hospedeiro e nas interações endófito-planta (SAIKKONEN et al., 2004).

Outros autores sugerem que a colonização assintomática é uma balança de antagonismo, onde ocorre um equilíbrio entre a virulência do fungo endofítico e as respostas de defesa da planta. Esta balança é dinâmica e pode ser alterada sob condições de *stress* do hospedeiro ou alterações fisiológicas em um dos organismos envolvidos (SCHULZ et al., 2005). Recentemente, revelou-se que a interação endófito-planta pode não ser apenas o equilíbrio entre a virulência e as respostas de defesa, mas uma interação mais complexa. Por exemplo, o endófito *F. solani*, isolado de *C. acuminata*, que produz o anticancerígeno camptotecina (KUSARI et al., 2009), poderia também produzir os precursores da camptotecina. No entanto, a enzima envolvida na biossíntese deste composto está presente somente na planta hospedeira (KUSARI; ZÜHLKE, SPITELLER, 2011). Então é necessário reconsiderar se a transferência horizontal de genes (planta para genoma do endófito ou vice-versa) é o único mecanismo no qual os endófitos possam produzir os mesmos compostos que seu hospedeiro (KUSARI; SPITELLER, 2011). Como as plantas são colonizadas por diversos micro-organismos endofíticos, estes podem interagir direto ou indiretamente com outros endófitos. Estas interações desempenham um papel fundamental na produção de metabólitos por bactérias e fungos endofíticos (Figura 1) (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

Figura 1. Esquema representativo de “crosstalk” entre espécies endófito-endófito. (A) “Crosstalk” entre fungos endofíticos; (B) “Crosstalk” entre fungos e bactérias endossimbiontes; (C) “Crosstalk” entre fungos e bactérias endofíticas.



Fonte: Adaptado de Kusari; Hertweck; Spiteller (2012, p.795)

1.3 Espécie vegetal hospedeira: *Eugenia brasiliensis*

O gênero *Eugenia* é um dos mais representativos da família Myrtaceae. No Brasil, existem 350 espécies nativas desse gênero. *Eugenia brasiliensis* Lam. é uma árvore encontrada no litoral das florestas brasileiras comumente conhecida como grumixama ou cereja brasileira (FISCHER et al., 2005). O fruto é rico em antocianinas e carotenoides, o que confere uma alta capacidade antioxidante e anti-inflamatória para estes extratos (TEIXEIRA et al., 2015).

E. brasiliensis (Figura 2) possui casca e folhas aromáticas, sendo que suas folhas são utilizadas na medicina popular no tratamento de reumatismo, artrites e diabetes, além de demonstrarem atividades antidepressiva e anti-inflamatória, as quais podem ser atribuídas a presença dos compostos fenólicos (COLLA et al., 2012; PIETROVSKI et al., 2008).

Figura 2. *Eugenia brasiliensis* (a), frutos (b) e folhas (c).



Fonte: Autor

Estudos fitoquímicos das folhas de *E. brasiliensis*, descrevem o isolamento e identificação de triterpenos como α -amirina, β -amirina, betulina, e compostos fenólicos como a quercetina, catequina e galocatequina (MAGINA et al., 2012).

Estudos realizados por Dametto (2014) por LC-MS/MS com os frutos de *E. brasiliensis* permitiram a identificação de várias antocianinas como a delfinidina-3-O--laminaribiosídeo, delfinidina-3-Ogalactosídeo, delfinidina-3-O-glicosídeo, cianidina-3-O-galactosídeo, dentre outras. Estudos biológicos com os extratos das folhas de *E. brasiliensis* mostraram atividade antioxidante e anti-inflamatória, evidenciada pela inibição de enzimas cicloxigenases COX-1 e COX-2. As substâncias isoladas das folhas de *E. brasiliensis* pertencem à classe dos dissacarídeos, flavanonas, chalconas e neolignanas.

Estas e outras questões instigam o estudo químico, enzimático e biológico dos fungos endofíticos associados a esta espécie vegetal, objetivando obter dados que direcionem para a compreensão da relação endófito-hospedeiro e a utilização dos produtos destes endófitos nas áreas de interesse.

1.4 Potencial biotecnológico dos endófitos

Os fungos endofíticos possuem a capacidade de produzir uma ampla variedade de enzimas e metabólitos secundários, que exibem diversas atividades biológicas (CORRÊA, 2014). Atualmente os micro-organismos são uma das formas de vida mais importantes, a qual fornece ferramentas biotecnológicas para a transformação da matéria orgânica, assim como a produção de produtos químicos e bioquímicos úteis (IÓCA; ALLARD; BERLINCK, 2014).

A investigação do potencial dos fungos endofíticos para a produção de enzimas e metabólitos bioativos é de grande interesse, dadas as inúmeras possibilidades de aplicações biotecnológicas destes compostos. Considerando que os endofíticos constituem a maior parcela da diversidade fúngica inexplorada, ainda há poucos estudos relatando concretas aplicações biotecnológicas deste nicho (NISA et al., 2015).

Entre micro-organismos capazes de produzir enzimas destacam-se os fungos filamentosos, pelo seu fácil cultivo e elevada produção de enzimas extracelulares de grande interesse industrial. Os fungos endofíticos representam uma fonte pouco explorada na obtenção de enzimas com diferentes aplicações tecnológicas (BHAGOBATY; JOSHI, 2012).

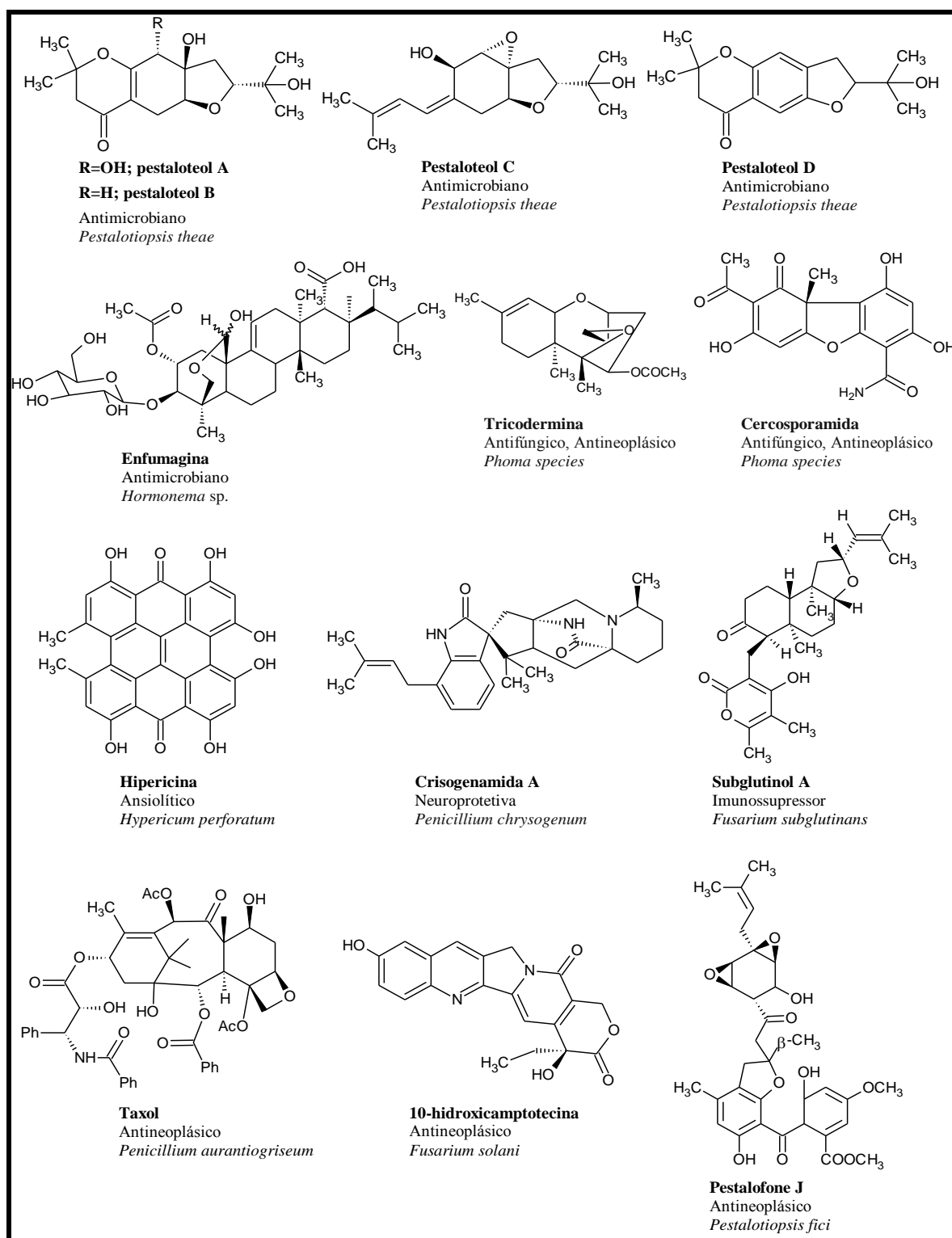
1.4.1 Metabólitos bioativos

Trabalhos mostraram que os fungos endófitos como, *Didymostilbe* sp., isolado de *Taxus chinensis* var. (WANG, Y.; TANG, 2011) e *Botryodiplodia theobromae* Pat., isolado de *Morinda citrifolia* Linn., (PANDI; MANIKANDAN; MUTHUMARY, 2010) produzem o fármaco taxol, sendo este isolado pela primeira vez do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* durante os anos 90 (STIERLE et al., 1993). Na produção de paclitaxel pelo endófito *Penicillium aurantiogriseum*, isolado de *Corylus avellana*, foi possível identificar clusters de genes envolvidos nesta produção diferentes do hospedeiro, demonstrando a evolução biossintética em espécies de *Penicillium*, independente da planta hospedeira (YANG et al., 2014; NEWMAN; CRAGG, 2015). Com as evidências de que fungos endófitos podem também produzir o taxol visualizou-se um novo processo, talvez mais eficiente e menos dispendioso, para a produção deste importante fármaco.

Outros produtos potencialmente bioativos produzidos por fungos endofíticos merecem destaque, como os anticancerígenos: derivados de antracenediona (ZHANG et al., 2010), 22-oxa-(12)-citocalasinas (PRITI et al., 2009) e novos meroterpenoides (pestalafones J e K) (WANG, B., 2016). Pesquisas ainda relatam outros compostos com atividades promissoras como a antraquinonas (ZHANG; SONG; TAN, 2006) e a 10-hidroxycamptotecina (SHWETA

et al., 2010), poderosos agentes antineoplásicos, isolado dos fungos endófitos *Pleospora* sp. e *Fusarium solani*, respectivamente; e o subglutinol A e B, um agente imunossupressor, produzido pelo endófito *Fusarium subglutinans* (GUO et al., 2008). Kusari e Spiteller (2011) descreveram a produção de hipericina a partir de um endófito isolado de *Hypericum perforatum*, um agente no combate a depressão e ansiedade. Em 2012, isolou-se do fungo endofítico pertencente ao gênero *Phoma* associado a *Arisaema erubescens*, os metabólitos tricolorina e cercosporamida, com fortes atividades antifúngicas e antineoplásicas (WANG, L. et. al., 2012).

Dentro deste contexto, os produtos naturais de fungos endofíticos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, sendo alguns exemplos, antimicrobiana (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; WANG, L. et. al., 2012), ansiolítica (KUSARI; SPITELLER, 2011), neuroprotetiva (ALY et al., 2010), propriedades imunossupressoras (GUO et al., 2008) e antineoplásicos (YANG et al., 2014; WANG, B., 2016; SHWETA et al., 2010; WANG, L. et. al., 2012) (Figura 3).

Figura 3. Substâncias bioativas isoladas de fungos endofíticos.

Fonte: Aly; Debbab; Proksch (2011); Wang, L. et al. (2012); Kusari; Spiteller. (2011); Aly et al. (2010); Guo et al. (2008); Yang et al. (2014); Wang, B. et al. (2016); Shweta et al. (2010); Wang, L. et al. (2012).

1.4.2 Enzimas

As enzimas de origem microbiana ocupam lugar de destaque no mercado biotecnológico, sendo inúmeras as aplicações em processos industriais. As proteases, por exemplo, são comercializadas em grande escala em biorremediação, nas indústrias de alimentos, detergente, couro e na indústria farmacêutica. As amilases, por sua vez, são utilizadas nas indústrias de amido e panificação; em cosméticos e produtos farmacêuticos. As pectinases são empregadas na extração de óleos vegetais, nas indústria têxtil e de sucos naturais. As xilanases são utilizadas em indústrias de alimentos, de fármacos, de polpa de celulose e papel (SAID; PIETRO, 2004). As celulasas são utilizadas em indústrias de papel, alimentícia, farmacêutica e, mais recentemente, na hidrólise da xilana presente em materiais lignocelulósicos, para a obtenção de xilose, a qual pode ser convertida em etanol de segunda geração por alguns micro-organismos fermentadores (KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011; SHARADA, 2014). Estima-se que, a venda mundial de enzimas industriais já atingiu um valor de US 1,6 bilhões de dólares, dos quais a celulase e enzimas aliadas ocupam no mercado uma posição significativa (SHARADA, 2014).

Devido à atividade significativa das substâncias produzidas pelos fungos e a capacidade de serem facilmente cultivados em escala industrial, coquetéis de celulasas em fungos são um excelente ponto de partida para aplicações em biorrefinarias (PAYNE, 2015).

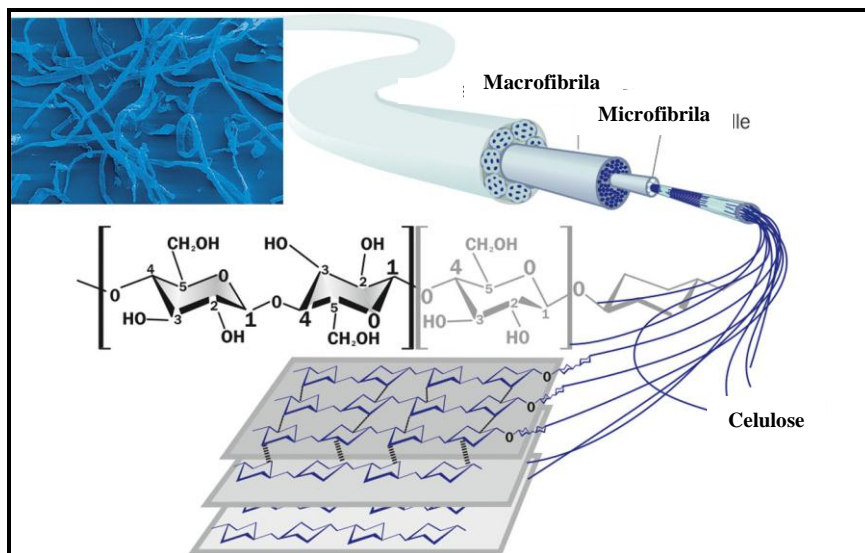
Um dos problemas para a utilização de enzimas nos processos industriais é o alto custo envolvido e alternativas para solucionar este problema é o cultivo de micro-organismos por fermentação em estado sólido (FES), devido à possibilidade de utilização de substratos lignocelulósicos de baixo custo e amplamente disponíveis, como resíduos agrícolas, agroindustriais, florestais e urbanos, que suportam o crescimento microbiano e estimulam a produção das enzimas (GAO et al., 2008; GRAMINHA et al., 2008; SUKUMARAN et al., 2009). No Brasil, estes resíduos e subprodutos agrícolas/agroindustriais são abundantes, o que possibilita a sua utilização em bioprocessos, especialmente no que se refere ao bagaço de cana-de-açúcar (LEITE et al., 2009), cuja produção anual é estimada em torno de 186 milhões de toneladas (SOCCOL et al., 2010). O cultivo de fungos filamentosos por FES simula as condições do habitat onde estes micro-organismos são naturalmente encontrados e, em geral, possibilita a vantagem em termos de elevadas concentrações enzimáticas e produtividade fermentativa (GERVAIS; MOLIN, 2003; YOON, 2014).

A principal fonte de enzimas industriais são os fungos filamentosos, devido a sua excelente capacidade de produção de enzimas extracelulares. Deste modo, fungos endofíticos

são capazes de degradar matrizes complexas (Figura 4) para a produção do combustível etanol e outros produtos com valor agregado. Além disso, os fungos endofíticos podem se tornar a nova fonte de enzimas úteis industrialmente, como as amilases, lipases e proteases (CORRÊA, 2014).

Bhagobaty e Joshi (2012) relatam que endófitos isolados das plantas *Potentilla fulgens* e *Osbeckia stellata* apresentaram a produção de xilanase, lipase, protease, amilase e celulase. O fungo endofítico *Acremonium strictum*, isolado de biomas brasileiros, apresentou boas atividades celulolíticas quando cultivado em bagaço de cana-de açúcar (GOLDBECK et al, 2013). Já o endófito *Cylindrocephalum* sp., isolado de *Alpinia calcarata*, demonstrou elevada atividade amilolítica (SUNITHA et al., 2012).

Figura 4. Esquema representativo da fibra de celulose.



Fonte: Adaptado de J. Hettenmaier & Sohne.

1.5 Gêneros: *Xylaria*, *Diaporthe* e *Colletotrichum*

Os fungos pertencentes a esses gêneros são fungos filamentosos, já isolados como endofíticos em nosso grupo de pesquisa, porém de outras plantas hospedeiras.

O endófito *Xylaria* sp. (Figura 5a), é conhecido por produzir muitos metabólitos novos e bioativos, como por exemplo, citocalasinas (CAFÊU et al., 2005), fitoxinas (ABATE; ABRAHAM; MEYER, 1997), ciclopeptídeos (WU et al., 2011), sesquiterpenos eremofilanos (SONG et al., 2012), entre muitas outras. *Xylaria cubensis*, isolado de *Litsea akoensis*, produziu sesquiterpenoides como 10-hidroxitujopsena e xylaritriol, um novo diterpenoide (cubentriol), um alcaloide (akodionina), uma nova isocumarina (akoliterina) (FAN et al., 2014), dentre outras.

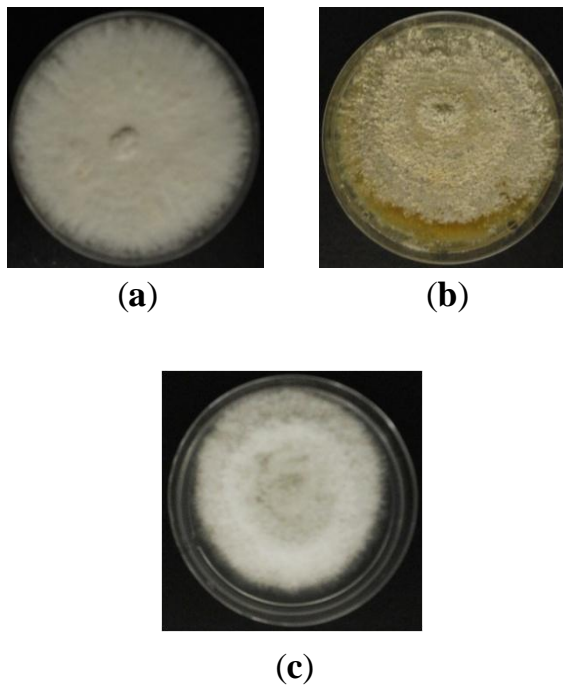
O endófito *Diaporthe* sp. (Figura 5b), que em sua forma assexuada é denominado *Phomopsis* sp. produz as citocalasinas H e J, as quais demonstraram ter efeitos inibitórios potentes frente aos neutrófilos humanos, atuando como inibidores potenciais de NADPH-oxidase e podendo assim ser alvos promissores para o desenvolvimento de agentes anti-inflamatórios (CHAPLA et al., 2014). Estudos realizados por Silva et al. (2006) com o fungo *Phomopsis cassiae* conduziram ao isolamento de dois novos policetídeos e cinco novos sesquiterpenos da classe dos cadinanos, sendo que algumas destas apresentaram atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, e também atividade citotóxica, *in vitro*, contra linhagem celular de tumor cervical humano (HeLa). Destaca-se o isolamento de duas novas benzopiranonas (Diaportheona A e B) deste fungo, as quais inibiram o crescimento da linhagem *Mycobacterium tuberculosis* (BUNGIHAN et al., 2011). O endófito *Diaporthe* sp., isolado de *Camptotheca acuminata*, produziu quatro análogos da lovastatina, um importante redutor de colesterol (LIU et al., 2013). Já o endófito *Phomopsis vexans*, isolado de *Solanum xanthocarpum*, produziu 550 mg L⁻¹ de lovastatina (PARTHASARATHY; SATHIYABAMA, 2015). Um composto inédito, derivado de triterpenoide tetracíclico 19-nor-lanostana, isolado de *Diapotha* sp., exibiu atividade antibacteriana significativa frente a bactérias Gram-positiva e negativa, especialmente às *Streptococcus pyogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como à linhagem patogênica humana *Staphylococcus aureus* (LI et al., 2015).

Colletotrichum (Figura 5c), é conhecido pela produção do ácido colletotrico, produzido por *C. gloesporioides*, associado à espécie vegetal *Artemisia mongolica*, que apresentou bioatividade contra as linhagens de *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (ZOU et al., 2000). Ressalta-se que *Colletotrichum gloesporioides*, isolado como endófito de

Piper nigrum, produziu o alcaloide piperina, o qual é um metabolito característico da planta hospedeira. A piperina é relatada por apresentar atividades biológicas como: antimicrobianas, antidepressivas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais (CHITHRA et al., 2014). Nos estudos com *Colletotrichum* sp., um endófito de *Buxus sinica* (planta tradicional da medicina Chinesa), isolou-se três novos compostos (colletotrichonas A-C), os quais apresentaram excelentes atividades antibacterianas (WANG, W. et al., 2016).

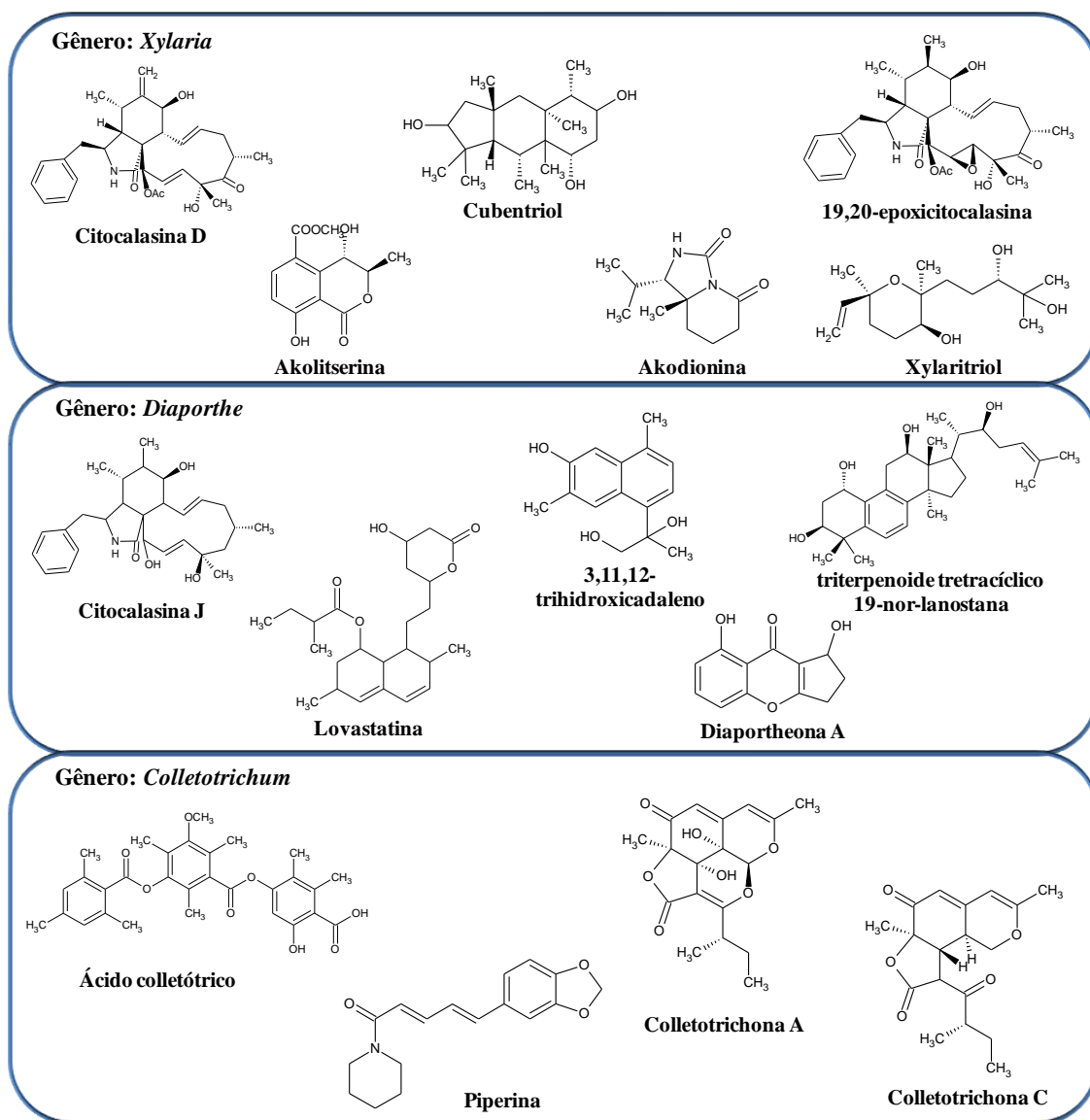
Dentro deste contexto, é evidente a grande diversidade e potencialidade biológica destes gêneros de fungos endofíticos.

Figura 5. Fotos de *Xylaria cubensis* (a), *Diaporthe* sp. (b) e *Colletotrichum* sp. (c) cultivados em PDA em placa de Petri.



Fonte: Autor

Figura 6. Substâncias isoladas dos gêneros *Xylaria*, *Diaporthe* e *Colletotrichum*.



Fonte: Cafêu et al. (2005); Fan et al. (2014); Chapla et al. (2014); Bungihan et al. (2011); Parthasarathy; Sathiyabama et al. (2015); Li et al. (2015); Zou et al. (2000); Chithra et al. (2014); Wang, W. et al. (2016).

1.6 Co-cultivo

Estudos recentes do genoma de micro-organismos revelaram que tais organismos são capazes de biossintetizar metabólitos secundários com diversidade estrutural superior as já existentes. Como muitos genes, responsáveis pela biossintese de produtos naturais podem estar silenciados em condições laboratoriais, instiga-se o desenvolvimento de novas estratégias para a ativação das vias biossintéticas. Neste sentido uma das estratégias é o co-cultivo de micro-organismos, que envolve o cultivo de dois ou mais micro-organismos no mesmo ambiente.

Os micro-organismos não vivem isoladamente na natureza, fazendo parte de complexos ecossistemas e, por isso, as comunidades microbianas carregam um imenso potencial para a produção de novos compostos. Há uma diversidade de sinalizações e interações ocorrendo entre os micro-organismos que são capazes de instigar a produção de novos compostos. Tais compostos, produzidos de forma dinâmica, são de muito interesse para a descoberta de novos fármacos. A sobrevivência em um ambiente competitivo exige estratégias que provavelmente culminam na produção de compostos bioativos (BRAKHAGE & SCHROECKH, 2011; BERTRAND et al., 2014).

O co-cultivo de micro-organismos pode ser realizado tanto em meios sólidos ou líquidos e, recentemente, os estudos centraram-se nas interações e na descoberta de novos metabólitos bioativos de origem microbiana (BERTRAND et al., 2014).

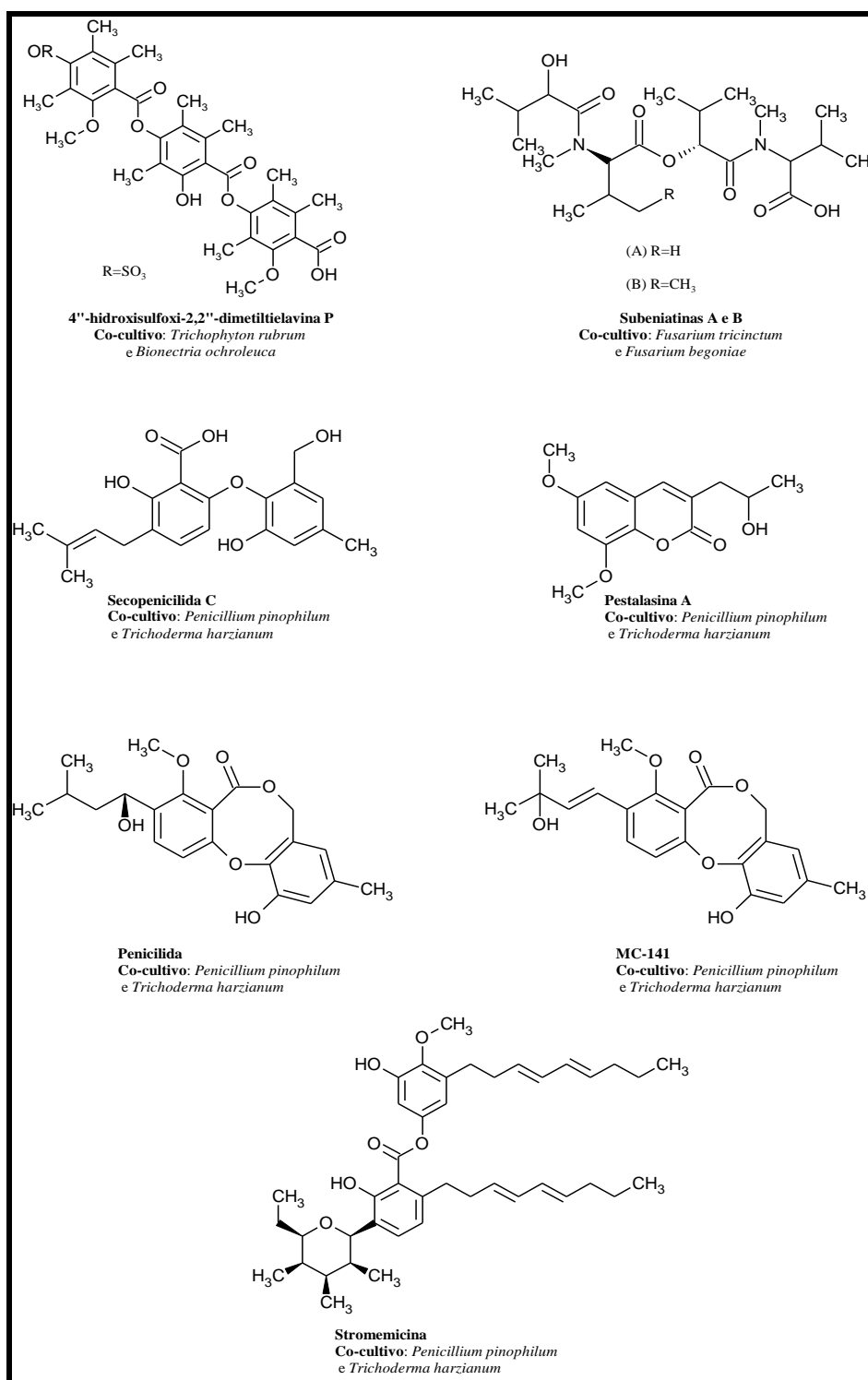
Estudos realizados com co-cultivos de *Trichophyton rubrum* e *Bionectria ochroleuca* em meio sólido foi possível observar a inibição do crescimento a longa distância entre os micro-organismos. A partir deste co-cultivo foi identificado o metabólito: 4"-hidroxissulfoxi-2,2"-dimetilrelavina P (um trímico substituído de ácido 3,5-dimetilorselínico) (Figura 7) (BERTRAND et al., 2013). A co-cultura em meio líquido de *Fusarium tricinctum* e *F. begoniae* induziram a produção de dois novos depsipeptídeos como subeniatinas A e B (Figura 7), os quais não foram detectados nas monoculturas (WANG, J. et al., 2013).

O co-cultivo de *Inonotus obliquus* e *Phellinus punctatus* demonstrou a redução na produção de biomassa micelial, mas houve um aumento na produção de compostos fenólicos, melaninas e da classe dos triterpenoides lanostanos (ZHENG et al., 2011).

Nonaka e colaboradores (2011) isolaram uma nova substância, denominada secopenicilida C e outras quatro conhecidas, como: penicilida, MC-141, pestalásina A e estromemicina (Figura 7), todas do co-cultivo líquido de *Penicillium pinophilum* e *Trichoderma harzianum*. A produção desses compostos, exceto a pestalásina A foi de 2 a 6 vezes superior no co-cultivo comparado a monocultura *P. pinophilum*, o qual é responsável pela produção destes compostos isoladamente.

Devido à complexidade dos extratos microbianos, métodos analíticos avançados, como a espectrometria de massas, são fundamentais para o êxito na detecção e identificação de metabólitos produzidos pelos co-cultivos (BERTRAND et al., 2014). A comparação da produção da monocultura com a do co-cultivos pode ser avaliada por ferramentas estatísticas como *scores* de PCA (Análise de componentes principais), PLS (Mínimos quadrados parciais), PLS-DA (Análise discriminante com calibração multivariada), dentre outras.

Figura 7. Compostos isolados do co-cultivo de fungos.



Fonte: Bertrand et al. (2013); Wang, J. et al. (2013); Nonaka et al. (2013).

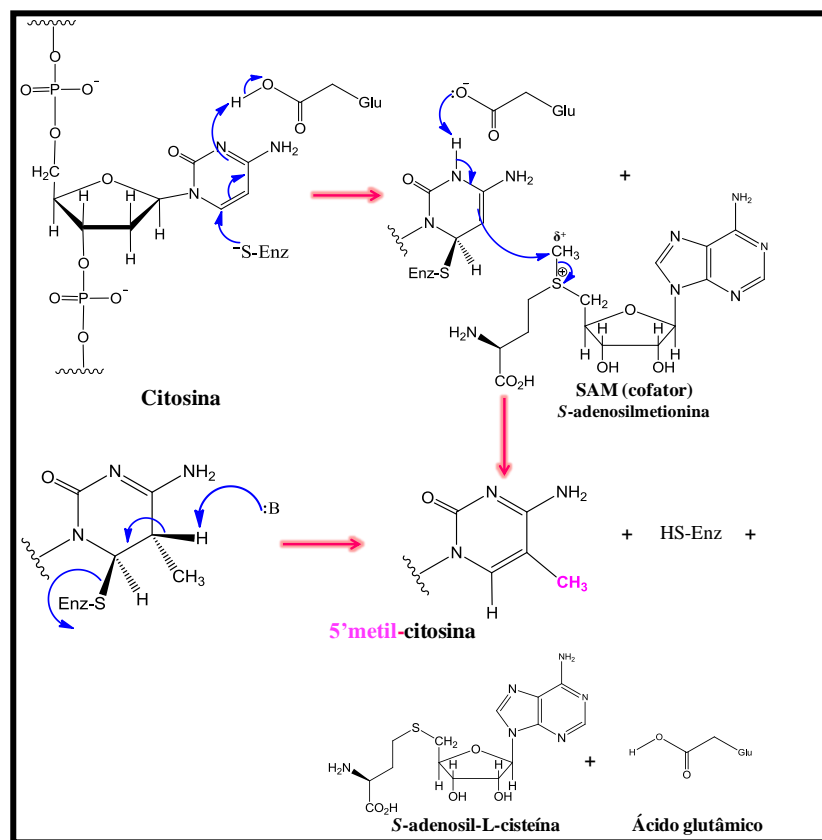
1.7 Epigenética

Os fungos são organismos capazes de biossintetizar uma grande diversidade química e biológica de metabólitos secundários. Infelizmente, métodos de fermentação em condições laboratoriais são ineficientes para mimetizar o habitat natural de um organismo. Como muitos

genes, responsáveis pela biossíntese de produtos naturais não são expressos no ambiente artificial de laboratório, instiga-se o desenvolvimento de novas estratégias para a ativação das vias biossintéticas (BRAKHAGE; SCHROECKH, 2011; WILLIAMS et al., 2008). Neste sentido uma das estratégias que possibilitará caminhos para a descoberta de novas moléculas bioativas é a epigenética como uma metodologia alternativa e eficaz para induzir a expressão de vias silenciosas e melhorar a produção de produtos naturais em fungos (WILLIAMS, et al., 2008). A epigenética consiste em mudanças hereditárias na expressão gênica, sem alteração na sequência de DNA. Dos mecanismos epigenéticos, os mais estudados e conhecidos são a metilação do DNA e as modificações das histonas, ao quais provocam a repressão transcricional (CICHEWICZ, 2010), inibindo a expressão de genes que culminariam na produção de metabólitos secundários.

As metilações no DNA ocorrem pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), resultando na conversão da citosina em seu correspondente 5'-metilcitosina (Figura 8) (CICHEWICZ, 2010).

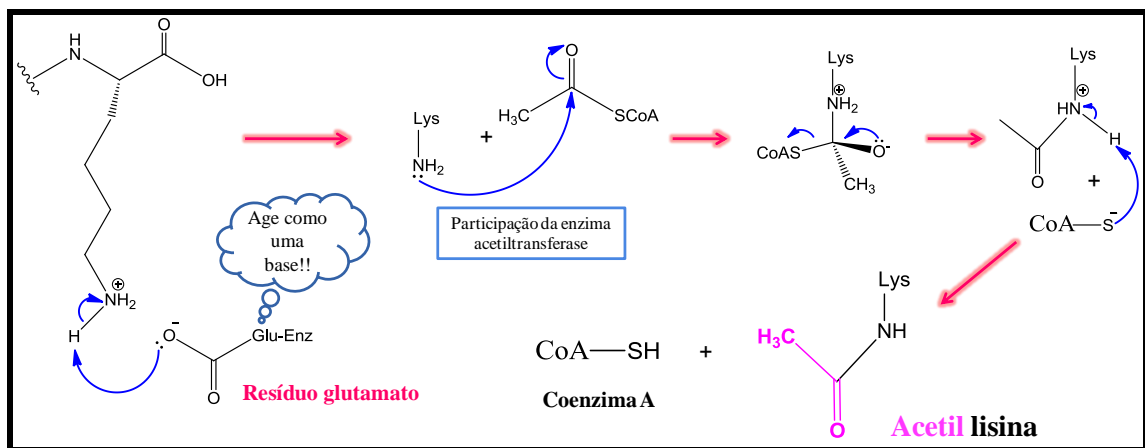
Figura 8. Metilação da citosina do DNA.



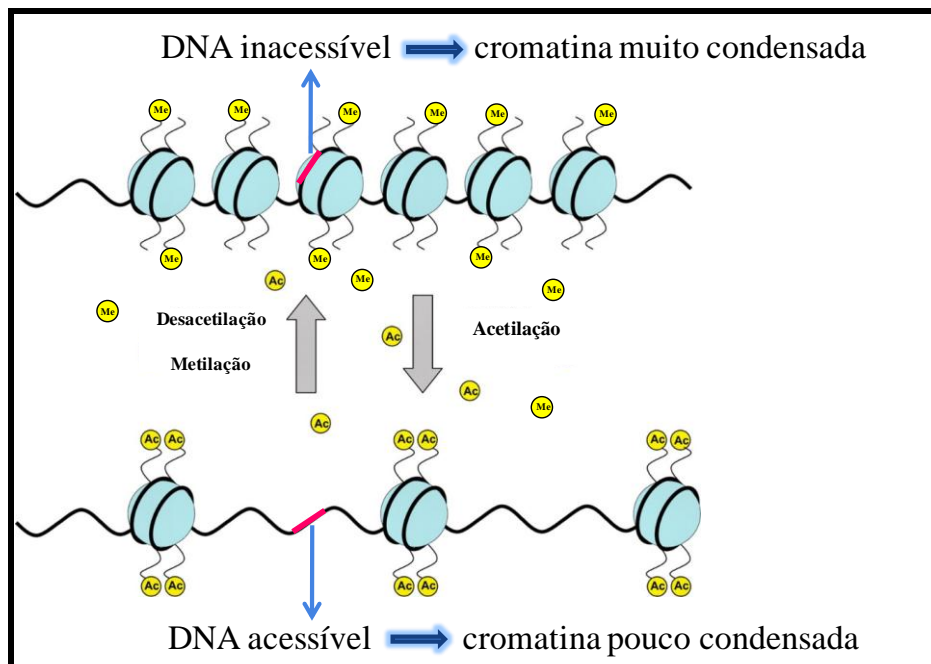
Fonte: Autor

As histonas são proteínas associadas à cromatina e possuem importantes funções. Nestas proteínas há o enovelamento do DNA e as mesmas participam no controle da regulação transcricional, que é essencial para o bom funcionamento celular (CICHEWICZ, 2010). A acetilação do grupo 3-amino da lisina (Figura 9) é a mais estudada modificação pós-traducional em histonas de fungos. O processo de acetilação e desacetilação da lisina é realizado por dois grupos de enzimas: histonas acetiltransferases (HATs) e histonas desacetilases (HDACs), respectivamente. A acetilação/desacetilação da lisina influencia na afinidade de ligação com o DNA (Figura 10), o que contribui para uma transição entre o estado da cromatina “aberta” e “fechada”, que estão envolvidos na regulação da expressão ou não dos genes, respectivamente (CICHEWICZ, 2010; CHERBLANC et al., 2013; PONS et al., 2009).

Figura 9. Acetilação nos resíduos de lisina da histona.



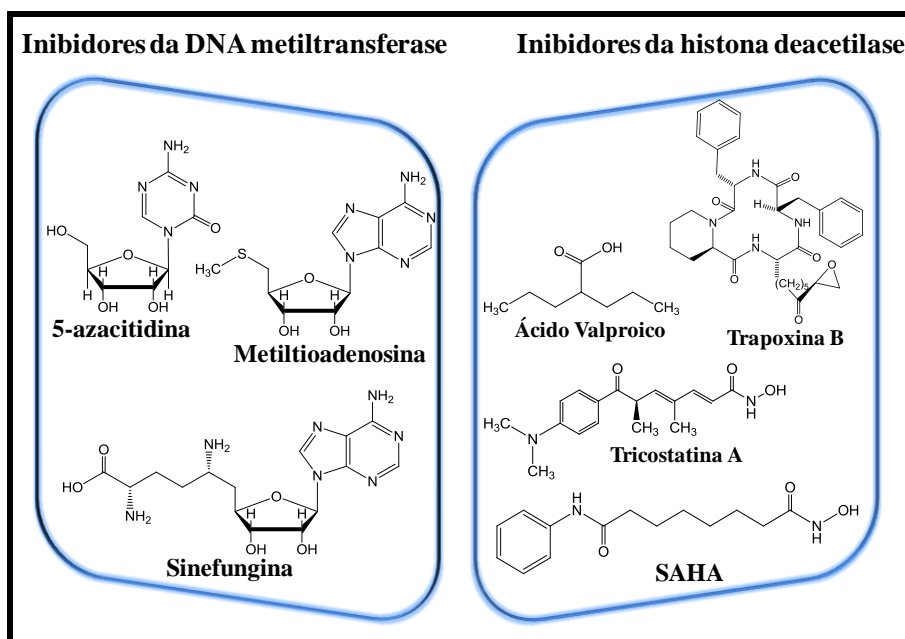
Fonte: Autor

Figura 10. Modificações na histona: cromatina “aberta” e “fechada”.

Fonte: Adaptada: Pons et al. (2009).

Uma série de pequenas moléculas surgiu como ferramentas e tem permitido o desenvolvimento de técnicas epigenéticas, sendo estas capazes de seletivamente ou semi-seletivamente inibir a DNA metiltransferase (DMNT) ou a histona desacetilase (HDAC) alterando o processo de transcrição do DNA.

Para expressar os genes silenciados, surgiram moléculas como 5-azacitidina e ácido hidroxâmico suberoilânido (Figura 11), capazes de inibir a metilação do DNA e a enzima desacetilase (HDAC), respectivamente (CHERBLANC, et al., 2013).

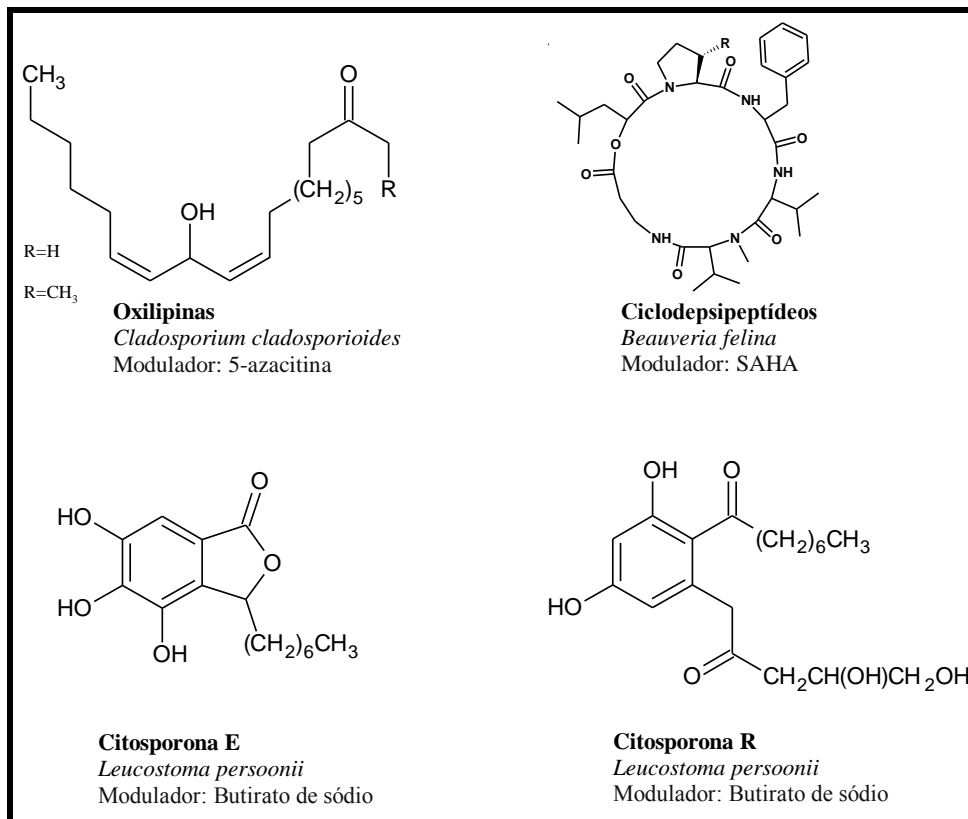
Figura 11. Estruturas de moléculas utilizadas como moduladores epigenéticos.

Fonte: Cichewicz (2010).

Os moduladores epigenéticos podem ser empregados para expressar vias biossintéticas silenciosas e melhorar a produção de metabólitos secundários de fungos (WILLIAMS et al., 2008).

As modificações epigenéticas em culturas fúngicas têm demonstrado bons resultados na produção de produtos naturais, como por exemplo, o cultivo de *Cladosporium cladosporioides* na presença de 5-azacitidina (inibidor de DMNT) resultou no isolamento de oxilipinas (Figura 12), substâncias sinalizadoras de células intra e inter-espécies (WILLIAN, 2008).

Chung e colaboradores (2013) observaram a mudança da produção metabólica do fungo *Beauveria felina* cultivado com o modulador SAHA (inibidor de HDAC), isolando três ciclodepsipeptídeos inéditos (Figura 12), não encontrados no controle. Outro trabalho interessante foi o cultivo do fungo *Leucostoma personii* na presença do modulador butirato de sódio (inibidor de HDAC), resultando no aumento da produção dos compostos antimicrobianos conhecidos como citosporonas B (360 %), C (580%) e E (890%), além da produção da citosporona R (Figura 12), ainda não relatada na literatura (BEAU et al., 2012).

Figura 12. Compostos isolados do cultivo de fungos com moduladores epigenéticos.

Fonte: Williams et al. (2008); Chung, Y. et al. (2013); Beau et al. (2012).

Objetivos

2. OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos deste trabalho foram o estudo químico, biológico e enzimático dos fungos endofíticos, isolados de *Eugenia brasiliensis*. Dentre os isolados, os fungos *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. foram estudados química e biologicamente, sendo ainda avaliados sob influência de moduladores epigenéticos e co-cultivo.

2.1 Objetivos Específicos

1. Isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos associados à *Eugenia brasiliensis*;
2. Cultivo dos endófitos isolados de *E. brasiliensis* em PDB e Czapek (escala reduzida) e obtenção dos respectivos extratos brutos;
3. Triagem química dos extratos brutos obtidos, por RMN de ^1H e HPLC-DAD;
4. Triagem biológica dos extratos brutos obtidos, pela avaliação das atividades: anticolinesterásica, citotóxica e antifúngica;
5. Triagem enzimática dos endófitos isolados de *E. brasiliensis* pelo cultivo por fermentação em estado sólido (FES) utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substratos;
6. Seleção dos fungos mais promissores quanto ao potencial biológico, enzimático e metabólico;
7. Cultivo em PDB dos endófitos *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. em escala ampliada;
8. Isolamento, elucidação ou determinação estrutural dos metabólitos secundários por técnicas cromatográficas (HPLC-DAD, colunas abertas) e espectrométricas (RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, EM);
9. Avaliação por LC-MS e por RMN de ^1H do co-cultivo dos endófitos *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. em meio sólido e líquido constituído por PDA e PDB, respectivamente;
10. Avaliação dos co-cultivos frente aos ensaios biológicos anticolinesterásico e antifúngico;
11. Avaliação da influência dos moduladores epigenéticos na produção metabólica dos fungos selecionados (*Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp.).

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Meios de cultivo

Tabela 1. Meios de cultura utilizados para o cultivo dos fungos endofíticos.

<i>Meios de Cultura</i>	<i>Tipo</i>	<i>[g L⁻¹</i>	<i>Composição</i>	<i>Fabricante</i>
PDB	Líquido	24	Fécula de batata (4g), dextrose (20g)	Acumedia
Czapek	Líquido	35	Sacarose (30g), NaNO ₃ (3g), Na ₂ (PO ₄) ₃ (1g), MgSO ₄ (0,5g), KCl (0,5g), FeSO ₄ (0,01g)	Himedia
PDA	Sólido	39	Fécula de batata (4g), dextrose (20g), ágar (15g)	Acumedia
Nutrient	Sólido	23	Digestão enzimática de gelatina (5g), extrato de carne (3g), Agar (15g)	Acumedia

Fonte: Autor

3.1.2 Solventes

Para a obtenção dos extratos brutos em escala reduzida e ampliada, como para CCDC, separações cromatográficas em coluna e em HPLC, foram utilizados, acetato de etila, metanol P.A. e analítico, clorofórmio e acetonitrila das seguintes marcas: Merck, J.T. Baker, Synth e Qhemis. Em análises de RMN 1D e 2D utilizou-se os solventes deuterados: DMSO-d₆, CDCl₃ e CH₃OH-d₄ (Aldrich, CIL e Deutero).

3.1.3 Reagentes

Os moduladores epigenéticos utilizados foram: ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA) e 5-azacitidina ≥98% HPLC (Sigma-Aldrich).

3.1.4 Cromatografia em Coluna

Nos fracionamentos cromatográficos em coluna aberta sob vácuo foram utilizadas colunas de vidro de diferentes diâmetros internos e comprimentos. A fase estacionária utilizada foi: sílica gel 50-60 C-18 (Macherey-Nagel).

3.1.5 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Nas análises por CCDC foram utilizadas placas de sílica gel 60 G F₂₅₄ analíticas (Macherey-Nagel).

3.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (HPLC-DAD)

As análises por HPLC-DAD analítico foram realizadas no equipamento Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A), com degaseificador DGU-20A₃ e injetor automático Shimadzu SIL-20A. O tratamento dos dados foi obtido através do software Shimadzu LC solution (versão 1.25 SP2). Foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex Luna com sílica tipo octadesil silano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5 µm). Realizou-se também análises no equipamento Waters (UPLC) com detector UV-Vis e injetor automático SIL-10ADVp. Foi utilizada a coluna analítica Acquity UPLC[®], sílica C-18 (2,1 x 100 mm; 1,7 µm).

As separações cromatográficas por HPLC-DAD preparativo foram realizadas no equipamento Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A), com degaseificador, injetor manual e software Shimadzu LC solution (versão 1.25 SP4). Foi utilizada uma coluna semi-preparativa Phenomenex Luna, sílica C-18 (250 x 10,0 mm; 5 µm).

3.1.7 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de ¹H e ¹³C)

Os espectros de RMN de ¹H (300 e 600 MHz) e ¹³C (75 e 151 MHz) 1D e 2D foram realizados em espectrômetro Bruker 300 Fourier (7,1 T) e Bruker Ascend 600 (14,1 T).

3.1.8 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetros como: Bruker Maxis Impact-ESI-QqTOF-MS (software Data Analysis, versão 4.2) e Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos (software X-calibur).

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em espectrômetros como: Thermo Scientific LCQ Fleet Ion Trap LC/MS (software X-calibur, versão 2.1) e Agilent 3200 QTRAP (Linear Ion Trap Quadrupole LC/MS/MS) (software Analyst, versão 1.5.1).

3.1.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas

As análises das micro-extrações, oriundas do co-cultivo e da epigenética foram analisadas no cromatógrafo líquido de ultra-alta pressão (UHPLC) Accela High Speed LC-Thermo Scientific® acoplado ao espectrômetro de massas (HRMS) LTQ Orbitrap Velos. Foi utilizada a coluna analítica Acquity UPLC®, sílica C-18 (2,1 x 100 mm; 1,7 µm).

As amostras oriundas da epigenética também foram analisadas no HPLC analítico Agilent acoplado ao espectrômetro de massas Agilent 3200 QTRAP (Linear Ion Trap Quadrupole LC/MS/MS). Foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex Luna com sílica tipo octadesil silano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5 µm).

3.1.10 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a SPE-TT

A separação cromatográfica por HPLC-SPE-TT (High Performance Liquid Chromatography-Solid Phase Extraction-Transfer Tube) analítico foi realizada no equipamento Agilent 1260 Infinity, com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (1260 DAD VL), com injetor automático, sistema de extração em fase sólida Bruker/Spark Prospekt II e um transferidor/preparador automático de amostras (Gilson). O software utilizado foi HyStar (versão 3.2). Foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex Luna com sílica tipo octadesil silano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5 µm).

3.1.11 Análise de rotação óptica $[\alpha]_{25}^D$

Os valores de rotação óptica foram obtidos em polarímetro digital Perkin Elmer, modelo 341 LC, com lâmpada de sódio ($\lambda = 589$ nm) e cela de quartzo com caminho ótico de 1,00 dm.

3.1.12 Equipamentos

Tabela 2. Equipamentos para o desenvolvimento do projeto.

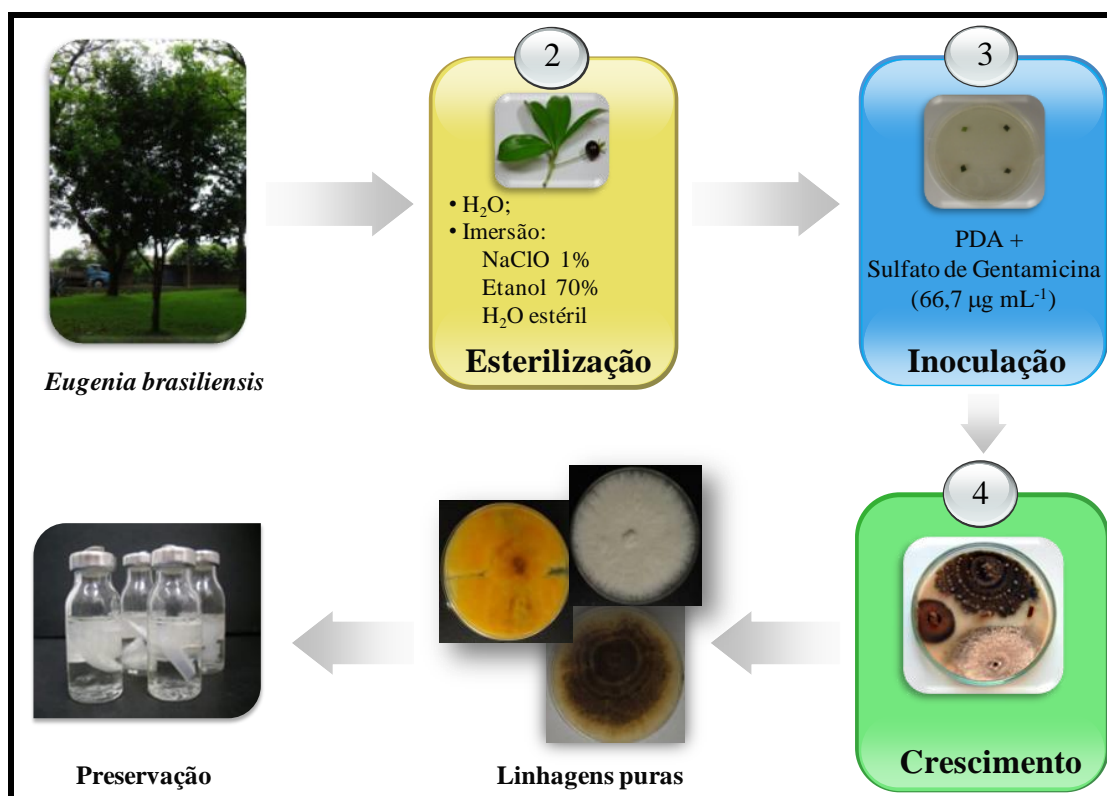
<i>Equipamentos</i>	<i>Fabricante</i>
Autoclave vertical	Quimis e Phoenix Lufenco
Câmara de fluxo laminar	Pachane PA-310
Incubadora com agitação orbital	QUIMIS
Milli-Q	Millipore
Rotaevaporador	BUCHI
Balança analítica	Mettler Toledo AG 245 e AG 204
Balança semi-analítica	Gehaka BG 2000

Fonte: Autor

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção da linhagem fúngica

A coleta de folhas, frutos e ramos jovens e saudáveis de *Eugenia brasiliensis* realizou-se na cidade de Araraquara-SP. O isolamento dos endófitos iniciou-se com a lavagem da superfície do material vegetal em água corrente, e esterilização por imersão em NaClO 1% e em etanol 70%, seguida de uma dupla lavagem em água estéril (Tabela 3) (SILVA, 2005). Após o processo de esterilização, as folhas/frutos/ramos foram seccionados assepticamente (3 a 4) e incubados em placas de Petri contendo batata-dextrose-ágar (PDA) e Nutrient ágar estéril a 28 °C. Após a esterilização em autoclave, adicionou-se o antibiótico sulfato de gentamicina ($66,7 \mu\text{g mL}^{-1}$) ao meio de cultivo para inibir o crescimento bacteriano. O crescimento dos fungos foi monitorado diariamente e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras. As linhagens foram avaliadas quanto à pureza, através da aparência uniforme nas placas com os meios de cultivos adequados, sendo posteriormente preservadas em água estéril (slants) (Figura 13).

Figura 13. Isolamento dos fungos endofíticos de *Eugenia brasiliensis*.

Fonte: Autor

Tabela 3. Tempo de esterilização das folhas, frutos e ramos.

Orgãos	NaClO 1%	Etanol 70%	Águas de lavagem
Folhas	3 min	1 min	15 min total
Frutos	30 s	1 min	10 min total
Ramos	5 min	3 min	15 min total

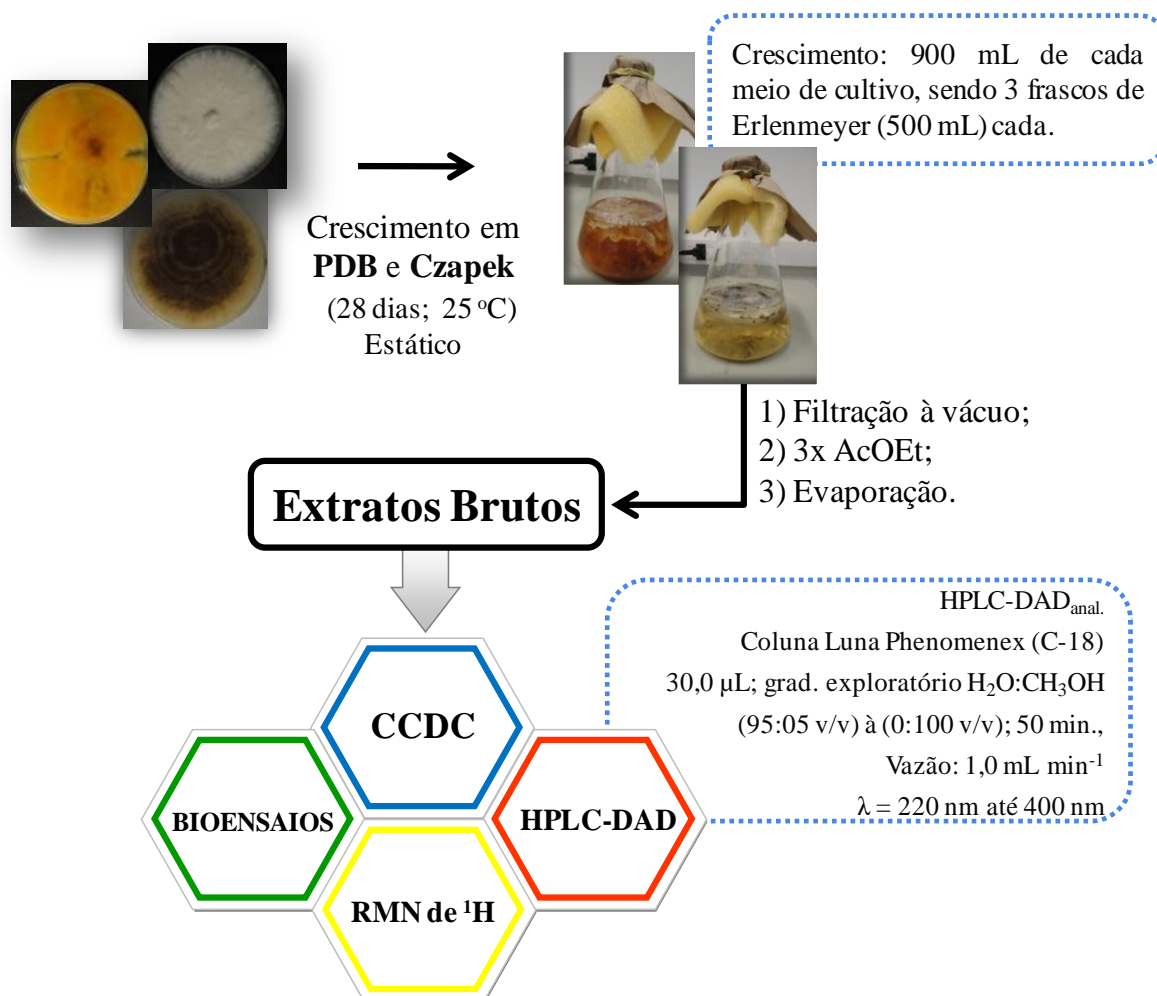
Fonte: Autor

Após o isolamento, os fungos endofíticos selecionados para os estudos químicos foram identificados por taxonomia e biologia molecular pelo Prof. Dr. Ludwig Heinrich Pfenning, da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e estão depositados na Micoteca do Departamento de Química Orgânica do IQ/Ar-UNESP.

3.2.2 Obtenção dos extratos brutos dos endófitos em PDB e Czapek (escala reduzida)

Os dezessete fungos endofíticos foram primeiramente cultivados em PDA (placas de Petri) durante 10 dias a 25 °C e posteriormente aproximadamente um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado em cada meio líquido: PDB e Czapek, sob modo estático por 28 dias a 25° C (Figura 14). O cultivo em escala reduzida foi realizado adicionando em frascos de Erlenmeyer (500,0 mL), 900,0 mL de cada meio líquido sendo estes previamente autoclavados a 121° C por 20 minutos. Após 28 dias de incubação o caldo fermentado foi separado do micélio por filtração a vácuo e submetido à partição líquido/líquido com AcOEt. O solvente foi evaporado, obtendo-se assim os extratos brutos (Tabela 6). Paralelamente foi realizado o branco PDB e Czapek seguindo a mesma metodologia sem a inoculação dos fungos endofíticos.

Figura 14. Cultivo e obtenção dos extratos brutos em PDB e Czapek (escala reduzida).



Fonte: Autor

Os solventes recolhidos foram reutilizados nesta extração e após o término desta foram adequadamente descartados em frascos previamente rotulados e encaminhados ao descarte conforme as Normas Gerais de Gerenciamento de Resíduos Químicos no IQ/UNESP presente no site: www.iq.unesp.br/APOIO-TECNICO/normas-residuos.pdf.

Os extratos brutos obtidos foram submetidos aos ensaios biológicos, a RMN de ^1H e a HPLC-DAD. As amostras foram submetidas a um “clean up” utilizando cartuchos de sílica C-18 acoplado em membrana (0,2 μm). Após este procedimento, as amostras (3,5 mg mL $^{-1}$) foram injetadas em HPLC-DAD, utilizando uma coluna analítica Phenomenex Luna tipo octadesil silano (C-18), com injeção de 30,0 μL e eluição em gradiente exploratório H_2O : CH_3OH (95:05 v/v) à (0:100 v/v) por 50 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., numa vazão de 1,0 mL min $^{-1}$ e $\lambda = 220$ nm a 400 nm.

3.2.3 Obtenção dos extratos brutos de *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. em PDB (escala ampliada)

Para obtenção dos extratos brutos em escala ampliada, o fungo endofítico *Xylaria cubensis* (Eb_caH_5) foi cultivado em 17 frascos de Erlenmeyers (5,1 L), o *Diaporthe* sp. (Eb_caS_4) em 19 frascos de Erlenmeyers (5,7 L) e o *Colletotrichum* sp. (Eb_frmH_1) em 40 frascos de Erlenmeyers (12 L), todos contendo meio de cultura PDB. A metodologia de crescimento e extração foi a mesma utilizada em escala reduzida (item 3.2.2). O solvente foi evaporado, obtendo-se assim os extratos brutos. Os extratos AcOEt foram submetidos a análise do perfil químico em RMN de ^1H e em HPLC-DAD nas mesmas condições descritas no item 3.2.2.

3.2.4 Fracionamento dos extratos brutos em PDB (escala ampliada)

A análise dos cromatogramas em HPLC-DAD dos extratos brutos em escala ampliada em PDB permitiu realizar um fracionamento de cada extrato por cromatografia em coluna sob vácuo, utilizando como fase estacionária sílica de fase reversa (C18) e como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente (Tabela 4 e 5), resultando em 6 frações cada fracionamento.

Tabela 4. Dados dos fracionamentos em coluna aberta dos extratos AcOEt (escala ampliada).

Extratos AcOEt	Massa aplicada	Dimensões da coluna	Massa C18	Volume de cada eluição	Gradiente de eluição
Eb_caH_5 (<i>Xylaria cubensis</i>)	630 mg	16,5 cm (C18) x 3,5 cm de diâmetro	100 g	240 mL	H ₂ O: CH ₃ OH 30-100% (CH ₃ OH (v/v))
Eb_caS_4 (<i>Diaporthe</i> sp.)	370 mg	14,5 cm (C18) x 3,5 cm de diâmetro	80 g	210 mL	
Eb_frmH_1 (<i>Colletotrichum</i> sp.)	1.050 g	16,0 cm (C18) x 3,5 cm de diâmetro	95 g	230 mL	

Tabela 5. Massas das frações obtidas do fracionamento dos extratos AcOEt (escala ampliada).

Frações	% CH ₃ OH	Massa (mg)		
		Eb_caH_5	Eb_caS_4	Eb_frmH_1
Fr1	30%	290,0	145,5	600,0
Fr2	55%	200,1	96,0	324,5
Fr3	65%	80,0	74,9	40,6
Fr4	80%	25,0	15,0	19,0
Fr5	95%	11,1	4,8	6,5
Fr6	100%	18,0	2,3	3,8

As frações obtidas foram submetidas a análise em RMN de ¹H e em HPLC-DAD nas mesmas condições descritas no item 3.2.2.

3.2.5 Isolamento dos metabólitos produzidos por *Xylaria cubensis* (Eb_caH_5)

A separação cromatográfica de Eb_Xyl-Fr1, Eb_Xyl-Fr2 e Eb_Xyl-Fr3 foram otimizadas em HPLC-DAD analítico (Shimadzu) utilizando uma coluna C18 (Phenomenex-Luna; 250 x 4,60 mm; 5 µm) e eluição em gradiente (H₂O:CH₃OH). Após as otimizações, as amostras foram fracionadas em HPLC-DAD preparativo (Shimadzu) em colunas C18 (Phenomenex-Luna; 150 x 21,2 mm; 5 µm e 250 x 10,0 mm; 5 µm) (Figura 15, 16 e 17).

Figura 15. Isolamentos dos metabólitos da fração Eb_Xyl-Fr1, produzidos por *Xylaria cubensis*.

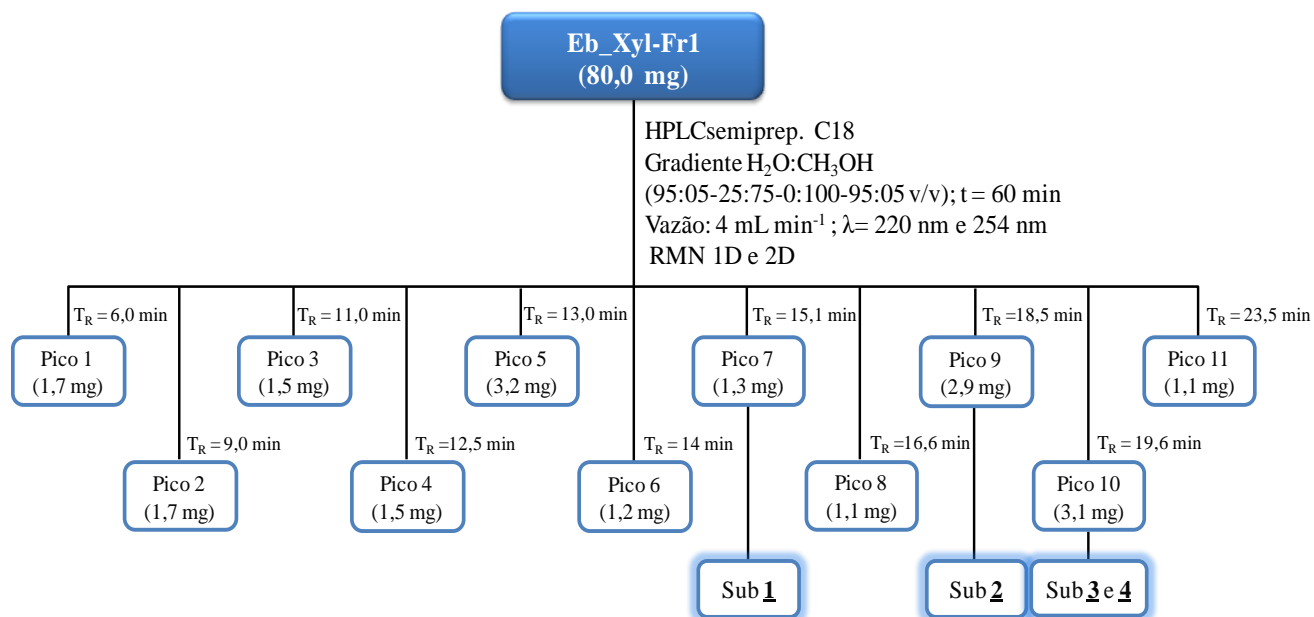


Figura 16. Isolamentos dos metabólitos da fração Eb_Xyl-Fr2, produzidos por *Xylaria cubensis*.

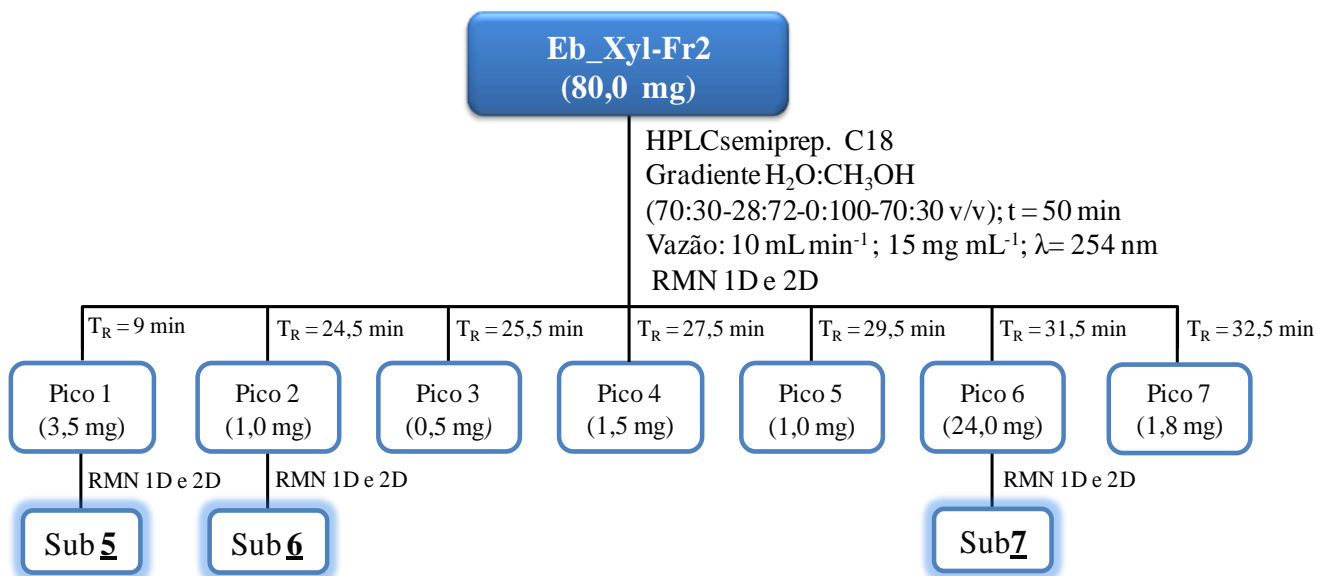
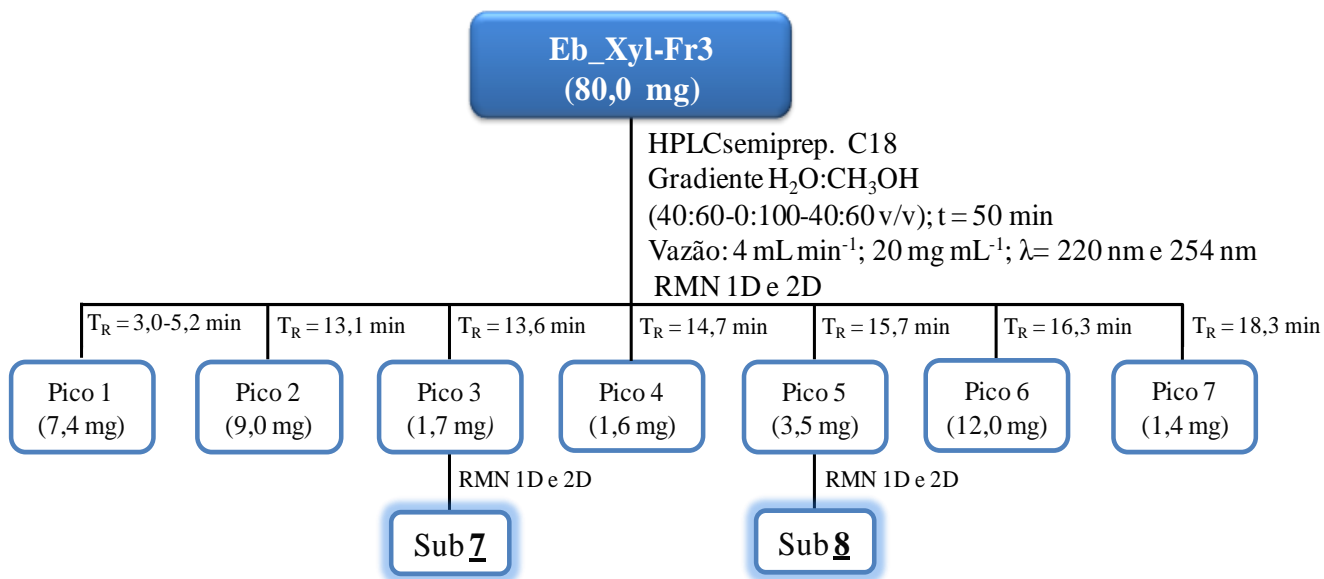


Figura 17. Isolamentos dos metabólitos da fração Eb_Xyl_5-Fr3, produzidos por *Xylaria cubensis*.

3.2.6 Isolamento dos metabólitos produzidos por *Diaporthe* sp. (*Eb_caS_4*)

A separação cromatográfica de Eb_Diap_4-Fr1 e Eb_Diap_4-Fr3 foram otimizadas em HPLC-DAD analítico (Shimadzu) utilizando uma coluna C18 (Phenomenex-Luna; 250 x 4,60 mm; 5 μm) e eluição em gradiente (H₂O:CH₃OH). Após as otimizações, as amostras foram fracionadas em HPLC-DAD preparativo (Shimadzu) em colunas C18 (Phenomenex-Luna; 150 x 21,2 mm; 5 μm e 250 x 10,0 mm; 5 μm) (Figura 18 e 19).

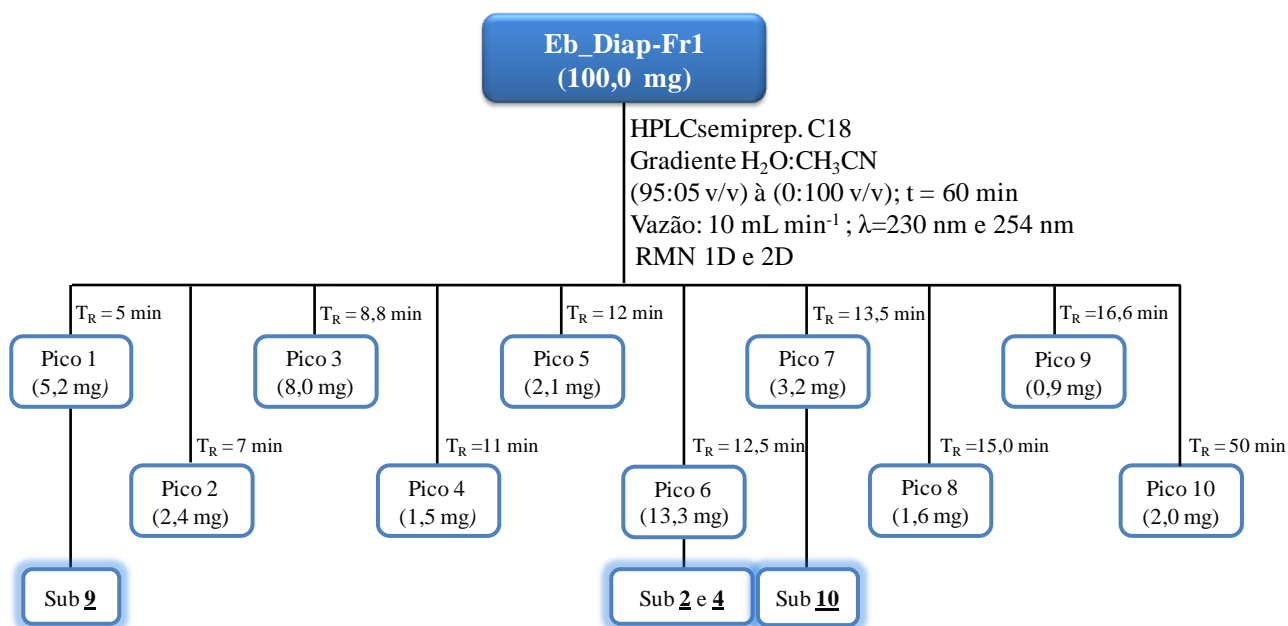
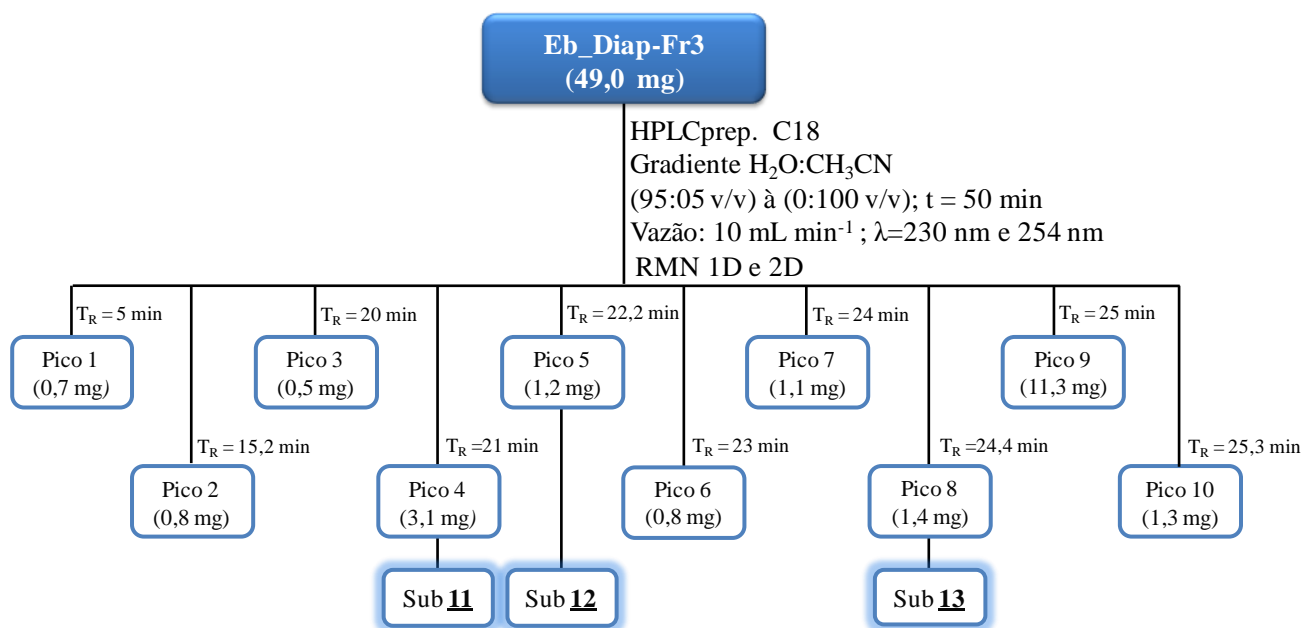
Figura 18. Isolamentos dos metabólitos da fração Eb_Diap_4-Fr1, produzidos por *Diaporthe* sp.

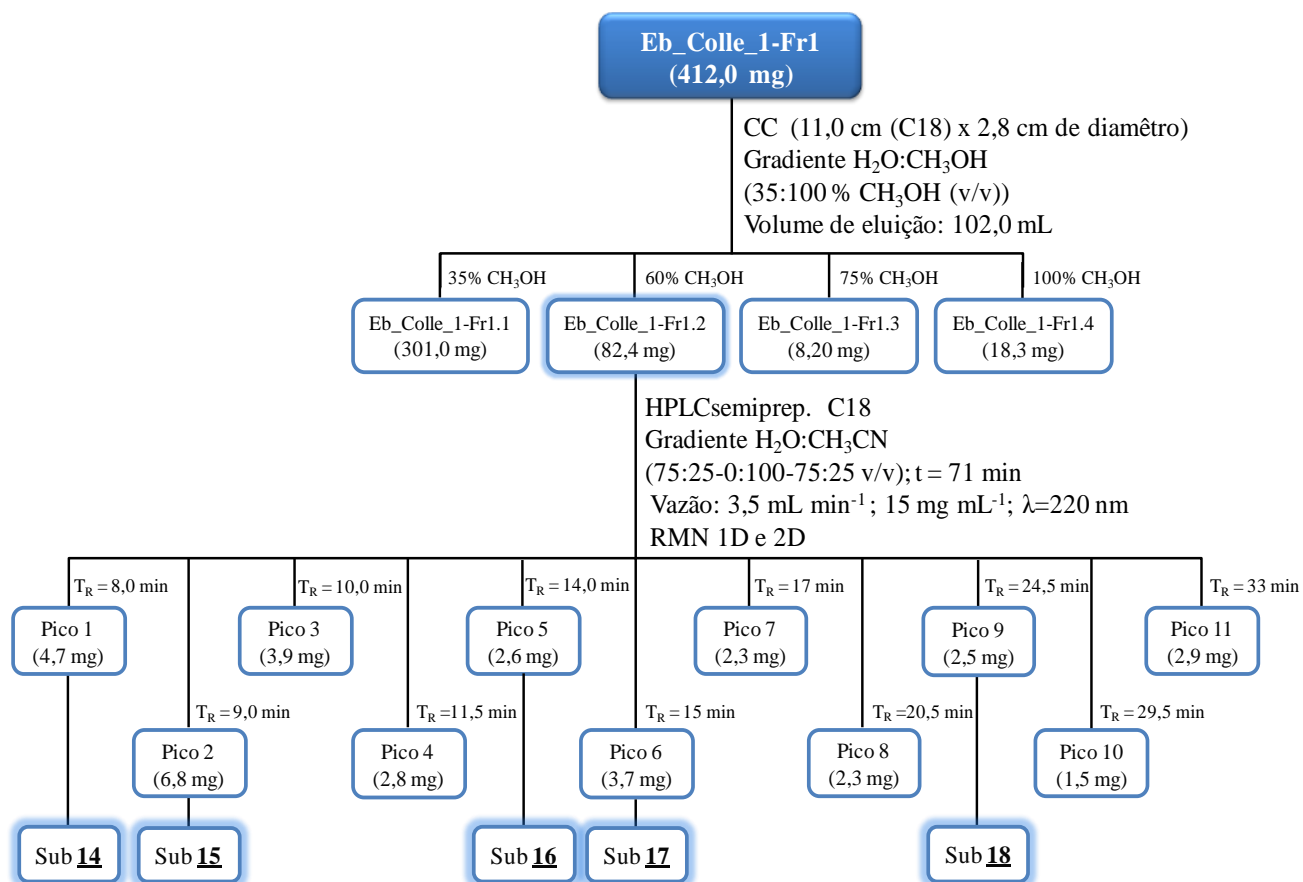
Figura 19. Isolamentos dos metabólitos da fração Eb_Diap_4-Fr3, produzidos por *Diaporthe* sp.

3.2.7 Isolamento dos metabólitos produzidos por *Colletotrichum* sp. (*Eb_frmH_1*)

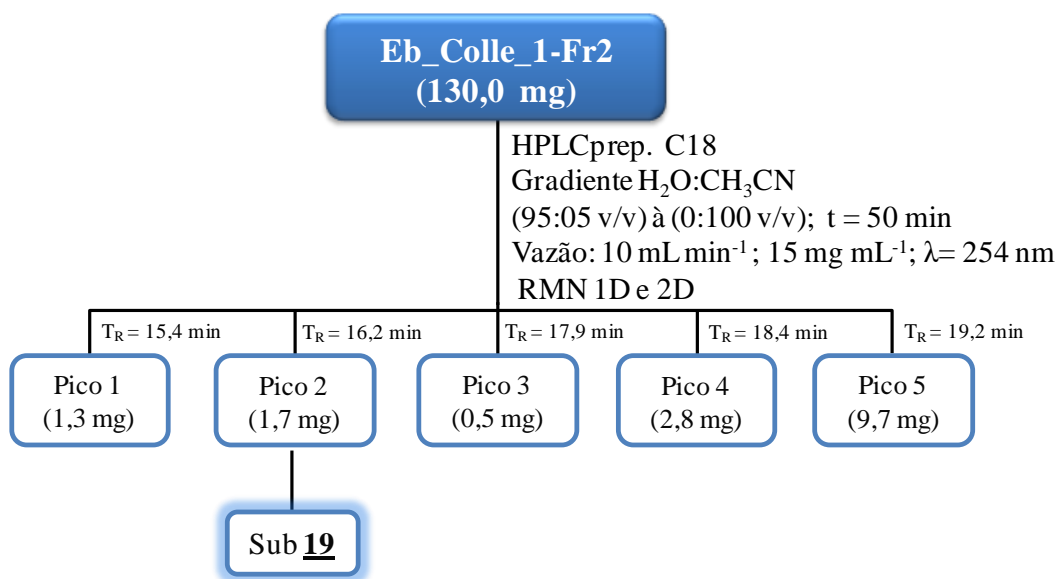
Primeiramente a fração Eb_Colle_1-Fr1 foi fracionada por cromatografia em coluna aberta sob vácuo, utilizando como fase estacionária sílica de fase reversa (C18) e como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente, resultando em 4 frações (Figura 20).

A separação cromatográfica de Eb_Colle_1-Fr1.2 foi otimizada em HPLC-DAD analítico (Shimadzu) utilizando uma coluna C18 (Phenomenex-Luna; 250 x 4,60 mm; 5 μm) e eluição em gradiente (H₂O:CH₃CN). Após as otimizações, a amostra foi fracionada em HPLC-DAD preparativo (Shimadzu) em coluna C18 (Phenomenex-Luna; 250 x 10,0 mm; 5 μm) (Figura 20).

Figura 20. Fracionamento de Eb_Colle_1-Fr1 e isolamento dos metabólitos da fração Eb_Colle_1-Fr1.2, produzidos por *Colletotrichum* sp.



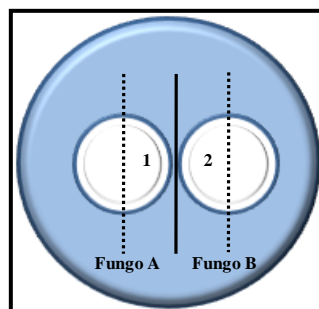
A separação cromatográfica de Eb_Colle_1-Fr2 foi otimizada em HPLC-DAD analítico (Shimadzu) utilizando uma coluna C18 (Phenomenex-Luna; 250 x 4,60 mm; 5 μm) e eluição em gradiente (H₂O:CH₃CN). Após as otimizações, a amostra foi fracionada em HPLC-DAD preparativo (Shimadzu) em coluna C18 (Phenomenex-Luna; 150 x 21,20mm; 5 μm) (Figura 21).

Figura 21. Isolamentos dos metabólitos da fração Eb_Colle_1-Fr2, produzidos por *Colletotrichum* sp.

3.2.8 Co-cultivo

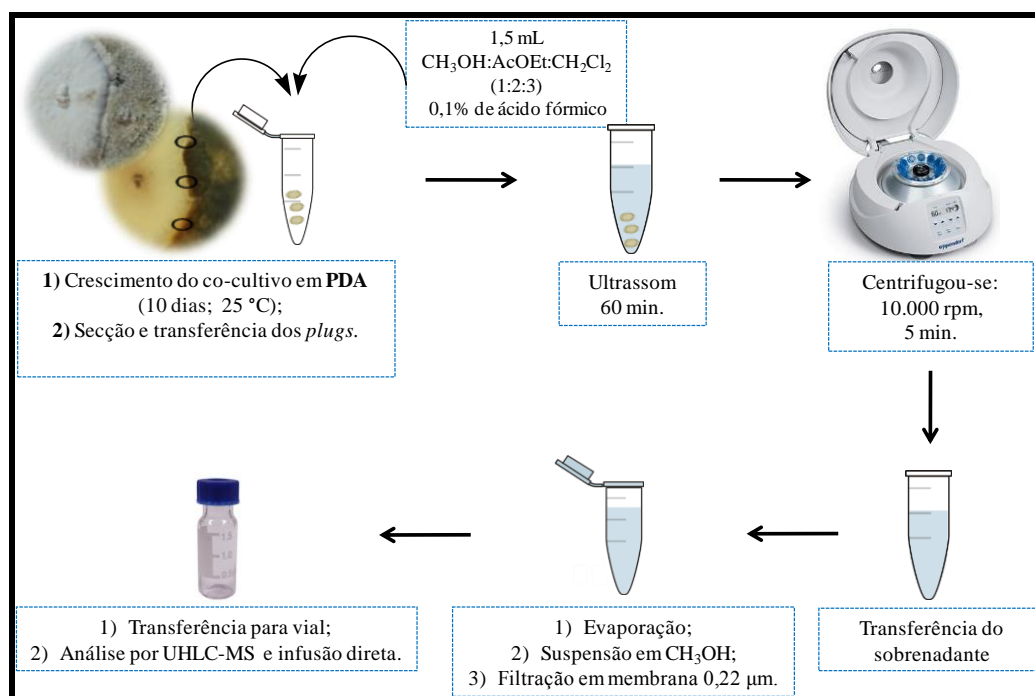
3.2.8.1 Co-cultivo em meio sólido (PDA)

Xylaria cubensis (A), *Diaporthe* sp. (B) e *Colletotrichum* sp. (C) foram primeiramente cultivados em PDA (placas de Petri) durante 10 dias a 25 °C. Os co-cultivos foram realizados por micro-cultivos, em placas de Petri contendo PDA, inoculando dois *plugs* (5 mm) de cada linhagem fúngica em lados opostos da placa de Petri, numa distância de aproximadamente 2 cm uma da outra. Após 7 dias de incubação, três *plugs* (5 mm de diâmetro) das regiões de micro-extração do co-cultivo (Figura 22) foram seccionados e transferidos para eppendorf (2 mL) (triplicata). Adicionou-se 1,5 mL da mistura de solventes CH₃OH:AcOEt:CH₂Cl₂ (1:2:3) com 0,1% de ácido fórmico em cada eppendorf (2 mL). Estes foram submetidos à extração por ultrassom por 60 min. Em seguida, centrifugou-se por 5 min a 10.000 rpm e transferiu-se o sobrenadante para outro eppendorf. Logo após a evaporação, realizou-se a suspensão em CH₃OH e filtrou-se as amostras em membrana PTFE 0,22 µm e transferido para *vial* de 2 mL para análise em UPLC (Waters), UHLC-MS e infusão direta (UPLC Thermo Scientific® acoplado ao espectrômetro de massas (HRMS) LTQ Orbitrap Velos) (Figura 24). Utilizou-se uma coluna analítica Acquity UPLC®, sílica C-18 (2,1 x 100 mm; 1,7 µm), com injeção de 10,0 µL e eluição em gradiente H₂O:CH₃CN (75:25-10:90-02:98-75:25 v/v, 0,1 % de ácido fórmico) por 10 min., numa vazão de 0,4 mL min⁻¹ e λ= 220 nm a 400 nm. Estes experimentos foram realizados em triplicata (MEDEIROS, L. S., 2014).

Figura 22. Regiões de micro-extração dos co-cultivos.

Fonte: Adaptado Medeiros (2014).

As regiões de micro-extração do co-cultivo (Região 1 e 2) podem ser visualizadas na Figura 22, sendo esta a interface de crescimento entre os fungos. Além disso, *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. foram cultivados separadamente em PDA como controles para posterior comparação.

Figura 23. Micro-extração dos co-cultivos fúngicos.

Fonte: Adaptado Medeiros (2014).

3.2.8.2 Co-cultivo em meio líquido (PDB)

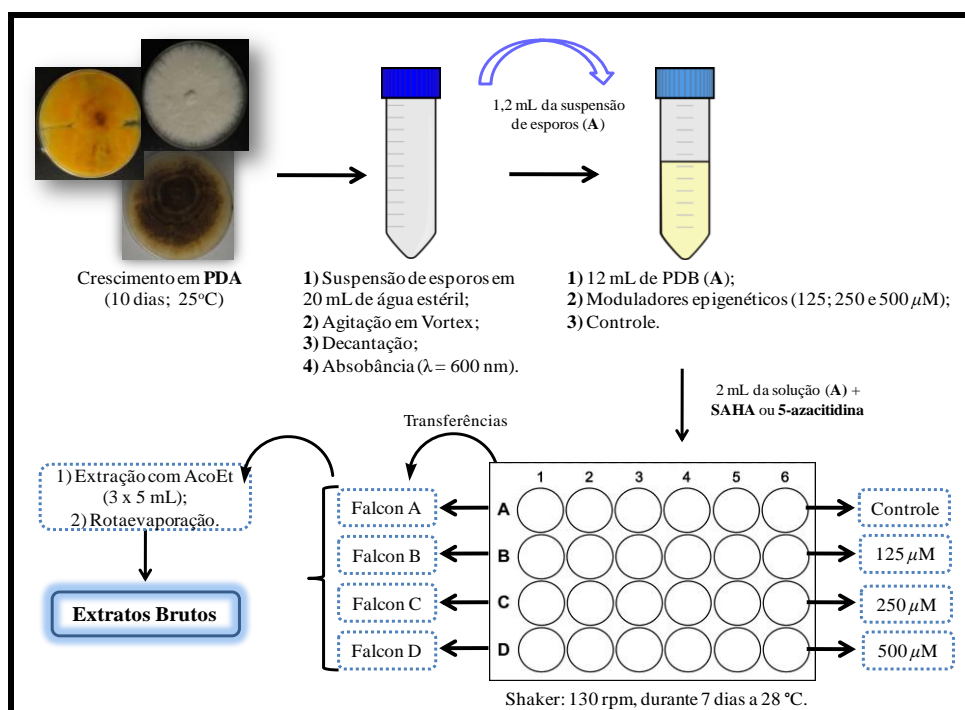
Xylaria cubensis (A), *Diaporthe* sp. (B) e *Colletotrichum* sp. (C) foram primeiramente cultivados em PDA (placas de Petri) durante 10 dias a 25 °C e posteriormente aproximadamente um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado em meio líquido

(PDB), seguindo as combinações: A+B, A+C e B+C. O co-cultivo realizou-se em escala reduzida, utilizando 900 mL de PDB para cada co-cultivo (triplicata), sendo estes previamente autoclavados a 121 °C por 20 minutos. A metodologia de crescimento e extração foi a mesma utilizada no item 3.2.2. O solvente foi evaporado, obtendo-se assim os extratos brutos (Tabela 33). Os perfis químicos dos extratos AcOEt foram analisados por LC-MS (UPLC Thermo Scientific® acoplado ao espectrômetro de massas (HRMS) LTQ Orbitrap Velos) e por RMN de ¹H. Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizado os softwares MATLAB, versão 8.3.0.532 e Amix, versão 3.9.12.

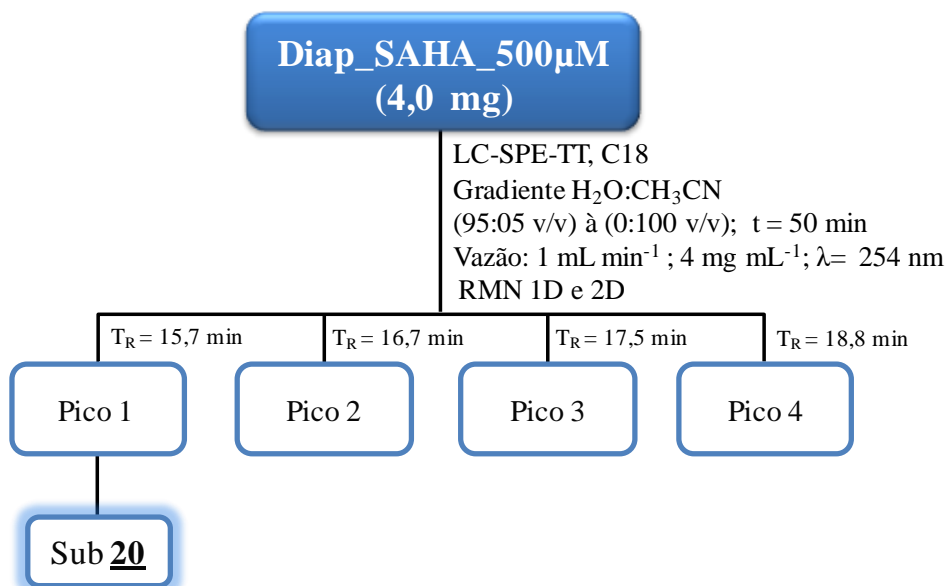
3.2.9 Epigenética

Os fungos endofíticos *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. foram primeiramente cultivados em PDA (placas de Petri) durante 10 dias a 25 °C. Em seguida preparou-se uma suspensão de esporos e mediu-se a transmitância ($\lambda = 600$ nm) em espectrofotômetro de UV/Vis. A suspensão de esporos foi adicionada (1,2 mL) em tubos Falcon, os quais continham 12 mL de PDB e diferentes concentrações dos modificadores epigenéticos, ácido hidroxâmico suberoilânilda e 5-azacitidina (125; 250 e 500 μ M). As soluções preparadas nos tubos Falcon foram transferidos para placas de 24 poços sendo incubadas com agitação orbital durante 7 dias, a 28 °C e 160 rpm. Após esse período o volume presente nos poços foi transferido para tubos Falcon e foram submetidos à extração líquido/líquido com acetato de etila (3 x 5,0 mL) O solvente foi evaporado obtendo-se os respectivos extratos brutos (Figura 24). Os extratos brutos foram submetidos à análise por HPLC acoplado a espectrometria de massas a baixa resolução (Agilent 3200 QTRAP (Linear Ion Trap Quadrupole LC/MS/MS) (LC-MS e infusão direta) e à análise por espectrometria de massas de alta (Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos). Utilizou-se uma coluna analítica Phenomenex Luna tipo octadesil silano (C-18), com injeção de 30,0 μ L e eluição em gradiente H₂O:CH₃CN (95:05 v/v) à (0:100 v/v) por 50 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., numa vazão de 1,0 mL min⁻¹ e $\lambda = 220$ nm a 400 nm.

A separação cromatográfica do extrato Diap_SAHA_500 μ M foi realizada em LC-SPE-TT em coluna C18 (Phenomenex-Luna 250 x 10,0 mm; 5 μ m) (Figura 25), injeção de 30,0 μ L e eluição em gradiente H₂O:CH₃CN (95:05 v/v) à (0:100 v/v) por 50 min., permanecendo nesta condição por mais 10 min., numa vazão de 1,0 mL min⁻¹ e $\lambda = 254$ nm.

Figura 24. Cultivo e obtenção dos extratos brutos em PDB com moduladores epigenéticos.

Fonte: Autor.

Figura 25. Isolamentos dos metabólitos do extrato Diap_SAHA_500 μM , produzidos por *Diaporthe* sp., com o modulador SAHA 500 μM .

3.2.10 Ensaio Biológicos

3.3.10.1 Avaliação da atividade antifúngica¹

Os extratos brutos (40 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) e as frações (20 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) foram eluídos em CCDC ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (88:12)). As cromatoplas foram nebulizadas com os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (concentração de 5×10^7 esporos mL^{-1} , em solução de glicose e sais). As placas foram incubadas a 25° C por 48 horas, na ausência de luz. O padrão positivo utilizado para comparação foi a nistatina (5 μg).

3.3.10.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica¹

A atividade anticolinesterásica foi detectada a partir da eluição dos extratos brutos (20 $\mu\text{g } 1 \mu\text{L}^{-1}$) em placas de sílica gel com eluentes adequados. Nestas cromatoplas foram borrifadas uma solução da enzima acetilcolinesterase, em seguida incubadas em câmara úmida fechada a 37° C por 20 minutos e após este período foi borrifada uma solução C². Como padrão positivo foi utilizado o composto fisostigmina a 0,05 $\mu\text{g } \text{mL}^{-1}$ (MARSTON; KISSLING; HOSTETTMANN, 2002).

¹Ensaio biológico realizado pela Profa. Dra. Maria Claudia Marx Young do Instituto Botânico, SP.

²Solução C contém 10 mL da solução A e 40 mL da solução B. Solução A: 250 mg de acetato de 1-naftila em 100 mL de etanol. Solução B: 400 mg do sal Fast Blue B em 160 mL de água destilada.

3.3.10.3 Avaliação da atividade antitumoral (citotoxicidade)²

O potencial citotóxico dos extratos brutos foi avaliado usando linhagens de células tumorais. As linhagens a serem utilizadas são MCF-7 (mama - humano), HCT-8 (cólon-humano) HL-60 e CEM (leucemia promielocítica humana) e Melanoma- B16 (pele-murino), cedidas pelo Mercy Children's Hospital, foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . Neste ensaio as células foram plaqueadas 2×10^4 céls./100 μL , para células suspensas e 2×10^3 céls 100 μL^{-1} , para células aderidas. As amostras teste foram acrescidas em diferentes concentrações, que variam entre 3,9 a 125 $\mu\text{g } \text{mL}^{-1}$ para extratos. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37° C. Em seguida, foram centrifugadas e o sobrenadante removido, quando então foram adicionados 200 μL da solução de MTT (sal de tetrazolium), incubando-se as placas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO em espectrofotômetro de placa a $\lambda = 550 \text{ nm}$.

²Ensaio realizados pelas Profa. Dra. Letícia Lotufo e Cláudia Pessoa, UFC, LOE.

3.3.10.4 Avaliação da atividade fitotóxica sobre o crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L.)³

A avaliação da atividade fitotóxica foi realizada pelo bioensaio de crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L. variedade Pizon). Cariopses de trigo foram germinadas em água destilada e mantidas em câmara de germinação a 25° C, durante 4 dias em ausência de luz (HANCOCK, et al. 1964). Posteriormente sob luz verde (NITSCH e NITSCH, 1956), para evitar a estagnação do crescimento das células, os coleóptilos foram selecionados e cortados em guilhotina de Van der Weij. Os ápices dos coleóptilos foram descartados, enquanto o restante foi cortado em 4 mm e adicionados em tubos de ensaio contendo uma solução tampão⁴ (pH = 5,6). Em cada tubo de ensaio foi adicionado 2 mL das amostras nas concentrações 0,8, 0,4 e 0,2 mg mL⁻¹ e cinco coleóptilos, sendo assim mantidos a 25 °C no escuro, sob agitação de 6 rpm (MACÍAS et al., 2010). Após 24h, os coleóptilos foram retirados dos tubos, fotografados e medidos com o auxílio do programa Image J. Como controle positivo foi utilizado o herbicida comercial GOAL[®] (Oxyfluorfen 240 g.i.a. L⁻¹) nas mesmas concentrações das amostras. Como controle negativo foi utilizado a solução tampão com DMSO (5%). A substância pura, foi testada nas concentrações 10⁻³, 3. 10⁻⁴, 10⁻⁴, 3. 10⁻⁵, 10⁻⁵ (NOVAES et al., 2013).

Os dados foram avaliados pela porcentagem de inibição ou estímulo em relação ao controle negativo, onde o “zero” referencia o controle, enquanto os valores positivos indicam o estímulo da característica analisada, e os negativos a inibição (NOVAES et al., 2013).

Todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Posteriormente foi utilizado ANOVA, seguida do teste de Tukey.

³ Ensaios realizados pela Profa. Dra Sonia Cristina Juliano Gualtieri, UFSCAR.

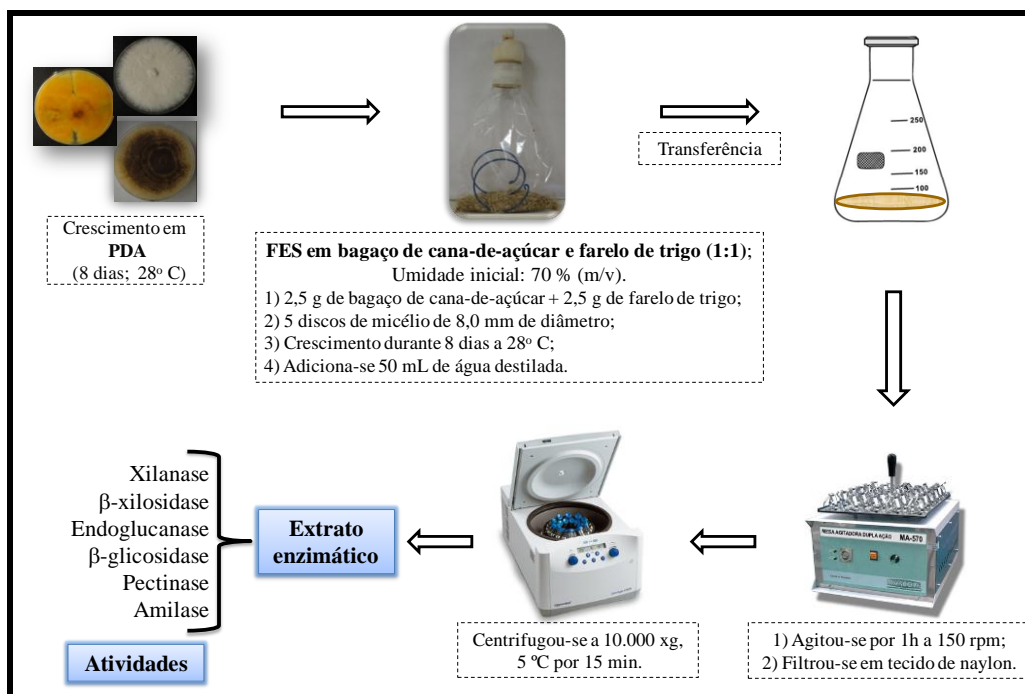
⁴ Solução tampão: sacarose (20 g L⁻¹), ácido cítrico monohidratado (1,05 g L⁻¹) e hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g L⁻¹).

3.2.11 Prospecção Enzimática

Todos os fungos endofíticos isolados de *E. brasiliensis* foram cultivados por fermentação em estado sólido (FES) em bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1) previamente lavados e secos a 65 °C. O bagaço foi triturado em triturador e peneirado em peneira de 0,59 mm de malha para a remoção do excesso de pó. Segundo metodologia adaptada de Lotong e Suwanarit (1985) e Merheb-Dini et al., (2007) a FES foi realizada em sacos de polipropileno autoclaváveis de 16 x 22 cm. Adicionou-se em cada saco 2,5 g de

bagaço de cana-de-açúcar, 2,5 g de farelo de trigo e um espiral de fio de cobre encapado, para evitar a compactação do saco com o meio de cultivo. Um pedaço de cano de PVC (5 cm de altura x 2,2 cm de diâmetro) foi utilizado como gargalo, vedado com tampão de algodão. Então cada saco de fermentação continha 5g de substrato e a umidade inicial foi padronizada em 70% (m/v), utilizando-se solução nutriente composta por (g L^{-1}): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3,5); KH_2PO_4 (3,0); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5); CaCl_2 (0,5) e Tween 80 (10,0), sendo o pH ajustado para 5,0. O material foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Para cada cultivo em FES, os fungos foram pré-cultivados, a 28 °C, em placas de Petri contendo meio de batata dextrose agar (PDA), por 8-10 dias até completo desenvolvimento micelial. Após este período, 5 discos de micélio de 8,0 mm de diâmetro foram utilizados como inóculo para cada saco de fermentação. Após o período de cultivo por FES, durante 8 dias, a 28 °C, foi adicionado 50 mL de água destilada em cada saco de fermentação para a extração das enzimas. Esta mistura foi homogeneizada manualmente, sendo transferida para frascos Erlenmeyer (250 mL) e mantida sob agitação de 150 rpm, por 1 hora, sob temperatura ambiente. Após este período, a mistura foi filtrada em tecido de nylon, o filtrado foi centrifugado a 10.000 xg, a 5 °C, por 15 minutos e as atividades enzimáticas foram quantificadas no sobrenadante (Figura 26).

Figura 26. Prospecção enzimática nos fungos endofíticos isolados de *Eugenia brasiliensis*.



Fonte: Autor

3.2.11.1 Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada em mistura de reação contendo 25 μL do extrato enzimático e 225 μL de solução de substrato xilana Beechwood (Sigma X4252) ($10,0 \text{ g L}^{-1}$, em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0). A reação foi mantida a 45°C por 10 minutos e, então, interrompida pela adição de 250 μL do reagente DNS (MILLER, 1959), a partir da curva padrão de xilose. Para o controle da reação adicionou-se 250 μL de DNS, 225 μL de solução de substrato xilana e, por fim, 25 μL do extrato enzimático. As misturas (reação e controle) foram submetidas a banho, a 100°C , por 10 minutos e, em seguida, resfriadas em banho de gelo. Adicionou-se 2,5 mL de água destilada, homogeneizou-se e realizou-se a leitura da absorbância em $\lambda = 540 \text{ nm}$.

3.2.11.2 β -xilosidase

Para a determinação da atividade de β -xilosidase, 50 μL do extrato enzimático foram adicionados à mistura de 250 μL de solução tampão acetato ($0,1 \text{ M}$, pH 5,0) e 250 μL de 4-nitrofenol- β -D-xilopiranosídeo 4 mM (PNPX, Sigma). A reação foi mantida a 45°C , por 10 minutos, e então interrompida com a adição de 2,0 mL de solução de Na_2CO_3 (2 mol L^{-1}). O tubo controle continha as mesmas quantidades de reagentes do tubo de reação, porém com a adição da solução de Na_2CO_3 antes do extrato enzimático. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar $1,0 \mu\text{mol}$ de nitrofenol por minuto de reação (FERNANDEZ; GOMES; SILVA, 2002).

3.2.11.3 Endoglucanase

A atividade de endoglucanase (CMCase) foi determinada pelo mesmo procedimento descrito no item 3.2.11.1, porém utilizando-se carboximetilcelulose (CMC-Sigma C5768) ($40,0 \text{ g L}^{-1}$) como substrato e curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar $1,0 \mu\text{mol}$ de açúcar redutor por minuto de reação.

3.2.11.4 β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi avaliada pelo mesmo procedimento descrito no item 3.2.11.2, exceto pela substituição do substrato pelo 4-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo 4 mM (PNPG, Sigma).

3.2.11.5 Pectinase

A atividade de pectinase foi avaliada em relação à exopoligalacturonase (Exo-PG), sendo pelo mesmo procedimento descrito no item 3.2.11.1, porém utilizando-se pectina de citrus ($10,0 \text{ g L}^{-1}$ em solução tampão acetato pH 5,5, $0,2 \text{ mol L}^{-1}$) como substrato e curva padrão do ácido galaturônico. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar $1,0 \text{ } \mu\text{mol}$ de ácido galaturônico por minuto de reação, sob as condições de reação.

3.2.11.6 Amilase

A atividade desta enzima foi analisada pelo método dextrinizante, como descrito por Fuwa (1954) e por Ponsawasdi e Yagisawa (1987), com pequenas modificações. Para o este método utilizou-se $300 \text{ } \mu\text{L}$ de solução de substrato (amido $5,0 \text{ g L}^{-1}$ em solução tampão acetato, pH 5,0, 0,1M) e $100 \text{ } \mu\text{L}$ de extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada a $45 \text{ } ^\circ\text{C}$, por 10 minutos, e finalizada com $4,0 \text{ mL}$ de HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Adicionou-se $0,5 \text{ mL}$ de solução de iodo (KI $3,0 \text{ g L}^{-1}$ e I_2 $0,3 \text{ g L}^{-1}$) e 10 mL de água, e a leitura da absorbância foi realizada ao $\lambda = 700 \text{ nm}$. O tubo controle continha $300 \text{ } \mu\text{L}$ de solução de substrato, $4,0 \text{ mL}$ de HCl $0,2 \text{ mol/L}$, $0,5 \text{ mL}$ da solução de iodo, $100 \text{ } \mu\text{L}$ de extrato enzimático e 10mL de água. Uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% a intensidade da cor azul do complexo Iodo-Amido por minuto.

Resultados e Discussões

Isolamento de fungos endofíticos associados à Eugenia brasiliensis e Prospecção química, biológica e enzimática dos extratos brutos produzidos pelos fungos endofíticos isolados.

4. Isolamento de fungos endofíticos associados à *Eugenia brasiliensis* e Prospecção química, biológica e enzimática dos extratos brutos produzidos pelos fungos endofíticos isolados.

4.1 Fungos isolados do caule, dos frutos maduros e das folhas

Os fungos endofíticos foram isolados conforme a metodologia descrita no item 3.2.1. O meio de cultivo PDA, foi selecionado para o isolamento, pela sua composição ser rica em nutrientes. Alguns fungos necessitam de condições e nutrientes específicos para o crescimento, o que poderia ter impedido o isolamento de outras linhagens fúngicas. Observou-se que o crescimento dos fungos Eb_FmH_1, Eb_FrmH_2, Eb_FrmH_3, Eb_FrmH_5, Eb_FrmH_6, isolados dos frutos maduros, ocorreu somente em meio de Nutrient ágar. No entanto, os fungos isolados foram as linhagens que mais se adaptaram às condições e nutrientes fornecidos.

A avaliação da pureza das linhagens foi realizada por estrias paralelas e pela aparência uniforme das placas. Foram obtidas 17 linhagens puras (Figuras 27 e 28) codificadas como Eb_caH_1, Eb_caH_3, Eb_caH_4, Eb_caH_5, Eb_caH_6, Eb_caH_7, Eb_caS_1, Eb_caS_2, Eb_caS_3, Eb_caS_4, Eb_FmH_1, Eb_FrmH_2, Eb_FrmH_3, Eb_FrmH_4, Eb_FrmH_5, Eb_FrmH_6 e Eb_flH_1 (Eb= *Eugenia brasiliensis*; ca= caule; fl= folha; frm= frutos maduros; H= Horto da Farmácia; S= SENAI) sendo posteriormente preservados em “slants” (método Castelani) e depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica, IQ-UNESP. O fungo codificado como Eb_FrmH_3 não compõe a Figura 28, devido sua foto não possuir boa resolução.

Figura 27. Fungos endofíticos isolados do caule de *Eugenia brasiliensis*.

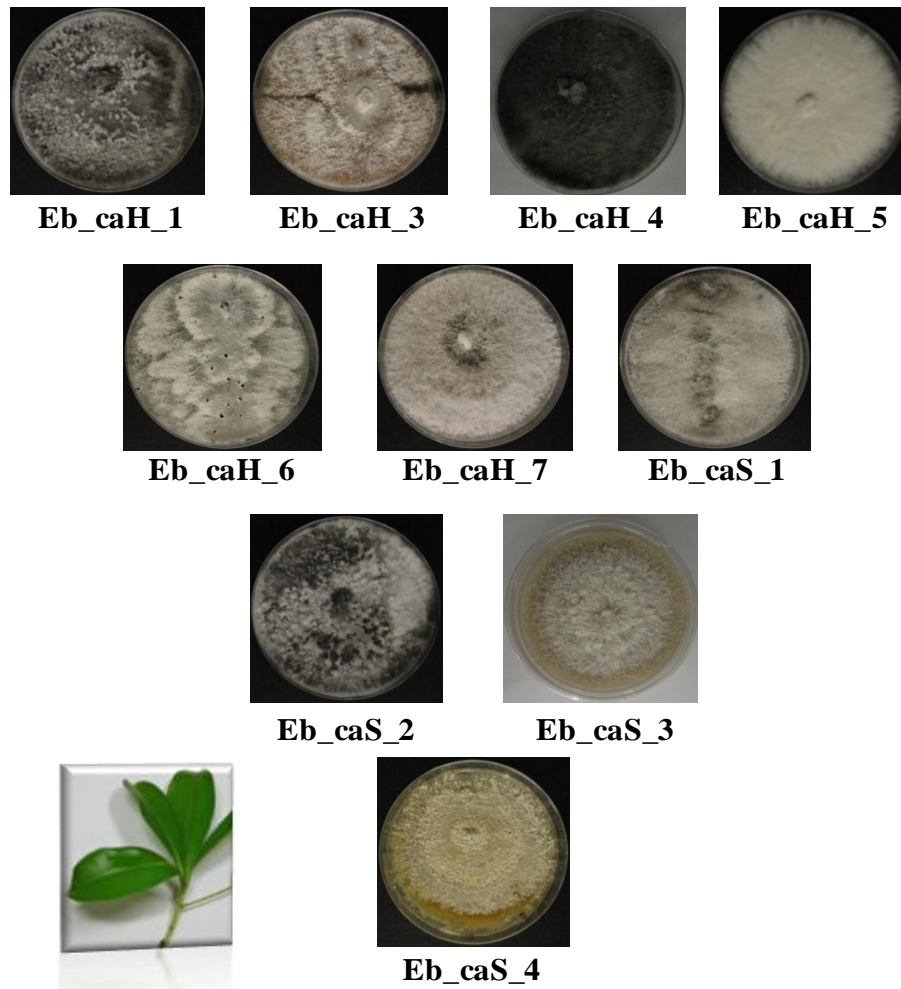
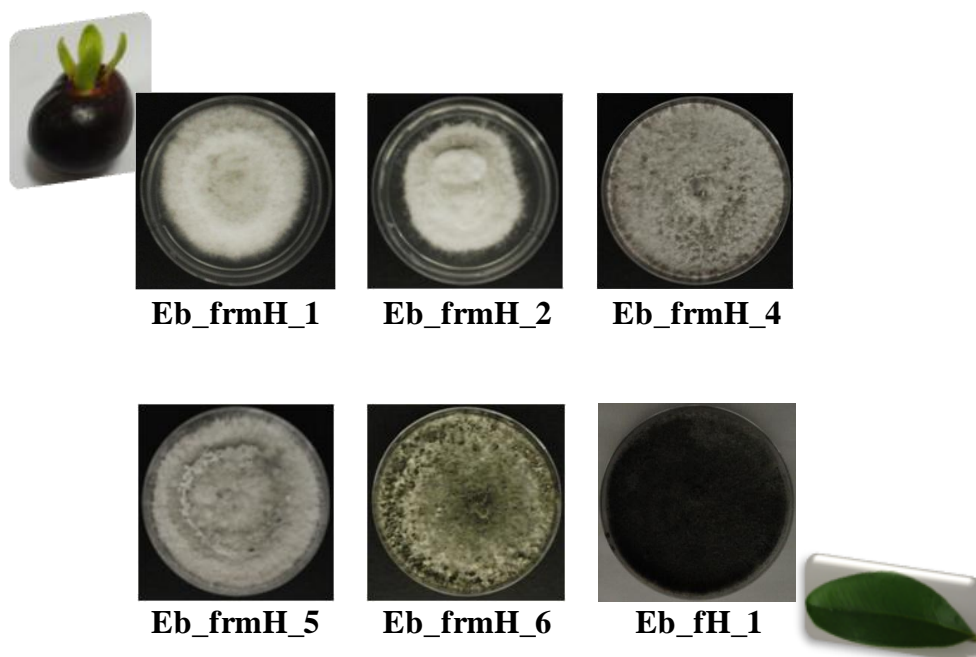


Figura 28. Fungos endofíticos isolados dos frutos maduros e das folhas de *Eugenia brasiliensis*.



4.2. Prospecção química dos fungos endofíticos isolados

4.2.1 Rendimento dos extratos brutos obtidos pelo cultivo em escala reduzida

As 17 linhagens fúngicas isoladas foram cultivadas conforme a metodologia descrita no item 3.2.2. Os dois meios de cultivo foram selecionados pela sua composição química, sendo o PDB, considerado um meio rico em nutrientes essenciais, e o Czapek, que possui majoritariamente compostos inorgânicos.

Os fungos Eb_ca_H_1, Eb_ca_H_3, Eb_ca_H_5, Eb_ca_S_4 e Eb_frm_H_2 destacaram-se por apresentarem rendimentos satisfatórios para ambos os meios de cultivo.

Tabela 6. Massa dos extratos brutos obtida do cultivo dos endófitos dos caules, folhas e frutos maduros em PDB e Czapek (escala reduzida).

Fungos endofíticos	Massas dos extratos (mg)	
	PDB	Czapek
Eb_caH_1	95,5	226,6
Eb_caH_3	54,1	142,3
Eb_caH_4	26,5	148,8
Eb_caH_5	156,2	87,2
Eb_caH_6	39,6	122,6
Eb_caH_7	60,3	61,3
Eb_caS_1	89,2	50,0
Eb_caS_2	84,5	48,2
Eb_caS_3	35,4	82,0
Eb_caS_4	82,6	77,9
Eb_flH_1	25,5	74,7
Eb_frmH_1	130,0	33,0
Eb_frmH_2	105,0	68,0
Eb_frmH_3	23,0	22,0
Eb_frmH_4	46,0	18,0
Eb_frmH_5	154,0	32,0
Eb_frmH_6	65,0	40,0

Eb = *E. brasiliensis*; ca, fl e fm = órgão do isolamento; H e S = local da coleta; numeral = ordem de isolamento dos endófitos.

4.2.2 Perfil cromatográfico dos extratos brutos obtidos em PDB e Czapek (escala reduzida)

Os cromatogramas dos extratos brutos PDB e Czapek, utilizando gradiente exploratório (HPLC-DAD) apresentaram além de picos com diferentes absorvâncias, vários picos com polaridades variando de média a alta, e boa resolução cromatográfica. Comparando os cromatogramas dos extratos brutos em PDB e Czapek (Figuras 29, 30 e 31), observou-se uma maior produção metabólica pelos endófitos cultivados em PDB, podendo evidenciar poucos constituintes químicos no extrato bruto em Czapek, ou constituintes que não absorvem na região ultravioleta. Pode-se observar a variação metabólica dos diferentes meios de cultivo em $\lambda = 254$ nm, no qual os extratos brutos apresentaram picos por todo o cromatograma.

Comparando-se os perfis cromatográficos, observou-se uma semelhança no perfil dos fungos Eb_frmH_1 e Eb_frmH_5. Os cromatogramas apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, podendo indicar fungos da mesma espécie e/ou gênero.

Figura 29. Cromatogramas dos extratos brutos obtidos em PDB e Czapek ($\lambda = 254$ nm) dos endófitos isolados dos frutos maduros: Eb_frmH_1 (a), Eb_frmH_2 (b), Eb_frmH_3 (c), Eb_frmH_4 (d), Eb_frmH_5 (e) e Eb_frmH_6 (f).

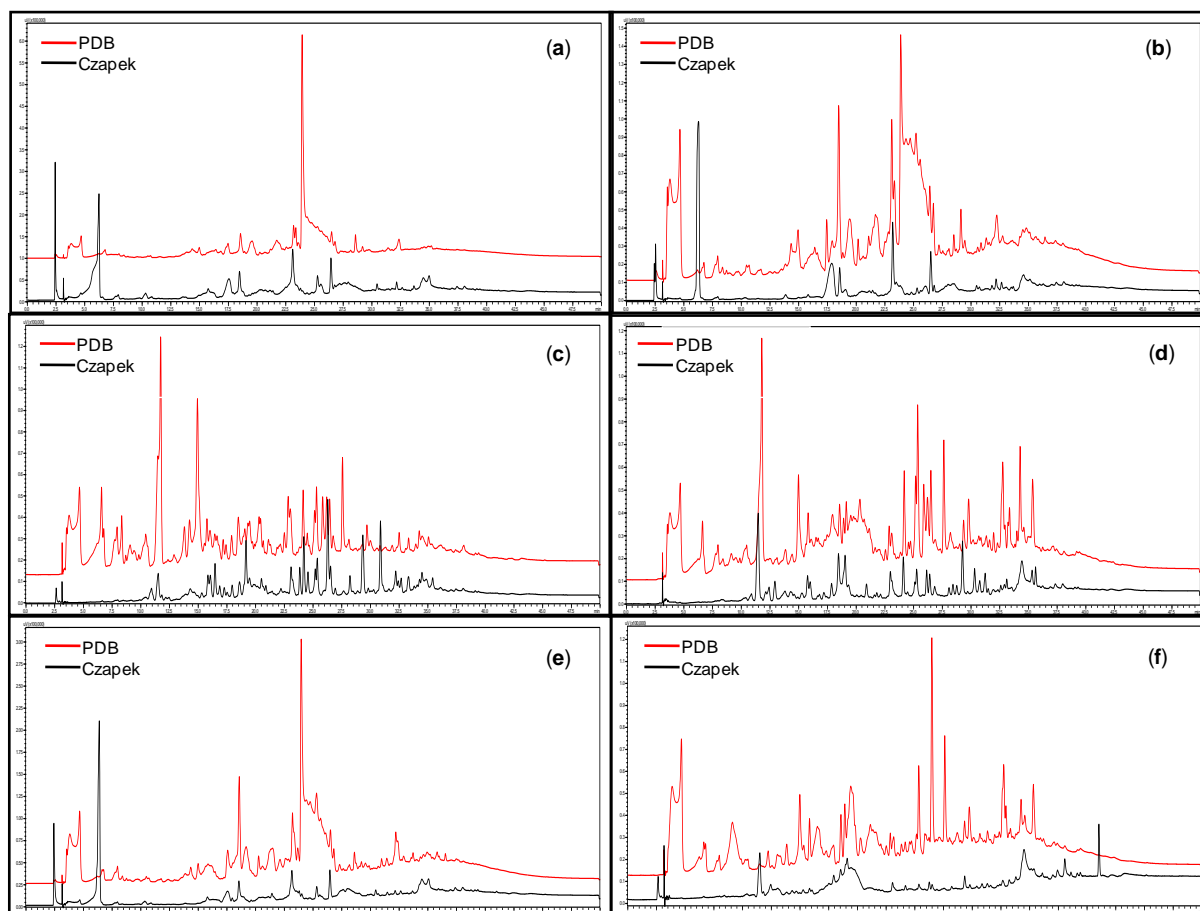


Figura 30. Cromatogramas dos extratos brutos obtidos em PDB e Czapek ($\lambda=254$ nm) dos endófitos isolados de caules de *E. brasiliensis*: Eb_caH_1 (a), Eb_caH_3 (b), Eb_caH_4 (c), Eb_caH_5 (d), Eb_caH_6 (e), Eb_caH_7 (f), Eb_caS_1 (g), Eb_caS_2 (h), Eb_caS_3 (i) e Eb_caS_4 (j).

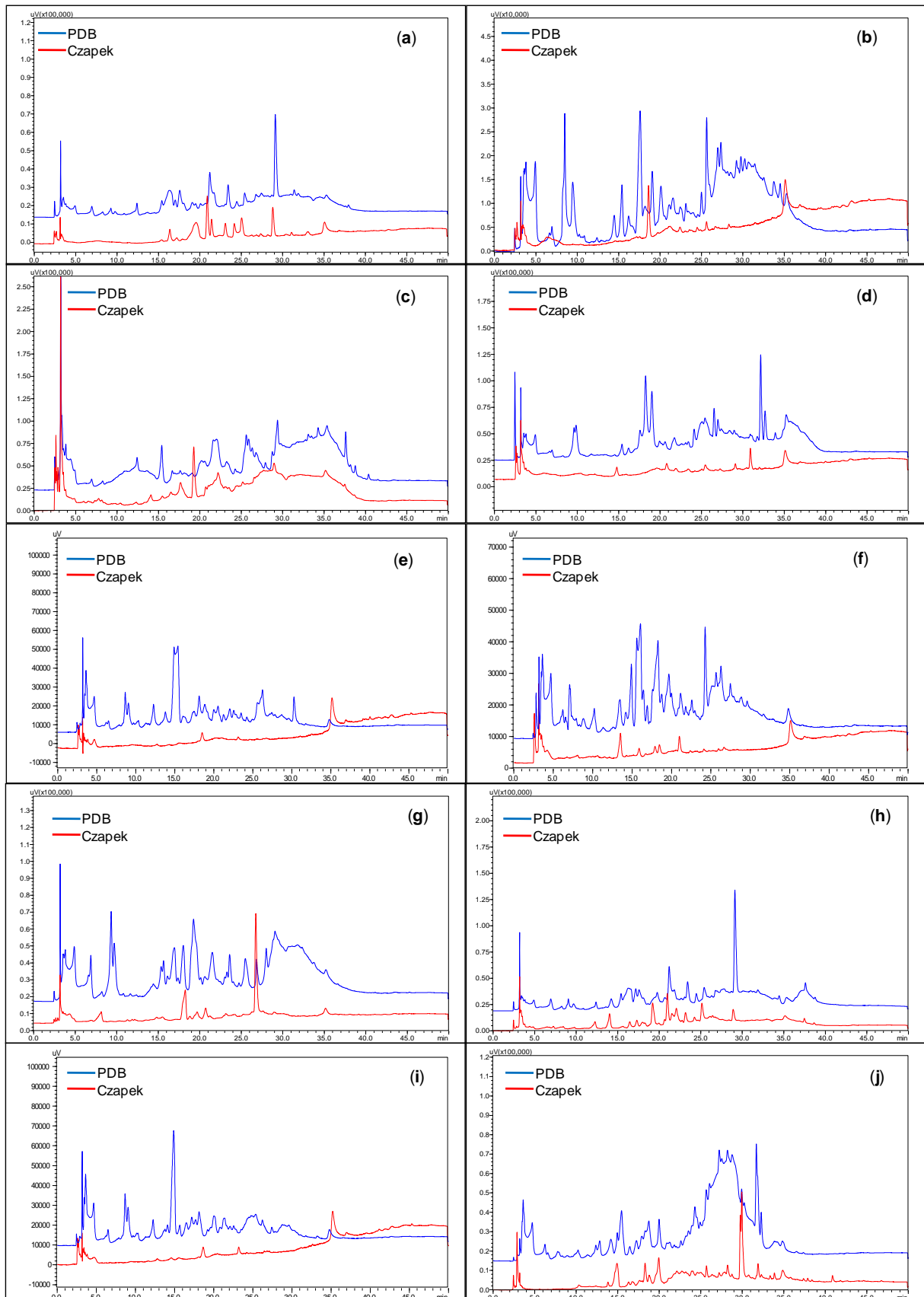
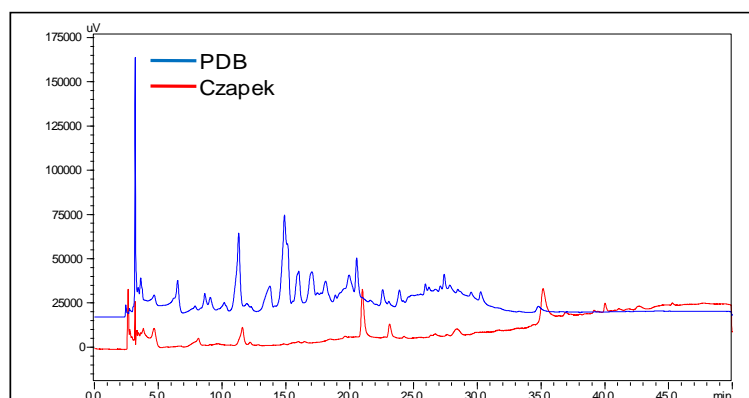


Figura 31. Cromatograma do extrato bruto obtido em PDB e Czapek ($\lambda=254\text{ nm}$) do endófito isolado de folhas de *E. brasiliensis*: Eb_fmH_1.



4.2.3 Perfil químico (RMN de ^1H) dos extratos brutos obtidos em PDB e Czapek (escala reduzida)

Os espectros de RMN de ^1H (Figuras 32, 33 e 34) destes extratos brutos corroboraram com a análise em HPLC-DAD, evidenciando sinais de hidrogênios na região dos carbinólicos (δ_{H} 3,0-4,0 ppm), sinais de hidrogênios aromáticos (δ_{H} 6,5-8,0 ppm), olefínicos (δ_{H} 4,5-6,0 ppm), hidrogênios metilênicos e metílicos (δ_{H} 0,8-3,0 ppm). Os extratos em PDB dos fungos Eb_fmH_1, Eb_fmH_2 e Eb_fmH_5 apresentaram um sinal interessante em δ_{H} 10,9, podendo ser sinais de hidrogênio de ácido carboxílico ou hidroxila quelada. Majoritariamente houve uma produção metabólica superior em PDB, devido à rica composição deste meio de cultivo, mas os extratos em Czapek dos fungos Eb_fmH_3 e Eb_fmH_4, merecem destaque pela sua rica produção metabólica.

Comparando-se os espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos em PDB, observou-se uma semelhança no perfil dos fungos Eb_fmH_1, Eb_fmH_2 e Eb_fmH_5. Corroborando com os cromatogramas em HPLC-DAD, pode-se evidenciar fungos da mesma espécie e/ou gênero.

Figura 32. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos obtidos em PDB e Czapek dos endófitos isolados de caules de *E. brasiliensis*: Eb_caH_1 (a), Eb_caH_3 (b), Eb_caH_4 (c), Eb_caH_5 (d), Eb_caH_6 (e), Eb_caH_7 (f), Eb_caS_1 (g), Eb_caS_2 (h), Eb_caS_3 (i) e Eb_caS_4 (j) (DMSO- d_6 , 300 MHz).

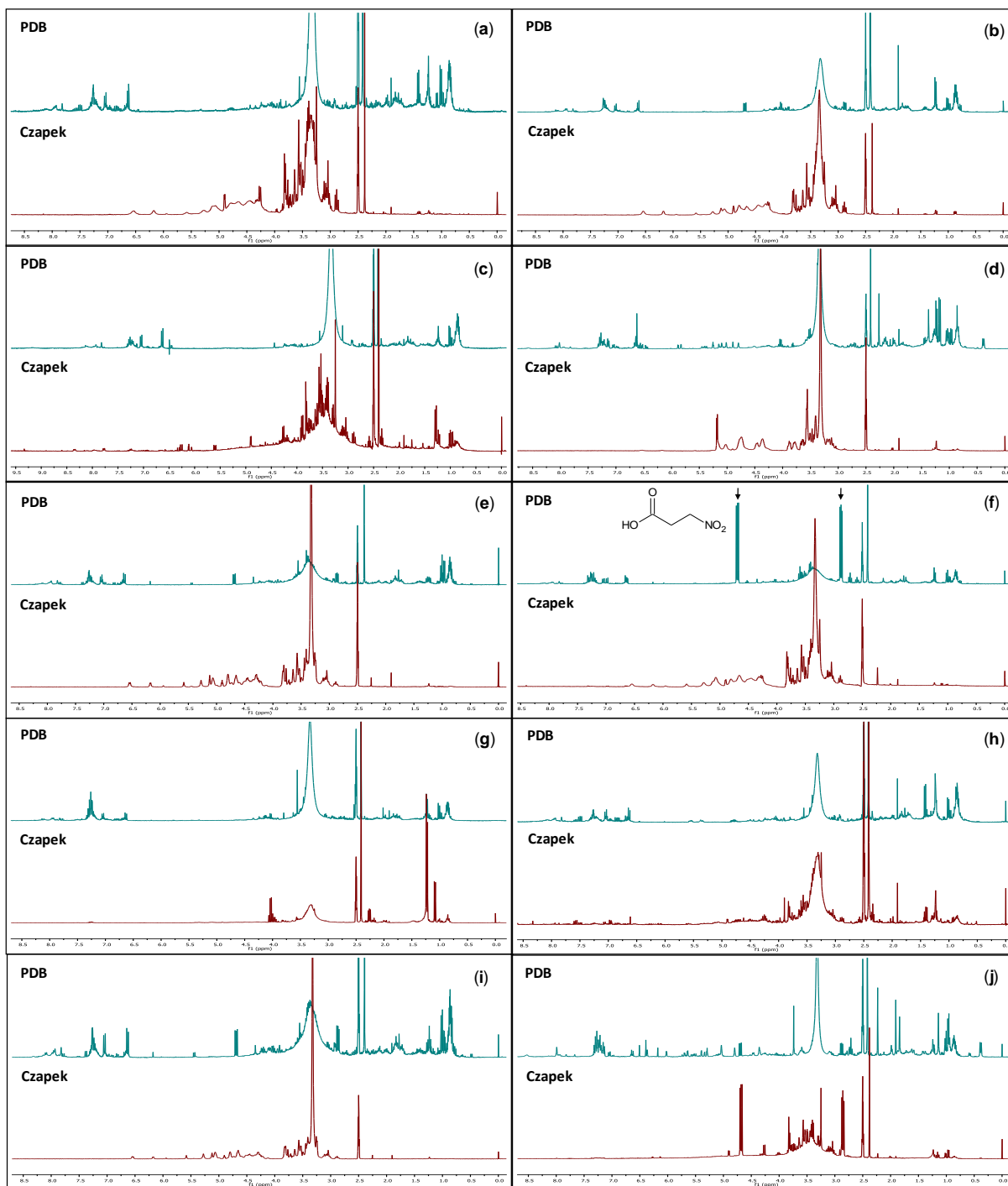


Figura 33. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos obtidos em PDB e Czapek dos endófitos isolados dos frutos maduros de *E. brasiliensis*: Eb_frmH_1 (a), Eb_frmH_2 (b), Eb_frmH_3 (c), Eb_frmH_4 (d), Eb_frmH_5 (e) e Eb_frmH_6 (f) (DMSO- d_6 , 300 MHz).

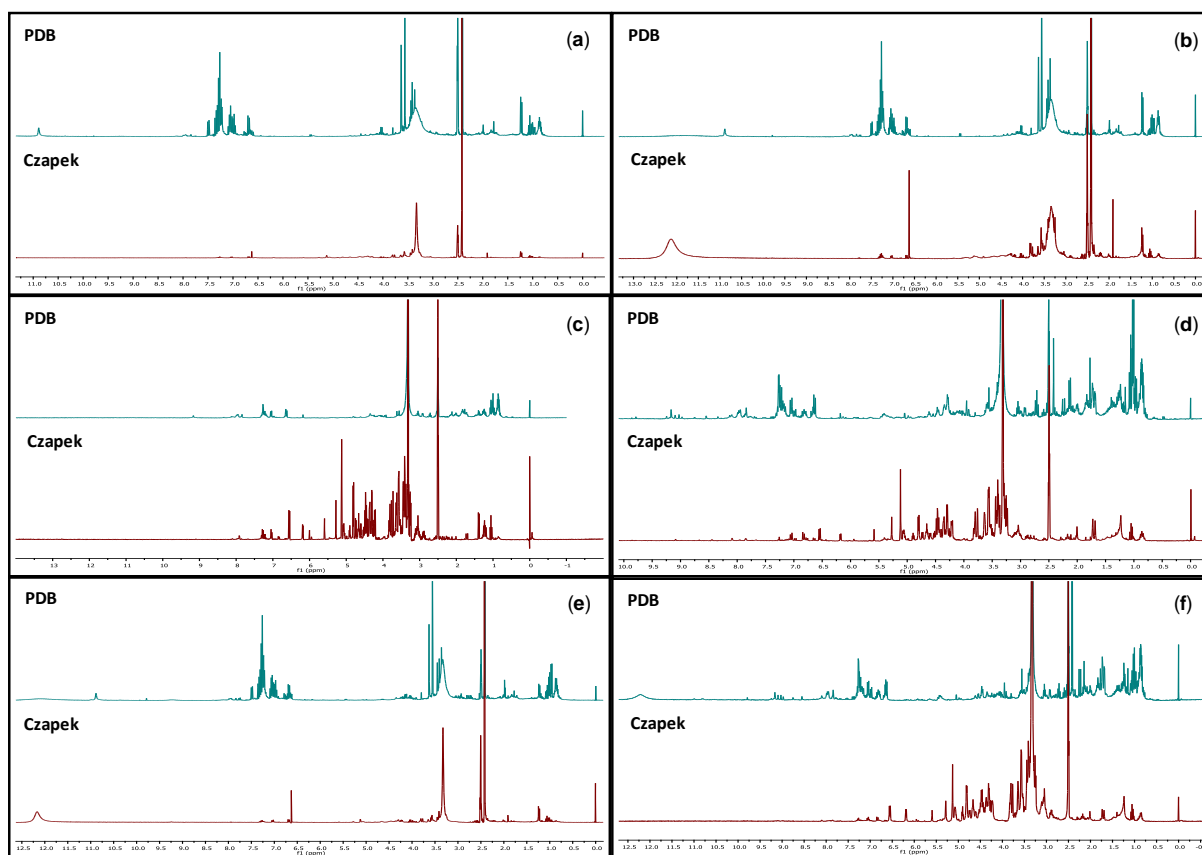
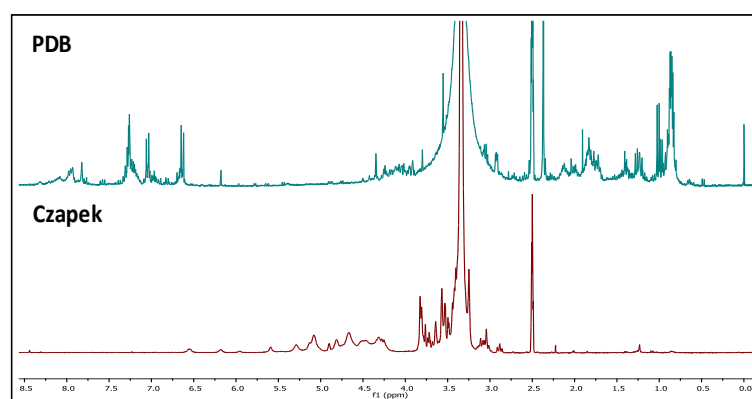


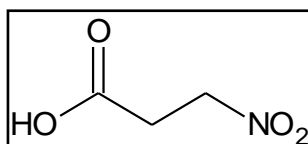
Figura 34. Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos obtidos em PDB e Czapek do endófito isolado de folhas de *E. brasiliensis*: Eb_fIH_1 (DMSO- d_6 , 300 MHz).



Verificou-se nos extratos brutos dos endófitos Eb_caH_3, Eb_caH_6, Eb_caH_7, Eb_caS_3 cultivados em PDB e do Eb_caS_4 tanto em PDB quanto em Czapek a produção do ácido nitropropiónico (Figura 35), devido a presença dos sinais de hidrogênio em δ_{H} 2,88

(t , $J= 6,0$ Hz) e δ_{H} 4,7 (t , $J= 6,0$ Hz) comparados com a literatura (CHOMCHEON et al., 2005; CHAPLA, 2010).

Figura 35. Estrutura do ácido nitropropiónico.



Fonte: Autor

Este metabólito já foi isolado pelo nosso grupo de pesquisa, dos fungos endofíticos *Phomopsis* sp. e *Phomopsis stipata* (CHAPLA, 2010; LEPTOKARYDIS, 2008). O ácido nitropropiónico isolado de *Phomopsis* sp. associado as espécies vegetais *Urobotrya siamensis* e a *Mesua férrea* apresentou alta atividade antibacteriana frente a *Mycobacterium tuberculosis* (CHOMCHEON et al., 2005; ELSASSER et al., 2005).

Este ácido também possui propriedades nematocidas (SCHWARZ et al., 2004) e é conhecido como um potente agente neurotóxico, inibindo o metabolismo oxidativo mitocondrial (BROWNELL et al., 2004). As atividades biológicas descritas para este metabólito nos permitem sugerir uma relação ecológica entre os fungos endofíticos e a espécie vegetal *Eugenia brasiliensis*. O ácido nitropropiónico, o qual possui atividade antibacteriana, poder ser produzido por estes endófitos, como uma maneira de sobrevivência dentro dos tecidos vegetais e protegendo a espécie hospedeira de outros patógenos.

4.2.4 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos (escala reduzida) produzidos pelos fungos endofíticos isolados dos caules, frutos maduros e folhas

4.2.4.1 Ensaio antifúngico e anticolinesterásico

Fungicidas utilizados no controle de doenças na agricultura, além de serem nocivos ao meio ambiente, são prejudiciais a saúde humana. Infecções fúngicas são as principais causas de morbidade e mortalidade, sendo assim esta constatação indica a urgência pela busca de novos antifúngicos, os quais os fungos são produtores promissores (COLEMAN et al., 2010).

Os extratos brutos testados apresentaram de baixo a alto potencial contra o fitopatógeno ensaiado (Tabela 7), destacando-se os extratos em PDB de *Xylaria cubensis* (Eb_caH_5), Eb_caH_7, *Diaporthe* sp. (Eb_caS_4), *Colletotrichum* sp. (Eb_frmH_1) e Eb_frmH_5 como

prolíficos produtores de compostos bioativos frente ao *C. sphaerospermum*. No meio de cultivo Czapek destaca-se o Eb_frmH_3, Eb_frmH_4 e novamente o endófito *Diaporthe* sp.

Para a descoberta de novos inibidores da acetilcolinesterase realizou-se o ensaio bioautográfico (CCDC) para os extratos brutos (Tabela 7). Os resultados indicam potencial de baixo a moderado na inibição da enzima acetilcolinesterase, destacando-se os endófitos: Eb_caS_1 (PDB), *Diaporthe* sp. (PDB), *Colletotrichum* sp. (PDB) e Eb_frmH_4 (Czapek).

Os fungos codificados como Eb_caH_5 (PDB), Eb_caH_7 (PDB), Eb_caS_4 (PDB), Eb_frmH_1 (PDB) e Eb_frmH_5 (PDB), Eb_frmH_3 (Czapek) e Eb_frmH_4 (Czapek) são notáveis por apresentar tanto potencial antifúngico quanto a inibição da enzima acetilcolinesterase.

Tabela 7. Avaliação dos extratos brutos frente ao fitopatógeno *C. sphaerospermum* e inibição da AChE.

Extratos (PDB)	<i>C. sphaerospermum</i>	Anticolinesterásica	Extratos (Czapek)	<i>C. sphaerospermum</i>	Anticolinesterásica
Eb_caH_1	**	*	Eb_caH_1	-	-
Eb_caH_3	*/*	**	Eb_caH_3	-	-
Eb_caH_4	*/*	*	Eb_caH_4	-	-
Eb_caH_5	**/*/**/*/**/*/**/*	*	Eb_caH_5	-	-
Eb_caH_6	*	*	Eb_caH_6	-	-
Eb_caH_7	**/*/**/*	*	Eb_caH_7	*	-
Eb_caS_1	***	*/**	Eb_caS_1	-	-
Eb_caS_2	*	**	Eb_caS_2	*	*
Eb_caS_3	-	*/*	Eb_caS_3	**	-
Eb_caS_4	***/**	*/**	Eb_caS_4	***/**	-
Eb_flH_1	-	-	Eb_flH_1	-	-
Eb_frmH_1	***/*	*/**	Eb_frmH_1	**	*
Eb_frmH_2	***	*	Eb_frmH_2		*
Eb_frmH_3	*	-	Eb_frmH_3	*/**	**/**
Eb_frmH_4	*	-	Eb_frmH_4	**/**	**
Eb_frmH_5	***/**/*	*	Eb_frmH_5	*	**
Eb_frmH_6	-	*	Eb_frmH_6	*	-

* fraca ** intermediária *** forte atividade

A atividade antifúngica apresentada nos extratos brutos permite sugerir uma relação ecológica entre os fungos endofíticos e a espécie vegetal *Eugenia brasiliensis*. Este potencial pode ser expresso por estes endófitos, como uma maneira de sobrevivência dentro dos tecidos vegetais e protegendo a espécie hospedeira frente aos fitopatógenos.

4.2.4.2 Ensaio antitumoral

Compostos derivados de metabólitos secundários de plantas e micro-organismos são frequentemente utilizados no tratamento do câncer, como por exemplo, taxol e camptotecina. A quimioterapia tem sido melhorada ao longo dos últimos anos, mas até hoje, muitos pacientes não tiveram boas respostas à quimioterapia, principalmente pelos efeitos colaterais ou resistência a multi-drogas. Dentro deste contexto os produtos naturais continuam a desempenhar um papel importante na pesquisa de novas moléculas com potencial antitumoral (COSTA et al., 2008).

Todos os extratos brutos testados apresentam atividade antitumoral (Tabela 8 e 9), mesmo que em pequenas porcentagens. Os extratos Eb_caH_6 (PDB e Czapek), Eb_caS_2 (PDB) e *Diaporthe* sp. (Eb_caS_4-Czapek) apresentaram notável potencial contra as linhagens tumorais testadas (ativo > 75%), sugerindo novas fontes naturais de metabólitos secundários com potencial antitumoral.

Tabela 8. Avaliação dos extratos brutos em PDB frente às células tumorais.

Extratos (PDB)	HCT-116		OVCAR-8		SF-295	
	GI% (média)	SD	GI% (média)	SD	GI% (média)	SD
Eb_caH_1	66.89%	6.33%	38.36%	8.58%	37.92%	6.01%
Eb_caH_3	34.10%	5.34%	20.28%	18.12%	25.06%	1.03%
Eb_caH_4	42.64%	3.03%	24.87%	1.72%	19.69%	3.63%
Eb_caH_5	71.04%	0.86%	42.61%	5.63%	70.55%	1.35%
Eb_caH_6	100.00%	0.59%	99.46%	0.00%	99.92%	0.22%
Eb_caH_7	33.64%	4.81%	9.69%	14.97%	34.25%	5.04%
Eb_caS_1	32.80%	0.20%	18.93%	1.91%	28.04%	6.66%
Eb_caS_2	95.48%	2.31%	61.49%	31.00%	70.28%	4.77%
Eb_caS_3	63.28%	16.05%	6.31%	5.78%	9.19%	1.53%
Eb_caS_4	83.86%	9.76%	37.08%	0.48%	73.92%	2.33%
Eb_flH_1	38.49%	6.40%	4.37%	8.97%	10.04%	1.35%
Eb_frmH_1	11.02%	12.13%	8.10%	7.77%	5.33%	7.61%
Eb_frmH_2	9.68%	11.62%	19.22%	5.06%	6.89%	0.25%
Eb_frmH_3	25.49%	5.31%	18.96%	1.99%	23.98%	0.25%
Eb_frmH_4	9.15%	11.37%	21.07%	4.61%	14.26%	2.33%
Eb_frmH_5	5.44%	11.56%	21.07%	7.86%	4.15%	0.18%
Eb_frmH_6	16.25%	13.08%	20.31%	4.79%	10.40%	1.29%

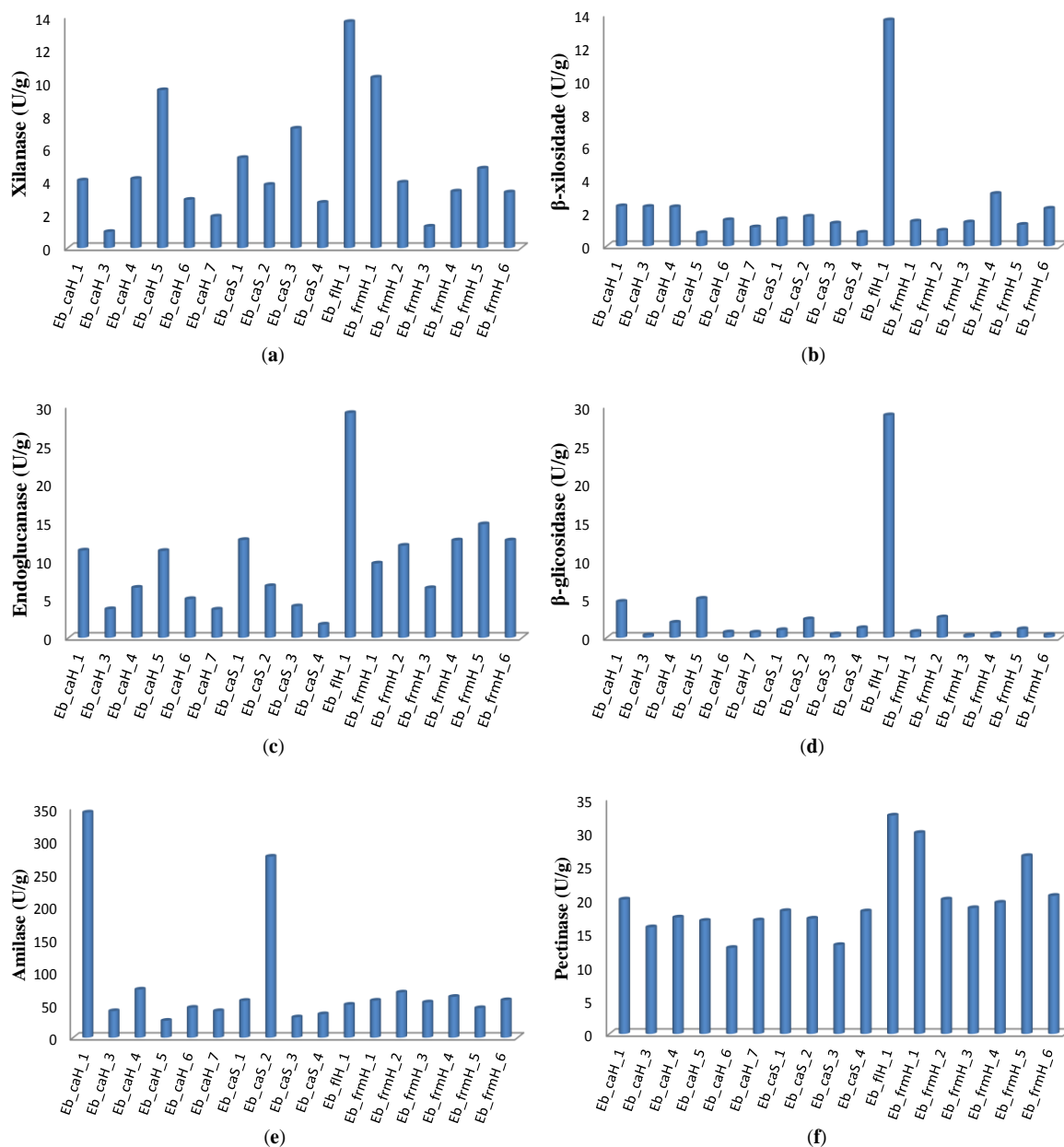
Tabela 9. Avaliação dos extratos brutos em Czapek frente às células tumorais.

Extratos (Czapek)	HCT-116		OVCAR-8		SF-295	
	GI% (média)	SD	GI% (média)	SD	GI% (média)	SD
Eb_caH_1	44.97%	3.28%	4.71%	6.42%	6.63%	3.80%
Eb_caH_3	29.78%	10.11%	15.77%	1.27%	5.93%	4.79%
Eb_caH_4	24.11%	10.04%	10.21%	3.52%	16.22%	10.00%
Eb_caH_5	29.16%	8.84%	20.75%	3.43%	24.50%	0.86%
Eb_caH_6	100.00%	0.19%	100.00%	0.27%	20.34%	9.70%
Eb_caH_7	24.65%	1.20%	18.90%	7.86%	15.61%	13.93%
Eb_caS_1	34.47%	4.99%	8.29%	1.17%	2.72%	1.10%
Eb_caS_2	24.33%	1.14%	20.50%	2.17%	-1.05%	6.32%
Eb_caS_3	25.72%	1.71%	16.73%	0.45%	15.09%	1.41%
Eb_caS_4	100.00%	0.06%	100.00%	0.00%	100.35%	0.25%
Eb_fIH_1	29.07%	14.15%	8.61%	0.18%	8.41%	6.32%
Eb_frmH_1	-1.40%	1.52%	12.57%	4.34%	13.92%	3.19%
Eb_frmH_2	-3.14%	2.72%	13.34%	8.50%	8.10%	3.07%
Eb_frmH_3	34.43%	7.83%	28.74%	2.80%	16.26%	2.45%
Eb_frmH_4	3.03%	0.69%	19.22%	0.72%	-23.57%	13.26%
Eb_frmH_5	1.28%	4.17%	5.16%	4.16%	-22.75%	9.95%
Eb_frmH_6	22.68%	4.99%	-1.93%	2.80%	-40.20%	3.62%

4.2.5 Prospecção enzimática

Todos os fungos endofíticos isolados neste trabalho foram capazes de crescer no bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como substrato e isto indica que enzimas hidrolíticas foram secretadas para despolimerizar as fontes de carbono, liberando açúcares simples prontamente assimiláveis para o seu crescimento, uma vez que nenhuma fonte de carbono adicional foi utilizada. As produções enzimáticas obtidas nesta triagem inicial estão apresentadas na Figura 36. O termo U/g refere-se à unidade de atividade enzimática/g de substrato seco.

Figura 36. Produção de xilanase (a), β -xilosidase (b), endoglucanase (c), β -glicosidase (d), amilase (e) e pectinase (f) por diferentes isolados fúngicos, em FES, tendo bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como substratos (misturas a 1:1 m/m).



Fonte: Autor

Os fungos endofíticos *Fusarium solani*, *Curvularia pallescens* e *Myrothecium roridum*, isolados de aguapé foram investigados por Okunowo e colaboradores (2010) quanto à capacidade de produzir enzimas celulolíticas. *Fusarium solani*, *C. pallescens* e *M. roridum* produziram 0,48, 0,84, e 0,39 U/mL de endoglucanase respectivamente, em cultura submersa contendo serragem como fonte de carbono. A maioria dos endófitos testados no presente

trabalho apresentou atividade igual ou superior às atividades citadas na literatura (OKUNOWO et al., 2010).

Dentre os endófitos ensaiados, Eb_fIH_1 destacou-se por apresentar produções significativas de xilanase, β -xilosidase, endoglucanase, β -glicosidase, pectinase e amilase. Os endófitos *Xylaria cubensis* (Eb_caH_5) e *Colletotrichum* sp. (Eb_frmH_1) apresentaram boas produções de xilanase, endoglucanase e pectinase. Os endófitos Eb_caH_1 e Eb_caS_2 por produzirem significativamente a enzima amilase, sugerem que a degradação do amido, reserva energética vegetal, pode estar relacionada a busca por fontes de carbono para seu desenvolvimento. Destaca-se a enzima amilase como uma das enzimas mais importantes utilizadas na biotecnologia moderna, especialmente no processo envolvendo hidrólise do amido (SUNITHA et al., 2012). Esta enzima possui um alto valor agregado (R\$ 326,00 cada 10 g de α -amilase do fungo *Aspergillus oryzae*, ~30 U/mg, Sigma-Aldrich®), sendo utilizados em diversos setores industriais como farmacêutico, alimentício, dentre outros.

Os endófitos *Colletotrichum* sp. e *Alternaria* sp. foram capazes de produzir elevadas quantidades de lipídeos utilizando palha de arroz e farelo de trigo como substrato, sendo este degradado por enzimas extracelulares como as celulasas. A partir deste estudo, pode-se concluir que os dois fungos possuem potencialidade para ser matéria-prima para produção de biodiesel (DEY; BANERJEE; MAITI, 2011).

Os fungos endofíticos podem estar produzindo essas enzimas extracelulares como parte do seu mecanismo de resistência para superar as defesas do hospedeiro e/ou para obter nutrientes. Cabe ressaltar ainda que, uma vez que fungos endofíticos colonizam os tecidos vegetais, suas enzimas devem apresentar características interessantes quanto ao ataque aos componentes da parede celular vegetal.

*Avaliação, isolamento e determinação estrutural
dos metabólitos produzidos por
Xylaria cubensis, Diaporthe sp. e Colletotrichum sp.*

5. Estudo dos metabólitos de *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp.

Após uma análise detalhada dos perfis químico, cromatográfico e biológico dos fungos endofíticos isolados, selecionou-se três destes endófitos para o desenvolvimento deste trabalho, sendo eles: Eb_caH_5, Eb_caS_4 e Eb_frmH_1, identificados pelo método de filogenia Neighbor Joining como: *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp, respectivamente.

5.1 Avaliação do perfil químico e cromatográfico dos extratos brutos de *X. cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. em escala ampliada (PDB)

Os cromatogramas (Figuras 37, 39 e 41) dos extratos brutos de *X. cubensis* (641,3 mg), *Diaporthe* sp. (444,8 mg) e *Colletotrichum* sp. (1.186,0 mg), obtidos por HPLC_DAD em diferentes comprimentos de onda apresentaram inúmeros picos com intensidades e polaridades variando de média a alta. Nos espectros de RMN de ^1H (Figuras 38, 40 e 42) observou-se sinais por toda faixa espectral variando de δ_{H} 0,3 a δ_{H} 11,0, evidenciando extratos promissores na produção de metabólitos secundários. A presença do sinal em δ_{H} 0,35 ppm nos extratos de *Xylaria cubensis* e *Diaporthe* sp. pode-se indicar a presença de hidrogênios de metilas blindadas. Estes dados corroboram com os observados nos cultivos dos mesmos fungos em escala reduzida. A análise minuciosa de todos os cromatogramas dos extratos brutos em PDB, em diferentes comprimentos de onda, utilizando o software LC- Solution permitiu selecionar o comprimento de onda para estabelecer condições de gradientes de eluição para o desenvolvimento das CC utilizando C-18, como fase estacionária.

Figura 37. Cromatogramas do extrato bruto de *Xylaria cubensis* em PDB (escala ampliada).

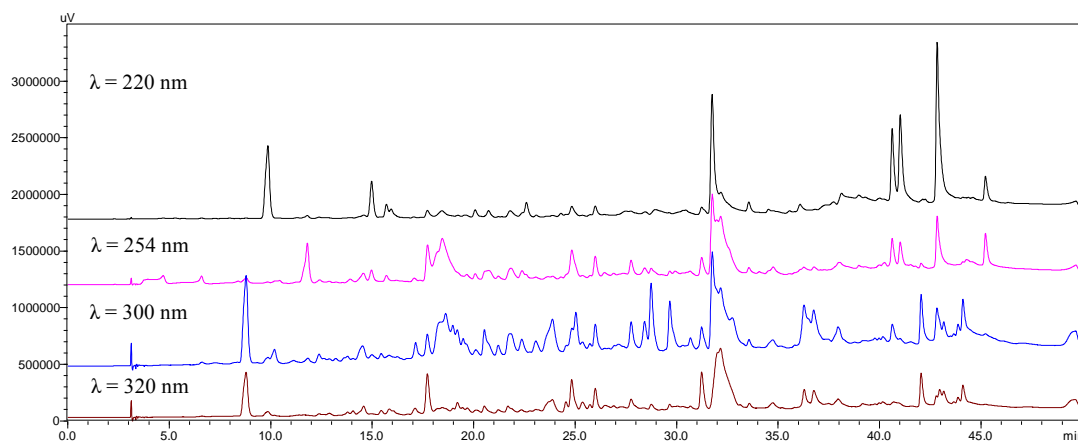


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *X. cubensis* em PDB (escala ampliada) (DMSO- d_6 , 300 MHz).

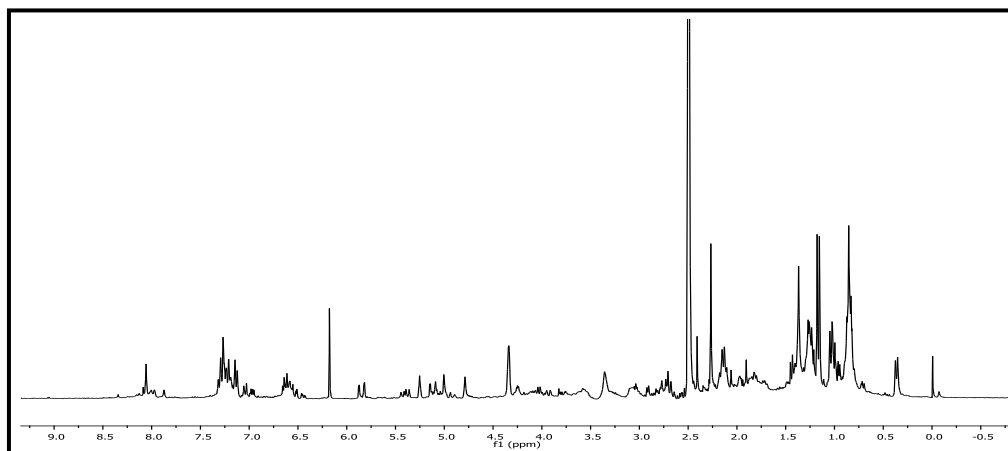


Figura 39. Cromatogramas do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. em PDB (escala ampliada).

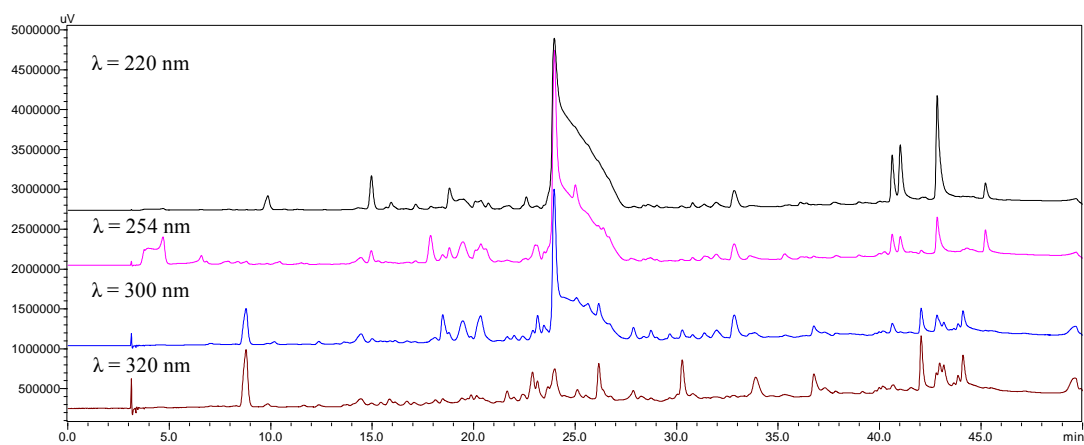


Figura 40. Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *Colletotrichum* sp. em PDB (escala ampliada) (DMSO- d_6 , 300 MHz).

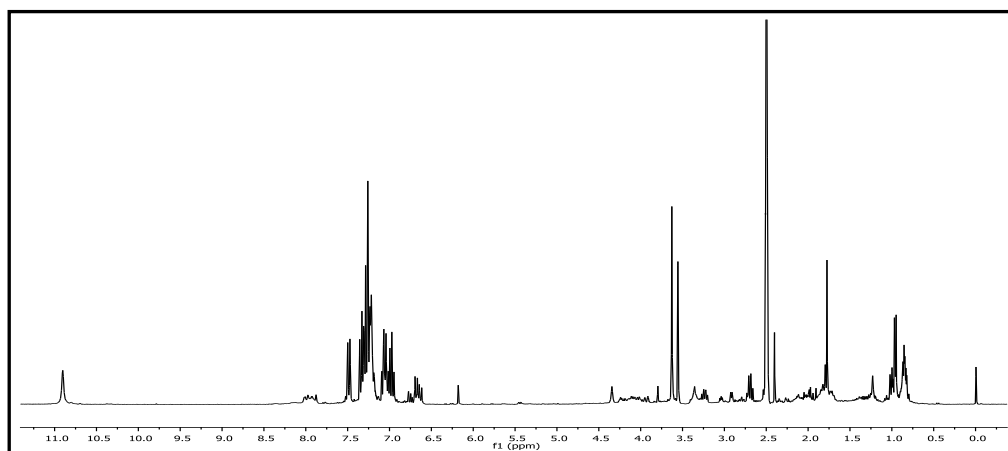
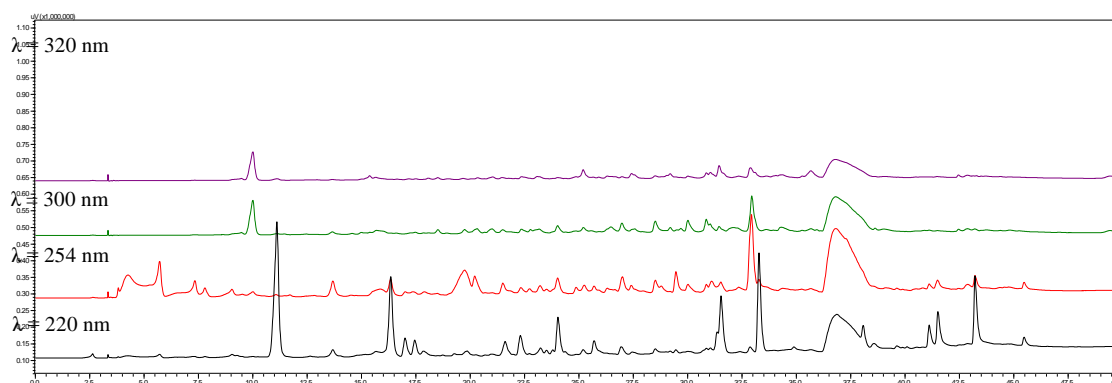
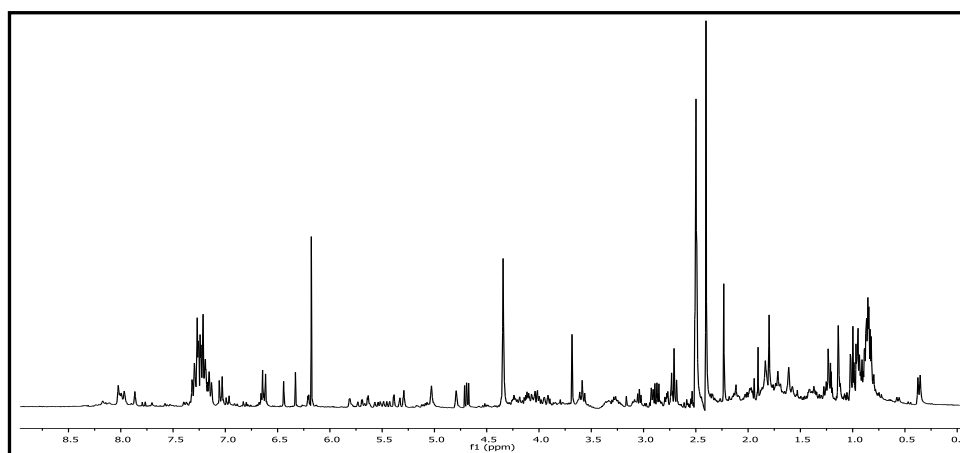


Figura 41. Cromatogramas do extrato bruto de *Diaporthe* sp. em PDB (escala ampliada).**Figura 42.** Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *Diaporthe* sp. em PDB (escala ampliada) (DMSO- d_6 , 300 MHz).

A comparação dos cromatogramas e espectros de RMN de ^1H dos extratos de *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. permitiu observar diferenças significativas na produção metabólica de cada endófito (Figuras 43 e 44), sugerindo várias classes de substâncias, instigando o estudo químico destes extratos brutos.

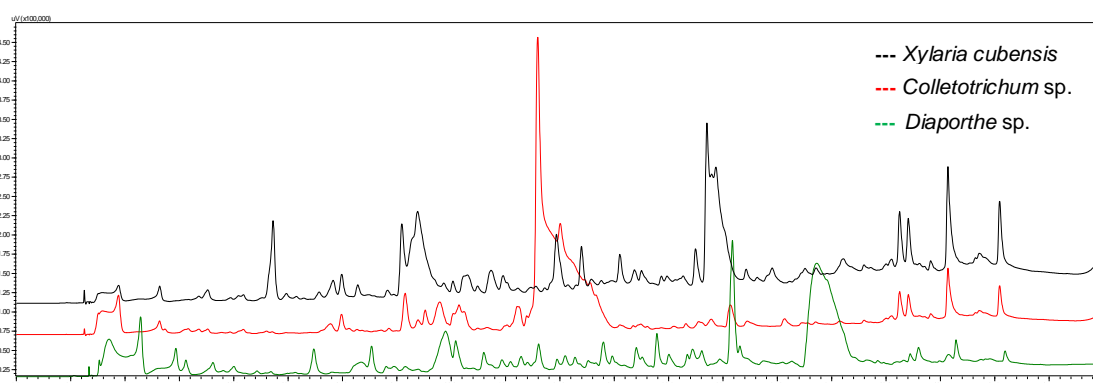
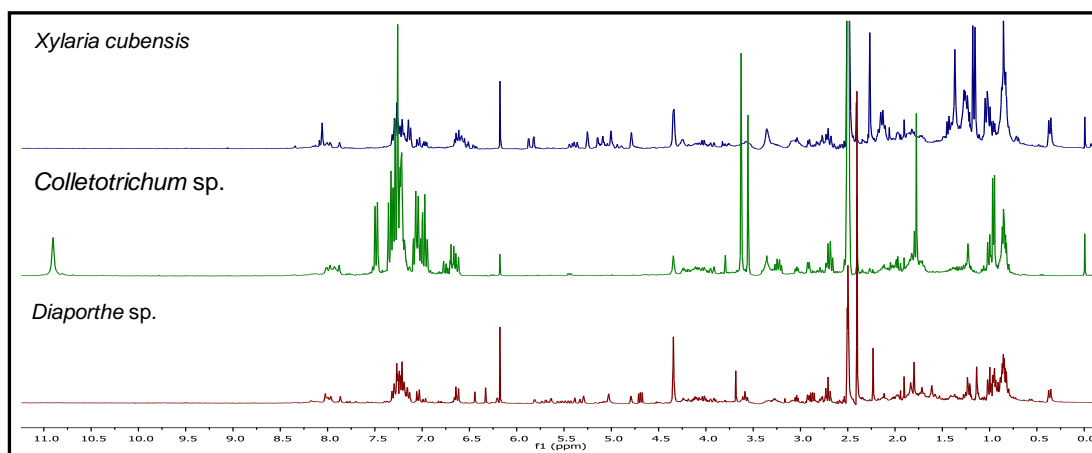
Figura 43. Comparação dos cromatogramas dos extratos brutos de *Xylaria cubensis*, *Colletotrichum* sp. e *Diaporthe* sp. em PDB (escala ampliada) a $\lambda = 254$ nm.

Figura 44. Comparação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos de *Xylaria cubensis*, *Colletotrichum* sp. e *Diaporthe* sp. em PDB (escala ampliada) (DMSO- d_6 , 300 MHz).



5.2 Avaliação do perfil biológico dos extratos brutos de *X. cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. em escala ampliada (PDB)

Os extratos brutos obtidos pelo cultivo em escala ampliada apresentaram atividades significativas tanto para ensaio frente ao fitopatógeno *C. sphaerospermum* quanto à inibição da enzima acetilcolinesterase (Tabela 10), corroborando com os resultados em escala reduzida. Os padrões positivos utilizados para comparação foram a nistatina ($5\mu\text{g } 5\mu\text{L}^{-1}$) e fisostigmina ($0,05\mu\text{g } 2,5\mu\text{L}^{-1}$), respectivamente. Os extratos brutos apresentaram atividade moderada frente às células tumorais testadas (Tabela 11).

Tabela 10. Avaliação dos extratos brutos em escala ampliada (PDB) frente ao fitopatógeno *C. sphaerospermum* e inibição da AChE.

Extratos brutos	<i>C. sphaerospermum</i>	Anticolinesterásica
<i>Xylaria cubensis</i>	**	**/**/*
<i>Colletotrichum</i> sp.	***	**
<i>Diaporthe</i> sp.	***/*	**/**/*

* fraca ** intermediária *** forte atividade

Tabela 11. Avaliação dos extratos brutos em escala ampliada (PDB) frente às células tumorais.

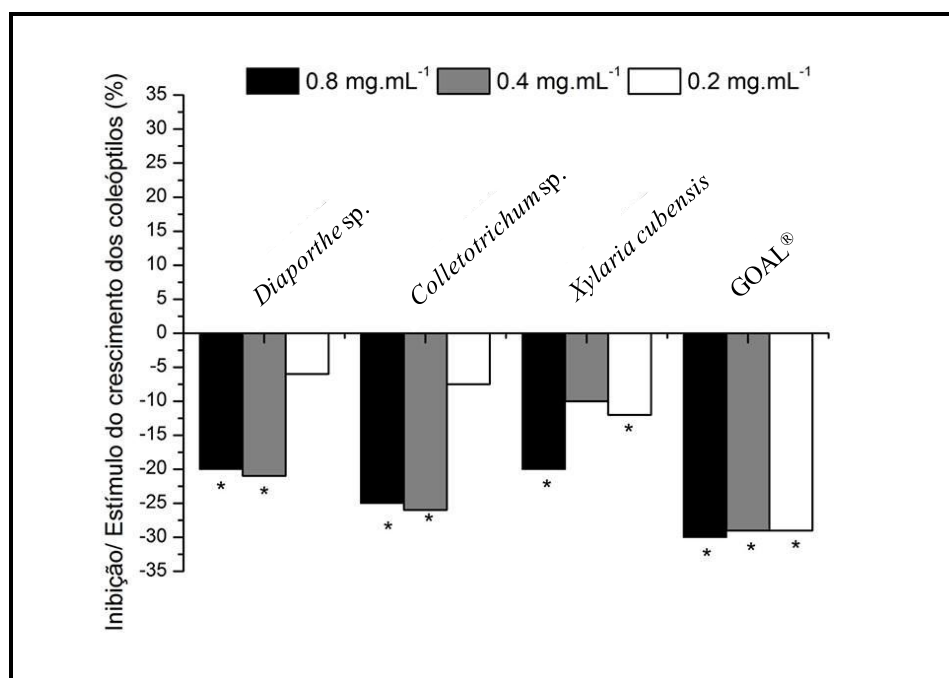
Extratos	HCT-116		OVCAR-8		SF-295	
	GI% (média)	SD	GI% (média)	SD	GI% (média)	SD
<i>Xylaria cubensis</i>	63,18%	4,49%	74,54%	12,76%	79,39%	4,34%
<i>Colletotrichum</i> sp.	18,81%	51,86%	40,95%	53,35%	39,30%	12,73%
<i>Diaporthe</i> sp.	34,78%	86,71%	75,57%	3,06%	76,69%	1,54%

5.2.1 Avaliação da atividade fitotóxica sobre o crescimento de coleótilos de trigo (*Triticum aestivum* L.)³

Herbicidas naturais como os bilafanos, ácido pelargônico e óleo de cravo (COPPING; DUKE, 2007) não são prejudiciais ao meio ambiente, sendo uma vantagem em relação a herbicidas sintéticos.

Os metabólitos secundários como quinonas, flavonoides, fenois, cumarinas, terpeno, alcalóides, dentre outros, apresentam atividade fitotóxica (RICE, 1984). Dentro deste contexto os produtos naturais continuam a desempenhar um papel importante na busca por moléculas com potencial fitotóxico, para substituir o uso de herbicidas sintéticos, os quais provocam danos ambientais.

Figura 45. Inibição/estímulo do crescimento dos coleótilos de trigo sob a atividade dos extratos brutos em escala ampliada (PDB).



*Frações que apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo (solução tampão).

Fonte: Autor

Os extratos brutos de *Diaporthe* sp., *Colletotrichum* sp. e *X. cubensis* inibiram o crescimento dos coleótilos de trigo nas duas maiores concentrações testadas, 0,8 e 0,4 mg mL⁻¹ (Figura 45), comparados com os coleótilos crescidos sob o efeito do controle negativo (solução tampão), que apresentou média de crescimento de 6,9 mm. A Tabela 12 compara as médias de crescimento dos coleótilos sob os extratos dos fungos

Diaporthe sp, *Colletotrichum* sp. e *X. cubensis* nas concentrações 0,8; 0,4 e 0,2 mg mL⁻¹ com as respectivas médias de crescimento produzidas pelo controle positivo (herbicida GOAL[®]).

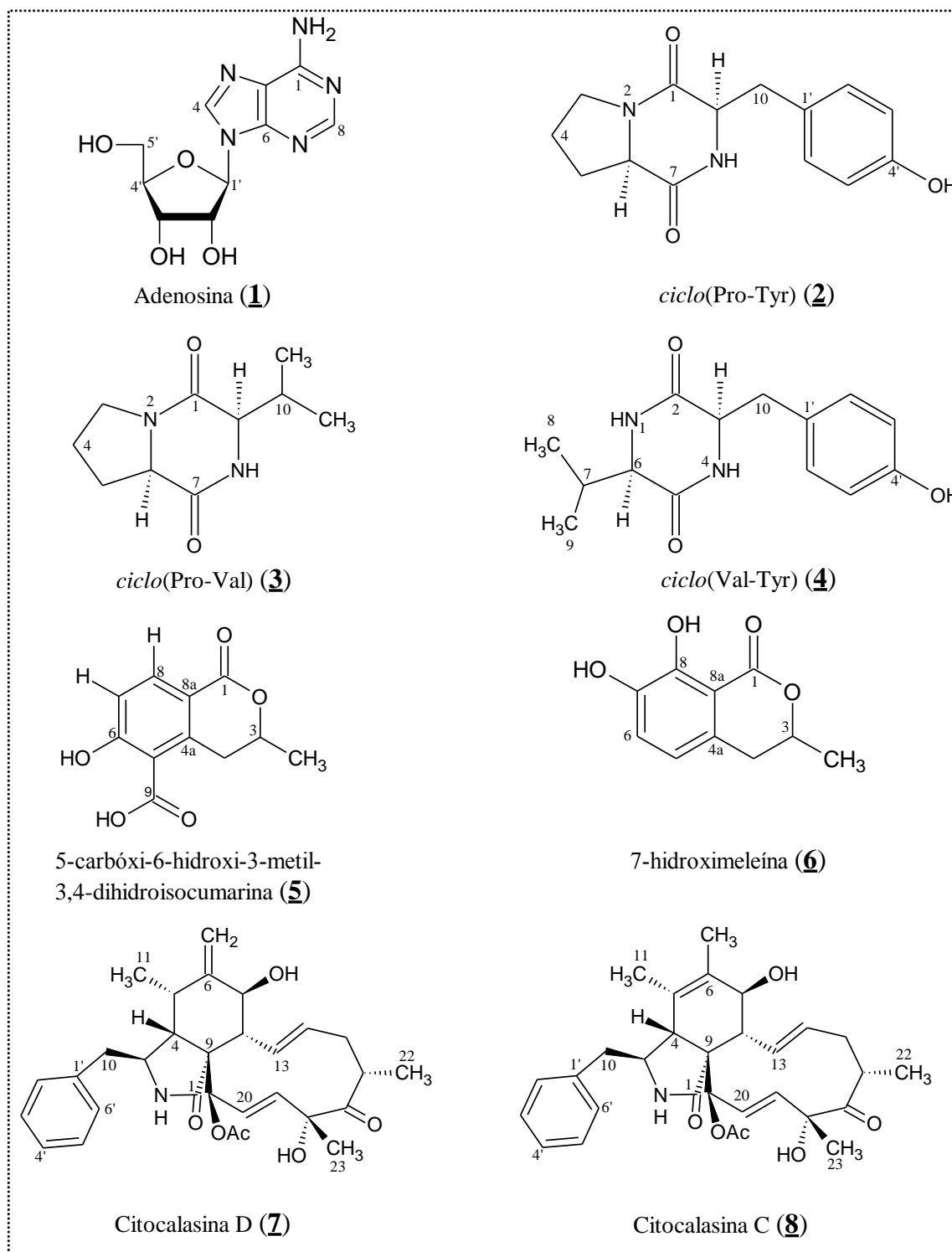
Tabela 12. Médias de crescimento dos coleóptilos sob o efeito dos extratos brutos de *Diaporthe* sp, *Colletotrichum* sp. e *X. cubensis* e do herbicida comercial GOAL[®].

Amostras	Concentrações (mg mL ⁻¹)		
	0,8	0,4	0,2
<i>Diaporthe</i> sp.	4,73 ± 0,1 c	4,70 ± 0,1 b	6,00 ± 0,1 c
<i>Colletotrichum</i> sp.	4,43 ± 0,0 b	4,31 ± 0,0 ab	5,47 ± 0,1 b
<i>Xylaria cubensis</i>	4,76 ± 0,1 c	5,41 ± 0,2 c	5,36 ± 0,1 b
GOAL	4,11 ± 0,0 a	4,16 ± 0,0 a	4,12 ± 0,0 a

*Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

A média de crescimento dos coleóptilos produzida pelo extrato de *Colletotrichum* sp, na concentração 0,4 mg mL⁻¹ não difere estatisticamente da média produzida pelo efeito do controle positivo (GOAL) na mesma concentração, sugerindo, assim que o extrato nesta concentração produz o mesmo efeito fitotóxico que o herbicida.

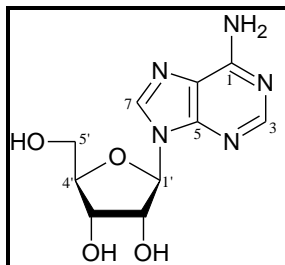
Considerando as vantagens dos fungos endofíticos como o rápido crescimento em escala ampliada, aliado a sua potencialidade biossintética, estes extratos testados instigam estudos biomonitorados para a descoberta de metabólitos com potencial herbicida.

5.3 Identificação estrutural das substâncias produzidas por *Xylaria cubensis*Figura 46. Substâncias produzidas pelo fungo endofítico *X. cubensis* cultivado em PDB.

Fonte: Autor

5.3.1 Identificação estrutural da substância **1**

Figura 47. Estrutura da substância **1** (Adenosina).



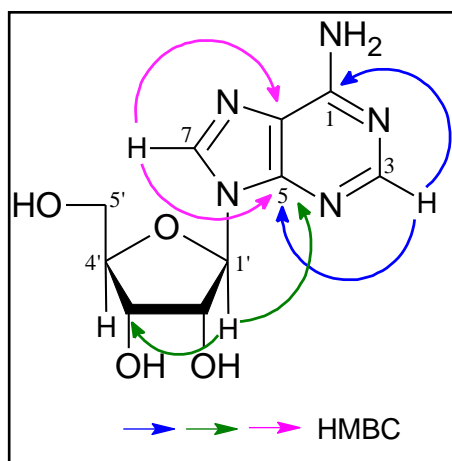
Fonte: autor

No espectro de RMN de ^1H (Figura 49) observou-se dois sinais na região dos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 8,13 (*s*, 1H, δ_{C} 152,3) e em δ_{H} 8,35 (*s*, 1H, δ_{C} 139,7) e δ_{H} 5,87 (*d*, 6,2 Hz, 1H, δ_{C} 87,8), δ_{H} 4,13 (*m*, 1H, δ_{C} 70,5) e em δ_{H} 4,60 (*t*, 5,6 Hz, 1H, δ_{C} 73,3). Os três últimos sinais mostraram correlações no espectro de COSY, o que aliado aos valores de deslocamento químico em RMN de ^1H , HSQC e multiplicidades foram atribuídos a unidade de ribose. A atribuição de todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono foi realizada após avaliação das correlações observadas pelo HSQC.

As correlações observadas a longa distância nos experimentos de HMBC (Figura 51) de $\text{H-3} \leftrightarrow \text{C-5/C-1}$ e $\text{H-7} \leftrightarrow \text{C-5/C-9}$, permitiram confirmar a presença da unidade timina. A correlação observada no espectro de HMBC entre $\text{H-1}' \leftrightarrow \text{C-5/C7}$ permitiu realizar a conexão entre a base nitrogenada com a unidade glicosídica.

A análise dos dados obtidos ESI-EM (Figura 53), modo positivo, evidenciou a molécula protonada m/z 268,17 $[\text{M}+\text{H}]^+$, o que associado aos dados de RMN permitiu propor a fórmula molecular de $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}_5$.

Os dados espectrais (Tabela 13), comparados com a literatura (DOMONDON et al., 2004) permitiram identificar a substância como adenosina (**1**).

Figura 48. Principais correlações de HMBC da substância **1**.

Fonte: autor

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) de **1** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δH	δC	HMBC	COSY
1	-	156,4	-	-
3	8,13 (<i>s</i>)	152,3	C1; C5	*
5	-	149,1	-	-
7	8,35 (<i>s</i>)	139,7	C5; C9	*
9	-	119,4	-	-
1'	5,87 (<i>d</i> ; 6,2 Hz)	87,8	C5; C7; C3'	H2'
2'	4,60 (<i>t</i> , 6,2 Hz)	73,3	*	H1'
3'	4,13 (<i>m</i>)	70,5	*	H3'
4'	3,96 (<i>q</i> ; 3,5 e 6,7 Hz)	86,0	*	H5'
5'	3,67/3,53 (<i>m</i>)	61,4	*	*

*Sinal não observado

Os nucleosídeos e seus análogos possuem diversas atividades biológicas, como anticancerígena, anti-agregação plaquetária e antioxidante, além de desempenharem funções de regulação e modulação de processos fisiológicos em nosso organismo (CAO, 2014; IYÚ, 2011; SENANAYAKE, 2011; SPANOU, 2007). Chen e colaboradores (2000) revelaram, ainda, que a ingestão da mistura nucleosídeo-nucleotídeo pode reduzir a deterioração da memória.

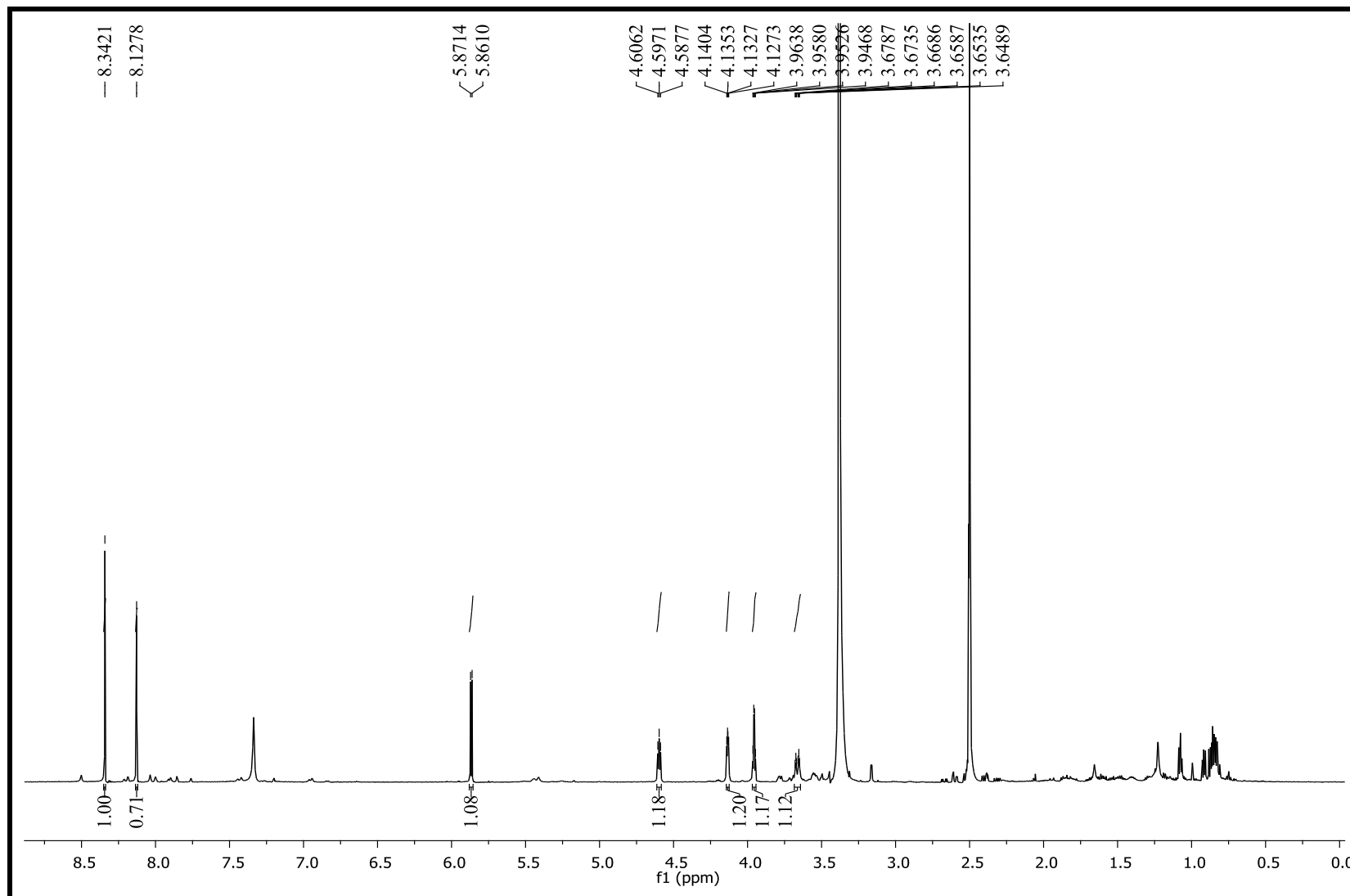
Figura 49. Espectro de RMN de ^1H da substância **1** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

Figura 50. Mapa de contorno de HSQC da substância **1** (DMSO-d₆, 600 MHz).

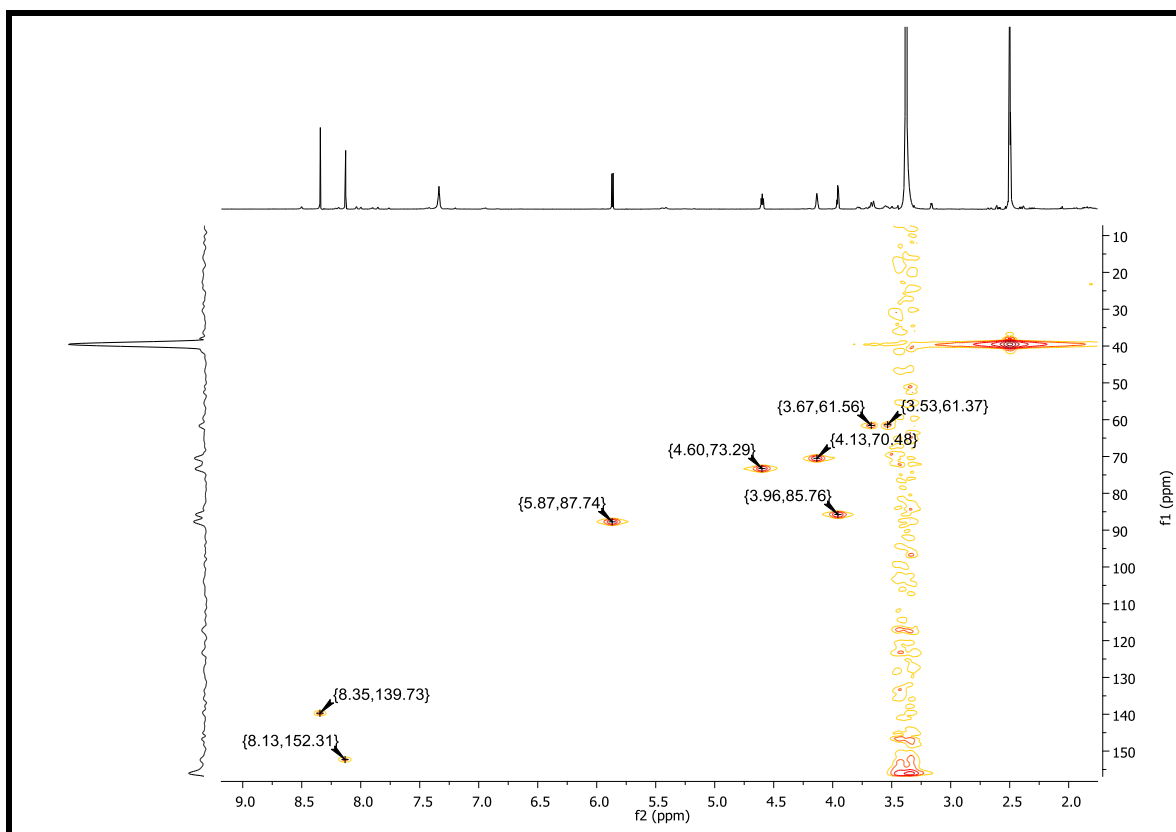


Figura 51. Mapa de contorno de HMBC da substância **1** (DMSO-d₆, 600 MHz).

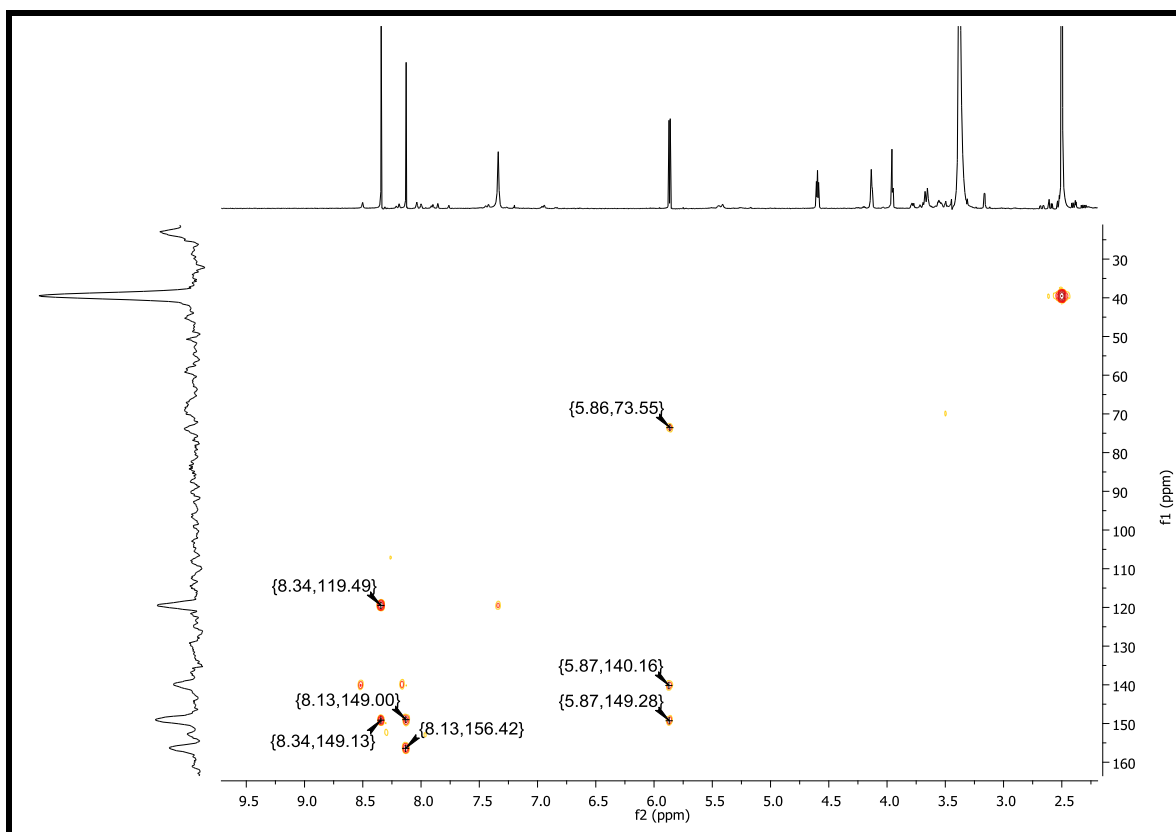
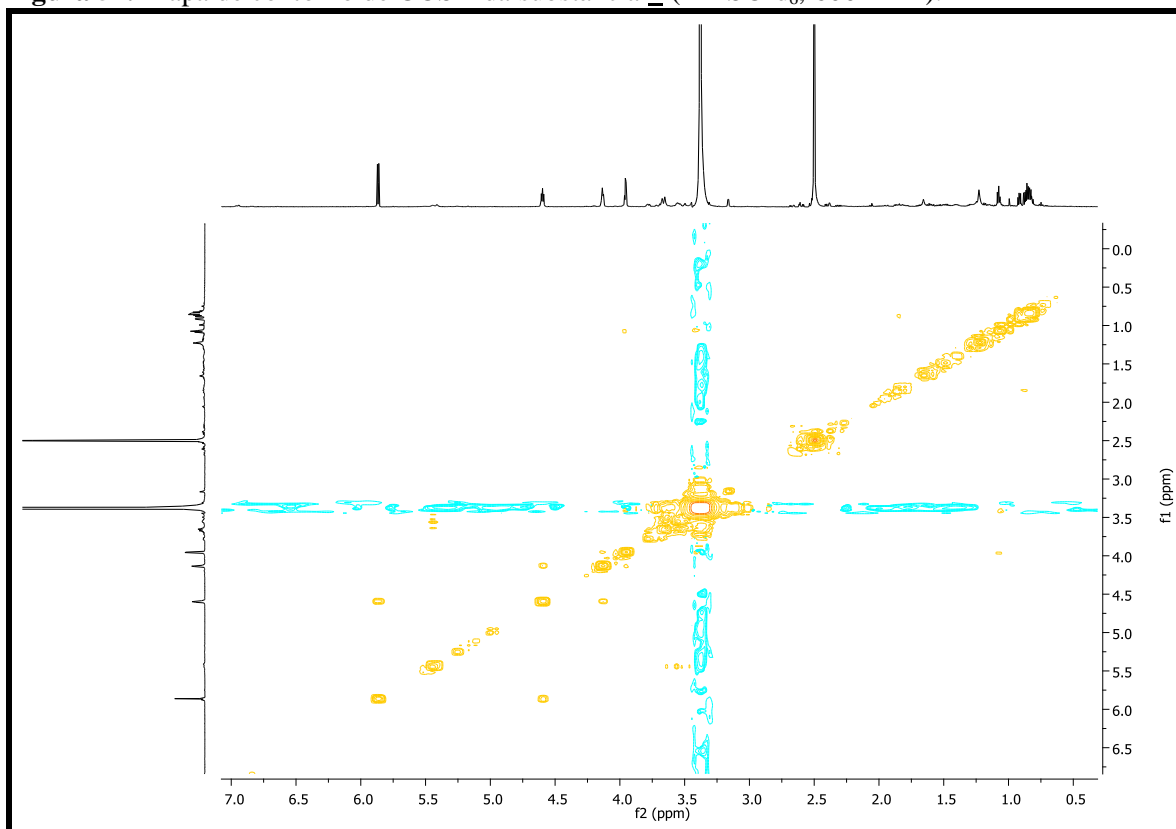
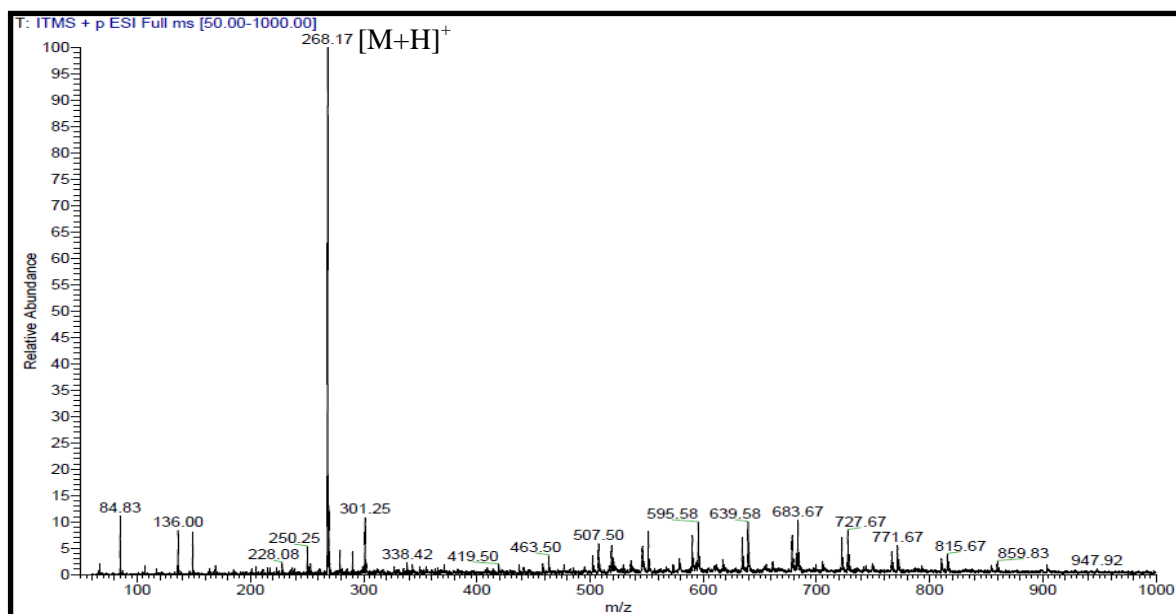
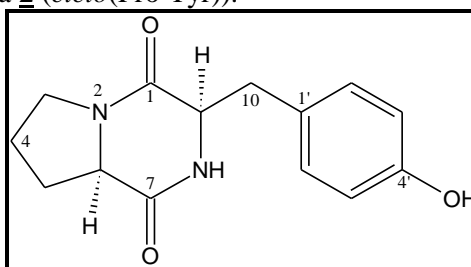


Figura 52. Mapa de contorno de COSY da substância **1** (DMSO-d₆, 600 MHz).**Figura 53.** Espectro de Massas da substância **1**.

5.3.2 Identificação estrutural da substância **2**

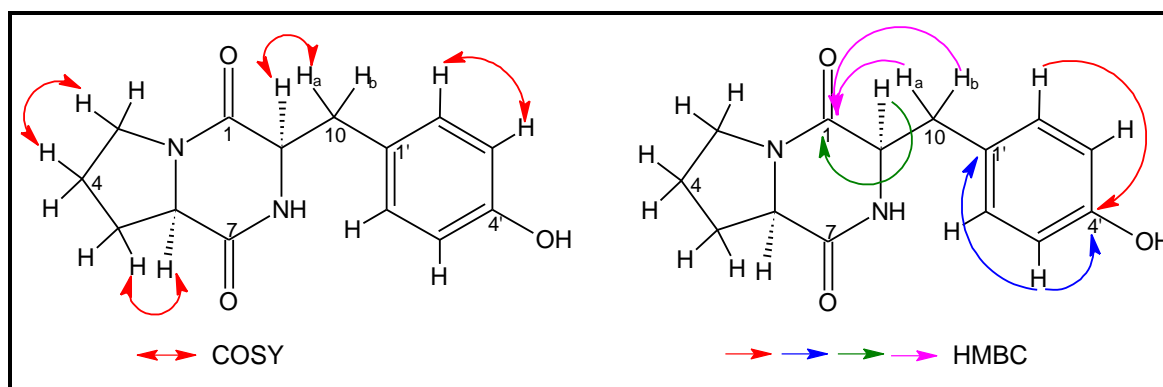
Figura 54. Estrutura da substância **2** (*ciclo*(Pro-Tyr)).



Fonte: Autor

A análise do conjunto dos espectros de RMN de ^1H (Figura 56) e dos mapas de contorno dos experimentos de HSQC (Figura 57) e HMBC (Figura 58) permitiu visualizar a presença dos hidrogênios e os respectivos carbonos (Tabela 14). Foram visualizados sinais de hidrogênios em δ_{H} 4,04 (*m*, 1H; δ_{C} 58,2, H-6), δ_{H} 4,24 (*t*, $J= 4,8$ Hz, 1H; δ_{C} 55,8, H-9), e de duas carbonilas em δ_{C} 165,8 e δ_{C} 169,1, que pelos valores característicos dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C evidenciaram um anel dicetopiperazínico.

O espectro de RMN de ^1H apresentou dois dubletos em δ_{H} 7,04 (*d*; $J= 8,5$ Hz) e δ_{H} 6,63 (*d*; $J= 8,5$ Hz) indicando um sistema típico de anel aromático *para*-disubstituído. Foram observados ainda a presença de três multipletos em δ_{H} 3,25-3,37 (*m*, 2H, δ_{C} 44,3), δ_{H} 1,70-1,73 (*m*, 2H, δ_{C} 21,4) e δ_{H} 1,38-2,00 (*m*, 2H, δ_{C} 27,4). A presença do deslocamento químico em δ_{C} 156,4 indicou a presença de um grupo $-\text{OH}$ ligado ao anel aromático sugerindo a presença de resíduo do aminoácido Tirosina (Tyr). Analisando o experimento de COSY (Figura 59) foi possível observar correlações entre os hidrogênios benzílicos $\text{H-10} \leftrightarrow \text{H-9}$ (δ_{H} 2,92 e 4,24), confirmando a presença da unidade Tyr. O sinal em δ_{H} 7,86 no experimento de RMN de ^1H foi atribuído ao NH-8, uma vez que não apresentou correlação direta com átomo de carbono em HSQC e mostrou correlação a longa distância em HMBC com C-6 (δ_{C} 58,2) e C-1 (δ_{C} 165,8). As principais correlações de COSY e HMBC estão representadas na Figura 55.

Figura 55. Principais correlações de COSY e HMBC da substância **2**.

Fonte: Autor

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) de **2** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δH	δC	HMBC	COSY
1	-	165,8	-	-
3	3,25/3,37 (<i>m</i>)	44,3	*	H4
4	1,70/1,73 (<i>m</i>)	21,4	*	H3; H5
5	1,38/2,00 (<i>m</i>)	27,4	*	H4; H6
6	4,04 (<i>m</i>)	58,2	*	H5
7	-	169,1	-	-
8	7,86 (<i>s</i>)	-	C1; C6	-
9	4,24 (<i>t</i> , 4,8 Hz)	55,8	C1	H10
10	2,92 (<i>m</i>)	34,7	C1; C9; C1'; C2'	H9
1'	-	127,3	-	-
2' e 6'	7,04 (<i>d</i> , 8,5 Hz)	130,9	C4'	H10; H3'
3' e 5'	6,63 (<i>d</i> , 8,5 Hz)	114,8	C1'; C3'; C4'	H2'
4'	-	156,4	-	-

*Sinal não observado

Estes dados espectrais, comparados com a literatura (CAFÊU, 2007; BIASETTO, 2011) permitiram identificar a substância como *ciclo*(Pro-Tyr) (**2**).

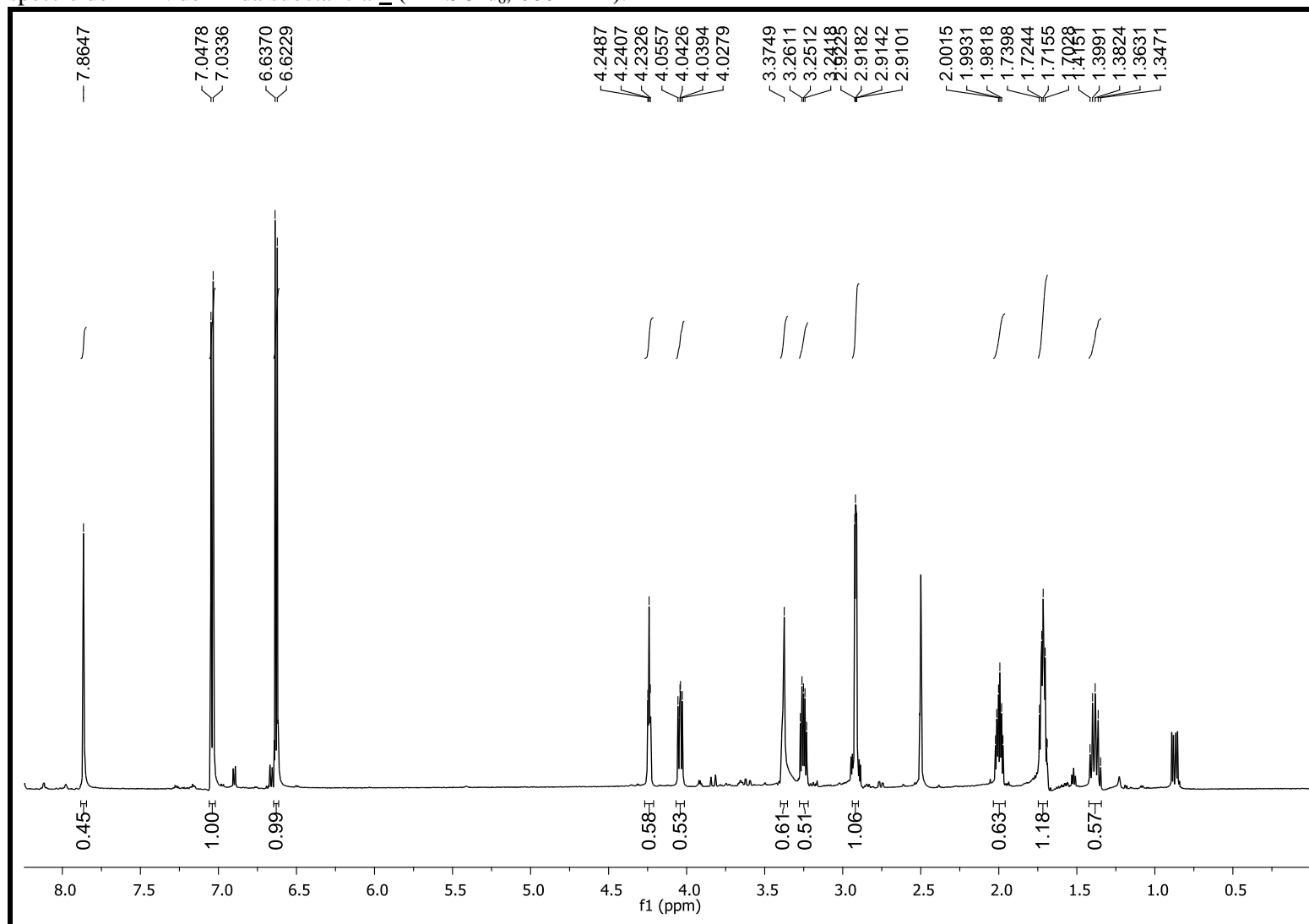
Figura 56. Espectro de RMN de ^1H da substância **2** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

Figura 57. Mapa de contorno de HSQC da substância **2** (DMSO-d₆, 600 MHz).

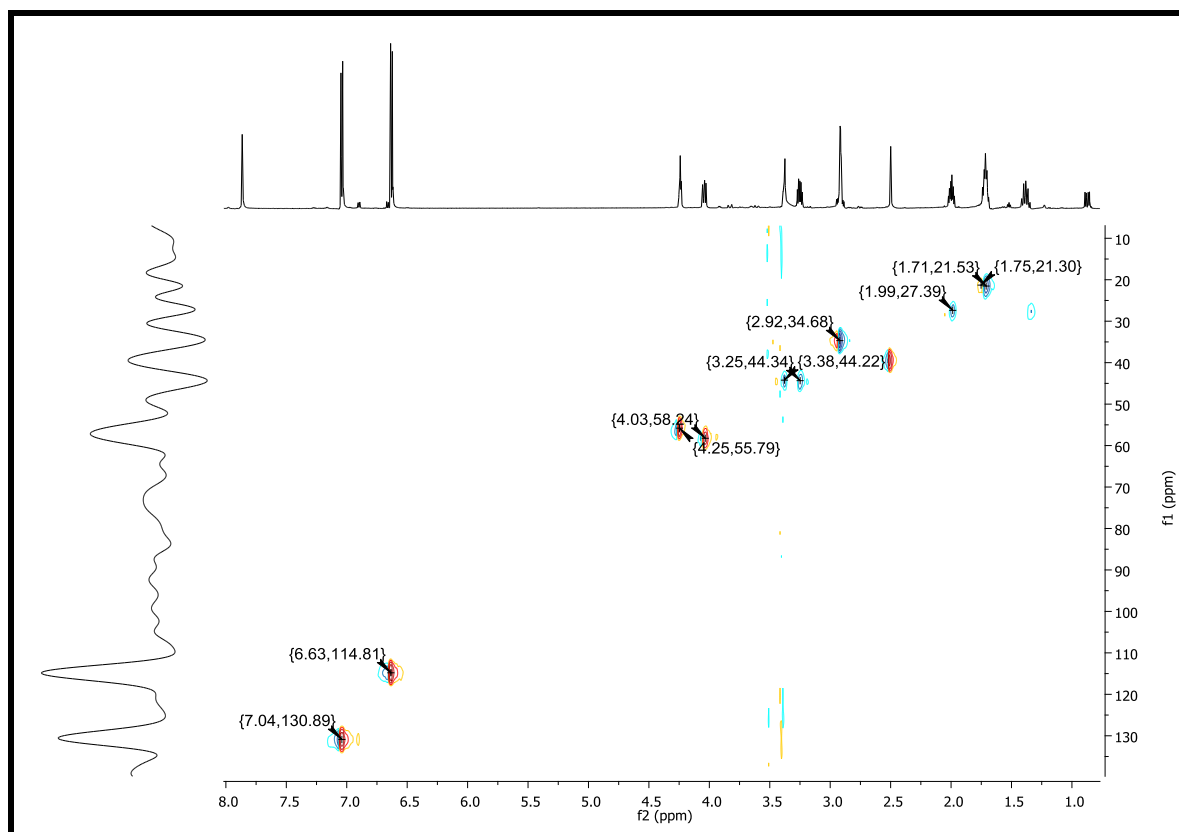


Figura 58. Mapa de contorno de HMBC da substância **2** (DMSO-d₆, 600 MHz).

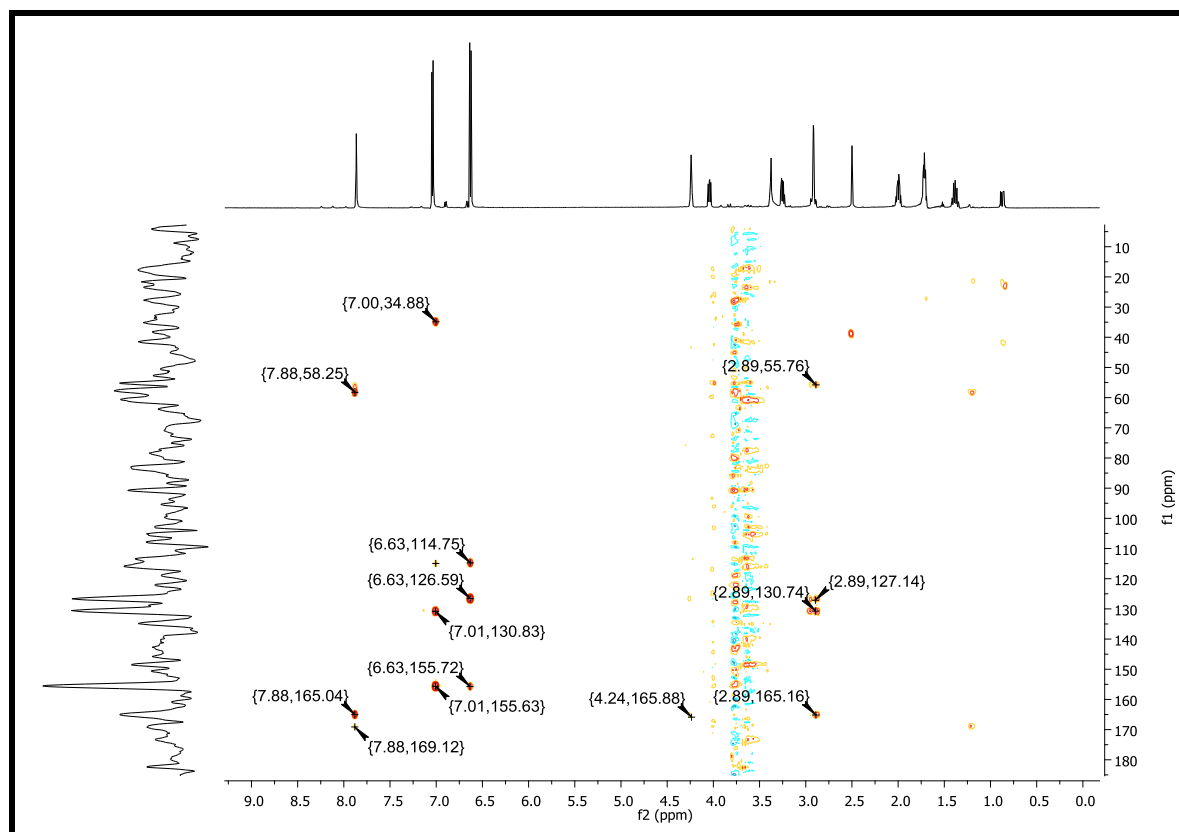
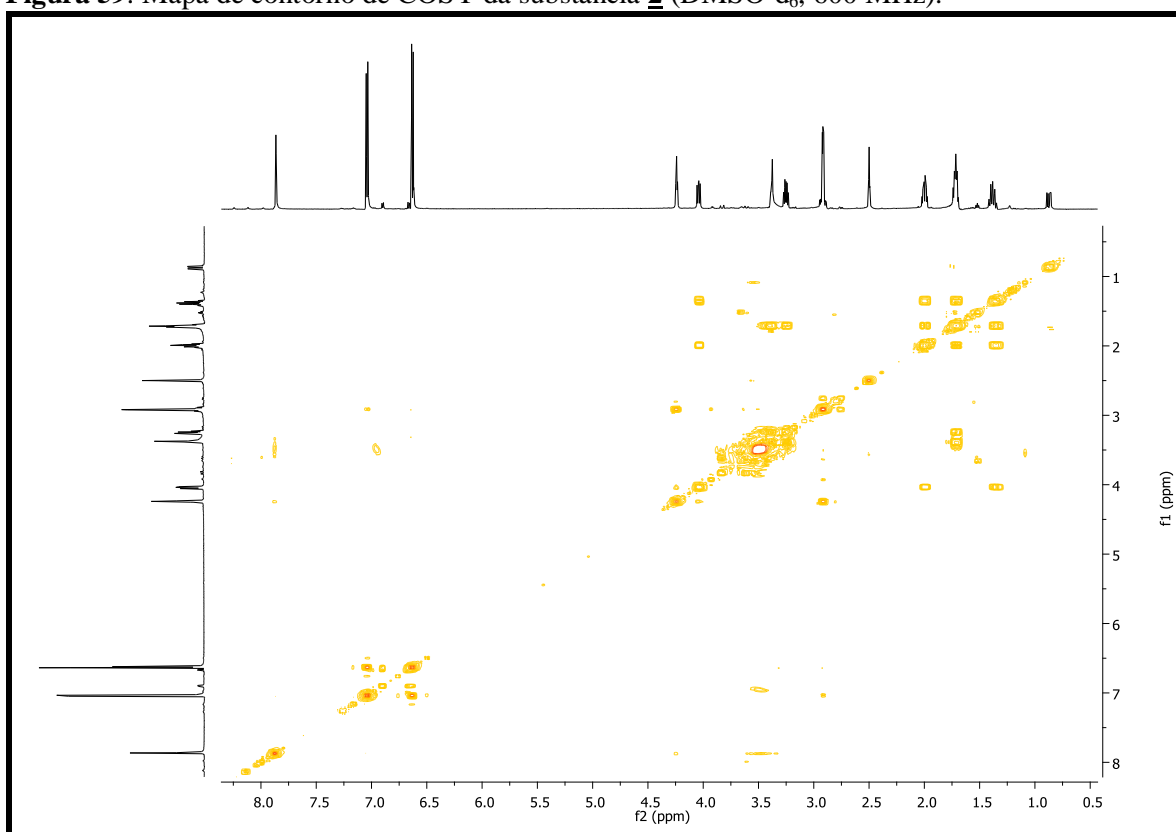
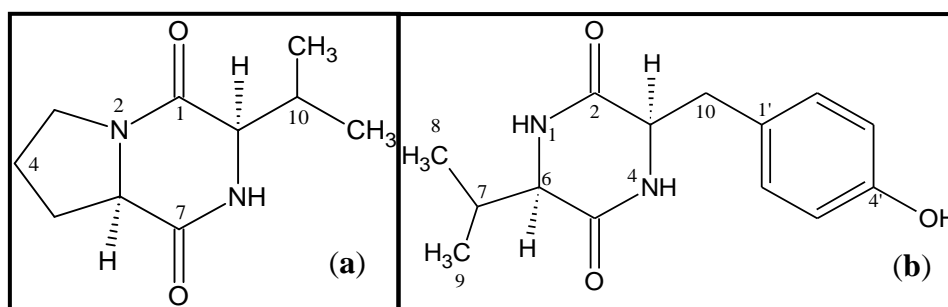


Figura 59. Mapa de contorno de COSY da substância **2** (DMSO-d₆, 600 MHz).

5.3.3 Identificação estrutural das substâncias **3** e **4**

Análise detalhada dos espectros de RMN de ¹H, HSQC e HMBC (Tabela 15) de Eb_Xyl-Fr1-Pico10 (3,1,mg) evidenciou uma mistura de duas substâncias. Assim como para a substância **2** foram visualizados sinais atribuídos a carbonos ligados a nitrogênio e carbonilas, indicando a presença de um anel dicetopiperazínico.

Figura 60. Estrutura das substâncias **3** (*ciclo*(Pro-Val)) (a) e **4** (*ciclo*(Val-Tyr)) (b)

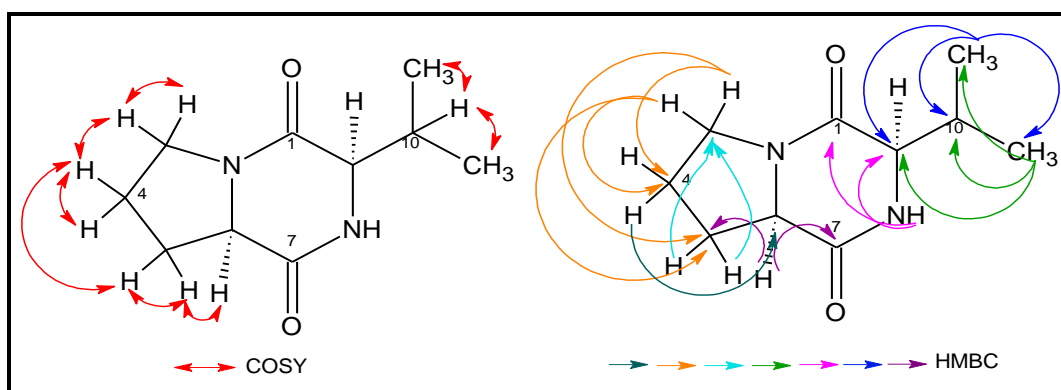
Fonte: Autor

O espectro de RMN de ^1H (Figura 63) apresentou três sinais na forma de multipletos (δ_{H} 3,40; 1,78/1,84 e 2,13/1,82), os quais mostraram correlação pelo COSY e sugeriram tratar-se de resíduo do aminoácido Prolina (FDHILA et al., 2003). Também foram visualizados dois dubletos em δ_{H} 0,84 (d , 3H, $J=7,0\text{Hz}$) e δ_{H} 1,01 (d , 3H, $J=7,0\text{Hz}$) e um multipletto em δ_{H} 2,34 (m , 1H) que se correlacionaram por COSY, sendo atribuídos aos hidrogênios H-10, H-11 e H-12, respectivamente. Estas informações evidenciaram uma unidade isopropila, indicando o aminoácido Valina. Estes dados permitiram identificar a presença da *ciclo*(Pro-Val) na mistura (CAFÊU, 2007).

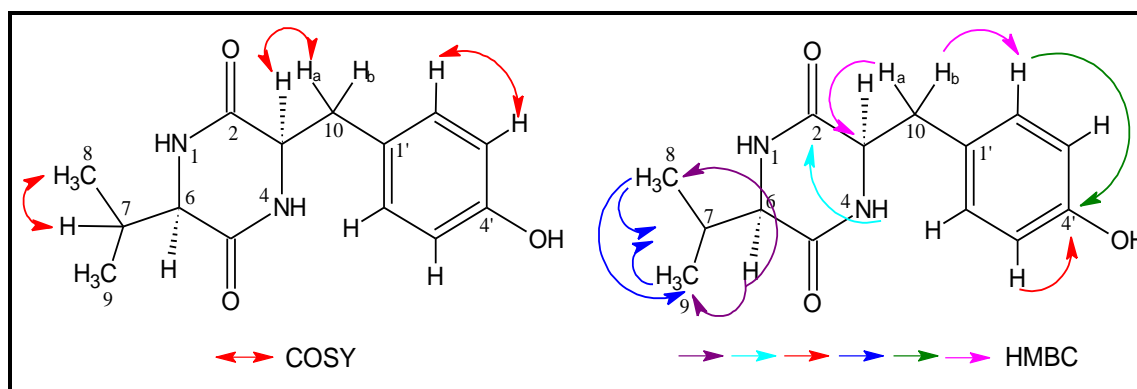
Paralelamente foi observado que os dubletos em δ_{H} 0,84 (d , $J=7,0\text{Hz}$; δ_{C} 16,2;) e δ_{H} 1,01 (d , $J=7,0\text{Hz}$; δ_{C} 18,2), também faziam parte de uma segunda substância que possuía um anel benzílico com sinais de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,98 (d ; $J=8,4\text{Hz}$, 2H) e δ_{H} 6,65 (d ; $J=8,4\text{Hz}$, 2H), e um sinal em δ_{C} 155,4 (indicando um grupo -OH ligado ao anel aromático) evidenciando a presença do resíduo de tirosina (Tyr) como um dos aminoácidos componentes da segunda substância presente na mistura. As correlações observadas pelo COSY entre os hidrogênios metílicos (H-8 e H-9) com o hidrogênio metínico δ_{H} 1,82 (H-7; δ_{C} 27,6) indicou a presença da valina (Val), como o outro aminoácido da molécula. Estes dados permitiram sugerir a presença da *ciclo*(Val-Tyr) (CAFÊU, 2007).

A conferência de todos os dados obtidos pelos experimentos de HSQC (Figura 64) e HMBC (Figura 65) foram comparados com a literatura (CAFÊU, 2007; BIASETTO, 2011) e permitiram identificar a substância **3** como *ciclo*(Pro-Val) e a substância **4** como *ciclo*(Val-Tyr) em mistura na fração Eb_Xyl-Fr1-Pico10.

Figura 61. Principais correlações de COSY e HMBC da substância **3**.



Fonte: Autor

Figura 62. Principais correlações de COSY e HMBC da substância **4**.

Fonte: Autor

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) de **3** e **4** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	Sub 3		Sub 4	
	δH	δC	δH	δC
1	-	165,4	7,96 (<i>s</i>)	-
2	-	-	-	170,5
3	3,40 (<i>m</i>)	44,4	3,51 (<i>t</i> , 7,3 Hz)	62,5
4	1,78/1,84 (<i>m</i>)	21,8	*	-
5	2,13/1,82 (<i>m</i>)	27,6	-	165,4
6	4,11 (<i>t</i> , 7,6 Hz)	58,1	3,91 (<i>sl</i>)	59,3
7	-	170,5	1,82 (<i>m</i>)	27,6
8	7,96 (<i>s</i>)	-	0,84 (<i>d</i> ; 7,0 Hz)	16,2
9	3,91 (<i>sl</i>)	59,3	1,01 (<i>d</i> ; 7,0 Hz)	18,2
10	2,34 (<i>m</i>)	27,4	2,60 (<i>t</i> ; 7,3 Hz)	38,1
11	0,84 (<i>d</i> ; 7,0 Hz)	16,2	-	-
12	1,01 (<i>d</i> ; 7,0 Hz)	18,2	-	-
1'	-	-	-	128,9
2' e 6'	-	-	6,98 (<i>d</i> , 8,4 Hz)	129,6
3' e 5'	-	-	6,65 (<i>d</i> , 8,4 Hz)	114,8
4'	-	-	-	155,4

*Sinal não observado

As dicetopiperazinas são conhecidas há mais de um século, mas os estudos sobre esta classe de substâncias intensificaram-se somente quando começaram a relatar a potencialidade biológica destas substâncias. Algumas das mais importantes atividades biológicas desta classe estão relacionadas com as alterações em funções cardiovasculares e coagulação do sangue. Também apresentam atividades como antitumoral, antiviral, antifúngica, antibacteriana, larvicida, agentes antihiperlipidêmico, afinidades receptoras dos canais de cálcio e serotoninérgico (MARTINS; CARVALHO, 2007; GENDY; RATEB, 2015; SATHYA et al., 2016).

Figura 63. Espectro de RMN de ^1H da substância **3** e **4** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

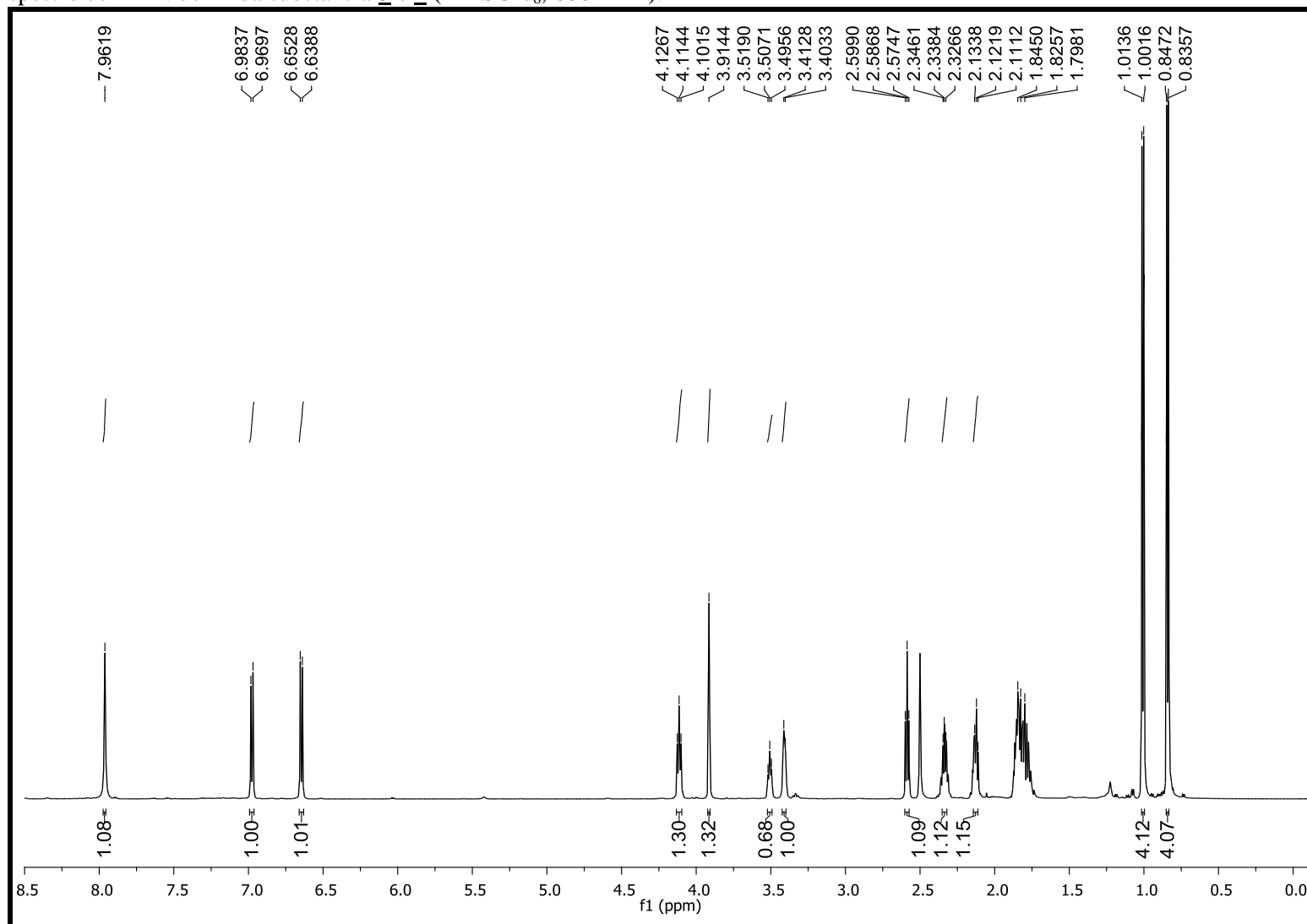


Figura 64. Mapa de contorno de HSQC da substância **3** e **4** (DMSO-d₆, 600 MHz).

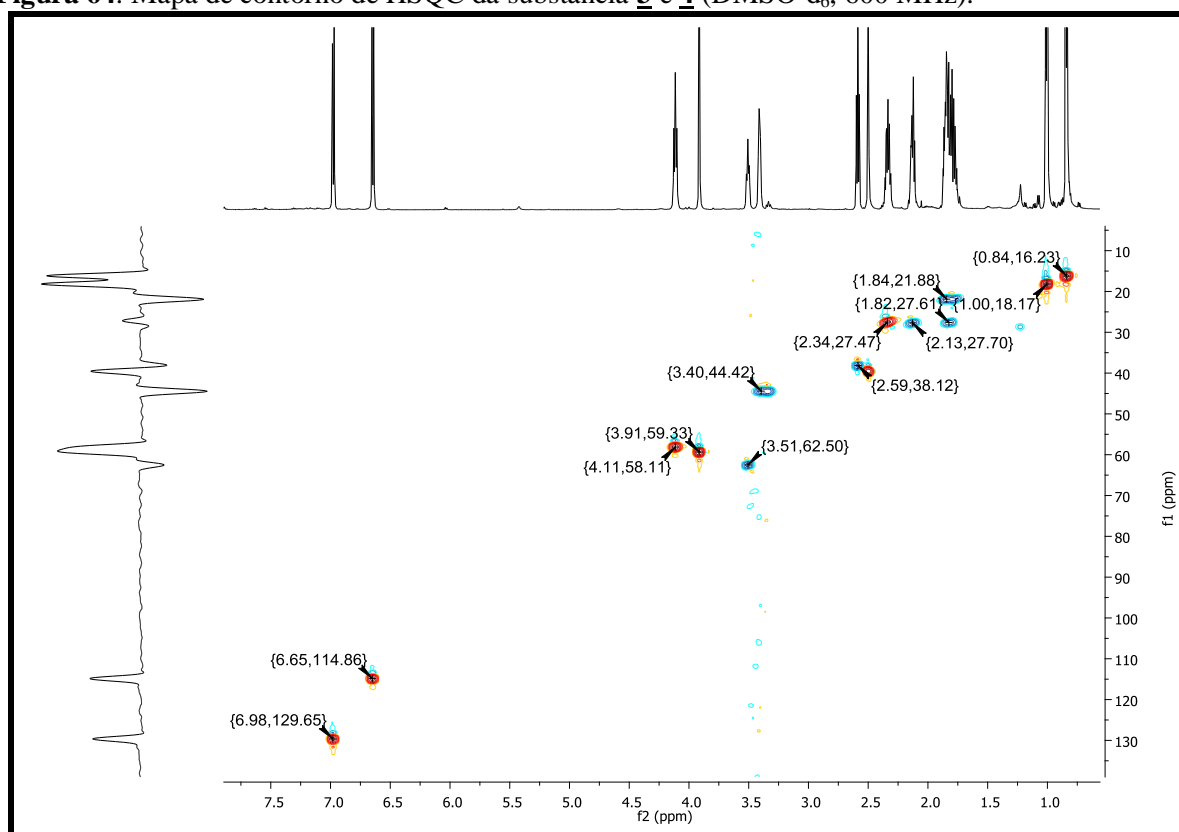


Figura 65. Mapa de contorno de HMBC da substância **3** e **4** (DMSO-d₆, 600 MHz).

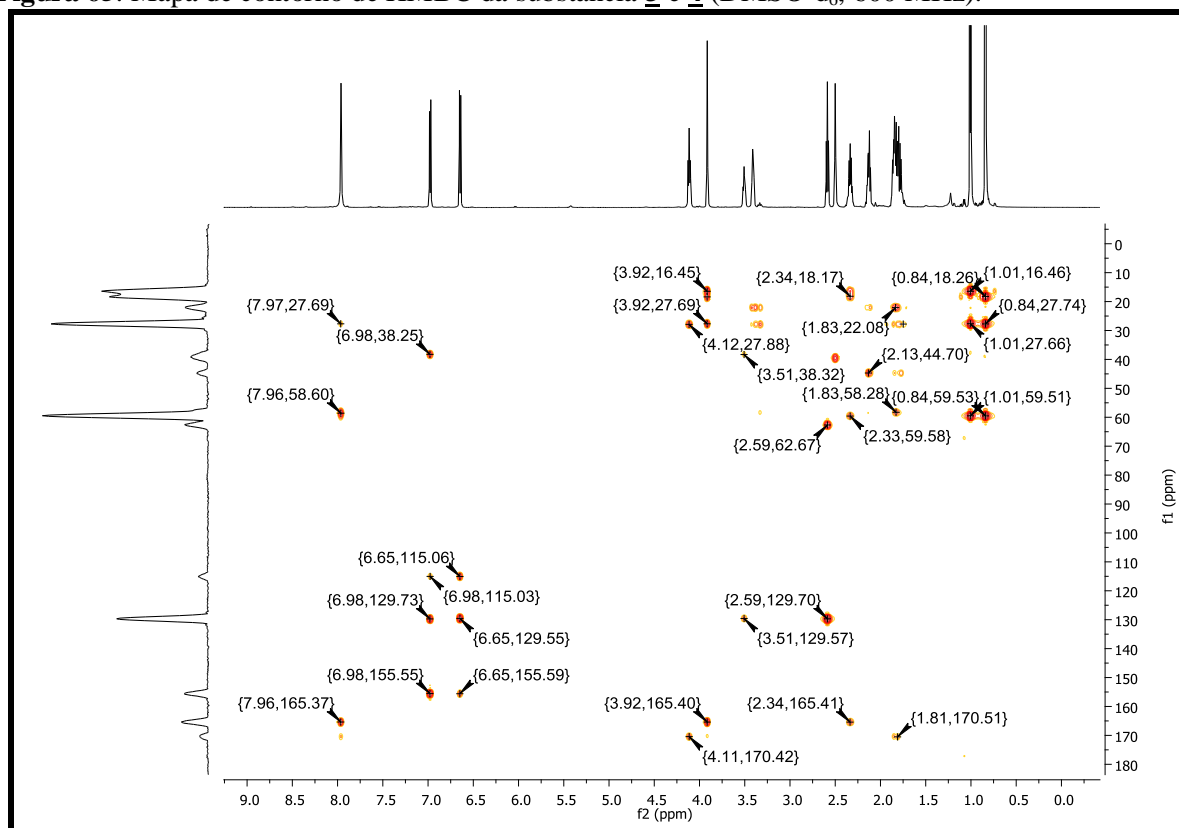
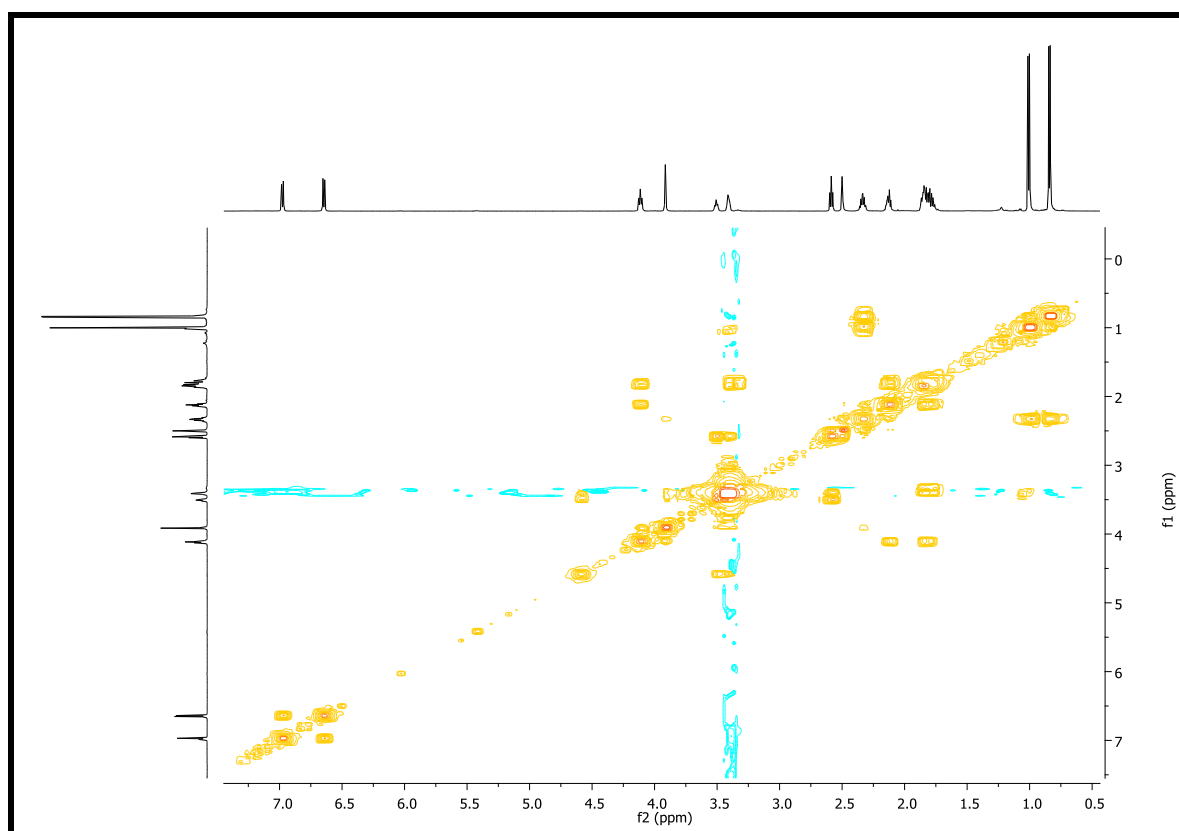
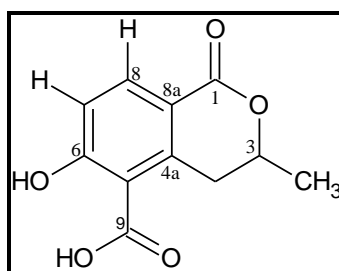


Figura 66. Mapa de contorno de COSY da substância **3** e **4** (DMSO-d₆, 600 MHz).

5.3.4 Identificação estrutural da substância **5**

Figura 67. Estrutura da substância **5** (5-carbóxi-6-hidroxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina).

Fonte: Autor

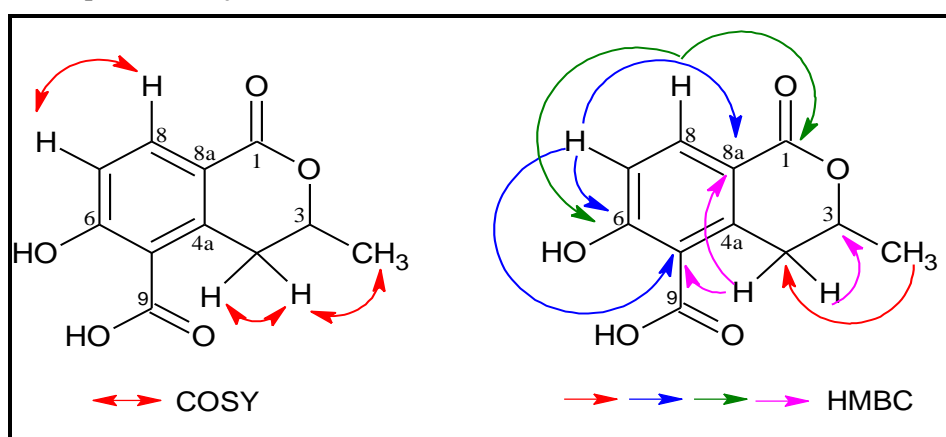
No espectro de RMN de ¹H (Figura 69) pode-se observar sinais na região dos aromáticos em δ_H 6,89 (*d*, $J=8,8$ Hz, 1H, δ_C 116,1) e δ_H 8,06 (*d*, $J=8,8$ Hz, 1H, δ_C 139,1), evidenciando um hidrogênio aromático em acoplamento *orto*, o que evidenciou a presença de anel aromático tetrasubstituído. No espectro de RMN de ¹H, foram observados ainda, sinais em δ_H 3,00 (*dd*, 11,8 e 17,6 Hz, δ_C 33,6), δ_H 3,84 (*dd*, 3,05 Hz e 17,6 Hz, δ_C 33,6) atribuídos aos hidrogênios diastereotópicos H-4 α e H-4 β , além de um multipletto em δ_H 4,70 (*m*, δ_C 76,9,

1H) e um duplete em δ_H 1,51 (*d*, 6,3 Hz) conferidos aos hidrogênios carbinólico H-3 e a Me-3, respectivamente. A atribuição de todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono foi realizada após avaliação das correlações observadas pelo HSQC (Figura 70).

As correlações observadas pelo HMBC (Figura 71) permitiram observar carbonos em δ_C 170,7 e δ_C 164,9 característicos de carbonila de éster e de ácido carboxílico, respectivamente e o sinal em δ_C 165,4 e, indicando carbono oxigenado. Estes dados, adicionados aos observados em COSY, permitiram sugerir o esqueleto de uma isocumarina.

As correlações observadas a longa distância nos experimentos de HMBC (Tabela 16) entre H-7 \leftrightarrow C-8a/C-5/C-6, de H-8 \leftrightarrow C-1/C-6/C-4a associados às correlações observadas no espectro de COSY (Tabela 13) de H-3 \leftrightarrow H-4 α /H-4 β e H-3 \leftrightarrow Me-3 (Figura 68) e comparação com a literatura (CAFÊU, 2007) permitiram identificar a substância 5-carbóxi-6-hidroxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina (**5**).

Figura 68. Principais correlações de COSY e HMBC da substância **5**.



Fonte: Autor

Tabela 16. Dados de RMN de ^1H ($\text{CH}_3\text{OH-d}_4$, 600 MHz) de **5** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δH	δC	HMBC	COSY
1	-	170,7	-	-
3	4,70 (<i>m</i>)	76,9	-	H-Me ₃ ; H _{α,β}
4α	3,00 (<i>dd</i> ; 11,8 e 17,6 Hz)	33,6	C8 α ; C5; C4 α ; C3	H _{β}
4β	3,84 (<i>dd</i> ; 3,05 e 17,6 Hz)		C8 α ; C5	H _{α}
4α	-	143,4	-	-
5	-	123,6	-	-
6	-	165,4	-	-
7	6,89 (<i>d</i> ; 8,8 Hz)	116,1	C8 α ; C5; C6	H8
8	8,06 (<i>d</i> ; 8,8 Hz)	139,1	C1; C4 α ; C6	H7
8α	-	109,6	-	-
9	-	164,9	-	-
Me-3	1,51 (<i>d</i> ; 6,3 Hz)	20,6	C4 α , β ; C3	H3

A classe das isocumarinas já foi isolada em nosso grupo de pesquisa, e apresentaram atividade anticolinesterásica e inibição dos fitopatógenos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, além dos relatos na literatura das seguintes atividades: antimicrobiana, antialérgica, antimalárica, citotóxica, antioxidante, entre outras (OLIVEIRA et al., 2011; CHAPLA; BIASSETTO; ARAUJO, 2013; SIMIC et al., 2016).

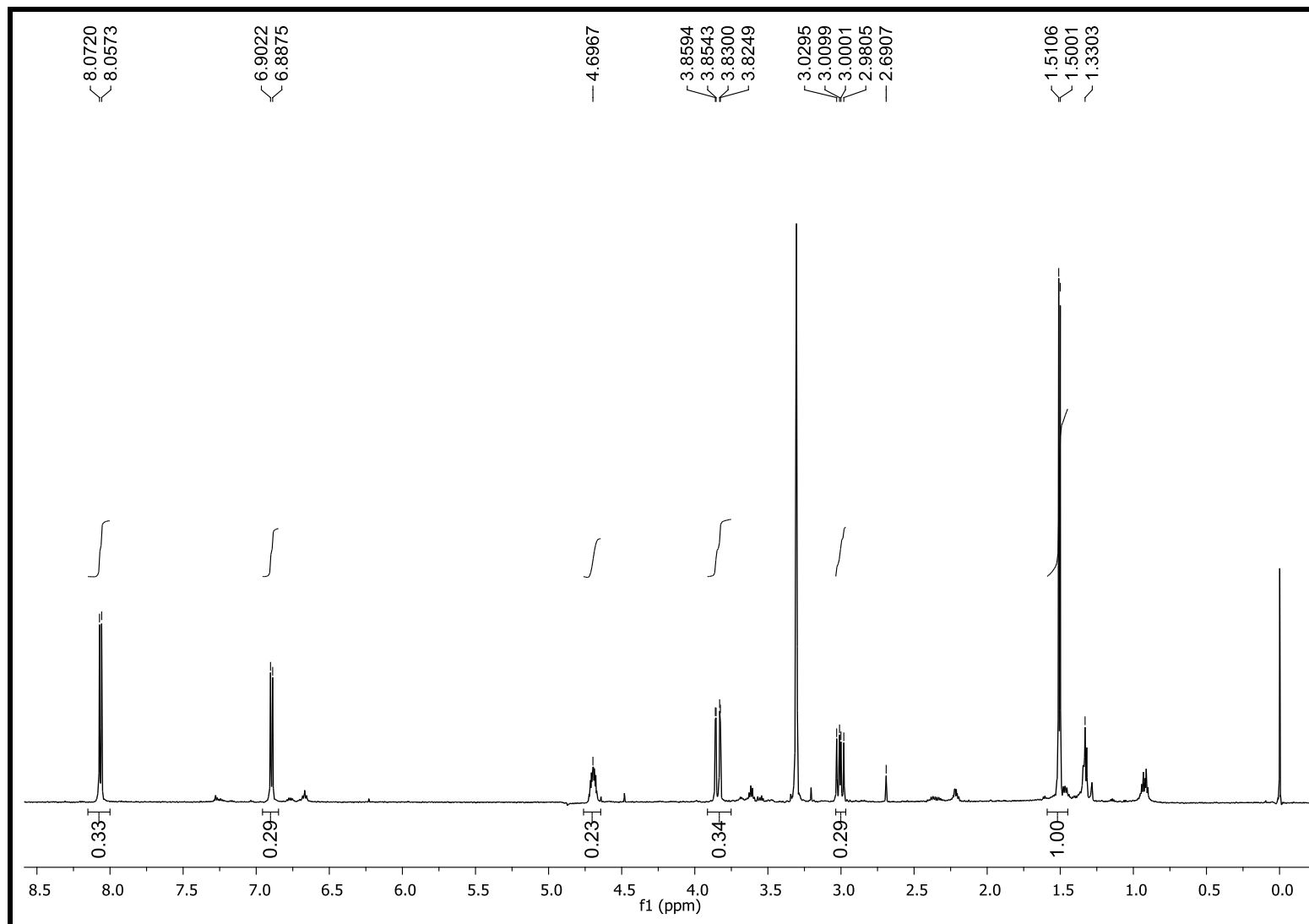
Figura 69. Espectro de RMN de ^1H das substâncias **5** ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$, 600 MHz).

Figura 70. Mapa de contorno de HSQC da substância **5** (CH₃OH-d₄, 600 MHz).

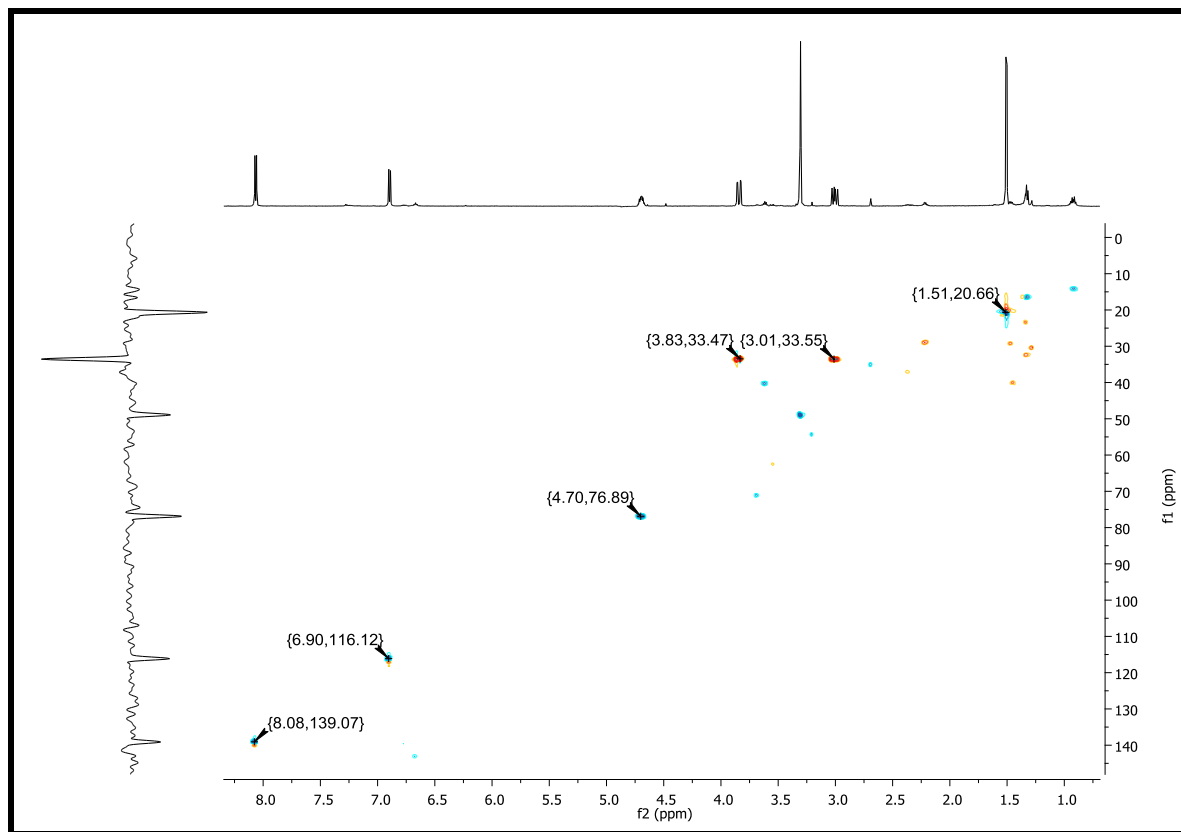


Figura 71. Mapa de contorno de HMBC da substância **5** (CH₃OH-d₄, 600 MHz).

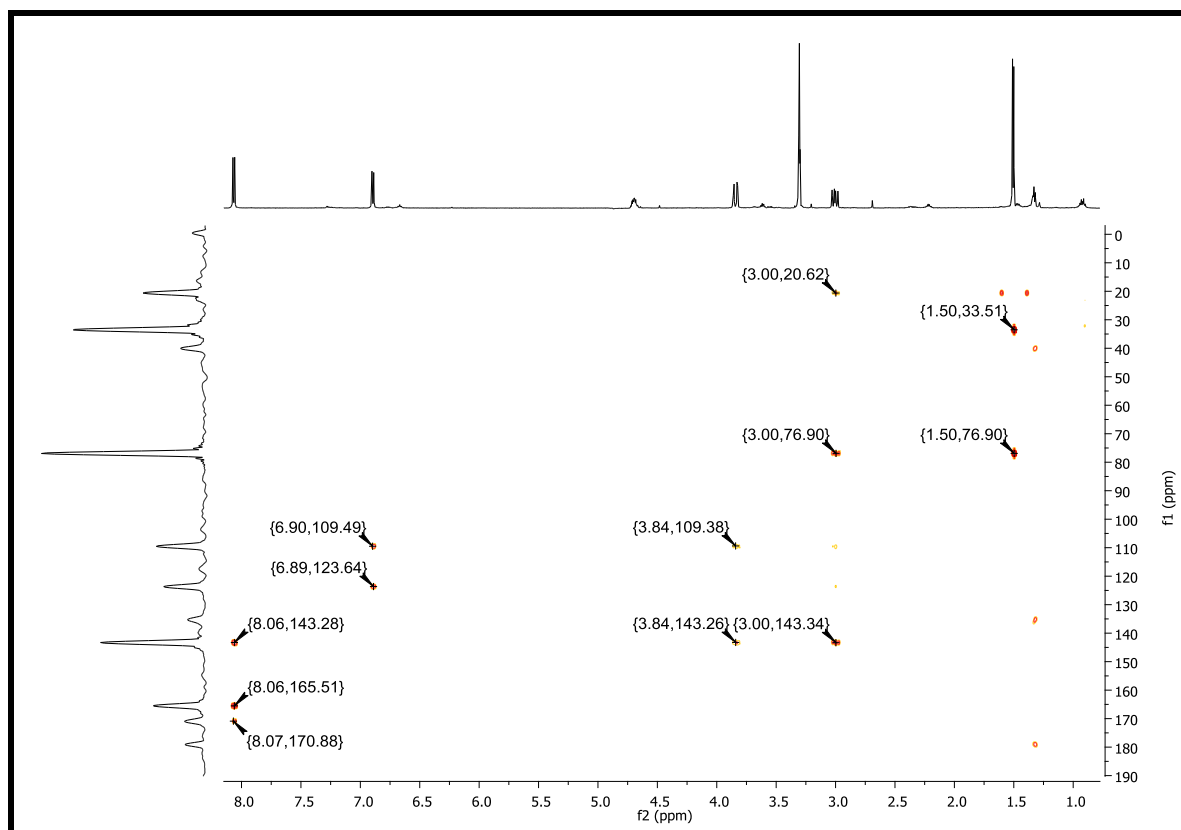
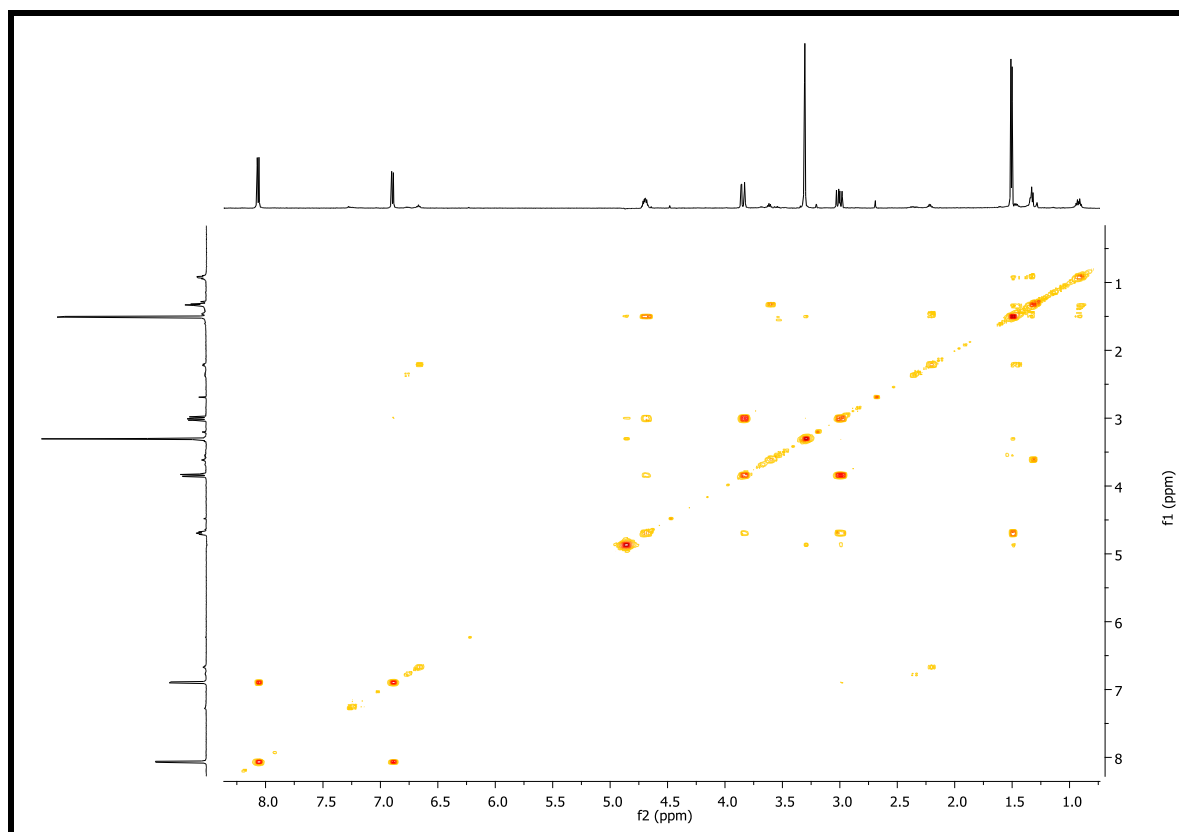
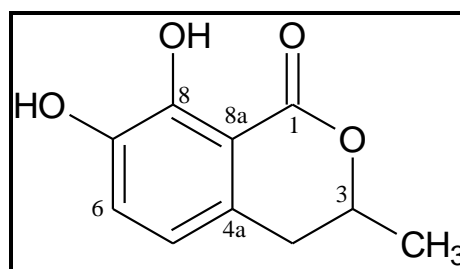


Figura 72. Mapa de contorno de COSY da substância **5** (CH₃OH-d₄, 600 MHz).

5.3.5 Identificação estrutural da substância **6**

Figura 73. Estrutura da substância **6** (7-hidroximeleína).

Fonte: Autor

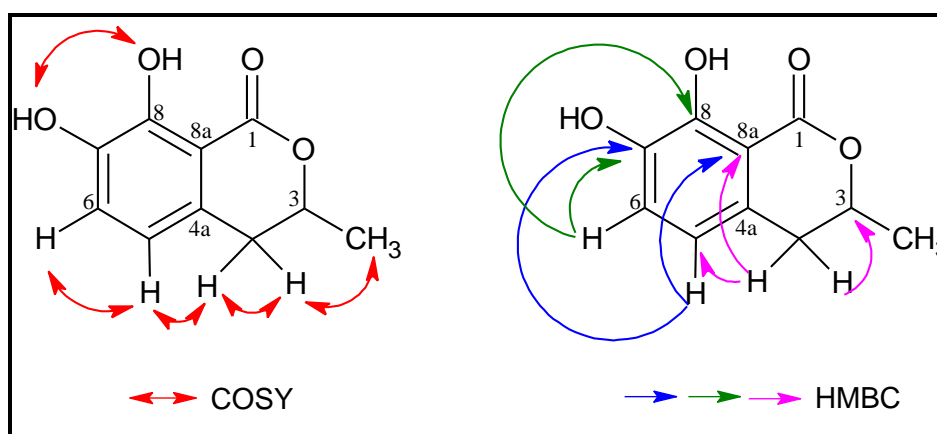
A análise do espectro de RMN de ¹H (Figura 75) da substância **6** apresentou dois dubletos em δ_{H} 6,71 (*d*, $J = 8,9$ Hz; δ_{C} 116,2) e δ_{H} 7,03 (*d*, $J = 8,9$ Hz; δ_{C} 124,9), evidenciando um acoplamento *orto* entre os hidrogênios aromáticos, sugerindo um anel tetrassubstituído.

No espectro de RMN de ¹H, foram observados ainda, sinais em δ_{H} 2,63 (*dd*, $J = 11,4$ e 16,9 Hz; δ_{C} 29,2), δ_{H} 3,17 (*dd*, $J = 3,4$ Hz e 16,9 Hz; δ_{C} 29,2) atribuídos aos hidrogênios diastereotópicos H-4 α e H-4 β , além de um multipletto em δ_{H} 4,70 (*m*, δ_{C} 77,5) e um dubletto

em δ_H 1,50 (*d*, $J= 6,3$ Hz). A atribuição de todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono foi realizada após avaliação das correlações observadas pelo HSQC (Figura 76). Estes dados, adicionados aos observados em HMBC, COSY (Tabela 17) e comparação com a substância **5** permitiram sugerir o esqueleto de uma isocumarina hidroxilada em C-7/C-8 ou em C-8/C-5. Para definir a posição das hidroxilas foi realizado o experimento HOMODEC, no qual a irradiação em δ_H 6,71 (H-5) mostrou interação com o sinal em δ_H 2,63 (H_{4 α}), evidenciando que a hidroxila encontra-se no C-7.

Estes dados espectrais, comparados com a literatura (OLIVEIRA et al., 2011) permitiram identificar a substância como 7-hidroximeleína (**6**).

Figura 74. Principais correlações de COSY e HMBC da substância **6**.



Fonte: Autor

Tabela 17. Dados de RMN de ¹H (CH₃OH-d₄, 600 MHz) de **6** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_H	δ_C	HMBC	COSY
1	-	*	-	-
3	4,70 (<i>m</i>)	77,5	*	H-Me ₃ ; H _{α,β}
4α	2,63 (<i>dd</i> ; 11,4 e 16,9 Hz)	29,2	C6; C3	H3; H β ; H5
4β	3,17 (<i>dd</i> ; 3,4 e 16,9 Hz)		C8a; C6	H3; H α
4a	-	*	-	-
5	6,71 (<i>d</i> ; 8,9 Hz)	116,2	C8a; C7	H6
6	7,03 (<i>d</i> ; 8,9 Hz)	124,9	C8; C7	H5
7	-	146,0	-	-
8	-	155,3	-	-
8a	-	108,2	-	-
Me-3	1,50 (<i>d</i> ; 6,3 Hz)	20,8	C3	H3

*Sinal não observado

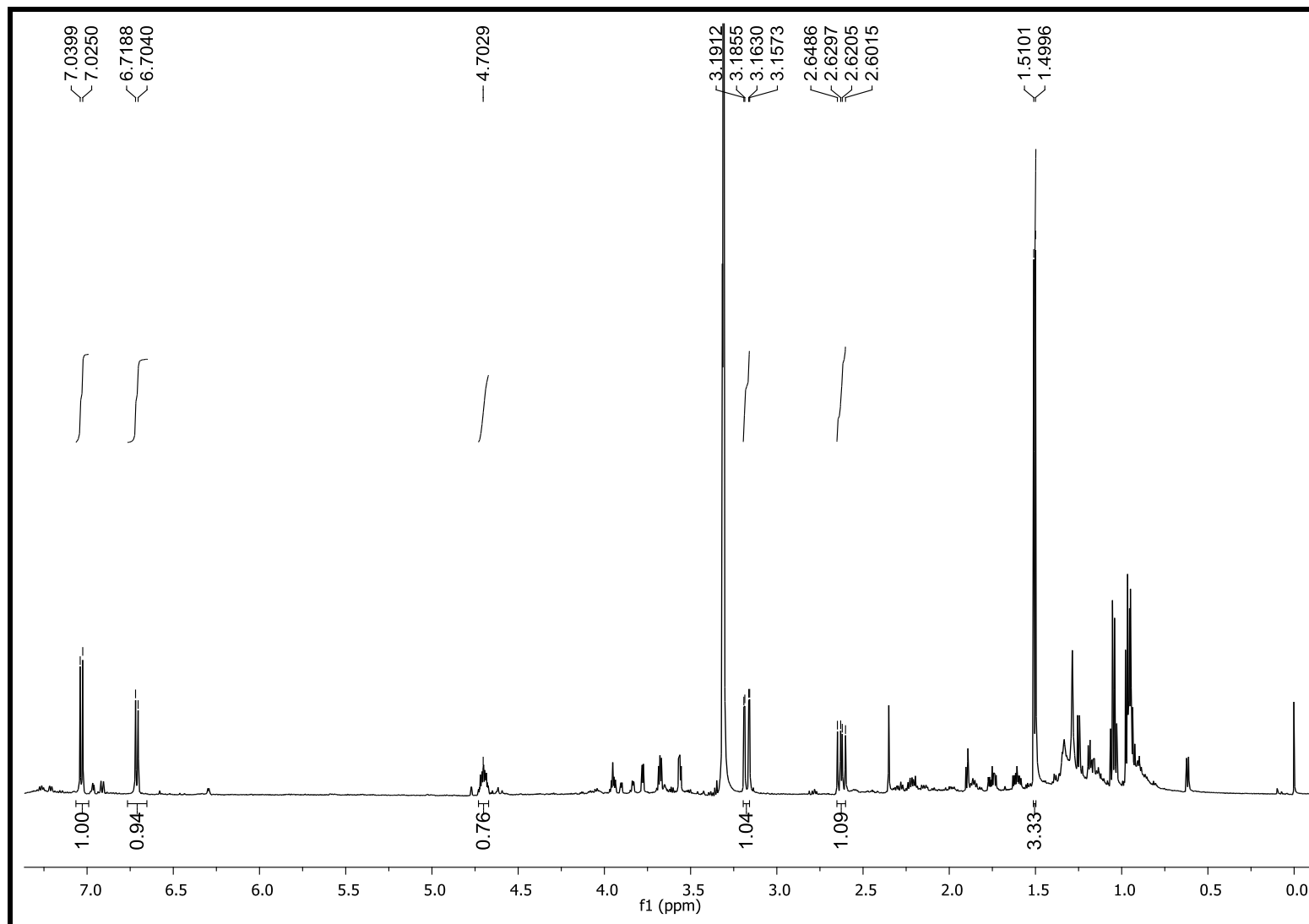
Figura 75. Espectro de RMN de ^1H da substância **6** ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$, 600 MHz).

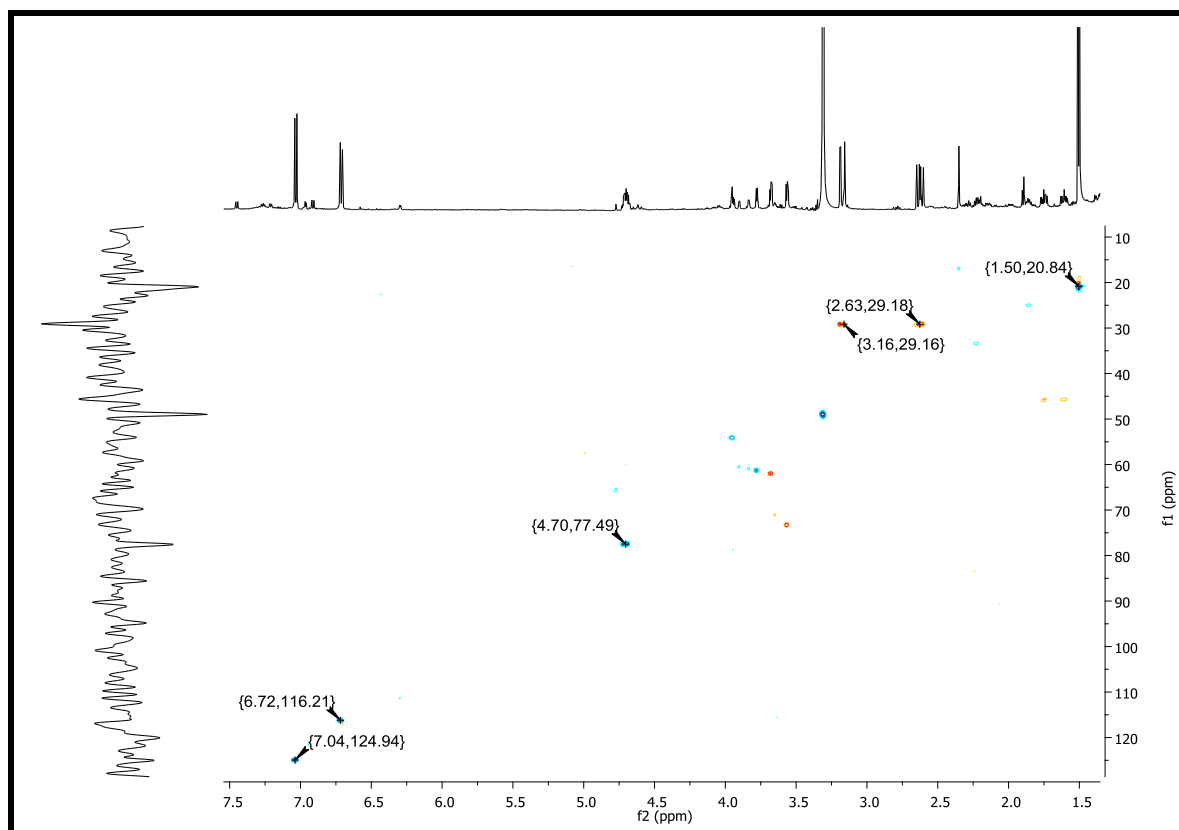
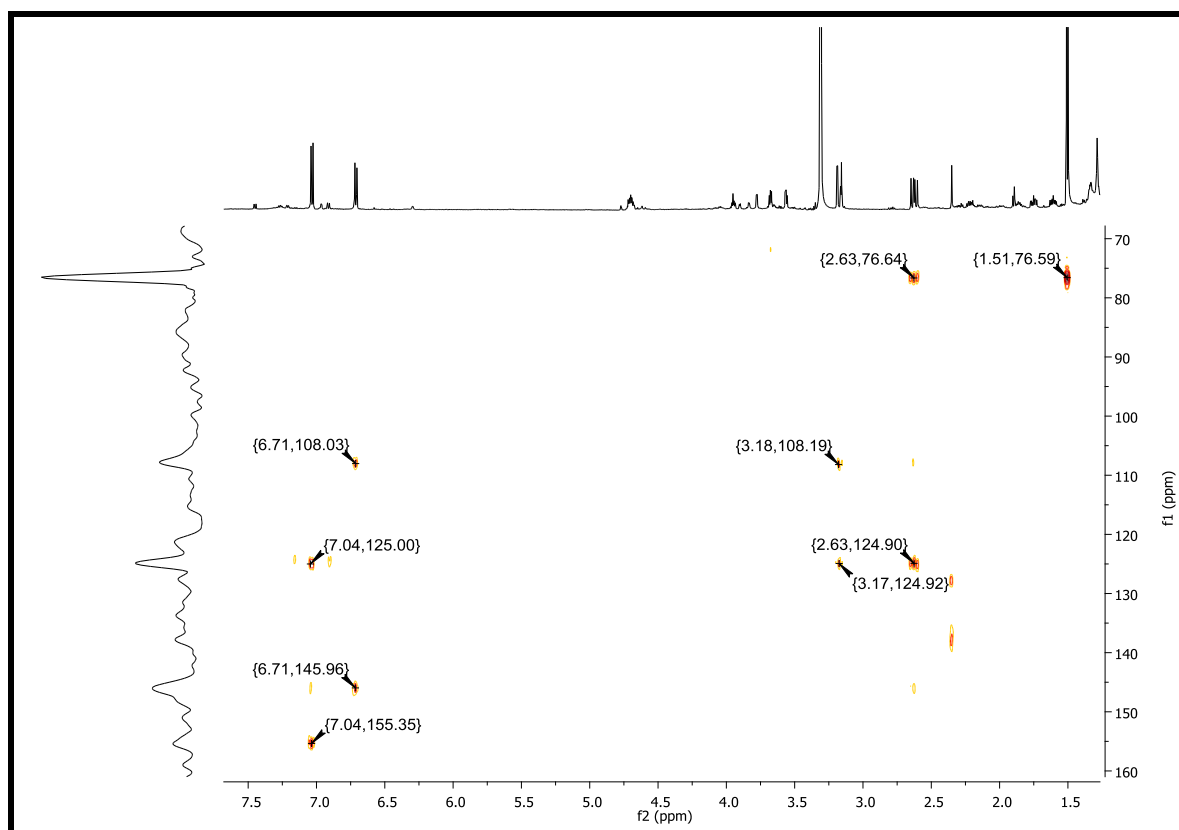
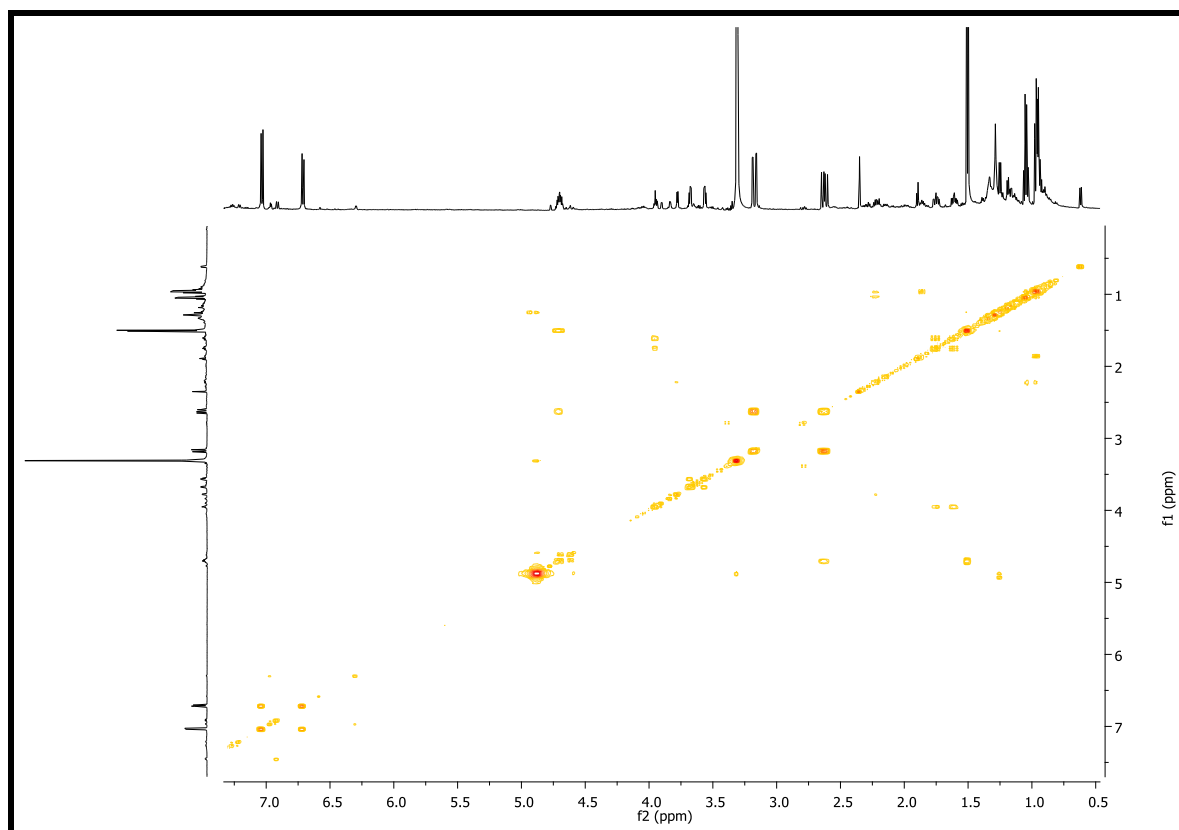
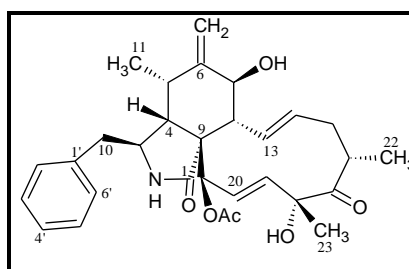
Figura 76. Mapa de contorno de HSQC da substância **6** (CH₃OH-d₄, 600 MHz).**Figura 77.** Mapa de contorno de HMBC da substância **6** (CH₃OH-d₄, 600 MHz).

Figura 78. Mapa de contorno de COSY da substância **6** (CH₃OH-d₄, 600 MHz).

5.3.6 Identificação estrutural da substância **7**

Figura 79. Estrutura da substância **7** (citocalasina D).

Fonte: Autor

A análise do espectro de RMN de ¹H (Figura 82) indicou a presença de um anel aromático monosubstituído, quatro metilas (δ_H 0,55, 1,14, 1,48 e 2,29) e sinais em δ_H 2,71 e δ_H 2,88 atribuídos aos hidrogênios benzílicos H-10 α e H-10 β . Também foram observados um metileno terminal em δ_H 4,98 e 5,17 (*s*, δ_C 113,7, C-12), duas ligações duplas endocíclicas em δ_H 5,54 (*dd*, δ_C 131,8, C-13), δ_H 5,29, (*m*, δ_C 134,5, C-14) e δ_H 5,23 (*d*, δ_C 128,9, C-19) e δ_H 5,98 (*dd*, δ_C 133,4, C-20). A geometria das ligações duplas $\Delta^{13,14}$ e $\Delta^{19,20}$ foi definida como

trans através da análise da constante de acoplamento de 15,7 e 15,9 Hz entre estes hidrogênios, respectivamente

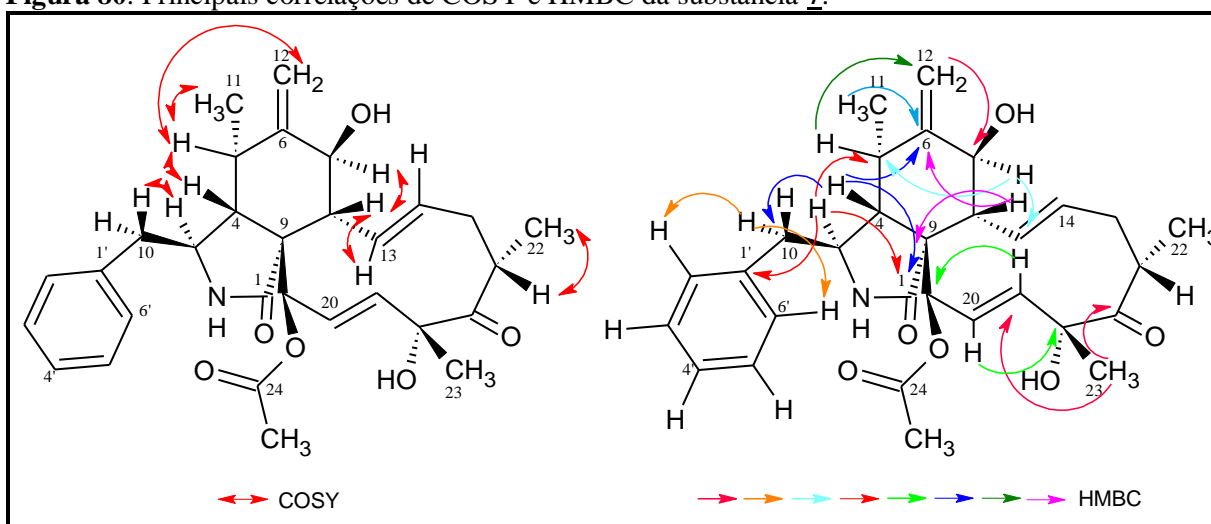
Os espectros de RMN apresentaram ainda sinais em δ_H 3,75 (*d*, $J= 10,4$ Hz, δ_C 72,3, H-7) e δ_H 5,41 (*t*; $J= 2,5$ Hz, δ_C 78,2, H-21) e um terceiro carbono carbinólico quaternário (δ_C 79,3).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 83) indicou a presença três carbonilas, sendo uma de cetona (δ_C 211,7) e duas de éster ou amida (δ_C 171,8 e 176,6), e três carbonos carbinólicos. A atribuição de todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono foi realizada após avaliação das correlações observadas pelo HSQC (Tabela 19). Análise de todos os experimentos de RMN 1D e 2D e comparação com a literatura (ZANARDI, 2010) permitiu identificar a substância **7** como Citocalasina D.

A configuração relativa de **7** foi determinada por comparação dos valores dos deslocamentos em RMN de 1H , ^{13}C e constantes de acoplamentos com dados da literatura (CAFÊU et al., 2005).

Na literatura a citocalasina D apresenta atividade citotóxica e inibitória frente aos fitopatógenos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (CAFÊU et al., 2005).

Figura 80. Principais correlações de COSY e HMBC da substância **7**.



Fonte: Autor

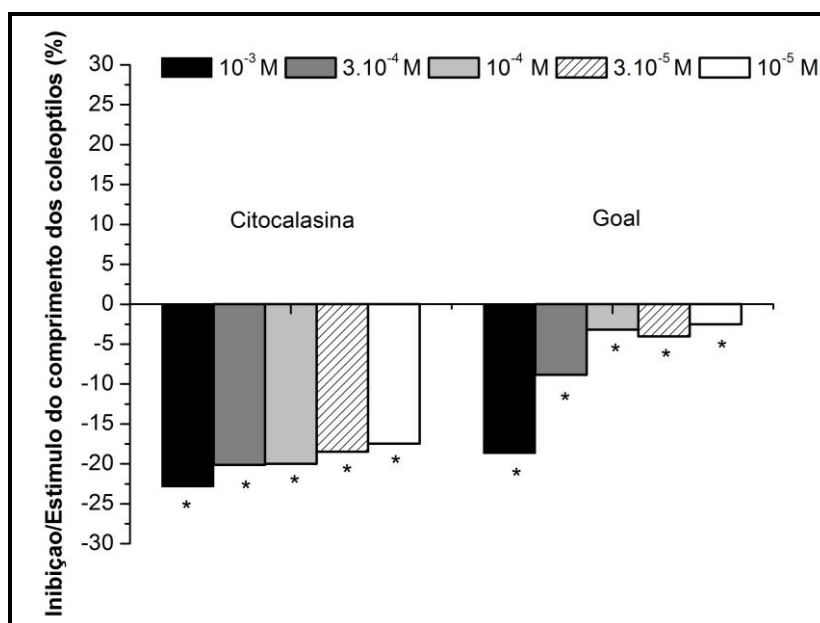
Tabela 18. Dados de RMN de ^1H ($\text{CH}_3\text{OH-d}_4$, 300 MHz) de **7** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δH	δC	HMBC	COSY
1	-	176,6	-	-
2	*	-	*	*
3	3,28 (<i>m</i>)	55,2	C1; C5; C4; C1'	H4
4	2,17 (<i>m</i>)	49,6	C1; C5; C10; C3; C6	H3; H5
5	2,61 (<i>m</i>)	33,4	C4; C11; C12	H4
6	-	150,9	-	-
7	3,75 (<i>d</i> ; 10,4 Hz)	72,3	C5; C12; C13	H8
8	2,86 (<i>m</i>)	47,8	C1; C6; C7; C21	H7; H13
9	-	54,9	-	-
10α	2,71 (<i>m</i>)	44,9	C2'e 6'; C1'; C4; C3	H3
10β	2,88 (<i>m</i>)			
11	0,55 (<i>d</i> ; 6,8 Hz)	13,5	C5; C4; C6	H5
12α	4,98 (<i>s</i>)	113,7	C5; C6; C7	H5
12β	5,17 (<i>s</i>)			
13	5,54 (<i>dd</i> ; 9,8; 15,7 Hz)	131,8	C15; C8; C7	H8
14	5,29 (<i>m</i>)	134,5	C15; C8	H15 β
15α	1,99 (<i>dd</i> ; 5,0; 13,0 Hz)	39,4	C22; C16; C13; C17	H14
15β	2,37 (<i>m</i>)		C16; C13; C17	H16; H14
16	2,82 (<i>m</i>)	43,4	C15; C17	H22; H15 β
17	-	211,7	-	-
18	-	79,3	-	-
19	5,23 (<i>d</i> ; 2,5 Hz)	128,9	C20; C21	*
20	5,98 (<i>dd</i> ; 2,5; 5,9 Hz)	133,4	C21; C18; C19	H19
21	5,41 (<i>t</i> ; 2,5 Hz)	78,2	C4; C3; C19; C20; C24	*
22	1,14 (<i>d</i> ; 6,8 Hz)	19,7	C15; C16; C17	H16
23	1,48 (<i>s</i>)	24,6	C19; C17	*
24	-	171,8	-	-
25	2,29 (<i>s</i>)	20,6	C21; C24	-
1'	-	138,4	-	-
2' e 6'	7,18 (<i>d</i> ; 8,1 Hz)	130,9	C10; C4'	H3'/H5'
3' e 5'	7,30 (<i>t</i> ; 7,5 Hz)	129,6	C1'	H2'/H6'
4'	7,23 (<i>t</i> ; 7,5 Hz)	127,9	C2'/C6'	*

*Sinal não observado

A citocalasina D inibiu o crescimento dos coleóptilos de trigo em todas as concentrações testadas, assim como o controle positivo (herbicida GOAL[®]). As porcentagens de inibição da citocalasina D foram superiores às porcentagens de inibição causadas pelo efeito do herbicida comercial GOAL[®] (Figura 81). Utilizou-se como controle negativo uma solução tampão.

Figura 81. Inibição/estímulo do crescimento dos coleótilos de trigo sob a atividade da citocalasina D.



*Frações que apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo (solução tampão).

Fonte: Autor

A Tabela 19 apresenta as médias de crescimento dos coleótilos sob o efeito da citocalasina D, assim como as médias de crescimento dos coleótilos sob a atividade do controle positivo (herbicida GOAL[®]) nas mesmas concentrações.

Tabela 19. Médias de crescimento dos coleótilos sob o efeito da citocalasina D e do herbicida comercial GOAL[®].

Amostras	Concentrações (mol L ⁻¹)				
	10 ⁻³	3.10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	3.10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
Citocalasina D	4,6 ± 0,0 a	4,8 ± 0,1 b	4,8 ± 0,0 b	4,9 ± 0,0 b	5,0 ± 0,2 b
GOAL	4,9 ± 0,0 a	5,5 ± 0,0 a	5,8 ± 0,0 a	5,8 ± 0,0 a	5,8 ± 0,5 a

*Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Observou-se que na concentração 10⁻³ mol L⁻¹, a média de crescimento dos coleótilos na presença da citocalasina D e do herbicida GOAL não diferem estatisticamente.

Figura 82. Espectro de RMN de ^1H da substância **7** ($\text{CH}_3\text{OH}-d_4$, 300 MHz).

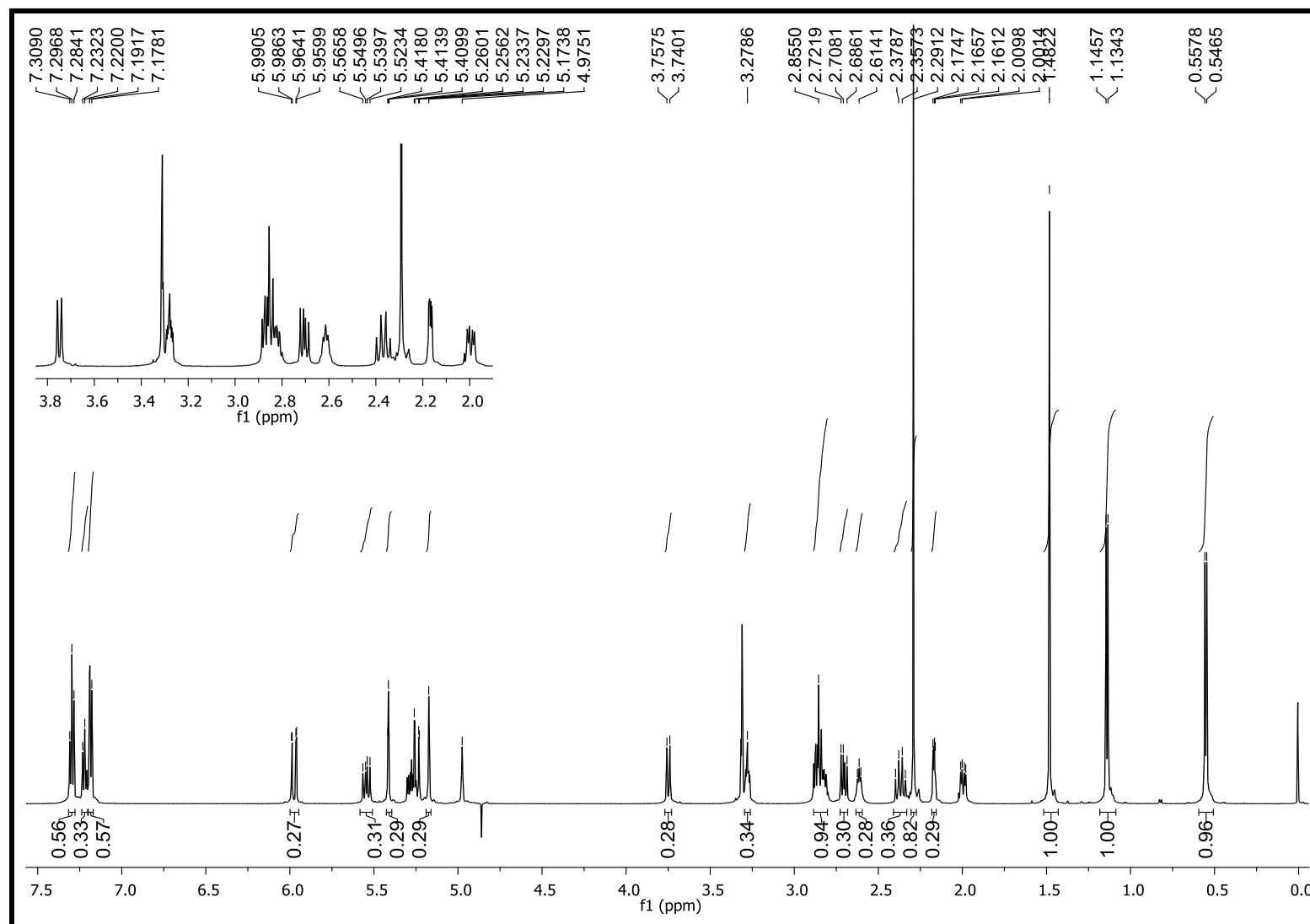


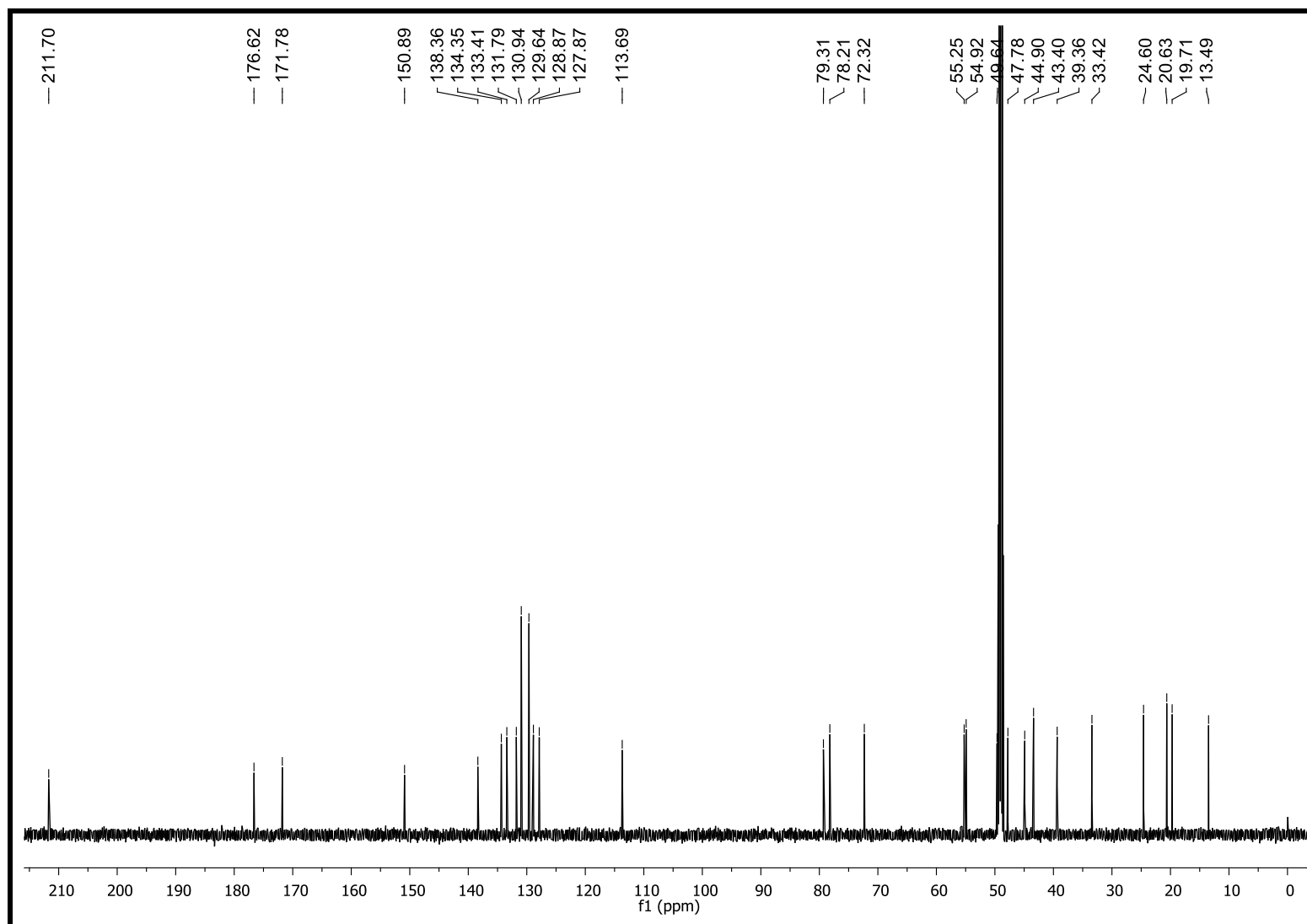
Figura 83. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **7** ($\text{CH}_3\text{OH-d}_4$, 300 MHz).

Figura 84. Mapa de contorno de HMBC da substância **7** (CH₃OH-d₄, 300 MHz).

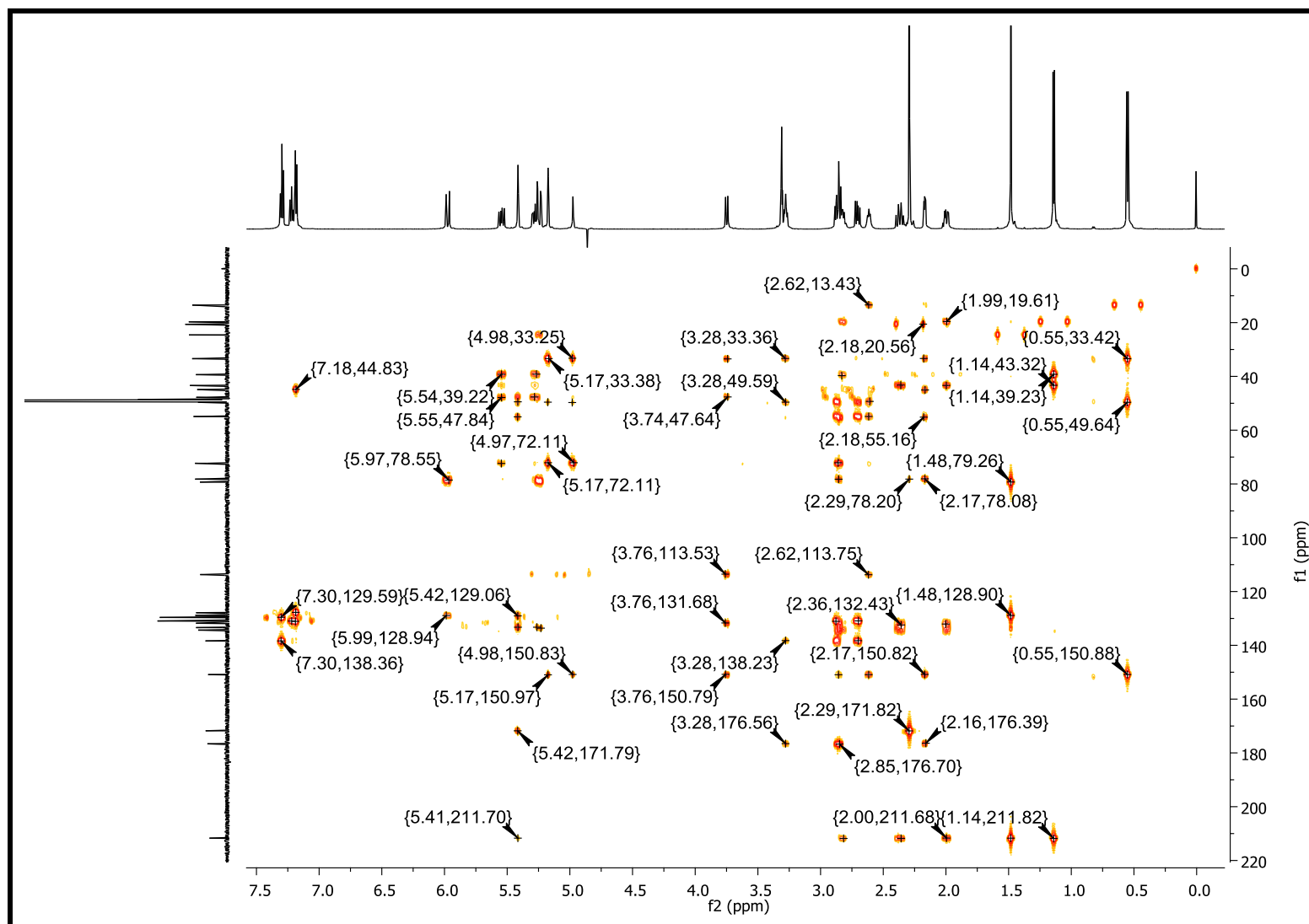


Figura 85. Mapa de contorno de HSQC da substância **7** (CH₃OH-d₄, 300 MHz).

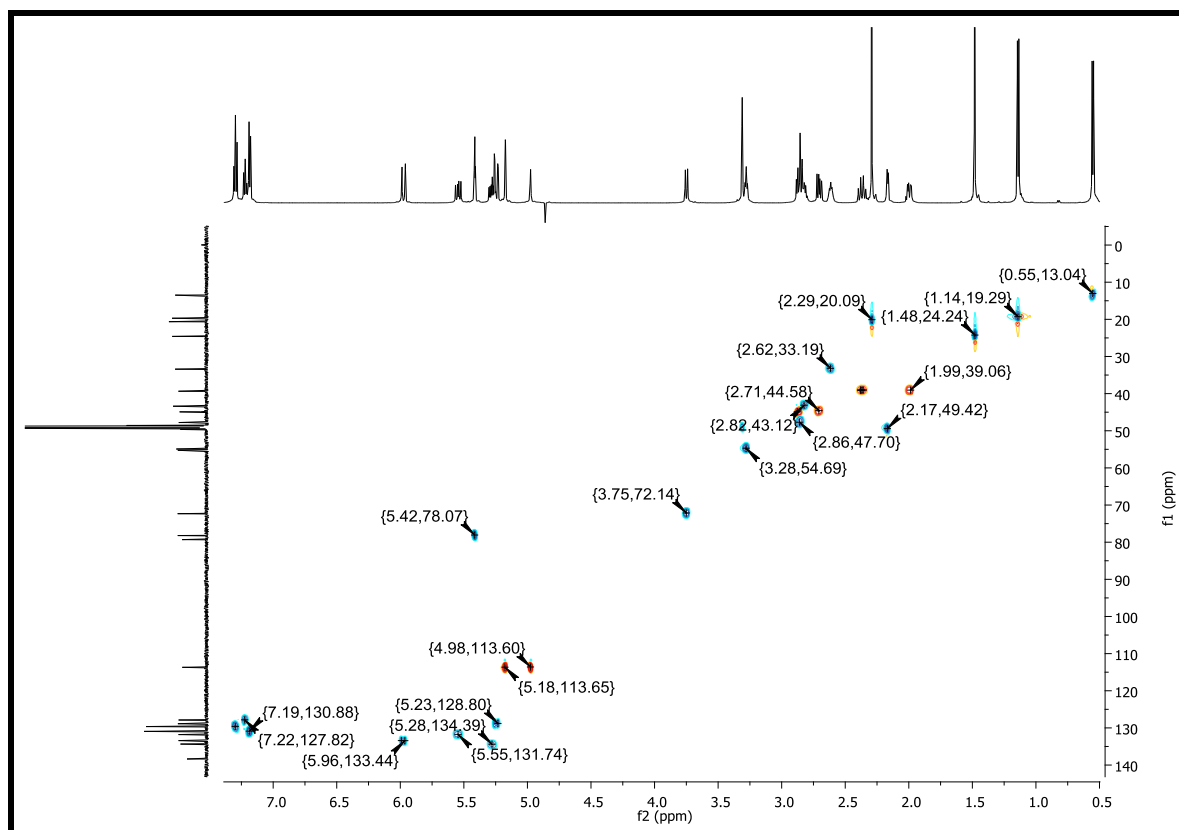
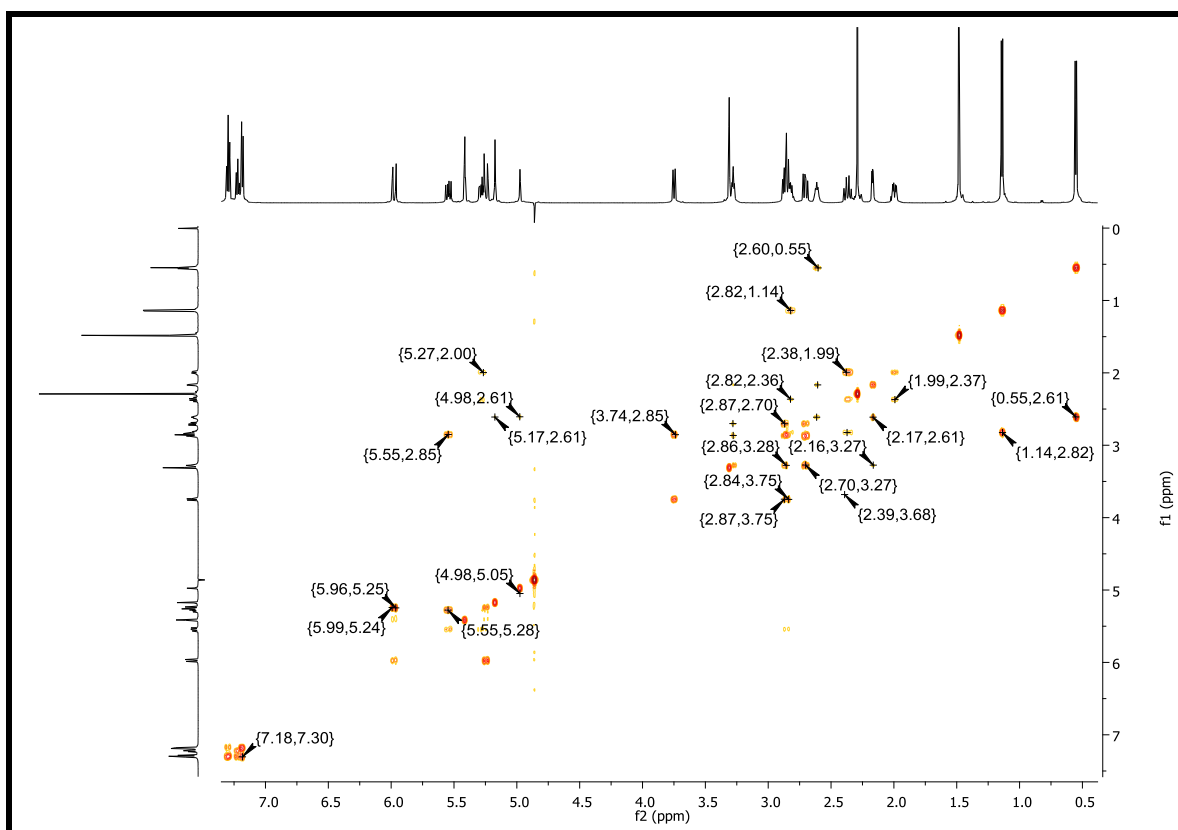
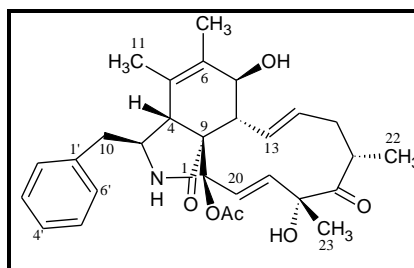


Figura 86. Mapa de contorno de COSY da substância **7** (CH₃OH-d₄, 300 MHz).



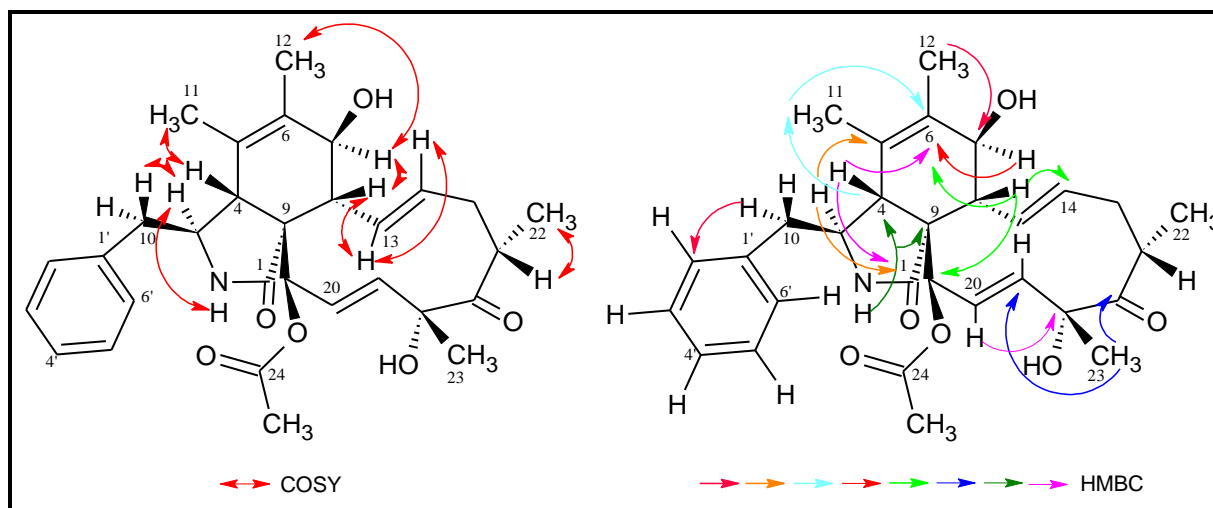
5.3.7 Identificação estrutural da substância **8****Figura 87.** Estrutura da substância **8** (citocalasina C).

Fonte: Autor

O espectro de RMN de ^1H (Figura 89) apresentou um perfil semelhante ao da citocalasina D (substância **7**), sendo que as únicas diferenças observadas foram o desaparecimento da ligação dupla exocíclica e do metileno na posição 12 o aparecimento de duas metilas sobre carbono sp^2 em δ_{H} 1,49 (*s*) e δ_{H} 0,91 (*s*) e dois carbonos olefínicos quaternários (δ_{C} 125,5, δ_{C} 133,2), sugerindo a isomerização da ligação dupla de $\Delta^{6,12}$ para $\Delta^{5,6}$. A análise do espectro de HMBC (Figura 92) mostrou as correlações à longa distância de H-11 e H-12/ $\text{C}4 \leftrightarrow \text{C}6 \leftrightarrow \text{C}7$, podendo fixar a posição da ligação dupla em 5,6.

A análise dos dados obtidos ESI-EM (Figura 94), modo positivo, evidenciou a molécula protonada m/z 508,2682 $[\text{M}+\text{H}]^+$, o que associado aos dados de RMN permitiu propor a fórmula molecular de $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{O}_6\text{N}$.

Estes dados aliados às informações obtidas pelo espectro de RMN de ^1H e à literatura (ESPADA et al., 1997; CAFEU, 2007) permitiu identificar a substância **8** como citocalasina C.

Figura 88. Principais correlações de COSY e HMBC da substância **8**.

Fonte: Autor

Tabela 20. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) de **8** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δH	δC	HMBC	COSY
1	-	174,1	-	-
2	8,16 (<i>sl</i>)	-	C3; C4; C9	H3
3	3,16 (<i>m</i>)	59,7	C1; C5	H2; H10
4	2,27 (<i>m</i>)	48,4	C1; C6; C7; C9; C21	H11
5	-	125,5	-	-
6	-	133,2	-	-
7	3,54 (<i>d</i> ; 7,1 Hz)	67,9	C6; C8	H8; H12
8	2,30 (<i>m</i>)	49,0	C6; C9; C14; C21	H13
9	-	52,5	-	-
10α	2,74 (<i>m</i>)	43,6	C1'; C2'e 6'; C3; C4	H9
10β	2,94 (<i>m</i>)			
11	1,49 (<i>s</i>)	14,4	C4; C5; C6; C7	H4
12	0,91 (<i>s</i>)	16,5	C4; C6; C7; C11	H7
13	5,56 (<i>dd</i> ; 15,4; 10,1 Hz)	131,1	C7; C8; C15	H8; H14
14	5,06 (<i>m</i>)	131,6	C8; C15	H13; H15
15α	1,90 (<i>dd</i> ; 12,4; 4,5 Hz)	38,0	C17; C14; C22; C16	H14
15β	2,19 (<i>m</i>)			
16	2,75 (<i>m</i>)	41,5	C17; C22	H22; H15 β
17	-	209,9	-	-
18	-	77,6	-	-
19	5,16 (<i>dd</i> ; 15,8; 1,9 Hz)	127,8	C21; C23	H19
20	5,80 (<i>dd</i> ; 15,8; 1,9 Hz)	131,8	C18; C21	H20
21	5,67 (<i>sl</i>)	74,9	C4; C9; C24; C20; C19	H19
22	1,04 (<i>d</i> ; 6,7 Hz)	19,4	C15; C16; C17	H16
23	1,38 (<i>s</i>)	24,6	C17; C19	*
24	-	170,5	-	-
25	2,29 (<i>s</i>)	20,7	C21; C24	-
1'	-	137,8	-	-
2' e 6'	7,19 (<i>d</i> ; 7,3 Hz)	129,4	C10; C4'	H3'/H5'
3' e 5'	7,32 (<i>t</i> ; 7,5 Hz)	128,6	C1'	H2'/H6'
4'	7,23 (<i>t</i> ; 7,3 Hz)	126,7	C2'/C6'	*

*Sinal não observado

As citocalasinas exibem um amplo espectro de atividades, incluindo atividade antibiótica, antitumoral, inibidor de proteases de HIV, atividade fitotóxica, entre outras (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013).

Figura 89. Espectro de RMN de ^1H da substância **8** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

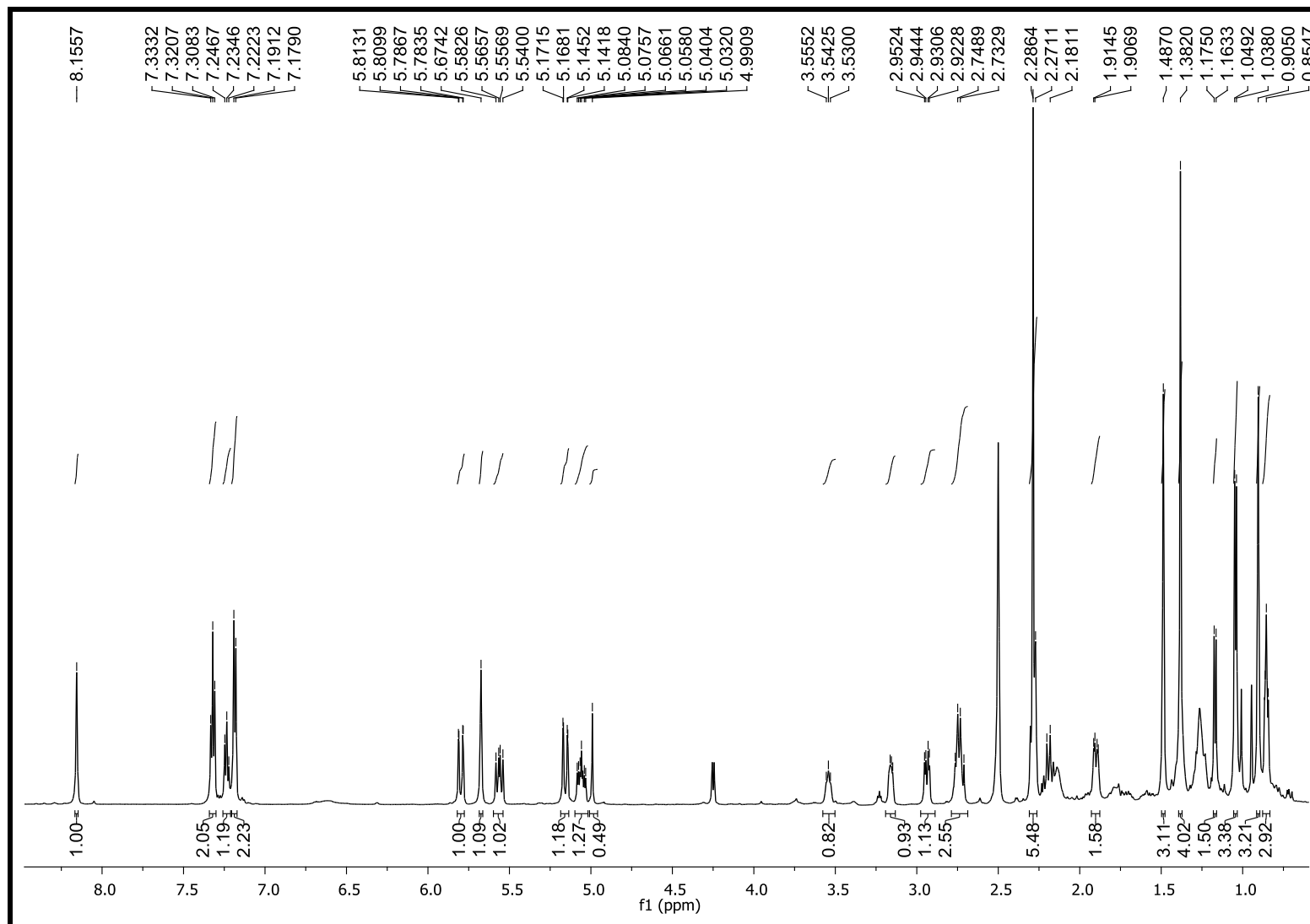


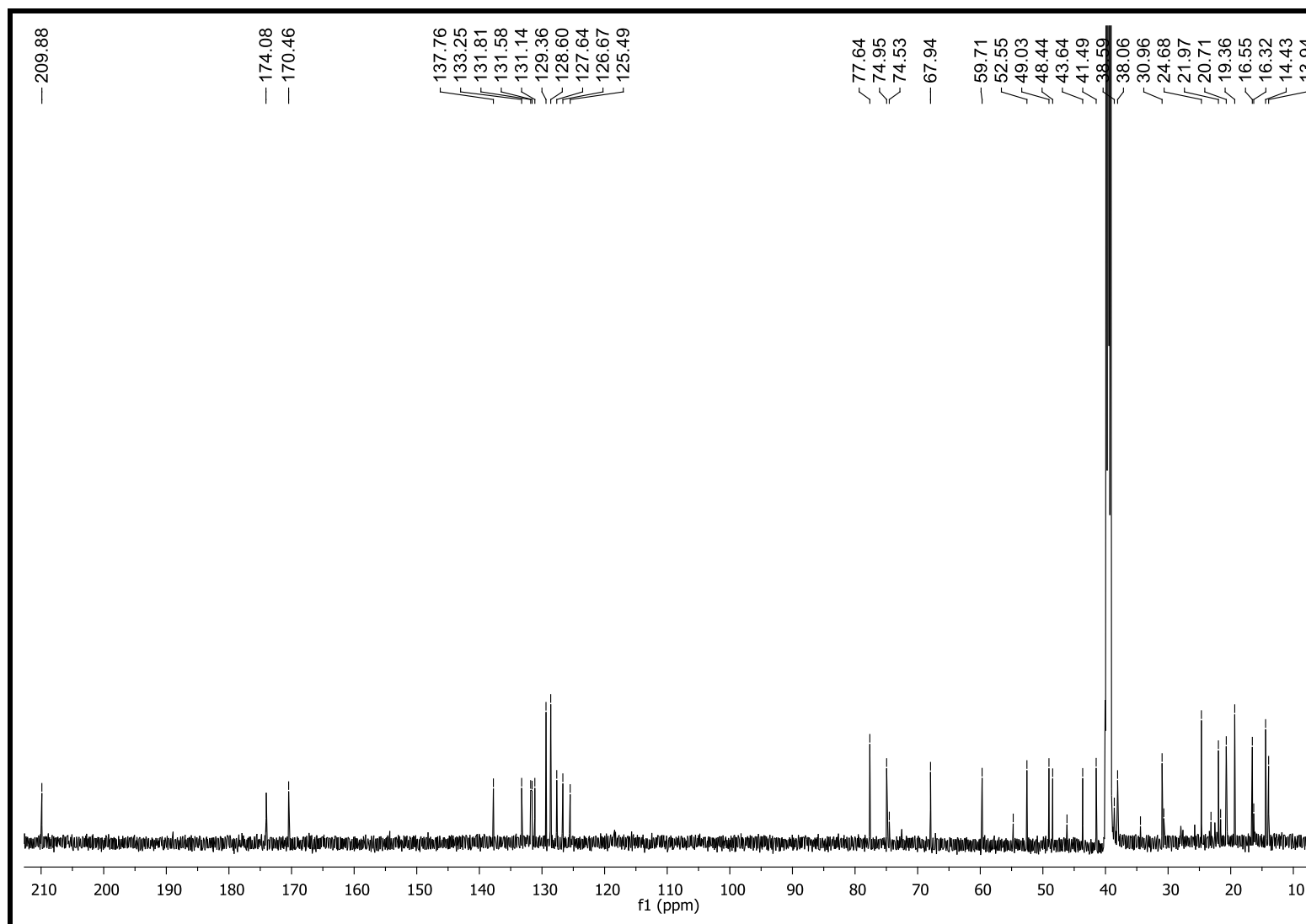
Figura 90. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **8** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

Figura 91. Mapa de contorno de HSQC da substância **8** (DMSO-d₆, 600 MHz).

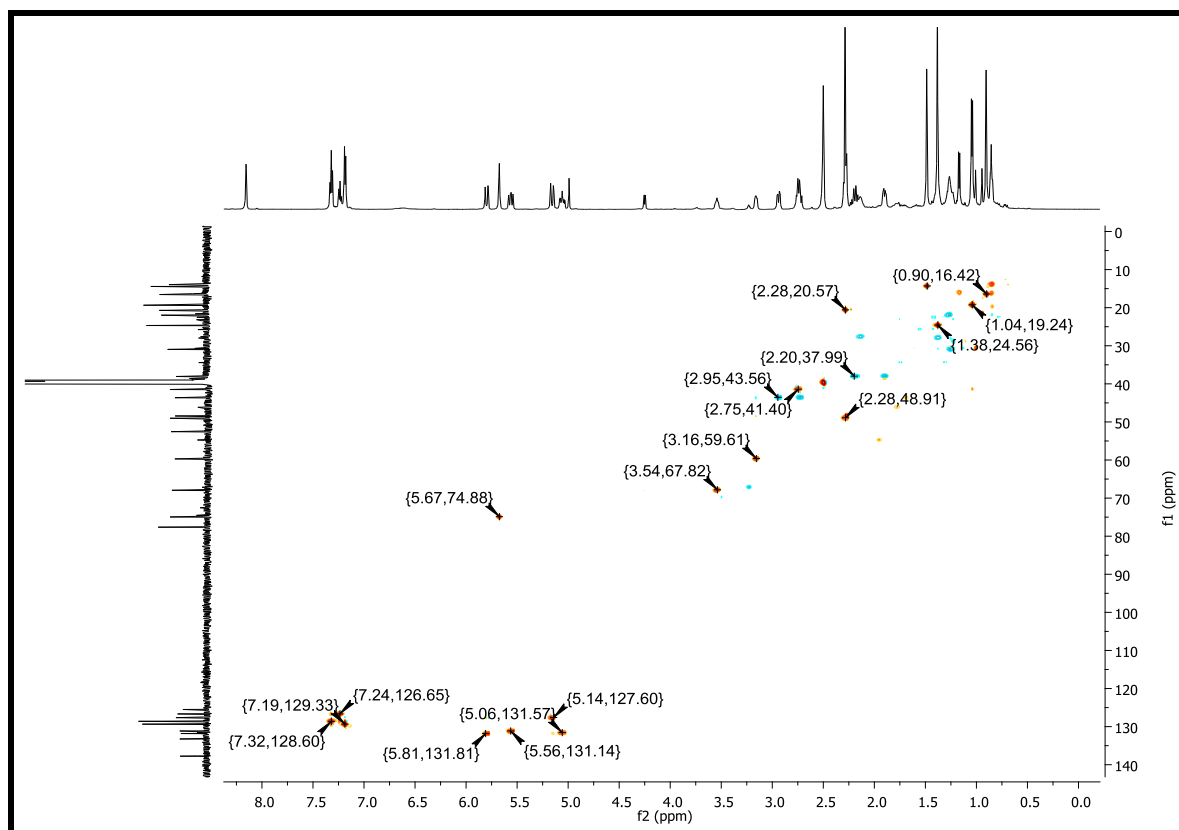


Figura 92. Mapa de contorno de HMBC da substância **8** (DMSO-d₆, 600 MHz).

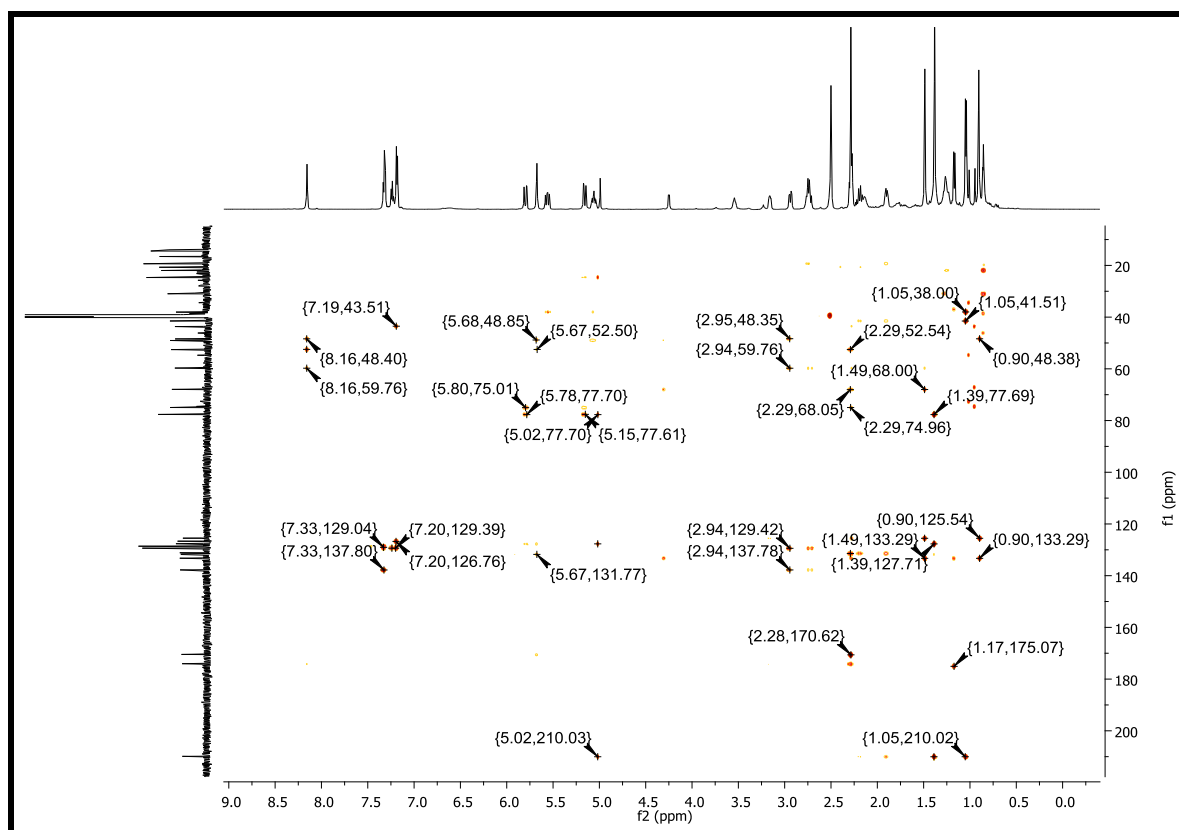
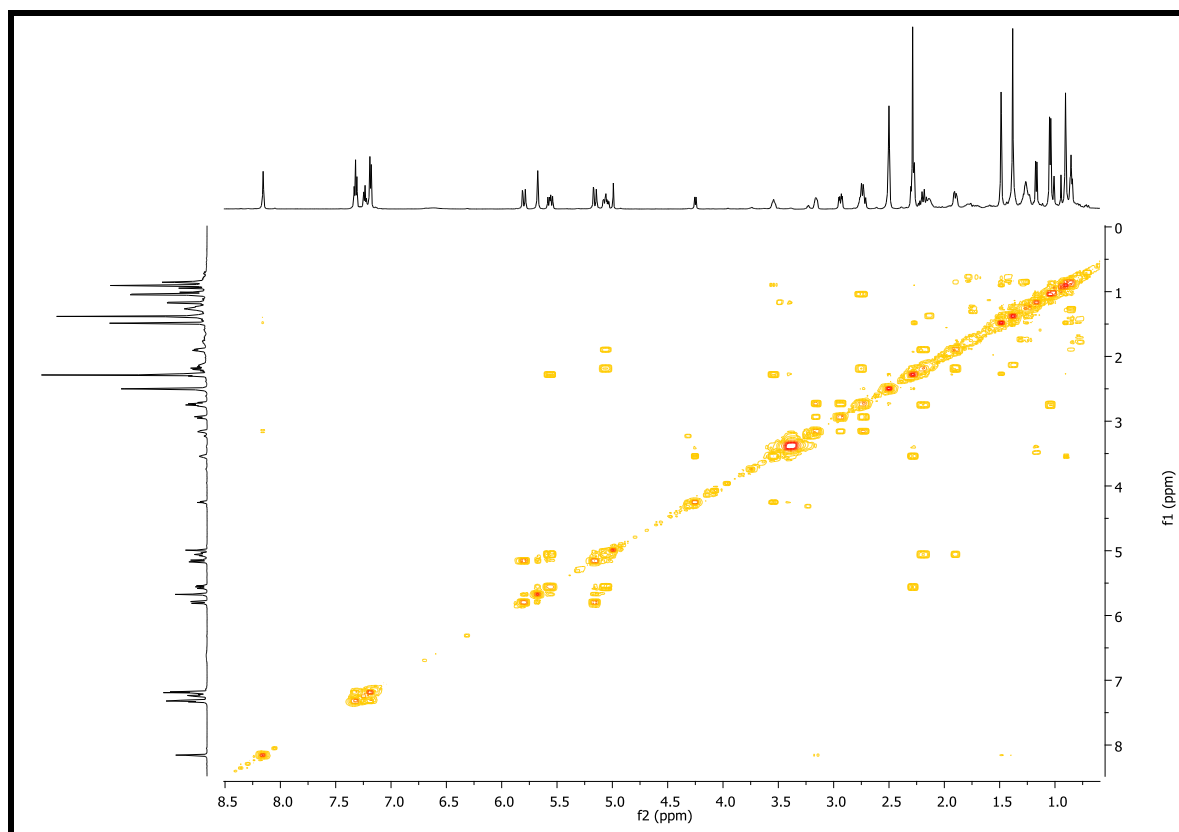
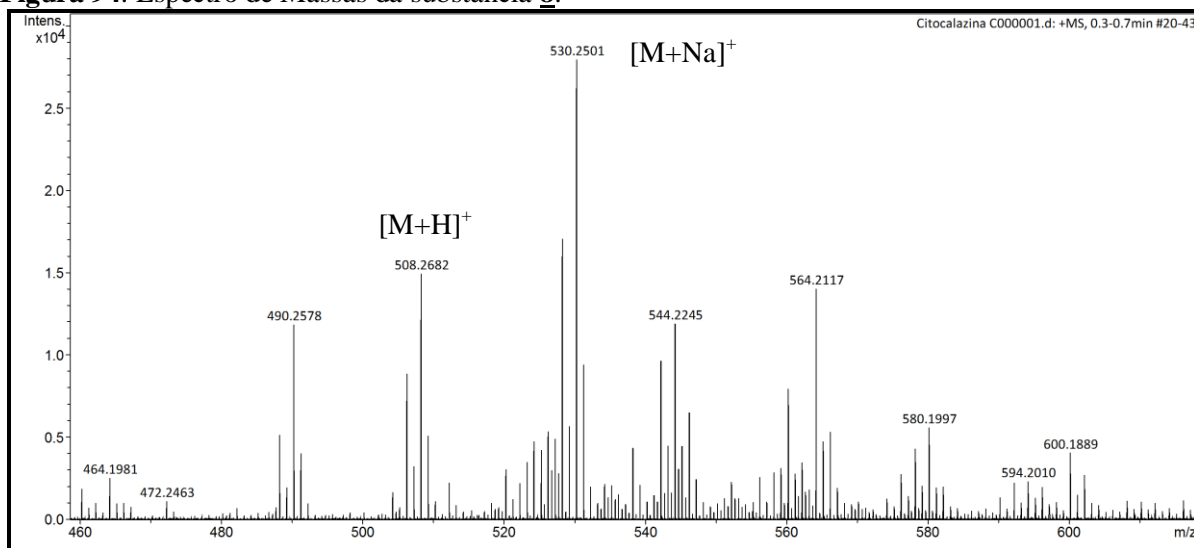
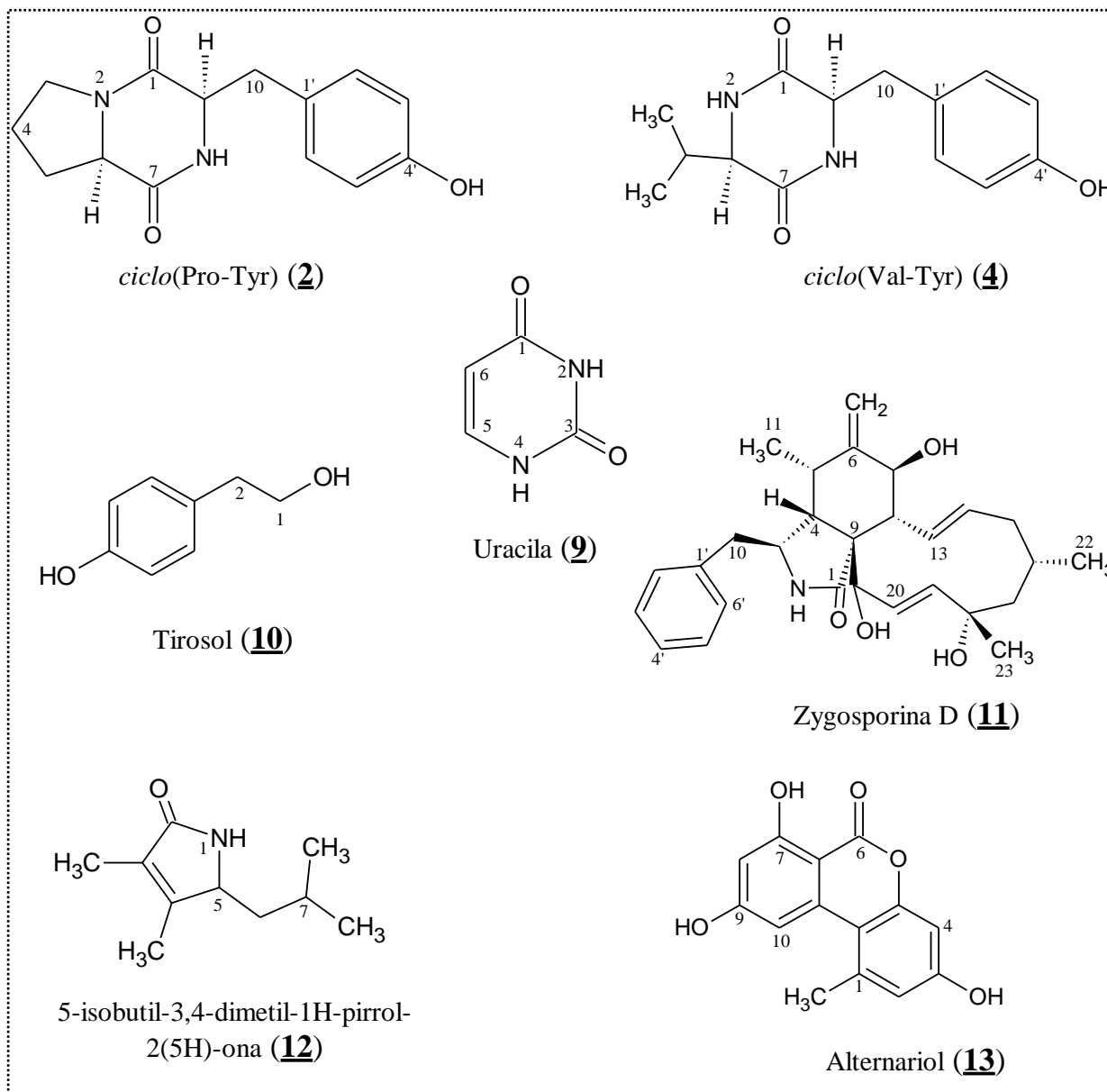


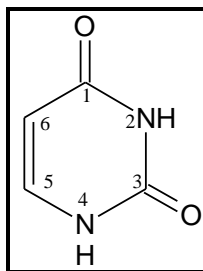
Figura 93. Mapa de contorno de COSY da substância **8** (DMSO-d₆, 600 MHz).**Figura 94.** Espectro de Massas da substância **8**.

5.4 Identificação estrutural das substâncias produzidas por *Diaporthe* sp.Figura 95. Substâncias produzidas pelo fungo endofítico *Diaporthe* sp. cultivado em PDB.

Fonte: Autor

5.4.1 Identificação estrutural da substância **9**

Figura 96. Estrutura da substância **9** (Uracila).



Fonte: Autor

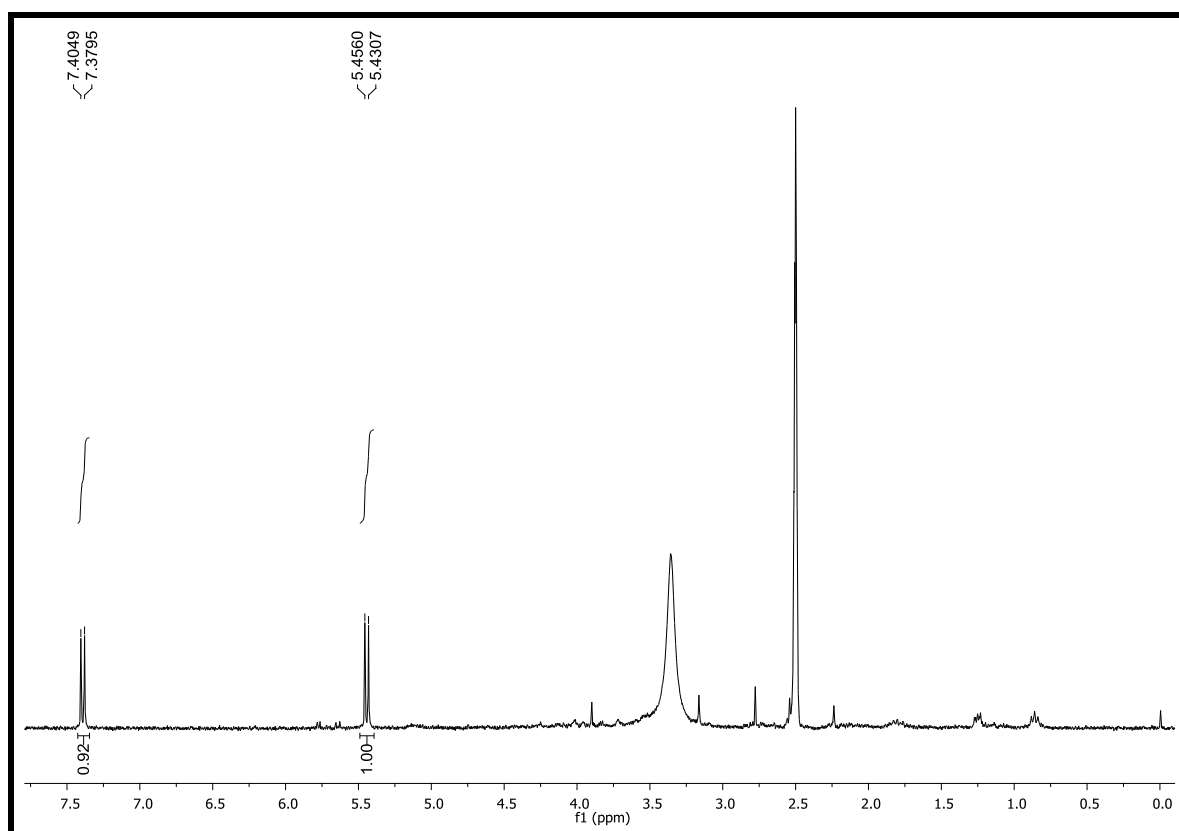
A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 97) evidenciou detectar a presença de hidrogênios em δ_{H} 5,43 (*d*, $J=7,6$ Hz, 1H) e 7,38 (*d*, $J=7,6$ Hz, 1H), sendo estes atribuídos a uma posição α e β de uma carbonila. As constantes de acoplamento evidenciam uma ligação dupla de configuração *cis*.

A comparação desses valores com os descritos na literatura (SCHINDLER; 1988), permitiram identificar a substância **9** como a uracila (Figura 96).

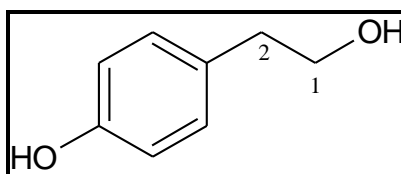
Tabela 21. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) de **9** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_{H}
1	-
2	-
3	-
4	-
5	7,38 (<i>d</i> ; 7,6 Hz)
6	5,43 (<i>d</i> ; 7,6 Hz)

A uracila e seus derivados, componentes do material genético, desempenham um papel fundamental em processos biológicos. A importância da uracila tem sido reportada por inúmeras publicações com interesse na bioquímica e na farmacologia da uracila 5-substituída. Como exemplo, 5-fluoruracila é utilizado no tratamento de tumores de cabeça, pescoço e mama e exibe também atividade antibacteriana (PALAFOX et al., 2010).

Figura 97. Espectro de RMN de ^1H da substância **9** (DMSO- d_6 , 300 MHz).

5.4.2 Identificação estrutural da substância **10**

Figura 98. Estrutura da substância **10** (Tirosol).

Fonte: Autor

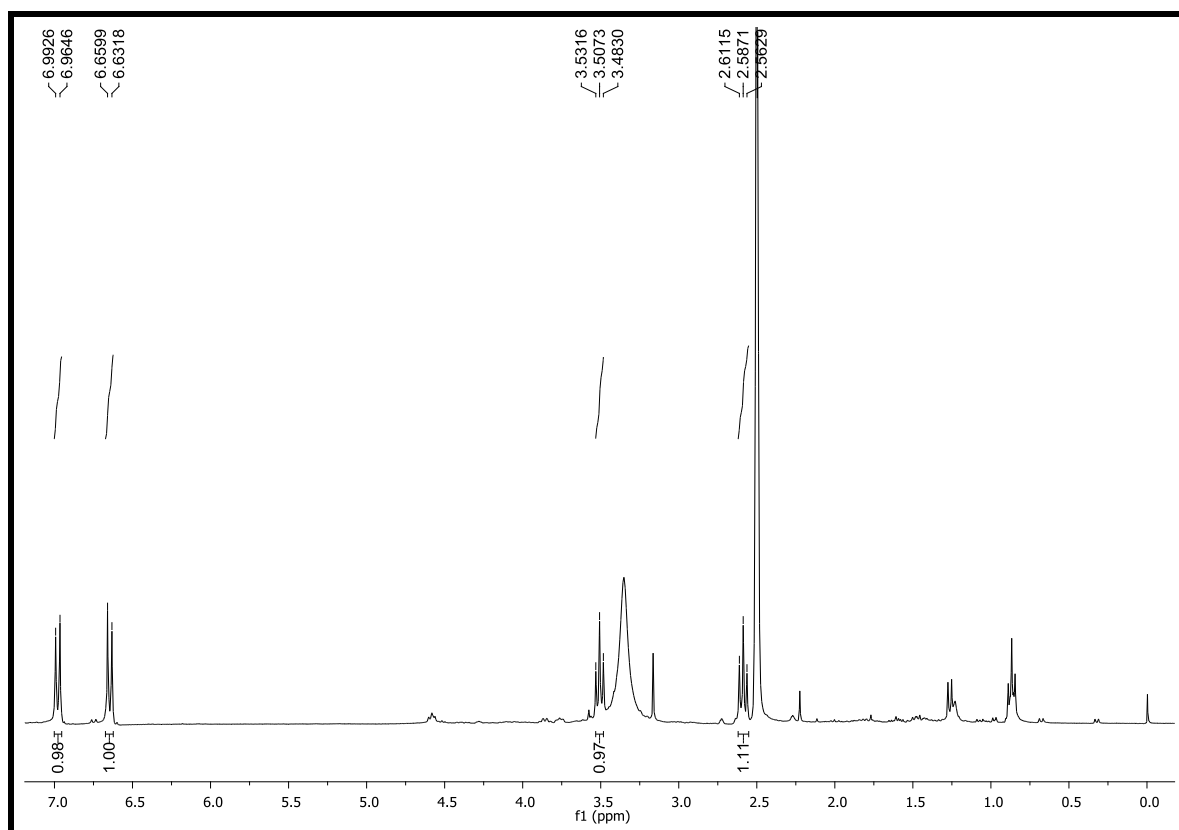
A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 99), evidenciou a presença de hidrogênios em δ_{H} 6,98 (*d*, $J= 8,4$ Hz, 2H) e 6,65 (*d*, $J= 8,4$ Hz, 2H), indicando um sistema típico de anel aromático *para*-disubstituído, e dois tripletos em δ_{H} 2,59 ($J= 7,3$ Hz, 2H) e δ_{H} 3,51 ($J= 7,3$ Hz, 2H) evidenciando metilenos benzílicos e carbinólicos, respectivamente. As constantes de acoplamento destes dois tripletos de 7,3 Hz indicam que há acoplamento entre eles.

A comparação desses valores com os descritos na literatura (CHEN, H. et al., 2004; CAFEU, 2007), permitiram identificar a substância **10** como o tirosol (Figura 98).

Tabela 22. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) de **10** (δ em ppm e J em Hz).

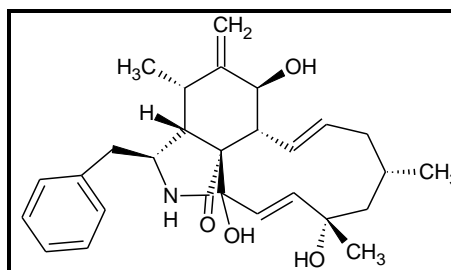
Posição	δH
1	3,51 (t ; 7,3 Hz)
2	2,59 (t ; 7,3 Hz)
3	-
4 e 8	6,98 (d ; 8,4 Hz)
5 e 7	6,65 (d ; 8,4 Hz)
6	-

O tirosol já foi relatado como metabólito secundário produzido pelos fungos endofíticos *Phomopsis oblonga* e *Ceratocystis fimbriata*. Esta substância é relatada na literatura como molécula sinalizadora com importantes implicações na dinâmica do crescimento e morfogênese de *Candida albicans*, além de ser um agente antifúngico em potencial (GUIMARÃES, 2006).

Figura 99. Espectro de RMN de ^1H da substância **10** (DMSO- d_6 , 300 MHz).

5.4.3 Identificação estrutural da substância **11**

Figura 100. Estrutura da substância **11** (Zygosporina D).



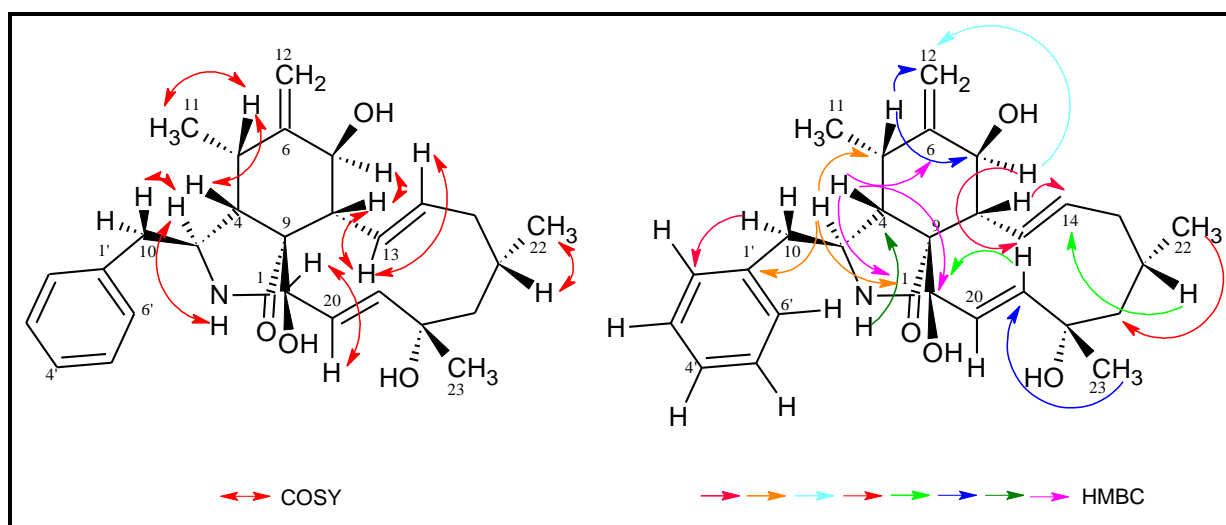
Fonte: Autor

O espectro de RMN de ¹H da substância **11** (Figura 102) apresentou perfil espectrocópico muito semelhante ao da citocalasina D (substância **7**), sendo que a única diferença observada foi a ausência da função acetato em C-21 e da carbonila de cetona em C-17. O valor do deslocamento químico de H-21 que passou de δ_H 5,41 (δ_C 78,2) da substância **7** para δ_H 4,10 (δ_C 76,5) evidenciam proteção de C-21 e corroboram para a desacetilação na substância **11**. A atribuição de todos os hidrogênios aos respectivos átomos de carbono foi realizada após avaliação das correlações observadas pelo HSQC (Tabela 23).

A análise dos dados obtidos ESI-EM (Figura 106), modo positivo, evidenciou a molécula protonada *m/z* 452,2797 [M+H]⁺, o que associado aos dados de RMN permitiu propor a fórmula molecular de C₂₈H₃₇O₄N.

Estes dados aliados às informações obtidas pelos espectros de RMN 1D e 2D e à literatura (ESPADA et al., 1997; CAFEU, 2007) permitiram identificar a substância **11** como zygosporina D.

Figura 101. Principais correlações de COSY e HMBC da substância **11**.



Fonte: Autor

Tabela 23. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de **11** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δH	δC	HMBC	COSY
1	-	175,8	-	-
2	5,60 (<i>sl</i>)	-	C1; C4	H3
3	3,28 (<i>m</i>)	53,7	C1; C5; C1'	H4
4	2,60 (<i>m</i>)	50,2	C1; C3; C5; C6; C8; C21	H3; H5
5	2,90 (<i>m</i>)	32,9	C6; C7; C9; C11; C12	H4; H11
6	-	148,5	-	-
7	3,81 (<i>d</i> ; 10,8 Hz)	69,8	C12; C13	H8
8	2,91 (<i>m</i>)	45,5	C6; C14	H7
9	-	52,9	-	-
10α	2,89 (<i>m</i>)	45,5	C2'e 6'; C4	H3
10β	2,59 (<i>m</i>)			
11	1,10 (<i>d</i> ; 6,7 Hz)	13,9	C4; C5; C6	H5
12α	5,11 (<i>sl</i>)	113,8	C5; C6; C7	*
12β	5,33 (<i>sl</i>)			
13	5,74 (<i>m</i>)	127,8	C8; C15	H8; H14
14	5,33 (<i>m</i>)	137,8	C15; C16	H13; H15
15α	1,79 (<i>d</i> ; 11,5 Hz)	42,5	C13; C17; C22	H14
15β	2,00 (<i>dd</i> ; 4,7; 11,5 Hz)			
16	1,78 (<i>m</i>)	28,3	C14	H22
17α	1,56 (<i>dd</i> ; 14,3; 2,8 Hz)	53,7	C18; C22	*
17β	2,00 (<i>dd</i> ; 11,7; 4,7 Hz)			
18	-	74,5	-	-
19	5,77 (<i>d</i>)	137,1	C21	H20; H21
20	6,02 (<i>dd</i> ; 16,7; 2,1 Hz)	131,1	C18; C21	H19; H21
21	4,10 (<i>sl</i>)	76,5	C4; C8; C19	H19; H20
22	1,03 (<i>d</i> ; 6,7 Hz)	26,3	C15; C17	H16
23	1,37 (<i>s</i>)	31,0	C17; C19	*
1'	-	137,0	-	-
2' e 6'	7,15 (<i>d</i> ; 7,4 Hz)	129,1	C10; C4'	H3'/H5'
3' e 5'	7,31 (<i>t</i> ; 7,4 Hz)	129,0	C1'	*
4'	7,24 (<i>t</i> ; 7,4 Hz)	127,0	C2'/C6'	*

*Sinal não observado

Figura 102. Espectro de RMN de ^1H da substância **11** (CDCl_3 , 600 MHz).

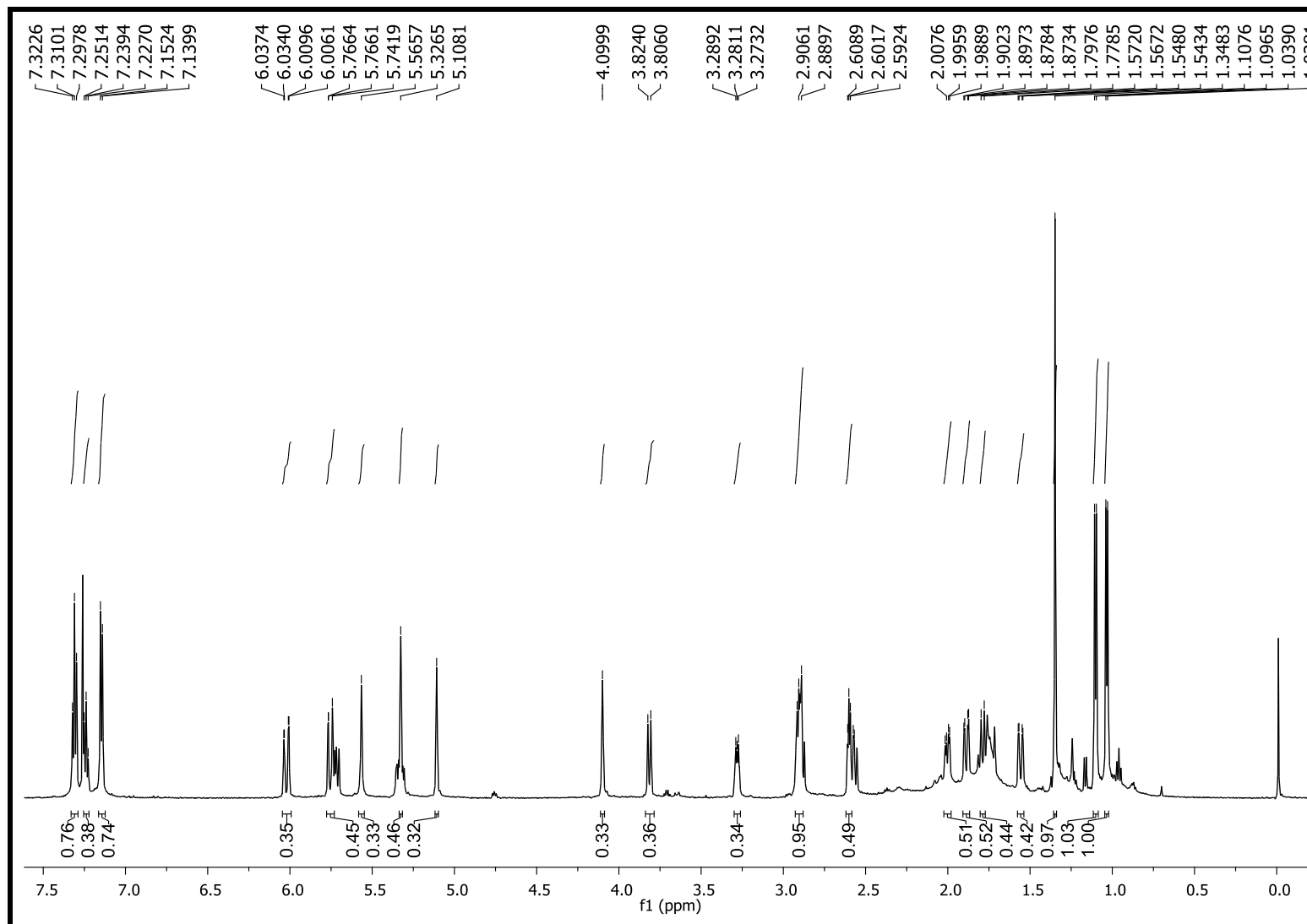


Figura 103. Mapa de contorno de HMBC da substância **11** (CDCl₃, 600 MHz).

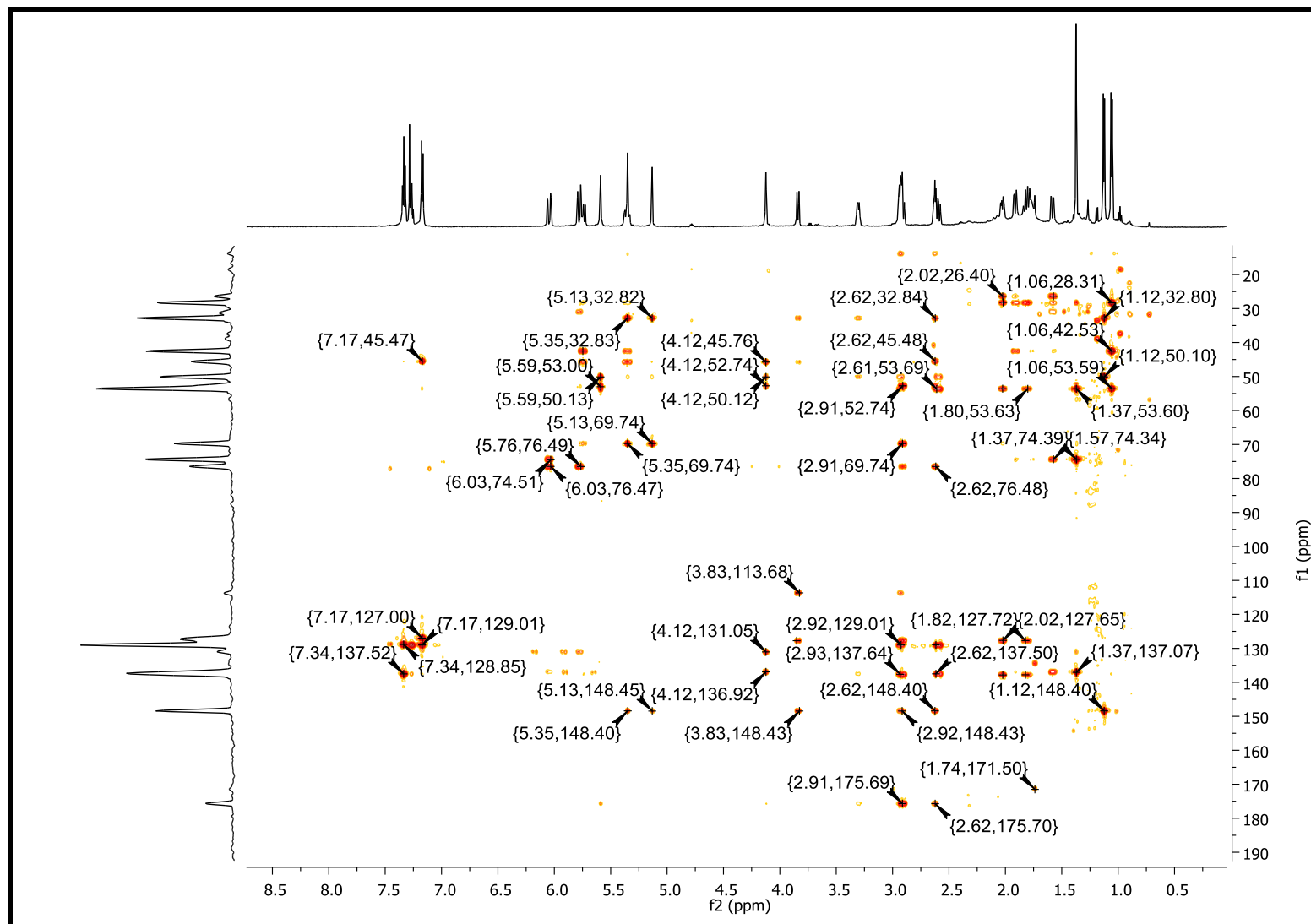


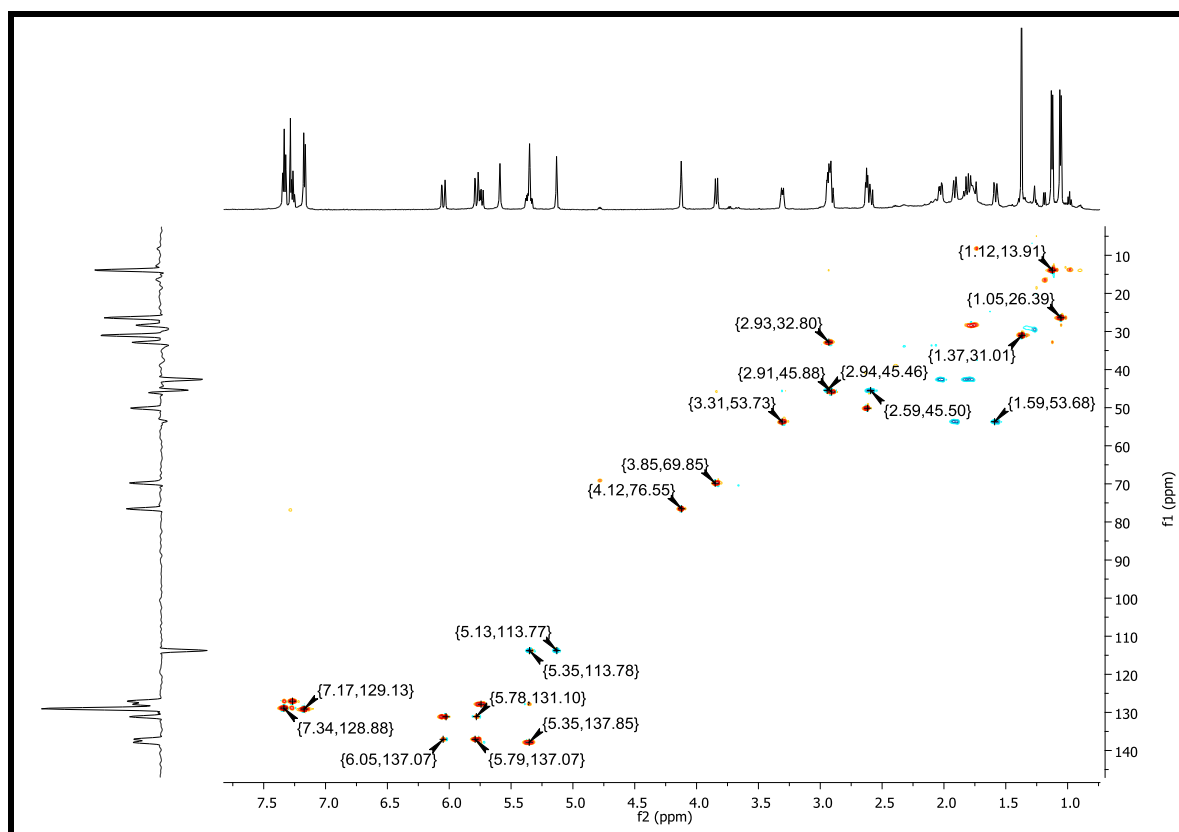
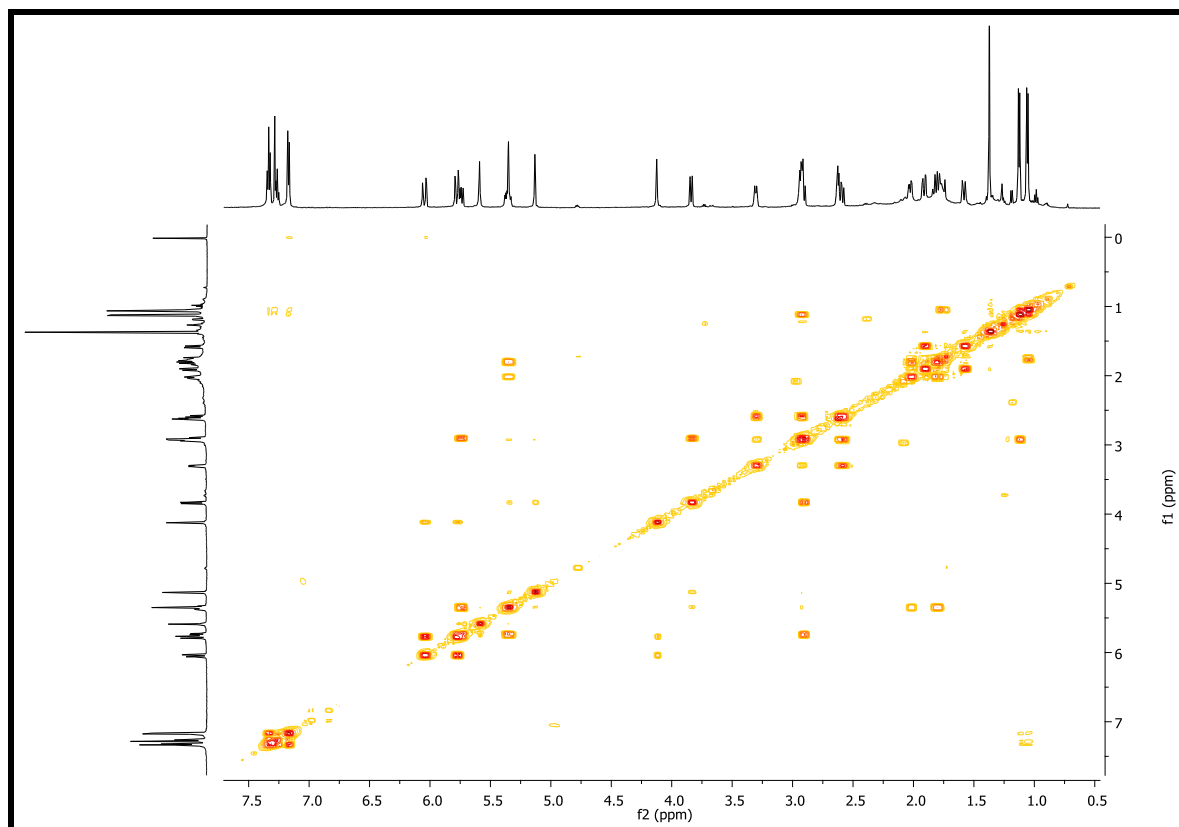
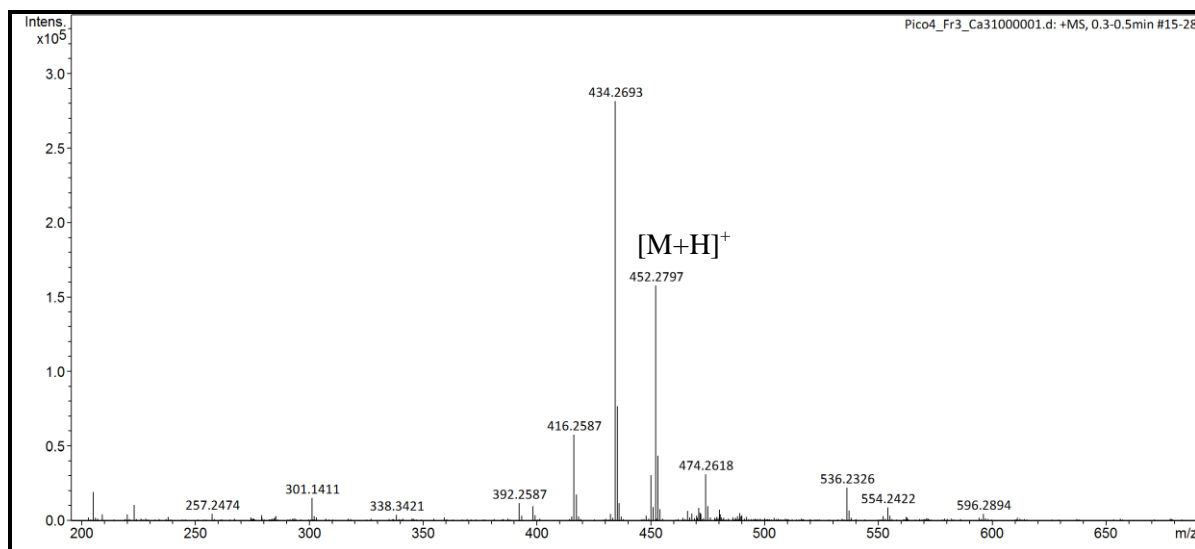
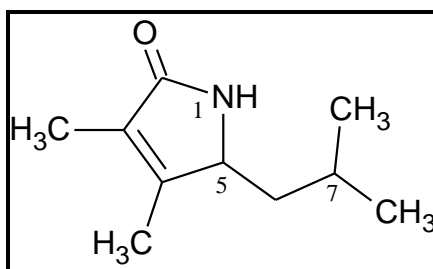
Figura 104. Mapa de contorno de HSQC da substância **11** (CDCl₃, 600 MHz).**Figura 105.** Mapa de contorno de COSY da substância **11** (CDCl₃, 600 MHz).

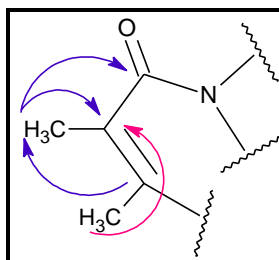
Figura 106. Espectro de Massas da substância **11**.

5.4.4 Identificação estrutural da substância **12**

Figura 107. Estrutura da substância **12** (5-isobutil-3,4-dimetil-1H-pirrol-2(5H)-ona).

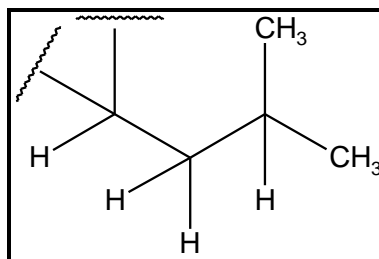
Fonte: Autor

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 112 e 113) indicou a presença de duas metilas sobre carbono sp^2 em δ_{H} 1,84 (s; δ_{C} 11,9, Me-3) e δ_{H} 1,61 (s; δ_{C} 8,2, Me-4), e valores de deslocamento químico observados em δ_{C} 173,6; 126,9 e 152,5 sugerem uma lactama α,β -insaturada. Estas observações associadas às correlações observadas no experimento de HMBC (Figura 115) permitiram propor a estrutura parcial **A** (Figura 108) para a substância em questão.

Figura 108. Estrutura parcial A.

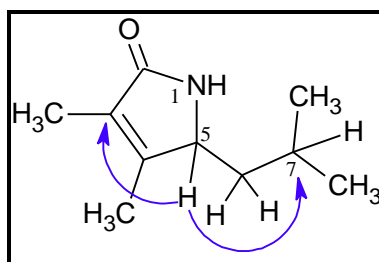
Fonte: Autor

Adicionalmente no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C foram observados duas outras metilas desdobrando como dois dubletos em δ_{H} 0,87 (*d*, $J= 6,6$ Hz, δ_{C} 23,9, Me-7_b) e 0,90 (*d*, $J= 6,6$ Hz, δ_{C} 21,5, Me-7_a), além de sinais em δ_{H} 1,02 (*ddd*, 3,2; 10,1 e 13,4 Hz, δ_{C} 41,8), δ_{H} 1,45 (*ddd*, 3,8; 10,2 e 13,8 Hz, δ_{C} 41,8) atribuídos aos hidrogênios diastereotópicos H-6 α e H-6 β , um multiplete em δ_{H} 1,75 (*m*, δ_{C} 24,8, 1H) e um dubleto em δ_{H} 3,83 (*d*, 9,9 Hz). Estas informações aliadas às correlações entre H-7a e H-7b \leftrightarrow H-7/H-6 α /H-6 β pelo COSY, permitiram propor a estrutura parcial **B** (Figura 109).

Figura 109. Estrutura parcial B.

Fonte: Autor

A conexão entre as estruturas parciais A e B foi realizada pelas correlações observadas em HMBC entre H-5 \leftrightarrow C-3/C-7 (Figura 110).

Figura 110. União das estruturas parciais A e B.

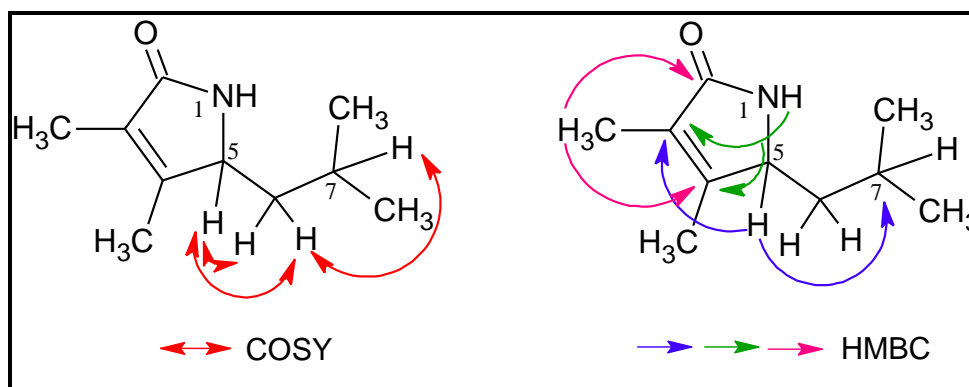
Fonte: Autor

Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos com base na análise do espectro de HSQC (Tabela 24).

As correlações observadas nos experimentos de HMBC e COSY (Figuras 115 e 116; Tabela 24) permitiram propor a estrutura **12** como 5-isobutil-3,4-dimetil-1H-pirrol-2(5H)-ona. Levantamento bibliográfico realizado no SciFinder e Web of Science sugeriram esta substância como inédita, sendo apenas encontrado na literatura relatos da síntese de seus análogos (SHEN et al., 2010).

A análise dos dados obtidos ESI-EM (Figura 117), modo positivo, evidenciou a molécula protonada m/z 168,1385 $[M+H]^+$, o que associado aos dados de RMN permitiu propor a fórmula molecular de $C_{10}H_{17}ON$. Realizou-se a análise de $[\alpha]_D$ e o valor obtido foi $[\alpha]_D +2,50^\circ$ (c 0,10, CH_3OH , $T= 29,0^\circ C$), no entanto a configuração absoluta não foi determinada.

Figura 111. Principais correlações de COSY e HMBC da substância **12**.



Fonte: Autor

Tabela 24. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) de **12** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δH	δC	HMBC	COSY
1	8,17 (<i>s</i>)	-	C5; C3; C4	*
2	-	173,6	-	-
3	-	126,9	-	-
4	-	152,5	-	-
5	3,83 (<i>d</i> ; 9,9 Hz)	57,6	C7; C6; C3; C4	H6; H _{Me-4}
6α	1,02 (<i>ddd</i> ; 3,2; 10,1; 13,4 Hz)	41,8	C5; C7 _a	H5; H6 β ; H7
6β	1,45 (<i>ddd</i> ; 3,8; 10,2; 13,8 Hz)		C7 _a ; C7 _b	H5; H6 α ; H7
7	1,75 (<i>m</i>)	24,8	C _{Me-3}	H6 β ; H _{Me-7b}
Me-3	1,84 (<i>s</i>)	11,9	C4; C _{Me-4} ; C5; C2; C3	-
Me-4	1,61 (<i>s</i>)	8,2	C _{Me-3} ; C5; C6; C2; C3	-
Me-7_a	0,90 (<i>d</i> ; 6,6 Hz)	21,5	C6; C7 _b	H7; H6 α
Me-7_b	0,87 (<i>d</i> ; 6,6 Hz)	23,9	C6; C7 _a	H7

*Sinal não observado

As substâncias pertencentes à classe das γ -lactamas como R-metileno- γ -lactamas são unidades estruturais fundamentais que ocorrem em uma grande variedade de produtos naturais biologicamente ativos. Comparando aos seus isômeros de substituição, R-metileno- γ -lactonas, as γ -lactamas são frequentemente utilizadas como inibidor da DNA polimerase e do receptor nuclear da vitamina D, devido a suas bioatividades semelhantes em propriedades antibacteriana, anti-inflamatória e antianafilática, no entanto, com efeitos colaterais muito menos tóxicos.

Nas últimas décadas os esqueletos R-metileno- γ -lactâmicos, receberam atenção por serem candidatos potenciais a fármacos, assim como pelo seu papel significativo em blocos de construção para a síntese total de uma série de compostos-alvo bioativos (SHEN et al., 2010).

Figura 112. Espectro de RMN de ^1H da substância **12** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

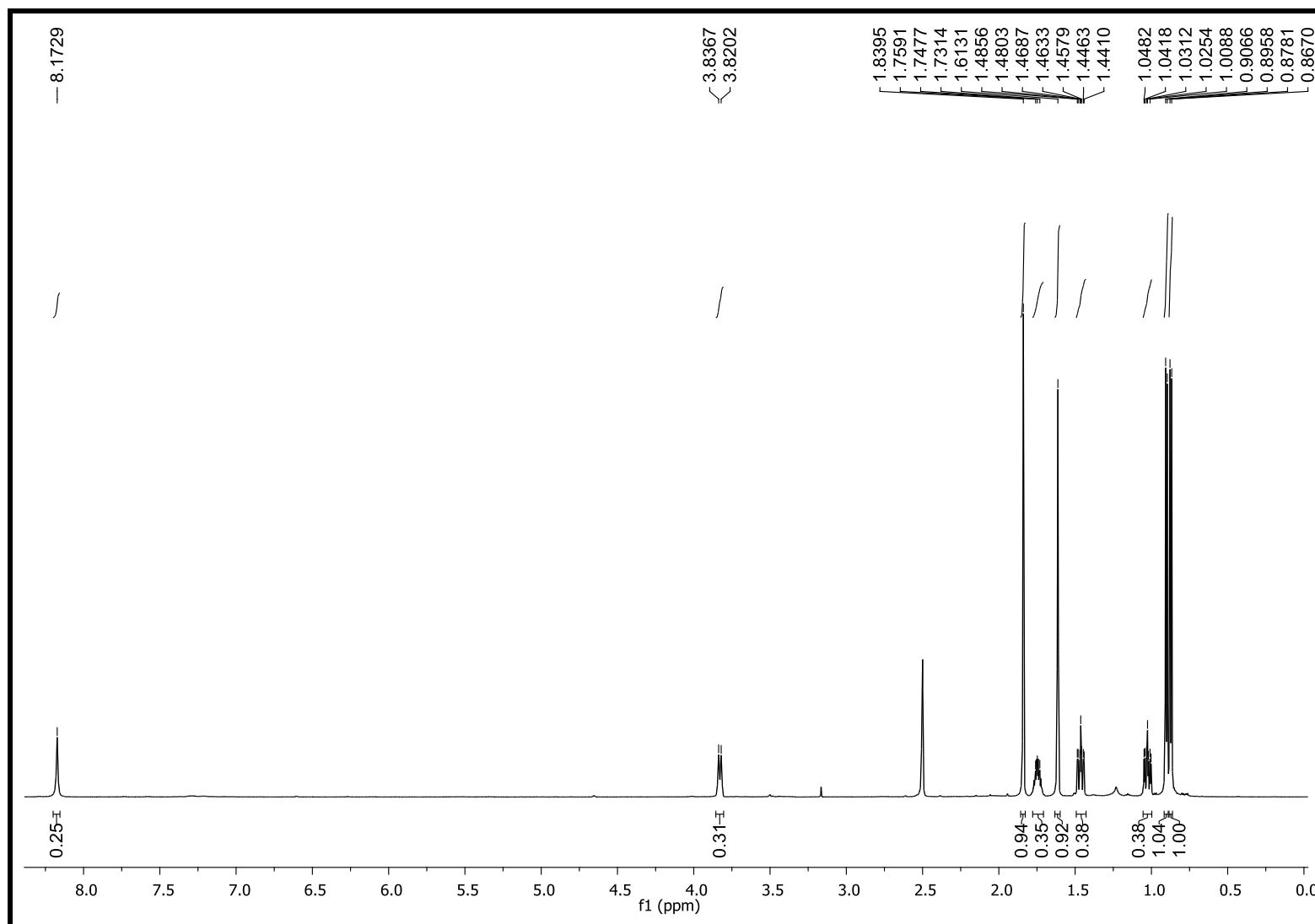


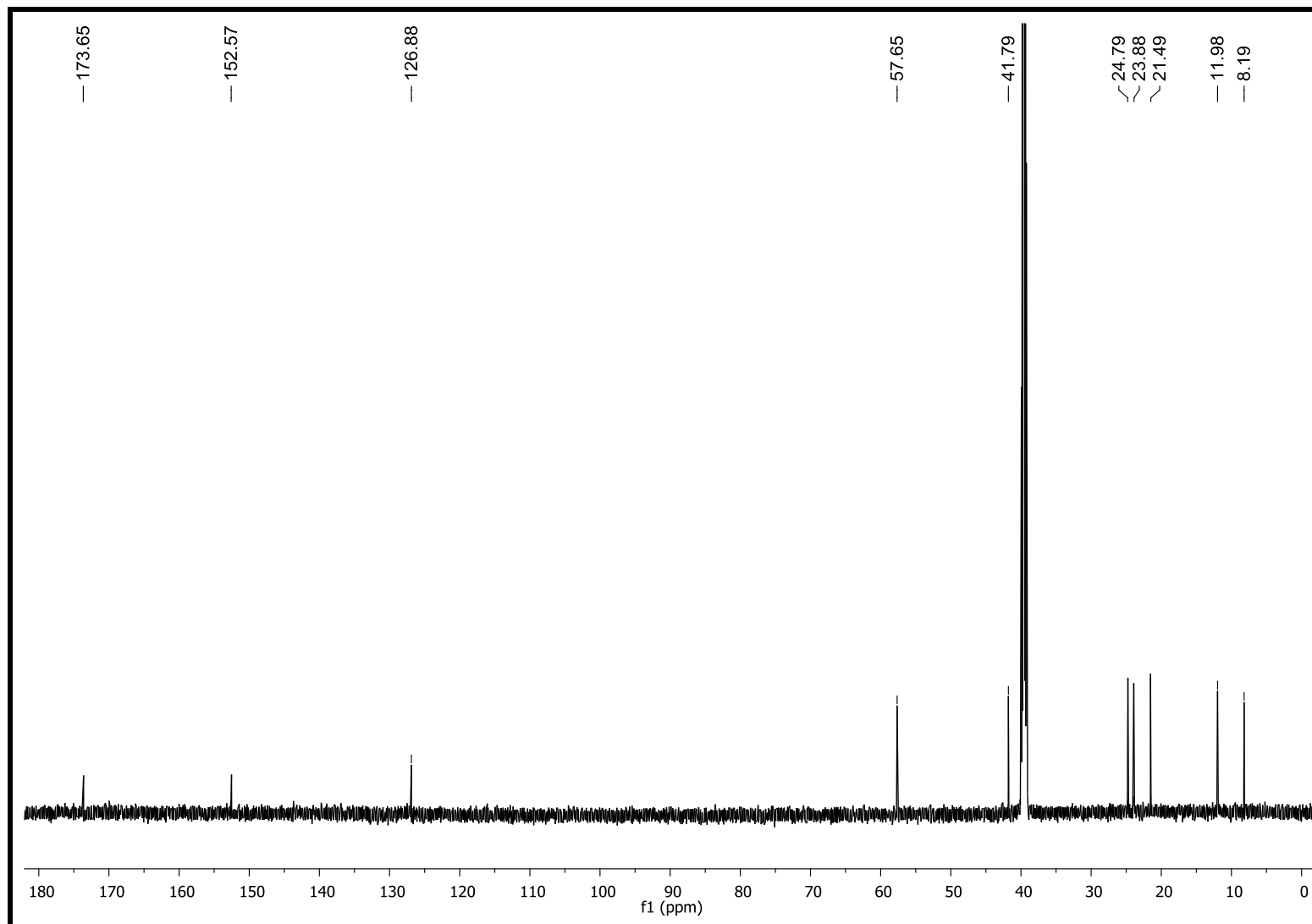
Figura 113. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **12** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

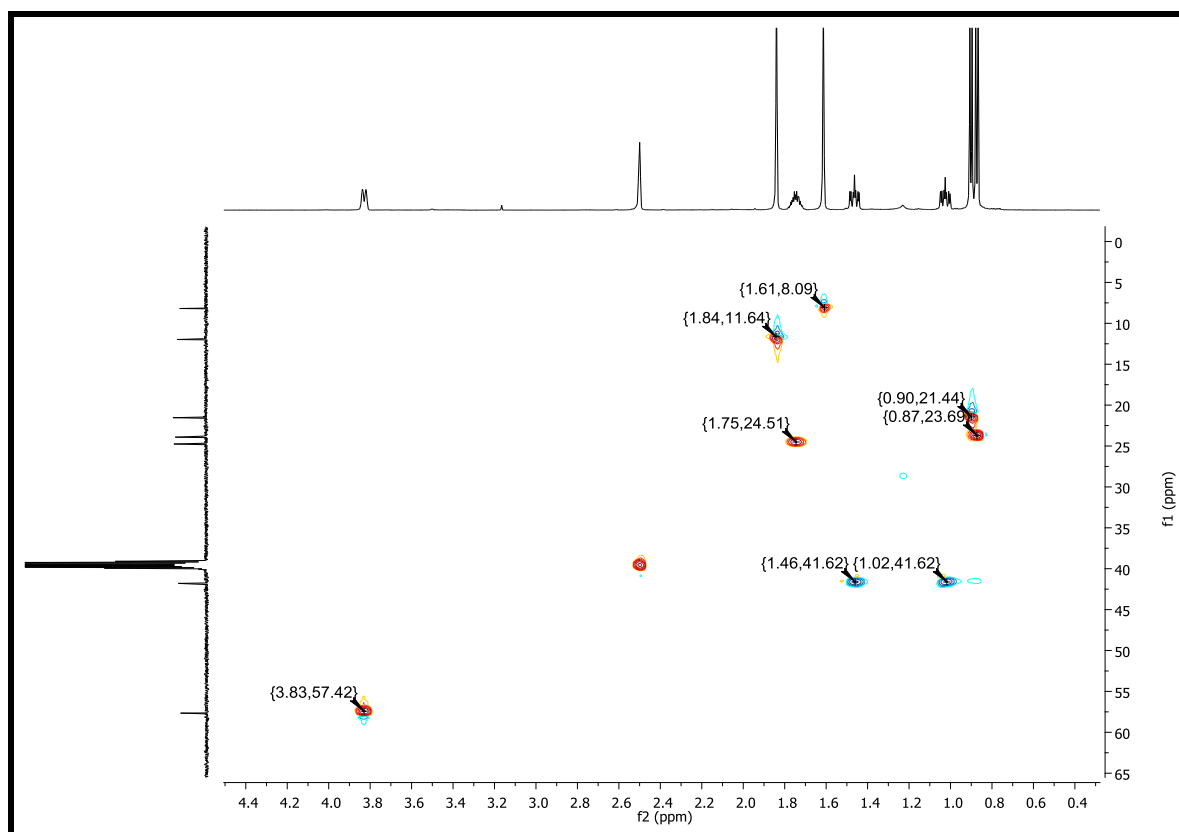
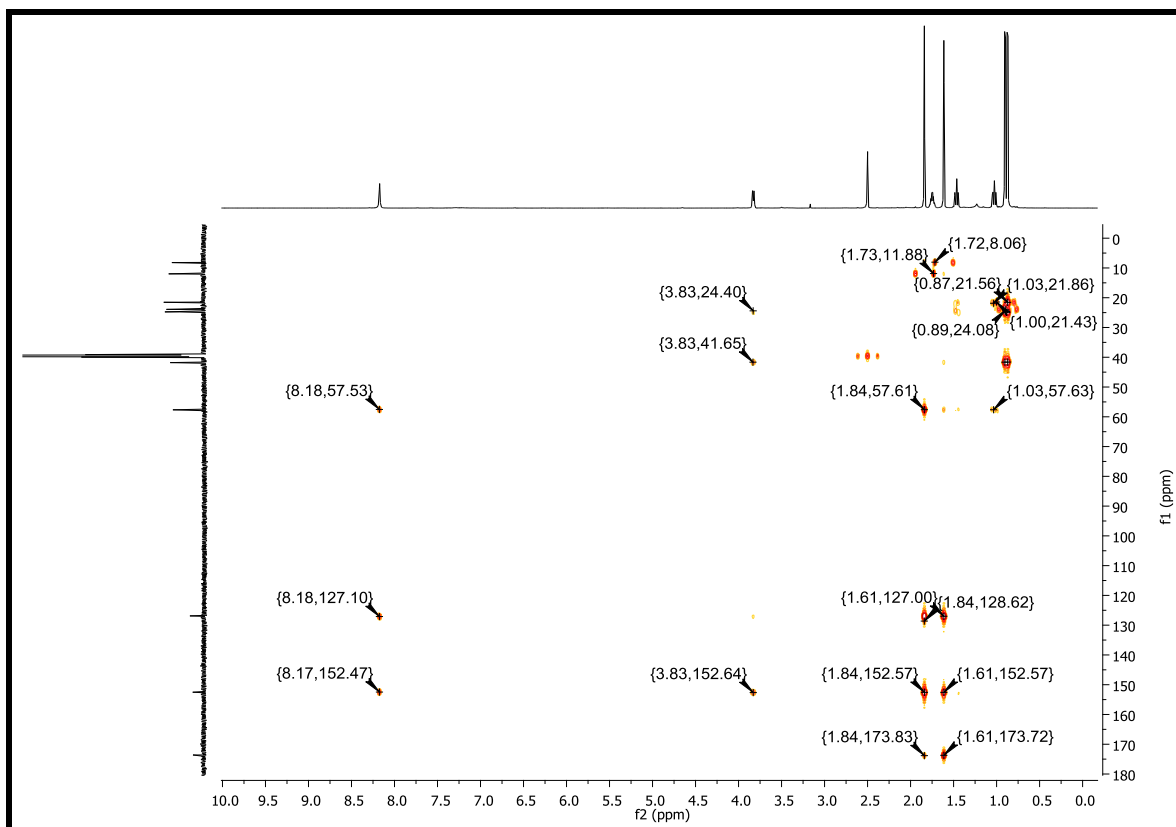
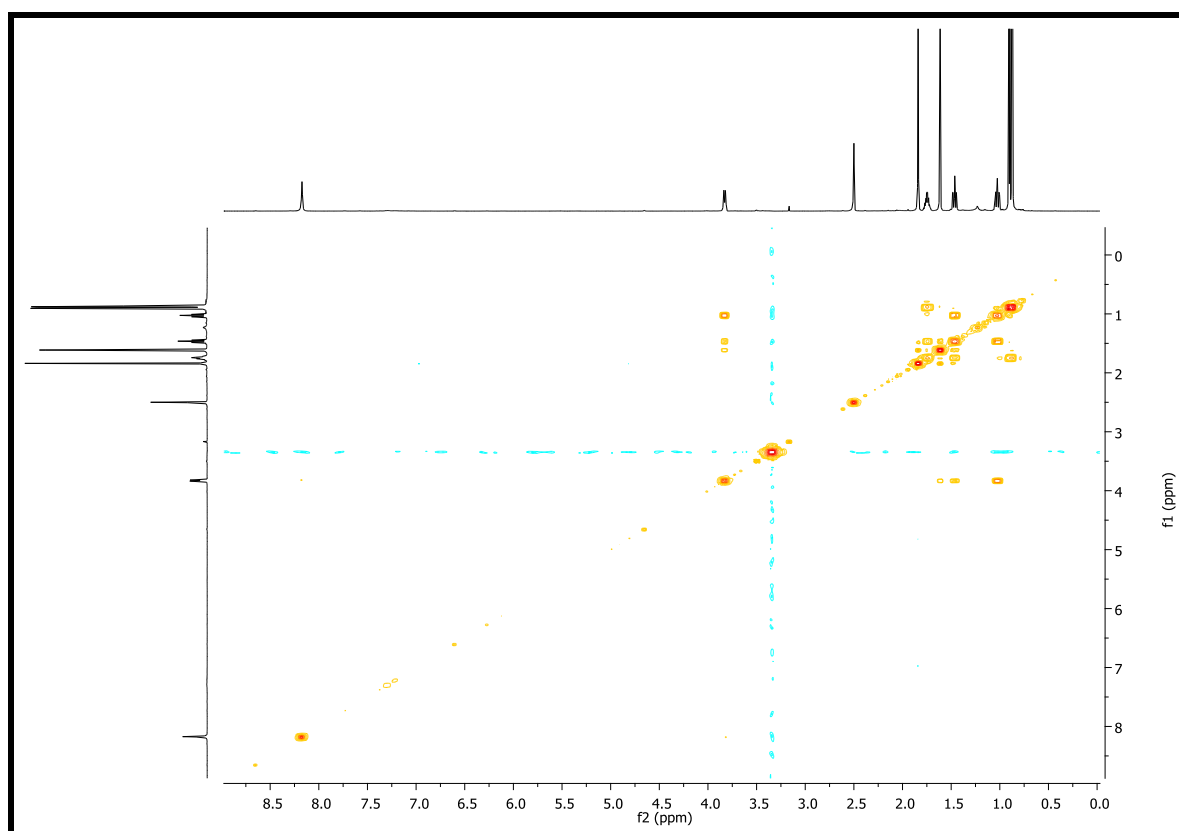
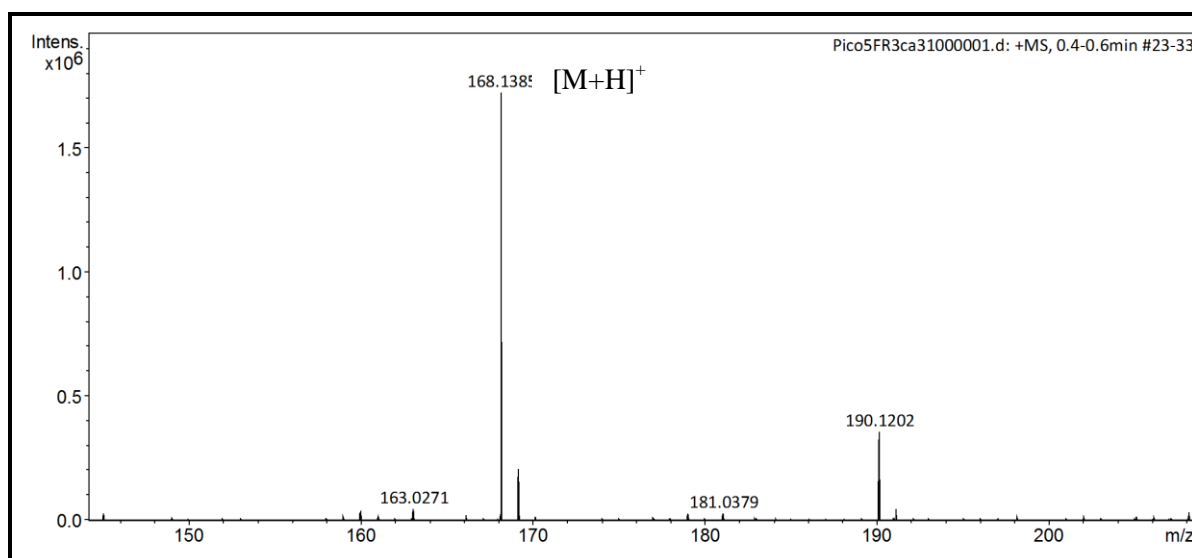
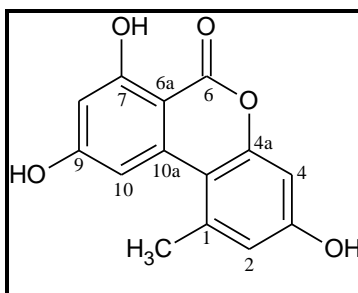
Figura 114. Mapa de contorno de HSQC da substância **12** (DMSO-d₆, 600 MHz).**Figura 115.** Mapa de contorno de HMBC da substância **12** (DMSO-d₆, 600 MHz).

Figura 116. Mapa de contorno de COSY da substância **12** (DMSO-d₆, 600 MHz).**Figura 117.** Espectro de Massas da substância **12**.

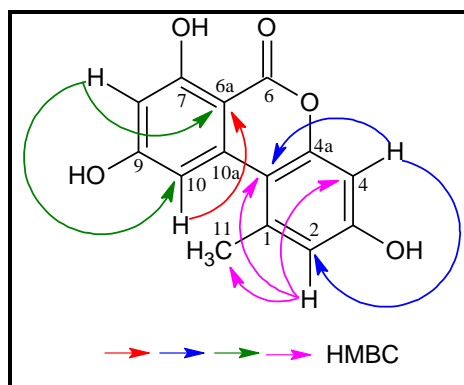
5.4.5 Identificação estrutural da substância **13****Figura 118.** Estrutura da substância **13** (Alternariol).

Fonte: Autor

O espectro de RMN de ¹H (Figura 120) apresentou sinais em δ_H 6,37 (*d*; 1,8 Hz), δ_H 6,64 (*d*; 2,6 Hz), δ_H 6,72 (*d*; 2,6 Hz) e δ_H 7,24 (*d*; 1,8 Hz), evidenciando dois sistemas aromáticos de acoplamento *meta*, o que sugeriu a presença de dois anéis aromáticos tetrassubstituídos. Observou-se um sinal em δ_H 2,70 (*s*), atribuído a uma metila benzílica. Os hidrogênios foram atribuídos aos seus respectivos carbonos pelos mapas de contorno do experimento HSQC. No espectro de HMBC observou-se um sinal em δ_C 164,2 característico de carbonila de éster conjugado.

As correlações observadas a longa distância em HMBC (Figura 122) entre H-8 \leftrightarrow C6a/C10; H10 \leftrightarrow C6a/C8/C10b e H4 \leftrightarrow C2/C10b, reforçaram a substância **13** como o alternariol. A análise dos dados obtidos ESI-EM (Figura 123), modo negativo, evidenciou a molécula desprotonada *m/z* 257,0450 [M-H]⁻, o que associado aos dados de RMN permitiu propor a fórmula molecular de C₁₄H₁₀O₅.

Estes dados aliados às informações obtidas pelo espectro de RMN de ¹H e à literatura (CHAPLA, 2010) permitiram identificar a substância **13** como alternariol.

Figura 119. Principais correlações de COSY e HMBC da substância **13**.

Fonte: Autor

Tabela 25. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) de **13** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δH	δC	HMBC
1	-	138,3	-
2	6,72 (<i>d</i> ; 2,6 Hz)	117,6	C4; C11; C10b
3	-	158,7	-
4	6,64 (<i>d</i> ; 2,6 Hz)	101,5	C2; C10b
4a	-	152,8	-
6	-	164,2	-
6a	-	97,4	-
7	-	164,8	-
8	6,37 (<i>d</i> ; 1,8 Hz)	100,6	C6a; C10
9	-	165,5	-
10	7,24 (<i>d</i> ; 1,8 Hz)	104,2	C8; C6a; C10b
10a	-	*	-
10b	-	108,8	-
11	2,70 (<i>s</i>)	25,0	C1; C2; C10b

*Sinal não observado

O alternariol é uma micotoxina, frequentemente encontrado em alimentos contaminados com *Alternaria alternata* (PFEIFFER et al., 2007). A presença destas micotoxinas em ambientes naturais, bem como em gêneros alimentícios, é descrito como um problema na agricultura. De acordo com FAO (Food and Agriculture Organization), aproximadamente 25% dos alimentos colhidos no mundo são contaminados com micotoxinas. As micotoxinas, como o alternariol são mutagênicas em bactérias e células de mamíferos, então suspeita-se que esses metabólitos estejam associados ao câncer de esôfago humano (WATANABE et al., 2007). O alternariol já foi isolado do gênero *Phomopsis* (DAI et al., 2005), indicando assim que o endófito deve estar exercendo um papel ecológico na espécie hospedeira, possivelmente protegendo-a contra possíveis predadores.

Figura 120. Espectro de RMN de ^1H da substância **13** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

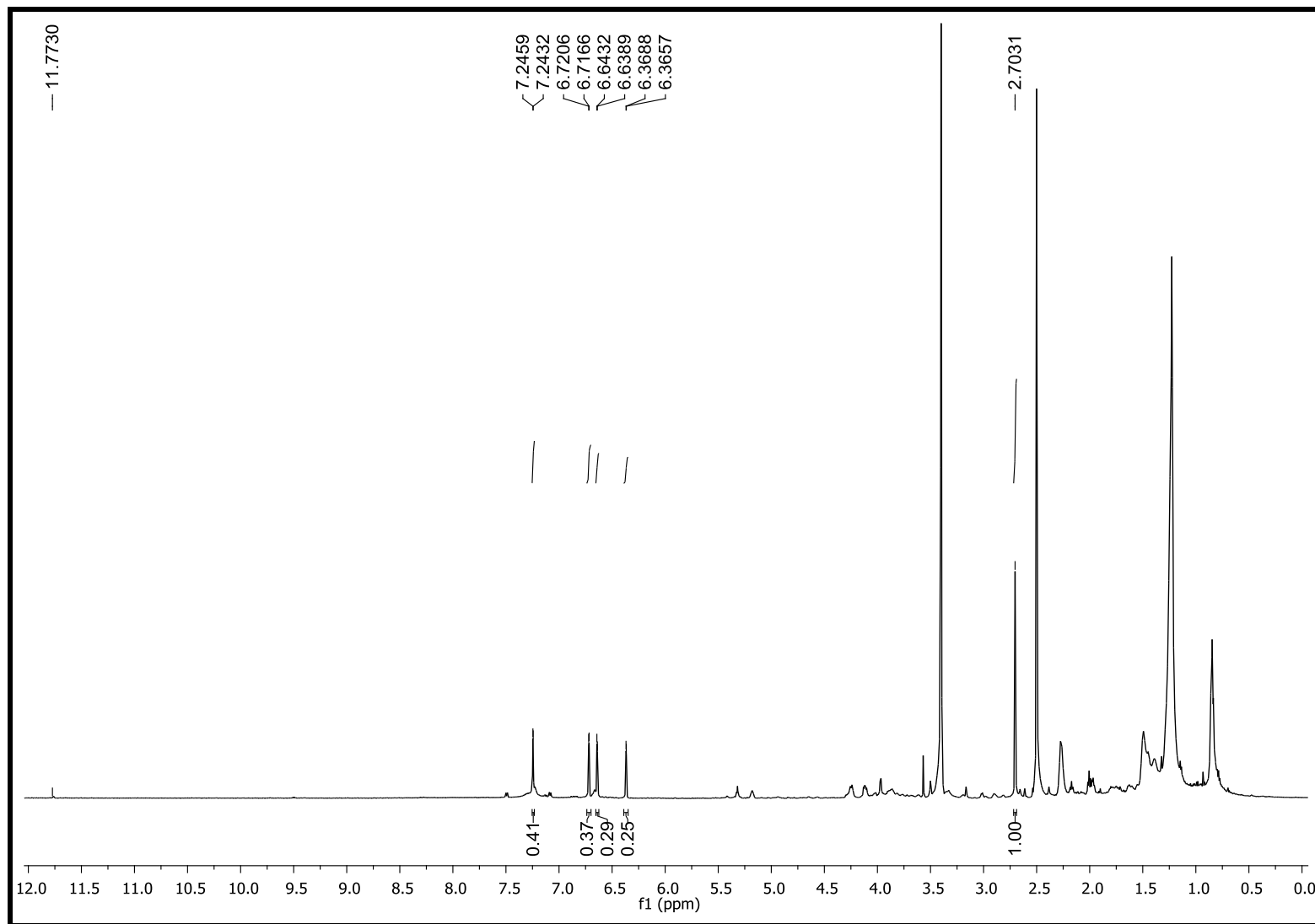


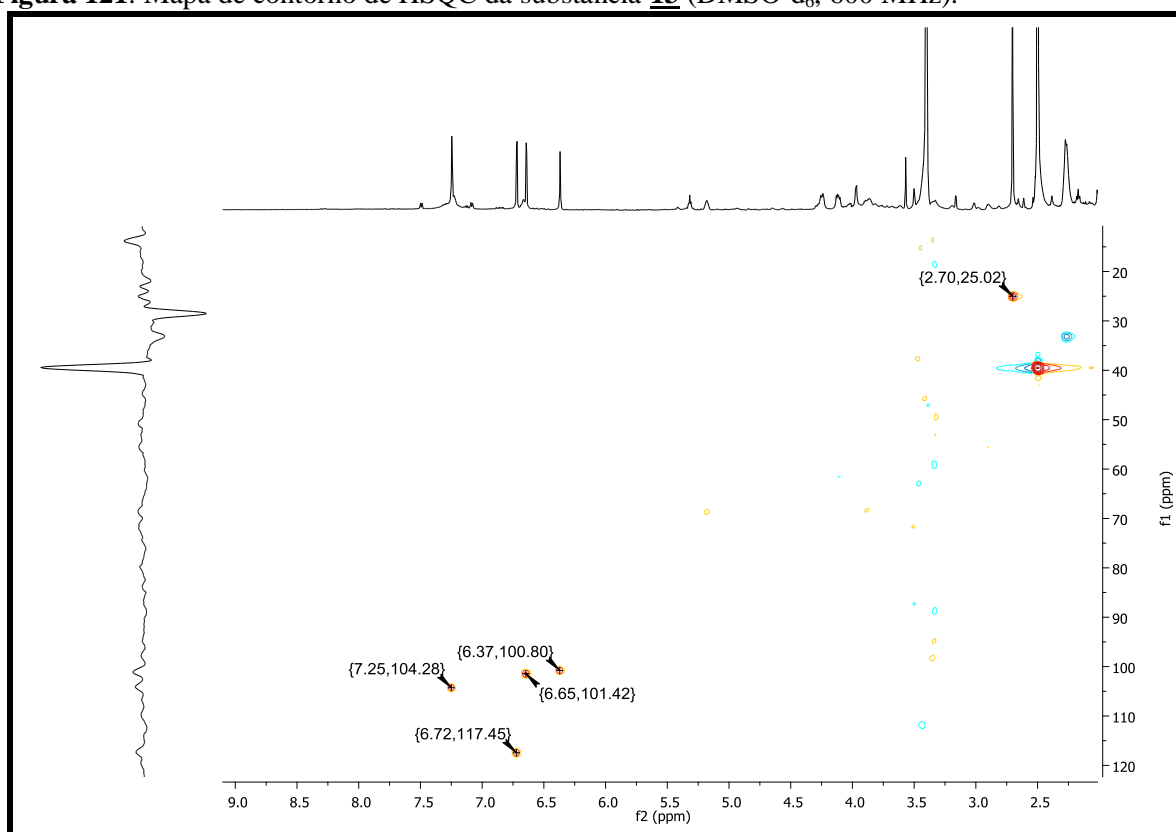
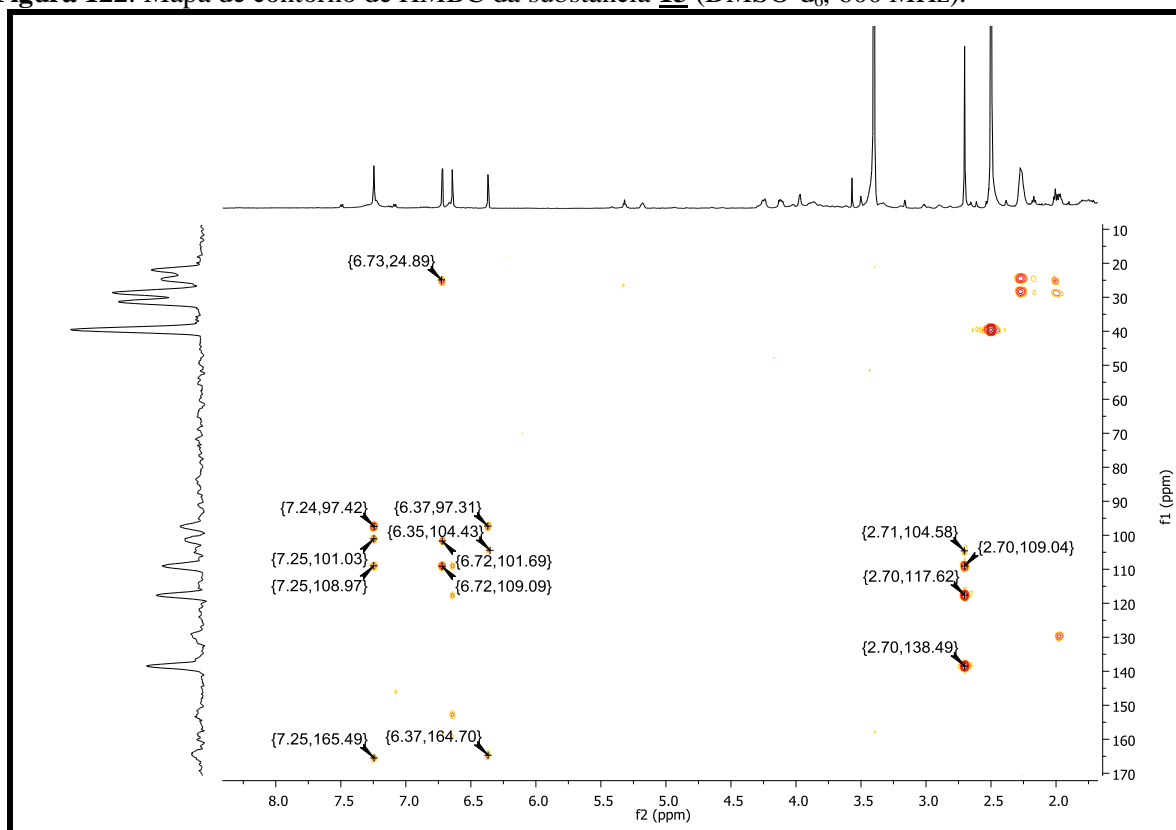
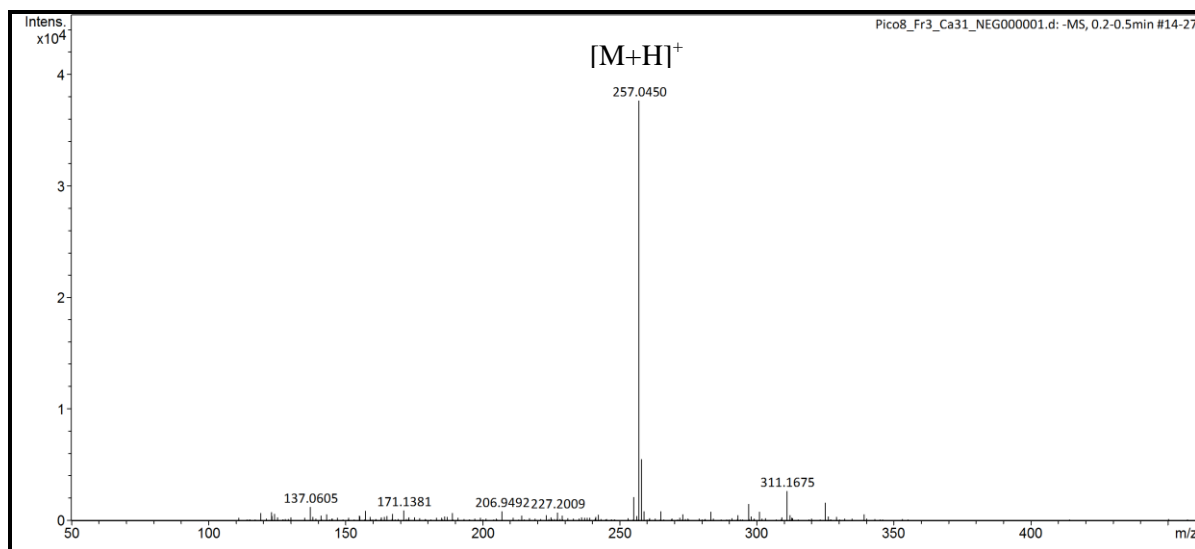
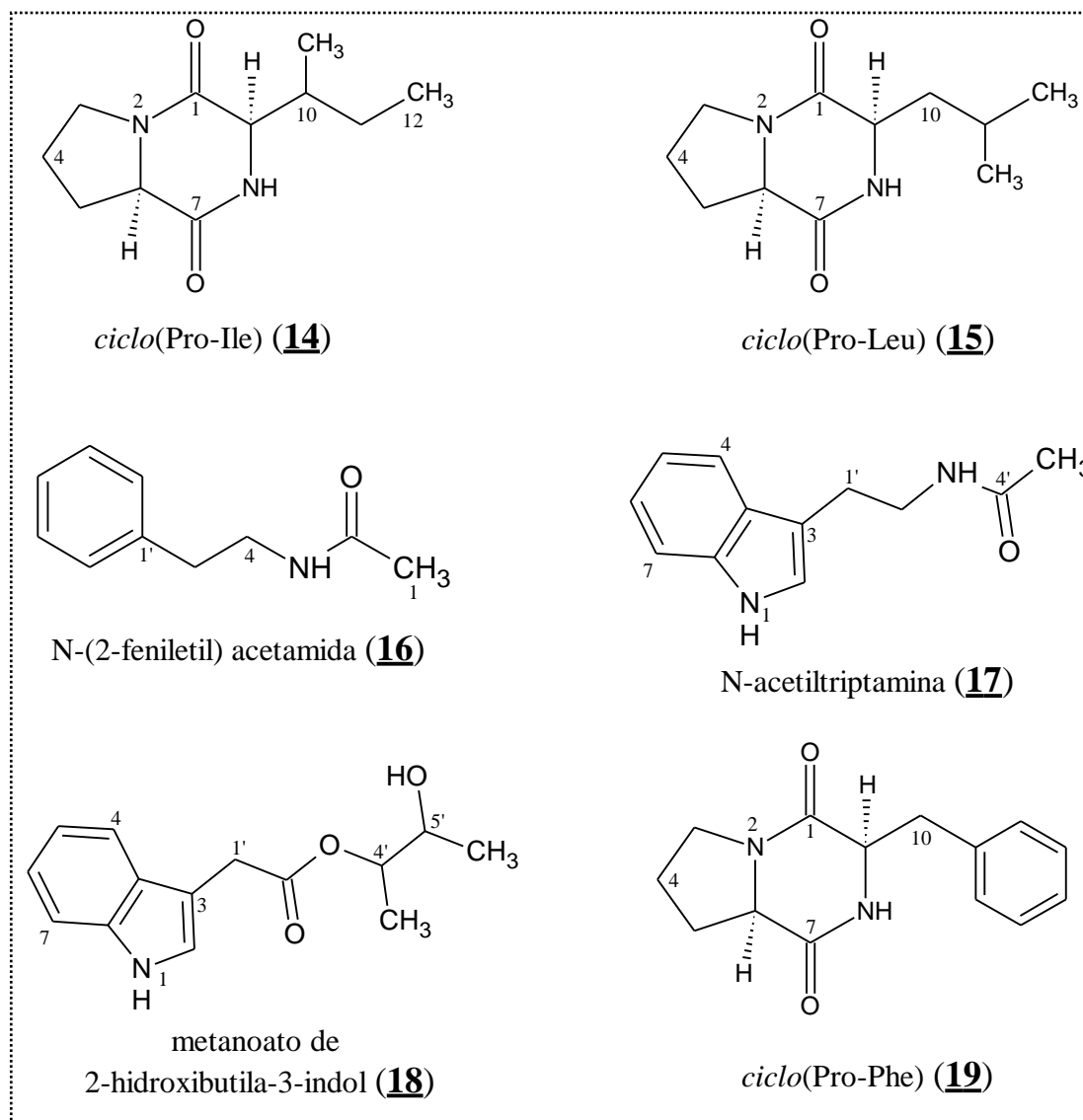
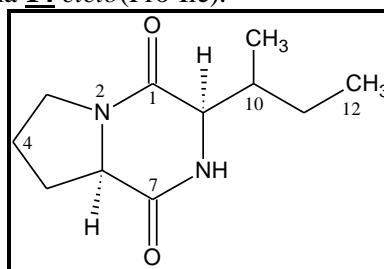
Figura 121. Mapa de contorno de HSQC da substância **13** (DMSO-d₆, 600 MHz).Figura 122. Mapa de contorno de HMBC da substância **13** (DMSO-d₆, 600 MHz).

Figura 123. Espectro de Massas da substância **13**.

5.5 Identificação estrutural das substâncias produzidas por *Colletotrichum* sp.Figura 124. Substâncias produzidas pelo fungo endofítico *Colletotrichum* sp. cultivado em PDB.

Fonte: Autor

5.5.1 Identificação estrutural da substância **14****Figura 125.** Estrutura da substância **14** *ciclo*(Pro-Ile).

Fonte: Autor

O espectro de RMN de ^1H (Figura 126) apresentou-se similar ao da substância **3**, sendo que a única diferença foram as metilas em δ_{H} 0,82 (*t*, 3H, $J = 7,4$ Hz, δ_{C} 12,1) e δ_{H} 0,98 (*d*, 3H, $J = 7,4$ Hz, δ_{C} 14,8) (Tabela 26) desdobrando-se como tripleto e dubleto, respectivamente, em substituição ao dois dubletos. Esses dados indicaram a presença do resíduo do aminoácido Isoleucina (Ile) na substância **14** ao invés da valina como na Sub **3**.

A comparação destes dados espectrais com os descritos na literatura (FDHILA et al., 2003; BIASETTO, 2011), confirmam a estrutura proposta para a substância **14** como sendo *ciclo*(Pro-Ile).

Tabela 26. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) de **14** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_{H}	δ_{C}
1	-	*
3	3,34/3,41 (<i>m</i>)	44,5
4	1,84/1,79 (<i>m</i>)	21,8
5	2,14/1,80 (<i>m</i>)	27,8
6	4,11 (<i>t</i> ; 7,9 Hz)	58,0
7	-	*
8	7,97 (<i>sl</i>)	-
9	3,95 (<i>sl</i>)	59,0
10	2,02 (<i>m</i>)	34,6
11	1,33 (<i>m</i>)	23,7
12	0,82 (<i>t</i> ; 7,4 Hz)	12,1
Me-10	0,98 (<i>d</i> ; 7,4 Hz)	14,8

*Sinal não observado

Figura 126. Espectro de RMN de ^1H da substância **14** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

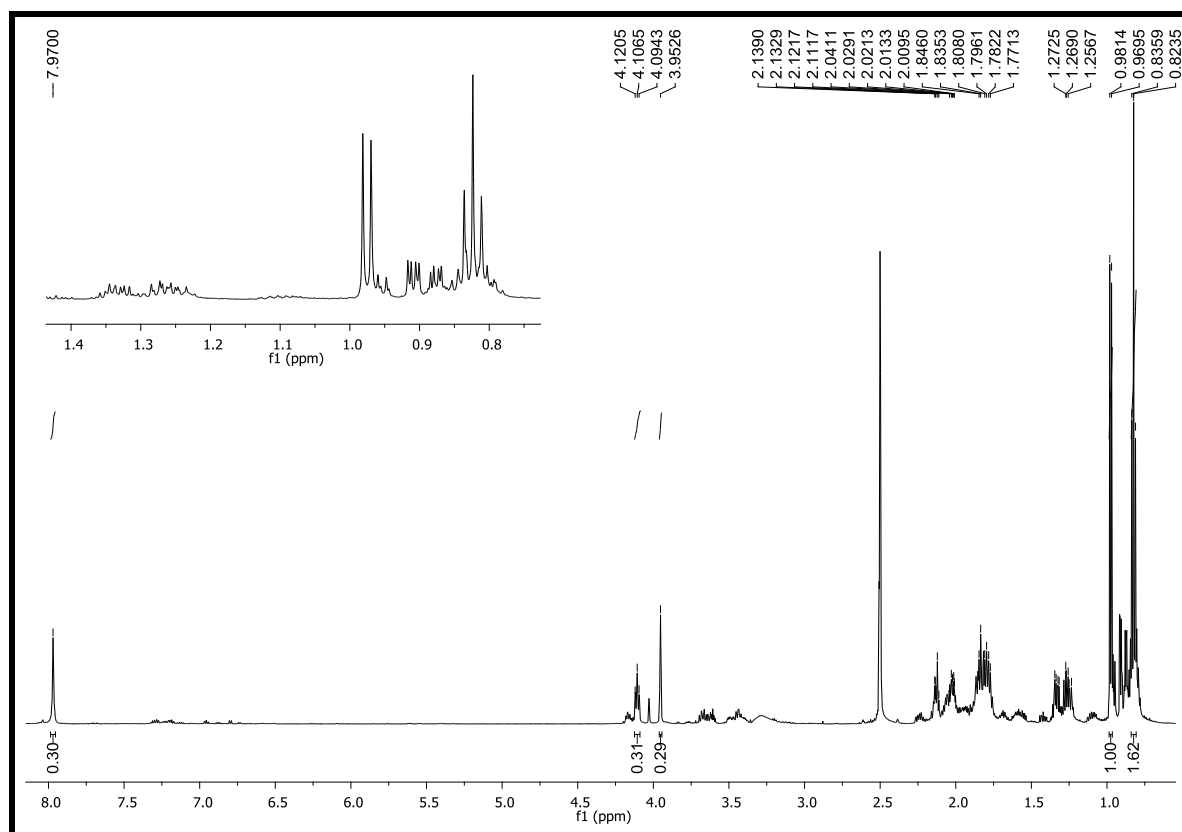
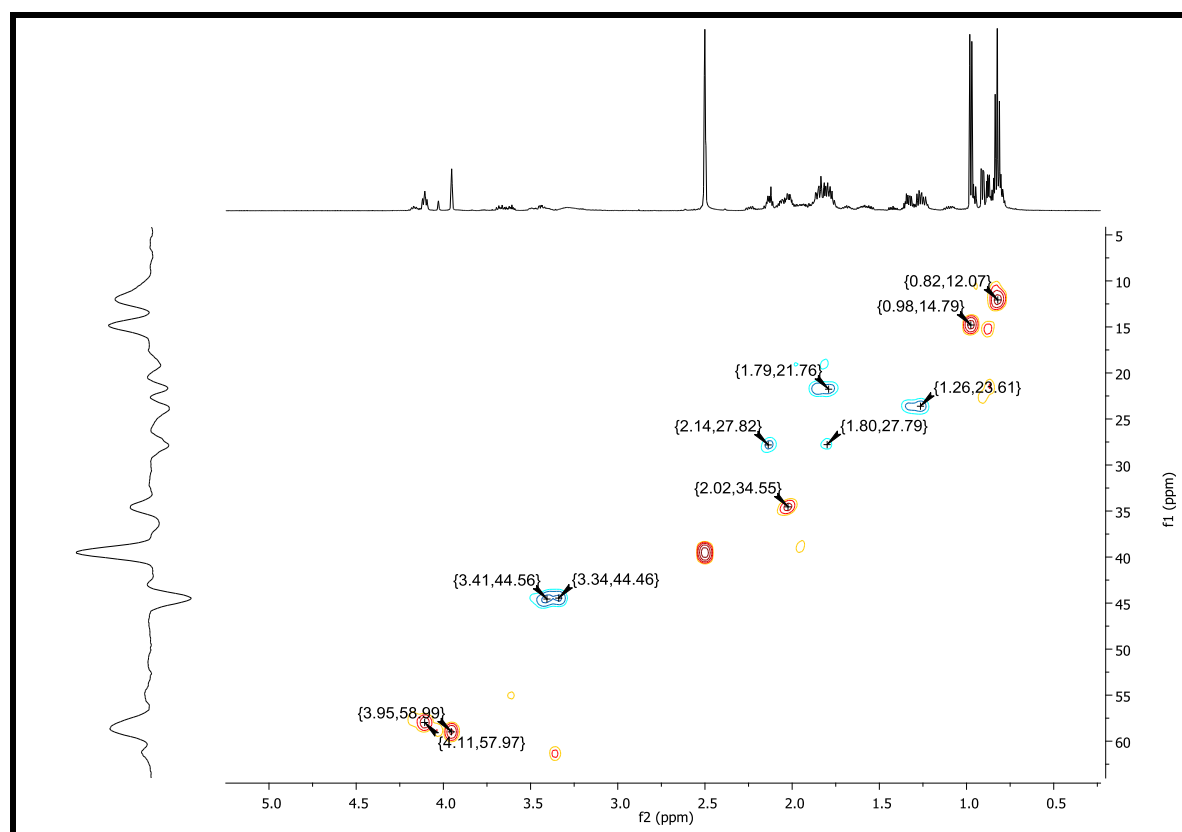
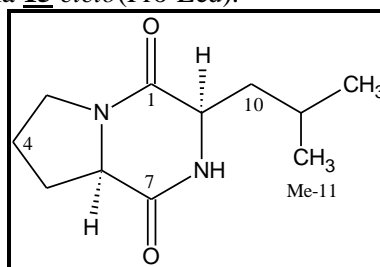


Figura 127. Mapa de contorno de HSQC da substância **14** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

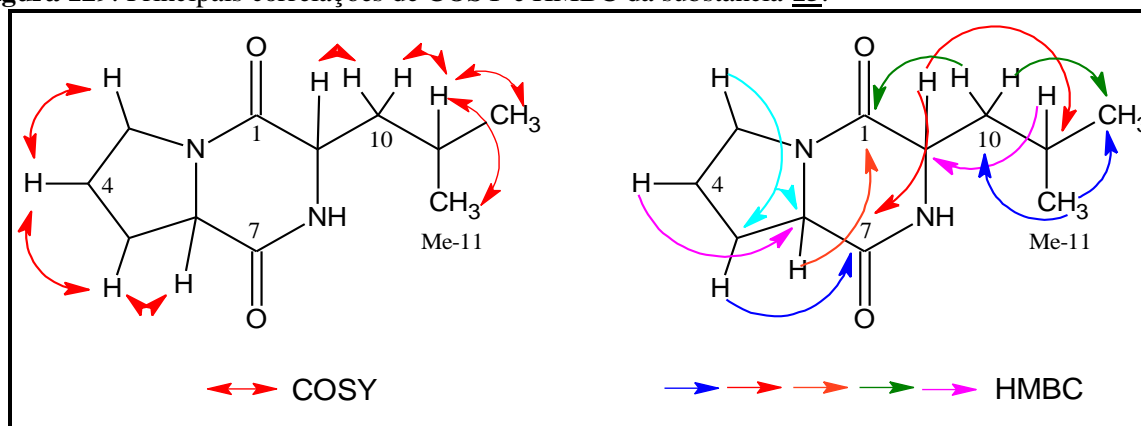


5.5.2 Identificação estrutural da substância **15****Figura 128.** Estrutura da substância **15** *ciclo*(Pro-Leu).

Fonte: Autor

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 130) da substância **15** mostrou-se semelhante com a substância **14**, sendo que a única diferença observada foi a presença de 2 metilas desdobrando-se como dubletos em δ_{H} 0,86 ($J= 6,5\text{Hz}$, 3H) e 0,87 ($J= 6,5\text{Hz}$, 3H) em substituição as duas metilas, que desdobravam-se em duplete e tripleto na substância **14**. As correlações observadas em COSY (Figuras 133) de Me-11 \leftrightarrow H11 e Me-12 \leftrightarrow H9 \leftrightarrow H10 \leftrightarrow H11 confirmaram as observações acima e indicaram a presença de uma unidade do aminoácido Leucina (Leu) como um dos componentes da substância **15**.

A substância **15** encontra-se em mistura, mas pelas correlações observadas nos experimentos COSY e HMBC (Tabela 27) e comparação com a literatura permitiram identificar a substância majoritária como *ciclo*(Pro-Leu). (CAFEU, 2007; FDHILA et al., 2003).

Figura 129. Principais correlações de COSY e HMBC da substância **15**.

Fonte: Autor

Tabela 27. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) de **15** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δH	δC	HMBC	COSY
1	-	170,4	-	-
3	3,33 (<i>m</i>)	44,7	C5; C6	H4
4	1,79/1,82 (<i>m</i>)	22,1	C6	H3
5	1,90/2,11 (<i>m</i>)	27,2	C3; C7	H4
6	4,19 (<i>t</i> ; 8,0 Hz)	58,2	C1	H5
7	-	166,6	-	-
8	8,02 (<i>sl</i>)	-	C6	*
9	4,00 (<i>t</i> ; 6,3 Hz)	52,4	C7; C11	H10
10a	1,35 (ddd; 13,8; 7,5; 6,0 Hz)	37,7	C1; C12; Me-11	H9; H11
10b	1,76 (<i>m</i>)			
11	1,87 (<i>m</i>)	23,8	C9; C10	H10; H12; Me-11
Me-11	0,86(<i>d</i> ; 6,5 Hz)	22,1	C10; C12	H11
Me-12	0,87(<i>d</i> ; 6,5 Hz)	22,2	C10; Me-11	H11

*Sinal não observado

Figura 130. Espectro de RMN de ^1H da substância **15** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

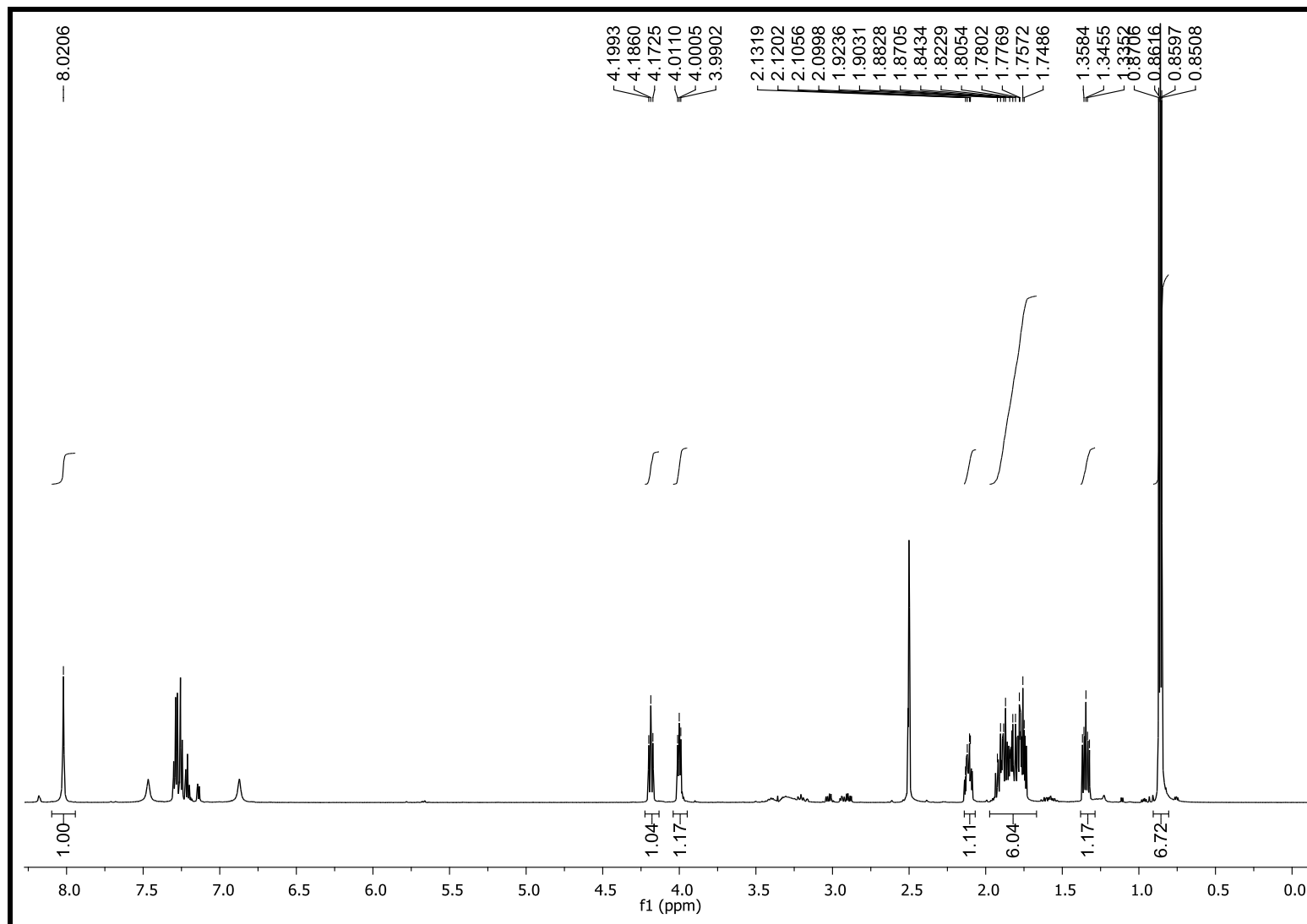


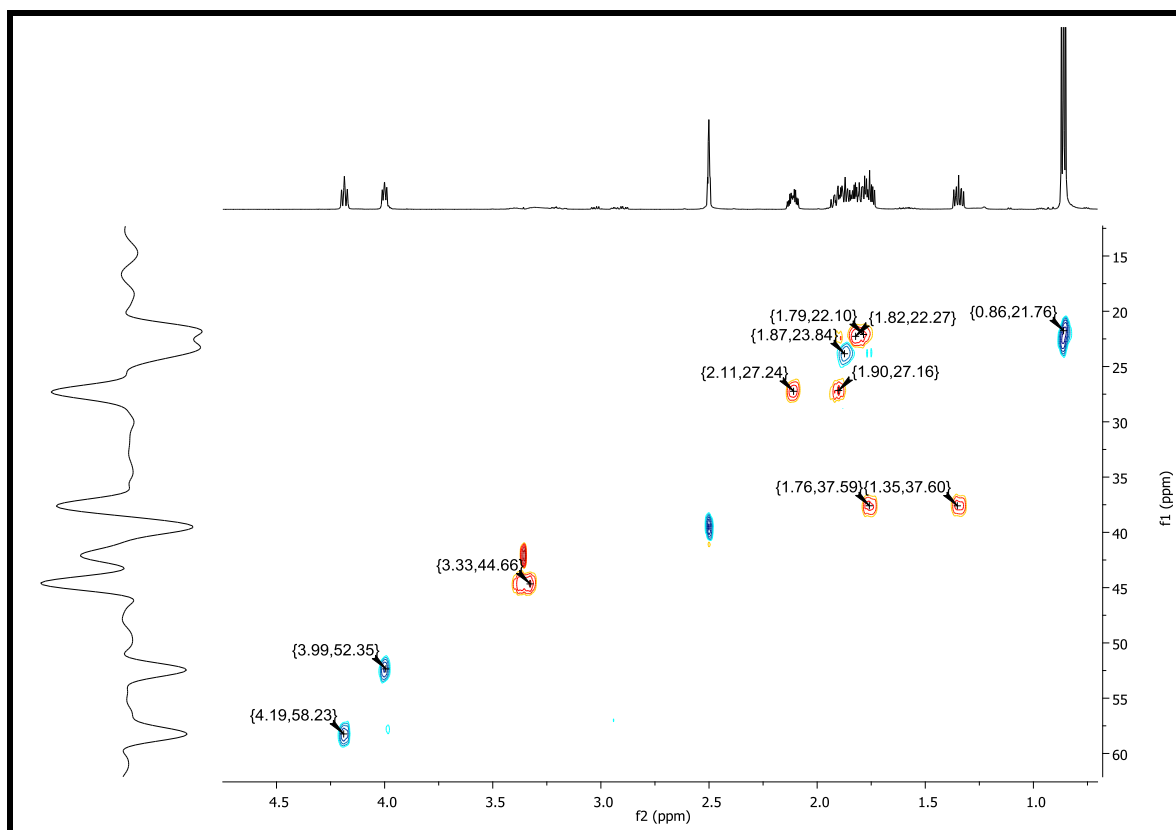
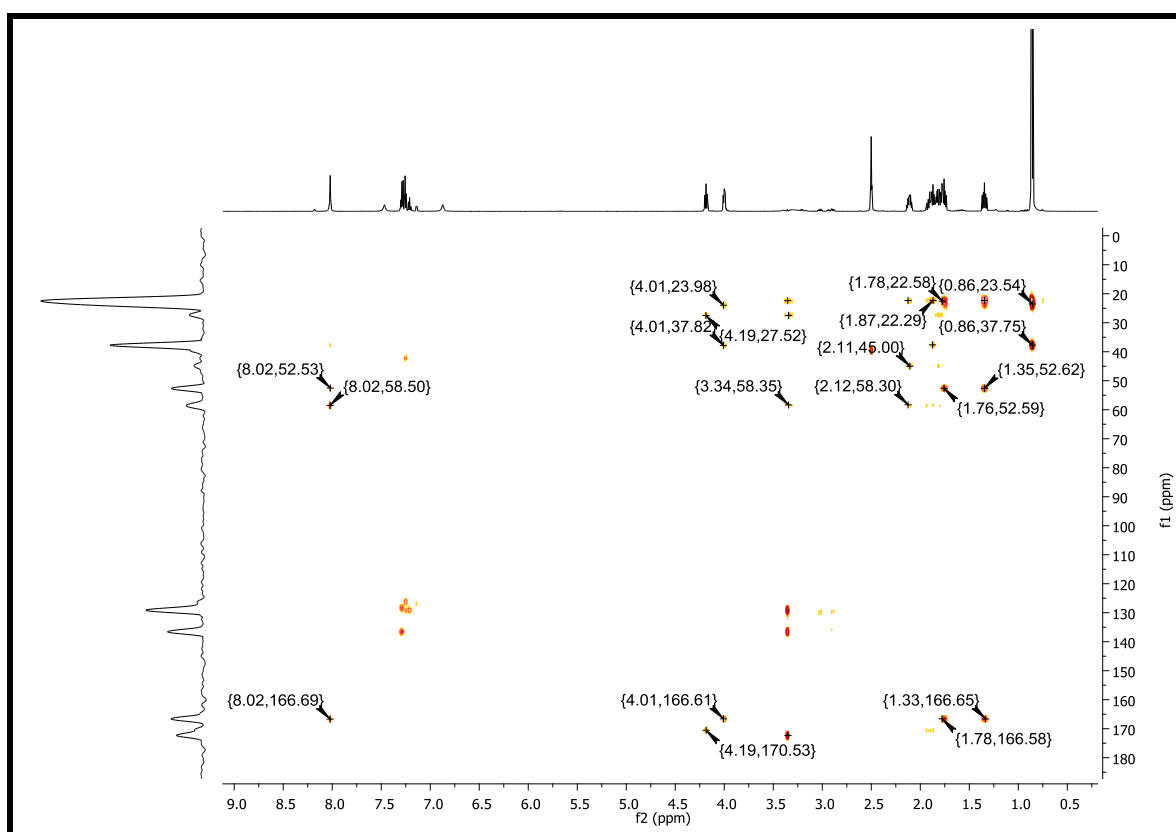
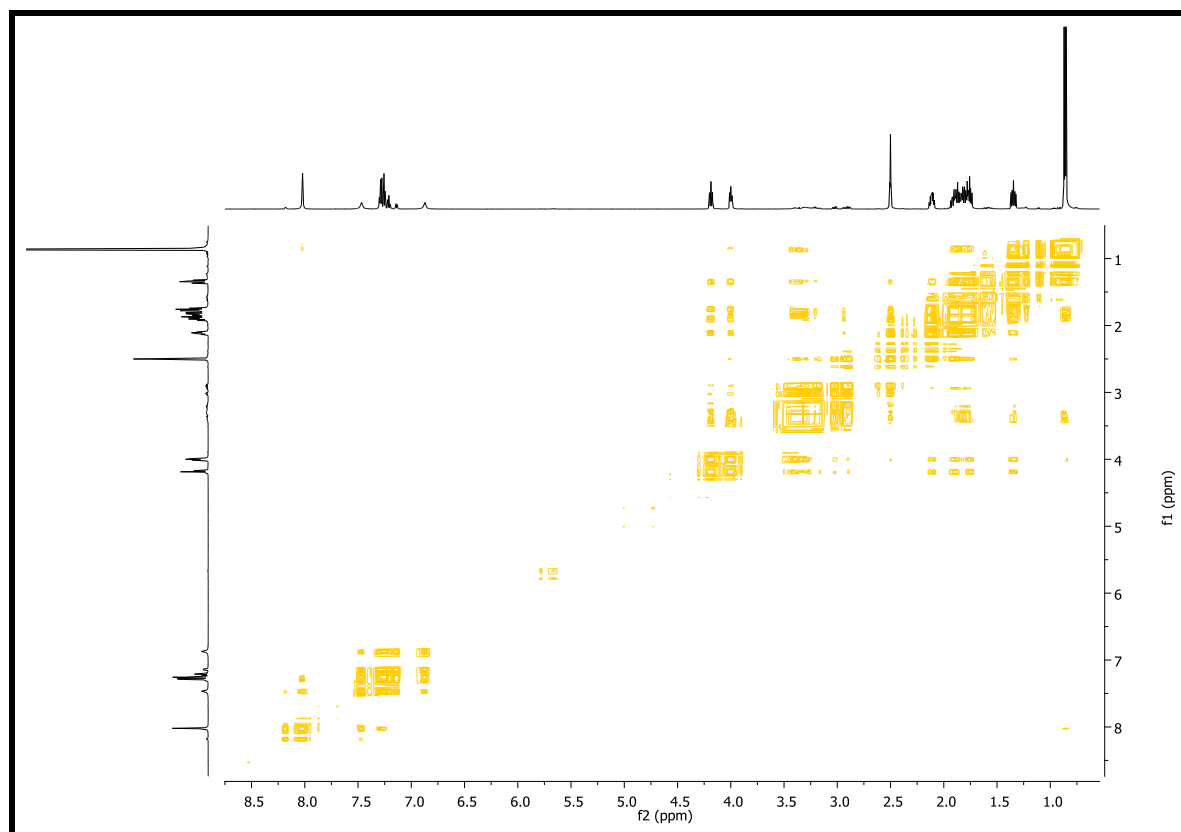
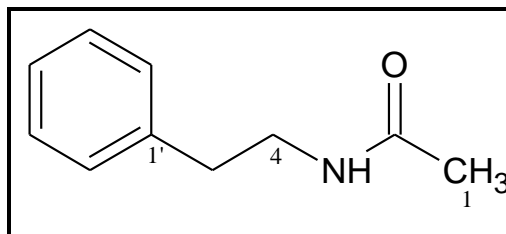
Figura 131. Mapa de contorno de HSQC da substância **15** (DMSO-d₆, 600 MHz).**Figura 132.** Mapa de contorno de HMBC da substância **15** (DMSO-d₆, 600 MHz).

Figura 133. Mapa de contorno de COSY da substância **15** (DMSO-d₆, 600 MHz).

5.5.3 Identificação estrutural da substância **16**

Figura 134. Estrutura da substância **16** (N-(2-feniletil) acetamida).



Fonte: Autor

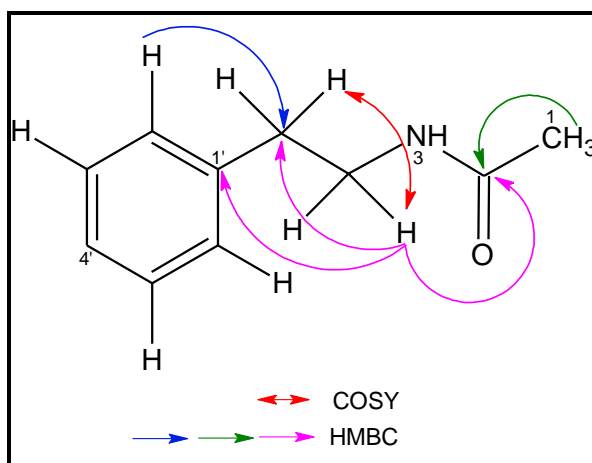
Os espectros de RMN de ^1H (Figura 136) evidenciaram a presença de uma metila ligada a uma carbonila, dois grupos metilênicos, sendo um benzílico e o outro ligado a nitrogênio.

Na região de aromáticos, foram visualizados sinais em δ_{H} 7,20 (*m*; 1H; δ_{C} 126,0), 7,21 (*m*; 2H; δ_{C} 128,5) e δ_{H} 7,29 (*m*; 2H; δ_{C} 128,3) (Tabela 28) evidenciando um sistema benzílico monossustituído.

Todos os deslocamentos químicos de RMN de ^1H foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono através da análise de HSQC (Figura 137).

A conexão da unidade etilênica ao anel aromático foi permitida pela correlação observada em HMBC (Figura 138) de $\text{H-4} \leftrightarrow \text{C-1}'$. As correlações observadas em HMBC (Figura 135) de $\text{H-1}/\text{H-4} \leftrightarrow \text{C-2}$ associado às correlações observadas em COSY (Figura 139) entre $\text{H-4}/\text{H-5}$ e a comparação com dados da literatura (MASKEY et al., 2002; CAFÊU, 2007) permitiram identificar a substância **16** como sendo N-(2-feniletil)acetamida.

A estrutura proposta para esta substância foi confirmada após análise por ESI-EM onde há a presença da molécula protonada de m/z 164,08 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) (Figura 140), o que associado aos dados de RMN permitiu propor a fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NO}$.

Figura 135. Principais correlações de COSY e HMBC da substância **16**.

Fonte: Autor

Tabela 28. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 600 MHz) de **16** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	COSY
1	1,77 (<i>s</i>)	22,4	C2	*
2	-	169,1	-	-
3	7,93 (<i>sl</i>)	-	*	*
4	3,24 (<i>m</i>)	40,0	C1; C5; C1'	H3; H5
5	2,69 (<i>t</i> ; 7,5Hz)	35,0	C4	H4
1'	-	139,7	-	-
2' e 6'	7,20 (<i>m</i>)	126,0	C5	*
3' e 5'	7,21 (<i>m</i>)	128,5	*	*
4'	7,29 (<i>m</i>)	128,3	C1'	*

*Sinal não observado

As ariletilamidas são descritas na literatura pelo seu potencial antimicrobiano (MASKEY et al., 2002).

Figura 136. Espectro de RMN de ^1H da substância **16** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

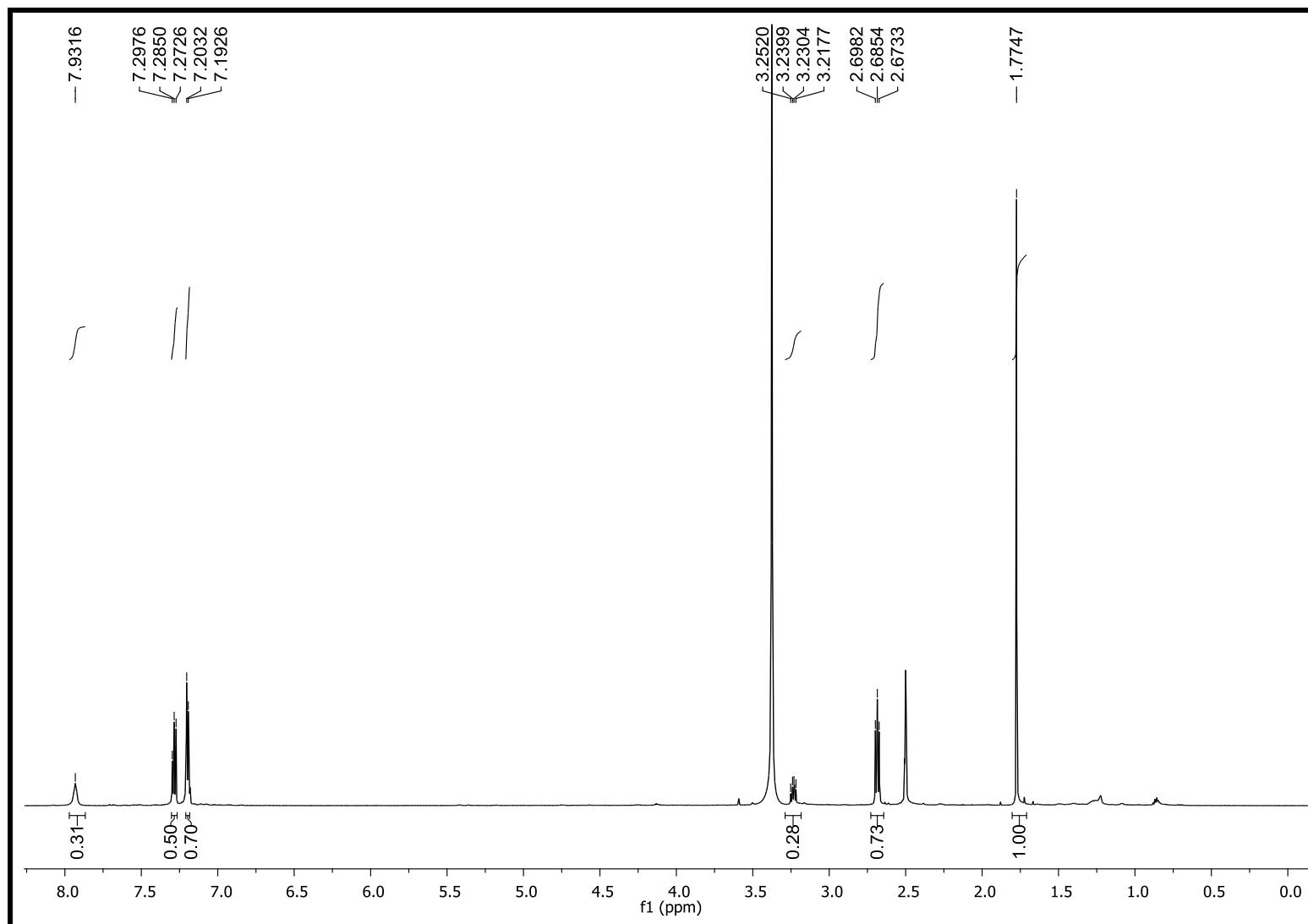


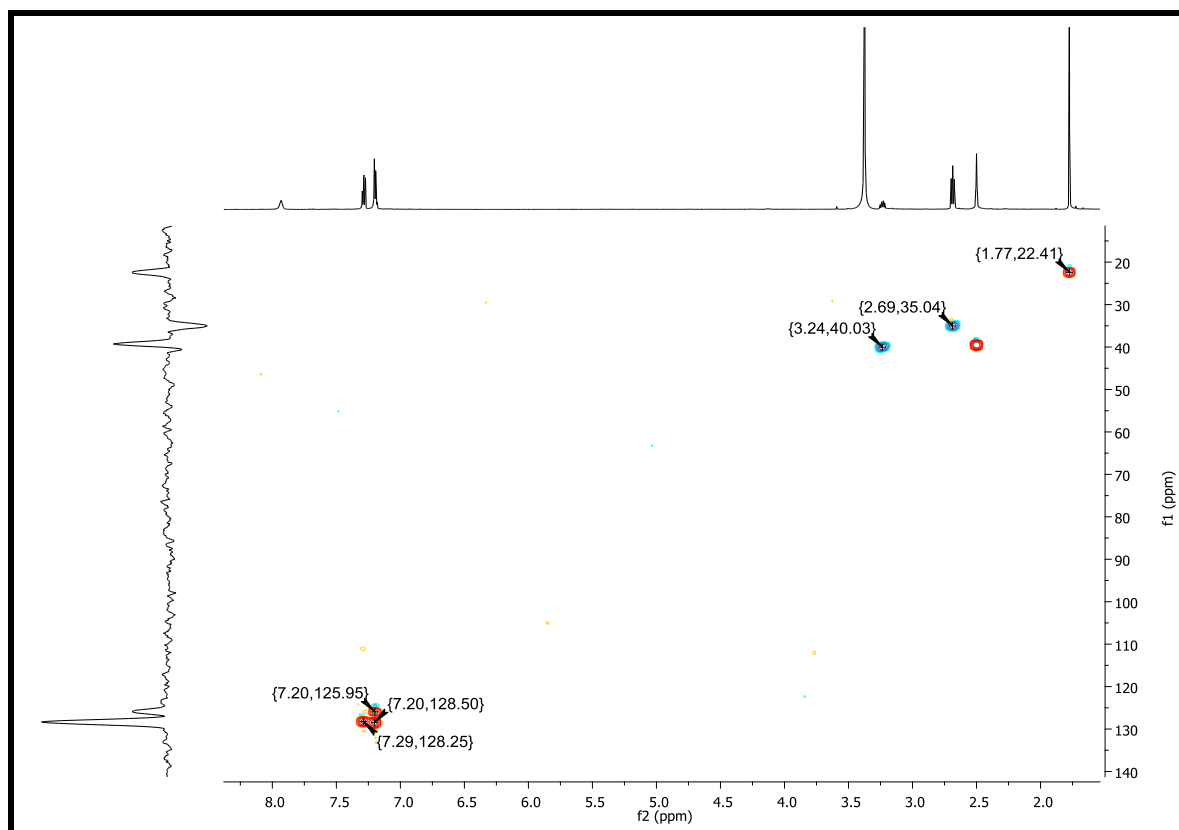
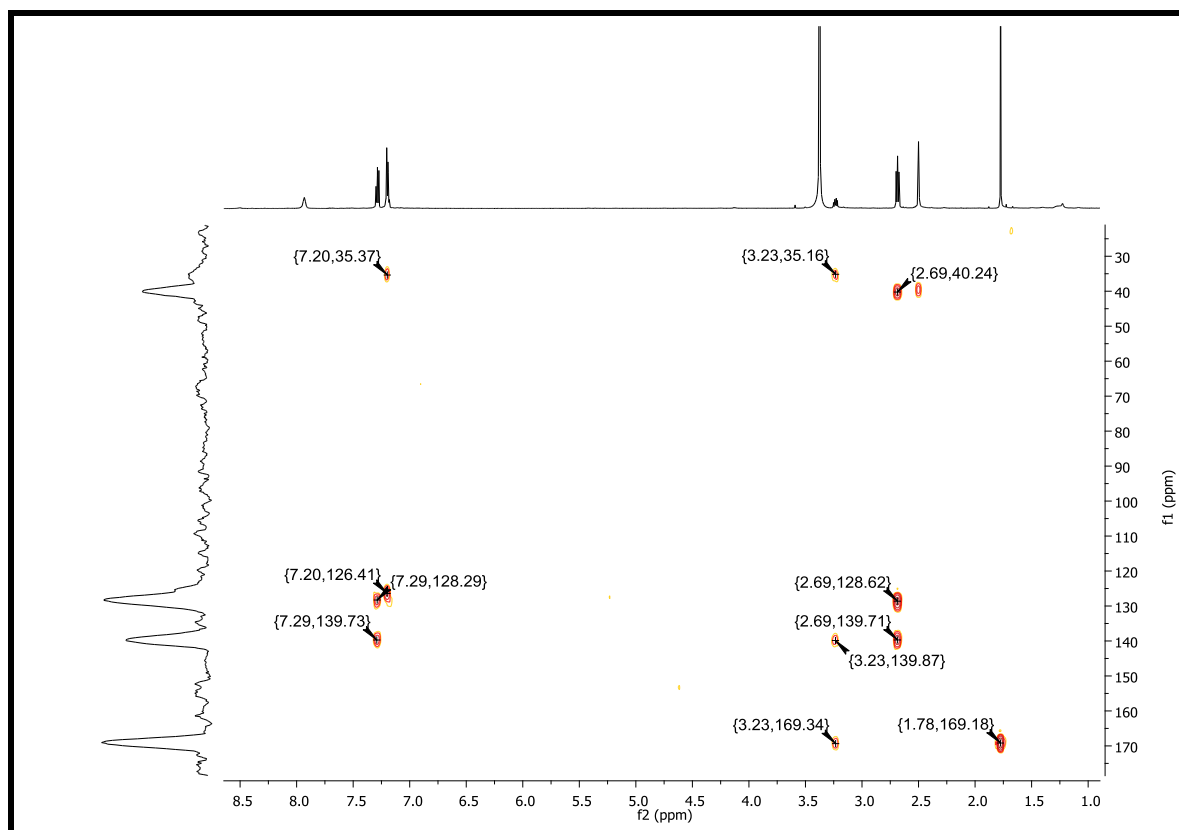
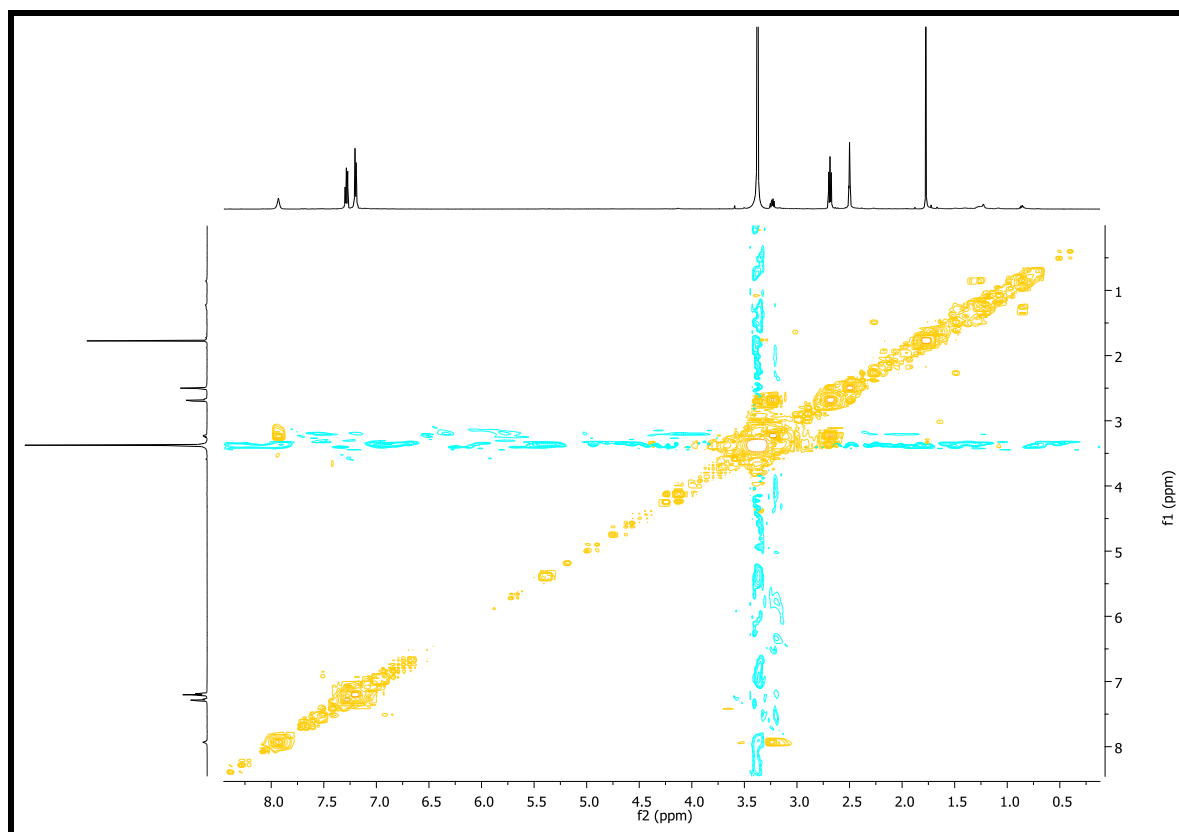
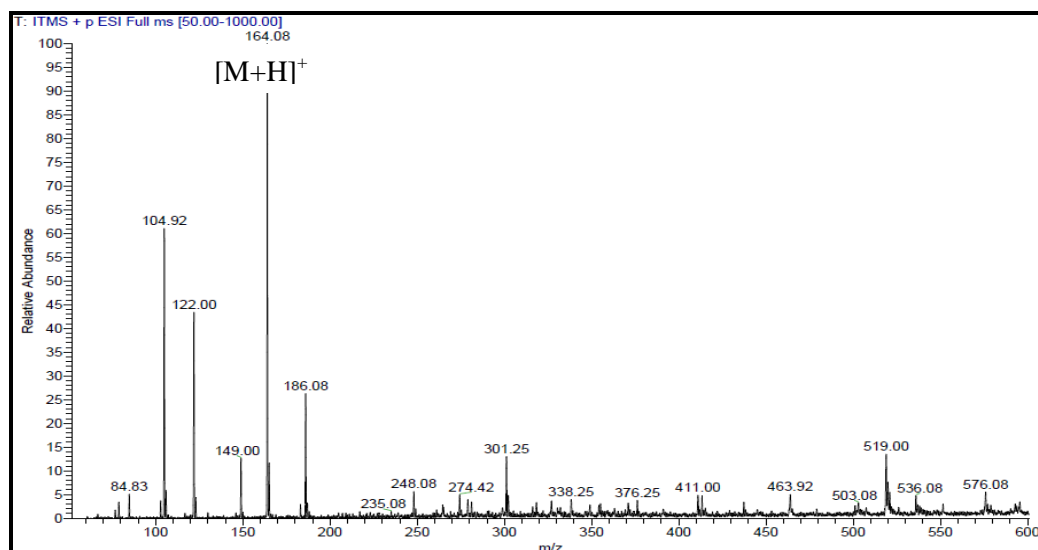
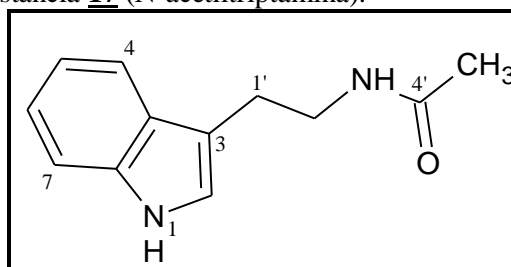
Figura 137. Mapa de contorno de HSQC da substância **16** (DMSO-d₆, 600 MHz).**Figura 138.** Mapa de contorno de HMBC da substância **16** (DMSO-d₆, 600 MHz).

Figura 139. Mapa de contorno de COSY da substância **16** (DMSO-d₆, 600 MHz).**Figura 140.** Espectro de Massas da substância **16**.

5.5.4 Identificação estrutural da substância **17**

Figura 141. Estrutura da substância **17** (N-acetiltriptamina).

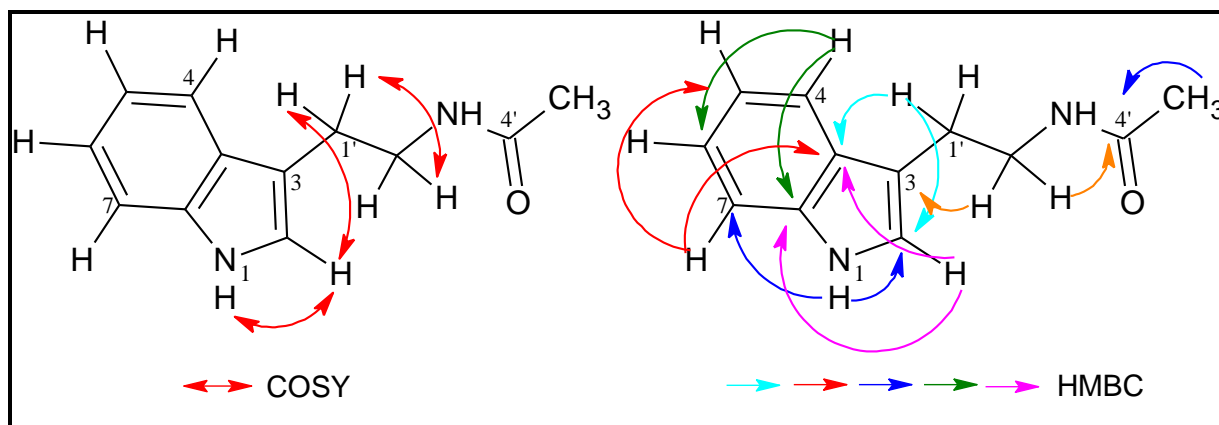


Fonte: Autor

Os sinais presentes nos espectros de RMN de ¹H (Figura 143) são semelhantes ao da substância **16**, sendo que a única diferença observada foi a presença de um núcleo indólico na substância **17** no lugar de um sistema benzílico monossustituído como na substância **16**. Os sinais referentes ao núcleo indólico foram observados em δ_H 6,97 (*ddd*; 1H; δ_C 118,2), 7,06 (*ddd*; δ_C 120,9), δ_H 7,33 (*dt*; 1H; δ_C 111,4) e δ_H 7,51 (*d*; 1H; δ_C 118,3) (Tabela 29). Todos os deslocamentos químicos dos hidrogênios foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono pelas análises do experimento de HSQC (Figura 144).

A conexão da unidade etilênica ao anel indólico foi realizada pela correlação observada em HMBC (Figura 142) de H-1' ↔ C₂/C-3a. As correlações observadas em HMBC (Figura 145) de H-2'/H-5' ↔ C-4' associado às correlações observadas em COSY (Figura 146) entre H-1'/H-2 e a comparação com dados da literatura (NAGIA et al., 2012) permitiram identificar a substância **17** como sendo N-acetiltriptamina.

A estrutura proposta para esta substância foi confirmada após análise por ESI-EM pela presença da molécula protonada de m/z 203,1175 ([M+H]⁺) (Figura 147), o que associado aos dados de RMN permitiu propor a fórmula molecular C₁₂H₁₄N₂O.

Figura 142. Principais correlações de COSY e HMBC da substância **17**.

Fonte: Autor

Tabela 29. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 600 MHz) de **17** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	COSY
1	10,8 (<i>sl</i>)	-	C2; C7	H2
2	7,13 (<i>d</i> ; 2,3 Hz)	122,5	C3; C3a; C7a	H1; H1'
3	-	111,9	-	-
3a	-	127,2	-	-
4	7,51 (<i>d</i> ; 8,4 Hz)	118,3	C6; C7a	*
5	6,97 (<i>ddd</i> ; 8,0; 7,0; 1,0 Hz)	118,2	C7; C3a	*
6	7,06 (<i>ddd</i> ; 8,0; 7,0; 1,0 Hz)	120,9	C5; C7a	*
7	7,33 (<i>dt</i> ; 8,0; 1,0 Hz)	111,4	C5; C3a	*
7a	-	136,3	-	-
1'	2,80 (<i>t</i> ; 7,3 Hz)	25,1	C2'; C2; C3a	H2
2'	3,30 (<i>m</i>)	39,4	C1'; C4'; C3	H3'
3'	7,96 (<i>t</i> ; 5,3 Hz)	-	*	H2'
4'	-	169,2	-	-
5'	1,80 (<i>s</i>)	22,5	C4'	*

*Sinal não observado

Figura 143. Espectro de RMN de ^1H da substância **17** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

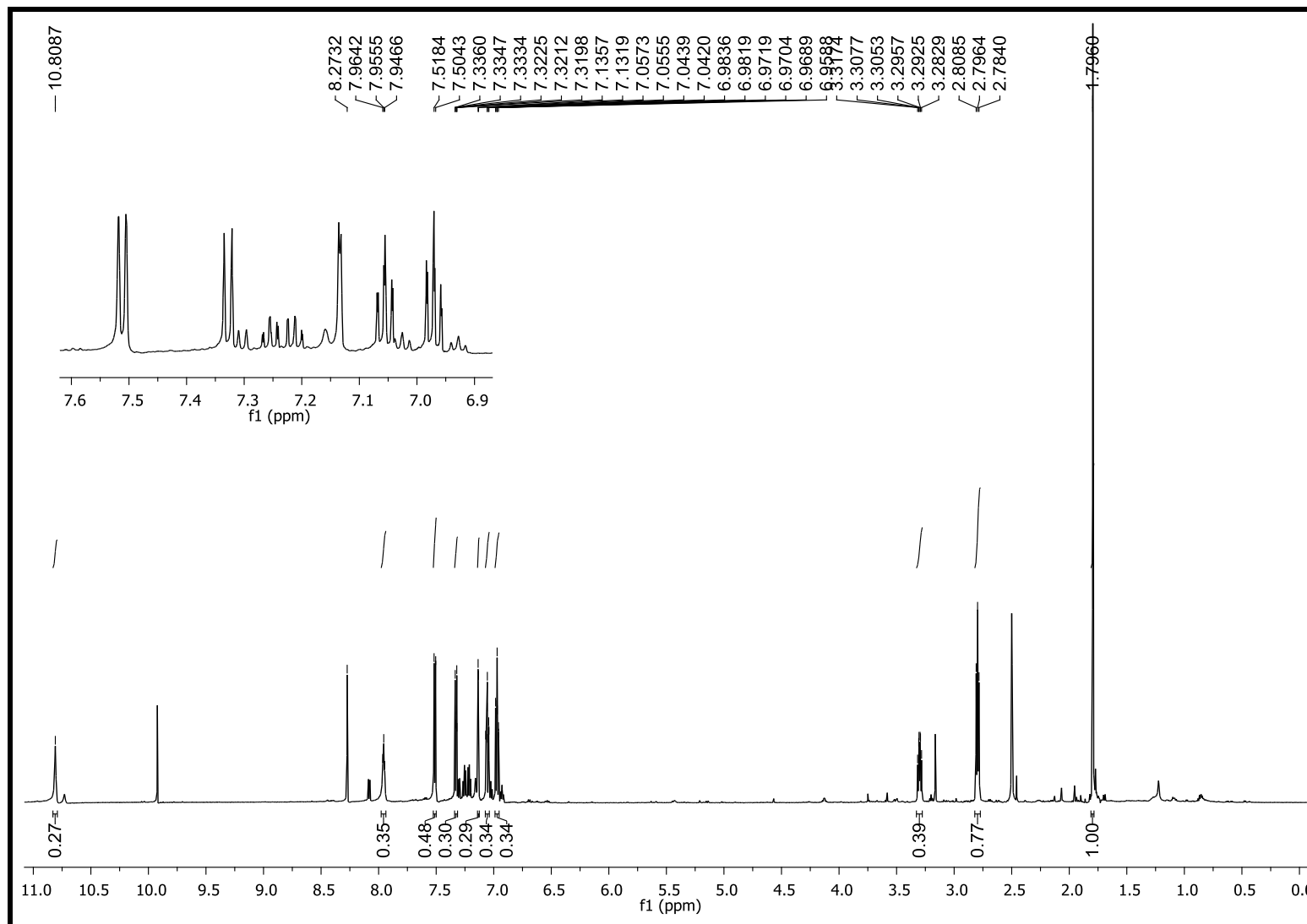


Figura 144. Mapa de contorno de HSQC da substância **17** (DMSO-d₆, 600 MHz).

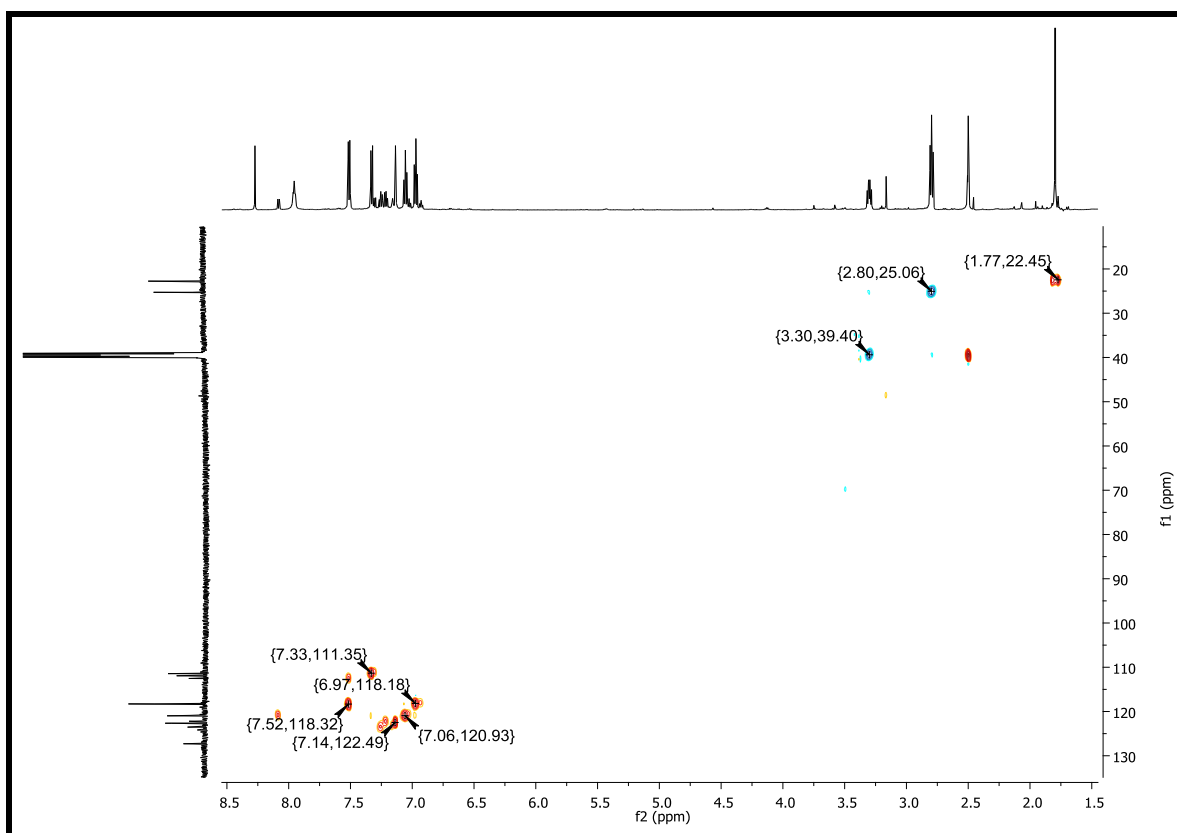


Figura 145. Mapa de contorno de HMBC da substância **17** (DMSO-d₆, 600 MHz).

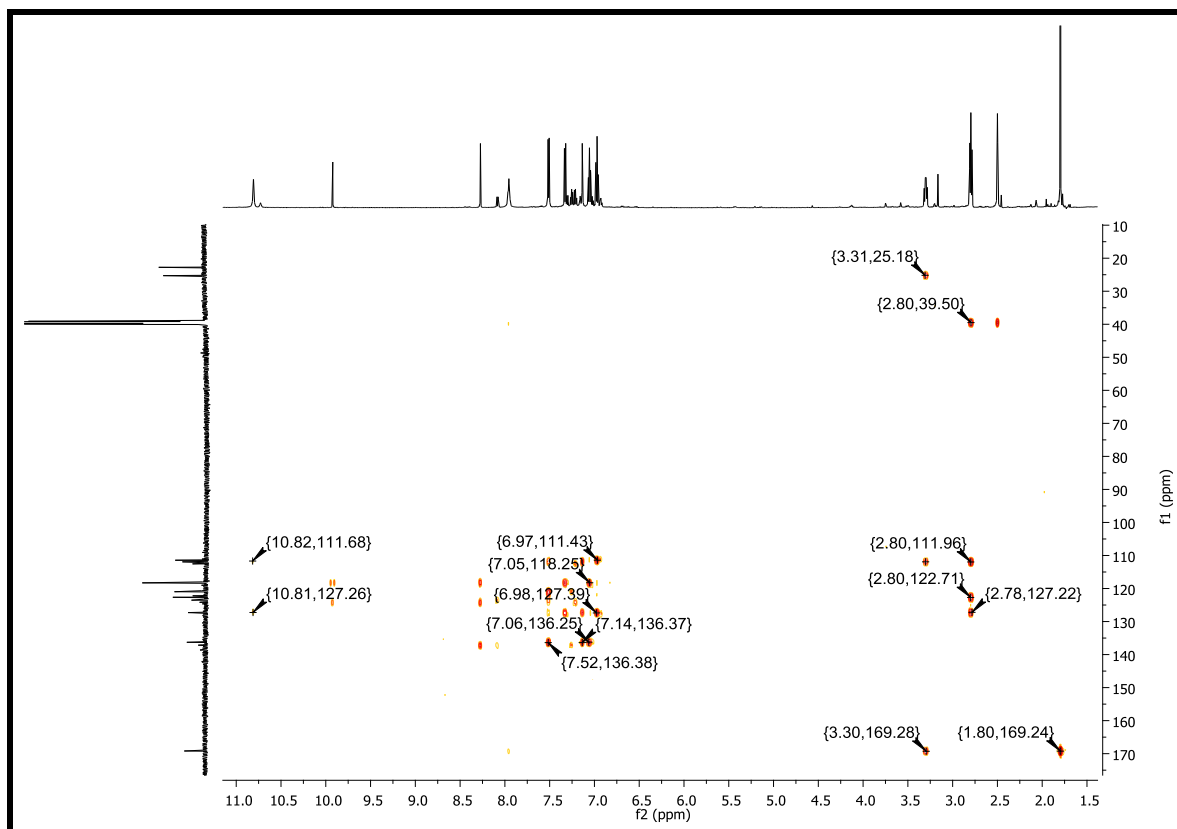
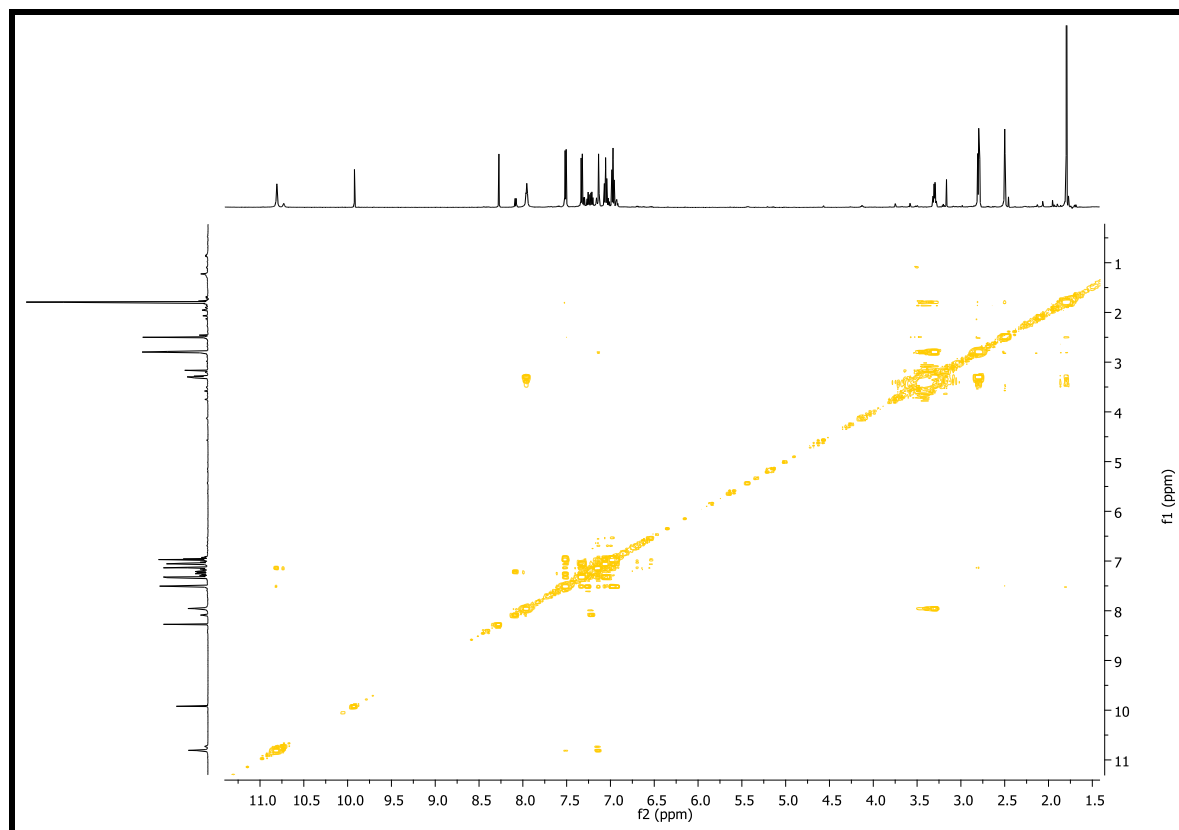
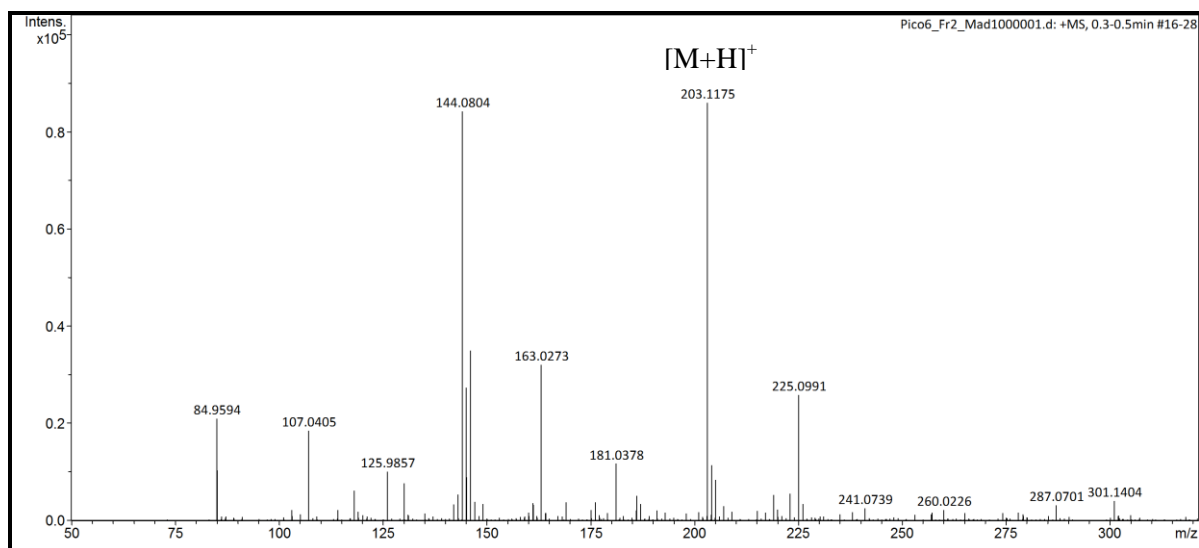
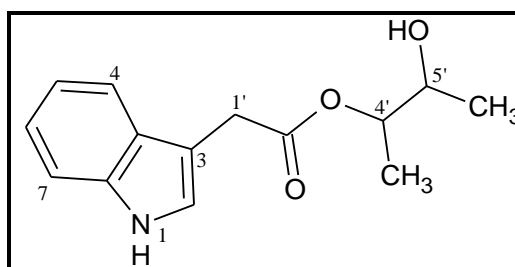


Figura 146. Mapa de contorno de COSY da substância **17** (DMSO-d₆, 600 MHz).**Figura 147.** Espectro de Massas da substância **17**

5.5.5 Identificação estrutural da substância **18**

Figura 148. Estrutura da substância **18** (metanoato de 2-hidroxitubila 3-indol).



Fonte: Autor

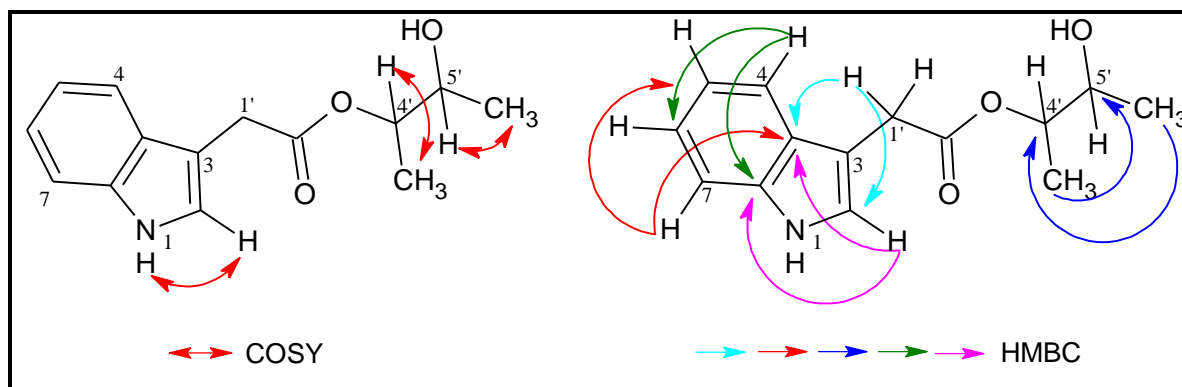
Os espectros de RMN de ^1H (Figura 150) da substância **18** assim como da Sub **17** evidenciaram a presença de um núcleo indólico com sinais em δ_{H} 6,97 (*t*; 1H; δ_{C} 118,3), 7,07 (*t*; δ_{C} 121,0), δ_{H} 7,34 (*d*; 1H; δ_{C} 111,3) e δ_{H} 7,49 (*d*; 1H; δ_{C} 118,4) (Tabela 30) e um dupletto em δ_{H} 7,24 (1H; δ_{C} 123,8) atribuído ao H-2. O singletto observado em δ_{H} 3,71 (*s*, δ_{C} 30,8) foi atribuído ao H-1', que foi confirmado pela correlação de H-1' \leftrightarrow C2/C-3a. Estas observações permitiram confirmar a presença de um derivado esterificado do ácido indol acético.

Ainda no espectro de RMN de ^1H foram observadas duas metilas desdobrando-se como dubletos em δ_{H} 0,98 (*d*; $J=6,4$ Hz, 3H; δ_{C} 18,1), δ_{H} 1,08 (*d*; $J=6,4$ Hz, 3H; δ_{C} 15,0) e dois multipletos em δ_{H} 3,62 (δ_{C} 67,3) e δ_{H} 4,68 (δ_{C} 73,6) evidenciando serem carbinólicos. Com o auxílio do experimento de COSY foram visualizados correlações entre H-4' \leftrightarrow Me-4' e H5' \leftrightarrow Me-5'. As correlações observadas em HMBC (Figura 152) de Me-4'/Me-5' \leftrightarrow C4' e Me-4'/Me-5' \leftrightarrow C5' corroboram para a proposta acima.

Todos os deslocamentos químicos de RMN de ^1H foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono através da análise de HSQC (Figura 151).

A conexão da unidade esterificada do ácido indol acético com a unidade indólica foi verificada pela correlação observada em HMBC (Figura 149) de H-1' \leftrightarrow C2/C-3a. A comparação com dados da literatura (SUGIYAMA et al., 2009) permitiram identificar a Sub **18** como uma substância inédita e nomeada metanoato de 2-hidroxitubila 3-indol.

A estrutura proposta para esta substância foi confirmada após análise por ESI-EM onde há a presença da molécula protonada de m/z 248,1277 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) (Figura 154), e os principais fragmentos m/z 230,1181 $[\text{M}+\text{H}-18]^+$, m/z 176,0707 $[\text{M}+\text{H}-72]^+$ e m/z 130,0649 $[\text{M}+\text{H}-46]^+$, o que associado aos dados de RMN permitiu propor a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_3$.

Figura 149. Principais correlações de COSY e HMBC da substância **18**.

Fonte: Autor

Tabela 30. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 600 MHz) de **18** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	COSY
1	10,92 (<i>sl</i>)	-	*	*
2	7,24 (<i>d</i> ; 2,2 Hz)	123,8	C3a; C7a	H1; H1'
3	-	107,6	-	-
3a	-	127,2	-	-
4	7,49 (<i>d</i> ; 7,8 Hz)	118,4	C6; C7a	*
5	6,97 (<i>t</i> ; 7,6 Hz)	118,3	C7; C3a	*
6	7,07 (<i>t</i> ; 7,6 Hz)	121,0	C5; C7a	*
7	7,34 (<i>d</i> ; 8,0 Hz)	111,3	C5; C3a	*
7a	-	136,2	-	-
1'	3,71 (<i>s</i>)	30,8	C2; C3a	*
2'	-	171,2	-	-
4'	3,62 (<i>m</i>)	67,3	*	Me-4'; Me-5'
Me-4'	0,98 (<i>d</i> ; 6,4 Hz)	18,1	C4'; C5'	H4'
5'	4,68 (<i>m</i>)	73,6	*	Me-5'
Me-5'	1,08 (<i>d</i> ; 6,4 Hz)	15,0	C4'; C5'	H5'

*Sinal não observado

Os derivados indólicos apresentam atividade antioxidante (SUGIYAMA et al., 2009) e anti-inflamatória (RANI; SRIVASTAVA; KUMAR, 2004) na literatura. A maioria dos micro-organismos produz o ácido indol-3-acético (IAA) e seus derivados, apenas na presença do aminoácido triptofano no meio cultivo (CHUNG, K. et al., 2003; MAOR et al., 2004). Sugere-se que os fungos podem produzir IAA para mediar a interação do fungo-planta, na qual altas concentrações de IAA podem inibir a resposta de hipersensibilidade e suprimir a expressão gênica de defesa da planta (MAOR et al., 2004).

Figura 150. Espectro de RMN de ^1H da substância **18** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

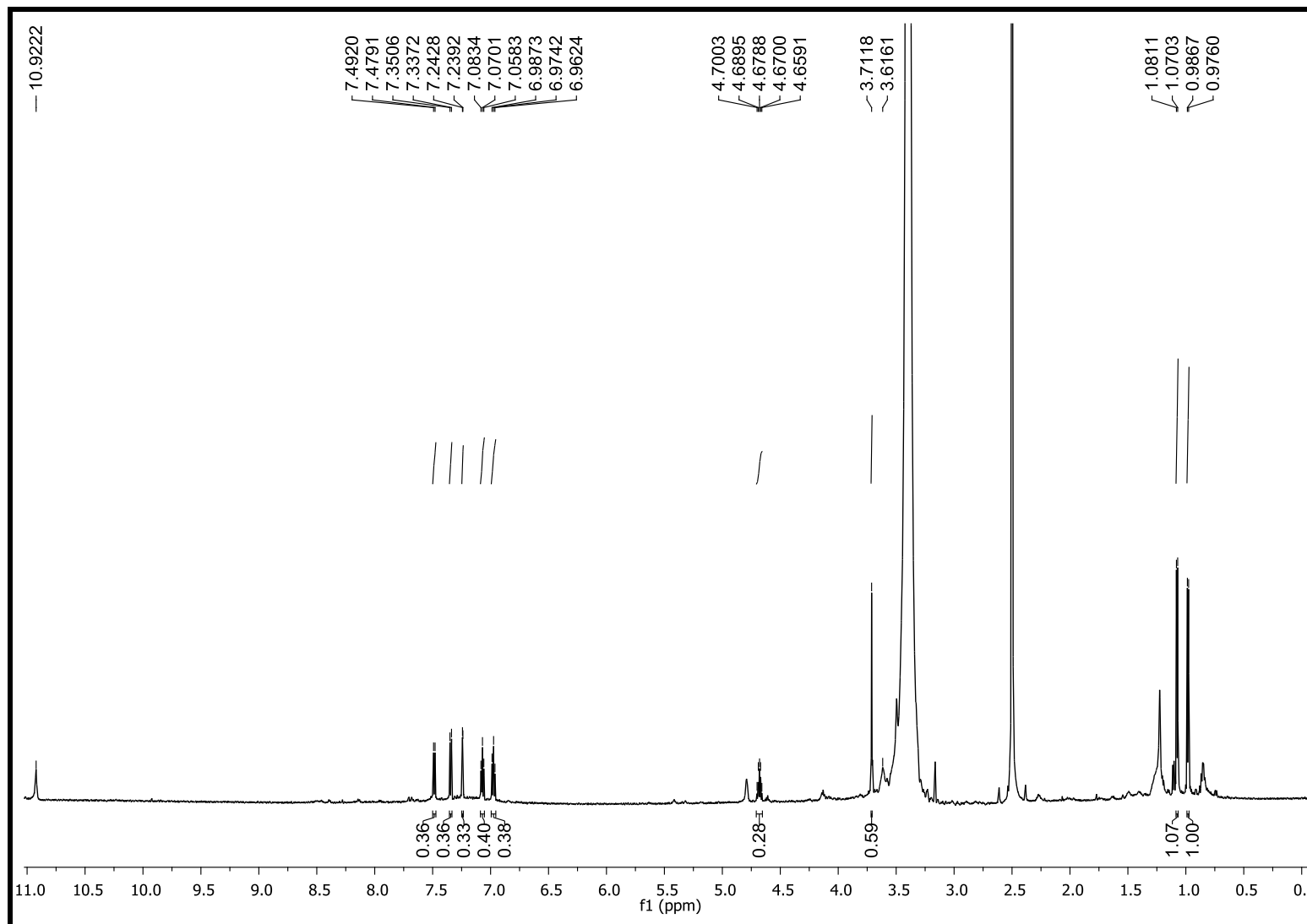


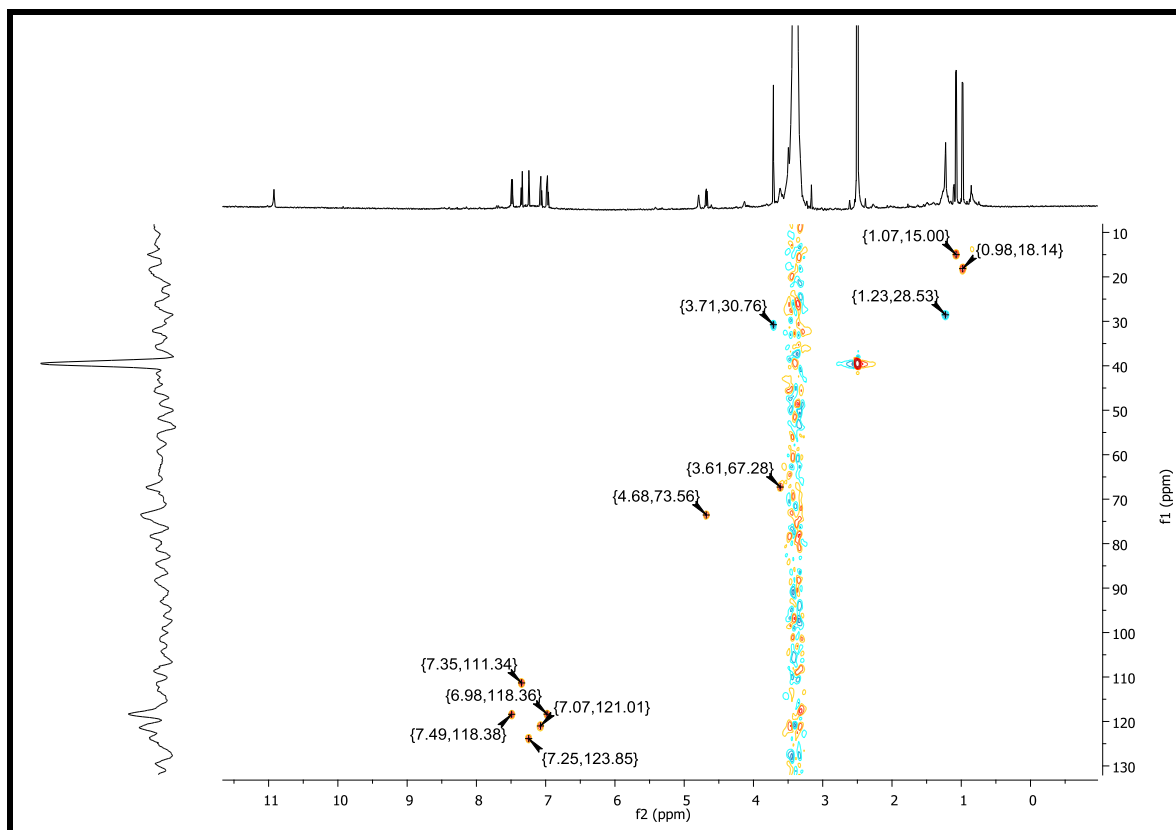
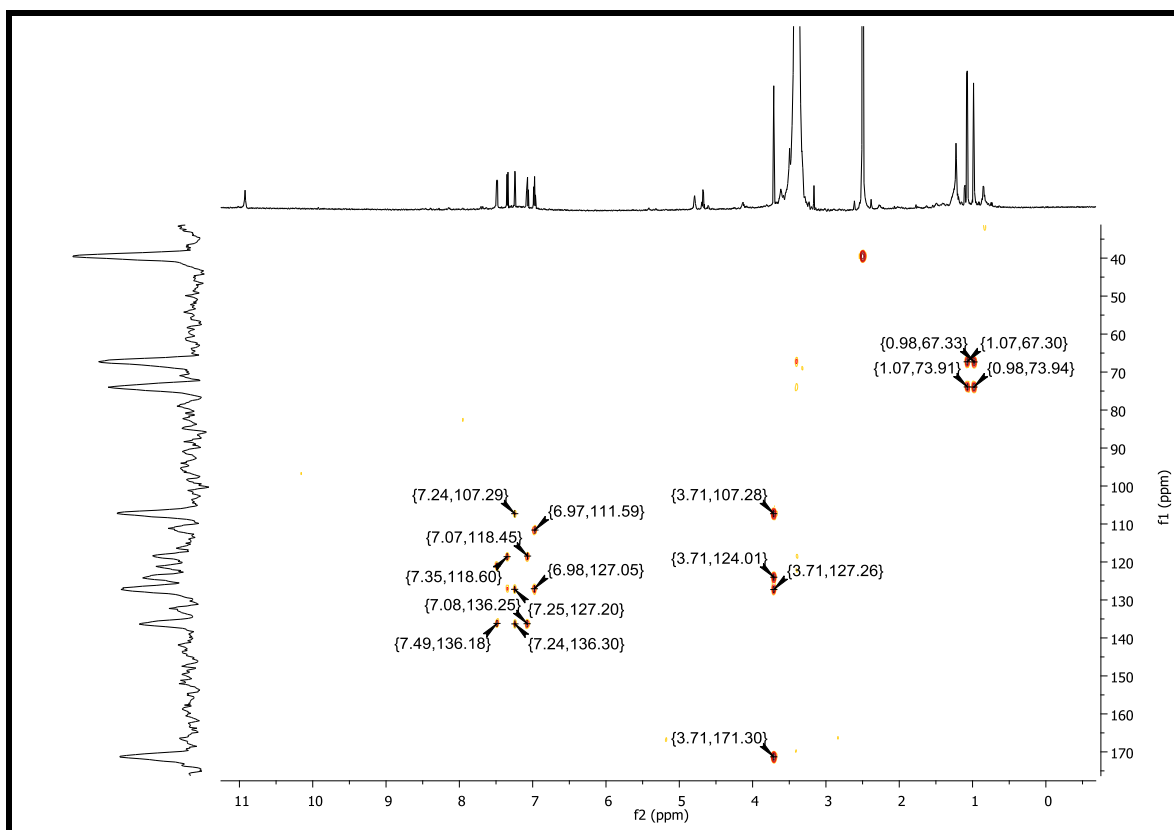
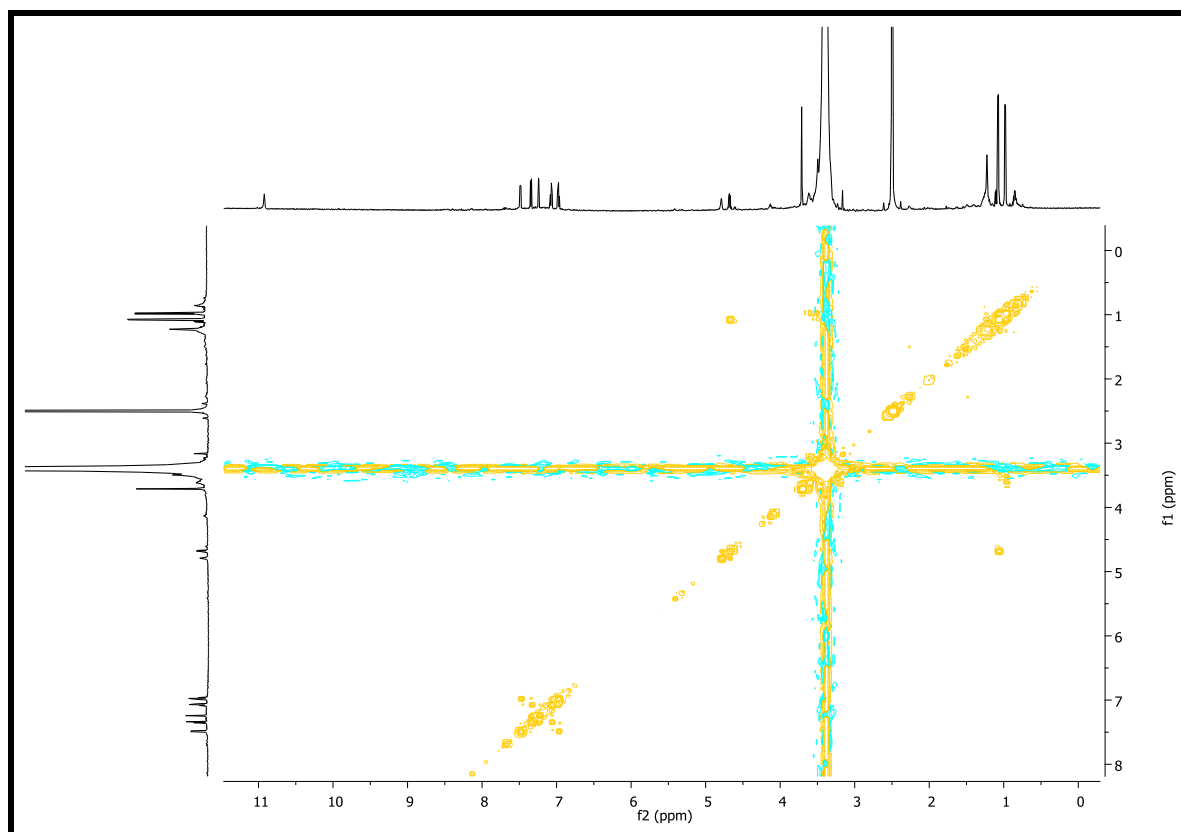
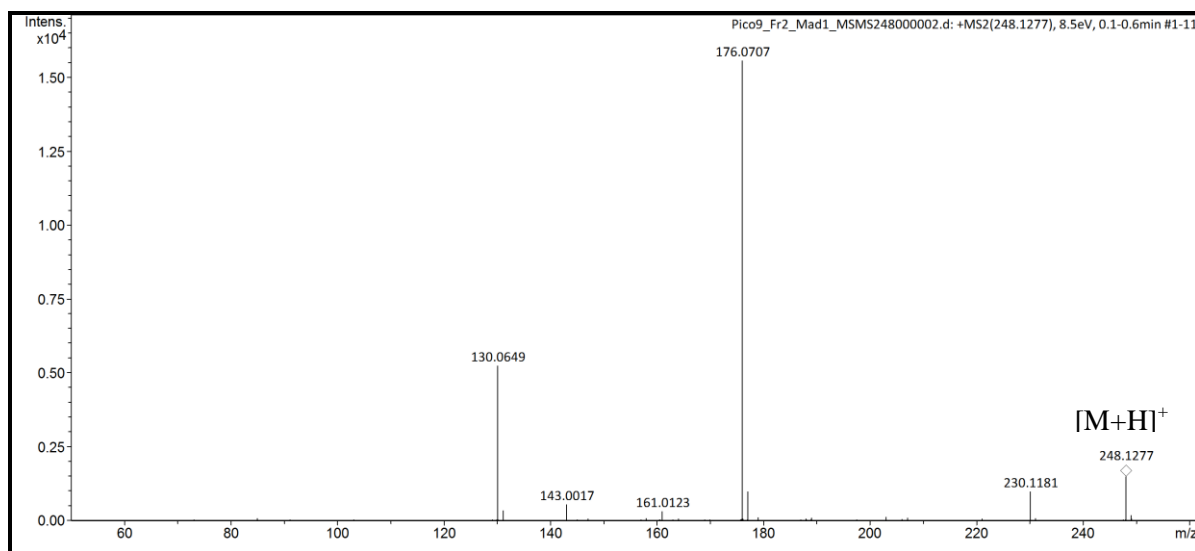
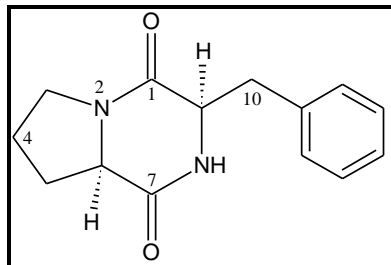
Figura 151. Mapa de contorno de HSQC da substância **18** (DMSO-d₆, 600 MHz).**Figura 152.** Mapa de contorno de HMBC da substância **18** (DMSO-d₆, 600 MHz).

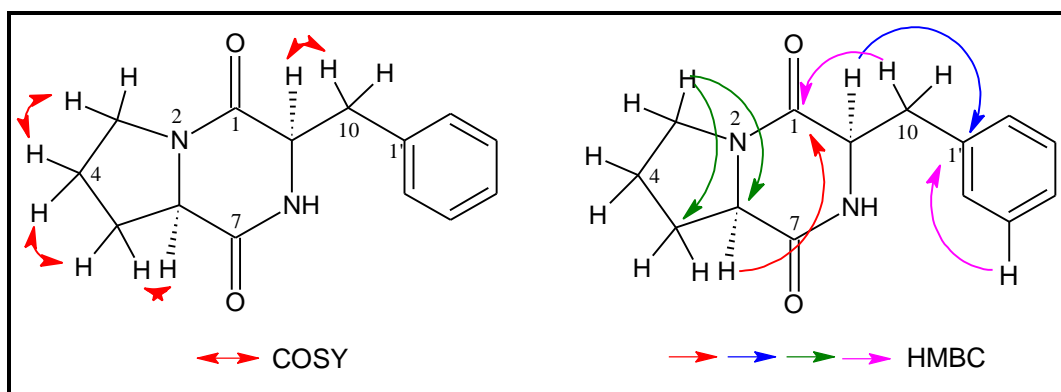
Figura 153. Mapa de contorno de COSY da substância **18** (DMSO-d₆, 600 MHz).**Figura 154.** Espectro de Massas: molécula protonada ($[M+H]^+$) e principais fragmentos da substância **18**.

5.5.6 Identificação estrutural da substância **19****Figura 155.** Estrutura da substância **19** *ciclo*(Pro-Phe).

Fonte: Autor

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 157) e dos mapas de contorno dos experimentos HSQC e HMBC permitiu detectar a presença de hidrogênios em δ_{H} 4,07 (*t*; δ_{C} 58,1), δ_{H} 4,35 (*t*; δ_{C} 55,5) e de duas carbonilas em δ_{C} 169,3 e δ_{C} 165,1 (Tabela 31), característicos de anel dicetopiperazínico. A substância **19** apresentou o mesmo perfil espectroscópico que a Sub **2**, sendo que a única diferença observada foi a substituição do anel aromático. Na Sub **2** visualiza-se a unidade Tirosina (Tyr) e em **19** a Fenilalanina (Phe). As principais correlações de COSY e HMBC, que confirmam a estrutura proposta estão representadas na Tabela 31.

Os dados espectrais foram comparados com a literatura (WANG, G. et al., 2010; BIASETTO, 2011) e permitiram identificar a substância **19** como *ciclo*(Pro-Phe).

Figura 156. Principais correlações de COSY e HMBC da substância **19**.

Fonte: Autor

Tabela 31. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) de **19** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δH	δC	HMBC	COSY
1	-	165,1	-	-
3	3,26 (<i>m</i>)/3,38 (<i>m</i>)	44,3	C4; C5; C6;C7	H4
4	1,72 (<i>m</i>)	21,7	C3; C5; C6	H3; H5
5α	1,40 (<i>m</i>)	27,5	C1; C4; C6	H4; H6
5β	2,00 (<i>m</i>)		C3; C4; C6	H6
6	4,07 (<i>t</i> ; 9,0 Hz)	58,1	C1; C5	H5
7	-	169,3	-	-
8	7,98 (<i>s</i>)	-	-	-
9	4,35 (<i>t</i> ; 5 Hz)	55,5	C10; C1; C1'	H8; H10
10	3,04 (<i>dd</i> ; 5,0 e 13,5 Hz)	35,1	C9; C1'; C7	H9
	3,05 (<i>dd</i> ; 5,2 e 13,5 Hz)		C9; C1'; C7	
1'	-	137,3	-	-
2' e 6'	7,27 (<i>m</i>)	127,1	C1'	*
3' e 5'	7,24 (<i>m</i>)	129,5	C10; C1'	*
4'	7,19 (<i>m</i>)	126,2	C3' e C5'	*

*Sinal não observado

Figura 157. Espectro de RMN de ^1H da substância **19** (DMSO- d_6 , 600 MHz).

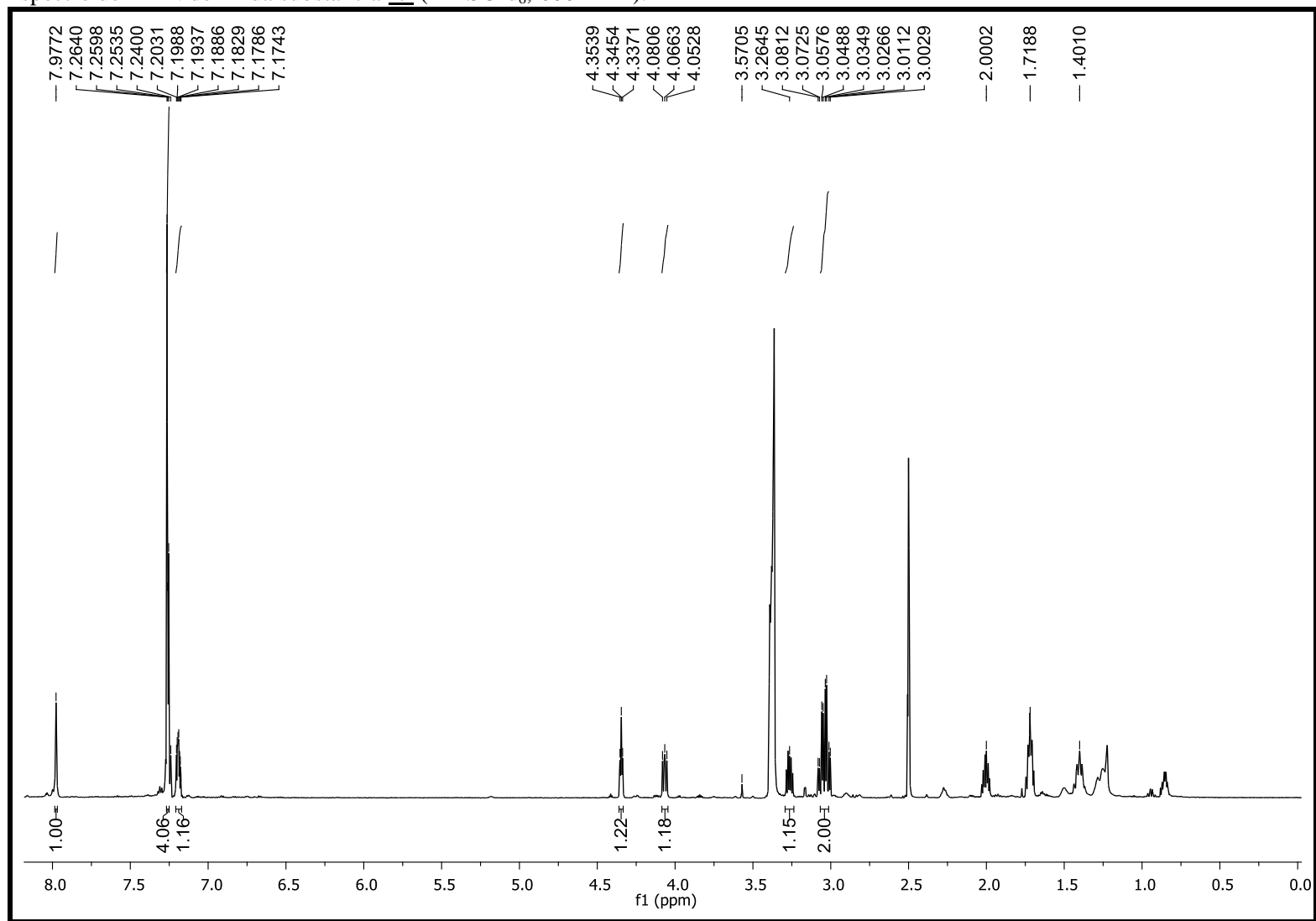


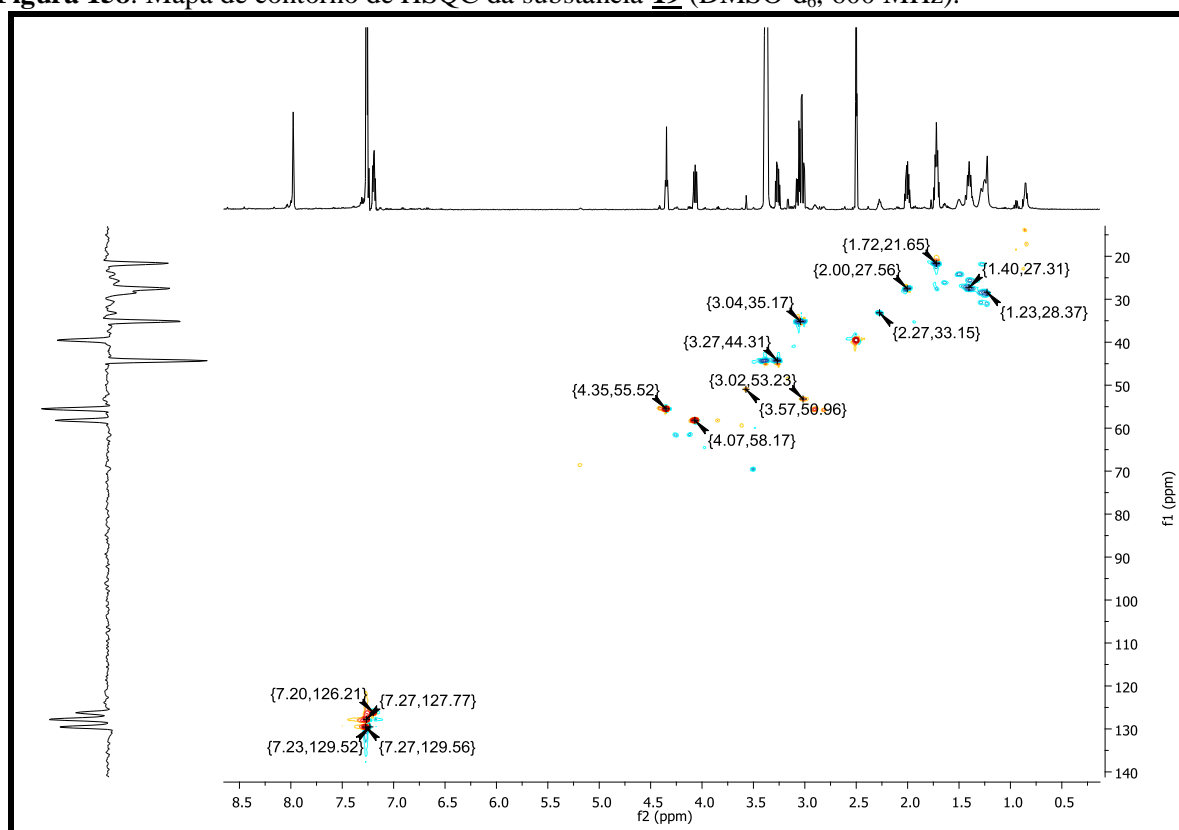
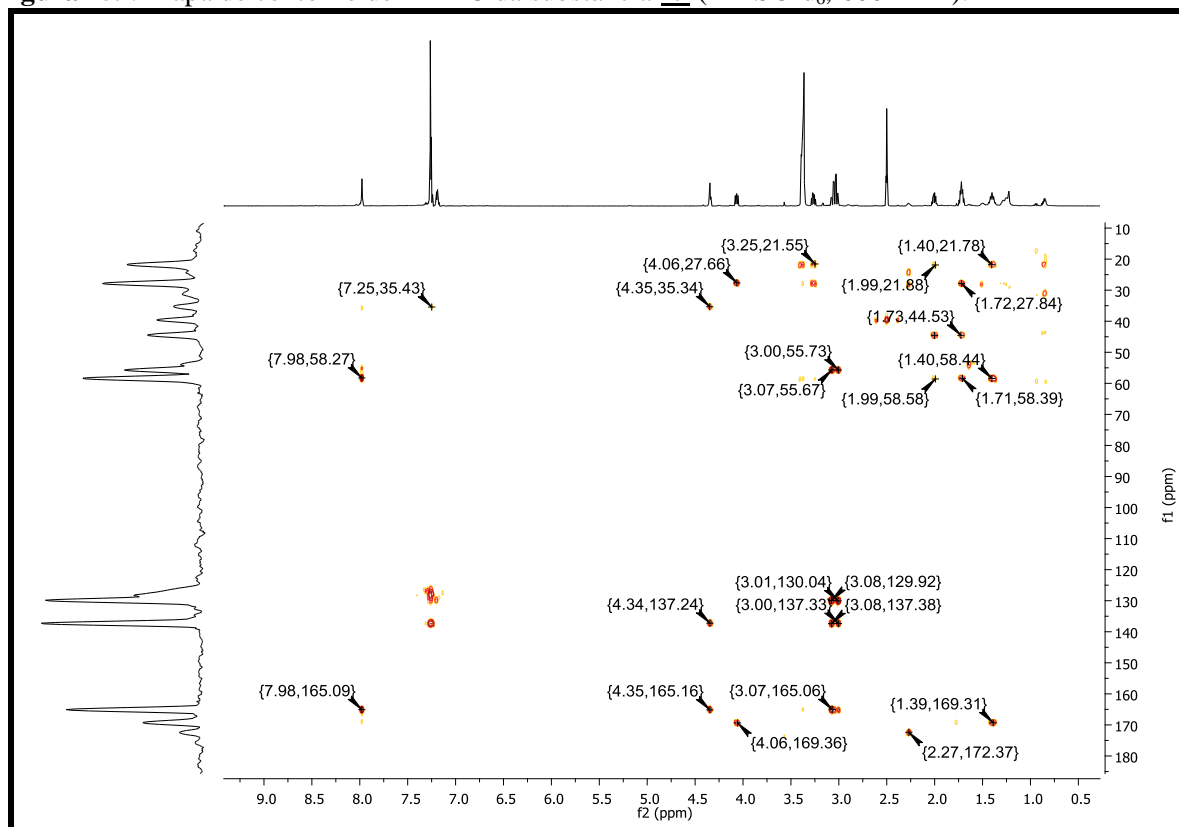
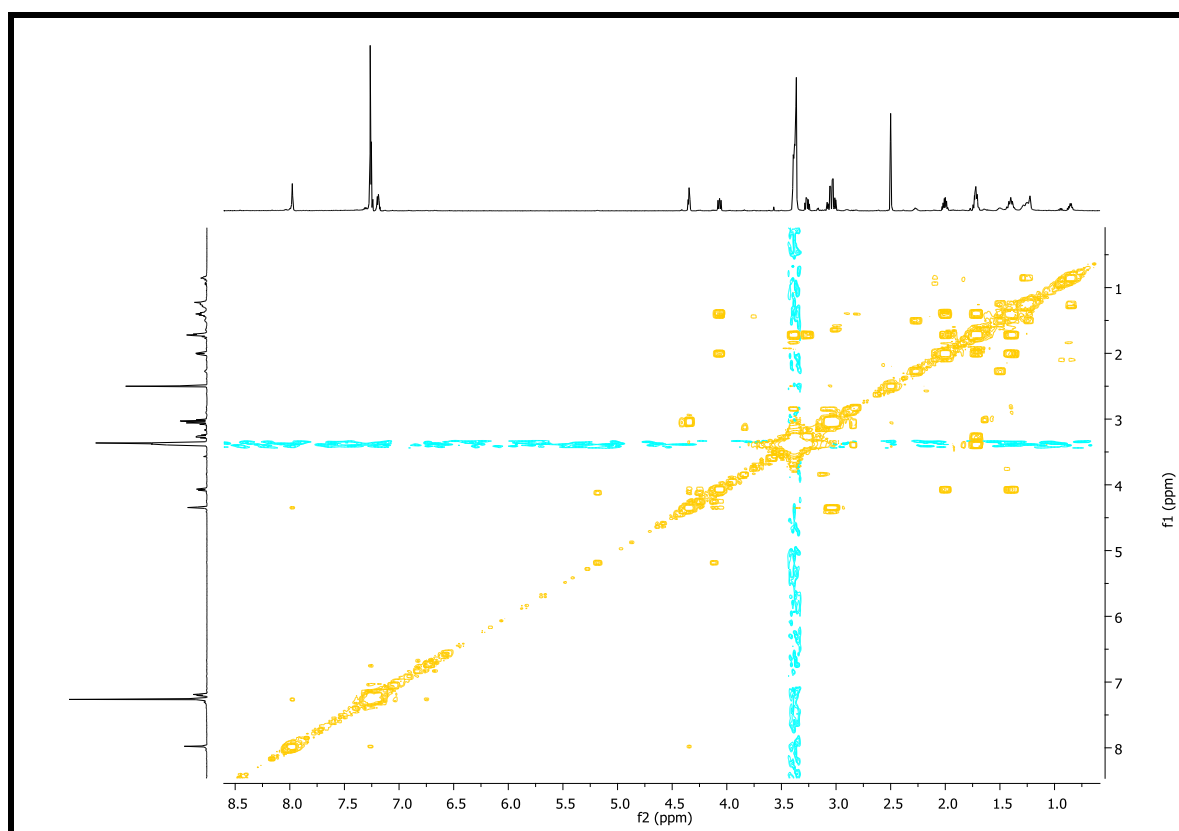
Figura 158. Mapa de contorno de HSQC da substância **19** (DMSO-d₆, 600 MHz).**Figura 159.** Mapa de contorno de HMBC da substância **19** (DMSO-d₆, 600 MHz).

Figura 160. Mapa de contorno de COSY da substância **19** (DMSO-d₆, 600 MHz).

Os endófitos representam um importante reservatório de exclusivas estruturas químicas que foram modificadas através evolução e acredita-se que estão envolvidas na proteção e comunicação com a planta hospedeira (GUNATILAKA, 2006).

*Co-cultivo e Epigenética :
Xylaria cubensis, Diaporthe sp. e Colletotrichum sp.*

6. Co-cultivo e Epigenética: *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp.

Indústrias farmacêuticas, assim como pesquisadores de produtos naturais, dedicam suas investigações pela busca de novas substâncias com potencial biológico. Co-cultivo e epigenética são ferramentas que vem sendo desenvolvidas para a busca de novas substâncias, ativando genes silenciados do sistema fúngico, visando assim à descoberta de novas vias metabólicas (WILLIAMS et al., 2008; GERKE et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2013).

6.1 Co-cultivo: *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp.

O co-cultivo pode ser considerado uma vertente da abordagem OSMAC, pois a competição entre os micro-organismos pode levá-los a produzir novas substâncias ou maximizar/minimizar a produção de substâncias já biossintetizadas.

Conhecendo alguns metabólitos identificados neste trabalho e pelos relatos da literatura, instigou a aplicação desta estratégia com o objetivo avaliar a produção de novos metabólitos pelo co-cultivo em meio sólido (PDA) e líquido (PDB) dos fungos endofíticos *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. (Figura 161), isolados de *Eugenia brasiliensis*.

Figura 161. Co-cultivos realizados entre: *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp.



Fonte: Autor

6.1.1 Co-cultivo em meio sólido (PDA)

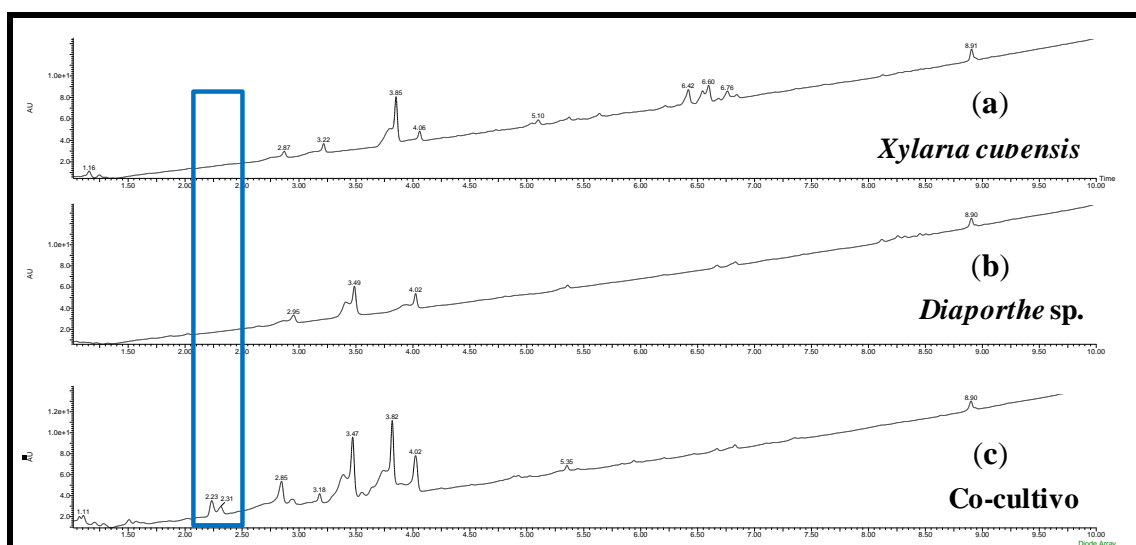
Xylaria cubensis (A), *Diaporthe* sp. (B) e *Colletotrichum* sp. (C) foram cultivados em PDA (placas de Petri) durante 7 dias a 25 °C, seguindo as combinações: A+B, A+C e B+C. Em todos os ensaios realizados, as amostras analisadas foram correspondentes às regiões de micro-extração do co-cultivo (Região 1 e 2) (Figura 22) e ao cultivo das monoculturas fúngicas, como branco.

As análises das micro-extrações do co-cultivo por UPLC-MS evidenciaram a produção de substâncias diferentes somente para o extrato co-cult_Xyl_Diap (A+B) (Figura 162), picos aparentemente inexistentes nos cromatogramas das monoculturas. Com relação aos extratos co-cult_Xyl_Colle (A+C) e co-cult_Diap_Colle (B+C), não foram detectados metabólitos produzidos exclusivamente pela realização do experimento, quando comparados com os extratos dos endófitos isoladamente. Observou-se a intensificação da produção de alguns metabólitos perante outros, quando comparadas as intensidades destes compostos nos cromatogramas adquiridos. Na Tabela 32, está apresentado a média aritmética das massas obtidas nas triplicatas, referentes a cada co-cultivo e as monoculturas.

Tabela 32. Massa dos extratos brutos obtida dos co-cultivos e monoculturas (PDA) dos endófitos *X. cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp.

Extratos	Massa (mg)
Co-cult_Xyl_Diap	0,20
Co-cult_Xyl_Colle	0,27
Co-cult_Diap_Colle	0,23
<i>Xylaria cubensis</i>	0,10
<i>Diaporthe</i> sp.	0,20
<i>Colletotrichum</i> sp.	0,27

A análise do cromatograma do co-cultivo entre *Xylaria cubensis* e *Diaporthe* sp. (Figura 162), evidenciou dois picos em 2,21 e 2,31 minutos, inexistentes nos cromatogramas dos extratos controles. Este co-cultivo demonstrou atividade moderada frente ao fitopatógeno *C. cladosporioides*.

Figura 162. Cromatogramas dos extratos de: *Xylaria cubensis* (a), *Diaporthe* sp. (b) e co-cultivo (c).

Para confirmar este resultado, realizou-se LC-MS para verificar as massas correspondentes às bandas cromatográficas. As relações massa/carga encontradas foram m/z 497 e 543 no modo negativo, entre 2,31-2,44 minutos no cromatograma avaliado.

Com o processamento do cromatograma de íons extraídos para m/z 497 e 543, constatou-se novamente a ausência destes íons em ambos os controles fúngicos, sendo que a detecção dos íons ocorreu apenas no extrato de co-cultivo (Figura 163 e 164).

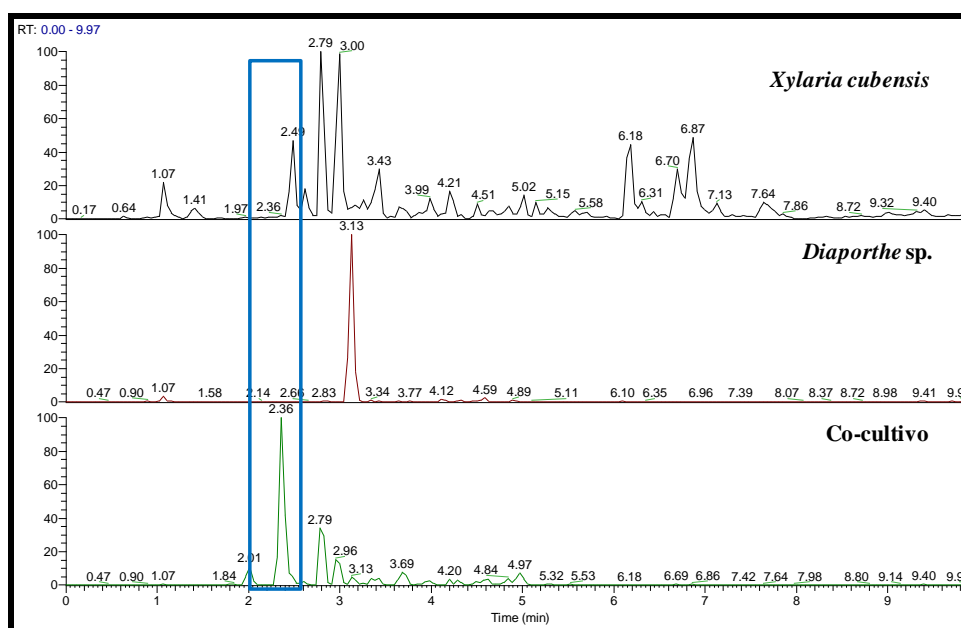
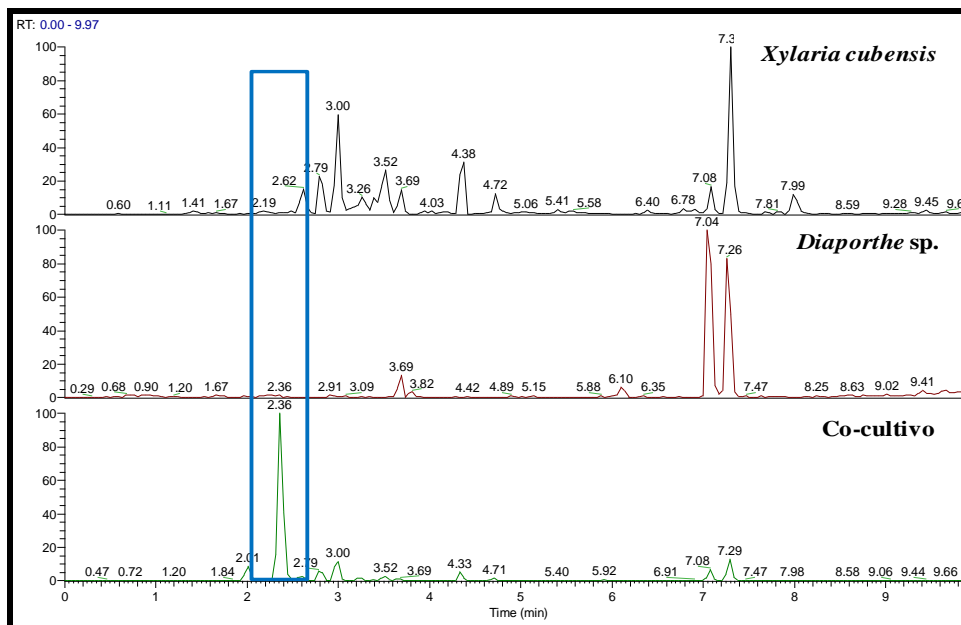
Figura 163. Cromatogramas de íons extraídos para m/z 497-498 (-) dos extratos de: *Xylaria cubensis* (a), *Diaporthe* sp. (b) e co-cultivo (c).

Figura 164. Cromatogramas de íons extraídos para m/z 543-544 (-) dos extratos de: *Xylaria cubensis* (a), *Diaporthe* sp. (b) e co-cultivo (c).



Posteriormente, realizou-se o crescimento deste co-cultivo em escala ampliada e após a obtenção do extrato bruto, este foi submetido ao fracionamento em HPLCprep para isolar as substâncias de interesse, ou seja, produzidas somente em co-cultivo. O isolamento não foi satisfatório, sendo assim utilizou-se a derreplicação como estratégia para identificar os metabólitos. O extrato foi submetido a LC-MS/MS e consultas ao banco AntiBase2012.

A análise dos espectros de massas de alta resolução, modo negativo, indicou substâncias com m/z 497,2776 $[M-H]^-$ e m/z 543,2831 $[M-H]^-$ (Figura 165). Então realizou-se uma busca nos bancos de dados, sugerindo 14 estruturas para m/z 497,2776 $[M-H]^-$ e 15 propostas para m/z 543,2831 $[M-H]^-$ pelo banco AntiBase2012. Bancos de dados como Massbank, Chemspider e Metlin propuseram outras estruturas químicas. Algumas estruturas propostas pelos bancos de dados (AntiBase) estão nas Figuras 166 e 167.

Figura 165. Espectro de massas (alta resolução), referente aos picos produzidos pelo co-cultivo e propostas de fórmulas moleculares.

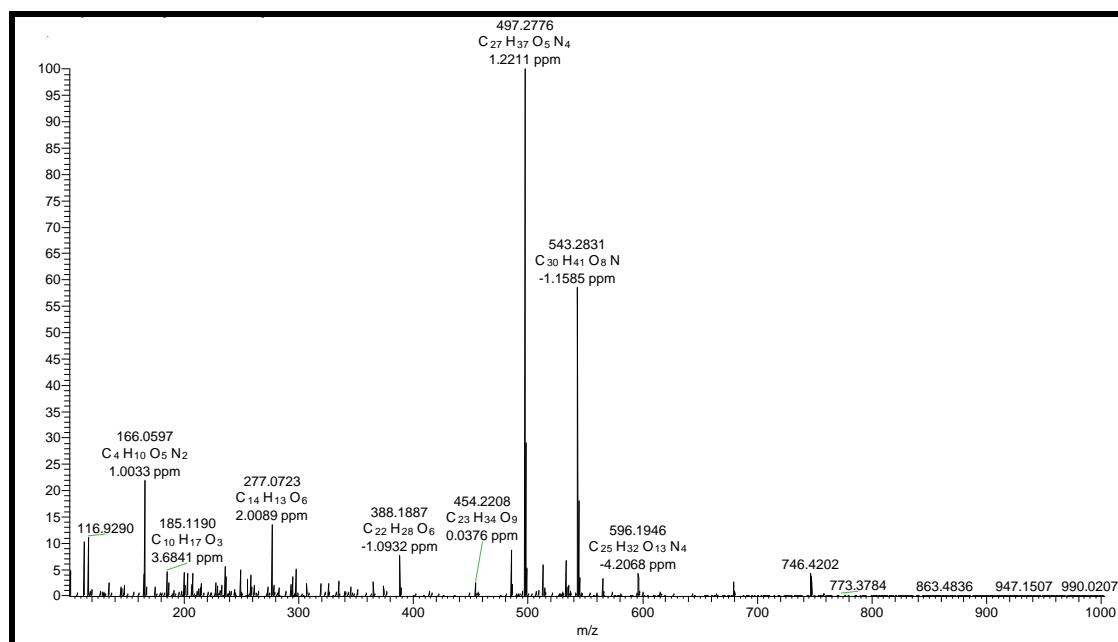
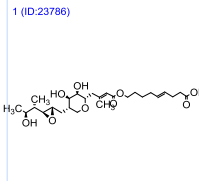
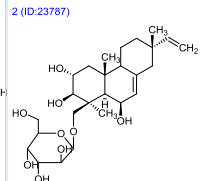
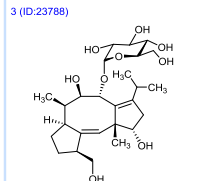
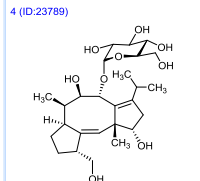
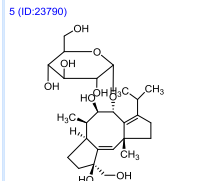
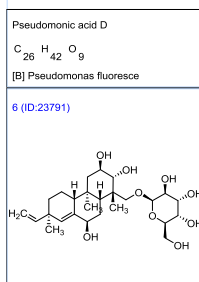
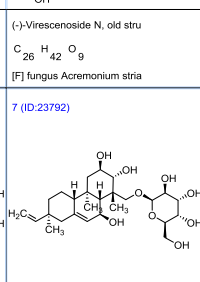
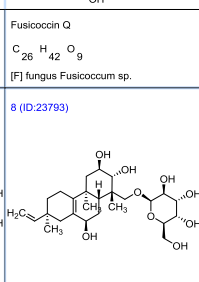
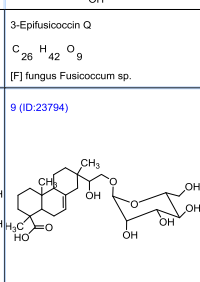
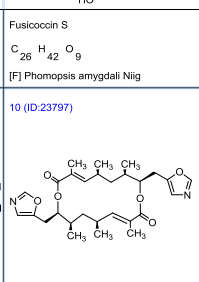
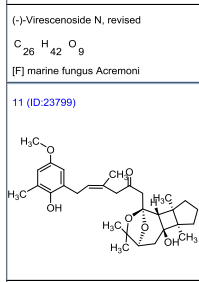
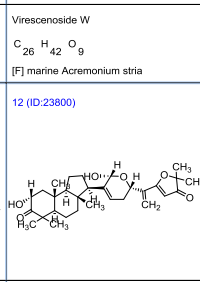
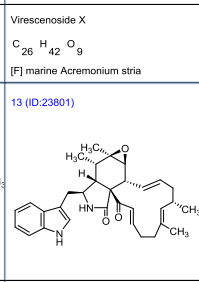
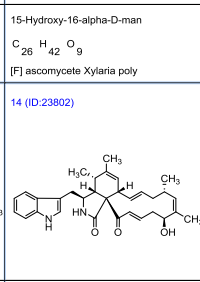


Figura 166. Propostas geradas pelo banco AntiBase aos metabólitos de m/z 497,2776 [M-H].

<p>1 (ID:23786)</p>  <p>Pseudomonic acid D C₂₆ H₄₂ O₉ [B] Pseudomonas fluoresce</p>	<p>2 (ID:23787)</p>  <p>(-)-Viresenoside N, old stru C₂₆ H₄₂ O₉ [F] fungus Acremonium stria</p>	<p>3 (ID:23788)</p>  <p>Fusiococcin Q C₂₆ H₄₂ O₉ [F] fungus Fusiococcin sp.</p>	<p>4 (ID:23789)</p>  <p>3-Epifusiococcin Q C₂₆ H₄₂ O₉ [F] fungus Fusiococcin sp.</p>	<p>5 (ID:23790)</p>  <p>Fusiococcin S C₂₆ H₄₂ O₉ [F] Phomopsis amygdali Niig</p>
<p>6 (ID:23791)</p>  <p>(-)-Viresenoside N, revised C₂₆ H₄₂ O₉ [F] marine fungus Acremoni</p>	<p>7 (ID:23792)</p>  <p>Viresenoside W C₂₆ H₄₂ O₉ [F] marine Acremonium stria</p>	<p>8 (ID:23793)</p>  <p>Viresenoside X C₂₆ H₄₂ O₉ [F] marine Acremonium stria</p>	<p>9 (ID:23794)</p>  <p>15-Hydroxy-16-alpha-D-man C₂₆ H₄₂ O₉ [F] ascomycete Xylaria poly</p>	<p>10 (ID:23797)</p>  <p>Conglobatin C₂₈ H₃₈ N₂ O₆ [B] Streptomyces conglobatu</p>
<p>11 (ID:23799)</p>  <p>cis-Strictaketol C₃₀ H₄₂ O₆ [A] Marine brown algae (Cys</p>	<p>12 (ID:23800)</p>  <p>Sodagnitin-A C₃₀ H₄₂ O₆ [F] (basidiomycete) Cortinari</p>	<p>13 (ID:23801)</p>  <p>Prochaetoglobosin-IV C₃₂ H₃₈ N₂ O₃ [F] Chaetomium subaffine +</p>	<p>14 (ID:23802)</p>  <p>Chaetoglobosin T C₃₂ H₃₈ N₂ O₃ [F] Chaetomium globosum</p>	

Fonte: AntiBase

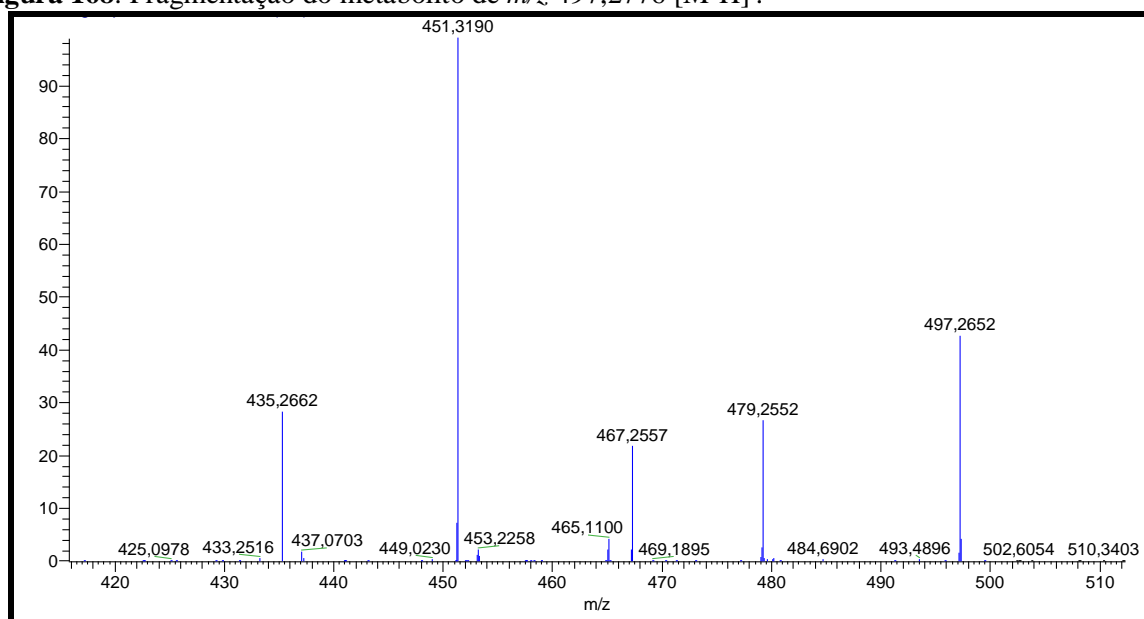
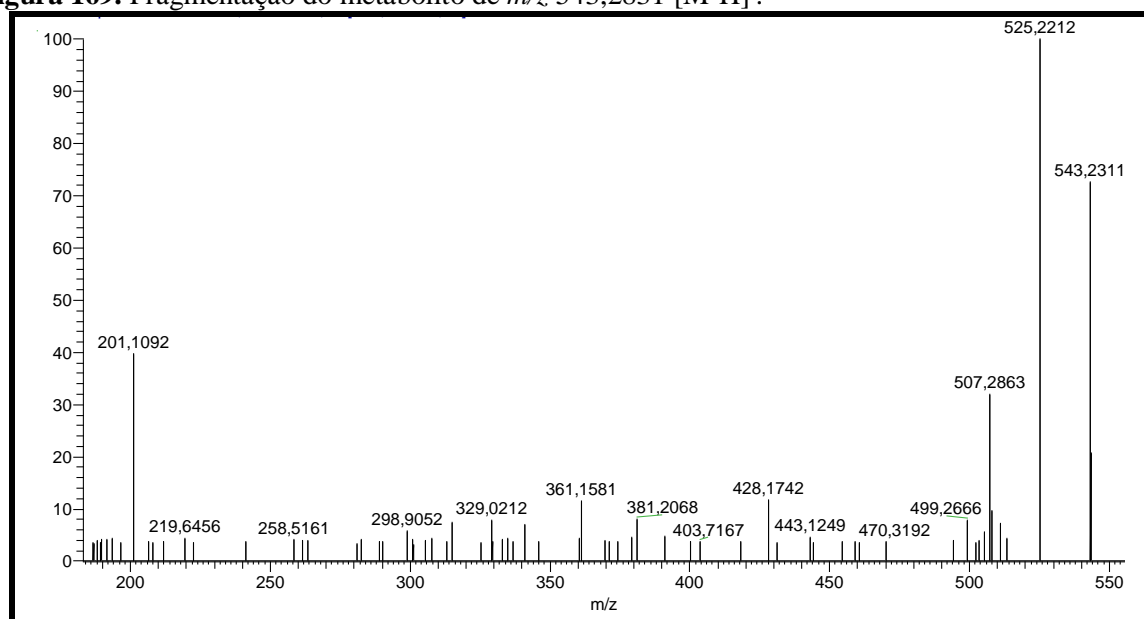
Figura 167. Propostas geradas pelo banco AntiBase aos metabólitos de m/z 543,2831 $[M-H]^-$.

26/Feb/2015 15:30:59 O:\SOFTWARE\ACD ANTIBASE\ANTIASE2012NEW.CFD Page: 1(1)

1 (ID:25886)	2 (ID:25891)	3 (ID:25892)	4 (ID:25893)	5 (ID:25894)
Guadinomine D C ₂₂ H ₄₀ N ₈ O ₈ [B] <i>Streptomyces</i> sp. K01-0	15-Desmethylnacbecin C ₂₉ H ₄₀ N ₂ O ₈ [B] <i>Actinosynnema pretiosu</i>	Deoxy-dihydroxylamlydocin C ₂₈ H ₄₀ N ₄ O ₇	Pyrocystis luciferin C ₃₁ H ₃₆ N ₄ O ₅ [D] <i>Pyrocystis fusiformis</i>	DKxanthene 544 C ₃₁ H ₃₆ N ₄ O ₅ [M] <i>Myxococcus xanthus</i>
6 (ID:25895)	7 (ID:25896)	8 (ID:25897)	9 (ID:25898)	10 (ID:25899)
Difficidin C ₃₁ H ₄₅ O ₆ P [B] <i>Bacillus subtilis</i>	iso-Difficidin C ₃₁ H ₄₅ O ₆ P [B] <i>Bacillus subtilis</i>	Difficidin thermoisomer C ₃₁ H ₄₅ O ₆ P [B] <i>Bacillus subtilis</i> mb3575/	Methyl ganoderate M C ₃₁ H ₄₄ O ₈ [F] <i>Ganoderma lucidum</i>	Methyl ganoderate N C ₃₁ H ₄₄ O ₈ [F] <i>Ganoderma lucidum</i>
11 (ID:25900)	12 (ID:25901)	13 (ID:25902)	14 (ID:25903)	15 (ID:25904)
30-Hydroxymilbemycin-a3 C ₃₁ H ₄₄ O ₈ [B] <i>Amicolata autotrophica</i> s	5-O-Demethyl-28-deoxy-6,2 C ₃₁ H ₄₄ O ₈ [B] <i>Streptomyces libani</i> libani	4a-Hydroxymilbemycin a1; M C ₃₁ H ₄₄ O ₈ [B] <i>Streptomyces</i> sp. ksb-19	14,15-Epoxy milbemycin A3 C ₃₁ H ₄₄ O ₈ [B] <i>Streptomyces libani</i> libani	Elfvingic acid H Me ester C ₃₁ H ₄₄ O ₈ [F] fungus <i>Elfvingia applanat</i>

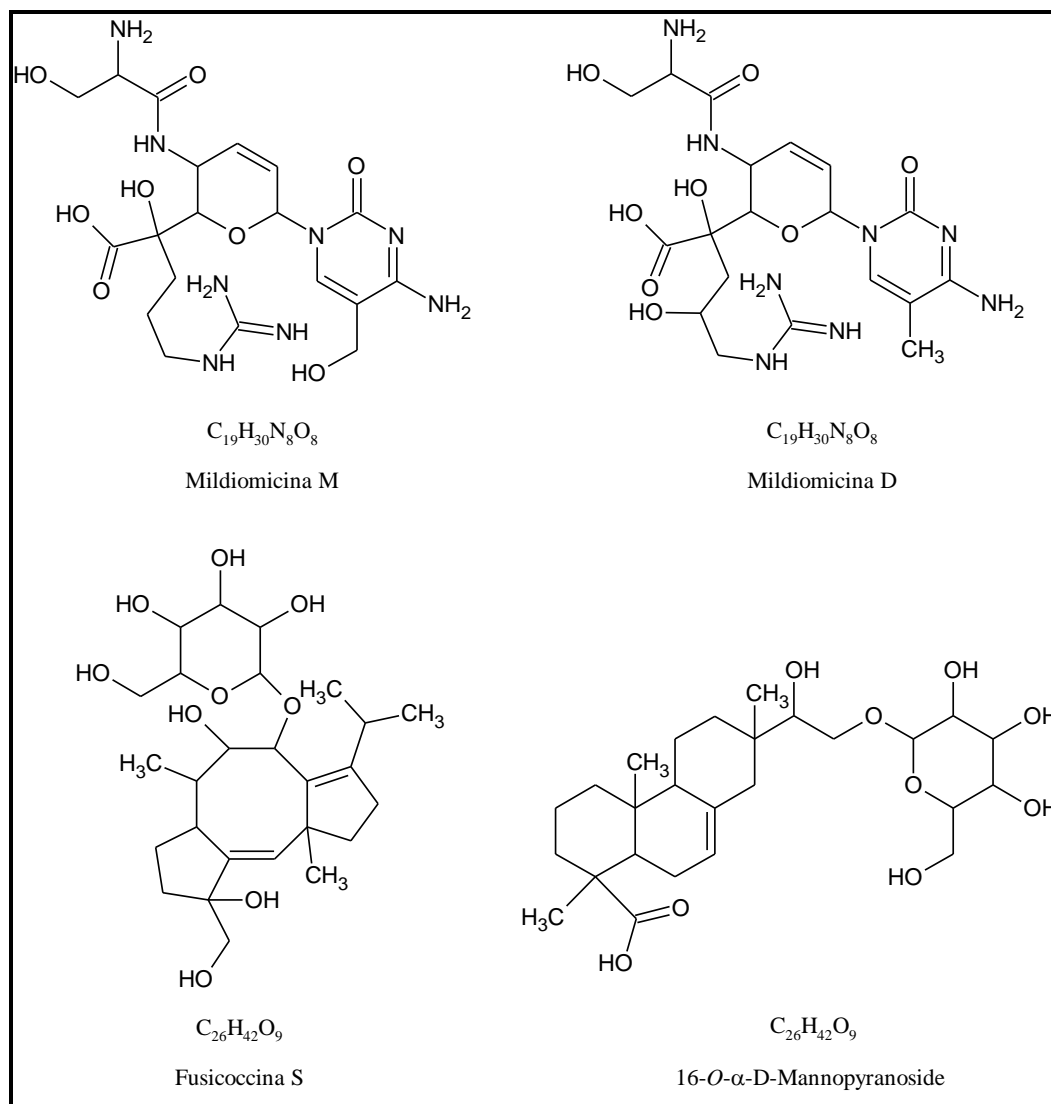
Fonte: AntiBase

O extrato bruto co-cult_Xyl_Diap foi submetido a infusão direta para fragmentação de m/z 497,2776 $[M-H]^-$ e m/z 543,2831 $[M-H]^-$. Para m/z 497,2776 $[M-H]^-$ observou-se os principais fragmentos em m/z 479,2652 $[M-H-18]^-$, m/z 451,3190 $[M-H-28]^-$ e m/z 435, 2662 $[M-H-16]^-$ (Figura 168). Para m/z 543,2831 $[M-H]^-$ observou-se os principais fragmentos em m/z 525,2212 $[M-H-18]^-$, m/z 507,2863 $[M-H-18]^-$ e m/z 499, 2666 $[M-H-44]^-$ (Figura 169).

Figura 168. Fragmentação do metabólito de m/z 497,2776 [M-H].**Figura 169.** Fragmentação do metabólito de m/z 543,2831 [M-H].

No Dicionário de Produtos Naturais foi realizado uma busca pela massa molecular na faixa entre 498 e 499 g mol^{-1} , aonde foi possível correlacionar com os endófitos envolvidos no co-cultivo, resultando assim em 4 prováveis substâncias (Figura 170).

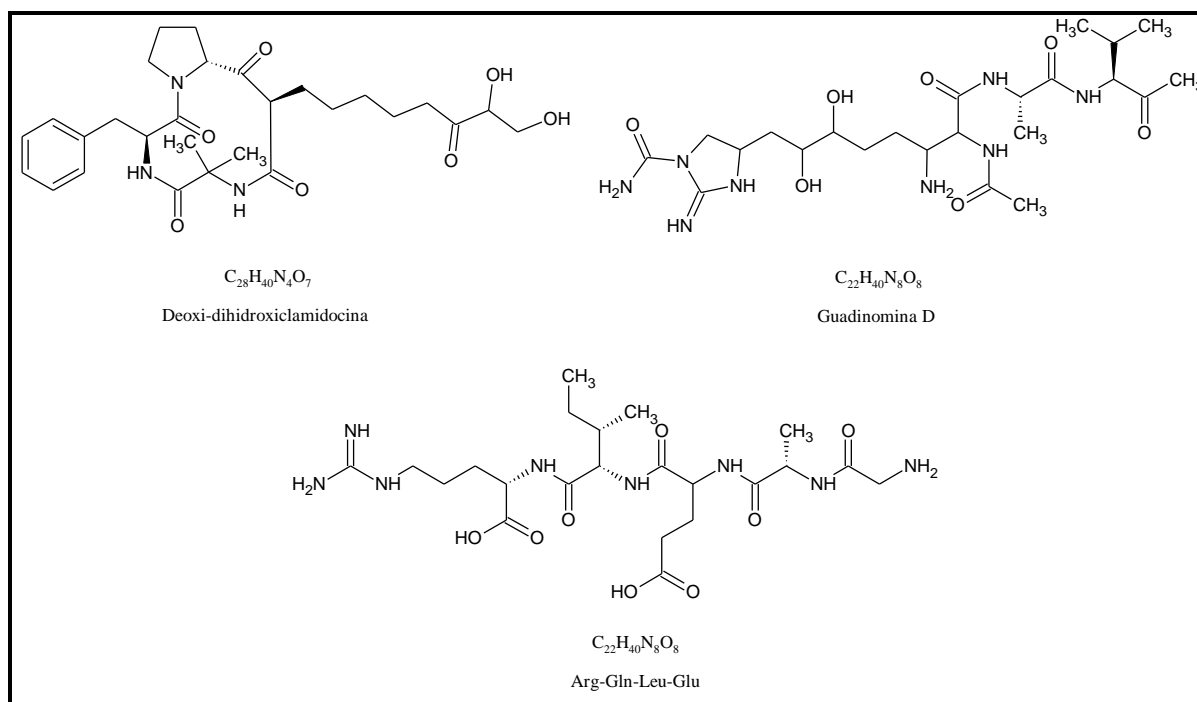
Figura 170. Propostas geradas pelo Dicionário de Produtos Naturais aos metabólitos com a massa molecular na faixa de 498 a 499 g mol⁻¹.



Fonte: Dicionário de Produtos Naturais

A busca pela massa molecular 544,2831 g mol⁻¹, no Banco de Dados Metlin e Massbank, e correlacionando com os principais fragmentos, sugeriu 3 prováveis estruturas químicas (Figura 171).

Figura 171. Propostas geradas pelos Bancos de Dados Metlin e Massbank aos metabólitos de m/z 543,2831 $[M-H]^-$.



Fonte: Bancos de Dados Metlin e Massbank

Analisando as prováveis substâncias sugeridas pelos bancos de dados, é possível indicar algumas moléculas, pelos fragmentos obtidos. Como por exemplo, para a m/z 497,2776 $[M-H]^-$, é possível sugerir a classe de metabólitos das Mildiomycinas M e D, pois nestas moléculas observou-se a perda de uma molécula de água, carbonila, amina, corroborando com os principais fragmentos obtidos no co-cultivo. Para a m/z 543,2831 $[M-H]^-$, é possível sugerir a classe de metabólitos das Deoxy-dihydroxiclamidocina, Guadinomina D e Arg-Gln-Leu-Glu, pois nestas moléculas observou-se a perda de duas moléculas de água e de uma amida. Desta maneira, corrobora com os principais fragmentos obtidos no co-cultivo.

6.1.1.1 Análise multivariada dos dados de LC-MS do co-cultivo em PDA

Os extratos brutos dos co-cultivos em duplicatas (1 mg mL^{-1}) foram analisados por LC-MS (ESI), modo negativo, com o objetivo de comparar estatisticamente a produção metabólica dos co-cultivos, com as monoculturas e com o branco (extrato somente do meio de cultivo PDA).

Os dados foram tratados estatisticamente, utilizando o software MATLAB (versão 8.3.0.532), com a ferramenta PLS-DA (Análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais). Esta consiste em uma técnica de classificação

supervisionada que pode ser utilizada para melhorar a separação das amostras entre classes (WISHART, 2008).

A matriz foi normalizada, com o intuito de remover variações sistemáticas das amostras e centrada na média, para que as coordenadas fiquem no centro dos dados. Então a PLS-DA foi aplicada, gerando gráficos de *scores* da PLS-DA (Figuras 172 e 173).

Figura 172. Gráfico de *scores* da PLS-DA normalizado e centrado na média: PC1xPC2.

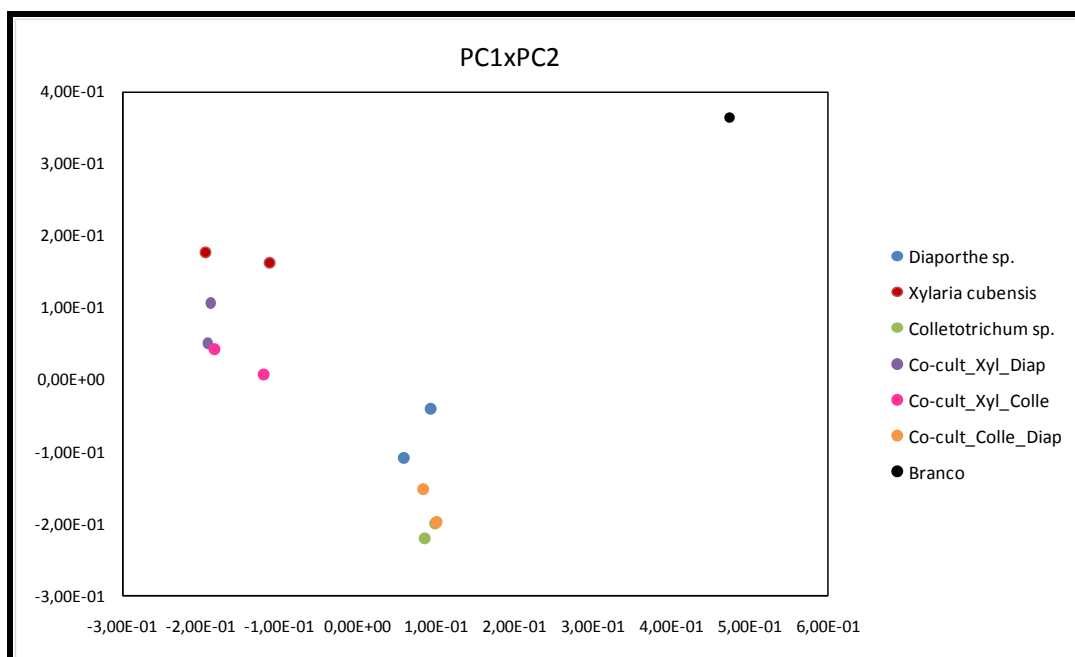
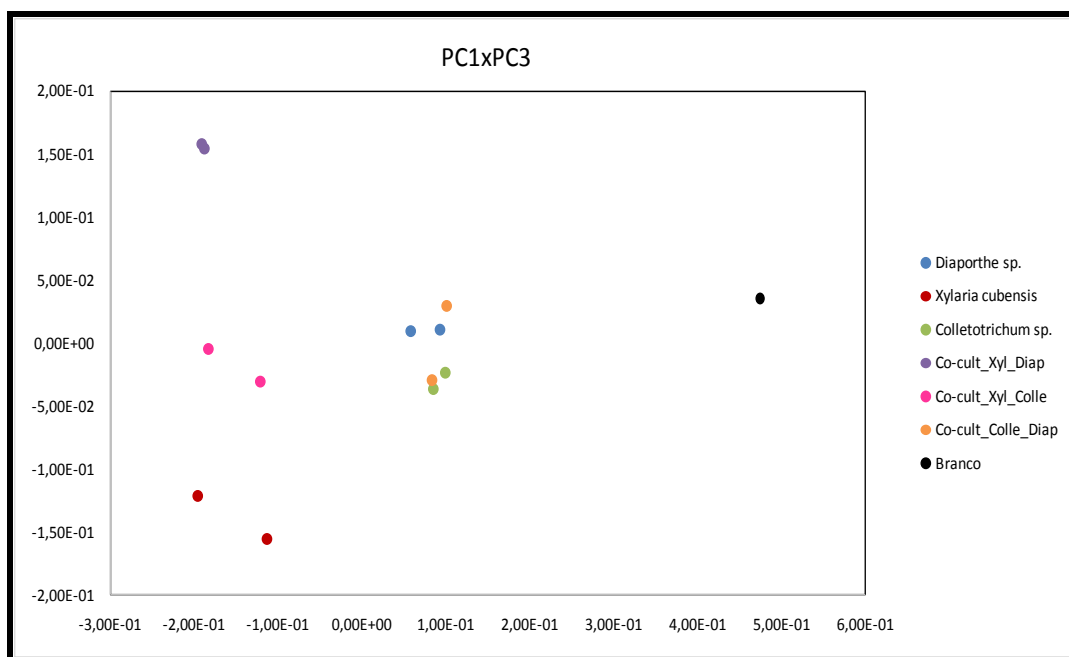


Figura 173. Gráfico de *scores* da PLS-DA normalizado e centrado na média: PC1xPC3.



Nos gráficos de *scores* da PLS-DA, utilizando PC1xPC2 e PC1xPC3 (componentes principais), pode-se observar evidentemente uma boa separação das classes. Além disso, é possível observar: a) o branco distanciou-se das amostras, indicando que as monoculturas e os co-cultivos produzem metabólitos distintos do branco; b) duplicatas localizam-se próximas uma das outras, indicando reprodutibilidade das mesmas e c) o extrato co-cult_Colle_Diap apresenta características similares às monoculturas correspondentes, o que é verificado pela proximidade e sobreposição entre os dados.

Os resultados obtidos pelo *scores* da PLS_DA demonstraram que o co-cultivo das linhagens envolvidas, produziu metabólitos diferentes, quando comparados com a produção das monoculturas.

6.1.2 Co-cultivo em meio líquido (PDB)

Xylaria cubensis (A), *Diaporthe* sp. (B) e *Colletotrichum* sp. (C) foram primeiramente cultivados em PDA (placas de Petri) durante 10 dias a 25 °C. Posteriormente aproximadamente um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado em meio líquido (PDB), seguindo as combinações: A+B, A+C e B+C em triplicatas. Ao mesmo tempo cultivou os três endófitos separadamente, como branco. A metodologia de crescimento e extração foi a mesma utilizada no item 3.2.2.

Na Tabela 33, está apresentado a média aritmética das massas obtidas nas triplicatas, referentes a cada co-cultivo e as monoculturas.

Tabela 33. Massa dos extratos brutos obtida dos co-cultivos e monoculturas (PDB) dos endófitos *X. cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp.

Extratos	Massa (mg)
Co-cult_Xyl_Diap	115,6
Co-cult_Xyl_Colle	107,8
Co-cult_Diap_Colle	33,0
Co-cult_Xyl_Diap_Colle	137,1
<i>Xylaria cubensis</i>	117,7
<i>Diaporthe</i> sp.	45,5
<i>Colletotrichum</i> sp.	32,9

6.1.2.1 Atividade biológica do co-cultivo em meio líquido (PDB)

Os extratos dos co-cultivos em PDB apresentaram atividades significativas tanto para o ensaio frente aos fitopatógenos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* quanto à inibição da enzima acetilcolinesterase (Tabela 34). Os extratos apresentaram uma atividade frente ao fitopatógeno *C. cladosporioides* tão extraordinária, que foi necessário realizar o ensaio novamente utilizando metade da concentração (200 ug) usual para este ensaio. E mesmo para a concentração de 200 ug, demonstraram uma alta atividade fitopatógena.

Os padrões positivos utilizados para comparação foram a nistatina (5ug 5uL⁻¹) e fisostigmina (0,05ug 2,5uL⁻¹), respectivamente.

Tabela 34. Avaliação dos extratos dos co-cultivos frente aos fitopatógenos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (400 ug) e inibição da AChE.

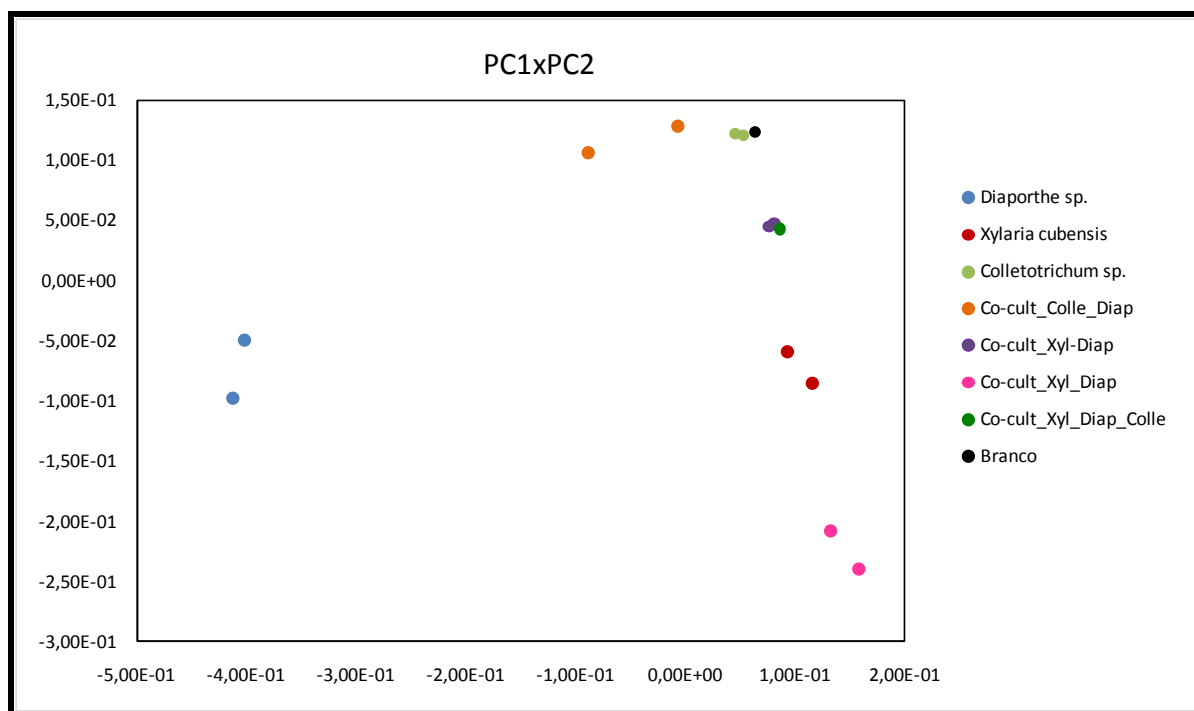
Extratos brutos	<i>C.</i> <i>cladosporioides</i>	<i>C.</i> <i>sphaerospermum</i>	Anticolinesterásica
Co-cult_Xyl_Diap	***	*/**/**	*
Co-cult_Xyl_Colle	***	*	*
Co-cult_Diap_Colle	***/**	*/**/**/**/**	*/**
Co-cult_Xyl_Diap_Colle	***/**/**	*/**	*
<i>Xylaria cubensis</i>	***	**	*
<i>Diaporthe</i> sp.	***	***/**	*/**
<i>Colletotrichum</i> sp.	***	***/**	**
Padrão	***	***	***

* fraca ** intermediária *** forte atividade

6.1.2.2 Análise multivariada dos dados de LC-MS do co-cultivo em PDB

Os extratos brutos dos co-cultivos em duplicata (1 mg mL⁻¹) foram analisados por LC-MS (ESI), modo positivo, com o objetivo de comparar estatisticamente a produção metabólica dos co-cultivos, com as monoculturas e com o branco (extrato somente do meio de cultivo PDB).

Os dados foram tratados estatisticamente, utilizando o software MATLAB (versão 8.3.0.532), com a ferramenta PLS-DA. A matriz foi normalizada, com o intuito de remover variações sistemáticas das amostras e centrada na média, para que as coordenadas fiquem no centro dos dados. Então a PLS-DA foi aplicada, gerando gráficos de *scores* da PLS-DA (Figura 174).

Figura 174. Gráfico de scores da PLS-DA normalizado e centrado na média: PC1xPC2.

Nos gráficos de *scores* da PLS-DA, utilizando PC1xPC2 (componentes principais), pode-se observar evidentemente uma boa separação das classes. Além disso, é possível observar: a) o branco distanciou-se das amostras, exceto do extrato de *Colletotrichum* sp. indicando que a produção desta monocultura pode conter substâncias presente no branco; b) duplicatas localizam-se próximas uma das outras, indicando reprodutibilidade das mesmas e c) o extrato co-cult_Colle_Diap apresenta características similares a monocultura de *Colletotrichum* sp.; d) o extrato co-cult_Xyl_Diap_Colle, apresenta uma produção metabólica similar ao extrato co-cult_Xyl_Diap, o que é verificado pela proximidade e sobreposição entre os dados.

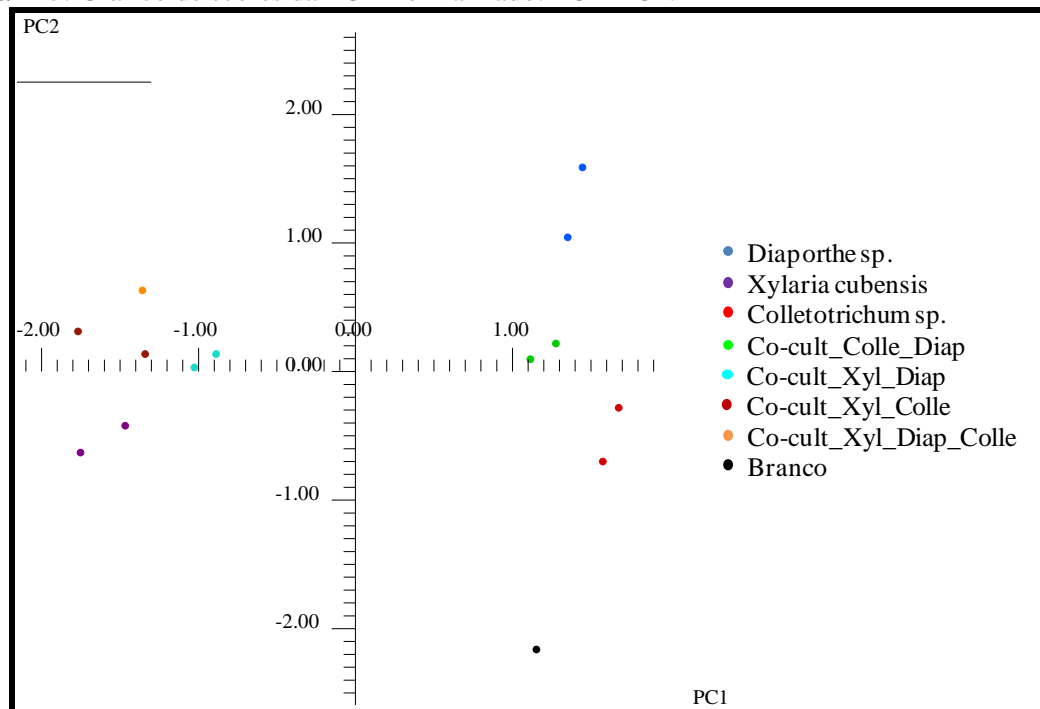
Os resultados obtidos pelo *scores* da PLS_DA demonstraram que o co-cultivo das linhagens envolvidas, produziu metabólitos diferentes, quando comparados com a produção das monoculturas.

6.1.2.3 Análise multivariada dos dados de RMN de ^1H do co-cultivo em PDB

Os extratos brutos dos co-cultivos em duplicata (13 mg mL^{-1}) foram analisados por RMN de ^1H (CD_3OD) com o objetivo de comparar estatisticamente a produção metabólica dos co-cultivos com as monoculturas e com o branco (extrato somente do meio de cultivo PDB).

Os dados foram tratados estatisticamente, utilizando o software Amix, com a ferramenta PCA.

Figura 175. Gráfico de scores da PCA normalizado: PC1xPC2.



Nos gráficos de *scores* da PCA, pode-se observar evidentemente uma boa separação das classes. Além disso, é possível observar: a) o branco distanciou-se das amostras, indicando que as monoculturas e os co-cultivos produzem metabólitos distintos do branco; b) na maioria dos *scores*, as duplicatas localizam-se próximas uma das outras, indicando reprodutibilidade das mesmas. Na Figura 175, o extrato co-cult_Colle_Diap apresentou características similares ao cultivo de *Colletotrichum* sp., o que pode ser verificado pela proximidade dos dados.

Os resultados obtidos pelo *scores* da PCA demonstraram que o co-cultivo das linhagens envolvidas, produziu metabólitos diferentes, quando comparados com a produção das monoculturas.

Os resultados obtidos das análises multivariadas tanto por LC-MS, quanto por RMN de ^1H reforçam que o metabolismo dos micro-organismos é influenciado, na presença de outra linhagem, podendo ativar a expressão de genes silenciados ou maximizar/minimizar a produção de metabólitos de interesse.

6.2 Epigenética: *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp.

Os fungos são organismos capazes de produzir uma gama de estruturas químicas com potencial biológico. Infelizmente, os métodos mais comuns de fermentação, ainda são pobres para mimetizar o habitat natural desses micro-organismos. Com isso muitas vias biossintéticas tornam-se silenciadas, limitando a completa descoberta do potencial desses micro-organismos (WILLIAMS et al., 2008).

Conhecendo alguns metabólitos identificados neste trabalho e pelos relatos da literatura, instigou a aplicação desta estratégia com o objetivo avaliar a produção de novos metabólitos, pela ativação de genes silenciados, oriundos do cultivo dos fungos endofíticos *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. (Figura 5) com os moduladores epigenéticos: ácido hidroxâmico suberoilânilida (SAHA) e 5-azacitidina (AZA).

6.2.1 Cultivo dos endófitos na presença dos moduladores

O cultivo dos fungos *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp. em placa de 24 poços, na presença do modulador epigenético SAHA (250 e/ou 500 μM) apresentou mudanças na produção metabólica. As análises dos extratos obtidos por LC-MS evidenciaram a produção de picos diferentes no extrato produzido pelo endófito *Diaporthe* sp., com o modulador SAHA (500 μM) (Figura 176) e pelo demais fungos na presença do SAHA (250 μM), quando comparado com o controle (PDB+endófito). O cultivo dos endofitos na presença do modulador AZA a 125 μM , 250 μM e 500 μM , não apresentou mudanças significativas na produção metabólica.

Observou-se que não houve crescimento dos endófitos *Xylaria cubensis* e *Colletotrichum* sp. na presença do modulador SAHA somente na concentração de 500 μM , constatando que esta concentração foi tóxica a estes endófitos.

Nas Tabelas 35, 36 e 37, estão apresentadas as massas obtidas, referentes aos cultivos na presença dos moduladores e do controle.

Tabela 35. Massa dos extratos brutos obtida do cultivo de *Xylaria cubensis* na presença dos moduladores SAHA e AZA e do controle.

Extratos	SAHA-Massa (mg)	AZA-Massa (mg)
Xyl_125 μ M	5,9	1,9
Xyl_250 μ M	6,0	3,0
Xyl_500 μ M	*	3,4
Xyl_controle	4,6	3,5

*Não houve crescimento do endófito.

Tabela 36. Massa dos extratos brutos obtida do cultivo de *Diaporthe* sp. na presença dos moduladores SAHA e AZA e do controle.

Extratos	SAHA-Massa (mg)	AZA-Massa (mg)
Diap_125 μ M	3,7	0,7
Diap_250 μ M	3,5	2,6
Diap_500 μ M	5,0	2,7
Diap_controle	2,8	0,8

Tabela 37. Massa dos extratos brutos obtida do cultivo de *Colletotrichum* sp. na presença dos moduladores SAHA e AZA e do controle.

Extratos	SAHA-Massa (mg)	AZA-Massa (mg)
Colle_125 μ M	3,8	1,6
Colle_250 μ M	6,3	1,6
Colle_500 μ M	*	1,4
Colle_controle	3,2	2,4

*Não houve crescimento do endófito.

Analisando as massas de uma maneira geral, pode-se observar a obtenção de maiores rendimentos dos extratos na presença do SAHA, exceto *X. cubensis* e *Colletotrichum* sp., que não se desenvolveram na concentração de 500 μ M. Observou-se que o crescimento de *Diaporthe* sp. foi influenciado pela presença do modulador SAHA somente na concentração de 500 μ M, pois visualmente foi possível perceber que seu crescimento foi inferior as demais concentrações e ao controle. Os moduladores epigenéticos influenciam na transcrição de diferentes clusters gênicos, tal interferência pode afetar de forma negativa a sobrevivência dos micro-organismos alvo. A diversidade de alvos relacionados ao epigenoma em fungos é ampla, porém nem todas as espécies respondem positivamente aos modificadores epigenéticos conhecidos, sendo o sucesso desta abordagem considerado ainda imprevisível (CICHEWICZ, 2010; BERTRAND et al., 2014).

A Figura 176 foi o primeiro LC-MS (baixa resolução) realizado com os extratos, no qual, foi possível observar os valores de m/z referente a cada sinal diferente produzido pelos endófitos na presença do SAHA. Os três endófitos apresentaram picos distintos do controle em 15,69 e 16,49 min, os quais pode-se detectar m/z 265 $[M+H]^+$ e 271 $[M+Na]^+$, respectivamente. Após observar os picos distintos, analisou-os novamente por LC-MS (alta resolução) (Figura 177) para confirmar e fragmentar os m/z obtidos.

Figura 176: LC-MS (baixa resolução) dos extratos na presença do modulador SAHA: Diap_500 μ M (a), do Diap_controle (b); m/z 265,2 $[M+H]^+$ (c) e m/z 271,2 $[M+H]^+$ (d).

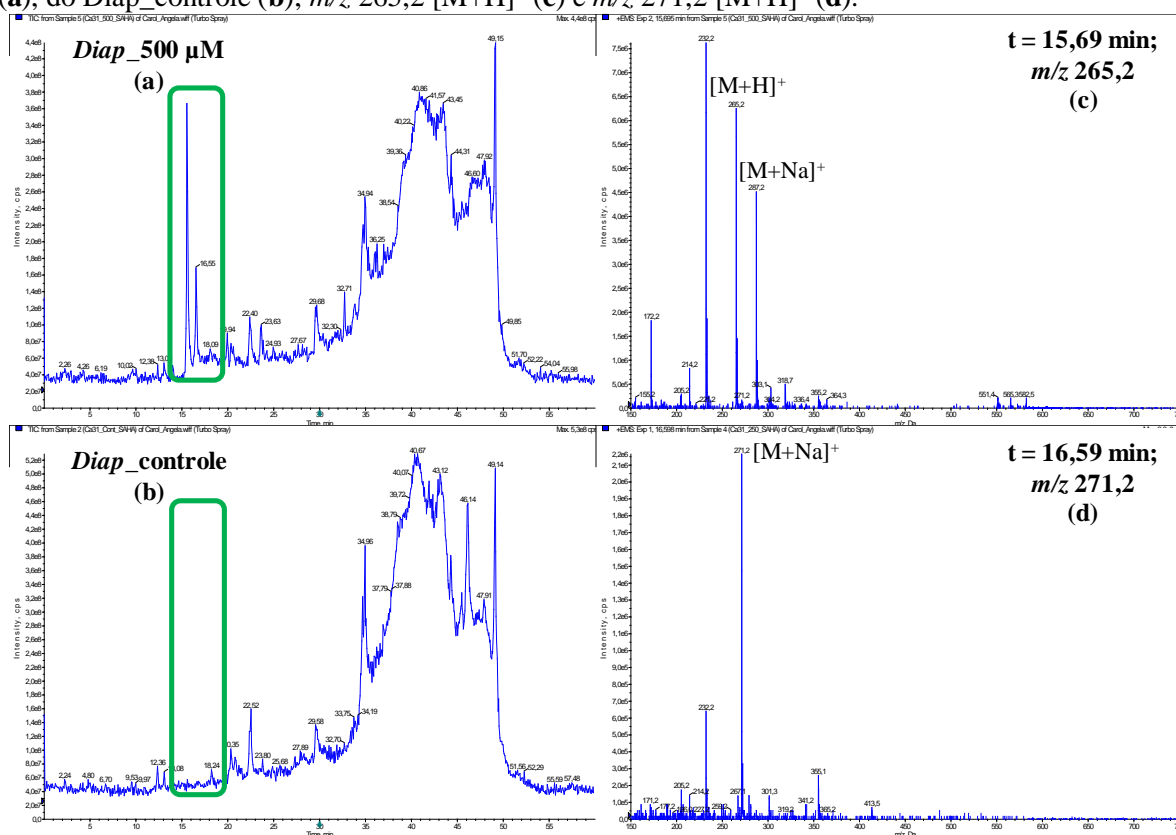
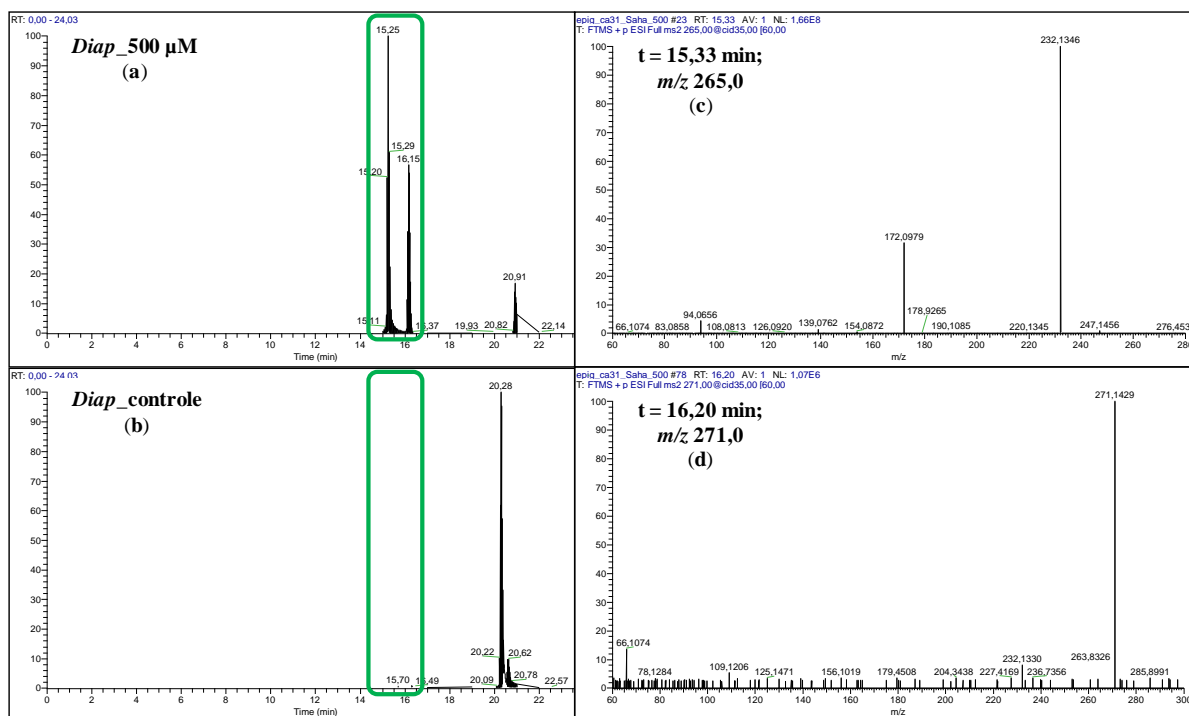


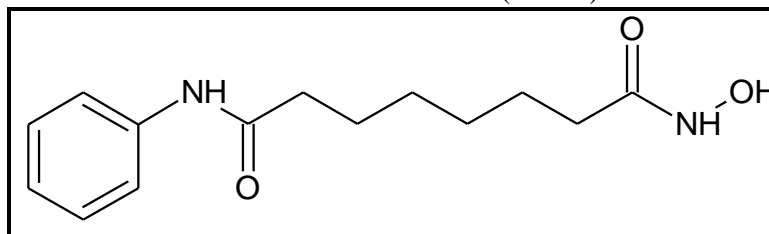
Figura 177: LC-MS (alta resolução) dos extratos na presença do modulador SAHA: Diap_500 μM (a), do Diap_controle (b); m/z 265,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (c) e m/z 271,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (d).



6.2.2 Isolamento dos metabólitos produzidos na presença do modulador SAHA

Para confirmar os metabólitos detectados no LC-MS, o extrato Diap_500 μM , foi submetido a LC-SPE-TT, no qual isolou-se quatro picos. Sendo que o primeiro pico (Pico 1_LC-SPE-TT) foi identificado por RMN de ^1H (Figura 179) e confirmado pelo espectro de massas (Figura 180), que tratava-se do próprio modulador SAHA (Figura 178) (STOWELL; HUOT; VOAST, 1995).

Figura 178. Estrutura do ácido hidroxâmico suberoilânilida (SAHA).



Fonte: Autor

O espectro de RMN de ^1H (Figura 179) evidenciou a presença dos grupos metilênicos, sendo dois ligados as carbonilas.

Na região de aromáticos, foram visualizados sinais em δ_{H} 7,08 (*m*; 1H), 7,29 (*t*; 2H) e δ_{H} 7,53 (*dd*; 2H) evidenciando um sistema benzílico com o anel aromático monossustituído.

A estrutura foi confirmada após análise por ESI-EM onde há a presença da molécula protonada de m/z 265,1 ($[M+H]^+$) e de m/z 287,1 ($[M+Na]^+$) (Figura 180), o que associado aos dados de RMN permitiu propor a fórmula molecular $C_{14}H_{20}N_2O_3$.

Figura 179. Espectro de RMN de 1H do Pico 1_LC-SPE-TT (SAHA) (DMSO- d_6 , 600 MHz).

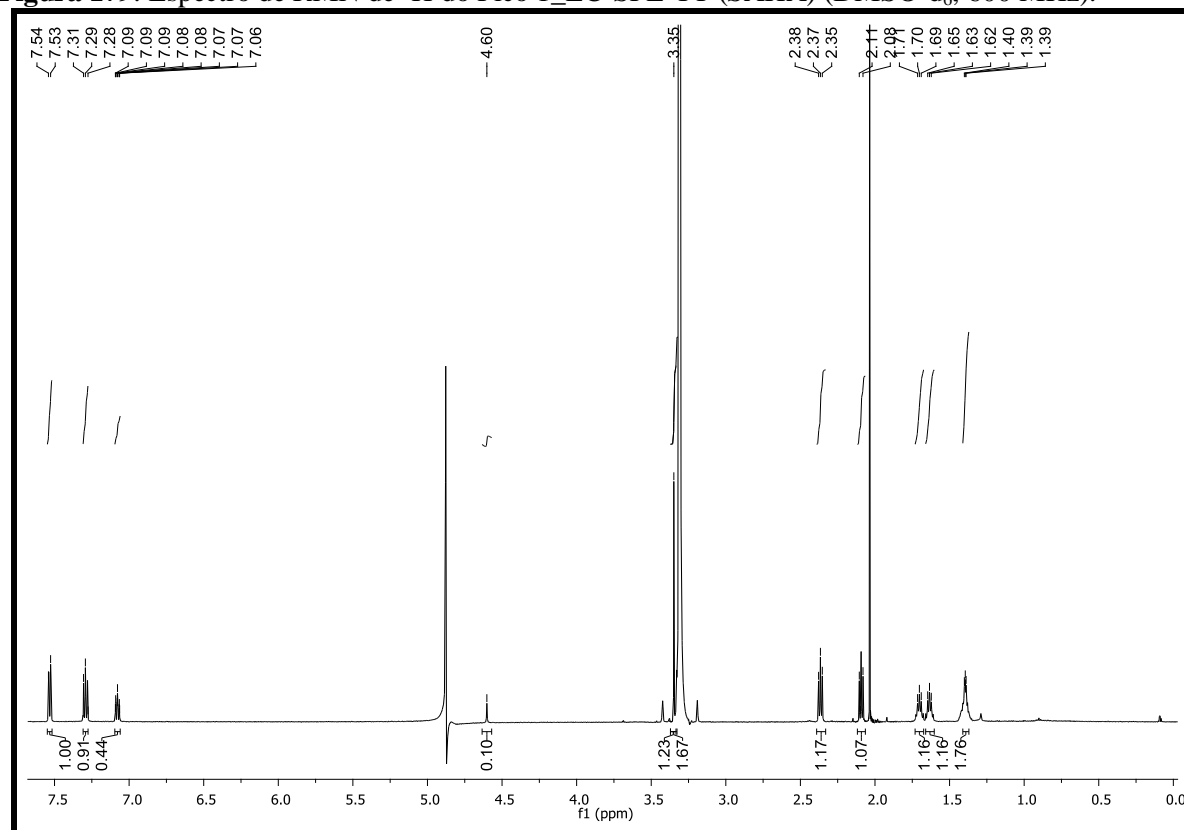
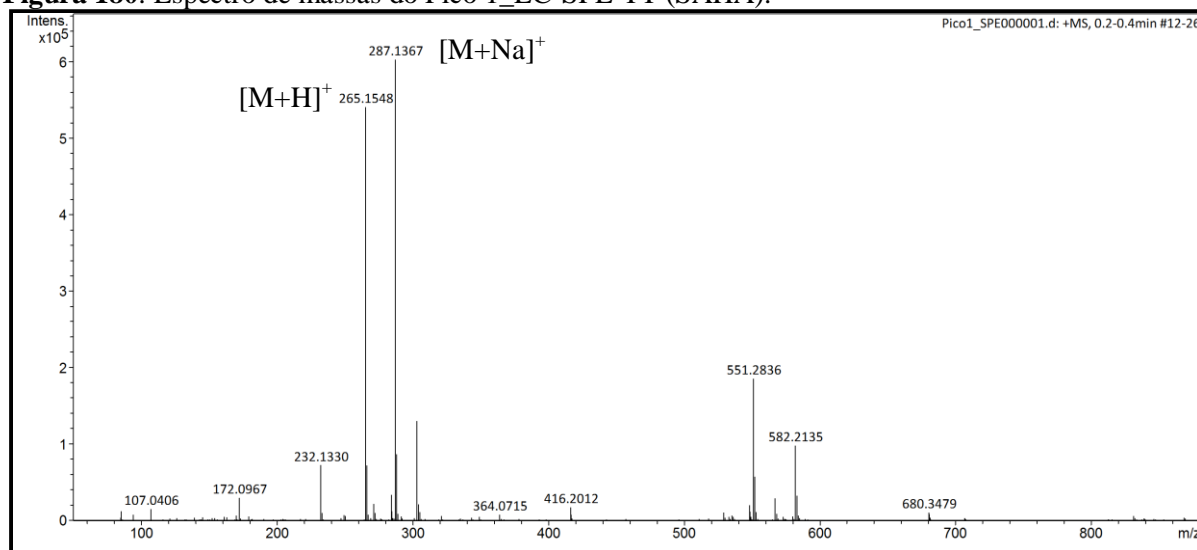
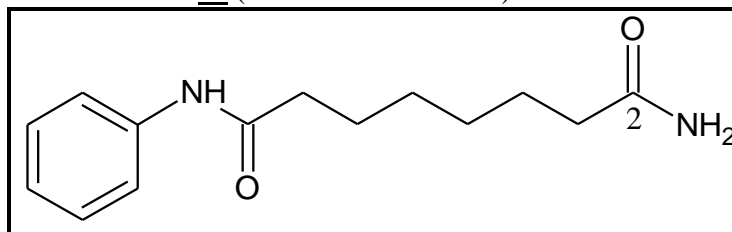


Figura 180. Espectro de massas do Pico 1_LC-SPE-TT (SAHA).



O segundo pico (Pico 2_LC-SPE-TT), isolado do extrato Diap_500 μM foi identificado por RMN de ^1H (Figura 182) e confirmado pelo espectro de massas (Figura 184), como sendo um derivado do modulador SAHA (Figura 181).

Figura 181. Estrutura da substância **20** (N-feniloctanodiamida).



Fonte: Autor

O espectro de RMN de ^1H (Figura 182) evidenciou a presença dos grupos metilênicos, sendo dois ligados as carbonilas.

Na região de aromáticos, foram visualizados sinais em δ_{H} 7,08 (*m*; 1H), 7,29 (*t*; 2H) e δ_{H} 7,53 (*dd*; 2H) evidenciando um sistema benzílico com o anel aromático monossustituído.

Os dados de RMN de ^1H da substância **20** são similares ao espectro de RMN de ^1H do SAHA (STOWELL; HUOT; VOAST, 1995), observando somente uma diferença no deslocamento químico do tripleto δ_{H} 2,09 (Pico1_LC-SPE-TT), referente ao grupo metilênico ligado a carbonila C2. O tripleto no Pico2_LC-SPE-TT foi observado em δ_{H} 2,21. Esse dado pode ser relacionado a ausência da hidroxila na substância **20** e sugere também que este metileno não está localizado no cone de proteção da carbonila, deslocando-o para regiões de maior frequência do espectro de RMN de ^1H (Figura 183).

Figura 182. Espectro de RMN de ^1H do Pico 2_LC-SPE-TT (DMSO- d_6 , 600 MHz).

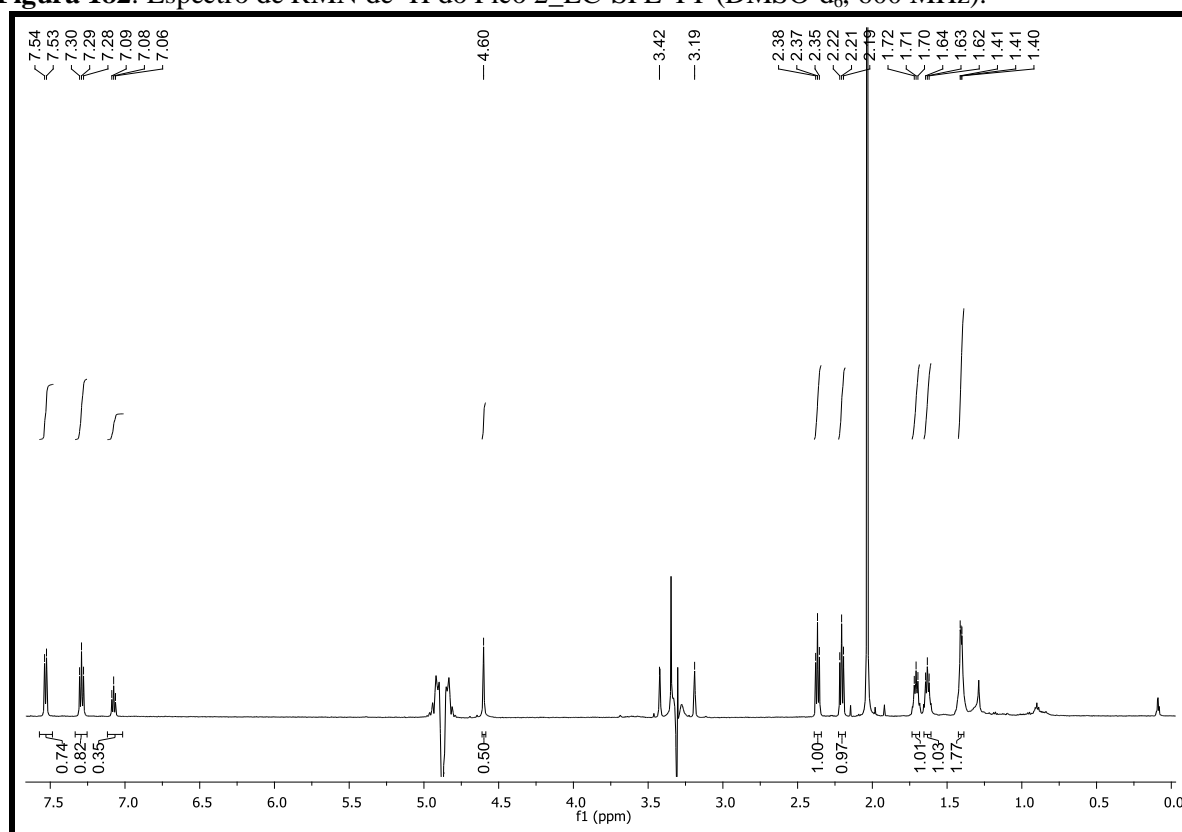
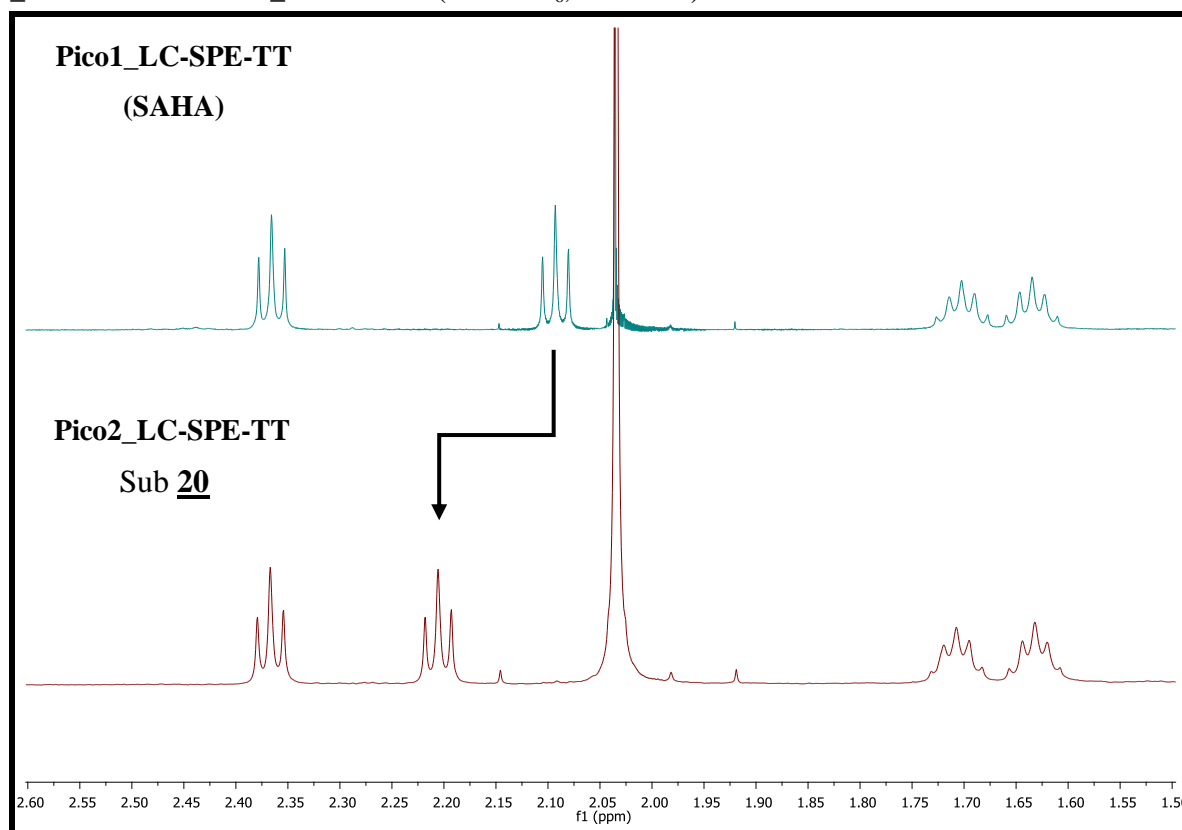
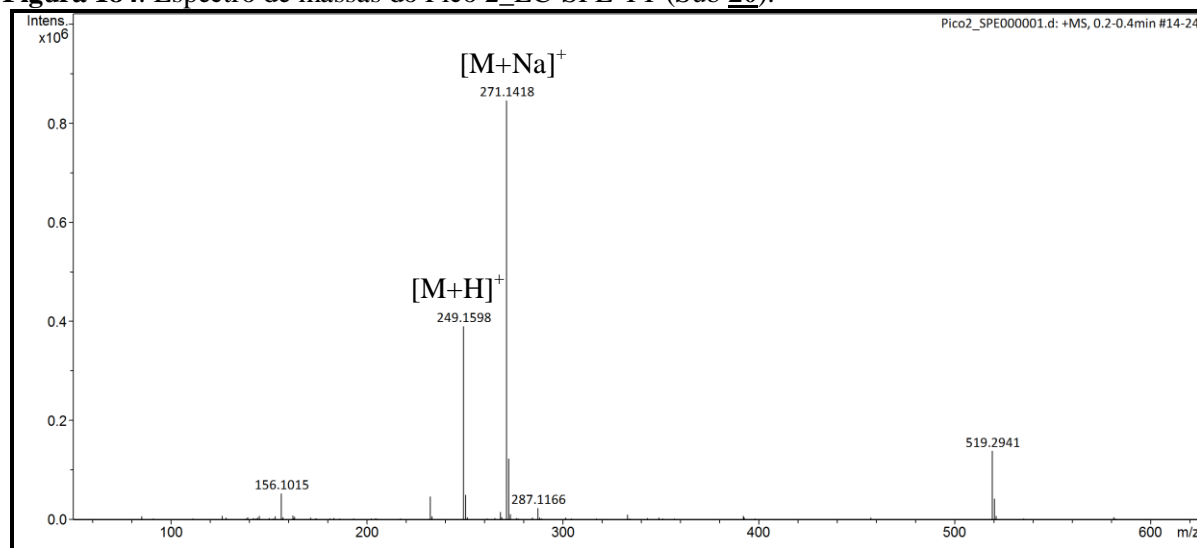


Figura 183. Espectros de comparação de RMN de ^1H na região de 2,05-2,40 ppm, referente aos Pico 1_LC-SPE-TT e Pico 2_LC-SPE-TT (DMSO- d_6 , 600 MHz).



A estrutura foi confirmada após análise por ESI-EM onde há a presença da molécula protonada de m/z 249,1 ($[M+H]^+$) e de m/z 271,1 ($[M+Na]^+$) (Figura 184), o que associado aos dados de RMN permitiu propor a fórmula molecular $C_{14}H_{20}N_2O_2$.

Figura 184. Espectro de massas do Pico 2_LC-SPE-TT (Sub **20**).



O endófito não conseguiu se desenvolver satisfatoriamente na presença do SAHA (500 μ M), sendo assim sugere-se que o endófito biotransformou o modulador epigenético (SAHA) na substância N-feniloctanodiamida, um derivado do SAHA, para sua sobrevivência. Infelizmente, dentro do reino fungi, uma porção de fungos isolados pode ser resistente as moléculas atualmente disponíveis como moduladores epigenéticos (CICHEWICZ, 2010).

Conclusões

7. CONCLUSÕES

Nesta tese foi discutido amplamente que fungos endofíticos compreendem um grupo de micro-organismos que possuem uma enorme capacidade na produção de substâncias bioativas com potencial para serem utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e na agricultura. *Eugenia brasiliensis* é uma espécie pertencente à família Myrtaceae e mostrou ser uma hospedeira de diversos fungos endofíticos, sendo que neste trabalho isolou-se 17 linhagens que resultaram em extratos brutos muito promissores na produção de enzimas e substâncias bioativas. É importante destacar que as enzimas produzidas pelos endófitos possuem um grande interesse comercial e são amplamente empregadas em diversos setores industriais. A variação metabólica observada pela análise dos dados de RMN de ^1H e HPLC-DAD dos extratos brutos das linhagens cultivadas foi muito distinta, evidenciando diversas classes de metabólitos secundários. Esta observação sugere que essas substâncias estejam exercendo um possível papel ecológico na espécie vegetal. A potencialidade destes extratos frente aos ensaios anticolinesterásico e antifúngico contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, ensaios para avaliação da atividade herbicida, assim como atividade citotóxica foram surpreendentes, considerando que todas as linhagens apresentaram uma ou mais substâncias com potencial atividade.

As citocalasinas isoladas neste trabalho têm demonstrado inúmeras atividades biológicas, como antibiótica, antitumoral, antifúngica, fitotóxica, dentre outras. A produção desta classe de substâncias pode estar associada ao mecanismo de proteção do hospedeiro como forma de assegurar sua sobrevivência no espaço inter ou intracelular de *E. brasiliensis*. As dicetopiperazinas são substâncias produzidas por várias espécies de fungos e apresentam diversas atividades biológicas, como antibiótica, ansiolítica, citotóxicas entre outras, o que sugere um papel ecológico deste micro-organismo quando associado à espécie vegetal, protegendo-a de possíveis patógenos ou predadores ou ainda letal a estes. As isocumarinas responsáveis por atividades antimicrobiana, antialérgica, antimalárica, citotóxica, antioxidante, entre outras, também reforçam esta suposição.

Finalmente o isolamento de duas substâncias inéditas 5-isobutil-3,4-dimetil-1H-pirrol-2(5H)-ona e metanoato de 2-hidroxi-butila 3-indol, sendo a última um derivado esterificado do ácido indol acético, hormônio de crescimento, o qual sugere que os micro-organismos associados estejam em uma relação de simbiose com *E. brasilienses* produzindo hormônios que auxiliem no desenvolvimento fisiológico da mesma. O isolamento de 5-isobutil-3,4-dimetil-1H-pirrol-2(5H)-ona continua evidenciando a capacidade biossintética de fungos endofíticos na produção de estruturas novas e provavelmente bioativas.

A atividade herbicida comprovada da citocalasina D mostra que esta substância possui maior potencial fitotóxico a coleóptilos de trigo que o herbicida comercial GOAL[®]. Este dado justifica inquestionavelmente a importância de fungos endofíticos na inibição de ervas daninhas causadoras de grandes prejuízos na agricultura.

Os resultados obtidos dos co-cultivos demonstraram uma produção metabólica interessante e diferente em relação à produção das monoculturas. Constatando que micro-organismos são influenciados na presença de outros micro-organismos. Além disso, o excelente resultado antifúngico contra o fitopatógeno *C. cladosporioides*, apresentado pelos co-cultivos, demonstram uma interação ecológica com o hospedeiro, onde esses endófitos vivendo em associações no interior dos vegetais podem potencializar a produção de substâncias para proteção do hospedeiro. A ferramenta estatística PLS-DA permitiu uma rápida identificação e localização dos perfis metabólicos dos co-cultivos comparados as monoculturas, o qual demonstrou novamente que a produção metabólica dos co-cultivos foi diferente da produção das monoculturas.

Com relação a utilização de moduladores epigenéticos no cultivo de *X. cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp., pode-se observar a alteração na produção metabólica dos endófitos, ocorrendo um aumento de até 2 vezes na produção em relação a massa na presença do SAHA. Na triagem em escala reduzida, utilizando os moduladores SAHA e AZA e nas respectivas concentrações, não foi possível detectar diferenças significativas na produção de novos compostos, porém observou-se que o fungo endofítico *Diaporthe* sp. biotransformou o modulador epigenético (SAHA) na substância N-feniloctanodiamida para sua sobrevivência. Como descrito anteriormente os moduladores epigenéticos podem influenciar de forma positiva ou negativa na sobrevivência dos micro-organismos alvo. A diversidade de alvos relacionados ao epigenoma em fungos é ampla, porém nem todas as espécies respondem positivamente aos modificadores epigenéticos conhecidos, sendo o sucesso desta abordagem considerado ainda imprevisível (CICHEWICZ, 2010; BERTRAND et al., 2014).

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a potencialidade do estudo neste nicho de micro-organismos, principalmente quando considera-se a taxa de extinção da biodiversidade que abriga inúmeros endófitos que nem sequer foram descritos e conseqüentemente explorados do ponto de vista químico e biológico.

REFERÊNCIAS

- ABATE, D.; ABRAHAM, W. R.; MEYER, H. Cytochalasins and phytotoxins from the fungus *Xylaria obovata*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1443-1448, 1997.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied of Microbiology Biotechnology**, v. 90, p. 1829-1845, 2011.
- ALY, A. H. et al. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, p. 1-16, 2010.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 189-207.
- AZEVEDO, J. L.; ESPOSITO, E. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010.
- BAE, H. et al. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 3279-3295, 2009.
- BAILEY, B. A. et al. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. **Planta**, v. 224, p. 1449-1464, 2006.
- BEAU, J. et al. Epigenetic tailoring for the production of anti-infective cytosporones from the marine fungus *Leucostoma persoonii*. **Marine Drugs**, v. 10, n. 4, p. 762-774, 2012.
- BERTRAND, S. et al. De novo production of metabolites by fungal co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*?. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1157-1165, 2013.
- BERTRAND, S. et al. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1180-1204, 2014.
- BHAGOBATY, R. K.; JOSHI, S. R. Enzymatic activity of fungi endophytic on five medicinal plant species of the pristine sacred forests of meghalaya, India. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 33-40, 2012.
- BIASETTO, C. R. **Avaliação química e biológica do fungo endofítico *Schizophyllum commune* isolado de *Alchornea glandulosa***. 2011. 145 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- BILLS, G. F. Analysis of microfungal diversity from a users perspective. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. 1, p. S33-S41, 1995.

- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.
- BRAKHAGE, A. A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites-strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48. p. 15-22, 2011.
- BROWNELL, A. et al. 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity-assessed by ultra high resolution positron emission tomography with comparison to magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, n. 5, p. 1206-1214, 2004.
- BULTMAN, T. L.; BELL, G. D. Interaction between fungal endophytes and environmental stressors influences plant resistance to insects. **OIKOS**, v. 103, p. 182-190, 2003.
- BUNGIHAN, M. E. et al. Bioactive metabolites of *Diaporthe* sp. P133, an endophytic fungus isolated from *Pandanus amaryllifolius*. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, p. 606-609, 2011.
- CAFÊU, M. C. **Estudo químico e avaliação biológica os fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris***. 2007. 252 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- CAFÊU, M. C. et al. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.
- CAO, Y. et al. Rapid determination of nucleosides, nucleobases and free amino acids in brown seaweeds using ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 675-686, 2014.
- CHAPLA, V. M. **Estudo químico e biológico do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da *Senna spectabilis***. 2010. 176 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 421-437, 2013.
- CHAPLA, V. M. et al. Bioactive secondary metabolites from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus from *Senna spectabilis*. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6597-6608, 2014.
- CHEN, H. et al. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 14, p. 5048-5052, 2004.
- CHEN, T. H. et al. A nucleoside-nucleotide mixture may reduce memory deterioration in old senescence-accelerated mice. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 3085-3089, 2000.
- CHERBLANC, F. L. et al. Perspectives on natural product epigenetic modulators in chemical biology and medicine. **Natural Product Report**, v. 30, n. 5, p. 605-624, 2013.

- CHITHRA, S. et al. Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, v. 21, p. 534-540, 2014.
- CHOMCHEON, P. et al. 3-Nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: is 3-NPA in some plants produced by endophytes? **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1103-1105, 2005.
- CHUNG, K. R. et al. Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. **FEMS Microbiology Letters**, v. 226, p. 23-30, 2003.
- CHUNG, Y. et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces the production of anti-inflammatory cyclodepsipeptides from *Beauveria feline*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 7, p. 1260-1266, 2013.
- CICHEWICZ, R. H. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 11-22, 2010.
- COLEMAN, J. J. et al. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n. 3, p. 321-332, 2010.
- COLLA, A. R. S. et al. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 720-731, 2012.
- COPPING, L. G.; DUKE, S. O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science**, v. 63, p. 524-554, 2007.
- CORRÊA, R. C. G. et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 41, p. 1467-1478, 2014.
- COSTA, P. M. et al. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 854-863, 2008.
- DAÍ, J. et al. Novel highly substituted biaryl ethers, phomosines D–G, isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 23, p. 5100-5105, 2005.
- DAMETTO, A. C. **Estudo químico e avaliação da atividade biológica de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* (Myrtaceae)**. 2014. 169 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.
- DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 185-201, 2014.
- DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 499-514, 2000.

- DEY, P.; BANERJEE, J.; MAITI, M. K. Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates - *Colletotrichum* sp. and *Alternaria* sp. having potential utilities as biodiesel feedstock. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5815-5823, 2011.
- DOMONDON, D. L. et al. β -adenosine, a bioactive compound in grass chaff stimulating mushroom production. **Phytochemistry**, v. 65, p. 181-187, 2004.
- ELSASSER, B. et al. T. X-ray structure determination, absolute configuration and biological activity of phomoxanthone A. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 21, p. 4563-4570, 2005.
- ESPADA, A. et al. New cytochalasins from the fungus *Xylaria hypoxylon*. **Tetrahedron**, v. 53, n. 18, p. 6485-6492, 1997.
- FAETH, S. H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? **OIKOS**, v. 98, p. 25-36, 2002.
- FAN, N. W. et al. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Xylaria cubensis*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 97, n. 12, p. 1689-1699, 2014.
- FDHILA, F. et al. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1299-1301, 2003.
- FERNANDEZ, E. R. D. P.; GOMES, E.; SILVA, R. Purification and characterization of two β -glucosidases from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* Miede. **Folia Microbiologica**, v. 47, p. 685-690, 2002.
- FISCHER, D. C. H. et al. Essential oils from leaves of two *Eugenia brasiliensis* specimens from southeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 499-500, 2005.
- FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583-603, 1954.
- GAO, J. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7623-7629, 2008.
- GENDY, B. D. M.; RATEB, M. E. Antibacterial activity of diketopiperazines isolated from a marine fungus using t-butoxycarbonyl group as a simple tool for purification. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 3125-3128, 2015.
- GERKE, J. et al. Breaking the silence: protein stabilization uncovers silenced biosynthetic gene clusters in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 23, p. 8234-8244, 2012.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85-101, 2003.

- GOLDBECK, R. et al. Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian biome using different substrates. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 797-803, 2013.
- GRAMINHA, E. B. N. et al. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1-22, 2008.
- GUIMARÃES, D. O. **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados à *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**. 2006. 208 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.
- GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.
- HANCOCK, C. R.; BARLOW, H. W.; LACEY, H. J. The east malling coleoptile straight growth test method. **Experimental Botany**, v. 15, n. 1, p. 166-176, 1964.
- IÓCA, L. P.; ALLARD, P. M.; BERLINCK, R. G. S. Thinking big about small beings-the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 646-675, 2014.
- IYÚ, D. et al. Adenosine derived from ADP can contribute to inhibition of platelet aggregation in the presence of a P2Y₁₂ antagonist. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, p. 416-422, 2011.
- J. HETTENMAIER & SOHNE. **Fibrillar structure of cellulose fiber**. Disponível em: <http://www.jrs.eu/jrs_en/innovative-funktionen/uebersicht-funktionen-jrs-produkte>. Acesso em: 16 mar. 2016.
- KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, 2011. doi:10.4061/2011/280696.
- KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1203-1207, 2011.
- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 792-798, 2012.
- KUSARI, S.; PANDEY, S. P.; SPITELLER, M. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. **Phytochemistry**, v. 91, p. 81-87, 2013.

- KUSARI, S.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 1, p. 2-7, 2009.
- KUSARI, S.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. Effect of artificial reconstitution of the interaction between the plant *Camptotheca acuminata* and the fungal endophyte *Fusarium solani* on camptothecin biosynthesis. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 764-775, 2011.
- KUSARI, S. et al. Implications of endophyte-plant crosstalk in light of quorum responses for plant biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 5383-5390, 2015.
- LEITE, R. C. C. et al. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**, v. 34, p. 655-661, 2009.
- LEPTOKARYDIS, I. H. **Busca de substâncias bioativas em fungos associados com a espécie *Michelia champaca* L. (Magnoliaceae)**. 2008. 262 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- LI, G. et al. Endophytic *Diaporthe* sp. LG23 produces a potent antibacterial tetracyclic triterpenoid. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 2128-2132, 2015.
- LIU, Y. et al. A new polyketide from *Diaporthe* sp. SXZ-19, an endophytic fungal strain of *Camptotheca acuminata*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 22, p. 2100-2104, 2013.
- LOTONG, N.; SUWANARIT, P. Production of soy sauce koji mold spores inoculum in plastic bags. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1224-1226, 1985.
- MACÍAS, F. A. et al. Isolation and phytotoxicity of terpenes from *Tectona grandis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, p. 396-404, 2010.
- MAGINA, M. D. A. et al. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1184-1188, 2012.
- MAOR, R. et al. In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1852-1854, 2004.
- MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 51-54, 2002.
- MARTINS, M. B.; CARVALHO, I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis. **Tetrahedron**, v. 63, p. 9923-9932, 2007.
- MASKEY, R. P. et al. Phytotoxic arylethylamides from limnic bacteria using a screening with microalgae. **Journal of Antibiotics**, v. 55, n. 7, p. 643-649, 2002.
- MAUSETH, J. D. **Botany**: an introduction to plant biology. 3rd ed. Boston: James and Bartlett Publishers, 2003. 868 p.

- MEDEIROS, L. S. **Prospecção química do metabolismo de fungos endofíticos isolados de maçã (*Malus domestica*) e goiaba (*Psidium guajava*)**. 2014. 294 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.
- MERHEB-DINI, C. W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; SILVA, R. da. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, v. 104, p. 127-131, 2007.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MILLER, J. D.; TRENHOLM, H. L. **Mycotoxins in grain**: compounds other than aflatoxin. Minnesota: Eagan Press, 1991. 552 p.
- MOORE, D.; ROBSON, G. D.; TRINCI, A. P. J. Natural classification of fungi. In: _____. **21st century guidebook to fungi**. New York: Cambridge University Press, 2011. Chap. 3, p. 41-79.
- MULLER, C. B.; KRAUSS, J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 450-456, 2005.
- NAGIA, M. M. S. et al. Secondary metabolites and bioactivity of two fungal strains. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 11, p. 16-21, 2012.
- NEWMAN, D.; CRAGG, G. M. Endophytic and epiphytic microbes as “sources” of bioactive agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, 2015. doi:10.3389/fchem.2015.00034.
- NISA, H. et al. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p. 50-59, 2015.
- NITSCH, J. P.; NITSCH, C. Studies on the growth coleoptiles and first internoid sections. A new sensitive straight-growth test for auxins. **Plant Physiology**, v. 31, p. 94-111, 1956.
- NONAKA, K. et al. Enhancement of metabolites productivity of *Penicillium pinophilum* FKI-5653, by co-culture with *Trichoderma harzianum* FKI-5655. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 769-774, 2011.
- NOVAES, P. et al. Allelopathic potencial of *Rapanea umbellata* leaf extracts. **Chemistry & Biodiversity**, v.10, p. 1539-1548, 2013.
- OKUNOWO, W. O. et al. Media studies on *Myrothecium roridum* Tode: a potential biocontrol agent for water hyacinth. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 1, n. 4, p. 55-56, 2010.
- OLIVEIRA, C. M. et al. Dihydroisocoumarins produced by *Xylaria* sp. and *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with *Piper aduncum* and *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 93-96, 2011.

- PALAFIX, M. A. et al. Relationships observed in the structure and spectra of uracil and its 5-substituted derivatives. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 75, p. 1261-1269, 2010.
- PANDI, M.; MANIKANDAN, R.; MUTHUMARY, J. Anticancer activity of fungal taxol derived from *Botryodiplodia theobromae* Pat., an endophytic fungus, against 7,12 dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary gland carcinogenesis in Sprague dawley rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 48-53, 2010.
- PARTHASARATHY, R.; SATHIYABAMA, M. Lovastatin-producing endophytic fungus isolated from a medicinal plant *Solanum xanthocarpum*. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 29, n. 24, p. 2282-2286, 2015.
- PAYNE, C. M. et al. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 1308-1448, 2015.
- PFEIFFER, E. et al. Novel oxidative in vitro metabolites of the mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, p. 307-316, 2007.
- PIETROVSKI, E. F. et al. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 479-487, 2008.
- PONS, D. et al. Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodelling: new targets for therapy in cardiovascular disease. **European Heart Journal Advance**, v. 30, p. 266-277, 2009.
- PONSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomalto-dextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal Fermentation Technology**, v. 65, n. 4, p. 463-467, 1987.
- PRITI, V. et al. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites? **Current Science**, v. 97, n. 4, p. 477-478, Aug. 2009.
- RAISTRICK, H. Bakerian lecture: a region of biosynthesis. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 136, n. 885, p. 481-508, 1950.
- RANI, P.; SRIVASTAVA, V. K.; KUMAR, A. Synthesis and antiinflammatory activity of heterocyclic indole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 449-452, 2004.
- RICE, E. L. **Allelopathy**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1984. 422 p.
- RODRIGUEZ, R. J. et al. Review: fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 182, p. 314-330, 2009.
- SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 412 p.
- SAIKKONEN, K. et al. Evolution of endophyte–plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275-280, June 2004.

- SATHYA, A. et al. Assessment of a diketopiperazine, cyclo(Trp-Phe) from *Streptomyces griseoplanus* SAI-25 against cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 51, p. 11-20, 2016.
- SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A. L.; SPIERING, M. J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 315-340, 2004.
- SCHAWARZ, M. et al. 3-Hydroxypropionic acid as a nematicidal principle in endophytic fungi. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2239-2245, 2004.
- SCHINDLER, M. Magnetic properties in terms of localized quantities. The DNA bases and the protonation of adenine. **American Chemical Society**, v. 110, n. 20, p. 6623-6630, 1988.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.
- SENANAYAKE, T. H.; WARREN, G.; VINOGRADOV, S. V. Novel anticancer polymeric conjugates of activated nucleoside analogues. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, p. 1983-1993, 2011.
- SHARADA, R. et al. Applications of cellulases-review. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 4, n. 2, p. 424-437, 2014.
- SHEN, A. et al. One-pot synthesis of chiral α -methylene- γ -lactams with excellent diastereoselectivities and enantioselectivities. **Organic Letters**, v. 12, n. 22, p. 5154-5157, 2010.
- SHWETA, S. et al. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. **Phytochemistry**, v. 71, p. 117-122, 2010.
- SILVA, G. H. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria* sp., *Phomopsis cassiae* e *Acremonium* sp. associados a espécies vegetais do Cerrado**. 2005. 306 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- SILVA, G. H. et al. Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). **Phytochemistry**, v. 67, n. 17, p. 1964-1969, 2006.
- SIMIC, M. et al. Functionalised isocoumarins as antifungal compounds: synthesis and biological studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 235-239, 2016.
- SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820-4825, 2010.
- SONG, Y. et al. Four eremophilane sesquiterpenes from the mangrove endophytic fungus *Xylaria* sp. BL321. **Marine Drugs**, v. 10, p. 340-348, 2012.

- SPANOU, C. et al. Antioxidant activity of a series of fluorinated pyrano-nucleoside analogues of N4-benzoyl cytosine and N6-benzoyl adenine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, p. 695-704, 2007.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.
- STOWELL, J. C.; HUOT, R. I.; VOAST, L. V. The synthesis of N-hydroxy-N'-phenyloctanediamide and its inhibitory effect on proliferation of AXC rat prostate cancer cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 8, p. 1411-1413, 1995.
- SUGIYAMA, Y. et al. Indole derivatives from a marine sponge-derived yeast as DPPH radical scavengers. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 11, p. 2069-2071, 2009.
- SUKUMARAN, R. K. et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocelluloses saccharification for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, p. 421-424, 2009.
- SUNITHA, V. H. et al. Amylase production by endophytic fungi *cylindrocephalum* sp. isolated from medicinal plant *Alpinia calcarata* (haw.) Roscoe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1213-1221, 2012.
- TAKAHASHI, J. A. et al. Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungi. **Phytochemistry Reviews**, v.12, n. 4, p. 773-789, 2013.
- TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.
- TEIXEIRA, L. L. et al. Identification of ellagitannins and flavonoids from *Eugenia brasilienses* Lam. (Grumixama) by HPLC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 5417-5427, 2015.
- WANG, B. et al. New cytotoxic meroterpenoids from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 99, p. 151-156, 2016.
- WANG, G. et al. Two diketopiperazine cyclo(Pro-Phe) isomers from marine bacteria *Bacillus Subtilis* Sp. 13-2. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 4, p. 583-585, 2010.
- WANG, J. P. et al. Induced production of depsipeptides by co-culturing *Fusarium tricinctum* and *Fusarium begonia*. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 2492-2496, 2013.
- WANG, L. W. et al. Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1231-1239, 2012.
- WANG, W.-X. et al. Antibacterial azaphilones from an endophytic fungus, *Colletotrichum* sp. BS4. **Journal of Natural Products**, 2016. Ahead of print.doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00436.

- WANG, Y.; TANG, K. A new endophytic taxol- and baccatin III-producing fungus isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 72, p. 16379-16386, 2011.
- WATANABE, I. et al. Potential mycotoxin productivity of *Alternaria alternate* isolated from garden trees. **Mycotoxins**, v. 57, n. 1, p. 3-9, 2007.
- WILLIAMS, R. B. et al. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, p. 1895-1897, 2008.
- WISHART, D. S. Quantitative metabolomics using NMR. **TrAC, Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 228-237, 2008,
- WU, W. et al. Isolation and structural elucidation of proline-containing cyclopentapeptides from an endolichenic *Xylaria* sp. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1303-1308, 2011.
- YANG, Y. et al. Genome sequencing and analysis of the paclitaxel-producing endophytic fungus *Penicillium aurantiogriseum* NRRL 62431. **BioMed Central Genomics**, v. 15, n. 69, p. 1471-2164, 2014.
- YIN, H.; SUN, Y.-H. Vincamine-producing endophytic fungus isolated from *Vinca minor*. **Phytomedicine**, v. 18, p. 802-805, 2011.
- YOON, L. W. et al. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.
- ZAIN, M. E. et al. Biological activity of fungal secondary metabolites. **International Journal of Chemical and Applied Biological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 14-22, 2014.
- ZANARDI, L. M. **Estudo químico e biológico de fungos endofíticos associados a *Senna spectabilis***. 2010. 254 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 753-771, 2006.
- ZHANG, J. Y. et al. Anthracenedione derivatives as anticancer agents isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1469-1481, 2010.
- ZHENG, W. et al. Production of antioxidant and antitumor metabolites by submerged cultures of *Inonotus obliquus* cocultured with *Phellinus punctatus*. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 89, p. 157-167, 2011.
- ZOU, W. X. et al. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1529-1530, 2000.