UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Cultura mista, manipulação química e genética de
micro-organismos: estratégias para a diversificação do
metabolismo secundário**

Fernanda Oliveira das Chagas

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 24/04/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Cultura mista, manipulação química e genética de
micro-organismos: estratégias para a diversificação do
metabolismo secundário**

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientada: Fernanda Oliveira das Chagas

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Co-orientador: Prof. Dr. Eric W. Schmidt

Ribeirão Preto
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Chagas, Fernanda Oliveira das
Cultura mista, manipulação química e genética de micro-organismos: estratégias para a diversificação do metabolismo secundário. Ribeirão Preto, 2014.
339p. : il. ; 30 cm.

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

Orientadora: Pupo, Mônica Tallarico.

Co-orientador: Schmidt, Eric W.

1. Biossíntese de produtos naturais. 2. Culturas mistas de endofíticos. 3. Engenharia genética de fungos filamentosos. 4. Metabolismo secundário. 5. Modulação química e epigenética.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Oliveira das Chagas

Cultura mista, manipulação química e genética de micro-organismos: estratégias para a diversificação do metabolismo secundário

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

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientadora: Profa. Dra. Mônica T. Pupo
Co-orientador: Prof. Dr. Eric W. Schmidt

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha família, por ser o alicerce da minha vida, o amor incondicional e apoio sempre presente.

Aos meus amigos especiais, que encontrei ao longo da jornada, e que tornaram minha vida mais feliz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a razão de tudo e a verdade incontestável;

À minha orientadora pela oportunidade, por sua disponibilidade e dedicação, e ao meu co-orientador, por me permitir enfrentar tantos novos desafios;

Aos meus professores e às pessoas que formal ou informalmente me transmitiram valiosos conhecimentos que auxiliaram na minha formação;

Aos colaboradores pela disponibilização de laboratórios e equipamentos, aos técnicos, que gentilmente me auxiliaram, e todas as pessoas envolvidas direta ou indiretamente na realização desse trabalho;

Aos colegas de trabalho do LQMo, e de outros laboratórios, pela ajuda e discussões valiosas;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) e à Universidade de São Paulo (USP);

Ao College of Pharmacy-University of Utah, Salt Lake City, Estados Unidos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado concedida e por financiar sua realização no Brasil;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado sanduiche e por financiar a realização do estágio de doutoramento nos Estados Unidos.

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas.....	xi
Lista de anexos.....	xiii
Lista de símbolos, siglas e abreviaturas.....	xviii
1 INTRODUÇÃO GERAL - Desafios na descoberta de produtos naturais.....	1
2 CAPÍTULO I - Novas estratégias para acessar produtos naturais microbianos: culturas mistas de endofíticos, modulação química e epigenética de vias biossintéticas.....	3
2.1 INTRODUÇÃO	3
2.1.1 Regulação e remodelagem epigenética.....	3
2.1.2 Inibidores biossintéticos e eliciadores químicos.....	10
2.1.3 Interações microbianas e culturas mistas.....	13
2.2 OBJETIVOS	21
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	22
2.3.1 Material.....	22
2.3.1.1 Solventes, reagentes, meios de cultura, fases estacionárias para cromatografia e vidrarias.....	22
2.3.1.2 Equipamentos.....	23
2.3.2 Métodos.....	23
2.3.2.1 Seleção e identificação dos micro-organismos.....	23
2.3.2.1.1 Identificação dos fungos por sequenciamento genético da região ITS do rDNA.....	24
2.3.2.1.1.1 Obtenção da massa micelial e extração do DNA fúngico.....	24
2.3.2.1.1.2 Amplificação e purificação da região do DNA específica para a identificação.....	25
2.3.2.1.1.3 Sequenciamento do DNA amplificado.....	26
2.3.2.2 Produção e extração dos metabólitos secundários e/ou enzimas.....	27
2.3.2.2.1 Modulação química e epigenética.....	27
2.3.2.2.1.1 Seleção do meio de cultivo fermentativo.....	27

2.3.2.2.1.2 Determinação da toxicidade dos diferentes moduladores contra o fungo <i>A. tenuissima</i> SS77.....	28
2.3.2.2.1.3 Efeito da adição de moduladores em cultivos em meio líquido.....	29
2.3.2.2.1.3.1 Cultura controle - sem adição de modulador.....	29
2.3.2.2.1.3.2 Cultura sob modulação química ou epigenética.....	30
2.3.2.2.1.4 Alteração das condições de cultivo em meio líquido para moduladores potencialmente promissores.....	30
2.3.2.2.1.5 Efeito da adição do modulador 5-azacitidina em cultivos em meio semi-sólido.....	31
2.3.2.2.1.5.1 Cultura controle - sem adição de modulador.....	31
2.3.2.2.1.5.2 Cultura sob modulação epigenética.....	31
2.3.2.2.1.6 Efeito da adição de moduladores em cultivos utilizando diferentes meios semi-sólidos e extraídos em micro-escala com diferentes misturas de solventes.....	32
2.3.2.2.1.6.1 Cultura controle - sem adição de modulador.....	32
2.3.2.2.1.6.2 Cultura sob modulação química ou epigenética.....	33
2.3.2.2.1.7 Obtenção de metabólitos secundários a partir de culturas mistas do fungo <i>A. tenuissima</i> SS77 com <i>N. sphaerica</i> SS67.....	33
2.3.2.2.2 Interações microbianas entre actinobactérias e fungos endofíticos..	35
2.3.2.2.2.1 Obtenção de metabólitos secundários em meio semi-sólido – adição da actinobactéria previamente à adição do fungo na cultura mista.....	35
2.3.2.2.2.1.1 Culturas simples dos fungos e das actinobactérias.....	35
2.3.2.2.2.1.2 Culturas mistas de fungos com actinobactérias.....	35
2.3.2.2.2.2 Obtenção de enzimas a partir de culturas simples e mistas em meio semi-sólido.....	36
2.3.2.2.2.2.1 Teste para verificar a presença de enzimas – amilase, pectinase e protease.....	37
2.3.2.2.2.3 Obtenção de metabólitos secundários em meio líquido – adição do fungo previamente à adição da actinobactéria na cultura mista.....	38
2.3.2.2.2.3.1 Culturas simples dos fungos e das actinobactérias.....	38
2.3.2.2.2.3.2 Culturas mistas de fungos com actinobactérias.....	38
2.3.2.3 Triagem química dos extratos brutos.....	39
2.3.2.4 Triagem biológica dos extratos brutos – atividade citotóxica em células tumorais.....	39
2.3.2.5 Seleção de extratos promissores, cultivos ampliados e alterações nas condições de cultivo.....	40

2.3.2.5.1 Cultivos ampliados em meio líquido - adição do fungo previamente à adição da actinobactéria na cultura mista.....	40
2.3.2.5.1.1 Obtenção de metabólitos secundários da cultura simples do fungo FLe6.....	40
2.3.2.5.1.2 Obtenção de metabólitos secundários da cultura mista do fungo FLe6 com actinobactéria RLe7.....	41
2.3.2.5.2 Cultivos ampliados em meio líquido - adição simultânea dos micro-organismos em cultura mista.....	41
2.3.2.5.2.1 Obtenção de metabólitos secundários de cultura simples do fungo FLe6 e da actinobactéria RLe7.....	41
2.3.2.5.2.2 Obtenção de metabólitos secundários de cultura mista do fungo FLe6 com actinobactéria RLe7.....	42
2.3.2.5.3 Obtenção de metabólitos secundários em meio sólido - adição simultânea dos micro-organismos em cultura mista.....	43
2.3.2.5.3.1 Cultura simples do fungo FLe6.....	43
2.3.2.5.3.2 Cultura mista do fungo FLe6 com actinobactéria RLe7.....	43
2.3.2.5.4 Obtenção de metabólitos secundários em meio sólido - adição do fungo previamente à adição da actinobactéria na cultura mista.....	44
2.3.2.5.4.1 Culturas simples do fungo FLe6 e da actinobactérias RLe7.....	44
2.3.2.5.4.2 Cultura mista do fungo FLe6 com a actinobactérias RLe7.....	45
2.3.2.6 Fracionamento dos extratos e análise das frações obtidas.....	45
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
2.4.1 Identificação dos micro-organismos por sequenciamento genético.....	46
2.4.2 Modulação química e epigenética.....	49
2.4.2.1 Seleção do meio de cultivo fermentativo.....	49
2.4.2.2 Determinação da toxicidade dos diferentes moduladores contra o fungo <i>A. tenuissima</i> SS77.....	51
2.4.2.3 Avaliação do efeito da adição de moduladores em cultivos em meio líquido.....	53
2.4.2.4 Avaliação do efeito da adição de moduladores em cultivos em meio semi-sólido.....	58
2.4.2.5 Alteração nas condições de cultivo líquido para moduladores potencialmente promissores.....	59
2.4.2.6 Efeito da adição de moduladores em cultivos utilizando diferentes meios semi-sólidos e extraídos em micro-escala com diferentes misturas de solventes.....	63

2.4.2.7 Determinação estrutural dos policetídeos isolados do fungo <i>A. tenuissima</i> SS77.....	75
2.4.3 Interações microbianas.....	92
2.4.3.1 Avaliação da produção de metabólitos secundários pelas culturas simples e mistas em meio semi-sólido.....	92
2.4.3.2 Avaliação da produção de enzimas pelas culturas simples e mistas em meio semi-sólido.....	96
2.4.3.3 Seleção de algumas linhagens para serem cultivadas em meio líquido..	98
2.4.3.4 Avaliação do potencial para a produção de metabólitos secundários dos micro-organismos cultivados em culturas simples e mistas em meio líquido.....	104
2.4.3.4.1 Primeira seleção envolvendo todos os micro-organismos.....	104
2.4.3.4.2 Segunda seleção envolvendo todos os micro-organismos.....	107
2.4.3.5 Ampliação do cultivo simples do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 e do cultivo misto desse fungo com a actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7 em meio líquido - adição do fungo previamente à adição da actinobactéria na cultura mista.....	109
2.4.3.5.1 Fracionamento do extrato da cultura mista de <i>S. albospinus</i> RLe7 com <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 em meio líquido e determinação estrutural das substâncias presentes nas frações.....	111
2.4.3.5.2 Correlação das substâncias isoladas e identificadas aos perfis cromatográficos dos extratos brutos das culturas simples e mistas de <i>S. albospinus</i> RLe7 com <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 em meio líquido.....	158
2.4.3.6 Cultivo simples do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 e cultivo misto desse fungo com a actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7 em meio sólido de arroz parboilizado enriquecido com meio ISP-2 líquido - adição simultânea dos micro-organismos em cultura mista.....	160
2.4.3.6.1 Fracionamento do extrato da cultura simples de <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 crescido em meio sólido e determinação estrutural das substâncias presentes nas frações.....	165
2.4.3.6.2 Fracionamento do extrato da cultura mista do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 com actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7 em meio sólido e determinação estrutural das substâncias presentes nas frações.....	170
2.4.3.7 Cultivo simples do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 e da actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7 e do cultivo misto desses micro-organismos em meio líquido - adição simultânea dos micro-organismos em cultura mista.....	183
2.4.3.8 Cultivo simples do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 e da actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7 e do cultivo misto desses micro-organismos em meio sólido - adição do fungo previamente à adição da actinobactéria na cultura mista.....	189

2.4.3.8.1 Fracionamento do extrato da cultura simples de <i>S. albospinus</i> RLe7 crescida em meio sólido e determinação estrutural das substâncias presentes nas frações.....	193
2.5 CONCLUSÕES.....	206
3 CAPÍTULO II - Estudo genômico da biossíntese de produtos naturais em fungos filamentosos.....	208
3.1 INTRODUÇÃO.....	208
3.1.1 Produtos naturais de fungos filamentosos.....	208
3.1.2 Maquinaria genética para a biossíntese de produtos naturais em fungos.....	209
3.1.3 Biossíntese do composto equisetina pelo fungo <i>Fusarium heterosporum</i>	210
3.2 OBJETIVOS.....	212
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	213
3.3.1 Material	213
3.3.1.1 Reagentes e equipamentos utilizados nos experimentos envolvendo biologia molecular e genética.....	213
3.3.1.2 Reagentes e equipamentos utilizados nos experimentos para obtenção de extratos brutos e análises químicas.....	215
3.3.2 Métodos.....	215
3.3.2.1 Planejamento das construções genéticas realizadas.....	216
3.3.2.2 Vetores utilizados para a hibridização.....	216
3.3.2.3 Escolha do gene <i>pks</i> fúngico utilizado nos estudos de hibridização e desenho de <i>primers</i> para amplificar diferentes regiões desse gene.....	218
3.3.2.4 Obtenção do DNA fúngico – extração de DNA de <i>A. fumigatus</i>	219
3.3.2.5 Amplificação das diferentes regiões do gene <i>pks</i> através de PCR e extração dos fragmentos de DNA obtidos.....	220
3.3.2.6 Recombinação genética em levedura – método de transformação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> usando lítio em altas concentrações.....	221
3.3.2.7 Isolamento de plasmídeo de levedura <i>S. cerevisiae</i>	223
3.3.2.8 Transformação de bactéria por eletroporação – transformação de <i>Escherichia coli</i> auxiliada por pulso elétrico.....	225
3.3.2.8.1 Preparação de células eletrocompetentes.....	225
3.3.2.9 Transformação química de bactéria – transformação de <i>E. coli</i> auxiliada por compostos químicos.....	226
3.3.2.9.1 Preparação de células quimicamente competentes.....	227

3.3.2.10 Isolamento de plasmídeo de bactéria <i>E. coli</i>	227
3.3.2.11 Recombinação genética em fungo – transformação de <i>F. heterosporum</i> pelo método de formação de protoplastos.....	228
3.3.2.12 Cultivo de linhagens de <i>F. heterosporum</i> transformadas em farelo de milho e obtenção dos extratos brutos.....	230
3.3.2.13.1 Fracionamento dos extratos brutos das linhagens transformadas..	231
3.3.2.14 Análise química dos extratos brutos e das frações obtidas.....	231
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	232
3.4.2 Considerações gerais de processos: planejamento das construções, construção de vetores, escolha de genes para fusão no vetor, desenho de <i>primers</i> , extração de DNA e amplificação de DNA por PCR.....	232
3.4.3 <i>Primers</i> utilizados nos vetores <i>deg2</i> e <i>deg3</i>	236
3.4.4 Recombinação genética em <i>S. cerevisiae</i> e extração de plasmídeos de leveduras.....	237
3.4.5 Transformação de <i>E. coli</i> e isolamento de plasmídeo de bactéria.....	240
3.4.6 Recombinação genética em fungo <i>F. heterosporum</i>	243
3.4.7 Seleção de construções no vetor <i>deg3</i> em detrimento ao <i>deg2</i>	246
3.4.8 Cultivo das linhagens de <i>F. heterosporum</i> transformadas, obtenção e análise dos extratos brutos.	247
3.4.9 Possíveis causas para a não observação de um novo composto nas linhagens geneticamente transformadas.....	255
3.5 CONCLUSÕES.....	259
4 CONCLUSÃO GERAL.....	260
5 REFERÊNCIAS.....	261
ANEXOS.....	287

RESUMO

CHAGAS, F. O. **Cultura mista, manipulação química e genética de micro-organismos: estratégias para a diversificação do metabolismo secundário.** 2014. 339p. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Recentes estudos genômicos têm mostrado que vários fungos e bactérias possuem um potencial biossintético superior à quantidade de metabólitos secundários já isolados desses micro-organismos. A descoberta de produtos naturais inéditos e bioativos é limitada pela impossibilidade dos micro-organismos expressarem todas as suas rotas biossintéticas em laboratório. Assim, estratégias alternativas para induzir a produção de produtos naturais microbianos são necessárias. A utilização de culturas mistas de micro-organismos é uma estratégia que vem sendo recentemente utilizada, na tentativa de mimetizar condições mais naturais de crescimento. Além disso, a adição de moduladores químicos e epigenéticos às culturas microbianas também pode potencialmente estimular a produção de compostos de interesse, seja por ativar mecanismos celulares em resposta à condição de estresse, ou por alterar a taxa de transcrição de certos genes, em função de mudanças no grau de enovelamento da cromatina. Alternativamente, a indução de certos genes, e até mesmo a diversificação do metabolismo secundário, podem ser conseguidos através de engenharia genética, pela manipulação direta de genes de interesse. A linhagem endofítica *Alternaria tenuissima* SS77, selecionada para os experimentos de modulação química e epigenética, teve seu metabolismo secundário alterado após o tratamento com diferentes moduladores. Provavelmente, o efeito observado ocorreu em função de uma eliciação inespecífica dos diferentes moduladores. Além disso, o cultivo misto desse fungo com o fungo endofítico *Nigrospora sphaerica* SS67, isolada da mesma planta hospedeira (*Smallanthus sonchifolius*), levou ao isolamento de dois novos policetídeos, da classe das perilenequinonas, juntamente com um já relatado na literatura científica. Para realizar os cultivos microbianos mistos, envolvendo uma linhagem bacteriana e uma fúngica, três linhagens de actinobactérias e cinco de fungos, todos endofíticos da planta *Lychnophora ericoides*, foram selecionadas. Alterações no perfil metabólico da cultura mista de *Phomopsis* sp FLe6 com *Streptomyces albospinus* RLe7 foram as mais evidentes e por isso a maioria das investigações foram focadas nessa cultura mista. Várias condições de cultivo foram testadas e diferentes resultados foram obtidos. Em alguns casos, o desenvolvimento da linhagem fúngica foi inibido pela bacteriana, e em outros, foi observado o inverso. Da mesma forma, houve acentuada inibição da produção de alguns metabólitos secundários na presença da linhagem desafiadora, mas também foi verificada a eliciação de outros. Os extratos das culturas simples desses micro-organismos também apresentaram relativas alterações nos perfis metabólicos em função das condições de cultivo. Os metabólitos produzidos pelo fungo *Phomopsis* sp FLe6 e pela actinobactéria *Streptomyces albospinus* RLe7 foram isolados e caracterizados. Os resultados mostram que as interações entre os micro-organismos endofíticos são bastante complexas, estando sujeitas a ação de diversos fatores externos que muitas vezes não podem ser pré-determinados. Por isso, estabelecer um cultivo misto adequado, do ponto de vista da eliciação da produção de metabólitos secundários, pode requerer uma série de tentativas. Ainda assim, os resultados almejados podem ser conseguidos utilizando essa estratégia. Diferentemente das linhagens endofíticas, manipuladas quimicamente através de diferentes estratégias, a linhagem sequenciada de *Fusarium heterosporum* ATCC 74349, foi manipulada geneticamente para a construção de um gene biossintético híbrido *pks-nrps*, contendo a porção *nrps* do gene híbrido da equisetina e um *pks* críptico de *Aspergillus fumigatus*. Era esperado que a linhagem hibridizada fosse capaz de produzir o metabólito secundário geneticamente planejado, entretanto, após seu cultivo, esse produto não foi detectado nos extratos, e as possíveis razões são discutidas. Ainda que os resultados esperados não tenham sido obtidos, estudos que contribuam para a ampliação do entendimento das megassintases fúngicas são de extrema valia.

Palavras-chave: biossíntese de produtos naturais, culturas mistas de endofíticos, engenharia genética de fungos filamentosos, metabolismo secundário, modulação química e epigenética.

ABSTRACT

CHAGAS, F. O. **Mixed culture, chemical and genetic manipulation of microorganisms: strategies for diversifying the secondary metabolism.** 2014. 339p. Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Recently, genetic studies have shown that several bacteria and fungi hold a greater biosynthetic potential than the amount of secondary metabolites isolated from these microorganisms. The discovery of novel bioactive natural products is limited by the inability of microorganisms to express all their biosynthetic pathways in laboratory conditions. Therefore, alternative strategies to induce the production of microbial natural products are required. Mixed cultures of microorganisms are a strategy that has been used to mimic more natural conditions of growth. Furthermore, the addition of chemical and epigenetic modulators to the microbial cultures can also stimulate the production of compounds by activating cellular mechanisms in response to stress conditions or by changing the transcription rate of certain genes, due to changes in the chromatin folding. Alternatively, the induction of some genes, and even the diversification of secondary metabolism, can be achieved by genetic engineering, by manipulating genes of interest. The endophytic strain *Alternaria tenuissima* SS77, which was selected for the experiments of chemical and epigenetic modulation, had changed its secondary metabolism after treatment with different modulators. Probably, the observed effect was due to a nonspecific elicitation of those modulators. Moreover, the mixed cultures of this fungus with the endophytic fungus *Nigrospora sphaerica* SS67, isolated from the same host plant (*Smallanthus sonchifolius*), led to the isolation of two new polyketides, belonging to perylene quinone class, along with another one already reported in the scientific literature. Three strains of actinobacteria and five fungi, all endophytes of *Lychnophora ericoides*, were selected to grow in microbial mixed cultures comprising one bacteria and one fungus. Changes in the metabolic profile of the mixed culture of *Phomopsis* sp. FLe6 with *Streptomyces albospinus* RLe7 were the most obvious, and then further studies were focused on this mixed culture. Many culture conditions were analyzed and different results were obtained. In some cases, the development of the fungal strain was inhibited by bacteria, and in other cases was observed the opposite. Similarly, there was a remarkable inhibition of the production of certain secondary metabolites in the presence of the challenging strain, but the eliciting of others was also observed. The extracts of the single cultures of these microorganisms also showed changes in metabolic profiles due to culture conditions. The metabolites produced by the fungus *Phomopsis* sp. FLe6 and the actinobacteria *S. albospinus* RLe7 were isolated and characterized. The results show that interactions between endophytic microorganisms are quite complex and are influenced by various external factors that often can not be previously determined. Therefore, establishing a suitable mixed culture to elicit the production of secondary metabolites may require some attempts. Still, the expected results can be achieved using this strategy. Unlike the endophytic strains, that was chemically manipulated by different strategies, the sequenced strain *Fusarium heterosporum* ATCC 74349 was genetically manipulated to construct a hybrid PKS-NRPS biosynthetic gene containing the NRPS portion of the hybrid gene of equisetin and a cryptic PKS gene of *Aspergillus fumigatus*. It was expected that hybridized strain could be able to produce the secondary metabolite genetically planned, however, after its cultivation, this product was not detected in any extracts, and some possible reasons are discussed. Although the expected results have not been obtained, studies that contribute to increasing the understanding of fungal megasynthases are extremely valuable.

Keywords: biosynthesis of natural products, mixed culture of endophytes, genetic engineering of filamentous fungi, secondary metabolism, chemical and epigenetic modulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Compostos inéditos produzidos em culturas de micro-organismos tratados com moduladores epigenéticos.....	9
Figura 4. Moduladores químicos e epigenéticos utilizados nos experimentos de modulação.....	12
Figura 5. Policetídeos isolados do fungo <i>A. tenuissima</i> SS77.....	18
Figura 4. Moduladores químicos e epigenéticos utilizados nos experimentos de modulação.....	29
Figura 5. Policetídeos isolados do fungo <i>A. tenuissima</i> SS77.....	49
Figura 6. Cromatogramas dos extratos brutos obtidos em meio líquido Czapek, extrato de malte e PDB.....	51
Figura 7. Placa de 96 poços utilizada para determinar o MIC dos moduladores químicos e epigenéticos.....	52
Figura 8. Análise por CCDA dos extratos brutos obtidos após tratamento do fungo <i>A. tenuissima</i> com diferentes moduladores químicos e epigenéticos.....	54
Figura 9. Análise por CCDA dos extratos brutos obtidos após tratamento do fungo <i>A. tenuissima</i> com lovastatina e jasmonato de metila.....	55
Figura 10. Cromatogramas dos extratos brutos obtidos após a adição de lovastatina ao meio líquido e dos extratos controle contendo apenas o fungo, no qual não foi adicionado modulador.....	55
Figura 11. Cromatogramas dos extratos brutos obtidos após a adição de hidralazina ao meio líquido e dos extratos controle contendo apenas o fungo.....	56
Figura 12. Cromatogramas do extrato bruto obtido após a adição de hidralazina ao meio líquido e do padrão de hidralazina.....	56
Figura 13. Cromatogramas do extrato bruto obtido após a adição de 5-azacitidina ao meio semi-sólido e do extrato controle contendo apenas o fungo.....	59
Figura 14. Cromatogramas do extrato bruto obtido após a adição de 50 μ M de hidralazina ao meio de cultivo, do extrato controle contendo apenas o fungo, e do extrato controle contendo apenas meio de cultura e hidralazina.....	61
Figura 15. Cromatogramas do extrato bruto obtido após a adição de 500 μ M de lovastatina ao meio de cultivo e do extrato controle contendo apenas o fungo.....	62
Figura 16. Cromatogramas do extrato bruto obtido após a adição de 100 μ M de lovastatina ao meio de cultivo e do extrato controle contendo apenas o fungo.....	62

Figura 17. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com procaína em meio de extrato de malte e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO, ambos extraídos com acetonitrila:água 1:1.....	65
Figura 18. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com ácido valpróico em meio de extrato de malte e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO, extraídos com acetonitrila:água 1:1.....	65
Figura 19. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com 5-azacitidina em meio de extrato de malte e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO, extraídos com isopropanol:acetato de etila 1:1.....	66
Figura 20. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com 5-azacitidina em meio PDA e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO, extraídos com acetonitrila:água 1:1.....	67
Figura 21. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com ácido suberoidroxâmico em meio de extrato de malte e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO, extraídos com acetonitrila:água 1:1.....	67
Figura 22. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com ácido suberoidroxâmico em meio de extrato de malte e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO, extraídos com isopropanol:acetato de etila 1:1.....	68
Figura 23. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com butirato de sódio em meio de extrato de malte e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO, extraídos com isopropanol:acetato de etila 1:1.....	69
Figura 24. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com lovastatina em meio de extrato de malte e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO, ambos extraídos com isopropanol:acetato de etila 1:1.....	70
Figura 25. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com iodoacetamida em meio de extrato de malte e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO, extraídos com isopropanol:acetato de etila 1:1.....	70
Figura 26. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com actidione em meio PDA e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO, extraídos com isopropanol:acetato de etila 1:1.....	71
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 563.....	78
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 563.....	79

Figura 29. Estrutura do composto estenfitriol e deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos segundo dados de RMN de ^1H , gHMQC e gHMBC da fração 563 adquiridos em CD_3OD e em CDCl_3	81
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 5610.....	84
Figura 31. Estrutura do composto inédito estenfitriol mono-metil éter e deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos segundo dados de RMN de ^1H , gHMQC e gHMBC da fração 5610 adquiridos em CDCl_3	85
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 551.....	88
Figura 33. Estrutura do composto inédito 1,4,9-trihidróxi-1,2-dihidroperilene-3,10-diona e deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos segundo dados de RMN de ^1H , gHMQC e gHMBC da fração 551 adquiridos em CDCl_3	90
Figura 34. Espectros de RMN de ^1H (500 MHz) da fração 5610, da fração 551 e do composto alterperilenol.....	91
Figura 35. Cultura simples das actinobactérias endofíticas <i>Streptomyces albospinus</i> RLe7, <i>Kitasatospora nipponensis</i> RLe10 e <i>Streptomyces albospinus</i> RLe12 cultivadas em meio semi-sólido.....	92
Figura 36. Cultura simples dos fungos endofíticos <i>Phomopsis</i> sp. FLe3, <i>Phomopsis</i> sp. FLe6, <i>Hyphodermella corrugata</i> FLe8.2, <i>Hyphodermella rosae</i> FLe11 e <i>Penicillium</i> sp. RLe14 cultivados em meio semi-sólido.....	92
Figura 37. Cultura mista da actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7 com os fungos <i>Phomopsis</i> sp. FLe3, <i>Phomopsis</i> sp. FLe6, <i>H. corrugata</i> FLe8.2, <i>H. rosae</i> FLe11 e <i>Penicillium</i> sp. RLe14 em meio semi-sólido.....	93
Figura 38. Cultura mista da actinobactéria <i>K. nipponensis</i> RLe10 com os fungos <i>Phomopsis</i> sp. FLe3, <i>Phomopsis</i> sp. FLe6, <i>H. corrugata</i> FLe8.2, <i>H. rosae</i> FLe11 e <i>Penicillium</i> sp. RLe14 em meio semi-sólido.....	93
Figura 39. Cultura mista da actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe12 com os fungos <i>Phomopsis</i> sp. FLe3, <i>Phomopsis</i> sp. FLe6, <i>H. corrugata</i> FLe8.2, <i>H. rosae</i> FLe11 e <i>Penicillium</i> sp. RLe14 em meio semi-sólido.....	93
Figura 40. Análise por CCDA dos extratos brutos das culturas simples e mistas do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 e actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7.....	100
Figura 41. Cromatogramas dos extratos brutos das culturas simples líquidas da actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7 e do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe3, da cultura mista envolvendo esses dois micro-organismos e do controle contendo apenas o meio de cultivo.....	100
Figura 42. Cromatogramas dos extratos brutos das culturas simples líquidas da actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7 e do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6, da cultura mista envolvendo esses dois micro-organismos e do controle contendo apenas o meio de cultivo.....	101

Figura 43. Cromatogramas dos extratos brutos das culturas líquidas simples da actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7 e do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6, e da cultura mista envolvendo esses dois micro-organismos.....	101
Figura 44. Cromatogramas dos extratos brutos das culturas semi-sólidas simples do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 e da actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7, da cultura mista contendo a colônia do fungo e da cultura mista contendo a colônia da actinobactéria juntamente com a zona de inibição...	102
Figura 45. Cromatogramas dos extratos brutos das culturas semi-sólidas simples do fungo FLe3 e da actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7, da cultura mista contendo a colônia do fungo e da cultura mista contendo a colônia da actinobactéria juntamente com a zona de inibição.....	102
Figura 46. Culturas simples e mista da actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7 e do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 em meio líquido.....	103
Figura 47. Cromatogramas dos extratos controle do cultivo com algumas linhagens em meio líquido e do cultivo com todas as linhagens em meio líquido.....	105
Figura 48. Cromatogramas dos extratos da cultura simples da actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7, da cultura simples do fungo <i>C. boninense</i> FLe 8.1 e da cultura mista envolvendo ambos micro-organismos.....	108
Figura 48. Fluxograma do fracionamento do extrato bruto 1aL-A7F6ac.....	114
Figura 49. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-7-11.....	116
Figura 50. Espectro de massas do pico com tr de 17,375 min obtido após análise da fração 1aL-A7F6ac-7-11 em GC-MS, e espectro do composto bis-2-etil-hexil-ftalato constante na biblioteca digital do aparelho.....	116
Figura 51. Estrutura do composto 4 e deslocamentos químicos dos hidrogênios segundo dados obtidos do RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-7-11.....	117
Figura 52. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-6-3.....	118
Figura 53. Estrutura do composto 5 e deslocamentos químicos dos hidrogênios segundo dados obtidos do RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-6-3.....	118
Figura 54. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-7-5.....	120
Figura 55. Espectro de GC da fração 1aL-A7F6ac-7-5. Os picos com tr de 8,518, 10,343 e 28,677 min correspondem, respectivamente, aos compostos tirosol, estireno-glicol e um ftalato.....	120
Figura 56. Estrutura do composto 6 e deslocamentos químicos dos hidrogênios segundo dados obtidos do RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-7-5.....	120
Figura 57. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-6-5.....	121

Figura 58. Estrutura do composto 7 e deslocamentos químicos dos hidrogênios segundo dados obtidos do RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-6-5.....	122
Figura 59. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-4-4.....	122
Figura 60. Estrutura do composto 8 e deslocamentos químicos dos hidrogênios segundo dados obtidos do RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-4-4.....	123
Figura 61. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-9-4-2.....	124
Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-9-4-2.....	124
Figura 63. Espectro de GC da fração 1aL-A7F6ac-9-4-2 e espectro de massas do pico com tempo de retenção de 7,635 min.....	125
Figura 64. Estrutura do composto 9 e deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos segundo dados obtidos do RMN de ^1H e de ^{13}C da fração 1aL-A7F6ac-9-4-2.....	124
Figura 65. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 1aL-A7F6ac-9-4-5.....	129
Figura 66. Estrutura do composto 10 e deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos segundo dados obtidos do RMN de ^1H , gHMQC e gHMBC da fração 1aL-A7F6ac-9-4-5.....	130
Figura 67. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-9-4-2.....	133
Figura 68. Possíveis fragmentações da citocalasina H responsáveis por gerar as m/z observadas em MS.....	134
Figura 69. Estruturas das citocalasinas de massa molecular 393 u isoladas de <i>Phomopsis</i> sp. relatadas na literatura científica.....	134
Figura 70. Estrutura de um precursor geral das citocalasinas.....	134
Figura 71. Estruturas das citocalasinas de massa molecular 351 u isoladas de <i>Phomopsis</i> sp. relatadas na literatura científica.....	136
Figura 72. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 1aL-A7F6ac-12-6.....	138
Figura 73. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1.....	139
Figura 74. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1.....	140
Figura 75. Espectro de GC da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1.....	142
Figura 76. Espectro de massas do pico com tr de 12,674 min obtido após análise da fração 1aL-A7F6ac-7-11 em GC-MS, e espectro da uracila, constante na biblioteca digital do aparelho.....	143
Figura 77. Espectro de massas do pico com tr de 8,339 min obtido após análise da fração 1aL-A7F6ac-7-11 em GC-MS.....	143

Figura 78. Estruturas químicas dos compostos 12 e 13 presentes na fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1, mostrando os deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos segundo dados obtidos do RMN de ^1H , gHMQC e gHMBC.....	144
Figura 79. Estrutura química, inicialmente proposta, do composto presente na fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.....	146
Figura 80. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.....	147
Figura 81. Estruturas químicas dos compostos 14 e 15 presentes na fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2, mostrando os deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos segundo dados obtidos do RMN de ^1H , gHMQC e gHMBC.....	149
Figura 82. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-3.....	151
Figura 83. Fragmentos estruturais propostos dos compostos 16 e 17 presentes na fração 1aL-A7F6ac-5-5.....	155
Figura 84. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 1aL-A7F6ac-5-5.....	156
Figura 85. Estruturas químicas dos compostos 16 e 17 presentes na fração 1aL-A7F6ac-5-5, mostrando os deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos segundo dados obtidos do RMN de ^1H , gHMQC e gHMBC.....	158
Figura 86. Análise por CCDA de algumas frações provenientes dos extratos brutos da cultura simples do fungo <i>Phomopsis</i> sp FLe6 e da sua mista com a actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7.....	162
Figura 87. Cromatogramas das frações Sa-F6-3b e Sa-A7F6-3b provenientes dos extratos brutos de culturas simples e mistas do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 cultivado em arroz.....	164
Figura 88. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da fração aF6-3-5... 168	168
Figura 89. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da fração aF6-3-6... 169	169
Figura 90. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração aA7F6-2-8, mostrando apenas δ 4,5 a δ 0,9.....	173
Figura 91. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da fração aA7F6-2-8, mostrando apenas δ 4,7 a δ 0,9.....	174
Figura 92. Estrutura química do composto 18 presente na fração aA7F6-2-8, mostrando os deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos atribuídos através dos dados do RMN de ^1H , gHMQC e gHMBC, obtidos em CDCl_3	176
Figura 93. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração aA7F6-2-14.....	178
Figura 94. Estrutura química do composto 19 presente na fração aA7F6-2-14, mostrando os deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos segundo dados do RMN de ^1H , gHMQC e gHMBC.....	179
Figura 95. Estrutura do composto 20 presente na fração aA7F6-2-7.....	181

Figura 96. Espectro de MS-MS do pico com m/z 276, da fração aA7F6-2-7 analisada em TQ-S. Energia de colisão de 10 eV.....	181
Figura 97. Espectro de MS-MS do pico com m/z 749, da fração aA7F6-2-16 analisada em TQ-S. Energia de colisão de 20 eV.....	182
Figura 98. Estrutura do composto 21 presente na fração aA7F6-2-16.	182
Figura 99. Culturas simples e mista da actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7 e do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 em meio líquido.....	184
Figura 100. Cromatogramas dos extratos 2L-7d-br, 2L-7d-A7, 2L-7d-F6 e 2L-7d-A7F6.....	185
Figura 101. Cromatogramas dos extratos 2L-14d-A7, 2L-14d-F6 e 2L-14d-A7F6.....	186
Figura 102. Culturas simples e mista da actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7 e do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 em meio sólido.....	190
Figura 103. Análise por CCDA dos extratos brutos das culturas simples e mistas do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 e actinobactéria <i>S. albospinus</i> RLe7 cultivados em arroz.....	191
Figura 104. Cromatogramas dos extratos aA2, aF2 e aM2.	192
Figura 105. Análise por CCDA das frações obtidas após o fracionamento de aA1A2-2.....	194
Figura 106. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração aA1A2-2-2.....	196
Figura 107. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração aA1A2-2-4.....	197
Figura 108. Espectro de MS-MS do pico com m/z 777, da fração aA7F6-2-4 analisada em TQ-S. Energia de colisão de 10, 15 e 20 eV.....	200
Figura 109. Espectro de MS-MS do pico com m/z 761, da fração aA7F6-2-4 analisada em TQ-S. Energia de colisão de 10 e 20 eV.....	200
Figura 110. Estrutura química da antraciclina glicosilada γ -rodomicina III....	201
Figura 111. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração aA1A2-2-7.....	201
Figura 112. Estrutura química do composto 22 presente na fração aA1A2-2-7, mostrando os deslocamentos químicos dos hidrogênios segundo dados obtidos do RMN de ^1H	202
Figura 113. Espectro de MS-MS do pico com m/z 601, da fração aA7F6-2-7 analisada em TQ-S. Energia de colisão de 10, 20 e 25 eV.....	202
Figura 114. Espectro de MS-MS do pico com m/z 801, da fração aA7F6-2-8 analisada em TQ-S. Energia de colisão de 15 e 20 eV.....	203
Figura 115. Estrutura química do composto 23 presente na fração aA1A2-2-8.....	203
Figura 116. Produtos naturais estruturalmente relacionados à equisetina...	211
Figura 117. Mapa genético do vetor <i>deg2</i> destacando os diferentes marcadores de seleção, alguns sítios de restrição e a região <i>open reading frame</i> ORF_1 que corresponde à sequência genética da porção NRPS do gene <i>deg2</i> juntamente com o módulo ACP que a precede.....	217

Figura 118. Mapa genético do vetor <i>deg3</i> destacando os diferentes marcadores de seleção e as regiões <i>open reading frame</i> ORF_3 e ORF_4 que em conjunto correspondem à sequência genética da porção NRPS do gene <i>deg3</i> juntamente com o módulo ACP.....	217
Figura 119. Representação esquemática do gene híbrido <i>pks-nrps</i> que codifica a enzima PKS-NRPS responsável pela produção de equisetina e de algumas construções realizadas.....	219
Figura 120. Anotações de alguns dos domínios contidos na enzima equisetina-sintetase de <i>F. heterosporum</i>	234
Figura 121. Alinhamento de quatro sequências homólogas de genes <i>pks</i> (LNKS_A e PKS_A) e genes <i>pks-nrps</i> (equisetin e pseurotinA-precursor) utilizando o programa <i>ClustalX2</i>	234
Figura 122. Após o processo de recombinação genética em leveduras, em placas de Petri contendo ágar SD sem uracila, foram inoculados o controle com vetor linearizado, o controle com vetor circular e leveduras transformadas com fragmento de DNA equivalente à construção 2- A2C....	239
Figura 123. Eletroforese em gel de agarose de plasmídeos de <i>E. coli</i> linearizados simultaneamente pelas enzimas de restrição <i>Ascl</i> , <i>NotI</i> -HF e <i>PacI</i>	243
Figura 124. Placas de Petri contendo o fungo transformado com a construção 4- TA.....	245
Figura 125. Cromatogramas do extrato bruto da linhagem selvagem, e dos extratos Fh-5.2 e Fh-5.3, ambos referentes à construção 5- HA.....	249
Figura 126. Cromatogramas do extrato bruto da linhagem selvagem e do extrato Fh-2.1, referente à construção 2- A2C.....	249
Figura 127. Cromatogramas do extrato bruto da linhagem selvagem e do extrato controle do meio de cultivo.....	250
Figura 128. Cromatogramas das frações 1, 2 e 3 obtidas a partir do extrato bruto Fh-cm (controle do meio de cultivo).....	251
Figura 129. Cromatogramas das frações 2, 3 e 4 obtidas a partir do extrato bruto Fh-cf (controle contendo a linhagem selvagem).....	252
Figura 130. Cromatogramas das frações 2, 3 e 4 obtidas a partir do extrato bruto Fh-2.1.....	252
Figura 131. Cromatogramas por detecção de íons totais das frações Fh-4.5-3, Fh-cf-3 e Fh-cm-2 reconstruídos a partir dos espectros de massas obtidos em modo negativo.....	253
Figura 132. Cromatogramas por detecção de íons totais das frações Fh-4.5-3, Fh-cf-3 e Fh-cm-2 reconstruídos a partir dos espectros de massas obtidos em modo positivo.	254
Figura 133. Espectros de massas da fração Fh-cf-3 analisada em <i>full scan</i> em modo negativo (superior) e positivo.....	254

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação das actinobactérias endofíticas.....	46
Tabela 2. Identificação dos fungos endofíticos.....	46
Tabela 3. Extratos brutos do fungo <i>A. tenuissima</i> SS77 cultivado em diferentes meios fermentativos.....	50
Tabela 4. Inibição do crescimento celular de linhagens tumorais por extratos brutos do fungo <i>A. tenuissima</i> SS77 cultivado em diferentes meios líquidos.....	51
Tabela 5. Extratos brutos das culturas líquidas sob modulação química e epigenética.....	53
Tabela 6. Inibição do crescimento celular de linhagens tumorais por extratos brutos oriundos do fungo <i>A. tenuissima</i> SS77 tratado com diferentes moduladores.....	57
Tabela 7. Extrato bruto da cultura semi-sólida sob modulação epigenética...	58
Tabela 8. Extratos brutos das culturas líquidas selecionadas sob modulação química e epigenética.....	59
Tabela 9. Dados de RMN ^1H (500 MHz), gHMQC, gHMBC e gCOSY referentes à fração 563.....	80
Tabela 10. Dados de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3), gHMQC, gHMBC e gCOSY referentes à fração 5610.....	83
Tabela 11. Dados de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3), gHMQC e gHMBC referentes à fração 551.....	89
Tabela 12. Extratos brutos das culturas simples e mistas em meio semi-sólido.....	94
Tabela 13. Inibição do crescimento celular de linhagens tumorais por extratos brutos das culturas simples e mistas cultivadas em meio semi-sólido.....	97
Tabela 14. Extratos brutos das culturas simples e mistas em meio líquido....	98
Tabela 15. Inibição do crescimento celular de linhagens tumorais por extratos brutos das culturas simples e mistas cultivadas em meio líquido.....	104
Tabela 16. Extratos brutos das culturas simples e mistas obtidos na primeira seleção em cultivo líquido de todos os micro-organismos.....	105
Tabela 17. Inibição do crescimento celular de linhagens tumorais por extratos brutos obtidos na primeira seleção em meio líquido de todos os micro-organismos.....	106
Tabela 18. Extratos brutos das culturas simples e mistas obtidos na segunda seleção em cultivo líquido de todos os micro-organismos.....	108
Tabela 19. Inibição do crescimento celular de linhagens tumorais por extratos brutos obtidos na segunda seleção em meio líquido de todos os micro-organismos.....	109

Tabela 20. Extratos brutos das culturas simples e mistas de <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 obtidos no primeiro cultivo líquido ampliado.....	110
Tabela 21. Percentual de inibição do crescimento celular dos extratos brutos do primeiro cultivo líquido ampliado em três linhagens de células tumorais.....	110
Tabela 22. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), gHMQC, gHMBC e gCOSY obtidos em CDCl_3 referentes ao composto 10 da fração 1aL-A7F6ac-9-4-5...	128
Tabela 23. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), gHMQC e gHMBC obtidos em CD_3OD referentes ao composto 12 da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1.....	142
Tabela 24. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), gHMQC e gHMBC obtidos em CD_3OD referentes ao composto 13 da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1.....	142
Tabela 25. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), gHMQC, gHMBC e gCOSY obtidos em CD_3OD referentes a dicetopiperazina 14 da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.....	148
Tabela 26. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), gHMQC, gHMBC e gCOSY obtidos em CD_3OD referentes a dicetopiperazina 15 da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.....	148
Tabela 27. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), gHMQC, gHMBC e gCOSY obtidos em CDCl_3 referentes ao composto 16 da fração 1aL-A7F6ac-5-5.....	157
Tabela 28. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), gHMQC, gHMBC e gCOSY obtidos em CDCl_3 referentes ao composto 17 da fração 1aL-A7F6ac-5-5.....	157
Tabela 29. Extratos brutos das culturas simples e mistas obtidos no primeiro cultivo em meio sólido.....	161
Tabela 30. Sub-frações obtidas após fracionamento dos extratos brutos das culturas simples e mistas do primeiro cultivo em meio sólido.....	161
Tabela 31. Dados de RMN de ^1H (400 MHz), gHMQC, gHMBC e gCOSY referentes ao composto 18 da fração aA7F6-2-8.....	175
Tabela 32. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), gHMQC, gHMBC e gCOSY obtidos em CD_3OD referentes ao composto 19 da fração aA7F6-2-14.....	179
Tabela 33. Extratos brutos das culturas simples de <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 e de <i>S. albospinus</i> RLe7 e das culturas mistas desses micro-organismos obtidos no segundo cultivo líquido ampliado.....	184
Tabela 34. Extratos brutos das culturas simples de <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 e de <i>S. albospinus</i> RLe7 e das culturas mistas desses micro-organismos obtidos no segundo cultivo sólido.....	190
Tabela 35. Protocolo padronizado para 50 μL de reação.....	221
Tabela 36. Extratos brutos do cultivo das linhagens de <i>F. heterosporum</i>	248
Tabela 37. Frações obtidas a partir dos extratos brutos de <i>F. heterosporum</i> .	250

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 563 entre δ 8,6 e 6,4.....	287
Anexo 2. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 563 entre δ 5,0 e 2,7.....	287
Anexo 3. Mapa de contornos de gHMQC (500 MHz, CD_3OD) da fração 563.....	288
Anexo 4. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CD_3OD) da fração 563.....	289
Anexo 5. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CD_3OD) da fração 563, mostrando um plano de corte mais inferior dos picos.....	290
Anexo 6. Espectro de gCOSY (500 MHz, CD_3OD) da fração 563.....	291
Anexo 7. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 563 entre δ 8,6 e 6,5.....	292
Tabela 8. Anexo 8. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 563 entre δ 5,1 e 1,9.....	292
Anexo 9. Espectro de HR-ESI-MS da fração 563 em modo negativo (m/z calculada 367,08233), obtido em Q-TOF.....	293
Anexo 10. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 5610 entre δ 8,0 e 6,9.....	294
Anexo 11. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 5610 entre δ 4,9 e 1,9.....	294
Anexo 12. Mapa de contornos de gHMQC (500 MHz, CDCl_3) da fração 5610.....	295
Anexo 13. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CDCl_3) da fração 5610.....	296
Anexo 14. Espectro de gCOSY (500 MHz, CDCl_3) da fração 5610.....	296
Anexo 15. Espectro de HR-ESI-MS da fração 5610 em modo negativo (m/z calculada 381,09798), obtido em Q-TOF.....	297
Anexo 16. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 551 entre δ 9,0 e 6,1.....	298
Anexo 17. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 551 entre δ 4,0 e 2,9.....	298
Anexo 18. Mapa de contornos de gHMQC (500 MHz, CDCl_3) da fração 551.....	299
Anexo 19. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CDCl_3) da fração 551.....	299
Anexo 20. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CDCl_3) da fração 551, destacando as correlações do composto majoritário.....	300
Anexo 21. Espectro de ESI-MS da fração 1aL-A7F6ac-6-3 em modo negativo, obtido em UltrO-TOF.....	301

Anexo 22. Espectro de ESI-MS, em modo negativo, da fração 1aL-A7F6ac-6-5, obtido em UltrO-TOF.....	302
Anexo 23. Espectro de ESI-MS, em modo negativo, da fração 1aL-A7F6ac-4-4, obtido em UltrO-TOF.....	303
Anexo 24. Mapa de contorno de gHMQC (500 MHz, CDCl ₃) da fração 1aL-A7F6ac-9-4-5.....	304
Anexo 25. Mapa de contorno de gHMBC (500 MHz, CDCl ₃) da fração 1aL-A7F6ac-9-4-5.....	304
Anexo 26. Espectro de gCOSY (500 MHz, CDCl ₃) da fração 1aL-A7F6ac-9-4-5.....	305
Anexo 27. Espectro de ESI-MS, em modo positivo, da fração 1aL-A7F6ac-9-4-5, obtido em UltrO-TOF.....	306
Anexo 28. Espectro de ESI-MS, em modo positivo, da fração 1aL-A7F6ac-9-4-r-5, obtido em TQ-S.....	306
Anexo 29. Mapa de contornos de gHMQC (500 MHz, CD ₃ OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1.....	307
Anexo 30. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CD ₃ OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1.....	308
Anexo 31. Espectro de ESI-MS, em modo negativo, da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1, obtido em TQ-S.....	308
Anexo 32. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.....	309
Anexo 33. Mapa de contornos de gHMQC (500 MHz, CD ₃ OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.....	310
Anexo 34. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CD ₃ OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.....	311
Anexo 35. Espectro de COSY (500 MHz, CD ₃ OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.....	312
Anexo 36. Espectro de ESI-MS, em modo positivo, da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2, obtido em UltrO-TOF.....	313
Anexo 37. Espectro de MS-MS do pico com <i>m/z</i> 197, da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2. Energia de colisão de 25 eV.....	313
Anexo 38. Espectro de MS-MS do pico com <i>m/z</i> 261, da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2. Energia de colisão de 25 eV.....	314
Anexo 39. Espectro de TOCSY (500 MHz, CD ₃ OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.....	314
Anexo 40. Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.....	315

Anexo 41. Espectro de massas obtido da análise de íons precursores que originam o íon produto de m/z 120, presente na fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-3. Análise realizada em TQ-S.....	316
Anexo 42. Espectro de MS-MS obtido da análise do íon de m/z 120, presente na fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-3.....	316
Anexo 43. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-5-5.....	317
Anexo 44. Mapa de contornos de gHMQC (500 MHz, CDCl_3) da fração 1aL-A7F6ac-5-5.....	318
Anexo 45. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CDCl_3) da fração 1aL-A7F6ac-5-5.....	319
Anexo 46. Espectro de gCOSY (500 MHz, CDCl_3) da fração 1aL-A7F6ac-5-5.....	320
Anexo 47. Espectro de ESI-MS, em modo positivo, da fração 1aL-A7F6ac-5-5 analisada em UltrO-TOF.....	321
Anexo 48. Espectro de ESI-MS, em modo positivo, da fração 1aL-A7F6ac-5-5 analisada em TQ-S.	321
Anexo 49. Cromatograma por detecção do íon produto de m/z 120 (superior) do extrato da cultura simples do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 em meio líquido e espectro de massas do pico com tr de 5,20 min (inferior). Análise realizada em TQ-S.....	322
Anexo 50. Cromatograma por detecção do íon produto de m/z 120 (superior) do extrato da cultura mista do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 em meio líquido e espectro de massas do pico com tr de 5,19 min (inferior). Análise realizada em TQ-S.....	322
Anexo 51. Cromatograma por detecção do íon produto de m/z 120 (superior) da fração 2 do extrato da cultura simples do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 em meio sólido e espectro de massas do pico com tr de 4,05 min (inferior). Análise realizada em TQ-S.....	323
Anexo 52. Cromatograma por detecção do íon produto de m/z 120 (superior) da fração 3 do extrato da cultura simples do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 em meio sólido. Análise realizada em TQ-S.....	323
Anexo 53. Espectros de massas dos picos com tr de 4,04, 4,39, 4,61, 5,16 e 5,70 min, respectivamente, do cromatograma por detecção do íon produto de m/z 120 da fração 3 do extrato da cultura simples do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 em meio sólido. Análise realizada em TQ-S.....	324
Anexo 54. Espectros de massas dos picos com tr de 6,02, 6,20 e 6,52 min, respectivamente, do cromatograma por detecção do íon produto de m/z 120 da fração 3 do extrato da cultura simples do fungo <i>Phomopsis</i> sp. FLe6 em meio sólido. Análise realizada em TQ-S.....	325
Anexo 55. Espectro de massas obtido da análise de íons precursores que originam o íon produto de m/z 120, presente na fração aF6-4, analisada em TQ-S.....	325
Anexo 56. Espectro de MS-MS do íon com m/z 416, da fração aF6-4. Energia de colisão de 10 e 20 eV.....	326

Anexo 57. Espectro de MS-MS do íon com m/z 432, da fração aF6-4. Energia de colisão de 10 e 20 eV.....	326
Anexo 58. Espectro de MS-MS do íon com m/z 434, da fração aF6-4. Energia de colisão de 10 e 20 eV.....	326
Anexo 59. Espectro de MS-MS do íon com m/z 450, da fração aF6-4. Energia de colisão de 10 e 20 eV.....	327
Anexo 60. Espectro de MS-MS do íon com m/z 476, da fração aF6-4. Energia de colisão de 10 e 20 eV.....	327
Anexo 61. Espectro de MS-MS do íon com m/z 492, da fração aF6-4. Energia de colisão de 10 e 20 eV	327
Anexo 62. Espectro de MS-MS do íon com m/z 494, da fração aF6-4. Energia de colisão de 10 e 20 eV.....	328
Anexo 63. Espectros de massas das frações aA7F6-5 (inferior) e aA7F6-6 (superior), em modo positivo, analisadas em TQ-S.....	328
Anexo 64. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração aA7F6-1-3.....	328
Anexo 65. Ampliação espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da de aA7F6-1-3, mostrando apenas δ 8,8 a δ 5,4.....	329
Anexo 66. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração aA7F6-2-8.....	329
Anexo 67. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração aA7F6-2-8.	329
Anexo 68. Espectro de COSY (500 MHz, CDCl_3) da fração aA7F6-2-8.....	330
Anexo 69. Mapa de contornos de gHMQC (500 MHz, CDCl_3) da fração aA7F6-2-8.....	330
Anexo 70. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CDCl_3) da fração aA7F6-2-8.....	331
Anexo 71. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração aA7F6-2-14, mostrando apenas δ 2,7 a δ 4,6.....	331
Anexo 72. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração aA7F6-2-14, mostrando apenas δ 0,8 a δ 2,3.....	332
Anexo 73. Espectro de COSY (500 MHz, CD_3OD) da fração aA7F6-2-14.....	332
Anexo 74. Mapa de contornos de gHMQC (500 MHz, CD_3OD) da fração aA7F6-2-14.....	333
Anexo 75. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CD_3OD) da fração aA7F6-2-14.....	333
Anexo 76. Espectro de massas, em modo positivo, da fração aA7F6-2-14, obtido em TQ-S.....	334
Anexo 77. Espectro de massas, em modo positivo, da fração aA7F6-2-7, obtido em TQ-S.....	334
Anexo 78. Espectro de massas, em modo positivo, da fração aA7F6-2-16, obtido em TQ-S.	335
Anexo 79. Espectro de massas, em modo positivo (inferior) e negativo (superior), da fração aA1A2-2-1, obtido em TQ-S.....	335
Anexo 80. Espectro de massas, em modo positivo (inferior) e negativo (superior), da fração aA1A2-2-2, obtido em TQ-S.....	336
Anexo 81. Espectro de massas, em modo positivo (inferior) e negativo (superior), da fração aA1A2-2-4, obtido em TQ-S.....	336
Anexo 82. Espectro de massas, em modo positivo (inferior) e negativo (superior), da fração aA1A2-2-7, obtido em TQ-S.....	337

Anexo 83. Espectro de massas, em modo positivo (inferior) e negativo (superior), da fração aA1A2-2-8, obtido em TQ-S.....	337
Anexo 84. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da fração aA1A2-2-9.	338
Anexo 85. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da fração aA1A2-2-9.....	338
Anexo 86. Espectro de massas, em modo positivo (inferior) e negativo (superior), da fração aA1A2-2-9, obtido em TQ-S.....	339

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

δ	- deslocamento químico
®	- marca registrada
™	- <i>trademark</i>
A	- <i>adenylation domain</i>
AcOEt	- acetato de etila
ACP	- <i>acyl carrier protein</i>
AT	- <i>acyltransferase domain</i>
ATCC	- <i>American type culture collection</i>
BOD	- <i>biochemical oxygen demand</i>
BSM	- <i>Bifidus selective medium</i>
bp	- <i>base pairs</i>
C	- <i>condensation domain</i>
CC	- cromatografia em coluna clássica
CCDA	- cromatografia em camada delgada analítica
CDCl ₃	- clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	- metanol deuterado
COSY	- <i>correlation spectroscopy</i>
<i>d</i>	- dubleto
<i>dd</i>	- duplo-dubleto
<i>ddd</i>	- duplo-duplo-dubleto
<i>dt</i>	- duplo-tripleto
<i>dq</i>	- duplo quadrupletto
<i>dquint</i>	- duplo quintupletto
DH	- <i>dehydratase domain</i>
DMSO	- dimetilsulfóxido
DNA	- ácido desoxirribonucleico
DNP	- <i>dictionary of natural products</i>
dNTP	- <i>deoxyribonucleoside triphosphate</i>
DTT	- dicloro-difenil-tricloro-etano
EDTA	- ácido etileno-diamino-tetra-acético
ESI-MS	- <i>electrospray ionization mass spectrometry</i>

EtOH	- ethanol
GC-MS	- <i>gas chromatography - mass spectrometry</i>
gCOSY	- <i>gradient correlation spectroscopy</i>
gHMBC	- <i>gradient heteronuclear multiple bond coherence</i>
gHMQC	- <i>gradient heteronuclear multiple quantum coherence</i>
Hex	- hexano
<i>HiFi</i>	- <i>high fidelity</i>
HPLC-DAD	- <i>high performance liquid chromatography - diode array detection</i>
HR-ESI-MS	- <i>high resolution electrospray ionization mass spectrometry</i>
HR-PKS	- <i>high-reducing polyketide synthase</i>
ISP	- <i>international Streptomyces project</i>
IV	- infravermelho
<i>J</i>	- constante de acoplamento
kbp	- <i>kilo base pairs</i>
KR	- <i>ketosynthase domain</i>
KS	- <i>ketoreductase domain</i>
LB	- Luria-Bertani
LC-MS	- <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
<i>m</i>	- múltiplo
MeCN	- acetonitrila
MeOH	- metanol
MIC	- <i>minimal inhibitory concentration</i>
MS	- <i>mass spectrometry</i>
MT	- <i>methyltransferase domain</i>
m/z	- relação massa/carga
MS/MS	- <i>mass spectrometry/mass spectrometry</i>
MeCN	- acetonitrila
MeOH	- metanol
NOE-diff	- <i>nuclear overhauser effect differential</i>
NR-PKS	- <i>non-reducing polyketide synthase</i>
NRPS	- <i>nonribosomal peptide synthetase</i>
PCP	- <i>peptide carrier protein</i>
PCR	- <i>polymerase chain reaction</i>

PDA	- <i>potato dextrose agar</i>
PDB	- <i>potato dextrose broth</i>
PEG	- polietilenoglicol
PKS	- <i>polyketide synthase</i>
<i>q</i>	- quadrupeto
Rf	- fator de retenção
RMN	- ressonância magnética nuclear
RMN de ^1H	- ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ^{13}C	- ressonância magnética nuclear de carbono.
RNA	- ácido ribonucleico
ODS	- octadecilsilanol
ORF	- <i>open reading frame</i>
Q-TOF	- <i>quadrupole-time of flight</i>
R	- <i>reduction domain</i>
RT-PCR	- <i>real time - polymerase chain reaction</i>
<i>s</i>	- singleto
SD	- <i>synthetic defined</i>
<i>sl</i>	- singleto largo
SOB	- <i>super optimal broth</i>
SOEing	- <i>splicing by overlap extension</i>
SPE	- <i>solid phase extraction</i>
T	- <i>thiolation domain</i>
TAE	- Tris-acetato-EDTA
TE	- Tris-EDTA
<i>td</i>	- triplo-dubleto
TOCSY	- <i>total correlation spectroscopy</i>
TQ	- <i>triple quadrupole</i>
tr	- tempo de retenção
UV	- ultravioleta
YPD	- <i>yeast potato dextrose</i>

1 INTRODUÇÃO GERAL

Desafios na descoberta de produtos naturais

Produtos naturais microbianos ainda representam uma excelente fonte de estruturas líderes para a descoberta de fármacos (WALSH; FISCHBACH, 2010; GROSS, 2009; HERTWECK, 2009; CRAGG; NEWMAN, 2013). No entanto, a alta taxa de redescoberta de metabólitos secundários conhecidos é um problema crônico na química de produtos naturais, evidenciando que novas abordagens são necessárias para aumentar a probabilidade de encontrar estruturas bioativas inéditas (GROSS, 2009; SCHERLACH; HERTWECK, 2009; ZERIKLY; CHALLIS, 2009; OH, 2007).

Os avanços no conhecimento da genômica microbiana tem favorecido o entendimento dos princípios que regem a biossíntese de produtos naturais, fornecendo alternativas promissoras para a descoberta e engenharia de novas entidades químicas (SCHERLACH; HERTWECK, 2009). Os programas recentes de sequenciamento genômico total revelaram que o potencial biossintético de um micro-organismo não tem sido amplamente explorado (FISCH et al., 2009; HERTWECK, 2009; SCHNEIDER; MISIEK; HOFFMEISTER, 2008). De fato, o número de genes que codificam enzimas biossintéticas em várias bactérias e fungos é claramente superior à quantidade de metabólitos conhecidos oriundos desses micro-organismos (HERTWECK, 2009; HOFFMEISTER; KELLER, 2007). A actinobactéria *Streptomyces coelicolor* foi um dos primeiros micro-organismos com o genoma sequenciado em que esse fato foi reconhecido (BENTLEY et al., 2002). Similares observações agora têm sido reportadas para uma grande diversidade de micro-organismos (GENBANK). Essas evidências representam uma forte contestação à idéia de que restam poucos compostos novos a serem descobertos a partir de fontes naturais (WALSH; FISCHBACH, 2010; CHALLIS, 2008). O maior desafio, no entanto, está na forma utilizada para conseguir acessá-los.

Uma das limitações na descoberta de novos compostos é que muitos organismos produtores ainda não são cultiváveis em laboratório (HERTWECK, 2009). Além disso, a exploração genética através de bioinformática, juntamente

com análises de transcriptoma e metaboloma, indicam que a maioria das regiões biossintéticas encontradas no genoma de micro-organismos cultiváveis se mantém silenciadas ou são pouco expressas na ausência de um estímulo particular, como determinados nutrientes, sinais ambientais, compostos sinalizadores, ou outros, que na maioria dos casos, são ainda desconhecidos (HERTWECK, 2009). Tais regiões biossintéticas são referidas como rotas “órfãs”, “silenciosas” ou “enigmáticas” (GROSS, 2009; SCHERLACH; HERTWECK, 2009).

Dentre os métodos que têm sido utilizados para explorar essas rotas metabólicas enigmáticas estão as abordagens relacionadas à forma de cultivo e as baseadas em biologia molecular, no entanto, ambas apresentam restrições e desvantagens (WILLIAMS et al., 2008). Ainda assim, os valiosos estudos utilizando essas abordagens têm permitido aprofundar o entendimento da fisiologia e genética dos micro-organismos, o que possibilitará à humanidade obter cada vez mais avanços, nos diversos campos de interesse, à medida que o potencial biossintético microbiano for sendo dominado.

2 CAPÍTULO I - Novas estratégias para acessar produtos naturais microbianos: culturas mistas de endofíticos, modulação química e epigenética de vias biossintéticas

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Regulação e remodelagem epigenética

O genoma contém todas as informações necessárias para construir um organismo. No entanto, durante a diferenciação e desenvolvimento, adicionais informações epigenéticas determinam o estado funcional de células e tecidos (LOIDL, 2004). Essas informações podem ser introduzidas por metilação do nucleotídeo citosina ou por marcações nas proteínas nucleossomais denominadas histonas. Há ainda evidências de que há uma inter-relação entre a metilação do DNA e as modificações nas histonas (DOBOSY; SELKER, 2001).

O processo de metilação das citosinas é importante para a regulação da atividade gênica e estabilidade genômica em eucariontes, e tem sido correlacionado com silenciamento gênico (LOIDL, 2004). Já as histonas são susceptíveis a uma ampla variedade de modificações pós-tradução (GRAESSLE; LOIDL; BROSCH, 2001; SHWAB et al., 2007). Uma das mais bem estudadas modificações é a acetilação do grupo amino na posição ϵ do resíduo de lisina conservado na cauda terminal das histonas H2A, H2B, H3, and H4. A acetilação-desacetilação de histonas afeta profundamente processos nucleares como replicação, reparo e transcrição do DNA, sendo as enzimas histona-acetiltransferases (HATs) e histona-desacetilases (HDACs) responsáveis por esse equilíbrio dinâmico (GRAESSLE; LOIDL; BROSCH, 2001). No geral, a hipoacetilação de histonas está associada com silenciamento de genes, enquanto que hiperacetilação é mais comumente associada com ativação gênica (TRIBUS et al., 2010; SHWAB et al., 2007), podendo haver exceções (DE NADAL et al., 2004; ROBYR; KURDISTANI; GRUNSTEIN, 2004; HANSEN et al., 2005). A metilação de histonas também é um processo que comumente ocorre e seu efeito na cromatina é dependente da quantidade de metilação (mono, di ou tri) e

de qual aminoácido sofreu a modificação, podendo resultar em ativação ou silenciamento gênico (LAWRENCE et al., 2004).

Em contraste à natureza universal do código expresso pelo DNA, a linguagem das histonas e sua maquinaria de decodificação diferem entre animais, plantas e fungos (LOIDL, 2004) e, apesar do rápido aumento no entendimento da regulação epigenética em eucariontes superiores, pouco é conhecido sobre seu papel em fungos filamentosos (TRIBUS et al., 2010; BROSCHE; LOIDL; GRAESSLE, 2008).

Nas últimas décadas, as propriedades bioativas, tanto benéficas quanto maléficas, dos metabólitos fúngicos têm sido um estímulo para a identificação de genes envolvidos em sua biossíntese e regulação (HOFFMEISTER; KELLER, 2007). A regulação do metabolismo fúngico parece ser dependente dos diferentes graus de organização cromossômica dos genes biossintéticos. Embora genes eucarióticos envolvidos em rotas metabólicas únicas geralmente estejam dispersos no genoma, os genes requeridos para a produção de determinados metabólitos secundários, frequentemente estão em *clusters*, adjacentes entre si no cromossomo (SHWAB; KELLER, 2008). Há uma grande probabilidade de que estes *clusters* de genes estejam posicionados em regiões específicas, as quais possuem a taxa de transcrição controlada por fatores epigenéticos (SHWAB et al., 2007).

A descoberta da metiltransferase LaeA, supostamente considerada um regulador global da produção de metabólitos secundários em fungos (KOSALKOVÁ et al., 2009; PERRIN et al., 2007), inspirou pesquisadores a examinarem os mecanismos pelos quais os micro-organismos, restritivamente, comandam a produção dos produtos naturais sob condições laboratoriais de cultivo (WILLIAMS et al., 2008). A deleção do gene *laeA* em *Penicillium chrysogenum* resultou em menor produção de penicilina, além de defeitos na esporulação e pigmentação, enquanto que a produção de roquefortina C não foi alterada (KOSALKOVÁ et al., 2009). Em *Aspergillus fumigatus*, a deleção desse gene levou à diminuição significativa da expressão de metabólitos secundários, incluindo algumas toxinas (PERRIN et al., 2007).

Em *Aspergillus nidulans*, a deleção do gene *cclA*, envolvido no processo de metilação de histonas, levou à ativação da expressão de *clusters* gênicos de

metabólitos secundários silenciados, o que resultou na produção de antraquinonas ativas, tais como monodictifenona, emodina e seus análogos, além de dois policetídeos antiosteoporose F9775A e F9775B (BOK et al., 2009). Além disso, a deleção do gene *hdaA* em *A. nidulans*, que codifica a enzima HDAC, levou à ativação transcricional do grupo de genes responsável pela produção de esterigmatocistina e penicilina, não afetando, no entanto, a produção de terraquinona (SHWAB et al., 2007). O tratamento de diferentes fungos com inibidores da enzima HDAC resultou na produção de vários metabólitos que não haviam sido identificados nas espécies não tratadas (SHWAB et al., 2007). A deleção do gene *hdaA* em *Aspergillus fumigatus* levou ao aumento da produção de diversos metabólitos secundários, no entanto, houve repressão da produção do fator de virulência gliotoxina. Em concordância, linhagens que superexpressam esse gene produzem mais gliotoxina que as linhagens selvagens (LEE et al., 2009). Utilizando moduladores epigenéticos, Fisch e colaboradores (2009) avaliaram a taxa de transcrição de diferentes genes PKS, NRPS e híbridos PKS-NRPS do fungo *Aspergillus niger*, e puderam observar aumento, diminuição ou transcrição inalterada de alguns genes, estando de acordo com o observado por outros pesquisadores.

Na tentativa de acessar rotas de produtos naturais silenciadas e aumentar a produção de metabólitos secundários microbianos, Williams e colaboradores (2008) suplementaram culturas de fungos com moduladores epigenéticos. Nos experimentos iniciais, doze fungos foram tratados com diversos inibidores de HDAC e de DNA-metiltransferases. A análise dos perfis metabólicos revelou que onze fungos responderam ao tratamento com a produção de novos produtos naturais e/ou com acúmulo de metabólitos secundários que já haviam sido identificados nas linhagens não tratadas. Além disso, o cultivo de linhagens selecionadas em diferentes tipos de meios de cultura confirmou que muitos dos novos metabólitos foram exclusivamente obtidos quando os fungos foram tratados com moduladores epigenéticos. Posteriormente, duas linhagens foram investigadas com mais detalhes. Adição de 5-azacitidina (inibidor de DNA-metiltransferases) à cultura de *Cladosporium cladosporioides* estimulou a produção de várias oxilipinas, enquanto que o tratamento com ácido suberoilânilida hidroxâmico (inibidor de HDAC) resultou em duas novas

perilenequinonas, cladocromes F e G (Figura 1), juntamente com quatro outras cladocromes conhecidas. A adição de 5-azacitidina à cultura do segundo fungo testado, do gênero *Diatrype*, desencadeou uma significativa mudança em seu perfil metabólico, resultando na produção de dois novos policetídeos, lunalídeos A e B (Figura 1) (WILLIAMS et al., 2008). Em trabalhos realizados pelo mesmo grupo, a utilização do ácido suberoilânilda hidroxâmico foi capaz de reestruturar radicalmente o metaboloma secundário do fungo *Aspergillus niger*, possibilitando a identificação de nigerona A, produzida exclusivamente quando a cultura foi tratada com o inibidor de HDAC (HENRIKSON et al., 2009).

A manipulação química do fungo *Penicillium citreonigrum* com o modulador epigenético 5-azacitidina levou a profundas mudanças no perfil metabólico do gutato produzido sobre a colônia fúngica (WANG et al. 2010). O gutato coletado das culturas tratadas foi enriquecido em metabólitos secundários, incluindo seis azafilonas, pencolídeo, e dois novos meroterpenos, atlantinonas A e B (Figura 1). Com exceção do pencolídeo, os compostos mencionados foram encontrados exclusivamente no gutato do fungo tratado.

O ácido suberoilânilda hidroxâmico foi usado para induzir a biossíntese do composto EGM-556, um novo ciclodepsipeptídeo de origem biossintética híbrida (Figura 1). O fungo produtor do composto, *Microascus* sp., juntamente com outros onze fungos derivados de sedimentos marinhos, teve o perfil metabólico avaliado em presença do referido inibidor de HDAC, e mudanças significativas foram observadas nas linhagens tratadas (VERVOORT; DRASKOVIC; CREWS, 2011).

O tratamento do fungo entomopatogênico *Torrubiella luteorostrata* com ácido suberoidroxâmico (inibidor de HDAC) levou a significantes mudanças em seu perfil metabólico e induziu a produção de três novos análogos prenilados do triptofano, luteorídeos A-C (Figura 1) (ASAI; YAMAMOTO; OSHIMA, 2011). O mesmo grupo procedeu com a utilização da abordagem epigenética química para outros fungos entomopatogênicos. A adição de 5-azacitidina nas culturas de *Cordyceps indigotica* levou ao isolamento de um novo policetídeo aromático glicosilado, indigotídeo B (Figura 1) (ASAI et al., 2012a). O tratamento desse fungo com ácido suberoidroxâmico levou ao isolamento de outros análogos, indigotídeo C-F, 13-hidróxi-indigotídeo A, e 8-O-metil-indigotídeo B, todos novos

(Figura 1) (ASAI; YAMAMOTO; OSHIMA, 2012). A adição concomitante de RG-108 (inibidor de DNA-metiltransferases) e ácido suberoidroxâmico ao meio de cultivo do fungo entomopatogênico *Isaria tenuipes* elevou significativamente a produção de metabólitos secundários pela linhagem e permitiu o isolamento do policetídeo tenuipirona (Figura 1), o qual é inédito e contém um sistema tetracíclico com componente espirocetal sem precedentes (ASAI et al., 2012b). Dois outros compostos já conhecidos, cefalosporolídeo B e F, também foram isolados, e os autores sugerem que um deles, cefalosporolídeo B, seria um plausível precursor biossintético do composto tenuipirona. O mesmo grupo publicou mais um trabalho em que o fungo *Chaetomium indicum*, após tratamento com ácido suberoidroxâmico, teve a produção de alguns policetídeos induzida, e acabou levando ao isolamento seis novos compostos, chaetofenol A-F (ASAI et al., 2013). A produção desses compostos também foi detectada no controle sem tratamento, mas foi estimulada em diferentes graus após o tratamento com o inibidor de HDAC, sendo que apenas chaetofenol A, B, C e E (Figura 1) parecem realmente ter sido induzidos devido ao tratamento. Os autores ainda verificaram um maior grau de acetilação em genes possivelmente envolvidos na biossíntese desses compostos.

O tratamento de um fungo endofítico (linhagem S1) isolado da planta medicinal *Datura stramonium* com 5-azacitidina e/ou ácido suberoidroxâmico levou à indução na produção de micotoxinas conhecidas, mas que não haviam sido produzidas na cultura controle (SUN et al., 2012). A linhagem R1 (identificada como *Fusarium oxysporum*) isolada da mesma planta, após o tratamento com ácido suberoidroxâmico, produziu dois compostos novos derivados do ácido fusárico, ácido 5-butil-6-oxo-1,6-diidropiridina-2-carboxílico e ácido 5-(but-9-enil)-6-oxo-1,6-diidropiridina-2-carboxílico (Figura 1) (CHEN et al., 2013).

O fungo marinho *Leucostoma personii* também foi tratado com os moduladores 5-azacitidina e ácido suberoidroxâmico, o que resultou em elevada indução na produção de citosporonas bioativas já conhecidas, juntamente com a produção de citosporona R, que não havia sido descrita previamente (Figura 1). Nos experimentos, o uso de ambos moduladores foi combinado mas produziu resultados inconsistentes. Constatou-se que a adição apenas de ácido

suberoidroxâmico nas culturas foi o meio mais efetivo de induzir a produção dos compostos bioativos (BEAU et al., 2012).

O efeito da modulação epigenética com ácido suberoilânilda hidroxâmico e 5-azacitidina na produção de compostos orgânicos voláteis pelo fungo endofítico *Hypoxyton* sp. também foi analisado. Após o tratamento, houve significantes variações no perfil de voláteis produzidos pelo fungo, com a produção de vários compostos que não eram produzidos pela linhagem não tratada (UL-HASSAN et al., 2012).

Apesar de ainda não estar claro o motivo pelo qual apenas alguns *clusters* de genes são afetados pelas enzimas HDAC e DNA-metiltransferases (KOSALKOVÁ et al., 2009; LEE et al., 2009), a regulação da produção de metabólitos mediada por essas enzimas provavelmente é um fenômeno disseminado em fungos filamentosos, que evoluiu como uma ferramenta para permitir a produção de metabólitos secundários sob condições específicas. Provavelmente, a regulação epigenética do metabolismo secundário é uma eficiente forma dos fungos assegurarem que a produção energeticamente desfavorável de determinadas moléculas só ocorrerá quando for vantajosa (SHWAB et al., 2007). Assim, o tratamento de fungos com inibidores químicos das enzimas HDAC e DNA-metiltransferases pode potencialmente promover o aumento da produção de metabólitos de interesse, além de auxiliar na identificação de novos produtos naturais que provavelmente não são detectados sob condições normais de cultivo.

Figura 1. Compostos inéditos produzidos em culturas de micro-organismos tratados com moduladores epigenéticos.

2.1.2 Inibidores biossintéticos e eliciadores químicos

As rotas biossintéticas presentes em micro-organismos e plantas são responsáveis pela produção de uma ampla diversidade estrutural de compostos químicos. Contudo, a biossíntese de metabólitos secundários em micro-organismos é estreitamente controlada por mecanismos regulatórios que, frequentemente, limitam a descoberta de novos compostos bioativos (MIAO et al., 2006). Assim, uma possível forma de induzir a produção dessas substâncias é suplementar os meios de cultivo com eliciadores químicos ou com inibidores biossintéticos específicos de rotas competitivas.

Inibidores específicos de vias biossintéticas são comumente utilizados para analisar a biossíntese de um metabólito secundário, evidenciando a rota biossintética envolvida (HAN; HEIJDEN; VERPOORTE, 2002; SIRCAR; MITRA, 2009), além de auxiliar na compreensão de sua regulação (NKEMBO et al., 2006). Isso possibilita uma manipulação adequada das rotas para aumentar a produção de determinados metabólitos secundários (SUN et al., 2009). Entretanto, a maioria desses estudos biossintéticos tem sido realizada em plantas.

Uma investigação da biossíntese de artemisinina em *Artemisia annua* (TOWLER; WEATHERS, 2007) e do ácido escopadúlcico B em *Scoparia dulcis* (NKEMBO et al., 2006), utilizando inibidores da via 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) e da via do mevalonato (MVA), forneceram informações acerca dos mecanismos de compensação envolvidos na biossíntese de isoprenóides. Os inibidores utilizados inibem as etapas de conversão que levariam à formação das unidades precursoras IPP (difosfato de isopentenila). Apesar das rotas formadoras de IPP, MEP e MVA, estarem compartimentalizadas nos plastídios e no citosol, respectivamente, elas podem atuar através de processos cooperativos devido à comunicação metabólica. Assim, quando uma das vias é inibida, IPPs provenientes da outra são utilizados para complementar a biossíntese de compostos pela via inibida, resultando na participação de IPP oriundo de ambas as vias na biossíntese de certos isoprenóides.

Em *Aspergillus glaucus*, foi verificado que a inibição da via responsável pela produção de uma determinada classe biossintética de compostos pode

resultar em aumento da produção de compostos pertencentes à outra classe, principalmente quando ambas as vias possuem o mesmo precursor biossintético. Isso ocorreu durante a produção de aspergiolídeo A, um composto derivado da via dos policetídeos. Tendo em vista que acetil-CoA é um precursor comum à via dos policetídeos e do mevalonato, a adição de inibidores específicos da via do mevalonato, tais como sinvastatina e citrato, no meio de cultivo de *A. glaucus* resultou em aumento da produção do policetídeo. Além disso, foi verificado que a adição de inibidores específicos da via dos policetídeos, como cerulenina e iodoacetamida, inibiu completamente a produção de aspergiolídeo A (SUN et al., 2009).

Em estudos com actinobactérias, Craney e colaboradores (2012) testaram uma série de compostos capazes de alterar o metabolismo secundário de várias espécies de actinobactérias. Foi verificado que as moléculas mais ativas, do ponto de vista da capacidade de remodelar o metabolismo secundário das bactérias, apresentavam similaridade estrutural ao conhecido agente antimicrobiano triclosano, um inibidor da síntese de ácidos graxos. Assim, foi hipotetizado que essas moléculas ativas poderiam estar induzindo um aumento na produção de alguns policetídeos, e de outros compostos que em algum momento da biossíntese dependem do precursor acetil-CoA, devido ao maior aporte desse precursor em função da inibição da síntese de ácidos graxos (CRANEY et al., 2012; OCHI; OKAMOTO, 2012). Além disso, foi verificado que compostos que possuem em sua estrutura porções derivadas de ácidos graxos tiveram sua biossíntese inibida após o tratamento. O próprio composto triclosano foi testado, e em concentrações sub-inibitórias, ele é capaz de induzir os mesmos efeitos no metabolismo secundário observados quando as moléculas similares foram utilizadas (CRANEY et al., 2012).

O tratamento do fungo *Sphaeropsidales* sp. com o antifúngico triciclazol, um inibidor da síntese de 1,8-diidróxi-naftaleno (DHN)-melanina, levou ao isolamento de dois novos bis-naftalenos, esferolona e diidro-esferolona (Figura 2). Os autores sugerem que tais compostos são produtos da dimerização de um intermediário da biossíntese de DHN, o 1,3,8-triidróxi-naftaleno (BODE; ZEECK, 2000).

Figura 2. Compostos inéditos produzidos em culturas de micro-organismos tratados com inibidores biossintéticos e eliciadores químicos.

A indução da produção de metabólitos secundários também foi conseguida com a utilização de eliciadores químicos diversos, os quais podem agir por mecanismos inespecíficos ou ainda não determinados. Experimentos mostraram que a adição de um potente inibidor de citoesqueleto, jasplaquinolídeo, em culturas do fungo marinho *Phomopsis asparagi*, resultou na produção de três novos análogos de chaetoglobosinas, também inibidores do citoesqueleto (Figura 2) (CHRISTIAN et al., 2005).

O ácido jasmônico também tem sido amplamente utilizado como eliciador do metabolismo secundário, sendo capaz de estimular a biossíntese de terpenos, alcalóides, flavonóides, e outros compostos fenólicos em plantas (ZHAO; DAVIS; VERPOORT, 2005). Geralmente, jasmonatos são compostos produzidos por plantas que atuam como reguladores de respostas de defesa (VERGOPOULOU; GALANOPOULOU; MARKAKI, 2001), no entanto, há relatos de que jasmonato de metila também pode ser produzido por patógenos de plantas (ABDOU et al., 2010, MIERSCH et al., 1987). Em culturas de *Aspergillus parasiticus* (VERGOPOULOU; GALANOPOULOU; MARKAKI, 2001) e *Aspergillus flavus* (GOODRICH-TANRIKULU; MAHONEY; RODRIGUEZ, 1995), jasmonato de

metila afetou a produção de aflatoxinas, podendo atuar, contraditoriamente, como promotor ou inibidor da biossíntese.

Diferentes compostos como oligossacarídeos, metais pesados, e mesmo solventes, têm sido utilizados como eliciadores químicos, levando à indução de moléculas de interesse (PETTIT, 2011).

Os promissores resultados obtidos em plantas e os poucos relatos envolvendo o uso de inibidores biossintéticos específicos em culturas de micro-organismos sugerem que o uso desses compostos deve ser mais amplamente explorado como ferramenta para manipular a produção de metabólitos secundários em micro-organismos. Além disso, o uso de eliciadores químicos de diferentes naturezas pode afetar inespecificamente a síntese de metabólitos secundários através da ativação de rotas biossintéticas silenciadas.

2.1.3 Interações microbianas e culturas mistas

Em seu habitat natural, os micro-organismos estão em constante interação, principalmente em áreas amplamente colonizadas. Sobreviver em um ambiente competitivo provavelmente requer estratégias, tais como a produção de metabólitos secundários bioativos (KNIGHT et al., 2003; SLATTERY; RAJBHANDARI; WESSON, 2001). Assim, grupos de genes potencialmente interessantes, responsáveis pela expressão de metabólitos que aumentam a competitividade no meio ambiente, podem estar silenciados nas condições não naturais de cultivo (PETTIT, 2009).

Uma estratégia utilizada para mimetizar o ambiente microbiológico natural é cultivar um micro-organismo em presença de outro. Em estudos prévios, a utilização de culturas mistas estimulou a produção de metabólitos secundários e/ou aumentou a atividade biológica de extratos microbianos (WHITT et al, 2014; CHAGAS; DIAS; PUPO, 2013, RATEB et al., 2013; ONAKA et al., 2011; ZUCK; SHIPLEY; NEWMAN, 2011; GLAUSER et al., 2009; PARK et al., 2009; PETTIT, 2009; KUROSAWA et al., 2008; OH et al., 2007; ZHU et al., 2007; ANGELL et al., 2006; ZHU; LIN, 2006; OH et al., 2005; DEGENKOLB et al., 2002; CUETO et al., 2001; SLATTERY; RAJBHANDARI; WESSON, 2001).

Evidências de que culturas mistas microbianas podem produzir novas moléculas biologicamente relevantes foram encontradas em experimentos em que fungos e bactérias originários de minas drenadas foram cultivados juntos. Somente em co-cultura com a linhagem bacteriana *Sphingomonas* sp., o fungo *Aspergillus fumigatus* foi capaz de produzir glionitrina A (Figura 3), uma nova dicetopiperazina bissulfeto, com atividade antibiótica e citotóxica (PARK et al., 2009). Zuck, Shipley e Newman (2011) também analisaram culturas mistas de *A. fumigatus* com vários micro-organismos e encontraram os mais interessantes resultados com *Streptomyces peucetius*. Essa co-cultura induziu o fungo a produzir análogos de formil-xantocilinas, incluindo os novos compostos fumiformamida e seu análogo di-metóxi-fenil (Figura 3). Rateb e colaboradores (2013) mostraram que o fungo *A. fumigatus* foi capaz de alterar seu metabolismo secundário em resposta a estímulos externos, como a adição na cultura de um metabólito de *quorum sensing*, a N-butil-DL-homoserina lactona, e o co-cultivo com uma linhagem de *Streptomyces*.

A biossíntese do antibiótico pestalona (Figura 3) pelo fungo *Pestalotia* sp., é um exemplo de indução da expressão de uma rota biossintética em resposta a co-cultura com bactéria marinha unicelular (CUETO et al., 2001). Os diterpenos libertelenona A-D (Figura 3) também foram produzidos em resposta às interações microbianas na co-cultura entre o fungo *Libertella* sp. e uma bactéria marinha unicelular (OH et al., 2005). Curiosamente, a linhagem da bactéria marinha que foi capaz de induzir a biossíntese das libertelenonas é a mesma que induziu a produção de pestalona nos estudos previamente mencionados.

A partir de uma mistura de micro-organismos originários de sedimentos marinhos foi isolada a piocianina, um pigmento azul com atividade antibiótica que não havia sido detectado em culturas puras. Após investigações, foram identificadas as duas espécies responsáveis pela produção do antibiótico, sendo *Pseudomonas aeruginosa* a verdadeira produtora e *Enterobacter* sp. a indutora. Foi verificado ainda que a produção de pequenas moléculas pela linhagem indutora não é suficiente para ativar a produção do composto pela linhagem produtora, sugerindo que a indução necessita de contato célula-célula, ou mecanismos mais complexos, como a constante troca de metabólitos entre os micro-organismos (ANGELL et al., 2006).

O co-cultivo envolvendo o fungo *Emericella sp.* e a actinobactéria marinha *Salinispora arenicola* levou ao isolamento de dois novos depsipeptídeos cíclicos antimicrobianos, emericelamidas A e B (Figura 3). Esses compostos são produzidos em baixíssimas quantidades pelo fungo em monocultura, no entanto, em co-cultura, os rendimentos foram ampliados em cem vezes (OH et al., 2007). Similarmente, aumento na produção do antibiótico istamicina pela bactéria marinha *Streptomyces tenjimariensis* também foi relatado na cultura mista com diferentes linhagens de bactéria unicelular marinha (SLATTERY; RAJBHANDARI; WESSON, 2001).

A produção de dois novos depsipeptídeos lineares, subeniatina A e B (Figura 3) foi induzida no cultivo misto de duas diferentes linhagens de *Fusarium spp.* (WANG et al., 2013). Ambos os compostos não haviam sido detectados nas culturas simples de nenhum dos fungos. Os autores sugerem que tais compostos são os precursores biossintéticos das eniatinas A, A1, B e B1, que são os compostos majoritários produzidos em culturas simples do fungo *Fusarium tricinctum*. O mesmo grupo co-cultivou o fungo *F. tricinctum* com a bactéria *Bacillus subtilis*, o que resultou no aumento da produção de compostos constitutivos do fungo, incluindo as eniatinas, juntamente com a produção de quatro compostos que não eram detectados nas culturas simples (OLA et al., 2013). Dentre esses compostos, a macrocarpona C, o ácido 2-carboximetilamino-benzóico e o citreoisocumarinol são novos (Figura 3). Ensaio de concentração inibitória mínima mostraram que as eniatinas A1 e B1, que tiveram sua produção extraordinariamente aumentada em cultura mista, são bastante ativas contra a bactéria *B. subtilis* utilizada nos co-cultivos, além de outras bactérias. Os compostos novos, entretanto, não foram ativos nas concentrações testadas.

O cultivo misto do fungo *Fusarium pallidoroseum* com a bactéria *Saccharopolyspora erythraea* levou a produção de três novos análogos da equisetina, que foram nomeados N-desmetil-ofiofetina, palidorosetina A e palidorosetina B (Figura 3). O composto ofiofetina, já relatado na literatura, foi produzido pelo fungo exclusivamente em cultura mista, e a produção de equisetina aumentou trinta vezes quando comparada ao controle contendo apenas o fungo (WHITT et al., 2014).

Durante o co-cultivo de *Acremonium sp.* e *Mycogone rosea*, foi observada a formação de novos lipoaminopeptídeos, acremostatinas A-C. Supostamente, ambos micro-organismos estão diretamente envolvidos na biossíntese desses compostos, sendo que o núcleo peptídico provém de *Acremonium sp.* enquanto que a porção de origem lipídica é oriunda de *M. rosea* (DEGENKOLB et al., 2002).

Novos antibióticos aminoglicosídeos foram produzidos por *Rhodococcus fascians* quando co-cultivado com *Streptomyces padanus*. Rodostreptomicina A e B (Figura 3) não foram detectadas nas culturas simples das respectivas bactérias, e ambos compostos apresentam amplo espectro de ação antibacteriana. Possivelmente, a biossíntese foi resultante de rotas biossintéticas combinadas dos diferentes micro-organismos, pois existe uma correlação entre a produção desses compostos e a presença de DNA de *S. padanus* em *R. fascians* (KUROSAWA et al., 2008).

Diferentes linhagens de bactérias produtoras de ácido micólico ao serem co-cultivadas com linhagens de *Streptomyces sp.* foram capazes de alterar o metabolismo secundário das actinobactérias em graus variados (ONAKA et al., 2011). Bactérias da família *Corynebacteriaceae* induziram a formação de pigmentos vermelhos por *Streptomyces lividans*, sendo que *Tsukamurella pulmonis* induziu a produção de actinorrodina enquanto que *Corynebacterium glutamicum* levou à produção de undecilprodigiosina. Além disso, a co-cultura de *T. pulmonis* com *Streptomyces endus* levou a produção de um novo antibiótico, a alchivemicina A (Figura 3).

Em experimentos de culturas mistas microbianas, também foi observado aumento da produção de toxinas e inibição do desenvolvimento dos micro-organismos. Quando *Fusarium proliferatum* foi cultivado em presença de *Trichoderma spp.*, ocorreu supressão da proliferação e acentuada diminuição da produção da toxina fumonisina B1 por *F. proliferatum* (ROJO et al., 2007). Em cultivo misto, *Trichoderma harzianum* foi capaz de inibir patógenos de solo e plantas (CHOUDARY; REDDY; REDDY, 2007; GAO et al., 2001). Experimentos mostraram que a produção de ocratoxina A, uma micotoxina bem conhecida produzida por espécies do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, foi inibida quando *Aspergillus carbonarius* cresceu em culturas mistas (VALERO et al., 2006). Em

contraste, outros relatos indicam que a produção foi significativamente estimulada em co-cultura (LEE; MANGAN, 1999). Além disso, houve aumento da produção da toxina esterigmatocistina pelo fungo *Aspergillus versicolor* quando este foi cultivado com *Penicillium aurantiogriseum* ou *Aspergillus parasiticus* (BOKHARI; FLANNIGAN, 1996).

O co-cultivo de *Aspergillus giganteus* com vários micro-organismos alterou a expressão do gene *afp*, responsável pela produção de uma proteína antifúngica. A presença de *Fusarium oxysporum* induziu a transcrição, enquanto que a cultura mista com *Aspergillus niger* resultou em supressão desse gene. Os experimentos ainda revelaram que a influência do cultivo misto foi extremamente dependente da composição do meio (MEYER; STAHL, 2003). Para medir a interação fungo-bactéria em nível molecular, Schroeckh e colaboradores (2009) cultivaram o fungo *Aspergillus nidulans* com uma coleção de 58 actinobactérias. Através de diferentes experimentos para medir expressão gênica, foi demonstrado que distintas interações fungo-bactérias levam à específica ativação de genes envolvidos no metabolismo secundário fúngico. Além disso, experimentos de diálise e análise por microscopia eletrônica mostraram que a interação física íntima da bactéria com o micélio fúngico é requerida para elicitar uma resposta específica, dando suporte à hipótese já relatada por muitos autores de que não apenas os sinais difusíveis como também o contato físico contribuem para a comunicação entre os micro-organismos e a indução de genes biossintéticos silenciados.

A produção de enzimas também pode estar diretamente envolvida na interação e competição entre os micro-organismos. Em culturas mistas, micro-organismos produzem enzimas como proteases, β -1,3-glucanases e quitinases que podem ser responsáveis pela degradação das paredes celulares das hifas dos micro-organismos competidores (SÁNCHEZ et al., 2007; ALMEIDA et al., 2007; GUTHRIE; CASTLE, 2006), e atuarem como fatores indutores da produção de metabólitos secundários (SHIN et al., 1998). As enzimas fenol-oxidases tais como lacase e peroxidase também são conhecidas por estarem envolvidas em processos de degradação. Adicionalmente, elas participam da detoxificação de compostos xenobióticos como antifúngicos (TSUJIYAMA; MINAMI, 2005).

Figura 3. Compostos inéditos isolados de culturas mistas microbianas.

Os mecanismos específicos pelos quais as interações entre várias espécies induzem a produção de metabólitos secundários ainda não são bem definidos, entretanto, o isolamento de várias substâncias inéditas com atividade biológica evidenciam que o cultivo misto representa uma estratégia promissora na indução da expressão do potencial metabólico total de cada micro-organismo, resultando em aumento da diversidade química. Além disso, as culturas mistas representam uma ferramenta útil para estudar as interações que ocorrem entre os micro-organismos em um dado ecossistema, como por exemplo, os micro-organismos endofíticos que habitam uma mesma planta hospedeira.

Os endofíticos são definidos como micro-organismos que colonizam os tecidos de uma planta hospedeira, podendo ser encontrados no interior das células ou entre elas, sem causar manifestações de doença. A relação fungo endofítico-planta hospedeira é caracterizada pelo equilíbrio entre a virulência fúngica e a defesa da planta. Se esse balanço for perturbado, a linhagem hospedada pode tornar-se patogênica (SAIKKONEN; GUNDEL; HELANDER, 2013; KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012; KOGEL; FRANKEN; HUCKELHOVEN, 2006; SCHULZ; BOYLE, 2005; SCHULZ et al., 2012).

A relação simbiótica de micro-organismos endofíticos com suas plantas hospedeiras tem sido estudada, demonstrando as diversas vantagens para ambos os organismos envolvidos e sua importância em estimular o potencial metabólico das espécies (BORGES et al., 2006; GUNATILAKA, 2006; SAIKKONEN et al., 2013). Entretanto, estudos das relações existentes entre os micro-organismos endofíticos que colonizam uma mesma planta hospedeira ainda são bastante escassos. O primeiro estudo envolvendo cultura mista de fungos endofíticos foi realizado na China, e levou à produção de novos análogos de 1-isoquinolona, marinamida e seu éster metílico (Figura 3) (ZHU; LIN, 2006), além da produção de dicetopiperazinas ciclo-(Phe-Phe) e do ácido 6-metil-salicílico (ZHU et al., 2007), que não foram produzidos quando os fungos foram cultivados individualmente. Nos experimentos realizados por Wang e colaboradores (2013), mencionados anteriormente, que levaram à produção dos novos depsipeptídeos lineares subeniatinas A e B (Figura 3), as culturas mistas foram feitas empregando linhagens de *Fusarium* spp. que foram isoladas como endofíticas, entretanto os autores não citam em nenhum momento esse fato, o

que poderia passar despercebido. Em uma publicação anterior, de Watjen e colaboradores (2009), é descrito como esses fungos foram isolados e então fica claro que todos são endofíticos da planta *Aristolochia paucinervis*.

Recentemente nosso grupo publicou um trabalho sobre culturas mistas utilizando fungos endofíticos da planta hospedeira *Smallanthus sonchifolius* (CHAGAS; DIAS; PUPO, 2013). Em resposta à presença de *Nigrospora sphaerica*, o fungo *Alternaria tenuissima* teve a produção de alguns policetídeos induzida, incluindo o estenfiperilenol. Os ensaios de atividade biológica revelaram que esse composto pode causar efeitos citotóxicos no fungo *Nigrospora sphaerica* enquanto que nenhuma fitotoxicidade na planta hospedeira *S. sonchifolius* pode ser observada, mesmo em concentrações muito superiores às aquelas tóxicas para o fungo. Isso sugere que os policetídeos produzidos por *A. tenuissima* podem ser importantes nas relações ecológicas endofítico-endofítico e endofíticos-planta hospedeira no ambiente natural.

Assim, o estudo de culturas mistas de micro-organismos endofíticos poderá possibilitar a descoberta de novas moléculas biologicamente ativas e ainda, fornecer uma valiosa oportunidade para aprofundar o entendimento das interações entre os vários endofíticos e sua relação com a planta hospedeira.

2.2 OBJETIVOS

Geral

- Cultivar as linhagens de micro-organismos endofíticos em culturas microbianas mistas ou na presença de moduladores químicos e epigenéticos como estratégia para aumentar a bio-atividade e diversidade química de produtos naturais microbianos.

Específicos

- Cultivar o fungo endofítico *Alternaria tenuissima* SS77 em meio líquido, sem e com adição individual de diferentes moduladores químicos ou epigenéticos;
- Cultivar três linhagens de actinobactérias endofíticas e cinco de fungos endofíticos em culturas simples e em misturas binárias envolvendo um fungo e uma actinobactéria (totalizando 15 combinações) em meio líquido e semi-sólido;
- Analisar os perfis químicos dos extratos obtidos através de CCDA, HPLC-DAD e RMN de ^1H ;
- Submeter os extratos obtidos aos ensaios de atividade citotóxica em células tumorais;
- Avaliar os resultados obtidos a fim de verificar o aumento da diversidade química e/ou bioativa em decorrência da aplicação de abordagens experimentais alternativas, tais como culturas microbianas mistas e o uso de moduladores químicos e epigenéticos;
- Selecionar cultivos promissores para serem ampliados, possibilitando obter quantidades suficientes de extratos para fracionamento cromatográfico, isolamento e elucidação estrutural das substâncias produzidas.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Material

2.3.1.1 Solventes, reagentes, meios de cultura, fases estacionárias para cromatografia e vidrarias

Solventes PA da marca Synth; solventes grau cromatográfico das marcas Merck, J.T. Baker e Mallinckrodt; solventes deuterados da marca Acros; moduladores químicos e epigenéticos da marca Sigma Aldrich; *kits* para biologia molecular da marca Qiagen e Applied Biosystems; cromatoplasmas sílica gel com suporte de alumínio e fluorescência UV₂₅₄, 250 µm, 20 x 10 cm (Whatman, Germany); papel de Filtro (AZ Labor); sílica flash 230-400 mesh (Merck); sílica gel 60 (Merck) 0,063-0,200 nm; sephadex LH – 20 (Sigma Aldrich); resina adsorvente diaion HP-20; PDA (dextrose, batata, ágar - Acumedia); dextrose (Vetec); extrato de levedura (Fluka); extrato de malte (Acumedia); PDB (potato dextrose broth – Sigma Aldrich); Czapek (Himedia); arroz parboilizado comercial; reagentes para eletroforese em gel de agarose e PCR; tubos *ependorf* de 1,5 e 2 mL; béqueres de 10, 50, 250 e 500, 1000 e 4000 mL (Vidrolabor); frascos *Erlenmeyer* de 50, 125, 500, 1000 e 2000 mL (Vidrolabor); colunas para cromatografia (Vidrolabor); colunas para SPE de fase normal e reversa Supelco[®] de 0,5, 1, 2 e 10 g; 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 fenil-hexil 250 mm x 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex) acoplada à pré-coluna 12,5 mm x 4,6 mm (Phenomenex); 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 UPLC: C18 50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm (Waters Acquity), acoplada à pré-coluna 5 mm x 2,1 mm (Waters Acquity); coluna para cromatografia gasosa: DB-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm) Agilent J&W GC Columns; 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 (CDCl₃) e MMS005B (CD₃OD); tubos de transferência de ágar (Fisher[®]).

2.3.1.2 Equipamentos

Aparelho de água Millipore Milli-Q (Millipore); autoclave vertical (Phoenix[®] AV 75); aparelho *NanoDrop* (Thermo Scientific); balança analítica BP 121S (Sartorius); aparelho vortex (Nova Instruments); Centrífuga Hettich EBA 12; incubadora BOD (Tecnal); evaporador centrífugo tipo Speed-Vac (UNIVAPO 100 ECH); bomba de vácuo (Micronal); capela de fluxo laminar (Pachane[®] PA 320); termociclador (Applied Biosystems); sistema a vácuo para SPE da Supelco[®]; 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 FRC-10A Shimadzu, injetor automático SIL-10AF Shimadzu e *software* Class VP; espectrômetro de RMN: (Bruker[®] DRX-500MHz); espectrômetro de massas: espectrômetro de massas XEVO TQ-S (Waters Corporation Milford, USA) acoplado a sistema de UPLC ACQUITY UPLC[™] H CLASS; e ESI-MS UltrO-TOF (Bruker-daltonics, Billerica, USA); cromatógrafo gasoso com detector de massas (GC-MS) Shimadzu modelo QP-2010; mesa agitadora com controle de temperatura (Innova TM 4300 – New Brunswick Scientific); rotaevaporadores (Büchi R-114 ou Micronal B525); sistema purificador de água osmose reversa OS10LX (Gehaka); sonicador Branson1200 (Branson Ultrasonics Corporation), cuba de eletroforese horizontal conectada à fonte; sequenciador ABI Prism[®] 3100 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*).

2.3.2 Métodos

2.3.2.1 Seleção e identificação dos micro-organismos

Os micro-organismos utilizados nos experimentos pertencem à coleção de micro-organismos endofíticos do Laboratório de Química de Micro-organismos da FCFRP-USP, coordenado pela Profa. Dra. Mônica T. Pupo. O fungo endofítico *A. tenuissima* SS77 utilizado na realização dos experimentos de modulação química e epigenética, foi isolado da planta medicinal *S. sonchifolius* (GALLO et al., 2009), e está sendo estocado em água deionizada estéril (CASTELLANI, 1963) e

óleo mineral (ARAÚJO et al., 2002). As actinobactérias e fungos endofíticos utilizados nos experimentos de culturas mistas foram isolados da planta medicinal *Lychnophora ericoides* (falsa-arnica), durante o doutorado do aluno Raphael Conti (proc. 08/00812-7), já finalizado. As actinobactérias foram identificadas por sequenciamento genético pela empresa *Genotyping* Biotecnologia. Os fungos também foram identificados através de sequenciamento genético, e esses experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da FCFRP-USP coordenado pelo Prof. Dr Gustavo Henrique Goldman e no Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP coordenado pela Prof. Dra. Angela Kaysel Cruz. Todos os micro-organismos foram estocados em óleo mineral, enquanto que os fungos também estão estocados em água deionizada estéril. Foram selecionadas as linhagens RLe7, RLe10 e RLe12 de actinobactérias, isoladas das raízes, e as linhagens de fungos FLe3, FLe6, FLe8 (purificadas em FLe8.1 e FLe8.2) e FLe11, isoladas das folhas, e RLe14, isolada da raiz.

2.3.2.1.1 Identificação dos fungos por sequenciamento genético da região ITS do rDNA

2.3.2.1.1.1 Obtenção da massa micelial e extração do DNA fúngico

As culturas estoques dos fungos endofíticos FLe3, FLe6, FLe8.1, FLe8.2, FLe11 e RLe14 foram reativadas em meio PDA. Após 7 dias, 10 fragmentos de ágar contendo micélio foram transferidos para 200 mL de meio fermentativo PDB (batata, dextrose, caldo). A cultura foi incubada por 6 dias a 30 °C sob agitação constante de 120 rpm.

A massa micelial foi separada do meio de cultura através de filtração à vácuo. Em seguida, foi triturada em nitrogênio líquido e uma porção foi transferida para tubos do tipo *ependorf* de 1,5 ou 2 mL contendo o tampão de extração (tris-HCl pH 8,5, 200 mM; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5%). Foi adicionado micélio até a saturação do tampão. Adicionou-se volume igual da mistura fenol-clorofórmio (1:1) e extraiu-se por 10 min usando misturador vórtex e depois centrifugou-se a 14.000 rpm por 15 min. A fase aquosa foi retirada e transferida

para outro tubo do tipo *ependorf* de 1,5 mL. Foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio, misturado e centrifugado a 14.000 rpm por 5 min. Transferiu-se a fase aquosa para outro tubo do tipo *ependorf* de 1,5 mL e adicionou-se 0,54 volume de isopropanol, misturou-se e centrifugou-se a 14000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi retirado, lavou-se o *pellet* com etanol 70% e centrifugou-se a 14.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco em aparelho de *speed vacuum* por 5 min e depois ressuspensão em água estéril (aproximadamente 100 µL).

A qualidade do DNA extraído foi verificada através de eletroforese em gel de agarose (1% de agarose em tampão TE corado com brometo de etídio; corrida de 30 minutos a 100V), aplicando-se 5 µL da amostra de DNA. O DNA foi quantificado em aparelho *NanoDrop*.

- tampão TE: 48,4 g de tris base, 11,42 mL de ácido acético glacial e 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0.

2.3.2.1.1.2 Amplificação e purificação da região do DNA específica para a identificação

Em termociclador (aparelho de PCR), foi feita a amplificação da região ITS do rDNA, que está localizada entre os genes 18SrDNA e 28SrDNA. Para isso, foi utilizado o par de *primers* ITS3 e ITS4 (ITS3: 5' GCATCGATGAAGAACGCAAGC 3' e ITS4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). A reação foi feita utilizando 500 µg de DNA, 5 µL de *Buffer* (com MgSO₄), 1 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de *primer* ITS3 10 pmol/µL, 1 µL de *primer* ITS4 10 pmol/µL, 1 U de Taq polimerase e água milli-Q estéril para um volume final de 50 µL. Seguiu-se a ciclagem: 94 °C por 5 min; 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 59 °C por 30 segundos, 72 °C por 3 min; 72 °C por 10 min; e 4º C até a retirada da reação do termociclador.

Foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% aplicando-se todo o material obtido após o procedimento, para verificar a eficácia do processo (observação de uma banda com cerca de 300 pb), e prosseguir-se com a purificação.

A purificação do DNA foi feita utilizando o protocolo da *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). A banda específica de DNA previamente obtida no gel

de agarose (de aproximadamente 300 pb) foi recortada e colocada em um tubo do tipo *ependorf*. Pesou-se a massa de gel obtida em cada *ependorf*, e adicionou-se 3 vezes o volume de *Buffer* QG. Incubou-se a 50 °C por cerca de 10 min para a completa dissolução do gel. Adicionou-se 10 µL de acetato de sódio 3 M pH 5 para corrigir o pH. Foi adicionado isopropanol (mesmo volume do gel) e misturado. A amostra foi transferida para uma coluna QIAquick contida em um tubo tipo *ependorf* de 2 mL. Centrifugou-se por 1 min a 13.000 rpm. A porção líquida foi descartada e adicionou-se 0,5 mL de *Buffer* QG à coluna e centrifugou-se por 1 min a 13.000 rpm. O líquido foi descartado. Em seguida, a coluna foi lavada adicionando-se 700 µL de *Buffer* PE, permanecendo por 5 min à temperatura ambiente e depois centrifugou-se por 1 min a 13.000 rpm (procedimento repetido 2 vezes). O líquido foi descartado e centrifugou-se novamente por 2 min a 13.000 rpm. A coluna foi transferida para um tubo do tipo *ependorf* de 1,5 mL. A eluição da amostra foi feita através da adição de 30 µL de água milli-Q estéril na coluna (aguardou-se 1 min), seguida de centrifugação por 1 min a 13.000 rpm.

O DNA obtido foi quantificado em aparelho *NanoDrop*.

2.3.2.1.1.3 Sequenciamento do DNA amplificado

A reação de sequenciamento foi realizada segundo o protocolo *Big Dye v3.1 kit* (Applied Biosystems). Foram utilizados 100 ng do DNA obtido após a purificação, 2 µL de *BigDye*, 0,5 µL de *primer* (20 pmol/µL, um *primer* por reação), 6 µL de tampão (2 mL de Tris-HCl 1 M pH 9, 1 mL de MgCl₂ 50 mM, e água milli-Q até o volume de 10 mL) e água milli-Q estéril para um volume final de 20 µL. Essa reação foi então submetida à seguinte ciclagem: 92 °C por 2 min; 40 ciclos de 96 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos, 60 °C por 4 min; e 16 °C até a retirada da reação do termociclador.

Para purificar o DNA, o produto dessa reação foi precipitado. Para isso, adicionou-se 80 µL de isopropanol 65%, misturou-se em misturador vórtex e cada tubo foi deixado à temperatura ambiente em local escuro, por 20 min. Centrifugou-se por 25 min a 12.000 rpm. O isopropanol foi removido, adicionou-se 200 µL de etanol 70% e centrifugou-se por 5 min a 12.000 rpm. Todo o etanol

foi removido e o material foi seco em aparelho *speed vacuum*. As amostras foram ressuspensas em 20 µL de formamida *Hi-Di* (altamente deionizada) e encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, onde foi realizado o sequenciamento automático, utilizando o equipamento ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer.

As sequências obtidas foram analisadas e editadas pelo *software Sequencher 4.1.4*. As sequências consenso foram então alinhadas com aquelas disponíveis no banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), utilizando para isso o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

2.3.2.2 Produção e extração dos metabólitos secundários e/ou enzimas

Os procedimentos envolvendo a produção dos metabólitos secundários e/ou enzimas foram realizados sob condições assépticas (capela de fluxo laminar) e todo material foi previamente esterilizado em autoclave. O procedimento de extração dos metabólitos secundários foi baseado nas metodologias empregadas durante o desenvolvimento do projeto de mestrado (CHAGAS, 2010), que se mostraram bastante eficazes para obtenção de extratos em altos rendimentos, e também em novas metodologias que foram sendo testadas e incorporadas.

2.3.2.2.1 Modulação química e epigenética

2.3.2.2.1.1 Seleção do meio de cultivo fermentativo

Antes da realização dos experimentos de modulação química e epigenética foi inicialmente selecionado o meio de cultivo fermentativo que seria utilizado. A produção de metabólitos secundários pelo fungo *A. tenuissima* SS77 foi avaliada em meio Czapek, de extrato de malte 0,7% e PDB. Os parâmetros utilizados nessa seleção foram o perfil metabólico e o potencial citotóxico dos extratos frente às linhagens de células tumorais.

2.3.2.2.1.2 Determinação da toxicidade dos diferentes moduladores contra o fungo *A. tenuissima* SS77

Antes de iniciar os experimentos de modulação química e epigenética, também foi verificada a toxicidade dos diferentes moduladores contra o fungo *A. tenuissima* SS77. Para isso, foi determinada a concentração inibitória mínima (MIC) desses compostos frente ao fungo.

O experimento de CIM foi realizado em placa de 96 poços. Inicialmente, as substâncias foram solubilizadas em DMSO, obtendo-se soluções iniciais na concentração de 500 mM. 50 µL dessas soluções foram diluídas em 200 µL de PDB (diluição 1:5). Nos primeiros poços foram adicionados 200 µL das soluções preparadas em PDB (100 mM) e nos poços seguintes foram adicionados 180 µL de PDB, exceto no último poço. Fez-se então a diluição em série transferindo-se 20 µL de um poço para o seguinte (diluição seriada de 1:10).

Em seguida, em uma placa de Petri contendo o fungo (7 dias de crescimento), foram adicionados 15 mL de PDB e efetuada a raspagem da superfície. O meio PDB, juntamente com esporos e fragmentos de micélio, foi transferido para um tubo tipo *Falcon* e homogeneizado. 150 µL dessa suspensão foram transferidos para todos os poços e em seguida, foram adicionados 30 µL do revelador resazurina. Após a adição do inóculo e do revelador, as concentrações finais das substâncias nos poços foram de 50 mM, 5 mM, 500 µM, 50 µM, 5 µM, 500 nM, 50 nM (linhas de H a B da placa, respectivamente). A concentração máxima de DMSO utilizada foi de 10% v:v (primeiros poços). Foi feito um controle de solvente (DMSO), um controle positivo com o antifúngico actidione e um controle negativo, no qual nenhuma substância foi adicionada (apenas meio de cultivo, fungo, água em substituição ao DMSO e revelador). Nas colunas de 1 a 12 da placa foram analisadas, respectivamente, as substâncias ácido suberoidroxâmico (AS), ácido valpróico (AV), butirato de sódio (BS), procaína (P), procainamida (PD), hidralazina (H), iodoacetamida (IO), jasmonato de metila (JM), lovastatina (L), actidione (controle positivo-CP), controle de solvente (CS) e controle negativo (CN, Figura 4). As placas foram colocadas em geladeira (aproximadamente 4 °C) e o crescimento fúngico foi acompanhado durante 5 dias.

Figura 4. Moduladores químicos e epigenéticos utilizados nos experimentos de modulação.

2.3.2.2.1.3 Efeito da adição de moduladores em cultivos em meio líquido

2.3.2.2.1.3.1 Cultura controle - sem adição de modulador

A cultura estoque do fungo endofítico *A. tenuissima* SS77 foi reativada em meio PDA (batata, dextrose, ágar). Após 7 dias, cinco fragmentos de micélio-ágar, de 0,5 cm de diâmetro, foram cortados e transferidos, com o auxílio de tubo de transferência da Fisher®, para 75 mL de meio fermentativo de extrato de malte 0,7% (meio previamente selecionado) contidos em um frasco do tipo *Erlenmeyer* de 250 mL de capacidade. Após 3 dias de cultivo, foram adicionados 100 µL de DMSO ao meio fermentativo. A cultura foi incubada por 11 dias adicionais a 30 °C sob agitação constante de 120 rpm. Após esse período, foram adicionados 75 mL de EtOH 95% ao meio de cultura, que permaneceu em maceração por aproximadamente 12 horas. O meio foi homogeneizado com aparelho mixer e mantido em ultrassom por 15 min. O micélio foi separado por filtração a vácuo, prosseguindo-se com a partição líquido-líquido da porção hidroalcoólica com Acetato de etila (procedimento repetido 2 vezes). As fases orgânicas foram

reunidas e concentradas, obtendo-se o extrato da cultura controle do fungo *A. tenuissima* SS77. Também foi obtido o extrato do meio de cultura apenas, seguindo-se os mesmos procedimentos, no entanto, sem adição do fungo, para comparação com o extrato da cultura inoculada com o fungo. Os controles foram realizados em duplicata.

2.3.2.2.1.3.2 Cultura sob modulação química ou epigenética

Os moduladores químicos testados foram os inibidores específicos de vias biossintéticas lovastatina (L) (via do mevalonato), e iodoacetamida (IO) (via dos policetídeos), além do eliciador jasmonato de metila (JM). Os moduladores epigenéticos testados foram os inibidores de HDAC butirato de sódio (BS), ácido suberoidroxâmico (AS) e ácido valpróico (AV), e os inibidores de DNA metiltransferase procaína (P), procainamida (PD) e hidralazina (H). Para realização dos experimentos, o fungo *A. tenuissima* SS77 foi cultivado e extraído como descrito anteriormente. No entanto, no terceiro dia de cultura fermentativa foi adicionado ao meio de cultivo, individualmente, cada um dos moduladores químicos e epigenéticos mencionados, na concentração final de 50 μ M, previamente solubilizados em 100 μ L de DMSO. As condições de cultivo e extração foram rigorosamente mantidas para que os resultados obtidos na cultura sob modulação química ou epigenética pudessem ser comparados aos da cultura controle. As substâncias foram avaliadas em duplicata.

2.3.2.2.1.4 Alteração das condições de cultivo em meio líquido para moduladores potencialmente promissores

Esses experimentos foram realizados como descrito previamente para a avaliação do efeito da adição de moduladores em meio líquido, com pequenas variações, já que durante esses últimos experimentos os cultivos foram ampliados. Apenas foram analisados moduladores que apresentaram resultados potencialmente promissores nos primeiros cultivos.

Assim, 12 fragmentos de ágar contendo micélio do fungo de 7 dias foram transferidos para 200 mL de meio fermentativo contidos em um frasco do tipo

Erlenmeyer de 500 mL de capacidade. Após 3 dias de cultivo, foram adicionadas ao meio fermentativo as diferentes substâncias solubilizadas em 250 µL de DMSO. As concentrações analisadas também foram diferentes. Hidralazina foi testada nas concentrações finais de 50 µM e 200 µM, iodoacetamida em 100 µM e lovastatina em 500 µM. Todo o restante do procedimento foi feito como descrito anteriormente.

2.3.2.2.1.5 Efeito da adição do modulador 5-azacitidina em cultivos em meio semi-sólido

2.3.2.2.1.5.1 Cultura controle - sem adição de modulador

A cultura estoque do fungo endofítico *A. tenuissima* SS77 foi reativada em meio PDA (batata, dextrose, ágar). Após 7 dias, três fragmentos de ágar (5 mm de diâmetro) contendo micélio foram transferidos para um tubo de ensaio contendo 5 mL de extrato de malte 0,7% que foi incubado a 30 °C sob agitação constante de 120 rpm. Após 3 dias, o meio de cultivo líquido foi transferido para a superfície de uma placa de Petri contendo 25 mL de meio de cultivo semi-sólido de extrato de malte 0,7%. A cultura foi incubada em estufa a 30 °C por 11 dias adicionais. Para realizar a extração, o meio de cultura (ágar e micro-organismo) foi transferido para um recipiente onde foram adicionados 100 mL de metanol e 100 mL de água destilada. Após 12 horas, aproximadamente, o meio foi sonificado por 15 min e filtrado a vácuo. A porção hidroalcoólica foi submetida à partição com acetato de etila (procedimento realizado 2 vezes). As fases orgânicas foram reunidas e concentradas, obtendo-se o extrato da cultura controle.

2.3.2.2.1.5.2 Cultura sob modulação epigenética

O modulador epigenético testado em meio semi-sólido foi o inibidor de DNA metiltransferase 5-azacitidina (AZ, Figura 4). Para realização dos experimentos, o fungo *A. tenuissima* SS77 foi cultivado e extraído como descrito anteriormente. No entanto, o meio de cultivo líquido foi transferido para a superfície do ágar contendo extrato de malte 0,7% já inoculado com o 5-

azacitidina, na concentração final de 150 μ M, previamente solubilizada em 35 μ L de DMSO. As condições de cultivo e extração foram rigorosamente mantidas para que os resultados obtidos na cultura sob modulação epigenética pudessem ser comparados aos da cultura controle.

2.3.2.2.1.6 Efeito da adição de moduladores em cultivos utilizando diferentes meios semi-sólidos e extraídos em micro-escala com diferentes misturas de solventes

2.3.2.2.1.6.1 Cultura controle - sem adição de modulador

A cultura estoque do fungo endofítico *A. tenuissima* SS77 foi reativada em meio PDA. Após 7 dias, placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultivo semi-sólido de PDA ou ágar de extrato de malte a 0,7% foram cobertas com 1,8 mL de solução aquosa de DMSO a 0,24% e deixou-se secar. Em seguida, 1 mL de glicerol a 20% foi adicionado na superfície da placa de Petri contendo o fungo e foi feita a raspagem para remover os esporos, juntamente com micélio. 20 μ L dessa suspensão foram transferidos e espalhados na superfície das placas cobertas com solução de DMSO. Além disso, um fragmento (0,5 cm de diâmetro) contendo micélio e ágar foi removido da cultura do fungo e transferido para o centro da placa com DMSO. A cultura foi incubada em estufa BOD a 30 °C por 14 dias adicionais. Além do controle contendo o meio de cultivo, o fungo e a solução de DMSO, foram feitos controles apenas com o meio de cultivo e controles em que foi adicionado o fungo ao meio de cultivo sem solução de DMSO. A extração dos meios de cultura foi realizada em micro-escala. Para isso, cinco fragmentos de diferentes regiões da placa onde o fungo se desenvolveu foram transferidos para tubos do tipo *ependorf* de 1,5 mL de capacidade, e então 1 mL da mistura-solvente Acetonitrila:água 1:1 ou Acetato de etila:isopropanol 1:1 foi adicionado aos tubos. Os fragmentos foram triturados com um bastão de vidro e em seguida, os tubos foram deixados em aparelho de ultra-som por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo *ependorf* limpo com auxílio de uma pipeta de Pasteur e seco em aparelho de *speed vacuum*.

2.3.2.2.1.6.1 Cultura sob modulação química ou epigenética

Os moduladores químicos testados foram os inibidores específicos de vias biossintéticas lovastatina (L) (via do mevalonato), e iodoacetamida (IO) (via dos policetídeos), além do eliciador ácido jasmônico (JM, Figura 4) e o antifúngico actidione (act). Os moduladores epigenéticos testados foram os inibidores de HDAC (enzimas histona-deacetilases) butirato de sódio (BS), ácido suberoidroxâmico (AS) e ácido valpróico (AV), e os inibidores de DNA metiltransferase procaína (P) e hidralazina (H) e 5-azacitidina (AZ). Para realização dos experimentos, o fungo *A. tenuissima* SS77 foi cultivado e extraído como descrito anteriormente, no entanto, a solução de DMSO adicionada ao meio de cultivo continha, individualmente, cada um dos moduladores químicos e epigenéticos mencionados, na concentração final de 10 μ M (actidione e iodoacetamida) ou 100 μ M (demais substâncias). As condições de cultivo e extração foram rigorosamente mantidas para que os resultados obtidos na cultura sob modulação química ou epigenética pudessem ser comparados aos das culturas controle.

2.3.2.2.1.7 Obtenção de metabólitos secundários a partir de culturas mistas do fungo *A. tenuissima* SS77 com *Nigrospora sphaerica* SS67

Os trabalhos de culturas mistas envolvendo dois fungos endofíticos isolados da mesma planta (*Smallanthus sonchifolius*), que foram iniciados no mestrado (CHAGAS; DIAS; PUPO, 2013; CHAGAS, 2010), foram prosseguidos durante o doutorado. A partir de extratos de culturas mistas de *A. tenuissima* SS77 com *N. sphaerica* SS67, foram isolados três compostos, produzidos por *A. tenuissima* SS77, além dos que já haviam sido identificados. Para a obtenção desses extratos, os fungos foram cultivados como a seguir:

As culturas estoque dos fungos endofíticos *A. tenuissima* SS77 e *N. sphaerica* SS67 foram reativadas meio PDA. Após 7 dias, três fragmentos de ágar contendo micélio foram transferidos para 10 mL de pré-cultura contendo meio rico em nutrientes (5 g de triptona, 10 g de dextrose, 3 g de extrato de levedura e 10 g de extrato de malte por litro de água), em tubos *Falcon* de

capacidade de 50 mL. Os fungos foram mantidos sob agitação constante a 120 rpm, 30 °C, por 7 dias. Após este período, 10 mL das pré-culturas de cada fungo foram transferidos para um mesmo frasco *Erlenmeyer* de 500 mL de capacidade, contendo 200 mL de meio fermentativo de extrato de malte 0,7%. Foram cultivados um total de quatro frascos de culturas mistas. Essas culturas foram incubadas, nas mesmas condições mencionadas, por um período adicional de 14 dias, seguindo-se a extração.

Foram utilizados dois métodos de extração diferentes. Dois frascos foram extraídos através de resina adsorvente e os outros dois por partição líquido-líquido. Para realizar a extração com resina, no sétimo dia de cultura fermentativa, foram adicionados 10 g de resina adsorvente diaion HP-20 (previamente empacotadas em bolsas de papel de filtro e esterilizadas) aos 200 mL de meio de cultura, e a cultura permaneceu em agitação por mais 7 dias. Após esse período, a resina foi retirada do meio de cultura e extraída. A extração dos metabólitos adsorvidos foi realizada com 100 mL de etanol, através de sonicação em ultrassom por 15 min e filtração a vácuo (procedimento repetido 2 vezes). Em seguida, da mesma forma, foi feita extração com 100 mL de acetona (procedimento realizado uma vez). Ambos os solventes foram reunidos e evaporados, resultando no extrato 1r6777 (60 mg). Na extração por partição, no décimo quarto dia da cultura fermentativa foram adicionados 200 mL de etanol aos 200 mL de meio de cultura. Após 12 horas, aproximadamente, o meio foi homogeneizado em liquidificador e mantido em ultrassom por 15 minutos. O micélio foi separado por filtração a vácuo e foram adicionados 300 mL de água destilada à fração hidroalcoólica, que foi posteriormente submetida à partição líquido-líquido com 700 mL de acetato de etila (volume dividido em 3 procedimentos). As fases orgânicas foram reunidas e concentradas, obtendo-se o extrato 1p6777 (70,5 mg).

2.3.2.2 Interações microbianas entre actinobactérias e fungos endofíticos

2.3.2.2.1 Obtenção de metabólitos secundários em meio semi-sólido – adição da actinobactéria previamente à adição do fungo na cultura mista

2.3.2.2.1.1 Culturas simples dos fungos e das actinobactérias

As culturas estoque dos fungos endofíticos FLe3, FLe6, FLe8 (FLe8.1+FLe8.2), FLe11 e RLe14 foram reativadas em meio PDA. Após 7 dias, dois fragmentos de ágar contendo micélio foram transferidos para placas de Petri (90 mm) contendo meio PDA, ficando separados entre si pela distância de 4 cm. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C, por 11 dias. Para realizar a extração, o meio de cultura (ágar e micro-organismo) foi transferido para um recipiente onde foram adicionados 100 mL de metanol e 100 mL de água destilada. Após 12 horas, aproximadamente, o meio foi sonificado por 15 min e filtrado a vácuo. A porção hidroalcoólica foi particionada com Acetato de etila (procedimento realizado 2 vezes). As fases orgânicas foram reunidas e concentradas, obtendo-se os extratos das respectivas culturas. O procedimento realizado para as actinobactérias foi praticamente o mesmo, com pequenas alterações. As culturas estoques das actinobactérias RLe7, RLe10 e RLe12 foram inicialmente reativadas em 4 mL de meio ISP-2 (4 g de extrato de levedura, 10 g de extrato de malte e 4 g de dextrose por litro de água destilada, pH 7,2), a 30 °C, 120 rpm, por 48 horas. Em seguida, foram inoculadas em meio ISP-2 ágar (15 g de ágar para cada 1 L de meio ISP-2) e incubadas a 30 °C. Após 7 dias, dois fragmentos de ágar foram transferidos para placas de Petri contendo meio PDA (4 cm de distância), que foram incubadas em estufa a 30 °C, por 14 dias, seguindo-se a extração. Experimentos controle, sem adição de micro-organismo, foram realizados para se obter extratos apenas do meio de cultura.

2.3.2.2.1.2 Culturas mistas de fungos com actinobactérias

Foram realizadas culturas mistas envolvendo um fungo e uma actinobactéria. Assim, foram feitas as seguintes combinações: RLe7 e FLe3,

RLe7 e FLe6, RLe7 e FLe8, RLe7 e FLe11, RLe7 e RLe14, RLe10 e FLe3, RLe10 e FLe6, RLe10 e FLe8, RLe10 e FLe11, RLe10 e RLe14, RLe12 e FLe3, RLe12 e FLe6, RLe12 e FLe8, RLe12 e FLe11, RLe12 e RLe14, totalizando 15 diferentes culturas mistas.

Os micro-organismos foram cultivados e extraídos como descrito para as culturas simples, no entanto, fragmentos de diferentes micro-organismos (um fungo e uma actinobactéria) foram transferidos para o meio PDA. Assim, o cultivo misto foi iniciado com a adição de um fragmento de micélio-ágar do fungo ao meio PDA já contendo um fragmento da actinobactéria de 3 dias. Os micro-organismos foram incubados juntos por um período adicional de 11 dias, e em seguida, foi realizada a extração. Nas culturas mistas, diferentes porções da placa foram extraídas separadamente: região contendo o fungo (F) e região contendo a actinobactéria juntamente com a zona de inibição (A). Assim, cada cultura mista gerou 2 extratos diferentes.

2.3.2.2.2 Obtenção de enzimas a partir de culturas simples e mistas em meio semi-sólido

Para obtenção de enzimas, os cultivos foram realizados em meio semi-sólido praticamente da mesma maneira que foram feitos para a obtenção de metabólitos secundários, com poucas alterações. Assim, o cultivo misto foi iniciado com a adição de um fragmento de micélio-ágar do fungo ao meio PDA já contendo um fragmento de actinobactéria de 3 dias, entretanto, foram utilizadas placas de Petri de 150 mm de diâmetro e os micro-organismos foram adicionados a uma distância de 9 cm. Da mesma forma, foram realizados cultivos simples como controle, nos quais foram adicionados fragmentos do mesmo micro-organismo. As placas foram incubadas em BOD (demanda bioquímica de oxigênio) a 30 °C, por um período total de 28 dias. Para realizar a extração, o ágar da região entre os micro-organismos foi recortado e transferido para um tubo do tipo *Falcon* de 50 mL de capacidade, seguido pela adição de 15 mL de tampão acetato 20 mM pH 5,0. O ágar foi triturado em banho de gelo (aproximadamente 4 °C), e permaneceu sob extração em tampão por 1 h. Centrifugou-se por 10 min a 3000 rpm e o sobrenadante contendo as enzimas foi

transferido para um tubo do tipo *Falcon* de 15 mL de capacidade e congelado à -20 °C.

2.3.2.2.2.1 Teste para verificar a presença de enzimas – amilase, pectinase e protease

A presença de enzimas foi determinada indiretamente através da avaliação da atividade enzimática específica das enzimas pesquisadas. A atividade enzimática é detectada através de reações colorimétricas ou fluorimétricas, nas quais a degradação do substrato específico pela enzima forma um subproduto capaz de reagir com um revelador e produzir cor ou fluorescência.

Para determinar a presença de pectinase, em um tubo de ensaio foram adicionados 500 µL do substrato pectina 0,25%, 250 µL de tampão fosfato pH 6,5 e 500 µL da solução contendo as enzimas. O tubo foi incubado a 37 °C por 60 s. Após esse período, foram adicionados 500 µL do reagente DNS (ácido dinitrosalicílico). A solução foi agitada e fervida por 5 min. Resfriou-se e adicionou-se 5,0 mL de água deionizada. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância em espectrômetro no UV-VIS, selecionando-se o comprimento de onda de 575 nm. O controle foi obtido da mesma maneira, no entanto, utilizou-se uma solução de enzima previamente fervida.

O mesmo procedimento foi realizado para determinar a presença de amilase, variando-se apenas o substrato (amido 0,5%).

Para determinar a presença de protease procedimentos similares também foram utilizados, variando-se o substrato (solução contendo proteínas) e o revelador (reagente de Bradford). O valor da absorbância foi adquirido em 595 nm.

2.3.2.2.3 Obtenção de metabólitos secundários em meio líquido – adição do fungo previamente à adição da actinobactéria na cultura mista

2.3.2.2.3.1 Culturas simples dos fungos e das actinobactérias

As culturas estoques dos fungos endofíticos FLe3, FLe6, FLe8.1, FLe11 e RLe14 foram reativadas em meio PDA. Após 7 dias, 12 fragmentos de ágar contendo micélio foram transferidos para 200 mL de meio fermentativo PDB. A cultura foi incubada por 14 dias a 30 °C sob agitação constante de 120 rpm. O restante do procedimento de extração para obtenção do extrato da cultura simples de cada fungo foi realizado como descrito anteriormente para o fungo *A. tenuissima* SS77. Para obtenção dos extratos das culturas simples das actinobactérias RLe7 e RLe10 (RLe12 não foi cultivada em meio líquido), a cultura estoque de cada actinobactéria foi reativada em 4 mL de meio ISP-2 sob agitação constante de 120 rpm, a 30 °C por 48 horas. Em seguida, as actinobactérias foram inoculadas em meio ISP-2 ágar, e incubadas a 30 °C. Após 7 dias, foi feita uma pré-cultura transferindo-se dois fragmentos de micélio-ágar para 4 mL de meio ISP-2, que permaneceu por 72 h, a 30 °C, 120 rpm. Os 4 mL de pré-cultura foram então transferidos para 200 mL de meio fermentativo PDB. A cultura foi incubada por 11 dias a 30 °C, 120 rpm. O procedimento de extração para obtenção do extrato de cada actinobactéria foi realizado como descrito anteriormente para o fungo *A. tenuissima* SS77. Também foram obtidos os extratos apenas dos meios de cultura, seguindo-se os mesmos procedimentos, no entanto, sem adição de fungo ou actinobactéria, para comparação com os extratos das culturas inoculadas com os micro-organismos.

2.3.2.2.3.2 Culturas mistas de fungos com actinobactérias

Da mesma forma que no cultivo semi-sólido, foram realizadas culturas mistas envolvendo um fungo e uma actinobactéria, entretanto, as culturas mistas envolvendo a actinobactéria RLe12 não foram avaliadas. Além disso, foi utilizada a linhagem FLe8.1 (purificada a partir de FLe8). Assim, foram feitas as seguintes combinações: RLe7 e FLe3, RLe7 e FLe6, RLe7 e FLe8.1, RLe7 e FLe11, RLe7

e RLe14, RLe10 e FLe3, RLe10 e FLe6, RLe10 e FLe8.1, RLe10 e FLe11, RLe10 e RLe14, totalizando 10 diferentes culturas mistas.

Os micro-organismos foram cultivados e extraídos como descrito para as culturas simples líquidas, com pequenas alterações. O cultivo misto foi iniciado com a adição de 4 mL da pré-cultura de 3 dias da actinobactéria aos 200 mL de cultivo fermentativo de 3 dias do fungo. Os micro-organismos foram mantidos juntos em meio fermentativo por 11 dias adicionais. Após extração, foram obtidos os extratos das culturas mistas líquidas de actinobactérias e fungos endofíticos.

2.3.2.3 Triagem química dos extratos brutos

Os extratos brutos obtidos foram analisados comparativamente por CCDA em fase normal com revelação em UV (254 e 365 nm) e vanilina sulfúrica, HPLC-DAD em fase reversa (utilizando coluna C18 ou coluna fenil-hexil como fases estacionárias e gradiente de metanol ou acetonitrila em água, como fases móveis) e RMN de ^1H .

2.3.2.4 Triagem biológica dos extratos brutos – atividade citotóxica em células tumorais

O ensaio citotóxico foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia sito na Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, sob os cuidados da Prof. Dra. Cláudia do Ó Pessoa (GALLO et al., 2009). A citotoxicidade dos extratos foi determinada através do ensaio colorimétrico do MTT (MOSMAM, 1983) utilizando-se três linhagens celulares tumorais humanas: MDA-MB435 (mama), HCT-8 (cólon) e SF295 (sistema nervoso), 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 . Os extratos foram incubados durante 72 h na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O controle positivo foi realizado com a substância doxorubicina cujas Cl_{50} são 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as células HCT-8 e SF-295, e 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a célula 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, sendo determinadas amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (Mo, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento celular variando de 75 a 100%).

2.3.2.5 Seleção de extratos promissores, cultivos ampliados e alterações nas condições de cultivo

Os perfis químicos dos extratos obtidos com e sem adição de moduladores químicos e epigenéticos foram comparados através das diferentes técnicas analíticas, tais como CCDA, HPLC-DAD e RMN de ^1H , assim como os dos extratos em culturas simples e mistas para verificar possíveis semelhanças e diferenças. A análise dos resultados dos ensaios biológicos dos extratos brutos permitiu avaliar se as diferentes estratégias utilizadas resultaram na produção de substâncias bioativas. Extratos que apresentaram atividade biológica significativa e/ou perfil químico interessante foram produzidos em maior quantidade para o isolamento das substâncias.

2.3.2.5.1 Cultivos ampliados em meio líquido - adição do fungo previamente à adição da actinobactéria na cultura mista

2.3.2.5.1.1 Obtenção de metabólitos secundários da cultura simples do fungo FLe6

As culturas estoques do fungo endofítico FLe6 foi reativada em meio PDA. Após 7 dias, 12 fragmentos de ágar contendo micélio foram transferidos para 5 frascos contendo 200 mL de meio fermentativo PDB cada. As culturas foram incubadas por 14 dias a 30 °C sob agitação constante de 120 rpm. Após esse período, foram adicionados 200 mL de EtOH 95% ao meio de cultura, contido em cada frasco, que permaneceu em maceração por aproximadamente 12 horas. O

meio foi homogeneizado com aparelho mixer e mantido em ultrassom por 15 min. O micélio foi separado por filtração a vácuo, prosseguindo-se com a partição líquido-líquido da porção hidroalcoólica com acetato de etila (procedimento repetido 2 vezes). As fases orgânicas foram reunidas e concentradas, obtendo-se o extrato bruto da cultura simples do fungo FLe6.

2.3.2.5.1.2 Obtenção de metabólitos secundários de cultura mista do fungo FLe6 com actinobactéria RLe7

Foi realizada a cultura mista do fungo FLe6 e da actinobactéria RLe7. O cultivo foi realizado como descrito para a cultura simples líquida, com pequenas alterações. O cultivo misto foi iniciado com a adição de 4 mL da pré-cultura de 3 dias da actinobactéria a 200 mL de cultivo fermentativo de 3 dias do fungo (o procedimento para a preparação de pré-culturas de actinobactérias está detalhado anteriormente). Os micro-organismos foram mantidos juntos em meio fermentativo por 11 dias adicionais. Os cultivos foram realizados em 9 frascos contendo cada um 200 mL do meio fermentativo PDB. Após extração, as fases orgânicas foram reunidas e concentradas, obtendo-se o extrato bruto da cultura mista líquida da actinobactéria RLe7 com o fungo FLe6.

2.3.2.5.2 Cultivos ampliados em meio líquido - adição simultânea dos micro-organismos em cultura mista

2.3.2.5.2.1 Obtenção de metabólitos secundários de cultura simples do fungo FLe6 e da actinobactéria RLe7

A cultura estoque do fungo endofítico FLe6 foi reativada em meio PDA. Após 7 dias, foram preparadas pré-culturas do fungo transferindo-se 1 fragmento de micélio-ágar contendo micélio para 10 mL de meio ISP-2 contidos em tubos *Falcon* de capacidade de 50 mL. As pré-culturas foram mantidas a 30 °C, 200 rpm por 48 h, e após esse período, cada pré-cultura foi transferida para 190 mL de meio fermentativo PDB contido em frasco *Erlenmeyer* de 500 mL de capacidade. Procedendo-se como descrito, 8 frascos foram inoculados, dos quais

2 foram mantidos em cultura por 7 dias e 6 por 14 dias a 30 °C sob agitação constante de 200 rpm. Após o período de cultivo, os meios contidos em diferentes frascos foram reunidos e deixados em ultrassom por 15 min, e então o micélio foi separado por filtração a vácuo. O meio de cultura foi eluído em colunas SPE de fase reversa DSC-18 Supelco[®] de 10 g (apenas 200 mL de meio de cultura foi eluído em cada coluna), utilizando o sistema a vácuo da Supelco[®]. A coluna foi primeiramente acondicionada com 50 mL de metanol, seguidos de 100 mL de água. Toda a fração aquosa proveniente do meio de cultura foi descartada e o material retido na coluna foi então eluído com 150 mL de metanol. Todos os diferentes solventes foram coletados numa única fração, que após seca originou o extrato bruto. Assim, foram obtidos os extratos de 7 e 14 dias da cultura simples do fungo FLe6. Para obtenção dos extratos das culturas simples da actinobactéria RLe7 a cultura estoque foi inoculada em meio PDA, e incubada a 30 °C. Após 7 dias, foi feita uma pré-cultura transferindo-se um fragmento de ágar contendo colônias bacterianas para 10 mL de meio ISP-2, que permaneceu por 48 h, a 30 °C e 200 rpm. Os 10 mL de pré-cultura foram então transferidos para 190 mL de meio fermentativo PDB. Um total de 8 frascos foram inoculados, dos quais 2 foram mantidos em cultura por 7 dias e 6 por 14 dias a 30 °C e 200 rpm. O procedimento de extração para obtenção do extrato da actinobactéria foi realizado como descrito anteriormente para o fungo FLe6. Também foram obtidos os extratos apenas dos meios de cultura, seguindo-se os mesmos procedimentos, no entanto, sem adição de fungo ou actinobactéria, para comparação com os extratos das culturas inoculadas com os micro-organismos.

2.3.2.5.2.2 Obtenção de metabólitos secundários de cultura mista do fungo FLe6 com actinobactéria RLe7

A cultura mista do fungo FLe6 e da actinobactéria RLe7 foi realizada como descrito anteriormente para as culturas simples líquidas, com pequenas alterações. O cultivo misto foi iniciado com a adição simultânea de 10 mL de pré-cultura da actinobactéria e 10 mL da pré-cultura do fungo a 180 mL de cultivo fermentativo PDB. Os micro-organismos foram mantidos juntos em meio fermentativo por 7 ou 14 dias (2 frascos de 7 dias e 4 frascos de 14 dias). Após

extração, foram obtidos os extratos das culturas mistas líquidas da actinobactéria RLe7 com o fungo FLe6.

2.3.2.5.3 Obtenção de metabólitos secundários em meio sólido - adição simultânea dos micro-organismos em cultura mista

2.3.2.5.3.1 Cultura simples do fungo FLe6

A cultura estoque do fungo endofítico FLe6 foi reativada em meio PDA. Após 7 dias, 10 fragmentos de ágar contendo micélio foram transferidos para o meio sólido, contendo 45 g de arroz parboilizado e 50 mL de meio ISP-2, que foram previamente autoclavados por 40 min. As culturas, crescidas em duplicata, foram incubadas por 28 dias a 30 °C em BOD. Após esse período, foram adicionados 200 mL de metanol ao meio de cultura, que permaneceu em maceração por aproximadamente 24 h. A porção sólida foi separada da porção alcoólica por filtração a vácuo. Em seguida foram adicionados mais 100 mL de metanol na porção sólida e após 24 h foi realizada a filtração. As porções alcoólicas obtidas foram reunidas e concentradas sob pressão reduzida até a secura. Uma pequena porção do extrato bruto (aproximadamente 100 mg) foi então fracionada em coluna SPE de fase reversa DSC-18 Supelco[®] de 2 g. A coluna foi primeiramente acondicionada com 10 mL de metanol, seguidos de 10 mL de água. Após a adição da amostra, a coluna foi eluída com os sistemas solventes: (1) 10 mL de água, (2) 10 mL de metanol:água 1:1, e (3) 10 mL de metanol, seguidos de 3 mL de acetona e 2 mL de clorofórmio. As frações correspondentes a cada sistema solvente foram coletadas separadamente, obtendo-se 3 sub-frações a partir de cada extrato bruto da cultura simples do fungo FLe6. Cada duplicata foi extraída e fracionada separadamente. Essas frações foram utilizadas nas análises de extrato bruto.

2.3.2.5.3.2 Cultura mista do fungo FLe6 com actinobactéria RLe7

Foi feita a cultura mista envolvendo o fungo FLe6 e a actinobactéria RLe7. Primeiramente foram feitas as pré-culturas da actinobactéria. Para isso, a

actinobactéria em estoque foi inoculadas em meio ISP-2 ágar, e incubadas a 30 °C. Após 7 dias, dois fragmentos de micélio-ágar foram transferidos para 4 mL de meio ISP-2, que permaneceu por 72 h, a 30 °C e 120 rpm. O cultivo misto foi iniciado com a adição simultânea em meio sólido de arroz de 4 mL de pré-cultura da actinobactéria e 10 fragmentos de micélio-ágar do fungo previamente crescido em PDA. Os micro-organismos foram mantidos juntos por 28 dias a 30 °C em estufa BOD. Após extração com metanol e secagem, seguido de fracionamento em coluna SPE de fase reversa, foram obtidos os extratos da cultura mista sólida desses micro-organismos, seguindo os mesmos procedimentos adotados para a cultura simples do fungo FLe6.

2.3.2.5.4 Obtenção de metabólitos secundários em meio sólido - adição do fungo previamente à adição da actinobactéria na cultura mista

2.3.2.5.4.1 Culturas simples do fungo FLe6 e da actinobactérias RLe7

A cultura estoque do fungo endofítico FLe6 foi reativada em meio PDA. Após 7 dias, 10 fragmentos de ágar contendo micélio foram transferidos para o meio sólido, contendo 40 g de arroz parboilizado e 80 mL de meio ISP-2, que foram previamente autoclavados por 45 min. A cultura foi incubada por 28 dias a 30 °C em BOD. Após esse período, foram adicionados 200 mL de metanol ao meio de cultura, que permaneceu em extração por 24 horas. A porção sólida foi separada da porção alcoólica por filtração a vácuo. Em seguida foram adicionados mais 100 mL de metanol e filtrou-se. As porções alcoólicas obtidas foram reunidas e concentradas até a secar, obtendo-se ambos os extratos da duplicata da cultura simples do fungo FLe6. Para obtenção dos extratos da cultura simples da actinobactéria RLe7, primeiramente foram feitas pré-culturas. Um fragmento de actinobactéria crescida por 5 dias em meio PDA foi transferido para 10 mL de meio ISP-2 que permaneceu incubado a 30 °C e 200 rpm por 2 dias. Em seguida, 200 µL desse meio foram utilizados para inocular 5 mL de meio ISP-2, o qual foi incubado a 30 °C e 200 rpm por 3 dias para originar as pré-culturas. Então, 5 mL de pré-cultura foram transferidos para o meio sólido de arroz enriquecido com ISP-2. Essa cultura, realizada em duplicata, foi incubada por 25

dias a 30 °C em BOD. O procedimento de extração para obtenção dos extratos da actinobactéria foi realizado como descrito anteriormente para o fungo. Também foram obtidos os extratos apenas dos meios de cultura, seguindo-se os mesmos procedimentos, no entanto, sem adição de fungo ou actinobactéria, para comparação com os extratos das culturas inoculadas com os micro-organismos.

2.3.2.5.4.2 Cultura mista do fungo FLe6 com a actinobactéria RLe7

Foi feita a cultura mista envolvendo o fungo FLe6 e a actinobactéria RLe7. Os micro-organismos foram cultivados e extraídos como descrito anteriormente para as culturas simples sólidas. O cultivo misto foi iniciado com a adição da pré-cultura de 3 dias de actinobactéria à cultura de 3 dias do fungo crescido em arroz. Os micro-organismos foram mantidos juntos por 25 dias. Após extração, foram obtidos os extratos da cultura mista sólida desses micro-organismos, seguindo os mesmos procedimentos adotados para as culturas simples.

2.3.2.6 Fracionamento dos extratos e análise das frações obtidas

Os extratos obtidos em maiores quantidades foram fracionados através de diferentes métodos cromatográficos, incluindo cromatografia em coluna clássica em fase normal, utilizando colunas de diversos tamanhos, SPE em fase normal e reversa, utilizando colunas contendo de 500 mg a 10 g de fase estacionária, HPLC em fase reversa e escala semi-preparativa, utilizando gradiente de acetonitrila ou metanol em água. Todos os fracionamentos foram acompanhados por CCDA, e algumas frações obtidas foram analisadas por RMN de ^1H , GC-MS ou ESI-MS por injeção direta. Algumas frações foram analisadas por RMN de ^{13}C gHMBC, gHMQC, gCOSY e por HR-ESI-MS. Os fracionamentos serão descritos juntamente com a discussão da análise dos extratos/frações para facilitar o acompanhamento.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Identificação dos micro-organismos por sequenciamento genético

Os micro-organismos utilizados nos experimentos de culturas mistas foram identificados por sequenciamento genético da região ITS do rDNA, localizada entre os genes 18SrDNA e 28SrDNA (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Identificação das actinobactérias endofíticas

Código laboratório	Linhagem descrita	Código GenBank	Similar	Identificação
RLe7	<i>Streptomyces albospinus</i>	KF057056.1	100%	<i>Streptomyces albospinus</i>
RLe10	<i>Kitasatospora nipponensis</i>	KF057058.1	100%	<i>Kitasatospora nipponensis</i>
RLe12	<i>Streptomyces albospinus</i>	KF057053.1	100%	<i>Streptomyces albospinus</i>

Tabela 2. Identificação dos fungos endofíticos

Código laboratório	Linhagem descrita	Código GenBank	Similar	Identificação
FLe3	<i>Phomopsis</i> sp.	HQ157158.1	100%	<i>Phomopsis</i> sp.
FLe6	<i>Phomopsis</i> sp.	JN153072.1	100%	<i>Phomopsis</i> sp.
FLe8.1*	<i>Colletotrichum boninense</i>	GU935881.1	100%	<i>Colletotrichum boninense</i>
FLe8.2*	<i>Hyphodermella corrugata</i>	EU118630.1	94%	<i>Hyphodermella</i> sp.
FLe11	<i>Hyphodermella rosae</i>	FN600389.1	92%	<i>Hyphodermella</i> sp.
RLe14	<i>Penicillium</i> sp.	JQ776535.1	100%	<i>Penicillium</i> sp.

* devido ao fungo FLe8 não apresentar uma morfologia homogênea durante o cultivo, diferentes porções foram analisadas separadamente (originando FLe8.1 e FLe8.2)

Após análise do laudo enviado pela empresa Genotyping Biotecnologia (data da análise: 25/10/2010), foi verificado que todas as linhagens de actinobactérias pertenciam ao gênero *Streptomyces*, sendo que RLe7 e RLe12 pareciam pertencer a mesma espécie, *Streptomyces albospinus*. Realmente ambas as linhagens apresentam características macroscópicas morfológicas bem semelhantes, variando apenas na velocidade de crescimento, já que as colônias de RLe7 crescem bem mais rápido que RLe12. Entretanto devido a RLe7 também apresentar 98% de similaridade com *Streptomyces albofaciens*, sua identificação precisa havia ficado somente em nível de gênero. O mesmo aconteceu com RLe10, que apesar de apresentar 99% de identidade com *Streptomyces aburaviensis* apresentou a mesma similaridade com linhagens

identificadas somente em nível de gênero. Reanalizando, mais recentemente, essas sequências genéticas, e utilizando dados mais atualizados dos bancos de dados, determinou-se a classificação das actinobactérias RLe7, RLe10 e RLe12 como sendo *Streptomyces albospinus*, *Kitasatospora nipponensis* e *Streptomyces albospinus*, respectivamente. Atualmente essas sequências estão disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) podendo ser acessadas pelo código KF057056.1, KF057058.1 e KF057053.1, respectivamente. Interessantemente, a linhagem RLe10, anteriormente classificada como membro do gênero *Streptomyces*, passou a ser identificada como *Kitasatospora nipponensis*.

Quando as sequências genéticas fúngicas foram alinhadas, verificou-se que as sequências dos fungos FLe8.2 e FLe11 não tinham uma alta similaridade às sequências do banco de dados do *GenBank*, e portanto, foram identificados somente em nível de gênero, sendo ambos *Hyphodermella* sp. Há grande possibilidade que eles pertençam a diferentes espécies já que suas colônias apresentam características morfologias macroscópicas bastante distintas, apesar de possuir a mesma coloração branca. É possível que ambos os micro-organismos realmente pertençam ao gênero *Hyphodermella*, entretanto, uma análise morfológica detalhada seria importante para determinar a espécie, já que diferentes espécies de *Hyphodermella* (*H. corrugata*, *H. rosae* e *H. densa*) apresentam características similares e que se sobrepõem (TELLERIA et al., 2010). Existem relativamente poucos relatos de basidiomicetos endofíticos, considerando que a grande maioria dos fungos isolados como endofíticos são ascomicetos (RUNGJINDAMAI et al., 2008). Ainda assim, o basidiomiceto *Hyphodermella corrugata* já foi isolado como endofítico (RUNGJINDAMAI et al., 2008).

Os fungos FLe3 e FLe6 também não puderam ser identificados em nível de espécie, apenas gênero. Essas sequências também apresentaram alta similaridade (99%) com *Diaporthe* sp., que representa o mesmo fungo em diferente estágio do ciclo de vida reprodutivo, ou seja, um fungo pode ser identificado como *Phomopsis* quando em fase anamórfica ou assexual e *Diaporthe* se estiver em fase teleomórfica ou sexual (NOZAKI et al., 2006). Apesar de ambos os fungos pertencerem ao gênero *Phomopsis*, eles também apresentam morfologias macroscópicas diferentes entre si, e isso pode ser

devido ao fato de não pertencerem à mesma espécie. A determinação da espécie poderia ser realizada por métodos convencionais, entretanto, há grandes chances de que a identificação permaneça em nível de gênero considerando que maior parte dos micro-organismos desse gênero possuem características insuficientes para uma classificação precisa (NOZAKI et al., 2006) já que a classificação é baseada em características morfológicas do fungo na fase teleomórfica (*Diaporthe*), enquanto que a maioria das espécies é encontrada como *Phomopsis*, tendo o estágio teleomorfo sido induzido em cultura em relativamente poucas espécies (SANTOS; CORREIA; PHILLIPS, 2010). Assim, uma análise genética mais específica seria necessária para determinar em qual estágio o micro-organismo se encontra (*Phomopsis/Diaporthe*) e qual é a espécie (SANTOS; CORREIA; PHILLIPS, 2010; SANTOS; PHILLIPS, 2009).

O fungo FLe8.1 apresentou 100% de similaridade com as espécies *Colletotrichum boninense* e *Colletotrichum gloeosporioides*, mas foi identificado como sendo *Colletotrichum boninense*. *Colletotrichum boninense* é uma espécie que foi classificada mais recentemente a partir da observação de pequenas variações nas colônias de fungos até então classificados como *Colletotrichum gloeosporioides*. Assim, esse grupo diferenciado de micro-organismos foi agrupado em uma nova espécie, *Colletotrichum boninense* (MORIWAKI; SATO; TSUKIBOSHI, 2003). Marcadores morfológicos foram caracterizados para permitir a distinção rápida e precisa dessas espécies (PILEGGI et al., 2009). A comparação morfológica macroscópica do fungo FLe8.1 com ambos os fungos descritos na literatura sugerem que FLe8.1 pertence à espécie *Colletotrichum boninense*. Essa espécie também foi recentemente isolada como endofítica da planta brasileira *Maytenus ilicifolia*, conhecida como espinheira-santa (PILEGGI et al., 2009).

O fungo RLe14 foi identificado como *Penicillium* sp. Esse fungo também apresentou 100% de similaridade a sequência do *GenBank* de código JQ776535.1, que pertence ao fungo identificado como *Penicillium dalea*, entretanto, não foi possível obter dados suficientes dessa espécie para comparar e poder fazer a identificação em nível de espécie, já que diferentes espécies de *Penicillium* podem ser bastante similares.

2.4.2 Modulação química e epigenética

2.4.2.1 Seleção do meio de cultivo fermentativo

O potencial do fungo endofítico *A. tenuissima* SS77 de produzir uma variedade de policetídeos já é conhecido, considerando que diferentes compostos (Figura 5) oriundos dessa rota biossintética foram isolados e caracterizados previamente (CHAGAS; DIAS; PUPO, 2013, CHAGAS, 2010). Além disso, três policetídeos foram mais recentemente isolados e identificados a partir de extratos da cultura mista de *A. tenuissima* SS77 com o fungo endofítico *N. sphaerica* SS67. Dois desses compostos são inéditos, e suas elucidações estruturais serão discutidas adiante.

Figura 5. Policetídeos isolados do fungo *A. tenuissima* SS77.

Antes dos experimentos de modulação serem realizados, foi avaliada a capacidade dos diferentes meios de cultivo de assegurar que o fungo produzisse esses compostos conhecidos, assim como outros com potencial biológico (citotoxicidade em células tumorais).

As análises por CCDA e HPLC-DAD revelaram que o perfil químico do fungo cultivado em meio Czapek é muito semelhante ao perfil do controle que contém apenas o meio de cultura, não sendo detectada a presença dos policetídeos. Já as análises do fungo cultivado em extrato de malte 0,7% e em PDB revelaram que ambos os meios proporcionam um adequado desempenho do fungo em relação à produção de metabólitos secundários detectáveis, incluindo os policetídeos (Figura 5). Pôde-se verificar, ainda, que em meio PDB o fungo apresenta um perfil metabólico mais complexo. Considerando apenas a massa dos extratos brutos (Tabela 3) poder-se-ia supor que em meio Czapek o fungo produz maior quantidade de metabólitos secundários, entretanto, uma avaliação simplista, levando-se em conta apenas as quantidades de extratos, seria insuficiente para permitir fazer essa afirmação já que os componentes do próprio meio de cultivo podem estar sendo extraídos, como foi observado no controle.

Tabela 3. Extratos brutos do fungo *A. tenuissima* SS77 cultivado em diferentes meios fermentativos

Meio fermentativo utilizado	Fungo	Código do extrato	Massa (mg)
Czapek	não	br-Czapek	318,8
Czapek	sim	77-Czapek	184,6
extrato de malte 0,7%	não	br-Malte	145,3
extrato de malte 0,7%	sim	77-Malte	27,9
PDB	não	br-PDB	232,7
PDB	sim	77-PDB	105,6

No código do extrato, br representa o branco, ou seja, o meio de cultivo sem o fungo enquanto que 77 indica a presença do fungo *A. tenuissima* SS77.

A avaliação da atividade biológica desses extratos (Tabela 4) mostrou que em qualquer um dos meios avaliados o fungo produz extratos com moderado potencial citotóxico. Comparativamente, esse potencial é menor em meio Czapek. Considerando que em meio fermentativo de extrato de malte 0,7% o fungo apresenta um perfil menos complexo (Figura 6), o que facilitaria as futuras análises para a observação de diferenças metabólicas após a utilização de moduladores químicos/epigenéticos, e ainda, que apesar dessa menor complexidade metabólica o extrato se mantém potencialmente ativo, inclusive frente à linhagem de câncer de mama, MDA-MB435 (Tabela 4), contra a qual normalmente poucos extratos testados têm atividade, escolheu-se o meio

fermentativo de extrato de malte 0,7% para se realizar os experimentos de modulação química e epigenética.

Tabela 4. Inibição do crescimento celular de linhagens tumorais por extratos brutos do fungo *A. tenuissima* SS77 cultivado em diferentes meios líquidos

Amostras	Linhagens Celulares		
	MDA-MB435	HCT-8	SF-295
77-Czapek	0,7% - PA	55,0% - Mo	17,2% - PA
77-Malte	67,8% - Mo	42,5% - PA	66,1% - Mo
77-PDB	17,7% - PA	67,1% - Mo	57,2% - Mo

SA=sem atividade; PA=pouco ativo (inibição de 1 a 50%); Mo=moderadamente ativo (inibição de 50 a 75%); MA=muito ativo (inibição de 75 a 100%).

Figura 6. Cromatogramas dos extratos brutos obtidos em meio líquido Czapek (preto), extrato de malte (azul) e PDB (verde). 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 32 min; 100% a 10% de MeOH, de 32 a 34 min; 10% de MeOH, de 34 a 40 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (225 nm).

2.4.2.2 Determinação da toxicidade dos diferentes moduladores contra o fungo *A. tenuissima* SS77

Antes de iniciar os cultivos de modulação química e epigenética, também foi determinada o MIC dos diferentes moduladores contra o fungo *A. tenuissima* SS77 para garantir que os compostos não seriam tóxicos para o fungo nas concentrações utilizadas.

Através da avaliação do crescimento fúngico (Figura 7) pôde-se verificar que a maioria dos compostos testados não são tóxicos para o fungo mesmo em concentrações elevadas. Os compostos ácido suberoidroxâmico (AS), ácido valpróico (AV), butirato de sódio (BS), hidralazina (H) e lovastatina (L) só foram

capazes de inibir o crescimento fúngico na concentração máxima testada (50 mM) (colunas 1, 2, 3, 6 e 9, respectivamente) e ainda essa inibição pode ter sido causada pelas altas concentrações de DMSO (como verificado no controle de solvente – coluna 11). Os moduladores procaína (P), procainamida (PD) e jasmonato de metila (JM), na concentração de 500 μ M, foram capazes de causar uma leve inibição do fungo (colunas 4, 5 e 8, respectivamente). Dentre todos os compostos, iodoacetamida (IO) foi o mais tóxico, inibindo o crescimento do fungo na concentração de 50 μ M (coluna 7), a mesma concentração inibitória do controle positivo (CP) actidione.

Apesar do composto iodoacetamida ser capaz de inibir o fungo na concentração de 50 μ M, essa concentração de modulador foi selecionada para ser utilizada nos experimentos de modulação química e epigenética.

Figura 7. Placa de 96 poços utilizada para determinar o MIC dos moduladores químicos e epigenéticos. As colunas de 1 a 12 correspondem, respectivamente, às substâncias ácido suberoidroxâmico (AS), ácido valpróico (AV), butirato de sódio (BS), procaína (P), procainamida (PD), hidralazina (H), iodoacetamida (IO), jasmonato de metila (JM), lovastatina (L), actidione (controle positivo-CP), controle de solvente (CS) e controle negativo (CN). A concentração final das substâncias nos poços foram de 50 mM, 5 mM, 500 μ M, 50 μ M, 5 μ M, 500 nM, 50 nM (linhas de H a B, respectivamente). A ausência de crescimento fúngico mantém o revelador químico resazurina na sua forma original não-reduzida de coloração azul. Foto tirada 5 dias após a inoculação.

2.4.2.3 Avaliação do efeito da adição de moduladores em cultivos em meio líquido

O fungo endofítico *A. tenuissima* SS77 foi cultivado na presença de diferentes moduladores químicos e epigenéticos (Tabela 5) para verificar a capacidade dessas substâncias em alterar o perfil metabólico fúngico, principalmente com relação à produção de policetídeos.

Tabela 5. Extratos brutos das culturas líquidas sob modulação química e epigenética

Modulador utilizado	Código do extrato	Massa (mg)
-	*1modbr-1 / 2	7,5 / 7,7
-	*1mod77-1 / 2	11,2 / 12,6
ácido suberoidroxâmico	1meAS-1 / 2	8,6 / 7,5
ácido valpróico	1meAV-1 / 2	7,3 / 5,6
butirato de sódio	1meBS-1 / 2	14,0 / 12,3
procaína	1meP-1 / 2	12,4 / 15,0
procaïnâmica	1mePD-1 / 2	12,9 / 13,9
hidralazina	1meH-1 / 2	7,9 / 8,5
iodoacetamida	1mqIO-1 / 2	8,7 / 9,2
jasmonato de metila	1mqJM-1 / 2	12,2 / 13,4
lovastatina	1mqL-1 / 2	8,3 / 7,8

*foram feitos controles contendo apenas o meio de cultivo (1modbr) e contendo o meio de cultura inoculado com o fungo (1mod77)

Nos códigos dos extratos, o número 1 inicial indica que se trata do primeiro cultivo líquido de modulação, seguido de me ou mq que significa modulação epigenética e modulação química, respectivamente. As letras em maiúsculo representam a sigla do modulador utilizado e os números 1 ou 2 no final são referentes às duas duplicatas.

Esses extratos foram analisados por CCDA e HPLC-DAD. A figura 8 mostra a análise de todos os extratos por CCDA em fase normal utilizando fase móvel hexano:acetato de etila na proporção 3:7. Nem todos os cromatogramas obtidos após análise por HPLC-DAD estão sendo apresentados, mas após as análises por CCDA e HPLC-DAD foi observado que os perfis químicos foram reprodutíveis nas duplicatas de todos os moduladores testados, havendo apenas pequenas variações quantitativas.

Os extratos obtidos a partir dos cultivos em que foram adicionados os compostos procaína e procaïnâmica não apresentaram alterações em relação ao extrato controle. No cultivo em que jasmonato de metila foi adicionado, ocorreu a completa hidrólise do composto, resultando na formação de ácido jasmônico, observado por CCDA (Figura 9), que desempenha função equivalente a do éster

correspondente (VERGOPOULOU; GALANOPOULOU; MARKAKI, 2001). Entretanto, nenhuma alteração no perfil metabólico do fungo foi observada. A adição dos outros moduladores resultou em uma acentuada diminuição da produção de substâncias mais apolares que eram produzidas na cultura controle (observado por HPLC-DAD). Além disso, a adição de lovastatina levou à observação de um composto com polaridade similar a dos policetídeos esteniferilenol, alterperilenol e altertoxina I que são produzidos pelo fungo na cultura controle. Esse composto não havia sido detectado previamente na cultura controle. Tal composto apresentou R_f de 0,58 em CCDA e t_r de 35,2 min, enquanto os policetídeos mencionados possuem R_f entre 0,65 e 0,77 e t_r de 32,8-34,7 min (Figura 8 e 10). O padrão de lovastatina foi analisado por CCDA (Figura 9) e por HPLC-DAD (não mostrado) e então foi possível constatar que esse composto era a lovastatina.

Figura 8. Análise por CCDA dos extratos brutos obtidos após tratamento de *A. tenuissima* SS77 com diferentes moduladores químicos e epigenéticos. Os códigos br e 77 são empregados, respectivamente, para o branco e para o controle contendo apenas o fungo. Os outros códigos representam os moduladores utilizados, como mencionado no texto. Os números 1 e 2 nos códigos representam as duplicatas. Placa de fase normal (sílica gel ativada) utilizando eluição com fase móvel Hex:AcOEt 3:7, revelação em UV de 254 e 365 nm e em vanilina sulfúrica.

Figura 9. Análise por CCDa dos extratos brutos obtidos após tratamento de *A. tenuissima* SS77 com lovastatina (L2) e jasmonato de metila (JM2). Os códigos 77, Lp, JMp e Ajp representam, respectivamente, o extrato controle contendo apenas o fungo, e os padrões de lovastatina, jasmonato de metila e ácido jasmônico. Placa de fase normal (sílica gel ativada) utilizando eluição com fase móvel Hex:AcOEt 3:7, revelação em UV de 254 e 365 nm e em vanilina sulfúrica.

Figura 10. Cromatogramas dos extratos brutos obtidos após a adição de lovastatina ao meio líquido (vermelho e rosa) e dos extratos controle contendo apenas o fungo (azul e verde), no qual não foi adicionado modulador. 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 (225 nm).

Alterações mais significativas no perfil químico foram observadas no cultivo em que hidralazina foi adicionada, havendo a produção de compostos de polaridade intermediária que não eram detectados previamente e aparente aumento na produção de alguns policetídeos (Figura 11). Para verificar se algum dos compostos de polaridade intermediária eram correspondentes ao próprio modulador adicionado, o padrão de hidralazina foi analisado por HPLC-DAD e foram observados vários picos com diferentes tempos de retenção (Figura 12), indicativos de impurezas no padrão ou mesmo degradação do composto. Para confirmar essa possibilidade, o padrão de hidralazina utilizado foi analisado por

RMN de ^1H , mas aparentemente, o espectro obtido era da substância pura. Assim, somente com esses dados, não foi possível concluir a que se devia os vários picos detectados por HPLC-DAD quando o padrão de hidralazina foi analisado.

Figura 11. Cromatogramas dos extratos brutos obtidos após a adição de hidralazina ao meio líquido (vermelho e rosa) e dos extratos controle contendo apenas o fungo (azul e verde). 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 (225 nm).

Figura 12. Cromatogramas do extrato bruto obtido após a adição de hidralazina ao meio líquido (azul) e do padrão de hidralazina (preto). 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 (225 nm).

Os extratos em que as duplicatas apresentaram diferenças quantitativas nos perfis químicos foram ambos enviados para serem avaliados biologicamente. Analisando os resultados de atividade citotóxica (Tabela 6), nota-se que também houve uma variação no potencial citotóxico desses extratos, o que pode estar associado ao aumento/diminuição na quantidade de metabólitos secundários específicos responsáveis pela atividade biológica observada. Comparando-se extratos obtidos de cultivos sob modulação química/epigenética com o extrato controle (apenas inoculado pelo fungo), pôde-se observar que não houve significativa diminuição no potencial citotóxico, sendo este mantido ou mesmo aumentado. Em relação aos extratos que demonstraram aumento na atividade citotóxica, é difícil determinar indubitavelmente se esse resultado está associado a um aumento na produção, pelo fungo, de metabólitos secundários bioativos ou é devido à presença dos moduladores adicionados ao meio de cultivo, os quais, pelos próprios mecanismos de ação, possuem um potencial citotóxico intrínseco.

Tabela 6. Inibição do crescimento celular de linhagens tumorais por extratos brutos oriundos do fungo *A. tenuissima* SS77 tratado com diferentes moduladores

Amostras	Linhagens Celulares		
	MDA-MB435	HCT-8	SF-295
1modbr-1	14,8% - PA	17,3% - PA	9,3% - PA
1mod77-1	7,0% - PA	69,4% - Mo	51,1% - Mo
1meAS-1	55,0% - Mo	100% - MA	83,3% - MA
1meAV-2	27,9% - PA	61,6% - Mo	64,8% - Mo
1meBS-2	23,9% - PA	78,0% - MA	45,6% - PA
1meP-1	22,6% - PA	37,6% - PA	60,0% - Mo
1meP-2	SA	58,5% - Mo	45,1% - PA
1mePD-2	21,4% - PA	80,5% - MA	54,5% - Mo
1meH-1	67,5% - Mo	98,9% - MA	82,1% - MA
1meH-2	29,3% - PA	90,2% - MA	57,7% - Mo
1mqIO-1	32,9% - PA	39,6% - PA	57,4% - Mo
1mqIO-2	23,2% - PA	81,6% - MA	60,0% - Mo
1mqJM-2	SA	66,8% - Mo	46,2% - PA
1mqL2	67,6% - Mo	100% - MA	87,1% - MA

SA=sem atividade; PA=pouco ativo (inibição de 1 a 50%); Mo=moderadamente ativo (inibição de 50 a 75%); MA=muito ativo (inibição de 75 a 100%).

2.4.2.4 Avaliação do efeito da adição de moduladores em cultivos em meio semi-sólido

Os experimentos envolvendo o modulador epigenético 5-azacitidina foram realizados em meio semi-sólido devido à instabilidade já relatada dessa substância em meio aquoso (ARGEMÍ; SAURINA, 2007; KISSINGER; STEMM, 1986). Assim, puderam ser obtidos os extratos da cultura semi-sólida tratada com 5-azacitidina (Tabela 7).

Tabela 7. Extrato bruto da cultura semi-sólida sob modulação epigenética

Modulador utilizado/ Concentração	Código do extrato	Massa (mg)
-	*S-1mod77-1	4,1
5-azacitidina / 150 µM	S-1meAZ150	4,1

*extrato controle proveniente do meio de cultivo apenas inoculado pelo fungo (sem adição do modulador). O S no início do código indica que foi feito em meio semi-sólido.

Através das análises por CCDA e HPLC-DAD pode-se perceber que os perfis metabólicos do fungo cultivado em meio líquido e em meio semi-sólido de extrato de malte 0,7% são semelhantes.

Relatos da literatura mostram que 5-azacitidina tem sido um dos mais eficazes moduladores utilizado para remodelar o perfil químico de fungos (WANG et al., 2010; WILLIAMS et al., 2008), no entanto, praticamente nenhuma diferença no perfil químico de *A. tenuissima* SS77 foi observada comparando-se o extrato obtido sob modulação epigenética com o extrato controle (Figura 13). Talvez a forma de incorporação dessa substância no meio de cultura pode não ter sido totalmente adequada, considerando a possibilidade de que o modulador incorporado ao ágar não tenha ficado completamente disponível para o fungo, ou mesmo que o teor aquoso aprisionado no ágar tenha sido suficiente para degradar o composto. Alternativamente, outros experimentos foram realizados, alterando-se alguns procedimentos, na tentativa de viabilizar o processo de incorporação do modulador pelo fungo, e obter melhores resultados.

Figura 13. Cromatogramas do extrato bruto obtido após a adição de 5-azacitidina ao meio semi-sólido (azul) e do extrato controle contendo apenas o fungo (preto). 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 (225 nm).

2.4.2.5 Alteração nas condições de cultivo líquido para moduladores potencialmente promissores

A partir dos resultados obtidos durante a avaliação do efeito da adição de moduladores em meio líquido, alguns moduladores foram selecionados para serem utilizados em cultivos líquidos em escala ampliada (Tabela 8).

Tabela 8. Extratos brutos das culturas líquidas selecionadas sob modulação química e epigenética

Modulador utilizado / Concentração	Código do extrato	Quantidade de frascos	Massa (mg)
- / 250 µL DMSO	*2mod77	1	29,7
hidralazina / 50 µM	*2modbr+H	1	28,3
hidralazina / 50 µM	2meH50	6	178,7
hidralazina / 200 µM	2meH200	1	29,1
lovastatina / 500 µM	2mqL500	1	31,1
Iodoacetamida / 100 µM	2mqIO100	1	22,5

* foi feito um controle de solvente adicionando-se DMSO ao meio de cultivo contendo o fungo (2mod77) e um controle adicionando-se somente hidralazina ao meio de cultivo sem o fungo (2modbr+H). O número 2 no início do código é indicativo que se trata do segundo cultivo em meio líquido.

Durante estes cultivos, além da avaliação da reprodutibilidade dos perfis metabólicos (comparados aos cultivos em pequena escala), pretendia-se verificar

o efeito de alguns moduladores quando adicionados em concentração superiores às aquelas previamente utilizadas.

Após o primeiro experimento utilizando hidralazina, pode-se perceber que o perfil químico (em HPLC-DAD) do extrato obtido apresentava alguns picos que não apareciam no extrato controle e não foi possível concluir indubitavelmente se eram referentes ao próprio padrão de hidralazina adicionado ao meio de cultivo, podendo ser produtos de degradação química ou de biotransformação do mesmo. Assim, partindo do princípio que esse cultivo era promissor, o extrato foi produzido em maior quantidade para que esses compostos pudessem ser isolados (extrato 2meH50). Concomitantemente, foi feito um cultivo quaduplicando a concentração de hidralazina para verificar o efeito do aumento da concentração. Além disso, foi feito um controle adicionando-se somente hidralazina ao meio de cultivo para determinar se os picos observados eram oriundos do próprio modulador após sofrer algum tipo de degradação química no meio. Após análise por HPLC-DAD verificou-se que o controle contendo apenas o meio de cultura e esse modulador apresentava picos coincidentes com os observados no extrato contendo o fungo sob modulação (Figura 14), e correspondem aos picos que haviam sido detectados no cultivo anterior (Figura 11). Adicionalmente, foi verificado que esses picos são bem mais intensos no extrato em que foram adicionados 200 μ M de hidralazina, no qual nenhuma diferença qualitativa foi observada. Assim, pode-se concluir que os compostos observados são produtos de degradação química do modulador, ou são impurezas oriundas do próprio modulador comercial que foram extraídas preferencialmente durante a etapa de extração, considerando que o perfil é diferente do perfil do padrão sem sofrer partição (Figura 12).

Figura 14. Cromatogramas do extrato bruto obtido após a adição de 50 μM de hidralazina ao meio de cultivo (rosa), do extrato controle contendo apenas o fungo (preto), e do extrato controle contendo apenas meio de cultura e hidralazina (azul). 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 (225 nm).

Após a adição de lovastatina, em particular, eram esperadas alterações significativas no perfil metabólico do fungo, ainda que apenas quantitativas, considerando que esse composto seria capaz de inibir a via do mevalonato que compete pelo mesmo substrato (acetil-CoA) da via dos policetídeos, os quais são produzidos pelo fungo e facilmente detectados por HPLC-DAD. No primeiro experimento em que esse modulador foi adicionado ao meio de cultivo, uma pequena variação no perfil metabólico do fungo foi verificada. Assim, com o intuito de exacerbar esse efeito, o modulador foi adicionado numa concentração 10 vezes superior à concentração previamente testada. Entretanto, aparentemente, até existem algumas alterações (tr 32,5-33,5 min) (Figura 15) mas não é possível afirmar se correspondem às alterações observadas no cultivo anterior e se são devido a uma possível modulação química.

Assim como na modulação por lovastatina, na modulação por iodoacetamida eram esperados efeitos relevantes no perfil químico do fungo, já que esse composto é capaz de inibir a biossíntese dos policetídeos. Já que no experimento prévio nenhum efeito havia sido observado, a concentração de iodoacetamida utilizada foi dobrada, mesmo aumentando-se as chances de inibir o crescimento fúngico, pois o MIC foi de 50 μM . Algumas variações no perfil foram observadas em HPLC-DAD, como aumento na intensidade do pico com tr

5,5-7,5 min e aparecimento de 2 picos entre 21,0 e 21,8 min (Figura 16), apesar de nenhuma alteração ter sido detectada por CCDA.

Figura 15. Cromatogramas do extrato bruto obtido após a adição de 500 μM de lovastatina ao meio de cultivo (azul) e do extrato controle contendo apenas o fungo (preto). O pico mais intenso do cromatograma, com t_r de 35,3 min, é da lovastatina. 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 (225 nm).

Figura 16. Cromatogramas do extrato bruto obtido após a adição de 100 μM de iodoacetamida ao meio de cultivo (azul) e do extrato controle contendo apenas o fungo (preto). 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 (225 nm).

2.4.2.6 Efeito da adição de moduladores em cultivos utilizando diferentes meios semi-sólidos e extraídos em micro-escala com diferentes misturas de solventes

Devido aos experimentos anteriores utilizando modulação química e epigenética não terem apresentado resultados satisfatórios, novos experimentos foram realizados. Nos primeiros experimentos de modulação química e epigenética, o fungo *A. tenuissima* SS77 tinha sido cultivado em meio líquido de extrato de malte a 0,7% e o meio foi extraído utilizando extração líquido-líquido com acetato de etila. Nestes experimentos, foram utilizados os meios semi-sólidos PDA e ágar de extrato de malte a 0,7%, e foi realizado o método de extração em micro-escala modificado de Smedsgaard (1997), utilizando duas misturas-solventes diferentes (acetonitrila:água 1:1 ou isopropanol:acetato de etila 1:1). O intuito desse experimento foi testar mais de uma condição de cultivo e de extração para aumentar a probabilidade de conseguir uma condição ideal de visualizar a modulação das vias biossintéticas do fungo testado. Além disso, a extração em micro-escala permite que menos manipulações sejam feitas nos extratos brutos, possibilitando uma melhor representatividade dos compostos presentes na cultura. Nesse experimento também foi testado o efeito do antifúngico actidione usado em concentração sub-inibitória. Após a extração dos fragmentos de ágar contendo micélio com as duas misturas-solventes mencionadas (para cada mistura foram utilizados 3 fragmentos de ágar) foram obtidos os extratos:

- P-iso, M-iso, P-acn, M-acn, que correspondem ao controle contendo apenas o meio de cultivo de extrato de malte (M) ou PDA (P), que foram extraídos com isopropanol:acetato de etila (iso) ou acetonitrila:água (acn);
- P-iso-F-DMSO, M-iso-F-DMSO, P-acn-F-DMSO, M-acn-F-DMSO, que correspondem ao controle contendo o meio de cultivo inoculado com fungo (F) na presença de 1% de DMSO que foram extraídos com as diferentes misturas solventes;
- P-iso-AZA, M-iso-AZA, P-acn-AZA, M-acn-AZA, que corresponde ao fungo crescido em diferentes meios (P ou M) e extraído de diferentes maneiras (isso ou ACN), e tratado com o modulador epigenético 5-azacitidina (AZA);

- da mesma maneira, foram obtidos quatro extratos com ácido suberoidroxâmico (SBHA), ácido valpróico (AV), butirato de sódio (BS), procaína (P), hidralazina (H), iodoacetamida (IO), ácido jasmônico (AJ), lovastatina (L) e actidione (act), totalizando 48 extratos com aproximadamente 3 mg cada.

O método escolhido inicialmente para analisar esses extratos foi a espectrometria de massas (ESI-MS) por inserção direta, tanto em modo positivo quanto negativo. Entretanto, após algumas análises foi verificado que a qualidade da amostra não estava adequada para MS, sendo detectados muitos interferentes que comprometeram essas análises. Devido a isso, as amostras tiveram que ser analisadas somente por HPLC-DAD.

Os cromatogramas dos extratos brutos provenientes de fungos tratados com diferentes moduladores químicos e epigenéticos apresentaram picos que não eram observados nos cromatogramas dos extratos controles. Todos os moduladores testados resultaram em alguma variação no perfil químico em pelo menos uma das condições testadas. Os moduladores epigenéticos procaína e ácido valpróico, por exemplo, causaram alterações no perfil do fungo que puderam ser melhor observadas em meio de extrato de malte extraído com acetonitrila:água 1:1 (extratos M-acn, Figuras 17 e 18, respectivamente). A procaína induziu a produção de vários compostos, com destaque para os picos com tr de 26,8, 27,5, 29,4 e 31,6 min (Figura 17). Já o ácido valpróico, além de elevar a produção de alguns compostos, inibiu fortemente a produção do composto com tr de 25,2 min (Figura 18). O mesmo foi observado quando o meio de extrato de malte foi extraído com isopropanol:acetato de etila 1:1. O tratamento com ácido valpróico foi o único que levou à inibição da produção dos compostos com tr entre 25,2 e 25,8 min. A produção desses compostos foi bastante reprodutível em todos os cultivos e serviram de parâmetro para a comparação dos extratos.

Figura 17. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com procaína em meio de extrato de malte (verde) e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO (preto), ambos extraídos com acetonitrila:água 1:1. Coluna analítica fenil-hexil 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 (240 nm).

Figura 18. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com ácido valpróico em meio de extrato de malte (rosa) e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO (preto), extraídos com acetonitrila:água 1:1. Coluna analítica fenil-hexil 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 (240 nm).

Os resultados dos tratamentos do fungo com os moduladores epigenéticos 5-azacitidina e ácido suberoidroxâmico puderam ser observados principalmente em dois extratos de cada. Nos extratos M-iso e P-acn do fungo tratado com 5-

azacitidina (Figuras 19 e 20, respectivamente) foi observada a indução dos compostos com tr de 26,6 e 28,9 min em meio de extrato de malte (Figura 19) enquanto um composto com tr de 29,8 foi induzido em meio PDA (Figura 20). Esses cultivos permitiram constatar que além do tratamento com o modulador ter levado à indução na produção de alguns compostos, se comparado ao cultivo controle sem tratamento, os compostos induzidos quando o fungo foi tratado com o mesmo modulador mas cultivado em diferentes meios e extraído de diferentes maneiras são diferentes entre si. Nos extratos M-acn e M-iso do fungo tratado com ácido suberoidroxâmico também foi possível observar a indução de diferentes compostos nos diferentes extratos (Figura 21 e 22, respectivamente), o que provavelmente se deve à extração, nesse caso, já que o meio de cultivo utilizado foi o mesmo (extrato de malte). Enquanto no extrato M-acn foi induzido um composto com tr de 29,1 min (Figura 21), em M-iso foi verificada a indução de compostos com tr de 28,6, 29,4, 30,2 e 31,3 min, principalmente (Figura 22).

Figura 19. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com 5-azacitidina em meio de extrato de malte (azul) e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO (preto), extraídos com isopropanol:acetato de etila 1:1. Coluna analítica fenil-hexil 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 (240 nm).

Figura 20. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com 5-azacitidina em meio PDA (azul) e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO (preto), extraídos com acetonitrila:água 1:1. Coluna analítica fenil-hexil 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 (240 nm).

Figura 21. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com ácido suberoidroxâmico em meio de extrato de malte (azul) e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO (preto), extraídos com acetonitrila:água 1:1. Coluna analítica fenil-hexil 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 (240 nm).

Figura 22. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com ácido suberoidroxâmico em meio de extrato de malte (rosa) e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO (preto), extraídos com isopropanol:acetato de etila 1:1. Coluna analítica fenil-hexil 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 (240 nm).

O modulador epigenético butirato de sódio levou a alterações metabólicas que puderam ser observados nos quatro extratos (P-iso, P-acn, M-iso e M-acn) originados a partir do fungo tratado com esse composto, sendo que o extrato M-iso foi o que apresentou alterações mais significativas (Figura 23). Nesse extrato pode-se observar, principalmente, a indução dos compostos com tr de 26,4, 27,8, 28,8, 29,3 e 31,0 min. A indução de alguns desses compostos também pode ser observada em outros extratos do fungo tratado com butirato de sódio, entretanto, como observado para outros tratamentos, tanto o meio de cultivo quanto a forma de extração parece ter influenciado no perfil metabólico obtido após o tratamento.

O fungo tratado com o modulador epigenético hidralazina praticamente não teve seu perfil metabólico alterado, tendo apenas sido observada a indução na produção de compostos mais apolares que apenas eluíram com 100% de metanol (tr de 31,5 a 32,6 min – cromatograma não apresentado).

Figura 23. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com butirato de sódio em meio de extrato de malte (verde) e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO (preto), extraídos com isopropanol:acetato de etila 1:1. Coluna analítica fenil-hexil 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 (240 nm).

O tratamento do fungo com os inibidores específicos de rotas biossintéticas e iodoacetamida levaram a observação de modificações metabólicas no perfil de quase todos os extratos obtidos após os tratamentos (exceto P-acn com iodoacetamida). As figuras 24 e 25 mostram os perfis dos extratos M-iso do fungo tratado com lovastatina e iodoacetamida, respectivamente. Comparando-se com os extratos controles é possível observar que em ambos os tratamentos houve a indução na produção de compostos.

Após o tratamento do fungo com o eliciador químico ácido jasmônico, praticamente nenhuma alteração foi observada no perfil químico dos diferentes extratos obtidos. Apenas no extrato P-iso foi possível observar a indução de compostos com tr de 18,8, 31,0 e 33,0 min (cromatograma não apresentado).

A. tenuissima SS77 também foi tratado com o antifúngico actidione em concentrações sub-inibitórias. Foram observadas alterações nos perfis metabólitos de todos os extratos exceto M-iso. No extrato M-acn foi apenas visualizada a indução de compostos apolares com tr de 31,8 a 32,6 min. Os perfis dos extratos P-iso e P-acn são semelhantes e em ambos houve a indução de um composto com tr de 31,0 min. No extrato P-iso, além desse composto, outros foram induzidos (Figura 26).

Figura 24. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com lovastatina em meio de extrato de malte (verde) e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO (preto), extraídos com isopropanol:acetato de etila 1:1. Coluna analítica fenil-hexil 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 (240 nm).

Figura 25. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com iodoacetamida em meio de extrato de malte (azul) e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO (preto), extraídos com isopropanol:acetato de etila 1:1. Coluna analítica fenil-hexil 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 (240 nm).

Figura 26. Cromatogramas do extrato bruto obtido após tratamento do fungo com actidione em meio PDA (azul) e do extrato controle contendo apenas o fungo crescido no meio com DMSO (preto), extraídos com isopropanol:acetato de etila 1:1. Coluna analítica fenil-hexil 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 (240 nm).

Após uma avaliação cautelosa de todos os resultados obtidos nesse experimento de modulação química e epigenética algumas conclusões gerais puderam ser feitas:

- tanto o meio de cultivo empregado quanto o solvente de extração podem influenciar o perfil metabólico detectado para os extratos. A utilização de meios de cultivo diferentes, contendo nutrientes variados, pode favorecer a produção de metabólitos diferentes entre si, enquanto que a extração com sistemas-solventes diferentes pode favorecer a extração de certos metabólitos em detrimento de outros. Sendo assim, era bem razoável esperar que os perfis metabólicos obtidos do fungo tratado com um mesmo modulador, mas cultivado e extraído em diferentes condições, também pudessem ser diferentes. O fungo *A. tenuissima* SS77 tem um perfil metabólico bastante reprodutível em diferentes meios de cultivo, ao menos em relação à produção dos policetídeos que já foram isolados desse fungo (motivo pelo qual foi selecionado para os experimentos de modulação). Entretanto, perante a ação do modulador, a biossíntese de alguns compostos pode ter sido ativada (ou silenciada, no caso do ácido valpróico) preferencialmente em algum dos meios. Isso justifica a indução de alguns compostos ter sido visualizada em um meio mas não em outro, ou ainda, compostos diferentes terem sido induzidos em diferentes meios; e então, o

solvente extrator, com afinidade diferente pelos compostos, também favoreceu a dissimilaridade dos extratos.

- os diferentes tratamentos foram mais efetivos em diferentes condições. Alguns moduladores foram capazes de alterar significativamente a produção de alguns metabólitos exclusivamente em um meio de cultivo (procaína e ácido valpróico em extrato de malte e ácido jasmônico em PDA). Para alguns moduladores as alterações causadas, apesar de terem sido detectadas em ambos os meios, foram mais profundas em um deles. O mesmo foi observado em relação ao solvente extrator. Portanto, não é possível escolher uma condição ideal, de cultivo e extração, dentre as testadas, para se obter os melhores resultados a partir do tratamento de *A. tenuissima* SS77 com todos os moduladores utilizados nesse experimento, pois cada tratamento foi mais efetivo em uma determinada condição. Ainda assim, analisando e comparando todos os resultados, seria possível afirmar que, no geral, o meio de extrato de malte foi o mais adequado para a maioria dos moduladores (oito moduladores contra três, ambos os meios foram bastante adequados para 5-azacitidina). Aparentemente a extração com isopropanol:acetato de etila (independente do meio utilizado) também foi a melhor dentre as duas (sete contra quatro, ambas adequadas para 5-azacitidina), entretanto considerando a diferença nos meios, utilizar ambos os sistemas extratores seria o mais adequado. Portanto, pode-se dizer que um experimento simplificado, cultivando o fungo *A. tenuissima* SS77 somente em extrato de malte e extraíndo o meio com ambos os sistemas extratores, um em seguida do outro, levaria a bons resultados para a maioria dos moduladores (apenas os experimentos com ácido jasmônico e actidione poderiam ser prejudicados já que ambos foram efetivos em meio PDA).

Comparando-se entre si os perfis metabólicos obtidos nos diferentes tratamentos, e considerando especificamente o modo de ação de cada modulador utilizado, algumas discussões devem se feitas:

- Primeiramente, é importante destacar que muitos dos picos cromatográficos que apareceram após o tratamento com os modulares são alargados e podem representar, ao invés de um único composto, um grupo de compostos co-eluído.

- Nos experimentos foram utilizados seis moduladores epigenéticos, dos quais três são inibidores de DNA-metil-transferases (procaína, 5-azacitidina e hidralazina) e três são inibidores de HDAC (ácido valpróico, ácido

suberoidroxâmico e butirato de sódio). Os três inibidores de DNA-metiltransferases resultaram em perfis químicos diferentes entre si, não sendo possível observar qualquer tipo de correlação entre o modo de ação específico esperado e a produção metabólica em resposta a esse mecanismo. O mesmo foi observado para os inibidores de HDAC. Aparentemente, o butirato de sódio apresentou alguns picos cromatográficos que correspondem aos apresentados pelo ácido suberoidroxâmico, entretanto, devido ao perfil alargado dos picos não é possível afirmar que se tratam dos mesmos compostos. Em particular, a diferença nos perfis químicos gerada pelos diferentes inibidores de HDAC poderia estar correlacionada à especificidade de cada inibidor para as diferentes classes ou isoformas da enzima HDACs, entretanto, os moduladores procaína e butirato de sódio atuam em enzimas HDAC de classe I e II humana, possuindo assim amplo espectro de ação (BOLDEN; PEART; JOHNSTONE, 2006; a especificidade do ácido suberoidroxâmico não foi determinada). Apesar dessa especificidade ter sido determinada em enzimas humanas (KIM; BAE, 2011), considerando a homologia existente entre tais enzimas e as de fungos filamentosos (KIM; BAE, 2011, TRIBUS et al.; 2010; GREGORETTI; LEE; GOODSON, 2004; TROJER et al., 2003) pode-se sugerir que os inibidores avaliados também apresentem amplo espectro de ação em enzimas HDAC fúngicas. Portanto, é esperado que a diferença nos perfis químicos do fungo *A. tenuissima* SS77 tratado com esses inibidores não seja devido à diferente especificidade de cada inibidor. Estudos tem mostrado que as enzimas HDAC também regulam o grau de acetilação de muitas enzimas não-histonas, incluindo fatores de transcrição, chaperonas e moléculas sinalizadoras, podendo levar à alterações na estabilidade proteica, interações entre proteínas e proteína-DNA (KIM; BAE, 2011). Sendo assim, os inibidores utilizados podem ter atuado, além de nas proteínas histonas, em outras proteínas, e afetado de forma imensurável diferentes processos celulares, que em último grau levaram a uma resposta metabólica de indução ou inibição de metabólitos secundários.

- O uso dos moduladores químicos específicos de rotas biossintéticas como lovastatina e iodoacetamida teve por objetivo aumentar a produção de compostos oriundos de outras rotas biossintéticas devido a uma disponibilidade maior de precursor biossintético causada pela inibição de rotas específicas (policetídeos – iodoacetamida; terpenos (MVA) – lovastatina). O uso desses moduladores levou

a alterações no perfil metabólico do fungo tratado e foi possível verificar a indução de diferentes compostos em cada tratamento. No entanto, em ambos os tratamentos houve aumento de compostos com tr entre 27,0 e 27,5 min. Devido ao aspecto alargado dos picos não é possível determinar indubitavelmente se esses picos se referem ao mesmo composto nos diferentes tratamentos. Aparentemente, o tratamento com iodoacetamida não levou à inibição na produção de alguns dos policetídeos previamente isolados, os quais possuem tempo de retenção em torno de 25,5 min. Entretanto, o cromatograma do fungo tratado deixou de apresentar o pico com tr de 29,3 min, que é o tempo de retenção que o composto alternariol mono-metil-éter apresenta nessas condições cromatográficas. Assim, somente a partir dessas observações não é possível concluir se a indução na produção de metabólitos secundários após os diferentes tratamentos ocorreu segundo os mecanismos propostos (indução de uma rota em função da inibição de outra). Para isso seria necessário o isolamento/determinação das substâncias referentes a cada pico cromatográfico que surgiu após os tratamentos para verificar se compostos iguais foram induzidos nos diferentes tratamentos, e principalmente, determinar a origem biossintética de tais compostos. Há a possibilidade de que a adição desses moduladores tenha simplesmente eliciado a produção de metabólitos secundários pelo fungo *A. tenuissima* SS77 em resposta a presença de compostos químicos potencialmente tóxicos, independente dos mecanismos celulares específicos envolvidos.

- A eliciação química também explicaria a indução de metabólitos durante o tratamento com o eliciador ácido jasmônico e com o antifúngico actidione em concentrações sub-inibitórias.

A partir dessas observações e discussões, pode-se concluir que todos os moduladores usados devem ter eliciado a produção de metabólitos secundários de alguma maneira, o que pode ter ocorrido através de diferentes e/ou múltiplos mecanismos.

2.4.2.7 Determinação estrutural dos policetídeos isolados do fungo *A. tenuissima* SS77

Os compostos estenfiperilenol, alterperilenol, altertoxina I, alternariol e alternariol mono-metil éter (Figura 5, pág. 49) foram isolados de culturas simples e mistas do fungo *A. tenuissima* SS77 (CHAGAS; DIAS; PUPO, 2013). Estenfiperilenol, alterperilenol, altertoxina I pertencem à classe das perilenequinonas, possuindo características estruturais típicas que auxiliam no reconhecimento de compostos dessa classe durante uma análise por RMN. Essas semelhanças estruturais serão mencionadas adiante, durante a discussão da elucidação estrutural das três perilenequinonas que foram isoladas de extratos obtidos das culturas mistas de *A. tenuissima* SS77 com *N. sphaerica* SS67.

O extrato 1r6777, contendo 60 mg, foi fracionado em coluna sephadex LH-20 (2,8x60 cm) eluída com metanol, sendo obtidas nove frações. A fração 1r6777-5 (4,2 mg) foi fracionada por HPLC, em coluna semi-preparativa, utilizando gradiente de acetonitrila em água. Assim, obtiveram-se duas frações, dentre elas, a fração denominada 551, que será discutida. Na outra fração foi identificado o composto estenfiperilenol.

O extrato 1p6777 (70,5 mg) foi inicialmente fracionado como 1r6777, sendo obtidas sete frações. A fração 1p6777-6 (5,1 mg) foi também fracionada em HPLC, mas utilizando eluição isocrática de acetonitrila:água 3:7, por 45 min, seguida de acetonitrila a 100%. Foram obtidas 11 frações, dentre elas, as frações 563 e 5610, que serão discutidas. Os compostos estenfiperilenol, altertoxina I e alterperilenol puderam ser identificados em outras três frações distintas.

O espectro de RMN de ^1H da fração 563 (0,3 mg) adquirido em CD_3OD (Figura 27, Anexos 1 e 2) mostrou que essa fração estava pura, e então os espectros bidimensionais também foram adquiridos (Anexos 3, 4, 5 e 6). Devido à amostra estar bem pouco concentrada, a qualidade dos espectros bidimensionais não ficou muito boa, mas ainda assim algumas correlações puderam ser observadas, como mostrado na Tabela 9. Apesar da pouca informação obtida com esses espectros, era possível verificar que a estrutura deveria ser bastante similar a das perilenequinonas já isoladas (estenfiperilenol, alterperilenol e altertoxina I, Figura 5, pág. 49). O espectro de RMN de ^1H em CD_3OD apresentou quatro sinais dubletos, referentes a dois pares de hidrogênios aromáticos que

acoplam entre si com J de 8,6 Hz, o que seria condizente com uma estrutura de perilenequinona similar a da altertoxina I ou do estenfiperilenol, em que não há a presença de uma ligação dupla em um dos ciclos contendo a cetona. Além disso, foi observada a presença de três sinais em δ 4,73, δ 4,54 e δ 4,40 possivelmente referentes a hidrogênios de carbonos ligados a hetero-átomo. O espectro de gHMQC confirmou essa hipótese para os hidrogênios em δ 4,73 e δ 4,54, que estão ligados a carbonos em δ 69,5 e δ 68,7, respectivamente, mas não para o hidrogênio em δ 4,40 que está ligado a um carbono em δ 45,3, pois esse deslocamento químico seria mais característico de carbono sp^3 quaternário ou metínico presente em sistemas policíclicos tensionados. Através das poucas correlações presentes no gHMBC, e da análise dos outros sinais presentes no espectro de RMN de 1H , com multiplicidades não bem definidas (incluindo um sinal de um hidrogênio encoberto pelo sinal do solvente em δ 3,31), não havia sido possível determinar a estrutura do composto **1**. Assim, foi adquirido um espectro de RMN de 1H em $CDCl_3$ (Figura 28, Anexos 7 e 8) na tentativa de se obter mais informações estruturais. Nesse espectro foi observada a presença de sinais referentes a hidrogênios de hidroxilas fenólicas queladas, como era esperado para uma estrutura similar à altertoxina I. As multiplicidades dos sinais de hidrogênio estavam mais bem definidas e as correspondências entre os sinais de ambos os espectros de RMN de 1H puderam ser feitas. Com isso, puderam ser observados três sinais adicionais, além dos das duas hidroxilas fenólicas, os quais foram atribuídos a três possíveis hidroxilas presentes na estrutura, ligadas em carbonos sp^3 . Baseando-se na similaridade estrutural à altertoxina, os dados obtidos foram suficientes para propor a estrutura do composto **1** (Figura 29). Através das constantes de acoplamento foi possível verificar que os hidrogênios em δ 4,73 (ou δ 4,88); δ 4,40 (ou δ 4,42); δ 3,28 (ou δ 3,29) e δ 3,05 (ou δ 3,09) estão todos em pseudo-axial, e assim, a configuração relativa dos centros estereogênicos foi determinada, sendo S^* , S^* , R^* e S^* . Com os dados obtidos não foi possível afirmar indubitavelmente que o acoplamento correto das duas unidades de tetralonas é cabeça-cabeça, como na altertoxina I, e não cabeça-cauda, como no estenfiperilenol, entretanto, devido a concordância dos nossos dados com os da literatura científica (KROHN et al. 1999), foi assumido que se tratava de um acoplamento cabeça-cabeça, que nesse caso, deu origem ao

estenfitriol (**1**). As correlações observadas entre o hidrogênio em δ 4,40 (ou δ 4,42) e os carbonos em δ 133,3 e δ 146,0 (Anexo 5) permitiu definir corretamente qual anel aromático está ligado no ciclo contendo o referido hidrogênio (Figura 29). A análise por HR-ESI-MS da fração 563, em modo negativo, revelou a presença de um pico com m/z 367,08510, o qual se refere ao composto **1** desprotonado (erro de 2,77 ppm, Anexo 9).

O estenfitriol (**1**) foi relatado pela primeira vez em 1999, tendo sido isolado do fungo endofítico *Monodictys fluctuata* por Krohn e colaboradores. Apenas a configuração relativa dos centros estereogênicos foi determinada nessa ocasião. Em 2009, Gao, Li e Wang relataram o isolamento de um epímero do estenfitriol a partir de *Alternaria alternata*, entretanto o artigo completo não pode ser acessado, e então não foi possível saber com certeza se foram determinadas as configurações absolutas desses centros, mas há fortes indícios de que não.

Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 563.

Figura 28. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 563.

Tabela 9. Dados de RMN ^1H (500 MHz), gHMQC, gHMBC e gCOSY referentes ao composto **1** da fração 563

posição	$\delta_{^{13}\text{C}}$ ^{b,c}	$\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz) ^a	$\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz) ^b	gHMBC ^b	gCOSY ^b
1	68,7	4,69 (<i>m</i>)	4,54 ^d	n.o.	3,05; 4,40
2	48,0	3,20 (<i>dd</i> , 4,5; 15,6) 3,09 (<i>dd</i> , 12,4; 15,6)	3,05 ^{d,e}	45,3; 68,7; 204,4	4,54
3	204,4	-	-	-	-
3a	n.o.	-	-	-	-
3b	144,0	-	-	-	-
4	161,1	-	-	-	-
5	117,4	6,99 (<i>d</i> , 8,6)	6,88 (<i>d</i> , 8,6)	115,8; 133,3	8,22
6	136,6	8,16 (<i>d</i> , 8,6)	8,22 (<i>d</i> , 8,6)	144,0; 161,1	6,88
6a	133,3	-	-	-	-
6b	133,9	-	-	-	-
7	137,1	8,20 (<i>d</i> , 8,6)	8,26 (<i>d</i> , 8,6)	146,0; 162,0	6,79
8	115,7	6,89 (<i>d</i> , 8,6)	6,79 (<i>d</i> , 8,6)	133,9	8,26
9	162,0	-	-	-	-
9a	115,8	-	-	-	-
9b	146,0	-	-	-	-
10	n.o.	-	-	-	-
11	43,9	3,29 (<i>dd</i> , 12,4; 15,6) 3,01 (<i>dd</i> , 4,5; 15,6)	3,28 ^d 2,83 (<i>d</i> , 4,2; 15,8)	n.o. n.o.	2,83 3,28
12	69,5	4,88 (<i>m</i>)	4,73 (<i>d</i> , 4,5; 12,4)	n.o.	2,83; 3,28
12a	n.o.	-	-	-	-
12b	45,3	4,42 (<i>d</i> , 9,8)	4,40 (<i>d</i> , 9,8)	133,3; 146,0	4,54
1-OH	-	2,07 (<i>sl</i> , OH)	-	-	-
4-OH	-	12,09 (<i>d</i> , 1,9, OH)	-	-	-
9-OH	-	12,23 (<i>d</i> , 1,4, OH)	-	-	-
12-OH	-	2,71 (<i>s</i> , OH)	-	-	-
12a-OH	-	2,62 (<i>d</i> , 6,3, OH)	-	-	-

^a em CDCl_3 ; ^b em CD_3OD ; ^c atribuído indiretamente através do gHMQC; ^d multiplicidade e *J* não bem definidos; ^e não é possível fazer a distinção entre esses hidrogênios; n.o.= valores não observados. O sinal em δ 3,05 integra para 2 H.

Figura 29. Estrutura do composto **1** e deslocamento químico dos hidrogênios (azul e verde) e carbonos (vermelho) segundo dados de RMN de ^1H , gHMBC e gHMBC da fração 563 adquiridos em CD_3OD (azul e vermelho) e em CDCl_3 (verde).

O espectro de RMN de ^1H da fração 5610 (0,4 mg) adquirido em CDCl_3 (Figura 30, Anexos 10 e 11) apresentou grande similaridade ao espectro da fração 563 (Figura 28). Em uma análise inicial já foi possível observar que o espectro de RMN de ^1H da fração 5610 possui um sinal singlete, em δ 3,45, que integra para 3 H, referente a um grupo metoxílico. Os espectros bidimensionais também foram adquiridos (Anexos 12, 13 e 14), mas pouquíssimas correlações puderam ser observadas, principalmente no gHMBC, como pode ser observado pela tabela 10. Entretanto, considerando que a estrutura deveria ser similar a do composto recém-identificado estenfitriol (**1**), foi feita uma análise comparativa dos dados para tentar determinar a estrutura da substância presente na fração 5610. Assim como no estenfitriol (**1**), estenfiperilenol e altertoxina I, há um sistema contendo dois anéis aromáticos, cada qual possuindo dois hidrogênios que acoplam entre si com *J* orto, e há ainda a presença de duas hidroxilas fenólicas queladas. Foram observadas no gHMBC correlações do hidrogênio com δ de 7,85 com carbonos com δ de 162,9 e 136,0, indicando que realmente se trata de uma perilenequinona similar às mencionadas anteriormente. Foi feita então a análise dos outros sinais para determinar o restante da estrutura. Como no

estenfitriol (**1**), foram observados sinais de hidrogênios em δ 4,68 e 4,67, que se correlacionam com sinais de carbonos em δ 65,6 e 79,1, respectivamente. Esses deslocamentos químicos são condizentes com carbonos ligados a hetero-átomos, entretanto, o carbono com δ de 79,1 está relativamente desblindado. O espectro também possui um sinal dubleto em δ 3,56, referente a um hidrogênio que está ligado a um carbono com δ de 47,8. Esse grupamento metínico seria correspondente ao grupamento metínico observado na estrutura do estenfitriol (**1**), apesar do sinal do hidrogênio estar bem mais blindado que na estrutura anterior, que era de 4,42. Como mencionado anteriormente, o espectro de RMN de ^1H possui um sinal em δ 3,45 referente a uma metoxila com carbono em δ 55,6. Analisando o espectro de gHMQC, por exclusão foi possível determinar quais sinais do espectro de RMN de ^1H eram referentes a hidroxilas. Diferente do observado na estrutura anterior, o espectro contém sinais de hidrogênios de apenas duas hidroxilas, em δ 2,83 e 1,98, o que estaria de acordo com a hipótese de uma delas ter sido metilada. No gHMBC pôde ser observada a correlação do hidrogênio em δ 3,45 com o carbono em δ 79,1, indicando que a metoxila está diretamente ligada a esse carbono metínico. A multiplicidade do sinal do hidrogênio presente nesse grupo metínico, um tripleto, indica em qual dos ciclos a metoxila está ligada, uma vez que este hidrogênio apresenta apenas dois acoplamentos, o grupo metoxílico deve estar ligado ao carbono em δ 47,8. Foram observados dois grupos metilênicos, sendo que diferentemente do observado na estrutura anterior, pelos valores de constante de acoplamento ficou determinado que o hidrogênio em δ 4,68, ligado ao carbono vizinho de um dos grupos metilênicos (δ_{C} 47,5, δ_{H} 2,90 e 3,17) possui conformação pseudo-axial, enquanto que hidrogênio em δ 4,67, ligado ao carbono vizinho do outro grupo (δ_{C} 36,8, δ_{H} 3,18 e 3,39) está em pseudo-equatorial. Assim, determinou-se que as configurações relativas dos centros estereogênicos contidos nessa estrutura são S^* , S^* , R^* e R^* . A análise por HR-ESI-MS, em modo negativo, revelou a presença de um pico com m/z 381,10081 (erro de 2,83 ppm, Anexo 15) condizente com a estrutura proposta do composto estenfitriol mono-metil éter (**2**) (Figura 31), ainda não relatada na literatura.

Tabela 10. Dados de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3), gHMQC, gHMBC e gCOSY referentes ao composto **2** fração 5610

posição	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz)	gHMBC	gCOSY
1	65,6	4,68 (<i>m</i>)	n.o.	2,90; 3,56
2	47,5	3,17 (<i>dd</i> , 4,6; 16,2) 2,90 (<i>dd</i> , 12,2; 16,2)	n.o. n.o.	2,90 3,17; 4,68
3	n.o.	-	-	-
3a	n.o.	-	-	-
3b	n.o.	-	-	-
4	n.o.	-	-	-
5	119,8	7,11 (<i>d</i> , 8,9)	n.o.	7,85
6	132,7	7,85 (<i>d</i> , 8,9)	136,0	7,11
6a	136,0	-	-	-
6b	n.o.	-	-	-
7	132,5	7,84 (<i>d</i> , 8,9)	162,9	7,04
8	118,1	7,04 (<i>d</i> , 8,9)	n.o.	7,84
9	162,9	-	-	-
9a	n.o.	-	-	-
9b	n.o.	-	-	-
10	n.o.	-	-	-
11	36,8	3,39 (<i>dd</i> , 2,2; 17,3) 3,18 (<i>dd</i> , 3,5; 17,3)	n.o. n.o.	3,18 3,39
12	79,1	4,67 (<i>t</i> , 2,2; 3,5)	n.o.	n.o.
12a	n.o.	-	-	-
12b	47,8	3,56 (<i>d</i> , 9,6)	n.o.	4,68
1-OH	-	2,83 (<i>d</i> , 6,0, OH)	n.o.	n.o.
4-OH	-	12,42 (<i>s</i> , OH)	n.o.	-
9-OH	-	12,46 (<i>s</i> , OH)	n.o.	-
12-OMe	55,6	3,45 (<i>s</i> , OMe)	79,1	n.o.
12a-OH	-	1,98 (<i>s</i> , OH)	n.o.	-

^a atribuído indiretamente através do gHMQC; n.o.= valores não observados.

Figura 30. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da fração 5610.

Figura 31. Estrutura do composto inédito **2** e deslocamento químico dos hidrogênios (azul) e carbonos (vermelho) segundo dados de RMN de ^1H , gHMBC e gHMBC da fração 5610 adquiridos em CDCl_3 . Os valores atribuídos aos hidrogênios e carbonos dos anéis aromáticos 1 e 2 e das hidroxilas fenólicas podem estar invertidos.

O espectro de RMN de ^1H da fração 551 (1,3 mg) foi adquirido em CDCl_3 (Figura 32, Anexos 16 e 17). Apesar do espectro revelar que a fração não estava pura, os espectros bidimensionais foram adquiridos (Anexos 18, 19 e 20). A análise do espectro de RMN de ^1H e de algumas correlações observadas nos espectros bidimensionais mostraram que a estrutura apresentava similaridade com as dos compostos **1** e **2** já isolados e identificados. A integração cuidadosa dos sinais do espectro de RMN de ^1H indicou que havia um composto majoritário juntamente com outros similares a ele, mas a partir dessa análise, puderam ser determinados os sinais que eram referentes a uma única estrutura, os quais estão indicados no espectro de RMN de ^1H (Figura 32) e na tabela 11. Comparando-se esses dados com os das estruturas anteriores, foi possível perceber que o composto em questão, **3**, também apresenta duas hidroxilas fenólicas queladas, mas ambas estão bem mais desblindadas (δ 15,20 e 13,23) que as presentes nas estruturas das perilenequinonas isoladas. Além disso, também foi possível verificar a presença de dois anéis aromáticos, cada um contendo dois hidrogênios que acoplam entre si com J_{orto} de 9,4 Hz, similar às

estruturas identificadas anteriormente. Há ainda a presença de dois sinais de hidrogênios ligados a carbonos insaturados, que acoplam entre si com J de 10,1 Hz, indicando a presença de uma ligação dupla conjugada à carbonila de um dos ciclos, assim como na estrutura do alterperilenol (Figura 5, pág. 49). Entretanto, os δ dos sinais desses hidrogênios também estavam bem mais desblindados, indicando que deveria haver algum fator estrutural ausente nas estruturas anteriores, que estava levando a essa desblindagem nos sinais correspondentes entre as estruturas. Além dos sinais já mencionados, foi observado um sinal tripleto em δ 6,17 de um hidrogênio ligado a um carbono com δ de 63,9. O deslocamento químico desse carbono é característico de um carbono ligado a hetero-átomo, no entanto, o δ do sinal do hidrogênio está mais desblindado que o esperado. Há ainda a presença de um carbono metilênico, com δ de 44,8, vizinho ao carbono com δ de 63,9 e vizinho à um carbono carbonílico de cetona (δ 201,1). Pelas constantes de acoplamento foi possível determinar que o hidrogênio em δ 6,17, ligado ao carbono em δ 63,9, está em pseudo-equatorial, enquanto que a hidroxila ligada nesse carbono está em pseudo-axial. A ausência de sinais de hidrogênios adicionais indicava que ambos os carbonos que conectam um ciclo ao outro correspondente deveriam estar substituídos, possivelmente com hidroxilas, o que resultaria numa estrutura muito similar ao do alterperilenol contendo uma hidroxila adicional. Entretanto, a presença de uma hidroxila a mais não explicaria a desblindagem observada nos sinais de vários hidrogênios, comparando-se as estruturas. Uma busca na literatura científica auxiliou na proposição de uma estrutura contendo uma ligação dupla entre os carbonos que conectam os ciclos contendo as cetonas. A conjugação estendida, tornando o ciclo central um anel aromático, explicaria o efeito de desblindagem observado. A visualização da correlação entre o hidrogênio em δ 3,42 com um carbono em δ 134,9, confirma a presença dessa ligação dupla. Assim foi proposta a estrutura da 1,4,9-triidróxi-1,2-diidroperilene-3,10-diona (**3**) (Figura 33), a qual é inédita na literatura. Os dados de compostos que apresentam uma relativa similaridade estrutural à proposta, como o ácido xanaltérico I (KJER et al., 2009), a actinoperilona (TAGUCHI et al., 2008) e a 4,9-diidroxi-1,2,11,12-tetraidroperilene-3,10-quinona (XIAN-LI et al., 2006), são condizentes com os observados. Apesar da estrutura conter apenas um centro estereogênico, a

configuração absoluta desse centro não pode ser determinada por dicroísmo circular pois o composto **3** não estava puro, e as tentativas de purificação não tiveram sucesso devido a pequena quantidade da amostra e a presença de outros compostos muito semelhantes na mistura, impedindo a recuperação do composto **3**. O HR-ESI-MS da fração 551 não foi obtido, mas um pico de m/z 331,06314, referente ao composto **3** desprotonado (calculada 331,29889, erro de 1,94 ppm) pôde ser observado no espectro de HR-ESI-MS da fração 5610 (Anexo 15). O estenfitriol mono-metil éter (**2**) é um dos compostos minoritários presente na fração 551, e como ambos esses compostos possuem tempo de retenção muito próximos nas condições de fracionamento em HPLC, era esperado que durante a análise por MS fossem observadas suas respectivas m/z , indicando a mistura. O mesmo acontece com o alterperilenol, que também pôde ser detectado no espectro de HR-ESI-MS da fração 5610 ($[M-H]^- = 349,07408$). Na figura 34 estão apresentados, em conjunto, os espectros de RMN de 1H da fração 5610, na qual o estenfitriol mono-metil éter (**2**) foi identificado, da fração 551, na qual a 1,4,9-triidróxi-1,2-diidroperilene-3,10-diona (**3**) foi identificada, e do alterperilenol, mostrando a mistura de compostos, que são estruturalmente muito similares, nas frações.

A 1,4,9-triidróxi-1,2-diidroperilene-3,10-diona (**3**) não foi isolada nas mesmas condições que os outros compostos, e por isso seu tempo de retenção em coluna semi-preparativa não pôde ser comparado aos dos demais para determinar a sequência de eluição dos policetídeos isolados de *A. tenuissima* SS77. Em eluição isocrática de acetonitrila:água 3:7, por 45 min, seguida de eluição com 100% de acetonitrila, os compostos estenfitriol (**1**), estenfiperilenol, altertoxina I, estenfitriol mono-metil éter (**2**), alterperilenol, alternariol e alternariol mono-metil éter apresentaram tr de 17,0, 25,8, 29,3, 31,9, 33,6, 42,9 e 55,0 min, respectivamente.

Figura 32. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 551.

Tabela 11. Dados de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3), gHMQC e gHMBC referentes ao composto **3** da fração 551

posição	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz)	gHMBC
1	63,9	6,17 (t, 3,2)	n.o.
2	44,8	3,42 (dd, 2,6; 16,9) 3,27 (dd, 3,9; 16,9)	63,9; 134,9; 201,1 n.o
3	201,1	-	-
3a	110,8	-	-
3b	127,7	-	-
4	162,6	-	-
5	122,7	7,53 (d, 9,4)	121,8
6	130,9	8,86 (d, 9,4)	127,7; 162,6
6a	121,8	-	-
6b	129,2	-	-
7	132,5	8,87 (d, 9,4)	125,5; 168,0
8	120,8	7,50 (d, 9,4)	129,2
9	168,0	-	-
9a	112,6	-	-
9b	125,5	-	-
10	187,9	-	-
11	129,3	7,14 (d, 10,1)	124,3
12	136,9	8,56 (d, 10,1)	125,5; 187,9
12a	124,3	-	-
12b	134,9	-	-
1-OH	-	n.o.	-
4-OH	-	13,23 (s)	110,8; 122,7; 162,6
9-OH	-	15,20 (s)	112,3; 120,8; 168,0

^a atribuído indiretamente através do gHMQC; n.o.= valores não observados.

Figura 33. Estrutura do composto inédito **3** e deslocamento químico dos hidrogênios (azul) e carbonos (vermelho) segundo dados de RMN de ^1H , gHMQC e gHMBC da fração 551 adquiridos em CDCl_3 .

Figura 34. Espectros de RMN de ^1H (500 MHz) da fração 5610 (superior vermelho e inferior vermelho, em CDCl_3), da fração 551 (inferior azul, em CDCl_3) e do composto alterperilenol (superior azul, em CD_3OD). Na sobreposição de espectros superior, pode ser observada a presença do alterperilenol na fração 5610, contendo majoritariamente estenfitriol mono-metil éter (**2**). Na sobreposição inferior, a presença do composto **2** pode ser observada na fração 551, na qual foi identificada a 1,4,9-triidróxi-1,2-diidroperilene-3,10-diona (**3**).

2.4.3 Interações microbianas

2.4.3.1 Avaliação da produção de metabólitos secundários pelas culturas simples e mistas em meio semi-sólido

Os fungos e actinobactérias endofíticas foram cultivados em culturas mistas e simples em meio semi-sólido (Figura 35-39). Como pode ser observado, foram formadas zonas de inibição em todas as culturas mistas (Figuras 37-39), indicando que as três actinobactérias produzem substâncias que inibem, em diferentes graus, o crescimento dos cinco fungos avaliados. As placas foram extraídas, como descrito em métodos, e assim foram obtidos os extratos das culturas simples e mistas em meio semi-sólido (Tabela 12).

Figura 35. Cultura simples das actinobactérias endofíticas *Streptomyces albospinus* RLe7 (1), *Kitasatospora nipponensis* RLe10 (2) e *Streptomyces albospinus* RLe12 (3) cultivadas em meio semi-sólido. Fotos tiradas após 14 dias de crescimento.

Figura 36. Cultura simples dos fungos endofíticos *Phomopsis* sp. FLe3 (1), *Phomopsis* sp. FLe6 (2), *Hyphodermella corrugata* FLe8.2 (3), *Hyphodermella rosae* FLe11 (4) e *Penicillium* sp. RLe14 (5) cultivados em meio semi-sólido. Fotos tiradas após 14 dias de crescimento.

Figura 37. Cultura mista da actinobatéria *S. albospinus* RLe7 com os fungos *Phomopsis* sp. FLe3 (1), *Phomopsis* sp. FLe6 (2), *H. corrugata* FLe8.2 (3), *H. rosae* FLe11 (4) e *Penicillium* sp. RLe14 (5) em meio semi-sólido. Fotos tiradas após 14 dias de crescimento.

Figura 38. Cultura mista da actinobatéria *K. nipponensis* RLe10 com os fungos *Phomopsis* sp. FLe3 (1), *Phomopsis* sp. FLe6 (2), *H. corrugata* FLe8.2 (3), *H. rosae* FLe11 (4) e *Penicillium* sp. RLe14 (5) em meio semi-sólido. Fotos tiradas após 14 dias de crescimento.

Figura 39. Cultura mista da actinobatéria *S. albospinus* RLe12 com os fungos *Phomopsis* sp. FLe3 (1), *Phomopsis* sp. FLe6 (2), *H. corrugata* FLe8.2 (3), *H. rosae* FLe11 (4) e *Penicillium* sp. RLe14 (5) em meio semi-sólido. Fotos tiradas após 14 dias de crescimento.

Tabela 12. Extratos brutos das culturas simples e mistas em meio semi-sólido

Micro-organismo utilizado	Código do extrato	Quantidade de placas	Massa (mg)
-	S-br	4	39,7
RLe7	S-A7	2	6,5
RLe10	S-A10	2	20,1
RLe12	S-A12	2	21,5
FLe3	S-F3	2	13,9
FLe6	S-F6	2	32,9
FLe8	S-F8	2	13,9
FLe11	S-F11	2	33,5
RLe14	S-F14	2	27,3
RLe7 + FLe3	S-A7F3-A7 / S-A7F3-F3	3	28,8 / 9,9
RLe7 + FLe6	S-A7F6-A7 / S-A7F6-F6	3	9,6 / 12,7
RLe7 + FLe8	S-A7F8-A7 / S-A7F8-F8	3	7,3 / 10,4
RLe7 + FLe11	S-A7F11-A7 / S-A7F11-F11	2	8,9 / 6,5
RLe7 + RLe14	S-A7F14-A7 / S-A7F14-F14	3	5,8 / 7,6
RLe10 + FLe3	S-A10F3-A10 / S-A10F3-F3	3	7,4 / 8,3
RLe10 + FLe6	S-A10F6-A10 / S-A10F6-F6	3	11,2 / 13,7
RLe10 + FLe8	S-A10F8-A10 / S-A10F8-F8	3	8,2 / 13,2
RLe10 + FLe11	S-A10F11-A10 / S-A10F11-F11	3	19,2 / 8,5
RLe10 + RLe14	S-A10F14-A10 / S-A10F14-F14	2	8,8 / 9,8
RLe12 + FLe3	S-A12F3-A12 / S-A12F3-F3	3	6,0 / 6,5
RLe12 + FLe6	S-A12F6-A12 / S-A12F6-F6	3	10,5 / 10,7
RLe12 + FLe8	S-A12F8-A12 / S-A12F8-F8	3	6,0 / 11,2
RLe12 + FLe11	S-A12F11-A12 / S-A12F11-F11	3	13,1 / 6,3
RLe12 + RLe14	S-A12F14-A12 / S-A12F14-F14	3	7,7 / 11,6

Nos códigos, o S inicial indica cultivo em meio semi-sólido, e em seguida está o número do código das linhagens utilizadas (ex. Actinobactéria *S. albospinus* RLe12 = A12, Fungo *Phomopsis* sp. FLe6 = F6). A presença de códigos de dois micro-organismos diferentes indica as culturas mistas. Nas culturas mistas, diferentes porções da placa foram extraídas separadamente: região contendo o fungo (ex. contendo Fungo: S-A7F3-F3) e região contendo a actinobactéria juntamente com a zona de inibição (ex. S-A7F3-A7), gerando dois extratos diferentes cada cultura mista.

Quando os experimentos em meio semi-sólido foram realizados, o fungo FLe8 ainda não havia sido purificado em *Colletotrichum boninense* FLe8.1 e *H. corrugata* FLe8.2 (acreditava-se se tratar de um único fungo). Assim, em algumas placas houve maior crescimento de fungo com características de *C. boninense* FLe8.1 e outras de *H. corrugata* FLe8.2, entretanto, todas foram extraídas juntas e foram consideradas como sendo do fungo primeiramente denominado de FLe8. Nas figuras 36-39, entretanto, são mostradas fotos em que as características do fungo *H. corrugata* FLe8.2 prevalecem.

Através das análises por CCDA e HPLC-DAD constatou-se que o perfil das actinobactérias, tanto em culturas simples quanto em mistas, são muito semelhantes ao perfil do controle contendo apenas o meio de cultivo. Assim, em relação aos metabólitos produzidos pelas actinobactérias, a comparação de

extratos provenientes de cultivos simples e mistos é muito difícil já que elas não apresentam um perfil químico característico quando analisadas por CCDA e HPLC-DAD. Já os fungos possuem perfis diferentes do observado no controle, portanto, comparações são possíveis de serem feitas.

Apesar de terem sido visualizadas zonas de inibição entre os microorganismos, provavelmente devido à produção de metabólitos secundários pelas actinobactérias, através das análises por CCDA e HPLC-DAD poucas diferenças nos perfis químicos entre as culturas simples e mistas foram observadas, sendo apenas quantitativas. Foi possível notar que alguns compostos produzidos pelos fungos em culturas simples estão presentes também na zona de inibição, indicando que são capazes de se difundir em ágar.

Considerando-se que a inibição do crescimento microbiano é realmente devido à produção de metabólitos secundários, então as técnicas analíticas utilizadas não foram adequadas para a detecção desses compostos, seja devido às pequenas quantidades produzidas, que ainda assim podem ser suficientes para exercer atividade biológica, ou por características intrínsecas das substâncias, como não absorverem na região do UV ou não se oxidarem no revelador vanilina sulfúrica.

Os extratos foram enviados para a avaliação de atividade citotóxica. Após a análise dos resultados de citotoxicidade em células tumorais (Tabela 13), foi observado que, dentre os extratos das culturas simples os que apresentaram maior atividade foram os da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 (extrato S-A7) e o do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 (extrato S-F6). Assim, pode-se sugerir que dentre as actinobactérias utilizadas, *S. albospinus* RLe7 é a mais ativa, enquanto que o fungo mais ativo é *Phomopsis* sp. FLe6, pelo menos quando cultivados em meio PDA. Dentre os extratos provenientes das culturas mistas, no geral, os mais ativos foram os que continham o fungo *Phomopsis* sp. FLe6 e/ou a actinobactéria *S. albospinus* RLe7, como já esperado. O aumento na atividade dos extratos referentes à zona de inibição entre o fungo *Phomopsis* sp. FLe6 e as diferentes actinobactérias (S-A7F6-A7, S-A10F6-A10, S-A12F6-A12) provavelmente está associado à difusão de compostos produzidos por *Phomopsis* sp. FLe6 no meio de cultivo. O extrato S-A7F14-A7 (actinobactéria *S. albospinus* RLe7 + zona de inibição entre *Penicillium* sp. RLe14 e *S. albospinus* RLe7) também merece destaque pois apresentou atividade muito elevada contra a linhagem tumoral

MDA-MB435, enquanto que os extratos das respectivas culturas simples (S-A7 e S-F14) foram pouco ativos contra essa linhagem, indicando que apesar de não terem sido vistas diferenças químicas entre os extratos das culturas simples e mistas, no cultivo misto deve estar sendo produzido algum composto que não foi detectado pelas técnicas analíticas utilizadas.

2.4.3.2 Avaliação da produção de enzimas pelas culturas simples e mistas em meio semi-sólido

Considerando que durante a interação entre os microrganismos não somente a produção de metabólitos secundários pode ser induzida, mas também a produção de enzimas (SÁNCHEZ et al., 2007; ALMEIDA et al., 2007; GUTHRIE; CASTLE, 2006; SHIN et al., 1998), e que estas podem ser responsáveis pela formação das zonas de inibição observadas em meio semi-sólido, a produção de diferentes enzimas na região entre os micro-organismos foi investigada.

Foram investigadas enzimas que podem estar associadas à adaptação do micro-organismo produtor ao ambiente devido a sua capacidade de degradar diferentes substratos, como amilases, pectinases e proteases.

Após os testes enzimáticos, não foram observadas diferenças colorimétricas significativas entre os frascos contendo a solução de enzima ativa e o controle, contendo a enzima desnaturada. Esses resultados sugerem que as enzimas investigadas não são produzidas ou estão presentes apenas em quantidades ínfimas nas culturas simples e/ou mistas. Alternativamente, as culturas mistas poderiam estar estimulando a produção de outras enzimas específicas que não foram investigadas. Enzimas específicas capazes de degradar as paredes dos micro-organismos, como as quitinases, não foram investigadas, entretanto, a ausência das enzimas investigadas, principalmente proteases, é um indicativo de que a formação das zonas de inibição entre os micro-organismos mais provavelmente ocorre devido à produção de metabólitos secundários.

Tabela 13. Inibição do crescimento celular de linhagens tumorais por extratos brutos das culturas simples e mistas cultivadas em meio semi-sólido

Amostras	Linhagens celulares		
	MDA-MB435	HCT-8	SF-295
S-br	12,0% - PA	38,4% - PA	29,2% - PA
S-A7	10,7% - PA	54,4% - Mo	57,4% - Mo
S-A10	SA	18,8% - PA	15,8% - PA
S-A12	SA	12,4% - PA	15,8% - PA
S-F3	SA	5,5% - PA	19,5% - PA
S-F6	67,8% - Mo	76,5% - MA	68,5% - Mo
S-F8	SA	20,9% - PA	22,4% - PA
S-F11	SA	22,6% - PA	16,8% - PA
S-F14	SA	19,1% - PA	19,6% - PA
S-A7F3-A7	SA	19,7% - PA	18,4% - PA
S-A7F3-F3	6,0% - PA	15,7% - PA	14,9% - PA
S-A7F6-A7	58,9% - Mo	69,2% - Mo	80,4% - MA
S-A7F6-F6	14,0% - PA	66,0% - Mo	64,4% - Mo
S-A7F8-A7	32,8% - PA	54,8% - Mo	58,2% - Mo
S-A7F8-F8	8,0% - PA	26,2% - PA	27,8% - PA
S-A7F11-A7	9,8% - PA	13,1% - PA	9,2% - PA
S-A7F11-F11	SA	23,5% - PA	16,5% - PA
S-A7F14-A7	91,2% - MA	46,1% - PA	21,8% - PA
S-A7F14-F14	SA	21,5% - PA	12,6% - PA
S-A10F3-A10	8,2% - PA	32,5% - PA	28,6% - PA
S-A10F3-F3	SA	31,6% - PA	27,8% - PA
S-A10F6-A10	15,0% - PA	62,7% - Mo	66,3% - Mo
S-A10F6-F6	65,1% - Mo	80,9% - MA	76,9% - PA
S-A10F8-A10	21,1% - PA	23,4% - PA	33,0% - PA
S-A10F8-F8	SA	15,1% - PA	9,3% - PA
S-A10F11-A10	SA	7,5% - PA	18,0% - PA
S-A10F11-F11	SA	18,2% - PA	15,1% - PA
S-A10F14-A10	9,9% - PA	37,3% - PA	34,2% - PA
S-A10F14-F14	21,1% - PA	23,4% - PA	33,0% - PA
S-A12F3-A12	16,9% - PA	21,1% - PA	27,6% - PA
S-A12F3-F3	5,5% - PA	24,2% - PA	25,4% - PA
S-A12F6-A12	21,7% - PA	2,9% - Mo	61,2% - Mo
S-A12F6-F6	SA	63,8% - Mo	63,3% - Mo
S-A12F8-A12	33,7% - PA	27,8% - PA	35,0% - PA
S-A12F8-F8	SA	34,4% - PA	29,3% - PA
S-A12F11-A12	9,4% - PA	35,7% - PA	27,8% - PA
S-A12F11-F11	SA	34,4% - PA	29,3% - PA
S-A12F14-A12	14,7% - PA	35,1% - PA	22,6% - PA
S-A12F14-F14	SA	19,2% - PA	24,8% - PA
DOX	97,3% - MA	96,9% - MA	87,7% - MA

SA=sem atividade; PA=pouco ativo (inibição de 1 a 50%); Mo=moderadamente ativo (inibição de 50 a 75%); MA=muito ativo (inibição de 75 a 100%).

2.4.3.3 Seleção de algumas linhagens para serem cultivadas em meio líquido

Devido à constatação de inibição do crescimento dos fungos pelas actinobactérias em meio semi-sólido, em contradição à ausência de detecção da produção de compostos pelas técnicas analíticas utilizadas, foram realizados cultivos em meio líquido (Tabela 14) para verificar se ocorriam mudanças detectáveis nos perfis metabólicos dos micro-organismos. Para esses experimentos, primeiramente, apenas algumas linhagens foram selecionadas. A seleção foi baseada na identificação dos micro-organismos e nos resultados de atividade citotóxica obtidos em meio semi-sólido. Dentre as actinobactérias, *S. albospinus* RLe7 foi a única que apresentou potencial citotóxico moderado em cultura simples e então foi escolhida. Dentre os fungos, *Phomopsis* sp. FLe6 também foi o mais ativo, tanto em culturas simples quanto nas mistas. Devido ao fungo *Phomopsis* sp. FLe3 pertencer ao mesmo gênero de *Phomopsis* sp. FLe6, ele também foi selecionado para que possíveis comparações pudessem ser feitas, apesar dos seus extratos em meio semi-sólido não serem potencialmente ativos.

Tabela 14. Extratos brutos das culturas simples e mistas em meio líquido

Micro-organismo utilizado	Código do extrato	Quantidade de frascos	Massa (mg)
-	L-br	2	15,1
RLe7	L-A7	3	86,5
FLe3	L-F3	3	67,2
FLe6	L-F6	3	96,7
RLe7+ FLe3	L-A7F3	4	65,8
RLe7+ FLe6	L-A7F6	4	118,6

Nos códigos dos extratos, a letra L inicial indica que o cultivo foi realizado em meio líquido, enquanto que o restante do código segue o padrão usado nos extratos em meio semi-sólido.

Através da análise por CCDA verificou-se que não houve diferenças entre a cultura mista de *S. albospinus* RLe7 com *Phomopsis* sp. FLe3 e as respectivas culturas simples (Figura A, primeira cromatoplaça). Entretanto, quando a cultura mista entre *S. albospinus* RLe7 e *Phomopsis* sp. FLe6 foi comparada com as respectivas simples, foi possível perceber algumas alterações. Notou-se que um composto que era produzido em grande quantidade na cultura simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 (R_f 0,54 em hexano:acetato de etila 3:7, mancha azul escuro), praticamente desapareceu na cultura mista. Adicionalmente, na cultura

mista foram detectadas substâncias que não estavam presentes nas culturas simples de ambos os micro-organismos (Figura 40). A análise por HPLC-DAD confirmou o que foi observado em CCDA para as culturas do fungo *Phomopsis* sp. FLe3 (Figura 46) e *Phomopsis* sp. FLe6 (Figura 42 e 43, fase móvel contendo metanol e acetonitrila, respectivamente). O composto que teve sua produção diminuída possui tr de 29,0 e 22,3 min quando são utilizadas eluição com metanol em água e acetonitrila em água, respectivamente (Figura 42 e 43). Além disso, a análise por HPLC-DAD revelou que o perfil do extrato da cultura simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 cultivado em meio líquido (Figura 18, cromatograma rosa) possui semelhanças ao proveniente do meio semi-sólido (Figura 44, cromatogramas azul), inclusive com a presença do composto com tr de 29,0 min. Além disso, é possível perceber que esse composto, juntamente com o composto com tr de 27,3 min é capaz de se difundir na zona de inibição da cultura mista em meio semi-sólido (Figura 44, cromatograma rosa). Quando se compara os extratos das culturas simples de *Phomopsis* sp. FLe3, pode-se notar que os perfis são bastante diferentes entre os cultivos em meio líquido (Figura 42, cromatograma rosa) e semi-sólido (Figura 45, cromatograma azul). Na cultura simples em meio semi-sólido, há prevalência acentuada dos compostos com tr de 19,8 e 22,7 min, o que não acontece na cultura em meio líquido. Além disso, quando as culturas simples, em ambos os meios, de *Phomopsis* sp. FLe3 e *Phomopsis* sp. FLe6 são comparadas percebe-se que o composto majoritário produzido por *Phomopsis* sp. FLe6 (R_f 0,54 em hexano:acetato de etila 3:7 e tr de 29,0 min em metanol aquoso) não é produzido por *Phomopsis* sp. FLe3, um grande indicativo de metabolismo secundário diferente entre os dois micro-organismos *Phomopsis* sp.

Figura 40. Análise por CCDA dos extratos brutos das culturas simples e mistas do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 e actinobactéria *S. albospinus* RLe7. Na primeira cromatoplaça, os códigos br, A7, F3, F6, 73 e 76 representam, respectivamente, o branco, as culturas simples de *S. albospinus* RLe7, *Phomopsis* sp. FLe3 e *Phomopsis* sp. FLe6, e as culturas mistas de *S. albospinus* RLe7 com *Phomopsis* sp. FLe3 e *Phomopsis* sp. FLe6. Na segunda placa, A7, F6 e A7F6 representam, respectivamente, as culturas simples de *S. albospinus* RLe7 e *Phomopsis* sp. FLe6, e a cultura mista desses dois micro-organismos. Placa de fase normal (sílica gel ativada) utilizando eluição com fase móvel Hex:AcOEt 3:7, revelação em UV de 254 e 365 nm e em vanilina sulfúrica.

Figura 41. Cromatogramas dos extratos brutos das culturas simples líquidas da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 (azul) e do fungo *Phomopsis* sp. FLe3 (rosa), da cultura mista envolvendo esses dois micro-organismos (verde) e do controle contendo apenas o meio de cultivo (preto). 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 por 5 min, 100% a 10% de MeOH por 2 min; 10% de MeOH por 8 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (225 nm).

Figura 42. Cromatogramas dos extratos brutos das culturas simples líquidas da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 (azul) e do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 (rosa), da cultura mista envolvendo esses dois micro-organismos (verde) e do controle contendo apenas o meio de cultivo (preto). 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 por 5 min, 100% a 10% de MeOH por 2 min; 10% de MeOH por 8 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (225 nm).

Figura 43. Cromatogramas dos extratos brutos das culturas líquidas simples da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 (azul) e do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 (rosa), e da cultura mista envolvendo esses dois micro-organismos (preto). Coluna analítica CLC-ODS 250 mm x 4,5 mm e fase móvel de MeCN em água (10% a 100% de MeCN, em 30 min; 100% de MeCN por 5 min, 100% a 10% de MeCN por 2 min; 10% de MeCN por 8 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (225 nm).

Figura 44. Cromatogramas dos extratos brutos das culturas semi-sólidas simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 (azul) e da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 (vermelho), da cultura mista contendo a colônia do fungo (verde) e da cultura mista contendo a colônia da actinobactéria juntamente com a zona de inibição (rosa). 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 por 2 min, 100% a 10% de MeOH por 2 min; 10% de MeOH por 6 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (225 nm).

Figura 45. Cromatogramas dos extratos brutos das culturas semi-sólidas simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe3 (azul) e da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 (vermelho), da cultura mista contendo a colônia do fungo (verde) e da cultura mista contendo a colônia da actinobactéria juntamente com a zona de inibição (rosa). 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 por 2 min, 100% a 10% de MeOH por 2 min; 10% de MeOH por 6 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (225 nm).

Além das diferenças nos perfis químicos dos micro-organismos *S. albospinus* RLe7 e *Phomopsis* sp. FLe6 quando cultivado sozinhos e em cultura mista, alterações na aparência dos cultivos líquidos também puderam ser

observadas quando RLe7 e *Phomopsis* sp. FLe6 foram misturados em cultura (Figura 46). Aparentemente, no cultivo misto o fungo adquiriu uma coloração bem mais escura que na cultura simples, provavelmente devido à presença da actinobactéria.

Figura 46. Culturas simples e mista da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 e do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 em meio líquido. (A) Cultura simples de *S. albospinus* RLe7, (B) cultura simples de *Phomopsis* sp. FLe6 e (C) cultura mista destes micro-organismos. Fotos tiradas após 14 dias de crescimento.

Comparando-se os resultados biológicos dos extratos brutos das culturas simples obtidos em meio líquido (Tabela 15) e em semi-sólido (Tabela 11), pôde-se perceber que o potencial citotóxico da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 diminuiu consideravelmente em meio líquido. Inversamente, o potencial do fungo *Phomopsis* sp. FLe3 aumentou. Já a atividade do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 manteve-se relativamente constante, diminuído apenas frente a linhagem MDA-MB435. O mesmo aconteceu na cultura mista envolvendo esse fungo. Já o extrato da cultura mista envolvendo o fungo *Phomopsis* sp. FLe3 apresentou um elevado aumento no potencial citotóxico, quando comparado às respectivas culturas simples, o que indicaria que nessas condições houve a produção de compostos que não eram produzidos nas culturas simples. Entretanto, essa variação na atividade biológica não foi acompanhada por variações qualitativas ou quantitativas observáveis no perfil químico, e assim, não foi possível sugerir quais compostos são responsáveis por essa elevação da atividade citotóxica. Interessantemente, a análise química da cultura mista de *Phomopsis* sp. FLe6 com *S. albospinus* RLe7 revelou que vários compostos adicionais foram produzidos, quando comparada à cultura simples, e apesar disso, não foi verificado aumento da atividade. Há a possibilidade de que a produção de adicionais compostos bio-ativos tenha ocorrido, entretanto, a concentração no

extrato dos compostos que originariamente eram responsáveis pela atividade observada na cultura simples diminuiu, resultando em um potencial citotóxico final equivalente.

Tabela 15. Inibição do crescimento celular de linhagens tumorais por extratos brutos das culturas simples e mistas cultivadas em meio líquido

Amostras	Linhagens Celulares		
	MDA-MB435	HCT-8	SF-295
L-br	SA	37,1% - PA	4,0% - PA
L-A7	33,6% - PA	SA	24,4% - PA
L-F3	20,0% - PA	61,9% - Mo	33,6% - PA
L-F6	46,3% - PA	78,2% - MA	67,4% - Mo
L-A7F3	16,1% - PA	82,3% - MA	50,3% - Mo
L-A7F6	47,0% - PA	76,5% - MA	65,7% - Mo

SA=sem atividade; PA=pouco ativo (inibição de 1 a 50%); Mo=moderadamente ativo (inibição de 50 a 75%); MA=muito ativo (inibição de 75 a 100%).

2.4.3.4 Avaliação do potencial para a produção de metabólitos secundários dos micro-organismos cultivados em culturas simples e mistas em meio líquido

2.4.3.4.1 Primeira seleção envolvendo todos os micro-organismos

Devido aos resultados promissores observados para o cultivo misto envolvendo a actinobactéria *S. albospinus* RLe7 e o fungo FLe6, realizado anteriormente em meio líquido, todas as outras possíveis culturas mistas entre fungos e actinobactérias foram também avaliadas em meio líquido (Tabela 16). Apenas as culturas mistas envolvendo a actinobactéria *S. albospinus* RLe12 não foram avaliadas já que essa linhagem é muito semelhante à *S. albospinus* RLe7.

Nesses experimentos o meio fermentativo PBD utilizado foi de diferente procedência (fornecedor) do que havia sido utilizado previamente nos experimentos em meio líquido. Provavelmente por esta razão, os perfis dos extratos não foram iguais aos que haviam sido observados nos experimentos anteriores envolvendo as culturas simples de *S. albospinus* RLe7, *Phomopsis* sp. FLe3 e *Phomopsis* sp. FLe6 e culturas mistas da actinobactéria com ambos os fungos. Pode-se observar, inclusive, que os perfis químicos dos controles contendo apenas o meio de cultivo são diferentes (Figura 47). Pequenas alterações nos perfis químicos foram observadas entre as culturas simples e

mistas envolvendo os fungos *C. boninense* FLe8.1 e *H. rosae* FLe11 e as actinobactérias.

Tabela 16. Extratos brutos das culturas simples e mistas obtidos na primeira seleção em cultivo líquido de todos os micro-organismos

Micro-organismo utilizado	Código do extrato	Massa (mg)
-	sL-br	130,3
RLe7	sL-A7	129,0
RLe10	sL-A10	138,2
FLe3	sL-F3	76,5
FLe6	sL-F6	83,7
FLe8.1	sL-F8.1	79,9
FLe11	sL-F11	124,0
RLe14	sL-F14	52,0
RLe7+ FLe3	sL-A7F3	54,4
RLe7+ FLe6	sL-A7F6	73,9
RLe7+ FLe8.1	sL-A7F8.1	190,2
RLe7+ FLe11	sL-A7F11	98,5
RLe7+ RLe14	sL-A7F14	45,3
RLe10+ FLe3	sL-A10F3	49,0
RLe10+ FLe6	sL-A10F6	65,3
RLe10+ FLe8.1	sL-A10F8.1	56,2
RLe10+ FLe11	sL-A10F11	87,0
RLe10+ RLe14	sL-A10F14	58,2

No código dos extratos, sL indica seleção em meio líquido, sendo seguido dos números dos códigos dos micro-organismos, como nos cultivos anteriores.

Figura 47. Cromatogramas dos extratos controle, contendo apenas meio PDB, do cultivo anterior (preto) e do atual (azul). 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, por 2 min, 100% a 10% de MeOH, por 2 min; 10% de MeOH, por 6 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (225 nm).

Todos os extratos obtidos foram enviados para a análise biológica (Tabela 17). Assim como no cultivo semi-sólido, o fungo mais ativo em meio líquido foi o *Phomopsis* sp. FLe6, tanto em cultura simples quanto nas mistas. Além disso, o fungo *Penicillium* sp. RLe14 também apresentou atividade moderada contra a linhagem tumoral de sistema nervoso (SF295) quando cultivado em cultura simples. Pode-se perceber que a atividade citotóxica do extrato proveniente da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 cultivada em meio líquido diminuiu consideravelmente em comparação ao cultivo em meio semi-sólido, sendo praticamente inativo. O mesmo foi observado no cultivo anterior em *S. albospinus* RLe7 também foi cultivada em meio líquido. Isso pode ter sido devido ao fato das actinobactérias não crescerem bem em meio líquido, evidenciando que o cultivo em meio sólido provavelmente é mais adequado para se obter metabólitos secundários bioativos de actinobactérias.

Tabela 17. Inibição do crescimento celular de linhagens tumorais por extratos brutos obtidos na primeira seleção em meio líquido de todos os micro-organismos

Amostras	Linhagens celulares		
	MDA-MB435	HCT8	SF295
SL-BRANCO	SA	23,3% - PA	21,0% - PA
SL-A7	SA	14,5% - PA	SA
SL-A10	5,9% - PA	12,3% - PA	28,9% - PA
SL-F3	SA	15,4% - PA	38,7% - PA
SL-F6	48,3% - PA	51,4% - Mo	68,1% - Mo
SL-F8.1	0,1% - PA	30,3% - PA	43,4% - PA
SL-F11	SA	23,7% - PA	32,1% - PA
SL-F14	SA	36,7% - PA	52,4% - Mo
SL-A7F3	5,4% - PA	21,3% - PA	23,8% - PA
SL-A7F6	54,9% - Mo	52,1% - Mo	66,8% - Mo
SL-A7F8.1	SA	13,9% - PA	29,9% - PA
SL-A7F11	SA	26,9% - PA	10,3% - PA
SL-A7F14	SA	27,1% - PA	40,8% - PA
SL-A10F3	7,4% - PA	28,6% - PA	46,2% - PA
SL-A10F6	50,2% - Mo	67,6% - Mo	61,4% - Mo
SL-A10F8.1	SA	22,0% - PA	44,8% - PA
SL-A10F11	SA	35,4% - PA	31,5% - PA
SL-A10F14	SA	SA	38,6% - PA
DOX	97,3% - MA	96,9% - MA	87,7% - MA

SA=sem atividade; PA=pouco ativo (inibição de 1 a 50%); Mo=moderadamente ativo (inibição de 50 a 75%); MA=muito ativo (inibição de 75 a 100%).

2.4.3.4.2 Segunda seleção envolvendo todos os micro-organismos

Apesar de terem sido observadas algumas diferenças no perfil metabólico dos extratos dos micro-organismos cultivados anteriormente em culturas líquidas simples e mistas (primeira seleção com todos os micro-organismos), todos os cultivos foram refeitos no mesmo meio PDB que foi primeiramente utilizado para cultivar os micro-organismos *S. albospinus* RLe7, *Phomopsis* sp. FLe3 e *Phomopsis* sp. FLe6, para que conclusões confiáveis pudessem ser obtidas. Assim, novos extratos, provenientes de todos os micro-organismos, foram obtidos (Tabela 18).

A análise dos perfis metabólicos revelou que a cultura mista envolvendo a actinobactéria *S. albospinus* RLe7 e o fungo *Phomopsis* sp. FLe6 apresentou variações em relação às respectivas culturas simples, como já observado em cultivos anteriores. Além disso, a cultura mista entre essa mesma actinobactéria e o fungo *C. boninense* FLe8.1 também se mostrou bastante promissora nesse sentido (Figura 48). Assim, o estudo aprofundado dessa cultura mista (*S. albospinus* RLe7 + *C. boninense* FLe8.1) foi incorporado ao projeto de mestrado, já concluído, do aluno Andrés Mauricio Caraballo Rodríguez, orientado pela Prof. Dra. Mônica Tallarico Pupo (CARABALLO, 2012). As outras culturas mistas praticamente não apresentaram alterações significativas em relação às culturas simples, como havia sido observado no cultivo anterior.

Tabela 18. Extratos brutos das culturas simples e mistas obtidos na segunda seleção em cultivo líquido de todos os micro-organismos

Micro-organismo utilizado	Código do extrato	Massa (mg)
-	2sL-br	176,4
RLe7	2sL-A7	389,9
RLe10	2sL-A10	196,3
FLe3	2sL-F3	47,8
FLe6	2sL-F6	125,6
FLe8.1	2sL-F8.1	80,6
FLe11	2sL-F11	136,6
RLe14	2sL-F14	94,5
RLe7+ FLe3	2sL-A7F3	98,8
RLe7+ FLe6	2sL-A7F6	119,0
RLe7+ FLe8.1	2sL-A7F8.1	31,4
RLe7+ FLe11	2sL-A7F11	103,6
RLe7+ RLe14	2sL-A7F14	111,8
RLe10+ FLe3	2sL-A10F3	83,7
RLe10+ FLe6	2sL-A10F6	202,5
RLe10+ FLe8.1	2sL-A10F8.1	25,2
RLe10+ FLe11	2sL-A10F11	221,5
RLe10+ RLe14	2sL-A10F14	84,8

No código dos extratos, 2sL indica a segunda seleção em meio líquido, sendo seguido dos números dos códigos dos micro-organismos, como nos cultivos anteriores.

Figura 48. Cromatogramas dos extratos da cultura simples da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 (preto), da cultura simples do fungo *C. boninense* FLe8.1 (azul) e da cultura mista envolvendo ambos micro-organismos (rosa). 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, por 5 min, 100% a 10% de MeOH, por 2 min; 10% de MeOH, por 8 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (225 nm).

Os extratos foram analisados biologicamente (Tabela 19) e, novamente, os extratos das culturas mistas envolvendo o fungo *Phomopsis* sp. FLe6 foram os mais ativos, apesar da cultura simples desse fungo não ter apresentado a

atividade significativa que vinha sendo observada em cultivos anteriores. Os demais extratos obtidos nesse cultivo não apresentaram atividade considerável contra as linhagens tumorais testadas.

Tabela 19. Inibição do crescimento celular de linhagens tumorais por extratos brutos obtidos na segunda seleção em meio líquido de todos os micro-organismos

Amostras	Linhagens celulares		
	MDA-MB435	HCT8	SF295
2-SL-BR	19,0% - PA	20,4% - PA	SA
2-SL-A7	43,0% - PA	29,7% - PA	SA
2-SL-A10	26,0% - PA	23,8% - PA	10,8% PA
2-SL-F3	29,2% - PA	24,6% - PA	18,2% - PA
2-SL-F6	36,7% - PA	46,2% - PA	35,1% - PA
2-SL-F8.1	25,8% - PA	31,7% - PA	31,0% - PA
2-SL-F11	21,4% - PA	24,7% - PA	28,1% - PA
2-SL-F14	SA	25,2% - PA	27,1% - PA
2-SL-A7F3	42,4% - PA	47,5% - PA	18,9% - PA
2-SL-A7F6	50,8% - Mo	73,0% - Mo	59,2% - Mo
2-SL-A7F8.1	37,0% - PA	47,2% - PA	45,7% - PA
2-SL-A7F11	45,7% - PA	32,6% - PA	31,7% - PA
2-SL-A7F14	49,0% - PA	41,0% - PA	SA
2-SL-A10F3	35,7% - PA	49,8% - PA	38,3% - PA
2-SL-A10F6	55,3% - Mo	79,6% - MA	64,4% - Mo
2-SL-A10F8.1	21,8% - PA	29,0% - PA	35,5% - PA
2-SL-A10F11	39,6% - PA	32,7% - PA	2,7% - PA
2-SL-A10F14	34,1% - PA	25,3% - PA	33,3% - PA
DOX	97,3% - MA	96,9% - MA	87,7% - MA

SA=sem atividade; PA=pouco ativo (inibição de 1 a 50%); Mo=moderadamente ativo (inibição de 50 a 75%); MA=muito ativo (inibição de 75 a 100%).

2.4.3.5 Ampliação do cultivo simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 e do cultivo misto desse fungo com a actinobactéria *S. albospinus* RLe7 em meio líquido - adição do fungo previamente à adição da actinobactéria na cultura mista

Dentre os cultivos mistos, o mais promissor foi o envolvendo a actinobactéria *S. albospinus* RLe7 e o fungo *Phomopsis* sp. FLe6 em meio líquido. Assim, esse cultivo foi selecionado para ser ampliado, permitindo-se obter maiores quantidades do respectivo extrato bruto. Acreditando-se que os compostos de interesse detectados são produzidos pelo fungo, o cultivo de *Phomopsis* sp. FLe6 em monocultura também foi ampliado, para que os extratos provenientes da cultura simples e da mista pudessem ser comparados. Além disso, durante a extração, após a partição com acetato de etila foi também

realizada a partição com butanol na tentativa de aumentar a eficiência de extração das substâncias de interesse. Apesar do alto rendimento em massa (Tabela 20), após análises por HPLC-DAD, verificou-se que estas substâncias são encontradas quase que predominantemente no extrato de acetato de etila, indicando que não é necessária uma extração adicional para aumentar o rendimento desses metabólitos específicos.

Tabela 20. Extratos brutos das culturas simples e mistas de *Phomopsis* sp. FLe6 obtidos no primeiro cultivo líquido ampliado

Micro-organismo utilizado	Código do extrato	Quantidade de frascos	Massa (mg)
FLe6	1aL-F6ac / 1aL-F6but	5	527,2 / 923,6
RLe7+ FLe6	1aL-A7F6ac / 1aL-A7F6but	9	1050,0 / 1872,7

No código do extrato, 1aL indica primeiro cultivo líquido ampliado, enquanto que ac e but se referem, respectivamente à extração com acetato de etila e butanol.

Após a análise biológica (Tabela 21) foi constatado que os extratos obtidos através da partição com acetato de etila são mais ativos que os obtidos da partição com butanol. Isso confirma que a extração com acetato de etila é suficiente para obter os metabólitos ativos produzidos no meio de cultivo, havendo pouco ou nenhum excedente de metabólitos ativos para serem extraídos posteriormente com butanol. Há grande possibilidade de que os metabólitos que possuem atividade contra essas linhagens tumorais sejam os que foram observados nas análises por HPLC-DAD, já que eles praticamente não estão presentes nos extratos butanólicos, sendo condizente com a baixa citotoxicidade desses extratos.

Tabela 21. Percentual de inibição do crescimento celular dos extratos brutos do primeiro cultivo líquido ampliado em três linhagens de células tumorais

Amostras	Linhagens celulares		
	MDA-MB435	HCT8	SF295
1AL-F6AC	52,8% - Mo	56,3% - Mo	68,8% - Mo
1AL-F6BUT	SA	22,9% - PA	26,0% - PA
1AL-A7F6AC	45,5% - PA	47,7% - PA	69,7% - Mo
1AL-A7F6BUT	SA	22,9% - PA	30,1% - PA
DOX	97,3% - MA	96,9% - MA	87,7% - MA

SA=sem atividade; PA=pouco ativo (inibição de 1 a 50%); Mo=moderadamente ativo (inibição de 50 a 75%); MA=muito ativo (inibição de 75 a 100%).

2.4.3.5.1 Fracionamento do extrato da cultura mista de *S. albospinus* RLe7 com *Phomopsis* sp. FLe6 em meio líquido e determinação estrutural das substâncias presentes nas frações

O extrato bruto 1aL-A7F6ac, da cultura mista de *S. albospinus* RLe7 com *Phomopsis* sp. FLe6, contendo 1,05 g, foi completamente fracionado por cromatografia em coluna clássica (CC) e algumas frações selecionadas, através de CCDA, foram purificadas por HPLC utilizando coluna semi-preparativa. Muitas frações foram analisadas por RMN de ^1H e algumas por GC-MS. As frações foram codificadas mantendo-se o código do extrato que a originou seguido de numeração sequencial que indica a sequência que a fração foi obtida durante o fracionamento. A figura 48 mostra de forma esquemática e resumida o fracionamento desse extrato, mas mais detalhes podem ser obtidos no texto que segue.

O extrato 1aL-A7F6ac foi primeiramente fracionado por CC originando 12 frações, 1aL-A7F6ac-1 a 1aL-A7F6ac-12. A primeira fração, 1aL-A7F6ac-1, de característica oleosa, foi refracionada em CC mas foram obtidas somente frações altamente apolares (7 frações). A fração 1aL-A7F6ac-1-4 (1,4 mg) foi selecionada para ser analisada por RMN de ^1H e apresentou sinais característicos de ftalato e ácidos graxos, indicando que todas as frações oriundas de 1aL-A7F6ac-1 devem conter somente esses tipos de compostos. Isso também foi observado na fração 1aL-A7F6ac-3.

As frações 1aL-A7F6ac-4 a 1aL-A7F6ac-8 e a fração 1aL-A7F6ac-10 foram fracionadas por HPLC. Picos que apresentaram mesmo tempo de retenção foram unidos, resultando em 23 frações, das quais apenas as que apresentaram massas superiores a 0,7 mg e estavam aparentemente puras foram selecionadas para ser analisadas por RMN de ^1H (total de 13 frações) e algumas, em que apenas com o RMN não foi possível determinar a estrutura do composto, ou que não apresentaram massa suficiente para serem analisadas por RMN, foram analisadas por GC-MS (total de 15 frações, incluindo algumas que foram analisadas por RMN de ^1H). A análise por GC-MS revelou que a maioria dessas frações apresenta similaridade (entre 90% e 95%) a uma variedade de derivados graxos, dentre eles ácido hexadecanóico, ácido eicosanóico, ácido oléico, ácido azelaico e ácido tetradecanóico, e também a ftalatos, principalmente do tipo bis-

2-etil-hexil-ftalato. Através da comparação com o banco de dados digital contido no aparelho de GC-MS, foi sugerida a presença de alguns compostos, entretanto, algumas das substâncias sugeridas não apresentaram espectros de MS com alta similaridade aos obtidos e outras estavam em pequeníssimas quantidades nas frações (menos que 10%), não podendo nem ser observadas no espectro de RMN de ^1H quando esse foi obtido. Dessa maneira, tais compostos não serão relatados aqui. Muitas frações ainda estavam em mistura e devido à pequena quantidade em massa não foi possível purificar mais, o que impossibilitou a determinação estrutural em alguns casos. Ainda assim, alguns compostos puderam ser determinados/identificados nessas análises. A determinação estrutural dos compostos presentes nas frações 1aL-A7F6ac-4-4, 1aL-A7F6ac-5-4, 1aL-A7F6ac-5-5, 1aL-A7F6ac-6-3, 1aL-A7F6ac-6-5, 1aL-A7F6ac-7-5 e 1aL-A7F6ac-7-11 será apresentada com detalhes adiante. Durante as análises por RMN de ^1H foi verificado que várias frações continham ftalatos e ácidos graxos em mistura com outros compostos que se pretendia identificar. Os sinais presentes no espectro referente a esses compostos foram desconsiderados das análises e não serão mencionados durante a discussão da determinação estrutural das substâncias.

A fração 1aL-A7F6ac-9 foi fracionada em CC resultando em 7 frações. As frações 1aL-A7F6ac-9-1 e 1aL-A7F6ac-9-6 foram analisadas por RMN de ^1H e ambas contém ftalato. A fração 1aL-A7F6ac-9-7 foi fracionada em CC originando 3 frações. O RMN de ^1H dessas frações revelou exclusivamente a presença de ftalatos, ácidos graxos e açúcares. As frações 1aL-A7F6ac-9-4 e 1aL-A7F6ac-9-5 foram fracionadas em HPLC, e os picos que apresentaram mesmo tempo de retenção foram unidos, resultando em 8 frações. Como explicado anteriormente, algumas foram selecionadas para serem analisadas por RMN de ^1H (5 frações) e algumas por GC-MS (2 frações). Outras porções das frações 1aL-A7F6ac-9-4 e 1aL-A7F6ac-9-5 (aproximadamente metade) foram fracionadas em HPLC utilizando um método de eluição diferente, e assim mais 8 frações foram geradas, das quais 6 foram analisadas por RMN de ^1H . As frações originadas do segundo fracionamento foram codificadas como anteriormente, mas também contendo a letra r no código (ex. 1aL-A7F6ac-9-4-r-2). De um total de 16 frações, as frações 1aL-A7F6ac-9-4-2, 1aL-A7F6ac-9-4-5, 1aL-A7F6ac-9-4-r-2 e 1aL-A7F6ac-9-4-r-5 serão discutidas com detalhes adiante.

As frações 1aL-A7F6ac-11 e 1aL-A7F6ac-12 foram unidas e fracionadas em CC, originando 8 frações. 1aL-A7F6ac-12-1 e 1aL-A7F6ac-12-3 contém apenas ftalato e a fração 1aL-A7F6ac-12-8 foi analisada posteriormente, juntamente com a fração 1aL-A7F6ac-12-7-8, por ser solúvel somente em água, possivelmente contendo apenas açúcares do meio de cultivo. A fração 1aL-A7F6ac-12-6 contém uma mistura de compostos e será discutida em detalhes. A fração 1aL-A7F6ac-12-7 foi fracionada por CC originando 8 frações. A sub-fração 1aL-A7F6ac-12-7-7, de alta polaridade, foi fracionada por CC e a análise por RMN de ^1H de uma alíquota da fração 1aL-A7F6ac-12-7-7-2, que continha 142,0 mg, revelou a presença exclusiva de açúcares, indicando que todas as outras frações também devem conter apenas açúcares. A fração 1aL-A7F6ac-12-7-8 foi unida a 1aL-A7F6ac-12-8 (do fracionamento anterior) e fracionada por CC. A análise de duas frações menos polares, dentre todas de alta polaridade, por RMN de ^1H revelou a presença de açúcares. Isso foi um forte indício de que esses compostos deveriam estar presentes em todas as frações. As frações 1aL-A7F6ac-12-7-3, 1aL-A7F6ac-12-7-4, 1aL-A7F6ac-12-7-5 e 1aL-A7F6ac-12-7-6 foram fracionadas por HPLC. Em um primeiro fracionamento não ocorreu separação satisfatória e por isso as frações obtidas foram reunidas e fracionadas utilizando outro método de eluição. O código das frações oriundas das que foram reunidas ficou como mencionado anteriormente, mas também contendo a letra j (ex. 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2). Assim, desses fracionamentos foram obtidas 4 frações, das quais 1aL-A7F6ac-12-7-6-1, 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2 e 1aL-A7F6ac-12-7-6j-3 serão discutidas com detalhes.

As frações serão discutidas na sequência em que as substâncias presentes foram determinadas.

Figura 48. Fluxograma do fracionamento do extrato bruto 1aL-A7F6ac. Os retângulos azuis indicam frações que foram analisadas por RMN de ^1H e são citadas no texto; os retângulos verdes indicam frações que sofreram refração que não foi mostrado no esquema, apenas no texto; e os retângulos vermelhos indicam as frações que serão discutidas com maiores detalhes no texto.

O espectro de RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-7-11 (0,9 mg, Figura 49) apresentou dois sinais na região de hidrogênios aromáticos que são característicos de compostos da classe dos ftalatos. Devido a grande variedade de ftalatos existentes, foi feita uma análise da substância por GC-MS (Figura 50) para verificar qual era o possível ftalato. A análise indicou alta similaridade (96%) ao composto bis-2-etil-hexil-ftalato (**4**). Re-analisando o espectro de RMN de ^1H pode-se perceber que os dados são condizentes aos esperados para esse ftalato, já que a presença das quatro metilas, duas em cada cadeia lateral, com deslocamentos químicos de δ 0,91 e 0,94 indicam a presença de ramificação não simétrica na cadeia lateral, e os sinais entre δ 1,2 e 1,7 sugerem uma cadeia carbônica não tão curta, como é observada em alguns ftalatos, como por exemplo, o di-iso-butil-ftalato. Além disso, os dados de RMN de ^1H estão de acordo com os da literatura (LYUTSKANOVA et al., 2009; AL-BARI et al., 2006).

O composto bis-2-etil-hexil-ftalato (**4**) (Figura 51) já foi isolado de diferentes espécies de *Streptomyces* (LYUTSKANOVA et al., 2009; AL-BARI et al., 2006) e apresentou atividade antibacteriana e antifúngica (LYUTSKANOVA et al., 2009; HABIB e KARIM, 2009; AL-BARI et al., 2006). Outros ftalatos diferentes, com atividade antibacteriana, também já foram isolados de espécies do gênero *Streptomyces* (ROY; LASKAR; SEN, 2006). Compostos do tipo ftalatos já foram isolados de fungo (LUCAS et al., 2008), bactéria (SULTAN; MOON; PARK, 2010) e alga (CHEN, 2004), sendo que alguns apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica. Devido aos derivados de ftalato estarem presentes em muitos plásticos e normalmente serem associados à contaminação das amostras com esses materiais, Chen (2004) através da incorporação de isótopos radioativos provou que os ftalatos isolados da alga vermelha *Bangia atropurpurea* realmente eram produzidos pela espécie, não sendo provenientes de contaminação do meio. Entretanto, sem uma análise específica como essa, não é possível determinar se o bis-2-etil-hexil-ftalato (**4**), isolado do extrato 1aL-A7F6ac, foi produzido pela actinobactéria RLe7 ou se é oriundo de contaminação durante o processo de obtenção do extrato.

Figura 49. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-7-11.

<< Target >>

Line#:2 R.Time:17.375(Scan#:2676) MassPeaks:159

RawMode:Averaged 17.370-17.380(2675-2677) BasePeak:149.00(5226546)

BG Mode:Calc. from Peak

Hit#:1 Entry:53128 Library:NIST62.LIB

SI:96 Formula:C₂₄H₃₈O₄ CAS:117-81-7 MolWeight:390 RetIndex:0

CompName:Bis(2-ethylhexyl) phthalate \$\$ 1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester \$\$ Phth:

Figura 50. Espectro de massas do pico com tr de 17,375 min obtido após análise da fração 1aL-A7F6ac-7-11 em GC-MS (superior), e espectro do composto bis-2-etil-hexil-ftalato constante na biblioteca digital do aparelho (inferior).

Figura 51. Estrutura do composto **4** e deslocamentos químicos dos hidrogênios segundo dados obtidos do RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-7-11.

O espectro de RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-6-3 (5,6 mg, Figura 52) apresentou dois sinais dubletos na região de hidrogênios aromáticos, em δ 7,01 e 6,68, que acoplam entre si com J de 8,5 Hz, sendo característicos de anel aromático dissustituído em *para*, e devido ao deslocamento químico, provavelmente um dos substituintes era uma hidroxila. Além disso, o espectro apresentou um sinal tripleto com deslocamento químico característico de hidrogênio de carbono ligado a hetero-átomo, em δ 3,67, que acopla com um sinal de hidrogênio tripleto em δ 2,70, que possui deslocamento químico que pode ser atribuído a hidrogênio de carbono ligado diretamente a anel aromático. Os sinais apresentam integrais na razão 1:1:1:1. Assim, sugeriu-se que a fração 1aL-A7F6ac-6-3 contém o tirosol (**5**) (Figura 53), um composto conhecido por estar envolvido em *quorum-sensing*, muito estudado em leveduras, responsável por mediar interações entre micro-organismos. O tirosol (**5**) já foi isolado de diferentes fungos endofíticos (GUIMARÃES et al., 2008), incluindo *Phomopsis* sp. (WEBER et al., 2005) e também de actinobactéria *Streptomyces* sp. (LIN et al., 2008). A análise por ESI-MS, em modo negativo, confirmou a massa do composto **5** desprotonado ($[\text{M-H}]^- = 137,0593$, Anexo 21).

Figura 52. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-6-3.

Figura 53. Estrutura do composto **5** e deslocamentos químicos dos hidrogênios segundo dados obtidos do RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-6-3.

Analisando o espectro de RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-7-5 (2,3 mg, Figura 54) pode-se perceber que ela não estava pura, e que contém os sinais dos hidrogênios do tirosol (**5**). No entanto, desconsiderando os sinais correspondentes ao tirosol (**5**), foi possível fazer a análise para determinar a estrutura do composto.

O espectro de RMN de ^1H apresentou três sinais na região de hidrogênios aromáticos com deslocamento químico de 7,36, 7,32 e 7,24, sendo um dubleto, e dois tripletos, que integram para 2, 2 e 1, respectivamente, correspondentes aos hidrogênios de um anel aromático monossustituído. Além disso, há um sinal duplo-dubleto em δ 4,67 de um hidrogênio que acopla com dois outros hidrogênios (J de 4,9 e 7,0 Hz, respectivamente), os quais apresentam sinais

duplo-dubletos em δ 3,61 e 3,58. Além disso, os hidrogênios em δ 3,61 e 3,58 acoplam entre si com J de 11,4 Hz, indicando um acoplamento geminal. Apenas através da análise do RMN de ^1H sugeriu-se que os sinais observados no espectro poderiam ser do aminoácido fenilalanina, entretanto, a análise por HR-ESI-MS não confirmou a massa desse composto, apenas pôde ser observada a massa correspondente ao tirosol (**5**) desprotonado ($[\text{M-H}^+] = 137,0628$). A fração foi então analisada por GC-MS e comparando-se os espectros de EI-MS dos picos obtidos por GC com o banco de dados digital, buscou-se por compostos que pudessem apresentar um espectro de RMN de ^1H com os sinais observados na fração 1aL-A7F6ac-7-5. O espectro de GC (Figura 55) apresentou um pico com tr de 10,343 min contendo 48% da área total dos picos analisados, que corresponde ao tirosol (**5**), e outro pico com tr de 8,518 min, representando 32% da área total, que possui espectro de MS 97% similar ao do composto estireno-glicol (**6**). Este composto (Figura 56) possui espectro de RMN de ^1H que corresponde aos sinais observados no espectro da fração 1aL-A7F6ac-7-5, sendo um dos compostos majoritários presente nessa fração, além do tirosol (**5**). Devido ao estireno-glicol (**6**) e o tirosol (**5**) possuírem a mesma massa molecular e ambos estarem presentes na fração 1aL-A7F6ac-7-5, a análise do espectro de HR-ESI-MS não pode ser usada para determinar indubitavelmente a presença de estireno-glicol (**6**) nessa fração.

Não há relatos da síntese de estireno-glicol (**6**) por micro-organismos, entretanto, há relatos de que micro-organismos, através do citocromo P-450, são capazes de oxidar estireno a óxido de estireno, o qual pode ser hidrolisado, formando estireno-glicol (**6**) (CHUNG et al., 2012; O'LEARY; O'CONNOR; DOBSON, 2002; PEDRAGOSA-MOREAU et al., 1996). O estireno é usado na fabricação de embalagens plásticas e materiais descartáveis, portanto, um contaminante que pode ter sido introduzido no meio de cultivo não intencionalmente.

Figura 54. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-7-5.

Figura 55. Espectro de GC da fração 1aL-A7F6ac-7-5. Os picos com tr de 8,518, 10,343 e 28,677 min correspondem, respectivamente, aos compostos tirosol (**5**), estireno-glicol (**6**) e um ftalato.

Figura 56. Estrutura do composto **6** e deslocamentos químicos dos hidrogênios segundo dados obtidos do RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-7-5.

O espectro de RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-6-5 (0,7 mg, Figura 57) apresentou quatro sinais dubletos com δ 7,23, 6,68, 6,58, e 6,32, referentes a quatro hidrogênios aromáticos com J de 2,3 Hz, indicando relação *meta*, o que sugere que os pares de hidrogênios estão em anéis aromáticos distintos. Além disso, o espectro de RMN de ^1H apresentou um sinal singlete, integrando para 3, em δ 2,76, possivelmente referente a hidrogênios de metila ligada a anel aromático. Comparando-se os dados de RMN de ^1H com dados de um composto previamente isolado do fungo *A. tenuissima* SS77 (CHAGAS, DIAS, PUPO, 2013), sugeriu-se que fração 1aL-A7F6ac-6-5 contém o policetídeo alternariol (**7**) (Figura 58). A análise da fração por ESI-MS, em modo negativo, indicou a presença de um pico com m/z 257,0464 referente ao composto **7** desprotonado (Anexo 22). O alternariol (**7**) também estava presente na fração 1aL-A7F6ac-5-4 (2,1 mg).

O composto alternariol (**7**) também já foi isolado de um fungo endofítico *Phomopsis* sp., juntamente com outros vários derivados (CHAPLA et al., 2010). O alternariol (**7**) é uma micotoxina bem conhecida por sua mutagenicidade e citototoxicidade em células bacterianas e de mamíferos (BURKHARDT; PFEIFFER; METZLER, 2009; LOGRIECO; MORETTI; SOLFRIZZO, 2009; OSTRY, 2008; PATRIARCA et al., 2007).

Figura 57. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-6-5.

Figura 58. Estrutura do composto **7** e deslocamentos químicos dos hidrogênios segundo dados obtidos do RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-6-5.

Considerando que além do alternariol (**7**), o seu derivado alternariol mono-metil éter (**8**) também foi isolado do fungo *Phomopsis* sp. (CHAPLA, 2010), era esperado que esse composto fosse isolado em algum momento. Seguindo-se com as análises das frações, foi verificado que a fração 1aL-A7F6ac-4-4 (0,7 mg) continha esse composto (Figura 59). O espectro dessa fração (Figura 60) é muito semelhante ao da fração 1aL-A7F6ac-6-5, que contém o alternariol (**7**), sendo que a maior diferença está na presença de um sinal singlete em δ 3,90 referente à metoxila ligada ao anel aromático. A análise dessa fração por ESI-MS indicou a presença de um pico de m/z 271,0601 referente ao alternariol mono-metil éter (**8**) desprotonado (Anexo 23).

Figura 59. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-4-4.

Figura 60. Estrutura do composto **8** e deslocamentos químicos dos hidrogênios segundo dados obtidos do RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-4-4.

O espectro de RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-9-4-2 (31,4 mg, Figura 61) apresentou apenas dois sinais singletos, um em δ 6,22 e outro em δ 4,47, que integram para 1 e 2 H, respectivamente. Devido à pouquíssima informação estrutural obtida através desse espectro, foi obtido o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 62), o qual apresentou apenas três sinais. O sinal em δ 57,5 possivelmente seria do carbono ao qual o hidrogênio com deslocamento de δ 4,47 estava ligado. Os valores de deslocamento químico desse carbono e de seu hidrogênio indicam que o carbono está ligado a um hetero-átomo. O carbono em δ 109,2 possivelmente estaria ligado ao hidrogênio em δ 6,22, cujos valores de deslocamento são condizentes com o de um grupo olefínico, sendo que o carbono em δ 155,8 seria referente ao outro carbono da insaturação. Esses dados sugerem um composto de peso molecular muito pequeno, podendo, alternativamente, ser uma estrutura simétrica. A fração foi então analisada por GC-MS (Figura 63), e a cromatografia gasosa revelou que a fração contém um composto majoritário. O espectro de massas do pico com tr de 7,635 min apresentou um íon molecular de m/z 128, e um pico base com m/z 97. Considerando o número de carbonos que foram visualizados no RMN de ^{13}C e a massa obtida por MS, constatou-se que se tratava de uma estrutura simétrica, e então pode ser proposta a estrutura do bis-2,5-hidroximetilfurano (**9**) (Figura 64), a qual estaria de acordo com os dados de RMN e MS. Esse composto também foi identificado na fração 1aL-A7F6ac-9-4-r-2.

O bis-2,5-hidroximetilfurano (**9**) já foi isolado de planta (SHEN e MU, 1990) e também de fungos (JU et al., 2010; SCHNEIDER et al., 1996; SONG et al., 1994).

Figura 61. Espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CD₃OD) da fração 1aL-A7F6ac-9-4-2.

Figura 62. Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CD₃OD) da fração 1aL-A7F6ac-9-4-2.

Figura 63. Espectro de GC da fração 1aL-A7F6ac-9-4-2 (superior) e espectro de massas do pico com tempo de retenção de 7,635 min (inferior).

Figura 64. Estrutura do composto **9** e deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos segundo dados obtidos do RMN de ^1H e de ^{13}C da fração 1aL-A7F6ac-9-4-2.

O espectro de RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-9-4-5 (5,3 mg, Figura 65) apresentou vários sinais distribuídos em toda a região do espectro, com constantes de acoplamento e multiplicidade bem definidas. Os espectros de gHMQC, gHMBC e gCOSY foram então adquiridos (Anexos 24, 25 e 26). Os dados de todos os espectros estão apresentados na tabela 22. No espectro de

RMN de ^1H foram observados três sinais na região de hidrogênios aromáticos, em δ 7,33, 7,26 e 7,17, apresentando multiplicidades e constantes de acoplamento característicos de um anel aromático do tipo benzênico monossustituído. Através do espectro de gHMBC foi verificado que os hidrogênios em δ 2,66 e 2,87, ambos ligados a um carbono em δ 45,5, se correlacionam com carbonos do anel aromático, indicando sua proximidade. Além disso, o hidrogênio em δ 2,66 se correlaciona com um carbono em δ 53,8, ao qual está ligado um hidrogênio em δ 3,27. Os deslocamentos químicos desse carbono e de seu hidrogênio seriam condizentes com o de um carbono metínico ligado a nitrogênio, e nesse caso, o fragmento estrutural descrito seria derivado do amino-ácido fenilalanina. Entretanto, os valores dos deslocamentos químicos do carbono e do hidrogênio α -carboxílicos estavam um pouco menor que o esperado.

Continuando a análise, foi possível observar seis hidrogênios ligados a carbonos sp^2 . Através do gCOSY foi vista a correlação entre os hidrogênios em δ 5,87 e 5,54, e a correlação entre os hidrogênios em δ 5,75 e 5,41. Ambos esses pares de hidrogênios possuem uma relação *trans* entre si. Pelo gHMQC verificou-se que os outros dois hidrogênios, em δ 5,36 e 5,12, estavam ligados no mesmo carbono. Esses hidrogênios acoplam entre si com uma constante de acoplamento geminal muito pequena, característica de ligações duplas terminais. O sinal de cada um desses hidrogênios no espectro de RMN de ^1H é um singlete largo, indicando que eles não possuem nenhum acoplamento *cis* ou *trans* com um possível hidrogênio ligado ao outro carbono da ligação dupla. Em acordo, no gCOSY não foram vistas correlações envolvendo esses hidrogênios, o que confirma que o outro carbono não possui hidrogênio diretamente ligado. Uma correlação discreta do hidrogênio em δ 5,36 com um carbono em δ 147,8 foi observada no gHMBC, que seria o deslocamento químico do outro carbono sp^2 . Foram observadas correlações de outros hidrogênios com esse carbono, indicando as proximidades estruturais.

No espectro de RMN de ^1H também foi observado um sinal singlete, integrando para 3 H, em δ 2,26, supostamente referente à metila de um grupo acetila. A correlação desse hidrogênio com um carbono em δ 170,1 confirmou a presença desse grupo. Além disso, o deslocamento químico do carbono em δ

170,1 sugere uma carboxila de éster ou amida (excluindo cetona). A correlação do hidrogênio em δ 5,57, ligado a um carbono em δ 77,4, com o carbono carboxílico indica a ligação direta desse grupo metínico ao hetero-átomo da carboxila, já que o grupo acetil já é um dos ligantes dessa carboxila. Pelos deslocamentos químicos do carbono e do hidrogênio do grupo metínico, a presença de uma carboxila de éster seria mais provável. O hidrogênio em δ 5,57 apresenta correlações com seis carbonos, indicando ramificações no esqueleto. O hidrogênio em δ 2,95, ligado ao carbono em δ 47,0 e próximo ao hidrogênio em δ 5,57, apresenta correlações com cinco carbonos, sendo que nem todos são os mesmos aos quais o hidrogênio em δ 5,57 se correlaciona. Isso é um indicativo da grande complexidade estrutura em termos de conectividade.

No espectro RMN de ^1H , foram ainda visualizados três sinais referentes a metilas, sendo dois dubletos, em δ 1,01 e 1,06, e um singlete em δ 1,36. Através das correlações vistas no gCOSY e no gHMBC, pôde-se determinar que a metila que contém os hidrogênios em δ 1,06 (em δ_c 26,3) está ligada ao carbono em δ 32,9, que está diretamente ligado ao carbono sp^2 em δ 147,8. A metila que contém os hidrogênios em δ 1,36 (em δ_c 31,2) está ligada ao carbono em δ 74,4, o qual não possui nenhum hidrogênio ligado e apresenta deslocamento característico de carbono ligado a oxigênio. Assim, a conexão estrutural dos outros fragmentos também foi sendo feita, entretanto, as ramificações na estrutura dificultavam a junção precisa de alguns fragmentos. Foi constatado que o composto possuía vários carbonos metilênicos, os quais possuíam hidrogênios diastereotópicos com deslocamentos químicos bastante distintos, o que sugeria que a estrutura deveria ser cíclica.

Com base em todas as informações obtidas dos espectros, foi sugerido que a estrutura era da classe das citocalasanas, mais especificamente, uma citocalasina (SCHERLACH et al., 2010). Assim, foram feitas buscas no *SciFinder* para auxiliar na junção dos fragmentos estruturais com precisão, possibilitando a determinação inequívoca da estrutura do composto **10** (Figura 66). O espectro de ESI-MS, obtido em modo positivo (Anexo 27), contém um pico com m/z 516,2711 referente à molécula cationizada com sódio ($[\text{M}+\text{Na}]^+$). Todos os dados obtidos estão de acordo com os da literatura para o composto citocalasina H (**10**) (COX

et al., 1983), que já foi previamente isolada de fungo endofítico *Phomopsis* sp. (CHAPLA, 2010).

Tabela 22. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), gHMQC, gHMBC e gCOSY obtidos em CDCl_3 referentes ao composto **10** da fração 1aL-A7F6ac-9-4-5

Posição	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz)	gCOSY	gHMBC
1	174,2	-	-	-
3	53,8	3,27 (dt, 4,3; 9,6)	2,14; 2,66; 2,87	n.o.
4	50,4	2,14 (t, 4,5)	2,79; 3,27	n.o.
5	32,9	2,79 (t, 5,6)	1,01; 2,14	n.o.
6	147,8	-	-	-
7	69,7	3,84 (d, 10,5)	2,95	114,2, 127,0; 147,8
8	47,0	2,95 (t, 10,2)	3,84; 5,75	51,7; 69,7; 127,0; 138,6; 174,2
9	51,7	-	-	-
10	45,5	2,87 (dd, 4,3; 13,4) 2,66 (dd, 9,6; 13,4)	2,66; 3,27 2,87; 3,27	129,1; 137,3 53,8; 129,1; 137,3
11	14,1	1,01 (d, 6,7)	2,79	32,9; 50,4; 147,8
12	114,2	5,36 (sl) 5,12 (sl)	n.o. n.o.	32,9; 69,7; 147,8 32,9; 69,7
13	127,0	5,75 (dd, 9,9; 15,4)	2,95; 5,41	42,6; 47,0
14	138,6	5,41 (ddd, 5,4; 10,4; 15,4)	5,75	n.o.
15	42,6	1,82 ^b 2,05 (dd, 5,4; 11,4)	2,05 1,82	28,3 n.o.
16	28,3	1,80 ^b	1,06; 5,41	127,0; 138,6
17	53,7	1,58 (dd, 1,8; 14,4) 1,89 (dd, 2,4; 14,4)	1,89 1,58	26,3; 74,4; 138,1 n.o.
18	74,7	-	-	-
19	138,1	5,54 (d, 16,4)	5,87	77,4
20	125,8	5,87 (dd, 2,9; 16,4)	5,54; 5,57	74,4; 77,4
21	77,4	5,57 (d, 2,9)	5,87	47,0; 50,4; 51,7; 125,8; 138,1; 170,1
22	26,3	1,06 (d, 6,2)	1,80	28,3; 42,6; 53,7
23	31,2	1,36 (s)	-	53,7; 74,4; 138,1
24	170,1	-	-	-
25	20,9	2,26 (s)	-	170,1
1'	137,3	-	-	-
2'	129,0	7,16 (d, 7,2)	7,33	45,5; 127,0; 129,0
3'	129,0	7,33 (t, 7,2)	7,16; 7,26	129,0; 137,3
4'	127,0	7,26 (t, 7,2)	7,33	129,0

^a atribuído indiretamente através do gHMQC; ^b multiplicidade e J não bem definidos; n.o.= valores não observados.

Figura 65. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 1aL-A7F6ac-9-4-5.

Figura 66. Estrutura do composto **10** e deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos segundo dados obtidos do RMN de ^1H , gHMQC e gHMBC da fração 1aL-A7F6ac-9-4-5.

O espectro de RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-9-4-r-5 (1,7 mg) chamou a atenção num primeiro momento, por apresentar sinais na região de hidrogênios aromáticos com integrais mais intensas que o restante da amostra (Figura 67). Esses sinais pareciam não pertencer à amostra, mas também não era possível visualizar no restante do espectro outros sinais com integrais equivalentes, os quais poderiam fazer parte da estrutura contendo o grupo aromático. O espectro por completo apresentou certa similaridade ao espectro da citocalasina H (**10**) (Figura 65), que havia sido isolada anteriormente. Integrando-se o sinal duplo-dublete em δ 5,72 para 1 H, o sinal tripleto em δ 7,29, referente a dois hidrogênios aromáticos de um anel benzênico monossustituído, que deveria integrar para 2 H, fica integrado para 12 H. Da mesma forma, o sinal contendo os outros três hidrogênios aromáticos, fica integrado para 18 H. Isso indica que nesses sinais haveria hidrogênios de seis anéis aromáticos monossustituídos, considerando a proporcionalidade ao sinal do hidrogênio em δ 5,72. Realmente, analisando o espectro mais cuidadosamente, foi possível observar que os sinais da citocalasina H (**10**) estavam presentes no espectro e ela era somente uma das estruturas presentes na mistura. Devido à fração ser uma mistura complexa, a abundância de sinais inviabilizaria a aquisição de espectros bi-dimensionais de

boa qualidade. Por outro lado, a purificação também não seria possível devido à pequena quantidade em massa. Com isso, optou-se por realizar uma análise por MS-MS na tentativa de identificar algum outro composto, além da citocalasina H (**10**).

O espectro de massas obtido por inserção direta, em modo positivo, apresentou os picos de m/z 398, 416, 432, 434, 476 e 494 (Anexo 28). Considerando que a citocalasina H (**10**) tem massa molecular de 493 u, o pico com m/z 494 seria referente à molécula protonada $[M+H]^+$ desse composto. Os perfis de fragmentação de todos os picos apresentaram similaridade ao do pico de m/z 494, indicando que realmente se tratava de moléculas semelhantes. Os picos de menor massa poderiam ser correspondentes à fragmentação do composto de m/z 494 durante a análise, já que a diferença entre as m/z são coerentes com possíveis perdas sucessivas que ocorreriam durante a fragmentação em MS-MS (Figura 68). Entretanto, era esperado que essas fragmentações fossem observadas somente no espectro de MS-MS, e não no espectro de MS. A possibilidade da citocalasina H (**10**) ter sofrido fragmentação na fonte foi descartada quando os dados da análise por MS foram comparados ao espectro de RMN de 1H .

Como mencionado anteriormente, o RMN de 1H indicava que essa fração deveria ser uma mistura de compostos, e a similaridade entre eles, observada na análise por MS-MS, explicaria a presença de hidrogênios aromáticos com integrais muito superiores ao restante da amostra, já que essa região seria conservada em todas as moléculas. Como a intensidade do sinal é referente aos hidrogênios aromáticos de todos os compostos analisados simultaneamente, o que se observou foi um efeito cumulativo que resultou em integrais aparentemente desproporcional às integrais dos outros hidrogênios. Assim, os dados do espectro de RMN de 1H confirmaram que os picos observados no espectro de MS não é resultado da fragmentação da citocalasina H (**10**), sendo na verdade referentes a compostos já presentes na amostra.

Considerando que os picos observados são dos compostos protonados, foram buscadas, nas diferentes base de dados (*DNP*, *MassBank* e *Metlin*), citocalasinas de massa molecular 397, 415, 431, 433, 475 e 493 u. No *DNP* constam 69 citocalasinas, e dentre aquelas que as estruturas químicas estavam disponíveis, foram encontradas duas citocalasinas de massa molecular de 433 u,

uma de 431 u, e três de 493 u. Durante as buscas, não foram encontradas citocalasinas de massa molecular 397, 415 e 475 u. Todas as citocalasinas de massas molecular 493 u (Figura 69), incluindo a citocalasina H (**10**), já foram isoladas de fungos do gênero *Phomopsis*. Analisando cuidadosamente os sinais do espectro de hidrogênio é possível observar algumas diferenças que as estruturas presentes na mistura devem ter. Entretanto, é impossível determinar indubitavelmente quais citocalasinas estão presentes nessa mistura complexa.

Foi levantada a hipótese de que as massas moleculares de 397 e 415 u poderiam ser referentes a precursores das citocalasinas, entretanto, o precursor geral das citocalasinas similares à citocalasina H (**10**) possui massa de 417 u (Figura 70, FISCH, 2013), sendo maior que as massas observadas. A formação de compostos com massa de 397 e 415 u, no próprio meio de cultivo, a partir da redução da citocalasina H (**10**) poderia ocorrer, mas com um gasto energético relativamente elevado, pois requereria eliminações de água (uma para 415 u e duas para 397 u) e ainda uma eliminação redutiva do grupo acetóxi. Já a formação de um composto com massa de 475 u, envolvendo uma única eliminação de água, seria mais plausível de ocorrer.

Tendo em mente que a comparação dos perfis das culturas simples e mistas, cultivadas em meio líquido, revelou que a quantidade detectada de citocalasina H (**10**) na cultura mista é bem inferior a da cultura simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6, foi sugerido que ocorreu uma inibição da produção em cultura mista devido a presença da actinobactéria *Streptomyces* sp. RLe7. Após os resultados das análises da fração 1aL-A7F6ac-9-4-5, surgiu a hipótese de que a menor quantidade de citocalasina H (**10**) detectada em cultura mista poderia ter sido consequência da degradação/transformação desse composto pela actinobactérias, gerando sub-produtos com menor citotoxicidade. Xu e colaboradores (2009) relataram que a presença do grupo acetóxi juntamente com a ligação dupla exocíclica, presentes em compostos como a citocalasina H (**10**), parecem aumentar a atividade citotóxica desses compostos, frente a células de leucemia humana. Assim, modificações estruturais nessas posições poderiam resultar em compostos menos citotóxicos. Entretanto, não foram obtidos dados suficientes para comprovar essa hipótese, sendo meramente especulativa.

Figura 67. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-9-4-2.

Figura 68. Possíveis fragmentações da citocalasina H (10) responsáveis por gerar as m/z observadas em MS.

Figura 69. Estruturas das citocalasinas de massa molecular 493 u isoladas de *Phomopsis* sp. relatadas na literatura científica.

Figura 70. Estrutura de um precursor geral das citocalasinas. Em rosa estão marcadas as metilas oriundas da metilação da cadeia policetílica pelo SAM (S-adenosil-metionina). As posições 6, 7, 17 e 18 são as mais comumente oxidadas pelo citocromo P-450.

O espectro de RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-12-6 (17,9 mg, Figura 72) indicou que essa fração não estava pura, entretanto, alguma semelhança com o espectro da citocalasina H (**10**) pôde ser observada. A análise por CCDA já tinha revelado que essa fração continha alguma citocalasina mais polar que a citocalasina H (**10**), além de outros compostos. Devido à qualidade do espectro não estar adequada para que os espectros bi-dimensionais fossem obtidos, foi feita primeiramente uma análise por MS. O espectro de MS apresentou um pico de m/z 452, e a fragmentação desse íon levou à formação dos picos com m/z 434 e 416. Assim, citocalasinas produzidas por *Phomopsis* sp., com massa molecular de 451 u, foram buscadas no *DNP*. Três compostos atendendo a essas condições foram encontrados (Figura 71). A citocalasina J, a desacetil-epóxi-citocalasina H, e a citocalasina O, correspondem, respectivamente, à citocalasina H (**10**), à epóxi-citocalasina H e à citocalasina N_{pho} desacetiladas. Comparando-se o espectro dessa fração com o da citocalasina H (**10**) (Figura 65) é clara a ausência do sinal singlete em δ 2,26, referente aos hidrogênios da metila do grupo acetil. Portanto, nesse ponto, as três estruturas encontradas estariam de acordo com o espectro, e não poderiam ser distinguidas.

Foram então consideradas as diferenças entre as estruturas químicas para determinar qual dos compostos estaria presente na fração em questão. Uma característica estrutural crucial na determinação da citocalasina, a qual o espectro pertencia, foi a presença dos sinais singletos largos em δ 5,33 e 5,11, referentes aos hidrogênios de ligação dupla exocíclica. Esses sinais puderam ser bem distinguidos no espectro, e apenas a citocalasina J (**11**) possui tais hidrogênios, sendo, portanto, o composto presente nessa fração. Outra característica estrutural que poderia ser utilizada seria o número de metilas. Apenas a citocalasina J (**11**) possui três metilas, enquanto que as outras possuem quatro. Na análise dessa fração, entretanto, a região contendo os sinais dos hidrogênios das metilas está relativamente encoberta pelos sinais dos hidrogênios das impurezas (ácidos graxos). Ainda assim, a estrutura da citocalasina O seria indubitavelmente excluída da análise, pois os sinais dos hidrogênios de suas duas metilas ligadas aos carbonos 5 e 6 seriam mais desblindados que os da impureza, e assim, deveriam estar presentes no espectro como dois singletos integrando para 3 cada, mas não estão.

Há relatos de que a citocalasina J (**11**) já foi isolada de fungos *Phomopsis* sp., juntamente com a citocalasina H (**10**) (CHAPLA, 2010; IZAWA et al., 1989; COLE et al., 1981).

Figura 71. Estruturas das citocalasinas de massa molecular 351 u isoladas de *Phomopsis* sp. relatadas na literatura científica.

Figura 72. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 1aL-A7F6ac-12-6.

O espectro de RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1 (4,8 mg) adquirido em CD_3OD (Figura 73) apresentou sinais bem definidos e, mesmo não estando pura, os espectros de gHMQC e gHMBC foram adquiridos (Anexos 29 e 30). Aparentemente, tratava-se de uma estrutura relativamente pequena que provavelmente possuía várias oxidações, o que explicaria a alta polaridade durante o fracionamento. Através do gHMBC, foi verificado que o hidrogênio em δ 5,58 se correlacionava com o carbono ao qual o hidrogênio em δ 7,37 estava ligado (δ_c 143,4), e também com um carbono em δ 168,2. Da mesma forma, o hidrogênio em δ 7,37 se correlacionava com o carbono ao qual o hidrogênio em δ 5,58 estava ligado (δ_c 101,6), com um carbono em δ 168,2, e ainda com um carbono em δ 154,2. Isso indicava que esses dois hidrogênios, que acoplam entre si com J de 7,7 Hz, estavam em carbonos vizinhos. Entretanto, não puderam ser observadas correlações com outros carbonos, aos quais os outros hidrogênios do espectro se correlacionavam.

Analisando esses outros hidrogênios, foi verificado que os hidrogênios em δ 7,06 e 6,10, ligados a carbonos em δ 149,7 e 128,2, respectivamente, acoplavam entre si com J de 10,6 Hz. O hidrogênio em δ 7,06 se correlacionava com um carbono em δ 197,9, indicando que os dois hidrogênios mencionados estão ligados entre si por uma ligação dupla conjugada a uma carbonila de cetona, o que seria condizente com os deslocamentos químicos de hidrogênio e de carbono observados. Além disso, ambos esses hidrogênios se correlacionam com um carbono em δ 95,1. Os outros quatro hidrogênios presentes, pertencem a dois grupamentos CH_2 . Os hidrogênios de um dos carbonos metilênicos acoplam com os carbonos em δ 95,1 e 149,7, enquanto que os hidrogênios do outro CH_2 acoplam com os carbonos em δ 95,1 e 197,9. As correlações observadas mostram que esses carbonos estão próximos na estrutura e todos os hidrogênios acoplam com o carbono em δ 95,1, que não possui nenhum hidrogênio diretamente ligado, e tem deslocamento químico de carbono sp^3 ligado a dois oxigênios. Pelas multiplicidades dos sinais dos hidrogênios, todos dubletos, foi possível verificar que há apenas acoplamento geminal, entre os hidrogênios dos grupamentos CH_2 , da mesma forma que ocorre apenas acoplamento *trans* entre os hidrogênios dos carbonos da ligação dupla, e portanto, esses fragmentos estruturais não estão diretamente ligados.

Figura 73. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1.

Figura 74. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, D_2O) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1.

Depois de tentativas frustradas de definir uma estrutura química condizente com todos os dados observados, foi considerada a hipótese de que, na verdade, os sinais de hidrogênios observados eram de dois compostos distintos, **12** e **13**. Os sinais em δ 7,37, 7,06, 6,10 e 5,58 pareciam integrar todos para 1 H, indicando que esses hidrogênios pertenciam a uma mesma estrutura química. Entretanto, as integrais obtidas não eram muito confiáveis pois havia uma mistura de compostos e os sinais de alguns hidrogênios estavam sobrepostos. Dessa forma, foi adquirido um espectro de RMN de ^1H em D_2O (Figura 74) na tentativa de que pudessem ser observadas mudanças nas proporções dos compostos na mistura, e consequentemente, nas integrais dos sinais referentes a cada composto, em função da diferente solubilidade em um solvente diferente.

Esse espectro deixou claro que os sinais majoritários observados no espectro em CD_3OD pertenciam a dois compostos. E assim, os sinais correspondentes a cada estrutura foram agrupados (composto **12** e **13**, Tabelas 23 e 24, respectivamente). Ainda assim, as estruturas dos compostos não puderam ser determinadas. O composto **12** apresentava apenas dois hidrogênios, ligados em diferentes carbonos sp^2 , os quais estavam unidos pela

mesma ligação dupla. As correlações observadas no gHMBC indicavam que os carbonos da vizinhança também possuíam hibridização sp^2 , entretanto, os deslocamentos químicos dos carbonos e dos hidrogênios não eram característicos dos anéis aromáticos mais conhecidos, do tipo benzeno, furano ou pirrol, e ainda, os hidrogênios dos carbonos sp^2 possuíam uma diferença de deslocamento químico de quase 2 ppm, também pouco característica.

Em relação ao composto **13**, foi proposta uma estrutura condizente aos dados obtidos (Figura 78, composto **13**), mas a não existência de tal composto na literatura científica, isolado de fontes naturais, aumentou as dúvidas em respeito a sua adequação. Optou-se então por fazer um GC-MS já que essas moléculas deveriam possuir baixa massa molecular, volatilizando com facilidade, e então, poderiam ser identificados com o auxílio da biblioteca digital do aparelho. Dentre os picos observados no GC (Figura 75), o pico com tempo de retenção de 12,674 min foi o único em que a estrutura sugerida através da biblioteca digital era condizente com os dados obtidos no RMN (Figura 73). Assim, foi sugerido que o composto **12** da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1 é a uracila (**12**) (Figura 78), uma base nitrogenada pirimídica precursora do RNA. Nossos dados de RMN estão de acordo com os da literatura científica (DING et al., 2009).

As outras estruturas sugeridas pela biblioteca digital foram descartadas pelos dados de RMN. Entretanto, os espectros de MS dos picos com tr de 8,339 e 9,534 min (Figura 75), que são muito similares, seriam condizentes com a estrutura previamente proposta para o composto **13** (Figura 78), apresentando um íon molecular de m/z 144 (não visualizado) e um pico base de m/z 60. A análise dessa fração por ESI-MS, em modo negativo, levou a visualização de um pico de m/z 143, que seria condizente com a estrutura proposta do análogo de 3-piranona (**13**) (Anexo 31).

Como mencionado anteriormente, não há relatos do isolamento do composto **13** de fontes naturais, entretanto, Adger e colaboradores (1991) obtiveram esse análogo de 3-piranona (**13**), sinteticamente, através da oxidação do bis-2,5-hidroximetilfurano (**9**). Considerando que o composto bis-2,5-hidroximetilfurano (**9**) foi isolado nesse cultivo (Figura 64), há chances de que o composto **13** também esteja presente no extrato, tendo sido produzido naturalmente pelos micro-organismos, ou através da oxidação não enzimática do bis-2,5-hidroximetilfurano (**9**). Na literatura, entretanto, não constam os dados de

RMN desse composto para poderem ser comparados aos nossos dados. A purificação dessa fração foi realizada, para tentar, posteriormente, identificar a massa do composto **13** por MS, entretanto, ele não foi recuperado após a purificação.

Tabela 23. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), gHMQC e gHMBC obtidos em CD_3OD referentes ao composto **12** da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1

Posição	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz)	gHMBC
2	154,2	-	-
4	168,2	-	-
5	101,6	5,58 (d, 7,7)	143,4; 168,2
6	143,4	7,37 (d, 7,7)	101,6; 154,2; 168,2

^a atribuído indiretamente através do gHMQC

Tabela 24. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), gHMQC e gHMBC obtidos em CD_3OD referentes ao composto **13** da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1

Posição	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz)	gHMBC
2	67,2	4,52 (d, 17,7)	95,1; 197,9
		4,08 (d, 17,7)	95,1; 197,9
3	197,9	-	-
4	128,2	6,10 (d, 10,6)	95,1
5	149,7	7,06 (d, 10,6)	95,1; 197,9
6	95,1	-	-
7	68,1	3,54 (d, 11,5)	95,1; 149,7
		3,60 (d, 11,5)	95,1; 149,7

^a atribuído indiretamente através do gHMQC

Figura 75. Espectro de GC da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1.

Figura 76. Espectro de massas do pico com tr de 12,674 min obtido após análise da fração 1aL-A7F6ac-7-11 em GC-MS (superior), e espectro da uracila (**12**), constante na biblioteca digital do aparelho (inferior).

Figura 77. Espectro de massas do pico com tr de 8,339 min obtido após análise da fração 1aL-A7F6ac-7-11 em GC-MS.

Figura 78. Estruturas químicas dos compostos **12** e **13** presentes na fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1, mostrando os deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos segundo dados obtidos do RMN de ^1H , gHMQC e gHMBC.

O espectro de RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2 (6,7 mg, Figura 80, Anexo 32) apresentou sinais distribuídos em todas as regiões do espectro, e devido a boa qualidade desses sinais, os espectros de gHMQC, gHMBC e gCOSY foram adquiridos (Anexos 33, 34 e 35). No espectro de RMN de ^1H foram visualizados dois sinais dubletos, em δ 6,68 e 7,02, integrando para 2 H cada, que acoplam entre si com J de 8,2 Hz. Esses sinais são característicos de sistemas aromáticos benzênicos 1,4-dissubstituídos, e os deslocamentos químicos sugeriam um anel fenólico. Através do gHMQC e gHMBC esse fragmento estrutural foi confirmado, e ainda, a observação de correlações desses hidrogênios com um carbono metilênico em δ 37,7, do qual os hidrogênios se correlacionam com carbonos em δ 57,9 e 167,0, indicou a presença de uma estrutura derivada do aminoácido tirosina. O hidrogênio em δ 4,34, ligado ao carbono metínico em δ 57,9, se correlaciona com o carbono carboxílico em δ 167,0 e com um outro em 170,8. Foram observados mais três grupos metínicos com deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono semelhantes (δ_{H} 4,18 com δ_{C} 59,9, δ_{H} 4,04 com δ_{C} 60,0 e δ_{H} 4,02 com δ_{C} 61,5). Os deslocamentos químicos desses carbonos e hidrogênios eram condizentes com os de carbonos e hidrogênios α -carboxílicos de aminoácidos, e além disso, foram vistas correlações desses hidrogênios com carboxilas.

Considerando todos os dados obtidos através dos diferentes espectros adquiridos, foi suposto que a estrutura era um tetra-peptídeo. Foi possível identificar os resíduos de tirosina, valina e duas prolinas. Inicialmente, ao invés de prolina, foi proposto um resíduo de aminoácido de cadeia aberta, entretanto, a

observação da correlação do hidrogênio em δ 3,54, presente no final da cadeia do resíduo em questão, com o carbono em δ 167,0, indicou que essa cadeia era fechada, sendo condizente com a estrutura da prolina. Da mesma forma, a correlação do hidrogênio em δ 3,52, presente no outro resíduo, com o carbono em δ 59,9, indicou que o resíduo também deveria ser de cadeia fechada, confirmando a presença de outra prolina na estrutura.

Foi realizada a análise por MS para confirmar a massa molecular do composto proposto (Figura 79), que deveria ter 456 u, entretanto, a massa não foi obtida, apenas puderam ser detectados os picos com m/z 261 e 197, em modo positivo, que seriam referentes aos fragmentos protonados contendo tirosina-prolina e valina-prolina, respectivamente (Anexo 36). A fragmentação desses picos em MS-MS gerou picos de m/z condizentes com possíveis fragmentações das referidas estruturas (Anexos 37 e 38), confirmando essas duas porções estruturais presentes no composto proposto. Em modo negativo, o pico mais intenso observado era o de m/z 259. Assim, os resultados das análises por MS sugeriam que a estrutura estava fragmentando na fonte, mas nem a diminuição na energia do cone resolveu o problema. A observação de um pequeno pico com m/z 673 no espectro de MS, em modo positivo, nos levou a acreditar que o composto poderia ter algo a mais em sua estrutura, que não foi observado através das análises de RMN realizadas. Assim, foram adquiridos os espectros de TOCSY e de RMN de ^{13}C (Anexos 39 e 40).

Esses espectros confirmaram a estrutura que já havia sido proposta, e o RMN de ^{13}C apenas auxiliou na determinação dos valores exatos dos deslocamentos químicos dos carbonos. Após muitas tentativas frustradas de entender os resultados obtidos, constatou-se que a estrutura inicialmente proposta não seria lábil para estar sendo fragmentada na fonte, num experimento de MS. Então foi concluído que se tratava de mistura de dois compostos, **14** e **15**, presentes em uma mistura na proporção de 1:1, o que levou a todo esse equívoco inicial. Assim, os picos observados em MS não eram fragmentos de um tetra-peptídeo, e sim representavam as m/z das estruturas de duas dicetopiperazinas diferentes. Os dados de RMN referentes a cada dicetopiperazina, **14** e **15**, foram agrupados nas tabelas 25 e 26.

Essas dicetopiperazinas, identificadas como ciclo-(Tyr-Pro) (**14**) e ciclo-(Val-Pro) (**15**), respectivamente (Figura 81), já foram isoladas de uma diversidade de micro-organismos, e os dados de RMN obtidos estão de acordo com os relatados na literatura (KUMAR et al., 2013; FURTADO et al., 2005; FDHILA et al., 2003). Entretanto, as configurações relativas não foram determinadas. Essa classe de compostos apresenta várias atividades biológicas (MARTINS; CARVALHO, 2007) e mais recentemente, dicetopiperazinas similares às isoladas têm sido relatadas como moléculas sinalizadoras de *quorum-sensing* (GU et al., 2013).

Figura 79. Estrutura química, inicialmente proposta, do composto presente na fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.

Figura 80. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.

Tabela 25. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), gHMQC, gHMBC e gCOSY obtidos em CD_3OD referentes à dicetopiperazina **14** da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2

Posição	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz, integral)	gCOSY	gHMBC
1	167,0	-	-	-
3	45,9	3,32 (<i>q</i> , 6,0, 1H) 3,52 (<i>m</i> , 1H)	1,78; 3,52 1,78; 3,32	22,7; 29,4 22,7; 29,4; 59,9; 167,0
4	22,7	1,78 (<i>m</i> , 2H)	1,19, 2,06; 3,32; 3,52	29,4; 45,9; 59,9
5	29,4	2,06 (<i>dq</i> , 1,5; 6,0, 1H) 1,19 (<i>m</i> , 1H)	4,04 1,78, 2,06	22,7; 45,9; 59,9 22,7, 59,8; 170,8
6	59,9	4,04 (<i>dd</i> , 1,7; 6,3 Hz, 1H)	1,19; 2,06	29,4; 170,8
7	170,8	-	-	-
9	57,9	4,34 (<i>dt</i> , 1,8; 4,6, 1H)	3,00; 3,07	37,7; 127,6; 167,0; 170,8
10	37,7	3,07 (<i>dd</i> , 5,1; 14,2, 1H) 3,00 (<i>dd</i> , 4,7; 14,2, 1H)	3,00; 4,34 3,07; 4,34	57,9; 127,6; 132,1; 167,0
1'	127,6	-	-	-
2'	132,1	7,02 (<i>d</i> , 8,2, 2H)	6,68	37,7; 116,2; 132,1; 157,7
3'	116,2	6,68 (<i>d</i> , 8,2, 2H)	7,01	116,2; 127,6; 157,7
4'	157,7	-	-	-

^a atribuído indiretamente através do gHMQC**Tabela 26.** Dados de RMN de ^1H (500 MHz), gHMQC, gHMBC e gCOSY obtidos em CD_3OD referentes à dicetopiperazina **15** da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2

Posição	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz, integral)	gCOSY	gHMBC
1	167,6	-	-	-
3	46,2	3,54 (<i>m</i> , 1H) 3,49 (<i>m</i> , 1H)	3,49 3,54	29,5 29,5
4	23,2	1,90 (<i>m</i> , 1H) 2,00 (<i>m</i> , 1H)	2,30; 3,49 3,54	29,5; 60,0 n.o.
5	29,5	1,94 (<i>m</i> , 1H) 2,30 (<i>m</i> , 1H)	4,18 1,90; 4,18	23,2; 60,0 23,2; 46,2; 60,0
6	60,0	4,18 (<i>dt</i> , 1,8; 7,6, 1H)	1,94; 2,30	29,5
7	172,6	-	-	-
9	61,5	4,02 (<i>t</i> , 2,2, 1H)	2,47	29,9; 167,6
10	29,9	2,47 (<i>dquint</i> , 7,1; 2,5, 1H)	0,91; 1,07; 4,02	16,6; 18,8; 61,7
11	18,8	1,07 (<i>d</i> , 7,0, 3H)	2,47	16,6; 29,9, 61,7
12	16,6	0,91 (<i>d</i> , 7,0, 3H)	2,47	18,8; 29,9; 61,7

^a atribuído indiretamente através do gHMQC; n.o.= valores não observado

Figura 81. Estruturas químicas dos compostos **14** e **15** presentes na fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2, mostrando os deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos segundo dados obtidos do RMN de ¹H, gHMQC e gHMBC.

O espectro de RMN de ¹H da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-3 (3,7 mg, Figura 82) foi obtido juntamente com o espectro da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2 (anterior). Acreditava-se que a fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2 estava pura e a 1aL-A7F6ac-12-7-6j-3, em menor quantidade, não. Por isso, os espectros bi-dimensionais dessa fração não foram obtidos. Após a determinação estrutural das duas dicetopiperazinas presentes na fração anterior, ficou claro que a fração atual também continha essa classe de compostos, em mistura.

Pelo espectro foi possível perceber a presença de seis sinais referentes a hidrogênios ligados em carbonos α -carbonílicos de aminoácidos, em δ 4,43, δ 4,24, δ 4,18, δ 4,11, δ 4,04 e δ 4,02, indicando a presença de três dicetopiperazinas distintas. Também foi possível distinguir os sinais referentes à hidrogênios de anel aromático benzênico monossustituído, em δ 7,29-7,19, juntamente com um sinal tripleto, integrando para 2 H, em δ 3,14, indicando a presença de um derivado da fenilalanina; e os sinais dos hidrogênios de quatro metilas, sendo três dubletos e um tripleto, que pelos δ_H e pelas análises de MS que serão discutidas adiante, indicam a presença de uma leucina e uma isoleucina. A presença de sinais em δ 3,56-3,32, integrando para 6 H, referentes a hidrogênios de carbonos ligados a hetero-átomos, indicaria a possível presença de três resíduos de prolina, como visto nas estruturas anteriores, mas que alternativamente, poderiam ser de arginina, cisteína ou lisina.

Foram então realizadas análises por MS na tentativa de obter dados que permitissem a distinção dos compostos. A análise por injeção direta resultou em

um espectro de baixa qualidade, em que os picos da amostra não podiam ser distinguidos de outros sinais interferentes. Assim, considerando que durante a fragmentação das dicetopiperazinas é formado um íon imínio referente a cada aminoácido presente (CHEN; LIOU; CHEN, 2004), o qual pode ser usado como íon diagnóstico, foram realizadas análises de íons produto. A presença de valina foi inicialmente averiguada, utilizando o íon produto de m/z 72. Não foi verificada a presença de íons precursores que poderiam gerar o íon de m/z 72, excluindo a presença de valina. Para determinar o aminoácido que estaria ligado a fenilalanina, foi feita a análise utilizando o íon produto de m/z 120 (Anexo 41). Um íon precursor de m/z 261 foi obtido, indicando que a fenilalanina estaria ligada a uma isoleucina ou leucina. Alternativamente, o íon observado seria condizente com a presença de uma 4-hidróxi-prolina, apesar de que os dados de RMN de ^1H não estariam de acordo com essa possibilidade. O íon de m/z 261 foi então fragmentado, e observou-se um perfil de fragmentação que seria mais condizente com a presença de uma prolina hidroxilada, devido a uma eliminação de água (Anexo 42). Isso gerou dúvidas em relação à eficácia das análises que estavam sendo realizadas em definir quais dicetopiperazinas estavam presentes na fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-3. Mesmo que pelo espectro de RMN de ^1H não haja dúvidas de que os compostos presentes nessa fração sejam dicetopiperazinas, a determinação inequívoca não pôde ser realizada com as poucas análises feitas por MS, visto a similaridade estrutural entre os aminoácidos e que a combinação entre eles, aos pares, podem levar a formação de compostos diferentes apresentando a mesma massa molecular (as massas moleculares das combinações entre os aminoácidos estão disponíveis em CHEN; LIOU; CHEN, 2004).

Assim, através dos resultados das análises realizadas é possível afirmar que essa fração, assim com a fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2, contém uma mistura de dicetopiperazinas formadas por aminoácidos que não sofreram significativas modificações adicionais, visto que na literatura há relatos de dicetopiperazinas nas quais os aminoácidos sofreram bastante diversificação estrutural (MARTINS; CARVALHO, 2007).

Figura 82. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-3.

O espectro de RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-5-5 (1,3 mg, Figura 83 e Anexo 43) apresentou sinais de hidrogênios com δ variando de 0 a 10. Essa fração, como muitas outras, estava contaminada com ftalato e outras pequenas impurezas, mas devido à pequena quantidade em massa a possibilidade de purificação foi descartada. Como o restante dos sinais apresentava boa qualidade e as multiplicidades podiam ser observadas com clareza, os espectros de RMN bi-dimensionais gHMQC, gHMBC e gCOSY foram adquiridos (Anexos 44, 45 e 46). Essa fração parecia apresentar estrutura bastante complexa, entretanto, alguns fragmentos estruturais puderam ser montados.

Aparentemente o composto apresentava duas porções estruturais similares, pois vários dos sinais do espectro se encontravam duplicados. Por exemplo, o espectro continha sinais de dois hidrogênios singletos, integrando para 1 H cada, em δ 9,61 e 9,54, que inicialmente poderiam ser atribuídos a presença de duas hidroxilas fenólicas queladas na estrutura, apesar de estas estarem mais blindadas que o esperado. Além disso, o composto, supostamente, deveria possuir dois anéis aromáticos não-benzênicos do tipo furano ou pirrol, já que os pares de hidrogênios em δ 7,07 e 5,98, e 6,97 e 6,21 apresentavam deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos ($J=4,2$ Hz) mais compatíveis com sistemas hetero-aromáticos. Os deslocamentos químicos dos ^{13}C correspondentes também estariam de acordo com um anel hetero-aromático.

Havia ainda a presença de dois pares de hidrogênios metilênicos, em δ 5,48 e 5,36, e 4,84 e 3,46, que acoplavam entre si com J característico de acoplamento geminal. Esses pares de hidrogênios estavam ligados aos carbonos em δ 63,2 e 63,4, respectivamente. Devido às correlações observadas no gHMBC, foi possível determinar que cada um dos grupamentos metilênicos estava ligado diretamente a um dos anéis hetero-aromático, e ainda, os hidrogênios em δ 5,36, e 4,84 se correlacionam, respectivamente, com os carbonos em δ 167,0 e 167,5, indicando a presença de uma carbonila na vizinhança. Esses δ_c seriam compatíveis com carbonilas de amidas, como observado nas estruturas das dicetopiperazinas presentes na fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2, discutida anteriormente. Além disso, os deslocamentos químicos dos carbonos metilênicos sugeriam que estes também estivessem ligados a um hetero-átomo, mais provavelmente oxigênio. Nesse caso, os

carbonos em δ 167,0 e 167,5 deveriam, portanto, ser de carbonilas de ésteres. Os hidrogênios em δ 5,87 e 6,04, ligados a carbonos em δ 56,0 e 59,0, respectivamente, pareciam ser hidrogênios α de aminoácidos, devido às correlações observadas no gHMQC e gHMBC, entretanto, estavam relativamente mais desblindados se comparados aos hidrogênios α das dicetopiperazinas isoladas. Haveria a possibilidade de cada um desses hidrogênios estarem ligados em carbonos α à carbonila de um éster ao invés de uma amida, assim como ocorre nas estruturas de depsipeptídeos.

Os espectros também mostravam a presença de hidrogênios em δ 3,54 e 3,46, ambos ligados a carbono em δ 40,0, e em δ 1,90 e 1,78, ligados a carbono em δ 42,0. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios e do carbono do primeiro grupamento metilênico, e as correlações no gHMBC, sugerem que esse CH₂ está ligado ao carbono em δ 59,0 (α -carbonílico) e a um anel aromático benzênico. Realmente haviam sido observados sinais de hidrogênio que sugeriam a presença de um anel aromático do tipo benzeno monossustituído, apesar de um dos sinais possivelmente estar encoberto pelo sinal do solvente em δ 7,26. O segundo grupamento metilênico (δ_H 1,90 e 1,78, δ_C 42,0) apresentava deslocamento de carbono similar ao anterior, mas os sinais dos hidrogênios estavam muito mais blindados. A correlação no gHMBC do hidrogênio em δ 5,87 (ligado ao carbono α -carbonílico em δ 56,0) com o carbono em δ 42,0 sugeria o mesmo tipo de sistema observado anteriormente, mas os deslocamentos químicos dos hidrogênios excluía a possibilidade da presença de um anel aromático na vizinhança. Como nenhuma correlação adicional pôde ser observada no gHMBC, não foi possível determinar a qual outro grupamento estrutural esse CH₂ estava ligado.

Até então, duas porções estruturais similares, mas distintas, tinham sido montadas, entretanto, nenhuma conectividade entre esses fragmentos pôde ser observada. Tendo em mente a determinação estrutural das dicetopiperazinas presentes na fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2, fração esta que continha uma mistura 1:1 de compostos similares, ao invés de um único composto, cogitou-se que a fração 1aL-A7F6ac-5-5 também poderia ser, na verdade, uma mistura de dois compostos, **16** e **17**. Assim, foi feita a comparação de um fragmento estrutural

com outro na tentativa de encontrar mais similaridades e determinar por completo as estruturas.

Considerando os sinais que ainda não haviam sido ligados na estrutura, foi verificada a presença de sinais de hidrogênios em δ 0,95 e 1,12, ambos dubletos, referentes a duas metilas. As correlações dos hidrogênios dessas metilas, no gHMBC, estavam um tanto confusas, mas ambas pareciam correlacionar com o carbono em δ 42,0. Além disso, no gCOSY, foram vistas as correlações dos hidrogênios de ambas as metilas com um hidrogênio em δ 1,80, o qual não pode ser visualizado no espectro de RMN de ^1H , e nem mesmo detectado através do gHMQC. Assim, sugeriu-se que um grupo isopropílico estava ligado ao carbono metilênico em δ 42,0, dando coerência a similaridade das estruturas: um composto seria um derivado do aminoácido fenilalanina e o outro, da leucina.

A observação da correlação do hidrogênio em δ 6,97, o qual está diretamente ligado a um dos anéis hetero-aromático, com um carbono em δ 179,0 foi de grande importância para determinar toda a vizinhança estrutural desse anel. Além disso, a presença de uma carbonila diretamente ligada no anel estaria de acordo com os deslocamentos químicos observados para os carbonos desse anel. Apesar de não ter sido observada esse mesmo tipo de correlação no anel hetero-aromático da outra estrutura, foi considerado que este anel também possuía uma carbonila diretamente ligada, pois os deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios de ambos os anéis eram muito parecidos.

Em seguida, tentou-se determinar qual tipo de carbonila estaria ligada, e a possibilidade de uma carbonila de aldeído parecia bem razoável, já que os hidrogênios em δ 9,61 e 9,54 possuíam deslocamento químico condizentes com aldeído diretamente ligado a anel hetero-aromático do tipo furano ou pirrol. Caso esses hidrogênios fossem de aldeído, as suas correlações com os respectivos carbonos carbonílicos poderiam ser observadas no gHMQC. Foi então que se verificou que o espectro de gHMQC tinha sido adquirido somente até δ 150 no eixo do carbono, e em consequência, essa correlação não pôde ser visualizada. Ainda assim, a presença de dois aldeídos foi sugerida.

Com isso, dois fragmentos estruturais similares foram propostos (Figura 83), apesar de que ainda não havia sido determinado se o anel hetero-aromático era furano ou pirrol e nem o que estaria ligado ao nitrogênio do resíduo de

aminoácido, pois em ambas as estruturas, o deslocamento químico do hidrogênio α -carbonílico e dos hidrogênios do carbono metilênico ligado ao anel hetero-aromático sugeria que o nitrogênio proveniente do aminoácido não poderia ser simplesmente um nitrogênio de amina. Os dados de RMN dos respectivos compostos estão agrupados nas tabelas 27 e 28, respectivamente.

Figura 83. Fragmentos estruturais propostos dos compostos **16** e **17** presentes na fração 1aL-A7F6ac-5-5.

Foram feitas buscas no *SciFinder* procurando-se essas sub-estruturas e foram encontrados os compostos **16** e **17** (Figura 85), derivados de formil-pirrol, que estariam de acordo com os dados de RMN observados. As análises dessa fração por MS revelaram a presença dos picos de m/z correspondentes a esses compostos (Anexos 47 e 48).

Há relatos bastante antigos de que esses compostos foram primeiramente isolados de folhas de tabaco curadas sob altas temperaturas (LLOYD et al., 1976), e seriam responsáveis por melhorar o sabor e aroma do tabaco (MILLER et al., 1976). Tais compostos são obtidos através da reação da D-glicose com um α -aminoácido sob altas temperaturas, acima de 200 °C (MILLER et al., 1976; SHIGEMATSU et al., 1971), o que deixa evidente que os compostos isolados de tabaco seria produzidos artificialmente após o processo de cura. Em 1978, Abe e colaboradores relataram o isolamento do composto **17** a partir do melaço de cana-de-açúcar, o qual, entre outros compostos, contribuiria para o sabor e aroma adocicados da cana-de-açúcar. Mais recentemente, o composto **16** foi isolado dos frutos de *Celastrus orbiculatus* (GUO et al., 2005). Não há relatos de que tais compostos tenham sido isolados de micro-organismos. Nossos dados de RMN estão de acordo com os da literatura científica (GUO et al., 2005; JERIC et al., 2000).

Figura 84. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 1aL-A7F6ac-5-5.

Tabela 27. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), gHMQC, gHMBC e gCOSY obtidos em CDCl_3 referentes ao composto **16** da fração 1aL-A7F6ac-5-5

Posição	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz, integral)	gCOSY	gHMBC
1	63,4	4,84 (<i>d</i> , 15,1, 1H) 3,46 (<i>d</i> , 15,1, 1H)	3,46 4,84	105,5; 132,0; 167,5 132,0
3	167,5	-	-	-
4	59,0	6,04 (<i>dd</i> , 3,5; 5,0, 1H)	3,44; 3,54	132,0
6	130,0	-	-	-
7	125,5	7,07 (<i>d</i> , 4,2, 1H)	5,98	105,5; 130,0; 132,0
8	105,5	5,98 (<i>d</i> , 4,2, 1H)	7,07	125,5; 130,0; 132,0
8a	132,0	-	-	-
9	n.o.	9,61 (<i>s</i> , 1H)	-	n.o.
10	40,0	3,54 (<i>dd</i> , 3,5; 14,1, 1H) 3,44 (<i>dd</i> , 5,0; 14,1, 1H)	4,44; 6,04 3,54; 6,04	129,8 59,0; 129,8; 135,0; 167,5
1'	135,0	-	-	-
2'	129,8	6,79 (<i>d</i> , 7,5, 2H)	7,19	40,0; 128,2; 129,8
3'	129,0	7,19 (<i>t</i> , 7,5, 2H)	6,79	129,8; 135,0
4'	128,2	7,27 ^b	n.o.	129,8

^a atribuído indiretamente através do gHMQC; ^b atribuído através do gHMQC; n.o.= valores não observados.

Tabela 28. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), gHMQC, gHMBC e gCOSY obtidos em CDCl_3 referentes ao composto **17** da fração 1aL-A7F6ac-5-5

Posição	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz, integral)	gCOSY	gHMBC
1	63,2	5,48 (<i>d</i> , 14,9, 1H) 5,36 (<i>d</i> , 14,9, 1H)	5,36 5,48	106,5; 131,0 106,5; 131,0; 167,0
3	167,0	-	-	-
4	56,0	5,87 (<i>dd</i> , 5,3; 9,9, 1H)	1,78; 1,90	42,0
6	n.o.	-	-	-
7	124,6	6,97 (<i>d</i> , 4,2, 1H)	6,21	106,5; 131,0; 179,0
8	106,5	6,21 (<i>d</i> , 4,2, 1H)	6,97	124,5; 131,0
8a	131,0	-	-	-
9	179,0	-	-	-
10	42,0	1,90 ^b 1,78 ^b	1,78; 5,87 1,90; 5,88	n.o. n.o.
11	24,0 ^e	1,80 ^{b,c}	0,95; 1,12	n.o.
12	21,4	1,12 (<i>d</i> , 6,3, 3H)	1,80	23,0; 24,0; 42,0
13	23,0	0,95 (<i>d</i> , 6,3, 3H)	1,80	21,4; 24,0; 42,0

^a atribuído indiretamente através do gHMQC; ^b multiplicidade e *J* não definidos; determinados através do ^cgCOSY e do ^egHMBC, pelas correlações dos hidrogênios em δ 0,95 e 1,12; ^d observado através do gHMBC pela correlações do hidrogênio em δ 6,97; n.o.= valores não observados.

Figura 85. Estruturas químicas dos compostos **16** e **17** presentes na fração 1aL-A7F6ac-5-5, mostrando os deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos segundo dados obtidos do RMN de ¹H, gHMQC e gHMBC.

2.4.3.5.2 Correlação das substâncias isoladas e identificadas aos perfis cromatográfico dos extratos brutos das culturas simples e mistas de *S. albospinus* RLe7 e *Phomopsis* sp. FLe6 em meio líquido

As frações nas quais os compostos foram identificados também foram analisadas por HPLC-DAD, em coluna C18 analítica, nas mesmas condições que os extratos brutos, para verificar os tempos de retenção desses compostos. Devido à maioria das frações não estarem puras, os tempos de retenção de muitos dos compostos não puderam ser determinados. Dentre os 14 compostos identificados, bis-2,5-hidroximetilfurano (**9**), tirosol (**5**), citocalasina H (**10**), alternariol (**7**) e alternariol mono-metil éter (**8**) apresentaram tempo de retenção de 5,4, 10,0, 10,0, 22,3, 24,8 e 25,7 min, respectivamente, nessas condições (Figura 86).

Através dessas análises, foi possível perceber que o fungo *Phomopsis* sp. FLe6 produziu grandes quantidades de citocalasina H (**10**) em cultura simples (Figura 86). Interessantemente, a produção desse composto diminuiu consideravelmente na cultura mista. Além disso, a produção de alternariol mono-metil éter (**8**) (Figura 86) só foi detectada em cultura mista. Além disso, foi

observado um relativo aumento na quantidade produzida de 2,5-bis-hidroximetilfurano (**9**) nesta condição.

Assim, os resultados das análises do cultivo líquido indicam que a cultura mista *S. albospinus* RLe7 com *Phomopsis* sp. FLe6, cultivados nessas condições, foi capaz de inibir a produção fúngica do composto citotóxico citocalasina H (**10**), enquanto que a produção de outros compostos foi estimulada, incluindo a micotoxina alternariol mono-metil éter (**8**). De alguma forma, o fungo pode ter compensado a provável diminuição de sua toxicidade devido à inibição na produção da citocalasina H (**10**) com o aumento da concentração de outras toxinas.

Figura 86. Cromatogramas dos extratos brutos das culturas simples da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 (azul) e do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 (rosa), e da cultura mista dos dois micro-organismos (preto). Os números nos picos correspondem à numeração dos compostos identificados. Coluna analítica CLC-ODS 250 mm x 4,5 mm e fase móvel de MeCN em água (10% a 100% de MeCN, em 30 min; 100% de MeCN, em 5 min, 100% a 10% de MeCN, em 2 min; 10% de MeCN, em 8 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (225 nm).

Apesar de que muitas das estruturas isoladas e identificadas não puderam ser correlacionadas aos picos observados nos cromatogramas, é muito possível que elas tenham uma função biológica e podem estar envolvidas nas interações entre o fungo *Phomopsis* sp. FLe6 e a actinobactéria *S. albospinus* RLe7, ou mesmo em sinalizações para o próprio micro-organismo que as produzem. O tirosol (**5**), por exemplo, já foi relatado como uma molécula de *quorum sensing*, assim como certas dicetopiperazinas. A presença de várias dicetopiperazinas

pôde ser verificada no extrato obtido da cultura mista, dentre as quais, a ciclo-(Tyr-Pro) (**14**) e ciclo-(Val-Pro) (**15**) foram isoladas e identificadas. A produção de compostos tóxicos pelo fungo *Phomopsis* sp. FLe6, como o alternariol (**7**), alternariol mono-metil éter (**8**), citocalasinas H (**19**) e J (**11**) seriam importantes para o potencial competitivo do fungo frente às células bacterianas de *S. albospinus* RLe7.

Grandes quantidades do composto bis-2,5-hidroximetilfurano (**9**) foram isoladas do extrato, e apesar de não haver relatos na literatura científica, esse composto pode ter alguma função biológica. A partir desse extrato também foi isolado o composto **13**, ainda não descrito na literatura, e os compostos **16** e **17**, não isolados previamente de micro-organismos, nos quais possuem funções totalmente desconhecidas. Os compostos **16** e **17** possuem odores adocicados, assim, poderia ser hipotetizado que tais compostos teriam, provavelmente, um papel ecológico relacionado com a atração de insetos, por exemplo, que auxiliariam na disseminação desses micro-organismos na natureza, ou ainda, poderiam complementar o metabolismo secundário de sua planta hospedeira.

2.4.3.6 Cultivo simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 e cultivo misto desse fungo com a actinobactéria *Streptomyces* sp. RLe7 em meio sólido de arroz parboilizado enriquecido com meio ISP-2 líquido - adição simultânea dos micro-organismos em cultura mista

Após verificar modificações nos perfis químicos dos extratos da cultura mista do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 com a actinobactéria *S. albospinus* RLe7, cultivados em meio líquido, optou-se por cultivar esses micro-organismos em meio sólido para verificar se os perfis se mantinham e poder comparar o crescimento em condições bastante diferentes. Para isso foi escolhido o meio sólido de arroz parboilizado, pois alguns trabalhos no laboratório já haviam sido feitos utilizando esse meio, entretanto, ao invés de água destilada foi adicionado meio ISP-2 líquido que é um meio utilizado para o crescimento de actinobactérias. Foram feitas as culturas mistas e simples de ambos os micro-organismos, além do controle contendo apenas meio de cultivo (Tabela 29).

Tabela 29. Extratos brutos das culturas simples e mistas obtidos no primeiro cultivo em meio sólido

Micro-organismo utilizado	Código do extrato	Massa (g)
FLe6	Sa-F6-a / Sa-F6-b	3,957 / 5,034
RLe7+ FLe6	Sa-A7F6-a / Sa-A7F6-a	4,945 / 4,652

No código dos extratos, Sa indica meio sólido de arroz, seguido do número do código da linhagem, como nos cultivos anteriores, e as letras a e b no final representam as diferentes duplicatas.

Uma pequena porção de cada extrato, aproximadamente 100 mg, foi fracionada utilizando coluna SPE de fase reversa Sulpeco® para extração em fase sólida, como mencionado na parte experimental, obtendo-se 3 sub-frações, em duplicata, de cada cultivo (Tabela 30). Comparando-se as quantidades obtidas de cada fração pode-se verificar que os compostos mais polares, contidos na fração 1, são os majoritários e provavelmente correspondem aos compostos do próprio meio de cultivo que eluíram em água. Considerando as frações 2 e 3, as quais devem conter os compostos efetivamente produzidos pelos micro-organismos, pode-se verificar que na cultura mista houve maior produção metabólica.

Tabela 30. Sub-frações obtidas após fracionamento dos extratos brutos das culturas simples e mistas do primeiro cultivo em meio sólido

Micro-organismo utilizado	Sistema solvente	Código do fração	Massa (mg)
FLe6	(1) água	Sa-F6-1a / Sa-F6-1b	81,2 / 78,8
FLe6	(2) metanol:água 1:1	Sa-F6-2a / Sa-F6-2b	2,0 / 3,7
FLe6	(3) metanol, acetona	Sa-F6-3a / Sa-F6-3b	4,1 / 6,5
RLe7+ FLe6	(1) água	Sa-A7F6-1a / Sa-A7F6-1b	71,3 / 56,9
RLe7+ FLe6	(2) metanol:água 1:1	Sa-A7F6-2a / Sa-A7F6-2b	26,2 / 26,7
RLe7+ FLe6	(3) metanol, acetona	Sa-A7F6-3a / Sa-A7F6-3b	10,3 / 4,0

Os códigos dos extratos foram mantidos como os anteriores, e os números 1, 2 e 3 indicam o sistema solvente que foi utilizado. Foram fracionados 119, 105, 135 e 108 mg dos extratos Sa-F6-a, Sa-F6-b, Sa-A7F6-a e Sa-A7F6-a, respectivamente.

Essas sub-frações foram analisados por CCDA e as duplicatas se mostraram bastante semelhantes entre si, indicando uma boa reprodutibilidade do experimento. Comparando-se as frações dos extratos da cultura simples com a mista, foi verificada uma grande diferença, tendo sido observadas muito mais manchas na fração 3 da cultura simples que na mista, inclusive duas azuis intensas reveladas com vanilina sulfúrica (Figura 86). Apesar de não haver uma grande diferença em massa entre as frações 3 das culturas simples e mistas,

pode-se concluir que a cultura simples do fungo produziu uma maior diversidade de compostos de média polaridade, enquanto que os compostos presentes na cultura mista são bastante polares e ficaram retidos na origem durante a análise com hexano:acetato de etila 3:7. Quando a fração 3 da cultura mista foi analisada com acetato de etila:metanol 8:2 (não mostrado), o mesmo perfil foi observado, indicando a alta polaridade dos compostos. Adicionalmente foi verificado que a fração 2 das culturas mistas possuem vários compostos com coloração acentuada e de alta polaridade que ficaram retidos na coluna durante a eluição com água, mas eluíram na presença de metanol (sistema solvente 2). Tais compostos poderiam ser responsáveis pelas elevadas massas das frações 2 das culturas mistas quando comparadas às culturas simples. Esses compostos ficaram retidos na origem da cromatoplaça eluída com hexano:acetato de etila 3:7 (Figura 86) mas puderam ser observados quando foi realizada eluição com acetato de etila:metanol 8:2. Provavelmente tais compostos polares, são de origem bacteriana.

Os resultados das análises por CCDA permitiram verificar que o fungo *Phomopsis* sp. FLe6 produziu uma variedade de compostos em meio sólido, os quais estão presentes exclusivamente na cultura simples. Inclusive a citocalasina H (**10**), o composto majoritário produzido pelo fungo *Phomopsis* sp. FLe6 (mancha azul escura com Rf de 0,54 em hexano:acetato de etila 3:7, Figura 86), não pôde ser observada na cultura mista através de CCDA.

Figura 86. Análise por CCDA de algumas frações provenientes dos extratos brutos da cultura simples do fungo *Phomopsis* sp FLe6 e da sua mista com a actinobactéria *S. albospinus* RLe7. Dentro do retângulo laranja são mostradas as frações da cultura simples Sa-F6-2b, Sa-F6-3a, Sa-F6-3b, respectivamente; e no verde estão as frações Sa-A7F6-2b, Sa-A7F6-3a, Sa-A7F6-3b da cultura mista. Ambas duplicatas das frações 3 são mostradas. Placa de fase normal (sílica gel ativada) utilizando eluição com fase móvel hexano:acetato de etila 3:7, revelação em UV de 254 e 365 nm e em vanilina sulfúrica.

Nesse ponto das investigações das culturas mistas envolvendo a actinobactéria *S. albospinus* RLe7 e o fungo *Phomopsis* sp. FLe6, algumas considerações puderam ser feitas: em meio líquido, pelo menos no meio utilizado (PDB) que não é específico para actinobactéria, o desenvolvimento do fungo é superior ao da actinobactéria, o que pode ser verificado tanto visualmente durante o crescimento quanto durante a análise dos extratos, já que os extratos das culturas mistas possuem um perfil mais semelhante ao da cultura simples do fungo, e poucos compostos são detectados na cultura simples da actinobactéria. Já quando os micro-organismos são cultivados em meio semi-sólido PDA (placas de Petri), o que se observa é o contrário: apesar da actinobactéria não crescer extensivamente na placa, após sua inoculação, as colônias são rapidamente formadas e ocorre a produção de compostos que prontamente inibem o crescimento fúngico. Já o desenvolvimento do fungo demora uns três dias para ser visualizado. Isso é um indício de que o desempenho competitivo da actinobactéria, aqui considerado como sua capacidade de se sobressair e se desenvolver efetivamente em presença de outro micro-organismo, é maior em condições semi-sólidas, e provavelmente sólidas, onde há um suporte físico para o crescimento.

Considerando a maneira que o cultivo misto foi estabelecido no meio sólido de arroz, ou seja, foram transferidos para o arroz 10 fragmentos contendo o fungo crescido em PDA ao mesmo tempo em que 4 mL de meio ISP-2 líquido contendo a actinobactéria foram adicionados ao meio, pode-se sugerir que a actinobactéria cresceu mais rapidamente no meio e produziu compostos antifúngicos, talvez até mesmo antes do fungo ter tempo para começar a se desenvolver a partir dos fragmentos adicionados. Quando foi verificada a aparência dos extratos, o extrato da cultura mista apresentou uma coloração bem escura, assim como o extrato da cultura simples da actinobactéria, enquanto que o extrato do fungo era amarelo pálido, o que indicou que a actinobactéria realmente se desenvolveu bem na cultura mista. Essas observações, em complementariedade a não detecção, por CCDA, de compostos produzidos pelo fungo na cultura mista, incluindo a citocalasina H (10), poderiam sugerir que a actinobactéria inibiu acentuadamente o crescimento do fungo, podendo inclusive ter causado sua morte.

Para confirmar que o metabolismo da actinobactéria prevaleceu sobre o do fungo, podendo inclusive ter inviabilizado o desenvolvimento fúngico, outras análises foram feitas, como a análise dos extratos por HPLC-DAD (Figura 87), que é uma técnica mais sensíveis que a CCDA, e poderia permitir a visualização de algum composto produzido pelo fungo também em cultura mista. Além disso, a presença da citocalasina H (**10**) e de outros compostos da mesma classe nos extratos brutos foi investigada, através de MS, pela detecção de íons precursores de um íon produto comum da classe das citocalasinas.

Através da análise por HPLC, nenhum composto que era produzido pelo fungo, e que absorve no UV, pôde ser visualizado na cultura mista. Apenas o pico com tr de 27,6 min estava presente em ambas as frações, entretanto, após o fracionamento (será discutido adiante), foi determinado que a amostra referente a esse pico apenas contém ftalato e ácido graxo, não podendo ser utilizado como parâmetro para dizer que há compostos produzidos pelo fungo na cultura mista.

Figura 87. Cromatogramas das frações Sa-F6-3b (verde) e Sa-A7F6-3b (azul) provenientes dos extratos brutos de culturas simples e mistas do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 cultivado em arroz. Coluna analítica CLC-ODS 250 mm x 4,5 mm e fase móvel de MeOH em água (10% a 100% de MeCN, em 30 min; 100% de MeCN, por 5 min, 100% a 10% de MeCN, por 2 min; 10% de MeOH, por 8 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (210 nm).

Para as análises de íon produto por MS, foi selecionado o íon produto de m/z 120, baseado em Xu e colaboradores (2012), que utilizaram um íon característico do grupo indólico para detectar sete chaetoglobosinas de

Chaetomium globosum. Diferentemente das chaetoglobosinas, derivadas do triptofano, as citocalasinas derivam da fenilalanina, e assim, durante a fragmentação, é formado um íon imínio a partir desse aminoácido, o qual tem m/z de 120. Esse íon, portanto, é comum na classe das citocalasinas, e foi usado pra detectar a presença de citocalasinas nos extratos brutos.

Foram analisados os extratos das culturas simples e mistas do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 cultivado em meio líquido (cultivo anterior) e no meio sólido de arroz. No caso dos cultivos líquidos, foram analisadas uma alíquota dos extratos brutos obtidos, enquanto que para a análise dos cultivos sólidos, foram utilizadas as frações 2 e 3 das culturas simples e mistas, as que mais provavelmente deveriam conter as citocalasinas (Anexos 49-54). Em todos os extratos foi visualizada a formação de íons produtos, exceto no extrato da cultura mista em meio sólido. Isso comprova que esse extrato não contém nenhuma citocalasina, mesmo em quantidades ínfimas.

Portanto, ambas as análises, de varredura por HPLC-DAD e de íon produto por MS, confirmaram a ausência de citocalasina H (**10**) na cultura mista.

Assim, o extrato da cultura mista foi fracionado na tentativa de identificar a presença de algum composto de origem fúngica e também os compostos antifúngicos produzidos pela actinobactéria. Da mesma forma, fracionou-se o extrato da cultura simples para que outros compostos que não foram produzidos/identificados no cultivo em meio líquido pudessem então ser determinados. Realmente, as análises por CCDA, HPLC e MS do extrato da cultura simples do fungo indicaram a presença de várias citocalasinas.

2.4.3.6.1 Fracionamento do extrato da cultura simples de *Phomopsis* sp. FLe6 crescido em meio sólido e determinação estrutural das substâncias presentes nas frações

O extrato da cultura simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 foi escolhido para ser primeiramente fracionado, na tentativa de se identificar alguns dos compostos que estavam presentes na cultura simples mas não foram detectados na mista, focando inicialmente nos compostos que revelaram com coloração azul em vanilina sulfúrica. Devido às duplicatas dos extratos serem quase idênticas, elas foram reunidas e fracionadas em conjunto, resultando num extrato inicial de

aproximadamente 9,0 g, o qual foi renomeado de aF6. O primeiro fracionamento foi realizado em coluna DSC-18 (fase reversa) Supelco® contendo 10 g de fase estacionária (60 mL). A eluição da coluna com 30 mL de H₂O originou a fração aF6-1 contendo 7,09 g, a eluição com 30 mL de metanol:água 1:1 gerou a fração aF6-2 de 1,09 g, enquanto que a eluição com diferentes volumes de metanol (15 e 60 mL) seguida de acetona gerou mais três frações (aF6-3, aF6-4 e aF6-5) que foram coletadas separadamente devido ao aspecto visual ser diferente. Por fim, a coluna foi eluída com 30 mL de metanol para finalizar sua limpeza (fração aF6-6).

Após a análise por CCDA das sub-frações obtidas, determinou-se que as frações aF6-3 (492 mg) e aF6-4 (242 mg) continham os dois compostos que revelavam azul em vanilina sulfúrica, e então a fração aF6-3, devido a maior quantidade, foi selecionada para ser refractionada em CC. Um dos compostos de interesse foi obtido quase puro (fração aF6-3-5, 119,1 mg) e o outro estava em mistura com o primeiro (fração aF6-3-6, 123,4 mg). Além disso, as frações aF6-3-4 (15,1 mg) e aF6-3-7 (14,7 mg) também continham os compostos de interesse menos concentrados.

Pela análise do espectro de RMN de ¹H da fração aF6-3-5 (Figura 88) percebeu-se que essa fração continha a citocalasina H (**10**), que já havia sido previamente isolada da cultura mista líquida. Comparação com o espectro RMN de ¹H do composto puro (Figura 65, pág. 129) permitiu determinar sua presença na fração, sendo referente à mancha azul de maior fator de retenção (R_f) (Figura 86).

O espectro de RMN de ¹H da fração aF6-3-6 (Figura 89) apresentou sinais de hidrogênios similares ao da citocalasina H (**10**). A análise em CCDA mostrou que essa fração continha um composto majoritário, provavelmente outra citocalasina, juntamente com a citocalasina H. Uma análise cautelosa do espectro de RMN de ¹H revelou que o composto majoritário não possui o grupo acetóxi em δ 2,23, podendo apenas ser visualizado um sinal bem pouco intenso, com esse deslocamento químico, referente aos hidrogênios da citocalasina H pouca concentrada, em mistura na amostra. Essa observação remete à discussão realizada anteriormente no fracionamento do cultivo líquido, em que foi determinada a presença de citocalasina J na fração 1aL-A7F6ac-12-6 (pág. 135-137). Assim, ficou determinado que a citocalasina J é o composto majoritário da

fração aF6-3-6, o qual se refere à mancha azul com menor R_f observada em CCDA. A fração em questão continha 123,4 mg e foi purificada para que a citocalasina J e alguma outra possível citocalasina presente pudessem ser isoladas.

Os espectros de RMN de ^1H das frações aF6-3-4 e aF6-3-7 indicaram que essas frações estavam bastante impuras mas continham citocalasinas. Assim, ambas foram purificadas.

As frações aF6-3-4, aF6-3-6 e aF6-3-7 foram fracionadas, mas os espectros de RMN de ^1H das frações obtidas não apresentaram qualidade suficiente para permitir a determinação estrutural das citocalasinas presentes.

As frações aF6-2 (1,09 g), aF6-5 (29,0 mg) e aF6-6 (49,1 mg) também foram fracionadas para verificar quais outros compostos poderiam estar presentes no extrato do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 cultivado em arroz, entretanto os espectros de RMN de ^1H dessas frações revelaram exclusivamente sinais de ftalato, derivados graxos e açúcares.

A fração aF6-4 (242 mg), que também continha os dois compostos que revelavam azul em vanilina sulfúrica, como mencionado anteriormente, foi analisada por MS. Primeiramente foi feita a análise do íon produto, utilizando o íon produto de m/z 120. Os resultados foram muito similares aos que vinham sendo observados anteriormente das frações contendo misturas de citocalasinas (Anexo 55). Os picos de m/z 494, 492, 476, 450, 434, 432 e 416 foram fragmentados por MS/MS. Esses íons possuem padrões de fragmentação semelhantes, mas não idênticos (Anexos 56-62). Quando foi utilizada uma baixa energia de fragmentação, de 10 eV, a maioria dos íons não fragmentaram, indicando que os picos observados no espectro de MS (sem posterior fragmentação) realmente são devido às m/z dos compostos e não aos seus fragmentos. Isso indica que uma variedade de citocalasinas estão presentes nos extratos do fungo *Phomopsis* sp. FLe6, entretanto, muitas delas devem estar em concentrações muito baixas, o que dificultou seu isolamento. Considerando a grande similaridade estrutural entre esses compostos, seria necessário que eles fossem isolados em elevado grau de pureza para que a pequena diferença estrutural pudesse ser observada, permitindo assim a determinação inequívoca das respectivas estruturas químicas.

Figura 88. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da fração aF6-3-5.

Figura 89. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da fração aF6-3-6.

Todo o extrato foi fracionado para que ele pudesse ser analisado por completo. A análise das frações e sub-frações revelou que, nessas condições, o fungo produziu quase que exclusivamente citocalasinas, em grande quantidade e diversidade, mas apenas as citocalasinas H e J puderam ser identificadas.

Através das análises realizadas, foi possível verificar que o extrato bruto, obtido a partir do cultivo do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 em arroz suplementado com ISP-2, apresentou uma elevada massa de componentes do próprio meio de cultura (principalmente nas frações aF6-1 e aF6-2-1), equivalente a aproximadamente 85-90% do extrato, sendo o restante de metabólitos secundários produzidos pelo fungo, juntamente com ácidos graxos. Ainda assim, pode-se considerar que o rendimento foi bastante elevado, bem superior ao obtido em meio líquido PDB, já que foram utilizados apenas dois frascos de meio de cultura. Assim, o meio de cultivo sólido de arroz suplementado pareceu mais adequado que o meio líquido PDB para obter maiores quantidades de metabólitos secundários.

2.4.3.6.2 Fracionamento do extrato da cultura mista do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 com a actinobactéria *S. albospinus* RLe7 em meio sólido e determinação estrutural das substâncias presentes nas frações

O extrato da cultura mista do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 com a actinobactéria *S. albospinus* RLe7, deveria conter exclusivamente, ou em sua maioria, metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria, como já discutido.

Devido à alta similaridade, as duplicatas desses extratos foram reunidas e fracionadas em conjunto, resultando num extrato inicial de aproximadamente 9,5 g, o qual foi renomeado de aA7F6. O primeiro fracionamento foi realizado em coluna DSC-18 de 10 g. A eluição da coluna foi feita como segue:

- 90 mL de H₂O - fração aA7F6-1, 7.746,0 mg
- 50 mL de metanol:água 9:1 - fração aA7F6-2, 43,2 mg
- 50 mL de metanol:água 7:3 - fração aA7F6-3, 16,9 mg
- 50 mL de metanol:água 1:1 - fração aA7F6-4, 11,3 mg
- 120 mL de metanol:água 2:8 - fração aA7F6-5, 255,9 mg
- 100 mL de metanol - fração aA7F6-6, 565,7 mg

- 80 mL de acetona - fração aA7F6-7, 42,3 mg
- 50 mL de metanol - fração aA7F6-8, 12,7 mg

Todas as frações, exceto aA7F6-1, foram analisadas por RMN de ^1H .

Os espectros de RMN de ^1H das frações aA7F6-2, aA7F6-3 e aA7F6-4 apresentaram maior diversidade de sinais em diferentes deslocamentos químicos, portanto foram selecionadas para prosseguimento dos trabalhos. Já os espectros de RMN de ^1H das frações aA7F6-7 e aA7F6-8 mostraram apenas sinais de triglicerídeos e açúcares, respectivamente, e os espectros das frações aA7F6-5 e aA7F6-6 (de aspecto oleoso) apresentaram, respectivamente, sinais de ftalato e ácidos graxos.

As frações aA7F6-5 e aA7F6-6 também foram analisadas por MS e os dados confirmaram o que foi observado por RMN de ^1H . No espectro de massas da fração aA7F6-6 foram observados predominantemente picos de m/z variando em 14 unidades, condizente com a presença de vários ácidos graxos possuindo diferentes tamanhos de cadeia carbônica (Anexo 63). O espectro de massas de aA7F6-5 apresentou os picos de m/z 301 e 279, que representariam, respectivamente, a molécula cationizada com sódio e a protonada de um mesmo composto (Anexo 63). O dibutil-ftalato protonado forma um íon de m/z 279, assim como outros ftalatos apresentando o mesmo número de carbonos nas cadeias, podendo ser simétricos ou não.

Considerando que actinobactérias, em geral, produzem uma variedade de compostos glicosilados, a fração aA7F6-1 foi fracionada para permitir a detecção de tais compostos, caso estivessem em mistura com os açúcares provenientes do meio de cultura. O fracionamento por CC originou sete frações das quais três foram analisadas por RMN de ^1H . As frações aA7F6-1-1 e aA7F6-1-2 apenas continham ftalato e ácidos graxos, enquanto que aA7F6-1-3 continha majoritariamente açúcares, ainda que sinais de outros compostos, bem pouco intensos, puderam ser observados (Anexos 64 e 65).

As frações aA7F6-2, aA7F6-3 e aA7F6-4 foram purificadas por HPLC, em coluna semi-preparativa. Picos cromatográficos de diferentes frações apresentando o mesmo t_r foram reunidos e uma única sub-fração. Essas sub-frações foram nomeadas de aA7F6-2-X, em que X é o número que representa a sequência de eluição de cada sub-fração. Foram obtidas 19 frações, das quais 13 foram analisadas por RMN de ^1H .

As frações ainda não estavam puras, o que dificultou bastante a determinação estrutural. Os sinais de hidrogênios observados em algumas frações também eram visualizados em várias outras. Com isso, apenas as estruturas dos compostos presentes em duas frações, aA7F6-2-8 e aA7F6-2-14, puderam ser determinadas através de RMN de ^1H .

O espectro de RMN de ^1H da fração aA7F6-2-8, adquirido em CD_3OD (Figura 90 e Anexo 66), indicava que essa fração não estava pura. Foi então adquirido um espectro em CDCl_3 (Figura 91 e Anexo 67) na tentativa de que os sinais do composto majoritário pudessem ser distinguidos dos outros contaminantes, devido às diferentes solubilidades nesses solventes. Isso auxiliou na determinação dos sinais de hidrogênios referentes a um mesmo composto.

A breve discussão que se segue será baseada no espectro de RMN de ^1H obtido em CD_3OD . Esse espectro apresentou três sinais dubletos referentes aos hidrogênios de três metilas, sendo que cada dubleto apresentou J distintos. Além disso, havia outros quatro sinais em δ 1,81, δ 2,60, δ 3,60 e δ 4,41. A multiplicidade desses sinais, relativamente complexa, indicava a proximidade entre os hidrogênios da estrutura. Pelas constantes de acoplamento, foi possível determinar que os hidrogênios da metila em δ 1,00 acoplavam com o hidrogênio em δ 1,81, enquanto que os em δ 1,23 acoplavam com o hidrogênio em δ 2,60 e os hidrogênios em δ 1,31, com o hidrogênio em δ 4,41. A multiplicidade dos sinais mais desblindados do espectro indicava que os hidrogênios referentes a esses sinais deveriam acoplar entre si. Os deslocamentos químicos dos hidrogênios em δ 4,41 e δ 3,60 indicavam que eles deveriam pertencer a carbonos ligados a hetero-átomos.

Com as informações obtidas do espectro de RMN de ^1H , levando em consideração os deslocamentos químicos, as constantes de acoplamento e a multiplicidade dos sinais, foi proposta a estrutura de uma δ -lactona mono-hidroxilada e tri-metilada (**18**) (Figura 92).

Figura 90. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração aA7F6-2-8, mostrando apenas δ 4,5 a δ 0,9.

Figura 91. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da fração aA7F6-2-8, mostrando apenas δ 4,7 a δ 0,9.

Os espectros bi-dimensionais foram adquiridos (Anexos 68, 69 e 70) para que todos os hidrogênios e carbonos pudessem ser atribuídos corretamente. Esses dados estavam de acordo com a estrutura da δ -lactona, corroborando a proposta inicial. Os dados do composto **18** estão agrupados na tabela 31, estando de acordo com os da literatura (CHAKRABORTY; TAPADAR; ROY, 2005; BROWN et al., 1995).

Essa δ -lactona tetra-substituída (**18**) já foi obtida de linhagens de *Streptomyces* geneticamente modificadas, nas quais foi introduzida uma parte enzima PKS tipo I modular responsável pela biossíntese do núcleo macrocíclico lactônico da eritromicina (YAN et al., 2012; BROWN et al., 1995). Esse composto também foi isolado de culturas de *Streptomyces* spp. (PU et al., 2013).

Tabela 31. Dados de RMN de ^1H (400 MHz), gHMQC, gHMBC e gCOSY referentes ao composto **18** da fração aA7F6-2-8

Posição	δ $^{13}\text{C}^{\text{b,c}}$	δ ^1H (mult., J Hz, integral) ^a	δ ^1H (mult., J Hz) ^b	gCOSY ^b	gHMBC ^b
2	173,9	-	-	-	-
3	43,4	2,60 (<i>dq</i> , 3,6; 7,5, 1H)	2,68 (<i>dq</i> , 3,6; 7,3)	1,33	37,3; 76,5
4	73,4	3,60 (<i>t</i> , 3,4, 1H)	3,74 (<i>t</i> , 3,6)	n.o.	43,4; 73,4; 173,9
5	37,3	1,81 (<i>ddt</i> , 3,4; 6,9, 10,0, 1H)	1,83 ^d	1,06	19,5; 76,5
6	76,5	4,41 (<i>dq</i> , 6,5; 10,0, 1H)	4,46 (<i>dq</i> , 6,3; 9,5)	1,36	37,3; 73,4; 76,5
7	19,5	1,31 (<i>d</i> , 6,5, 3H)	1,36 (<i>d</i> , 6,3)	4,46	73,4; 173,9
8	12,5	1,00 (<i>d</i> , 6,9, 3H)	1,06 (<i>d</i> , 7,3)	1,83	n.o.
9	15,8	1,23 (<i>d</i> , 7,5, 3H)	1,33 (<i>d</i> , 7,3)	2,68	12,5; 15,8; 76,5; 173,9

^a em CD_3OD ; ^b em CDCl_3 ; ^c atribuído indiretamente através do gHMQC; ^d multiplicidade e J não definidos; n.o.= valores não observados.

composto 18

Figura 92. Estrutura química do composto **18** presente na fração aA7F6-2-8, mostrando os deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos atribuídos através dos dados do RMN de ^1H , gHMBC e gHMBC, obtidos em CDCl_3 .

O espectro de RMN de ^1H da fração aA7F6-2-14 (Figura 93 e Anexos 71 e 72) apresentou sinais com multiplicidades bastante complexas. Devido à fração estar relativamente pura, os espectros de COSY, gHMBC e gHMBC foram adquiridos (Anexos 73, 74 e 75). Os dados referentes aos espectros uni e bidimensionais foram agrupados na tabela 32.

Foram observados quatro hidrogênios de carbonos ligados a hetero-átomos (δ_{C} 80,8 e δ_{H} 4,48, δ_{C} 70,1 e δ_{H} 3,98, δ_{C} 64,6 e δ_{H} 3,72 e 3,60), sendo dois CH e um CH_2 , respectivamente. O carbono em δ 80,0 estava mais desblindado que o esperado para um carbono apenas ligado a um oxigênio, indicando que algum outro fator estrutural deveria estar contribuindo para o deslocamento químico observado. Foram ainda observados carbonos metilênicos em δ 35,9, δ 34,2 e δ 24,2, metínicos em δ 47,5 e δ 28,8, e dois metílicos em δ 22,6. Através do gHMBC não puderam ser observados carbonos quaternários, entretanto, foi verificada a correlação dos hidrogênios em δ 2,84 e δ 2,18 com um carbono em δ 180,0.

O espectro de RMN de ^1H apresentou dois sinais dubletos, com deslocamentos químicos muito semelhantes, em δ 0,90 e 0,89, referentes aos hidrogênios de duas metilas previamente mencionadas. Essas metilas apresentam correlação no COSY apenas com o hidrogênio em δ 1,54, ligado ao carbono metínico em δ 28,8. As correlações no gHMBC desse hidrogênio em δ 1,54 e daqueles das metilas, sugerem que eles fazem parte de um grupamento isopropílico.

Também foi proposta a presença de uma γ -lactona, contendo os carbonos em δ 47,5, δ 24,2 e δ 80,8 nas posições α , β e γ , respectivamente. No carbono em δ 47,5 foi conectada uma cadeia carbônica linear ramificada, apresentando uma hidroxilação, e no carbono em δ 80,0 foi conectado um grupamento $\text{H}_2\text{C-OH}$. Assim, foi determinada a estrutura desse análogo de γ -lactona (**19**) (Figura 94).

Essa fração foi analisada por MS e a observação de um pico de m/z 239, referente à molécula cationizada com sódio, confirmou a massa molecular desse composto (Anexo 76).

O composto **19** pertence à classe dos butanolídeos, os quais têm sido isolados de linhagens de *Streptomyces* e têm sido relatos como reguladores da citodiferenciação e produção de metabólitos secundários (SAKUDA; YAMADA, 1991; KONDO et al., 1989). O composto isolado, entretanto, possui um padrão de substituição do anel lactônico diferente da maioria dos butanolídeos, que normalmente são 2,3-dissubstituídos. Há um único relato do isolamento do composto **19** (TANG et al., 2000), em uma conferência. Os dados de RMN obtidos estão de acordo com os relatos, exceto pela inversão nos deslocamentos químicos dos C_8 e C_9 .

Figura 93. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração aA7F6-2-14.

Tabela 32. Dados de RMN de ^1H (500 MHz), gHMQC, gHMBC e gCOSY obtidos em CD_3OD referentes ao composto **19** da fração aA7F6-2-14

Posição	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz, integral)	gCOSY	gHMBC
1	180,0	-	-	-
2	47,5	2,84 (ddd, 2,9; 9,6; 11,1, 1H)	2,02; 2,18; 3,98	24,2; 70,1; 180,0
3	24,2	2,18 (ddd, 6,7; 9,6; 12,4, 1H) 2,02 (ddd, 10,0; 11,1; 12,4, 1H)	2,02; 2,84; 4,48 2,18; 2,84; 4,48	47,5; 64,6; 180,0
4	80,8	4,48 (ddt, 3,4; 6,4, 10,0, 1H)	2,02; 2,18; 3,60	70,1; 80,8
5	64,6	3,72 (dd, 3,4; 12,3, 1H) 3,60 (dd, 6,1; 12,3, 1H)	3,60; 4,49 3,72; 4,49	-
6	70,1	3,98 (ddd, 2,9; 5,2, 10,3, 1H)	1,45; 2,84	24,2; 80,8
7	34,2	1,48 (m, 1H) 1,46 (m, 1H)	1,19; 1,34; 3,98 1,19; 1,34; 3,98	-
8	35,9	1,34 (m, 1H) 1,19 (dq, 4,0; 6,4, 1H)	1,19; 1,45 1,34; 1,45	28,8; 35,9; 47,5; 70,1
9	28,8	1,54 (sept, 6,6, 1H)	0,89; 0,90	22,6; 28,8; 34,2
10	22,6	0,89 (d, 6,6, 3H)	1,54	22,6; 28,8; 35,9
11	22,6	0,90 (d, 6,6, 3H)	1,54	22,6; 28,8; 35,9

^a atribuído indiretamente através do gHMQC; ^b multiplicidade e J não definidos; n.o.= valores não observados.

Figura 94. Estrutura química do composto **19** presente na fração aA7F6-2-14, mostrando os deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos segundo dados do RMN de ^1H , gHMQC e gHMBC.

As frações aA7F6-2-7 a aA7F6-2-16 (10 frações) foram também analisadas por ESI-MS. Apenas as análises conclusivas acerca das estruturas químicas serão discutidas.

O espectro de massas da fração aA7F6-2-7 revelou a presença predominante dos picos de m/z 276, 219 e 162, em modo positivo (Anexo 77). Buscas no *DNP* utilizando a massa molecular de 275 u, e *Streptomyces* como fonte biológica, sugeriu a estrutura da fisostigmina (**20**) (Figura 95), a qual já

havia sido isolada em nosso grupo (CARABALLO, 2012). O íon de m/z 276 foi então fragmentado (Figura 96), e já com a menor energia, de 10 eV, foram gerado intensos íons fragmentos, de m/z 219 e 162, que são condizentes com a estrutura da fisostigmina (**20**). No espectro de MS também pôde ser observado o pico de m/z 298 referente à molécula de fisostigmina (**20**) cationizada com sódio. Os picos de m/z 276, 219 e 162 estavam presentes em todas as frações, exceto em aA7F6-2-15 e aA7F6-2-16.

A fração aA7F6-2-14, na qual foi determinada a presença do análogo de γ -lactona (**19**) por RMN, apresentou um pico de m/z 239, em modo positivo, referente à molécula do referido composto cationizada com sódio (Anexo 76).

A fração aA7F6-2-16 apresentou, em modo positivo, um pico de m/z 749 (Anexo 78). A fragmentação desse íon levou a formação de um único íon de m/z 386 (Figura 97). Foram feitas buscas no *DNP* por compostos de massa molecular 748 u, produzidos por *Streptomyces*, e foi encontrado um derivado glicosilado da indomicina, a indomicina C (**21**) (Figura 98), de fórmula molecular $C_{41}H_{52}N_2O_{11}$. A indomicina aglicona tem massa molecular de 386 u, o que permitiu que fosse concluído, sem dúvidas, de que o composto referente ao íon de m/z 749 é uma indomicina glicosilada. A fórmula estrutural contendo os açúcares, entretanto, não estava disponível, já que no artigo foi determinada apenas uma fórmula provisória referente à massa molecular de 748 u (BROCKMANN, 1968). Ainda assim, considerando a fórmula molecular da aglicona ($C_{24}H_{18}O_5$), é possível determinar que a cadeia glicosídica contém três açúcares.

Durante as análises por RMN de 1H e MS das frações obtidas desse extrato da cultura mista, não foram detectados compostos produzidos pelo fungo. Da mesma forma que nas análises de íon produto do extrato da cultura mista não foram detectar as citocalasinas, os seus íons também não foram observados durante as análises das frações deste extrato.

As substâncias identificadas, oriundas da actinobactéria, podem estar relacionadas à toxicidade observada de *S. albospinus* RLe7 contra *Phomopsis* sp. FLe6, ou ainda, estarem envolvidas no processo de comunicação/sinalização entre esses micro-organismos.

Compostos da classe dos butanolídeos, a qual pertence a γ -lactona **19**, têm sido relatados como reguladores da produção de metabólitos secundários

(SAKUDA; YAMADA, 1991; KONDO et al., 1989). Da mesma forma, a δ -lactona **18** pode possuir um papel regulatório ainda não relatado. A fisostigmina (**20**), um conhecido inibidor da enzima anticolinesterase, teve sua atividade antifúngica avaliada contra o fungo endofítico *Colletotrichum boninense* FLe8.1 (CARABALLO, 2012), entretanto, não foi constatada atividade inibitória significativa nas condições testadas. Outros ensaios biológicos, relacionados ao possível papel ecológico desse composto, nunca foram relatados na literatura científica. O composto **21**, um análogo glicosilado da indomicina, apesar de não possuir uma atividade biológica relatada, provavelmente, possui potencial citotóxico, assim como várias outras antraciclinas glicosiladas já relatadas.

Figura 95. Estrutura do composto **20** presente na fração aA7F6-2-7.

Figura 96. Espectro de MS-MS do pico com m/z 276, da fração aA7F6-2-7 analisada em TQ-S. Energia de colisão de 10 eV.

Figura 97. Espectro de MS-MS do pico com m/z 749, da fração aA7F6-2-16 analisada em TQ-S. Energia de colisão de 20 eV.

composto 21 - R=triglicosídeo

Figura 98. Estrutura do composto **21** presente na fração aA7F6-2-16.

2.4.3.7 Cultivo simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 e da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 e cultivo misto desses micro-organismos em meio líquido - adição simultânea dos micro-organismos em cultura mista

Considerando os resultados obtidos nos cultivos ampliados em meio líquido PDB e em meio sólido de arroz suplementado com ISP-2, foi decidido que algumas alterações nos cultivos deveriam ser realizadas para que o desempenho das linhagens nessas condições diferentes pudesse ser avaliado.

No cultivo líquido anterior, os resultados obtidos foram interessantes do ponto de vista de que a produção de metabólitos secundários, pela cultura mista, foi diferente da observada nas respectivas culturas simples. Entretanto, o desenvolvimento da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 naquelas condições não foi muito efetivo, ainda que ela tenha sido eficaz em alterar o metabolismo secundário do fungo *Phomopsis* sp. FLe6. Assim, decidiu-se alterar algumas condições de modo a favorecer o crescimento e a produção de metabólitos por *S. albospinus* RLe7. Para isso, foi utilizada uma agitação maior das culturas, de 200 rpm, que seria mais adequada para ao crescimento de actinobactérias, e ainda, para estabelecer as culturas mistas, os micro-organismos foram adicionados simultaneamente no meio fermentativo. Além disso, os extratos foram extraídos após 7 ou 14 dias de cultivo, para verificar os perfis metabólicos de ambas as linhagens em um tempo de crescimento menor e compará-los aos perfis dos extratos obtidos após o tempo pré-determinado de 14 dias.

Somente considerando a aparência dos cultivos (Figura 99) foi possível observar que a actinobactéria cresceu bastante tanto em cultura simples quanto na mista, inclusive prejudicando o crescimento do fungo na mistura. Analisando visualmente, não há indícios de que o fungo tenha conseguido crescer na cultura mista. Os frascos das culturas de 14 dias tinham o mesmo aspecto visual das culturas de 7 dias apresentadas na figura 99, variando apenas a coloração da cultura simples do fungo, que ficou mais escurecida.

Após os períodos de cultivo determinados, foram obtidos os extratos das culturas simples e mistas (Tabela 33). Esses extratos foram então analisados por CCDA e por HPLC-DAD para verificar o perfil metabólico dos micro-organismos nessa condição diferente e poder comparar com a utilizada no cultivo líquido

anterior. A análise por CCDA, entretanto, não foi muito informativa já que os compostos não puderam ser visualizados.

Figura 99. Culturas simples e mista da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 e do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 em meio líquido. (A) Cultura simples da actinobactéria, (B) cultura simples do fungo e (C) cultura mista. Fotos tiradas após 7 dias de crescimento.

Tabela 33. Extratos brutos das culturas simples de *Phomopsis* sp. FLe6 e de *S. albospinus* RLe7 e das culturas mistas desses micro-organismos obtidos no segundo cultivo líquido ampliado

Micro-organismo utilizado	Dias de cultivo	Código do extrato	Quantidade de frascos	Massa (mg)	Massa/ Frasco (mg/frasco)
-	7 dias	2L-7d-br	1	86,1	86
RLe7	7 dias	2L-7d-A7	2	224,4	112
FLe6	7 dias	2L-7d-F6	2	179,0	90
RLe7 + FLe6	7 dias	2L-7d-A7F6	2	349,6	175
RLe7	14 dias	2L-14d-A7	6	701,6	117
FLe6	14 dias	2L-14d-F6	6	1659,1	277
RLe7 + FLe6	14 dias	2L-14d-A7F6	4	654,4	164

No código do extrato, 2L indica segundo cultivo líquido ampliado, 7d ou 14d indica o número de dias de cultivo, e em seguida está o número dos códigos dos micro-organismos, como nos cultivos anteriores, enquanto que br representa o branco, sem micro-organismo. O valor da quantidade em massa por frasco foi obtido através da média simples, dividindo-se a massa total de extrato de um cultivo pelo número de frascos.

Os cromatogramas dos extratos obtidos das culturas de 7 dias (Figura 100) mostraram que o perfil da cultura mista é bastante semelhante ao da cultura simples da actinobactéria *S. albospinus* RLe7. Entretanto, na cultura mista, houve uma redução acentuada do pico com tr 10,0 min, indicando que a produção do composto correspondente foi fortemente inibida. Além disso, diferentemente do observado no cultivo anterior, o perfil químico da actinobactéria pôde ser visualizado com clareza, sugerindo que nessa condição a produção metabólica foi mais efetiva. No cromatograma da cultura simples do fungo *Phomopsis* sp.

FLe6 puderam ser observados quatro picos prevalentes, que não estavam presentes na cultura mista. Possivelmente, o fungo produziu algumas citocalasinas mais polares que a citocalasina H.

Na análise dos extratos dos cultivos de 14 dias (Figura 100), os compostos que eram produzidos pela actinobactéria, tanto em cultura simples quanto na mista, foram detectados em quantidades muito inferiores às observadas nos cultivos de 7 dias. Da mesma forma que observado anteriormente, não há indícios da produção de compostos pelo fungo na cultura mista, e na sua cultura simples, puderam ser observados apenas dois picos, os quais são coincidentes com os que haviam sido detectados anteriormente, com acentuado aumento de um deles.

Figura 100. Cromatogramas dos extratos 2L-7d-br (preto), 2L-7d-A7 (rosa), 2L-7d-F6 (azul claro) e 2L-7d-A7F6 (azul escuro). Coluna analítica CLC-ODS 250 mm x 4,5 mm e fase móvel de MeCN em água (10% a 100% de MeCN, em 30 min; 100% de MeCN, por 5 min, 100% a 10% de MeCN, por 2 min; 10% de MeCN, por 8 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (200 nm).

Figura 101. Cromatogramas dos extratos 2L-14d-A7 (preto), 2L-14d-F6 (azul) e 2L-14d-A7F6 (rosa). Coluna analítica CLC-ODS 250 mm x 4,5 mm e fase móvel de MeCN em água (10% a 100% de MeCN, em 30 min; 100% de MeCN, por 5 min, 100% a 10% de MeCN, por 2 min; 10% de MeCN, por 8 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (210 nm).

Esses resultados indicam que as alterações nas condições de cultivo favoreceram o crescimento da actinobactéria *S. albospinus* RLe7, como esperado. Entretanto, como tem sido observado com outras linhagens de actinobactérias do nosso laboratório, o crescimento ótimo das actinobactérias ocorre antes da primeira semana de cultivo, e após esse período há evidências de que as células bacterianas comecem a morrer (dados não publicados). Foi com base nessa observação que foi proposto realizar o cultivo por um período menor, já que o crescimento celular máximo e a produção metabólica da actinobactéria deveriam ocorrer dentro desse período de tempo. Essas hipóteses seriam bem razoáveis considerando que o metabolismo celular de bactérias é muito mais acelerado que o de fungos.

Ainda assim, o fato dos compostos que eram detectados nos extratos de 7 dias terem sido detectados em menores quantidades após 14 dias, não pôde ser explicado com clareza. Mesmo que as células bacterianas morressem após certo tempo, os compostos já produzidos deveriam permanecer no meio de cultivo. Há a possibilidade de que os processos de degradação celular, envolvidos na decomposição inicial do organismo após sua morte, também degradassem os metabólitos secundários. Essa hipótese seria sustentável já que várias enzimas presentes no interior da célula viva poderiam ser liberadas no meio de cultivo após a morte da actinobactéria. Haveria, ainda, a possibilidade de que

metabólitos primários tenham ficado livres no meio de cultivo, após a degradação celular, e foram então extraídos, o que contribuiu para diminuir a concentração final dos metabólitos secundários no extrato. Entretanto, considerando a massa média de extrato obtido por frasco, nos diferentes tempos de cultivo da actinobactéria, sozinha e em mistura, pôde-se perceber que não houve aumento da massa de extrato no cultivo de 14 dias quando comparado ao de 7 dias, indicando que os metabólitos primários não devem estar contribuindo para a diminuição na concentração observada dos metabólitos secundários. Assim, os metabólitos secundários podem realmente ter sido degradados em metabólitos que não absorvem no UV ou ainda, após 7 dias, poderiam ter sido produzidos outros metabólitos secundários que não absorvem no UV. Neste caso, era esperado um aumento na massa média dos extratos, que não foi detectada, e ainda, é provável que as células bacterianas não estejam viáveis por tanto tempo.

Em relação ao fungo *Phomopsis* sp. FLe6, foi possível perceber que ele também cresceu bem nessas condições e os metabólitos secundários por ele produzidos foram detectados desde a primeira semana de cultivo. Entretanto, com o aumento na idade da cultura, foi observada a prevalência de alguns compostos em detrimento de outros, que poderiam ser precursores biossintéticos dos que foram detectados após 14 dias. Considerando a massa média dos extratos do fungo cultivado sozinho, que triplicou após 14 dias (comparando-se com os extratos de 7 dias), pôde-se dizer que apesar de haver produção metabólica até o sétimo dia, o fungo necessita de um período de cultivo mais longo para melhor expressar seu potencial metabólico. Isso também era esperado considerando a velocidade do ciclo metabólico de fungos.

O fato da actinobactéria ter expressado sua produção metabólica previamente ao fungo, pode ter causado a morte do fungo em cultura mista precocemente, antes mesmo que ele produzisse compostos tóxicos para a actinobactéria. Realmente, as citocalasinas, por exemplo, que são compostos bastante citotóxicos, não foram detectadas na cultura mista por HPLC. Entretanto, em cultura mista, foi verificada uma diminuição acentuada em um dos compostos produzidos pela cultura simples da actinobactéria, indicando que de alguma forma sua produção foi inibida. Esse composto possui o mesmo tempo de retenção do tirosol (5) analisado nessas condições, mas poderia, alternativamente, ser de um outro composto que elui com o mesmo tr. Há relatos

de tirosol (5) como molécula de *quorum sensing* em leveduras e fungos filamentos (ALBUQUERQUE e CASADEVALL, 2012), e apesar desse composto já ter sido isolado de *Streptomyces* sp. (LIN et al., 2008), sua possível função em bactérias nunca foi relatada.

Ao se planejar um experimento de cultura mista é necessário que todas essas informações das linhagens a serem utilizadas sejam conhecidas, para que se possa determinar um equilíbrio entre as velocidades de crescimento de cada micro-organismo para que o desenvolvimento de um não seja exclusivo, ao ponto de destruir a outra linhagem. Ambos os micro-organismos possuem um arsenal metabólico bastante completo, sendo que um pode inibir completamente o crescimento da linhagem competidora, caso obtenha vantagem durante o desenvolvimento inicial.

Nesse tipo de experimento, a actinobactéria deve agir mais como um eliciador do que como um efetivo produtor de metabólitos secundários. Considerando que foi utilizada uma mistura de micro-organismos pertencentes a reinos diferentes, com características metabólicas bastante distintas, o ajuste entre os tempos e condições ideais para se estabelecer o cultivo misto é mais impreciso, entretanto, se for permitido à actinobactéria se desenvolver efetivamente pode-se esperar que a produção precoce de compostos antifúngicos destrua a linhagem fúngica antes mesmo de seu desenvolvimento.

Quando se realiza qualquer experimento é necessário que sejam bem estabelecidos os objetivos. As condições utilizadas nesse cultivo, por exemplo, foram adequadas para a produção metabólica da actinobactéria, entretanto, o experimento anterior, também em meio líquido, se mostrou muito mais adequado para que a actinobactéria pudesse eliciar a produção metabólica do fungo, que é o almejado nas culturas mistas.

2.4.3.8 Cultivo simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 e da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 e do cultivo misto desses micro-organismos em meio sólido - adição do fungo previamente à adição da actinobactéria na cultura mista

Assim como foi realizado para os cultivos em meio líquido, o cultivo em meio sólido também foi realizado modificando algumas condições que tinham sido utilizadas no anterior.

Da forma como as culturas mistas haviam sido estabelecidas, aparentemente a actinobactéria *S. albospinus* RLe7 causou a morte do fungo *Phomopsis* sp. FLe6. Nos experimentos em meio líquido, resultados semelhantes foram observados: a adição simultânea dos micro-organismos na cultura mista permitiu que a actinobactéria se sobressaísse e inibisse por completo o desenvolvimento da linhagem fúngica. Entretanto, quando o fungo foi adicionado no meio fermentativo líquido antes da actinobactéria, foi verificada uma eliciação do fungo em função da presença bacteriana.

Com a intenção de promover a eliciação do fungo, e não sua morte, foi realizado um segundo cultivo em meio sólido, em que o fungo foi adicionado ao meio de cultivo 3 dias antes da actinobactéria. Além disso, esse cultivo também foi realizado para que o extrato da cultura simples da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 pudesse ser comparado ao da cultura mista do cultivo anterior, o qual foi fracionado, e aparentemente só continha metabólitos bacterianos.

Como observado na figura 102, o aspecto de cada cultura foi bastante diferente um do outro, enquanto que o das duplicatas é muito semelhante. A cultura mista apresentou coloração mais semelhante a da cultura simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6, apesar de que não foi observado o espalhamento de micélios fúngicos pelas paredes do frasco, como na cultura simples. A cultura simples da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 apresentou uma coloração vermelha acentuada que não havia sido observada em nenhum dos cultivos anteriores.

Cada duplicata do cultivo foi extraída separadamente, originando os respectivos extratos brutos (Tabela 34). Durante a extração, verificou-se que a cultura simples *S. albospinus* RLe7 tinha odor característico de actinobactéria, a cultura simples de *Phomopsis* sp. FLe6 cheirava a bolor, e a cultura mista

apresentava esses dois odores bem acentuados e misturados, indicando que ambos os micro-organismos devem ter crescido na mistura.

Figura 102. Culturas simples e mista da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 e do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 em meio sólido. (A) Cultura simples da actinobactéria, (B) cultura simples do fungo e (C) cultura mista. Fotos tiradas no dia da extração, com 28 dias de crescimento da cultura fúngica e da cultura mista, e 25 dias de crescimento da cultura bacteriana.

Tabela 34. Extratos brutos das culturas simples de *Phomopsis* sp. FLe6 e de *S. albospinus* RLe7 e das culturas mistas desses micro-organismos obtidos no segundo cultivo sólido

Micro-organismo utilizado	Código do extrato	Massa (mg)
-	aBranco	1.336,1
RLe7	aA1/aA2	15.083,7/10.849,1
FLe6	aF1/aF2	2.809,1/3.514,7
RLe7 + FLe6	aM1/aM2	2.950,9/2.876,6

No código dos extratos, a indica cultivo em arroz, seguido por Branco, A, F ou M, que indica, respectivamente, ausência de micro-organismos, cultura simples da actinobactéria, cultura simples do fungo, e cultura mista. Os números 1 e 2 representam cada duplicata. Cada extrato foi obtido a partir de um frasco de cultura.

Os extratos brutos foram analisados por CCDA e HPLC-DAD. Em ambas as análises, as duplicatas se mostraram bastante semelhantes e serão discutidas como sendo um único extrato.

A análise por CCDA (Figura 103) mostrou que o extrato da cultura mista apresentava maior similaridade ao extrato do fungo, enquanto que o extrato da cultura simples da actinobactéria apresentou uma mancha vermelha que não foi observada na cultura mista. Num primeiro momento, acreditou-se que tais compostos avermelhados estariam sendo produzidos pela actinobactéria somente nesse cultivo, entretanto, após uma averiguação cautelosa, foi constatado que compostos apresentando a mesma coloração e o mesmo Rf em CCDA

havia sido produzidos nos cultivos em meio semi-sólido PDA. As quantidades observadas nos cultivos mencionados, entretanto, foram bem menores, já que não pôde ser observada essa coloração no meio de cultura, tampouco no extrato obtido.

Figura 103. Análise por CCDA dos extratos brutos das culturas simples e mistas do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 e actinobactéria *S. albospinus* RLe7 cultivados em arroz. Em ambas as cromatoplaças, são apresentados, respectivamente, os extratos controle, da cultura simples do fungo, da cultura mista e da cultura simples da actinobactéria. Placa de fase normal (sílica gel ativada) utilizando eluição com fase móvel hexano:acetato de etila 3:7 (primeira placa) e acetato de etila:metanol 8:2 (segunda placa), revelação em UV de 254 e 365 nm (foto apresentada) e em vanilina sulfúrica.

Analisando os cromatogramas obtidos por HPLC (Figura 104), também pôde ser observada a semelhança da cultura mista com a cultura simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6. Comparando-se esses extratos, verificou-se um relativo aumento de três compostos produzidos pelo fungo em cultura mista, se comparado à cultura simples. Já o perfil metabólico da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 não foi muito expressivo nessas condições de análise, sendo que pouquíssimos metabólitos foram visualizados, e assim, poucas comparações puderam ser feitas. Apesar disso, o aspecto visual e o odor das culturas mistas são evidências de que a actinobactéria também se desenvolveu em cultura mista, ainda que sua produção metabólica não tenha sido tão acentuada. Além disso, os compostos que foram produzidos, provavelmente não puderam ser detectados por UV, dificultando a interpretação dos resultados obtidos de uma análise por HPLC-DAD.

Figura 104. Cromatogramas dos extratos aA2 (verde), aF2 (azul) e aM2 (rosa). Os picos marcados com asterisco são dos compostos que apresentaram um relativo aumento nas concentrações em cultura mista. Coluna analítica CLC-ODS 250 mm x 4,5 mm e fase móvel de MeCN em água (10% a 100% de MeCN, em 30 min; 100% de MeCN, por 5 min, 100% a 10% de MeCN, por 2 min; 10% de MeCN, por 8 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (210 nm).

Não há dúvidas de que em cultura simples a produção metabólica pela actinobactéria *S. albospinus* RLe7 foi bastante elevada, podendo ser constatada inclusive pela quantidade de extrato obtido em ambas as duplicatas dessa cultura (Tabela 34), que é muito superior à obtida dos cultivos mistos e do simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6. Há chances de que a actinobactéria tenha degradado mais o arroz que o fungo, e assim, os componentes do meio de cultura foram extraídos em maior quantidade. O fracionamento dos extratos da cultura simples da actinobactéria, que será apresentado adiante, revelou que realmente há uma grande quantidade de compostos altamente polares no extrato, provavelmente provenientes do meio de cultivo, mas ainda assim, a quantidade de metabólitos produzidos pelo micro-organismo é elevada.

Considerando os objetivos propostos, a adição prévia do fungo em cultura mista sólida pareceu mais adequada que a adição simultânea dos micro-organismos para permitir o desenvolvimento de ambas as linhagens, ainda que o fungo tenha tido um relativo favorecimento. A eliciação do metabolismo secundário fúngico foi observada, mas bem mais discreta que em meio líquido. É provável que o momento de estabelecimento da cultura mista ainda tenha que ser ajustado, de modo que o fungo cresça por um período menor, de um ou dois dias, antes da adição da actinobactéria, o que poderia favorecer uma competição

mais acirrada, ou, em contrapartida, permitir que o desenvolvimento da actinobactéria prevalecesse. Essas informações, entretanto, só podem ser obtidas experimentalmente.

2.4.3.8.1 Fracionamento do extrato da cultura simples de *S. albospinus* RLe7 crescida em meio sólido e determinação estrutural das substâncias presentes nas frações

Como mencionado anteriormente, os extratos das culturas simples da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 foram fracionados pra serem comparados aos extratos da cultura mista, do cultivo anterior, em que aparentemente somente a actinobactéria se desenvolveu, causando a morte do fungo *Phomopsis* sp. FLe6. Além disso, se objetiva determinar a estrutura dos compostos que deixaram o meio de cultura e os extratos com coloração vermelha intensa.

Devido à grande similaridade das duplicatas, ambas foram unidas formando um único extrato, aA1A2, contendo aproximadamente 26 g. Esse extrato foi pré-fracionado, por SPE, utilizando coluna DSC-18 (fase reversa) Supelco® contendo 10 g de fase estacionária (60 mL). A eluição da coluna com H₂O originou a fração aA1A2-1, de aproximadamente 21 g (a massa exata não foi obtida já que a fração parecia ainda conter água), a eluição com MeOH:H₂O 1:1 gerou a fração aA1A2, de coloração vermelha, contendo 1.472,1 mg, enquanto que a eluição com metanol originou a fração aA1A2, de 586,8 mg. A quantidade em massa da fração aA1A2-1 mostrou que o extrato era formado majoritariamente por compostos altamente polares, que deveriam ser principalmente componentes do meio de cultura, mas havendo a possibilidade de que alguns compostos produzidos pelo micro-organismos também tenham sido eluídos nessa fração.

Devido a fração aA1A2-2 apresentar a coloração vermelha, uma porção dessa fração, contendo aproximadamente 400 mg foi fracionada por SPE, em coluna DSC-18 Supelco® de 2g. Após o fracionamento, foram obtidas nove frações, que foram eluídas sucessivamente como descrito:

- 10 mL de H₂O - fração aA1A2-2-1 (357,0 mg)
- 15 mL de H₂O - fração aA1A2-2-2 (14,4 mg)
- 10 mL de H₂O - fração aA1A2-2-3 (2,2 mg)

- 20 mL de H₂O:MeOH 9:1 - fração aA1A2-2-4 (8,9 mg)
- 15 mL de H₂O:MeOH 8:2 - fração aA1A2-2-5 (4,3 mg)
- 15 mL de H₂O:MeOH 7:3 - fração aA1A2-2-6 (6,9 mg)
- 15 mL de H₂O:MeOH 6:4 - fração aA1A2-2-7 (10,4 mg)
- 15 mL de H₂O:MeOH 1:1 - fração aA1A2-2-8 (5,2 mg)
- 20 mL de MeOH seguido de acetona - fração aA1A2-2-9 (8,1 mg)

Todas as frações escureceram consideravelmente após permanecerem expostas à luminosidade ambiente, ainda que tenham sido secas exclusivamente a vácuo e temperaturas abaixo de 40 °C.

A análise das outras frações por CCDA (Figura 105) mostrou que alguns compostos apresentaram manchas avermelhadas após a revelação com vanilina, entretanto, na revelação em UV de 365 nm foi possível perceber realmente que os compostos vermelhos estavam disseminados em várias frações.

Figura 105. Análise por CCDA das frações obtidas após o fracionamento de aA1A2-2. Os números 2-9 representam as frações aA1A2-2-2 a aA1A2-2-9, respectivamente. Placa de fase normal (sílica gel ativada) utilizando eluição com fase móvel AcOEt:MeOH 8:2, revelação em UV de 254 (placas C e D) e 365 nm (E e F) e em vanilina sulfúrica (A e B).

As frações também foram analisadas por RMN de ¹H e ESI-MS. Os dados de ambos os espectros foram comparados e algumas estruturas que não apresentavam sinais bem definidos no espectro de RMN de ¹H, por não estarem puras, puderam ser determinadas com o auxílio do MS.

O espectro de massas da fração aA1A2-2-1 (Anexo 79) apresentou um padrão de sinais de *m/z* condizente com a presença de açúcares, havendo uma diferença de 162 ou 180 unidades entre os picos de *m/z* observados, indicando os diferentes tamanhos de carboidratos.

No espectro de massas da fração aA1A2-2-2 (Anexo 80), foram observados os mesmos picos de *m/z* da fração anterior, juntamente com os picos

de m/z de 259 e 281, em modo positivo, e 257, em modo negativo, referentes a um composto de massa molecular de 258 u. Durante buscas na base de dados *DNP* foi sugerida a estrutura de uma dicetopiperazina do tipo ciclo-Phe-Leu, contendo uma instauração entre as posições α - β de um dos aminoácidos.

O espectro de RMN de ^1H dessa fração (Figura 106) confirmou a presença de açúcares. Foram observados sinais de hidrogênios ligados a carbonos hidroxilados, além de sinais entre δ 2,5 e δ 1,3 e de hidrogênios de metilas. Os sinais dubletos em δ 1,11, de hidrogênios de metilas, sugerem a presença de açúcares metilados, comumente encontrados em compostos glicosilados de actinobactérias. Foram ainda observados sinais bem pouco intensos na região de hidrogênios aromáticos, entre δ 7,31 e δ 7,23. Esses sinais poderiam ser dos hidrogênios do anel aromático do resíduo de fenilalanina da dicetopiperazina sugerida pelo *DNP*, ou ainda de algum outro composto pouco concentrado na amostra.

Após a avaliação dos resultados das análises da fração aA1A2-2-2, não foram determinados quais compostos seriam realmente responsáveis pela coloração avermelhada dessa fração, e pelas manchas vermelhas observadas em CCDA (Figura 105). Foram observados predominantemente sinais de açúcares, mas há grande possibilidade, de que além dos açúcares do meio de cultivo, estejam presentes nessa fração compostos glicosilados, os quais seriam responsáveis pela coloração intensa observada. Devido à cor vermelha, seriam esperadas estruturas contendo um núcleo antraciclínico, no qual estariam conectadas cadeias de açúcares de diferentes tamanhos. Assim, foram feitas buscas por compostos de massa molecular de 684 u, ao qual se refere o pico mais intenso do espectro da fração aA1A2-2-1, de m/z 683, em modo negativo (Anexo 79). Foram sugeridas estruturas análogas de antraciclinas glicosiladas, que estariam de acordo com as suposições feitas.

Figura 106. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração aA1A2-2-2.

Figura 107. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração aA1A2-2-4.

Os espectros de RMN de ^1H das frações aA1A2-2-4 (Figura 107) e aA1A2-2-5 são bastante similares, apresentando vários sinais multipletos, entre δ 1,2 e δ 3,8, sinais de hidrogênios de metilas, sendo um tripleto, dois dubletos e um singleto. O sinal singleto está em δ 1,91. Existe um sinal em δ 3,49 que poderia ser de hidrogênios metoxílicos, entretanto, devido à amostra não estar pura, as integrais dos sinais não estão bem definidas. Há ainda, aparentemente, dois sinais dubletos sobrepostos em δ 7,29 e um multipletto em δ 7,23. Não foi possível determinar quais sinais referem-se a um mesmo composto, entretanto, os sinais com aspecto de tripletos mencionados, juntamente com o sinal singleto em δ 1,91, de hidrogênios de metila, sugerem uma estrutura que apresenta alguma similaridade com as desferrioxaminas de cadeia aberta, como por exemplo, a desferrioxamina B, que já foi isolada em nosso grupo a partir de outra linhagem de *Streptomyces* sp. (CONTI, 2012). Os sinais referentes às outras metilas podem ser ou não do mesmo composto, assim como os hidrogênios aromáticos, já que várias desferrioxaminas, estruturalmente distintas, têm sido isoladas, as quais podem possuir cadeias carbônicas saturadas ramificadas, derivadas de ácidos graxos, ou anéis aromáticos (D'ONOFRIO et al., 2010). Os sinais de hidrogênios vinílicos observados, no entanto, não são característicos de um anel do tipo benzeno, devido aos valores das constantes de acoplamento dos sinais dubletos (4,4 e 4,9 Hz).

Quando a fração aA1A2-2-4 foi analisada por MS, foram formados, em modo positivo, os íons de m/z 777 e 799, enquanto que em modo negativo, foi formado o íon de m/z 775 (Anexo 81), sendo todos referentes a um composto de massa molecular de 776 u. Há ainda a presença de um provável análogo, apresentando 16 unidades de massa a menos. O espectro da fração aA1A2-2-5 também apresentou os picos de m/z 775 e 777, nos modos negativo e positivo, respectivamente.

O perfil de fragmentação do pico de m/z 777 (Figura 108) confirma a presença de uma estrutura análoga das desferrioxaminas, as quais possuem um fragmento comum de m/z 201, como posso ser observado, por exemplo, na desferrioxamina E (Figura 111). Foram observadas três perdas de 200 e uma de 176 unidades de massa. O pico de m/z 761 também apresentou alguma semelhança no perfil de fragmentação (Figura 109), havendo duas perdas de

200, uma de 176, uma de 118 e uma de 66 unidades de massa. Foram feitas buscas no *DNP*, *MassBank* e *Metlin* com as massas moleculares de 776 e 760 u, mas nenhum composto análogo às desferrioxaminas foi encontrado. Assim, os resultados obtidos sugerem que a fração aA1A2-2-4 contém uma desferrioxamina ainda não relatada.

Além disso, nas frações aA1A2-2-4 e aA1A2-2-5 foi observado um íon com m/z 815. Durante buscas no *DNP*, várias estruturas foram sugeridas, incluindo um análogo da rodomicina, denominado γ -rodomicina III (Figura 110).

Os espectros de RMN de ^1H das frações aA1A2-2-6, aA1A2-2-7 (Figura 111) e aA1A2-2-8 são muito similares, apesar da fração aA1A2-2-6 e aA1A2-2-8 estarem bem mais impuras. Nesses espectros, foram observados sete sinais, em δ 1,31 (*m*), δ 1,50 (*quint*), δ 1,61 (*quint*), δ 2,45 (*t*), δ 2,76 (*t*), δ 3,15 (*t*) e δ 3,59 (*t*), que integram para um cada. Esses sinais são condizentes aos dos hidrogênios da desferrioxamina E (**22**) (Figura 112) e já foi isolada em nosso grupo (CONTI, 2012).

A análise por MS dessas frações confirmou o observado por RMN. Foram formados os íons de m/z 601 e 623, em modo positivo, e um íon de m/z 599, em modo negativo (Anexo 82). Da mesma forma que na fração aA1A2-2-4, foi observado um possível análogo com 16 unidade de massa a menos, já que foram observados nos espectros os picos de m/z 585 e 583 (modos positivo e negativo, respectivamente). O íon de m/z 601 foi fragmentado (Figura 113) levando a formação dos íons fragmentos de m/z 401 e 201, os quais são condizentes com a estrutura da desferrioxamina E (**22**), que é formada por três fragmentos estruturais iguais de massa molecular de 200 u.

Além disso, no espectro foram observados os picos de m/z 801 e 799 (nos modos positivo e negativo, respectivamente), os quais podem ser melhor visualizados na fração aA1A2-2-8 (Anexo 83), ainda que estejam pouco intensos. O íon de m/z 801 foi fragmentado, levando a formação dos fragmentos de m/z 601, 401 e 201 (Figura 114). Esses resultados sugerem que essas frações podem conter outra desferrioxamina de cadeia fechada (**23**), além da desferrioxamina E, mas que seria formada por quatro fragmentos estruturais iguais ao invés de três (Figura 115). O composto **23** não foi relatado na literatura.

Figura 108. Espectro de MS-MS do pico com m/z 777, da fração aA7F6-2-4 analisada em TQ-S. Energia de colisão de 10, 15 e 20 eV.

Figura 109. Espectro de MS-MS do pico com m/z 761, da fração aA7F6-2-4 analisada em TQ-S. Energia de colisão de 10 e 20 eV.

Figura 110. Estrutura química da antraciclina glicosilada γ-rodomicina III.

Figura 111. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração aA1A2-2-7.

Figura 112. Estrutura química do composto **22** presente na fração aA1A2-2-7, mostrando os deslocamentos químicos dos hidrogênios segundo dados obtidos do RMN de ^1H .

Figura 113. Espectro de MS-MS do pico com m/z 601, da fração aA7F6-2-7 analisada em TQ-S. Energia de colisão de 10, 20 e 25 eV.

Figura 114. Espectro de MS-MS do pico com m/z 801, da fração aA7F6-2-8 analisada em TQ-S. Energia de colisão de 15 e 20 eV.

composto 23

Figura 115. Estrutura química do composto **23** presente na fração aA1A2-2-8.

O espectro da fração aA1A2-2-9 (Anexo 84 e 85) apresentou três sinais na região de hidrogênios aromáticos, em δ 6,95 (*dd*, 2,2 e 8,4 Hz), δ 6,86 (*d*, 2,2 Hz) e δ 6,57 (*d*, 8,4 Hz), característicos de anel aromático 1,3,4-trissubstituído, e sendo condizentes com os da estrutura da fisostigmina (**20**) (Figura 95, pág. 181). Devido à amostra não estar pura, nem todos os sinais puderam ser bem caracterizados. Entretanto, no caso da fisostigmina (**20**), era esperado visualizar quatro sinais correspondentes a hidrogênios de metilas, sendo três deles singletos e um dubleto. Entretanto, foram observados dois singletos, em δ 3,09 e δ 1,60, e dois dubletos, em δ 2,89 e δ 2,71.

O espectro de massas dessa fração apresentou vários picos (Anexo 86), mas ainda assim, os picos de m/z 276, 219 e 162, característicos da fisostigmina (**20**), foram observados.

Há a possibilidade de que estruturas análogas da fisostigmina estejam presentes no extrato, já que a fragmentação de alguns íons levou à formação de íons fragmentos de m/z 219 e 162, assim como em outros, perdas de 57 unidades de massa foram observadas. Entretanto, tais compostos não foram determinados.

Ao final das análises, permaneceu a dúvida em relação aos compostos que estariam causando a coloração vermelha no extrato e na maioria de suas frações, havendo duas hipóteses: a cor poderia ser devido à presença de 1) compostos antraciclínicos, que poderiam estar glicosilados em diferentes graus, e também na forma aglicona, o que gerou compostos de polaridades distintas que foram observados em várias frações. As análises por RMN e MS não permitiram determinar indubitavelmente que esses compostos estão presentes no extrato, apesar de terem sido encontrados indícios de sua presença; 2) compostos quelantes de ferro, como as desferrioxaminas/ferrioxaminas, que dão coloração avermelhada ao meio de cultivo quando queladas com ferro. Durante as análises de MS, não foi verificada a presença das respectivas ferrioxaminas.

Comparando-se os resultados obtidos nesse cultivo em meio sólido de arroz suplementado, com o cultivo anterior, pôde-se verificar que a actinobactéria *S. albospinus* RLe7 não produziu a desferrioxamina E (**22**) na cultura mista com o fungo *Phomopsis* sp. FLe6. O extrato obtido do cultivo misto havia sido fracionado e analisado por RMN de ^1H e também por MS. Não foram formados

íons referentes a nenhum dos possíveis sideróforos observados no atual cultivo, tampouco puderam ser observados sinais das desferrioxaminas nos espectros de RMN de ^1H . No cultivo simples dessa actinobactéria, apresentado acima, pôde-se perceber que a desferrioxamina E (**22**) foi detectada majoritariamente na maioria das frações, tendo sido, provavelmente, produzida em grandes quantidades. Além disso, outros compostos similares, incluindo o composto **23**, foram detectados.

Há relatos do envolvimento de sideróforos na interação entre micro-organismos, de modo que as linhagens produtoras seriam responsáveis por favorecer o crescimento de outras linhagens bacterianas presentes no mesmo ambiente (D'ONOFRIO et al., 2010; YAMANAKA et al., 2005), além de assegurar seu próprio crescimento em condições restritivas de ferro (BENITE e MACHADO, 2002). Assim, a não produção desses compostos pela linhagem *S. albospinus* RLe7 cultivada em mistura com o fungo *Phomopsis* sp. FLe6 poderia representar uma tentativa da actinobactéria não facilitar o crescimento de uma linhagem competidora, ou ainda, através de algum mecanismo inibitório, o fungo poderia ter sido capaz de inibir a produção bacteriana desses compostos na tentativa de limitar o crescimento da actinobactéria.

2.5 CONCLUSÕES

Várias abordagens diferentes, como culturas mistas microbianas e modulação química e epigenética de vias metabólicas, foram utilizadas para induzir a produção de metabólitos secundários pelas linhagens de micro-organismos endofíticos selecionadas, e mesmo com algumas tentativas sem sucesso, os objetivos foram atingidos.

Tanto nos experimentos de modulação como nos de culturas mistas foi observado que quando as condições de cultivo são alteradas, os resultados em função das estratégias aplicadas são diferentes. Em determinadas condições, os moduladores químicos e epigenéticos não foram capazes de remodelar o metabolismo secundário do fungo *A. tenuissima* SS77, enquanto que em outras, foram observadas variações significativas nos perfis químicos. O mesmo foi verificado nos experimentos de culturas mistas. Algumas condições de crescimento favorecem alterações no metabolismo secundário dos micro-organismos cultivados em mistura, as quais nem sempre podem ser observadas simplesmente pela presença de um micro-organismo competidor. Isso indica que além da estratégia de indução metabólica utilizada, que é potencialmente eficaz, adequações nas condições de cultivo podem ser necessárias para que os resultados desejados sejam obtidos. Essa constatação, provavelmente, justificaria alguns relatos de notável sucesso paralelamente a outros de insucesso utilizando uma mesma estratégia de manipulação.

Os moduladores químicos e epigenéticos foram utilizados para que específicos mecanismos de indução metabólica fossem explorados, entretanto, os resultados das análises químicas deixaram evidente que a indução ocorreu por mecanismos não específicos, já que uma correlação entre o tipo de modulador utilizado e o efeito observado não pôde ser feita. Provavelmente a eliciação do metabolismo secundário ocorreu através de mecanismos gerais que são ativados em diversas condições de estresse.

Nos cultivos microbianos mistos, a co-cultura da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 com o fungo *Phomopsis* sp. FLe6 foi a que apresentou resultados mais promissores, já que logo nos primeiros experimentos realizados foram observadas alterações nos perfis metabólicos desses micro-organismos quando cultivados em mistura. Adicionalmente, os cultivos simples e mistos

contendo o fungo *Phomopsis* sp. FLe6 produziram os extratos mais ativos nos ensaios citotóxicos frente às células tumorais, indicando que esses micro-organismos mereciam ser pesquisados mais profundamente.

Ao se explorar as culturas mistas da actinobactéria *S. albospinus* RLe7 com o fungo *Phomopsis* sp. FLe6 diferentes resultados foram observados sempre que alguma condição de cultivo era alterada, devido ao crescimento em mistura.

Muitos dos compostos isolados e identificados não possuem uma função ecológica relatada. Ainda que alguma atividade biológica tenha sido testada, o papel dessas moléculas na natureza continua desconhecido. Compreender como a produção desses compostos é regulada no ambiente natural auxiliaria na adequação de condições para estimular a produção de metabólitos secundários pelas linhagens. As chances de sucesso na obtenção de compostos de interesse aumentam à medida que estratégias potencialmente eficazes são aplicadas.

Os micro-organismos endofíticos são reconhecidamente prolíficos, e uma diversidade ainda maior de compostos poderá ser acessada se as condições de cultivo forem racionalmente manipuladas.

3 CAPÍTULO II - Estudo genômico da biossíntese de produtos naturais em fungos filamentosos

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Produtos naturais de fungos filamentosos

Produtos naturais de fungos filamentosos são extremamente importantes em vários contextos. Esses compostos podem atuar como agentes mediadores de simbiose e patogenicidade, desempenhando importante papel na agricultura, medicina e no meio ambiente.

As infestações de lavouras por fungos geram preocupações em todo o mundo, e muitos dos danos causados são devido a produtos naturais como aflatoxina, toxina-T, fumonisina, além de outras toxinas e fatores de virulência (GALLO; FERRARA; PERRONE, 2013; CRAWFORD et al., 2008; TURGEON; BAKER, 2007; ZHU et al., 2006). Em tecidos vivos, foi demonstrado que uma enzima híbrida PKS-NRPS (policetídeo sintase-peptídeo sintetase não-ribossomal) é expressa exclusivamente durante a penetração do fungo *Magnaporthe grisea* em folhas de arroz (*Oryza sativa*), e provavelmente o seu produto, embora ainda não determinado, é reconhecido por cultivares resistentes, levando a ativação da resposta de defesa (BOHNERT et al., 2004). Uma enzima PKS-NRPS também está envolvida nas interações entre *Trichoderma virens* e raízes de milho, resultando na indução de resposta de defesa da planta (MUKHERJEE et al., 2012).

Fatores de virulência fúngicos em humanos também são relacionados a produtos naturais. Dentre vários exemplos, pode-se citar o produto de uma enzima peptídeo sintetase não-ribossomal (NRPS), a gliotoxina, que é um agente imunossupressor que facilita a infecção letal por fungos em humanos (PERRIN et al., 2007).

Além disso, os fungos desempenham um importante papel na biodiversidade da natureza. Muitos fungos são encontrados como endofíticos, os quais vivem em simbiose dentro de tecidos vegetais, podendo também habitar raízes, como os micorrizos, e até mesmo insetos (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; ZHANG; SONG; TAN, 2006; SCHULZ et al., 2002; LEE et al., 2001;

OMACINI et al., 2001). Nesses ambientes, tais micro-organismos expressam especificamente alguns genes para a biossíntese de produtos naturais que podem não ser expressos em cultivos laboratoriais, causando impacto direto na biodiversidade. Como um bom exemplo desse efeito, muitos fungos patógenos de humanos, somente durante a infecção, expressam suas rotas de produtos naturais que são essenciais no processo de patogenicidade (FOX, HOWLETT, 2008).

3.1.2 Maquinaria genética para a biossíntese de produtos naturais em fungos

A importância dos produtos naturais de origem fúngica em processos biológicos inspirou um grande número de estudos biossintéticos com o intuito de entender as origens dos produtos naturais. Esses estudos revelaram que os genomas fúngicos condificam as enzimas policetídeo sintases (PKS), peptídeo sintetases não-ribossomais (NRPS) e possuem genes biossintéticos que em alguns casos seguem regras fundamentalmente diferentes daquelas observadas em bactérias (CHIANG et al., 2010; DU; LOU, 2010; HERTWECK, 2009; McALPINE, 2009; CRAWFORD et al., 2008; SANCHEZ; CHIANG; WANG, 2008). Por exemplo, a enzima PKS aromática que leva à aflatoxina contém domínios sem precedentes em genes *pks* conhecidos de bactérias. O domínio tioesterase (TE) atua através de uma condensação de Dieckmann (FUJII et al., 2001), e os domínios molde para produto (PT) e unidade iniciadora (ST) foram apenas identificados mais recentemente (CRAWFORD et al., 2008).

Além do módulo protéico único, genes fúngicos *pks* também têm características bioquímicas exclusivas. As enzimas PKS redutoras atuam iterativamente, com cada sítio ativo sendo usado várias vezes para gerar a estrutura final (CHIANG et al., 2010; HERTWECK, 2009). De algum modo, estes domínios operam somente em cadeias de determinado tamanho. O mais ilustrativo exemplo desse princípio é a mais bem estudada PKS redutora responsável pela biossíntese de lovastatina. A enzima lovastatina nonacetídeo sintase (LNKS) faz a ligação de uma unidade de acetil-CoA a nove unidades de malonil-CoA, seguida de metilação única em uma posição específica, redução e eliminação seletivas para gerar o intermediário linear. Esse intermediário reage

via *Diels-Alder* para gerar a estrutura única do anel decalino presente na lovastatina (Figura 116) (ASKENAZI et al., 2003; AUCLAIR et al., 2000; HENDRICKSON et al., 1999; KENNEDY et al., 1999). O modo pelo qual a enzima LNKS controla todas essas etapas região-seletivas continua completamente obscuro.

3.1.3 Biossíntese do composto equisetina pelo fungo *Fusarium heterosporum*

A equisetina é um produto natural de fungo filamentoso, amplamente ativo, que contém em sua estrutura o anel do ácido tetrâmico (Figura 116) (BURKE et al., 2000; SINGH et al., 1998). Essa substância serviu como base para o planejamento do medicamento raltegravir (MK-0518), um inibidor de HIV-integrase utilizado clinicamente, e alguns compostos análogos estão sendo explorados na agricultura como pesticidas (LI et al., 2000; SINGH et al., 1998). Em 2005, foi reportado o primeiro gene para a enzima ácido tetrâmico sintetase, *eqiS*, o qual é necessário para a biossíntese da equisetina (SIMS et al., 2005). Além disso, a rota biossintética completa foi sequenciada e analisada (SIMS; SCHMIDT, 2008; SIMS et al., 2005). A enzima EqiS predita é uma proteína híbrida PKS-NRPS, e o gene *eqiS* foi o primeiro gene pertencente à essa classe que foi caracterizado.

O composto equisetina é estruturalmente relacionado à porção policetídica da lovastatina, e também se assemelha a um grande número de metabólitos importantes de fungos filamentosos, tais como citocalasinas, pramanicina, tenelina, pseurotina, dentre outros (Figura 116) (ELEY et al., 2007; MAIYA et al., 2007; SCHUMANN; HERTWECK, 2007; DUSPARA et al., 1998; HARRISON; HUGHES; RIDDOCH, 1998). Uma intrigante característica que torna essa família estrutural atrativa é que provavelmente todas essas substâncias são biossintetizadas por enzimas PKS iterativas similares, e apesar disso, essas enzimas originam classes estruturais muito diferentes.

Figura 116. Produtos naturais estruturalmente relacionados à equisetina. Em azul, subunidade de origem policetídica; em vermelho, subunidade derivada de aminoácido.

A biossíntese de produtos naturais em fungos filamentosos ainda é pouco estudada em nível genético quando comparado aos produtos naturais de bactérias. Apesar dos estudos genéticos, bioquímicos e de bioinformática envolvendo a biossíntese desses compostos, ainda não foi possível explicar como é gerada a grande diversidade de produtos sintetizados pelas enzimas híbridas PKS-NRPS de fungos (FISCH, 2013; CAMPBELL; VEDERAS, 2010; COLLEMARE et al., 2008; CRAWFORD et al., 2008; HALO et al., 2008; ZHOU et al., 2008; ELEY et al., 2007). Isso torna evidente que uma imensa diversidade química de origem fúngica poderá ser obtida se as barreiras científicas da manipulação genética de fungos forem superadas.

3.2 OBJETIVOS

Geral

- Compreender a complexa biossíntese dos metabólitos fúngicos através do estudo da relação entre a sequência genômica e a estrutura química do produto resultante.

Específicos

- Utilizar recombinação genética em levedura para gerar variantes de enzimas PKSs e NRPSs correlacionadas à enzima híbrida PKS-NRPS responsável pela produção do composto equisetina;
- Expressar esses recombinantes no fungo filamentoso *F. heterosporum*, originalmente produtor de equisetina, como sistema modelo de hospedeiro;
- Caracterizar novos compostos gerados a partir dos genes recombinantes.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Material

3.3.1.1 Reagentes e equipamentos utilizados nos experimentos envolvendo biologia molecular e genética

- Reagentes gerais: enzimas de restrição da New England Biolabs; enzima polimerase de alta fidelidade Platinum HiFi Taq da Invitrogen, enzimas digestivas de parede celular da Sigma; *kits* para biologia molecular da Qiagen e Applied Biosystems; PDA; dextrose; extrato de levedura; peptona; triptona; extrato de malte; PDB; ágar bacteriológico; tubos *ependorf* de 1,5 e 2 mL; micropipetas e ponteiros, tubos *Falcon*; frascos *Erlenmeyer* ou *Fernbach*; reagentes para eletroforese em gel de agarose, eletroporação e PCR.

- Reagentes elaborados para os procedimentos:

Caldo YPD: 10 g de extrato de levedura + 20 g de peptona + 20 g de dextrose em 1 L de água milli-Q;

Ágar SD (*synthetic defined*): 1,7 g de Difco™ *Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids*) + 5 g de sulfato de amônio + 1,54 g de meio BSM (*Bifidus Selective Medium*, Sigma) sem uracila + 20 g de dextrose + 20 g de ágar em 1 L de água milli-Q. Depois de autoclavado, o meio é suplementado com 10 mL de metionina a 1%, 10 mL de leucine a 1% e 10 mL de histidina a 1%. As soluções de aminoácidos devem ser esterilizadas em filtro esterilizante;

Tampão TE: 10 mM de Tris pH 7,5 + 1 mM de EDTA pH 8.0;

Solução de lítio 10X: 10 mM de Tris pH 7,5 + 1 mM de EDTA pH 8,0 + 1 M de acetato de lítio. A solução de lítio 1X é preparada diluindo-se a solução de 10X com tampão TE;

Solução de PEG a 50%: 10 mM de Tris pH 7,5 + 1 mM de EDTA pH 8,0 + 50% PEG (4000 ou 3350). A solução 40% PEG + 0.1 M lítio é preparada com 40 mL de solução de PEG a 50% + 5 mL da solução de lítio 10X + 5 mL de tampão TE;

Caldo SD: contém os mesmos componentes do ágar SD (descrito anteriormente), mas sem adição de ágar;

Solução estabilizadora A: 1M de sorbitol + 50 mM de Tris-HCl pH 8 + 30 mM de DTT (ditiotreitól);

Solução estabilizadora B: 1M de sorbitol + 50 mM de Tris-HCl pH 8 + 30 mM de DTT;

Caldo SOC: 20 g de triptona + 5 g de extrato de levedura + 10 mM de NaCl + 2,5 mM de KCl + 20 mM de MgSO₄ em 900 mL de água deionizada. 100 mL de solução de dextrose a 20 mM devem ser adicionados após o meio ter sido autoclavado e resfriado. A solução de dextrose pode ser esterilizada autoclavando-se separadamente ou filtrando-se em filtro esterilizante;

Ágar LB: 10 g de triptona + 5 g de extrato de levedura + 10 g de NaCl + 17 g de ágar em 1 L de água deionizada;

Caldo LB: mesmos componentes do ágar LB, mas sem adição de ágar.

Caldo SOB: 20 g de triptona + 5 g de extrato de levedura + 10 mM de NaCl + 2,5 mM de KCl em 1 L de água deionizada. Para obter células competentes não é adicionado MgSO₄ no meio SOB;

Ágar SOB: mesmos componentes do caldo SOB + 17g de ágar;

Tampão CCMB80: 10 mM de acetato de potássio pH 7,0 + 80 mM de CaCl₂ + 20 mM MnCl₂ + 10 mM MgCl₂ + 10% glicerol. O pH é ajustado para 6,4 com HCl quando necessário. A solução é esterilizada com filtro esterilizante e estocada a 4 °C;

Caldo regenerador: 1 M de sacarose + 0,02% de extrato de levedura em água deionizada;

Ágar regenerador seletivo: 1 M de sacarose + 0,02% de extrato de levedura + 1% de ágar + 150 µg.mL⁻¹ de higromicina B em água deionizada;

Tampão SC: 1,2 M de sorbitol + 100 mM de CaCl₂;

Tampão SPTC: 40% PEG + 1,2 M de sorbitol + 50 mM de CaCl₂, 10 mM de Tris pH 8,0;

Tampão SC/SPTC: 79% de tampão SC + 20% de tampão SPTC + 1% de DMSO;

Solução enzimática: 1 g de enzimas líticas de *T. harzianum* (L1412-Sigma) + 100 mg de yatalase (Takara) em 20 mL de NaCl 0,8 M tamponado com fosfato/citrato.

- Equipamentos: aparelho de água Millipore Milli-Q; autoclaves; aparelho *NanoDrop*; balança analítica; aparelho vortex; centrífuga para microtubos; evaporador *speed vacuum*; capela de fluxo laminar; termociclador; mesa agitadora com controle de temperatura; estufa para micro-organismos, cuba de

eletroforese horizontal conectada à fonte; espectrofotômetro, sequenciador (*Applied Biosystems*).

3.3.1.2 Reagentes e equipamentos utilizados nos experimentos para obtenção de extratos brutos e análises químicas

- Reagentes gerais: solventes PA; solventes grau cromatográfico; cromatoplasas sílica gel com suporte de alumínio e fluorescência UV₂₅₄, papel de filtro; PDA; farelo de milho comercial; béqueres; frascos *Erlenmeyer*; colunas para SPE de fase reversa; coluna analítica para HPLC CLC-ODS 250 mm x 4,6 mm, 5 µm, acoplada à pré-coluna 12,5 mm x 4,6 mm; e coluna para UPLC C18 50 mm x 2,1 mm, 1,7 µm, acoplada à pré-coluna 5 mm x 2,1 mm.

- Equipamentos: aparelho de água Millipore Milli-Q; autoclave vertical; balança analítica; incubadora BOD; bomba de vácuo; capela de fluxo laminar; sistema a vácuo para SPE da Supelco®; 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 FRC-10A Shimadzu, injetor automático SIL-10AF Shimadzu e *software* Class VP; espectrômetro de massas XEVO TQ-S (Waters Corporation Milford, USA) acoplado a sistema de UPLC ACQUITY UPLC™ H CLASS; rotaevaporadores; sistema purificador de água osmose reversa; sonificador Branson1200.

3.3.2 Métodos

Todos os procedimentos empregados foram baseados em metodologias já descritas na literatura científica e que são utilizadas no laboratório do Prof. Dr. Eric W. Schmidt, da *University of Utah*.

3.3.2.1 Planejamento das construções genéticas realizadas

Foram feitas construções genéticas para resultar em uma enzima do tipo PKS-NRPS. Para isso, as construções contêm um promotor, e um gene para PKS seguido de um gene para NRPS. Esse promotor contém a sequência genética do promotor do gene *pks-nrps* constitutivo de *F. heterosporum*, o qual é provavelmente responsável pela produção do composto equisetina pelo fungo; o gene *pks* selecionado é responsável pela produção de uma enzima PKS críptica, ou seja, o produto dessa enzima ainda não foi determinado; e o gene para enzima NRPS é na verdade a porção NRPS do gene *pks-nrps* de *F. heterosporum*, previamente citado. O módulo terminal C-A-T-R (contendo os domínios de condensação, adenilação, tiolação e redução, respectivamente), o qual corresponde à porção NRPS do gene *pks-nrps* e é responsável pela síntese do ácido tetrâmico, foi mantido em todos os recombinantes para que os compostos produzidos pudessem ser detectados através de CCDA, já que compostos contendo ácido tetrâmico são facilmente revelados com cloreto férrico.

3.3.2.2 Vetores utilizados para a hibridização

Os vetores utilizados foram previamente desenhados e confeccionados, sendo nomeados *deg2* e *deg3* (Figuras 117 e 118, respectivamente). Os dois vetores são bastante similares, contendo basicamente marcadores de seleção para uracila, higromicina B e ampicilina, e vários sítios de restrição. Além disso, cada um dos vetores contém a sequência genética responsável pela transcrição do módulo NRPS de enzimas híbridas PKS-NRPS sintetizadas a partir de dois diferentes genes *pks-nrps*, *deg2* e *deg3*, sendo essa sequência precedida pelo domínio ACP que une o módulo PKS ao NRPS, e pelo respectivo promotor de cada gene. Ambos os genes pertencem ao genoma de *F. heterosporum*, sendo que pelo menos um deles é responsável pela biossíntese do composto equisetina por esse fungo.

Assim sendo, o vetor *deg2* contém a porção NRPS do gene *deg2*, e o promotor desse gene, enquanto que o vetor *deg3* contém a porção NRPS do gene *deg3*, e o promotor de *deg3*.

Figura 117. Mapa genético do vetor deg2 destacando os diferentes marcadores de seleção (em laranja), alguns sítios de restrição (em azul) e a região *open reading frame* ORF_1 (em rosa) que corresponde à sequência genética da porção NRPS do gene *deg2* juntamente com o módulo ACP que a precede. O vetor deg2 possui em torno de 13,5 Kbp.

Figura 118. Mapa genético do vetor deg3 destacando os diferentes marcadores de seleção (em laranja) e as regiões *open reading frame* ORF_3 e ORF_4 (em rosa) que em conjunto correspondem à sequência genética da porção NRPS do gene *deg3* juntamente com o módulo ACP. O vetor deg3 possui em torno de 14,5 Kbp.

3.3.2.3 Escolha do gene *pks* fúngico utilizado nos estudos de hibridização e desenho de *primers* para amplificar diferentes regiões desse gene

Para realizar a hibridização, foi selecionado o gene de *Aspergillus fumigatus* responsável pela transcrição da proteína críptica XP753141. Esse gene é codificado no *GenBank* como AFUA_1G17740 e pertence ao cromossomo 1 da linhagem Af293 de *A. fumigatus*. A sequência completa, incluindo íntrons, pode ser acessada pelo código AAHF01000004.1. Através do *GenBank*, os intervalos de sequência de aminoácidos correspondentes aos diversos domínios da proteína PKS oriunda do gene *pks* puderam ser identificados, incluindo os domínios KS (ceto-sintase), KR (ceto-redutase) e ACP (proteína carreadora de acil), onde as fusões foram feitas. A partir da sequência de aminoácidos desejada, foi adquirida a sequência de nucleotídeos, e foram desenhados os *primers* responsáveis por amplificar essa região determinada, e que ainda continham uma porção homóloga ao vetor utilizado, porção essa responsável pela inserção do gene *pks* no local desejado da sequência do vetor. Dessa maneira, o *forward primer* contém o final da sequência genética do promotor do gene híbrido *pks-nrps* de *F. heterosporum* e o início da sequência do gene *pks* de *A. fumigatus*, sendo esse *primer* usado para realizar todas as construções em um mesmo vetor. O *reverse primer* contém a sequência complementar e inversa da porção do gene *pks* que se deseja fundir ao vetor e a sequência da porção NRPS do gene *pks-nrps* (já contida no vetor) onde se deseja fazer a fusão. Foi utilizado um *reverse primer* diferente em cada construção. Foram feitas 5 construções, sendo elas: (1) PKS, que contém PKS + TAA (*stop codon*) + ACP_{NRPS} + NRPS, (2) A2C, que contém PKS + ACP_{PKS} + NRPS; (3) K2A, que contém PKS + ACP_{NRPS} + NRPS; (4) TA, que contém PKS + ACP_{PKS} completo + ACP_{NRPS} completo + NRPR; e (5) HA, que contém PKS + porção de ACP_{PKS} + porção de ACP_{NRPS} + NRPR. As construções (2), (3) e (4) estão representadas na figura 119.

Durante o processo de seleção do ponto exato de fusão das sequências e desenho de *primers* foram utilizados programas/ferramentas como *Sequencher 5.0*, *ClustalX2*, *ClustalW*, *oligo tm calculator*, *complementary sequence conversion tool* e outros similares que podem ser encontrados gratuitamente na internet.

Figura 119. Representação esquemática do gene híbrido *pks-nrps* que codifica a enzima PKS-NRPS responsável pela produção de equisetina (primeira barra) e de algumas construções realizadas (três barras seguintes). Na segunda barra está representada a fusão (3) K2A, que contém a porção PKS de gene *pks* críptico de *A. fumigatus* unida ao ACP do gene *pks-nrps* de *F. heterosporum*, juntamente com a porção NRPS do mesmo gene; na terceira está a construção (2) A2C, contendo a porção PKS e o ACP provenientes do gene *pks* selecionado, juntamente com a porção NRPS do gene *pks-nrps*. Na quarta barra está representada a construção (4) TA, que contém tanto o ACP proveniente do gene *pks* quanto do gene *pks-nrps*.

3.3.2.4 Obtenção do DNA fúngico – extração de DNA de *A. fumigatus*

O fungo *A. fumigatus* (linhagem Af293) foi cultivado em meio líquido PDB (caldo de batata e dextrose) por 3 dias. Decantou-se o micélio por centrifugação a 4.000 rpm por 15 min, e em seguida o sobrenadante foi removido. As células foram congeladas em nitrogênio líquido (aproximadamente 100 mg de peso úmido de material) e rompidas utilizando almofariz e pilão. O material foi transferido para tubo *ependorf*. A extração foi realizada utilizando um *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN). Ao tubo contendo o material fúngico, foram adicionados 400 µL de tampão AP1 e 4 µL de RNase A. Agitou-se em vórtex e incubou-se por 10 min a 65 °C. O tubo foi invertido 3 vezes durante o período de incubação. Em seguida, 130 µL de tampão AP2 foram adicionados e misturados ao material, e incubou-se por 5 min em banho de gelo. Após, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 min. O lisado (solução) foi pipetado em uma coluna QIAshredder contida em um tubo coletor de 2 mL e centrifugado por 2 min a 13.000 rpm. O fluido foi transferido para outro tubo limpo cuidadosamente para não ressolubilizar o sedimento. 1,5 volumes de tampão AP3/E foram adicionados e misturados com uma pipeta imediatamente. Foram transferidos 650 µL da mistura para uma

coluna DNeasy contida em um tubo coletor de 2 mL. Centrifugou-se a 8.400 rpm por 60 s. O fluido foi descartado e o processo foi repetido com a amostra restante. A coluna foi transferida para outro tubo coletor e 500 µL de tampão AW foram adicionados. Centrifugou-se novamente por 60 s a 8.400 rpm e o fluido foi descartado. Adicionaram-se outros 500 µL de tampão AW e centrifugou-se por 2 min a 13.000 rpm. A coluna foi removida do tubo coletor cuidadosamente e transferida para outro tubo de mesmo volume. Para eluir o DNA, adicionaram-se 100 µL de tampão AE e a coluna foi incubada à temperatura ambiente por 5 min. Centrifugou-se por 60 s a 8.400 rpm. Esse procedimento para a eluição do DNA da coluna foi repetido 3 vezes.

A concentração do DNA obtido foi medida em aparelho *NanoDrop*. O DNA foi estocado em freezer a -20 °C e foi mantida uma porção para uso a 4 °C.

A qualidade do DNA extraído foi verificada analisando-se o espectro de absorbância (no *NanoDrop*) e por eletroforese em gel de agarose (1% de agarose em tampão 1X TAE corado com 0,01% de brometo de etídio; corrida de 30 minutos a 100 V; revelação em UV), aplicando-se 10-25 µL da amostra de DNA com 10% de *6X DNA loading-dye double blue*, e comparando-se com a escala padrão *2-log DNA ladder*. As análises por eletroforese realizadas nas etapas seguintes do experimento foram feitas nessas mesmas condições, exceto que a revelação dos DNAs que seriam posteriormente extraídos do gel foi feita em luz azul.

3.3.2.5 Amplificação das diferentes regiões do gene *pks* através de PCR e extração dos fragmentos de DNA obtidos

A amplificação do DNA foi feita em termociclador seguindo o procedimento padronizado (Tabela 35) após várias análises de eficácia da reação.

O programa de ciclagem térmica utilizado foi o seguinte: 94 °C por 5 min para a primeira etapa de desnaturação; 34 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, e 68 °C por 8 min; e elongação final a 68 °C por 12 min. Após o término do programa de termociclagem, o termociclador foi mantido a 4 °C até a retirada dos tubos de reação.

Tabela 35. Protocolo padronizado para 50 µL de reação

Componente – concentração	Volume (µL)
cada <i>primer</i> - 20 µM	2,5 + 2,5
tampão <i>HiFi</i> 10X	4,5
MgSO ₄ - 50 µM	1,5
dNTP - 10 µM	1,0
DNA fúngico	1,5
enzima Taq <i>HiFi</i>	0,5
água	36,0

O controle da eficácia da reação de PCR foi feito através de eletroforese em gel de agarose. O tamanho do DNA amplificado deveria ser em torno de 7-8 Kbp.

Após a eletroforese, para extrair o DNA amplificado do gel, as bandas visíveis em luz azul foram cortadas (menor volume possível) e transferidas separadamente para colunas Millipore específicas para a extração de DNA de géis de agarose. Centrifugou-se por 10 min a 5.000 xg e mediu-se a concentração de DNA extraído em aparelho *NanoDrop*.

3.3.2.6 Recombinação genética em levedura – método de transformação de *Saccharomyces cerevisiae* usando lítio em altas concentrações

Esse procedimento foi realizado para introduzir o fragmento de DNA obtido através de PCR (fragmento do gene *pks*) no vetor contendo a porção NRPS do gene *pks-nrps*, o que é feito por *S. cerevisiae*.

Para isso, leveduras *S. cerevisiae* auxotróficas para uracila (linhagem BY4741) foram inoculadas em 10 mL de meio líquido YPD (levedura, peptona, dextrose) e incubadas overnight a 30 °C e 220 rpm. 0,5 mL da fase estacionária de células obtida foram usadas para inocular outros 10 mL de meio líquido YPD fresco. Essa cultura foi incubada a 30 °C, 220 rpm, durante 2 a 4 h (a densidade óptica a 600 nm (OD₆₀₀) inicial da cultura de 10 mL deve ser em torno de 1.0 e o final em torno de 4.0).

Enquanto a cultura de leveduras permaneceu em crescimento para atingir o estágio de crescimento desejado (fase logarítmica), o vetor a ser utilizado na transformação foi linearizado. Para isso, foi feita uma reação enzimática utilizando 6 µL de vector (100 ng.µL⁻¹) + 0,5 µL da enzima de restrição PmeI + 0,5 µL da enzima de restrição KpnI + 2 µL de tampão n° 4 + 1 µL de BSA 10X. A

reação foi incubada a 37 °C por 2 h. Após esse período, a reação foi interrompida desnaturando-se as enzimas a 67 °C por 20 min.

Quando a cultura de leveduras atingiu o crescimento desejado, centrifugou-se a 3.000 rpm por 5 min, e o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas em 5 mL de tampão TE e centrifugadas novamente (3.000 rpm por 5 min). Ressuspendeu-se em 5 mL de solução de lítio 1X e incubou-se por 10 min a temperatura ambiente.

Enquanto isso, condicionou-se o DNA de esperma de Salmão que seria utilizado posteriormente. Para isso, uma solução de DNA de esperma de Salmão (10 mg.mL⁻¹), estocada a -20 °C, foi fervida a 80-100 °C por 10 min (tempo necessário para a solução ficar completamente fluida), e em seguida, mantida em banho gelo até o momento do uso.

A suspensão de células em lítio foi centrifugada novamente nas mesmas condições, e após o descarte do sobrenadante pela inversão do tubo *Falcon*, as células foram ressuspensas no pequeno volume de solução de lítio ainda restante no tubo. Essa solução de células foi transferida para um tubo *ependorf* e mantida em gelo.

Em um tubo *ependorf* limpo foram adicionados 10 µL do vetor linearizado (600 ng), 10 µL de DNA obtido no PCR (900 ng), 50 µL de células de levedura e 7 µL de DNA de esperma de Salmão liquefeito (7 µg). A mistura foi completamente homogeneizada. Tudo foi mantido em gelo durante o procedimento. Em seguida, 450 µL de solução (40% PEG + 0,1 M lítio) foram adicionados aos tubos de reação. Após a homogeneização, os tubos foram incubados a 30 °C por 20 min sem agitação. Em seguida, as células sofreram choque térmico de 42 °C por 15 min, e então foram deixadas à temperatura ambiente.

Centrifugou-se a 4.000 rpm por 5 min, descartou-se cuidadosamente o sobrenadante (para não desmanchar o pellet) e as células foram lavadas em 500 µL de tampão TE. Centrifugou-se novamente e ressuspendeu-se em 400 µL de tampão TE.

Os 400 µL de células de levedura foram plaqueados em ágar SD (sintético definido) sem uracila. As placas foram incubadas de 2 a 3 dias.

Foram feitos todos os controles da transformação:

Controle de crescimento após as células sofrerem os processos de transformação:

- Controle positivo (PC) – células de levedura não transformadas (sem adição de vetor e fragmentos de DNA) foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar SD com 0,01% de uracila;
- Controle negativo (NC) - células de levedura não transformadas foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar SD sem uracila.

Controle de incorporação do DNA ao vetor e do vetor à levedura:

- Controle com vetor linearizado (LV) – adição do vetor linearizado em levedura sem a adição de nenhum fragmento de DNA;
- Controle com vetor circular (CV) – adição em levedura de vetor que não sofreu reação enzimática de linearização.

3.3.2.7 Isolamento de plasmídeo de levedura *S. cerevisiae*

Após o crescimento em ágar SD das leveduras que sofreram transformação (procedimento anterior), todas as colônias contidas em uma mesma placa foram raspadas e inoculadas em 10 mL de meio líquido SD, e incubadas a 220 rpm, 30 °C, durante 16 a 20 h. Para realizar a extração de plasmídeos de levedura *S. cerevisiae*, foi utilizado o *QIA prep spin miniprep kit* (QIAGEN) com pequenas alterações no procedimento.

As células de leveduras crescidas em meio líquido foram concentradas através de centrifugação por 5 min a 4.000 g. Após o descarte do sobrenadante, 250 µL de tampão P1 contendo 0,1 mg/mL de RNase e 100 µL de pérolas de vidro de 0.5 mm (Biospec Products, Inc.) foram adicionados às células e misturados em aparelho vortex por 5 min. O lisado celular foi mantido em repouso por alguns segundos para que as pérolas decantassem. O sobrenadante foi pipetado para um tubo de microcentrífuga limpo. Foram então adicionados 250 µL do tampão de lise P2 ao tubo, o qual foi invertido cuidadosamente 6 vezes para homogeneizar. O tubo foi deixado à temperatura ambiente por 5 min. Adicionaram-se 350 µL do tampão de neutralização N3 e o tubo foi invertido imediatamente, mas cuidadosamente, 6 vezes. O lisado foi centrifugado por 10 min a 13.000 rpm. O lisado límpido foi transferido para coluna QIAprep invertendo-se o tubo. Centrifugou-se por 3 min a 5.000 rpm e descartou-se o

sobrenadante. A coluna foi lavada com 500 µL de tampão PB (centrifugação a 13.000 rpm por 30 s). Em seguida, a coluna foi novamente lavada através da adição de 750 µL de tampão PE seguida de centrifugação por 60 s a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e centrifugou-se por 1 min adicional para remover completamente o etanol residual. Para eluir o DNA, a coluna foi transferida para um tubo *ependorf* limpo e 50 µL de água deionizada estéril foram adicionados ao centro da coluna. Após 1 min de incubação à temperatura ambiente, a coluna foi centrifugada a 13.000 rpm por 60 s. O procedimento para a eluição do DNA foi repetido 2 vezes. A concentração de DNA obtido foi medida em aparelho *NanoDrop*.

No procedimento de remoção da parede celular, alternativamente ao uso de pérolas de vidro, foi utilizada a enzima zimoliase que remove a parede por digestão. Para isso, as leveduras crescidas em meio líquido foram concentradas através de centrifugação por 5 min a 4.000 xg. Em seguida, as células foram suspensas em 5 volumes de solução estabilizadora A (sorbitol e DTT) sendo deixadas à temperatura ambiente por 10 min. Centrifugou-se a 1.500 g, 4 °C, por 10 min e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 2 volumes de solução estabilizadora B (sorbitol e DTT menos concentrado). Adicionou-se a enzima zimoliase na concentração de 250 U.mL⁻¹ e incubou-se a 30 °C por 30 min, misturando-se ocasionalmente. Após esse período, centrifugou-se os esferoplastos formados a 1.000 g, 4 °C, por 10 min. Estes foram lavados duas vezes com 5 volumes de solução estabilizadora B. Após o descarte do sobrenadante, 250 µL de tampão P1 com RNase foram adicionados às células e a suspensão foi transferida para um tubo *ependorf*. Foram então adicionados 250 µL do tampão P2, e inverteu-se cuidadosamente 6 vezes para homogeneizar. Adicionaram-se 350 µL do tampão N3 e o tubo foi invertido imediatamente, mas cuidadosamente, 6 vezes. O lisado foi centrifugado por 10 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para uma coluna QIAprep invertendo-se o tubo. O restante do procedimento foi feito como descrito anteriormente na extração utilizando pérolas de vidro.

3.3.2.8 Transformação de bactéria por eletroporação – transformação de *Escherichia coli* auxiliada por pulso elétrico

A transformação de bactéria foi realizada para se produzir maiores quantidades de plasmídeos provenientes de leveduras (procedimento anterior), ou produzir maior quantidade de vetor.

Para isso, 50 µL de células de *E. coli* eletrocompetentes (linhagem DH10β ou TOP10) foram transferidas para uma cuveta de eletroporação previamente mantida em gelo. Adicionou-se 1 µL (300 ng) do plasmídeo desejado (vetor, plasmídeo de levedura ou plasmídeo de bactéria) à cuveta e homogeneizou-se cuidadosamente sem pipetar. A mistura foi mantida em gelo por 5 min adicionais. Secou-se a cuveta e procedeu-se a eletroporação em eletroporador. O pulso lido no aparelho deve ser entre 4 e 6 mV. 350 µL de meio líquido SOC (caldo de extrato de levedura, triptona, dextrose e sais) foram adicionados imediatamente após a descarga elétrica. O meio contendo as células foi transferido para um tubo *ependorf* que foi incubado a 30 °C, 225 rpm por 1,5 h. Diferentes volumes de meio de cultivo (20 e 200 µL) foram plaqueados em placas de Petri contendo ágar LB (ágar de extrato de levedura, triptona e NaCl) com antibiótico ampicilina (1 µL de ampicilina a 50 mg.mL⁻¹ para cada 1 mL de meio). As placas foram incubadas *overnight* a 30 °C. Foi feito um controle negativo de crescimento transferindo células que não foram eletroporadas para uma placa contendo ágar LB com ampicilina.

3.3.2.8.1 Preparação de células eletrocompetentes

Bactérias *E. coli* das linhagens DH10β ou TOP10 foram crescidas em placas de Petri contendo ágar SOB (ágar de extrato de levedura, triptona e sais). Uma única colônia foi utilizada para inocular 5 mL de meio líquido SOB, o qual foi incubado *overnight* a 30 °C, 220 rpm. A OD₆₀₀ foi medida e uma determinada quantidade dessa cultura foi usada para inocular 50 mL de meio líquido SOB fresco, de modo que a OD₆₀₀ inicial da nova cultura fosse 0.015. A cultura permaneceu em crescimento a 30 °C, 220 rpm, até obter-se uma OD₆₀₀ entre 0.3 e 0.5 (tempo aproximado de 3-4h).

Todas as etapas posteriores foram realizadas em ambiente resfriado, e todos os frascos mantidos em gelo. Centrifugou-se a cultura a 3.000 rpm, 4 °C por 10 min, e o sobrenadante foi descartado vertendo-se o frasco cuidadosamente e retirando o líquido residual com uma pipeta. As células foram ressuspensas em 20 mL de glicerol a 10% gelado. Centrifugou-se e descartou-se o sobrenadante como descrito anteriormente. Esse procedimento foi repetido 3 vezes. As células foram então ressuspensas em 2 mL de glicerol a 10% gelado e mediu-se a OD₆₀₀. A OD₆₀₀ da solução final deve estar entre 6.0-7.5. Alíquotas de 100 µL da solução final de células foram transferidas para tubos *ependorf* previamente resfriados em gelo. Os tubos contendo as células eletrocompetentes foram estocados a -80 °C.

Medida da competência das células:

Adicionou-se 1 µL do plasmídeo padrão pUC19 (10 pg.µL⁻¹) a 50 µL de células de *E. coli* preparadas. Seguiram-se os mesmos procedimentos para realizar eletroporação, e então 20 µL de cultura foram plaqueadas em ágar LB contendo ampicilina. Mediu-se a eficiência da transformação através do número de colônias obtidas por µg de DNA adicionado na transformação.

3.3.2.9 Transformação química de bactéria – transformação de *E. coli* auxiliada por compostos químicos

Adicionou-se 1 µL (aprox. 300 ng) do plasmídeo desejado a um tubo *ependorf* contendo 50 µL de células quimicamente competentes (linhagem DH10β ou TOP10) e misturado cuidadosamente sem pipetar. Os tubos permaneceram em gelo por 30 min. As células sofreram choque térmico de 42 °C por 60 s, sem agitação. Em seguida, os tubos foram colocados em gelo por 2 min. Assepticamente, 250 µL de meio SOC pré-aquecido (30 °C) foram adicionados em cada tubo, e estes foram agitados horizontalmente a 225 rpm, 30 °C por 1,5 h. Diferentes volumes de meio de cultivo (20 e 200 µL) foram plaqueados em placas contendo ágar LB com ampicilina pré-aquecido à 30 °C. As placas foram incubadas *overnight* a 30 °C. Foi feito um controle negativo de crescimento transferindo células que não foram quimicamente transformadas a uma placa contendo ágar LB com ampicilina.

3.3.2.9.1 Preparação de células quimicamente competentes

Bactérias *E. coli* das linhagens foram crescidas em placas de Petri contendo ágar SOB. Uma única colônia foi utilizada para inocular 5 mL de meio líquido SOB, o qual foi incubado overnight a 30 °C, 220 rpm. A OD₆₀₀ foi medida e usou-se uma determinada quantidade dessa cultura para inocular 50 mL de meio líquido SOB fresco, de modo que a OD₆₀₀ inicial da nova cultura fosse 0.015. A cultura permaneceu em crescimento a 30 °C, 220 rpm, até OD₆₀₀ entre 0.3 e 0.5.

Centrifugou-se a 3.000 rpm, 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado vertendo-se o frasco cuidadosamente e retirando o líquido residual com uma pipeta. As células foram ressuspensas em 80 mL de tampão CCMB80 (glicerol e sais, incluindo CaCl₂) gelado. Incubou-se em gelo por 20 min. Centrifugou-se a 4 °C e descartou-se o sobrenadante como descrito anteriormente. As células foram ressuspensas em 2 mL de tampão CCMB80 gelado e mediu-se a OD₆₀₀. A OD₆₀₀ da solução final deve estar entre 6.0-7.5. Alíquotas de 100 µL da solução final de células foram transferidas para tubos *ependorf* previamente resfriados em gelo. Os tubos contendo as células quimicamente competentes foram estocados a -80 °C.

Medida da competência das células:

Basicamente, foi realizado o mesmo procedimento para se verificar a competência de células eletrocompetentes, entretanto, foi feita uma transformação química com o plasmídeo padrão pUC19, em vez de eletroporação.

3.3.2.10 Isolamento de plasmídeo de bactéria *E. coli*

Colônias individuais de bactérias *E. coli* transformadas por eletroporação ou transformação química (procedimentos anteriores) foram crescidas *overnight* (30 °C, 220 rpm) em 10 mL meio líquido LB com ampicilina (1 µL de ampicilina para cada 1 mL de meio), em tubos *Falcon* de 50 mL de capacidade. No dia seguinte, a cultura foi centrifugada a 4.000 rpm por 10 min para concentrar as células, e o sobrenadante foi descartado.

Para realizar a extração de plasmídeos de bactéria *E. coli*, foi utilizado um *QIA prep spin miniprep kit* (QIAGEN).

As células obtidas após a centrifugação foram ressuspensas em 250 µL de tampão P1 (com RNase) e transferidas para um tubo do tipo *eppendorf*. Foram então adicionados 250 µL do tampão P2, e inverteu-se cuidadosamente 6 vezes para homogeneizar. Adicionaram-se 350 µL do tampão N3 e o tubo foi invertido imediatamente, mas cuidadosamente, 6 vezes. O lisado foi centrifugado por 10 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para uma coluna QIAprep invertendo-se o tubo. Centrifugou-se por 30 s a 13.000 rpm e descartou-se o sobrenadante. A coluna foi lavada com 500 µL de tampão PB (centrifugação a 13.000 rpm por 30 s). Em seguida, a coluna foi novamente lavada através da adição de 750 µL de tampão PE seguida de centrifugação por 30 s a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e centrifugou-se por 1 min adicional. Para eluir o DNA, a coluna foi transferida para um tubo *eppendorf* limpo e 50 µL de água deionizada estéril foram adicionados ao centro da coluna. Após 1 min à temperatura ambiente, a coluna foi centrifugada a 13.000 rpm por 60 s. O procedimento para a eluição do DNA foi repetido 2 vezes. A concentração de DNA obtido foi medida em aparelho *NanoDrop*.

Nessa etapa, foi verificado se o plasmídeo extraído contém o fragmento de DNA introduzido no vetor, verificando-se o tamanho total do plasmídeo. Para isso, o plasmídeo foi cortado usando diferentes enzimas de restrição e os tamanhos dos fragmentos foram observados através de eletroforese em gel de agarose. Os diferentes fragmentos provenientes da digestão dos plasmídeos transformados foram comparados com os de um vetor não hibridizado, e o tamanho total dos plasmídeos pode ser calculado.

3.3.2.11 Recombinação genética em fungo – transformação de *F. heterosporum* pelo método de formação de protoplastos

Nessa etapa, a sequência genética construída nas etapas anteriores, a qual mimetiza a sequência completa um gene *pks-nrps*, foi incorporada ao genoma de *F. heterosporum* ATCC 74349.

Para isso, o fungo *F. heterosporum* foi crescido durante 4 dias em placa de Petri contendo meio PDA (batata, dextrose e ágar). Após esse período, 10 mL de

glicerol a 20% foram transferidos para a placa e raspou-se cuidadosamente para remover apenas os esporos. A suspensão de esporos foi filtrada em algodão e transferida para 1 L de meio PDB contido em frascos *Fernbach* de 2,8 L de capacidade. O frasco foi incubado a 30 °C, 225 rpm durante 18-24 h (tempo necessário para atingir o crescimento adequado). Após, todo o meio de cultura foi transferido para duas garrafas de 0,5 L e centrifugado em rotor JA-20 por 25 min a 5.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante. O precipitado celular foi transferido para dois tubos do tipo *Falcon* e centrifugado a 4.000 rpm por 15 min. Após descartar o sobrenadante, as células foram lavadas com 50 mL de NaCl 0,8 M tamponado. Centrifugou-se a 4.000 rpm por 10 min e descartou-se o sobrenadante. Esse procedimento de lavagem foi repetido 2 vezes.

Preparou-se a solução enzimática (contendo as enzimas yatalase e enzimas líticas de *Trichoderma harzianum*) para digestão da parede celular fúngica e formação dos protoplastos. Uma porção das células fúngicas lavadas foram transferidas para a solução enzimática e incubou-se a 30 °C, sob agitação de 80 rpm, durante 3-5 h (tempo necessário para observar a formação de protoplastos).

Enquanto os protoplastos eram formados, foi feita a reação para linearizar o plasmídeo de *E. coli* que seria usado para transformar o fungo. Para isso, adicionaram-se 8 µL de DNA (aproximadamente 10 µg) + 1 µL da enzima de restrição *Ascl* + 1 µL de tampão n° 4. A reação foi incubada a 37 °C por 2 h. Após esse período, a enzima foi desnaturada a 67 °C por 20 min.

A solução enzimática contendo os protoplastos recém-formados foi filtrada em algodão para remover pedaços de hifas resistentes à digestão. O filtrado foi centrifugado a 2.880 g por 10 min, 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Os protoplastos foram cuidadosamente lavados com 20 mL de tampão SC (sorbitol e CaCl₂) gelado, centrifugou-se a 2.880 g por 5 min e descartou-se o sobrenadante. Esse procedimento de lavagem foi repetido 2 vezes. O precipitado foi então ressuspenso em 500 µL de tampão SC/SPTC (sorbitol, polietilenoglicol, tampão tris e CaCl₂) gelado e transferido para um tubo do tipo *ependorf*. Os protoplastos foram contados em câmara de Neubauer e diluídos com tampão SC/SPTC até ser obtida uma suspensão de concentração final aproximada de 1.10^8 protoplastos.mL⁻¹. 100 µL dessa solução foram adicionados aos 10 µL, contendo 10 µg, de DNA de *E. coli* linearizado, misturados cuidadosamente e

mantidos em gelo por 30 min. Em seguida, 100 µL de tampão SPTC foi adicionado e misturado delicadamente invertendo-se o tubo algumas vezes. Os tubos ficaram em repouso à temperatura ambiente por 50 min. Após, adicionaram-se 500 µL de tampão SC, misturou-se e centrifugou-se a 4.600 rpm por 5 min. O precipitado foi lavado mais 2 vezes com 750 µL de tampão SC (centrifugando-se a 4.600 rpm por 5 min e descartando-se o sobrenadante), e então ressuspenso em 100 µL de tampão SC e separado em duas alíquotas de 50 µL cada. Foram adicionados 200 µL de caldo regenerador (caldo de sacarose e extrato de levedura) em cada alíquota, as quais foram incubadas a 30 °C, 120 rpm, durante 17-24 h. Após esse período, os 250 µL de protoplastos regenerados foram adicionados em uma placa de Petri vazia, seguidos pela adição de ágar regenerador seletivo (contendo higromicina B) levemente morno. As placas foram homogeneizadas cuidadosamente e incubadas a 30 °C por 4-6 dias.

Foi feito um controle negativo de crescimento transferindo-se protoplastos que não foram transformados (sem adição de DNA) para placas contendo ágar regenerador com higromicina B e um controle positivo de crescimento adicionando-se protoplastos não transformados, mas que sofreram todos os processos de transformação exceto a adição de DNA, em ágar regenerador sem higromicina B.

Após o período de incubação em ágar, as colônias transformadas que começaram a crescer foram individualmente transferidas para novas placas contendo meio PDA com higromicina B para excluir falsos positivos e selecionar apenas fungos transformados estáveis.

3.3.2.12 Cultivo de linhagens de *F. heterosporum* transformadas em farelo de milho e obtenção dos extratos brutos

Todos os procedimentos anteriores foram realizados tanto com construções feitas no vetor deg2 como no deg3. Entretanto, por motivos que serão discutidos, apenas linhagens transformadas com construções no deg3 foram cultivadas em farelo de milho.

O cultivo das linhagens transformadas e selvagem do fungo *F. heterosporum* foi realizado seguindo protocolos do laboratório do Dr. Schmidt, com pequenas alterações.

Linhagens estáveis de fungo transformado foram crescidas por 5 dias em meio PDA. Após esse período foram adicionados 1,5 mL de glicerol 20% em cada cultura e a placa foi raspada. Em seguida, 1 mL dessa suspensão foi transferido para um frasco *Erlenmeyer* de 500 mL de capacidade, contendo 30 g de farelo de milho e 80 mL de destilada, previamente autoclavados por 45 min. As culturas permaneceram incubadas em BOD por 21 dias. Após esse período, foram adicionados 200 mL de acetona em cada frasco, que permaneceu sob extração *overnight*. No dia seguinte, cada cultura foi sonicada por 15 min e filtrada a vácuo. Foram também adicionados 200 mL de metanol, e após aproximadamente 4 h, o solvente foi removido por filtração a vácuo e reunido à fração de acetona obtida anteriormente. Os solventes foram secos em rotaevaporador e assim, puderam ser obtidos os extratos brutos das linhagens transformadas estáveis. Também foi feita uma cultura com o fungo selvagem para ser usada como controle e um outro controle contendo apenas o meio de cultivo. Dessa forma, foram obtidos os extratos brutos das linhagens transformadas, da linhagem selvagem e do controle do meio.

3.3.2.13.1 Fracionamento dos extratos brutos das linhagens transformadas

Após uma análise inicial, os extratos brutos foram fracionados em colunas SPE de fase reversa DSC-18 Supelco® de 2 g, utilizando o sistema a vácuo da Supelco®. A coluna foi primeiramente acondicionada com 10 mL de metanol, seguidos de 20 mL de água. Após a adição da amostra, a coluna foi eluída com os sistemas solventes: (1) 10 mL de água, (2) 10 mL de metanol:água 1:1, (3) 10 mL de metanol, (4) 10 mL de acetona. Assim, foram obtidas 4 frações a partir de cada extrato bruto.

3.3.2.14 Análise química dos extratos brutos e das frações obtidas

Os extratos brutos obtidos foram analisados comparativamente por CCDA em fase normal com revelação em UV (254 e 365 nm) e cloreto férrico, e HPLC-DAD em fase reversa (coluna C18 e gradiente de acetonitrila em água). As frações foram analisadas da mesma maneira que os extratos, e também por UPLC-MS.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.2 Considerações gerais de processos: planejamento das construções, construção de vetores, escolha de genes para fusão no vetor, desenho de *primers*, extração de DNA e amplificação de DNA por PCR

As construções foram planejadas de modo a gerar um novo gene *pks-nrps* responsável pela produção de um composto químico que possa ser facilmente identificado pelas técnicas analíticas devido à presença do ácido tetrâmico, o qual funcionaria como um marcador químico-genético, e assim, o produto críptico do gene *pks* que foi introduzido nessas construções poderia ser identificado.

Os vetores utilizados nos estudos de hibridização já haviam sido construídos e contêm todas as sequências genéticas necessárias para serem utilizados eficientemente. Vale ressaltar que os vetores que foram utilizados nesse estudo contêm 3 diferentes marcadores, sendo eles ampicilina, uracila e higromicina B, porque em distintas etapas do processo deveriam ser capazes de replicar em 3 micro-organismos diferentes: bactéria, levedura e fungo filamentoso, e assim capacitarem os micro-organismos transformados a crescerem num meio seletivo. Além disso, esses vetores possuem inúmeras regiões de restrições para que a linearização enzimática do vetor, para diversos fins, possa ser realizada por toda a sua extensão. O vetor contém a sequência completa da porção NRPS do gene *pks-nrps* de *F. heterosporum*, portanto a ligação do gene *pks* críptico de *A. fumigatus* a diferentes regiões da porção NRPS será ditada pela sequência homóloga contida no *reverse primer*.

Para a escolha do *pks* críptico foram apenas consideradas linhagens já contidas no laboratório ou comerciais, as quais poderiam ser adquiridas facilmente. Isso se deve ao fato de que o estudo realizado não utilizou apenas bioinformática, assim os genes selecionados para serem estudados deveriam ser amplificados em laboratório a partir da linhagem que os continha. Além disso, esses genes deveriam ter sido sequenciados e anotados (dados contidos no *GenBank*) para que as informações detalhadas e necessárias para os estudos de hibridização pudessem ser acessadas.

O intuito de se realizar cinco diferentes construções foi tentar superar problemas de inadequação no ponto de fusão do gene *pks* de *A. fumigatus* com a

porção NRPS do gene *pks-nrps* de *F. heterosporum*. Sabe-se que o domínio ACP presente entre os módulos PKS e NRPS de uma enzima híbrida é fundamental para a transferência do policetídeo sintetizado pelo módulo PKS para o módulo NRPS. Da mesma forma, o domínio ACP do C-terminal da enzima (outras nomenclaturas também são usadas para esse domínio terminal) é de extrema importância para a liberação do produto recém formado, e fusões genéticas que causem inativação desse domínio não irão levar ao produto final esperado. Assim, quatro diferentes fusões de ACP entre os módulos foram realizadas, uma contendo apenas a porção ACP do gene *pks* de *A. fumigatus* (construção 2 - A2C), uma contendo apenas a porção ACP do gene *pks-nrps* de *F. heterosporum* (construção 3 - K2A), uma contendo ambas as porções ACP completas do gene *pks* e *pks-nrps* (construção 4 - TA) e uma contendo uma parte da porção ACP do gene *pks* unida a uma parte da porção ACP do gene *pks-nrps* (construção 5 - HA). Além disso, como controle, foi feita uma construção contendo a sequência completa do gene *pks*, seguida de um *stop codon*, no caso TAA, mantendo-se também toda a porção NRPS do gene *pks-nrps* (construção 1 - PKS). Nessa construção, devido à presença do *stop codon*, apenas o produto da porção PKS deveria ser sintetizado, ou seja, o próprio policetídeo críptico.

O início e o final das sequências de aminoácidos de cada domínio presente nas enzimas pôde ser obtido no *GenBank* (Figura 120), entretanto, para determinar exatamente os pontos de fusão de uma sequência a outra é necessário fazer o alinhamento de várias sequências homólogas para localizar as regiões de consenso dentro das sequências (Figura 121). Sequências de consenso são sequências de aminoácidos altamente conservadas dentro de um domínio protéico e estão diretamente associadas à função enzimática. Assim, essas regiões não devem ser alteradas durante a hibridização. Conectando essas regiões altamente conservadas existem regiões com alta variabilidade de aminoácidos que são associadas às porções *linkers*, que podem conectar domínios, módulos ou ORFs. São essas regiões que devem ser usadas como pontos de fusão durante a hibridização (Figura 121). Diversos programas podem ser usados para se realizar o alinhamento múltiplo de sequências, nesse caso, foi usado o programa *ClustalX2*. Assim que o ponto de fusão de aminoácidos foi determinado usando esse programa, foi verificada a sequência de nucleotídeos correspondente a essa sequência de aminoácidos, com o auxílio do programa

Sequencher 5.0 (outros programas para sequenciamento podem ser usados), e os *primers* puderam então ser desenhados.

Region	12..447 /region_name="PKS_KS" /note="Beta-ketoacyl synthase; smart00825" /db_xref="CDD:197895"
Site	order(182,321,367) /site_type="active" /db_xref="CDD:29420"
Region	552..839 /region_name="fabD" /note="malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase; TIGR00128" /db_xref="CDD:199994"
Region	556..861 /region_name="PKS_AT" /note="Acyl transferase domain in polyketide synthase (PKS) enzymes; smart00827" /db_xref="CDD:197897"
Region	936..1109 /region_name="PKS_DH" /note="Dehydratase domain in polyketide synthase (PKS) enzymes; smart00826" /db_xref="CDD:197896"

Figura 120. Anotações de alguns dos domínios contidos na enzima equisetina-sintetase de *F. heterosporum*. Na figura são ordenados, a partir da sequência completa de aminoácidos da respectiva proteína, os aminoácidos iniciais e finais que correspondem a quatro domínios presentes nessa proteína. A sequência completa de aminoácidos e as regiões correspondentes a todos os domínios da enzima podem ser acessados através do *GenBank* na página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAV66106.2>.

Figura 121. Alinhamento de quatro sequências homólogas de genes *pks* (LNKS_A e PKS_A) e genes *pks-nrps* (equisetin e pseurotinA-precursor) utilizando o programa *ClustalX2*. A região inicial mostrada na figura representa a porção ACP altamente conservada desses genes (sequência de consenso) enquanto que a região posterior, destacada em cinza, é pouco conservada e representa um possível *linker*, região supostamente mais adequada para serem realizadas fusões funcionais.

As características que um *primer* deve apresentar foram consideradas durante o desenho dos *primers* utilizados, e programas e ferramentas como *ClustalW*, *oligo tm calculator*, *complementary sequence conversion tool* e outros

foram utilizados. Em divergência ao tamanho convencional de um *primer*, os *primers* desenhados contêm em torno de 60 nucleotídeos, pois possuem tanto uma sequência de nucleotídeos responsável por amplificar a região desejada do gene *pks* de *A. fumigatus*, contendo em torno de 20 nucleotídeos, quanto uma sequência de nucleotídeos que é homóloga à região do vetor onde essa sequência deve ser inserida. Esta porção do *primer* contém em torno de 40 nucleotídeos para evitar o emparelhamento aleatório em regiões não desejadas. Para determinar a temperatura de fusão (T_m) dos pares de *primers* apenas a sequência de 20 nucleotídeos foi considerada, pois é a sequência que efetivamente irá se ligar ao DNA fúngico na reação de polimerização do DNA.

Durante a extração do DNA, o ponto crucial é assegurar que o processo enzimático celular seja imediatamente inativo no início da lise para que não ocorra degradação do DNA e perda da qualidade do material. Além disso, deve-se garantir que a parede celular seja efetivamente rompida para que o material genético possa ser liberado e, ainda, que enzimas RNases sejam adicionadas para degradar o RNA presente que poderia interferir na quantificação do DNA e mesmo na sua amplificação por PCR.

Na reação de PCR algumas importantes considerações também devem ser feitas. A temperatura de anelamento (*Tanneal*) deve ser ajustada com base na T_m dos *primers*, sendo a *Tanneal* teórica 4 °C menor que T_m . Considerando que a T_m dos pares de *primers* é de 58 °C, diferentes *Tanneal* inferiores a 58 °C foram testadas e optou-se por usar uma *Tanneal* de 55 °C. Além disso, o tempo de alongação durante a ciclagem deve ser suficiente para que a enzima DNA-polimerase possa polimerizar toda a extensão de um determinado fragmento de DNA entre os *primers*. Portanto, devem ser consideradas a velocidade de polimerização da enzima utilizada (1000 bases min⁻¹) e o comprimento do fragmento de DNA que varia de 7-8 Kbp, nesse caso. Assim, o tempo de alongação foi ajustado para 8 min em todos os experimentos. Deve-se também atentar para a concentração dos reagentes utilizados na reação, tendo-se em mente que alterações nas concentrações destes podem alterar a eficiência de formação dos produtos, ou mesmo tornar a reação ineficiente.

3.4.3 Primers utilizados nos vetores deg2 e deg3

O *forward primer* é sempre igual e foi utilizado em todas as construções de um mesmo vetor, pois o ponto de fusão da sequência é sempre o mesmo, ou seja, o final do promotor do gene *pks-nrps* (já contido no vetor) com o início da porção KS do gene *pks* a ser introduzido no vetor. Entretanto, todos os *reverse primers* são diferentes porque devem unir diferentes partes do gene *pks* com diferentes regiões da porção NRPS do gene *pks-nrps* contida no vetor.

Construções no vetor deg2

O *forward primer* para o vetor deg2 foi desenhado da seguinte maneira:

- Parte final da sequência de nucleotídeos do promotor do gene deg2 (já contida no vetor): attaccttctccagatcatcaactggctctgctgctgatc
- Parte inicial da sequência de nucleotídeos do início da porção KS do gene *pks* selecionado: atgaaccaatcgccattatacgca

Unindo-se o final da primeira sequência (promotor) com o início da segunda (porção KS) é obtida a sequência:

- *forward primer* (5' → 3'):

ccttctccagatcatcaactggctctgctgctgatcatgaaccaatcgccattatacg

Para desenhar o *reverse primer*, de maneira similar ao modo como foi desenhado o *forward primer*, é unida a porção desejada do gene *pks* à porção NRPS do gene *pks-nrps* (já contida no vetor). Entretanto, a sequência do *reverse primer* será inversa e complementar à sequência desejada. Assim, foram obtidos os *reverse primers*:

- Construção 1- PKS: essa construção não foi realizada no vetor deg2

- Construção 2- A2C - *reverse primer* (5' → 3'):

atggatgtacaagtctcggctgatggcgctctggtaggggatcaagccgactcaata

- Construção 3- K2A - *reverse primer* (5' → 3'):

agtcttgagctgcactcgcaccggcacctttgatgatgcagatctgccttttaaatcacctgt

- Construção 4- TA - *reverse primer* (5' → 3'):

cttgagctgcactcgcaccggcacctttgatgatgcagaggcaacctctgtgcattga

- Construção 5- HA - *reverse primer* (5' → 3'):

ccagctcttcatgaaccaggatcgaatgtccaaagcaaccaagctgtcgacacccatgtcc

Construções no vetor deg3

Similarmente foram desenhados os *primers* para realizar as construções no vetor deg3:

- *forward primer* (5' → 3') (utilizado em todas as construções):

ttgcagattttattaccgtcccatgtgcagcttgcttgacaatgaaccaatcgccattatacg

- Construção 1- PKS - *reverse primer* (5' → 3'):

cggcaagttgtactctcaccggcacagtagatgtctttccttaggcaacctcctgtgcatt

- Construção 2- A2C - *reverse primer* (5' → 3'):

ggcttgagtcttgacgggtcccaagatgtcaagggagtgccgggatcaagccgactcaata

- Construção 3- K2A - *reverse primer* (5' → 3'):

cggcaagttgtactctcaccggcacagtagatgtctttcctctgccttttaaatcacctgt

- Construção 4- TA - *reverse primer* (5' → 3'):

cggcaagttgtactctcaccggcacagtagatgtctttccggcaacctcctgtgcatt

- Construção 5- HA - *reverse primer* (5' → 3'):

cttgagctgcactcgcaccggcacctttgatgatgcagaggcaacctcctgtgcattga

3.4.4 Recombinação genética em *S. cerevisiae* e extração de plasmídeos de leveduras

O fragmento de DNA da porção desejada do gene *pks* foi introduzido no vetor através de recombinação por homologia realizada em *S. cerevisiae*.

A técnica de transformação de levedura utilizando lítio em altas concentrações baseia-se na capacidade do lítio de provocar a desorganização da parede celular, aumentando a capacidade de difusão do DNA para o interior da célula. Adicionalmente, as altas concentrações de PEG ajudam a desestabilizar a membrana plasmática tornando-a mais permeável, enquanto que o DNA de esperma de Salmão ajuda a carrear o fragmento de DNA previamente amplificado por PCR para o interior da célula.

Nesses experimentos foram utilizadas leveduras auxotróficas para uracila, ou seja, leveduras que necessitam obter do meio de cultivo a uracila necessária ao seu crescimento.

Previamente à reação de transformação, o vetor foi linearizado através de reação enzimática em uma região entre as posições que se desejava adicionar o fragmento de DNA.

O controle positivo foi realizado para verificar se o processo em si não danificou as células microbianas e impediu seu crescimento, portanto, foram utilizadas células que passaram por todo o processo de transformação mas não receberam vetor ou fragmento de DNA, e portanto, não foram transformadas. Essas células de leveduras foram inoculadas em meio contendo 0,01% de uracila, e o crescimento indica que as células estão íntegras após o processo de transformação.

O controle negativo foi realizado para verificar se as células auxotróficas não transformadas, por alguma razão, adquiriram a capacidade de crescer em meio sem suplementação de uracila. Assim é esperado que as células não transformadas não cresçam nesse controle.

Além disso, foram feitos mais dois controles, que são de extrema importância para avaliar a eficácia do processo. Um deles é o controle com vetor linearizado, em que foi adicionado às células de levedura o vetor que foi linearizado mas não foi adicionado o fragmento de DNA; e outro é o controle com vetor circular, em que o vetor adicionado na reação de transformação não sofreu prévia linearização. As células de ambos os controles são inoculadas em meio de cultura sem uracila. No caso do controle com vetor circular é esperado que muitas colônias sejam formadas após inoculação em meio de cultivo seletivo (Figura 122), pois o vetor circular incorporado à célula de levedura já está pronto para sofrer replicação. No caso do controle com vetor linearizado, é esperado que nenhuma ou poucas colônias sejam formadas (Figura 122), pois é necessário que o vetor se torne circular novamente para ser então replicado no interior da levedura, e a probabilidade de ocorrer auto-recombinação aleatória entre as duas extremidades do vetor linearizado é muito pequena. Se o número de colônias observadas for elevado é um forte indício de que o processo de linearização do vetor não foi eficaz.

No caso de leveduras que foram transformadas recebendo tanto o vetor linearizado quanto o fragmento de DNA contendo uma sequência homóloga ao vetor de aproximadamente 40 nucleotídeos em cada extremidade, é de se esperar que a probabilidade de ocorrer recombinação por homologia do vetor

com o DNA é muito maior do que a auto-recombinação de um vetor linearizado. Considerando que o processo de recombinação do vetor com o DNA não é 100% efetivo, a taxa de crescimento celular no controle com vetor circular deve ser maior que das células transformadas com o fragmento de DNA (Figura 122).

Dessa maneira, comparando-se o crescimento de leveduras nesses dois últimos controles mencionados com o de leveduras supostamente transformadas com o DNA exógeno, pode-se prever se o processo de transformação com a incorporação do DNA desejado foi eficaz ou não.

Após o aparecimento das colônias, as placas foram completamente raspadas, obtendo-se a maior quantidade possível de células, e estas foram transferidas e crescidas em meio líquido sem uracila para a posterior extração dos plasmídeos. Quando a transformação é realizada em leveduras, a maior quantidade possível de material deve ser transferida para o meio líquido, sem a preocupação de tentar obter apenas uma colônia isolada. Isso se deve ao fato de que a produção de plasmídeos em leveduras é muito menor que em bactérias, sendo insuficiente para a próxima etapa de transformação caso apenas uma colônia seja selecionada. Além disso, as leveduras comercialmente disponíveis para transformação não estão livres de plasmídeos constitutivos, o que significa que o material final extraído não irá conter apenas plasmídeos que foram introduzidos no processo de transformação. Assim sendo, a concentração real dos plasmídeos não constitutivos dentro da amostra será ainda menor que a concentração total obtida, que normalmente já é bastante baixa.

Figura 122. Após o processo de recombinação genética em leveduras, em placas de Petri contendo ágar SD sem uracila, foram inoculados o controle com vetor linearizado (LV), o controle com vetor circular (CV) e leveduras transformadas com fragmento de DNA equivalente à construção 2- A2C (2).

A etapa crucial no processo de extração dos plasmídeos de levedura é o rompimento da rígida parede celular, que muitas vezes por ser ineficiente resulta em baixo rendimento de extração. Inicialmente, no laboratório eram utilizadas pérolas de vidro para realizar o rompimento mecânico dessas paredes, mas posteriormente, a metodologia foi modificada e passou-se a utilizar a enzima lítica zimoliase (ou liticase) que é capaz de degradar a parede celular de leveduras, e a partir de então, os rendimentos após a extração foi significativamente superiores. O restante do procedimento de extração foi realizado com *kits* comerciais que contém os reagentes necessários para obter os plasmídeos em grau de pureza adequado para posteriores etapas de transformações, mas para isso cada etapa do manual de instruções deve ser rigorosamente seguida. Como mencionado acima, a extração de plasmídeos de levedura pode apresentar baixos rendimentos, entretanto, e contraditoriamente, algumas vezes os rendimentos são muito maiores que o esperado. Altas concentrações de DNA após a extração também são indesejadas pois muito comumente o DNA sendo medido corresponde ao DNA cromossômico que foi extraído juntamente com os plasmídeos, indicando ineficácia no processo de extração (precipitação incompleta do DNA cromossômico ou ressolubilização deste durante o processo). Nesse caso, a concentração medida não é condizente com a concentração de DNA de plasmídeos na amostra, e isso pode afetar manipulações posteriores, em que uma concentração insuficiente de plasmídeos poderia estar sendo usada, além da possível interferência da presença de DNA cromossômico durante as transformações.

3.4.5 Transformação de *E. coli* e isolamento de plasmídeo de bactéria

O processo de transformação de leveduras sempre resulta em baixos rendimentos de plasmídeos, em concentrações insuficientes para a etapa posterior de transformação do fungo filamentoso. Assim, é necessário primeiro realizar uma transformação em bactéria para que possam ser obtidos plasmídeos em maiores quantidades, e além disso, em maior grau de pureza. A transformação em *E. coli* também foi utilizada para se produzir maiores quantidades dos vetores não transformados que seriam inicialmente empregados nos processos de transformação.

As bactérias *E. coli* foram transformadas através de eletroporação ou transformação química com os plasmídeos previamente extraídos de leveduras. Normalmente, a eletroporação é mais indicada para introduzir plasmídeos de tamanho elevado em *E. coli*, mas durante os experimentos, ambos processos de transformação foram eficientes para transformar bactérias com os plasmídeos de aproximadamente 22 Kbp (vetor deg2 = 13,5 kbp; vetor deg3 = 14,5 Kbp; fragmento de *pks* introduzido = 7-8 Kbp).

Anteriormente à transformação, foram preparadas células competentes de bactérias, ou seja, células que foram tratadas para se tornarem capazes de ser transformadas. Para o processo de eletroporação, é importante que sejam removidos das células todos os sais residuais do meio de cultivo em que elas foram crescidas, pois o processo de eletroporação é baseado na despolarização da membrana plasmática devido a passagem de um pulso elétrico de curtíssima duração, e a presença de sais, que possuem carga elétrica em solução, após serem dissociados, pode interferir nesse processo. Já o processo de transformação química é baseado na introdução de DNA exógeno em bactérias quimicamente competentes através de um choque térmico. Para que o DNA possa penetrar nas células, estas devem ser previamente tratadas com uma solução de glicerol contendo íons divalentes, como Ca^{2+} do CaCl_2 , que irão desestabilizar a membrana plasmática das células, tornando-as mais susceptíveis ao influxo de materiais. Imediatamente após a transformação química ou elétrica, é importante que seja adicionado às células meio rico em nutrientes para recuperar as células e ainda, que estas sejam altamente aeradas. Deve-se ter em mente que todas as manipulações devem ser realizadas com delicadeza pois as células transformadas são extremamente frágeis.

As bactérias que sofreram o processo de transformação foram transferidas para placas de Petri contendo meio com o antibiótico ampicilina. Bactérias que foram verdadeiramente transformadas, ou seja, receberam o plasmídeo contendo o marcador seletivo para ampicilina foram capazes de crescer no meio contendo o antibiótico, enquanto que as não transformadas não cresceram (assim foram feitos os controles do processo de transformação).

Após o crescimento em placa, as colônias foram individualmente selecionadas e transferidas para meio líquido contendo antibiótico, onde cresceram para posteriormente terem seus plasmídeos extraídos. Nessa etapa é

importante obter os plasmídeos oriundos de uma única colônia pois a partir daí podem ser obtidos plasmídeos puros. O processo de extração foi realizado com *kits* comerciais e é bastante simples desde que todas as instruções sejam seguidas. Nessa etapa foi verificado se o plasmídeo extraído continha o fragmento de DNA introduzido no vetor. A presença do DNA foi confirmada indiretamente através do tamanho total do plasmídeo obtido, que é a maneira mais simples. Assim, o plasmídeo foi cortado usando as enzimas de restrição *Ascl*, *NotI*-HF e *PacI* (outras também foram usadas em diferentes experimentos) e os tamanhos dos fragmentos foram observados e comparados com os de um vetor não hibridizado (Figura 123). Um vetor sem incorporação de DNA quando cortado simultaneamente por essas enzimas deve resultar em fragmentos de 3.762, 3.887 e 6.858 bp de comprimento, enquanto que vetores em que o DNA foi incorporado devem originar fragmentos de comprimento 3.762, 3.887 e um fragmento maior em torno de 14.000 bp (o tamanho varia ligeiramente dependendo da construção). Os fragmentos de 3.762 e 3.887, presentes tanto em vetores sem DNA quanto em vetores com DNA incorporado, são vistos em gel de agarose como uma única banda alargada e mais intensa, pois essa banda corresponde a 2 fragmentos de tamanhos parecidos (Figura 123). Em vetores sem DNA, próximo a essa banda, pode ser visualizada a banda do fragmento de 6.858 bp, enquanto que em vetores nos quais o DNA foi incorporado, será vista uma banda mais distante, de menor taxa de eluição, correspondente à banda de aproximadamente 14.000 bp (Figura 123). Pela análise por eletroforese em gel de agarose mostrada na figura 123, pôde-se verificar que apenas em um dos três diferentes plasmídeos provenientes de *E. coli* da construção 1 foi incorporado o DNA exógeno, pois os outros dois plasmídeos (poços 2 e 3) são iguais aos controles com o vetor sem DNA (poços 17, 18 e 19). Entretanto, todos os três plasmídeos provenientes das construções 2, 3, 4 e 5 contém o DNA incorporado.

Figura 123. Eletroforese em gel de agarose de plasmídeos de *E. coli* linearizados simultaneamente pelas enzimas de restrição *AscI*, *NotI*-HF e *PacI*. Cada sequência de 3 poços correspondem a três diferentes plasmídeos provenientes de uma mesma construção no vetor *deg3*. Os poços 1, 2 e 3 correspondem a plasmídeos da construção 1; os poços 4, 5 e 6 são da construção 2; os poços 7, 8 e 10 são da construção 3; os poços 11, 12 e 13 são da construção 4; os poços 14, 15 e 16 são da construção 5; os poços 17, 18 e 19 são de vetor controle sem adição de DNA; e o poço 9 é a escala padrão *2-log DNA ladder* (a resolução do padrão não ficou boa).

3.4.6 Recombinação genética em fungo *F. heterosporum*

Esta foi a etapa mais complexa do processo, apresentando vários pontos de entrave e resultando em baixa eficiência de transformação fúngica.

Para a transformação, uma quantidade razoavelmente elevada de plasmídeos (aproximadamente 10 µg) é necessária, o que requer uma adequada eficiência de transformação e rendimento de extração das etapas anteriores. Além disso, o processo de formação e manipulação dos protoplastos requer certa experiência do manipulador. O tempo de crescimento do fungo em cultura não pode ser muito elevado, pois sua parede celular pode tornar-se resistente à digestão enzimática, e impossibilitar a formação dos protoplastos, e ainda, a presença de hifas íntegras na suspensão de protoplastos, devido a digestão incompleta, pode interferir no processo de transformação fúngica. A manipulação dos protoplastos deve ser realizada de forma cuidadosa já que as células são muito frágeis devido à ausência de parede celular. Sendo assim, movimentos de homogeneização mais rigorosos podem destruí-los e diminuir a eficiência da transformação.

Algumas considerações a respeito de como ocorre a transformação fúngica devem ser feitas para que os resultados obtidos possam ser interpretados corretamente:

- a) a inserção em *F. heterosporum* de DNA exógeno ocorre através de recombinação ectópica (ou não homóloga), ou seja, o DNA é inserido aleatoriamente em qualquer local do genoma fúngico. Há a possibilidade de que o DNA exógeno seja incorporado no local original do gene *pks-nrps* constitutivo, mas ainda assim não será uma recombinação homóloga, pois ocorrerá ao acaso. Caso a incorporação do DNA cause rompimento na sequência do gene *pks-nrps* constitutivo, este gene pode se tornar inativo e, em consequência, o seu produto (equisetina) não ser mais observado nos cultivos com o fungo transformado;
- b) para que o gene construído seja inserido corretamente no genoma do fungo e seu produto seja, possivelmente, observado nos cultivos, é necessário que previamente à etapa de transformação, o plasmídeo seja linearizado em uma posição adequada, ou seja, qualquer região do plasmídeo que não pertença à construção genética realizada que contém o promotor do gene *pks-nrps*, o gene *pks* inserido e a porção NRPS do gene *pks-nrps*. Considerando que o DNA exógeno não pode ser incorporado ao DNA do fungo na forma circular, um plasmídeo não linearizado seria clivado pelo fungo aleatoriamente, e isso poderia causar ruptura da sequência genética construída;
- c) essa sequência construída contém o componente necessário para que sua transcrição seja iniciada no fungo, o promotor do gene, e uma vez que o promotor foi ativado, é esperado que toda a sequência genética subsequente seja transcrita. Além disso, é esperado que o próprio fungo contenha toda a maquinaria genética necessária para o processo de transcrição. O gene *pks* inserido no vetor contém íntrons em sua sequência, assim como a porção NRPS do gene *pks-nrps* (apenas no caso do vetor *deg3*), que devem ser removidos durante o processo de *splicing* realizado pelo fungo. Devido aos genes inseridos serem de origem fúngica, o fungo *F. heterosporum* deveria reconhecer as sequências conservadas de íntrons fúngicos e fazer o *splicing* nas posições corretas, unindo os êxons de forma a não alterar a fase de leitura, resultando numa enzima PKS-NRPS funcional.

Assim como na transformação de leveduras, foi feito um controle negativo para confirmar que fungos não transformados não são capazes de crescer em

meio contendo o antibiótico higromicina B, e um controle positivo sem antibiótico para verificar se o próprio processo de transformação incapacitou as células de crescer normalmente. Esse controle é especialmente importante durante a transformação fúngica pois o processo todo de transformação envolve muitas etapas de manipulação com os protoplastos, o que pode torná-los inviáveis, ou seja, incapazes de se regenerar para dar origem a estrutura fúngica completa. Os fungos transformados que foram capazes de crescer em meio regenerador contendo higromicina B foram transferidos para meio PDA contendo esse antibiótico (Figura 124) para confirmar que esses fungos apresentam transformações estáveis, já que poderia acontecer de alguns fungos terem sido transformados e crescerem em um primeiro momento, mas subsequentemente, perderem a capacidade de replicar o DNA exôgeno e em consequência, deixarem de ser resistentes ao antibiótico de seleção.

Após as recombinações genéticas foram obtidas linhagens estáveis contendo todas as construções no vetor deg3, exceto a construção 2- A2C, que não pode ser obtida mesmo após dois procedimentos de transformação. Sendo assim, foi dada continuidade nos experimentos mesmo sem essa construção. Os trabalhos com o vetor deg2 foram interrompidos logo após a transformação do fungo, antes mesmo da obtenção de linhagens estáveis contendo construções no vetor deg2.

Figura 124. Placas de Petri contendo o fungo transformado com a construção 4-TA. Alguns dias após o processo de transformação, as colônias transformadas começam a aparecer no meio regenerador contendo antibiótico (A); individualmente, essas colônias são transferidas pra meio PDA com antibiótico (B).

3.4.7 Seleção de construções no vetor deg3 em detrimento ao deg2

O vetor deg2 foi desenhado no laboratório do Dr. Schmidt e construído por outro laboratório há alguns anos atrás. A sequência genética da porção NRPS do gene *pks-nrps* de *F. heterosporum*, a qual foi inserida no vetor deg2, foi baseada no sequenciamento genético desse fungo realizado há aproximadamente 10 anos atrás, a partir do qual foram encontrados no genoma de *F. heterosporum* três genes para PKS (SIMS et al., 2005), denominados deg1, deg2 e deg3. Por RT-PCR, foi determinado que apenas o deg2 era expresso durante a biossíntese de equisetina, sendo, portanto, o mais provável gene envolvido em sua biossíntese. Foi verificado que esse gene era um híbrido *pks-nrps*. Assim sendo, o vetor foi construído utilizando o gene deg2. Recentemente, utilizando métodos mais modernos de sequenciamento, a porção do vetor contendo parte do gene *pks-nrps* de *F. heterosporum* foi novamente sequenciada, assim como o fungo todo (SCHMIDT, comunicação pessoal). Verificou-se que o vetor deg2, na verdade, continha a sequência do gene deg2 com alguns erros, no caso a deleção de um nucleotídeo em uma sequência e a inserção de um nucleotídeo em outra sequência, ambas presentes na região ACP do gene. Esse erro na sequência genética contida no vetor resultaria na formação de uma proteína contendo 14 aminoácidos incorretos, o que poderia afetar a função dessa enzima. Assim, foi preciso corrigir a sequência original do vetor deg2 para que o trabalho pudesse continuar sendo feito. Além disso, após o sequenciamento mais recente do fungo, foi verificado que o gene deg3 também é um gene híbrido *pks-nrps*. Desde então, surgiu a possibilidade de que esse gene fosse responsável pela biossíntese do composto equisetina, e não o gene deg2, ou ainda, ambos poderiam estar envolvidos na biossíntese. O grupo do Dr. Schmidt trabalhou intensivamente para confirmar alguma das hipóteses, e para complementar as investigações, foi criado o vetor deg3 contendo a porção NRPS do gene recentemente descoberto, deg3, e seu promotor. Algumas evidências que surgiram quando o grupo começou a investigar simultaneamente os genes deg2 e deg3 (através de manipulações com os vetores deg2 e deg3) sugeriam que o gene deg3 poderia estar mais diretamente envolvido na biossíntese da equisetina. Desde então o vetor deg3 foi selecionado para continuar sendo investigado em meus trabalhos, enquanto que no grupo do Dr. Schmidt ambos

continuaram sendo investigados. Todas as construções foram refeitas utilizando o vetor *deg3*, e finalmente a transformação do fungo *F. heterosporum* pode ser feita, dessa vez com as construções genéticas que continha a parte do gene *pks-nrps deg3*.

Assim, como mencionado em materiais e métodos, todas as etapas de manipulação genética foram feitas tanto com o vetor *deg2* como com o *deg3*, mas apenas linhagens transformadas com construções oriundas do vetor *deg3* foram cultivadas em farelo de milho.

Recentemente, o grupo do Dr. Schmidt publicou um trabalho corrigindo todo esse equívoco (KAKULE et al., 2013). Ficou determinado que o gene *deg3*, renomeado para *eqx*, é o responsável pela produção de equisetina, enquanto que o gene *deg2*, renomeado para *fsd*, o qual acreditava-se anteriormente estar diretamente envolvido na síntese de equisetina, é na verdade responsável pela síntese de um composto novo, a fusaridiona A.

3.4.8 Cultivo das linhagens de *F. heterosporum* transformadas, obtenção e análise dos extratos brutos

Para realizar o cultivo em meio sólido de farelo de milho, foram selecionadas linhagens transformadas estáveis (construídas com *deg3*) que tiveram um bom crescimento em meio PDA contendo higromicina B, já que algumas colônias, mesmo que resistentes ao antibiótico, cresciam muito lentamente nesse meio.

As linhagens transformadas selecionadas foram inoculadas em placas contendo meio PDA sem antibiótico e crescidas por 5 dias antes de serem transferidas para o meio sólido, como descrito anteriormente. O crescimento das linhagens transformadas foi equivalente ao da linhagem selvagem, e nenhuma morfologia distinta pode ser observada. Após a extração, foram obtidos os extratos brutos das linhagens transformadas e dos controles, um contendo apenas o meio de cultura e outro sendo referente ao cultivo da linhagem selvagem (Tabela 36).

Tabela 36. Extratos brutos do cultivo das linhagens de *F. heterosporum*

Código do extrato	Construção	Massa (mg)
Fh-cm	-	409,1
Fh-cf	selvagem	650,2
Fh-1.1	1- PKS	707,5
Fh-1.2	1- PKS	811,3
Fh-2.1	2- A2C	600,4
Fh-4.5	4- TA	579,3
Fh-5.2	5- HA	625,8
Fh-5.3	5- HA	745,4

Nos códigos dos extratos, Fh indica cultivo do fungo *F. heterosporum*, e os números subsequentes indicam a construção e a colônia selecionada, respectivamente. As letras cm e cf indicam, respectivamente, controle do meio e controle do fungo.

Esses extratos brutos foram analisados inicialmente por CCDA. Aparentemente, todos apresentavam o mesmo perfil cromatográfico, incluindo a presença do composto equisetina. Os extratos foram em seguida analisados por HPLC-DAD, que por ser mais sensível que a CCDA poderia revelar alguma alteração no perfil químico das linhagens transformadas que não pôde ser visualizada por CCDA. A análise por HPLC também revelou que os perfis cromatográficos de linhagens diferentes que receberam a mesma construção eram muito parecidos entre si (Figura 125). Além disso, todas as linhagens transformadas tinham perfis muito semelhantes ao da linhagem selvagem (Figura 125 e 126). Foi ainda verificado que o perfil do extrato Fh-cf (da linhagem selvagem) era semelhante ao do extrato do meio de cultivo (Figura 127), indicando que os componentes do meio estavam em evidência e poderiam estar interferindo na análise dos extratos. Devido a isso, os extratos foram fracionados na tentativa de minimizar a interferência do meio de cultivo na detecção de possíveis compostos produzidos pelas linhagens após a transformação. Como foram produzidos extratos de duas linhagens diferentes contendo as construções 1- PKS e 5- HA, apenas um extrato de cada construção foi selecionado para o fracionamento. Assim, foram obtidas 4 frações a partir de cada extrato fracionado (Tabela 37).

Figura 125. Cromatogramas do extrato bruto da linhagem selvagem (preto), e dos extratos Fh-5.2 (verde) e Fh-5.3 (rosa), ambos referentes à construção 5-HA. Coluna analítica CLC-ODS 250 mm x 4,5 mm e fase móvel de acetonitrila em água (10% a 100% de MeCN, em 30 min; 100% de MeCN, de 30 a 35 min, 100% a 10% de MeCN, de 35 a 37 min; 10% de MeCN, de 37 a 45 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (225 nm).

Figura 126. Cromatogramas do extrato bruto da linhagem selvagem (preto) e do extrato Fh-2.1 (vermelho), referente à construção 2-A2C. Coluna analítica CLC-ODS 250 mm x 4,5 mm e fase móvel de acetonitrila em água (10% a 100% de MeCN, em 30 min; 100% de MeCN, de 30 a 35 min, 100% a 10% de MeCN, de 35 a 37 min; 10% de MeCN, de 37 a 45 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (225 nm).

Figura 127. Cromatogramas do extrato bruto da linhagem selvagem (preto) e do extrato controle do meio de cultivo (azul). Coluna analítica CLC-ODS 250 mm x 4,5 mm e fase móvel de acetonitrila em água (10% a 100% de MeCN, em 30 min; 100% de MeCN, de 30 a 35 min, 100% a 10% de MeCN, de 35 a 37 min; 10% de MeCN, de 37 a 45 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (225 nm).

Tabela 37. Frações obtidas a partir dos extratos brutos de *F. heterosporum*

Código do extrato	Sistema solvente	Massa (mg)
Fh-cm-1	2	73,5
Fh-cm-2	3	75,3
Fh-cm-3	4	30,4
Fh-cf-1	1	325,2
Fh-cf-2	2	77,0
Fh-cf-3	3	186,3
Fh-cf-4	4	31,7
Fh-1.1-1	1	363,2
Fh-1.1-2	2	114,7
Fh-1.1-3	3	163,5
Fh-1.1-4	4	29,5
Fh-2.1-1	1	357,6
Fh-2.1-2	2	52,3
Fh-2.1-3	3	212,6
Fh-2.1-4	4	33,0
Fh-4.5-1	1	308,6
Fh-4.5-2	2	58,1
Fh-4.5-3	3	148,8
Fh-4.5-4	4	29,2
Fh-5.3-1	1	411,7
Fh-5.3-2	2	77,5
Fh-5.3-3	3	214,1
Fh-5.3-4	4	32,7

Os códigos foram formados como mencionado anteriormente. Os números 1, 2 e 3 indicam a sequência de obtenção das frações durante o fracionamento. A fração do extrato Fh-cm eluída com o sistema solvente 1 não continha nada e foi descartada.

Todas as frações obtidas foram analisadas por HPLC-DAD. Nessas análises pôde ser verificada uma menor interferência dos componentes do meio de cultivo quando os cromatogramas foram analisados em 254 nm (Figura 128).

Os picos correspondentes a compostos do meio que são observados em 210 nm não são visualizados em 254 nm e podem ser distinguidos dos compostos produzidos pelo fungo (Figuras 128 e 129). A maioria dos compostos que absorvem no UV-vis estão presentes nas frações 3 dos extratos do fungo, fração na qual a equisetina e seu epímero, possuindo configuração invertida na posição 5' (Figura 116) (WHEELER; STIPANOVIC; PUCKHABER, 1999; TUROS; AUDIA; DANISHEFSKY, 1988) puderam ser detectados (Figuras 129 e 130). A análise das outras frações (2 e 4) por HPLC não foram informativas já que pouquíssimos compostos puderam ser visualizados. Entretanto, considerando apenas as frações 3 de todos os extratos contendo o fungo, foi possível verificar a grande similaridade dentre os perfis cromatográficos, impossibilitando a detecção de qualquer diferença. Aparentemente, nenhum composto adicional foi produzido nas linhagens transformadas, e da mesma forma, nenhum composto que era produzido pela linhagem selvagem deixou de ser produzido após as transformações genéticas. Os cromatogramas das frações 3 dos extratos brutos Fh-cf e Fh-2.1 apenas exemplificam o que foi observado em todos os cultivos (cromatogramas em azul, Figuras 129 e 130).

Figura 128. Cromatogramas das frações 1 (preto), 2 (azul) e 3 (rosa) obtidas a partir do extrato bruto Fh-cm (controle do meio de cultivo). Coluna analítica CLC-ODS 250 mm x 4,5 mm e fase móvel de acetonitrila em água (10% a 100% de MeCN, em 30 min; 100% de MeCN, de 30 a 35 min, 100% a 10% de MeCN, de 35 a 37 min; 10% de MeCN, de 37 a 45 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (254 nm).

Figura 129. Cromatogramas das frações 2 (preto), 3 (azul) e 4 (rosa) obtidas a partir do extrato bruto Fh-cf (controle contendo a linhagem selvagem). Coluna analítica CLC-ODS 250 mm x 4,5 mm e fase móvel de acetonitrila em água (10% a 100% de MeCN, em 30 min; 100% de MeCN, de 30 a 35 min, 100% a 10% de MeCN, de 35 a 37 min; 10% de MeCN, de 37 a 45 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (254 nm). Os picos A e B correspondem à equisetina e seu epímero, respectivamente.

Figura 130. Cromatogramas das frações 2 (preto), 3 (azul) e 4 (rosa) obtidas a partir do extrato bruto Fh-2.1. Coluna analítica CLC-ODS 250 mm x 4,5 mm e fase móvel de acetonitrila em água (10% a 100% de MeCN, em 30 min; 100% de MeCN, de 30 a 35 min, 100% a 10% de MeCN, de 35 a 37 min; 10% de MeCN, de 37 a 45 min), à vazão de 1 mL min⁻¹, e detecção no UV (254 nm).

Na tentativa de detectar algum composto que tenha sido produzido em pequenas quantidades ou mesmo visualizar qualquer diferença no perfil químico do fungo, que possa ter ocorrido em função das transformações genéticas, as frações foram todas analisadas por LC-MS. Cada cromatograma por detecção de íons totais foi analisado cuidadosamente, assim como os espectros de massas que os geraram, tanto em modo positivo quanto negativo. Nenhuma modificação pode ser observada comparando-se as frações provenientes da linhagem

selvagem com aquelas provenientes das linhagens transformadas. As figuras 131 e 132 ilustram a grande semelhança que pode ser observada entre os cromatogramas de massas obtidos de frações correspondentes. Os espectros de massas das frações provenientes de um mesmo sistema solvente extrator são muito semelhantes entre si, apresentando os mesmos picos de m/z . Como havia sido observado por HPLC-DAD, as frações 3 apresentam o composto equisetina, que pode ser detectado tanto em modo positivo como em negativo, apresentando m/z 374 e 372, respectivamente (Figura 133), e tr entre 6,30 e 6,45 mim (Figuras 131 e 132).

Assim, todas as análises realizadas deixaram claro que nenhum composto foi produzido em função das modificações genéticas realizadas no fungo *F. heterosporum*. Além disso, é possível afirmar que a inserção no genoma da linhagem selvagem das diferentes sequências genéticas construídas não causou ruptura da sequência genética original, contida no fungo, responsável pela síntese de equisetina, já que esse composto pode ser detectado em todas as linhagens transformadas.

Figura 131. Cromatogramas por detecção de íons totais das frações Fh-4.5-3 (superior), Fh-cf-3 (meio) e Fh-cm-2 (inferior) reconstruídos a partir dos espectros de massas obtidos em modo negativo. Coluna analítica C18, 50 mm x 2,1 mm, e fase móvel de acetonitrila em água (10% a 100% de MeCN, em 5,8 min; 100% de MeCN, de 5,8 a 7,6 min, 100% a 10% de MeCN, de 7,6 a 8,0 min; 10% de MeCN, de 8,0 a 10,0 min), à vazão de 0,2 mL min⁻¹, e detecção em *full scan*, modo negativo.

Figura 132. Cromatograma por detecção de íons totais das frações Fh-4.5-3 (superior), Fh-cf-3 (meio) e Fh-cm-2 (inferior) reconstruídos a partir dos espectros de massas obtidos em modo positivo. Coluna analítica C18, 50 mm x 2,1 mm, e fase móvel de acetonitrila em água (10% a 100% de MeCN, em 5,8 min; 100% de MeCN, de 5,8 a 7,6 min, 100% a 10% de MeCN, de 7,6 a 8,0 min; 10% de MeCN, de 8,0 a 10,0 min), à vazão de 0,2 mL min⁻¹, e detecção em *full scan*, modo positivo.

Figura 133. Espectros de massas da fração Fh-cf-3 analisada em *full scan* em modo negativo (superior) e positivo (inferior). Os picos que aparecem no espectro obtido em modo positivo, com m/z 396, 374 e 356, correspondem, respectivamente, à molécula de equisetina cationizada com sódio, à molécula protonada, e à molécula protonada após sofrer uma perda neutra de água.

3.4.9 Possíveis causas para a não observação de um novo composto nas linhagens geneticamente transformadas

Considerando que nenhum produto adicional foi detectado após a análise química das linhagens transformadas, falhas nas diferentes etapas do processo podem ter ocorrido e serão aqui discutidas.

Primeiramente, a não visualização dos compostos poderia ser exclusivamente um problema de detecção, mas essa hipótese foi descartada pois as amostras foram analisadas, tanto de por HPLC-DAD como por UPLC-MS. O ESI-MS é uma técnica muito sensível para detectar uma variedade de compostos, e o pré-fracionamento por UPLC da amostra a ser analisada ameniza bastante problemas de supressão de ionização devido a presença de outros compostos facilmente ionizáveis. No grupo do Dr. Schmidt foi relatado que a produção de equisetina por *F. heterosporum* cultivado em meio sólido de farelo de milho por 21 dias é de 2 g.L⁻¹ (SIMS et al., 2005). Isso indica que o promotor do gene é bastante ativo nessas condições e deveria levar a uma produção detectável do composto geneticamente planejado, ainda que sua produção fosse centenas de vezes menor que da equisetina. Portanto, caso algum composto tivesse sido produzido, ele teria sido detectado já que foram usadas técnicas analíticas adequadas.

Há ainda a possibilidade de que o promotor não tenha sido ativo como esperado, e a sequência não tenha sido transcrita. Durante os experimentos, foram mantidas todas as condições de cultivo em que o promotor do gene para a produção de equisetina é bastante ativo. Uma vez que o promotor fosse ativado, toda a sequência genética subsequente deveria ser transcrita. A transcrição só seria interrompida pela presença de um *stop codon*, que nas construções, estava posicionado no final do gene *pks-nrps*, exceto na construção 1- PKS, em que ele foi posicionado no final do gene *pks*. Tendo em mente que durante os experimentos surgiram dúvidas em relação aos genes que realmente originavam a equisetina, e o vetor *deg3* foi construído mesmo sem que um estudo detalhado desse *cluster* fosse realizado, há a possibilidade de que as regiões definidas como a promotora e a ORF, para a produção de equisetina, não estejam completamente corretas, não resultando em construções precisas. Sabe-se que a região promotora de um gene se situa imediatamente *upstream* ao gene,

possuindo, no geral, não mais que 1000 bp de comprimento. Entretanto, vários elementos reguladores podem estar envolvidos na regulação do promotor, e esses elementos podem estar situados a mais de 1 Kbp de distância do promotor, inclusive em cromossomos diferentes (BERGMANN et al., 2010; MIELE; DEKKER, 2008). Sendo assim, tais elementos não estariam presentes no vetor construído, e o promotor poderia não ser tão ativo sem a regulação deles. Considerando todas essas questões, e o fato de que foi feito um estudo detalhado com o suposto promotor do gene envolvido na síntese de equisetina, seria mais aconselhável utilizar um promotor não constitutivo de *F. heterosporum* mas que tenha sido bem estudado e possa ser induzido, auxiliando no controle da expressão do gene de interesse durante os experimentos. Os promotores *alcA*, *thiA*, *amyB* e *glaA* têm sido utilizados em fungos filamentosos para esse fim (SHOJI et al., 2005; LIU et al., 2003; ROMERO et al., 2003; NIKOLAEV et al., 2002; TADA et al., 1991).

Falhas nos processos de transformação também poderiam ser consideradas. Todas as etapas de transformação foram acompanhadas por controles que indicaram que as diferentes linhagens utilizadas (bactérias, leveduras e fungos) foram verdadeiramente transformadas, ou seja, o DNA exógeno foi incorporado ao DNA do hospedeiro. Além disso, foram selecionadas linhagens fúngicas estáveis, que seriam capazes de manter o DNA exógeno mesmo após o cultivo mais longo em meio não seletivo (sem o antibiótico higromicina B). Entretanto, em nenhum momento durante o processo foi feito o sequenciamento do DNA inserido para checar se não ocorreram mutações nas sequências em algum momento do processo. Mutações podem ter consequências imprevisíveis na estrutura proteica. A mutação de um nucleotídeo, em alguns casos, pode não causar alteração do aminoácido correspondente. Quando ocorre a mutação de um ou alguns aminoácidos, há chances de que a estrutura tridimensional seja pouco comprometida, resultando em nenhum ou pouco prejuízo para a atividade enzimática. Nesse caso, o ponto de mutação também é crucial, pois mutações no domínio ativo normalmente resultam em enzimas não funcionais. Além disso, a deleção ou inserção de um único nucleotídeo na sequência pode alterar a fase de leitura do RNA sendo traduzido, levando à síntese de proteínas com sequências de aminoácidos completamente diferentes. Entretanto, durante a amplificação por PCR do DNA de *A. fumigatus*,

foi utilizada uma enzima polimerase que sintetiza a nova fita de DNA com alta fidelidade à sequência genética da fita complementar, e capaz de manter essa alta taxa de precisão mesmo em sequências longas. Para a inserção desse fragmento de DNA no vetor foi utilizada a técnica de recombinação por homologia em levedura (IIZASA; NAGANO, 2006), entretanto o vetor contendo esse fragmento também poderia ter sido construído por PCR utilizando a técnica denominada gene SOEing (SHEVCHUK et al., 2004). Em ambos há uma taxa de mutação média, mas a não utilização de levedura no processo permitiria a construção de um vetor um pouco mais simplificado, não contendo, por exemplo, o marcador de seleção para levedura. Considerando que a técnica selecionada foi a de recombinação em levedura, tomou-se o devido cuidado para que o período de cultivo das linhagens nunca fosse mais elevado que o necessário para obter material genético suficiente, minimizando, assim, as mutações espontâneas que ocorrem normalmente durante os processos de duplicação celular de qualquer organismo (LYNCH, 2010; DRAKE, 1998). O mesmo foi feito durante o crescimento das linhagens de bactérias.

Mais decisivas que mutações, que possuem relativamente baixa taxa de ocorrência, falhas nas construções genéticas poderiam levar a uma enzima definitivamente não-funcional. Planejar as construções, e determinar os pontos de fusão, é uma parte bastante desafiadora dentro do processo de hibridização. Essa etapa requer muito conhecimento teórico prévio e também dados de trabalhos realizados, que podem auxiliar nas escolhas e aumentar a probabilidade de serem criadas junções funcionais. Algumas considerações gerais podem ser feitas para determinar os pontos de fusões, como já mencionado, entretanto, o modo que essas junções irão afetar a estrutura final proteica ainda é imprevisível. A biossíntese de compostos oriundos das rotas híbridas PKS-NRPS de fungos filamentosos ainda não é conhecida com detalhamento suficiente para que os domínios funcionais dessas enzimas possam ser manipulados com precisão (FISCH, 2013). A manipulação e dissecação de domínios em fungos filamentosos é uma prática bastante recente e tem sido realizada somente em enzimas PKS não-redutoras (NR-PKS) (CHIANG et al., 2013; YEH et al., 2013; XU et al., 2013; VAGSTAD et al., 2013; AHUJA et al., 2012; ITOH et al., 2012; LIU et al., 2011). Quando essas manipulações são bem sucedidas, resultados valiosos podem ser obtidos. Em

nossas construções foi utilizado um gene para PKS altamente redutora (HR-PKS). As junções foram realizadas em sequências genéticas não conservadas dentro dos domínios (exceto a construção 4- HA), as quais mais provavelmente não são responsáveis por formar a cavidade catalítica da enzima, e portanto, não deveriam afetar, ou deveriam afetar muito pouco a atividade enzimática. Entretanto, há relatos em bactérias de que essas regiões não conservadas, denominadas *linker*, apesar de não estarem diretamente envolvidas com a atividade específica da enzima, são importantes para determinar o espaçamento ideal entre os domínios dentro da estrutura tridimensional, permitindo dinamizar as diversas reações enzimáticas que ocorrerão nos distintos domínios (ANAND; MOHANTY, 2012); e são importantes para a transferência da cadeia sintetizada nascente entre os módulos de enzimas híbridas PKS-NRPS (SHEN et al., 2002; DU; SANCHEZ; SHEN, 2001). Nas construções realizadas foram feitas junções entre os módulos, o que pode, portanto, ter afetado de alguma maneira a transferência da cadeia policetílica sintetizada no módulo PKS para o módulo NRPS da enzima híbrida. Além disso, o produto híbrido resultante, se formado, deveria ser liberado da enzima, e para isso a porção NRPS presente no vetor deveria conter todos os elementos necessários para isso. No caso do produto não ser capaz de ser liberado da enzima, ainda que todas as junções realizadas tenham sido funcionais, e que o promotor tenha sido ativo nas condições dos experimentos (discutido anteriormente), o produto formado não seria detectado.

Alguns dos pontos discutidos acima, que eventualmente podem estar envolvidos na falta de sucesso desse experimento de engenharia químico-genética, apenas mostram como o processo como um todo é altamente complexo e a sua realização está sujeita à interferência de diversos fatores.

3.5 CONCLUSÕES

Além da habilidade prática para realizar os experimentos de biologia molecular, um alto nível de conhecimento teórico é crucial para que todo o planejamento experimental possa ser feito adequadamente. Além disso, a disponibilidade de dados e resultados de trabalhos similares ao que se objetiva realizar auxiliam bastante no desenvolvimento de um novo projeto, entretanto, quando este é muito inovador, a escassez de material para ser consultado é grande. Isso aumentou ainda mais a complexidade dos experimentos que foram propostos e a possibilidade de não serem obtidos os resultados desejados. Apesar dos avanços nos estudos genômicos de micro-organismos, relativamente pouco é conhecido e entendido sobre as megassintases fúngicas, que possuem uma complexidade mais elevada que as das bactérias, com muitos detalhes esperando por ser desvendados.

O conhecimento obtido e gerado em investigações aprofundadas dessas enzimas pode auxiliar no entendimento de seu funcionamento em nível molecular e servir de suporte para pesquisas futuras. Esse conhecimento, atrelado ao conhecimento da química envolvida na formação da ampla diversidade de compostos gerados por tais enzimas, e ainda, dos fatores que regulam a síntese dos metabólitos secundários, poderão permitir que as pesquisas em produtos naturais atinjam um grau de desenvolvimento nunca visto antes.

4 CONCLUSÃO GERAL

As pesquisas mais recentes em produtos naturais têm focado no estudo genômico dos organismos produtores, o que levou à descoberta de vários genes crípticos em micro-organismos. Desde então, o interesse em produtos naturais tem ganhado um novo estímulo, já que existem vários novos metabólitos secundários para serem descobertos de fontes microbianas, e os esforços têm sido concentrados em estratégias para acessar tais compostos.

Manipulações diversas das condições de cultivo, como mudança na constituição do meio de cultivo, adição de compostos químicos na cultura, cultivo com outras linhagens microbianas, dentre outros, têm sido realizadas para mimetizar as condições ambientais de estresse que podem estimular a biossíntese de metabólitos secundários pelas linhagens cultivadas em condições laboratoriais. Nesse trabalho utilizaram-se culturas microbianas mistas e adição de moduladores químicos e epigenéticos aos meios de cultivos, e ambas as estratégias se mostraram efetivas para diversificar o metabolismo secundário das linhagens testadas.

Além disso, a utilização de técnicas de biologia molecular é uma alternativa que vem sendo cada vez mais empregada como ferramenta para a expressão de genes crípticos. Os genes biossintéticos que originam produtos naturais já conhecidos também têm sido alvo de manipulações genéticas que objetivam causar modificações químicas no produto resultante, formando produtos geneticamente modificados. Esta metodologia foi empregada nesse trabalho, e apesar do produto modificado não ter sido obtido, muito conhecimento foi adquirido e está sendo transmitido.

Todas essas estratégias têm contribuído para aumentar a diversidade de metabólitos obtidos a partir de um micro-organismo, e durante esses estudos, mais conhecimento a respeito da genética dos micro-organismos, da regulação da biossíntese de metabólitos secundários e de seus possíveis papéis ecológico tem sido gerado.

O grande potencial biossintético microbiano atrelado aos avanços nas diversas áreas do conhecimento torna os micro-organismos um excitante alvo para pesquisa em produtos naturais. Assim, os produtos naturais de diversas fontes continuarão sendo o foco de muitas pesquisas por um longo período.

5 REFERÊNCIAS

- ABDOU, R.; SCHERLACH, K.; DAHSE, H.M.; SATTler, I.; HERTWECK, C. Botryorhodines A-D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*. **Phytochemistry** 71, 110-116, 2010.
- ABE, E.; NAKATANI, Y.; YAMANISHI, T.; MURAKI, S. 105. Studies on the "Sugary Flavor" of Raw Cane Sugar. I. **Proceedings of the Japan Academy** 54, 542-547, 1978.
- ADGER, B. M.; BARRETT, C.; BRENNAN, J.; MCKERVEY, M.; MURRAY, R. W. Oxidation of furans with dimethyldioxirane. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, 1553-1554, 1991.
- AHUJA, M.; CHIANG, Y. M.; CHANG, S. L.; PRASEUTH, M. B.; ENTWISTLE, R.; SANCHEZ, J. F.; LO, H. C.; YEH, H. H.; OAKLEY, B. R.; WANG, C. C. Illuminating the diversity of aromatic polyketide synthases in *Aspergillus nidulans*. **Journal of the American Chemical Society** 134, 8212-8221, 2012.
- AL-BARI, A. A.; SAYEED, M. A.; RAHMAN, S.; MOSSADIK, A. Characterization and Antimicrobial Activities of a Phthalic Acid Derivative Produced by *Streptomyces bangladeshiensis* A Novel Species Collected in Bangladesh **Research Journal of Medicine and Medical Sciences** 1, 77-81, 2006.
- ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi – a review. **Medical Mycology** 50, 337–345, 2012.
- ALMEIDA, F. B. R.; CERQUEIRA, F. M.; SILVA, R. N.; ULHOA, C. J.; LIMA, A. L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters** 29, 1189-1193, 2007.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology** 90, 1829-1845, 2011.
- ANAND, S.; MOHANTY, D. Inter-domain movements in polyketide synthases: a molecular dynamics study. **Molecular BioSystems** 8, 1157-1171, 2012.

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

ARAÚJO, L. W.; LIMA, S. O. A.; AZEVEDO, L. J.; MARCON, J.; SOBRAL, K. J.; LAVACA, T. P. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos, Piracicaba: **ESALQ**, 2002, p. 86.

ARGEMÍ, A.; SAURINA, J. Study of the degradation of 5-azacytidine as a model of unstable drugs using a stopped-flow method and further data analysis with multivariate curve resolution. **Talanta** 74, 176-182, 2007.

ASAI, T.; CHUNG, Y. M.; SAKURAI, H.; OZEKI, T.; CHANG, F. R.; YAMASHITA, K.; OSHIMA, Y. Tenuipyrone, a novel skeletal polyketide from the entomopathogenic fungus, *Isaria tenuipes*, cultivated in the presence of epigenetic modifiers. **Organic Letters** 14, 513-515, 2012b.

ASAI, T.; YAMAMOTO, T.; CHUNG, Y. M.; CHANG, F. R.; WU, Y. C.; YAMASHITA, K.; OSHIMA, Y. Aromatic polyketide glycosides from an entomopathogenic fungus, *Cordyceps indigotica*. **Tetrahedron Letters** 53, 277-280, 2012a.

ASAI, T.; YAMAMOTO, T.; OSHIMA, Y. Aromatic polyketide production in *Cordyceps indigotica*, an entomopathogenic fungus, induced by exposure to a histone deacetylase inhibitor. **Organic Letters** 14, 2006-2009, 2012.

ASAI, T.; YAMAMOTO, T.; OSHIMA, Y. Histone deacetylase inhibitor induced the production of three novel prenylated tryptophan analogs in the entomopathogenic fungus, *Torrubiella luteorostrata*. **Tetrahedron Letters** 52, 7042-7045, 2011.

ASAI, T.; YAMAMOTO, T.; SHIRATA, N.; TANIGUCHI, T.; MONDE, K.; FUJII, I.; GOMI, K.; OSHIMA, Y. Structurally diverse chaetophenol productions induced by chemically mediated epigenetic manipulation of fungal gene expression. **Organic Letters** 15, 3346-3349, 2013.

ASKENAZI, M.; DRIGGERS, E. M.; HOLTZMAN, D. A.; NORMAN, T. C.; IVERSON, S.; ZIMMER, D. P.; BOERS, M. E.; BLOMQUIST, P. R.; MARTINEZ, E. J.; MONREAL, A. W.; FEIBELMAN, T. P.; MAYORGA, M. E.; MAXON, M. E.; SYKES, K.; TOBIN, J. V.; CORDERO, E.; SALAMA, S. R.; TRUEHEART, J.; ROYER, J. C.; MADDEN, K. T. Integrating transcriptional and metabolite profiles

to direct the engineering of lovastatin-producing fungal strains. **Nature Biotechnology** 21, 150-156, 2003.

AUCLAIR, K.; SUTHERLAND, A.; KENNEDY, J.; WITTER, D. J.; VAN DEN HEEVER, J. P.; HUTCHINSON, C. R.; VEDERAS, J. C. Lovastatin Nonaketide synthase catalyzes an intramolecular Diels–Alder reaction of a substrate analogue. **Journal of the American Chemical Society** 122, 11519-11520, 2000.

BASE DE DADOS **DNP** <<http://dnp.chemnetbase.com>>

BASE DE DADOS **GenBank** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>

BASE DE DADOS **GenBank** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>

BASE DE DADOS **MassBank** <<http://www.massbank.jp>>

BASE DE DADOS **Metlin** <<https://metlin.scripps.edu>>

BASE DE DADOS **SciFinder** <https://scifinder.cas.org>

BEAU, J.; MAHID, N.; BURDA, W. N.; HARRINGTON, L.; SHAW, L. N.; MUTKA, T.; KYLE, D. E.; BARISIC, B.; OLPHEN, A.; BAKER, B. J. Epigenetic tailoring for the production of anti-infective cytosporones from the marine fungus *Leucostoma persoonii*. **Marine Drugs** 10, 762-774, 2012.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. D.; MACHADO, B. D., Siderophores: "A microorganism's answer". **Química Nova**, 25, (6B), 2002.

BENTLEY, S. D., CHATER, K. F., CERDENO-TARRAGA, A. M., CHALLIS, G. L., THOMSON, N. R., JAMES, K. D., HARRIS, D. E., QUAIL, M. A., KIESER, H. HARPER, D.; BATEMAN, A.; BROWN, S.; CHANDRA, G.; CHEN, C. W.; COLLINS, M.; CRONIN, A.; FRASER, A.; GOBLE, A.; HIDALGO, J.; HORNSBY, T.; HOWARTH, S.; HUANG, C. H.; KIESER, T.; LARKE, L.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SAUNDERS, D.; SHARP, S.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TAYLOR, K.; WARREN, T.; WIETZORREK, A.; WOODWARD, J.; BARRELL, B. G.; PARKHILL, J.; HOPWOOD, D. A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Nature** 417, 141-147, 2002.

- BERGMANN, S.; FUNK, A. N.; SCHERLACH, K.; SCHROECKH, V.; SHELEST, E.; HORN, U.; HERTWECK, C.; BRAKHAGE, A. A. Activation of a silent fungal polyketide biosynthesis pathway through regulatory cross talk with a cryptic nonribosomal peptide synthetase gene cluster. **Applied and Environmental Microbiology** 76, 8143-8149, 2010.
- BODE, H. B.; ZEECK, A. Sphaerolone and dihydrosphaerolone, two bisnaphthyl-pigments from the fungus *Sphaeropsidales* sp. F-24'707. **Phytochemistry** 54, 597-601, 2000.
- BOHNERT, H. U.; FUDAL, I.; DIOH, W.; THARREAU, D.; NOTTEGHEM, J. L.; LEBRUN, M. H. A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice. **Plant Cell** 16, 2499-2513, 2004.
- BOK, J. W.; CHIANG, Y. M.; SZEWCZYK, E.; REYES-DOMINGEZ, Y.; DAVIDSON, A. D.; SANCHEZ, J. F.; LO, H. C.; WATANABE, K.; STRAUSS, J.; OAKLEY, B. R.; WANG, C. C. C.; KELLER, N. P. Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. **Nature Chemical Biology** 5, 462- 464, 2009.
- BOKHARI, F. M.; FLANNIGAN, B. Effect of storage environment and fungal competitors on growth of *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin production in cereals. **Dechema Monographien** 133, 287-293, 1996.
- BOLDEN, J. E.; PEART, M. J.; JOHNSTONE, R. W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery** 5, 769-784, 2006.
- BORGES, W. S. B.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry** 13, 1137-1163, 2009.
- BROCKMANN, H. Indomycins and Indomycinones. **Angewandte Chemie International Edition in English** 7, 481, 1968.
- BROSCH, C.; LOIDL, P.; GRAESSLE S. Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews** 32, 409-439, 2008.
- BROWN, M. J. B.; CORTES, J.; CUTTER, A. L.; LEADLAY, P. F.; STAUNTON, J. A Mutant Generated by Expression of an Engineered DEBS1 Protein from the

Erythromycin-producing Polyketide Synthase (PKS) in *Streptomyces coelicolor* Produces the Triketide as a Lactone, but the Major Product is the nor-Analogue Derived from Acetate as Starter Acid. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, 1517-1518, 1995.

BURKE, L. T.; DIXON, D. J.; LEY, S. V.; RODRIGUEZ, F. A short stereoselective total synthesis of the *Fusarium* toxin equisetin. **Organic Letters** 2, 3611-3613, 2000.

BURKHARDT, B.; PFEIFFER, E.; METZLER, M. Absorption and metabolism of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether in Caco-2 cells in vitro. **Mycotoxin Research** 25, 149-157, 2009.

CAMPBELL, C. D.; VEDERAS, J. C. Biosynthesis of lovastatin and related metabolites formed by fungal iterative PKS enzymes. **Biopolymers** 93, 755-763, 2010.

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. **Dissertação de Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos** - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-24062013-141903/>>

CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathologia et Mycologia Applicata** 20, 1-6, 1963.

CHAGAS, F. O. Utilização de culturas mistas como estratégia para estimular a biossíntese de produtos naturais por fungos endofíticos. **Dissertação de Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos**- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-15032010-125530/>>

CHAGAS, F. O.; DIAS, L. G.; PUPO, M. T. A mixed culture of endophytic fungi increases production of antifungal polyketides. **Journal of Chemical Ecology** 39, 1335-1342, 2013.

CHAKRABORTY, T. K.; TAPADAR, S.; ROY, S. Synthesis of 3,5-dihydroxy-2,4-dimethylheptanoic acid δ -lactone in enantiomerically pure form. **Archive for Organic Chemistry**, 170-178, 2005.

CHALLIS, G. L. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. **Microbiology** 154, 1555-1569, 2008.

CHAPLA, V. M. Estudo químico e biológico do fungo endofítico *Phomopsis* sp. isolado da *Senna spectabilis*. **Dissertação de Mestrado em Química** - IQ/Unesp, 274p, 2010. Disponível em:
http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/biq/33004030072P8/2010/chapla_vm_me_araiq.pdf

CHEN, Y. H.; LIOU, S. E.; CHEN, C. C. Two-step mass spectrometric approach for the identification of diketopiperazines in chicken essence. **European Food Research and Technology** 218, 589-597, 2004.

CHEN, C. Y. Biosynthesis of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) from red alga-*Bangia atropurpurea*. **Water Research** 38, 1014-1018, 2004.

CHEN, H.; AWAKAWA, T.; SUN, J.; WAKIMOTO, T.; ABE, I. Epigenetic modifier-induced biosynthesis of novel fusaric acid derivatives in endophytic fungi from *Datura stramonium* L. **Natural Products and Bioprospecting** 3, 20-23, 2013.

CHIANG, Y. M.; OAKLEY, C. E.; AHUJA, M.; ENTWISTLE, R.; SCHULTZ, A.; CHANG, S. L.; SUNG, C. T.; WANG, C. C.; OAKLEY, B. R. An efficient system for heterologous expression of secondary metabolite genes in *Aspergillus nidulans*. **Journal of the American Chemical Society** 135, 7720-7731, 2013.

CHIANG, Y.M.; OAKLEY, B. R.; KELLER, N. P.; WANG, C. C. Unraveling polyketide synthesis in members of the genus *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 86, 1719-36, 2010.

CHOUDARY, D. A.; REDDY, K. R. N.; REDDY, M. S. Antifungal activity and genetic variability of *Tricoderma harzianum* isolates. **Journal of Mycology and Plant Pathology** 37, 295-300, 2007.

CHRISTIAN, O. E.; COMPTON, J.; CHRISTIAN, K. R.; MOOBERRY, S. L.; VALERIOTE, F. A.; CREWS, P. Using jasplakinolide to turn on pathways that

enable the isolation of new chaetoglobosins from *Phomopsis asparagi*. **Journal of Natural Products** 68, 1592-1587, 2005.

CHUNG, J. K.; SHEN, S.; JIANG, Z.; YUAN, W.; ZHENG, J. Structure-toxicity relationship study of *para*-halogenated styrene analogues in CYP2E1 transgenic cells. **Toxicology Letters** 210, 353-359, 2012.

COLE, R. J.; WELLS, J. M.; COX, R. H.; CUTLER, H. G. Isolation and Biological Properties of Deacetylcytochalasin H from *Phomopsis* sp. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 29, 205-206, 1981.

COLLEMARE, J.; BILLARD, A.; BOHNERT, H. U.; LEBRUN, M. H. Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: the role of hybrid PKS-NRPS in pathogenicity. **Mycological Research** 112, 207-215, 2008.

CONTI, R. Micro-organismos de interesse farmacêutico e agrícola: estudo químico e biossintético. **Tese de Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos**- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

COX, R. H.; CUTLER, H. G.; HURD, R. E.; COLE, R. J. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 31, 405-408, 1983.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta** 1830, 3670-3695, 2013.

CRANEY, A.; OZIMOK, C.; PIMENTEL-ELARDO, S. M.; CAPRETTA, A.; NODWELL, J. R. Chemical perturbation of secondary metabolism demonstrates important links to primary metabolism. **Chemistry & Biology** 19, 1020-1027, 2012.

CRAWFORD, J. M.; THOMAS, P. M.; SCHEERER, J. R.; VAGSTAD, A. L.; KELLEHER, N. L.; TOWNSEND, C. A. Deconstruction of iterative multidomain polyketide synthase function. **Science** 320, 243-246, 2008.

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

D'ONOFRIO, A.; CRAWFORD, J. M.; STEWART, E. J.; WITT, K.; GAVRISH, E.; EPSTEIN, S.; CLARDY, J.; LEWIS, K. Siderophores from Neighboring Organisms

Promote the Growth of Uncultured Bacteria. **Chemistry & Biology** 17, 254-64, 2010.

DE NADAL, E.; ZAPATER, M.; ALEPUZ, P. M.; SUMOY, L.; MAS, G.; POSAS, F. The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. **Nature** 427, 370-374, 2004.

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* DMS 12973. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 66, 883-886, 2002.

DING, Z. G.; ZHAO, J. Y.; YANG, P. W.; LI, M. G.; HUANG, R.; CUI, X. L.; WEN, M. L. ¹H and ¹³C NMR assignments of eight nitrogen containing compounds from *Nocardia alba* sp.nov (YIM 30243^T). **Magnetic Resonance in Chemistry** 47, 366–370, 2009.

DOBOSY, J. R.; SELKER, E. U. Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. **Cellular and Molecular Life Sciences** 58, 721-727, 2001.

DRAKE, J. W.; CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D.; CROW, J. F. Rates of spontaneous mutation. **Genetics** 148, 1667-1686, 1998.

DU, L.; LOU, L. PKS and NRPS release mechanisms. **Natural Product Reports** 27, 255-278, 2010.

DU, L.; SANCHEZ, C.; SHEN, B. Hybrid peptide polyketide natural products: biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. **Metabolic Engineering** 3, 78-95, 2001.

DUSPARA, P.; JENKINS, S. I.; HUGHES, D. W.; HARRISON, P. H. M. The biosynthesis of pramanicin: intact incorporation of serine and absolute configuration of the antibiotic. *Chemical Communications* 2643-2644, 1998.

ELEY, K. L.; HALO, L. M.; SONG, Z.; POWLES, H.; COX, R. J.; BAILEY, A. M.; LAZARUS, C. M.; SIMPSON, T. J. Biosynthesis of the 2-pyridone tenellin in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *ChemBioChem* 8, 289-297, 2007.

FDHILA, F., VÁZQUEZ, V., SÁNCHEZ, J. L., RIGUERA, R. DD-Diketopiperazines: Antibiotics Active against *Vibrio anguillarum* Isolated from Marine Bacteria

Associated with Cultures of *Pecten maximus*. **Journal of Natural Products** 66, 1299-1301, 2003.

FISCH, K. M. Biosynthesis of natural products by microbial iterative hybrid PKS–NRPS. **RSC Advances** 3, 18228-18247, 2013.

FISCH, K. M.; GILLASPY, A. F.; GIPSON, M.; HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; JACKSON, L.; NAJAR, F. Z.; WAGELE, H.; CICHEWICZ, R. H. Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 36, 1199-1213, 2009.

FOX, E. M.; HOWLETT, B. J. Biosynthetic gene clusters for epipolythiodioxopiperazines in filamentous fungi. **Mycological Research** 112, 162-169, 2008.

FUJII, I.; WATANABE, A.; SANKAWA, U.; EBIZUKA, Y. Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*. **Chemistry & Biology** 8, 189-197, 2001.

FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; CARVALHO, I.; CAMPO, V. L.; DUARTE, M. C. T.; BASTOS, J. K. Diketopiperazines Produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian Strain. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 16, 1448-1453, 2005.

GALLO, A.; FERRARA, M.; PERRONE, G. Phylogenetic study of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of mycotoxins. **Toxins** 5, 717-742, 2013.

GALLO, M. B. C.; CHAGAS, F. O.; ALMEIDA, M. O.; MACEDO, C. C.; CAVALCANTI, B. C.; BARROS, F. W. A.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFFO, L. V.; PESSOA, C.; BASTOS, J. K. Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. **Journal of Basic Microbiology** 49, 142-151, 2009.

GAO, K.; LIU, X.; GUO, R.; HUAI, W.; ZHANG, M. Study on antagonism of *Trichoderma* species on canker pathogen fungi of poplar. **Linze Kexue** 37, 82-86, 2001.

GAO, S. S.; LI, X. M.; WANG, B. G. Perylene derivatives produced by *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Laurencia* species. **Natural Product Communications** 4, 1477-1480, 2009.

GLAUSER G.; GINDRO, K.; FRINGELI, J.; 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** 57, 1127-1134, 2009.

GOODRICH-TANRIKULU, M.; MAHONEY, N.; RODRIGUEZ, S. B. The plant growth regulator methyl jasmonate inhibits aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **Microbiology** 141, 2831-2837, 1995.

GRAESSLE, S.; LOIDL, P.; BROSCHE, G. Histone acetylation: plants and fungi as model systems for the investigation of histone deacetylases. **Cellular and Molecular Life Sciences** 58, 704-720, 2001.

GREGORETTI, I. V.; LEE, I. M.; GOODSON, H. V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. **Journal of Molecular Biology** 338, 17-31, 2004.

GROSS, H. Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology** 75, 267-277, 2009.

GU Q.; FU, L.; WANG, Y.; LIN, J. Identification and Characterization of Extracellular Cyclic Dipeptides As Quorum-Sensing Signal Molecules from *Shewanella baltica*, the Specific Spoilage Organism of *Pseudosciaena crocea* during 4 °C Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 61, 11645–11652, 2013.

GUIMARÃES, 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. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 52, 134–144, 2008.

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

GUO, Y., LI, X., WANG, J., XU, J., LI, N. A new alkaloid from the fruits of *Celastrus orbiculatus*. **Fitoterapia** 76, 273-275, 2005.

- GUTHRIE, J. L.; CASTLE, A. J. Chitinase production during interaction of *Trichoderma aggressivum* and *Agaricus bisporus*. **Canadian Journal of Microbiology** 52, 961-967, 2006.
- HABIB, M. R.; KARIM, M. R. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate and Anhydrosophoradiol-3-acetate Isolated from *Calotropis gigantea* (Linn.) Flower. **Mycobiology** 37, 31-36, 2009.
- HALO, L. M.; MARSHALL, J. W.; YAKASAI, A. A.; SONG, Z.; BUTTS, C. P.; CRUMP, M. P.; HENEGHAN, M.; BAILEY, A. M.; SIMPSON, T. J.; LAZARUS, C. M.; COX, R. J. Authentic heterologous expression of the tenellin iterative polyketide synthase nonribosomal peptide synthetase requires coexpression with an enoyl reductase. **ChemBioChem** 9, 585-594, 2008.
- HAN, Y. S.; HEIJDEN, R.; VERPOORTE, R. Improved anthraquinone accumulation in cell cultures of *Cinchona* 'Robusta' by feeding of biosynthetic precursors and inhibitors. **Biotechnology Letters** 24, 705-710, 2002.
- HANSEN, K. R.; BURNS, G.; MATA, J.; VOLPE, T. A.; MARTIENSSEN, R. A.; BAHLER, J.; THON, G. Global effects on gene expression in fission yeast by silencing and RNA interference machineries. **Molecular and Cellular Biology** 25, 590-601, 2005.
- HARRISON, P. H. M.; HUGHES, D. W.; RIDDOCH, R. W. The biosynthesis of pramanicin: origin of the carbon skeleton. **Chemical Communications** 273-274, 1998.
- HENDRICKSON, L.; DAVIS, C. R.; ROACH, C.; NGUYEN, D. K.; ALDRICH, T.; MCADA, P. C.; REEVES, C. D. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. **Chemistry & Biology** 6, 429-439, 1999.
- HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; JOYNER P. M.; CICHEWICZ R. H. A chemical epigenetics approach for engineering the *in situ* biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. **Organic & Biomolecular Chemistry** 7, 435-438, 2009.
- HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. **Nature Chemical Biology** 5, 450-452, 2009.

HERTWECK, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. **Angewandte Chemie International Edition** 48, 4688-4716, 2009.

HOFFMEISTER, D.; KELLER, N. P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. **Natural Products Reports** 24, 393-416, 2007.

IIZASA, E.; NAGANO, Y. Highly efficient yeast-based in vivo DNA cloning of multiple DNA fragments and the simultaneous construction of yeast/ *Escherichia coli* shuttle vectors. **Biotechniques** 40, 79-83, 2006.

ITOH, T.; TOKUNAGA, K.; RADHAKRISHNAN, E. K.; FUJII, I.; ABE, I.; EBIZUKA, Y.; KUSHIRO T. Identification of a key prenyltransferase involved in biosynthesis of the most abundant fungal meroterpenoids derived from 3,5-dimethylorsellinic acid. **ChemBioChem** 13, 1132-1135, 2012.

IZAWA, Y.; HIROSE, T.; SHIMIZU, T.; KOYAMA, K.; NATORI, S. Six new 10-phenyl-cytochalasans, cytochalasins N-S from *Phomopsis* sp. **Tetrahedron** 45, 2323-2335, 1989.

JERIC, I., SIMICIC, L., STIPETIC, M., HORVAT, S. Synthesis and reactivity of the monosaccharide esters of amino acids as models of teichoic acid fragment. **Glycoconjugate Journal** 17, 273-282, 2000.

JU, Y. M.; WANG, G. J.; CHEN, C. Y.; TSAU Y. J.; CHOU, C. H.; LEE, T. H. Chemical constituents from fermented broth and mycelium of the basidiomycete *Lacrymaria velutina* Botanical. **Studies** 51, 311-315, 2010.

KAKULE, T. B.; SARDAR, D.; LIN, Z.; SCHMIDT, E. W. Two related pyrrolidinedione synthetase *loci* in *Fusarium heterosporum* ATCC 74349 produce divergent metabolites. **ACS Chemical Biology** 8, 1549-1557, 2013.

KENNEDY, J.; AUCLAIR, K.; KENDREW, S. G.; PARK, C.; VEDERAS, J. C.; HUTCHINSON, C. R. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. **Science** 284, 1368-1372, 1999.

KIM, H. J.; BAE, S. C. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. **American Journal of Translational Research** 3, 166-179, 2011.

KISSINGER, L. B.; STEMM, N. L. Determination of the antileukemia agents cytarabine and azacitidine and their respective degradation products by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography** 353, 309-318, 1986.

KJER, J.; WRAY, V.; EDRADA-EBEL, R.; EBEL, R.; PRETSCH, A.; LIN, W.; PROKSCH, P. Xanalteric acids I and II and related phenolic compounds from an endophytic *Alternaria* sp. isolated from the mangrove plant *Sonneratia alba*. **Journal of Natural Products** 72, 2053-2057, 2009.

KNIGHT, V.; SANGIER, J. J.; DiTULIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology** 62, 446-458, 2003.

KOGEL, K.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – What decides? **Current Opinion in Plant Biology** 9, 358-363, 2006.

KONDO, K.; HIGUCHI, Y.; SAKUDA, S.; NIHIRA, T.; YAMADA, Y. New virginiae butanolides from *Streptomyces virginiae*. **The Journal of Antibiotics** 42, 1873-1876, 1989.

KOSALKOVÁ, K.; GARCÍA-ESTRADA, C.; ULLÁN, R.V.; GODIO, R.P.; FELTRER, R.; TEIJEIRA, F.; MAURIZ, E.; MARTÍN, J.F. The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*. **Biochimie** 91, 214-225, 2009.

KROHN, K.; JOHN, M.; AUST, H. J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. Biologically active metabolites from fungi. 13-Stemphytriol, a new perylene derivative from *Monodictys fluctuata*. **Natural Product Letters** 14, 31-34, 1999.

KUMAR N.; MOHANDAS, C.; NAMBISAN, B.; KUMAR, D. R.; LANKALAPALLI, R. S. Isolation of proline-based cyclic dipeptides from *Bacillus* sp. N strain associated with rhabditid entomopathogenic nematode and its antimicrobial properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 29, 355-364, 2013.

KUROSAWA, K.; GHIVIRIGA, I.; SAMBANDAN, T. G.; LESSARD, P. A.; BARBARA J. E.; RHA, C.; SINSKEY, A. J. Rhodostreptomycins, antibiotics biosynthesized following horizontal gene transfer from *Streptomyces padanus* to

Rhodococcus fascians. **Journal of the American Chemical Society** 130, 1126-1127, 2008.

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

LAWRENCE, R. J.; EARLEY, K.; PONTES, O.; SILVA, M.; CHEN, Z. J.; NEVES, N.; VIEGAS, W.; PIKAARD, C. S. A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. **Molecular Cell** 13, 599-609, 2004.

LEE, H. B.; MAGAN, N. Environment factors influence in vitro interspecific interactions between *A. ochraceus* and other maize spoilage fungi, growth and ochratoxin production. **Mycopathologia** 146, 43-47, 1999.

LEE, I.; OHA, J. H.; SHWAB, E. K.; DAGENAIS, T. R. T.; ANDES, D.; KELLER, N. P. HdaA, a class 2 histone deacetylase of *Aspergillus fumigatus*, affects germination and secondary metabolite production. **Fungal Genetics and Biology** 46, 782-790, 2009.

LEE, T.; YUN, S. H.; HODGE, K. T.; HUMBER, R. A.; KRASNOFF, S. B.; TURGEON, G. B.; YODER, O. C.; GIBSON, D. M. Polyketide synthase genes in insect- and nematode-associated fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology** 56, 181-187, 2001.

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

LIN, Z. J.; LU, X. M.; ZHU, T. J.; FANG, Y. C.; GU, Q. Q.; ZHU, W. GPR12 Selections of the metabolites from an endophytic *Streptomyces* sp. Associated with *Cistanches deserticola*. **Archives of Pharmacal Research** 31, 1108-1114, 2008.

LIU, L.; LIU, J.; QIU, R. X.; ZHU, X. G.; DONG, Z. Y.; TANG, G. M. Improving heterologous gene expression in *Aspergillus niger* by introducing multiple copies of protein-binding sequence containing CCAAT to the promoter. **Letters in Applied Microbiology** 36, 358-361, 2003.

LIU, T.; CHIANG, Y. M.; SOMOZA, A. D.; OAKLEY, B. R.; WANG, C.C. Engineering of an “unnatural” natural product by swapping polyketide synthase

domains in *Aspergillus nidulans*. **Journal of the American Chemical Society** 133, 13314-13316, 2011.

LLOYD, R. A.; MILLER, C. W.; ROBERTS, D. L.; GILES, J. A.; DICKERSON, J. P.; NELSON, N. H.; RIX, C. E.; AYERS, P. H. Flue-cured tobacco flavor. I. Essence and essential oil components. **Tobacco Science** 20, 125-33, 1976.

LOGRIECO, A.; MORETTI, A.; SOLFRIZZO, M. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. **World Mycotoxin Journal** 2, 129-140, 2009.

LOIDL, P. A plant dialect of the histone language. **Trends in Plant Science** 9, 84-90, 2004.

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

LYNCH, M. Evolution of the mutation rate. **Trends in Genetics** 26, 345-352, 2010.

LYUTSKANOVA, V. D.; IVANOVA, M. STOILOVA-DISHEVA, M. KOLAROVA, K. ALEKSIEVA, V. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 1220-1224, 2009.

MAIYA, S.; GRUNDMANN, A.; LI, X.; LI, S. M.; TURNER, G. Identification of a hybrid PKS/NRPS required for pseurotin A biosynthesis in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. **ChemBioChem** 8, 1736-1743, 2007.

MARTINS, M. B.; CARVALHO, I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis. **Tetrahedron** 63, 9923-9932, 2007.

Mc-ALPINE, J. B. Advances in the understanding and use of the genomic base of microbial secondary metabolite biosynthesis for the discovery of new natural products. **Journal of Natural Products** 72, 566–572, 2009.

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

MIAO, L.; KWONG, T.F.N.; QIAN, P.Q. 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** 72, 1063-1073, 2006.

MIELE, A.; DEKKER, J. Long-range chromosomal interactions and gene regulation. **Molecular BioSystems** 4, 1046-1057, 2008.

MIERSCH, O.; PREISS, A.; SEMBDNER, G.; SCHREIBER, K. (+)-7-iso-jasmonic acid and related compounds from *Botryodiplodia theobromae*. **Phytochemistry** 26, 1037-1039, 1987.

MILLER, C. W.; DICKERSON, J. P.; RIX, C. E. Tobacco product. **US**, 3996941-19761214, 1976.

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

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

MUKHERJEE, P. K.; BUENSANTEAI, N.; MORAN-DIEZ, M. E.; DRUZHININA, I. S.; KENERLEY, C. M. Functional analysis of non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) in *Trichoderma virens* reveals a polyketide synthase (PKS)/NRPS hybrid enzyme involved in the induced systemic resistance response in maize. **Microbiology** 158, 155-165, 2012.

NIKOLAEV, I.; MATHIEU, M.; VAN DE VONDERVOORT, P.; VISSER, J.; FELENBOK, B. Heterologous expression of the *Aspergillus nidulans alcR-alcA* system in *Aspergillus niger*. **Fungal Genetics and Biology** 37, 89-97, 2002.

NKEMBO, M. K.; LEE, J. B.; NAKAGIRI, T.; HAYASHI, T. Involvement of 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in biosynthesis of aphidicolin-like tetracyclic diterpene of *Scoparia dulcis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** 54, 758-760, 2006.

NOZAKI, M. H.; CAMARGO, M.; LEMOS, E. G. M.; AUKAR, A. P. A.; BARRETO, M. Caracterização molecular através da técnica fAFLP de isolados de *Diaporthe citri*. **Summa Phytopathologica** 32, 147-50, 2006.

- OCHI, Z.; OKAMOTO, S. A magic bullet for antibiotic discovery. **Chemistry & Biology** 19, 932-934, 2012.
- 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** 13, 5267-5273, 2005.
- 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** 70, 515-520, 2007.
- 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** 70, 515-520, 2007.
- OLA, A. R.; THOMY, D.; LAI, D.; BROTZ-OESTERHELT, H.; PROKSCH, P. Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. **Journal of Natural Products** 76, 2094-2099, 2013.
- O'LEARY, N. D.; O'CONNOR, K. E.; DOBSON, A. D. Biochemistry, genetics and physiology of microbial styrene degradation. **FEMS Microbiology Reviews** 26, 403-417, 2002.
- OMACINI, M.; CHANETON, E. J.; GHERSA, C. M.; MULLER, C. B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature** 409, 78-81, 2001.
- ONAKA, H.; MORI, Y.; IGARASHI, Y.; FURUMAI, T. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. **Applied and Environmental Microbiology** 77, 400-6, 2011.
- OSTRY, V. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. **World Mycotoxin Journal** 1, 175-188, 2008.
- 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** 72, 248-252, 2009.

PATRIARCA, A.; AZCARATE, M. P.; TERMINIELLO, L.; PINTO, V. F. Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinean wheat. **International Journal of Food Microbiology** 119, 219-222, 2007.

PEDRAGOSA-MOREAU, S.; MORISSEAU, C.; ZYLBER, J.; ARCHELAS, A.; BARATTI, J.; FURSTOSS, R. Microbiological Transformations. 33. Fungal Epoxide Hydrolases Applied to the Synthesis of Enantiopure *Para*-Substituted Styrene Oxides. A Mechanistic Approach. **Journal of Organic Chemistry** 61, 7402-7407, 1996.

PERRIN, R. M.; FEDEROVA, N. D.; BOK, J. K.; CRAMER, R. A.; WORTMAN, J. R.; KIM, H. S.; NIERMAN, W. C.; KELLER, N. P. Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. **PLoS Pathogens** 3, 508-517, 2007.

PERRIN, R. M.; FEDOROVA, N. D.; BOK, J. W.; CRAMER, R. A.; WORTMAN, J. R.; KIM, H. S.; NIERMAN, W. C.; KELLER, N. P. Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. **PLoS Pathogens** 3, 508-517, 2007.

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

PETTIT, R. K. Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. **Microbial Biotechnology** 4, 471-478, 2011.

PILEGGI, S. A. V.; OLIVEIRA, S. F. V.; ANDRADE, C. W.; VICENTE, V. A.; DALZOTO, P. R.; CRUZ, G. K.; GABARDO, J.; MASSOLA, M. S.; TOZZE, H. J.; 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** 55, 1076-88, 2009.

PU, X.; LI, G.; YANG, T.; LI, G.; YI, J.; ZHANG, G.; LUO, Y. A new cyclododeca[d]oxazole derivative from *Streptomyces* spp. CIBYL1. **Natural Products Research** 27, 603-608, 2013.

RATEB, M. E.; HALLYBURTON, I.; HOUSSEN, C. E.; BULL, A. T.; GOODFELLOW, M.; SANTHANAM, R.; JASPARSA, M.; EBEL, R. Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. **RSC Advances** 3, 14444-14450, 2013.

ROBYR, D.; KURDISTANI, S. K.; GRUNSTEIN, M. Analysis of genome-wide histone acetylation state and enzyme binding using DNA microarrays. **Methods in Enzymology** 376, 289-304, 2004.

ROJO, F.; FEREZ, M.; REYNOSO, M.; TORRES, A.; CHULZE, S. Effect of *Tricoderma* species on growth of *Fusarium proliferatum* and production of fumonisins, fusaproliferin and beauvericin. **Mycotoxin Research** 23, 173-179, 2007.

ROMERO, B.; TURNER, G.; OLIVAS, I.; LABORDA, F.; DE LUCAS, J. R. The *Aspergillus nidulans* alcA promoter drives tightly regulated conditional gene expression in *Aspergillus fumigatus* permitting validation of essential genes in this human pathogen. **Fungal Genetics and Biology** 40, 103-114, 2003.

ROY, R. N.; LASKAR, S.; SEN, S. K. Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2. **Microbiological Research** 161, 121-126, 2006.

RUNGJINDAMAI, N., PINRUAN, U., CHOYEKLIN, R., HATTORI, T. AND JONES, E.B.G. Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. **Fungal Diversity** 33, 139-161, 2008.

SAIKKONEN, K.; GUNDEL, P. E.; HELANDER, M. Chemical ecology mediated by fungal endophytes in grasses. **Journal of Chemical Ecology** 39, 962-968, 2013.

SAKUDA, S.; YAMADA, Y. Stereochemistry of Butyrolactone Autoregulators from *Streptomyces*. **Tetrahedron Letters** 32, 1817-1820, 1991.

SANCHEZ, J. F.; CHIANG, Y.; WANG, C. C. C. Diversity of polyketide synthases found in the aspergillus and streptomyces genomes. **Molecular Pharmaceutics** 5, 226-233, 2008.

SÁNCHEZ, V.; REBOLLEDO, O.; PICASO, R. M.; CÁRDENAS, E.; CÓRDOVA, J.; GONZÁLEZ, O.; SAMUELS, G.J. *In vitro* antagonism of *Thielaviopsis paradoxa* by *Trichoderma longibrachiatum*. **Mycopathologia** 163, 49-58, 2007.

SANTOS, J. M.; PHILLIPS, A. J. L. Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. **Fungal Diversity** 34, 111-125, 2009.

SANTOS, J. M.; CORREIA, V. G.; PHILLIPS, A. J. L. Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. **Fungal Biology** 114, 255-70, 2010.

SCHERLACH, K.; BOETTGER, D.; REMME, N.; HERTWECK, C. The chemistry and biology of cytochalasans. **Natural Products Reports** 27, 869-886, 2010.

SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic & Biomolecular Chemistry** 7, 1753-1760, 2009.

SCHNEIDER, P.; MISIEK, M.; HOFFMEISTER, D. *In vivo* and *in vitro* production options for fungal secondary metabolites. **Molecular Pharmaceutics** 5, 234-242, 2008.

SCHROECKH, V.; SCHERLACH, K.; NUTZMANN, 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** 106, 14558-14563, 2009.

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

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

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

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

SHEN YM; MU, Q. Z. New Furans from *Cirsium chlorolepis*. **Planta Medica** 56, 472-474, 1990.

SHEN, B.; DU, L.; SANCHEZ, C.; EDWARDS, D. J.; CHEN, M.; MURRELL, J. M. Cloning and characterization of the bleomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces verticillus* ATCC 15003. **Journal of Natural Products** 65, 422-431, 2002.

SHEVCHUK, N. A.; BRYKSIN, A. V.; NUSINOVICH, Y. A.; CABELLO, F. C.; SUTHERLAND, M.; LADISCH, S. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. **Nucleic Acids Research** 32, e19, 1-12, 2004.

SHIGEMATSU, H.; KURATA, T.; KATO, H.; FUJIMAKI, M. Formation of 2-(5-Hydroxymethyl-2-formylpyrrol-1-yl)alkyl Acid Lactones on Roasting Alkyl- α -amino Acid with D-Glucose. *Agricultural and Biological Chemistry* 35, 2097-2105, 1971.

SHIN, C. S.; KIM, H. J.; KIM, M. J.; JU, J. Y. Morphological change and enhanced pigment production of *Monascus* when co-cultured with *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology and Bioengineering** 59, 576-581, 1998.

SHOJI, J. Y.; MARUYAMA, J.; ARIOKA, M.; KITAMOTO, K. Development of *Aspergillus oryzae* *thiA* promoter as a tool for molecular biological studies. **FEMS Microbiology Letters** 244, 41-46, 2005.

SHWAB, E. K.; BOK, J. W.; TRIBUS, M.; GALEHR, J.; GRAESSLE, S.; KELLER, N. P. Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. **Eukaryotic Cell** 6, 1656-1664, 2007.

SHWAB, E. K.; KELLER, N. P. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. **Mycological Research** 112, 225-230, 2008.

SIMS, J. W.; FILLMORE, J. P.; WARNER, D. D.; SCHMIDT, E. W. Equisetin biosynthesis in *Fusarium heterosporum*. **Chemical Communications** 186-188, 2005.

SIMS, J. W.; SCHMIDT, E. W. Thioesterase-like role for fungal PKS-NRPS hybrid reductive domains. **Journal of the American Chemical Society** 130, 11149-11155, 2008.

SINGH, S. B.; ZINK, D. L.; GOETZ, M. A.; DOMBROWSKI, A. W.; POLISHOOK, J. D.; HAZUDA, D. J. Equisetin and a novel opposite stereochemical homolog

phomasetin, two fungal metabolites as inhibitors of HIV-1 integrase. **Tetrahedron Letters** 39, 2243-2246, 1998.

SIRCAR, D.; MITRA, A. Accumulation of *p*-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota* 2: Confirming biosynthetic steps through feeding of inhibitors and precursors. **Journal of Plant Physiology** 166, 1370-1380, 2009.

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

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

SONG, K. S.; CHO, S. M.; KO, K. S.; HAN, M. W.; YOO, I. D. Secondary metabolites from the mycelial culture broth of *Phellinus linteus*. **Han'guk Nonghwa Hakhoechi** 37, 100-104, 1994.

SULTAN, M. Z.; MOON, S. S.; PARK, K. Natural Phthalate Derivatives from the Bacterium *Burkholderia cepacia* K87. **Journal of Scientific Research** 2, 191-195, 2010.

SUN, J.; AWAKAWA, T.; NOGUCHI, H.; ABE, I. Induced production of mycotoxins in an endophytic fungus from the medicinal plant *Datura stramonium* L. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 22, 6397-6400, 2012.

SUN, X.; ZHOU, X.; CAI, M.; TAO, K.; ZHANG, Y. Identified biosynthetic pathway of aspergiolide A and a novel strategy to increase its production in a marine-derived fungus *Aspergillus glaucus* by feeding of biosynthetic precursors and inhibitors simultaneously. **Bioresource Technology** 100, 4244-4251, 2009.

TADA, S.; GOMI, K.; KITAMOTO, K.; TAKAHASHI, K.; TAMURA, G.; HARA, S. Construction of a fusion gene comprising the Taka-amylase A promoter and the *Escherichia coli* β -glucuronidase gene and analysis of its expression in *Aspergillus oryzae*. **Molecular and General Genetics** 229, 301-306, 1991.

TAGUCHI, T.; OKAMOTO, S.; ITOH, T.; EBIZUKA, Y.; OCHI, K.; ICHINOSE, K. Actinoperylon, a novel perylenequinone-type shunt product, from a deletion mutant of the actVA-ORF5 and ORF6 genes for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Tetrahedron Letters** 49, 1208-1211, 2008.

TANG, Y. Q.; SATTLER, I.; THIERICKE, R.; GRABLEY, S.; FENG, X. Z. Parallel chromatography in natural products chemistry: isolation of new secondary metabolites from *Streptomyces* sp. **Proceedings of ECSOC-4**, 1605-1622, 2000.

TELLERIA, M. T.; DUENAS, M.; MELO, I.; MARTÍN, M. P. Morphological and molecular studies of *Hyphodermella* in the Western Mediterranean area. **Mycological Progress** 9, 585-596, 2010.

TOWLER, M. J.; WEATHERS, P. J. Evidence of artemisinin production from IPP stemming from both the mevalonate and the nonmevalonate pathways. **Plant Cell Reports** 26, 2129-2136, 2007.

TRIBUS, M.; BAUER, I.; GALEHR, J.; RIESER, G.; TROJER, P.; BROSCHE, G.; LOIDL, P.; HAAS, H.; GRAESSLE, S. A novel motif in fungal class 1 histone deacetylases is essential for growth and development of *Aspergillus*. **Molecular Biology of the Cell** 21, 345-353, 2010.

TROJER, P.; BRANDTNER, E. M.; BROSCHE, G.; LOIDL, P.; GALEHR, J.; LINZMAIER, R.; HAAS, H.; MAIR, K.; TRIBUS, M.; GRAESSLE, S. Histone deacetylases in fungi: novel members, new facts. **Nucleic Acids Research** 31, 3971-3981, 2003

TSUJIYAMA, S. I.; MINAMI, M. Production of phenol-oxidizing enzymes in the interaction between white-rot fungi. **Mycoscience** 46, 268-271, 2005.

TURGEON, B. G.; BAKER, S. E. Genetic and genomic dissection of the *Cochliobolus heterostrophus* *tox1* locus controlling biosynthesis of the polyketide virulence factor T-toxin. **Advances in Genetics** 57, 219-261, 2007.

TUROS, E.; AUDIA, J. E.; DANISHEFSKY, S. J. Total synthesis of the *Fusarium* toxin equisetin: proof of the stereochemical relationship of the tetramate and terpenoid sectors. **Journal of the American Chemical Society** 111, 8231-8236, 1989.

UL-HASSAN, S. R.; STROBEL, G. A.; BOOTH, E.; KNIGHTON, B.; FLOERCHINGER, C.; SEARS, J. Modulation of volatile organic compound formation in the Mycodiesel-producing endophyte *Hypoxylon* sp. CI-4. **Microbiology** 158, 465-473, 2012.

VAGSTAD, A. L.; NEWMAN, A. G.; STORM, P. A.; BELECKI, K.; CRAWFORD, J. M.; TOWNSEND, C. A. Combinatorial domain swaps provide insights into the rules of fungal polyketide synthase programming and the rational synthesis of non-native aromatic products. **Angewandte Chemie International Edition** 52, 1718-1721, 2013.

VALERO, A.; FARRÉ, J. R.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; MARIN, S. Effects of fungal interaction on ochratoxin A production by *A. carbonarius* at different temperatures and a_w . **International Journal of Food Microbiology** 110, 160-164, 2006.

VERGOPOULOU, S.; GALANOPOULOU, D.; MARKAKI, P. Methyl jasmonate stimulates aflatoxin B1 biosynthesis by *Aspergillus parasiticus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49, 3494-3498, 2001.

VERVOORT, H. C.; DRASKOVIC M.; CREWS, P. Histone deacetylase inhibitors as a tool to up-regulate new fungal biosynthetic products: isolation of EGM-556, a cyclodepsipeptide, from *Microascus* sp. **Organic Letters** 13, 410-413, 2011.

WALSH, C. T.; M. A. FISCHBACH. Natural Products Version 2.0: Connecting Genes to Molecules. **Journal of the American Chemical Society** 132, 2469-2493, 2010.

WANG, J. P.; LINC, W.; WRAYD, V.; LAIA, D. Induced production of depsipeptides by co-culturing *Fusarium tricinctum* and *Fusarium begonia*. **Tetrahedron Letters** 54, 2492-2496, 2013.

WANG, X.; SENA FILHO, J. G.; HOOVER, A. R.; KING, J. B.; ELLIS, T. K.; POWELL, D. R.; CICHEWICZ, R. H. Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum*. **Journal of Natural Products** 73, 942-948, 2010.

WATJEN, W.; DEBBAB, A.; HOHLFELD, A.; CHOVOLOU, Y.; KAMPKOTTER, A.; EDRADA, R. A.; EBEL, R.; HAKIKI, A.; MOSADDAK, M.; TOTZKE, F.; KUBBUTAT, M. H.; PROKSCH, P. Enniatins A1, B and B1 from an endophytic strain of *Fusarium tricinctum* induce apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by inhibition of ERK phosphorylation. **Molecular Nutrition & Food Research** 53, 431-40, 2009.

WEBER D.; GORZALCZANY S.; MARTINO V.; ACEVEDO C.; STERNER O.; ANKE T. **Zeitschrift für Naturforschung C** 60, 467-77, 2005.

WHEELER, M. H.; STIPANOVIC, R. D.; PUCKHABER, L. S. Phytotoxicity of equisetin and epi-equisetin isolated from *Fusarium equiseti* and *F. pallidoroseum*. **Mycological Research** 103, 967-973, 1999.

WHITT, J.; SHIPLEY, S. M.; NEWMAN, D. J.; ZUCK, K. M. Tetramic acid analogues produced by coculture of *Saccharopolyspora erythraea* with *Fusarium pallidoroseum*. **Journal of Natural Products** 77, 173-177, 2014.

WILLIAMS, R. B.; HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; LEE, A. E; CICHEWICZ, R. H. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Organic & Biomolecular Chemistry** 6, 1895-1897, 2008.

XIAN-LI, P. Z.; JING-XU, N. L.; MENG, D. L.; SHA, Y. A new perylenequinone from the fruit bodies of *Bulgaria inquinans*. **Journal of Asian Natural Products Research** 8, 743-746, 2006.

XU, G. B.; LI, L. M.; FANG, D. M.; LI, G. Y.; ZHANG, G. L.; WU, Z. J. Electrospray ionization tandem mass spectrometry of chaetoglobosins. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** 26, 2115–2122, 2012.

XU, S.; GE, H. M.; SONG, Y. C.; SHEN, Y.; DING, H.; TAN, R. X. Cytotoxic Cytochalasin Metabolites of Endophytic *Endothia gyrosa*. **Chemistry & Biodiversity** 6, 739-745, 2009.

XU, Y.; ZHOU, T.; ZHANG, S.; XUAN, L. J.; ZHAN, J.; MOLNÁR, I. Thioesterase domains of fungal nonreducing polyketide synthases act as decision gates during combinatorial biosynthesis. **Journal of the American Chemical Society** 135, 10783-10791, 2013.

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-Sgm** 151, 2899-2905, 2005.

YAN, J.; HAZZARD C.; BONNETT, S. A.; REYNOLDS, K. A. Functional Modular Dissection of DEBS1-TE Changes Triketide Lactone Ratios and Provides Insight into Acyl Group Loading, Hydrolysis, and ACP Transfer. **Biochemistry** 51, 9333–9341, 2012.

- YEH, H. H.; CHANG, S. L.; CHIANG, Y. M.; BRUNO, K. S.; OAKLEY, B. R.; WU, T. K.; WANG, C. C. Engineering fungal nonreducing polyketide synthase by heterologous expression and domain swapping. **Organic Letters** 15, 756-759, 2013.
- ZERIKLY, M.; CHALLIS, G. L. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. **ChemBioChem** 10, 625-633, 2009.
- ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports** 23, 753-771, 2006.
- ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORT, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances** 23, 283-333, 2005.
- ZHOU, H.; ZHAN, J.; WATANABE, K.; XIE, X.; TANG, Y. A polyketide macrolactone synthase from the filamentous fungus *Gibberella zeae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 105, 6249-6254, 2008.
- ZHU, F.; LIN, Y. C. 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** 51, 1426-1430, 2006.
- ZHU, F.; LIN, Y.; DING, J.; WANG, X.; HUANG, L. Secondary metabolites of two marine-derived mangrove endophytic fungi (strain nos. 1924# and 3893#) by mixed fermentation. **Chemistry & Industry of Forest Products** 27, 8-10, 2007.
- ZHU, X.; YU, F.; BOJJA, R. S.; ZALETA-RIVERA, K.; DU, L. J. Functional replacement of the ketosynthase domain of FUM1 for the biosynthesis of fumonisins, a group of fungal reduced polyketides. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 33, 859-868, 2006.
- ZUCK, K. M.; SHIPLEY, S.; NEWMAN, D. J. Induced production of n-formyl alkaloids from *Aspergillus fumigatus* by co-culture with *Streptomyces peucetius*. **Journal of Natural Products** 74, 1653-1657, 2011.

ANEXOS

Anexo 1. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 563 entre δ 8,6 e 6,4.

Anexo 2. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração 563 entre δ 5,0 e 2,7.

Anexo 3. Mapa de contornos de gHMQC (500 MHz, CD₃OD) da fração 563. Devido à baixa qualidade do espectro, para facilitar a visualização, as correlações foram distinguidas do ruído com círculos vermelhos.

Anexo 4. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CD_3OD) da fração 563.

Anexo 5. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CD₃OD) da fração 563, mostrando um plano de corte mais inferior dos picos. Os círculos em vermelho mostram correlações do hidrogênio com δ de 4,40 com os carbonos com δ de 133,3 e 146,0.

Anexo 6. Espectro de gCOSY (500 MHz, CD₃OD) da fração 563.

Anexo 7. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 563 entre δ 8,6 e 6,5.

Anexo 8. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 563 entre δ 5,1 e 1,9.

Anexo 9. Espectro de HR-ESI-MS da fração 563 em modo negativo (m/z calculada 367,08233), obtido em Q-TOF.

Anexo 10. Ampliação do espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da fração 5610 entre δ 8,0 e 6,9.

Anexo 11. Ampliação do espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) da fração 5610 entre δ 4,9 e 1,9.

Anexo 12. Mapa de contornos de gHMQC (500 MHz, CDCl₃) da fração 5610.

Anexo 13. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CDCl_3) da fração 5610.

Anexo 14. Espectro de gCOSY (500 MHz, CDCl_3) da fração 5610.

Anexo 15. Espectro de HR-ESI-MS da fração 5610 em modo negativo (m/z calculada 381,09798), obtido em Q-TOF.

Anexo 16. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 551 entre δ 9,0 e 6,1.

Anexo 17. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 551 entre δ 4,0 e 2,9.

Anexo 18. Mapa de contornos de gHMQC (500 MHz, CDCl₃) da fração 551.

Anexo 19. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CDCl₃) da fração 551.

Anexo 20. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CDCl_3) da fração 551, destacando as correlações do composto majoritário.

Anexo 21. Espectro de ESI-MS da fração 1aL-A7F6ac-6-3 em modo negativo, obtido em UltrO-TOF .

Anexo 22. Espectro de ESI-MS, em modo negativo, da fração 1aL-A7F6ac-6-5, obtido em UltrO-TOF .

Anexo 23. Espectro de ESI-MS, em modo negativo, da fração 1aL-A7F6ac-4-4, obtido em UltrO-TOF .

Anexo 24. Mapa de contorno de gHMQC (500 MHz, CDCl₃) da fração 1aL-A7F6ac-9-4-5.

Anexo 25. Mapa de contorno de gHMBC (500 MHz, CDCl₃) da fração 1aL-A7F6ac-9-4-5.

Anexo 26. Espectro de gCOSY (500 MHz, CDCl₃) da fração 1aL-A7F6ac-9-4-5.

Anexo 27. Espectro de ESI-MS, em modo positivo, da fração 1aL-A7F6ac-9-4-5, obtido em UltrO-TOF .

Anexo 28. Espectro de ESI-MS, em modo positivo, da fração 1aL-A7F6ac-9-4-r-5, obtido em TQ-S. Os picos com m/z 432, 434, e 494 não estão marcados no espectro.

Anexo 29. Mapa de contornos de gHMQC (500 MHz, CD₃OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1.

Anexo 30. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CD₃OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1.

Anexo 31. Espectro de ESI-MS, em modo negativo, da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6-1, obtido em TQ-S.

Anexo 32. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.

Anexo 33. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.

Anexo 34. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.

Anexo 35. Espectro de COSY (500 MHz, CD₃OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.

Anexo 36. Espectro de ESI-MS, em modo positivo, da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2, obtido em Ultra-TOF .

Anexo 37. Espectro de MS-MS do pico com m/z 197, da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2. Energia de colisão de 25 eV.

Anexo 38. Espectro de MS-MS do pico com m/z 261, da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2. Energia de colisão de 25 eV.

Anexo 39. Espectro de TOCSY (500 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.

Anexo 40. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-2.

31012014_Amostra J3

Am_J3_IDMS_02 18 (0.686) Cm (16:34)

1: Parents of 120ES+
5.48e6

Anexo 41. Espectro de massas obtido da análise de íons precursoros que originaram o íon produto de m/z 120, presente na fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-3. Análise realizada em TQ-S.

31012014_Amostra J3 - MS/MS - m/z 261

Am_J3_261_01 27 (0.916) Cm (16:48)

1: Daughters of 261ES+
3.01e6

Am_J3_261_01 21 (0.710) Cm (17:43)

2: Daughters of 261ES+
4.56e6

Anexo 42. Espectro de MS-MS obtido da análise do íon de m/z 120, presente na fração 1aL-A7F6ac-12-7-6j-3.

Anexo 43. Ampliação do espectro de RMN de ^1H da fração 1aL-A7F6ac-5-5.

Anexo 44. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CDCl_3) da fração 1aL-A7F6ac-5-5.

Anexo 45. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CDCl_3) da fração 1aL-A7F6ac-5-5.

Anexo 46. Espectro de gCOSY (500 MHz, CDCl₃) da fração 1aL-A7F6ac-5-5.

Anexo 47. Espectro de ESI-MS, em modo positivo, da fração 1aL-A7F6ac-5-5 analisada em UltrO-TOF . Os picos de m/z referentes às moléculas protonada (m/z 256) e cationizada com sódio (m/z 278) do composto 1 podem ser distinguidos no espectro.

Anexo 48. Espectro de ESI-MS, em modo positivo, da fração 1aL-A7F6ac-5-5 analisada em TQ-S. Os picos de m/z referentes à molécula protonada (m/z 222) do composto 2, e às moléculas protonada (m/z 256) e cationizada com sódio (m/z 278) do composto 1 podem ser distinguidos no espectro.

Anexo 49. Cromatograma por detecção do íon produto de m/z 120 (superior) do extrato da cultura simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 em meio líquido e espectro de massas do pico com tr de 5,20 min (inferior). Análise realizada em TQ-S.

Anexo 50. Cromatograma por detecção do íon produto de m/z 120 (superior) do extrato da cultura mista do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 em meio líquido e espectro de massas do pico com tr de 5,19 min (inferior). Análise realizada em TQ-S.

21032013_Amostra_F6_2_Ion Precursor m/z 120

F6_2_Ion_Precursor_01 Sm (Mn, 2x2)

Parents of 120ES+
BPI
2.45e6

21032013_Amostra_F6_2_Ion Precursor m/z 120

F6_2_Ion_Precursor_01 606 (4.041) Sm (SG, 3x0.75); Cm (592:634)

Parents of 120ES+
4.43e5

Anexo 51. Cromatograma por detecção do íon produto de m/z 120 (superior) da fração 2 do extrato da cultura simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 em meio sólido e espectro de massas do pico com tr de 4,05 min (inferior). Análise realizada em TQ-S.

21032013_Amostra_F6_3_Ion Precursor m/z 120

F6_3_Ion_Precursor_01 Sm (Mn, 2x3)

Parents of 120ES+
TIC
3.34e9

Anexo 52. Cromatograma por detecção do íon produto de m/z 120 (superior) da fração 3 do extrato da cultura simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 em meio sólido. Análise realizada em TQ-S.

21032013_Amostra_F6_3_Ion Precursor m/z 120

F6_3_Ion_Precursor_01 605 (4.035) Sm (SG, 3x0.75); Cm (594:621)

Parents of 120ES+
2.72e7 **21032013_Amostra_F6_3_Ion Precursor m/z 120**

F6_3_Ion_Precursor_01 658 (4.388) Sm (SG, 3x0.75); Cm (647:676)

Parents of 120ES+
2.50e6 **21032013_Amostra_F6_3_Ion Precursor m/z 120**

F6_3_Ion_Precursor_01 691 (4.609) Sm (SG, 3x0.75); Cm (677:706)

Parents of 120ES+
8.22e6 **21032013_Amostra_F6_3_Ion Precursor m/z 120**

F6_3_Ion_Precursor_01 774 (5.162) Sm (SG, 3x0.75); Cm (756:799)

Parents of 120ES+
5.71e7 **21032013_Amostra_F6_3_Ion Precursor m/z 120**

F6_3_Ion_Precursor_01 855 (5.703) Sm (SG, 3x0.75); Cm (851:860)

Parents of 120ES+
1.68e6

Anexo 53. Espectros de massas dos picos com tr de 4,04, 4,39, 4,61, 5,16 e 5,70 min, respectivamente, do cromatograma por detecção do íon produto de m/z 120 da fração 3 do extrato da cultura simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 em meio sólido. Análise realizada em TQ-S.

Anexo 54. Espectros de massas dos picos com tr de 6,02, 6,20 e 6,52 min, respectivamente, do cromatograma por detecção do íon produto de m/z 120 da fração 3 do extrato da cultura simples do fungo *Phomopsis* sp. FLe6 em meio sólido. Análise realizada em TQ-S.

Anexo 55. Espectro de massas obtido da análise de íons precursores que originaram o íon produto de m/z 120, presente na fração aF6-4, analisada em TQ-S.

31012014_Amostra aF6-4 - MS/MS - m/z 450

Am_aF6-4_450_01 19 (1.020) Cm (10:30)

3: ScanWave DS of 450ES+
1.05e6

Anexo 59. Espectro de MS-MS do íon com m/z 450, da fração aF6-4. Energia de colisão de 10 e 20 eV.

31012014_Amostra aF6-4 - MS/MS - m/z 476

Am_aF6-4_476_01 21 (1.130) Cm (10:30)

3: ScanWave DS of 476ES+
7.77e5

Anexo 60. Espectro de MS-MS do íon com m/z 476, da fração aF6-4. Energia de colisão de 10 e 20 eV.

31012014_Amostra aF6-4 - MS/MS - m/z 492

Am_aF6-4_492_01 20 (1.075) Cm (10:30)

3: ScanWave DS of 492ES+
5.70e5

Anexo 61. Espectro de MS-MS do íon com m/z 492, da fração aF6-4. Energia de colisão de 10 e 20 eV.

Anexo 62. Espectro de MS-MS do íon com m/z 494, da fração aF6-4. Energia de colisão de 10 e 20 eV.

Anexo 63. Espectros de massas das frações aA7F6-5 (inferior) e aA7F6-6 (superior), em modo positivo, analisadas em TQ-S.

Anexo 64. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração aA7F6-1-3.

Anexo 65. Ampliação espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da de aA7F6-1-3, mostrando apenas δ 8,8 a δ 5,4.

Anexo 66. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração aA7F6-2-8.

Anexo 67. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração aA7F6-2-8.

Anexo 68. Espectro de COSY (500 MHz, CDCl_3) da fração aA7F6-2-8.

Anexo 69. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CDCl_3) da fração aA7F6-2-8.

Anexo 70. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CDCl_3) da fração aA7F6-2-8.

Anexo 71. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) da fração aA7F6-2-14, mostrando apenas δ 2,7 a δ 4,6.

Anexo 72. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD₃OD) da fração aA7F6-2-14, mostrando apenas δ 0,8 a δ 2,3.

Anexo 73. . Espectro de COSY (500 MHz, CD₃OD) da fração aA7F6-2-14.

Anexo 74. Mapa de contornos de gHMQC (500 MHz, CD₃OD) da fração aA7F6-2-14.

Anexo 75. Mapa de contornos de gHMBC (500 MHz, CD₃OD) da fração aA7F6-2-14.

08012014_Amostra 2-14
2_14_IDMS_01 30 (0.807) Cm (21:51)

1: Scan ES+
9.47e7

Anexo 76. Espectro de massas, em modo positivo, da fração aA7F6-2-14, obtido em TQ-S.

08012014_Amostra A7F6-27
A7F6_27_IDMS_01 32 (0.861) Cm (20:56)

1: Scan ES+
1.17e8

Anexo 77. Espectro de massas, em modo positivo, da fração aA7F6-2-7, obtido em TQ-S.

08012014_Amostra 2-15

2_16_IDMS_01 29 (0.793) Cm (21:40)

2: Scan ES-
2.00e7

2_16_IDMS_01 29 (0.779) Cm (21:51)

1: Scan ES+
1.15e8

Anexo 78. Espectro de massas, em modo positivo, da fração aA7F6-2-16, obtido em TQ-S.

09122013_Amostra A1A2_21

A1A2_21_IDMS_01 27 (0.828) Cm (17:54)

2: Scan ES-
9.99e7

A1A2_21_IDMS_01 26 (0.782) Cm (17:52)

1: Scan ES+
1.24e8

Anexo 79. Espectro de massas, em modo positivo (inferior) e negativo (superior), da fração aA1A2-2-1, obtido em TQ-S.

09122013_Amostra A1A2_22

A1A2_22_IDMS_01 26 (0.798) Cm (18:49)

2: Scan ES-
8.10e7

A1A2_22_IDMS_01 25 (0.752) Cm (18:50)

1: Scan ES+
9.36e7

Anexo 80. Espectro de massas, em modo positivo (inferior) e negativo (superior), da fração aA1A2-2-2, obtido em TQ-S.

09122013_Amostra A1A2_24

A1A2_24_IDMS_01 26 (0.798) Cm (17:50)

2: Scan ES-
8.77e7

A1A2_24_IDMS_01 26 (0.782) Cm (18:50)

1: Scan ES+
1.27e8

Anexo 81. Espectro de massas, em modo positivo (inferior) e negativo (superior), da fração aA1A2-2-4, obtido em TQ-S.

09122013_Amostra A1A2_27

A1A2_27_IDMS_01 26 (0.798) Cm (17:52)

2: Scan ES-
1.14e8

Anexo 82. Espectro de massas, em modo positivo (inferior) e negativo (superior), da fração aA1A2-2-7, obtido em TQ-S.

09122013_Amostra A1A2_28

A1A2_28_IDMS_01 26 (0.767) Cm (17:48)

2: Scan ES-
8.59e7

Anexo 83. Espectro de massas, em modo positivo (inferior) e negativo (superior), da fração aA1A2-2-8, obtido em TQ-S.

Anexo 84. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da fração aA1A2-2-9.

Anexo 85. Ampliação do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da fração aA1A2-2-9.

Anexo 86. Espectro de massas, em modo positivo (inferior) e negativo (superior), da fração aA1A2-2-9, obtido em TQ-S.