**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Bioprospecção de fungos endofíticos isolados de guaranazeiros da
Amazônia**

Luciana Mecatti Elias

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2015**

Luciana Mecatti Elias
Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas

Bioprospecção de fungos endofíticos isolados de guaranazeiros da Amazônia
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **SIMONE POSSEDENTE DE LIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Elias, Luciana Mecatti

Bioprospecção de fungos endofíticos isolados de guaranazeiros da Amazônia / Luciana Mecatti Elias. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

157 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Antracnose 2. *Colletotrichum* 3. Compostos bioativos 4. Produtos naturais I. Título

CDD 589.2
E42b

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais José Antônio (Zito) e Lucia Helena,
Pelo AMOR, companheirismo e paciência durante todos os dias da minha vida,
DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) pela infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade e a todos os professores, funcionários e alunos que fazem parte deste programa pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao CNPq (processo nº 143275/2011-9) e a FAPESP (processo nº 2012/02000-5) pelas bolsas concedidas. Ao Projeto Regular FAPESP (processo nº 2014/15760-3) e ao Projeto Temático FAPESP (processo nº 2013/50228-8) pelo apoio financeiro.

A minha orientadora Profa. Dra. Simone Possedente de Lira pela orientação e paciência sempre, por me ensinar a cada dia como me tornar uma cientista e pessoa melhor e principalmente pela amizade, carinho e atenção. Muito obrigada pelas horas e horas dedicadas a minha formação, conselhos e lições de vida. Admiro muito você!

Ao professor Dr. João Lúcio de Azevedo (ESALQ-USP) e a aluna de doutorado Thana Esashika Bezerra pelas linhagens de fungos endofíticos utilizadas neste trabalho.

Ao professor Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck (USP, São Carlos) por disponibilizar o equipamento CLAE-UV-EM e as técnicas Fabiana e Karin por ajudarem na utilização do equipamento.

Ao professor Dr. Antonio Gilberto Ferreira (UFSCar, São Carlos) e a técnica Luciana pelas análises de RMN.

Ao professor Dr. Edson Rodrigues Filho e ao aluno de pós-doutorado Dr. Douglas Ferreira (UFSCar, São Carlos) pelas análises de MALDI-TOF e RMN.

Ao técnico João Luiz Bronzel Junior (UNESP, Araraquara) pelas análises de HR-EM.

Ao professor Nelson Sidnei Massola Júnior (ESALQ-USP) pelo aprendizado adquirido enquanto monitora das disciplinas de Microbiologia e Fitopatologia, pelas dicas e ajuda.

Ao professor André Rodrigues (UNESP, Rio Claro) por disponibilizar seu laboratório para a realização das análises morfológicas e moleculares e aos alunos Lucas e Quimi pela enorme ajuda na interpretação dos dados.

Aos meus pais Zito e Lucia pelo amor infinito e por terem investido tanto na minha educação.

Aos meus irmãos Rodrigo e Valéria, aos cunhados Waleska e Rodolfo e aos sobrinhos mais lindos do mundo Alícia e Benício por tornarem esta fase da minha vida muito mais agradável e feliz. Amo muito todos!

Ao companheiro Matheus pelo amor, paciência, carinho, companheirismo e alegria! Você tornou esta etapa muito mais fácil!

A amiga Thaiane pela amizade verdadeira sem fim, pelas conversas, saidinhas e apoio sempre!

A prima Maria Clara que mesmo longe sempre esteve presente, dando força, carinho e atenção. Saudades!

A todas as pessoas do Depto de Química da ESALQ-USP! Professores: Arquimedes, Marcos, Wanessa, Simone e Marcelo; Funcionários: Beto, Felipe, Lenita, Janaína, Rita, Gertrudes, Helen e Nádia; Alunos: Sérgio, Flávio, Diana, Gislaine, Isabela, Ana Cláudia, Joze, Richtier, Jeane, Pipoca, Amanda, Cleiton, Marina, Natália, Marquinhos, Fernanda, Marília, Isabelli e Higor. Agradeço a todos pela amizade, convivência e cafézinhos (muitos cafézinhos!). Vou sentir MUITA falta de vocês!

Ao amigo Sérgio pelas infinitas risadas, conversas, apoio, amizade e comilanças! Obrigada por me aguentar nos bons e maus momentos e por tornar meus dias mais alegres!

Ao amigo Flávio pelo apoio, paciência, ensinamentos, elucidação de moléculas, dicas, conversas. Sem você tudo teria sido muito mais difícil!

A amiga Jeane pelas risadas, conversas, confidências, dicas, passeios no shopping, enfim, obrigada pelos muitos momentos de alegria e pela amizade!

Ao amigo Marcos (Pipoca) pelas análises estatísticas, dicas e ajuda. Obrigada!

As amigas Diana, Gislaine e Joze pelo apoio, dicas, risadas e conversas. Valeu gente!

Aos amigos Higor e Marília (processo FAPESP nº 2014/05940-4) pela ajuda e apoio. Desejo muita sorte a vocês dois.

Aos técnicos Felipe e Beto pela ajuda, pelos diversos consertos e reparos, ensinamentos e pelas muitas risadas.

As amigas e companheiras matinais Maiara, Giovanna e Letícia. Vocês tornaram minhas idas e vindas de Piracicaba muito mais divertidas.

Aos amigos bioloucos da PUC-Campinas Adrien, Monique, Raphaela, Cainho, Digão e Pink por estarem até hoje ao meu lado.

Enfim, obrigada a todas as pessoas que fizeram parte deste momento da minha vida. Cada um de vocês foi essencial para a realização deste trabalho.

*“A única maneira de se definir o limite do possível é ir
além dele, para o impossível”.*

Arthur C. Clarke

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	21
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Fungos	25
2.2 Fungos endofíticos.....	26
2.3 Produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos.....	27
2.3.1 Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos com atividade inibitória à fitopatógenos	30
2.3.1.1 Metabólitos secundários produzidos por endófitos do gênero <i>Penicillium</i> com atividade inibitória à fitopatógenos	33
2.3.1.2 Metabólitos secundários produzidos por endófitos do gênero <i>Aspergillus</i> com atividade inibitória à fitopatógenos	34
2.3.1.3 Metabólitos secundários produzidos por endófitos do gênero <i>Xylaria</i> com atividade inibitória à fitopatógenos	36
2.4 Antracnose	37
2.4.1 Antracnose na cultura do guaranazeiro	38
2.4.2 Antracnose na cultura do pimentão	40
3 OBJETIVOS.....	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos.....	43
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 Obtenção de material biológico.....	45
4.1.1 Coleta de folhas e galhos de guaranazeiros do Amazonas	45
4.1.2 Isolamento dos fungos endofíticos	45
4.1.3 Linhagens de fungos fitopatogênicos	46
4.1.4 Preservação dos fungos	46
4.2 Identificação polifásica das linhagens fúngicas.....	46
4.2.1 Identificação morfológica.....	46
4.2.2 Identificação molecular	47

4.2.3 Identificação por Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo (EM-MALDI-TOF).....	48
4.3 Obtenção dos extratos brutos dos fungos endofíticos.....	49
4.3.1 Obtenção das frações	49
4.4 Técnicas cromatográficas utilizadas no isolamento dos compostos	49
4.4.1 Cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada	49
4.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	50
4.5 Técnicas utilizadas na elucidação estrutural dos compostos	51
4.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a UV-EM.....	51
4.5.2 Espectrometria de massas de alta resolução (HR-EM).....	51
4.5.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	52
4.6 Ensaios biológicos.....	52
4.6.1 Ensaio biológico por cultivo pareado.....	52
4.6.2 Ensaio biológico por difusão em disco	53
4.6.3 Ensaio biológico para determinação da concentração média inibitória (CI ₅₀).....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Linhagens de fungos endofíticos.....	55
5.2 Identificação polifásica dos fungos endofíticos	56
5.3 Seleção dos fungos endofíticos com potencial antifúngico a <i>Colletotrichum</i> spp.....	59
5.3.1 Cultivo pareado dos fungos endofíticos contra os fitopatógenos do gênero <i>Colletotrichum</i>	59
5.3.2 Avaliação dos extratos brutos dos fungos endofíticos	63
5.4 Estudo biológico e químico dos extratos dos fungos endofíticos	66
5.4.1 Estudo biológico e químico do extrato do fungo endofítico <i>A. flavus</i> (272)	66
5.4.2 Estudo biológico e químico do extrato do fungo endofítico <i>Xylaria</i> sp. (214).....	77
5.4.3 Estudo biológico e químico do extrato do fungo endofítico <i>Xylaria</i> sp. (249).....	88
5.4.4 Estudo biológico e químico do extrato do fungo endofítico <i>T. aculeatus</i> (507).....	97
5.4.4.1 Purificação da fração F507a3a.....	99
5.4.4.2 Purificação da fração F507a3c	111
5.4.4.2.1 Fração F507a3c3	112
5.4.4.2.2 Fração F507a3c5	117
6 CONCLUSÕES FINAIS.....	123
REFERÊNCIAS.....	127
ANEXOS	143

RESUMO

Bioprospecção de fungos endofíticos isolados de guaranazeiros da Amazônia

Fungos do gênero *Colletotrichum* são considerados um dos principais fitopatógenos do mundo, comprometendo diversas culturas e causando danos econômicos e sociais para diversos países, inclusive o Brasil. Apesar de medidas de controle já serem empregadas, estas nem sempre são eficazes, motivo pelo qual se faz necessária a busca por novas opções de controle que possam atuar no manejo integrado. Dentre estas, encontram-se os metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos, os quais estão envolvidos na produção de compostos de interesse biotecnológico, com aplicações em diversas áreas, inclusive a agrônoma. Neste contexto, o presente trabalho de doutorado teve por objetivo explorar o potencial biológico e químico de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de guaranazeiros da Amazônia, avaliando sua atividade antifúngica “in vitro” a *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado da cultura do guaranazeiro, a *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, isolados da cultura do pimentão. Para tanto, 16 linhagens de fungos endofíticos foram avaliadas em ensaio biológico por cultivo pareado e pelo método de difusão em disco contra *Colletotrichum* spp. Observou-se que quatro linhagens se mostraram mais promissoras, as quais foram selecionadas para o estudo de bioprospecção. A partir do extrato bruto do endófito *Aspergillus flavus* (272) foi isolado o composto ativo asperfuran, que apresentou atividade inibitória aos três fitopatógenos, com $CI_{50} < 100 \mu\text{g disco}^{-1}$, semelhante ao fungicida comercial difenoconazol. A partir do extrato bruto de *Xylaria* sp. (214) foi isolado o composto ativo citocalasina D, que apresentou atividade inibitória a *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro, com $CI_{50} > 500 \mu\text{g disco}^{-1}$. A partir do extrato bruto de *Xylaria* sp. (249) foi isolado o composto ativo ácido pilifórmico, que apresentou atividade inibitória a *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro, com CI_{50} de $500 \mu\text{g disco}^{-1}$ e à *C. acutatum* isolado o pimentão, com CI_{50} de $300 \mu\text{g disco}^{-1}$. E, a partir do extrato bruto de *Talaromyces aculeatus* (507) foram isolados três compostos, da classe dos ésteres ftálicos, sendo um ativo. A fração antecessora destes três compostos apresentou atividade inibitória a *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro, com $CI_{50} > 500 \mu\text{g disco}^{-1}$. A partir do extrato bruto de *T. aculeatus* também foi isolado um composto ativo parcialmente identificado e um composto ativo semi-purificado. A fração antecessora destes dois compostos apresentou atividade inibitória aos dois *C. gloeosporioides*, com $CI_{50} > 300 \mu\text{g disco}^{-1}$ e a *C. acutatum*, com CI_{50} em torno de $150 \mu\text{g disco}^{-1}$. A atividade antifúngica destes compostos a fungos do gênero *Colletotrichum* está sendo relatada pela primeira vez neste estudo.

Palavras-chave: Antracnose; *Colletotrichum*; Compostos bioativos; Produtos naturais

ABSTRACT

Bioprospecting of endophytic fungi isolated from the Amazonian guarana

Colletotrichum fungi are considered one of the main pathogens in the world, affecting different cultures and causing social and economic damage to several countries, including Brazil. Despite control measures already being employed, these are not always effective, which is why the search for new control options that can act in the integrated management is necessary. Among these, the secondary metabolites produced by endophytes are involved in the production of compounds of biotechnological interest, with applications in several areas, including the agronomic. In this context, this study aimed to explore the biological and chemical potential of secondary metabolites produced by endophytic fungi isolated from the Amazonian guarana, evaluating their antifungal activity "in vitro" to *Colletotrichum gloeosporioides*, isolated from the culture of guarana and *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*, isolated from the red pepper crop. For this purpose, 16 strains of endophytic fungi were evaluated in biological assay of dual culture and disk diffusion method against *Colletotrichum* spp. Four strains of these strains presented promising results which were selected for bioprospecting. From the crude extract of the endophyte *Aspergillus flavus* (272) was isolated the active compound asperfuran, which showed inhibitory activity to three pathogens, with $IC_{50} < 100 \mu\text{g disk}^{-1}$, similar to the commercial fungicide difenoconazole. From the crude extract of *Xylaria* sp. (214) was isolated the active compound cytochalasin D, which showed inhibitory activity against *C. gloeosporioides* isolated from guarana ($IC_{50} > 500 \mu\text{g disk}^{-1}$). From the crude extract of *Xylaria* sp. (249) was isolated the active compound piliformic acid, which showed inhibitory activity against *C. gloeosporioides* isolated from guarana (IC_{50} of $500 \mu\text{g disk}^{-1}$) and *C. acutatum* isolated from red pepper (IC_{50} of $300 \mu\text{g disk}^{-1}$). And from the crude extract of *Talaromyces aculeatus* (507) were isolated three compounds, of phthalate esters class, one of them with activity. The predecessor fraction of these three compounds showed inhibitory activity against *C. gloeosporioides* isolated from guarana ($IC_{50} > 500 \mu\text{g disk}^{-1}$). From the crude extract of *T. aculeatus* it was also isolated a partially identified active compound and a semi-purified active compound. The predecessor fraction of these two compounds showed inhibitory activity to both *C. gloeosporioides* ($IC_{50} > 300 \mu\text{g disk}^{-1}$) and to *C. acutatum* (IC_{50} around $150 \mu\text{g disk}^{-1}$). The antifungal activity of the compounds isolated in this study is being reported for the first time against fungus of the genus *Colletotrichum*.

Keywords: Anthracnose; *Colletotrichum*; Bioactive compounds; Natural products

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folhas de guaranazeiro com sintoma de antracnose. A) Crestamento foliar em folíolos jovens, B) Lesões necróticas em folíolos em expansão e C) Deformação e enrolamento dos folíolos.....	39
Figura 2 - Fotos demonstrando as consequências da antracnose em fruto (A) e folha (B) de pimentão	40
Figura 3 - Linhagens de fungos endofíticos (isoladas de guaranazeiro) utilizadas neste estudo, em meio BDA.....	55
Figura 4 - Análises morfológicas de quatro fungos endofíticos com a utilização de microscopia óptica. A) Conidióforo de <i>Aspergillus</i> sp. (272); B) Conidióforos de <i>Penicillium</i> sp. (507); C) Conidióforos de <i>Clonostachys</i> sp. (47); D) Microconídios de <i>Fusarium</i> sp. (225)	56
Figura 5 - Dendrograma de similaridade química de proteínas das 16 linhagens de fungos endofíticos.....	58
Figura 6 - Espectros obtidos para os MSP's das linhagens do gênero <i>Xylaria</i> agrupadas na mesma sub-chave do dendrograma.....	58
Figura 7 - Cultivo pareado das 16 linhagens de fungos endofíticos (FE) (na parte inferior das placas) com o fitopatógeno do guaranazeiro – FP1: <i>C. gloeosporioides</i> (na parte superior das placas).....	60
Figura 8 - Cultivo pareado das 16 linhagens de fungos endofíticos (FE) (na parte inferior das placas) com dois fitopatógenos do pimentão – FP2: <i>C. gloeosporioides</i> e FP3: <i>C. acutatum</i> (na parte superior das placas).....	61
Figura 9 - Avaliação dos extratos brutos dos fungos endofíticos por ensaio de difusão em disco.....	64
Figura 10 - Inibição do crescimento micelial do fitopatógeno <i>C. gloeosporioides</i> (isolado de guaranazeiro) pelos compostos presentes nos extratos brutos das 16 linhagens de fungos endofíticos, utilizando-se o método de difusão em disco	64
Figura 11 - Endófito <i>A. flavus</i> (272) em placa de Petri (à esquerda) e observação em microscópio óptico de um conidióforo típico de <i>Aspergillus</i> (à direita)	66
Figura 12 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações aquosa e AcOEt (F272), obtidas do extrato bruto do fungo endofítico <i>A. flavus</i> (272), a 2000 µg disco ⁻¹	66

Figura 13 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações (F272a → F272f), obtidas da F272 do fungo endofítico <i>A. flavus</i> (272), a 1000 µg disco ⁻¹	67
Figura 14 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações (F272d1 → F272d6), obtidas da F272d do fungo endofítico <i>A. flavus</i> (272), a 1000 µg disco ⁻¹	67
Figura 15 - Cromatograma da fração F272d1	67
Figura 16 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações (F272d1a → F272d1d), obtidas da F272d1 do fungo endofítico <i>A. flavus</i> (272), a 500 µg disco ⁻¹	68
Figura 17 - Cromatograma da fração F272d1c	68
Figura 18 - Espectro de absorção do UV da fração F272d1c	68
Figura 19 - Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo da fração F272d1c	69
Figura 20 - Espectro de massas de baixa resolução em modo negativo da fração F272d1c ...	69
Figura 21 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração F272d1c	71
Figura 22 - Fluxograma do estudo químico do fungo endofítico <i>A. flavus</i> (272).....	73
Figura 23 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a três fitopatógenos do gênero <i>Colletotrichum</i> realizado com o composto asperfuran (F272d1c) e com o fungicida comercial difenoconazol, pelo método de difusão em disco, nas concentrações de 100, 200 e 300 µg disco ⁻¹	75
Figura 24 - Porcentagens de inibição apresentadas a três fitopatógenos do gênero <i>Colletotrichum</i> , pelo fungicida comercial difenoconazol e pelo composto asperfuran (F272d1c) isolado neste estudo	75
Figura 25 - Endófito <i>Xylaria</i> sp. (214) em placa de Petri	77
Figura 26 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações aquosa e AcOEt (F214), obtidas do extrato bruto do fungo endofítico <i>Xylaria</i> sp. (214), a 2000 µg disco ⁻¹	77
Figura 27 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações (F214a → F214f), obtidas da F214 do fungo endofítico <i>Xylaria</i> sp. (214), a 1000 µg disco ⁻¹	78
Figura 28 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações (F214d1 → F214d6), obtidas da F214d do fungo endofítico <i>Xylaria</i> sp. (214), a 1000 µg disco ⁻¹	78
Figura 29 - Cromatograma da fração F214d3	78

Figura 30 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações (F214d3a → F214d3c), obtidas da F214d3 do fungo endofítico <i>Xylaria</i> sp. (214), a 500 µg disco ⁻¹	79
Figura 31 - Cromatograma da fração F214d3c.....	79
Figura 32 - Espectro de absorção do UV da fração F214d3c.....	79
Figura 33 - Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo da fração F214d3c.....	80
Figura 34 - Espectro de massas de baixa resolução em modo negativo da fração F214d3c.....	80
Figura 35 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração F214d3c.....	82
Figura 36 - Fluxograma do estudo químico do fungo endofítico <i>Xylaria</i> sp. (214).....	85
Figura 37 - Endófito <i>Xylaria</i> sp. (249) em placa de Petri.....	88
Figura 38 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações aquosa e AcOEt (F249), obtidas do extrato bruto do fungo endofítico <i>Xylaria</i> sp. (249), a 2000 µg disco ⁻¹	88
Figura 39 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações (F249a → F249f), obtidas da F249 do fungo endofítico <i>Xylaria</i> sp. (249), a 1000 µg disco ⁻¹	89
Figura 40 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações (F249d1 → F249d5), obtidas da F249d do fungo endofítico <i>Xylaria</i> sp. (249), a 1000 µg disco ⁻¹	89
Figura 41 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações (F249d1a → F249d1e), obtidas da F249d1 do fungo endofítico <i>Xylaria</i> sp. (249), a 1000 µg disco ⁻¹	89
Figura 42 - Cromatograma da fração F249d1b	90
Figura 43 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações (F249d1b1 → F249d1b4), obtidas da F249d1b do fungo endofítico <i>Xylaria</i> sp. (249), a 500 µg disco ⁻¹	90
Figura 44 - Cromatograma da fração F249d1b4	90
Figura 45 - Espectro de absorção do UV da fração F249d1b4.....	91
Figura 46 - Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo da fração F249d1b4...	92
Figura 47 - Espectro de massas de baixa resolução em modo negativo da fração F249d1b4..	92
Figura 48 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração F249d1b4.....	94
Figura 49 - Fluxograma do estudo químico do fungo endofítico <i>Xylaria</i> sp. (249).....	96
Figura 50 - Endófito <i>T. aculeatus</i> (507) em placa de Petri (à esquerda) e observação em microscópio óptico de um conidióforo típico de <i>Talaromyces</i> (à direita).....	97

Figura 51 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações aquosa e AcOEt (F507), obtidas do extrato bruto do fungo endofítico <i>T. aculeatus</i> (507), a 2000 µg disco ⁻¹	98
Figura 52 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações (F507a → F507e), obtidas da F507 do fungo endofítico <i>T. aculeatus</i> (507), a 1000 µg disco ⁻¹	98
Figura 53 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações (F507a1 → F507a4), obtidas da F507a do fungo endofítico <i>T. aculeatus</i> (507), a 1000 µg disco ⁻¹	98
Figura 54 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações (F507a3a → F507a3e), obtidas da F507a3 do fungo endofítico <i>T. aculeatus</i> (507), a 1000 µg disco ⁻¹	99
Figura 55 - Cromatograma da fração F507a3a	99
Figura 56 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C. gloeosporioides</i> realizado com as frações (F507a3a1 → F507a3a4), obtidas da F507a3a do fungo endofítico <i>T. aculeatus</i> (507), a 500 µg disco ⁻¹	100
Figura 57 - Cromatograma das frações F507a3a1 (A), F507a3a2 (B) e F507a3a3 (C).....	101
Figura 58 - Espectro de absorção do UV das frações F507a3a1 (A), F507a3a2 (B) e F507a3a3 (C)	102
Figura 59 - Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo das frações F507a3a1 (A), F507a3a2 (B) e F507a3a3 (C)	103
Figura 60 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo das frações F507a3a1 (A), F507a3a2 (B) e F507a3a3 (C).....	105
Figura 61 - Cromatograma da fração F507a3c	111
Figura 62 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a <i>C.gloeosporioides</i> realizado com as frações (F507a3c1 → F507a3c7), obtidas da F507a3c do fungo endofítico <i>T. aculeatus</i> (507), a 500 µg disco ⁻¹	112
Figura 63 - Cromatograma da fração F507a3c3	112
Figura 64 - Espectro de absorção do UV da fração F507a3c3.....	113
Figura 65 - Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo da fração F507a3c3.	113
Figura 66 - Espectro de massas de baixa resolução em modo negativo da fração F507a3c3	114
Figura 67 - Intensidades relativas de picos de isótopo de cloro.....	114
Figura 68 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração F507a3c3 ...	115

Figura 69 - Estrutura química parcial do composto F507a3c3 com esquema de correlações HSQC, COSY e HMBC	117
Figura 70 - Cromatograma da fração F507a3c5	117
Figura 71 - Espectro de absorção do UV da fração F507a3c5	117
Figura 72 - Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo da fração F507a3c5 .	118
Figura 73 - Espectro de massas de baixa resolução em modo negativo da fração F507a3c5	118
Figura 74 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração F507a3c5	119
Figura 75 - Porcentagens de inibição apresentadas a três fitopatógenos do gênero <i>Colletotrichum</i> , pelo fungicida comercial difenoconazol e pela fração F507a3c	120
Figura 76 - Fluxograma do estudo químico do fungo endofítico <i>T. aculeatus</i> (507).....	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação morfológica e molecular das 16 linhagens de fungos endofíticos do guaranazeiro.....	57
Tabela 2 - Tipos de interação endófito-fitopatógeno (BADALYAN; INNOCENTI; GARIBYAN, 2002) e cálculo do índice de antagonismo (CAMPANILE; RUSCELLI; LUISI, 2007).....	62
Tabela 3 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) do composto F272d1c e do asperfuran, ambos em acetona- d_6	72
Tabela 4 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) do composto F214d3c e da citocalasina D, ambos em DMSO- d_6	84
Tabela 5 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) do composto F249d1b4 e do ácido pilifórmico, ambos em CDCl_3	95
Tabela 6 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) dos compostos F507a3a1, F507a3a2 e F507a3a3, ambos em CDCl_3	109
Tabela 7 - Dados de RMN ^1H , HSQC, COSY ^1H - ^1H e HMBC (600 MHz) do composto F507a3c3 em CDCl_3	116
Tabela 8 - Compostos isolados de extratos brutos de fungos endofíticos durante o presente trabalho de doutorado	125

1 INTRODUÇÃO

O Brasil abriga cerca de 20% da biodiversidade mundial, principalmente constituída pela floresta amazônica, considerada a maior do planeta e fonte incalculável de matéria-prima. Apesar da grande diversidade biológica amazônica, as espécies que a compõem, incluindo micro-organismos e suas interações inter e intraespecíficas neste bioma, ainda são pouco conhecidas (SOUZA et al., 2004).

Sabe-se que os micro-organismos podem se associar as plantas, e, acredita-se que estas estabeleçam algum tipo de associação com fungos epifíticos (presentes nas superfícies vegetais), rizosféricos (presentes na rizosfera das plantas) e/ou endofíticos.

Os fungos endofíticos habitam o interior de tecidos vegetais sem causar danos ao seu hospedeiro (ARAÚJO et al., 2010; RODRIGUEZ et al., 2009) e estão envolvidos na produção de compostos de interesse biotecnológico com aplicações em diversas áreas, como por exemplo, medico-farmacológica, industrial e agrônoma. No último caso, eles são importantes candidatos ao controle de fitopatógenos, pelo fato de colonizarem um nicho ecológico semelhante ao ocupado pelos mesmos (ARAÚJO et al., 2010), pela competição por nutrientes, parasitismo, indução da planta a desenvolver resistência ou produção de metabólitos secundários antagônicos.

Dentre os fungos endofíticos que se destacam na produção de metabólitos secundários, estão os dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Xylaria*. Estes fungos são frequentemente isolados como endófitos dos tecidos de diversas plantas e são uns dos mais frequentemente selecionados nos trabalhos de bioprospecção. Além disso, os compostos produzidos por endófitos têm emergido como uma promissora fonte de recursos para o desenvolvimento de novos defensivos agrícolas no controle de fitopatógenos.

Dentre os principais problemas de caráter agrônomo, podemos citar a doença conhecida como antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, que afeta diversas culturas, incluindo as do guaranazeiro e do pimentão.

O guaraná, fruto do guaranazeiro (*Paullinia cupana*, var. *sorbilis* (Mart.) Duke) é nativo da Amazônia e é um dos principais produtos dos estados do Amazonas e Bahia. A cultura do guaranazeiro é de grande importância para o Brasil, tanto do ponto de vista econômico quanto social. Já o pimentão (*Capsicum annuum* L.) é uma das 10 hortaliças mais importantes do mercado brasileiro e tem sua maior produção concentrada nos estados de São Paulo e Minas Gerais.

Tanto na cultura do guaranazeiro, quanto na do pimentão, a antracnose é considerada uma das principais doenças. Apesar de existirem medidas de controle, tais como poda fitossanitária, uso de sementes sadias e uso de fungicidas, essas culturas não ficam livres desta doença, demonstrando uma evidente necessidade de pesquisas que busquem novas opções de controle que possam auxiliar no manejo integrado.

Levando em consideração que até o presente momento não há estudos sobre compostos produzidos por fungos endofíticos do guaraná da Amazônia, o presente trabalho é uma contribuição na descoberta de novos compostos bioativos contra *Colletotrichum* spp., causador de antracnose nas culturas do guaraná e pimentão, e, além disso, espera-se abrir novas perspectivas para o potencial biotecnológico de micro-organismos endofíticos presentes em plantas da Amazônia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos

Os fungos constituem um grupo de micro-organismos eucarióticos pertencentes ao Reino Fungi (Domínio Eukarya), possuindo formas unicelulares ou multicelulares. Possuem membrana, parede celular e produzem uma grande variedade de esporos reprodutivos sexuais e assexuais. São organismos heterotróficos que se alimentam por absorção de nutrientes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005), oriundas de fontes de carbono (proveniente de carboidratos, lipídeos e proteínas), nitrogênio (proveniente de aminoácidos e peptídeos), dentre outras (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997).

Estes micro-organismos estão presentes na maioria dos ambientes e alguns podem ser cultiváveis em meios de cultivo artificiais, formando colônias leveduriformes ou filamentosas. As colônias leveduriformes são unicelulares e as filamentosas são multicelulares, em forma de hifas. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio (TRABULSI et al., 2002).

Os estudos sobre as estimativas do número de espécies fúngicas conhecidas diferem significativamente. Segundo Mueller e Schmit (2007), as estimativas do número total de espécies fúngicas existentes no mundo variam entre 0,5 a 9,9 milhões em estudos realizados entre 1990 a 2006. No Brasil, foi registrado no “Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil” que até o ano de 2010, foram descritas 3.608 espécies fúngicas, sendo 519 da Amazônia (FORZZA et al., 2010).

Segundo Barbieri e Carvalho (2001), do total de espécies de fungos descritas, 2/3 estabelecem relações íntimas (parasíticas, comensalíticas ou mutualísticas) com outros organismos vivos, sendo que, um grande número dessas espécies vive em associação com as plantas.

Acredita-se que todas as espécies de plantas que vivem em ecossistemas naturais estabelecem algum tipo de associação simbiótica com fungos (RODRIGUEZ et al., 2009), os quais podem estar presentes nas superfícies vegetais (epífitos), na rizosfera ou no interior dos tecidos (endófitos).

2.2 Fungos endofíticos

Os endófitos são micro-organismos que habitam no interior de tecidos vegetais sem causar dano algum ao seu hospedeiro (ARAÚJO et al., 2010). Estes micro-organismos vivem em interação, recebendo nutrientes e proteção da planta hospedeira e produzindo compostos químicos, que podem ter função protetora a planta (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Segundo Mendes e Azevedo (2007), endófitos são todos os micro-organismos cultiváveis ou não, que não causam danos aparentes aos seus hospedeiros, e podem ser divididos em dois tipos: Tipo I, são aqueles que não formam estruturas externas na planta hospedeira e Tipo II, são aqueles que formam tais estruturas como os fungos micorrízicos. Os endofíticos do Tipo I são bem menos estudados, os quais foram o foco deste estudo.

Estes micro-organismos foram descobertos por de Bary (1866) e primeiramente descritos na planta Darnel (*Lolium temulentum*) (FREEMAN, 1904). Desde então, eles tem sido isolados de vários órgãos de diferentes espécies de plantas, dos trópicos ao ártico, e dos ecossistemas selvagens aos agrícolas (ARNOLD, 2007), e, até agora, todas as espécies de plantas estudadas abrigavam pelo menos um endófito. Segundo Nisa et al. (2015) os fungos endofíticos são onipresentes, pois, até hoje, nenhum estudo demonstrou a existência de uma espécie de planta sem endófitos.

Evidências da associação planta – micro-organismos foram encontradas em tecidos fossilizados de folhas e galhos revelando que essas associações podem ter evoluído a partir do momento em que as primeiras plantas superiores apareceram na Terra (REDECKER; KODNER; GRAHAM, 2000). Assim, acredita-se que os fungos endofíticos possam ter evoluído de dois modos de transmissão: vertical e horizontal. No primeiro modo o fungo teria sido transmitido para a planta via colonização de sementes e no segundo, teria operado via transferência sexual ou assexual de esporos (SAIKKONEN; HELANDER; FAETH, 2004).

O tipo de interação entre um endófito e a planta é controlado por genes de ambos os organismos e modulado pelo ambiente (MORICCA; RAGAZZI, 2008). Qualquer interação planta-fungo é precedida por um encontro físico, seguida por várias barreiras químicas e físicas que devem ser superadas para estabelecer com sucesso uma associação.

A colonização dos tecidos das plantas por endófitos envolve vários passos incluindo reconhecimento do hospedeiro, germinação dos esporos, penetração na epiderme e colonização dos tecidos (PETRINI, 1991, 1996). Depois que colonizam com sucesso nos tecidos do hospedeiro, o nicho começa a ser estabelecido. Neste nicho, os endófitos obtêm

uma fonte de nutrição proveniente dos fragmentos da planta, exsudados e lixiviados e protegem o hospedeiro contra outros micro-organismos (GAO; DAI; LIU, 2010).

A hipótese do antagonismo balanceado (SCHULZ et al., 1999; SCHULZ; BOYLE, 2005) foi inicialmente proposta para tratar como um endófito poderia evitar ativar as defesas do hospedeiro, garantindo auto-resistência antes de ser incapacitado pelos metabólitos tóxicos do hospedeiro, e conseguiria crescer dentro de seu hospedeiro sem causar manifestações visíveis de infecção ou doença (ARNOLD, 2007; SCHULZ; BOYLE, 2006). Esta hipótese propõe que a colonização assintomática é um balanço de antagonismos entre o hospedeiro e o endófito. Se a virulência do fungo e a defesa da planta são balanceadas, a associação é aparentemente assintomática e avirulenta (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

No nicho de um fungo endofítico ocorrem diversas interações, entre o fungo endofítico com outros fungos, bactérias e vírus endofíticos e com a planta hospedeira, sob várias pressões bióticas (como patógenos) e abióticas (como fatores ambientais). Tais interações são indispensáveis para os processos ecossistêmicos realizados pelos fungos endofíticos e os organismos relacionados (KUSARI; SINGH; JAYABASKARAN, 2014), uma vez que, a partir do momento em que a comunidade endofita se associa ao hospedeiro, ela pode desempenhar relevantes funções para a sanidade vegetal, atuando como controladores de insetos, herbívoros e fitopatógenos (PEIXOTO NETO et al., 2002).

2.3 Produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos

A produção dos metabólitos secundários por endófitos sofre influência dos fatores ambientais, tais como fonte de carbono e nitrogênio, temperatura, luz, pH, dentre outros. Deste modo, os fungos são capazes de regular os processos de produção de metabólitos secundários de acordo com as condições ambientais e necessidades específicas (ALY et al., 2010).

Uma vez que eram considerados exclusivos para as plantas, a produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos levantou questões intrigantes sobre qual organismo seria a fonte original. Na verdade, é possível que vários metabólitos atribuídos às plantas possam, de fato, terem sido produtos biossintéticos dos seus endófitos (YU et al., 2002). Neste contexto, a penicilina (**1**), famoso antibiótico no início dos anos 40, mudou o foco dos produtos naturais como fonte de novos fármacos das plantas para os micro-organismos (SURYANARAYANAN et al., 2009).

(1)

Durante a longa co-evolução dos endófitos e suas plantas hospedeiras, eles se adaptaram ao seu microambiente especial através de variação genética, incluindo captação de algum DNA da planta dentro de seus próprios genomas (GERMAINE et al., 2004). Isso pode ter levado certos endófitos a biossintetizar alguns fitoquímicos originalmente associados com as plantas hospedeiras (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

O exemplo mais conhecido é o taxol (2), um composto inicialmente isolado da planta *Taxus brevifolia* (WANI et al., 1971). Este composto tem potente atividade anticancerígena (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993) e vem sendo utilizado no combate principalmente ao câncer de ovário, de mama e de pulmão; e atualmente está sendo estudado para o tratamento de carcinoma de células escamosas da cavidade oral e língua (LEDWITCH et al., 2013).

(2)

A disponibilidade limitada de árvores maduras, a taxa lenta de crescimento das plantas cultivadas e o baixo rendimento no isolamento do taxol resultaram no alto custo deste produto e também levantou preocupações sobre os danos ambientais pela excessiva exploração das árvores silvestres. Para atender a demanda pelo produto, pesquisas por fontes alternativas de taxol foram realizadas por cientistas de todo o mundo, e, em decorrência disso, uma das descobertas mais significantes da última década foi a produção do taxol por fungos endofíticos, idêntico ao produzido pelas plantas, química e biologicamente.

Primeiramente, foi descoberta a produção de taxol por um fungo endofítico da própria planta *Taxus brevifolia*, o *Taxomyces andreanae* (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). Posteriormente, os trabalhos de alguns autores demonstraram que fungos endofíticos associados a outras plantas também possuem a capacidade de produzir o taxol: *Pestalotiopsis microspora*, *Alternaria alternata*, *Periconia* sp., *Pithomyces* sp., *Monochaetia* sp., *Seimatoantlerium nepalense* (DAHIYA, 1996; LI et al., 1998), *Chaetomella raphigera* (GANGADEVI; MUTHUMARY, 2009), dentre outros. Desde então, os fungos têm servido como fonte de matéria prima potencial para a engenharia genética melhorar a produção do taxol em larga escala (PANDI; RAJAPRIVA; MANOHARAN, 2013).

Outro composto, também com atividade anticancerígena, é a vincristina (**3**), que foi inicialmente isolada da planta *Catharanthus roseus* e posteriormente do seu fungo endofítico *Fusarium oxysporum* (JALGAONWALA; MOHITE; MAHAJAN, 2011). A podofilotoxina (**4**), também utilizada no tratamento de câncer, foi inicialmente isolada de plantas do gênero *Podophylum*, e posteriormente isolada dos fungos endofíticos *Trametes hirsuta* e *Phialocephala fortinii* (ALY et al., 2011).

Além da atividade anticancerígena, os metabólitos secundários sintetizados por fungos endofíticos podem possuir diversas atividades biológicas, tais como antimicrobiana (DAI et al., 2007), antioxidante (HARPER et al., 2003), antiviral (GUO et al., 2000; ZHANG et al., 2011), citotóxica (LIN et al., 2008; PURI et al., 2006; SHAO et al., 2010), entre outras, gerando um grande interesse biotecnológico e sendo cada vez mais alvo de pesquisas.

Porém, apesar das evidentes propriedades dos metabólitos bioativos dos fungos endofíticos, estes ainda não foram muito explorados, pois sua distribuição e ecologia são ainda pouco compreendidas (SURYANARAYANAN et al., 2009). Na ausência de um completo entendimento da interação dos fungos endofíticos com organismos associados,

Kusari, Singh e Jayabaskaran (2014) relatam que é particularmente interessante o fato de o fungo endofítico produzir um amplo espectro de produtos naturais quando cultivados fora se seu hospedeiro natural ou nicho ecológico, em condições laboratoriais “in vitro”.

Neste contexto, o grande interesse nos fungos endofíticos como fonte para o isolamento de novos compostos com atividade médico-farmacológica é claramente refletido pelo crescente número de publicações sobre este assunto. Entre 2008-2009 as pesquisas com fungos endofíticos levaram a descoberta de mais de 100 novos produtos naturais (ALY et al., 2010), e a descoberta de novas opções de aplicações, principalmente em países com alta biodiversidade, resulta em grandes perspectivas para os endófitos (PEIXOTO NETO et al., 2002).

Na busca por compostos bioativos, apenas uma pequena fração da biodiversidade fúngica estimada já foi investigada quimicamente (ALY et al., 2011), e apenas um pequeno número destes já foi cultivado e selecionado para a produção de fármacos. As principais áreas da pesquisa que vem contribuindo para o desenvolvimento dos estudos de metabólitos fúngicos são de interesse médico-farmacológico, industrial e mais recentemente outras áreas, como a agrônômica (HANSON, 2008; NISA et al., 2015).

2.3.1 Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos com atividade inibitória à fitopatógenos

As práticas agrícolas geralmente dependem de um amplo uso de defensivos agrícolas, bactericidas e fungicidas. No cenário atual, com a alta demanda por produtos orgânicos, indicando a preferência do consumidor para a redução do uso de produtos químicos, fica evidente a necessidade de se desenvolver estratégias sustentáveis inovadoras para a proteção das culturas, que não dependam de modificação genética e/ou substâncias químicas nocivas (KANCHISWAMY; MALNOY; MAFFEI, 2015).

Neste contexto, os endófitos são importantes candidatos ao controle de fitopatógenos, principalmente pelo fato de colonizarem um nicho ecológico semelhante ao ocupado pelos mesmos (ARAÚJO et al., 2010). Isto porque eles podem competir por nutrientes, produzir substâncias antagônicas, parasitar o patógeno ou induzir a planta a desenvolver resistência. Porém, pouco se sabe sobre a regulação da interação plantas-fungos endofíticos e como os fungos protegem as plantas contra os fitopatógenos.

Segundo Gao, Dai e Liu (2010) é proposto que os endófitos inibem os fitopatógenos principalmente pela indução da produção de fitoalexinas e da ocupação ecológica. Os

mecanismos dos fungos endofíticos na proteção das plantas contra os fitopatógenos incluem os de efeito direto (interação entre endófitos e fitopatógenos), efeito indireto (defesa da planta) e efeitos ecológicos (ocupação de nicho ecológico).

No caso do efeito direto, os endófitos suprimem diretamente os fitopatógenos pela produção de antibióticos e secreção de enzimas líticas. No caso do efeito indireto, as plantas criam uma série de mecanismos contra as condições desfavoráveis como seca, frio, estresse salino ou ataque de fitopatógenos, podendo ocorrer mudanças morfológicas e bioquímicas que incluem necrose celular, resposta hipersensível e produção de fitoalexinas, que respondem a vários estresses rapidamente. Em suma, a colonização dos fungos endofíticos resulta na secreção de hidrolases pelas células da planta para limitar o crescimento do fungo fitopatogênico.

No caso dos efeitos ecológicos, a interação planta-patógeno-endófito depende do nicho. O reconhecimento do endófito e sua rápida ocupação no nicho ecológico, não deixando espaço para o desenvolvimento dos fitopatógenos, parecem ser a principal razão que mostra os fungos endofíticos inibindo a infecção dos patógenos nas plantas.

Outra estratégia ecológica proveniente dos endófitos para proteger a planta hospedeira é o hiperparasitismo. Neste caso, o fitopatógeno é diretamente atacado por um endófito específico (TRIPATHI et al., 2008).

Portanto, a defesa da planta associada com os endófitos é potencializada através do aumento na resistência e da produção de metabólitos secundários por parte dos endófitos.

Existem muitos estudos que utilizam compostos bioativos de fungos endofíticos contra o crescimento de fitopatógenos “in vitro” (FU et al., 2011; LIU et al., 2001; MAO et al., 2010; STROBEL et al., 1999; WANG et al., 2012) e alguns “in vivo” (OROLE; ADEJUMO, 2009; PARK et al., 2003).

Os metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos incluem diversas classes químicas, tais como, alcaloides, compostos alifáticos e clorados, fenilpropanóides, fenóis, isocumarinas, lignanas, peptídeos, quinonas, terpenóides e xantonas (SCHULZ; BOYLE, 2005; TAN; ZOU, 2001).

Um exemplo de alcalóide produzido por um fungo endofítico é o composto criptocina (5), isolado de *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* e que apresenta atividade contra o fungo fitopatogênico *Pyricularia oryzae* e outros fitopatógenos (LI et al., 2000). Outros exemplos são os compostos epoxy-citocalasina (6), citocalasina N (7) e citocalasina H (8), produzidos pelo fungo endofítico *Phomopsis* sp., com atividade contra diversos fitopatógenos como

Sclerotinia sclerotiorum, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia cerealis*, dentre outros (FU et al., 2011).

(5)

(6)

(7)

(8)

Os terpenóides também tem sido isolados de fungos endofíticos, como o composto enfumafungina (9), isolado de *Hormonema* sp., que possui atividade antifúngica (PELAEZ et al., 2000). Um exemplo de isocumarina é o composto meleina (10) isolado do endófito *Pezicula* sp. Este composto possui atividade fungicida, herbicida e algicida (SCHULZ et al., 1995).

(9)

(10)

Os compostos da classe dos fenóis também têm sido isolados de fungos endofíticos. Um exemplo é o composto oosporeina (11), produzido por *Chaetomium cupreum*, que apresenta atividade contra os fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora ultimum* e *B. cinerea* (MAO et al., 2010). Outro exemplo é um composto derivado da tetralona, que foi isolado do fungo endofítico *Phoma* sp. (12). Este composto apresenta atividade antifúngica aos

importantes fitopatógenos da agricultura *Fusarium oxysporum* e *R. solani* (WANG et al., 2012).

Exemplos de compostos clorados isolados de fungos endofíticos com ação antimicrobiana são a micorrizina A **(13)** e a criptosporiopsina **(14)**, isolados de *Pezicula* sp. Estes compostos apresentaram atividade inibitória aos fitopatógenos *Ustilago violacea*, *Mycotypha microspora* e *Eurotium repens* (SCHULZ et al., 1995).

2.3.1.1 Metabólitos secundários produzidos por endófitos do gênero *Penicillium* com atividade inibitória à fitopatógenos

Fungos do gênero *Penicillium* são anamórficos pertencentes ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales e família Aspergillaceae (<http://www.mycobank.org>). Possuem vasta ocorrência na maioria dos ambientes terrestres, compreendendo mais de 200 espécies descritas, sendo a maioria correspondente a habitantes comuns do solo, contaminantes alimentares e ingredientes alimentares usados na preparação de queijos (FRISVAD; SAMSON, 2004; PITT, 2000).

Este gênero tem sido frequentemente isolado como endófito dos tecidos de diversas plantas, tais como café – *Coffea arabica* (VEGA et al., 2006) e amargoseira – *Melia azedarach* (SANTOS et al., 2003), e são capazes de produzir uma grande diversidade de metabólitos secundários ativos, incluindo antibacterianos (LUCAS; CASTRO;

TAKAHASHI, 2007; RANCIC et al., 2006), imunossupressores (KWON et al., 2002), micotoxinas potentes (FRISVAD; SAMSON, 2004), antifúngicos (NICOLETTI et al., 2007), dentre outros.

Um exemplo de metabólito secundário com atividade à fitopatógenos, isolado de *Penicillium*, é o 3-*o*-metilfunicono (**15**), que foi capaz de inibir o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Cylindrocladium scoparium* e *Alternaria alternata*, na concentração de 0,1 mg mL⁻¹, por ensaio “in vitro” de difusão em ágar (DE STEFANO et al., 1999). Outro exemplo é o antifúngico 7-hidroximeleina (**16**), que inibiu o crescimento dos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, a 5 e 10 µg, respectivamente, através do ensaio de bioautografia (OLIVEIRA et al., 2011).

Neste cenário, muitas de linhagens de *Penicillium* já foram utilizadas em estudos de bioprospecção desde a descoberta da penicilina, e novos metabólitos secundários ativos continuam sendo descobertos (GE et al., 2008; LARSEN et al., 2007; TAKAHASHI; LUCAS, 2008), indicando sua importância como fonte de metabólitos secundários ativos para serem utilizados nas mais diversas áreas, inclusive na área agronômica.

2.3.1.2 Metabólitos secundários produzidos por endófitos do gênero *Aspergillus* com atividade inibitória à fitopatógenos

Fungos do gênero *Aspergillus* são anamórficos pertencentes ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales e família Aspergillaceae (<http://www.mycobank.org>).

Este gênero compreende mais de 260 espécies descritas (SAMSON; VARGA, 2009) divididas em 16 seções, sendo que as mais comumente estudadas pertencem às seções *Circumdati*, *Flavi* e *Nigri* (VARGA et al., 2004). Seus representantes são considerados cosmopolitas e são amplamente distribuídos na natureza, possuindo uma abundância maior em regiões de climas tropicais e subtropicais (PITT; HOCKING, 2009).

Estes fungos são economicamente muito importantes, apresentando impactos negativos e positivos. Exemplos de impactos negativos seriam algumas linhagens oportunistas *Aspergillus fumigatus*, causadoras de aspergilose pulmonar em humanos (LATGÉ, 1999) e *Aspergillus niger*, contaminante de produtos agrícolas em diferentes fases (PERRONE et al., 2007). Já os exemplos de impactos positivos incluem os fungos utilizados na indústria biotecnológica, como é o caso do *Aspergillus niger*, muito utilizado na produção de enzimas extracelulares (SCHUSTER et al., 2002), e os fungos utilizados na produção de metabólitos secundários com diversas aplicações, como é o caso de certas linhagens de *Aspergillus flavus*, produtoras de compostos que apresentam potente atividade farmacológica (PATIL; PATIL; MAHESHWARI, 2015).

Na área agrônômica, diversos metabólitos secundários isolados de linhagens de *Aspergillus* com atividade contra fitopatógenos já foram relatadas. Um exemplo é a fumitremorgina B (17), que se mostrou ativa a *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Gibberella saubinetii* e *Colletotrichum gloeosporioides* na mesma concentração que os fungicidas comerciais carbendazim e himexazol, pelo método de diluição seriada (LI et al., 2012). Outro exemplo é o ácido kójico (18), que se mostrou ativo aos fitopatógenos *Phytophthora graminicola*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*, pelo método de difusão em ágar (KAYAHARA et al., 1990).

Dentre todos os fungos, os do gênero *Aspergillus* são um dos que mais foram estudados quanto ao isolamento de metabólitos bioativos. O estudo realizado por Bérdy (2005) mostrou que, dos mais de 6000 metabólitos bioativos isolados de fungos, mais de 30% foram obtidos a partir de *Penicillium* e *Aspergillus*, indicando sua importância nos estudos de bioprospecção, inclusive na área agrônômica.

2.3.1.3 Metabólitos secundários produzidos por endófitos do gênero *Xylaria* com atividade inibitória à fitopatógenos

Fungos do gênero *Xylaria* são teleomórficos pertencentes ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, ordem Xylariales e família Xylariaceae. (<http://www.mycobank.org>).

Representantes deste gênero são normalmente isolados de plantas das regiões tropicais do globo terrestre como endófitos (BAYMAN et al., 1998). Porém, algumas espécies são fitopatogênicas, como é o caso de *Xylaria arbuscula* (WHALLEY, 1996).

Estes fungos se destacam na produção de metabólitos secundários, principalmente da classe das citocalasinas, isocumarinas, lactonas, sesquiterpenos, triterpenos e xantonas, e com as mais diversas atividades biológicas, tais como anticancerígena, antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, antiviral (HEALY et al., 2004), inibidora de HIV-1 protease, antibiótica, antitumoral (ESPADA et al., 1997), dentre outras.

Na área agronômica, diversos metabólitos secundários isolados de linhagens de *Xylaria* com atividade contra fitopatógenos já foram relatadas na literatura. Um exemplo é a griseofulvina (**19**), que se mostrou ativa a *Magnaporthe grisea*, *Corticium sasaki*, *Puccinia recondita* e *Blumeria graminis*, nas concentrações entre 50 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (PARK et al., 2005). Outro exemplo é o ácido xilarínico A (**20**), que se mostrou ativo a *Pythium ultimum*, *Magnaporthe grisea*, *Aspergillus niger*, *Alternaria panax* e *Fusarium oxysporium*. Os autores observaram zonas de inibição de crescimento micelial dos fitopatógenos, utilizando o método de difusão em disco com 50 μg do composto (JANG et al., 2007).

Neste cenário, dentre os principais problemas encontrados na área agronômica, podemos citar as doenças causadas por fungos, que são considerados os micro-organismos mais agressivos na maioria das culturas, gerando danos econômicos e sociais, como é o caso de alguns fungos do gênero *Colletotrichum*, causadores de antracnoses.

2.4 Antracnose

Fungos do gênero *Colletotrichum* foram identificados pela primeira vez por Corda (1831) e são considerados uns dos principais fitopatógenos em diversas culturas, como pimentão, guaraná, morango, maracujá, manga, cebola, alho, dentre outras. No ano de 2012, os fungos do gênero *Colletotrichum* foram classificados como o oitavo grupo mais importante de fungos fitopatogênicos do mundo, baseado em perspectivas científicas e significância econômica (DEAN et al., 2012).

A dispersão dos esporos ocorre principalmente pela chuva nas superfícies das plantas. Essa fase de dispersão é de curta duração e o tempo é insuficiente para os esporos serem influenciados pela atividade microbiana. Contudo, uma vez que os esporos tenham chegado ao local de infecção potencial, ocorrem importantes eventos que podem ser influenciados pela atividade do microbioma residente, incluindo fixação de esporos, germinação de esporos, formação de apressórios e desenvolvimento da infecção inicial (BAILEY et al., 1992).

Para invadir o tecido hospedeiro, as espécies de *Colletotrichum* desenvolveram estruturas especializadas, como os apressórios. Após a colonização nos tecidos da planta surgem os sintomas da antracnose, visíveis em folhas, inflorescências e frutos (MENEZES, 2006). Nas folhas e ramos os sintomas são evidenciados pela presença de pequenas lesões necróticas circulares ou alongadas. Já nos frutos, os sintomas são caracterizados por lesões necróticas geralmente com formato circular (KUROSAWA; PAVAN; KRAUSE-SAKATE, 2005).

As plantas podem ser afetadas pela antracnose tanto na época de desenvolvimento no campo, quanto na época de pós-colheita, estando sujeitas à doença em todas as fases do seu desenvolvimento (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998).

O sucesso no controle de doenças pós-colheita é alcançado pela adoção de boas práticas de manejo pré e pós-colheita, tais como, controle de temperatura durante armazenamento, manipulação e aplicação de fungicidas. Neste caso, a eficácia da aplicação e o tipo de fungicida é dependente do estágio em que está ocorrendo a infecção. No estágio de pré-colheita, fungicidas (geralmente cúpricos) são aplicados no campo para diminuir os níveis de inóculo. No estágio de pós-colheita, o tratamento com fungicidas é utilizado para controlar infecções estabelecidas nos tecidos epidérmicos dos produtos, ou protege-los contra infecções que podem ocorrer durante o armazenamento e manipulação (BAUTISTA-BAÑOS, 2014).

2.4.1 Antracnose na cultura do guaranazeiro

O Brasil é o principal produtor de guaraná, e seu cultivo ocorre principalmente nos estados do Amazonas e Bahia (TRINDADE; POLTRONIERI, 1997). Segundo Schimpl et al. (2013), estes dois estados juntos detem 95% de toda a área plantada de guaranazeiro no Brasil, sendo que esta área na Bahia é cerca de 2,5 vezes maior que no Amazonas. A produtividade superior no estado da Bahia é atribuída principalmente às boas características fitossanitárias das suas plantas.

A diferença de produtividade entre estes dois estados é parcialmente compensada pelo preço de mercado das sementes, que é maior no Amazonas (cerca de R\$ 1,50 a mais que na Bahia) (IBGE, 2011). Esta diferença de preço ocorre principalmente porque os produtores do Amazonas negociam diretamente com as indústrias de processamento de guaraná, localizadas exclusivamente neste estado, resultando no envolvimento desde pequenos agricultores até grandes empresas e se tornando fonte de renda direta e indireta para muitas pessoas.

Um exemplo é empresa “American Beverage Company” (Ambev), localizada no Amazonas, que tem grande produção e é responsável pelo abastecimento nos mercados do Amazonas, Roraima e parte do Pará e do Acre, e tem capacidade para gerar em torno de 280 mil litros por ano, que são distribuídos para todo o Brasil e ainda exporta principalmente para o Japão e Portugal (AMBEV, 2011).

Apesar da principal utilização do fruto de guaraná ser na indústria alimentícia, o seu uso não se restringe apenas para a produção de bebidas gaseificadas ou xaropes, sendo também utilizado como matéria-prima nas indústrias farmacêutica, cosmética, e outras (BENTES; COSTA NETO, 2011). Entretanto, a produção nacional não atende inteiramente a demanda do mercado, principalmente devido às doenças causadas por fungos, em especial a antracnose (BENTES; BARRETO, 2004).

A antracnose é considerada a principal doença do guaranazeiro (figura 1). O patógeno infecta as folhas e caules tenros em todos os estádios da planta comprometendo gravemente a cultura (TRINDADE; POLTRONIERI, 1997).

Fotos: Murilo Arruda. Comunicado Técnico 61 – Embrapa (Araújo et al., 2008)

Figura 1 - Folhas de guaranazeiro com sintoma de antracnose. **A)** Crestamento foliar em folíolos jovens, **B)** Lesões necróticas em folíolos em expansão e **C)** Deformação e enrolamento dos folíolos

Quanto ao agente causal, possivelmente várias espécies de *Colletotrichum* estão envolvidas no aparecimento dos sintomas da doença (BENTES; BARRETO, 2004). Ainda, fungos deste gênero são encontrados tanto em guaranazeiros doentes quanto saudáveis, indicando que neste hospedeiro existem espécies de *Colletotrichum* endófitas/epífitas e fitopatogênicas, e que, provavelmente, esta distinção é um resultado de fatores bióticos e abióticos (COSTA NETO, 2009).

As formas atuais de controle da antracnose na cultura do guaranazeiro incluem o uso dos fungicidas: buprofezina, dimetomorfe e lambda-cialotrina (AGROFIT, 2015), a realização de podas de limpeza logo após a colheita, para eliminar galhos secos e remanescentes de inflorescências e cachos e a poda fitossanitária no final do período das chuvas em plantios altamente afetados, com a redução de 50% do volume da copa e remoção de 50% do comprimento dos ramos. Além disso, como medida preventiva de controle, a Embrapa recomenda que se utilize cultivares que apresentem resistência estável a doença, adquirindo-se as mudas em viveiros idôneos, credenciados pelo Ministério da Agricultura (RIBEIRO, 2012).

Mesmo com essas medidas a cultura ainda não fica livre da doença, demonstrando uma necessidade de pesquisas que busquem novas opções de controle.

2.4.2 Antracnose na cultura do pimentão

A antracnose também é a mais comum e destrutiva doença das plantas da família das Solanáceas, especialmente as que se desenvolvem em condições de clima quente e úmido (LOBO JR et al., 2001), como ocorre com o pimentão (*Capsicum annuum* L.) no Brasil. Essa doença é considerada uma das principais na cultura do pimentão em todos os países produtores, sendo que no Brasil a doença ocorre em todas as regiões produtoras, desde o Rio Grande do Sul até a região Nordeste (SALGADO; TOKESHI, 1980). Porém, a maior produção, e consequentemente a incidência da doença, está concentrada nos estados de São Paulo e Minas Gerais (RIBEIRO; CRUZ, 2002).

O fungo ataca todos os órgãos aéreos da planta, mas os sintomas típicos da doença são observados nos frutos (figura 2A), na forma de lesões deprimidas e aquosas que progridem e coalescem, e nas folhas (figura 2B) e ramos, na forma de pequenas lesões necróticas, geralmente circulares (REIS et al., 2009).

Fotos: Ailton Reis. Circular Técnica 79 – Embrapa (REIS et al., 2009)

Figura 2 - Fotos demonstrando as consequências da antracnose em fruto (A) e folha (B) de pimentão

Os danos causados por esta doença podem chegar a 100% na ausência de medidas de controle adequada (KUROSAWA et al., 2005), e a infecção que ocorre nos campos pode permanecer quiescente até o período de pós-colheita, estendendo os prejuízos aos comerciantes e consumidores (BLACK et al., 1991).

No Brasil, por muitos anos a espécie *C. gloeosporioides* era considerada o único agente causal da antracnose na cultura do pimentão (KUROSAWA et al., 2005), até que estudos demonstraram que outras espécies de *Colletotrichum*, tal como *C. acutatum* (TOZZE JÚNIOR; MELLO; MASSOLA JÚNIOR, 2006) também estão associadas como agente causal desta doença em algumas regiões do país.

O fitopatógeno é transmitido principalmente pelas sementes, e umas das principais formas atuais de controle é a utilização de sementes sadias. Também eliminam-se os frutos que apresentam sintomas iniciais da doença, além da rotação de culturas, a redução do adensamento no plantio (AZEVEDO et al., 2006) e o uso dos fungicidas: abamectina, tiametoxam, azoxistrobina, difenoconazol e buprofezina (AGROFIT, 2015).

Apesar destas medidas de controle já serem utilizadas, a doença continua causando muitos danos nesta cultura.

Na busca por alternativas aos métodos atuais de controle de fitopatógenos, diversas pesquisas vêm sendo realizadas. Adicionalmente, a população mundial vem cada vez mais buscando produtos livres de defensivos agrícolas nocivos à saúde.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi o estudo de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de folhas do guaranazeiro com atividade antifúngica aos fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*, causadores de antracnose nas culturas do guaraná e do pimentão.

3.2 Objetivos específicos

- i. Selecionar linhagens de fungos endofíticos, segundo o potencial antifúngico a *Colletotrichum*;
- ii. Isolar os metabólitos secundários bioativos utilizando-se de técnicas cromatográficas;
- iii. Elucidar estruturalmente os compostos ativos por técnicas espectrométricas e espectroscópicas;
- iv. Avaliar os compostos puros em ensaios de atividade antifúngica “in vitro”.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção de material biológico

4.1.1 Coleta de folhas e galhos de guaranazeiros do Amazonas

As amostras foram coletadas em Manaus/AM, na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e em Maués/AM, na Fazenda Santa Helena (Ambev – American Beverage Company). As coletas foram realizadas em junho e novembro de 2010 em Manaus/AM e em junho de 2010 e março de 2011 em Maués/AM. As amostras coletadas foram folhas e ramos de um total de 20 plantas adultas (10 de cada localidade), sendo cinco com aparência sadia e cinco afetadas pela antracnose. Estas foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório na UFAM, sendo iniciado um pré-isolamento dos micro-organismos, sob a responsabilidade do grupo do Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo.

4.1.2 Isolamento dos fungos endofíticos

No laboratório da UFAM as amostras foram submetidas ao método de desinfecção superficial (ARAÚJO et al., 2001; PEREIRA; AZEVEDO; PETRINI, 1993), que consistiu em lavar as amostras abundantemente em água corrente para a retirada de resíduos de poeira e solo; colocá-las imersas em etanol 70% por um minuto; colocá-las imersas em hipoclorito de sódio (3% de sódio ativo) por três minutos; colocá-las novamente imersas em etanol 70% por 30 segundos; e finalmente enxaguá-las duas vezes em água destilada esterilizada. Estes procedimentos foram realizados para a retirada de micro-organismos epifíticos das folhas e galhos, e, por esta razão, uma alíquota de 100 µL da água proveniente da última lavagem foi inoculada em placa contendo meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA) para confirmar a eficácia do método.

Após a assepsia, sete fragmentos (8-12 mm) das amostras foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA acrescido de 100 µg mL⁻¹ de cloranfenicol e de 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina, e foram mantidas em incubadora do tipo B.O.D. a 27° C.

As placas foram observadas diariamente e após o crescimento dos fungos, pequenos fragmentos de micélio foram repicados para tubos de ensaio para a observação do índice de infecção dos gêneros mais frequentes. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente até esporulação das colônias.

Foram isolados em torno de 240 fungos endofíticos do guaranazeiro, dos quais 16 foram cedidos para investigação e realização do presente trabalho, e foram identificados sob os seguintes códigos: 47, 81, 214, 222, 225, 249, 250, 272, 372, 415, 465, 472, 473, 479, 507 e 509.

4.1.3 Linhagens de fungos fitopatogênicos

A linhagem do fitopatógeno causador de antracnose na cultura do guaranazeiro utilizada neste estudo foi *Colletotrichum gloeosporioides*, e foi cedida pelo grupo da UFAM, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo. Já as linhagens dos fitopatógenos causadores de antracnose na cultura do pimentão utilizadas foram *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*, e foram cedidas pelo Laboratório de Fungos Fitopatogênicos da ESALQ/USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior.

4.1.4 Preservação dos fungos

Os isolados estoques foram mantidos conforme método descrito por Castellani (1939), que consiste em repicar fragmentos do meio de cultura sólido contendo pedaços da colônia, colocá-los em frascos contendo água esterilizada e mantê-los a temperatura ambiente. Os isolados estoques também foram mantidos em tubo inclinado contendo meio de cultura BDA (Acumedia – 39 g L⁻¹) e mantidos em refrigeração a 8° C. Para a reativação, fragmentos dos estoques eram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e mantidos em B.O.D. a 27° C.

4.2 Identificação polifásica das linhagens fúngicas

As linhagens de endófitos isolados do guaranazeiro foram identificadas utilizando-se diferentes ferramentas taxonômicas.

4.2.1 Identificação morfológica

A identificação morfológica a nível de gênero foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. André Rodrigues da UNESP (Campus Rio Claro), no Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos.

A identificação dos endófitos teve início com uma triagem morfológica (observação das características macro e microscópicas). Para isto, as linhagens foram crescidas durante

oito dias em extrato de malte 2%, em B.O.D. a 25° C, e, após o tempo de incubação, as características macroscópicas foram observadas em microscópio lupa estereoscópico e as características microscópicas em lâminas preparadas com glicerol 10% para a observação e fotodocumentação das estruturas utilizando-se um microscópio óptico com câmera acoplada (Leica DM750). As ultraestruturas observadas foram: a) hifas, b) conidióforos, c) fiálides e d) conídios, as quais foram comparadas com chaves taxonômicas específicas para cada gênero (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1980; WATANABE, 2002).

4.2.2 Identificação molecular

A identificação molecular foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. André Rodrigues da UNESP (Campus Rio Claro), no Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos. Para isto, o DNA dos isolados fúngicos foram extraídos pelo método CTAB (cetiltrimetil brometo de amônio) modificado de Moller et al. (1992) e Gerardo et al. (2004). Para checar a qualidade do DNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% corado com Loading Dye (Thermo Scientific) e GelRedTM (1:1) (Biotium) e, em seguida, o gel foi visualizado em luz UV e fotodocumentado.

As regiões amplificadas pela técnica de PCR foram a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e/ou a do gene que codifica a beta tubulina, dependendo das características observadas através da identificação morfológica, utilizando-se os iniciadores ITS4 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (SCHOCH et al., 2012) e B-t2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') B-t2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (GLASS; DONALDSON, 1995). A reação de PCR foi realizada utilizando-se 5,0 µL de tampão 5X para Taq Polimerase, 0,2 µL de Taq DNA Polymerase (5 U/µL), 1,0 µL de cada iniciador numa concentração final de 10 µM, 4,0 µL de cada dNTP numa concentração de 1,25 mM cada, 2,0 µL de MgCl₂ a 25 mM, 1,0 µL de BSA (10 mg/mL), 2,0 µL de DNA genômico (1:10) e 8,8 µL de água ultrapura esterilizada para um volume final de 25 µL. O ciclo utilizado para a amplificação foi de 94° C/3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94° C/1 minuto, 55° C/1 minuto e 72° C/2 minutos. Para checar se a purificação foi eficiente foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% conforme as condições já citadas.

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com a utilização do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Para checar se a purificação foi eficiente foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% conforme as condições já citadas.

Para a reação de sequenciamento os produtos de amplificação purificados foram quantificados em aparelho Nanodrop. Esta reação foi realizada utilizando-se 0,3 µL de Big Dye 3.1, 2,0 µL de Buffer 5X, 0,32 µL de iniciador numa concentração final de 10 µM, 1,0 µL de DNA (20 ng) e 6,38 µL de água ultrapura esterilizada para um volume final de 10 µL. Foram realizadas duas reações de sequenciamento por amostra, sendo uma com o iniciador *forward* e uma com o iniciador *reverse*. O ciclo utilizado para esta reação foi de 95° C/1 minuto, seguido de 28 ciclos de 95° C/15 segundos, 50° C/45 segundos e 60° C/4 minutos. Os produtos obtidos foram purificados com a utilização de EDTA 125 mM, acetato de sódio 3M, etanol 100% e etanol 70%, sendo, posteriormente aplicados no Sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados público *GenBank*, do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), utilizando-se a ferramenta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST).

Para a análise filogenética, as sequências foram alinhadas juntamente com as retiradas do *GenBank*. A árvore filogenética foi inferida com o algoritmo de *Neighbor-joining* com 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*.

4.2.3 Identificação por Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Vôo (EM-MALDI-TOF)

A identificação por EM-MALDI-TOF foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho da UFSCar (Campus São Carlos), no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microrganismos. Para isto, as linhagens foram crescidas em meio aveia-água (60 g aveia L⁻¹) em triplicata, durante sete dias e, em seguida, aplicadas em uma placa de aço MTP384 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) específica para esta técnica. As amostras foram sobrepostas por 1,5 µL de matriz (20 mg mL⁻¹ de ácido α -cyano-4-hidroxicinâmico em solução de acetonitrila 0,2%/ácido trifluoractérico aquoso 1:1). Cada simplicata foi aplicada em seis *spots*, sendo o experimento realizado por dois analistas. Desta forma, para cada isolado obteve-se um total de 36 *spots* geradores de espectro.

O equipamento utilizado foi o espectrômetro Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipado com laser smartbeam II, 1 kHz (335 nm) em uma faixa de leitura de 2-20 KDa, onde cada *spot* da placa foi lido em modo randômico.

Os espectros obtidos para cada linhagem foram primeiramente analisados utilizando-se o programa FLEX-Analysis 3.3, que permitiu a comparação e análise de múltiplos espectros. Em seguida, os espectros foram carregados no programa MALDI Biotyper 3.1 e pré-processados utilizando-se algoritmos padrão para subtração, alisamento e normalização da linha de base. Os espectros de cada linhagem foram agrupados criando MSP's (*Main Spectral Projection*), que foram comparados entre si de acordo com uma lista de picos presentes em pelo menos 25% dos 36 espectros de cada linhagem, contendo informações sobre a média da m/z em relação à intensidade dos picos, gerando assim um dendrograma de similaridade.

4.3 Obtenção dos extratos brutos dos fungos endofíticos

Para obtenção dos extratos brutos, as linhagens selecionadas tiveram seus fragmentos das bordas das colônias inoculados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL de meio líquido BD, e foram mantidos sob agitação constante de 140 rpm, a 27° C, durante 5 dias.

Após o crescimento dos fungos, o micélio foi separado do meio metabólico por centrifugação a 12000 x g /5 minutos. O sobrenadante obtido foi submetido a um sistema de filtração a vácuo com a utilização de membranas Millipore (74 mm de diâmetro – 0,22 μ m de poro), obtendo-se o extrato bruto, que foi seco em liofilizador, pesado e armazenado sob refrigeração de 8° C.

4.3.1 Obtenção das frações

O extrato bruto foi submetido a uma partição líquido-líquido com o solvente orgânico acetato de etila (300 mL em três repetições), obtendo-se duas frações: a fração aquosa e a fração acetato de etila. A fração aquosa foi liofilizada para a retirada de toda a água presente nas amostras e a fração acetato de etila foi concentrada em um evaporador rotativo para a retirada do solvente presente nas amostras. Estas foram identificadas por um código, pesadas, armazenadas em geladeira e posteriormente submetidas ao ensaio de atividade antifúngica.

4.4 Técnicas cromatográficas utilizadas no isolamento dos compostos

4.4.1 Cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada

A separação dos compostos foi realizada por meio de técnicas cromatográficas, utilizando-se colunas pré-empacotadas do tipo Sep-Pak de 10 g (60 mL), de 5 g (20 mL), de 2 g (12 mL) e de 1 g (12 mL) (Phenomenex®), com fase estacionária de sílica e fase móvel em

modo gradiente com os solventes orgânicos hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol (todos de grau PA) e/ou colunas de vidro com fase estacionária de gel Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia Biotech[®]) e fase móvel em modo isocrático com metanol (grau PA), otimizadas de acordo com o perfil químico de cada fração, observado por cromatografia em camada delgada (CCD).

Para as análises por CCD, foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 (20 x 20 cm) sobre poliéster com indicador ultravioleta (Macherey-Nagel[®]) e três diferentes eluições (**Eluente a:** diclorometano/metanol 9:1, **Eluente b:** diclorometano/acetato de etila 8:2, **Eluente c:** hexano/diclorometano/metanol 1:8:1). Após as eluições, as placas foram inspecionadas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm e reveladas com dois reagentes específicos: 1) solução de ácido fosfomolibdico (EtOH/ácido fosfomolibdico 9,5:0,5) para a detecção de esteróis, derivados de lipídios e substâncias redutoras e 2) solução do reagente Dragendorff (H₂O/ácido acético/Dragendorff 7,5:1,5:1) para a detecção de alcalóides e/ou compostos nitrogenados.

Após a separação dos compostos, as frações obtidas foram analisadas e reunidas segundo similaridade química observada em CCD e submetidas ao ensaio de atividade antifúngica. Esta cromatografia em coluna se repetiu até as frações apresentarem no máximo cinco compostos, observados em CCD.

4.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As frações foram purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência no equipamento HPLC Agilent[®] 1100 Series UV/Vis, com bomba quaternária, acoplado a um detector de ultravioleta MWD (*Multiple Wavelength Detector*), utilizando-se como fase estacionária uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil (Agilent[®] Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ de dimensões 5 µm, 250 x 4,6 mm) e fase móvel com os solventes metanol, acetonitrila (grau HPLC) e água ultrapura Milli-Q, eluída com vazão de 1 mL min⁻¹, de acordo com o perfil químico de cada amostra:

Condição CLAE 1: Água/metanol 60:40 em modo isocrático;

Condição CLAE 2: Água/metanol 80:20 em modo isocrático;

Condição CLAE 3: Água/metanol 80:20 em modo gradiente (30 min. 100% metanol);

Condição CLAE 4: Água/metanol/acetonitrila 90:5:5 em modo gradiente (30 min. 100% metanol).

As amostras foram diluídas em metanol grau HPLC na concentração de 1 mg mL^{-1} , os comprimentos de onda utilizados no detector UV/Vis para a observação dos compostos foram 228, 254, 275 e 365 nm e a temperatura utilizada na coluna foi de 30° C .

4.5 Técnicas utilizadas na elucidação estrutural dos compostos

4.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a UV-EM

As análises de CLAE-UV-EM foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, no Laboratório de Química Orgânica de Sistemas Biológicos – Instituto de Química de São Carlos (USP).

Os compostos purificados por CLAE foram submetidos à análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência com bomba quaternária (Waters[®], modelo Alliance 2695) com detector de arranjo de fotodiodo com varredura no UV-visível entre 200 e 800 nm (Waters[®], modelo 2996), acoplado a espectrômetro de massas (Waters[®], modelo ZQ 2000) com ionização eletrospray e analisador do tipo quadrupolo com faixa de detecção entre 100 e 1000 Da, operado pela plataforma Empower 2.0. A energia de ionização utilizada foi de 30 eV.

Para a obtenção destes espectros os compostos puros foram diluídos para a concentração de 1 mg mL^{-1} em 1 mL de metanol grau HPLC e transferidas para frascos específicos (vials de 2 mL) do amostrador. A coluna utilizada foi de sílica gel derivatizada com grupos octadecil (Waters X-Terra MS- C_{18} de dimensões $3,5 \text{ }\mu\text{m}$ e $50 \times 2,1 \text{ mm}$), e gradiente de metanol/acetonitrila 1:1 em água Milli-Q, com vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, em 20 minutos.

4.5.2 Espectrometria de massas de alta resolução (HR-EM)

As análises de HR-EM foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Espectrometria de Massas (LMEM), no Instituto de Química de Araraquara (UNESP).

Os espectros de massas de alta resolução foram adquiridos em um Espectrômetro de Massas Q-TOF Maxis Impact (software Bruker Compass DataAnalysis 4.2) em modo positivo, com ionização eletrospray. As análises foram realizadas por injeção direta, com energia de ionização de 3000 V e faixa de detecção entre 50 e 3000 Da.

4.5.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira, no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (UFSCar, campus São Carlos). Os espectros unidimensionais de RMN ^1H e RMN ^{13}C e bidimensionais de COSY ^1H - ^1H (*correlation spectroscopy*), HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*) e HMBC (*heteronuclear multiple bond coherence*) foram obtidos em dois equipamentos: Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e a 100,10 MHz na frequência do carbono (^{13}C) e/ou Bruker AVANCEIII, operando a 600,00 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e a 150,00 MHz na frequência do carbono (^{13}C). As amostras foram preparadas utilizando-se solventes deuterados: clorofórmio deuterado (CDCl_3), dimetilsufóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$) e metanol deuterado ($\text{MeOH}-d_4$). O padrão utilizado como referência interna foi o trimetilsilano (TMS).

4.6 Ensaios biológicos

4.6.1 Ensaio biológico por cultivo pareado

Os fungos endofíticos isolados de folhas do guaranazeiro foram desafiados a crescer na presença de três fungos fitopatogênicos (*C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro e *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* isolados do pimentão) utilizando-se a técnica de cultivo pareado em placas de Petri (DENNIS; WEBSTER, 1971). Para isso, discos (ou plugs) de 5 mm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA e colônias do fitopatógeno, foram transferidos para uma das extremidades de placas de Petri (a 1 cm da borda). Após dois dias, foram repicados os isolados dos fungos endofíticos na extremidade oposta (a 1 cm da borda). Todos os tratamentos foram realizados em duplicata e as placas foram mantidas em B.O.D. a 27° C até o crescimento total dos fitopatógenos nas placas controle. Também foram preparadas placas controle contendo somente os fitopatógenos, nas mesmas condições citadas.

Os resultados foram avaliados segundo metodologia descrita por Badalyan, Innocenti e Garibyan (2002), onde os testes de antagonismo são diferenciados em três tipos de interações endófito-fitopatógeno (A, B e C) e quatro subtipos (C_{A1} , C_{B1} , C_{A2} e C_{B2}). Nos tipos A e B ocorre uma inibição mútua, na qual nenhum organismo é capaz de crescer sobre o outro, com contato micelial (A) e sem contato micelial (B). No tipo C o endófito é capaz de crescer sobre o fitopatógeno, sem que ocorra uma inibição inicial. No tipo C_{A1} ocorre um crescimento parcial e no tipo C_{A2} um crescimento completo do endófito sobre o fitopatógeno

após uma inibição inicial com contato micelial. No tipo C_{B1} ocorre um crescimento parcial e no tipo C_{B2} um crescimento completo do endófito sobre o fitopatógeno após inibição inicial sem contato micelial.

Simultaneamente foi realizada a medição do diâmetro das colônias dos fitopatógenos, utilizando-se o programa de análise ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*), visando calcular o índice de antagonismo (IA) de cada endófito, segundo a fórmula proposta por Campanile, Rusceli e Luisi (2007).

$$IA = \frac{(RM - rm)}{RM} \times 100$$

Onde: rm é o raio da colônia em direção ao fungo antagonista e RM é a média dos três raios da colônia do antagonista nas outras direções.

Nos itens a seguir, que envolveram ensaios “in vitro” de atividade antifúngica, foi utilizado apenas um fitopatógeno (do guaranazeiro), escolhido aleatoriamente dentre os três possíveis (para biomonitorar as frações ativas), visando deixar a maior quantidade possível de massa dos compostos puros para a elucidação estrutural e ensaio “in vitro” final, realizado com os três fitopatógenos.

4.6.2 Ensaio biológico por difusão em disco

Estes ensaios foram realizados visando à verificação da inibição de crescimento micelial “in vitro” dos fitopatógenos aos compostos presentes nos extratos brutos, frações e compostos puros dos fungos endofíticos. Todas as etapas de separação foram monitoradas pelo referido ensaio biológico antifúngico.

A metodologia utilizada foi de natureza quantitativa e consistiu em colocar discos de papel filtro esterilizados de 6 mm de diâmetro contendo extratos (2000 µg mL⁻¹), frações (1000 µg mL⁻¹) e compostos puros (500 µg mL⁻¹), sobre o meio de cultura sólido com um inóculo do fitopatógeno em um disco de 7 mm de diâmetro retirado da borda de uma placa recém repicada. Os controles consistiram em uma placa contendo meio de cultura com o inóculo do fitopatógeno e outra placa contendo disco de papel filtro esterilizado (de 6 mm de diâmetro) contendo apenas metanol grau PA (solvente utilizado na aplicação dos compostos aos discos) com um inóculo do fitopatógeno. As placas inoculadas foram mantidas em B.O.D. a 27° C até que o controle tivesse colonizado toda a placa, tempo que variou de 5-7 dias.

Após este período as placas foram fotodocumentadas e as porcentagens de inibição foram calculadas utilizando-se o programa de análise ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*).

4.6.3 Ensaio biológico para determinação da concentração média inibitória (CI₅₀)

Este ensaio foi realizado para determinar CI₅₀ dos compostos puros ou semi-puros isolados dos fungos endofíticos contra os três fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*. A metodologia utilizada também foi a de difusão em disco, chamada de “Poisoned Food” por Alam (2004) e Kumar et al. (2011). Esta constiu em colocar discos de papel filtro esterilizados (de 6 mm de diâmetro) contendo os compostos nas concentrações de 100, 200 e 300 µg disco⁻¹, sobre o meio de cultura sólido com um inóculo do fitopatógeno em um disco de 7 mm de diâmetro retirado da borda de uma placa recém repicada. Os controles consistiram em uma placa contendo meio de cultura com o inóculo do fitopatógeno, uma placa contendo disco de papel filtro estéril (de 6 mm de diâmetro) contendo apenas metanol grau PA (solvente utilizado na aplicação dos compostos aos discos) com um inóculo do fitopatógeno.

Como controle positivo para comparação de parâmetros foi utilizado o fungicida comercial difenoconazol, diluído em água Milli-Q estéril nas mesmas concentrações dos compostos (100, 200 e 300 µg disco⁻¹). Este fungicida foi selecionado por ser muito utilizado no controle químico de fungos do gênero *Colletotrichum*.

As placas inoculadas foram mantidas em B.O.D. a 27° C até que o controle tivesse colonizado toda a placa, tempo que variou de 5-7 dias. Após este período as placas foram fotodocumentadas e as porcentagens de inibição foram calculadas utilizando-se o programa de análise ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Linhagens de fungos endofíticos

Foram isoladas aproximadamente 600 linhagens de fungos endofíticos de guaranazeiro, pelo grupo da UFAM. Uma avaliação preliminar realizada por alunos do grupo indicou que 16 linhagens apresentaram promissora atividade antagônica à *C. gloeosporioides* (isolado de guaranazeiro), após a realização de um ensaio biológico por cultivo pareado. Estas linhagens foram cedidas para um estudo aprofundado de bioprospecção (figura 3).

Figura 3 - Linhagens de fungos endofíticos (isoladas de guaranazeiro) utilizadas neste estudo, em meio BDA

5.2 Identificação polifásica dos fungos endofíticos

Pela análise morfológica foram identificados os gêneros *Penicillium* (5 isolados), *Fusarium* (2 isolados), *Aspergillus* (3 isolados), *Clonostachys* (2 isolados) e *Phomopsis* (1 isolado). Três isolados de *Xylaria* sp. não puderam ser identificadas porque somente apresentaram micélio estéril (ausência de estruturas reprodutivas).

Na figura 4 a seguir são demonstradas fotos de algumas lâminas com as principais características microscópicas dos fungos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Clonostachys* e *Fusarium*, os mais frequentes neste estudo.

Figura 4 - Análises morfológicas de quatro fungos endofíticos com a utilização de microscopia óptica. A) Conidióforo de *Aspergillus* sp. (272); B) Conidióforos de *Penicillium* sp. (507); C) Conidióforos de *Clonostachys* sp. (47); D) Microconídios de *Fusarium* sp. (225)

A partir destas informações, foi realizada a identificação molecular dos endófitos, utilizando-se marcadores moleculares específicos. As sequências foram comparadas com o bando de dados do GenBank e mostraram altas porcentagens de similaridade (99-100%), com exceção do fungo sob o código 509 que apresentou 90% de similaridade.

A tabela 1 a seguir sumariza a identificação morfológica e molecular das 16 linhagens de fungos endofíticos.

Tabela 1 - Identificação morfológica e molecular das 16 linhagens de fungos endofíticos do guaranazeiro

Cód. ¹	Marcador ²	Identificação morfológica	NCBI – GenBank ³			
			Id (%)	E	Micro-organismo e n° de acesso	Identificação final
47	ITS	<i>Clonostachys</i> sp.	99	0,0	<i>Clonostachys ochroleuca</i> (HQ607832)	<i>Clonostachys ochroleuca</i>
81	bTub	<i>Aspergillus</i> sp.	100	0,0	<i>Aspergillus flavus</i> (KF562195)	<i>Aspergillus flavus</i>
214	ITS	micélio estéril	99	0,0	<i>Xylaria cubensis</i> (AB625429)	<i>Xylaria</i> sp.
222	ITS	<i>Fusarium</i> sp.	100	0,0	<i>Fusarium</i> sp. (EF687915)	<i>Fusarium</i> sp.
225	ITS	<i>Fusarium</i> sp.	100	0,0	<i>Fusarium</i> sp. (EF687915)	<i>Fusarium</i> sp.
249	ITS	micélio estéril	99	0,0	<i>Xylaria cubensis</i> (AB625429)	<i>Xylaria</i> sp.
250	ITS	micélio estéril	99	0,0	<i>Xylaria cubensis</i> (AB625429)	<i>Xylaria</i> sp.
272	bTub	<i>Aspergillus</i> sp.	100	0,0	<i>Aspergillus flavus</i> (KF562195)	<i>Aspergillus flavus</i>
372	ITS	<i>Phomopsis</i> sp.	100	0,0	<i>Diaporthe</i> sp. (GU592018)	<i>Diaporthe</i> sp.
415	ITS	<i>Clonostachys</i> sp.	99	0,0	<i>Clonostachys ochroleuca</i> (HQ607832)	<i>Clonostachys ochroleuca</i>
465	bTub	<i>Aspergillus</i> sp.	100	0,0	<i>Aspergillus flavus</i> (KF562195)	<i>Aspergillus flavus</i>
472	bTub	<i>Penicillium</i> sp.	99	0,0	<i>Talaromyces pinophilus</i> (KM520391)	<i>Talaromyces pinophilus</i>
473	bTub	<i>Penicillium</i> sp.	99	0,0	<i>Talaromyces trachyspermus</i> (KJ885281)	<i>Talaromyces trachyspermus</i>
479	bTub	<i>Penicillium</i> sp.	99	0,0	<i>Talaromyces pinophilus</i> (KM520391)	<i>Talaromyces pinophilus</i>
507	bTub	<i>Penicillium</i> sp.	99	0,0	<i>Talaromyces aculeatus</i> (KF741995)	<i>Talaromyces aculeatus</i>
509	bTub	<i>Penicillium</i> sp.	90	6E-164	<i>Penicillium multicolor</i> (KC773795)	<i>Penicillium</i> sp.

¹Códigos dos fungos endofíticos; ²Marcadores genéticos utilizados nas análises moleculares (ITS: *Internal Transcribed Spacer* e bTub: gene que codifica para a beta-tubulina); ³Comparação das sequências obtidas da extração de DNA dos fungos endofíticos àquelas depositadas no banco de dados GenBank (Id (%): porcentagem de similaridade, E: significância do alinhamento)

Através das análises moleculares foi possível identificar os endófitos sob os códigos 81, 272, 465 (*Aspergillus flavus*), 507 (*Talaromyces aculeatus*), 472, 479 (*Talaromyces pinophilus*), 473 (*Talaromyces trachyspermus*), 47 e 415 (*Clonostachys ochroleuca*). Para os endófitos codificados 214, 249, 250 (*Xylaria* sp.), 222, 225 (*Fusarium* sp.), 372 (*Diaporthe* sp.) e 509 (*Penicillium* sp.) a identificação foi realizada a nível de gênero, necessitando de análises adicionais, tais como a amplificação de outros genes, para atribuir de forma inequívoca as espécies destas linhagens. As árvores filogenéticas inferidas com o algoritmo de *Neighbor-joining* podem ser visualizadas nos anexos 1, 2 e 3.

Após identificação morfológica e molecular, as 16 linhagens foram submetidas a análise espectroscópica por EM-MALDI-TOF utilizando-se a técnica da “célula intacta”, na qual porções do micélio, conídios ou esporos da cultura fúngica são misturadas com a solução matriz e aplicadas na placa específica para MALDI-TOF. Para cada linhagem foram obtidos 36 espectros, sendo estes utilizados na criação de MSP's (*Main Spectral Projection*) individuais. Os MSP's individuais das 16 linhagens foram comparados e agrupados de acordo com sua similaridade química de proteínas, gerando assim, um dendrograma (figura 5).

Figura 5 - Dendrograma de similaridade química de proteínas das 16 linhagens de fungos endofíticos

O agrupamento observado no dendrograma foi feito segundo a presença e intensidade de picos iguais referentes à relação m/z . Assim, foi possível observar que linhagens agrupadas como sendo do mesmo gênero apresentaram maior intensidade de suas bandas espectrais em determinadas m/z . Como exemplo foi utilizada a chave onde foram agrupadas as linhagens do gênero *Xylaria* (figura 6).

Figura 6 - Espectros obtidos para os MSP's das linhagens do gênero *Xylaria* agrupadas na mesma sub-chave do dendrograma

Na figura 6 é possível observar que dentre as três linhagens de *Xylaria* agrupadas, duas (249 e 250) apresentaram similaridade maior que 90% e uma (214) apresentou similaridade em torno de 40% em relação às demais. Analisando os espectros dos MSP's foi possível observar que uma das diferenças é que a linhagem 214 apresenta o pico mais intenso em m/z 8175,80, enquanto que as linhagens 249 e 250 apresentam o pico mais intenso em m/z 8455,55 e 8455,41, respectivamente.

Uma explicação para este agrupamento distinto é que linhagens diferentes, mesmo que do mesmo gênero e/ou espécie, possuem formação de estruturas proteicas características, inclusive entre a composição da parede celular e dos esporos (KEMPTNER et al., 2009). Além disso, o endófito codificado 214 foi isolado de uma planta de guaranazeiro da cidade de Maués-AM, enquanto que os codificados 249 e 250 foram isolados de plantas de guaranazeiros da cidade de Manaus-AM.

A linhagem codificada 465 do gênero *Aspergillus*, também não agrupou com os outros representantes do mesmo gênero. Segundo De Carolis et al. (2011), a taxonomia de *Aspergillus* da seção Flavi, como é o caso da linhagem de *A. flavus* (465) ainda é uma questão de debate, necessitando de mais estudos taxonômicos e de genética de populações.

A espectrometria de massas por MALDI-TOF é uma ferramenta analítica tradicionalmente utilizada na área química. Recentemente, estudos realizados sobre identificação e caracterização de fungos através desta técnica têm mostrado o potencial desta nova abordagem, com boa discriminação na maioria dos casos. Além disso, os dados podem ser somados aos de morfologia, bioquímica e biologia molecular, caracterizando desta forma uma abordagem polifásica (SANTOS; PHILLIPS, 2009).

5.3 Seleção dos fungos endofíticos com potencial antifúngico a *Colletotrichum* spp.

5.3.1 Cultivo pareado dos fungos endofíticos contra os fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*

A técnica de cultivo pareado em placas de Petri foi utilizada para avaliar a interação de 16 fungos endofíticos isolados do guaranazeiro frente ao crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos *C. gloeosporioides* (guaranazeiro), *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* (pimentão).

Primeiramente, foram avaliados os 16 fungos endofíticos contra o crescimento micelial de uma linhagem de fitopatógeno isolado do guaranazeiro. O ensaio pode ser visualizado na figura 7, onde na parte inferior das placas de Petri foram inoculadas as

linhagens dos fungos endofíticos (FE) e na parte superior foi inoculado o fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* (FP1).

Figura 7 - Cultivo pareado das 16 linhagens de fungos endofíticos (FE) (na parte inferior das placas) com o fitopatógeno do guaranazeiro – FP1: *C. gloeosporioides* (na parte superior das placas)

Posteriormente, em um segundo ensaio foram avaliados os mesmos 16 fungos endofíticos contra o crescimento micelial de duas linhagens de fitopatógenos isolados de lesões do pimentão. O ensaio pode ser visualizado na figura 8, onde na parte inferior das placas de Petri foram inoculadas as linhagens dos fungos endofíticos (FE) e na parte superior foram inoculados os fungos fitopatogênicos *C. gloeosporioides* (FP2) e *C. acutatum* (FP3).

Figura 8 - Cultivo pareado das 16 linhagens de fungos endofíticos (FE) (na parte inferior das placas) com dois fitopatógenos do pimentão – FP2: *C. gloeosporioides* e FP3: *C. acutatum* (na parte superior das placas)

Observando os resultados obtidos por esta técnica, foi possível verificar que alguns endófitos apresentaram o mesmo comportamento frente aos três fitopatógenos, enquanto outros apresentaram comportamentos distintos de antagonismo entre um fitopatógeno e outro.

Em alguns casos observou-se que o endófito cresceu mais (ou menos) do que o fitopatógeno, com a ocorrência de contato micelial. Já em outros casos o endófito cresceu sobre o micélio do fitopatógeno.

Enfim, vários tipos de interações endófito-fitopatógeno foram observados e avaliados segundo Badalyan, Innocenti e Garibyan (2002). Os índices de antagonismo foram calculados segundo fórmula proposta por Campanile, Ruscelli e Luisi (2007), e os resultados obtidos podem ser visualizados na tabela 2, a seguir.

Tabela 2 - Tipos de interação endófito-fitopatógeno (BADALYAN; INNOCENTI; GARIBYAN, 2002) e cálculo do índice de antagonismo (CAMPANILE; RUSCELLI; LUISI, 2007)

Fungos endofíticos (códigos)	Tipo de interação com FP1	IA (%)	Tipo de interação com FP2	IA (%)	Tipo de interação com FP3	IA (%)
<i>C. ochroleuca</i> (47)	C _{B1}	45,7	C _{B1}	45,2	C _{B1}	47,3
<i>A. flavus</i> (81)	B	52,1	C _{A1}	27,4	C _{A1}	28,1
<i>Xylaria</i> sp. (214)	C _{B1}	39,2	C _{B1}	36,7	C _{B1}	37,8
<i>Fusarium</i> sp. (222)	A	36,7	A	35,1	A	34,3
<i>Fusarium</i> sp. (225)	A	38,1	A	38,7	A	36,4
<i>Xylaria</i> sp. (249)	C	43,5	C	41,2	C _{B1}	43,5
<i>Xylaria</i> sp. (250)	C _{B1}	40,1	C _{B1}	40,2	C _{B1}	41,5
<i>A. flavus</i> (272)	B	56,8	C _{A1}	33,3	B	39,5
<i>Diaporthe</i> sp. (372)	A	37,1	A	36,1	A	35,2
<i>C. ochroleuca</i> (415)	C _{B1}	41,3	C _{B1}	42,3	C _{B1}	43,5
<i>A. flavus</i> (465)	C _{A1}	20,3	C _{A1}	20,1	C _{A2}	22,3
<i>T. pinophilus</i> (472)	C _{A1}	30,1	C _{A1}	28,9	C _{A1}	29,1
<i>T. trachyspermus</i> (473)	B	35,8	B	43,1	B	44,2
<i>T. pinophilus</i> (479)	C _{A1}	32,3	C _{A1}	28,2	A	29,4
<i>T. aculeatus</i> (507)	B	45,2	B	35,5	B	34,8
<i>Penicillium</i> sp. (509)	C _{B1}	38,1	C _{B1}	37,1	C _{B1}	36,7

FP1: *C. gloeosporioides* (guaranazeiro); FP2: *C. gloeosporioides* (pimentão); FP3: *C. acutatum* (pimentão)

Na tabela 2 é possível observar que do total de 48 interações analisadas, 10 foram do tipo **A**, que consiste em uma inibição mútua com contato micelial. O IA desses fungos foi no intervalo de 34,3 a 52,1%. Foram obtidas também nove interações do tipo **B**, que consiste em uma inibição mútua sem contato micelial. O IA desses fungos foi no intervalo de 33,3 a 57,1%.

Nas interações do tipo C, foram obtidos os seguintes resultados: 10 do tipo **C_{A1}**, representadas pelo crescimento parcial do endófito sobre o fitopatógeno após inibição inicial com contato micelial, com IA de 20,1 a 33,4%; 16 do tipo **C_{B1}**, representadas pelo crescimento parcial do endófito sobre o fitopatógeno após inibição inicial sem contato micelial, com IA de 36,7 a 47,3%; uma do tipo **C_{A2}**, representada pelo crescimento completo do endófito sobre o fitopatógeno após inibição inicial com contato micelial, com IA de 22,3; duas do tipo **C**, representada pelo crescimento do endófito sobre o fitopatógeno sem inibição unicial e nenhuma do tipo **C_{B2}**.

Analisando estes dados, foi possível observar que ocorreram poucas alterações nos tipos de interações endófito-fitopatógeno. As alterações observadas foram com os endófitos *A. flavus* (codificados 81, 272 e 465), *Xylaria* sp. (249 e 250) e *T. pinophilus* (479), que apresentaram tipos de interação diferentes entre os fitopatógenos.

Para os fitopatógenos do guaraná, os endófitos *A. flavus* (81 e 272) apresentaram **IA > 50%**; *Xylaria* sp. (249 e 250), *C. ochroleuca* (47 e 415) e *T. aculeatus* (507) apresentaram **IA**

de 40-50%; *Fusarium* sp. (222 e 225), *Diaporthe* sp. (372), *Xylaria* sp. (214), *T. pinophilus* (472 e 479), *T. trachyspermus* (473) e *Penicillium* sp. (509) apresentaram **IA de 30-40%**; e *A. flavus* (465) apresentou **IA em torno de 20%**.

Para os fitopatógenos do pimentão, os endófitos *Xylaria* sp. (249 e 250), *C. ochroleuca* (47 e 415) e *T. trachyspermus* (473) apresentaram **IA de 40-50%**; *Fusarium* sp. (222 e 225), *Diaporthe* sp. (372), *Xylaria* sp. (214), *A. flavus* (272), *T. aculeatus* (507) e *Penicillium* sp. (509) apresentaram **IA de 30-40%**; *A. flavus* (81) e *T. pinophilus* (472 e 479) apresentaram **IA de 20-30%**; e *A. flavus* (465) apresentou **IA em torno de 20%**.

Através destes dados foi possível observar que para 12, dos 16 endófitos, os IA foram semelhantes para os três fitopatógenos, e que para quatro (81, 272, 473 e 507) os IA foram diferentes entre os fitopatógenos do guaraná e os do pimentão.

Após avaliação dos resultados obtidos neste ensaio, foi possível atribuir os melhores resultados para os endófitos *Xylaria* sp. (249 e 250) e *C. ochroleuca* (47 e 415) por terem apresentado IA de 40-50% para os três fitopatógenos. Separadamente, para os fitopatógenos do guaraná, os melhores resultados foram atribuídos para os endófitos *A. flavus* (81 e 272), por terem apresentado IA > 50% e para os fitopatógenos do pimentão, os melhores resultados foram atribuídos para os endófitos *Xylaria* sp. (249 e 250), *C. ochroleuca* (47 e 415) e *T. trachyspermus* (473), por terem apresentado IA de 40-50%.

Neste ensaio foi possível avaliar o tipo de interação endófito-fitopatógeno. Porém, mesmo com o cálculo de porcentagem de índice de antagonismo, este pode não refletir diretamente a inibição do crescimento do fitopatógeno pela produção de metabólitos secundários produzidos pelo endófito.

Por isso, previamente ao isolamento de compostos com potencial antifúngico, necessita-se de avaliações biológicas do desenvolvimento do fitopatógeno frente ao meio metabólico (ou extrato bruto) que contem os metabólitos secundários do endófito.

5.3.2 Avaliação dos extratos brutos dos fungos endofíticos

Foram obtidos os 16 extratos brutos dos fungos endofíticos, que foram submetidos ao ensaio “in vitro” de difusão em disco, para avaliação dos metabólitos secundários quanto à atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (guaranazeiro).

Os extratos brutos foram aplicados em discos de papel filtro, utilizando-se uma concentração de 2000 µg mL⁻¹ e o resultado deste ensaio pode ser visualizado na figura 9 abaixo.

Figura 9 - Avaliação dos extratos brutos dos fungos endofíticos por ensaio de difusão em disco
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

Após observação de atividade antifúngica, as porcentagens de inibição foram calculadas pelo programa ImageJ e os resultados podem ser visualizados na figura 10.

Figura 10 - Inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *C. gloeosporioides* (isolado de guaranazeiro) pelos compostos presentes nos extratos brutos das 16 linhagens de fungos endofíticos, utilizando-se o método de difusão em disco

O resultado obtido mostra que os melhores resultados de inibição foram apresentados pelos extratos brutos dos endófitos *A. flavus* (272) e *T. aculeatus* (507), que apresentaram porcentagens de inibição ao crescimento micelial do fitopatógeno maiores que **90%**. Outros extratos brutos que apresentaram destacada atividade foram os dos endófitos *Xylaria* sp. (214 e 249), *A. flavus* (81), *T. pinophilus* (472) e *Penicillium* sp. (509), que apresentaram

porcentagens de inibição **maiores que 50%**. As menores porcentagens de inibição foram apresentadas pelos extratos brutos dos endófitos *Fusarium* sp. (222 e 225), *C. ochroleuca* (47 e 415), *Xylaria* sp. (250), *T. trachyspermus* (473), *A. flavus* (465), *T. pinophilus* (479) e *Diaporthe* sp. (372), **menores que 50%**.

Na figura pode-se observar que alguns compostos presentes nos extratos inibiram o fitopatógeno sem que ocorresse crescimento micelial sobre o papel filtro, enquanto que outros inibiram com contato micelial. Os únicos que inibiram sem contato micelial foram os compostos presentes nos extratos brutos dos endófitos *A. flavus* (272), *T. aculeatus* (507) e *Xylaria* sp. (249 e 214).

Para o estudo químico dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos, com potencial de atividade antifúngica ao fitopatógeno *Colletotrichum*, foram selecionadas quatro linhagens.

A linhagem de *A. flavus* (272) foi selecionada por ter apresentado interação do tipo B (inibição mútua sem contato micelial) no cultivo pareado para dois fitopatógenos, IAs de 56,8% para FP1, 33,3% para FP2 e 39,5% para FP3 e a maior porcentagem de inibição na avaliação de atividade do extrato bruto (93,3%). A linhagem de *T. aculeatus* (507) foi selecionada por ter apresentado somente interação do tipo B, IAs de 45,2% para FP1, 35,5% para FP2 e 34,8% para FP3 e a segunda maior porcentagem de inibição na avaliação de atividade do extrato bruto (90,4%). As linhagens de *Xylaria* sp. (214 e 249) foram selecionadas por terem apresentado IAs de aproximadamente 40% para os três fitopatógenos e altas porcentagens de inibição na avaliação de atividade do extrato bruto (52,2% e 68,1%, respectivamente). Apesar de terem sido selecionadas duas linhagens do gênero *Xylaria*, elas foram isoladas de locais diferentes (214 - Maués e 249 - Manaus), fato que pode influenciar na expressão gênica e consequentemente no potencial para produção de metabólitos secundários.

5.4 Estudo biológico e químico dos extratos dos fungos endofíticos

5.4.1 Estudo biológico e químico do extrato do fungo endofítico *A. flavus* (272)

O endófito *A. flavus* (272) foi isolado de uma folha de guaranazeiro de Manaus-AM, com aparência sadia. Este foi identificado morfológicamente através da observação de conidióforo típico de *Aspergillus* (figura 11). A partir desta informação foi realizada a identificação molecular, amplificando o gene que codifica a beta-tubulina, região muito utilizada para a distinção de espécies de fungos deste gênero.

Figura 11 - Endófito *A. flavus* (272) em placa de Petri (à esquerda) e observação em microscópio óptico de um conidióforo típico de *Aspergillus* (à direita)

Por ter apresentado destacada atividade no ensaio por cultivo pareado e no ensaio “in vitro” de atividade antifúngica com o extrato bruto (93,3%) a *C. gloeosporioides*, esta linhagem foi selecionada para um estudo químico.

A linhagem foi cultivada em meio de cultura líquido e o extrato bruto gerado (segundo descrito no item 4.3) foi submetido a uma partição líquido-líquido, obtendo-se duas frações (aquosa e acetato de etila) que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 12).

Figura 12 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações aquosa e AcOEt (F272), obtidas do extrato bruto do fungo endofítico *A. flavus* (272), a 2000 µg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

Conforme pode ser verificado neste ensaio, a fração aquosa não se mostrou ativa, provavelmente por conter apenas nutrientes de composição do meio de cultura, e eventualmente compostos polares não ativos. Já a fração acetato de etila mostrou-se ativa, inibindo em 77,21% o crescimento micelial do fitopatógeno.

Com isso, a fração acetato de etila (F272) foi submetida à separação cromatográfica em coluna pré-empacotada do tipo Sep-Pak com fase estacionária de sílica e fase móvel em gradiente (hexano, diclorometano e metanol). Desta obtiveram-se seis frações (F272a →

F272f), reunidas após observação de similaridade química por CCD, que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 13).

Figura 13 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações (**F272a** → **F272f**), obtidas da **F272** do fungo endofítico *A. flavus* (272), a 1000 µg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

O resultado deste ensaio demonstra que somente a fração **F272d** apresentou-se ativa, inibindo em 85,67% o crescimento micelial do fitopatógeno. Esta foi então submetida a uma segunda separação em coluna pré-empacotada do tipo Sep-Pak com fase estacionária de sílica e fase móvel em gradiente (diclorometano, acetato de etila e metanol). Desta obtiveram-se seis frações (**F272d1** → **F272d6**), reunidas após observação de similaridade química por CCD, que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 14).

Figura 14 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações (**F272d1** → **F272d6**), obtidas da **F272d** do fungo endofítico *A. flavus* (272), a 1000 µg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

Dentre as seis frações avaliadas, a **F272d1** apresentou uma alta atividade (93,45%) e pela análise química em CCD foi verificada a presença de poucos compostos. Sendo assim, esta fração foi submetida à purificação por CLAE em fase reversa, e o cromatograma obtido pode ser visualizado na figura 15, a seguir.

Figura 15 - Cromatograma da fração **F272d1**

Condições de análise: coluna Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (dimensões 250 x 4,6 mm; 5 µm) eluída em modo isocrático com MeOH/H₂O 60:40, por 20 minutos, com vazão de 1 mL min⁻¹. Monitoramento em λ 254 nm

Os compostos presentes na fração **F272d1** absorveram em todos os comprimentos de onda inspecionados (254, 275 e 365 nm), sendo que a absorção máxima foi observada no λ 254 nm. Baseando-se nesta informação, foram coletados os intervalos conforme sinalização na figura acima (de a $\rightarrow$ d), obtendo-se quatro frações que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 16).

Figura 16 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações (**F272d1a** $\rightarrow$ **F272d1d**), obtidas da **F272d1** do fungo endofítico *A. flavus* (272), a 500 μg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

A fração **F272d1c**, referente ao composto no tempo de retenção em 7,34 minutos, apresentou 92,88% de inibição ao crescimento micelial do fitopatógeno.

Se compararmos esta atividade com a dos primeiros ensaios, é possível verificar que ela foi aumentando conforme o composto ativo ia sendo purificado, indicando que sua ação antifúngica não sofre sinergismo com outros compostos.

Esta fração foi isolada e então submetida à análise por CLAE com detectores de ultravioleta (UV) e espectrômetro de massas de baixa resolução (EM). O cromatograma obtido pelo CLAE e o espectro de UV podem ser observados nas figuras 17 e 18 a seguir.

Figura 17 - Cromatograma da fração **F272d1c**
Condições de análise: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (dimensões 50 x 2,1 mm; 3,5 μm) eluída em modo gradiente com H₂O/MeOH/MeCN 90:5:5, por 20 minutos, com vazão de 0,5 mL min⁻¹

Figura 18 - Espectro de absorção do UV da fração **F272d1c**

No cromatograma foi possível observar que a fração **F272d1c** apresentava bom grau de pureza, com tempo de retenção de 6,98 minutos. No espectro de absorção na região do UV foi possível observar uma banda de absorção mais intensa em 227,2 nm, e uma banda de absorção menos intensa em 294,6 nm.

Segundo Pavia et al. (2010) duas bandas de intensidade média, ambas com $\lambda_{\text{máx.}}$ acima de 200 nm, indicam, em geral, a presença de um sistema aromático e bandas de intensidade acima de 210 nm representam, em geral, uma cetona insaturada, um dieno ou um polieno.

O espectro de massa de baixa resolução desta amostra foi obtido nos modos positivo (figura 19) e negativo (figura 20).

Figura 19 - Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo da fração **F272d1c**

Figura 20 - Espectro de massas de baixa resolução em modo negativo da fração **F272d1c**

Os espectros de massas de baixa resolução apresentaram vários sinais de íon molecular. Analisando estes espectros foi possível observar um sinal intenso em m/z 219 no modo positivo e um sinal intenso em m/z 217 no modo negativo. Esta diferença de duas unidades de massa sugere que o primeiro seria a massa do composto protonada $[M+H]^+$ e o segundo seria a massa do composto desprotonada $[M-H]^-$, ou seja, o composto avaliado apresenta massa molar de 218 Da. Foi observado também o íon aduto de sódio $[M+Na]^+$ em m/z 241 e os dímeros protonado $[2M+H]^+$ em m/z 437, aduto de sódio $[2M+Na]^+$ em m/z 459 e desprotonado $[2M-H]^-$ em m/z 435. Além disso, foi observado que o composto em questão apresenta grupo funcional hidroxila (OH) em sua estrutura, devido a observação do íon em m/z 201, referente à perda de 18 Da.

Utilizando-se destas informações, foi realizada uma busca no banco de dados “Dictionary of Natural Products” (DNP), disponível no endereço eletrônico <http://dnp.chemnetbase.com>, onde foi possível verificar que para o valor de massa molar de 218 Da, utilizando-se a palavra chave “fungo” como fonte biológica, foi compatível com três compostos. O primeiro é o 1,8-dihidroxi-2-naftaleno ácido carboxílico; 8-metil éter, de fórmula molecular $C_{12}H_{10}O_4$ – CAS nº 91368-82-0 (**21**). O segundo é o 7,9-iludadieno-3-ol (sinônimo: radulol), de fórmula molecular $C_{15}H_{22}O$ – CAS nº 221374-87-4 (**22**). E o terceiro, o 6-hidroxi-7,8-tridecadieno-10,12-ácido dinóico (sinônimo: antibiótico LL-07F 275), de fórmula molecular $C_{13}H_{14}O_3$ – CAS nº 164740-30-1 (**23**). Em uma segunda busca, alternando-se a palavra chave para “*Aspergillus*” como fonte biológica, o valor de massa molar de 218 Da foi compatível com apenas um composto, o 2,3-dihidro-2-(1,3-pentadienil)-5,7-benzofurandiolo (sinônimos: artrografol e asperfuran), de fórmula molecular $C_{13}H_{14}O_3$ – CAS nº 138331-36-9 (**24**).

Diante da possibilidade de ser quatro compostos conhecidos ou eventualmente outros compostos, a fração foi submetida à análise por Espectrometria de massas de alta resolução e simultaneamente por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN- ^1H), para realizar a identificação química do composto ativo de forma inequívoca.

O espectro de massas de alta resolução da fração **F272d1c** é apresentado na figura 21 abaixo.

Figura 21 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração **F272d1c**

No espectro de massas de alta resolução observou-se o íon molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 219,099 e os íons $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 241,082, $[2\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 437,192 e $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 459,176, corroborando com os dados obtidos pelo espectro de massas de baixa resolução e fornecendo a massa exata calculada do composto em 218,092 Da. Neste espectro também foi observado que o composto apresenta pelo menos dois grupos OH em sua estrutura, devido a observação dos íons em m/z 201,097 e 183,094, referentes a perda de 18 e 36 Da, respectivamente, a partir do íon molecular.

Tanto o composto (**23**) quanto o (**24**) apresentam massa exata de 218,094 Da e duas hidroxilas, porém os valores de $\text{UV}_{\text{máx.}}$ do composto (**23**), segundo o DNP, são 208, 236, 249,

263 e 278 nm e do **(24)** são 227 e 295 nm. Portanto, de acordo com estas características, o composto que condiz com o composto **F272d1c**, onde foram observados valores de $UV_{\text{máx.}}$ de 227 e 295 nm, é o **(24)**.

No espectro de RMN ^1H (anexo 1) foi possível obter dados sobre os deslocamentos de hidrogênios do composto **F272d1c**, e, em comparação com a literatura, foi possível correlacioná-lo estruturalmente com o composto **(24)**. Os resultados podem ser visualizados na tabela 3.

Tabela 3 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) do composto **F272d1c** e do asperfuran, ambos em acetona- d_6

	F272d1c	asperfuran (Pfefferle et al., 1990; Ayer e Craw, 1991)
Posição do H	δ_{H} , (multiplicidade e J)	δ_{H} , (multiplicidade e J)
5'	1,75 (*d, 6,8 Hz)	1,72 (d, 7 Hz)
3b	2,85 (ddl, 15,4 e 8,25 Hz)	2,85 (ddl, 15 e 8 Hz)
3a	3,25 (ddl, 15,4 e 8,8 Hz)	3,23 (ddl, 15 e 8,5 Hz)
2	5,12 (ddl, 7,9 e 15,9 Hz)	5,08 (ddd, 8,5, 8 e 7,5 Hz)
1'	5,71 (dd, 15 e 7,5 Hz)	5,71 (dd, 15 e 7,5 Hz)
4'	5,75 (m)	5,76 (m)
3'	6,09 (ddl, 15,5 e 13,3 Hz)	6,09 (ddl, 15 e 11)
4	6,13 (m)	6,17 (m)
6	6,16 (m)	6,20 (m)
2'	6,28 (dd, 15,2 e 10,45 Hz)	6,28 (dd, 15 e 11)

*d: dubleto, dd: duplo dubleto, ddl: duplo dubleto largo, ddd: duplo duplo dubleto largo, m: multipletto, sl: singleto largo

J =constante de acoplamento

Analisando o espectro de RMN ^1H , foi possível atribuir o sinal com valor de deslocamento em δ 1,75 (d, 5' H), referente a três hidrogênios, aos hidrogênios do grupo metil; os sinais com valores de deslocamento em δ 5,75 (m, 4' H); 6,09 (ddl, 3' H); 6,28 (dd, 2' H) e 5,71 (dd, 1' H), referentes a um hidrogênio cada, aos hidrogênios metínicos do pentadienil; os sinais com valores de deslocamento em δ 5,12 (ddl, 2 H); 3,25 (ddl, 3a H) e 2,85 (ddl, 3b H), referentes a um hidrogênio cada, aos hidrogênios do anel furano; e os sinais com valores de deslocamento em δ 6,13 (m, 4 H) e 6,16 (m, 6 H), referentes a um hidrogênio cada, aos hidrogênios do anel benzeno.

Os valores de deslocamento químico, multiplicidade e constante de acoplamento foram compatíveis, e, portanto, não foi necessária a aquisição de espectros adicionais. Sendo assim, foi possível confirmar que o composto ativo **F272d1c** refere-se ao composto conhecido asperfuran **(24)**, pela comparação de dados com Pfefferle et al. (1990) e Ayer e Craw (1991).

O fluxograma a seguir sumariza o trabalho de isolamento químico do composto ativo presente no extrato do endófito *A. flavus* (272) (figura 22).

Figura 22 - Fluxograma do estudo químico do fungo endofítico *A. flavus* (272)

m: massa da fração; B: porcentagem de inibição no bioensaio

*condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil (Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ de dimensões 250 x 4,6 mm) eluída em modo isocrático com MeOH/H₂O 60:40, vazão de 1 mL min⁻¹ e λ 254, 275 e 365 nm

O composto asperfuran pertence à classe química dos benzofuranos, que são compostos heterocíclicos constituídos de um anel benzeno e um anel furano (25).

Várias atividades biológicas já foram reportadas para os derivados do benzofurano, dentre as quais: antiviral, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena, anti-hiperglicêmica e analgésica (KHANAM, 2014).

Na área agrônômica, um exemplo é o benzofurano hidroxilado cicerfurano (**26**), ativo contra o fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, causador da murcha de *Fusarium* ou “*Fusarium wilt*”, na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (STEVENSON; VEITCH, 1998). Este composto também foi ativo contra os fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum* e *Monilinia aucupariae*, na concentração mínima inibitória (CMI) de 25, 50, >400 e $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (ASLAM et al., 2009). Nos dois estudos a avaliação da CMI foi realizada em microplacas de 96 poços, com suspensão dos esporos dos fitopatógenos.

O benzofurano isolado asperfuran (**24**) foi reportado pela primeira vez por dois grupos de pesquisa simultaneamente. Em um dos grupos o composto foi isolado de uma linhagem de *Aspergillus oryzae* (PFEFFERLE et al., 1990) e no outro grupo de uma linhagem de *Arthographis pinicola* (AYER; NOZAWA, 1990). Posteriormente, foi isolado de uma linhagem de *Aspergillus flavus* de habitat marinho (SCHLÖRKE, 2005) e de fungos do gênero *Penicillium* (BARRETO et al., 2011; FRISVAD et al., 2004; YAMAJI et al., 1999).

A síntese do asperfuran foi relatada por Miyake e Fujimoto (1993), e sua atividade biológica foi relatada por apresentar ação antifúngica, ação inibitória da síntese de quitina e ação inibitória a proliferação de células tumorais. O estudo de Pfefferle et al. (1990) mostrou que o asperfuran causou mudanças morfológicas ao micélio do fungo zigomiceto *Rhizomucor miehei*, começando com $0,02 \mu\text{g disco}^{-1}$, em ensaio realizado pelo método de difusão em disco. Neste mesmo estudo, os autores mostraram que o asperfuran inibiu a síntese de quitina pelo fungo basidiomiceto *Coprinus cinereus*, em 50% a uma concentração de 300 Mm e a proliferação de células tumorais HeLaS3 e L1210 em 50% a uma concentração de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

No estudo de Ayer e Craw (1991) a ação antifúngica do asperfuran ($50 \mu\text{g disco}^{-1}$), inibiu o crescimento do fungo ascomiceto *Ophiostoma clavigerum*, fitopatógeno do pinheiro *Pinus contorta*. Assim como no estudo de Pfefferle et al. (1990), foi utilizado o método de difusão em disco.

O composto asperfuran (**F272d1c**) foi submetido ao ensaio final pelo método de difusão em disco e avaliado contra os três fitopatógenos do gênero *Colleotrichum* (*C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro, *C. gloeosporioides* isolado do pimentão e *C.*

acutatum isolado do pimentão), em comparação com o fungicida comercial difenoconazol (figura 23).

Fitopatógeno/ hospedeiro	asperfuran (F272d1c)			Difenoconazol		
	100µg disco ⁻¹	200µg disco ⁻¹	300µg disco ⁻¹	100µg disco ⁻¹	200µg disco ⁻¹	300µg disco ⁻¹
<i>C. gloeosporioides</i> (guaranazeiro)
<i>C. gloeosporioides</i> (pimentão)
<i>C. acutatum</i> (pimentão)

Figura 23 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a três fitopatógenos do gênero *Colletotrichum* realizado com o composto asperfuran (**F272d1c**) e com o fungicida comercial difenoconazol, pelo método de difusão em disco, nas concentrações de 100, 200 e 300 µg disco⁻¹

A partir dos resultados obtidos neste ensaio, foram calculadas as porcentagens de inibição para os três fitopatógenos (figura 24).

Figura 24 - Porcentagens de inibição apresentadas a três fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*, pelo fungicida comercial difenoconazol e pelo composto asperfuran (**F272d1c**) isolado neste estudo
CGG: *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro, CGP: *C. gloeosporioides* isolado do pimentão e CAP: *C. acutatum* isolado do pimentão

Os dados apresentados na figura 24 mostram que o composto asperfuran (**F272d1c**) apresentou uma porcentagem de inibição acima de 69% nas três concentrações avaliadas, para os três fitopatógenos, sendo um pouco mais efetivo para *C. gloeosporioides* (guaraná) e *C. acutatum* (pimentão), com inibição acima de 75%.

A concentração inibitória média (CI₅₀), ou seja, a concentração capaz de inibir em 50% o crescimento micelial dos fitopatógenos foi <100 µg disco⁻¹ nos três casos.

O fungicida comercial difenoconazol apresentou valores similares de inibição, com diferença de 13,1% a mais na média de inibição a *C. gloeosporioides* (guaraná), 5,1% a mais a *C. gloeosporioides* (pimentão) e 4,3% a mais a *C. acutatum* (pimentão). A CI₅₀ foi <100 µg disco⁻¹ para os três fitopatógenos.

Este fungicida sistêmico contém como ingrediente ativo o difenoconazol (**27**), um composto do grupo químico do triazol, a uma concentração de 250 g L⁻¹.

No entanto, ele apresenta classificação toxicológica I (extremamente tóxico) e classificação do potencial de periculosidade ambiental II (produto muito perigoso ao meio ambiente). Seu modo de ação consiste na inibição da demetilação durante a síntese de ergosterol, um componente crítico para a integridade das membranas fúngicas. Quanto ao mecanismo de toxicidade em humanos, sua ação ainda é desconhecida.

O composto ativo asperfuran isolado neste estudo foi produzido pelo fungo endofítico *A. flavus*, e apresentou atividade promissora em comparação com o fungicida comercial, com uma estrutura química totalmente diferente, demonstrando ser uma nova opção de classe química ativa, como opção aos fungicidas utilizados atualmente.

Análises adicionais deverão concluir sobre a toxicidade deste composto, assim como seu mecanismo de ação fungicida e sua concentração mínima inibitória.

Apesar de já ser relatada a produção e a ação antifúngica do composto asperfuran, a produção por *A. flavus* de habitat terrestre e a ação antifúngica a fungos do gênero *Colletotrichum*, é relatada pela primeira vez neste estudo.

5.4.2 Estudo biológico e químico do extrato do fungo endofítico *Xylaria* sp. (214)

O endófito *Xylaria* sp. (214) (figura 25) foi isolado de uma folha de guaranazeiro de Maués-AM, com aparência doente. A identificação morfológica desta linhagem não foi possível, pois seu micélio se apresentava estéril, ou seja, não apresentava esporulação. Este foi então identificado por marcadores morfológicos, através da amplificação do ITS (espaço interno transcrito), região conservada do DNA de fungos.

Figura 25 - Endófito *Xylaria* sp. (214) em placa de Petri

Por ter apresentado atividade no ensaio por cultivo pareado e no ensaio “in vitro” de atividade antifúngica com o extrato bruto (52,2%) a *C. gloeosporioides*, esta linhagem foi selecionada para um estudo químico.

A linhagem foi cultivada em meio de cultura líquido e o extrato bruto gerado (segundo descrito no item 4.3) foi submetido a uma partição líquido-líquido, obtendo-se duas frações (aquosa e acetato de etila) que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 26).

Figura 26 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações aquosa e AcOEt (**F214**), obtidas do extrato bruto do fungo endofítico *Xylaria* sp. (214), a 2000 µg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

Conforme pode ser verificado neste ensaio, a fração aquosa não se mostrou ativa, provavelmente por conter apenas nutrientes de composição do meio de cultura, e eventualmente compostos polares não ativos. Já a fração acetato de etila mostrou-se ativa, inibindo em 47,82% o crescimento micelial do fitopatógeno.

Com isso, a fração acetato de etila (**F214**) foi submetida à separação cromatográfica em coluna pré-empacotada do tipo Sep-Pak com fase estacionária de sílica e fase móvel em gradiente (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol). Desta obtiveram-se seis frações (**F214a** → **F214f**), reunidas após observação de similaridade química por CCD, que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 27).

Figura 27 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações (**F214a** → **F214f**), obtidas da **F214** do fungo endofítico *Xylaria* sp. (214), a 1000 µg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

O resultado deste ensaio demonstra que somente a fração **F214d** apresentou-se ativa, inibindo em 40,49% o crescimento micelial do fitopatógeno. Esta foi então submetida a uma segunda separação em coluna pré-empacotada do tipo Sep-Pak com fase estacionária de sílica e fase móvel em gradiente (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol). Desta obtiveram-se seis frações (**F214d1** → **F214d6**), reunidas após observação de similaridade química por CCD, que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 28).

Figura 28 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações (**F214d1** → **F214d6**), obtidas da **F214d** do fungo endofítico *Xylaria* sp. (214), a 1000 µg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

Dentre as seis frações avaliadas, a **F214d3** apresentou atividade (39,44%) e pela análise química em CCD foi verificada a presença de poucos compostos. Nesta análise também se observou que havia compostos que foram positivos quando revelados com o reagente Dragendorff, que sugere a presença de alcalóides ou compostos nitrogenados. Sendo assim, esta fração foi submetida à purificação por CLAE em fase reversa, e o cromatograma obtido pode ser visualizado na figura 29, a seguir.

Figura 29 - Cromatograma da fração **F214d3**
Condições de análise: coluna Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (dimensões 250 x 4,6 mm; 5 µm) eluída em modo gradiente com H₂O/MeOH 80:20, por 15 minutos, com vazão de 1 mL min⁻¹. Monitoramento em λ 254 nm

Os compostos presentes na fração **F214d3** absorveram em todos os comprimentos de onda inspecionados (228, 254, 275 e 365 nm), sendo que a absorção máxima foi observada no λ 254 nm. Baseando-se nesta informação, foram coletados os intervalos conforme sinalização na figura acima (de a $\rightarrow$ c), obtendo-se três frações que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 30).

Figura 30 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações (**F214d3a** $\rightarrow$ **F214d3c**), obtidas da **F214d3** do fungo endofítico *Xylaria* sp. (214), a 500 μg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

A fração **F214d3c**, referente ao composto no tempo de retenção em 5,92 minutos, apresentou 38,76% de inibição ao crescimento micelial do fitopatógeno. Observa-se ainda que a atividade se manteve semelhante ao extrato inicial, mesmo após algumas separações.

Esta fração foi isolada e então submetida à análise por CLAE com detectores de ultravioleta (UV) e espectrômetro de massas de baixa resolução (EM). O cromatograma obtido pelo CLAE e o espectro de UV podem ser observados nas figuras 31 e 32 a seguir.

Figura 31 - Cromatograma da fração **F214d3c**

Condições de análise: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (dimensões 50 x 2,1 mm; 3,5 μm) eluída em modo gradiente com H₂O/MeOH/MeCN 90:5:5, por 20 minutos, com vazão de 0,5 mL min⁻¹

Figura 32 - Espectro de absorção do UV da fração **F214d3c**

No cromatograma foi possível observar que a fração **F214d3c** apresentava bom grau de pureza, com tempo de retenção de 7,59 minutos. No espectro de absorção na região do UV foi possível observar uma banda de absorção mais intensa em 217,7 nm e uma banda de absorção menos intensa em 286,3 nm.

Duas bandas de intensidade média, ambas com $\lambda_{\text{máx.}}$ acima de 200 nm, indicam, em geral, a presença de um sistema aromático e bandas de intensidade acima de 210 nm representam, em geral, uma cetona insaturada, um dieno ou um polieno (PAVIA et al., 2010).

O espectro de massa de baixa resolução desta amostra foi obtido nos modos positivo (figura 33) e negativo (figura 34).

Figura 33 - Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo da fração **F214d3c**

Figura 34 - Espectro de massas de baixa resolução em modo negativo da fração **F214d3c**

Os espectros de massas de baixa resolução apresentaram vários sinais de íon molecular. Analisando os espectros foi possível observar quatro sinais de maiores intensidades em m/z 430, 490, 508 e 1016 no modo positivo e um sinal em m/z 506 no modo negativo. A diferença de duas unidades de massa entre os íons em m/z 508 e 506 sugere que o primeiro seria a massa do composto protonada $[M+H]^+$ e o segundo seria a massa do composto desprotonada $[M-H]^-$, ou seja, o composto avaliado apresenta massa molar de 507 Da. Foi observado também o íon aduto de sódio $[M+Na]^+$ em m/z 530 e os íons $[M-H_2O]^+$ em m/z 490 e $[M-OCOCH_3-H_2O]^+$ em m/z 430.

Utilizando-se destas informações, foi realizada uma busca no banco de dados DNP, onde foi possível verificar que para o valor de massa molar de 507 Da, utilizando-se a palavra chave “fungo” como fonte biológica, foi compatível com dois compostos. O primeiro é a citocalasina M, de fórmula molecular $C_{30}H_{37}NO_6$ – CAS nº 79648-73-0 (28), e o segundo é a citocalasina Q, também de fórmula molecular $C_{30}H_{37}NO_6$ – CAS nº 189371-38-8 (29). Em uma segunda busca, alternando-se a palavra chave para “*Xylaria*” como fonte biológica, o valor de massa molar de 507 Da foi compatível com dois compostos. O primeiro é a citocalasina D, de fórmula molecular $C_{30}H_{37}NO_6$ – CAS nº 22144-77-0 (30), e o segundo é a citocalasina Q (29), já localizado na busca anterior.

Diante da possibilidade de ser três compostos conhecidos ou eventualmente outros compostos, a fração foi submetida à análise por Espectrometria de massas de alta resolução e simultaneamente por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN- ^1H), para realizar a identificação química do composto ativo de forma inequívoca.

O espectro de massas de alta resolução da fração **F214d3c** é apresentado na figura 35 abaixo.

Figura 35 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração **F214d3c**

No espectro de massas de alta resolução observou-se o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 508,268, o íon aduto de sódio $[M+Na]^+$ em m/z 530,251 (figura 35A), o íon $[M-OCOCH_3-H_2O]^+$ em m/z 430,236 (figura 35B), e os dímeros protonado $[2M+H]^+$ em m/z 1015,5310 e aduto de sódio $[2M+Na]^+$ em m/z 1037,513 (figura 35C), corroborando com os dados obtidos pelo espectro de massas de baixa resolução e fornecendo a massa exata calculada do composto em 507,260 Da. Neste espectro também foi observado que o composto apresenta grupo hidroxila (OH) em sua estrutura, devido a observação do íon em m/z 490,251, referente a perda de 18 Da a partir do íon molecular, grupo acetila ($OCOCH_3$), devido a observação do íon em m/z 448,247, referente a perda de 59 Da a partir do íon molecular e átomos de nitrogênio em número ímpar, devido ao íon molecular apresentar-se em número par.

Outra análise que corrobora com a presença de nitrogênio, foi a análise por CCD da fração **F214d3c**, que revelou positivamente ao reagente Dragendorff.

As três citocalasinas, M (**28**), Q (**29**) e D (**30**) apresentam massa exata de 507,262 Da, porém apenas a citocalasina D (**30**) apresenta grupo acetila em sua estrutura. Além disso, os valores de $UV_{máx.}$ do composto (**28**), segundo o DNP, é de 235 nm, o do (**29**) não foi informado e do (**30**) é de 286 nm. Portanto, de acordo com estas características, o composto que condiz com o composto **F214d3c**, onde foram observados os valores de $UV_{máx.}$ de 217 e 286 nm, é o (**30**).

No espectro de RMN 1H (anexo 2) foi possível obter dados sobre os deslocamentos de hidrogênio do composto **F214d3c**, e, em comparação com a literatura, foi possível correlacioná-lo estruturalmente com o composto (**30**). Os resultados podem ser visualizados na tabela 4.

Tabela 4 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) do composto **F214d3c** e da citocalasina D, ambos em $\text{DMSO-}d_6$

Posição do H	F214d3c δ_{H} , (multiplicidade e J)	citocalasina D (Maccotta et al., 1993) δ_{H} , (multiplicidade e J)
-	-	-
H ₂	8,06 (s)	8,08
H ₃	3,09 (tl, 4,4 Hz)	3,08 tl
H ₄	1,98 (dd, 2,5 e 5,5 Hz)	1,96 (dd, 2,5 e 5,5 Hz)
H ₅	2,49	2,46
CH ₃ (5)	0,38 (d, 6,7 Hz)	0,38 (d, 6,5 Hz)
-	-	-
H ₇	3,57 (d, 10,2 Hz)	3,54 (d, 10 Hz)
H ₈	2,66	2,67
-	-	-
H _{10a}	2,78 (dd, 4,9 e 13,2 Hz)	2,78 (dd, 5 e 13 Hz)
H _{10b}	2,52 (dd, 8,8 e 13,2 Hz)	2,53 (dd, 8,5 e 13 Hz)
-	-	-
H _{2'} , H _{6'}	7,15 (d, 7 Hz)	7,13 (d, 7 Hz)
H _{3'} , H _{5'}	7,30 (t, 7,3 Hz)	7,28 (t, 7,5 Hz)
H _{4'}	7,22 (t, 7,3 Hz)	7,20 (t, 7,5 Hz)
H _{11a}	5,02 (s)	4,99 (s)
H _{11b}	4,8 (s)	4,77 (s)
H ₁₂	5,42 (dd, 9,6 e 15,5 Hz)	5,39 (dd, 10 e 15 Hz)
H ₁₃	5,08 (ddd, 5,5; 10,5 e 15,2 Hz)	5,06 (ddd, 6; 10 e 15 Hz)
H _{14a}	2,15 (m)	2,15 (m)
H _{14b}	1,89 (ddl, 4,9 e 12,6 Hz)	1,88 (ddl, 4,5 e 12,5 Hz)
H ₁₅	2,75 (m)	2,73 (m)
CH ₃ (15)	1,06 (d, 6,7 Hz)	1,04 (d, 7 Hz)
-	-	-
-	-	-
CH ₃ (17)	1,38 (s)	1,38 (s)
OH(17)	4,54	
H ₁₈	5,11 (dd, 2 e 15 Hz)	5,13 (dd, 2,3 e 15,8 Hz)
H ₁₉	5,85 (dd, 2 e 15 Hz)	5,86 (dd, 2,3 e 15,8 Hz)
H ₂₀	5,25 (t, 2 Hz)	5,26 (t, 2,3 Hz)
OH(20)	4,94	4,93
-	-	-
H ₂₂	2,28 (s)	2,27 (s)

*s: singleto, d: dubleto, dd: duplo dubleto, ddl: duplo dubleto largo, ddd: duplo duplo dubleto, t: tripleto, tl: tripleto largo, m: multipeto

J =constante de acoplamento

Analisando o espectro de RMN ^1H , foi possível atribuir três sinais aos grupos metila (CH_3): um dubleto em δ 0,38 (6,7 Hz), um dubleto em δ 1,06 (6,7 Hz) e um singleto em δ 1,38. O espectro também indicou a presença de três grupos metileno (CH_2): o primeiro é um multipeto em δ 2,15 e um duplo dubleto largo em δ 1,89 (4,9 e 12,6 Hz), o segundo é um singleto em δ 4,8 e um singleto em δ 5,02, e o terceiro é um duplo dubleto em δ 2,52 (8,8 e 13,2 Hz) e um duplo dubleto em δ 2,78 (4,9 e 13,2 Hz). Onze sinais foram atribuídos aos hidrogênios metínicos (CH): δ 1,98 (dd, 2,5 e 5,5 Hz); δ 2,49; δ 2,66; δ 2,75 (m); δ 3,09 tl (4,4 Hz); δ 3,57 (d, 10,2 Hz); δ 5,08 (ddd, 5,5; 10,5 e 15,2 Hz); δ 5,13 dd (2,3 e 15,8 Hz); δ 5,26 (t, 2,3 Hz); δ 5,42 (dd, 9,6 e 15,5 Hz) e δ 5,86 (dd 2,3 e 15,8 Hz). Neste espectro também foi possível observar um singleto em δ 8,06 indicando o hidrogênio que está ligado ao nitrogênio

(NH) e os sinais em δ 4,54 e δ 4,93 referentes às duas hidroxilas (OH). Os sinais em δ 7,15 (d, 7 Hz), δ 7,22 (t, 7,3 Hz) e δ 7,30 (t, 7,3 Hz) indicaram os hidrogênios do anel aromático, e o singlete em δ 2,27 indicou o hidrogênio do grupo acetila (OCOCH_3).

Os valores de deslocamento químico, multiplicidade e constante de acoplamento foram compatíveis, e, portanto, não foi necessária a aquisição de espectros adicionais. Sendo assim, foi possível confirmar que o composto ativo **F214d3c** refere-se ao composto conhecido por citocalasina D (**30**), pela comparação de dados com Maccotta et al. (1993).

O fluxograma a seguir sumariza o trabalho de isolamento químico do extrato do endófito *Xylaria* sp. (214) (figura 36).

Figura 36 - Fluxograma do estudo químico do fungo endofítico *Xylaria* sp. (214)

m: massa da fração; B: porcentagem de inibição no bioensaio

*condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil (Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ de dimensões 250 x 4,6 mm) eluída em modo gradiente de H₂O/MeOH 80:20, vazão de 1 mL min⁻¹ e λ 228, 254, 275 e 365 nm

As citocalasinas são compostos de origem biossintética mista, envolvendo uma unidade de aminoácido (fenilalanina, triptofano ou leucina) e uma cadeia policetídica. Os compostos provenientes do aminoácido fenilalanina são denominados citocalasinas e zigosporinas, as provenientes do aminoácido triptofano são as caetoglobosinas e as provenientes do aminoácido leucina são as aspocalasinas (PRASAIN et al., 2002).

Estruturalmente, as citocalasinas são caracterizadas pela presença de um anel biciclo isoindolona (**31**) fundido a um macrociclo de 11 a 14 membros e pela presença de uma unidade fenil na posição 10. A variedade estrutural desta classe de compostos se deve as substituições no C-3 sobre o anel peridroisoindoil-1-ona e ao tamanho do anel macrocíclico (FENG et al., 2002).

Na família Xylariaceae, representada por fungos dos gêneros *Xylaria*, *Daldinia*, *Hypoxylon*, dentre outros, o esqueleto representativo das citocalasinas (**32**) apresenta, em sua maioria, o anel macrocíclico com 11 membros, um grupo fenila na posição 10, grupos metílicos nas posições 5, 6, 16 e/ou 18 e, em muitos casos, uma ligação dupla na posição 13(14) (DOMBROWSKI et al., 1992).

Desde a descoberta na década de 70, as citocalasinas tem se tornado um importante instrumento na medicina e biologia molecular, principalmente devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas relatadas (EVIDENTE et al., 2003; SCHÜMANN; HERTWECK, 2007), tais como, transporte de glicose, inibição da polimerização da actina, secreção de hormônios, imunossupressora, antibiótica, antiviral, herbicida e antifúngica (BETINA et al.,

1972; FOISSNER; WASTENEYS, 2007; MATESIC et al., 2006; MILLS et al., 2000; PRASAIN et al., 2002).

Existem mais de 60 citocalasinas conhecidas que foram isoladas de diferentes gêneros de fungos, tais como *Phoma* sp., *Daldinia* sp., *Chalara* sp., *Hypoxylon* sp., *Xylaria* sp., dentre outras.

No caso da citocalasina D, foi relatada pela primeira vez por Aldridge e Turner (1969), como um metabólito secundário isolado do fungo *Metarhizium anisopliae*. Posteriormente este composto foi isolado de outras linhagens fúngicas, tais como *Hypoxylon terricola* (EDWARDS; MAITLAND; WHALLEY, 1989) e *Engleromyces goetzii* (JIKAI et al., 2002).

A produção de citocalasina D também já foi relatada por fungos do gênero *Xylaria*, assim como neste trabalho. Alguns exemplos são *X. hypoxylon* (ESPADA et al., 1997), *X. mellisii* (PITTAYAKHAJONWUT et al., 2005), *Xylaria* sp. (CHEN et al., 2011), *X. carpophila* (YIN et al., 2011), *X. cubensis* (KLAIKLAY et al., 2012) e *X. arbuscula* (AMARALA et al., 2014).

A citocalasina D apresenta diversas atividades biológicas, tais como antibiótica e citotóxica. Na área agrônômica, como agente antifúngico, Betina et al. (1972) relataram a atividade da citocalasina D contra o fitopatógeno *Botrytis cinerea*, causador da podridão cinzenta em plantas, a uma concentração de 25 µg disco⁻¹ em ensaio realizado pelo método de difusão em disco.

No estudo de Cafêu et al. (2005) a ação antifúngica da citocalasina D a *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, causadores de verrugoses, pelo método de bioautografia, ocorreu a uma concentração de 10 e 25 µg mL⁻¹, respectivamente.

O composto citocalasina D (**F214d3c**) foi submetido ao ensaio final pelo método de difusão em disco e avaliado contra os três fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*, em comparação com o fungicida comercial difenoconazole.

Os resultados obtidos neste ensaio nos mostraram que as respostas foram todas negativas, para os três fitopatógenos testados. Baseando-se no resultado apresentado na figura 30, em que o composto **F214d3c** inibiu em 38,76% o crescimento micelial do fitopatógeno *C. gloeosporioides* do guaranazeiro em uma concentração de 500 µg disco⁻¹, pode-se inferir que, pelo menos no caso deste fitopatógeno, a CI₅₀ estaria em uma faixa >500 µg disco⁻¹.

Em conclusão, no estudo biológico e químico do fungo endofítico *Xylaria* sp. (214), foi isolado o composto ativo citocalasina D. Apesar de este composto ser conhecido, a atividade antifúngica ao fitopatógeno *C. gloeosporioides* apresentada neste trabalho está sendo relatada pela primeira vez.

5.4.3 Estudo biológico e químico do extrato do fungo endofítico *Xylaria* sp. (249)

O endófito *Xylaria* sp. (249) (figura 37) foi isolado de uma folha de guaranazeiro de Manaus-AM, com aparência doente. A identificação morfológica desta linhagem não foi possível, pois seu micélio se apresentava estéril, ou seja, não apresentava esporulação. Este foi então identificado por marcadores morfológicos, através da amplificação do ITS (espaço interno transcrito), região conservada do DNA de fungos.

Figura 37 - Endófito *Xylaria* sp. (249) em placa de Petri

Por ter apresentado atividade no ensaio por cultivo pareado e no ensaio “in vitro” de atividade antifúngica com o extrato bruto (68,1%) a *C. gloeosporioides*, esta linhagem foi selecionada para um estudo químico.

A linhagem foi cultivada em meio de cultura líquido e o extrato bruto gerado (segundo descrito no item 4.3) foi submetido a uma partição líquido-líquido, obtendo-se duas frações (aquosa e acetato de etila) que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 38).

Figura 38 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações aquosa e AcOEt (**F249**), obtidas do extrato bruto do fungo endofítico *Xylaria* sp. (249), a $2000 \mu\text{g disco}^{-1}$
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

Conforme pode ser verificado neste ensaio, a fração aquosa não se mostrou ativa, provavelmente por conter apenas nutrientes de composição do meio de cultura, e eventualmente compostos polares não ativos. Já a fração acetato de etila mostrou-se ativa, inibindo em 60,39% o crescimento micelial do fitopatógeno.

Com isso, a fração acetato de etila (**F249**) foi submetida à separação cromatográfica em coluna pré-empacotada do tipo Sep-Pak com fase estacionária de sílica e fase móvel em gradiente (hexano, diclorometano e metanol). Desta obtiveram-se seis frações (**F249a** → **F249f**), reunidas após observação de similaridade química por CCD, que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 39).

Figura 39 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações (**F249a** → **F249f**), obtidas da **F249** do fungo endofítico *Xylaria* sp. (249), a 1000 µg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

O resultado deste ensaio demonstra que somente a fração **F249d** apresentou-se ativa, inibindo em 63,33% o crescimento micelial do fitopatógeno. Esta foi então submetida a uma segunda separação em coluna pré-empacotada do tipo Sep-Pak com fase estacionária de sílica e fase móvel em gradiente (hexano, diclorometano e metanol). Desta obtiveram-se seis frações (**F214d1** → **F214d6**), reunidas após observação de similaridade química por CCD, que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 40).

Figura 40 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações (**F249d1** → **F249d5**), obtidas da **F249d** do fungo endofítico *Xylaria* sp. (249), a 1000 µg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

O resultado deste ensaio demonstra que somente a fração **F249d1** apresentou-se ativa, inibindo em 66,73% o crescimento micelial do fitopatógeno. Esta foi então submetida a uma terceira separação em coluna de gel Sephadex[®] LH-20 e fase móvel com eluição isocrática de metanol. Desta obtiveram-se cinco frações (**F249d1a** → **F249d1e**), reunidas após observação de similaridade química por CCD, que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 41).

Figura 41 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações (**F249d1a** → **F249d1e**), obtidas da **F249d1** do fungo endofítico *Xylaria* sp.(249), a 1000 µg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

Dentre as cinco frações avaliadas, a **F249d1b** apresentou atividade (57,31%) e pela análise química em CCD foi verificada a presença de poucos compostos. Sendo assim, esta fração foi submetida à purificação por CLAE em fase reversa, e o cromatograma obtido pode ser visualizado na figura 42, a seguir.

Figura 42 - Cromatograma da fração **F249d1b**

Condições de análise: coluna Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (dimensões 250 x 4,6 mm; 5 µm) eluída em modo gradiente com H₂O/MeOH 80:20, por 25 minutos, com vazão de 1 mL min⁻¹. Monitoramento em λ 254 nm

Os compostos presentes na fração **F249d1b** absorveram em todos os comprimentos de onda inspecionados (228, 254, 275 e 365 nm), sendo que a absorção máxima foi observada no λ 254 nm. Baseando-se nesta informação, foram coletados os intervalos conforme sinalização na figura acima (de 1 → 4), obtendo-se quatro frações que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 43).

Figura 43 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações (**F249d1b1** → **F249d1b4**), obtidas da **F249d1b** do fungo endofítico *Xylaria* sp. (249), a 500 µg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

A fração **F249d1b4**, referente ao composto no tempo de retenção em 11,22 minutos, apresentou 51,33% de inibição ao crescimento micelial do fitopatógeno. Observa-se ainda que a atividade se manteve semelhante ao extrato inicial, mesmo após algumas separações.

Esta fração foi isolada e então submetida à análise por CLAE com detectores de ultravioleta (UV) e espectrômetro de massas de baixa resolução (EM). O cromatograma obtido pelo CLAE e o espectro de UV podem ser verificados nas figuras 44 e 45 a seguir.

Figura 44 - Cromatograma da fração **F249d1b4**

Condições de análise: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (dimensões 50 x 2,1 mm; 3,5 µm) eluída em modo gradiente com H₂O/MeOH/MeCN 90:5:5 por 20 minutos, com vazão de 0,5 mL min⁻¹

Figura 45 - Espectro de absorção do UV da fração **F249d1b4**

No cromatograma foi possível observar que a fração **F249d1b4** apresentava bom grau de pureza, com tempo de retenção de 7,70 minutos. No espectro de absorção na região do UV foi possível observar uma banda de absorção intensa em 227,2 nm, demonstrando que provavelmente este composto apresenta poucos cromóforos, ou seja, insaturações e/ou anéis aromáticos em sua estrutura química.

Segundo Silverstein, Webster e Kiemle (2005) bandas com absorção de 227-228 nm são características de compostos aromáticos com anel de cinco átomos substituídos. Se este anel for um furano com um grupo carboxaldeído (CHO) na posição 2 do anel o $UV_{máx.}$ será de 227 nm, e se o anel for um pirrol com um ácido carboxílico (CO_2H) na posição 2 do anel o $UV_{máx.}$ será de 228 nm.

O espectro de massa de baixa resolução desta amostra foi obtido nos modos positivo (figura 46) e negativo (figura 47).

Figura 46 - Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo da fração **F249d1b4**

Figura 47 - Espectro de massas de baixa resolução em modo negativo da fração **F249d1b4**

Os espectros de massas de baixa resolução apresentaram vários sinais de íon molecular. Analisando estes espectros foi possível observar quatro sinais mais intensos em m/z 151, 169, 197 e 237 e três menos intensos em m/z 341, 451 e 681 no modo positivo e dois picos em m/z 169 e 213 no modo negativo, sendo o segundo o mais intenso. Estes dados sugerem que o íon em m/z 213 $[M-H]^-$ seria a massa do composto desprotonada, o íon em m/z 237 seria o aduto de sódio $[M+Na]^+$, o íon em m/z 169 seria referente a perda de um grupo carboxila $[M-COOH]^+$ e o íon em m/z 451 seria o dímero aduto de sódio $[2M+Na]^+$.

Utilizando-se destas informações, foi realizada uma busca no DNP, onde foi possível verificar que para o valor de massa molar de 214 Da, utilizando-se a palavra chave “fungo” como fonte biológica, foi compatível com seis compostos, sendo que somente um apresenta grupo carboxila, o comuniol B, de fórmula molecular $C_{11}H_{18}O_4$ – CAS nº 785794-18-5 (**33**).

Em uma segunda busca, alternando-se a palavra chave para “*Xylaria*” como fonte biológica, o valor de massa molar de 214 Da foi compatível com dois compostos, sendo que somente um apresenta grupo carboxila, o 2-hexilideno-3-ácido metil succínico (sinônimo: ácido pilifórmico), também de fórmula molecular $C_{11}H_{18}O_4$ – CAS nº 98985-75-2 (34).

Diante da possibilidade de ser dois compostos conhecidos ou eventualmente outros compostos, a fração foi submetida à análise por Espectrometria de massas de alta resolução e simultaneamente por Ressonância Magnética Nuclear de 1H (RMN- 1H), para realizar a identificação química do composto ativo de forma inequívoca.

O espectro de massas de alta resolução da fração **F249d1b4** é apresentado na figura 48 abaixo.

Figura 48 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração **F249d1b4**

No espectro de massas de alta resolução observou-se o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 215,126, o íon aduto de sódio $[M+Na]^+$ em m/z 237,110 (figura 48A) e o íon referente ao dímero aduto de sódio $[2M+Na]^+$ em m/z 451,230 (figura 48B), corroborando com os dados obtidos pelo espectro de massas de baixa resolução e fornecendo a massa exata calculada do composto em 214,118 Da. Neste espectro também foi observado que o composto apresenta pelo menos dois grupos carboxila (COOH) em sua estrutura, devido a observação dos íons em m/z 169,121 e 123,116, referentes a perda de 45 e 90 Da, respectivamente, a partir do íon molecular.

Tanto o composto **(33)** quanto o **(34)** apresentam massa exata de 214,120 Da, porém o **(33)** apresenta apenas um grupo carboxila em sua estrutura e o **(34)** dois grupos carboxila, condizendo com o composto **F249d1b4**.

No espectro de RMN 1H (anexo 3) foi possível obter dados sobre os deslocamentos de hidrogênios do composto **F249d1b4**, e, em comparação com a literatura, foi possível correlacioná-lo estruturalmente com o composto **(34)**. Os resultados podem ser visualizados na tabela 5.

Tabela 5 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) do composto **F249d1b4** e do ácido pilifórmico, ambos em CDCl_3

	F249d1b4	ácido pilifórmico (Mangaleswaran e Argade, 2000)
Tipo de H	δ_{H}, (multiplicidade, <i>J</i> e integração)	δ_{H}, (multiplicidade, <i>J</i> e integração)
CH_3	0,92 (t, 5,9 Hz, 3H)	0,90 (t, 6 Hz, 3H)
$(\text{CH}_2)_2$ e CH_3	1,14-1,45 (m, 7H)	1,15-1,47 (m, 7H)
CH_2	1,45-1,65 (m, 2H)	1,47-1,65 (m, 2H)
CH_2	2,03-2,36 (m, 2H)	2,05-2,40 (m, 2H)
CH	3,59 (q, 6,9 Hz, 1H)	3,58 (q, 8 Hz, 1H)
CH	7,02 (t, 7,2 Hz, 1H)	7,03 (t, 8 Hz, 1H)
$(\text{COOH})_2$	-	11-12,50 (sl, 2H)

* t: tripleto, m: multipeto, sl: singleto largo, q: quadrupeto

J=constante de acoplamento

Analisando o espectro de RMN ^1H , foi possível atribuir o tripleto com valor de deslocamento em δ 0,90 a metila terminal, os multipetos com valores de deslocamento em δ 1,14-1,45; δ 1,45-1,65; δ 2,03-2,36 aos 11 hidrogênios da cadeia lateral hexilideno - $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ e o quadrupeto com valor de deslocamento em δ 3,59 e o tripleto com valor de deslocamento em δ 7,02 aos dois grupos metinos da molécula. O singleto largo com valor de deslocamento em δ 11-12,50 correspondente aos hidrogênios dos grupos carboxila e observado por Mangaleswaran e Argade (2000), não pôde ser observado no espectro adquirido.

Segundo Pavia et al. (2010), o hidrogênio de ácido carboxílico é desblindado pelo oxigênio e considerado altamente ácido. Seu sinal no espectro de RMN ^1H é um pico largo e muito característico. Contudo, ligações de hidrogênio e trocas podem fazer o pico se alargar (tornar-se muito largo na base do pico) e mostrar uma intensidade muito pequena ou desaparecer na linha de base. Nesse caso, o próton ácido poderá não ser observado.

Conforme descrito por Anderson, Edwards e Whalley (1985), os valores de deslocamento químico para o hidrogênio olefínico em aproximadamente δ 6,8 corresponde a forma *E* e em aproximadamente δ 6,2 corresponde a forma *Z*. Portanto, o composto **F249d1b4** corresponde a forma *E* do ácido pilifórmico, pois apresentou δ 7,02.

Os valores de deslocamento químico, multiplicidade, constante de acoplamento e integração foram compatíveis, e, portanto, não foi necessária a aquisição de espectros adicionais. Sendo assim, foi possível confirmar que o composto ativo **F249d1b4** refere-se ao composto conhecido ácido pilifórmico (**34**), pela comparação de dados com Mangaleswaran e Argade (2000).

O fluxograma a seguir sumariza o trabalho de isolamento químico do extrato do endófito *Xylaria* sp. (249) (figura 49).

Figura 49 - Fluxograma do estudo químico do fungo endofítico *Xylaria* sp. (249)

m: massa da fração; B: porcentagem de inibição no bioensaio

*condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil (Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ de dimensões 250 x 4,6 mm), em modo gradiente de H₂O/MeOH 80:20, vazão de 1 mL min⁻¹ e λ 228, 254, 275 e 365 nm

O ácido pilifórmico ou ácido 2-hexilideno-3-metilsuccínico foi identificado por Anderson, Edwards e Whalley (1985) como um metabólito produzido por fungos da família Xylariaceae: *Hypoxylon* (*H. deustum*), *Poronia* (*P. piliformis*) e *Xylaria* (*X. polymorpha*, *X. longipes*, *X. Mali* e *X. hypoxylon*). Segundo Magaleswaram et al. (2000), este composto é comum de fungos endofíticos pertencentes à família Xylariaceae, em especial aos do gênero *Xylaria*.

Poucas atividades biológicas já foram relatadas na literatura para o ácido pilifórmico, dentre elas está moderada citotoxicidade contra células cancerígenas KB e BC-1 (CHINWORRUNGSEE et al., 2001) e atividade antifúngica a leveduras dos gêneros *Nadsonia*, *Nematospora*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces* a uma concentração >100 µg mL⁻¹, em ensaio realizado através do método de difusão em disco (SCHNEIDER; ANKE; STERNER, 1996).

O composto ácido pilifórmico (**F249d1b4**) foi submetido ao ensaio final pelo método de difusão em disco e avaliado contra os três fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*, em comparação com o fungicida comercial difenoconazol.

Os resultados obtidos neste ensaio nos mostraram que a concentração de 300 µg disco⁻¹ inibiu em 47,09% o crescimento micelial do fitopatógeno *C. acutatum* do pimentão, demonstrando que a CI₅₀ estaria em uma faixa próxima dessa concentração. O restante das respostas foram todas negativas, para os três fitopatógenos testados.

Baseando-se no resultado apresentado na figura 43, em que o composto **F249d1b4** inibiu em 51,33% o crescimento micelial do fitopatógeno *C. gloeosporioides* do guaranazeiro em uma concentração de 500 µg disco⁻¹, pode-se inferir que, pelo menos no caso deste fitopatógeno, a CI₅₀ é de 500 µg disco⁻¹.

Em conclusão, no estudo biológico e químico do fungo endofítico *Xylaria* sp. (249), foi isolado o composto ativo ácido pilifórmico. Apesar de este composto ser conhecido, a atividade antifúngica ao fitopatógeno *C. gloeosporioides* apresentada neste trabalho está sendo relatada pela primeira vez.

5.4.4 Estudo biológico e químico do extrato do fungo endofítico *T. aculeatus* (507)

O endófito *T. aculeatus* (código **507**) foi isolado de uma folha de guaranazeiro de Manaus/AM, com aparência sadia. Este foi identificado morfológicamente através da observação de conidióforo típico de *Talaromyces* (figura 50). A partir desta informação foi realizada a identificação molecular, amplificando o gene que codifica a beta-tubulina, região muito utilizada para a distinção de espécies de fungos deste gênero.

Figura 50 - Endófito *T. aculeatus* (507) em placa de Petri (à esquerda) e observação em microscópio óptico de um conidióforo típico de *Talaromyces* (à direita)

Por ter apresentado destacada atividade no ensaio por cultivo pareado e no ensaio “in vitro” de atividade antifúngica com o extrato bruto (90,4%) a *C. gloeosporioides*, esta linhagem foi selecionada para um estudo químico.

A linhagem foi cultivada em meio de cultura líquido e o extrato bruto gerado (segundo descrito no item 4.3) foi submetido a uma partição líquido-líquido, obtendo-se duas frações (aquosa e acetato de etila) que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 51).

Figura 51 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações aquosa e AcOEt (**F507**), obtidas do extrato bruto do fungo endofítico *T. aculeatus* (507), a 2000 µg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

Conforme pode ser verificado neste ensaio, a fração aquosa não se mostrou ativa, provavelmente por conter apenas nutrientes de composição do meio de cultura, e eventualmente compostos polares não ativos. Já a fração acetato de etila mostrou-se ativa, inibindo em 88,31% o crescimento micelial do fitopatógeno.

Com isso, a fração acetato de etila (**F507**) foi submetida à separação cromatográfica em coluna pré-empacotada do tipo Sep-Pak com fase estacionária de sílica e fase móvel em gradiente (diclorometano e metanol). Desta obtiveram-se cinco frações (**F507a** → **F507e**), reunidas após observação de similaridade química por CCD, que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 52).

Figura 52 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações (**F507a** → **F507e**), obtidas da **F507** do fungo endofítico *T. aculeatus* (507), a 1000 µg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

O resultado deste ensaio mostra que somente a fração **F507a** apresentou-se ativa, inibindo em 86,08% o crescimento micelial do fitopatógeno. Esta foi então submetida a uma segunda separação cromatográfica em coluna pré-empacotada do tipo Sep-Pak com fase estacionária de sílica e fase móvel em gradiente (diclorometano, acetato de etila e metanol). Desta obtiveram-se quatro frações (**F507a1** → **F507a4**), reunidas após observação de similaridade química por CCD, que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 53).

Figura 53 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações (**F507a1** → **F507a4**), obtidas da **F507a** do fungo endofítico *T. aculeatus* (507), a 1000 µg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

O resultado deste ensaio demonstra que somente a fração **F507a3** apresentou-se ativa, inibindo em 70,3% o crescimento micelial do fitopatógeno. Esta foi então submetida a uma terceira separação em coluna pré-empacotada do tipo Sep-Pak com fase estacionária de sílica e fase móvel em gradiente (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol). Desta obtiveram-se cinco frações (**F507a3a** → **F507a3e**), reunidas após observação de similaridade química por CCD, que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 54).

Figura 54 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações (**F507a3a** → **F507a3e**), obtidas da **F507a3** do fungo endofítico *T. aculeatus* (507), a 1000 µg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

Dentre as cinco frações avaliadas, as frações **F507a3a** e **F507a3c** apresentaram atividade (20,73% e 53,52%, respectivamente) e pela análise em CCD foi verificada a presença de poucos compostos. Sendo assim, estas frações foram submetidas à purificação por CLAE em fase reversa.

5.4.4.1 Purificação da fração F507a3a

O cromatograma da fração **F507a3a** pode ser visualizado na figura 55, a seguir.

Figura 55 - Cromatograma da fração **F507a3a**

Condições de análise: coluna Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (dimensões 250 x 4,6 mm; 5 µm) eluída em modo gradiente com H₂O/MeOH/MeCN 90:5:5, por 30 minutos, com vazão de 1 mL min⁻¹. Monitoramento em λ 254 nm

Os compostos presentes na fração **F507a3a** foram inspecionados nos comprimentos de onda de 254, 275 e 365 nm e só absorveram nos dois primeiros, sendo que a absorção máxima foi observada no λ 254 nm. Baseando-se nesta informação, foram coletados os intervalos conforme sinalização na figura acima (de 1 → 4), obtendo-se quatro frações que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 56).

Figura 56 - Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* realizado com as frações (**F507a3a1** → **F507a3a4**), obtidas da **F507a3a** do fungo endofítico *T. aculeatus* (507), a 500 µg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

A fração **F507a3a3**, referente ao composto no tempo de retenção em 13,80 minutos, apresentou 20,09% de inibição ao crescimento micelial do fitopatógeno.

Se compararmos esta atividade com a do ensaio realizado com a fração **F507a3a**, é possível verificar que ela se manteve após a purificação.

Esta fração foi isolada e então submetida à análise por CLAE com detectores de ultravioleta (UV) e espectrômetro de massas de baixa resolução (EM), assim como as frações **F507a3a1** e **F507a3a2**, que mesmo não apresentando atividade inibitória ao fitopatógeno, se mostraram puras pela análise em CLAE e muito próximas da **F507a3a3**, ativa. Os cromatogramas obtidos pela CLAE e os espectros de UV podem ser observados nas figuras 57 e 58 a seguir.

Figura 57 - Cromatograma das frações **F507a3a1 (A)**, **F507a3a2 (B)** e **F507a3a3 (C)**
Condições de análise: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (dimensões 50 x 2,1 mm; 3,5 µm) eluída em modo gradiente com H₂O/MeOH/MeCN 90:5:5, por 20 minutos, com vazão de 0,5 mL min⁻¹

Figura 58 - Espectro de absorção do UV das frações **F507a3a1** (A), **F507a3a2** (B) e **F507a3a3** (C)

No cromatograma foi possível observar que as frações **F507a3a1**, **F507a3a2** e **F507a3a3** apresentavam bom grau de pureza, com tempos de retenção de 9,68; 10,09 e 10,50 minutos, respectivamente. No espectro de absorção na região do UV foi possível observar uma banda de absorção mais intensa em torno de 230 nm, e uma banda de absorção menos intensa em 274,4 nm, nos três casos, demonstrando que provavelmente este composto apresenta cromóforos, ou seja, insaturações e/ou anéis aromáticos em sua estrutura química.

Os espectros de massas de baixa resolução destas amostras foram obtidos nos modos positivo (figura 59) e negativo.

Figura 59 - Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo das frações **F507a3a1** (A), **F507a3a2** (B) e **F507a3a3** (C)

Nos espectros de massas de baixa resolução, obtidos no modo positivo, foi possível observar que os três compostos apresentaram como sinal mais intenso o íon em m/z 149.

Para o composto **F507a3a1**, o espectro de massas de baixa resolução, obtido no modo positivo, apresentou vários sinais de íon molecular. Analisando o espectro foi possível observar um sinal intenso em m/z 301 e outro menos intenso em m/z 279. Esta diferença de 22 Da sugere que o segundo seria a massa do composto protonada $[M+H]^+$ e o primeiro seria o íon aduto de sódio $[M+Na]^+$, ou seja, o composto avaliado apresenta massa molar de 278 Da. Foi observado também o dímero aduto de sódio $[2M+Na]^+$ em m/z 579.

No caso do composto **F507a3a2**, o espectro de massas de baixa resolução, obtido no modo positivo, apresentou padrão semelhante ao composto **F507a3a1**, com um sinal intenso em m/z 315 e outro menos intenso em m/z 293 (ambos com acréscimo de 14 Da em relação ao composto anterior), sugerindo que o segundo seria a massa do composto protonada $[M+H]^+$ e o primeiro seria o íon aduto de sódio $[M+Na]^+$, ou seja, o composto avaliado apresenta massa molar de 292 Da. Foi observado também o dímero aduto de sódio $[2M+Na]^+$ em m/z 607.

E para o composto **F507a3a3**, o espectro de massas de baixa resolução, obtido no modo positivo, apresentou padrão semelhante aos compostos **F507a3a1** e **F507a3a2**, com um sinal intenso em m/z 329 e outro menos intenso em m/z 307 (ambos com acréscimo de 14 Da em relação ao composto **F507a3a2** e 28 Da em relação ao composto **F507a3a1**), sugerindo que o segundo seria a massa do composto protonada $[M+H]^+$ e o primeiro seria o íon aduto de sódio $[M+Na]^+$, ou seja, o composto avaliado apresenta massa molar de 306 Da. Foi observado também o dímero aduto de sódio $[2M+Na]^+$ em m/z 635.

Os espectros de massas de baixa resolução obtidos no modo negativo apresentaram muitos sinais de ruído, não sendo conclusivos. Em contrapartida, pelos espectros obtidos no modo positivo, foi possível verificar que os três compostos seguem um padrão, sugerindo que possam pertencer a mesma classe de compostos químicos.

Utilizando-se destas informações, foi realizada uma busca no DNP, onde foi possível verificar que para o valor de massa molar de 278 Da (**F507a3a1**), utilizando-se a palavra chave “fungo” como fonte biológica, foi compatível com um composto, e, em uma segunda busca, alternando-se a palavra chave para “*Talaromyces/Penicillium*” como fonte biológica, o valor de massa molar de 278 Da foi compatível com 13 compostos. No caso do valor de massa molar 292 Da (**F507a3a2**), utilizando-se a palavra chave “fungo” como fonte biológica, foi compatível com 13 compostos e, em uma segunda busca, alternando-se a palavra chave para “*Talaromyces/Penicillium*” como fonte biológica, foi compatível com oito

compostos. E para o valor de massa molar de 306 Da (**F507a3a3**), utilizando-se a palavra chave “fungo” como fonte biológica, foi compatível com dois compostos, e, em uma segunda busca, alternando-se a palavra chave para “*Talaromyces/Penicillium*” como fonte biológica, foi compatível com 15 compostos.

Diante da possibilidade de serem muitos compostos conhecidos ou eventualmente outros compostos, as frações foram submetidas à análise por espectrometria de massas de alta resolução e simultaneamente por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN- ^1H), para realizar a identificação química dos compostos de forma inequívoca.

Os espectros de massas de alta resolução das frações **F507a3a1**, **F507a3a2** e **F507a3a3** são apresentados na figura 60 abaixo.

Figura 60 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo das frações **F507a3a1** (A), **F507a3a2** (B) e **F507a3a3** (C)

Para o composto **F507a3a1**, observou-se no espectro de massas de alta resolução o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 279,159 e os íons $[M+Na]^+$ em m/z 301,142 e $[2M+Na]^+$ em m/z 579,294, corroborando com os dados obtidos pelo espectro de massas de baixa resolução e fornecendo a massa exata calculada do composto em 278,151 Da. Para o composto **F507a3a2**, observou-se os íons $[M+Na]^+$ em m/z 315,158 e $[2M+Na]^+$ em m/z 607,326, corroborando com os dados obtidos pelo espectro de massas de baixa resolução e fornecendo a massa exata calculada do composto em 292,167 Da. E para o composto **F507a3a3**, observou-se o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 307,190 e os íons $[M+Na]^+$ em m/z 329,173 e $[2M+Na]^+$ em m/z 635,357, corroborando com os dados obtidos pelo espectro de massas de baixa resolução e fornecendo a massa exata calculada do composto em 306,182 Da.

Em nova busca no DNP, utilizando-se os valores de massa exata, foi possível verificar que o valor de massa molar de 278,151 Da, referente ao composto **F507a3a1**, utilizando-se as mesmas palavras chave da pesquisa anterior, foram compatíveis com quatro compostos: pestaloficiol F – CAS nº 1174415-52-1 (**35**), ácido 1,2-benzenodicarboxílico; dibutil éster – CAS nº 84-74-2 (**36**), penicitrinol D – CAS nº 1401306-04-4 (**37**) e brefeldin A – CAS nº 62989-90-6 (**38**), todos de fórmula molecular $C_{16}H_{22}O_4$ e com massa exata de 278,151 Da.

(35) **(36)** **(37)** **(38)**

Diante da possibilidade de serem quatro compostos conhecidos ou eventualmente outros compostos, pelo espectro de RMN 1H (anexo 4) foi possível obter dados sobre os deslocamentos de hidrogênio do composto **F507a3a1**, e, em comparação com a literatura não

foi possível correlacioná-lo com nenhum dos quatro compostos listados acima, mas foi possível correlacioná-lo com um composto da mesma classe do (36), o ácido 1,2-benzenodicarboxílico, bis(2-metilpropil) éster (39).

Para o composto **F507a3a2**, em nova busca no DNP, utilizando-se o valor de massa exata (292,167 Da) e as mesmas palavras chave da pesquisa anterior, foram compatíveis com dois compostos: guignardone D – CAS nº 1448337-80-1 (40) e 3,6-dihidroxi-7(11),9-eremofiladieno-8-ona – CAS nº 1119834-67-1 (41), ambos de fórmula molecular $C_{17}H_{24}O_4$ e com massa exata de 292,167 Da.

Diante da possibilidade de serem dois compostos conhecidos ou eventualmente outros compostos, pelo espectro de RMN 1H (anexo 5) foi possível obter dados sobre os deslocamentos de hidrogênio do composto **F507a3a2**, e, em comparação com a literatura não foi possível correlacioná-lo com nenhum dos dois compostos listados acima. Em busca no banco de dados “SciFinder”, modificando a estrutura do composto (39) (**F507a3a1**), com a inserção de um grupo metil na cadeia (14 Da), foi possível atribuir o composto **F507a3a2** ao composto já conhecido ácido 1,2-benzenodicarboxílico, 1-butil 2-(3-metilbutil) éster (42).

Para o composto **F507a3a3**, em nova busca no DNP, utilizando-se o valor de massa exata (306,182 Da) e as mesmas palavras chave da pesquisa anterior, foram compatíveis com um composto: deacilcompactina – CAS nº 58889-19-3 (**43**), de fórmula molecular $C_{18}H_{26}O_4$ e com massa exata de 306,183 Da.

Diante da possibilidade de ser este composto conhecido (**43**) ou eventualmente outros compostos, pelo espectro de RMN 1H (anexo 6) foi possível obter dados sobre os deslocamentos de hidrogênio do composto **F507a3a3**, e, em comparação com a literatura não foi possível correlacioná-lo com o composto acima. Em busca no banco de dados “SciFinder”, modificando a estrutura do composto (**42**) (**F507a3a2**), com a inserção de um grupo metil na cadeia (14 Da), foi possível atribuir o composto **F507a3a3** ao composto já conhecido ácido 1, 2-benzenodicarboxílico, bis(3-metilbutil) éster (**44**).

A seguir é apresentada uma tabela mostrando os dados obtidos do RMN 1H (deslocamento de hidrogênio, multiplicidade, acoplamento e integração) para compostos **F507a3a1**, **F507a3a2** e **F507a3a3**.

Tabela 6 - Dados de RMN ^1H (600 MHz) dos compostos **F507a3a1**, **F507a3a2** e **F507a3a3**, ambos em CDCl_3

	507a3a1	507a3a2	507a3a3
δ_{H}	multiplicidade, J e integração		
7,75	m (2H)	m (2H)	m (2H)
7,56	m (2H)	m (2H)	m (2H)
4,36	-	t - 7,04 Hz (2H)	t - 7,04 Hz (4H)
4,12	d - 6,75 Hz (4H)	d - 6,75 Hz (2H)	-
2,06	m (1H)	m (1H)	-
1,78	-	q - 6,75Hz (1H)	q - 6,75Hz (1H)
1,64	-	dd - 7,04 e 13,79 Hz (2H)	dd- 6,75 e 13,79 Hz (4H)
1,02	d - 6,46 Hz (12H)	d - 6,75 Hz (7H)	d - 6,75 Hz (2H)
0,98	d - 6,75 Hz (1H)	d - 6,75 Hz (5H)	d - 6,46 Hz (11H)

*d: dubleto, m: multiplete, t: tripleto, q: quadrupeto, dd: duplo dubleto
 J =constante de acoplamento

Os sinais com valores de deslocamento em δ 0,98 (d), 1,02 (d), 7,56 (d) e 7,75 (d) são comuns para os três compostos e correspondem aos hidrogênios das metilas (δ 0,98 e 1,02) e aos hidrogênios do anel aromático (δ 7,56 e 7,75). Os sinais com valores de deslocamento em δ 4,12 (d) e 2,06 (m) são comuns apenas para os compostos **F507a3a1** e **F507a3a2**, e referem-se aos metilenos e metinos. Os sinais com valores e deslocamento em δ 4,36 (t), 1,78 (q) e 1,64 (dd) são comuns apenas para os compostos **F507a3a2** e **F507a3a3**, e referem-se também aos metilenos e metinos. Através da integração foi possível observar que os compostos possuem 22, 24 e 26 hidrogênios respectivamente, corroborando com as fórmulas moleculares de $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$, $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_4$ e $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_4$.

Os valores de deslocamento químico, multiplicidade, constante de acoplamento e integração foram compatíveis com os descritos na literatura por Saeed et al. (2007), Mabrouk et al. (2008), Lucas et al. (2008) e Wang et al. (2012), e, portanto, não foi necessária a aquisição de espectros adicionais. Sendo assim, foi possível confirmar que o composto **F507a3a1** refere-se ao composto conhecido ácido 1,2-benzenodicarboxílico, bis(2-metilpropil) éster (**38**), o **F507a3a2** ao composto conhecido 1,2-benzenodicarboxílico, 1-butil 2-(3-metilbutil) éster (**41**) e o **F507a3a3** ao composto conhecido 1,2-benzenodicarboxílico, bis(3-metilbutil) éster (**43**).

Através dos resultados apresentados foi possível verificar que os três compostos apresentam perfis semelhantes tanto nos espectros de RMN ^1H quanto nos espectros de massas, além de estruturas químicas semelhantes, demonstrando que todos são realmente da mesma classe de compostos, os ésteres ftálicos (**45**).

Os ésteres ftálicos são resultado da condensação do ácido 1,2-benzenodicarboxílico com cadeia de alcoóis compreendendo de 2 a 8 átomos de carbono. Este grupo de compostos pode ser encontrado, por exemplo, em adesivos, cosméticos e pesticidas (SAILLENFAIT; LAUDET, 2005) e são amplamente utilizados como plastificantes para aumentar a flexibilidade e trabalhabilidade de polímeros de alto peso molecular.

A liberação dos ésteres ftálicos no ambiente pode ocorrer durante a produção, distribuição e eliminação de resíduos dos produtos que o utilizam como componente, e devido à sua baixa solubilidade na água eles podem se adsorver aos sedimentos do solo e aos sólidos em suspensão nos rios. Apesar dos ftalatos apresentarem baixa toxicidade aguda, eles são classificados como poluentes, uma vez que podem causar distúrbios endócrinos (CHAO et al., 2006).

Apesar de serem conhecidos por atuar no sistema endócrino, outras atividades biológicas já foram relatadas para os ésteres ftálicos, tais como antibacteriana, antifúngica (HABIB; KARIM, 2009; ROY; LASKAR; SEN, 2006) e citotóxica (HABIB; KARIM, 2009). A produção sintética dos ésteres ftálicos é amplamente conhecida. Porém, alguns estudos relatam que organismos vivos também possuem a capacidade de produzir estes compostos, tais como as actinobactérias do gênero *Streptomyces*: *S. albidoflavus* (ROY et al., 2006), *S. nasri* (EL-NAGGAR, 1997) e *S. melanosporofaciens* (LEE, 2000), os fungos do gênero *Penicillium*: *P. bilaii* (SAVARD et al., 1994), *P. olsonii* (AMADE; MALLEA; BOUAICHA, 1994) e *Penicillium* sp. (MUHARNI et al., 2014), as plantas *Calotropis gigantea* (HABIB; KARIM, 2009) e *Pterocarpus angolensis* (SAMIE et al., 2009), dentre outros.

O estudo de Frisvad et al. (2004) apresenta uma revisão de metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Penicillium* e suas respectivas atividades biológicas, e, dentre estes, se encontram diversos ésteres ftálicos.

Alguns autores relatam que utilizaram materiais contendo plástico e que o isolamento dos ésteres ftálicos pode ter ocorrido através da contaminação da amostra com estes materiais. Em contrapartida, outros autores relataram que em nenhum momento do isolamento dos

compostos utilizaram materiais plásticos e que, portanto, os ésteres ftálicos foram produzidos por organismos vivos.

No caso do presente estudo, as amostras tiveram contato apenas com ponteiros de material plástico, e, portanto, os ésteres ftálicos sob os códigos **F507a3a1**, **F507a3a2** e **F507a3a3** podem ter sido isolados tanto de materiais quanto dos metabólitos produzidos pelo endófito *T. aculeatus* (507).

A fração **F507a3a** foi submetida ao ensaio final pelo método de difusão em disco e avaliada contra os três fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*, em comparação com o fungicida comercial difenoconazol. A fração **F507a3a** é antecessora as frações **F507a3a1**, **F507a3a2** e **F507a3a3**, e foi testada devido a pouca massa obtida destes três compostos.

Os resultados obtidos neste ensaio nos mostraram que as respostas foram todas negativas, para os três fitopatógenos testados. Baseando-se no resultado apresentado na figura 56, em que o composto **F507a3a3** inibiu em 20,09% o crescimento micelial do fitopatógeno *C. gloeosporioides* do guaranazeiro em uma concentração de 500 $\mu\text{g disco}^{-1}$, pode-se inferir que, pelo menos no caso deste fitopatógeno, a CI_{50} estaria em uma faixa $>500 \mu\text{g disco}^{-1}$.

Em conclusão, no estudo biológico e químico da fração **F507a3a** do fungo endofítico *T. aculeatus* (507), foi isolado o composto ativo ácido 1,2-benzenodicarboxílico, bis (3-metilbutil) éster. Apesar de este composto ser conhecido, a atividade antifúngica ao fitopatógeno *C. gloeosporioides* apresentada neste trabalho está sendo relatada pela primeira vez.

5.4.4.2 Purificação da fração F507a3c

O cromatograma da fração **F507a3c** pode ser visualizado na figura 61, a seguir.

Figura 61 - Cromatograma da fração **F507a3c**

Condições de análise: coluna Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (dimensões 250 x 4,6 mm; 5 μm) eluída em modo isocrático com H₂O/MeOH 60:40, por 20 minutos, com vazão de 1 mL min⁻¹. Monitoramento em λ 254 nm

Os compostos presentes na fração **F507a3c** absorveram em todos os comprimentos de onda inspecionados (254, 275 e 365 nm), sendo que a absorção máxima foi observada no λ 254 nm. Baseando-se nesta informação, foram coletados os intervalos conforme sinalização na figura acima (de 1 $\rightarrow$ 7), obtendo-se sete frações que foram avaliadas em ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* (figura 62).

Figura 62 – Ensaio “in vitro” de atividade antifúngica a *C.gloeosporioides* realizado com as frações (**F507a3c1** $\rightarrow$ **F507a3c7**), obtidas da **F507a3c** do fungo endofítico *T. aculeatus* (507), a 500 μg disco⁻¹
Controle: fungo fitopatogênico *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro

As frações **F507a3c3** e **F507a3c5**, referentes aos compostos nos tempos de retenção em 6,08 minutos e 7,86 minutos, apresentaram 23,31% e 60,22% de inibição ao crescimento micelial do fitopatógeno.

Se compararmos estas atividades com a dos primeiros ensaios, é possível verificar que ela diminuiu conforme o composto ativo **F507a3c3** ia sendo purificado e se manteve conforme o composto ativo **F507a3c5** ia sendo purificado, indicando que as altas porcentagens de inibição apresentadas nos primeiros ensaios provavelmente ocorreram devido à presença do composto **F507a3c5**.

Estas frações foram então isoladas e então submetidas à análise por CLAE com detectores de ultravioleta (UV) e espectrômetro de massas de baixa resolução (EM).

5.4.4.2.1 Fração F507a3c3

O cromatograma obtido pela CLAE e o espectro de UV referentes à fração **F507a3c3** podem ser verificados nas figuras 63 e 64 a seguir.

Figura 63 - Cromatograma da fração **F507a3c3**
Condições de análise: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (dimensões 50 x 2,1 mm; 3,5 μm) eluída em modo gradiente com H₂O/MeOH/MeCN 90:5:5, por 20 minutos, com vazão de 0,5 mL min⁻¹

Figura 64 - Espectro de absorção do UV da fração **F507a3c3**

No cromatograma foi possível observar que a fração **F507a3c3** apresentava bom grau de pureza, com tempo de retenção de 6,48 minutos. No espectro de absorção na região do UV foi possível observar uma banda de absorção intensa em 253,1 nm, demonstrando que provavelmente este composto apresenta poucos cromóforos, ou seja, insaturações e/ou anéis aromáticos em sua estrutura química.

O espectro de massas de baixa resolução desta amostra foi obtido nos modos positivo (figura 65) e negativo (figura 66).

Figura 65 - Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo da fração **F507a3c3**

Figura 66 - Espectro de massas de baixa resolução em modo negativo da fração **F507a3c3**

Os espectros de massas de baixa resolução apresentaram vários sinais de íon molecular. Analisando os espectros foi possível observar correlações entre eles, tais como os íons em m/z 213 no modo positivo e m/z 211 no modo negativo e m/z 447 no modo positivo e m/z 445 no modo negativo, sugerindo que o íon em m/z 447 seria a massa do composto protonada $[M+H]^+$ e o íon em m/z 445 seria a massa do composto desprotonada $[M-H]^-$. Os íons em m/z 213 e 235 seriam os dois fragmentos principais do íon molecular em m/z 447.

Também foi possível observar duas perdas de 18 Da, do íon em m/z 213 para o íon em m/z 195 e deste para o íon em m/z 177, inferindo que existem pelo menos dois grupos hidroxila (OH) nesta molécula e padrão isotópico de cloro (figura 67).

Figura 67 - Intensidades relativas de picos de isótopo de cloro

Quando um composto apresenta uma molécula de ^{35}Cl em sua estrutura química, o íon molecular apresenta-se com 100% de intensidade relativa e padrão isotópico com duas unidades de massa superior, referente ao seu isótopo ^{37}Cl , na intensidade relativa de 32,6%.

Quando duas moléculas de cloro fazem parte da estrutura química, o íon molecular apresenta-se com 100% de intensidade relativa e padrão isotópico com duas e quatro unidades de massa superior, com intensidades relativas de 65,3% e 10,6%, respectivamente,

Utilizando-se destas informações, foi realizada uma busca no banco de dados DNP, onde foi possível verificar que para o valor de massa molar de 446 Da, utilizando-se a palavra chave “fungo” como fonte biológica, foi compatível com dois compostos. Em uma segunda busca, alternando-se a palavra chave para “*Talaromyces/Penicillium*” como fonte biológica, o valor de massa molar de 446 Da foi compatível com sete compostos.

Destes nove compostos compatíveis, nenhum apresenta cloro em sua estrutura química e nenhum apresenta $UV_{máx.}$ de 253 nm ou próximo. Diante da possibilidade de ser um composto inédito, a fração foi submetida à análise por espectrometria de massas de alta resolução e simultaneamente por Ressonância Magnética Nuclear unidimensional de 1H e ^{13}C e bidimensional de COSY, HMBC e HSQC. O espectro de massas de alta resolução da fração **F507a3c3** é apresentado na figura 68 abaixo.

Figura 68 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração **F507a3c3**

No espectro de massas de alta resolução observou-se o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 447,197 e os íons $[M+2]^+$ em m/z 449,211 e $[M+4]^+$ em m/z 451,218 (figura 69A), evidenciando a presença de dois átomos de cloro na molécula e fornecendo a massa exata do composto em 446,189 Da. Além disso, outros dois íons apresentaram padrão isotópico de cloro: **a)** $[M+H]^+$ em m/z 213,110, $[M+2]^+$ em m/z 215,125 e $[M+4]^+$ em m/z 217,103, e **b)** $[M+H]^+$ em m/z 235,093 e $[M+2]^+$ em m/z 237,108 (figura 69B), fornecendo as massas exatas de 212,103 Da e 234,085 Da. Estes dois valores somados fornecem uma massa exata de 446,188 Da, demonstrando que provavelmente estes íons realmente representam dois fragmentos da molécula principal.

Através dos espectros de RMN 1H (anexo 7) e ^{13}C (anexo 8), foi possível obter dados sobre os deslocamentos de hidrogênio e carbono do composto **F507a3c3**. Pela análise do espectro de COSY (anexo 9) puderam ser realizadas as atribuições dos hidrogênios que acoplaram entre si. O espectro de HMBC (anexo 10) forneceu informações sobre os acoplamentos de longa distância. Já no espectro de HSQC (anexo 11) puderam ser realizadas as atribuições dos sinais de hidrogênios ligados aos seus respectivos carbonos.

No espectro de RMN 1H foi possível verificar a presença de dois grupos metila (CH_3) devido aos sinais com deslocamento em torno de 0,9 e a integração (6H). Os sinais com deslocamento em 3,5-4,0 provavelmente referem-se aos carbonos ligados a cloro, pois segundo Pavia et al. (2010) CH-Cl possui valor de deslocamento de 3,1-4,1. Os sinais com deslocamento em 5,9-6,5 provavelmente referem-se aos hidrogênios ligados a um anel. Já no espectro de RMN ^{13}C foi possível distinguir 35 sinais de carbonos, sendo apenas nove intensos e 26 na linha de base.

As correlações observadas através dos espectros de COSY, HSQC e HMBC podem ser visualizadas na tabela 7.

Tabela 7 - Dados de RMN 1H , HSQC, COSY 1H - 1H e HMBC (600 MHz) do composto **F507a3c3** em $CDCl_3$

RMN 1H	HSQC	COSY 1H - 1H	HMBC
0,9	13,9	1,36 / 1,37 / 1,66	22,4 / 27,1
1,36	27,1	0,9	-
1,37	22,4	0,9 / 1,85	27,1
1,45	27,1	1,66 / 1,85	-
1,66	35,0	1,45 / 1,85 / 4,47	-
1,85	35,0	1,37 / 1,66 / 4,47	-
2,03	35,6	2,56 / 3,67 / 4,47	44,7
2,56	35,6	2,03 / 3,67 / 4,47	44,7
3,67	44,7	2,03 / 2,56	35,6 / 125 / 131 / 168
4,47	79,0	1,66 / 1,85 / 2,03 / 2,56	168
5,93	131,2	-	44,7 / 125 / 168
5,98	131,2	-	44,7 / 125 / 168
6,53	131,9	-	44,7 / 168
6,55	131,9	-	44,7 / 168

Os dados observados na tabela 7 nos permitiu construir uma parte do composto, conforme mostra a figura 69.

Figura 69 - Estrutura química parcial do composto **F507a3c3** com esquema de correlações HSQC, COSY e HMBC

*números em vermelho indicam valores de deslocamento de hidrogênio e números em azul indicam valores de deslocamento de carbono

5.4.4.2 Fração F507a3c5

O cromatograma obtido pela CLAE e o espectro de UV referentes à fração **F507a3c5** podem ser verificados nas figuras 70 e 71 a seguir.

Figura 70 - Cromatograma da fração **F507a3c5**

Condições de análise: coluna Waters X-Terra MS-C₁₈ (dimensões 50 x 2,1 mm; 3,5 μ m) eluída em modo gradiente com H₂O/MeOH/MeCN 90:5:5, por 20 minutos, com vazão de 0,5 mL min⁻¹

Figura 71 - Espectro de absorção do UV da fração **F507a3c5**

No cromatograma foi possível observar que a fração **F507a3c5** apresentou dois compostos, com tempos de retenção 6,57 minutos e 7,43 minutos. O composto com tempo de retenção de 6,57 minutos tratava-se da fração não trabalhada (**F507a3c4**).

No espectro de absorção na região do UV do composto **F507a3c5** foi possível observar duas banda de absorção mais intensa em 221,3 e 273,2 nm e uma de absorção menos intensa em 363,7 nm, evidenciando que este composto apresenta cromóforos, ou seja, insaturações e/ou anéis aromáticos em sua estrutura química.

O espectro de massas de baixa resolução desta amostra foi obtido nos modos positivo (figura 72) e negativo (figura 73).

Figura 72 - Espectro de massas de baixa resolução em modo positivo da fração **F507a3c5**

Figura 73 - Espectro de massas de baixa resolução em modo negativo da fração **F507a3c5**

Os espectros de massas de baixa resolução apresentaram vários sinais de íon molecular. Analisando os espectros foi possível observar um sinal em m/z 351 no modo positivo e um sinal intenso em m/z 349 no modo negativo, sugerindo que o primeiro seria a massa do composto protonada $[M+H]^+$ e o segundo seria a massa do composto desprotonada $[M-H]^-$. Reforçando esta hipótese, foi observado o íon aduto de sódio $[M+Na]^+$ em m/z 373 e os dímeros aduto de sódio $[2M+Na]^+$ em m/z 723 e desprotonado $[2M-H]^-$ em m/z 699, ou seja, o composto avaliado apresenta massa molar de 350 Da.

Utilizando-se destas informações, foi realizada uma busca no banco de dados DNP, onde foi possível verificar que para o valor de massa molar de 350, utilizando-se a palavra chave “fungo” como fonte biológica, foi compatível com nove compostos. Em uma segunda busca, alternando-se a palavra chave para “*Talaromyces/Penicillium*” como fonte biológica, foi compatível com sete compostos.

Diante da possibilidade de serem compostos conhecidos ou eventualmente outros compostos, a fração foi submetida à análise por espectrometria de massas de alta resolução (figura 74).

Figura 74 - Espectro de massas de alta resolução em modo positivo da fração **F507a3c5**

No espectro de massas de alta resolução observou-se o íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 351,133 e o íon $[M+Na]^+$ em m/z 373,116, corroborando com os dados obtidos pelo espectro de massas de baixa resolução e fornecendo a massa exata calculada do composto em 350,126 Da.

Em nova busca no DNP, utilizando-se o valor da massa exata calculada, foi possível verificar que o valor de 350,126 Da, referente ao composto **F507a3c5**, utilizando-se a palavra chave “fungo” como fonte biológica, não foi atribuído a compostos e utilizando-se a palavra chave “*Talaromyces/Penicillium*” como fonte biológica, foi atribuído a apenas um composto. Porém, este composto apresenta cloro em sua composição, o que não é o caso do composto **F507a3c5**.

Para realizar a identificação química deste composto ativo de forma inequívoca será necessário obter mais massa, purificar a amostra (que contém dois compostos) e posteriormente submetê-la a análise por Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais.

A fração **F507a3c** foi submetida ao ensaio final pelo método de difusão em disco e avaliada contra os três fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*, em comparação com o fungicida comercial difenoconazol. A fração **F507a3c** é antecessora as frações **F507a3c3** e **F507a3c5**, e foi testada devido a pouca massa obtida destes dois compostos.

Os resultados obtidos neste ensaio nos mostraram que a única concentração capaz de inibir *C. gloeosporioides* do guaranazeiro e *C. gloeosporioides* do pimentão foi a de 300 µg disco⁻¹, em 33,29% e 34,82%, respectivamente. Já o *C. acutatum* do pimentão teve seu crescimento inibido nas três concentrações testadas (100, 200 e 300 µg disco⁻¹), em 40,76%, 60,21% e 67,12%, respectivamente. Estes resultados ficaram abaixo da média geral apresentada pelo fungicida comercial difenoconazol, de 86,4% (figura 75).

Figura 75 – Porcentagens de inibição apresentadas a três fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*, pelo fungicida comercial difenoconazol e pela fração **F507a3c**
 CGG: *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro, CGP: *C. gloeosporioides* isolado do pimentão e CAP: *C. acutatum* isolado do pimentão

A CI_{50} , no caso dos dois fitopatógenos *C. gloeosporioides* foi $>300 \mu\text{g disco}^{-1}$. Já no caso do *C. acutatum* a CI_{50} foi $>100 \mu\text{g disco}^{-1}$ e $<200 \mu\text{g disco}^{-1}$, demonstrando que este fitopatógeno é mais sensível aos compostos presentes na fração **F507a3c**. Além disso, o ensaio apresentado na figura 63 demonstrou que para *C. gloeosporioides* do guaranazeiro CI_{50} foi de aproximadamente $500 \mu\text{g disco}^{-1}$.

Em conclusão, no estudo biológico e químico da fração **F507a3c** do fungo endofítico *T. aculeatus* (507), foram isolados dois compostos ativos ainda não identificados, possivelmente inéditos, com ação antifúngica a fungos do gênero *Colletotrichum*. Análises químicas adicionais serão necessárias para elucidar a estrutura química de **F507a3c3** e **F507a3c5**.

O fluxograma a seguir sumariza o trabalho de isolamento químico do extrato deste endófito (figura 76).

Figura 76 - Fluxograma do estudo químico do fungo endofítico *T. aculeatus* (507)

m: massa da fração; B: porcentagem de inibição no bioensaio

*condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil (Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ de dimensões 250 x 4,6 mm) ¹em modo gradiente de H₂O/MeOH/MeCN 90:5:5, vazão de 1 mL min⁻¹ e λ 254, 275 e 365 nm e ²em modo isocrático de H₂O/MeOH 60:40, vazão de 1 mL min⁻¹ e λ 254, 275 e 365 nm

6 CONCLUSÕES FINAIS

Foi realizado o estudo químico e biológico dos metabólitos secundários provenientes de fungos endofíticos de guaranazeiros da Amazônia, para inibição de fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*.

Para isso, 16 linhagens de fungos endofíticos foram avaliadas em ensaio biológico por cultivo pareado e em ensaio biológico por difusão em disco com seus extratos brutos, contra fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*, o que permitiu a seleção de quatro linhagens.

As quatro linhagens foram avaliadas por abordagem polifásica e identificadas como *Aspergillus flavus* (272), *Talaromyces aculeatus* (507), *Xylaria* sp. (214) e *Xylaria* sp. (249).

Com o extrato bruto de cada fungo selecionado realizou-se isolamento biomonitorado dos compostos com atividade inibitória ao fitopatógeno do guaranazeiro *C. gloeosporioides*. A tabela 8 abaixo sumariza os resultados obtidos.

A fração ativa F272d1c, isolada de *A. flavus* (272), foi identificada como sendo o composto asperfuran e apresentou atividade inibitória de 92,9 % a *C. gloeosporioides*, a uma concentração de 500 µg disco⁻¹ e se equiparou ao fungicida comercial difenoconazol nas concentrações avalidas.

A fração ativa F214d3c, isolada de *Xylaria* sp. (214), foi identificada como sendo o composto citocalasina D e apresentou atividade inibitória de 38,8% a *C. gloeosporioides*, na concentração de 500 µg disco⁻¹.

A fração ativa F249d1b4, isolada de *Xylaria* sp. (249), foi identificada como sendo o composto ácido pilifórmico e apresentou atividade inibitória de 51,3% a *C. gloeosporioides*, na concentração de 500 µg disco⁻¹.

O estudo de duas linhagens do mesmo gênero (*Xylaria* sp. 214 e 249), justifica-se pelo fato de que, além de terem sido isoladas de locais diferentes, obteve-se compostos bioativos diferentes tanto em estrutura química quanto em resposta a avaliação inibitória ao fitopatógeno, demonstrando relevância na investigação química de fungos do mesmo gênero.

Foram isolados cinco compostos a partir do extrato bruto de *T. aculeatus* (507). Três foram identificados como: ácido 1,2-benzoldicarboxílico, 1,2-bis(2-metilpropil) éster (F507a3a1); ácido 1,2-benzoldicarboxílico, 1-butil, 2-(3-metilbutil) éster (F507a3a2); e ácido 1,2-benzoldicarboxílico, 1,2-bis(3-metilbutil) éster (F507a3a3), e duas (F507a3c3 e F507a3c5) não foram identificadas integralmente até o momento e possivelmente tratam-se de compostos inéditos.

Dos três compostos identificados de *T. aculeatus* (507), os compostos das frações F507a3a1 e F507a3a2 não apresentaram atividade inibitória e da fração F507a3a3 apresentou atividade inibitória de 20,09% ao fitopatógeno *C. gloeosporioides*, na concentração de 500 µg disco⁻¹. Já as frações F507a3c3 e F507a3c5, com compostos possivelmente inéditos, apresentaram 23,31% e 60,22% de atividade inibitória, respectivamente, na concentração de 500 µg disco⁻¹.

Os endófitos *A. flavus* (272) e *T. aculeatus* (507), que foram isolados de plantas saudáveis, se mostraram mais ativos aos fitopatógenos do que os endófitos *Xylaria* sp. (214) e *Xylaria* sp. (249), que foram isolados de plantas com sintomas da doença antracnose, levantando hipóteses que ainda muito tem que ser estudado para compreender o papel do metabolismo secundário de endófitos em diferentes condições bióticas e abióticas.

Os compostos isolados dos extratos de *A. flavus*, *Xylaria* sp. e *T. aculeatus*, estão sendo relatados pela primeira vez com atividade antifúngica a fitopatógenos do gênero *Colletotrichum*.

Levando em consideração que até o presente momento não há estudos sobre a prospecção química e biológica de fungos endofíticos isolados de guaranazeiros da Amazônia, o presente trabalho apresenta a contribuição científica tanto de compostos ativos, como de questões ambientais da ocorrência destes endófitos. Estudos futuros poderão avaliar a toxicidade ambiental e aos seres humanos e viabilizar ou não o seu uso no manejo integrado para o controle desta doença tão relevante.

Tabela 8 - Compostos isolados de extratos brutos de fungos endofíticos durante o presente trabalho de doutorado

Fonte biológica (código)	Fração	Composto isolado	Estrutura química	UV _{máx.} (nm)	m/z	Bioensaio*
<i>A. flavus</i> (272)	F272d1c	asperfuran		227 e 295	219 [M+H] ⁺ 217 [M-H] ⁻ 241 [M+Na] ⁺	ativo 92,88%
<i>Xylaria</i> sp. (214)	F214d3c	citocalasina D		218 e 286	508 [M+H] ⁺ 506 [M-H] ⁻ 530 [M+Na] ⁺	ativo 38,76%
<i>Xylaria</i> sp. (249)	F249d1b4	ácido pilifórmico		227	215 [M+H] ⁺ 213 [M-H] ⁻ 237 [M+Na] ⁺	ativo 51,33%
<i>T. aculeatus</i> (507)	F507a3a1	ácido 1,2-benzenodicarboxílico, bis(2-metilpropil) éster		236 e 274	279 [M+H] ⁺ 301 [M+Na] ⁺	não ativo
<i>T. aculeatus</i> (507)	F507a3a2	ácido 1,2-benzenodicarboxílico, 1-butil 2-(3-metilbutil) éster		230 e 274	293 [M+H] ⁺ 315 [M+Na] ⁺	não ativo
<i>T. aculeatus</i> (507)	F507a3a3	ácido 1,2-benzenodicarboxílico, bis(3-metilbutil) éster		217, 238 e 274	307 [M+H] ⁺ 329 [M+Na] ⁺	ativo 20,09%
<i>T. aculeatus</i> (507)	F507a3c3	não identificado	parcialmente identificada	253	447 [M+H] ⁺ 445 [M-H] ⁻	ativo 23,31%
<i>T. aculeatus</i> (507)	F507a3c5	não identificado	não identificada	221, 273 e 363	351 [M+H] ⁺ 349 [M-H] ⁻ 373 [M+Na] ⁺	ativo 60,22%

*Porcentagem de inibição a *C. gloeosporioides* isolado do guaranazeiro na concentração de 500 µg disco⁻¹

REFERÊNCIAS

AGROFIT. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>>. Acesso em: 08 jun. 2015.

ALAM, S. Synthesis, antibacterial and antifungal activity of some derivatives of 2-phenylchromen-4-one. **Journal of Chemical Sciences**, Bangalore, v.116, n.6, p.325-331, 2004.

ALDRIDGE, D.C.; TURNER, W.B. Structures of cytochalasins C and D. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, London, n.6, p.923-928, 1969.

ALY, A.H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fifty years of drug discovery from fungi. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.50, p.3-19, 2011.

ALY, A.H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.41, p.1-16, 2010.

AMADE, P.; MALLEA, M.; BOUAICHA, N. Isolation, structural identification and biological activity of two metabolites produced by *Penicillium olsonii* Bainier and Sartory. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.47, n.2, p.201-208, 1994.

AMARALA, L.S.; RODRIGUES-FILHO, E.; SANTOS, C.A.; DE ABREU, L.M.; PFENNING, L.H. An HPLC evaluation of cytochalasin D biosynthesis by *Xylaria arbuscula* cultivated in different media. **Natural Product Communications**, Westerville, v.9, n.9, p.1279-1282, 2014.

AMBEV. **Ambev mantém seis unidades no Amazonas**. Disponível em: <<http://www.ambev.com.br/pt-br/imprensa/noticias/2011/12/11/ambev-mantem-seisunidades-no-amazonas>>. Acesso em: 15 dez. 2011.

ANDERSON, J.R.; EDWARDS, R.L.; WHALLEY, A.J.S. Metabolites of the higher fungi. Part 22. 2-Butyl-3-methylsuccinic acid and 2-hexylidene-3-methylsuccinic acid from xylariaceous fungi. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, London, p.1481-1485, 1985.

ARAÚJO, J.C.A.; PEREIRA, J.C.R.; GASPAROTTO, L.; ARRUDA, M.R. **Controle químico da antracnose do guaranazeiro**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 2p. (Comunicado Técnico, 61).

ARAÚJO, W.L.; LACAVA, P.T.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; SOBRAL, J.K.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALO, 2010. 167p.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR., W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.47, n.3, p.299-236, 2001.

ARNOLD, A.E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v.21, p.51-66, 2007.

ASLAM, S.N.; STEVENSON, P.C.; KOKUBUN, T.; HALL, D.R. Antibacterial and antifungal activity of cicerfuran and related 2-arylbenzofurans and stilbenes. **Microbiological Research**, Jena, v.164, n.2, p.191-195, 2009.

AYER, W.A.; NOZAWA, K. Taxonomy and chemistry of a new fungus from bark beetle infested *Pinus contorta* var. *latifolia*. Part 2. Arthrographol, the metabolite inhibitory to *Ophiostoma clavigerum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.36, n.2, p.83-85, 1990.

AYER, W.A.; CRAW, P.A. Synthesis of (+/-) arthrographol. **Canadian Journal of Chemistry**, Ottawa, v.69, n.12, p.1909-1916, 1991.

AZEVEDO, C.P.; CAFÉ FILHO, A.C.; HENZ, G.P.; REIS, A. **Recomendações de manejo da antracnose do pimentão e das pimentas**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006. 4p. (Comunicado Técnico, 35).

BADALYAN, S.M.; INNOCENTI, G.; GARIBYAN, N.G. Antagonist activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v.41, p.200-225, 2002.

BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J.A.; JEGGER, M.J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p.88-120.

BARBIERI, R.; CARVALHO, I.F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.7, p.79-83, 2001.

BARRETO, M.C.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R.A.; FRISVAD, J.C.; SAN-ROMÃO, M.V. Taxonomic studies of the *Penicillium glabrum* complex and the description of a new species *P. subericola*. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.49, n.1, p.23-33, 2011.

BARY, A. Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und Mycomycetum V. II, Engelman, Leipzig, 1866.

BAUTISTA-BAÑOS, S. (Ed.). **Postharvest Decay: Control Strategies**. Elsevier, 2014. p.337-346.

BAYMAN, P.; ANGULO-SANDOVAL, P.; BÁEZ-ORTIZ, Z.; LODGE, D. Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. **Mycological Research**, Cambridge, v.102, n.8, p.944-948, 1998.

BENTES, J.L.S.; COSTA NETO, P.Q. Variabilidade genética de *Colletotrichum guaranicola* usando marcadores AFLP. **ACTA Amazonica**, Manaus, v.41, n.2, p.251-256, 2011.

BENTES, J.L.S.; BARRETO, L.W. Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuq. Agente causal da antracnose do guaranazeiro. **ACTA Amazonica**, Manaus, v.34, n.1, p.129-131, 2004.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, Tokyo, v.58, n.1, p.1-26, 2005.

BETINA, V.; MIČEKOVÁ, D.; NEMEC, P. Antimicrobial properties of cytochalasins and their alteration of fungal morphology. **Journal of General Microbiology**, London, v.71, n.2, p.343-349, 1972.

BLACK, L.L.; GREEN, S.K.; HARTMAN, G.L.; POULOS, J.M. **Pepper diseases: a field guide**. Tainan: AVRDC, 1991. 98p.

CAFÊU, M.C.; SILVA, G.H.; TELES, H.L.; BOLZANI, V.D.S.; ARAÚJO, Â.R.; YOUNG, M.C.M.; PFENNING, L.H. Antifungal compounds of *Xylaria* sp., an endophytic fungus isolated from *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Quimica Nova**, São Paulo, v.28, n.6, p.991-995, 2005.

CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N.. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.117, n.3, p.237-246, 2007.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v.42, p.225-226, 1939.

CHAO, W.L.; LIN, C.M.; SHIUNG, I.I.; KUO, Y.L. Degradation of di-butyl-phthalate by soil bacteria. **Chemosphere**, Oxford, v.63, n.8, p.1377-1383, 2006.

CHEN, Z.; HUANG, H.; CHEN, Y.; WANG, Z.; MA, J.; WANG, B.; JU, J. New cytochalasins from the marine derived fungus *Xylaria* sp. SCSIO 156. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v.94, n.9, p.1671-1676, 2011.

CHINWORRUNGSEE, M.; KITTA KOOP, P.; ISAKA, M.; RUNGROD, A.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Antimalarial halorosellinic acid from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.11, n.15, p.1965-1969, 2001.

CORDA, A.K.J. Die Pilze Deutschlands. **Deutschlands Flora in Abbildungen nach der Natur mit Beschreibungen**, Nürnberg, v.3, p.33-64, 1831.

DAHIYA, J.S. **Fermentation for taxol producing**. WO 96/32490, 1996.p???????

DAI, J.; KROHN, K.; ELSÄSSER, B.; FLÖRKE, U.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; PESCIPELLI, G.; SALVADORI, P.; ANTUS, S.; KURTÁN, T. Metabolic products of the endophytic fungus *Microsphaeropsis* sp. From *Larix deciduas*. **European Journal of Organic Chemistry**, Weinheim, p.4845-4854, 2007.

DE CAROLIS, E.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C.; VELLA, A.; FLORIO, A.R.; TORELLI, R.; GIRMENIA, C.; COLOZZA, C.; TORTORANO, A.M.; SANGUINETTI, M.; FADDA, G. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v.18, n.5, p.475-484, 2012.

DE STEFANO, S.; NICOLETTI, R.; MILONE, A.; ZAMBARDINO, S. 3-*o*-Methylfunicone, a fungitoxic metabolite produced by the fungus *Penicillium pinophilum*. **Phytochemistry**, Oxford, v.52, p.1399-1401, 1999.

DEAN, R.; VAN KAN, J.A.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND- KOSACK, K.E.; DI PIETRO, A.; SPANU, P.D.; FOSTER, G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.13, n.4, p.414-430, 2012.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.57, p.359-363, 1971.

DOMBROWSKI, A.W.; BILLS, G.F.; SABNIS, G.; KOUPAL, L.R.; MEYER, R.; ONDEYKA, J.G.; LINGHAM, R.B. L-696,474, a novel cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease. I. The producing organism and its fermentation. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.45, n.5, p.671-678, 1992.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, 1980. 672p.

EDWARDS, R.L.; MAITLAND, D.J.; WHALLEY, A.J.S. Metabolites of the higher fungi. Part 24. Cytochalasin N, O, P, Q, and R. New cytochalasins from the fungus *Hypoxylon terricola* Mill. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, London, n.1, p.57-65, 1989.

EL-NAGGAR, M.Y.M. Dibutyl phthalate and the antitumor agent F5A1, two metabolites produced by *Streptomyces nasri* submutant H35. **Biomedical Letters**, Cambridge, v.55, p.125-131, 1997.

ESPADA, A.; RIVERA-SAGREDO, A.; DE LA FUENTE, J.M.; HUESO-RODRIGUEZ, J.A.; ELSON, S.W. New cytochalasins from the fungus *Xylaria hypoxylon*. **Tetrahedron**, Oxford, v.53, n.18, p.6485-6492, 1997.

EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; VURRO, M.; ZONNO, M.C.; MOTTA, A. Cytochalasins Z4, Z5, and Z6, three new 24-oxa [14] cytochalasans produced by *Phoma exigua* var. *heteromorpha*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.66, n.12, p.1540-1544, 2003.

FENG, Y.; BLUNT, J.W.; COLE, A.L.; MUNRO, M.H. Three novel cytochalasins X, Y, and Z from *Pseudeurotium zonatum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.65, n.9, p.1274-1277, 2002.

FOISSNER, I.; WASTENEYS, G.O. Wide-ranging effects of eight cytochalasins and latrunculin A and B on intracellular motility and actin filament reorganization in characean internodal cells. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v.48, n.4, p.585-597, 2007.

FORZZA, R.C.; BAUMGRATZ, J.F.A.; BICUDO, C.E.M.; CARVALHO-JR., A.A.; COSTA, A.; COSTA, D.P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P.M.; LOHMANN, L.G.; MAIA, L.C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M.P.; COELHO, M.A.N.; PEIXOTO, A.L.; PIRANI, J.R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L.P.; SOUZA, V.C.; STEHMANN, J.R.; SYLVESTRE, L.S.; WALTER, B.M.T.; ZAPPI, D. **Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil**. v.1. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. 875p.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, St. Paul, v.82, p.596-605, 1998.

FREEMAN, E.M. The seed-fungus of *Lolium temulentum* L., the Darnel. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v.196, p.1-27, 1904.

FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, Baarn, v.49, p.1-174, 2004.

FRISVAD, J.C.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T.O.; SAMSON, R.A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, Baarn, v.49, p.201-241, 2004.

FU, J.; ZHOU, Y.; LI, H.F.; YE, Y.H.; GUO, J.H. Antifungal metabolites from *Phomopsis* sp. By254, an endophytic fungus in *Gossypium hirsutum*. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v.5, p.1231-1236, 2011.

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY J. A novel endophytic taxol-producing fungus *Chaetomella raphigera* isolated from a medicinal plant, *Terminalia arjuna*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.158, p.675-684, 2009.

GAO, F.; DAI, C.; LIU, X. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v.4, p.1346-1351, 2010.

GE, H.M.; SHEN, Y.; ZHU, C.H.; TAN, S.H.; DING, H.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Penicidones A-C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp. **Phytochemistry**, Oxford, v.69, n.2, p.571-576, 2008.

GERARDO, N.M.; MUELLER, U.G.; PRICE, S.L.; CURRIE, C.R. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v.271, p.1791-1798, 2004.

GERMAINE, K.; KEOGH, E.; GARCIA-CABELLOS, G.; BORREMANS, B.; LELIE, D.; BARAC, T.; OEYEN, L.; VANGRONVELD, J.; MOORE, F.P.; MOORE, E.R.B.; CAMPBELL, C.D.; RYAN, D.; DOWLING, D.N. Colonisation of poplar trees by *gfp* expressing bacterial endophytes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.48, p.109, 2004.

- GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1323-1330, 1995.
- GUO, B.; DAI, J.; SIEWBEE, N.G.; HUANG, Y.; LEONG, C.; ONG, W.; CARTE, B.K. Cytonic acids A and B: novel tridepside Inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora* species. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.63, p.602-604, 2000.
- HABIB, M.R.; KARIM, M.R. Antimicrobial and cytotoxic activity of di-(2-ethylhexyl) phthalate and anhydrosophoradiol-3-acetate isolated from *Calotropis gigantea* (Linn.) flower. **Mycobiology**, Seoul, v.37, n.1, p.31-36, 2009.
- HANSON, J.R. **Chemistry of fungi**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2008. p.1-15.
- HARPER, J.K.; ARIF, A.M.; FORD, E.J.; STROBEL, G.A.; PORCO, J.A.; TOMER, D.P.; O'NEILL, K.L.; GRANT, D.M. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. **Tetrahedron**, Oxford, v.59, p.2471-2476, 2003.
- HEALY, P.C.; HOCKING, A.; TRAN-DINH, N.; PITT, J.I.; SHIVAS, R.G.; MITCHELL, J.K.; DAVIS, R.A. Xanthones from a microfungus of the genus *Xylaria*. **Phytochemistry**, Oxford, v.65, n.16, p.2373-2378, 2004.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento sistemático da produção agrícola (LSPA). 2011. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/2012/lspa_201202](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/2012/lspa_201202)>. Acesso em: 13 julho 2015.
- JALGAONWALA, R.E.; MOHITE, B.V.; MAHAJAN, R.T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, Udaipur, v.1, p.21-32, 2011.
- JANG, Y.W.; LEE, I.K.; KIM, Y.S.; LEE, S.; LEE, H.J.; YU, S.H.; YUN, B.S. Xylarinic acids A and B, new antifungal polypropionates from the fruiting body of *Xylaria polymorpha*. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.60, n.11, p.696-699, 2007.
- JIKAI, L.; JIANWEN, T.; ZEJUN, D.; ZHIHUI, D.; XIANGHUA, W.; PEIGUI, L. Neoengleromycin, a novel compound from *Engleromyces goetzii*. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v.85, n.5, p.1439-1442, 2002.
- KANCHISWAMY, C.N.; MALNOY, M.; MAFFEI, M.E. Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.20, n.4, p.206-211, 2015.
- KAYAHARA, H.; SHIBATA, N.; TADASA, K.; MAEDA, H.; KOTANI, T.; ICHIMOTO, I. Amino acid and peptide derivatives of kojic acid and their antifungal properties. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.54, n.9, p.2441-2442, 1990.

KEMPTNER, J.; MARCHETTI-DESCHMANN, M.; MACH, R.; DRUZHININA, I.S.; KUBICEK, C.P.; ALLMAIER, G. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) preparation techniques for surface characterization of intact *Fusarium* spores by MALDI linear time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v.23, n.6, p.877-884, 2009.

KHANAM, H. Bioactive Benzofuran derivatives: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v.97, p.483-504, 2014.

KLAIKLAY, S.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SUKPONDMA, Y.; PHONGPAICHIT, S.; BUATONG, J.; BUSSABAN, B. Metabolites from the mangrove-derived fungus *Xylaria cubensis* PSU-MA34. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v.35, n.7, p.1127-1131, 2012.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; PRAKASH, B.; DUBEY, N.K. Chemical composition of *Ocimum basilicum* L. essential oil and its efficacy as a preservative against fungal and aflatoxin contamination of dry fruits. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v.46, n.9, p.1840-1846, 2011.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A.; KRAUSE-SAKATE, R. Doenças das solanáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.589-596.

KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.32, n.6, p.297-303, 2014.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, London, v.19, p.792-798, 2012.

KWON, O.E.; RHO, M.C.; SONG, H.Y.; LEE, S.W.; CHUNG, M.Y.; LEE, J.H.; KIM, Y.H.; LEE, H.S.; KIM, Y.K. Phenylpyropene A and B, new inhibitors of Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase produced by *Penicillium griseofulvum* F1959. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.55, n.11, p.1004-1008, 2002.

LARSEN, T.O.; LANGE, L.; SCHNORR, K.; STENDER, S.; FRISVAD, J.C. Solistatinol, a novel phenolic compactin analogue from *Penicillium solitum*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v.48, n.7, p.1261-1264, 2007.

LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.12, n.2, p.310-350, 1999.

LEDWITCH, K.; OGBURN, R.; COX, J.; GRAHAM, R.; FRITZSHE, A.; GOSNELL, D.; MANNING, T. Taxol: efficacy against oral squamous cell carcinoma. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v.13, n.4, p.509-521, 2013.

LEE, D.S. Dibutyl phthalate, an α -glucosidase inhibitor from *Streptomyces melanosporofaciens*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v.89, n.3, p.271-273, 2000.

LI, X.J.; ZHANG, Q.; ZHANG, A.L.; GAO, J.M. Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant, and toxic activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.60, n.13, p.3424-3431, 2012.

LI, J.Y.; STROBEL, G.; HARPER, J.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Organic Letters**, Washington, v.2, p.767-770, 2000.

LI, J.Y.; SIDHU, R.S.; FORD, E.J.; LONG, D.M.; HESS, W.M.; STROBEL, G.A. The induction of taxol production in the endophytic fungus *Periconia* sp. from *Torreya grandifolia*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v.20, p.259-264, 1998.

LIN, Z.; ZHU, T.; FANG, Y.; GU, Q.; ZHU, W. Polyketides from *Penicillium* sp. JP-1, an endophytic fungus associated with the mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. **Phytochemistry**, Oxford, v.69, p.1273-1278, 2008.

LIU, C.H.; ZOU, W.X.; LU, H.; TAN, R.X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.88, p.277-282, 2001.

LOBO JR, M.; SILVA-LOBO, V.L.; LOPES, C.A. Reação de genótipos de *Capsicum* spp. (pimentas e pimentão) à antracnose (*Colletotrichum gloesporioides*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.373, 2001.

LUCAS, E.M.F.; ABREU, L.M.; MARRIEL, I.E.; PFENNING, L.H.; TAKAHASHI, J.A. Phthalates production from *Curvularia senegalensis* (Speg.) Subram, a fungal species associated to crops of commercial value. **Microbiological Research**, Jena, v.163, n.5, p.495-502, 2008.

LUCAS, E.M.F.; CASTRO, M.C.M.; TAKAHASHI, J.A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a Brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* Van Beyma. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v.38, n.4, p.785-789, 2007.

MABROUK, A.M.; KHEIRALLA, Z.H.; HAMED, E.R.; YOUSSEF, A.A.; EL ATY, A.A.A. Production of some biologically active secondary metabolites from marine-derived fungus *Varicosporina ramulosa*. **Malaysian Journal of Microbiology**, Malaysia, v.4, n.1, p.14-24, 2008.

MACCOTTA, A.; VALENSIN, G.; GAGGELLI, N.; GAGGELLI, E. The conformation of cytochalasin D in DMSO solution from ^1H and ^{13}C NMR relaxation rates. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, London, v.2, n.4, p.729-732, 1993.

MAO, B.Z.; HUANG, C.; YANG, G.M.; CHEN, Y.Z.; CHEN, S.Y. Separation and determination of the bioactivity of oosporein from *Chaetomium cupreum*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.9, p.5955-5961, 2010.

- MANGALESWARAN, S.; ARGADE, N.P. An efficient synthesis of ($\pm$)-piliformic acid. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, London, n.19, p.3290-3291, 2000.
- MATESIC, D.F.; VILLIO, K.N.; FOLSE, S.L.; GARCIA, E.L.; CUTLER, S.J.; CUTLER, H. G. Inhibition of cytokinesis and akt phosphorylation by chaetoglobosin K in ras-transformed epithelial cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Berlin, v.57, n.6, p.741-754, 2006.
- MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A.M. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: UFPE: 2007. p.129-140.
- MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v.3, p.170-179, 2006.
- MILLS, J.W.; PEDERSEN, S.F.; WALMOD, P.S.; HOFFMANN, E.K. Effect of cytochalasins on F-actin and morphology of Ehrlich ascites tumor cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.261, n.1, p.209-219, 2000.
- MOLLER, E.M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, London, v.20, p.6115-6116, 1992.
- MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quercina*. **Phytopathology**, St. Paul, v.98, p.380-386, 2008.
- MUELLER, G.M.; SCHMIT, J.P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?. **Biodiversity and Conservation**, London, v.16, p.1-5, 2007.
- MUHARNI, M.; FITRYA, F.; RULIZA, M.O.; SUSANTI, D.A.; ELFITA, E. Di-(2-ethylhexyl) phthalate and pyranon derivated from endophytic fungi *Penicillium* sp. the leave of Kunyit Putih (*Curcuma zedoaria*). **Indonesian Journal of Chemistry**, Yogyakarta, v.14, n.3, p.290-296, 2014.
- MIYAKE, M.; FUJIMOTO, Y. Synthesis of (+)-Arthrographol (Asperfuran). **Chemistry Letters**, Tokyo, n.10, p.1683-1686, 1993.
- NICOLETTI, R.; LOPEZ-GRESA, M.P.; MANZO, E.; CARELLA, A.; CIAVATTA, M.L. Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.163, n.5, p.295-301, 2007.
- NISA, H.; KAMILI, A.N.; NAWCHOO, I.A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, S.A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**, London, v.82, p.50-59, 2015.

OLIVEIRA, C.M.; REGASINI, L.O.; SILVA, G.H.; PFENNING, L.H.; YOUNG, M.C.M.; BERLINCK, R.G.S.; BOLZANI, V.S.; ARAUJO, A.R. Dihydroisocoumarins produced by *Xylaria* sp. and *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with *Piper aduncum* and *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v.4, n.2, p.93-96, 2011.

OROLE, O.O.; ADEJUMO, T.O. Activity of fungal endophytes against four maize wilt pathogens. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v.3, p.969-973, 2009.

PANDI, M.; RAJAPRIVA, P.; MANOHARAN, P.T. Extraction and characterization of Taxol: an anticancer drug from an endophytic and pathogenic fungi. **Fungal Biology**, Amsterdam, p.523-527, 2013.

PARK, J.; PARK, J.H.; CHOI, G.J.; LEE, S.; JANG, K.S.; CHOI, Y.H.; CHO, K.Y.; KIM, J. Screening for antifungal endophytic fungi against six plant pathogenic fungi. **Mycobiology**, Seoul, v.31, p.179-182, 2003.

PARK, J.H.; CHOI, G.J.; LEE, H.B.; KIM, K.M.; JUNG, H.S.; LEE, S.W.; KIM, J.C. Griseofulvin from *Xylaria* sp. strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v.15, n.1, p.112-117, 2005.

PATIL, M.P.; PATIL, R.H.; MAHESHWARI, V.L. Biological activities and identification of bioactive metabolite from endophytic *Aspergillus flavus* L7 isolated from *Aegle marmelos*. **Current Microbiology**, New York, 2015. p.1-10.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, v.4, 2010. 716p.

PEIXOTO-NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. **Biociência e Desenvolvimento**, Brasília, n.29, p.62-77, 2002.

PELAEZ, F.; CABELLO, A.; PLATAS, G.; DIEZ, M.T.; DEL VAL A.G.; BASILIO, A.; MARTAN, I.; VICENTE, F.; BILLS, G.F.; GIACOBBE, R.A.; SCHWARTZ, R.E.; ONISHI, J.C.; MEINZ, M.S.; ABRUZZO, G.K.; FLATTERY, A.M.; KONG, L.; KURTZ, M.B. The discovery of fenfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *Hormonema* species biological activity and taxonomy of the producing organisms. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.23, p.333-343, 2000.

PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2.ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997. v.1.

PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*. **Mycologia**, Lancaster, v.85, p. 362-364, 1993.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRLICH, K.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C.; MEIJER, M.; NOONIM, P.; MAHAKARNCHANAKUL, W.; SAMSON, R.A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, Baarn, v.59, p.53-66, 2007.

- PETRINI, O. Ecological and physiological aspects of host specificity in endophytic fungi. In: REDLIN, S.C.; CARRIS, L.M. **Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematic, ecology and evolution**. St. Paul: APS Press, 1996. p.87-100.
- PETRINI, O. Fungal endophytes in tree leaves. In: ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer, 1991. p.179-197.
- PFEFFERLE, W.; ANKE, H.; BROSS, M.; STEFFAN, B.; VIANDEN, R.; STEGLICH, W. Asperfuran, a novel antifungal metabolite from *Aspergillus oryzae*. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.43, n.6, p.648-654, 1990.
- PITT, J.I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. 3.ed. Australia: Food Science Australia Publishers, 2000. 197p.
- PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. New York: Springer, 2009. 330p.
- PITTAYAKHAJONWUT, P.; SUVANNAKAD, R.; THIENHIRUN, S.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P.; TANTICHAROEN, M. An anti-herpes simplex virus-type 1 agent from *Xylaria mellisii* (BCC 1005). **Tetrahedron Letters**, Oxford, v.46, n.8, p.1341-1344, 2005.
- PRASAIN, J.K.; UEKI, M.; STEFANOWICZ, P.; OSADA, H. Rapid screening and identification of cytochalasins by electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v.37, n.3, p.283-291, 2002.
- PURI, S.C.; NAZIR, A.; CHAWLA, R.; ARORA, R.; RIYAZ-UL-HASAN, S.; AMNA, T.; AHMED, B.; VERMA, V.; SINGH, H.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; RANCIC, A.; SOKOVIC, M.; KARIOTI, A.; VUKOJEVIC, J.; SKALTSA, H. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v.22, n.1, p.80-84, 2006.
- RANCIC, A.; SOKOVIC, M.; KARIOTI, A.; VUKOJEVIC, J.; SKALTSA, H. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v.22, n.1, p.80-84, 2006.
- REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L.E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**, New York, v.289, p.1920-1921, 2000.
- REIS, A.; BOITEUX, L.S.; HENZ, G.P. **Antracnose em hortaliças da família Solanaceae**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2009. 9 p. (Circular Técnica, 79).
- RIBEIRO, A. **Controle da antracnose do guaranazeiro**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2012. 1 p. (Prosa Rural). Disponível em: <<http://hotsites.sct.embrapa.br/prosarural/programacao/2012/>>. Acesso em: 7 mar. 2013.
- RIBEIRO, C.S.C.; CRUZ, D.M.R. Tendências de mercado: comércio de sementes de pimentão está em expansão. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, Pelotas, v.3, n.14, p.16-19, 2002.

- RODRIGUEZ, R.J.; WHITE JR, J.F.; ARNOLD, A.E.; REDMAN, R.S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **The New Phytologist**, Oxford, v.182, p.314-330, 2009.
- ROY, R.N.; LASKAR, S.; SEN, S.K. Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2. **Microbiological Research**, Jena, v.161, n.2, p.121-126, 2006.
- SAEED, M.K.; DENG, Y.; PARVEEN, Z.; DAI, R.; AHMAD, W.; YU, Y. Studies on the chemical constituents of *Torreya grandis* Fort. Ex Lindl. **Journal of Applied Sciences**, Faisalabad, v.7, n.2, p.269-273, 2007.
- SAILLENFAIT, A.M.; LAUDET-HESBERT, A. Phtalates. **EMC-Toxicologie-Pathologie**, Paris, v.2, n.1, p.1-13, 2005.
- SAIKKONEN, K.; HELANDER, M.; FAETH, S.H.; Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v.9, p.275-280, 2004.
- SALGADO, C.L.; TOKESHI, H. Doenças das solanáceas. In: GALLI, F. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. p.497-510.
- SAMIE, A.; HOUSEIN, A.; LALL, N.; MEYER, J.J.M. Crude extracts of, and purified compounds from, *Pterocarpus angolensis*, and the essential oil of *Lippia javanica*: their in-vitro cytotoxicities and activities against selected bacteria and *Entamoeba histolytica*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, London, v.103, n.5, p.427-439, 2009.
- SAMSON, R.A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*?. **Medical Mycology**, Oxford, v.47, n.1, p.13-20, 2009.
- SANTOS, J.M.; PHILLIPS, A.J.L. Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.34, p.111-125, 2009.
- SANTOS, R.M.G. dos; RODRIGUES-FO, E.; ROCHA, W.C.; TEIXEIRA, M.F.S. Endophytic fungi from *Melia azedarach*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.19, n.8, p.767-770, 2003.
- SAVARD, M.E.; MILLER, J.D.; BLAIS, L.A.; SEIFERT, K.A.; SAMSON, R.A. Secondary metabolites of *Penicillium bilaii* strain PB-50. **Mycopathologia**, Den Haag, v.127, n.1, p.19-27, 1994.
- SCHIMPL, F.C.; DA SILVA, J.F.; DE CARVALHO GONÇALVES, J.F.; MAZZAFERA, P. Guarana: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.150, n.1, p.14-31, 2013.
- SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUFNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, A.; CHEN, W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.109, p.6241-6246, 2012.

SCHLÖRKE, O. **Isolierung, Strukturaufklärung und Biosynthese von Sekundärmetaboliten endophytischer Pilze aus Algen und Pflanzen mariner Habitate.** 2005. 214 p. Tese (Doutorado). Universidade de Göttingen, Göttingen.

SCHNEIDER, G.; ANKE, H.; STERNER, O. Xylaramide, a new antifungal compound, and other secondary metabolites from *Xylaria longipes*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Tübingen, v.51, n.11-12, p.802-806, 1996.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. What are endophytes? In: SCHULZ, B.J.E.; BOYLE, C.J.C.; SIEBER, T.N. **Microbial Root Endophytes**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. p.1-13.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v.109, p.661-686, 2005.

SCHULZ, B.; RÖMMERT, A.K.; DAMMANN, U.; AUST, H.J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. **Mycological Research**, Cambridge, v.103, p.1275-1283, 1999.

SCHULZ, B.; SUCKER, J.; AUST, H.J.; KROHEN, K.; LUDEWIG, K.; JONES P.G.; DORING, D. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* sp. **Mycological Research**, Cambridge, v.99, p.1007-1015, 1995.

SCHÜMANN, J.; HERTWECK, C. Molecular basis of cytochalasan biosynthesis in fungi: gene cluster analysis and evidence for the involvement of a PKS-NRPS hybrid synthase by RNA silencing. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.129, n.31, p.9564-9565, 2007.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J.C.; VAN DIJCK, P. On the safety of *Aspergillus niger*—a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.59, n.4/5, p.426-435, 2002.

SHAO, C.; WANG, C.; GU, Y.; WEI, M.; PAN, J.; DENG, D.; SHE, Z.; LIN, Y. Penicnoline, a new pyrrolyl 4-quinolinone alkaloid with an unprecedented ring system from an endophytic fungus *Penicillium* sp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, n.20, p.3284-3286, 2010.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7th ed. Hoboken; Wiley, NJ. 2005. 512p.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M.L.B.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **ACTA Amazonica**, Manaus, v.34, p.185-195, 2004.

STEVENSON, P.C.; VEITCH, N.C. A 2-arylbenzofuran from roots of *Cicer bijugum* associated with *Fusarium* wilt resistance. **Phytochemistry**, Oxford, v.48, n.6, p.947-951, 1998.

- STIERLE A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, New York, v.260, p.214-216, 1993.
- STROBEL, G.A.; MILLER, R.V.; MARTINEZ-MILLER, C.; CONDRON, M.M.; TELOW, D.B.; HESS, W.M. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Microbiology**, Washington, v.145, p.1919-1926, 1999.
- SURYANARAYANAN, T.S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M.B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T.S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v.23, p.9-19, 2009.
- TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Occurrence and structural diversity of fungal metabolites with antibiotic activity. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.7, p.1807-1813, 2008.
- TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, London, v.18, p.448-459, 2001.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.
- JÚNIOR, H.J.T.; MELLO, M.B.A.; JÚNIOR, N.S.M. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, n.1, p.71-79, 2006.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 586p.
- TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, L.S. Doenças do guaraná. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. p.459-462.
- TRIPATHI, S.; KAMAL, S.; SHERAMATI, I.; OELMULLER, R.; VARMA, A. Mycorrhizal fungi and other root endophytes as biocontrol agents against root pathogens. **Mycorrhiza**, Berlin, p.281-306, 2008.
- VARGA, J.; JUHÁSZ, Á.; KEVEI, F.; KOZAKIEWICZ, Z. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. In: **Molecular Diversity and PCR-detection of Toxigenic Fusarium Species and Ochratoxigenic Fungi**. Springer Netherlands, 2004. p. 627-640.
- VEGA, F.E.; POSADA, F.; PETERSON, S.W.; GIANFAGNA, T.J.; CHAVES, F. *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. **Mycologia**, Lancaster, v.98, n.1, p.31-42, 2006.
- WHALLEY, A.J.S. The xylariaceous way of life. **Mycological Research**, Cambridge, v.100, n.8, p.897-922, 1996.

WANG, L.W.; XU, B.G.; WANG, J.Y.; SU, Z.Z.; LIN, F.C.; ZHANG, C.L.; KUBICEK, C.P. Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.93, p.1231-1239, 2012.

WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A.T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.93, p.2325-2327, 1971.

YAMAJI, K.; FUKUSHI, Y.; HASHIDOKO, Y.; YOSHIDA, T.; TAHARA, S. Characterization of antifungal metabolites produced by *Penicillium* species isolated from seeds of *Picea glehnii*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.25, n.7, p.1643-1653, 1999.

YIN, X.; FENG, T.; LI, Z.H.; SU, J.; LI, Y.; TAN, N.H.; LIU, J.K. Chemical investigation on the cultures of the fungus *Xylaria carpophila*. **Natural Products and Bioprospecting**, Heidelberg, v.1, n.2, p.75-80, 2011.

YU, T.W.; BAI, L.; CLADE, D.; HOFFMANN, D.; TOELZER, S.; TRINH, K.Q.; XU, J.; MOSS, S.J.; LEISTNER, E.; FLOSS, H.G. The biosynthetic gene cluster of the maytansinoid antitumor agent ansamitocin from *Actinosynnema pretiosum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.99, p.7968-7973, 2002.

ZHANG, G.; SUN, S.; ZHU, T.; LIN, Z.; GU, J.; LI, D.; GU, Q. Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceras corniculatum*. **Phytochemistry**, Oxford, v.72, p.1436-1442, 2011.

ANEXOS

Anexo 1 - Posição filogenética das linhagens codificadas 47, 214, 249, 250, 372, 415, L1 e L3 (em **negrito**). A análise foi baseada no espaço interno transcrito (ITS). A filogenia foi inferida com o algoritmo de *Neighbor-joining* e 1000 pseudoréplicas de *bootstrap* (valores inferiores a 50% não estão representados). Nomes científicos estão seguidos pelo código da linhagem. A espécie *Cordyceps militaris* CBS 178.59 foi utilizada como *outgroup*. Barra indica 0,05 substituições por sítio

Anexo 2 - Posição filogenética das linhagens codificadas 472, 473, 479, 507 e 509 (em negrito). A análise foi baseada no marcador β -tubulina (Bt2a–Bt2b). A filogenia foi inferida com o algoritmo de *Neighbor-joining* e 1000 pseudoréplicas de *bootstrap* (valores inferiores a 50% não estão representados). Nomes científicos estão seguidos pelo código da linhagem. A espécie *Metarhizium pinghaense* ARSEF:7929 foi utilizada como *outgroup*. Barra indica 0,05 substituições por sítio.

Anexo 3 - Posição filogenética das linhagens codificadas 81, 272, 465 (em negrito). A análise foi baseada no marcador β -tubulina (Bt2a–Bt2b). A filogenia foi inferida com o algoritmo de *Neighbor-joining* e 1000 pseudoréplicas de *bootstrap* (valores inferiores a 50% não estão representados). Nomes científicos estão seguidos pelo código da linhagem. A espécie *Metarhizium pinghaense* ARSEF:7929 foi utilizada como *outgroup*. Barra indica 0,05 substituições por sítio

Anexo 4 - Espectro de RMN ^1H do composto **F272d1c**, em acetona- d_6 (600 MHz)

Anexo 5 - Espectro de RMN ^1H do composto **F214d3c**, em $\text{DMSO}-d_6$ (600 MHz)

Anexo 6 - Espectro de RMN ^1H do composto **F249d1b4**, em CDCl_3 (600 MHz)

Anexo 7 - Espectro de RMN ^1H do composto **F507a3a1**, em CDCl_3 (600 MHz)

Anexo 8 - Espectro de RMN ^1H do composto **F507a3a2**, em CDCl_3 (600 MHz)

Anexo 9 - Espectro de RMN ^1H do composto **F507a3a3**, em CDCl_3 (600 MHz)

Anexo 10 - Espectro de RMN ^1H do composto **F507a3c3**, em CDCl_3 (600 MHz)

Anexo 11 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **F507a3c3**, em CDCl_3 (100 MHz)

Anexo 12 - Espectro de COSY ^1H - ^1H do composto **F507a3c3**, em CDCl_3 (600 MHz)

Anexo 14 - Espectro de HSQC ^1H - ^{13}C do composto **F507a3c3**, em CDCl_3 (600 e 150 MHz)