

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 10/02/2019.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**

Gustavo Morandi Rahmé

**Prospecção Química em *Pseudofusicoccum stromaticum*, um Fungo  
Endofítico em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae).**

Araraquara  
2017

GUSTAVO MORANDI RAHMÉ

**Prospecção Química em *Pseudofusicoccum stromaticum*, um Fungo Endofítico em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae).**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Regina Araujo

Araraquara  
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

R147p Rahmé, Gustavo Morandi  
Prospecção química em *Pseudofusicoccum stromaticum*,  
um fungo endofítico em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae) /  
Gustavo Morandi Rahmé. – Araraquara : [s.n.], 2017  
78 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientador: Angela Regina Araujo

1. Química orgânica. 2. Produtos naturais.  
3. Microorganismos. 4. Fungos endofíticos. 5. Metabólitos.  
I. Título.

GUSTAVO MORANDI RAHMÉ

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

Araraquara, 10 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Angela Regina Araujo  
Instituto de Química - UNESP – Araraquara - SP



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



Prof. Dr. Geraldo Humberto Silva  
Universidade Federal de Viçosa – UFV, Rio Paranaíba - MG

## **DADOS CURRICULARES**

### **Dados pessoais**

Nome: Gustavo Morandi Rahmé

Filiação: José Nagib Rahmé e Lucia Cristina Morandi Rahmé

Nascimento: 14/04/1992 - Campinas/ SP - Brasil

### **Endereço profissional**

NuBBE – Nucleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais.

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química

Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho,

Instituto de Química de Araraquara

Rua Prof. Francisco Degni, s/no – Araraquara-SP,

CEP: 14081-970, SP - Brasil

Telefone: 16 33016600 (ramal 6793)

**rahmegm@gmail.com**

### **Formação acadêmica/Titulação**

#### **2014 - 2017**

Mestrado em Química pela Universidade Estadual Paulista- UNESP - Araraquara, São Paulo.

Titulo: Prospecção Química em *Pseudofusicoccum stromaticum*, um Fungo Endofítico em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae).

Orientadora: Angela Regina Araujo

Bolsista do: CNPQ

#### **2010 - 2014**

Graduação em Química pela Universidade Estadual Paulista- UNESP - Araraquara, São Paulo.

Titulo: Estudo Químico e Biológico do Fungo Endofítico *Pseudofusicoccum stromaticum* Isolado dos Frutos Maduros de *Eugenia jambolana*.

Orientadora: Angela Regina Araujo

Bolsista do: CNPQ

### **Produção bibliográfica**

Apresentação de trabalho:

Rahmé, G. M.; Uliana, F.; Gubiani, J. R.; Araujo, A. R.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. S. Estudo da variação metabólica do fungo endofítico *Pseudofusicoccum stromaticum* isolado de *Eugenia jambolana*. In: XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP.

Aos meus pais.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus amigos Maria Izabel, Eduardo e Felipe pela ajuda e pelos momentos de alegria.

Aos meus pais e meu irmão por todo o apoio, motivação e amor.

A Prof<sup>a</sup> Angela pela orientação, bom humor, apoio e ensinamentos.

Aos colegas de laboratório pela ajuda e ensinamentos.

Ao Nivaldo que sempre se disponibilizou a fazer os diversos experimentos de RMN, além de ceder seu tempo para ajudar na discussão dos mesmos.

Aos técnicos do laboratório pela disposição em ajudar sempre.

A CNPQ pela bolsa concedida.

“O insucesso é apenas uma oportunidade para  
recomeçar com mais inteligência.”  
Henry Ford

## RESUMO

O fungo endofítico *P. stromaticum* isolado dos frutos maduros da espécie vegetal *E. jambolana* foi cultivado em escala ampliada no meio líquido de Malte por 28 dias a 25 °C no modo estático e, no meio sólido de milho tipo canjica por 21 dias a 25 °C no modo estático. Após 28 dias de crescimento no meio líquido, este foi submetido a sucessivas extrações com acetato de etila (AcOEt), que após evaporado forneceu o extrato bruto de Malte AcOEt. O meio sólido, após 21 dias de cultivo, foi extraído com metanol, seguido de filtração e evaporação fornecendo o extrato bruto metanólico. Este foi submetido à partição líquido/líquido com acetato de etila e água, sendo que a fração AcOEt foi evaporada fornecendo o extrato bruto AcOEt. Este foi particionado com acetonitrila e hexano, e após evaporação dos solventes forneceu os extratos acetonitrila (ACN) e hexânico do meio sólido. O extrato ACN do meio sólido passou por novas partições com acetonitrila e hexano, por apresentar ácidos graxos ainda, fornecendo o extrato bruto de milho NP (novas partições). O extrato bruto de Malte AcOEt, foi fracionado em coluna de bancada, sendo coletadas 11 frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma). Já o extrato bruto de milho NP sofreu partição utilizando-se cartucho de C18, com base em seu cromatograma, resultando em 6 frações (Fr-1 Ps Milho a Fr-6 Ps Milho). Das 6 frações obtidas do extrato de milho NP, escolheu-se trabalhar com a primeira, a qual sofreu partição no CLAE-DAD preparativo, resultando em 8 frações (Fr-1.1 Ps Milho a Fr-1.8 Ps Milho). O extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações, além do extrato bruto de milho NP, foram submetidos à avaliação química por RMN de <sup>1</sup>H e biológica contra o fungo fitopatogêno *Cladosporium sphaerospermum* (e no caso do milho ao *C. cladosporioides* também) e de inibição da enzima acetilcolinesterase, apresentando atividade, enquanto o extrato bruto de milho NP se mostrou inativo. Foram identificadas duas substâncias inéditas, sendo uma da Fr-6 Ps Malte, um ftalato (4,5-dimetil-3,4,5,6-tetrahidrobenzo[c][1,6]dioxecina-1,8-diona) e outra da Fr-1.3 Ps Milho, uma cumarina (2-(7-hidroxi-4-metil-2-oxo-2H-cromen-5-il) ácido acético) e foram propostas as estruturas de outras duas substâncias.

**Palavras-chave:** Fungos endofíticos. *Pseudofusicoccum stromaticum*. *Eugenia jambolana*.

## ABSTRACT

The endophytic fungus *P. stromaticum* isolated from the ripe fruits of the *E. jambolana* was cultivated in large scale in the malt liquid medium for 28 days at 25 °C in the static mode and in the solid medium of hominy corn for 21 days at 25 °C in static mode. After 28 days of growth in the liquid medium, it was made successive extractions with ethyl acetate (EtOAc). The organic layer was evaporated affording the crude extract of Malt EtOAc. The solid medium, after 21 days of cultivation, was extracted with methanol, followed by filtration and evaporation to give the crude methanolic extract. This was subjected to the liquid/liquid partition with EtOAc and H<sub>2</sub>O, being this EtOAc fraction evaporated giving the crude EtOAc extract. After that, the extract was partitioned with acetonitrile and hexane, and after the evaporation of the solvents provided the acetonitrile (ACN) and hexane extracts from the solid medium. The ACN extract of the solid medium was partitioned again with ACN and hexane, due the remaining fatty acid, providing the corn crude extract NP (new partitions). The crude extract of Malt EtOAc was fractionated in a chromatographic column, resulting in 11 fractions (Fr-1 Ps Ma to Fr-11 Ps Ma). The crude extract of corn NP was fractionated by solid phase extraction in reverse phase (C18), based on its chromatogram, resulting in 6 fractions (Fr-1 Ps Corn to Fr-6 Ps Corn). Among the corn fractions collected, it was chosen the fraction Fr-1 Ps Corn to the chemical studies. This fraction was fractionated by preparative HPLC-DAD resulting in 8 fractions. The crude extract of Malt EtOAc and its fraction and the crude extract of corn NP, were submitted to the chemical evaluation by <sup>1</sup>H NMR and biological against the phytopathogenic fungus *Cladosporium sphaerospermum* (and in the case of corn to *C. cladosporioides* as well). Besides, anticolinesterasic activity was made, the crude extract of Malt EtOAc and its fractions showed activity. The fractionating of the crude extracts and then of the fractions gotten afforded the isolation of 2 new substances, one of the Fr-6 Ps Malt, a phthalate (4,5-dimethyl-3,4,5,6-tetrahydrobenzo [c] [1,6] dioxecyn-1,8-dione) and another from Fr-1.3 Ps Corn, a coumarin (2- (7-hydroxy-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-5-yl) acetic acid) and was possible to propose two structures for another two substances.

**Keywords:** Fungal endophyte. *Pseudofusicoccum stromaticum*. *Eugenia jambolana*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Substâncias de uso terapêutico produzidas por fungos. ....	17
<b>Figura 2</b> – <i>P. stromaticum</i> , superfície do endófito. ....	19
<b>Figura 3</b> – <i>P. stromaticum</i> cultivado no meio sólido de Milho tipo canjica. ....	28
<b>Figura 4</b> – Planejamento de partição do extrato bruto de milho NP com base no cromatograma em $\lambda$ 254. ....	29
<b>Figura 5</b> – Frações obtidas da eluição no cartucho de C18. ....	30
<b>Figura 6</b> – Crescimento do endófito <i>P. stromaticum</i> no meio líquido de Malte. ....	33
<b>Figura 7</b> – Espectros de RMN de $^1\text{H}$ e expansões, com pré-saturação da água, em $\text{CD}_3\text{OD}$ (300 MHz) do extrato bruto de milho NP e do extrato branco de milho. ....	37
<b>Figura 8</b> – Espectros de RMN de $^1\text{H}$ , com pré-saturação da água, em $\text{CD}_3\text{OD}$ (300 MHz) das Fr-1 Ps Milho a Fr-6 Ps Milho. ....	38
<b>Figura 9</b> – Espectros de RMN de $^1\text{H}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$ (600 MHz), com pré-saturação da água, das frações Fr-1.1 Ps Milho a Fr-1.8 Ps Milho. ....	39
<b>Figura 10</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ e expansão, em $\text{DMSO-d}_6$ (300 MHz), com pré-saturação da água, do extrato bruto de Malte AcOEt. ....	40
<b>Figura 11</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ e expansão, em $\text{DMSO-d}_6$ (600 MHz), com pré-saturação da água, do extrato branco de Malte. ....	40
<b>Figura 12</b> – Espectros de RMN de $^1\text{H}$ em $\text{DMSO-d}_6$ (300 MHz), com pré-saturação da água, das Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma. ....	41
<b>Figura 13</b> – Cromatograma do extrato bruto de milho NP (a, b, c, d, e, f, g) e do branco de milho (h, i, j, l, m, n, o), em $\lambda$ 203, 210, 230, 254, 267, 290 e 366 nm, respectivamente. ....	42
<b>Figura 14</b> – Resultado da atividade antifúngica do extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma) ao serem testados frente ao fungo fitopatogênico <i>C. sphaerospermum</i> . ....	45
<b>Figura 15</b> – Atividade anticolinesterásica, do extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma). ....	47
<b>Figura 16</b> – Estrutura do 2-(7-hidroxi-4-metil-2-oxo-2H-cromen-5-il) ácido acético. ....	49
<b>Figura 17</b> – Espectro de massas de baixa resolução da substância 1 (CLAE-EM). ....	49
<b>Figura 18</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ e expansões, com pré-saturação da água, em $\text{CD}_3\text{OD}$ (600 MHz) da substância 1. ....	50
<b>Figura 19</b> – Ampliação do mapa de contorno $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação em $\text{CD}_3\text{OD}$ (14,7 T) da substância 1. ....	51
<b>Figura 20</b> – Ampliação do mapa de contorno $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância em $\text{CD}_3\text{OD}$ (14,7 T) da substância 1. ....	52
<b>Figura 21</b> – Espectro de massas (Ms/Ms) da substância 1, mostrando a quebra sofrida pela mesma. ....	53
<b>Figura 22</b> – Fragmentação por EM da substância 1. ....	54
<b>Figura 23</b> – Proposta de biossíntese para a substância 1. ....	55
<b>Figura 24</b> – Estrutura do 4,5-dimetil-3,4,5,6-tetrahidrobenzo[c][1,6]dioxecina-1,8-diona. ....	56

<b>Figura 25</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ , com pré-saturação da água, em $\text{CD}_3\text{OD}$ (600 MHz) da substância 2.....	57
<b>Figura 26</b> – Espectro de COSY em $\text{CD}_3\text{OD}$ (600 MHz) da substância 2.....	57
<b>Figura 27</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$ (150 MHz) da substância 2.....	58
<b>Figura 28</b> – Ampliação do mapa de contorno $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação em $\text{CD}_3\text{OD}$ (14,7 T) da substância 2.....	59
<b>Figura 29</b> – Ampliação do mapa de contorno $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância em $\text{CD}_3\text{OD}$ (14,7 T) da substância 2.....	60
<b>Figura 30</b> – Principais correlações observadas no experimento de HMBC (seta preta) e de COSY (seta duplo sentido verde), da substância 2.....	60
<b>Figura 31</b> – Estrutura do Pseudofusicato. ....	61
<b>Figura 32</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ e expansões, com pré-saturação da água, em $\text{CD}_3\text{OD}$ (600 MHz) das substâncias 3. ....	62
<b>Figura 33</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$ (150 MHz) das substâncias 3. ....	63
<b>Figura 34</b> – Ampliação do mapa de contorno $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação em $\text{CD}_3\text{OD}$ (14,7 T) da substância 3.....	64
<b>Figura 35</b> – Ampliação do mapa de contorno $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância em $\text{CD}_3\text{OD}$ (14,7 T) da substância 3.....	65
<b>Figura 36</b> – Formação do Pseudofusicato.....	66
<b>Figura 37</b> – Estrutura do 5-(hidroximetil)furano-2-ácido carboxílico. ....	66
<b>Figura 38</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ e expansões, com pré-saturação da água, em $\text{CD}_3\text{OD}$ (600 MHz) das substâncias 4. ....	67
<b>Figura 39</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$ (150 MHz) das substâncias 4. ....	68
<b>Figura 40</b> – Ampliação do mapa de contorno $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a uma ligação em $\text{CD}_3\text{OD}$ (14,7 T) da substância 4.....	69
<b>Figura 41</b> – Ampliação do mapa de contorno $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ a longa distância em $\text{CD}_3\text{OD}$ (14,7 T) da substância 4.....	70

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

<b>Fluxograma 1</b> – Obtenção do extrato bruto do endófito em milho. ....	28
<b>Fluxograma 2</b> – Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de milho NP produzido por <i>P. stromaticum</i> .....	31
<b>Fluxograma 3</b> – Fracionamento da Fr-1 Ps Milho, utilizando-se CLAE-DAD preparativo. ....	32
<b>Fluxograma 4</b> – Obtenção do extrato bruto do endófito em extrato de Malte. ....	33
<b>Fluxograma 5</b> – Fracionamento cromatográfico do extrato bruto AcOEt (3,91g) produzido por <i>P. stromaticum</i> em Malte.....	34
<b>Fluxograma 6</b> – Fracionamento cromatográfico de 1,2635 g da Fr-1 Ps Ma, produzida por <i>P. stromaticum</i> em malte.....	35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Resultado do ensaio antifúngico para o extrato bruto de milho NP. ....	43
<b>Tabela 2</b> – Resultado do ensaio anticolinesterásico para o extrato bruto de milho NP. ....	44
<b>Tabela 3</b> – Resultado do ensaio antifúngico para o extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma). ....	46
<b>Tabela 4</b> – Resultado do ensaio anticolinesterásico para o extrato bruto de Malte AcOEt e as frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma).....	48
<b>Tabela 5</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}^a$ (600 MHz) da substância 1.....	53
<b>Tabela 6</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}^a$ (14,7 T) da substância 2.....	61
<b>Tabela 7</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}^a$ (14,7 T) da substância 3.....	65
<b>Tabela 8</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}^a$ (14,7 T) da substância 4.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\delta$ : Deslocamento químico

ACN: Acetonitrila

AcOEt: Acetato de etila

BDA: Batata dextrose ágar

C18: Octadecilsilano

CCDC: Cromatografia em camada delgada comparativa

$\text{CHCl}_3$ : Clorofórmio

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

*d*: Dupleto

Da: Dalton

DAD: Detector de arranjo de diodos

*dd*: Duplo dupleto

EM: Espectrômetro de Massas

Fr: Fração

*hep*: Hepteto

Hex: Hexano

Hz: Hertz

*J*: Constante de acoplamento

MeOH: Metanol

*m/z*: Razão massa carga

NP: Novas partições

PTFE: Politetrafluoretileno

RMN: Ressonância magnética nuclear

*s*: Singleto

SPE: Extração em fase sólida

TMS: Tetrametilsilano

UV: Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1	Fungos endofíticos	18
1.2	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	19
1.3	Produtos naturais obtidos de fungos endofíticos	19
1.4	Escolha da espécie vegetal	21
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
2.1	Objetivo Geral	23
2.2	Objetivos Específicos	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
3.1	Obtenção do extrato ACN bruto cultivado em milho	26
3.2	Novas partições do extrato bruto de milho ACN	29
3.3	Fracionamento do extrato bruto de milho NP	29
3.4	Fracionamento da Fr-1 Ps Milho	31
3.5	Obtenção do extrato bruto de Malte AcOEt	32
3.6	Fracionamento, em coluna, do extrato bruto de Malte AcOEt, produzido por <i>P. stromaticum</i>	33
3.7	Fracionamento da Fr-1 Ps Ma	34
3.8	Bioensaios	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>
4.1	Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de <sup>1</sup> H) do extrato bruto de milho NP e suas frações (Fr-1 Ps Milho a Fr-6 Ps Milho)	37
4.2	Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio das frações Fr-1.1 Ps Milho a Fr-1.8 Ps Milho	38
4.3	Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio do extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações ( Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma)	39
4.4	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)	42
4.5	Bioensaios do extrato bruto de milho NP	43
4.6	Bioensaios do extrato bruto de Malte AcOEt e suas frações (Fr-1 Ps Ma a Fr-11 Ps Ma)	44
4.7	Determinação Estrutural da Substância 1	49
4.8	Determinação Estrutural da substância 2	56
4.9	Determinação Estrutural da substância 3	61
4.10	Determinação Estrutural da substância 4	66
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>72</b>
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICE A	76
	APÊNDICE B	77
	APÊNDICE C	78

## 1 INTRODUÇÃO

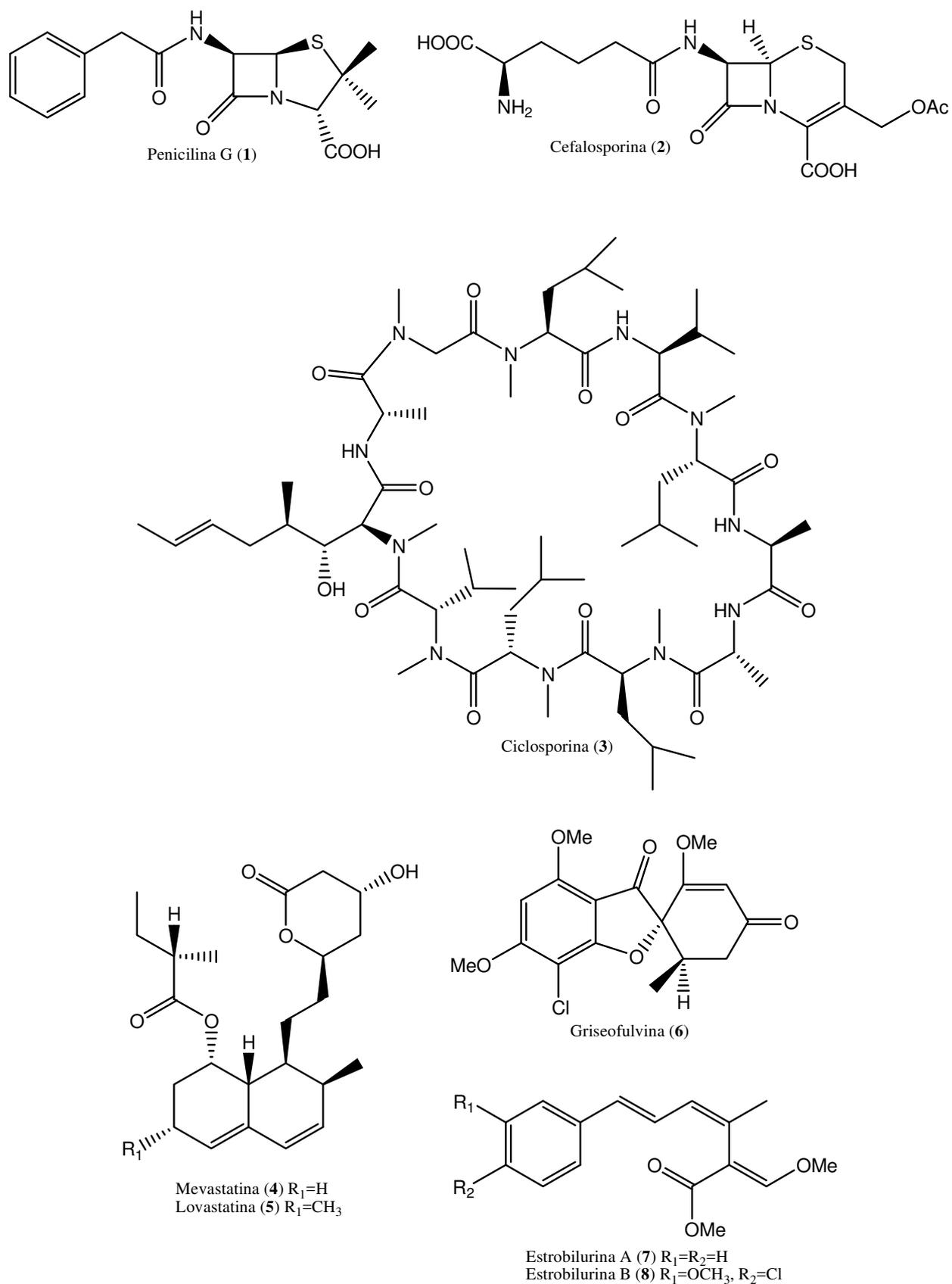
Por mais de 50 anos substâncias produzidas por fungos têm revolucionado a medicina, fornecendo medicamentos de enorme valor terapêutico e de grande potencial na agricultura. Desde a descoberta da penicilina (1), o primeiro antibiótico  $\beta$ -lactâmico, do fungo *Penicillium notatum* por Alexander Fleming, fungos têm provido a medicina moderna com importantes antibióticos para a cura de doenças infecciosas fatais. Penicilina, inicialmente ativa contra bactérias Gram positivas deu origem a uma nova geração de antibióticos de amplo espectro contra várias linhagens de bactérias, inclusive Gram negativa. Os  $\beta$ -lactâmicos, principalmente penicilinas e cefalosporinas (2) estão entre as drogas mais consumidas, com vendas que atingiram 15 bilhões de dólares em 2002 e representam aproximadamente 65% o mercado de antibióticos no mundo. Estes antibióticos tiveram a produção aumentada pela manipulação nas técnicas de fermentação de *Penicillium chrysogenum* e *Acremonium chrysogenum*, o que resultou na redução dos custos destes medicamentos (ALY et al., 2011).

A ciclosporina (3), obtida de *Tolypocladium inflatum*, um fungo de solo isolado por pesquisadores da Sandoz, é outro medicamento campeão mundial de vendas com uma arrecadação de 1,4 bilhões de dólares no período de 2004-2008. Esta é um peptídeo cíclico formado por 11 aminoácidos sendo que um deles apresenta a configuração D, raramente encontrado na natureza. A ciclosporina deu origem a nova era em imunologia e transplantes de órgãos, a qual começou em 1971 (ALY et al., 2011).

As estatinas, substâncias antilipêmicas, representam outro grupo de importantes drogas obtidas de fungos, sendo os mais potentes redutores de colesterol disponíveis no mercado. Algumas estatinas são obtidas por reação de biotransformação da mevastatina (4), a qual foi primeira estatina isolada de *Penicillium citrinum*, como exemplo temos a lovastatina (Mevacor®) (5), a qual também já foi isolada de *Monascus ruber* e posteriormente de *Aspergillus terreus*. Outras estatinas são derivadas sintéticas, análogas ao produto natural isolado de fungos, tais como lipitor®, crestor® e livalo®, entre outros. As vendas de todas as estatinas disponíveis no mercado atingiram o valor de 15,5 bilhões de dólares em 2004 (ALY et al., 2011).

Griseofulvina (6) (Fulvicin<sup>®</sup>, Grifulvin<sup>®</sup>, Grisovin FP<sup>®</sup>, Gristatin<sup>®</sup>), outro importante metabólito secundário produzido pelo fungo filamentosso *Penicillium griseofulvum* é usado no tratamento de infecções fúngicas da pele, cabelo e unhas, com um mercado mundial de 31,1 milhões de dólares em 2007 (ALY et al., 2011).

Outras importantes drogas ou produtos para a agricultura, derivados ou inspirados em produtos naturais, de fungos, incluem as estrobilurinas (7, 8), com atividade contra vários fungos filamentosos e leveduras; equinocandinas uma substância com forte atividade antifúngica (ALY et al., 2011).



**Figura 1** – Substâncias de uso terapêutico produzidas por fungos.

Fonte: adaptado de Aly et al. (2011).

Adicionalmente, a obtenção de hormônios esteroidais usados na medicina como anti-inflamatório, diurético, anabólico, anti-androgênico, antifúngico, anticancerígeno (mama e prostata), no tratamento de osteoporose, prevenção de doenças coronárias, prevenção e tratamento de infecções por HIV, anti-obesidade e por último e, não menos importante como contraceptivo oral, tem sido obtidos por biotransformação de esteróides utilizando fungos. Hormônios esteroidais estão entre os medicamentos mais vendidos no mundo, e é uma das chaves de sucesso na biotecnologia (MORICCA; RAGAZZI, 2008).

Com base nas colocações acima e que entre os 20 medicamentos mais prescritos no mundo, seis são originários de fungos, e que estimativas sugerem a existência de 5,1 milhões de espécies de fungos, a chance de se encontrar novos compostos com potencial na medicina e agricultura é enorme, e impulsiona o estudo neste nicho de micro-organismo praticamente inexplorado (MORICCA; RAGAZZI, 2008).

### **1.1 Fungos endofíticos**

O termo endófitos originalmente descrito por De Bary em 1866, refere-se a qualquer micro-organismo que vive nos tecidos das plantas, distinguindo-se dos epifíticos que vivem na superfície. São encontradas diferentes definições de endófitos na literatura (AZEVEDO; ESPOSITO, 2010), mas a definida por Bacon e Write amplamente aceita e utilizada, é que endófitos são micro-organismos que colonizam os tecidos internos das plantas sem causar efeitos negativos imediatos (KHARWAR et al., 2011).

Os fungos endofíticos são um grupo diversificado de ascomicetos definidos por sua ocorrência assintomática dentro dos tecidos vegetais, ocorrem em todo o território terrestre, nas comunidades naturais e antrópicas, colonizando plantas no Ártico, Antártica, solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas tropicais, mangues e florestas costeiras (JALGAONWALA et al., 2011; ARNOLD, 2007). Em quase todas as plantas vasculares, algas marinhas, musgos e samambaias, estudadas até o momento, foram encontradas bactérias e fungos endofíticos. Normalmente, centenas de espécies de endófitos podem ser isolados de uma única planta, sendo que pelo menos um é específico ao hospedeiro (TAN; ZOU, 2001).

Esta associação sugere que estes micro-organismos co-evoluíram com os

seus hospedeiros, apresentando uma íntima relação mutualística, onde os endófitos recebem nutrientes e proteção enquanto a planta tem vantagens decorrentes dessa interação, como a maior resistência em ambientes com intenso estresse causado por fatores bióticos (insetos, herbívoros, nematóides parasitas e micro-organismos fitopatogênicos) ou abióticos (pH, temperatura, estresse hídrico, ventos fortes, salinidade, etc.) (AZEVEDO; ESPOSITO, 2010; KHARWAR et al., 2011; ARAUJO et al., 2010; OWNLEY; GWINN 2010).

### **1.2 *Pseudofusicoccum stromaticum***

*P. stromaticum* pertencente à família Botryosphaeraceae. Micro-organismos desta família podem ser saprófitas, se alimentando de cascas de madeira em decomposição, patógenos primários em espécies de plantas lenhosas e agrícolas e endófitos. São encontrados em uma grande diversidade de plantas. (CASTRO-MEDINA; CASTILLO, 2009).

A cultura de *P. stromaticum* forma micélios abundantes na superfície de coloração esbranquiçada e, o reverso das colônias torna-se acinzentado escuro após o envelhecimento (Figura 2).



**Figura 2** – *P. stromaticum*, superfície do endófito.

**Fonte:** Gubiani (2015, p. 150).

### **1.3 Produtos naturais obtidos de fungos endofíticos**

Os micro-organismos endofíticos associados a plantas representam uma fonte inexplorada de produtos naturais novos e bioativos, com mais de 20.000 substâncias descritas (OWNLEY; GWINN 2010), sendo que a grande maioria

apresenta alguma bioatividade, evidenciando o potencial biológico e biossintético (PARANAGAMA et al., 2007; YANG et al., 2012). Isto pode ser explicado pela teoria ecológica, que estabelece que a produção metabólica depende do nicho ecológico no qual o micro-organismo está inserido e das conseqüentes interações bióticas e abióticas (STROBEL; DAISY, 2003; CARTER, 2011). Estes relatos sugerem que a seleção do endófito deve se realizada com fungos de diferentes biotas, principalmente os que enfrentam freqüentes e intensas interações no ambiente como plantas de regiões áridas, florestas tropicais, entre outras (SCHULZ et al., 2002; STROBEL et al., 2004).

Os produtos naturais de fungos endofíticos apresentam um amplo espectro de atividade biológica como, antimicrobiana, antiparasita, neuroprotetora, antioxidante, antidiabética, propriedades imunossupressoras, antiviral, anticolinesterásica, agentes neoplásicos e citotóxicas, estes metabólitos podem ser agrupados em várias classes, incluindo alcaloides, esteroides, terpenos, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides, lignanas, ácidos fenólicos, entre outros (STROBEL; DAISY, 2003; ALY et al., 2011; WANG et al., 2012).

Outros produtos potencialmente bioativos produzidos por fungos endofíticos merecem destaque, como os anticancerígenos derivados de antracenediona (ZHANG et al., 2010) e 22-oxa-(12)-citocalasinas (PRITI et al., 2009). Pesquisas ainda relatam outros compostos com atividades promissoras como as antraquinonas (ZHANG; SONG; TAN, 2006) e a 10-hidroxiamptotecina (SHWETA et al., 2010), poderosos agentes antineoplásicos, isolado dos fungos endofitos *Pleospora sp.* e *Fusarium solani*, respectivamente; e o subglutinol A e B, agentes imunossupressores, produzidos pelo endófito *Fusarium subglutinans* (GUO et al., 2008). Kusari (2011) descreveu a produção de hipericina em cultura do endófito *Hypericum perforatum*, um agente no combate a depressão e ansiedade. O metabólito fomocromona A foi isolado do endófito *Phomopsis sp.*, demonstrando uma boa atividade antifúngica, antibacteriana e inibidora de crescimento de algas (AHMED et al., 2011).

Em 2012, isolou-se do endófito pertencente ao gênero *Phoma* associado a *Arisaema erubescens*, os metabólitos tricodermina e cercosporamida, com fortes atividades antifúngicas e antitumorais (WANG et al., 2012).

Alguns estudos demonstram que os fungos endofíticos são capazes de produzir um grande número de importantes metabólitos secundários bioativos,

conhecidos apenas em plantas, sugerindo dessa forma que os endófitos são uma fonte alternativa na produção destes metabólitos (ALY et al., 2011; ALY et al., 2010; GREVE et al., 2010; JALGAONWALA et al., 2011). Um exemplo bem conhecido é a produção do Taxol<sup>®</sup>, uma importante droga anticancerígena, pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* isolado da planta *Taxus brevifolia* que também produz esta substância. Outro importante anticancerígeno é a vincristina isolada da planta *Catharanthus roseus*, e recentemente isolada do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* obtido da mesma planta (JALGAONWALA et al., 2011). Podofilotoxina também utilizada no tratamento de câncer é conhecida por ser encontrada em espécies vegetais do gênero *Podophyllum* e também relatada dos endófitos *Trametes hirsuta* e *Phialocephala fortinii* (ALY et al., 2011). Existem outros exemplos de compostos de origem vegetal que também são produzidos por fungos que habitam os vegetais (ALY et al., 2011; ARNOLD, 2007).

Endófitos representam uma inesgotável e sustentável fonte de recursos de novos produtos naturais (KUSARI; SPITELLER, 2011). Das 300 mil espécies de plantas existentes, cada uma é hospedeira de pelo menos um micro-organismo endofítico e raras destas espécies vegetais têm sido estudadas em relação a sua biologia endofítica. Conseqüentemente é grande a possibilidade de descoberta de novos e interessantes micro-organismos endofíticos de plantas de diferentes ecossistemas (STROBEL et al., 2004; AZEVEDO; ESPOSITO, 2010).

#### **1.4 Escolha da espécie vegetal**

Devido ao enorme número de espécies de vegetais no mundo, algumas estratégias de seleção devem ser utilizadas na busca por fungos endofíticos produtores de substâncias bioativas (STROBEL et al., 2004), tais como plantas com história etnobotânica que relata uso e aplicação específica de partes do vegetal; plantas endêmicas que ocupam solos mais antigos, plantas nativas de áreas com grande biodiversidade, plantas de habitats extremos, entre outras. Esta seleção pode nos garantir oportunidade de isolamento de novos gêneros e espécies de fungos endofíticos e possivelmente novos metabólitos secundários com possível aplicação na medicina, agricultura e indústria alimentícia.

Dentro deste contexto, *Eugenia jambolana*, uma espécie vegetal muito utilizada na medicina popular para tratamento de diabetes e que apresenta

diferentes atividades biológicas como adstringente, diurética, antidiabética, antioxidante, antibiótica e anti-inflamatória (VASI et al., 2009; SANTOS et al, 2012) foi selecionada para estudo da microbiota associada. Utilizando metodologia adequada, treze fungos endofíticos foram isolados das folhas, caule, frutos verdes e maduros. Estes foram cultivados em pequena escala em diversos meios e os extratos obtidos foram submetidos a ensaios para avaliação das atividades antifúngica e anticolinesterásica. Dentre os extratos ensaiados, o produzido por Eifm-01 (classificado como *P. stromaticum*) em milho tipo canjica e em extrato de Malte, apresentou atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, e anticolinesterásica. Esta observação nos direcionou para o estudo químico e biológico dos extratos brutos produzidos por *P. stromaticum*, objetivando o isolamento das substâncias responsáveis pelas atividades observadas nos extratos brutos.

## 5 CONCLUSÃO

A triagem química e biológica realizada com os extratos brutos de milho NP e de Malte AcOEt, produzidos por *P. stromaticum*, confirmaram que a produção metabólica é dependente do meio de cultivo e que o extrato bruto de Malte AcOEt produzido por *P. stromaticum* apresenta substâncias com atividade anticolinesterásica e antifúngica, sugerindo que os fungos endofíticos podem estar exercendo função ecológica, protegendo as espécies hospedeiras contra possíveis fitopatógenos.

O isolamento e determinação estrutural de duas substâncias inéditas, o ftalato (4,5-dimetil-3,4,5,6-tetrahidrobenzo[*c*][1,6]dioxecina-1,8-diona) **2** e a cumarina (2-(7-hidroxi-4-metil-2-oxo-2H-cromen-5-il) ácido acético) **1**, sendo que a substância **2** apresenta atividade antifúngica contra *C. sphaerospermum* e anticonesterásica, evidenciam *P. stromaticum* como um prolífico produtor de substâncias inéditas bioativas.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, I. et al. Three new antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 15 p. 2867-2873, 2011
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fifty years of drug discovery from fungi. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 1, p. 3-19, 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.
- ARAÚJO, W. L. et al. (Coord.). **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiroz, 2010. 167 p.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 51-66, 2007.
- AZEVEDO, J. L.; ESPOSITO, E. (Org.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. rev. ampl. Caxias do Sul: Ed. UCS, 2010. 638 p.
- CARTER, G. T. Natural products and pharma 2011: strategic changes spur new opportunities. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1783-1789, 2011.
- CASTRO-MEDINA, F.; CASTILLO, S. M. Botryosphaeriaceae en Venezuela (una revisión). **Fitopatología Venezolana**, v. 22, n. 2, p. 44-44, 2009.
- COSTA, T. M.; TAVARES, L. B. B.; OLIVEIRA, D. Fungi as a source of natural coumarins production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016. doi:10.1007/s00253-016-7660-z.
- GREVE, H. et al. Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 537-545, 2010.
- GUBIANI, J. R. **Bioprospecção de fungos endofílicos *Camarops* sp., *Periconia atropurpurea* e *Pseudofusicoccum stromaticum* e avaliação epigenética de *Phoma* sp.** 2015. 225 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2015.
- GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008
- HENG-CHAO, E. et al. Secondary metabolites from the fungus *Engyodontium album* associated with starfish *Anthenea pentagonula* in the South China Sea. **Chinese Journal of Marine Drugs**, v. 32, n. 6, p. 8-12, 2013.
- JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAM, R. T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.

- KHARWAR, R. N. et al. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1208-1228, 2011.
- 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.
- LI, Z.; YANG, X. Cytotoxic secondary metabolites from liquid culture of plant endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula*. **Mycosystema**, v. 33, n. 1, p. 97-102, 2014.
- LUCAS, E. M. F. et al. Phthalates production from *Curvularia senegalensis* (Speg.) Subram, a fungal species associated to crops of commercial value. **Microbiological Research**, v. 163, p. 495-502, 2008.
- 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.
- MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Fungal endophytes in Mediterranean Oak Forest: a lesson from *Discula quercina*. **Phytopathology**, v. 98, n. 4, p. 380-386, 2008.
- OWNLEY, B.; GWINN, K.; VEJA, F. E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **BioControl**, v. 55, p. 113-128, 2010.
- PARANAGAMA, P. A.; WIJERATNE, E. M. K.; GUNATILAKA A. A. L. Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi: effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1939-1945, 2007.
- 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.
- RAHALISON, L. et al. A bioautographic agar overlay method for the detection of anti-fungal compounds from higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 199-201, 1991.
- SANTOS, K. K. A. et al. Cytotoxic, trypanocidal, and antifungal activities of *Eugenia jambolana* L. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 1, p. 66-70, 2012.
- SCHULZ, B. et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.
- SHEN, K. et al. Separation, identification and bioactivity of anti-tumor components from fermented broth and mycelia of fungus *Penicillium stoloniferum* derived from *Salicornia herbacea*. **Food Science**, v. 33, n. 23, p. 278-282, 2012.

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.

SOUZA, L. G.; RENNÓ, M. N.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Coumarins as cholinesterase inhibitors: a review. **Chemico-Biological Interactions**, 2016. doi:10.1016/j.cbi.2016.05.001.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 491-502, 2003.

STROBEL, G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolite. **Natural Product Reports**, v.18, p. 448-459, 2001.

UMASHANKAR, T.; GOVINDAPPA, M.; RAMACHANDRA, Y. L. In vitro antioxidant and antimicrobial activity of partially purified coumarins from fungal endophytes of *Crotalaria pallida*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 8, p. 58-72, 2014

VASI, S.; AUSTIN, A. Antioxidant potential of *Eugenia jambolana* Lam. Seeds. **Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 8, p. 894-898, 2009.

WANG, L. et al. Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 1231-1239, 2012.

YANG, X.; ZHANG, J.; LUO, D. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. **Journal of Natural Products**, v. 29, p. 622-641, 2012.

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, Z.; LIU, Y.; FAN, L. Antioxidant activity and structure identification of metabolites of an endophytic fungus *Alternaria* sp. N.SBA10 isolated from *Scutellaria baicalensis*. **Mycosystema**, v. 31, n. 6, p. 917-923, 2012.