

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 11/10/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA - CAMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

GISLAINE FELIPPE MARTINS

**Prospecção de griseofulvina, um potente
antimicótico, em fungos endofíticos do gênero
Xylaria sp. isolados de espécies vegetais do Cerrado**

Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Orientadora

Araraquara

-2016-

GISLAINE FELIPPE MARTINS

**Prospecção de griseofulvina, um potente antimicótico, em
fungos endofíticos do gênero *Xylaria* sp. isolados de espécies
vegetais do Cerrado**

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

Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Orientadora

Araraquara

-2016-

FICHA CATALOGRÁFICA

M379p Martins, Gislaine Felipe
Prospecção de griseofulvina, um potente antimicótico, em fungos endofíticos do gênero *Xylaria* sp. isolados de espécies vegetais do Cerrado / Gislaine Felipe Martins. – Araraquara-SP : [s.n.], 2016
204 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Angela Regina Araujo

1. Fungos endofíticos. 2. Metabólitos. 3. Análise cromatográfica. 4. Citotoxicidade. 5. Atividade antifúngica.
I. Título.

GISLAINE FELIPPE MARTINS

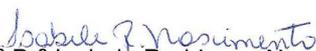
Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em
Química.

Araraquara, 11 de outubro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Angela Regina Araújo (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Profª Drª Isabele Rodrigues Nascimento
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Dr. Nivaldo Boralle
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Drª Adriana Aparecida Lopes
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, Ribeirão Preto -SP



Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto - SP

Agradeço a Deus, e aos meus familiares pelo
amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade e força nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, que foram meus primeiros professores nessa escola que se chama vida.

À Profa. Dra. Angela Regina Araujo, pela disponibilidade de orientação, pela paciência, dedicação, e pelos conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Geraldo H. Silva e Cláudio Rodrigo Nogueira pela ajuda nas determinações estruturais.

À Dra. Lucinéia e ao Dr. Nivaldo Boralle, pela amizade e pelos momentos de descontração no café e também pela realização dos espectros de RMN.

Ao João pela realização das análises de Espectrometria de Massas.

Aos técnicos Juliana João, e Marquinhos pela ajuda, ensinamentos e amizade.

À Dra. Adriana Aparecida Lopes e ao Dr. Nivaldo Borale pelas valiosas contribuições no meu exame de Qualificação, e pela disponibilidade em estarem na minha defesa em conjunto com a Profa. Isabele, com quem tenho uma profunda admiração e carinho, e com o Prof. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, agradeço a todos pela presença no fechamento deste ciclo.

Às Profa. Dra. Andréia Morandim, Profa. Dra. Maria Luíza Zeraik, Dr. Gabriel e ao Mestrando Richard pelo tratamento dos dados estatísticos e ajuda nas análises.

As pessoas que auxiliaram em meu trabalho: Carol, Juliana, Júlia, Afif, Karina, Lidiane, Alana, Fernandinho, Richard, entre muitos outros... muito obrigada pelo carinho, disponibilidade e ajuda.

Aos amigos do IQ, em especial: Júlia, Bruninha, Doni, Juliano, Alexander, Juhzinha, Amauri e Carla pela paciência e momentos alegres e tristes, e como Garth Henrichs mencionou: a gente não amigos, reconhece-os... Tenho muito orgulho de tê-los encontrado nesse percurso.

As secretárias do departamento de Química Orgânica: Ângela, Fátima e Vilma pela ajuda, paciência e amizade.

À Marli e a todas as meninas da Alt Tec pelo café maravilhoso, pelas conversas descontraídas, e também pela companhia nos dias e horários ermos.

Às meninas da STPG: Wennia, Célia, Paula e Cíntia, que sempre foram muito atenciosas e exemplos de pessoas, sempre dispostas a nos ouvir e ajudar, o meu muito obrigada, o carinho e gratidão que sinto por vocês é imenso!

Às meninas da Seção de Comunicação, Valéria e Regina, que sempre foram muito queridas comigo, agradeço de coração.

À Gabriela da AGREO que sempre me atendeu com sorriso no rosto e me auxiliou em minhas dúvidas, obrigada Gabi por tudo.

Ao meu marido Diogo, por sempre estar ao meu lado até quando eu não estava, pelo apoio incondicional, paciência e carinho.

Às minhas irmãs, pelas conversas, risadas, por serem minhas melhores amigas, e principalmente por serem verdadeiras nas horas em que eu mais precisei.

À família que adiquiri aqui em Araraquara, agradeço por toda ajuda e carinho.

Aos meus sobrinhos e afilhados que me divertem e me fazem esquecer um pouco dos problemas e das obrigações que a vida nos determina.

Às minhas meninas pelo amor incondicional, carinho, afeto e minhas desculpas por não ter tanto tempo para ficarmos juntas e cuidar melhor de vocês.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram de forma positiva para a realização deste trabalho, que dedicaram o que tinham de mais precioso em sua vida, o tempo, para me axiliar em meu trabalho, incluo aqui todos os funcionários do IQ que sempre me trataram com muito carinho e respeito, pois um trabalho não é realizado por uma só pessoa, mas por várias que nos auxiliam dentro deste percurso.

E ao Instituto de Química e às agências de fomento CNPq, pela bolsa, e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

“É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: Nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”

(Chico Xavier)

RESUMO

Fungos são organismos que podem ser encontrados nos mais diversos habitats e constituem um dos maiores grupos sobre a Terra. Em particular, os fungos endofíticos associados a espécies vegetais, são excelentes produtores das mais diversas classes de metabólitos secundários, sendo uma fonte promissora e racional na obtenção de protótipos para os mais diversos usos terapêuticos. Os endófitos do gênero *Xylaria* pertencentes à família Xylareaceae, constituem um grupo de espécies que produzem substâncias que apresentam as mais diversas atividades biológicas como antitumorais, antibióticas, entre outros. Dentro deste contexto, neste trabalho avaliamos a produção de griseofulvina, um metabólito secundário produzido por *Xylaria* spp., e de utilização na terapêutica animal e humana. Também foi realizado o estudo químico e biológico de sete espécies diferentes de fungos endofíticos do gênero *Xylaria*. Estes foram cultivados em meios líquidos comerciais (MDB, Czapek, YM, EM e Nutrient) e sólidos (arroz e milho) para obtenção dos extratos brutos, totalizando 49 extratos. Cinco evidenciaram a produção de griseofulvina e foram submetidos a análises por RMN de ^1H e CLAE-DAD para a detecção e quantificação desta substância, respectivamente. O fungo que apresentou maior produção de griseofulvina foi o *Xylaria* sp., codificado como PR-03 e cultivado em Czapek. Neste meio foi realizado o estudo de aplicação de estímulos, tais como agitação e luz, utilizando planejamento experimental visando a maximização da produção desta substância, o que culminou em um aumento significativo desta produção. Paralelamente, todos os extratos obtidos foram submetidos a bioensaios para verificação das atividades antitumoral, antifúngica, e anticolinesterásica. Dois extratos que apresentaram perfis químico e biológico promissores foram submetidos a fracionamento cromatográfico para isolamento e identificação de substâncias. As substâncias isoladas tiveram suas estruturas determinadas ou elucidadas por técnicas de RMN uni e bidimensionais, Espectrometria de Massas, UV, entre outras. De *Xylaria* sp. CSY-06 foram isoladas e identificadas seis substâncias: kigelina, demetiligelina, xylariolideo D, dankasterona A, 6-hidroxi-3-metil-7,8-dimetoxi-3,4-dihidroisocumarina e 5-butil-6-hidroximetil-2H-piran-2-ona sendo as duas últimas inéditas. De *Xylaria* sp. PR-03 foram isoladas dez substâncias, sendo oito identificadas como: declorogriseofulvina, griseofulvina, ácido 2-hexilideno-3-metil-butanodioico, e as citocalasinas B, Z₂, F, B₂, e T. Os estudos com endófitos *Xylaria* sp. visam contribuir e fornecer subsídios para maior conhecimento sobre a constituição química dos extratos analisados, e relacionar a sua composição com a interação micro-organismo e espécie vegetal, levando a compreensão da função ecológica existente.

Palavras-chave: fungos endofíticos. *Xylaria* sp. griseofulvina. Cerrado.

ABSTRACT

Fungi are organisms that can be found in a diversity of habitats and constitute one of the largest groups on Earth. In particular, the endophytic fungi associated with plant species are excellent producers of several classes of secondary metabolites, as well a promising rational source in obtaining prototypes for several therapeutic effects. Endophytes of the genus *Xylaria* belong to Xylareaceae family, are a group of species that produce substances with potential biological activities, including antitumoral, antibacterial, among others. In this context, this study evaluated the optimal conditions of griseofulvin-producing endophytic fungus from *Xylaria* spp., for application in animal and human therapy. It was also conducted chemical and biological study of seven different species of endophytic fungi of the genus *Xylaria*. The fungal strain was cultivated in commercial liquid (Potato Dextrose Broth, Czapek, Yeast Medium, Malt Extract and Nutrient) and solid media forms (rice and corn) to obtain the crude extracts (n= 49). Five samples showed griseofulvin production and were analyzed by ¹H NMR and HPLC-DAD for the detection and quantification of the substance, respectively. The fungus that showed higher production of griseofulvin was *Xylaria* sp., encoded as PR-03 and cultured in Czapek. In this environment, the experiments design under light and shaker induced stimulus were performed in order to improve the production of the substance. It was observed a significant increase of production under both conditions. At the same time, all the extracts were submitted to bioassays for evaluation of antitumor, antifungal, and acetylcholinesterase activities. Two extracts that revealed promising chemical and biological profiles were subjected to chromatographic fractionation for isolation and identification of substances. Two compounds had their structures determined or elucidated by NMR uni and bidimensional techniques, mass spectrometry, UV, among others. In *Xylaria* sp. CSY-06 were isolated and identified six substances kigelin, demetilkigelin, xylariolideo D, dankasterone A, 6-hydroxy-7,8-dimethoxy-3-methyl-3,4-dihydroisocoumarin and 5-butyl-6-hydroxymethyl-2H-pyran-2-one with the last two unpublished. In *Xylaria* sp. PR-03 were isolated ten substances, eight identified as dechlorogriseofulvin, griseofulvin, 2-hexylidene-3-methyl-butanedioic acid, and cytochalasins B, Z₂, F, B₂, and T. Studies with endophytes *Xylaria* sp. aim to contribute and provide support for greater knowledge about the chemical composition of the extracts analyzed, and relate its composition to the micro-organism interaction and plant species, leading to understanding of the ecological function.

Keywords: Endophytic fungi. *Xylaria* sp. griseofulvin. Cerrado.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida dos endófitos em associação com a planta hospedeira. 23
- Figura 2.** Substâncias isoladas do endófito *Xylaria* sp. associado à espécie vegetal *Piper aduncum* (Piperaceae)..... 26
- Figura 3.** Substâncias isoladas dos endófitos *Xylaria* sp. associados às espécies vegetais *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) e *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) 27
- Figura 4.** Estrutura da griseofulvina..... 28
- Figura 5.** Crescimento dos endófitos (AS-03, CSY-03, CSY-06, CV-06, PA-01, PM-03 e PR-03) cultivados em placas de Petri contendo BDA 40
- Figura 6.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. AS-03 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente 49
- Figura 7.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. CSY-03 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente 50
- Figura 8.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. CSY-06 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente 51
- Figura 9.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. CV-06 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente 52
- Figura 10.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. PA-01 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente 53
- Figura 11.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. PM-03 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente 54
- Figura 12.** Perfil cromatográfico dos extratos obtidos por inoculação do endófito *Xylaria* sp. PR-03 nos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente 55
- Figura 13.** Perfil cromatográfico dos brancos dos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente 56
- Figura 14.** Espectro de RMN de ^1H com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito *Xylaria* sp. AS-03 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. DMSO- d_6 ; 7,1 T 58
- Figura 15.** Espectro de RMN de ^1H com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito *Xylaria* sp. CSY-03 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. DMSO- d_6 ; 7,1 T 58
- Figura 16.** Espectro de RMN de ^1H com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito *Xylaria* sp. CSY-06 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. DMSO- d_6 ; 7,1 T 59
- Figura 17.** Espectro de RMN de ^1H com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito *Xylaria* sp. CV-06 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. DMSO- d_6 ; 7,1 T 59

Figura 18. Espectro de RMN de ^1H com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito <i>Xylaria</i> sp. PA-01 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. DMSO- d_6 ; 7,1 T	60
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito <i>Xylaria</i> sp. PM-03 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. DMSO- d_6 ; 7,1 T	60
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H com PRESAT dos extratos obtidos pela inoculação do endófito <i>Xylaria</i> sp. PR-03 nos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. DMSO- d_6 ; 7,1 T	61
Figura 21. Espectro de RMN de ^1H com PRESAT dos brancos dos meios de cultivo líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e sólidos (Arroz e Milho), respectivamente. DMSO- d_6 ; 7,1 T	61
Figura 22. (a) Cromatograma da substância padrão, griseofulvina, na concentração de 0,1 mg mL $^{-1}$, e (b) sua absorção no UV. Condições do CLAE-DAD: coluna Phenomenex, Fenil-Hexil (C-18, 250 x 4,6 mm, 5 μm), fase móvel ACN:H $_2\text{O}$ 45:65, vazão 0,5 mL min $^{-1}$, detector UV: 232 nm	62
Figura 23. Curva analítica da substância padrão, griseofulvina, obtida com as seguintes concentrações: 0,0075; 0,005; 0,001; 0,05; 0,02; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2 e 0,25 mg mL $^{-1}$	63
Figura 24. (a) Cromatograma, e comparação do (b) RMN de ^1H e com PRESAT do extrato bruto obtido pela inoculação do endófito <i>Xylaria</i> sp. PR-03 em meio líquido de Czapek, e do padrão griseofulvina (DMSO- d_6 , 14,1 T). 66	66
Figura 25. Curva analítica da substância padrão, griseofulvina, obtida com as seguintes concentrações: 0,001; 0,02; 0,05; 0,075; 0,1; 0,15; 0,2 e 0,25 mg mL $^{-1}$; utilizada para análise do planejamento fatorial	68
Figura 26. Gráfico de pareto indicando os valores dos efeitos padronizados	73
Figura 27. Superfície de resposta e mapa de contorno gerados a partir dos dados obtidos no planejamento fatorial da combinação dos fatores: (a) A+B; (b) A+C; e (c) B+C.....	74
Figura 28. Gráfico dos efeitos principais para o rendimento de griseofulvina.....	75
Figura 29. Análise da produção de griseofulvina em diferentes dias (24, 26, 28, 30 e 32 dias) pelo endófito PR-03 em Czapek, com utilização de agitação e luminosidade durante o cultivo.....	75
Figura 30. Condições cromatográficas no modo preparativo: eluição em gradiente ACN/H $_2\text{O}$ 5-100% em 40 min., e 10 min. a 100 % de ACN; C18 preparativa, vazão 4,5 mL min. $^{-1}$, λ de 254 nm	82
Figura 31. Estrutura atribuída à substância 3	83
Figura 32. Determinação da unidade A da substância 3	84
Figura 33. Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância 3	84
Figura 34. Estrutura atribuída à substância 4	85
Figura 35. Determinação da estrutura parcial, A , da substância 4	86
Figura 36. Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância 4	87
Figura 37. Estrutura atribuída à substância 5	87
Figura 38. Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância 5	88
Figura 39. Estrutura atribuída às substâncias 1 e 2	90
Figura 40. Estruturas das substâncias 1 e 5	91
Figura 41. Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância 1	91
Figura 42. Estruturas das substâncias 2 e 3	91
Figura 43. Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância 2	92
Figura 44. Proposta biossintética para as isocumarinas e pironas isoladas	93
Figura 45. Estrutura atribuída à substância 6	94

Figura 46.	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância 6	96
Figura 47.	Extrato produzido pelo endófito <i>Xylaria</i> sp. PR-03 em Arroz; a) imagem do frasco contendo o extrato, e b) fundo do frasco	97
Figura 48.	Perfil do extrato produzido em escala ampliada obtido por inoculação do endófito <i>Xylaria</i> sp. PR-03 em meio sólido de Arroz (a) cromatográfico; e b) por RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 14,1 T), respectivamente	98
Figura 49.	Perfil cromatográfico das frações: (a) Fr_1-3 a (k) Fr_47-49, respectivamente, obtidas pelo fracionamento em coluna de PR-03 A	100
Figura 50.	Estrutura atribuída a substância 12	101
Figura 51.	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância 12	102
Figura 52.	Estrutura atribuída à substância 9	103
Figura 53.	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância 9	104
Figura 54.	Biossíntese proposta para a substância 12	105
Figura 55.	Estrutura atribuída à substância 10	106
Figura 56.	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância 10	107
Figura 57.	Estrutura atribuída à substância 11	108
Figura 58.	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância 11	110
Figura 59.	Comparação dos espectros obtidos por RMN de ^1H com PRESAT das substâncias: (a) 11 ; (b) 13 , (c) 14 , (d) 15 , e (e) 16 (CD_3OD ; 14,1 T) ...	111
Figura 60.	Estrutura atribuída à substância 13	112
Figura 61.	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância 13	113
Figura 62.	Estrutura atribuída à substância 14	114
Figura 63.	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância 14	115
Figura 64.	Estrutura atribuída a substância 15	116
Figura 65.	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância 15	117
Figura 66.	Estrutura atribuída à substância 16	117
Figura 67.	Principais correlações observadas por COSY e HMBC da substância 16	119
Figura 68.	Comparação dos espectros obtidos por RMN de ^1H e com PRESAT de: (a) substância 11 ; (b) substância observada no funil de separação; e (c) extrato bruto PR-03 A. Os espectros de (a) e (b) obtidos em CD_3OD , e (c) em $\text{DMSO}-d_6$, 14,1 T.....	120
Figura 69.	Biossíntese proposta para as citocalasinas isoladas: 11 , 13 , 14 , 15 e 16	122

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Metodologia de isolamento e purificação de cepas fúngicas	38
Esquema 2. Obtenção dos extratos brutos dos endófitos nos meios líquidos de MDB, Czapek, Extrato de Malte, YM e Nutrient	41
Esquema 3. Obtenção dos extratos dos endófitos nos meios sólidos de arroz e milho	42
Esquema 4. Planejamento fatorial completo 2^3 com níveis codificados e utilizando as variáveis: Adição de KCl, Luminosidade e Agitação.....	44
Esquema 5. Fracionamento em coluna cromatográfica do extrato produzido pelo endófito PR-03 em Arroz	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos endófitos do gênero <i>Xylaria</i> sp. que foram isolados de diferentes espécies vegetais do cerrado	38
Tabela 2. Meios de cultivo utilizados para o crescimento dos endófitos.....	39
Tabela 3. Massa dos extratos obtidos a partir dos endófitos <i>Xylaria</i> sp. inoculados nos respectivos meios líquidos (MDB, CZP, EM, YM e N) e nos meios sólidos (Arroz e Milho). Sendo referente aos endófitos codificados como AS-03, CSY-03, CSY-06, CV-06, PA-01, PM-03 e PR-03.....	47
Tabela 4. Dados referentes à curva analítica de griseofulvina (padrão)	63
Tabela 5. Concentração de griseofulvina presente nos extratos dos endófitos do gênero <i>Xylaria</i> sp. obtida a partir da curva analítica que originou os coeficientes da equação de regressão linear da reta	65
Tabela 6. Dados referentes à curva analítica de griseofulvina (padrão) para análise do planejamento experimental.....	68
Tabela 7. Precisão intra e inter-dia. Cálculo das médias, desvio padrão e coeficientes de variação percentual dos picos cromatográficos do padrão griseofulvina	69
Tabela 8. Avaliação da robustez do método cromatográfico com relação aos t_R do padrão analisado em diferentes temperaturas	70
Tabela 9. Análise da recuperação de griseofulvina avaliado pelo método de extração com a adição de padrão ao meio de cultivo isento do endófito.....	71
Tabela 10. Produção de griseofulvina em função dos experimentos realizados a partir do planejamento fatorial aplicado ao endófito <i>Xylaria</i> sp. PR-03 em meio de Czapek.....	72
Tabela 11. Percentual de inibição do crescimento celular (IG%) dos extratos obtidos pela inoculação dos endófitos <i>Xylaria</i> sp. nos meios líquidos e sólidos em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, controle positivo doxorrubicina.....	77
Tabela 12. Resultado da avaliação da atividade antifúngica contra os fungos <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i> dos extratos obtidos pela inoculação dos endófitos <i>Xylaria</i> sp. nos meios líquidos e sólidos, controle positivo nistatina.....	79
Tabela 13. Resultado da avaliação da atividade anticolinesterásica produzidos pelos endófitos frente ao padrão fisostigmina.....	80
Tabela 14. Rendimento das substâncias obtidas por fracionamento cromatográfico do extrato CSY-06 A	82
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H com PRESAT e ^{13}C da substância 3 (CD_3OD ; 14,1 T).....	83
Tabela 16. Dados de RMN de ^1H com PRESAT e ^{13}C da substância 4 (CD_3OD ; 14,1 T).....	85
Tabela 17. Dados de RMN de ^1H com PRESAT e ^{13}C da substância 5 (CD_3OD ; 14,1 T).....	88
Tabela 18. Dados de RMN de ^1H com PRESAT e ^{13}C das substâncias 1 e 2 (CD_3OD ; 14,1 T).....	90
Tabela 19. Dados de RMN de ^1H com PRESAT e ^{13}C da substância 6 (CD_3OD ; 14,1 T).....	94
Tabela 20. Rendimento das substâncias 7 a 16 obtidas pela separação cromatográfica em CLAE _{preparativo} das frações de PR-03 A.....	99
Tabela 21. Dados de RMN de ^1H com PRESAT e HSQC da substância 12 (CD_3OD ; 14,1 T).....	101
Tabela 22. Dados de RMN de ^1H com PRESAT e HSQC da substância 9 (CD_3OD ; 14,1 T).....	103

Tabela 23. Dados de RMN de ^1H com PRESAT e HSQC da substância 10 (CD_3OD ; 14,1 T).....	106
Tabela 24. Dados de RMN de ^1H com PRESAT e ^{13}C da substância 11 (CD_3OD ; 14,1 T).....	108
Tabela 25. Dados de RMN de ^1H com PRESAT e ^{13}C da substância 13 (CD_3OD ; 14,1 T).....	112
Tabela 26. Dados de RMN de ^1H com PRESAT e ^{13}C da substância 14 (CD_3OD ; 14,1 T).....	114
Tabela 27. Dados de RMN de ^1H com PRESAT e ^{13}C da substância 15 (CD_3OD ; 14,1 T).....	116
Tabela 28. Dados de RMN de ^1H com PRESAT e ^{13}C da substância 16 (CD_3OD ; 14,1 T).....	118

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Arroz
a	Coefficiente linear da reta
AcOEt	Acetato de Etila
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
AS-03	Espécie de <i>Xylaria</i> associado à <i>Arrabidea samydoides</i>
b	Coefficiente angular da reta
atm	atmosfera
BDA	Batata Dextrose Ágar
C	Concentração
Cálc.	Calculado
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CE	Ceará
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cél/mL	Célula por Mililitro
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
C18	Sílica Gel de fase reversa tipo Octadecil Silano
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
CSY-03 e CSY-06	Espécies de <i>Xylaria</i> associados à <i>Casearia sylvestris</i>
CV-06	Espécie de <i>Xylaria</i> associado à <i>Cupania vernaes</i>
CV	Coefficiente de Variância
CZP	Czapek
°C	Graus celsius
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
d	Dubleto
dd	Duplo-dubleto
ddd	Duplo-duplo-dubleto
DMSO	Dimetilsufóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsufóxido deuterado
δ _C e δ _H	Deslocamentos químicos de Carbono e Hidrogênio, respectivamente
DP	Desvio Padrão
DPM	Desvio Padrão da Média
EC	Eletroforese Capilar
EM	Extrato de Malte
ESI-qQ-TOF	Electrospray Ionization – Time of Flight
EUA	Estados Unidos da América
eV	Eletron Volt
Fr	Fração
g	Gramas
g/L	Gramas por Litro
HCT	Linhagem Tumoral de Cólon Humano
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IC ₅₀	Half Maximal Inhibitory Concentration
ICI	Investment Company Institute
LD e LQ	Limite de Detecção e Quantificação, respectivamente

LOE	Laboratório de Oncologia Experimental
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
M	Milho
<i>m</i>	Multiplete
MDB	Meio Líquido de Batata Dextrose
MG	Minas Gerais
mg	Miligramas
min.	Minutos
MHz	Mega Hertz
mm	Milímetro
mL	Mililitro
mol.	Molécula
MTT	Sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
m/z	Razão Massa-Carga
nº	Número
N	Nutrient
NCI	National Cancer Institute
nm	Nanômetro
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
OVCAR	Linhagem Tumoral de Carcinoma de Ovário Humano
p.	Página
P.A.	Para Análise
PA-01	Endófito <i>Xylaria</i> associado à <i>Piper aduncum</i>
PAJ-11	Endófito <i>Xylaria</i> associado à <i>Ocotea corymbosa</i>
pH	Potencial Hidrogênio
PM-03	Endófito <i>Xylaria</i> associado à <i>Palicourea marcgravii</i>
ppm	Parte por Milhão
PRESAT	Espectro de RMN de ¹ H com supressão do sinal da água do solvente
PR-03	Endófito <i>Xylaria</i> associado à <i>Prunus myrtifolia</i>
r ²	Coefficiente de regressão linear da reta
RMN de ¹ H, ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono
rpm	Rotação por Minuto
RUV-01	Endófito <i>Xylaria</i> associado à <i>Rudgea viburnioides</i>
s	Singleto
SAM	S-adenosilmetionina
SF	Linhagem Tumoral de Glioblastoma Humano
<i>sl</i>	Singleto Largo
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/Volume
<i>t</i>	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
t _R	Tempo de Retenção
YM	Yeast Medium
λ	Comprimento de Onda
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Química de Produtos Naturais e micro-organismos	19
1.2 Fungos – aspectos gerais	20
1.3 Fungos endofíticos	21
1.4 Família Xylariaceae, gênero e espécies <i>Xylaria</i>	23
1.5 Griseofulvina	28
1.6 Análise Quantitativa	29
1.7 Aplicação de estímulos às condições de cultivo de micro-organismos	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 MATERIAIS, MÉTODOS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	34
3.1 Análises por Ressonância Magnética Nuclear	34
3.2 Espectrometria de Massas	34
3.3 Análises cromatográficas	34
3.4 Esterilização dos materiais	36
3.5 Manipulação dos micro-organismos.....	36
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	37
4.1 Endófitos do gênero <i>Xylaria</i> sp. associados a espécies vegetais.....	37
4.1.1 Isolamento das cepas fúngicas de <i>Xylaria</i> sp.	37
4.1.2 Cultivo dos endófitos	39
4.1.2.1 Cultivo dos endófitos nos meios líquidos.....	40
4.1.2.2 Cultivo dos endófitos nos meios sólidos	41
4.2 Análises quantitativas e quimiométricas.....	43
4.2.1 Análise quantitativa de griseofulvina	43
4.2.2 Análises quimiométricas	43
4.3 Atividades biológicas dos extratos brutos obtidos nos meios líquidos e sólidos	44
4.3.1 Ensaio citotóxico	44
4.3.2 Ensaio antifúngico.....	45
4.3.3 Ensaio anticolinesterásico	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Rendimento dos extratos	47
5.2 Perfil cromatográfico dos extratos (CLAE-DAD)	48
5.3 Perfil químico dos extratos por RMN de ¹ H (PRESAT).....	57
5.4 Análise quantitativa de griseofulvina nos extratos	62
5.4.1 Análises quantitativas e quimiométricas aplicadas ao endófito <i>Xylaria</i> sp. PR-03 em Czapek	66
5.4.1.1 Análise quantitativa de griseofulvina	67
5.4.1.2 Validação do método cromatográfico (CLAE-DAD).....	68
5.4.1.3 Seletividade, Linearidade e Limites de detecção e quantificação.....	68
5.4.1.4 Precisão.....	69
5.4.1.5 Robustez.....	70
5.4.1.6 Recuperação e exatidão	70
5.4.1.7 Otimização da produção de griseofulvina aplicando planejamento fatorial	71
5.5 Avaliação das atividades biológicas dos extratos	76

5.5.1 Ensaio citotóxico	76
5.5.2 Ensaio antifúngico.....	78
5.5.3 Ensaio anticolinesterásico	80
5.6 Fracionamento do extrato produzido pelo endófito CSY-06	82
5.6.1 Determinação estrutural de 3	83
5.6.2 Determinação estrutural de 4	85
5.6.3 Determinação estrutural de 5	87
5.6.4 Determinação estrutural de 1 e 2	89
5.6.5 Proposta biossintética das isocumarinas e pironas isoladas	92
5.6.6 Determinação estrutural de 6	93
5.7 Fracionamento do extrato produzido pelo endófito PR-03	97
5.7.1 Determinação estrutural de 12	101
5.7.2 Determinação estrutural de 9	102
5.7.3 Biossíntese da griseofulvina.....	104
5.7.4 Determinação estrutural de 10	106
5.7.5 Determinação estrutural de 11	107
5.7.6 Determinação estrutural de 13	112
5.7.7 Determinação estrutural de 14	113
5.7.8 Determinação estrutural de 15	115
5.7.9 Determinação estrutural de 16	117
5.7.10 Biossíntese proposta para as citocalasinas isoladas.....	121
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	123
REFERÊNCIAS	125
APÊNDICE	131

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Química de Produtos Naturais e micro-organismos*

Pode-se dizer que o interesse do homem pelas substâncias químicas, que o rodeiam, é tão antigo como o próprio homem e que o reconhecimento das propriedades químicas de tais substâncias, numa época em que a palavra química ainda não era conhecida, está associado com a sua própria sobrevivência no planeta. É que desde muito cedo e de forma bem rudimentar a espécie humana utiliza os produtos naturais, seja na alimentação, na caça, na medicina, ou em rituais religiosos, entre outras formas. ¹

Durante grande parte da história a natureza tem fornecido, de forma expressiva, uma grande quantidade de medicamentos para o tratamento de diversas doenças, sendo que a ingestão de ervas e folhas tenha constituído uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais para este fim. Descrições sobre a utilização de produtos naturais na medicina, realizada pelo homem, datam desde as sagradas escrituras. No Papiro de Ebers enumeram-se mais ou menos 100 doenças e um grande número de drogas de natureza animal e vegetal. ¹

Por volta do século XIX, os avanços no conhecimento científico levaram à descoberta de substâncias bioativas, frequentemente relatadas como produtos naturais e se deu o início da fitoquímica. ²

Compreendem-se como produtos naturais os bioprodutos obtidos a partir de plantas, animais, e micro-organismos, e que podem ser utilizados para seu benefício. As propriedades bioativas dos produtos naturais são atribuídas à diversidade e complexidade estrutural dos metabólitos secundários. ³

Dentro deste contexto, os produtos naturais são divididos em dois grupos: metabólitos primários e metabólitos secundários. Os metabólitos primários estão relacionados aos processos essenciais à vida, amplamente distribuídos em plantas e micro-organismos, ou seja, são comuns a estas espécies. Os metabólitos secundários são produtos do metabolismo especial, biossintetizados a partir do metabolismo primário. Grande parte dos

princípios ativos responsáveis pela atividade biológica de uma planta é atribuída aos metabólitos secundários presentes, que englobam as classes de substâncias como terpenos, alcaloides, compostos fenólicos e policetídeos. ⁴

São várias as utilidades dos produtos naturais, sendo que o seu estudo tem contribuído enormemente para o desenvolvimento de diversas áreas. Suas maiores contribuições são na utilização como suplementos na indústria alimentícia, intermediários utilizados na indústria farmacêutica e agroquímica, e na indústria de cosméticos. ⁵

Contribuindo para a enorme importância dos produtos naturais, os micro-organismos também começaram a ser investigados como fonte de princípios bioativos. Os fungos passaram a serem estudados quimicamente após a descoberta acidental da penicilina G, por Fleming (1928), um poderoso antibiótico produzido por *Penicillium notatum*. ⁶

Deste modo, nos últimos anos os micro-organismos receberam atenção especial por parte da indústria e dos pesquisadores de produtos naturais. Os avanços obtidos no campo da biotecnologia, aliado ao emprego de técnicas modernas de fracionamento químico, elucidação e triagem na busca por novos protótipos bioativos, têm revelado seu potencial em fornecerem novas substâncias químicas bioativas, ⁷ com utilização nas mais diversas áreas.

1.2 Fungos – aspectos gerais

Fungos são organismos que utilizam como fonte de energia compostos orgânicos (quimiorganotróficos), cujo corpo pode ser unicelular (leveduriforme) ou pluricelular (filamentoso). ⁸ São encontrados em diferentes lugares, como água, solo, ar, animais e plantas, ⁹ devido às condições simples de temperatura (~ 25°C), pH ligeiramente ácido, condições aeróbias ou anaeróbias necessárias para o seu crescimento. ¹⁰ Os fungos são divididos em vários grupos como coprófilos, micoparasitas, termófilos, epifíticos, endofíticos, entre outros. ¹¹

Estes organismos são descritos por uma característica universal que é a impossibilidade de realizar a fotossíntese e desprovidos de clorofila, portanto são heterotróficos. Com isto, os fungos adquirirão seus nutrientes

no meio ambiente em que vivem ou de organismos mortos, além disso, alguns fungos são capazes de desenvolver uma relação simbiótica com seus hospedeiros. ¹²

Os fungos ocorrem basicamente em três modos de vida: simbiótico, parasítico e saprófita. Quando associados às plantas, assumem vários tipos de interações, sendo as simbióticas as que conferem a ambos os organismos diversas vantagens, produzindo ou induzindo a produção de metabólitos que podem auxiliar a planta evitando o ataque de herbívoros, no aumento da tolerância a estresses abióticos e no controle de ataque de insetos ou outros micro-organismos. ¹³ Por outro lado, eles são capazes de sequestrar metabólitos produzidos pelas plantas que irão atuar como defesa química, ou produzi-los em resposta à pressão exercida por outros micro-organismos endofíticos ou fitopatógenos ou até mesmo por predadores. ¹⁴

Nas associações parasitárias o fungo vive dentro da planta, de onde obtém o alimento necessário para seu desenvolvimento. Neste caso, geralmente o metabolismo secundário do fungo é prejudicial à planta, ou pelo consumo de seus elementos vitais ou pela biossíntese de substâncias tóxicas às plantas. O parasitismo está relacionado à patogenicidade e pode, eventualmente, levar a planta à morte. ¹⁵

Os fungos que vivem na forma de saprófitas obtêm seus alimentos de substâncias orgânicas em decomposição, eles criam estruturas reprodutoras a partir do micélio, sendo de grande importância no ecossistema. ¹⁶

Com relação à ocorrência e biodiversidade, os fungos constituem o segundo maior grupo de espécies sobre a terra, perdendo apenas para os insetos. Estimativas sugerem que existam aproximadamente 5,1 milhões de espécies diferentes, sendo que, menos de 5% foram descritas. ^{9, 17} Assim tem-se constatado nos últimos anos uma urgente necessidade em se estudar a química dos fungos, temendo-se a perda da biodiversidade. ^{6, 18}

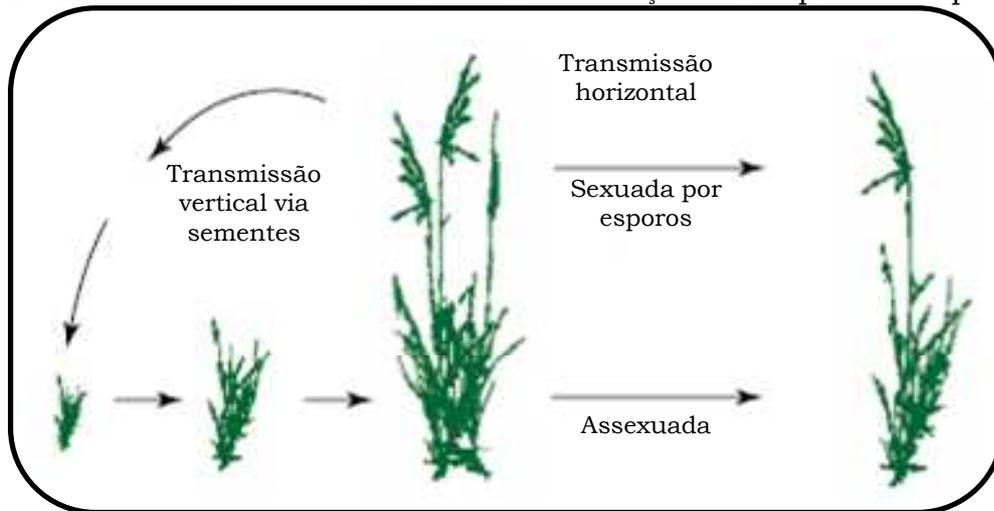
1.3 Fungos endofíticos

O termo endofítico ocorreu em 1866, quando De Bary apresentou ao mundo que “endófito é qualquer organismo que ocorre dentro dos tecidos vegetais”. Entretanto, a definição mais amplamente citada foi dada por

Petrini em 1991 afirmando que endófitos são "todos os organismos que habitam os órgãos da planta que, em algum momento de sua vida, podem colonizar tecidos internos da planta sem causar dano aparente para o hospedeiro". Mais tarde, Bacon e White propuseram uma definição mais conclusiva e amplamente aceita: "endófitos são micro-organismos que colonizam tecidos internos das plantas, sem causar efeitos negativos imediatos".^{19, 20} A definição dada por Strobel (2013) de que "fungos endofíticos são encontrados em toda a natureza e habitam os espaços intra e intersticiais dos tecidos vegetais sem provocar nenhuma evidência externa aparente de sua presença na planta", é a mais atual.²¹

Um fungo endofítico encontra-se em um processo de relacionamento biológico com a planta hospedeira, no entanto, seu papel na vida das plantas é pouco compreendido. Alguns autores descrevem que os endófitos podem ser patógenos, mas, que estão em estado latente. No entanto, o que decide se um endófito é inofensivo ou prejudicial é o equilíbrio entre as demandas da invasão de fungos e a resposta da planta, sendo que uma vez desequilibradas, o endófito pode se transformar em um patógeno.²⁰ Embora a relação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros varie de organismo para organismo, eles constituem um componente importante da biodiversidade microbiana. A espécie hospedeira pode ser infectada, pelos endófitos, horizontalmente por lesões naturais, como estômatos ou crescimento das raízes, e artificiais, como injúrias causadas por práticas agrícolas. A infecção também pode ocorrer verticalmente pelas sementes do hospedeiro, neste caso, o endófito pode se instalar em uma planta por toda sua vida (**Figura 1**, p. 23).²² O modo com que o fungo infecta uma espécie vegetal pode alterar o tipo de interação endófito-hospedeiro. Na transmissão vertical é predominante a interação mutualística, enquanto que na transmissão horizontal (não sistêmica) essa interação tende a ser antagonica. Uma vez no hospedeiro o endófito permanece, geralmente, em um estado latente por toda sua vida ou por um período prolongado, até que as condições ambientais lhe sejam favoráveis, assumindo uma função patogênica.^{23, 24}

Figura 1. Ciclo de vida dos endófitos em associação com a planta hospedeira.



FONTE: Adaptado de SAIKKONEN et al (2004).²²

Os fungos endofíticos são micro-organismos capazes de produzir metabólitos potencialmente bioativos, e estes habitam o interior de plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como as folhas, ramos e raízes, podendo habitar a planta por toda vida, sendo transmitidos, em alguns casos, para futuras gerações por meio da semente do hospedeiro.¹⁶ Evidências da associação planta-micro-organismo têm sido descobertas em tecidos fossilizados de caules e folhas. Provavelmente, ao longo do tempo e da evolução das espécies, os endofíticos podem ter desenvolvido sistemas de comunicação que permitissem a transferência de informações entre eles e a planta e vice-versa, possibilitando ao endófito lidar com condições ambientais instáveis e aumentando a compatibilidade com a planta hospedeira.⁶

Uma das vantagens dos micro-organismos sobre outras fontes naturais está relacionada com a conservação ambiental, uma vez que requerem uma única e pequena remoção do ambiente natural. Outra vantagem é que por se tratarem de fontes renováveis, o cultivo em escala ampliada para produzir metabólitos bioativos pode ser realizada usando a tecnologia existente com a otimização das condições de cultivo.²⁵

1.4 Família Xylariaceae, gênero e espécies *Xylaria*

Fungos do gênero *Xylaria* sp. pertencem à ordem Xylariales e a família Xylariaceae. Xylariaceae pertence a classe dos pirenomicetos (Ascomicota) e

é uma das famílias mais conhecidas e está distribuída por todo o mundo, ocorrendo predominantemente em regiões tropicais e subtropicais. ^{26, 27, 28}

A maioria destas espécies habita tocos e ramos de árvores caídas ou mortas, podendo atuar como saprófitas, mas algumas espécies podem ser comumente isoladas como endófitas e outras espécies são consideradas patógenas. ^{29, 30}

Compreende mais de 85 gêneros e 1300 espécies desta família, porém torna-se óbvio que estes números tendem a ser maiores devido a remanescentes fungos que poderão ser descobertos e classificados em diversas regiões tropicais. ^{26, 31}

A família Xylariaceae tem sido extensivamente estudada nas últimas décadas, isso se deve às propriedades químicas, biológicas e taxonômicas apresentadas por suas espécies. ³⁰ Estes estudos demonstram que os representantes desta família produzem uma grande variedade de metabólitos secundários, sendo que um número considerável destes é inédito. Os principais metabólitos produzidos podem ser agrupados como: diidroisocumarinas e derivados, ácido succínico e seus derivados, butirólactonas, citocalasinas, sesquiterpenos, griseofulvina e derivados, derivados do naftaleno, ácidos graxos de cadeia longa, entre outros. ^{32, 33}

Devido à grande dificuldade na classificação e a falta de coleções modernas de espécies tropicais, uma forma alternativa de identificação pode ser a de relacionar a presença destes compostos com sua posição sistemática e pelos dados químicos, os quais comprovar-se-ia a associação entre as espécies, grupos de espécies e gêneros desta família. ^{29, 32, 33}

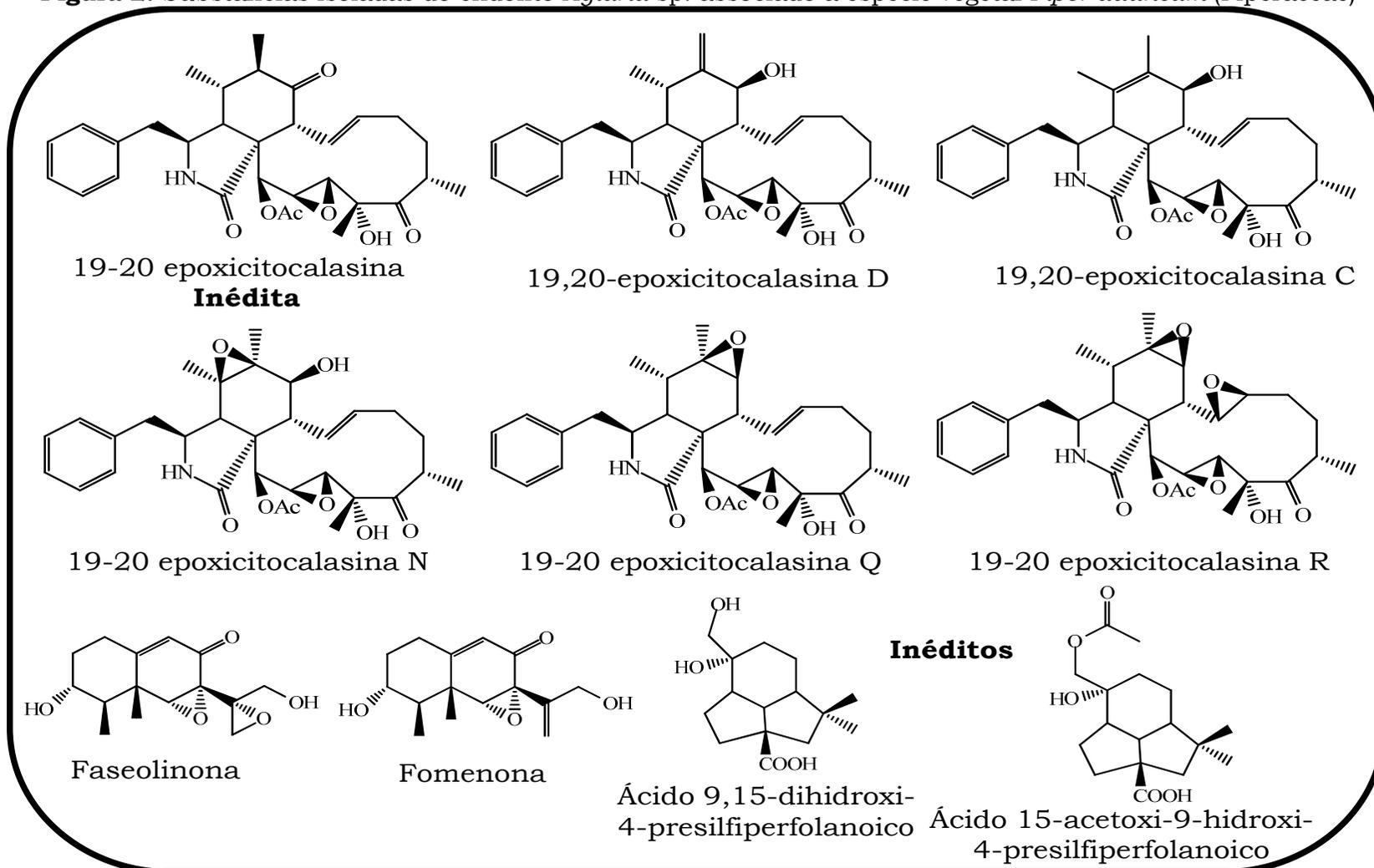
Como contribuição a identificação de espécies *Xylaria*, a experiência do grupo de pesquisa em estudos com estas espécies mostrou-se muito promissora, conduzindo ao isolamento e determinação estrutural das mais diversas classes de substâncias bioativas.

Fato este comprovado pelo trabalho do Dr. Geraldo H. Silva com o endófito *Xylaria* sp. associado a espécie vegetal *Piper aduncum* (Piperaceae), conduzindo ao isolamento e determinação estrutural de dez substâncias, incluindo seis citocalasinas e sesquiterpenos eremofilanos e

persilfiperfolanos, sendo algumas destas substâncias inéditas na literatura (**Figura 2**, p. 26).^{9, 34}

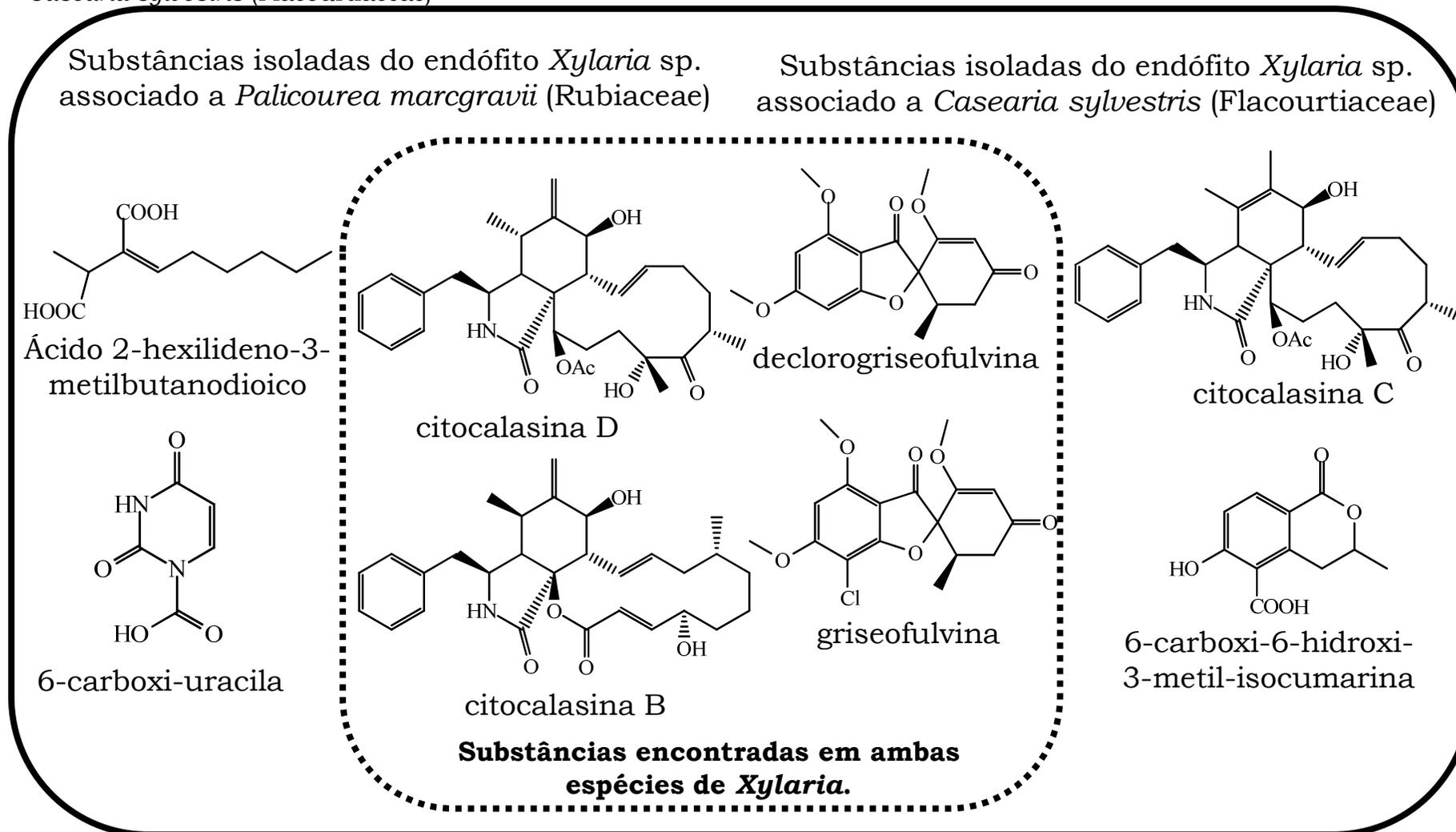
Nos trabalhos com endófitos *Xylaria* sp. associados às espécies vegetais *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) e *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae), ambos conduzidos por Mariana C. Cafêu, resultaram no isolamento de substâncias bioativas de grande importância econômica (**Figura 3**, p. 27), ênfase dada as citocalasinas B, C, e D que são substâncias altamente citotóxicas frente a linhagens de células tumorais, e para a griseofulvina, uma substância antifúngica, sendo que para esta última substância, foi constatado também que seu rendimento nos extratos brutos é influenciado pelo meio de cultivo.^{35, 36}

Figura 2. Substâncias isoladas do endófito *Xylaria* sp. associado à espécie vegetal *Piper aduncum* (Piperaceae)



FONTE: Adaptado de SILVA, G. H. (2005 e 2010) , 8, 34

Figura 3. Substâncias isoladas dos endófitos *Xylaria* sp. associados às espécies vegetais *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) e *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae)

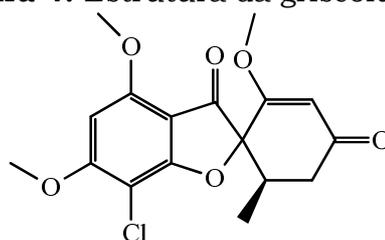


1.5 Griseofulvina

O produto natural griseofulvina é um medicamento antifúngico, utilizado em terapêutica humana e animal, por possuir ação fungistática afetando o sistema microtubular dos fungos, o fuso mitótico e os microtúbulos citoplasmáticos (**Figura 4**, p. 28).³⁷

A griseofulvina foi isolada em 1939 por Oxford e colaboradores a partir da produção metabólica do fungo *Penicillium griseofulvum* Diercks. Em 1946, foram publicados estudos por Brian e colaboradores sobre uma substância isolada a partir do fungo *P. janczewskii* descrito como o "Fator de ondulação", devido à indução da ondulação das hifas fúngicas. Em 1947 descobriu-se que griseofulvina e o "Fator de ondulação" constituíam de fato a mesma substância.³⁸

Figura 4. Estrutura da griseofulvina



Esta substância tem sido amplamente utilizada como um potente antibiótico com atuação antifúngica para o tratamento de doenças causadas por fungos patogênicos e de doenças inflamatórias, podendo ser administrada no tratamento de humanos e animais, no combate a micoses epiteliais na pele (inclusive no couro cabeludo) e nas unhas, e na agricultura.^{39, 40}

Recentemente, griseofulvina tem atraído renovada atenção devido a relatos de bioatividades complementares tais como: antiviral, contra o vírus da hepatite C, suprimindo a replicação do vírus *in vitro*; e como antitumoral, quando em associação com outros medicamentos quimioterápicos, inibindo a proliferação de vários tipos de células cancerígenas induzindo a apoptose destas, com baixíssima toxicidade ao organismo, atraindo considerável atenção para utilização em quimioterapia.^{39, 40, 41}

Utilizada comercialmente desde 6 de abril de 1959 nos EUA pela ICI sob o nome comercial "Fulcin" e no Reino Unido pela Glaxo como "Grisovin",³⁸ foi introduzida para tratamento de micoses em animais e seres humanos, apresentando atividade contra várias espécies de *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Trychophyton*.⁴² Como agente antifúngico, possui mecanismo de ação fungistático, em oposição a fungicida, ou seja, inibe o crescimento de fungos ao invés de matá-los por competição.⁴³

Existem relatos que as espécies de fungos *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Xylaria* sp. e *Nigrospora* sp. são típicos produtores de griseofulvina, e que apesar de alguns pesquisadores já proporem a possibilidade de se produzir esta substância por via sintética, esta forma de obtenção não é economicamente viável devido à necessidade de várias etapas e intermediários até o produto final. Deste modo, atualmente a griseofulvina é produzida comercialmente por fermentação empregando diferentes espécies de *Penicillium*.^{37, 43}

1.6 Análise Quantitativa

Técnicas de separação, tais como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) se sobressaem na química analítica por propiciarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos.⁴⁴

A aplicabilidade de uma análise quantitativa compreende a identificação dos analitos de interesse, livres de compostos interferentes, e propicia a determinação da concentração destes presentes em uma amostra. Para isto, esta análise pode ser baseada em estabelecer o valor da área da banda cromatográfica registrada como um pico, que idealmente deve ter um formato gaussiano, com resposta linear na faixa de detecção utilizado e tendo pleno conhecimento das limitações do método adotado.⁴⁵

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, este deve ser validado.⁴⁶ Segundo a resolução n° 899 da ANVISA,⁴⁶ o objetivo de uma validação é demonstrar que o método utilizado é apropriado para a finalidade

pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa ou quantitativa de determinadas substâncias em matrizes complexas. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Os parâmetros analíticos normalmente utilizados na validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Estes termos conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, ⁴⁷ podem ser definidos como:

Seletividade: é a capacidade que o método possui de medir exatamente o analito em presença de outros componentes tais como: impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz;

Linearidade: é a capacidade de um método analítico corroborar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado;

Limite de detecção: é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada;

Limite de quantificação: é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantitativamente determinada com apropriada precisão e exatidão;

Precisão: é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta avaliação deve ser considerada em três níveis:

Repetibilidade (precisão intra-dia): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

Precisão intermediária (precisão inter-dia): concordância entre os resultados do mesmo laboratório em dias diferentes.

Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, como em estudos colaborativos;

Robustez: mede a sensibilidade que este apresenta em relação a pequenas variações dos seus valores otimizados, quando este não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros;

Exatidão ou recuperação: é a proximidade dos resultados encontrados pelo método em estudo em relação ao verdadeiro convencional. ^{48, 49}

1.7 Aplicação de estímulos às condições de cultivo de micro-organismos

Produtos naturais de micro-organismos são uma fonte essencial para agentes terapêuticos inovadores. O metabolismo secundário de micro-organismos é regulado por uma grande quantidade de genes que codificam enzimas biossintéticas e, portanto, pode ser produzido uma variedade de metabólitos secundários. De fato, apenas uma minoria desses genes de vias é expresso sob condições de laboratório padronizadas e muitos metabólitos valiosos são negligenciados. ⁵⁰

Considerando que cada etapa biossintética pode ser influenciada por diferentes fatores ambientais, aplicações de estímulos simples ou alterações nos parâmetros de cultivo (como por exemplo: composição do meio, pH, temperatura, adição de inibidores enzimáticos, nível de aeração, recipiente de cultura e controle da luminosidade) provavelmente influenciarão na produção de novas substâncias, bem como no aumento da produção de um metabólito de interesse a partir de um único micro-organismo. ⁵¹

Novas abordagens de separação, identificação e quantificação estão sendo desenvolvidas para acelerar o processo de obtenção de substâncias químicas que possuam atividades farmacológicas. Dentre elas podemos destacar a utilização de ferramentas quimiométricas que auxiliam no planejamento e otimização experimental. A necessidade de uma instrumentação mais complexa para analisar estes sistemas de forma eficiente exige, da mesma forma, ferramentas computacionais para manipular e interpretar as informações obtidas. ⁵¹

A utilização de planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, permite extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos, podendo melhorar e

aperfeiçoar o trabalho realizado. Esses métodos são ferramentas poderosas, com as quais, vários objetivos específicos podem ser alcançados.⁵²

Para tal, ao invés de variar apenas um fator de cada vez para encontrar condições otimizadas de análise, é razoável propor a variação de todos os fatores simultaneamente. A razão para isso é que as variáveis podem influenciar-se mutuamente, e o valor ideal para uma delas pode depender do valor da outra. As nomenclaturas adotadas para esse procedimento são a propriedade de interesse chamada resposta, as variáveis que em princípio influenciam a resposta são os fatores e a função que descreve essa influência é chamada de superfície de resposta.⁵⁰

Considerando que o Brasil importa toda griseofulvina e o alto custo que isto acarreta ao país a quantificação deste potente antifúngico em diferentes espécies de *Xylaria*, poderá se tornar uma fonte alternativa na produção desta substância e então contribuir para a utilização de uma fonte biológica alternativa para a produção de griseofulvina e para um melhor direcionamento na produção farmacológica de produtos que utilizam esse princípio ativo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho realizado com os endófitos do gênero *Xylaria* sp. isolados de diferentes espécies vegetais do Cerrado, permitiu uma avaliação da potencialidade dos extratos obtidos em escala reduzida na produção de metabólitos secundários. Os cinco meios de cultivo líquidos comerciais (MDB, Czapek, EM, YM, e Nutrient) e os dois meios sólidos (arroz e milho) apresentaram uma produção metabólica muito rica e com um perfil químico promissor quando analisado por CLAE-DAD e RMN de ^1H (com PRESAT), podendo-se concluir que a produção metabólica dos endófitos em estudo depende da composição nutritiva de cada meio de cultivo. Embora os meios de cultivo líquido evidenciassem uma rica produção metabólica, os meios de cultura sólidos renderam massa de extrato bem maior que os demais meios.

A potencialidade destes extratos frente aos ensaios anticolinesterásico, citotóxico e antifúngico contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* foram surpreendentes, principalmente frente aos ensaios antifúngicos, considerando que a maioria, dos extratos apresentaram uma ou mais substâncias com potencial atividade. Esta triagem inicial permitiu selecionar os endófitos isolados de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) CSY-06, e *Prunus myrtifolia* (Rosaceae) PR-03 para estudo mais detalhado sobre os constituintes químicos presentes nos extratos obtidos em meio sólido de arroz.

O fracionamento do extrato produzido pelo endófito CSY-06 em arroz por CLAE-DAD_{preparativo} forneceu o isolamento de seis substâncias pertencentes a diferentes classes: duas substâncias da classe das pironas, três isocumarinas, e um esteroide, e duas destas substâncias são inéditas. Todas as substâncias isoladas e com relatos na literatura possuem interesse, tanto pelas atividades apresentadas, como para utilização comercial.

O fracionamento do extrato produzido pelo endófito PR-03 em arroz primeiramente em coluna e posteriormente por CLAE-DAD_{preparativo} conduziu ao isolamento e identificação de oito substâncias, como a griseofulvina e declorogriseofulvina, um diácido, e cinco citocalasinas. Metabólitos estes

com renomado potencial bioativo relatado na literatura, e com alto valor agregado, sugerindo que o micro-organismo em associação com a espécie vegetal deva produzir estas substâncias como forma de proteção quanto a possíveis patógenos.

A potencialidade da produção de griseofulvina pelos endófitos *Xylaria* sp., quando submetidos a diferentes meios de cultivo, líquidos e sólidos, permitiu inferir o endófito e meio de cultivo onde essa produção foi mais acentuada (PR-03 em Czapek). O planejamento fatorial realizado para este endófito neste meio de cultivo apresentou uma maximização desta produção em mais de 150% com o valor obtido inicialmente, e a validação do método cromatográfico permitiu assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos, colaborando para uma possível utilização deste endófito na obtenção desta substância para fins comerciais.

Também foi possível verificar, mais uma vez, que o meio de cultivo utilizado favorece a formação de certas classes de metabólitos secundários. Quando o meio de cultivo utilizado foi Czapek (líquido) para o endófito *Xylaria* sp. codificado PR-03, a principal substância produzida foi a griseofulvina, no entanto quando o meio de cultivo utilizado foi o de arroz (sólido) houve maior produção de citocalasinas. Esta observação sugere que as vias biossintéticas são dependentes dos nutrientes oferecidos ao micro-organismo, o que têm sido amplamente discutido na técnica de OSMAC (*One Strain Many Compounds*).

Os resultados encontrados até o momento reforçam a suposição das interações ecológicas existentes entre estes micro-organismos e suas plantas hospedeiras, e a importância em se estudar, química e biologicamente, estes micro-organismos como pode ser verificado pela admirável produção de metabólitos secundários potencialmente bioativos e muitos possivelmente com estruturas inéditas.

REFERÊNCIAS

- 1 LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. **Biossíntese de produtos naturais**. Lisboa: Ed. Instituto Superior Técnico, 2007.
- 2 PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.
- 3 BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.
- 4 HERBERT, R. B. **The biosynthesis of secondary metabolites**. 2nd ed. London: Chapman & Hall, 1989.
- 5 NGUYEN, Q. T.; MERLO, M. E.; MEDEMA, M. H.; JANKEVICS, A.; BREITLING, R.; TAKANO, E. Metabolomics methods for the synthetic biology of secondary metabolism. **FEBS Letters**, v. 586, p. 2177-2183, 2012.
- 6 STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.
- 7 VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; BARREIRO, E. J.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D.; EBERLIN, M. N. Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 908-910, 2004.
- 8 SILVA, G. H. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria* sp., *Phomopsis cassiae* e *Acremonium* sp. associados com espécies vegetais do Cerrado**. 2005. 306 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- 9 HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.
- 10 ALCANO, I. E. The fungi. In: _____. **Fundamentals of microbiology**. 4th ed. Redwood City: Benjamin/Cummings Publishing, 1994, Chap. 14, p. 421-450.
- 11 HAINSWORTH, G. C.; SUSSMAN, A. S. (Ed.). **The fungi, an advanced treatise**. New York: Academic Press, 1965. v. 1.
- 12 BORGES, W. de S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137-1163, 2009.
- 13 SUN, J.; ZANG, W.; GUO, L.; CHI, D. Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. **Science in China Series C**, v. 51, n. 8, p. 751-759, 2008.
- 14 AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 116-137.

- 15 AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 3rd ed. New York: Academic Press, 1998.
- 16 PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. In: _____. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. Rio de Janeiro: Makron Books, 1996. v. 1.
- 17 BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, p. 426-438, 2011.
- 18 CHEN, Y. L.; ZHANG, Y.; YE, J. S.; HAN, H. Y.; WAN, S. Q.; CHEN, B. D. Six-year fertilization modifies the biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a temperate steppe in Inner Mongolia. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 69, p. 371-381, 2014.
- 19 CHOWDHARY, K.; GONZÁLES, A. C.; KAUSHIK, N.; CABRERA, R. Endophytic fungi and their metabolites isolated from Indian medicinal plant. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, p. 467-485, 2012.
- 20 KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S.; STIERLE, A.; STIERLE, D. B. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1208-1228, 2011.
- 21 STROBEL, G. A. Methods of discovery and techniques to study endophytic fungi producing fuel-related hydrocarbons. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 259-272, 2014.
- 22 SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S. H. Evolution of endophyte-plant Symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.
- 23 ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.
- 24 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.
- 25 TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.
- 26 STADLER, M.; KUHNERT, E.; PERŠOH, D.; FOURNIER, J. The Xylariaceae as model example for a unified nomenclature following the “One Fungus-One Name” (1F1N) concept. **Mycology**, v. 4, p. 5-21, 2013.
- 27 CHAREPRASERT, S.; ABDELGHANY, M. T.; EL-SHEIKH, H. H.; AHMED, A. F.; KHALIL, A. M. A.; SHARPLES, G. P.; SIHANONTH, P.; SOLIMAN, H. G.; SUWANNASAI, N.; WHALLEY, A. J. S.; WHALLEY, M. A. Xylariaceae on the fringe. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, v. 53, p. 229-241, 2012.
- 28 HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity-magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**, v. 95, p. 641-655, 1991.
- 29 WHALLEY, A. J. S. The xylariaceous way of life. **Mycological Research**, v. 100, p. 897-922, 1996.

- 30 TANG, A. M. C.; JEEWON, R.; HYDE, K. D. A re-evaluation of the evolutionary relationships within the *Xylariaceae* based on ribosomal and protein-coding gene sequences. **Fungal Diversity**, v. 34, p. 127-155, 2009.
- 31 STADLER, M.; FOURNIER, J.; LÆSSØE, T.; DECOCK, C.; PERŠOH, D.; RAMBOLD, G. *Ruwenzoria*, a new genus of the Xylariaceae from Central Africa. **Mycology Progress**, v. 9, p. 169-179, 2010.
- 32 WHALLEY, A. J. S.; EDWARDS, R. L. The Xylariaceae: a case study in biological and chemical diversity. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIODIVERSITY AND BIORESOURCES: CONSERVATION AND UTILIZATION, 1997, Phuket. **Proceedings...** [S.l.: s.n.], 1997. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.577.7836&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 10 set. 2016.
- 33 SONG, F.; WU, S. H.; ZHAI, Y. Z.; XUAN, Q. C.; WANG, T. Secondary metabolites from the genus *Xylaria* and their bioactivities. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, p. 673-694, 2014.
- 34 SILVA, G. H.; OLIVEIRA, C. M.; TELES, H. L.; PAULETTI, P. M.; CASTRO GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; COSTA NETO, C. M.; PFENNING, L. H.; BERLINCK, R. G. S.; ARAUJO, A. R. Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 3, p. 164-167, 2010.
- 35 CAFÊU, M. C. **Substâncias bioativas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii***. 2004. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.
- 36 CAFÊU, M. C. **Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae)**. 2007. 255 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- 37 PETERSEN, A. B.; RØNNEST, M. H.; LARSEN, T. O.; CLAUSEN, M. H. The chemistry of griseofulvin. **Chemicals Reviews**, v. 114, p. 12088-12107, 2014.
- 38 DE CARLI, L.; LARIZZA, L. Griseofulvin. **Mutation Research**, v. 195, p. 91-126, 1988.
- 39 SHANGA, Z.; LIA, X. M.; LIA, C. S.; WANG, B. G. Diverse secondary metabolites produced by marine-derived fungus *Nigrospora* sp. MA75 on various culture media. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, p. 1338-1348, 2012.
- 40 ZHAO, J. H.; ZHANG, Y. L.; WANG, L. W.; WANG, J. Y.; ZHANG, C. L. Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 2107-2112, 2012.
- 41 SICA, V. P.; REES, E. R.; TCHEGNON, E.; BARDSLEY, R. H.; RAJA, H. A.; OBERLIES, N. H. Spatial and temporal profiling of griseofulvin production in *Xylaria cubensis* using mass spectrometry mapping. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 544-559, 2016.

- 42 CAFÊU, M. C.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. da S.; ARAUJO, A. R. Substâncias antifúngicas de *Xylaria sp.*, um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.
- 43 PARK; J.-H.; CHOI, G. J.; LEE, H. B.; KIM, K. M.; JUNG, H. S.; LEE, S. W.; JANG, K. S.; CHO, K. Y.; KIM, J.C. Griseofulvin from *Xylaria sp.* Strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 112-117, 2005.
- 44 RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- 45 NASSER, A. L. M. **Identificação de oligômeros presentes em garrafas PET destinadas ao acondicionamento de água mineral e de suco de fruta: desenvolvimento e validação de método analítico.** 2003. 118 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- 46 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Determinação da publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jul. 2003.
- 47 SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 3, p. 12-20, 1998.
- 48 ZERAIK, M. L. **Estudo analítico dos flavonoides dos frutos do maracujá (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener*).** 2010. 191 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 49 ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise: um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.
- 50 ZHANG, H.; DENG, Z.; GUO, Z.; PENG, Y.; HUANG, N.; HE, H; TU, X.; ZOU, K. Effect of culture conditions on metabolite production of *Xylaria sp.* **Molecules**, v. 20, p. 7940-7950, 2015.
- 51 FELIPPE, L. G. **Estudo das lignanas de *Peperomia blanda* (Piperaceae): abordagem de aspectos estruturais, metabólicos e biossintéticos.** 2013. 206 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- 52 BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.
- 53 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, n. 3, p. 421-437, 2013.

- 54 TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
- 55 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, p. 51-54, 2002.
- 56 CROTHERS, M.; ZHOU, Z. Y.; RICARDO, N. M. P. S.; YANG, Z.; TABOADA, P.; CHAIBUNDIT, C.; ATTWOOD, D.; BOOTH, C. Solubilisation in aqueous micellar solutions of block copoly(oxyalkylene)s. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 300, p. 22-31, 2005.
- 57 SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n.13, p. 1107-1112, 1990.
- 58 MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- 59 BERRIDGE, M. V. et al. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.
- 60 OLIVEIRA, C. M. **Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos associados com a espécie vegetal *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. 2009. 288 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- 61 SHIMADA, A.; INOKUCHI, T.; KUSANO, M.; TAKEUCHI, S.; INOUE, R.; TANITA, M.; FUJIOKA, S.; KIMURA, Y. 4-hydroxykigelin and 6-demethylkigelin, root growth promoters, produced by *Aspergillus terreus*. **Journal of Biosciences**, v. 59, p. 218-222, 2004.
- 62 GOVINDACHARI, T. R.; PATANKAR, S. J.; VISWANATHAN, N. Isolation and structure of two new dihydroisocoumarins from *Kigelia pinnata*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 1603-1606, 1971.
- 63 EHSAN, S.; AZAM, Q.I. Synthesis of (±)-Kigelin. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 739-742, 2005.
- 64 FANG, B.; XIE, X.; ZHAO, C.; JING, P.; LI, H.; WANG, Z.; GU, J.; SHE, X. Asymmetric total synthesis of fusarentin 6-methyl ether and its biomimetic transformation into fusarentin 6,7-dimethyl ether, 7-O-demethylmonocerin, and (+)-monocerin. **Journal of Organic Chemistry**, v. 78, p. 6338-6343, 2013.
- 65 HU, Z. Y.; LI, Y. Y., LU, C. H.; LIN, T.; HU, P.; SHEN, Y. M. Seven novel linear polyketides from *Xylaria* sp. NCY2. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, p. 925-933, 2010.
- 66 DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. Hoboken: Wiley, 2008.

- 67 UMEOKOLI, B. O.; MUHARINI, R.; OKOYE, F. B.; AJIWE, V. I.; AKPUAKA, M. U.; LIN, W.; LIU, Z.; PROKSCH, P. New C-methylated flavonoids and α -pyrone derivative from roots of *Talinum triangulare* growing in Nigeria. **Fitoterapia**, v. 109, p. 169-173, 2016.
- 68 AMAGATA, T.; DOI, M.; TOHGO, M.; MINOURA, K.; NUMATA, A. Dankasterone, a new class of cytotoxic steroid produced by a *Gymnascella* species from a marine sponge. **Chemical Communication**, n. 14, p. 1321-1322, 1999.
- 69 AMAGATA, T.; TANAKA, M.; DOI, M.; MINOURA, K.; OHISHI, H.; YAMORI, T.; NUMATA, A. Variation in cytostatic constituents of a sponge-derived *Gymnascella dankaliensis* by manipulating the carbon source. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1731-1740, 2007.
- 70 CHOOI, Y. H.; CACHO, R.; TANG, Y. Identification of the viridicatumtoxin and griseofulvin gene clusters from *Penicillium aethiopicum*. **Chemistry & Biology**, v. 17, p. 483-494, 2010.
- 71 EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; VURRO, M.; ZONNO, M. C.; MOTT, A. Cytochalasins Z₁, Z₂ and Z₃, three 24-oxa[14]cytochalasans produced by *Pyrenophora semeniperda*. **Phytochemistry**, v. 60, p. 45-53, 2002.
- 72 KIM, E. L.; LI, J. L.; DANG, H. T.; HONG, J.; LEE, C. O.; KIM, D. K.; YOON, W. D.; KIM, E.; LIU, Y.; JUNG, J. H. Cytotoxic cytochalasins from the endozoic fungus *Phoma* sp. of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 9, p. 3126-3129, 2012.
- 73 KONIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; AUST, H. J.; DRAGER, S.; SCHULZ, B. Geniculol, a new biologically active diterpene from the endophytic fungus *Geniculosporium* sp. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 1, p. 155-157, 1999.
- 74 CAPASSO, R.; EVIDENTE, A.; VURRO, M. Cytochalasins from *Phoma exigua* var. *heteromorpha*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3945-3950, 1991.
- 75 EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; VURRO, M.; ZONNO, M. C.; MOTT, A. Cytochalasins Z₄, Z₅, and Z₆, three new 24-Oxa[14]cytochalasans produced by *Phoma exigua* var. *heteromorpha*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1540-1544, 2003.
- 76 FUJII, R.; MINAMI, A.; GOMI, K.; OIKAWA, H. Biosynthetic assembly of cytochalasin backbone. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 2999-3002, 2013.
- 77 QIAO, K.; CHOOI, Y. H.; TANG, Y. Identification and engineering of the cytochalasin gene cluster from *Aspergillus clavatus* NRRL 1. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 6, p. 723-732, 2011.