ORLANDO LUIZ AMADO GIARLETTI

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE METABÓLITOS
PRODUZIDOS PELO FUNGO *EPICOCCUM NIGRUM* ISOLADO
DE *RIZOPHORA MANGLE***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Ciências – Biotecnologia.

São Paulo
2014

ORLANDO LUIZ AMADO GIARLETTI

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE METABÓLITOS
PRODUZIDOS PELO FUNGO *EPICOCCUM NIGRUM* ISOLADO
DE *RIZOPHORA MANGLE***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Ciências – Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Ana Olívia de Souza

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Giarletti, Orlando Luiz Amado.

Estudo da atividade antifúngica de metabólitos produzidos pelo fungo *Epicoccum nigrum* isolado de *Rizophora mangle* / Orlando Luiz Amado Giarletti. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Ana Olívia de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Pesquisa de agentes antimicrobianos a partir da biodiversidade.

Versão do título para o inglês: Study of the antifungal activity of metabolites produced by the fungus *Epicoccum nigrum* isolated from *Rizophora mangle*.

1. Fungos 2. Antifúngicos 3. Manguezal 4. Isolamento & Purificação
5. *Epicoccum nigrum* I. Souza, Profa. Dra. Ana Olívia de
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB032/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Orlando Luiz Amado Giarletti.

Título da Estudo da atividade antifúngica de metabólitos produzidos
pelo fungo *Epicoccum nigrum* isolado de *Rizophora mangle*.

Orientador(a): Profa. Dra. Ana Olívia de Souza.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 22 de junho de 2012.

Protocolo: I-948/12

Dr. Ana Olívia de Souza
Laboratório de Bioquímica e Biofísica
Instituto Butantan

**Referente Projeto: "Estudo químico de extrato bruto antifúngico
produzido por fungo isolado de manguezal".**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) informa que o projeto acima referido é isento de análise por parte desta Comissão, pois não faz uso de animais vertebrados em sua execução.

Cordialmente,

Dr. Marcelo Larami Santoro
Coordenador da CEUAIB

Este trabalho é dedicado a meus pais, Conceição e Luiz, meus exemplos de vida, pelo amor incondicional, sacrifício, constante incentivo, paciência e compreensão.

Devo tudo que sou a vocês! Muito obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Ana Olívia de Souza** pela oportunidade, confiança, apoio e ensinamentos durante o período de realização deste trabalho no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.

Ao **Instituto Butantan** e à **Universidade de São Paulo** por toda estrutura que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos professores **Dr. Pedro Ismael da Silva Júnior, Dr. André Gustavo Tempone Cardoso** e **Dr. Wellington Luiz de Araújo** pelas preciosas sugestões no exame de qualificação.

À **Dra. Toshie Kawano** (in memoriam) por ter me iniciado na ciência e pesquisa. Foi um grande exemplo de pessoa e pesquisadora para mim.

A meus pais, **Luiz** e **Conceição**, pelo apoio incondicional e suporte. Nada disso seria possível se não fossem os esforços de vocês dedicados a mim.

À minha esposa e melhor amiga, **Suellen**, por acreditar em mim nos momentos em que eu mesmo já não acreditava. Além de sempre ter sido compreensiva com minhas limitações, deu-me muita força para seguir em frente.

Aos companheiros de laboratório **Alexandre** e **Liu**, que colaboraram diretamente com a realização deste trabalho com troca de experiência e discussões importantes, além de proporcionarem um bom ambiente para isso.

Às técnicas **Vera** e **Patrícia** que colaboraram de modo fundamental sempre que necessário.

Aos familiares **Nazinha, Atushi, Rosane, Isa** e **Neguinho** pelos bons momentos, preocupação, acolhimento e ajuda de todo tipo.

Aos meus amigos de longa data **Bruno, Diego, Dênis, Émerson** e **Samuel**, meus “brothers” para sempre, independentemente do tempo que fiquemos sem nos falar. Sei que sempre poderei contar com cada um de vocês.

À **CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)** pelo auxílio financeiro e incentivo durante o desenvolvimento do projeto.

“A vida resulta da sobrevivência
não-aleatória de replicadores
aleatoriamente mutantes”

Richard Dawkins

RESUMO

GIARLETTI, O. L. A. **Estudo da atividade antifúngica de metabólitos produzidos pelo fungo *Epicoccum nigrum* isolado de *Rizophora mangle***. 2014. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O atual arsenal de drogas antifúngicas é limitado, enquanto a frequência e variedade de infecções fúngicas profundas está aumentando, especialmente em países em desenvolvimento. Assim, novas drogas antifúngicas mais eficientes e menos tóxicas são necessárias. Microrganismos são importante fonte de metabólitos secundários bioativos, neste aspecto, o mangue brasileiro é um bioma inexplorado. O mangue é um ambiente extremo, com rica diversidade de microrganismos. O fungo *Epicoccum nigrum* foi isolado de folhas de *Rhizophora mangle* e apresentou halo de inibição contra fungos patogênicos. O objetivo deste trabalho foi purificar o extrato bruto obtido a partir de *E. nigrum* e caracterizar as moléculas antifúngicas isoladas. *E. nigrum* foi cultivado em meio líquido batata dextrose a 28 °C, 150 rpm por 14 dias. O sobrenadante foi extraído com hexano (HEX), diclorometano (DCM) e acetato de etila (AE). Frações e subfrações do extrato bruto foram obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), fase reversa. A atividade antifúngica das frações e subfrações foram avaliadas *in vitro* por ensaio de microdiluição (Concentração Inibitória Mínima – CIM) nas concentrações abaixo de 500 µg/mL contra *C. albicans* ATCC 36802/IOC 3704 (CA), *T. rubrum* IOC 4527 (TR), *C. neoformans* IOC 4528 (CN) e *A. fumigatus* IOC 4526 (AF). A CIM é definida como a menor concentração capaz de inibir ao menos 90% do crescimento do patógeno. A caracterização das frações foi realizada por espectrometria de massa (LC/MS e CG/MS) e ressonância magnética nuclear (RMN). O extrato bruto de HEX inibiu todos os patógenos com valores de CIM entre 31,25 e 62,5 µg/mL, enquanto a inibição dos patógenos com extrato bruto obtido de DCM foi menor, com valores de CIM entre 62,5 e 250 µg/mL, mas seu rendimento em massa foi maior. O extrato bruto obtido de AE não inibiu o crescimento dos patógenos. O perfil cromatográfico do extrato bruto HEX mostrou-se mais simples do que o DCM, sendo ambos fracionados (de HEX-F1 a HEX-F9 e de DCM-F1 a DCM-F10). Das frações de HEX apenas HEX-F9 apresentou atividade antifúngica promissora, com CIM entre 31,25 e 250 µg/mL, exceto sobre AF. As frações DCM-F3, F5, F6, F9 e F10 apresentaram atividade antifúngica mais promissora, especialmente DCM-F6 (com valores de CIM entre 31,25 e 250 µg/mL contra todos os patógenos) e DCM-F9 (com valores de CIM entre 62,5 e 250 µg/mL contra CA, TR e CN). Em seguida, DCM-F6 teve seu principal pico antifúngico determinado, mas não mais produzido em culturas subsequentes. Percebeu-se que o perfil cromatográfico de DCM-F9 era o mesmo de HEX-F4, mas a atividade deste último não foi determinada inicialmente provavelmente por excesso de precipitado na fração, causando erro na diluição. Os resultados do LC/MS, CG/MS e RMN sugeriram uma fração impura, dificultando a determinação do composto principal. Novas abordagens estão sendo avaliadas.

Palavras-chave: Fungos. Antifúngicos. Manguezal. Isolamento & Purificação. *Epicoccum nigrum*.

ABSTRACT

GIARLETTI, O. L. A. **Study of the antifungal activity of metabolites produced by the fungus *Epicoccum nigrum* isolated from *Rizophora mangle***. 2014. 85 f. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The current antifungal arsenal of drugs is limited while the frequency and diversity of severe fungal infections are increasing, mainly in developing countries. Thus, new antifungal drugs more efficient and less toxic are needed. Microorganisms are source of important bioactive secondary metabolites and in this aspect Brazilian mangrove is an unexplored biome. The mangrove can be an extreme environment and its microorganism diversity is rich. The fungus *Epicoccum nigrum* was isolated from the leaves of *Rhizophora mangle* and showed inhibition zone against pathogenic fungus under laboratorial growth. The aim of this study was to purify the crude extract produced from *E. nigrum* and perform the characterization of the antifungal isolated molecules. *E. nigrum* was cultivated in potato dextrose broth at 28°C, 150 rpm for 14 days. The culture supernatant was extracted with hexane (HEX), dichloromethane (DCM) and ethyl acetate (AE). Fractions and sub-fractions of the crude extract were obtained by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), reversed phase. The antifungal activity of the sub or fractions were evaluated *in vitro* by microdilution assay (Minimal Inhibitory Concentration - CIM) at concentrations lower than 500 µg/mL against *C. albicans* ATCC 36802/IOC 3704 (CA), *T. rubrum* IOC 4527 (TR), *C. neoformans* IOC 4528 (CN) and *A. fumigatus* IOC 4526 (AF). The CIM was defined as the lowest concentration that inhibits at least 90% of the pathogens growth. The characterization of fractions was performed by mass spectrometry (LC/MS and CG/MS) and nuclear magnetic resonance (RMN). The HEX crude extract inhibited all pathogens with CIM values ranging from 31,25 to 62,5 µg/mL, while DCM crude extract pathogens inhibition was lower with CIM values ranging from 62,5 to 250 µg/mL, but its mass production of extract was much higher. The AE crude extract had no inhibition effect on the pathogens. The chromatographic profile of the HEX extract was simpler than the DCM one and both were fractionated (from HEX-F1 to HEX-F9 and from DCM-F1 to DCM-F10). From HEX fractions only HEX-F9 showed promising antifungal activity with CIM ranging from 31,25 to 250 µg/mL, but it didn't inhibit AF. The DCM-F3, F5, F6, F9 and F10 fractions showed more promising antifungal activity, mainly, DCM-F6 (CIM values ranging from 31,25 and 62,5 µg/mL against all pathogens) and DCM-F9 (CIM values ranging from 62,5 and 250 µg/mL against CA, TR and CN). After, DCM-F6 had its main antifungal peak determined, but was not produced anymore by the fungus in the subsequent cultures. It was found that DCM-F9 chromatographic profile was the same as HEX-F4, but the last one activity hadn't been detected initially probably by excess precipitate in the fraction, causing a dilution error. The F9-DCM LC/MS, CG/MS and RMN results suggested impure fraction, making difficult to determine the mainly compound. New approaches are being considered.

Keywords: Fungi. Antifungal agents. Mangrove. Isolation & Purification. *Epicoccum nigrum*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FC – flucitosina

5-FU – 5-fluorouracila

A. flavus – *Aspergillus flavus*

A. fumigatus – *Aspergillus fumigatus*

A. melleus – *Aspergillus melleus*

A. nidulans – *Aspergillus nidulans*

A. niger – *Aspergillus niger*

A. terreus – *Aspergillus terreus*

ABCD – anfotericina B em dispersão coloidal

ABLC – anfotericina B em complexo lipídico

ACV – alanina-cisteína-valina

AE – acetato de etila

AIDS – síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AMB – anfotericina B

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

B. dermatitides – *Blastomyces dermatitides*

B. subtilis – *Bacillus subtilis*

BD – batata dextrose

BDA – batata dextrose ágar

BHT – hidroxitolueno butilado

C. albicans – *Candida albicans*

C. glabrata – *Candida glabrata*

C. immitis - *Coccidioides immitis*

C. krusei – *Candida krusei*

C. neoformans – *Cryptococcus neoformans*

C. parapsilosis – *Candida parapsilosis*

C. tropicalis – *Candida tropicalis*

CIM – concentração inibitória mínima

DCM – diclorometano

DMSO - dimetilsufóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico
DNAr – ácido desoxirribonucleico ribossômico
dNTP – desoxirribonucleotídeos fosfatados
E. coli – *Escherichia coli*
E. nigrum – *Epicoccum nigrum*
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
EMAR – espectrometria de massas de alta resolução
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
eV – elétron-volt
FDA - United States Food and Drug Administration
g – gravidade
h – hora
H. capsulatum – *Histoplasma capsulatum*
HAART – terapia anti-retroviral altamente ativa
HEX – hexano
HIV – vírus da imunodeficiência humana
HIV-1 – vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
IC₅₀ – concentração inibitória 50%
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
IV – infravermelho
L-AMB – anfotericina B lipossomal
M. audouinii – *Microsporium audouinii*
M. mycetomatis – *Madurella mycetomatis*
MHz - Megahertz
min – minuto
NCBI – National Center for Biotechnology Information
NCCLS (CLSI) - Clinical and Laboratory Standards Institute
NRPS – peptídeo sintetase não ribossomal
P. brasiliensis – *Paracoccidioides brasiliensis*
P. brevicompactum – *Penicillium brevicompactum*
P. marneffei – *Penicillium marneffei*
PBP – proteínas ligadoras de penicilina
PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico
PK – policetídeo
PKS – policetídeo sintetase
RMN – ressonância magnética nuclear
RNA – ácido ribonucleico
RNAm – ácido ribonucleico mensageiro
rpm – rotações por minuto
RPMI – Roswell Park Memorial Institute
S – sul
S. aureus – *Staphylococcus aureus*
S. apiospermum – *Scedosporium apiospermum*
S. schenckii – *Sporothrix schenckii*
SDS – dodecil sulfato de sódio
sp – espécie
SP – São Paulo
spp – espécies
ST - esterigmatocistina
T. andreanae – *Taxomyces andreanae*
T. mentagrophytes – *Trichophyton mentagrophytes*
T. rubrum – *Trichophyton rubrum*
T. violaceum – *Trichophyton violaceum*
TBE – tris/borato/EDTA
TFA – ácido trifluoroacético
Tris-HCl – trisaminometano hidrocloreto
UFC – unidades formadoras de colônia
v – volume
V – volts
W – oeste

LISTA DE SÍMBOLOS

% – por cento

~ – aproximadamente

' – minutos

” – segundos

> – maior que

$\leq$ – menor ou igual que

® – marca registrada

AgNO₃ – nitrato de prata

CH₂Cl₂ – cloreto de metileno, diclorometano

H₂O – água

MeOH – metanol

MgCl₂ – cloreto de magnésio

NaCl – cloreto de sódio

° – graus

°C – graus Celsius

™ – marca registrada

US\$ – dólares americanos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Unidades formadoras de colônias (UFC/m) do fungo R-2BI-8 com relação a absorbâncias a 590 nm	50
Figura 2 – Representação do fluxograma de fracionamento dos extratos orgânicos obtidos a partir da cultura do fungo R-2BI-8, e de suas respectivas frações e subfrações	52
Figura 3 - Perfil cromatográfico do extrato R-2BI-8-HEX	53
Figura 4 – Perfil cromatográfico do extrato R-2BI-8-DCM	53
Figura 5 – Perfil cromatográfico da fração R-2BI-8-DCM-F3, subfracionada em 7 subfrações (F3-1 a F3-7)	55
Figura 6 – Perfil cromatográfico do extrato R-2BI-8-DCM-F5, subfracionado em 4 subfrações (F5-1 a F5-4)	56
Figura 7 – Perfil cromatográfico do extrato R-2BI-8-DCM-F6, subfracionado em 5 subfrações (F6-1 a F6-5)	57
Figura 8 – Perfil cromatográfico do extrato R-2BI-8-DCM-F9	58
Figura 9 – Perfil cromatográfico do extrato R-2BI-8-HEX-F9	58
Figura 10 – Perfil cromatográfico do extrato R-2BI-8-DCM-F6-1 purificado	60
Figura 11 – Perfil cromatográfico de DCM-F9 em CG/MS	61
Figura 12 - Espectro de RMN da fração DCM-F9	62
Figura 13 – Árvore fenética, via Blast do fungo R-2BI-8, identificado como <i>Epicoccum nigrum</i>	63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Métodos de fracionamento em HPLC dos extratos/frações obtidos a partir da cultura do fungo R-2BI-8 47
- Tabela 2** – CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos brutos contra os fungos patogênicos *C. albicans* ATCC 36802, *C. neoformans* IOC 4528, *A. fumigatus* IOC 4526 e *T. rubrum* IOC 452751
- Tabela 3** – CIM ($\mu\text{g/mL}$) das frações obtidas a partir de R-2BI-8-HEX e R2-BI-8-DCM contra os fungos patogênicos *C. albicans* ATCC 36802, *C. neoformans* IOC 4528, *A. fumigatus* IOC 4526 e *T. rubrum* IOC 452753
- Tabela 4** – CIM das subfrações obtidas a partir das frações F3, F5 e F6 do extrato R2-BI8-DCM contra os fungos patogênicos *C. albicans* ATCC 36802, *C. neoformans* IOC 4528, *A. fumigatus* IOC 4526 e *T. rubrum* IOC 452759

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Fungos e infecções fúngicas	19
2.1.1 Micoses superficiais	20
2.1.2 Micoses subcutâneas	21
2.1.3 Micoses sistêmicas	23
2.1.4 Compostos antifúngicos	26
2.2 Fungos de manguezal	31
2.3 Produtos naturais isolados de fungos	32
2.3.1 Importância de produtos naturais obtidos de fungos	33
2.4 Mecanismos fúngicos para regular a produção de metabólitos secundários	35
2.5 Fungo <i>Epicoccum nigrum</i>	37
2.5.1 Compostos isolados de <i>E. nigrum</i>	38
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Coleta, isolamento e manutenção do fungo R-2BI-8	44
4.2 Estabelecimento da relação do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) pela absorbância para emprego nos inóculos	44
4.3 Produção de extratos orgânicos	44
4.4 Avaliação da ação antifúngica pelo ensaio de concentração inibitória mínima (CIM)	45
4.5 Avaliação da concentração fungicida (CF)	45
4.6 Fracionamento dos extratos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC)	46
4.7 Caracterização dos compostos antifúngicos	47
4.8 Identificação taxonômica do fungo R-2BI-8 por análise molecular	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Estabelecimento do número de UFC/mL a ser usado na produção de extratos orgânicos	49
5.2 Obtenção de extratos orgânicos	50

5.3 Ação antifúngica dos extratos orgânicos e fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC)	50
5.4 Caracterização dos compostos antifúngicos	59
5.5 Identificação taxonômica do fungo R-2BI-8 por análise molecular	61
6 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICE – Compostos isolados de <i>E. nigrum</i>	74

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são conhecidos pela humanidade desde há muitos séculos pela ampla aplicação na produção de alimentos como massas, queijos e bebidas de alto valor nutricional e degustativo (SILVA; COELHO, 2006). Além disso, muitas espécies estão sendo estudadas para aplicação no tratamento de resíduos industriais têxteis e papeleiros de difícil degradação, no tratamento de esgotos, biorremediação de solos e na indústria farmacêutica (GIMENES, 2010).

O descobrimento do primeiro antibiótico, a penicilina, em 1928, a partir do fungo *Penicillium chrysogenum*, abriu um novo campo de estudo para a microbiologia envolvendo a pesquisa de antibióticos (IWAI; TAKAHASHI, 1992). Assim, Santos (2001) destaca a importância da biodiversidade, que com o desenvolvimento da biotecnologia, está sendo mais estudada e pode oferecer possibilidades de desenvolvimento ao país, principalmente na área farmacêutica.

Kathiresan e Bingham (2001) explicam que os mangues são ambientes de interação entre ecossistemas terrestres e marinhos, com alta salinidade, temperatura, solo anaeróbico e lamacento. Para sobreviver neste ambiente com condições extremas, as plantas possuem adaptações morfofisiológicas exclusivas. Os mangues ainda são pouco compreendidos e a diversidade de fungos encontrada em *habitats* individuais é surpreendente, incluindo novas espécies e até novos gêneros. No entanto, são raros os trabalhos de bioprospecção realizados em mangues brasileiros.

Moretti (2007) e Warnock (2007) relatam que o número de infecções fúngicas invasivas e oportunistas vem aumentando nos últimos anos, especialmente nos países em desenvolvimento, devido ao aumento de indivíduos imunocomprometidos e da sobrevivência de pacientes com risco de morte. Warnock (2007) também destaca que o grande crescimento urbano e mudanças nos padrões de uso do solo aumentam a chance de infecções fúngicas endêmicas. Além disso, Moretti (2007) explica que o número de drogas antifúngicas é bastante restrito e que são necessárias novas drogas mais eficazes e menos tóxicas. Considerando esta abordagem, uma espécie de fungo isolado de mangue do estado de São Paulo foi empregada neste estudo na pesquisa de substâncias com ação antifúngica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2 Fungos e Infecções fúngicas

Os fungos são organismos eucarióticos e heterotróficos, que se alimentam por absorção de nutrientes. Assim, tornaram-se saprófitos, parasitas ou simbiontes. Apenas no final da década de 1960 foram classificados em um reino à parte, denominado Fungi (MANOHARACHARY; KUNWAR; REDDY, 2010). As características dos fungos os aproximam mais aos animais do que aos vegetais, pois, vegetais são autótrofos e realizam fotossíntese, armazenando amido como fonte de reserva energética, enquanto fungos e animais são heterotróficos e armazenam glicogênio. Além disso, fungos apresentam quitina em sua parede celular como principal componente, também encontrado no exoesqueleto de artrópodes (animais), enquanto as plantas apresentam celulose como principal componente da parede celular (GOMPERTZ et al., 2008).

Apesar dessa maior semelhança com células animais, ainda há muita discussão acerca da origem filogenética do reino Fungi. Gouy e Li (1989) analisaram sequências de diversas macromoléculas comuns aos três reinos e concluíram que o reino Fungi originou-se antes de Animalia e Plantae, que formariam clados irmãos. Os mesmos resultados foram obtidos por Veuthey e Bittar (1998) ao analisar proteínas ribossômicas. No entanto, devido à falta de evidência fóssil, ainda não está clara a relação entre os três reinos e mais estudos são necessários (MANOHARACHARY; KUNWAR; REDDY, 2010).

Enquanto leveduras (fungos unicelulares) comuns a microbiota humana são capazes de desencadear infecção frente à perda do equilíbrio parasita-hospedeiro, fungos filamentosos (bolors) normalmente não fazem parte da microbiota animal e, portanto, o homem não é um reservatório importante para esse grupo de fungos. As portas de entrada destes no hospedeiro são as vias aéreas superiores ou as lesões epidérmicas após traumatismos perfuro-cortantes. Apesar dos fungos serem estimados em cerca de 250 mil espécies, menos de 150 são descritas como patogênicas aos seres humanos, capazes de causar infecções fúngicas (micoses) (ANVISA, 2004).

Alguns fungos causam doenças em indivíduos saudáveis, no entanto a maioria torna-se patogênica quando o hospedeiro está de alguma forma debilitado, como o sistema imunológico comprometido pelo vírus da AIDS, por quimioterapia ou por drogas imunossupressoras. Alguns fungos são dimórficos, e na natureza, a 24-28 °C, formam colônias filamentosas, entretanto em meios especiais e a 35-37 °C desenvolvem uma forma

leveduriforme ou parasitária. As micoses podem ser classificadas em superficiais, quando ocorrem nas camadas externas da pele, unhas, cabelo e mucosas; subcutâneas, quando ocorrem na derme e tecidos subcutâneos; e sistêmicas ou profundas, quando atingem tecidos profundos ou órgãos internos (GARBER, 2001).

Em países desenvolvidos, antes do uso difundido da terapia anti-retroviral altamente ativa (HAART), cerca de 80% dos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) desenvolviam candidíase de mucosas, enquanto outros desenvolviam criptococose e outras infecções fúngicas letais, como a penicilose. Nesses países, a difusão da HAART reduziu de forma notável as infecções fúngicas oportunistas associadas à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Em contraste, nos países em desenvolvimento, a incidência dessas doenças é alta e ainda está em crescimento (SLAVIN; CHAKRABARTI, 2012; WARNOCK, 2007).

2.1.1 Micoses superficiais

Apesar das variações regionais, as micoses superficiais apresentam distribuição global. Algumas passam de criança para criança como infecções endêmicas, enquanto outras são mais comuns em regiões tropicais devido ao clima e às condições sociais (HAY, 2006). A maior parte destas infecções é causada por fungos dermatófitos, que são degradadores de queratina e pertencem principalmente aos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. A transmissão se dá pelo contato direto com pessoas, animais, solo ou objetos contaminados. A infecção recebe o nome dependendo da localização, como do couro cabeludo (*Tinea capitis*), dos pés (*Tinea pedis*), das mãos (*Tinea manun*), das unhas (*Tinea unguium*), da barba (*Tinea barbae*) e do corpo (*Tinea corporis*). *Tinea pedis*, popularmente chamada de frieira ou pé-de-atleta, é a micose mais frequente, mesmo em países desenvolvidos. É causada por *T. rubrum* ou *T. mentagrophytes* e deixa o local suscetível a infecção bacteriana secundária (GARBER, 2001). *Tinea capitis* é uma infecção de destaque em áreas tropicais, causada por *T. violaceum* e *M. audouinii*, especialmente na África, onde não é raro encontrar uma escola com mais de 20% de crianças infectadas. Em áreas desenvolvidas é comum a ocorrência de casos importados ou em imigrantes. Infecções por *Scytalidium* sp são semelhantes às dermatofitoses, afetando mãos, pés e unhas, mas de ocorrência ainda pouco estudada (HAY, 2006).

Outra micose superficial importante é a pitíriase versicolor, causada por leveduras do gênero *Malassezia*, presente naturalmente na pele humana (GARBER, 2001). Hay (2006) explica que essa infecção é mais frequente em áreas tropicais, pois o calor parece aumentar a

forma micelar da levedura. A infecção manifesta-se por descamação e hipo ou hiperpigmentação na pele, dependendo da espécie infectante. Garber (2001) cita infecções sistêmicas oportunistas causadas por *Malassezia* spp, associadas à nutrição parenteral.

A tinea nigra, causada por *Phaeoannelomyces werneckii* também é uma micose superficial de ocorrência em áreas tropicais. Caracteriza-se por manchas negras ou marrons irregulares, geralmente nas mãos (HAY, 2006). Piedra negra é outro exemplo, causada pelo fungo *Piedraia hortae*, de ocorrência principalmente na África, Ásia e América Central (LUPI; TYRING; MCGINNIS, 2005).

As principais micoses de mucosas são as candidíases, causadas por leveduras do gênero *Candida*, especialmente *C. albicans*, e afetam principalmente boca, esôfago e genitálias. É a principal infecção ginecológica em mulheres saudáveis. No entanto, cerca de 90% dos indivíduos com AIDS desenvolve candidíase orofaríngea, sendo uma das complicações mais comuns da doença. Apesar de *C. albicans* ser o agente predominante, uma série de outras cepas de *C. não albicans* estão emergindo (GARBER, 2001; MIKULSKA et al., 2012).

2.1.2 Micoses subcutâneas

Já as micoses subcutâneas são causadas por fungos encontrados no solo e em plantas, que são introduzidos na derme ou tecido subcutâneo após lesão. A ocorrência desse tipo de micose é praticamente restrita às regiões subtropicais e tropicais (HAY, 2006). As principais micoses subcutâneas são esporotricose, cromoblastomicose, feo-hifomicose, micetoma e lobomicose.

A esporotricose afeta pessoas e animais que entram em contato direto com madeira, solo e plantas, como fazendeiros, jardineiros e gatos doméstico, causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*, principalmente nas Américas, África, Japão e Austrália. A infecção pode ser linfocutânea ou cutânea fixa, sendo que em casos mais graves pode se tornar sistêmica. A forma mais comum é a linfocutânea, que geralmente atinge membros superiores ou inferiores, e se dá em forma de nódulos e ulcerações na pele junto aos vasos linfáticos, enquanto a forma fixa ocorre em um único ponto, onde há ulceração semelhante à causada na leishmaniose. Subnutrição, alcoolismo e infecção por HIV são fatores de predisposição à esporotricose, sendo que a AIDS aumenta o risco de disseminação interna da doença (HAY, 2006; LUPI; TYRING; MCGINNIS, 2005).

A cromoblastomicose, ou cromomicose, é uma infecção subcutânea crônica, de ocorrência principalmente na África, Ásia e América Latina, que afeta pessoas após a penetração do fungo pela pele traumatizada, geralmente nas mãos e pés em áreas rurais, uma vez que os fungos vivem no solo, em plantas e em madeira. Os fungos causadores pertencem à família Dematiaceae e são pigmentados, como *Fonsecaea pedrosoi*, *Phialophora verrucosa* e *Cladophialophora carrionii*. A infecção se inicia como nódulos semelhantes a verrugas, ou placas na pele. Algumas complicações são infecções bacterianas secundárias, linfedemas secundários que podem evoluir para elefantíase e carcinoma epidermoide em lesões crônicas (HAY, 2006; LUPI; TYRING; MCGINNIS, 2005).

Os mesmos fungos pigmentados causam a feo-hifomicose, apesar de outros fungos também poderem causa-la em menor frequência. Nessa infecção há formação de cistos inflamatórios subcutâneos, que podem ser removidos cirurgicamente (HAY, 2006).

Outra infecção crônica subcutânea é a micetoma, que pode ser causada por bactérias (actinomicetoma) ou por fungos (eumicetoma), que são endêmicos da África Equatorial, Oriente Médio, Índia, México e Brasil. Geralmente acomete trabalhadores rurais expostos a espinhos de acácias e cactos, onde os fungos vivem saprofiticamente, como *Acremonium* sp e *Madurella grisea* no Brasil, *M. mycetomatis* na Índia e África e *Pseudallescheria boydii* na América do Norte. Inicialmente o local afetado, quase sempre pés ou mãos, incha e há formação de grãos na pele. A doença progride lentamente a partir do local inicial de infecção e pode atingir músculos e o osso subjacente, destruindo-os, podendo levar a deformidade e perda do membro afetado, ou mesmo à morte se atingir estruturas vitais, como no crânio (LUPI; TYRING; MCGINNIS, 2005).

A principal micose subcutânea na região amazônica é a lobomicose, com alguns registros na América Central e do Norte e na França. Caracteriza-se por numerosos nódulos subcutâneos crônicos, semelhantes a queloides, que crescem lentamente. Curiosamente afeta golfinhos de água doce da Amazônia e da costa da Espanha e França e ainda Texas e Flórida, nos Estados Unidos. O agente causador nunca foi cultivado em laboratório, mas foi denominado *Lacazia loboi*. Seu reservatório natural pode ser o solo e plantas, apesar de provavelmente existir também um reservatório aquático. A adaptação a um ciclo de vida hidrofílico pode ser a razão pela qual não é possível cultivar o fungo, que pode ser parasita obrigatório de algum animal menor, e explica porque não cresce a 37 °C, desenvolvendo-se nas regiões mais externas e frias do corpo, não afetando vísceras (LUPI; TYRING; MCGINNIS, 2005). Análise de DNA do fungo demonstrou que pertence à ordem

Onygenales, sendo um grupo irmão de *Paracoccidioides brasiliensis*, e assim como outros fungos patogênicos desta ordem, provavelmente é dimórfico (HERR et al., 2001).

2.1.3 Micoses sistêmicas

Nos últimos anos as infecções fúngicas sistêmicas foram responsáveis por alta morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos, especialmente a criptococose e a candidíase (WARNOCK, 2007). Assim, as micoses sistêmicas podem ocorrer de duas maneiras: infecções oportunistas ou infecções respiratórias endêmicas (HAY, 2006). Concomitante ao aumento de indivíduos imunocomprometidos, a incidência das micoses sistêmicas oportunistas tem aumentado por afetarem principalmente estes indivíduos (GARBER, 2001). Já as infecções endêmicas são capazes de afetar indivíduos saudáveis e ocorrem em regiões geográficas específicas, geralmente após penetração de partículas por inoculação, levando a infecção pulmonar primária, que pode espalhar-se pelos vasos sanguíneos ou linfáticos (RIVITTI; AOKI, 1999).

O principal grupo de risco associado a micoses sistêmicas oportunistas são pacientes imunocomprometidos, principalmente pessoas portadoras do vírus HIV, pacientes transplantados, submetidos a cirurgias invasivas (catéteres, nutrição parenteral), com malignidades hematológicas, queimaduras e recém-nascidos (WARNOCK, 2007). Em pacientes com leucemia, por exemplo, a mortalidade dos pacientes que contraem infecções por *Candida* sp e *Aspergillus* pode ser superior a 70 e 80%, respectivamente. Do mesmo modo, 5-45% dos pacientes que receberam transplantes de órgãos sólidos desenvolvem infecções fúngicas sistêmicas. Em transplantes de pulmão é possível que o órgão doador seja um reservatório de fungos patogênicos dormentes ou comensais responsáveis por infecção pós-transplante (GARBER, 2001).

Tanto nos Estados Unidos quanto no Brasil, infecções hospitalares de corrente sanguínea causadas por *Candida* sp são a quarta mais comum, com 1,5 e 3,7 casos a cada 10.000 pacientes dia, respectivamente. Na Europa esse número é um pouco menor, com 0,5-0,7 casos por 10.000 pacientes dia. Existem mais de 200 espécies de *Candida* sp, mas a mais comum presente em infecções é a *C. albicans*. No entanto, outras espécies vêm ganhando importância, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, sendo que todas estas somadas chegam a 95% das infecções por *Candida*. É comum que estas e outras espécies apresentem resistência a um ou mais antifúngicos (WARNOCK, 2007).

Já a criptococose, causada pela levedura *Cryptococcus neoformans*, é uma infecção oportunista e está intimamente ligada à AIDS. Antes da epidemia do vírus HIV era uma infecção rara, mas passou a ser importante causa de morbidade e mortalidade entre estes pacientes nas décadas de 1980 e 1990. Cerca de 90% dos casos ocorreram em pessoas portadoras do vírus. Durante a década de 1990, devido ao avanço no tratamento contra o vírus HIV, a incidência de casos diminuiu, mas não a taxa de mortalidade, que se manteve praticamente igual, em 11,7%, inclusive em pessoas não portadoras do HIV. Na década de 2000, a área de maior risco foi a África Subsaariana, com mais de 60% da população infectada por HIV no mundo (WARNOCK, 2007). O contágio ocorre pela inalação de esporos do fungo presentes no solo e em excrementos de aves, especialmente o pombo. A levedura apresenta afinidade com o sistema nervoso e comumente leva ao desenvolvimento de meningite criptocócica (GARBER, 2001).

A aspergilose é outra infecção oportunista causada principalmente pelo fungo *A. fumigatus*, mas pode ser causada em menor escala por *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus*. O fungo vive no solo, na água ou em vegetação em decomposição e penetra pelas vias aéreas, estando associado a poeiras presentes nas reformas em hospitais ou contaminação do sistema de ventilação, apesar de poder haver contágio no manejo de plantas ou alimentos, como pimenta. Trata-se da infecção fúngica mais comum em pacientes com transplante de medula óssea tratados profilaticamente com fluconazol (GARBER, 2001).

Um levantamento sobre pneumonia adquirida por adultos transplantados de medula óssea na década de 1980, em um hospital americano, revelou que 20% dos pacientes adquiriram pneumonia, sendo que, 67,3% destes tiveram o agente etiológico identificado, que em 36% dos casos foi *Aspergillus* spp. A taxa de mortalidade desses casos foi 95% (PANNUTI et al., 1991). Outro levantamento, realizado na Europa, com pacientes com mieloma múltiplo sem aloenxerto, tratados em centros de hematologia ou oncologia entre 1984 e 1996, identificou 31 pacientes com aspergilose invasiva, dos quais 14 (45%) morreram pela infecção (LORTHOLARY et al., 2000). No entanto, Warnock (2007) explica que o acesso aos dados de incidência da infecção é difícil pela falta de definição de casos e de efetivos mecanismos de vigilância, assim como as demais infecções por fungos filamentosos.

Outro tipo de micoses sistêmicas são as endêmicas, como a paracoccidioidomicose, a histoplasmose, a coccidioidomicose, a blastomicose e a peniciliose. Essas infecções ocorrem em regiões geográficas específicas, onde podem se tornar um problema de saúde pública. O crescente aumento de casos dá-se pela modificação e desenvolvimento da terra e pela proliferação da infecção de HIV, ainda que afetem indivíduos imunocompetentes. Além disso,

o aumento das disponibilidades de viagens para esses locais faz com que algumas infecções sejam identificadas milhares de quilômetros distantes. Outro problema é que os sintomas nem sempre são específicos (GARBER, 2001).

A paracoccidioidomicose, ou blastomicose sul-americana, é uma doença insidiosa, progressiva e crônica causada pelo fungo dimórfico *P. brasiliensis*, caracterizada por lesões polimórficas em qualquer órgão, principalmente na pele, nos linfonodos, nos pulmões e no sistema nervoso. Ocorre em quase todos os países da América Latina, com maior número de casos no Brasil, Colômbia e Venezuela (RIVITTI; AOKI, 1999). No Brasil, ocorre principalmente na região sudeste, próximo a áreas de florestas, sendo que homens jovens, que trabalham na área rural ou caçadores representam o maior grupo de risco. Apesar de mulheres também entrarem em contato com o agente etiológico raramente desenvolvem infecção, provavelmente por efeitos supressivos de estrógenos sobre o fungo em sua transformação de forma micelial para levedura. O tempo de incubação pode ser de vários anos e a doença pode se manifestar em viajantes muito tempo após a visita a áreas endêmicas (HAY, 2006; LUPI; TYRING; MCGINNIS, 2005). Anticorpos para *P. brasiliensis* já foram identificados em cães, bovinos e equinos, sugerindo que o fungo infecta não apenas o homem, mas diversos animais pela aspiração, não havendo transmissão direta de indivíduo para indivíduo. Esta espécie de fungo tem nicho ecológico ainda indefinido, mas já foi isolado esporadicamente do solo e de fezes de morcegos e pinguins, e regularmente encontrado em espécies de tatus que se enterram no solo (BAGAGLI et al., 2008).

Outra micose endêmica na América Latina, além da parte centro-oeste dos Estados Unidos, é a histoplasmose, causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, que vive no solo e em cavernas ou sótãos, em relação com morcegos e aves, como pombos. A infecção dá-se pela inalação do fungo presente na poeira ou dejetos animais e pode ser assintomática, na maioria dos casos, ou aguda e evoluir para crônica, sendo mais grave em crianças. Do pulmão pode se espalhar para outras partes do corpo e, nas formas mais avançadas apresentar ulcerações na língua, mucosa oral, faringe ou, mais raramente, na genitália ou reto. A disseminação da AIDS em áreas endêmicas aumentou o número de casos de infecção sistêmica por *H. capsulatum* (RIVITTI; AOKI, 1999).

A blastomicose, ou blastomicose norte-americana, é causada pelo fungo dimórfico *Blastomyces dermatitides*, na América do Norte (especialmente centro-oeste americano), no México, na África (principalmente África do Sul e Zimbábue), e na Ásia, como no Líbano, em Israel, na Arábia Saudita e na Índia. Assim como na paracoccidioidomicose não há aumento de casos em pacientes imunocomprometidos, mas estes podem ter infecções de

maior gravidade. A infecção ocorre predominantemente em homens em torno de 40 anos, devido à exposição recreativa, como em pescarias e acampamentos, ou ocupacional, como guardas florestais. A infecção é comum em animais, principalmente em cães. No entanto, o nicho ecológico de *B. dermatitides* permanece indefinido. A infecção ocorre por aspiração do fungo ou seus esporos, com período de incubação em média de 45 dias e pode ser assintomática ou causar infecção pulmonar. Assim, a infecção pode evoluir para doença pulmonar severa e progressiva ou se disseminar pelo corpo. Neste caso, pode haver lesões cutâneas, como pápulas que evoluem para pústulas, verrugas e ulcerações, ou pode haver, ainda, lesões nos ossos, nas genitálias, no sistema nervoso central e outras regiões (LÓPEZ-MARTÍNEZ; MÉNDÉZ-TOVAR, 2012).

Também de ocorrência na América, mas não no Brasil, a coccidioidomicose é causada pelo fungo dimórfico *Coccidioides immitis* na região oeste dos Estados Unidos, na América Central e do Sul, especialmente na Venezuela e região do Chaco (Argentina, Bolívia e Paraguai). Geralmente a infecção é assintomática, mas pode resultar em lesões cutâneas, como nódulos, abscessos, ulcerações ou lesões vegetantes ou verrucosas (RIVITTI; AOKI, 1999).

Estes quatro fungos causadores de micoses endêmicas, *P. brasiliensis*, *H. capsulatum*, *B. dermatitides* e *C. immitis*, estão relacionados entre si e organizados na ordem Onygenales, sendo que os três primeiros, junto do *Lacazia loboi*, causador da lobomicose, pertencem à família Ajellomycetaceae (HERR et al., 2001).

Outra micose endêmica é a peniciliose, causada pelo fungo dimórfico *Penicillium marneffei*. Até a expansão do vírus HIV ao sul da Ásia, a peniciliose era rara, no entanto hoje está disseminada na população de pacientes com HIV em alguns locais. A área endêmica da infecção é o sudeste asiático, com maioria de casos na Tailândia, onde é mais comum que a criptococose. É comum afetar indivíduos longe da área endêmica, mas com histórico de viagem para esta área. O nicho ecológico do *P. marneffei* é pouco conhecido, mas sabe-se que infecta naturalmente roedores, principalmente após estações chuvosas, devendo habitar o solo ou matéria orgânica vegetal em decomposição. A infecção ocorre após inalação de esporos do fungo e, geralmente dissemina-se. Há febre e lesões na medula óssea, no baço, no pulmão, na pele e no fígado. Na pele e na mucosa oral surgem pápulas com centro necrosado ou pequenas ulcerações na face (HAY, 2006; LUPI; TYRING; MCGINNIS, 2005).

2.1.4 Compostos antifúngicos

Drogas antifúngicas formam um pequeno e importante grupo de antibióticos com papel importante no controle de micoses. O número de antifúngicos comercialmente disponíveis é menor que o dos antibacterianos por diversas razões. Primeiramente, as infecções fúngicas passaram a ter maior importância, paradoxalmente, com o avanço da medicina, pois pessoas imunocomprometidas devido a transplantes de órgãos, quimioterapia ou HIV positivas são mais vulneráveis a infecções por fungos oportunistas, contribuindo para o aumento da morbidade e mortalidade desses pacientes. Assim, a necessidade de novos antifúngicos, mais seguros e eficientes tornou-se um grande desafio para a indústria farmacêutica. Em segundo lugar, como os fungos são eucariotos, agentes inibidores de síntese de DNA, RNA ou proteínas em fungos, tendem a ter o mesmo mecanismo de ação em células de seres humanos, gerando efeitos colaterais (GEORGOPAPADAKOU; WALSH, 1994; GUPTE; KULKARNI; GANGULI, 2002).

Em 2002, o mercado mundial de antifúngicos alcançou US\$ 4 bilhões, com crescimento anual estimado em 10% anual (DEMAIN, 2014).

O primeiro antibiótico antifúngico foi isolado por Oxford, Raistrick e Simonart (1939) a partir do fungo *Penicillium griseofulvum*, a griseofulvina. É um composto utilizado contra dermatofitoses, infecções causadas por fungos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Possui ação fungistática por inibição da fase mitótica da célula do fungo, que é removida por descamação e renovação da pele (GULL; TRINCI, 1973).

Na década de 40, a cicloheximida foi isolada do actinomiceto *Streptomyces griseus*, por Whiffen, Bohonos e Emerson (1946). A cicloheximida não afeta procariontes ou vírus, mas é muito tóxica a eucariontes, pois inibe a síntese de DNA e proteínas (KERRIDGE, 1958), levando a diversos efeitos colaterais.

Em seguida, descobriu-se o primeiro antifúngico do grupo dos polienos macrolídeos, por Hazen e Brown (1950), a fungicidina, mais tarde denominada nistatina (BROWN; HAZEN; MASON, 1953). O grupo dos polienos caracteriza-se por apresentar longos anéis lactônicos com ligações duplas conjugadas, e uma unidade de açúcar. Apesar da sensibilidade à luz e alta toxicidade, são muito utilizados contra micoses. O mecanismo de ação ocorre principalmente na membrana celular do fungo por ligação ao ergosterol e indução de permeabilidade celular (BOLARD, 1986; GUPTE; KULKARNI; GANGULI, 2002).

Mais de 200 compostos polienos já foram identificados, mas poucos totalmente caracterizados, sendo a anfotericina B (AMB) o representante mais utilizado para o tratamento de micoses sistêmicas (EVANS; CONNEL, 2003; STERNBERG, 1994). Os polienos também se ligam ao colesterol presente na membrana das células humanas, causando

significativos efeitos colaterais (MARTINEZ, 2006). Assim, a administração de nistatina ficou restrita ao uso tópico (THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009), mas a anfotericina B ainda mantém a posição de droga de referência no controle de micoses sistêmicas.

O espectro de ação da anfotericina B inclui as leveduras *Candida* spp, *C. neoformans*; *Malassezia* spp e *Saccharomyces cerevisiae*; os fungos filamentosos *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, que naturalmente é menos sensível, *Scedosporium apiospermum*, *Sporothrix schenckii*, *Paecilomyces* spp, *Fusarium* spp, *P. marneffei*, *Bipolaris* spp, *Exophiala* spp e *Cladophiala* spp, Zigomicetos (ELLIS, 2002), *Blastomyces* spp e *Histoplasma* spp (GUPTE; KULKARNI; GANGULI, 2002).

No entanto, existem casos de resistências para algumas cepas de leveduras, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *S. apiospermum*, *S. schenckii* e algumas cepas de zigomicetos (ELLIS, 2002).

De modo geral, a anfotericina B apresenta atividade contra a maioria das leveduras ou fungos filamentosos, sendo o maior desafio a alta toxicidade e os efeitos colaterais. As raras cepas resistentes à anfotericina B apresentam menor concentração de ergosterol na membrana plasmática ou uma mutação na síntese de ergosterol, que é substituído por outro lipídeo semelhante (ELLIS, 2002).

Com a finalidade de redução da nefrotoxicidade da anfotericina B, foram desenvolvidas formulações lipídicas, como a lipossomal (L-AMB), em dispersão coloidal (ABCD) e em complexo lipídico (ABLC). Nessas formulações, a farmacocinética do antibiótico é alterada e, quando comparada à formulação convencional, ocorre maior concentração no fígado e baço do que nos rins. Porém, para igualar ou superar os efeitos da formulação convencional essas formulações exigem doses maiores (MARTINEZ, 2006).

Outro composto antifúngico é a flucitosina (5-FC), sintetizada em 1957, como agente antitumoral, a partir da fluoretação da citosina. Apesar de inefetiva como agente antitumoral, mostrou-se ativa contra candidíase e criptococose em ratos e em 1968 começou a ser utilizada em humanos no tratamento dessas infecções (VERMES; GUCHELAAR; DANKERT, 2000). O mecanismo de ação se deve à rápida desaminação de 5-FC em 5-FU (5-fluorouracila) pela enzima citosina desaminase dentro das células. Em seguida, o 5-FU é convertido em ácido 5-fluorodeoxiuridílico, que interfere na síntese de DNA. A 5-FC constitui-se em um inibidor seletivo para fungos, já que mamíferos não têm a enzima citosina desaminase. No entanto, espécies de fungos que não convertem 5-FC em 5-FU não são sensíveis a este fármaco e, por outro lado, a 5-FU não pode ser ministrada diretamente por ser tóxica a células de mamíferos

(THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009; VERMES; GUCHELAAR; DANKERT, 2000).

A flucitosina pode ter efeito fungistático ou fungicida, dependendo da espécie ou cepa. É mais efetiva em leveduras, como *Candida*, *Torulopsis*, *Cryptococcus* e *Saccharomyces* spp, e fungos dematiáceos (grupo de fungos filamentosos escuros, que produzem melanina), causadores de cromomicose, como *Phialophora* e *Cladosporium* spp. Porém, quando a flucitosina é utilizada como único agente fungicida em infecções, exceto em cromomicoses, é muito comum o surgimento de resistência a este antifúngico (THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009; VERMES; GUCHELAAR; DANKERT, 2000). Essa resistência pode ocorrer devido a mutações em enzimas necessárias no transporte e absorção de 5-FC ou devido a aumento da síntese de pirimidinas, que competem com os derivados de 5-FC, diminuindo sua atividade. Dessa forma, a flucitosina é utilizada como único agente antifúngico apenas no tratamento de cromomicoses e candidíases vaginais e trato urinário sem maiores complicações. Ela é utilizada com outros agentes antifúngicos, especialmente AMB, para o tratamento de micoses sistêmicas, inclusive contra *Aspergillus* spp (VERMES; GUCHELAAR; DANKERT, 2000). Trata-se de um composto teratogênico e não deve ser ministrado a gestantes (THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009).

Quase 30 anos após o descobrimento da anfotericina B, em 1981, o cetoconazol, primeiro antifúngico do grupo dos azóis foi liberado pelo FDA (U. S. Food and Drug Administration) para administração oral. Os azóis são caracterizados pela presença de um anel pentagonal com nitrogênio e carbono. Os imidazóis (cetoconazol e miconazol) apresentam dois átomos de nitrogênio, enquanto os triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol) apresentam três. Os azóis apresentam amplo espectro de ação e atuam sobre enzimas do citocromo P450 dos fungos, bloqueando a desmetilação do lanosterol e a síntese de ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana e, na maior parte dos casos, causando ação fungistática (MARTINEZ, 2006; THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009). No entanto, os imidazóis apresentam alta toxicidade e efeitos colaterais, como desenvolvimento de ginecomastia, irregularidades menstruais e hepatotoxicidade. As pesquisas com azóis levaram ao desenvolvimento dos triazóis, menos tóxicos e com maior espectro de ação. Ainda assim, os azóis interagem com outras classes de medicamentos, além de serem teratogênicos, não devendo ser administrados a gestantes ou lactantes (MARTINEZ, 2006; QUEIROZ; OLIVEIRA, 2006; THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009).

Os agentes de micoses endêmicas *P. brasiliensis*, *H. capsulatum*, *C. immitis*, *C. neoformans* e *B. dermatitides* são sensíveis aos azóis, assim como aos agentes de dermatomicoses. A maioria das espécies de *Candida* também é sensível aos azóis, sendo que apenas *C. krusei* e *C. glabrata* apresentam menor sensibilidade. Alterações na enzima C-14-alfademetilase e aumento da capacidade de eliminação das drogas são causas de resistência aos azólicos, constatada em espécies de *Candida* não *albicans* (MARTINEZ, 2006).

O itraconazol é usado como alternativa à anfotericina B para pacientes com aspergilose, no combate a *A. fumigatus* e outras espécies do gênero, além de ser empregado no combate a micoses sistêmicas endêmicas. O cetoconazol também pode ser utilizado em casos menos graves destas micoses. O fluconazol é o mais utilizado contra *C. neoformans* e espécies sensíveis de *Candida*, além de empregado em infecções urinárias e do sistema nervoso central. O voriconazol, o posaconazol e o ravuconazol são triazóis de segunda geração, obtidos pela modificação de fluconazol e itraconazol. Estes compostos tem como vantagem o maior espectro de ação em comparação aos azóis de primeira geração (MARTINEZ, 2006).

O fármaco sintético, naftifina, foi testado por Georgopoulos et al. (1981) *in vitro* contra diversas cepas fúngicas, apresentando ação destacada contra dermatófitos. Em seguida, diversos compostos similares foram sintetizados e denominados como alilaminas, um novo grupo de antifúngicos (PETRANYL; RYDER; STÜTZ, 1984). Os dois principais membros desse grupo são a própria naftifina e a terbinafina. O modo de ação das alilaminas é por inibição de etapas iniciais da biossíntese do ergosterol. A inibição da enzima esqualeno epoxidase leva à acumulação de esqualeno, um precursor do ergosterol, nas células, que pode aumentar a permeabilidade celular e as levar à ruptura (FRANÇOIS et al., 2005).

Outra classe de antifúngicos sintéticos com mecanismo de ação semelhante ao das alilaminas é a dos tiocarbamatos (MORITA; NOZAWA, 1985). Os principais representantes desse grupo são o tolnaftato e o tolclato. Assim como as alilaminas, o espectro de ação desse grupo é restrito a dermatófitos. Raramente são reportados casos de resistência às drogas desses dois grupos (FRANÇOIS et al., 2005).

A caspofungina foi o primeiro antifúngico da classe das equinocandinas a ser aprovado pelo FDA, em 2001. Esta classe apresenta lipopeptídeos sintéticos que inibem a síntese de β -(1,3)-D-glucana, e, conseqüentemente, a produção do polissacarídeo glucana, componente da parede celular dos fungos, levando as células fúngicas ao desequilíbrio osmótico. A sensibilidade do fungo está relacionada à concentração de glucana na parede celular, sendo espécies de *Candida* spp, incluindo cepas resistentes aos azóis, *Aspergillus* spp,

Pneumocystis carinii, *Histoplasma*, *Blastomyces* e *Sporothrix* spp sensíveis *in vitro*. Por outro lado, espécies de *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Rhizopus* e *Pseudoallescheria* spp não apresentam glucanas na parede celular e são, portanto insensíveis a estes antifúngicos (CORNELLY; SCHMITZ; AISENBREY, 2002). Como células de mamíferos não possuem parede celular, as equinocandinas apresentam especificidade pelo alvo de ação (DE LA TORRE; REBOLI, 2007; KAUFFMAN; CARVER, 2008).

De fato, equinocandinas agem *in vitro* contra diversas leveduras e fungos filamentosos, mas em infecções experimentais a ação é restrita a infecções graves causadas por *Candida* sp e *Aspergillus* sp, sendo a ação apenas fungistática contra *Aspergillus*. Embora as equinocandinas induzam efeitos adversos em menor proporção que a AMB e a interação com outros medicamentos seja menos intensa do que aquela dos azóis, estas drogas tem a desvantagem de proporcionarem baixa biodisponibilidade por via oral e requererem administração exclusivamente por via endovenosa (MARTINEZ, 2006).

Outras equinocandinas incluem a micafungina e a anidulafungina. Estudos *in vitro* e pilotos têm demonstrado potencial de uso de equinocandinas em terapia combinatória, por associação a AMB ou a azól. Estudos continuam em andamento (THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009). Em uma revisão sobre terapia antifúngica combinatória em pacientes com aspergilose invasiva, Garbati et al. (2012) relatam que as evidências de seu benefício apresentam força moderada, mas ainda são conflituosas.

Moretti (2007) explica que o arsenal terapêutico dos antifúngicos ainda é bastante restrito, sendo necessários novos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos.

2.2 Fungos de manguezal

Os mangues são ambientes de interação entre ecossistemas terrestres e marinhos em regiões tropicais e subtropicais. Neste ambiente as condições são extremas com alta salinidade, alta temperatura, solo anaeróbico e lamacento, marés e ventos fortes (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001). Embora este ambiente esteja em maior evidência, ainda são poucos os estudos de sua ecologia, como: fluxo de energia, teias alimentares, animais dependentes e efeitos da poluição na fauna e flora.

Os fungos são vitais para a ciclagem de nutrientes nos mangues. Os estudos sobre a diversidade de fungos encontrados em *habitats* individuais é surpreendente, incluindo novas espécies e até novos gêneros (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001). Costa et al., (2012) relataram que, na década de 1980, o estudo de fungos endofíticos, por exemplo, intensificou-

se em regiões subtropicais. No entanto, em regiões tropicais, apesar do maior número de plantas e de fungos epifíticos e saprofíticos, os estudos são escassos.

Nos últimos anos, foram publicados muitos trabalhos de grupos de pesquisa chineses sobre a busca de novos compostos bioativos de origem marinha e de manguezal (ZHOU; GUO, 2012). Benatti e Marcelli (2007) atualizaram a lista de fungos liquenizados dos manguezais do sul e sudeste do Brasil. Os autores relataram 81 gêneros de fungos e apresentaram uma chave de identificação. Outro estudo revelou um grande reservatório da diversidade genética de fungos em manguezal da região de Cananéia, no estado de São Paulo (SEBASTIANES et al., 2013).

2.3 Produtos naturais isolados de fungos

Por meio da evolução e seleção natural, a natureza aperfeiçoou o desenvolvimento de certos compostos. Produtos de origem natural podem melhorar a qualidade de vida das pessoas, diminuindo dores e sofrimento, e consequentemente revolucionando a medicina. Os organismos produtores de metabólitos secundários foram evoluindo de acordo com a pressão de seleção natural em seus ambientes e caso o metabólito fosse útil ao organismo, seus genes produtores eram mantidos e modificações genéticas futuras aprimorariam o processo (DEMAIN; ZHANG, 2005). Os metabólitos secundários não agem diretamente no crescimento do microrganismo, mas podem funcionar como hormônios sexuais, ionóforos, sistema de defesa contra outras bactérias, fungos, protozoários, insetos ou plantas, agentes de simbiose, fatores de diferenciação ou agentes de comunicação entre células (DEMAIN, 2007).

Möller, Bühler e Dreyfuss (1995), em um estudo de variedade genética, encontraram enorme diversidade entre espécimes do fungo cosmopolita *Chaunopycnis alba*, produtor do imunossupressor ciclosporina A e, assim, defendem a seleção de microrganismos de diferentes regiões e climas para a provável obtenção de cepas que, embora da mesma espécie, possam produzir metabólitos secundários diferentes.

Grande parte dos microrganismos permanece desconhecida, principalmente pela dificuldade de isolamento e cultura em laboratório, e que devido ao grande número de espécies estimadas, os fungos constituem o grupo de maior potencial para a descoberta de novos compostos bioativos (BERDY et al., 2005). Demain e Zhang (2005) relataram que o número de espécies de fungos estimado é 5 vezes o de plantas e 50 vezes o de bactérias. A estimativa do número de espécies fúngicas proposta por Blackwell (2011), por exemplo,

prevê a existência de mais de 5 milhões de espécies, das quais apenas cerca de 100.000 estão descritas.

Mais de um milhão de compostos naturais já foram descritos, dos quais aproximadamente 250.000 são bioativos. A estrutura de mais de 160 mil compostos já é conhecida, sendo a metade de plantas e a outra metade de microrganismos. Este número aumenta em cerca de 10 mil a cada ano. Cerca de 20.000 são de origem marinha, apesar de menos de 1% dos microrganismos comensais serem cultiváveis. Cerca de 60% dos compostos bioativos foram obtidos de vegetais e, dos demais, alguns foram obtidos de animais e a maior parte de microrganismos (23.000). Destes, 42% foram obtidos por fungos, que representam a origem de 20% dos antibióticos conhecidos contra fungos e bactérias. Já em 2003, produtos naturais e seus derivados representavam US\$ 40 bilhões em vendas por ano (DEMAIN, 2014).

2.3.1 Importância de produtos naturais obtidos de fungos

Fungos se destacam na biotecnologia pela produção de policetídeos, ácidos orgânicos, etanol, hormônios animais e vegetais e enzimas com utilização na indústria alimentícia, de detergentes, têxtil, de couro e papel e celulose (DEMAIN, 2007; 2009).

Na década de 1990 grandes companhias farmacêuticas investiram na química combinatória para sintetizar um grande número de novas moléculas na expectativa de descobrir novos compostos bioativos. Porém, os resultados obtidos não foram os esperados e o interesse em compostos de origem natural foi renovado (DEMAIN; ZHANG, 2005).

A maior parte dos agentes antitumorais foi descoberta a partir de actinomicetos, porém o Taxol® (paclitaxel), descoberto em coníferas do gênero *Taxus*, é utilizado contra câncer de mama e ovário, agindo no bloqueio a despolimerização de microtúbulos. No ano de 2000, a venda de Taxol representou 10% das vendas da Bristol-Myers Squibb e foi o terceiro produto mais vendido da empresa (DEMAIN; VELASCO; ADRIO, 2005). Seu mercado atualmente é de US\$ 1,6 bilhão por ano. No entanto, o fungo endofítico de *Taxus brevifolia*, *Taxomyces andreanae* mostrou-se capaz de produzir Taxol em baixas quantidades. Os autores defendem que, com aprimoramentos genéticos, a produção de Taxol por *T. andreanae* poderia tornar-se viável (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). Pelo menos outros 10 fungos endofíticos de *Taxus brevifolia* com capacidade de produção de Taxol já foram descritos (STIERLE; STROBEL, 1995). O taxol apresenta, ainda, atividade antibiótica contra oomicetos patogênicos para plantas (DEMAIN, 2014).

Outro agente antitumoral é a camptotecina, que foi isolada de algumas plantas angiospermas, e seus derivados, em 2003, venderam US\$ 1 bilhão (LORENCE; NESSLER, 2004). Estudos mostraram que o fungo endofítico *Entrophospora infrequens*, isolado da planta *Nothapodytes foetida*, da qual a camptotecina era extraída, também é capaz de produzi-la e pode ser uma alternativa para a produção deste antifúngico com aprimoramentos do processo fermentativo (AMNA et al., 2006).

A maior parte do colesterol humano provém da produção hepática e não da alimentação. Dessa forma, o uso de estatinas, substâncias que limitam a biossíntese de colesterol pelo fígado, é uma maneira de ajudar no controle de altas taxas de colesterol no sangue e, conseqüentemente, também reduzir problemas cardíacos (ENDO, 1985). As estatinas foram descobertas em 1976, a partir da produção de compactina (mevastatina) pelos fungos *Penicillium citrinum* e *P. brevicompactum*. Em seguida, outras estatinas produzidas por fungos foram descobertas, entre elas a lovastatina, estatina mais efetiva, isolada de culturas de *Monascus ruber* e de *A. terreus*, sendo aprovada pela FDA em 1987. A venda de estatinas atinge US\$ 15 bilhões (DEMAIN; VELASCO; ADRIO, 2005).

A ciclosporina A e o ácido micofenólico são substâncias imunossupressoras isoladas a partir da cultura dos fungos *Tolypocladium inflatum* e do gênero *Penicillium*, respectivamente. Estas substâncias causaram grande impacto na medicina e são utilizadas no transplante de coração, fígado e rim (DEMAIN; VELASCO; ADRIO, 2005).

Porém, dentre os metabólitos secundários, os antibióticos são os mais conhecidos. Podem ser moléculas muito pequenas, como a cicloserina, de 102 daltons ou polipeptídeos, como a nisina. Os antibióticos possuem diversos mecanismos de ação, podendo atuar em alvos da atividade microbiana, como síntese de RNA, DNA ou de proteínas, membranas, transportes de elétrons, esporulação, germinação, entre outros processos. O mercado mundial de antibióticos é de US\$ 35 bilhões, sendo mais de US\$ 4 bilhões em antifúngicos, como azóis, responsáveis por US\$ 2 bilhões. A penicilina e a cefalosporina são antibacterianos descobertos a partir de fungos com grande importância no mercado atual. Graças ao processo de semissíntese, novos antibióticos são produzidos pela derivação de sua estrutura natural. Técnicas de DNA recombinante têm sido utilizadas para introdução de genes codificadores de síntese de antibióticos em novos organismos produtores para obtenção de antibióticos híbridos ou modificados (DEMAIN, 2007).

Dos antibióticos isolados a partir de microrganismos, na década de 1960, os actinomicetos (bactérias filamentosas) foram fonte de mais de 70% das moléculas descobertas e até o final da década de 80 ainda eram responsáveis por mais de 60% dos novos

antibióticos. No entanto, a partir da década de 90, os fungos foram ganhando maior importância na descoberta de novas moléculas antibióticas e em 2001 já eram fonte de mais de 50%, contra menos de 30% de actinomicetos (BERDY, 2005).

2.4 Mecanismos fúngicos para regular a produção de metabólitos secundários

Hull et al. (1989) foram os primeiros a descrever um cluster de genes em eucariotos, envolvido no catabolismo de L-prolina em *A. nidulans*. O resultado foi surpreendente porque as vias metabólicas de procariotos são geralmente organizadas em *clusters*, que podem ser definidos como dois ou mais genes ligados que participam de uma via metabólica ou do desenvolvimento de um metabólito. Nos anos seguintes, muitas vias metabólicas secundárias foram descritas em fungos, sendo muitas organizadas em *clusters* (KELLER; HOHN, 1997). Estes metabólitos secundários são tipicamente expressos em condições de crescimento sub-ótimas, de modo a aumentar a sobrevivência do fungo na falta de nutrientes ou em situações de competição. Hanson (2008) explica que é comum esses genes necessitarem de fatores de transcrição para se expressarem, como pH, fontes de carbono ou nitrogênio, proteínas ou pequenas moléculas. Assim, em culturas laboratoriais, genes podem estar desativados ou sofrerem desativação após culturas repetidas, por perderem este fator.

A aflatoxina é um metabólito altamente carcinogênico que possui um dos maiores *clusters* conhecidos, com 75 kb (75.000 bases nitrogenadas) e 30 genes potencialmente envolvidos em sua produção por *A. parasiticus* e *A. flavus* (YU; EHRLICH, 2011). Seu precursor é a esterigmatocistina (ST), cuja produção envolve 54 kb e 23 genes deste *cluster*. No entanto, a ST também pode ser produzida pelo fungo *Podospora anserina*, que está em classe taxonômica diferente de *Aspergillus*. Slot e Rokas (2011) defendem que houve transferência horizontal de genes entre estas espécies e que se foi possível um dos maiores *clusters* metabólicos ser transferido intacto e funcional para outra espécie de fungo taxonomicamente distante, então transferências devem ter tido importante contribuição na diversidade metabólica dos fungos.

Um caso mais extremo de transferência horizontal envolve a penicilina e a cefalosporina, dois dos principais antibióticos, que são produzidos por fungos e por procariotos. A via gênica da penicilina está em *clusters* em *P. chrysogenum* e *A. nidulans*, assim como a da cefalosporina em *Acremonium chrysogenum* (KELLER; HOHN, 1997). A semelhança genética entre as vias da penicilina entre fungos é de cerca de 80%, enquanto de

fungos para procariotos 60%, o que evidencia uma provável transferência horizontal de genes entre procariotos e eucariotos (PEÑALVA et al., 1990).

No entanto, nem todos os genes relacionados a metabólitos secundários estão organizados em clusters. As vias metabólicas da cefalosporina ou da melanina, por exemplo, podem estar ou não em *clusters*, dependendo da espécie de fungo. Keller e Hohn (1997) defendem que a dissolução de um *cluster* gênico pode ser o primeiro passo para a perda de uma via metabólica ou representar a falta de pressão natural para sua manutenção. Assim, estes genes podem interagir com novos genes, formando ou alterando vias metabólicas. Os autores explicam que uma vantagem evolutiva da manutenção de metabólitos em *clusters* é a maior probabilidade da via metabólica ser transferida integralmente durante a reprodução sexuada, já que diminui a chance de separação dos genes envolvidos durante a meiose, por estarem muito próximos.

Apesar da aparente diversidade estrutural, os metabólitos de fungos podem ser divididos em quatro grupos: derivados de aminoácidos; formados pela via de síntese de policetídeos; terpenoides; e intermediários do ciclo do ácido cítrico. É comum metabólitos fúngicos serem formados por uma combinação de vias metabólicas (HANSON, 2008).

Dentre os metabólitos derivados de aminoácidos estão os peptídeos não-ribossomais, pequenos peptídeos formados por uma megaenzima multimodular, chamada de peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS). Formam um grupo muito diverso de produtos naturais, como os antibióticos penicilina e cefalosporina, formados a partir do tripeptídeo ACV, cujos anéis β -lactâmicos ligam-se irreversivelmente a proteínas ligadoras de penicilina (PBP) e inibem a síntese de parede celular bacteriana, causando lise celular (DU; LOU, 2010; TOMASZ, 1979). Outros importantes peptídeos incluem a ciclosporina A, os alcaloides de Ergot, sideróforos, as dicetopiperazinas, as asterriquinonas, entre outros (HOFFMEISTER; KELLER, 2007).

Outro mecanismo importante para a produção de metabólitos é a síntese de policetídeos (PKs) a partir de condensações de unidades aciltioéster, como malonil-CoA ou outros pequenos ácidos carboxílicos, de maneira semelhante à biossíntese de ácidos graxos. Os policetídeos são produzidos por enzimas multifatoriais, as policetídeos sintetases (PKSs), organizadas estruturalmente em módulos contendo um ou mais domínios para cada passo enzimático. Geralmente, as PKSs de fungos possuem apenas um módulo e formam PKs reduzidos ou aromáticos. Existem compostos híbridos peptídeo-policetídeo, cuja biossíntese envolve NRPS e PKS. A lovastatina, agente redutor de colesterol e as micotoxinas: T-toxinas, fumonisinas, aflatoxinas, citrinina e ocratoxinas são exemplos de policetídeos importantes,

sendo que todos os *loci* gênicos estudados para policetídeos apresentam organização em *clusters* (DU; LOU, 2010; SCHÜMANN; HERTWECK, 2006).

Provar a identidade de um gene PKS específico é um desafio, sendo necessária a introdução dos genes PKS em uma linhagem fúngica para expressá-los ou inativá-los. Diversas técnicas são ou podem ser empregadas nestes estudos, mas Schümann e Hertweck (2006) explicam que ainda estamos no início da produção de PKs fúngicos em larga escala, diferentemente do que acontece com PKs bacterianos. A presença de íntrons e mecanismos específicos de *splicing* do RNAm, além do grande tamanho dos *locus* gênicos são algumas das dificuldades. A levedura *S. cerevisiae*, fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, actinomicetos, *Escherichia coli*, e até a planta do tabaco são os organismos já utilizados para a produção de PKs fúngicos.

2.5 Fungo *Epicoccum nigrum*

O fungo *Epicoccum nigrum* é cosmopolita, sendo comumente encontrado em solos, em matéria orgânica em decomposição, e associado a plantas (MIMS; RICHARDSON, 2005). Esta espécie pode ser encontrada em ambientes internos, como residências (SU et al., 1992) e hospitais (SIMMONS et al., 1997) e seus esporos podem causar alergias ou agravar casos de asma (BLACK; UDY; BRODIE, 2000; MENG et al., 2012; NEAS et al., 1998). A frequência relativa de *Epicoccum* na atmosfera é de 52% em São Paulo, 31% em Belo Horizonte, 24% na Baixada Santista, 16% em Presidente Prudente e 15% em Curitiba; já na água salgada e doce a frequência é de 10% em Bertioga e 5% em Santos, enquanto que em animais da cidade de São Paulo é de 5% em equinos e 12,1% em primatas (GOMPERTZ et al., 2008).

Estudos indicam a presença endofítica de *E. nigrum* em arroz (FISHER; PETRINI, 1992), trigo (LARRAN et al., 2007) pupunheira (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005), orquídea *Maxillaria rigida* (VAZ et al., 2009) e cana-de-açúcar (FÁVARO; SEBASTIANES; ARAÚJO, 2012). A maior parte destes estudos indica que endófitos produzem compostos importantes para a planta, como antifúngicos, que ajudariam no combate a patógenos.

Fávaro, Sebastianes e Araújo (2012) fizeram um estudo da interação entre uma cepa de *E. nigrum* endofítica e cana-de-açúcar. O estudo sugere que o fungo coloniza a planta pelas aberturas dos estômatos assintomaticamente, sem causar alterações nas folhas, e habitam os espaços epidermais. Seus resultados sugerem que *E. nigrum* estabelece uma interação endofítica facultativa, colonizando folhas de qualquer idade. A inoculação do fungo em

sementes de cana-de-açúcar proporcionou o desenvolvimento de plantas com maior quantidade de biomassa radicular.

O fungo *E. nigrum* foi encontrado em associação com uvas na Europa (GRUBE; SCHMID; BERG, 2011; MIKUŠOVÁ et al., 2010) e no Brasil (BRUM et al., 2012), sendo proposto por Martini et al. (2009) que a presença endofítica de *E. nigrum* em videiras é importante para a indústria vinícola, pois o fungo é capaz de inibir o crescimento de patógenos. Além disso, foi sugerido o uso de *E. nigrum* como agente de biocontrole contra: *Candidatus Phytoplasma mali*, patógeno de diversas plantas, como maçã e da planta ornamental *Catharanthus roseus* (MUSETTI et al., 2011); o fungo *Monilinia laxa*, patógeno de pêssego (MADRIGAL; TADEO; MELGAREJO, 1991); o oomiceto *Phytophthora infestans* e o fungo *Rhizoctonia solani*, patógenos da batata (LAHLALI; HIJIRI, 2010, LI et al., 2013) e; o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, importante patógeno de girassol (PIECKENSTAIN et al., 2001).

Também foram isoladas cepas marinhas de *E. nigrum* associadas à alga *Fucus vesiculosus* (ABDEL-LATEFF et al., 2003), ao pepino do mar *Apostichopus japonicus* (XIA et al., 2012), à água-viva *Aurelia aurita* (WRIGHT; OSTERHAGE; KÖNIG, 2003), e a esponjas (SUN, et al., 2011; WIESE et al., 2011), e até mesmo na Antártida (HENRÍQUEZ, 2014).

Schol-Schwarz (1959) avaliou 70 isolados do gênero *Epicoccum* e os reuniu em uma espécie com muitas variações, pois verificou que o meio de cultivo, a luz e o pH influenciam a coloração das colônias, além de haver diferenças no tamanho dos esporos. No entanto, este autor concluiu que não há diferenças significativas entre as cepas para separá-las em espécies diferentes. Mas, recentemente, o estudo de Fávaro et al. (2011) abriu nova discussão acerca da classificação de mais espécies no gênero *Epicoccum*, pois estudos morfofisiológicos e moleculares sugeriram no mínimo dois grupos distintos entre 110 isolados brasileiros, sendo a maioria do estado de São Paulo.

2.5.1 Compostos isolados de *E. nigrum*

Diversos compostos, com diferentes atividades já foram isolados de *E. nigrum* e estão organizados em uma tabela (Apêndice – Compostos isolados de *E. nigrum*). O primeiro composto foi o antibiótico flavipina, isolado por Bamford, Norris e Ward (1961), já anteriormente isolado dos fungos *Aspergillus flavipes* e *A. terreus*. A flavipina também foi obtida no trabalho de Burge et al. (1976), que também isolou ácido húmico e os pigmentos

antibióticos epirodina A e B, identificados por Ikawa et al. (1978). Deffieux et al. (1978) e Deffieux; Filleau; Baute (1978) isolaram as epicorazinas A e B, efetivas contra bactérias gram-positivas, mas o rendimento e a atividade da epicorazina A foi superior a B (BAUTE et al., 1978). Em um estudo para controle dos oomicetos parasitas de plantas *Phytophthora* spp. e *Pythium* spp., Brown, Finlay e Ward (1987) detectaram as epicorazinas A e B nos primeiros estágios de crescimento de *E. nigrum*, e flavipina nos estágios finais, além de três compostos ativos não identificados. Estes autores destacaram a atividade antifúngica da epicorazina A, B e flavipina, sendo que contra *Pythium* spp a epicorazina foi mais efetiva.

A partir de uma cepa de *E. nigrum* endofítica de cana-de-açúcar, Araújo et al. (2012) isolaram o composto inédito epicolactona e meleína, importante metabólito isolado anteriormente de *A. melleus*, que possui atividade bactericida, algicida e fungicida. A epicolactona também foi isolada a partir de uma cepa endofítica de cacau por Talontsi et al. (2013), que isolaram, ainda, os epicoccolídeos A e B. Os três compostos são policetídeos que inibiram o crescimento de bactérias e fungos. Os autores propuseram uma via biossintética na qual epicoccolídeos A e B são derivados da flavipina.

Além de compostos já conhecidos, os policetídeos epicocconigronas A e B, 3-metoxiepicocconas A e B e 2,3,4-trihidroxi-6-(metoximetil)-5-metilbenzaldeído, derivados da flavipina, foram isolados por El Amrani et al (2013) a partir de uma cepa endofítica de *Mentha suaveolens*. A epicocconigrona A e o epicoccolídeo B destacaram-se pela ação citostática nas células tumorais (linfomas) RAJI e U-937, sendo que o efeito não foi observado em células normais. Ambos os compostos demonstraram potente ação inibitória de proteínas quinase que apresentam relação com tumores e inibição de enzimas histona deacetilase, cuja atividade alterada está relacionada à agressividade de cânceres. Estes efeitos podem explicar a ação antiproliferativa contra células tumorais. Segundo os autores, ambos os compostos são promissores no desenvolvimento de drogas antitumorais, sendo que a epicocconigrona A mostrou-se mais potente que o epicoccolídeo B.

Zhang et al. (2007) identificaram uma molécula nova de *E. nigrum*, associado ao fungo *Cordyceps*, com atividade antibacteriana, a epicoccina A, ativa contra *Bacillus subtilis*. Os autores isolaram, ainda, epicoccinas B-D, que não apresentaram atividade. A continuidade dos estudos com esta cepa levou ao isolamento de seis novos compostos: quatro epicoccinas (E-H) e difenilalazinas A e B. Epicoccinas G e H e difenilalazina A foram capazes de inibir a replicação do vírus HIV-1 em células sanguíneas tumorais C8166, sendo a epicoccina G a mais efetiva (GUO et al., 2009).

Outro estudo com uma cepa de *E. nigrum*, isolada endofiticamente de folhas de *Lysidice rhodostega*, também levou ao isolamento das já conhecidas epicoccinas A, B, C, E, rostratina A e (3S,6S)-3,6-dibenzilpiperazina-2,5-diona, além das novas moléculas epicoccinas I, J, L, M, N, O, P, Q, R, S, T e um enantiômero da G (molécula com a mesma ressonância magnética nuclear, espectroscopia e difração de raio-X da epicoccina G, mas rotações específicas opostas), chamado de ent-epicoccina G. Os autores verificaram efeito anti-inflamatório das moléculas epicoccinas E, M, S e ent-epicoccina G, por meio da inibição de β -glicuronidase em leucócitos polimorfonucleares de ratos, sendo que a epicoccina E foi a mais efetiva, com IC₅₀ menor do que o controle positivo, o ginkgolídeo B (WANG et al., 2010).

Kemami Wangun e Hertweck (2007) isolaram os compostos epicoccarina A, B e epipiridona, de uma cepa de *Epicoccum* associada ao corpo de frutificação do cogumelo *Pholiota squarrosa*. A epicoccarina A apresentou acentuada atividade contra bactérias gram-positivas, enquanto epicoccarina B e epipiridona apresentou baixa atividade. Desta mesma cepa foram isoladas quatro epicoccamidas (A-D), sendo que a D apresentou baixa atividade citotóxica contra células tumorais HeLa (colo do útero) e baixo efeito antiproliferativo contra células tumorais L929 (fibroblasto de rato) e K562 (leucemia humano) (KEMAMI WANGUN; DAHSE; HERTWECK, 2007). Por fim, o grupo isolou a epicoccalona, inibidor da quimotripsina (serino-protease), além de um composto previamente isolado de *A. terreus* (1,3-dihidro-4,5,6-trihidroxi-7-metil-isobenzofuran) com atividade antioxidante por inibição de lipoxigenase e um isômero da epicoccona (KEMAMI WANGUN; ISHIDA; HERTWECK, 2008). A epicoccona, por sua vez, foi isolada por Abdel-Lateff et al. (2003) de *Epicoccum* sp. associado à alga marinha *Fucus vesiculosus* e demonstrou significativa atividade antioxidante, pois na concentração de 1 μ g/mL apresentou atividade maior do que o BHT (hidroxitolueno butilado), controle positivo, na concentração de 10 μ g/mL.

Sun et al. (2011) encontraram polissacarídeos extracelulares, denominados ENP1 e ENP2, com atividade antioxidante de uma cepa marinha de *E. nigrum*, isolada da esponja *Callyspongia* sp. Segundo os autores ENP2 pode ser explorado para saúde humana, já que apresentou atividade antioxidante superior aos controles laboratoriais BHT e ácido ascórbico, além de atividade e rendimento superior a ENP1. Peng et al. (2012), estudando a mesma cepa, isolaram o composto D8646-2-6, já conhecido por sua atividade inibidora da telomerase, e seu novo isômero, iso-D8646-2-6. Ambos apresentaram atividade antiviral maior que ribavirin, controle positivo, contra o vírus influenza A (H1N1), além de baixa inibição de NF-kB, importante fator na resposta inflamatória de células animais.

Shu et al. (1997), também estudando compostos antivirais, isolaram o oreovactaeno de uma cepa de *E. nigrum*, isolada de folhas de *Tiarella cordifolia*, e avaliaram sua atividade na inibição da interação entre RRE (região específica do RNA viral de HIV-1) e Rev, sua proteína ativadora, fundamental para a replicação do vírus HIV-1. Apesar de apresentar atividade inibitória, o composto não protegeu células CEM-SS (linfoblastoide T humano) contra o vírus HIV. O oreovactaeno apresentou, ainda, baixa atividade antifúngica contra *C. albicans* e moderada atividade citotóxica contra a linhagem tumoral M109 (pulmão de rato). Wiese et al. (2011) obtiveram oreovactaeno, além de epicoccamida, de uma cepa de *E. nigrum* associada a esponjas *Tethya aurantium*, enquanto Pereira et al. (2008) o obtiveram de uma cepa associada à planta *Cedrela fissilis* e verificaram sua propriedade antibacteriana contra *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *E. coli*.

Frederick et al. (1981) estudaram sideróforos (moléculas de origem microbiana que transportam ferro) produzidos por *E. nigrum* e observaram a produção acentuada destas moléculas em meios pobres em ferro. Além das moléculas ferricrocin e coprogen, já conhecidas, outras novas moléculas foram isoladas. Destas, uma, nomeada triornicin, apresentou atividade antitumoral, prolongando a vida de camundongos inoculados com células ascíticas de Ehrlich em até 36%.

Quatro diterpenos do tipo pimarano foram isolados de uma cepa marinha de *Epicoccum* associada ao pepino do mar *Apostichopus japonicus*, dos quais três apresentaram atividade citotóxica contra as linhagens celulares KB e KBv200 (carcinoma epidérmico). Destas, duas são moléculas novas, sendo a mais efetiva batizada de aspergilona A, enquanto a terceira, já conhecida, a diaportina B, isolada dos fungos *Diaporthe* sp. e *Eutypella scoparia* (XIA et al., 2012).

Um composto derivado de cromanona e três de isobenzofuran, sendo dois inéditos, foram obtidos de uma cepa de *E. nigrum* isolada da associação com um fungo não identificado sobre madeira por Lee, Gloer e Wicklow (2007). No entanto, nenhum dos compostos, apresentou atividade antifúngica contra *A. flavus* e *Fusarium verticillioides*.

Bell e Karuso (2003) contaminaram acidentalmente uma cultura de leveduras com *E. nigrum* e perceberam que as leveduras próximas ao fungo continuaram a crescer normalmente, mas com coloração laranja. Sob luz ultravioleta as colônias fluoresciam vermelho, devido à proteína epicocconona, posteriormente isolada. Os autores defenderam a aplicação dessa proteína para marcação celular, citometria de fluxo, microscopia ou detecção de proteínas em gel de eletroforese. De fato, a epicocconona tornou-se um produto comercial como corante fluorescente biodegradável para detecção de proteínas em gel 1D e 2D de

eletroforese, chamado “Deep Purple™” pela Amersham Biosciences (Uppsala, Suécia) (MACKINTOSH et al., 2003).

Até mesmo nanopartículas de prata já foram biossintetizadas a partir de uma cepa de *E. nigrum* endofítica de *Phellodendron amurense*. Por um processo de química “verde”, íons de prata (AgNO_3) foram reduzidos a nanopartículas com efeito fungistático em nove espécies de fungos patogênicos testadas, com valores de concentração inibitória mínima (CIM) entre 0,125 e 1 $\mu\text{g/mL}$. O estudo concluiu que a linhagem testada é promissora para a obtenção de nanopartículas metálicas em larga escala, importantes na indústria alimentícia e na produção de materiais de segurança médica e produção de materiais relacionados à saúde, e que estudos devem ser realizados para a compreensão da toxicidade das nanopartículas para utilização clínica (QIAN et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O estudo teve como objetivo obter e caracterizar compostos com ação antifúngica a partir da cultura do fungo isolado de folha de *Rhizophora mangle*, codificado como R-2BI-8. Para esta finalidade os objetivos específicos foram:

3.2 Objetivos específicos

1. Identificação taxonômica do fungo R-2BI-8, por sequenciamento da região 26S DNAr;
2. Cultivo do fungo R-2BI-8 para obtenção de extratos orgânicos com hexano (HEX), diclorometano (DCM) e acetato de etila (AE);
3. Purificação dos extratos orgânicos, fracionamento e isolamento dos princípios ativos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) direcionada pelos ensaios de ação antifúngica;
4. Avaliação da ação antifúngica *in vitro* (CIM) das frações e/ou moléculas isoladas sobre os fungos patogênicos: *T. rubrum* IOC 4527, *C. albicans* ATCC 36802/IOC 3704, *A. fumigatus* IOC 4526 e *C. neoformans* IOC 4528;
5. Avaliação da citotoxicidade (IC₅₀) e caracterização físico-química por ressonância magnética nuclear ¹H e ¹³C (RMN) e/ou infravermelho (IV) e espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) das moléculas isoladas e com ação antifúngica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta, isolamento e manutenção do fungo R-2BI-8

O fungo codificado como R-2BI-8 e empregado neste estudo foi isolado de folhas de *R. mangle* de mangue em Bertioga (S 23° 53' 42,8", W 46° 12' 30,1"), litoral sul de São Paulo, pela equipe do Dr. Itamar Soares de Melo, do Laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Meio Ambiente de Jaguariúna, SP. Após o isolamento, o fungo foi preservado em laboratório pelo Método Castellani (1967) e congelamento a -80 °C.

4.2 Estabelecimento da relação do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) pela absorbância para emprego nos inóculos

Para estabelecimento do número de unidades formadoras de colônias a serem empregadas nos inóculos para produção de extrato orgânico, o fungo R-2BI-8 foi cultivado em meio sólido batata dextrose ágar (BDA) (Himedia, Mumbai, Índia) por 6 dias e as colônias foram suspensas em solução salina e homogeneizadas por agitação (agitador de tubos, marca Phoenix, modelo AP 56, Araraquara, SP, Brasil). A absorbância foi ajustada para 0,5 em espectrofotômetro UV/VIS a 590 nm (marca Agilent, modelo 8453) e dez novas suspensões foram preparadas com absorbâncias na faixa de 0,01 a 0,45. Para cada valor de absorbância, diluições seriadas na faixa de 10^{-1} a 10^{-6} foram preparadas e inoculadas em meio BDA a 28 °C, em triplicata para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

O número de UFC/mL foi calculado e os dados expressos em UFC/mL *versus* absorbância a 590 nm, para cálculo da equação da reta no software Origin 6.1.

4.3 Produção de extratos orgânicos

O fungo R-2BI-8 foi mantido em cultura em meio BDA e, para a produção de extratos orgânicos, colônias com 6 dias de crescimento foram suspensas em solução salina e transferidas para Erlenmeyer de 2 litros contendo 800 mL de meio líquido batata dextrose (BD) (Himedia, Mumbai, Índia). Os Erlenmeyers foram incubados em *Shaker* (Marca Marconi, Modelo MA-830, Piracicaba, SP, Brasil) a 150 rpm e 28 °C por 14 dias.

Após a filtração em gaze de algodão, a biomassa foi descartada (após descontaminação em autoclave) e o sobrenadante foi utilizado para extração líquido-líquido com hexano (HEX) [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$], diclorometano (DCM) (CH_2Cl_2) e acetato de etila (AE) ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$). Os solventes foram removidos por evaporação a vácuo, (Rotaevaporador marca Buchi, Modelo R-210, Suíça), e os extratos orgânicos brutos obtidos foram armazenados protegidos da luz.

4.4 Avaliação da ação antifúngica pelo ensaio de concentração inibitória mínima (CIM)

Os extratos brutos e/ou frações obtidas do fracionamento por cromatografia líquida (abaixodescrita) foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e esterilizados por filtração em membrana de celulose regenerada (0,22 μm). Os extratos foram diluídos em meio de cultura RPMI-1640 nas concentrações de 225 a 500 $\mu\text{g/mL}$.

As suspensões dos fungos patogênicos *C. albicans* ATCC 36802/IOC 3704, *C. neoformans* IOC 4528, *A. fumigatus* IOC 4526 e *T. rubrum* IOC 4527 foram preparadas em meio de cultura RPMI-1640 nas concentrações de 0,5-2,5x10³ UFC/mL para as leveduras *C. albicans* e *C. neoformans* e a 5x10³ UFC/mL para *A. fumigatus* e *R. rubrum* (NCCLS, 2002a; 2002b) de acordo com curvas padrão previamente estabelecidas por leitura das absorbâncias a 530 nm.

Em uma placa de 96 cavidades os extratos e/ou frações foram serialmente diluídos em meio de cultura RPMI-1640 e, em seguida, foram adicionados 100 μL da suspensão de patógenos. Para controle positivo utilizou-se anfotericina B na concentração máxima de 16 μM .

As placas foram incubadas em estufa a 30-32 °C e 24 h antes da leitura das CIM 25 μL do corante resazurin a 0,02% foram adicionados em cada cavidade. A leitura das CIM para *C. albicans* foi realizada em 24 h, de *C. neoformans* em 48 h e de *A. fumigatus* e *T. rubrum* em 72 h.

A permanência da cor azul indica ausência de crescimento de microrganismo e a alteração para a cor rosa indica presença de microrganismos. A CIM é a concentração mais baixa na qual ocorre pelo menos 90% de inibição do crescimento de microrganismo.

4.5 Avaliação da concentração fungicida (CF)

Para determinação da concentração fungicida (CF), em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, foram inoculados 50 µL das suspensões correspondentes às CIM das amostras, e duas concentrações acima da CIM, retiradas da microplaca do ensaio de CIM. As placas foram incubadas a 37 °C e analisadas diariamente por até 96 horas para se determinar a ausência ou presença de colônias de fungos patogênicos. A CF será aquela onde não houver crescimento dos fungos patogênicos.

4.6 Fracionamento dos extratos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC)

O fracionamento dos extratos por cromatografia líquida foi direcionado pelos resultados de CIM. Os extratos obtidos a partir de hexano (R-2BI-8-HEX) e diclorometano (R-2BI-8-DCM) foram submetidos a fracionamento em coluna de fase reversa (C8, 4,6 x 250 mm – ACE, Escócia) com fluxo de 1,0 mL/minuto e gradientes de 60-100% B e de 35-74% B, por 30 minutos para R-2BI-8-HEX e R-2BI-8-DCM, respectivamente (Tabela 1). As fases móveis usadas foram: (A) H₂O/TFA (99,99:0,01%) e (B) MeOH/H₂O/TFA (90:10:0,01).

As frações foram coletadas e secas em centrífuga a vácuo tipo SpeedVac®Plus, modelo SC-210A (Savant, USA). As amostras secas foram utilizadas nos ensaios de CIM e caracterização dos compostos purificados.

Tabela 1 – Métodos de fracionamento em HPLC dos extratos/frações obtidos a partir da cultura do fungo R-2BI-8.

Extrato/ Fração	Métodos de fracionamento
R-2BI-8 DCM	Gradiente: 35 a 74% B em 30 minutos
R-2BI-8 F3 DCM	Gradiente: 30 a 45% B em 30 minutos
R-2BI-8 F5 DCM	Gradiente: 35 a 42% B em 30 minutos
R-2BI-8 F6 DCM	Gradiente: 35 a 74% B em 30 minutos
R-2BI-8 F6-1 DCM	Isocrático: 33% B em 25 minutos
R-2BI-8 F9 DCM*	Isocrático: 60% B em 30 minutos
R-2BI-8 HEX	Gradiente: 60 a 100% B em 30 minutos
R-2BI-8 F2 HEX	Isocrático: 48% B em 25 minutos
R-2BI-8 F9 HEX	Isocrático: 78% B em 25 minutos

* Em todos os métodos utilizou-se coluna de fase reversa C8, 4,6 x 250 mm, e fases móveis: (A) H₂O/TFA (99,99:0,01%) e (B) MeOH/H₂O/TFA (90:10:0,01%) e fluxo de 1mL/min, exceto no método para a fração R-2BI-8 F9 DCM, no qual utilizou-se a coluna Luna PFP(2), 250 x 4,6 mm (Phenomenex, USA).

4.7 Caracterização dos compostos antifúngicos

A fração DCM-F9 foi analisada em cromatógrafo gasoso GCT-Premier Waters acoplado à espectrometria de massas (GC/MS), com coluna capilar HP5-MS, fase estacionária mistura de 5% fenil- e 95% dimetil-polisiloxano e gás hélio a fluxo constante de 1,7 mL/min¹. A temperatura inicial da coluna foi de 70 °C por 5 minutos, programada para chegar a 320 °C, aumentando 5 °C/min, e mantida em 320 °C por 5 minutos. A temperatura do injetor e do detector foi de 70 e 300 °C, aumentando 120 °C/min. As amostras foram ionizadas por elétron a uma voltagem de 70 eV, com temperatura da fonte de 230 °C e do quadrupolo 150 °C.

A análise de ressonância magnética nuclear ¹H, 500 MHz, foi realizada pela equipe do Dr. Massou Jorge Kato, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.8 Identificação taxonômica do fungo R-2BI-8 por análise molecular

A identificação taxonômica do fungo R-2BI-8 foi realizada pela aluna de mestrado Liu Yu Ping. Para isso, o fungo foi cultivado em meio BD a 28 °C por 6 dias e o micélio formado foi liofilizado para total remoção de resíduos de água. A biomassa foi cuidadosamente macerada e empregada para a extração do DNA genômico a 4 °C.

Em um tubo tipo *eppendorf* com capacidade para dois mL, foram adicionados 200 µL de tampão de extração (SDS 3%; EDTA 0,5 mM; NaCl 1,0 M; e Tris-HCl 0,1 mM pH 8,0) a 20 mg de micélio macerado e a mistura foi homogeneizada em agitador de tubos por 15 segundos. Em seguida, 200 µL de uma solução de clorofórmio:fenol:álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v) foi adicionada lentamente, e o tubo foi incubado em banho-maria a 65 °C, por 5 minutos (GONZÁLEZ-MENDOZA et al., 2010). A mistura foi resfriada a temperatura ambiente e centrifugada a 10.000 g, e a 4 °C por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e acrescido do mesmo volume de etanol absoluto gelado. A mistura foi agitada e incubada a -20 °C por 20 minutos para precipitação total de DNA. Após centrifugação a 10.000 g e a 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e um mL de etanol a 75% foi adicionado ao DNA precipitado. Após repetição desta última etapa e descarte do sobrenadante, o DNA precipitado foi solubilizado com 50 µL de água deionizada estéril e armazenado a -20 °C até o momento do uso.

Para amplificação da região ITS do DNAr foram utilizados os *primers* ITS1 (5' CCCGCCGCGCGCGGGCGGGGC 3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada utilizando-se 25 µL de uma solução

contendo: 20 ng de DNA, $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, tampão da reação 1 X, ITS1F 0,5 μM , ITS4 0,5 μM e Taq DNA polimerase 1 U (Prime TaqTM DNA polymerase Genet Bio). As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Mastercycler gradient machine (Eppendorf, Alemanha). A programação consistiu de uma desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto, seguida por 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94 °C, 30 segundos de anelamento a 50 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 0,5 X durante aproximadamente 90 min a 80 V.

O produto da PCR foi purificado com kit GeneJETTM Gel Extraction (Fermentas, Lituânia) e a amostra (produto de PCR purificado + primer) foi sequenciada no sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (PE Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). As sequências de DNA obtidas foram analisadas utilizando-se o programa BLASTn, disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estabelecimento da relação número de UFC/mL pela absorbância para emprego nos inóculos para produção de extratos orgânicos

A padronização do número de UFC/mL presentes no inóculo é importante, pois, estudos sugerem que o número de colônias presentes no inóculo pode mudar o crescimento micelial, a morfologia e a produtividade de fungos quando em meio de cultura líquido (TUCKER; THOMAS, 1994). No entanto, os autores concluem que a mesma concentração do inóculo utilizada em incubadora com agitação (*shakers*) ou em biorreatores pode resultar em diferenças quanto a estes aspectos, pois os muitos fatores que afetam a viabilidade dos esporos e sua morfogênese não são adequadamente controlados em *shakers*.

A padronização da concentração do inóculo a ser usada na cultura do fungo R-2BI-8, para produção de extratos orgânicos, foi realizada por contagem do número de UFC/mL com relação aos valores de absorbâncias de 0,01 a 0,5 a 590 nm. A equação da reta calculada foi: $y = -1300,2237 + 11198,61781 x$, sendo $R = 0,99966$ de acordo com o gráfico da Figura 1.

Figura 1 – Unidades formadoras de colônias (UFC/mL) do fungo R-2BI-8 com relação a absorbâncias a 590 nm. Equação da reta: $y = -1300,2237 + 11198,61781 x$ sendo $R = 0,99966$. Cálculo no Software Origin 6.1.

Considerando a equação da reta, a concentração do inóculo definido para cultura do fungo R-2BI-8 (por 14 dias) na produção de extrato orgânico é de $9,6 \times 10^3$ UFC para um volume total de 800 mL (12 UFC/mL).

5.2 Obtenção de extratos orgânicos

Após a cultura de R-2BI-8 em 800 mL de meio BD, por 14 dias a 28 °C, e filtração para remoção da biomassa, foram obtidos extratos a partir de hexano (HEX), diclorometano (DCM) e acetato de etila (AE). Os solventes foram removidos resultando em extratos brutos com rendimentos de 17,7, 45,8 e 43,3 mg para HEX, DCM e AE, respectivamente. Assim, o rendimento do extrato bruto em hexano foi muito menor do que os extraídos com diclorometano e acetato de etila.

5.3 Ação antifúngica dos extratos orgânicos e fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC)

O extrato R-2BI8-HEX apresentou baixo rendimento, mas ação antifúngica sobre os fungos patogênicos *C. albicans* ATCC 36802, *C. neoformans* IOC 4528, *A. fumigatus* IOC 4526 e *T. rubrum* IOC 4527 com CIM no valor de 31,25 a 62,5 µg/mL. O o extrato R-2BI-8-DCM foi obtido com maior rendimento, mas apresentou menor efetividade com relação à capacidade de inibição do crescimento dos fungos patogênicos, com CIM na faixa de 62,5 a 250 µg/mL, exceto *A. fumigatus*, que não foi inibido na maior concentração testada (1.000 µg/mL) (Tabela 2). O extrato R-2BI-8 AE não apresentou ação antifúngica sobre os patógenos testados e as extrações continuaram, então, sendo efetuadas somente com diclorometano e hexano.

Tabela 2 – CIM (µg/mL) dos extratos brutos contra os fungos patogênicos *C. albicans* ATCC 36802, *C. neoformans* IOC 4528, *A. fumigatus* IOC 4526 e *T. rubrum* IOC 4527

Amostra	CIMs (µg/mL)			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>T. rubrum</i>
	24 h	96 h	72 h	72 h
R-2BI-8-HEX	62,5	31,25	62,5	62,5
R-2BI-8-DCM	250	62,5	>1000	250
R-2BI-8-AE	>1000	>1000	>1000	>1000
AmB (µM)	0,5	0,0625	1	0,5

A CIM para R-2BI-8-HEX foi de 62,5 µg/mL para *C. albicans*, *A. fumigatus* e *T. rubrum* e 31,25 µg/mL para *C. neoformans*, revelando atividade antifúngica promissora, enquanto o extrato R-2BI-8-DCM apresentou valores de CIM mais altos, não inibindo *A.*

fumigatus mesmo na maior concentração testada (1.000 µg/mL). Conforme esperado, a anfotericina B (AmB) inibiu todos os patógenos em concentrações inferiores a 1 µM.

Após detecção da ação antifúngica, os extratos R-2BI-8 HEX e DCM foram fracionados por cromatografia. A Figura 2 ilustra o fluxograma das frações obtidas a partir dos extratos brutos. Para R-2BI-8-HEX foram obtidas 9 frações (Figura 3) e para R-2BI-8-DCM 11 frações (Figura 4). O extrato R-2BI8-DCM tem a composição mais complexa, com grande quantidade de picos. As frações foram avaliadas quanto a ação antifúngica e os dados estão representados na Tabela 3. A determinação da concentração fungicida foi sugerida na banca de qualificação, no entanto não foi possível determiná-la, pois todo material obtido após o exame foi destinado à purificação e caracterização dos compostos.

Figura 2 – Representação do fluxograma de fracionamento dos extratos orgânicos obtidos a partir da cultura do fungo R-2BI-8, e de suas respectivas frações e subfrações. As amostras com atividade antifúngica com CIM na faixa de <1,4 a 125µg/mL estão destacadas nos retângulos com fundo escuro.

Figura 3 - Perfil cromatográfico do extrato R-2BI-8-HEX. Gradiente: Início em 60% B por 4 minutos, seguido por 60 a 100% B em 30 minutos, 100% B em 3 minutos, 100 a 60% B em 3 minutos e 60% B por 5 minutos. Coluna C8, 4,6 x 250 mm, ACE. Fase A: H₂O/TFA (99,99:0,01%) e B MeOH/H₂O/TFA (90:10:0,01%). Fluxo: 1mL/min.

Figura 4 – Perfil cromatográfico do extrato R-2BI-8-DCM. Gradiente: Início em 35% B por 3 minutos, seguido por 35 a 74% B em 30 minutos, 100% B em 4 minutos, 100 a 35% B em 3 minutos e 35% B por 3 minutos. Coluna C8, 4,6 x 250 mm, ACE. Fase A: H₂O/TFA (99,99:0,01%) e B MeOH/H₂O/TFA (90:10:0,01%). Fluxo: 1mL/min.

Tabela 3 – CIM ($\mu\text{g/mL}$) das frações obtidas a partir de R-2BI-8-HEX e R2-BI-8-DCM contra os fungos patogênicos *C. albicans* ATCC 36802, *C. neoformans* IOC 4528, *A. fumigatus* IOC 4526 e *T. rubrum* IOC 4527

Amostra		CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
		<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>T. rubrum</i>
		24 h	48 h	72 h	72 h
DCM	F1	>500	500	>500	>500
	F2	>500	250	>500	>500
	F3	>500	125	>250	500
	F4	>250	125	>250	250
	F5	ND	125	>250	125
	F6	31,25	31,25	31,25	62,5
	F7	>500	500	>500	125
	F8	500	500	>500	500
	F9	250	62,5	>500	125
	F10	>500	125	>500	62,5
	F11	ND	250	>500	250
HEX	F1	>500	>500	>500	>500
	F2	250	500	>500	>500
	F3	500	>500	>500	>500
	F4	>500	500	>500	500
	F5	>450	>450	>450	>450
	F6	>225	225	>225	>225
	F7	>225	225	>225	225
	F8	500	500	>500	500
	F9	250	31,25	>250	125
AmB (μM)		0,5	$\leq 0,5$	4	8

ND = Não determinado.

A fração R-2BI-8-DCM-F6 inibiu o crescimento de todos os patógenos com CIM entre 31,25 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e foi a única efetiva sobre o *A. fumigatus*. Outras frações de R-2BI-8-DCM que apresentaram ação antifúngica promissora foram F3, F4, F5, F9 e F10 com CIM de pelo menos 125 $\mu\text{g/mL}$ contra um dos patógenos. Assim, decidiu-se priorizar as purificações destas frações, pois, além de mais material, as frações de R-2BI-8-HEX não apresentaram ação antifúngica promissora. A exceção foi a fração R-2BI-8-HEX-F9, que apresentou atividade destacada, porém menos efetiva do que o extrato bruto. Pauletti, Bolzani e Young (2003) também observaram que ao purificar componentes da planta *Arrabidaea samydoides*, cujo extrato bruto apresentou ação antioxidante em células de leveduras, subsequentes fracionamentos diminuía gradativamente a bioatividade das subfrações. Os autores explicam que esses resultados são frequentes em estudos químicos bioguiados, possivelmente pela existência de sinergismo ou perda de atividade durante a separação

cromatográfica. Bhakuni e Rawat (2005) explicam que princípios ativos podem apresentar grupos funcionais reativos que podem rapidamente sofrer reação, tornando-os inativos.

Figura 5 – Perfil cromatográfico da fração R-2BI-8-DCM-F3, subfracionada em 7 subfrações (F3-1 a F3-7). Gradiente: Início em 30% B por 3 minutos, seguido por 30 a 45% B em 30 minutos, 100% B em 3 minutos, 100 a 30% B em 3 minutos e 35% B por 5 minutos. Coluna C8, 4,6 x 250 mm, ACE. Fase A: H₂O/TFA (99,99:0,01%) e B MeOH/H₂O/TFA (90:10:0,01%). Fluxo: 1mL/min.

O refracionamento da fração F3 de R-2BI-8-DCM resultou em 7 subfrações (Figura 5), sendo 5 picos (F3-1 a F3-3 e F3-5 e 6), um conjunto de picos minoritários (F3-4) e ao menos três picos de difícil separação (F3-7), que foram coletadas e armazenadas secas para posterior análise de CIM.

Durante o refracionamento da fração F5 de R-2BI-8-DCM o perfil foi dividido em quatro subfrações, sendo três picos majoritários (F5-1 a F5-3) e uma junção de dois picos de menor intensidade (F5-4) (Figura 6). As frações foram armazenadas secas para posterior análise de CIM.

Figura 6 – Perfil cromatográfico do extrato R-2BI-8-DCM-F5, subfracionado em 4 subfrações (F5-1 a F5-4). Gradiente: Início em 35% B por 3 minutos, seguido por 35 a 42% B em 30 minutos, 100% B em 3 minutos, 100 a 35% B em 4 minutos e 35% B por 3 minutos. Coluna C8, 4,6 x 250 mm, ACE. Fase A: H₂O/TFA (99,99:0,01%) e B MeOH/H₂O/TFA (90:10:0,01%). Fluxo: 1mL/min.

A fração F6 de R-2BI-8-DCM, tida como a mais promissora até aqui, foi refracionada em 5 subfrações, das quais 4 são picos majoritários (F6-1, F6-2, F6-4 e F6-5) e uma é um conjunto de picos de menor intensidade (F6-3) (Figura 7). As subfrações foram coletadas e armazenadas secas para posterior análise de CIM.

A purificação da fração F9 de R-2BI-8-DCM resultou em um pico majoritário apresentando absorbâncias em 214, 254 e 280 nm (Figura 8). A pureza e a caracterização físico-química do composto começaram a ser definidas por espectrometria de massas (LC-MS e CG/MS), seguida de ressonância magnética nuclear (RMN ¹H e ¹³C). No entanto, os resultados indicaram material impuro. Todo material obtido, em seguida, foi sucessivamente injetado no HPLC na tentativa de purificação, mas não foi possível determinar o composto. Novas abordagens de purificação estão sendo analisadas para a continuação do projeto.

Figura 7 – Perfil cromatográfico do extrato R-2BI-8-DCM-F6, subfracionado em 5 subfrações (F6-1 a F6-5). Gradiente: Início em 35% B por 3 minutos, seguido por 35 a 74% B em 30 minutos, 100% B em 4 minutos, 100 a 35% B em 3 minutos e 35% B por 3 minutos. Coluna C8, 4,6 x 250 mm, ACE. Fase A: H₂O/TFA (99,99:0,01%) e B MeOH/H₂O/TFA (90:10:0,01%). Fluxo: 1mL/min.

O extrato bruto R-2BI-8-HEX deu origem a fração F9 com CIM variando de 31,25 a 250 µg/mL sobre os patógenos avaliados, exceto *A. fumigatus*, que não foi inibido até esta concentração. Embora sem muito sucesso, algumas tentativas foram empreendidas para a sua total purificação e foram testadas as colunas, C18, C8, C4, PFP, CN, e para as fases móveis o metanol foi substituído por acetonitrila (Figura 9).

Após a análise cromatográfica, realizou-se ensaio de CIM das subfrações obtidas a partir das frações DCM-F3, F5 e F6 (Tabela 4). Dentre as subfrações de DCM-F3, F3-7 mostrou-se efetiva contra as leveduras *C. neoformans* e *C. albicans*, com CIM de 31,25 e 62,5 µg/mL, respectivamente.

Figura 8 – Perfil cromatográfico do extrato R-2BI-8-DCM-F9. Isocrático: 60% B por 30 minutos. Coluna C8, 4,6 x 250 mm, ACE. Fase A: H₂O/TFA (99,99:0,01%) e B MeOH/H₂O/TFA (90:10:0,01%). Fluxo: 1mL/min.

Figura 9 – Perfil cromatográfico do extrato R-2BI-8-HEX-F9. Isocrático: 78% B por 25 minutos. Coluna Luna PFP(2), 250 x 4,6 mm. Fase A: H₂O/TFA (99,99:0,01%) e B MeOH/H₂O/TFA (90:10:0,01%). Fluxo: 1mL/min.

Tabela 4 – CIM das subfrações obtidas a partir das frações F3, F5 e F6 do extrato R2-BI8-DCM contra os fungos patogênicos *C. albicans* ATCC 36802, *C. neoformans* IOC 4528, *A. fumigatus* IOC 4526 e *T. rubrum* IOC 4527

		CIM (µg/mL)			
Amostra		<i>Ca. albicans</i>	<i>Cr. neoformans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>T. rubrum</i>
		24 h	48 h	72 h	72 h
DCM	F3-5	>225	112,5	>225	>225
	F3-6	>250	62,5	>250	250
	F3-7	62,5	31,25	>250	125
	F5-1	>90	11,25	>90	45
	F5-2	>225	112,5	>225	112,5
	F5-3	<2,81	<1,4	<1,4	<1,4
	F5-4	67,5	33,75	67,5	135
	F6-1	ND	50	25	25
	F6-4	ND	>50	>50	50
	F6-5	ND	125	>250	250
AmB (µM)		0,5	≤ 0,5	4	8

ND = Não determinado

Já entre as subfrações de F5, F5-1 e F5-2 inibiram o crescimento de *C. neoformans* e *T. rubrum*, com CIM de 11,25 a 45 µg/mL para F5-1 e 112,5 µg/mL para F5-2. Porém, dentre as subfrações testadas a F5-3 foi a mais efetiva e inibiu todos os patógenos até a menor concentração testada de 1,4 µg/mL. Por fim, a fração F5-4 também inibiu todos os patógenos, na concentração mínima de 33,75 µg/mL para *C. neoformans*. Devido à proximidade com F5-3, que se mostrou muito efetiva na inibição do crescimento dos patógenos, a ação de F5-4 pode ser devido a uma pequena contaminação com F5-3. É preciso refracionar F5-4 e isolar todos os picos para confirmar o potencial antifúngico demonstrado. Porém, culturas subsequentes não reproduziram o perfil cromatográfico de DCM-F3 e F5.

A subfração F6-1, obtida a partir de F6, também foi efetiva contra todos os fungos testados e teve CIM variando entre 25 e 50 µg/mL. Como seu valor de CIM foi semelhante ao da fração F6, é provável que este seja o composto responsável por esse potencial antifúngico. A purificação de F6-1 foi considerada prioritária e foi padronizada (Figura 10). No entanto, não foi possível obter maior quantidade de material porque nas culturas subsequentes o pico não foi detectado. Foram feitas novas culturas com o fungo original descongelado, no entanto, mesmo assim não se detectou o pico. A subfração F6-4 inibiu o crescimento de *T. rubrum* a 50 µg/mL, que foi a maior concentração testada dessa subfração, mas é preciso realizar o teste novamente com maiores concentrações para verificar o valor de CIM nos outros patógenos.

Por fim, F6-5 também apresentou inibição de *C. neoformans* e *T. rubrum*, porém, em concentrações mais elevadas.

Figura 10 – Perfil cromatográfico do extrato R-2BI-8-DCM-F6-1 purificado. A caracterização do composto não foi possível por não ser mais produzido pelo fungo. Isocrático: 33% B por 25 minutos. Coluna C8, 4,6 x 250 mm, ACE. Fase A: H₂O/TFA (99,99:0,01%) e B MeOH/H₂O/TFA (90:10:0,01%). Fluxo: 1mL/min.

5.4 Caracterização dos compostos antifúngicos

A fração DCM-F9 foi purificada em HPLC e seu grau de pureza analisado em CG/MS. O perfil cromatográfico em CG/MS foi de 5 picos principais com tempo de retenção entre 47 e 51 min (Figura 11), sugerindo que há mais de um composto na amostra, que pode ter sido fragmentado, deixando a análise inconclusiva.

Figura 11 – Perfil cromatográfico de DCM-F9 em CG/MS. Análise em cromatógrafo gasoso GCT-Premier Waters acoplado à espectrometria de massas (GC/MS). Coluna capilar HP5-MS, fase estacionária de 5% fenil- e 95% dimetil-polisiloxano e gás hélio a fluxo constante de 1,7 mL/min.

Os espectros de massas dos picos observados no CG apresentam semelhanças entre si. Todos apresentaram fragmentos de massa de 286 ou 287 g/mol, sendo que a fragmento de maior massa variou de 286 a 335 g/mol.

Já a análise por RMN também foi inconclusiva por apresentar mais de um composto (Figura 12). Assim, confirmou-se que a pureza do material não estava suficiente para a caracterização do composto antifúngico. No entanto, novas abordagens de purificação estão sendo analisadas a fim de possibilitar a caracterização do composto estudado.

Figura 12 – Espectro de RMN, 500MHz da fração DCM-F9, sugerindo presença de mais de um composto, material impuro.

5.5 Identificação taxonômica do fungo R-2BI-8 por análise molecular

Após sequenciamento genético, o fungo R-2BI-8 foi identificado como *Epicoccum nigrum* (Query Coverage 100% e 99% de similaridade) (Figura 13). SCHOL-SCHWARZ (1959) avaliou 70 isolados do gênero *Epicoccum* e os reuniu em uma espécie com muitas variações: *E. nigrum*. Fávalo et al. (2011) defendem a separação da espécie *E. nigrum* em, pelo menos, duas espécies distintas, devido às diferenças morfofisiológicas existentes, e reclassificação de diversas linhagens do GenBank e coleções de cultura, uma vez que o gênero tem potencial para biocontrole de microrganismos patogênicos em plantações e produção de compostos de aplicação biotecnológicas, como: antimicrobianos, antioxidantes, inibidores de replicação viral, inibidores de protease, inibidores de telomerase e fluorescentes.

Figura 13 – Árvore fenética, via Blast, do fungo R-2BI-8, identificado como *Epicoccum nigrum* após análise de sequências obtidas com operon ribossomal ITS1-5.8S-ITS2 e sequências de linhagens relacionadas no banco de dados CBS (*Didymella phacae*, *Ascochyta rabiei*, *Phoma sojae*).

6 CONCLUSÃO

O fungo codificado como R-2BI-8 foi identificado por técnicas de Biologia Molecular como *Epicoccum nigrum* e a partir da sua cultura e devidas extrações com os solventes orgânicos hexano (HEX), diclorometano (DCM) e acetato de etila (AE) foram obtidos três extratos designados como R-2BI-8 Hex, R-2BI-8 DCM e R-2BI-8 AE.

O extrato R-2BI-8-AE não apresentou ação antifúngica e o R-2BI-8-HEX foi mais efetivo que R-2BI-8 DCM contra todos os fungos patogênicos testados. Por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o extrato R-2BI-8-HEX foi fracionado em 9 frações e somente a fração R-2BI-8-HEX-F9 apresentou ação antifúngica promissora com CIM de 31,25 µg/mL sobre *C. neoformans*. Do fracionamento do extrato R-2BI-8-DCM foram obtidas 11 frações e R-2BI-8-DCM F3, F4, F5, F6, F9 e F10 apresentaram ação antifúngica promissora com CIM na faixa de 31,25 a 500 µg/mL. Destas, a fração R-2BI-8-DCM F6 inibiu todos os fungos patogênicos na concentração máxima de 62,5 µg/mL.

As subfrações R-2BI-8 DCM F3-5, F3-6, F3-7, F5-1, F5-2, F5-3, F5-4, F6-1, F6-4 e F6-5 apresentaram ação antifúngica, sendo que a subfração R-2BI-8-DCM F5-3 exibiu CIM $\leq 2,8$ µg/mL sobre todos os fungos patogênicos testados. A subfração R-2BI-8-DCM-F6-1 apresentou CIM de 25 µg/mL sobre os patógenos *A. fumigatus* e *T. rubrum* e de 50 µg/mL sobre *C. neoformans*,

Foram definidos métodos para a repurificação das frações e/ou subfrações DCM-F6-1 e DCM-F9. A fração DCM-F6-1 não foi mais detectada em novas culturas. Já a fração DCM-F9 não estava suficientemente pura para caracterização pelos métodos de espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear. Novas abordagens estão sendo analisadas para o sucesso e continuidade na purificação destes materiais.

REFERÊNCIAS*

- ABDEL-LATEFF, A.; FISCH, K. M.; WRIGHT, A. D.; KÖNIG, G. M. A new antioxidant isobenzofuranone derivative from the algicolous marine fungus *Epicoccum* sp. **Planta Med.**, v. 69, p. 831-834, 2003.
- ALMEIDA, C. V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 40, n. 5, p. 467-470, 2005.
- AMNA, T.; PURI, S. C.; VERMA, V.; SHARMA, J. P.; KHAJURIA, R. K.; MUSARRAT, J.; SPITELLER, M.; QAZI, G. N. Bioreactor studies on the endophytic fungus *Entrophospora infrequens* for the production of an anticancer alkaloid camptothecin. **Can. J. Microbiol.**, v. 52, p. 189-196, 2006.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Detecção e identificação dos fungos de importância médica. In: ANVISA. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. 1. ed.. Brasília: Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. Módulo VII. 50p.
- ARAÚJO, F. D. S.; FÁVARO, L. C. L.; ARAÚJO, W. L.; OLIVEIRA, F. L.; APARICIO, R.; MARSAIOLI, A. J. Epicolactone – Natural product isolated from the the sugarcane endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 2012, p. 5225-5230, 2012.
- BAGAGLI, E.; THEODORO, R. C.; BOSCO, S. M. G.; MCEWEN, J. G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, p. 197-207, 2008.
- BAUTE, M. A.; DEFFIEUX, G.; BAUTE, R.; NEVEU, A. New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*: I. Fermentation, isolation and antibacterial properties. **J. Antibiot.**, v. 31, n. 11, p. 1099-1101, 1978.
- BELL, P. J. L.; KARUSO, P. Epicocconone, a novel fluorescent compound from the fungus *Epicoccum nigrum*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, n. 31, p. 9304-9305, 2003.
- BENATTI, M. N.; MARCELLI, M. P. Gêneros de fungos liquenizados dos manguezais do Sul-Sudeste do Brasil, com enfoque no manguezal do Rio Itanhaém, Estado de São Paulo. **Acta bot. bras.**, v. 21, n. 4, p. 863-878, 2007.
- BÉRDY, J.; Bioactive microbial metabolites: a personal view. **J. Antibiot.**, v.58, n. 1, p. 1-26, 2005.
- BHAKUNI, D. S.; RAWAT, D. S. **Bioactive marine natural products**. Nova Deli: Anamaya Publishers, 2005.
- BLACK, P. N.; UDY, A. A.; BRODIE, S. M. Sensitivity to fungal allergens is a risk factor for life-threatening asthma. **Allergy**, v. 55, p. 501-504, 2000.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **Am. J. Bot.**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.
- BOLARD, J. How do the polyene macrolides antibiotics affect the cellular membrane properties. **BBA**, v. 864, p. 257-304, 1986.
- BROWN, A. E.; FINLAY, R.; WARD, J. S. Antifungal compounds produced by *Epicoccum purpurascens* against soil-borne plant pathogenic fungi. **Soil Biol. Biochem.**, v. 19, n. 6, p. 657-664, 1987.
- BROWN, R.; HAZEN, E. L.; MASON, A. Effect of fungicidin (nystatin) in mice injected with lethal mixtures of aureomycin and *Candida albicans*. **Science**, v. 117, p. 609-610, 1953.
- BRUM, M. C. P.; ARAÚJO, W. L.; MAKI, C. S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. ('Niagara Rosada') and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. **Genet. Mol. Res.**, v. 11, n. 4, p. 4187-4197, 2012.
- CASTELLANI, A. A Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **Jour. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, 181-184, 1967.
- CORNELY; O. A.; SCHMITZ, K.; AISENBREY; S. The first echinocandin: caspofungin. **Mycoses**, v. 45, Suppl. 3, p. 56-60, 2002.
- COSTA, I. P. M. W.; ASSUNÇÃO, M. M. C.; LIMA, T. E. F.; OLIVEIRA, R. J. V. CAVALCANTI, M. A. Q. Checklist of endophytic fungi from tropical regions. **Mycotaxon**, v. 119, 2012.
- DE LA TORRE, P.; REBOLI, A. C. Anidulafungin: a new echinocandin for candidal infections. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v. 5, n. 1, p. 45-52, 2007.
- DEFFIEUX, G.; BAUTE, M. A.; BAUTE, R.; FILLEAU, M. J. New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*: II. Epicorazine A: structure elucidation and absolute configuration. **J. Antibiot.**, v. 31, n. 11, p. 1102-1105, 1978.
- DEFFIEUX, G.; FILLEAU, M. J.; BAUTE, R. New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*: III. Epicorazine B: structure elucidation and absolute configuration. **J. Antibiot.**, v. 31, n. 11, p. 1106-1109, 1978.
- DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 41, p. 185-201, 2014.
- DEMAIN, A. L. The business of biotechnology. **Ind. Biotechnol.**, v. 3, n. 3, p. 269-283, 2007.
- DEMAIN, A. L.; VELASCO, J.; ADRIO, J. L. Industrial mycology: Past, present and future. In: AN, Z. (Ed.). **Handbook of Industrial Mycology**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2005. v. 22. cap. 1, p. 3-25.
- DEMAIN, A. L.; ZHANG, L. Natural products and drug discovery. In: ZHANG, L.; DEMAIN, A. L. **Natural Products**. Totowa: Humana Press, 2005. cap. 1, p. 3-29.

DU, L.; LOU, L. PKS and NRPS release mechanisms. **Nat. Prod. Rep.**, v. 27, p. 255-278, 2010.

EL AMRANI, M.; LAI, D.; DEBBAB, A.; ALY, A. H.; SIEMS, K.; SEIDEL, C.; SCHNEKENBURGER, M.; GAIGNEAUX, A.; DIEDERICH, M.; FEGER, D.; LIN, W.; PROKSCH. Protein kinase and HDAC inhibitors from the endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. **J. Nat. Prod.**, v. 77, p. 49-56, 2014.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 49, Suppl. S1, p. 7-10, 2002.

ENDO, A. Compactin (ML-236B) and related compounds as potencial cholesterol-lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase. **J. Med. Chem.**, v. 28, n. 4, p. 401-405, 1985.

EVANS, D. A.; CONNEL, B. T. Synthesis of the antifungal macrolide antibiotic (+)-roxaticin. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, p. 10899-10905, 2003.

FÁVARO, L. C. L.; MELO, F. L.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; ARAÚJO, W. L. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* Warrants reclassification into separate species. **Plos One**, v. 6, n. 8, p. e14828, 2011.

FÁVARO, L. C. L.; SEBASTIANES, F. L. S.; ARAÚJO, W. L. *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. **Plos One**, v. 7, n. 6, p. e36826, 2012.

FISHER, P. J.; PETRINI, O. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of Rice (*Oryza sativa* L.). **New Phytol.**, v. 120, n. 1, p. 137-143, 1992.

FRANÇOIS, I. E. J. A.; AERTS, A. M.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K. Currently used antimycotics: spectrum, mode of action and resistance occurrence. **Curr. Drug Targets**, v. 6, n. 8, p. 895-907, 2005.

FREDERICK, C. B.; SZANISZLO, P. J.; VICKREY, P. E.; BENTLEY, M. D.; SHIVE, W. Production and isolation of siderophores from the soil fungus *Epicoccum purpurascens*. **Biochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2432-2436, 1981.

GARBER, G. And overview of fungal infections. **Drugs**, v. 61, Suppl. 1, p. 1-12, 2001.

GEORGOPAPADAKOU, N. H.; WALSH, T. J. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. **Science**, v. 264, p. 371-373, 1994.

GEORGOPOULOS, A.; PETRANYL, G.; MIETH, H.; DREWS, J. In vitro activity of naftifine, a new antifungal agent. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 19, n. 3, p. 386-389, 1981.

GIMENES, L. J. **Fungos Basidiomicetos: Técnicas de coleta, isolamento e subsídios para processos biotecnológicos**. Instituto de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. São Paulo, 2010. Disponível em

<http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Basidiomicetos_Luciana_J_Gimenes.pdf>. Acesso em 03 nov. 2011.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORRÊA, B. Características gerais dos fungos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª edição. São Paulo: Atheneu, 2008a. Cap. 65, p. 479-491.

GONZÁLEZ-MENDOZA, D.; ARGUMEDO-DELIRA, R.; MORALES-TREJO, A.; PULIDO-HERRERA, A.; CERVANTES-DÍAZ, L.; GRIMALDO-JUAREZ, O.; ALARCÓN, A. A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. **Genet. Mol. Res.**, v. 9, n. 1, p. 162-166, 2010.

GOUY, M.; LI, W. H. Molecular phylogeny of the kingdoms Animalia, Plantae, and Fungi. **Mol. Biol. Evol.**, v. 6, n. 2, p. 109-122, 1989.

GRUBE, M.; SCHMID, F.; BERG, G. Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. **Fungal Biol.**, v. 115, p. 978-986, 2011.

GULL, K.; TRINCI, A. P. J. Griseofuvin inhibits fungal mitosis. **Nature**, v. 244, p. 292-294, 1973.

GUO, H.; SUN, B.; GAO, H.; CHEN, X.; LIU, S.; YAO, X.; LIU, X.; CHE, Y. Diketopiperazines from the *Cordyceps*-colonizing fungus *Epicoccum nigrum*. **J. Nat. Prod.**, v. 72, n. 12, p. 2115-2119, 2009.

GUPTE, M.; KULKARNI, P.; GANGULI, B. N.; Antifungal antibiotics. **App. Microbiol. Biotechnol.**, 58, p. 46-57, 2002.

HANSON, J. R. The chemistry of growing fungi. In: HANSON J. R. **The chemistry of fungi**. 1. ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008. cap. 2, p. 18-31.

HAY, R. J. Fungal infections. **Clin. Dermatol.**, v. 24, p. 201-212, 2006.

HAZEN, E. L.; BROWN, R. Two agents produced by a soil actinomycete. **Science**, v. 112, p. 423, 1950.

HENRÍQUEZ, M.; VERGARA, K.; NORAMBUENA, J.; BEIZA, A.; MAZA, F.; UBILLA, P.; ARAYA, I.; CHÁVEZ, R.; SAN-MARTÍN, A.; DARIAS, J.; DARIAS, M. J.; VACA, I. Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 30, p. 65-75, 2014.

HERR, R. A.; TARCHA, E. J.; TABORDA, P. R.; TAYLOR, J. W.; AJELLO, L.; MENDOZA, L. Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 1, p. 309-314, 2001.

HOFFMEISTER, D.; KELLER, N. P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. **Nat. Prod. Rep.**, v. 24, p. 393-416, 2007.

HULL, E. P.; GREEN, P. M.; ARST JUNIOR, H. N.; SCAZZOCCHIO, C. Cloning and physical characterization of the L-proline catabolism gene cluster of *Aspergillus nidulans*. **Mol. Microbiol.**, v. 3, p. 553-559, 1989.

IKAWA, M.; MCGRATTAN, C. J.; BURGE, W. R.; IANNITELLI, R. C.; UEBEL, J. J. NOGUCHI, T. Epirocin, a polyene antibiotic from the mold *Epicoccum nigrum*. **J. Antibiot.**, v. 31, n. 2, p. 159-161, 1978.

IWAI, Y.; TAKAHASHI, Y. Selection of microbial sources of bioactive compounds. In: OMURA, S. **The search for bioactive compounds from microorganisms**. Nova Iorque: Brock/springer, 1992. cap. 15, p. 281-302.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Adv. Mar. Biol.**, v. 40, p. 81-251, 2001.

KAUFFMAN, C. A.; CARVER, P. L. Update on echinocandin antifungals. **Sem. Resp. Crit. Care M.**, v. 29, n. 2, p. 211-219, 2008.

KELLER, N. P.; HOHN, T. M. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. **Fungal Genet. Biol.**, v. 21, p. 17-29, 1997.

KEMAMI WANGUN, H. V.; DAHSE, H. M.; HERTWECK, C. Epicoccamides B-D, glycosylated tetramic acid derivatives from an *Epicoccum* sp. associated with the fungus *Pholiota squarrosa*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 11, p. 1800-1803, 2007.

KEMAMI WANGUN, H. V.; HERTWECK, C. Epicoccarines A, B and epipyridone: tetramic acids and pyridone alkaloids from an *Epicoccum* sp. associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa*. **Org. Biomol. Chem.**, v. 5, p. 1702-1705, 2007.

KEMAMI WANGUN, H. V.; ISHIDA, K.; HERTWECK, C. Epicoccalone, a coumarin-type chymotrypsin inhibitor, and isobenzofuran congeners from an *Epicoccum* sp. Associated with a tree fungus. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 2008, n. 22, p. 3781-3784, 2008.

KERRIDGE, D. The effect of actidione and other antifungal agents on nucleic acid and protein synthesis on *Saccharomyces carlsbergensis*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 19, p. 497-506, 1958.

LAHLALI, R.; HIJIRI, M. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 311, p. 152-159, 2010.

LARRAN, S.; PERELLÓ, A.; SIMÓN, M. R.; MORENO, V. The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 23, p. 565-572, 2007.

LAURENCE, A.; NESSLER, C. L. Camptothecin, over four decades of surprising findings. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2735-2749, 2004.

LEE, N. H.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T. Isolation of chromanone and isobenzofuran derivatives from a fungicolous isolate of *Epicoccum purpurascens*. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 28, n. 5, p. 877-879, 2007.

LI, Y.; XIA, L. Q.; WANG, Y. N.; LIU, X. Y.; ZHANG, C. H.; HU, T.L.; CAO, K. Q. The inhibitory effect of *Epicoccum nigrum* strain XF1 against *Phytophthora infestans*. **Biol. Control**, v. 67, p. 462-468, 2013.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R.; MÉNDÉZ-TOVAR, L. J. Blastomycosis. **Clin. Dermatol.**, v. 30, p. 565-572, 2012.

LORTHOLARY, O.; ASCIOGLU, S.; MOREAU, P.; HERBRECHT R.; MARINUS, A.; CASASSUS, P.; DE PAUW, B. E.; DENNING, D. W. Invasive aspergillosis as an opportunistic infection in nonallografted patients with multiple myeloma: A European Organization for Research and Treatment of Cancer. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 41-46, 2000.

LUPI, O.; TYRING, S. K.; MCGINNIS, M. R. Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 53, n. 6, p. 931-951, 2005.

MACKINTOSH, J. A.; CHOI, H. Y.; BAE, S. H.; VEAL, D. A.; BELL, P. J. L.; FERRARI, B. C.; VAN DYK, D. D.; VERRILLS, N. M.; PAIK, Y. K.; KARUSO, P. A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. **Proteomics**, v. 3, p. 2273-2288, 2003.

MADRIGAL, C.; TADEO, J. L.; MELGAREJO, P. Relationship between flavipin production by *Epicoccum nigrum* and antagonism against *Monilinia laxa*. **Mycol. Res.**, v. 95, n. 12, p. 1375-1381, 1991.

MANOHARACHARY, C.; KUNWAR, I. K.; REDDY, S. V. Biodiversity, phylogeny and evolution of fungi. In: SHARMA, V. P. **Nature at Work – Ongoing Saga of Evolution**. 1. ed. Nova Deli: The National Academy of Sciences, India, 2010. cap. 10, p. 141-158.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J. Bras. Pneumol.**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MARTINI, M.; MUSETTI, R.; GRISAN, S.; POLIZZOTTO, R.; BORSELLI, S.; PAVAN, F.; OSLER, R. DNA-dependent detection of the grapevine fungal endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. **Plant Dis.**, v. 93, n. 10, p. 993-998, 2009.

MENG, J.; BARNES, C. S.; ROSENWASSER, L. J.; THE CHILDREN'S MERCY CENTER FOR ENVIRONMENTAL HEALTH. Identity of the fungal species present in the homes of asthmatic children. **Clin. Exp. Allergy**, v. 42, p. 1448-1458, 2012.

MIKULSKA, M.; DEL BONO, V.; RATTO, S.; VISCOLI, C. Occurrence, presentation and treatment of candidemia. **Expert Rev. Clin. Immunol.**, v. 8, n. 8, p. 755-765, 2012.

MIKUŠOVÁ, P.; RITIENI, A.; SANTINI, A.; JUHASOVÁ, G.; ŠROBÁROVÁ, A. Contamination by moulds of grape berries in Slovakia. **Food Addit. Contam.**, v. 27, n. 5, p. 738-747, 2010.

MIMS, C. W.; RICHARDSON, E. A. Ultrastructure of sporodochium and conidium development in the anamorphic fungus *Epicoccum nigrum*. **Can. J. Bot.**, v. 83, p. 1354-1363, 2005.

MÖLLER, C.; BÜHLER, T.; DREYFUSS, M. M. Intraspecific genetic diversity of *Chaunopycnis alba* detected by random amplified polymorphic DNA assay. **Mycol. Res.**, v. 99, n. 6, 681-688, 1995.

MORETTI, M. L. A importância crescente das infecções fúngicas. **Rev. Panam. Infectol.**, v. 9, n. 2, p. 8-9, 2007.

MORITA, T.; NOZAWA, Y. Effects of antifungal agents on ergosterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Trichophyton mentagrophytes*: Differential inhibitory sites of naphthiomate and miconazole. **J. Invest. Dermatol.**, v. 85, n. 5, p. 434-437, 1985.

MUSETTI, R.; GRISAN, S.; POLIZZOTTO, R.; MARTINI, M.; PADUANO, C.; OSLER, R. Interactions between ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ and the apple endophyte *Epicoccum nigrum* in *Catharanthus roseus* plants. **J. Appl. Microbiol.**, v. 110, p. 746-756, 2011.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras**: Norma aprovada. 2. ed. Norma M27-A2. Pensilvânia, v. 22, n. 15, 2002b.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos**: Norma aprovada. Norma M38-A. Pensilvânia, v. 22, n. 16, 2002a.

NEAS, L. M.; DOCKERY, D. W.; BURGE, H.; KOUTRAKIS, P.; SPEIZER, F. E. Fungus spores, air pollutants, and others determinants of peak expiratory flow rate in children. **Am. J. Epidemiol.**, v. 143, n. 8, p.797-807, 1996.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 22, p. 552-558, 2011.

OXFORD, A. E.; RAISTRICK, H.; SIMONART, P. Studies in the biochemistry of micro-organism: LX. Griseofulvin, C₁₇H₁₇O₆.Cl, a metabolic product of *Penicillium griseo-fulvum* DIERCKX. **Biochem. J.**, v. 33, n. 2, p. 240-248, 1939.

PANNUTI, C. S.; GINGRICH, R. D.; PFALLER, M. A.; WENZEL, R. P. Nosocomial pneumonia in adult patients undergoing bone marrow transplantation: a 9-year study. **J. Clin. Oncol.**, v. 9, n. 1, p. 77-84, 1991.

PAULETTI, P. M.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (BIGNONIACEAE). **Quim. Nova.** v. 26, n. 5, p. 641-643, 2003.

PEÑALVA, M. A.; MOYA, A.; DOPAZO, J.; RAMÓN, D. Sequences of isopenicillin N synthetase genes suggest horizontal gene transfer from prokaryotes to eukaryotes. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 241, p. 164-169, 1990.

PENG, J.; JIAO, J.; LI, J.; WANG, W.; GU, Q.; ZHU, T.; LI, D. Pyronepolyene C-glucosides with NF-κB inhibitory and anti-influenza A viral (H1N1) activities from the sponge-associated fungus *Epicoccum* sp. JJY40. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 22, p. 3188-3190, 2012.

PEREIRA, M. L. M. ; GARBI, A. D.; FILL, T. P.; RODRIGUES FILHO, E. Produção do pigmento oreovactaeno, inibidor da replicação do vírus HIV-1, pelo fungo *Epicoccum* sp. e sua atividade antibiótica. In: 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 26-29 mai. 2008. Águas de Lindoia. **Do petróleo à biomassa**, Soluções para um mundo melhor?, São Paulo: SBQ, 2008.

PETRANYL, G.; RYDER, N.; STÜTZ, A. Allylamine derivatives: new class of synthetic antifungal agents inhibiting fungal squalene epoxidase. **Science**, v. 224, p. 1239-1241, 1984.

PIECKENSTAIN, F. L.; BAZZALO, M. E.; ROBERTS, A. M. I.; UGALDE, R. A. *Epicoccum purpurascens* for biocontrol of *Sclerotinia* head rot of sunflower. **Mycol. Res.**, v. 105, n. 1, p. 77-84, 2001.

QIAN, Y. YU, H.; HE, D.; YANG, H.; WANG, W.; WAN, X.; WANG, L. Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 36, n. 11, p. 1613-1619, 2013.

QUEIROZ, J. C. E.; OLIVEIRA, J. G. Análise Histológica dos Efeitos Provocados por Antifúngicos Derivados de Azóis (Cetoconazol e Fluconazol) em Fígado de *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). **Perquirere**, v. 3, 2006.

RIVITTI, E. A.; AOKI, V. Deep fungal infections in tropical countries. **Clin. Dermatol.**, v. 17, p. 171-190, 1999.

SANTOS, A. S. R.; Biodiversidade, bioprospecção, conhecimento tradicional e o futuro da vida. **Revista de Informação e Tecnologia**, Campinas, mar. 2001. Disponível em <<http://www.ccuec.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html>>. Acesso em 01 nov. 2011.

SCHOL-SCHWARZ, M. B. The genus *Epicoccum* Link. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, v. 42, n. 2, p. 149-173, 1959.

SCHÜMANN, J.; HERTWECK, C. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. **J. Biotechnol.**, v. 124, p. 690-703, 2006.

SEBASTIANES, F. L. S.; ROMÃO-DUMARESQ, A. L.; LACAVA, P. T.; HAKAKA, R.; AZEVEDO, J. P.; MELO, I. S.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. **Curr. Genet.**, v. 59, p. 153-166, 2013.

SHU, Y. Z.; YE, Q.; LI, H.; KADOW, K. F.; HUSSAIN, R. A.; HUANG, S.; GUSTAVSON, D. R.; LOWE, S. E.; CHANG, L. P.; PIRNIK, D. M.; KODUKULA, K. Oreovactaene, a novel binding inhibitor of HIV-1 Rev Protein to Rev response element (RRE) from *Epicoccum nigrum* WC47880. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 7, n. 17, p. 2295-2298, 1997.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. **Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas**. Instituto de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. São Paulo, 2006. Disponível em

<http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Ricardo_Silva_e_Glauciane_Coelho.pdf>. Acesso em : 03 nov. 2011.

SIMMONS, R. B.; PRICE, D. L.; NOBLE, J. A.; CROW, S. A.; AHEARN, D. G. Fungal colonization of air filters from hospitals. **AIHA J.**, v. 58, n. 12, p. 900-904, 1997.

SLAVIN; M. A; CHAKRABARTI, A. Opportunistic fungal infections in the Asia-Pacific region. **Med. Mycol.**, v. 50, p. 18-25, 2012.

SLOT, J. C.; ROKAS, A. Horizontal transfer of a large and highly toxic secondary metabolic gene cluster between fungi. **Curr. Biol.**, v. 21, p. 134-139, 2011.

STERNBERG, S. The emerging fungal threat. **Science**, v. 266, p. 1632-1634, 1994.

STIERLE, A. STROBEL, G. The search for a Taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 58, n. 9, p. 1315-1324, 1995.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, n. 9, p. 214-216, 1993.

SU, H. J.; ROTNITZKY, A.; BURGE, H. A.; SPENGLER, J. D. Examination of fungi in domestic interiors by using factor analysis: correlations and associations with home factors. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, n. 1, p. 181-186, 1992.

SUN, H. H.; MAO, W. J.; JIAO, J. Y.; XU, J. C.; LI, H. Y.; CHEN, Y.; QI, X. H.; CHEN, Y. L.; XU, J.; ZHAO, C. Q.; HOU, Y. J.; YANG, Y. P. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by the marine fungus *Epicoccum nigrum* JJY-40 and their antioxidant activities. **Mar. Biotechnol.**, v. 13, n. 5, p. 1048-1055, 2011.

TALONTSI, F. M.; DITTRICH, B.; SCHÜFFLER, A.; SUN, H.; LAATSCH, H. Epicoccolides: Antimicrobial and antifungal polyketides from an endophytic fungus *Epicoccum* sp. associated with *Theobroma cacao*. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 2013, p. 3174-3180, 2013.

THOMPSON, G. R.; CADENA, J.; PATTERSON, T. F. Overview of antifungal agents. **Clin. Chest. Med.**, v. 30, n. 2, p. 203-215, 2009.

TOMASZ, A. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: How the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 33, p. 113-137, 1979.

TUCKER, K. G.; THOMAS, C. R. Inoculum effects on fungal morphology: Shake flasks vs agitated bioreactors. **Biotechnol. Tech.**, v. 8, n. 3, p. 153-156, 1994.

VAZ, A. B. M.; MOTA, R. C.; BOMFIM, M. R. Q.; VIEIRA, M. L. A.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with Orchidaceae in Brazil. **Can. J. Microbiol.**, v. 55, p. 1381-1391, 2009.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 46, p. 171-179, 2000.

VEUTHEY, A. L.; BITTAR, G. Phylogenetic relationships of Fungi, Plantae, and Animalia inferred from homologous comparison of ribosomal proteins. **J. Mol. Evol.**, v. 47, p. 81-92, 1998.

WANG, J. M.; DING, G. Z.; FANG, L.; DAI, J. G.; YU, S. S.; WANG, Y. H.; CHEN, X. G.; MA, S. G.; QU, J.; XU, S.; DU, DAN. Thiodiketopiperazines produced by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. **J. Nat. Prod.**, v. 73, n. 7, p. 1240-1249, 2010.

WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.**, v. 48, p. 1-12, 2007.

WHIFFEN, A. J.; BOHONOS, N.; EMERSON, R. L. The production of an antibiotic by *Streptomyces griseus*. **J. Bacteriol.**, v. 56, p. 283-291, 1946.

WRIGHT, A. D.; OSTERHAGE, C.; KÖNIG, G. M. Epicoccamide, a novel secondary metabolite from a jellyfish-derived culture of *Epicoccum purpurascens*. **Org. Biomol. Chem.**, v. 1, n. 3, p. 507-510, 2003.

XIA, X.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; WEI, F.; LIU, X.; JIA, A.; LIU, C.; LI, W.; SHE, Z.; LIN, Y. Pimarane diterpenes from the fungus *Epicoccum* sp. HS-1 associated with *Apostichopus japonicus*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 22, p. 3017-3019, 2012.

YU, J.; EHRLICH, K. C. Aflatoxin biosynthetic pathway genes. In: GUEVARA-GONZALEZ, R. G. (Ed.). **Aflatoxins** - Biochemistry and molecular biology. 1. ed. Rijeka: InTech, 5 out. 2011. cap. 3, p. 41-66. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-biochemistry-and-molecular-biology/aflatoxin-biosynthetic-pathway-and-pathway-genes>>. Acesso em: 07/02/2013.

ZHANG, Y.; LIU, S.; CHE, Y.; LIU, X. Epicoccins A-D, epipolythiodioxopiperazines from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Epicoccum nigrum*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 9, p. 1522-1525, 2007.

ZHOU, Z.; GUO, Y. Bioactive natural products from Chinese marine flora and fauna. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 33, p. 1159-1169, 2012.

APÊNDICE – Compostos isolados de *E. nigrum*

Composto / Fórmula Molecular / Massa molecular (u)	Fórmula estrutural	Atividade	Referência
1,3-dihidro-4,5,6-trihidroxi-7-metil-isobenzofuran / $C_9H_{10}O_4$ / 182,176		Antioxidante por inibição de lipoxigenase	Kemani Wangun; Ishida; Hertweck, 2008
1,3-dihidro-4,6-dihidroxi-7-metil-isobenzofuran / $C_9H_{10}O_4$ / 182,176		-	Lee; Gloer; Wicklow, 2007
1,3-dihidro-4,6-dihidroxi-5-metoxi-7-metil-isobenzofuran / $C_{10}H_{12}O_4$ / 196,0736		-	Lee; Gloer; Wicklow, 2007
4,5-dimetilresorcinol / $C_8H_{10}O_2$ / 138,17		-	Araújo et al., 2012
Ácido Cítrico / $C_6H_8O_7$ / 192,123		Antioxidante	Domelsmith; Klich; Goynes, 1988
Ácidos húmicos	Diversos	-	Burge et al., 1976

Ácido Málico / $C_4H_6O_5$ / 134,06		-	Domelsmith; Klich; Goynes, 1988
Arabitol / $C_5H_{12}O_5$ / 152,14		-	Domelsmith; Klich; Goynes, 1988
Aspergilona A / $C_{20}H_{26}O_5$ / 347,1853		Citotóxico para KB e KBv200	Xia et al., 2012
Coprogênio / $C_{35}H_{53}FeN_6O_{13}$ / 821,67		-	Frederick et al., 1981
D8646-2-6 / - / 613		Anti-H1N1 e NF-kB	Peng et al., 2012

Diterpeno do tipo pimarano / $C_{20}H_{28}O_3$ / 317,2111		Citotóxico para KB e KBv200	Xia et al., 2012
Diterpeno do tipo pimarano / $C_{20}H_{32}O_2$ / 327,2296		-	Xia et al., 2012
Diaportéia B		Citotóxico para KB e KBv200	Xia et al., 2012
Difenilalazina A / $C_{19}H_{18}N_2Na$ / 329,1266		Antiviral contra HIV	Guo et al., 2009
Difenilalazina B / $C_{19}H_{18}N_2O_3Na$ / 345,1215		-	Guo et al., 2009
ENP1 / - / 19.200	Manose, glucose e galactose em proporção molecular de 5:2,1:1 e com principal cadeia de polissacarídeos de (1→2)- linked manose, (1→3)-linked manose, manose terminal,	Antioxidante	Sun et al., 2011

(1→6)-linked glucose, (1→4)-linked glucose, e (1→4)-linked galactose			
ENP2 / - / 32.700	Manose, galactose, glucose e ácido glicurônico em proporção molecular de 12,4:11,2:8,3:1e padrão de ligação glicosídica incluindo manose terminal (1→6)-linked glucose, (1→4)-linked galactose, e (1→3)-linked mannose	Antioxidante	Sun et al., 2011
Ent-epicoccina G / C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O ₆ S ₂ Na / 477,1130		Anti-β-glicoronidase	Wang et al., 2010
Epicoccalona / C ₁₆ H ₁₆ O ₇ / 319,0814		Inibidor da serina protease (quimotripsina)	Kemami Wangun; Ishida; Hertweck, 2008
Epicoccamida / C ₂₉ H ₅₁ NO ₉ / 557,71		-	Wright; Osterhage; König, 2003
Epicoccamida B / C ₃₁ H ₅₂ O ₁₀ N / 598,3591		-	Kemami Wangun; Dahse; Hertweck, 2007

Epicoccamida C / $C_{31}H_{52}O_{10}N$ / 598,3591		-	Kemami Wangun; Dahse; Hertweck, 2007
Epicoccamida D / $C_{31}H_{54}O_9N$ / 584,3799		Citotóxico para HeLa e antiproliferativo para L-929 e K-562	Kemami Wangun; Dahse; Hertweck, 2007
Epicoccarina A / $C_{23}H_{30}O_4N$ / 384,2175		Antibiótica contra bactérias Gram +	Kemami Wangun; Hertweck, 2007
Epicoccarina B / $C_{23}H_{30}O_5N$ / 400,2124		-	Kemami Wangun; Hertweck, 2007
Epicoccina A / $C_{18}H_{19}N_2O_6S_3$ / 455,04		Antibacteriana contra <i>B. subtilis</i>	Zhang et al., 2007
Epicoccina B / $C_{18}H_{18}N_2O_7S_3$ / 471,0349		-	Zhang et al., 2007

Epicoccina C / $C_{18}H_{19}N_2O_6S_4$ / 487,012		-	Zhang et al., 2007
Epicoccina D / $C_{18}H_{18}N_2O_6S_2$ / 423,0679		-	Zhang et al., 2007
Epicoccina E / $C_{18}H_{18}N_2O_7S_2Na$ / 461,0453		Anti- β -glucuronidase	Guo et al., 2009; Wang et al., 2010
Epicoccina F / $C_{18}H_{20}O_6S_3Na$ / 479, 0381		-	Guo et al., 2009
Epicoccina G / $C_{20}H_{26}N_2O_6S_2Na$ / 477,1130		Antiviral contra HIV	Guo et al., 2009

Epicoccina H / $C_{20}H_{26}N_2O_8S_2Na$ / 509,1028		Antiviral contra HIV	Guo et al., 2009
Epicocina I / $C_{19}H_{20}N_2O_5S_2Na$ / 443,0711		-	Wang et al., 2010
Epicocina J / $C_{20}H_{25}N_2O_6S_2$ / 453,1154		-	Wang et al., 2010
Epicocina K / $C_{20}H_{31}N_2O_6S_2$ / 459,1623		-	Wang et al., 2010
Epicoccina L / $C_{20}H_{28}N_2O_6S_2Na$ / 479,1286		-	Wang et al., 2010

Epicoccina M / C ₁₉ H ₂₃ N ₂ O ₆ S ₃ / 471,0718		Anti-β-glicoronidase	Wang et al., 2010
Epicoccina N / C ₁₉ H ₂₃ N ₂ O ₇ S ₃ / 487,0667		-	Wang et al., 2010
Epicoccina O / C ₁₉ H ₂₃ N ₂ O ₆ S ₃ / 439,0998		-	Wang et al., 2010
Epicoccina P / C ₁₉ H ₂₅ N ₂ O ₆ S ₂ / 441,1154		-	Wang et al., 2010
Epicoccina Q / C ₁₈ H ₁₉ N ₂ O ₇ S ₃ / 471,0354		-	Wang et al., 2010

Epicoccina R / $C_{18}H_{19}N_2O_6S_3$ / 455,0405		-	Wang et al., 2010
Epicoccina S / $C_{20}H_{23}N_2O_7S_3$ / 499,0667		Anti- β -glucuronidase	Wang et al., 2010
Epicoccina T / $C_{18}H_{23}N_2O_6S_2$ / 427,0998		-	Wang et al., 2010
Epicoccona / $C_9H_8O_5$ / 196,03072		Antioxidante	Abdel-Lateff et al., 2003
Epicoccona B / $C_9H_8O_5$ / 196,0376		-	Kemani Wangun; Ishida; Hertweck, 2008
Epicocconona / $C_{23}H_{22}O_7$ / 410,42		Fluorescente	Bell; Karuso, 2003

Epicolactona / $C_{17}H_{16}O_8$ / 347,0772		-	Araújo et al., 2012
Epicorazina A / $C_{18}H_{16}N_2O_6S_2$ / 420,045		Antibiótica contra <i>S. aureus</i>	Baute et al., 1978; Deffieux et al., 1978
Epicorazina B / $C_{18}H_{16}N_2O_6S_2$ / 420		Antibiótica contra <i>S. aureus</i>	Baute et al., 1978; Deffieux; Filleau; Baute, 1978
Epipiridona / $C_{23}H_{28}O_3N$ / 366,2069		-	Kemami Wangun; Hertweck, 2007

Epirodina A e B / $C_{21}H_{44}O_5$ / 376,571		Antibiótica contra bactérias Gram +	Burge et al., 1976
Flavipina / $C_9H_8O_5$ / 196,2		Antifúngico contra <i>Botrytis allii</i>	Bamford; Norris; Ward, 1961
Ferricrocina / $C_{28}H_{44}FeN_9O_{13}$ / 770,546		-	Frederick et al., 1981
Iso-D8646-2-6 / $C_{34}H_{44}O_{10}$ / 611,2851		Antiviral contra H1N1	Peng et al., 2012
Manitol / $C_6H_{14}O_6$ / 182,172		-	Domelsmith; Klich; Goynes, 1988
Meleína / $C_{10}H_{10}O_3$ / 178,18		-	Araújo et al., 2012

Orevactaeno / C ₃₄ H ₄₄ O ₁₀ / 613,3012		Antiviral contra HIV, Citotóxico contra M109 e Antifúngico contra <i>C. albicans</i>	Shu et al., 1997
Rodoxantina / C ₄₀ H ₅₀ O ₂ / 562,82		-	Foppen; Gribanovski- Sassu, 1968
Torularrodina / C ₄₀ H ₅₂ O ₂ / 564,8397		Antioxidante	Foppen; Gribanovski- Sassu, 1968
Trealose / C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ / 342,296		-	Domelsmith; Klich; Goynes, 1988
Triornicina / C ₃₁ H ₅₀ N ₆ O ₁₂ / 698,7617		Antitumoral contra tumor de Ehrlich	Frederick et al., 1981
β-Caroteno / C ₄₀ H ₅₆ / 536,87		Antioxidante	Foppen; Gribanovski- Sassu, 1968
γ-Caroteno / C ₄₀ H ₅₆ / 536,87		Antioxidante	Foppen; Gribanovski- Sassu, 1968