UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Micro-organismos de interesse farmacêutico e agrícola:
estudo químico e biossintético**

Raphael Conti

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 15/06/2012. A versão original encontra-se disponível na faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto - SP

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Micro-organismos de interesse farmacêutico e agrícola:
estudo químico e biossintético**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientado: Raphael Conti

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Ribeirão Preto - SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Conti, Raphael

Micro-organismos de interesse farmacêutico e agrícola: estudo químico e biossintético. Ribeirão Preto, 2012.

236 p.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Pupo, Mônica Tallarico.

1. Actinobactérias. 2. Bioprospecção 3. Biossíntese 4. *Botrytis cinerea*. 5. Fitopatôgeno. 6. Micro-organismo endofítico.

*Foto da capa de autoria de Raphael Conti

FOLHA DE APROVAÇÃO

Raphael Conti

Micro-organismos de interesse farmacêutico e agrícola: estudo químico e biossintético

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A minha mãe Maria Aparecida Conti, por ter proporcionado aos meus irmãos e a mim uma vida digna. Com ela crescemos acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos e íntegros de caráter. Seu exemplo nos fortaleceu a nunca desistirmos de concretizar nossos sonhos.

Agradecimentos

À Universidade de São Paulo junto a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e pelo financiamento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o doutorado sandwich e início do meu doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro às pesquisas.

Ao Departamento de Química Orgânica da Universidad de Cádiz (UCA) – Puerto Real, Espanha.

À minha orientadora Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo por sua exemplar conduta ético-profissional e pela paciência em me ensinar, dentre outras coisas, que um espectro de RMN não é um eletrocardiograma, e sim, peça de um grande quebra-cabeça para a determinação estrutural de um composto. Meus sinceros agradecimentos.

A todos os professores que ajudaram em minha formação acadêmica, em especial aos que me deram suporte e conhecimento científico: Profa. Dra. Edna Scremin-Dias, Profa. Dra. Neli Kika Honda, Profa. Dra. Maria Isabel Lima Ramos e Profa. Dra. Janete Magali de Araújo, minha eterna gratidão.

Aos professores que estiveram envolvidos tanto na disponibilização de equipamentos quanto pelo conhecimento compartilhado.

Aos técnicos Áurea Donizeti Lanchote, Cláudia Castania de Macedo, Isabel Cristina Casanova Turatti, José Carlos Tomaz, Luís Otávio Bunhotto Zamoner e Vinícius Palaretti.

Ao secretariado da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (FCFRP), pela atenção prestada.

Aos amigos farei uso das palavras de Benjamin Franklin para expressar o quanto são importantes para mim “Um irmão pode não ser um amigo, mas um amigo será sempre um irmão”.

Aos meus irmãos Rodrigo e Rachel que apesar da distância sempre me apoiaram.

Epigrafe

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina"

(Cora Coralina)

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	ix
Lista de quadro	x
Lista de protocolos	xi
Lista de abreviaturas e siglas	xii
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Micro-organismos de interesse farmacêutico e agrícola: estudo químico e biossintético	1
2 CAPÍTULO I - Avaliação do potencial biotecnológico de actinobactérias endofíticas isoladas de Asteraceae.....	3
2.1 INTRODUÇÃO.....	3
2.1.1 Produtos naturais	3
2.1.2 Micro-organismos endofíticos	4
2.1.3 Características gerais de actinobactérias e sua importância	7
2.1.4 Busca por novos antimicrobianos e anticancerígenos	15
2.1.2 Asteraceae.....	16
2.1.2.1 <i>Lychnophora ericoides</i>	17
2.1.2.2 <i>Tithonia diversifolia</i>	18
2.2 OBJETIVOS	20
2.2.1 Objetivo geral	20
2.2.2 Objetivos específicos	20
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	21
2.3.1 Material.....	21
2.3.1.1 Solventes.....	21
2.3.1.2 Reagentes e fases estacionárias usados nos meios de cultura, ensaios antimicrobianos e colunas cromatográficas.....	21
2.3.1.3 Equipamentos e vidrarias.....	21
2.3.1.4 Micro-organismos utilizados nos ensaios antimicrobianos	22
2.3.1.5 Linhagens tumorais utilizadas	22
2.3.2 Métodos	22
2.3.2.1 Coleta das amostras vegetais	22
2.3.2.2 Esterilização superficial.....	23
2.3.2.3 Isolamento de micro-organismos endofíticos.....	24
2.3.2.4 Preservações dos micro-organismos isolados.....	25
2.3.2.5 Identificação dos micro-organismos isolados	25
2.3.2.6 Cultivo dos micro-organismos endofíticos e preparação dos extratos	26
2.3.2.6.1 Pré-inóculo	26
2.3.2.6.1.1 Pré-inóculo (triagem).....	26
2.3.2.6.1.2 Pré-inóculo (escala ampliada).....	26

2.3.2.6.2 Cultivo em meio sólido	26
2.3.2.6.3 Obtenção dos extratos	27
2.3.2.6.3.1 Extração (triagem)	27
2.3.2.6.3.2 Extração (escala ampliada)	27
2.3.2.7 Ensaios biológicos	29
2.3.2.7.1 Atividade antimicrobiana por concentração mínima inibitória (CIM).....	29
2.3.2.7.1.1 Preparo do antibiótico padrão (estreptomicina).....	29
2.3.2.7.1.2 Preparo do antibiótico padrão (penicilina G).....	29
2.3.2.7.1.3 Preparo do antibiótico padrão (miconazol).....	29
2.3.2.7.1.4 Preparo do inóculo - bactéria.....	30
2.3.2.7.1.5 Preparo do inóculo - levedura.....	30
2.3.2.7.1.6 Preparo das amostras	30
2.3.2.7.1.7 Preparo da solução reveladora	31
2.3.2.7.2 Atividade citotóxica.....	34
2.3.2.8 Fracionamento e isolamento de compostos produzidos pelas linhagens <i>Streptomyces</i> sp. RLe 8 e <i>Streptomyces cattleya</i> RLe 4	35
2.3.2.9 Comparação via CLAE-DAD entre extratos dos micro-organismos e da planta hospedeira	40
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
2.4.1 Isolamento, preservação, identificação e ensaios biológicos de actinobactérias endofíticas.....	41
2.4.2 Isolamento dos metabólitos secundários do cultivo em arroz de <i>Streptomyces</i> sp. RLe 8 e <i>Streptomyces cattleya</i> RLe 4	54
2.4.3 Determinação estrutural dos compostos isolados do cultivo em arroz de <i>Streptomyces</i> sp. RLe 8 e <i>Streptomyces cattleya</i> RLe 4	58
2.4.3.1 Determinação estrutural da 3-hidroxibenzamida (Ss 1) e 2-hidroxibenzamida (Sc 8).....	58
2.4.3.2 Determinação estrutural de 4-hidróxi-3-metoxibenzamida (Ss 2) e 3-hidróxi- 4-metoxibenzamida (Ss 3)	72
2.4.3.3 Determinação estrutural de 3,4-dimetoxibenzamida (Ss 9).....	85
2.4.3.4 Determinação estrutural de benzamida (Ss 4)	92
2.4.3.5 Determinação estrutural de 3,4-diidro-3,4,6,8-tetraidróxi-1(2H)-naftalenona (Ss 5).....	99
2.4.3.6 Determinação estrutural de 3,4-diidro-3,4,6,8-tetraidróxi-1(2H)-naftalenona (Ss 6) e 2-fenilacetamida (Ss 7) em mistura	108
2.4.3.7 Determinação estrutural de 2,3-diidro-2,2-dimetil-4(1H)-quinazolinona (Ss 10).....	117
2.4.3.8 Determinação estrutural de desferrioxamina E (Sc 11) e desferrioxamina B (Ss 12).....	124
2.4.3.9 Determinação estrutural de 1-(3',4'-dimetoxifenil)-1-propanona (Sc 13)	148
2.4.3.10 Determinação estrutural de 1-(3',4'-dimetoxifenil)-1-etanona (Sc 14).....	156
2.4.4 Comparação metabólica actinobactéria <i>versus</i> planta hospedeira.....	164
2.5 CONCLUSÕES.....	167
3 CAPÍTULO II - Investigação biossintética de aristoloquenos em <i>Botrytis cinerea</i>....	169
3.1 INTRODUÇÃO.....	169
3.1.1 <i>Botrytis cinerea</i> - “mofo cinzento”	169

3.2 OBJETIVOS	173
3.2.1 Objetivo geral	173
3.2.2 Objetivos específicos	173
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	174
3.3.1 Linhagens de <i>Botrytis cinerea</i>	174
3.3.2 Otimização das condições de cultivo de <i>Botrytis cinerea</i> para o estudo de biossíntese dos sesquiterpenos da classe dos aristoloquenos	174
3.3.2.1 Otimização das condições de cultivo para a produção dos sesquiterpenos da classe dos aristoloquenos pelo fungo <i>Botrytis cinerea</i>	174
3.3.2.2 Otimização para a incorporação dos substratos marcados para o estudo de biossíntese.....	176
3.3.2.3 Incorporação de acetato de sódio deuterado (D_3 , 99%) e acetato de sódio marcado com ^{13}C (1- ^{13}C , 99%) para o estudo de biossíntese	177
3.3.2.4 Incorporação de acetato de sódio deuterado (D_3 , 99%) e acetato de sódio marcado com ^{13}C (2- ^{13}C , 99%) para o estudo de biossíntese em ausência de glicose	178
3.3.2.5 Incorporação de glicose deuterada (6,6- D_2 , 99%) para o estudo de biossíntese em ausência de glicose.....	178
3.3.3 Isolamento de sesquiterpenos da classe dos aristoloquenos por métodos cromatográficos	179
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	181
3.4.1. Vias de biossíntese dos terpenos.....	181
3.4.2. Estudos biossintéticos em <i>Botrytis cinerea</i>	192
3.5 CONCLUSÕES.....	216
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	217

RESUMO

CONTI, R. **Micro-organismos de interesse farmacêutico e agrícola: estudo químico e biossintético**. 2012. 236f. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A biodiversidade microbiana de diferentes ecossistemas tem incentivado estudos químicos e biológicos com micro-organismos dos mais variados habitats, os quais têm conduzido à obtenção de moléculas bioativas com aplicações na medicina, indústria química e agricultura, proporcionando melhorias na qualidade de vida ao homem. O presente trabalho teve como objetivos a bioprospecção por actinobactérias endofíticas e seus metabólitos, além do estudo da via biossintética dos sesquiterpenos aristoloquenos produzidos pelo fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea*. No estudo de bioprospecção foram isoladas 41 linhagens de actinobactérias endofíticas de duas espécies de Asteraceae (*Thitonia diversifolia* e *Lychnophora ericoides*). A identificação através do sequenciamento de DNAr indicou predominância do gênero *Streptomyces*. As linhagens foram cultivadas em meio de arroz e os extratos etanólicos submetidos aos ensaios de citotoxicidade frente a células tumorais e antimicrobiano. Um total de 58,5% dos extratos apresentou atividade em pelo menos um dos ensaios realizados. Foram selecionadas as linhagens *Streptomyces cattleya* RLe 4 e *Streptomyces* sp. RLe 8 para cultivo em escala ampliada, isolamento e identificação de metabólitos bioativos. O isolamento dos compostos foi realizado através de diferentes técnicas cromatográficas e a identificação estrutural foi baseada em dados de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas. De *S. cattleya* RLe 4 foram isolados quatro compostos: 2-hidroxibenzamida, desferrioxamina E, 1-(3',4'-dimetoxifenil)-1-propanona e 1-(3',4'-dimetoxifenil)-1-etanona. Dos extratos de *Streptomyces* sp. RLe 8 foram isolados dez compostos: benzamida, 3-hidroxibenzamida, 3-hidróxi-4-metoxibenzamida, 4-hidróxi-3-metoxibenzamida, 3,4-dimetoxibenzamida, 2-fenilacetamida, dois isômeros de 3,4-diidro-3,4,6,8-tetraidrôxi-1(2H)-naftalenona, 2,3-diidro-2,2-dimetil-4(1H)-quinazolinona e desferrioxamina B. O composto 2,3-diidro-2,2-dimetil-4(1H)-quinazolinona apresentou elevada atividade frente as células de câncer de cólon (HCT-8) e glioblastoma (SF295), com 93,9 % e 87,0 % de inibição, respectivamente. O outro enfoque da tese envolveu a otimização da produção de sesquiterpenos aristoloquenos por linhagens de *B. cinerea*, seguido de estudo biossintético destes produtos naturais através de experimentos de incorporação de precursores isotopicamente enriquecidos com ^2H (deutério) e ^{13}C (carbono treze). As análises dos dados obtidos de RMN de ^2H e de ^{13}C do sesquiterpeno majoritário indicaram que a biossíntese desta substância ocorre pela via do mevalonato (MVA). Os resultados também sugeriram o possível envolvimento da via do metil-eritritolfosfato ou 1-desoxi-D-xilulose-fosfato (MEP/DPX) na biossíntese deste sesquiterpeno. Estes resultados podem contribuir para o planejamento racional de fungicidas seletivos com aplicação na agricultura. O trabalho desenvolvido mostrou o grande potencial de actinobactérias endofíticas para a obtenção de moléculas bioativas e que estudos usando precursores isotopicamente marcados fornecem informações precisas acerca da origem biossintética de produtos naturais.

Palavras Chave: Actinobactérias; *Botrytis cinerea*; bioprospecção; biossíntese; endofítico e fitopatógeno.

ABSTRACT

CONTI, R. **Microorganisms of pharmaceutical and agricultural interests: chemical and biosynthetic studies**. 2012. 236f. Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The microbial biodiversity from different ecosystems has incited chemical and biological studies with microorganisms from several habitats, leading to the isolation of bioactive natural products with applications in medicine, chemical industry and agriculture, and thus contributing to a better quality of life. This thesis aimed the bioprospecting on endophytic actinobacteria and their natural products, and also the biosynthetic study of aristolochene sesquiterpenes in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. A total of 41 actinobacterial strains were isolated of two Asteraceae species (*Thitonia diversifolia* and *Lychnophora ericoides*) for the bioprospecting study. The rDNA sequencing showed predominancy of *Streptomyces* genus. All the strains were cultured on rice medium, and the ethanolic extracts were screened in cytotoxicity and antimicrobial assays. As a result, 58.5% of the extracts showed activity in at least one bioassay. The strains *Streptomyces cattleya* RLe 4 and *Streptomyces* sp. RLe 8 were selected for scale up cultures, isolation and identification of bioactive compounds. Different chromatographic methods were applied for the isolation of compounds, and structural analysis were based on ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance and mass spectrometry data. Four compounds were isolated from *S. cattleya* RLe 4: 2-hydroxybenzamide, desferrioxamine E, 1-(3',4'-dimethoxyphenyl)-1-propanone, and 1-(3',4'-dimethoxyphenyl)-1-ethanone. Ten compounds were isolated from *Streptomyces* sp. RLe 8: benzamide, 3-hydroxybenzamide, 3-hydroxy-4-methoxybenzamide, 4-hydroxy-3-methoxybenzamide, 2-phenylacetamide, two isomers of 3,4-dihydro-3,4,6,8-tetrahydroxy-1(2H)-naphthalenone, 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-4(1H)-quinazolinone, and desferrioxamine B. Compound 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-4(1H)-quinazolinone showed high antiproliferative activity against colon cancer cells (HCT-8) and glioblastoma cells (SF295), with 93.9 and 87.0% of inhibition, respectively. The second focus of the thesis involved the optimization of aristolochene sesquiterpenes production by two strains of *B. cinerea*, followed by the biosynthetic study through feeding experiments with ^2H (deuterium) and ^{13}C isotopically labeled precursors. The ^2H and ^{13}C NMR obtained data showed that the biosynthesis of the sesquiterpene proceeds by the mevalonate pathway (MVA). The results also suggested the possible participation of the non mevalonate pathway, methylerythritol phosphate ou 1-deoxy-D-xylulose phosphate (MEP/DXP), in the biosynthesis. These results might contribute to the rational design of selective fungicides with application in agriculture. This thesis showed the endophytic actinobacteria as promising sources of bioactive natural products, and also showed that the isotopically labeled feeding experiments give reliable information about the natural products biosynthetic pathways.

Key words: Actinobacteria; *Botrytis cinerea*; bioprospecting; biosynthesis; endophytic and phytopathogen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos fármacos inovativos derivados de produtos naturais (adaptado de GANESAN, 2008)	3
Figura 2 - Substâncias detectadas em micro-organismos endofíticos e isoladas de suas respectivas plantas hospedeiras	6
Figura 3 - Distribuição dos antibióticos descobertos entre 1950-2000, de acordo com suas origens (adaptado de BÉRDY, 2005).....	8
Figura 4 - Alguns antibióticos antibacterianos de uso clínico isolados de espécies de <i>Streptomyces</i>	15
Figura 5 - Alguns antibióticos antitumorais de uso clínico isolados de espécies de <i>Streptomyces</i>	16
Figura 6 - Alguns metabólitos secundários isolados de <i>L. ericoides</i>	18
Figura 7 - Alguns metabólitos secundários isolados de <i>T. diversifolia</i>	19
Figura 8 - Esquema geral de obtenção de micro-organismos endofíticos	25
Figura 9 - Esquema geral do cultivo em pequena escala em arroz e obtenção do extrato etanólico das linhagens para triagem biológica	28
Figura 10 - Esquema geral do cultivo e obtenção dos extratos e frações em escala ampliada das linhagens selecionadas.....	28
Figura 11 - Fluxograma para a obtenção das subfrações AcOEt da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. RLe 8 por coluna cromatográfica em sephadex LH20 a partir da fração AcOEt eluída com MeOH	35
Figura 12 - Fluxograma para o isolamento dos compostos Ss 1-Ss 10 da subfração RLe 8.3.3	36
Figura 13 - Fluxograma do fracionamento da subfração Rle 8.2 e obtenção dos compostos Ss 2, Ss 3 e Ss 9 por cromatografia líquida de alta eficiência	37
Figura 14 - Fluxograma do fracionamento da fração <i>n</i> -BuOH do cultivo de <i>Streptomyces</i> sp. RLe 8 e obtenção do composto Ss 12	38
Figura 15 - Fluxograma do fracionamento da fração AcOEt do cultivo de <i>S. cattleya</i> RLe 4 e obtenção dos compostos Sc 8, Sc 11, Sc 13 e Sc 14	39
Figura 16 - Isolamento de actinobactérias endofíticas das raízes de <i>Lychnophora ericoides</i>	43
Figura 17 - Isolamento de actinobactérias endofíticas das raízes de <i>Tithonia diversifolia</i>	43
Figura 18 - Isolamento de fungos endofíticos das folhas de <i>Erithrina speciosa</i>	43
Figura 19 - Amostragem da biodiversidade de micro-organismos endofíticos isolados de <i>T. diversifolia</i> e <i>L. ericoides</i>	44
Figura 20 - Preservação em óleo dos micro-organismos isolados.....	44
Figura 21 - Eletroforese do DNAr amplificado para sequenciamento em gel de agarose 1,5% em TAE. Regiões do DNAr amplificados: 16S (actinobactérias) e ITS (fungos); nº 1-7 - amostras de RNA amplificados dos micro-organismos endofíticos: 1 - RLe 5; 2 - RTd 14; 3 - RTd 7; 4 - RLe 11; 5 - RLe 3; 6 - Fle 5 e 7 - RTd 6 e os controles: 8 - controle positivo: <i>Escherichia coli</i> para 16S e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para ITS e 9 - controle negativo (reagentes); L - Ladder 100 bp.	49
Figura 22 - Culturas em placa de Petri das linhagens <i>Streptomyces cattleya</i> RLe 4 e <i>Streptomyces</i> sp. RLe 8 (21 dias a 30°C) em meio <i>International Streptomyces Project</i> 2 (ISP2).....	50
Figura 23 - Microscopia eletrônica por varredura (MEV) da linhagem <i>Streptomyces</i> sp. RLe 8 (foto cedida pelo Prof. Dr. Itamar S. Melo - EMBRAPA Jaquariuna)	50

Figura 24 - Espectro de RMN de ^1H do extrato EtOH de <i>S. cattleya</i> RLe 4 (D_2O , 500 MHz).....	51
Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H do extrato EtOH de <i>Streptomyces</i> sp. RLe 8 (D_2O , 500 MHz)	52
Figura 26 - Cromatograma da subfração Rle 8.3.3. Fase móvel: MeOH 6% em H_2O isocrático; Coluna preparativa: Shim-pack PREP-ODS (fase reversa, C-18) (2 x 25 cm); Vazão da fase móvel: 8 mL min^{-1} e detecção em 210 nm. *D subfração coletada 100% MeOH.....	55
Figura 27 - Cromatograma do pico A e obtenção do composto Ss 2. Fase móvel: MeOH 6% em H_2O isocrático; Coluna semipreparativa: Macherey/Nagel - VP250/10 nucleosil 120-5 C18 (fase-reversa) (250 mm x 10,0 mm, $5\mu\text{m}$) acoplado a pré-coluna Agilent Technologies (15 mm x 9,4 mm, $7\mu\text{m}$); Vazão da fase móvel: 4 mL min^{-1} e detecção em 210 nm	55
Figura 28 - Cromatograma dos picos reunidos B e C. Fase móvel: MeOH 12% em H_2O isocrático; Coluna preparativa: Shim-pack PREP-ODS (fase reversa) (2 x 25 cm); Vazão da fase móvel: 8 mL min^{-1} e detecção em UV em 210 nm	56
Figura 29 - Cromatograma da fase metanólica *D (limpeza). Fase móvel: MeOH 24% em H_2O isocrático; Coluna preparativa: Shim-pack PREP-ODS (fase reversa) (2 x 25 cm); Vazão da fase móvel: 8 mL min^{-1} e detecção em 210 nm.....	56
Figura 30 - Cromatograma da subfração Rle 4.5. Fase móvel: MeOH 45% em H_2O isocrático; Coluna preparativa: Shim-pack PREP-ODS (fase reversa, C-18) (2 x 25 cm); Vazão da fase móvel: 8 mL min^{-1} e detecção em 234 nm.....	57
Figura 31 - Cromatograma da subfração Rle 8c. Fase móvel: MeOH 17,5% em H_2O isocrático; Coluna preparativa: Shim-pack PREP-ODS (fase reversa, C-18) (2 x 25 cm); Vazão da fase móvel: 8 mL min^{-1} e detecção em 220 nm.....	57
Figura 32 - Cromatograma do composto Ss 12. Fase móvel: MeOH 5% em H_2O isocrático; Coluna preparativa: Shim-pack PREP-ODS (fase reversa, C-18) (2 x 25 cm); Vazão da fase móvel: 6 mL min^{-1} e detecção em 220 nm.....	57
Figura 33 - Fragmentação por IE do composto Ss 1 (adaptado de WATSON; SPARKMAN, 2007).....	59
Figura 34 - Fragmentação por IE do composto Sc 8 (adaptado de WATSON; SPARKMAN, 2007).....	61
Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H do composto Ss 1 (MeOH-d_4 , 500 MHz).....	63
Figura 36 - Mapa de contornos HMQC do composto Ss 1 (MeOH-d_4 , 500 MHz).....	64
Figura 37 - Mapa de contornos HMBC do composto Ss 1 (MeOH-d_4 , 500 MHz).....	65
Figura 38 - Espectro de massas obtido via CG do composto Ss 1	66
Figura 39 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Ss 1	66
Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H do composto Sc 8 (CDCl_3 , 500 MHz)	67
Figura 41 - Mapa de contornos COSY do composto Sc 8 (CDCl_3 , 500 MHz).....	68
Figura 42 - Mapa de contornos HMQC do composto Sc 8 (CDCl_3 , 500 MHz).....	69
Figura 43 - Mapa de contornos HMBC do composto Sc 8 (CDCl_3 , 500 MHz).....	70
Figura 44 - Espectro de massas obtido via CG do composto Sc 8.....	71
Figura 45 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Sc 8.....	71
Figura 46 - Estrutura química da vanilina	74
Figura 47 - Esquema geral da biossíntese da vanilina (adaptado de NARBAD; GASSON, 1998).....	75
Figura 48 - Espectro de RMN de ^1H do composto Ss 2 (MeOH-d_4 , 500 MHz).....	77
Figura 49 - Mapa de contornos HMQC do composto Ss 2 (MeOH-d_4 , 500 MHz).....	78
Figura 50 - Mapa de contornos HMBC do composto Ss 2 (MeOH-d_4 , 500 MHz).....	79
Figura 51 - Espectro de massas obtido via CG do composto Ss 2	80

Figura 52 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Ss 2	80
Figura 53 - Espectro de RMN de ^1H do composto Ss 3 (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	81
Figura 54 - Mapa de contornos HMQC do composto Ss 3 (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	82
Figura 55 - Mapa de contornos HMBC do composto Ss 3 (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	83
Figura 56 - Espectro de massas obtido via CG do composto Ss 3	84
Figura 57 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Ss 3	84
Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H do composto Ss 9 (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	88
Figura 59 - Mapa de contornos HMQC do composto Ss 9 (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	89
Figura 60 - Mapa de contornos HMBC do composto Ss 9 (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	90
Figura 61 - Espectro de massas obtido via CG do composto Ss 9	91
Figura 62 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Ss 9	91
Figura 63 - Fragmentação obtida por IE do composto Ss 4 (adaptado de HOLMES; BENOIT, 1971; WATSON; SPARKMAN, 2007).....	93
Figura 64 - Espectro de RMN de ^1H do composto Ss 4 (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	95
Figura 65 - Mapa de contornos HMQC do composto Ss 4 (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	96
Figura 66 - Mapa de contornos HMBC do composto Ss 4 (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	97
Figura 67 - Espectro de massas obtido via CG do composto Ss 4	98
Figura 68 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Ss 4	98
Figura 69 - Fragmentação por IE do composto Ss 5 (adaptado de WATSON; SPARKMAN, 2007).....	100
Figura 70 - Rota biossintética parcial da via da melanina pelo fungo <i>Wangiella dermatitidis</i> (adaptado de WHEELER et al., 2008)	102
Figura 71 - Espectro de RMN de ^1H do composto Ss 5 (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	103
Figura 72 - Mapa de contornos COSY do composto Ss 5 (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	104
Figura 73 - Mapa de contornos HMQC do composto Ss 5 (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	105
Figura 74 - Mapa de contornos HMBC do composto Ss 5 (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	106
Figura 75 - Espectro de massas obtido via CG do composto Ss 5	107
Figura 76 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Ss 5	107
Figura 77 - Fragmentação por IE do composto Ss 7 (adaptado de LEE; MAYER; WOLFGANG, 1988)	109
Figura 78 - Espectro de RMN de ^1H da subfração Rle 8 S2.2, destacando os deslocamentos químicos e integrais dos sinais referentes ao composto Ss 6 (*) e Ss 7 (●) (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	111
Figura 79 - Mapa de contornos COSY da subfração Re 8 S2.2 que contém os compostos Ss 6 e Ss 7 (MeOH- d_4 , 500 MHz)	112
Figura 80 - Mapa de contornos HMQC da subfração Rle 8 S2.2 que contém os compostos Ss 6 e Ss 7 (MeOH- d_4 , 500 MHz)	113
Figura 81 - Mapa de contornos HMBC da subfração Rle 8 S2.2 que contém os compostos Ss 6 e Ss 7 (MeOH- d_4 , 500 MHz)	114
Figura 82 - Espectro de massas obtido via CG do composto Ss 6	115
Figura 83 - Espectro de massas obtido via CG do composto Ss 7	115
Figura 84 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES da mistura dos composto Ss 6 e Ss 7	116
Figura 85 - Fragmentação por IE do composto Ss 10 (adaptado de DAENENS; VAN BOVEN, 1976; SAEED; SHAHEEN; BOLTE, 2010)	118
Figura 86 - Espectro de RMN de ^1H do composto Ss 10 (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	120
Figura 87 - Mapa de contornos HMQC do composto Ss 10 (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	121
Figura 88 - Mapa de contornos HMBC do composto Ss 10 (MeOH- d_4 , 500 MHz).....	122
Figura 89 - Espectro de massas obtido via CG do composto Ss 10	123
Figura 90 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Ss 10	123

Figura 91 - Proposta da via biogenética das desferrioxaminas B e E. (adaptado de UEKI et al., 2009).....	128
Figura 92 - Estrutura dos complexos férricos ferrioxamina B e E (adaptado de ESSÉN et al., 2007).....	129
Figura 93 - Espectro de RMN de ^1H do composto Sc 11 (DMSO- d_6 , 500 MHz).....	131
Figura 94 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto Sc 11 (DMSO- d_6 , 500 MHz).....	132
Figura 95 - Mapa de contornos COSY do composto Sc 11 (DMSO- d_6 , 500 MHz)	133
Figura 96 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto Sc 11 (DMSO- d_6 , 125 MHz).....	134
Figura 97 - Espectro de DEPT do composto Sc 11 (DMSO- d_6 , 125 MHz).....	135
Figura 98 - Mapa de contornos HMQC do composto Sc 11 (DMSO- d_6 , 500 MHz)	136
Figura 99 - Mapa de contornos HMBC do composto Sc 11 (DMSO- d_6 , 500 MHz)	137
Figura 100 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Sc 11 ..	138
Figura 101 - Espectro de RMN de ^1H da fração <i>n</i> -BuOH do cultivo em arroz de <i>Streptomyces</i> sp. RLe 8 (DMSO- d_6 , 500 MHz)	139
Figura 102 - Espectro de RMN de ^1H do composto Ss 12 (D_2O , 500 MHz)	140
Figura 103 - Mapa de contornos COSY do composto Ss 12 (D_2O , 500 MHz).....	141
Figura 104 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto Ss 12 (D_2O , 125 MHz)	142
Figura 105 - Espectro de DEPT do composto Ss 12 (D_2O , 125 MHz)	143
Figura 106 - Mapa de contornos HMQC do composto Ss 12 (D_2O , 500 MHz)	144
Figura 107 - Mapa de contornos HMBC do composto Ss 12 (D_2O , 500 MHz).....	145
Figura 108 - Ampliação do Mapa de contornos HMBC do composto Ss 12 (D_2O , 500 MHz).....	146
Figura 109 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Ss 12 ..	147
Figura 110 - Fragmentação por IE do composto Sc 13 (adaptado de WATSON; SPARKMAN, 2007).....	149
Figura 111 - Espectro de RMN de ^1H do composto Sc 13 (CDCl_3 , 500 MHz)	151
Figura 112 - Mapa de contornos HMQC do composto Sc 13 (CDCl_3 , 500 MHz).....	152
Figura 113 - Mapa de contornos HMBC do composto Sc 13 (CDCl_3 , 500 MHz).....	153
Figura 114 - Ampliação do mapa de contornos HMBC do composto Sc 13 (CDCl_3 , 500 MHz).....	154
Figura 115 - Espectro de massas obtido via CG do composto Sc 13	155
Figura 116 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Sc 13 ..	155
Figura 117 - Fragmentação por IE do composto Sc 14 (adaptado de WATSON; SPARKMAN, 2007).....	157
Figura 118 - Espectro de RMN de ^1H do composto Sc 14 (CDCl_3 , 500 MHz)	159
Figura 119 - Mapa de contornos HMQC do composto Sc 14 (CDCl_3 , 500 MHz).....	160
Figura 120 - Mapa de contornos HMBC do composto Sc 14 (CDCl_3 , 500 MHz).....	161
Figura 121 - Ampliação do mapa de contornos HMBC do composto Sc 14 (CDCl_3 , 500 MHz).....	162
Figura 122 - Espectro de massas obtido via CG do composto Sc 14	163
Figura 123 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Sc 14 ..	163
Figura 124 - Cromatogramas do extrato da folha de <i>L. ericoides</i> (a) e do extrato da actinobactéria <i>S. cattleya</i> RLe 4 (b)	164
Figura 125 - Comparação dos espectros de absorção no UV do extrato da folha de <i>L. ericoides</i> (a) e do extrato da actinobactéria <i>S. cattleya</i> RLe 4 (b) no tempo de retenção de 27 minutos (*)	165
Figura 126 - 6,8-di- <i>C</i> - β -glicosilcrisina isolada do extrato das folhas de <i>L. ericoides</i>	165
Figura 127 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do extrato AcOEt das folhas de <i>L. ericoides</i>	166

Figura 128 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES da subfração Rle 4.7.....	166
Figura 129 - Representantes das classes químicas isoladas de <i>B. cinerea</i>	171
Figura 130 - <i>Botrytis cinerea</i> UCA 992.....	174
Figura 131 - <i>Botrytis cinerea</i> B05-10 cnd15.....	174
Figura 132 - Esquema geral da otimização para a produção dos sesquiterpenos da classe dos aristoloquenos produzidos por <i>Botrytis cinerea</i>	176
Figura 133 - Esquema geral da otimização para a incorporação dos substratos marcados.....	177
Figura 134 - Esquema utilizado para adição de $\text{HOCD}_2(\text{CHOH})_4\text{CHO}$ para o estudo de biossíntese dos compostos da classe dos aristolequenos.....	179
Figura 135 - Fluxograma do fracionamento do extrato Cnd15 AcOEt e subfração Cnd15Aad3.....	180
Figura 136 - Estrutura geral dos sesquiterpenos da classe dos aristoloquenos.....	181
Figura 137 - Interconversão de IPP em DMAPP por transposição antarafacial [1,3] de hidrogênio, catalisada pela isomerase IPP. (adaptado de DURBECQ et al., 2001)....	183
Figura 138 - Rotas biossintéticas da via do MVA e do DXP/MEP na formação de IPP e DMAPP (adaptado de DEWICK, 2009; DICKSCHAT et al., 2011).....	184
Figura 139 - Molécula de citidina trifosfato (CTP).....	185
Figura 140 - Mecanismo da condensação “cabeça-cauda” na conjugação das unidades isoprênicas por intermédio das preniltransferases (adaptado de ZHANG; DEMAINE, 2005; DEWICK, 2009).....	186
Figura 141 - Biossíntese das diferentes classes de terpenóides (adaptado de WENDT; SCHULZ, 1998; ZHANG; DEMAINE, 2005; DEWICK, 2009).....	187
Figura 142 - Biossíntese dos sesquiterpenos por dois mecanismos de ciclização a partir do precursor pirofosfato de farnesila, os números indicados acima das setas referem-se às porções dos átomos de carbono envolvidas nas ciclizações (adaptado de DICKSCHAT, 2011).....	189
Figura 143 - Rota biossintética de sesquiterpenos derivados do cátion pirofosfato de germacrila (adaptado de DEWICK, 2009).....	191
Figura 144 - Estrutura dos aristoloquenos utilizados como padrões para o estudo de biossíntese.....	193
Figura 145 - Cromatografia em camada delgada comparativa de algumas frações obtidas dia-a-dia dos cultivos em agitação e estático da linhagem mutante <i>B. cinerea</i> B05-10 cnd15; fase móvel: AcOEt:Hex 8:2 (v/v); padrões: 1a ; 1b ; 1c ; 1d e M - mistura (1a e 1b) e revelador: <i>oleum</i>	194
Figura 146 - Cromatograma da subfração Cnd15Aad3 e isolamento do composto Bc 15 (representado pela seta). Fase móvel: Hex:AcOEt 2,5:7,5 (v/v); Coluna semi-preparativa: Lichrospher [®] Si 80 (10um) 25 cm x 1 cm; Vazão da fase móvel: 2,5 mL min ⁻¹ e detecção por índice de refração (RID).....	194
Figura 147 - Espectro de RMN de ¹ H do composto Bc 15 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	195
Figura 148 - Espectro de RMN de ¹³ C do composto Bc 15 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	196
Figura 149 - Estrutura química do composto Bc 15	198
Figura 150 - Espectro de RMN de ² H do composto Bc 15 obtido do primeiro experimento com CD ₃ COONa (CHCl ₃ , 400 MHz).....	200
Figura 151 - Espectro de RMN de ¹³ C do composto Bc 15 não marcado para comparação com o experimento CH ₃ COONa 1- ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz).....	201
Figura 152 - Espectro de RMN de ¹³ C do composto Bc 15 enriquecido isotopicamente com ¹³ C após incorporação de CH ₃ COONa 1- ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz).....	201

Figura 153 - Rota biossintética dos aristoloquenos a partir da incorporação de CH_3COONa 1- ^{13}C (adaptado de DELIGEORGOPOULOU; ALLEMANN, 2003; DEWICK, 2009; DICKSCHAT et al., 2011)	203
Figura 154 - Espectro de RMN de ^2H do composto Bc 15 em CHCl_3 (CHCl_3 , 400 MHz).....	205
Figura 155 - Rota biossintética dos aristoloquenos a partir da incorporação de CD_3COONa (adaptado de DELIGEORGOPOULOU; ALLEMANN, 2003; DEWICK, 2009; DICKSCHAT, 2011).....	206
Figura 156 - RMN de ^{13}C do composto Bc 15 não marcado com CH_3COONa 2- ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz).....	207
Figura 157 - RMN de ^{13}C do composto Bc 15 marcado com CH_3COONa 2- ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz).....	207
Figura 158 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do composto Bc 15 marcado com CH_3COONa 2- ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz) mostrando o acoplamento existente entre os carbonos 4a e 12.....	208
Figura 159 - Rota biossintética dos aristoloquenos a partir da incorporação de CH_3COONa 2- ^{13}C (adaptado de DELIGEORGOPOULOU; ALLEMANN, 2003; DEWICK, 2009; DICKSCHAT et al., 2011)	209
Figura 160 - Via da glicólise e a quebra de $\text{HOCD}_2(\text{CHOH})_4\text{CHO}$ em gliceraldeído-3-fosfato, piruvato e acetil-CoA (adaptado de NELSON; COX, 2008).....	211
Figura 161 - Formação de unidades isoprênicas (IPP e DMAPP) a partir da glicose como substrato (adaptado de BERNARDS, 2010).....	212
Figura 162 - Formação dos precursores IPP e DMAPP da biossíntese de sesquiterpenos a partir da glicose deuterada [$\text{HOCD}_2(\text{CHOH})_4\text{CHO}$] como substrato (adaptado de DEWICK, 2009)	213
Figura 163 - RMN de ^2H do composto Bc 15 marcado com $\text{HOCD}_2(\text{CHOH})_4\text{CHO}$ em CHCl_3 (CHCl_3 , 400 MHz).....	214

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número aproximado de produtos naturais microbianos bioativos isolados até 2002 (adaptado de BÉRDY, 2005).....	9
Tabela 2 - Novos compostos bioativos isolados de actinobactérias endofíticas	10
Tabela 3 - Rendimentos dos extratos etanólicos do cultivo estático em meio sólido de arroz em pequena escala das actinobactérias endofíticas isoladas das folhas e raízes de <i>L. ericoides</i> e <i>T. diversifolia</i>	45
Tabela 4 - Percentual de inibição do crescimento celular de três linhagens tumorais apresentados pelos extratos etanólicos de actinobactérias endofíticas (50 µg mL ⁻¹).....	47
Tabela 5 - Atividade antimicrobiana representada pelos valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos etanólicos dos cultivos estáticos em meio sólido de arroz das actinobactérias endofíticas isoladas das folhas e raízes de <i>L. ericoides</i> e <i>T. diversifolia</i>	48
Tabela 6 - Identificação a nível molecular das linhagens com atividade biológica pelo sequenciamento da região 16S do DNAr	49
Tabela 7 - Rendimentos das frações obtidas por partição líquido-líquido dos cultivos em escala ampliada das linhagens <i>S. cattleya</i> RLe 4 e <i>Streptomyces</i> sp. RLe 8.....	53
Tabela 8 - Atividade citotóxica das frações AcOEt, <i>n</i> -BuOH e Hex das linhagens <i>Streptomyces</i> . sp. RLe 8 e <i>S. cattleya</i> RLe 4 e subfrações da fração AcOEt de RLe 8 através do percentual de inibição do crescimento celular em três linhagens tumorais (50 µg/mL)	53
Tabela 9 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C em MeOH-d ₄ do composto Ss 1	60
Tabela 10 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C em CDCl ₃ do composto Sc 8	62
Tabela 11 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C em MeOH-d ₄ do composto Ss 2	73
Tabela 12 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C em MeOH-d ₄ do composto Ss 3	76
Tabela 13 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C em MeOH-d ₄ do composto Ss 9	86
Tabela 14 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C em MeOH-d ₄ do composto Ss 4	93
Tabela 15 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C em MeOH-d ₄ do composto Ss 5	101
Tabela 16 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C em MeOH-d ₄ do composto Ss 10	119
Tabela 17 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C em DMSO-d ₆ do composto Sc 11	126
Tabela 18 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C em D ₂ O do composto Ss 12	127
Tabela 19 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C em CDCl ₃ do composto Sc 13	150
Tabela 20 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C em CDCl ₃ do composto Sc 14	158
Tabela 21 - Classificação taxonômica sexual e assexual de <i>Botrytis cinerea</i> Pers.: Fr. <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetz. (adaptado de BEEVER; WEEDS, 2004).....	169
Tabela 22 - Dados de RMN de ¹ H, RMN de ¹³ C e bidimensionais em CDCl ₃ do composto Bc 15	197
Tabela 23 - Rendimento (mg) dos extratos AcOEt dos cultivos em agitação em meio Cz-dox	199
Tabela 24 - Valores da área e integral dos carbonos do composto Bc 15 marcado, não-marcado e a porcentagem de incorporação de CH ₃ COONa 1- ¹³ C.....	201
Tabela 25 - Valores da área e integral dos carbonos do composto Bc 15 marcado, não-marcado e a porcentagem de incorporação de CH ₃ COONa 2- ¹³ C.....	209

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Compostos isolados dos cultivos em arroz de <i>Streptomyces</i> sp. RLe 8 e <i>Streptomyces cattleya</i> RLe 4 agrupados por classe química.....	54
--	----

LISTA DE PROTOCOLOS

PROTOCOLO 1 - Triagem de actinobactérias CIM – Concentração inibitória mínima por microdiluição. Extratos (Amostras).....	32
PROTOCOLO 2 - Triagem de actinobactérias CIM – Concentração inibitória mínima por microdiluição. Controles.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
Bc	<i>Botrytis cinerea</i>
CC	Coluna Cromatográfica
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CDP-ME2P	4-fosfatocitidina-2- <i>C</i> -metil- <i>D</i> -eritritol-2-fosfato
CDP-MEP	4-fosfatocitidina-2- <i>C</i> -metil- <i>D</i> -eritritol
CG	Cromatografia gasosa
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CTP	Citidina trifosfato
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>dl</i>	Dubleto largo
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalila
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPX	1-deoxi- <i>D</i> -xilulose-fosfato
EM	Espectrometria de massas
EtOH	Etanol
FGPP	Pirofosfato de farnesilgeranila
FM	Fase móvel
FPP	Pirofosfato de farnesila
GGPP	Pirofosfato de geranilgeranila
GPP	Pirofosfato de geranila
<i>h</i>	Altura
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i>
HMBPP	Pirofosfato de 4-hidróxi-3-metil-but-2-enila
HMG-CoA	3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA
HMGR	Hidroximetilglutaril-CoA redutase

HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i>
IE	Impacto eletrônico
IES	Ionização por eletrospray
IPP	Pirofosfato de isopentenila
<i>J</i>	Constante de acoplamento (em Hz)
<i>m</i>	Múltiplo
MEcPP	2- <i>C</i> -metil- <i>D</i> -eritritol-2,4-ciclodifosfato
MeOH	Metanol
MEP	2- <i>C</i> -metil- <i>D</i> -eritritol-4-fosfato
MHz	Mega hertz
MVA	Mevalonato ou ácido mevalônico
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
O	Oeste
RLe	Raiz <i>Lychnophora ericoides</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN 1D	Ressonância magnética nuclear unidimensional
RMN 2D	Ressonância magnética nuclear bidimensional
rpm	Rotação por minuto
RTd	Raiz <i>Tithonia diversifolia</i>
S	Sul
<i>s</i>	Singleto
Sc	<i>Streptomyces cattleya</i>
<i>sl</i>	Singleto largo
Ss	<i>Streptomyces</i> sp.
<i>t</i>	Tripleto
<i>tl</i>	Tripleto largo
TPP	Difosfato de tiamina
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico
$\square$	Diâmetro

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Micro-organismos de interesse farmacêutico e agrícola: estudo químico e biossintético

A grande biodiversidade microbiana nos diferentes ecossistemas está associado a um grande potencial biotecnológico, o que tem incentivado intensos estudos com micro-organismos de distintos habitats. Os micro-organismos endofíticos destacam-se como fontes de produtos naturais que têm sido intensamente estudados nos últimos anos para a descoberta de moléculas bioativas de diferentes classes químicas, com aplicação na medicina, na indústria e na agricultura (GUNATILAKA, 2006; QIN et al., 2011).

Os endofíticos, ao contrário dos micro-organismos patogênicos, não causam fitopatogenias aparentes a seus hospedeiros, podendo ser patógenos latentes, mutualísticos, comensalistas e/ou saprofíticos (BACON; WHITE, 2000; SCHULTZ; BOYLE, 2005; KOGL; FRANKEN; HÜCKELHOVEN, 2006).

Os micro-organismos endofíticos geralmente estão associados com a sanidade da planta que os hospeda através da produção ou inibição de metabólitos primários e/ou secundários como mecanismo de defesa, podendo proporcionar diversas vantagens ao hospedeiro, tais como: controle de insetos e animais herbívoros; produção de antimicrobianos contra micro-organismos fitopatogênicos; aumento da tolerância a estresses abióticos; produção de fito-hormônios, entre outros (SCHARDL; LEUCHTMANN; SPIERING, 2004; SELOSSE; BAUDOIN; VANDENKOORNHUYSE, 2004; HASHIBA; NARISAWA, 2005; BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006).

Outro exemplo de micro-organismos de interesse biotecnológico são os fitopatogênicos que, ao contrário dos endofíticos, causam danos à planta que os hospedam, consequentemente, diversos prejuízos ao setor agroindustrial em função do comprometimento às variadas plantações. Atualmente, as pesquisas de controle microbiológico vêm sendo uma das medidas empregadas em sistemas agroecológicos e em algumas plantações convencionais na tentativa de combater os fitopatógenos (VERMA; SINGH; PRAKASH, 2011). Outra forma de combate aos fitopatógenos são os estudos direcionados aos fatores de virulência e os mecanismos de infecção utilizados por estes micro-organismos, através de técnicas mais elaboradas como o da biossíntese (COLLADO; SÁNCHEZ; HANSON, 2007).

O conhecimento de biossíntese auxilia a desvendar as vias metabólicas envolvidas na produção de substâncias responsáveis pela infecção e propagação destes micro-organismos,

favorecendo a descoberta de novas formas de combate aos patógenos, e, conseqüentemente, contribuindo no melhoramento das lavouras e/ou na forma de manejo aplicado a elas, reduzindo o uso de agrotóxicos (ACERO et al., 2011).

O uso de agrotóxicos causa cada vez mais impactos nos ecossistemas. Tal fato induz a seleção de linhagens de micro-organismos mais resistentes, dificultando o controle das doenças, como no caso do fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea* (COLLADO; SÁNCHEZ; HANSON, 2007). Outros agravantes são o acúmulo de resíduos químicos nos lençóis freáticos, no solo e também nos alimentos, privando o consumidor de adquirir alimentos saudáveis, livres de agrotóxicos.

Os estudos de micro-organismos com aplicabilidade à saúde, da mesma forma que os envolvidos com a agricultura estão se mostrando promissores e contribuindo na melhoria da qualidade de vida da humanidade.

2 Capítulo I

Avaliação do Potencial Biotecnológico de Actinobactérias Endofíticas

Isoladas de Asteraceae

Capítulo I – Introdução

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Produtos naturais

Os produtos naturais apresentam uma grande importância para as indústrias farmacêutica e biotecnológica, em decorrência da sua diversidade e complexidade estruturais que os tornam interessantes modelos ou protótipos para a síntese e semissíntese de novas moléculas bioativas (CHIN et al., 2006; HARVEY, 2008; JOSEPH; PRIYA, 2011; BLUNT et al., 2011). Newman e Cragg (2007) analisaram a origem dos fármacos desenvolvidos e aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) entre 1981 a 2006 e concluíram que 63% das pequenas moléculas consideradas como entidades químicas apresentavam alguma correlação com produtos naturais. Destes fármacos, 6% são totalmente originários de produtos naturais, 28% são derivados semissintéticos e 29% são derivados miméticos ou de síntese total, porém foram baseados nos grupos farmacofóricos de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007). Estes dados foram recentemente atualizados (NEWMAN; CRAGG, 2012), englobando fármacos aprovados para uso clínico no período entre 1981-2010. As estatísticas são muito semelhantes à revisão anterior mostrando que, entre as pequenas moléculas aprovadas neste período de 30 anos, os produtos naturais e seus derivados semissintéticos ainda correspondem a 34% do total de fármacos.

Ganesan (2008) reavaliou os dados publicados por Newman e Cragg em 2007, aplicando filtros para analisar de fato as contribuições inovadoras dos produtos naturais na terapêutica após 1970. Desta análise resultaram 24 fármacos (produtos naturais ou derivados semissintéticos), dos quais 54% (n=13) foram obtidos de actinobactérias de solo, 21% de plantas, 17% de fungos e 8% de bactérias (Figura 1, pag. 3). Estes dados demonstram o grande potencial dos micro-organismos, em especial as actinobactérias, como fonte de obtenção de novos produtos naturais com aplicação farmacêutica.

Figura 1 - Distribuição dos fármacos inovativos derivados de produtos naturais (adaptado de GANESAN, 2008).

A exploração de novos habitats em processos biotecnológicos tem ajudado na descoberta de novos micro-organismos como fonte alternativa na obtenção de novos compostos, exemplo disso são os micro-organismos endofíticos (INAHASHI et al., 2011; YU et al., 2011). Um estudo realizado por Schulz e colaboradores (2002) observou que 51% dos metabólitos bioativos isolados dos cultivos destes micro-organismos tratavam-se de compostos inéditos, enquanto que das substâncias isoladas da microbiota do solo somente 38% eram novas. Gunatilaka (2006), Joseph e Priya (2011) também apontam a importância de se explorar a biodiversidade microbiana na busca por produtos naturais e sua importância no desenvolvimento de novos fármacos. Newman e Gragg (2012) enfatizam o número significativo de protótipos naturais produzidos por micro-organismos, destacando a importância do estudo das interações entre micro-organismos e seus hospedeiros na pesquisa por novos produtos naturais bioativos.

2.1.2 Micro-organismos endofíticos

A palavra endofítico é originária do grego (*éndon* + *phytón*), significando “dentro da planta”. O termo abrange principalmente bactérias e fungos que convivem de forma simbiótica com a planta hospedeira (OWEN; HUNDLEY, 2004; SCHULZ; BOYLE, 2005). A comunidade endofítica, ao contrário dos micro-organismos patogênicos, não causa fitopatogênias aparentes a seus hospedeiros, podendo ser patógenos latentes, mutualísticos, comensalistas e/ou saprofíticos (SCHULTZ; BOYLE, 2005; KOGEL; FRANKEN; HÜCKELHOVEN, 2006).

Os endófitos, com exceção dos transmitidos pelas sementes (transmissão vertical), penetram no vegetal primariamente através da zona radicular, embora micro-organismos do ar possam utilizar aberturas naturais como estômatos e hidatódios, presentes nas partes aéreas da planta como folhas, caule, cotilédones, flores e frutos (transmissão horizontal) (ZINNIEL et al., 2002; SAIKKONEN et al., 2004; MARINHO et al., 2005; TAYLOR et al., 2012). Os micro-organismos podem permanecer próximos ao local de entrada ou se disseminarem pelo sistema vascular, alojando-se intra e/ou intercelularmente (ZINNIEL et al., 2002).

Diversos estudos relatam que os micro-organismos endofíticos estão associados com a sanidade da planta que os hospeda em um equilíbrio, através da produção ou inibição de metabólitos primários e/ou secundários como mecanismo de defesa, conferindo diversas vantagens tais como: controle de insetos e animais herbívoros; produção de antimicrobianos contra micro-organismos fitopatogênicos (controle biológico); aumento da tolerância a

estresses abióticos; produção de fitohormônios e outros fatores de crescimento (SCHULZ; BOYLE, 2005; AFKHAMI; RUDGERS, 2009; VERMA; SINGH; PRAKASH, 2011).

A relação bioquímica e a produção de metabólitos secundários entre endófitos e suas plantas hospedeiras ainda não está totalmente esclarecida (OWEN; HUNDLEY, 2004; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Acredita-se que o metabólito bioativo produzido por estes micro-organismos esteja diretamente associado ao seu hospedeiro pela recombinação gênica ocorrida durante a fase evolutiva entre as espécies. Alguns dados da literatura têm mostrado a habilidade associada à versatilidade dos fungos endofíticos em produzir *in vitro* metabólitos secundários idênticos aos da planta hospedeira (Figura 2, pag. 6) (STROBEL et al., 1996; ALY et al., 2010).

O primeiro relato foi descrito por Stowe e Yamaki (1957) com o isolamento do ácido giberélico (3) da cultura de *Gibberela fugikuroi*, fungo endofítico de *Curcubita maxima*. Porém, o mais marcante exemplo foi o isolamento de paclitaxel (1) do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, a partir de *Taxus brevifolia* (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993), e posteriormente de outros fungos endofíticos (TAN; ZOU, 2001; STROBEL, 2002; STROBEL et al., 2004). Há também relatos da produção deste composto pela actinobactéria *Kitasatospora* sp. isolada de *Taxus baccata* (CARUSO et al., 2000). Rizzo e colaboradores (1997) isolaram tricotecenos macrocíclicos (4) do cultivo de *Ceratophyllum demersum*, fungo endofítico de *Baccharis coridifolia*. A vincristina (2), fármaco anticancerígeno, foi isolada do fungo endofítico *Mycelia sterilia* associado a *Catharanthus roseus* (YANG et al., 2004). *Entrophospora infrequens*, um endofítico isolado de *Nothapodytes foetida*, produziu o antitumoral camptotecina (5) (PURI et al., 2005). Outro produto natural vegetal, podofilotoxina (6), precursor de diversos agentes anticancerígenos semissintéticos, foi produzido por *Trametes hirsute*, um fungo endofítico de *Podophyllum hexandrum* (PURI et al., 2006) e também por *Phialocephala fortinii*, fungo associado com *Podophyllum peltatum* (EYBERGER; DONDAPATI; PORTER, 2006). A hipericina (7), produzida por *Hypericum perforatum*, é uma substância de diversas atividades biológicas e foi detectada nas culturas de seu endófito *Thielavia subthermophila* (KUSARI et al., 2008, 2009).

Figura 2 - Substâncias detectadas em micro-organismos endofíticos e isoladas de suas plantas hospedeiras.

Dentre os micro-organismos endofíticos estão as actinobactérias, com um número muito menor de estudos em comparação com os fungos, o que acarreta um conhecimento bastante limitado sobre a relação com a planta hospedeira e a produção de metabólitos.

Um dos primeiros relatos de actinobactérias como micro-organismos endofíticos foi observado por Brunchorst, em 1886, ao isolar dos nódulos das raízes de uma planta não-leguminosa a actinobactéria *Frankia*, que atua de forma simbiótica com sua planta hospedeira na fixação de nitrogênio. Mas isso só foi confirmado realmente por Silver, Becking e colaboradores em 1964 ao observarem por microscopia eletrônica que se tratava de um micro-organismo procarionte e não de um fungo (SWENSEN; BENSON, 2008).

Uma vantagem de se trabalhar com micro-organismos endofíticos é que mesmo com a existência de incontáveis micro-organismos epifíticos e do solo, a literatura destaca o potencial destes micro-organismos como uma fonte promissora de produtos naturais, importante para a descoberta de moléculas bioativas de diversas classes químicas com aplicação na medicina, na indústria e na agricultura (GUNATILAKA, 2006; BORGES et al., 2009; JOSEPH; PRIYA, 2011; QIN et al., 2011).

As actinobactérias endofíticas começaram a ser vistas como uma fonte alternativa na obtenção de novas moléculas bioativas após o isolamento da substância metilalbounoursina, que é um fraco antibiótico da classe das dicetopiperazinas, produzida por uma linhagem *Streptomyces* sp., isolada de sua planta hospedeira *Lolium perenne* (GURNEY; MANTLE, 1993).

Investigações recentes mostram que a utilização da etnobotânica para prospecção de micro-organismos de interesse biotecnológico de plantas medicinais constitui uma fonte de grande importância para a obtenção de novas moléculas com atividade biológica e de grande interesse terapêutico (WIYAKRUTTA et al., 2004; LI et al., 2005; ZHAO et al., 2011).

Outro fator positivo foi a obtenção de novos micro-organismos como *Streptomyces* SUK 06 (isolado como endofítico de fragmentos do caule de *Thottea grandiflora*, uma planta medicinal da Malásia utilizada como tônico em pós-parto, antitérmico e no tratamento da malária) e, recentemente, o *Streptosporangium oxazolinicum* sp. nov. K07-0460^T, produtor de novos antibióticos anti-tripanosoma isolado da raiz de uma Orchidaceae (GHADIN et al., 2008; INAHASHI et al., 2011).

2.1.3 Características gerais de actinobactérias e sua importância

O domínio Bacteria é representado por aproximadamente 53 filos; destes apenas 27 apresentam representantes cultiváveis, enquanto os demais são considerados como candidatos a filo, ou seja, são reconhecidos apenas pela classificação filogenética realizada através do sequenciamento do gene 16S RNAr (KELLER; ZENGLER, 2004). Dentre os filos cultiváveis está o Actinobacteria, representado por uma única classe também denominada Actinobacteria, composta por cinco subclasses, oito ordens, dezessete subordens e 57 famílias, constituindo um dos maiores e principais filos do domínio Bacteria (<http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html#Actinobacteria>, acessado em: 18/02/2011).

A classe Actinobacteria é formada por bactérias Gram-positivas, aeróbias em sua grande maioria e que, filogeneticamente, apresentam um alto teor de guanina e citosina em seu DNA, podendo variar de 51% em espécies do gênero *Corynebacterium*, a mais de 70% em espécies dos gêneros *Streptomyces* e *Frankia*, porém menos de 50% (C+G) foi observado em *Tropheryma whippelii* (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983; STACKEBRANDT; RAINEY; WARD-RAINEY, 1997; VENTURA et al., 2007). A classe Actinobacteria também exibe uma ampla variedade morfológica dentre as bactérias que a representa: cocóides (ex. *Micrococcus*); bacilos cocóides (ex. *Arthrobacter*); filamentos fragmentados (ex. *Nocardia*) e filamentos ramificados (ex. *Streptomyces*) (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983).

A palavra actinomiceto, atualmente conhecida por actinobactéria, é derivada do grego “aktis” (traço) e “mykes” (fungo), sendo aplicada principalmente às bactérias que apresentam uma organização filamentosa, muitas vezes ramificada, formada por um micélio vegetativo ou vegetativo e aéreo. Estes micro-organismos também são capazes de produzir cadeias de

esporos semelhantes aos conídios, o que os tornam muito semelhantes aos fungos imperfeitos (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1967). Actinobactérias são micro-organismos cosmopolitas, ou seja, estão distribuídos nos mais variados ecossistemas, principalmente no solo. Estes micro-organismos vivem em sua maioria como saprofíticos, executando um importante papel biológico como o da reciclagem de biomateriais, enquanto outros estão em relação mutualística ou parasitária com plantas e animais (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983).

Membros da ordem Actinomycetales como os da família Streptomycetaceae tornaram-se uma das principais fontes de obtenção de antibióticos após a descoberta da actinomicina por Waksman e Woodruff em 1940. Estes micro-organismos são importantes em processos biotecnológicos, especialmente na indústria farmacêutica, devido à sua grande capacidade de produzir metabólitos secundários de diversas classes químicas e atividades biológicas, sendo isoladas e empregadas na produção de diversos medicamentos como: enzimas, agentes antitumorais, imunomoduladores e, principalmente, antimicrobianos (GOODFELLOW; WILLIAMS; MORDARSKI, 1988; DEMAINE, 1995; BÉRDY, 2005; RAJA; PRABAKARANA, 2011).

A figura 3 (pag. 8) ilustra o número total de compostos bioativos descobertos entre 1950-2000, onde se pode observar a constante importância do principal e mais estudado gênero das actinobactérias *Streptomyces* na produção de antibióticos. Durante a “Era Dourada dos Antibióticos”, compreendida entre as décadas de 1940 e 1950, praticamente todas as principais classes de antibióticos usados terapêuticamente até hoje foram descobertas, entre elas os derivados β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos e peptídeos. Entre as décadas de 50 e 60, cerca de 70-80% dos antibióticos descobertos foram produzidos por espécies de *Streptomyces*. Os dados mostram ainda a contribuição crescente de fungos e bactérias na produção de compostos bioativos (BÉRDY, 2005).

Figura 3 - Distribuição dos antibióticos descobertos entre 1950-2000, de acordo com suas origens (retirado de BÉRDY, 2005).

A significativa contribuição de actinobactérias na produção de antibióticos e outras substâncias bioativas pode ser comparada com a de outros micro-organismos, como fungos e bactérias, através dos números apresentados na tabela 1 (pag. 9) (BÉRDY, 2005). A busca por actinobactérias é de grande importância na descoberta de novos fármacos. A população e a biodiversidade de actinobactérias em um ecossistema são determinadas por diversos fatores físicos, químicos e biológicos (WANG et al., 1999). Portanto, a exploração de novos habitats é crucial para a descoberta de novas actinobactérias.

Tabela 1 - Número aproximado de produtos naturais microbianos bioativos isolados até 2002 (adaptado de BÉRDY, 2005).

Fonte	Antibióticos	Outros metabólitos bioativos	Total de metabólitos bioativos	Metabólitos usados na terapêutica	Metabólitos inativos
Bactérias	2900	900	3800	8-10	3000-5000
Actinobactérias	8700	1400	10100	70-75	5000-10000
Fungos	4900	3700	8600	13-15	2000-15000
Total	16500	6000	22500	~ 100	20000-25000

A literatura sobre produtos naturais de fungos endofíticos é mais abundante que os relatos sobre substâncias de actinobactérias endofíticas. Porém, os dados publicados indicam a elevada habilidade das actinobactérias endofíticas na produção novas substâncias bioativas (Tabela 2, pag. 10). De acordo com Clardy e Walsh (2004), novas fontes biológicas frequentemente estão associadas à nova diversidade química, indicando que a pesquisa por substâncias bioativas inéditas a partir do estudo com actinobactérias endofíticas pode ser um campo promissor na química de produtos naturais microbianos.

Tabela 2 - Novos compostos bioativos isolados de actinobactérias endofíticas.

Actinobactéria	Planta hospedeira	Metabólito secundário	Classe química	Atividade	Referência
<i>Streptomyces</i> sp. NRRL 30562	<i>Kennedia nigriscans</i>	Munumbicins A, B, C, D, E-4 e E-5 (estruturas ainda não elucidadas)	Peptídeo	Antibacteriano Antifúngico Antiparasitário	CASTILLO et al., 2002 CASTILLO; STROBEL; MULLENBERG, 2006
<i>Streptomyces</i> sp. NRRL 30566	<i>Grevillea pteridifolia</i>	8 kakadumicina A kakadumicina B (estrutura não elucidada)	Peptídeo	Antibacteriano	CASTILLO et al., 2003
<i>Streptomyces</i> sp. MSU-2110	<i>Mostera</i> sp.	coronamicinas (estruturas ainda não elucidadas)	Peptídeo	Antifúngico Antiparasitário	EZRA et al., 2004
<i>Streptomyces</i> sp. CS	<i>Maytenus hookeri</i>	9: R ₁ =R ₂ =OH 10: R ₁ =OCH ₃ ; R ₂ =OH 11: R ₁ =R ₂ =OCH ₃ 9 24-desmetil-bafilomicina A1 10 21-O-metil-24-desmetil-bafilomicina A1 11 19,21-di-O-metil-24-desmetil-bafilomicina A1	Macrolídeo	Antitumoral	LI; LU; SHEN, 2010
		12 17,18-desidro-19,21-di-O-metil-24-desmetil-bafilomicina A1
		13 24-desmetil-bafilomicina D			

Actinobactéria	Planta hospedeira	Metabólito secundário	Classe química	Atividade	Referência
<i>Streptomyces</i> sp. CS	<i>Maytenus hookeri</i>		Macrolídeo	Antitumoral Antifúngico	LU; SHEN, 2003 LU; SHEN, 2004

		11 19,21-di- <i>O</i> -metil-24-desmetil-bafilomicina A1

		15 24-desmetilbafilomicina A2

		16 24-desmetilbafilomicina A2 desidratada			
<i>Streptomyces</i> <i>albidoflavus</i>	<i>Bruguiera</i> <i>gymnorrhiza</i>		Macrolídeo	Antifúngico	YAN et al., 2010

		17 antimicina A18			
<i>Streptomyces</i> sp. Is9131	<i>Maytenus hookeri</i>		Macrolídeo	Antitumoral Antibacteriano	ZHAO et al., 2005

		18 dinactina dimérica

		19 nonactina dimérica			
<i>Streptomyces</i> <i>hygroscopicus</i> TP-A0451	<i>Pteridium aquilinum</i>		δ -lactona	Antitumoral	IGARASHI et al., 2006

		20 pterocidina			

Actinobactéria	Planta hospedeira	Metabólito secundário	Classe química	Atividade	Referência
<i>Streptomyces</i> sp. SUC1	<i>Ficus benjamina</i>	<p>21 R= H 22 R= CH₃</p> <p>21 lansai A 22 lansai B</p>	Dicetopiperazina	Antitumoral Antifúngico	TUNTIWACHWUTTIKUL et al., 2008
<i>Streptomyces</i> <i>laceyi</i> MS53	<i>Ricinus communis</i> L.	<p>25 R= CH₃ 26 R= CH₂CH₃</p> <p>25 salaceína A 26 salaceína B</p>	Ác. 6- alquilsalicílico	Antitumoral	KIM et al., 2006
<i>Streptomyces</i> sp. GT-20026114	<i>Aegiceras</i> <i>comiculatum</i>	<p>27 5-hidróxi-3-[(metoxicarbonil)amino]-5-vinil-2-ciclopenten-1-ona</p> <p>28 3-amino-5-hidroxi-5-vinil-2-ciclopenten-1-ona</p> <p>29 3-isobutilpropanamida-2-ciclopenten-1-ona</p> <p>30 5-hidróxi-3-[[2-(4-hidroxifenil)etil]amino]-5-vinil-2-ciclopenten-1-ona</p>	Ciclopentenona	-----	LI et al., 2005

Actinobactéria	Planta hospedeira	Metabólito secundário	Classe química	Atividade	Referência
<i>Streptomyces</i> sp. Lz531	<i>Maytenus hookeri</i>	<p>31 ciclo (L-Pro-L-Val-L-Val)</p>	Peptídeo (31) Fenetilamida (32)	-----	ZHAO et al., 2007
		<p>32 13-metil-N-(2-feniletíl) tetradecanamida</p>			
<i>Micromonospora lupini</i> sp. nov. Lupac 08	<i>Lupinus angustifolius</i>	<p>33 R=CH₃ 34 R=H</p> <p>33 lupinacidina A 34 lupinacidina B</p>	Antraquinona	Antitumoral	IGARASHI et al., 2007
<i>Streptomyces griseus</i> HK10412	<i>Kandelia candel</i>	<p>35 ác. 7-(4-aminofenil)-2,4-dimetil-7-oxo-hept-5-enóico</p>	Ác. <i>p</i> -aminoacetofenônico	-----	GUAN, et al., 2005
		<p>36 ác. 9-(4-aminofenil)-7-hidróxi-2,4,6-trimetil-9-oxo-non-2-enóico</p>
		<p>37 ác. 12-(4-aminofenil)-10-hidróxi-6-(1-hidroxietil)-7,9-dimetil-12-oxo-dodeca-2,4-dienóico</p>			

Actinobactéria	Planta hospedeira	Metabólito secundário	Classe química	Atividade	Referência
<i>Streptomyces</i> sp. MaB-QuH-8	<i>Maytenus aquifolia</i>	<p>38 celsamycin A</p>	Heterocíclico (38) Antraquinona (39)	Antibacteriano	PULLEN et al., 2002
<i>Streptomyces</i> sp. LR4612	<i>Maytenus hookeri</i>	<p>40 (2<i>S</i>,3<i>S</i>)-5-amino-3-hidróxi-5-oxopentano-2-il 3-(formilamino)-2-hidroxibenzoato</p> <p>42 N-[(3<i>R</i>,4<i>R</i>)-3-amino-3,4-diidro-4-metil-2,6-dioxo-2H,6H-1,5-benzodioxocino-10-il]formamida</p>	Amida (40 , 42) Sesquiterpeno (41) Butirolactona (43)	-----	ZHAO.; LI.; SHEN, 2006
<i>Streptomyces</i> sp. W5	<i>Trewia nudiflora</i> L.	<p>44 <i>cis</i>-2-(1',8'-diidroxi-8'-metilnonil)-3-hidroximetilbutanolídeo</p>	γ -butirolactona	-----	WEI et al., 2010

2.1.4 Busca por novos antimicrobianos e anticancerígenos

O uso constante de antimicrobianos inevitavelmente leva à seleção de micro-organismos resistentes, portanto, existe uma necessidade contínua e cíclica por novos antibióticos (CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006; RODRÍGUEZ-NORIEGA et al., 2010). A maioria dos antibióticos de uso clínico é de origem microbiana, incluindo os próprios produtos naturais e seus derivados semissintéticos, com ênfase em substâncias produzidas por actinobactérias do gênero *Streptomyces* e fungos (PUPO et al., 2006; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; RAJA; PRABAKARANA, 2011). Alguns dos antibióticos utilizados clinicamente e produzidos por actinobactérias do gênero *Streptomyces* encontram-se na figura 4 (pag. 15).

Apesar dos avanços da química orgânica sintética, química combinatória e ensaios em larga escala (*high-throughput screening*), os micro-organismos continuam sendo a fonte mais promissora para a obtenção de novos antibióticos (CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006). Vale mencionar que os antibióticos introduzidos nos últimos anos no mercado foram isolados de actinobactérias: o lipopeptídeo daptomicina (**50**), lançado em 2003 e inicialmente isolado de *Streptomyces roseosporus* e a dalbavancina (**51**), um glicopeptídeo semissintético em fase de pré-registro cujo precursor natural também é produzido por *Streptomyces* (Figura 4, pag. 15) (FERNANDES, 2006; RAJA; PRABAKARANA, 2011).

Figura 4 - Alguns antibióticos antibacterianos de uso clínico isolados de espécies de *Streptomyces*.

A descoberta frutífera de novos antibióticos a partir de fontes naturais é, portanto, bem validada. O mercado de antibióticos é também muito significativo, motivando a indústria farmacêutica a investir constantemente neste segmento (FOX, 2006). Antibióticos de origem natural também representam uma parcela significativa dos fármacos usados na quimioterapia do câncer. Novamente, o gênero *Streptomyces* destaca-se como o principal produtor de antibióticos anticancerígenos exemplificados por bleomicinas (**52**), mitomicina C (**53**), antraciclina (daunorrubicina) (**54**) e actinomicina D (dactinomicina) (**55**), ilustrados na figura 5 (pag. 16) (PUPO et al., 2006). Nesta área terapêutica o desenvolvimento contínuo de resistência das células tumorais aos agentes quimioterápicos disponíveis motiva a busca por novos protótipos para o desenvolvimento de agentes anticancerígenos.

Figura 5 - Alguns antibióticos antitumorais de uso clínico isolados de espécies de *Streptomyces*.

A grande diversidade de estruturas bioativas, já em uso clínico, produzida por espécies de *Streptomyces* de solo, principalmente, motiva a busca por substâncias em actinobactérias endofíticas, tanto do gênero *Streptomyces* quanto outros gêneros menos explorados.

2.1.2 Asteraceae

A família Asteraceae (Compositae) é a maior entre as angiospermas, representada por 25.000 espécies pertencentes a 1.600 gêneros distribuídos em 17 tribos e três subfamílias (BREMER 1994). No Brasil, a família está representada por aproximadamente 196 gêneros e cerca de 1.900 espécies, predominantemente nas regiões de cerrado (BARROSO et al., 1991; GOTTLIEB; KAPLAN; BORIN, 1996).

Espécies do gênero destacam-se por sua importância biológica e econômica, empregadas na terapêutica, na medicina popular e como alimento. Como exemplos desta vasta família, temos a carqueja (*Baccharis trimera*), o guaco (*Mikania glomerata*) e o boldo brasileiro (*Vernonia condensata*).

2.1.2.1 *Lychnophora ericoides*

O gênero *Lychnophora*, pertencente à tribo das Vernoniae, compreende 34 espécies restritas ao cerrado brasileiro ocorrendo em regiões elevadas e tendo distribuição restrita aos complexos rupestres de quartzito da Bahia, Goiás, Tocantins e Minas Gerais (ROBINSON, 1999).

A medicina tradicional brasileira utiliza o extrato alcoólico e hidroalcoólico preparado a partir das folhas e pós das raízes de *L. ericoides* como anti-inflamatório, analgésico, antimicrobiano e cicatrizante (CERQUEIRA et al., 1987; LOPES, 2001). Até recentemente, pouco se conhecia sobre as formas de cultura, a composição química e ensaios biológicos desta espécie.

Com relação à constituição química, estudos com o extrato apolar obtido das folhas levaram à identificação de lactonas sesquiterpênicas (56, 57), lignanas (58, 59) e flavonóides (60) (Figura 6, pag. 18) (BORELLA et al., 1998; BORSATO et al., 2000; SAKAMOTO et al., 2003). Entre as substâncias presentes nas raízes, foi verificada atividade analgésica para as lignanas cubebina (58) e metil-cubebina (59), sendo que a primeira apresentou-se mais ativa (BORSATO et al., 2000). Já o estudo fitoquímico realizado com a fração polar do extrato das raízes resultou no isolamento de uma saponina e de ácidos cafeoilquínicos (61-64) (Figura 6, pag. 18) (SANTOS, 2002).

Segundo Santos e colaboradores (2005), os ácidos di-cafeoilquínicos presentes na fração polar mostram significativa atividade analgésica em teste de indução de convulsão com ácido acético em baixas doses. Os estudos dos constituintes polares das folhas levaram ao isolamento de C-flavonóides junto com os ácidos quínicos previamente isolados nas raízes (GOBBO-NETO et al., 2005).

Figura 6 - Alguns metabólitos secundários isolados de *L. ericoides*.

Os estudos farmacológicos revelaram que o C-flavonóide vicenina-2 (**60**) apresenta uma significativa atividade anti-inflamatória, portanto os resultados obtidos nos ensaios com extratos e substâncias isoladas parecem validar o uso popular da planta. Não há na literatura nenhum estudo com micro-organismos endofíticos associados a esta planta.

2.1.6 *Tithonia diversifolia*

Tithonia diversifolia Hemsl A. Gray, denominada popularmente por margaridão ou girassol-mexicano, é uma herbácea pertencente a tripo Heliantheae, originária da América Central e que no Brasil se tornou invasora, sugerindo que tenha atividade alelopática sobre outras espécies (SCHUSTER et al., 1992; PEREIRA et al., 1997; TONGMA; KOBAYASHI; USUI, 1998).

As partes aéreas tem sido utilizadas em alguns países na medicina popular, incluindo o Brasil, evidenciando-se principalmente sua ação anti-inflamatória (OWOYELE et al., 2004; CHAGAS, 2010).

Estudos fitoquímicos têm evidenciado principalmente a presença de sesquiterpenos das classes germacranos e eudesmanos e, em menor proporção, derivados de flavonóides e cadinanos (Figura 7, pag. 19) (PEREIRA, et al., 1997; KUO; CHEN, 1998; GU et al., 2002)

Figura 7 - Alguns metabólitos secundários isolados de *T. diversifolia*.

Fungos endofíticos desta planta já foram isolados e mostraram-se promissores para a obtenção de novos compostos e em processos de biotransformação (BORGES; PUPO, 2006; BORGES et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2008). Estudos com actinobactérias não foram relatados.

A experiência prévia do grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Mônica T. Pupo (Laboratório de Química de Micro-organismos (LQMo) da FCFRP-USP) no estudo químico de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e o potencial promissor de actinobactérias endofíticas, ainda pouco estudadas, motivaram o desenvolvimento desta tese de doutorado.

Capítulo I – Objetivos

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

- Isolar, identificar e avaliar as atividades antimicrobiana e antitumoral dos metabólitos secundários produzidos por actinobactérias endofíticas de *Lychnophora ericoides* e *Tithonia diversifolia*.

2.2.2 Objetivos específicos

- Isolar actinobactérias endofíticas associadas às folhas e raízes de *L. ericoides* e *T. diversifolia*;
- Cultivar as actinobactérias em pequena escala para a produção de extratos brutos;
- Submeter os extratos à avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica contra células cancerígenas;
- Comparar os perfis químicos de *L. ericoides* e das actinobactérias endofíticas através da análise dos dados de IES-EM;
- Cultivar as actinobactérias selecionadas pela triagem biológica em escala ampliada e fracionar os extratos obtidos através de métodos cromatográficos para isolamento das substâncias;
- Identificar as estruturas das substâncias isoladas através de métodos de RMN 1D e 2D, EM e UV;
- Avaliar o potencial antimicrobiano e antitumoral dos metabólitos produzidos pelas actinobactérias endofíticas.

Capítulo 7 – Material e Métodos

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Material

2.3.1.1 Solventes

Solventes PA da marca Synth; solventes grau cromatográfico das marcas: Merck, J.T. Baker e Mallinckrodt; solventes deuterados da marca Acros.

2.3.1.2 Reagentes e fases estacionárias usados nos meios de cultura, ensaios antimicrobianos e colunas cromatográficas

Ácido clorídrico (J.T. Baker); ácido húmico (Fluka); ácido nalidíxico (Sigma Aldrich); ágar bacteriológico (Fluka); ágar Müller Hinton (Merck); arroz parbolizado; CaCO_3 (Synth); caldo Müller Hinton (Merck); caseína (Difco); cicloexamida (Fluka); cloreto de trifeniltetrazólio (Sigma Aldrich); cromato placas sílica gel com suporte de alumínio e fluorescência UV_{254} , 250 μm , 20 x 10 cm (Whatman, Germany); estreptomicina 777U/mg (Sigma Aldrich); extrato de carne (Biolog); extrato de levedura (Fluka); extrato de malte (Acumedia); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck); glicose (Vetec); KCl (Synth); K_2HPO_4 (Synth); KNO_3 (Merck); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck); miconazol (Sigma Aldrich); NaCl (Synth); Na_2HPO_4 (Synth); NaOH (Synth); papel de filtro (AZ Labor); penicilina G 1215U/mg (Sigma Aldrich); peptona (Fluka); Sep-Pak[®] (Waters); Sephadex[®] LH - 20 (Sigma Aldrich); sílica gel 60 (Merck) 0,063-0,200 nm); vitaminas - ácido aminobenzóico, biotina, Ca-pantotenato, inositol, niacina, piridoxina, riboflavina e tiamina - (Sigma Aldrich).

2.3.1.3 Equipamentos e vidrarias

Aparelho de água ultrapura Millipore Milli-Q[®] (Millipore); autoclave vertical (Phoenix[®] AV 75); balança analítica BP 121 S (Sartorius); béquer (10, 50, 250, 500, 1000 e 4000 mL - Vidrolabor); B.O.D. (Tecnal); bomba de vácuo (Micronal); capela de fluxo laminar (Pachane[®] PA 320); colunas para cromatografia (Vidrolabor); cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE (Shimadzu[®] Shim-Pak), acoplado a bombas modelo LC-6 AD Shimadzu[®], sistema de controle SCL-10A_{VP} Shimadzu[®], detector arranjo de diodos UV/VIS

SPD-M10A_{VP} Shimadzu[®], coletor de fração FRC-10A Shimadzu[®], injetor automático SIL-10AF Shimadzu[®], programa Class VP; cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu[®], acoplado a bombas de modelo LC-6AD Shimadzu, com controlador de sistema CBM-20A Shimadzu[®], detectores de arranjo de diodos UV/VIS SPD-20A Shimadzu[®] e RID-10A Shimadzu[®] e programa LC solution; frasco Erlenmeyer (Vidrolabor); espectrômetro de RMN: (Bruker[®] DPX-300MHz e Bruker[®] DRX-500MHz); espectrômetro de massas ESI-MS UltrO-TOF (Bruker-daltonics, Billarica, USA) e Proeminence UFLC Shimadzu[®], equipado com bombas LC-20AD, injetor automático modelo Sil-20A HT, detector de DAD SPD-M20A, controlador CBM-20A, forno para coluna CTO-20^a acoplado ao espectrômetro de massas com ionização por IES: microTOF II, Bruker[®]; mesa agitadora orbital com controle de temperatura (Innova[®] 4300 - New Brunswick Scientific); rotaevaporadorer Büchi[®] R-114, Switzerland; sistema purificador de água por osmose reversa OS10LX (Gehaka); ultrassom Branson[®] 1200 (Branson Ultrasonics Corporation); tubos RMN 5 mm, serie 500, 7 pol. (Sigma Aldrich); tubo Falcon (Nunc); tubo de ensaio (Vidrolabor).

2.3.1.4 Micro-organismos utilizados nos ensaios antimicrobianos

Staphylococcus aureus ATCC 6538, *S. saprophyticus* ATCC 15305, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e *Candida glabrata* ATCC 2001.

2.3.1.5 Linhagens tumorais utilizadas

MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólon), SF-295 (glioblastoma) e HL-60 (leucemia).

2.3.2 Métodos

2.3.2.1 Coleta das amostras vegetais

Foram coletadas folhas (11/04/2008) de cinco espécimes e raízes (24/11/2008) de dois espécimes de *Lychnophora ericoides* (Asteraceae) presentes em uma população de monitoramento contínuo na região de Furnas-MG (20° 15' 318" S; 46° 15' 318" O). A exsicata (NPL-128) foi depositada no herbarium da UNICAMP. Esta coleta foi realizada

juntamente com o Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes (FCFRP-USP) sob autorização do CGEN. Folhas (16/08/2008) de *Erythrina speciosa* (Fabaceae) (21° 10' 242" S; 47° 50' 477") e folhas (20/06/2008) e raízes (18/10/2008) de *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) (21° 10' 081" S; 47° 51' 181" O) foram obtidas de cinco espécimes e coletadas no campus da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto. As exsiccatas foram enviadas para depósito com o número de coletor R.B. Oliveira 496 e 497, respectivamente, no herbarium da FFCLRP-USP.

O material destinado aos estudos foi selecionado e inspecionado quanto ao aspecto saudável das plantas hospedeiras. Após a coleta, as amostras foram conservadas individualmente em sacos plásticos esterilizados, previamente identificados e transportados em câmara com gelo para o Laboratório de Química de Micro-organismos (LQMo) da FCFRP-USP, sob responsabilidade da Profa. Dra. Mônica T. Pupo para os procedimentos de isolamento de actinobactérias endofíticas (Figura 8, pag. 25).

2.3.2.2 Esterilização superficial

O material botânico coletado foi processado no prazo de 24 horas após a coleta. Foram inicialmente lavados abundantemente em água corrente. Em seguida, de forma asséptica em fluxo laminar, as folhas e raízes de cada indivíduo foram esterilizadas superficialmente empregando a metodologia utilizada no LQMo (GUIMARÃES et al., 2008; BORGES; PUPO, 2006) e também descrita por Pereira e colaboradores (1993) e Araújo e colaboradores (2001), como se segue abaixo:

- a. Submergir em álcool 70% por 1 min em capela de fluxo laminar;
- b. Submergir em hipoclorito sódico (2-4% de Cl ativo) por 4 min;
- c. Submergir em álcool 70% por 30 s;
- d. Enxaguar três vezes em água destilada e esterilizada.

Para cada espécime foi montada uma batelada de esterilização com o intuito de se evitar que problemas de contaminação ocasionassem a perda de todo o experimento.

A eficácia da esterilização superficial dos tecidos vegetais em análise foi realizada a partir de uma alíquota de 1 mL de água da última lavagem que foi semeada pela técnica de espalhamento em placa (*spread plate*) nos respectivos meios de cultura utilizados durante o isolamento dos micro-organismos. As folhas e raízes esterilizadas foram fragmentadas em pedaços ($\pm 0,5$ cm) com o uso de pinças e bisturi cirúrgico esterilizados (Figura 8, pag. 25).

2.3.2.3 Isolamento de micro-organismos endofíticos

Diversos meios de cultura podem ser propostos nos experimentos de isolamento de micro-organismos endofíticos com a finalidade de se obter uma maior biodiversidade da microbiota endofítica de suas plantas hospedeiras.

Para a obtenção dos micro-organismos de interesse em nossa pesquisa foi proposto que, de cada espécime vegetal, oito fragmentos de folha e raiz seriam semeados por meio de cultura em triplicata. Os meios de cultura utilizados foram: Bennett ágar (glicose 10,0g; extrato de levedura 1,0 g; peptona 2,0 g; extrato de carne 1,0 g; ágar 15,0 g; água 1 L, pH 7,2) (JONES, 1949); caseína amido ágar - meio CAA (amido 10,0 g; ágar 15,0 g; caseína 0,3 g; NaCl 2,0 g; KNO₃ 2,0 g; K₂HPO₄ 2,0 g; MgSO₄.7H₂O 0,05 g; CaCO₃ 0,02 g; FeSO₄.7H₂O 0,01 g; água 1 L e pH 7,0-7,5) (KUSTER; WILLIAMS, 1964) e “humic-acid vitamin” conhecido por meio HV (ácido húmico 1,0g dissolvido em 10 mL de NaOH 0,2N; ágar 5,0 g; CaCO₃ 0,02 g; KCl 1,71 g; MgSO₄.7H₂O 0,05 g; Na₂HPO₄ 0,5 g; FeSO₄.7H₂O 0,01 g; vitaminas (tiamina-HCl 0,5 mg; riboflavina 0,5 mg; niacina 0,5 mg; piridoxina-HCl 0,5 mg; inositol 0,5 mg; Ca-pantotenato 0,5 mg; ácido aminobenzóico 0,5 mg; biotina 0,25 mg); água 1 L e pH 7,2) (HAYAKAWA; NONOMURA, 1987) para o isolamento dos micro-organismos das folhas de *Lychnophora ericoides*. Para as raízes, além dos diversos meios já citados, também se fez uso do meio “International *Streptomyces* Project 2” - meio ISP2 (ágar 15 g; extrato de levedura 4 g; extrato de malte 10 g; glicose 4 g; água 1 L e pH 7,2) (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966). Para *Tithonia diversifolia* e *Erythrina speciosa* foi utilizado somente o meio CAA nos isolamentos.

Para evitar o crescimento de fungos e bactérias Gram-negativas foram adicionados o antifúngico cicloexamida (50 ppm) e o antibacteriano ácido nalidíxico (10 ppm) na composição dos meios. Quando houve aparecimento de micro-organismos de crescimento rápido, os fragmentos vegetais que não apresentaram crescimento foram transferidos para outra placa contendo o respectivo meio de cultura e mantidos sob as mesmas condições.

Os micro-organismos recém desenvolvidos foram purificados pela técnica de esgotamento em placa na tentativa de se obter colônias isoladas. Os fragmentos vegetais foram incubados por até 40 dias a 30 °C, conforme o surgimento dos micro-organismos (Figura 8, pag. 25).

2.3.2.4 Preservações dos micro-organismos isolados

Actinobactérias e os fungos resistentes a cicloexamida foram preservados adicionando-se óleo mineral esterilizado sobre os cultivos em meio sólido inclinado. Outra forma empregada foi a manutenção em “*slants*” sob refrigeração a 8 °C. Para os fungos também se fez uso da preservação em água estéril descrita por Castellani (1939).

Figura 8 - Esquema geral de obtenção de micro-organismos endofíticos.

2.3.2.5 Identificação dos micro-organismos isolados

As linhagens de actinobactérias purificadas que apresentaram atividade biológica foram identificadas a nível molecular pela empresa Genotyping Biotecnologia LTDA (<http://www.genotyping.com.br/>), pelo sequenciamento da região 16S do DNAr.

2.3.2.6 Cultivo dos micro-organismos endofíticos e preparação dos extratos

2.3.2.6.1 Pré-inóculo

2.3.2.6.1.1 Pré-inóculo (triagem)

Para a triagem biológica, 41 micro-organismos foram selecionados quanto aos aspectos macro e micromorfológicos das actinobactérias, sendo 12 isolados de *L. ericoides* (doze de raiz) e 29 de *T. diversifolia* (um de folha e 28 de raiz). Para a reativação das linhagens, os micro-organismos foram cultivados durante 48 h (30 °C a 120 rpm) em tubos de ensaio em meio ISP2 líquido (ausente de ágar) e semeados em placas de Preti com ISP2 ágar com o auxílio de um “swab”, que é um cotonete de haste comprida, bastante comum em procedimentos de coleta de material biológico.

As placas foram incubadas por sete dias a 30 °C. Em tubos Falcon (capacidade 50 mL) contendo 10 mL de meio ISP2, foram adicionados dois discos de micélio-ágar de aproximadamente 5 mm de diâmetro, obtidos com o auxílio de um transfertube[®]. Os tubos Falcon foram então submetidos à agitação por 48 h (120 rpm a 30 °C) (Figura 9, pag. 28).

2.3.2.6.1.2 Pré-inóculo (escala ampliada)

Os extratos etanólicos (EtOH) das linhagens com os melhores resultados nos ensaios biológicos foram analisados por RMN de ¹H quanto à complexidade química e cultivadas em escala ampliada. A reativação das linhagens selecionadas (RLe 8 e RLe 4) foi realizada com o mesmo procedimento aplicado na triagem dos micro-organismos descrita no tópico 2.3.6.1.1 (Figura 9, pag. 28).

Para a preparação do pré-inóculo em escala ampliada, vinte discos de micélio-ágar foram adicionados em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio ISP2 líquido, os quais foram cultivados sob as mesmas condições dos pré-inóculos da triagem (Figura 10, pag. 28).

2.3.2.6.2 Cultivo em meio sólido

Para o cultivo dos 41 micro-organismos foram utilizados um frasco Erlenmeyer de 500 mL por linhagem contendo o meio sólido de arroz (90 g de arroz parbolizado e 90 mL de água) autoclavados por 40 minutos, aos quais foram adicionados os pré-inóculos (10 mL) e

incubados em estufa B.O.D. (Biological Oxygen Demand) a 30 °C por 21 dias (Figura 9, pag. 28). Nos cultivos em escala ampliada foram utilizados 25 frascos Erlenmeyer para cada linhagem selecionada, nas mesmas condições (2250 g de arroz parbolizado no total) (Figura 10, pag. 28).

2.3.2.6.3 Obtenção dos extratos

2.3.2.6.3.1 Extração (triagem)

Para cada cultivo foram adicionados inicialmente 150 mL de etanol, os quais foram macerados e mantidos em repouso por 24 h. Posteriormente, foram submetidos ao ultrassom por 15 min e filtrados a vácuo. O resíduo foi então lavado com 100 mL de etanol. Os filtrados foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório a 45°C. A secagem dos extratos EtOH obtidos foi finalizada sob ar comprimido (Figura 9, pag. 28).

2.3.2.6.3.2 Extração (escala ampliada)

A técnica empregada na extração em larga escala foi a mesma utilizada na obtenção dos extratos etanólicos durante a triagem, descrita no tópico 2.3.6.3.1.

O filtrado etanólico foi concentrado e o extrato obtido ressuspenso em água, a fase aquosa foi submetida à partição líquido-líquido com hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (*n*-BuOH), por três vezes com cada solvente na proporção de 3:1 (v/v). As fases orgânicas obtidas foram concentradas à vácuo, com o auxílio de rotaevaporador (Figura 10, pag. 28).

Figura 9 - Esquema geral do cultivo em pequena escala em arroz e obtenção do extrato etanólico das linhagens para triagem biológica.

Figura 10 - Esquema geral do cultivo e obtenção dos extratos e frações em escala ampliada das linhagens selecionadas.

2.3.2.7 Ensaios biológicos

2.3.2.7.1 Atividade antimicrobiana por concentração mínima inibitória (CIM)

2.3.2.7.1.1 Preparo do antibiótico padrão (estreptomicina)

Como parâmetro de atividade contra as bactérias Gram-negativas foi pesado 1 mg do antibiótico estreptomicina e dissolvido em 10 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹, pH = 7,9 (16,73 g de fosfato de potássio dibásico, 0,523 g de fosfato de potássio monobásico, qsp 1000 mL). Foi transferido 1 mL desta solução para um tubo de ensaio contendo 4 mL de caldo Müeller Hinton e aplicados 59 µL desta última solução no primeiro orifício da placa de 96 poços (NCCLS, 2003).

2.3.2.7.1.2 Preparo do antibiótico padrão (penicilina G)

Como parâmetro de atividade contra bactérias Gram-positivas foi pesado 1 mg do antibiótico penicilina G e dissolvido em 10 mL de tampão fosfato de potássio a 0,07 mol L⁻¹, pH = 6,0 (2,0 g de fosfato de potássio dibásico, 8,0 g de fosfato de potássio monobásico, qsp 1000 mL). Foi transferido 1 mL desta solução para um tubo de ensaio contendo 4 mL de caldo Müeller Hinton. Foram aplicados 59 µL desta última solução no primeiro orifício da placa de 96 poços (NCCLS, 2003).

2.3.2.7.1.3 Preparo do antibiótico padrão (miconazol)

Como parâmetro de atividade contra leveduras foi pesado 1 mg do antifúngico miconazol e dissolvido em 750 µL de dimetilsulfóxido. Foram transferidos 75 µL desta solução para um tubo de ensaio contendo 4925 µL de caldo Müeller Hinton modificado, adaptado a partir dos experimentos realizado por Pfaller e colaboradores (2004). Foram aplicados 59 µL desta última solução no primeiro orifício da placa de 96 poços (NCCLS, 2003).

2.3.2.7.1.4 Preparo do inóculo - bactéria

Suspensões das culturas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *S. saprophyticus* ATCC 15305, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram feitas em tubos contendo 5 mL de solução salina esterilizada (0,9%) e padronizadas com a escala de McFarland 0,5. Uma alíquota de 1000 µL de cada suspensão foi transferida e diluída em 9000 µL de solução salina. Em seguida, 2000 µL da suspensão foram adicionados em 10000 µL de caldo Müller Hinton. Desta última suspensão foram retiradas alíquotas de 20 µL de inóculo (NCCLS, 2003).

2.3.2.7.1.5 Preparo do inóculo - levedura

Uma suspensão da cultura de *Candida glabrata* ATCC 2001 foi feita em tubo contendo 5 mL de solução salina esterilizada (0,85%). Com o auxílio de uma escala de McFarland 0,5 a suspensão de partida foi padronizada. Da suspensão de partida 100 µL foram transferidos para 900 µL de solução salina. Em seguida, 200 µL da suspensão foram transferidos em 7800 µL de caldo Müller Hinton modificado. Desta última suspensão foram retiradas alíquotas de 20 µL de inóculo (NCCLS, 2003).

2.3.2.7.1.6 Preparo das amostras

Inicialmente, 10 mg dos extratos foram pesados em frascos eppendorf esterilizados, aos quais foram adicionados 75 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções foram agitadas até a solubilização completa. Em cada frasco eppendorf contendo 75 µL das soluções de extratos foram adicionados 925 µL de caldo. Destas soluções, alíquotas de 37,5 µL foram transferidas para outros frascos eppendorfs e diluídas em 462,5 µL de caldo. Destas soluções finais, alíquotas de 80 µL foram retiradas e adicionadas no primeiro poço da placa de 96 poços para a realização da diluição seriada.

Os ensaios foram realizados em réplica e as amostras que apresentaram resultado positivo em pelo menos um dos micro-organismos foram testadas novamente, perfazendo no total uma tréplica.

2.3.2.7.1.7 Preparo da solução reveladora

Uma solução de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 0,2% em água destilada esterelizada foi preparada e alíquotas de 40 µL desta solução foram adicionadas em cada orifício da placa multipoços.

PROTOCOLO 1 – Triagem de actinobactérias
CIM – Concentração inibitória mínima por microdiluição

Extratos (Amostras)

	80µL	80µL	80µL	80µL	80µL		80µL	80µL	80µL	80µL	80µL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(400µg mL ⁻¹) 80 µL Amostra 80 µL Caldo 20 µL Inóculo	(200µg mL ⁻¹) 80 µL Caldo 20 µL Inóculo	(100µg mL ⁻¹) 80 µL Caldo 20 µL Inóculo	(50µg mL ⁻¹) 80 µL Caldo 20 µL Inóculo	(25µg mL ⁻¹) 80 µL Caldo 20 µL Inóculo	Esterilidade da amostra 20 µL Caldo	(400µg mL ⁻¹) 80 µL Amostra 80 µL Caldo 20 µL Inóculo	(200µg mL ⁻¹) 80 µL Caldo 20 µL Inóculo	(100µg mL ⁻¹) 80 µL Caldo 20 µL Inóculo	(50µg mL ⁻¹) 80 µL Caldo 20 µL Inóculo	(25µg mL ⁻¹) 80 µL Caldo 20 µL Inóculo	Esterilidade da amostra 20 µL Caldo
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

■ Amostra x

■ Amostra y

- 1º - Adicionar 80 µL de meio em todos os poços;
- 2º - Adicionar 80 µL da amostra;
- 3º - Diluição seriada (transferir 80µL);
- 4º - Adicionar Inóculo;
- 5º - Incubar a 37°C “over night”;
- 6º - Revelar com TTC (cloreto trifeniltetrazólio).

PROTOCOLO 2 – Triagem de actinobactérias
CIM – Concentração inibitória mínima por microdiluição

Controles

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A								Teste DMSO 77 µL Caldo 3 µL DMSO 20 µL Inóculo		Esterilidade do solvente 1 µL DMSO 99 µL Caldo		Esterilidade do caldo 100 µL C
B	5,9 µg mL ⁻¹ 59 µL P 59 µL Caldo + 21 µL C 20 µL Inóculo	2,95 µg mL ⁻¹ 59 µL D1 59 µL Caldo + 21 µL C 20 µL Inóculo	1,475 µg mL ⁻¹ 59 µL D2 59 µL Caldo + 21 µL C 20 µL Inóculo	0,7375 µg mL ⁻¹ 59 µL D3 59 µL Caldo + 21 µL C 20 µL Inóculo	0,3688 µg mL ⁻¹ 59 µL D4 59 µL Caldo + 21 µL C 20 µL Inóculo	0,1844 µg mL ⁻¹ 59 µL D5 59 µL Caldo + 21 µL C 20 µL Inóculo	0,0922 µg mL ⁻¹ 59 µL D6 59 µL Caldo + 21 µL C 20 µL Inóculo	0,0461 µg mL ⁻¹ 59 µL D7 59 µL Caldo + 21 µL C 20 µL Inóculo	0,0230 µg mL ⁻¹ 59 µL D8 59 µL Caldo + 21 µL C 20 µL Inóculo	0,0115 µg mL ⁻¹ 59 µL D9 59 µL Caldo + 21 µL C 20 µL Inóculo	Esterilidade do antibiótico 59 µL D10 41 µL Caldo	Controle da cultura 20 µL Inóculo 80 µL Caldo
C												
D												
E												
F												
G												
H												

penicilina G

Gram-positivas

- 1- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- 2- *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305

estreptomicina

Gram-negativas

- 1- *Escherichia coli* ATCC 25922
- 2- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883
- 3- *Proteus mirabilis* ATCC 29906
- 4- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145

miconazol

levedura

- 1- *Candida glabrata* ATCC 2001

2.3.2.7.2 Atividade citotóxica

Os ensaios de citotoxicidade em células cancerígenas foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, sob a responsabilidade da Prof. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

A citotoxicidade dos extratos e substâncias isoladas foi determinada através do ensaio colorimétrico do MTT (MOSMAM, 1983) utilizando-se linhagens celulares tumorais humanas: MDA-MB-435 (mama); HCT-8 (côlon); SF-295 (glioblastomas) e para algumas frações HL-60 (leucemia). As linhagens de células foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂ e plaqueadas em placas de 96 cavidades nas seguintes densidades: 0,1 x 10⁶ (MDA-MB-435), 0,7 x 10⁵ (HCT-8), 0,6 x 10⁵ (SF-295) e 0,3 x 10⁶ (HL-60).

As amostras (extratos, frações e subfrações) foram dissolvidas em DMSO na concentração estoque de 10 mg mL⁻¹ e 5 mg mL⁻¹ para compostos puros adicionadas aos poços. As placas foram incubadas por 72 h em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. As amostras foram testadas em uma única concentração (50 µg mL⁻¹). O controle positivo foi realizado com a substância doxorrubicina cujas CI₅₀ são: 0,2 µg mL⁻¹ para a célula MDA-MB-435 e HL-60 e 0,04 µg mL⁻¹ para as células HCT-8 e SF-295. As absorbâncias foram obtidas com o auxílio de um espectofotômetro de placa a 550 nm.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança a partir da regressão não linear no programa GraphPad Prism. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas.

Os resultados foram expressos como: amostras sem atividade (SA); com pouca atividade (PA) - inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%; com atividade moderada (MO) - inibição de crescimento celular variando de 50 a 75% e com muita atividade (MA) - inibição de crescimento celular variando de 75 a 100%.

2.3.2.8 Fracionamento e isolamento de compostos produzidos pelas linhagens *Streptomyces* sp. RLe 8 e *Streptomyces cattleya* RLe 4

Os extratos EtOH obtidos dos cultivos em escala ampliada foram submetidos a partição com hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (*n*-BuOH) na proporção de 3:1 (v/v) e subfracionados por diferentes métodos cromatográficos, incluindo-se CLAE (Shimadzu) e cromatografia em coluna através de fases estacionárias apropriadas às características das substâncias presentes nas misturas, tais como: sílica gel, sílica gel em fase reversa C-18 e Sephadex[®] LH20.

A fração AcOEt obtido do cultivo em arroz da actinobactéria *Streptomyces* sp. RLe 8 foi processada conforme os fluxogramas abaixo para a obtenção dos compostos **Ss 1-Ss 10** (Figuras 11-13, pags. 35-37). As subfrações obtidas foram reunidas quando necessário pelas semelhanças observadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e espectros de RMN de ¹H obtidos posteriormente.

Figura 11 - Fluxograma para a obtenção das subfrações AcOEt da linhagem *Streptomyces* sp. RLe 8 por coluna cromatográfica em sephadex LH20 a partir da fração AcOEt eluída com MeOH.

As subfrações Rle 8.1-Rle 8.3 foram submetidas ao ensaio de citotoxicidade e analisadas em CCDC para posterior fracionamento.

Figura 12 - Fluxograma para o isolamento dos compostos **Ss 1-Ss 10** da subfração **Rle 8.3.3**.

Figura 13 - Fluxograma do fracionamento da subfração Rle 8.2 e obtenção dos compostos Ss 2, Ss 3 e Ss 9 por cromatografia líquida de alta eficiência.

A fração *n*-BuOH obtida do cultivo em arroz de *Streptomyces* sp. RLe 8 foi submetida a procedimentos cromatográficos para a obtenção do composto **Ss 12**, conforme ilustrado na figura 14 (pag. 38).

Figura 14 - Fluxograma do fracionamento da fração *n*-BuOH do cultivo de *Streptomyces* sp RLe 8 e obtenção do composto **Ss 12**.

Para a obtenção dos compostos **Sc 11**, **Sc 8**, **Sc 13** e **Sc 14** a fração AcOEt obtida do cultivo sólido em meio sólido de arroz da actinobactéria *Streptomyces cattleya* RLe 4 foi submetida a fracionamentos conforme ilustrado na figura 15 (pag. 39).

Figura 15 - Fluxograma do fracionamento da fração AcOEt do cultivo de *S. cattleya* RLe 4 e obtenção dos compostos Sc 8, Sc 11, Sc 13 e Sc 14.

A análise estrutural dos compostos isolados foi baseada nos resultados de técnicas espectroscópicas (RMN 1D e 2D) e espectrométricas (CG-EM e IES-EM).

2.3.2.9 Comparação via CLAE-DAD entre extratos dos micro-organismos e da planta hospedeira

As análises comparativas dos extratos das actinobactérias endofíticas de *L. ericoides* foram realizadas em CLAE com cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu[®], acoplado a bombas de modelo LC-6AD Shimadzu[®], com controlador de sistema SCL-10AVP Shimadzu[®], detectores de arranjo de diodos UV/VIS SPD-M10AVP Shimadzu[®] e RID-10A Shimadzu[®], injetor automático SIL-10AF Shimadzu[®] e software Class VP. Acoplado ao cromatógrafo foi utilizada uma coluna analítica CLC-ODS (C-18) Shimadzu[®] de 250 x 4,6 mm, 5 μ . Utilizou-se a condição cromatográfica descrita na literatura para análise dos extratos de *L. ericoides* (GOBBO-NETO; LOPES 2008) nos seguintes modos de eluição: solução A (H₂O com 2% de HOAc) e solução B (ACN 88% - MeOH 10% - HOAc 2%)

- 0 - 35 min - 8-20% solução B
- 35 - 65 min - 20-28% solução B
- 65 - 95 min - 28-38% solução B
- 95 - 135 min - 38-55% solução B
- 135 - 145 min - 55-100% solução B
- 145 - 150 min - 100% solução B
- 150 - 155 min - 100-8% solução B
- 155 - 160 min - 8% solução B

As análises foram realizadas injetando-se 20 μ L de amostra (extratos) por 160 minutos, UV 309 nm e vazão 1,5 mL/min.

Para a análise do massas, utilizou-se o equipamento Proeminence UFLC Shimadzu[®], equipado com bombas LC-20AD, injetor automático modelo Sil-20A HT, detector de DAD SPD-M20A, controlador CBM-20A, forno para coluna CTO-20^a acoplado ao espectrômetro de massas com ionização por ESI: microTOF II, Bruker[®].

Capítulo I – Resultados e Discussão

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Isolamento, preservação, identificação e ensaios biológicos de actinobactérias endofíticas

A exploração dos recursos naturais biológicos realizada de forma racional visa um melhor conhecimento de nossa biodiversidade e, conseqüentemente, seu potencial, através da bioprospecção. A bioprospecção auxilia na descoberta de novos micro-organismos de interesse biotecnológico, visto que a utilização destes organismos na busca por soluções nas áreas de saúde, agricultura, meio ambiente e indústria vem crescendo de forma acelerada nos dias atuais. Como exemplo, temos as actinobactérias endofíticas, que comparadas aos fungos endofíticos, são consideradas como fontes ainda menos exploradas.

Estudos de bioprospecção com actinobactérias têm demonstrado o grande potencial destes micro-organismos como produtores de compostos bioativos dos mais diversos representando uma alternativa para ampliar a busca por novos candidatos a fármacos (QIN et al., 2011).

O trabalho realizado por Verma e colaboradores (2009) reforça a importância das actinobactérias endofíticas como fonte de prospecção por produtos naturais bioativos, visto que das 55 linhagens de actinobactérias analisadas, a maioria pertencentes ao gênero *Streptomyces*, 32 apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um dos dezessete micro-organismos testados: *Pythium oligandrum* FC 011; *P. ultimum* FC 036; *P. aphanidermatum* FC 001; *Phytophthora cypogea* FC 509; *P. cactorum* FC 514; *P. infestans* DJF 21; *Trichophyton rubrum* IMS/2013; *T. mentagrophytes* IMS/2156; *Microsporum gypseum* IMS/A-014; *M. nanum* IMS/A-554; *Candida albicans* IMS/C-25; *Aspergillus niger* MCPL/2135; *Pseudomonas fluorescens*; *Bacillus subtilis*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumonia*.

A alta ocorrência de atividade biológica também foi relatada por Zhao e colaboradores (2011) ao testarem 60 linhagens pré-selecionadas pelas características macro e micromorfológicas, dentre 560 linhagens de actinobactérias isoladas de 26 espécies de plantas medicinais da medicina chinesa, frente a onze micro-organismos: *Aspergillus niger* SAUM 1275; *Colletotrichum orbiculare* SAUM 0321; *Verticillium dahliae* Kleb. SAUM 0110; *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* SAUM 2312; *F. oxysporum* f. sp. *niveum* SAUM0674; *F. graminearum* SAUM 2912; *Exerohilum turcicum* SAUM 0218; *Curvularia lunata* SAUM 1373; *Botrytis cinerea* SAUM 1294; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e

Escherichia coli ATCC 35218. Das linhagens testadas, 98% apresentaram atividade contra pelo menos um dos micro-organismos utilizados e 63% contra pelo menos cinco.

Em nosso trabalho visamos obter actinobactérias endofíticas de 360 fragmentos de folhas de cinco espécimes de *Lychnophora ericoides* (Figura 16, pag. 43). Porém, no decorrer do trabalho, observamos que de um total de onze micro-organismos isolados, todas as linhagens correspondiam a fungos que apresentaram resistência à cicloexamida. Estes fungos foram também purificados e preservados para posteriores estudos desenvolvidos pelo grupo do Laboratório de Química de Micro-organismos (LQMo).

Devido à dificuldade de realizar novas coletas da planta *L. ericoides*, em função da disponibilidade do coletor credenciado (Prof. Dr. Noberto P. Lopes) e da distância do local de coleta (Furnas-MG), outras espécies de plantas, como *Tithonia diversifolia* (Figura 17, pag. 43) e *Erithrina speciosa* (Figura 18, pag. 43), foram introduzidas no estudo na tentativa de aumentar o número de isolados de actinobactérias endofíticas. Um total de 120 fragmentos de folha de cinco espécimes de *T. diversifolia* foram incubados e somente uma linhagem de actinobactéria foi isolada. Já dos fragmentos das folhas de *E. speciosa*, apenas o crescimento de fungos foi visível, dos quais seis linhagens foram selecionadas, purificadas e preservadas.

As condições climáticas e os procedimentos de coleta são de grande importância, pois dias chuvosos e o mau armazenamento da amostra coletada podem facilitar a penetração de micro-organismos oportunistas no tecido da planta antes da realização da esterilização. Outros fatores que devem ser levados em consideração são a escolha dos meios de cultura, o pH e a temperatura, uma vez que não sabemos das condições ideais para o crescimento dos micro-organismos *in vitro*.

Apesar da baixa incidência de actinobactérias endofíticas nas folhas das plantas selecionadas, a metodologia de esterilização superficial empregada está de acordo com o relatado para o isolamento de micro-organismos endofíticos (QIN et al., 2011). A técnica de esterilização superficial do material botânico utilizada tem como principal função a eliminação de micro-organismos epifíticos, uma vez que micro-organismos fitopatogênicos são desconsiderados quando a planta hospedeira apresenta um aspecto saudável.

Figura 16 - Isolamento de actinobactérias endofíticas das raízes de *Lychnophora ericoides*.

Figura 17 - Isolamento de actinobactérias endofíticas das raízes de *Tithonia diversifolia*.

Figura 18 - Isolamento de fungos endofíticos das folhas de *Erithrina speciosa*.

A ausência e/ou baixa frequência de actinobactérias endofíticas nas folhas das plantas selecionadas nas condições propostas direcionou para microbiota presente nas raízes de *L. ericoides* e *T. diversifolia*. O motivo é que as raízes são a principal porta de entrada destes micro-organismos em suas plantas hospedeiras (TAYLOR et al., 2012).

A baixa frequência de actinobactérias em folhas também foi observada por diversos pesquisadores. Verma e colaboradores (2009) relataram a diversidade de actinobactérias presentes na folha (21,8%), caule (23,6%) e raiz (54,5%) de *Azadirachta indica*. Zhu e colaboradores (2009) não observaram a presença de actinobactérias nas folhas e frutos da planta *Trewia nudiflora*, porém, relataram em semente (3,8%), galho (34,3%) e raiz (61,9%). Mais recentemente, Zhao e colaboradores (2011) descreveram a presença de actinobactérias nas folhas (14%), caules (27,8%) e raízes (58,2%) de 26 espécies de plantas.

Como a planta *L. ericoides* está ameaçada de extinção, apenas dois espécimes foram coletados e analisados quanto à biodiversidade microbiana em suas raízes. No total, 96 fragmentos foram cultivados e quinze micro-organismos endofíticos foram selecionados, sendo doze possíveis actinobactérias, dois fungos e uma bactéria. De *T. diversifolia*, 120 fragmentos de raízes de cinco espécimes foram cultivados e 28 actinobactérias foram isoladas. No total, 61 micro-organismos foram isolados, purificados e preservados (Figuras 19 e 20, pag. 44).

Figura 19 - Amostragem da biodiversidade de micro-organismos endofíticos isolados de *T. diversifolia* e *L. ericoides*.

Figura 20 - preservação em óleo dos micro-organismos isolados.

Para a realização do processo de bioprospecção, todos os micro-organismos que apresentaram características macro e micromorfológicas de actinobactérias foram submetidos à triagem em ensaios biológicos. Ao todo, 41 linhagens foram selecionadas, sendo 12 isoladas da raiz de *L. ericoides* e 29 de *T. diversifolia*, uma de folha e 28 de raiz.

Inicialmente, o cultivo em meio líquido havia sido proposto para a triagem dos micro-organismos produtores de moléculas bioativas. Porém, em virtude dos baixos rendimentos apresentados, o que inviabilizava a realização dos ensaios biológicos, optou-se pelo cultivo em meio sólido, na tentativa de otimizar os rendimentos dos extratos.

Esta escolha está fundamentada na observação de Robinson e colaboradores (2001), que compararam as vantagens e desvantagens entre os cultivos em meios sólido e líquido. Os rendimentos dos extratos etanólicos obtidos dos cultivos em meio sólido em pequena escala para a triagem estão representados na tabela 3 (pag. 45).

Tabela 3 - Rendimentos dos extratos etanólicos do cultivo estático em meio sólido de arroz em pequena escala das actinobactérias endofíticas isoladas das folhas e raízes de *L. ericoides* e *T. diversifolia*.

Rendimento dos extratos EtOH obtidos da fermentação em meio sólido de arroz (triagem)			
Amostra	Rendimento (g)	Amostra	Rendimento (g)
Branco	0,9494	RTd 9	2,1639
RLe 1	1,5606	RTd 10	6,3859
RLe 2	3,5025	RTd 11	2,0649
RLe 3	1,9105	RTd 12	3,5977
RLe 4	1,5475	RTd 13	6,9037
RLe 6	1,8457	RTd 14	1,3973
RLe 7	8,7286	RTd 15	1,7239
RLe 8	3,2454	RTd 16	4,2116
RLe 9	3,0805	RTd 17	6,7724
RLe 10	3,2321	RTd 18	6,1495
RLe 11	1,5970	RTd 19	6,0968
RLe 12	9,6226	RTd 22	6,6911
RLe 13	6,9656	RTd 23	9,5222
FTd 1	4,5426	RTd 24	23,8465
RTd 1	5,4242	RTd 25	12,0308
RTd 2	1,8361	RTd 26	4,4575
RTd 4	1,7283	RTd 27	4,1182
RTd 5	8,1307	RTd 28	9,4217
RTd 6	4,1905	RTd 29	10,4626
RTd 7	9,9791	RTd 30	5,7791
RTd 8	9,7306	RTd 31	1,3458

FLe – Folha *Lychnophora ericoides*; RLe – Raiz *Lychnophora ericoides*; RTd – Raiz *Tithonia diversifolia*; FTd – Folha *Tithonia diversifolia* e n° – número da linhagem.

Foram realizados ensaios de atividade citotóxica em células tumorais e antimicrobiana para os 41 extratos EtOH obtidos. Dos extratos analisados, 58,5% apresentaram atividade alta ou moderada em pelo menos um dos ensaios realizados (Tabelas 4 e 5, pages. 47 e 48).

Em relação à atividade citotóxica, observou-se que 46,3% dos extratos apresentaram atividade em pelo menos uma das linhagens de células tumorais humanas utilizadas. Contra a linhagem MDA-MB-435 (melanoma) 34,1% dos extratos apresentaram atividade, destes, 64,3% apresentaram alta atividade. Contra a linhagem HCT-8 (câncer de cólon), 46,3% dos extratos foram ativos, sendo 63,2% com alta atividade. Finalmente, frente à linhagem SF-295 (glioblastoma) foram 36,6% de extratos ativos, dos quais 73,3% demonstraram alta atividade.

Com relação à atividade antimicrobiana, os extratos EtOH foram testados por microdiluição em diluição seriada para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). No total, 39% dos extratos EtOH apresentaram atividade em pelo menos um dos micro-organismos testados. Deste total de extratos ativos, 62,5% dos extratos apresentaram atividades contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305; 43,8% contra as bactérias Gram-negativas *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 e *Escherichia coli* ATCC 25922 e 43,8% contra a levedura *Candida glabrata* ATCC 2001.

No geral, dos 12 micro-organismos selecionados de *L. ericoides* 91,7% de seus extratos apresentaram atividade em pelo menos um dos ensaios realizados. Dos 29 micro-organismos isolados de *T. diversifolia*, 44,8% apresentaram atividade em ambos os ensaios realizados. A discrepância observada pode ser decorrência da seletividade natural ocorrente do próprio local de coleta, já que a planta *L. ericoides* coletada no cerrado em campo aberto está muito mais susceptível ao estresse por fatores bióticos e abióticos que a planta *T. diversifolia*, coletada dentro do campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto.

Tabela 4 - Percentual de inibição do crescimento celular de três linhagens tumorais apresentados pelos extratos etanólicos de micro-organismos (50 µg mL⁻¹).

Amostra	Percentual de Inibição em células tumorais (%)		
	MDA-MB-435	HCT-8	SF-295
Branco	5,74	31,53	SA
RLe 1	96,48	94,23	79,52
RLe 2	SA	39,44	SA
RLe 3	84,57	85,32	66,96
RLe 4	84,06	93,37	92,36
RLe 6	100,00	94,01	97,64
RLe 7	22,34	35,38	33,93
RLe 8	95,63	100,00	100,00
RLe 9	28,15	72,91	60,91
RLe 10	6,64	23,48	14,09
RLe 11	72,12	58,96	47,45
RLe 12	SA	16,49	SA
RLe 13	39,42	54,40	23,47
FTd 1	2,47	22,27	SA
RTd 1	SA	8,23	SA
RTd 2	15,14	36,87	11,01
RTd 4	SA	20,91	8,51
RTd 5	41,06	64,29	56,76
RTd 6	49,70	58,89	64,22
RTd 7	66,36	52,39	49,62
RTd 8	18,89	24,57	25,96
RTd 9	SA	12,50	SA
RTd 10	SA	27,18	7,16
RTd 11	SA	5,09	SA
RTd 12	SA	15,43	SA
RTd 13	36,07	57,72	46,56
RTd 14	63,33	81,31	78,38
RTd 15	60,65	78,68	75,64
RTd 16	3,78	40,51	5,10
RTd 17	65,91	92,30	86,45
RTd 18	84,57	90,00	89,16
RTd 19	SA	11,79	SA
RTd 22	89,40	98,17	94,52
RTd 23	46,30	21,65	16,96
RTd 24	85,86	88,32	88,14
RTd 25	25,83	34,57	27,04
RTd 26	23,06	30,63	45,79
RTd 27	31,70	42,31	27,93
RTd 28	44,30	38,44	30,68
RTd 29	SA	14,42	17,66
RTd 30	2,96	20,27	5,81
RTd 31	95,32	95,40	88,71
DOX	97,30	96,94	87,67

SA – Sem Atividade; Atividade baixa – $1 \geq 50\%$; Atividade moderada – $50 \geq 75\%$; Atividade alta – $75 \geq 100\%$. DOX – doxorubicina. Linhagens de células tumorais: MDA-MB-435 (melanoma); HCT-8 (câncer de cólon) e SF-295 (glioblastoma).

Tabela 5 - Atividade antimicrobiana representada pelos valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos etanólicos dos cultivos estáticos em meio sólido de arroz das actinobactérias endofíticas isoladas das folhas e raízes de *L. ericoides* e *T. diversifolia*.

Linhagem	Micro-organismos teste – CIM (µg/mL)						
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S.saprophyticus</i> ATCC 15305	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>P. mirabilis</i> ATCC 29906	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001
RLe 1	400	-	-	-	-	-	25
RLe 3	200	100	200	-	-	-	-
RLe 4	400	-	-	-	-	-	400
RLe 6	-	-	-	-	-	-	25
RLe 7	-	-	-	-	-	-	50
RLe 8	-	200	-	-	100	-	25
RLe 9	-	-	-	-	400	-	-
RLe 10	200	-	-	-	-	-	25
RLe 11	25	400	-	-	-	-	-
RLe 12	-	-	-	-	-	-	100
RTd 5	-	-	-	-	400	-	-
RTd 6	-	100	-	-	-	-	-
RTd 10	-	200	-	-	400	-	-
RTd 13	400	50	-	-	200	-	-
RTd 19	-	-	-	-	400	-	-
RTd 22	25	25	-	-	-	-	-

(-) não foi ativo

Controles:

Bactérias Gram positivas

Staphylococcus aureus ATCC 6538: 0,0922 µg/mL de penicilina

Staphylococcus saprophyticus ATCC 15305: 0,1844 µg/mL de penicilina

Bactérias Gram negativas

Escherichia coli ATCC 25922: 5,9 µg/mL de estreptomicina

Klebsiella pneumoniae ATCC 13883: 2,95 µg/mL de estreptomicina

Proteus mirabilis ATCC 29906: resistente a estreptomicina

Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145: 5,9 µg/mL de estreptomicina

Fungo Leveduriforme

Candida glabrata ATCC 2001: 0,0115 µg/mL de miconazol

As linhagens de actinobactérias que apresentaram atividade biológica nos ensaios propostos foram selecionadas fenotipicamente e encaminhadas à identificação molecular pela empresa Genotyping Biotecnologia LTDA (Tabela 6, pag. 49). A identificação foi feita através do plaqueamento das linhagens, extração do DNA, amplificação por PCR (*polymerase chain reaction*), purificação da reação e sequenciamento da região 16S do DNAr seguida de comparação com duas outras linhagens diferentes como controles (*Escherichia coli* para 16 S e *Saccharomyces cerevisiae* para ITS) (Figura 21, pag. 49).

Tabela 6 - Identificação a nível molecular das linhagens com atividade biológica pelo sequenciamento da região 16S do DNAr.

Identificação a nível molecular					
<i>Lychnophora ericoides</i>			<i>Tithonia diversifolia</i>		
Código	Identificação	%	Código	Identificação	%
RLe 1	<i>Streptomyces</i> sp.	99	RTd 5	<i>Streptomyces</i> sp.	100
RLe 3	<i>Streptomyces</i> sp.	98	RTd 6	<i>Streptomyces</i> sp.	86
RLe 4	<i>Streptomyces cattleya</i>	99	RTd 7	<i>Streptomyces</i> sp.	99
RLe 6	<i>Streptomyces</i> sp.	99	RTd 10	<i>Streptomyces</i> sp.	100
RLe 7	<i>Streptomyces</i> sp.	98	RTd 13	<i>Streptomyces</i> sp.	100
RLe 8	<i>Streptomyces</i> sp.	98	RTd 14	<i>Streptomyces</i> sp.	99
RLe 9	<i>Streptomyces</i> sp.	100	RTd 15	<i>Streptomyces</i> sp.	99
RLe 10	<i>Streptomyces</i> sp.	99	RTd 17	<i>Streptomyces</i> sp.	100
RLe 11	<i>Streptomyces</i> sp.	98	RTd 18	<i>Streptomyces</i> sp.	99
RLe 12	<i>Streptomyces albospinus</i>	99	RTd 19	<i>Streptomyces</i> sp.	85
RLe 13	<i>Streptomyces</i> sp.	100	RTd 22	<i>Streptomyces platensis</i>	99
			RTd 24	<i>Streptomyces</i> sp.	100
			RTd 31	<i>Streptomyces</i> sp.	99

Figura 21 - Eletroforese do DNAr amplificado para sequenciamento em gel de agarose 1,5% em TAE. Regiões do DNAr amplificados: 16S (actinobactérias) e ITS (fungos); n° 1-7 - amostras de RNA amplificados dos micro-organismos endofíticos: 1 - RLe 5; 2 - RTd 14; 3 - RTd 7; 4 - RLe 11; 5 - RLe 3; 6 - Fle 5 e 7 - RTd 6 e os controles: 8 - controle positivo (*Escherichia coli* para 16S e *Saccharomyces cerevisiae* para ITS) e 9 - controle negativo (reagentes); L - Ladder 100 bp. A banda mais inferior possui 100 bp, aumentando de 100 em 100 até 1000bp. Depois uma banda de 1500 e outra de 2000.

Todas as linhagens correspondem a actinobactérias do gênero *Streptomyces* com base no banco de dados disponível pela NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Geralmente, espécies

do gênero *Streptomyces* são mais predominantes que de outros gêneros como *Microbispora*, *Micromonospora*, *Nocardioides*, *Nocardia* e *Streptosporangium* em isolamentos de endofíticos (QIN et al., 2011). Como exemplo, de 619 actinobactérias isoladas de diferentes cultivos de tomate, todas foram *Streptomyces* spp. (TAN et al., 2006).

Após a análise dos resultados dos ensaios biológicos, foram adquiridos os espectros de RMN de ^1H de todos os extratos EtOH ativos e por cruzamento de dados da atividade biológica e a diversidade química, foram selecionadas as linhagens RLe 4 (*Streptomyces cattleya*) e RLe 8 (*Streptomyces* sp.) para serem cultivadas em escala ampliada (Figuras 22 e 23, pag. 50). Ambas as linhagens apresentaram elevada atividade citotóxica frente a todas as células cancerígenas.

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos (Figuras 24 e 25, pags. 51 e 52) mostraram sinais que sugerem a presença de açúcares, alguns eventualmente provenientes do meio de cultivo. Além destes sinais, o espectro de RMN de ^1H do extrato etanólico de *S. cattleya* RLe 4 mostra também sinais de hidrogênios aromáticos e/ou vinílicos entre δ 6,7-7,5 e hidrogênios alifáticos entre δ 1,0-2,5. O espectro de RMN de ^1H do extrato etanólico de *Streptomyces* sp. RLe 8 também apresenta, diversos sinais de hidrogênios alifáticos entre δ 0,8-3,0.

Figura 22 - Culturas em placa de Petri das linhagens *Streptomyces cattleya* RLe 4 e *Streptomyces* sp. RLe 8 (21 dias a 30°C) em meio *International Streptomyces Project 2* (ISP 2).

Figura 23 - Microscopia eletrônica por varredura (MEV) da linhagem *Streptomyces* sp. RLe 8 (foto cedida pelo Prof. Dr. Itamar S. Melo - EMBRAPA Jaquariuna).

Figura 24 - Espectro de RMN de ^1H do extrato EtOH de *Streptomyces cattleya* RLe 4 (MeOH- d_4 , 500 MHz).

Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H do extrato EtOH de *Streptomyces* sp. RLe 8 (MeOH-d_4 , 500 MHz).

Para a obtenção de maiores quantidades de extratos, cada linhagem foi cultivada em 25 Erlenmeyers contendo 90 g de arroz cada (total = 2250 g de arroz), nas mesmas condições utilizadas para a obtenção dos extratos EtOH em pequena escala. Os extratos obtidos foram submetidos à partição líquido-líquido com hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (*n*-BuOH), e seus rendimentos estão apresentados na tabela 7 (pag. 53).

Tabela 7 - Rendimentos das frações obtidas por partição líquido-líquido dos cultivos em escala ampliada das linhagens *S. cattleya* RLe 4 e *Streptomyces* sp. RLe 8.

Rendimento das frações em meio sólido (escala ampliada)			
<i>Streptomyces cattleya</i> RLe 4		<i>Streptomyces</i> sp. RLe 8	
Amostra	Rendimento (g)	Amostra	Rendimento (g)
Rle 4 Hex	1,6197	Rle 8 Hex	2,9300
Rle 4 AcOEt	7,5426	Rle 8 AcOEt	6,7740
Rle 4 <i>n</i> -BuOH	10,2332	Rle 8 <i>n</i> -BuOH	17,9550

As frações obtidas das partições foram analisadas quanto à citotoxicidade em células tumorais. Os resultados demonstraram uma alta atividade dos extratos de média polaridade (AcOEt) e polares (*n*-BuOH). Os extratos de baixa polaridade (Hex) não apresentaram atividade no modelo experimental empregado. Algumas subfrações obtidas por fracionamento em Sephadex[®] LH-20 da fração AcOEt de *Streptomyces* sp. RLe 8 (RLe 8.1, RLe 8.2, RLe 8.3) também foram submetidas ao ensaio de citotoxicidade, com a finalidade de direcionar o isolamento das substâncias responsáveis pela atividade (Tabela 8, pag. 53).

Tabela 8 - Atividade citotóxica das frações AcOEt, *n*-BuOH e Hex das linhagens *Streptomyces*. sp. RLe8 e *S. cattleya* RLe4 e subfrações da fração AcOEt de RLe8 através do percentual de inibição do crescimento celular em três linhagens tumorais (50 µg/mL).

Amostra	Percentual de inibição em células tumorais (%)			
	MDA-MB-435	HCT-8	SF-295	HL-60
Rle 8 Hex	SA	SA	SA	-
Rle 8 AcOEt	100,00	100,00	100,00	-
Rle 8 <i>n</i> -BuOH	47,06	-	78,42	91,40
Rle 8.1	75,19	-	88,98	100
Rle 8.2	100	-	100	100
Rle 8.3	53,78	-	42,96	60,31
Rle 4 AcOEt	98,89	-	100	100
Rle 4 <i>n</i> -BuOH	97,51	-	100	100
Rle 4 Hex	SA	-	14,99	3,64

Sem Atividade - SA; Atividade baixa - 1 ≥ 50%; Atividade moderada - 50 ≥ 75%; Atividade alta - 75 ≥ 100%. Linhagens de células tumorais: MDA-MB-435 (melanoma); HCT-8 (câncer de cólon); SF-295 (glioblastoma) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda); (-) não foram testados contra esta linhagem.

O fracionamento das sub-frações de ambas as actinobactérias foi realizado através de diversas técnicas cromatográficas, incluindo cromatografia por exclusão (Sephadex[®] LH-20), por adsorção em fase normal (sílica gel) e por CLAE em fase reversa. Os compostos isolados

das actinobactérias *Streptomyces* sp. RLe8 e *S. cattleya* RLe 4 estão apresentados no quadro 1 (pag. 54).

Quadro 1 - Compostos isolados dos cultivos em arroz de *Streptomyces* sp. RLe 8 e *Streptomyces cattleya* RLe 4 agrupados por classe química

Benzamidas	Ss 1	Sc 8	Ss 2	Ss 3	Ss 9	Ss 4	Ss 7
Naftalenônicos	Ss 5	Ss 6	<div>Quinazolinona</div> Ss 10				
Sideróforos	Sc 11		Ss 12				
Acetofenonas	Sc 13		Sc 14				

Códigos: **Ss** – *Streptomyces* sp. RLe 8 e **Sc** – *Streptomyces cattleya* RLe 4.

2.4.2 Isolamento dos metabólitos secundários do cultivo em arroz de *Streptomyces* sp. RLe 8 e *Streptomyces cattleya* RLe 4

As substâncias **Ss 1**, **Ss 3** e **Ss 4** foram isoladas da subfração Rle 8.3.3 obtida por sephadex LH-20 a partir da fração AcOEt do cultivo em arroz da actinobactéria *Streptomyces* sp. RLe 8. A purificação destes compostos foi realizada por cromatografia líquida de alta

eficiência (CLAE) em coluna preparativa de fase reversa C-18 a 6% MeOH em H₂O em condição isocrática, vazão de 8 mL min⁻¹ e detecção por absorção na luz ultravioleta (UV) a 210 nm (Figura 26, pag. 55).

Os picos A, B e C foram novamente fracionados por CLAE com a finalidade de melhorar o grau de pureza apresentado na cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC).

Figura 26 - Cromatograma da subfração Rle 8.3.3. Fase móvel: MeOH 6% em H₂O isocrático; Coluna preparativa: Shim-pack PREP-ODS (fase reversa, C-18) (2 x 25 cm); Vazão da fase móvel: 8 mL min⁻¹ e detecção em 210 nm. *D subfração coletada 100% MeOH.

O composto **Ss 2** foi obtido do pico A por CLAE em coluna semi-preparativa de fase reversa C-18 a 6% MeOH em H₂O com vazão de 4 mL min⁻¹ e detectada por UV a 210 nm (Figura 27, pag. 55).

Figura 27 - Cromatograma do pico A e obtenção do composto **Ss 2**. Fase móvel: MeOH 6% em H₂O isocrático; Coluna semi-preparativa: Macherey/Nagel - VP250/10 nucleosil 120-5 C18 (fase-reversa) (250 mm x 10,0 mm, 5µm) acoplado a pré-coluna Agilent Technologies (15 mm x 9,4 mm, 7 µm); Vazão da fase móvel: 4 mL min⁻¹ e detecção em 210 nm.

Os picos B e C foram reunidos e submetidos à outra condição por CLAE, passando de 6% MeOH em H₂O para 12% MeOH em H₂O em condição isocrática, possibilitando o isolamento do composto **Ss 5** (Figura 28, pag. 56).

Figura 28 - Cromatograma dos picos reunidos B e C. Fase móvel: MeOH 12% em H₂O isocrático; Coluna preparativa: Shim-pack PREP-ODS (fase reversa) (2 x 25 cm); Vazão da fase móvel: 8 mL min⁻¹ e detecção em UV em 210 nm.

O pico E apresentou rendimento e grau de pureza insatisfatório. O pico F foi fracionado, desta vez, em coluna aberta da qual se obteve a subfração Rle 8 S2.2 (Figura 12, pag. 36) e em mistura foram determinadas as estruturas dos compostos **Ss 6** e **Ss 7**.

Ao término da separação cromatográfica por CLAE da subfração RLe 8.3.3, foi realizada a limpeza da coluna cromatográfica com eluição em 100% MeOH (*D). Esta fase metanólica foi coletada e concentrada. Esta subfração foi fracionada por CLAE mudando apenas a fase móvel de 6% MeOH em H₂O para 24% MeOH. Dois compostos foram isolados, **Ss 9** e **Ss 10** (Figura 29, pag. 56).

Figura 29 - Cromatograma da fase metanólica *D (limpeza). Fase móvel: MeOH 24% em H₂O isocrático; Coluna preparativa: Shim-pack PREP-ODS (fase reversa) (2 x 25 cm); Vazão da fase móvel: 8 mL min⁻¹ e detecção em 210 nm.

Do fracionamento realizado com a subfração Rle 8.2 foram isolados os compostos **Ss 2**, **Ss 3** e **Ss 9**, presentes em sua fração vizinha Rle 8.3.

Durante o fracionamento da fração AcOEt do cultivo em arroz da actinobactéria *S. cattleya* RLe4 por Sephadex[®] LH-20, observou-se a formação de um precipitado de cor branca. Para melhorar a pureza do composto, foram realizadas diversas lavagens com MeOH gelado, fornecendo o composto **Sc 11**. No fracionamento por CLAE também foi obtido o composto **Sc 11**, de algumas subfrações (Figura 15, pag. 39). Para estas análises foi utilizado

coluna preparativa de fase-reversa (C-18) em condição isocrática de fase móvel de 45% MeOH em H₂O, com vazão a 8 mL min⁻¹ e detecção em 234 nm (Figura 30, pag. 57)

Figura 30 - Cromatograma das subfrações de Rle 4.5. Fase móvel: MeOH 45% em H₂O isocrático; Coluna preparativa: Shim-pack PREP-ODS (fase reversa, C-18) (2 x 25 cm); Vazão da fase móvel: 8 mL min⁻¹ e detecção em 234 nm.

O composto **Ss 12** foi isolado por CLAE da subfração Rle 8.c obtida por Sephadex[®] da fração *n*-BuOH do cultivo em arroz da actinobactéria *Streptomyces* sp. RLe 8 e reinjetada para melhorar o grau de pureza (Figuras 31 e 32, pag. 57).

Figura 31 - Cromatograma da subfração Rle 8c. Fase móvel: MeOH 17,5% em H₂O isocrático; Coluna preparativa: Shim-pack PREP-ODS (fase reversa, C-18) (2 x 25 cm); Vazão da fase móvel: 8 mL min⁻¹ e detecção em 220 nm.

Figura 32 - Cromatograma do composto **Ss 12**. Fase móvel: MeOH 5% em H₂O isocrático; Coluna preparativa: Shim-pack PREP-ODS (fase reversa, C-18) (2 x 25 cm); Vazão da fase móvel: 6 mL min⁻¹ e detecção em 220 nm.

Os compostos **Sc 8**, **Sc 13** e **Sc 14** isolados de subfrações da fração AcOEt do cultivo em arroz da actinobactéria *S. cattleya* RLe 4 (Figura 15, pag. 39) apresentaram boa absorção no UV a 254 nm e foram isolados por cromatografia preparativa em camada delgada,

utilizando cromatoplasas de sílica gel com suporte de alumínio e fluorescência UV₂₅₄, 250 µm (Whatman, Germany). O composto **Sc 8** apresentou *R_f* de 0,28 utilizando como fase móvel AcOEt e CHCl₃ na proporção de 1:9 (v/v). Os compostos **Sc 13** e **Sc 14** apresentaram *R_f*s de 0,63 e 0,32 respectivamente, utilizando como fase móvel 100% CHCl₃.

2.4.3 Determinação estrutural dos compostos isolados do cultivo em arroz de *Streptomyces* sp. RLe 8 e *Streptomyces cattleya* RLe 4

A determinação estrutural dos compostos isolados foi realizada através da análise conjunta dos dados de RMN 1D e 2D e EM. Para facilitar a discussão, os compostos foram agrupados de acordo com a similaridade estrutural, independente da linhagem microbiana de origem.

2.4.3.1 Determinação estrutural da 3-hidroxibenzamida (**Ss 1**) e 2-hidroxibenzamida (**Sc 8**)

As estruturas dos compostos **Ss 1** (1,39 mg), e **Sc 8** (0,81 mg) foram determinadas através da análise dos dados de RMN 1D e 2D e de espectrometria de massas via CG e IES (Figuras 35-45, pags. 63-71).

O espectro de RMN de ¹H (500 MHz; CD₃OD) do composto **Ss 1** apresentou sinais com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios aromáticos. Foram observados sinais em δ 7,24-7,31 (*m*, 3H; H-2, H-5 e H-6) e δ 6,95 (*dd*, *J* = 8,0 e 1,4 Hz; 1H, H-4). Os valores das integrais, os deslocamentos químicos dos sinais dos hidrogênios e as constantes de acoplamento indicaram a presença de um anel aromático dissustituído em relação *meta*.

Os deslocamentos químicos dos átomos de carbono do composto **Ss 1** foram atribuídos com base nos experimentos de HMQC e HMBC. As correlações de H-6 com o

carbono carbonílico C-7 (δ 172,5), e de H-2 com os carbonos C-1 e C-3, em δ 136,3 e δ 158,8, respectivamente, permitiram a atribuição dos carbonos quaternários.

Pelo espectro de massas obtido via CG foram observados quatro picos de maior intensidade referente aos íons: m/z 137, 121, 93 e 65. O pico relativo ao íon molecular $M^{+\bullet}$ foi de m/z 137, apresentando uma diferença de 16 u do íon de pico base de m/z 121, indicando a perda de um radical amina ($\cdot NH_2$). Os picos dos íons de m/z 93 e m/z 65 foram produtos de fragmentação secundária, resultantes das perdas de uma e/ou duas unidades de $-CO$ (28 u) a partir do íon de m/z 121 (Figura 33, pag. 59).

Figura 33 - Fragmentação por IE do composto **Ss 1** (adaptado de WATSON; SPARKMAN, 2007).

O espectro de massas de alta resolução obtido via IES apresentou picos dos íons do composto **Ss 1** em sua forma protonada $[M+H]^+$ m/z 138,0541 e em maior intensidade, seu aduto de sódio $[M+Na]^+$ m/z 160,0357, com erros de 6,1 e 7,6 ppm respectivamente.

Após todas as análises espectrais o composto **Ss 1** foi estabelecido como 3-hidroxibenzamida, conhecido também por *m*-hidroxibenzamida (Tabela 9, pag. 60). Pelos relatos da literatura este composto é obtido principalmente por síntese (STANFORD RES INST INT, 1986). Porém, foi também obtido como metabólito secundário da actinobactéria

marinha *Salinispora pacifica* (LUO et al., 2009). A principal atividade desta substância é a de inibidor da enzima poli(ADP-ribose) polimerase, que tem como função a reparação do DNA (BANASIK et al., 1992). Também há relato de uma sutil atividade de inibição de divisão celular frente à bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis* (CZAPLEWSKI et al., 2009).

Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em MeOH-d_4 do composto **Ss 1**.

3-hidroxibenzamida				
	Posição	$\delta^1\text{H}$ (500 MHz)	$^*\delta^{13}\text{C}$ (125 MHz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
137,05 g mol ⁻¹	1	-	136,3	-
	2	7,24-7,31 (m, 3H)	130,5	C-1/ C-3
	3	-	158,8	-
	4	6,95 (dd, $J = 1,4; 8,0$ Hz, 1H)	119,8	C-6/C-5
	5	7,24-7,31 (m, 3H)	119,4	C-6
	6	7,24-7,31 (m, 3H)	115,4	C-5/ C-7
	7	-	172,4	-

*Valores observados indiretamente por HMQC e HMBC.

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **Sc 8** apresentou quatro sinais de hidrogênio com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios aromáticos em δ 7,44 (t , $J = 7,5$ Hz, 1H), δ 7,38 (d , $J = 8$ Hz, 1H), δ 7,01 (d , $J = 8,5$ Hz, 1H) e δ 6,87 (t , $J = 7,5$ Hz, 1H) referentes aos hidrogênios H-4, H-6, H-3 e H-5, respectivamente, típico de um anel aromático dissustituído em *orto*. Os dados adquiridos pelo mapa de contornos COSY corroboraram com a hipótese levantada com os dados obtidos pelo espectro de RMN de ^1H .

Com base nos mapas de contornos HMQC e HMBC atribuiu-se os deslocamentos químicos dos átomos de carbono do composto **Sc 8**, através das correlações dos hidrogênios com os carbonos. Pelo HMBC observamos as correlações de H-6 com o carbono carbonílico C-7 em δ 172,4, dos hidrogênios H-3, H-4 e H-6 com o carbono C-2 em δ 162,1, e dos hidrogênios H-3 e H-5 com o carbono C-1 em δ 113,1.

Os dados de RMN de ^1H são conclusivos para a determinação do padrão de substituição nos anéis aromáticos dos compostos **Ss 1** de **Sc 8**. Porém, os espectros de massas obtidos via CG também forneceram informações conclusivas sobre a isômeria de posição apresentada entre os compostos. Como discutido anteriormente, o composto **Ss 1** apresentou quatro picos de maior intensidade com íons de m/z 137, 121, 93 e 65.

O composto **Sc 8**, apresentou um rearranjo *orto* na fragmentação por IE (impacto eletrônico), conhecido também por *efeito orto*, que de acordo com a literatura é observado em compostos aromáticos dissustituídos que envolvem heteroátomo em relação *orto* (DASS, 2007; WATSON; SPARKMAN, 2007). Similar ao rearranjo McLafferty, essa reação também requer a transferência de um átomo de hidrogênio de um dos substituintes ao grupo receptor do outro substituinte, por meio de uma transição de seis membros a partir da qual uma molécula neutra é eliminada através de um efeito indutivo, permitindo que o isômero *orto* seja distinguido de seus isômeros *meta* e *para* pela aparência de seus espectros de massas. Porém, isômeros *meta* e *para* só podem ser distinguidos um do outro por suas diferenças de tempo de retenção no cromatograma (DASS, 2007; WATSON; SPARKMAN, 2007).

Pelo espectro de massas via CG do composto **Sc 8** observou-se quatro picos dos íons de m/z 137, 120, 92 e 65. O M^{++} foi de m/z 137, e o íon de pico base em m/z 120, característico em moléculas onde ocorre rearranjo por *efeito orto* (Figura 34, pag. 62).

Para o composto **Sc 8**, o íon de m/z 120, está relacionado à eliminação do grupamento amino em sua forma livre ($-\text{NH}_3$) do substituinte ligado ao anel aromático. Os demais picos de m/z 92 e m/z 65 são produtos de fragmentação a partir do íon de m/z 120, devido à perda de unidades de $-\text{CO}$ (28 u), como observado em **Ss 1** a partir do íon m/z 121.

Figura 34 - Fragmentação por IE do composto **Sc 8** (adaptado de WATSON; SPARKMAN, 2007).

Os dados de espectrometria de massas obtidos via IES estão coerentes com a estrutura proposta, onde observou-se em maior intensidade o íon em sua forma protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z

138,0551, com erro de 1,4 ppm. O composto **Sc 8** trata-se da 2-hidroxibenzamida, também conhecida comercialmente por salicilamida (Tabela 10, pag. 62).

Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 do composto **Sc 8**.

2-hidroxibenzamida					
	Posição	$\delta^1\text{H}$ (500 MHz)	COSY	$^*\delta^{13}\text{C}$ (125 MHz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
<p>137,05 g mol⁻¹</p>	1	-	-	113,1	-
	2	-	-	162,1	--
	3	7,01 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz, 1H)	H-4	118,7	C-1/C-2/C-5
	4	7,44 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz, 1H)	H-3/H-5	135	C-2/C-6
	5	6,87 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,5 Hz, 1H)	H-4/H-6	118,7	C-1/C-3
	6	7,38 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8 Hz, 1H)	H-5	126,4	C-2/C-4/C-7
	7	-	-	172,4	-

*Valores observados indiretamente por HMQC e HMBC.

De acordo com a literatura, este composto foi pela primeira vez sintetizado por Cahours em 1843. Porém, foi também obtido como produto de biotransformação por *Streptomyces* spp., utilizando ésteres do ácido salicílico como substrato (STANFORD RES INST INT, 1986; POSPÍSIL et al., 1996; VELCHEVA; STAMBOLIYSKA, 2008).

A salicilamida foi introduzida na terapêutica em 1968. Como outros derivados do ácido salicílico, é também um anti-inflamatório não esteroideal capaz de inibir a síntese de prostaglandinas pelas enzimas ciclo-oxigenases. Apesar de não ser tão efetivo quanto o ácido acetilsalicílico, é ainda utilizado como analgésico, antipirético, antirreumático e como antifúngico (KROGSGAARD-LARSEN; LILJEFORS; MADSEN, 1996; NCANGO et al., 2011). Quando na forma de sal monossódio é empregado como imunoterápico no tratamento de câncer (ABRAMS, SAMUEL, B., 2005).

Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Ss 1** (MeOH-d_4 , 500 MHz).

Figura 36 - Mapa de contornos HMQC do composto **Ss 1** (MeOH- d_4 , 500 MHz).

Figura 37 - Mapa de contornos HMBC do composto **Ss 1** (MeOH-d₄, 500 MHz).

Figura 38 - Espectro de massas obtido via CG do composto Ss 1.

Figura 39 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Ss 1.

Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Sc 8** (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 41 - Mapa de contornos COSY do composto **Sc 8** (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 42 - Mapa de contornos HMQC do composto **Sc 8** (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 43 - Mapa de contornos HMBC do composto **Sc 8** (CDCl₃, 500 MHz).

Figura 44 - Espectro de massas obtido via CG do composto **Sc 8**.

Figura 45 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto **Sc 8**.

2.4.3.2 Determinação estrutural de 4-hidroxi-3-metoxibenzamida (Ss 2) e 3-hidroxi-4-metoxibenzamida (Ss 3)

A estrutura dos compostos **Ss 2** (2,09 mg) e **Ss 3** (2,21 mg) foram determinadas através da análise dos dados de RMN 1D e 2D e de espectrometria de massas via CG e IES (Figuras 48-57, pags. 77-84).

O espectro de RMN de ^1H do composto **Ss 2** apresentou três sinais integrando para um hidrogênio cada, correspondendo aos hidrogênios aromáticos H-2 em δ 7,48 (*d*, $J = 1,5$ Hz), H-5 em δ 6,83 (*d*, $J = 8$ Hz) e H-6 em δ 7,41 (*dd*, $J = 8$ Hz; 1,5 Hz), típicos de um anel aromático 1,2,4-trissubstituído em δ 3,91 (*s*). Foi também observado um sinal integrando para três hidrogênios, característico de hidrogênios metoxílicos.

Pelo espectro de HMQC foram obtidos os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos C-2 em δ 112,4, C-5 em δ 115,7, C-6 em δ 122,4 referentes aos carbonos aromáticos (sp^2) e o carbono metoxílico (sp^3) C-8 em δ 56,1, por correlação direta ($^1J_{\text{CH}}$) com os hidrogênios H-2, H-5, H-6 e H-8, respectivamente.

Os carbonos não hidrogenados do composto **Ss 2** foram propostos com base nas correlações a longa distância entre hidrogênios e carbonos ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$) observadas no espectro HMBC: entre os hidrogênios H-2 e H-6 com o carbono carbonílico C-7 em δ 172,2; H-2 e H-5 com o carbono C-1 em δ 125,6; H-2, H-5 e H-8 com o carbono aromático C-3 em δ 148,9 e, por último, H-2, H-5 e H-6 com o carbono aromático C-4 em δ 152,0.

Os valores de deslocamento químico dos carbonos C-3 e C-4 e as correlações observadas no HMBC entre hidrogênios e carbonos permitiram o posicionamento dos substituintes (-OH e -OCH₃) no anel aromático.

Os dados obtidos por CG-EM auxiliaram na determinação estrutural proposta, onde notou-se o pico relativo do íon molecular M^{++} de m/z 167 e a presença do pico base de m/z 151, com uma diferença de 16 u , justificando a presença do grupamento amino, eliminado como radical ($\cdot NH_2$) e o íon de m/z 123 como produto de fragmentação do íon de m/z 151 com perda de 28 u ($-CO$), o qual nos levou a determinar a presença de uma amida primária ligada ao anel aromático.

Analizando o espectro de massas de alta resolução obtido via IES evidenciou-se os íons do composto **Ss 2** em sua forma protonada $[M+H]^+$ m/z 168,0646 e, em maior intensidade, seu aduto de sódio $[M+Na]^+$ m/z 190,0474, com erros de 5,6 e 0,5 ppm respectivamente. O composto **Ss 2** foi determinado como 4-hidroxi-3-metoxibenzamida (Tabela 11, pag. 73).

Tabela 11 - Dados de RMN de 1H e ^{13}C em MeOH- d_4 do composto **Ss 2**.

4-hidroxi-3-metoxibenzamida				
	Posição	δ^1H (500MHz)	$\delta^{13}C$ (125 MHz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	-	125,6	-
	2	7,48 (<i>d</i> , $J = 1,5$ Hz, 1H)	112,4	C-1/C-3/C-4/C-6/C-7
	3	-	148,9	-
	4	-	152,0	-
	5	6,83 (<i>d</i> , $J = 8$ Hz, 1H)	115,7	C-1/C-3/C-4
	6	7,41 (<i>dd</i> , $J = 8; 1,5$ Hz, 1H)	122,4	C-2/C-4/C-7
	7	-	172,2	-
	8	3,91 (<i>s</i> , 3H)	56,1	C-3

*Valores observados indiretamente por HMQC e HMBC.

A grande maioria dos trabalhos presentes na literatura é dúbia quanto a real presença de amidas primárias como produtos naturais, devido ao uso de amônia na obtenção dos extratos. Jaroszewski e colaboradores (2005) relataram pela primeira vez os compostos 4-hidroxi-3-metoxibenzamida, 4-metoxibenzamida e o 3,4-metilenodioxibenzamida das flores

de *Naravelia zeylanica* L. (Ranunculaceae), sem a utilização de amônia na preparação do extrato. Para o preparo dos extratos das actinobactérias neste trabalho em nenhum momento foi usada amônia, portanto pode-se inferir que os compostos são produtos no metabolismo secundário dos micro-organismos. O composto **Ss 2** foi previamente isolado de *Houttuynia cordata* Thunb (Saururaceae) (CHOU; KU; WU, 2009).

O composto aromático 4-hidroxi-3-metoxibenzamida também foi obtido como produto final de biotransformação do micro-organismo *Streptomyces violaceoninger* utilizando como substrato a vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) (Figura 46, pag. 74), com rendimento significativo de 70%. Este processo foi apontado como uma forma alternativa e direta de obtenção do composto com a utilização de micro-organismos, já que por síntese química o mesmo foi obtido em cinco etapas (KERGOMARD; RENARD, 1986).

Figura 46 - Estrutura química da vanilina.

Hipoteticamente, a presença do composto **Ss 2** no extrato também poderia estar correlacionada com a biotransformação do ácido ferúlico (*trans*-ácido 4-hidroxi-3-metóxi-cinâmico), derivado do aminoácido fenilalanina e menos comumente da tirosina (Figura 47, pag. 75) (DE LA ROSA; ALVAREZ-PARRILLA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2010).

O ácido ferúlico está significativamente presente em paredes e sementes de diversos vegetais, como exemplo, o arroz, o trigo e a aveia, podendo ser encontrado em sua forma livre ou ligado covalentemente a biopolímeros, tais como polissacarídeos, alcoóis, triterpenos e fitoesteróides (ZHENG et al., 2007; DE LA ROSA; ALVAREZ-PARRILLA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2010). O ácido ferúlico é o precursor de diversas moléculas com funções das mais diversas, entre estas moléculas está a vanilina (KERGOMARD; RENARD, 1986; GASSON et al., 1998; ZHENG et al., 2007; DE LA ROSA; ALVAREZ-PARRILLA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2010). Uma vez que o cultivo do micro-organismo foi realizado em arroz, é possível que tenha ocorrido biotransformação do ácido ferúlico levando a formação de 4-hidroxi-3-metoxibenzamida (**Ss 2**).

Figura 47 - Esquema geral da biossíntese da vanilina (adaptado de NARBAD; GASSON, 1998).

O composto **Ss 2** também foi alvo de síntese para ser empregado em radioterapia (STANFORD RES INST INT, 1986). No ensaio antitumoral realizado neste trabalho o composto **Ss 2** não apresentou atividade antitumoral frente as células de câncer de cólon (HCT-8), glioblastoma (SF-295) e melanoma humano (MDA-MB-435).

Com relação ao composto **Ss 3**, observou-se que o espectro de RMN de ^1H apresenta uma grande similaridade com o do composto **Ss 2** (4-hidroxi-3-metoxibenzamida), ocorrendo apenas uma inversão nos deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos H-2 e H-6.

Para o composto **Ss 2**, o hidrogênio H-2 foi o mais desblindado δ 7,48 (*d*, $J = 1,5$ Hz), seguido do hidrogênio H-6 em δ 7,41 (*dd*, $J = 8; 1,5$ Hz). No composto **Ss 3** ocorreu o oposto: o hidrogênio mais desblindado foi o H-6, em δ 7,38 (*dd*, $J = 8,5; 2$ Hz), seguido do hidrogênio H-2, em δ 7,34 (*d*, $J = 2$ Hz).

Os dados de HMQC, HMBC e CG-EM do composto **Ss 3** também foram utilizados na atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e no posicionamento dos substituintes ($-\text{CONH}_2$, $-\text{OMe}$ e $-\text{OH}$) no anel aromático.

Portanto, este composto é um isômero de posição do composto **Ss 2**, com a inversão do posicionamento dos grupamentos metoxílico e hidroxílico no anel aromático. Além disso,

observou-se pela espectrometria de massas obtida via CG, a presença do íon molecular M^{+} em m/z 167 *u*, do pico base em m/z 151 e de produto de fragmentação m/z de 123, reforçando a idéia de uma estrutura isomérica do composto **Ss 2**.

O espectro de massas de alta resolução obtido via IES está coerente para a estrutura proposta, já que mostrou o pico do íon cationizado com sódio $[M+Na]^+$ m/z 190,0478, com erro de 4,1 ppm. O composto **Ss 3** trata-se portanto do 3-hidroxi-4-metoxibenzamida (Tabela 12, pag. 76).

Tabela 12 - Dados de RMN de 1H e ^{13}C em MeOH- d_4 do composto **Ss 3**.

3-hidroxi-4-metoxibenzamida				
	Posição	δ^1H (500 MHz)	$\delta^{13}C$ (125 MHz)	HMBC (H→C)
1	-	127,4	-
	2	7,34 (<i>d</i> , $J = 2$ Hz, 1H)	115,5	C-3/C-4/C-6/C-7
	3	-	147,6	-
	4	-	152,3	-
	5	6,97 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz, 1H)	111,6	C-1/C-3/C-4
	6	7,38 (<i>dd</i> , $J = 8,5; 2$ Hz, 1H)	120,7	C-2/C-4
	7	-	172,2	-
	8	3,92 (<i>s</i> , 3H)	56	C-4
167,16 g mol ⁻¹				

*Valores observados indiretamente por HMQC e HMBC.

Pelo levantamento bibliográfico realizado com o auxílio do banco de dados do Scifinder e do dicionário de produtos naturais (<http://dnp.chemnetbase.com/dictionary-search.do?method=view&id=4880654&si=>, acessado em: 25/01/2012), o composto 3-hidroxi-4-metoxibenzamida foi obtido apenas por síntese e é empregado em radioterapia (STANFORD RES INST INT, 1986). No ensaio antitumoral realizado também não foi evidenciada atividade citotóxica significativa.

Figura 48 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Ss 2** (MeOH-d_4 , 500 MHz).

Figura 49 - Mapa de contornos HMBC do composto Ss 2 (MeOH-d₄, 500 MHz).

Figura 50 - Mapa de contornos HMBC do composto **Ss 2** (MeOH- d_4 , 500 MHz).

Figura 51 - Espectro de massas obtido via CG do composto **Ss 2**.

Figura 52 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto **Ss 2**.

Figura 53 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Ss 3** (MeOH-d_4 , 500 MHz).

Figura 54 - Mapa de contornos HMQC do composto Ss 3 (MeOH- d_4 , 500 MHz).

Figura 55 - Mapa de contornos HMBC do composto **Ss 3** (MeOH-d₄, 500 MHz).

Figura 56 - Espectro de massas obtido via CG do composto **Ss 3**.

Figura 57 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto **Ss 3**.

2.4.3.3 Determinação estrutural de 3,4-dimetoxibenzamida (Ss 9)

O composto **Ss 9** (5,22 mg) teve sua estrutura definida com base na análise dos espectros de RMN 1D e 2D e espectros de massas via CG e IES (Figuras 58-62, pags. 88-91). O espectro de RMN de ^1H deste composto mostrou três sinais na região dos hidrogênios aromáticos, integrando para um hidrogênio cada, correspondentes aos hidrogênios H-2, H-5 e H-6, em δ 7,00 (*d*, $J = 8,3$ Hz), δ 7,47 (*sl*) e δ 7,50 (*dl*, $J = 8,4$ Hz), respectivamente. Estes sinais são típicos de um anel aromático 1,2,4-trissubstituído. Também foram observados dois sinais típicos de hidrogênios do grupo metoxila em δ 3,88 (*s*, 3H; H-8) e em δ 3,89 (*s*, 3H; H-9).

A atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono baseou-se nas correlações a curta ($^1J_{\text{CH}}$) e longa distância ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$) entre hidrogênios e carbonos observadas nos espectros HMQC e HMBC.

Pelo mapa de contorno HMQC obtivemos os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos C-2 (δ 112), C-5 (δ 115,7), C-6 (δ 122,4) referentes aos carbonos aromáticos (sp^2) e os carbonos metoxílico (sp^3) C-8 (δ 56,1) e C-9 (δ 57,8), em correlação com os hidrogênios H-2, H-5, H-6, H-8 e H-9, respectivamente.

Os carbonos não hidrogenados foram propostos pela análise realizada no mapa de contornos HMBC, através das correlações de H-6 com o carbono carbonílico da amida C-7 (δ 171,7), H-5 com o carbono aromático C-1 (δ 126,8), H-2, H-5 e H-8 com o carbono aromático C-3 (δ 148,9), H-5, H-6 e H-9 com o carbono aromático C-4 (δ 152,0). Os valores de deslocamento químico dos carbonos C-3 e C-4, e as correlações entre hidrogênios e carbonos atribuídas, permitiram o posicionamento das duas metoxilas ($-\text{OCH}_3$) no anel aromático.

Os dados obtidos pelo espectro de massas via CG auxiliaram na determinação estrutural proposta, onde observou-se o pico relativo do íon molecular M^+ de m/z 181 e a presença do íon de pico base de m/z 165, com uma diferença de 16 Da que corroboraram na presença do grupamento amino ligado a um dos substituintes do anel aromático, eliminado como radical ($\cdot NH_2$) e o íon de m/z 137 como produto de fragmentação do íon de m/z 165 com perda de 28 u (-CO), o qual nos levou a determinar a presença de uma amida primária ligada ao anel aromático.

Do espectro de massas de alta resolução obtido via IES observou-se principalmente em maior intensidade o pico do íon como aduto de sódio $[M+Na]^+$ m/z 204,0645, com erro de 6,7 ppm. A estrutura determinada do composto **Ss 9** foi a 3,4-dimetoxibenzamida, também conhecida por veratramida (Tabela 13, pag. 86), muito semelhante aos compostos **Ss 2** e **Ss 3** descritos anteriormente.

Tabela 13 - Dados de RMN de 1H e ^{13}C em MeOH- d_4 do composto **Ss 9**.

3,4 - dimetoxibenzamida				
	Posição	δ^1H (500 MHz)	$\delta^{13}C$ (125 MHz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	-	126,8	-
	2	7,47 (<i>sl</i> , 1H)	112	C-6/C-3
	3	-	149,9	-
	4	-	153,4	-
	5	7,00 (<i>dl</i> , $J = 8,3$ Hz, 1H)	111,8	C-1/C-3/C-4
	6	7,50 (<i>dl</i> , $J = 8,4$ Hz, 1H)	122,3	C-5/C-4/C-7
	7	-	171,7	-
	8	3,88 (<i>s</i> , 3H)	56,3	C-3
	9	3,89 (<i>s</i> , 3H)	57,8	C-4
181,19 g mol $^{-1}$				

*Valores observados por HMQC e HMBC.

Pelo levantamento bibliográfico, 3,4-dimetoxibenzamida pode ser obtida por síntese, como exemplo, a metodologia recentemente desenvolvida por Gowda e Chakraborty (2011)

na conversão direta de 3,4-dimetoxibenzaldeído reagindo-o com quantidades estequiométricas de cloridrato de hidroxilamina na presença de Cs_2CO_3 e quantidades catalíticas de FeCl_3 . Também foi obtido como produto natural do cultivo sólido em trigo granel da actinobactéria *Streptoverticillium morookaense* (FENG et al., 2007).

Não há muitos relatos de aplicação deste composto, apenas o emprego em ensaios de radioterapia (STANFORD RES INST INT, 1986). No ensaio biológico realizado, o composto **Ss 9**, a uma concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, não apresentou atividade citotóxica significativa frente às linhagens de células tumorais HCT-8 (câncer de cólon), SF-295 (glioblastoma) e MDA-MB-435 (melanoma humano).

Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Ss 9** (MeOH-d_4 , 500 MHz).

Figura 59 - Mapa de contornos HMQC do composto **Ss 9** (MeOH-d₄, 500 MHz).

Figura 60 - Mapa de contornos HMBC do composto **Ss 9** (MeOH-d₄, 500 MHz).

Figura 61 - Espectro de massas obtido via CG do composto Ss 9.

Figura 62 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Ss 9.

2.4.3.4 Determinação estrutural de benzamida (Ss 4)

O composto **Ss 4** (1,30 mg) teve sua estrutura definida com base na análise dos espectros de RMN 1D e 2D e de espectrometria de massas via CG e IES (Figuras 64-68, pags. 95-98). A atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono baseou-se também em correlações a curta ($^1J_{CH}$) e longa ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$) distância entre hidrogênio e carbono observadas nos espectros de HMQC e HMBC respectivamente.

Pelo espectro de RMN de 1H observou-se três sinais na região dos hidrogênios aromáticos, sendo um dubleto largo (*dl*) em δ 7,87 integrando para dois hidrogênios (H-2 e H-6), e dois tripletos largos (*tl*), um em δ 7,46, integrando para dois hidrogênios (H-3 e H-5) e outro em δ 7,54 integrando para um hidrogênio (H-4). A constante de acoplamento observada foi de $J = 7,5$ Hz para todos os sinais apresentados, caracterizando acoplamento *orto* de hidrogênios aromáticos. O padrão de multiplicidades e integrais observadas são compatíveis com o de anel benzênico monossustituído.

O mapa de contornos HMQC mostrou a correlação dos sinais dos hidrogênios H-2 e H-6 com os carbonos C2 e C6, em δ 128,4, e entre os hidrogênios H-3 e H-5 com os carbonos C3 e C5 em δ 129,3. O C-4 foi observado em δ 132,8 pela correlação direta com o H-4.

Os carbonos não hidrogenados foram determinados pelo espectro HMBC através da correlação dos hidrogênios H-3 e H-5 com C-1, em δ 134,9, e dos hidrogênios H-2 e H-6 com o carbono carbonílico C-7, em δ 172,5.

Os dados obtidos por CG-EM, reforçaram a determinação estrutural proposta, com a presença de três íons de maior intensidade, o pico relativo ao íon molecular M^{++} de m/z 121 e o de pico base de m/z 105, com uma diferença de 16 u , justificando a presença do grupamento amino eliminado como radical ($\cdot NH_2$), e o íon de m/z 77, como produto de fragmentação do íon de m/z 105 com perda de 28 u ($-CO$), que também confirma a presença da amida ligada ao anel aromático. Os dados apresentados são compatíveis com os relatados por Holmes e Benoit (1971) no experimento de fragmentação da substância benzamida (Figura 63, pag. 93).

Figura 63 - Fragmentação obtida por IE do composto **Ss 4** (adaptado de HOLMES; BENOIT, 1971; WATSON; SPARKMAN, 2007).

O espectro de massas de alta resolução obtido via IES confirmou a proposta estabelecida com a presença do pico do íon cationizado com sódio $[M+Na]^+$ m/z 144,0414, com erro de 4,1 ppm. O composto isolado foi determinado como benzamida (Tabela 14, pag. 93).

Tabela 14 - Dados de RMN de 1H e ^{13}C em $MeOH-d_4$ do composto **Ss 4**.

benzamida				
	Posição	δ^1H (500 MHz)	$\delta^{13}C$ (125 MHz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	-	134,9	-
	2/6	7,87 (<i>dl</i> , $J = 7,5$ Hz, 2H)	128,4	C-2 ou C-6/C-4/C-7
	3/5	7,46 (<i>tl</i> $J = 7,5$ Hz, 2H)	129,3	C-1/C-3 ou C-5
	4	7,54 (<i>tl</i> $J = 7,5$ Hz, 1H)	132,8	C-2/C-6
	7	-	172,5	-
	-	-	-	-
	-	-	-	-

*Valores observados indiretamente por HMQC e HMBC.

A benzamida já foi obtida por síntese através da redução de bezoil azida com boroidreto de zinco em 1,2-dimetoxietano, e como produto natural de origem vegetal de *Homalium foetidum* (Roxb.) Benth. (Flacourtiaceae), *Cerbera maghas* L. (Apocynaceae), *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) e *Houttuynia cordata* (JOHNS; LAMBERTON, 1969; RANU; SARKAR; CHAKRABORTY, 1994; MOUSTAFA et al., 2007; CHOU; KU; WU, 2009; ZHANG et al., 2010).

A benzamida é classificada como bloqueador de primeira geração da enzima poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), cuja função é ajudar nos reparos do DNA, catalisando a transferência intracelular de unidades de ADP-ribose a partir da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) para as proteínas nucleares, levando à formação de polímeros ADP-ribose. Sem a capacidade de reparar o DNA danificado por agentes de quimioterapias e radioterapias, os inibidores da PARP, como a benzamida, diminuem a resistências das células tumorais durante o tratamento (PENNING et al., 2009; PERALTA-LEAL et al., 2009).

No ensaio antitumoral realizado com o composto **Ss 4**, não observou-se atividade citotóxica significativa contra as células de câncer de cólon (HCT-8), glioblastoma (SF-295) e melanoma humano (MDA-MB-435). Porém, o composto **Ss 4** não foi avaliado em sinergismo com outras drogas.

Figura 64 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Ss 4** (MeOH-d_4 , 500 MHz).

Figura 65 - Mapa de contornos HMPC do composto Ss 4 (MeOH- d_4 , 500 MHz).

Figura 66 - Mapa de contornos HMBC do composto Ss 4 (MeOH- d_4 , 500 MHz).

Figura 67 - Espectro de massas obtido via CG do composto Ss 4.

Figura 68 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Ss 4.

2.4.3.5 Determinação estrutural de 3,4-diidro-3,4,6,8-tetraidróxi-1(2H)-naftalenona (Ss 5)

O composto **Ss 5** (4,12 mg) teve sua estrutura determinada com base nos dados obtidos de seus espectros de RMN 1D e 2D e de espectrometria de massas via CG e IES (Figuras 71-76, pags. 103-107). O espectro de RMN de ^1H mostrou dois singletos largos (*sl*) integrando para um hidrogênio cada, com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios aromáticos blindados, correspondendo aos hidrogênios H-5 em δ 6,60 e H-7 em δ 6,17. O não desdobramento dos sinais indicou uma constante pequena de acoplamento entre eles, característica de relação *meta*.

A ausência de outros sinais na região de hidrogênios aromáticos e a integral para dois hidrogênios somente, sugeriu um anel aromático tetrassubstituído. Pela análise do espectro HMQC observou-se a correlação destes hidrogênios com os carbonos C-5 em δ 108,4 e C-7 em δ 102,4, respectivamente.

O espectro de RMN de ^1H também apresentou sinais em δ 2,61 (*dd*, $J = 17$; 9 Hz) e δ 2,94 (*dd*, $J = 17$; 4 Hz), de hidrogênios que acoplam entre si com constante de acoplamento de $J_{\text{H-H}}$ de 17 Hz, sugerindo hidrogênios geminais (H-2 $_{\beta}$ e H-2 $_{\alpha}$) de grupamento $-\text{CH}_2-$, o que foi confirmado pelo HMQC pela ligação destes hidrogênios ao carbono metilênico C-2 em δ 44,0.

Os outros valores de constantes de acoplamento $J = 9$ e 4 Hz observados para os hidrogênios geminais, aliados à presença de hidrogênios metínicos em δ 4,48 (*d*, 7,5 Hz, H-4) e em δ 3,96 (*m*, H-3), sugeriram a presença de um sistema cíclico. Pelo mapa de contornos HMQC, observou-se a correlação dos hidrogênios H-3 e H-4 com os carbonos hidroximetínicos C-3 (δ 71,5) e C-4 (δ 73,5), respectivamente.

Os sinais e correlações observados pelos espectros de RMN de ^1H , HMQC e HMBC dos hidrogênios H-2 $_{\beta}$, H-2 $_{\alpha}$, H-3 e H-4 e carbonos sp^3 C-2, C-3 e C-4 sugeriram a presença de um sistema de spins $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}(\text{OH})-$, o qual foi confirmado pelo mapa de contornos

COSY. Com os resultados apresentados inferimos os hidrogênios oximetínicos estão orientados em relação trans-pseudo-di-axial e, conseqüentemente, as hidroxilas em pseudo-equatorial, uma na face alfa e outra na face beta da molécula.

Os carbonos quaternários C-6 e C-8, com deslocamentos químicos em δ 167,0 e δ 167,5, respectivamente, sugeriram a presença de duas hidroxilas ligadas ao anel aromático. A localização dessas hidroxilas foi determinada com base nas correlações observadas no espectro HMBC entre os hidrogênios aromáticos H-5 com os carbonos C-1a (δ 110,5), C-4, C-6 e C-7 (δ 102,2) e H-7 com os carbonos C-1a, C-5 e C-8. A presença do carbono carbonílico C-1 (δ 201,4) também foi observada pelo espectro HMBC através da correlação H-2 β com H-2 α , que pelo valor apresentado indicou ser uma carbonila cetônica do sistema cíclico.

Os dados obtidos por CG-EM reforçaram a determinação estrutural proposta com a presença do íon de m/z 192, com uma diferença de 18 u do que seria do pico do íon molecular $M^{++} m/z$ 210, ausente no espectro adquirido (Figura 69, pag. 100).

Figura 69 - Fragmentação por IE do composto **Ss 5** (adaptado de WATSON; SPARKMAN, 2007).

Pelo espectro de massas obtido via IES, observou-se os íons do composto **Ss 5** em sua forma protonada $[M+H]^+$ m/z 211,0595 e, em maior intensidade seu aduto de sódio $[M+Na]^+$ m/z 233,0408, com erros de 2,9 e 5,5 ppm, respectivamente, confirmando a hipótese levantada sobre os dados fornecidos pelo espectro obtido via CG. O composto em questão é o 3,4-diidro-3,4,6,8-tetra-hidroxi-1(2H)-naftalenona (Tabela 15, pag. 101).

Tabela 15 - Dados de RMN de 1H e ^{13}C em MeOH- d_4 do composto **Ss 5**.

3,4-diidro-3,4,6,8-tetra-hidroxi-1(2H)-naftalenona					
	Posição	δ^1H (500 MHz)	COSY	$\delta^{13}C$ (125 MHz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	-	-	201,4	-
	1a	-	-	110,5	-
	2	β 2,61 (<i>dd</i> , $J = 17$; 9 Hz, 1H) α 2,94 (<i>dd</i> , $J = 17$; 4 Hz, 1H)	H-2 α /H-3 H-2 β /H-3	44,0 -	C-1/C-3/C-4 C-1/C-4
	3	3,96 (<i>m</i> , Hz, 1H)	H-2 β e α /H-4	71,5	-
	4	4,48 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz, 1H)	H-3	73,5	C-1a/C-2/C-3/C-4a/C-5
	4a	-	-	148,3	-
	5	6,60 (<i>sl</i> , 1H)	H-7	108,4	C-1a/C-4/C-6/C-7
	6	-	-	167,0	-
	7	6,17 (<i>sl</i> , 1H)	H-5	102,4	C-1a/C-5/C-8
	8	-	-	167,5	-

210,18 g mol $^{-1}$

*Valores observados indiretamente por HMQC e HMBC.

O composto 3,4-diidro-3,4,6,8-tetraidróxi-1(2H)-naftalenona já foi isolado como subproduto da biossíntese da melanina (Figura 70, pag. 102) do cultivo de diversos fungos, como exemplo, *Pyricularia oryzae*, *Monosporascus cannonballus*, *Wangiella dermatitidis*, *Hortaea werneckii*, *Phaeothea triangularis*, *Trimmatostroma salinum*, *Phaeoacremonium aleophilum*, entre outros (WOLOSHUK et al., 1980; KOGEJ et al., 2004; WHEELER et al., 2004, 2008). Também foi isolado do micélio de uma actinobactéria do gênero *Streptomyces* (FIEDLER; GOODFELLOW, 2004). No ensaio antitumoral realizado neste trabalho, o composto **Ss 5** não apresentou atividade significativa.

Figura 70 - Rota biossintética parcial da via da melanina pelo fungo *Wangiella dermatitidis* (adaptado de WHEELER et al., 2008).

Figura 71 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Ss 5** (MeOH-d_4 , 500 MHz).

Figura 72 - Mapa de contornos COSY do composto **Ss 5** (MeOH-d₄, 500 MHz).

Figura 73 - Mapa de contornos HMQC do composto Ss 5 (MeOH- d_4 , 500 MHz).

Figura 74 - Mapa de contornos HMBC do composto **Ss 5** (MeOH- d_4 , 500 MHz).

Figura 75 - Espectro de massas obtido via CG do composto Ss 5.

Figura 76 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Ss 5.

2.4.3.6 Determinação estrutural de 3,4-diidro-3,4,6,8-tetraidróxi-1(2H)-naftalenona (Ss 6) e 2-fenilacetamida (Ss 7) em mistura

As estruturas dos compostos **Ss 6** e o **Ss 7** foram determinadas em mistura na subfração S2.2 (0,84 mg), com base na análise dos espectros de RMN 1D e 2D e espectrometria de massas via CG e IES (Figuras 78-84, pags. 111-116). A atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono baseou-se principalmente pelas correlações a curta distância ($^1J_{CH}$) observadas no espectro HMQC. O mapa de contornos HMBC não apresentou correlações que permitissem a atribuição de todos seus sinais de carbono.

O espectro de RMN de 1H da mistura em que se encontra o composto **Ss 6** apresentou sinais de hidrogênios muito semelhantes aos observados para o composto **Ss 5** (3,4-diidro-3,4,6,8-tetraidróxi-1(2H)-naftalenona), o que sugeriu uma estrutura isomérica.

Após a análise dos dados de RMN de 1H e COSY dos compostos **Ss 5** e **Ss 6** concluímos que se tratavam de diastereoisômeros, onde ocorreu apenas uma inversão da configuração relativa do grupo hidroxílico ligado ao carbono C-3. O hidrogênio H-3, que na estrutura anterior se apresentava em axial, agora está em equatorial, o que ocasionou uma diminuição dos valores das constantes de acoplamento entre o H-3 e os hidrogênios H-2 $_{\beta}$, H-2 $_{\alpha}$ e H-4. Esta proposta é justificada pelo valor de constante de acoplamento observada para o sinal de H-4 (d , δ 4,37, $J = 2,1$ Hz) que é menor comparado ao $J = 7,5$ Hz observado para H-4 no composto **Ss 5**. Os deslocamentos químicos de H-4 nos dois compostos também são diferentes.

O espectro de massas via CG do composto **Ss 6** ajudou na confirmação da proposta estabelecida com a presença dos mesmos íons de maior intensidade com m/z 192, 136, 108 e 69, observados também no espectro do composto **Ss 5**. Pelo espectro de massas obtido via IES os íons protonado $[M+H]^+$ m/z 211,0595 e, em maior intensidade, como aduto de sódio $[M+Na]^+$ m/z 233,0413, também foram observados, com erros de 0,9 e 0,5 ppm respectivamente, corroborando a proposição do composto **Ss 6** como isômero do composto **Ss 5**.

Com relação ao composto **Ss 7**, o espectro de massas obtido via CG foi crucial na determinação estrutural. O íon molecular M^{++} de m/z 135, sugeriu a presença de um nitrogênio em sua estrutura devido à relação massa-carga ímpar, e pela diferença de 44 u em relação ao íon de pico base de m/z 91, que sugeriu a presença do grupamento amida $[CONH_2]^+$. O íon de m/z 91 característico de íon tropílio, ajudou na confirmação de um anel aromático ramificado, que deu origem ao pico do íon de m/z 65, através da liberação de uma molécula livre de $-C_2H_2$ (26 u) (Figura 77, pag. 109).

Com relação ao pico do íon de m/z 92, a perda de $-CONH$ do íon M^{++} geralmente ocorre em amidas primárias, induzido pela migração de hidrogênio do átomo de nitrogênio da amida, o que a torna a principal reação de fragmentação em muitos casos, como descrito por Lee e colaboradores (1988) ao estudarem o mecanismo de fragmentação por impacto eletrônico de fenilacetamidas *meta* e *para* substituídas.

Figura 77 - Fragmentação por IE do composto **Ss 7** (adaptado de LEE; MAYER; WOLFGANG, 1988).

Pelo espectro de RMN de ^1H do composto **Ss 7**, em mistura com **Ss 6**, observamos um sistema aromático monossustituído entre δ 7,29-7,21 (*m*, 5H) e a presença de hidrogênios metilênicos em δ 3,49 (*s*, 2H), desblindados devido à sua ligação direta com o grupamento amida.

Através dos mapas de contornos HMQC e HMBC reforçou-se a proposta pela correlação dos hidrogênios metilênicos em H-2 com os carbonos C-2 e C-1 em δ 43,0 e com a carbonila da amida em δ 175,7.

Pelo espectro de massas de alta resolução obtido via IES confirmou-se a proposta estabelecida com a presença do pico do íon cationizado com sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 158,0569, com erro de 5,8 ppm. O composto **Ss 7** foi determinado como 2-fenilacetamida.

O composto 2-fenilacetamida é um composto sintético conhecido e também como produto natural isolado das partes aéreas da planta *Schinus terebinthifolius* e das folhas de *Allophylux cobbe* (Sapindaceae), de actinobactérias do gênero *Streptomyces* e da esponja *Halichondria* sp. (JOHNS; LAMBERTON, 1969; FROHWEIN et al., 1973; LI; MATSUNAGA; FUSETANI, 1994; MASKEYA et al., 2005; MOUSTAFA et al., 2007; FENG et al., 2007).

Figura 78 - Espectro de RMN de ^1H da subfração Rle 8 S2.2, destacando os deslocamentos químicos e integrais dos sinais referentes ao composto **Ss 6** (*) e **Ss 7** (•) (MeOH- d_4 , 500 MHz).

Figura 79 - Mapa de contornos COSY da subfração Rle 8 S2.2 que contém os compostos **Ss 6** e **Ss 7** (MeOH-d_4 , 500 MHz).

Figura 80 - Mapa de contornos HMQC da subfração Rle 8 S2.2 que contém os compostos **Ss 6** e **Ss 7** (MeOH-d_4 , 500 MHz).

Figura 81 - Mapa de contornos HMBC da subfração Rle 8 S2.2 que contém os compostos **Ss 6** e **Ss 7** (MeOH-d₄, 500 MHz).

Figura 82 - Espectro de massas obtido via CG do composto Ss 6.

Figura 83 - Espectro de massas obtido via CG do composto Ss 7.

Figura 84 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES da mistura dos compostos Ss 6 e Ss7.

2.4.3.7 Determinação estrutural de 2,3-diidro-2,2-dimetil-4(1H)-quinazolinona (Ss 10)

A estrutura do composto **Ss 10** (4,39 mg) foi determinada pela análise dos dados de RMN 1D e 2D e de massas via CG e IES (Figuras 86-90, pags. 120-123). O espectro de RMN de ^1H apresentou quatro sinais de hidrogênios aromáticos correspondentes aos hidrogênios H-6 em δ 6,71 (*tl*, $J = 8,0$, 1H), H-8 em δ 6,68 (*dl*, $J = 8,0$, 1H), H-7 em δ 7,27 (*dt*, $J = 1,0$; 8,0 Hz, 1H) e H-5 em δ 7,68 (*dd*, $J = 1,0$; 8,0 Hz, 1H), típicos de um anel aromático dissustituído em *orto*.

Também foi evidenciada a presença de um singlete em δ 1,48 integrando para seis hidrogênios, sugerindo a presença de duas metilas (H-9 e H-10), que pelo experimento HMQC apresentaram correlação com os carbonos metílicos (sp^3) em δ 28,8. O mapa de contornos HMBC evidenciou que ambos hidrogênios metílicos estavam correlacionando com o carbono quaternário (sp^3) C-2 (δ 68,2) e com o carbono da metila vizinha (C-9 ou C-10) de mesmo deslocamento químico (δ 28,8).

Pelo mapa de contornos HMQC também obteve-se os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos aromáticos (sp^2) C-5 (δ 128,4), C-6 (δ 118,4), C-7 (δ 135,0) e C-8 (δ 115,6). Os carbonos quaternários foram propostos pela análise realizada no experimento HMBC através das correlações dos hidrogênios H-5 e H-7 com o carbono aromático C-8a (δ 148,7) e H-5 com o carbono carbonílico C-4 (δ 167,0).

Os deslocamentos químicos dos carbonos C-4a e C-8 apresentaram valores muito próximos, em δ 115,0 e δ 115,6, respectivamente. A correlação observada no HMBC entre H-6 (δ 6,71) e o carbono em δ 115,0 confirma a atribuição deste ao C-4a. Estes dados estão de acordo com a literatura (KLEMM, 1998).

Os dados obtidos via CG-EM corroboraram a determinação estrutural de **Ss 10**, onde observou-se o pico relativo ao íon molecular M^{+} de m/z 176 e a presença do pico base de m/z 161, com uma diferença de 15 u referente a perda de uma metila ($[M-CH_3]^{+}$). Outros picos de íons de m/z 120, m/z 92 e m/z 65 também foram observados (Figura 85, pag. 118).

Figura 85 - Fragmentação por IE do composto **Ss 10** (adaptado de DAENENS; VAN BOVEN, 1976; SAEED; SHAHEEN; BOLTE, 2010).

O espectro de massas de alta resolução obtido via IES evidenciou em maior intensidade o pico do íon cationizado com sódio $[M+Na]^{+}$ m/z 199,0853, com erro de 5,4 ppm. Com base na comparação dos dados obtidos, determinou-se que o composto **Ss 10** refere-se à 2,3-diidro-2,2-dimetil-4(1H)-quinazolinona (Tabela 16, pag. 119).

Tabela 16 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em MeOH-d_4 do composto **Ss 10**.

2,3-diidro-2,2-dimetil-4(1H)-quinazolinona				
	Posição	$\delta^1\text{H}$ (500 MHz)	$^*\delta^{13}\text{C}$ (125 MHz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
176,22 g mol ⁻¹	1	-	-	-
	2	-	68,2	-
	3	-	-	-
	4	-	167,0	-
	4a	-	115,0	-
	5	7,68 (dd, $J = 1; 8$ Hz, 1H)	128,4	C-4/C-7/C-8a
	6	6,71 (tl, $J = 8$, 1H)	118,4	C-4a (115)
	7	7,27 (dt, $J = 1; 8$ Hz)	135,0	C-5/C-8/C-8a
	8	6,68 (dl, $J = 8$, 1H)	115,6	C-6
	8a	-	148,7	-
	9/10	1,48 (s, 6H)	28,8	C-2/C-9 ou C-10

*Valores observados por HMQC e HMBC.

Pelo levantamento bibliográfico realizado, o composto 2,3-diidro-2,2-dimetil-4(1H)-quinazolinona é um heterociclo pertencente à classe das quinazolinonas sintetizado pela primeira vez por Carrington em 1955. Desde então diversas novas metodologias vem sendo descritas (ROSTAMI; TAVAKOLI, 2011). Como produto natural foi isolado de uma bactéria marinha do gênero *Cytophaga* (SHAABAN et al., 2002; SHAABAN, 2004).

Pouco se sabe com relação à sua atividade biológica. No entanto, a classe das 2,3-diidroquinazolinonas atrai muita atenção devido à grande variedade de atividades farmacêuticas, incluindo antitumoral, anticoncepcional, antibacteriana, antifúngica e antidepressiva (inibidor da monoamino oxidase - MAO) (HOUR et al., 2000; SELVAM; KUMAR, 2011).

No ensaio antitumoral realizado, o composto **Ss 10**, a uma concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentou elevada atividade citotóxica para as linhagens de câncer de cólon (HCT-8) e glioblastoma (SF-295) com 93,89 % e 86,96% de inibição, respectivamente. Contra a linhagem de melanoma humano (MDA-MB-435) apresentou uma atividade moderada com inibição de 74,03%.

Figura 86 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Ss 10** (MeOH-d_4 , 500 MHz).

Figura 87 - Mapa de contornos HMQC do composto **Ss 10** (MeOH-d_4 , 500 MHz).

Figura 88 - Mapa de contornos HMBC do composto **Ss 10** (MeOH- d_4 , 500 MHz).

Figura 89 - Espectro de massas obtido via CG do composto **Ss 10**.

Figura 90 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto **Ss 10**.

2.4.3.8 Determinação estrutural de desferrioxamina E (Sc 11) e desferrioxamina B (Ss 12)

As estruturas dos compostos **Sc 11** (144,96 mg) e **Ss 12** (12,43 mg) foram determinadas com base na análise dos espectros de RMN 1D e 2D e de espectrometria de massas de alta resolução via IES (Figuras 93-109, pags. 131-147).

O espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 Hz) do composto **Sc 11** apresentou sete sinais de multipletos integrando para dois hidrogênios cada, referentes aos hidrogênios metilênicos H-2 (δ 2,58), H-3 (δ 2,27), H-6 (δ 3,49), H-7 (δ 1,48), H-8 (δ 1,20), H-9 (δ 1,36) e H-10 (δ 3,00). Outros dois sinais de singletos, um de um grupo hidroxílico (H-5) em δ 9,63 e outro de um grupo amino (H-11) em δ 7,74 foram também observados.

Pelo espectro de RMN de ^{13}C observou-se a presença de nove carbonos, sendo que o DEPT indicou sete referentes aos carbonos metilênicos C-2 (δ 27,3), C-3 (δ 29,8); C-6 (δ 46,7); C-7 (δ 25,6); C-8 (δ 22,9); C-9 (δ 28,3) e C-10 (δ 38,1). No espectro de RMN de ^{13}C foram ainda observados dois carbonos quaternários carbonílicos, C-1 (δ 171,3) e C-4 (δ 171,8).

A atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono de ambos compostos baseou-se pelas correlações a curta ($^1J_{\text{CH}}$) e longa ($^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$) distância observadas nos mapas de contornos HMQC e HMBC, junto aos dados obtidos pelo COSY, os quais possibilitaram a formação de dois fragmentos estruturais conhecidos por succinil (A) e cadaverina (B).

Fragmento A - succinil. **Fragmento B - cadaverina.**

Estes dois fragmentos se ligam pelo grupamento amida originando uma subunidade $C_9H_{16}N_2O_3$, tendo em parte de sua estrutura a hidroxilamida (CONOH), como representado no fragmento C. A junção observada foi confirmada no experimento COSY, pelo acoplamento entre o hidrogênio metilênico H-10 e o hidrogênio do grupo amino H-11. A correlação entre H-6 (δ 3,49) e C-4 (δ 171,8) observada no experimento HMBC corrobora a junção dos fragmentos A e B.

Fragmento C - unidade 1**Fragmento C - unidade 2**

Fragmento C - Fragmento estrutural contendo as subunidades succinil e cadaverina com correlações chave observadas no HMBC (setas).

Pelo espectro de massas de alta resolução obtido via IES evidenciou-se os íons protonado $[M+H]^+$ m/z 601,3573 e sodiado $[M+Na]^+$ m/z 623,3379, com erros de 2,9 e 0,6 ppm respectivamente, sugerindo que a estrutura poderia ser formada pela junção de três unidades do fragmento C. O mapa de contornos HMBC confirma esta união de três fragmentos C através da correlação de H-10 (δ 3,00) com C-1 (δ 171,3). A conexão destas três subunidades levou à formação do composto desferrioxamina E, também conhecido por nocardamina (Tabela 17, pag. 126). Os dados obtidos para **Sc 11** estão de acordo com os dados descritos na literatura para a desferrioxamina E (nocardamina) (YAMANAKA et al., 2005).

Tabela 17 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em DMSO- d_6 do composto **Sc 11**.

desferrioxamina E					
	Posição	$\delta^1\text{H}$ (500 MHz)	COSY	$\delta^{13}\text{C}$ (125 MHz) (DEPT)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1; 12; 23	-	-	171,3 (C)	-
	2; 13; 24	2,58 (m, 6H)	2,27	27,3 (CH ₂)	29,8; 171,3; 171,8
	3; 14; 25	2,27 (m, 6H)	2,58	29,8 (CH ₂)	27,3; 171,3; 171,8
	4; 15; 26	-	-	171,8 (C)	-
	5; 16; 27	9,63 (s, 3H, -NOH)	-	-	-
	6; 17; 28	3,46 (m, 6H)	1,48	46,7 (CH ₂)	22,9; 25,6; 171,8
	7; 18; 29	1,48 (m, 6H)	1,20; 3,46	25,6 (CH ₂)	22,9; 28,3; 46,7
	8; 19; 30	1,20 (m, 6H)	1,36; 1,48	22,9 (CH ₂)	25,6; 38,1; 46,7
	9; 20; 31	1,36 (m, 6H)	1,20; 3,00	28,3 (CH ₂)	22,9; 25,6; 38,1
	10; 21; 32	3,00 (m, 6H)	1,36; 7,74	38,1 (CH ₂)	22,9; 28,3; 171,3
	11; 22; 33	7,74 (s, 3H, -NH)	3,00	-	171,3; 38,1

600,70 g mol⁻¹

A fração butanólica do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. RLe 8 apresentou aspecto visual semelhante ao composto **Sc 11** (Figura 131, pag. 139). O espectro de massas de alta resolução obtido via IES desta fração apresentou um íon de maior intensidade com m/z 561,3654.

A busca por compostos com este peso molecular no dicionário de produtos naturais (<http://dnpc.chemnetbase.com/dictionary-search.do?method=view&id=4834553&si=>, acessado em: 25/01/2012) sugeriu que **Ss 12** poderia se tratar da desferrioxamina B, sideróforo acíclico análogo a **Sc 11**.

O espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) da fração *n*-BuOH também apresentou diversos sinais (multipletos) compatíveis com a substância sugerida. No entanto, alguns dos sinais apresentaram-se sobrepostos. Para garantir a hipótese levantada, uma pequena quantidade da fração butanólica foi purificada e, com o auxílio dos dados da literatura e dos espectros adquiridos em D₂O, 500 MHz, a estrutura foi determinada como desferrioxamina B (BORGAS; HUGI; RAYMOND, 1989; HIGASHI; FAN; LANE, 1998).

O espectro de RMN de ^1H mostra um singlete em δ 2,10 (3H) (Figura 102, pag. 140). Estes hidrogênios estão ligados a um carbono em δ 20,1, como evidenciado pelo espectro de HMQC. Estes dados indicam a presença de um grupo acetila na estrutura. Os demais sinais no espectro de RMN de ^1H estão entre δ 1,25-3,64, e são todos multipletos, não permitindo informações estruturais mais completas. Isto deve-se à natureza quase simétrica da estrutura e sua alta flexibilidade conformacional. Neste sentido, os espectros de RMN bidimensionais

(COSY, HMQC e HMBC) foram fundamentais para a confirmação da estrutura de **Ss 12**. O espectro de COSY (Figura 103, pag. 141) permitiu o estabelecimento dos acoplamentos entre os multipletos e o espectro de HMQC possibilitou a atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos ligados aos hidrogênios. O espectro de HMBC apresentou diversas correlações, porém algumas foram fundamentais para a atribuição inequívoca de alguns carbonos. As principais correlações do HMBC e os sistemas de acoplamentos evidenciados no COSY estão representados abaixo:

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos atribuídos (Tabela 18, pag. 127) estão de acordo com a literatura para a desferrioxamina (BORGIAS; HUGI; RAYMOND, 1989; HIGASHI; FAN; LANE, 1998). Devido à liberdade conformacional da estrutura, à coincidência de deslocamentos químicos de diversos hidrogênios metilênicos e à natureza quase simétrica da molécula, não é possível atribuir inequivocamente todos os deslocamentos químicos dos átomos de carbono.

Tabela 18 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em D_2O do composto **Ss 12**.

desferrioxamina B			
	Posição	$\delta^1\text{H}$ (500 MHz)	$^*\delta^{13}\text{C}$ (125 MHz)
	1	2,10 (s, 3H)	20,1
	2	-	174,3
	4; 15; 26	3,57-3,64 (m, 6H)	48,8; 48,6; 48,5
	5; 7; 16; 18; 27; 29	1,47-1,70 (m, 12H)	26,2-28,8
	6; 17; 28	1,25-1,32 (m, 6H)	23,5; 23,9
	8; 19	3,12-3,15 (m, 4H)	40,1
	10; 21	-	175,6
	11; 12; 22; 23	2,75-2,78 (m, 4H) e 2,45-2,48 (m, 4H)	31,3; 31,2
	13; 24	-	174,6
	30	2,94-3,00 (m, 2H)	40,2
560, 68 g mol ⁻¹			

*Valores observados indiretamente por HMQC e HMBC.

Os compostos **Sc 11** e **Ss 12** são pertencentes à classe dos sideróforos (do grego *sideros* = ferro, *foros* = transportador) do tipo hidroxamatos e são biossintetizados por enzimas multifuncionais chamadas de peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS) (Figura 91, pag. 128), que são também responsáveis pela biossíntese da maioria dos antibióticos peptídicos microbianos (CROSA; WALSH, 2002; MIETHKE; MARAHIEL, 2007).

Sid - enzimas envolvidas na biossíntese de desferrioxaminas

Figura 91 - Proposta da via biogênica das desferrioxaminas B e E. (adaptado de UEKI et al., 2009).

Os sideróforos atuam como um dos mecanismos mais eficazes desenvolvidos pelos micro-organismos na captação de ferro livre; as desferrioxaminas quando complexadas ao

ferro são denominadas de ferrioxaminas (Figura 92, pag. 129) (MIETHKE e MARAHIEL, 2007; ESSÉN et al., 2007).

Figura 92 - Estrutura dos complexos férricos ferrioxamina B e E (adaptado de ESSÉN et al., 2007).

O ferro é o segundo metal e o quarto elemento mais abundante da crosta de nosso planeta. Como oligoelemento, é essencial para diversas funções metabólicas, entre elas a biossíntese de adenosina trifosfato (ATP). Nos *habitat* microbianos, o íon ferroso (Fe^{+2}) é oxidado para íon férrico (Fe^{+3}) espontaneamente por reação com o oxigênio molecular (O_2) ou enzimaticamente durante a assimilação pelo micro-organismo. Porém, no meio ambiente aeróbio, como o solo, a biodisponibilidade deste mineral se torna muito baixa. Isto ocorre porque em pH neutro ou alcalino, na presença de oxigênio e água, o íon Fe^{+3} forma complexos de oxi-hidróxidos. Estes complexos são muito estáveis e não podem ser assimilados pelos micro-organismos (CHALLIS, 2005; MIETHKE; MARAHIEL, 2007).

A desferrioxamina E (nocardamina) foi relatada pela primeira vez por Stoll e colaboradores (1951) como um antibiótico produzido pela actinobactéria *Nocardia* sp.. A desferrioxamina E foi também isolada dos cultivos de *Pseudomonas* sp., *Chromobacterium* sp., *Streptomyces* sp. e mais recentemente da bactéria marinha *Citricoccus* sp. (MIETHKE; MARAHIEL, 2007; YAMANAKA et al., 2005; UEKI et al., 2009; KALINOVSKAYA et al., 2011). Também foi sintetizada totalmente por Bergeron e Mcmanis (1990). As atividades biológicas apresentadas por ela são das mais diversas: antimicrobiana; antitumoral; indutor metabólico; antioxidante e detoxificante (KALINOVSKAYA et al., 2011).

A desferrioxamina B foi descoberta há aproximadamente 50 anos pelo professor laureado com o prêmio Nobel Vladimir Prelog e seus colaboradores H. Zahner e H. Keberle como um antagonista ao antibiótico ferrimicina. O composto foi obtido do fermentado da actinobactéria *Streptomyces pilosus*, entretanto, outras espécies do gênero *Streptomyces* também são relatadas como produtoras deste metabólito, como exemplo, *S. acidiscabies*

(DIMKPA et al., 2008; HELI; MIRTORABI; KARIMIAN, 2011). Após o reconhecimento de seu potencial como quelante férrico, a desferrioxamina B foi introduzida no mercado pela indústria farmacêutica Ciba-Geigy, atualmente Novartis, na forma de sal de mesilato e denominada por Desferal[®] (HELI; MIRTORABI; KARIMIAN, 2011).

O Desferal[®] foi aprovado para uso clínico pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1969 e por muitos anos foi o único fármaco disponível no mercado que age como desintoxicante no tratamento de doenças como a hemocromatose e a talassemia (HELI; MIRTORABI; KARIMIAN, 2011). Porém, devido ao seu alto peso molecular não é administrado oralmente, e sim subcutâneo. Outros inconvenientes são sua natureza lipofílica e o elevado custo de produção. Em 1988, Bergeron e Pegram desenvolveram uma rota de síntese total, porém os rendimentos não foram muito satisfatórios.

Na terapêutica, além do Desferal[®], existem outros dois fármacos aprovados pela FDA para o tratamento por intoxicação ocasionada pelo acúmulo de ferro: Exjade[®] e Ferriprox[®]. As vantagens destes novos fármacos são a administração oral e a produção de baixo custo (HELI; MIRTORABI; KARIMIAN, 2011). Porém, o uso simultâneo de Desferal[®] com Ferriprox[®] tem mostrado um efeito sinérgico durante os tratamentos, proporcionando uma melhor adesão ao tratamento pelos pacientes.

Diversos estudos buscam por novas aplicações terapêuticas da desferrioxamina B como antitumorais, antiprotozoários, antibacterianos e no tratamento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (JIANG et al., 2006; DAS et al., 2007).

O ensaio biológico de citotoxicidade realizado neste trabalho com o composto **Sc 11** (desferrioxamina E) apresentou atividade de inibição de crescimento moderada frente as células de câncer de cólon HCT-8 (54,20%) e glioblastoma humano SF-295 (59,02%).

Figura 93 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Sc 11** (DMSO-d_6 , 500 MHz).

Figura 94 - Ampliação do espectro de RMN de ^1H do composto **Sc 11** (DMSO-d_6 , 500 MHz).

Figura 95 - Mapa de contornos COSY do composto **Sc 11** (DMSO-d₆, 500 MHz).

Figura 96 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **Sc 11** (DMSO-d_6 , 125 MHz).

Figura 97 - Espectro de DEPT do composto **Sc 11** (DMSO-d₆, 125 MHz).

Figura 98 - Mapa de contornos HMQC do composto **Sc 11** (DMSO- d_6 , 500 MHz).

Figura 99 - Mapa de contornos HMBC do composto **Sc 11** (DMSO- d_6 , 500 MHz).

Figura 100 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto **Sc 11**.

Figura 101 - Espectro de RMN de ^1H da fração *n*-BuOH do cultivo em arroz de *Streptomyces* sp. RLe 08 (DMSO- d_6 , 500 MHz).

Figura 102 - Espectro de RMN de ^1H do composto Ss 12 (D_2O , 500 MHz).

Figura 103 - Mapa de contornos COSY do composto **Ss 12** (D₂O, 500 MHz).

Figura 104 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto Ss 12 (D_2O , 125 MHz).

Figura 105 - Espectro de DEPT do composto **Ss 12** (D₂O, 125 MHz).

Figura 106 - Mapa de contornos HMQC do composto Ss 12 (D₂O, 500 MHz).

Figura 107 - Mapa de contornos HMBC do composto **Ss 12** (D₂O, 500 MHz).

Figura 108 - Ampliação do Mapa de contornos HMBC do composto **Ss 12** (D_2O , 500 MHz).

Figura 109 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Ss 12.

2.4.3.9 Determinação estrutural de 1-(3',4'-dimetoxifenil)-1-propanona (Sc 13)

Sc 13

O composto **Sc 13** (3,65 mg) teve sua estrutura determinada com base na análise dos espectros de RMN 1D e 2D e de espectrometria de massas via CG e IES (Figuras 111-116, pags. 151-155). A atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono baseou-se pelas correlações a curta ($^1J_{CH}$) e longa ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$) distância entre hidrogênio e carbono observadas nos espectros de HMQC e HMBC, respectivamente.

O espectro de RMN de 1H do composto **Sc 13** apresentou três sinais integrando para um hidrogênio cada, correspondendo aos hidrogênios aromáticos H-2' em δ 7,54 (*d*, $J = 1,5$ Hz), H-5' em δ 6,88 (*d*, $J = 8,5$ Hz) e H-6' em δ 7,58 (*dd*, $J = 1,5; 8,5$ Hz), típicos de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído.

Na região dos hidrogênios metoxílicos observou-se a sobreposição de dois singletos em δ 3,94 (4'-OMe) e δ 3,95 (3'-OMe), integrando seis hidrogênios no total. Também foram observados um quadrupletto integrando para dois hidrogênios com constante de acoplamento de $J = 7,0$ Hz, na região de hidrogênios metilênicos em δ 2,97 (H-2), e um triplete integrando para três hidrogênios com constante de acoplamento de $J = 7,0$ Hz, na região de hidrogênios metílicos em δ 1,22 (H-3), indicando um grupo etílico.

Pelo espectro HMQC obteve-se os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos aromáticos C-2' (δ 110,2), C-5' (δ 110,0), C-6' (δ 122,5), metilênico C-2 (δ 31,3), metílico C-3 (δ 8,5) e os carbonos metoxílicos em δ 55,9 (C-3'-OMe) e δ 56,1 (C-4'-OMe).

Os carbonos não hidrogenados foram propostos pela análise realizada no espectro HMBC, através das correlações dos hidrogênios H-2' com o carbono C-1' (δ 130,2), H-5' com o carbono C-3' (δ 167,0), H-2' e H-6' com o carbono C-4' (δ 153,1) e H-2', H-2 e H-3 com o carbono carbonílico C-1 (δ 199,7).

Os dados de RMn permitiram a proposição da estrutura de **Sc 13** como a 1-(3',4'-dimetoxifenil)-1-propanona.

Os dados obtidos por CG-EM reforçaram a determinação estrutural proposta. Na análise dos dados, observou-se os picos do íon molecular M^{++} com m/z 194 e base com m/z 165, que por rearranjo de McLafferty apresentaram uma diferença de 29 u entre eles, devido a perda de $CH_2=CH_2$ e um hidrogênio radicalar ($\cdot H$) (Figura 110, pag. 149).

Figura 110 - Fragmentação por IE do composto **Sc 13** (adaptado de WATSON; SPARKMAN, 2007).

Pelo espectro de massas de alta resolução obtido via IES observou-se o íon protonado em maior intensidade $[M+H]^+$ m/z 195,1023, com erro de 3,3 ppm.

Os dados espectrométricos obtidos para **Sc13** foram confrontados com os descritos na literatura e foram coerentes com a estrutura da 1-(3,4-dimetoxifenil)-1-propanona, também conhecida por propioveratrone (Tabela 19, pag. 149) (PARK et al., 2011)

A propilveratrone já foi isolada das partes aéreas da planta *Pteronia camphorata* (Compositae) e do rizoma de *Acorus gramineus* (Acoraceae). Também há relatos de sua presença nas folhas de *Hedyosmum scabrum* (Chloranthaceae) e como produto de biotransformação pela actinobactéria *Nocardia coralline* (ZDERO; JAKUPOVIC;

BOHLMANN, 1990; PÉREZ et al., 2001; PARK et al., 2011). O composto também pode ser obtido por rotas sintéticas (PERRY; KALNINS; DEITCHER, 1972).

Tabela 19 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 do composto **Sc 13**.

1-(3',4'-dimetoxifenil)-1-propanona				
	Posição	$\delta^1\text{H}$ (500 MHz)	$^*\delta^{13}\text{C}$ (125 MHz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
<p>194,23 g mol⁻¹</p>	1'	-	130,2	-
	2'	7,54 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,5 Hz, 1H)	110,2	C-4'/C-6'/C-1
	3'	-	149	-
	4'	-	153,1	-
	5'	6,88 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,5 Hz, 1H)	110,0	C-1'/C-3'/C-4'
	6'	7,58 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 1,5; 8,5 Hz, 1H)	122,5	C-4'/C-5'
	1	-	199,7	-
	2	2,97 (<i>q</i> , <i>J</i> = 7 Hz, 2H)	31,3	C-1/C-3
	3	1,22 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7 Hz, 3H)	8,5	C-1/C-2
	3'-OMe	3,95 (<i>s</i> , 3H)	55,9	C-3'
	4'-OMe	3,94 (<i>s</i> , 3H)	56,1	C-4'

*Valores observados indiretamente por HMQC e HMBC.

Das atividades biológicas relatadas, foi evidenciada somente uma fraca atividade antifúngica frente ao dermatófito de isolado clínico *Epidermophyton floccosum* C 114 (ZACCHINO et al., 1999).

No ensaio antitumoral, o composto **Sc 13**, a uma concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, não apresentou atividade citotóxica significativa contra as células de câncer de cólon (HCT-8), glioblastoma (SF-295) e melanoma humano (MDA-MB-435).

Figura 111 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Sc 13** (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 112 - Mapa de contornos HMQC do composto **Sc 13** (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 113 - Mapa de contornos HMBC do composto **Sc 13** (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 114 - Ampliação do mapa de contornos HMBC do composto **Sc 13** (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 115 - Espectro de massas obtido via CG do composto Sc 13.

Figura 116 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto Sc 13.

2.4.3.10 Determinação estrutural de 1-(3',4'-dimetoxifenil)-1-etanona (Sc 14)

Sc 14

O composto **Sc 14** (0,75 mg) teve sua estrutura determinada com base na análise dos espectros de RMN 1D e 2D e de espectrometria de massas via CG e IES (Figuras 118-123, pag. 159-163).

A análise dos dados de RMN de ^1H indicou sinais característicos de hidrogênios aromáticos em δ 7,53 (*sl*, H-2'), em δ 6,89 (*d*, $J = 8,5$ Hz; H-5') e em δ 7,58 (*dd*, $J = 1,5$; 8,5 Hz; H-6'), típicos de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Na região dos hidrogênios metoxílicos observou-se dois singetos em δ 3,94 (3'-OMe) e δ 3,95 (4'-OMe), integrando para seis hidrogênios no total, e um singeto integrando para três hidrogênios na região dos hidrogênios metílicos em δ 2,57 (H-2).

A atribuição dos sinais dos átomos de carbono foi obtida através das correlações entre hidrogênios e carbonos observadas nos espectros de HMQC e HMBC. Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos aromáticos C-2' (δ 110,2), C-5' (δ 109,9), C-6' (δ 123,2), carbono metílico C-2 (δ 25,9) e os carbonos metoxílicos 3'-OMe (δ 55,8) e 4'-OMe (δ 56,0) foram obtidos pelo mapa de contornos HMQC.

Os carbonos não hidrogenados foram atribuídos pela análise do espectro HMBC. Foram observadas correlações dos hidrogênios H-2 e H-8 com o carbono C-7 (δ 196,8), H-2, H-5', H-6' e 4'-OMe com o carbono C-4' (δ 153,3), H-5' e 3'-OMe com o C-3' (δ 148,8) e H-5' e H-2 com o carbono C-1' (δ 130,4).

Os dados obtidos por CG-EM reforçaram a determinação estrutural proposta, pela presença dos picos do íon molecular M^{+} com m/z 180 e base com m/z 165, com uma diferença de 15 u referente a perda de uma metila e o íon de m/z 137, subproduto do íon de pico base com a perda de $-CO$ (28 u) (Figura 117, pag. 157).

Figura 117- Fragmentação por IE do composto **Sc 14** (adaptado de WATSON; SPARKMAN, 2007).

Pelo espectro de massas de alta resolução obtido IES observou-se o íon protonado em maior intensidade $[M+H]^{+}$ m/z 181,0855, com erro de 2,3 ppm. Comparando os dados obtidos com os da literatura, determinou-se que o composto **Sc 14** é a 1-(3',4'-dimetoxifenil)-1-etanona, também conhecido por acetoveratrone (Tabela 20, pag. 158) (JIANG; RAGAUSKAS, 2007).

Tabela 20 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 do composto **Sc 14**.

1(3,4-dimetoxifenil)-1-etanona				
	Posição	$\delta^1\text{H}$ (500 MHz)	$\delta^{13}\text{C}$ (125 MHz)	HMBC (H→C)
180,20 g mol ⁻¹	1'	-	130,4	-
	2'	7,53 (sl, 3H)	110,2	C-4'/C-6'/C-1
	3'	-	148,8	-
	4'	-	153,3	-
	5'	6,89 (d, J = 8,5 Hz, 1H)	109,9	C-1'/C-3'/C-4'
	6'	7,58 (dd, J = 1,5; 8,5 Hz, 1H)	123,2	C-4'/C-5'
	1	-	196,8	-
	2	2,57 (s, 3H)	25,9	C-1'/C-1
	3'-OMe	3,94 (s, 3H)	55,8	C-3'
	4'-OMe	3,95 (s, 3H)	56,0	C-4'

*Valores observados indiretamente por HMQC e HMBC.

O composto 1-(3,4-dimetoxifenil)-1-etanona (acetoveratrone) foi obtido como metabólito de degradação de ligninas do tipo arilglicerol- β -aril éter pela bactéria *Pseudomonas acidovorans* (VICUÑA et al., 1987). Também foi detectado por CG-EM na planta *Calamintha nepeta* (L) Savi (Lamiaceae) e em *Juniperus* spp. (Cupressaceae) e na caracterização de ácidos húmicos obtidos por compostagem (MASTELIC et al., 1988; UÇAR; BALABAN, 2002; AMIR et al., 2006). Por síntese pode ser obtido a partir de diversas rotas (JIANG; RAGAUSKAS, 2007; KUMAR; AKULA; LAKSHMAN, 2010).

O composto **Sc 14** não apresentou atividade citotóxica significativa frente as células tumorais usadas no modelo experimental.

Figura 118 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Sc 14** (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 119 - Mapa de contornos HMQC do composto **Sc 14** (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 120 - Mapa de contornos HMBC do composto **Sc 14** (CDCl_3 , 500 MHz).

Figura 121 - Ampliação do mapa de contornos HMBC do composto **Sc 14** (CDCl₃, 500 MHz).

Figura 122 - Espectro de massas obtido via CG do composto **Sc 14**.

Figura 123 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do composto **Sc 14**.

2.4.4 Comparação metabólica actinobactéria *versus* planta hospedeira

O monitoramento dos extratos etanólicos obtidos dos cultivos em arroz das 12 actinobactérias isoladas de *L. ericoides* foi realizado via CLAE-DAD, em comparação com o extrato hidroalcoólico das folhas da planta hospedeira. Observou-se que os cromatogramas do extrato da planta e do extrato do cultivo da actinobactéria RLe 4 apresentaram semelhanças (Figura 124, pag. 164), porém a análise de cada pico mostrou espectros de absorção no UV bem diferenciados. Apenas um pico no tempo de retenção de 27 minutos (Figura 125, pag. 165) aparentou semelhança em ambos os extratos, tanto pelo tempo de retenção, quanto pelos espectros de absorção no UV em 309 nm.

Figura 124 - Cromatogramas do extrato da folha de *L. ericoides* (a) e do extrato da actinobactéria *S. cattleya* RLe 4 (b).

Figura 125 - Comparação dos espectros de absorção no UV do extrato da folha de *L. ericoides* (a) e do extrato da actinobactéria *S. cattleya* RLe 4 (b) no tempo de retenção de 27 minutos (*).

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2008), este pico está presente nos extratos da folha de *L. ericoides* e foi caracterizado como sendo uma flavona glicosilada, a 6,8-di-*C*- β -glicosilcrisina (Figura 126, pag. 165).

Figura 126 - 6,8-di-*C*- β -glicosilcrisina isolada do extrato das folhas de *L. ericoides*.

Dessa forma, as frações em AcOEt e *n*-BuOH do cultivo em escala ampliada da actinobactéria *S. cattleya* RLe 4 foram analisadas e o pico com o tempo de retenção em 27 minutos foi observado apenas na fração Rle 4 AcOEt. A fração Rle 4 AcOEt foi submetida ao fracionamento cromatográfico em Sephadex[®] LH-20 usando MeOH, as subfrações obtidas foram analisadas em CLAE-DAD. As subfrações Rle 4.7, Rle 4.8, Rle 4.9 e Rle 4.10 apresentaram picos com o mesmo tempo de retenção do composto presente no extrato vegetal.

Após as análises espectrométricas, foi realizada uma nova análise via CLAE-EM para confirmar se o pico observado nas subfrações da actinobactéria RLe 4 tratava-se da flavona glicosilada.

Figura 127 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES do extrato AcOEt das folhas de *L. ericoides*.

Figura 128 - Espectro de massas de alta resolução obtido via IES da subfração RLe 4.7.

Observando os espectros obtidos pelo CLAE-EM (Figuras 127 e 128, pag. 166), foi possível confirmar que os picos observados nos cromatogramas do extrato de *L. ericoides* e da actinobactéria RLe 4 são uma mera coincidência, já que os valores correspondentes aos íons moleculares foram diferentes, sendo, apresentando m/z 579 e 446, respectivamente.

Todos os demais onze extratos comparados não apresentaram picos nos cromatogramas coincidentes com o cromatograma do extrato vegetal. Até o momento, no LQMo não foi isolado nenhum metabólito microbiano coincidente com os metabólitos isolados dos vegetais hospedeiros.

Capítulo I – Conclusões

2.5 CONCLUSÕES

Com base nos dados apresentados, observou-se uma maior frequência de actinobactérias endofíticas nos experimentos de isolamento a partir das raízes em comparação aos das folhas de *L. ericoides* e *T. diversifolia*. Das 41 linhagens de actinobactérias endofíticas, doze foram selecionadas fenotipicamente e encaminhadas à identificação pela análise sequencial da região 16S do DNAr. Os laudos emitidos pela empresa Genotyping indicam a predominância do gênero *Streptomyces* na amostragem obtida.

A avaliação biológica dos extratos EtOH obtidos dos cultivos em arroz das 41 linhagens demonstrou o grande potencial destes micro-organismos na produção de compostos bioativos. A alta atividade dos extratos EtOH dos cultivos das actinobactérias isoladas de *L. ericoides*, em comparação aos dos micro-organismos obtidos de *T. diversifolia*, pode estar diretamente correlacionada aos fatores bióticos e abióticos em que a planta hospedeira se encontra, proporcionando uma maior seletividade entre os micro-organismos que a hospeda.

Do cultivo em larga escala de *S. cattleya* RLe 4 e *Streptomyces* sp. RLe 8 foram isolados ao todo 14 compostos, sendo que dois foram identificados em mistura. Ambas linhagens utilizadas neste estudo produziram compostos pertencentes à classe das benzamidas, isolados das frações AcOEt. Dentre os compostos isolados desta classe está a salicilamida, utilizada na terapêutica como analgésico e antitérmico e comercializada com o nome de Coristina R[®] (Mantecorp). O composto 3-hidróxi-4-metoxibenzamida está sendo relatado pela primeira vez como produto natural. Os compostos obtidos da classe das benzilamidas, apesar de apresentarem complexidade estrutural relativamente baixa, são pouco descritos como produtos naturais, o que torna estes micro-organismos uma fonte alternativa de sua obtenção. Outras classes químicas como os derivados naftalênicos, quinazolinona e acetofenonas também foram isoladas.

Foi observada a predominância dos compostos da classe dos sideróforos nos cultivos de *S. cattleya* RLe 4 e *Streptomyces* sp., com isolamento da desferrioxamina B, já existente no mercado como Desferal[®] (Novartis) e utilizado clinicamente para diversas patologias relacionadas à sobrecarga de ferro, e da desferrioxamina E.

A 2,3-diidro-2,2-dimetil-4(1H)-quinazolinona foi o composto mais ativo nos ensaios de atividade citotóxica frente as células cancerígenas. Porém, estudos mais detalhados de sinergismo devem ser realizados, pois há relatos na literatura da ação de benzamidas, como a própria benzamida e a 3-hidroxibenzamida, como inibidores da poli (ADP-ribose) polimerase, enzima atuante na reparação do DNA.

A partir dos resultados do estudo de correlação entre o perfil metabólico das actinobactérias endofíticas de *L. ericoides* com os de sua planta hospedeira não foi observada nenhuma semelhança nas condições metodológicas realizadas. A literatura apresenta poucos exemplos sobre fungos endofíticos produzindo os mesmos compostos das plantas hospedeiras. Nesses trabalhos a detecção dos compostos foram, geralmente, realizadas por espectrometria de massas, devido às baixas concentrações produzidas. Assim, a transferência genética entre os endofíticos e seus hospedeiros não parece ser significativa para a produção de metabólitos secundários.

A pesquisa realizada foi a primeira com actinobactérias endofíticas no LQMo-FCFRP-USP e permitiu ampliar o conhecimento acerca do potencial relevante destes micro-organismos na produção de extratos com atividade frente a células tumorais. Ainda, foi possível ampliar as informações acerca do tipo de metabólitos produzidos pelas duas linhagens selecionadas do gênero *Streptomyces*.

3 Capítulo II

Investigação biossintética de aristoloquenos em

Botrytis cinerea

Capítulo II – Introdução

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 *Botrytis cinerea* - “mofo cinzento”

O gênero *Botrytis* Pers. foi documentado pela primeira vez em 1729 por Micheli e validado por Persoon em 1801. Este gênero chegou a incluir mais de 380 espécies, mas atualmente é constituído por 22 espécies e um híbrido (JARVIS, 1980; STAATS; VAN BAARLEN; VAN KAN, 2005). Em uma revisão do gênero, Beever e Weeds (2004) afirmaram que há espécies ainda não descritas e que algumas descritas foram mal caracterizadas.

Dentre as espécies mais conhecidas, está *Botrytis cinerea* (Persoon) (fungo imperfeito) que é o estágio anamorfo de *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. (Tabela 21, pag. 169). Seu nome provém da palavra grega “botrys”, que significa caixo de uva, descrevendo o arranjo formado por seus esporos assexuados (conídios) no conidióforo e “cinereus”, que equivale a acinzentado em latim, correspondendo à sua cor (HORNSEY, 2007).

Tabela 21 - Classificação taxonômica sexual e assexual de *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. (adaptado de BEEVER; WEEDS, 2004).

	Classificação assexuada	Classificação sexuada
Reino	Fungi	Fungi
Filo	Deuteromycota	Ascomycota
Classe	Hyphomycetes	Discomycetes
Ordem	Moniliales	Helotiales
Família	Moniliaceae	Sclerotiniaceae
Gênero	<i>Botrytis</i>	<i>Botryotinia</i>
Espécie	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Botryotinia fuckeliana</i>

O mofo cinzento ocasionado pelo fungo *B. cinerea* é uma fitopatogenia bastante comum e observada em pelo menos 235 plantas, principalmente dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramináceas (JARVIS, 1977). Uma grande variedade de plantas frutíferas, ornamentais, olerícolas e florestais em todo o mundo são afetadas no pré ou pós colheita por este fungo, ocasionando uma significativa perda agroeconômica (TEN HAVE, 2000).

A esporulação e a proliferação deste fungo são influenciadas por diversos fatores bióticos e abióticos dentre estes fatores o principal é a umidade, ocasionando um aspecto de mofo acinzentado, bastante característico desta doença (AGRIOS, 2005). *B. cinerea* também vive como saprófita na matéria orgânica sem vida aderida à planta hospedeira, e como

parasita dentro ou sobre a planta, comprometendo-a na captação dos nutrientes necessários para sua sobrevivência e infectando, principalmente os tecidos já enfraquecidos em decorrência do envelhecimento celular ou aqueles ainda imaturos (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1993).

O controle de *B. cinerea* é bastante problemático, devido às diversas formas de infecção, diferentes plantas hospedeiras como fontes de inóculo, à capacidade de propagação por segmentos de hifa e/ou conídios e à formação de escleródios (esporos de resistência) no próprio resíduo agrícola. Por estas razões, o uso de qualquer medida simples de controle dificilmente terá sucesso e uma compreensão mais detalhada da interação patógeno-hospedeiro e de seus mecanismos de invasão é essencial (WILLIAMSON et al., 2007; ACERO et al., 2011).

Na infecção acometida por este fungo necrotrófico, a planta hospedeira é bombardeada por numerosas enzimas extracelulares e metabólitos secundários, importantes para o fungo durante o processo de infecção, induzindo a clorose e/ou rompimento da parede celular (COLMENARES et al., 2002; ELAD et al., 2004; CHOQUER et al., 2007).

Entre os danos agrícolas causados por *B. cinerea*, destacam-se as significativas perdas em vinícolas, ocasionando sérios prejuízos aos países produtores de vinho. Neste sentido, o fungo *B. cinerea* tem sido extensivamente estudado na tentativa de se conhecer os principais mecanismos de virulência, o que tem auxiliado no desenvolvimento racional de fungicidas específicos. Uma das vertentes destes estudos envolve a caracterização das toxinas produzidas por *B. cinerea*, envolvidas na sua fitopatogenicidade. Diversos químicos de produtos naturais têm se dedicado à caracterização destas micotoxinas, destacando-se o grupo de Química Orgânica do Departamento de Química Orgânica da Faculdade de Ciências da Universidade de Cádiz, Puerto Real, Espanha, coordenado pelo Prof. Dr. Isidro G. Collado (COLLADO; SÁNCHEZ; HANSON, 2007).

Entre os metabólitos secundários produzidos por *B. cinerea*, destacam-se duas classes de fitotoxinas não seletivas: uma pertencente à classe dos sesquiterpenos, com estruturas básicas aos botrianos, principalmente botridial e diidrobotridial, e outra classe pertencente aos policetídeos, representados pelos botcinolídeos (ácido boticínico e derivados) e botrilactonas (Figura 129, pag. 170) (FEHLHABER et al., 1974; WELMAR; TSCHESCHE; BREITMAIER, 1979; COLMENARES et al., 2002; TANI et al., 2005, 2006; REINO et al., 2006; MORAGA et al., 2011).

Figura 129 - Representantes das classes químicas isoladas de *B. cinerea*.

Botridial é o principal metabólito fitotóxico produzido por *B. cinerea*. Este sesquiterpeno produz lesões no tabaco e folhas de feijão quando aplicado em discos foliares e a plantas intactas a uma concentração de 1 ppm (COLLADO; SÁNCHEZ; HANSON, 2007).

Apesar dos diversos trabalhos já publicados acerca dos metabólitos secundários e fitotoxinas produzidas por *B. cinerea*, há ainda muito a ser pesquisado sobre a capacidade biossintética deste fungo.

Os avanços genômicos na área de química de produtos naturais revelam que o potencial biossintético dos micro-organismos não tem sido completamente expresso em condições laboratoriais usuais de cultivo. O sequenciamento do genoma das linhagens *B. cinerea* B05-10 e *B. cinerea* T4 pelo Broad Institute, nos EUA, (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/botrytis_cinerea) e pelo Genoscope, na França, (<http://www.genoscope.cns.fr>) (CHOQUER et al., 2008), forneceu oportunidades para a caracterização mais aprofundada de alguns genes, incluindo genes envolvidos na biossíntese de sesquiterpenos. Este sequenciamento também mostrou a grande diversidade de enzimas biossintéticas codificadas por este fungo. *B. cinerea* codifica oito peptídeo sintetases não ribossomais (NRPS), 22 policetídeo sintetases (PKS), seis sesquiterpenos ciclases (STC), três diterpeno ciclases (DTC) e uma dimetilaliltriptofano sintetase (DMATS) (COLLADO, comunicação pessoal). Este arsenal enzimático não é traduzido nos metabólitos secundários isolados de *B. cinerea* até o momento. Assim, o potencial a ser explorado neste fungo na investigação de novos produtos naturais, eventualmente envolvidos nos processos fitopatogênicos, ainda é expressivo.

Considerando-se apenas a classe dos sesquiterpenos, somente a classe dos botrianos e do ácido abscísico foram isoladas das culturas de *B. cinerea*, restando, portanto, quatro classes adicionais como genes silenciados/crípticos nas linhagens selvagens fungicas. Em trabalhos anteriores no grupo do Prof. Collado, uma terceira classe de sesquiterpenos, a dos aristoloquenos, foi identificada como constituintes minoritários nas culturas de linhagem

selvagem de *B. cinerea* (dados ainda não publicados), corroborando os dados de sequenciamento genômico.

Colaboradores do Prof. Collado no *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA), França, têm obtido linhagens mutantes de *B. cinerea* através da deleção de genes, na tentativa de produzir linhagens modificadas geneticamente para estudos de virulência, entre outros (CHOQUER et al., 2008). O grupo coordenado pelo Prof. Collado já caracterizou genes envolvidos na biossíntese do botridial (PINEDO et al., 2008) e tem se dedicado ao estudo químico de linhagens mutantes para investigar a produção de eventuais metabólitos secundários crípticos.

Assim, para o desenvolvimento do estágio sanduíche desta tese de doutorado, foi proposto o estudo das condições de produção dos aristoloquenos minoritários por duas linhagens de *B. cinerea*, uma mutante (B05-10 cnd15), com a via de produção das botrylactonas silenciada e uma selvagem (UCA 992), para posterior estudo biossintético desta classe de sesquiterpenos. O papel destes sesquiterpenos na virulência de *B. cinerea* ainda não está estabelecido, desta forma o estudo de linhagens que os produzam em maiores quantidades é importante para que os bioensaios possam ser conduzidos. Além disso, o conhecimento das vias biossintéticas envolvidas na produção de metabólitos secundários pode permitir o planejamento racional de inibidores biossintéticos, com potencial aplicação como fungicidas. O grupo coordenado pelo Prof. Collado conta com patentes depositadas, sendo duas licenciadas na área de fungicidas planejados com base no conhecimento das vias de biossíntese das principais toxinas de *B. cinerea* já caracterizadas.

Capítulo II – Objetivos

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo geral

- Determinar a via biossintética operante em *Botrytis cinerea* para a produção de sesquiterpenos aristoloquenos através de experimentos de incorporação isotópica.

3.2.2 Objetivos específicos

- Determinar as condições ideais de cultivo que favoreçam a biossíntese dos sesquiterpenos minoritários;
- Cultivar o fungo na presença de precursores enriquecidos isotopicamente com deutério e carbono treze;
- Isolar os sesquiterpenos de interesse por métodos cromatográficos;
- Analisar os espectros de RMN de ^2H e RMN de ^{13}C para determinação da via biossintética de sesquiterpenos aristoloquenos.

Capítulo II – Material e Métodos

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Linhagens de *Botrytis cinerea*

Duas linhagens do fungo *Botrytis cinerea*, foram utilizadas no desenvolvimento deste trabalho. A linhagem selvagem UCA 992 (Figura 130, pag. 174) foi isolada do fruto de *Vitis vinifera* dos vinhedos de Domecq em Jerez de la Frontera, Espanha e apresenta resistência ao antifúngico benomil. A linhagem geneticamente modificada foi obtida a partir desta linhagem selvagem pelo Institut National de La Recherche Agronomique (INRA), França, denominada B 05-10 cnd15 (*bcbot2Δ*) (Figura 131, pag. 174), e teve a via biossintética de botrilactonas deletada. Ambas as linhagens pertencem à coleção de micro-organismos do Departamento de Química Orgânica da *Universid de Cádiz* (UCA) sob responsabilidade do Prof. Isidro G. Collado.

Figura 130 - *Botrytis cinerea* UCA 992.

Figura 131 - *Botrytis cinerea* B05-10 cnd15.

3.3.2 Otimização das condições de cultivo de *Botrytis cinerea* para o estudo de biossíntese dos sesquiterpenos da classe dos aristoloquenos

3.3.2.1 Otimização das condições de cultivo para a produção dos sesquiterpenos da classe dos aristoloquenos pelo fungo *Botrytis cinerea*

Para a otimização das condições iniciais dos cultivos de *B. cinerea* foram utilizados como parâmetros o modo estático e o agitado, em função do tempo de produção e rendimentos dos metabólitos de interesse, para posterior estudo de biossíntese. A reativação dos esporos (conídios) das linhagens em estudo, armazenados em glicerol a -40°C foi feita pela ambientação e inoculação por “spread plate” em ágar malte e incubação por 48 h a 25°C na presença de luz fluorescente. Com o auxílio de um perfurador de cobre de 5 mm de

diâmetro, foram obtidos os discos de micélio-ágar, os quais foram inoculados um a um no centro de uma placa de Petri contendo meio ágar suco de tomate (20 g de ágar; 500 mL de suco de tomate *in natura* sem pele e 500 mL de água) para a indução de esporulação. As placas foram incubadas por aproximadamente 21 dias, sob as mesmas condições de incubação utilizadas na reativação (Figura 132, pag. 176).

Para a realização da fermentação, a escolha do meio de cultivo Czapek-Dox modificado (CZm) (30 g de glicose; 1 g de extrato de levedura; 5 g de K_2HPO_4 ; 2,5 g de $NaNO_3$; 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,001 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5 g de KCl; 0,005 g de $CuSO_4$ e 1 L de H_2O) foi baseada em experimentos anteriores já desenvolvidos pelo grupo do departamento de Química Orgânica da *Universidad de Cádiz* quanto à produção dos compostos químicos de interesse para os estudos de biossíntese.

Para a obtenção do inóculo, esporos de *B. cinerea* foram coletados das placas de Petri com o auxílio de uma alça de Drigalski (alça em L) por fricção junto a alíquotas do meio de cultivo Czapek-Dox modificado. O material foi mantido em tubo Falcon refrigerado em banho de gelo com a finalidade de assegurar ao máximo a viabilidade dos esporos até a realização da inoculação.

Antes da inoculação, em câmara de Neubauer, foi realizada a contagem dos esporos da suspensão obtida. Com o auxílio de micropipetadores, os esporos foram inoculados a uma proporção de $5 \cdot 10^4$ para cada mililitro de meio de cultura utilizado nos cultivos. Os cultivos sob agitação foram realizados com 200 mL de meio de cultivo em frasco Erlenmeyer de 500 mL, em mesa agitadora orbital a 180 rpm. Na condição estática, os fungos foram cultivados em 150 mL de meio em garrafa de Roux.

Durante doze dias foi realizado o acompanhamento da produção de sesquiterpenos da classe dos aristoloquenos nos extratos obtidos da biomassa micelial e do líquido fermentado. Foi realizada cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), usando os compostos previamente isolados pelo grupo da UCA como padrões, e adquiridos os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de 1H).

Os extratos da biomassa foram obtidos após a filtragem seguida da adição de 100 mL de acetato de etila (AcOEt) e uso de ultrassom por 15 min. Os extratos do líquido fermentado foram obtidos por partição com AcOEt (3:1, v/v) (Figura 132, pag. 176).

Figura 132 - Esquema geral da otimização para a produção dos sesquiterpenos da classe dos aristoloquenos produzidos por *Botrytis cinerea*.

3.3.2.2 Otimização para a incorporação dos substratos marcados para o estudo de biossíntese

Determinada a linhagem, a condição ideal e o dia de início da produção dos compostos de interesse, foi realizada mais uma otimização no intuito de melhorar a taxa de incorporação dos substratos marcados isotopicamente aos compostos em estudo, por meio da diminuição da fonte de carbono do meio Czapek-Dox modificado (CZm).

Para este experimento, foram inicialmente obtidos os pré-inóculos (biomassa micelial) a partir do cultivo em agitação da linhagem mutante de *B. cinerea* BO 510 cnd15, usando 18 frascos Erlenmeyer contendo cada um 200 mL de meio Czapek-Dox modificado. Foram retirados seis frascos em cada um dos seguintes tempos de cultivo: 96 horas (quarto dia), 120 horas (quinto dia) e 144 horas (sexto dia). Os cultivos obtidos destes seis frascos foram filtrados de forma asséptica em fluxo laminar para a obtenção da biomassa micelial, que foi transferida uma a uma para três frascos contendo 200 mL cada do meio Czapek-Dox modificado, com a concentração de glicose reduzida para 15 g L^{-1} , e para outros três frascos contendo 200 mL cada do meio Czapek-Dox modificado sem adição de glicose.

Os frascos foram então submetidos à agitação por mais três dias, totalizando sete, oito e nove dias de cultivo. A produção dos sesquiterpenos aristoloquenos foi confirmada por

CCDC e RMN de ^1H dos extratos AcOEt obtidos a partir da extração de 600 mL do líquido fermentado (Figura 133, pag. 177).

Figura 133 - Esquema geral da otimização para a incorporação dos substratos marcados.

3.3.2.3 Incorporação de acetato de sódio deuterado (D_3 , 99%) e acetato de sódio marcado com ^{13}C ($1\text{-}^{13}\text{C}$, 99%) para o estudo de biossíntese

Os experimentos com a adição dos substratos marcados isotopicamente foram baseados nos dados experimentais obtidos da otimização realizada para a incorporação de substratos marcados descrita no tópico 3.3.2.2. A escolha inicial da metodologia para este experimento com a concentração da glicose reduzida para 15 g L^{-1} foi baseada nos rendimentos dos extratos AcOEt e na nítida produção já existente dos aristoloquenos.

No experimento com acetato de sódio deuterado (CD_3COONa ; D_3 , 99%), foram cultivados inicialmente dez frascos Erlenmeyer como pré-inóculo, que foram mantidos sob agitação durante cinco dias para a obtenção da biomassa micelial do fungo *B. cinerea* BO 510 cnd15 já ativado metabolicamente para a biossíntese dos compostos alvos em estudo.

A biomassa obtida de cada frasco foi transferida para o mesmo meio de cultivo CZm com a concentração de glicose reduzida pela metade (15 g L^{-1}), suplementado com 100 mg de CD_3COONa em suspensão por frasco. Previamente, o CD_3COONa havia sido solubilizado no

menor volume de água destilada possível e filtrado por membrana estéril (0,45 μm) Millipore®. Depois de mais três dias de fermentação (oito dias experimentais) foi realizada a extração por partição com AcOEt (3:1, v/v).

Para o experimento com acetato de sódio isotopicamente marcado no carbono C-1 [CH_3COONa ($1\text{-}^{13}\text{C}$, 99%)] foram utilizados 40 frascos Erlenmeyer, sendo vinte para a obtenção do pré-inóculo e os demais para a transferência da biomassa, com a adição de 100 mg de CH_3COONa ($1\text{-}^{13}\text{C}$, 99%) por frasco, totalizando 4 L de líquido fermentado, posteriormente extraídos com AcOEt (3:1, v/v).

3.3.2.4 Incorporação de acetato de sódio deuterado (D_3 , 99%) e acetato de sódio marcado com ^{13}C ($2\text{-}^{13}\text{C}$, 99%) para o estudo de biossíntese em ausência de glicose

Para o experimento com CD_3COONa (D_3 , 99%) foram utilizados 40 frascos Erlenmeyer, sendo vinte para a obtenção de biomassa micelial e os outros vinte para a transferência da biomassa e adição do substrato marcado. Para o experimento com CH_3COONa ($2\text{-}^{13}\text{C}$, 99%) foram utilizados 28 frascos Erlenmeyer, sendo catorze para a obtenção da biomassa e os outros para a transferência do pré-inóculo e adição do substrato. Os parâmetros utilizados foram os mesmos já descritos no tópico 3.3.2.2, passando a ser utilizado o meio de cultura Cz-dox modificado sem adição de glicose.

3.3.2.5 Incorporação de glicose deuterada ($6,6\text{-}D_2$, 99%) para o estudo de biossíntese em ausência de glicose

Para o experimento com incorporação de glicose deuterada [$\text{HOCD}_2(\text{CHOH})_4\text{CHO}$ ($6,6\text{-}D_2$, 99%)] foram utilizados 40 frascos Erlenmeyer, sendo vinte para a obtenção de biomassa micelial e os outros vinte para a transferência da biomassa e adição de 200 mg do substrato marcado em três pulsos, com intervalos de três dias entre um e outro, após a transferência do pré-inóculo (Figura 134, pag. 179). Os parâmetros de cultivo foram os mesmos já descritos no tópico 3.3.2.3.

Figura 134 - Esquema utilizado para adição de $\text{HOCD}_2(\text{CHOH})_4\text{CHO}$ para o estudo de biossíntese dos compostos da classe dos aristolequenos.

3.3.3 Isolamento de sesquiterpenos da classe dos aristoloquenos por métodos cromatográficos

Os extratos obtidos foram fracionados em coluna cromatográfica aberta e as frações obtidas reunidas por similaridade em CCDC com padrões previamente isolados por Collado e colaboradores e utilizando como revelador *oleum* [$\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_2\text{SO}_4$, (80:16:4, v/v/v)]. Caso houvesse a necessidade de se obter uma subfração menos complexa quimicamente, a subfração era novamente submetida a outra coluna cromatográfica, como exemplo a fração Cnd15Aad3 (Figura 135, pag. 180).

Figura 135 - Fluxograma do fracionamento do extrato Cnd15 AcOEt e subfração Cnd15Aad3.

O sesquiterpeno presente na subfração Cnd15ad3.1 foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu®), utilizando como detector o índice de refração (RID) em coluna semi-preparativa Lichrospher Si 80® (10 μ m) 250 mm x 10 mm, fase móvel Hex:AcOEt (2,5:7,5, v/v) e vazão de 2,5 mL min⁻¹. Foram obtidos 1,3 mg do composto **Bc 15**.

Para os extratos obtidos dos diferentes experimentos de incorporação de precursores isotopicamente marcados foi seguido o mesmo procedimento cromatográfico para isolamento de **Bc 15**.

Capítulo II – Resultados e Discussão

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Vias de biossíntese dos terpenos

O fungo *Botrytis cinerea* é alvo de inúmeros estudos científicos devido ao grande interesse do setor agroeconômico. Diversos trabalhos têm investigado os mecanismos de invasão utilizados pelo fungo na depreciação de plantas e algumas ferramentas como a biologia molecular e os estudos de biossíntese têm auxiliado na caracterização dos fatores responsáveis por sua fitopatogenicidade (WANG et al., 2009; DALMAIS et al., 2011).

A caracterização dos diversos compostos produzidos por *B. cinerea* motivou os estudos de investigação biossintética, como os sesquiterpenos da classe dos botrianos (botridial e diidrobotridial) e a classe das lactonas policetílicas conhecidas por botcinolídeos (ácidos botcínicos) e botrylactonas (COLLADO et al., 2007)

Durante estudos prévios com *B. cinerea*, o grupo de pesquisa do Prof. Isidro G. Collado e colaboradores detectaram a presença de uma terceira classe de sesquiterpenos pertencentes aos aristoloquenos (Figura 136, pag. 181). Porém, esta classe nem sempre foi detectada nos diferentes cultivos de *B. cinerea* (dados ainda não publicados). A determinação estrutural desta classe foi laboriosa, devido à pequena quantidade destes compostos. Não há relatos na literatura sobre a biossíntese dos aristoloquenos produzidos pelo fungo *B. cinerea*, por isso este estudo foi delineado no intuito de auxiliar na compreensão das vias metabólicas envolvidas e na eventual fitopatogenicidade destes metabólitos.

Figura 136 - Estrutura geral dos sesquiterpenos da classe dos aristoloquenos.

Os aristoloquenos pertencem à família dos isoprenóides, também conhecida por terpenos ou terpenóides. Esta classe de substâncias apresenta a mais variada e rica classe de produtos naturais, com um acervo de mais de 40.000 compostos estruturalmente diferentes,

isolados a partir de animais e micro-organismos diversos, bem como de uma variedade de plantas (MISAWA, 2011).

Os isoprenóides, representados pelas classes de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, bem como os carotenóides (tetraterpenos), exercem uma grande variedade de funções nos organismos que as produzem, tornando-os de grande interesse no desenvolvimento de produtos farmacêuticos e químicos (MISAWA, 2011).

As rotas biossintéticas envolvidas para isoprenóides são bem estabelecidas, apesar da enorme diversidade estrutural presente entre os compostos. Todos os terpenóides são biossintetizados a partir do mesmo precursor, o isopreno, formado por cinco carbonos (C₅) e que participa das reações de formação dos isoprenóides na forma de pirofosfato de isopentenila (IPP) e seu isômero alílico, pirofosfato de dimetilalila (DMAPP). Assim, todo composto derivado da junção destas unidades possuirá um esqueleto carbônico básico de fórmula (C₅H₈)_n (DEWICK, 2009; DICKSCHAT, 2011; MISAWA, 2011).

Em geral, organismos eucariotos como fungos, mamíferos e alguns protozoários têm suas unidades isoprênicas (IPP e DMAPP) oriundas da via do mevalonato ou ácido mevalônico (MVA) produzidas no citoplasma. Há também relatos de arqueobactérias e algumas eubactérias que são micro-organismos procariontes fazendo uso desta via (ASHIHARA; CROZIER; KOMAMINE, 2011; LOMBARD; MOREIRA, 2011; LOPES; PUPO, 2011; MISAWA, 2011).

No passado, o ácido mevalônico era conhecido como o único precursor responsável pela biossíntese universal que levava à formação das unidades de IPP. Na década passada, outra via envolvida na formação de compostos terpenóides, denominada de via alternativa (via independente do mevalonato), foi descrita. A rota alternativa, também chamada de 2-C-metil-*D*-eritritol-4-fosfato (MEP) ou 1-desoxi-*D*-xilulose-fosfato (DPX), é responsável pela biogênese das vitaminas tiamina (B₁) e piridoxal (B₆). A via do DPX/MEP é utilizada por micro-organismos procariontes (eubactérias e cianobactérias) na biossíntese de terpenóides, compartimentalizada em organelas. No entanto, há relatos de alguns protozoários pertencentes ao filo Apicomplexa e algas clorofíceas que biossintetizam terpenóides a pela via DPX/MEP (OKADA; HASE, 2005; DEWICK, 2009; MISAWA, 2011; ASHIHARA; CROZIER; KOMAMINE, 2011; LOMBARD; MOREIRA, 2011; SASSO et al., 2012).

Com relação às plantas superiores, estas são capazes de biossintetizar terpenóides simultaneamente por ambas as vias, ou seja, pela via do MVA que ocorre no citoplasma e pela via do DPX/MEP que ocorre em organelas multifuncionais, denominadas de plastídio (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004; ASHIHARA; CROZIER;

KOMAMINE, 2011; SASSO et al., 2011). Recentemente, Soliman e colaboradores (2011) relataram a existência da via do DPX/MEP envolvida na biossíntese de terpenóides produzidos pelo fungo endofítico *Paraconiothyrium* sp. Apesar das vias do MVA e DPX/MEP serem independentes uma da outra na biossíntese de isoprenóides, elas estão interligadas quanto à obtenção dos mesmos precursores biossintéticos IPP e DMAPP.

A partir da via do MVA, ou via clássica dos isoprenos (Figura 138, pag. 183), a biossíntese das unidades isoprênicas ocorre a partir da condensação de três moléculas de acetil-CoA em duas etapas: na primeira, duas moléculas sofrem condensação de Claisen catalisada pela acetoacetil-CoA sintetase, dando origem ao acetoacetil-CoA, posteriormente, sofre condensação aldólica com a terceira molécula de acetil-CoA por intermédio da hidroximetilglutaril-CoA sintetase formando 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) (DEWICK, 2009; DICKSCHAT, 2011).

Para a obtenção do ácido mevalônico (MVA), o HMG-CoA sofre duas reduções, uma de tio-éster para aldeído via hemitioacetal e outra de aldeído para álcool, intermediadas pela hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA-redutase, ou HMGR) na presença de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH). O MVA sofre duas fosforilações por ação das enzimas mevalonato quinase e mevalonato-5-fosfato quinase com o gasto energético de duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP), obtendo-se o mevalonato-5-pirofosfato que, finalmente, sofre descarboxilação pela enzima mevalonato-5-pirofosfato descarboxilase (utilizando mais um ATP) sendo convertido em pirofosfato de isopentenila. A enzima IPP isomerase é a responsável pelo mecanismo de protonação e desprotonação transformando IPP no isômero DMAPP (Figura 137, pag. 183) (DEIGHTON et al., 2001; DEWICK, 2009; DICKSCHAT, 2011).

Figura 137 - Interconversão de IPP em DMAPP por transposição antarafacial [1,3] de hidrogênio, catalisada pela isomerase IPP. (adaptado de DURBECQ et al., 2001).

Figura 138 - Rotas biossintéticas da via do MVA e do DXP/MEP na formação de IPP e DMAPP (adaptado de DEWICK, 2009; DICKSCHAT, 2011).

A biossíntese na via do DPX/MEP, ou via alternativa dos isoprenos (Figura 138, pag. 184), é iniciada pela condensação do ácido pirúvico e difosfato de tiamina (TPP) seguida de outra condensação com o *D*-gliceraldeído-3-fosfato, dando origem ao 1-desoxi-*D*-xilulose-5-fosfato (DXP) por intermédio da enzima 1-desoxi-*D*-xilulose-fosfato sintetase (DXP sintetase). A 1-desoxi-*D*-xilulose-5-fosfato reductoisomerase, também conhecida por MEP sintetase, tem como finalidade catalisar o rearranjo molecular e simultaneamente reduzir o DXP, originando o 2-*C*-metil-*D*-eritritol-4-fosfato (MEP). O MEP por sua vez é ligado a uma molécula de citidina trifosfato (CTP) (Figura 139, pag. 185) por intermédio de 4-fosfatocitidina-2-*C*-metil-*D*-eritritol transferase, dando origem a 4-fosfatocitidina-2-*C*-metil-*D*-eritritol (CDP-MEP) (DEWICK, 2009; DICKSCHAT, 2011).

Figura 139 - Molécula de citidina trifosfato (CTP).

O intermediário CDP-MEP é fosforilado com a atuação da enzima 4-fosfatocitidina-2-*C*-metil-*D*-eritritol-2-fosfato quinase com o gasto de uma molécula de ATP, produzindo 4-fosfatocitidina-2-*C*-metil-*D*-eritritol-2-fosfato (CDP-ME2P). O CDP-ME2P é transformado em 2-*C*-metil-*D*-eritritol-2,4-ciclodifosfato (MEcPP) com a atuação da enzima 2-*C*-metil-*D*-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintetase. O produto MEcPP desta reação é reduzido a pirofosfato de 4-hidróxi-3-metil-but-2-enila (HMBPP) pela enzima pirofosfato de 4-hidróxi-3-metil-but-2-enila sintetase e eliminação do grupo CDP. Finalmente, o HMBPP é convertido nos isoprenos IPP e DMAPP pela pirofosfato de 4-hidróxi-3-metil-but-2-enila redutase. (DEWICK, 2009; DICKSCHAT, 2011).

Após a biossíntese dos precursores pirofosfato de isopentenila (IPP) e de seu isômero pirofosfato de dimetilalila (DMAPP), estas unidades pentacarbonadas sofrem sucessivas condensações durante o alongamento da cadeia isoprênica por intermédio das enzimas preniltransferases (GPPS, FPPS, GGPPS e FGPPS) (ZHANG; DEMAINE, 2005; DEWICK, 2009; DICKSCHAT, 2011).

A formação dos diversos terpenóides ocorre a partir dos precursores DMAPP e IPP por meio de uma reação denominada “cabeça-cauda”. Esta reação ocorre por meio da condensação entre o carbono C-4 do IPP com o carbono terminal C-1' do DMAPP. A classificação destes isoprenóides se dá pelo número de unidades isoprênicas (C_5) presentes em seu esqueleto carbônico (Figura 140, pag. 186) (ZHANG; DEMAINE, 2005; DEWICK, 2009; DICKSCHAT, 2011).

Figura 140 - Mecanismo da condensação “cabeça-cauda” na conjugação das unidades isoprênicas por intermédio das prenilttransferases (adaptado de ZHANG; DEMAINE, 2005; DEWICK, 2009).

Os hemiterpenos são considerados a menor unidade de isoprenóides formados, e raramente são isolados em sua forma livre. A partir da junção de IPP com seu isômero DMAPP é formado o pirofosfato de geranila (GPP, C_{10}), precursor dos monoterpenos e iridóides. A condensação de GPP com mais uma molécula de IPP origina o pirofosfato de farnesila (FPP, C_{15}), que atua como precursor dos sesquiterpenos (C_{15}). A condensação de mais uma molécula de IPP ao FPP leva à formação do pirofosfato de geranilgeranila (GGPP, C_{20}), responsável pela formação de diterpenos e de politerpenos (C_n). Por fim, o GGPP forma o pirofosfato de farnesilgeranila (FGPP) com incorporação de mais uma molécula de IPP em sua estrutura, precursor dos sesterpenos (C_{25}) (ZHANG; DEMAINE, 2005; DEWICK, 2009; DICKSCHAT, 2011).

Os triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}) são biossintetizados pela condensação “cabeça-cabeça” a partir de duas unidades de FPP e GPP, respectivamente. A condensação leva à formação de esqualeno (C_{30}) para os triterpenos, e fitoeno (C_{40}) para os tetraterpenos, e ambos são os precursores-chave para esta classe terpenoídica (Figura 141, pag. 187) (BERNARDS, 2010; MISAWA, 2011; MILLER; ALLEMANN, 2012).

Figura 141 - Biossíntese das diferentes classes de terpenóides (adaptado de WENDT; SCHULZ, 1998; ZHANG; DEMAINE, 2005; DEWICK, 2009).

Com relação à classe geral dos compostos em estudo, os sesquiterpenos representam a maior classe de diversificação estrutural entre os isoprenóides, tendo mais de 7000 compostos diferentes com as mais diversas funções biológicas. Estes compostos formam 300 classes estruturais, incluindo esqueletos acíclicos; mono-, bi- e tricíclicos decorrentes de uma ampla variedade de rearranjos estruturais, biossintetizados a partir de seu precursor universal (FPP) por mecanismos catiônicos intermediados pelas enzimas sesquiterpeno sintetases (ou ciclases) do tipo I (FORCAT; ALLEMANN, 2006; ASADOLLAHI, et al., 2008; MISAWA, 2011; DICKSCHAT, 2011).

A cascata de ciclização dos sesquiterpenos é iniciada pela ionização da porção pirofosfato do precursor FPP (forma alílica), provocada por uma complexa interação entre hidrogênios e íons metálicos de coordenação. Três íons Mg^{2+} (ou Mn^{2+}) estão envolvidos na ligação ou abstração da porção pirofosfato do precursor FPP (VEDULA et al., 2008; DICKSCHAT, 2011). Esses íons metálicos são encadeados por duas sequências gênicas de iniciação (domínios) características de todas as terpeno sintetases conhecidas, sendo uma rica em asparagina descrita por DDXXD(D/E) e a tríade NSE/DTE, geralmente relatada por (N/D)DXX(S/T)XX(K/R)(D/E) (CANE; IKEDA, 2012).

A ciclização para obtenção dos sesquiterpenos é possível através de seis vias alternativas, envolvendo dois mecanismos distintos, porém intimamente relacionados:

(i) ionização-ciclização: iniciada a partir da ionização do FPP para a formação do cátion alílico farnesila [(*E,E*)-FPP], que quando ciclizado entre os carbonos C-1 e C-10, dá origem ao cátion *trans* (*E,E*)-germacrila, e quando ciclizado entre C-1 e C-11, forma um anel de 11 membros denominado de cátion *trans* (*E,E*)-humulila. Estes cátions formados atuam como precursores de todos os sesquiterpenos com ligação dupla *trans*, como o aristoloqueno, o pentaleno e o presilfiperfolano-8 β -ol (Figura 142, pag. 189) (DEWICK, 2009; DICKSCHAT, 2011).

(ii) ionização-isomerização-ionização-ciclização: O precursor FPP inicialmente sofre uma isomerização tornando-se um éter alílico terciário correspondente ao pirofosfato de nerolidila (NPP), que por sua vez apresenta uma flexibilidade conformacional adequada e apropriada para a formação de compostos cíclicos derivados. Subsequentemente, o NPP dará origem aos seguintes cátions: bisabolila (anel de 6 membros); ciclo-heptenila (anel de 7 membros); (*Z,E*)-germacrila (anel de 10 membros) e *cis* (*Z,E*)-humulila (anel de 11 membros). Esse mecanismo de ciclização explica a biogênese de compostos como o tricodieno e bergamoteno (Figura 142, pag. 189) (DEWICK, 2009; DICKSCHAT, 2011; HU et al., 2011).

Figura 142 - Biossíntese dos sesquiterpenos por dois mecanismos de ciclização a partir do precursor pirofosfato de farnesila, os números indicados acima das setas referem-se às porções dos átomos de carbono envolvidas nas ciclações (adaptado de DICKSCHAT, 2011).

Os cátions formados pelos mecanismos citados, em conjunto com outros possíveis rearranjos, ciclizações e diferentes formas de extinção dos cátions, resultam na grande diversidade estrutural da classe dos sesquiterpenos (DICKSCHAT, 2011).

Os aristoloquenos são os sesquiterpenos produzidos pelo fungo *B. cinerea*, e apresentam sistema bicíclico do tipo eremofilano. Esta classe de sesquiterpenos foi isolada pela primeira vez da planta *Aristolochia indica*, e mais tarde, das plantas *Piper fulvescens*, *Bixa orellana*, *Petasites officinalis* entre outras. Os fungos *Aspergillus terreus* e *Penicillium roquefortii* também biossintetizam esta classe de sesquiterpeno (GOVINDACHARI; MOHAMED; PARTHASARATHY, 1970; JELEN, 2002; ZHAO et al., 2004; SORENSEN et al., 2007).

A biossíntese dos aristoloquenos ocorre a partir da conversão do carbocátion *trans*-alifático (*E,E*) na formação do cátion (*E,E*)-germacrila (Figura 143, pag. 191). O cátion (*E,E*)-germacrila sofre sucessivas migrações 1,2 de hidreto e uma desprotonação no carbono C-12 resultando na formação do (*S*)-germacreno A. Este decalino *cis*-fundido é então protonado (carbonos C-6 e C-7) e sofre sucessivas migrações 1,2 de hidreto e metila levando à formação do cátion eudesmila. Este complexo mecanismo de reação envolve enzimas catalizadoras na conversão de FPP em aristoloqueno e tem sido provado experimentalmente com o uso de derivados deuterados e análogos fluorados de FPP (FARALDOS; KARIUKI; ALLEMANN, 2010).

Figura 143 - Rota biossintética de sesquiterpenos derivados do cátion pirofosfato de germacrila (adaptado de DEWICK, 2009).

3.4.2 Estudos biossintéticos em *Botrytis cinerea*

Para o estudo biossintético dos aristoloquenos produzidos pelo fungo *B. cinerea* foi realizada, inicialmente, a otimização das condições de produção destes metabólitos minoritários por duas linhagens microbianas, uma mutante (B05-10 cnd15), com a via de produção das botrylactonas silenciada, e uma selvagem (UCA 992). A otimização foi baseada na comparação entre os cultivos mantidos em agitação (180 rpm) e os cultivos estáticos. Os extratos obtidos do líquido fermentado e da biomassa foram analisados com base nos rendimentos de produção dos metabólitos de interesse e no tempo ideal de produção destes compostos, para então dar início aos estudos de biossíntese.

A determinação do tempo de início da produção dos aristoloquenos foi fundamental para iniciar os experimentos de incorporação dos substratos marcados em *B. cinerea*. Para obtermos estes dados, os experimentos foram realizados em duplicata e o monitoramento da produção metabólica foi realizado com os extratos AcOEt do meio líquido fermentado e do micélio, obtidos após um período de 12 dias de cultura. A comparação foi realizada por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) com o auxílio de quatro padrões derivados de aristoloquenos previamente isolados pelo grupo do Departamento de Química Orgânica da Universidad de Cádiz-Espanha.

Os padrões derivados de aristoloquenos utilizados foram denominados de **1a**, **1b**, **1c** e **1d** (Figuras 144, pag. 193). Análises espectrométricas de RMN de ^1H dos extratos que apresentaram manchas de mesmo *R_f* ao dos padrões também foram realizadas.

Os aristoloquenos não foram detectados nos extratos AcOEt obtidos partir da biomassa micelial das linhagens em cultivo agitado (180 rpm), pelas análises em CCDC. Estes resultados indicaram que os sesquiterpenos são liberados para o meio extracelular, já que sua presença foi detectada apenas nos extratos AcOEt obtidos das partições do líquido fermentado.

A escolha da condição de cultivo e da linhagem empregada na continuidade dos estudos de biossíntese foram embasadas na complexidade química apresentada pelos extratos, devido aos rendimentos dos extratos AcOEt não terem sido uma variante significativa entre os modelos experimentais propostos.

Figura 144 - Estrutura dos derivados de aristoloquenos utilizados como padrões para o estudo de biossíntese.

Os dados de RMN de ^1H e a análise por CCDC dos extratos AcOEt obtidos em condição estática evidenciaram que tanto a linhagem mutante (B05-10 cnd15) quanto a linhagem selvagem (UCA 992) tiveram um aumento significativo da produção de boticininas em comparação aos cultivos realizados em agitação. Este aumento foi mais proeminente nos cultivos da linhagem selvagem do que nos cultivos da linhagem mutante.

No entanto, por CCDC observou-se um aumento significativo da produção dos derivados de sesquiterpenos da classe dos aristoloquenos nos extratos obtidos dos cultivos em agitação em comparação ao cultivo estático (Figura 145, pag. 194). A linhagem mutante foi selecionada para os experimentos de incorporação dos precursores biossintéticos, pois devido ao silenciamento gênico da via das botrylactonas, seus extratos foram muito menos complexos quimicamente em relação aos da linhagem selvagem.

A linhagem mutante iniciou a produção dos metabólitos de interesse a partir do segundo dia de fermentação em agitação, enquanto a produção dos metabólitos de interesse pela linhagem selvagem iniciou a partir do terceiro dia sob as mesmas condições. Todos os sesquiterpenos caracterizados por Collado e colaboradores e utilizados como padrões foram observados nos cultivos em agitação da linhagem mutante B05-10 cnd15 em seu quinto dia de fermentação. Já para a linhagem selvagem UCA 992 os sesquiterpenos foram observados somente ao sétimo dia de cultura.

Figura 145 - Cromatografia em camada delgada comparativa de algumas frações obtidas dia-a-dia dos cultivos em agitação e estático da linhagem mutante *B. cinerea* B05-10 cnd15; fase móvel: AcOEt:Hex 8:2 (v/v); padrões: **1a**; **1b**; **1c**; **1d** e M – mistura (**1a** e **1b**) e revelador: *oleum*.

Os extratos do cultivo em agitação oriundos da otimização da cultura da linhagem mutante foram reunidos e fracionados em coluna aberta de sílica e as subfrações foram monitoradas com os padrões por CCDC e submetidas à CLAE com a finalidade de obter os aristoloquenos utilizados como padrões puros e com isso determinarmos o composto majoritário (Figura 146, pag. 194).

Figura 146 - Cromatograma da subfração Cnd15Aad3 e isolamento do composto **Bc 15** (representado pela seta). Fase móvel: Hex:AcOEt 2,5:7,5 (v/v); Coluna semi-preparativa: Lichrospher® Si 80 (10μm) 25 cm x 1 cm; Vazão da fase móvel: 2,5 mL min⁻¹ e detecção por índice de refração (RID).

Dentre os compostos isolados, o composto **Bc 15** apresentou melhor rendimento comparado aos padrões, o composto **Bc 15** apresentou *R_f* (0,46) igual ao do composto padrão **1a** previamente isolado pelo grupo de pesquisa da UCA. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C deste composto (Figuras 147 e 148, pags 195 e 196) foram obtidos apenas para confirmar e garantir a eficácia da metodologia utilizada na purificação deste composto, pois estudos de determinação estrutural (Tabela 22, pag. 197) já haviam sido realizados por Collado e colaboradores (dados ainda não publicados). O composto de interesse (**Bc 15**) é um metabólito inédito na literatura.

Figura 147 - Espectro de RMN de ^1H do composto **Bc 15** (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 148 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **Bc 15** (CDCl_3 , 100 MHz).

Tabela 22 - Dados de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e bidimensionais em CDCl_3 do composto **Bc 15**.

Estrutura	Posição	$\delta^1\text{H}$ (Hz)	$^*\delta^{13}\text{C}$	NOESY	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	α 2,24 (<i>dddd</i> , $J= 2,0; 2,0; 11,5; 12,2$) β 2,31 (<i>dd</i> , $J= 2,0; 5,3; 12,2$)	41,77 (<i>t</i>)	H-14 H-2; H-9	H-9
	2	β 3,74 (<i>dddd</i> , $J= 5,3; 5,3; 11,5; 11,5$)	67,84 (<i>d</i>)	H-1 β ; H-3 β ; H-15	H-1 α ; H-1 β ; H-3 α ; H-3 β
	3	α 1,88 (<i>ddd</i> , $J= 5,3; 12,3; 12,3$) β 1,64 (<i>m</i> , sobreposto com H-4, H-7 e H-8 α)	39,80 (<i>t</i>)	H-4; H-14	H-1 β ; H-15
	4	α 1,64 (<i>m</i> , sobreposto com H-3 β , H-7 e H-8 α)	41,50 (<i>d</i>)		H-3 α ; H-6; H-14; H-15
	5	-	38,06 (<i>s</i>)		H-1 β ; H-4; H-9; H-15
	6	α 1,18 (<i>m</i> , sobreposto com H-12, H-13 e H-14) β 1,78 (<i>ddd</i> , $J= 2,7; 2,7; 13,5$)	38,51 (<i>t</i>)	H-6 β ; H-7; H-15	H-7; H-12; H-13
	7	β 1,70–1,60 (<i>m</i> , sobreposto com H-3 β , H-4 e H-8 α)	43,11 (<i>d</i>)		H-12; H-13
	8	α 1,65 (<i>m</i> , sobreposto com H-3 β , H-4 e H-7) β 2,05 (<i>m</i>)	26,10 (<i>t</i>)	H-8 α ; H-9; H-12; H-13	H-9
	9	5,62 (<i>ddd</i> , $J= 2,0; 1,7; 6,9$)	123,52 (<i>d</i>)	H-1 β ; H-8 α ; H-8 β	H-1 α ; H-1 β ; H-8 α ; H-8 β
	10		138,02 (<i>s</i>)		H-1 α ; H-1 β ; H-6 β ; H-8 α ; H-8 β ; H-14
	11		72,80 (<i>s</i>)		H-12; H-13
	12	1,17 [#] (<i>s</i> , sobreposto com H-5 α)	27,26* (<i>c</i>)		H-12; H-13
	13	1,18 [#] (<i>s</i> , sobreposto com H-5 α)	27,23* (<i>c</i>)		H-12; H-13
	14	1,18 (<i>s</i> , sobreposto com H-5 α)	30,41 (<i>c</i>)		H-4; H-14
	15	β 0,98 (<i>d</i> , $J= 7,6$)	18,77 (<i>c</i>)	H-2; H-4; H-6 β	H-3 α ; H-4

^{#,*} sinais sobrepostos

Após a determinação da condição de cultivo, do tipo de linhagem, do tempo de início da produção dos aristoloquenos e do composto alvo (**Bc 15**) (Figura 149, pag. 198), iniciou-se a investigação biossintética. Para os experimentos de incorporação com os substratos marcados, foi averiguada a capacidade metabólica do fungo *B. cinerea* em manter a produção de aristoloquenos com a diminuição da fonte de carbono presente no meio CZ-dox modificado, que passou de 30 g L⁻¹ de glicose para 15 g L⁻¹ e sem glicose.

Figura 149 - Estrutura química do composto **Bc 15**.

O experimento foi realizado após a transferência da biomassa micelial (pré-inóculo) dos cultivos obtidos do quarto ao sexto dia em CZ-dox modificado (30 g L⁻¹ de glicose) para o mesmo meio de cultura, no entanto com alterações na concentração de glicose (15 g L⁻¹ e zero). Esta é uma estratégia interessante uma vez que a diminuição da fonte de carbono pode induzir o micro-organismo a utilizar outra fonte de carbono alternativa, no caso, o substrato marcado disponível no meio de cultura. A finalidade deste experimento foi a de tentar aumentar a taxa de incorporação dos substratos marcados à molécula alvo, em função da maquinaria enzimática de *B. cinerea* estar apta para assimilar de forma mais eficaz as fontes de carbono disponíveis no meio de cultura.

Pelas análises realizadas em CCDC e RMN de ¹H dos extratos AcOEt deste experimento, observou-se que a concentração de glicose no meio de cultura não alterou a biossíntese dos aristoloquenos pelo fungo *B. cinerea*. Porém, os experimentos realizados com a biomassa micelial transferida no quinto dia já apresentavam nitidamente o início da produção dos compostos de interesse para iniciar a incorporação dos precursores biossintéticos isopicamente marcados.

Com base nestes resultados, optou-se trabalhar com o meio de cultivo em agitação contendo a metade da concentração de glicose devido ao maior rendimento do extrato bruto AcOEt (Tabela 23, pag. 199) obtido da partição de 600 mL do líquido fermentado e a partir da biomassa micelial transferida assepticamente no quinto dia e mantida por agitação mais três dias, totalizando oito dias experimentais.

Tabela 23 - Rendimentos (mg) dos extratos AcOEt dos cultivos em agitação em meio Cz-dox.

Dias	<i>Botrytis cinerea</i> B05-10 cnd15	
	Cz-dox modificado 15g L ⁻¹	Cz-dox sem glicose
4-7	29,15	19,66
5-8	35,51	22,73
6-9	26,17	20,76

Para o desenvolvimento dos experimentos de incorporação com isótopos, foi utilizado uso de acetato de sódio com a finalidade de verificar o uso da via do MVA pelo fungo *B. cinerea* na biossíntese de aristoloquenos. Inicialmente, foi usado o acetato de sódio deuterado (CD_3COONa) como substrato, por ser um precursor de baixo custo em comparação aos demais substratos isotopicamente marcados. Além disso, este experimento proporcionou dados referentes às trocas de hidrogênios por deutério na estrutura e seu uso garantiu a eficácia de incorporação de seus isótopos durante a biossíntese de aristoloquenos pelo fungo *B. cinerea* e a readequação do modelo experimental quando necessária.

Para o primeiro experimento com CD_3COONa , foram utilizados 20 frascos Erlenmeyer, sendo 10 para a produção de biomassa micelial por cinco dias e os outros 10 para a transferência da biomassa e adição do substrato ao meio Cz-modificado com a concentração de glicose 15g L⁻¹. Após transferência do micélio e posterior cultivo por três dias sob as mesmas condições, realizou-se a extração com AcOEt do líquido fermentado (2 L) e obteve-se 141,41 mg de extrato, dos quais foram isolados 1,3 mg do composto **Bc 15**, para posterior análise da incorporação de deutério (Figura 150, pag. 200).

O espectro RMN de 2H obtido para determinar a incorporação de CD_3COONa no composto foi adquirido em solvente não deuterado (neste caso, o clorofórmio ($CHCl_3$) com alto grau de pureza) e para isso foi realizada uma alteração na frequência do equipamento de RMN. O espectro obtido apresentou uma baixa incorporação, o que impossibilitou a determinação exata dos hidrogênios substituídos por deutérios e seus acoplamentos sem uma boa resolução.

Simultaneamente, realizou-se um segundo experimento com incorporação de $CH_3COONa-1-^{13}C$ (carbono carbonílico é enriquecido isotopicamente), no qual foram utilizados 40 frascos Erlenmeyer, sendo 20 para o pré-inóculo e os outros 20 para a transferência da biomassa micelial. A metodologia utilizada foi baseada no primeiro experimento de CD_3COONa . A partir da partição realizada do meio líquido fermentado (4 L) foram obtidos 300 mg de extrato AcOEt, dos quais foram isolados 2 mg do composto **Bc 15**.

Figura 150 - Espectro de RMN de ^2H do composto **Bc 15** obtido do primeiro experimento com CD_3COONa (CHCl_3 , 400 MHz).

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos com 63924 acumulações a 100 MHz em CDCl_3 . Ambos os experimentos foram adquiridos com a mesma quantidade do composto (marcado e não-marcado), seguindo rigorosamente as mesmas condições de preparo da amostra e aquisição de espectro. Este procedimento foi fundamental para a análise comparativa entre os espectros e para o cálculo percentual da incorporação do substrato marcado em cada carbono da molécula (Figuras 151e 152, pag. 201). Os dados da tabela 24 (pag. 202) apresentam os valores de início e fim dos deslocamentos químicos em ppm de cada carbono e suas respectivas integrais, dos experimentos realizados com o composto **Bc 15** marcado com $\text{CH}_3\text{COONa } 1\text{-}^{13}\text{C}$ e não marcado.

Conforme a fórmula abaixo se obteve o valor de incorporação ocorrido em cada carbono da molécula.

$$\frac{\text{Intensidade da Integral do carbono marcado}}{\text{Intensidade da Integral do carbono não-marcado}} = \frac{X\%}{1,1\%} - 1,1\%$$

O valor de subtração 1,1% é referente ao valor de abundância isotópica de ^{13}C presente na natureza, obtendo-se dessa forma o valor real de incorporação.

Tabela 24 - Valores da área e integral dos carbonos do composto **Bc 15** marcado, não-marcado e a porcentagem de incorporação de $\text{CH}_3\text{COONa } 1\text{-}^{13}\text{C}$.

porcentagem de incorporação de CH ₃ COOH a 1 °C.							
	Sesquiterpeno da classe dos Aristolequenos (Bc 15)						Valor de incorporação (%)
	Marcado			Não marcado			
C	Início	Fim	Integral	Início	Fim	Integral	
10	137,96	137,845	75,6536	137,907	137,848	27,3272	1,95
9	123,419	123,304	60,4525	123,408	123,291	64,1436	-0,06
11	72,7169	72,5298	115,455	72,7003	72,5851	36,4764	2,38
2	67,7808	67,5612	252,924	67,7569	67,6281	58,7754	3,63
7	43,0415	42,9386	71,6513	43,0228	42,8965	72,9455	-0,02
1	41,7038	41,6112	99,0207	41,6707	41,5392	87,1919	0,15
4	41,462	41,318	250,581	41,3971	41,2919	65,3711	3,12
3	39,7539	39,5995	118,287	39,761	39,5663	95,1081	0,27
6	38,4574	38,3236	322,767	38,4247	38,2826	83,2551	3,16
5	37,9789	37,8966	56,4634	37,9407	37,8249	36,7432	0,59
14	30,3308	30,2124	108,004	30,351	30,1985	92,7637	0,18
12	27,1746	27,0992	109,178	27,2094	27,0834	105,955	0,03
13	27,0946	27,0329	100,365	27,0834	26,9598	86,8286	0,17
8	26,0572	25,879	361,198	26,0024	25,8739	85,9769	3,52
15	18,6524	18,5554	100	18,7244	18,5429	100	0

Figura 151 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **Bc 15** não marcado para comparação com o experimento $\text{CH}_3\text{COONa } 1\text{-}^{13}\text{C}$ (CDCl_3 , 100 MHz).

Figura 152 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **Bc 15** enriquecido isotopicamente com ^{13}C após incorporação de $\text{CH}_3\text{COONa } 1\text{-}^{13}\text{C}$ (CDCl_3 , 100 MHz).

Apesar do primeiro experimento com CD_3COONa não ter apresentado uma boa incorporação, o experimento com CH_3COONa $1\text{-}^{13}\text{C}$ possibilitou, através da análise do espectro de RMN de ^{13}C , definir que ocorreu enriquecimento isotópico de ^{13}C nos carbonos das posições 2, 4, 6, 8, 10 e 11. A figura 153 (pag. 203) ilustra a biossíntese de **Bc 15** por *B. cinerea* nos experimentos realizados com CH_3COONa $1\text{-}^{13}\text{C}$.

Os resultados experimentais sugerem que as unidades de acetato de sódio isotopicamente marcadas no carbono C-1 (CH_3COONa $1\text{-}^{13}\text{C}$) adicionadas ao cultivo são convertidas inicialmente em acetil-coenzima A ($\text{CH}_3\text{COO-CoA}$), etapa inicial da biossíntese das unidades universais (IPP e DMAPP) pela via do MVA na biossíntese de terpenos. No estudo realizado, os carbonos das unidades de IPP e DMAPP foram enriquecidos com a incorporação de carbonos isótopos (^{13}C) nas posições 1 e 3 (Figura 153, pag. 203).

Figura 153 - Rota biossintética dos aristoloquenos a partir da incorporação de CH_3COONa $1\text{-}^{13}\text{C}$ (adaptado de DELIGEORGIOPOULOU; ALLEMANN, 2003; DEWICK, 2009; DICKSCHAT, 2011).

Na tentativa de aumentar os rendimentos de incorporação e de se obter dados mais precisos nos estudos de biossíntese, o experimento com CD_3COONa foi novamente realizado, devido à baixa incorporação apresentada pelo composto **Bc 15**, obtido do extrato AcOEt dos

cultivos com a concentração de glicose reduzida pela metade. Esta repetição foi realizada nas mesmas proporções utilizadas durante o primeiro experimento, tendo apenas como variante a ausência de glicose no meio de cultura. Ao todo foram obtidos 121,12 mg de extrato AcOEt de 4 L de caldo fermentado, do qual obteve-se 2,3 mg do composto **Bc 15**.

Após a obtenção do espectro de RMN de ^2H (Figura 154, pag. 205) observou-se uma nítida melhora na resolução dos sinais, incluindo sinais antes não observados e/ou não diferenciados dos ruídos da linha de base. Pelos valores de deslocamento obtidos pelo espectro de RMN de ^2H observou-se incorporação de deutério nos hidrogênios metínicos H-4, H-7 e H-9, nos hidrogênios metilênicos H-1, H-3 α e H-3 β e nos hidrogênios metílicos H-12, H-13, H-14 e H-15. A via biossintética está ilustrada na figura 155 (pag. 206).

Figura 154 - Espectro de RMN de ^2H do composto **Bc 15** em CHCl_3 (CHCl_3 , 400 MHz).

Figura 155 – Rota biossintética dos aristoloquenos a partir da incorporação de CD_3COONa (adaptado de DELIGEORGIOPOULOU; ALLEMANN, 2003; DEWICK, 2009; DICKSCHAT, 2011).

Foi também realizado um experimento de incorporação com CH_3COONa 2- ^{13}C . Da extração com AcOEt de 1,4 L do líquido fermentado foram obtidos 50 mg de extrato, dos quais foram isolados 0,84 mg do composto **Bc 15** enriquecido isotopicamente. A aquisição dos espectros de RMN de ^{13}C do composto marcado e não-marcado foi realizada em condições experimentais idênticas, os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos com 39616 acumulações a 150 MHz em CDCl_3 (Figuras 156 e 157, pag. 207).

Neste experimento não foram calculados os valores de incorporação nos carbonos 5 e 14 da molécula, devido à existência de acoplamento entre eles (Figura 158, pag. 208), pois dos cinco carbonos que formaram a unidade isoprênicas, três foram marcados isotopicamente, sendo eles os carbonos 2, 4 e 5, como ilustrado na figura 159 (pag. 209). Estes dados reforçam a participação da via do mevalonato (MVA) na formação desta classe de sesquiterpenos. Os valores de incorporação estão apresentados na tabela 25, (pag. 209).

Figura 156 - RMN de ^{13}C do composto **Bc 15** não marcado com $\text{CH}_3\text{COONa } 2\text{-}^{13}\text{C}$ (CDCl_3 , 150 MHz).

Figura 157 - RMN de ^{13}C do composto **Bc 15** marcado com $\text{CH}_3\text{COONa } 2\text{-}^{13}\text{C}$ (CDCl_3 , 150 MHz).

Figura 158 - Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C do composto **Bc 15** marcado com CH_3COONa 2- ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz) mostrando o acoplamento existente entre os carbonos 4a e 12.

Figura 159 - Rota biossintética dos aristoloquenos a partir da incorporação de CH_3COONa 2- ^{13}C (adaptado de DELIGEORGIOPOULOU; ALLEMAN, 2003 e DEWICK, 2009; DICKSCHAT, 2011).

Tabela 25 - Valores da área e integral dos carbonos do composto **Bc 15** marcado, não-marcado e a porcentagem de incorporação de CH_3COONa 2- ^{13}C .

C	Sesquiterpeno da classe dos Aristolequenos (Bc 15)						Valor de incorporação (%)
	Marcado			Não marcado			
	Início	Fim	Integral	Início	Fim	Integral	
10	137,903	137,881	24,6011	137,918	137,86	48,7248	-0,55
9	123,425	123,328	836,177	123,394	123,353	88,619	9,28
11	72,635	72,6258	16,5836	72,6621	72,6137	43,8975	-0,68
2	67,7059	67,6666	79,8079	67,7224	67,6588	96,4572	-0,19
7	43,0115	42,9419	666,173	43,0095	42,9503	81,3027	7,91
1	41,6611	41,6039	820,621	41,6622	41,5945	112,184	6,95
4	41,3872	41,3594	63,5769	41,402	41,3428	77,3345	-0,20
3	39,6994	39,647	951,769	39,7212	39,6415	111,347	8,30
6	38,4082	38,3524	100	38,4089	38,3415	100	0
12	27,1407	27,0921	853,368	27,152	27,0914	109,989	7,43
13	27,0921	27,0506	954,286	27,0914	27,0424	94,0154	10,06
8	25,9708	25,9496	72,7671	25,9807	25,9302	88,8817	-0,2
15	18,6359	18,5511	812,343	18,6505	18,5683	100,579	7,78

Os dados descritos até o momento confirmam o envolvimento da via do MVA na biossíntese dos sesquiterpenos, através dos experimentos de fermentação descontínua com os substratos CH_3COONa diferentemente enriquecidos isotopicamente e incorporados ao meio

de cultura de uma só vez. Porém, a fim de se confirmar a exclusividade da via do MVA pelo fungo *B. cinerea*, realizou-se a incorporação de glicose deuterada (*D*-glicose-6,6-d₂) [HOCD₂(CHOH)₄CHO], que após metabolização leva à formação de unidades de IPP oriundas tanto pela via do MVA quanto pela via do DXP/MEP. Este estudo utilizando glicose diverge metodologicamente dos experimentos com CH₃COONa por ser uma fermentação com alimentação descontínua.

Devido à glicose ser um substrato universal, responsável pela origem de todos os precursores envolvidos na biogênese, optou-se em incorporá-la ao cultivo em três intervalos, com a finalidade de manter o substrato isotopicamente marcado disponível por mais tempo durante a biossíntese dos aristoloquenos pelo fungo *B. cinerea*.

Para a glicose deuterada originar os precursores envolvidos na biossíntese de sesquiterpenos, ela é inicialmente fosforilada no grupo hidroxila do carbono C-6 a partir da hidrólise de uma molécula de ATP em uma reação irreversível pela via glicolítica (via de Embden-Meyerhof) (Figura 160, pag. 211), mediada pela enzima hexoquinase e íons de Mg⁺² como cofatores, formando a glicose-6-fosfato que em seguida é isomerizada pela enzima 6-fosfato isomerase em frutose-6-fosfato por uma reação reversível (NELSON; COX, 2008).

A frutose-6-fosfato sofre a segunda fosforilação com perda de mais uma molécula de ATP pela via da glicólise, convertendo-a em frutose-1,6-difosfato. Esta é também uma reação irreversível e catalisada pela enzima 6-fosfofrutoquinase e íons de Mg⁺² como cofatores. Esta reação tem como finalidade tornar a molécula simétrica para a reação de clivagem da enzima aldolase na formação de duas trioses isoméricas, o gliceraldeído-3-fosfato e a diidroxiacetona fosfato (DHAP), que são facilmente interconvertíveis pela triosefosfato isomerase (NELSON; COX, 2008).

A via prossegue com a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato catalisada por uma desidrogenase (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), que tem como cofator NAD⁺, seguida de fosforilação pelo fosfato inorgânico (Pi), constituindo o 1,3-difosfoglicerato, este é catalisado pela fosfoglicerato quinase a partir da transferência do grupo fosfato ao ADP, dando origem a primeira molécula de ATP na via glicolítica e ao 3-fosfoglicerato (NELSON; COX, 2008).

Figura 160 - Via da glicólise e a quebra de $\text{HOCD}_2(\text{CHOH})_4\text{CHO}$ em gliceraldeído-3-fosfato, piruvato e acetil-CoA (adaptado de NELSON; COX, 2008).

O fósforo do 3-fosfoglicerato é reposicionado pela fosfoglicerato mutase à 2-fosfoglicerato que sofre uma desidratação catalisada pela enolase, dando origem ao fosfoenolpiruvato. Finalmente, o fosfoenolpiruvato é catalisado pela piruvato quinase, repassando seu grupo fosfato para uma molécula de ADP formando um ATP e piruvato (ácido pirúvico) (NELSON; COX, 2008)

A partir da formação do piruvato, precursor comum das rotas do MVA e do DXP/MEP, ocorre a formação das unidades de IPP e DMAPP. A figura 161 (pag, 212) mostra resumidamente a biogênese da via do MVA e do DXP/MEP a partir de *D*-glicose-6,6-d₂.

Figura 161 - Formação de unidades isoprênicas (IPP e DMAPP) a partir da glicose como substrato (adaptado de BERNARDS, 2010)

No experimento de incorporação com *D*-glicose-6,6-d₂, foram obtidos 150 mg de extrato AcOEt a partir da extração de 4 L de caldo fermentado, que após purificação levaram ao isolamento de 2,14 mg do composto **Bc 15**.

Figura 162 - Formação dos precursores IPP e DMAPP da biossíntese de sesquiterpenos a partir da glicose deuterada $[\text{HOCD}_2(\text{CHOH})_4\text{CHO}]$ como substrato (adaptado de DEWICK, 2009).

Observando a figura 162 (pag. 213) se pode notar que pela biogênese as posições 1, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 estariam deuteradas no sesquiterpeno **Bc 15** pela via MVA. Uma análise preliminar dos dados de RMN de ^2H deste experimento sugeriu a possível participação da via DXP ou MEP na formação dos aristoloquenos (Figura 163, pag. 214), uma vez que o hidrogênio da posição 2 aparece deuterado. A posição 2 não estaria deuterada se houvesse apenas a participação da via do MVA, como se pode observar na figura 162 (pag. 213). As outras posições eventualmente oriundas da via DXP ou MEP não são conclusivas, pois há sobreposição de sinais de deutério com sinais observados pela via MVA.

Figura 163 – RMN de ^2H do composto **Bc 15** marcado com $\text{HOCD}_2(\text{CHOH})_4\text{CHO}$ em CHCl_3 (CHCl_3 , 400 MHz).

Com base na informação obtida sobre a posição 2, experimentos complementares e mais conclusivos estão sendo desenvolvidos na *Universidad de Cádiz* utilizando precursor enriquecido com ^{13}C , no caso, 1- ^{13}C -D-glicose. Estudos com inibidores da enzima HMG-CoA redutase, como a lovastatina, poderão ser aplicados na tentativa de inibir a via do mevalonato. Caso seja confirmado o dado obtido pelos experimentos com glicose, poderá ser inferido que ambas as vias do MVA e DXP/MEP estão envolvidas na biossíntese dos sesquiterpenos pelo

fitopatígeno *B. cinerea*. Se isso for confirmado, este será o segundo relato da produção de terpenos pela via alternativa por fungos.

Capítulo II – Conclusões

3.5 CONCLUSÕES

Os experimentos mostraram que ambas as linhagens de *Botrytis cinerea*, a mutante B05-10 cnd15 e a selvagem UCA 992, produzem os sesquiterpenos aristoloquenos. Porém, a linhagem mutante foi selecionada para os estudos biossintéticos por produzir extratos menos complexos quimicamente devido à deleção da via biossintética de produção das botrylactonas. Os diversos experimentos mostraram que a aeração levou ao aumento da produção do sesquiterpeno **Bc 16**, enquanto a ausência de glicose permitiu uma melhor incorporação dos precursores biossintéticos enriquecidos isotopicamente. Estes resultados ilustram a importância da otimização das condições de cultivo em experimentos biossintéticos, pois a determinação da melhor condição de produção dos compostos alvo é fundamental para a obtenção de quantidades suficientes para as análises por RMN. Além disso, o alto custo dos precursores biossintéticos requer sua utilização de forma racional.

Os experimentos realizados com acetato de sódio marcado isotopicamente [CD_3COONa (D_3 , 99%)], [CH_3COONa ($1\text{-}^{13}\text{C}$, 99%)] e [CH_3COONa ($2\text{-}^{13}\text{C}$, 99%)] demonstraram indubitavelmente que os sesquiterpenos aristoloquenos produzidos pelo fungo *B. cinerea* B05-10 cnd15 são biossintetizados pela via do mevalonato como uma rota de primeira escolha, de acordo com os relatos de biossíntese de outros terpenos para fungos na literatura. O experimento com glicose deuterada [$\text{HOCD}_2(\text{CHOH})_4\text{CHO}$ ($6,6\text{-D}_2$, 99%)] sugeriu que o fungo *B. cinerea* pode também utilizar a via alternativa DPX/MEP na biossíntese de sesquiterpenos aristoloquenos. Porém, estes dados não são conclusivos e experimentos adicionais são necessários para confirmação desta hipótese.

Os estudos da biossíntese dos compostos produzidos por *B. cinerea* são de extrema importância, pois podem auxiliar no desenho racional de novos agentes fungicidas com menor impacto ambiental, com base no planejamento de inibidores específicos para as rotas de produção de micotoxinas.

Referências Bibliográficas

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, SAMUEL, B. (United State) OHNO, T. **Combined immunotherapy of fusion cells and interleukin-12 for treatment of cancer**. WO/2005/079271. 01. Sept. 2005.

ACERO, F. J. F.; CARBÚ, M.; EL-AKHAL, M. R.; GARRIDO, C.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, V. E.; CANTORAL, J. M. Development of proteomics-based fungicides: new strategies for environmentally friendly control of fungal plant diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 795-816, 2011.

AFKHAMI, M. E.; RUDGERS, J. Endophyte-mediated resistance to herbivores depends on herbivore identity in the wild grass *Festuca subverticillata*. **Environmental Entomology**, v. 38, n. 4, p. 1086-1095, 2009.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 2005. 922 p.

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**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2010.

AMIR, S.; HAFIDI, M.; LEMEE, L.; MERLINA, G.; GUIRESSE, M.; PINELLI, E.; REVEL, J. C.; BAILLY, J. R.; AMBLES, A. Structural characterization of humic acids, extracted from sewage sludge during composting, by thermochemolysis-gas chromatography-mass spectrometry. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 410-422, 2006.

ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI, W.; AGUILAR-VIDOSO, 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**, v.47, n. 3, p. 229-236, 2001.

ASADOLLAHI, M. A.; MAURY, J.; MOLLER, K.; NIELSEN, K. F.; SCHALK, M.; CLARK, A.; NIELSEN, J. Production of plant sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of ERG9 repression on sesquiterpene biosynthesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 3, p. 666-677, 2008.

ASHIHARA, H.; CROZIER, A.; KOMAMINE, A. **Plant metabolism and biotechnology**. Chichester, Reino Unido: J. Wiley & Sons, 2011. 420 p.

BACON, C. W.; WHITE JR., J. F. **Microbial endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000. 487 p.

BANASIK, M.; KOMURA, H.; SHIMOYAMA, M.; UEDA, K. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(adp-ribosyl)transferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 3, p. 1569-1575, 1992.

BANDARA, W. M. M. S.; SENEVIRATNE, G.; KULASOORIYA, S. A. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Biosciences**, v. 31, n. 5, p. 645-650, 2006.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa, 1991. v. 3, 326 p.

BEEVER, R. E.; WEEDS, P. L. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: ELAD Y, WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P.; DELAN, N. (Eds). **Botrytis: biology, pathology and control**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 29-52, 2004.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 1-26, 2005.

BERGERON, R. J.; MCMANIS, J. S. The total synthesis of desferrioxamines E and G. **Tetrahedron**, v. 46, n. 17, p. 5881-5888, 1990.

BERGERON, R. J.; PEGRAM, J. J. An efficient total synthesis of desferrioxamine B. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 3131-3134, 1988.

BERNARDS, M. A. Plant natural products: a primer. **Canadian Journal of Zoology**, v. 88, n. 7, p. 601-614, 2010.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 2, p 196-268, 2011.

BORELLA, J. C.; LOPES, J. L. C.; VICHNEWSKI, W.; CUNHA, W. R.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora pseudovillosissima*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 671-676, 1998.

BORGES, K. B.; BORGES, W. S.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.77, n. 3, p. 669-674, 2007.

BORGES, W. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 1137-1163, 2009.

BORGES, W. S.; PUPO, M. T. Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophyte found in association with the medicinal plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 5, p. 929-934, 2006.

BORGAS, B.; HUGI, A. D.; RAYMOND, K. N. Isomerization and solution structures of desferrioxamine B complexes of Al^{3+} and Ga^{3+} . **Inorganic Chemistry**, v. 28, n. 18, p. 3538-3545, 1989.

BORSATO, M. L. C.; GRAEL, C. F. F.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 809-813, 2000.

BREMER, K. **Asteraceae: cladistics and classification**. Portland: Timber Press, 1994, 429 p.

- CANE, D. E.; IKEDA, H. Exploration and mining of the bacterial terpenome. **Accounts of Chemical Research**, 2012. In press.
- CARRINGTON, H. C. 1,2-Dihydro-2,2-dimethylquinazolines. The condensation of acetone with anthranilamide derivatives. **Journal of the Chemical Society**, p. 2527-2528, 1955.
- CARUSO, M.; COLOMBO, A. L.; CRESPI-PERELLINO, N.; FEDELI, L.; MALYSZKO, J.; PAVESI, A.; QUARONI, S.; SARACCHI, M.; VENTRELLA, G. Studies on a strain of *Kitasatospora* sp. paclitaxel producer. **Annals of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 89-102, 2000.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 42, n.15, p. 225-226, 1939.
- CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M. A. M.; TELOW, D. B.; STEVENS, D.; YAYER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**, v. 148, n. 9, p. 2675-2685, 2002.
- CASTILLO, U.; HARPER, J. K.; STROBEL, G. A.; SEARS, J.; ALES, K.; FORD, E.; LIN, J.; HUNTER, M.; MARANTA, M.; GE, H.; YAYER, D.; JENSEN, J. B.; PORTER, H.; ROBISON, R.; MILLAR, D.; HESS, W. M.; CONDRON, M.; TELOW, D. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, n. 2, p. 183-190, 2003.
- CASTILLO, U.; STROBEL, G. A.; MULLENBERG, K. Munumbicins E-4 and E-5: novel broad spectrum antibiotics from *Streptomyces* NRRL 3052. **FEMS Microbiology Letters**, v. 255, n. 2, p. 296-300, 2006.
- CERQUEIRA, M. B. S.; SOUZA, J. T.; JUNIOR, R. A.; PEIXOTO, A. B. F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas da *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica). **Ciência e Cultura**, v.39, n. 5/6, p. 551-553, 1987.
- CHAGAS, P. D. A. **Atividade anti-inflamatória e caracterização fitoquímica do chá e de diferentes extratos de *Tithonia diversifolia* (Asteraceae)**. Universidade de São Paulo, Dissertação (Mestrado) - FCFRP, Ribeirão Preto, 2010. 116 p.
- CHALLIS, G. L. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. **ChemBioChem**, v. 6, n. 4, p. 601-611, 2005.
- CHIN, Y. W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal**, v. 8, n. 2, p. 239-253, 2006.
- CHOQUER, M.; FOURNIER, E.; KUNZ, C.; LEVIS, C.; PRADIER, J. M.; SIMON, A.; VIAUD, M. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphagous pathogen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, n. 1, p. 1-10, 2007.
- CHOQUER, M.; ROBIN, G.; LE-PÊCHEUR, P.; GIRAUD, C.; LEVIS, C.; VIAU, M. Ku70 or Ku80 deficiencies in the fungus *Botrytis cinerea* facilitate targeting of genes that are hard to knock out in a wild-type context. **FEMS Microbiology Letters**, v. 289, p. 225-232, 2008.

- CHOU, S. C.; KU, Y. C.; WU, T. S. The constituents and their bioactivities of *Houttuynia cordata*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 11, p. 1227-1230, 2009.
- CLARDY, J.; FISCHBACH, M. A.; WALSH, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1541-1550, Dec., 2006.
- CLARDY, J.; WALSH, C. T. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829-837, 2004.
- COLLADO, I. G.; SÁNCHEZ, A. J. M.; HANSON, J. R. Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Natural Products Report**, v. 24, n. 4, p. 674-686, 2007.
- COLMENARES, A. J.; ALEU, J.; DURAN-PATRON, R.; COLLADO, I. G.; HERNANDEZ-GALAN, R. The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 5, p. 997-1005, 2002.
- CROSA, J. H.; WALSH, C. T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 2, p. 223-249, 2002.
- CZAPLEWSKI, L. G.; COLLINS, I.; BOYD, E. A.; BROWN, D.; EAST, S. P.; GARDINER, M.; FLETCHER, R.; HAYDON, D. J.; HENSTOCK, V.; INGRAM, P.; JONES, C.; NOULA, C.; KENNISON, L.; ROCKLEY, C.; ROSE, V.; THOMAIDES-BREARS, H. B.; URE, R.; WHITTAKER, M.; STOKES, N. R. Antibacterial alkoxybenzamide inhibitors of the essential bacterial cell division protein FtsZ. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 2, p. 524-527, 2009.
- DAENENS, P.; VAN BOVEN, M. The identification of quinazolinones on the illicit market. **Journal of Forensic Sciences**, v. 21, n. 3, p. 552-563, 1976.
- DALMAIS, B.; SCHUMACHER, J.; MORAGA, J.; PÊCHEUR, P. L.; TUDZYNSKI, B.; GONZALEZ, C. I.; VIAUD, M. The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 6, p. 564-579, 2011.
- DAS, A.; PRASAD, R.; SRIVASTAVA, A.; GIANG, P.H.; BHATNAGAR, K.; VARMA, A. Fungal siderophores: structure, functions and regulation. In: VARMA, A.; CHINCHOLKAR, S. B. (Eds). **Microbial siderophores**. Berlin: Springer Verlag, p. 1-40, 2007.
- DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. New York: Wiley, 2007. 585 p.
- DE LA ROSA, L. A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. **Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability**. New Delhi, India: John Wiley and Sons, 2010. 367 p.

DEIGHTON, N.; MUCKENSCHNABEL, I.; COLMENARES, A. J.; COLLADO, I. G.; WILLIAMSON, B. Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p. 689-692, 2001.

DELIGEORGOPOULOU, A.; ALLEMANN, R. K. Evidence for differential folding of farnesyl pyrophosphate in the active site of aristolochene synthase: a single-point mutation converts aristolochene synthase into an (*E*)- β -farnesene synthase. **Biochemistry**, v. 42, n. 25, p. 7741-7747, 2003.

DEMAIN, A. L. Why do microorganisms produce antimicrobials? In: **Fifty years of antimicrobials: past, prospective and future trends - Symposium 53**. Hunter, P. A.; Darby, G. K.; Russell, N. J. (Eds). Society of General Microbiology, Cambridge: Cambridge University Press, p. 205-228, 1995.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products; a biosynthetic approach**; 3rd ed. Chichester: Wiley, 2009. 539 p.

DICKSCHAT, J. S. Isoprenoids in three-dimensional space: the stereochemistry of terpene biosynthesis. **Natural Product Report**, v. 28, n. 12, p. 1917-1936, 2011.

DIMKPA, C.; SVATOS, A.; MERTEN, D.; BÜCHEL, G.; KOTHE, E. Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 163-172, 2008.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. 2nd ed. v.1, Eching: IHW-Verlag, 1993. 860 p.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, n. 4, p. 1893-1902, 2004.

DURBECQ, V.; SAINZ, G.; OUDJAMA, Y.; CLANTIN, B.; BOMPARD-GILLES, C.; TRICOT, C.; CAILLET, J.; STALON, V.; DROOGMANS, L.; VILLERET, V. Crystal structure of isopentenyl diphosphate: dimethylallyl diphosphate isomerase. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 7, p. 1530-1537, 2001.

ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P.; DELEN, N. **Botrytis: biology, pathology and control**. Kluwer academic, Dordrecht: The Netherlands, 2004. 404 p.

ESSÉN, S. A.; JOHNSON, A.; BYLUND, D.; PEDERSEN, K.; LUNDSTRÖM, U. S. Siderophore production by *Pseudomonas stutzeri* under aerobic and anaerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 18, p. 5857-5864, 2007.

EYBERGER, A. L., DONDAPATI, R.; PORTER, J. R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1121-1124, 2006.

EZRA, D.; CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; CONDRON, M. A. M.; TELOW, D. B.; SEARS, J.; MARANTA, M.; HUNTER, M.; WEBER, B.; YAVAR, D. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate

Streptomyces sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp.. **Microbiology**, v. 150, n. 4, p. 785-793, 2004.

FARALDOS, J. A.; KARIUKI, B.; ALLEMANN, R. K. Intermediacy of eudesmane cation during catalysis by aristolochene synthase. **The Journal Organic Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 1119-25, 2010.

FEHLHABER, H. W.; GEIPAL, R.; MERCKER, H. J.; TSCHESCHE, R.; WELMAR, K. Botrydial, a sesquiterpene antibiotic from the culture solution of the fungus *Botrytis cinerea*. **Chemische Berichte**, v. 107, n. 5, p. 1720-1730, 1974.

FENG, N.; YE, W.; WU, P.; HUANG, Y.; LIN, L.; WEI, X. Amides produced by *Streptoverticillium morookaense*. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 2, p. 151-153, 2007.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development-the failure of success? **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1497-1503, 2006.

FIEDLER, H. P.; GOODFELLOW, M. Alkaliphilic streptomycetes as a source of novel secondary metabolites. **Microbiology Australia**, v. 25, p. 27-29, May, 2004.

FORCAT, S.; ALLEMANN, R. K. Stabilisation of transition states prior to and following eudesmane cation in aristolochene synthase. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 4, n. 13, p. 2563-2567, 2006.

FOX, J. L. The business of developing antibacterials **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1521-1528, 2006.

FROHWEIN, Y. Z.; DAFNI, Z.; FRIEDMAN, M.; MATELES, R. I. New metabolites of *Streptomyces alboniger*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 679-680, 1973.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 3, p. 306-317, 2008.

GASSON, M. J.; KITAMURA, Y.; MCLAUCHLAN, W. R.; NARBAD, A.; PARR, A. J.; PARSONS, E. L. H.; PAYNE, J.; RHODES, M. J. C.; WALTONI, N. J. Metabolism of ferulic acid to vanillin. A bacterial gene of the enoyl-SCoA hydratase/isomerase superfamily encodes an enzyme for the hydration and cleavage of a hydroxycinnamic acid SCoA thioester. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 7, p. 4163-4170, 1998.

GHADIN, N.; ZIN, N. M.; SABARATNAM, V.; BADYA, N.; BASRI, D. F.; LIAN, H. H.; SIDIK, N. M. Isolation and characterization of a novel endophytic *Streptomyces* SUK 06 with antimicrobial activity from Malaysian plant **Asian Journal of Plant Sciences**, v.7, n. 2, p. 189-194, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones and flavonoids in the Brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and -MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their

simultaneous analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p.1193-1204, 2008.

GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M. D.; KANASHIRO, A; ALMEIDA, M. C.; VALIM, Y. M. L.; LOPES, J. L. C.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of di-C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). **Planta Medica**, v. 71, n. 1, p. 3-6, 2005.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, p. 189-216, Oct., 1983.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T.; MORDARSKI, M. **Actinomycetes in Biotechnology**, London: Academic Press, 1988. 501 p.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. **Biodiversidade: um enfoque químico-biológico**. Rio de Janeiro: Ed. UFRJ, 1996. 267 p.

GOVINDACHARI, T. R.; MOHAMED, P. A.; PARTHASARATHY, P. C. Ishwarane and aristolochene, two sesquiterpene hydrocarbons from *Aristolochia indica*. **Tetrahedron**, v. 26, n. 2, p. 615-619, 1970.

GOWDA, R. R.; CHAKRABORTY, D. Fe^{III}-catalyzed synthesis of primary amides from aldehydes. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2011, n. 12, p. 2226-2229, 2011.

GU, J. Q.; GILLS, J. J.; PARK, E. J.; GREENWOOD, E. M.; HAWTHORNE, M. E.; AXELROD, F.; CHAVEZ, P. I.; FONG, H. H. S.; MEHTA, R. G.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potencial cancer chemopreventive activity. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 4, p. 532-536, 2002.

GUAN, S. H.; SATLER, I.; LIN, W. H.; GUO, D. A.; GRABLEY, S. p-aminoacetophenonic acids produced by a mangrove endophyte: *Streptomyces griseus* subsp.. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 8, p. 1198-1200, 2005.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; GOLDMAN, G. H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O. H.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 134-144, 2008.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.

GURNEY, K. A.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of 1-N-methylalbonoursin by an endophytic *Streptomyces* sp. **Jornal of Natural Products**, v. 56, n. 7, p. 1194-1198, 1993.

- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.
- HASHIBA, T.; NARISAWA, K. The development and endophytic nature of the fungus *Heteroconium chaetospora*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, n. 2, p. 191-196, 2005.
- HAYAKAWA, M.; NONOMURA, H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. **Journal of Fermentation Technology**, v. 65, n. 5, p. 501-509, 1987.
- HELI, H.; MIRTORABI, S.; KARIMIAN, K. Advances in iron chelation: an update. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 21, n. 6, p. 819-856, 2011.
- HIGASHI, R. M.; FAN, T. W.M.; LANE, A. N. Association of desferrioxamine with humic substances and their interaction with cadmium (II) as studied by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analyst**, v. 123, n. 5, p. 911-918, 1998.
- HOLMES, J. L.; BENOIT, F. The mass spectra of benzamide and thiobenzamide. **Organic Mass Spectrometry**, v. 5, n. 5, p. 525-530, 1971.
- HORNSEY, I. **The Chemistry and Biology of Winemaking**. Cambridge, UK: RSC Publishing, 2007. 316 p.
- HOURL, M. J.; HUANG, L. J.; KUO, S. C.; XIA, Y.; BASTOW, K.; NAKANISHI, Y.; HAMEL, E.; LEE, K. H. 6-alkylamino- and 2,3-dihydro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinazolinones and related compounds: Their synthesis, cytotoxicity, and inhibition of tubulin polymerization. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 23, p. 4479-4487, 2000.
- HU, Y.; CHOU, W. K. W.; HOPSON, R.; CANE, D. E. Genome mining in *Streptomyces clavuligerus*: expression and biochemical characterization of two new cryptic sesquiterpene synthases. **Chemistry & Biology**, v. 18, n. 1, p. 32-37, 2011.
- IGARASHI, Y.; MIURA, S. S.; FUJITA, T.; FURUMAI, T. Pterocidin, A cytotoxic compound from the endophytic *Streptomyces hygroscopicus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 59, n. 3, p. 193-195, 2006.
- IGARASHI, Y.; TRUJILLO, M. E.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; YANASE, S.; MIYAGA, S.; OBATA, T.; SAKURAI, H.; SAIKI, I.; FUJITA, T.; FURUMAI, T. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupine* sp. nov. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 13, p. 3702-3705, 2007.
- INAHASHI, Y.; MATSUMOTO, A.; ŌMURA, S.; TAKAHASHI, Y. *Streptosporangium oxazolinicum* sp. nov., a novel endophytic actinomycete producing new antitrypanosomal antibiotics, spoxazomicins. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 297-302, April, 2011.
- JAROSZEWSKI, J. W.; STAERK, D.; HOLM-MÓLLER, S. B.; JENSEN, T. H.; FRANZYK, H.; SOMANADHAN, B. *Naravelia zeylanica* occurrence of primary benzamides in flowering plants. **Natural Product Research**, v. 19, n. 3, p. 291-294, 2005.

JARVIS, W. R. Pathology. In: ***Botryotinia and Botrytis Species: Taxonomy, Physiology, and Pathogenicity***. Canada Department of Agriculture, Monograph, Ottawa, n. 15, 1977. 62 p.

JARVIS, W. R. Epidemiology. In: COLEY-SMITH, J. R.; VERHOEFF, K.; JARVIS, W. R. (Eds). **The biology of Botrytis**. London: Academic Press, p. 219-250, 1980.

JELLEN, H. H. Volatile sesquiterpene hydrocarbons characteristic for *Penicillium roqueforti* strains producing PR toxin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6569-6574, 2002.

JIANG, H.; LUAN, Z.; WANG, J.; XIE, J. Neuroprotective effects of iron chelator desferal on dopaminergic neurons in the substantia nigra of rats with iron-overload. **Neurochemistry International**, v. 49, n. 6, p. 605-609, 2006.

JIANG, N.; RAGAUSKAS, A. J. Selective aerobic oxidation of activated alcohols into acids or aldehydes in ionic liquids. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 18, p. 7030-7033, 2007.

JOHNS, S. R.; LAMBERTON, J. A. Isolation of simple acid amides from *Allophylus cobbe* (Sapindaceae), *Homalium foetidum* (Flacourtiaceae), and from an *Aglaia* species (Meliaceae). **Australian Journal Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 1315-1316, 1969.

JONES, K. L. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. **Journal of Bacteriology**, v. 57, n. 2, p. 141-145, 1949.

JOSEPH, B.; PRIYA, R. M. Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: a review. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, n. 3, p. 291-309, 2011.

KALINOVSKAYA, N. I.; ROMANENKO, L. A.; IRISAWA, T.; ERMAKOVA, S. P.; KALINOVSKY, A. I. Marine isolate *Citricoccus* sp. KMM 3890 as a source of a cyclic siderophore nocardamine with antitumor activity. **Microbiological Research**, v. 166, n. 8, p. 654-661, 2011.

KELLER, M.; ZENGLER, K. Tapping into microbial diversity. **Nature Review Microbiology**, v. 2, p. 141-150, Feb., 2004.

KERGOMARD, A.; RENARD, M. F. Action of two strains of *Streptomyces* on aromatic substrates. **Agricultural Biology and Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2913-2914, 1986.

KIM, N.; SHIN, J. C.; KIM, W.; HWANG, B. Y.; KIM, B. S.; HONG, Y. S.; LEE, D. Cytotoxic 6-alkylsalicylic acid from the endophytic *Streptomyces laceyi*. **The Journal of Antibiotics**, v. 59, n. 12, p. 797-800, 2006.

KLEMM, L. H.; WEAKLEY, T. J. R.; GILBERTSON, R. D.; SONG, Y. H. Definitive structural assignment of condensation products from anthranilamide and 3-amino-2-carbamoylthiophene with ketones. Formation of tetrahydroquinazolinones and their thiophene isosteres. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 35, n. 6, p. 1269-1273, 1998.

KOGEJ, T.; WHEELER, M. H.; RIZNER, T. L.; GUNDE-CIMERMAN, N. Evidence for 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, n. 2, p. 203-209, 2004.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite - what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 4, p. 358-363, 2006.

KROGSGAARD-LARSEN, P.; LILJEFORS, T.; MADSEN, U. **A textbook of drug design and development**, 2nd ed. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1996. 543 p.

KUMAR, A.; AKULA, H. K.; LAKSHMAN, M. K. Simple synthesis of amides and Weinreb amides using PPh₃ or polymer-supported PPh₃ and iodine. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2010, n. 14, p. 2709-2715, 2010.

KUO, Y. H.; CHEN, C. H. Sesquiterpenes from the leaves of *Tithonia diversifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 6, p. 827-828, 1998.

KUSARI, S.; LAMSHÖFT, M.; ZÜHLKE, S.; SPITELLERACTIVITY, M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 2, p. 159-162, 2008.

KUSARI, S.; ZÜHLKE, S.; KOSUTH, J.; CELLAROVA, E.; SPITELLER, M. Light-independent metabolomics of endophytic *Thielavia subthermophila* provides insight into microbial hypericin biosynthesis. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 10, p. 1825-1835, 2009.

KUSTER, E.; WILLIAMS, S. T. Selection of media for isolation of streptomycetes. **Nature**, v. 202, p. 928-929, May, 1964.

LECHEVALIER, H. A.; LECHEVALIER, M. P. Biology of the actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v. 21, p. 71-100, 1967.

LEE, D. U.; MAYER, K. K.; WOLFGANG, W. Mass spectrometric investigations of henylacetic acid derivatives, III: fragmentations of meta- and para-substituted phenylacetamides after electron impact. **Archiv der Pharmazie**, v. 321, n. 6, p. 315-320, 1988.

LI, J.; LU, C.; SHEN, Y. Macrolides of the bafilomycin family produced by *Streptomyces* sp. CS. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, p. 595-599, Sept., 2010.

LI, H.; QING, C.; ZHANG, Y.; ZHAO, Z. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 8/9, p. 1515-1519, 2005.

LI, H. Y.; MATSUNAGA, S.; FUSEYANI, N. Simple antifungal metabolites from a marine sponge, *Halichondria* sp.. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 107, n. 2, p. 261-264, 1994.

- LOMBARD, J.; MOREIRA, D. Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 1, p. 87-99, 2011.
- LOPES, A. A.; PUPO, M. T. Biosynthesis of aphidicolin proceeds via the mevalonate pathway in the endophytic fungus *Nigrospora sphaerica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 1, p. 80-85, 2011.
- LOPES, N. P. A essência da arnica. **Revista Pesquisa FAPESP**, v. 64, p. 42-44, maio, 2001.
- LUO, X.; QI, S.; TIAN, X.; YIN, H.; GAO, C.; ZHANG, C. Chemical constituents of fermentation broth in *Salinispora pacifica*. **Zhongcaoyao**, v. 40, n. 11, p. 1710-1712, 2009.
- LU, C.; SHEN, Y. Two new macrolides produced by *Streptomyces* sp. CS. **The Journal of Antibiotic**, v. 57, n. 9, p. 597-600, 2004.
- LU, C.; SHEN, Y. The new macrolide antibiotic with antitumor activity produced by *Streptomyces* sp. CS, a commensal microbe of *Maytenus hookeri*. **The Journal of Antibiotic**, v. 56, n. 4, p. 415-418, 2003.
- MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES-FILHO, E.; MOITINHO, M. L. R.; SANTOS, L. S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n. 2, p. 280-283, 2005.
- MASKEYA, R. P.; HUTHA, F.; GRÜN-WOLLNYB, I.; LAATSCHA, H. 2-Alkyl-3,4-dihydroxy-5-hydroxymethylpyridine derivatives: New natural vitamin B6 analogues from a terrestrial *Streptomyces* sp. **Zeitschrift für Naturforschung. B, A Journal of Chemical Sciences**, v. 60, n. 1, p. 63-66, 2005.
- MASTELIC, J.; MILOS, M.; KUSTRAK, D.; RADONIC, A. The essential oil and glycosidically bound volatile compounds of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. **Croatica Chemica Acta**, v. 71, n. 1, p.147-154, 1998.
- MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.71, n. 3, p. 413-451, 2007.
- MILLER, D. J.; ALLEMANN, R. K. Sesquiterpene synthases: passive catalysts or active players? **Natural Product Reports**, v. 29, n. 1, p. 60-71, 2012.
- MISAWA, N. Pathway engineering for functional isoprenoids. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 627-633, 2011.
- MORAGA, J.; PINEDO, C.; DURÁN-PADRÓN, R.; COLLADO, G. I.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R. Botrylactone: new interest in na old molecule - review of its absolute configuration and related compounds. **Tetrahedron**, v. 67, n. 2, p. 417-420, 2011.
- MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1/2, p. 55-63, 1983.

MOUSTAFA, A. M. Y.; KOUAM, S. F.; KULSOOM, A.; EJAZ, A.; ALI, S.; ANJUM, S.; CHOUDHARY, M. I. Phytochemical investigation and biological evaluation of *Schinus terebinthifolius*. **Research Journal of Phytochemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2007.

NARBAD, A.; GASSON, M. J. Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel CoA-dependent pathway in a newly isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. **Microbiology**, v. 144, p. 1397-1405, 1998.

NCANGO, D. M.; POHL, C. H.; VAN WYK, P. W. J.; KOCK, J. L. F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) inhibit growth of yeast pathogens. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 9, p. 1123-1125, 2011.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard, 6th ed. NCCLS document M7-A6. NCCLS, Pennsylvania: Wayne, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5th ed. New York: W.H. Freeman, 2008. 1100 p.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, 2012. In press.

OKADA, K.; HASE, T. Cyanobacterial non-mevalonate pathway: (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase interacts with ferredoxin in *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 21, p. 20672-20679, 2005.

OWEN, N. L.; HUNDLEY, N. Endophytes - the chemical synthesizers inside plants. **Science Progress**, v. 87, n. 2, p. 79-99, 2004.

OWOYELE, V. B.; WURAOLA, C. O.; SOLADOYE, A. O.; OLALEYE, S. B. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Tithonia diversifolia* leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2-3, p. 317-321, 2004.

PARK, C. H.; KIM, K. H.; LEE, I. K.; LEE, S. Y.; CHOI, S. U.; LEE, J. H.; LEE, K. R. Phenolic constituents of *Acorus gramineus*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 8, p. 1289-1296, 2011.

PENNING, T. D.; ZHU, G. D.; GANDHI, V. B.; GONG, J.; LIU, X.; SHI, Y.; KLINGHOFER, V.; JOHNSON, E. F.; DONAWHO, C. K.; FROST, D. J.; BONTCHEVA-DIAZ, V.; BOUSKA, J. J.; OSTERLING, D. J.; OLSON, A. M.; MARSH, K. C.; LUO, Y.; GIRANDA, V. L. Discovery of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor 2-[(*R*)-2-methylpyrrolidin-2-yl]-1H-benzimidazole-4-carboxamide (ABT-888) for the treatment of cancer. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 514-523, 2009.

PERALTA-LEAL, A.; RODRÍGUEZ-VARGAS, J. M.; AGUILAR-QUESADA, R.; RODRÍGUEZ, M. I.; LINARES, J. L.; ALMODÓVAR, M. R.; OLIVER, F. J. PARP

inhibitors: New partners in the therapy of cancer and inflammatory diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, n. 1, p. 13-26, 2009.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: A first report. **Mycologia**, v. 85, n. 3, p. 362-364, 1993.

PEREIRA, P. S.; DIAS, D. A.; VICHNEWSKI, W.; NASI, A. M. T. T.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones from brazilian *Tithonia diversifolia*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1445-1448, 1997.

PÉREZ, H. I.; LUNA, H.; MANJARREZ, N.; SOLÍS, A. Microbiological resolution of chiral arylethyl carbinols by *Nocardia coralline*. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 18, p. 1467-1472, 2001.

PERRY, C. W.; KALNINS, M. V.; DEITCHER, K. H. Synthesis of lignans. I. nordihydroguaiaretic acid. **Journal of Organic Chemistry**, v. 37, n. 26, p. 4371-4376, 1972.

PFALLER, M. A.; BOYKEN L.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J. Stability of Mueller-Hinton agar supplemented with glucose and methylene blue for disk diffusion testing of fluconazole and voriconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1288-1289, 2004.

PINEDO, C.; WANG, C. M.; PRADIER, J. M.; DALMAIS, B.; CHOQUER, M.; LE-PÊCHEUR, P.; MORGANT, G.; COLLADO, I. G.; CANE, D. E.; VIAUD, M. Sesquiterpene synthase from the botrydial biosynthetic gene cluster of the phytopatogen *Botrytis cinerea*. **ACS Chemical Biology**, v. 3, p. 791-801, 2008.

POSPÍSIL, S.; PRIKRYLOVÁ, V.; NEMECEK, J.; SPÍZEK, J. Oxidation and amidation of salicylate by *Streptomyces* species. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 867-869, 1996.

PULLEN, C.; SCHMITZ, P.; MEURER, K.; BAMBERGER, D. D. V.; LOHMANN, S.; FRANÇA, S. D. C.; GROTH, I.; SCHLEGEL, B.; MÖLLMANN, U.; GOLLMICK, F.; GRÄFE, U.; LEISTNER, E. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in wood of Celastraceae. **Planta**, v. 216, n. 1, p. 162-167, 2002.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In: TAFT, C. A. (Ed), **Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry**, Kerala, India: Research Signpost, 2006. p. 51-78.

PURI, S. C.; NAZIR, A.; CHAWLA, R.; ARORA, R.; RIYAZ-UL-HASAN, S.; AMNAA, T.; AHMEDA, B.; VERMA, V.; SINGH, S.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; SHARMA, R. K.; QAZI, G. N. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 494-510, 2006.

PURI, S. C.; VERMA, V.; AMNA, T.; QAZI, G. N.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1717-1719, 2005.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J. H.; XU, L. H.; LI, W. J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 457-473, 2011.

RAJA, A.; PRABAKARANA, P. Actinomycetes and drugs-an overview. **American Journal of Drug Discovery and Development**, v. 1, n. 2, p. 75-84, 2011.

RANU, B. C.; SARKAR, A.; CHAKRABORTY, R. Reduction of azides with zinc borohydride. **Journal Organic Chemistry**, v. 59, n. 15, p. 4114-4116, 1994.

REINO, J. L.; DURAN-PATRON, R. M.; DAOUBI, M.; COLLADO, I. G.; HERNANDEZ-GALAN, R. Biosynthetic studies on the botcinolide skeleton: new hydroxylated lactones from *Botrytis cinerea*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 2, p. 562-565, 2006.

RIZZO, I. L.; VARSAVKY, E.; HAIDUKOWSKI, M.; FRADE, H. Macrocyclic trichothecenes in *Baccharis coridifolia* plants and endophytes and *Baccharis artemisioides* plants. **Toxicon**, v. 35, n. 5, p. 753-757, 1997.

ROBINSON, H. **Generic and sub-tribal classification of American Vernoniae**. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 1999. v. 89, 116 p.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 284-289, 2001.

RODRÍGUEZ-NORIEGA, E.; SEAS, C.; GUZMÁN-BLANCO, M.; MEJÍA, C.; ALVAREZ, C.; BAVESTRELLO, L.; ZURITA, J.; LABARCA, J.; LUNA, C. M.; SALLES, M. J.; GOTUZZO, E. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. e560-e566, 2010.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.

ROSTAMI, A.; TAVAKOLI, A. Sulfamic acid as a reusable and green catalyst for efficient and simple synthesis of 2-substituted-2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-ones in water or methanol. **Chinese Chemical Letters**, v. 22, n. 11, p. 1317-1320, 2011.

SAEED, A.; SHAHEEN, U.; BOLTE, M. Synthesis, characterization and crystal structure of some novel 1-aryl-2-thioxo-2,3-dihydro-1H-quinazolin-4-ones. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 57, n. 1, p. 82-88, 2010.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S. H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.

SAKAMOTO, H. T.; FLAUSINO, D.; CASTELLANO, E. E.; STARK, C. B. W.; GATES, P. J.; LOPES, N. P. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 5, p. 693-695, 2003.

SANTOS, M. D.; NETO, L. G.; ALBARELLA, L.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 545-549, 2005.

SANTOS, M. D. **Isolamento dos constituintes polares e avaliação da atividade antinociceptiva das raízes de *Lychnophora ericoides* Mart.**. Universidade de São Paulo, Dissertação (Mestrado) - FCFRP, Ribeirão Preto, 2002. 86 p.

SASSO, S.; POHNERT, G.; LOHR, M.; MITTAG, M.; HERTWECK, C. Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. **FEMS Microbiology Reviews**, 2012. In press.

SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 315-340, 2004.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; AUST, H. J.; ROMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SCHUSTER, A.; STOKES, S.; PAPASTENGIOU, F.; CASTRO, V.; POVEDA, L.; JAKUPOVIC, J. Sesquiterpene lactones from two *Tithonia* species. **Phytochemistry**, v. 31, n. 9, p. 3139-3141, 1992.

SELOSSE, M. A.; BAUDOUIN, E.; VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants, **Comptes Rendus Biologies**, v. 327, n. 7, p. 639-648, 2004.

SELVAM, T. P.; KUMAR, P. V. Quinazoline marketed drugs - a review. **Research in Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 1-21, 2011.

SHAABAN, M. A. **Bioactive secondary metabolites from marine and terrestrial bacteria: isoquinolinequinones, bacterial compounds with a novel pharmacophore**. Göttingen University. PhD thesis, Germany, 2004. 388p.

SHAABAN, M.; MASKEY, R. P.; WAGNER-DÖBLER, I.; LAATSCH, H. Pharacine, a natural *p*-cyclophane and other indole derivatives from *Cytophaga* sp. strain AM13.11. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 11, p. 1660-1663, 2002.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.

SOLIMAN, S. S. M.; TSAO, R.; RAIZADA, M. N. Chemical inhibitors suggest endophytic fungal paclitaxel is derived from both mevalonate and non-mevalonate-like pathways. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 12, p. 2497-2504, 2011.

SORENSEN, D.; RADITSIS, A.; TRIMBLE, L. A.; BLACKWELL, B. A.; SUMARAH, M. W.; MILLER, J. D. Isolation and structure elucidation by LC-MS-SPE/NMR: PR toxin- and

cuspidatol-related eremophilane sesquiterpenes from *Penicillium roqueforti*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 1, p. 121-123, 2007.

STAATS, M.; VAN BAARLEN, P.; VAN KAN, J. A. L. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 2, p. 333-346, 2005.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 479-491, 1997.

STANFORD RES INST INT (United States) LEE, W. W.; BROWN, M. J.; GRANDE, E. W.; MARTINEZ, A. P. **Benzamide and nicotinamide radiosensitizers**. WO 8606628 (A1), 20. Nov. 1986.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

STOLL, A.; BRACK, A.; RENZ, J. Nocardamin, ein neues antibioticum aus einer *Nocardia*. **Schweizerische Zeitschrift fur allgemeine Pathologie und Bakteriologie**, v. 14, n. 2, p. 225-233, 1951.

STOWE, B. B.; YAMAKI, T. The history and physiological action of the gibberellins. **Annual Reviews of Plant Physiology**, v. 8, p. 181-216, 1957.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G. A. Rainforest Endophytes and Bioactive Products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

STROBEL, G. A.; YANG, X. S.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R. S.; HESS, W. M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus Wallachiana*. **Microbiology**, v. 142, n. 2, p. 435-440, 1996.

SWENSEN, S. M.; BENSON, D. R. Evolution of actinorhizal host plants and *Frankia* endosymbionts. In: PAWLOWSKI, K.; NEWTON, W. E. (Eds). **Nitrogen-fixing actinorhizal symbioses**. Nitrogen fixation: origins, applications and research progress. Netherlands: Springer, v. 6, p. 73-98, 2008.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

TAN, H. M.; CAO, L. X.; HE, Z. F.; SU, G. J.; LIN B.; ZHOU, S. N. Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities Against *Ralstonia solanacearum* in vitro. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1275-1280, 2006.

TANI, H.; KOSHINO, H.; SAKUNO, E.; CUTLER, H. G.; NAKAJIMA, H. Botcinins E and F and botcinolide from *Botrytis cinerea* and structural revision of botcinolides. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 4, p. 722-725, 2006.

TANI, H.; KOSHINO, H.; SAKUNO, E.; NAKAJIMA, H. Botcinins A, B, C, and D, metabolites produced by *Botrytis cinerea*, and their antifungal activity against *Magnaporthe grisea*, a pathogen of rice blast disease. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1768-1772, 2005.

TAYLOR, T. N.; KRINGS, M.; GALTIER, J.; DOTZLER, N. Fungal endophytes in *Astromyelon*-type (Sphenophyta, Equisetales, Calamitaceae) roots from the Upper Pennsylvanian of France. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 171, p. 9-18, fev, 2012.

TEN HAVE, A. **The *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase gene family**, The University of Wageningen, PhD thesis, Netherlands, 2000. 128 p.

TONGMA, S.; KOBAYASHI, K.; USUI, K. Allelopathic activity of Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*) in soil. **Weed Science**, v. 46, n. 4, p. 432-437, 1998.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; TAECHOWISAN, T.; WANBANJOB, A.; THADANITI, S.; TAYLOR, W. C. Lansai A-D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp. SUC 1. **Tetrahedron**, v. 64, n. 32, p. 7583-7586, 2008.

UÇAR, G.; BALABAN, M. The composition of volatile extractives from the wood of *Juniperus excelsa*, *Juniperus foetidissima* and *Juniperus oxycedrus*. **Holz als Roh- und Werkstoff**, v. 60, n. 5, p. 356-362, 2002.

UEKI, M.; SUZUKI, R.; TAKAMATSU, S.; TAKAGI, H.; URAMOTO, M.; IKEDA, H.; OSADA, H. Nocardamin production by *Streptomyces avermitilis*. **Actinomycetologica**, v. 23, n. 2, p. 34-39, 2009.

VEDULA, L. S.; JIANG, J.; ZAKHARIAN, T.; CANE, D. E.; CHRISTIANSON, D. W. Structural and mechanistic analysis of trichodiene synthase using sitedirected mutagenesis: probing the catalytic function of tyrosine-295 and the asparagine-225/serine-229/glutamate-233-Mg²⁺_B motif. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 469, n. 2, p. 184-194, 2008.

VELCHEVA, E.A.; STAMBOLIYSKA, B.A. Structural changes caused by the conversion of 2-hydroxybenzamide (salicylamide) into the oxyanion. **Journal of Molecular Structure**, v. 875, n. 1-3, p. 264-271, 2008.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G.F.; CHATER, K. F.; VAN SINDEREN, D. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 495-548, 2007.

VERMA, V. C.; GOND, S. K.; KUMAR, A.; MISHRA, A.; KHARWAR, R. N.; GANGE, A. C. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss : isolation, diversity, and antimicrobial activity. **Microbial Ecology**, v. 57, n. 4, p. 749-756, 2009.

VERMA, V. C.; SINGGH, S. K.; PRAKASH, S. Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss.. **Journal of Basic Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 550-556, 2011.

VICUÑA, R.; GONZÁLEZ, B.; MOZUCH, M. D.; KIRK, T. K. Metabolism of lignin model compounds of the arylglycerol- β -aryl ether type by *Pseudomonas acidovorans* D₃. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 11, p. 2605-2609, 1987.

WAKSMAN, S. A.; WOODRUFF, H. B. The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease-producing bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 40, n. 4, p. 581-600, 1940.

WANG, C. M.; HOPSON, R.; LIN, X.; CANE, D. E. Biosynthesis of the sesquiterpene botrydial in *Botrytis cinerea*. mechanism and stereochemistry of the enzymatic formation of presilphiperfolan-8 β -ol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 24, p. 8360-8361, 2009.

WANG, Y.; ZHANG, Z. S.; RUAN, J. S.; WANG, Y. M.; ALI, S. M. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 178-187, 1999.

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. **Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation**. 4th ed., Chichester: J. Wiley & Sons, 2007. 818 p.

WEI, G.; ZHU, N.; ZENG, Y.; SHEN, Y.; ZHAO, P. Chemical constituents from endophytic *Streptomyces* sp. W5 isolated from *Trewia nudiflora* L.. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 249-253, 2010.

WELMAR, K.; TSCHESCHE, R.; BREITMAIER, E. Botrylactone, a new antibiotic from the culture solution of the fungus *Botrytis cinerea*. **Chemische Berichte**, v. 112, n. 11, p. 3598-3602, 1979.

WENDT, K. U.; SCHULZ, G. E. Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes. **Structure**, v. 6, n. 2, p. 127-133, 1998.

WHEELER, M. H.; ABRAMCZYK, D.; PUCKHABER, S. L.; NARUSE, M.; EBIZUKA, Y.; FUJII, I.; SZANISZLO, P. J. New biosynthetic step in the melanin pathway of *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*: evidence for 2-acetyl-1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene as a novel precursor. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 10, p. 1699-1711, 2008.

WHEELER, M. H.; BRUTON, B. D.; PUCKHABER, L. S.; ZHANG, J.; STIPANOVIC, R. D. Identification of 1,8-dihydroxynaphthalene melanin in *Monosporascus cannonballus* and the analysis of hexaketide and pentaketide compounds produced by wild-type and pigmented isolates of the fungus. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 4113-4120, 2004.

WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, B.; TUDZYNSKI, P.; VAN KAN, J. A. L. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 561-580, 2007.

WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; DANWISSETKANJANA, K.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 265-272, 2004.

WOLOSHUK, C. P.; SISLER, H. D.; TOKOUSBALIDES, M. C.; DUTKY, S. R. Melanin biosynthesis in *Pyricularia oryzae*: site of tricyclazole inhibition and pathogenicity of melanin-deficient mutants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 14, n. 3, p.256-264, 1980.

YAMANAKA, K.; OIKAWA, H.; OGAWA, H. O.; HOSONO, K.; SHINMACHI, F.; TAKANO, H.; SAKUDA, S.; BEPPU, T.; UEDA, K. Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. **Microbiology**, v. 151, n. 9, p. 2899-2905, 2005.

YAN, L. L.; HAN, N. N.; ZHANG, Y. Q.; YU, L. Y.; CHEN, J.; WEI, Y. Z.; LI, Q. P.; TAO, L.; ZHENG, G. H.; YANG, S. E.; JIANG, C. X.; ZHANG, X. D.; HUANG, Q.; HABDIN, X.; HU, Q. B.; LI, Z.; LIU, S. W.; ZHANG, Z. Z.; HE, Q. Y.; SI, S. Y.; SUN, C. H. Antimycin A18 produced by an endophytic *Streptomyces albidoflavus* isolated from a mangrove plant. **The Journal of Antibiotics**, v. 63, p. 259-261, May, 2010.

YANG, X.; ZHANG, L.; GUO, B.; GUO, S. Preliminary study of vincristine-endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. **Zhongcaoyao**, v. 35, n. 1, p. 79-81, 2004.

YU, Z.; ZHAO, L. X.; JIANG, C. L.; DUAN, Y.; WONG, L.; CARVER, K. C.; SCHULER, L. A.; SHEN, B. Bafilomycins produced by an endophytic actinomycete *Streptomyces* sp. YIM56209. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 159-162, jan, 2011.

ZACCHINO, S. A.; LÓPEZ, S. N.; PEZZENATI, G. D.; FURLÁN, R. L.; SANTECCHIA, C. B.; MUÑOZ, L.; GIANNINI, F. A.; RODRÍGUEZ, A. M.; ENRIZ, R. D. In vitro evaluation of antifungal properties of phenylpropanoids and related compounds acting against dermatophytes. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 10, p. 1353-1357, 1999.

ZDERO, C.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F. Diterpenes and other constituents from *Pteronia* species. **Phytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 1231-1245, 1990.

ZHANG, L.; DEMAINE, A. L. **Natural products: drug discovery and therapeutic medicine**. Totowa: Humana Press, 2005. 382 p.

ZHANG, X. P.; PEI, Y. H.; LIU, M. S.; KANG, S. L.; ZHANG, J. Q. Chemical constituents from the leaves of *Cerbera manghas*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 2, p. 109-111, 2010.

ZHAO, K.; PENTTINEN, P.; GUAN, T.; XIAO, J.; CHEN, Q.; XU, J.; LINDSTROM, K.; ZHANG, L. L.; ZHANG, X. P.; STROBEL, G. A. The diversity and antimicrobial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi Plateau, China. **Current Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 182-190, 2011.

ZHAO, P. JI.; FAN, L. M.; LI, G. H.; ZHU, N.; SHEN, Y. M. Antibacterial and antitumor macrolides from *Streptomyces* sp. Is9131. **Archives of Pharmacal Research**, v. 8, n. 11, p. 1228-1232, 2005.

ZHAO, P.; LI, G. H.; SHEN, Y. M. New chemical constituents from the endophyte *Streptomyces* species LR4612 cultivated on *Maytenus hookeri*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 3, n. 3, p. 337-342, 2006.

ZHAO, P.; WANG, H. X.; LI, G. H.; LI, H. D.; LIU, J.; SHEN, Y. M. Secondary metabolic from endophytic *Streptomyces* sp Lz531. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4, n. 5, p. 899-904, 2007.

ZHAO, Y.; SCHENK, D. J.; TAKAHASHI, S.; CHAPPELL, J.; COATES, R. M. Eremophilane sesquiterpenes from capsidiol. **The Journal of Organic Chemical**, v. 69, n. 22, p. 7428-7435, 2004.

ZHENG, L.; ZHENG, P.; SUN, Z.; BAI, Y.; WANG, J.; GUO, X. Production of vanillin from waste residue of rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 5, p. 1115-1119, 2007.

ZHU, N.; ZHAO, P.; SHEN, Y. Selective isolation and ansamycin-targeted screenings of commensal actinomycetes from the “maytansinoids-producing” arboreal *Trewia nudiflora*. **Current Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 87-89, 2009.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, B. N.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2198-2208, 2002.