

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/02/2017.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Paepalanthus chiquitensis*
(ERIOCAULACEAE) E EFEITOS DE MODULADORES QUÍMICOS
EPIGENÉTICOS NO CULTIVO DE *Pochonia chlamydosporia*

FELIPE HILÁRIO

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

ARARAQUARA - SP

2016

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA
DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Paepalanthus chiquitensis*
(ERIOCAULACEAE) E EFEITOS DE MODULADORES QUÍMICOS
EPIGENÉTICOS NO CULTIVO DE *Pochonia chlamydosporia*

FELIPE HILÁRIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

ARARAQUARA - SP

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

H641e Hilário, Felipe
Estudo químico e avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à *Paepalanthus chiquitensis* (ERIOCAULACEAE) e efeitos de moduladores químicos epigenéticos no cultivo de *Pochonia chlamydosporia* / Felipe Hilário – Araraquara, 2016
146 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Lourdes Campaner dos Santos
Coorientador: Taís Maria Bauab

1. Eriocaulaceae. 2. *Paepalanthus chiquitensis*. 3. *Fusarium*. 4. *Bipolaris*. 5. Epigenética.
I. Santos, Lourdes Campaner dos, orient. II. Bauab, Taís Maria, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE FELIPE HILARIO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aos 22 dias do mês de fevereiro do ano de 2016, às 09:00 horas, no(a) Anfiteatro da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. LOURDES CAMPANER DOS SANTOS do(a) Instituto de Química de Araraquara-UNESP / Departamento de Química Orgânica do , Prof. Dr. DANIEL RINALDO do(a) Faculdade de Ciências do Campus de Bauru da UNESP / Departamento de Química da, Profa. Dra. ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP / Departamento de Fármacos e Medicamentos da , sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de FELIPE HILARIO, intitulada **ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS ENDOFOLÍTICOS ASSOCIADOS À Paepalanthus chiquetensis (Eriocaulaceae) E EFEITOS MODULADORES QUÍMICOS EPIGENÉTICOS NO CULTIVO DE Pochonia chlamydosporia**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. LOURDES CAMPANER DOS SANTOS 

Prof. Dr. DANIEL RINALDO 

Profa. Dra. ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO 

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem ou que os seus planos nunca vão dar certo ou que você nunca váis ser alguém...”
Renato Russo

*Dedico este trabalho aos meus pais Eduardo e Maria Anália, e ao meu irmão Fernando Hilário que sempre me apoiaram.
Muito Obrigado!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por existir, por estar sempre presente na minha vida e por tudo que tem me concedido.

Aos meus pais, Eduardo e Maria Anália, que sempre me incentivaram e por terem acreditado em mim.

Ao meu irmão, Fernando, pela sincera amizade e por sempre poder contar com você.

À minha querida prima Mari e aos meus queridos sobrinhos Lê, Bia, Breno e Léo.

À professora Lourdes Campaner dos Santos, pela excelente orientação e, principalmente, pelo aprendizado adquirido, os quais foram essenciais à minha formação e na realização desse trabalho, pela amizade, paciência, preocupação e respeito depositados a mim desde a IC em 2007.

À professora Taís Maria Bauab, minha estimada co-orientadora, por ter aberto as portas de seu laboratório e proporcionar-me a valiosa oportunidade de trabalhar com os ensaios de atividade antimicrobiana, além das enriquecedoras discussões.

Às professoras Rosemeire C. L. R. Pietro & Lúcia Maria Xavier pela participação na banca de qualificação e pelas importantes sugestões para a finalização deste trabalho.

Aos professores Rosemeire C. L. R. Pietro & Daniel Rinaldo, que gentilmente aceitaram o convite para compor a banca de defesa do mestrado.

Ao professor Marcelo Aparecido da Silva pela amizade, orientação e imenso aprendizado durante a iniciação científica.

À professora Angela Regina do Araujo por ter dado a oportunidade em trabalhar com fungos endofíticos, pela parceria, contribuição e pelos valiosos ensinamentos.

A todos os colegas do laboratório de fitoquímica: Aninha, Carol Gomes, Carlos, Claudinha, Daniel, Michelle, Guilherme, Rodrigo, Leonardo, Ju Severi, Mayara, Tiago Nakamura, Júlia, Raissa, Fabiano, Viviane, Clenilson, Tangerina, Claudia, Maria do Socorro, Lima Neto, Samara, Sauna, Wesley, Daylin, Alexander, Talitinha, Taís, Carlos, Francisco, Fabiana, Juliana Severe, Cássia, Mariana Pacífico e Fabiana pela amizade e pela convivência. Foi muito bom ter vocês comigo!

A todos os colegas do laboratório de Fisiologia de Micro-organismos: Patrícia Bento, Matheus Ramos, Kamila Negri, Victor Lucena, Isadora, Malu, Raquel (Ruge), Thaís Jovenazzo, Larissa, Bruna e Luciene pela amizade, receptividade e prestatividade em todos os momentos.

A todos os colegas do laboratório de Micro-organismos: Juzinha, Carol, Andressa (Blossom), Alana, Rebeca, Vanessa Chapla pela convivência dentro e fora do laboratório.

Aos grandes amigos, Giovana, Roça, Jú Bosso, Alice Haddad, Ana Carolinda, Raquel Sabará, Marininha, Dú, Bel, Patrick, Martina, Revorta, Naira, Babs e Mari ruiva.

Aos estimados de São Carlos, Henry, Michel, Geandro, Cona, Mônica, Rogério e Otávio!

Aos técnicos João e Marília, do Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Química, pelas análises.

Ao Rafael (PT) pelo espectro de IV.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Instituto de Química UNESP-Araraquara, pela acolhida e incentivo à vida acadêmica

Agradeço também The University of Arizona e aos membros do Natural Product Center (Tucson, Arizona-EUA), em especial ao Dr. Kitshir pela amizade e por tudo que aprendi com vocês. Muito obrigado!

Ao prof. Dr. Leslie A. A. Gunatilaka pela orientação, pelos ensinamentos, compreensão e amizade.

A todos os funcionários da FCFAr e do IQ que contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPESP pelas bolsas concedidas no Brasil (Processo No. 2013/12564-6) e no exterior (Processo No. 2014/25181-0) e aos funcionários vinculados à FAPESP.

As agências de fomento Capes e CNPq.

RESUMO

Este trabalho apresenta os resultados da pesquisa de metabólitos secundários ativos produzidos por fungos endofíticos associados às partes aéreas (folhas, escapos e capítulos) de *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae). Entre os 25 fungos isolados da espécie de Eriocaulaceae, o *Fusarium* sp. foi o fungo mais promissor quanto à atividade antimicrobiana para as cepas de bactérias Gram-negativa *Escherichia coli* e *Salmonella setubal*, da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e para a levedura *Candida albicans* resistente ao fluconazol, e ainda exibiu a capacidade bactericida e fungicida. Outro fungo selecionado foi o *Bipolaris* sp. isolado das folhas de *P. chiquitensis* devido a sua diversidade química. O cultivo dos fungos em *Potato Dextrose Broth* (PDB) em escala ampliada resultou no extrato acetato de etila (EAcOEt) que foram purificados por métodos cromatográficos em escala preparativa. A identificação/elucidação por métodos espectrométricos e espectroscópicos (EM, IV, UV, RMN mono e bidimensionais) forneceu as substâncias: 3,4-Piridinadiamina, *N*⁴-1-metil-5-(3'-buten-1-il) (**S1**), ácido fusárico (**S2**), 2-(1*H*-indol-6-il)-acético (**S3**), 2-Piridinametilamina-*N*⁸-metil-5-hexanoato (**S4**) e o sesterterpeno terpestacina (**S5**), Etanoato de etila-2-(2-acetil-4,6-diidroxifenil) (**B4**) e um alcalóide inédito na literatura (**B1**). Com este trabalho, observamos que os fungos endofíticos estudados possuem sua química completamente distinta quando comparada com as classes de substâncias isoladas de espécies vegetais de Eriocaulaceae, sendo uma importante fonte de novos produtos naturais com potencial atividade biológica. Este trabalho contempla também o estudo dos efeitos de modificadores epigenéticos e íons metálicos na diversificação metabólica do fungo *Pochonia chlamydosporia* (ATCC). A adição de ácido anacárdico (AA) no meio de cultivo líquido (PDB+AA) rendeu 2,6 vezes mais extrato do que o controle PDB. Os perfis químicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e cromatografia em camada delgada (CCD) foram comparados, foi identificado que o radicicol é majoritário em todos os extratos analisados. Estes extratos foram submetidos à análise quantitativa por CLAE, o AA adicionado no meio líquido Potate Dextrose Agar (PDB) rendeu 4,6 vezes mais radicicol do que o controle PDB. O EAcOEt preparado do cultivo em escala ampliada em meio PDB + Mg²⁺ foi purificado por métodos cromatográficos em escala preparativa e resultou no isolamento e identificação das substâncias ausentes no controle (PDB), Poconinas B, E e L e também do mixostiol, substâncias (**P1-P4**) respectivamente.

Palavras-chave: Eriocaulaceae, *Paepalanthus chiquitensis*, *Fusarium*, *Bipolaris*, epigenética.

ABSTRACT

This work presents the results of the research of active secondary metabolites produced by endophytic fungi associated with the aerial parts (capitulae, scapes and leaves) of *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae). Among the 25 species of fungi isolated from the specie of Eriocaulaceae, the *Fusarium* sp. was the fungus that showed the best biological activity against the strains of Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Salmonella setubal*, the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* yeast resistant to fluconazole. The *Fusarium* sp also displayed bactericidal and fungicidal effects. The research also presents the chemical studies of the fungus *Bipolares* sp., isolated from the leaves of *P. chiquitensis* which was selected due to its chemical profile. The large scale cultivation of both fungi afforded the respective ethyl acetate extracts which were purified by preparative chromatography methods. The chemical structures were elucidated by spectrometric and spectroscopic methods (MS, IR, UV, mono- and bidimensional NMR affording the following substances from the *Fusarium* sp.: 5-(but-3-en-1-yl)-*N*⁴-methylpyridine-3,4-diamine (**S1**), fusaric acid (**S2**), 2-(1H-indol-6-yl)-acid (**S3**), 5-Butyl-2-pyridinecarboxamide (**S4**) and the sesterterpene fusaproliferin (**S5**), while for the *Bipolaris* sp.: Acetic acid, (2-acetyl-3,5-dihydroxyphenyl)-, ethyl ester (**B4**) and a new alkaloid (**B1**). Herein, we also showed the study of the effects of epigenetic modifiers and metal ions in metabolic diversity from the fungus *Pochonia chlamydosporia* (ATCC). The presence of anacardic acid in the liquid medium afforded 2.6 times more ethyl acetate extract compared with the PDB (Potato Dextrose Broth) control. Besides, the analysis by analytical HPLC (High Performance Liquid Chromatography) identified the radicicol as the major compound present in EtOAc extracts and showed that when anacardic acid (AA) is added to the liquid medium, there is a production of 4.6 times more of the radicicol than the PDB control. This fungus was cultivated in large scale in PDB + Mg²⁺, yielding four compounds absent in the PDB control: pochonins B, E and L and the myxostiol compounds (P1-P4), respectively.

Keywords: Eriocaulaceae, *Paepalanthus chiquitensis*, *Fusarium* sp., *Bipolaris* sp., epigenetics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Diversidade estrutural dos metabólitos isolados dos fungos endofíticos (Schulz, 2002)..... 21
- Figura 02.** Espécie hospedeira *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae) na Serra do Cipó no estado de Minas Gerais..... 22
- Figura 03.** Diversidade estrutural dos metabólitos isolados de fungos de *Fusarium* spp. . 28
- Figura 04.** Metabólitos secundários ativos isolados de espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*..... 29
- Figura 05.** Esquema da microplaca para a determinação da CIM..... 44
- Figura 06.** Reação de oxirredução da resazurina..... 44
- Figura 07.** Reação de oxirredução do TTC 46
- Figura 08.** Cromatograma representando o perfil do EAcOEt em pequena escala de Pg-Fj-5 produzido pelo fungo *Bipolaris* sp. isolado das folhas de *P. chiquitensis* [Coluna Analítica Phenomenex[®] Luna (2) C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. MeOH + 0,01 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 295 nm]. 54
- Figura 09.** Cromatograma representando o perfil do EAcOEt em escala ampliada produzido pelo fungo *Bipolaris* sp. isolado das folhas de *P. chiquitensis* [Coluna Analítica Phenomenex[®] Luna (2) C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. MeOH + 0,01 % TFA. Gradiente de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 295 nm]. 54
- Figura 10.** Espectros no UV dos picos 1-4 do EAcOEt de Pg-Fj(5)-2 produzido pelo fungo *Bipolaris* sp isolado das folhas de *P. chiquitensis*; λ= 295 nm. 55
- Figura 11.** Cromatograma representando o perfil do EAcOEt de C8 realizado em pequena escala (A); escala ampliada (B); e da sobreposição de ambas escalas de crescimento (C), produzido pelo fungo endofítico *Fusarium* sp isolado dos capítulos de *P.chiquitensis* [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ[®] C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01 % TFA; Solvente B. ACN + 0,01 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 270 nm]. 56
- Figura 12.** Análise por CCD das frações obtidas do fracionamento por Sephadex LH-20; Sistema de solventes. CHCl₃/MeOH/n-PrOH/H₂O (5.6.1.4,v/v/v/v); 1) Fr. 1-17; 2) Fr. 18-23; 3) Fr. 24-29; 4) Fr. 30-38 e 5) Fr. 39-43..... 57
- Figura 13.** Fluxograma do fracionamento e purificação do EACOEt C8 (*Bipolaris* sp.).. 58
- Figura 14.** Análise por CCD dos extratos, frações obtidas do fracionamento por sephadex LH-20 e substâncias isoladas; Sistema de solventes. CHCl₃/AcOEt (7:3,v/v); C8) Extrato em pequena escala; C8-2) Extrato em escala ampliada; A-F) reuniões das frações obtidas do

fracionamento por Spdx. A) Fr.1-23; B) Fr. 24-29; C) Fr. 30-32; D) Fr. 33-39; E) Fr. 40-49 e F) Fr. 50-79. 59

Figura 15. Cromatograma da Fr.18-23 proveniente do sephadex LH-20 [Coluna Analítica Phenomenex® Luna (2) C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. MeOH + 0,01 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 295 nm]. 60

Figura 16. Fluxograma do fracionamento e purificação do EACOEt C8 (*Fusarium* sp.). 61

Figura 17. Cromatogramas A, B e C das substâncias **S1-S3** isoladas por CLAE- DAD semipreparativo. [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. ACN + 0,01 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 270 nm]. 62

Figura 18. Cromatogramas A, B e C das substâncias S4-S6 isoladas por CLAE- DAD semipreparativo. [Coluna Analítica Thermo Hypersil Gold aQ® C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. ACN + 0,01 % TFA. Gradiente..... 63

exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 270 nm]. 63

Figura 19. Cromatograma mostrando o pico da substância **B4**, isolada por CC [Coluna Analítica Phenomenex® Luna (2) C18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A. H₂O + 0,01% TFA; Solvente B. MeOH + 0,01 % TFA. Gradiente exploratório de 5-100 % de B em 60 min; vazão de 1,00 mL min⁻¹; λ= 295 nm]. 64

Figura 20. Análise por CCD da substância B4 purificada por cromatografia em coluna de sílica; Sistema de solventes. CHCl₃/AcOEt (7:3,v/v). 64

Figura 21. Espectro de RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **B1**. 69

Figura 22. Ampliação do espectro de RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **B1**. 70

Figura 23. Espectro de RMN ¹³C (150 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **B1**. 70

Figura 25. Mapa de contorno HSQC (600 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **B1**. 71

Figura 26. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **B1**. 72

Figura 27. Mapa de contorno HMBC ¹H-¹⁵N (600 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **B1**. .. 72

Figura 29. Espectro de RMN de DOSY (600 MHz, DMSO-*d*₆) da substância **B1**. 73

Figura 30. Correlações HSQC-TOCSY da substância **B1** 74

Figura 31. COSY, correlações HMBC e HMBC ¹H-¹⁵N da substância **B1**. 74

Figura 34. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) da substância **B4**. 78

Figura 35. Espectro de RMN de COSY (300 MHz, CDCl₃) da substância **B4**. 79

Figura 36. Mapa de contorno HSQC (300 MHz, CDCl ₃) da substância B4	79
Figura 37. Mapa de contorno HMBC (300 MHz, CDCl ₃) da substância B4	80
Figura 38. Espectro ESI-IT-MS. (<i>full scan</i> , modo negativo) da substância B4	80
Figura 40. Estrutura química da substância B4	81
Figura 41. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) da substância S1	84
Figura 42. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, CDCl ₃) da substância S1	85
Figura 43. Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CDCl ₃) da substância S1	85
Figura 44. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CDCl ₃) da substância S1	86
Figura 45. Espectro ESI-IT-MS/MS (modo negativo) da substância B4	86
Figura 46. Estrutura química da substância S1	86
Figura 47. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) da substância S2	89
Figura 48. Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆) da substância S2	90
Figura 49. Espectro de RMN de COSY(300MHz, DMSO-d ₆) da substância S2	90
Figura 50 Mapa de contorno HSQC (300 MHz, DMSO-d ₆) da substância S2	91
Figura 51. Mapa de contorno HMBC (300 MHz, DMSO-d ₆) da substância S2	91
Figura 52. Espectro ESI-Qtrap-MS (modo negativo) da substância S2	92
Figura 53. Estruturas químicas propostas para da substância S2	92
Figura 54. Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) da substância S3	95
Figura 55. Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆) da substância S3	96
Figura56. Espectro de RMN de COSY (300 MHz, DMSO-d ₆) da substância S3	96
Figura 57. Mapa de contorno HSQC (300 MHz, DMSO-d ₆) da substância S3	97
Figura 58. Mapa de contorno HMBC (300 MHz, DMSO-d ₆) da substância S3	97
Figura 59. Espectro ESI-MS (modo negativo) da substância S3	98
Figura 60. Espectro ESI-MS/MS (modo negativo) da substância S3	98
Figura 61. Estrutura química da substância S3	98
Figura 62. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) da substância S4	101
Figura 63. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, CDCl ₃) da substância S4	102

Figura 64. Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CDCl ₃) da substância S4	102
Figura 65. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CDCl ₃) da substância S4	103
Figura 66. Espectro ESI-Qtrap-MS (modo positivo) da substância S4	103
Figura 67. Estrutura química da substância S4	104
Figura 67. Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância S5	107
Figura 68. Amp; do espectro de RMN ¹ H (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância S5	107
Figura 69. Espectro de RMN ¹³ C (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância S5	108
Figura 71. Espectro de RMN DEPT 135 (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância S5	108
Figura 72. Espectro de RMN de COSY (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância S5	109
Figura 73. Mapa de contorno HSQC (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância S5	109
Figura 74. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância S5	110
Figura 75. Mapa de contorno HSQC TOCSY (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância S5	110
Figura 76. Espectro ESI-MS (modo negativo) da substância S5	110
Figura 77. Correlações HSQC TOCSY da substância S5	111
Figura 78. Correlações HMBC e COSY da substância S5	112
Figura 79. Estrutura química da substância S5	112
Figure 80. Avaliação dos perfis cromatográficos por CCD em sílica gel dos extratos AcOEt preparados em escala reduzida (PDB); Sistema de solventes. MeOH/DCM (96.4,v/v); anisaldeído H ₂ SO ₄ ; R = radicicol; 1) PDB; 2) PDB + Cu ²⁺ ; 3) PDB + Mg ²⁺ ; 4) PDB + AA; 5) PDB + SAHA; 6) PDB + AZA; 7) PDB + DMSO.....	115
Figure 81. Chromatograma representativo dos perfis químicos dos extratos preparados em escala reduzida produzidos pelo fungo <i>P.chlamydosporia</i> ATCC [Coluna analítica Luna (2) C18-Phenomenex® 250 x 4.60 mm id x 5 µm; Solvente B. H ₂ O; Solvente C. MeOH. Gradient 70-100% B em 30 min; vazão 0.80 ml min ⁻¹ ; λ = 250 nm.....	116
Figure 82. Curva de calibração do Radicicol.....	117
Figura 83 CCD (sílica gel), Sistema de solventes MeOH/DCM (6.94; v/v); A) anisaldeído; B) UV 254 nm e C) UV 365 nm.....	118
Figura 84. Purificação da reunião das frações 19-20 por CCD preparativa.....	120
Figura 87. Esquema de purificação das frações 15-18 por métodos cromatográficos.....	121
Figura 88. Purificação da reunião das frações 11-14 por métodos cromatográficos.....	122

Figura 89. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância P1	124
Figura 90. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância P1	124
Figura 91. Estrutura química da Poconina B.....	125
Figura 92. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância P2	127
Figura 93. Estrutura química da Poconina E	127
Figura 94. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância P3	129
Figura 95. Espectro de RMN de HSQC (100 MHz, CDCl_3) da substância P3	129
Figure 96. Estrutura química da Poconina L	130
Figura 97. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância P4	133
Figura 98. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância P4	133
Figura 99. Espectro de RMN de COSY (400 MHz, CDCl_3) da substância S4	134
Figura 100. Espectro de RMN de HSQC (400 MHz, CDCl_3) da substância S4	134
Figura 101. Espectro de RMN de HMBC (400 MHz, CDCl_3) da substância S4	135
Figura 102. Estrutura Química do Mixostiol (Azul ^1H e ^{13}C RMN literaratura)	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Condições de cultivo em escala reduzida de <i>P. chlamydosporia</i>	38
Tabela 02. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos dos fungos endofíticos de <i>P. chiquitensis</i>	49
Tabela 03. CBM e CFM dos extratos dos fungos endofíticos de <i>P. chiquitensis</i>	50
Tabela 04. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos dos fungos endofíticos de <i>P. chiquitensis</i>	52
Tabela 05. Atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos dos fungos endofíticos de <i>P. chiquitensis</i>	52
Tabela 06. Substâncias isoladas do EAcOEt C8 do <i>Fusarium</i> sp.	60
Tabela 07. Dados de RMN de ^1H ^{13}C (600 e 150 MHz, em DMSO- d_6) da substância B1 . 68	
Tabela 08. ^1H ^{13}C (300 e 75 MHz, em CHCl_3) mono e bidimensionais da substância B4 .	
Tabela 09. ^1H e ^{13}C (600 MHz, em CDCl_3) mono e bidimensionais da substância S1	83
Tabela 10. ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, em DMSO- d_6) mono e bidimensionais de S2	88
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300 e 75 MHz, em DMSO- d_6) mono e bidimensionais da substância S3	94
Tabela 12. ^1H e ^{13}C (600 MHz, em CDCl_3) mono e bidimensionais da substância S4 . 100	
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H ^{13}C (600 e 150 MHz, DMSO- d_6) da substância S5	106
Tabela 14. Cultivo em escala reduzida de <i>P. chlamydosporia</i>	114
Tabela 15. Rendimento e concentração de Radicol presente nos três experimentos.....	117
Tabela 16. Porcentagem e volume dos solventes utilizados - coluna cromatográfica	118
Tabela 17. Código, Massa e rendimento relativo em % das frações reunidas	119
Tabela 18. Dados de RMN ^1H e ^{13}C NMR da Poconin B.	125
Tabela 19. Dados RMN ^1H da Poconina E.....	126
Tabela 20. Dados RMN ^1H da Poconina L	130
Tabela 21. Dados de RMN ^1H e ^{13}C do Mixostiol isolado e da literatura.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$[\alpha]_D^{20}$	Rotação específica a 20 °C
λ	Comprimento de onda
δ	Deslocamento químico
1J	Acoplamento a uma ligação
2J	Acoplamento a duas ligações
3J	Acoplamento a três ligações
AA	Ácido anacárdico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AZA	5-azacitidina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
d.i.	Diâmetro interno
DOSY	Espectroscopia de coeficiente de difusão ordenada (<i>Diffusion Ordered Spectroscopy</i>)
dt	Duplo tripleto
EAcOEt	Extrato acetato de etila
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>
FIA-ESI-IT-MS	<i>Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Ion Trap - Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas acoplada a um ion-trap com interface de Ionização por Electrospray e inserção direta da amostra)
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple-quantum coherence</i>
CLAE	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
IR	<i>Infrared</i> (Infravermelho)
J	Constante de acoplamento
m	Multiplete
$[M - H]^-$	Molécula desprotonada
$[M + H]^+$	Molécula protonada
m/z	Relação massa carga
MHA	Ágar Müeller-Hinton

MOPS	ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico
MHC	caldo Müeller-Hinton
<i>Q</i>	Quadrupletto
NOESY	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
Nt	não testado
DAD	Photodiode array detector (detector de arranjo de diodos)
PDA	<i>Potato dextrose agar</i> (ágar batata dextrose)
PDB	<i>Potato dextrose broth</i> (meio de batata dextrose)
PBS	tampão fosfato de sódio
Pg-Cv	<i>Paepalanthus giganteus (Paepalanthus chiquitensis)</i> - capítulos
Pg-Ev	<i>Paepalanthus giganteus (Paepalanthus chiquitensis)</i> - escapos
Pg-Fj	<i>Paepalanthus giganteus (Paepalanthus chiquitensis)</i> - folhas
PTFE	Politetrafluoroetileno (Teflon)
<i>R_f</i>	Distância percorrida pela substância / distância percorrida pelo solvente, em CCD.
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
SAHA	Ácido hidroxâmico suberoilânida
<i>sL</i>	Singleto largo
TTC	cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid phase extraction</i>)
sp.	Espécies
<i>T</i>	Tripletto
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i>
<i>R_T</i>	Tempo de retenção
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
V	Volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Fungos endofíticos.....	20
1.2 Espécie hospedeira <i>Paepalanthus chiquitensis</i> (ERIOCAULACEAE)	22
1.3 Gênero <i>Bipolaris</i>	24
1.4 Gênero <i>Fusarium</i>	26
1.5 Diversificação metabólica e epigenética	29
1.5.1 <i>Pochonia chlamydosporia</i>	31
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivos gerais	33
2.2 Objetivos específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Etapa química e cultivo dos fungos endofíticos	35
3.1.1 Solventes	35
3.1.2 Meios para cultivo dos micro-organismos	35
3.1.3 Modificadores epigenéticos e íons metálicos	35
3.1.4 Esterilização dos materiais e meios de cultura	36
3.1.5 Manipulação dos micro-organismos	36
3.1.7 Identificação dos fungos endofíticos	36
3.1.8 Micro-organismo	36
3.1.9 Obtenção do extrato AcOEt em escala ampliada	36
3.1.10 Suspensão de hifas-esporos.	37
3.1.11 Fermentação e extração em meio de cultivo líquido.....	37
3.1.13 Análises por CLAE- DAD no modo analítico.....	38
3.1.14 Fracionamento do extrato em coluna de permeação em gel	39
3.1.15 Isolamento dos metabólitos secundários por coluna cromatográfica	39
3.1.16 Isolamento por CLAE- DAD no modo semi-preparativo	39
3.1.17 Cromatografia em Camada Delgada	40
3.1.18 Análises dos metabólitos secundários por FIA-ESI-IT-MS ⁿ	41
3.1.20 Identificação das substâncias por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	42
3.1.21 Outros equipamentos.....	42
3.2 Avaliação da atividade antibacteriana	43
3.2.1 DADronização da suspensão bacteriana	43
3.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	43
3.2.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima.....	44
3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	45
3.3.1 DADronização da suspensão fúngica	45
3.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	45
3.3.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima.....	46

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	48
4.1.1 Determinação da CIM dos 25 extratos estudados	48
4.1.2 Determinação da CIM do Extrato C8, frações e substâncias isoladas.....	51
4.2. Obtenção do extrato bruto em escala ampliada	53
4.3. Análises por CLAE- DAD.....	53
4.3.1 Pg-FJ(5) – <i>Bipolaris</i> sp.....	53
4.3.2 Pg-CJ(8) – <i>Fusarium</i> sp.....	56
4.4. Fracionamento do EAcOEt em Sephadex e análise por CCD.....	57
4.5.1 Pg-Fj(5).....	57
4.5.2. Pg-Cj(8).....	59
4.5. Isolamento das substâncias por CLAE- DAD –	59
4.5.1 Pg-Fj(5)- <i>Bipolaris</i> sp.	59
4.5.2 Pg-Cj(8) - <i>Fusarium</i> sp.	60
4.6. Isolamento da substância B4 por coluna cromatográfica	64
4.7 Elucidação estrutural	65
4.7.1 Substância B1	65
4.7.2 Substância B4	76
4.7.3 Substância S1 - <i>Fusarium</i> sp.....	82
4.7.4 Substância S2 - <i>Fusarium</i> sp.....	87
4.7.5 Substância S3 - <i>Fusarium</i> sp.....	93
4.7.6 Substância S4 - <i>Fusarium</i> sp.....	99
4.7.7 Substância S5 - <i>Fusarium</i> sp.....	104
5. ESTUDO COM MODIFICADORES QUÍMICO EPIGENÉTICOS	113
5.1. Cultivo em escala reduzida de <i>P. chlamydosporia</i>	113
5.2. Perfil químico por CCD.....	115
5.3. Perfil cromatográfico por CLAE analítico.	115
5.4 Quantificação do radicicol nos extratos AcOEt por CLAE analítico.....	117
5.5 Fracionamento do extrato AcOEt (PDB+ MgSO ₄)	118
5.6 Isolamento do composto minoritário Poconina B	120
5.7 Isolamento das Poconinas E e L.....	121
5.8 Isolamento do Mixostiol.....	122
5.9 Elucidação estrutural	123
5.9.1 Substância P1 . - <i>P. chlamydosporia</i>	123
5.9.2 Substância P2 - <i>P. chlamydosporia</i>	128
5.9.3 Substância P3 - <i>P. chlamydosporia</i>	128
5.9.4 Substância P4 - <i>P. chlamydosporia</i>	128
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	137
7. REFERÊNCIAS	140

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS

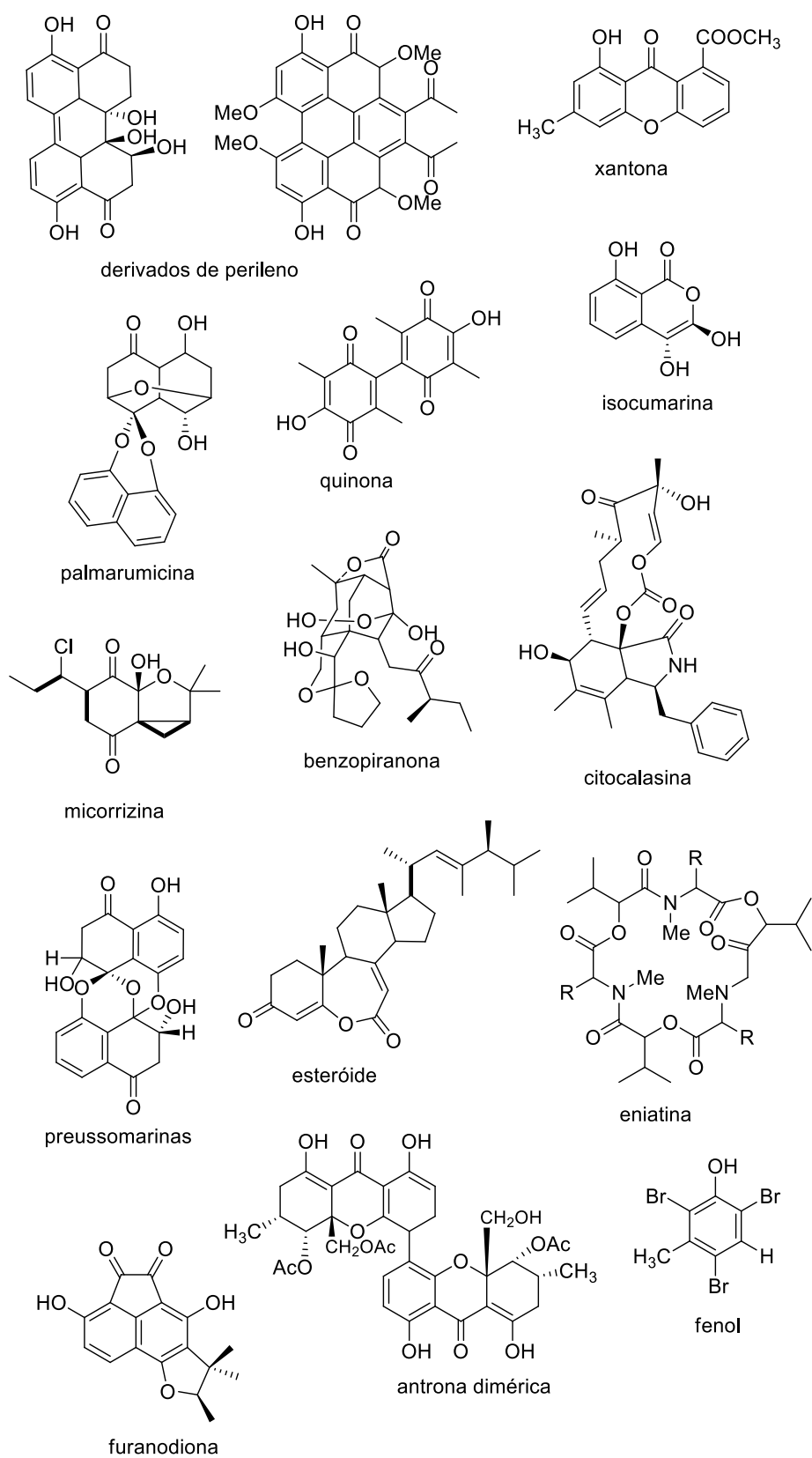
Estima-se a existência de 3,5 a 5,1 milhões de espécies de fungos no planeta (O'BRIEN et al., 2005; BLACKWELL, 2011), sendo que menos de 0,1 milhão de fungos associados com organismos superiores, parasitas ou saprófitos foram descritos pela literatura (SCHEFFERS et al., 2012, EL-ELIMAT et al., 2014). Em vista disto, pesquisadores de diversas áreas envolvidos no estudo com fungos ficaram intrigados com o seguinte questionamento. onde poderiam existir os demais fungos do planeta? Tal questionamento instigou cientistas nas décadas passadas dando início às pesquisas com plantas, na tentativa de descobrir um reservatório de organismos conhecidos por endofíticos (STROBEL, 2003).

Os fungos endofíticos são definidos como fungos que vivem assintomaticamente dentro do tecido de plantas superiores (KHARWAR et al., 2011; ALY, 2013). Esses organismos são considerados uma importante fonte de novas substâncias bioativas (KHARWAR et al., 2011), sendo também capazes de produzir muitas classes de metabólitos, com várias aplicabilidades na medicina (SCHULZ, 2002). Além disso, trabalhos de relevância destacam que 51 % das substâncias isoladas de fungos endofíticos são biologicamente ativas (STROBEL, 2003; SAIKKONEN et al., 2004).

Os metabólitos secundários produzidos por fungos são diversos quanto as suas estruturas e atividades biológicas. Alguns são pigmentos, outros são toxinas de plantas e/ou animais, outros podem regular o crescimento da planta, outros apresentam propriedades farmacêuticas, e outros podem também contribuir com a patogenicidade da planta (MA, et al., 2013).

Tan & Zou (2001) revisaram a diversidade de metabólitos que foram isolados de fungos endofíticos, enfatizando seu potencial papel ecológico. Estes metabólitos secundários de endófitos são sintetizados através de diversas vias metabólicas (TKACZ 2000, TAN & ZOU 2001), por exemplo, policetídeos, isoprenóides ou derivação de aminoácidos.

Figura 01. Diversidade estrutural dos metabólitos isolados dos fungos endofíticos (SCHULZ, 2002).



Como pode ser visto na Figura 01, os principais metabólitos isolados foram. esteróides, xantonas, fenóis, isocumarinas, derivados de perileno, quinonas, furanodionas, terpenóides, depsipeptídeos, citocalasinas (KROHN et al., 1996, 1999a, b, 2001). Alguns deles representam novos grupos estruturais, como por exemplo, os palmarumicinas (KROHN et al., 1997a, b) e benzopiranona (KROHN et al., 2002).

1.2 ESPÉCIE HOSPEDEIRA. *Paepalanthus chiquitensis* (ERIOCAULACEAE)

A família Eriocaulaceae possui 1200 espécies e está dividida em 10 gêneros (ANDRADE et al., 2011; GIULIETTI et al., 2012). É caracterizada por possuir inflorescências do tipo capítulos, que são envolvidos por brácteas, e folhas em forma de roseta, de onde surgem os escapos, e destes, surgem os capítulos (Figura 02) (GIULIETTI, 1997; RICCI et al., 1996).

A família Eriocaulaceae é conhecida na literatura por apresentar xantonas (SANTOS et al., 2001; PACIFICO et al., 2011) e naftopiranonas, (VILEGAS et al., 1998; SANTOS et al., 2001; ZANUTTO et al., 2012, AMARAL et al., 2014); substâncias com comprovadas atividades biológicas como antiúlcera, antioxidante (SANTOS et al., 2002; AMARAL et al., 2012) e mutagênica (VARANDA et al., 1977).

Figura 02. Espécie hospedeira *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae) na Serra do Cipó no estado de Minas Gerais.



Fonte: TROVÓ; SANO 2010.

A espécie *Paepalanthus chiquitensis* Herzog tem como sinonímia *Paepalanthus giganteus* Sano (TROVÓ; SANO, 2010), além disso, *Paepalanthus* é o maior gênero da família, contendo 500 espécies, das quais mais de 400 existem apenas no Brasil (GIULIETTI et al., 2012).

Ao contrário das demais espécies da família Eriocaulaceae que habitam locais com altitude elevada, *P. chiquitensis* também ocorre em regiões mais baixas (SATO, 2007).

Sua distribuição geográfica é ampla, podendo ocorrer desde o Amazonas até São Paulo, já que esta espécie se adapta a uma boa variabilidade de solos. Esta característica resulta em uma enorme variabilidade morfológica desta espécie, principalmente no que se refere ao tamanho e forma de suas folhas (SATO, 2007).

A principal utilização destas espécies é ornamental, devido à beleza exibida por seus capítulos que mesmo depois de coletados permanecem com aspecto de vivas por muitos anos, sendo por isto conhecidas popularmente como “sempre vivas”. As espécies de Eriocaulaceae são frequentemente exportadas para países da Europa, sendo por isso consideradas a principal fonte de renda para muitas famílias em Minas Gerais, Bahia e Tocantins.

Um dos fatores mais importantes que também justifica a importância em estudar fungos endofíticos associados às Eriocaulaceae, diz respeito à região onde as mesmas são encontradas. Essas espécies de plantas pertencem principalmente à região da Serra do Cipó localizada em Minas Gerais. Essa região é privilegiada para o estudo de plantas endêmicas e em extinção, que é um fator a mais para a necessidade de estudos de espécies vegetais e micro-organismos associados existentes nessas regiões de habitat extremo.

Portanto, considerando que muitas das espécies são endêmicas possuindo uma grande diversidade química e biológica, e que existem poucos estudos na literatura de micro-organismos associados com espécies da família (AMORIM et al., 2016), foi proposto neste trabalho, o estudo dos fungos endofíticos isolados de *P. chiquitensis* a fim de se obter informações à respeito de sua microbiota, visando também à produção de novos metabólitos secundários com atividade antimicrobiana.

Os resultados dos estudos iniciais com fungos endofíticos associados às partes aéreas de *P. chiquitensis* vêm sendo realizados desde a iniciação científica (2012), resultou no isolamento 25 fungos das partes aéreas (capítulos escapos e folhas) de *P. chiquitensis*. Foram registrados os perfis químicos por CLAE-DAD dos respectivos extratos acetato de etila preparados a partir de cada um dos fungos isolados, sendo selecionado duas cepas para

prosseguimento dos estudos químicos. O fungo identificado como *Bipolaris* sp. foi selecionado por sua diversidade química por CLAE-DAD. Também foi realizada a triagem da atividade antimicrobiana desses 25 extratos preparados previamente, sendo então selecionado o *Fusarium* sp., que por ser o mais promissor quanto a atividade antimicrobiana foi escolhido para dar continuidade ao estudo químico de isolamento e identificação estrutural e também avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos isolados.

1.3 GÊNERO *Bipolaris*

O gênero *Bipolaris* é composto por fungos filamentosos ascomicetos, da Classe Dothideomycetes, Ordem Pleosporales e Família Pleosporaceae (MANAMGODA et al., 2014). O gênero *Bipolaris* contém mais de 100 espécies das quais a grande maioria é saprófita no solo e agentes patogênicos de plantas, sendo que algumas espécies são potencialmente capazes de infectarem os seres humanos e animais (DA CUNHA et al., 2012).

O gênero *Bipolaris* faz parte do grupo de fungos dematiáceos, também chamados de fungos negros. Formam um grupo de micro-organismos que possuem coloração escura, devido à presença do pigmento melanina na sua parede celular (HOFFMANN, 2011).

A melanina presente nos fungos dematiáceos é formada a partir do polímero diidroxinaftaleno (DNH), produzido no citoplasma e excretado na parede celular. A interação do polímero DNH com macromoléculas como lipídeos, proteínas e carboidratos resultam na formação do complexo melanínico, considerado um fator de virulência associado aos fungos do gênero *Bipolaris* (CALIGIORNE et al., [s.d.]).

Embora a maioria das espécies pertencentes ao gênero *Bipolaris* sejam sapróbios do solo ou patógenos de plantas, as espécies *Bipolaris australiensis*, *B. hawaiiensis* e *B. spicifera* são responsáveis por infecções em indivíduos imunocompetentes e imunodeprimidos (SHANKARAPPA et al., 2014). É considerado um fungo patogênico oportunista (BRANDT; WARNOCK, 2003).

Os fungos dematiáceos são os principais responsáveis por causarem feohifomicoses em humanos e animais (ALINE et al., 2010). A infecção pode ser cutânea, subcutânea e sistêmica (REVANKAR et al., 2002). As apresentações clínicas mais comuns são a sinusite alérgica, ceratite, endoftalmite, onicomicose, peritonite peritoneal associada à diálise,

infecções de pulmão e pele, e, menos frequente, as infecções do sistema nervoso central (DA CUNHA et al., 2012).

As espécies pertencentes ao gênero *Bipolaris* têm sido extensivamente relatadas como produtoras de micotoxinas, fitotoxinas sendo também fonte de metabólitos secundários ativos de diferentes classes químicas (ARUNPANICHLERT et al., 2012).

Os sesquiterpenos bipolaroxina (fitotoxina) e diidrobipolaroxina foram isoladas da espécie *B. cynodontis* (SUGAWARA et al., 1985); o sesterterpeno 11-epiterpestacina (Nihashi et al., 2002) é uma fitotoxina isolada de *B. sorokiniana* (NIHASHI et al., 2002); além disso, as espécies de *Bipolaris* produzem também as fitotoxinas sesterterpenóides chamadas de ophiobolinas (AU; CHICK; LEUNG, 2000). Por fim, outros quatro diterpenóides chamados de coicenais A-D foram isolados de *B. coicis* (WANG et al., 2013).

É importante ressaltar que embora o conhecimento dos fungos do gênero *Bipolaris*, ainda seja limitado em relação à produção de metabólitos bioativos, esses organismos vêm sendo cada vez mais estudados e observados, visando tanto à descoberta de novas drogas, quanto à análise de seu potencial como possíveis causadores de doenças em humanos (SHEN et al., 1999, BRANDT & WARNOCK, 2003).

A atividade antimicrobiana das trieno amidas bipolamidas A e B isoladas de *Bipolaris* sp. foi avaliada, e a bipolamida B apresentou moderada atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides*, *C. cucumerinum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus oryzae*. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) foram de 16, 32, 32, 64 e 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente (SIRIWACH et al., 2014).

Entre outros compostos de relevância estão a micotoxina esterigmatocistina (RABIE; LUBBEN; STEYN, 1976); a anti-microalga bipolaral isolada de *Bipolaris* sp. (WATANABE et al., 1995) e a dioxopiperazina bipolaramida isolada de *B. sorokiniana* (RABIEB, 1982). Arunpanichlert et al. (2012) descreveram o isolamento e a avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante de dois compostos, sendo um deles uma cromanona dimérica chamada de bipolarinona e o ftalato bipolarilida.

A victoxinina e a pré-helminthosporolactona (MARDER et al., 2006), as citotoxinas ophiobolinas (BENCSIK et al., 2014); a fitotoxina radicinina isolada de *B. coicis* (COICIS, 1997); e a espirostaphilotrichina apresentou atividade antioxidante (WANG et al., 2013).

1.4 GÊNERO *Fusarium*

O gênero *Fusarium* é composto por fungos filamentosos ascomicetos, da Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales e Família Nectriaceae, apresentando importantes espécies patogênicas de plantas, sendo também produtoras de micotoxinas e causadoras de doenças oportunistas (MA, et al., 2013). O gênero *Fusarium* é muito vasto e tem sido amplamente estudado nos últimos 200 anos. Muitos desses trabalhos são relatados em função da complexa taxonomia e da difícil identificação que requer um conjunto de diferentes marcadores morfológicos, biológicos e filogenéticos (SUMMERELL & LESLIE, 2011).

Durante toda a sua história, as espécies desse gênero têm sido conhecidas por sua habilidade como patógeno de plantas. No início da década de 1960, os metabólitos secundários relatados como micotoxinas em humanos e outros animais foram quimicamente caracterizados. Este arsenal de compostos incluem compostos que estão na lista do governo americano de agentes que afetam a segurança alimentar, e por isso têm se tornado uma barreira comercial (SUMMERELL & LESLIE, 2011). O gênero é capaz de produzir uma variedade de micotoxinas, sendo os tricotecenos, as fumosininas e as zearalenonas as toxinas alimentares mais amplamente descritas (MARIN et al., 2013).

Os tricotecenos são uma das principais classes conhecidas de fusariotoxinas sendo indubitavelmente considerados um problema mundial por causarem significantes impactos econômicos nas culturas de cereais e de grãos. Essa classe é também comum em outros gêneros como *Myrothecium*, *Spicellum*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*, *Trichoderma* e *Trichothecium*. Todos esses fungos são da ordem Hypocreales, encontrados por todo o mundo, sendo formas bem adaptadas com grande capacidade de colonização e crescimento sob diversas condições nutricionais e disponibilidade de umidade (MCCORMICK et al., 2011).

Os tricotecenos são caracterizados por apresentarem um esqueleto tetracíclico 12,13-epoxi-tricotec-9-eno constituindo uma família de sesquiterpenóides. Existem aproximadamente 170 diferentes compostos chamados de tricotecenos, sendo estes divididos em quatro tipos (A-D) de acordo com as variações no grupo funcional hidroxila e no grupo lateral acetoxi. Os tricotecenos dos tipos A são representados pelas toxinas HT-2 e pela toxina T-2, e o tipo B é representado pelo desoxinivalenol (DON). Em geral, os tricotecenos são compostos muito estáveis e não são degradados em altas temperaturas. Os tipos C e D incluem alguns tricotecenos de menor importância (MARIN et al., 2013).

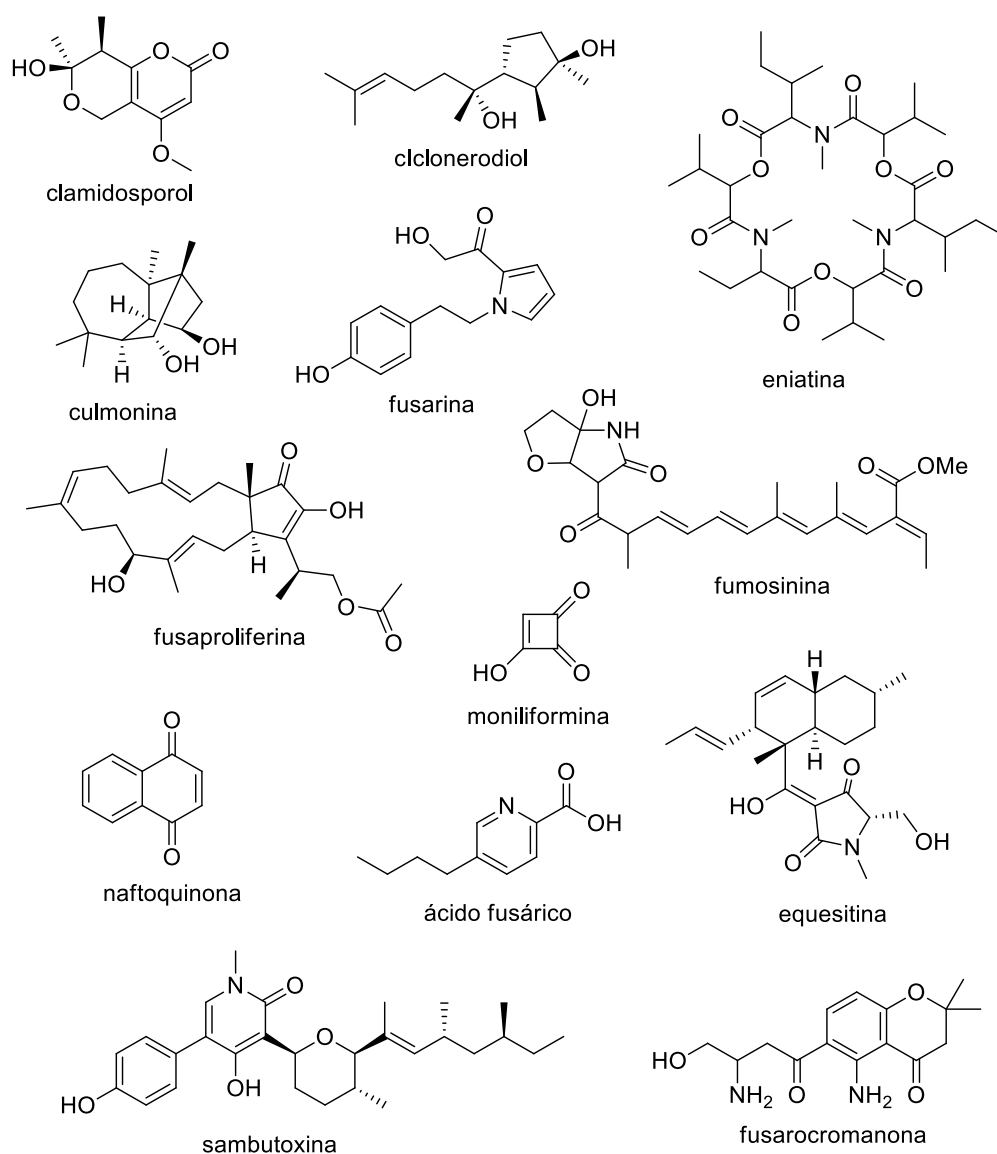
Os tricotecenos estão entre os metabólitos secundários mais nocivos de fungos para a saúde humana e animal, causando uma série de sintomas agudos e crônicos. Quando consumido através de alimentos contaminados, os tricotecenos são neurotóxicos, imunossupressores e nefrotóxicos (FRUHMANN et al., 2014).

Os sintomas resultantes da intoxicação por tricotecenos incluem vômitos, inflamação da pele, perda de peso, podendo ocasionar a morte de humanos e de animais (CORLEY et al., 1987).

Outro metabólito produzido por fungo pertencente ao gênero *Fusarium* é o ácido fusárico, uma das micotoxinas mais distribuídas na natureza (SANTIN et al., 2000). Na literatura BACON et al. (1996) essa micotoxina é considerada um indicador da contaminação de *Fusarium* em grãos e alimentos (SANTIN et al., 2000).

Outros metabólitos secundários de grande importância produzidos pelo *Fusarium* incluem. acuminatum, beauverivina, butenolida, culmorina, ciclonerodiol, eniatinas, equisetinas, fusaproliferinas, fusariocromanonas, ácido fusárico, fusarinina, moniliformina, moniliformina, sambutoxina e wortmanina (Figura 03), não sendo esses metabólitos produzidos estritamente por fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* (SUMMERELL & LESLIE, 2011).

Figura 03. Diversidade estrutural dos metabólitos isolados de fungos de *Fusarium* spp (SUMMERELL & LESLIE, 2011).

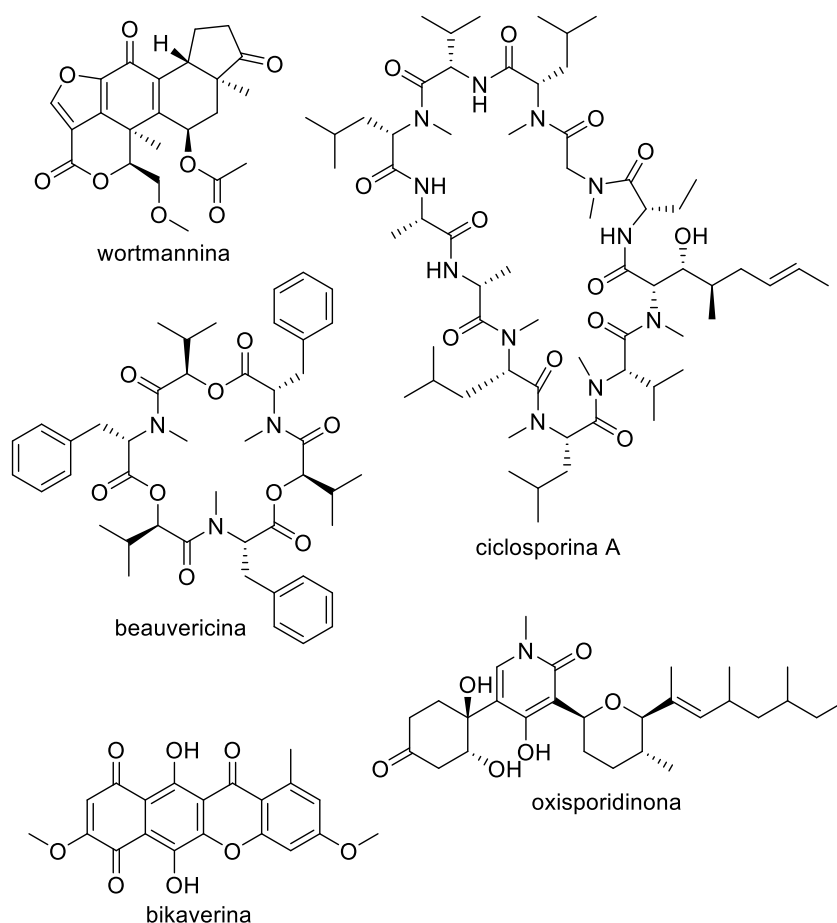


Fonte: SUMMERELL & LESLIE, 2011 com modificações.

Diversos trabalhos descrevem os fungos do gênero *Fusarium* como sendo uma fonte rica de metabólitos secundários biologicamente ativos (WANG et al., 2011), incluindo os agentes antifúngicos oxisporidinona (BREINHOLD et al., 1997), o agente antimicrobiano bicaverina que é um pigmento avermelhado produzido por várias espécies do gênero (LIMÓN; RODRÍGUEZ-ORTIZ; AVALOS, 2010); a micotoxina beauvericinaé, uma micotoxina com propriedade inseticida e que pode induzir apoptose em células animais

sendo produzida por *Fusarium* spp. (Figura 04) (LOGRIECO et al., 1998), e o agente imunossupressor ciclosporina A (RODRIGUEZ; CABRERA; GODEAS, 2006).

Figura 04. Metabólitos secundários ativos isolados de espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*.



Fonte: elaborada pelo autor.

1.5 DIVERSIFICAÇÃO METABÓLICA E EPIGENÉTICA

Os endofíticos podem ser manipulados geneticamente e físico-quimicamente, tanto para aumentar a produtividade de metabólitos desejados quanto para produzir novos análogos de metabólitos bioativos (KHARWAR et al., 2011).

Infelizmente, os métodos de fermentação usuais tais como modo estático, agitação em “shaker” e os meios de cultura artificialmente definidos não são opções satisfatórias para mimetizar o habitat natural de um fungo endofítico. Consequentemente, apenas um subconjunto dos genes responsáveis pela produção de metabólitos secundários serão sempre

expressos no ambiente artificial de laboratório, limitando assim o potencial desses organismos (WILLIAMS et al., 2008).

O termo epigenética é definido como alterações herdáveis na expressão gênica que ocorrem sem que haja mudanças na sequência do DNA (CHERBLANC et al., 2013). O epigenoma representa uma promissora oportunidade para a obtenção de novos metabólitos secundários de fungos e outros organismos.

O uso de modificadores epigenéticos pode ser explorado como uma ferramenta efetiva para promover a expressão das vias biossintéticas silenciosas responsáveis por produzir metabólitos secundários com características únicas (LIU et al., 2014). Além disso, tem sido descrito na literatura que oligossacarídeos, metais pesados e solventes orgânicos como etanol e dimetilsulfóxido atuam como eliciadores químicos, ou seja, são capazes de induzir a produção de metabólitos pelos fungos (PETTIT, 2011). Diferente dos modificadores químicos e epigenéticos, os eliciadores químicos induzem a produção de metabólitos secundários por meio de mecanismos inespecíficos ou ainda não determinados (CHAGAS, 2014).

Existem diferentes mecanismos epigenéticos, estes estão envolvidos nas alterações do epigenoma, que controla a acessibilidade transcricional dos genes que codificam as enzimas biossintéticas. Dos mecanismos epigenéticos, os mais estudados e conhecidos são a metilação do DNA e as modificações das histonas (CICHEWICZ, 2010; FISCH et al., 2009). Assim, o tratamento dos fungos com inibidores químicos das enzimas HDAC e DNA-metiltransferase pode promover potencialmente o aumento na produção e diversificação dos metabólitos produzidos por eles (CHUNG, 2013).

As vantagens em usar inibidores de pequenas moléculas que têm como alvo o epigenoma reside no fato dessa técnica ser de baixo custo, sendo de fácil implantação na maioria dos laboratórios de pesquisa não requerendo o conhecimento prévio sobre sequências genômicas dos fungos (CICHEWICZ, 2010). Verificou-se recentemente que a incorporação de metais pesados nos meios de cultura melhora a produção de metabólitos fúngicos (PARANAGAMA et al., 2007).

1.5.1 *Pochonia chlamydosporia*

A espécie *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & Gams (sinonímia *Verticillium chlamydosporium*) (ZARE; GAMS; EVANS, 2001) foi reportada pela primeira vez em 1974 como sendo um parasita de ovos de nematódeos por Wilcox e Tribe no Reino Unido. Desde então, esse fungo tornou-se um dos mais estudados por ser um agente de controle biológico de nematódeos (MANZANILLA-LOPEZ et al., 2013).

O fungo *P. chlamydosporia* faz parte do numeroso grupo de fungos parasitas de ovos, sendo uma das espécies mais estudados do grupo (ATKINS et al., 2003) possuindo distribuição mundial. Esse fungo é encontrado em solos supressivos (MANZANILLA-LOPEZ et al., 2013), um tipo de solo onde o desenvolvimento de doenças é suprimido, mesmo para patógenos na presença de um hospedeiro suscetível (COOK 1974; GHINI; ZARONI, 2001).

A espécie *P. chlamydosporia* é um fungo nematófago, sendo capaz de infectar ou capturar nematoides (FERNANDES et al., 2014). Esse fungo coloniza e penetra os ovos de helmintos através de uma estrutura chamada de apressórios (LYSEK, 1976, 1978; LYSEK; STERBA, 1991).

Com relação à sua nutrição, a espécie *P. chlamydosporia* não é estritamente dependente de nematoide para sobreviver, sendo considerada também como saprófita na ausência do hospedeiro. É capaz de produzir estruturas de resistência chamadas de clamidósporos (KERRY, 2001). Os clamidósporos são estruturas de sobrevivência do fungo nematófago *P. chlamydosporia* (DALLEMOLE-GIARETTA et al., 2011), e em situações de condições extremas não favoráveis, aumentam a sobrevivência desse fungo.

Entre os metabólitos secundários isolados de *P. chlamydosporia* relatados na literatura encontra-se o radicicol também conhecido pelo nome de monorden, um inibidor da proteína do choque térmico ou Hsq 90, que tem participação em vários processos celulares como proliferação celular, diferenciação e apoptose (HE et al., 2013). Essas proteínas também estão envolvidas em doenças como a síndrome de resposta inflamatória sistêmica, o câncer, as doenças infecciosas entre outras (MEYER; SILVA, 1999).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi realizado a triagem pela atividade antimicrobiana de 25 extratos AcOEt produzidos por fungos endofíticos isolados de *P. chiquitensis* (Eriocaulaceae) sendo escolhido o fungo *Fusarium* sp por ter apresentado a melhor CIM para todas as cepas de bactérias e levedura testadas, assim como o único com capacidade bactericida e fungicida para todas elas também.

O fracionamento e purificação do EAcOEt preparado a partir do cultivo em escala ampliada forneceu as seguintes substâncias: 3,4-Piridinadamina, *N*⁴-1-metil-5-(3'-buten-1-il) (**S1**), ácido fusárico (**S2**), 2-(1*H*-indol-6-il)-acético (**S3**), 2-Piridinametilamina-*N*⁸-metil-5-hexanoato (**S4**) e o sesterterpeno terpestacina (**S5**). Sendo que as substâncias **S1** e **S4** inéditas até a presente data na literatura.

Do cultivo em escala ampliada de *Bipolaris* sp. foram isoladas quatro substâncias sendo duas delas elucidadas: acetato de etila-2-(2-acetil-4,6-diidroxifenil) (**B4**) e uma proposta para a estrutura da substância (**B1**).

Podemos concluir que ambos os fungos endofíticos de *P. chiquitensis* estudados são fontes de diversas classes de compostos químicos, e sua química é completamente distinta quando comparada com as classes de substâncias isoladas de espécies de Eriocaulaceae, sendo uma importante fonte de novos produtos naturais para outras atividades biológicas.

Foi também realizado o estudo com modificadores epigenéticos, utilizando modificadores químicos epigenéticos no cultivo do fungo *P. chlamydosporia*. O ácido anacárdico adicionado no meio líquido PDB rendeu 4,6 vezes mais radicicol do que o controle PDB, evidenciado a capacidade do AA como um eliciador na produção e diversificação de metabólitos secundários de *P. chlamydosporia*.

A presença dos íons de magnésio no meio de cultivo não apenas levou ao maior rendimento dos EacOEt como também levou a produção de diversas substâncias minoritárias não produzidas no cultivo em meio líquido PDB, permitindo o isolamento e identificação das substâncias: Poconina B (**P1**), Poconina E (**P2**), Poconina L (**P3**) e do Mixostiol (**P4**).

Por fim, podemos concluir que além dos já conhecidos modificadores epigenéticos SAHA e o AZA, íons metálicos e o AA são capazes também de induzir a produção e a diversificação de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos, sendo portando uma importante abordagem para a descoberta de novos compostos.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- ALINE, N. colocar todos autores sem et al. Feohifomicose cutânea causada por *Curvularia* sp. em um equino. **Pathology**, v. 38, p. 73-76, 2010.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes—secret producers of bioactive plant metabolites. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 7, p. 499-505, 2013.
- AMARAL, F. et al. HPLC-ESIMSⁿ profiling, isolation, structural elucidation, and evaluation of the antioxidant potential of phenolics from *Paepalanthus geniculatus*, **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 547-556, 2012.
- AMORIM, M. A. et al. Compounds of *Anthostomella brabeji*, an endophytic fungus isolated from *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae), **Journal of the Brazilian chemical Society**, v. 0, p. 1-16, 2016.
- ANDRADE, M, J, G. et al. Blastocaulon (Eriocaulaceae), a synonym of *Paepalanthus*. morphological and molecular evidence, **Taxon**, v. 60, n. 1, p. 178-184, 2011
- ARUNPANICHLERT, J. et al. A dimeric chromanone and a phthalide. Metabolites from the seagrass-derived fungus *Bipolaris* sp. PSU-ES64. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 3, p. 604-608, 2012.
- ATKINS, S. D. et al. Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. **Pest Management Science**, v. 59, n. 2, p. 183-189, 2003.
- AU, T. K.; CHICK, W. S.; LEUNG, P. C. The biology of ophiobolins. **Life Sciences**, v. 67, n. 7, p. 733-42, 2000.
- BACON, C. W. et al. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4039-4043, 1996
- BENCSIK, O. et al. Ophiobolin A from *Bipolaris oryzae* perturbs motility and membrane integrities of porcine sperm and induces cell death on mammalian somatic cell lines. **Toxins**, v. 6, n. 9, p. 2857-2871, 2014.
- BLACKWELL, M. The Fungi. 1, 2, 3... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.
- BONIFÁCIO, B. V. **Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroetanólicos de *Astronium* sp. incorporados ou não em sistemas nanoestruturados**. 2014. 140f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2014.
- BREINHOLD, J. et al. Oxysporidinone. a novel, antifungal N-methyl-4-hydroxy-2-pyridone from *Fusarium oxysporum*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 33-35, 1997.

CALIGIORNE, R. B. et al. Fungos dematiáceos. **Biotecnologia e Ciência e Desenvolvimento**, p. 4, [s.d.].

CHAGAS, F. O. **Cultura mista, manipulação química e genética de micro-organismos. estratégias para a diversificação do metabolismo secundário.** 2014. f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014. Disponível em:<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-28102014-202425/>>. Acesso em: 25 nov 2015.

CHAPLA, V. M. **Bioprospecção dos fungos endofíticos associados à espécie vegetal *Eugenia jambolana* e utilização de modificador epigenético no cultivo do fungo *Lecythophora* sp.** 2014. 251 f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

CHERBLANC, F. L.; DAVIDSON, R. W.; DI FRUSCIA, P.; SRIMONGKOLPITHAK, N.; FUCHTER, M. J. Perspectives on natural product epigenetic modulators in chemical biology and medicine. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 5, p. 605-624, 2013.

CHUNG, Y. M. et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces the production of anti-inflammatory cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 7, p. 1260-1266, 2013.

CICHEWICZ, R. H. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. **Natural product reports**, v. 27, n. 1, p. 11-22, 2010.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A6. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard.** 6th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA., 2006.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A3. **Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standard.** Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA., 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products. a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CUNHA, K. C. et al. Diversity of *Bipolaris* species in clinical samples in the United States and their antifungal susceptibility profiles. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 12, p. 4061-4466, 2012.

DALLEMOLE-GIARETTA, R. et al. Produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* em diferentes substratos. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 35, n. 2, p. 314-321, 2011.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

- EL-ELIMAT, T. et al. Greensporones. Resorcylic acid lactones from an aquatic *Halenospora* sp. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 9, p. 2088-2098, 2014.
- ELOFF, J.N. A Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.
- FERNANDES, R. H. et al. *Pochonia chlamydosporia* e *Bacillus subtilis* no controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em mudas de tomateiro. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 194-200, 2014.
- FRUHMANN, P. et al. Isolation and structure elucidation of pentahydroxyscirpene, a trichothecene *Fusarium* mycotoxin. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 188-192, 2014.
- FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 22-26, 2003.
- GHINI, R.; ZARONI, M. M. H. Relação entre coberturas vegetais e supressividade de solos a *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 10-15, 2001.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms. distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.
- HE, Y. et al. Radicol, a heat shock protein 90 inhibitor, inhibits differentiation and adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 436, n. 2, p. 169-174, 2013.
- HOFFMANN, C. C. et al. Infecções causadas por fungos demácios e suas correlações anátomo-clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 138-141, 2011.
- HELLWIG, V. et al. *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 6, p. 829-837, 2003.
- GELLERSTEDT, G. Gel permeation chromatography. In: **Methods in lignin chemistry**, Berlin. Springer Heidelberg. 1992. cap. 8.1, p. 487- 497
- GIULIETTI, A. M. **Análise crítica da evolução da morfologia e da sistemática das Eriocaulaceae**. 1997. 161f. Tese (Titular em Sistemática de Vegetais Superiores)– Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 1997.
- GIULIETTI, A.M. et al. The synonymization of *Philodice* with *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, v. 60, p. 50-56, 2012.
- HEMSHEKHAR, M. et al. Emerging roles of anacardic acid and its derivatives. a pharmacological overview. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 122-132, 2012.

HILARIO, F. Título : Local: Editora, 2012. (Relatório FAPESP)

KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S. K., STIERLE, A.; STIERLE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes. their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 7, p. 1208-1228, 2011.

KIMURA, Y. et al. Myxostioliide, myxostiol, and clavatoic acid, plant growth regulators from the fungus *Myxotrichum stipitatum*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 4, p. 621-623, 2002.

KROHN, K. et al. Biologically active secondary metabolites from fungi 11. Herbarulide, a ketodivinyllactone steroid with an unprecedented homo-6-oxaergostane skeleton from the endophytic fungus *Pleospora herbarum*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 629-630, 1999a.

KROHN, K. et al. Biologically active secondary metabolites from fungi, 13. Stemphytriol, a new perylene derivative from *Monodictys fluctuata*. **Natural Products Letters**, v. 14, p. 31-34, 1999b.

KROHN, K.; BIELE, C. et al. Biologically active secondary metabolites from fungi, 18. Fusidilactones, a new group of polycyclic lactones from an endophyte, *Fusidium sp.* **European Journal of Organic Chemistry**, n. 14, p. 2331-2336, 2002.

KROHN, K. et al. Biologically active metabolites from fungi. Part 16. new preussomerins J, K and L from an endophytic fungus. structure elucidation, crystal structure analysis and determination of absolute configuration by CD calculations. **Tetrahedron**, v. 57, p. 4343-4348, 2001.

LIMÓN, M. C.; RODRÍGUEZ-ORTIZ, R.; AVALOS, J. Bikaverin production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 21-29, 2010.

LIU, D. Z.; LIANG, B. W.; LI, X. F.; LIU, Q.. Induced production of new diterpenoids in the fungus *Penicillium funiculosum*. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 5, p. 607-608, 2014.

LOGRIECO, A. et al. Beauvericin production by *Fusarium species*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 3084-3088, 1998.

MANAMGODA, D. S. et al. The genus *Bipolaris*. **Studies in Mycology**, v. 79, p. 221-288, 2014.

MAES, C. M. et al. The structure of bipolaramide, a novel dioxopiperazine from *Bipolaris sorokiniana*. **Journal of the Chemical Society. Chemical Communications**, v. 6, p. 350-351, 1982.

MANZANILLA, R. et al. *Pochonia chlamydosporia*. Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 45, n. 1, p. 1-7, 2013.

- MARDER, L. et al. Quantitative analysis of total mycotoxins in metabolic extracts of four strains of *Bipolaris sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*). **Process Biochemistry**, v. 41, p. 177-180, 2006.
- MEYER, T. N.; SILVA, A. L. DA. Resposta celular ao estresse. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 181-188, 1999.
- NAKAJIMA, H. et al. Phytotoxins and related metabolites produced by *Bipolaris coicis*, the pathogen of job's tears. **Phytochemistry**, v. 45, n. 1, p. 41-45, 1997.
- NIHASHI, Y. et al. Phytotoxic Sesterterpene, 11-Epiterpestacin, from *Bipolarissorokiniana* NSDR-011. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 3, p. 685-688, 2002.
- O'BRIEN, H. E. et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5544-5550, 2005.
- PACIFICO, M. et al. Metabolite *fingerprint* of capim dourado (*Syngonanthus nitens*), a basis of Brazilian handicrafts. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 488-496, 2011.
- 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, n. 12, p. 1939-1945, 2007.
- PETTIT, R. K. Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 471- 478, 2011.
- RABIE, C. J.; LUBBEN, A.; STEYN, M. Production of sterigmatocystin by *Aspergillus versicolor* and *Bipolaris sorokiniana* on semisynthetic liquid and solid media. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 206-208, 1976.
- RABIEB, C. J. The Structure of bipolaramide, a. v. 55, n. 350, p. 350-351, 1982.
- REVANKAR, S. G. et al. Disseminated phaeohyphomycosis . review of an emerging mycosis. v. 34, p. 467- 476, 2002.
- RICCI, C. V. et al. Flavonoids of *Syngonanthus* Ruhl, (Eriocaulaceae). taxonomic implications, **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 24, n. 6, p. 577-583, 1996.
- RODRIGUEZ, M. A.; CABRERA, G.; GODEAS, A. Cyclosporine A from a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* suppressing *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 575-586, 2006.
- SANTIN, E. et al. Micotoxinas do *Fusarium* spp. na avicultura comercial. **Ciência Rural**, v. 31, n. 1, p. 185-190, 2000.

- SANTOS, L. C. ; HONDA, N. K. ; CARLOS, I. Z. Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens. **Fitoterapia**, v. 75, n. 5, p. 473-479, 2004.
- SANTOS, L. C. et al. Xanthonenes and flavonoids from *Leiothrix curvifolia* and *Leiothrix flavescens*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 853-856, 2001.
- SATO, C, S. Parque Nacional da Serra do Cipó, MG. percepção ambiental e estabelecimento de áreas para educação. 2007.171 f. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área Botânica) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- SCHEFFERS, B. R. et al. "What we know and don't know about Earth's missing biodiversity. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 27, n. 9, p. 501-510, 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.
- SHANKARAPPA, B. et al. Bipolaris. a rare etiology of ureteric mycosis with Double J stent *in situ*. **International Journal of Advances in Medicine**, v. 1, n. 1, p. 52, 2014.
- SILVERSTEIN, R. M. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 2006.
- SIRIWACH, R. et al. Bipolamides A and B, triene amides isolated from the endophytic fungus *Bipolaris* sp. MU34. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 2, p. 167-70, 2014.
- SHINONAGA, H. et al. . Pochonins K-P. new radicicol analogues from *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* and their WNT-5A expression inhibitory activities. **Tetrahedron**, v. 65, n. 17, p. 3446-3453, 2009.
- SOMEI, M.; KAWASAKI, T. The first and simple synthesis of indole alkaloid, bipolaramide. **Heterocycles**, v. 42, n. 1, p. 281-287, 1996.
- STEFFECK, R. J.; YURY Z.; K. H. GAHM. Enantioselective separation of racemic secondary amines on a chiral crown ether-based liquid chromatography stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 947, n. 2, p. 301-305, 2002.
- STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535-544, 2003.
- STROBEL, G., DAISY, B., CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from endophytic microorganisms¹. **Journal of Natural Products**, v. 67, n.2, p. 257-268, 2004.
- SUGAWARA, F. et al. Bipolaroxin, a selective phytotoxin produced by *Bipolaris cynodontis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 24, p. 8291- 8294, 1985.
- TKACZ, J. S. Polyketide and peptide products of endophytic fungi. variations on two biosynthetic themes of secondary metabolism. In **Microbial Endophytes** .BACON, C. W.; WHITE, J. F. (Ed.). New York:Marcel Dekker, 2000. p.263-294.

- TROVÓ, M.; SANO, P.T. Taxonomic survey of *Paepalanthus* section *Diphyomene* (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, v. 14, n. 49-55, 2010.
- VILEGAS, W. et al. Isocoumarin from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2299–2301, 1990.
- VILEGAS, W. et al. Naphtopyranones glycosides from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 207–210, 1998.
- VIZZOTO, L. **Estudo e aplicações das técnicas de RMN HR-MAS e DOSY em plantas e extratos de plantas de ordem Rutales**. 2004. f. Tese (Doutorado em Química). Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - Universidade Federal de São Carlos - São Carlos, 2004.
- WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. M. **Plant drug analysis**. a thin layer chromatography atlas. Berlin. Springer, 1984.
- WANG, Q.-X. et al. Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 5, p. 777- 781, 2011.
- WANG, Q.-X. et al. Coicenals A-D, four new diterpenoids with new chemical skeletons from the plant pathogenic fungus *Bipolaris coicis*. **Organic Letters**, v. 15, n. 15, p. 3982-3295, 2013.
- WATANABE, N. et al. Bipolal. anti-microalgal compound isolated as a candidate for marine antifouling produced by *Bipolaris* sp. F5206. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 3, p. 463- 466, 1995.
- WILLIAMS, R. B. et al. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 11, p. 1895–1897, 2008.
- XU, W, GAVIA, D. J.; TANG, Y. Biosynthesis of fungal indole alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 10, p. 1474-1487, 2014.
- ZANUTTO, F. V. et al. Characterization of flavonoids and naphthopyranones in methanol extracts of *Paepalanthus chiquitensis* Herzog by HPLC-ESI-IT-MS and their mutagenic activity. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 244-262, 2012.
- ZARE, R.; GAMS, W.; EVANS, H. C. A revision of *Verticillium* section Prostrata. V. The genus *Pochonia*, with notes on Rotiferophthora. **Nova Hedwigia**, v. 73, n. 1-2, p. 51-86, 2001.