UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Acesso a produtos naturais mediante a estratégia de cultivos mistos de endofíticos: o fungo *Colletotrichum boninense* FLe 8.1 e a actinobactéria *Streptomyces albospinus* RLe 7

Andrés Mauricio Caraballo Rodríguez

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Acesso a produtos naturais mediante a estratégia de cultivos mistos de endofíticos: o fungo *Colletotrichum boninense* FLe 8.1 e a actinobactéria *Streptomyces albospinus* RLe 7

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Andrés Mauricio Caraballo Rodríguez

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 22/04/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2013

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.

Caraballo Rodríguez, Andrés Mauricio

Acesso a novos produtos naturais mediante a estratégia de cultivos mistos de endofíticos: o fungo *Colletotrichum boninense* FLe 8.1 e a actinobactéria *Streptomyces albospinus* RLe 7. Ribeirão Preto, 2013.

167. p. : il. ; 30 cm.

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

Orientadora: Pupo, Mônica Tallarico.

1. Micro-organismos endofíticos. 2. Co-cultura de micro-organismos endofíticos. 3. Fisostigmina 4. *Streptomyces albospinus.* 5. *Colletotrichum boninense.*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Andrés Mauricio Caraballo Rodríguez

Acesso a produtos naturais mediante a estratégia de cultivos mistos de endofíticos: o fungo *Colletotrichum boninense* FLe 8.1 e a actinobactéria *Streptomyces albospinus* RLe 7

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre 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:_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Alfonso e Aurora, que através do exemplo me mostraram a grande satisfação que sentimos depois de lutar com grande esforço para alcançarmos cada um dos objetivos que nós vamos formulando dia a dia.

Aos meus irmãos, Hugo e Angélica, à minha cunhada, Karen e ao meu sobrinho, Diego, porque acredito que através do exemplo nós nos sentimos estimulados a superar qualquer meta.

A minha cara e paciente noiva, Tatiana, quem há sido um grande apoio em todas as metas conseguidas até agora, e que o será ainda mais nas que escreveremos juntos. ILT.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir-me a oportunidade de explorar e aprender, desde o ponto de vista químico, as maravilhas da natureza.

À minha família: o meu pai Alfonso, à minha mãe Aurora, à minha irmã Angélica, ao meu irmão Hugo, sua esposa, Karen e o meu sobrinho, Diego, por acreditarem e confiarem em mim.

À minha cara noiva, Tatiana, pela paciência e dedicação nos meus assuntos, me ajudando no caminho à perfeição.

À minha orientadora, Professora Mônica Tallarico Pupo, pela oportunidade de trabalhar no seu grupo e por ter me aberto as portas deste lindo país.

Ao LQMo, porque fizeram-me sentir como em casa, e porque alegraram todos os dias da pesquisa com um grande sorriso. Obrigado Claudia, Fernanda, Eduardo, Camila, Raphael, Rita, Denise, Gisele, Larissa, Marília, Mayra, Adriana, Ulysses, Taíse, Isabela.

A todos os professores, funcionários e pesquisadores, que direta ou indiretamente, contribuíram nesta etapa da minha formação como pesquisador: professor Norberto Peporine Lopes, José Carlos Tomaz, Izabel Cristina Casanova Turatti, Jacqueline Mendonça, Denise Brentan, professor Luiz Alberto Beraldo de Moraes, Eduardo José Crevelin, Thiago Branquinho, Luis Otavio Bunhotto Zamoner.

À Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto, pelo apoio das moradias para os Pós-Graduandos, ao CAPEE pela colaboração aos alunos estrangeiros, à CAPES pela bolsa e à FAPESP pela bolsa e pelo financiamento do projeto.

Aos amigos que de alguma ou outra forma contribuíram na minha vida no Brasil: Diego, Marco, Izabel, Santiago, Danilo, e todos os amigos da FCFRP e da casa 13 da Pós-Graduação.

“O objetivo da ciência não é conhecer as coisas em si mesmas senão as relações entre as coisas”
Henri Poincaré

“A história da ciência é a história das boas perguntas”
Jorge Wagensberg

“O mais interessante não se vê”
H. Michaux

RESUMO

CARABALLO RODRÍGUEZ, A. M. **Acesso a produtos naturais mediante a estratégia de cultivos mistos de endofíticos: o fungo *Colletotrichum boninense* FLe 8.1 e a actinobactéria *Streptomyces albospinus* RLe 7.** 2013. 167 f. Dissertação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Na literatura encontram-se referências de estudos envolvendo micro-organismos endofíticos, e mais recentemente estudos que avaliam a interação entre micro-organismos o que resulta na modificação, no tipo ou quantidade dos compostos que são produzidos. Neste trabalho foram realizados cultivos simples e mistos do fungo *Colletotrichum boninense* FLe 8.1 e da actinobacteria *Streptomyces albospinus* RLe 7, endófiticos isolados de *Lychnophora ericoides* que pertencem à coleção do Laboratório de Química de Micro-organismos (LQMo) da FCFRP-USP, com o objetivo de aumentar suas capacidades de produção de novos compostos com atividade biológica. O cultivo misto, ou co-cultivo, é uma estratégia que tem sido usada para o acesso aos produtos naturais de origem microbiana. Existem poucos relatos de compostos com atividade biológica isolados a partir de *S. albospinus* e não há relatos de metabólitos secundários obtidos a partir de *C. boninense.* Nenhum desses micro-organismos tem sido descrito como endofítico na literatura e não existem relatos sobre co-cultivos envolvendo qualquer um deles na busca de compostos bioativos. Juntando as informações geradas através das diferentes técnicas de detecção utilizadas, como TLC, HPLC-DAD, GC-MS, ESI-MS, RMN e depois da análise correspondente, foi possível identificar e atribuir as estruturas de algumas substâncias conhecidas de origem microbiana como a mevalonolactona, o tirosol, a fisostigmina, a desferrioxamina E. ESI-MS foi utilizada para análises dos extratos brutos originados dos cultivos em meio arroz parbolizado permitindo visualizar compostos produzidos em baixas quantidades pelos micro-organismos na cultura simples quanto na co-cultura. Além disso, foram obtidos os perfis metabólicos desses micro-organismos a partir de cultivos em placa de Petri, possibilitando a detecção dos metabólitos em regiões específicas da interação microbiana, o que conduziu à identificação da fisostigmina e o seu análogo N-etilcarbamato produzidos pela actinobactéria, na interação com o fungo. Análises posteriores de MS sequencial permitiram obter perfis de fragmentação, os quais, juntamente com os dados dos íons detectados nos extratos, foram comparados com a informação disponível em bases de dados como DNP, METLIN e MassBank. Tais informações geradas a partir dessas análises permitiram sugerir possíveis compostos envolvidos na interação dos micro-organismos endofíticos mencionados. Foi sugerido que a fisostigmina, substância produzida pela actinobactéria *S. albospinus* RLe 7 e isolada nesse trabalho, poderia ter algum papel na inibição do crescimento do fungo *C. boninense* FLe 8.1 já que a inibição só foi observada quando cultivados ambos os micro-organismos na mesma placa de Petri. Porém, bioensaios com fisostigmina pura demonstraram que essa substância não possui atividade antifúngica *per se,* mas é possível que exista uma sinergia com outras substancias produzidas pela actinobactéria. Os resultados apresentados nesse trabalho demonstram a importância do uso de técnicas de detecção muito sensíveis, como a ESI-MS, na identificação de substâncias envolvidas na troca metabólica e permitiram gerar informações que serão utilizadas em estudos futuros utilizando esses micro-organismos endofíticos.

Palavras-chave: Micro-organismos endófiticos, produtos naturais, *Streptomyces albospinus, Colletotrichum boninense,* co-cultivo, fisostigmina.

ABSTRACT

CARABALLO RODRÍGUEZ, A. M. **Access to natural products by using the co-culture strategy of endophytic microorganisms: fungus *Colletotrichum boninense* FLe 8.1 and actinobacteria *Streptomyces albospinus* RLe 7.** 2013. 167 f. Dissertation. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

There are several studies involving endophytic microorganisms, and more recently some studies evaluate microbial interaction resulting in metabolic profiles modifications. In this study, simple and mixed cultures of the fungus *Colletotrichum boninense* FLe 8.1 and the actinobacteria *Streptomyces albospinus* RLe 7 were carried out. These endophytic microorganisms, isolated from *Lychnophora ericoides*, belong to the collection of the Laboratory of Microbial Chemistry (LQMo) of the FCFRP-USP. The main goal of this work was to increase the bioactive compounds production capacities. Co-culture, or mixed culture, is a recent strategy for accessing microbial natural products. There are few reports of bioactive metabolites from *S. albospinus* RLe 7 and there are no one about secondary metabolites obtained from *C. boninense* FLe 8.1. Neither the actinobacteria nor the fungus have been described as endophytic microorganisms and there are no co-culture studies involving these microorganisms in order to obtain natural products. Joining and analyzing all together the generated information from several detection techniques, such as TLC, HPLC-DAD, GC-MS, ESI-MS, NMR, it was possible to identify and attribute the chemical structures of some known natural, such as mevalonolactone, tyrosol, physostigmine and deferrioxamine E. ESI-MS was used for extracts analysis from cultures in parboiled rice medium, allowing visualization of compounds produced in very low yields. Besides that, it was possible to obtain metabolic profiles from cultures in Petri dishes, leading to the detection of metabolites in specific regions of the microbial interaction. Physostigmine and its N-ethylcarbamate analogue were identified as actinobacteria metabolites in the interaction against the fungus. Posterior analysis by MS/MS allowed to obtain fragmentation profiles, which together with the ions detected from the extracts analysis, were compared by searching in databases, such as DNP, METLIN and MassBank. Such information allowed to suggest possible candidates for the compounds involved in the microbial metabolic exchange. It was hypothesized that physostigmine, isolated from the actinobacteria in this work, had a role in the fungal growth inhibition observed when both microorganisms were co-cultured. However, this substance did not show considerable antifungal activity when tested against *C. boninense* FLe 8.1, but it is possible that other compounds produced by this actinobacteria are acting in a synergistic way. The results showed here demonstrated the importance of very sensitive techniques, as ESI-MS, in the identification of molecules involved in the microbial metabolic exchange and will help in the generation of information for future studies involving those endophytic microorganisms.

Keywords: Endophytic microorganisms, natural products, *Streptomyces albospinus, Colletotrichum boninense,* co-culture, physostigmine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alguns exemplos representativos de substâncias com atividade anticancerígena obtidos a partir de fungos endofíticos. 5

Figura 2. Alguns exemplos de novos metabólitos secundários obtidos a partir de fungos endofíticos 6

Figura 3. Alguns exemplos de metabólitos secundários obtidos a partir de actinobactérias endofíticas 8

Figura 4. Algumas estruturas químicas de compostos de origem microbiana isolados em estudos utilizando a estratégia de co-cultura. 11

Figura 5. Alguns metabólitos secundários isolados do gênero *Colletotrichum.* 17

Figura 6. Metabólitos secundários isolados de *Streptomyces albospinus.* 18

Figura 7. Metodologia da extração em micro-escala 29

Figura 8. Obtenção das frações L-A7F8.1Bu3.3.8 e L-A7F8.1Bu3.3.9 contendo mevalonolactona. 32

Figura 9. Purificação do tirosol a partir do extrato L-A7F8.1AcO da cultura mista em meio líquido PDB. 33

Figura 10. Isolamento da fisostigmina a partir do extrato da cultura simples da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 em arroz parbolizado 34

Figura 11. Cromatograma dos extratos de AcOEt da cultura mista do *C. boninense* FLe 8.1 com as actinobactérias *S. albospinus* RLe 7 e *S. aburaviensis* RLe 10. 38

Figura 12. Resultados dos ensaios de citotoxicidade dos extratos das culturas simples e mistas de *S. albospinus* RLe 7 e *C. boninense* FLe 8.1 em três linhagens de células tumorais. 41

Figura 13. Cromatograma da análise por GC-MS da amostra L-A7F8.1Bu3.3.9. 42

Figura 14. Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) da amostra L-A7F8.1Bu3.3.8. 44

Figura 15. Região do espectro de ESI-MS da amostra L-A7F8.1Bu3.3.8 apresentando os íons de *m/z* 131 e de *m/z* 153 confirmando a presença da mevalonolactona. 45

Figura 16. Espectro de RMN de ^{1}H do tirosol isolado da cultura mista da RLe 7 e o FLe 8.1 em meio líquido PDB (D_2O, 500 MHz). 46

Figura 17. Espectro de massas do extrato em AcOEt da cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 em meio arroz parbolizado obtido por ESI-MS por inserção direta do extrato. 52

Figura 18. Espectros de RMN de ^{1}H (500 MHz, CD_3OD) dos extratos de AcOEt das culturas simples e mistas de *S. albospinus* RLe 7 e *C. boninense* FLe 8.1 em meio arroz parbolizado. 54

Figura 19. Espectro de massas da cultura mista de *S. albospinus* RLe 7 e *C. boninense* FLe 8.1 em meio arroz parbolizado obtido por ESI-MS por inserção direta dos extratos de AcOEt.....55

Figura 20. Comparação dos espectros de ESI-MS dos extratos do fungo controle FLe 8.1 em meio arroz parbolizado.....58

Figura 21. Gráfico de escores e pesos das PCAs referentes aos extratos da cultura mista em arroz parbolizado. 59

Figura 22. Gráfico de scores da PC1 x PC2 x PC3 referente aos extratos da cultura mista em arroz parbolizado. 60

Figura 23. Dendrograma dos extratos da cultura mista em arroz parbolizado. 61

Figura 24. Espectro de MS/MS por CID do íon de *m/z* 403.....68

Figura 25. Espectro de MS/MS do íon de *m/z* 335 por CID.....69

Figura 26. Espectros da análise por ESI-MS do extrato SA-F28HexB. 70

Figura 27. Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) da fisostigmina isolada da cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 em arroz parbolizado.....72

Figura 28. Espectro de COSY (500 MHz, $CDCl_3$) da fisostigmina isolada da cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 em arroz parbolizado.....73

Figura 29. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) da fisostigmina isolada da cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 em arroz parbolizado.....74

Figura 30. Espectro de DEPT (125 MHz, $CDCl_3$) da fisostigmina isolada da cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 em arroz parbolizado.....75

Figura 31. Espectro de HMQC (500 MHz, $CDCl_3$) da fisostigmina isolada da cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 em arroz parbolizado.....76

Figura 32. Espectro de HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) da fisostigmina isolada da cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 em arroz parbolizado.....77

Figura 33. Análise por GC-MS da fração SA-A7BuX4.2.1 contendo um possível produto de degradação da fisostigmina (eserolina).....79

Figura 34. Espectro de ESI-MS da fisostigmina padrão (Sigma-Aldrich®), $[M+H]^+$ *m/z* 276. 80

Figura 35. Espectro de MS/MS por CID do íon de *m/z* 276.....81

Figura 36. Espectro de MS/MS por CID do íon de *m/z* 219.....82

Figura 37. Espectro de ESI-MS da fração SA A7AcOX6.....84

Figura 38. Fragmentação do íon precursor de *m/z* 803 por CID. Energia de colisão 40 eV.....85

Figura 39. Fragmentação do íon precursor de *m/z* 771 por CID. Energia de colisão 40 eV.....85

Figura 40. Fragmentação do íon precursor de *m/z* 743 por CID. Energia de colisão 40 eV.....86

Figura 41. Fragmentação do íon precursor de *m/z* 743 por CID. Energia de colisão 40 eV.....86

Figura 42. Co-cultivo de *S. albospinus* RLe 7 e *C. boninense* FLe 8.1 em meio ISP-2. 94

Figura 43. Espectros de ESI-MS dos extratos do halo de inibição comparando as duas misturas solventes utilizadas na extração em micro-escala. 96

Figura 44. Espectro de ESI-MS do extrato BRP correspondente ao meio de cultura ISP-2 ágar. 98

Figura 45. Espectro de ESI-MS do extrato FCP correspondente ao fungo controle. 98

Figura 46. Espectro de ESI-MS do extrato AACP correspondente ao ágar da actinobactéria controle. 99

Figura 47. Espectro de ESI-MS do extrato MACP correspondente à margem da actinobactéria controle. 99

Figura 48. Espectro de ESI-MS do extrato ACP correspondente ao micélio da actinobactéria controle. 100

Figura 49. Espectro de ESI-MS do extrato AP correspondente ao micélio da actinobactéria na co-cultura. 100

Figura 50. Espectro de ESI-MS do extrato MAP correspondente à margem da actinobactéria na co-cultura. 101

Figura 51. Espectro de ESI-MS do extrato HIP correspondente à halo de inibição na co-cultura.....101

Figura 52. Espectro de ESI-MS do extrato FP correspondente ao micélio do fungo na co-cultura.....102

Figura 53. Espectro de ESI-MS do extrato MFP correspondente à margem do fungo na co-cultura.....102

Figura 54. Fragmentação do íon precursor *m/z* 276 por CID. Energia de colisão 15 eV. 104

Figura 55. Fragmentação do íon precursor *m/z* 233 por CID. Energia de colisão 15 eV. 104

Figura 56. Fragmentação do íon precursor *m/z* 219 por CID. Energia de colisão 15 eV. 105

Figura 57. Fragmentação do íon precursor de *m/z* 290 por CID. Energia de colisão 15 eV. 105

Figura 58. Formação do íon fragmento *m/z* 219 a partir dos íons *m/z* 276 e *m/z* 290 106

Figura 59. Fragmentação do íon precursor *m/z* 304 por CID. Energia de colisão 25 eV. 109

Figura 60. Fragmentação do íon precursor de *m/z* 672 por CID. Energia de colisão 25 eV. 114

Figura 61. Espectro de fragmentação do íon precursor de *m/z* 592 por CID. Energia de colisão 20 eV. 114

Figura 62. Espectro de fragmentação do íon precursor de *m/z* 614 por CID. Energia de colisão 25 eV. 114

Figura 63. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 274 por CID a 25 eV. 118

Figura 64. Espectro de fragmentação do íon precursor de *m/z* 257 por CID a 20 eV.....119

Figura 65. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 222 por CID. Energia de colisão 20 eV.....122

Figura 66. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 758 por CID. Energia de colisão 20 eV.....126

Figura 67. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 782 por CID. Energia de colisão 20 eV.....127

Figura 68. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 784 por CID. Energia de colisão 25 eV.....127

Figura 69. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 786 por CID. Energia de colisão 25 eV.....128

Figura 70. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 820 por CID. Energia de colisão 30 eV.....128

Figura 71. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 822 por CID. Energia de colisão 30 eV.....129

Figura 72. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 824 por CID. Energia de colisão 30 eV.....129

Figura 73. Espectro de fragmentação do íon precursor de *m/z* 249 por CID. Energia de colisão 20 eV. 134

Figura 74. Bioensaio de compostos voláteis segundo a metodologia de Strobel et al.[120] 137

Figura 75. Bioensaio de compostos voláteis segundo a metodologia de Bruce et al.[121] 137

Figura 76. Ensaio antifúngico da fisostigmina por diluição em caldo contra o fungo *C. boninense* FLe 8.1. 138

Figura 77. Ensaio de inibição do crescimento do fungo em placa com fisostigmina. 138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados dos ensaios de citotoxicidade dos extratos das culturas simples e mistas de *S. albospinus* RLe 7 e *C. boninense* FLe 8.1 em três linhagens de células tumorais. 40

Tabela 2. Resultados da busca em bases de dados dos íons *m/z* 601, *m/z* 623 e *m/z* 639. 49

Tabela 3. Dados das análises de ESI-MS, dos extratos dos cultivos mistos em meio arroz parbolizado, utilizados na PCA.....57

Tabela 4. Intensidade do ìon de *m/z* 455 nas culturas em meio arroz parbolizado ..63

Tabela 5. Resultados da busca no DNP do íon de *m/z* 455. 64

Tabela 6. Intensidade do ìon de *m/z* 623 nas culturas em meio arroz parbolizado ..65

Tabela 7. Possíveis candidatos para o íon de *m/z* 403.....67

Tabela 8. Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e COSY obtidos em $CDCl_3$ referentes à fisostigmina isolada da cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 em meio arroz parbolizado. 78

Tabela 9. Resultados da busca em bases de dados do íon *m/z* 803.....87

Tabela 10. Resultados da busca em bases de dados do íon de m/z 771.....89

Tabela 11. Resultados da busca em bases de dados do íon m/z 743.....92

Tabela 12. Resultados da busca em bases de dados do íon m/z 691.....93

Tabela 13. Rendimento dos extratos obtidos a partir do experimento de extração em micro-escala. 95

Tabela 14. Íons detectados nos extratos da co-cultura em meio ISP-2 ágar e submetidos a CID. 97

Tabela 15. Resultados da busca em bases de dados do íon *m/z* 304.....108

Tabela 16. Resultados da busca em bases de dados do íon *m/z* 672.....110

Tabela 17. Possíveis candidatos para o íon de *m/z* 592.....113

Tabela 18. Possíveis candidatos para o íon de *m/z* 614.....116

Tabela 19. Resultados da busca em bases de dados do íon *m/z* 274.....118

Tabela 20. Possíveis candidatos para o íon de *m/z* 257.....120

Tabela 21. Possíveis candidatos para o íon *m/z* 222.....121

Tabela 22. Possíveis candidatos dos íons *m/z* 782, *m/z* 784, *m/z* 786, *m/z* 820, *m/z* 822 e *m/z* 824. 124

Tabela 23. Possíveis candidatos para o íon de *m/z* 249.....131

Tabela 24. Metabólitos secundários identificados e/ou atribuídos neste trabalho ..135

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
BOD	*Biochemical Oxygen Demand*
BuOH	n-Butanol
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CD_3OD	Metanol deuterado
CID	*Collision Induced Dissociation*
COSY	*Correlation spectroscopy*
δ	Deslocamento químico
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
DEPT	*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNP	*Dictionary of Natural Products*
EI-MS	*Electron Impact-Mass Spectrometry*
ESI-MS	*Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*
ESI-TOF	*Electrospray Ionization-Time of Flight*
EtOH	Etanol
eV	Elétron-volts
GC-MS	*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*
HCA	*Hierarchical Cluster Analysis*
Hex	n-Hexano
HMBC	*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*
HPLC-DAD	*High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection*

HR-ESI-MS	*High Resolution-Electrospray Ionization Mass Spectrometry*
HMQC	*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*
ISP-2	*International Streptomyces Project-Medium 2*
J	Constante de acoplamento (em Hz)
m	Multipleto
MS	Mass spectrometry
MS/MS	Mass spectrometry/mass spectrometry
MeOH	Metanol
m/z	Relação massa/carga
PCA	*Principal Component Analysis*
PDA	*Potato Dextrose Agar*
PDB	*Potato dextrose broth*
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de ^{1}H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
s	Simpleto
SPE	*Solid-Phase Extraction*
TLC	*Thin Layer Chromatography*
tr	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO ..... **I**
ABSTRACT ..... **II**
LISTA DE FIGURAS ..... **III**
LISTA DE TABELAS ..... **VII**
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS ..... **VIII**

1. INTRODUÇÃO **2**
1.1. Importância dos produtos naturais na busca de substâncias com atividade biológica 2
1.2. Micro-organismos endofíticos 3
1.3. Co-cultivo microbiano 9
1.4. Outros fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários 14
1.5. Espectrometria de massas na detecção de produtos naturais microbianos 15
1.6. *Colletotrichum boninense* e *Streptomyces albospinus* 16

2. OBJETIVOS **20**

3. MATERIAL E MÉTODOS **22**
3.1. Material 22
3.2. Métodos 24
3.2.1. Condições e metodologia de cultivo 24
3.2.1.1. Cultivo líquido em meio PDB 24
3.2.1.1.1. Cultura simples em meio PDB 24
3.2.1.1.2. Cultura mista em meio PDB 25
3.2.1.2. Cultura mista em meio sólido ISP-2 ágar 25
3.2.1.3. Ensaio de inibição por compostos voláteis em placa de Petri 26
3.2.1.4. Cultivo em meio arroz parbolizado 26
3.2.1.4.1. Cultura simples em meio arroz parbolizado 26
3.2.1.4.2. Cultura mista em meio arroz parbolizado 27
3.2.2. Obtenção dos extratos 27
3.2.2.1. Cultura mista em meio líquido PDB 27
3.2.2.2. Extração da cultura mista em meio ISP-2 ágar 28
3.2.2.3. Cultura mista em meio arroz parbolizado 29
3.2.3. Triagem biológica dos extratos obtidos 30
3.2.4. Triagem química dos extratos obtidos 30

3.2.4.1. Cultura mista em meio líquido PDB 32
3.2.4.1.1. Obtenção da mevalonolactona 32
3.2.4.1.2. Obtenção do tirosol 33
3.2.4.2. Cultura mista em meio sólido ISP-2 33
3.2.4.3. Cultura em meio arroz parbolizado 33
3.2.4.4. PCA dos extratos das culturas em meio arroz parbolizado 34
3.2.5. Ensaio de inibição com substância pura 35
3.2.5.1. Ensaio antifúngico por diluição 35
3.2.5.2. Ensaio de inibição do crescimento fúngico em placa de Petri 36

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 38
4.1. Micro-organismos selecionados 38
4.2. Triagem biológica dos extratos obtidos 39
4.3. Cultura mista em meio líquido PDB 42
4.3.1. Isolamento e caracterização da mevalonolactona 42
4.3.2. Identificação e caracterização do tirosol 45
4.4. Cultivo em meio arroz parbolizado 47
4.4.1. Cultivo simples da actinobactéria RLe 7 47
4.4.2. Cultivo misto em meio sólido de arroz parbolizado 53
4.4.2.1. Análise de Componentes Principais dos extratos brutos de AcOEt dos cultivos mistos em meio sólido de arroz parbolizado 56
4.4.2.2. Análise por ESI-MS dos extratos de AcOEt dos cultivos mistos 62
4.4.2.3. Análise por ESI-MS do extrato controle de AcOEt do fungo FLe 8.1 cultivado em arroz parbolizado 65
4.4.2.4. Análise por ESI-MS do extrato SA-F28HexB 70
4.4.3. Identificação estrutural e caracterização da fisostigmina 71
4.4.4. Análise por ESI-MS da fração SA-A7AcOX6 83
4.5. Cultura mista em meio sólido ISP-2 94
4.6. Ensaio de inibição por compostos voláteis em placa de Petri 136
4.7. Ensaio de inibição com substância pura 137
4.7.1. Ensaio antifúngico por diluição 137
4.7.2. Ensaio de inibição do crescimento fúngico em placa de Petri 138

5. CONCLUSÕES 141

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 144

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância dos produtos naturais na busca de substâncias com atividade biológica

Os produtos naturais continuam sendo importantes na descoberta de novas substâncias bioativas a fim de desenvolver fármacos com indicações para um grande número de doenças.[1] Os antibióticos, por exemplo, têm sido usados amplamente para o tratamento de doenças infecciosas. Entretanto, a exposição contínua dos micro-organismos presentes no ambiente a antibióticos usados pelo homem é a causa mais provável da resistência a esse tipo de substâncias, mais do que a resistência adquirida intra-hospitalarmente.[2, 3] Apesar da maioria dos antibióticos utilizados clinicamente na atualidade serem naturalmente produzidos por micro-organismos, muitas dessas substâncias promovem diferentes respostas quando utilizados em concentrações subinibitórias. Como consequência, a função dessas moléculas no ambiente real como mecanismo de comunicação microbiana, precisa ser estudada.[4]

Por essa razão, um dos aspectos da fisiologia microbiana que merece maior consideração é o que tem sido denominado como “Parvoma”, ou compostos bioativos de baixo peso molecular produzidos pelos micro-organismos.[2, 5, 6] É possível que todas as células vivas apresentem respostas específicas a pequenas moléculas, e que por exemplo, uma substância capaz de produzir antibiose em altas concentrações, produza efeitos contrários em baixas concentrações. Por esta razão, nem todos os metabólitos secundários produzidos por micro-organismos deveriam ser classificados como antibióticos indiscriminadamente, já que essa representa só uma descrição parcial das múltiplas atividades biológicas que uma molécula poderia ter no ambiente real.[7]

Atualmente, o estudo de micro-organismos, devido ao potencial na produção de metabólitos com atividade biológica, tornou-se uma grande área de interesse. Desde a descoberta da penicilina a partir de *Penicillium notatum*, em 1928 por Alexander Fleming, compreendeu-se o significado dos fungos como fontes de novos compostos.[8] Mundialmente tem sido mencionado que se conhece apenas 7% dos 1,5 milhões de espécies de fungos que estimam-se presentes na Terra,[9] podendo-se postular que apenas uma mínima porcentagem de metabólitos com importância

farmacológica de origem fúngica tem sido descoberta. Esses micro-organismos produzem uma coleção de metabólitos de várias classes químicas, tais como terpenoides, esteroides, xantonas, quinonas, fenóis, isocumarinas, benzopiranonas, tetralonas, citocalasinas e eniatinas,[10] porém acredita-se que a maioria dos genes envolvidos na biossíntese desses produtos naturais podem ter sido silenciados, tornando-se crítico encontrar diferentes estratégias para expressá-los. Assim, a fim de acessar esse reservatório de metabólitos inexplorados, é necessário induzir sua biossíntese.[11]

1.2. Micro-organismos endofíticos

O termo "endofítico" tem sido discutido por vários autores, basicamente se referindo àqueles micro-organismos, fungos ou bactérias, que colonizam tecidos vegetais, mas que não produzem efeitos patogênicos no hospedeiro.[12, 13] Os micro-organismos endofíticos possuem um grande potencial já que a interação com a planta hospedeira resulta na produção de novas moléculas.[10] Na Terra existem quase 300.000 espécies de plantas, e cada uma contém um ou mais micro-organismos endofíticos,[14, 15] razão pela qual a possibilidade de que a interação entre os micro-organismos conduza à produção de novas moléculas bioativas é grande.

Micro-organismos endofíticos e plantas hospedeiras têm uma relação tanto mutualística como antagonística.[16] Há relatos mencionando tolerância das plantas ao calor e a sais provavelmente devido à presença dos endofíticos,[17] assim como tem sido proposto que os endofíticos decompõem alguns metabólitos vegetais a fim de obter nutrientes e energia,[16] mostrando dessa maneira o beneficio dos dois organismos. Sob o ponto de vista antagônico, as plantas têm mecanismos para evitar o crescimento descontrolado dos endofíticos, produzindo uma variedade de metabólitos tóxicos, assim como os fungos sobrevivem contrapondo esses mecanismos de defensa da planta.[10, 16] É essa continua interação endófito-planta a que faz interessantes este tipo de micro-organismos sob a ótica dos produtos naturais. Curiosamente, apesar do primeiro micro-organismo endofítico ter sido reportado em 1904, eles não receberam muita atenção até há pouco tempo.[8]

Inúmeros estudos avaliando atividade antioxidante,[18] antimicrobiana, [19-24] inseticida,[25] antifúngica, [26-28] antimalárica, [20, 29] antileishmania, [30] antiviral, [31] e anticancerígena[32] de vários micro-organismos endofíticos tem sido publicados,

sendo a maioria deles fungos. Há estudos reportando avaliação biológica dos extratos obtidos,[33] assim como outros estudos resultaram em isolamento e identificação de novos compostos bioativos.[34-41]

Tem sido publicadas várias revisões ressaltando a importância dos fungos endofíticos na busca de produtos naturais.[8, 10, 13, 16, 32, 42-44] Aly et al.[8] fizeram uma revisão exaustiva de relatos de metabólitos obtidos a partir de fungos endofíticos avaliando-os como futuros fármacos. Os autores encontraram um número crescente de publicações e no período de 2 anos, compreendido entre 2008-2009, a pesquisa nessa área levou à descoberta de mais de 100 novos produtos naturais, enquanto o mesmo número de novos compostos foi reportado no período de 8 anos compreendido entre 2000-2007. Alguns autores tem sugerido que os fungos endofíticos podem ser fontes promissoras de compostos anticancerígenos[45] e antifúngicos,[46] e mais recentemente outros autores tem concluído que os compostos antimicrobianos são os principais produtos esperados de fungos endofíticos ,[47] e em muitos casos esses compostos estão implicados na proteção da planta frente a micro-organismos fitopatogênicos.[13]

Um fator que justifica a pesquisa nesse grupo de micro-organismos, além de encontrar novas estruturas, é o uso como fontes de compostos bioativos cuja obtenção por síntese é difícil, e obtenção de compostos produzidos pelos vegetais hospedeiros. Por exemplo, a camptotecina (**1**) foi obtida a partir de um dos fungos da família Phycomycetes como endofítico de *Nothapodytes foetida*,[48] assim como a partir de *Fusarium solani*, fungo endofítico de *Camptotheca acuminata.*[49] O exemplo clássico da literatura é o do paclitaxel (**2**), composto anticancerígeno produzido no córtex de *Taxus brevifolia.* Este composto foi produzido por um dos endófitos desta planta, *Taxomyces andreanae.*[50] Recentemente tem sido publicados outros exemplos, como o do pro-fármaco desoxipodofilotoxina (**3**) produzido pelo fungo endofítico *Aspergillus fumigatus* Fresenius,[51] a podofilotoxina (**4**) produzida pelo fungo endofítico *Phialocephala fortunii,* presente em *Podophyllum peltatum L.*,[52] e a piperina (**5**) produzida pelo fungo *Pericornia* sp. endofítico de *Piper longum* L.[53]

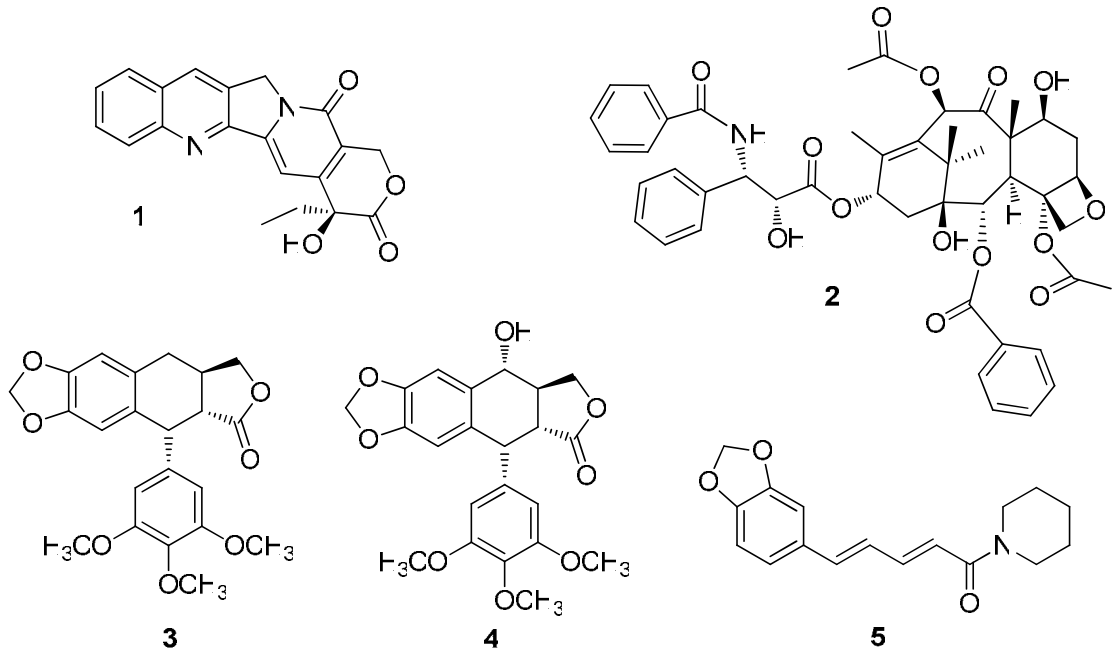


Figura 1. Alguns exemplos representativos de substâncias com atividade anticancerígena obtidos a partir de fungos endofíticos.

Rukachaisirikul e colaboradores[54] reportaram o isolamento de vinte sete metabólitos a partir de duas linhagens de *Botryosphaeria rhodina*, fungo endofítico das folhas de *Garcinia mangostana*. Dentre os metabólitos mencionados, cinco novos compostos foram isolados da linhagem PSU-M35: botriosfaerilactonas A (**6**), B (**7**), C (**8**), botriosfaeridiona (**9**), botriosfaerihidrofurano (**10**), enquanto a partir da linhagem PSU-M114 foram isolados dois novos metabólitos: botriosfaerinona (**11**) e botriosfaeriodiplodina (**12**). Este exemplo demonstra a diversidade química dos metabólitos secundários, mesmo em linhagens da mesma espécie de micro-organismos.

Na busca de produtos naturais com atividade antimalárica, Cao e Clardy[55] reportaram o isolamento de duas novas naftoquinonas, delitzchianonas A (**13**) e B (**14**) a partir de *Delitzchia winteri*, e uma nova δ-lactona, 8-acetoxi pestalopirona (**15**) a partir do fungo endofítico *Phomatospora bellaminuta*. Nenhuma das novas substâncias mencionadas por esses autores apresentou atividade antimalárica considerável.

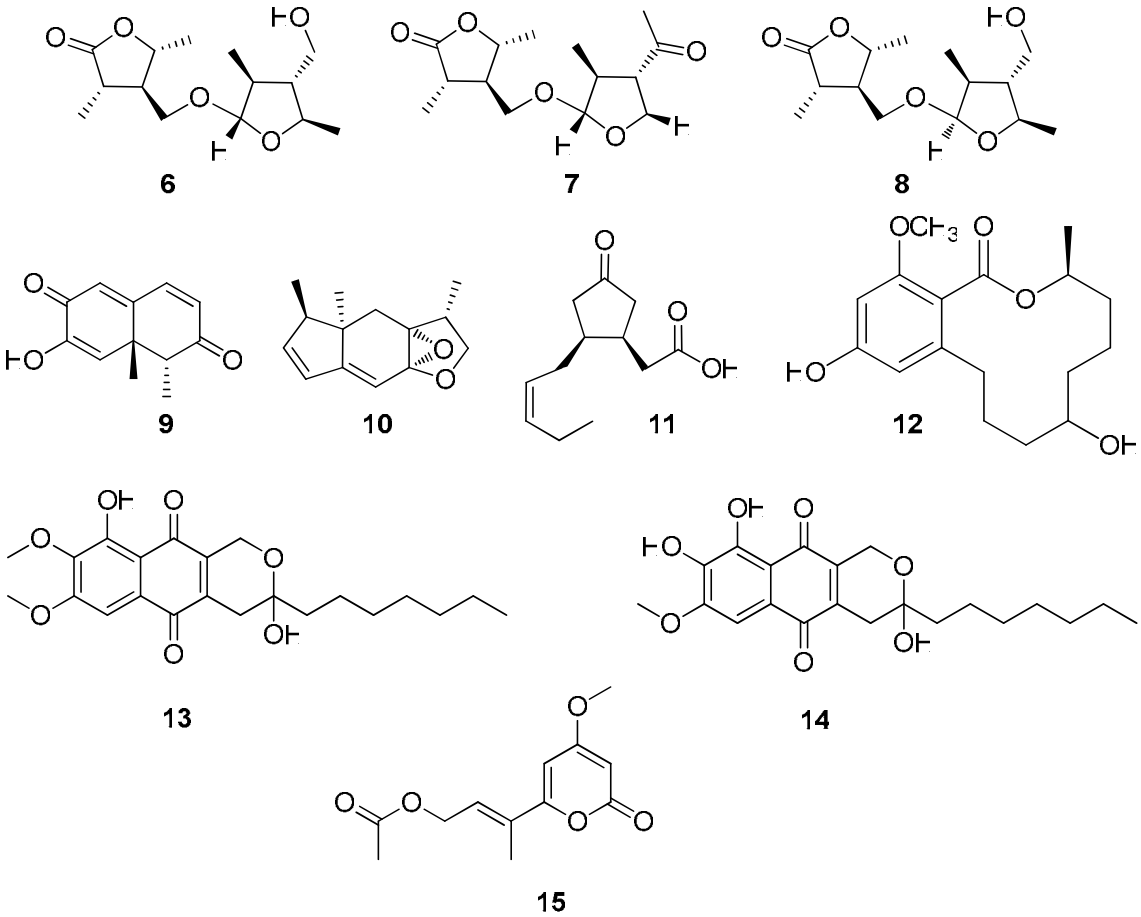


Figura 2. Alguns exemplos de novos metabólitos secundários obtidos a partir de fungos endofíticos

Os fungos endofíticos parecem ser mais inovadores do que fungos isolados de solo. Um estudo mostrou que de 135 metabólitos isolados, a proporção de novas estruturas produzidas por endofíticos foi consideravelmente elevada (51%) quando comparada com a produzida por fungos de solo (38%).[10] Outro estudo incluindo 150 fungos endofíticos mostrou que certos gêneros tais como *Alternaria, Chaetomium, Colletotrichum, Curvularia, Nigrospora* e *Xylaria* produzem um grande número de compostos bioativos, entre eles fomopsólidos, caetoglobosinas, prosalanapironas e solanapironas.[42] Baseado nos resultados de pesquisa em produção metabólica de *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp. e *Pestalotiopsis guepinii*, todos fungos endofíticos isolados de *Spondias mombin (*Anacardiaceae*)*, Rodrigues e colaboradores [19] sugeriram a necessidade de aumentar a pesquisa sobre a microbiota brasileira devido à alta biodiversidade extensivamente reportada.

Como mencionado para os fungos, as actinobactérias que residem nos tecidos de plantas vivas sem causar dano a elas são denominadas também de endofíticas.[56] Elas estão amplamente presentes como endofíticas e adquiriram

grande importância como fontes de compostos bioativos inovadores. [57, 58] Qin e colaboradores[57] fizeram uma extensa revisão sobre micro-organismos promissores, actinobactérias endofíticas, mostrando o gênero *Streptomyces* como o mais importante produtor de substâncias bioativas de interesse farmacológico. Actinobactérias do gênero *Streptomyces* têm sido reconhecidas como excelentes produtoras de metabólitos bioativos por outros autores[59, 60] e recentemente foi revalidada a sua capacidade de produção de novas substâncias com a descoberta de genes de policetídeo sintase envolvidos na biossíntese de policetídeos aromáticos,[61] e estudos dos fatores de regulação da produção de antibióticos.[62]

Alguns exemplos de metabólitos secundários obtidos a partir de actinobactérias endofíticas incluem as celastramicinas A (**16**) e B (**17**),[63] 7'-desmetilnovobiocina (**18)** e 5''-desmetilnovobiocina (**19**),[64] substâncias com atividade antibiótica, o ácido pterídico (**20**),[65] regulador de crescimento vegetal, as cedarmicinas A (**21**) e B (**22**)[66] e o 6-prenilindol (**23**),[67] substâncias com atividade antifúngica, a fistupirona (**24**),[68] a qual a pesar de não apresentar atividade antifúngica *in vitro,* inibe a infecção do repolho chinês causada por *Alternaria brassicicola* ao suprimir a germinação dos esporos desse fungo, a anicemicina (**25**),[69] substância com atividade citotóxica, e a cletramicina (**26**), substância inibidora do crescimento do tubo polínico e que também possui atividade antifúngica, todas elas obtidas do gênero *Streptomyces.*

De fato, as actinobactérias têm sido importantes na procura de novos fármacos, como ressaltado por Raja e Prabakarana.[58] Esses autores também enfatizaram o papel do gênero *Streptomyces* na produção dos antibióticos e quimioterápicos atualmente comercializados. Eles mencionaram que 45% dos metabólitos microbianos bioativos conhecidos, em torno de 10.000 compostos, foram isolados de actinobactérias, sendo 34% do gênero *Streptomyces* e 11% de outras actinobactérias pouco conhecidas. Isso mostra claramente o grande potencial da pesquisa em produtos naturais provenientes de actinobactérias.

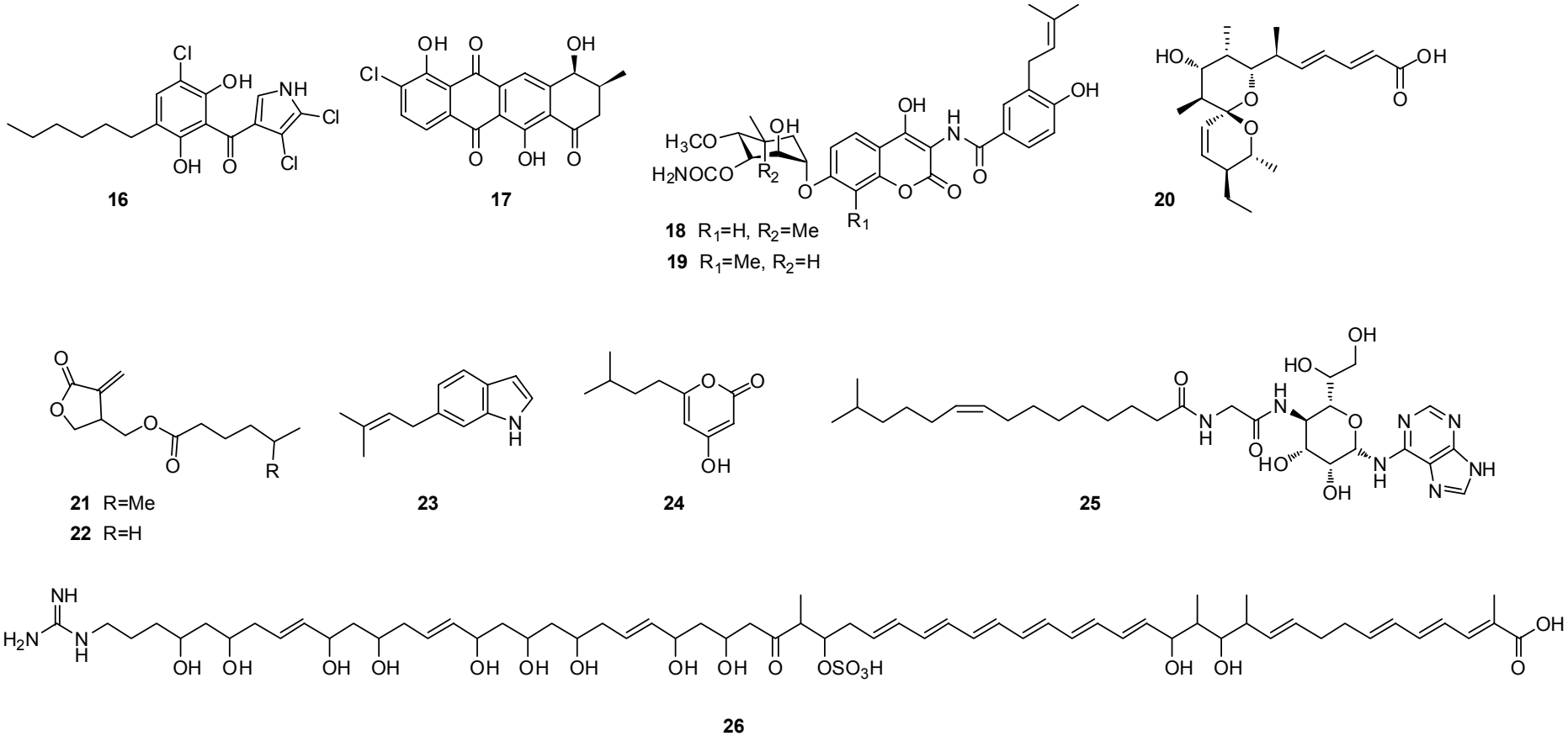


Figura 3. Alguns exemplos de metabólitos secundários obtidos a partir de actinobactérias endofíticas

1.3. Co-cultivo microbiano

A falta de estímulo da interação planta-endofítico no meio de cultivo pode explicar a atenuação na produção de metabólitos secundários pelos micro-organismos isolados a partir de tecido vegetal cultivados exaustiva e sucessivamente.[70] Foi devido a essa necessidade de estimular a produção de metabólitos pela interação entre micro-organismos que a co-cultura, ou cultura mista, surgiu como uma interessante estratégia para induzir a resposta química de micro-organismos interagindo em um mesmo ambiente. A co-cultura refere-se ao cultivo de diferentes micro-organismos no mesmo meio de cultura induzindo a competição, simulando condições naturais como acontece no interior da planta, resultando na produção de compostos bioativos.[17, 71-74]

A co-cultura tornou-se uma estratégia bem-sucedida a fim de induzir a produção de compostos de interesse e emergiu devido à falta de conhecimento sobre as complexas redes de interações bióticas.[75] Cueto e colaboradores,[71] utilizaram a estratégia da co-cultura entre uma linhagem de deuteromiceto e uma bactéria marinha, o que levou à obtenção de uma nova benzofenona, a pestalona (**27**), a qual apresentou elevada atividade antibiótica frente a bactérias resistentes. A pestalona não foi produzida na cultura simples suportando o uso dessa estratégia na busca de novos produtos naturais. Penttinen e colaboradores[76] obtiveram resultados que sugeriram a interação entre a actinobactéria gram-positiva *Streptomyces californicus* e o fungo *Stachybotrys chartarum* como a razão do estímulo na produção de compostos citostáticos, os quais não foram identificados nesse estudo. Esses resultados demonstraram a importância da competição microbiana na produção de compostos bioativos, ressaltando a utilidade dos ensaios de indução inter-espécie e inter-gênero.

Um exemplo recente de co-cultura entre actinobactéria e fungo foi desenvolvido por Zuck e colaboradores[77] cultivando *Aspergillus fumigatus* frente a vários micro-organismos. A interação mais significativa foi observada frente à actinobactéria *Streptomyces peucetius*, resultando em dois novos compostos, fumiformamida (**28**) e N,N´-((1Z,3Z)-1,4-bis(4-metoxifenil)buta-1,3-dien-2,3-di-il)di-formamida (**29**), três compostos já conhecidos, e aumento na produção de três compostos previamente isolados do fungo em cultura simples. Schroeckh e colaboradores[78] utilizaram a estratégia de co-cultura de *Aspergillus nidulans* frente a

cada uma das 58 actinobactérias de uma coleção, identificando que a actinobactéria *Streptomyces hygroscopicus* foi capaz de ativar a expressão de um *cluster* de genes silenciados do fungo levando à produção de ácido orselínico (**30**), ácido lecanórico (**31**), e os inibidores de catepsina K, F-9775A (**32**) e F-9775B (**33**). Na revisão de Brakhage e colaboradores,[11] foram mencionadas algumas das estratégias para ativar genes silenciados em fungos filamentosos, ressaltando a importância da comunicação inter-espécie conduzindo à produção de substâncias bioativas.

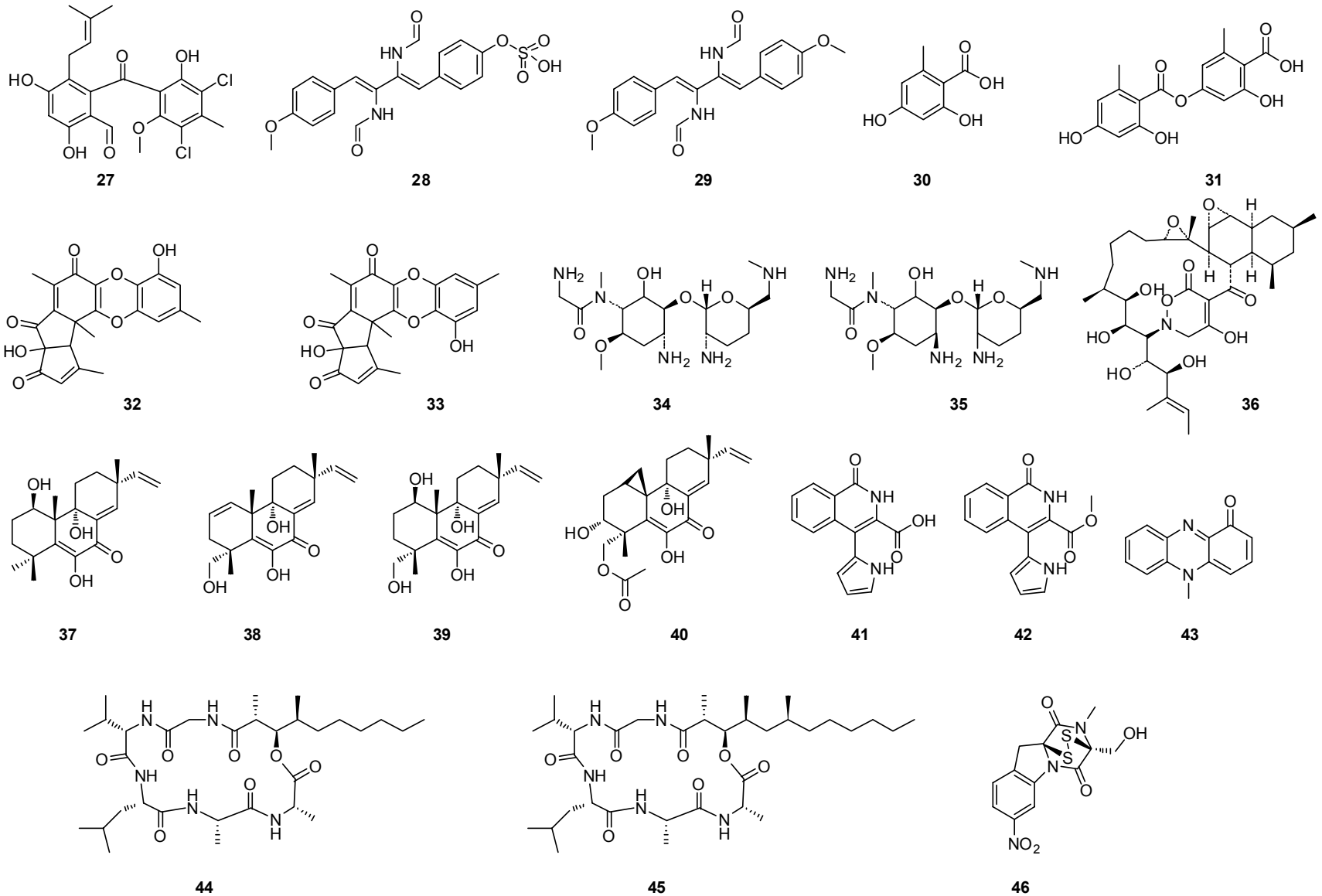


Figura 4. Algumas estruturas químicas de compostos de origem microbiana isolados em estudos utilizando a estratégia de co-cultura.

Como foi mencionado, a co-cultura não somente resulta na produção de compostos não obtidos nas culturas simples de micro-organismos, mas também permite o aumento das quantidades de metabólitos produzidos em cultura simples. Slattery e colaboradores[79] observaram que de cinquenta e três linhagens de bactérias, cada uma delas co-cultivada com *Streptomyces tenjimariensis*, somente doze induziram a produção dos antibióticos istamicina A (**34**) e B (**35**) em quase o dobro do nível produzido em mono-cultura. Esses autores também mencionaram a influência de outros fatores na produção dos compostos tais como acessibilidade aos nutrientes, afinidade taxonômica, assim como requerimentos fisiológicos.

Meyer e Stahl[80] utilizaram a co-cultura a fim de aumentar os níveis de Proteína Antifúngica (AFP) produzida por *Aspergillus giganteus* quando cultivado em presença de *Fusarium oxysporium*. Estes autores demonstraram que a produção de AFP foi dependente do contato célula-célula entre células vivas do fungo, assim como também da composição do meio. Outro estudo ressaltando a importância da interação entre células vivas dos micro-organismos em co-cultura foi publicado por Onaka e colaboradores,[81] demonstrando que bactérias produtoras de ácido micólico induziram a produção de um novo antibiótico, alchivemicina A (**36**) produzida por *Streptomyces endus.* Os autores concluíram que foi necessária a adição de bactérias vivas produtoras de ácido micólico para observar mudanças no perfil metabólico de várias linhagens de *Streptomyces*, já que experimentos separados onde só foram adicionadas bactérias mortas ou somente ácido micólico não tiveram influência sobre tais perfis.

Degenkolb e colaboradores,[82] reportaram a obtenção de lipoaminopeptídeos utilizando a co-cultura entre o fungo endofítico *Acremonium* sp e o fungo *Mycogone rósea*, enfatizando assim o uso do co-cultivo a fim de conseguir uma maior diversificação de estruturas microbianas.

Oh e colaboradores,[83] demonstraram a indução de biossíntese em resposta à interação microbiana em co-cultivo. A obtenção das libertelonas A-D (**37-40**), novos diterpenoides, foi obtida mediante o co-cultivo do fungo marinho *Libertella* sp. e uma α-proteobactéria. Esses micro-organismos não produziram nenhum dos compostos mencionados quando cultivados isoladamente, e sim, quando uma pequena quantidade de cultivo bacteriano foi transferida ao meio contendo o fungo. Nenhum desses compostos apresentou atividade antibiótica, porém a libertelona D

apresentou atividade citotóxica quando testada frente a uma linhagem de células de carcinoma de colón humano.

Zhu e colaboradores,[84] obtiveram a marinamida (**41**) e o seu metil éster (**42**), análogos de 1-isoquinolina, empregando o co-cultivo entre dois fungos endofíticos. Esses compostos apresentaram atividade antibacteriana significativa contra *Escherichia coli, Pseudomonas pyocyanea* and *Staphylococcus aureus.* Nenhum desses compostos foi produzido quando cultivado isoladamente.

Angell e colaboradores, [85] estudaram comunidades microbianas marinhas como fonte de substâncias com atividade antibiótica e antifúngica. Eles observaram a produção de um metabólito azul, piocianina (**43**), em presença de *Pseudomonas aeruginosa.* Os autores sugeriram que *P. aeruginosa* agia sinergicamente com as bactérias selecionadas naquele estudo. Finalmente, eles concluíram que as interações bacterianas têm um forte impacto na produção de metabólitos secundários, e também ressaltaram a importância de pesquisar a atividade biológica dos extratos orgânicos de populações microbianas mistas.

Posteriormente, Oh e colaboradores[73] reportaram mais outro estudo de indução envolvendo o fungo marinho *Emericella* sp. e a actinobactéria *Salinispora arenicola*, na produção de metabólitos levando ao isolamento de dois novos depsipeptídeos cíclicos com atividade antimicrobiana, emericelamidas A (**44**) e B (**45**). Enquanto esses compostos foram produzidos em baixa quantidade pelo fungo quando cultivado isoladamente, a co-cultura levou ao aumento de quase 100 vezes a quantidade produzida na cultura simples.

Park e colaboradores[86] aplicaram a estratégia da co-cultura em micro-organismos obtidos a partir de minas abandonadas, conseguindo a obtenção de um novo composto. A competição entre *Aspergillus fumigatus* e a bactéria *Sphingomonas* sp. levou à obtenção de glionitrina A (**46**), uma nova dicetopiperazina apresentando atividade antibiótica e citotóxica. Os autores desse estudo contemplaram quatro possíveis hipóteses para explicar a obtenção do composto: o fungo poderia ter produzido um precursor que seria posteriormente biotransformado enzimaticamente pela bactéria, alteração da expressão gênica do fungo por algum tipo de estímulo bacteriano, indução da produção por fatores externos, ou indução pela interação competitiva em longo prazo entre o fungo e a bactéria. Esta última hipótese foi aceita pelos autores em função dos resultados dos experimentos

desenvolvidos, nos quais nenhuma das outras hipóteses avaliadas conduziu à produção de gliotrinina A pelo fungo.

1.4. Outros fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários

Vale a pena ressaltar que a composição do meio de cultura também influencia a produção metabólica dos micro-organismos. Mínimas alterações nas condições de cultivo podem resultar em mudanças do perfil metabólico dos micro-organismos. Por exemplo, altas concentrações de sacarose e glicose, junto com extratos de malte ou de levedura, e adição de minerais e elementos traço, usualmente resultam em metabólitos altamente variados e em altos rendimentos.[87] Adicionalmente, a produção de alguns metabólitos secundários de origem fúngica é influenciada por fatores ambientais tais como as fontes de nitrogênio e de carbono, temperatura, luz e pH. [8] Assim a partir de uma simples linhagem pode ser obtida uma grande variedade de compostos, de acordo com a estratégia OSMAC (*one strain, many compounds*). [88] Essa estratégia foi utilizada com sucesso por Bode e colaboradores envolvendo fungos e actinobactérias levando à obtenção de mais de 100 compostos apresentando mais de 25 tipos diferentes de estruturas utilizando apenas seis linhagens de micro-organismos.[88] As manumicinas, obtidas a partir de *Streptomyces parvulus*,[89] e vários novos espirobisnaftalenos obtidos a partir do fungo *Sphaeropsidales* sp.,[90] são alguns dos exemplos dos resultados que podem-se conseguir modificando os parâmetros de cultivo.

Miao e colaboradores, [91] também concluíram que os parâmetros de cultivo para o crescimento fúngico (temperatura, pH, salinidade e composição do meio de cultivo) assim como o cultivo em competição frente a bactérias, tiveram efeitos consideráveis sobre o crescimento miceliar e a atividade biológica a *Arthrinium c.f. saccarichola.* Esse fungo produziu mais compostos quando cultivado em condições de estresse.

1.5. Espectrometria de massas na detecção de produtos naturais microbianos

Nielsen e Smedsgaard[92] apresentaram os dados correspondentes à desreplicação e detecção de 474 micotoxinas e metabólitos fúngicos mediante uma metodologia que envolve LC-UV-MS aplicando o método modificado de extração em micro-escala publicado por Smedsgaard[93], o qual foi desenhado para ser utilizado em meios ricos que permitam altos rendimentos de metabólitos secundários e mínima interferência nas análises. Além dos dados para os metabólitos incluídos, o estudo apresenta os dados correspondentes aos adutos comumente observados nas análises por ESI-MS.

Mais recentemente, Nielsen e colaboradores[94] apresentaram um estudo detalhado de fragmentação e formação de adutos por ESI-MS de 719 compostos incluídos na base de dados própria, a qual foi construída através dos anos de pesquisa do grupo. Os autores avaliaram o impacto da exatidão da massa e do padrão isotópico a fim de diferenciar composições elementares de 33.136 compostos válidos incluídos em AntiBase 2008. Os autores demonstraram que ESI-MS no modo positivo de detecção foi o método mais versátil para detectar 93% dos compostos avaliados. A atribuição, apenas utilizando o padrão de formação de adutos, foi possível e sem ambiguidade, para 56% dos compostos detectados por ESI-MS no modo positivo, e 37% no modo negativo. Desta maneira se ressalta o uso da MS a fim de desreplicar misturas de metabólitos secundários de origem microbiana.

A utilização de técnicas de imageamento por espectrometria de massas com ionização-desorção de matriz assistida por laser (MALDI-IMS)[95, 96] permitiu a descoberta de duas substâncias peptídicas a partir de co-culturas de colônias bacterianas,[97] demonstrando também a complexidade química da troca metabólica na co-cultura entre *Bacillus subtilis* e *Streptomyces coelicolor*.[98] MALDI-IMS também pode ser utilizada para gerar hipóteses com relação à função dos metabólitos detectados nas interações microbianas,[97] assim como permitir a observação da produção de compostos em resposta à competição simulada em cultivos em meio líquido.[99]

Finalmente, vale a pena ressaltar a importância das bases de dados na estratégia de desreplicação. METLIN,[100] base de dados de metabólitos, permite

realizar buscas utilizando informação gerada a partir de MS.[100] Essa base de dados foi desenvolvida a fim de facilitar a identificação de metabólitos através de análises de massas. METLIN é uma base de dados pública, de acesso livre, que fornece as seguintes informações geradas a partir de diferentes fontes biológicas: dados físicos e estruturais de metabólitos endógenos conhecidos, fármacos e metabólitos de fármacos; dados de FT-MS de amostras de referência; dados de MS sequencial de referência de metabólitos conhecidos e derivados; perfis de LC-MS de metabólitos humanos e de alguns organismos modelo.

MassBank[101] é outra base de dados pública, de acesso gratuito, de pequenas moléculas (<3000 Da) criada a fim de auxiliar as pesquisas nas ciências da vida. Os dados são compostos por espectros de massa de metabólitos primários, flavonoides, giberelinas, saponinas, carotenoides, fosfolípideos e oligosacarídeos. Assim MassBank contem aproximadamente 9276 dados de ESI-MS^n de 1889 compostos químicos. Também há disponíveis dados de EI-MS para compostos voláteis tais como terpenoides, alcoóis alquílicos, aldeídos e ácidos carboxílicos. MassBank é uma base de dados analisados sobe condições experimentais não padronizadas, na qual os contribuidores fornecem as informações desde seus próprios servidores, e que desenvolve e fornece ferramentas para manipular os dados. Assim, para facilitar a identificação, os dados de ESI-MS^2 foram agrupados por composto fornecendo informação de um mesmo composto em diferentes condições experimentais.

1.6. *Colletotrichum boninense* e *Streptomyces albospinus*

O fungo *Colletotrichum boninense* não tem sido estudado sob o ponto de vista da produção de metabólitos secundários. Esse fungo foi identificado como um dos agentes responsáveis de antracnose em abacate,[102] limão, tomate, manga,[103] também em amêndoa e morango,[104] assim como em pimenta.[105] Anteriormente, *C. boninense* foi classificado erroneamente como *C. gloeosporioides* devido à similaridade morfológica entre as espécies.[106, 107] Posteriormente, foi realizada uma caracterização molecular e morfológica mais rigorosa, levando a propor *C. boninense* como uma nova espécie em 2003, habitando uma ampla faixa de plantas tais como *Crinum, Clivia* e *Cymbidium*, e com uma distribuição que alcançava o litoral pacífico do Japão.[108] Recentemente foi descrito que *C. boninense* representa

um complexo de espécies.[109] *C. boninense* também tem sido isolado, junto com *C. gloeosporioides*, como endofítico a partir de folias de *Maytenus ilicifolia,*[110] assim como em plantas de café de Colômbia, Hawai, México e Porto Rico.[111] Alguns metabólitos tem sido reportados para o gênero *Colletotrichum*, como o ácido coletótrico (**47**) isolado de *C. gloeosporioides,* [112] os três novos compostos: ácido 6-isoprenilindol-3-carboxilico (**48**), 3b,5a-diidroxi-6b-acetoxi-ergosta-7,22-dieno (**49**) e 3b,5a-diidroxi-6b-fenilacetiloxi-ergosta-7,22-dieno (**50**) produzidos por *Colletotrichum* sp., endofítico de *Artemisia annua* L. (Asteraceae),[113] dois compostos antifúngicos, (-) cis-4-hidroxi-6-desoxiscitalona (**51**) e (4R)-4,8-diidroxi-α-tetralona (**52**), produzidos por linhagens de *C. gloeosporioides* isolado como endofítico de *Cryptocarya mandioccana* (Lauraceae).[114]

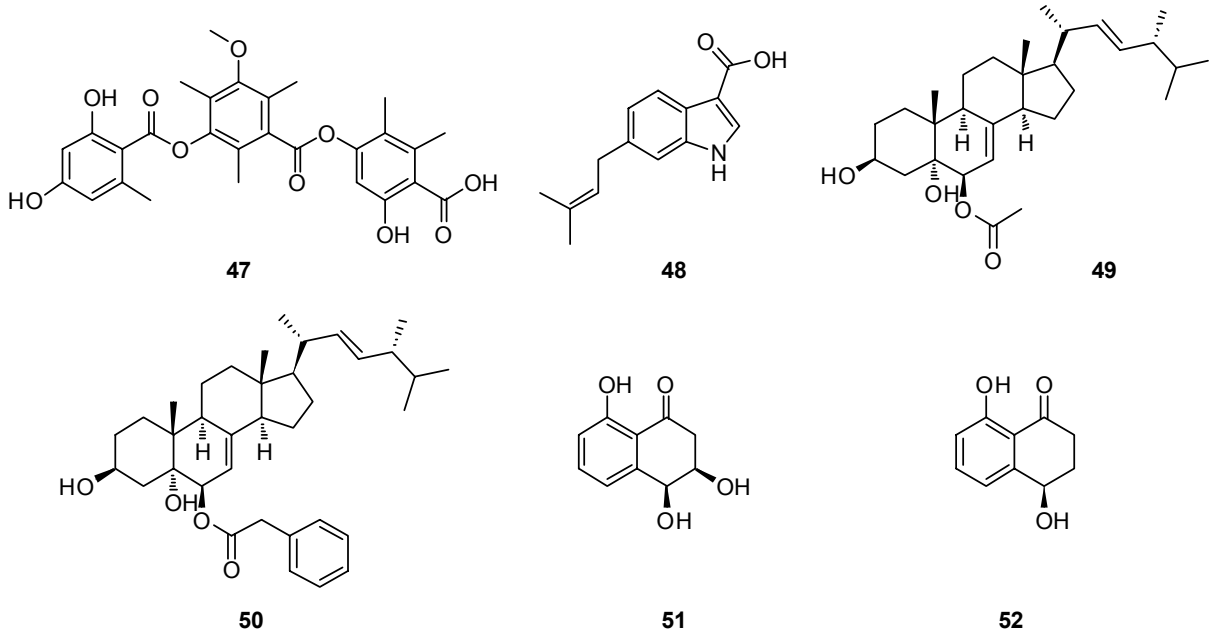


Figura 5. Alguns metabólitos secundários isolados do gênero *Colletotrichum.*

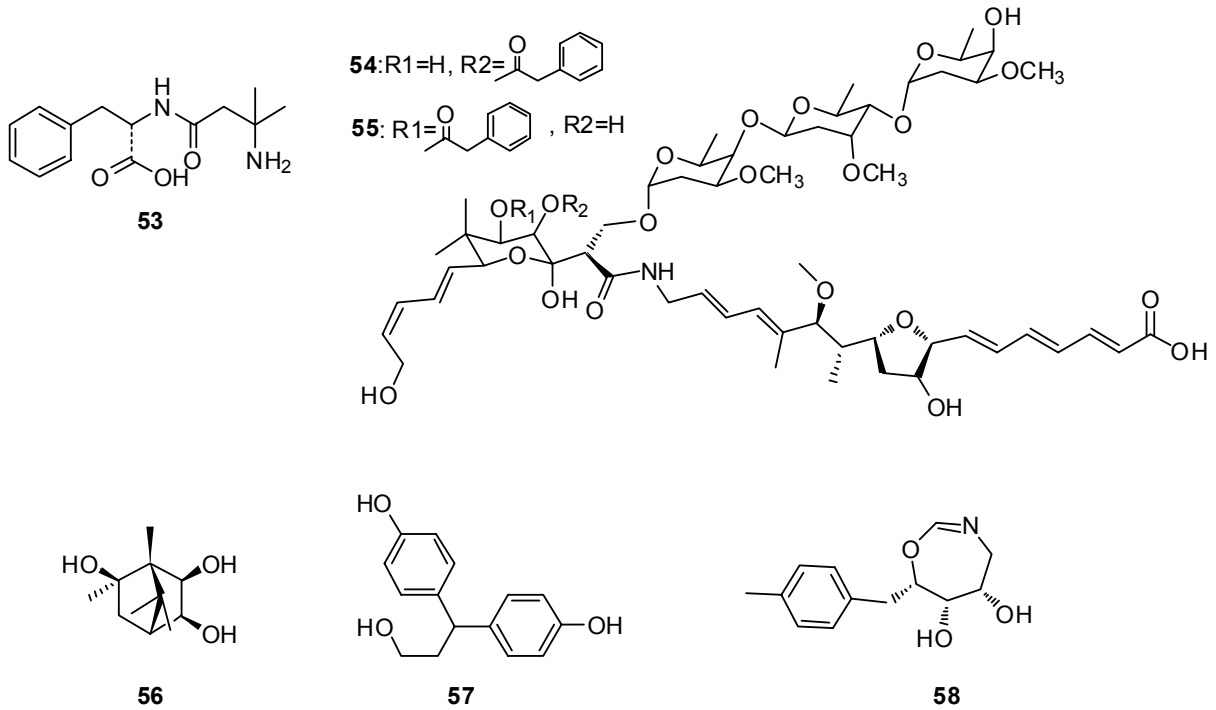


Figura 6. Metabólitos secundários isolados de *Streptomyces albospinus.*

Da actinobactéria *Streptomyces albospinus* isolada de solos*,* mesma espécie utilizada neste projeto, existem alguns estudos reportando a obtenção de metabólitos secundários como a fenamida, derivado de fenilalanina (**53**),[115] novos membros da família das elfamicinas, os antibióticos fenelfamicina G (**54**) e H (**55**),[116] além de três novos compostos: 2-metil-2,5,6-bornantriol (**56**); 4,4´-(3-hidroxipropano-1,1-diil) difenol (**57**) e 7-(4-metoxibenzil)- 4,5,6,7-tetrahidro-1,3-oxazepina-5,6-diol (**58**).[117]

Não há estudos ainda reportando *S. albospinus* como micro-organismo endofítico. Também não tem sido estudadas interações em co-cultura envolvendo *S. albospinus* e *C. boninense*. Contudo, este é apenas o começo de um longo caminho na busca de produtos naturais a partir da interação desses micro-organismos endofíticos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

O objetivo principal deste trabalho foi identificar, isolar e determinar estruturalmente os compostos produzidos a partir das culturas simples e mista da actinobactéria *Streptomyces albospinus* RLe 7 e o fungo C*olletotrichum boninense* FLe 8.1, ambos micro-organismos endofíticos.

Objetivos específicos:

- Cultivar a actinobactéria endofítica *S. albospinus* RLe7 e o fungo endofítico *C. boninense* FLe8.1 em culturas simples e em mistura em meio líquido e sólido;
- Analisar os perfis químicos dos extratos obtidos através de TLC, HPLC-DAD, RMN de ^{1}H e ESI-MS;
- Submeter os extratos obtidos aos ensaios de atividade citotóxica em células tumorais *in vitro;*
- Avaliar os resultados obtidos a fim de verificar o aumento da diversidade química e/ou bioativa em decorrência da aplicação da estratégia de cultivos microbianos mistos;
- Selecionar os cultivos promissores para serem ampliados, possibilitando obter quantidades suficientes de extratos para fracionamento cromatográfico, isolamento e elucidação estrutural das substâncias produzidas.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

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

Meios de cultura: PDA (dextrose, batata, ágar - Acumedia); dextrose (Vetec); extrato de levedura (Fluka); extrato de malte (Acumedia); PDB (potato dextrose broth – Sigma Aldrich); arroz parbolizado,* meio ISP-2 (4 g de extrato de levedura, 10 g de extrato de malte, 4 g de dextrose, água destilada para 1L, pH 7.2), meio ISP-2 ágar (15 g de ágar em 1L de meio ISP-2).

Cromatografia: cromatoplacas sílica gel com suporte de alumínio e fluorescência UV_{254}, 250 µm, 20 x 10 cm (Whatman, Germany); resina XAD-4; resina XAD-16; sephadex LH – 20 (Sigma Aldrich); sílica flash 230-400 mesh (Merck); sílica gel 60 (Merck) 0,063-0,200 nm; Colunas para cromatografia (Vidrolabor); colunas para HPLC: analítica CLC-ODS 250 mm x 4,6 mm, 5 µm (Shimadzu) acoplada à pré-coluna 12,5 mm x 4,6 mm (Agilent Technologies); analítica 250 mm x 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex) acoplada à pré-coluna 12,5 mm x 4,6 mm (Phenomenex); coluna semi-preparativa VP250/10 nucleosil 120-5 C18 250 mm x 10,0 mm, 5 µm (Macherey-Nagel) acoplada a pré-coluna 15 mm x 9,4 mm, 7 µm (Agilent Technologies); coluna para análise por cromatografia de gases: DB-5MS (30m x 0.25mm x 0.25um) Agilent J&W GC Columns.

Vidraria: Béquers de 10, 50, 250 e 500, 1000 e 4000 mL (Vidrolabor); Erlenmeyers de 50, 125, 500, 1000 e 2000 mL (Vidrolabor); placas de Petri de 10 cm de diâmetro, placas de Petri de 5 cm de diâmetro, tubos RMN 5 mm, serie 500, 7 pol. (Sigma Aldrich); tubos RMN grade 7 U-P PK-5 (Kontes Glass Company); tubos RMN 5 mm (Shigemi®) código CMS005B ($CDCl_3$), MMS005B (CD_3OD), BMS 0003 (D_2O).

* O meio arroz foi preparado com 45 g de arroz parbolizado mais 50 mL de meio ISP-2, e autoclavado durante 40 min.

Equipamentos: Aparelho de purificação de água Millipore Milli-Q (Millipore); autoclave vertical (Phoenix® AV 75); balança analítica Gehaka BG 400; balança analítica Mettler-Toledo XS-205 Dual Range; incubadora BOD (biochemical oxygen demand - Tecnal); bomba de vácuo (Micronal); capela de fluxo laminar (Pachane® PA 320); Centrífuga Hettich EBA 12 D-78532 Tuttingen (Alemanha) Typ 1000, Werk Nr. 0005843-02-00, Baujahr 2000, E Kin 5700Nm, 230/240V, 50/60Hz, 2,2A, 350W, zul. Drehzal 18,000 U/min, zul. Dichte: 1,2 Kg/dm^3; Evaporador centrífugo tipo Speed-Vac (UNIVAPO 100 ECH); espectrômetro de RMN: (Bruker® DRX-500MHz); Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – HPLC (Shimadzu® Shim-Pak), acoplado a bombas modelo LC-6 AD Shimadzu, sistema de controle SCL-10AVP Shimadzu, detector arranjo de diodos UV/VIS SPD-M10AVP Shimadzu, coletor de fração FRC10A Shimadzu, injetor automático SIL-10AF Shimadzu e *software* Class VP; espectrômetro no UV-VIS (Shimadzu® PC 1520 – Diode Array); espectrômetro de massas XEVO TQ-S (Waters Corporation Milford, USA) acoplado a sistema de UPLC ACQUITY UPLC^{TM} H CLASS; espectrômetro de massas: ESI-MS micro-TOF (Bruker-daltonics, Billerica, USA); rota-evaporadores (Büchi R-114 ou Micronal B525); sistema purificador de água osmose reversa OS10LX (Gehaka); sonicador Branson1200 (Branson Ultrasonics Corporation); cromatógrafo gasoso com detector de massas (GC-MS) Shimadzu modelo QP-2010.

Micro-organismos selecionados: Os micro-organismos selecionados pertencem à coleção do Laboratório de Química de Micro-organismos (LQMo) da FCFRP-USP coordenado pela Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo. Tanto a actinobactéria *S. albospinus* RLe 7, isolada da raiz, como o fungo *C. boninense* FLe 8.1, isolado das folhas, foram obtidos da espécie *Lychnofora ericoides* durante o projeto de doutorado do aluno Raphael Conti.[118] Tanto a actinobactéria quanto o fungo foram identificados por sequenciamento genético durante o projeto de doutorado da aluna Fernanda Oliveira das Chagas (Proc. FAPESP 09/17695-6):

Código LQMo	**Identificação do micro-organismo**	**Código de acesso do GenBank**	**Similaridade**
RLe 7	*Streptomyces albospinus*	EU521699.1	98%
FLe 8.1	*Colletotrichum boninense*	GU935881.1	100%

Os micro-organismos foram escolhidos por apresentarem diferenças nos perfis cromatográficos após análise dos extratos por HPLC-DAD quando comparadas as culturas mistas e as culturas simples.

Outros: Papel de Filtro (AZ Labor); tubo de transferência (Fischer ®); alça de platina; DataAnalysis 4.0 ESI Compass 1.3 for micrOTOF.

3.2. Métodos

3.2.1. Condições e metodologia de cultivo

Os dois micro-organismos escolhidos foram cultivados em meios líquido e sólido para verificar a variação da produção metabólica segundo o tipo de meio. Os procedimentos envolvendo a produção dos metabólitos secundários foram realizados sob condições assépticas (capela de fluxo laminar) e o material utilizado foi previamente esterilizado em autoclave. Os procedimentos de extração foram baseados nas metodologias empregadas durante o desenvolvimento do projeto de mestrado da aluna Fernanda O. das Chagas,[119] que se mostraram eficazes para obtenção de extratos em altos rendimentos.

3.2.1.1. Cultivo líquido em meio PDB

3.2.1.1.1. Cultura simples em meio PDB

A actinobactéria *S. albospinus* RLe 7 foi reativada a partir do estoque mantido em óleo mineral. Com ajuda de uma alça de platina foi feita a raspagem do estoque e transferência imediata a um tubo de vidro contendo 4 mL de meio ISP-2 líquido. A cultura foi incubada por 48 horas em agitação a 120 rpm e 30 ^{o}C. A cultura foi transferida a uma placa contendo ISP-2 ágar e incubada por sete dias a 30 ^{o}C. A partir desta placa foi realizada uma pré-cultura transferindo dois fragmentos de micélio-ágar de 5 mm de diámetro, utilizando um tubo de transferência, a um tubo de 4 mL contendo meio ISP-2. Esta pré-cultura foi incubada por 72 horas em agitação a 120 rpm e 30 ^{o}C. Depois da incubação, a pré-cultura foi vertida em 200 mL de meio

PDB e incubada por 11 dias em agitação a 120 rpm e 30 ^{o}C. Desta maneira foi obtida a cultura simples da actinobactéria em meio líquido PDB.

O fungo *C. boninense* FLe 8.1 foi reativado a partir do estoque mantido em água. Fragmentos de micélio-ágar de 5 mm de diámetro contendo o fungo foram transferidos a uma placa contendo meio PDA e deixados em incubação a 30 ^{o}C por sete dias. Posteriormente, doze fragmentos de micélio-ágar de 5 mm de diâmetro foram transferidos a 200 mL de meio PDB e incubados por 14 dias em agitação a 120 rpm e 30 ^{o}C. Desta maneira foi obtida a cultura simples do fungo em meio líquido PDB.

3.2.1.1.2. Cultura mista em meio PDB

A pré-cultura da actinobactéria *S. albospinus* RLe 7, como descrito na cultura simples, foi adicionada à cultura do fungo *C. boninense* FLe 8.1 em meio líquido PDB de três dias de incubação. A cultura mista foi mantida por 11 dias, depois da adição da actinobactéria *S. albospinus* RLe 7, em agitação a 120 rpm e 30 ^{o}C.

3.2.1.2. Cultura mista em meio sólido ISP-2 ágar

A actinobactéria *S. albospinus* RLe 7 foi reativada como descrito na cultura simples, a partir do estoque mantido em óleo mineral, porém não foi feita a pré-cultura. Diretamente do tubo contendo a actinobactéria em 4 mL de meio ISP-2 líquido, incubado por 48 horas em agitação a 120 rpm e 30 ^{o}C, foi espalhada a actinobactéria *S. albospinus* RLe 7 com ajuda de um palito com algodão estéril ao longo da placa com ISP-2 ágar, de maneira tal que uma extensão de 3 cm foi coberta com a actinobactéria. A placa foi incubada a 30 ^{o}C durante três dias, depois deste período foi colocado um fragmento de ágar contendo o fungo *C. boninense* FLe 8.1 a 6 cm de distância da actinobactéria *S. albospinus* RLe 7. O fungo foi cultivado como descrito na cultura simples. A cultura mista foi incubada por 21 dias depois da adição do fungo e mantida a 30 ^{o}C para análise por ESI-MS.

3.2.1.3. Ensaio de inibição por compostos voláteis em placa de Petri

Um dos bioensaios de antimicrobianos voláteis foi baseado na metodologia de Strobel et al.,[120] preparando placas de Petri com meio de cultura ISP-2 ágar e deixando-as esfriar. Posteriormente foi retirada uma faixa de aproximadamente 1 cm de meio de cultura da região central da placa. Os micro-organismos foram reativados como descrito no item 3.2.1.1.1. Cada micro-organismo foi inoculado em uma região da placa ficando separados por uma região sem meio de cultura para evitar a difusão de compostos solúveis no meio. Foram feitos controles das culturas mistas, nas quais cada micro-organismo foi inoculado em uma região da placa de Petri enquanto a outra região da placa continha apenas meio de cultura. As culturas foram incubadas por 7 dias a 30 ^{o}C.

Outro dos bioensaios de antimicrobianos voláteis foi baseado na metodologia de Bruce et al.[121] Os micro-organismos foram reativados como descrito no item 3.2.1.1.1 incubando individualmente cada um deles em placas de Petri contendo meio ISP-2 ágar, durante três dias a 30 ^{o}C. Depois desse período, a tampa da placa de Petri contendo o fungo foi removida, e substituída pela placa de Petri contendo a actinobactéria, selando-as com parafilme, permanecendo um micro-organismo acima do outro durante o resto do experimento. Os controles do fungo e da actinobactéria foram realizados substituindo a tampa da placa de Petri por placas contendo apenas meio de cultura ISP-2 ágar. Os micro-organismos foram incubados por 10 dias a 30 ^{o}C. Esse período foi estabelecido devido a que foi o tempo no qual o fungo controle cresceu na placa de Petri inteira. A actinobactéria não apresentou esse tipo de crescimento, permanecendo na região na qual foi inoculada.

3.2.1.4. Cultivo em meio arroz parbolizado

3.2.1.4.1. Cultura simples em meio arroz parbolizado

A actinobactéria *S. albospinus* RLe 7 foi reativada a partir do estoque em óleo mineral como descrito no item 3.2.1.1.1. A pré-cultura da actinobactéria foi transferida, após 72 horas de incubação em agitação a 120 rpm e 30 ^{o}C, ao meio arroz parbolizado e incubada por 25-28 dias a 30 ^{o}C em BOD. Foram incubados dezenove Erlenmeyers da cultura simples da actinobactéria durante 28 dias, e mais

quatro Erlenmeyers como controles da cultura mista (dois Erlenmeyers de 25 dias de incubação, e dois da cultura mista de 28 dias de incubação).

O fungo *C. boninense* FLe 8.1 foi reativado a partir do estoque em água estéril como descrito no item 3.2.1.1.1. Doze fragmentos de sete dias de incubação em meio PDA do fungo foram transferidos ao meio arroz parbolizado o qual foi incubado por 25-28 dias a 30 ^{o}C em BOD. Foram feitos quatro controles da cultura mista (dois Erlenmeyers de 25 dias de incubação, e dois da cultura mista de 28 dias de incubação).

3.2.1.4.2. Cultura mista em meio arroz parbolizado

A cultura mista foi realizada seguindo três ordens de adição dos micro-organismos, cada uma deles em duplicata, como descrito a seguir:

- Adição da actinobactéria *S. albospinus* RLe 7 ao meio arroz, como descrita na cultura simples, e três dias depois foram adicionados os fragmentos de micélio-ágar contendo o fungo *C. boninense* FLe 8.1, deixando a cultura mista em incubação por 25 dias a 30 ^{o}C em BOD.
- Adição simultânea da actinobactéria *S. albospinus* RLe 7 e o fungo *C. boninense* FLe 8.1, como foi descrita para a cultura simples de cada um deles, e deixando a cultura mista em incubação por 28 dias a 30 ^{o}C em BOD.
- Adição do fungo *C. boninense* FLe 8.1 ao meio arroz, como descrita na cultura simples, e três dias depois foi adicionada a pré-cultura da actinobactéria *S. albospinus* RLe 7, deixando a cultura mista em incubação por 25 dias a 30 ^{o}C em BOD.

3.2.2. Obtenção dos extratos

3.2.2.1. Cultura mista em meio líquido PDB

Depois do período de incubação da cultura líquida (14 dias), foram adicionados 200 mL de EtOH diretamente na cultura dos micro-organismos. Após 12 horas aproximadamente, o meio foi homogeneizado com ajuda do aparelho mixer e

sonicado por 15 minutos, posteriormente foi filtrado a vácuo. Depois de evaporar o EtOH, uma quantidade de água foi adicionada para completar o volume a 400 mL e realizar a respectiva partição com solventes Hex, AcOEt e BuOH. Cada partição foi realizada com um volume total de 400 mL de solvente orgânico o qual foi divido em três procedimentos. Os extratos orgânicos foram secos a pressão reduzida.

3.2.2.2. Extração da cultura mista em meio ISP-2 ágar

Os extratos da cultura mista em meio ISP-2 foram obtidos seguindo o procedimento de extração em micro-escala descrito por Smedsgaard[93] realizando algumas modificações para a análise da cultura mista dos micro-organismos mencionados neste trabalho.

Como mostrado na Figura 7, foram retirados três fragmentos de ágar (5 mm de diâmetro) de cada região específica da placa de cultivo. Na placa da cultura mista, as regiões foram: micélio do fungo (F), margem do micélio do fungo (MF), halo de inibição (HI), margem do micélio da actinobactéria (MA), micélio da actinobactéria (A). No caso do fungo controle, uma única região correspondente ao micélio (FC) foi retirada já que depois do tempo de cultivo deste experimento (21 dias) o fungo cresceu na placa toda. No caso da actinobactéria controle as regiões foram: micélio da actinobactéria controle (AC), margem do micélio da actinobactéria controle (MAC) e ágar da actinobactéria controle (AAC). Cada grupo de fragmentos das regiões mencionadas foi extraído da seguinte maneira, descrito também na Figura 7: os fragmentos foram transferidos a um tubo Eppendorf de 1,5 mL, adicionando 1 mL de mistura solvente.[†] Os fragmentos foram extraídos por ultrassom durante 15 minutos, e centrifugados por 10 minutos a 14000 rpm. O extrato orgânico foi transferido para outro tubo Eppendorf limpo com ajuda de uma pipeta Pasteur e seco sob vácuo. O resíduo seco foi re-dissolvido com ajuda de ultrassom por 10 minutos com MeOH:H_2O 1:1 para análise por ESI-MS.

.

[†] Foram utilizadas duas misturas solventes diferentes realizando o procedimento de extração com cada uma delas, obtendo-se os extratos correspondentes: MeOH:CH_2Cl_2:AcOEt (1:2:3) contendo 1% de ácido fórmico (v/v) e ACN:H_2O (65:35) contendo 1% de ácido fórmico.

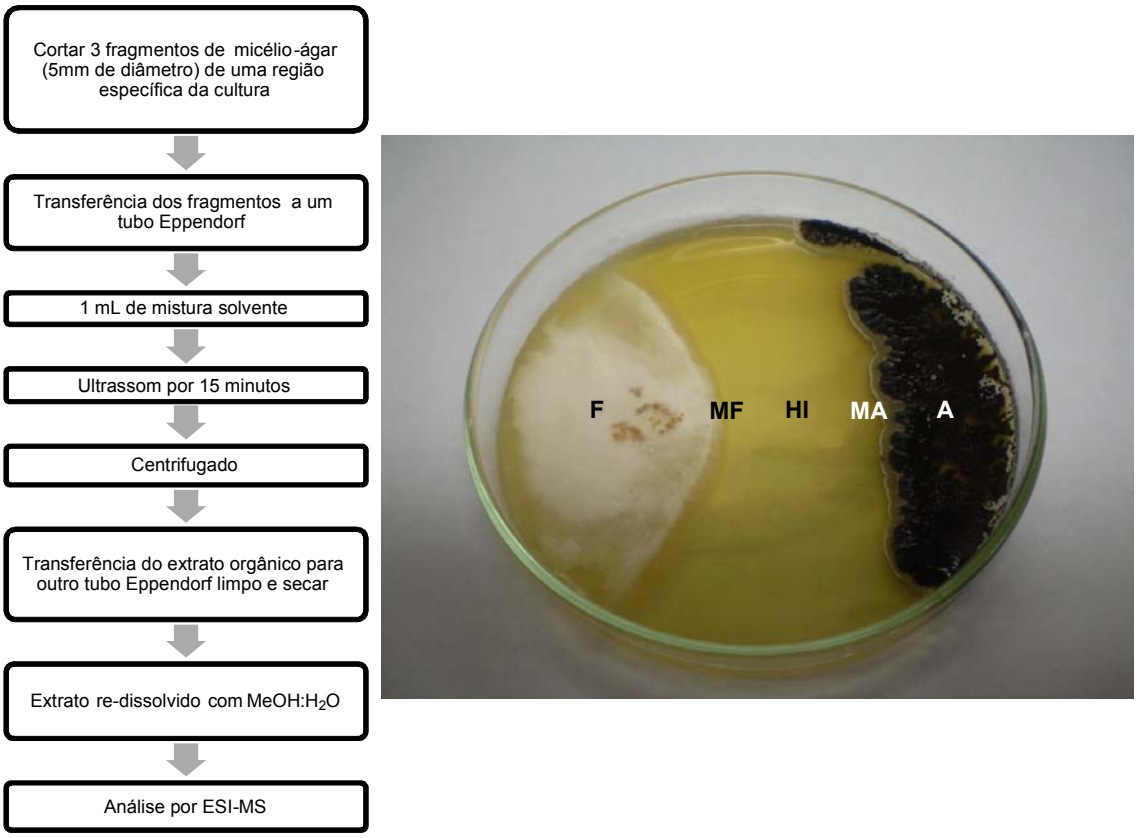


Figura 7. Metodologia da extração em micro-escala. Modificação a partir de Smedsgaard (1997).[93] Três fragmentos de micélio-ágar foram retirados de cada região marcada na figura: F (fungo), MF (margem do fungo), HI (halo de inibição), MA (margem da actinobactéria), A (actinobactéria).

3.2.2.3. Cultura mista em meio arroz parbolizado

Depois do período de incubação, 25-28 dias, das culturas simples e mistas em meio sólido arroz parbolizado, foram adicionados 200 mL de MeOH em cada Erlenmeyer. Após 24 horas, as suspensões foram sonicadas por 15 minutos e filtradas a vácuo. Antes de ser realizada a partição, o MeOH foi evaporado e posteriormente foi adicionada uma quantidade de água levando o volume para 400 mL em cada Erlenmeyer. No caso da cultura simples da actinobactéria *S. albospinus* RLe 7, os extratos hidroalcoólicos foram reunidos em um só para ser particionado com 7,6 L de solvente orgânico. No caso da cultura mista, cada Erlenmeyer foi extraído e particionado por separado. O volume do solvente orgânico para cada partição (Hex, AcOEt, BuOH) foi divido para realizar o procedimento três vezes. Os extratos orgânicos foram secos à pressão reduzida.

3.2.3. Triagem biológica dos extratos obtidos

O estudo da citotoxicidade *in vitro* dos extratos foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. A citotoxicidade das amostras foi avaliada pelo método do MTT[122] utilizando três linhagens de células tumorais: MDA-MB435 (melanoma - humano), HCT-8 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano). As células foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (Estados Unidos), e 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 CO_2.

As células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades nas seguintes densidades: 0,7 x 10^5 (HCT-8), 0,6 x 10^5 (SF-295) e 0,1 x10^6 (MDAMB-435). Os extratos e frações foram incubados durante 72 horas em uma única concentração (50 µg/mL). As absorbâncias foram obtidas com o auxílio de um espectofotômetro de placa a 595 nm. Doxorrubicina (Dox) foi utilizada como controle positivo apresentando IC_{50} de 0,04 µg mL^{-1} para as células HCT-8 e SF-295, e de 0,2 µg mL^{-1} para as células MDA-MB435.

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, como observado na Tabela 1, foram apresentados da maneira seguinte: 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 variando de 75 a 100%)

3.2.4. Triagem química dos extratos obtidos

Os extratos das culturas líquidas e sólidas em meio arroz parbolizado foram submetidos à análise por TLC, HPLC-DAD, RMN de ^1H e GC-MS. Alguns dos extratos obtidos a partir da cultura sólida em arroz parbolizado, assim como os extratos obtidos a partir da extração em micro-escala (Figura 7), foram analisados também por MS.

As análises da extração em micro-escala foram realizadas por inserção direta dos extratos no equipamento ACQUITY UPLCTM H CLASS acoplado a detector de massas XEVO TQ-S da Waters Corporations Milford, USA, nas seguintes condições: polaridade: modo positivo, capilar: 32 KV, cone: 40 V, temperatura da fonte: 150°C, temperatura de dessolvatação do gás nitrogênio: 400 ^{o}C, gás de colisão: argônio. Como solvente A: H_2O + 0.1% ác. fórmico e como solvente B: MeOH + 0.1% ác. fórmico, na relação 20% solvente A: 80% solvente B. Vazão de 0.1 mL/min, volume de injeção de 5 µL. As análises foram realizadas no modo positivo.

As análises por GC-MS foram realizadas no cromatógrafo gasoso com detector de massas Shimadzu modelo QP-2010. As condições das análises foram as seguintes: temperatura do forno 100 ^{o}C; temperatura de injeção 250 ^{o}C; modo de injeção split, modo linear de controle da velocidade da vazão; pressão 81,5 KPa; vazão total 26,1 mL/min; vazão na coluna 1,1mL/min; velocidade linear 39,0 cm/seg; vazão de purga 3,0 mL/min. GCMS-QP2010: temperatura da fonte 250 ^{o}C; temperatura de interface 290 ^{o}C; tempo de corte do solvente 3,5 min. MS: tempo de início 4,00 min; tempo final 49,00 min; modo *scan* de aquisição; intervalo 0,3 seg; velocidade de *scan* 1666; faixa de massa *m/z* 50,00-500,00. As bases de dados de comparação de espectros obtidos por EI-MS foram NIST 08S, NIST 08 e WILEY-7.

As análises dos extratos dos cultivos em meio arroz parbolizado por inserção direta foram realizadas no equipamento micrOTOF II - ESI-TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). As condições do experimento foram as seguintes: vazão da bomba de infusão: 300 µL/h, fase móvel de solubilização: MeOH:H_2O, modo de detecção positivo. Devido à alta resolução do aparelho, foi realizada calibração interna antes das análises com solução de trifluoroacetato sódico a 10 mg/mL. As condições do aparelho durante as análises foram as seguintes: *end plate*: 500 Volts, *capillary*: 4500 Volts, *capillary exit*: 120 Volts, *skimmer* 1: 50 Volts, *skimmer* 2: 22 Volts, *transfer*: 70 µs, *dry gas temperature*: 200 ^{o}C, *dry gas flow*: 4 L/min, *nebulization gas pressure*: 0.4 Bar, gas nitrogênio, bomba de infusão modelo Cole Parmer.

As análises por MS sequencial dos extratos dos cultivos em meio arroz parbolizado foram realizadas no equipamento micrOTOF-Q II - ESI-TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). As condições do experimento foram as seguintes: vazão da bomba de infusão: 250 µL/h, fase móvel de solubilização: MeOH:H_2O, modo de detecção positivo. Devido à alta resolução do aparelho, foi realizada calibração interna antes das análises com solução de

trifluoroacetato sódico a 10 mg/mL. As condições do aparelho durante as análises foram as seguintes: end plate: 500 Volts, capillary: 3500 Volts, skimmer 1 RF: 200 Vpp, skimmer 2 RF: 200 Vpp, transfer: 70 µs, dry gas temperature: 180 ^{o}C, dry gas flow: 4 L/min, nebulization gas pressure: 0.4 Bar, gas nitrogênio, bomba de infusão modelo KdScientific mod. no. 601553.

As análises por TLC foram realizadas em fase normal utilizando gradiente de polaridade com Hex, AcOEt e MeOH e em fase reversa usando gradientes de polaridade usando água:MeOH, quando adequado. Foi utilizada revelação no UV (254nm e 365nm) assim como vanilina sulfúrica. As análises por HPLC-DAD em fase reversa foram realizadas utilizando coluna analítica CLC-ODS 250 mm x 4,60 mm x 5 µm e fase móvel em gradiente de MeOH:água (10% a 100% de MeOH em 30 minutos). A concentração dos extratos foi de 5µg/µL injetando 20µL, vazão de 1mL/min, e detecção na faixa do UV entre 190-370nm.

As amostras para análises por RMN de ^{1}H foram solubilizadas em $CDCl_3$, CD_3OD ou D_2O. As amostras analisadas por GC-MS foram solubilizadas em $CHCl_3$. As amostras analisas por ESI-MS foram solubilizadas em H_2O:MeOH 1:1.

3.2.4.1. Cultura mista em meio líquido PDB

3.2.4.1.1. Obtenção da mevalonolactona

Primeiro foi fracionado o extrato butanólico da cultura mista, L-A7F8.1Bu, utilizando uma série de procedimentos cromatográficos começando com um fracionamento usando sílica flash em vácuo. Nem todas as frações obtidas através dos diferentes procedimentos cromatográficos resultaram em isolamento de substâncias puras de interesse, porém são apresentadas as duas frações, as quais segundo os dados das análises por RMN de ^{1}H e CG-MS, contém mevalonolactona. O esquema da Figura 8 mostra a obtenção da mevalonolactona presente em duas frações do extrato butanólico da cultura mista em meio líquido.

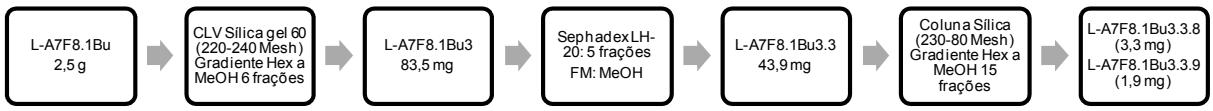


Figura 8. Obtenção das frações L-A7F8.1Bu3.3.8 e L-A7F8.1Bu3.3.9 contendo mevalonolactona.

3.2.4.1.2. Obtenção do tirosol

O extrato orgânico da cultura mista em meio líquido obtido com AcOEt, L-A7F8.1AcO foi submetido a fracionamento por SPE C-18 usando fase móvel em gradiente de água a MeOH 100%. Algumas das frações obtidas a partir deste fracionamento foram analisadas por ESI-MS. O esquema da Figura 9 mostra o procedimento cromatográfico que resultou no isolamento do tirosol.

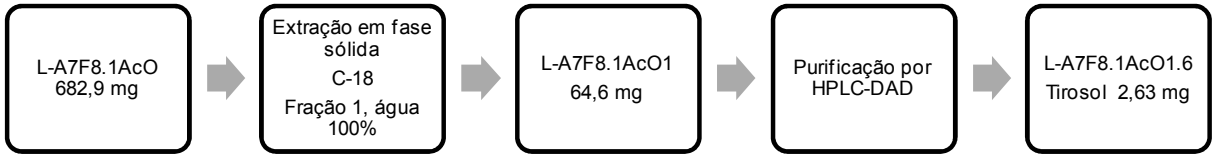


Figura 9. Purificação do tirosol a partir do extrato L-A7F8.1AcO da cultura mista em meio líquido PDB.

3.2.4.2. Cultura mista em meio sólido ISP-2

Os extratos obtidos segundo a metodologia descrita na Figura 7 foram analisados diretamente por ESI-MS a fim de detectar os possíveis metabólitos envolvidos na inibição do crescimento do fungo.

3.2.4.3. Cultura em meio arroz parbolizado

Alguns dos extratos da cultura simples e mista foram analisados por RMN de ^{1}H e ESI-MS. Os extratos da cultura simples da actinobactéria *S. albospinus* RLe 7 foram submetidos a fracionamento utilizando resina XAD-16 ou XAD-4, posteriormente foi realizado um fracionamento por exclusão de tamanho molecular utilizando Sephadex LH-20. Tanto na cultura simples (extratos BuOH e AcOEt) como na mista foi detectada a presença de fisostigmina por ESI-MS. Esta substância também foi detectada por GC-MS na fração SA-A7AcOX4.5.2. A fisostigmina foi obtida segundo o procedimento cromatográfico descrito na Figura 10.

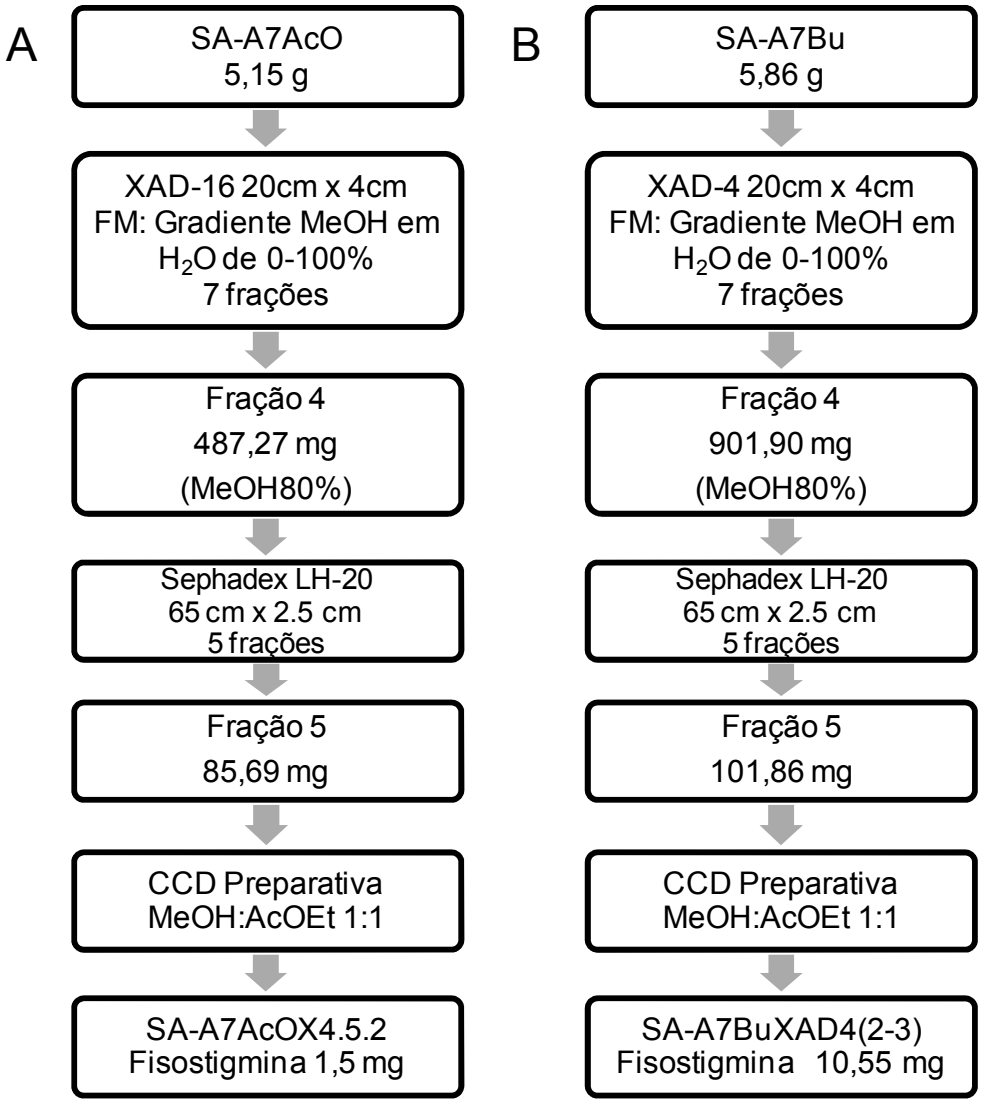


Figura 10. Isolamento da fisostigmina a partir do extrato da cultura simples da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 em arroz parbolizado. Extrato de AcOEt (A), extrato de BuOH (B)

3.2.4.4. PCA dos extratos das culturas em meio arroz parbolizado

A fim de obter maior informação gerada das análises dos extratos de AcOEt das culturas em meio arroz parbolizado foram realizados dois tipos de análises quimiométricas de reconhecimento não supervisionado de padrões, PCA (análise de componentes principais) e HCA (análise de agrupamento hierárquico), utilizando os dados gerados por ESI-MS pela inserção direta dos seguintes extratos:

SA A7 AcO A: cultura simples da actinobactéria RLe 7;

SA A25 AcO A: controle de 25 dias da actinobactéria RLe 7 da cultura mista;

SA A28 AcO A: controle de 28 dias da actinobactéria RLe 7 da cultura mista;

SA F25 AcO A: controle de 25 dias do fungo FLe 8.1 da cultura mista;

SA F28 AcO A: controle de 28 dias do fungo FLe 7 da cultura mista;
SA PA AcO A: cultura mista com adição inicial da actinobactéria RLe 7;
SA PF AcO A: cultura mista com adição inicial do fungo FLe 8.1;
SA MD AcO A: cultura mista com adição simultânea dos micro-organismos.

Os parâmetros levados em conta na PCA foram os sinais detectados nos espectros de massas, as intensidades dos íons, assim como a origem biológica do possível metabólito (íon detectado), sendo o fungo, a actinobactéria, ou a interação entre os dois micro-organismos. A PCA foi calculada utilizando o método SVD (decomposição de valores singulares) utilizando o software The Unscrambler® 9.6.

A HCA foi realizada utilizando os mesmos dados de ESI-MS das amostras da cultura mista utilizando o mesmo software The Unscrambler® 9.6. Foi realizado um pré-processamento de dados manual com objetivo de eliminar informações não relevantes, condicionando a matriz de dados para uma análise mais eficiente.[123] O tipo de pré-processamento utilizando neste trabalho foi uma normalização utilizando a seguinte fórmula:$\sqrt{(I+1)}$, onde I é a intensidade do pico em cnts.

3.2.5. Ensaio de inibição com substância pura

Após o isolamento da fisostigmina a partir da cultura simples da actinobactéria, foram realizados ensaios para determinar se a fisostigmina era a substância responsável pela inibição do fungo FLe 8.1 na cultura mista em meio sólido ISP-2, e também a responsável da inibição da produção metabólica do fungo no meio arroz parbolizado.

3.2.5.1. Ensaio antifúngico por diluição

O ensaio antifúngico da fisostigmina contra o fungo FLe 8.1 foi realizado segundo o método de micro-diluição em caldo M38-A da CLSI[124] com pequenas modificações. O ensaio foi feito em placas estéreis de 96 poços utilizando 12 concentrações da substância a ser testada em diluições seriadas a razão de 2 desde 400 µg/mL até 195.3 ng/mL. O volume final de cada poço foi de 200 µL. A fisostigmina foi testada em triplicata. Como controle positivo foi utilizado o antifúngico actidione. Como indicador colorimétrico foi utilizado o corante resazurina,

o qual apresenta uma mudança de cor de roxo, quando dissolvido em meio PDB (ausência de crescimento), para rosa (indicando crescimento). Foram feitos os controles correspondentes ao micélio, controle negativo da actidione, controle de esterilidade da fisostigmina, controle de esterilidade do DMSO e controle de esterilidade do meio PDB. A temperatura foi mantida a 30 ^{o}C durante o ensaio.

Após várias tentativas seguindo procedimentos descritos na literatura para esporulação de *C. boninense*[109], não foi observada esporulação do fungo endofítico, razão pela qual o ensaio foi realizado usando uma suspensão do micélio. Esta suspensão foi obtida mediante raspagem superficial com meio PDB (10 mL) auxiliado por uma alça de platina a partir do cultivo do fungo *C. boninense* FLe 8.1 em meio PDA em placa de Petri (10 cm de diâmetro) após sete dias de crescimento. Desta suspensão foram adicionados 80 µL em cada poço.

As observações foram feitas e registradas com câmera fotográfica durante sete dias. Este experimento foi realizado duas vezes nas mesmas condições para confirmar os resultados observados.

3.2.5.2. Ensaio de inibição do crescimento fúngico em placa de Petri

O ensaio de inibição em placa foi realizado mediante transferência de fragmentos de micélio-ágar (5 mm de diámetro) do fungo *C. boninense* FLe 8.1 de sete dias de crescimento em meio PDA a uma placa de Petri (5 cm de diâmetro) contendo fisostigmina. Foram feitos dois experimentos paralelos, um deles utilizando meio PDA em cinco placas de Petri e outro utilizando meio ISP-2 ágar. Foram preparadas cinco concentrações da fisostigmina (500, 400, 300, 200 e 100 µg/mL) em um volume total de 5 mL de meio em cada placa. O crescimento do fungo foi registrado durante duas semanas e comparado com o crescimento do fungo nas mesmas condições sem adição da fisostigmina. As culturas foram mantidas a 30 ^{o}C durante o ensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Micro-organismos selecionados

Inicialmente foram realizadas as culturas mistas em meio líquido, seguindo a metodologia descrita no item 3.2.1.1.2, entre a actinobactéria *S. aburaviensis* RLe 10 e o fungo *C. boninense* FLe 8.1, assim como a cultura entre a actinobactéria *S. albospinus* RLe7 e o fungo *C. boninense* FLe 8.1. Depois de 14 dias foram obtidos os extratos em AcOEt, os quais foram analisados por HPLC-DAD. Foi observado que a cultura mista entre a actinobactéria *S. aburaviensis* RLe10 e o fungo *C. boninense* FLe 8.1 não apresentou diferenças no perfil químico quando comparado com a cultura simples. Por outro lado, foram observadas diferenças nos perfis de absorção no UV obtidos depois da análise por HPLC-DAD na cultura mista entre a actinobactéria *S. albospinus* RLe 7 e o fungo *C. boninense* FLe 8.1 (Figura 11). Assim esses dois micro-organismos foram escolhidos para o prosseguimento do projeto de mestrado.

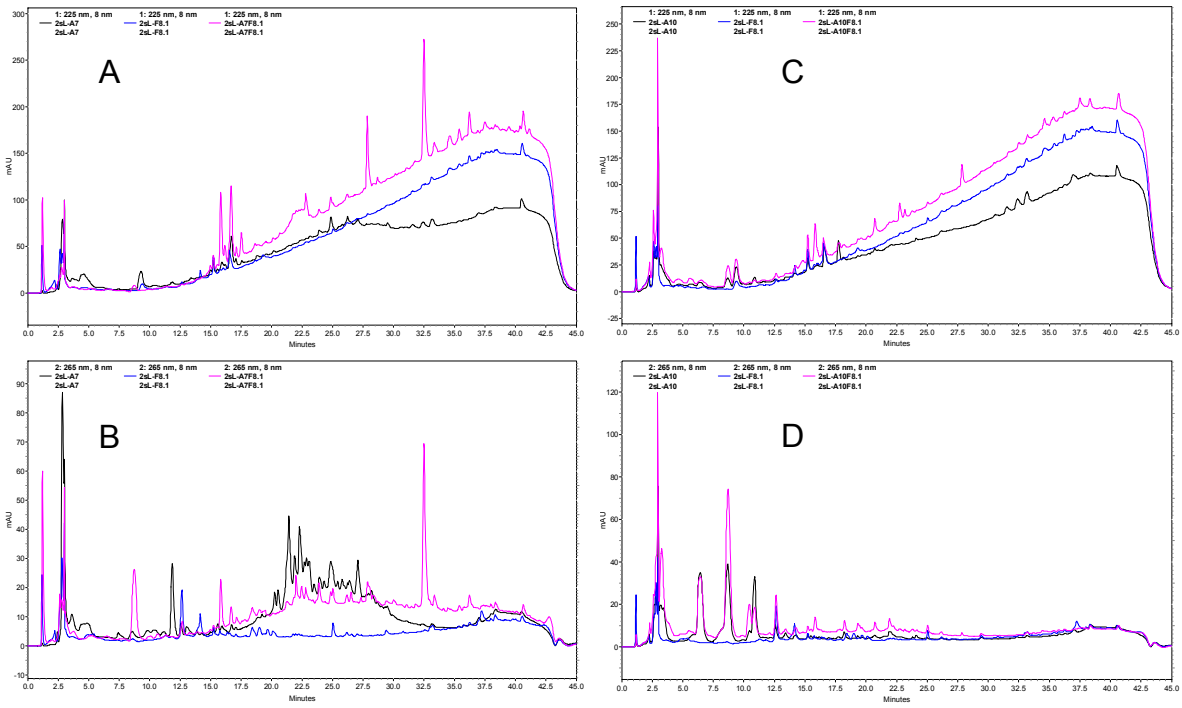


Figura 11. Cromatograma dos extratos de AcOEt da cultura mista do *C. boninense* FLe 8.1 com as actinobactérias *S. albospinus* RLe 7 e *S. aburaviensis* RLe 10.
A). *S. albospinus* RLe 7 (preto), *C. boninense* FLe 8.1 (azul), cultura mista (rosa), absorção a 225 nm. B). *S. albospinus* RLe 7 (preto), *C. boninense* FLe 8.1 (azul), cultura mista (rosa), absorção a 265 nm. C). *S. aburaviensis* RLe 10 (preto), *C. boninense* FLe 8.1 (azul), cultura mista (rosa), absorção a 225 nm. D). *S. aburaviensis* RLe 10 (preto), *C. boninense* FLe 8.1 (azul), cultura mista (rosa), absorção a 265 nm. Coluna analítica CLC-ODS 250 mm x 4,5 mm e fase móvel de MeOH em água (10% a 100% de MeOH, em 30 min; 100% de MeOH, de 30 a 35 min, 100% a 10% de MeOH, de 35 a 37 min; 10% de MeOH, de 37 a 45 min), à vazão de 1 mL min-1, e detecção no UV.

4.2. Triagem biológica dos extratos obtidos

Como observado na Tabela 1 e na Figura 12 as amostras SA-F28HEXB e SA-A7AcOX6 na concentração de 50 µg/mL apresentaram elevada atividade citotóxica em pelo menos uma das linhagens empregadas.

Segundo estes resultados, curiosamente só um dos extratos em hexano da duplicata da cultura do fungo de 28 dias de incubação em meio arroz parbolizado apresentou atividade citotóxica. Não se esperava atividade neste único extrato, já que não apresentaram atividade citotóxica nenhum dos extratos de hexano de 25 dias de incubação do fungo, nem mesmo a duplicata de 28 dias.

Ambos os extratos SA-F28HEXB e SA-A7AcOX6 foram submetidos a fracionamentos cromatográficos que não resultaram em isolamento de substâncias responsáveis pela atividades mencionada, provavelmente pela baixa quantidade contida neles. Como tentativa adicional, amostras desses dois extratos foram analisadas por ESI-MS.

Tabela 1. Resultados dos ensaios de citotoxicidade dos extratos das culturas simples e mistas de *S. albospinus* RLe 7 e *C. boninense* FLe 8.1 em três linhagens de células tumorais.

Amostras	Rendimento	Linhagens celulares		
	Massa (mg)	**MDA-MB435**	**HCT8**	**SF295**
L-A7F8.1ACO	682,9	PA (34,73%)	PA (8,55 %)	PA (30,28 %)
L-A7F8.1BU	2495,2	PA (3,16%)	SA	SA
SA-PFACOA	158,6	SA	SA	SA
SA-F25ACOA	149,9	SA	SA	SA
SA-PFBUA	2126,9	SA	SA	PA (17,90 %)
SA-MDACOA	183,4	SA	SA	PA (18,11 %)
SA-A25ACOA	853,8	SA	SA	PA (5,52 %)
SA-A28BUA	2606,3	SA	SA	SA
SA-BRBUA	260,7	SA	SA	PA (5,93 %)
SA-A25BUA	1026,8	SA	SA	PA (14,15 %)
SA-F25BUA	955,6	SA	SA	SA
SA-F28BUA	1083,4	PA (27,18%)	SA	PA (20,19 %)
SA-F28ACOA	237,8	PA (10,45%)	PA (22,75 %)	PA (28,51 %)
SA-BRACOA	320,7	PA (12,84%)	SA	SA
SA-PABUA	2306,0	PA (7,13%)	SA	SA
SA-MDBUA	2843,7	PA (24,06%)	SA	SA
SA-A28ACOA	292,1	SA	SA	PA (11,24 %)
SA-PAACOA	139,0	SA	SA	PA (23,41 %)
SA-A7HEX	10638,6	PA (23,84%)	SA	PA (29,55 %)
SA-A7ACO	19926,6	SA	SA	PA (7,60 %)
SA-A7BU	38853,6	SA	SA	SA
SA-MDACOB	112,6	PA (18,57%)	PA (26,14 %)	PA (27,58 %)
SA-F28ACOB	170,0	PA (24,81%)	PA (15,42 %)	PA (23,00 %)
SA-F28BUB	918,1	SA	SA	SA
SA-MDBUB	3041,5	SA	SA	SA
SA-PAACOB	119,6	SA	PA (5,43 %)	PA (16,02 %)
SA-A25HEXA	344,0	PA (11,93 %)	PA (9,51 %)	PA (34,08 %)
SA-A25HEXB	316,1	PA (12,65 %)	SA	PA (29,96 %)
SA-A7HEX	10638,6	PA (19,16 %)	PA (13,54 %)	PA (24,65 %)
SA-PAHEXA	252,1	SA	SA	PA (16,58 %)
SA-PAHEXB	287,2	SA	SA	PA (9,69 %)
SA-F25HEXA	94,4	PA (28,05 %)	PA (22,65 %)	PA (22,45 %)
SA-F25HEXB	122,7	PA (45,92 %)	PA (48,76 %)	PA (38,76 %)
SA-A28HEXA	537,9	PA (22,89 %)	PA (11,34 %)	PA (30,97 %)
SA-A28HEXB	530,8	PA (17,49 %)	PA (12,99 %)	PA (35,04 %)
SA-PFHEXA	270,5	SA	SA	PA (16,41 %)
SA-PFHEXB	204,4	SA	PA (6,21 %)	PA (20,76 %)
SA-F28HEXA	351,0	SA	SA	PA (45,82 %)
SA-F28HEXB	125,1	MA (93,25 %)	PA (32,56 %)	PA (47,85 %)
SA-MDHEXA	0,3	PA (22,26 %)	SA	SA
SA-MDHEXB	397,0	PA (21,14 %)	SA	PA (21,09 %)
SA-A7AcOX6	69,1	PA (47,19 %)	MA (82,15 %)	MO (70,37 %)
Dox	-	MA (98,27%)	MA (97,30 %)	MA (96,94 %)

Códigos das amostras: L- se refere à cultura mista em meio líquido PDB (A7F8.1=*S. albospinus* RLe 7 e *C. boninense* FLe 8.1). SA- se refere à cultura em meio arroz parbolizado (PF=adição inicial do fungo *C. boninense* FLe 8.1 na cultura mista; F25 ou F28=*C. boninense* FLe 8.1 de 25 ou 28 dias de incubação respectivamente; MD= adição simultânea dos micro-organismos na cultura mista; A25 ou A28=*S. albospinus* RLe 7 de 25 ou 28 dias de incubação respectivamente; BR= Branco; PA= adição inicial de *S. albospinus* RLe 7 na cultura mista; A7=cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 de 28 dias de incubação; ACO=acetato de etila; BU=butanol; HEX=hexano; as letras A ou B no final do código de cada extrato se refere à duplicata).

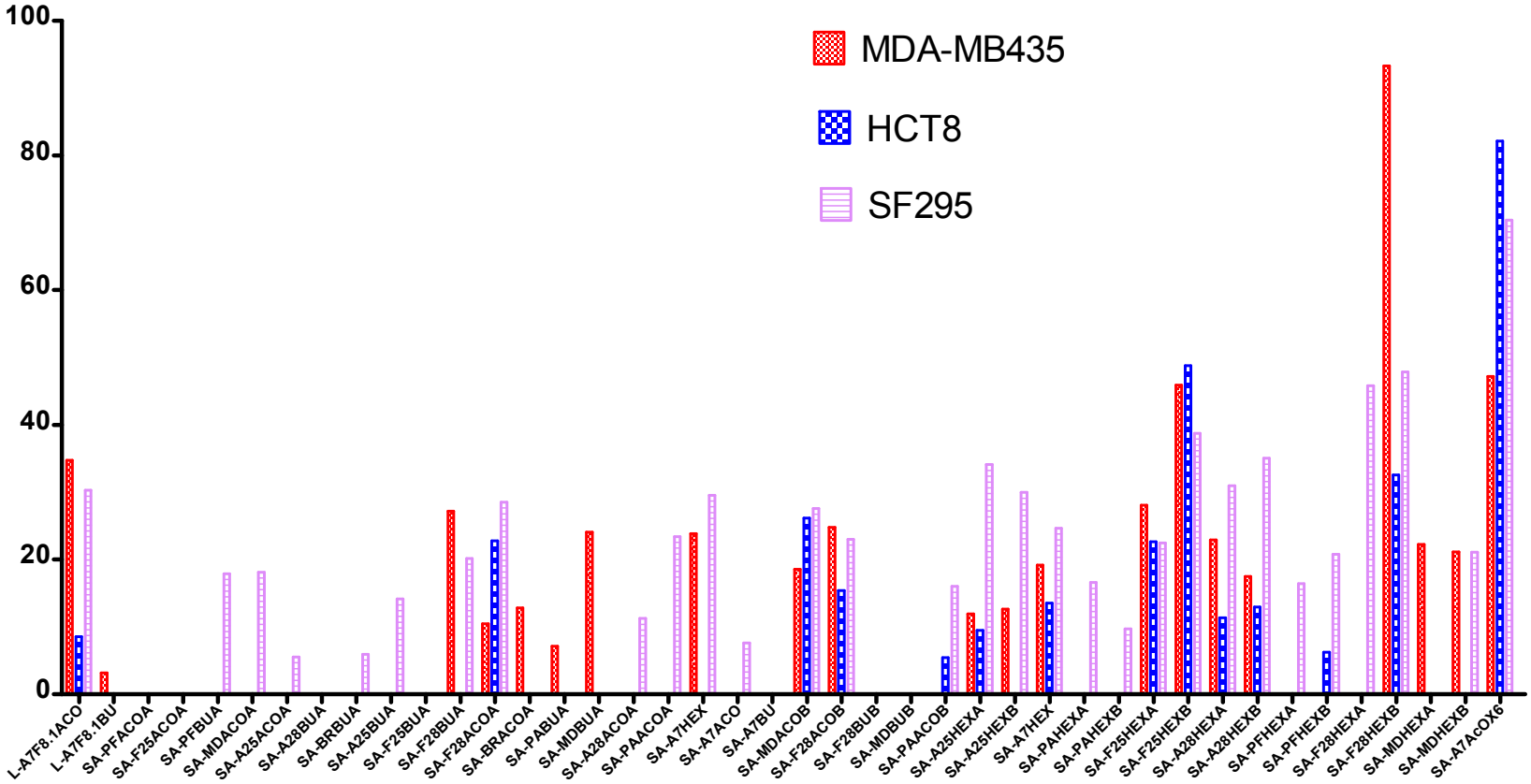


Figura 12. Resultados dos ensaios de citotoxicidade dos extratos das culturas simples e mistas de *S. albospinus* RLe 7 e *C. boninense* FLe 8.1 em três linhagens de células tumorais.

4.3. Cultura mista em meio líquido PDB

A partir do fracionamento cromatográfico do extrato de BuOH da cultura mista em meio líquido foram obtidas várias frações que foram analisadas por RMN de ^{1}H e por GC-MS.

4.3.1. Isolamento e caracterização da mevalonolactona

Os espectros de RMN de ^{1}H das amostras L-A7F8.1Bu3.3.8 e L-A7F8.1Bu3.3.9 foram muito semelhantes, apresentando sinais interessantes na região entre δ 4.6-1.0 apesar de não corresponder a substâncias puras. A fim de obter maior informação, a amostra L-A7F8.1Bu3.3.9 foi analisada por GC-MS e a amostra L-A7F8.1Bu3.3.8 analisada por ESI-MS.

Os dados de GC-MS da amostra L-A7F8.1Bu3.3.9 evidenciam uma mistura de pelo menos sete substâncias, e cujos espectros de massas por IE foram comparados com os da biblioteca de compostos do NPPNS-FCFRP-USP quando foi possível. Segundo o cromatograma obtido (Figura 13), o primeiro sinal (tempo de retenção de 8.75 minutos e 58.3% de área total), corresponde à mevalonolactona, tetraidro-4-hidroxi-4-metil-2H-piran-2-ona, de acordo com a comparação com o banco de espectros da biblioteca mencionada (97% de similaridade).

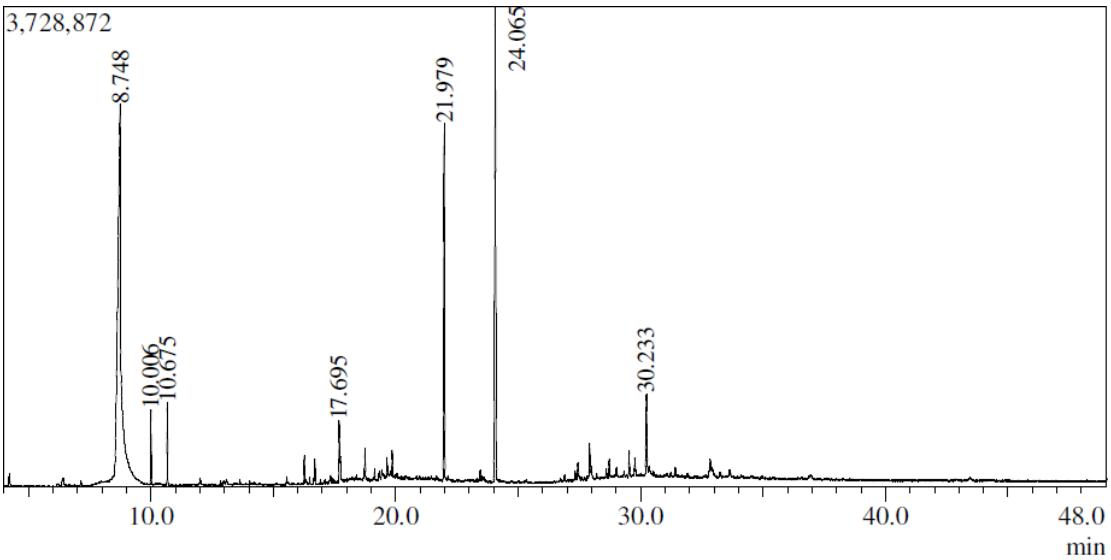


Figura 13. Cromatograma da análise por GC-MS da amostra L-A7F8.1Bu3.3.9.

Segundo o espectro de RMN de ^{1}H da amostra L-A7F8.1Bu3.3.8 (Figura 14), vários dos sinais são coerentes com a estrutura da substância sugerida: *δ* 4,60 (1H, ddd, J=4,53, 11,29, 10,74 Hz), 4,36 (1H, m), 2,66 (1H, dd, *J*=1,8, 17,4 Hz), 2,54 (1H, d, J=17,4), 1,91 (2H, m), 1,41 (3H, s) os quais, quando comparados com literatura,[125, 126] são idênticos aos da mevalonolactona. A informação obtida por ESI-MS (Figura 15) sugere também a presença desta molécula já que foi detectado o íon majoritário *m/z* 153.0530 (erro de 5,1 ppm)[‡], correspondente a $[M+Na^{+}]$, assim como o íon *m/z* 131.0705 (erro de 1,7 ppm), correspondente a $[M+H^{+}]$. A mevalonolactona é um metabólito de origem natural previamente reportado na literatura também em fungos endofíticos.[127, 128] Adicionalmente, foi realizada busca no DNP[129] corroborando que este composto possui atividade biológica, sendo ativo contra *Enterobacter agglomerans* e *Fusarium avenaceum*.[130] No caso da atividade contra a *E. agglomerans* foi observado que a aplicação da mevalonolactona junto com o ácido benzóico, a 5-metil-2,4-imidazolidinediona (metil-hidantoína), e a tetra-hidro- 4-hidroxi-4-metil-2H-piran-2-ona (ciclo-glicil-L-leucil) apresentou maior atividade em comparação com as substâncias utilizadas separadamente, demonstrando que existe um efeito sinérgico entre elas.

Este metabólito não foi ainda descrito para a actinobactéria *S. albospinus*, ou para o fungo *C. boninense*. Devido aos relatos mencionando a mevalonolactona como produzida por fungos, provavelmente foi produzida pelo fungo *C. boninense* FLe 8.1, porém não foi determinado se ela foi produzida na cultura simples do fungo em meio líquido, e como será descrito posteriormente, a mevalonolactona também não foi detectada na cultura simples do fungo *C. boninense* FLe 8.1 em meio arroz parbolizado.

[‡] Cálculo do erro = massa teórica - massa experimental x 1000000/ massa teórica
Massa exata da mevalonolactona = 130. 062995

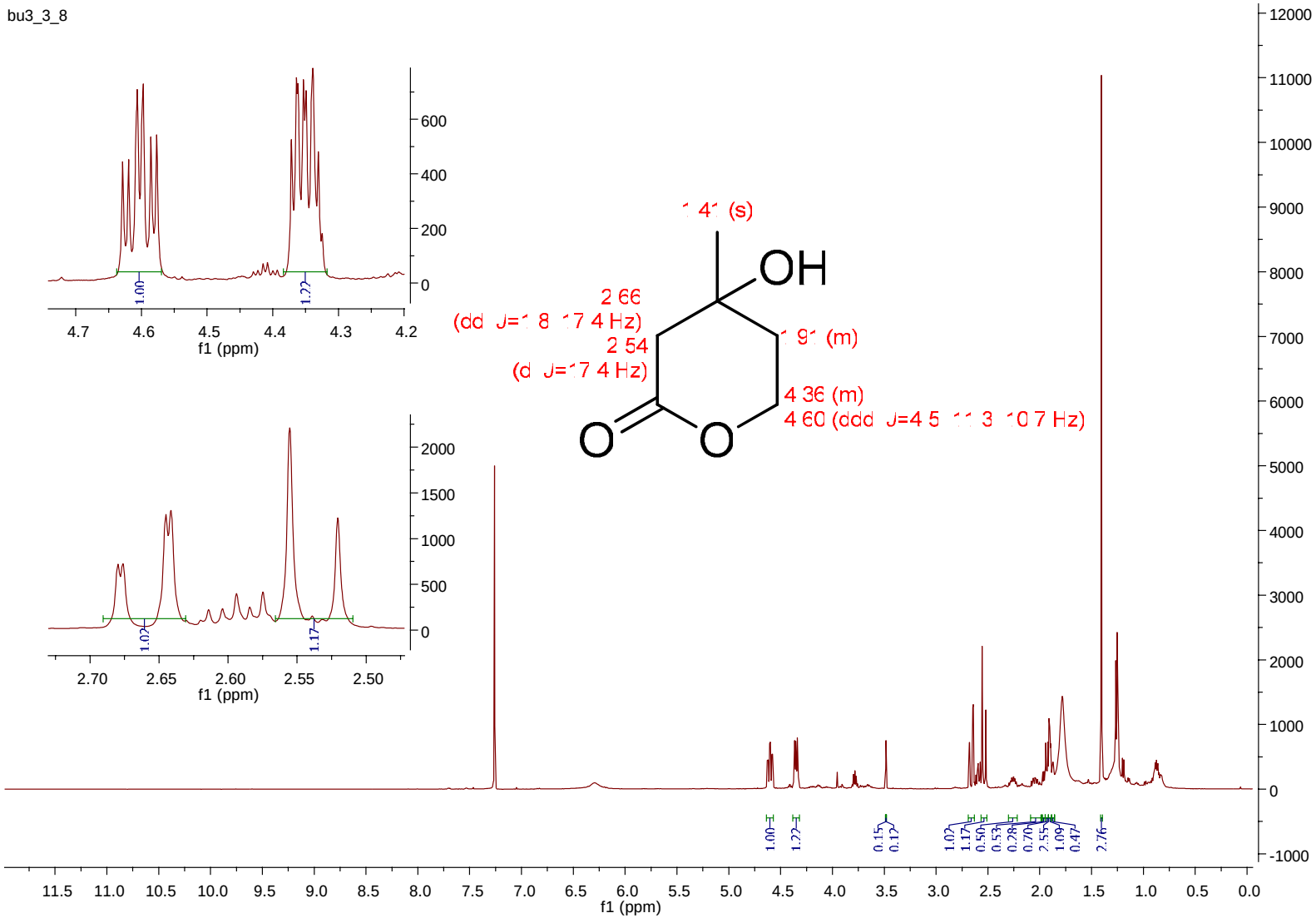


Figura 14. Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) da amostra L-A7F8.1Bu3.3.8. Estrutura da mevalonolactona, $C_6H_{10}O_3$, mostrando em vermelho os deslocamentos químicos de hidrogênio (δ em ppm).

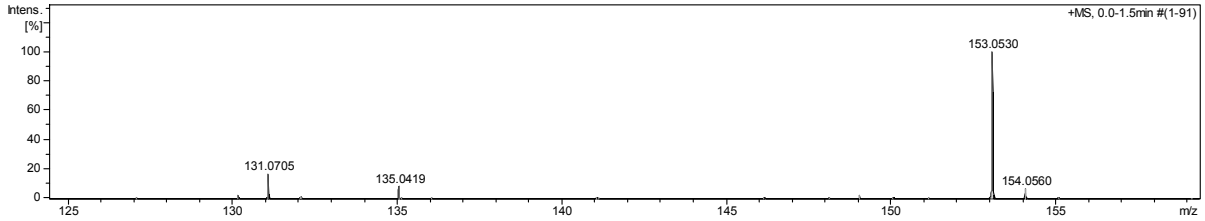


Figura 15. Região do espectro de ESI-MS da amostra L-A7F8.1Bu3.3.8 apresentando os íons de *m/z* 131 e de *m/z* 153 confirmando a presença da mevalonolactona.

4.3.2. Identificação e caracterização do tirosol

A partir do extrato de AcOEt da cultura mista em meio líquido foi isolado o tirosol, derivado da tirosina, molécula amplamente conhecida envolvida em *quorum sensing* e de origem fúngica.[131] Esta molécula foi isolada do fungo patogênico *Candida albicans*[132] e posteriormente foi descrita sua função como molécula sinalizadora.[133] Na Figura 16 se mostra o espectro de RMN de ^{1}H obtido da fração L-A7F8.1AcO1.6 contendo o tirosol observando os seguintes deslocamentos químicos atribuídos para esta molécula: δ 7,13 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 6,80 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H), 3,73 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 2,73 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), os quais são coerentes com os reportados na literatura.[133] O tirosol também foi isolado de fungos endofíticos em trabalhos prévios do LQMo.[134, 135]

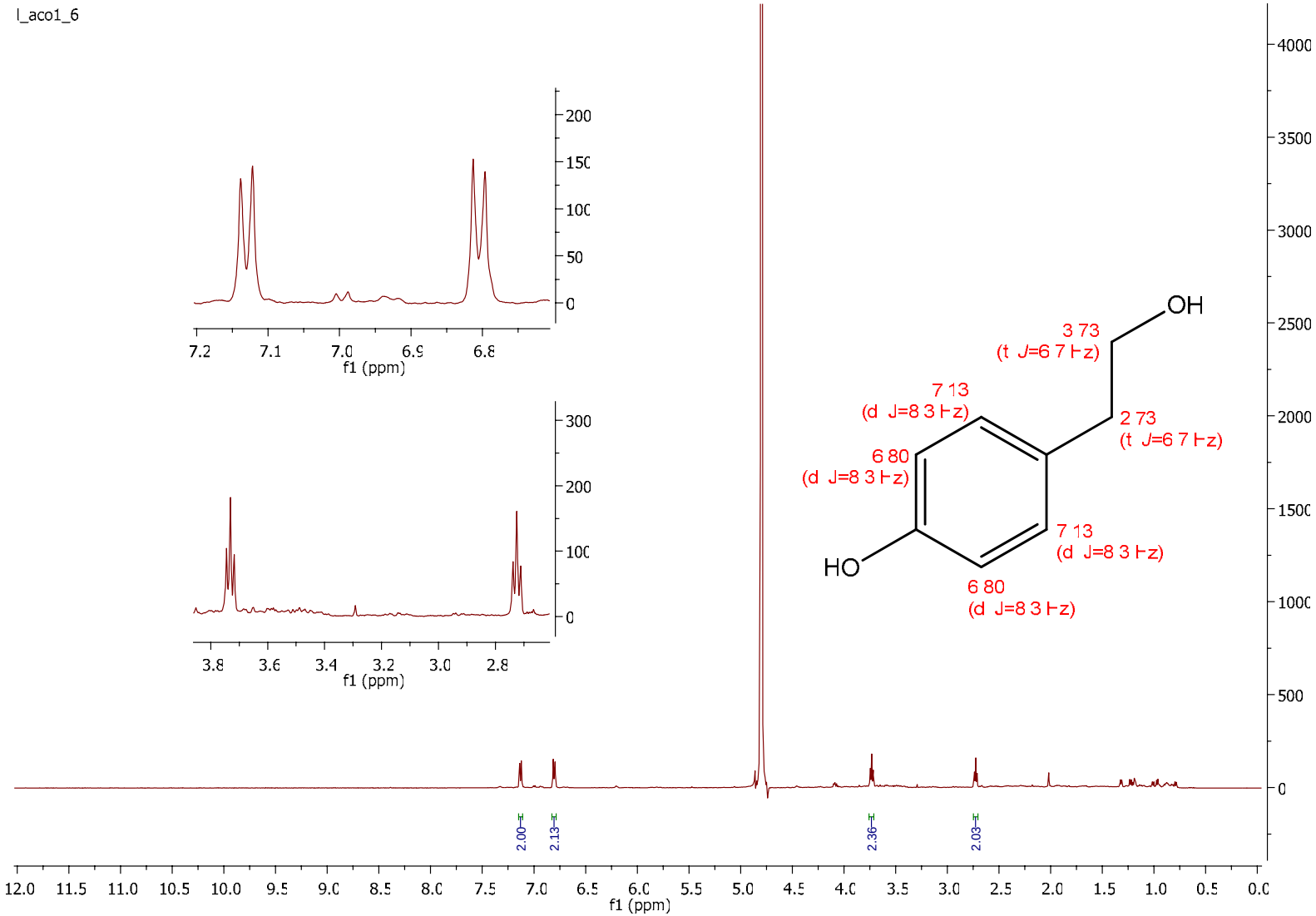


Figura 16. Espectro de RMN de ^{1}H do tirosol isolado da cultura mista da RLe 7 e o FLe 8.1 em meio líquido PDB (D_2O, 500 MHz). Estrutura do tirosol mostrando em vermelho os deslocamentos químicos de ^{1}H (δ em ppm).

4.4. Cultivo em meio arroz parbolizado

4.4.1. Cultivo simples da actinobactéria RLe 7

A análise da cultura simples da actinobactéria *S. albospinus* RLe 7 foi feita inicialmente por HPLC-DAD no UV, porém não foi possível observar diferenças quando comparado com o extrato do meio de cultura, devido provavelmente à baixa concentração dos metabólitos contidos nele. Na análise por RMN de ^{1}H do extrato da cultura simples e do meio de cultura também não foi possível observar diferenças devido à alta proporção dos açúcares do meio de cultura. Por esta razão, foi feita também a análise por ESI-MS (Figura 17) detectando os íons de *m/z* 276,17 e de *m/z* 219,11 como os mais intensos. Busca do íon de *m/z* 276,17 nas bases de dados METLIN[100] e MassBank[101] resultou na fisostigmina como um dos possíveis compostos atribuíveis à massa de 275 Da (METLIN ID 1934; MassBank Record KOX00723) correspondendo a $[M+H]^+$ como foi observado nas análises aqui apresentadas. Os dados de RMN de ^{1}H que suportam a atribuição deste íon à molécula conhecida como fisostigmina são apresentados no item 4.4.3. Este resultado permitiu validar outras buscas nas bases de dados mencionadas utilizando a informação gerada por ESI-MS.

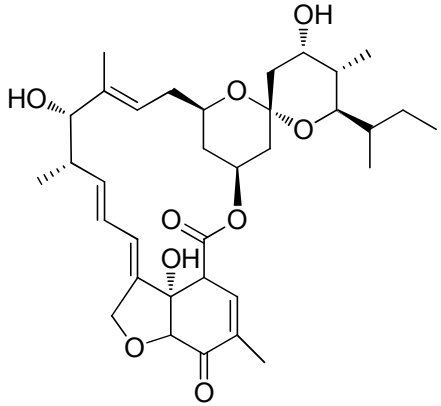
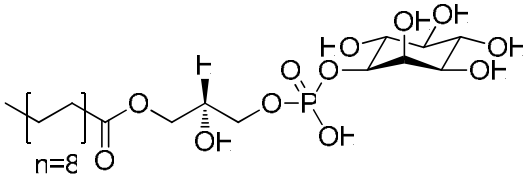
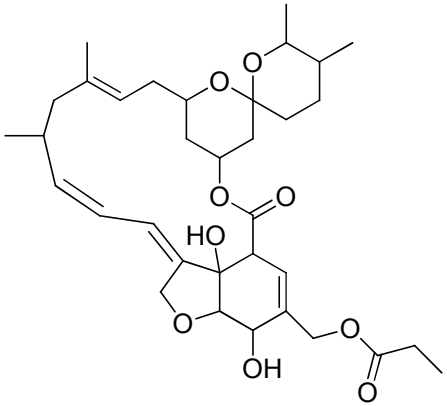
Outro dos íons detectados corresponde provavelmente à desferrioxamina E, também conhecida como nocardamina. Segundo essa hipótese, o íon detectado com maior intensidade corresponde à $[M+Na]^+$ *m/z* 623,3368 (I=79505 cnts[§])[**], além dos íons correspondentes a $[M+H]^+$ *m/z* 601,3593 I=54373 cnts); $[M+K]^+$ *m/z* 639,3211 (I= 54091 cnts). A desferrioxamina E, molécula coincidente com os íons mencionados já foi isolada anteriormente no LQMo.[118] Busca pelo íon *m/z* 623,33 $[M+Na]^+$ na base de dados METLIN[100] sugeriu duas possíveis estruturas que formam adutos com sódio no modo positivo nas análises por ESI-MS, mas nenhuma apresentando compostos protonados nem formando adutos com potásio, enquanto a base de dados MassBank[101] não mostrou nenhum resultado, utilizando como parâmetros de busca os três sinais mencionados. No DNP[129] a busca por massa exata e fonte biológica sugeriu cinco possíveis estruturas, entre elas a nocardamina. Os resultados e os parâmetros das buscas nas bases de dados para os íons *m/z*

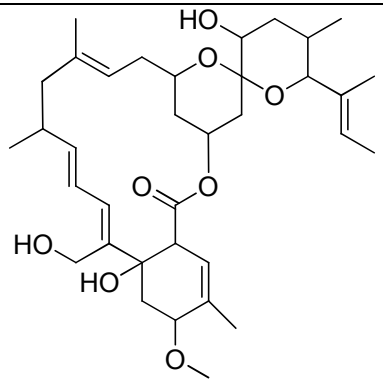
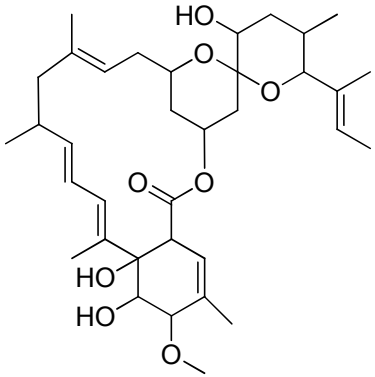
[§] Desferrioxamina E, $C_{27}H_{48}N_6O_9$, $[M+Na]^+$ teórico *m/z* 623,337498. Erro de 1,1.

[**] I=Intensidade em cnts.

601, *m/z* 623 e *m/z* 639 se mostram na Tabela 2. Levando-se em conta que uma molécula com esse perfil no espectro de ESI-MS foi isolada de actinobactérias da coleção do LQMo[118] e que uma das bases de dados, específica de produtos naturais sugeriu a mesma molécula, isolada também do gênero *Streptomyces*, pode-se afirmar a presença da desferrioxamina E no extrato da cultura simples da actinobactéria *S. albospinus* RLe 7 em meio arroz parbolizado.

Tabela 2. Resultados da busca em bases de dados dos íons *m/z* 601, *m/z* 623 e *m/z* 639.

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
METLIN	íon *m/z* 623,33; $[M+Na]^+$	$C_{34}H_{48}O_9$		METLIN ID 63705	[136], Patente[137]
METLIN	íon *m/z* 623,33; $[M+Na]^+$	$C_{27}H_{53}O_{12}P$		1-octadecanoil-glycero-3-fosfo-(1'-mio-inositol), METLIN ID 46746	PubChem 74380467
DNP	Massa exata 600,3-600,4; Fonte biológica "*Streptomyces*"	$C_{34}H_{48}O_9$		Milbemicina α22	[138]

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata 600,3-600,4; Fonte biológica "*Streptomyces*"	$C_{35}H_{52}O_8$		VM 48640, CAS 175448-15-4	[139], Patente[140]
DNP	Massa exata 600,3-600,4; Fonte biológica "*Streptomyces*"	$C_{35}H_{52}O_8$		VM 44867, CAS 115008-92-9	[139, 140]

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata 600,3-600,4; Fonte biológica "*Streptomyces*"	$C_{27}H_{48}N_6O_9$		Nocardamina ou desferrioxamina E, CAS 26605-16-3	[141, 142]
DNP	Massa exata 600,3-600,4; Fonte biológica "*Streptomyces*"	$C_{32}H_{44}N_2O_9$		Estreptolidigina, CAS 7229-50-7	[143-145]

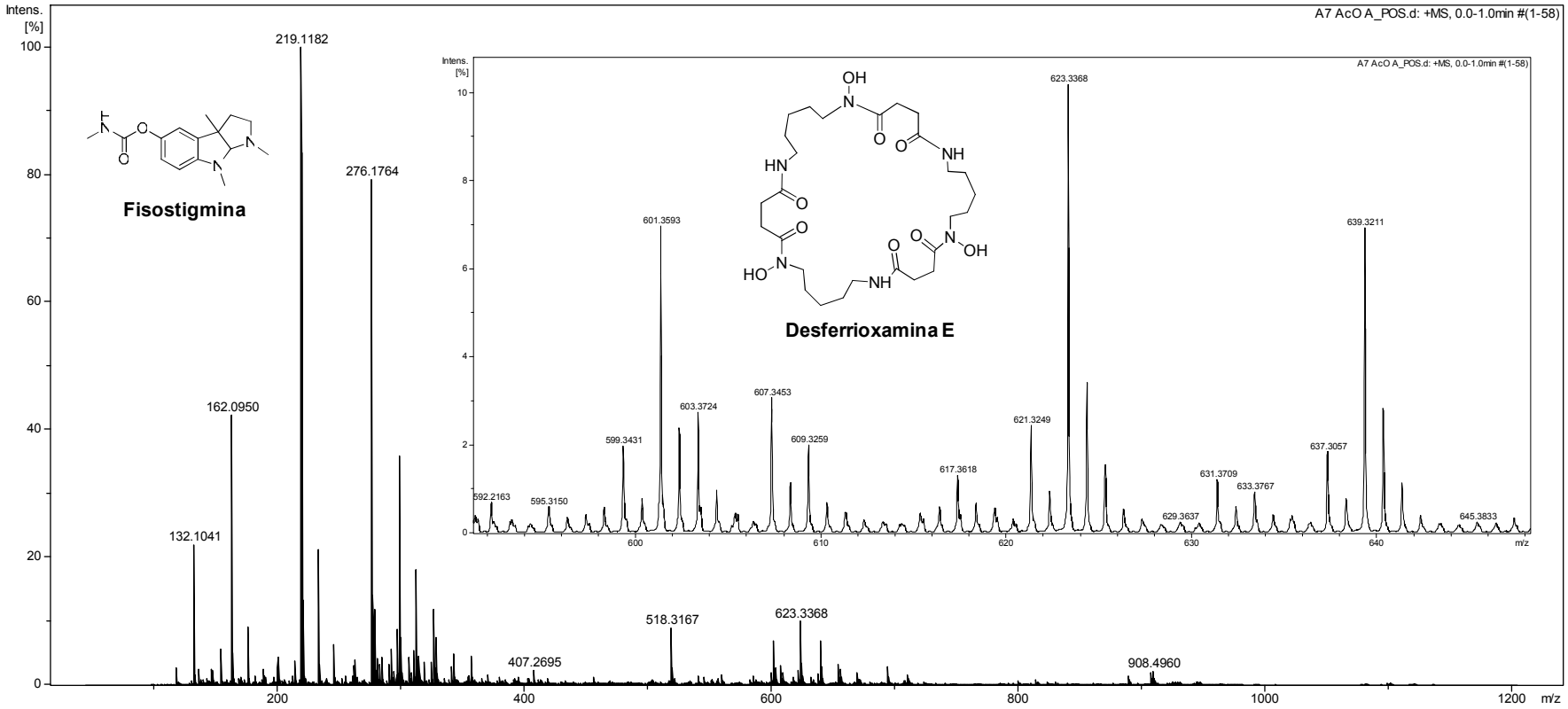


Figura 17. Espectro de massas do extrato em AcOEt da cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 em meio arroz parbolizado obtido por ESI-MS por inserção direta do extrato. Na região ampliada do espectro observam-se os íons de *m/z* 601, *m/z* 623 e *m/z* 639 atribuídos à desferrioxamina E correspondendo a $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$, respectivamente. Também, observa o íon de *m/z* 276 atribuído à fisostigmina correspondendo a $[M+H]^+$.

4.4.2. Cultivo misto em meio sólido de arroz parbolizado

Os extratos de AcOEt dos cultivos mistos da actinobactéria *S. albospinus* RLe 7 e do fungo *C. boninense* FLe 8.1 em meio de arroz parbolizado, foram analisados por HPLC-DAD obtendo perfis pouco satisfatórios devido à similaridade dos cromatogramas quando comparados os perfis dos extratos das culturas, tanto simples como mistas, e os extratos do meio de cultura. Os espectros de RMN de ^{1}H dos extratos em AcOEt (Figura 18), também não permitiram identificar diferenças entre os extratos da cultura mista com os das culturas simples e com o extrato do meio de cultura. Tanto as análises por HPLC-DAD e RMN de ^{1}H mostraram bastante interferência do meio de cultura de arroz parbolizado, como observado no espectro de RMN de ^{1}H (Figura 18) o qual apresentou sinais na região entre δ 3,0-5,0 correspondentes a hidrogênios ligados a carbonos sp^3 contendo função álcool, o que refere-se possivelmente a hidrogênios pertencentes a carboidratos. Assim, o conteúdo de metabólitos secundários de origem microbiana pode ter sido muito baixo com relação à quantidade de interferentes do meio de cultura nas condições de extração descritas levando a cromatogramas e espectros de RMN de ^{1}H muito complexos que não permitiram obter informações úteis a fim de confirmar a presença de substâncias de origem microbiana pelas análises dos extratos brutos.

Assim, os extratos de AcOEt dos cultivos em meio de arroz parbolizado também foram analisados por ESI-MS obtendo os espectros mostrados na Figura 19. Esse tipo de análise permite detectar moléculas que provavelmente estejam em baixa quantidade devido à alta sensibilidade do equipamento, porém não necessariamente todos os íons detectados correspondem a moléculas produzidas pelos micro-organismos. Com os dados dos espectros de ESI-MS dos extratos dos cultivos mistos em meio de arroz parbolizado foi realizada uma análise quimiométrica descrita no ítem 4.4.2.1, a fim de identificar possiveis diferenças não facilmente observadas na Figura 19.

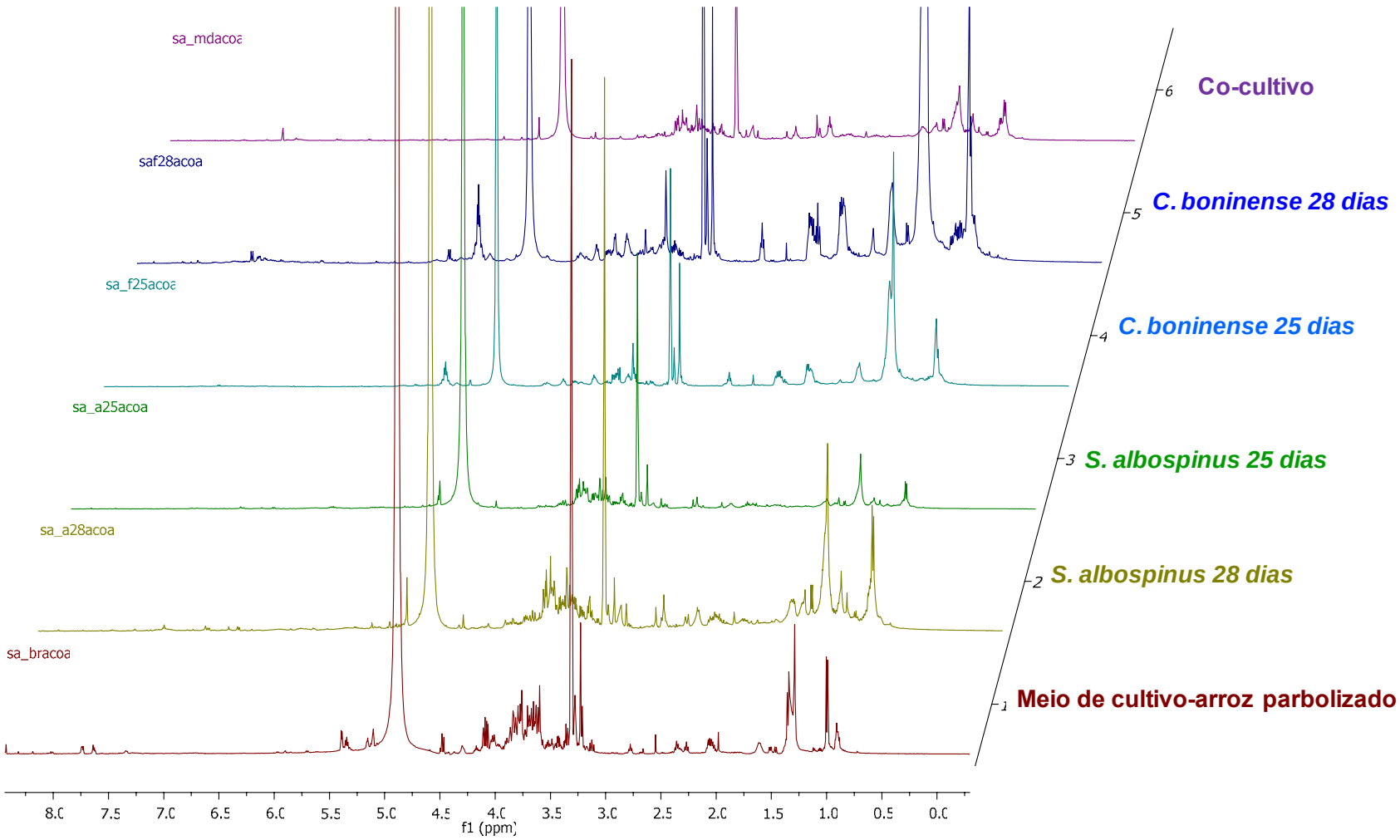


Figura 18. Espectros de RMN de ^{1}H (500 MHz, CD_3OD) dos extratos de AcOEt das culturas simples e mistas de *S. albospinus* RLe 7 e *C. boninense* FLe 8.1 em meio arroz parbolizado. De cima para baixo: cultura mista com adição simultânea dos micro-organismos; controle do fungo FLe 8.1 de 28 dias; controle do fungo FLe 8.1 de 25 dias; controle da actinobactéria RLe 7 de 25 dias; controle da actinobactéria RLe 7 de 28 dias; branco do meio de cultura de arroz parbolizado.

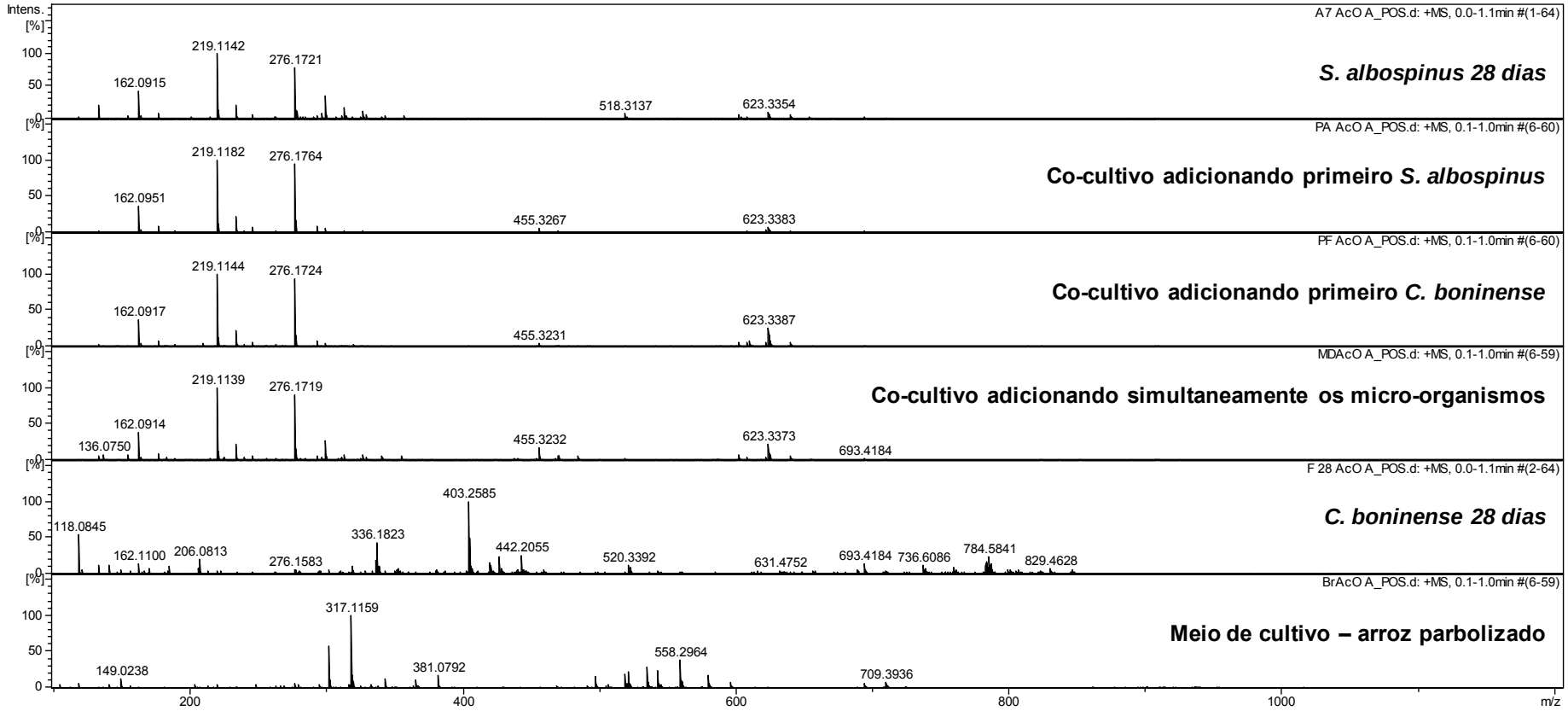


Figura 19. Espectro de massas da cultura mista de *S. albospinus* RLe 7 e *C. boninense* FLe 8.1 em meio arroz parbolizado obtido por ESI-MS por inserção direta dos extratos de AcOEt. De cima para baixo: *S. albospinus* RLe 7 controle de 28 dias (1267 íons detectados na faixa *m/z* 99.0865-1135.5971); cultura mista adicionando primeiro *S. albospinus* RLe 7 (1140 íons detectados na faixa *m/z* 118.0870-1119.5866); cultura mista adicionando primeiro *C. boninense* FLe 8.1 (1073 íons detectados na faixa m/z 100.0730-1119.5983); cultura mista com adição simultânea dos micro-organismos (1209 íons detectados na faixa *m/z* 106.0643-1100.5657); controle de *C. boninense* FLe 8.1 de 28 dias (1078 íons detectados na faixa *m/z* 100.0725-1136.7970); branco do meio de cultura (1097 íons detectados na faixa *m/z* 104.1043-1077.6306).

4.4.2.1. Análise de Componentes Principais dos extratos brutos de AcOEt dos cultivos mistos em meio sólido de arroz parbolizado

Utilizando os dados gerados a partir dos espectros de ESI-MS dos extratos da cultura mista em meio arroz parbolizado (Tabela 3), foram aplicadas as análises exploratórias e análises de agrupamentos não supervisionados de padrões, PCA (análise de componentes principais) e HCA (análise de agrupamentos hierárquicos). Atualmente estas ferramentas metabolômicas vem sendo usadas nas estratégias de desreplicação e priorização de linhagens microbianas que ajudem na descoberta de novos produtos naturais.[146] Dado que este método é utilizado para encontrar similaridade entre amostras,[147] depois da aplicação do PCA, os extratos foram classificados em três grupos, evidenciando que não houve diferença entre os extratos controle da actinobactéria RLe 7 e os extratos das culturas mistas com o fungo FLe 8.1. Um dos extratos controle do fungo FLe 8.1 (SA F25 AcOA) gerou um conflito inicial na análise, já que como se observa na Tabela 3, o número de íons detectados reportados pelo software Compass DataAnalysis foi inferior, provavelmente devido a um erro próprio do software na conversão dos dados do espectro. Esse inconveniente não gerou problema nenhum na análise, já que depois da validação manual, na qual os íons gerados pelo extrato do branco foram subtraídos de todos os extratos, os dados restantes foram correspondentes aos íons gerados unicamente a partir dos extratos. Adicionalmente, na Figura 20 se observa que os espectros dos extratos controle do fungo FLe 8.1, SA F28 AcO A e SA F25 AcO A, foram muito similares, o que foi corroborado na Figura 21 depois da PCA.

Mediante as análises dos gráficos de escores e pesos é possível identificar quais sinais são responsáveis pela diferenciação entre as amostras.[123] O gráfico de escores da PC1 x PC2 (Figura 21A) mostra que com a PC1 somente se conseguem diferenciar os extratos controle do fungo do resto de extratos, e já com a PC2 se conseguiu diferenciar entre os extratos do fungo controle de 25 e 28 dias de incubação. O gráfico de pesos da PC1 x PC2 (Figura 21B) mostra que os íons *m/z* 276 e *m/z* 219 foram os responsáveis pela similaridade entre os extratos da actinobactéria controle e os das culturas mistas, devido à presença e intensidade nos espectros. Também, observa-se que tanto o íon de *m/z* 784 presente com maior

intensidade no extrato F25AcOA, quanto o íon de *m/z* 336 presente somente no extrato F28AcOA, foram responsáveis pela diferenciação destes extratos na PC2.

Na Figura 21C observa-se que a PC3 permitiu diferenciar os extratos da cultura mista PFAcOA e PAAcOA dos extratos controle da actinobactéria. Isto foi devido à maior intensidade dos íons *m/z* 276 e *m/z* 219 nos extratos mencionados quando comparados os mesmos íons no extrato MDAcOA. Na mesma Figura 21C se observa a proximidade entre os extratos PFAcOA e PAAcOA, mostrando a similaridade entre elas. Isto foi corroborado no gráfico de pesos PC1 x PC3 onde se observa novamente a presença dos íons de *m/z* 219 e de *m/z* 276 como determinantes de similaridade das amostras.

Tabela 3. Dados das análises de ESI-MS, dos extratos dos cultivos mistos em meio arroz parbolizado, utilizados na PCA.

Código do extrato	**Número de íons detectados**	**Faixa de *m/z***
SA A7 AcO A	1267	99,0865-1135,5971
SA A25 AcO A	1324	116,0730-1129,5883
SA A 28 AcO A	1231	106,0662-1119,6145
SA PA AcO A	1140	118,0870-1119,5866
SA PF AcO A	1073	100,0730-1119,5983
SA MD AcO A	1209	106,0643-1100,5657
SA F25 AcO A	78	118,0818-838,5254
SA F28 AcO A	1078	100,0714-1136,7851
SA BR AcO A	1097	104,1043-1077,6306

Códigos das amostras: SA- se refere à cultura em meio arroz parbolizado (PF=adição inicial do fungo *C. boninense* FLe 8.1 na cultura mista; F25 ou F28=*C. boninense* FLe 8.1 de 25 ou 28 dias de incubação respectivamente; MD= adição simultânea dos micro-organismos na cultura mista; A25 ou A28=*S. albospinus* RLe 7 de 25 ou 28 dias de incubação respectivamente; BR= Branco do meio dd cultura; PA= adição inicial de *S. albospinus* RLe 7 na cultura mista; A7=cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 de 28 dias de incubação; ACO=acetato de etila; a letra A no final do código de cada extrato significa que só uma das duplicatas foi utilizada nas análises.

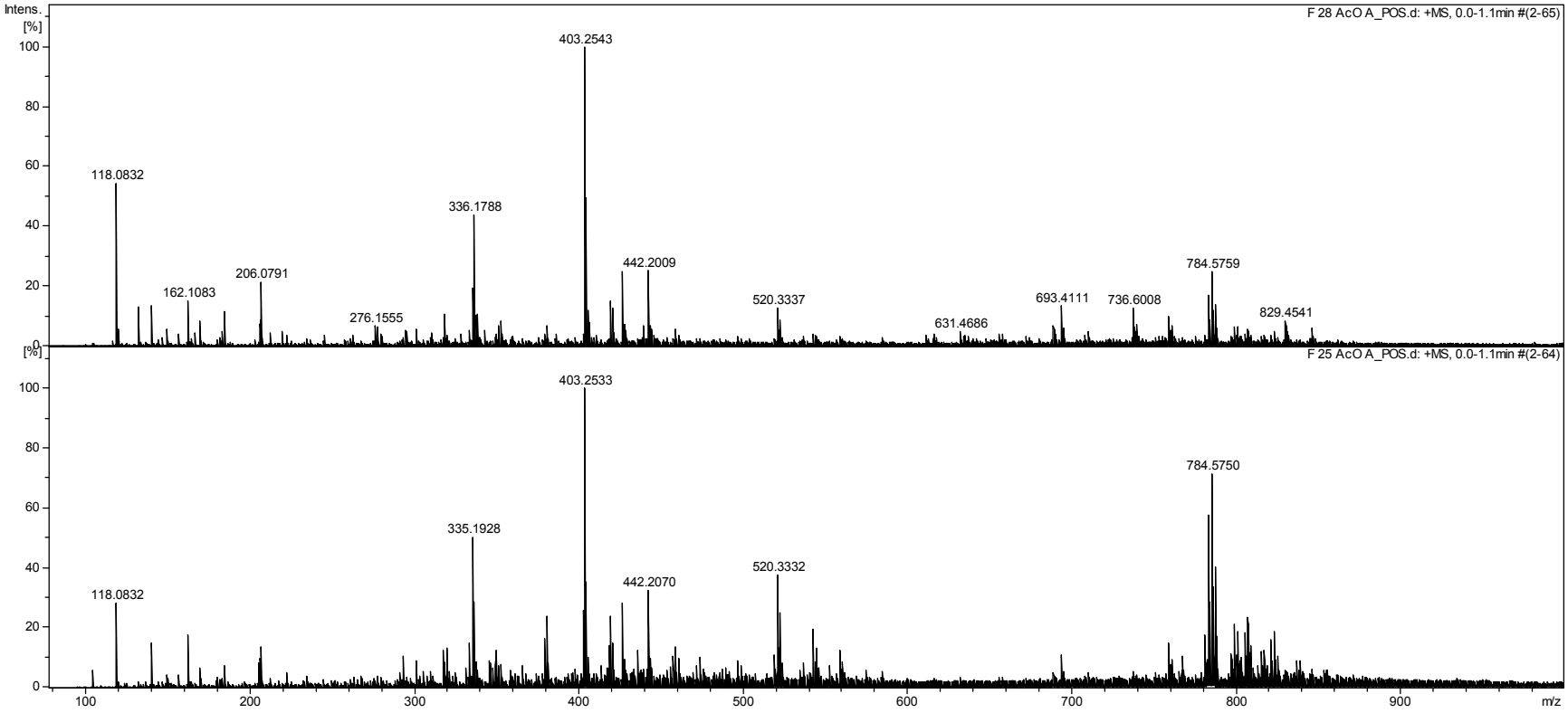


Figura 20. Comparação dos espectros de ESI-MS dos extratos do fungo controle FLe 8.1 em meio arroz parbolizado. Superior: SA F28 AcO A, inferior: SA F25 AcO A.

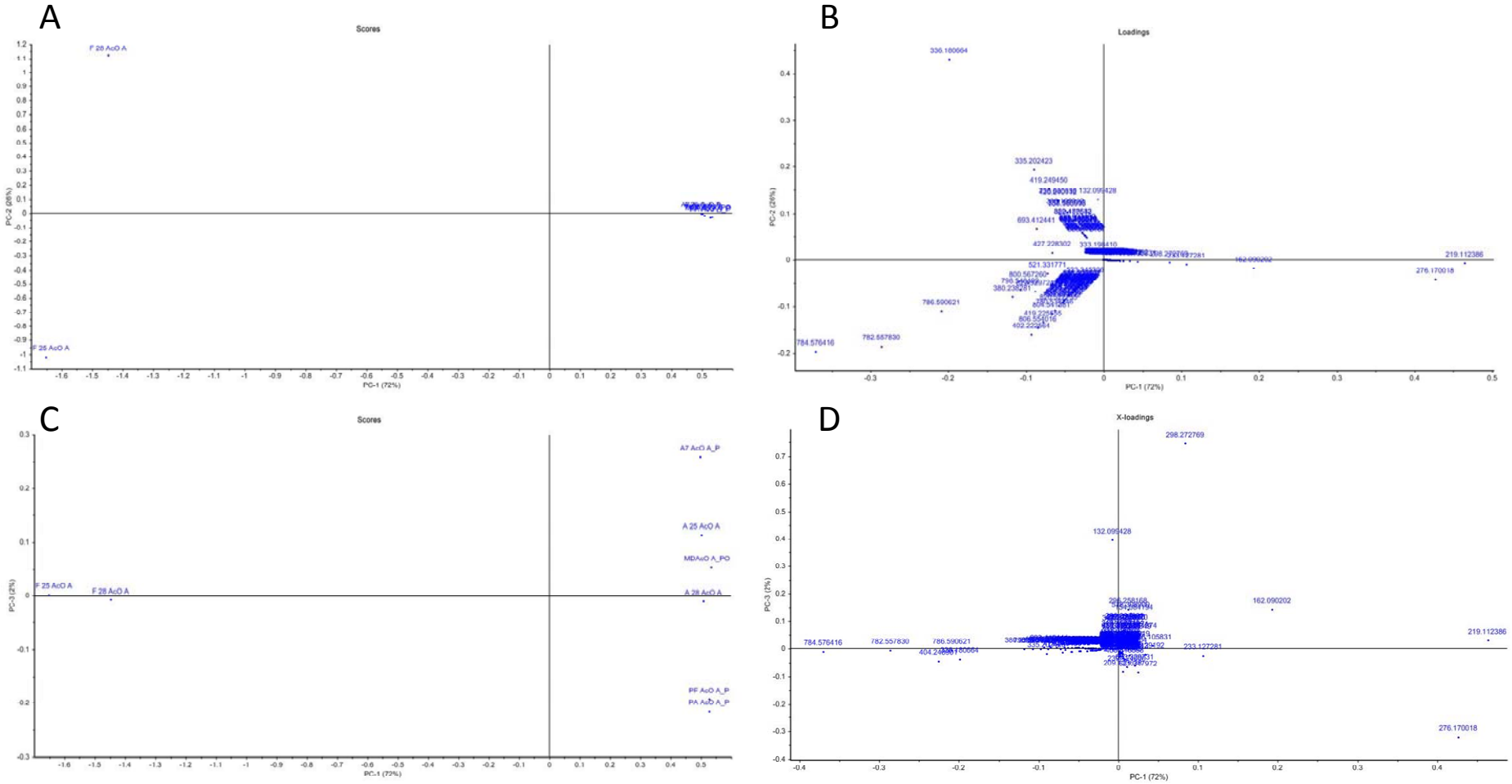


Figura 21. Gráfico de escores e pesos das PCAs referentes aos extratos da cultura mista em arroz parbolizado. A. Gráfico de escores da PC1 x PC2, B. Gráfico de pesos da PC1 x PC2, C. Gráfico de escores da PC1 x PC3, D. Gráfico de pesos da PC1 x PC3.

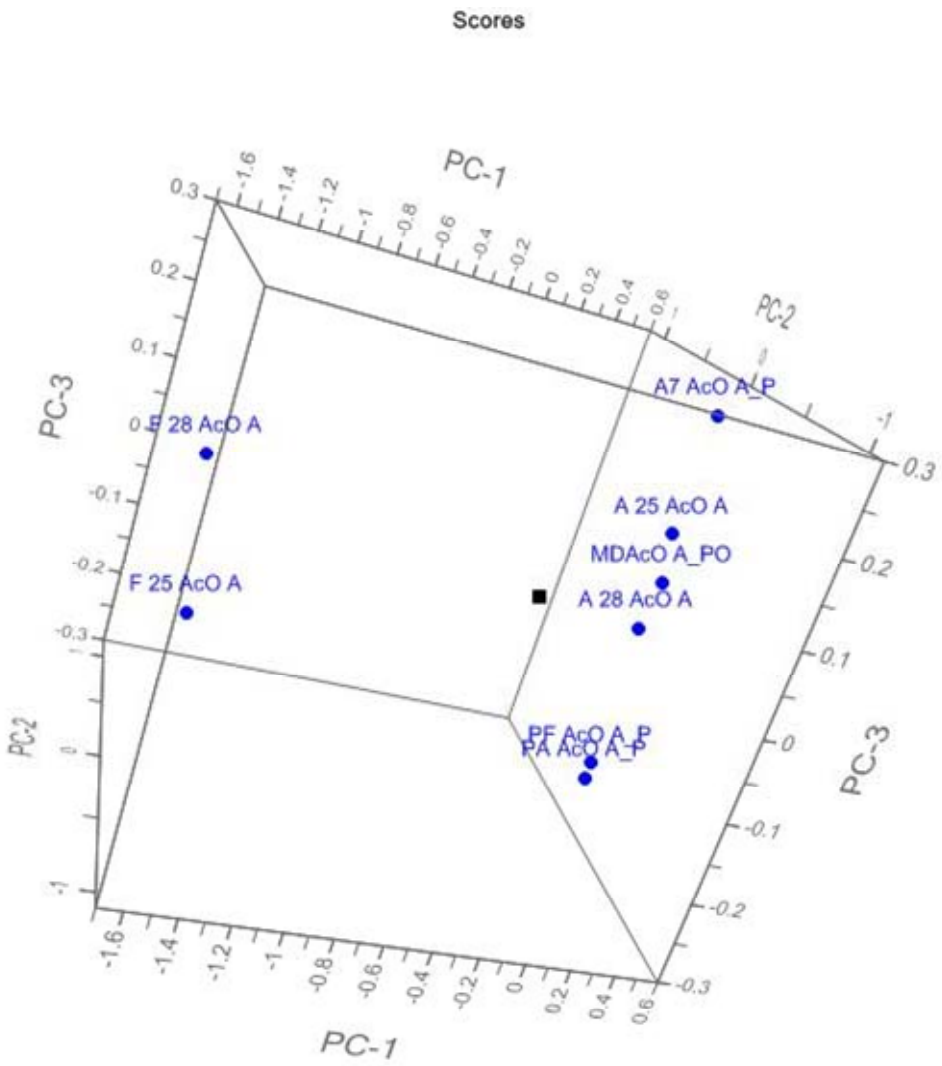


Figura 22. Gráfico de scores da PC1 x PC2 x PC3 referente aos extratos da cultura mista em arroz parbolizado.

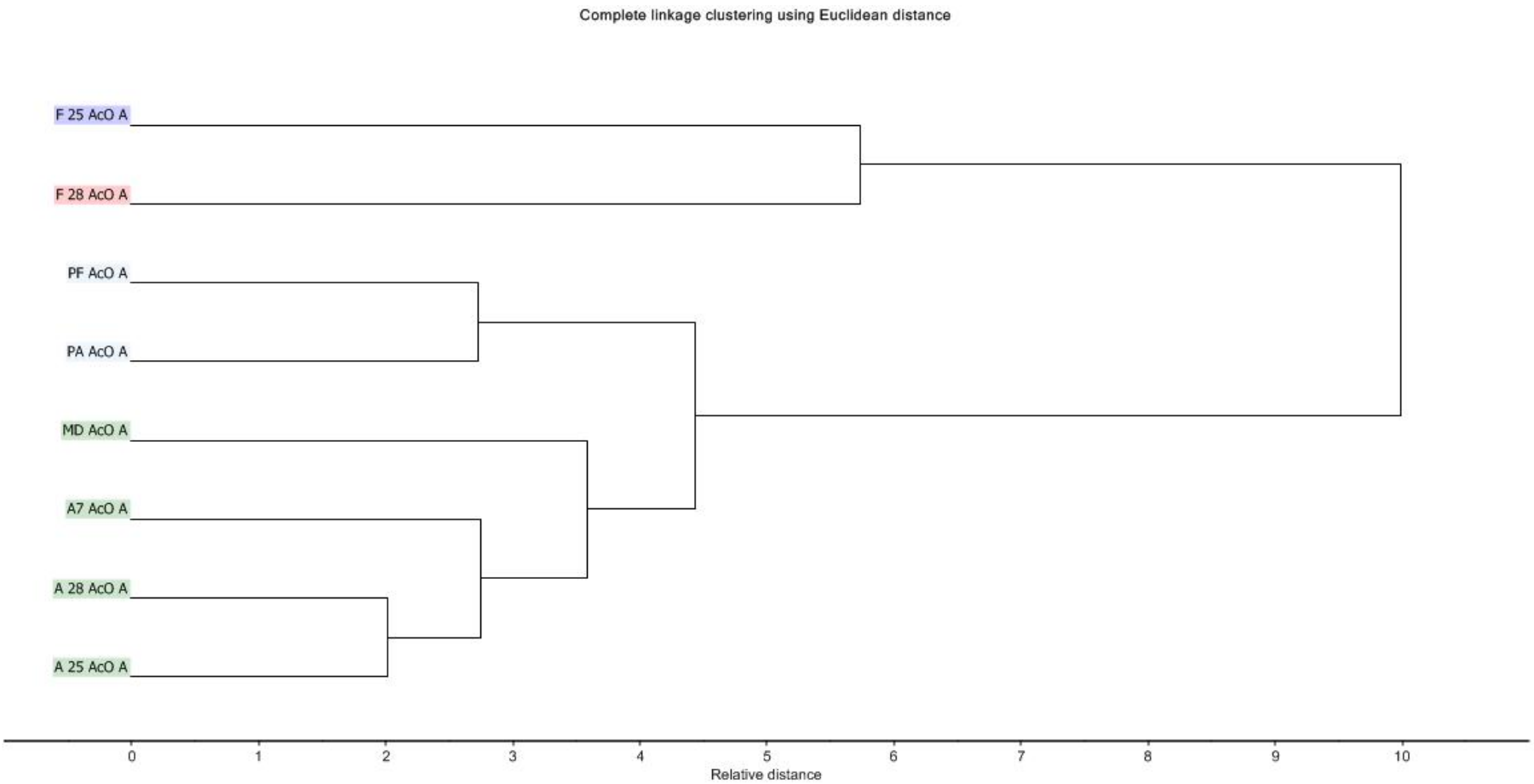


Figura 23. Dendrograma dos extratos da cultura mista em arroz parbolizado.

Na Figura 23 podem-se observar os três grupos gerados pela similaridade entre os extratos das culturas mistas com relação aos extratos das culturas simples mediante o método de agrupamento HCA-complete-linkage usando a distância Euclidiana do software The Unscrambler®. Os extratos F25AcOA e F28AcOA estão na mesma distância significando que não houve diferença entre os extratos dos cultivos controle do fungo de 25 e 28 dias de incubação. Os extratos PFAcOA e PAAcOA ficaram no mesmo grupo indicando que não houve diferenças quando o fungo ou a actinobactéria foram adicionados com antecedência na cultura mista. O terceiro grupo incluiu os extratos das culturas simples das actinobactérias A7AcOA, A25AcOA e A28AcOA, assim como o da cultura mista MDAcOA. Esta classificação apresentou o mesmo padrão obtido no gráfico de escores da Figura 22.

Basicamente, a análise exploratória de dados por PCA permitiu verificar que não houve diferenças entre os extratos de AcOEt das culturas simples e mistas em meio arroz parbolizado. As variáveis utilizadas foram a presença ou ausência de sinais, assim como a intensidade, levando em conta que a baixa intensidade dos sinais representa baixa abundância dos íons correspondentes, o que poderia ser indicativo da presença de compostos em baixa quantidade, pois em ESI-MS a intensidade de um sinal é função da concentração do analito na amostra.[148]

4.4.2.2. Análise por ESI-MS dos extratos de AcOEt dos cultivos mistos

Apesar de não ter observado diferenças significativas entre os extratos, alguns sinais apresentaram intensidade relativamente maior na co-cultura quando comparados com a cultura simples. Um destes exemplos corresponde ao íon de *m/z* 455, sinal que apresenta maior intensidade quando comparados os espectros das culturas mistas com o da cultura simples da actinobactéria (Figura 19). Na Tabela 4 observa-se que na cultura mista de adição simultânea dos micro-organismos, extrato MDAcOA, a intensidade desse sinal foi maior quando comparado com o sinal correspondente ao mesmo íon na cultura simples da actinobactéria, extrato A28AcOA. Não foi isolado nenhum composto correspondente a esse íon, porém foram realizadas buscas no DNP,[129] partindo da hipótese do que o íon de *m/z* 455 corresponde ao íon $[M+H]^+$. A busca na base de dados sugeriu 4 possíveis compostos com a mesma fórmula molecular (Tabela 5). Os três compostos

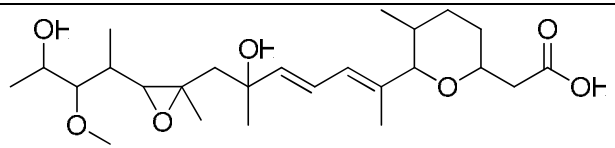
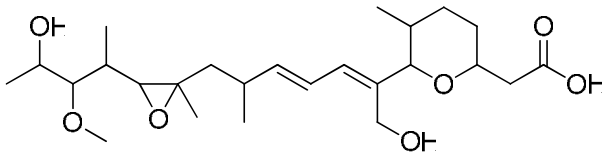
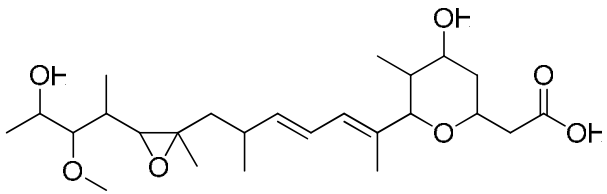
derivados do herboxidieno (GEX 1Q1, GEX 1Q2 e GEX 1Q4) são compostos que seriam detectados por MS preferivelmente no modo negativo devido à presença de um grupo carboxila na estrutura. Na publicação de Sakai et al.[149] esses compostos foram analisados por HRFAB-MS detectando o íon $[M-H]^-$, o que impede realizar a atribuição desses compostos como possíveis candidatos do íon *m/z* 455 detectado no modo positivo nesta análise. A orimicina ou olimicina é um composto produzido por *S. albochromogenes* com atividade antifúngica patenteado em 1960, cuja estrutura não se encontra publicada na literatura, razão pela qual também não pode ser atribuída ao íon *m/z* 455.

Os resultados da busca em uma faixa de massa maior, *m/z* 454.0-454.9, sugeriu alguns compostos derivados das kinamicinas.[150-153] Se menciona o resultado dessa busca simplesmente para ressaltar a utilidade da alta resolução nas análises por MS quando não se dispõe de informação relacionada a fragmentação por MS sequencial. Junto ao íon *m/z* 455, foram observados outros dois íons, *m/z* 469 e *m/z* 483, e entre as kinamicinas sugeridas na busca, três análogos poderiam apresentar os mesmos três sinais por ESI-MS: kinamicina D ($C_{22}H_{18}N_2O_9$), FL120C´ ($C_{23}H_{20}N_2O_9$) e FL120C ($C_{24}H_{22}N_2O_9$).[154, 155] Pelo cálculo de erro, de aproximadamente 472 ppm, podem ser descartadas as fórmulas moleculares das kinamicinas como candidatas para os sinais mencionados. O aumento na abundância do íon *m/z* 455 na co-cultura pode ser indicativo de que o composto correspondente poderia ter alguma atividade inibitória no crescimento do fungo FLe 8.1 nas condições mencionadas. Com a informação disponível, nenhuma das estruturas sugeridas na base de dados foi atribuída ao íon *m/z* 455.

Tabela 4. Intensidade do ìon de *m/z* 455 nas culturas em meio arroz parbolizado

Extrato	**Código**	**Intensidade do íon *m/z* 455 (cnts)**
Cultura simples RLe 7	A7 AcO A	10156
Co-cultura adicionando primeiro o fungo FLe 8.1	PF AcO A	35953
Co-cultura adicionando primeiro a actinobactéria RLe 7	PA AcO A	55906
Co-cultura adicionando simultâneamente os micro-organismos	MD AcO A	98115

Tabela 5. Resultados da busca no DNP do íon de *m/z* 455.

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata "454.29-454.39" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{25}H_{42}O_7$		GEX 1Q2, CAS 192320-35-7	[149]
DNP	Massa exata "454.29-454.39" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{25}H_{42}O_7$		GEX 1Q4, CAS 192320-37-9	[149]
DNP	Massa exata "454.29-454.39" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{25}H_{42}O_7$		GEX 1Q1, CAS 192320-34-6	[149]
DNP	Massa exata "454.29-454.39" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{25}H_{42}O_7$	Estrutura não reportada	Orimicina, CAS 103000-46-0	Patente [156]

A desferrioxamina E, sideróforo amplamente conhecido isolado de actinobactérias[157] e presente na cultura simples de *S. albospinus* RLe 7, como foi mencionado anteriormente, também foi detectada na cultura mista de *S. albospinus* RLe 7 e *C. boninense* FLe 8.1. Na cultura mista esse sideróforo parece ter maior intensidade quando comparado com a cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 (Tabela 6). Para a identificação da desferrioxamina E foram levados em conta os íons correspondentes $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$, assim como a informação obtida a partir das buscas nas bases de dados como mencionado na cultura simples da actinobactéria RLe 7 (Tabela 2). A detecção destes três íons sugeriu novamente a presença da desferrioxamina E nos extratos, já que os dados dos espectros de RMN de ^{1}H do extrato da cultura mista não permitiram determinar claramente a presença desta molécula quando comparados com os dados da literatura.[157] No extrato do fungo *C. boninense* FLe 8.1 em cultura simples não foi identificado o sideróforo, corroborando que ele foi produzido pela actinobactéria RLe 7 e provavelmente a biossíntese deste composto aumentou na cultura mista devido à competição por nutrientes do meio, mas essa hipótese não foi testada neste trabalho.

Tabela 6. Intensidade do ìon de *m/z* 623 nas culturas em meio arroz parbolizado

Extrato	**Código**	**Intensidade do íon *m/z* 623 (cnts)**
Cultura simples RLe 7	A7 AcO A	79826
Co-cultura adicionando primeiro o fungo FLe 8.1	PF AcO A	210979
Co-cultura adicionando primeiro a actinobactéria RLe 7	PA AcO A	80122
Co-cultura adicionando simultâneamente os micro-organismos	MD AcO A	128235

4.4.2.3. Análise por ESI-MS do extrato controle de AcOEt do fungo FLe 8.1 cultivado em arroz parbolizado

Foi realizada a análise MS/MS do íon de *m/z* 403 presente no extrato de AcOEt do fungo FLe 8.1 em meio arroz parbolizado, como observado nos espectros de massas da Figura 19. O estudo de fragmentação foi realizado utilizando várias energias de colisão observando que o íon de *m/z* 403 gerou o íon de *m/z* 335 por perda de 68 Da (Figura 24). Adicionalmente, foi observado que o íon de *m/z* 335 gerou o íon de *m/z* 205 por perda de um fragmento de 130 Da (Figura 25).

Assumindo esse íon como $[M+H]^+$, realizou-se busca no DNP[129] na faixa de *m/z* 402,0-402,9 e origem biológica "fungus" obtendo-se quatro possíveis candidatos (Tabela 7). O fitolídeo A poderia ser descartado como um dos candidatos já que segundo a literatura, por ESI-MS espera-se detectar o íon de *m/z* 425 correspondente a $[M+Na]^+$, [158] o qual não foi observado. Nenhum dos outros três candidatos pode ser atribuído ao íon *m/z* 403 já que o erro calculado foi superior a 100 ppm. Busca na base de dados METLIN[100] pelos íons fragmento *m/z* 335 e *m/z* 205 sugeriu duas possíveis estruturas, mas nenhuma delas coincidente com o íon precursor de *m/z* 403. Apesar da valiosa informação obtida dos espectros de MS/MS, não foi possível definir se o íon *m/z* 403 corresponde a algum dos três compostos restantes ou trata-se de um composto inédito.

Tabela 7. Possíveis candidatos para o íon de *m/z* 403.

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata "402.0-402.9" e origem biológica "fungus"	$C_{18}H_{30}N_2O_4S_2$		FE 399, CAS 200127-94-2	Patente [159]
DNP	Massa exata "402.0-402.9" e origem biológica "fungus"	$C_{20}H_{18}O_9$		Integrastatina B	[160]
DNP	Massa exata "402.0-402.9" e origem biológica "fungus"	$C_{22}H_{26}O_7$		Fitólido A, CAS 200936-84-1	[158]
DNP	Massa exata "402.0-402.9" e origem biológica "fungus"	$C_{23}H_{30}O_6$		Sch 65676, CAS 178117-40-3	[161]

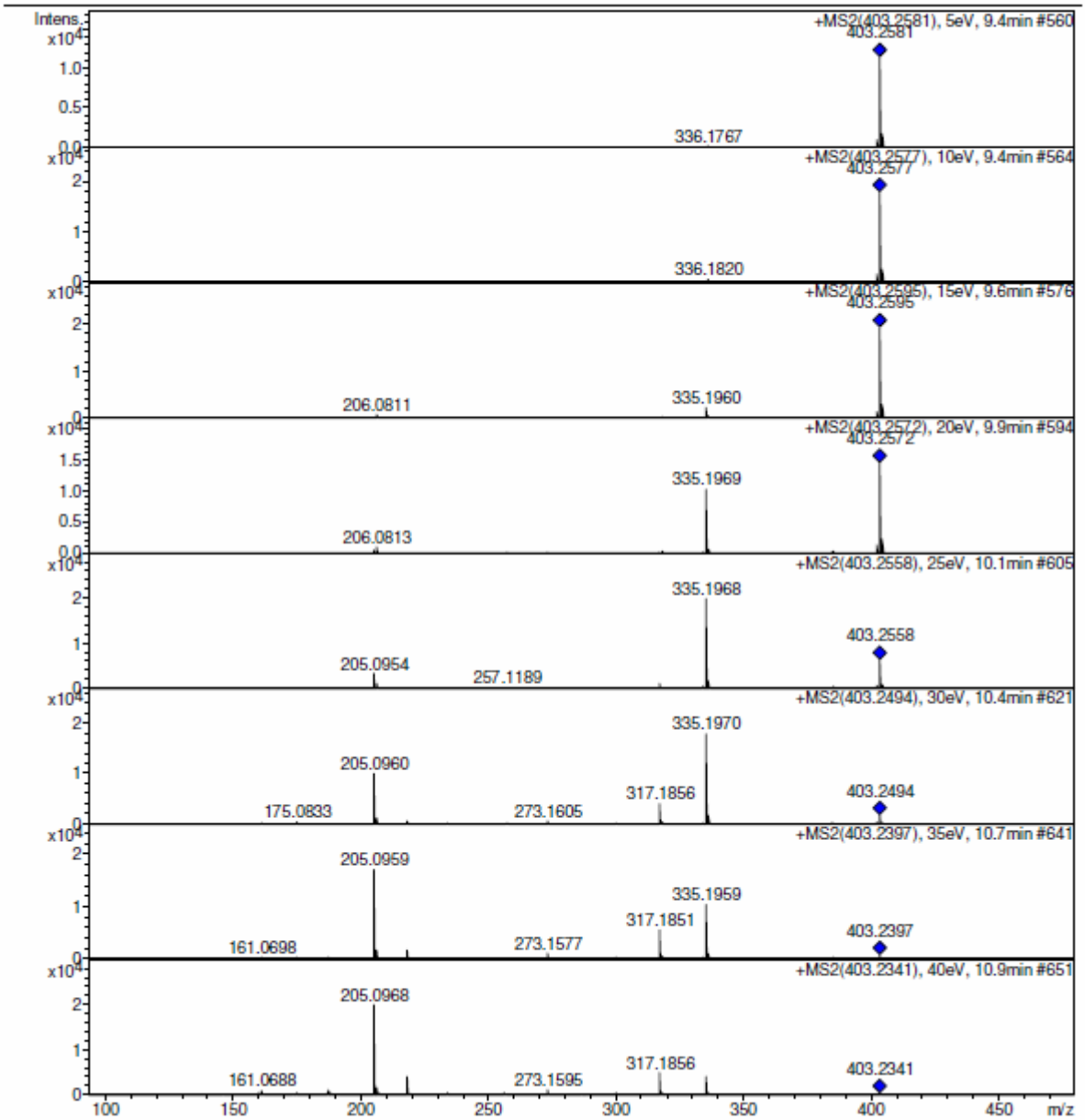


Figura 24. Espectro de MS/MS por CID do íon de *m/z* 403.

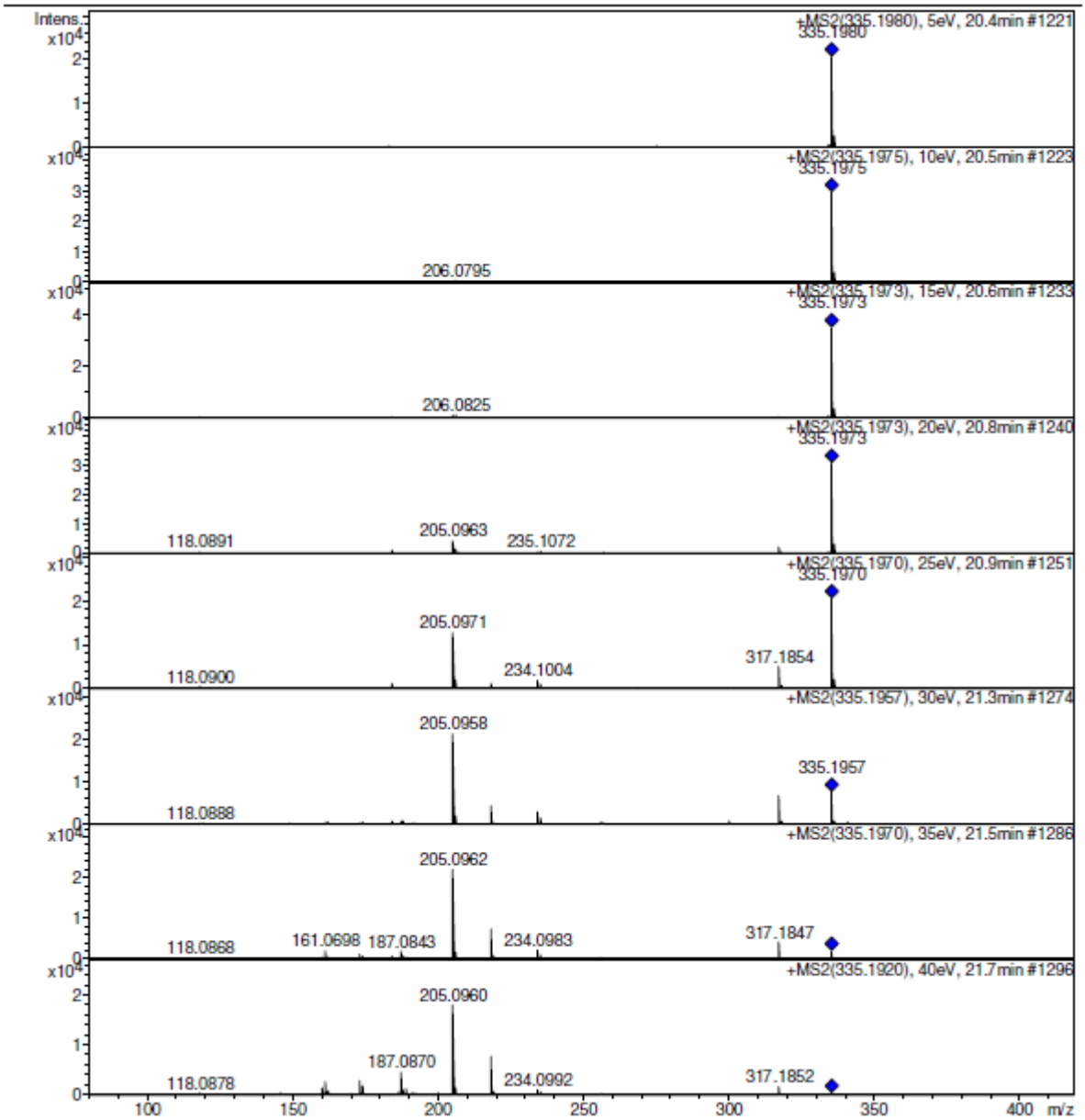


Figura 25. Espectro de MS/MS do íon de *m/z* 335 por CID.

4.4.2.4. Análise por ESI-MS do extrato SA-F28HexB

Como foi mencionado anteriormente, o extrato SA-F28HexB provem da fração hexânica do fungo cultivado durante 28 dias em meio de arroz parbolizado. Segundo os resultados observados na Tabela 1, esse extrato apresentou atividade citotóxica elevada frente a uma das linhagens celulares testadas, porém a duplicata desse extrato não apresentou atividade significativa. Foi realizada a análise por ESI-MS de maneira simultânea ao extrato SA-A7AcOX6 sendo observados muitos sinais coincidentes entre eles, indicando que a maioria dos sinais observados correspondeu à interferência procedente do meio de cultivo. Um único íon, *m/z* 496, proveniente desse extrato foi analisado por MS sequencial. Na Figura 26 observam-se o espectro em *full scan* do extrato e o espectro MS-MS do íon de *m/z* 496.

O íon de *m/z* 496 apresentou uma primeira perda de 18 Da correspondente provavelmente a $[M+H-H_2O]^+$. Busca no DNP[129] não sugeriu nenhuma substância dentre a faixa de massa de *m/z* 495,0-495,5 e de origem fúngica. Buscas pelo padrão de fragmentação nas bases de dados METLIN[100] e MassBank[101] não sugeriu nenhum candidato para o íon mencionado, razão pela qual não foi possível realizar a atribuição correspondente.

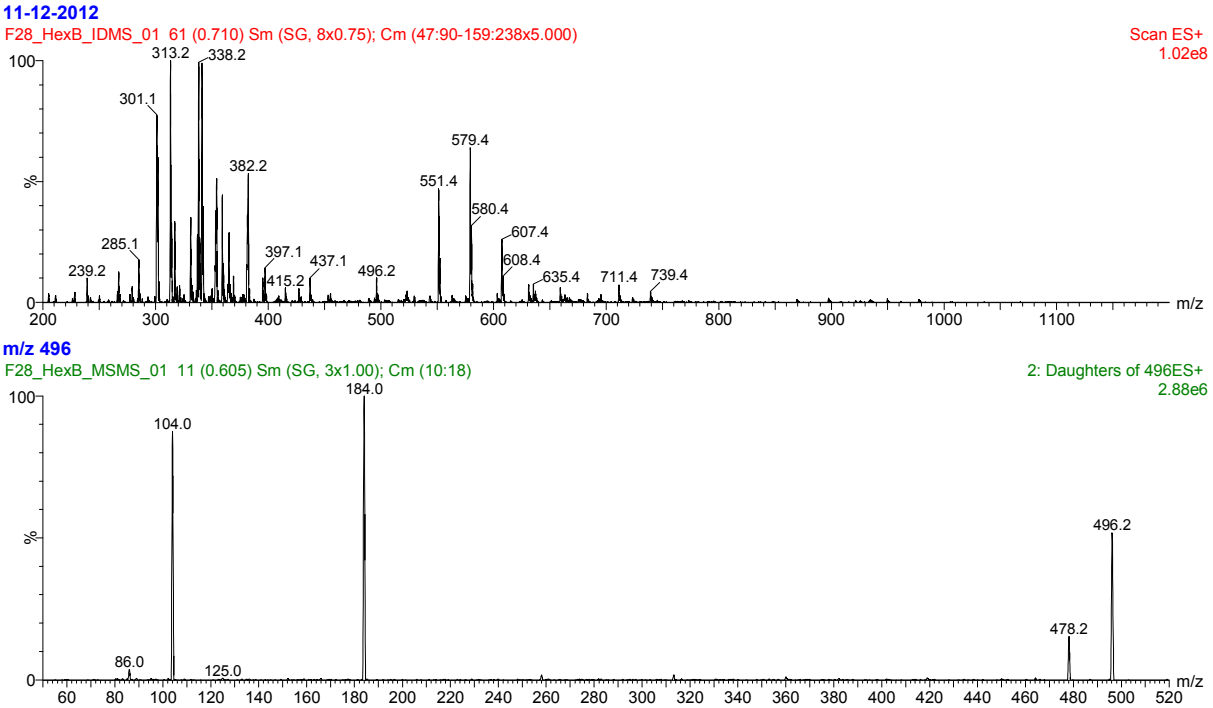


Figura 26. Espectros da análise por ESI-MS do extrato SA-F28HexB. Superior: Espectro em *full scan* do extrato. Inferior: Espectro de fragmentação por CID do íon de *m/z* 496.

4.4.3. Identificação estrutural e caracterização da fisostigmina

O espectro de RMN de ^{1}H em $CDCl_3$ (Figura 27) da fisostigmina, isolada segundo o esquema da Figura 10, mostra um hidrogênio aromático em δ 6,80, duplo dupleto (*J*=1,7, 8,8 Hz), que acopla com um hidrogênio em δ 6,34, dupleto (*J*=8,3 Hz), em relação *orto*. Este mesmo hidrogênio em δ 6,80 acopla com um hidrogênio em relação *meta* que apresenta um deslocamento químico em δ 6,76, dupleto (*J*=1,7 Hz). Foram identificados quatro sinais cada um integrando para três hidrogênios, indicando a presença de quatro metilas. Os hidrogênios em δ 2,87 se observam como um dupleto (*J*=4,1 Hz), provavelmente pelo acoplamento com o hidrogênio do carbamato, simpleto largo em δ 4,93. Observam-se os hidrogênios metílicos pouco desblindados em δ 1,43 como um simpleto, e mais dois simpletos correspondentes aos hidrogênios das outras duas metilas, especificamente N-metilas em δ 2,55 e δ 2,93. Aparecem dois sinais cada um integrando para um hidrogênio, um deles como multipleto em δ 2,79 e o outro como duplo dupleto, em δ 2,63 (J=7,6, 15,5 Hz) indicando acoplamento com o hidrogênio geminal e com um hidrogênio vicinal. A atribuição dos H2a e H2b foi feita segundo a análise feita por Santos-Sánchez *et al.*[162] O multipleto em δ 1,98 foi atribuído ao hidrogênio na posição 3, o qual integrou para dois hidrogênios. O experimento ^{1}H-^{1}H COSY (Figura 28) permitiu determinar a conexão entre C3 e C2, assim como o acoplamento entre a metila do carbamato (δ 2,87) e o hidrogênio ligado ao nitrogênio (δ 4,93). Igualmente, este experimento permitiu confirmar as ligações entre os carbonos aromáticos da posição 6 (δ 6,80) e 7 (δ 6,34). Os dados de RMN de ^{13}C permitiram determinar a presença dos 15 carbonos da molécula (Figura 29), assim como a presença de dois metilenos, nas posições 2 (δ 53,2) e 3 (δ 40,6), pelos dados do experimento DEPT (Figura 30). Os dados de HMQC (Figura 31) e HMBC (Figura 32) foram necessários para identificar as conexões entre hidrogênios e carbonos, possibilitando a atribuição completa dos deslocamentos químicos. Os dados obtidos e mostrados na Tabela 8 são coerentes com os atribuídos à fisostigmina na literatura.

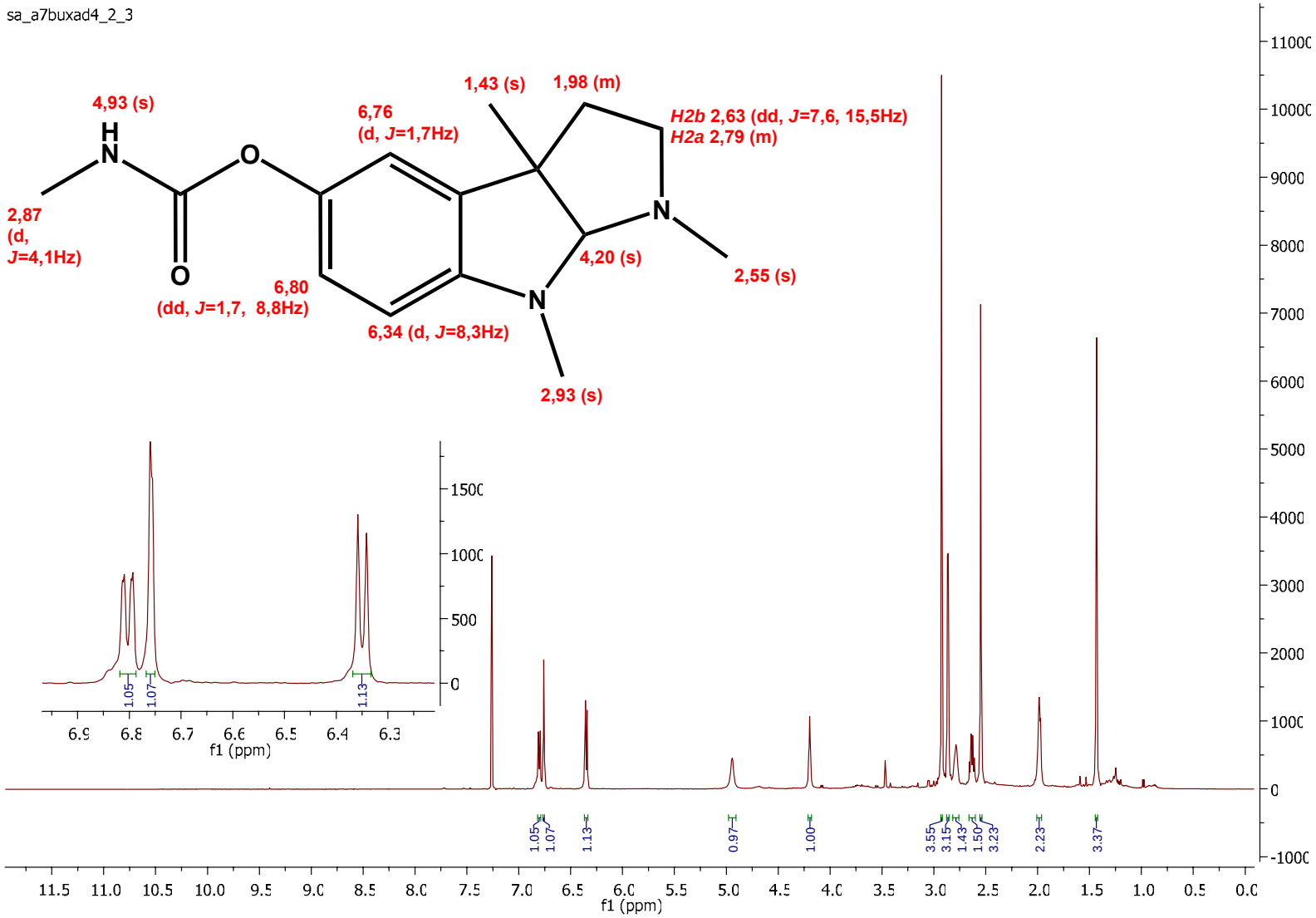


Figura 27. Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) da fisostigmina isolada da cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 em arroz parbolizado.

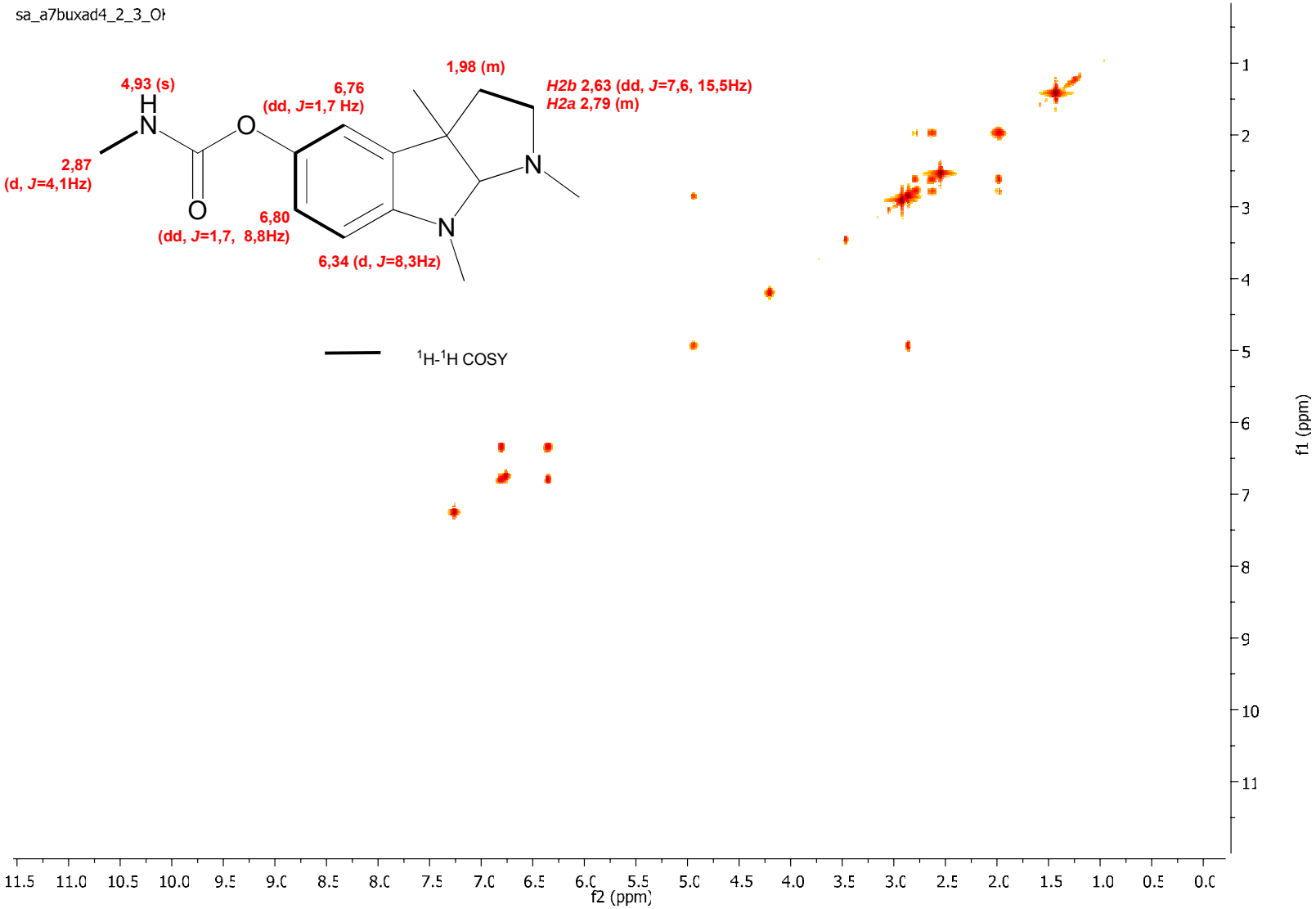


Figura 28. Espectro de COSY (500 MHz, $CDCl_3$) da fisostigmina isolada da cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 em arroz parbolizado.

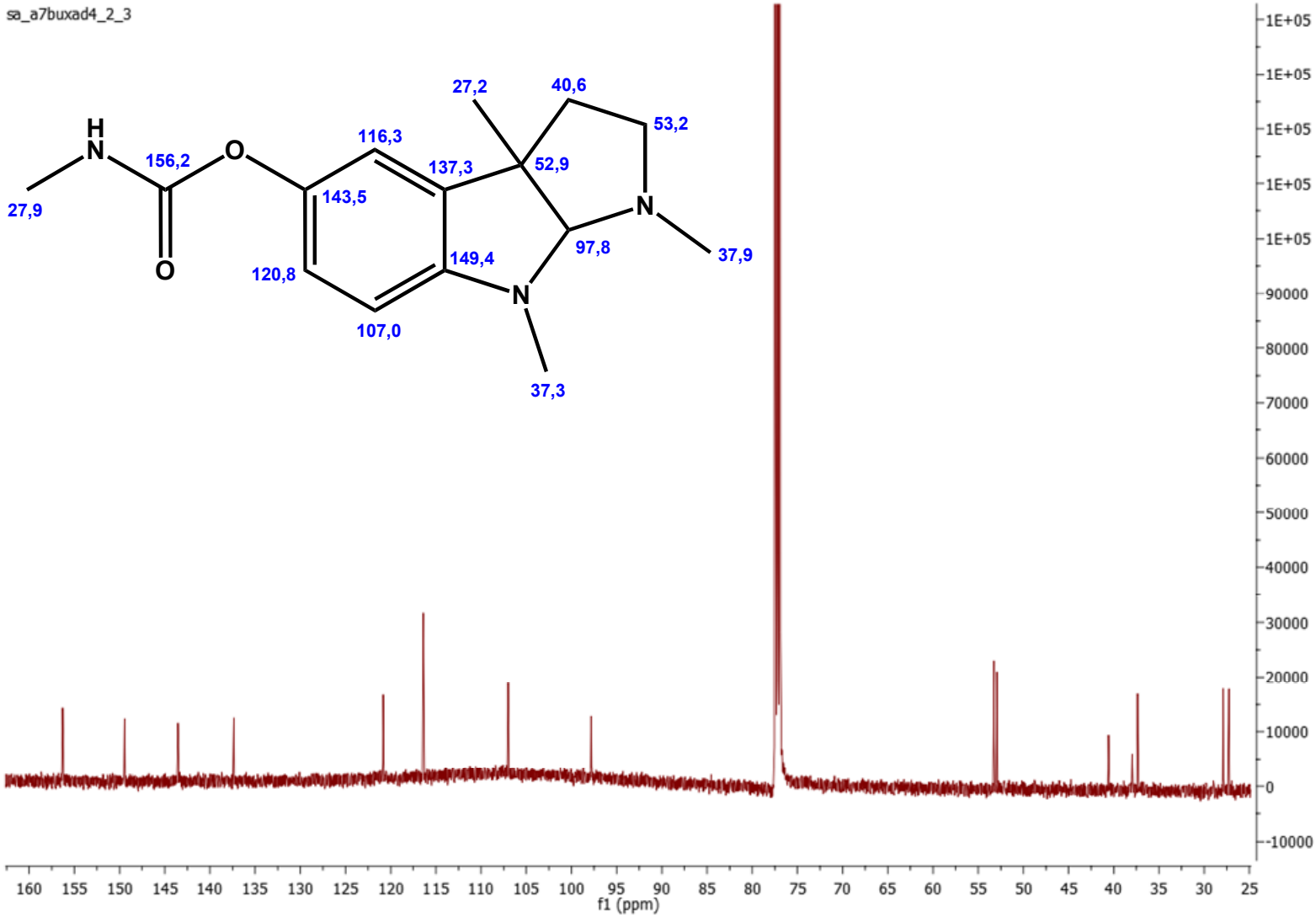


Figura 29. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) da fisostigmina isolada da cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 em arroz parbolizado.

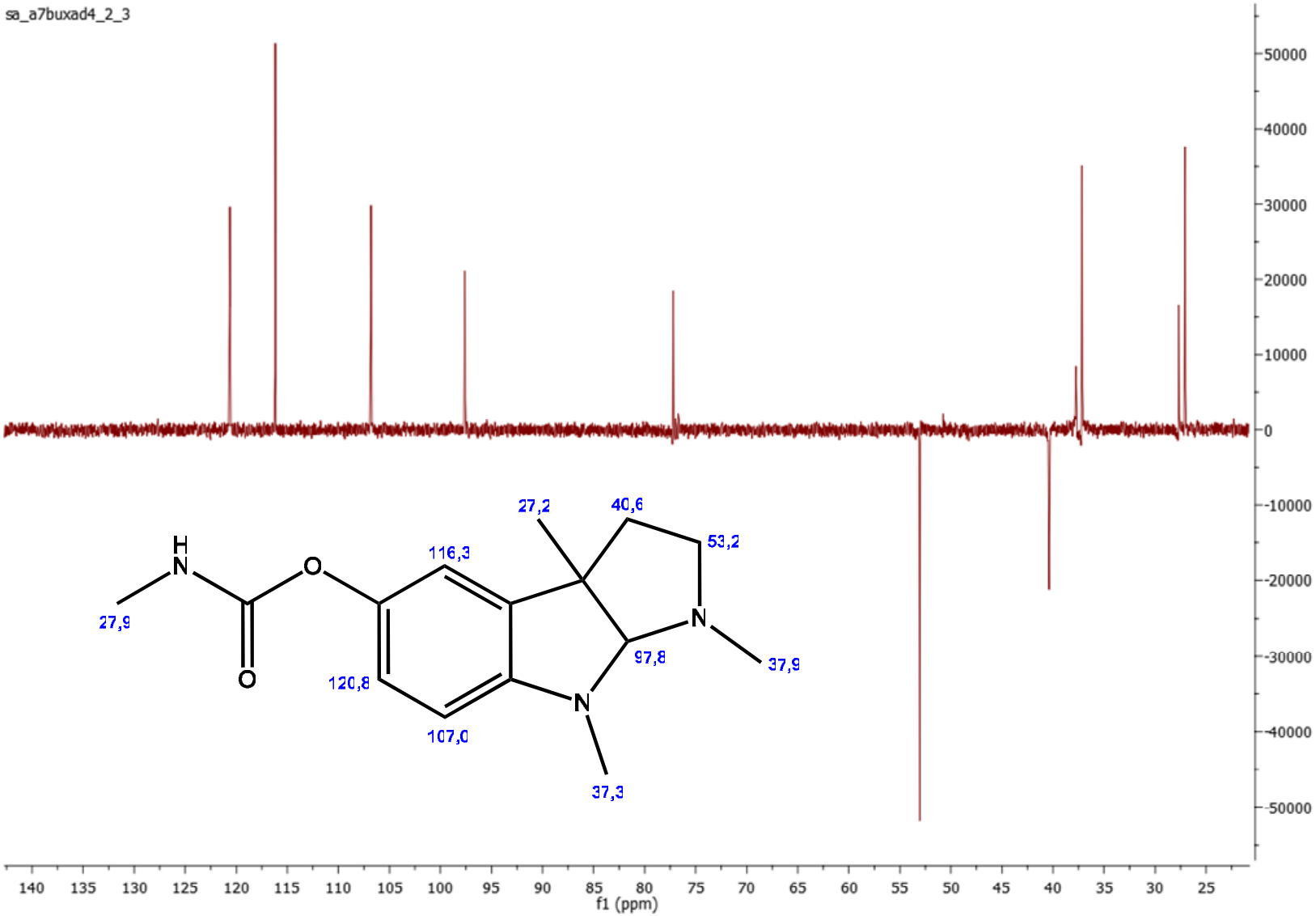


Figura 30. Espectro de DEPT (125 MHz, $CDCl_3$) da fisostigmina isolada da cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 em arroz parbolizado.

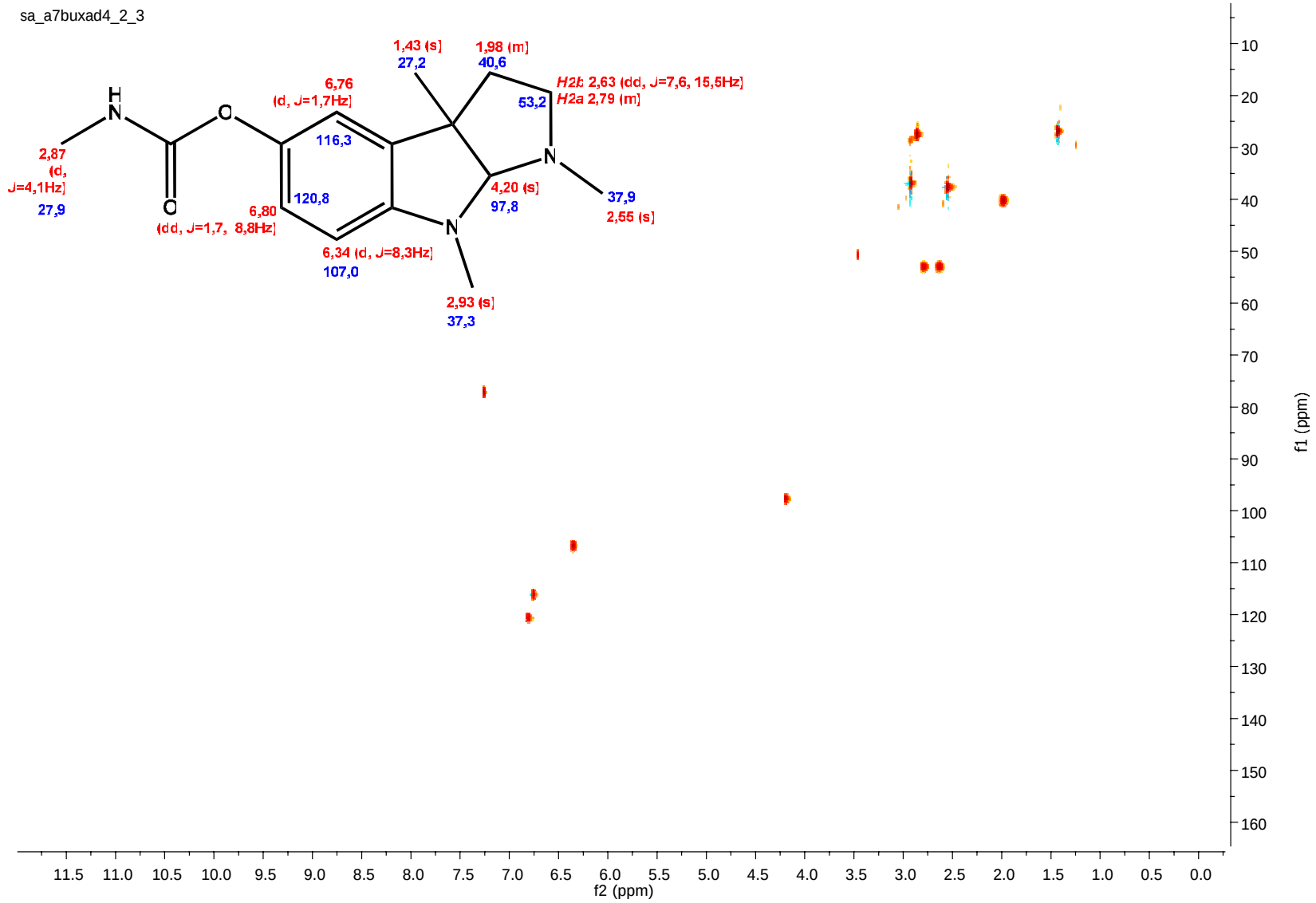


Figura 31. Espectro de HMQC (500 MHz, $CDCl_3$) da fisostigmina isolada da cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 em arroz parbolizado.

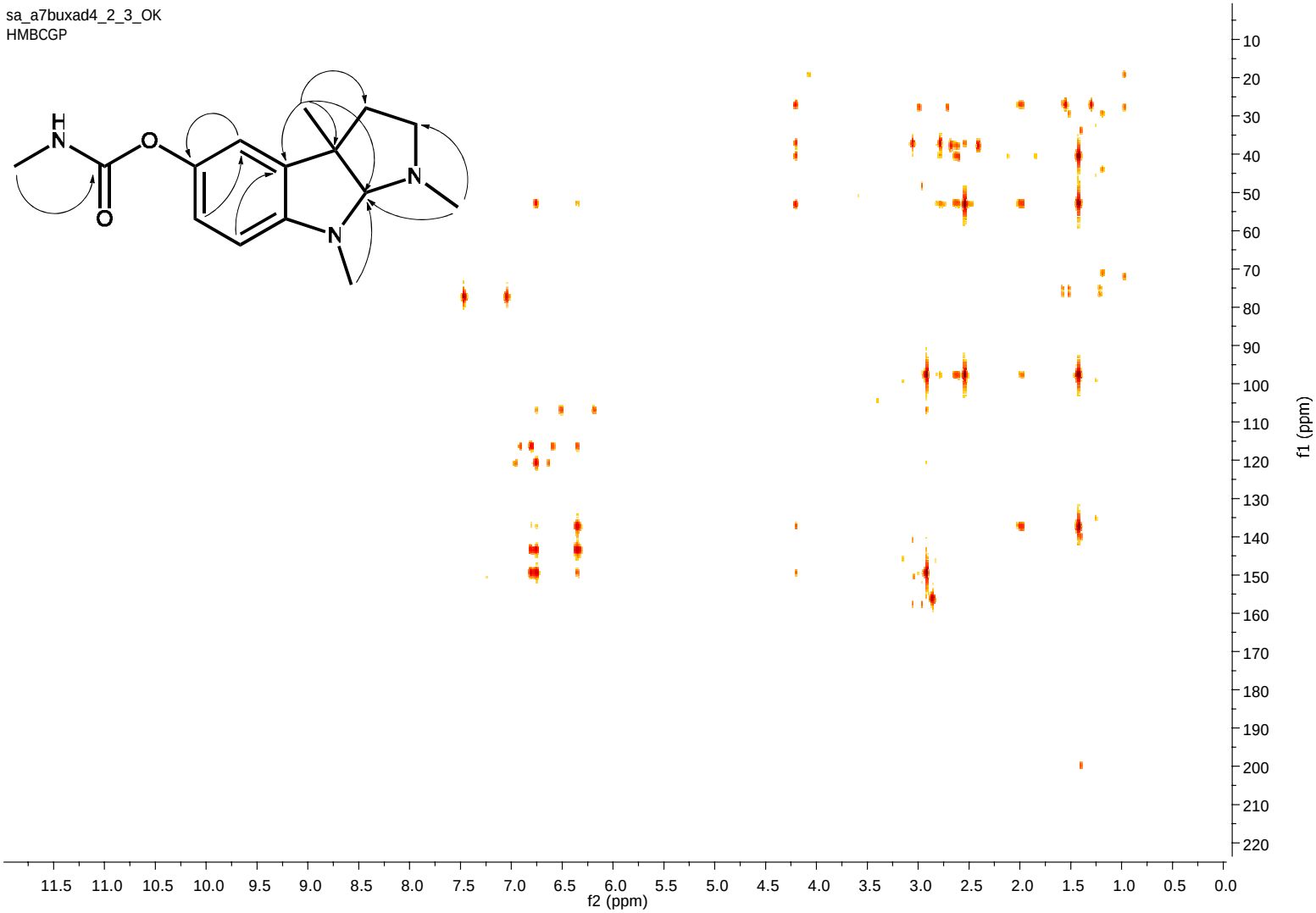


Figura 32. Espectro de HMBC (500 MHz, $CDCl_3$) da fisostigmina isolada da cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 em arroz parbolizado. Na parte superior, estrutura da fisostigmina mostrando algumas das correlações H→C observadas no espectro de HMBC.

Tabela 8. Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz), HMQC e COSY obtidos em $CDCl_3$ referentes à fisostigmina isolada da cultura simples de *S. albospinus* RLe 7 em meio arroz parbolizado.

Átomo	δ ^{13}C	δ ^{1}H (multiplicidade, *J* em Hz)	COSY	HMBC ($^{1}H \rightarrow ^{13}C$)
C(3a)-**CH_3**	27,2	1,43 (s)	-	C-3; C-3a; C-8a; C-3b
C3	40,6	1,98 (m)	H2b; H2a	C(3a)-**CH_3**; C-3a; C-3b
N(1)- **CH_3**	37,9	2,55 (s)	-	C-2; C-8a
C2 (Hb)	53,2	2,63 (dd, *J*=7,6;15,5)	H3; H2a	N(1)- **C**; C-3; C-3a; C-8a
C2 (Ha)	53,2	2,79 (m)	H2b; H3	N(1)- **C**
NH-**CH_3**	27,9	2,87 (d, *J*=4,1)	N-H	**CO_2N**
N(8)- **CH_3**	37,3	2,93 (s)	-	C-8a
C8a	97,8	4,20 (s)	-	C(3a)-**C**; N(1)- **C**; C-3; C-3a
N-**H**	-	4,93 (s)	NH-**CH_3**	-
C7	107,0	6,34 (d, 8,3)	H-6	C-3b; C-5
C4	116,3	6,76 (d, 1,7)	-	C-3a; C-6; C-7a; C-5
C6	120,8	6,80 (dd, 1,7; 8,8)	H-7	C-4; C-7a; C-5
CO_2N	156,2	-	-	-
C5	143,5	-	-	-
C(3a)-CH_3	52,9	-	-	-
C3b	137,3	-	-	-
C7a	149,4	-	-	-

A fisostigmina é um produto natural reconhecido por sua ação inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase. Já foi isolada de outras actinobactérias, havendo inclusive patentes relacionadas com o processo de obtenção a partir de cultivo de actinobactérias em cultura simples (Merck)[163] como em mista (Takeda Chem. Ind.),[164] em meio líquido. Também existem patentes sobre derivados da fisostigmina, porém obtidos por síntese[165-167], demonstrando a importância que teve essa molécula na busca de substâncias como potenciais fármacos. Porém, como descrito neste trabalho, a fisostigmina só foi detectada e isolada a partir de cultivos em meio sólido.

Durante o procedimento de isolamento da fisostigmina, foi observada possível degradação da substância. Na literatura têm sido descritos vários produtos de degradação da fisostigmina nas tentativas de isolamento desse alcaloide,[168-172] assim como há estudos da estabilidade da fisostigmina reportando alguns dos produtos de degradação deste produto natural.[173] Embora tenha sido observado um possível produto de degradação de coloração vermelha atribuível à rubreserina, durante a secagem a pressão reduzida a 40 °C de várias amostras contendo fisostigmina, a análise por GC-MS não foi conclusiva pois foi encontrada apenas uma similaridade de 88% com eserolina, composto incolor, como observado na Figura 33. A importância dos produtos de degradação da fisostigmina tem sido

reportada, já que alguns deles, além da rubreserina, apresentaram atividade citotóxica frente a algumas linhagens de células tumorais.[174]

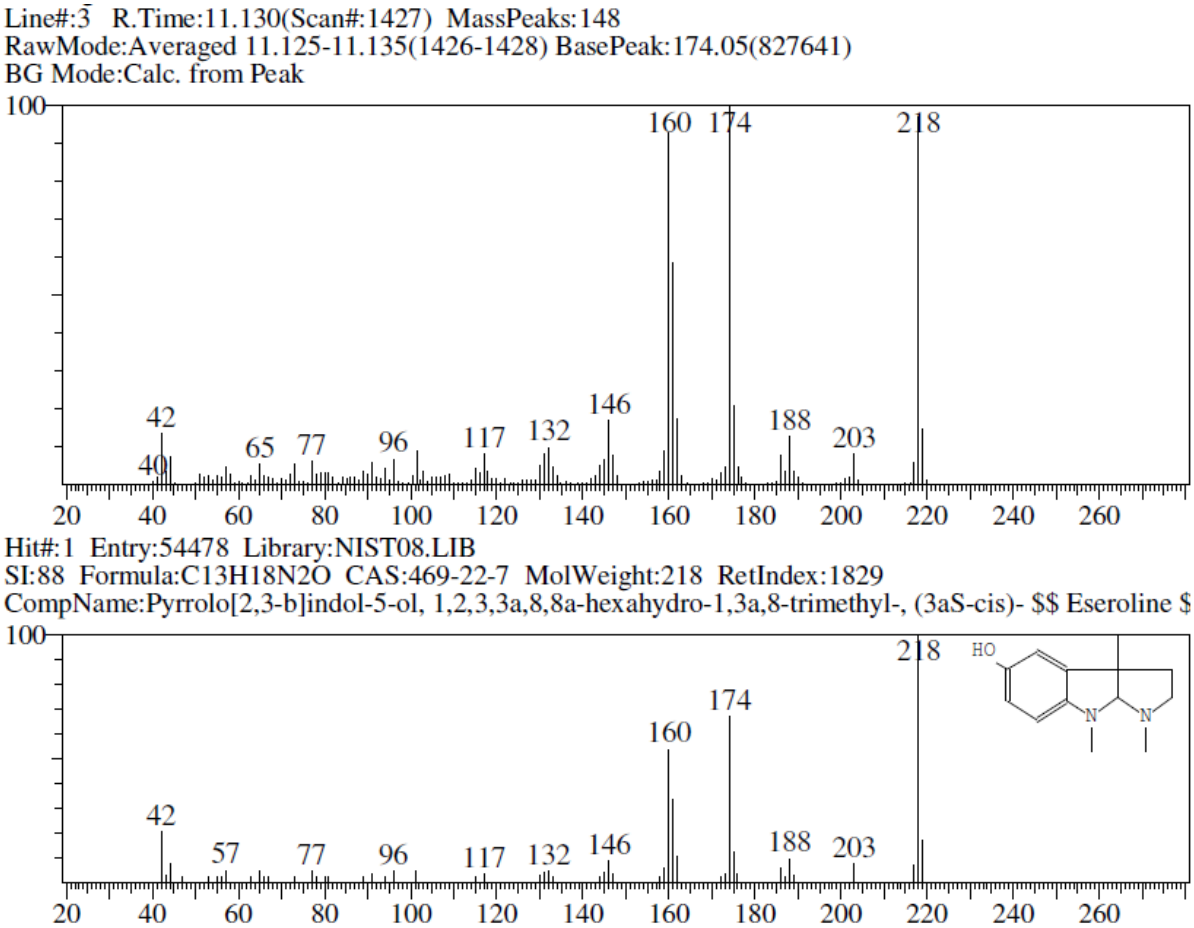


Figura 33. Análise por GC-MS da fração SA-A7BuX4.2.1 contendo um possível produto de degradação da fisostigmina (eserolina).

Com os resultados apresentados, o interesse principal foi isolar a fisostigmina, e determinar se essa substância apresentava atividade antifúngica, portanto não foram realizadas outras análises dos produtos de degradação da fisostigmina. Adicionalmente, foi demonstrada a formação da eserolina como produto de hidrólise na fonte de ionização por ESI-MS mostrando a formação do íon de *m/z* 219. Além da eserolina, são formados outros fragmentos por dissociação na fonte, *m/z* 233 e *m/z* 162 (Figura 34). Também foram feitas análises MS/MS da fisostigmina (Figura 35) e do íon de *m/z* 219 para verificar a procedência do íon de *m/z* 162 a partir do íon de *m/z* 219 (Figura 36).

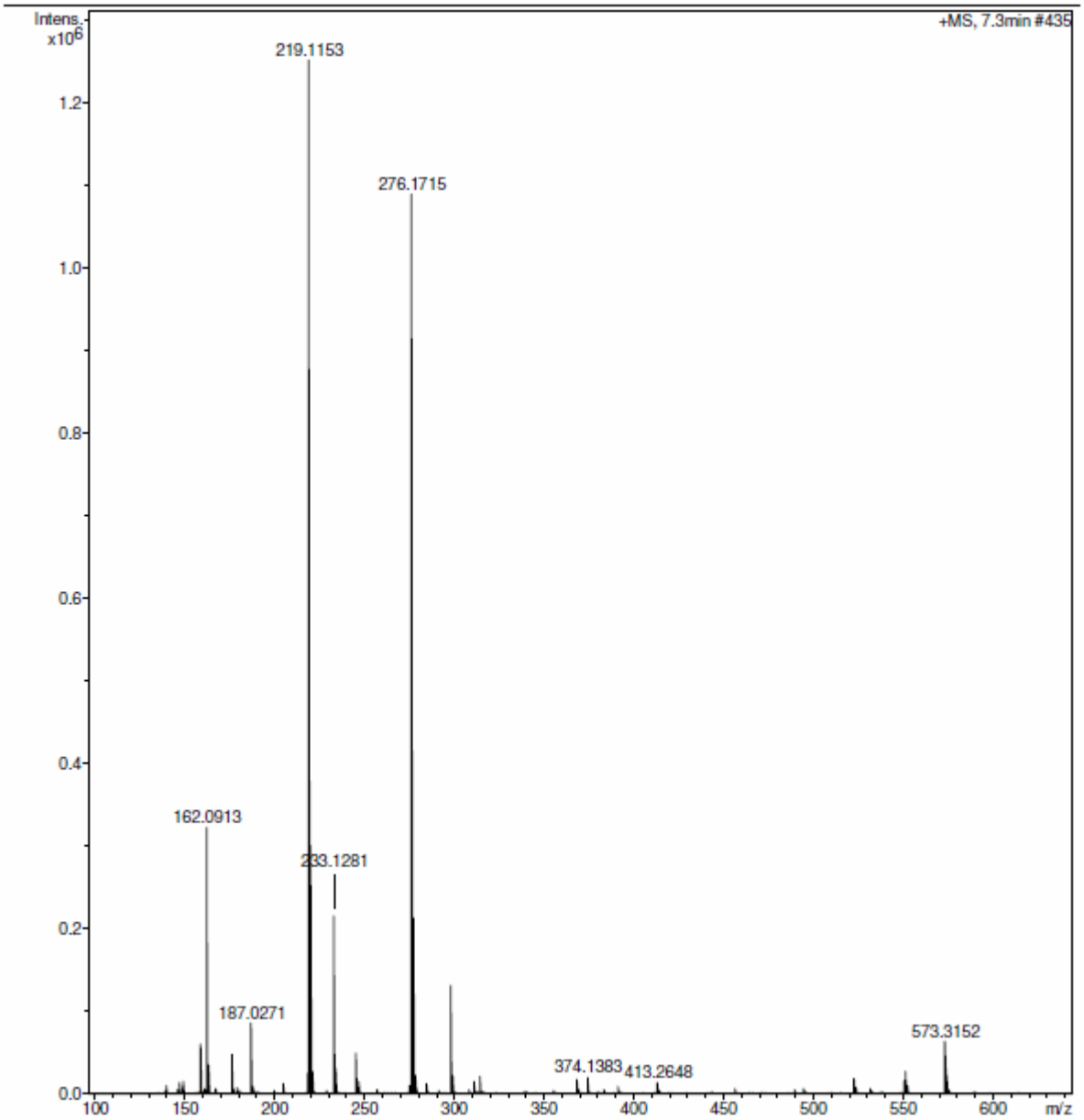


Figura 34. Espectro de ESI-MS da fisostigmina padrão (Sigma-Aldrich®), $[M+H]^+$ *m/z* 276.

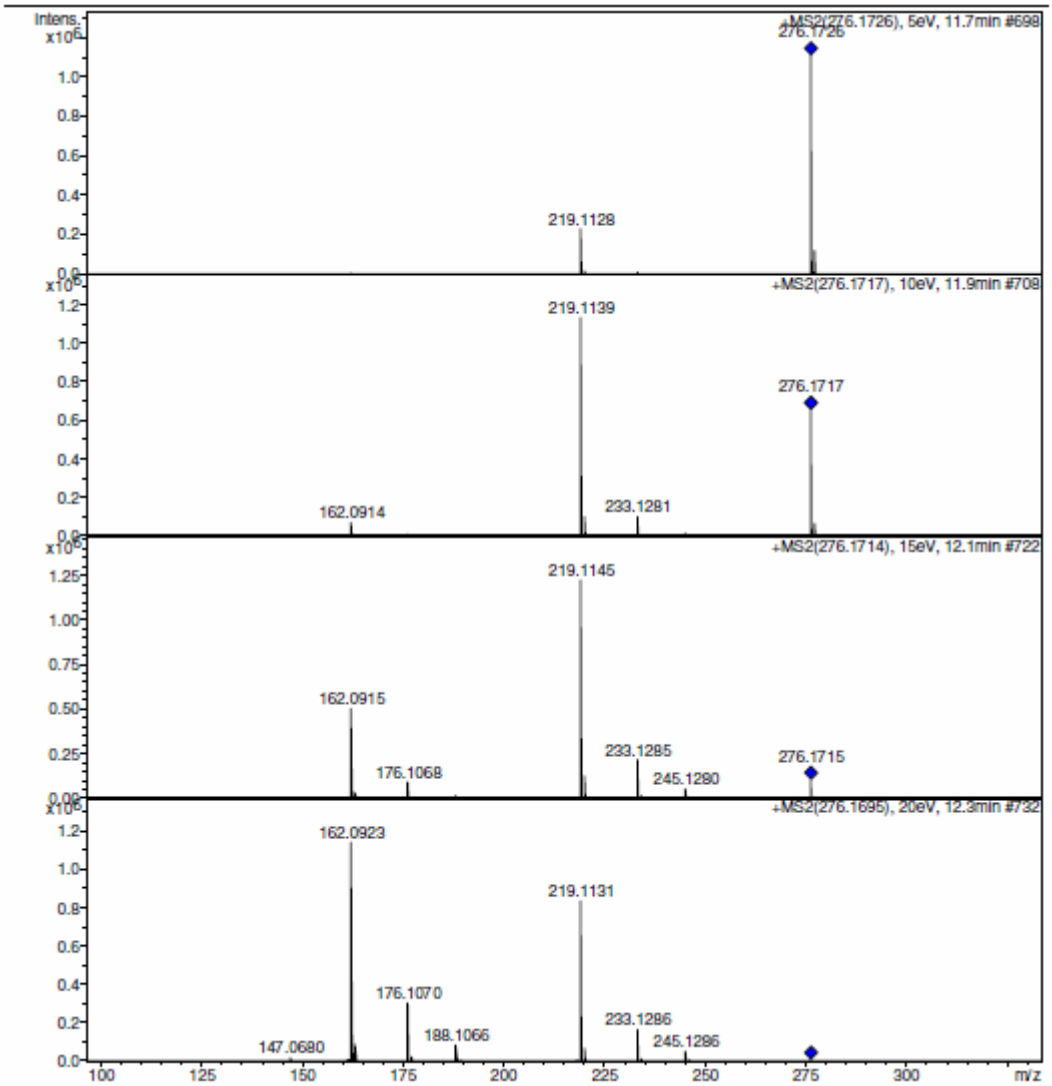


Figura 35. Espectro de MS/MS por CID do íon de *m/z* 276

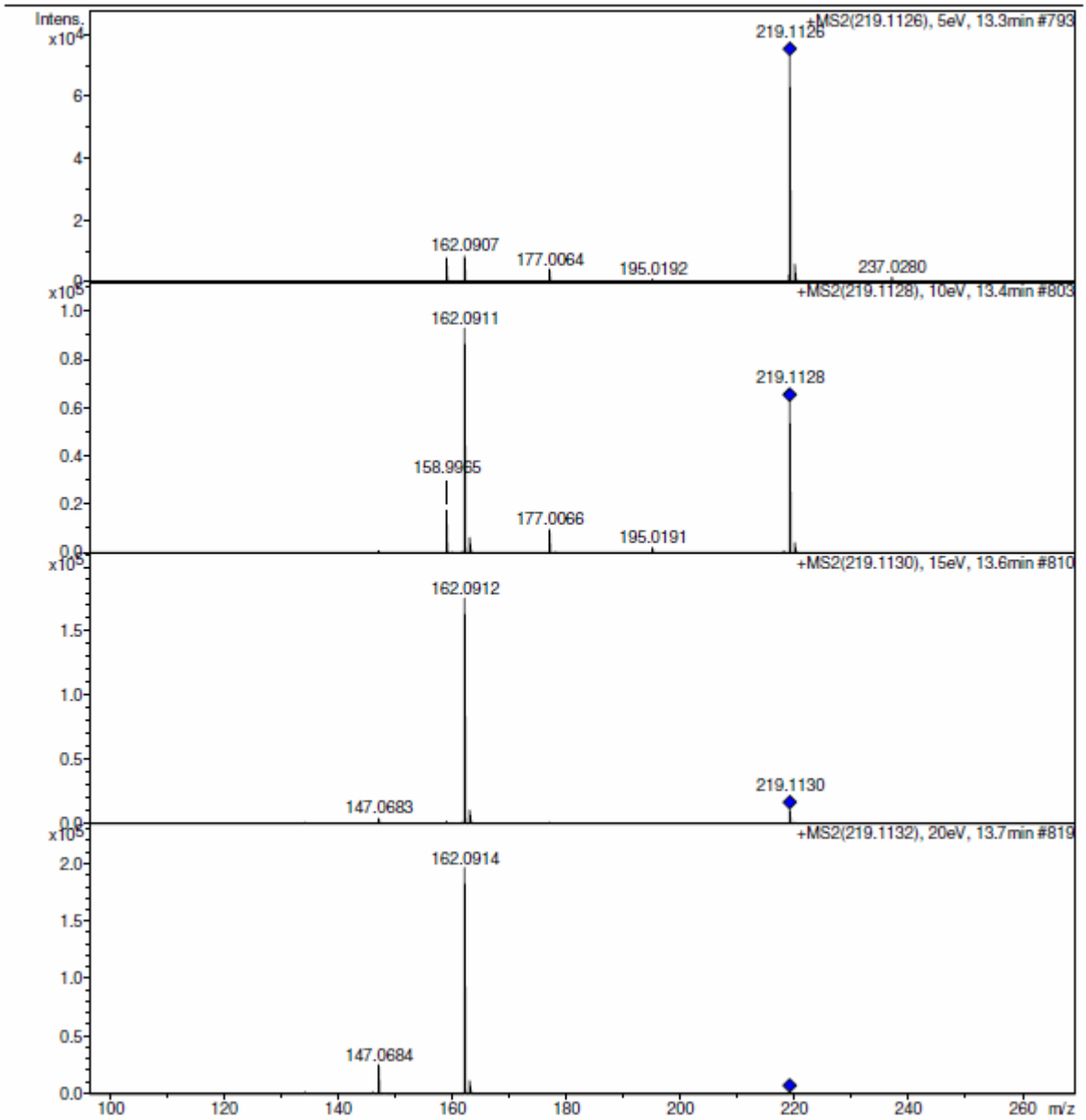


Figura 36. Espectro de MS/MS por CID do íon de *m/z* 219

4.4.4. Análise por ESI-MS da fração SA-A7AcOX6

Como descrito anteriormente no item 3.2.4.3 (Figura 10) foram obtidas sete frações no procedimento cromatográfico, a amostra SA-A7AcOX6 corresponde à última fração recuperada utilizando resina XAD-16. Devido à dificuldade de isolar qualquer substância a partir dessa fração utilizando alguns procedimentos cromatográficos, foi realizada a análise por ESI-MS obtendo o espectro observado na Figura 37. Adicionalmente, foram realizadas as análises de MS sequencial de vários íons correspondentes a possíveis metabólitos depois de fazer uma depuração dos sinais correspondentes aos interferentes procedentes do meio de cultivo.

Os íons de *m/z* 803 (Figura 38), *m/z* 771 (Figura 39), *m/z* 743 (Figura 40) e *m/z* 691 (Figura 41) foram submetidos a análises por MS sequencial apresentando um padrão de fragmentação similar, originando sempre um íon de maior abundância correspondente ao sinal de *m/z* 413. Provavelmente os íons mencionados correspondem a uma série análoga de compostos. Segundo o padrão de fragmentação, é provável que essa série de compostos corresponda a derivados antraciclínicos glicosilados, os quais podem sofrer quebra da ligação glicosídica onde a carga pode-se localizar tanto na aglicona quanto no açúcar, também apresentando clivagem da cadeia lateral da aglicona, assim como perdas neutras adicionais de H_2O, NH_3 ou CO.[175]

A hipótese dos íons mencionados pertencerem a derivados de antraciclinas glicosiladas pode-se conceber levando em conta que vários dos compostos sugeridos pela busca no DNP[129] (Tabela 9-12) apresentaram esse tipo de estrutura, como o composto derivado de 8-desoxipremitramicinona (Tabela 9), o antibiótico MA 144 U6, a citorodina J e a cinerubina K (Tabela 10), já que um derivado desse tipo de estrutura poderia gerar o íon de *m/z* 413 devido à quebra da ligação glicosídica e posteriores quebras, por exemplo nas cadeias laterais do anel A dariam lugar ao íon de *m/z* 301.

Os derivados antraciclínicos, por exemplo citorodina J,[176] sugeridos para o íon de *m/z* 771 (Tabela 10) poderiam dar lugar a fragmentos similares daqueles observados no espectro Figura 39 devido à quebra da ligação glicosídica e perda posterior de 32 Da devido possivelmente a perda de CH_3OH. Os dados de fragmentação da cinerubina K mencionados por Mahmoud[177] sugerem presença do

íon de *m/z* 415 correspondente à aglicona formando aduto com sódio e o íon de *m/z* 383 correspondente à porção glicosídica formando aduto com sódio. Segundo essa informação, a formação dos íons *m/z* 413 e *m/z* 381 é coerente com essa classe de compostos, suportando a hipótese da presença desse tipo de compostos na fração SA A7 AcOX6.

Segundo essa informação da literatura, assim como a informação observada nas análises por ESI-MS, existe a possibilidade de que os íons aqui mencionados correspondam a derivados glicosilados apresentando uma estrutura cíclica rígida que dificilmente fragmenta, porém a informação obtida e analisada não é conclusiva, o que impede realizar a atribuição estrutural dos compostos detectados devido a que não existem estudos de fragmentação por CID que permitam uma comparação adequada.

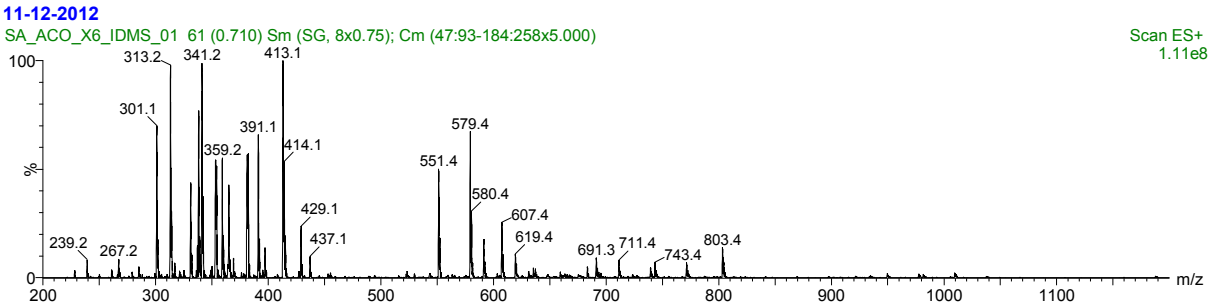


Figura 37. Espectro de ESI-MS da fração SA A7AcOX6

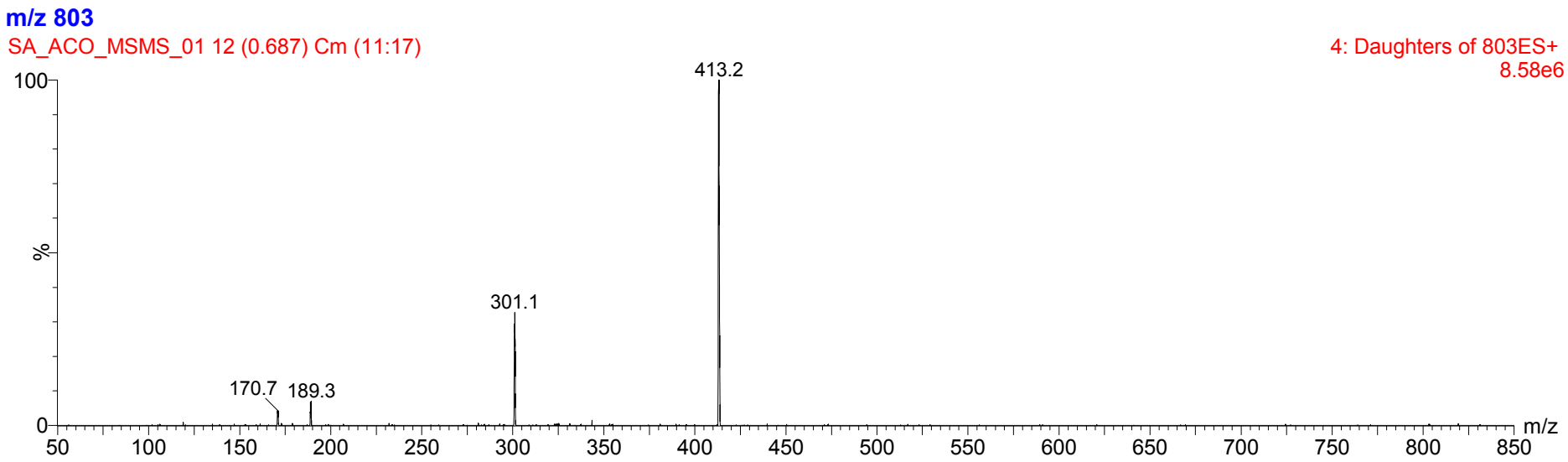


Figura 38. Fragmentação do íon precursor de *m/z* 803 por CID. Energia de colisão 40 eV.

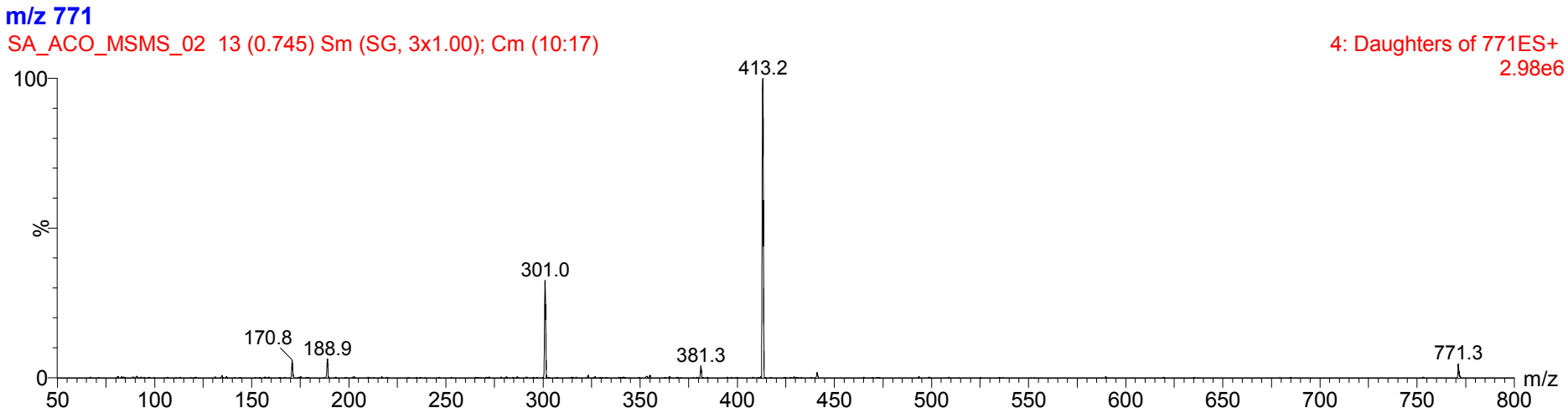


Figura 39. Fragmentação do íon precursor de *m/z* 771 por CID. Energia de colisão 40 eV.

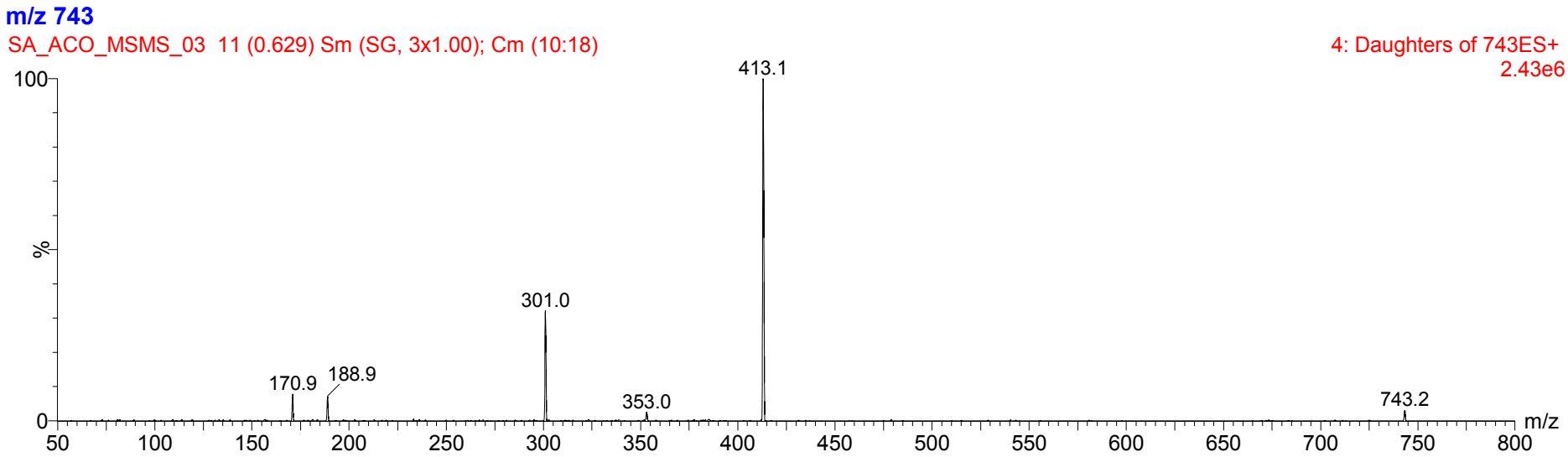


Figura 40. Fragmentação do íon precursor de *m/z* 743 por CID. Energia de colisão 40 eV.

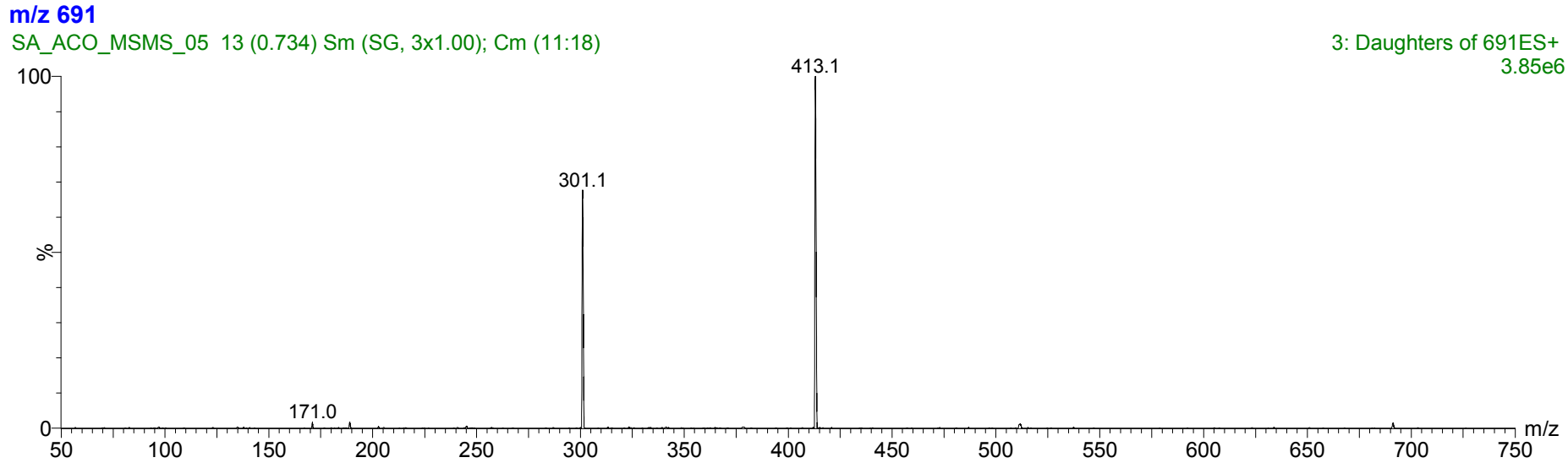
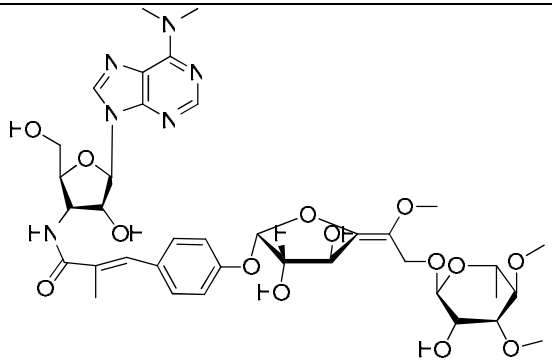
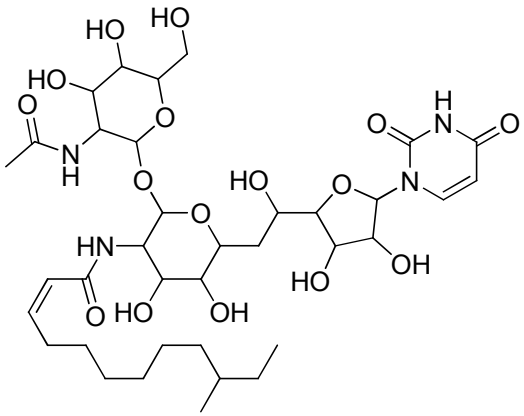


Figura 41. Fragmentação do íon precursor de *m/z* 691 por CID. Energia de colisão 40 eV.

Tabela 9. Resultados da busca em bases de dados do íon *m/z* 803

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata "802,0-802,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{37}H_{50}N_6O_{14}$		Antibiótico A 201A, CAS 37305-78-5	178
DNP	Massa exata "802,0-802,5" e origem biológica "*Streptomyces*	$C_{43}H_{50}N_2O_{13}$	Derivado antraquinônico, estrutura não reportada.	Antibiótico DC 14, CAS 73070-83-4	179
DNP	Massa exata "802,0-802,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{36}H_{58}N_4O_{16}$		Estreptovirudina B_2, CAS 51330-31-5	180, 181

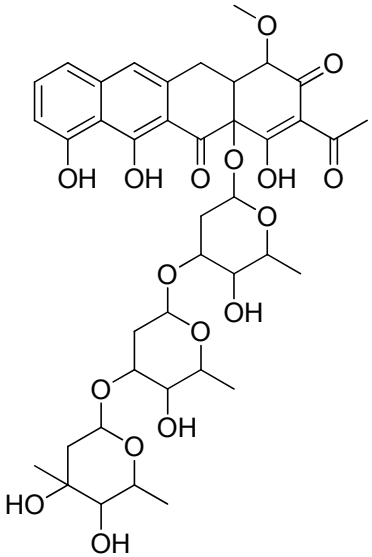
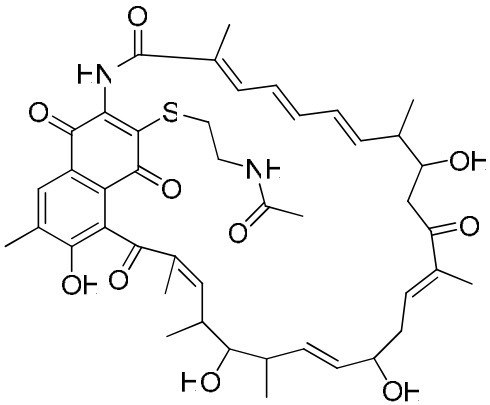
Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata “802,0-802,5” e origem biológica “*Streptomyces*”	$C_{40}H_{50}O_{17}$		4*a*-*O*-[2,6-Didesoxi-3-*C*-metil-β-D-*ribo*-hexopiranosil-(1→3)-2,6-didesoxi-β-D-*lyxo*-hexopiranosil-(1→3)-2,6-didesoxi-β-D-*arabino*-hexopiranosido]- 8-desoxipremitramicinona, CAS 475111-68-3	182
DNP	Massa exata “802,0-802,5” e origem biológica “*Streptomyces*”	$C_{44}H_{54}N_2O_{10}S$		Derivado de naftomicina A: *N*-[2-[[(6*Z*,8*Z*,10*E*,12*S*,13*S*,16*E*,19*S*,20*E*,22*S*,23*S*,24*S*,25*E*)-4,5,12,13,14,15,18,19,22,23,24,27-dodeca hidro-13,19,23,28-tetrahidroxi-6,12,16,22,24,26,29-heptametil-1,5,15,27,32-pentaoxo-3,31-metano-1*H*-4-benzazaciclononacosin-2-il]tio]etil]-acetamida, CAS 214281-72-8	183

Tabela 10. Resultados da busca em bases de dados do íon de m/z 771

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata "771,0-771,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{40}H_{50}O_{15}$		Antibiótico MA 144 U6, CAS 64222-71-1	[184, 185]
DNP	Massa exata "771,0-771,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{40}H_{50}O_{15}$		Citorodina J, CAS 95599-42-1	[176]

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata “771,0-771,5” e origem biológica “*Streptomyces*”	$C_{40}H_{50}O_{15}$		Cinerubina K	177
DNP	Massa exata “771,0-771,5” e origem biológica “*Streptomyces*”	$C_{43}H_{62}O_{12}$		Antibiótico UK 78622, CAS 127346-85-4	186

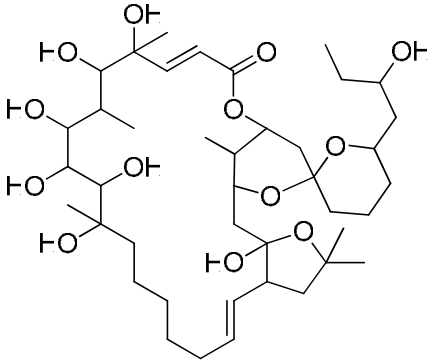
Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata "771,0-771,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{41}H_{70}O_{13}$		Antibiótico NK 154183ª, CAS 152986-47-5	[187]
DNP	Massa exata "771,0-771,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{41}H_{43}ClN_4O_9$	Antibiótico peptídico, estrutura não reportada	Yemenimicina, CAS 12764-56-6	[188], Patente[189]

Tabela 11. Resultados da busca em bases de dados do íon m/z 743

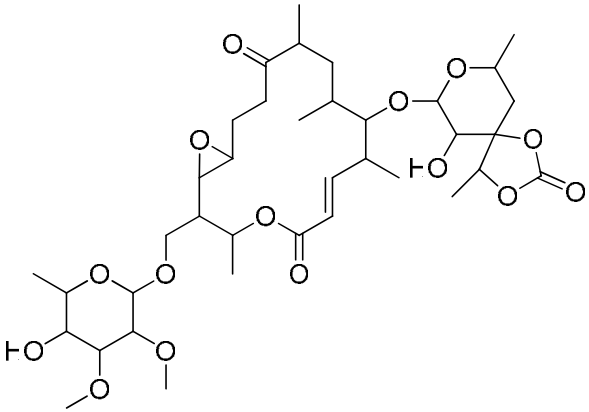
Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata "742,0-742,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{40}H_{54}N_8O_6$	Estrutura não reportada	Antibiótico SS 8228B, CAS 98444-88-3	Patente[190, 191]
DNP	Massa exata "742,0-742,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{37}H_{58}O_{15}$		Aldgamicina E	[192]

Tabela 12. Resultados da busca em bases de dados do íon m/z 691

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata "690,0-690,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{37}H_{38}O_{13}$		Antibiótico Sch 47554, CAS 150050-20-7	193
DNP	Massa exata "690,0-690,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{38}H_{58}O_{11}$		Higrolidina, CAS 83329-73-1	194
DNP	Massa exata "690,0-690,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{39}H_{62}O_{10}$		Roseofungina, CAS 12687-98-8	195
DNP	Massa exata "690,0-690,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{27}H_{50}N_{10}O_{11}$		Ácido *N*-acetilestreptotricina E, CAS 1123520-73-9	196

4.5. Cultura mista em meio sólido ISP-2

Devido às poucas quantidades de material disponíveis a partir de cultivos em placa de Petri, é necessário utilizar técnicas analíticas mais sensíveis para obter um perfil metabólico da cultura de micro-organismos.[197] Assim, foi utilizado o protocolo desenvolvido por Smedsgaard[93] para obter um perfil metabólico da interação entre *S. albospinus* RLe 7 e *C. boninense* FLe 8.1, na qual o crescimento fúngico foi inibido pela actinobactéria como observado na Figura 42, com uma pouca quantidade de amostra e mínimo consumo de solventes. O rendimento dos extratos obtidos dos fragmentos de micélio-ágar é mostrado na Tabela 13.

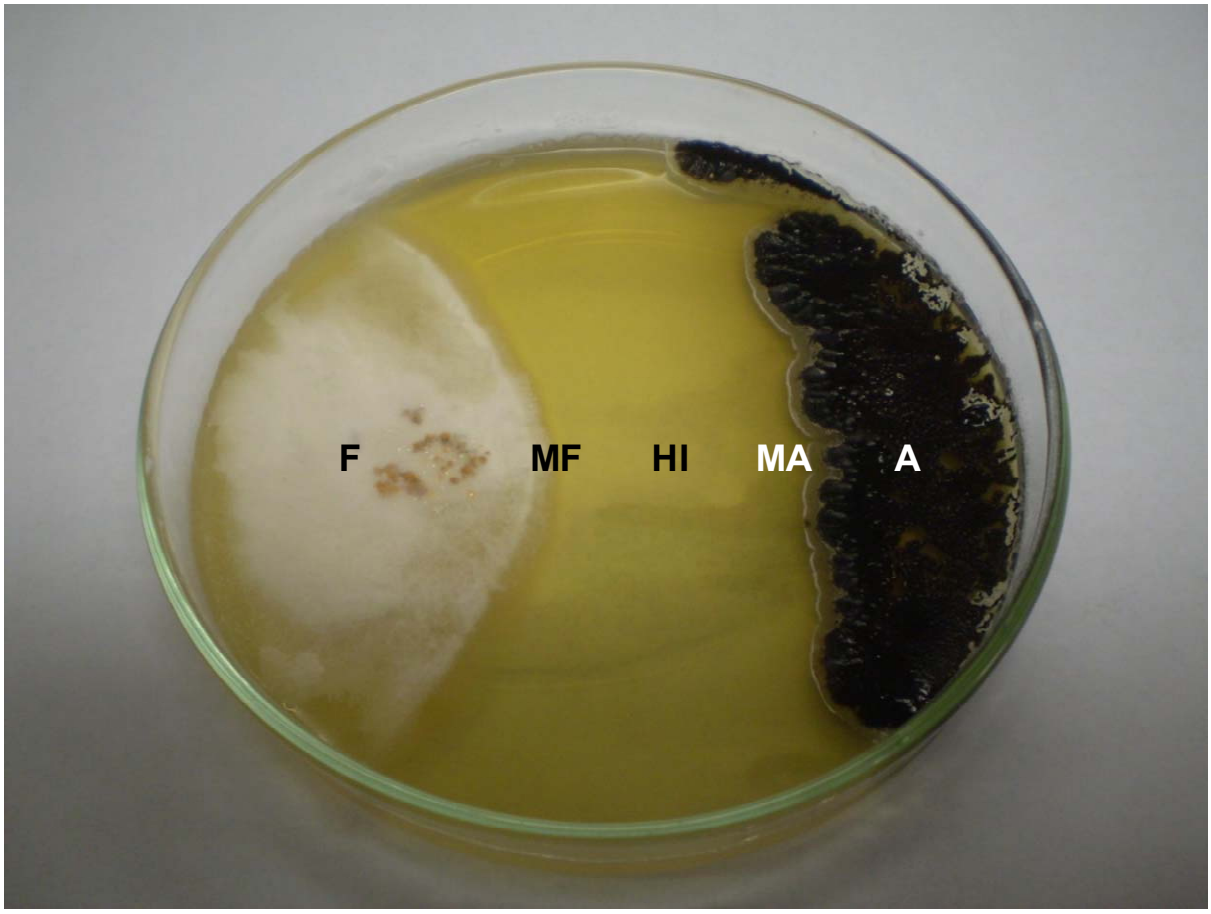


Figura 42. Co-cultivo de *S. albospinus* RLe 7 e *C. boninense* FLe 8.1 em meio ISP-2.
S. albospinus RLe 7 (direita) e *C. boninense* FLe 8.1 (esquerda). Os códigos na figura referem-se a: F (fungo), MF (margem do fungo), HI (halo de inibição), MA (margem da actinobactéria), A (actinobactéria).

Tabela 13. Rendimento dos extratos obtidos a partir do experimento de extração em micro-escala.

Extratos obtidos com mistura solvente P[††]	**Massa dos 3 fragmentos de micélio-ágar (mg)**	**Massa do extrato seco (mg)**	**Códigos dos extratos obtidos com mistura solvente A**[‡‡]	**Massa dos 3 fragmentos de micélio-ágar (mg)**	**Massa do extrato seco (mg)**
ACP	213,2	2,5	ACA	224,9	1,6
MACP	288,4	3,0	MACA	239,3	1,1
AACP	246,1	2,5	AACA	270,4	0,8
FCP	227,6	2,2	FCA	225,7	0,8
AP	213,9	2,6	AA	255,0	2,1
MAP	162,0	1,9	MAA	167,8	0,6
HIP	147,3	1,4	HIA	146,1	0,6
MFP	163,9	2,0	MFA	142,0	0,6
FP	180,5	1,6	FA	167,0	0,7
BRP	172,8	5,4	BRA	188,0	0,6

As análises foram realizadas por ESI-MS no modo positivo, já que foi observado um melhor perfil de detecção, o que é coerente com um estudo recentemente publicado demonstrando que muitos dos produtos naturais geralmente são detectados nesse modo, já que de 719 metabólitos microbianos e micotoxinas padrão, 93% foram detectados usando ESI-MS no modo positivo.[94]

Segundo os espectros obtidos por ESI-MS, a extração com ACN:H_2O foi mais eficiente possibilitando a observação de maior número de sinais quando comparados os espectros do halo de inibição dos extratos HIP (mistura ACN:H_2O 1% ác. fórmico) e HIA (AcOEt:CH_2Cl_2:MeOH 1% ác. fórmico) (Figura 43). Isto também pode ser observado na Tabela 13 na qual se mostram os valores das massas de peso seco dos extratos obtidos com os dois tipos de mistura solvente. Levando-se em conta os melhores rendimentos dos extratos obtidos com a mistura solvente ACN:H_2O e maior intensidade dos sinais detectados, as análises descritas na continuação do texto serão baseadas nos espectros gerados a partir destes extratos.

[††] ACN:H_2O (65:35) contendo 1% de ácido fórmico (v/v).
[‡‡] MeOH:CH_2Cl_2:AcOEt (1:2:3) contendo 1% de ácido fórmico (v/v).

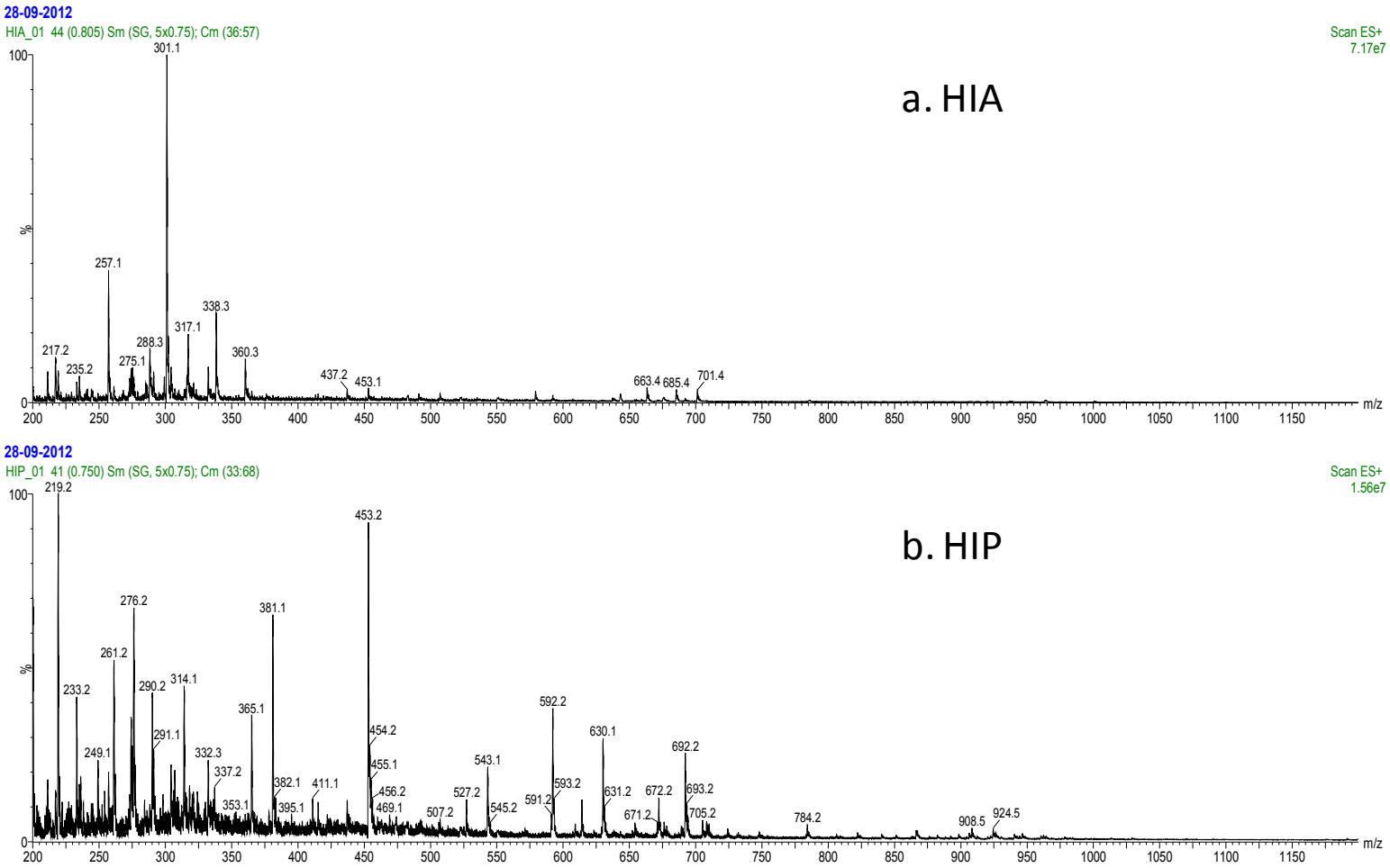


Figura 43. Espectros de ESI-MS dos extratos do halo de inibição comparando as duas misturas solventes utilizadas na extração em micro-escala. a). Extrato do halo de inibição obtido com a mistura solvente MeOH:CH_2Cl_2:AcOEt (1:2:3) contendo 1% de ácido fórmico (v/v); b). Extrato do halo de inibição obtido com a mistura solvente ACN:H_2O (65:35) contendo 1% de ácido fórmico (v/v).

Os espectros de massas dos extratos mencionados foram comparados entre si a fim de identificar diferenças nos perfis, já que cada extrato foi representativo de uma região específica da interação microbiana. Assim, a identificação de sinais nas regiões da interação na co-cultura e posterior comparação com os controles correspondentes, permitiu propor o micro-organismo responsável pela produção do possível metabólito identificado. A análise contemplou também a verificação de que os íons detectados nos extratos dos micro-organismos não proviessem do extrato do meio de cultura (branco) nem do solvente, neste caso o MeOH. Depois de realizar essa depuração, foram realizadas análises de massas sequencial por CID a diferentes energias de colisão (5, 15, 25, 30 eV) para obter informação estrutural das moléculas detectadas mediante esta técnica. Da Figura 44 até a Figura 53 estão mostrados os espectros em *full scan* de cada um dos extratos. Na Tabela 14 mostram-se os íons submetidos a fragmentação por CID, e os espectros representativos das análises MS/MS mostram-se a partir da Figura 54.

Tabela 14. Íons detectados nos extratos da co-cultura em meio ISP-2 ágar e submetidos a CID.

Íon (*m/z*)	**Extratos**	**Fragmentos mais representativos gerados por CID (energia de colisão)**
304	AACP, MACP, ACP, AP,MAP	212, 188, 173 (25 eV)
290	AACP, MACP, ACP, AP, MAP, HIP, FP, MFP	219, 174, 162, 147 (15 eV)
276	AACP, MACP, ACP, AP, MAP, HIP, FP, MFP	245, 233, 219, 188, 176, 162 (15 eV)
274	FCP, HIP, FP, MFP	256, 212, 203, 187, 174, 171, 157, 130, 127, 114, 112, 106, 102, 97, 88, 84, 83, 72, 71, 70, 68, 58, 57, 55 (25 eV)
257	FCP, FP, MFP	211, 140, 139, 121, 96, 95, 84, 72, 70 (20 eV)
249	AP, MAP, HIP	204, 189, 176, 170, 147, 84 (20 eV)
222	FCP, FP	204, 176, 163, 151, 149, 136, 130, 120, 108, 105, 102, 91, 86, 84, 72, 71, 58 (20 eV)
614	AACP, MACP, ACP, AP, MAP, HIP, FP, MFP	478, 460, 453, 364, 346, 317, 308, 241, 159, 132 (25 eV)
672	AACP, MACP, ACP, AP, MAP, HIP, FP, MFP	592, 572, 456, 438, 162, 144, 137, 136 (25 eV)
592	AACP, MACP, ACP, AP, MAP, HIP, FP, MFP	456, 438, 162, 144, 137, 126 (20 eV)
758	FCP, FP	184 (20 eV)
782	FCP, FP	184 (20 eV)
784	FCP, AP, MAP, HIP, FP, MFP	184 (25 eV)
786	FCP, FP	184 (25 eV)
820	FCP, FP	761, 700, 584, 478, 301, 163 (30 eV)
822	FCP, FP	804, 763, 480, 303, 163 (30 eV)
824	FCP, FP	678, 649, 538, 163 (30 eV)

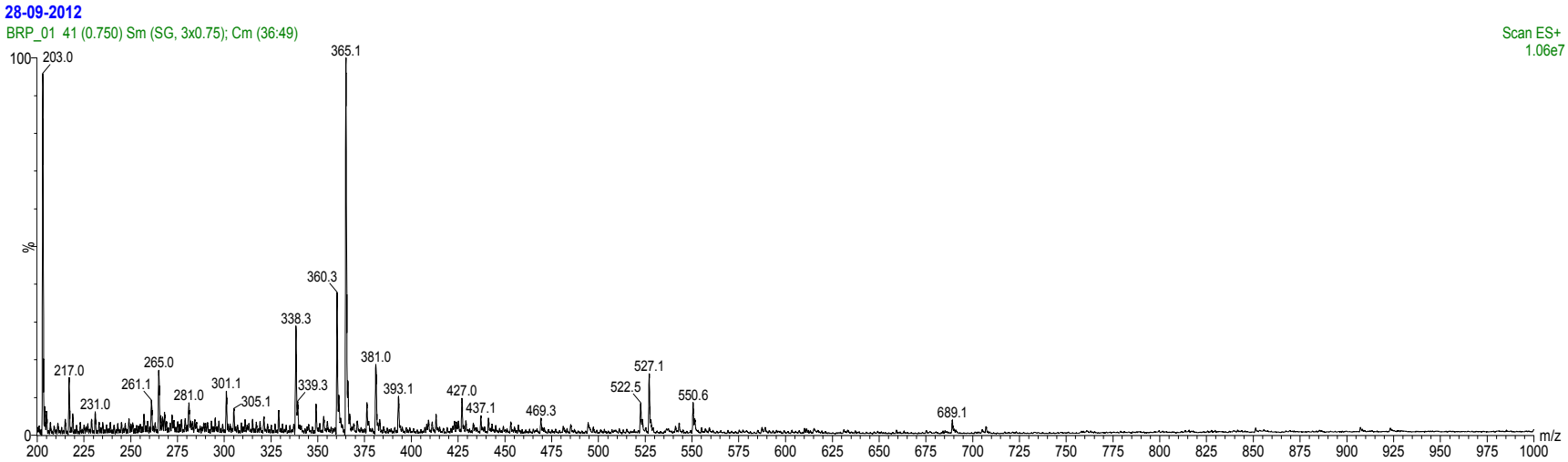


Figura 44. Espectro de ESI-MS do extrato BRP correspondente ao meio de cultura ISP-2 ágar.

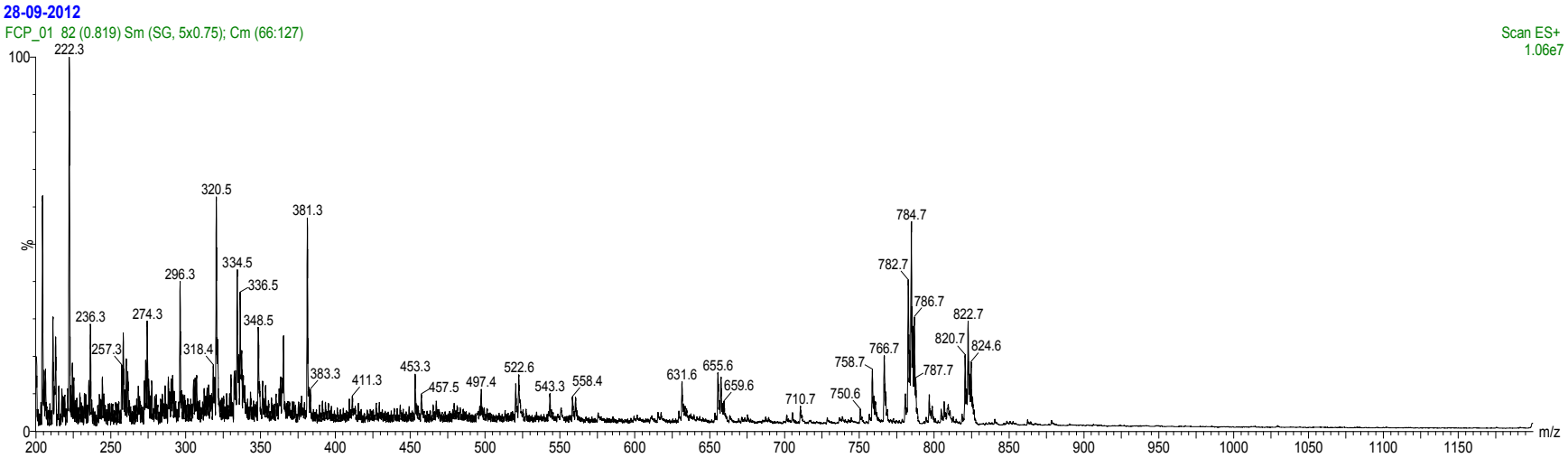


Figura 45. Espectro de ESI-MS do extrato FCP correspondente ao fungo controle.

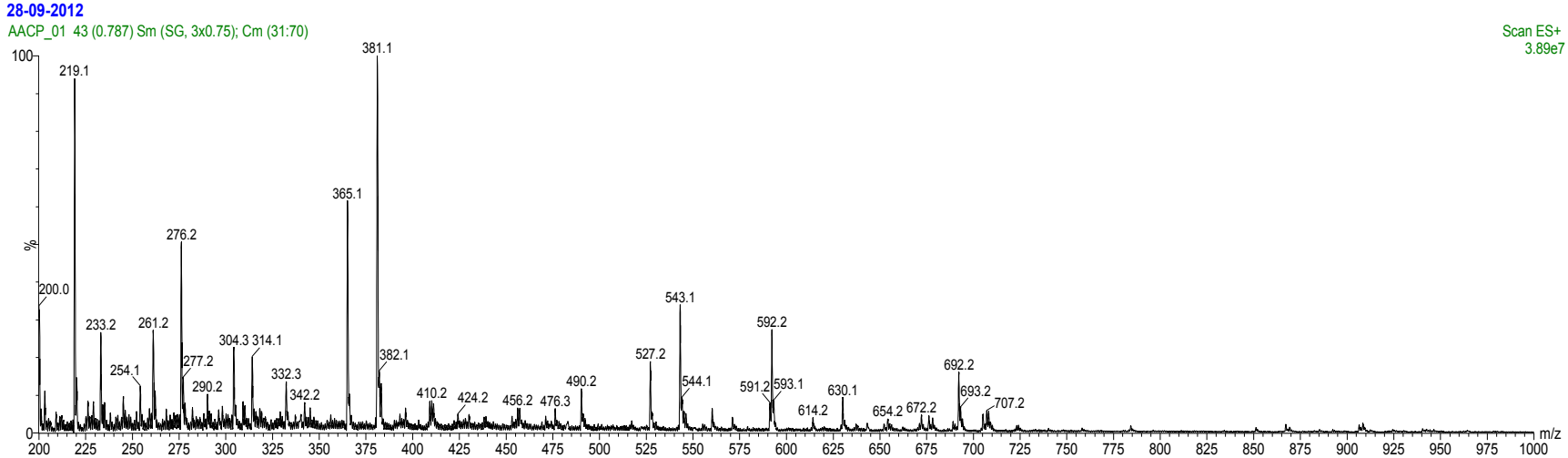


Figura 46. Espectro de ESI-MS do extrato AACP correspondente ao ágar da actinobactéria controle.

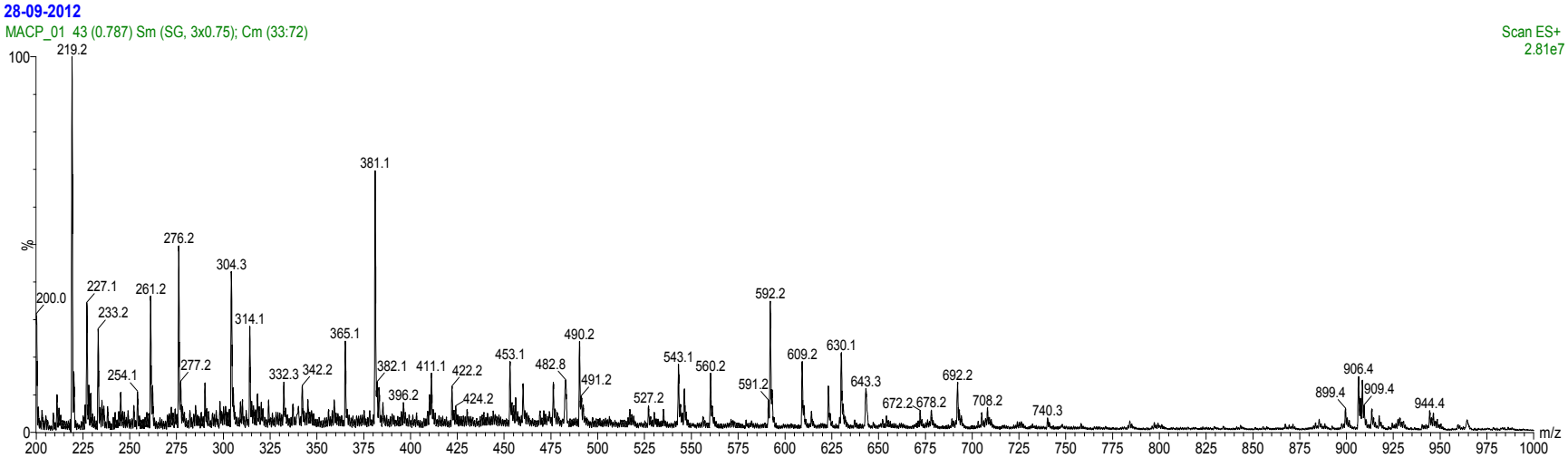


Figura 47. Espectro de ESI-MS do extrato MACP correspondente à margem da actinobactéria controle.

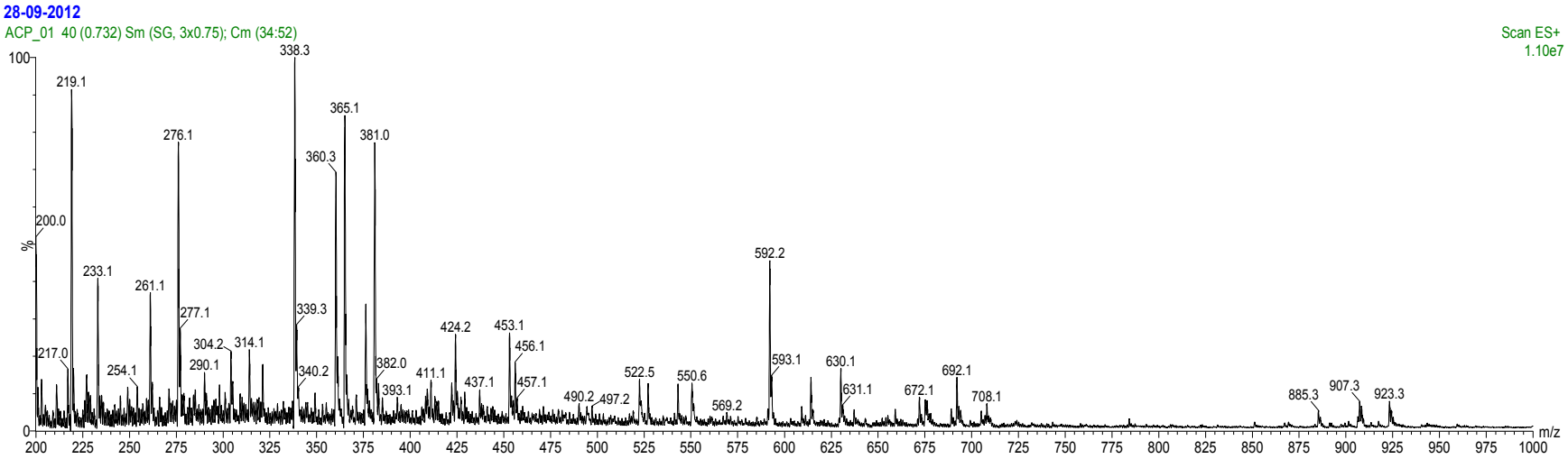


Figura 48. Espectro de ESI-MS do extrato ACP correspondente ao micélio da actinobactéria controle.

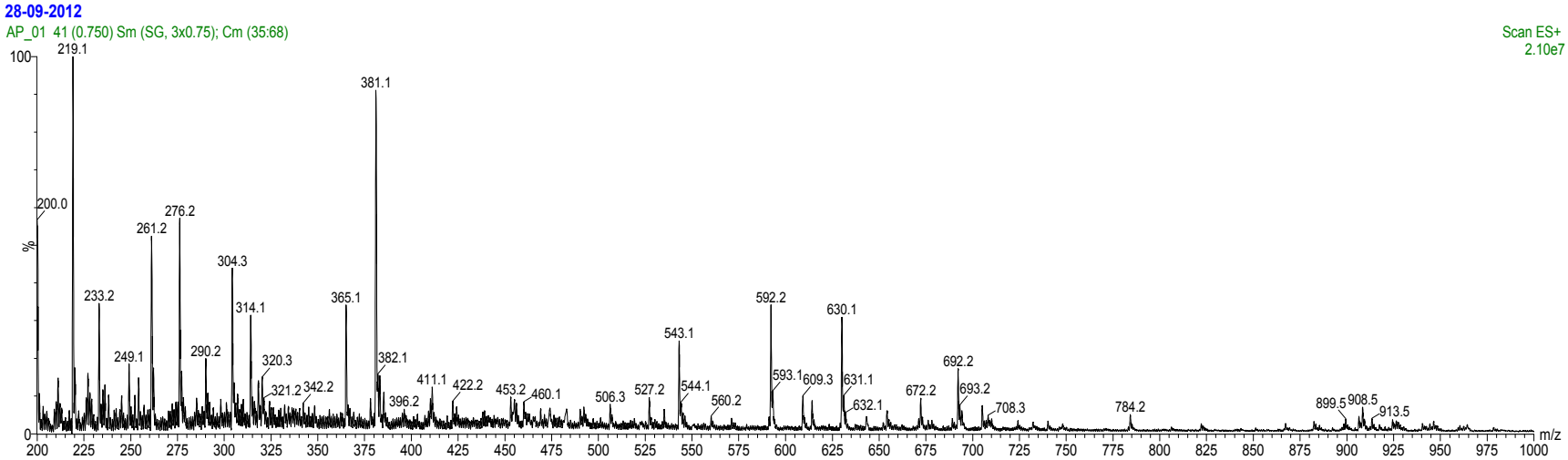


Figura 49. Espectro de ESI-MS do extrato AP correspondente ao micélio da actinobactéria na co-cultura.

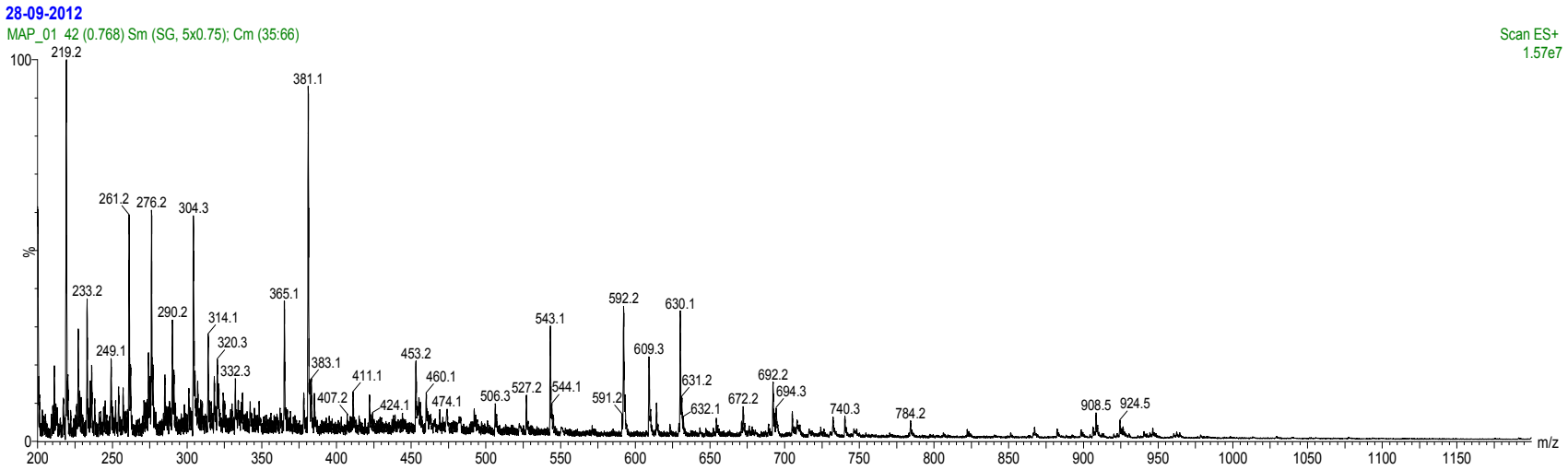


Figura 50. Espectro de ESI-MS do extrato MAP correspondente à margem da actinobactéria na co-cultura.

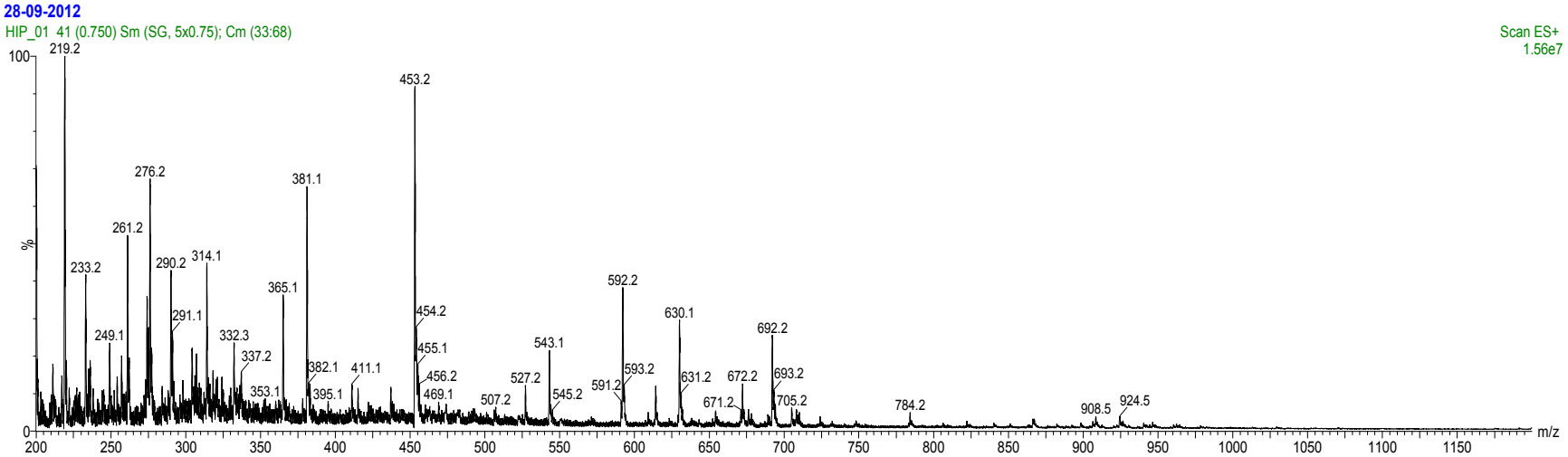


Figura 51. Espectro de ESI-MS do extrato HIP correspondente à halo de inibição na co-cultura.

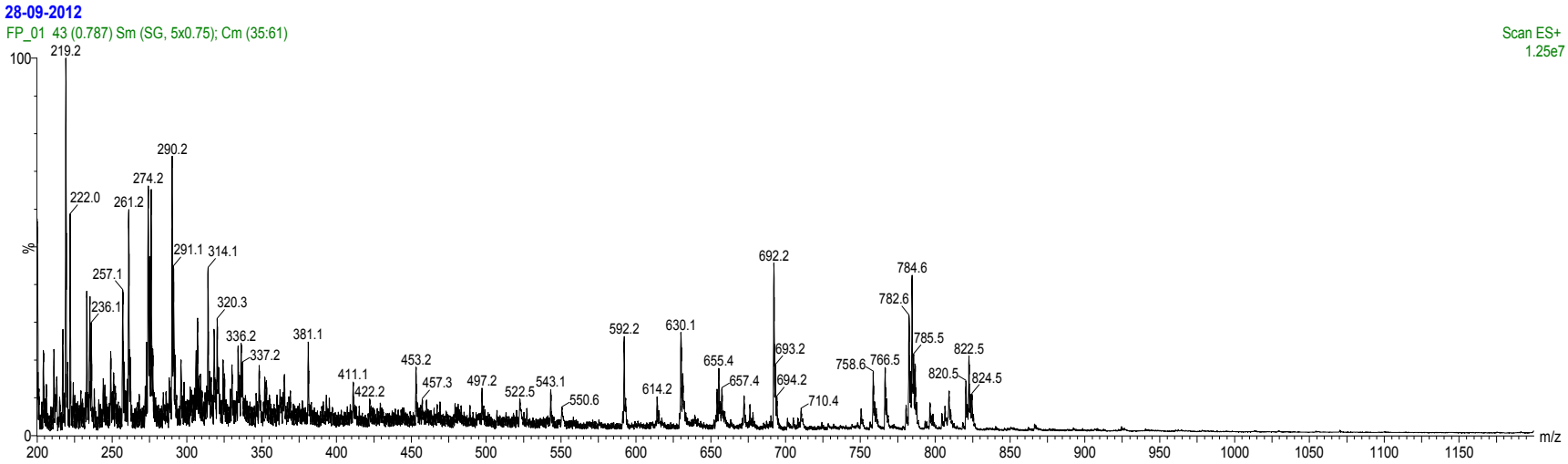


Figura 52. Espectro de ESI-MS do extrato FP correspondente ao micélio do fungo na co-cultura.

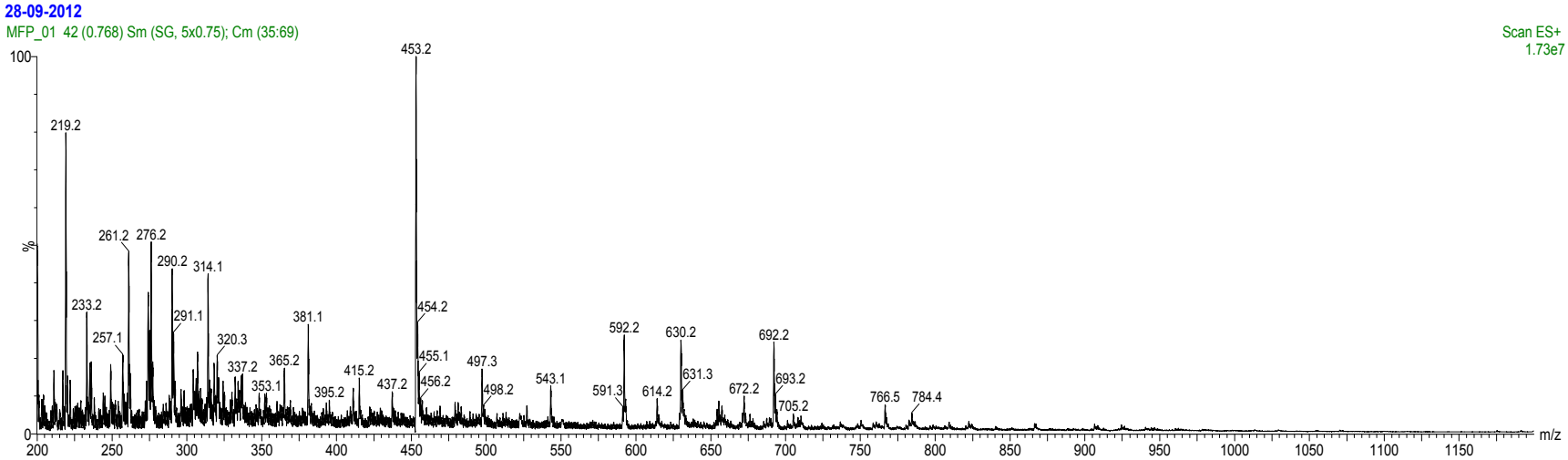


Figura 53. Espectro de ESI-MS do extrato MFP correspondente à margem do fungo na co-cultura.

Vários dos íons foram atribuídos a substâncias produzidas pela actinobactéria *S. albospinus* RLe 7. O íon $[M+H]^+$ *m/z* 276 foi atribuído à fisostigmina ($C_{15}H_{21}N_3O_2$) levando em conta o perfil de fragmentação gerado a partir da CID (Figura 54). Foram observados os fragmentos *m/z* 245, *m/z* 233, *m/z* 219, *m/z* 188, *m/z* 176 e *m/z* 162 o que permitiu eliminar a hipóteses desses íons serem atribuídos a outros metabólitos produzidos pela actinobactéria. Adicionalmente foram feitas análises MS/MS dos íons *m/z* 233 (Figura 55) e *m/z* 219 (Figura 56), confirmando-os como fragmentos da fisostigmina produzidos por dissociação na fonte de ionização. A presença da fisostigmina nos extratos mencionados (Tabela 14) indica que esta substância foi produzida pela actinobactéria e difundiu até o micélio do fungo na cultura mista, provavelmente estando envolvida na inibição do crescimento desse fungo.

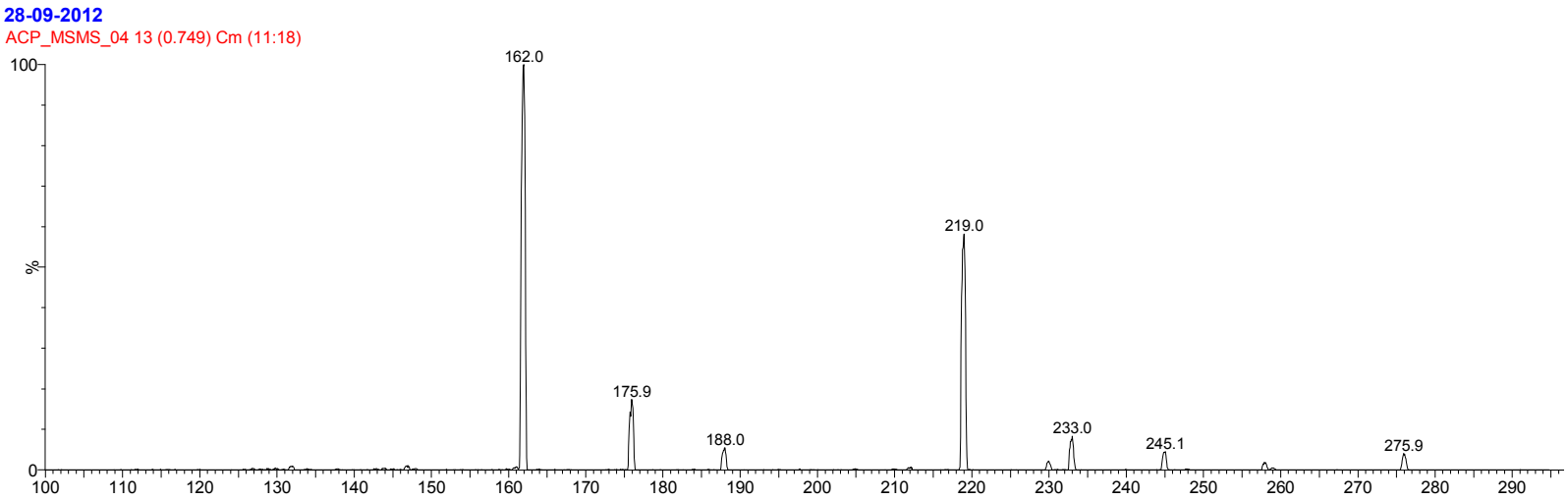


Figura 54. Fragmentação do íon precursor *m/z* 276 por CID. Energia de colisão 15 eV.

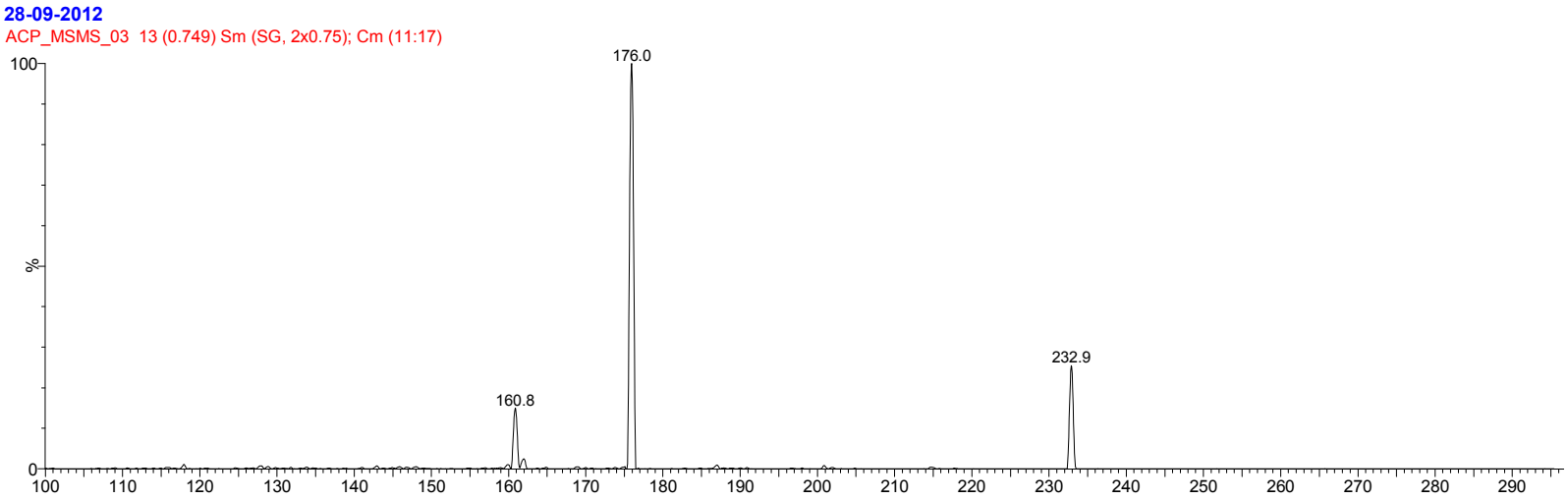


Figura 55. Fragmentação do íon precursor *m/z* 233 por CID. Energia de colisão 15 eV.

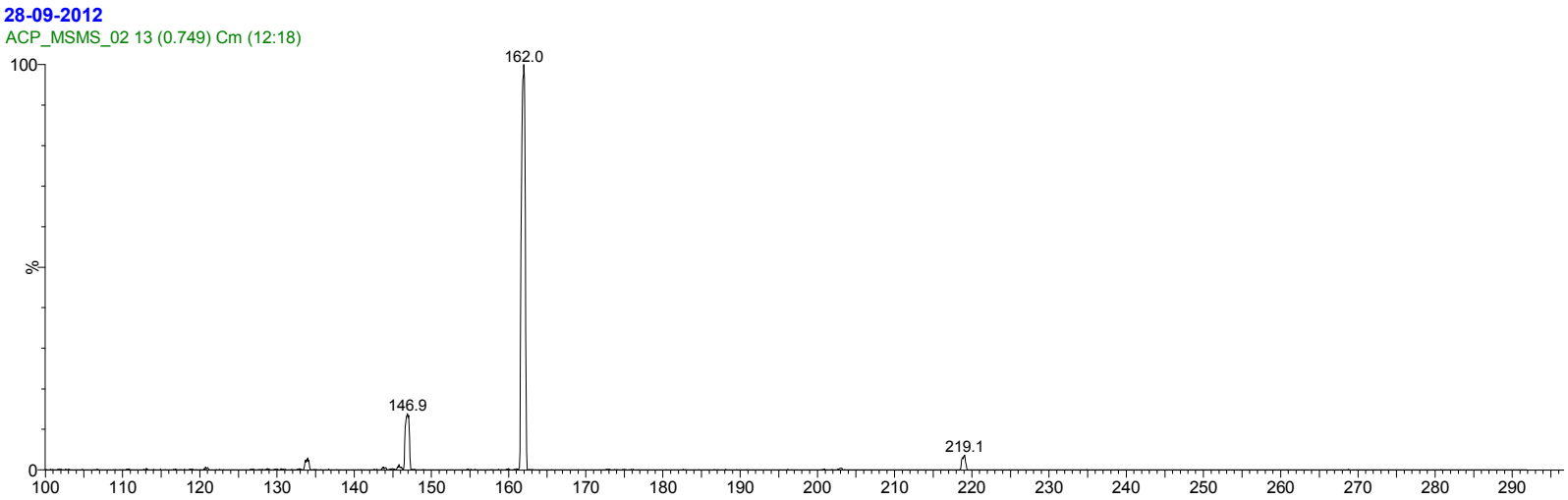


Figura 56. Fragmentação do íon precursor *m/z* 219 por CID. Energia de colisão 15 eV.

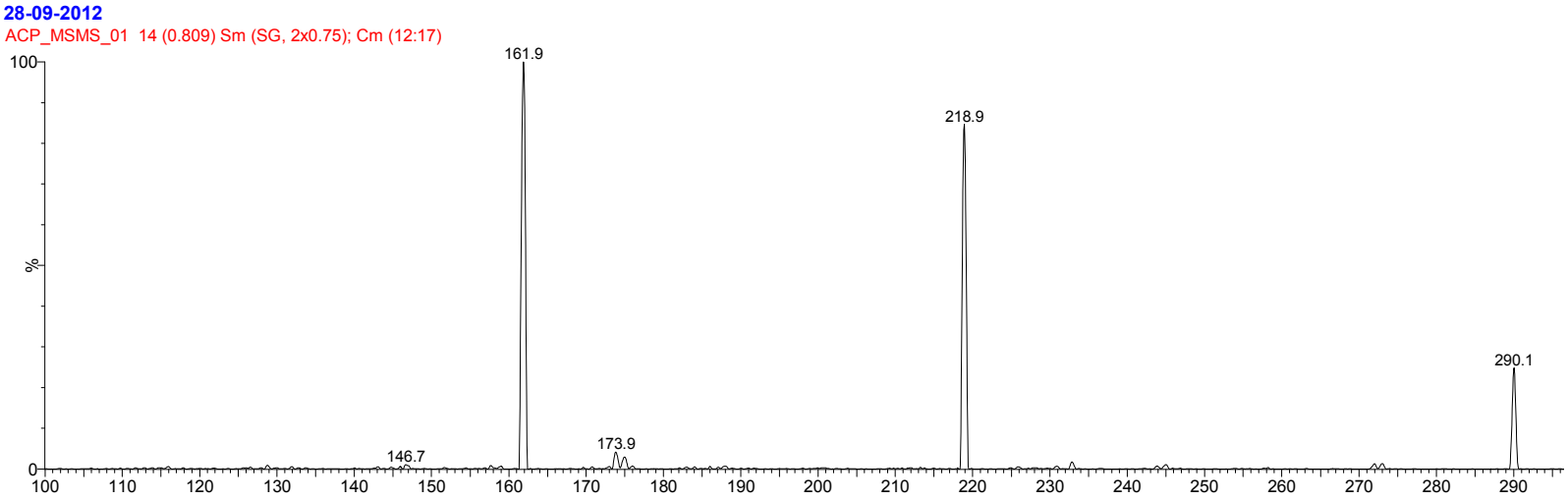


Figura 57. Fragmentação do íon precursor de *m/z* 290 por CID. Energia de colisão 15 eV.

O íon $[M+H]^+$ *m/z* 290 foi detectado nos extratos da actinobactéria controle e na co-cultura. Isto indica que esse metabólito, produzido pela actinobactéria, difunde no meio de cultura até atingir o micélio do fungo. As intensidades deste íon parecem maiores nas regiões de interação com o fungo na co-cultura, sugerindo que esta molécula também poderia estar envolvida na inibição do crescimento do fungo. Provavelmente a presença do fungo estimula a produção dessa molécula. O espectro MS/MS mostra os fragmentos m/z 219 e m/z 162 apresentados também pela fisostigmina, indicando que estas duas substâncias podem ser análogas. A diferença de 14 Da entre os íons *m/z* 276 e *m/z* 290 pode ser devido à presença de um grupo N-etila no carbamato, já que a possível perda neutra de isocianato de etila geraria o mesmo íon fragmento observado na fisostigmina, [M+H - EtNCO] *m/z* 219 (Figura 58). Baseado na informação mencionada, sugere-se a fórmula molecular $C_{16}H_{23}N_3O_2$ para esta molécula, e o íon detectado na análise foi $[M + H]^+$ *m/z* 290. Não existem relatos dessa substância como produto natural, mas devido à importante atividade anticolinesterase da fisostigmina, os efeitos do alongamento da cadeia N-carbâmica mediante síntese orgânica tem sido estudados na busca de alternativas para o tratamento da doença de Alzheimer.[198, 199] O análogo N-etilcarbamato da fisostigmina foi sintetizado, junto com outros derivados, em um trabalho que demonstrou a seletividade dos derivados N-alquilcarbamato da fisostigmina pela enzima butirilcolinesterase.[200] Não há relatos de atividade antifúngica para essa substância, pelo qual não pode ser concluída o efeito biológico na interação com o fungo *C. boninense* FLe 8.1.

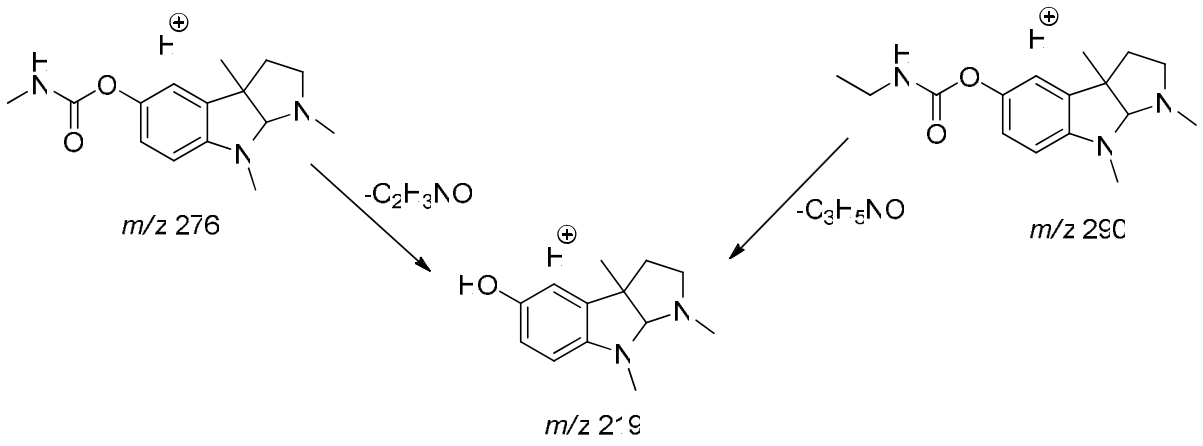


Figura 58. Formação do íon fragmento *m/z* 219 a partir dos íons *m/z* 276 e *m/z* 290

Levando-se em conta a produção da fisostigmina e o análogo descrito, sugeriu-se a presença de mais análogos dessas substâncias. O íon *m/z* 304 foi detectado também nos extratos da actinobactéria controle e na co-cultura. Assumindo o íon de *m/z* 304 como $[M+H]^+$, foi realizada uma busca no DNP[129] sob os critérios de massa exata na faixa entre 303,0-303,5 e restringindo a fonte biológica ao gênero *Streptomyces*, encontrando-se seis estruturas químicas de produtos naturais já isolados, cinco dos quais contêm nitrogênio (Tabela 15). Uma das estruturas sugeridas é o antibiótico TAN 1169A patenteado em 1990,[201] análogo N^1-acetil da fisostigmina. A análise do espectro gerado a partir da CID (Figura 59) indica que não pode ser feita tal atribuição já que o íon *m/z* 304 apresentou um perfil diferente ao da fisostigmina e do análogo descrito, não observando-se perda inicial de 57 Da nem de 71 Da correspondente ao metil e etil carbamato, respectivamente (Figura 54). Busca na base de dados METLIN[100] e no MassBank[101] comparando os fragmentos obtidos por CID não mostrou resultados. Os dados obtidos nesta análise não são suficientes para sugerir a estrutura correspondente ao íon *m/z* 304.

Tabela 15. Resultados da busca em bases de dados do íon *m/z* 304

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata "303,0-303,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{15}H_{17}N_3O_2S$		Colismicina E, CAS 161504-76-3	[202]
DNP	Massa exata "303,0-303,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{19}H_{29}NO_2$		Iromicina A, CAS 213137-53-2	[203]
DNP	Massa exata "303,0-303,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{13}H_{17}N_7O_2$		Kikumicina A, CAS 37913-77-2	[204]
DNP	Massa exata "303,0-303,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{18}H_{13}N_3O_2$		Mansouramicina D, CAS 1199808-47-3	[205]
DNP	Massa exata "303,0-303,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{16}H_{21}N_3O_3$		TAN 1169A, CAS 132663-94-6	[201]
DNP	Massa exata "303,0-303,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{17}H_{25}N_3O_2$		Valindolmicina, CAS 102141-01-5	[206, 207]

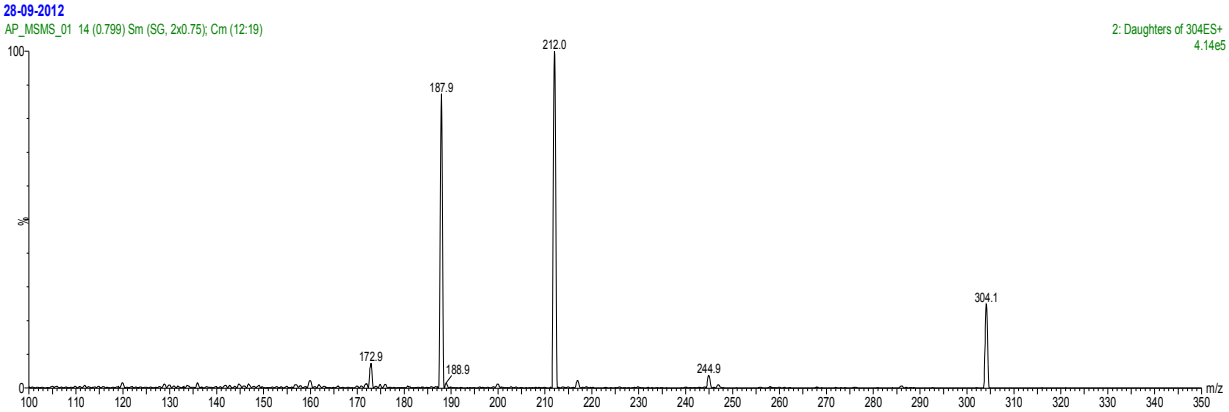


Figura 59. Fragmentação do íon precursor *m/z* 304 por CID. Energia de colisão 25 eV.

Os íons *m/z* 672 e *m/z* 592 apresentam o mesmo padrão de fragmentação por CID. A partir do íon *m/z* 672, devido á perda de 80 Da, o íon *m/z* 592 é gerado. A sequência a partir do íon fragmento *m/z* 456 é idêntica. Isto sugere que os dois compostos correspondem a estruturas análogas produzidas pela actinobactéria tanto na cultura simples como na co-cultura. Vale a pena esclarecer que o íon *m/z* 592 não corresponde ao aduto dimérico da fisostigmina $[2M+H+MeCN]^+$ já que o solvente utilizado nas análises por ESI-MS foi MeOH:H_2O. Busca no DNP[129] com os critérios de massa exata na faixa de 671,0-671,5 e origem biológica "*Streptomyces*" sugeriu seis compostos, todos nitrogenados (Tabela 16). Na literatura disponível sobre os compostos sugeridos na base de dados não existem estudos de MS/MS por CID que permitam comparar com a informação para os íons mencionados. Os compostos pepsidina A[208] e pepstatina BU[209] são derivados peptídicos o que permitiria sugerir possíveis fragmentações nas ligações peptídicas, porém, não há estudos de fragmentação de nenhum destes dois compostos. Busca nas bases de dados METLIN[100] e MassBank[101] por múltiplos íons fragmentos a partir do íon precursor *m/z* 672 não sugeriu nenhuma substância com o mesmo padrão de fragmentação obtido nas análise por ESI-MS.

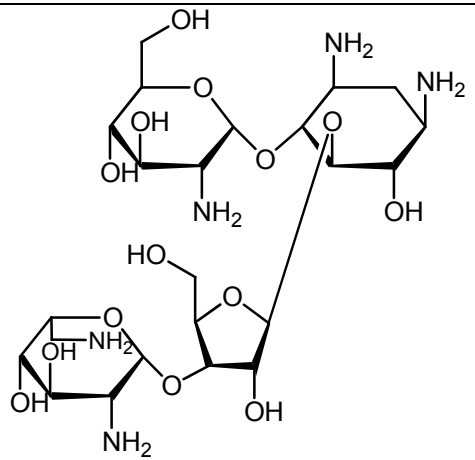
Tabela 16. Resultados da busca em bases de dados do íon *m/z* 672

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata "671,0-671,5 e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{34}H_{41}NO_{13}$		Antibiótico CG17A, CAS 124526-25-6	[210]
DNP	Massa exata "671,0-671,5 e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{38}H_{49}N_5O_6$		Bingcamida B, CAS 1196866-44-0	[211]

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata "671,0-671,5 e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{34}H_{41}NO_{13}$		TAN 1120, CAS 131443-34-0	[212]
DNP	Massa exata "671,0-671,5 e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{39}H_{45}NO_9$		Naftomicina C, CAS 86825-87-8	[213]
DNP	Massa exata "671,0-671,5 e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{33}H_{61}N_5O_9$		Pepsidina A, CAS 51724-57-3	[208], Patente[214]
DNP	Massa exata "671,0-671,5 e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{33}H_{61}N_5O_9$		Pepstatina BU, CAS 50655-18-0	[209]

Ao realizar a busca no DNP[129] por possíveis compostos atribuíveis ao íon de *m/z* 592 (Tabela 17) foi sugerido o antibiótico C 8030B o qual foi produzido por *S. pseudogriseolus* junto com outros derivados, incluindo entre eles a fisostigmina[215]. Segundo essa publicação que originou uma patente[216], os compostos isolados apresentaram atividade antibacteriana e inseticida. Não se encontrou informação adicional com relação à estrutura química do composto C 8030B além dele ser um antibiótico nucleosídico similar à adenomicina. Adicionalmente, a busca por íons fragmentos na base de dados MassBank[101] sugeriu a paromomicina, composto cujo espectro de MS/MS por ESI-MS a 20 eV apresentou dois sinais coincidentes com aqueles observados para o íon de *m/z* 592, os íons fragmento de *m/z* 455 e de *m/z* 162. Nenhum dos íons de *m/z* 671 e de *m/z* 592 podem ser atribuídos à paromomicina, já que devido à sua massa, se esperaria o íon de *m/z* 616 correspondente a $[M+H]^+$.

Tabela 17. Possíveis candidatos para o íon de *m/z* 592

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
MassBank	íons fragmento: *m/z* 456; *m/z* 162 íon precursor: *m/z* 592	$C_{23}H_{45}N_5O_{14}$		Paromomicina, CAS 7542-37-2	[217]
DNP	Massa exata "591-592" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{22}H_{33}N_5O_{14}$	Estrutura não reportada	Antibiótico C 8030B, CAS 71427-14-0	[215], Patente [216]

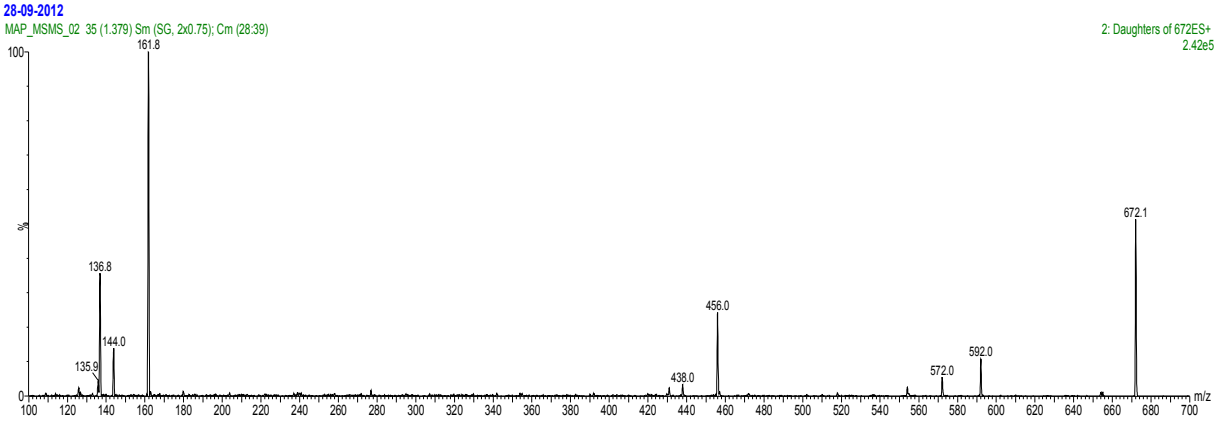


Figura 60. Fragmentação do íon precursor de *m/z* 672 por CID. Energia de colisão 25 eV.

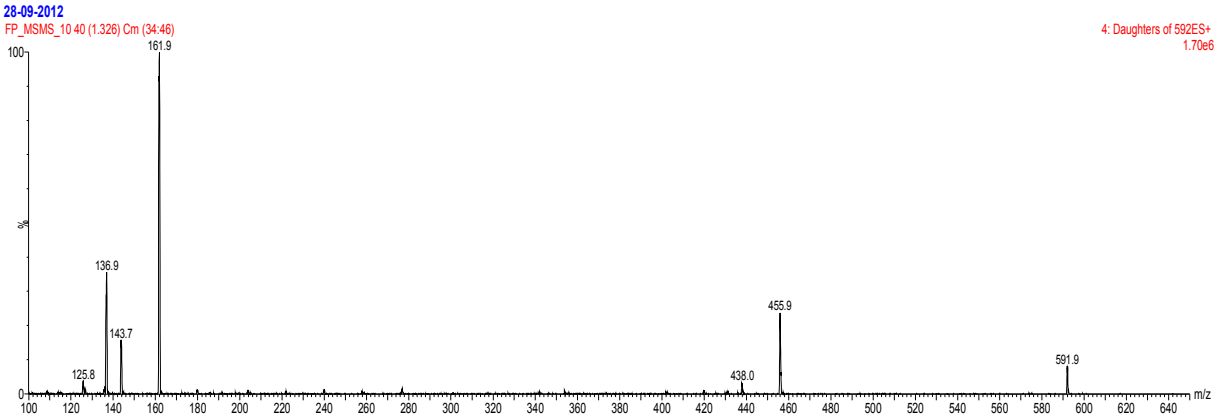


Figura 61. Espectro de fragmentação do íon precursor de *m/z* 592 por CID. Energia de colisão 20 eV.

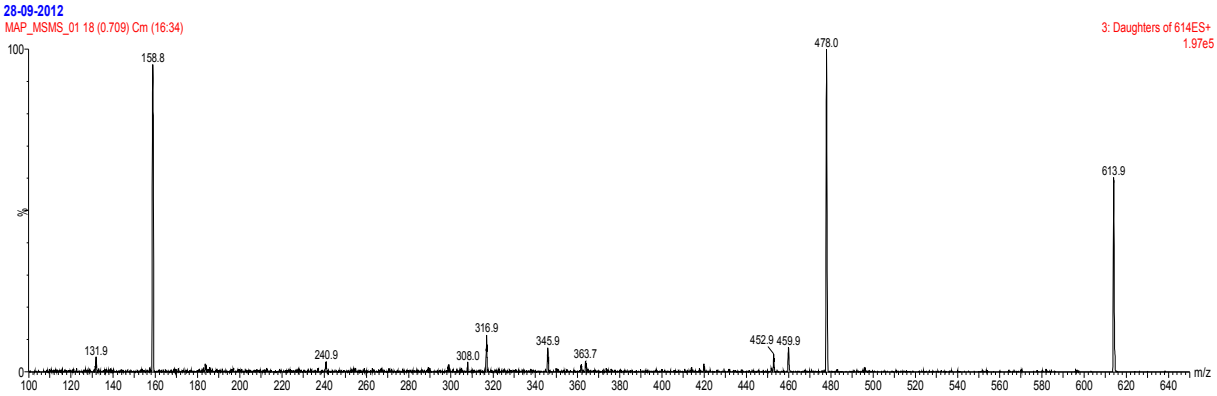


Figura 62. Espectro de fragmentação do íon precursor de *m/z* 614 por CID. Energia de colisão 25 eV.

Continuando as análises e segundo a sugestão da paromomicina, foi detectado o íon de *m/z* 614, sinal com baixa intensidade, sendo produzido pela actinobactéria. Esse íon foi submetido também a CID (Figura 62) apresentando dois íons fragmento com elevada intensidade, porem, eles não coincidiram com os fragmentos mencionados para a paromomicina. Buscas nas bases de dados METLIN[100] e MassBank[101] não sugeriram nenhuma estrutura, em quanto a busca no DNP[129] (Tabela 18) sugeriu, entre seis compostos, o sideróforo ferrioxamina B. Assim como foi descrita anteriormente nas culturas em meio arroz parbolizado a presença da desferrioxamina E, não se descartou a presença da ferrioxamina B já que nenhum dos íons correspondentes à desferrioxamina E (*m*/z 601, *m/z* 623 e *m/z* 639) foi detectado na cultura em meio ISP-2 ágar. Além disso, a produção dos sideróforos é conhecida e há vários relatos de isolamento,[141, 218, 219] assim como de estudo da sua função biológica na interação com outros micro-organismos.[157, 220, 221] Não existe informação disponível sobre a fragmentação por ESI-MS de nenhuma das restantes cinco estruturas sugeridas, impossibilitando a correta atribuição do íon de *m/z* 614.

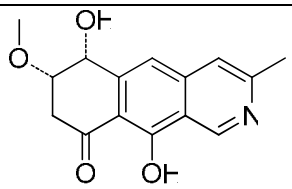
Tabela 18. Possíveis candidatos para o íon de *m/z* 614

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata "612.9-613.9" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{25}H_{45}FeN_6O_8$		Ferrioxamina B, CAS 14836-73-8	[222], Patentes[223, 224]
DNP	Massa exata "612.9-613.9" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{31}H_{51}NO_{11}$		Desmicarosil-platenomicina, CAS 52044-89-0	[225]
DNP	Massa exata "612.9-613.9" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{30}H_{48}NO_{10}P$		Fosfazomicina C_2	[226]

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata “612.9-613.9” e origem biológica “*Streptomyces*”	$C_{30}H_{48}NO_{10}P$		Fosfazomicina C_1, CAS 122856-27-3	[226]
DNP	Massa exata “612.9-613.9” e origem biológica “*Streptomyces*”	$C_{34}H_{47}NO_9$		Oleficina, CAS 12764-54-4	[227]
DNP	Massa exata “612.9-613.9” e origem biológica “*Streptomyces*”	$C_{31}H_{35}NO_{12}$		1-hidroxisulfurmicina T	[228]

Alguns dos sinais detectados foram atribuídos a metabólitos produzidos pelo fungo *C. boninense* FLe 8.1. O perfil de fragmentação do íon de *m/z* 274 por CID (Figura 63) foi diferente daqueles descritos para a actinobactéria, mostrando um primeiro fragmento *m/z* 256, provavelmente correspondente a $[M+H-H_2O]^+$, o que levou à hipótese que tratava-se de uma substância contendo um grupo hidroxila que sofreu facilmente desidratação nas condições da análise. Buscas nas bases de dados METLIN[100] e MassBank[101] não sugeriram nenhuma estrutura utilizando como parâmetros tanto o íon de *m/z* 274 quanto o padrão de fragmentação por CID. A busca no DNP[129] sugeriu o pirenolina A, derivado isoquinolínico apresentando um grupo hidroxila e um metoxila, e cuja estrutura daria lugar a uma perda de água. Não há estudos de fragmentação da pirenolina A que permitam sugerir uma perda de 44 Da gerando o íon fragmento *m/z* 212. Com a informação disponível não é possível atribuir o íon *m/z* 274 à pirenolina A. Estudos de fragmentação são necessários a fim de formular mecanismos de fragmentação característicos pelo menos por classe de compostos, apesar de que os caminhos reais de dissociação podem ser atípicos como mostrado em outros derivados isoquinolínicos, por exemplo nas isoquinolin-3-carboxamidas.[229]

Tabela 19. Resultados da busca em bases de dados do íon *m/z* 274

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata "273.0-273.5" e origem biológica "fungus"	$C_{15}H_{15}NO_4$		Pirenolina A, CAS 129134-97-0	[230]

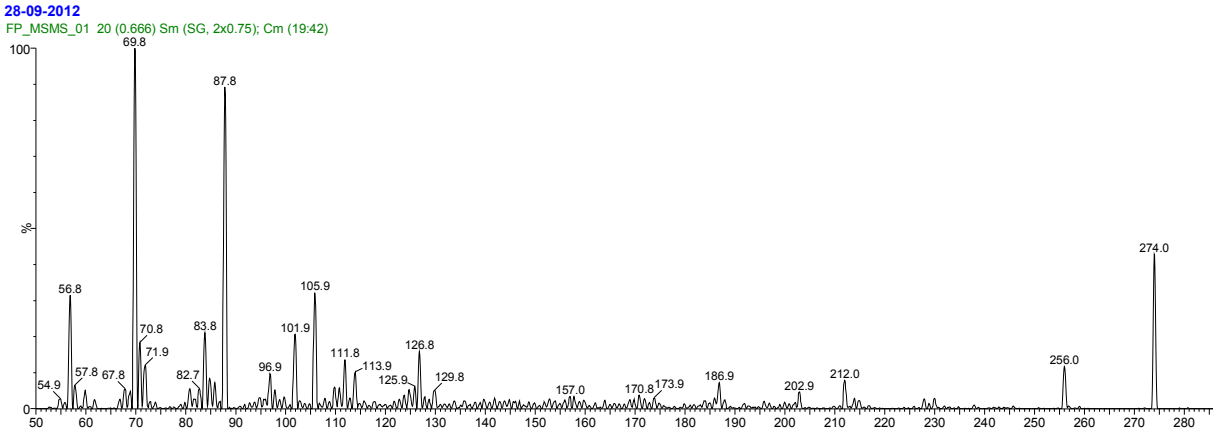


Figura 63. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 274 por CID a 25 eV.

O íon *m/z* 257 apresentou uma perda de 117 Da na CID (Figura 64) gerando o íon fragmento de *m/z* 140 sugerindo uma estrutura rígida que não dissocia facilmente. Nenhum dos espectros de MS/MS dos compostos sugeridas pela busca na base de dados METLIN[100] apresentou fragmentação que originasse o íon de *m/z* 140. A busca no DNP[129] (Tabela 20) sugeriu cinco compostos, dos quais não foram encontradas informações sobre fragmentação para nenhuma delas nas bases de dados METLIN[100] e MassBank.[101] Não foi observado nenhum sinal coincidente ao padrão isotópico do cloro, o qual estaria em *m/z* 259 com um terço da intensidade do sinal em *m/z* 257, razão pela qual a substância conhecida como avicenina A pode ser descartada dentre os possíveis candidatos atribuíveis ao sinal em *m/z* 257. Com relação à equinotinctona, a única informação disponível de MS refere-se ao espectro obtido por HR-EI-MS, gerando dois fragmentos em *m/z* 227 e *m/z* 211,[231] os quais não necessariamente seriam gerados a partir da fragmentação por ESI deste derivado xantônico. Do composto lambertelina,[232] já obtido por síntese,[233] também não há estudos de fragmentação que permitam prever analogia estrutural. Com a informação disponível não foi atribuída nenhuma dessas estruturas ao íon de *m/z* 257.

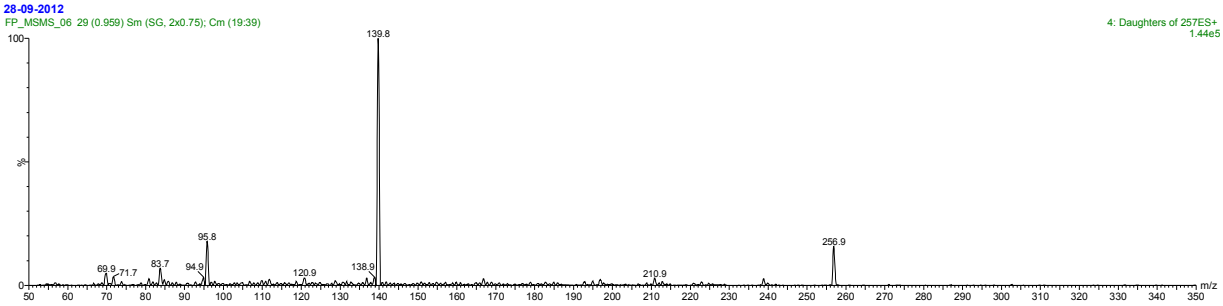
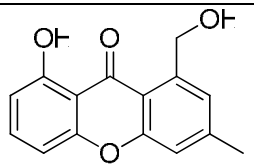
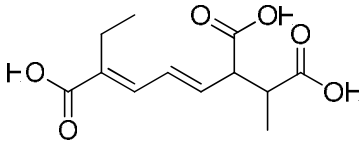
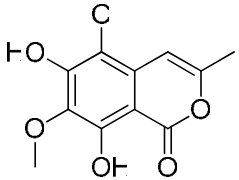
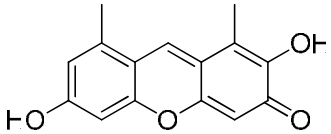
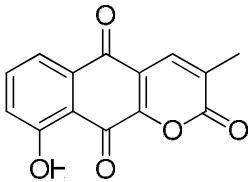


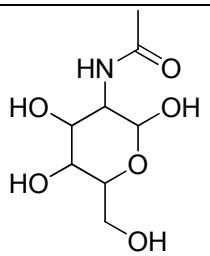
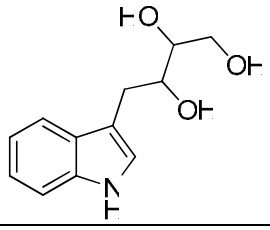
Figura 64. Espectro de fragmentação do íon precursor de *m/z* 257 por CID a 20 eV

Tabela 20. Possíveis candidatos para o íon de *m/z* 257.

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata “255.9-256.5” e origem biológica “fungus”	$C_{15}H_{12}O_4$		8-Hidroxi-1-hidroximetil-3-metilxantona, CAS 60883-98-9	[234]
DNP	Massa exata “255.9-256.5” e origem biológica “fungus”	$C_{12}H_{16}O_6$		Ácido telfaírico, CAS 181213-66-1	[235]
DNP	Massa exata “255.9-256.5” e origem biológica “fungus”	$C_{11}H_9ClO_5$		Avicenina A	[236]
DNP	Massa exata “255.9-256.5” e origem biológica “fungi”	$C_{15}H_{12}O_4$		Equinotinctona, CAS 176181-82-1	[231]
DNP	Massa exata “255.9-256.5” e origem biológica “fungi”	$C_{14}H_8O_5$		Lambertelina, CAS 28980-51-0	[232]

O íon de *m/z* 222 também apresentou perda de 18 Da, provavelmente correspondente a H_2O, na CID gerando o íon fragmento 204 sugerindo uma possível desidratação devido à presença de um grupo álcool na estrutura. Busca no DNP[129] sugeriu apenas uma possível estrutura, 3-(2,3,4-trihidroxibutil)indol. Porter e colaboradores,[237] além de apresentar os dados sobre a estrutura sugerida, também sugeriram um sinergismo entre os três alcaloides indólicos identificados e isolados do fungo *Balansia epichloe*. O estudo da fragmentação e o mecanismo proposto da dissociação foi realizada por EI,[237] dados que não permitem uma comparação válida com a fragmentação obtida por CID para o íon *m/z* 222. A busca na base de dados de MassBank[101] pelos sinais observados no espectro de fragmentação do íon mencionado (Figura 65) junto com as intensidades relativas sugeriu 20 possíveis compostos nenhum dos quais foi coincidente com a massa (~221 Da) nem com o padrão de fragmentação, ou seja, apenas poucos sinais foram coincidentes (máximo 5) em intensidades não coerentes quando comparadas com as observadas na Figura 65. Busca por METLIN[100] só sugeriu dois compostos apresentando unicamente um dos íons fragmento, dos quais só um foi coincidente com uma massa de 221 Da, mas a fragmentação por CID com várias energias, até 40 eV, mostrou um espectro de fragmentação não coincidente com o obtido para o íon de *m/z* 222 da Figura 65. A partir da informação aqui analisada, não foi possível atribuir o íon de *m/z* 222 a nenhum dos dois possíveis candidatos (Tabela 21) sugeridos pelas buscas nas bases de dados.

Tabela 21. Possíveis candidatos para o íon *m/z* 222

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
METLIN	Íons fragmento: 222, 204, 176, 163, 130, 91, 86, 84, 71, 57.	$C_8H_{15}NO_6$		N-acetil-β-D-manosa, CAS 7772-94-3	[238]
DNP	Massa exata "220.9-221.9" e origen biológica "fungus"	$C_{12}H_{15}NO_3$		3-(2,3,4-trihidroxibutil)indol, CAS 61183-25-3	[237]

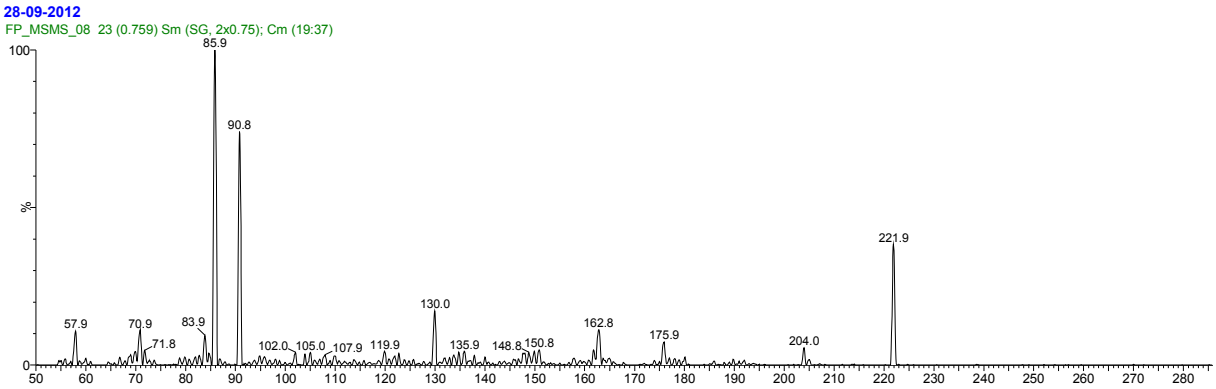


Figura 65. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 222 por CID. Energia de colisão 20 eV.

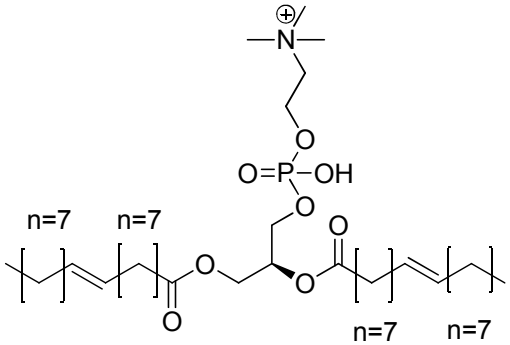
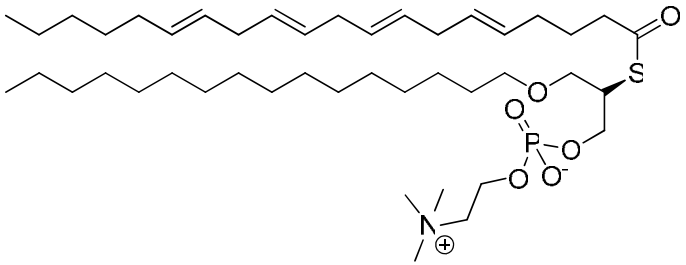
Na faixa de massa de *m/z* 780-825 nos extratos provenientes do micélio do fungo controle se observaram sinais correspondentes a três compostos. Os sinais observados em *m/z* 824, *m/z* 822 e *m/z* 820 correspondem provavelmente aos íons $[M+K]^+$, enquanto os sinais em *m/z* 786, *m/z* 784 e *m/z* 782 correspondem aos íons $[M+H]^+$, respectivamente, já que as diferenças entre 824 e 786, 822 e 784, assim como 820 e 782, foram de 38 Da, sendo a mesma diferença de massa que existe entre H^+ e K^+. Esta informação também sugeriu que os compostos correspondem a uma série de análogos com diferenças apenas no número de insaturações, o que explicaria a diferença de massa de 2 Da.

Os íons de *m/z* 782 (Figura 67), *m/z* 784 (Figura 68) e *m/z* 786 (Figura 69) apresentaram o mesmo padrão de fragmentação, todos eles gerando o íon *m/z* 184 por CID. Adicionalmente, o íon em *m/z* 758 (Figura 66) também apresentou esse mesmo padrão de fragmentação. Buscas por dados de MS/MS e por faixa de massa entre "781-785" na base de dados METLIN[100] (Tabela 22) sugeriu sete possíveis estruturas, entre as quais os compostos 1,2 doleoil fosfatidilcolina e araquidonoil tiofosfatidilcolina poderiam ser candidatos para os íons de *m/z* 786 e de *m/z* 784, respectivamente. Segundo os espectros de MS/MS disponíveis nessa base de dados, pode-se observar o sinal de *m/z* 184 como único fragmento a várias energias de colisão (10, 20 e 40 eV) para esses dois compostos. Partindo dessa informação, a busca no DNP[129] por derivados de fosfatidilcolina também sugeriu outros derivados de fosfatidilcolina de fórmula estrutural $C_{42}H_{80}NO_8P$, compostos que poderiam corresponder ao sinal em *m/z* 758, assim como compostos de fórmula molecular $C_{44}H_{80}NO_8P$, que poderiam corresponder ao sinal em *m/z* 782, e cuja fragmentação por CID também originaria o íon de *m/z* 184 correspondente à espécie fosfocolina $[C_5H_{15}NO_4P]^+$. A formação do íon fragmento de *m/z* 184 é coerente com

o reportado na literatura envolvendo estudos de fragmentação de fosfolipídeos.[239] A função biológica dos lipídeos nos micro-organismos tem sido objeto de estudo, demonstrando, por exemplo, que os lipídeos da superfície em plantas atuam como moléculas de sinalização na interação planta-fungo induzindo a fase patogênica no desenvolvimento de fungos como *Colletotrichum* sp.[240] Apesar dos derivados de fosfatidilcolina não terem sido descritos especificamente para *C. boninense,* todos os segundos mensageiros lipídicos são formados a partir dos principais precursores de membrana, fosfatidilcolina e esfingomielina.[241]

Por outro lado, na busca no DNP[129] sob os critérios de massa exata entre "781 – 785" e origem biológica "fungi" (Tabela 22) foi sugerida somente o composto de fórmula molecular $C_{45}H_{57}N_3O_9$ correspondente à beauvericina (Tabela 22), composto bioativo isolado pela primeira vez de *Beauveria bassiana.*[242] A beauvericina forma complexos com metais alcalinos,[243, 244] sendo um ionóforo específico para potássio,[245, 246] sugerindo a possibilidade de que os íons de *m/z* 820, *m/z* 822 e *m/z* 824 pudessem corresponder à espécie $[M+K]^+$. Devido a que esse depsipeptídeo está formado por três moléculas de N-metil-fenilalanina ($C_{10}H_{11}NO_2$) e três moléculas de ácido 2-hidroxi-isovalérico (C_5H_8O), teoricamente, ao fragmentar a beauvericina seriam observados sinais em *m/z* 177, correspondente ao resíduo de metil fenilalanina, ou em *m/z* 84, correspondente ao resíduo do ácido 2-hidroxi-isovalérico, os quais não coincidiram com o sinal observado em *m/z* 184 nem com o observado em *m/z* 163, descartando a beauvericina como candidato provável dos íons mencionados.

Tabela 22. Possíveis candidatos dos íons *m/z* 782, *m/z* 784, *m/z* 786, *m/z* 820, *m/z* 822 e *m/z* 824.

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
METLIN	Massa exata “781-786” e dados MS/MS	$C_{44}H_{84}NO_8P$		1,2 Dioleoil fosfatidilcolina, CAS 56648-95-4	
METLIN	Massa exata “781-786” e dados MS/MS	$C_{44}H_{82}NO_6PS$		Araquidonoil tio-fosfatidilcolina, CAS 146797-82-2	

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata “819-824” e origem biológica “fungi”	$C_{35}H_{53}FeN_6O_{13}$		Coprogen, CAS 31418-71-0	[247]
DNP	Massa exata “781-785” e origem biológica “fungi”	$C_{45}H_{57}N_3O_9$		Beauvericina, CAS 26048-05-5	[242]

Como mencionado anteriormente, os íons em *m/z* 820 (Figura 70), *m/z* 822 (Figura 71) e *m/z* 824 (Figura 72) apresentaram o mesmo perfil de fragmentação por CID gerando também o íon comum de *m/z* 163, apesar de ter menor abundância quando o íon *m/z* 824 foi dissociado. Busca no DNP[129] (Tabela 22) sugeriu apenas o sideróforo coprogen.[247] Segundo o estudo de fragmentação do coprogen,[248] esse composto possui um grupo quelante com alta afinidade por íons metálicos formando elevadas quantidades de adutos iônicos com sódio $[M+Na]^+$ o que levaria a observar o íon de *m/z* 844, o qual não foi observado nos espectros do micélio do fungo controle (Figura 45) nem no espectro do micélio de fungo na co-cultura (Figura 52). No mesmo estudo de MS sequencial do coprogen[248] conclui-se que os sideróforos livres de ferro dissociam mais efetivamente quando comparados com os complexados com Fe(III) como o coprogen. Além disso, os autores mencionaram que nas análises do coprogen por ESI-MS no modo positivo foram observados sinais correspondentes aos adutos com sódio $[M+Na]^+$ dificultando os estudos de fragmentação, os quais finalmente foram realizados por ESI no modo negativo. Segundo a informação mencionada, é pouco provável que os íons de *m/z* 820, *m/z* 822 e *m/z* 824 correspondam ao coprogen. Devido ao fato de não existirem estudos relacionados com obtenção de metabólitos secundários de *C. boninense*, a informação obtida por MS não foi suficiente para uma completa caracterização estrutural, porém é valiosa para estudos posteriores envolvendo metabolismo secundário desse micro-organismo.

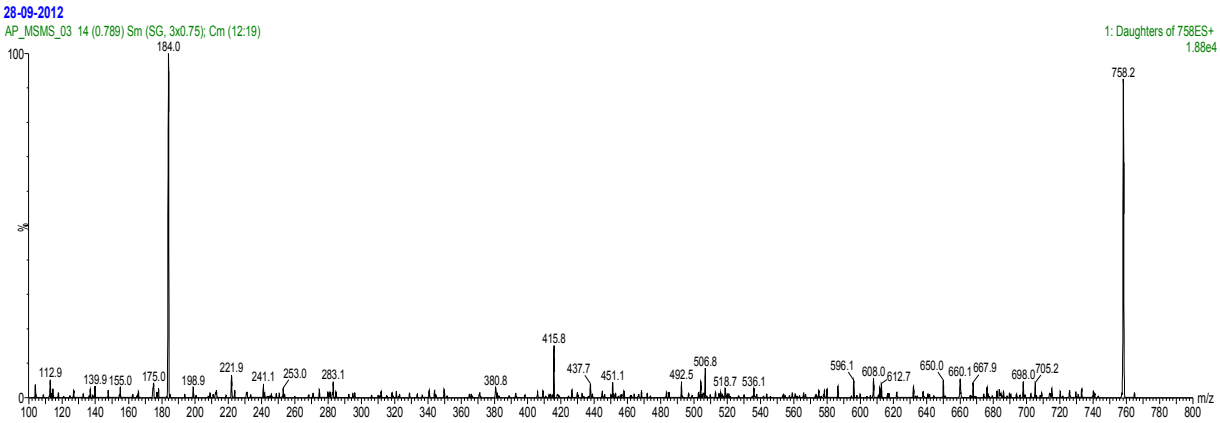


Figura 66. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 758 por CID. Energia de colisão 20 eV.

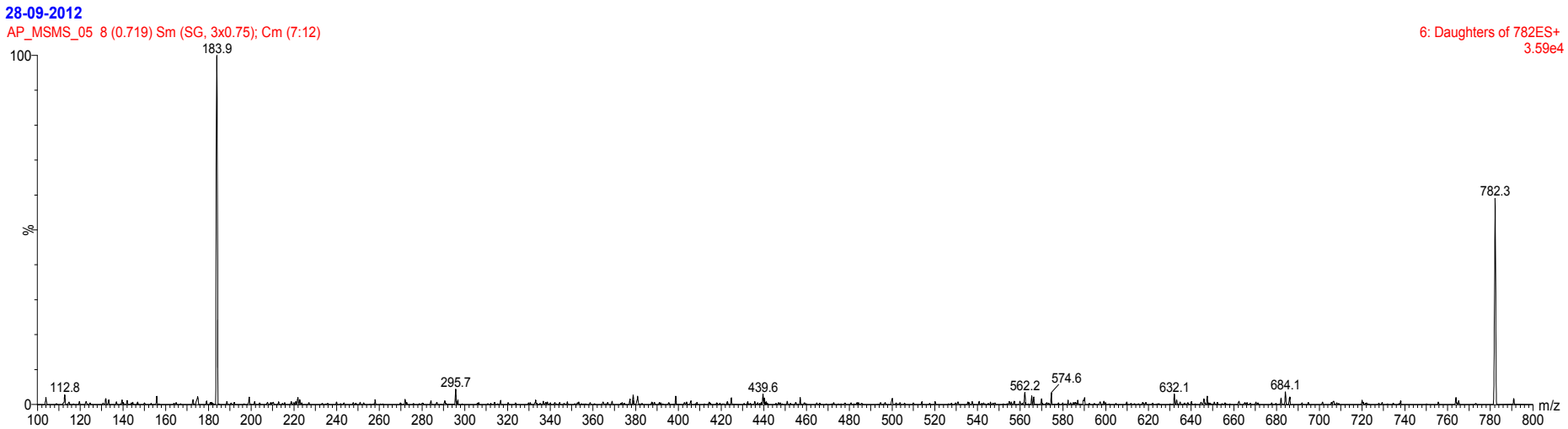


Figura 67. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 782 por CID. Energia de colisão 20 eV.

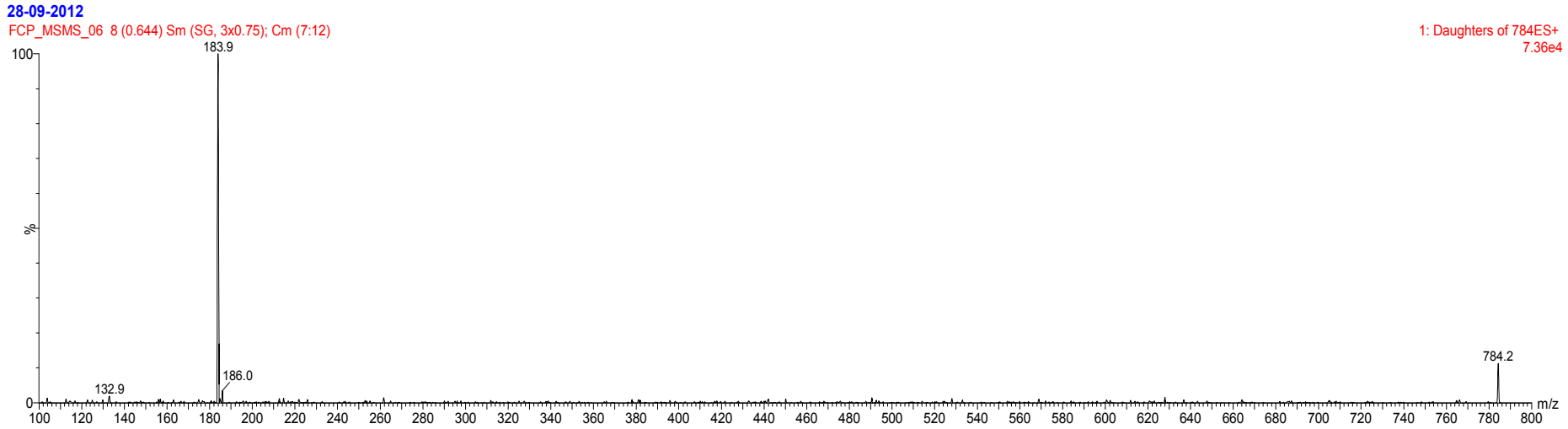


Figura 68. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 784 por CID. Energia de colisão 25 eV.

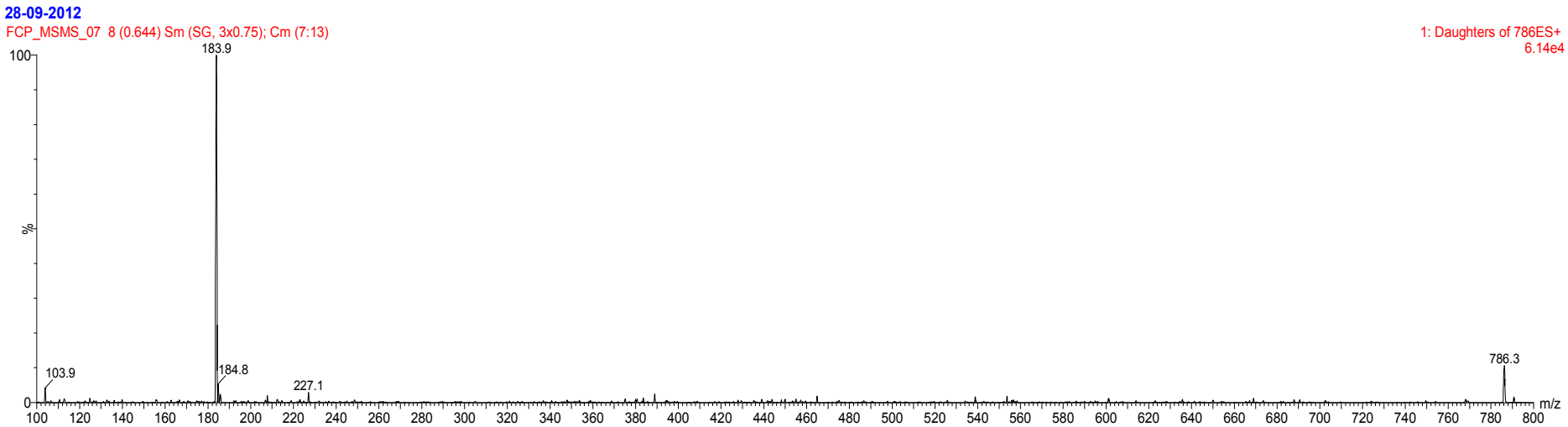


Figura 69. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 786 por CID. Energia de colisão 25 eV.

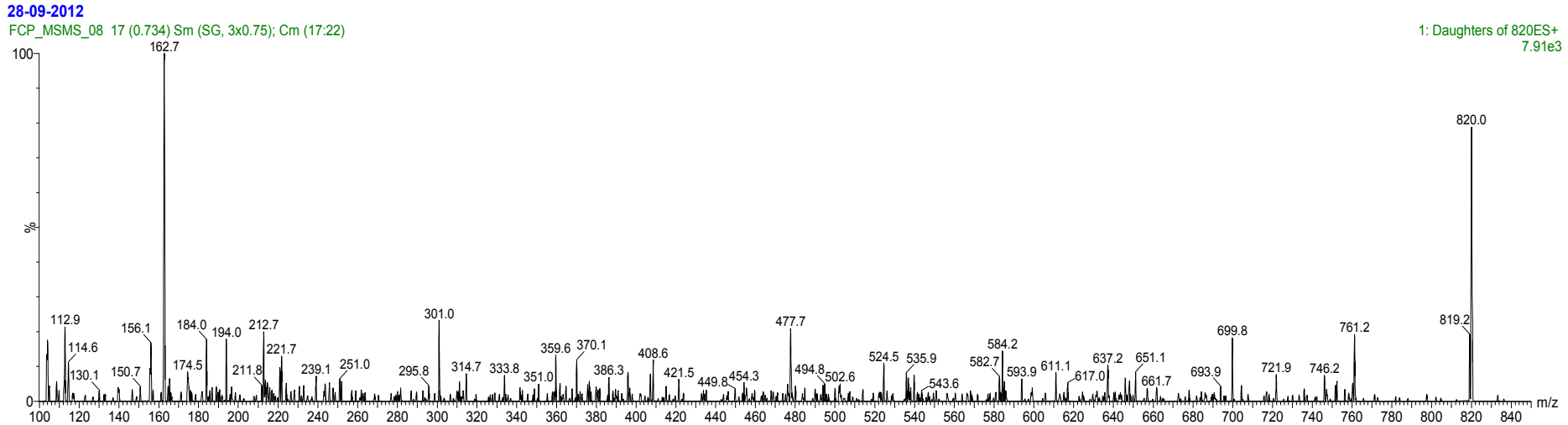


Figura 70. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 820 por CID. Energia de colisão 30 eV.

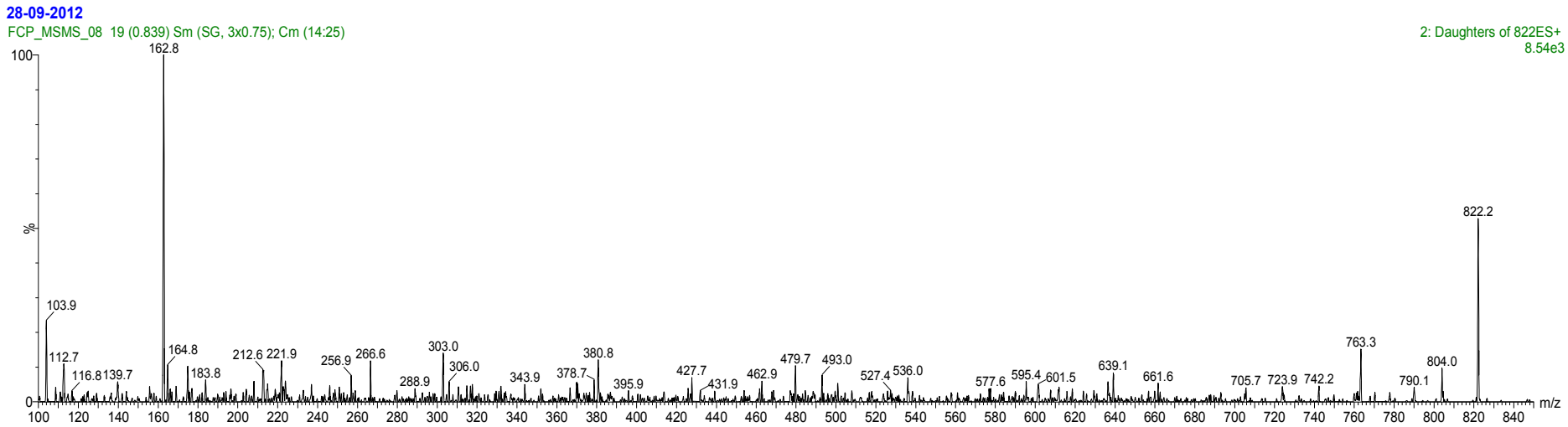


Figura 71. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 822 por CID. Energia de colisão 30 eV.

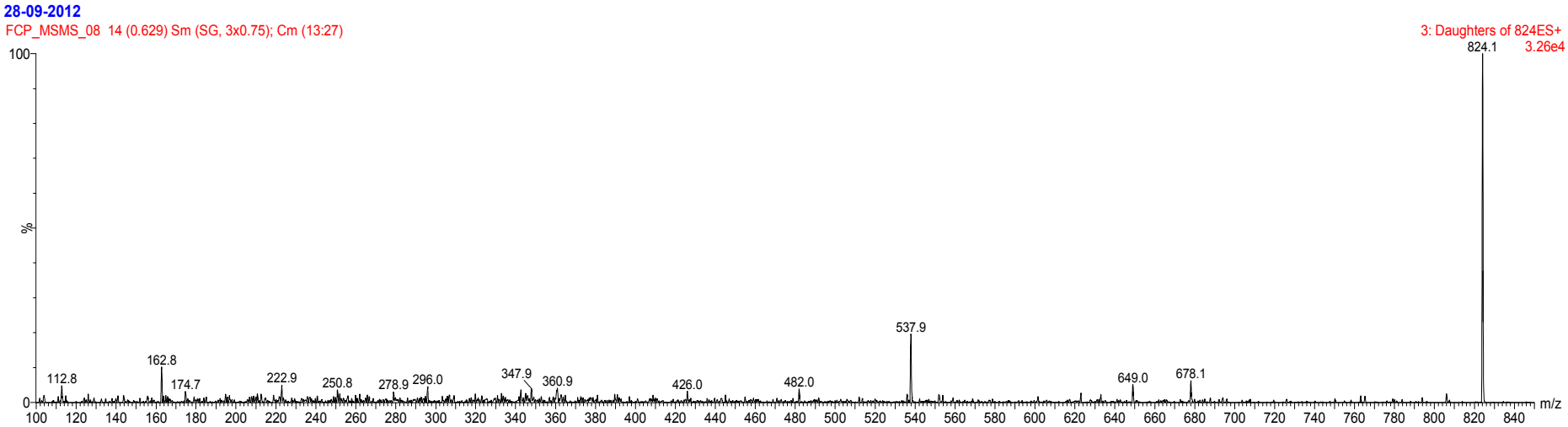
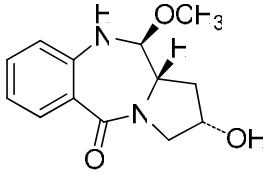
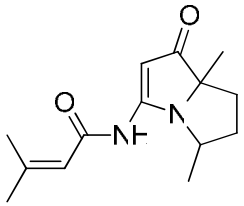
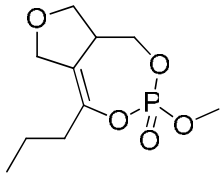
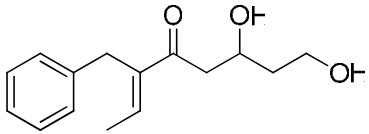
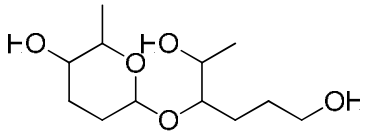
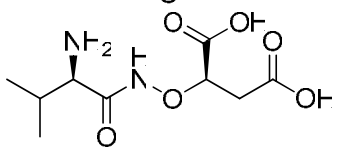


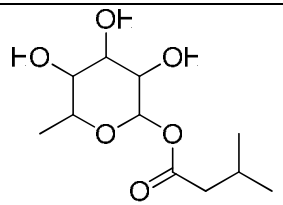
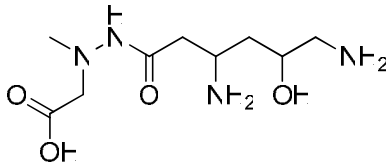
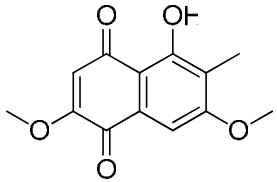
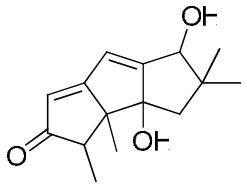
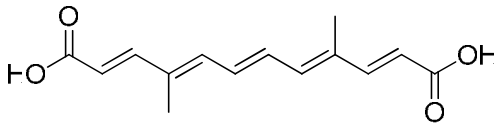
Figura 72. Espectro de fragmentação do íon precursor *m/z* 824 por CID. Energia de colisão 30 eV.

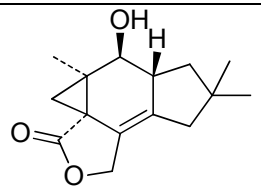
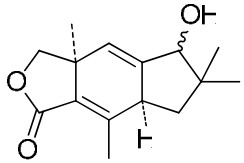
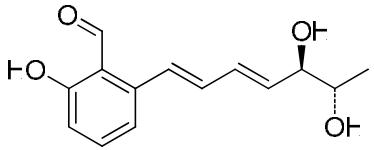
Um único íon, *m/z* 249, presente nos extratos da co-cultura não foi detectado em nenhum dos controles sugerindo-o como um produto da indução resultado da interação microbiana. O perfil de fragmentação por CID (Figura 73) foi diferente dos anteriormente descritos para os metabólitos da actinobactéria e do fungo, mostrando uma primeira perda de 45 Da, e uma segunda de 28 Da, gerando os íons fragmento de *m/z* 204 e de 176, respectivamente. Nenhuma outra informação pode ser obtida para uma correta caracterização estrutural. Além disso, baseado na informação obtida por MS não foi possível atribuir a produção dessa substância a qualquer um dos dois micro-organismos. Busca no DNP[129] variando a origem biológica sugeriu 10 possíveis candidatos para o gênero *Streptomyces* e cinco para fungos.

Segundo os dados publicados por Bitzer e colaboradores,[249] o composto isovaleril 6-desoxi-α-L-talopiranosido foi detectado por ESI-MS como o íon de *m/z* 271 correspondente à espécie $[M+Na]^+$, cujo sinal não foi observado no espectro da Figura 73. O composto piriculariol,[250] metabólito de origem fúngica com atividade fitotóxica, apresenta uma estrutura molecular susceptível a perda de 45 Da devido á quebra do fragmento hidroximetil terminal da cadeia alifática, assim como também pode ocorrer a perda de 28 Da como CO correspondente ao aldeído presente no anel aromático. Não existem estudos de fragmentação desse composto que permitam realizar uma comparação e atribuir tal estrutura ao íon de *m/z* 249, porém o piriculariol é o candidato mais provável a ser atribuído dentre os resultados sugeridos pelas bases de dados.

Tabela 23. Possíveis candidatos para o íon de *m/z* 249.

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata "247,8-248,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{13}H_{16}N_2O_3$		Antibiótico SA4-3, CAS 108073-64-9	[251]
DNP	Massa exata "247,8-248,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{14}H_{20}N_2O_2$		Antibiótico NP 25302	[252]
DNP	Massa exata "247,8-248,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{10}H_{17}O_5P$		CGA 134735	[253]
DNP	Massa exata "247,8-248,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{15}H_{20}O_3$		2-etiliden-5,7-di-hidroxi-1-fenil-3-heptanona	[254]
DNP	Massa exata "247,8-248,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{12}H_{24}O_5$		Narbosine D, CAS 133578-70-8	[255]
DNP	Massa exata "247,8-248,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_9H_{16}N_2O_6$		Malioxamicina, CAS 73020-27-6	[256]

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata "247,8-248,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{11}H_{20}O_6$		Isovaleril 6-desoxi-α-L-talopiranosido	[249]
DNP	Massa exata "247,8-248,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_8H_{12}N_2O_7$	Estrutura não reportada	Morimicina, CAS 102149-28-0	Patente[257]
DNP	Massa exata "247,8-248,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_9H_{20}N_4O_4$		L-*threo* Negamicina	[258]
DNP	Massa exata "247,8-248,5" e origem biológica "*Streptomyces*"	$C_{13}H_{12}O_5$		Misakimicina, CAS 91776-49-7	[259]
DNP	Massa exata "247,8-248,5" e origem biológica "fungus"	$C_{15}H_{20}O_3$		Hirsutanol C, CAS 210897-92-0	[260]
DNP	Massa exata "247,8-248,5" e origem biológica "fungus"	$C_{14}H_{16}O_4$		Micorradicina, CAS 160162-46-9	[261]

Base de dados	Parâmetros de busca	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Nome ou código	Referência
DNP	Massa exata “247,8-248,5” e origem biológica “fungus”	$C_{15}H_{20}O_3$		Merulactona	262
DNP	Massa exata “247,8-248,5” e origem biológica “fungus”	$C_{15}H_{20}O_3$		Nidulol, CAS 81784-05-6	263
DNP	Massa exata “247,8-248,5” e origem biológica “fungus”	$C_{14}H_{16}O_4$		Piriculariol, CAS 79863-70-0	250

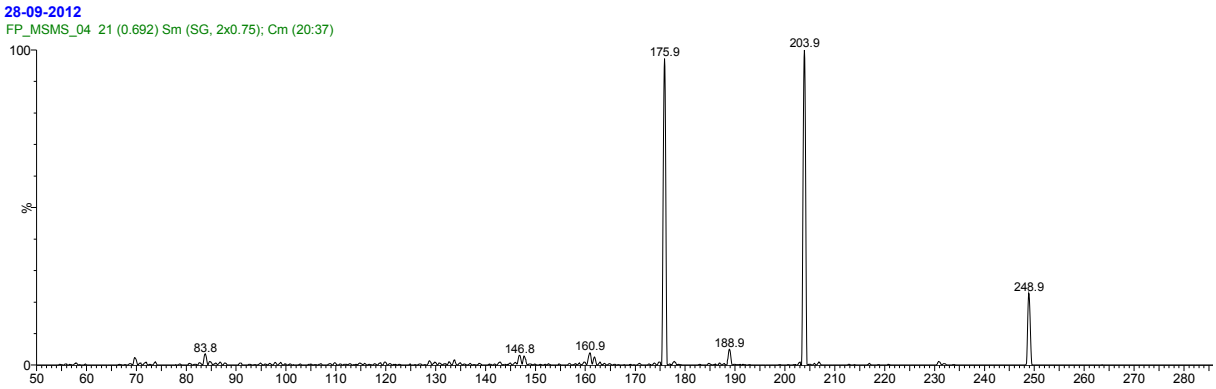


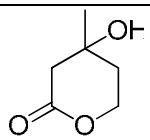
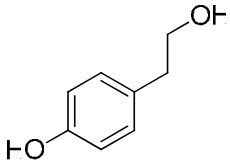
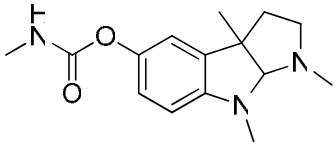
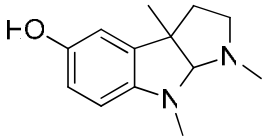
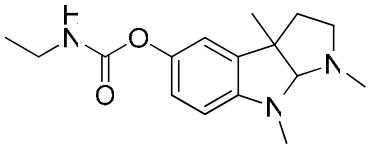
Figura 73. Espectro de fragmentação do íon precursor de *m/z* 249 por CID. Energia de colisão 20 eV.

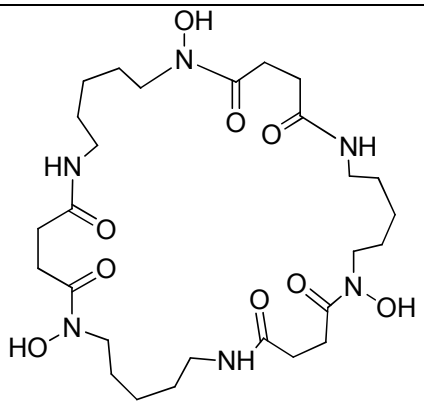
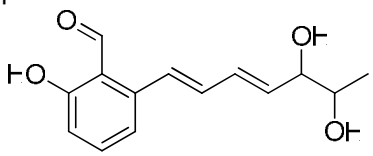
O experimento de co-cultura utilizando a extração em micro-escala e posterior análise por ESI-MS confirma que esta técnica permite obter informação relacionada com a troca metabólica na interação microbiana. Provavelmente variando a mistura solvente poderão ser observados outros metabólitos produzidos nestas condições de cultivo que não foram detectados. Outras técnicas de visualização metabólica vêm sendo desenvolvidas a fim de detectar e visualizar espaço-temporalmente a produção metabólica no ambiente real sem precisar de procedimentos de extração, usando técnicas acopladas à espectrometria de massas[95, 97, 98, 264-268]. Assim, o procedimento de extração em micro-escala é uma primeira abordagem que permitiu detectar rapidamente e com um mínimo tempo no preparo de amostra, alguns dos possíveis metabólitos produzidos pela interação entre *S. albospinus* RLe 7 e *C. boninense* FLe 8.1 por ESI-MS. Deve-se levar em conta que só poucos sinais dos muitos observados por MS, da mesma maneira como foi observado na extração em micro-escala, podem ser identificados e/ou atribuídos com exatidão.[266]

Os métodos de micro-escala são desenhados para meios ricos que permitem a obtenção de altos rendimentos de metabólitos secundários e mínima interferência do meio de cultura.[92] Este experimento permitiu observar vários dos sinais correspondentes aos metabólitos produzidos pelos micro-organismos estudados, assim como foi possível obter informações estruturais geradas a partir das fragmentações mediante MS sequencial. Isto demonstra que MS é uma boa técnica para realizar análises com pouca quantidade de amostra assim como baixa quantidade de metabólitos microbianos. Desta maneira, a informação aqui incluída será importante para posteriores estudos envolvendo *S. albospinus* RLe 7 e *C. boninense* FLe 8.1.

Recapitulando, na Tabela 24 observam-se as substâncias que foram detectadas por MS, caracterizadas por MS/MS e/ou isoladas neste trabalho, assim como a origem biológica de cada uma delas.

Tabela 24. Metabólitos secundários identificados e/ou atribuídos neste trabalho

Micro-organismo	Metabólito ou íon detectado	Fórmula estrutural	Técnica de identificação
C. boninense FLe 8.1	Mevalonolactona Substância isolada		EI-MS, ESI-MS, RMN de ^{1}H
C. boninense FLe 8.1	Tirosol, substância isolada		RMN de ^{1}H
C. boninense FLe 8.1	íon de *m/z* 403	Não definida	ESI-MS/MS
C. boninense FLe 8.1	íon de *m/z* 496	Não definida	ESI-MS/MS
C. boninense FLe 8.1	íon de *m/z* 274	Não definida	ESI-MS/MS
C. boninense FLe 8.1	íon de *m/z* 257	Não definida	ESI-MS/MS
C. boninense FLe 8.1	íon de *m/z* 222	Não definida	ESI-MS/MS
C. boninense FLe 8.1	íon de *m/z* 758	Possível derivado de fosfatidilcolina	ESI-MS/MS
C. boninense FLe 8.1	íon de *m/z* 782, *m/z* 784, *m/z* 786	Possíveis derivados de fosfatidilcolina	ESI-MS/MS
C. boninense FLe 8.1	íon de *m/z* 820, *m/z* 822, *m/z* 824	Não definidas	ESI-MS/MS
S. albospinus RLe 7	íon de *m/z* 276: fisostigmina, substância isolada		EI-MS, ESI-MS, RMN de ^{1}H e de ^{13}C
S. albospinus RLe 7	íon de *m/z* 219: eserolina		EI-MS, ESI-MS/MS
S. albospinus RLe 7	íon de *m/z* 290: N-etil fisostigmina		ESI-MS/MS

Micro-organismo	Metabólito ou íon detectado	Fórmula estrutural	Técnica de identificação
S. albospinus RLe 7	íon de *m/z* 601, *m/z* 623, *m/z* 639: desferrioxamina E ou nocardamina		ESI-MS
S. albospinus RLe 7	íon de *m/z* 455,	Não definida	ESI-MS/MS
S. albospinus RLe 7	íons de *m/z* 803, *m/z* 771, *m/z* 743, *m/z* 691	Possíveis derivados glicosilados antraciclínicos	ESI-MS/MS
S. albospinus RLe 7	íon de *m/z* 304	Não definida	ESI-MS/MS
S. albospinus RLe 7	íon de *m/z* 614	Não definida	ESI-MS/MS
S. albospinus RLe 7	íon de *m/z* 672	Não definida	ESI-MS/MS
S. albospinus RLe 7	íon de *m/z* 592	Não definida	ESI-MS/MS
Co-cultivo, origem biológica não definida	íon de *m/z* 249	Possivelmente atribuído ao piriculariol 	ESI-MS/MS

4.6. Ensaio de inibição por compostos voláteis em placa de Petri

O experimento de inibição por compostos voláteis permitiu observar que a atividade antifúngica não foi produzida devido a compostos de caráter volátil produzidos pela actinobactéria. Apesar do meio ISP-2 ágar não ser ideal para fungos, o crescimento de ambos os micro-organismos foi satisfatório nesse meio. Os micro-organismos foram incubados por 7 dias a 30 ^{o}C. Não foi observada inibição do crescimento do fungo, sugerindo que a inibição do crescimento em meio sólido deve-se a substâncias que difundem no meio de cultura.

Os bioensaios seguindo as metodologias de Strobel et al.[120] (Figura 74) e de Bruce et al.[121] (Figura 75) demonstraram que a inibição só foi produzida quando os micro-organismos estavam no mesmo meio sem nenhuma interferência que impedisse a troca metabólica entre eles.

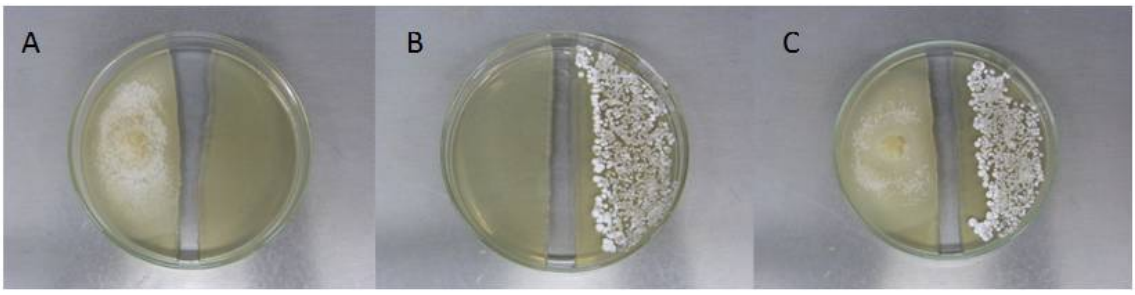


Figura 74. Bioensaio de compostos voláteis segundo a metodologia de Strobel et al.[120] **A.** Controle do fungo *C. boninense* FLe 8.1, **B.** Controle da actinobactéria *S. albospinus* RLe 7, **C.** Cultura mista, não foi observada inibição do crescimento do fungo.

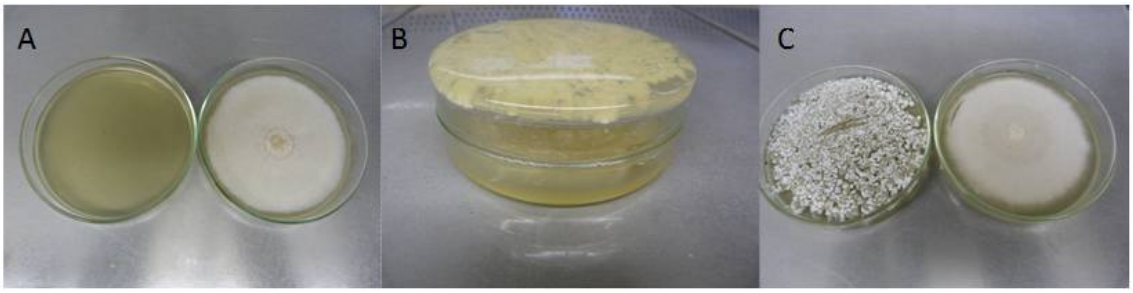
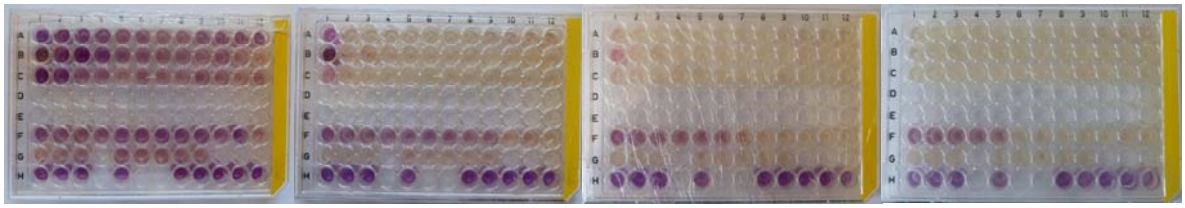


Figura 75. Bioensaio de compostos voláteis segundo a metodologia de Bruce et al.[121] **A.** Controle de *Colletotrichum boninense* FLe 8.1, **B.** Placas de Petri mostrando a maneira como foram superpostos os micro-organismos: placa superior contendo *Streptomyces albospinus* RLe 7, placa inferior contendo o fungo *C. boninense* FLe 8.1, **C.** Placas de Petri abertas mostrando que não houve inibição do crescimento do fungo *C. boninense* FLe 8.1 (direita) pela actinobactéria *S. albospinus* RLe 7 devido a compostos voláteis.

4.7. Ensaio de inibição com substância pura

4.7.1. Ensaio antifúngico por diluição

A fim de determinar se a fisostigmina foi responsável pela inibição do crescimento do fungo em placa de Petri, assim como da inibição da produção metabólica pelo fungo observada na cultura mista em meio arroz parbolizado, foi realizado o ensaio de inibição em placa de 96 poços utilizando fisostigmina pura (Sigma-Aldrich). Aparentemente foi observada atividade antifúngica na concentração de 400 µg/mL a qual foi mantida somente por 72 horas já que depois de 144 horas a ausência de cor do indicador sugeriu que houve crescimento fúngico em todos os poços (Figura 76). Porém, estes resultados não permitiram atribuir à fisostigmina como a única substância responsável pela inibição do crescimento do fungo observada nos experimentos iniciais de antagonismo em placas de Petri.



24 h 48 h 72 h 144 h

Figura 76. Ensaio antifúngico da fisostigmina por diluição em caldo contra o fungo *C. boninense* FLe 8.1. Substância em triplicata nos poços A, B e C de 1 até 12 nas concentrações de 1452,7, 726,3, 363,2, 181,6, 90,8, 45,4, 22,7, 11,3, 5,7, 2,8, 1,4 e 0,7 nmol/mL. Em F o controle positivo do antifúngico actidione, nas concentrações de 1421,7, 710,9, 355,4, 177,7, 88,9, 44,4, 22,2, 11,1, 5,5, 2,8, 1,4 e 0,7 nmol/mL. G1-3 controle negativo micélio FLe 8.1. G5-9 controle DMSO nas concentrações de 5%, 4%, 3%, 2% e 1% respectivamente. H1-3 triplicata do controle da fisostigmina sem adição do micélio do fungo. H5 controle de esterilidade do antifúngico actidione. H8-9 controle do DMSO. H10-12 controle do meio PDB.

4.7.2. Ensaio de inibição do crescimento fúngico em placa de Petri

O ensaio de inibição em placa tanto em meio ISP-2 ágar como em meio PDA não apresentou diferenças no crescimento do fungo *C. boninense* FLe 8.1 quando comparado ao controle do fungo sem adição da fisostigmina, como pode ser observado na Figura 77.

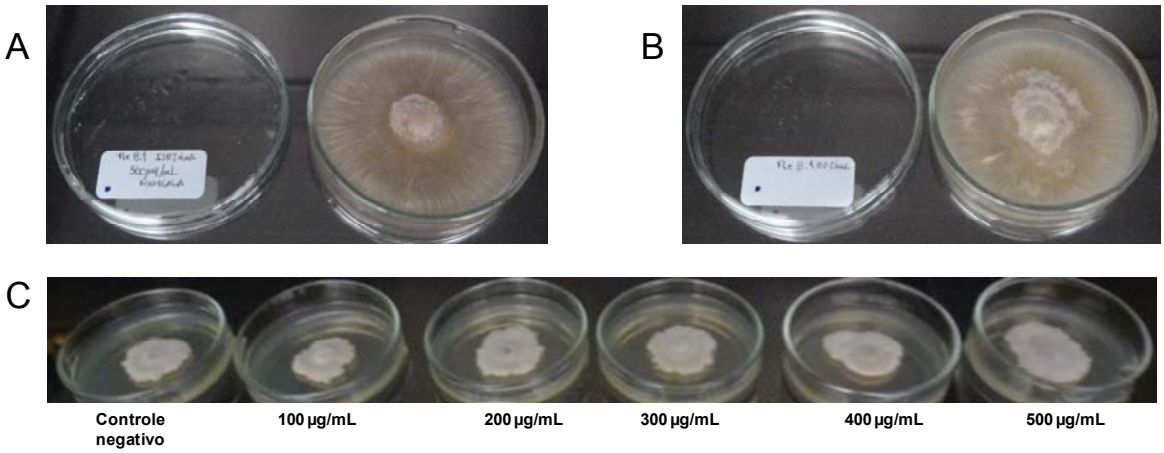


Figura 77. Ensaio de inibição do crescimento do fungo em placa com fisostigmina. A. FLe 8.1 em meio ISP-2 ágar com adição de 500 µg/mL de fisostigmina. B. FLe 8.1 em meio ISP-2 ágar. C. FLe 8.1 em meio PDA com adição de fisostigmina nas seguintes concentrações, de esquerda a direita: Controle negativo, 363,2, 726,3, 1089,5, 1452,7 e 1815.9 nmol/mL.

Assim, os resultados obtidos nos ensaios de inibição sugeriram que a fisostigmina não possui atividade antifúngica considerável contra o fungo *C. boninense* FLe 8.1 por si só, nas condições mencionadas para os experimentos descritos. Levando em conta a discussão apresentada com relação à extração em

micro-escala na cultura mista em meio ISP-2, análogos da fisostigmina podem estar agindo junto com ela a fim de impedir o crescimento do fungo, isto é, atuando sinergicamente. Provavelmente *S. albospinus* RLe 7 produziu além da fisostigmina, derivados com alguma atividade antimicrobiana que foram ativos contra o fungo, como tem sido descrito em outras actinobactérias produtoras de fisostigmina.[215] Assim, é possível que outras moléculas estejam envolvidas na inibição do crescimento do fungo atuando sinergicamente. Atualmente, a detecção e atribuição de produtos naturais utilizando MS continua sendo um desafio, situação exemplificada pela tanamicina, composto antifúngico que não foi detectado por técnicas tradicionais, mas que foi detectado e parcialmente caracterizado utilizando técnicas recentes de MS e análise de dados.[269]

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Apesar de terem sido observadas diferenças no perfil metabólico entre a cultura simples e mista em meio líquido entre as linhagens da actinobactéria *S. albospinus* RLe 7 e o fungo *C. boninense* FLe 8.1, a dificuldade no isolamento das substâncias ainda continua sendo uma limitante como resultado da baixa quantidade produzida nas condições de cultivo testadas em meio líquido. Foram identificadas e caracterizadas duas substâncias com conhecida atividade biológica de origem fúngica, a mevalonolactona e o tirosol.

O uso de outras condições de cultivo permitiu identificar e isolar a fisostigmina, conhecido inibidor da acetilcolinesterase. Essa substância foi identificada a partir dos cultivos da actinobactéria *S. albospinus* RLe 7 em meio sólido, arroz parbolizado e ISP-2 ágar, fazendo uso da espectrometria de massas como técnica muito sensível para detectar metabólitos em muita baixa quantidade. Outros possíveis metabólitos foram detectados mediante MS, e junto com o auxílio de bases de dados, foi possível identificar ou propor candidatos prováveis a serem atribuídos aos sinais detectados por MS, como se demonstrou também com a desferrioxamina E, sideróforo produzido por *Streptomyces,* ou os derivados de fosfatidilcolina no fungo *C. boninense.* O isolamento e caracterização da fisostigmina permitiu detectar o análogo N-etilcarbamato da fisostigmina, substância ainda não reportada como produto natural, mediante MS/MS, ressaltando o uso dessa técnica na busca de produtos naturais de origem microbiana.

A fisostigmina não apresentou atividade antifúngica contra o fungo C. *boninense* FLe 8.1, sugerindo de fato que outras substâncias puderam ter sido produzidas, atuando de maneira independente ou em sinergia, possivelmente junto com a fisostigmina. Isto poderia ter acontecido com o derivado N-etilcarbamato da fisostigmina, identificado por MS, já que outros análogos da fisostigmina possuem atividade antibiótica.

Outras técnicas de detecção foram utilizadas demonstrando que existem muitos metabólitos produzidos em baixa quantidade, o que dificultou seu isolamento, identificação e caracterização estrutural. Porém, sendo a desreplicação um importante passo cujo objetivo busca distinguir entre compostos conhecidos e inéditos[268], a abordagem utilizada neste projeto gerou informações importantes, as quais foram comparadas com a literatura disponível, sobre os perfis metabólicos dos

micro-organismos utilizados no desenvolvimento, e que servirão como base para futuros trabalhos que conduzam ao esclarecimento da relação microbiana em termos de troca metabólica desses micro-organismos.

Reunindo as informações geradas através das diferentes técnicas de detecção utilizadas (TLC, HPLC-DAD, GC-MS, ESI-MS, RMN), e depois de uma cuidadosa análise, foi possível identificar e atribuir as estruturas de algumas substâncias conhecidas de origem microbiana (mevalonolactona, tirosol, fisostigmina, desferrioxamina E) sendo produzidas por micro-organismos que ainda não foram descritos na literatura como endofíticos e que não tem sido amplamente estudados.

Pode-se concluir a importância de utilizar a espectrometria de massas como uma das técnicas mais sensíveis para direcionar a busca de moléculas de interesse, ou seja, para realizar isolamento de compostos de interesse guiado por espectrometria de massas,[99] uma vez que a triagem biológica não permitiu observar atividade citotóxica considerável dos extratos. Isto não significa, porém, que não existam moléculas de interesse com outras atividades biológicas. Isto foi demonstrado com a fisostigmina, a qual, apesar de não mostrar atividade antifúngica *per se* quando testada frente ao fungo *C. boninense* FLe 8.1, possui elevada atividade anticolinesterase que em seu momento lhe permitiu ser uma molécula importante para a realização de modificações estruturais a fim de obter derivados ativos com menor toxicidade, para o uso na doença do Alzheimer.[270] Além disso, deve-se levar em conta que outros derivados da fisostigmina possuem atividade antibiótica,[201, 215] indicando que *S. albospinus* RLe 7 pode ter a capacidade de produzir outros derivados com essa atividade, potencial que pode ser explorado mediante a estratégia de co-cultura utilizando outras linhagens de micro-organismos endofíticos, assim como outros meios de cultura.

Para finalizar, é necessário ressaltar a importância não só dos artigos científicos e bases de dados de produtos naturais, mas também das informações contidas nas patentes, já que muitos dos resultados das pesquisas científicas resultam sendo protegidos por sistemas de propriedade intelectual que não se disponibilizam em artigos de pesquisa. Além disso, as informações de MS incluídas nas bases de dados são parte essencial das estratégias de desreplicação, o que facilitará a descoberta de novos produtos naturais.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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**, v. 75, p. 311-335, 2012.

2. DAVIES, J. Darwin and microbiomes. **Embo Reports**, v. 10, p. 805-805, 2009.

3. DAVIES, J. Inactivation of antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes. **Science**,v. 264, p. 375-382, 1994,.

4. ROMERO, D.; TRAXLER, M. F.; LOPEZ, D.; KOLTER, R., Antibiotics as signal molecules. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 5492-5505, 2011.

5. DAVIES, J.; RYAN, K. S. Introducing the parvome: bioactive compounds in the microbial world. **ACS Chemical Biology**, v. 7, p. 252-259, 2012.

6. DAVIES, J. How to discover new antibiotics: harvesting the parvome. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.15, p. 5-10, 2011.

7. DAVIES, J., Are antibiotics naturally antibiotics? **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, p. 496-499, 2006.

8. 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, p. 1-16, 2010.

9. HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, p. 9-17, 2004.

10. SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, p. 996-1004, 2002.

11. BRAKHAGE, A. A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites - Strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 15-22, 2011.

12. STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

13. 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, p. 509-526, 2006.

14. GAMBOA, M. A.; BAYMAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia* : Meliaceae). **Biotropica**, v. 33, p. 352-360, 2001.

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

16. WANG, Y.; DAI, C. C. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation and biodegradation. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 207-215, 2011.

17. ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1829-1845, 2011.

18. SONG, Y. C.; HUANG, W. Y.; SUN, C.; WANG, F. W.; TAN, R. X. Characterization of graphislactone a as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp 1FB-E001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 506-509, 2005.

19. RODRIGUES, K. F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, p. 261-267, 2000.

20. WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; DANWISETKANJANA, 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, p. 265-272, 2004.

21. DE SIQUEIRA, V. M.; CONTI, R.; DE ARAUJO, J. M.; SOUZA-MOTTA, C. M. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**, v. 53, p. 89-95, 2011.

22. RADJI, M.; SUMIATI, A.; RACHMAYANI, R.; ELYA, B. Isolation of fungal endophytes from *Garcinia mangostana* and their antibacterial activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 103-107, 2011.

23. IGARASHI, Y.; OGURA, H.; FURIHATA, K.; OKU, N.; INDANANDA, C.; THAMCHAIPENET, A. Maklamicin, an Antibacterial Polyketide from an Endophytic *Micromonospora* sp. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 670-674, 2011.

24. ZHAO, K.; PENTTINEN, P.; GUAN, T.; XIAO, J.; CHEN, Q.; XU, J.; LINDSTROM, K.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; STROBEL, G. A. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in panxi plateau, China. **Current Microbiology**, v. 62, p. 182-190, 2011.

25. HU, M. Y.; ZHONG, G. H.; SUN, Z. T.; SH, G.; LIU, H. M.; LIU, X. Q. Insecticidal activities of secondary metabolites of endophytic *Pencillium* sp in *Derris elliptica* Benth. **Journal of Applied Entomology**, v. 129, p. 413-417, 2005.

26. HUSSAIN, H.; KROHN, K.; ULLAH, Z.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B., Bioactive chemical constituents of two endophytic fungi. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 898-900, 2007.

27. TEJESVI, M. V.; KINI, K. R.; PRAKASH, H. S.; SUBBIAH, V.; SHETTY, H. S. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. **Fungal Diversity**, v. 24, p. 37-54, 2007.

28. MACIAS-RUBALCAVA, M. L.; HERNANDEZ-BAUTISTA, B. E.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; GONZALEZ, M. C.; GLENN, A. E.; HANLIN, R. T.; HERNANDEZ-ORTEGA, S.; SAUCEDO-GARCIA, A.; MURIA-GONZALEZ, J. M.; ANAYA, A. L. Naphthoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1185-1196, 2008.

29. JIMENEZ-ROMERO, C.; ORTEGA-BARRIA, E.; ARNOLD, A. E.; CUBILLA-RIOS, L. Activity against *Plasmodium falciparum* of lactones isolated from the endophytic fungus *Xylaria* sp. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, p. 700-703, 2008.

30. ROSA, L. H.; GONCALVES, V. N.; CALIGIORNE, R. B.; ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.; SALES, P. A.; ROMANHA, A. J.; SOBRAL, M. E. G.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 420-430, 2010.

31. GUO, B. Y.; DAI, J. R.; NG, S.; HUANG, Y. C.; LEONG, C. Y.; ONG, W.; CARTE, B. K. Cytonic acids A and B: Novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 602-604, 2000.

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

33. FERNANDES, M. D. V.; SILVA, T.; PFENNING, L. H.; DA COSTA-NETO, C. M.; HEINRICH, T. A.; DE ALENCAR, S. M.; DE LIMA, M. A.; IKEGAKI, M. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 677-685, 2009.

34. KROHN, K.; KOCK, I.; ELSASSER, B.; FLORKE, U.; SCHULZ, B.; DRAEGER, S.; PESCITELLI, G.; ANTUS, S.; KURTAN, T. Bioactive natural products from the endophytic fungus *Ascochyta* sp from *Meliotus dentatus* - Configurational assignment by solid-state CD and TDDFT calculations. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 1123-1129, 2007.

35. ZHANG, W.; KROHN, K.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. Bioactive isocoumarins isolated from the endophytic fungus *Microdochium bolleyi*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1078-1081, 2008.

36. ALY, A. H.; EDRADA-EBEL, R.; WRAY, V.; MULLER, W. E. G.; KOZYTSKA, S.; HENTSCHEL, U.; PROKSCH, P.; EBEL, R. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1716-1725, 2008.

37. KROHN, K.; KOUAM, S. F.; CLUDIUS-BRANDT, S.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B., Bioactive nitronaphthalenes from an endophytic fungus, *Coniothyrium* sp., and their chemical synthesis. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 3615-3618, 2008.

38. GU, W., Bioactive metabolites from *Alternaria brassicicola* ML-P08, an endophytic fungus residing in *Malus halliana*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, p. 1677-1683, 2009.

39. DEBBAB, A.; ALY, A. H.; EDRADA-EBEL, R.; WRAY, V.; MUELLER, W. E. G.; TOTZKE, F.; ZIRRGIEBEL, U.; SCHAECHTELE, C.; KUBBUTAT, M. H. G.; LIN, W. H.; MOSADDAK, M.; HAKIKI, A.; PROKSCH, P.; EBEL, R. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum* isolated from M*entha pulegium*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 626-631, 2009.

40. HUSSAIN, H.; AKHTAR, N.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; PESCITELLI, G.; SALVADORI, P.; ANTUS, S.; KURTAN, T.; KROHN, K. New bioactive 2,3-epoxycyclohexenes and isocoumarins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp from *Laurus azorica*. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 749-756, 2009.

41. GALLO, M. B. C.; CAVALCANTI, B. C.; BARROS, F. W. A.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; BASTOS, J. K.; PUPO, M. T. Chemical constituents of *Papulaspora immersa*, an endophyte from *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae), and their cytotoxic activity. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 2941-2950, 2010.

42. SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GUVINDARAJULU, M. B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T. S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, p. 9-19, 2009.

43. VERMA, V. C.; KHARWAR, R. N.; STROBEL, G. A. Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. **Natural Product Communications**, v. 4, p. 1511-1532, 2009.

44. 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, p. 1137-1163, 2009.

45. PAN, L.; CHAI, H.; KINGHORN, A. D. The continuing search for antitumor agents from higher plants. **Phytochemistry Letters**, v. 3, p. 1-8, 2010.

46. HUANG, Y. J.; WANG, J. F.; LI, G. L.; ZHENG, Z. H.; SU, W. J. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei, Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 31, p. 163-167, 2001.

47. YU, H.; ZHANG, L.; LI, L.; ZHENG, C.; GUO, L.; LI, W.; SUN, P.; QIN, L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, v. 165, p. 437-449, 2010.

48. 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, p. 1717-1719, 2005.

49. KUSARI, S.; ZUEHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 2-7, 2009.

50. STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces-andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**,v. 260, p. 214-216, 1993.

51. KUSARI S, L. M., SPITELLER M. *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1019–1030, 2009.

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

53. VERMA, V. C.; LOBKOVSKY, E.; GANGE, A. C.; SINGH, S. K.; PRAKASH, S. Piperine production by endophytic fungus *Periconia* sp isolated from *Piper longum* L. **Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 427-431, 2011.

54. RUKACHAISIRIKUL, V.; ARUNPANICHLERT, J.; SUKPONDMA, Y.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J. Metabolites from the endophytic fungi *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 and PSU-M114. **Tetrahedron**, v. 65, p. 10590-10595, 2009.

55. CAO, S.; CLARDY, J. New naphthoquinones and a new delta-lactone produced by endophytic fungi from Costa Rica. **Tetrahedron Letters**, v. 52, p. 2206-2208, 2011.

56. STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. **Microbial Endophytes**, p. 3-29, 2000.

57. 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, p. 457-473, 2011.

58. RAJA, A.; PRABAKARANA, P. Actinomycetes and drug-An overview. **American Journal of Drug Discovery and Development**, v. 1, p. 75-84, 2011.

59. BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. A personal view. **Journal of Antibiotics**, v. 59, p. 1-1, 2005.

60. TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; TAECHOWISAN, T.; WANBANJOB, A.; THADANITI, S.; TAYLOR, W. C. Lansai A-D, secondary metabolites from *Streptomyces* sp SUC1. **Tetrahedron**, v. 64, p. 7583-7586, 2008.

61. KOMAKI, H.; HARAYAMA, S. Sequence Diversity of Type-II Polyketide Synthase Genes in *Streptomyces*. **Actinomycetologica**, v. 20, p. 42-48, 2006.

62. VAN WEZEL, G. P.; MCDOWALL, K. J. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1311-1333, 2011.

63. PULLEN, C.; SCHMITZ, P.; MEURER, K.; BAMBERG, D. D. V.; LOHMANN, S.; FRANCA, S. D. C.; GROTH, I.; SCHLEGEL, B.; MOLLMANN, U.; GOLLMICK, F.; GRAFE, U.; LEISTNER, E. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of *Celastraceae*. **Planta**, v. 216, p. 162-167, 2002.

64. SASAKI, T.; IGARASHI, Y.; SAITO, N.; FURUMAI, T., TPU-0031-A and B, new antibiotics of the novobiocin group produced by *Streptomyces* sp TP-A0556. **Journal of Antibiotics**, v. 54, p. 441-447, 2001.

65. IGARASHI, Y.; IIDA, T.; YOSHIDA, R.; FURUMAI, T. Pteridic acids A and B, novel plant growth promoters with auxin-like activity from *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0451. **Journal of Antibiotics**, v. 55, p. 764-767, 2002.

66. SASAKI, T.; IGARASHI, Y.; SAITO, N.; FURUMAI, T. Cedarmycins A and B, new antimicrobial antibiotics from *Streptomyces* sp TP-A0456. **Journal of Antibiotics**, v. 54, p. 567-572, 2001.

67. SASAKI, T.; IGARASHI, Y.; OGAWA, M.; FURUMAI, T. Identification of 6-prenylindole as an antifungal metabolite of *Streptomyces* sp TP-A0595 and synthesis and bioactivity of 6-substituted indoles. **Journal of Antibiotics**, v. 55, p. 1009-1012, 2002.

68. IGARASHI, Y.; OGAWA, M.; SATO, Y.; SAITO, N.; YOSHIDA, R.; KUNOH, H.; ONAKA, H.; FURUMAI, T. Fistupyrone, a novel inhibitor of the infection of Chinese cabbage by *Alternaria brassicicola*, from *Streptomyces* sp TP-A0569. **Journal of Antibiotics**, v. 53, p. 1117-1122, 2000.

69. IGARASHI, Y.; OOTSU, K.; ONAKA, H.; FUJITA, T.; UEHARA, Y.; FURUMAI, T. Anicemycin, a new inhibitor of anchorage-independent growth of tumor cells from *Streptomyces* sp TP-A0648. **Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 322-326, 2005.

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

71. CUETO, M.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C.; FENICAL, W.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1444-1446, 2001.

72. HO, W. H.; TO, P. C.; HYDE, K. A., Induction of antibiotic production of freshwater fungi using mix-culture fermentation. **Fungal Diversity**, v. 12, p. 45-51, 2003.

73. OH, D.-C.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp in competing co-culture. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 515-520, 2007.

74. PETTIT, R. K. Mixed fermentation for natural product drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, p. 19-25, 2009.

75. LU, C. H.; SHEN, Y. M., Harnessing the potential of chemical defenses from antimicrobial activities. **Bioessays**, v. 26, p. 808-813, 2004.

76. PENTTINEN, P.; PELKONEN, J.; HUTTUNEN, K.; HIRVONEN, M. R. Co-cultivation of *Streptomyces californicus* and *Stachybotrys chartarum* stimulates the production of cytostatic compound(s) with immunotoxic properties. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 217, p. 342-351, 2006.

77. ZUCK, K. M.; SHIPLEY, S.; NEWMAN, D. Induced production of N-formyl alkaloids from *Aspergillus fumigatus* by co-culture with *Streptomyces peucetius*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1653-1657, 2011.

78. SCHROECKH, V.; SCHERLACH, K.; NUETZMANN, H.-W.; SHELEST, E.; SCHMIDT-HECK, W.; SCHUEMANN, J.; MARTIN, K.; HERTWECK, C.; BRAKHAGE, A. A. Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 14558-14563, 2009.

79. SLATTERY, M.; RAJBHANDARI, I.; WESSON, K. Competition-mediated antibiotic induction in the marine bacterium *Streptomyces tenjimariensis*. **Microbial Ecology**, v. 41, p. 90-96, 2001.

80. MEYER, V.; STAHL, U. The influence of co-cultivation on expression of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 68-74, 2003.

81. ONAKA, H.; MORI, Y.; IGARASHI, Y.; FURUMAI, T. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 400-406, 2011.

82. DEGENKOLB, T.; HEINZE, S.; SCHLEGEL, B.; STROBEL, G.; GRAFE, U. Formation of new lipoaminopeptides, acremostatins A, B, and C, by co-cultivation of *Acremonium* sp Tbp-5 and *Mycogone rosea* DSM 12973. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, p. 883-886, 2002.

83. OH, D. C.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C. A.; FENICAL, W. Libertellenones A-D: Induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 5267-5273, 2005.

84. ZHU, F.; LIN, Y. Marinamide, a novel alkaloid and its methyl ester produced by the application of mixed fermentation technique to two mangrove endophytic fungi from the South China Sea. **Chinese Science Bulletin**, v. 51, p. 1426-1430, 2006.

85. ANGELL, S.; BENCH, B. J.; WILLIAMS, H.; WATANABE, C. M. H. Pyocyanin isolated from a marine microbial population: Synergistic production between two distinct bacterial species and mode of action. **Chemistry & Biology**, v. 13, p. 1349-1359, 2006.

86. PARK, H. B.; KWON, H. C.; LEE, C.-H.; YANG, H. O. Glionitrin A, an antibiotic-antitumor metabolite derived from competitive interaction between abandoned mine microbes. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 248-252, 2009.

87. FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, v. 112, p. 231-240, 2008.

88. BODE, H. B.; BETHE, B.; HOFS, R.; ZEECK. A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **Chembiochem**, v. 3, p. 619-627, 2002.

89. SATTLER, I.; THIERICKE, R.; ZEECK, A. The manumycin-group metabolites. **Natural Product Reports**, v. 15, p. 221-240, 1998.

90. BODE, H. B.; WALKER, M.; ZEECK, A. Secondary metabolites by chemical screening, 42 - Cladospirones B to I from *Sphaeropsidales* sp F-24 ' 707 by variation of culture conditions. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 3185-3193, 2000.

91. MIAO, L.; KWONG, T. F. N.; QIAN, P.-Y. Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium* c.f. *saccharicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 1063-1073, 2006.

92. NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, p. 111-136, 2003.

93. SMEDSGAARD, J. Micro-escale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. **Journal of Chromatography A**, v. 760, p. 264-270. 1997.

94. NIELSEN, K. F.; MANSSON, M.; RANK, C.; FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O. Dereplication of Microbial Natural Products by LC-DAD-TOFMS. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 2338-2348, 2011.

95. ESQUENAZI, E.; COATES, C.; SIMMONS, L.; GONZALEZ, D.; GERWICK, W. H.; DORRESTEIN, P. C. Visualizing the spatial distribution of secondary metabolites produced by marine cyanobacteria and sponges via MALDI-TOF imaging. **Molecular Biosystems**, v. 4, p. 562-570, 2008.

96. WATROUS, J. D.; DORRESTEIN, P. C. Imaging mass spectrometry in microbiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 683-694, 2011.

97. LIU, W.-T.; YANG, Y.-L.; XU, Y.; LAMSA, A.; HASTE, N. M.; YANG, J. Y.; NG, J.; GONZALEZ, D.; ELLERMEIER, C. D.; STRAIGHT, P. D.; PEVZNER, P. A.; POGLIANO, J.; NIZET, V.; POGLIANO, K.; DORRESTEIN, P. C. Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 16286-16290, 2010.

98. YANG, Y.-L.; XU, Y.; STRAIGHT, P.; DORRESTEIN, P. C. Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry. **Nature Chemical Biology**, v. 5, p. 885-887, 2009.

99. YANG, Y.-L.; XU, Y.; KERSTEN, R. D.; LIU, W.-T.; MEEHAN, M. J.; MOORE, B. S.; BANDEIRA, N.; DORRESTEIN, P. C. Connecting chemotypes and phenotypes of cultured marine microbial assemblages by imaging mass spectrometry. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 50, p. 5839-5842, 2011.

100. SMITH, C. A.; O'MAILLE, G.; WANT, E. J.; QIN, C.; TRAUGER, S. A.; BRANDON, T. R.; CUSTODIO, D. E.; ABAGYAN, R.; SIUZDAK, G. METLIN - A metabolite mass spectral database. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, p. 747-751, 2005.

101. HORAI, H.; ARITA, M.; KANAYA, S.; NIHEI, Y.; IKEDA, T.; SUWA, K.; OJIMA, Y.; TANAKA, K.; TANAKA, S.; AOSHIMA, K.; ODA, Y.; KAKAZU, Y.; KUSANO, M.; TOHGE, T.; MATSUDA, F.; SAWADA, Y.; HIRAI, M. Y.; NAKANISHI, H.; IKEDA, K.; AKIMOTO, N.; MAOKA, T.; TAKAHASHI, H.; ARA, T.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; SHIBATA, D.; NEUMANN, S.; IIDA, T.; TANAKA, K.; FUNATSU, K.; MATSUURA, F.; SOGA, T.; TAGUCHI, R.; SAITO, K.; NISHIOKA, T. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 45, p. 703-714, 2010.

102. SILVA-ROJAS, H. V.; AVILA-QUEZADA, G. D., Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. **Plant Pathology**, v. 60, p.899-908, 2011.

103. MARTINEZ, E. P.; HIO, J. C.; OSORIO, J. A.; TORRES, M. F. Identification of *Colletotrichum* species causing anthracnose on Tahiti lime, tree tomato and mango. **Agronomía Colombiana**, v. 27, p. 211-218, 2009.

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

105. TOZZE, H. J., JR.; MASSOLA, N. M., JR.; CAMARA, M. P. S.; GIORIA, R.; SUZUKI, O.; BRUNELLI, K. R.; BRAGA, R. S.; KOBORI, R. F. First report of *Colletotrichum boninense* causing anthracnose on *Pepper* in Brazil. **Plant Disease**, v. 93, p. 106-106, 2009.

106. MORIWAKI, J.; TSUKIBOSHI, T.; SATO, T. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. **Journal of General Plant Pathology**, v. 68, p. 307-320, 2002.

107. JOHNSTON, P. R.; PENNYCOOK, S. R.; MANNING, M. A. Taxonomy of fruit-rotting fungal pathogens: what's really out there? . **New Zealand Plant Protection**, v. 58, p. 42–46, 2005.

108. MORIWAKI, J.; SATO, T.; TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization of Colletotrichum boninense sp. nov. from Japan. **Mycoscience**, v. 44, p. 47-53, 2003.

109. DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDENBERG, J. H. C.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S.; TAN, Y. P.; SHIVAS, R. G.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum boninense* species cornplex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 1-36, 2012.

110. VELGA PILEGGI, S. A.; VIEIRA DE OLIVEIRA, S. F.; ANDRADE, C. W.; VICENTE, V. A.; DALZOTO, P. D. R.; DA CRUZ, G. K.; GABARDO, J.; MASSOLA, N. S., JR.; TOZZE, H. J., JR.; PILEGGI, M.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L. V.; PIMENTEL, I. C.; STRINGARI, D.; GLIENKE, C. Molecular and morphological markers for rapid distinction between 2 *Colletotrichum* species. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 1076-1088, 2009.

111. VEGA, F. E.; SIMPKINS, A.; AIME, M. C.; POSADA, F.; PETERSON, S. W.; REHNER, S. A.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; ARNOLD, A. E. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. **Fungal Ecology**, v. 3, p. 122-138, 2010.

112. ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y.; TAN, R. X. Metabolites of *Colletotrichum gloesporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1529-1530, 2000.

113. LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v. 151, p. 67-73, 2000.

114. INACIO, M. L.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. D. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; ARAUJO, A. R. Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocarya mandioccana* Nees (Lauraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 822-824, 2006.

115. MAKKAR, N. S.; NICKSON, T. E.; TRAN, M.; BIEST, N.; MILLERWIDEMAN, M.; LAWSON, J.; MCGARY, C. I.; STONARD, R. Phenamide, a fungicidal metabolite from *Streptomyces albospinus* A19301 - Taxonomy, fermentation, isolation, physicochemical and biological properties. **Journal of Antibiotics**, v. 48, p. 369-374, 1995.

116. BROETZ, E.; KULIK, A.; VIKINESWARY, S.; LIM, C.-T.; TAN, G. Y. A.; ZINECKER, H.; IMHOFF, J. F.; PAULULAT, T.; FIEDLER, H.-P. Phenelfamycins G and H, new elfamycin-type antibiotics produced by *Streptomyces albospinus* Acta 3619. **Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 257-266, 2011.

117. YU, L.; DAI, H.-F.; ZHAO, Y.-X.; ZENG, Y.-B.; JIANG, W.-T.; MEI, W.-L.; ZENG, H.-C. Three new compounds from soil actinomycete *Streptomyces albospinus* 15-4-2. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 13, p. 901-906, 2011.

118. CONTI, R. Micro-organismos de interesse farmacêutico e agrícola: estudo químico e biosintético. Tese de doutorado em Ciências. Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2012.

119. CHAGAS, F. O. D. Utilização de culturas mistas como estratégia para estimular a biossíntese de produtos naturais por fungos endofíticos. Dissertação de mestrado em Ciências. Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2010.

120. STROBEL, G. A.; DIRKSE, E.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

121. BRUCE, A.; STEWART, D.; VERRALL, S.; WHEATLEY, R. E. Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of sapstain fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p.101-108, 2003.

122. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

123. DE SOUZA, A. M.; Poppi, R. J. Teaching experiment of chemometrics for exploratory analysis of edible vegetable oils by mid infrared spectroscopy and principal component analysis: a tutorial. Part I. **Quimica Nova**, v. 35, p. 223-229, 2012.

124. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos In *Norma Aprovada. Documento M38-A do NCCLS [ISBN 1-56238-470-8].* , NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

125. EGUCHI, T.; WATANABE, E.; KAKINUMA, K. Practical enantioselective synthesis of fully deuterated (R)-mevalonolactone. **Tetrahedron**, v. 59, p. 6035-6038, 2003.

126. LAKNER, F. J.; HAGER, L. P. Chloroperoxidase as enantioselective epoxidation catalyst: an efficient synthesis of (R)-(-)-mevalonolactone. **Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p. 3923-3925, 1996.

127. WEBER, D.; GORZALCZANY, S.; MARTINO, V.; ACEVEDO, C.; STERNER, O.; ANKE, T. Metabolites from endophytes of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences**, v. 60, p. 467-477, 2005.

128. PITTAYAKHAJONWUT, P.; THEERASILP, M.; KONGSAEREE, P.; RUNGROD, A.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Pughiinin A, a sesquiterpene from the fungus *Kionochaeta pughii* BCC 3878. **Planta Medica**, v. 68, p. 1017-1019, 2002.

129. Dictionary of Natural Products. In CRCnetBASE: http://dnp.chemnetbase.com. Último acesso: dez 2012.

130. NIKU-PAAVOLA, M. L.; LAITILA, A.; MATTILA-SANDHOLM, T.; HAIKARA, A. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 29-35, 1999.

131. ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi - a review. **Medical Mycology**, v. 50, p. 337-345, 2012.

132. NARAYANAN, T. K.; RAO, G. R. Production of Beta-(4-hydroxiphenyl)ethanol and Beta-(-4-hydroxiphenyl)lactic acid by *Candida* species. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, p. 384-389, 1976.

133. CHEN, H.; FUJITA, M.; FENG, Q. H.; CLARDY, J.; FINK, G. R. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 5048-5052, 2004.

134. GUIMARÃES, D. O. Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de *Asteraceae* e ensaio antibiótico no modelo de infecção em "*Caenorhabditis elegans*". Tese de doutorado em Ciências. Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil, http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-08022010-092443/, 2010.

135. GUIMARAES, D. O.; BORGES, W. S.; KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; GOLDMAN, G. H.; NOMIZO, A.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; 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, p. 134-144, 2008.

136. LONGNECKER, K.; KUJAWINSKI, E. B. Composition of dissolved organic matter in groundwater. **Geochimica Et Cosmochimica Acta**, v. 75, p.2752-2761, 2011.

137. KOKAI TOKKYO KOHO. Sato, K.; Yokoi, S. **Preparation of novel milbemycin 13-esters.** JP 06345770 A, Jun. 10, 1993, Dez. 20, 1994.

138. NONAKA, K.; TSUKIYAMA, T.; OKAMOTO, Y.; SATO, K.; KUMASAKA, C.; YAMAMOTO, T.; MARUYMA, F.; YOSHIKAWA, H. New milbemycins from *Streptomyces hygroscopicus* subsp aureolacrimosus: Fermentation, isolation and structure elucidation. **Journal of Antibiotics**, v. 53, p. 694-704, 2000.

139. BAKER, G. H.; BLANCHFLOWER, S. E.; DORGAN, R. J. J.; EVERETT, J. R.; MANAGER, B. R.; READING, C. R.; READSHAW, S. A.; SHELLEY, P. Further novel milbemycin antibiotics from *Streptomyces* sp E225 fermentation, isolation and structure elucidation. **Journal of Antibiotics**, v. 49, p. 272-280, 1996.

140. BAYER A.-G. Robert, S.; Martin, K.; Wolfgang, B.; Michael, D.; Wolfgang, R.; Bernd, D.; Werner, O.; Peter, A.; Wilhelm, S.; Achim, H.; Ulrike, W.-N.; Robert, S. **Fermentation of milbemycin analogs with *Streptomyces***. DE 3916931, May 24, 1989, Dec. 6, 1990.

141. MEYER, J. M.; ABDALLAH, M. A., The siderochromes of non-fluorescent pseudomonads - production of nocardamine by *Pseudomonas-Stutzeri*. **Journal of General Microbiology**, v. 118, p. 125-129, 1980.

142. BROWN, R. F. C.; BÜCHI, G.; KELLER-SCHIERLEIN, W.; PERLOG, V.; RENZ, J. Über die Konstitution des Nocardamins. **Helvetica Chimica Acta**, v. 43, p. 1868-1871, 1960.

143. RINEHART, K. L.; SPICER, L. D.; EPSTEIN, W. W.; BECK, J. R. Streptolydigin.1. Streptolic Acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 4035-4037, 1963.

144. RINEHART, K. L.; BORDERS, D. B. Streptolydigin. 2. Ydiginic Acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 4037-4038, 1963.

145. RINEHART, K. L.; BECK, J. R.; KINSTLE, T. H.; KRAUSS, D.; BORDERS, D. B. Streptolydigin. 3. Chromophore and structure. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 4038-4039, 1963.

146. HOU, Y.; BRAUN, D. R.; MICHEL, C. R.; KLASSEN, J. L.; ADNANI, N.; WYCHE, T. P.; BUGNI, T. S. Microbial strain prioritization using metabolomics tools for the discovery of natural products. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 4277-4283, 2012.

147. WU, W.; MASSART, D. L.; DEJONG, S. The kernel PCA algorithms for wide data .1. Theory and algorithms. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 36, p.165-172, 1997.

148. WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D., Mass Spectrometry/Mass Spectrometry, in Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation. John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK., 2008; Vol. Fourth Edition.

149. SAKAI, Y.; YOSHIDA, T.; OCHIAI, K.; UOSAKI, Y.; SAITOH, Y.; TANAKA, F.; AKIYAMA, T.; AKINAGA, S.; MIZUKAMI, T. GEX1 compounds, novel antitumor antibiotics related to herboxidiene, produced by *Streptomyces* sp - 1. Taxonomy, production, isolation, physicochemical properties and biological activities. **Journal of Antibiotics**, v. 55, p. 855-862, 2002.

150. ITO, S.; MATSUYA, T.; OMURA, S.; OTANI, M.; NAKAGAWA, A.; TAKESHIM.H; IWAI, Y.; OHTANI, M.; HATA, T. A Nem antibiotic, kinamycin. **Journal of Antibiotics**, v. 23, p. 315-317, 1970.

151. HATA, T.; OMURA, S.; IWAI, Y.; NAKAGAWA, A.; OTANI, M.; ITO, S.; MATSUYA, T. New antibiotic, kinamycin - fermentation, isolation, purification and properties. **Journal of Antibiotics**, v. 24, p. 353-359, 1971.

152. SATO, Y.; GOULD, S. J. Biosynthesis of kinamycin-D-incorporation of 1,2 C-13 acetate and of 2-H-2(3),1-C-13 acetate. **Tetrahedron Letters**, v. 26, p. 4023-4026, 1985.

153. GOULD, S. J.; TAMAYO, N.; MELVILLE, C. R.; CONE, M. C. Revised structures for the kinamycin antibiotics - 5-diazobenzo b fluorenes rather than benzo b carbazole cyanamides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, p. 2207-2208, 1994.

154. LIN, H. C.; CHANG, S. C.; WANG, N. L.; CHANG, L. R. FL-120A, FL-120B, FL-120C, FL-120D, FL-120B', FL-120-C', FL120-D', New products related to kinamycin from *Streptomyces-Chattanoogensis* Subsp *Taitungensis* Subsp Nov .1. Taxonomy, fermentation and biological properties. **Journal of Antibiotics**, v. 47, p. 675-680, 1994.

155. YOUNG, J. J.; HO, S. N.; JU, W. M.; CHANG, L. R. FL-120A-Similar-to-D', new products related to kinamycin from *Streptomyces-Chattanoogensis* Subsp *Taitungensis* Subsp Nov .2. isolation and structure determination. **Journal of Antibiotics**, v. 47, p. 681-687, 1994.

156. NIKKEN CHEMICALS CO LTD. Ooka, M.; Tamioka, T.; Shiozu, S.; Suzuki, H. **Olimycin, an antifungal substance**. JP 35013898 B4, Sep. 21, 1960.

157. 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, p. 2899-2905, 2005.

158. WANG, G. Y. S.; BORGESON, B. M.; CREWS, P. Pitholides A-D, polyketides from a marine tunicate-derived culture of *Pithomyces* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 38, p. 8449-8452, 1997.

159. AJINOMOTO CO INC. Obayashi, Y.; Yoshimura, T.; Ikenoue, Y.; Fudo, R.; Murata, M.; Ando, T. **Novel Antitumor compounds and the process for producing the same**. WO 9744479, Mar. 13, 1996, Apr. 21, 1999.

160. SINGH, S. B.; ZINK, D. L.; QUAMINA, D. S.; PELAEZ, F.; TERAN, A.; FELOCK, P.; HAZUDA, D. J. Integrastatins: structure and HIV-1 integrase inhibitory activities of two novel racemic tetracyclic aromatic heterocycles produced by two fungal species. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 2351-2354, 2002.

161. CHU, M.; MIERZWA, R.; TRUUMEES, I.; KING, A.; PATEL, M.; PICHARDO, J.; HART, A.; DASMAHAPATRA, B.; DAS, P. R.; PUAR, M. S. Sch 65676: A novel fungal metabolite with the inhibitory activity against the cytomegalovirus protease. **Tetrahedron Letters**, v. 37, p. 3943-3946, 1996.

162. SANTOS-SANCHEZ, N. F.; MORALES-RIOS, M. S.; JOSEPH-NATHAN, P. NMR and theoretical conformational studies of the anticholinergic physostigmine. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 39, p. 696-700, 2001.

163. MERCK & CO INC. Daoust, D. R. **Physostigmine microbiological prodn - by aerobic cultivation of S*treptomyces griseofuscus***, US 3734832 A, Sep. 24, 1971, May 22, 1973.

164. TAKEDA CHEM IND LTD. Iwasa, T.; Harada, S.; Sato, Y. **Preparation of physostigmine, used as pharmaceutical, by culturing a strain of *Streptomyces***. JP 54062390 A, Oct. 24, 1977, May 19, 1979.

165. AESCULAPIUS FARMACEUTICI S.R.L. Puricelli, L. **New hexa:hydro-3A,8-di:methyl-pyrrolo-(2,3-B)-indole(s) and analogues, used to treat cholinergic disorders especially the enhancement of memory**. EP550007 A, -A2, -A3. Dec 23, 1992, Jul 7, 1993.

166. PHARMAGROUP INTERNATIONAL. Yu, Q.; Brossi, A.; Massari, D. C. **New optically pure 5-oxygenated (3S)-1,3-di:methyl-oxindole -3-acetic acids - are intermediates for physostigmine compounds and other alkaloid(s).** US 5310935 A, Jun. 30, 1992, May 10, 1994.

167. MEDIOLANUM FARMACEUTICI S.P.A. Lappa, S.; Pagella, P. G.; Ferrari, E.; Maiorana, S.; Marchesini, D.; Alisi, M. A.; Brufani, M.; Cesta, M. C.; Filocamo, L.; Gostoli, G.; Eieocamo, L.; Brufani, M. E. **Preparation of aminoalkylcarbamic esters of eseroline suitable for use as cholinesterase activity inhibitors.** EP575954-A1, Jun. 22, 1993, Dec. 29, 1993.

168. SALWAY, A. H. Researches on the constitution of physostigmine Part I. **Journal of the Chemical Society**, v. 101, p. 978-989, 1912.

169. ELLIS, S.; PLACHTE, F. L.; SIRAUS, O. H. The destruction of physostigmine in buffered solutions and in serum. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 79, p. 295-308, 1943.

170. ELLIS, S.; KRAYER, O.; PLACHTE, F. L. Breakdown products of physostigmine, their inhibitory effect on cholinesterase and their pharmacological action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 79, p. 309-319, 1943.

171. ELLIS, S. Chemical studies on physostigmine breakdown products and related epinephrine derivatives. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 79, p. 364-372, 1943.

172. POOBRASERT, O.; CORDELL, G. A. Blue degradation products of rubreserine. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 578-580, 1997.

173. CHEN, J. L.; YEH, M. K.; CHIANG, C. H. Anaerobic stability of aqueous physostigmine solution. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, p. 1007-1011, 2000.

174. POOBRASERT, O.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. Cytotoxic degradation product of physostigmine. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 1087-1089, 1996.

175. SLENO, L.; CAMPAGNA-SLATER, V.; VOLMER, D. A. Dissociation reactions of protonated anthracycline antibiotics following electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 255, p. 130-138, 2006.

176. REDDY, G. C. S.; SAHAI, R.; FEHLHABER, H. W.; GANGULI, B. N. Isolation and structure of a new epsilon-rhodomycin compound produced by a *Streptomyces* Species Hpl Y-11472. **Journal of Antibiotics**, v. 38, p. 1423-1425, 1985.

177. MAHMOUD, K. A. S. Nafisamycin, cyclisation product of a new enediyne precursor, highly cytotoxic mansouramycins, karamomycins possessing a novel heterocyclic skeleton and further unusual secondary metabolites from terrestrial and marine bacteria. Doctorate thesis. Georg-August-Universität zu Göttingen, 2008.

178. KIRST, H. A.; DORMAN, D. E.; OCCOLOWITZ, J. L.; JONES, N. D.; PASCHAL, J. W.; HAMILL, R. L.; SZYMANSKI, E. F. The Structure of A201A, a novel nucleoside antibiotic. **Journal of Antibiotics**, v. 38, p. 575-586, 1985.

179. SHIMIZU, K.; OHKUBO, S.; MORIMOTO, M.; TOMITA, F. New anti-tumor antibiotic DC-14. **Journal of Antibiotics**, v; 35, p. 87-89, 1982.

180. ECKARDT, K.; IHN, W.; TRESSELT, D.; KREBS, D. The chemical structures of streptovirudins. **Journal of Antibiotics**, v. 34, p. 1631-1632, 1981.

181. ECKARDT, K.; THRUM, H.; BRADLER, G.; TONEW, E.; TONEW, M. Streptovirudins, new antibiotics with antibacterial and antiviral activity .2. isolation, chemical characterization and biological-activity of streptovirudins A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 and D2. **Journal of Antibiotics**, v. 28, p. 274-279, 1975.

182. KUNNARI, T.; KLIKA, K. D.; BLANCO, G.; MENDEZ, C.; MANTSALA, P.; HAKALA, J.; SILLANPAA, R.; TAHTINEN, P.; SALAS, J.; YLIHONKO, K. Hybrid compounds generated by the introduction of a nogalamycin-producing plasmid into *Streptomyces argillaceus*. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1**, p. 1818-1825, 2002.

183. HOOPER, A. M.; RICKARDS, R. W. 3-amino-5-hydroxybenzoic acid in antibiotic biosynthesis. XI. Biological origins and semisynthesis of thionaphthomycins, and the structures of naphthomycins I and j. **Journal of Antibiotics**, v. 51, p. 845-851, 1998.

184. MATSUZAWA, Y.; YOSHIMOTO, A.; SHIBAMOTO, N.; TOBE, H.; OKI, T.; NAGANAWA, H.; TAKEUCHI, T.; UMEZAWA, H. New anthracycline metabolites from mutant strains of *Streptomyces-Galilaeus* Ma144-M1 .2. Structure of 2-hydroxyaklavinone and new aklavinone glycosides. **Journal of Antibiotics**, v. 34, p. 959-964, 1981.

185. YOSHIMOTO, A.; MATSUZAWA, Y.; OKI, T.; TAKEUCHI, T.; UMEZAWA, H., New anthracycline metabolites from mutant strains of *Streptomyces-Galilaeus* Ma144-M1 .1. Isolation and characterization of various blocked mutants. **Journal of Antibiotics**, v. 34, p. 951-958, 1981.

186. HAXELL, M. A.; BISHOP, B. F.; BRYCE, P.; GRATION, K. A. F.; KARA, H.; MONDAY, R. A.; PACEY, M. S.; PERRY, D. A.; KOJIMA, Y.; MAEDA, H.; NISHIYAMA, S.; TONE, J.; HUANG, L. H. C-13-Beta-acyloxymilbemycins, a new family of macrolides - discovery, structural determination and biological properties. **Journal of Antibiotics**, v. 45, p. 659-670, 1992.

187. TSUCHIYA, K.; KIMURA, C.; NISHIKAWA, K.; HARADA, T.; NISHIKIORI, T.; TATSUTA, K. NK154183A and B, antitumor substances produced by *Streptomyces* sp. **Journal of Antibiotics**, v. 49, p. 1281-1283, 1996.

188. SHIMI, I. R.; DEWEDAR, A.; ABDALLAH, N. Yemenimycin, a new antibiotic. **Journal of Antibiotics**, v. 24, p. 283-289, 1971.

189. EGYPT. Shimi, I. **Antibiotic yemenimycin and preparation - by cultivation of *Streptomyces albus*(shimi)**. US 3839560-A, Apr. 10, 1972, Oct. 1, 1974.

190. S. S. PHARMACEUTICAL CO., LTD. Ono, J.; Asaoka, T.; Sato, J.; Yokoi, K.; Nakajima, T. **Antibiotic SS8228B and its preparation.** JP 60-137294, Dec. 26, 1983, Jul. 20, 1985.

191. S. S. PHARMACEUTICAL CO., LTD. Ono, J.; Asaoka, T.; Sato, J.; Yokoi, K.; Nakajima, T. **Antibiotic Substance SS8228B and its Preparation**. JP 60-047688, Ago. 26, 1983, Mar. 15, 1985.

192. ACHENBACH, H.; KARL, W. Investigations on metabolites of microorganisms. 6. structure of antibiotic aldgamycin-E. **Chemische Berichte-Recueil**, v. 108, p. 759-771, 1975.

193. CHU, M.; YARBOROUGH, R.; SCHWARTZ, J.; PATEL, M. G.; HORAN, A. C.; GULLO, V. P.; DAS, P. R.; PUAR, M. S. SCH-47554 and SCH-47555, 2 Novel antifungal antibiotics produced from a *Streptomyces* sp. **Journal of Antibiotics**, v. 46, p. 861-865, 1993.

194. SETO, H.; AKAO, H.; FURIHATA, K.; OTAKE, N. The structure of a new antibiotic, hygrolidin. **Tetrahedron Letters**, v. 23, p. 2667-2670, 1982.

195. VETLUGINA, L. A. Antibiotic roseofungin, its isolation and physicochemical properties. **Antibiotiki (Moscow)**, v. 13, p. 992-997, 1968.

196. JI, Z.; WEI, S.; ZHANG, J.; WU, W.; WANG, M. Identification of streptothricin class antibiotics in the early-stage of antibiotics screening by electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Antibiotics**, v. 61, p. 660-667, 2008.

197. GLAUSER, G.; GINDRO, K.; FRINGELI, J.; DE JOFFREY, J.-P.; RUDAZ, S.; WOLFENDER, J.-L. Differential analysis of mycoalexins in confrontation zones of grapevine fungal pathogens by ultrahigh pressure liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and capillary nuclear magnetic resonance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1127-1134, 2009.

198. MARTA, M.; GATTA, F.; POMPONI, M. Physostigmine analogs anticholinesterases - effects of the lengthening of the n-carbamic chain on the inhibition-kinetics. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1120, p. 262-266, 1992.

199. MARTA, M.; CASTELLANO, C.; OLIVERIO, A.; PAVONE, F.; PAGELLA, P. G.; BRUFANI, M.; POMPONI, M. New analogs of physostigmine - alternative drugs for alzheimers-disease. **Life Sciences**, v. 43, p. 1921-1928, 1988.

200. LUO, W. M.; YU, Q. S.; ZHAN, M.; PARRISH, D.; DESCHAMPS, J. R.; KULKARNI, S. S.; HOLLOWAY, H. W.; ALLEY, G. M.; LAHIRI, D. K.; BROSSI, A.; GREIG, N. H. Novel anticholinesterases based on the molecular skeletons of furobenzofuran and methanobenzodioxepine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 998-994, 2005.

201. TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. Shirafuji, H.; Tsuboya, S.; Harada, S. **Acetylcholinesterase inhibitors TAN-1169 and their manufacture with *Streptomyces* species.** JP 02270875 A, Apr. 12, 1990, Nov. 5, 1990.

202. GOMI, S.; AMANO, S.; SATO, E.; MIYADOH, S.; KODAMA, Y. Novel antibiotics SF2738A, SF2738B and SF2738C and their analogs produced by *Streptomyces* sp. **Journal of Antibiotics**, v. 47, p. 1385-1394, 1994.

203. SURUP, F.; WAGNER, O.; VON FRIELING, J.; SCHLEICHER, M.; OESS, S.; MUELLER, P.; GROND, S. The iromycins, a new family of pyridone metabolites from *Streptomyces* sp. I. Structure, NOS inhibitory activity, and biosynthesis. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, p. 5085-5090, 2007.

204. KIKUCHI, M.; KUMAGAI, K.; ISHIDA, N.; ITO, Y.; YAMAGUCH.T; FURUMAI, T.; OKUDA, T. Isolation, purification and properties of kikumycins A and B. **Journal of Antibiotics**, v.18, p. 243- 250, 1965.

205. HAWAS, U. W.; SHAABAN, M.; SHAABAN, K. A.; SPEITLING, M.; MAIER, A.; KELTER, G.; FIEBIG, H. H.; MEINERS, M.; HELMKE, E.; LAATSCH, H. Mansouramycins A-D, cytotoxic isoquinolinequinones from a marine *Streptomycete*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 2120-2124, 2009.

206. IRIE, K.; KAJIYAMA, S.; FUNAKI, A.; KOSHIMIZU, K.; HAYASHI, H.; ARAI, M. Biosynthesis of (-)-indolactam-V, the basic ring-structure of tumor promoters teleocidins. **Tetrahedron Letters**, v. 31, p. 101-104, 1990.

207. IRIE, K.; KAJIYAMA, S.; KOSHIMIZU, K.; HAYASHI, H.; ARAI, M. Isolation and biosynthesis of (-)-indolactam-I, a new congener of indole alkaloid tumor promoter teleocidins. **Tetrahedron Letters**, v. 31, p. 7337-7340, 1990.

208. KANAMARU, T.; SUGINO, H.; ASANO, T.; KAKINUMA, A. Studies on pepsin inhibitors produced by Actinomycetes, 2: Purification and elucidation of the structures of pepsin inhibitors produced by *Streptomyces* No.2907. **Journal of the Takeda Research Laboratories**, v. 35, p. 128-135, 1976.

209. AOYAGI, T.; YAGISAWA, Y.; KUMAGAI, M.; HAMADA, M.; MORISHIM.H; TAKEUCHI, T.; UMEZAWA, H. New Pepstatins, Pepstatins BU, PR and AC produced by *Streptomyces*. **Journal of Antibiotics**, v. 26, p. 539-541, 1973.

210. JOHDO, O.; TONE, H.; OKAMOTO, R.; YOSHIMOTO, A.; NAGANAWA, H.; SAWA, T.; TAKEUCHI, T. Microbial glycosidation of some anthracycline antibiotics by an antibiotic-negative mutant of aclarubicin producer. **Journal of Antibiotics**, v. 46, p. 1219-1231, 1993.

211. XIANG, W.-S.; WANG, J.-D.; WANG, X.-J.; ZHANG, J. Bingchamides A and B, two novel cyclic pentapeptides from the *Streptomyces bingchenggensis*: fermentation, isolation, structure elucidation and biological properties. **Journal of Antibiotics**, v. 62, p. 501-505, 2009.

212. NOZAKI, Y.; HIDA, T.; IINUMA, S.; ISHII, T.; SUDO, K.; MUROI, M.; KANAMARU, T. TAN-1120, A new anthracycline with potent angiostatic activity. **Journal of Antibiotics**, v. 46, p. 569-579, 1993.

213. KELLERSCHIERLEIN, W.; MEYER, M.; ZEECK, A.; DAMBERG, M.; MACHINEK, R.; ZAHNER, H.; LAZAR, G. Metabolites of microorganisms. 220. Isolation and structural elucidation of naphthomycins-B and naphthomycins-C. **Journal of Antibiotics**, v. 36, p. 484-492, 1983.

214. TAKEDA CHEM IND LTD. Kikinuma, A.; Kanamaru, T.; Sugino, H.; Asano, T.; Yoneda, M. **Pepsinostreptin and pepsinostreptin-p and their methylesters - protease inhibitors used to treat ulcers, hyperpepsia.** BE797862 A1, Apr. 6, 1973, Jul. 31, 1973.

215. IWASA, T.; HARADA, S.; SATO, Y. Miticidal antibiotics C-8030 B, C, D, and physostigmine produced by *Streptomyces pseudogriseolus* subsp. iriomotensis subsp. nov. **Journal of the Takeda Research Laboratories**, v. 40, p. 12-26, 1981.

216. TAKEDA CHEM IND LTD. Iwasa, K.; Harada, S.; Sato, Y. **Antibiotic C-8030 B,C,D, and E having insecticidal and miticidal activities, obtd. from *Streptomyces* strain**. JP54061101-A, Oct. 24, 1977, May 17, 1979.

217. HASKELL, T. H.; FRENCH, J. C.; BARTZ, Q. R. Paromomycin. 4. Structural studies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 81, p. 3482-3483, 1959.

218. KHAMNA, S.; YOKOTA, A.; LUMYONG, S. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, p. 649-655, 2009.

219. LAUTRU, S.; DEETH, R. J.; BAILEY, L. M.; CHALLIS, G. L. Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. **Nature Chemical Biology**, v. 1, p. 265-269, 2005.

220. BARONA-GOMEZ, F.; LAUTRU, S.; FRANCOU, F.-X.; LEBLOND, P.; PERNODET, J.-L.; CHALLIS, G. L. Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependent iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. **Microbiology**, v. 152, p. 3355-3366, 2006.

221. BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. D.; MACHADO, B. D. Siderophores: "A microorganism's answer". **Quimica Nova**, v. 25, p. 1155-1164, 2002.

222. BICKEL, H.; BOSSHARDT, R.; GAUMANN, E.; REUSSER, P.; VISCHER, E.; VOSER, W.; WETTSTEIN, A.; ZAHNER, H. Stoffwechselprodukte Von Actinomyceten. 26. Uber die isolierung und charakterisierung der ferrioxamine a-f, neuer wuchsstoffe der sideramin-gruppe. **Helvetica Chimica Acta**, v. 43, p. 2118-2128, 1960.

223. CIBA SA. Gaeumann, E.; Prelog, V.; Bickel, H.; Vischer, E. **Ferrioxamine b.** GB 963905 A, Oct. 25, 1960, Jul. 15, 1964.

224. CIBA LTD. Prelog, V.; Gaeumann, E.; Vischer, E.; Bickel, H. **Compositions containing ferrioxamine b or salts thereof**. CA 664441 A, Jun. 4, 1963.

225. FURUMAI, T.; SUZUKI, M. Studies on biosynthesis of basic 16-membered macrolide antibiotics, platenomycins .2. Production, isolation and structures of 3-0-propionyl-5-0-mycaminosyl platenolides-i and platenolides-ii, 9-dehydro demycarosyl platenomycin and demycarosyl platenomycin. **Journal of Antibiotics**, v. 28, p. 775-782, 1975.

226. TOMIYA, T.; URAMOTO, M.; ISONO, K. Isolation and structure of phosphazomycin-C. **Journal of Antibiotics**, v. 43, p. 118-121, 1990.

227. HORVATH, G.; GYIMESI, J.; MEHESFAL.Z. Structure of oleficin, a new polyenic antibiotic exhibiting antibacterial activity. **Tetrahedron Letters**, p. 3643-3648, 1973.

228. PHIPPS, R. K.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; MUNRO, M. H. G. Anthracycline derivatives from a marine-derived New Zealand Streptomycete. **Arkivoc**, p. 94-100. 2004.

229. BEUCK, S.; SCHWABE, T.; GRIMME, S.; SCHLOERER, N.; KAMBER, M.; SCHAENZER, W.; THEVIS, M. Unusual mass spectrometric dissociation pathway of protonated isoquinoline-3-carboxamides due to multiple reversible water adduct formation in the gas phase. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, p. 2034-2048, 2009.

230. COVAL, S. J.; HRADIL, C. M.; LU, H. S. M.; CLARDY, J.; SATOURI, S.; STROBEL, G. A. Pyrenoline-A And Pyrenoline-B, 2 New phytotoxins from *Pyrenophora-teres*. **Tetrahedron Letters**, v. 31, p. 2117-2120, 1990.

231. YE, Y.; JOSTEN, I.; ARNOLD, N.; STEFFAN, B.; STEGLICH, W. Isolation of a fluorone pigment from the Indian paint fungus *Echinodontium tinctorium* and *Pyrofomes albomarginatus*. **Tetrahedron**, v. 52, p. 5793-5798, 1996.

232. ARMSTRON, J. J.; TURNER, W. B., Structure of Lambertellin. **Journal of the Chemical Society**, p. 5927-5930, 1965.

233. DE, SAROJ. R.; GHORAI, S. K.; MAL, D., Synthesis and rearrangement of quinone-embedded epoxycyclopentenones: a new avenue to pyranonaphthoquinones and indenopyranones. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, p. 1598-1604, 2009.

234. SANCHEZ, J. F.; ENTWISTLE, R.; HUNG, J.-H.; YAEGASHI, J.; JAIN, S.; CHIANG, Y.-M.; WANG, C. C. C.; OAKLEY, B. R. Genome-based deletion analysis reveals the prenyl xanthone biosynthesis pathway in *Aspergillus nidulans*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, p. 4010-4017, 2011.

235. ADEBOYA, M. O.; EDWARDS, R. L.; LAESSOE, T.; MAITLAND, D. J.; WHALLEY, A. J. S. Metabolites of the higher fungi .30. Threo- and erythro-telfairic acid and 2,3-didehydrotelfairic anhydride from the fungus *Xylaria telfairii.* **Liebigs Annalen**, p. 1437-1441, 1996.

236. WAN, J.; LIN, Y.; WU, X.; ZHOU, S.; VRIJMOED, L. L. P. Avicennin A, a new isocoumarine from mangrove endophytic fungus No. 2533 from the South China Sea. **Zhongshan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban**, v. 40, p. 127-128, 2001.

237. PORTER, J. K.; BACON, C. W.; ROBBINS, J. D.; HIMMELSBACH, D. S.; HIGMAN, H. C. Indole alkaloids from *Balansia-epichloe* (We*ese)*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, p. 88-93, 1977.

238. NEUMAN, A.; GILLIERPANDRAUD, H.; LONGCHAMBON, F. Cristal structure of N-acetyl-Beta-D-mannosamine. **Acta Crystallographica Section B-Structural Science**, v. 31, p. 2628-2631, 1975.

239. REIS, A.; DOMINGUES, P.; FERRER-CORREIA, A. J. V.; DOMINGUES, M. R. M. Peptide-phospholipid cross-linking reactions: Identification of leucine enkephalin-alka(a)nal-glycerophosphatidylcholine adducts by tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 17, p. 657-660, 2006.

240. PODILA, G. K.; Rogers, L. M.; Kolattukudy, P. E., Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum-Gloeosporioides*. **Plant Physiology**, v. 103, p. 267-272, 1993.

241. MYSYAKINA, I. S.; FEOFILOVA, E. P. The role of lipids in the morphogenetic processes of mycelial fungi. **Microbiology**, v. 80, p. 297-306, 2011.

242. HAMILL, R. L.; HIGGENS, C. E.; BOAZ, H. E.; GORMAN, M. Structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia Salina*. **Tetrahedron Letters**, v. 10, p. 4255-4258, 1969.

243. BYSTROV, V. F.; KOZMIN, S. A.; MIKHALEV, II; OVCHINNI.YA; KHALILUL.KK; IVANOV, V. T. Biologically-active alkali-metal complexones. A ^{13}C-NMR study of ion-dipole interaction. **FEBS Letters**, v. 21, p. 34-38, 1972.

244. KHALED, M. A.; DAVIES, D. B. Solution and ion-complexed conformations of beauvericin determined by proton magnetic-resonance spectroscopy. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 704, p. 186-196, 1982.

245. PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. **Annual Review of Biochemistry**, v. 45, p. 501-530, 1976.

246. IVANOV, V. T.; KOGAN, G. A.; TULCHINS.VM; MIROSHNI.AV; MIKHALYO, II; EVSTRATO.AV; ZENKIN, A. A.; KOSTETSK.PV; OVCHINNI.YA; LOKSHIN, B. V. Far-infrared spectra of alkali-metal ion complexes with valinomycin, beauvericin, nonactin and perhydroantamanide in solution. **FEBS Letters**, v. 30, p. 109-204, 1973.

247. HESSELTINE, C. W.; PIDACKS, C.; WHITEHILL, A. R.; BOHONOS, N.; HUTCHINGS, B. L.; WILLIAMS, J. H. Coprogen, a new growth factor for coprophilic fungi. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, p. 1362-1362, 1952.

248. SIMIONATO, A. V. C.; DE SOUZA, G. D.; RODRIGUES, E.; GLICK, J.; VOUROS, P.; CARRILHO, E. Tandem mass spectrometry of coprogen and deferoxamine hydroxamic siderophores. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 193-199, 2006.

249. BITZER, J.; ZEECK, A. 6-deoxy-alpha-L-talopyranosides from *Streptomyces* sp. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 3661-3666, 2006.

250. NUKINA, M.; SASSA, T.; IKEDA, M.; UMEZAWA, T.; TASAKI, H. Pyriculariol, a new phytotoxic metabolite of *Pyricularia oryzae* Cavara. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 45, p. 2161-2162, 1981.

251. HOCHLOWSKI, J. E.; ANDRES, W. W.; THERIAULT, R. J.; JACKSON, M.; MCALPINE, J. B., Abbeymycin, A new anthramycin-type antibiotic produced by a Streptomycete. **Journal of Antibiotics**, v. 40, p. 145-148, 1987.

252. ZHANG, Q. L.; SCHRADER, K. K.; ELSOHLY, H. N.; TAKAMATSU, S. New cell-cell adhesion inhibitors from *Streptomyces* sp UMA-044. **Journal of Antibiotics**, v. 56, p. 673-681, 2003.

253. NEUMANN, R.; PETER, H. H. Insecticidal organophosphates - nature made them 1st. **Experientia**, v. 43, p. 1235-1237, 1987.

254. LEE, C.-H.; LIM, H.; MOON, S.; SHIN, C.; KIM, S.; KIM, B.-J.; LIM, Y. Novel anticancer agent, benzyldihydroxyoctenone, isolated from *Streptomyces* sp causes G(1) cell cycle arrest and induces apoptosis of HeLa cells. **Cancer Science**, v. 98, p. 795-802, 2007.

255. HENKEL, T.; BREIDINGMACK, S.; ZEECK, A.; GRABLEY, S.; HAMMANN, P. E.; HUTTER, K.; TILL, G.; THIERICKE, R.; WINK, J. Secondary metabolites by chemical-screening .18. narbosines, new carbohydrate metabolites from *Streptomyces*. **Liebigs Annalen Der Chemie**, p. 575-580, 1991.

256. TAKEUCHI, M.; INUKAI, M.; ENOKITA, R.; IWADO, S.; TAKAHASHI, S.; ARAI, M. Malioxamycin, a new antibiotic with spheroplast-forming activity .1. producing organism, fermentation, isolation and characterization. **Journal of Antibiotics**, v. 33, p. 1213-1219, 1980.

257. KAKEN CHEMICAL CO., LTD. Kado, M.; Akasaki, K.; Shirado, S.; Kiyono, A. **Manufacture of a new antibiotic morimycin**. JP 70000955 B, Jun. 8, 1966, Jan. 13, 1970.

258. HAMADA, M.; TAKEUCHI, T.; KONDO, S.; IKEDA, Y.; NAGANAWA, H.; MAEDA, K.; OKAMI, Y.; UMEZAWA, H. A new antibiotic, negamycin. **Journal of Antibiotics**, v. 23, p. 170-171, 1970.

259. IMAI, S.; FUJIOKA, K.; FURIHATA, K.; SETO, H. Studies on cell-growth stimulating substances of low-molecular-weight .4. misakimycin, a mammalian-cell growth-stimulating substance produced by *Streptomyces misakiensis*. **Journal of Antibiotics**, v. 46, p. 1323-1325, 1993.

260. WANG, G. Y. S.; ABRELL, L. M.; AVELAR, A.; BORGESON, B. M.; CREWS, P. New hirsutane based sesquiterpenes from salt water cultures of a marine sponge-derived fungus and the terrestrial fungus *Coriolus consors*. **Tetrahedron**, v. 54, p. 7335-7342, 1998.

261. KLINGNER, A.; HUNDESHAGEN, B.; KERNEBECK, H.; BOTHE, H. Localization of the yellow pigment formed in roots of gramineous plants colonized by arbuscular fungi. **Protoplasma**, v. 185, p. 50-57, 1995.

262. STERNER, O.; ANKE, T.; SHELDRICK, W. S.; STEGLICH, W. New sterpurane and isolactarane sesquiterpenes from the fungus *Merulius-tremellosus*. **Tetrahedron**, v. 46, p. 2389-2400, 1990.

263. AYER, W. A.; MCCASKILL, R. H.; REFFSTRUP, T. Metabolites of birds' nest fungi. Part 17. Nidulol and nidulone, novel sesquiterpenes from some bird's nest fungi. **Revista Lationamericana de Química**, v. 12, p. 118-120, 1981.

264. ESQUENAZI, E.; DALY, M.; BAHRAINWALA, T.; GERWICK, W. H.; DORRESTEIN, P. C. Ion mobility mass spectrometry enables the efficient detection and identification of halogenated natural products from cyanobacteria with minimal sample preparation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 6639-6644, 2011.

265. WANG, H.-Y.; CHU, X.; ZHAO, Z.-X.; HE, X.-S.; GUO, Y.-L. Analysis of low molecular weight compounds by MALDI-FTICR-MS. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1166-1179, 2011.

266. WATROUS, J. D.; ALEXANDROV, T.; DORRESTEIN, P. C. The evolving field of imaging mass spectrometry and its impact on future biological research. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 46, p. 209-222, 2011.

267. WATROUS, J.; HENDRICKS, N.; MEEHAN, M.; DORRESTEIN, P. C. Capturing bacterial metabolic exchange using thin film desorption electrospray ionization-imaging mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 1598-1600, 2010.

268. SHAABAN, M. Bioactive secondary metabolites from marine and terrestrial bacteria: isoquinolinequinones, bacterial compounds with a novel pharmacophor. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten., Georg-August-Universität zu Göttingen, 2004.

269. WATROUS, J.; ROACH, P.; ALEXANDROV, T.; HEATH, B. S.; YANG, J. Y.; KERSTEN, R. D.; VAN DER VOORT, M.; POGLIANO, K.; GROSS, H.; RAAIJMAKERS, J. M.; MOORE, B. S.; LASKIN, J.; BANDEIRA, N.; DORRESTEIN, P. C. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, p. E1743-E1752, 2012.

270. BROSSI, A. Bioactive alkaloids. 4. Results of recent investigations with colchicine and physostigmine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, p. 2311-2319, 1990.