



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

EDUARDO ANTONIO ABREU PINHEIRO*

**PERFIL CROMATOGRÁFICO E POTENCIAL QUÍMICO E BIOLÓGICO DE
FUNGOS DE SOLO E FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Bauhinia
guianensis* e *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Santana Barbosa Marinho.

Coorientador: Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho.

*Bolsista FAPESPA/VALE

BELÉM-PA

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

EDUARDO ANTONIO ABREU PINHEIRO

**PERFIL CROMATOGRÁFICO E POTENCIAL QUÍMICO E BIOLÓGICO DE
FUNGOS DE SOLO E FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Bauhinia
guianensis* e *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*.**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química
como parte dos requisitos à obtenção do
título de **Doutor em Química**.

BELÉM-PA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Pinheiro, Eduardo Antonio Abreu, 1987-

Perfil cromatográfico e potencial químico e biológico de fungos e fungos endofíticos isolados de bauhinia guianensis e mimosa acutistipula var. ferrea. / Eduardo Antonio Abreu Pinheiro. - 2016.

Orientadora: Patricia Santana Barbosa Marinho;

Coorientador: Andrey Moacir do Rosário Marinho.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Química, Belém, 2016.

1. Fungos de solo. 2. Fungos -Amazônia. I. Título.

CDD 23. ed. 579.55



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

EDUARDO ANTONIO ABREU PINHEIRO

**PERFIL CROMATOGRÁFICO E POTENCIAL QUÍMICO E BIOLÓGICO DE
FUNGOS DE SOLO E FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Bauhinia
guianensis* e *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química como parte dos requisitos à
obtenção do título de **Doutor em Química**.

Data: 04/03/2016

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Patrícia Santana Barbosa Marinho
Instituto de Ciências Exatas e Naturais/UFPA – Orientador

Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho
Instituto de Ciências Exatas e Naturais/UFPA – Coorientador

Prof^a. Dra. Mara Silvia Pinheiro Arruda
Instituto de Ciências Exatas e Naturais/UFPA – Membro

Prof. Dr. João da Silva Carneiro
Centro de Ciências Sociais e de Educação/UEPA – Membro

Prof. Dr. Sebastião da Cruz Silva
Instituto de Ciências Exatas/UNIFESSPA – Membro

Prof^a. Dra. Simone Yasue Simote Silva
Instituto de Ciências Exatas/UNIFESSPA – Membro

Belém-PA
2016

Dedico a minha inesquecível avó materna Zulmira Nunes de Abreu, *in memoriam*, pelos cuidados e pelos ensinamentos que me transmitiu durante sua existência e que ficam gravados no meu coração.

De vitórias e louros coroados,
Altivo, o Paysandu jamis temeu...
Tem um belo, honradíssimo passado, //
São nobres as batalhas que venceu; // (Bis)

Cada um de nós guarda no peito
Valor e orgulho extraordinários;
Das nossas cores têm respeito
Os mais punjantes adversários;

“Lutar! Eis a divisa que trazemos!
“Vencer”! Eis a esperança que nos guia!
Leses e destemidos seguiremos//
A glória que o futuro nos confia! (Bis)

Cada um de nós guarda no peito....
Somos jovens e ousados paladinos,
E sempre achar-nos-hão de gladio nú,
Elevando nos prélios mais ferinos//
Com honra o pantilhão do Paysandu// (Bis)

Amamos os combates! E na luta,
Como antigos heróis nos comportamos,
Por isso a vez do público se escuta, //
Saudar o Paysandu com aclamos. (Bis)

(Hino Oficial do Paysandu Sport Club – José Simões)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

O SENHOR é o meu pastor, nada me faltará.

Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranqüilas.

Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome.

Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum,
porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.

Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a minha
cabeça com óleo, o meu cálice transborda.

Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha
vida; e habitarei na casa do Senhor por longos dias.

(Salmos 23:1-6).

Quando a vida faz nascer o mês de Outubro

Eu descubro um bem maior

Que me faz voltar no tempo e ser menino

E ao som do sino ver a vida amanhcecer

Ver o povo em procissão tomando as ruas

Anunciando que é Círio outra vez

Que a Rainha da Amazônia vem chegando

Vem navegando pelas ruas de Belém

Corda que avança o corpo cansa

Só pra alma descansar

É o meu olhar chorando ao ver o teu olhar em mim

Tão pequenina na Berlinda segues a recolher

Flores e Amores que o teu povo que ter dar

Ó Virgem Santa, teu povo canta

Senhora de Nazaré!

Tu és Rainha e tens no manto as cores do açaí

(...) (Círio Outra Vez- Padre Fábio de Melo).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Socorro Abreu e Darlô Pinheiro, pelos tantos desafios enfrentados, pelas palavras de incentivo e encorajamento e pelo constante apoio em todas as minhas decisões que colaboraram para superar todos os obstáculos. Agradeço-lhes também pelas pessoas honestas que são e pela contribuição para que me pudesse me tornar o que sou hoje.

Ao Programa de Pós-Graduação de Química da UFPA, por permitir a realização do meu Doutorado.

À VALE e à FAPESPA, pelo apoio financeiro.

Aos meus professores orientadores Profa. Dra. Patrícia Santana Barbosa Marinho e Andrey Moacir do Rosário Marinho, por acreditarem na minha pessoa e aceitarem me orientar, confiando no êxito do trabalho. Para eles, a minha eterna admiração e gratidão por serem também profissionais amigos, éticos e meus exemplos de cidadania dentro do mundo científico.

Às professoras Dra. Giselle Guillhon (com muito carinho), Dra. Mara Arruda e aos professores Dr. Marivaldo Correia, Dr. Lourivaldo Santos, Dr. Alberto Arruda, Dr. Fábio Borges e Dr. Alberdan Santos, pelas amizades, pelas nossas conversas, pelos momentos de alegria e principalmente pela simplificação e resolução dos problemas que estiveram aos seus alcances.

Ao grupo de pesquisa de Laboratório de Bioensaios e Química de Micro-organismos (LaBQuiM), em especial ao Jorgeffson Cordeiro e a Monaliza Cerqueira, por me auxiliar ao máximo para a conclusão do meu Doutorado.

Ao técnico e amigo Elinaldo Sampaio de Almeida, por realizar os espectros de RMN 1D e 2D das substâncias isoladas durante a minha trajetória no Laboratório de Produtos Naturais.

Aos colegas André Feitosa e Josiwander Carvalho, por obterem os espectros de massas das substâncias isoladas que constam nesta Tese.

À técnica e amiga Márcia Souza, do Laboratório de Microbiologia da UFPA, por identificar os fungos endofíticos desta Tese e pelas nossas conversas.

Aos meus amigos e alunos de IC Jefferson Pina, Layana Agnes e Luanna Paixão, por compartilharem desta batalha tão difícil e também pelas conversas.

Aos meus companheiros de Laboratório, em especial, aos meus amigos Williams Ribeiro, Fabiane Trindade e Antônio Castanhede, por me ajudarem a vencer mais este objetivo em minha vida e por compartilharem experiências profissionais que contribuíram para o andamento da minha pesquisa e da minha carreira.

À Central de Extração, em especial, ao meu amigo Wandson Pinheiro por permitir que as soluções do meu trabalho fossem concentradas neste Laboratório.

Aos meus tios que amo de coração, que sempre rezaram por mim ou que assumiram responsabilidades comigo (principalmente na ausência da minha avó materna a quem dedico esta Tese de Doutorado), possibilitando oportunidades para vencer esta dura batalha. Em especial, agradeço a minha Nazaré (*in memoriam*), tia Izaura (*in memoriam*), tio Dudu, tia Zeca (*in memoriam*), tia Boneca, tia Marilene e também a minha madrinha de Crisma Rosângela e a amiga da família Sra. Maria Esteves.

Aos amigos, pois eles são os bens mais preciosos que uma pessoa poderia ter. Aos que só deixo as palavras “Saudades” e “Fidelidade” que resumem meus sentimentos guardados em meu coração. Enquanto essas palavras existirem, nossa amizade será eterna.

Aos autores citados, que contribuíram para o enriquecimento desta Tese de Doutorado.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549	Linhagem de célula cancerígena humana relacionado ao pulmão
AFI	Atividade de índices antialimentares
ATCC	American Type Culture Collection
BC	Linhagem de célula cancerígena humana relacionada ao β -caroteno
B.D.A	Batata-Dextrose-Ágar
B-Enz	Base enzimática
BEL-7402	Linhagem de célula cancerígena humana hepática crônica
B.H.I	Brain Heart Infusion
B.O.D	Biochemical oxygen demand
cap.	Capítulo
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCVU	Cromatografia em Coluna por Via Úmida
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
CGMCC	China General Microbiological Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNPJ	Cadastro Nacional de Pessoa Jurídica
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
dt	Duplo tripleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DL₅₀	Dose Letal para matar 50% dos indivíduos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSM	Sequenciamento completo do genoma
DU145	Linhagem de célula cancerígena humana da próstata
EAA	Extrato acetato de etila do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. EJC08
EAEr	Extrato acetato de etila do fungo endofítico <i>Exserohilum rostratum</i>

EAFRiz	Extrato aceto de etila do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12
ed.	Edição
EHA	Extrato hexânico do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. EJC 08
EHEr	Extrato hexânico do fungo endofítico <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er
EHFRiz	Extrato hexânico do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12
EJC	Escada de Jabuti (caule)
EJCP	Escada de Jabuti (cipó)
EJF	Escada de Jabuti (folha)
EM	Espectrometria de Massas
EMFriz	Extrato metanólico do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI	Electrospray ionization
FAEMA	Fase acetato de etila do extrato metanólico do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. EJC08
FAEMEr	Fase acetato de etila do extrato metanólico do fungo endofítico <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er
FAPESPA	Fundação Amazônica de Amparo a Estudos e Pesquisas do Pará
FAO	Food and Agriculture of the United Stations
FCMC	Fungos do caule da <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>férrea</i>
FCN	Fungos da Canga
FDA	Food and Drug Administration
FFMC	Fungos das folhas da <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>férrea</i>
FHEXEMA	Fase hexânica do extrato metanólico do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. EJC08
FHEXEMEr	Fase hexânica do extrato metanólico do fungo endofítico <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er
FHIDROEMA	Fase hidroalcoolica do extrato metanólico do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. EJC 08
FHIDROEMEr	Fase hidroalcoolica do extrato metanólico do fungo endofítico <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FMFe	Fungos da mina FeN ₄ W Norte
FMIC	Fungo Micorrízico

FRIZ	Fungo Rizosférico
FSF	Fungo do Solo da Floresta
HeLa	Linhagem de célula cancerígena humana cervical
HepG2	Hepatocarcinoma humano
HETCOR	Heteronuclear Correlated Spectroscopy
HCA	Hierarchical Component Analysis
HL-60	Linhagem celular mielóide humana contínua
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HPLC-PDA	High Performance/Pressure Liquide Chromatography-Photodiode Array Detector
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HSV-1	Herpes Simplex Vírus-1
IC	Iniciação científica
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IR	Índice de retenção
J	Constante de acoplamento
KB	Linhagem de célula cancerígena humana escamosa oral
m	Multiplete
MCF-7	Linhagem de célula cancerígena humana epitelial
MDA-MB-231	Linhagem de célula cancerígena humana relacionada à mama
MHz	Mega Hertz
MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
m/z	Relação Massa/Carga
n.	Número
NAD⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate redutase
NBRC	National Brain Research Centre
NCI-H187	Linhagem de célula cancerígena humana relacionada ao pulmão
NP-PEG	Difenilboriloxietilamina 1% em Metanol Seguida de Solução de Polietilenoglicol 4000 5,0% em Etanol
OIE	World Organization for Animal Health
OMS	Organização Mundial da Saúde

p.	Página
P.A.	Para Análise
PCA	Principal Component Analysis
pH	Potencial Hidrogeniônico
PN	Produtos Naturais
ppm	Partes por Milhão
q2	Quadrante 02
q4	Quadrante 04
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN 1D	Ressonância Magnética Nuclear Unidimensional
RMN 2D	Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
s	Singleto
SAM	S-adenosil-metionina
δ_C	Deslocamento dos sinais de carbono em ppm
δ_H	Deslocamento dos sinais de hidrogênio em ppm
sl	Singleto largo
SMMC-7721	Hepatocarcinoma humano
SW-1990	Adenocarcinoma pancreático
SRB	Sulforrodamina B
T	Tripleto
tl	Tripleto largo
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
UEPA	Universidade do Estado do Pará
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPA	Universidade Federal do Pará
UV	Ultravioleta
v.	Volume
var.	Variedade
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Estrutura da pestalotiopena A isolada do fungo endofítico <i>Pestalotiopsis</i> sp.	36
Figura 02 – Estrutura do 2,4-diidroxi-2,6-diacetoxi-3-metoxi-5-metil-difeniléter isolado do fungo endofítico <i>Verticillium</i> sp.	37
Figura 03 – Estruturas de oblongólideos isolados do fungo endofítico <i>Phomopsis</i> sp. BCC 9789	38
Figura 04 – Substâncias isoladas do fungo endofítico <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> F2	38
Figura 05 – Substâncias antileishmanicidas isoladas do fungo endofítico <i>Nigrospora sphaerica</i>	39
Figura 06 – Substâncias antileucêmicas isoladas do fungo endofítico <i>Nigrospora sphaerica</i>	40
Figura 07 – Estruturas de peniadilinas isoladas do fungo endofítico <i>Penicillium</i> sp.	41
Figura 08 – Novas antraquinonas isoladas do fungo endofítico <i>Alternaria</i> sp. XZSBG-1.	41
Figura 09 – Pachibasina, uma substância antimicrobiana isolada do fungo endofítico codificado como AFKR18.	42
Figura 10 – Estruturas de metabólitos secundários bioativos isolados do fungo endofítico <i>Aspergillus ochraceus</i> EM-31	44
Figura 11 – Estruturas de metabólitos secundários bioativos isolados do fungo endofítico <i>Aspergillus niger</i> MA-132	45
Figura 12 – Estrutura da brevianamida F isolada do fungo endofítico <i>Aspergillus fumigatus</i>	46
Figura 13 – Estruturas de metabólitos secundários bioativos isolados do fungo endofítico <i>Aspergillus fumigatus</i> LN-4	47
Figura 14 – Estruturas de antraquinonas isoladas do fungo endofítico <i>Aspergillus sydowii</i>	47
Figura 15 – Estrutura do asperterpenóide A isolado do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. 16-5uc	48
Figura 16 – Estrutura de asperternóis isolados do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. 08242	48

Figura 17 – Estrutura de compostos bioativos isolados do fungo endofítico <i>Aspergillus nidulans</i> MA-143	49
Figura 18 – Estruturas de aniquinazolinonas isoladas do fungo endofítico <i>Aspergillus nidulans</i> MA-143	50
Figura 19 – Estrutura de compostos bioativos isolados do fungo endofítico <i>Aspergillus fumigatus</i> R7	51
Figura 20 – Substâncias citotóxicas frente linhas de células HepG2 isoladas do fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> como endofítico de <i>Diphylleia sinensis</i> L.	52
Figura 21 – Estruturas de isocumarinas isoladas do fungo endofítico <i>Exserohilum rostratum</i>	54
Figura 22 – Estruturas de exserolídeos isolados do fungo endofítico <i>Exserohilum</i> sp.	55
Figura 23 – Estruturas de rostratinas isoladas do fungo endofítico <i>Exserohilum rostratum</i>	56
Figura 24 – Estruturas de substâncias bioativas isoladas do fungo de solo <i>Penicillium citrinum</i> PSU-RSPG95	58
Figura 25 – Estruturas com atividade antitumoral isoladas do fungo de solo <i>Neosartoya fischeri</i>	59
Figura 26 – Estruturas com atividade antiviral isoladas do fungo de solo <i>Aspergillus terreus</i> Gwq-48.....	60
Figura 27 – Estruturas com atividade citotóxica isoladas do fungo de solo <i>Aspergillus effuses</i> H1-1.....	61
Figura 28 – Estrutura da citosporona S isolada do fungo de solo <i>Trichoderma</i> sp. FKI-6626.....	62
Figura 29 – Substâncias antimicrobianas utilizadas no tratamento de infecções causadas por bactérias do gênero <i>Salmonella</i>	65
Figura 30 – Estrutura da vancomicina	66
Figura 31 – Fotografia microscópica de <i>Bacillus subtilis</i>	67
Figura 32 – Aspecto típico de <i>Escherichia coli</i> após técnica de Gram	68
Figura 33 – Fotografia de <i>Salmonella typhimurium</i>	69
Figura 34 – Fotografia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70
Figura 35 – Fotografia de <i>Staphylococcus aureus</i>	70
Figura 36 – (A) <i>Bauhinia guianensis</i> (EMBRAPA) e (B) as folhas de sua espécie catalogadas (Herbário –excisata N ^o de registro: 177.179)	72

Figura 37 – (A) Folhas, flores e frutos de <i>B. guianensis</i> ; (B) Espécie <i>B. guianensis</i>	73
Figura 38 – Representantes do gênero <i>Mimosa</i> na APA (Área de Proteção Ambiental) Serra Branca	74
Figura 39 – (A) “Canga hematítica”- vegetação que cresce diretamente sobre o afloramento rochoso e (B) Fronteira Geográfica bem definida entre a “Canga hematítica” e a Floresta Tropical	75
Figura 40 – Mapa da Serra dos Carajás.....	76
Figura 41 – Fotografias da espécime vegetal <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> (A) e dos solos estudados B,C, D e E.....	83
Figura 42 – Processo de assepsia das folhas e do caule de <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i>	84
Figura 43 – Fotografia de placa de Petri contendo fragmentos de <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i>	85
Figura 44 – Processo de isolamento dos fungos de solo (Método de Clark adaptado).85	
Figura 45 – Fotografia de placas de petri com fungos de solo	86
Figura 46 – Extração de metabólitos secundários em micro-escala.....	87
Figura 47 – (A) Crescimento do fungo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12 em meio Sabouraud e (B) Adição de MeOH no micélio do respectivo fungo	88
Figura 48 – Fotografia de placa de Petri inoculada com o fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. EJC08 em meio BDA	89
Figura 49 – Fotografia de placa de Petri inoculadas com o fungo endofítico <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er em meio BDA	90
Figura 50 – Fotografia de placa de Petri inoculada com o fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12 em meio BDA.....	90
Figura 51 – Crescimento das colônias do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. EJC08 em meio sólido (arroz) após 30 dias de incubação	91
Figura 52 – Crescimento das colônias do fungo endofítico <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er em meio sólido (arroz) após 30 dias de incubação.....	91
Figura 53 – Crescimento das colônias do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12 em meio sólido (arroz) após 25 dias de incubação	92
Figura 54 – Frascos de Erlenmeyer contendo biomassa fúngica dos fungos endofíticos <i>Aspergillus</i> sp. EJC08 e <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er.....	93

Figura 55 – Filtração à vácuo para obtenção da solução MeOH-1 do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. EJC08.....	93
Figura 56 – Solução MeOH-1 (2L) do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. EJC08 obtida após filtração à vácuo.....	93
Figura 57 – Partição da Solução MeOH-1 com AcOEt para o fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. EJC08	94
Figura 58 – Adição de Hexano na biomassa fúngica do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12	100
Figura 59 – Filtração à vácuo para obtenção da solução hexânica do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12.....	100
Figura 60 – Solução hexânica (4L) do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12 obitda após filtração à vácuo.....	101
Figura 61 – Partição da solução metanólica com acetato de etila para o fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12.....	101
Figura 62 – Representação da leitura da CIM, usando-se o corante TTC.....	110
Figura 63 – Representação geral do tipo de atividade observada.....	110
Figura 64 – Representação do teste de citotoxicidade preliminar frente à <i>A. salina</i> realizado no Laboratório de Bioensaios e Química de Micro-organismos (LabQuiM) da Universidade Federal do Pará.....	113
Figura 65 – Fotografias de placas de Petri inoculadas com fungos rizoféricos em meio BDA (A-Frente e B-Verso).....	115
Figura 66 – Fotografias de placas de Petri inoculadas com fungos do solo canga em meio BDA (A-Frente e B-Verso).....	115
Figura 67 – Fotografias de placas de Petri inoculadas com fungos micorrízicos em meio BDA (A-Frente e B-Verso).....	116
Figura 68 – Fotografias de placas de Petri inoculada com fungos de solo da floresta em meio BDA (A-Frente e B-Verso).....	116
Figura 69 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FCN02; $\lambda_{\text{máx}}= 232,0$ nm	118
Figura 70 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FMIC02; $\lambda_{\text{máx}}= 266,6$ nm	118
Figura 71 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FMIC07; $\lambda_{\text{máx}}= 254,0$ nm	119

Figura 72 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FRIZ03; $\lambda_{\text{máx}}$ = 270,0 nm	119
Figura 73 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FSF10; $\lambda_{\text{máx}}$ = 268,7 nm	120
Figura 74 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FRIZ01; $\lambda_{\text{máx}}$ = 255,0 nm	120
Figura 75 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FRIZ10; $\lambda_{\text{máx}}$ = 280,0 nm	121
Figura 76 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FCN01; $\lambda_{\text{máx}}$ = 270,0 nm.....	122
Figura 77 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FRIZ02; $\lambda_{\text{máx}}$ = 270,0 nm	122
Figura 78 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FRIZ12; $\lambda_{\text{máx}}$ = 270,0 nm	123
Figura 79 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FRIZ04; $\lambda_{\text{máx}}$ = 270,0 nm	123
Figura 80 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FRIZ11; $\lambda_{\text{máx}}$ = 285,9 nm	124
Figura 81 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FMIC11; $\lambda_{\text{máx}}$ = 280,0 nm	125
Figura 82 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FSF09; $\lambda_{\text{máx}}$ = 240,0 nm	126
Figura 83 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FMIC01; $\lambda_{\text{máx}}$ = 265,0 nm	126
Figura 84 – Gráfico de <i>spots</i> dos micro-extratos fúngicos.....	128
Figura 85 – Gráfico de <i>scores</i> dos micro-extratos fúngicos.....	129
Figura 86 – Curva de crescimento do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12	130
Figura 87 – Esqueleto esteroidal.....	141
Figura 88 – Ergosterol (S-1).....	142
Figura 89 – Peróxido de Ergosterol (S-2).....	143
Figura 90 – Cerivisterol (S-3).....	144
Figura 91 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S-1	147
Figura 92 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S-1	148

Figura 93 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S-2	149
Figura 94 – Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S-2	150
Figura 95 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S-3	151
Figura 96 – Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S-3	152
Figura 97 – Mistura dos esteroides β-sitosterol (S-4) e estigmasterol (S-5)	153
Figura 98 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S-4+S-5	156
Figura 99 – Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S-4+S-5	157
Figura 100 – Ampliação do espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S-4+S-5	158
Figura 101 – Esqueleto básico de uma pirona	159
Figura 102 – 2-fenilmetil-4H-piran-4-ona (S-6)	159
Figura 103 – Correlações de COSY de S-6	160
Figura 104 – Correlações de HMBC de S-6	161
Figura 105 – Proposta de fragmentação de S-6	162
Figura 106 – Proposta de rota biossintética de S-6	163
Figura 107 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S-6	165
Figura 108 – Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S-6	166
Figura 109 – Espectro de COSY (300 MHz, CDCl ₃) de S-6	167
Figura 110 – Espectro de HSQC (300 MHz, CDCl ₃) de S-6	168
Figura 111 – Espectro de HMBC (75 MHz, CDCl ₃) de S-6	169
Figura 112 – Espectro de massas (full scan) ESI (+) de S-6	170
Figura 113 – Espectro de massas dos íons filhos de <i>m/z</i> 187 de S-6	170
Figura 114 – Flavasperona (S-7)	171
Figura 115 – Correlações de HMBC de S-7	173
Figura 116 – Proposta de fragmentação de S-7	174
Figura 117 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S-7	176
Figura 118 – Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S-7	177
Figura 119 – Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl ₃) de S-7	178
Figura 120 – Espectro de COSY (300 MHz, CDCl ₃) de S-7	179
Figura 121 – Espectro de HSQC (300 MHz, CDCl ₃) de S-7	180
Figura 122 – Espectro de HMBC (75 MHz, CDCl ₃) de S-7	181
Figura 123 – Ampliação 01 do espectro de HMBC de S-7	182
Figura 124 – Ampliação 02 do espectro de HMBC de S-7	183
Figura 125 – Espectro de massas (full scan) ESI (+) de S-7	184

Figura 126 – Espectro de massas dos íons filhos de m/z 287 de S-7	184
Figura 127 – Annularina I (S-8)	185
Figura 128 – Correlações de HMBC de S-8	187
Figura 129 – Annularina D	187
Figura 130 – Proposta de fragmentação de S-8	188
Figura 131 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S-8	189
Figura 132 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S-8	190
Figura 133 – Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl_3 de S-8	191
Figura 134 – Espectro de COSY (300 MHz, CDCl_3) de S-8	192
Figura 135 – Espectro de HETCOR (75 MHz, CDCl_3 de S-8	193
Figura 136 – Espectro de HMBC (75 MHz, CDCl_3 de S-8	194
Figura 137 – Espectro de massas (full scan) ESI (+) de S-8	195
Figura 138 – Espectro de massas dos íons filhos de m/z 197 de S-8	195
Figura 139 – Annularina J (S-9)	196
Figura 140 – Correlações de COSY de S-9	197
Figura 141 – Annularina B	198
Figura 142 – Proposta de fragmentação de S-9	199
Figura 143 – Proposta de rota biossintética de S-8 e S-9	200
Figura 144 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S-9	201
Figura 145 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S-9	202
Figura 146 – Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl_3 de S-9	203
Figura 147 – Espectro de COSY (300 MHz, CDCl_3) de S-9	204
Figura 148 – Espectro de HETCOR (75 MHz, CDCl_3 de S-9	205
Figura 149 – Espectro de HMBC (75 MHz, CDCl_3 de S-9	206
Figura 150 – Espectro de massas (full scan) ESI (+) de S-9	207
Figura 151 – Espectro de massas dos íons filhos de m/z 213 de S-9	207
Figura 152 – Esqueleto básico de isocumarinas	208
Figura 153 – Monocerina (S-10)	208
Figura 154 – Correlações de COSY de S-10	209
Figura 155 – Correlações de HMBC de S-10	211
Figura 156 – Proposta de fragmentação de S-10	212
Figura 157 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S-10	214
Figura 158 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S-10	215

Figura 159 – Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl ₃) de S-10	216
Figura 160 – Espectro de COSY (300 MHz, CDCl ₃) de S-10	217
Figura 161 – Espectro de HETCOR (75 MHz, CDCl ₃) de S-10	218
Figura 162 – Espectro de HMBC (75 MHz, CDCl ₃) de S-10	219
Figura 163 – Espectro de massas (full scan) ESI (+) de S-10	220
Figura 164 – Espectro de massas dos íons filhos de <i>m/z</i> 309 de S-10	220
Figura 165 – 5-hidroxiacetilfurfural (S-11)	221
Figura 166 – Correlações de HMBC de S-11	222
Figura 167 – Proposta de fragmentação de S-11	223
Figura 168 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S-11	225
Figura 169 – Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S-11	226
Figura 170 – Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl ₃) de S-11	227
Figura 171 – Espectro de COSY (300 MHz, CDCl ₃) de S-11	228
Figura 172 – Espectro de HSQC (300 MHz, CDCl ₃) de S-11	229
Figura 173 – Espectro de HMBC (75 MHz, CDCl ₃) de S-11	230
Figura 174 – Espectro de massas (full scan) ESI (+) de S-11	231
Figura 175 – Espectro de massas dos íons filhos de <i>m/z</i> 127 de S-11	231
Figura 176 – Uridina (S-12)	232
Figura 177 – Correlações de COSY de S-12	233
Figura 178 – Correlações de HMBC de S-12	234
Figura 179 – Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD) de S-12	236
Figura 180 – Espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD) de S-12	237
Figura 181 – Ampliação do espectro de RMN ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD) de S-12	238
Figura 182 – Espectro de COSY (300 MHz, CD ₃ OD) de S-12	239
Figura 183 – Espectro de HETCOR (75 MHz, CD ₃ OD) de S-12	240
Figura 184 – Espectro de HMBC (75 MHz, CD ₃ OD) de S-12	241
Figura 185 – Lapachol	242
Figura 186 – Mevalactona	244

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 01 - Representação dos processos de obtenção dos extratos do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. EJC08 em meio sólido (arroz).	95
Fluxograma 02 – Fracionamento do extrato hexânico do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. EJC08	96
Fluxograma 03 – Representação dos processos de obtenção dos extratos do fungo endofítico <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er em meio sólido (arroz).....	97
Fluxograma 04 – Fracionamento da Fase AcOEt do extrato MeOH do fungo endofítico <i>E. rostratum</i> 1.11 Er.....	98
Fluxograma 05 – Fracionamento de uma alíquota da fase hidroalcoólica do extrato MeOH do fungo endofítico <i>E. rostratum</i> 1.11 Er.....	99
Fluxograma 06 – Representação dos processos de obtenção dos extratos do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12 em meio sólido (arroz)	102
Fluxograma 07 – Fracionamento do extrato hexânico do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12.....	103
Fluxograma 08 – Fracionamento da fração 02 do extrato hexânico do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12	104
Fluxograma 09 - Fracionamento da fração 04 do extrato hexânico do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12	105
Fluxograma 10 – Partição líquido-líquido do extrato metanólico de <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ 12 e o fracionamento da fase AcOEt	106
Fluxograma 11 – Fracionamento da fração 06 da partição líquido-líquido (Hex. e AcOEt) do extrato MeOH.....	107
Fluxograma 12 – Procedimento adotado na execução dos ensaios antimicrobianos..	111

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 – Classificação taxonômica de fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	42
Quadro 02 – Classificação taxonômica do fungo endofítico <i>Exserohilum rostratum</i>	53
Quadro 03 - Os cinco gêneros vegetais da sub-família Caesalpinioideae.....	72
Quadro 04 – Quantidade de fungos isolados	114
Quadro 05 – Valores de CIM para os ensaios antimicrobianos dos micro-extratos dos fungos endofíticos de <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>férrea</i> e fungos de solo frente às bactérias <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	132
Quadro 06 – Resultados dos ensaios antimicrobianos dos extratos e fases orgânicas obtidos do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. EJC08	133
Quadro 07 – Resultados dos ensaios antimicrobianos dos extratos e fases orgânicas obtidos do fungo endofítico <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er	134
Quadro 08 – Resultados dos ensaios antimicrobianos dos extratos e fases orgânicas obtidos do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12	135
Quadro 09 – Resultado de citotoxicidade preliminar frente à <i>Artemia salina</i> dos micro-extratos de fungos endofíticos de <i>M. acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> e fungos do solo ...	136
Quadro 10 – Resultados de citotoxicidade preliminar frente à <i>Artemia salina</i> dos extratos orgânicos de fungos endofíticos <i>Aspergillus</i> sp. EJC 08, <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er e do fungo de solo FRIZ12	137
Quadro 11 – Resultados dos ensaios antimicrobianos e de citotoxicidade preliminar frente à <i>A.salina</i> para a annularina I (S-8), a annularina J (S-9) e a monocerina (S-10).....	245
Quadro 12 – Resultados dos ensaios antimicrobianos e de citotoxicidade preliminar frente à <i>A.salina</i> para a 2-benzil-4H-piran-4-ona (S-6), a flavasperona (S-7) e a uridina (S-12).....	247

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Atribuição dos dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) para S-1 , S-2 e S-3 juntamente com os dados descritos na literatura para ergosterol, peróxido de ergosterol e cerivisterol, respectivamente	145
Tabela 02 – Atribuição dos dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) para S-1 , S-2 e S-3 juntamente com os dados descritos na literatura para ergosterol, peróxido de ergosterol e cerivisterol, respectivamente	146
Tabela 03 – Atribuição dos dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S-4 e S-5 juntamente com os dados descritos na literatura para o estigmasterol e β -sitosterol, respectivamente	155
Tabela 04 – Atribuição dos dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S-6	164
Tabela 05 – Atribuição dos dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S-7 juntamente com os dados descritos na literatura para o estigmasterol e β -sitosterol, respectivamente.....	175
Tabela 06 – Atribuição dos dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S-8 e S-9	198
Tabela 07 – Atribuição dos dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S-10 juntamente com os dados descritos na literatura para a monocerina. 213	
Tabela 08 – Atribuição dos dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S-11 juntamente com os dados descritos na literatura para o 5-hidroximetilfurfural	224
Tabela 09 – Atribuição dos dados de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) e RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de S-12 juntamente com os dados descritos na literatura para a uridina.....	235

RESUMO

PINHEIRO, E. A. A. **Perfil cromatográfico e potencial químico e biológico de fungos de solo e fungos endofíticos isolados de *Bauhinia guianensis* e *Mimosa acutistipula* var. *ferrea***. Tese. Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2016.

O estudo de fontes naturais pouco exploradas e que exibem interações ecológicas específicas no seu habitat tem sido enfatizado como estratégico para a descoberta de novas substâncias com atividades biológicas. Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo realizar o estudo químico e bioativo de fungos endofíticos e de fungos de solo da Amazônia, visando contribuir na busca de compostos bioativos. Neste trabalho, 15 espécies fúngicas foram reativadas em placas de Petri contendo meio BDA. Após a reativação, foram obtidos os micro-extratos de 15 fungos conforme a metodologia adaptada de Smedsgaar. Os micro-extratos foram avaliados por UPLC/MS para determinação do perfil cromatográfico e foi feita a avaliação dos agrupamentos por separação de componentes principais, além de serem também submetidos aos ensaios antimicrobianos e ao ensaio de citotoxicidade preliminar frente à *Artemia salina* para a avaliação do potencial biológico. Foram realizados estudos químicos com os fungos *Aspergillus* sp. EJC08, *Exserohilum rostratum* 1.11 Er e *Aspergillus* sp. FRIZ12. As três espécies fúngicas foram cultivadas em meio de cultura sólido (arroz) em quantidade suficiente para o isolamento de metabólitos secundários. Os compostos foram isolados através de métodos cromatográficos e identificados por métodos espectrométricos. Foram obtidos doze compostos, sendo três esteroides comuns em espécies fúngicas (ergosterol, peróxido de ergosterol e cerivisterol), mistura de dois esteroides comumente encontrados em plantas (β -sitosterol e estigmaterol), cinco substâncias de origem policetídica (2-benzil-4H-piran-4-ona, flavasperona, annularinas I e J, monocerina), um carboidrato (5-hidroximetilfurfural) e um nucleosídeo (uridina). Das substâncias isoladas, destacam-se as annularinas I e J, produtos naturais inéditos, e a 2-benzil-4H-piran-4-ona, segunda ocorrência como produto natural. Os policetídeos e a uridina apresentaram boas atividades antimicrobianas e moderadas atividades citotóxicas no geral.

Palavras chaves: fungos de solo, fungos – Amazônia.

ABSTRACT

PINHEIRO, E. A. A. **Chromatographic profile and chemical and biological potential of soil fungi and endophytic fungi isolated from *Bauhinia guianensis* and *Mimosa acutistipula* var. *ferrea***. Thesis. Institute of Exact and Natural Sciences, Graduate Program in Chemistry – UFPA, Belém-PA, 2016.

The study of natural sources and that exhibit little explored specific ecological interactions their habitat has been emphasized as a strategy for the discovery of new substances with biological activities. In this context, this study aims to carry out the chemical and bioactive study of endophytic fungi and the Amazon soil fungi, to contribute in the search for bioactive compounds. In this study, 15 fungal species were reactivated in Petri dishes containing PDA medium. After reactivation, micro-fungal extracts 15 were obtained according to a methodology adapted Smedsgaar. The micro extracts were evaluated by UPLC / MS to determine the chromatographic profile and was made to evaluate the clusters separation main components, and are also subjected to antimicrobial assays and test preliminary cytotoxicity on *Artemia salina* for the assessment of biological potential. chemical studies were conducted with *Aspergillus* sp. EJC08, *Exserohilum rostratum* 1:11 Er and *Aspergillus* sp. FRIZ12. The three fungal species were grown on solid medium (rice) in sufficient quantity for the isolation of secondary metabolites. The compounds were isolated by chromatographic methods and identified by spectroscopic methods. twelve compounds were obtained, three steroids in common fungal species (ergosterol, ergosterol peroxide and cerivisterol), mixture of two steroids commonly found in plants (β -sitosterol and estigmaterol), five substances polyketide source (2-benzyl-4H-pyran-4-one, flavasperona, annularinas I and J monocerina), a carbohydrate (5-hydroxymethylfurfural) and a nucleoside (uridine). Of the isolated compounds, there are the annularinas I and J, novel natural products, and 2-benzyl-4H-pyran-4-one, second occurrence as a natural product. The polyketides and uridine showed good antimicrobial activity and moderate cytotoxic activities in general.

Key Words: soil fungi, fungi- Amazon.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3 REFERENCIAL TEÓRICO	33
3.1 FUNGOS	33
3.1.1 Fungos endofíticos e seus metabólitos secundários bioativos	34
3.1.1.1 O gênero <i>Aspergillus</i> e seus metabólitos secundários bioativos	41
3.1.1.2 A espécie fúngica <i>Exserohilum rostratum</i> e seus metabólitos secundários bioativos	51
3.1.2 Fungos de solo e seus metabólitos secundários bioativos	55
3.2 BACTÉRIAS	61
3.2.1 <i>Bacillus subtilis</i>	65
3.2.2 <i>Escherichia coli</i>	66
3.2.3 <i>Salmonella typhimurium</i>	67
3.2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
3.2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	68
3.3 ARTEMIA SALINA E O TESTE DE CITOTOXIDADE PRELIMINAR	70
3.4 DESCRIÇÃO DAS MATRIZES VEGETAIS	70
3.4.1 Descrição da espécie vegetal <i>Bauhinia guianensis</i>	70
3.4.2 Descrição da espécie vegetal <i>Mimosa acutistipula var. ferrea</i>	72
3.5 DESCRIÇÃO DA SERRA DOS CARAJÁS	74
3.6 QUIMIOMETRIA	77
4 METODOLOGIA	80
4.1 MATERIAIS	80
4.1.1 Equipamentos técnicos	80
4.1.2 Vidrarias e outros materiais	80
4.1.3 Meios de cultura	81
4.1.4 Solventes e substratos	81
4.2 MÉTODOS	82

4.2.1 Coleta das amostras dos fungos endofíticos de <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> e dos fungos de solo	82
4.2.2 Processo de assepsia e de isolamento dos fungos endofíticos de <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i>	83
4.2.3 Processo de assepsia e de isolamento dos fungos de solo (Método de Clark adaptado)	84
4.2.4 Extração de metabólitos secundários em micro-escala (Método de Smedsgaar adaptado)	85
4.2.5 Obtenção do perfil químico dos micro-extratos por CLAE/DAD	86
4.2.6 Análise quimiométrica dos micro-extratos por UPLC/MS	86
4.2.7 Curva de crescimento do fungo de solo FRIZ12	87
4.2.8 Reativação dos fungos endofíticos <i>Aspergillus</i> sp. EJC08 e <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er e do fungo de solo FRIZ12 em placas de Petri contendo meio BDA	88
4.2.9 Cultivo dos fungos endofíticos <i>Aspergillus</i> sp. EJC08 e <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er em meio sólido (arroz)	89
4.2.10 Cultivo do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ 12 em meio sólido (arroz) ..	90
4.2.11 Obtenção dos extratos dos fungos endofíticos <i>Aspergillus</i> sp. EJC08 e <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er	91
4.2.12 Fracionamento dos extratos do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. EJC08 ...	93
4.2.13 Fracionamento dos extratos do fungo endofítico <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er	95
4.2.14 Obtenção dos extratos e fracionamentos do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12	98
4.2.15 Ensaio antimicrobianos	107
4.2.15.1 Ativação das bactérias.....	107
4.2.15.2 Padronização das culturas.....	107
4.2.15.3 Preparo das amostras.....	108
4.2.15.4 Ensaio para medir a concentração mínima inibitória (CIM).....	108
4.2.15.5 Tipos de atividades antimicrobianas.....	109
4.2.16 Ensaio de triagem de atividade citotóxica preliminar frente à <i>Artemia salina</i>	110

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	113
5.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> E DE FUNGOS DE SOLO DA SERRA DOS CARAJÁS	113
5.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> E DE FUNGOS DE SOLO.....	115
5.3 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DOS MICRO-EXTRATOS	126
5.4 CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO DE SOLO FRIZ12 PARA A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	128
5.5 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS DOS MICRO-EXTRATOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> E DE FUNGOS DE SOLO.....	129
5.6 ENSAIOS CITOTÓXICOS PRELIMINARES DOS MICRO-EXTRATOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> E DE FUNGOS DE SOLO FRENTE À <i>Artemia salina</i>	131
5.6.1 Ensaios antimicrobianos para os extratos orgânicos do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. EJC08.....	131
5.6.2 Ensaios antimicrobianos para os extratos orgânicos do fungo endofítico <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er	132
5.6.3 Ensaios antimicrobianos para os extratos orgânicos do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12.....	133
5.7 ENSAIOS CITOTÓXICOS PRELIMINARES DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS <i>Aspergillus</i> sp. EJC 08, <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er E DO FUNGO DE SOLO FRIZ 12 FRENTE À <i>Artemia salina</i>	134
5.8 ENSAIOS CITOTÓXICOS PRELIMINARES DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS <i>Aspergillus</i> sp. EJC08, <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er E DO FUNGO DE SOLO <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12 FRENTE À <i>Artemia salina</i>	135
5.9 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	136
5.9.1 Substâncias isoladas do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. EJC08	137
5.9.2 Substâncias isoladas do fungo endofítico <i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er..	137
5.9.3 Substâncias isoladas do fungo de solo <i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12.....	138
5.9.4 Esteroides	139
5.9.4.1 Elucidação estrutural do ergosterol (S-1)	140
5.9.4.2 Elucidação estrutural do peróxido de ergosterol (S-2).....	142
5.9.4.3 Elucidação estrutural do cerivisterol (S-3).....	143

5.9.4.4 Elucidação estrutural da mistura do β -sitosterol (S-4) e do estigmasterol (S-5)	152
5.9.5 Pironas	158
5.9.5.1 Elucidação estrutural da 2-benzil-4H-piran-4-ona (S-6)	158
5.9.5.2 Elucidação estrutural da flavasperona (S-7).....	170
5.9.6 Lactonas	184
5.9.6.1 Elucidação estrutural da annularina I (S-8)	184
5.9.6.2 Elucidação estrutural da annularina J (S-9).....	195
5.9.7 Isocumarina	207
5.9.7.1 Elucidação estrutural da monocerina (S-10)	207
5.9.8 Carboidrato	220
5.9.8.1 Elucidação estrutural da 5-hidroxifurfural (S-11)	220
5.9.9 Nucleosídeo	231
5.9.9.1 Elucidação estrutural da uridina (S-12)	231
5.10 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS E DE CITOTOXIDADE PRELIMINAR FRENTE À <i>Artemia salina</i> PARA OS COMPOSTOS ISOLADOS	241
5.10.1 Ensaios antimicrobianos e de citotoxicidade preliminar frente à <i>A. salina</i> para a annularina I (S-8), a annularina J (S-9) e a monocerina (S-10).....	241
5.10.2 Ensaios antimicrobianos e de citotoxicidade preliminar frente à <i>A. salina</i> para a 2-benzil-4H-piran-4-ona (S-6), a flavasperona (S-7) e a uridina (S-12)	244
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	246
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	250

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa em produtos naturais é uma das áreas mais tradicionais da Química no Brasil devido aos fatores históricos amplamente discutidos e à grande biodiversidade do país. A maioria dos trabalhos na área está voltada para o isolamento e identificação de substâncias, muitas vezes, associados aos ensaios biológicos ou estudos quimiotaxonômicos (PUPO *et al.*, 2007).

Produtos naturais desempenham um importante papel no tratamento e prevenção de doenças humanas a milhares de anos (MUSSI-DIAS *et al.*, 2012). A natureza é fonte de agentes medicinais e diferentes fármacos modernos são provenientes de fontes naturais, particularmente plantas, os quais tiveram seu uso baseado na medicina tradicional (CRAGG; NEWMAN, 2005). Os produtos naturais, ainda, têm um papel fundamental no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos por um longo tempo (MOLINARI, 2009). Além disso, a complexidade estrutural dos produtos naturais serve de modelo na área da síntese orgânica e também como ferramentas para pesquisa e compreensão de vias bioquímicas (GALLO *et al.*, 2009).

Aproximadamente 10 dos 20 medicamentos mais vendidos no mundo são de origem natural e totalizaram uma arrecadação de cerca de US\$ 16 bilhões em 2009 (BARREIRO; BOLZANI, 2010). De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2012), é estimado que pelo menos 40% de todos os medicamentos são derivados diretamente ou indiretamente de produtos naturais. No que se refere aos medicamentos antitumorais e antimicrobianos, esta porcentagem pode ser maior que 60% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Ao longo dos últimos 30 anos, aproximadamente 50% dos medicamentos terapêuticos desenvolvidos e aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) foram produtos naturais, derivados ou mimetizam os compostos sintéticos relacionados (CRAGG; NEWMAN, 2012).

A necessidade de fontes alternativas para substâncias de importância farmacológica, de novas substâncias biologicamente ativas, e a descoberta de novos processos químicos, vem ao encontro da química de micro-organismos. Os fungos endofíticos são muito diferenciados em relação aos demais micro-organismos quanto ao seu modo de associação com as plantas, podendo se dar em níveis muito próximos de intimidade bioquímica (LI *et al.*, 1998). Assim, essa pode

ser uma fonte útil, versátil e renovável de muitas substâncias potencialmente úteis à humanidade (MARINHO; RODRIGUES-FILHO, 2011).

A busca por metabólitos produzidos por micro-organismos tem uma história mais recente em comparação com os produtos obtidos de vegetais. A descoberta da penicilina por Fleming, em 1928, revolucionou o tratamento de infecções bacterianas (BASHYAL *et al.*, 2007). Essa descoberta levou pesquisadores da academia e de indústrias farmacêuticas a procurarem, intensivamente, produtos bioativos derivados de micro-organismos (GALLO *et al.*, 2009).

Os fungos formam um complexo grupo de organismos, presentes nos mais diversos habitats terrestres e aquáticos. Esses organismos são exímios produtores de metabólitos secundários, muitos dos quais bioativos. O solo é o habitat tradicionalmente investigado como fonte de fungos e outros micro-organismos empregados em programas de prospecção química, visando ao isolamento de novos metabólitos secundários bioativos (BÉRDY, 2005).

O solo é um recurso natural finito e um dos principais recursos na exploração dos agrossistemas. Considerado como a base da agricultura, pode também ser encarada como habitat de inúmeras e variadas populações de micro-organismos de vida livre ou em associações com outros organismos. A Floresta Amazônica por ser um dos nichos ecológicos do mundo, abrigando uma enorme quantidade de animais, plantas e micro-organismos, possui uma biodiversidade enorme, principalmente no solo, sendo alvo de exploração para a produção de metabólitos tanto para a indústria internacional farmacêutica quanto à estética (FEDRIZZI, 2006).

Apesar da grande diversidade de metabólitos produzidos por fungos e do fato de que novidades taxonômicas são, normalmente, acompanhadas de substâncias inéditas, muitos metabólitos são coproduzidos por espécies distintas. Por outro lado, espécies muito semelhantes são capazes de produzir perfis diferentes de metabólitos secundários (FRISVAD *et al.*, 2008). Logo, o emprego de métodos analíticos para a caracterização prévia dos metabólitos presentes em extratos brutos originados de fungos pode auxiliar na escolha mais racional das espécies a serem investigadas em programa de prospecção química. Métodos cromatográficos, como HPLC-PDA (High Performance/Pressure Liquide Chromatography-Photodiode Array Detector), podem ser empregados no perfilamento de metabólitos secundários presentes em extratos brutos de fungos e os dados analíticos usados para a

desreplicação dos metabólitos, estimativa da diversidade química dos extratos e comparação entre extratos (SMEDSGAARD; NIELSEN, 2005). Como as amostras usadas nas análises cromatográficas são diminutas, os extratos brutos podem ser obtidos em micro-escala, o que permite a triagem, de dezenas a centenas, de amostras em pouco tempo. As substâncias detectadas e caracterizadas durante o perfilamento de metabólitos secundários, também, podem ser usadas como marcadores em estudos quimiotaxonômicos (FRISVAD *et al.*, 2008).

SANTOS (2010) e CÔRREA (2010) realizaram o perfil químico e os ensaios antimicrobianos de diversas espécies fúngicas endofíticas isoladas de *Bauhinia guianensis*, dentre as quais os fungos *Aspergillus* sp. EJC08 e *Exserohilum rostratum* 1.11 Er mostraram-se mais interessantes e foram reativados em placas de Petri contendo meio BDA para o isolamento de seus compostos bioativos.

Nesta pesquisa, foram também isolados compostos bioativos do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 que escolhido após a realização dos ensaios antimicrobianos do seu micro-extrato e, também, foi traçado o perfil cromatográfico para este fungo. Foram realizados ainda o perfil químico por CLAE/UV e ensaios biológicos para micro-extratos de outras 14 espécies fúngicas, originadas tanto de amostras de solo da Serra dos Carajás como da *Mimosa acutistupula* var. *férrea*. Por fim, houve a análise quimiométrica para agrupar as 15 espécies de fungo conforme a grau de semelhança das classes de substâncias, avaliando a relação *m/z*.

Assim sendo, é necessário o estudo químico de fungos endofíticos e de fungos de solo da Amazônia com o intuito de descobrir novas substâncias com atividades biológicas que venham para ajudar no combate de males a humanidade, como, por exemplo, as doenças causadas por bactérias. Além disso, contribuir para a interação dos fungos com os habitats onde se desenvolvem para a produção de metabólitos de classes químicas diferentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem por objetivo realizar o estudo químico e bioativo de fungos endofíticos e fungos de solo da Amazônia visando contribuir na busca de compostos bioativos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar os fungos endofítico da *Mimosa acutistipula var. ferrea* e dos solos da Serra dos Carajás;
- Selecionar os fungos que serão estudados quimicamente;
- Obter o perfil químico por HPLC e por EM dos fungos selecionados;
- Isolar os compostos presentes nos extratos e/ou fases orgânicas dos fungos selecionados e identificá-los por RMN e EM;
- Realizar ensaios antimicrobianos e citotóxicos (preliminar) com os extratos e compostos obtidos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 FUNGOS

Os fungos apresentam um conjunto de características próprias que determinam sua diferenciação das plantas, pois não sintetizam clorofila, não têm celulose na sua parede celular, exceto em alguns fungos aquáticos, não armazenam amido como substância reserva, sendo organismos quimiorganotróficos, cujo corpo pode ser unicelular (leveduriforme) ou pluricelular (filamentoso) (SILVA, 2005).

Os fungos são os principais decompositores em certos ecossistemas e vivem associados em muitos organismos. Em 1991, um documento marco estimou que houvesse 1,5 milhão de fungos na Terra (HAWKSWORTH, 1991). Como apenas 700 mil espécies de fungos haviam sido descritas na época, impulsionou os pesquisadores a procurarem e identificarem as espécies fúngicas anteriormente desconhecidas (MUELLER *et al.*, 2007). Estimativas mais recentes, baseadas nos métodos de sequenciamento de DNA de alto rendimento, sugerem que existam aproximadamente 5,1 milhões de espécies fúngicas (BLACKWELL, 2011).

Os fungos formam um complexo grupo de organismos, presentes nos mais diversos habitats terrestres e aquáticos. Várias espécies são patogênicas a plantas e produzem toxinas que auxiliam na infecção e colonização de suas hospedeiras. Já a contaminação de alimentos e forragens por fungos pode trazer riscos à saúde humana e animal, devido à capacidade desses de produzir micotoxinas (BENNETT; KLICH, 2003). Os fungos também são fonte de metabólitos secundários utilizados como fármacos, ou como precursores para síntese ou semisíntese de medicamentos diversos, como antibióticos, antifúngicos, antitumorais, imunossupressores e antidiabéticos (MISIEK; HOFFMEISTER, 2007).

O solo é o habitat tradicionalmente investigado como fonte de fungos e outros micro-organismos empregados em programas de prospecção química, visando ao isolamento de novos metabólitos secundários bioativos (BÉRDY, 2005). Mais recentemente, o interesse de vários químicos de produtos naturais tem-se voltado para outras fontes de organismos potencialmente produtores de substâncias bioativas, incluindo os fungos de ambientes aquáticos e aqueles que habitam o interior das plantas, os endófitos (SCHULZ *et al.*, 2002). Centenas de novos

metabólitos foram isoladas de fungos endófitos nos últimos quinze anos e a taxa de novas descobertas segue acelerada, visto que a diversidade, tanto biológica quanto química, desses organismos tem se mostrado imensa e relativamente pouco estudada (SCHULZ; BOYLE, 2005).

3.1.1 Fungos endofíticos e seus metabólitos secundários bioativos

Fungos endofíticos são habitantes de espécies vegetais, não causando sintomas de doenças aparentes a elas e podem até mesmo ser benéficos aos seus hospedeiros (STADLER; SCHULZ, 2009).

As interações endófito/planta podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas. Nas interações simbióticas os micro-organismos se associam às plantas de forma mutualística, competindo com os patógenos, aumentando a tolerância a estresses abióticos (SCHARDL *et al.*, 2004) e bióticos (CLAY; SCHARDL, 2002), recebendo, em contrapartida, proteção e nutrientes do seu hospedeiro. Nas interações baseadas no neutralismo, não é observado nenhum efeito para ambos os indivíduos, pois eles não apresentam necessidade para o seu crescimento (AGRIOS, 1988). Já, nas interações antagônicas, os fungos antagônicos causam desequilíbrios no seu hospedeiro, levando até mesmo a instalação de doenças devido às alterações de fatores bióticos e abióticos do ecossistema e na quantidade e na qualidade de nutrientes disponíveis pelo hospedeiro. Estes tipos de fungos possuem um grande potencial fitopatogênico e são encontrados praticamente em todos os solos naturais e agrícolas. Estudos sobre a ocorrência e distribuição destes micro-organismos no solo e a interação dos mesmos com as plantas e o ambiente vão auxiliar no monitoramento das condições ecológicas do sistema que está sendo avaliado (SILVA, 2006). As interações antagônicas são importantes do ponto de vista metabólito, pois os organismos que estão sendo atacados podem produzir substâncias como os antibióticos que inibem o desenvolvimento do outro (RODRIGUES, 2006).

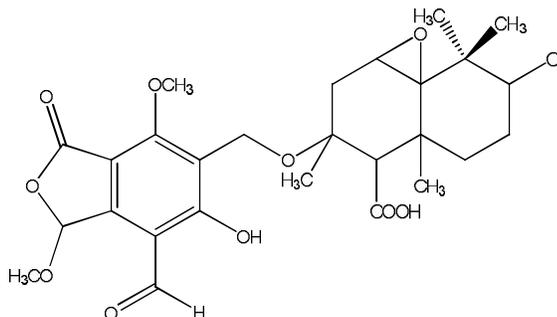
A relação simbiótica entre fungos e plantas podem ter efeitos profundos sobre ecologia, aptidão, evolução, comunidades de plantas e formação da planta hospedeira, manifestando fortes efeitos sobre a estrutura da comunidade e a diversidade de organismos associados (RODRIGUEZ *et al.*, 2009). Em associação

com os vegetais, os fungos endofíticos mostram-se ubíquos, uma vez que todas as plantas examinadas, até o momento, abrigam centenas de espécies (RAKOTONIRIANA *et al.*, 2007).

Os endofíticos são reconhecidos como valiosa fonte de metabólitos bioativos com grande aplicabilidade para a indústria farmacêutica, médica e agricultura. Algumas pesquisas demonstraram que a porcentagem de isolados endofíticos produtores de substâncias com atividade antimicrobiana pode ser, em determinados casos, superior a 30% (MUSSI-DIAS *et al.*, 2012). A proporção de estruturas inéditas e extratos bioativos produzidos por endofíticos é consideravelmente superior à quantidade produzida por outros micro-organismos de outros habitats. Isso se deve ao fato de que a síntese de compostos biologicamente ativos pode ser favorecida pela interação simbiótica, ainda que esse grupo de organismos não tenha sido extensivamente estudado (SCHULZ *et al.*, 2002).

Um novo produto natural, chamado de pestalotiopena A (Figura 01) foi obtido do fungo *Pestalotiopsis* sp. isolado como endofítico de uma planta chinesa de mangue, a *Rhizophora mucronata*. A pestalotiopena A exibiu uma atividade moderada contra a bactéria *Enterococcus faecalis* com valor de CIM entre 125 µg/mL e 250 µg/mL (HEMBERGER *et al.*, 2013).

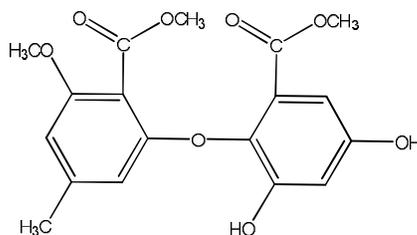
Figura 01- Estrutura da pestalotiopena A isolada do fungo endofítico *Pestalotiopsis* sp.



O composto inédito 2,4-diidroxi-2,6-diacetoxi-3-metoxi-5-metil-difeniléter (Figura 02, p.37) foi obtido do fungo *Verticillium* sp. isolado como endofítico de *Rehmannia glutinosa* (Gaertn) Libosch. A substância apresentou atividade citotóxica contra linhagens de célula HL-60 com DL₅₀=2,24 µg/mL e atividade antifúngica

contra *Candida albicans* (CIM= 8 µg/mL) e *Aspergillus fumigatus* (CIM= 16 µg/ml) (PENG *et al.*, 2013).

Figura 02- Estrutura do 2,4-diidroxi-2,6-diacetoxi-3-metoxi-5-metil-difeniléter isolado do fungo endofítico *Verticillium sp.*



Os fungos endofíticos são importantes fontes de metabólitos secundários, dentre eles os seis novos oblongolídeos W1, W2, X, Y, Z e 2-desoxi-4 α -hidroxioblongolídeo (Figura 03, p. 38) que foram isolados do fungo endofítico *Phomosis sp.* BCC 9789. O oblongolídeo Z mostrou atividade anti-HSV-1 (Herpes Simplex Vírus-1) com DL₅₀= 14 µg/mL e as atividades citotóxicas contra KB (carcinoma escamoso oral), BC (β -caroteno), NCI-H187 (câncer de pulmão), e (Vero) linhagens de células não malignas, com os respectivos valores de DL₅₀ de 37 µg/mL, 26 µg/mL, 32 µg/mL e 60 µg/mL. O oblongolídeo Y mostrou atividade citotóxica contra a linhagem de células BC com um valor de DL₅₀= 48 µg/mL (BUNYAPAIBOONSRI *et al.*, 2010).

Seis novas dicetopiperazinas, contendo enxofre, denominadas lasiodiplinas A-F (Figura 04, p. 38) foram obtidas do fungo *Lasiodiplodia pseudotheobromae* F2 isolado como endofítico da flor de *Illigera rhodantha* (Hernandiaceae). A lasiodiplina E (Figura 05, p. 39) é um novo agente antibacteriano que apresentou os valores de CIM na faixa de 0,12-0,25 µg/mL contra as cepas clínicas de *Streptococcus sp.*, *Bacteroides vulgates*, *Peptostreptococcus spp.* e *Veillonella parvula* (WEI *et al.*, 2014).

Figura 03- Estruturas de oblongólídeos isolados do fungo endofítico *Phomosis* sp. BCC 9789.

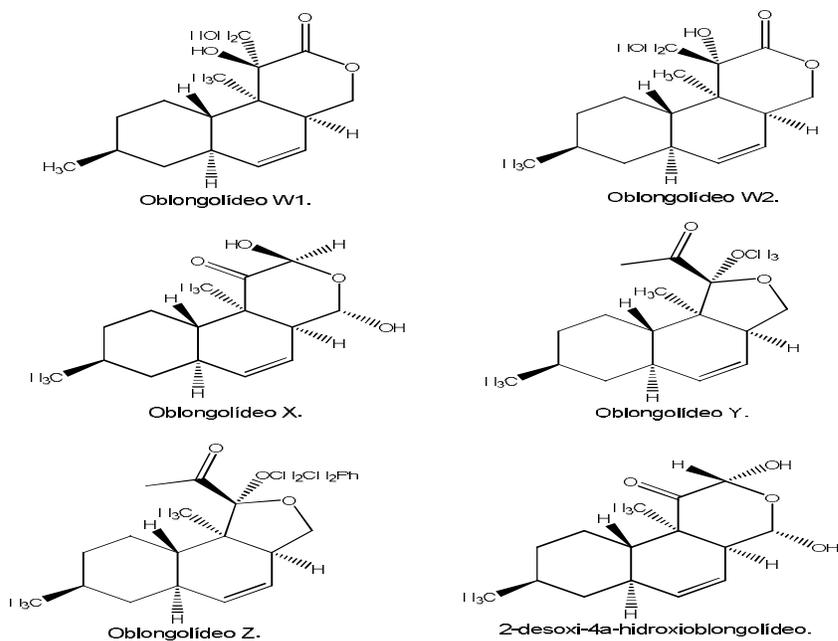
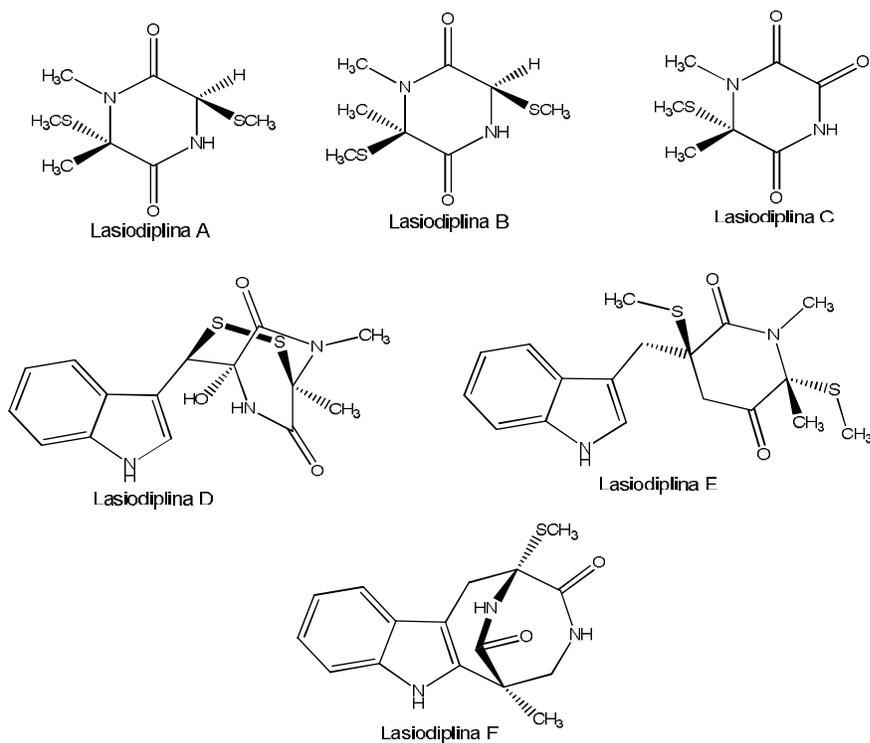


Figura 04- Substâncias isoladas do fungo endofítico *Lasiodiplodia pseudotheobromae* F2.



Metwaly e colaboradores (2014) obtiveram o fungo endofítico *Nigrospora sphaerica* isolado de diversas plantas e organismos marinhos, o qual teve seus metabólitos bioativos estudados. Os compostos ergosta-7,22-dieno-3 β -ol, ergosta-4,6,8(14),22-tetraeno-3 β -ol e ergosta-5(6),7,22-trieno-3 β -ol (Figura 05) mostraram uma moderada atividade antileishmanicida com valores de DL₅₀ de 30,2 μ g/mL; 26,4 μ g/mL e 36,4 μ g/mL respectivamente. Os compostos ergosta-4,6,8(14),22-tetraeno-3-ona, ergosta-7,9(14),22-trieno-3 β -ol, 4-(hidroximetil)-3,5-dimetil-diidrofuran-2(3H)-ona e 3-(1-hidroxietil)-4-metil-diidrofuran-2(3H)-ona (Figura 06, p. 40) apresentaram uma boa atividade antileucêmica contra linhagem de células HL-60 (mielóide contínua) com os respectivos valores de DL₅₀ de 0,03 μ g/mL; 0,39 μ g/mL; 0,20 μ g/ml e 0,40 μ g/mL e contra células K562 com os valores de DL₅₀ de 0,35 μ g/mL; 0,35 μ g/mL; 0,49 μ g/mL e 0,01 μ g/mL, respectivamente.

Figura 05- Substâncias antileishmanicidas isoladas do fungo endofítico *Nigrospora sphaerica*.

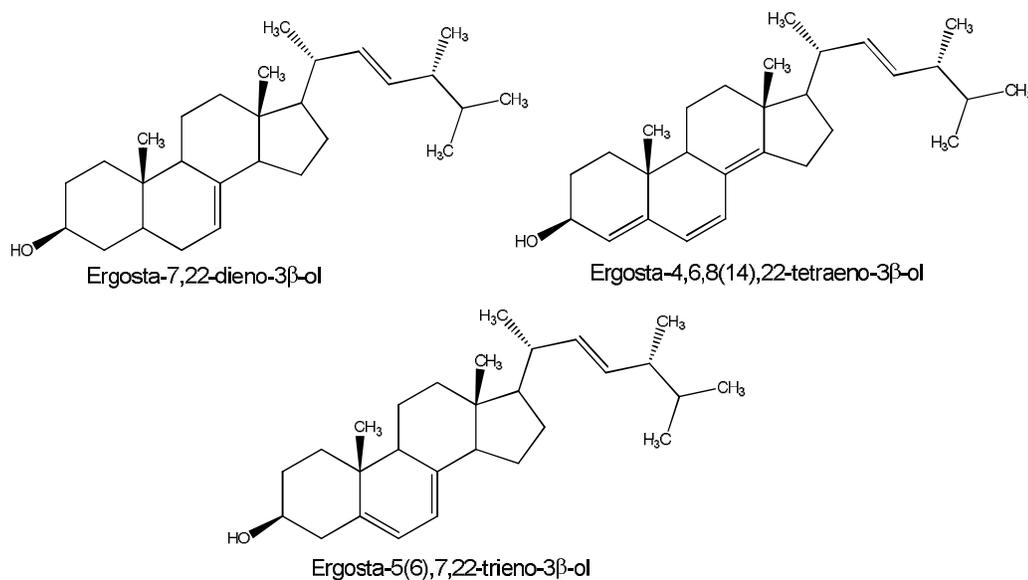
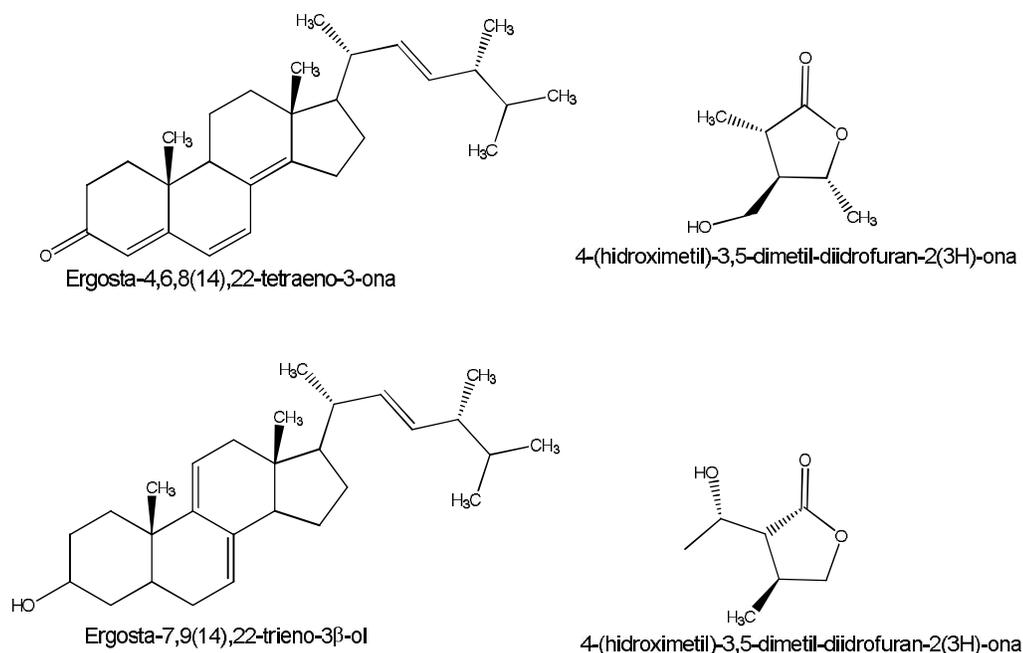
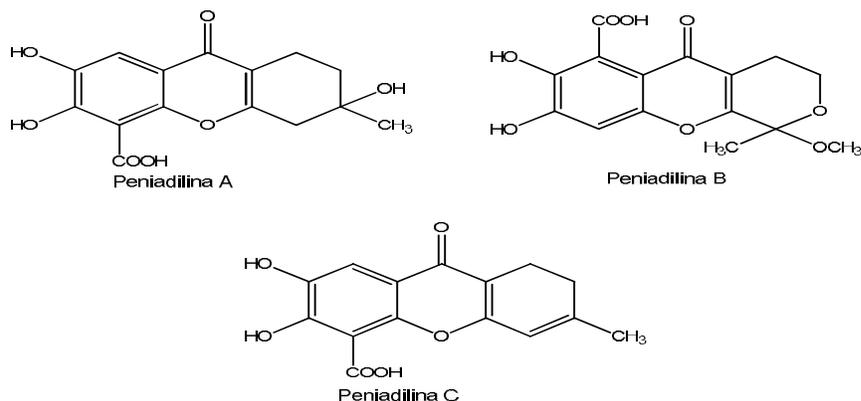


Figura 06- Substâncias antileucêmicas isoladas do fungo endofítico *Nigrospora sphaerica*.



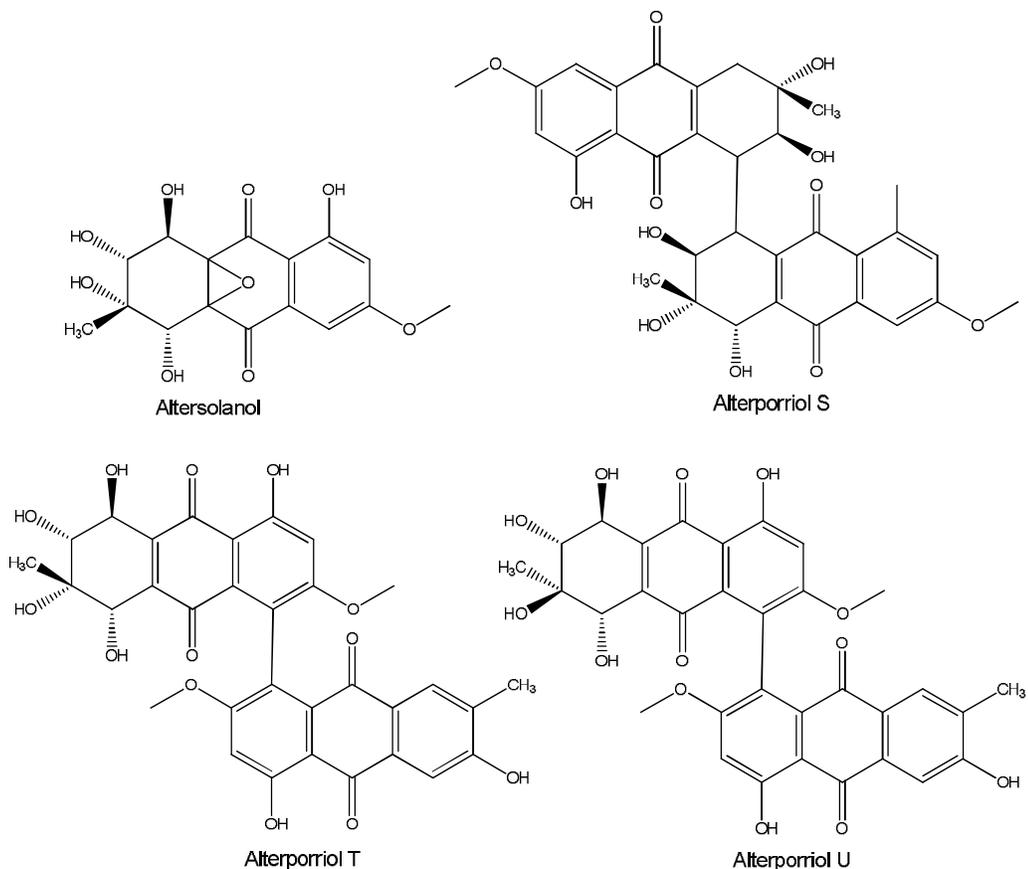
Três novos policetídeos denominados de peniadilinas A-C (Figura 07, p. 41) foram isoladas de um fungo endofítico *Penicillium* sp., abrigado nas folhas das plantas medicinais camaronesas *Garcinia nobilis* (JOURDA *et al.*, 2014). Os novos compostos apresentaram excelentes atividades antimicrobianas frente às bactérias *Escherichia coli* (DSM 1116), *E. coli* (DSM 682) e *Bacillus subtilis* (DSM 1088) e *Acinetobacter* sp. BD4 (DSM 586), comparando-se suas atividades em relação ao padrão de referência estreptomicina. A peniadilina A apresentou valores maiores que 10 µg/mL frente às referidas bactérias. Já, as peniadilina B e C apresentaram CIM maior que 10 µg/mL frente à *Acinetobacter* sp. BD4 (DSM 586), enquanto que a substância padrão teve CIM igual a 10 µg/mL frente à mesma bactéria. As peniadilinas B e C também apresentaram CIM igual a 10 µg/mL frente às bactérias *E. coli* (DSM 1116) e *E. coli* (DSM 682), enquanto que a estreptomicina apresentou CIM, igual a 1 µg/mL frente às duas bactérias testadas. Por fim, as peniadilinas B e C apresentaram os respectivos valores de CIM maior que 10 µg/mL e igual a 5 µg/mL frente à bactéria *B. subtilis* (DSM 1088), enquanto que o padrão teve CIM igual a 1 µg/mL.

Figura 07- Estruturas de peniadilinas isoladas do fungo endofítico *Penicillium* sp.



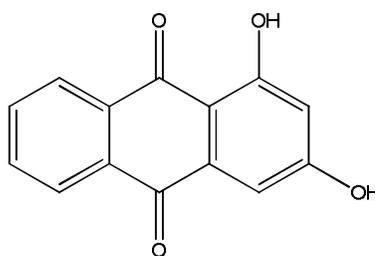
Quatro novas antraquinonas denominadas de altersolanol e os alterporriol S, T e U (Figura 08) foram isoladas do fungo endofítico *Alternaria* sp. XZSBG-1 de sedimentos do lago de sal de Bange, Tibet, China. O alterporriol S mostrou uma boa atividade inibidora sobre α -glicosidase com IC₅₀ de 7,2 μ M (CHEN *et al.*, 2014a).

Figura 08- Novas antraquinonas isoladas do fungo endofítico *Alternaria* sp. XZSBG-1.



O fungo endofítico codificado como AFKR18, pertencente à classe dos fungos Coelomycetes, de *Arcangelisia flava* (L.) Merr, produziu a pachibasina (Figura 09) que mostrou atividade antimicrobiana frente às bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* com valores de CIM de 64,0 µg/mL; 64,0 µg/mL e 32,0 µg/mL, respectivamente (WULANSARI *et al.*, 2014).

Figura 09- Pachibasina, uma substância antimicrobiana isolada do fungo endofítico codificado como AFKR18.



3.1.1.1 O gênero *Aspergillus* e seus metabólitos secundários bioativos

Dentre os endófitos produtores de metabólitos antimicrobianos, destacam-se os fungos endofíticos do gênero *Aspergillus* que foi descrito pela primeira vez pelo botânico italiano Pier Antonio Micheli em 1729 (BOSSCHE *et al.*, 1988; KELLER *et al.*, 2005), apresentando a classificação taxonômica descrita no Quadro 01.

Quadro 01. Classificação taxonômica de fungos do gênero *Aspergillus*:

Classificação taxonômica	Gênero <i>Aspergillus</i>
Domínio	Eukaryota
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Subfilo	Pezizomycotina
Subdivisão	Deuteromycotina
Classe	Eurotiomycetes
Subclasse	Eurotiomycetidae
Ordem	Eurotiales
Família	Trichocomaceae

Fonte: SOARES *et al.*, 2010.

Os fungos do gênero *Aspergillus* apresentam uma reduzida necessidade nutricional, podendo ser isolado do solo, água, vegetação, material em

decomposição e ar. A reprodução ocorre de forma assexuada, embora algumas espécies apresentem a forma sexuada do tipo ascosporada, como é o caso do *A. nidulans* e *A. glaucus* (KEARNS; LOUDIS, 2003).

Os fungos do gênero *Aspergillus* apresentam um talo filamentosos constituído por hifas septadas, com ramificações dicotômicas fazendo ângulos de 45°, mostrando estruturas de reprodução assexuada situadas no cimo de uma vesícula terminal com forma variável e que é o prolongamento do conidióforo. A forma da vesícula (esférica, hemisférica, alongada ou elíptica) constitui uma característica de identificação da respetiva espécie. Quanto à cor, esta estrutura apresenta-se igual ao conidióforo ou incolor. O conjunto da vesícula, das células conidiogêneas também denominadas por fiálides, e das cadeias de conídios, é designado por cabeça aspergilar. Esta é suportada por um conidióforo que é em regra perpendicular à célula pé. As fiálides que formam cadeias basípetas de esporos designados de fialoconídios inserem-se na vesícula e podem constituir uma ou mais séries (MURRAY *et al.*, 2006).

A diferenciação das espécies de *Aspergillus* é realizada a partir da macro e micromorfologia do fungo. Na avaliação macroscópica, as colônias deste gênero apresentam diferentes colorações do verso e reverso, textura e topografia conforme a espécie (MARTINS *et al.*, 2005). Todas as espécies do gênero *Aspergillus* apresentam microscopicamente hifas regulares medindo aproximadamente 4 µm de diâmetro, septadas, com bifurcações em ângulo agudo, e estrutura de esporulação caracterizada por conidióforos com extremidade dilatada formando a vesícula, de onde se originam as fiálides que dão origem aos conídios (SIDRIM; ROCHA, 2004). São fungos caracterizados pelo desenvolvimento de colônias brilhantes e coloridas e por produzir conídios em cabeças típicas, do tipo “*mop-like*” (escovão) (PITT; HOCKING, 1997).

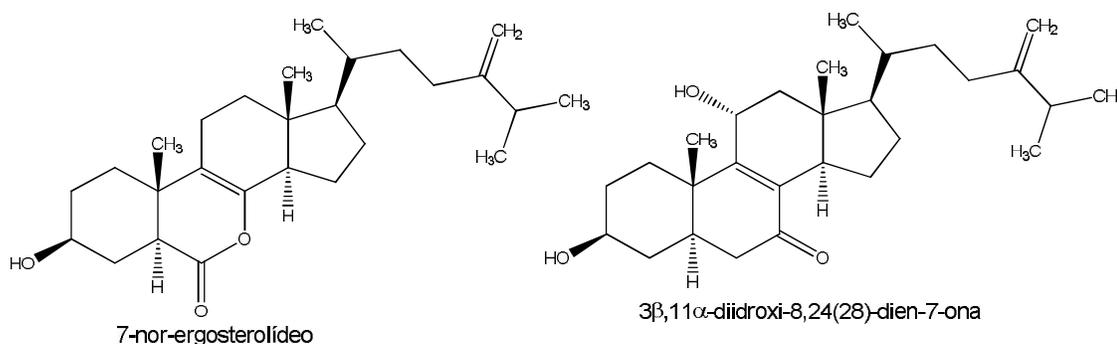
As espécies de *Aspergillus* são micro-organismos cosmopolitas, capazes de colonizar uma grande variedade de substratos (LAFORET, 2008). Em geral, são frequentes em climas tropicais e subtropicais (TANIWAKI; SILVA, 2001). Muitos possuem importância ecológica, genética, capacidade de exportação biotecnológica, sem falar de seus aspectos patogênicos e micotoxicológicos relacionados com o homem e os animais (POWELL *et al.*, 1994).

A aspergilose é uma infecção fúngica oportunista das mais comuns em todo o mundo, provocada por algumas das espécies do género *Aspergillus*. A maioria das infecções em humanos é causada por *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus* e como principal responsável tem o *A. fumigatus*. Estes fungos, então distribuídos na natureza, encontram-se no solo, no material orgânico em decomposição e podem originar vários quadros clínicos (JIANG *et al.*, 2013).

A inalação de esporos de fungos podem causar doenças pulmonares que vão desde a inflamação local das vias aéreas para infecções graves e com risco de vida do pulmão, tais como aspergilose broncopulmonar alérgica, aspergilose invasiva (BEISSWENGER *et al.*, 2012). A doença tem sido relatada por ocorrer principalmente como uma complicação em doentes com asma e fibrose cística (MURRAY *et al.*, 2006).

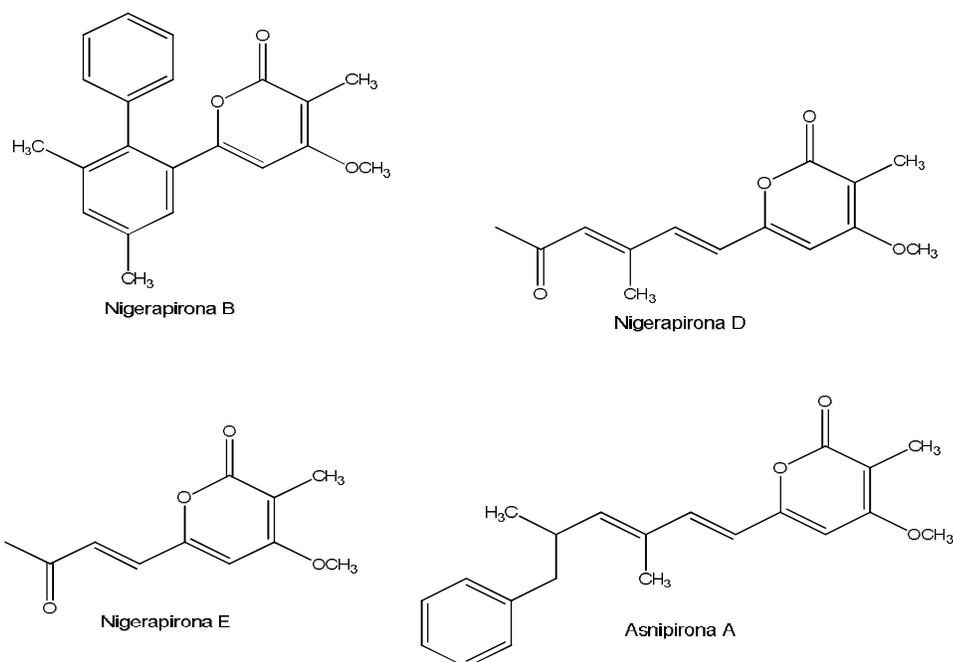
Cui e colaboradores (2010) obtiveram o fungo endofítico *A. ochraceus* EN-31 isolado da alga marrom *Sargassum kjellmanianum*, o qual teve seus metabólitos bioativos estudados. O 7-nor-ergosterolídeo (Figura 10) exibiu uma citotoxicidade contra linhagens de células NCI-H460, SMMC-7721 (hepatocarcinoma humano) e SW-1990 (adenocarcinoma pancreático) com valores de DL_{50} de 5,0 $\mu\text{g/mL}$; 7,0 $\mu\text{g/mL}$ e de 28,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O composto $3\beta,11\alpha$ -dihidroxi-8,24(28)-dien-7-ona (Figura 11) também apresentou citotoxicidade contra linhas de células SMMC-7721 com valor de DL_{50} de 28,0 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 10- Estruturas de metabólitos secundários bioativos isolados do fungo endofítico *Aspergillus ochraceus* EM-31.



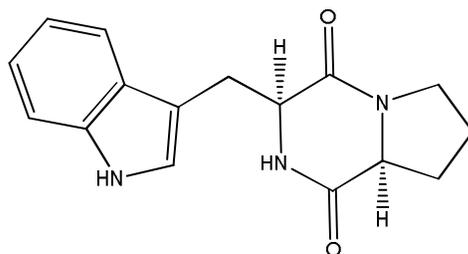
Liu e colaboradores (2011) obtiveram o fungo *A. niger* MA-132 isolado como endofítico do tecido interno da planta de mangue *Avicennia marina*, o qual teve seus metabólitos bioativos estudados. Os compostos nigerapirona B, D e E e asnipirona A (Figura 11) foram avaliados quanto ao seu potencial citotóxico contra as linhagens de células tumorais DU145 (câncer de próstata), HeLa (câncer cervical), HepG2 (hepatocarcinoma), MCF-7 (câncer epitelial), NCI-H460, A549 (carcinoma de pulmão), MDA-MB-231 (câncer de mama) e SW-1990. A nigerapirona B mostrou atividade seletiva contra HePG2 com valor de IC_{50} de 62 μ M, enquanto que a nigerapirona D exibiu atividade moderada e fraca contra as linhagens de célula MCF-7, HePG2 e A549 com valores de IC_{50} de 121 μ M, 81 μ M e 81 μ M, respectivamente. Já, a nigerapirona E apresentou atividade citotóxica contra as linhagens de célula SW-1990, MDA-MB-231 e A549 com valores de IC_{50} de 38 μ M, 48 μ M e 43 μ M, respectivamente. Além disso, a nigerapirona E também apresentou fracas e moderadas atividades citotóxicas contra MCF-7, HePG2, DU145, NCI-H460 e MDA-MB-231 com valores de DL_{50} de 105 μ M, 86 μ M, 86 μ M, 43 μ M e 48 μ M, respectivamente. Por fim, a asnipirona A exibiu atividade citotóxica contra a linhagem de célula A549 com valor de DL_{50} de 62 μ M.

Figura 11 – Estrutura de metabólitos secundários bioativos isolados do fungo endofítico *Aspergillus niger* MA-132.



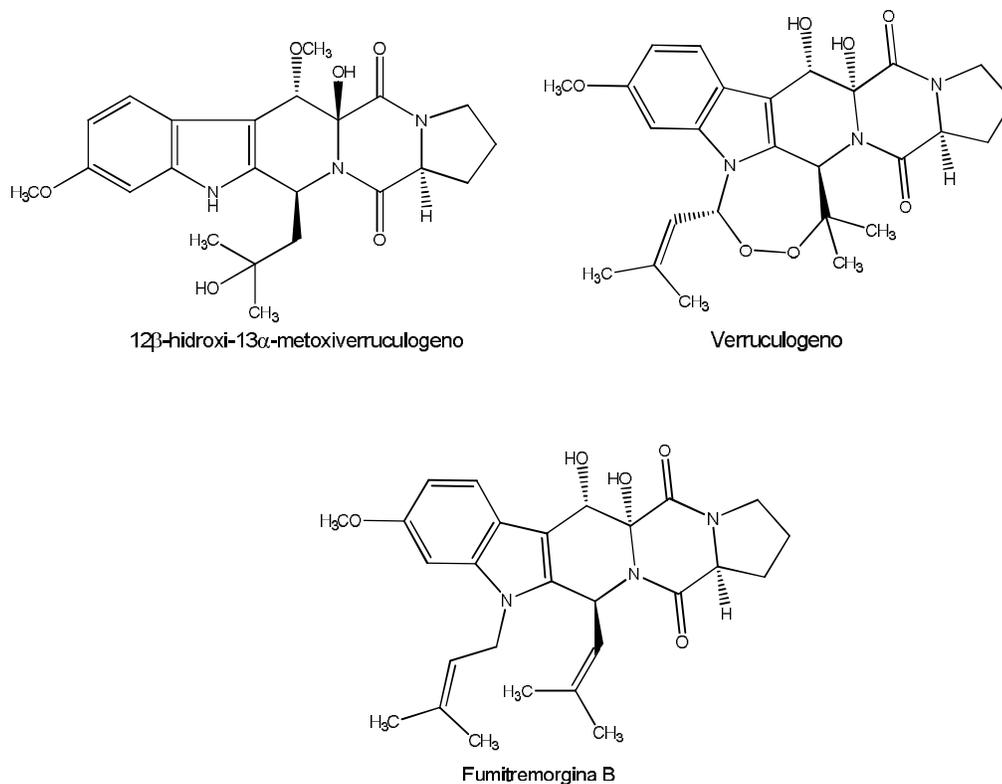
A brevianamida F (Figura 12), um alcalóide 14 indol dicetopiperazínido, foi obtida do fungo *A. fumigatus* isolado como endofítico de *Melia azeradach*. A brevianamida F foi identificado como um novo tipo de potencial inibidor de crescimento natural das plantas, inibindo, por exemplo, o nabo (*Raphanus sativus*) e o alongamento dos brotos de raiz do mesmo com IR (índice de retenção) de -0,76 ppm e -0,70 ppm, respectivamente, a 120 ppm e inibe, fortemente, o crescimento das mudas do amaranto (*Amaranthus mangostanus*) com alto IR de -0,9 ppm a 40 ppm (ZHANG *et al.*, 2013).

Figura 12- Estrutura da brevianamida F isolada do fungo endofítico *Aspergillus fumigatus*.



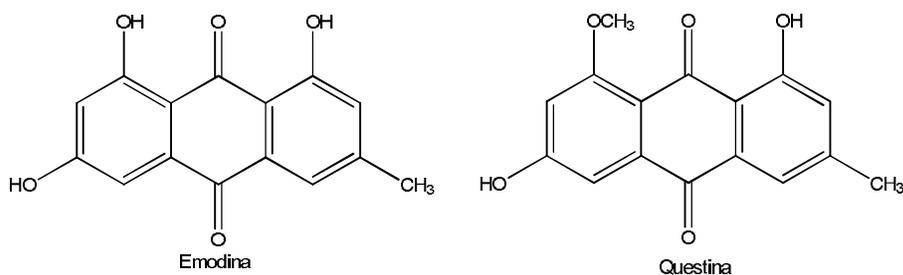
Li e colaboradores (2012) obtiveram o fungo endofítico *A. fumigatus* LN-4 isolado da casca do caule de *Melia azedarach*, o qual teve seus metabólitos bioativos estudados. O 12 β -hidroxi-13 α -metoxiverruculogeno, a fumitremorgina B e o verruculogeno (Figura 13, p. 47) exibiram atividades antifúngicas com valores de CIM de 6,25-50 μ g/mL contra os fungos patogênicos *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *A. alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum f. sp. Niveum*, *F. oxysporum f. sp. Vasinfectum* e *Gibberella saubinetii*. A fumitremorgina B e o verruculogeno exerceram letalidade moderada para camarões de água salgada e apresentaram toxicidade significativa com a concentração letal média com valores DL₅₀ de 13,6 mg/mL e 15,8 mg/mL, respectivamente. A fumitremorgina B e o verruculogeno são fagodeterrentes contra larvas de lagartas de borboletas (*Mythimna separata* Walter) e apresentaram AFI (atividade de índices anliamentares) de 50% e 55%, respectivamente.

Figura 13 – Estrutura de metabólitos secundários bioativos isolados do fungo endofítico *Aspergillus fumigatus* LN-4.



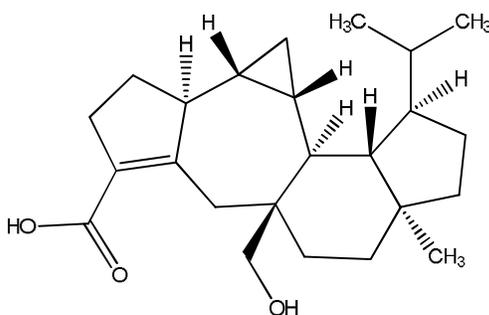
As antraquinonas emodina e questina (Figura 14) foram obtidas do fungo *A. sydowii* isolado como endofítico de *Scapania ciliata* S. Lac e apresentaram atividades imunossupressoras moderadas contra a proliferação induzida de Con A (concanavalina A) com os respectivos valores de DL₅₀ de 8,45 µg/mL e 10,10 µg/mL e contra LPS (lipopolissacarídeo) induzida, respectivamente, com valores de DL₅₀ de 10,25 µg/mL e 14,10 µg/mL (SONG *et al.*, 2013).

Figura 14- Estruturas de antraquinonas isoladas do fungo endofítico *Aspergillus sydowii*.



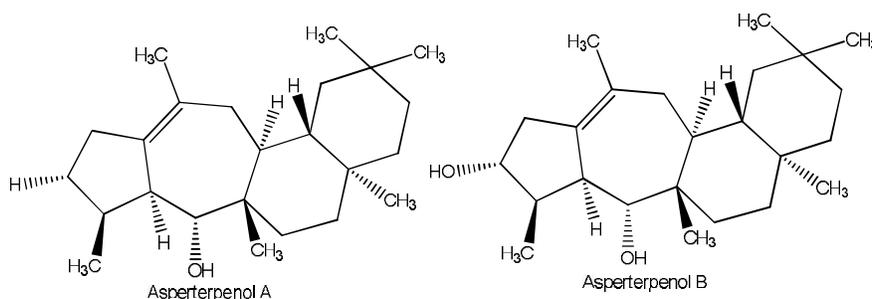
O novo sesterterpenoide asperterpenóide A (Figura 15) foi isolado do fungo endofítico *Aspergillus* sp. 16-5c e apresentou forte atividade inibidora da proteína tirosina fosfatase B (mPTPB) da bactéria *Mycobacterium tuberculosis* com valor de IC_{50} de 2,2 μ M (HUANG *et al.*, 2013).

Figura 15- Estrutura do asperterpenóide A isolado do fungo endofítico *Aspergillus* sp. 16-5uc.



Os novos sesterterpenoides asperterpenol A e asperterpenol B (Figura 16) foram isolados do fungo endofítico *Aspergillus* sp. 085242 e apresentaram forte atividade inibidora da acetilcolinesterase com valores de DL_{50} de 2,3 μ M e 3,0 μ M, respectivamente (XIAO *et al.*, 2013).

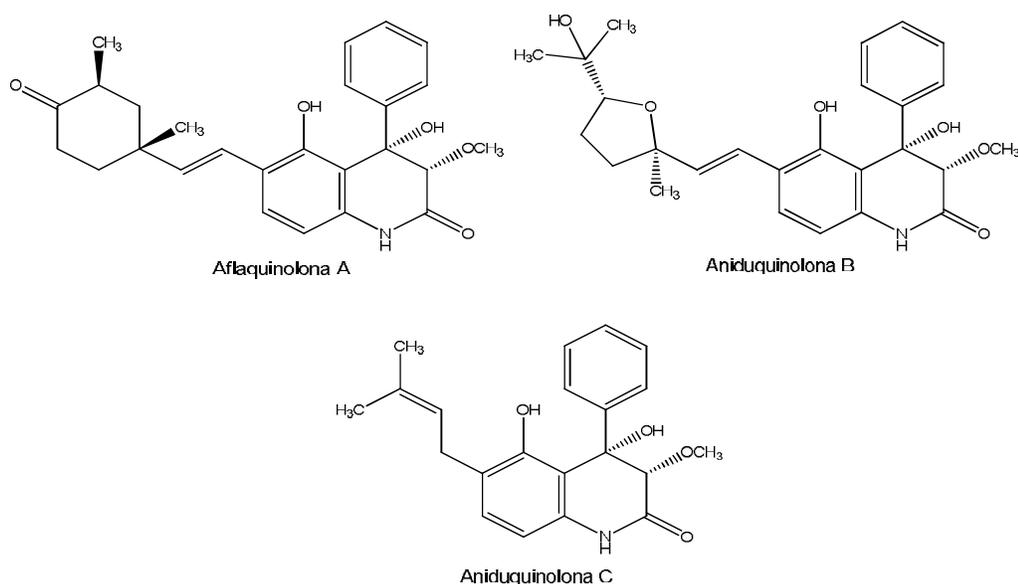
Figura 16- Estrutura de asperternóis isolados do fungo endofítico *Aspergillus* sp. 08242.



An e colaboradores (2013a) obtiveram o fungo *A. nidulans* MA-143 isolado como endofítico de folhas da planta de mangue marinho *Rhizophora stylosa*, o qual teve seus metabólitos bioativos estudados. A aflaquinolona A e seus dois novos derivados, a aniduquinolona B e a aniduquinolona C (Figura 17, p. 49), apresentaram potente atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e

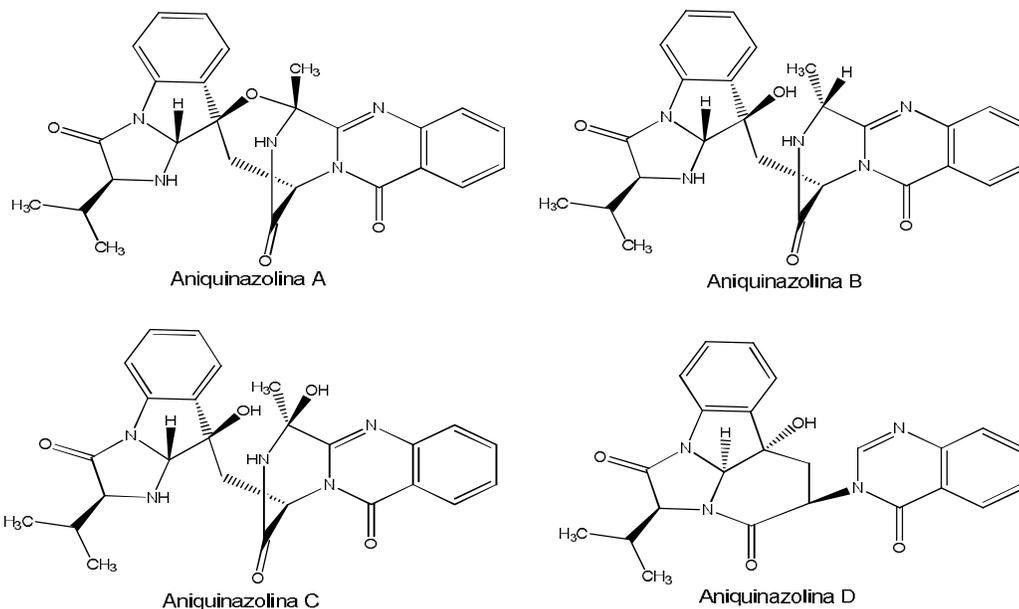
Staphylococcus aureus, forte citotoxicidade contra quatro linhagens de células tumorais BEL-7402 (hepatoma crônico), MDA-MB-231, HL-60 e K562 e exibiram uma modesta letalidade contra camarões de água salgada com valores de DL₅₀ de 5,5 μM; 7,1 μM; 4,5 μM, respectivamente.

Figura 17- Estrutura de compostos bioativos isolados do fungo endofítico *Aspergillus nidulans* MA-143.



Quatro novos alcaloides de quinazolinona, denominados de aniquinazolininas A-D (Figura 18, p. 50), foram obtidos do fungo *A. nidulans* MA-143 isolado como endofítico de folhas da planta de mangue *Rhizophora stylosa*. Os alcalóides aniquinazolininas A-D exibiram uma potente letalidade contra camarões de água salgada com valores de DL₅₀ de 1,27 μM, 2,11 μM, 4,95 μM e 3,42 μM, respectivamente (AN *et al.*, 2013b).

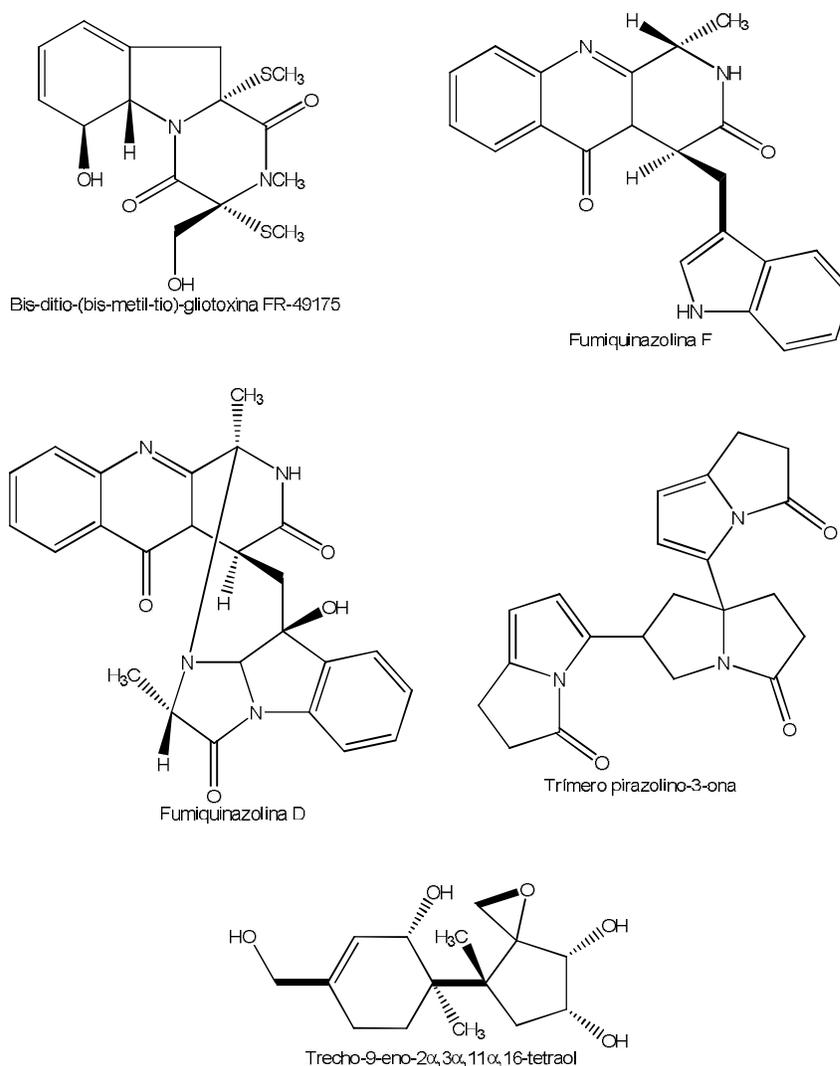
Figura 18- Estruturas de aniquinazolinonas isoladas do fungo endofítico *Aspergillus nidulans* MA-143.



Durante a pesquisa para metabólitos secundários bioativos de microorganismos, o fungo endofítico *A. fumigatus* sp. isolado R7 foi encontrado por produzir um conjunto de promissores compostos bioativos, após a sua fermentação em larga escala (SHAABAN *et al.*, 2013). As substâncias bis-ditio-(bis-metil-tio)-gliotoxina FR-49175, fumiquinazolina F, fumiquinazolina D, trímero pirazolino-3-ona e trecho-9-eno-2 α ,3 α ,11 α ,16-tetraol (Figura 19, p. 51) apresentaram, respectivamente, halo de inibição de 15 mm, 12 mm, 15 mm, 11 mm e 12 mm contra a bactéria *Staphylococcus aureus*. Já, fumiquinazolina F, fumiquinazolina D, trímero pirazolino-3-ona e trecho-9-eno-2 α ,3 α ,11 α ,16-tetraol mostraram halos de inibição de 12 mm, 11 mm, 13 mm e 13 mm contra a bactéria *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57). Todas as substâncias mostraram-se inativas contra a bactéria *Escherichia coli*. Quanto ao ensaio antifúngico, somente às substâncias fumiquinazolina F e fumiquinazolina D apresentaram, respectivamente, halos de inibição de 11 mm e 11 mm frente ao fungo *Candida albicans* e halos de inibição de 12 mm e 13 mm frente ao fungo *Mucor miehi*, respectivamente. Por fim, em relação ao ensaio preliminar de citotoxicidade, frente às larvas de camarões de água salgada (*Artemia salina*),

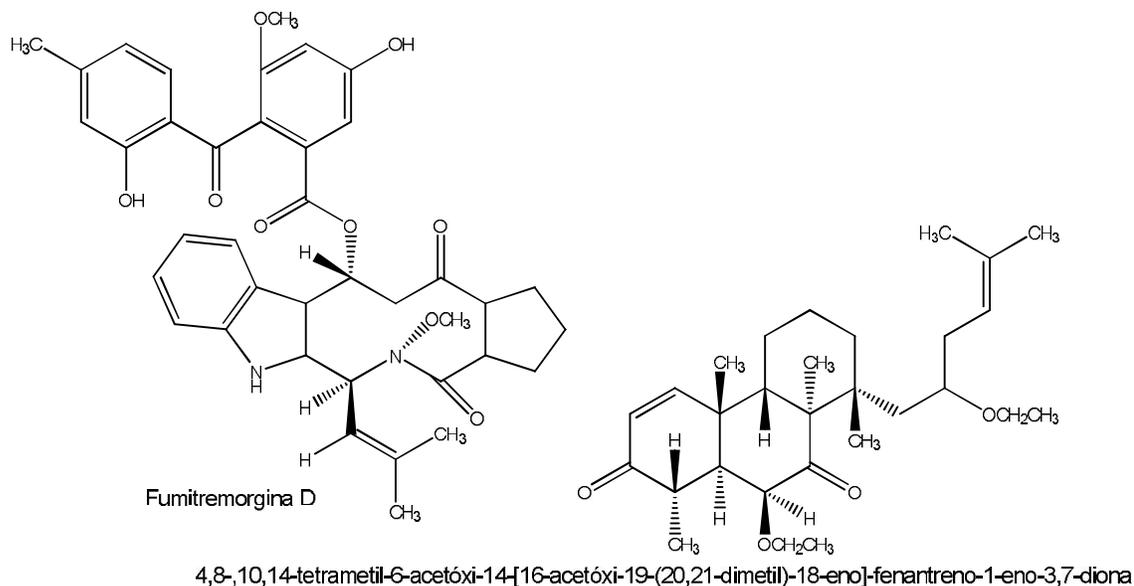
destacaram-se as substâncias fumiquinazolina F e fumiquinazolina D, respectivamente, com percentual de 85% e 80% de índice de morte de *A. salina*.

Figura 19- Estrutura de compostos bioativos isolados do fungo endofítico *Aspergillus fumigatus* R7.



Liang e colaboradores (2015) isolaram dois novos compostos, o alcaloide fumitremorgina D e o esteroide 4,8,10,14-tetrametil-[16-acetóxi-19-(20,21-dimetil)-18-eno]-fenantreno-1-eno-3,7-diona (Figura 20, p.52), do fungo endofítico *Aspergillus fumigatus* de *Diphylleia sinensis* L. Essas substâncias mostraram atividade citotóxica frente linhas de células HepG2 com valores de IC de 47,5 μ M e 139,9 μ M, respectivamente.

Figura 20- Substâncias citotóxicas frente linhas de células HepG2 isoladas do fungo *Aspergillus fumigatus* isolado como endofítico de *Diphylleia sinensis* L.



3.1.1.2 A espécie fúngica *Exserohilum rostratum* e seus metabólitos secundários bioativos

O fungo *Exserohilum rostratum* tem como primeiros identificadores Leonard e Suggs em 1974 (POLTRONIERI *et al.*, 2008). Este fungo foi isolado pela primeira vez como endofítico da espécie vegetal *Stemona* sp. coletada na província Ayutthaya na Tailândia (SAPPAPAN *et al.*, 2008). A espécie *E. rostratum* classifica-se, taxonomicamente, conforme apresentado no Quadro 02 (p. 53).

O fungo *E. rostratum* é patógeno de gramíneas e membro da Dothideomycetes, a maior e, ecologicamente, mais diversificada classe de Ascomycetes, que inclui um número ligeiro de patógenos de plantas agressivas bem como sapróbios (OHM *et al.*, 2012). Alguns táxons nesta classe, tais como *E. rostratum* e *Cochliobolus lunatus*, são conhecidos por serem patógenos humanos oportunistas e considerado “*crossover*” (micro-organismos que compartilham a mesma informação genética com outro) de patógenos (GAUTHIER; KELLER, 2013). Em 2012, a espécie *E. rostratum*, também conhecida como *Setosphaeria rostrata*, causou um surto de meningite na China (DONGLIANG; TURGEON, 2013).

Quadro 02. Classificação taxonômica do fungo endofítico *Exserohilum rostratum*:

Classificação taxonômica	Fungo <i>Exserohilum rostratum</i>
Domínio	Eukaryota
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Classe	Deuteromycetes
Ordem	Moniliales
Família	Dematiaceae
Gênero	<i>Exserohilum</i> (Forma assexuada) <i>Setosphaeria</i> (Forma sexuada)
Espécie	<i>Exserohilum rostratum</i> (Forma assexuada) <i>Setosphaeria rostrata</i> (Forma sexuada)

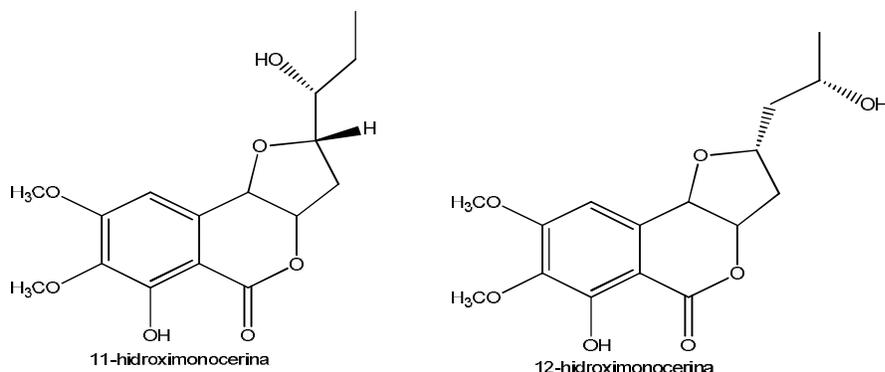
Fonte: REIS *et al.*, 2004.

Existem outros relatos na literatura em que o *E. rostratum* apresenta condição fitopatogênica ao invés de mutualista em plantas como no açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) do município de São Domingos (MA), onde foram observadas pequenas manchas foliares de coloração pardo-avermelhadas que coalesciam, resultando no secamento das folhas (POLTRONIERI *et al.*, 2008). *E. rostratum* também é encontrado como fitopatógeno de outras espécies vegetais doentes, tais como em *Heliconia stricta* (anão jamaicano) usado em decorações, em *Chrysalidocarpus lutescens* (CÚNDOM, 2006), no algodão (gênero botânico *Gossypium* L.) (MIRZAEI *et al.*, 2010), no ananás (*Ananas comosus*) (LUO *et al.*, 2012) e na banana (*Musa parasidiaca* L.) (SHAN-HAI *et al.*, 2011).

As lesões nas folhas causadas pelo *Exserohilum rostratum*, dependendo da espécie vegetal, diferem no tamanho e tom de cor, porém, apresentam alguns aspectos característicos, como o desenvolvimento de manchas ovais e marrons, com margens ligeiramente amareladas, e também, as lesões que se expandem em número e tamanho coalescendo em todo o tecido foliar, levando ao aparecimento de perfurações nas mesmas (POLTRONIERI *et al.*, 2008).

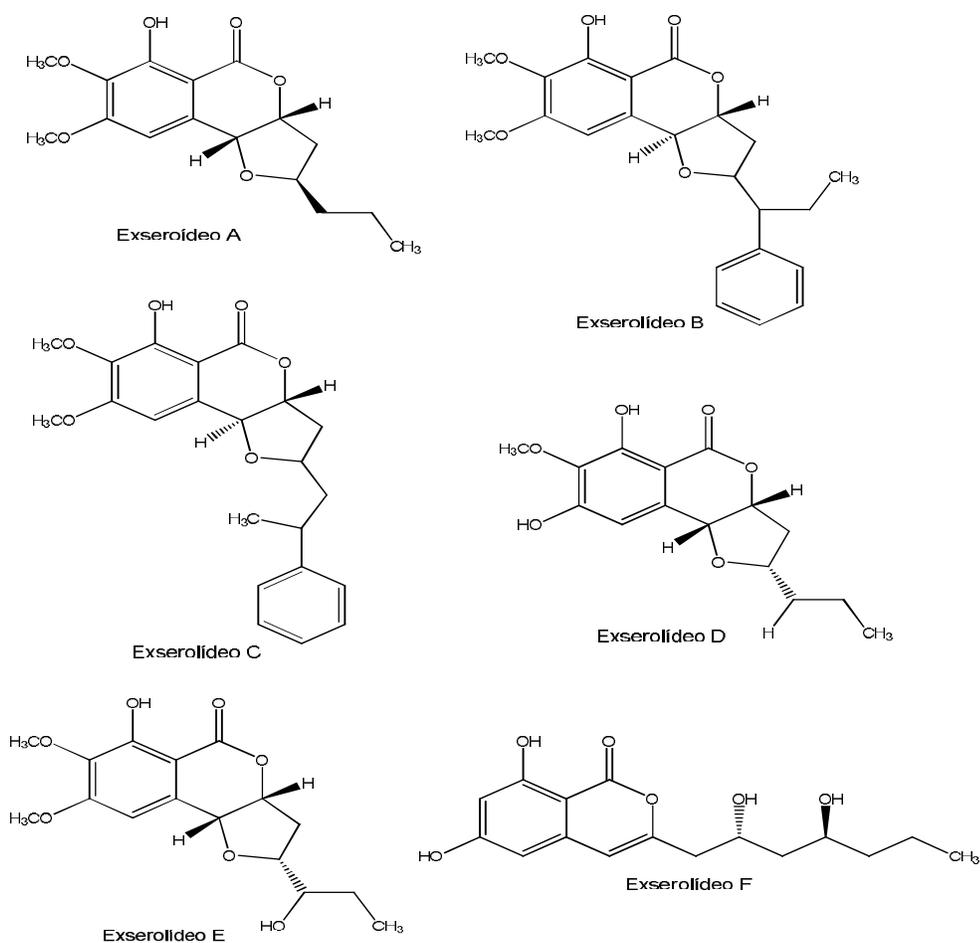
Na literatura são encontrados poucos trabalhos relatando a produção de metabólitos secundários de *E. rostratum*. As isocumarinas 11-hidroximonocerina e 12-hidroximonocerina (Figura 21, p. 54) foram isoladas de cultura de *E. rostratum* obtido como endofítico de *Stemona* sp. A 11-hidroximonocerina apresenta atividade antimalárica contra o *Plasmodium falciparum* (K1, cepa multiresistente) com os respectivos valores de DL₅₀ igual a 0,68 µM e 7,70 µM (SAPPAPAN *et al.*, 2008).

Figura 21- Estruturas de isocumarinas isoladas do fungo endofítico *Exserohilum rostratum*.



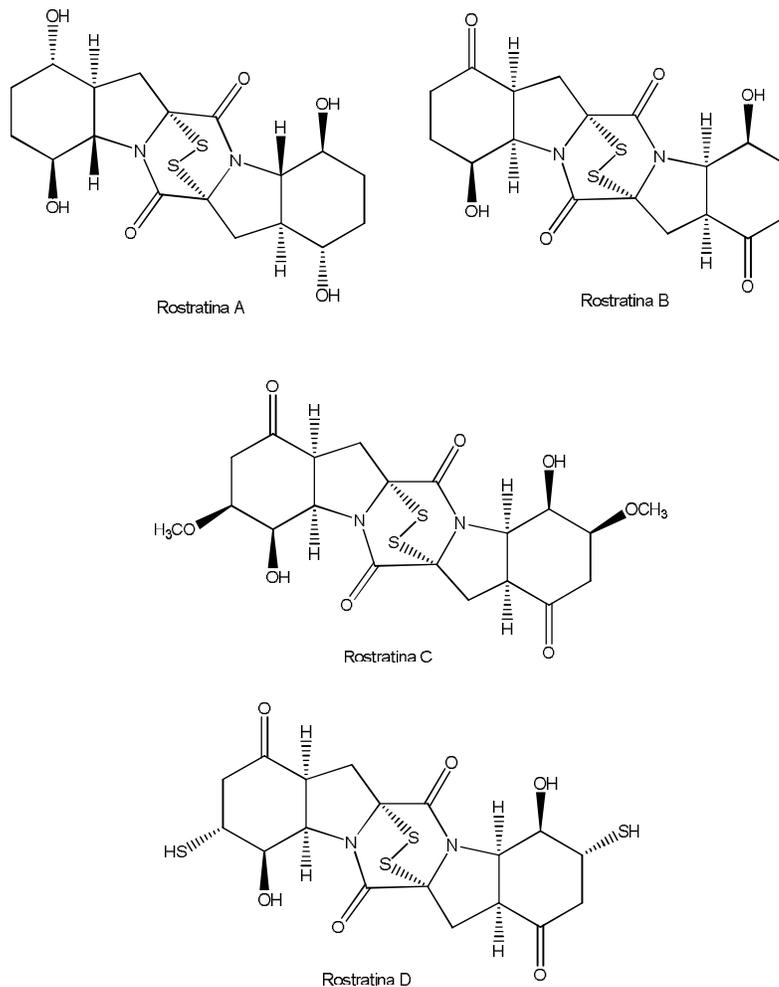
Os exserolídeos (Figura 22, p. 55), novos derivados bioativos de isocumarinas, foram obtidas do fungo *Exserohilum* sp. isolado como endofítico de *Acer truncatum* Bunge. Os compostos inéditos foram testados frente às bactérias *Bacillus subtilis* (ATCC 6.633), *Staphylococcus aureus* (CGMCC 12.465), *Streptococcus pneumoniae* (CGMCC 11.692) e *Escherichia coli* (CGMCC 12.340), e quanto à sua atividade antifúngica frente ao fungo *Fusarium oxysporum* (CGMCC 32830), destacam-se as substâncias exserolídeos C e F. O composto exserolídeo C apresentou atividade antifúngica contra *F. oxysporum* com valor de CIM de 20 µg/mL, enquanto que o controle positivo anfotericina B apresentou um valor de CIM de 0,63 µg/mL. Já, a substância exserolídeo F exibiu atividades antimicrobianas significativas frente às bactérias Gram-positivas *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. pneumoniae* com respectivos valores de CIM de 20 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL (o controle positivo ampicilina mostrou os valores de CIM de 1,25 µg/mL; 0,16 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente) e também frente à bactéria Gram-negativa *E. coli* com valor de CIM de 20 µg/mL (o controle positivo gentamicina mostrou um valor de CIM de 2,5 µg/mL (LI *et al.*, 2014).

Figura 22 – Estruturas de exserolídeos isolados do fungo endofítico *Exserohilum* sp.



As rostratinas A, B, C e D (Figura 23, p. 56), substâncias pertencentes à classe de dissulfeto de dicetopiperazina, foram obtidas da cultura de *E.rostratum* isolado de cianobactérias marinhas, coletadas próximo à Ilha de Lanai, no Havaí, em 1997, e mostraram, *in vitro*, citotoxicidade contra o carcinoma do cólon humano com valores de DL₅₀ de 8,5 µg/mL; 1,9 µg/mL; 0,76 µg/mL e 16,5 µg/mL respectivamente (TAN *et al.*, 2004).

Figura 23 - Estruturas de rostratinas isoladas do fungo endofítico *Exserohilum rostratum*.



3.1.2 Fungos de solo e seus metabólitos secundários bioativos

O solo é constituído das frações orgânica e inorgânica (rochas e minerais) e é habitado por inúmeras espécies, formando um ecossistema. Os micro-organismos fazem parte do solo de uma maneira indissociável, sendo responsáveis por inúmeras reações bioquímicas, relacionadas não só com a transformação da matéria orgânica, mas também com intemperismo das rochas. Assim, os micro-organismos do solo desempenham papel fundamental na gênese do solo e ainda atuam como reguladores de nutrientes, pela decomposição da matéria orgânica e ciclagem dos elementos, atuando, portanto, como fonte e dreno de nutrientes para o crescimento das plantas (ANDREOLA; FERNANDES, 2007).

Os micro-organismos do solo, também são chamados, coletivamente, de microbiota e são representados por cinco grandes grupos: bactérias, actinomicetos, fungos, algas e protozoários (ANDREOLA; FERNANDES, 2007). Muitos micro-organismos se encontram concentrados no solo rizosférico devido ao aumento de disponibilidade de substrato (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Vários micro-organismos de solo apresentam reações de antagonismo a patógenos, mantendo em equilíbrio estas populações, sendo que estudos apontam que o maior controle é apresentado na cultura de origem dos mesmos (ZAMBONI-PINOTTI, 2005).

O solo, visto como um componente crítico na biosfera terrestre, funciona não só como sistema de produção agrícola, mas também na manutenção da qualidade ambiental com efeito local e regional, podendo ser caracterizado como um corpo natural organizado, vivo e dinâmico, que desempenha inúmeras funções no ecossistema terrestre (REETZ, 2007). O manejo do solo é, portanto, sinônimo de fertilidade e extremamente importante quando se trata de micro-organismos relacionados a diferentes culturas que se encontram neste. Esta enorme diversidade microbiana interligada entre si sofre em condições adversas que podem ocasionar a seleção dos mais resistentes, determinando perdas de espécies importantes ao desenvolvimento destas culturas. Dentre os micro-organismos de solo, a biomassa fúngica é predominante e nela se encontram várias espécies com potencial antagônico e de promoção de crescimento, entre outros (KURAKOV *et al.*, 2008).

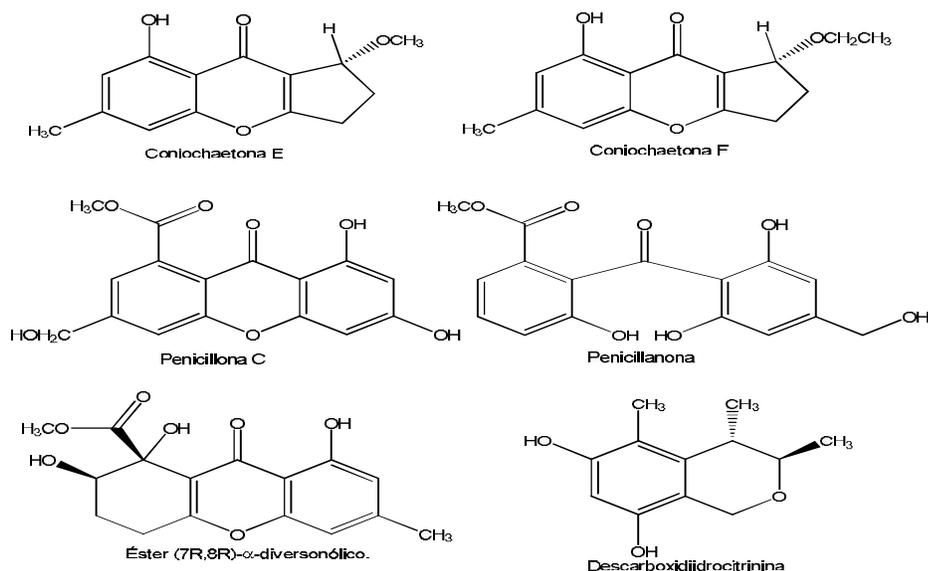
A atividade fúngica depende do conteúdo de matéria orgânica no solo, a qual determina sobremaneira a ocorrência e a distribuição desses organismos. O conhecimento do solo, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram, pode levar ao descobrimento de processos metabólicos utilizados por estes organismos tornando-se importantes para as interações ambientais e em aplicações biotecnológicas (RUEGGER; TAUKTORNISIELO, 2004).

A maioria dos micro-organismos produtores de antibióticos é comumente encontrada no solo, dos quais muitos com propriedades de uso na agricultura e na medicina, entre os quais se destacam espécies de *Penicillium* e *Cephalosporium* (STROBEL; DAISY, 2003).

Foram isolados quatro novos compostos, a coniochaetona E, a coniochaetona F, a penicillona C e a penicillanona, e também os compostos ésteres (7*R*,8*R*)- α -

diversonólico e a descarboxidiidrocitrinina (Figura 24) do fungo de solo *Penicillium citrinum* PSU-RSPG95. A atividade citotóxica dos metabólitos secundários foi avaliada contra as linhagens de células KB, NCI-H137, MCF-7 e células noncancerígenas Vero. Os compostos mostraram-se inativos nos testes citotóxicos contra as referidas linhagens de células, enquanto que o composto éster (7R,8R)- α -diversonólico exibiu atividade citotóxica moderada contra as linhagens de células KB, NCI-H137, MCF-7 e células noncancerígenas Vero com valores de DL₅₀ de 29 μ M, 44 μ M, 95 μ M e 30 μ M, respectivamente. Além disso, o composto descarboxidiidrocitrinina mostrou atividade citotóxica fraca contra a linhagem de célula NCI-H137 com valor de DL₅₀ de 237 μ M, mas não apresentou nenhuma citotoxicidade contra as linhagens de célula MCF-7 (TRISUWAN *et al.*, 2014).

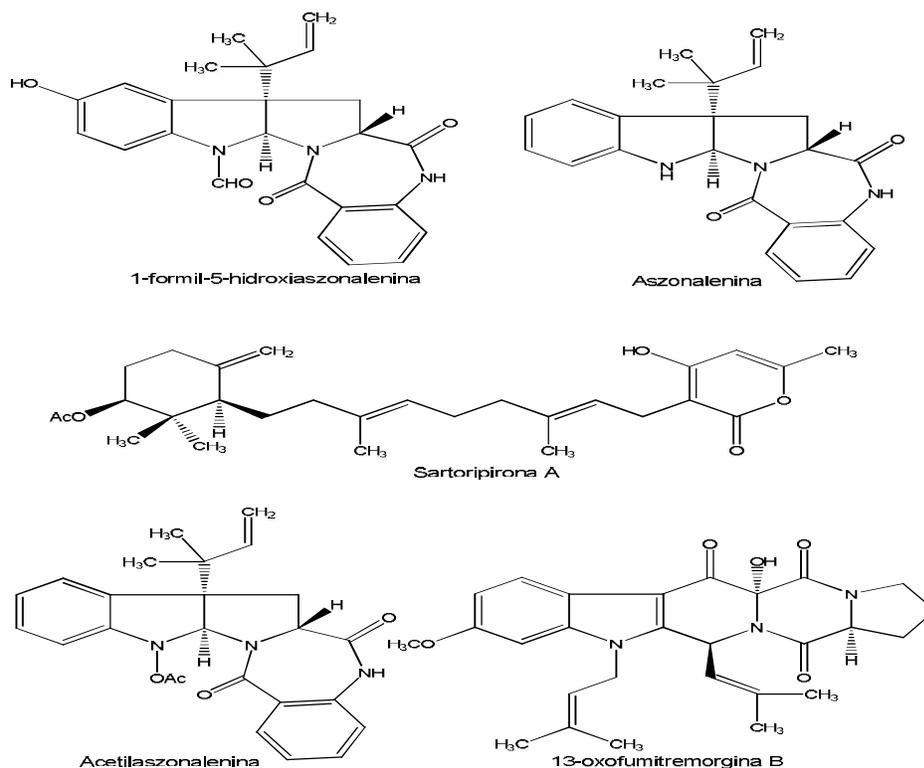
Figura 24- Estruturas de substâncias bioativas isoladas do fungo de solo *Penicillium citrinum* PSU-RSPG95.



Eamvijarn e colaboradores (2013) estudaram o fungo *Neosartorya fischeri* (KUFC6344) isolado do solo da floresta costeira da Ilha Samaersarn, localizada na província de Chonburi, na Tailândia, cujo fungo teve seus metabólitos bioativos estudados. Foram isolados do referido fungo um novo composto, o 1-formil-5-hidroxiasonalenina, e um novo meroditerpeno, a sartoripirona A, juntamente com a aszonalenina, a acetilaszonalenina, a aszonapirona A, a 13-oxofumitremorgina B

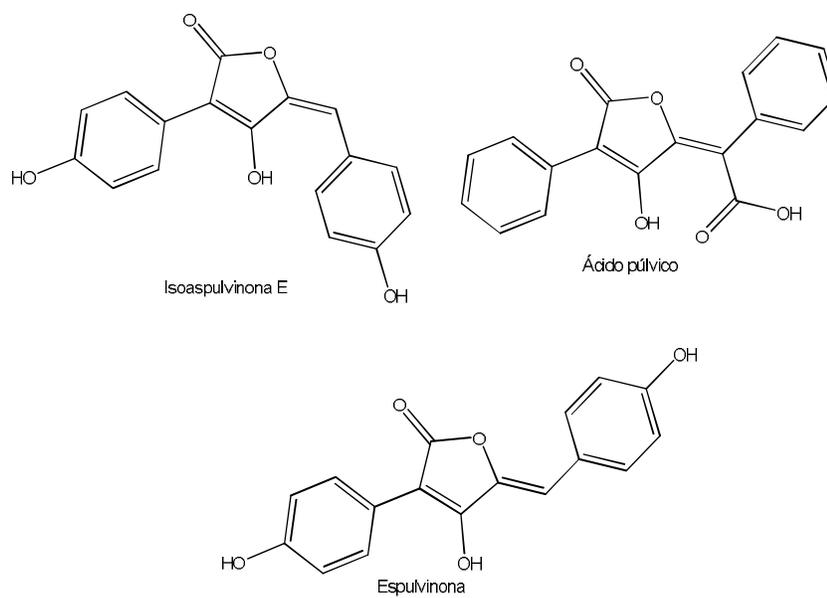
(Figura 25), cujas atividades foram avaliadas contra três importantes células tumorais de seres humanos MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-H460 (câncer de pulmão) e A375-C5 (melanoma) pelo método do corante SRB (sulforrodamina B) de ligação protéica. As substâncias acetilaszonalenina, aszonalenina e 1-formil-5-hidroxiaszonalenina apresentaram atividades anticancerígenas com valores maiores que 150 μM frente às células tumorais MCF-7, NCI-H460 e A375-C5. A substância sartoripirona A apresentou DL_{50} de $46,3 \pm 7,6$ frente à célula tumoral MCF-7, de $37,3 \pm 4,0$ frente à célula tumoral NCI-H460 e $21,5 \pm 1,9$ frente à célula tumoral A375-C5. Por fim, o composto 13-oxofumitremorgina B apresentou DL_{50} de $115,2 \pm 20,0$ frente à célula tumoral MCF-7, de $123,3 \pm 11,5$ frente à célula tumoral NCI-H460 e de $68,6 \pm 12,9$ frente à célula tumoral A375-C5.

Figura 25- Estruturas com atividade antitumoral isoladas do fungo de solo *Neosartoya fischeri*.



Gao e colaboradores (2013a) estudaram o fungo *Aspergillus terreus* Gwq-48 isolado do solo rizosférico de um mangue localizado na costa da província de Fujian, cujo fungo teve seus metabólitos bioativos estudados. A isoaspulvinona E, a aspulvinona E e o ácido púlvico (Figura 26) apresentaram significativa atividade contra o vírus H1N1 da influenza A com os respectivos valores de DL₅₀ de 32,3 µg/mL; 56,9 µg/mL e 29,1 µg/mL, respectivamente.

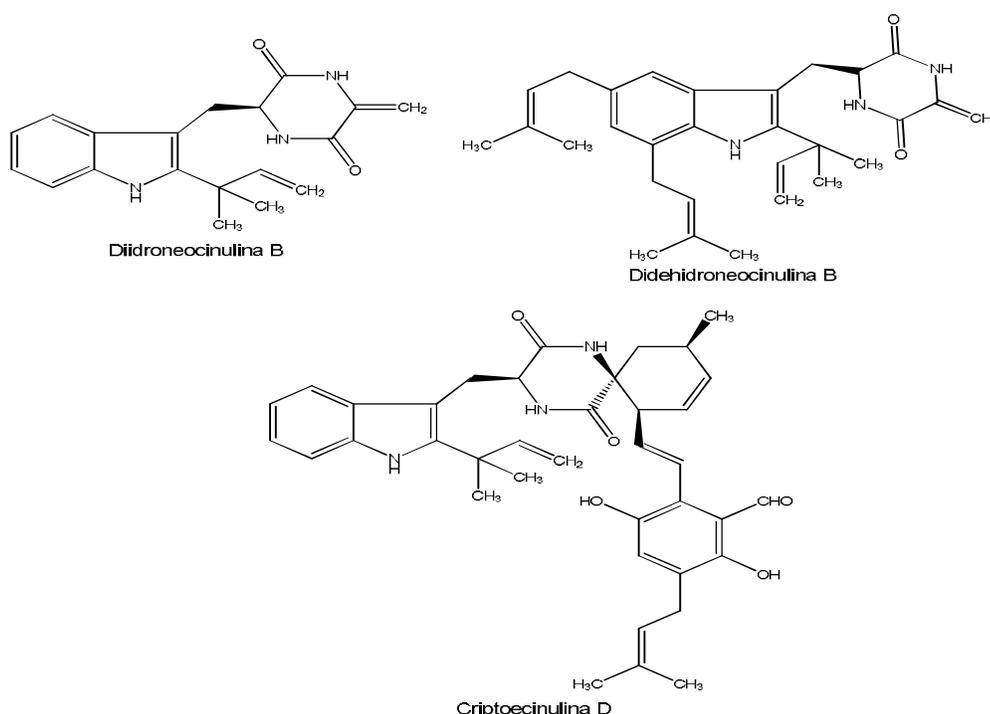
Figura 26- Estruturas com atividade antiviral isoladas do fungo de solo *Aspergillus terreus* Gwq-48.



Gao e colaboradores (2013b) estudaram o fungo *Aspergillus effuses* H1-1 isolado do solo rizosférico de um mangue, cujo fungo teve seus metabólitos bioativos estudados. O novo alcalóide diidroneocinulina B e os compostos didehidroecinulina B e criptoecinulina D (Figura 27, p. 61) foram avaliados preliminarmente quanto ao seu potencial citotóxico contra as linhagens de células P-388, HL-60, BEL-7402 e A-549 através do método SRB ou MTT (teste de redução do tetrazólio). A diidroneocinulina B mostrou fraca atividade contra as linhagens de células BEL-7402 and A-549 e não apresentou atividade citotóxica para as demais. A didehidroecinulina B exibiu significativa atividade inibitória contra as linhas de célula A-549 e BEL-7402 com os respectivos valores de IC₅₀ de 1,43 µM e 4,20 µM;

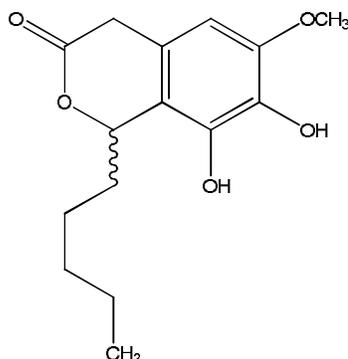
enquanto que a criptoecinulina D apresentou significativa atividade contra as linhas de célula P-388 com valor de DL₅₀ de 3,43 µM.

Figura 27- Estruturas com atividade citotóxica isoladas do fungo de solo *Aspergillus effuses* H1-1.



Ishii e colaboradores (2013) obtiveram um novo composto antimicrobiano denominado de citosporona S (Figura 28, p. 62), que foi isolado do fungo *Trichoderma* sp. FKI-6626 (coletado no solo de Haja-jima, Ilhas Bonin, em Tóquio, no Japão). O novo composto apresentou atividade antimicrobiana contra diversas cepas bacterianas e fúngicas. A substância citosporona S apresentou atividade bacteriológica com valor de CIM= 50 µg/mL frente às bactérias *Staphylococcus aureus* KB210 (ATCC 6538p), KB335, KB349, *Staphylococcus epidermidis* KB352 (NBRC 12993), *Bacillus subtilis* KB355 (NBRC 3134), *Bacillus cereus* KB143 (NBRC 3001), *Kocuria rhizophila* KB212 (ATCC 9341) e *Mycobacterium smegatis* KB242 (ATCC 607). Quanto ao ensaio antifúngico, a citosporona S foi ativa contra os fungos *Candida albicans* KF1, *Saccharomyces cerevisiae* KF26, *Aspergillus oryzae* KF439, *Aspergillus niger* KF104 e *Mucor racemous* KF223 com os respectivos valores de CIM= 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 50 µg/mL; 50 µg/mL e 100 µg/mL.

Figura 28- Estrutura da citosporona S isolada do fungo de solo *Trichoderma* sp. FKI-6626.



3.2 BACTÉRIAS

As bactérias são organismos unicelulares, procariontes, podem ser aeróbias, anaeróbias ou ainda serem anaeróbias facultativas. As bactérias são um dos organismos mais antigos, com evidência encontrada em rochas de 3,8 bilhões de anos (CRAPEZ, 2002).

As bactérias foram descobertas por Antoni van Leeuwenhoek em 1683. A palavra “*bacterium*” foi introduzida pelo microbiologista alemão C.G. Ehrenberg, em 1828, que a foi buscar na língua grega, na qual *βακτηριον* significa “pequeno bastão” (em alusão às bactérias com essa forma) (MADIGAN; MARTINKO, 2005).

O termo “*antibiose*” foi proposto por Vuillemin em 1889 para definir o antagonismo entre seres vivos, é um processo natural de seleção onde um ser vivo destrói outro para assegurar sua sobrevivência. Isso é conhecido desde o surgimento da era bacteriana, em que certos germes não cresciam na presença de outros, conforme assinalado por Pasteur e Joubert em 1877, nas suas experiências como o bacilo do antrax (RIBEIRO *et al.*, 2009). O termo “*antibiótico*” foi proposto por Waksman em 1942 e utilizado para definir substâncias produzidas por seres vivos microscópicos, capazes de agir em pequenas concentrações sobre micro-organismos patogênicos (CLARDY *et al.*, 2009).

A possibilidade de micro-organismos, como bactérias, serem causadores de processos infecciosos começou a ser levantada no início do século XIX e cientistas como Robert Koch identificaram micro-organismos responsáveis por doenças como tuberculose, cólera e febre tifoide. Nessa época, as pesquisas eram conduzidas na

busca de agentes químicos que apresentassem atividade antimicrobiana (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

O pesquisador Paul Ehrlich, conhecido como pai da quimioterapia, foi responsável pelos conceitos primários de que uma substância química poderia interferir na proliferação de micro-organismos patogênicos como as bactérias, em concentrações toleráveis pelo hospedeiro (PATRICK, 2009). Em 1910, Paul Ehrlich no seu laboratório juntamente com o químico Alfred Bertheim e o bacteriologista Sahachiro Hata desenvolveram o primeiro antibiótico de origem sintética, o salvarsan, medicamento usado contra a sífilis, doença sexualmente transmissível, endêmica e quase incurável na época, causada pela bactéria *Treponema pallidum* (AMINOV, 2010).

Algumas espécies bacterianas são consideradas naturalmente resistentes aos antibacterianos (resistência primária), pois somente concentrações inviáveis *in vivo* exerceriam efeito sobre elas. Sob exposição continuada a antimicrobianos, apresentam resistência adquirida (secundária), decorrente do desenvolvimento de novos mecanismos de defesa (FUCHS; WANNMACHER, 1999). Algumas células podem adquirir mutações genéticas aleatoriamente que podem proporcionar resistência a algum antibiótico (DECAMP; MORIARTHY, 2006). Denomina-se resistência simples quando o germe é resistente a uma só droga; resistência múltipla, quando simultaneamente a duas ou mais (TAVARES, 2001).

A resistência pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como uma resposta da bactéria frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente (DEMAIN, 2002). As bactérias multiplicam-se rapidamente, sofrem mutação e são promíscuas, podendo trocar material genético entre linhagens de mesma espécie ou espécies diferentes. São consideradas micro-organismos de alta capacidade de adaptação a diversos fatores, como a exposição a agentes químicos potentes (FERNANDES, 2006).

Para que ocorra a resistência adquirida a antibióticos é necessário ganho ou alteração temporária ou permanente da informação genética bacteriana. A maioria dos genes de resistência está presente em plasmídios, que podem ser trocados com elementos cromossomais. A resistência a antibióticos pode ser realizada por três mecanismos principais: diminuição da absorção ou aumento do efluxo do antibiótico;

alteração do sítio-alvo do antibiótico e obtenção da habilidade de destruir ou modificar o antibiótico (STROHL *et al.*, 2004).

Alexander Fleming já havia descrito sobre a problemática da resistência dos antibióticos às bactérias, bem antes da descoberta da penicilina quando observou que bactérias como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* não eram inibidas pela penicilina, caracterizando a resistência natural (NICOLAOU; MONTAGNON, 2009).

O primeiro exemplo de aquisição de resistência por bactérias foi dado pela *Staphylococcus aureus*. No início da utilização da penicilina G em grande escala, durante a Segunda Guerra Mundial, quase 100% desses micro-organismos eram sensíveis. Seis anos depois cerca de 5% das cepas já eram conhecidas, em 1959 já se contavam um valor de 80% e, atualmente, a resistência atinge quase 100% (SALLES; SALLES, 2000).

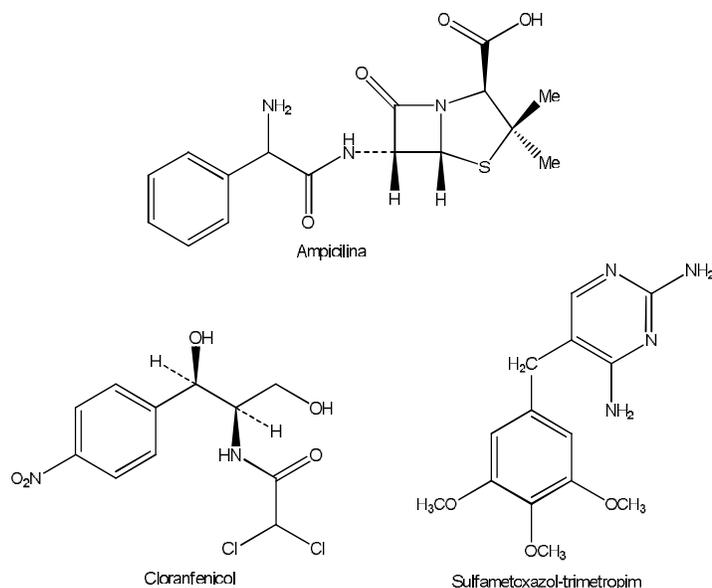
A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a resistência de bactérias aos antibióticos uma série ameaça. Recentemente, o problema tem chamado a atenção depois de casos recorrentes de infecção por micro-organismos resistentes em hospitais. Segundo a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Brasil, a taxa de infecção hospitalar é de 15% mais alta do que em países da Europa e nos Estados Unidos, onde o mesmo índice é de 10% (MOUTINHO, 2015).

O desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas é um problema importante no tratamento de doenças infecciosas causadas por micro-organismos patogênicos (VIMAL *et al.*, 2009). Em 2013, as doenças infecciosas foram uma das principais causas de morte no mundo, representando 25% de todas as mortes (LIMA, 2013). Recentemente, um estudo encomendado pelo governo britânico indicou que, a partir de 2050, pelo menos 10 milhões de pessoas poderão morrer a cada ano por causa das superbactérias, com os custos de tratamento estimados em 100 trilhões de dólares (TANJI, 2015).

Agentes antimicrobianos são adotados de forma essencial para cuidados com a saúde humana e animal. São usados em diferentes ambientes e com diferentes propósitos para prevenir ou curar, fato que promove o surgimento de cepas com múltipla resistência a agentes microbianos, caracterizando um problema de saúde pública (FAO/ OIE/ WHO, 2006) especialmente no tratamento de infecções invasivas. No passado, a ampicilina, o cloranfenicol e o sulfametoxazol-trimetropim

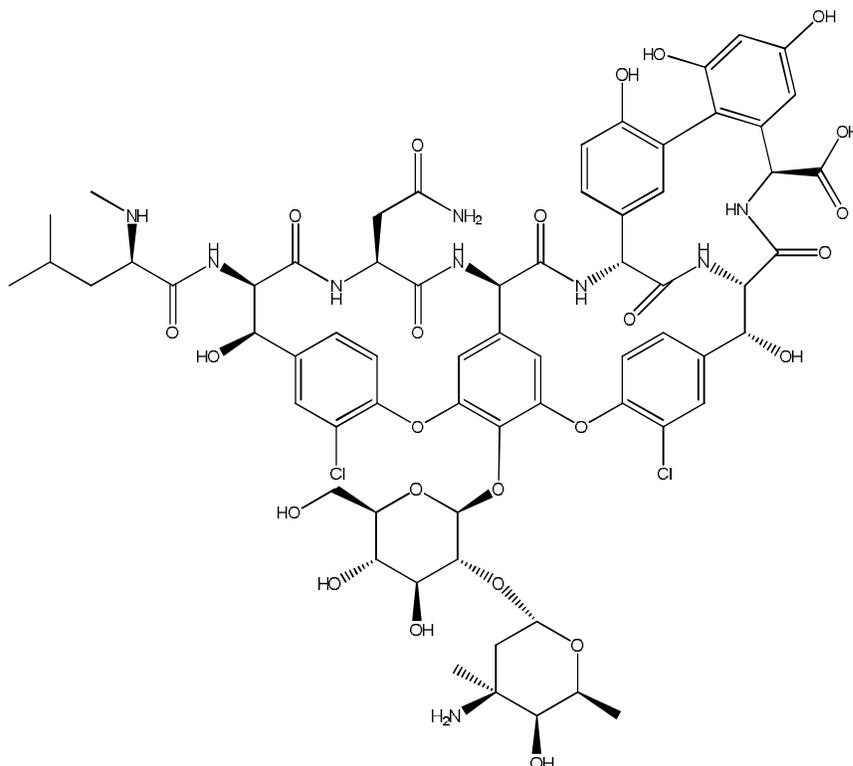
(Figura 29) eram considerados como "tratamento de escolha" para infecções provocadas por *Salmonella* (McDONALD *et al.*, 1987), o que hoje não se observa devido à resistência adquirida a estes antimicrobianos.

Figura 29- Substâncias antimicrobianas utilizadas no tratamento de infecções causadas por bactérias do gênero *Salmonella*.



As bactérias são essenciais à vida e muitas delas estão presentes em nosso corpo auxiliando em diversas funções, inclusive na absorção de vitaminas (HIRATA, 2008). E como qualquer ser vivo, elas vão se adaptando e desenvolvendo mecanismos de defesa cada vez mais sofisticados. O problema é que, com isso, podem neutralizar ou destruir a ação de certos medicamentos como os antibióticos, que são armas eficazes de defesa quando bem indicadas, mas o uso indiscriminado (incluindo a automedicação) propiciou o aumento da resistência bacteriana e assim a criação das chamadas superbactérias (NICOLAOU; MONTAGNON, 2009). Dentro da nova safra de superbactérias, a mais preocupante é a *Staphylococcus aureus*, resistente à meticilina (antiinfecioso potente usado em casos de infecção hospitalar), ou MRSA (na sigla em inglês correspondente a Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*). No entanto, essa bactéria já desenvolveu outras versões tão ou igualmente perigosas. No Japão, por exemplo, foram encontradas cepas da *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina (Figura 30, p. 66), o antiinfecioso mais poderoso já criado pela indústria farmacêutica (HIRATA, 2008).

Figura 30- Estrutura da vancomicina.



Seguem algumas informações a respeito das cinco bactérias que foram utilizadas nos ensaios antimicrobianos dos extratos brutos e das substâncias isoladas deste trabalho.

3.2.1 *Bacillus subtilis*

A bactéria *Bacillus subtilis* é uma bactéria Gram positiva que possui característica ubíqua comumente encontrada na água, solo, ar e decomposição de resíduos vegetais. A bactéria produz endósporos que lhe permite suportar condições extremas de calor e ressecamento do ambiente, além disso, uma variedade de proteases e outras enzimas que permitam degradar uma grande variedade de substratos naturais. No entanto, na maioria das condições do organismo não é biologicamente ativo, mas existe sob a forma de esporos.

O *B. subtilis* (Figura 31, p.67) é saprófito e não é patogênico, podendo ser encontrado tanto no solo como na água. São bacilos conhecidos como "bacilos da grama" ou "bacilos de feno", toleram condições ambientais atípicas, por isso estão presentes frequentemente em alimentos estragados, conferindo aquela "aparência lingueta" ao arroz, ao bolo, ao pão, por exemplo. Por não ser um patógeno

humano, o *B. subtilis* é muito utilizado na agricultura e na horticultura ou como aditivo em detergentes de roupa. Esta bactéria foi utilizada em pesquisas pelo Departamento de Defesa dos EUA no "Projeto SHAD" – fabricação de armas químicas e biológicas durante a Guerra Fria (ARAÚJO, 2010).

Figura 31- Fotografia microscópica de *Bacillus subtilis*.



Fonte: ARAÚJO, 2010. Disponível em <http://www.infoescola.com/reino-monera/bacillus-subtilis>.

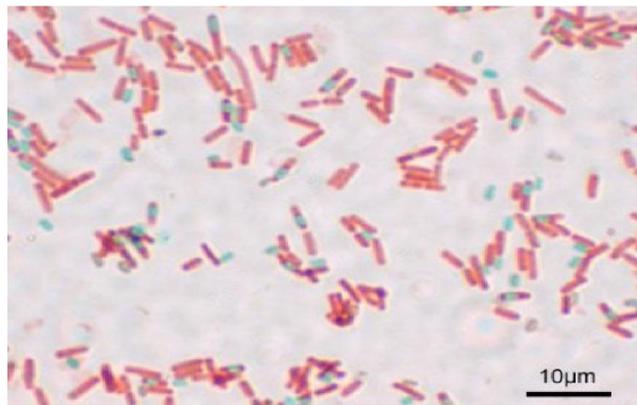
Acesso em: 25 Mai. 2014.

3.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (Figura 32, p.68) é um dos micro-organismos tido como habitante natural da flora microbiana do trato intestinal de humanos e da maioria dos animais de sangue quente, sendo, portanto, normalmente encontrado nas fezes destes animais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). São classificados como bastonetes retos, Gram negativos, não formadores de esporos, possuem motilidade através de flagelos ou são imóveis. Algumas bactérias podem causar infecções se as defesas do hospedeiro estão comprometidas (ARBIQUE, 2007).

A *E. coli* possui fímbrias ou pili (pêlos), são apêndices filamentosos menores e mais curtos que os flagelos e se fixa na parede do trato urinário para não ser arrastada pelo fluxo urinário, a *E.coli* na flora intestinal não causa dano algum, pois faz parte da microbiota intestinal, mas, se alcançar as vias urinárias, causa infecção por ser um patógeno agressivo no trato urinário (SPINDOLA, 2006).

Figura 32- Aspecto típico de *Escherichia coli* após técnica de Gram.



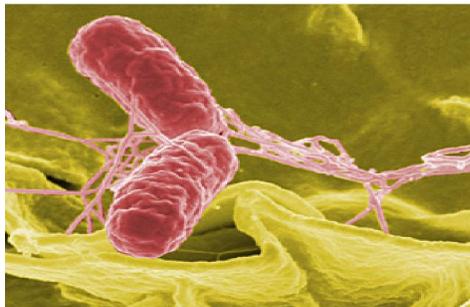
Fonte: MURRAY *et al.*, 2006.

3.2.3 *Salmonella typhimurium*

As espécies de salmonelas são bactérias Gram-negativas, flageladas, bacilos anaeróbios facultativos. Existem mais de 1.800 sorotipos conhecidos que a classificação atual considera como espécies distintas. Na cultura, a bactéria vai crescer em meios artificiais para formar colônias. *Salmonella typhimurium* (Figura 33, p.69) multiplica-se no trato gastrointestinal de muitas espécies animais em que normalmente não causa doença, mas seu crescimento nos seres humanos provoca a gastroenterite. Visto que, entre 6 (seis) a 48 (quarenta e oito) horas após a ingestão de água ou alimentos contaminados (normalmente de aves ou carne), a doença pode começar com náuseas e vômitos, muitas vezes seguidos por diarreia (MURRAY *et al.*, 2009).

Isolamentos de *Salmonella* causando gastroenterite em seres humanos têm aumentado nos últimos anos nos países desenvolvidos, principalmente porque os métodos modernos de criação de animais, preparação de alimentos e distribuição deve favorecer a propagação de salmonelas. A *S. typhimurium* é o agente causador da febre tifóide. A febre tifóide tem um início insidioso, caracterizada por febre, dor de cabeça, constipação, mal estar, calafrios, mialgia e com algumas características clínicas que confiavelmente pode-se distinguir entre uma variedade de outras doenças infecciosas. Confusão, delírio, perfuração intestinal e a morte podem ocorrer em casos severos. O agente etiológico pode ser recuperado a partir do sangue ou de medula óssea (McGARVEY *et al.*, 2009).

Figura 33- Fotografia de *Salmonella typhimurium*.



Fonte: WESCHENFELDER, 2009.

3.2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 34, p.70) é uma bactéria móvel, em forma de bastonetes, medindo 0,6 x 2,0 μ m. É Gram-negativa e ocorre como bactéria isolada, em pares e, em certas ocasiões, em cadeias curtas. É um organismo saprófito difundido na natureza, particularmente em ambientes úmidos. No entanto, devido a sua habilidade de sobreviver em materiais inertes e sua resistência a muitos antissépticos e antibióticos, *Pseudomonas aeruginosa* tem se tornado um importante e frequente patógeno. De fato, em pias de hospitais, equipamentos para terapia respiratória e soluções antissépticas ou detergentes podem agir como seus reservatórios (MURRAY *et al.*, 2009). Uma característica da *Pseudomonas aeruginosa* é a alta resistência a diversos tipos de antibióticos, seja ela intrínseca ou adquirida. A resistência apresentada por esses micro-organismos é principalmente devida à baixa permeabilidade da membrana externa. Os exames laboratoriais muitas vezes podem diagnosticar a presença de *P. aeruginosa*, tendo como resultado as amostras de lesões cutâneas, pus, urina, sangue, escarro e outros, conforme o tipo de infecção (SIQUEIRA, 2002).

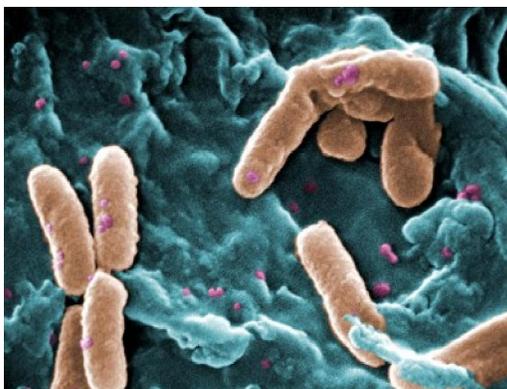
3.2.5 *Staphylococcus aureus*

As *Staphylococcus aureus* (Figura 35, p.70) são super bactérias Gram positivas de forma esférica e cor amarelada que se desenvolve em locais salinos. Quando, em contato com as células humanas tem função destrutiva e é adquirida através de cortes na pele, contato com doentes e por ingestão de alimentos pré-salgados (CABRAL, 2008). Essa bactéria pode provocar impetigo, foliculite, pneumonia, endocardite, osteomielite, furúnculo, meningite, infecções urinárias,

intoxicação alimentar, septicemia e síndrome do choque tóxico, matando cerca de 5% dos pacientes que adquirem a doença (MURRAY *et al.*, 2009). Possui proteína “A” que neutraliza os anticorpos, toxina alfa que destrói a membrana das células, toxina beta que hidrolisa os lipídios, toxina esfoliativa que provoca a esfoliação da pele, enterotoxina que ativa o sistema imunológico de forma inadequada e toxina da síndrome do choque que ativa os linfócitos de forma desvairada (CABRAL, 2008).

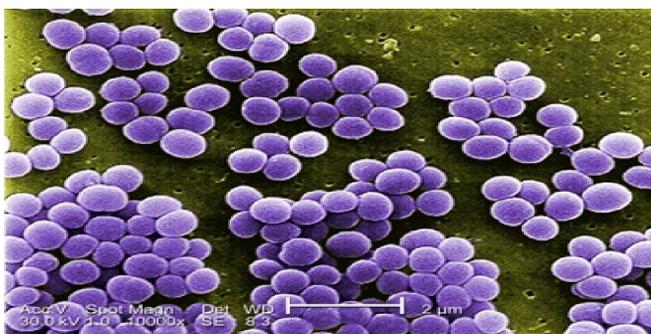
Segundo Cabral (2008), os antibióticos utilizados ainda hoje para tratar infecções provocadas pela bactéria são administrados de forma intravenosa principalmente para ação rápida. São antibióticos glicopeptídicos que são administrados a partir das variações do estágio das infecções. Essa bactéria, que já provocou milhares de mortes, provoca em sua maioria infecções sanguínea.

Figura 34- Fotografia de *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: MOUTINHO, 2011.

Figura 35- Fotografia de *Staphylococcus aureus*.



Fonte: ARDUÍNO, 2010.

3.3 ARTEMIA SALINA E O TESTE DE CITOTOXIDADE PRELIMINAR

Artemia salina é um crustáceo da ordem Anostraca (sem carapaça) que vive em lagos de água salgada e em salinas de todo o mundo (CÂMARA, 2004). Está adaptado para sobrevivência em corpos de água que sofrem grandes variações sazonais e pode tolerar salinidades que flutuam de 3,5 a 70 % (ANDRIOLLI *et al.*, 2007). As artêmias são ricas em proteínas, vitaminas (caroteno) e sais minerais, por isso são utilizadas em larga escala em cultivo de camarões e peixes na fase larval, acelerando o crescimento dos animais (CÂMARA, 2004).

O primeiro trabalho relativo ao uso de *A. salina* em bioensaio foi publicado pela primeira vez em 1956 e, a partir daí, inúmeros artigos reportam estudos utilizando produtos e toxinas naturais na literatura, e tem sido proposto como padrão por Van Haecke e Persoone (CAVALCANTE *et al.*, 2000).

A simplicidade com que pode ser manuseado, a rapidez dos ensaios e o baixo custo favorece a sua utilização rotineira em diversos estudos, além do que, tais ensaios de letalidade são muito utilizados, em análises preliminares, de toxicidade geral (LUNA *et al.*, 2005).

Desde 1982 esse teste tem sido utilizado para monitorar o isolamento de substâncias com potencial ação antitumoral e pesticida, a partir de plantas. Contudo, o ensaio é usado para avaliar diferentes atividades farmacológicas, uma vez que tem demonstrado uma boa correlação com várias atividades biológicas (MEYER *et al.*, 1982) como, por exemplo, a atividade antitumoral (McLAUGHLIN *et al.*, 1998), atividade antibacteriana (BRASILEIRO *et al.*, 2006) e antifúngica (NINÕ *et al.*, 2006).

3.4 DESCRIÇÃO DAS MATRIZES VEGETAIS

3.4.1 Descrição da espécie vegetal *Bauhinia guianensis*

O gênero *Bauhinia* pertence à subfamília botânica Caesalpinioideae (Leguminosae). A Leguminosae é a terceira família de plantas em número de espécies, com mais de 19.325 espécies em mais de 700 gêneros (LEWIS *et al.*, 2005). São plantas de hábitos muito variados, desde grandes árvores das matas tropicais a arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes e, também, muitas trepadeiras; vivendo nos mais variados ambientes (ALMEIDA, 2003). *Bauhinia*

guianensis Aubl. (Figura 36) é conhecida, popularmente, como “escada-de-jabutí”, “cipó-unha-de-boi”, “unha-de-vaca” ou “mororó-cipó” (CECHINEL FILHO, 2002).

Figura 36 - (A) *Bauhinia guianensis* (EMBRAPA) e (B) as folhas de sua espécie catalogadas (Herbário – Nº de registro: 177.179). Fonte: SANTOS, 2010.



(A)



(B)

A subfamília Caesalpinioideae é composta por 5 gêneros distribuídos em aproximadamente 1.000 espécies conforme apresentado no Quadro 03.

Quadro 03 Os cinco gêneros vegetais da subfamília Caesalpinioideae:

GÊNEROS	ESPÉCIES
<i>Cassia</i>	500-600
<i>Bauhinia</i>	300
<i>Caesalpinia</i>	100
<i>Gleditsia</i>	11
<i>Cercis</i>	7

Fonte: SANTOS, 2010.

As plantas do gênero *Bauhinia* são usadas na medicina tradicional em diversas partes do mundo por suas propriedades analgésicas, antidiabética, anti-inflamatória, antimicrobiana, adstringente, diurética (no tratamento de inchaços) e tumores estomacais, diarreia e úlcera (KUMAR; CHANDRASHEKAR, 2011). O uso popular mais, comumente, relatado para esse gênero vegetal no Brasil está relacionado à atividade hipoglicemiante, com várias espécies usadas para esse fim, em especial *Bauhinia forficata*, que é, amplamente, comercializada em variadas formas farmacêutica (NOGUEIRA; SABINO, 2012).

Algumas espécies pertencentes ao gênero *Bauhinia*, entre elas *B. macrostachya*, *B. splendens*, *B. sprucei* e *B. guianensis* apresentam praticamente as

mesmas características botânicas: são trepadeiras altas ou arbustos escandentes; folhas simples, pecioladas, bilobadas frequentemente aglomeradas; flores largas; caule sinuoso, comprido e achatado, sulcado longitudinalmente com depressões alternadas em forma de concha (Figura 37), dando-lhes aspecto de escada (BLUNDELL, 1992 *apud* COSTA, 1999). São frequentemente encontradas em vegetação capoeira ou áreas alteradas, encontradas na Amazônia Brasileira, Colômbia e Guiana. Podendo ser encontrada em regiões de clima equatorial.

Figura 37 - (A) Folhas, flores e frutos de *B. guianensis*; (B) Espécie *B. guianensis*.



(A)



(B)

Fonte: VIANA, 1999.

Santos (2010) e Corrêa (2010) isolaram fungos e realizaram o perfil químico de 54 fungos endofíticos isolados dos tecidos sadios do caule, folha e cipó da espécie *Bauhinia guianensis* Aubl. que constam catalogados no LaBQuiM (Laboratório de Bioensaio e Química de Micro-organismos). No estudo, as autoras isolaram 15 fungos endofíticos do caule (EJC), 12 fungos da folha (EJF) e 27 fungos do cipó (EJCP). Na ocasião, fungos dos gêneros *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* sp., *Aspergillus*, *Curvularia*, *Phomopsis* sp., *Exserohilum*, *Xylaria* e *Scedosporium* foram identificados por microscopia eletrônica ou por sequenciamento por DNA.

3.4.2 Descrição da espécie vegetal *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*

Mimosa L., com mais de 540 espécies (Figura 38, p.74), é o segundo maior gênero de Mimosoidae. Distribui-se predominantemente na região Neotropical, com cerca de 500 táxons endêmicos dos Neotrópicos e 40 espécies nativas do Velho Mundo (SIMON *et al.*, 2011). Suas espécies podem ser encontradas em diferentes ambientes, desde florestas até áreas mais abertas de savanas, campos, caatingas,

ou ainda, em regiões desérticas do México. Os seus principais centros de diversidade localizam-se na América do Sul (Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina) e no Centro-Sul do México (BARNEBY, 1991). No Brasil, está representado por cerca de 320 espécies (DUTRA; MORIM, 2010).

Figura 38 – Representantes do gênero *Mimosa* na APA (Área de Proteção Ambiental) Serra Branca.



Fonte: DOURADO *et al.*, 2013.

O gênero *Mimosa* é caracterizado, principalmente, pelo fruto do tipo craspédio (mais raramente lomento ou sacelo), apresentando margens persistentes (replo), com valvas inteiras ou mais frequentemente segmentadas em artículos monospermicos. Além disso, as flores são isostêmones ou diplostêmones e as anteras não apresentam glândulas apicais, o que diferencia *Mimosa* de gêneros afins como *Anadenanthera* Speg., *Piptadenia* Benth e *Proposis* L. (QUEIROZ, 2009).

Mimosa é um grupo botânico funcionalmente importante dentro do ecossistema terrestre (SANTOS-SILVA; SALES, 2010). Várias de suas espécies são pioneiras, colonizando locais perturbados, tais como, beira de estradas, margem de rios e clareiras de matas. Esta característica deve-se, principalmente, ao seu rápido crescimento e à sua capacidade de regeneração vegetativa (CAMARGO-RICALDE; GREYER, 1998). Nessas áreas, promovem o enriquecimento do solo e evitam a sua erosão e, portanto, facilitam o estabelecimento de outras plantas (CAMARGO-RICALDE; GARCÍA-GARCÍA, 2001), o que torna suas espécies boas candidatas para a restauração de áreas degradadas.

Segundo Barneby (1991), *Mimosa acutistipula* é endêmica do Brasil, ocorrendo em ambientes de caatinga, cerrado e tabuleiro dos Estados do Piauí, de Pernambuco e da Bahia. A espécie vegetal *M. acutistipula* var. *ferrea* Barneby foi descrita recentemente para a região da Serra dos Carajás, no Estado do Pará (MORAES, 2012). Barbeny (1991) baseado na variação do número de pinas e comprimento de raques das inflorescências reconheceu duas variedades para a espécie: *M. acutistipula* var. *acutistipula* e *M. acutistipula* var. *ferrea*.

Segundo Silva (1992), a espécie *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* localiza-se, também, na Serra dos Carajás, em um tipo especial de vegetação conhecida como “canga hematítica” (vegetação que cresce diretamente sobre o afloramento rochoso de ferro de Carajás – Figura 39). A canga hematítica constitui um verdadeiro “enclave”, pois faz fronteiras geográficas bem definidas com a floresta tropical. Apesar do nome, a *M. acutistipula* var. *ferrea* apresenta o níquel como o principal metal pesado em sua composição dentre os outros que se localizam na Serra dos Carajás (ferro, manganês, cobre, cromo, chumbo) (SILVA, 1992).

Figura 39 - (A) “Canga hematítica” – vegetação que cresce diretamente sobre o afloramento rochoso e (B) Fronteira Geográfica bem definida entre a “Canga hematítica” e a Floresta Tropical.



(A)



(B)

Fonte: Disponível em “<http://www.forumcarajas.org.br/>”. Acesso em 31 Jan. 2015.

3.5 DESCRIÇÃO DA SERRA DOS CARAJÁS

A região de Carajás está localizada na faixa conhecida como corredor seco da Amazônia Oriental (Figura 40, p.76), caracterizada pelo clima transicional entre a

da Bacia Amazônica e o Planalto Brasileiro. Apresenta ainda grande variedade geomorfológica e altitude variando de cerca de 200 a 900 metros (FARIA *et al.*, 2011).

Essas características ambientais fazem com que a região de Carajás apresente uma grande diversidade paisagística, que varia de florestas em áreas altas denominadas Terra Firme (montanha e submontanha) a grandes extensões de savana, denominadas vegetação de Canga (SECCO; MESQUITA, 1983).

Foi no âmbito do Projeto Grande Carajás, no sudeste paraense, atualmente município de Parauapebas, que iniciou a extração do minério de ferro da Serra dos Carajás. Projeto cuja condução havia sido assumida, em 1977, pela Companhia Vale do Rio Doce. Para tanto, montou-se uma gigantesca estrutura envolvendo, além da *company Town* na Serra dos Carajás, um sistema que abarca minas, instalações de beneficiamento e um pátio de estocagem (MONTEIRO, 2005).

Figura 40- Mapa da Serra dos Carajás.



Fonte: GEO-CONCEIÇÃO. Disponível em <http://geoconceicao.blogspot.com.br/2010/05/recursos-minerais.html>. Acesso em 31 Jan. 2015.

A Serra dos Carajás, distrito ferrífero do Brasil, cuja magnitude e importância econômica tornam-no equivalente ao do Quadrilátero Ferrífero, localizado na região

sudeste do país, em plena selva amazônica, a 550 km ao sul de Belém, capital do estado do Pará, e a 1.600 km ao norte de Brasília. A região da Província Mineral Carajás é considerada como a área limitada a leste pelos rios Araguaia- Tocantins, a oeste pelo rio Xingu, a norte pela serra do Bacajá, e a sul pela Serra dos Gradaús (DOCEGEO, 1988). Sua designação como província deve-se à sua enorme riqueza mineral, incluindo os depósitos de ferro das serras Norte (N1 a N9), Sul (S1 a S45) e Leste os depósitos da classe óxidos de Fe-Cu-Au, Salobo, Pojuca, Alemão, Igarapé Bahia, Cristalino, Sossego, Alvo 118, Gameleira; Manganês Azul; e de níquel Vermelho (TASSINARI *et al.*, 2000).

A Serra dos Carajás é explorada principalmente pela Companhia Vale, uma mineradora global comprometida com práticas sustentáveis em toda a cadeia do seu negócio. Diferentemente do que muitos pensam, a mineração pode contribuir para a proteção ambiental. Isso é o que demonstra a atuação da Vale no Sudeste do Pará. Desde que iniciou a extração de minério de ferro na região, em 1985, a empresa ajuda a preservar 400 mil hectares de mata nativa, na Floresta Nacional de Carajás e outras áreas do bioma amazônico, em parceria com o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Além disso, a empresa mantém um viveiro, com capacidade para produzir 1,2 milhão de mudas de 300 espécies da Floresta Amazônica, com o objetivo de recompor a vegetação de cerca de 10 mil hectares de terras no entorno da Floresta Nacional de Carajás (PROJETO FERRO CARAJÁS S11D, 2013).

A Floresta Nacional de Carajás, que abriga minas de ferro, manganês, cobre e também abrigará a S11D que é uma Unidade de Conservação criada em 1988 por decreto presidencial, prevê, entre outros objetivos, a exploração sustentável dos recursos naturais, como a extração mineral. As operações da Vale na Flora Carajás ocupam somente 3% da área da floresta, de aproximadamente 4.120 km². Além disso, o apoio da Vale foi fundamental para evitar que a pecuária e a atividade de madeireiras avançassem sobre a cobertura vegetal (PROJETO FERRO CARAJÁS S11D, 2013).

Outras quatro áreas adjacentes, que totalizam 4.559,5 km², compõem junto com a Flona Carajás o Mosaico de Unidades de Conservação da Região de Carajás. Esse mosaico é protegido pela parceria entre Vale e ICMBio, que realiza atividades

de fiscalização, pesquisa, prevenção e combate a incêndios e educação ambiental (PROJETO FERRO CARAJÁS S11D, 2013).

Há, ainda, os projetos do Fundo Vale para o Desenvolvimento Sustentável, um fundo de cooperação que atua em parceria com organizações socioambientais e que contribui para a conservação da Amazônia. Entre as iniciativas, destacam-se o monitoramento contínuo em 100% do desmatamento da Amazônia brasileira e o apoio a instituições que cuidam de 63% das áreas protegidas no estado do Pará (PROJETO FERRO CARAJÁS S11D, 2013).

3.6 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é um conjunto de técnicas de cálculo que tem por objetivo promover a obtenção de informação útil de um conjunto complexo de dados, englobando conceitos de planejamento experimental, pré-processamento de dados, estatística e análise multivariada que fornecem o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos (MORGANO *et al.*, 1999).

Atualmente, a quimiometria é vasta nas diversas áreas da Química e, no Brasil, o primeiro trabalho data de 1981. A partir deste, juntamente com o desenvolvimento computacional, a produção científica na área vem crescendo anualmente (NETO *et al.*, 2006). A aplicação de ferramentas quimiométricas na cromatografia data de 1989 quando Poppi desenvolveu seu projeto de Mestrado, utilizando-se da calibração multivariada de dados (POPPI, 1989).

As aplicações da quimiometria são amplas e podem ser aplicadas em associação com diversos equipamentos. Dentre as vantagens oferecidas pela quimiometria estão uma boa exatidão e precisão nas predições e a rapidez e a simplicidade em que os dados são obtidos (WOLD; SJÖSTROM, 1998). Para a análise de dados multivariados são os mais adequados, pois permitem um estudo com várias espécies presentes ao mesmo tempo, não importando a existência ou ausência de diferenças espectrais marcantes entre elas nem a existência de alta correlação nos dados (HAIR *et al.*, 2005).

Para a utilização da quimiometria em cromatografia seja satisfatória como uma ferramenta de análise e classificação de uma grande quantidade de dados é essencial que todos os extratos a serem analisados sejam obtidos a partir do mesmo

procedimento. Assim, a garantia de que a composição do extrato seja sempre a mesma para amostras replicadas aumenta. Do mesmo modo, também é fundamental que os cromatogramas a serem obtidos a partir destes extratos passem pelas mesmas condições cromatográficas, garantindo que a única variável de diferenciação entre as amostras seja simplesmente as propriedades intrínsecas destas (CARVALHO, 2011).

Interferências de parâmetros espectrais, como espalhamento de luz, profundidade de penetração de luz, entre outros, são fatores que podem variar de um espectro a outro, mesmo que seja da mesma amostra. Operações matemáticas podem ser utilizadas antes da construção do modelo de calibração multivariada, no intuito de reduzir, eliminar ou padronizar os impactos sobre os espectros (FERREIRA *et al.*, 1999). De acordo com Recih (2005), para a execução de análises qualitativas e quantitativas em infravermelho a aplicação de algum método matemático e/ou estatístico é necessária para a obtenção de dados importantes e a exclusão de dados desnecessários do espectro.

Existem muitas ferramentas quimiométricas de grande utilidade para análises qualitativa e quantitativa de compostos em função de sua estrutura e atividade, sendo as análises exploratórias e os métodos de regressão os mais utilizados. Entre as análises exploratórias comumente utilizadas estão a análise por componentes principais (Principal Component Analysis – PCA) e a análise por agrupamento hierárquico (Hierarchical Component Analysis – HCA) (FERREIRA, 2002).

A extração de informações dos resultados de um experimento químico envolve a análise de grande número de variáveis. Muitas vezes, um pequeno número destas variáveis contém as informações químicas mais relevantes, enquanto que a maioria das variáveis adiciona pouco ou nada à interpretação dos resultados em termos químicos. A decisão sobre quais variáveis são importantes é feita, geralmente, com base na intuição química ou na experiência, ou seja, baseado em critérios que são mais subjetivos que objetivos (KOWALSKI, 1984).

A redução de variáveis através de critérios objetivos, permitindo a construção de gráficos bidimensionais contendo maior informação estatística, pode ser conseguida através da PCA. É possível também construir agrupamentos entre as amostras de acordo com as suas similaridades, utilizando todas as variáveis disponíveis, e representa-los de maneira bidimensional através de um dendograma,

utilizando a HCA. Estas duas análises são técnicas de estatística multivariada complementares que têm grande aceitação na análise de dados químicos (BROWN, 1995).

Os algoritmos PCA e HCA procuram correlacionar todas as variáveis, a fim de encontrar alguma relação entre elas. Se em alguma linha de produção for identificada a formação de algum produto indesejável e ele, após o tratamento matemático, encontrar-se correlacionado com outro produto no meio da linha de produção, pode-se encontrar uma solução para tal correlação (FIDÊNCIO, 2001).

A PCA é um método de compressão de dados que consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise dos dados. Em outras palavras, as n-variáveis originais geram, através de suas combinações lineares, n-componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é que são obtidos em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 detém mais informação estatística que a componente principal 2, que por sua vez tem mais informação estatística que a componente principal 3 e assim por diante (FERREIRA, 2002).

A HCA interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendograma onde as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si. A suposição básica de sua interpretação é esta: quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras. Para proceder esta classificação se faz necessária a definição matemática do conceito de proximidade: distância entre dois objetos (KOWALSKI; BENDER, 1972).

Antes de realizar qualquer análise quimiométrica com os dados oriundos de diversos cromatogramas, é necessário que estes passem por um pré-tratamento organizando-se os dados em uma única matriz com o intuito de remover ruídos experimentais, corrigir desvios de linha de base e, principalmente, alinhar as bandas cromatográficas (MARTINS *et al.*, 2011). Tal desalinhamento é o principal obstáculo na utilização de ferramentas quimiométricas, pois quaisquer diferenças, sejam de intensidade de sinal ou de tempo de retenção dos mesmos compostos entre cromatogramas obtidos a partir da mesma amostra, podem fazer com que a análise seja prejudicada obtendo-se resultados errôneos ou imprecisos (ZHENG *et al.*, 2009).

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Equipamentos técnicos

- Capela de fluxo laminar (PANCHANE* modelo PA 320) para o manuseio dos micro-organismos;
- Estufa de incubação do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) QUIMIS* para crescimento dos micro-organismos;
- Estufa de incubação bacteriológica QUIMIS* Modelo 031612 Série 10040005;
- Estufa de secagem e de esterilização NEUONI*;
- Balanças analíticas SHIMADZU* modelos AUY 220 e AY 220;
- Evaporador rotativo QUIMIS* para a concentração dos extratos;
- Câmara de análise e fluorescência por luz ultravioleta BOITTON* modelo Boit Gab01 Série 0196 para análise das placas cromatográficas;
- Chapa aquecedora QUIMIS* ISSO 9002 Série Q-261-22;
- Autoclave vertical PRISMATIC*;
- Mesa agitadora orbital MARCONI* modelo MA 140;
- Polarímetro Automático Digital NOVA* 1412;
- Agitador de tubos IKA Vortex Genius 3;
- Sonicador QUIMIS*;
- Aparelho de Ressonância Magnética Nuclear VARIAN OXFORD* NMR 300;
- Cromatógrafo WATERS* Alliance 2695;
- HPLC 2998 Water 2695 Separations Module com detector de UV (PDA);
- Espectrômetro de massas WATERS* ACQUITY TQD System.

4.1.2 Vidrarias e outros materiais

- Frascos de Erlenmeyer de 1000 mL e 500 mL;
- Placas de Petri de 100 x 15 mm;
- Kitassato;
- Funil de Büchner;
- Funil de Decantação;

- Funis simples;
- Provetas de 500, 100, 50 e 10 mL;
- Pipetas;
- Grau e pistilo;
- Papéis de filtro, filme e alumínio;
- Tetina de silicone;
- Algodão e álcool etílico 92,8° C INPM-Santa Cruz;
- Silica gel SILICYCLE* 70-230 mesh;
- Sephadex™ LH-20;
- Colunas cromatográficas com diâmetros e alturas conforme a massa da amostra;
- Colunas cromatográficas de fase reversa Sunfire C18 (150 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula 5 µm; WATERS*, Ireland) com uma coluna de guarda C18 (20 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho da partícula 5 µm, WATERS*);
- Cromatoplasmas 25 DC-Alufolien 20 x 20 cm Kieselgel 60 e 25 TLC aluminium sheets 20 x 20 cm (sílica gel- SILICYCLE*);

4.1.3. Meios de cultura

- B.D.A. (Batata natural; dextrose e ágar HIMEDIA*);
- Ágar bacteriológico HIMEDIA*;
- Saubourad HIMEDIA*;
- Meio sólido (Arroz Tio João® tipo 1 e parbolizado);

4.1.4. Solventes e substratos

- Hexano, acetato de etila, metanol e diclorometano P.A. (TEDIA BRAZIL*) para a extração, procedimentos cromatográficos e solubilização das amostras;
- Metanol e clorofórmio deuterados (CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES*) para a análise das amostras por técnicas espectrométricas (RMN 1D e 2D);
- Acetonitrila grau HPLC (TEDIA BRAZIL*);
- Metanol grau HPLC (TEDIA BRAZIL*);

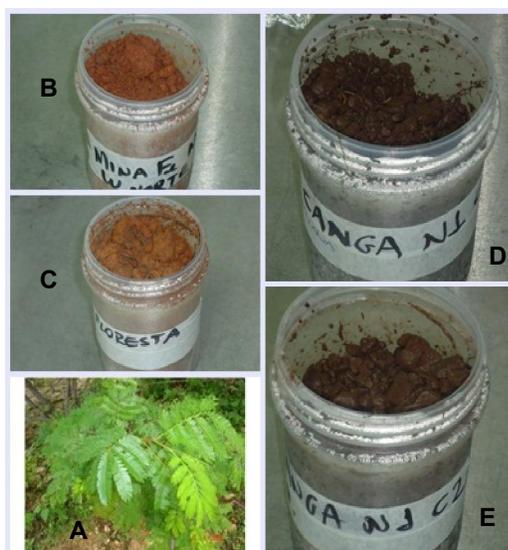
- Água purificada em aparelho Milli-Q;
- Reveladores para cromatografia em camada delgada analítica: solução ácida de sulfato cérico, solução de ácido sulfúrico, solução de iodeto de bismuto de potássio (reagente de Dragendorff) e solução de NP-PEG;

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Coleta das amostras dos fungos endofíticos da *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* e dos fungos do solo

Em janeiro de 2013, na Floresta Nacional de Carajás (PA) na área da Companhia Vale, foi realizada a coleta de amostras de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* (Leguminosae Mimosoidae) para o posterior isolamento dos fungos endofíticos. Na ocasião, amostras do solo da rizosfera da planta citada, da Canga (foram realizados 2 pontos de coletas – **C1** e **C2**), da Floresta e da mina de Ferro N₄W Norte (Figura 41) também foram coletadas para o isolamento dos fungos de solo destas áreas.

Figura 41- Fotografias da espécime de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* (A) e dos solos estudados B, C, D e E.



4.2.2 Processo de assepsia e de isolamento dos fungos endofíticos de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*

Após a coleta de um espécime de *M. acutistipula* var. *ferrea*, o material botânico foi dividido em folhas, raízes e caules. As amostras foram lavadas em água corrente, sem ferir as amostras e descartando-se as danificadas. A desinfecção superficial das folhas e dos caules deu-se através de lavagens por imersão (Figura 42) em capela de fluxo laminar. Primeiramente, o material vegetal foi mergulhado duas vezes por 2 minutos em hexano para retirada de gordura existente na superfície. Em seguida, mergulhou-se em uma solução de hipoclorito de sódio a 11% por 4 minutos. Posteriormente, foram expostas em solução de álcool etílico a 70% por 30 segundos para matar os fungos epifíticos (os que vivem na superfície das plantas) e três vezes em água destilada esterilizada por 1 minuto para retirar os resquícios dos agentes esterilizantes (MARINHO *et al.*, 2005). Já, as raízes foram desinfectadas somente com água destilada esterilizada por 5 minutos e após secagem, foram maceradas em seguida.

Figura 42- Processo de assepsia das folhas e dos caules de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*.



As folhas, os caules e as raízes foram cortados em fragmentos circulares de aproximadamente 6-9 mm. Nove fragmentos foram transferidos para placas de Petri (Figura 43, p. 85) contendo meio de cultivo B.D.A (infuso de 200 g de batata; dextrose, 20 g; ágar, 15 g). O meio BDA foi adicionado a 1.000 mL de água destilada e autoclavado a 125 °C por 15 minutos. Após a esterilização do meio BDA e o mesmo atingir a temperatura ambiente, foi adicionado o antibiótico tetraciclina (100 mg/L) ao meio em capela de fluxo laminar. Por fim, as placas de Petri contendo os

fragmentos foram incubadas à temperatura ambiente de 25 °C em estufa B.O.D durante 3 dias.

Figura 43- Fotografia de placa de Petri com fragmentos de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*.



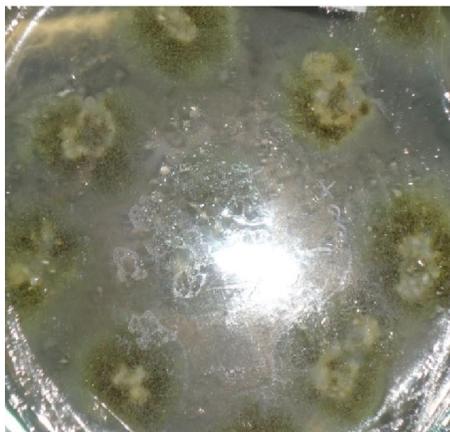
4.2.3 Processo de assepsia e de isolamento dos fungos do solo (Método Clark adaptado)

Para o isolamento de fungos do solo, aplicou-se a técnica de diluição sucessiva (CLARK, 1965) com algumas adaptações, utilizando 1 g de solo úmido previamente peneirado em malha de 2 mm, transferidos para tubos de ensaio contendo 9 mL de água destilada esterilizada (Figura 44) e agitados em agitador de tubos do tipo Vortex (100 rpm) por 10 minutos. Desta diluição, 1 mL foi adicionado a 9 mL de água destilada esterilizada obtendo-se a diluição de 10^{-2} ; repetiu-se esse procedimento para se obter a diluição 10^{-3} . Da diluição 10^{-3} retirou-se 0,1 mL, que foi colocado em placas de Petri contendo meio de cultivo B.D.A e em outras placas de Petri contendo o meio de cultivo Sabouraud (30 g por 1.000 mL de água destilada esterilizada) (Figura 45, p. 86).

Figura 44- Processo de isolamento dos fungos de solo (Método de Clark adaptado).



Figura 45- Fotografia de placa de Petri com fungos de solo.



4.2.4 Extração dos metabólitos secundários em micro-escala (Método de Smedsgaar adaptado)

Colônias de fungos, com 21 dias de crescimento em placas de Petri em meio BDA, foram extraídas de acordo com o método de extração de metabólitos secundários em micro-escala, descrito por Smedsgaar (1997), com algumas adaptações: de cada colônia foram retirados, com o auxílio de alça de platina devidamente esterilizada, 12 fragmentos de 6 mm de diâmetro que foram transferidos para frascos de penicilina autoclavados a 121 °C por 15 min contendo 10 mL do sistema de extração (Acetato de etila:Diclorometano:Metanol 3:2:1) (Figura 46, p. 87). As amostras foram lacradas com papel alumínio e posteriormente papel filme para diminuir a evaporação do sistema. As amostras foram deixadas em repouso, na ausência de luz, por um período de 3 dias. Após este tempo, as amostras foram filtradas e transferidas para pequenos potes devidamente esterilizados, pesados e identificados. Foi acrescentado, novamente, o sistema de extração por 2 vezes com o mesmo intervalo de extração por vez. As soluções foram secas em capela de exaustão e submetidas à análise de seus perfis cromatográficos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) após secagem.

Figura 46- Extração de metabólitos secundários em micro-escala.



4.2.5 Obtenção do perfil químico dos micro-extratos por CLAE/DAD

A análise dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada em um cromatógrafo da linha Alliance e2695 (Waters) equipado com amostrador automático (autosampler) e detector de arranjo de fotodiodos (PDA), o qual coleta dois espectros por segundo na região do ultravioleta e visível, na faixa entre 210 e 600 nm. As separações foram realizadas em uma coluna de fase reversa Sunfire C18 (150 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho de partícula 5 μm ; Waters, Ireland) com uma coluna de guarda C18 (20 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, tamanho da partícula 5 μm , Waters). O volume de amostra injetado foi de 20 μL e a temperatura da coluna foi mantida a 40 $^{\circ}\text{C}$. O sistema cromatográfico foi operado pelo software Empower3 Personal Single System (Waters, 2008) serial number W2KAR8091M. A fase móvel constituiu-se de uma mistura de H_2O e MeOH. O gradiente exploratório linear de eluição usado foi de H_2O -MeOH 90:10 a 0:100 em 40 min, com mais 5 min mantidos na última concentração. O gradiente foi retornado à concentração inicial em 5 min e mantido por mais 15 min, para o equilíbrio do sistema, antes da injeção da próxima amostra. O fluxo do eluente foi de 0,5 mL/min.

4.2.6. Análise quimiométrica dos micro-extratos por UPLC/MS

Neste estudo, a análise quimiométrica dos dados foi feita através da análise por componentes principais (PCA), que é geralmente uma ferramenta eficiente para reduzir a dimensionalidade dos dados, além de selecionar as variáveis (relações m/z) no espectrômetro de massas para uma melhor discriminação dos agrupamentos das amostras.

As análises quimiométricas por PCA no espectrômetro de massas foram feitas utilizando um capilar de 3,5 kV, cone de 30 V e temperatura de desolvatação de 500°C além de uma coluna Acquity UPLC BEH® (1,7 µm x 2,1 mm x 50 mm) com fase estacionária C₁₈. A eluição no modo gradiente empregou água (A) e acetonitrila (B), obedecendo as seguintes condições: 90% (A) a 10% (B) em 0 minuto, 70% (A) a 30% (B) em 1 minuto, 50% (A) a 50% (B) em 3 minutos, 20% (A) a 80% (B) em 6 minutos e 5% (A) a 90% (B) em 8 minutos. O fluxo da fase móvel foi de 0,3 mL/min.

4.2.7 Curva de crescimento do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12:

Inicialmente, o fungo codificado como *Aspergillus* sp. FRIZ12 foi reativado em placas de Petri contendo meio B.D.A. Posteriormente foi feito o cultivo de três pequenos fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² do fungo *Aspergillus* sp. FRIZ12 em 11 frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de água destilada e 6 g do meio Sabouraud por frasco. Todos os frascos de Erlenmeyer foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Os frascos de Erlenmeyer foram incubados em modo estático sem a presença de luz por 40 dias (Figura 47). Um frasco de Erlenmeyer de 500 mL foi usado para controle (“branco”).

Figura 47- (A) Crescimento do fungo *Aspergillus* sp. FRIZ12 em meio Sabouraud e (B) adição de MeOH no micélio do respectivo fungo.



(A)



(B)

A cada quatro dias, filtrava-se um dos frascos de Erlenmeyer e separava-se o micélio do meio líquido, totalizando um período de filtração de 40 dias. O micélio de cada filtração foi transferido para potes devidamente autoclavados a 121 °C por 15 minutos e pesados. Após isso, foi adicionado metanol para eliminar todos os

esporos do fungo e secos em capela de exaustão. Finalmente, houve o acompanhamento diário da massa do micélio em cada pote até adquirir massa constante.

4.2.8 Reativação dos fungos endofíticos *Aspergillus* sp. EJC08 e *Exserohilum rostratum* 1.11 Er e do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 em placas de Petri contendo meio BDA

Para a reativação dos fungos endofíticos de *Bauhinia guianensis* em placa de Petri contendo meio BDA, foram utilizados os micro-organismos *Aspergillus* sp. EJC08 (Figura 48) e *Exserohilum rostratum* 1.11 Er (Figura 49, p. 90) que se encontravam armazenados na micoteca do LaBQuiM. O fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 (Figura 50, p. 90) também foi reativado após os resultados dos ensaios antimicrobianos. Estes fungos foram reativados em placas de Petri contendo meio BDA.

Após o preparo e da esterilização em autoclave vertical a 125 °C do infuso BDA deixou-se o mesmo atingir a temperatura ambiente para vertê-lo em placas de Petri dentro da capela de fluxo laminar (esterilizada com álcool etílico 70% e UV por 20 min.). Posteriormente, foram transferidos três pequenos fragmentos de cada fungo para cada 3 placas de Petri contendo o meio B.D.A. Por fim, as placas de Petri com os referidos fungos inoculados foram armazenadas durante 7 dias em estufa B.O.D. para que hifas do fungo se desenvolvessem e os mesmos tivessem seus estudos químicos iniciados.

Figura 48- Fotografia de placa de Petri inoculada com o fungo endofítico *Aspergillus* sp. EJC08 em meio BDA.



(A) FRENTE

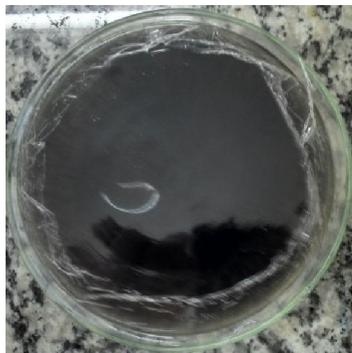


(B) VERSO

Figura 49- Fotografia de placa de Petri inoculada com o fungo endofítico *Exserohilum rostratum* 1.11 Er em meio BDA.



(A) FRENTE



(B) VERSO

Figura 50- Fotografia de placa de Petri inoculada com o fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 em meio BDA.



(A) FRENTE



(B) VERSO

4.2.9 Cultivo dos fungos endofíticos *Aspergillus* sp. EJC08 e *Exserohilum rostratum* 1.11 Er em meio sólido (arroz)

Após o oitavo dia de incubação em meio B.D.A., foi feito o cultivo em meio sólido (arroz Tio João[®] parbolizado). Foram usados 3,0 Kg do cereal que foram distribuídos uniformemente em 15 frascos de Erlenmeyers de 1.000 mL, 200 g de cereal por frasco, em seguida adicionou-se 75 mL de água destilada em cada frasco. Todos os frascos de Erlenmeyer foram autoclavados a 121 °C por 45 minutos. Deixou-se o material atingir a temperatura ambiente e introduziram-se por frasco três pequenos fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² do fungo para 13 dos 15 frascos de Erlenmeyer utilizados. Os fungos endofíticos *Aspergillus* sp. EJC08 (Figura 51, p. 91) e *Exserohilum rostratum* 1.11 Er (Figura 52, p. 91) foram incubados em modo

estático sem presença de luz por 30 dias. Dois frascos de Erlenmeyer foram usados para controle (“brancos”).

Figura 51- Crescimento das colônias do fungo endofítico *Aspergillus* sp. EJC08 em meio sólido (arroz) após 30 dias de incubação.



Figura 52- Crescimento das colônias do fungo endofítico *Exserohilum rostratum* 1.11 Er em meio sólido (arroz) após 30 dias de incubação.



4.2.10 Cultivo do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 em meio sólido (arroz)

Após o oitavo dia de incubação em meio BDA, foi feito o cultivo em meio sólido (arroz Tio João[®] parbolizado). Foram usados 3,0 Kg do cereal que foram distribuídos uniformemente em 15 frascos de Erlenmeyers de 1000 mL, 200 g de cereal por frasco, em seguida adicionou-se 75 mL de água destilada. Todos os frascos de Erlenmeyer foram autoclavados a 121 °C por 45 minutos. Deixou-se o material atingir a temperatura ambiente e introduziram-se por frasco três pequenos fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² do fungo para 13 dos 15 frascos de Erlenmeyer utilizados. O fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 (Figura 53, p. 92) foi incubado em modo estático sem presença de luz por 25 dias, tempo estipulado para

o crescimento do fungo. Dois frascos de Erlenmeyer foram usados para controle (“brancos”).

Figura 53- Crescimento das colônias do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 em meio sólido (arroz) após 25 dias de incubação.



4.2.11 Obtenção dos extratos dos fungos endofíticos *Aspergillus* sp. EJC08 e *Exserohilum rostratum* 1.11 Er

Após o tempo de incubação em meio sólido (arroz), foram obtidos os extratos da biomassa. Inicialmente foram acrescentados 300 mL de metanol em cada frasco de Erlenmeyer para destruir os esporos dos fungos endofíticos *Aspergillus* sp. EJC08 e *Exserohilum rostratum* 1.11 Er (Figura 54, p. 93) e assim eliminar perigos de contaminação no manuseio das amostras. Após 24 horas da adição do metanol o material foi filtrado à vácuo (Figura 55, p. 93) com o uso de papel de filtro e de funil de Büchner, obtendo uma solução de MeOH-1 (Figura 56, p. 93) e a massa fúngica. Depois disso, adicionou-se hexano à biomassa e o sistema foi deixado em repouso por três dias sendo posteriormente filtrado à vácuo. Foram realizadas mais duas adições de hexano à biomassa e filtrações a vácuo para a obtenção total da solução hexânica. Por fim, a solução hexânica foi concentrada em evaporador rotativo, obtendo-se o extrato hexânico de cada fungo endofítico.

Figura 54- Frascos de Erlenmeyer contendo biomassa fúngica dos fungos endofíticos *Aspergillus* sp. EJC08 (A) e *Exserohilum rostratum* 1.11 Er acrescidos de MeOH.



(A)



(B)

Figura 55- Filtração à vácuo para obtenção da solução MeOH-1 do fungo endofítico *Aspergillus* sp. EJC 08.



Figura 56- Solução MeOH-1 (2L) do fungo endofítico *Aspergillus* sp. EJC 08 obtida após filtração à vácuo.



O mesmo procedimento usado para a extração da biomassa com hexano (Hex.) foi realizado também com o acetato de etila e por último utilizando metanol,

obtendo respectivamente uma solução de acetato de etila e outra solução de metanol (MeOH-2) para os dois fungos endofíticos. As soluções AcOEt e MeOH-2 foram concentradas em evaporador rotativo, obtendo-se os extratos AcOEt e MeOH-2, respectivamente. Após concentração em evaporador rotativo, os extratos MeOH-1 e MeOH-2 sofreram partição líquido-líquido (Figura 57) com AcOEt (3 x 100 mL), obtendo-se as fases AcOEt e hidroalcoólicas do extrato MeOH-1 e MeOH-2.

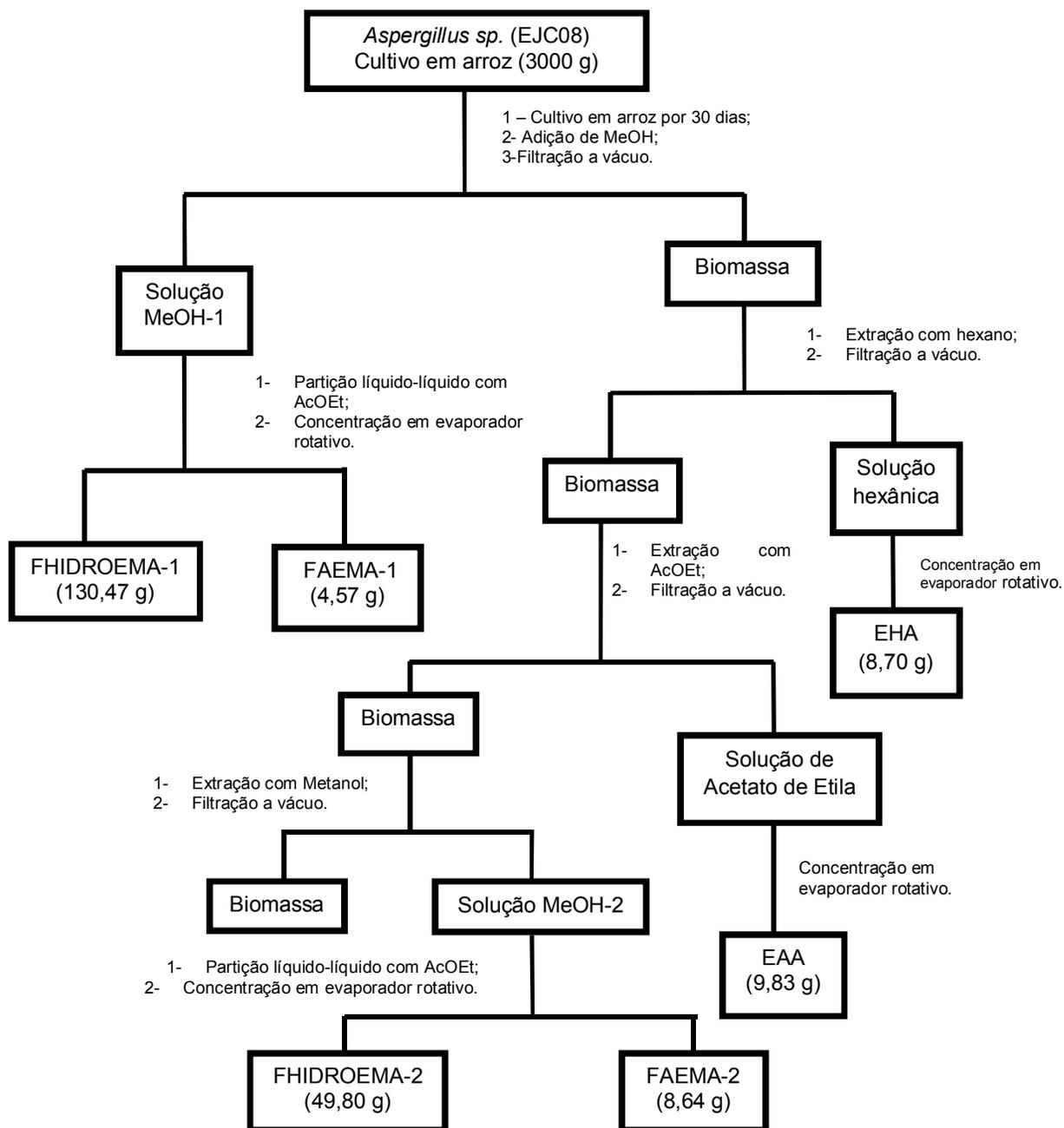
Figura 57- Partição da Solução MeOH-1 com AcOEt para o fungo endofítico *Aspergillus* sp. EJC 08.



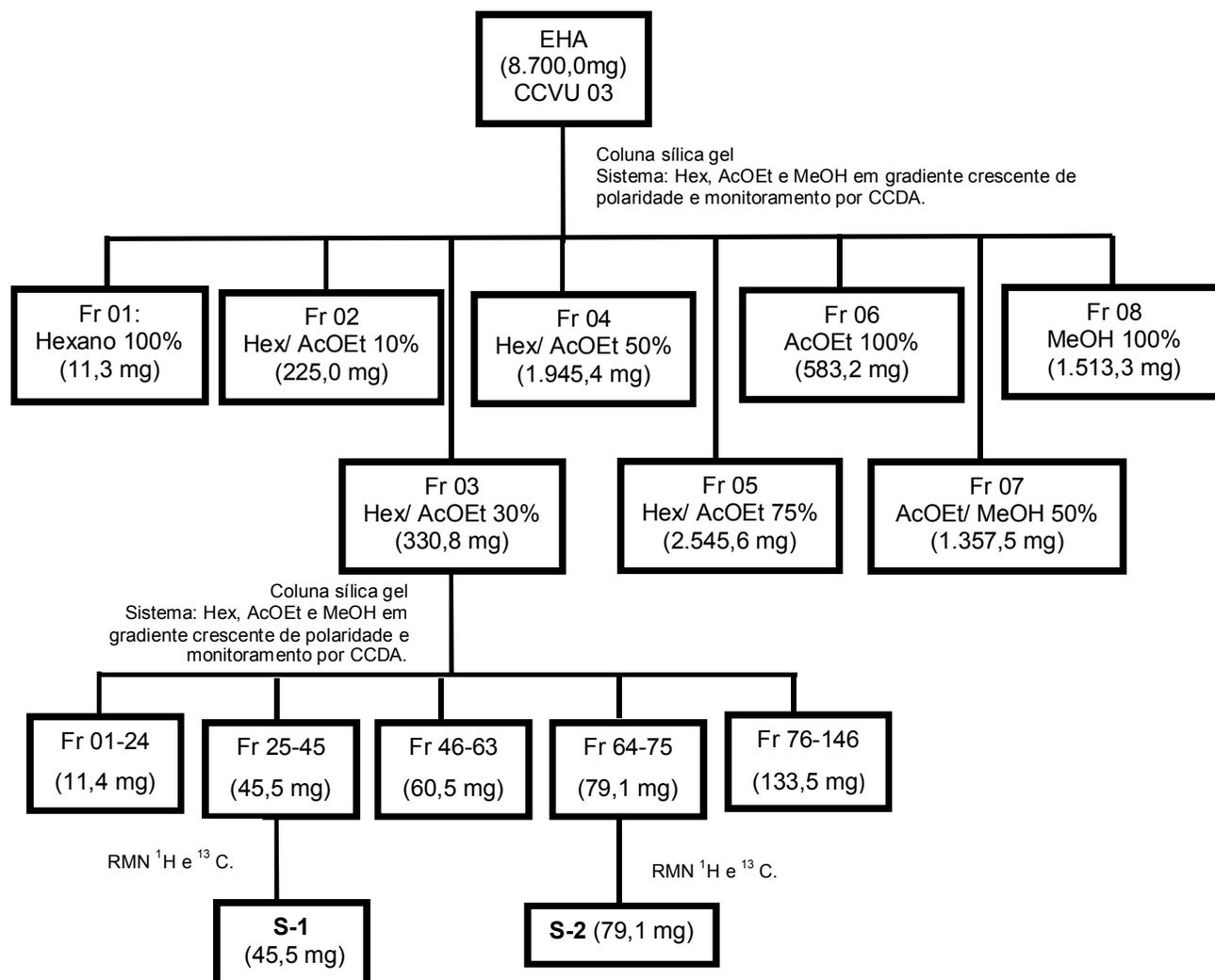
4.2.12 Fracionamento dos extratos do fungo endofítico *Aspergillus* sp. EJC08

Todas as etapas de obtenção dos extratos durante o estudo químico dos fungos endofíticos *Aspergillus* sp. EJC 08 estão descritas no Fluxograma 01 (p. 95).

De cada extrato ou fase, foram retiradas 5 mg e 10 mg de cada um(a) para a realização dos ensaios antimicrobianos e citotóxicos, respectivamente. A massa restante do EHA foi utilizada para fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel por via úmida utilizando hexano, acetato de etila e metanol como eluentes em gradiente crescente de polaridade, rendendo oito frações (Fluxograma 02, p. 96).



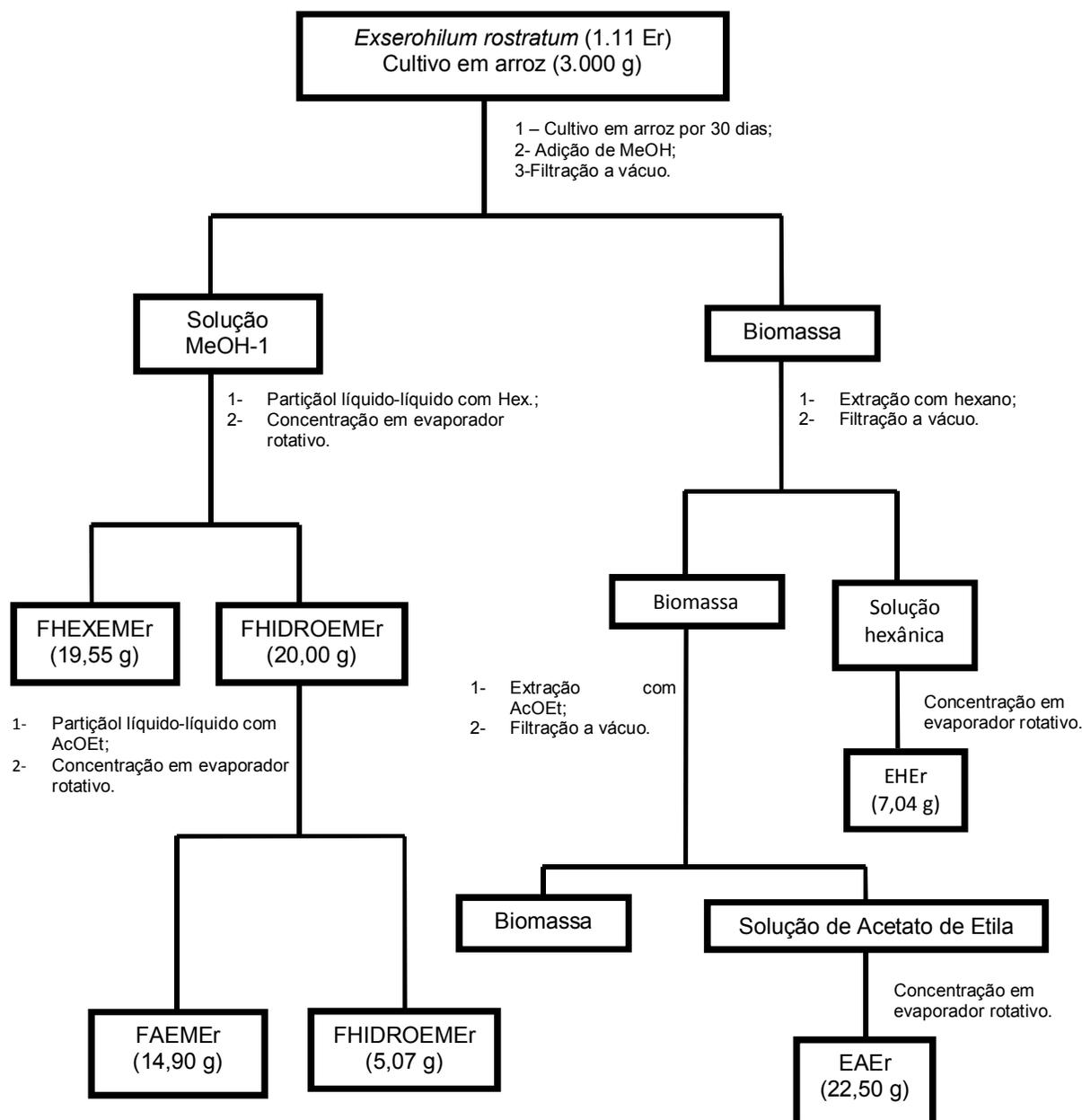
Fluxograma 01: Representação dos processos de obtenção dos extratos do fungo endofítico *Aspergillus sp.* EJC08 em meio sólido (arroz).



Fluxograma 02: Fracionamento do extrato hexânico do fungo endofítico *Aspergillus* sp. EJC08.

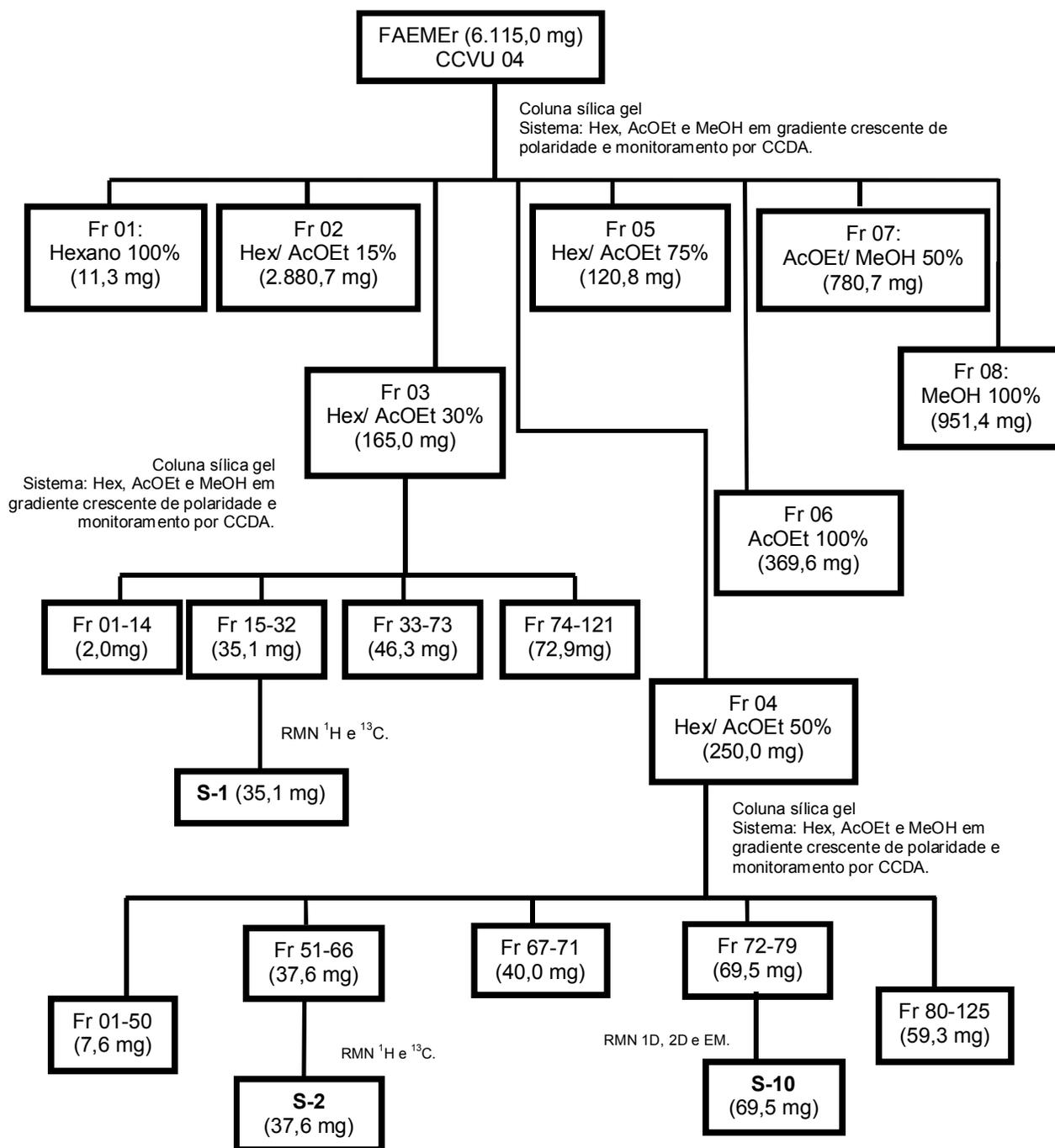
4.2.13 Fracionamento dos extratos do fungo endofítico *Exserohilum rostratum* 1.11 Er

Todas as etapas de obtenção dos extratos orgânicos durante o estudo químico dos fungos endofíticos *Exserohilum rostratum* 1.11 Er estão descritas no Fluxograma 03 (p. 97).



Fluxograma 03: Representação dos processos de obtenção dos extratos do fungo endofítico *Exserohilum rostratum* 1.11 Er em meio sólido (arroz).

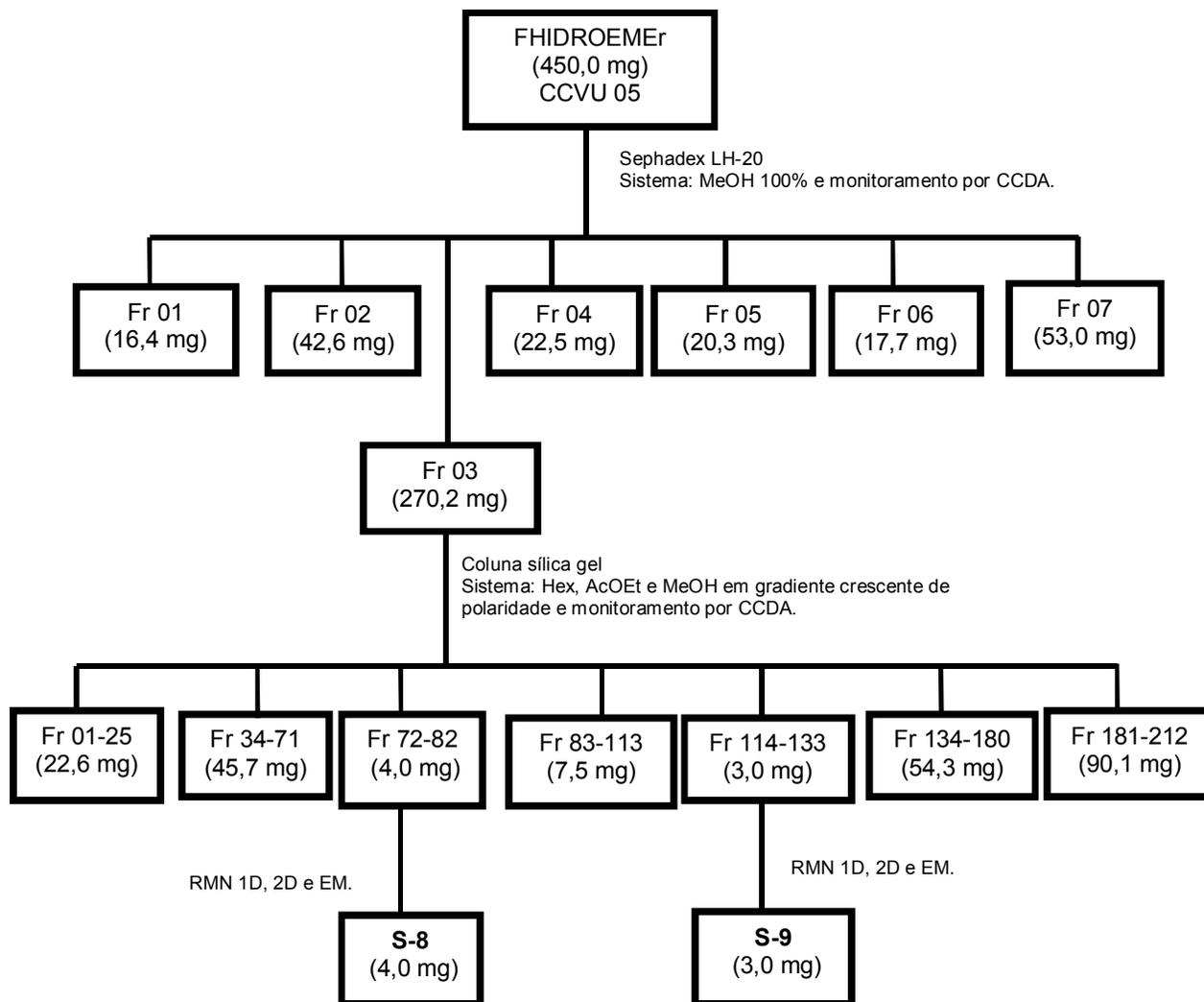
Parte da fase AcOEt (6.115,0 mg) do extrato MeOH foi submetida ao fracionamento por via úmida (CCVU), utilizando-se como eluentes solventes puros ou misturas dos solventes hexano, acetato de etila e metanol em gradiente crescente de polaridade, resultando em oito frações, as quais foram analisadas por CCDA, conforme mostra o Fluxograma 04 (p. 98).



Fluxograma 04: Fracionamento da Fase AcOEt do extrato MeOH do fungo endofítico *E. rostratum* 1.11 Er.

Parte da fase hidroalcolólica do extrato MeOH foi submetida à cromatografia de exclusão em Sephadex LH-20, utilizando-se como eluente metanol em modo isocrático, resultando em sete frações que foram concentradas em evaporador

rotativo e analisadas por CCDA. Através do monitoramento por CCDA, a fração 03 mostrou-se interessante e foi fracionada conforme mostra o Fluxograma 05.



Fluxograma 05: Fracionamento de uma alíquota da fase hidroalcoólica do extrato MeOH do fungo endofítico *E. rostratum* 1.11 Er.

4.2.14 Obtenção dos extratos e fracionamentos do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12:

Após o tempo de incubação em meio sólido (arroz), foram obtidos os extratos da biomassa. Inicialmente foram acrescentados 300 mL de hexano em cada frasco de Erlenmeyer para destruir os esporos do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 (Figura 58, p. 100), assim eliminar perigos de contaminação no manuseio das

amostras. Após 24 horas da adição do hexano o material foi filtrado à vácuo (Figura 59) com o uso de papel de filtro e de funil de Büchner, obtendo uma parte da solução hexânica e a massa fúngica. Depois disso, adicionou-se hexano à biomassa por mais duas vezes e cada adição foi deixada em repouso por três dias sendo posteriormente filtrado a vácuo e obtida então uma solução hexânica. A solução hexânica (Figura 60, p. 101) foi concentrada em evaporador rotativo para a obtenção do extrato hexânico.

Figura 58- Adição de Hexano na biomassa fúngica do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12.



Figura 59- Filtração a vácuo para obtenção da solução hexânica do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12.

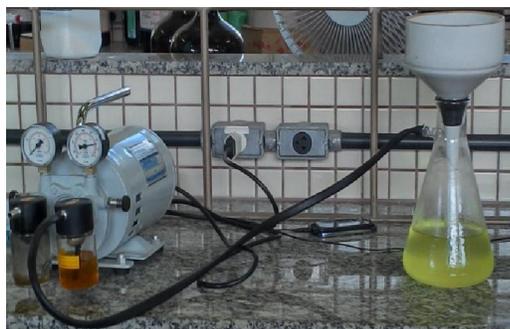


Figura 60- Solução hexânica (4L) do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 obtida após filtração à vácuo.

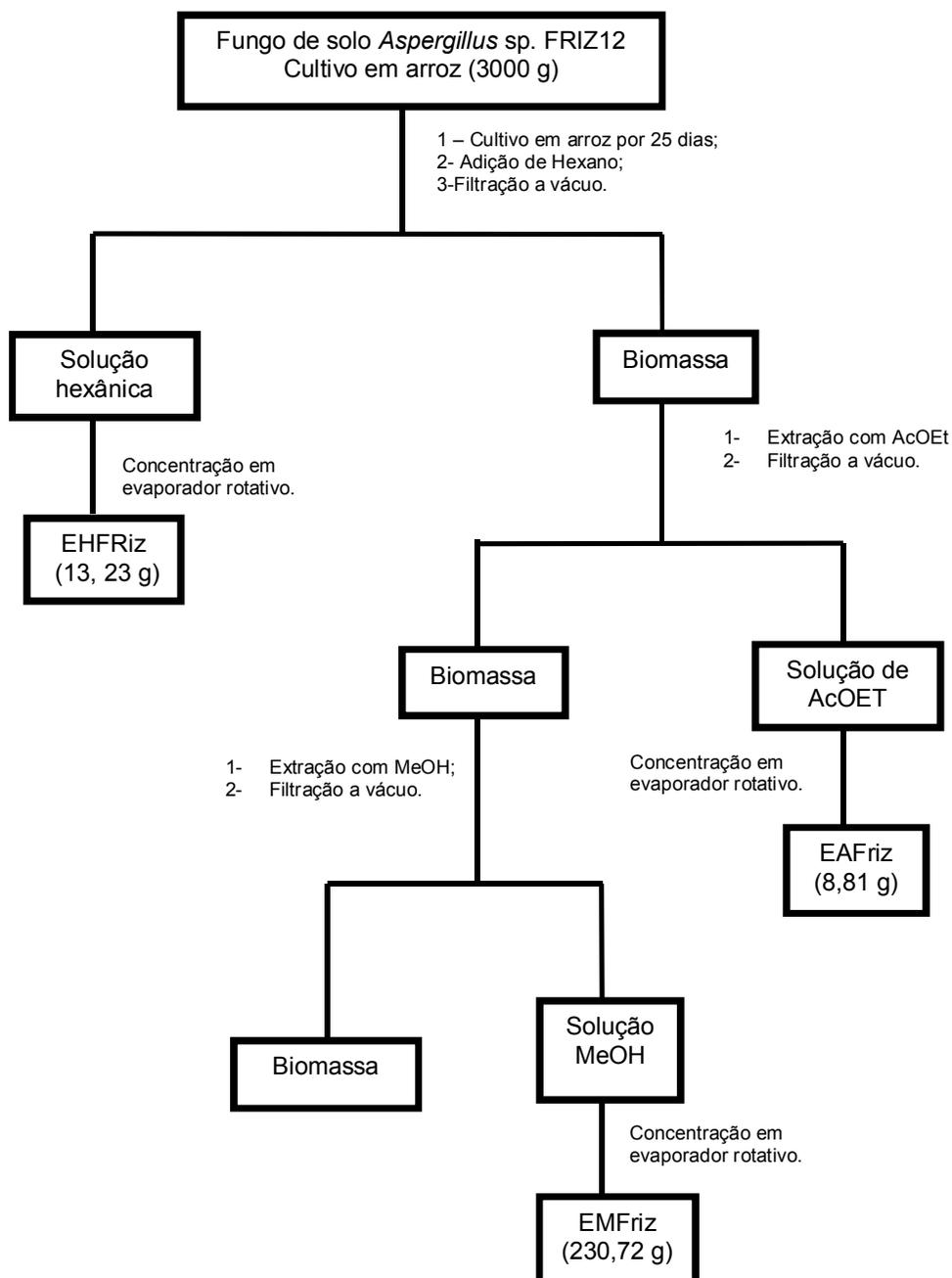


O mesmo procedimento usado para a extração da biomassa com hexano (Hex.) foi realizado, também, com o solvente acetato de etila e, por último, metanol, obtendo, respectivamente, uma solução de acetato de etila e outra solução de metanol (MeOH-2) para os referidos fungos endofíticos. As soluções AcOEt e MeOH foram concentradas em evaporador rotativo, obtendo-se os extratos AcOEt e MeOH-2, respectivamente. Após concentração em evaporador rotativo, uma alíquota do extrato metanólico sofreu partição líquido-líquido (Figura 61) com hexano (3 x 250 mL) e AcOEt (3 x 250 mL), obtendo-se as fases hexânica, AcOEt e hidroalcoólica do extrato metanólico.

Figura 61- Partição da solução metanólica com acetato de etila para o fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12.

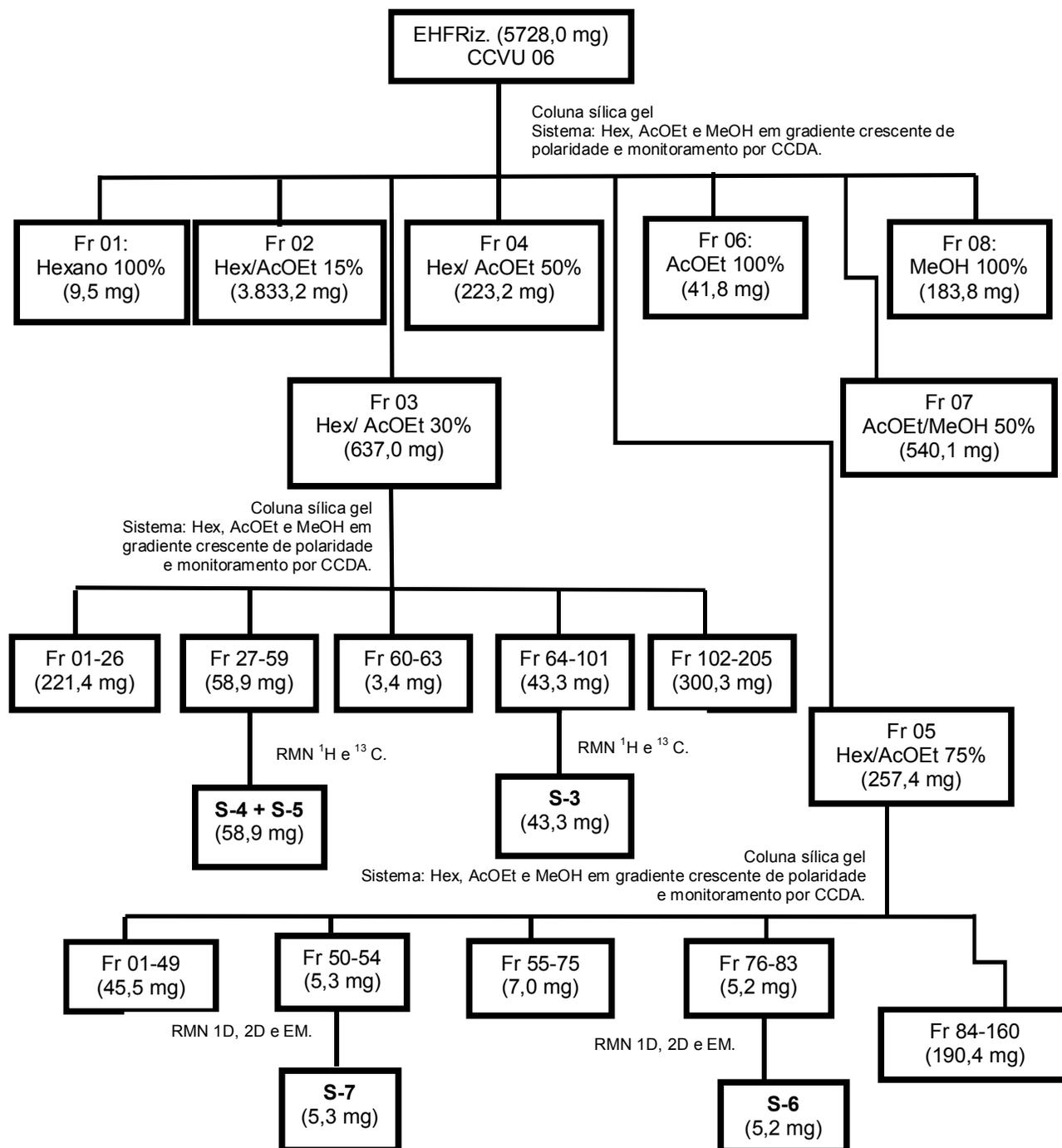


Todas as etapas de obtenção dos extratos do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 estão descritas no Fluxograma 06.



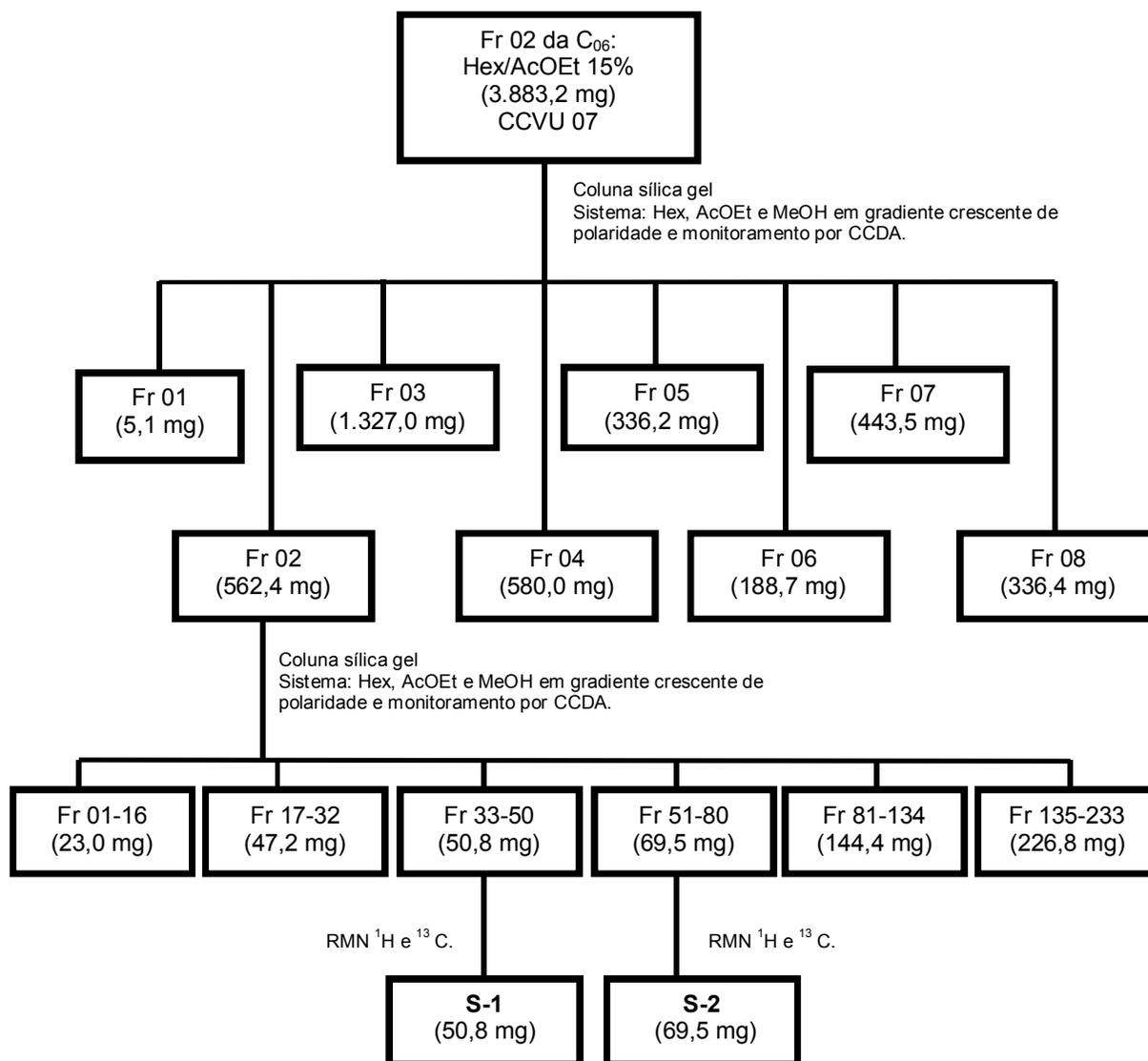
Fluxograma 06: Representação dos processos de obtenção dos extratos do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 em meio sólido (arroz).

Parte do extrato hexânico (5,72 g) foi submetida ao fracionamento por CCVU em sílica-gel, utilizando-se como eluentes solventes puros ou misturas dos solventes hexano, acetato de etila e metanol em gradiente crescente de polaridade, resultando em oito frações que foram concentradas em rotaevaporador e analisadas por CCDA. O Fluxograma 07 resume os fracionamentos do extrato hexânico.

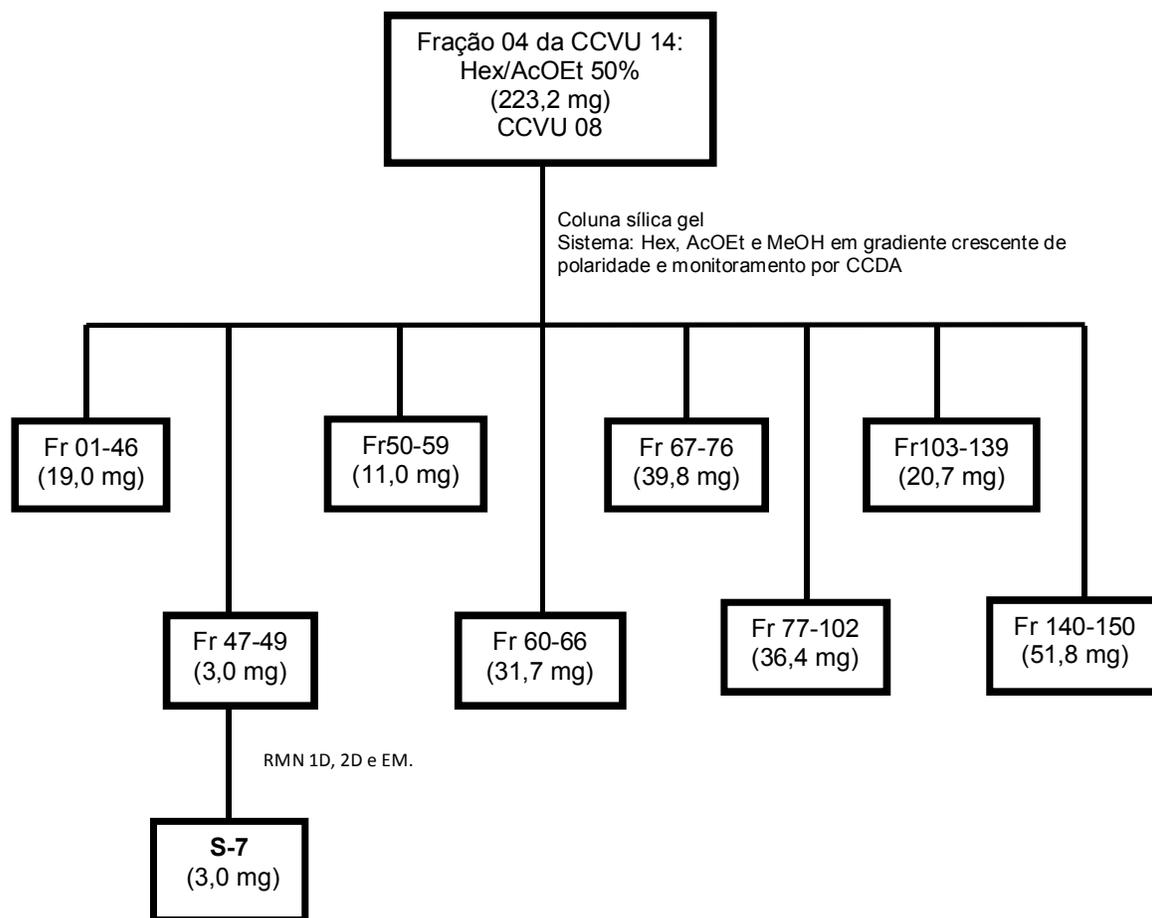


Fluxograma 07: Fracionamento do extrato hexânico do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12.

Na purificação das frações obtidas do extrato hexânico do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 foram usados métodos cromatográficos clássicos tais como cromatografia de coluna por via úmida (CCVU) e monitoramento por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). Os Fluxogramas 08 e 09 (p. 104) resumem os fracionamentos das frações obtidas do extrato hexânico do referido fungo rizosférico.

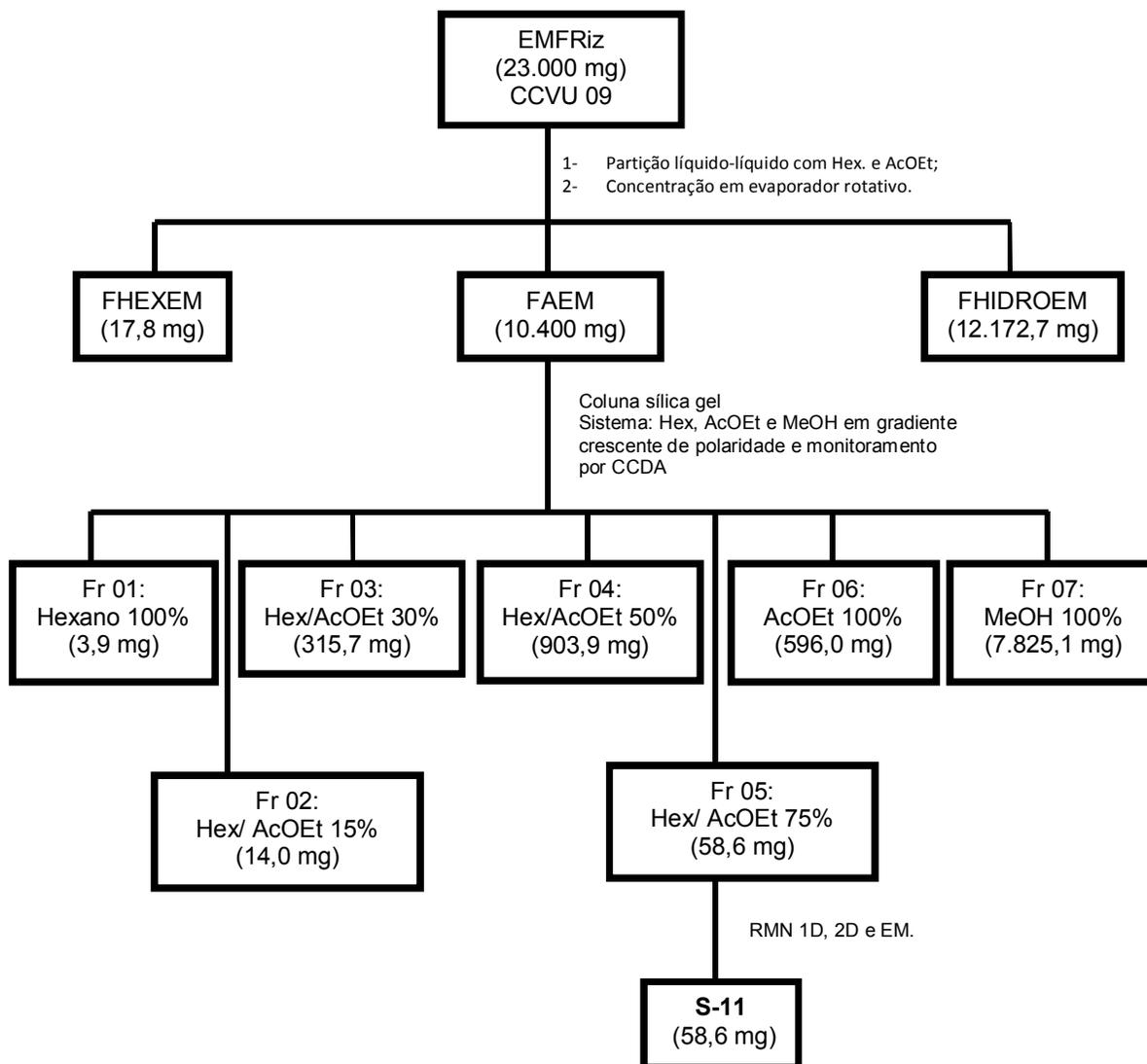


Fluxograma 08: Fracionamento da fração 02 do extrato hexânico do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12.

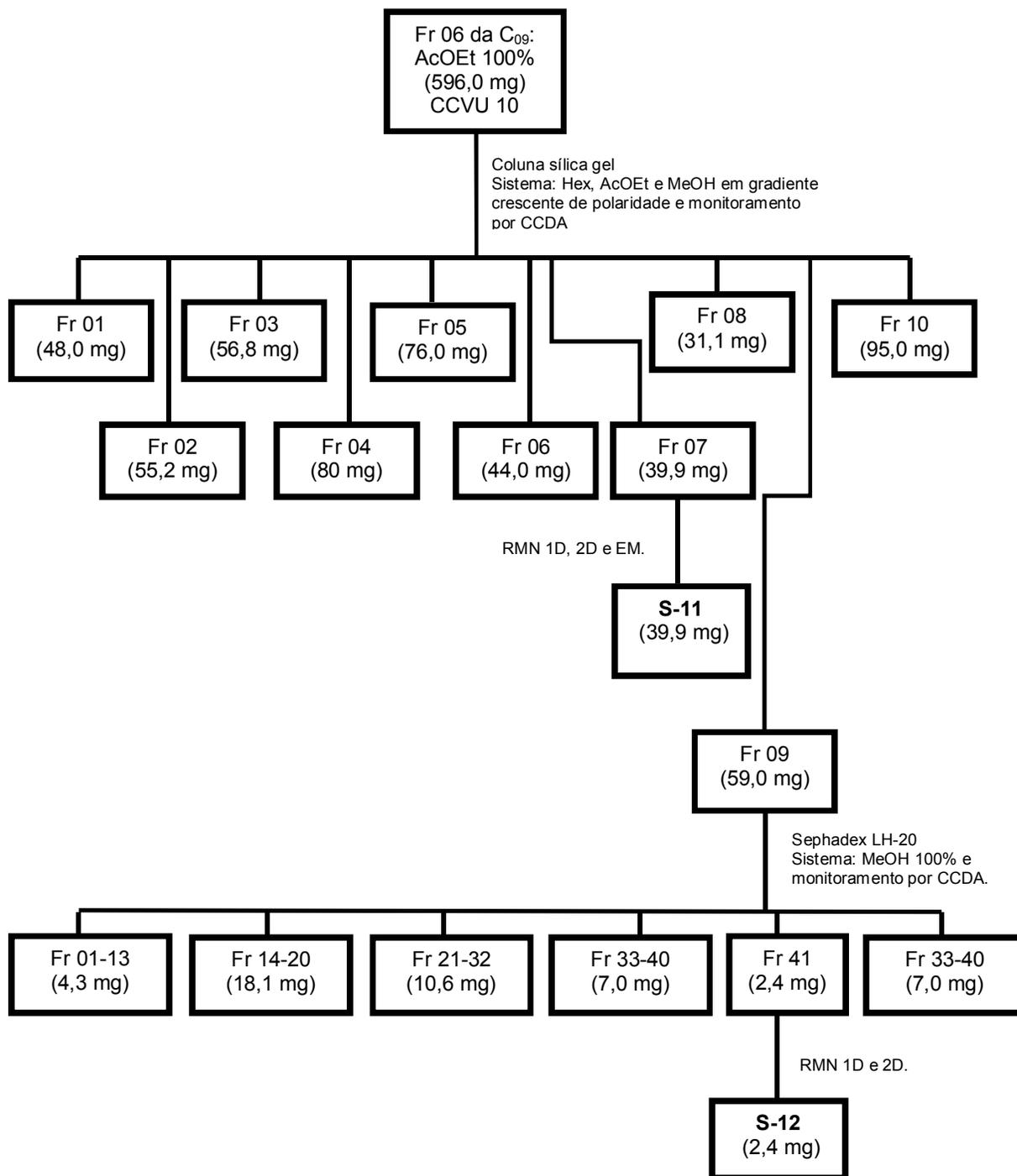


Fluxograma 09: Fracionamento da fração 04 do extrato hexânico do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12.

Parte do extrato metanólico do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ 12 (23 g) sofreu partição líquido-líquido com hexano (3 x 250 mL) e com AcOEt (3 x 250 mL), fornecendo, assim, as suas respectivas soluções que foram concentradas em evaporador rotativo para a obtenção de suas respectivas fases. A terceira solução foi denominada solução hidroalcoólica que também foi concentrada em evaporador rotativo para a obtenção das fases hexânica e acetato de etila. Através do monitoramento por CCDA, foi escolhida a fase AcOEt para fracionamento cromatográfico por via úmida, onde suas frações foram também monitoradas por CCDA conforme pode ser observado nos Fluxogramas 10 (p. 106) e 11 (p. 107).



Fluxograma 10: Partição líquido-líquido do extrato metanólico de *Aspergillus* sp. FRIZ12 e o fracionamento da fase AcOEt.



Fluxograma 11: Fracionamento da fração 06 do extrato FAEM.

4.2.15 Ensaios Antimicrobianos

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Bioensaios e Química de Micro-organismos (LaBQuiM) do Laboratório de Química – Pesquisa da UFPA. Foram utilizadas cepas certificadas das bactérias *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella typhimurium* (ATCC14028) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), cedidas pelo Instituto Evandro Chagas.

Para a realização do ensaio, preparou-se o caldo de B.H.I. (Infuso Cérebro Coração), seguindo as recomendações do fabricante: para cada 1 (um) litro de caldo foram utilizados 37 g de meio de cultura em um frasco de Erlenmeyer. Em outro frasco de Erlenmeyer, o meio Àgar BHI foi preparado através da adição de 5 g de àgar bacteriológico a cada 100 mL de caldo BHI. Após essas dissoluções, os meios foram autoclavados a 121 °C, por 15 minutos, para garantir total esterilidade. Após, deixou-se atingir à temperatura ambiente para suas posteriores utilizações.

Os extratos, os policetídeos e o nucleosídeo tiveram suas atividades antimicrobianas avaliadas pelo método de diluição sucessiva em microcaldo recomendado pela Subcomissão de Teste à Susceptibilidade Antifúngica do Comitê Nacional dos EUA para Padrão Clínico Laboratorial (CLSI, 1997).

4.2.15.1 Ativação das bactérias

As bactérias utilizadas nos ensaios foram ativadas em placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo agar B.H.I., por um período de 24 h. Após esse tempo foram transferidas, com o auxílio de um palito, aproximadamente três colônias de cada bactéria para tubos de ensaio contendo 3 mL de caldo B.H.I. e incubadas por mais um período de 24 h.

4.2.15.2 Padronização das culturas

Obteve-se, por meio de uma mistura das soluções de H₂SO₄ a 1% (9,95mL) e BaCl₂, também, a 1% (0,05mL) uma solução de sulfato de bário (BaSO₄). Após este processo comparou-se o grau de turvação do tubo de ensaio contendo a solução bacteriana padronizada em uma concentração de 1,0 x 10⁸ UFC/mL (unidades formadas de colônias por mililitros) com o tubo de ensaio que continha o sulfato de bário. Por fim, a solução bacteriana foi diluída, sucessivamente, até a concentração

de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios antimicrobianos, tanto dos extratos como das substâncias (CLSI, 2003).

4.2.15.3 Preparo das amostras

Foram testados 5 mg dos extratos orgânicos, 1 mg dos micro-extratos orgânicos dos fungos endofíticos de *Mimosa acutistipula var. ferrea* e de fungos de solo e 1 mg de cada substância isolada e purificados para serem dissolvidos em 100 µL de DMSO, contidos em tubos de Eppendorf. Em seguida foram adicionados 900 µL de caldo B.H.I. esterilizado. No intervalo de cada adição do solvente e do caldo B.H.I. ao extrato ou à substância, as amostras eram agitadas para uma melhor homogeneização.

4.2.15.4 Ensaio para medir a concentração inibitória mínima (CIM)

Em cada placa de ELISA de 96 furos foram adicionados 100 µL de caldo BHI em cada cavidade. Em seguida acrescentou-se na primeira cavidade de cada coluna 100 µL da solução contendo as amostras a serem testadas e homogeneizou-se essa solução. Após isso foram realizadas diluições sucessivas, retirando-se 100 µL da primeira cavidade, transferindo esse volume para a próxima e homogeneizando. Esse procedimento foi repetido até a penúltima cavidade da placa de Elisa, de onde foram retirados 100 µL e descartados. A última linha da placa foi utilizada como um controle do meio usado. Em cada cavidade foi adicionado 5 µL da suspensão bacteriana e incubaram-se as placas a 37°C por 24h. A leitura dos resultados foi feita adicionando-se 10 µL do TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico) em cada cavidade da placa de Elisa.

Para o preparo do corante usou-se um frasco de penicilina com 10 mL de água destilada esterilizada. Em seguida foi adicionado ao mesmo, em capela de fluxo laminar, de 0,2 g de TTC. Após atingir a temperatura ambiente, agitou-se para uma homogeneização mais efetiva. Depois de pronta, a solução-corante apresentava-se translúcida; mas ao entrar em contato com meios onde há microrganismos, a mesma apresentou uma coloração vermelha (Figura 62, p. 110).

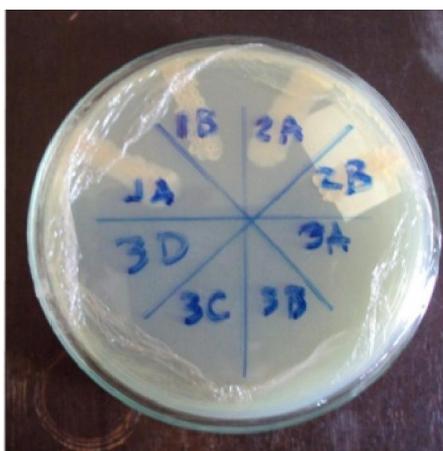
Figura 62- Representação da leitura da CIM, usando-se o corante TTC.

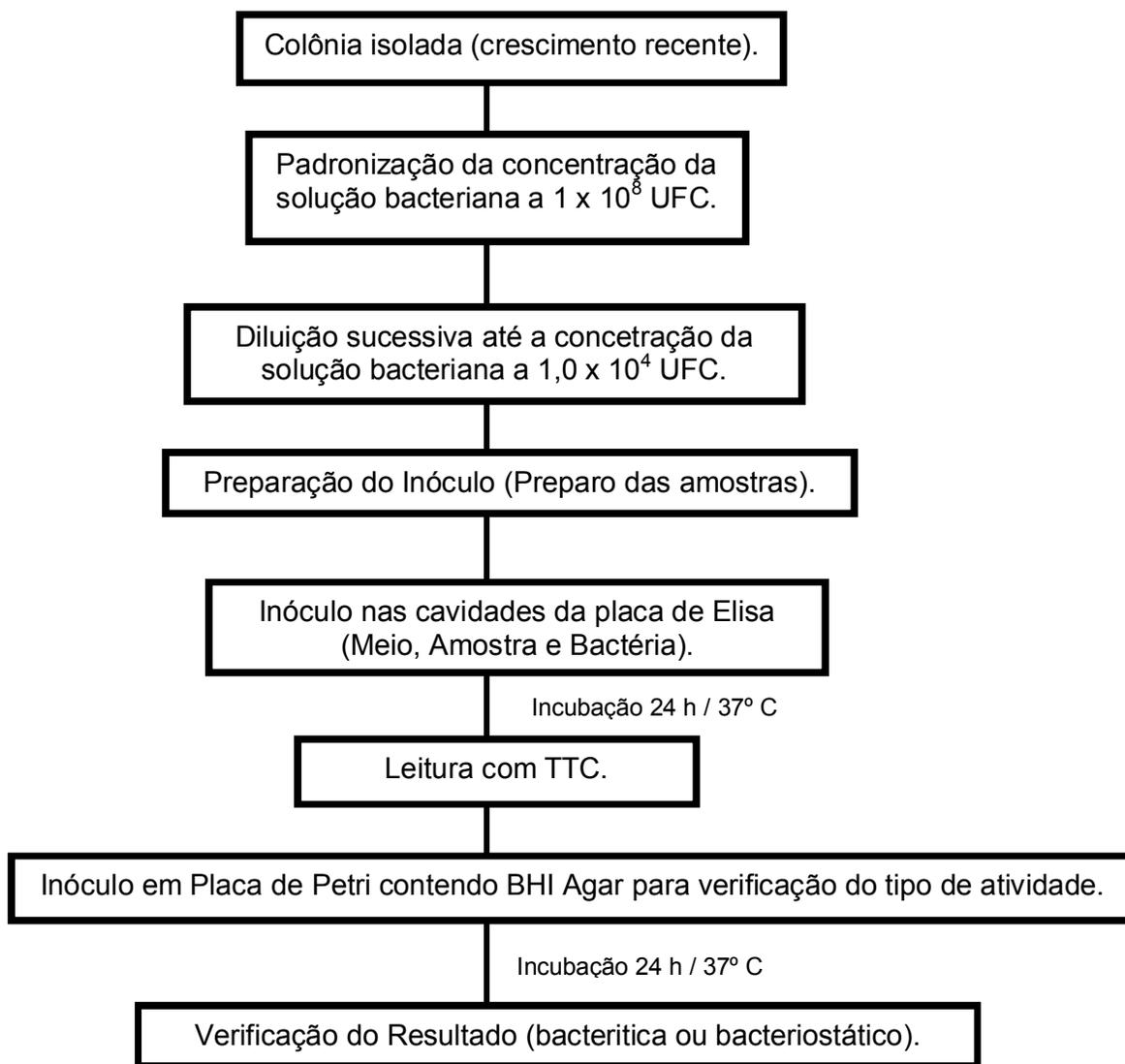
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○
F	●	●	●	●	●	●	○	○	●	●	●	●
G	●	●	●	●	●	●	○	○	●	●	●	●
H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

4.2.15.5 Tipos de atividades antimicrobianas

Após verificar a CIM das substâncias, torna-se necessário saber o tipo de atividade apresentada em cada concentração (bacteriostática ou bactericida). Nas cavidades onde não apresentou coloração vermelha, os extratos ou as substâncias foram (re)inoculados(as) em placa de Petri contendo meio de cultura àgar BHI e incubadas a 37 °C por 24 h. Onde houve crescimento da bactéria, indicava que o extrato ou a substância isolada possuía efeito bacteriostático a essa concentração. E onde não houve crescimento da bactéria, o extrato ou a substância possui efeito bactericida (Figura 63). O Fluxograma 12 (p. 111) representa todas as etapas do ensaio antimicrobiano.

Figura 63- Representação geral do tipo de atividade observada.





Fluxograma 12: Procedimento adotado na execução dos ensaios antimicrobianos.

4.2.16 Ensaio de triagem da atividade citotóxica frente à *Artemia salina*

Os ensaios de citotoxicidade preliminar para as substâncias puras foram realizados nas concentrações de 50, 25, 10, 5 e 1 $\mu\text{g/mL}$. Onde 1 mg da substância pura foi solubilizado em água salina e 100 μL de DMSO, até a obtenção da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Partindo-se dessa solução padrão de 100 $\mu\text{g/mL}$, diluições foram efetuadas para obtenção das concentrações testadas.

Os extratos foram testados nas concentrações de 250, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Onde 5 mg do extrato foi solubilizado em água salina e 100 μL DMSO até a

concentração de 1 mg/mL. Partindo-se dessa solução padrão de 1 mg/mL, efetuou-se diluições para obtenção das concentrações testadas.

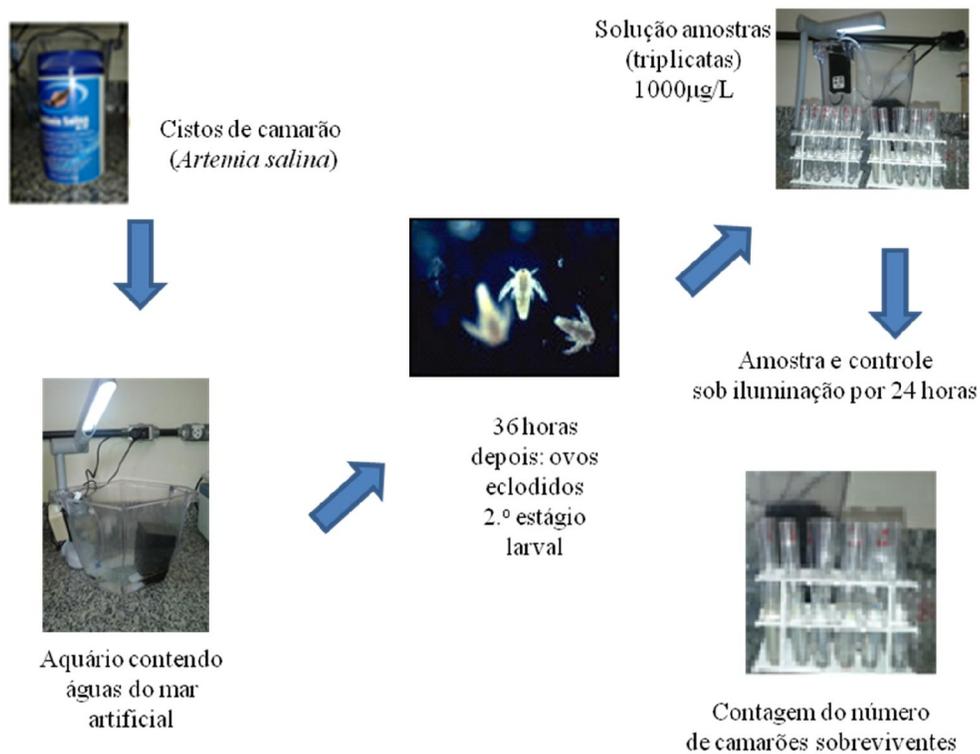
Em cada concentração do ensaio citotóxico preliminar frente à *Artemia salina* tanto para os extratos, assim como, para as substâncias, foram inseridos 10 indivíduos, incluindo o grupo controle.

Baseado na metodologia de Fontenele e colaboradores (1988), com algumas adaptações, preparou-se em uma cuba 1.000 mL de água salina, utilizando 1.000 mL de água destilada e 15 g de sal marinho (NATURAL OCEAN), adicionou-se meia espátula de ovos de *A. salina* (CNPJ 14.737.857/0001-01). O sistema ficou submetido à luz artificial e à temperatura ambiente de (21-25 °C) até o período de eclosão das larvas, o qual se completou após 36 horas do início do experimento. Verificou-se o pH de 8,7 para o sistema após a eclosão das larvas.

Para a realização dos bioensaios (Figura 64, p. 113) foram separadas larvas de *A. salina* recém-eclodidas e distribuídas 10 larvas por tubo de ensaio. Cada tubo continha 100 µL de DMSO e 4.900 µL de solução salina, totalizando 5 mL de solução, sendo que o experimento foi realizado em triplicata. Um grupo controle, também, foi preparado nas mesmas condições sem a presença da substância ou extrato.

Decorrido o tempo de 24 h, realizou-se as leituras da contagem do número de larvas sobreviventes nos testes das amostras e no grupo controle. Utilizou-se o EPA Probit Analysis Program para estimativa a cerca da DL_{50%} do Método de Análise de Probitos. Após o uso do referido programa, os cálculos da média aritmética e do desvio padrão em relação aos testes de citotoxicidade frente à *A. salina* foram feitos através do uso do Programa Microsoft Excel.

Figura 64- Representação do teste de citotoxicidade preliminar frente à *A. salina* realizado no Laboratório de Bioensaios e Química de Micro-organismos (LaBQuiM) da Universidade Federal do Pará.



Fonte: SOUZA, 2014.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* E FUNGOS DE SOLO DA SERRA DOS CARAJÁS

Foram isolados 56 (cinquenta e seis) fungos endofíticos da espécie vegetal *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* e 64 (sessenta e quatro) fungos de solo utilizado Método de Clark adaptado conforme mostra o Quadro 04.

Quadro 04- Quantidade de fungos isolados.

Fungos	Código	Quantidade
<i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i>	FMIC	21
	FFMC	10
	FCMC	25
Solo	FCN	10
	FSF	17
	FRIZ	34
	FeN ₄ W Norte	03

Legenda: FMIC- Fungo micorrízico, FFMC – fungo das folhas da *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*, FCMC- fungo do caule da *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*, FCN- fungo da canga, FSF- fungo do solo da floresta, FRIZ- fungo rizosférico e FeN₄W Norte- fungo da mina de ferro N₄W Norte.

Foram isolados 21 (vinte um) fungos micorrízicos (FMIC 01-21), 10 fungos das folhas (FFMC 01-10) e 25 fungos do caule (FCMC 01-25). Além disso, ainda foram isolados 3 fungos do solo da mina de ferro N₄W Norte (FMFe 01-03), 34 fungos rizosféricos (FRIZ 01-34), 17 fungos do solo da floresta (FSF 01-17) e 10 fungos do solo da Canga (FCN 01-10). Entre o total de fungos isolados, foi escolhido aleatoriamente 15 espécies fúngicas para serem objetos de estudo desta Tese de Doutorado. Nas figuras 65-68 (p.115-116) segue as fotos dos fungos escolhidos e reativados em placas de Petri contendo meio BDA.

Figuras 65- Fotografias de placas de Petri inoculadas com fungos rizosféricos em meio BDA (A- Frente e B-Verso).

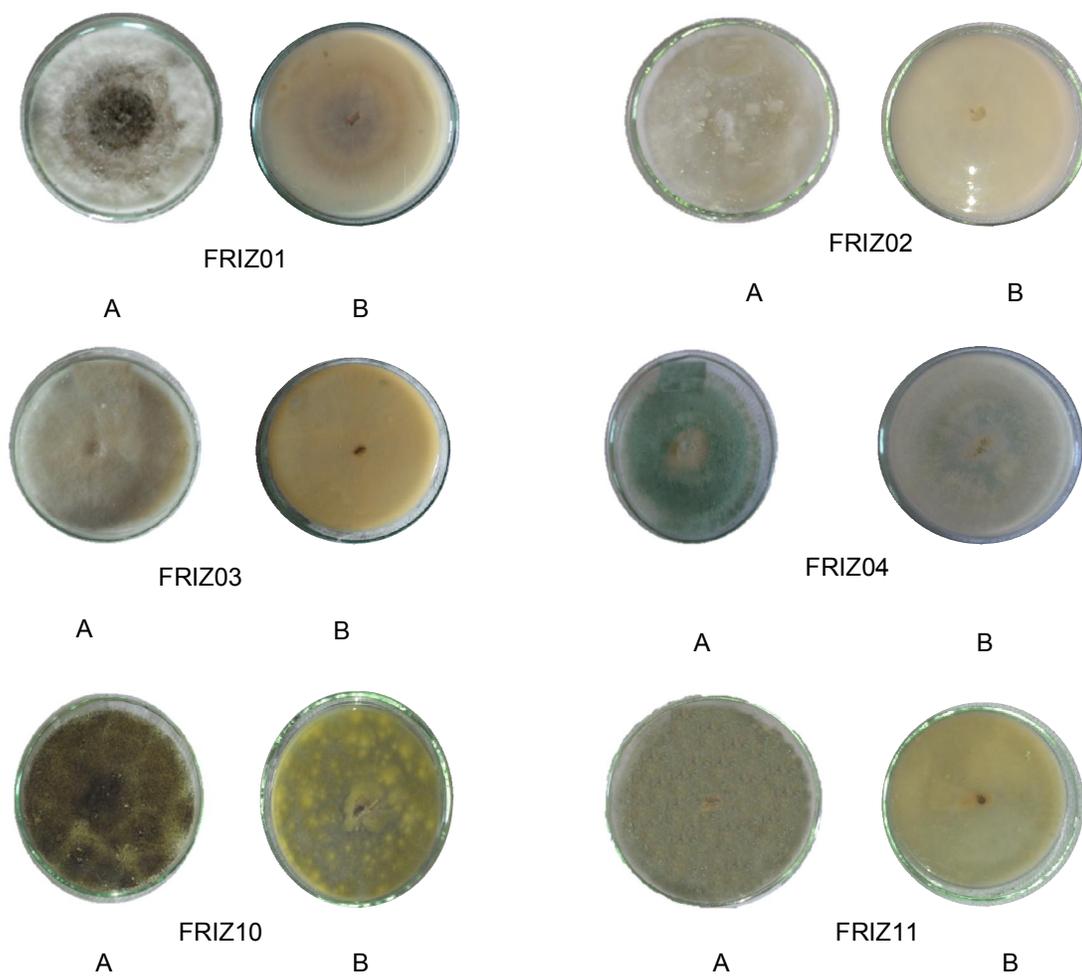


Figura 66- Fotografias de placas de Petri inoculadas com fungos do solo da canga em meio BDA (A- Frente e B-Verso).



Figura 67- Fotografias de placas de Petri inoculadas com fungos micorrízicos em meio BDA (A- Frente e B-Verso).

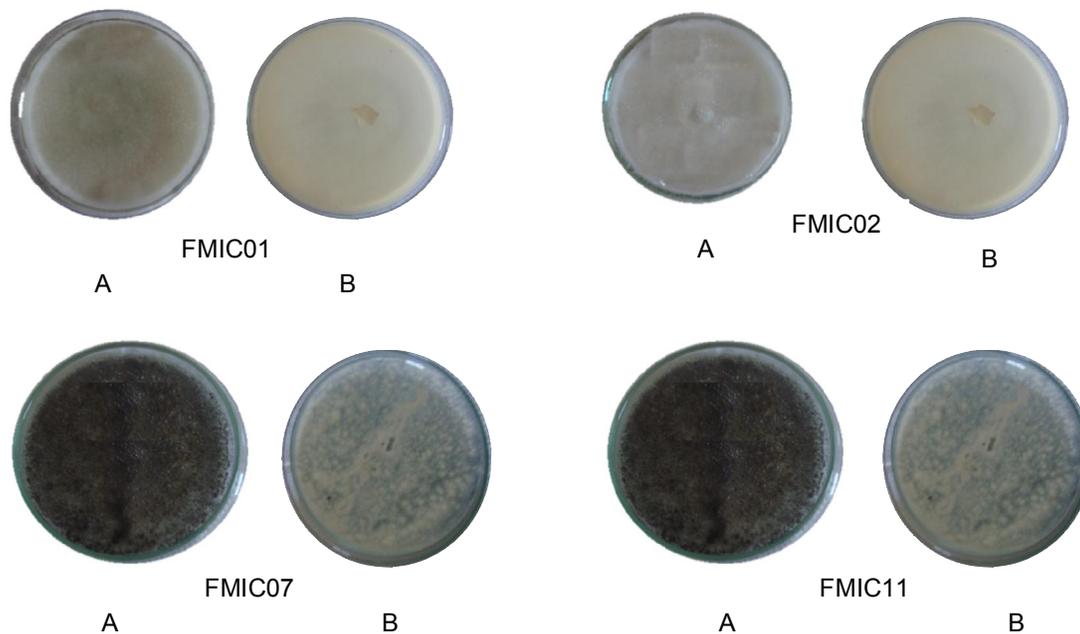


Figura 68- Fotografias de placas de Petri inoculadas com fungos de solo da floresta em meio BDA (A- Frente e B-Verso).



5.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* E DE FUNGOS DE SOLO

Nas análises por CLAE-DAD foi observada uma variedade de classes de metabólitos secundários e/ou primários encontrada nos micro-extratos fúngicos analisados nesta Tese de Doutorado e evidenciada pela presença de bandas cromatográficas com diferentes tempos de retenção (t_R). Foram observados nos cromatogramas comprimentos de onda de máxima absorção ($\lambda_{m\acute{a}x}$) de cromóforos que sugerem a presença de compostos de diversas classes químicas.

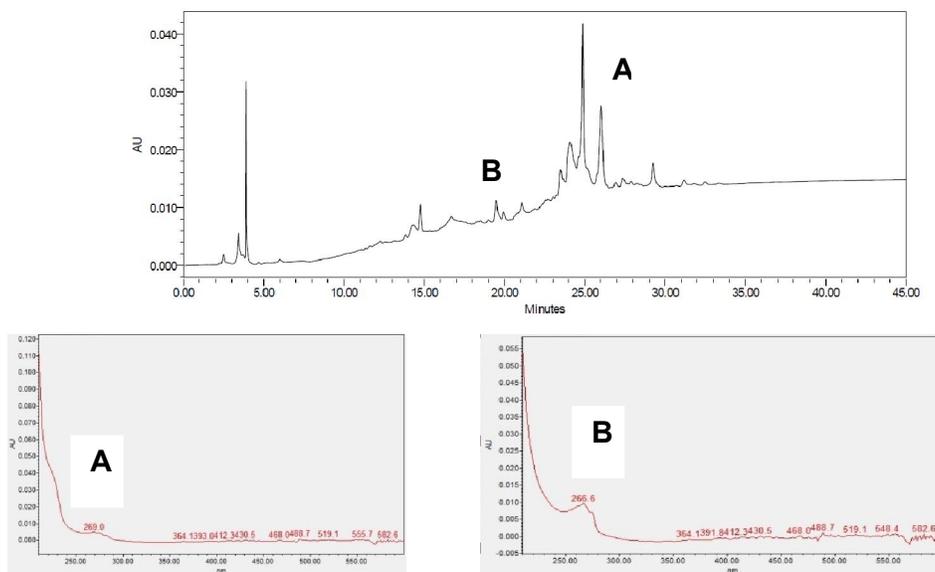
Os cromatogramas dos micro-extratos fúngicos apresentaram de 6 a 17 bandas cromatográficas, sendo que a maioria das bandas está presente na região dos compostos de média polaridade.

Os cromatogramas dos micro-extratos FCN02 (Figura 69, p. 118), FMIC02 (Figura 70, p. 118), FMIC07 (Figura 71, p. 119), FRIZ03 (Figura 72, p. 119) e FSF10 (Figura 73, p. 120) apresentaram uma banda de baixa à média intensidade com o t_R de 19,5 min que no espectro de UV possui $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 266,6 nm, sugerindo a presença de compostos tipo flavonóis (FONSECA *et al.*, 2007). No cromatograma do FRIZ03 (Figura 72, p. 119), foi possível também verificar uma banda de baixa à alta intensidade com os respectivos valores de t_R de 22,0 min e de 19,0 min que no espectro de UV possuem $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 260,7 nm, sugerindo a presença de ácidos fenólicos (MA *et al.*, 2008).

O perfil cromatográfico dos micro-extratos FCN02 (Figura 69, p. 118) e FRIZ10 (Figura 75, p. 121) apresentou bandas de média intensidade com o t_R de 26,1 min e 24,2 min que no espectro de UV possui $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 269,0 nm, sugerindo a presença de alcaloides aporfínicos (LAGE, 2011).

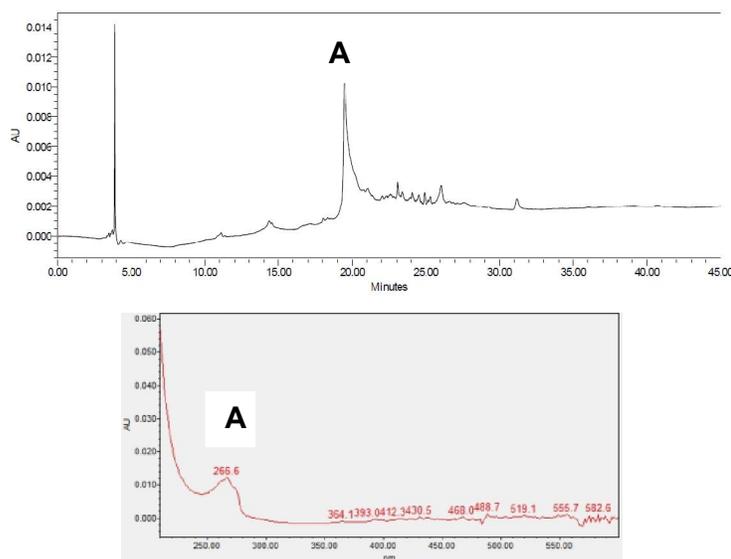
Na análise cromatográfica por CLAE do micro-extrato FRIZ01 (Figura 74, p. 120), foi possível também verificar três bandas de média à alta intensidade com o t_R de 18,7 min que no espectro de UV possui $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 224,1 nm e 265,4 nm, sugerindo a presença de aflatoxinas (NIELSEN; SMEDSGAAR, 2003), 22,0 min que no espectro de UV possuem $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 260,7 nm, sugerindo a presença de ácidos fenólicos (MA *et al.*, 2008) e de 23,1 min e de que no espectro de UV possuem $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 256,0 nm, sugerindo a presença de ésteres benzóicos (NIELSEN; SMEDSGAAR, 2003). O cromatograma do micro-extrato FMIC07 apresentou também uma banda de alta intensidade com t_R de 17,3 min que no espectro de UV possui $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 256,0 nm e 314,2 nm, sugerindo a presença de flavonóides (NIELSEN; SMEDSGAAR, 2003).

Figura 69 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FCN02; $\lambda_{\text{máx}} = 232,0 \text{ nm}$.



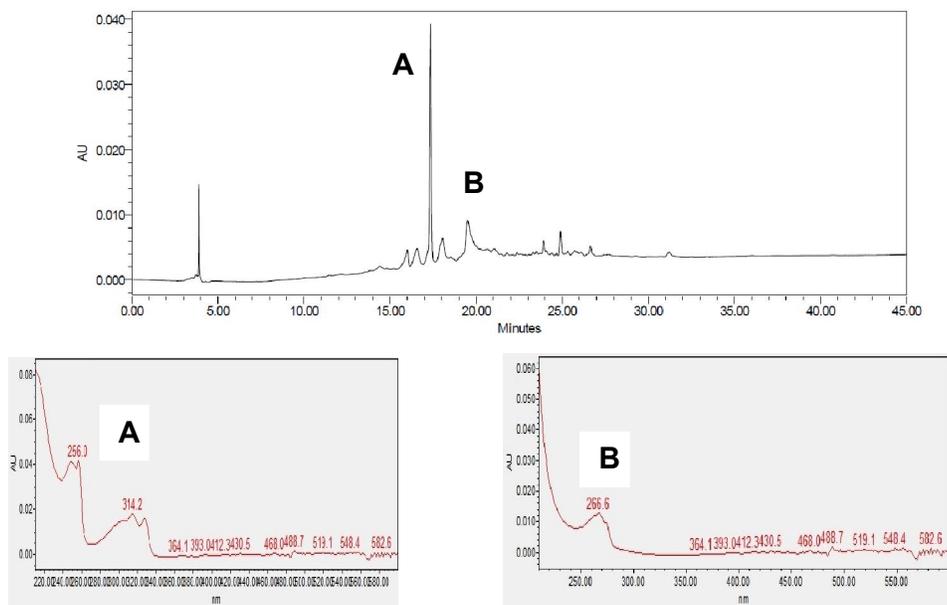
Legenda: A- Banda com t_R de 26,1 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 269,0 nm; B- Banda com t_R de 19,5 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 266,6 nm.

Figura 70 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FMIC02; $\lambda_{\text{máx}} = 266,6 \text{ nm}$.



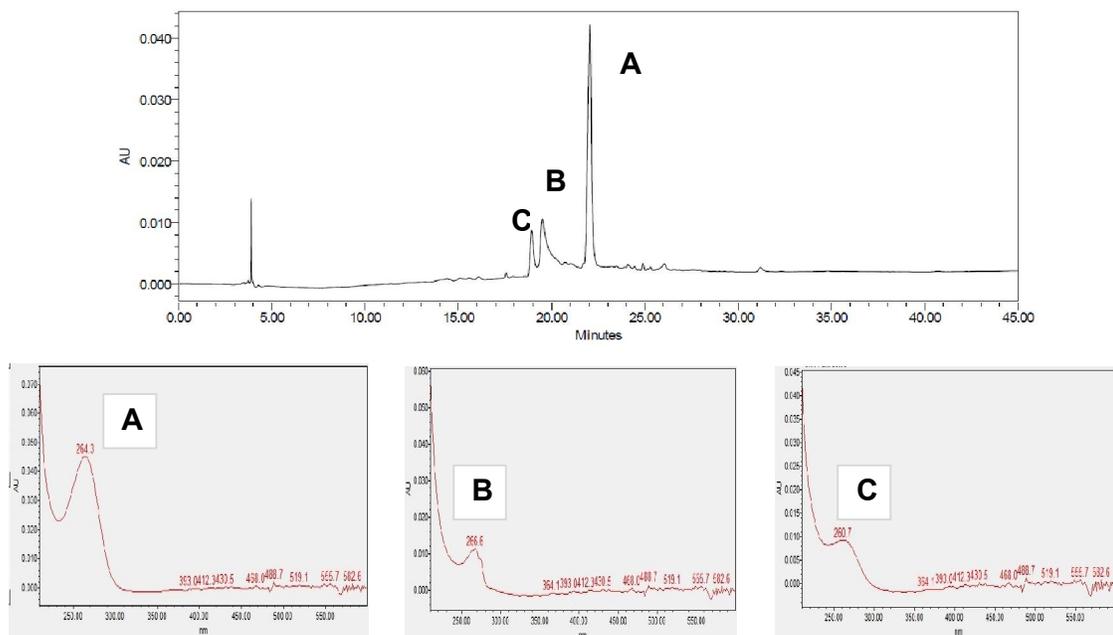
Legenda: A- Banda com t_R de 19,5 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 266,6 nm.

Figura 71– Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FMIC07; $\lambda_{\text{máx}} = 254,0 \text{ nm}$.



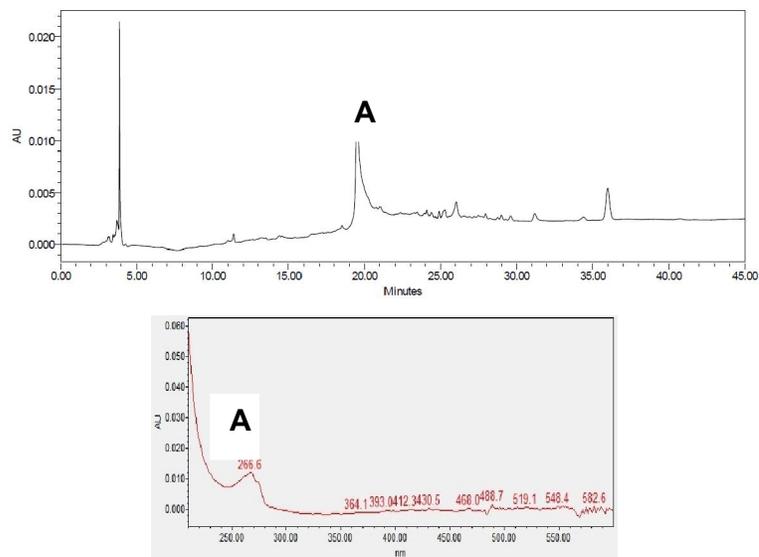
Legenda: A- Banda com t_R de 17,3 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 256,0 nm e 314,2 nm; B- Banda com t_R de 19,5 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 266,6 nm.

Figura 72 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FRIZ03; $\lambda_{\text{máx}} = 270,0 \text{ nm}$.



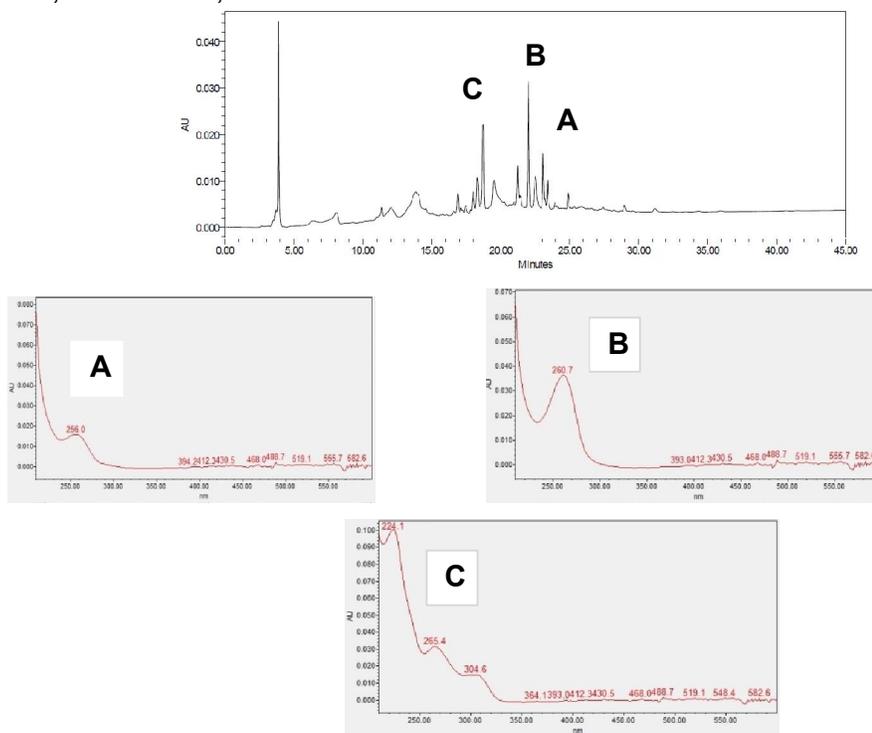
Legenda: A- Banda com t_R de 22,0 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 264,3 nm; B- Banda com t_R de 19,5 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 266,6 nm; C- Banda com t_R de 19,0 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 260,7 nm.

Figura 73 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FSF10; $\lambda_{\text{máx}} = 268,7 \text{ nm}$.



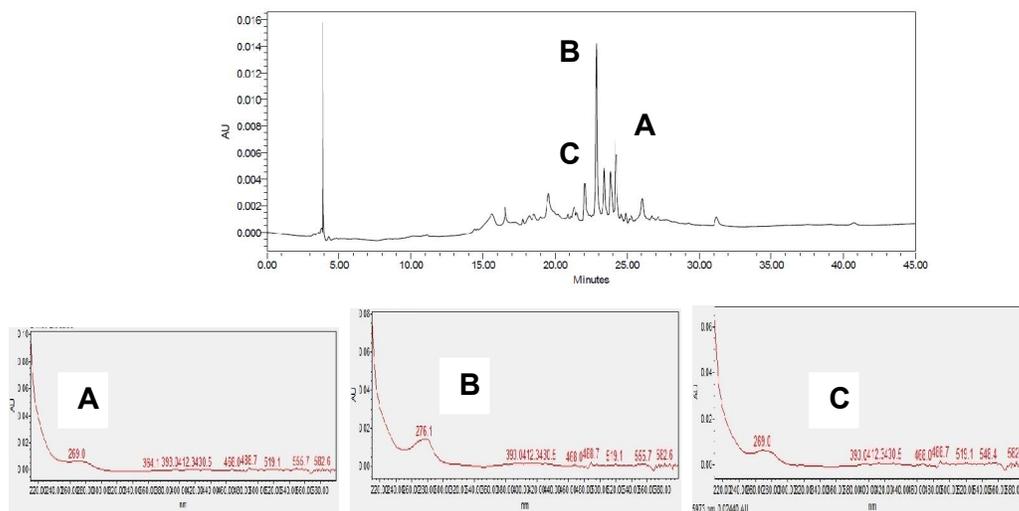
Legenda: A- Banda com t_R de 19,5 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 266,6 nm.

Figura 74 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FRIZ01; $\lambda_{\text{máx}} = 255,0 \text{ nm}$.



Legenda: A- Banda com t_R de 23,1 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 256,0 nm; B- Banda com t_R de 22,0 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 260,7 nm; C- Banda com t_R de 18,7 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 224,1 nm e 265,4 nm.

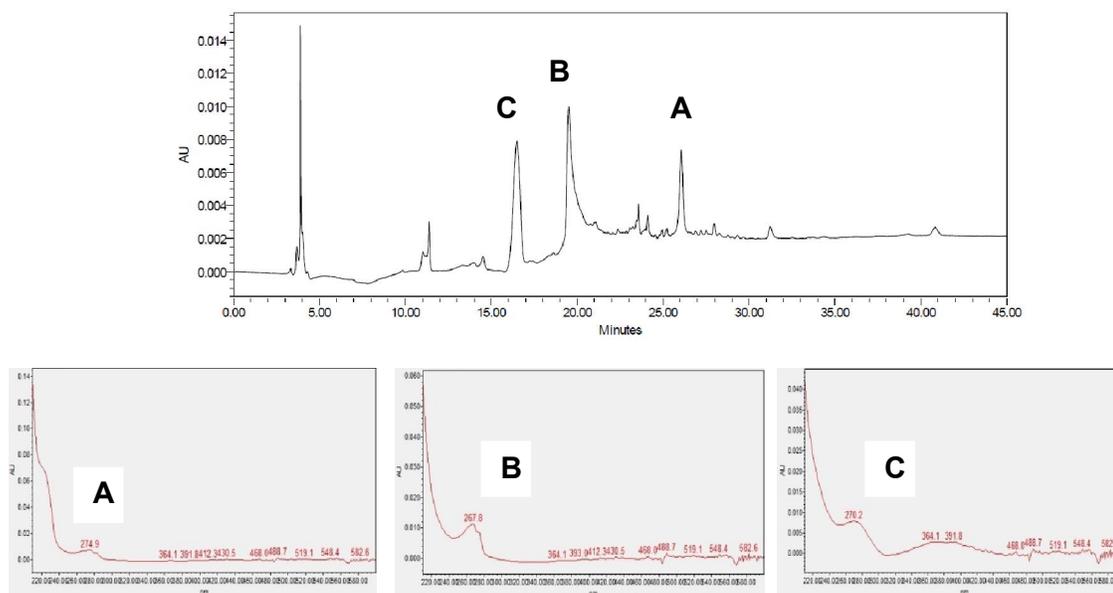
Figura 75 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FRIZ10; $\lambda_{\text{máx}} = 280,0 \text{ nm}$.



Legenda: A- Banda com t_R de 24,2 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 269,0 nm; B- Banda com t_R de 23,0 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 276,1 nm; C- Banda com t_R de 22,0 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 269,0 nm.

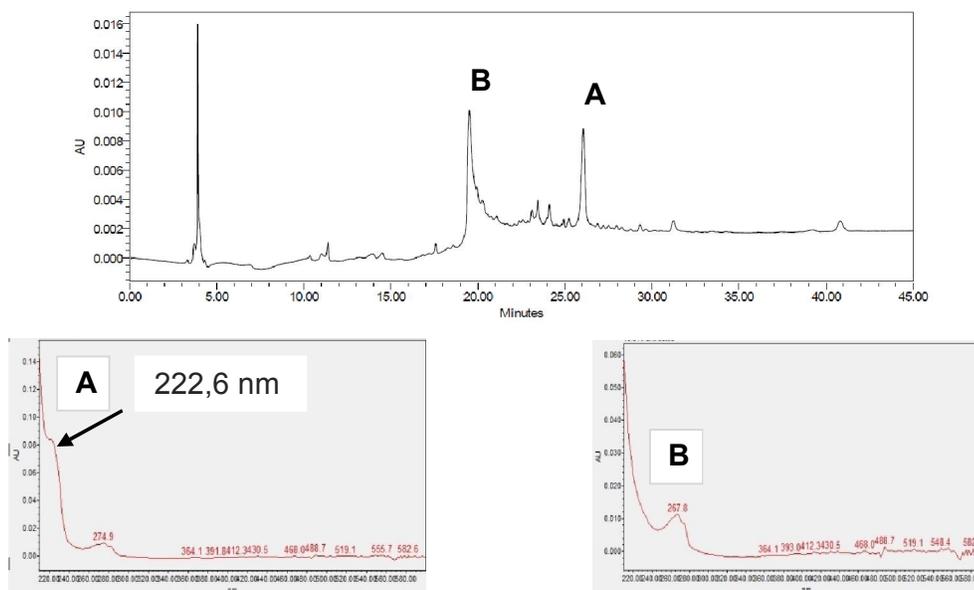
Os cromatogramas dos micro-extratos FCN01 (Figura 76, p. 122), FRIZ02 (Figura 77, p. 122) e *Aspergillus* sp. FRIZ12 (Figura 78, p. 123) apresentaram uma banda de média à alta intensidade com os respectivos tempos de retenção de 26,1 min; 26,0 min e 23,0 min que no espectro de UV possui $\lambda_{\text{máx}}$ de 222,6 e 274,9 nm, sugerindo a presença de flavonóides (LIANDA, 2009). Já, o perfil químico do micro-extrato FRIZ04 (Figura 79, p. 123) também apresenta uma banda de alta intensidade de t_R de 43,6 min que no espectro de UV de $\lambda_{\text{máx}}$ de 222,6 e 274,9 nm, sugerindo a presença de antraquinonas (ENDALE *et al.*, 2013). Já, Os cromatogramas dos micro-extratos FCN01, FRIZ 02 e *Aspergillus* sp. FRIZ12 apresentaram uma banda de média à alta intensidade com o t_R de 19,5 min de no espectro de UV possui $\lambda_{\text{máx}}$ de 267,8 nm, sugerindo a presença de triterpenos (RAMLI *et al.*, 2007) ou flavonas (CHAGAS *et al.*, 2014). O cromatograma do micro-extrato FCN01 também apresentou uma banda de média intensidade com o t_R de 16,5 min de no espectro de UV possui $\lambda_{\text{máx}}$ de 270,2 nm, sugerindo a presença de composto lactônico (NIELSEN; SMEDSGAAR, 2003). O cromatograma do micro-extrato FRIZ04 apresentou, ainda, uma banda de média intensidade com o t_R de 34,1 min que no espectro de UV possui $\lambda_{\text{máx}}$ de 254,8 nm, sugerindo a presença de terpenóides (SILVA *et al.*, 2015).

Figura 76– Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FCN01; $\lambda_{\text{máx}}= 270,0 \text{ nm}$.



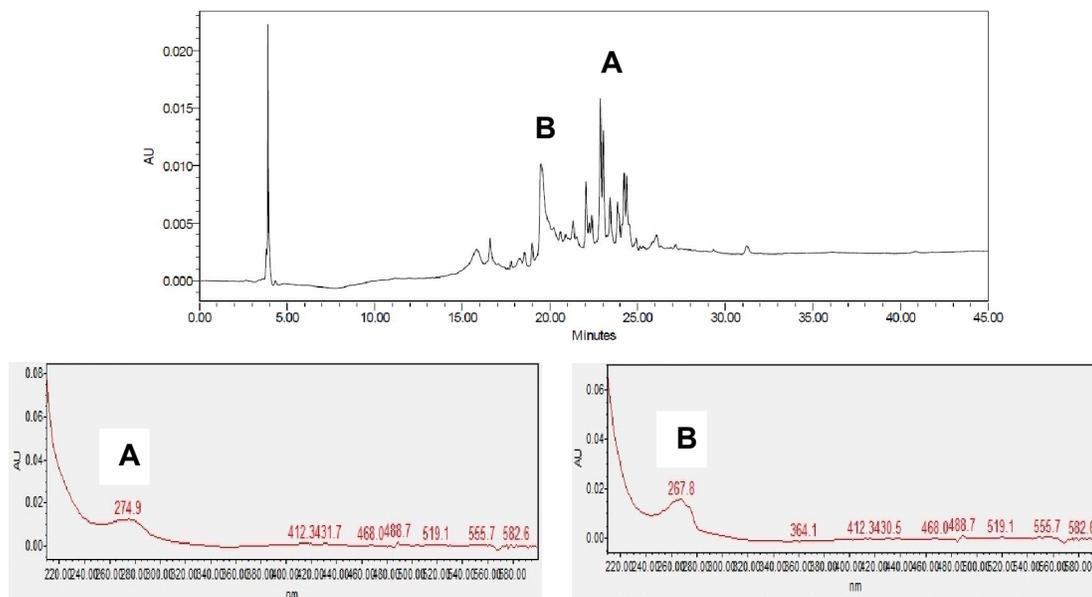
Legenda: A- Banda com t_R de 26,1 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 274,9 nm; B- Banda com t_R de 19,5 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 267,8 nm; C- Banda com t_R de 16,5 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 270,2 nm.

Figura 77 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FRIZ02; $\lambda_{\text{máx}}= 270,0 \text{ nm}$.



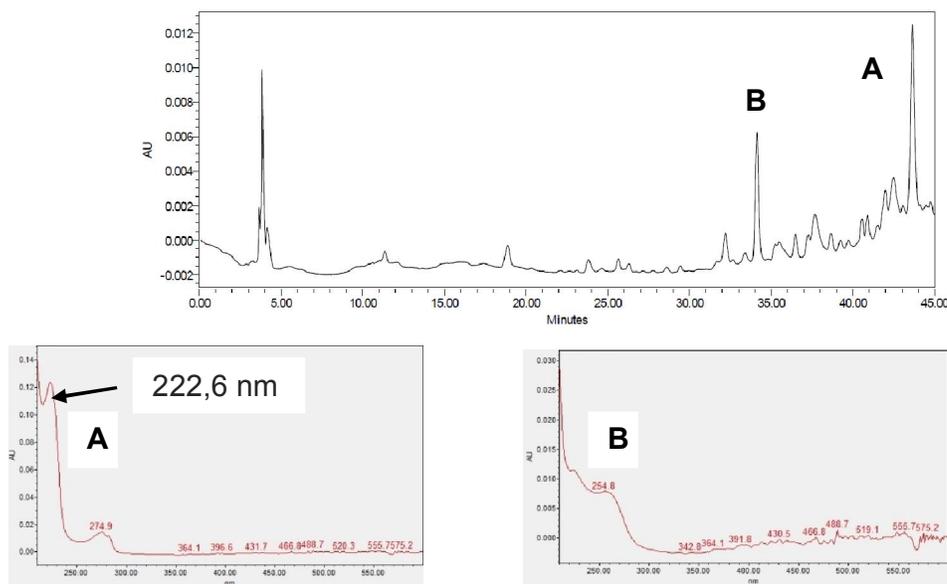
Legenda: A- Banda com t_R de 26,1 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 222,6 nm e 274,9 nm; B- Banda com t_R de 19,5 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 267,8 nm.

Figura 78– Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico *Aspergillus* sp. FRIZ12; $\lambda_{\text{máx}} = 270,0 \text{ nm}$.



Legenda: A- Banda com t_R de 23,0 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 274,9 nm; B- Banda com t_R de 19,5 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 267,8 nm.

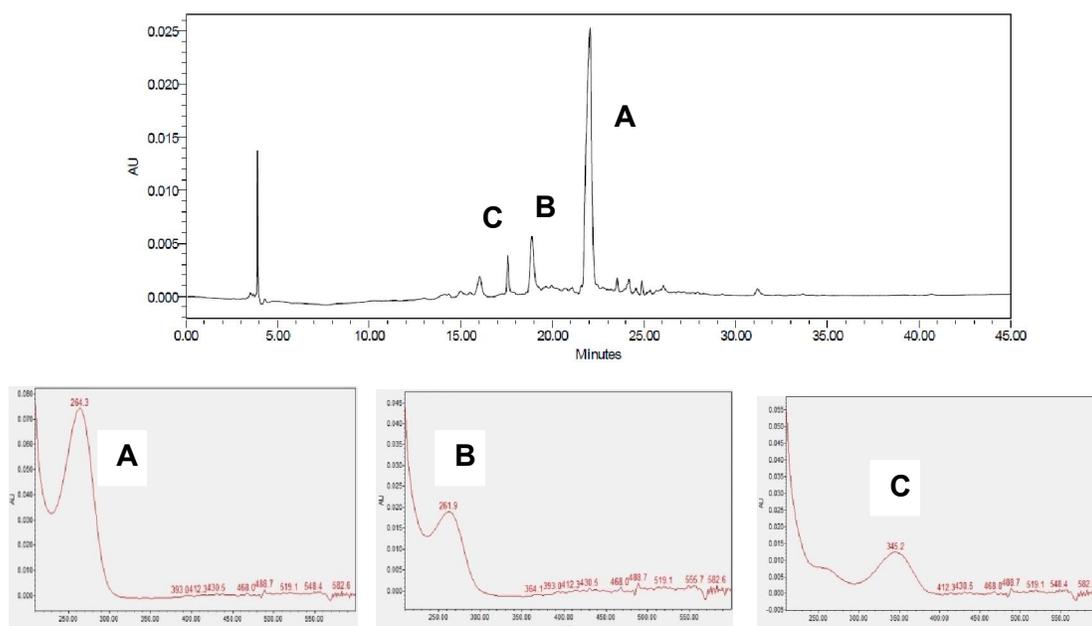
Figura 79 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FRIZ04; $\lambda_{\text{máx}} = 270,0 \text{ nm}$.



Legenda: A- Banda com t_R de 43,6 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 222,6 nm e 274,9 nm; B- Banda com t_R de 34,1 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 254,8 nm.

O perfil químico do micro-extrato FRIZ11 (Figura 80) por CLAE-DAD apresentou duas bandas de baixa intensidade com t_R de 17,6 min que no espectro de UV possuem $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 345,2 nm, sugerindo a presença de flavonoides O-glicosilados (MOURA *et al.*, 2011) e em t_R de 19,0 min que no espectro de UV possuem $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 261,9 nm, sugerindo a presença de sesquiterpenos (RAHBAEK *et al.*, 1997) e uma banda de alta intensidade com t_R de 22,0 min que no espectro de UV possui $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 264,3 nm, sugerindo a presença de neurotoxinas derivadas de diterpenoides indólicos (MUNDAY-FINCH *et al.*, 1998).

Figura 80 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FRIZ11; $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 285,9 nm.

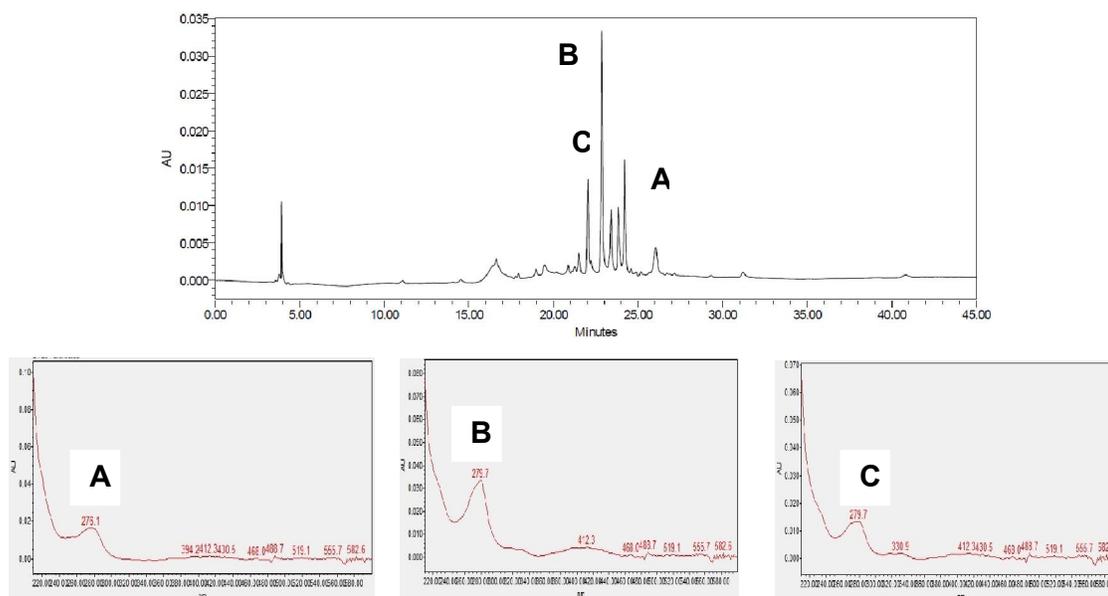


Legenda: A- Banda com t_R de 22,1 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 264,3 nm; B- Banda com t_R de 19,0 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 261,9 nm; C- Banda com t_R de 17,6 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 345,2 nm.

Os cromatogramas dos micro-extratos FMIC11 (Figura 81, p. 125) e FRIZ10 (Figura 75, p. 121) apresentaram uma banda de alta intensidade com os respectivos valores de t_R de 24,0 min e 23,0 min que no espectro de UV possui $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 276,1 nm sugerindo a presença de ácidos carboxílicos (NIELSEN; SMEDSGAAR, 2003). No perfil cromatográfico por CLAE do micro-extrato FMIC11 (Figura 81, p. 125), destacaram-se ainda duas bandas cromatográficas de alta intensidade com t_R de 22,0 min e de 23,0 min que no espectro de UV possuem $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 279,7 nm, sugerindo

a presença de citocalasinas alcaloides (DING *et al.*, 2006) ou azafilonas (VALADÃO, 2012). Por fim, o cromatograma do micro-extrato FRIZ 10 também apresentou duas bandas de média intensidade com os t_R de 22,0 min e 24,2 min que no espectro de UV possui $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 269,0 nm, sugerindo a presença de compostos tipo flavonas (RINALDO, 2007).

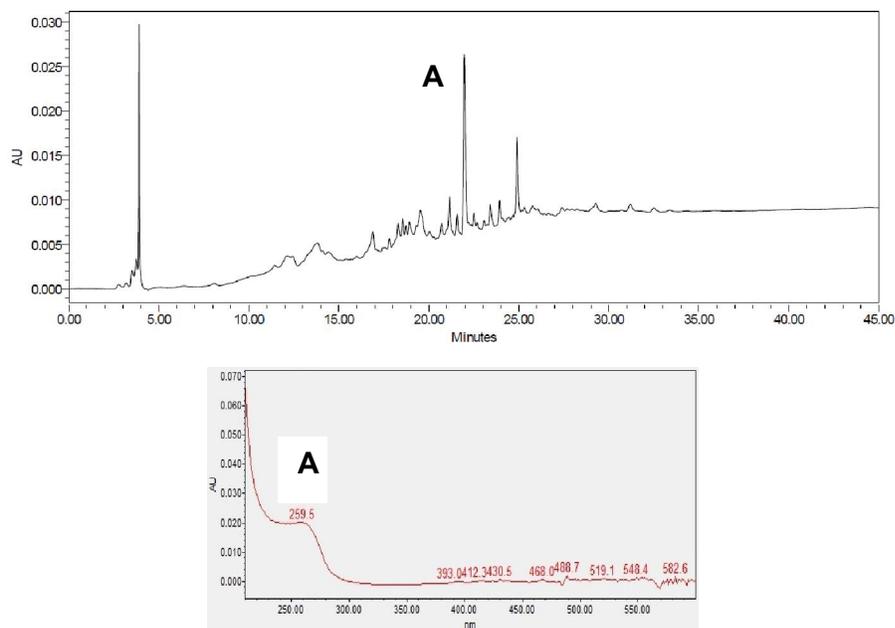
Figura 81 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FMIC11; $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 280,0 nm.



Legenda: A- Banda com t_R de 24,2 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 276,1 nm; B- Banda com t_R de 23,0 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 279,7 nm; . C- Banda com t_R de 22,0 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 279,7 nm.

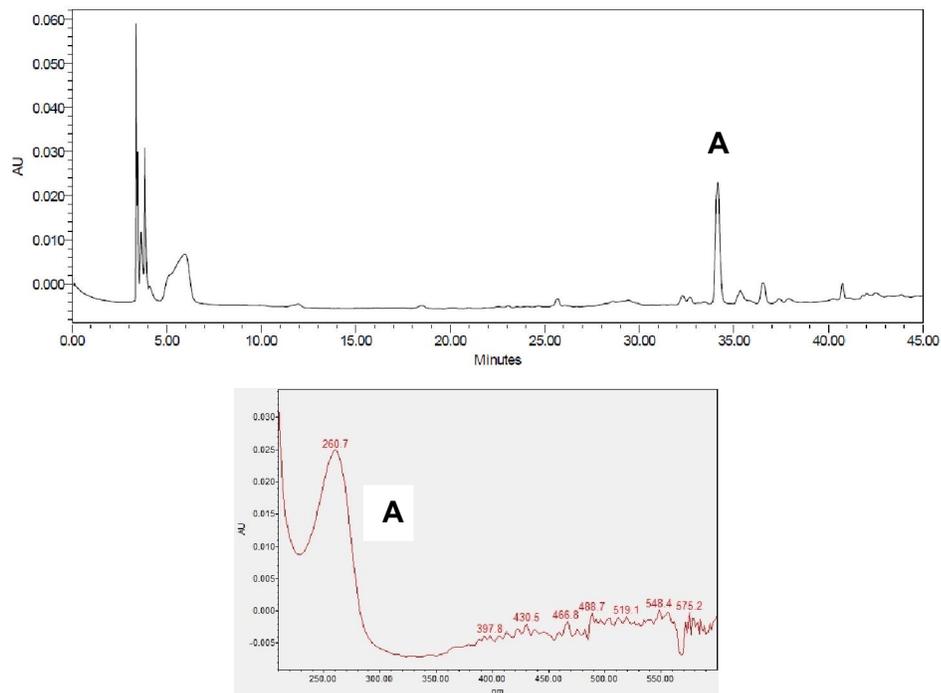
O perfil químico do micro-extrato do fungo FSF09 (Figura 82, p. 126) apresentou uma banda de alta intensidade com o t_R de 22,0 min que no espectro de UV possui $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 259,5 nm, sugerindo a presença de nucleosídeos (MOURA *et al.*, 2011) e micotoxinas (STINSON *et al.*, 1982). Por fim, o perfil químico do micro-extrato do fungo FMIC01 (Figura 83, p. 126) apresentou uma banda de alta intensidade com o t_R de 34,2 min que no espectro de UV possui $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 260,7 nm, sugerindo a presença de piridonas (WU *et al.*, 2014).

Figura 82 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FSF09; $\lambda_{\text{máx}} = 240,0 \text{ nm}$.



Legenda: A- Banda com t_R de 22,0 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 259,5 nm.

Figura 83 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD para o micro-extrato fúngico FMIC01; $\lambda_{\text{máx}} = 265,0 \text{ nm}$.



Legenda: A- Banda com t_R de 34,2 min apresenta no espectro de UV com $\lambda_{\text{máx}}$ de 260,7 nm.

5.3 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DOS MICRO-EXTRATOS

Foi utilizada a ferramenta PCA para a análise quimiométrica dos 15 micro-extratos de fungos endofíticos de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* e dos fungos de solo, cuja técnica foi disseminada por Wold e colaboradores em 1987. Na PCA, cada um dos espectros de massa, que constitui um conjunto de dados multivariados, torna-se um *spot* (objeto) em um espaço virtual definido por eixos ortogonais que correlacionam a variância total dos dados no plano ao qual pertence (MILLER; MILLER, 2010). Com essa distribuição, observa-se a organização não supervisionada dos dados, ou seja, eles se autoorganizam de acordo com suas similaridades e diferenças, possibilitando a formação de agrupamentos desses *spots* (CARVALHO, 2011).

Antes que se faça a utilização desta ferramenta, é preciso, na grande maioria das análises quimiométricas, que seja feito algum tipo de pré-processamento dos dados com o intuito de atribuir a mesma importância a todas as variáveis, assim, é utilizado o autoescalamento dos dados. Este pré-tratamento de dados, quando utilizado em espectrometria de massas, faz com que qualquer pequeno detalhe nas relações *m/z* tenha a mesma importância no momento das análises quimiométricas. Essa propriedade é fundamental, pois se tratando de amostras de diversas espécies fúngicas, estas pequenas diferenças nos *fingerprints* poderão ser decisivas no desenvolvimento dos modelos quimiométricos de classificação (CARVALHO, 2011).

Na PCA, os escores são as coordenadas das amostras projetadas em um novo sistema de eixos, formado pelos componentes principais, e revelam similaridades ou diferenças entre eles, bem como a ocorrência de tendências e amostras com comportamento atípico (BEEBE *et al.*, 1998). Dessa forma, amostras com composição química similar apresentaram valores de escores próximos, enquanto que amostras diferentes entre si tendem a apresentar valores bem distintos (RIBEIRO *et al.*, 2013).

A PCA mostra que foram observados 51 *spots*, onde a maioria está contida em dois principais grupos. A Figura 84 (p. 128) apresenta o gráfico de *spots* de Q₂ (quadrante 02) versus q₄ (quadrante 04). Dessa figura, é possível observar que Q₄ separa os compostos em escores positivos, dos que se encontra em escores

negativos em Q_2 e isso significa que o agrupamento de substâncias é mais intensificado em Q_4 que em Q_2 .

A Figura 85 (p. 129) apresenta o gráfico de escores no qual Q_1 e Q_4 descreveram mais de 90% de variância do conjunto de dados analisados e representaram a tendência de formação de somente dois agrupamentos amostrais que produzem as mesmas classes químicas de compostos. No Q_1 , há a presença dos micro-extratos dos fungos FMIC01, FMIC 11, FRIZ12, FSF09, FSF10, FCN01 e FCN02. Já, o Q_4 apresentou os fungos FRIZ01, FRIZ02, FRIZ03, FRIZ04, FRIZ10, FMIC02 e FMIC07. Destaca-se também um terceiro agrupamento formado apenas por micro-extrato do fungo FRIZ11 que apresenta, então, uma composição química diferente das demais amostras presentes na análise quimiométrica por PCA.

Figura 84 – Gráfico de *spots* dos micro-extratos fúngicos.

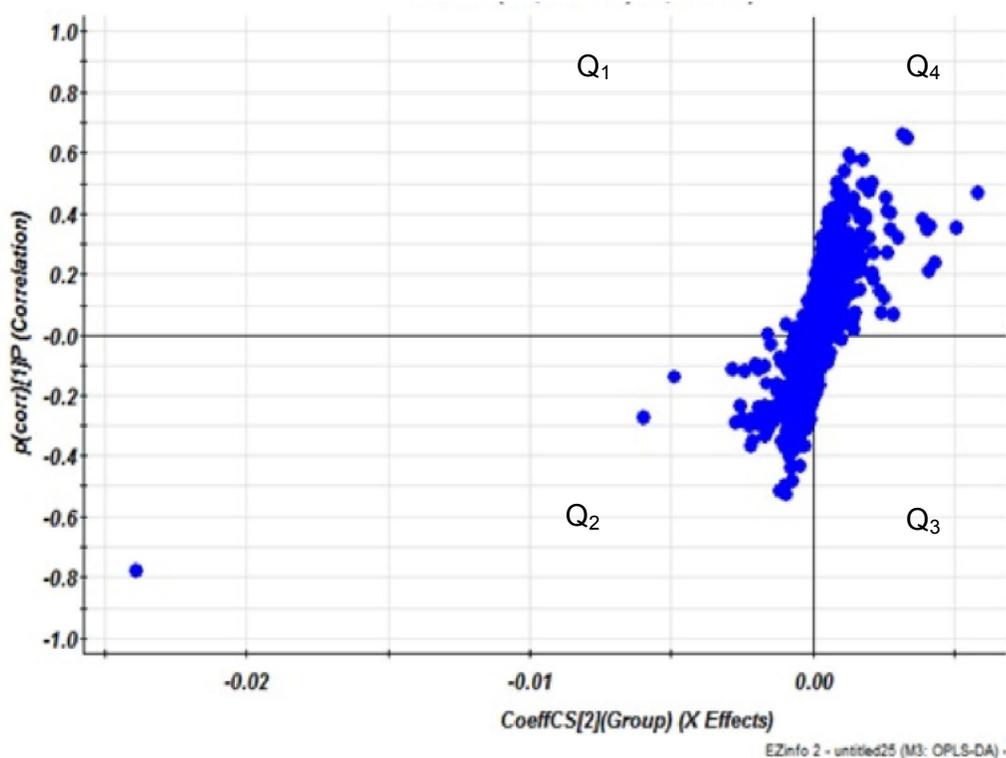
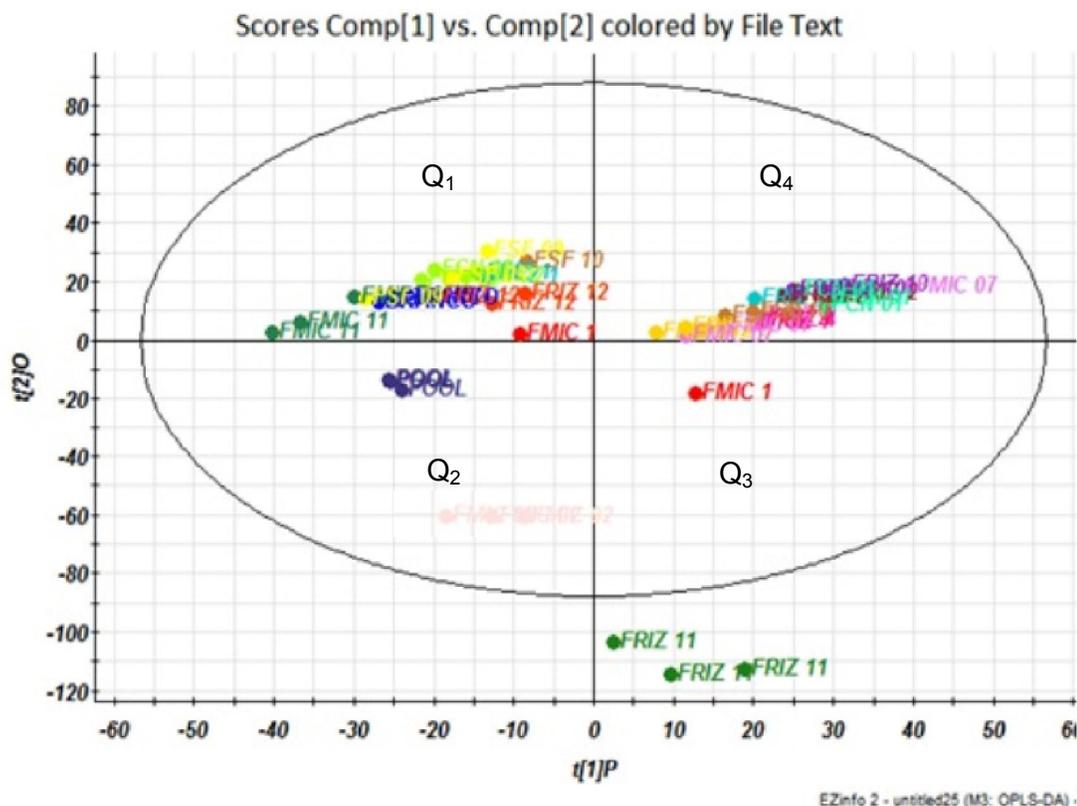


Figura 85- Gráfico de scores dos micro-extratos fúngicos.



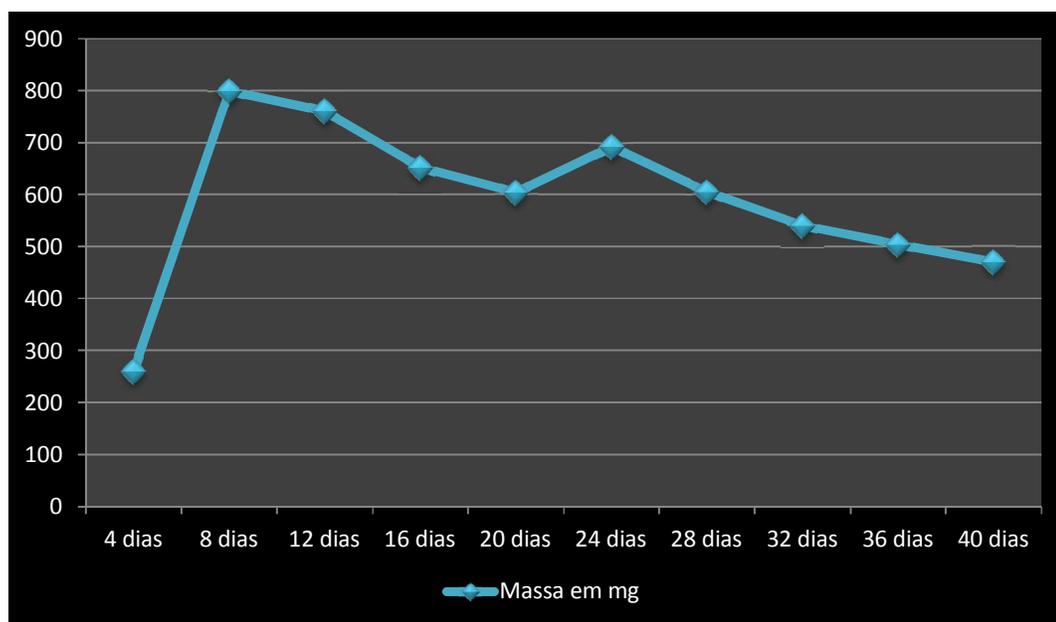
5.4 CURVA DE CRESCIMENTO DO FUNGO DE SOLO *Aspergillus* sp. FRIZ12 PARA A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O metabolismo secundário de micro-organismos é extremamente diversificado, proporcionando a descoberta de novos compostos químicos bem como novas classes de compostos (PIMENTA, 2010). Todavia, a produção de metabólitos secundários por parte de fungos depende intrinsecamente das condições utilizadas para seu crescimento e desenvolvimento (tempo de incubação, temperatura, pH) (TEVA *et al.*, 2009) e do meio empregado (MAHAJAN; BALACHANDRAN, 2012). Outro fator importante seria a necessidade de exposição à radiação luminosa, variando de acordo com a espécie: muitas exigem luz para o seu desenvolvimento; outras são inibidas pela luz (PIMENTA, 2010).

A partir das diversas condições expostas acima para o crescimento de fungos; o fungo *Aspergillus* sp. FRIZ12, escolhido através dos resultados dos

ensaios antimicrobianos, foi cultivado segundo as condições expostas no subitem 4.2.6 da METODOLOGIA e se verificou que o período ótimo para a produção de metabólitos secundários por este fungo foi entre 23 a 25 dias, uma vez que a curva se mostrou mais estável durante este intervalo de tempo conforme se nota na Figura 86.

Figura 86- Curva de crescimento do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12.



5.5 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS DOS MICRO-EXTRATOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Mimosa acutistipula* var. *férrea* E DE FUNGOS DE SOLO

Foram realizados os ensaios antimicrobianos dos micro-extratos dos fungos endofíticos de *Mimosa acutistipula* var. *férrea* e dos fungos de solo escolhidos anteriormente no ítem 5.1 frente às bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Segundo Holetz e colaboradores (2002), os extratos podem ser classificados quanto a sua atividade antimicrobiana como: bom se a concentração da atividade antimicrobiana for menor que 100 µg/mL; moderado se a concentração da atividade antimicrobiana for entre 100 a 500 µg/mL; fraco se a concentração da atividade

antimicrobiana for entre 500 a 1.000 µg/mL e inativo se a concentração da atividade antimicrobiana for superior a 1.000 µg/mL.

Frente à bactéria *Bacillus subtilis*, os micro-extratos dos fungos FRIZ01, FRIZ02, FRIZ03, FRIZ04, *Aspergillus* sp. FRIZ12, FCN01, FCN02 e FMIC11 apresentaram boas atividades antimicrobianas, pois seus valores de CIM foram inferiores a 100 µg/mL. Já, os micro-extratos dos fungos FRIZ10, FRIZ11, FSF09, FSF10, FMIC01, FMIC02 e FMIC07 não apresentaram atividade antimicrobiana para a bactéria Gram-positiva.

Os micro-extratos dos fungos FCN01 e FCN02 apresentaram atividade bactericida até a concentração de 125 µg/mL e bacteriostática até a concentração de 7,81 µg/mL em relação à bactéria *Escherichia coli*. Destacaram-se também os micro-extratos dos fungos FRIZ01, FRIZ03, FRIZ04, *Aspergillus* sp. FRIZ12 e FSF10 por inibirem o crescimento da referida bactéria até as respectivas concentrações de 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 62,5 µg/mL e 250 µg/mL. Os micro-extratos dos fungos FRIZ03, FRIZ04 e *Aspergillus* sp. FRIZ12 apresentaram boas atividades porque tiveram atividades bacteriostáticas até as concentrações de 15,62 µg/mL; 31,25 µg/mL e 15,62 µg/mL, respectivamente. É importante salientar que o micro-extrato rizosférico do fungo FRIZ02 teve boa atividade antimicrobiana frente à *E. coli* com valor de CIM de 31,25 µg/mL, enquanto que os micro-extratos dos fungos FRIZ10 e FRIZ11 mostraram-se inativos frente à *E. coli*. Os micro-extratos dos fungos FMIC02 e FMIC07 possuem atividades bacteriostáticas até as concentrações de 62,5 µg/mL e 125 µg/mL, mas não houve atividade antibacteriana frente à *E. coli* para os micro-extratos dos fungos micorrízicos FMIC01 e FMIC11. Por fim, o micro-extrato do fungo FSF09 apresentou atividade bacteriostática até a concentração de 15,62 µg/mL frente à *E. coli*.

Frente à *P.aeruginosa*, os micro-extratos dos fungos FRIZ10, FRIZ 11 e *Aspergillus* sp. FRIZ12 apresentaram as melhores atividades antimicrobianas com valor de CIM de 7,81 µg/mL. Da mesma forma, os micro-extratos dos fungos FRIZ04, FSF09, FCN01, FCN02, FMIC02 e FMIC07 tiveram boas atividades antimicrobianas *P.aeruginosa*. Enquanto que os micro-extratos dos fungos FRIZ01, FRIZ02 e FSF10 relataram moderadas atividades antimicrobianas frente à *P.aeruginosa*. Por fim, os micro-extratos dos fungos FRIZ03, FMIC01 e FMIC11 mostraram-se inativos frente à bactéria Gram-negativa *P.aeruginosa*.

O Quadro 05 resume todos os ensaios antimicrobianos dos micro-extratos dos fungos destacados anteriormente frente às bactérias *B. subtilis*, *E.coli* e *P. aeruginosa*.

Quadro 05. Valores de CIM para os ensaios antimicrobianos dos micro-extratos dos fungos endofíticos de *Mimosa acutistipula var. férrea* e fungos de solo frente às bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Fungos	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
FRIZ01	62,5 (-)	250 (=)	250 (-)
FRIZ02	31,25 (-)	31,25 (-)	125 (-)
FRIZ03	15,62 (-)	15,62 (-)	> 500
FRIZ04	15,62 (-)	31,25 (-)	31,25 (-)
FRIZ10	> 500	> 500	7,81 (-)
FRIZ11	> 500	> 500	7,81 (-)
<i>Aspergillus sp.</i> FRIZ12	7,81 (-)	15,62 (-)	7,81 (-)
FSF09	> 500	15,62 (-)	62,5 (-)
FSF10	> 500	250 (=)	125 (-)
FCN01	62,5 (-)	7,81 (-)	62,5 (-)
FCN02	31,25 (-)	7,81 (-)	62,5 (-)
FMIC01	> 500	> 500	> 500
FMIC02	>500	62,5 (-)	62,5 (-)
FMIC07	> 500	125 (-)	62,5 (-)
FMIC11	7,81 (-)	> 500	> 500

Legenda: *HOLETZ *et al.* (2002); CIM; = Bactericida; - Bacteriostático.

5.6 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS PARA OS EXTRATOS ORGÂNICOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS E DO FUNGO DE SOLO

5.6.1 Ensaios antimicrobianos para os extratos orgânicos do fungo endofítico *Aspergillus sp.* EJC08

Conforme a escala de ensaio antimicrobiano desenvolvida por Holetz e colaboradores (2002), os extratos EHA, EAA e FHIDROEMA-2 apresentaram boas atividades antimicrobianas frente à *Bacillus subtilis*. Já, os extratos FHIDROEMA-1, FAEMA-1 e FAEMA-2 apresentaram moderadas atividades antimicrobianas frente à bactéria Gram-positiva mencionada acima.

Em relação à *E.coli*, os extratos EHA, EAA e FHIDROEMA-2 apresentaram atividades bacteriostáticas até as concentrações de 39,06 µg/mL; 78,12 µg/mL e

78,02 µg/mL, respectivamente. Já, os extratos FHIDROEMA-1, FAEMA-1 e FAEMA-2 também apresentaram atividade bacteriostática até as respectivas concentrações de 156,25 µg/mL; 312,5 µg/mL e 156,25 µg/mL.

Os extratos EHA e EAA apresentaram boas atividades antimicrobianas frente à *Pseudomonas aeruginosa*. Já, os extratos acetato de etila, FAEMA-1, FAEMA-2 e FHIDROEMA-2 apresentaram moderadas atividades antimicrobianas em relação à *P. aeruginosa*. Por fim, o extrato FHIDROEMA-1 apresentou uma fraca atividade antimicrobiana para a bactéria Gram-negativa citada.

O Quadro 06 expressa os resultados dos ensaios antimicrobianos de todos os extratos e fases orgânicas obtidas do fungo endofítico *Aspergillus sp.* EJC08.

Quadro 06. Resultados dos ensaios antimicrobianos dos extratos e fases orgânicas obtidos do fungo endofítico *Aspergillus sp.* EJC08.

Extratos fúngicos	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EHA	78,12 (-)	39,06 (-)	39,06 (-)
FHIDROEMA-1	156,25 (-)	156,25 (-)	625 (-)
FAEMA-1	156,25 (-)	312,5 (-)	156,25 (-)
FAEMA-2	156,25 (-)	156,25 (-)	312,5 (-)
EAA	78,12 (-)	78,12 (-)	78,12 (-)
FHIDROEMA-2	78,12 (-)	78,12 (-)	156,25 (-)

Legenda: CIM; - Bacteriostático.

5.6.2 Ensaio antimicrobianos para os extratos orgânicos do fungo endofítico *Exserohilum rostratum* 1.11 Er

Conforme a escala de ensaio antimicrobiano desenvolvida por Holetz e colaboradores (2002), o extrato FAEMEr apresentou boa atividade antimicrobiana frente à bactéria *Bacillus subtilis*. Já, os extratos EAEr e FHIDROEMEr apresentaram moderadas atividades antimicrobianas para a bactéria *B. subtilis*. Por fim, os extratos hexânico e FHEXEMEr mostraram-se inativos.

Quanto ao ensaio antimicrobiano frente à *E.coli*, os extratos EHEr, EAEr e FHIDROEMEr do fungo endofítico *Exserohilum rostratum* 1.11 Er apresentaram atividades bacteriostáticas até as concentrações de 78,12 µg/mL; 156,25 µg/mL e 312,5 µg/mL, respectivamente. Já, os extratos FAEMEr e FHEXEMEr também apresentaram atividades bacteriostáticas até as concentrações de 312,5 µg/mL e 1.250 µg/mL, respectivamente.

Conforme a escala de ensaio antimicrobiano desenvolvida por Holetz e colaboradores, o extrato FAEMEr apresentou moderada atividade antimicrobiana frente à *Pseudomonas aeruginosa*, com atividade bacteriostática até a concentração de 312,5 µg/mL. Já, o extrato EAER apresentou fraca atividade antimicrobiana em relação à *P. aeruginosa*, com atividade bacteriostática até a concentração de 625 µg/mL. Por fim, os extratos EHEr, FHEXEMEr e FHIDROEMEr mostraram-se inativos conforme é observado no Quadro 07.

Quadro 07. Resultados dos ensaios antimicrobianos dos extratos e fases orgânicas obtidos do fungo endofítico *Exserohilum rostratum* 1.11 Er.

Extratos fúngicos	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EHEr	> 2.500	78,12 (-)	> 2.500
EAER	156,25 (-)	156,25 (-)	625 (-)
FAEMEr	78,12 (-)	312,5 (-)	312,5 (-)
FHEXEMEr	> 2.500	1.250 (-)	> 2.500
FHIDROEMEr	312,5 (-)	312,5 (-)	> 2.500

Legenda: CIM; - Bacteriostático.

5.6.3 Ensaio antimicrobianos para os extratos orgânicos do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ 12

Conforme a escala de ensaio antimicrobiano desenvolvida por Holetz e colaboradores (2002), os extratos hexânico e AcOEt apresentaram boas atividades antimicrobianas frente à *Bacillus subtilis*, com atividades bacteriostáticas até as concentrações de 78,12 µg/mL e 39,06 µg/mL, respectivamente. Já, o extrato MeOH mostrou-se inativo.

Os extratos EHFriz e EAFriz do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 apresentaram boas atividades antimicrobianas frente à *Escherichia coli* com os respectivos valores de CIM de 156,25 µg/mL e 78,12 µg/mL, enquanto que o extrato EMFriz mostrou fraca atividade antimicrobiana.

Os extratos EHFriz e EAFriz apresentaram boas atividades antimicrobianas frente à *P.aeruginosa*, ambos até as concentrações de 39,06 µg/mL. Já, o extrato EMFriz mostrou-se praticamente inativo, apresentando atividade bacteriostática até a concentração de 1.250 µg/mL como pode ser verificado no Quadro 08 (p. 135).

Quadro 08. Resultados dos ensaios antimicrobianos dos extratos e fases orgânicas obtidos do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12.

Extratos fúngicos	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EHFriz	78,12 (-)	156,25 (-)	39,06 (-)
EAFriz	39,06 (-)	78,12 (-)	39,06 (-)
EMFriz	> 2.500	625 (-)	1.250 (-)

Legenda: CIM; - Bacteriostático.

5.7 ENSAIOS CITOTÓXICOS PRELIMINARES DOS MICRO-EXTRATOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Mimosa acutistipula* var. *férrea* E DE FUNGOS DE SOLO FRENTE À *Artemia salina*

O teste de citotoxicidade preliminar parte da premissa que uma substância ativa pode ser tóxica dependendo da dose (BOHLIN; BRUHN, 1999). Para substâncias puras ou extratos onde DL_{50} é menor que 80 $\mu\text{g/mL}$ consideram-se altamente tóxico, entre 80 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ moderadamente tóxico e acima de 250 $\mu\text{g/mL}$ com baixa toxicidade (DOLABELA, 1997).

Os micro-extratos dos fungos FRIZ01, FRIZ02, FCN01, FCN02, FSF09, FSF10 e FMIC02 foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade preliminar frente à *Artemia salina* para verificar a taxa percentual de mortalidade dos indivíduos no final deste ensaio biológico. Correlacionando os dados de porcentagem de morte versus concentração do extrato, esses dois parâmetros permitiram estimar valores inferiores a 80 $\mu\text{g/mL}$ (DOLABELA, 1997), considerando-se, então, os micro-extratos ativos com alta toxicidade. É importante salientar que não houve óbitos no grupo controle.

Segundo o estabelecido por Dolabela (1997), os micro-extratos dos fungos FRIZ04, FMIC07 e FMIC11 mostraram-se ativos com moderada toxicidade, uma vez que apresentaram valores de DL_{50} entre 80 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$. Por fim, o micro-extrato do fungo FRIZ11 apresentou um valor de DL_{50} de 577,7 $\mu\text{g/mL}$, cujo valor está acima que 250 $\mu\text{g/mL}$ e, portanto, possui uma fraca atividade citotóxica preliminar frente à *A. salina*.

Meyer e colaboradores (1982) estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, DL_{50} , apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*, desde então, considera-se que quando são verificados valores acima de 1.000 $\mu\text{g/mL}$, estes, são considerados atóxicos. Por isso, os micro-extratos

dos fungos FRIZ03, FRIZ10, *Aspergillus* sp. FRIZ12 e FMIC01 mostraram-se inativos conforme pode ser verificado no Quadro 09.

Quadro 09. Resultado de citotoxicidade preliminar frente à *Artemia salina* dos micro-extratos de fungos endofíticos de *M. acutistipula* var. *férrea* e fungos do solo.

MICRO-EXTRATOS DOS FUNGOS	DL ₅₀ (µg/mL)	ATIVIDADE CITOTÓXICA PRELIMINAR
FRIZ01	3,45±1,27	Alta toxicidade
FRIZ02	7,40±0,054	Alta toxicidade
FRIZ03	1313,7±0,91	Inativo
FRIZ04	186,3±0,13	Moderada toxicidade
FRIZ10	2080,7±0,33	Inativo
FRIZ11	577,7±0,52	Baixa toxicidade
<i>Aspergillus</i> sp. FRIZ12	1746,5±0,48	Inativo
FCN01	2,5±0,21	Alta toxicidade
FCN02	2,2±0,17	Alta toxicidade
FSF09	19,0±1,34	Alta toxicidade
FSF10	1,4±0,50	Alta toxicidade
FMIC01	2579,6±0,97	Inativo
FMIC02	4,9±0,10	Alta toxicidade
FMIC07	168,9±0,89	Moderada toxicidade
FMIC11	127,1±0,68	Moderada toxicidade

Legenda: *DOLABELA (1997), MEYER *et al.* (1982); DL₅₀ Dose Letal para matar 50% dos indivíduos; ±Desvio padrão.

5.8 ENSAIOS CITOTÓXICOS PRELIMINARES DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS *Aspergillus* sp. EJC08, *Exserohilum rostratum* 1.11 Er E DO FUNGO DE SOLO *Aspergillus* sp. FRIZ12 FRENTE À *Artemia salina*

Nenhum extrato orgânico dos fungos endofíticos *Aspergillus* sp. EJC08, *Exserohilum rostratum* 1.11 Er e do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 mostrou-se ativo em relação ao ensaio citotóxico preliminar frente à *Artemia salina* (Quadro 10, p. 137), pois apresentaram valores de DL₅₀ maiores que 1.000 µg/mL (MEYER *et al.*, 1982).

Quadro 10. Resultados de citotoxicidade preliminar frente à *Artemia salina* dos extratos orgânicos de fungos endofíticos *Aspergillus* sp. EJC08, *Exserohilum rostratum* 1.11 Er e do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ 12.

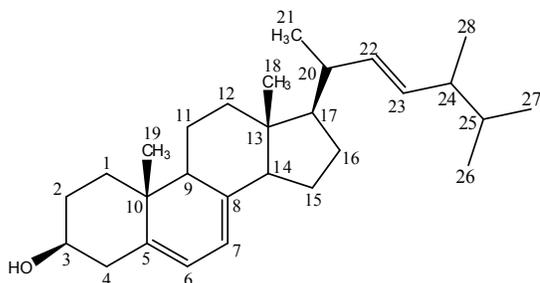
Fungos	EXTRATOS E FASES ORGÂNICAS	DL ₅₀ (µg/mL)	ATIVIDADE CITOTÓCIA PRELIMINAR
<i>Aspergillus</i> sp. EJC 08	EHA	1.645,8±0,60	Inativo
	EAA	1.155±0,34	Inativo
	FAEMA-1	1.263,7±0,76	Inativo
	FAEMA-2	1.136,3±0,47	Inativo
	FHIDROEMA-1	1.080,7±0,29	Inativo
	FHIDROEMA-2	1.527,2±0,88	Inativo
<i>Exserohilum rostratum</i> 1.11 Er	EHEr	1.746,5±1,05	Inativo
	EAEr	1.205,1±1,11	Inativo
	FAEMEr	1.723,0±0,44	Inativo
	FHEXEMEr	1.189,6±1,39	Inativo
	FHIDROEMEr	2.211,7±0,58	Inativo
<i>Aspergillus</i> sp. FRIZ 12	EHFriz	1.933,5±0,95	Inativo
	EAFriz	1.479,9±1,33	Inativo
	EMFriz	2.148,8±0,92	Inativo

Legenda: *MEYER *et al.* (1982); DL₅₀ Dose Letal para matar 50% dos indivíduos; ±Desvio padrão.

5.9 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

No estudo químico dos fungos, foram isoladas substâncias de diferentes classes de metabólitos com destaque para os esteroides e policetídeos, além um nucleosídeo. As substâncias de cada fungo são apresentadas com sua respectiva origem de isolamento, seu solvente de solubilização e seu aspecto físico. Para facilitar o entendimento, haverá a apresentação das discussões espectrais juntamente com a biossíntese das annularinas I e J e da 2-benzil-4H-piran-4-ona no primeiro momento e posteriormente serão mostrados os resultados obtidos dos ensaios antimicrobianos e do ensaio de citotoxicidade preliminar frente à *Artemia salina*.

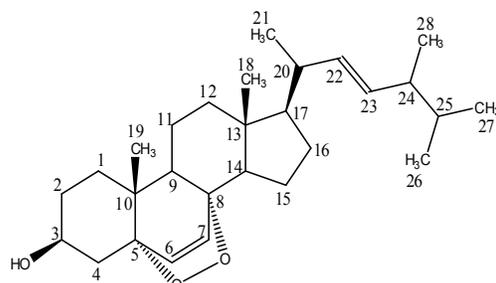
5.9.1 Substâncias isoladas do fungo endofítico *Aspergillus* sp. EJC08



Ergosterol (**S-1**)

Fluxograma: 02 (p.95)

Discussão espectral: p. 140-141;

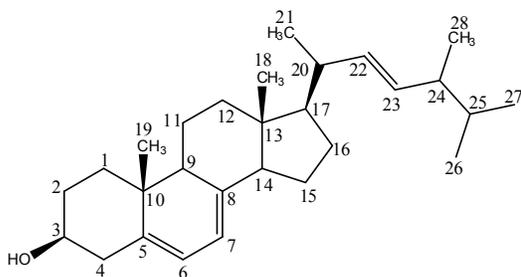


Peróxido de ergosterol (**S-2**)

Fluxograma: 02 (p.95)

Discussão espectral: p. 142-143;

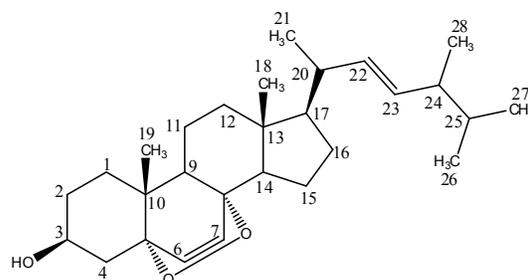
5.9.2 Substâncias isoladas do fungo endofítico *Exserohilum rostratum* 1.11 Er



Ergosterol (**S-1**)

Fluxograma: 04 (p.97)

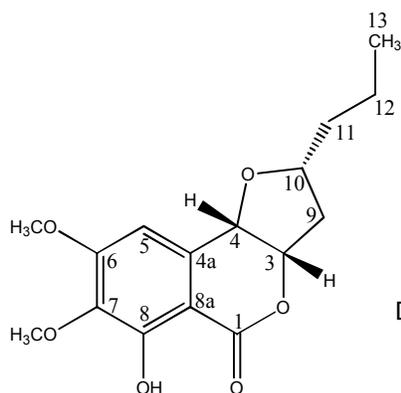
Discussão espectral: p. 140-141;



Peróxido de ergosterol (**S-2**)

Fluxograma: 04 (p.97)

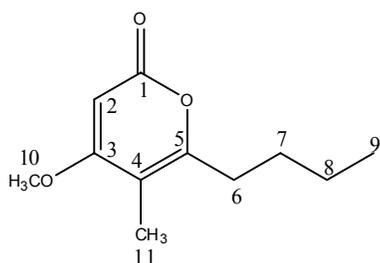
Discussão espectral: p. 142-143;



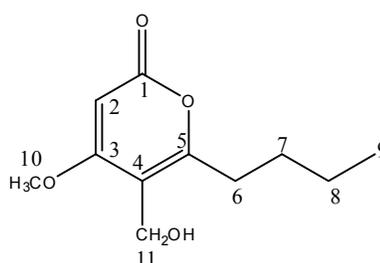
Monocerina (**S-10**)

Fluxograma: 04 (p.97)

Discussão espectral: p. 207 -210;

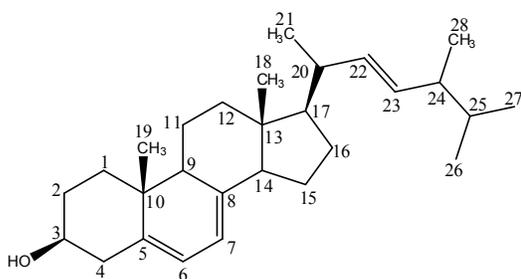


Annularina I (S-8)
 Fluxograma: 05 (p.98)
 Discussão espectral: p. 184-186;
 Biossíntese: p. 199.

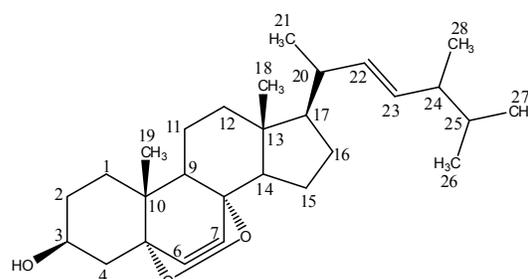


Annularina J (S-9)
 Fluxograma: 05 (p.98)
 Discussão espectral: p. 195-197;
 Biossíntese: p. 199.

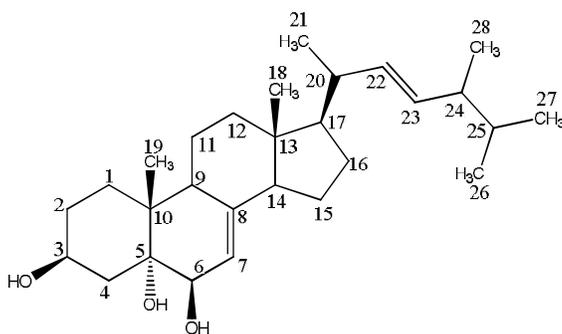
5.9.3 Substâncias isoladas do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12



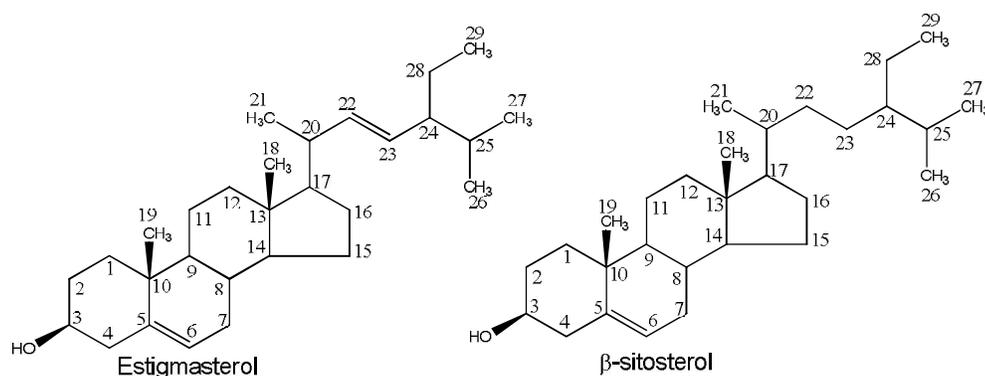
Ergosterol (S-1)
 Fluxograma: 08 (p.103)
 Discussão espectral: p. 140-141;



Peroxido de ergosterol (S-2)
 Fluxograma: 08 (p.103)
 Discussão espectral: p. 142-143;



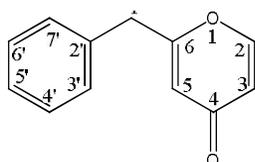
Cerivisterol (S-3)
 Fluxograma: 07 (p.102)
 Discussão espectral: p. 143-144;



Mistura dos esteroides β-sitosterol (**S-4**) e estigmasterol (**S-5**)

Fluxograma: 07 (p.102)

Discussão espectral: p. 152-153;

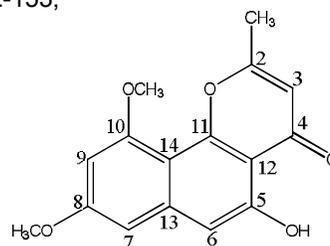


2-benzil-4H-piran-4-ona (**S-6**)

Fluxograma: 07 (p.102)

Discussão espectral: p. 158-161;

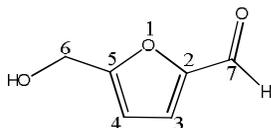
Biossíntese: p. 162.



Flavasperona (**S-7**)

Fluxogramas: 07 (p.102) e 09 (p.104)

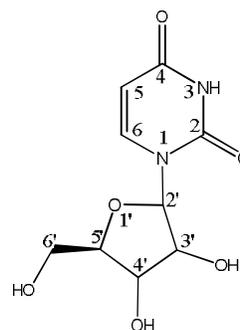
Discussão espectral: p. 170-172;



5-(hidroximetil)furfural (**S-11**)

Fluxogramas: 10 (p.105) e 11 (p. 106);

Discussão espectral: p. 220-222.



Uridina (**S-12**)

Fluxograma: 11 (p.106);

Discussão espectral: p. 231-233.

5.9.4 Esteroides

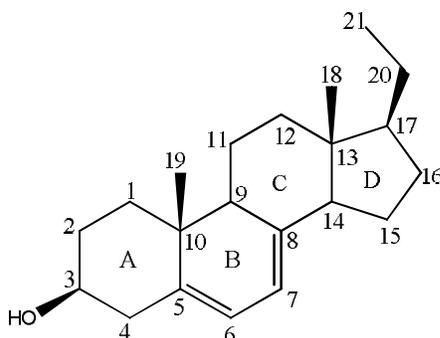
Os esteroides compreendem um amplo grupo de compostos orgânicos naturais e sintéticos que compartilham de uma estrutura química semelhante como 17 átomos de carbono dispostos em um sistema de quatro anéis (GOMES; MEREDITH, 2009). O núcleo tetracíclico fundido (ciclopentanoperhidrofenantreno),

característico de esteroides, determina a estrutura carbonada dos hormônios característicos de importantes grupos de mamíferos (LEDNICER, 1998).

Um dado relevante na química dos esteroides é o sistema de numeração (Figura 87). Este sistema idiosincrático de numeração deve-se ao fato de ter sido antes da estrutura do núcleo esteroidal estar totalmente estabelecida (LEDNICER, 1998).

Dentre os esteroides originados de fontes naturais, foram isolados o ergosterol (**S-1**), peróxido de ergosterol (**S-2**), cerivisterol (**S-3**) e uma mistura de β -sitosterol (**S-4**) e estigmasterol (**S-5**) durante o estudo químico dos fungos citados nesta Tese.

Figura 87- Esqueleto esteroidal.



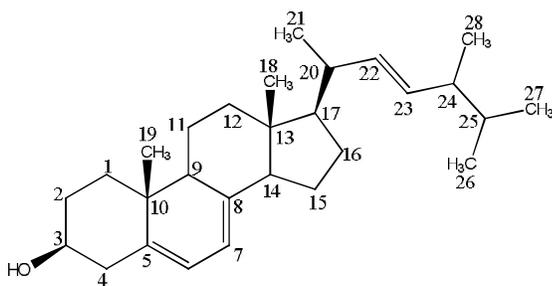
5.9.4.1 Elucidação estrutural do ergosterol (**S-1**)

O ergosterol (**S-1**, Figura 88, p. 142) foi isolado das três espécies de fungos estudadas na forma de um sólido cristalino branco, solúvel em diclorometano. Na análise do espectro de RMN ^1H (Figura 91, p. 146) de **S-1**, observam-se sinais de hidrogênio referentes ao esqueleto ergostano em δ_{H} 0,63 (*s*, 3H, H-19), δ_{H} 0,82 (*d*, 3H, $J= 6,8$ Hz, H-26), δ_{H} 0,84 (*d*, 3H, $J= 6,8$ Hz, H-27), δ_{H} 0,94 (*d*, 3H, $J= 6,8$ Hz, H-28), δ_{H} 0,94 (*s*, 3H, H-18) e δ_{H} 1,04 (*d*, 3H, $J= 6,6$ Hz, H-21) referentes aos hidrogênios metílicos, além do sinal na região de hidrogênios oximetínicos em δ_{H} 3,63 (*m*, 1H) e quatro sinais na região dos hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,20 (*tl*, 2H, $J= 6,3$, H-22/ H-23), δ_{H} 5,38 (*dd*, 1H, $J= 6,0$ e 2,3 Hz; H-7) e em δ_{H} 5,56 (*dd*, 1H, $J=5,6$ e 2,3 Hz, H-6). O padrão espectral apresentado no RMN ^1H é típico de substância da classe dos esteroides de fungos.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 92, p. 148) de **S-1** pode-se observar sinais referente a 28 átomos carbonos, sendo seis referentes a carbonos metílicos (δ_{C} 11,9; 16,0; 17,5; 19,8; 21,1 e 33,0), sete metilênicos (δ_{C} 21,1; 23,0; 28,2; 31,9; 39,6; 39,7 e 40,4), sete metínicos (δ_{C} 19,4; 40,4; 42,8; 45,9; 54,4; 56,0 e 71,1), além de seis sinais atribuídos aos carbonos olefínicos (δ_{C} 116,5; δ_{C} 118,9; δ_{C} 132,3; δ_{C} 135,4; δ_{C} 140,1 e δ_{C} 140,7) e dois sinais referentes a carbonos quaternários (δ_{C} 37,2 e δ_{C} 42,8). Com essas informações resolveu-se então comparar os dados espectrométricos de **S-1** com dados obtidos na literatura para esteroides comumente isolados de fungos. Observou-se a concordância dos deslocamentos químicos dos sinais de RMN ^1H e RMN ^{13}C de **S-1** com os dados da literatura para o ergosterol (MARINHO *et al.*, 2007) conforme mostram as Tabelas 01 (p.147) e 02 (p.148), respectivamente.

O ergosterol é um esteroide muito importante na produção de antimicóticos, principalmente os azóis e funciona, também, como um agente antimutagênico e antineovascularizante (LUCAS, 2008). Sua ausência causa alterações na permeabilidade das membranas plasmáticas e inibição do crescimento. Drogas utilizadas no tratamento de infecções fúngicas (como a candidíase) são fungistáticas e agem na inibição da síntese do ergosterol, resultando em parada da síntese da membrana celular do fungo (PHILLIPS, 2005).

Figura 88- Ergosterol (**S-1**).



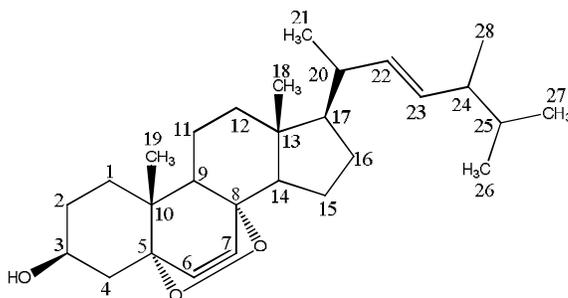
A formação dos esteroides se dá através da ciclização do óxido de esqualeno levando ao cátion protosteril, que de acordo com o tipo de migrações sofrida por esse cátion ele levará ou a formação dos cicloartanos, precursores dos esteroides em plantas, ou ao lanosterol que é o precursor dos esteroides em fungos e nos animais (DEWICK, 2009).

5.9.4.2 Elucidação estrutural do peróxido de ergosterol (**S-2**)

O composto peróxido de ergosterol (**S-2**, Figura 89) foi isolado das três espécies de fungos estudadas na forma de um sólido cristalino branco, solúvel em diclorometano.

No espectro de RMN ^1H (Figura 93, p. 149) de **S-2** observa-se sinais típicos de um composto com esqueleto esteroidal. Pode-se ver na região das metilas sinais em δ_{H} 0,80 (*d*, 3H, $J= 6,9$ Hz, H-27), 0,83 (*d*, 3H, $J= 6,9$ Hz, H-26), 0,87 (*s*, 3H, H-19), 0,89 (*d*, 3H, $J= 6,9$ Hz, H-21), 0,91 (*d*, 3H, $J= 6,9$ Hz, H-28) e 1,25 (*s*, H-18). Há ainda o sinal em δ_{H} 3,95 (*m*) atribuído a presença de um hidrogênio carbinólico em **S-2**, os sinais em δ_{H} 5,15 (*dd*, 1H, $J= 15,0$ e 7,8 Hz, H-23) e em δ_{H} 5,21 (*dd*, 1H, $J= 15,0$ Hz e 6,9Hz, H-22) são comumente atribuídos à existência de ligações duplas na cadeia lateral de um esteroide. Além desses sinais foram observados também os sinais em δ_{H} 6,23 (*d*, 1H, $J= 8,0$ Hz, H-6) e δ_{H} 6,51 (*d*, 1H, $J= 8,0$ Hz, H-7) referentes aos hidrogênios olefínicos da estrutura que acoplam entre si com constante de 8 Hz, indicando a estereoquímica *cis* para os hidrogênios.

Figura 89- Peróxido de ergosterol (**S-2**).



No espectro de RMN ^{13}C (Figura 94, p. 150) de **S-2**, observa-se três sinais referentes a carbonos ligados a heteroátomo em δ_{C} 66,3; 79,4 e 82,1; enquanto que no espectro de RMN ^1H observa-se apenas um sinal referente a hidrogênio oximetínico. Logo, há dois carbonos que não sustentam hidrogênio ligados a oxigênio no composto. São observados também os sinais em δ_{C} 130,7; 132,2; 135,1 e δ_{C} 135,4; confirmando a existência de duas ligações duplas, uma entre os carbonos C-6/C-7 do anel B e outra entre os C-22/C-23 de cadeia lateral. Esses dados foram comparados com os dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos da literatura (MARINHO *et al.*, 2007) para o peróxido ergosterol, o qual mostrou-se total

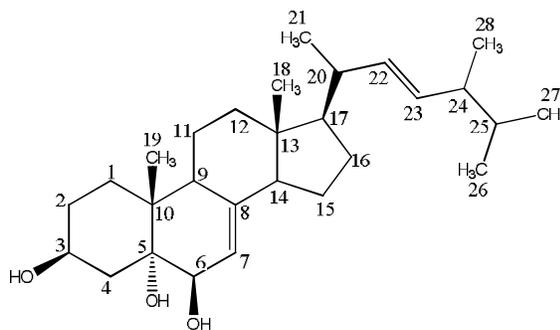
similaridade (Tabelas 01, p.146 e 02, p.147). A rota biogenética de **S-2** encontra-se na Figura 91 (p.146).

O peróxido de ergosterol é um esteróide que possui atividade antitumoral, relatada em experimentos em carcinomas humanos (KAHLOS; HILTUNEN, 1989).

5.9.4.3 Elucidação estrutural do cerivisterol (**S-3**):

A substância cerivisterol (**S-3**, Figura 90) foi isolada do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 na forma de um sólido cristalino branco, solúvel em diclorometano. De acordo com os dados de RMN de ^1H (Figura 95, p. 151), foi possível observar sinais na região das metilas em δ_{H} 0,59 (s, 3H), 0,81 (d; 3H; 6,8 Hz, H-26); 0,83 (d; 3H; 6,7 Hz, H-27); 0,90 (d; 6,8 Hz, H-28); 1,02 (d; 3H, 6,4 Hz, H-21) e 1,07 (s, 3H, H-19), dois sinais de hidrogênios oximetínicos em δ_{H} 3,63 (m, 1H, H-6) e δ_{H} 4,07 (m, 1H, H-3) e três sinais de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,19 (t, 1H; 7,2 Hz, H-22/ H-23) e δ_{H} 5,34 (sl, 1H, H-7). O perfil do espectro de RMN de ^1H de **S-3** apresenta características de esteróides semelhantes a **S-1** e **S-2**.

Figura 90- Cerivisterol (**S-3**).



O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 96, p. 152) apresentou características de substância com esqueleto esteroidal confirmando os dados de RMN de ^1H . Os sinais em δ_{C} 143,9; δ_{C} 135,3; δ_{C} 132,2 e δ_{C} 117,5 que foram atribuídos aos carbonos C-8, C-23, C-22 e C-7, respectivamente, atribuídos às ligações duplas na cadeia. No espectro de RMN de ^{13}C , verificou-se ainda sinais de carbonos carbinólicos em δ_{C} 76,7; δ_{C} 72,0 e δ_{C} 67,7; enquanto que no RMN de ^1H só há dois sinais atribuídos a hidrogênios oximetínicos, sendo então um dos sinais sugestivo de carbono que não sustenta hidrogênio ligado ao heteroátomo. Esses dados foram comparados com os dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos da literatura (MARINHO *et al.*, 2007) para o

cerivisterol, o qual mostrou total similaridade conforme pode ser observado nas Tabelas 01 e 02 (p. 146).

O cerivisterol é um esteroide que inibe a ADN-polimerase de células eucarióticas de mamíferos (RUBEL, 2006). É um inibidor da translocação do NF-KB (potente indutor da transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-6, que contribuem ativamente no processo inflamatório de obesidade e, conseqüentemente, na formação da placa de ateroma de genes do citoplasma para o núcleo (KIM *et al.*, 2008).

Tabela 01- Atribuição dos sinais de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) para **S-1**, **S-2** e **S-3** juntamente com a comparação dos dados descritos na literatura de ergosterol, peróxido ergosterol e cerivisterol, respectivamente.

	S-1	S-1^{a,b}	S-2	S-2^{a,b}	S-3	S-3^{a,b}
H	(δ , multip., <i>J</i> em Hz)	δ , multip., <i>J</i> em Hz)				
3	3,63 (<i>m</i>)	3,63 (<i>m</i>)	3,95 (<i>m</i>)	3,95 (<i>m</i>)	4,07 (<i>m</i>)	4,07 (<i>m</i>)
6	5,56 (<i>dd</i> ; 5,6 e 2,3)	5,56 (<i>m</i>)	6,23 (<i>d</i> ; 8,0)	6,22 (<i>d</i> ; 8,0)	3,63 (<i>m</i>)	3,63 (<i>m</i>)
7	5,38 (<i>dd</i> ; 6,0 e 2,3)	5,38 (<i>m</i>)	6,51 (<i>d</i> ; 8,0)	6,49 (<i>d</i> ; 8,0)	5,36 (<i>s</i>)	5,34 (<i>sl</i>)
18	0,94 (<i>s</i>)	0,95 (<i>s</i>)	1,25 (<i>s</i>)	1,22 (<i>s</i>)	0,59 (<i>s</i>)	0,59 (<i>s</i>)
19	0,63 (<i>s</i>)	0,63 (<i>s</i>)	0,87 (<i>s</i>)	0,88 (<i>s</i>)	1,08 (<i>s</i>)	1,07 (<i>s</i>)
21	1,04 (<i>d</i> ; 6,7)	1,04 (<i>d</i> ; 6,7)	0,89 (<i>d</i> ; 6,9)	0,89 (<i>d</i> ; 6,9)	1,04 (<i>d</i> ; 6,4)	1,02 (<i>d</i> ; 6,4)
22	5,20 (<i>tl</i> ; 6,3)	5,20 (<i>m</i>)	5,21 (<i>dd</i> ; 15,0 e 6,9)	5,21 (<i>m</i>)	5,19 (<i>t</i> ; 7,2)	5,19 (<i>t</i> ; 7,2)
23	5,20 (<i>tl</i> ; 6,3)	5,20 (<i>m</i>)	5,15 (<i>dd</i> ; 15,0 e 7,5)	5,15 (<i>m</i>)	5,19 (<i>t</i> ; 7,2)	5,20 (<i>m</i>)
26	0,82 (<i>d</i> ; 6,8)	0,82 (<i>d</i> ; 6,8)	0,83 (<i>d</i> ; 6,9)	0,83 (<i>d</i> ; 6,7)	0,83 (<i>d</i> ; 6,8)	0,81 (<i>d</i> ; 6,7)
27	0,84 (<i>d</i> ; 6,8)	0,84 (<i>d</i> ; 6,8)	0,80 (<i>d</i> ; 6,9)	0,80 (<i>d</i> ; 6,5)	0,85 (<i>d</i> ; 6,8)	0,83 (<i>d</i> ; 6,5)
28	0,94 (<i>d</i> ; 6,8)	0,92 (<i>d</i> ; 6,8)	0,91 (<i>d</i> ; 6,9)	0,98 (<i>d</i> ; 6,8)	0,93 (<i>d</i> ; 6,8)	0,90 (<i>d</i> ; 6,8)

^a[MARINHO *et al.*, 2007];

^bDados de RMN ^1H e ^{13}C (200 MHz e 75 MHz respectivamente, CDCl_3) da literatura.

Tabela 02- Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) para **S-1**, **S-2** e **S-3** juntamente com a comparação dos dados descritos na literatura de ergosterol, peróxido ergosterol e cerivisterol, respectivamente.

C	S-1	S-1^{a,b}	S-2	S-2^{a,b}	S-3	S-3^{a,b}
1	39,6	38,3	30,0	29,6	32,8	33,0
2	31,9	31,9	34,6	34,6	33,7	33,9
3	71,1	70,4	66,4	66,4	67,3	67,8
4	40,4	40,7	39,3	39,7	39,3	39,3
5	140,7	141,3	82,1	82,1	76,7	76,0
6	118,9	119,6	135,1	135,1	72,0	73,1
7	116,5	116,3	130,7	130,7	117,5	117,3
8	140,1	139,7	79,4	79,4	143,9	144,0
9	45,9	46,2	51,0	51,0	43,3	43,5
10	37,2	37,0	36,9	36,9	37,1	37,2
11	21,1	21,1	20,6	20,6	22,0	22,1
12	28,2	28,3	36,8	36,9	39,3	39,5
13	42,8	42,8	44,5	44,5	43,7	43,8
14	54,4	54,5	51,6	51,6	54,7	54,8
15	23,0	23,0	23,3	23,3	22,9	22,9
16	39,7	39,1	28,6	28,6	27,9	27,9
17	56,0	55,7	56,1	56,1	56,0	56,0
18	11,9	12,0	12,8	12,9	12,3	12,3
19	16,0	16,2	18,1	18,2	18,7	18,8
20	40,4	40,5	39,6	39,7	40,4	40,4
21	19,4	19,4	20,8	20,9	19,6	19,6
22	132,3	132,0	132,3	132,3	132,2	132,2
23	135,4	135,5	135,4	135,4	135,4	135,4
24	42,8	42,8	42,7	42,8	42,8	42,8
25	19,8	19,9	33,0	33,1	33,1	33,1
26	33,0	33,2	19,6	19,6	19,9	19,9
27	21,1	21,0	19,9	19,9	21,1	21,1
28	17,5	17,5	17,5	17,5	17,6	17,6

^a [MARINHO *et al.*, 2007];

^b Dados da literatura de RMN ^1H e ^{13}C em CDCl_3 .

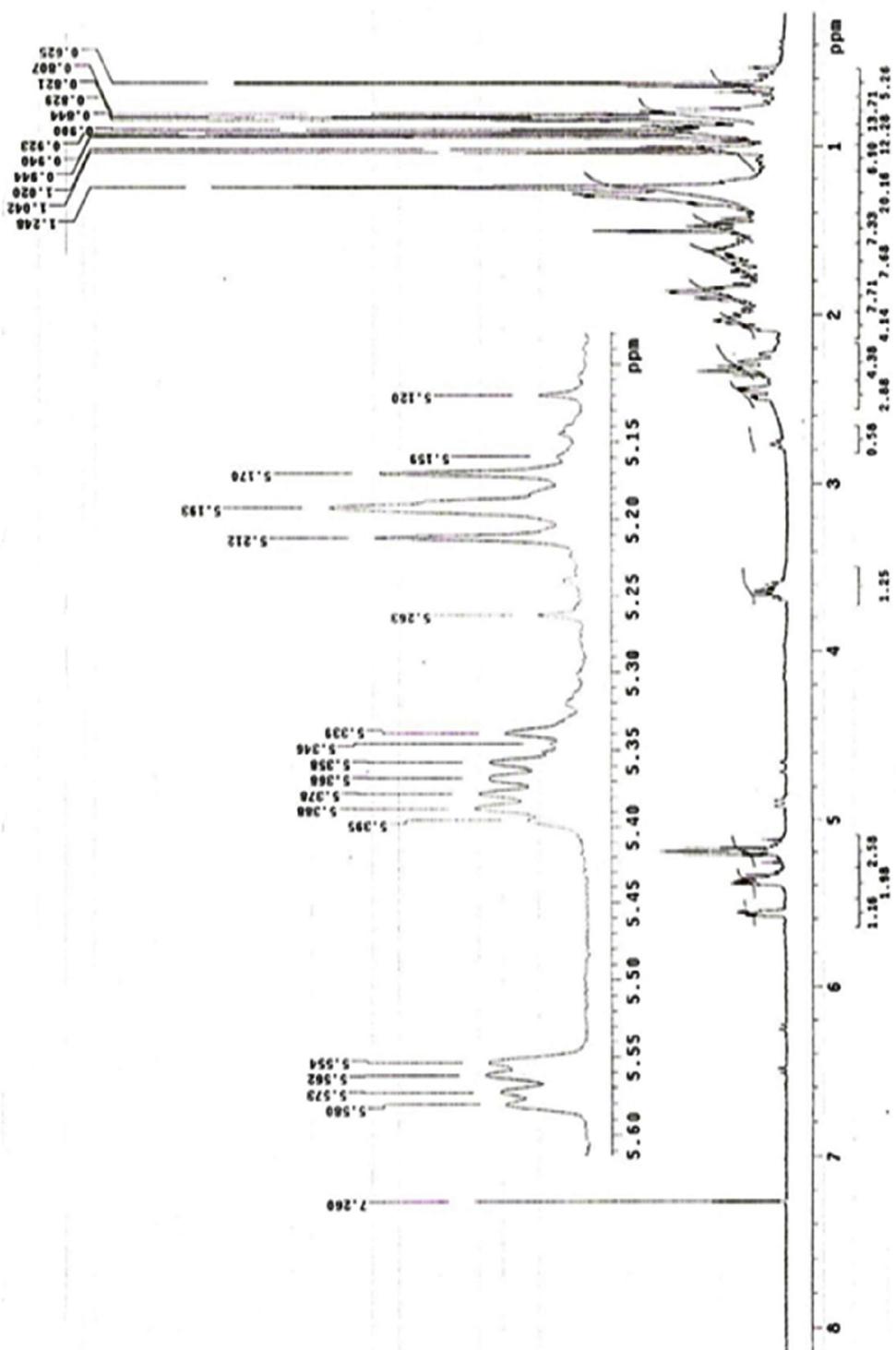
Figura 91 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S-1.

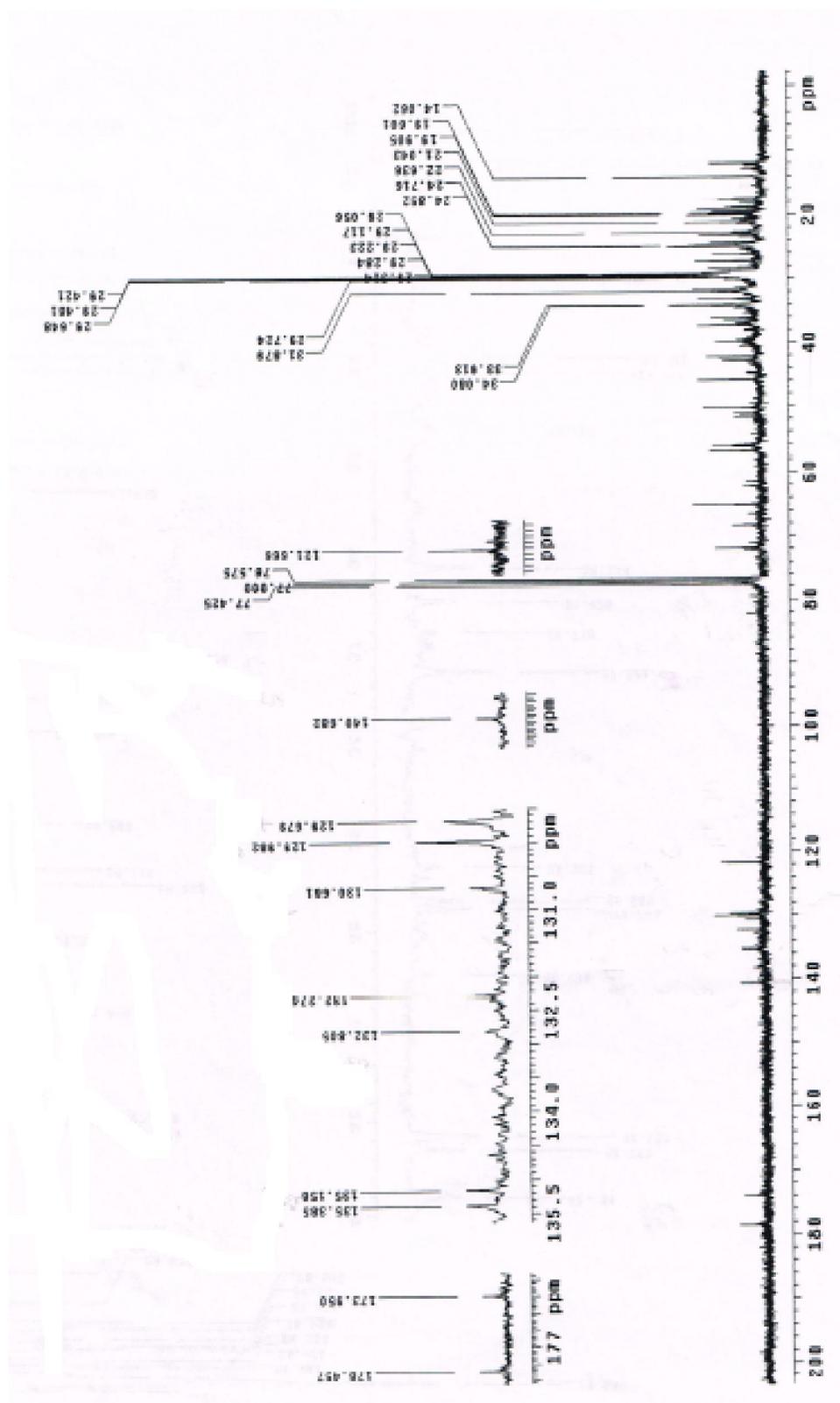
Figura 92 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S-1.

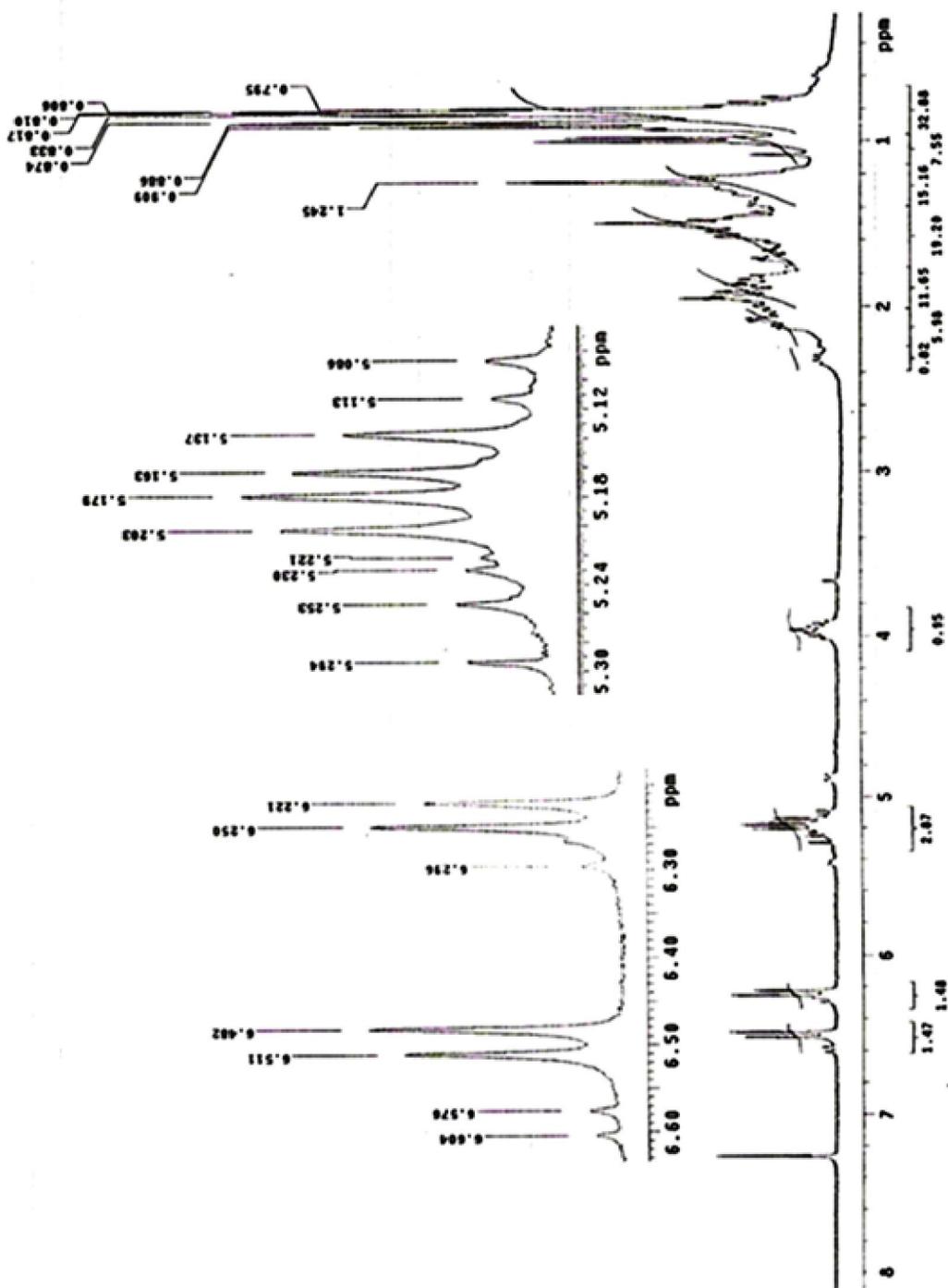
Figura 93 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S-2.

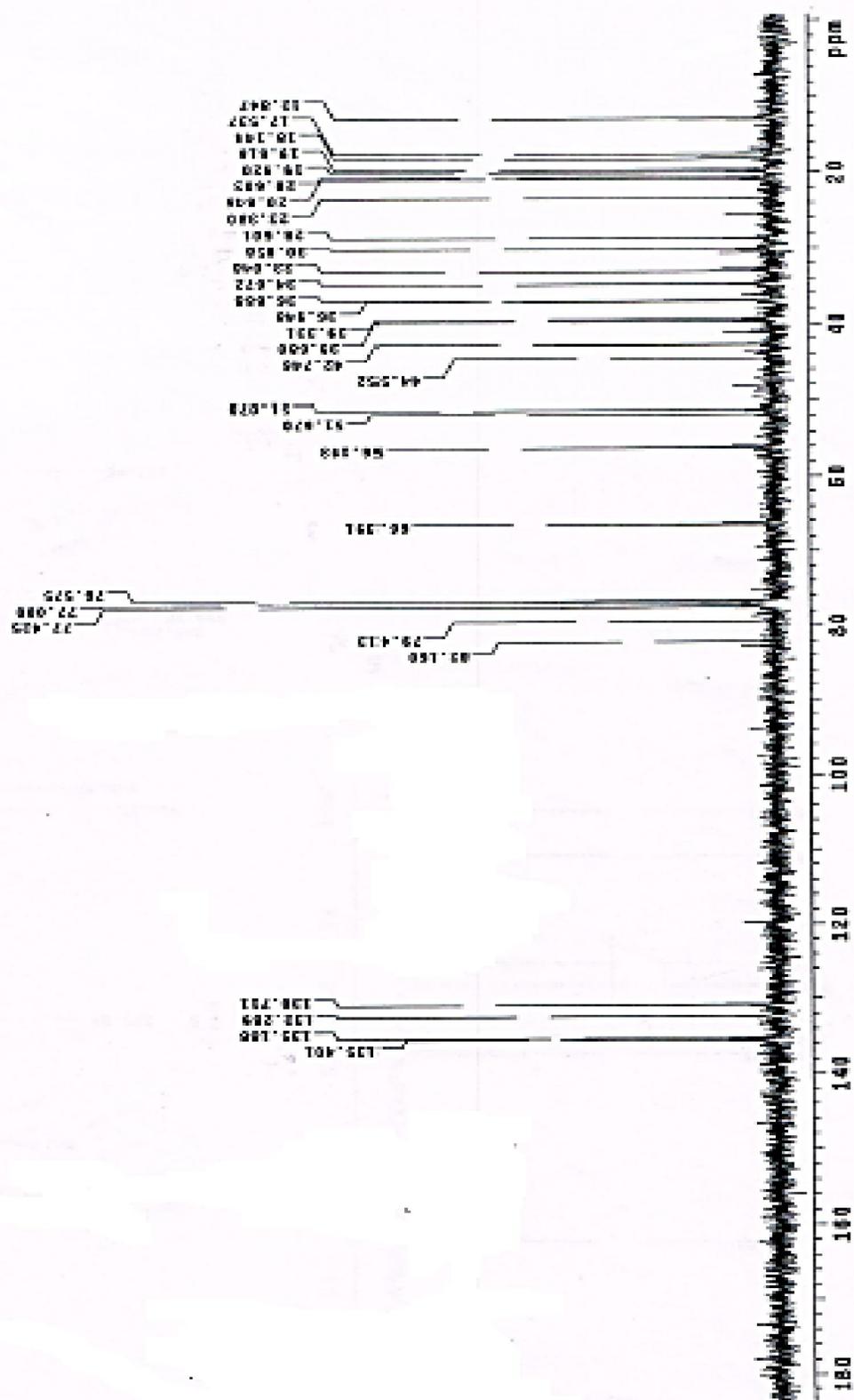
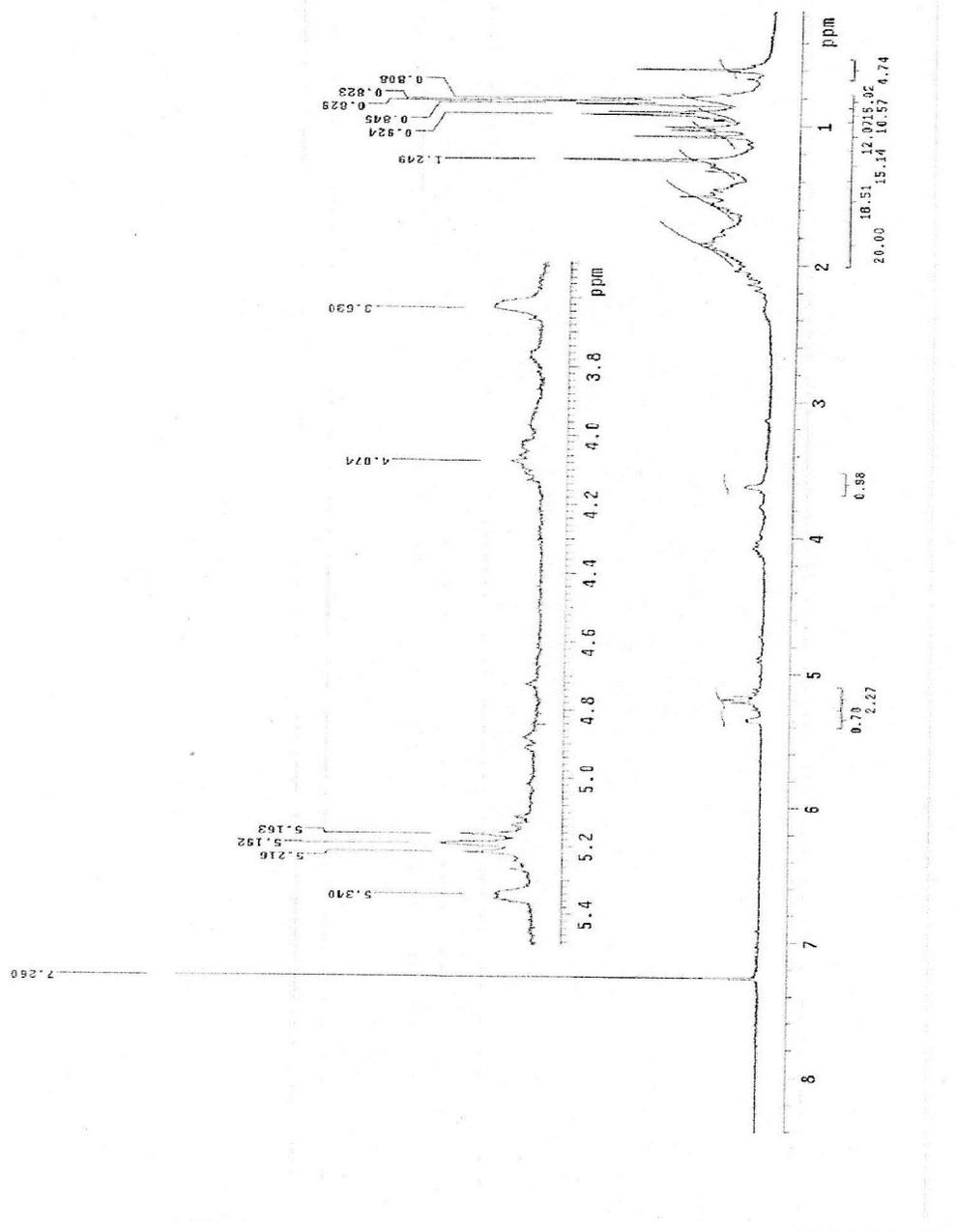
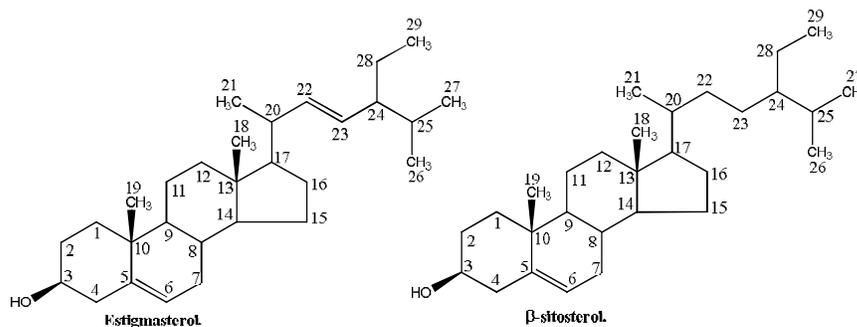
Figura 94 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S-2.

Figura 95 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **S-3**.

5.9.4.4 Elucidação estrutural da mistura de β -sitosterol (**S-4**) e estigmasterol (**S-5**):

A mistura dos esteroides β -sitosterol (**S-4**) e do estigmasterol (**S-5**) (Figura 98) foi obtida do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 na forma de um sólido cristalino branco, solúvel em diclorometano. É a primeira vez que as substâncias foram obtidas em mistura de um fungo de solo.

Figura 97- Mistura dos esteroides β -sitosterol (**S-4**) e estigmasterol (**S-5**).



Através de sinais característicos dos esteróides no espectro de RMN ^1H (Figura 98, p. 156), foi possível caracterizar a presença da mistura de β -sitosterol e do estigmasterol. Como nos demais derivados quimicamente relacionados, a maioria dos sinais concentrou-se entre δ_{H} 0,5 e 2,0. Somente quatro sinais de hidrogênio apareceram em campo menos protegido, sendo estes os dos hidrogênios olefínicos localizados no anel B de ambos esteroides e na cadeia lateral do estigmasterol, e ainda ao H-3 referente ao hidrogênio oximetínico (FORGO; KÖVER, 2004). Destacam-se o multiplete em δ_{H} 3,49 (*m*; 1H; H-3) e o tripleto em δ_{H} 5,34 (*t*; 1H; 4,5 Hz; H-6) que são hidrogênios com características comuns em ambos os compostos e, portanto, possuem o mesmo deslocamento químico aproximadamente. Ainda, pode ser visualizado no espectro de RMN ^1H da mistura de β -sitosterol (**S-4**) e estigmasterol (**S-5**), os duplo-dubletos em δ_{H} 5,02 (*dd*; 1H; 15,0 Hz e 8,4 Hz; H-23) e δ_{H} 5,15 (*dd*; 1H; 15,8 Hz e 9,1 Hz; H-22) referentes aos hidrogênios olefínicos do estigmasterol (FORGO; KÖVER, 2004).

No espectro de RMN ^{13}C (Figuras 99-100, p. 157-158), a presença de quatro sinais de carbono na região dos carbonos sp^2 (δ_{C} 140,7; δ_{C} 138,3; δ_{C} 130,0 e δ_{C} 121,7) sugere a existência de duas ligações duplas. Segundo dados da literatura, sinais de carbono em δ_{C} 140,7 e δ_{C} 121,7 são característicos de esteroides com ligação dupla em C-5 e C-6 (DE-EKNAMKUL; POTDUANG, 2003) e em δ_{C} 130,0 e

δ_C 138,3 são característicos de uma ligação dupla entre C-22 e C-23 na cadeia lateral dos esteroides (DE-EKNAMKUL; POTDUANG, 2003). Estes sinais são, portanto, muito importantes na elucidação estrutural de compostos esteroidais como o β -sitosterol (24 α -etil-colestan-5-eno-3 β -ol) e do estigmasterol (24 α -etil-colestan-5,2-dieno-3 β -ol). Na revisão da literatura, é possível constatar que o β -sitosterol e o estigmasterol são frequentemente identificados em misturas (JAMAL *et al.*, 2009). No espectro de RMN ^{13}C , nota-se também que há um sinal intenso de carbono em δ_C 71,8, característico de carbono carbinólico (NASSER *et al.*, 2013). Estes compostos possuem uma mesma insaturação (Δ^5) e, portanto, os sinais de carbono coincidirão nos espectros de RMN ^{13}C e assim os sinais referentes a C-5 e C-6 estarão mais intensos quando comparados com os outros dois sinais referentes a insaturação em Δ^{22} , que está presente somente no estigmasterol (CHATURVEDULA; PRAKASH, 2012). No espectro de RMN ^{13}C dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol, destaca-se também os sinais de carbono em δ_C 12,0 e δ_C 11,8, respectivamente, referentes ao C-29 que é uma unidade de metila a mais na cadeia lateral destes esteroides em relação ao ergosterol, peróxido de ergosterol e cervisterol. Esses dados foram comparados com os dados de RMN 1H e ^{13}C obtidos da literatura (CHATURVEDULA; PRAKASH, 2012) para os esteroides β -sitosterol e estigmasterol, o qual mostrou total similaridade conforme pode ser observado na Tabela 03 (p. 155).

O β -sitosterol e o estigmasterol são dois fitosteróis, ou seja, são esteroides comumente isolados de espécies vegetais como as do gênero *Serjania* (QUINTANILLA; PINTO, 2014), a planta *Rubus suavissimus* (CHATURVEDULA; PRAKASH, 2012) e *Annona crossiflora* Seeds (INOUE *et al.*, 2010), mas também já houve relatos das duas substâncias serem encontradas em espécies fúngicas (CARVALHO, 2014). O β -sitosterol também foi encontrado nas espécies fúngicas *Annulohyphoxylon elevatidiscus* (CHENG *et al.*, 2015) e *Xylaria* sp. (WANG *et al.*, 2014), enquanto que o estigmasterol também foi isolado do fungo *Paecilomyces* sp. (MOSADEGHZAD *et al.*, 2013).

O estigmasterol é um esteroide que apresenta atividade antifúngica (MBAMBO *et al.*, 2012), antitumoral (GHOSH *et al.*, 2011) e reduz os níveis de colesterol no plasma sanguíneo (BATTA *et al.*, 2006). Já, o β -sitosterol tem

demonstrado efeito normalizador do açúcar no sangue e nos níveis de insulina em diabetes tipo I e II (LÁSZLÓ, 2012) e atividade antifúngica (MBAMBO *et al.*, 2012).

Tabela 03- Atribuição dos sinais de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) para **S-4** e **S-5** juntamente com a comparação dos dados descritos na literatura para o β -sitosterol e o estigmasterol, respectivamente.

Posição	Estigmasterol				β -sitosterol			
	^1H ((δ , multip., J em Hz)		^{13}C		^1H ((δ , multip., J em Hz)		^{13}C	
	S-5	S-5 ^a	S-5	S-5 ^{a,b}	S-4	S-4 ^{a,b}	S-4	S-4 ^{a,b}
1			37,2	37,6			37,0	37,5
2			32,4	32,1			31,9	31,9
3	3,49 (m)	3,51 (ddd; 4,5; 4,2; 3,8)	71,8	72,1	3,49 (m)	3,53 (ddd; 4,5; 4,2; 3,8)	71,7	72,0
4			42,2	42,4			42,3	42,5
5			141,3	141,1			140,7	140,9
6	5,33 (d; 4,5)	5,31 (t; 6,1)	121,7	121,8	5,33 (d; 4,5)	5,36 (t; 6,4)	121,7	121,9
7			31,5	31,8			31,9	32,1
8			31,5	31,8			31,9	32,1
9			50,1	50,2			50,1	50,3
10			36,1	36,6			36,4	36,7
11			21,1	21,5			21,1	21,3
12			39,8	39,9			39,8	39,9
13			42,2	42,4			42,3	42,6
14			56,7	56,8			56,7	56,9
15			24,3	24,4			26,1	26,3
16			29,2	29,3			28,2	28,5
17			56,0	56,2			56,0	56,3
18			40,7	40,6			36,5	36,3
19	0,92 (d; 6,3)	0,91 (d; 6,2)	21,1	21,7	0,93 (d; 6,3)	0,93 (d; 6,5)	19,4	19,2
20	4,97 (m)	4,98 (m)	26,1	25,4			34,0	34,2
21			46,2	46,1			26,1	26,3
22	5,15 (dd; 15,8; 9,1)	5,14 (m)	138,3	138,7			46,2	46,1
23	5,02 (dd; 15,0; 8,4)		130,0	129,6			23,1	23,3
24	0,84 (t; 7,2)	0,83 (t; 7,1)	11,8	12,1	0,86 (d; 7,2)	0,84 (t; 7,2)	12,0	12,2
25			29,7	29,6			29,1	29,4
26	0,82 (d; 6,3)	0,82 (d; 6,6)	19,8	20,2	0,83 (d; 6,3)	0,83 (d; 6,4)	19,4	20,1
27	0,80 (d; 6,3)	0,80 (d; 6,6)	19,0	19,8	0,81 (d; 6,3)	0,81 (d; 6,4)	19,0	19,6
28	0,67 (s)	0,71 (s)	18,8	18,9	0,67 (s)	0,68 (s)	18,8	19,0
29	1,03 (s)	1,03 (s)	12,0	12,2	1,02 (s)	1,01 (s)	11,8	12,0

^a[CHATURVEDULA; PRAKASH, 2012];

^bDados da literatura de RMN ^1H e ^{13}C em CDCl_3 .

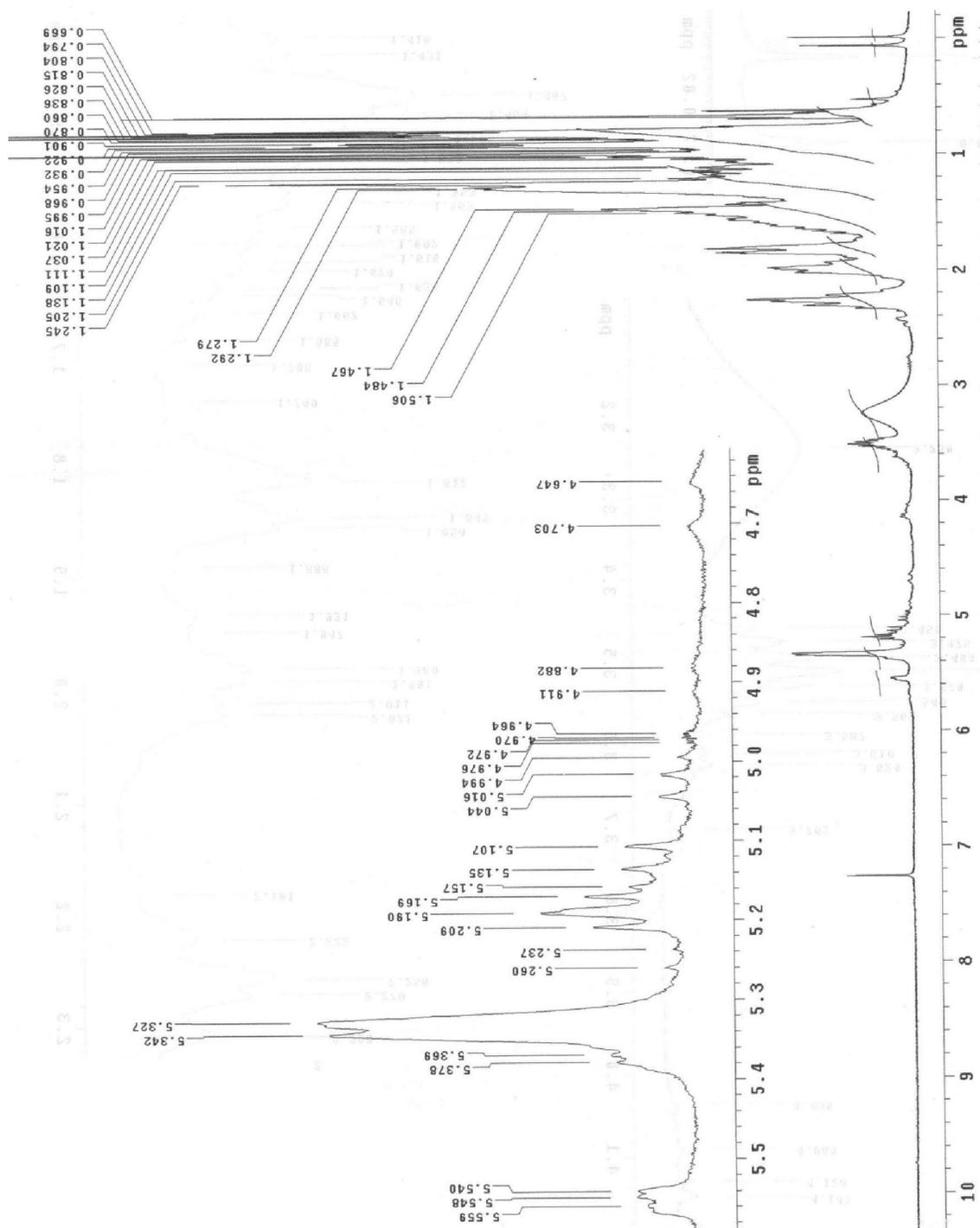
Figura 98 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S-4 + S-5.

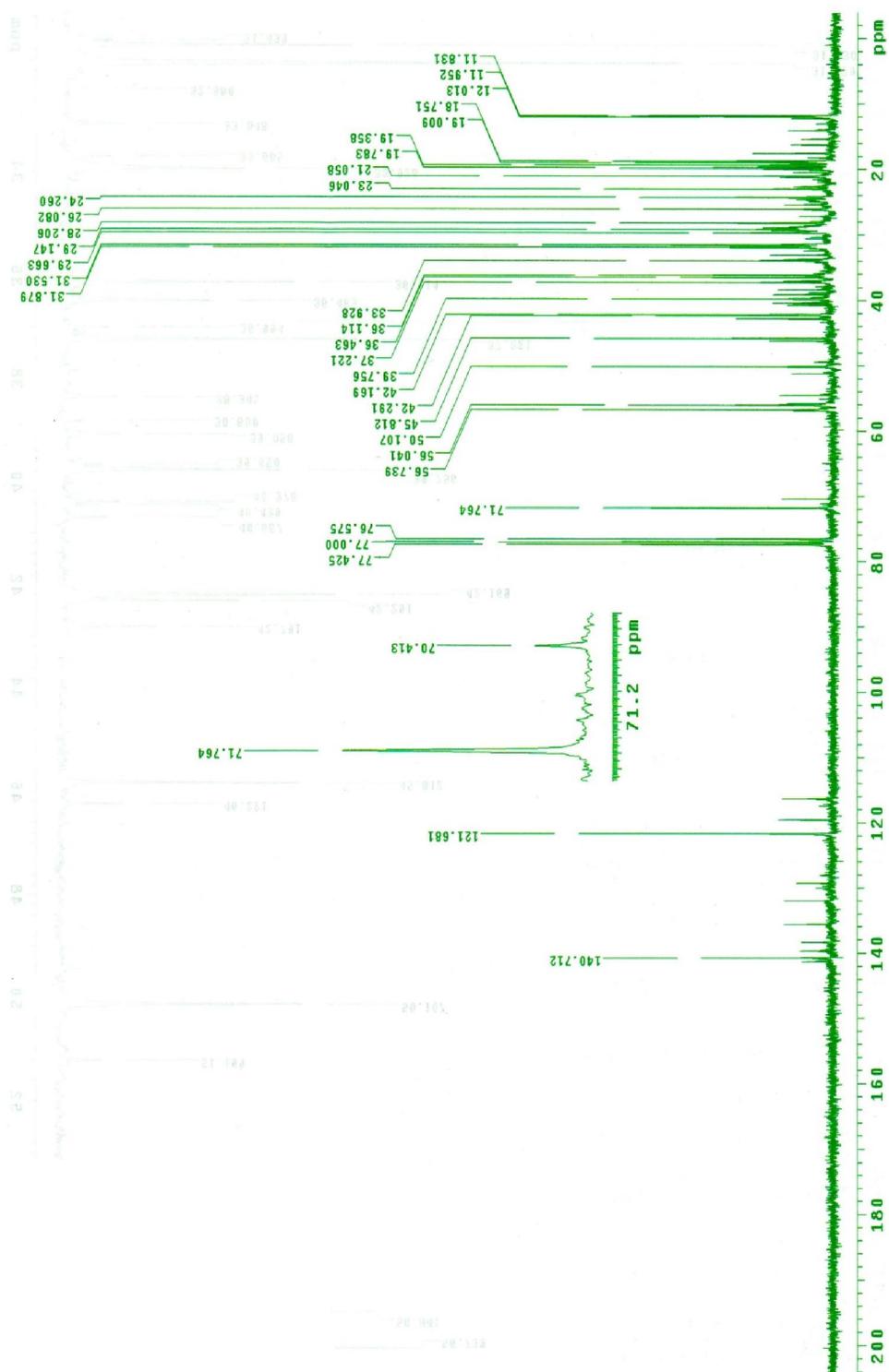
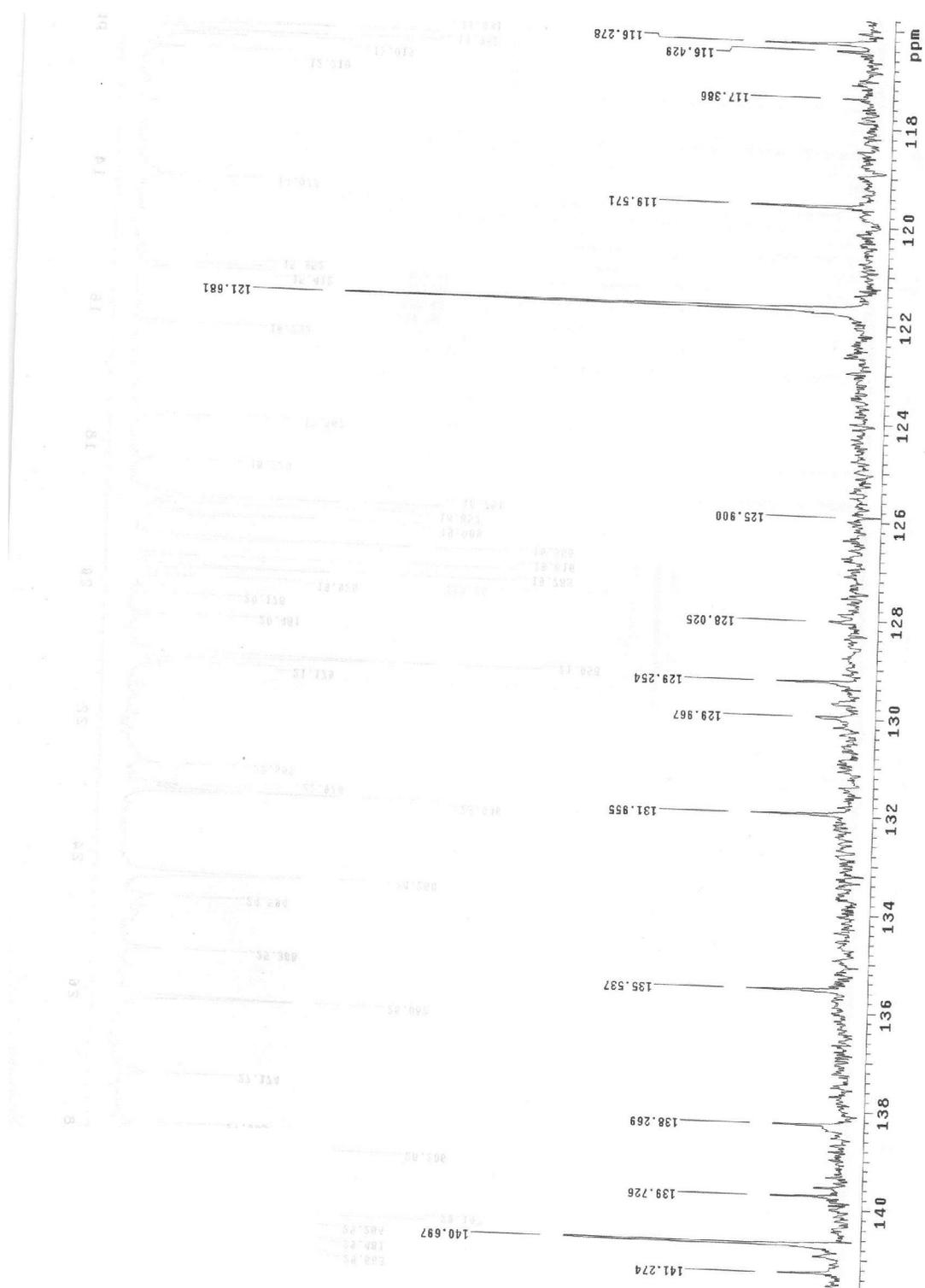
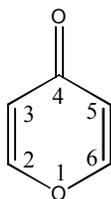
Figura 99 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **S-4+S-5**.

Figura 100- Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **S-4 + S-5**.

5.9.5 Pironas

As pironas, geralmente, são obtidas como produtos sintéticos da síntese de poliacetato e espirocetálicas contendo produtos naturais (ZAWACKI; CRIMMINS, 1996), mas substâncias contendo a anel pirânico estão amplamente presentes no reino animal e vegetal (GOEL; RAM, 2009) e fúngico (LU *et al.*, 2014), possuindo diversas atividades farmacológicas e aplicações na agricultura (LU *et al.*, 2014). O anel pirânico é composto por um oxigênio presente em um anel de seis membros com duas ligações duplas (GOEL; RAM, 2009) conforme pode ser observado na Figura 101.

Figura 101 – Esqueleto básico de uma pirona.

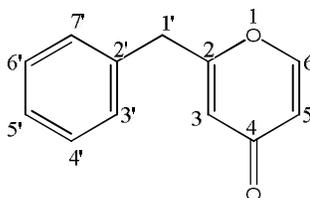


Dentre os diversos metabólitos secundários da classe das pironas, o fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 produziu a 2-benzil-4H-piran-4-ona (**S-6**) e a flavasperona (**S-7**).

5.9.5.1 Elucidação estrutural da 2-benzil-4H-piran-4-ona (**S-6**)

A substância 2-benzil-4H-piran-4-ona (Figura 102) foi isolada do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 na forma de um sólido cristalino amarelo, solúvel em diclorometano.

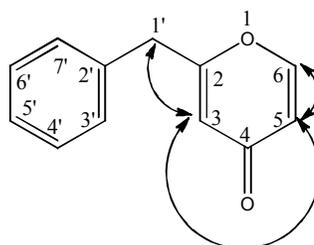
Figura 102- 2-benzil-4H-piran-4-ona (**S-6**).



No espectro de RMN ^1H (Figura 107, p. 165), é possível observar a presença de um sinal multipeto centralizado em δ_{H} 7,33 atribuído aos hidrogênios aromáticos.

Na análise conjunta do espectro de RMN ^1H com o espectro de COSY (Figura 109, p.167) de **S-6**, observa-se a correlação do sinal de hidrogênio olefínico em δ_{H} 7,70 (*d*, 1H; $J=5,7$ Hz; H-6) com o sinal de hidrogênio olefínico em δ_{H} 6,34 (*dd*, 1H; $J=5,7$ e 2,4 Hz; H-5) e este também se correlaciona com o sinal de hidrogênio olefínico em δ_{H} 6,21 (*dl*, 1H; $J=2,4$ Hz; H-3), Por fim, há a correlação entre os sinais de hidrogênio olefínico em δ_{H} 6,21 (H-3) e o sinal de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,83 (*s*, 2H, H-1'). Estas correlações indicam a presença de um anel pirano em **S-6** (HUANG *et al.*, 2007). As correlações de COSY de **S-6** encontram-se na Figura 103.

Figura 103- Correlações de COSY de **S-6**.



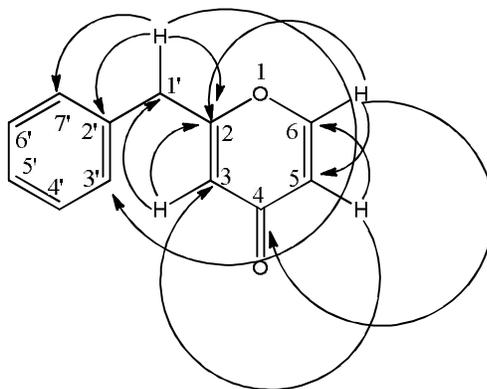
Na análise espectro de RMN ^{13}C (Figura 108, p. 166), observa-se a presença do sinal de carbono referente à carbonila típica do anel pirano em δ_{C} 179,4 (C-4) (HUANG *et al.*, 2007). É importante destacar que a análise do espectro de RMN ^{13}C de **S-6** permitiu observar a presença de 10 ao invés de 12 sinais de carbono, uma vez que há um plano de simetria entre o C-2' e C-5' do anel aromático e, em virtude disso, o sinal de carbono em δ_{C} 128,9 é equivalente para os carbonos aromáticos C-3' e C-7' e o sinal de carbono em δ_{C} 129,1 é equivalente para os carbonos aromáticos C-4' e C-6' (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). No espectro de RMN ^{13}C , observa-se ainda o sinal de carbono aromático em δ_{C} 134,4 (C-2') e o sinal de carbono olefínico ligado a oxigênio em δ_{C} 168,5 (C-2).

A análise conjunta do espectro de RMN ^{13}C com o espectro de HSQC (Figura 110, p. 168) de **S-6** permitiu observar a correlação do sinal de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 3,83 (H-1') com o sinal de carbono metilênico em δ_{C} 40,0 (C-1') e as correlações dos sinais de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 7,70 (H-6), δ_{H} 6,34 (H-5) e δ_{H} 6,21 (H-3) com os sinais de carbonos olefínicos em δ_{C} 155,4 (C-6), δ_{C} 116,6 (C-5) e δ_{C} 115,5 (C-3), respectivamente.

A análise conjunta do espectro de RMN ^{13}C com o espectro de HMBC (Figura 111, p. 169) de **S-6** foi possível observar que o sinal de hidrogênio olefínico em δ_{H} 7,70 (H-6) se correlaciona com o sinal de carbono carbinólico em δ_{C} 179,4 (C-4) a 3J , com o sinal de carbono olefínico em δ_{C} 116,6 (C-5) a 2J e com o sinal de carbono olefínico ligado a oxigênio em δ_{C} 168,5 (C-2) a 3J ; as correlações do sinal de hidrogênio olefínico em δ_{H} 6,34 (H-5) com os sinais de carbonos olefínicos δ_{C} 155,4 (C-6) a 2J e δ_{C} 115,5 (C-3) a 3J e também os acoplamentos do sinal de hidrogênio olefínico em δ_{H} 6,21 (H-3) com o sinal de carbono olefínico em δ_{C} 116,6 (C-5) a 3J , o sinal de carbono olefínico ligado a oxigênio em δ_{C} 168,5 (C-2) a 2J e o sinal de carbono metilênico em δ_{C} 40,0 (C-1') a 3J . Estas correlações confirmam a presença de um anel pirano na estrutura de **S-6**, corroborando com os dados de RMN ^1H e de COSY.

Na análise conjunta do espectro de RMN ^{13}C com o espectro de HMBC de **S-6**, foram constatadas também as correlações do sinal de hidrogênio metilênico em δ_{H} 3,83 (H-1') com o sinal de carbono olefínico ligado a oxigênio em δ_{C} 168,5 (C-6) a 2J e com os sinais de carbonos aromáticos em δ_{C} 128,9 (C-3'/C-7') a 3J e δ_{C} 134,4 (C-2') a 2J . Na Figura 104, encontram-se as correlações de HMBC de **S-6**.

Figura 104- Correlações de HMBC de **S-6**.



Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-6** que em conjunto com a interpretação dos espectros de RMN 2D e do espectro de massa ESI (+) (Figuras 112-113, p. 169), que apresentou o pico do íon pseudomolecular em m/z 187 $[\text{M}+\text{H}]^+$, permitiram chegar a conclusão que **S-6** tratava-se do policetídeo 2-benzil-4H-pirano-4-ona. A

proposta de fragmentação dos íons filhos de **S-6** está na Figura 105 juntamente com a proposta de rota biossintética de **S-6** (Figura 106, p. 162).

Figura 105- Proposta de fragmentação de **S-6**.

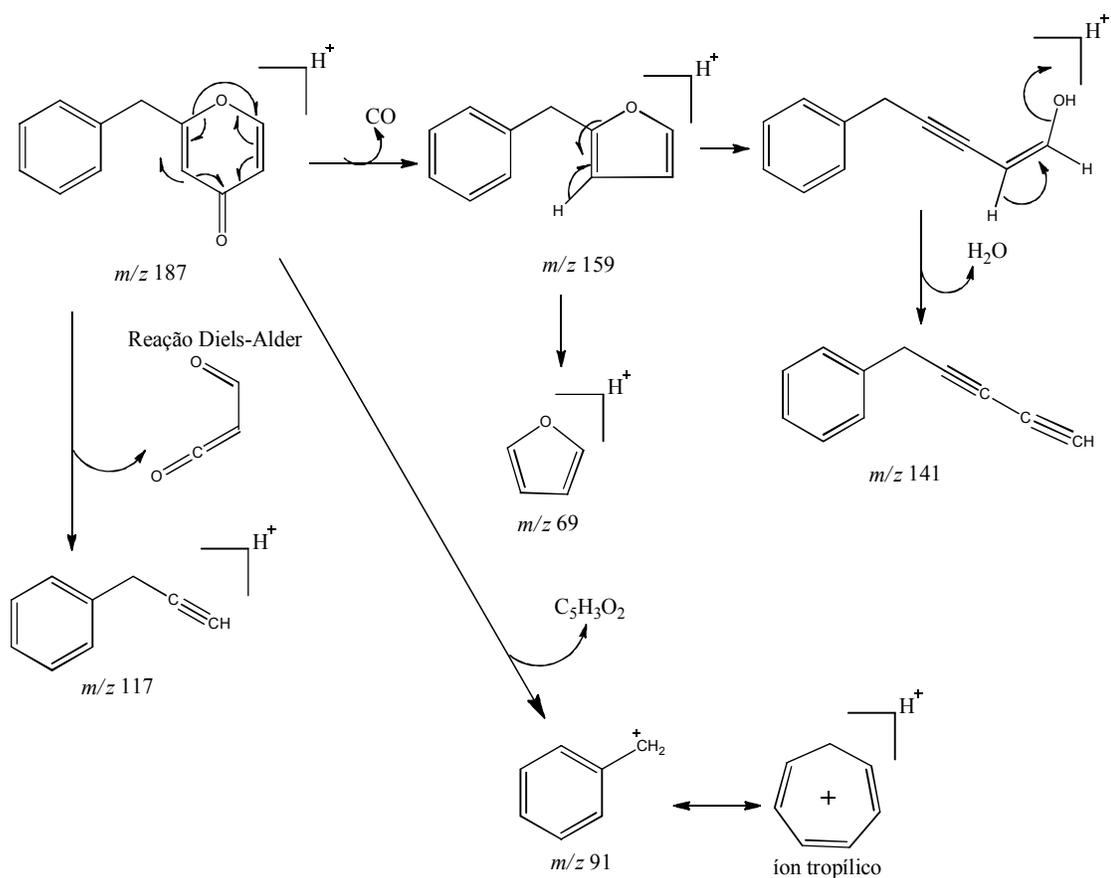
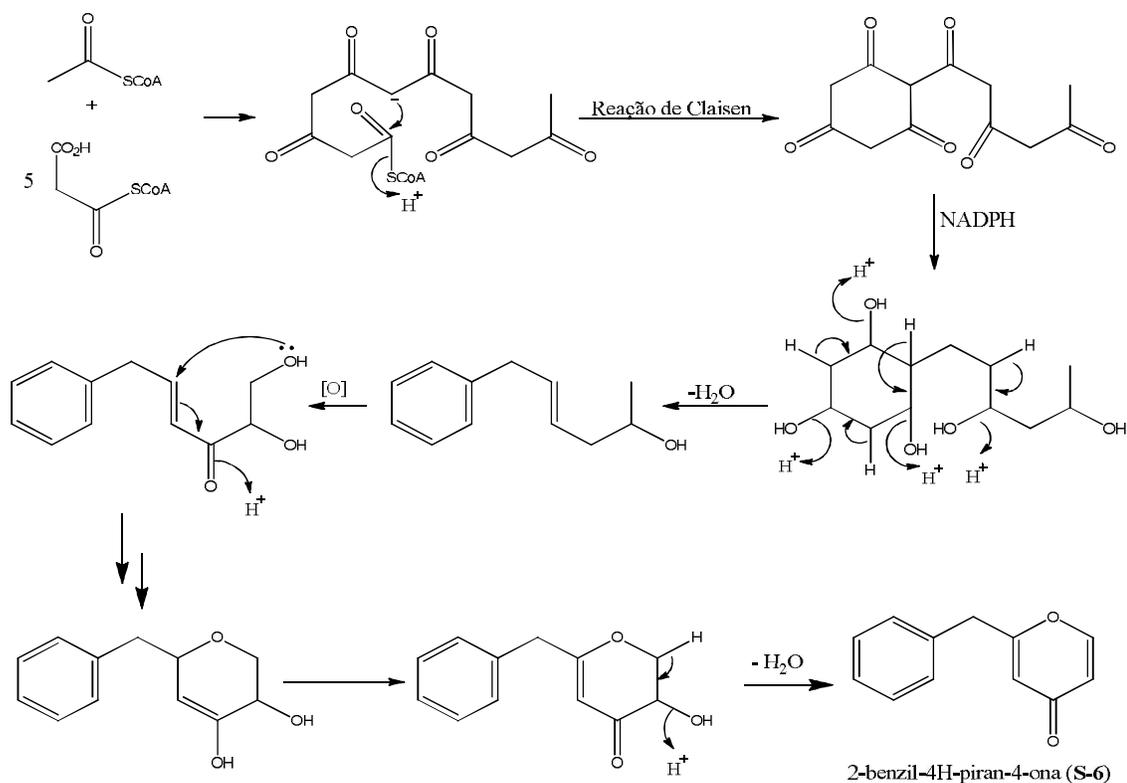


Figura 106- Proposta de rota biossintética de **S-6**.



A substância 2-benzil-4H-piran-4-ona (**S-6**) é relatada como produto de síntese orgânica (ZAWACKI; CRIMMINS, 1996) e foi isolada como produto natural pela primeira vez por HUANG *et al.* (2007), sendo então este o segundo relato dela como produto natural. A Tabela 04 (p. 164) apresenta os dados de RMN ^1H e de RMN ^{13}C para o composto **S-6**.

Tabela 04. Atribuição dos dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 2- benzil-4H-piran-ona (**S-6**).

	S-6	S-6
	H (δ, mult., J em Hz)	C
2		168,5
3	6,21 (<i>dl</i> ; 2,4)	115,5
4		179,4
5	6,34 (<i>dd</i> ; 5,7; 2,4)	116,5
6	7,70 (<i>d</i> ; 5,7)	155,4
1'	3,83 (<i>s</i>)	40,0
2'		134,4
3'	7,33 (<i>m</i>)	128,9
4'	7,33 (<i>m</i>)	129,1
5'	7,33 (<i>m</i>)	127,6
6'	7,33 (<i>m</i>)	129,1
7'	7,33 (<i>m</i>)	128,9

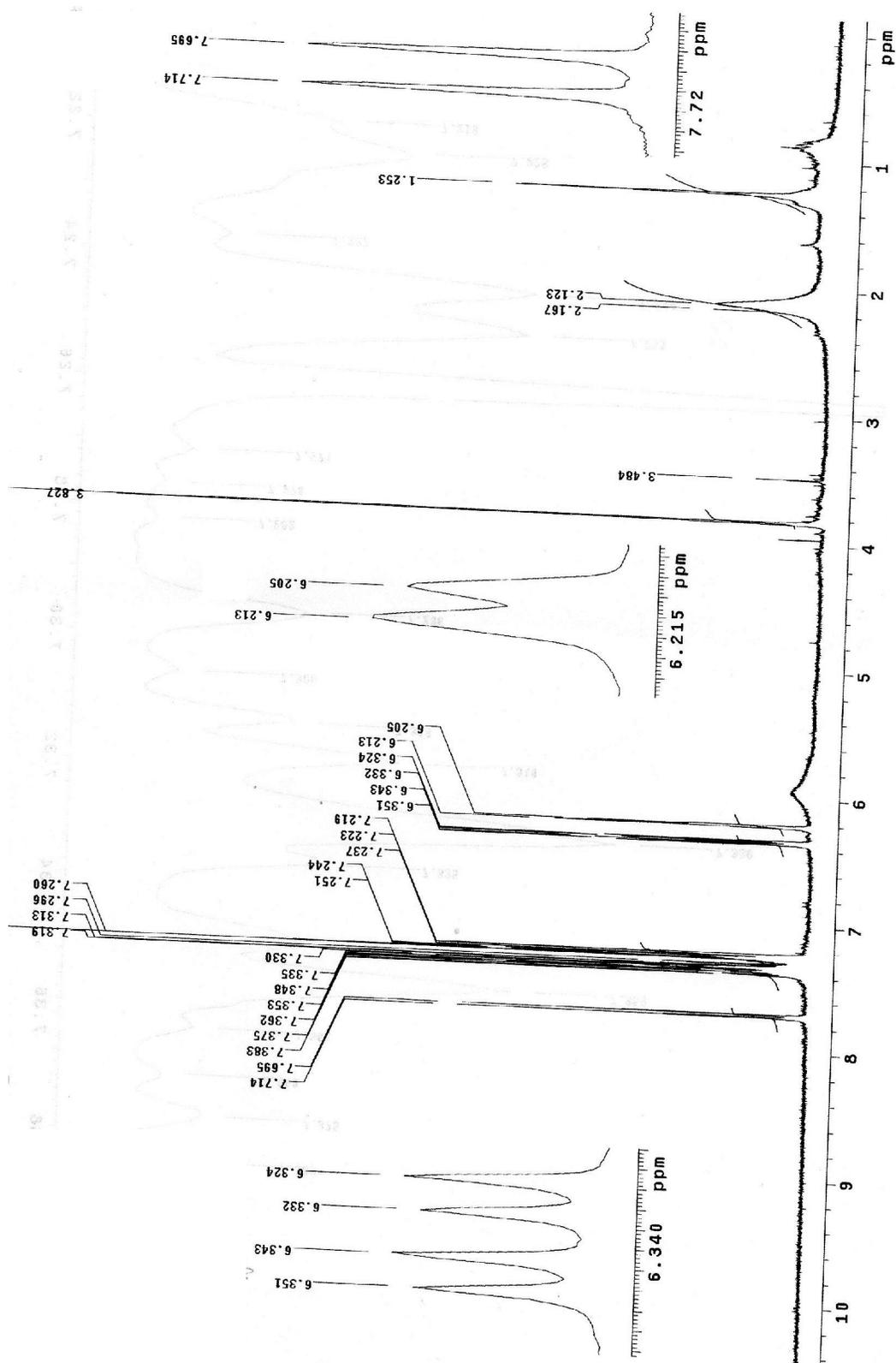
Figura 107 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S-6.

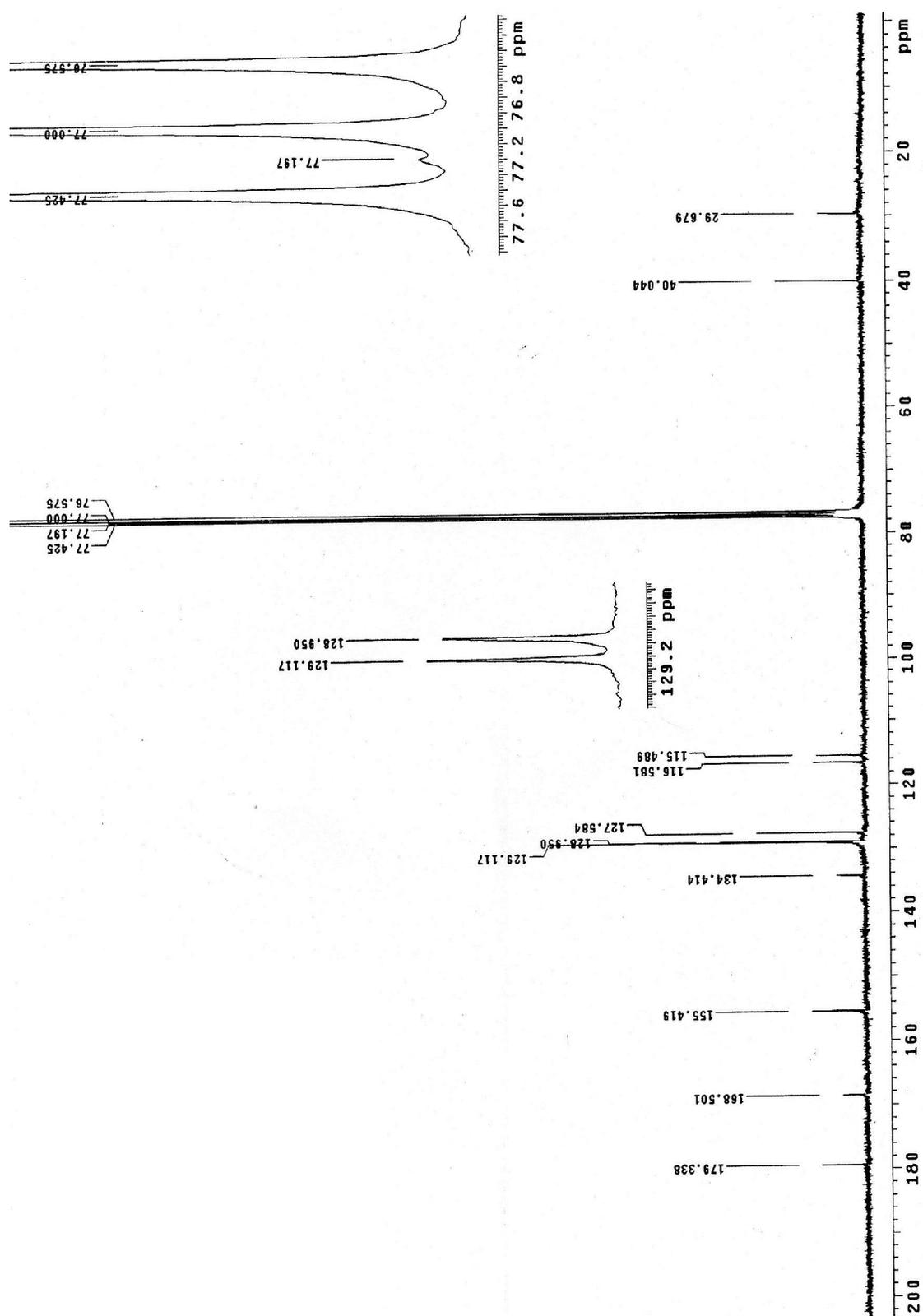
Figura 108 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S-6.

Figura 109- Espectro de COSY (300 MHz, CDCl_3) de S-6.

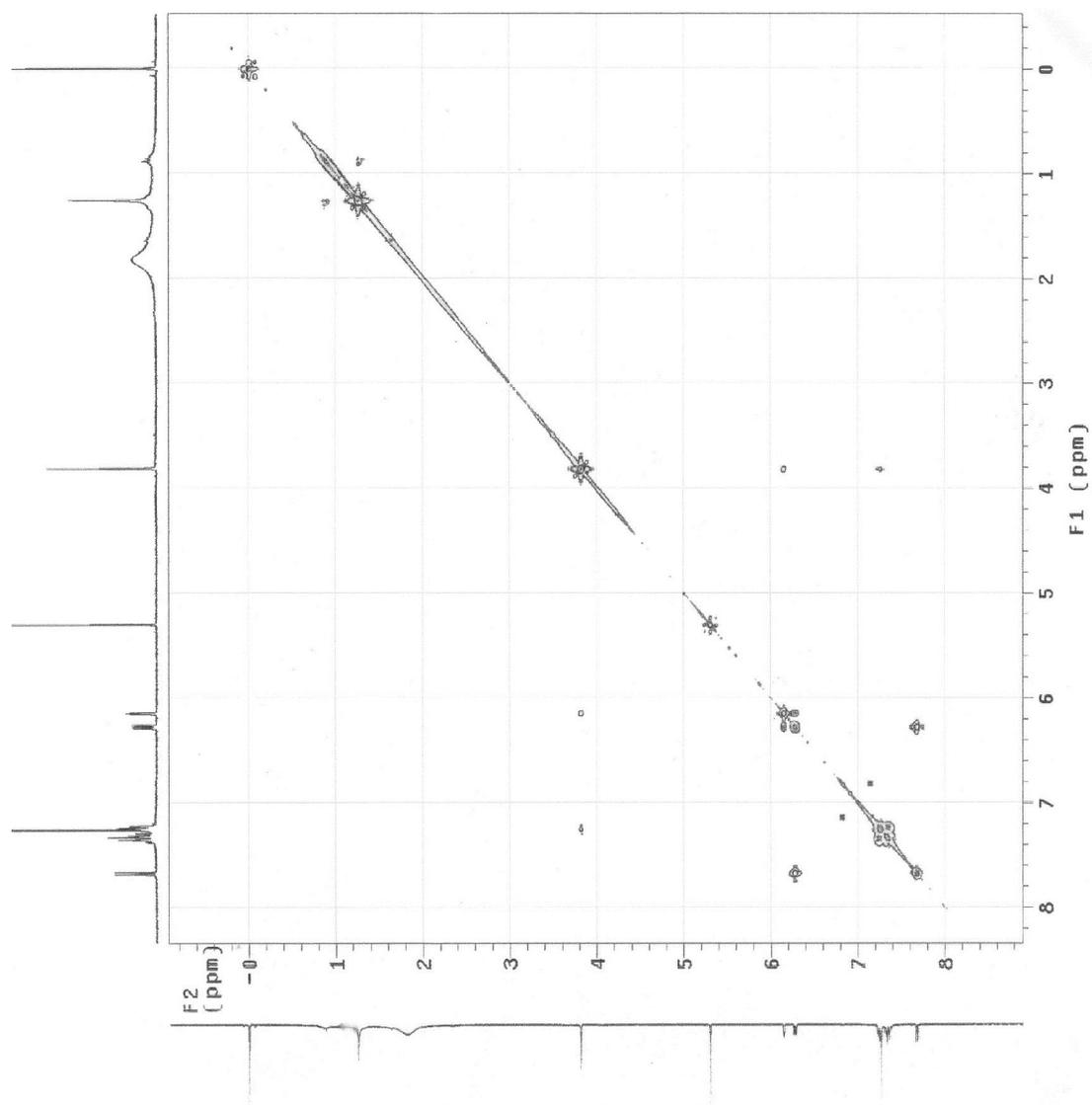


Figura 110- Espectro de HSQC (300 MHz, CDCl_3) de S-6.

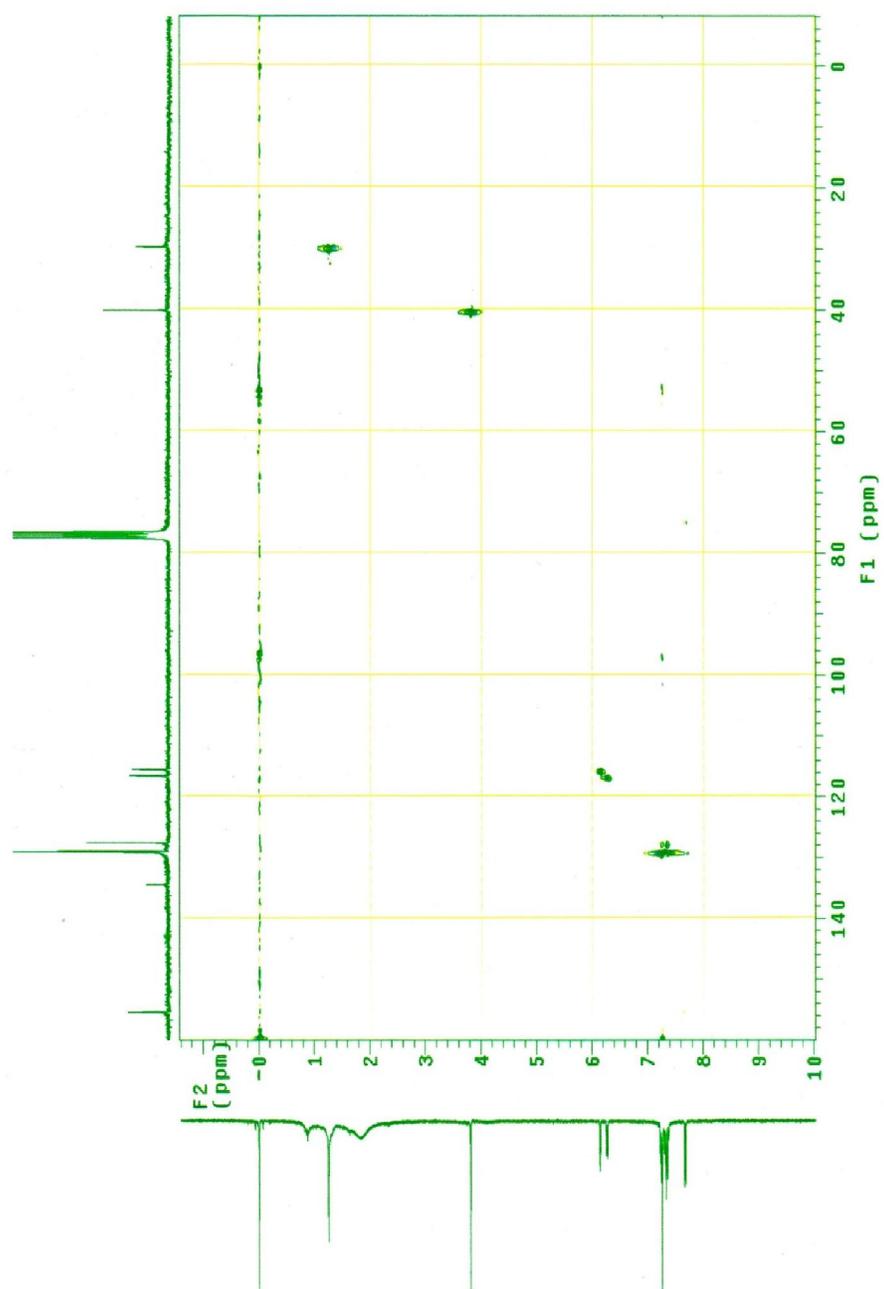


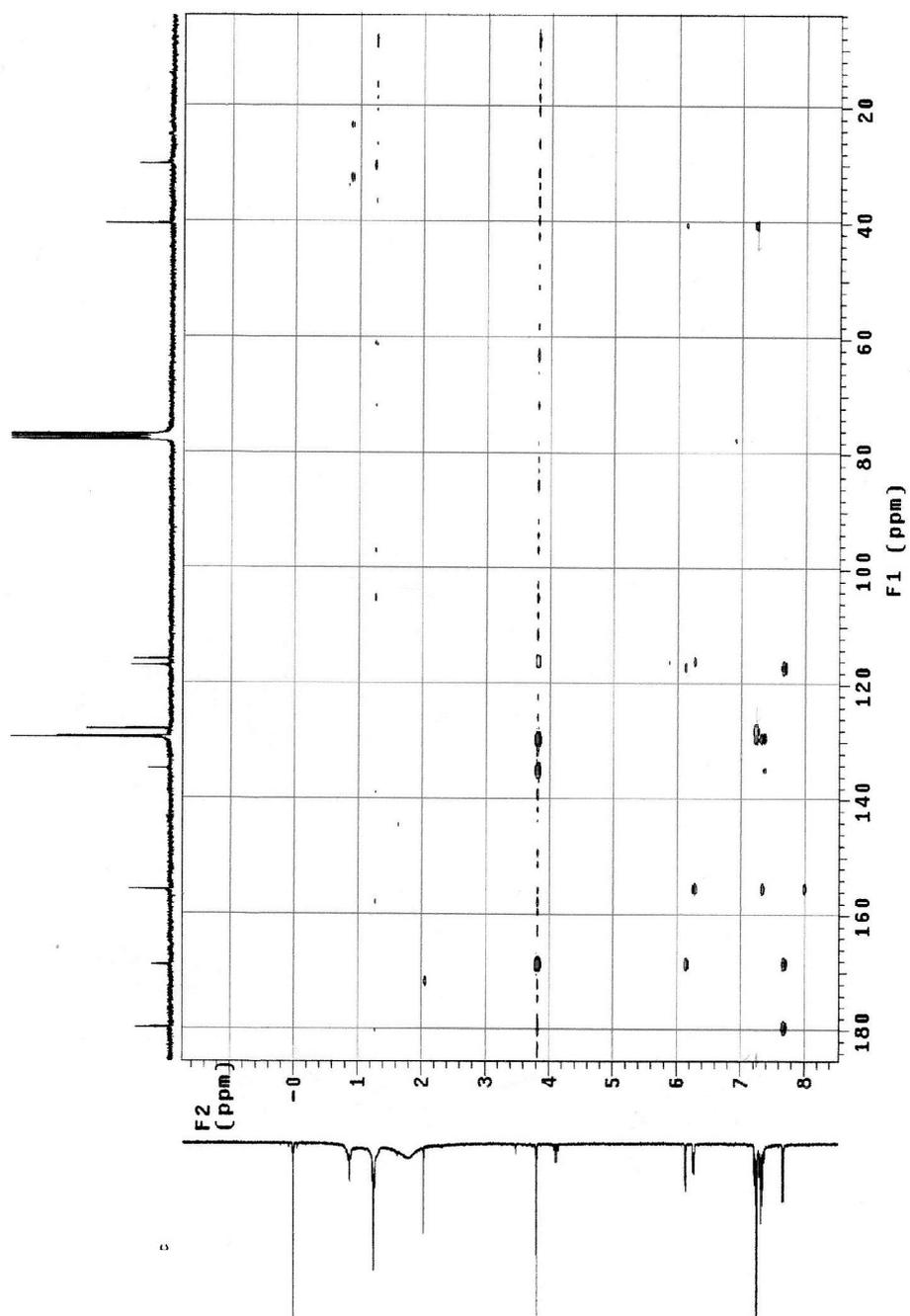
Figura 111- Espectro de HMBC (75 MHz, CDCl_3) de S-6.

Figura 112 - Espectro de massas (full scan) ESI (+) de S-6.

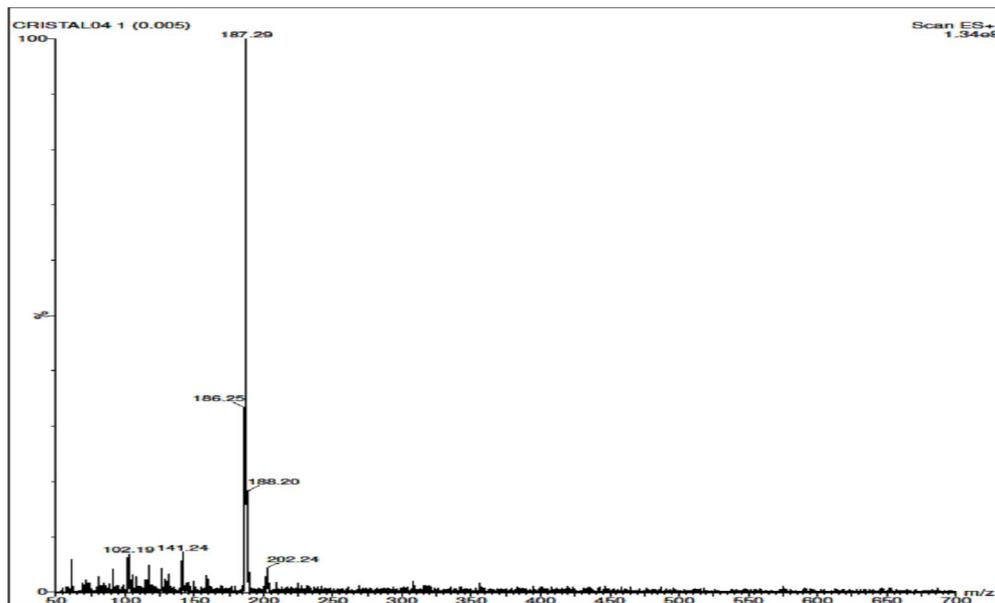
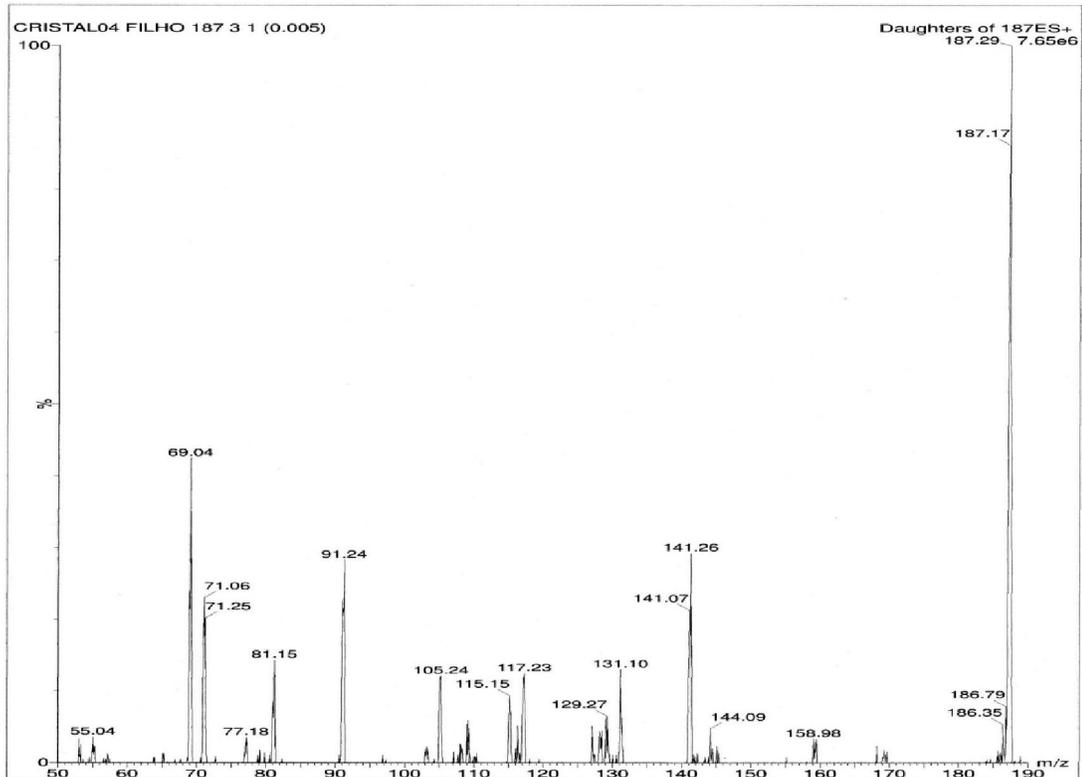


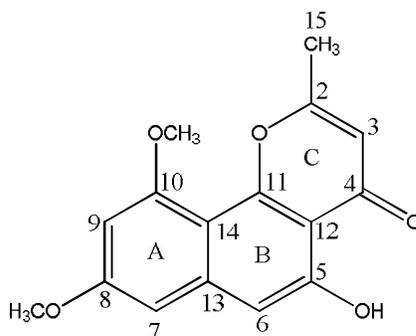
Figura 113 - Espectro de massas dos íons filhos de m/z 187 de S-6.



5.9.5.2 Elucidação estrutural da flavasperona (**S-7**)

A substância flavasperona (Figura 114) foi isolada do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 na forma de um sólido cristalino amarelo, solúvel em diclorometano.

Figura 114- Flavasperona (**S-7**).



No espectro de RMN ^1H (Figuras 117, p. 176), é possível observar a presença de um sinal singlete em δ_{H} 12,80 (s, 1H, OH-5) referente ao hidrogênio da hidroxila quelada à carbonila tipicamente de pironas (GORST-ALLMAN *et al.*, 1980). No espectro de RMN ^1H , há ainda um sinal singlete em δ_{H} 6,86 (s, 1H, H-6) atribuído ao hidrogênio do anel aromático B e dois sinais singletos em δ_{H} 3,96 (s, 3H, OCH₃-10) e δ_{H} 3,92 (s, 3H, OCH₃-8) referentes aos átomos de hidrogênios de duas metoxilas aromáticas presentes no anel A da flavasperona (**S-7**).

Na análise conjunta do espectro de RMN ^1H com o espectro de COSY (Figura 120, p. 179) de **S-7**, observa-se a correlação do sinal de hidrogênio aromático em δ_{H} 6,27 (*dl*, 1H; $J=0,3$ Hz; H-3) com o sinal de hidrogênios metílicos ligados ao anel aromático C em δ_{H} 2,49 (*dl*, 3H; $J=0,9$ Hz; H-15). Outra correlação observada no espectro de COSY é entre os sinais dupletos de hidrogênios do anel aromático A em δ_{H} 6,58 (*d*, 2H; $J=2,4$ Hz; H-7) e δ_{H} 6,40 (*d*, 2H; $J=2,4$ Hz; H-9).

Na análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 118, p. 177), são observados sinais referentes a 16 carbonos, sendo o sinal de carbono em δ_{C} 182,8 característico de carbonila de anel pirano (GORST-ALLMAN *et al.*, 1980) e um sinal de carbono aromático ligado ao oxigênio do anel pirano C de **S-7** em δ_{C} 155,8 (C-11). A análise conjunta do espectro de RMN ^{13}C com o espectro de DEPT (Figura 119, p. 177) confirma a presença dos sinais metoxílicos aromáticos em δ_{C} 55,9 (OCH₃-10) e δ_{C}

55,5 (OCH₃-8), do sinal de carbono metílico aromático em δ_C 20,5 (C-15) e dos sinais de carbonos metínicos aromáticos em δ_C 97,9 (C-7), δ_C 97,0 (C-9), δ_C 105,8 (C-6) e δ_C 110,2 (C-3).

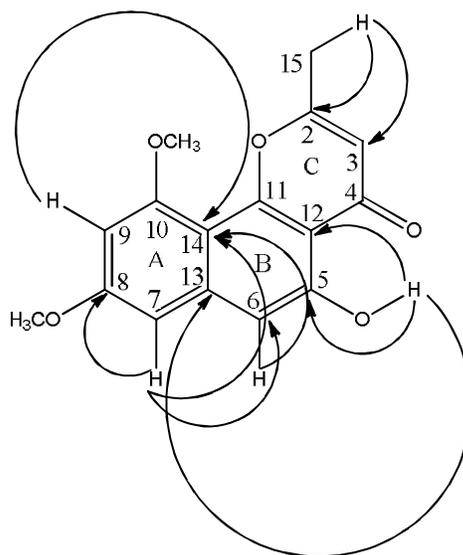
O espectro de HSQC (Figura 121, p. 180) mostra sete correlações: a correlação do sinal em δ_H 6,86 (H-6) com o sinal em δ_C 105,8 (C-6), a correlação do sinal em δ_H 6,58 (H-7) com o sinal em δ_C 97,9 (C-7), a correlação do sinal em δ_H 6,40 (H-9) com o sinal em δ_C 97,9 (C-9) e a correlação do sinal em δ_H 6,28 (H-3) com o sinal em δ_C 110,2 (C-3). Há ainda as correlações dos sinais de hidrogênios metoxílicos aromáticos em δ_H 3,96 (OCH₃-10) e δ_C 3,92 (OCH₃-8) com os sinais de carbonos metoxílicos aromáticos em δ_C 55,9 (OCH₃-10) e δ_C 55,5 (OCH₃-8) respectivamente e a correlação do sinal de hidrogênios metílicos em δ_H 2,49 (H-15) com o sinal de carbono metílico em δ_C 20,5 (C-15).

Na análise conjunta do espectro de RMN ¹³C com o espectro de HMBC (Figura 122-124, p. 181-183) de **S-7**, observam-se as correlações do sinal de hidrogênio de hidroxila quelada em δ_H 12,80 (OH-5) com o sinal de carbono em δ_C 156,6 (C-5) a ²J e δ_C 108,8 (C-12) a ³J. Destacam-se ainda as correlações entre o sinal de hidrogênios metílicos em δ_H 2,49 (H-15) com os sinais de carbonos aromáticos em δ_C 166,6 (C-2) a ²J e δ_C 110,2 (C-3) a ³J. Estas correlações confirmam a presença do anel pirano C ligado ao anel aromático B na estrutura de **S-7**, corroborando com os dados de RMN ¹H e de COSY.

No espectro de HMBC de **S-7**, são observadas também as correlações do sinal de hidrogênio de hidroxila quelada em δ_H 12,80 (OH-5) com os sinais de carbonos em δ_C 105,8 (C-6) a ³J e δ_C 156,6 (C-5) a ²J; as correlações do sinal de hidrogênio em δ_H 6,88 (H-6) com os sinais de carbonos aromáticos em δ_C 108,8 (C-12) a ³J, δ_C 156,6 (C-5) a ²J, δ_C 104,9 (C-14) a ³J e δ_C 97,9 (C-7) a ³J; as correlações do sinal de hidrogênio em δ_H 6,58 (H-7) com os sinais de carbonos aromáticos em δ_C 161,4 (C-8) a ²J, δ_C 105,8 (C-6) a ³J e δ_C 104,9 (C-14) a ³J e a correlação do sinal de hidrogênio em δ_H 6,40 (H-9) com o sinal de carbono aromático em δ_C 104,9 (C-14) a ³J. Nota-se ainda a correlação do sinal de hidrogênio metoxílico em δ_H 3,97 (OCH₃-10) com o sinal de carbono aromático em δ_C 159,0 (C-10) a ³J e a correlação do sinal de hidrogênio metoxílico em δ_H 3,92 (OCH₃-8) com o sinal de carbono

aromático em δ_C 161,4 (C-8) a 3J . As correlações de HMBC de **S-7** encontram-se na Figura 115.

Figura 115- Correlações de HMBC de **S-7**.



Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-7** foram comparados com os dados da literatura (Tabela 05, p. 175) que em conjunto com a interpretação dos espectros de RMN 2D e do espectro de massa ESI (+) (Figuras 125-126, p. 183), que apresentou o pico do íon molecular em m/z 287 $[\text{M}+\text{H}]^+$, permitiram chegar a conclusão que **S-7** tratava-se do policetídeo flavasperona. A proposta de fragmentação dos íons filhos de **S-7** está na Figura 116 (p. 174).

A substância flavasperona (**S-7**) é um importante metabólito secundário inibidor seletivo da enzima aciltransferase 2 do colesterol (SAKAI *et al.*, 2008). Ela já foi isolada de diversas espécies fúngicas endofíticas do gênero *Aspergillus* (SIRIWARDANE *et al.*, 2015), mas este é o primeiro relato de isolamento desta substância de fungos de solo.

Figura 116- Proposta de fragmentação de S-7.

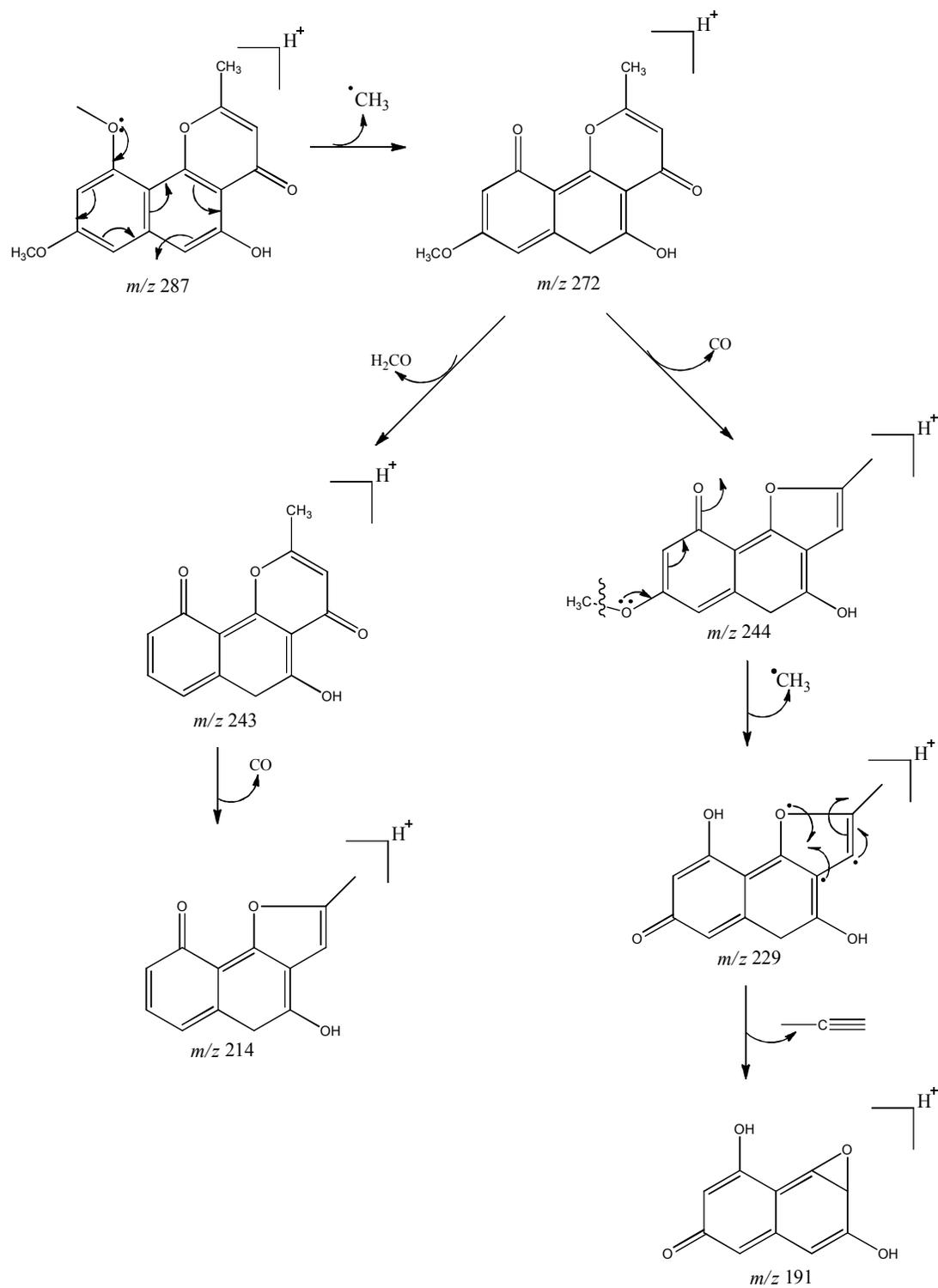


Tabela 05. Atribuição dos dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **S-7** juntamente com os dados descritos na literatura para a flavasperona.

	S-7	Lit^{a,b}	S-7	Lit^{a,b}
	H (δ, mult., <i>J</i> em Hz)	H (δ, mult., <i>J</i> em Hz)	C	C
2			166,6	166,5
3	6,27 (<i>d</i> ; 0,3)	6,23 (<i>d</i> ; 0,3)	110,2	110,2
4			182,8	182,8
5			156,6	156,7
6	6,86 (<i>s</i>)	6,80 (<i>s</i>)	105,8	105,7
7	6,58 (<i>d</i> ; 2,4)	6,53 (<i>d</i> ; 2,5)	97,9	98,0
8			161,4	161,5
9	6,40 (<i>d</i> ; 2,4)	6,35 (<i>d</i> ; 2,5)	97,0	97,0
10			159,0	159,1
11			155,8	155,8
12			104,9	104,0
13			141,2	141,2
14			108,8	108,8
15	2,49 (<i>d</i> ; 0,9)	2,45 (<i>d</i> ; 0,6)	20,5	20,4
OCH₃-8	3,92 (<i>s</i>)	3,91 (<i>s</i>)	55,5	55,4
OCH₃-10	3,96 (<i>s</i>)	3,92 (<i>s</i>)	55,9	55,8
OH-5	12,80 (<i>s</i>)	12,93 (<i>s</i>)		

^a[GORST-ALLMAN *et al.*, 1980];
^bDados da literatura de RMN ^1H e ^{13}C em CDCl_3 .

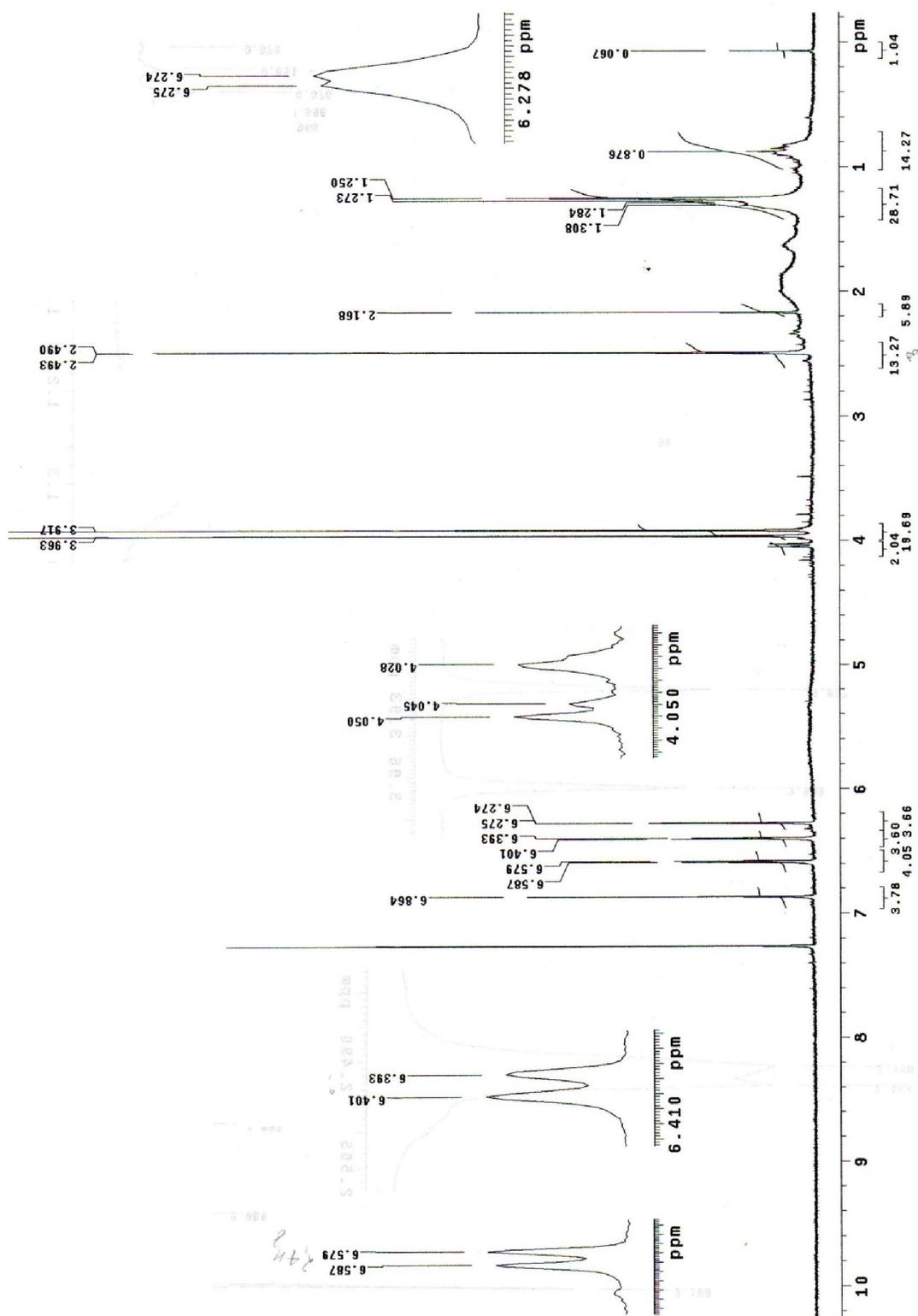
FIGURA 117 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S-7.

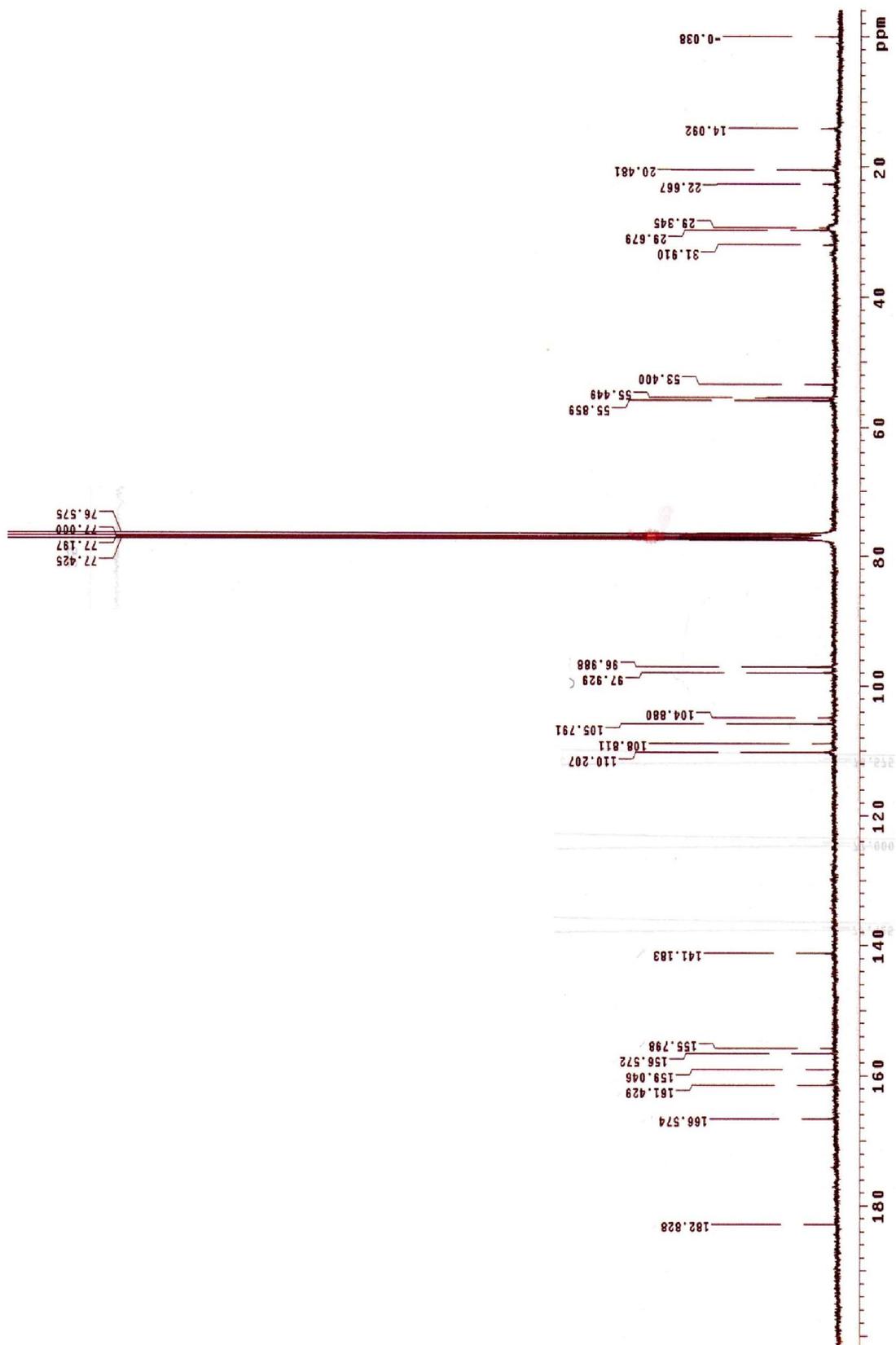
FIGURA 118 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S-7.

Figura 119- Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl_3) de S-7.

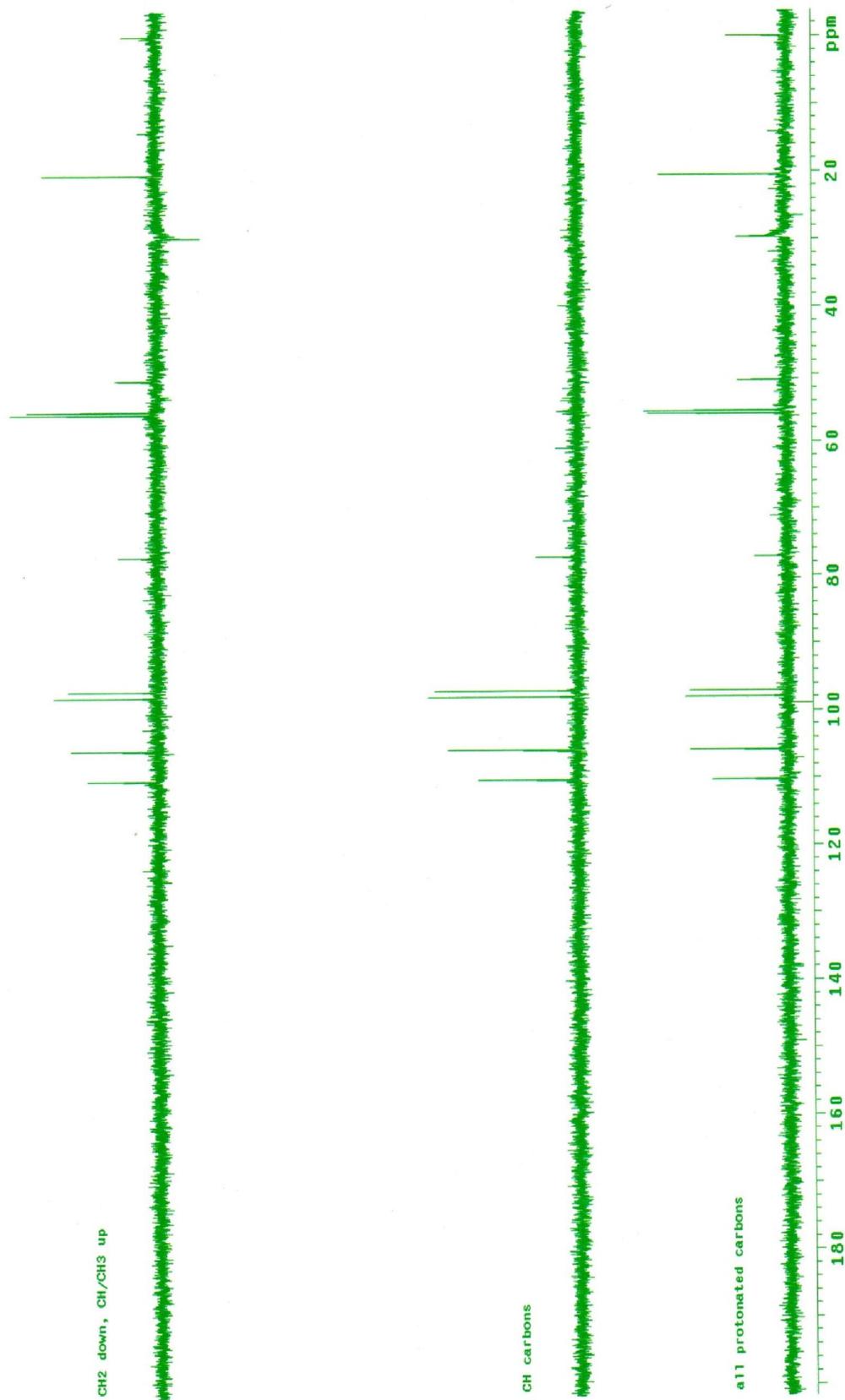


Figura 120- Espectro de COSY (300 MHz, CDCl_3) de S-7.

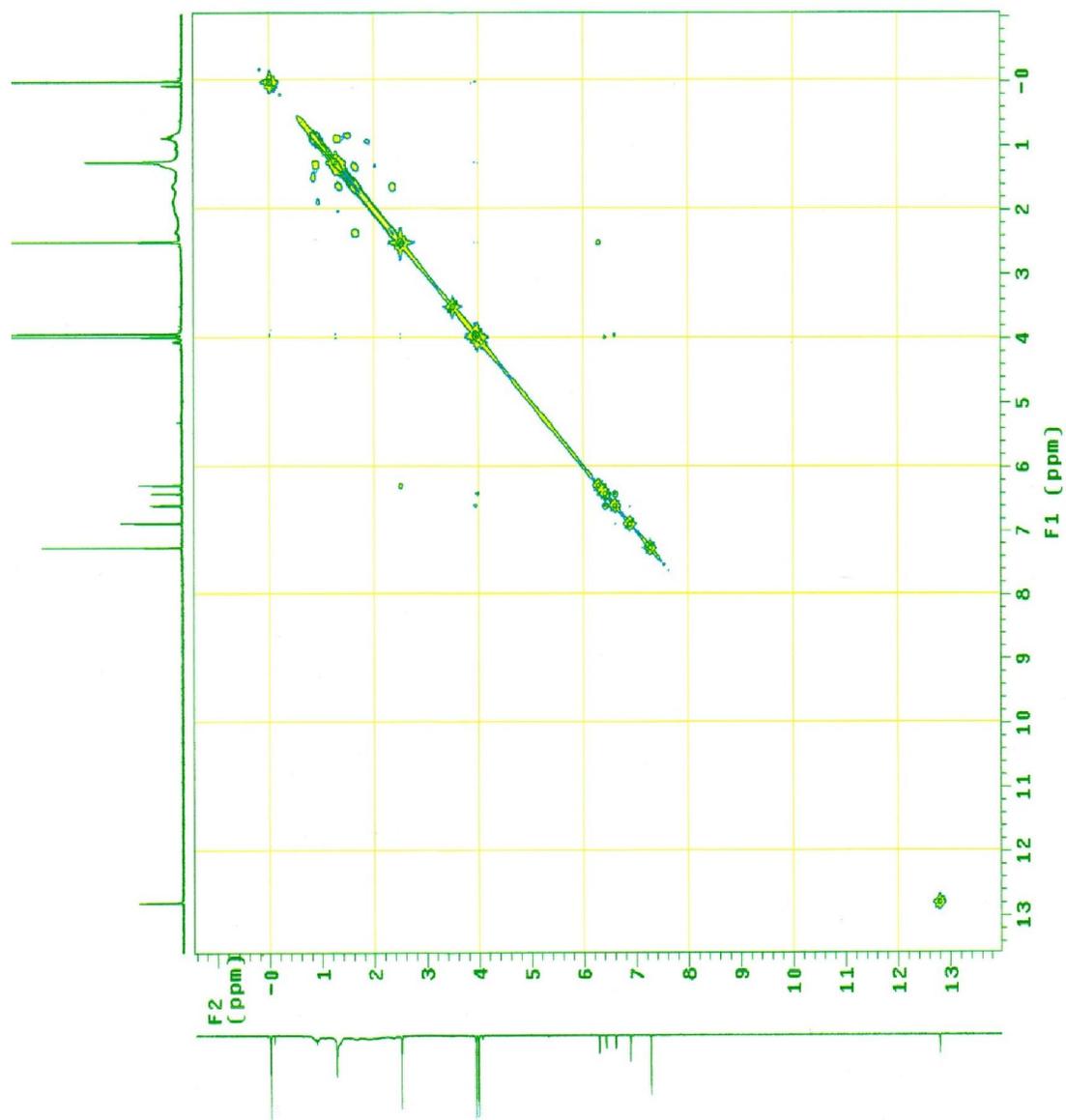


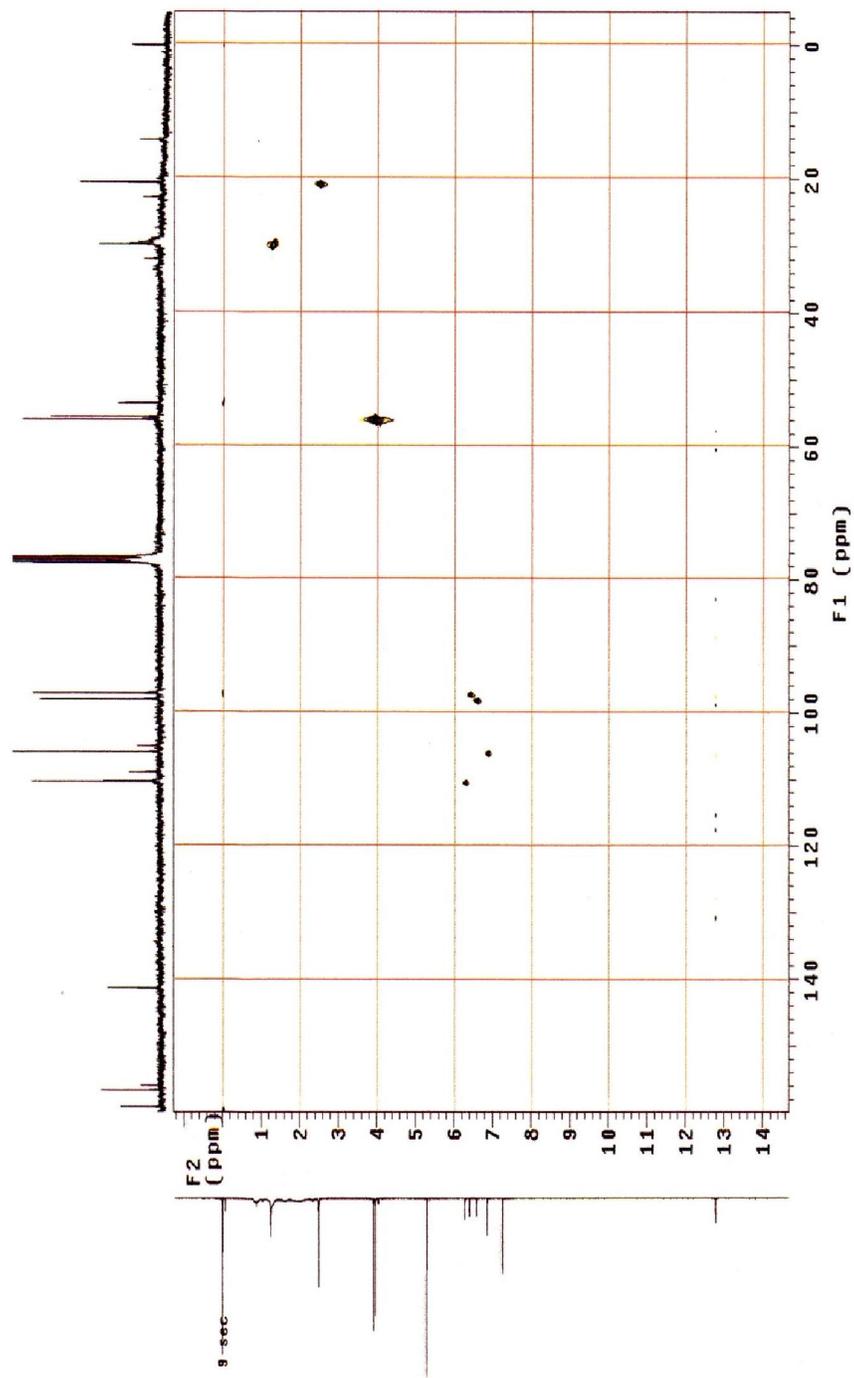
Figura 121- Espectro de HSQC (300 MHz, CDCl_3) de S-7.

Figura 122- Espectro de HMBC (75 MHz, CDCl_3) de S-7.

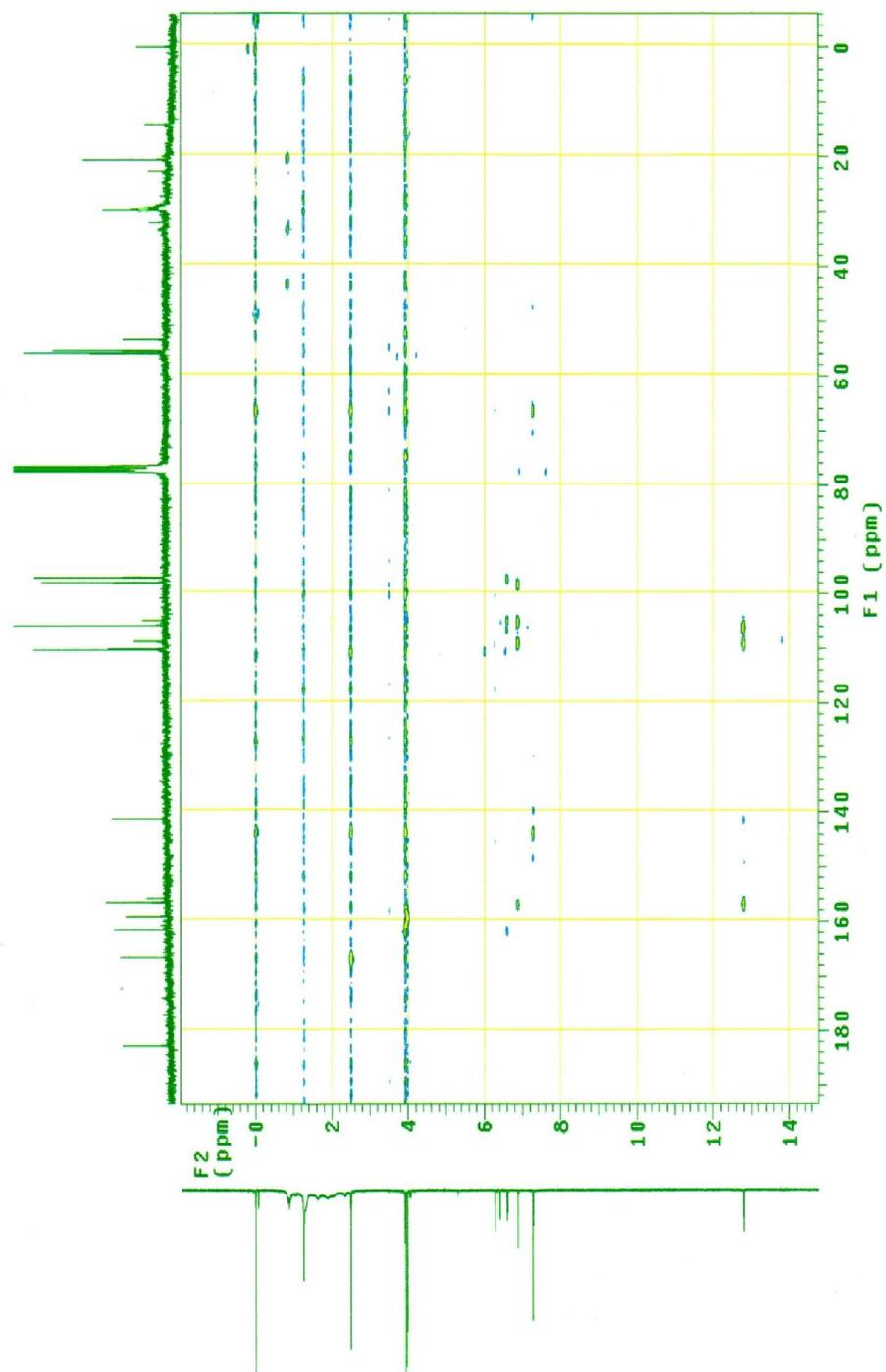


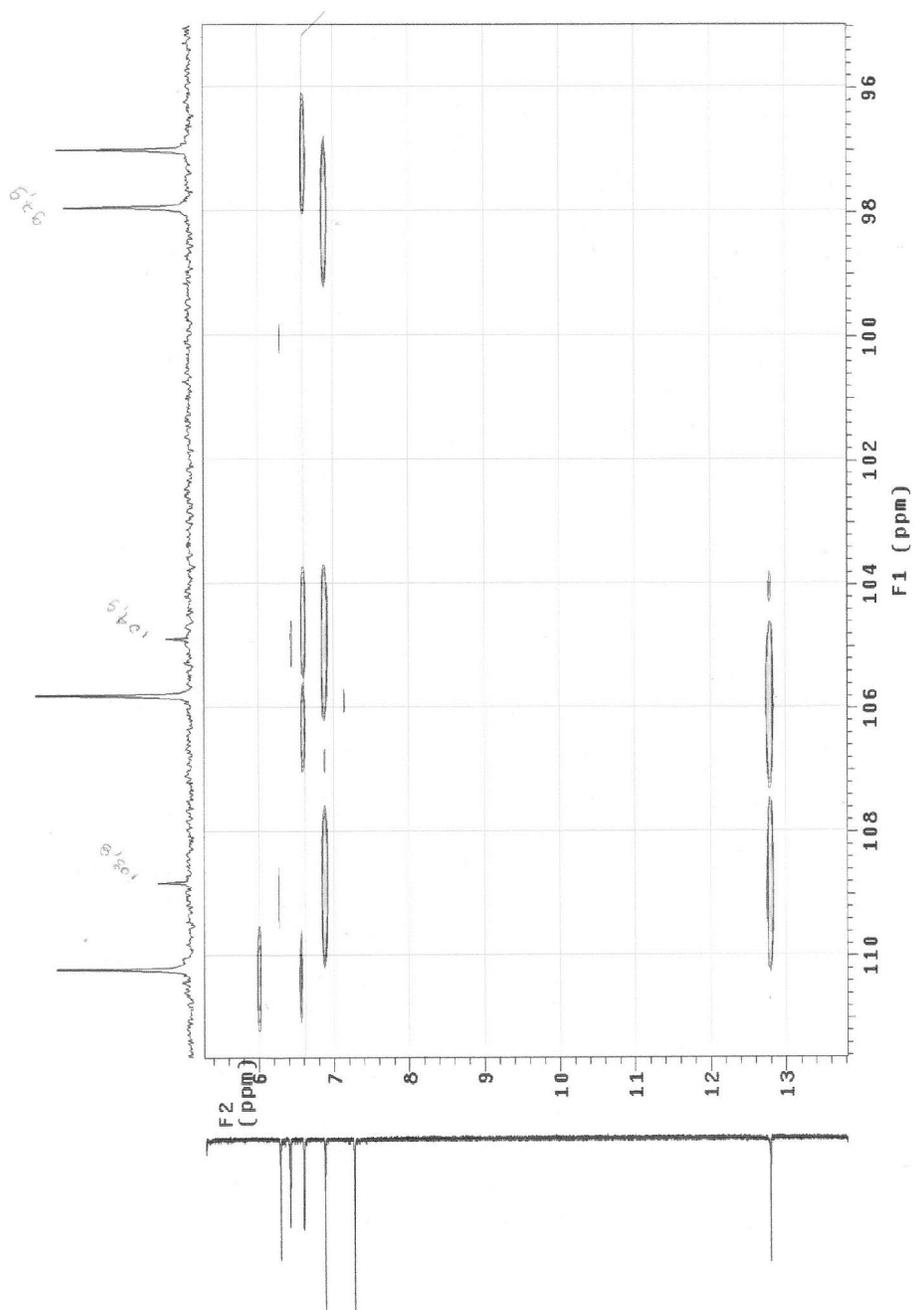
Figura 123- Ampliação 01 do espectro de HMBC (75 MHz, CDCl_3) de **S-7**.

Figura 124- Ampliação 02 do espectro de HMBC (75 MHz, CDCl₃) de S-7.

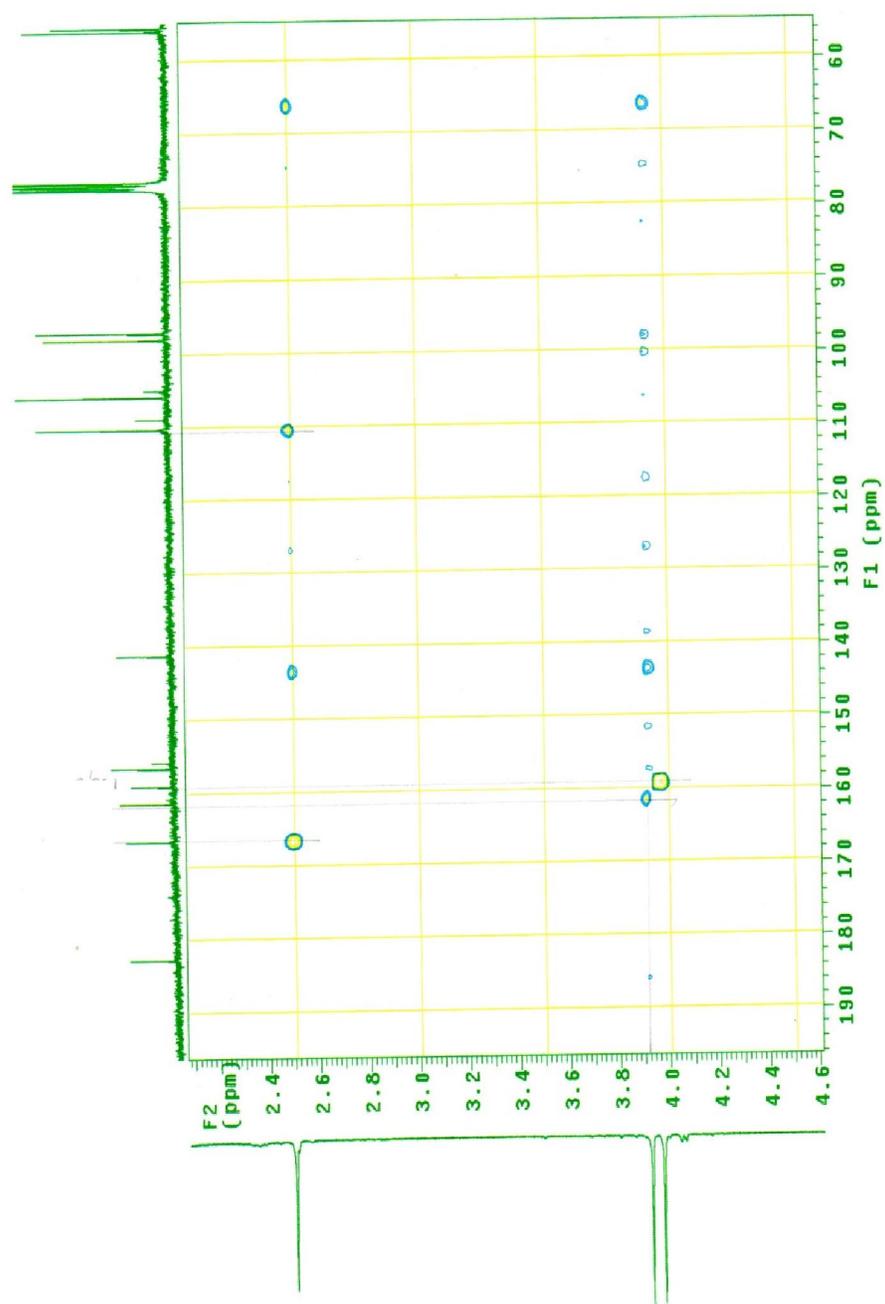


Figura 125- Espectro de massas (full scan) ESI (+) de m/z 287 de S-7.

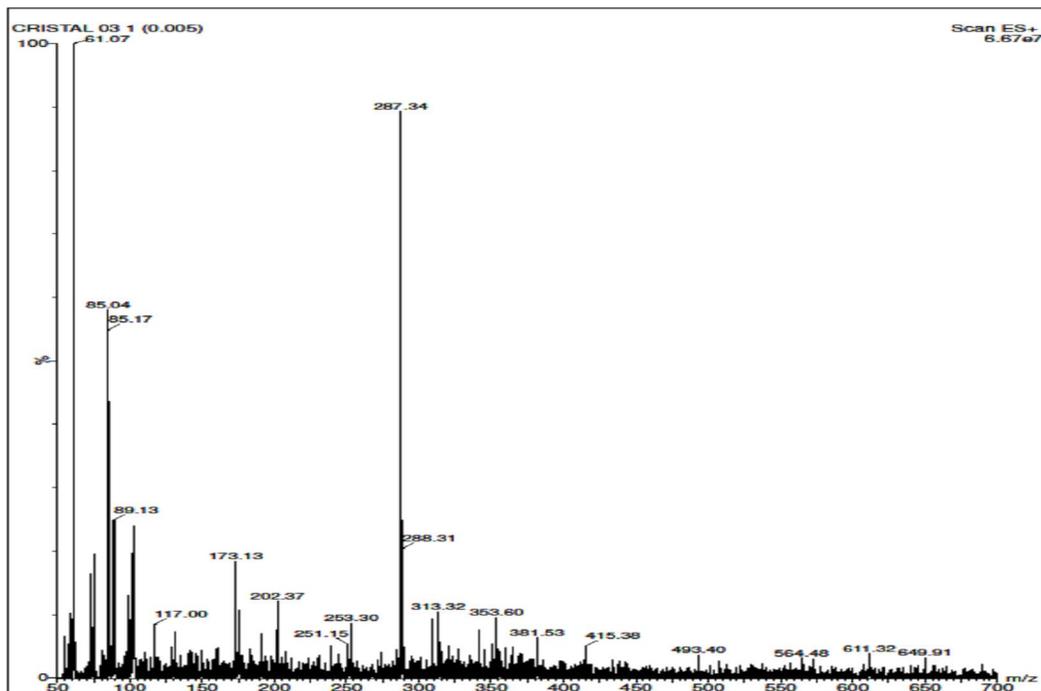
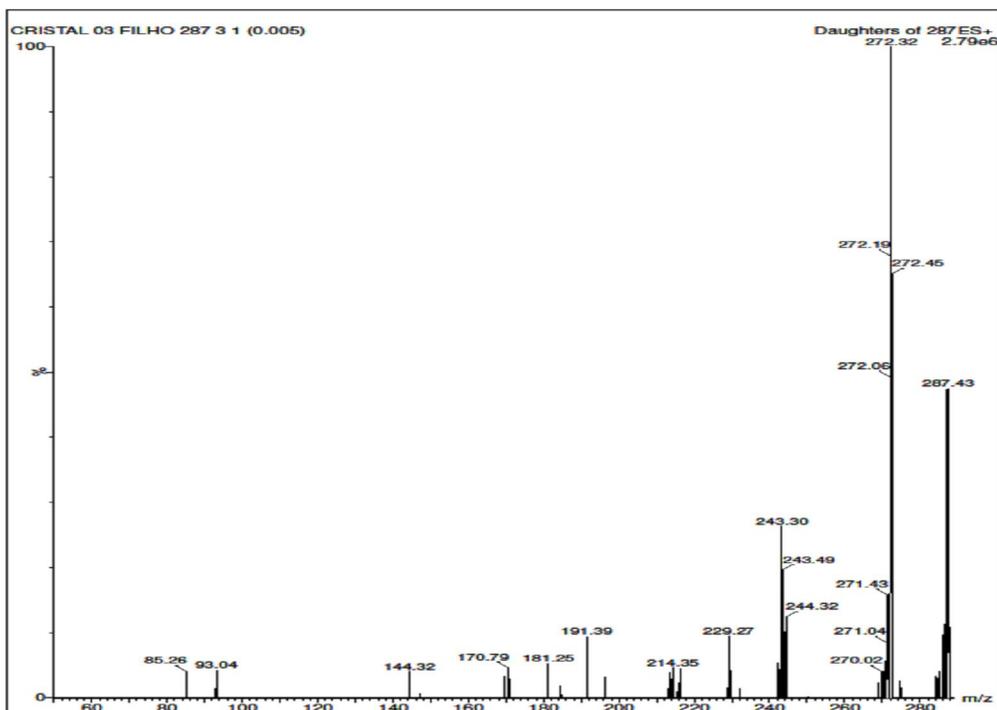


Figura 126- Espectro de massas dos íons filhos de m/z 287 de S-7.



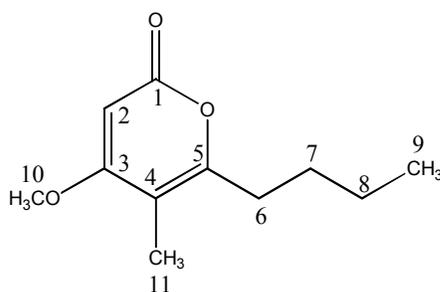
5.9.6 Lactonas

As lactonas são estéres cíclicos resultantes da condensação de um grupo funcional álcool e um grupo ácido carboxílico, sendo que as mais estáveis são lactonas de 5 membros (γ -lactonas) e lactonas de 6 membros (δ -lactonas) por causa da mínima tensão na estrutura dos compostos (SMITH, 2013). Elas são unidades estruturais presentes em um variado número de produtos naturais, sendo, conseqüentemente, importantes alvos sintéticos (LONGO JUNIOR *et al.*, 2008). As lactonas são substâncias derivadas das α -pironas (LI *et al.*, 2015). Das diversas lactonas provenientes de fontes naturais, foram isoladas do fungo endofítico *Exserohilum rostratum* 1.11 Er duas substâncias inéditas desta classe denominadas annularinas I e J. Estes novos produtos naturais foram nomeadas desta forma, em função de outras lactonas, estruturalmente semelhantes, terem sido isoladas do fungo aquático *Annulatascus triseptatus* (LI *et al.*, 2003).

5.9.6.1 Elucidação estrutural da annularina I (**S-8**)

A annularina I (**S-8**) (Figura 127) foi isolada do fungo *Exserohilum rostratum* 1.11 Er na forma de um sólido amorfo amarelado, solúvel em diclorometano.

Figura 127– Annularina I (**S-8**).



Na análise conjunta do espectro de RMN ^1H (Figura 131, p. 189) com o espectro de COSY (Figura 134, p. 192), observa-se que o sinal de hidrogênio em δ_{H} 0,90 (*t*, 3H, $J=6,9$ Hz, H-9), referente aos hidrogênios de metila terminal, se correlaciona com os sinais de hidrogênios metilênicos alquílicos centrados em δ_{H} 1,33 (*m*, 4H, H-8/H-7). Este sinal multiplete correlaciona-se com o sinal de hidrogênio em δ_{H} 2,30 (*t*, 3H, $J=6,9$ Hz, H-6) característico de hidrogênios metilênicos ligados diretamente ao carbono olefínico oxigenado. No espectro de RMN ^1H , há a presença também de dois sinais singletos em δ_{H} 5,44 (1H) e em δ_{H}

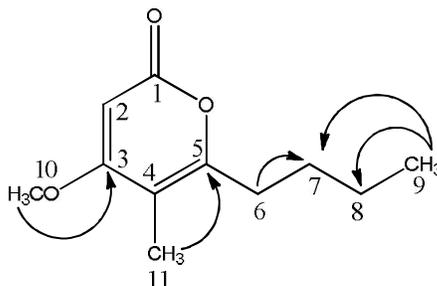
3,80 (3H, H-10) atribuídos respectivamente ao hidrogênio sp^2 (H-2) e aos hidrogênios do grupo metoxila. O padrão espectral apresentado no RMN ^1H é típico de substâncias da classe das lactonas trissubstituídas (LI *et al.*, 2003).

Na análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 132, p. 190) são observados sinais referentes a 11 átomos de carbonos, sendo o sinal de carbono em δ_c 164,8 característico de carbonila de grupo lactônico (LI *et al.*, 2003). Os sinais de carbono em δ_c 170,9 e δ_c 157,9 foram atribuídos aos carbonos olefínicos oxigenados em C-3 e C-5 respectivamente, enquanto que os sinais em δ_c 87,8 e δ_c 112,0 foram atribuídos aos carbonos olefínicos em C-2 e C-4 respectivamente. A análise conjunta do espectro de RMN ^{13}C com o espectro de DEPT (Figura 133, p. 191) permitiu atribuir a presença dos sinais em δ_c 56,0 referente ao carbono metoxílico; os sinais em δ_c 23,9; δ_c 31,4; δ_c 22,9 em ordem crescente atribuídos aos carbonos metilênicos e os sinais em δ_c 13,8 e δ_c 17,0 referentes aos carbonos metílicos.

A análise do espectro de HETCOR (Figura 135, p. 193) mostra sete correlações: sendo o sinal em δ_H 0,90 (H-9) com o sinal em δ_c 13,8 (C-9); os sinais dos hidrogênios metilênicos em δ_H 1,33 (H-8/H7) e em δ_H 2,30 (H-6) com os sinais em δ_c 22,6 (C-8), δ_c 31,4 (C-7) e δ_H 23,9 (C-6) respectivamente. O sinal de hidrogênios metílicos em δ_H 2,19 (H-11) correlaciona-se com o sinal em δ_c 17,1 (C-11) assim como se observa a correlação do hidrogênio do anel lactônico insaturado em δ_H 5,44 (H-2) com o sinal em δ_c 87,8 (C-2) e a correlação dos hidrogênios metoxílicos em δ_H 3,80 (H-10) com o sinal em δ_c 56,0 (C-10).

A análise conjunta do RMN ^{13}C com o espectro de HMBC (Figura 136, p. 194) permitiu determinar que os grupos metílico e metoxílico encontram-se ligados ao C-4 e ao C-3, respectivamente, pois o sinal dos hidrogênios metílicos em δ_H 2,19 (H-11) correlaciona-se com o sinal em δ_c 157,9 (C-5) a 3J e há a correlação entre o sinal dos hidrogênios metoxílicos (OMe-10) em δ_H 3,80 com o sinal em δ_c 170,9 (C-3) a 3J . No espectro de HMBC, são observadas ainda as correlações do sinal em δ_H 0,90 (H-9) com o sinal em δ_c 22,6 (C-8) a 2J e com o sinal em δ_c 31,4 (C-7) a 3J , confirmando a presença de um grupo alquílico ligado ao anel lactônico. Na Figura 128 (p. 187), seguem as correlações de HMBC da annularina I (**S-8**).

Figura 128 – Correlações de HMBC de **S-8**.



Os dados de RMN de **S-8** (Tabela 05, p. 202) foram comparados com os dados da literatura e mostraram que pertencem a classe dos policetídeos conhecida como annularinas (LI *et al.*, 2003), sendo que **S-8** difere da annularina D (Figura 129) por um carbono adicional na cadeia lateral. Esta diferença foi confirmada pelos dados de RMN uni e bidimensionais e ratificada pelos dados dos espectros de massas ESI (+) (Figuras 137-138, p. 195) que apresentou um pico pseudomolecular de m/z 197 $[M+H]^+$ condizente com a fórmula molecular $C_{11}H_{16}O_3$. A substância **S-8** trata-se de um produto natural inédito e foi denominada de annularina I. As propostas de fragmentação e de rota biossintética de **S-8** encontram-se nas figuras 130 (p. 188) e 143 (p. 200), respectivamente.

Figura 129 – Annularina D.

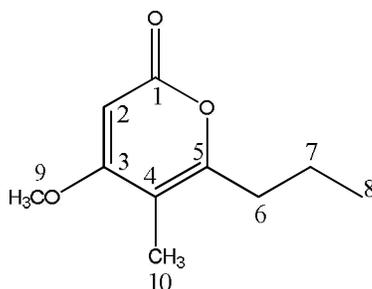


Figura 130- Proposta de fragmentação de S-8.

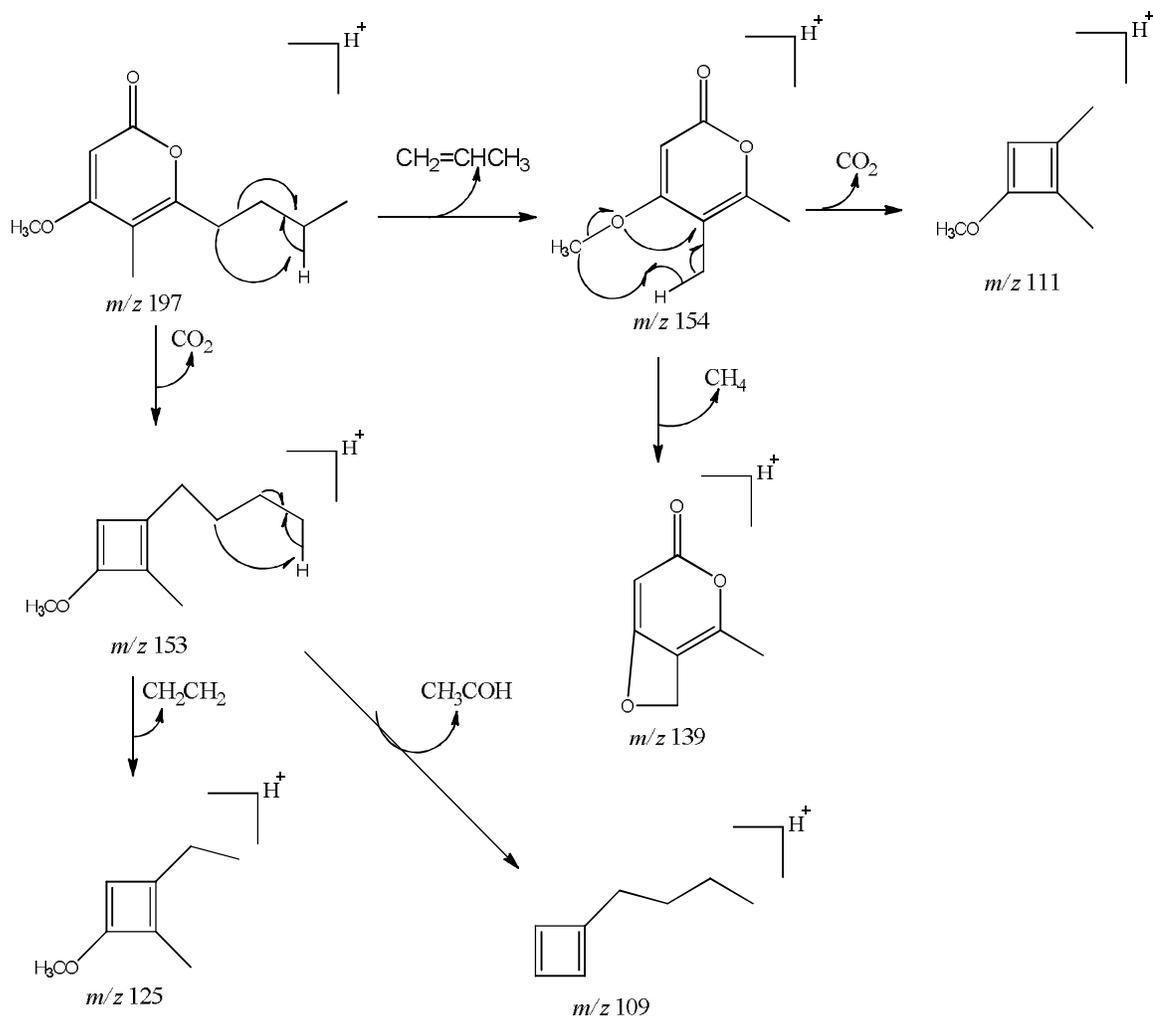


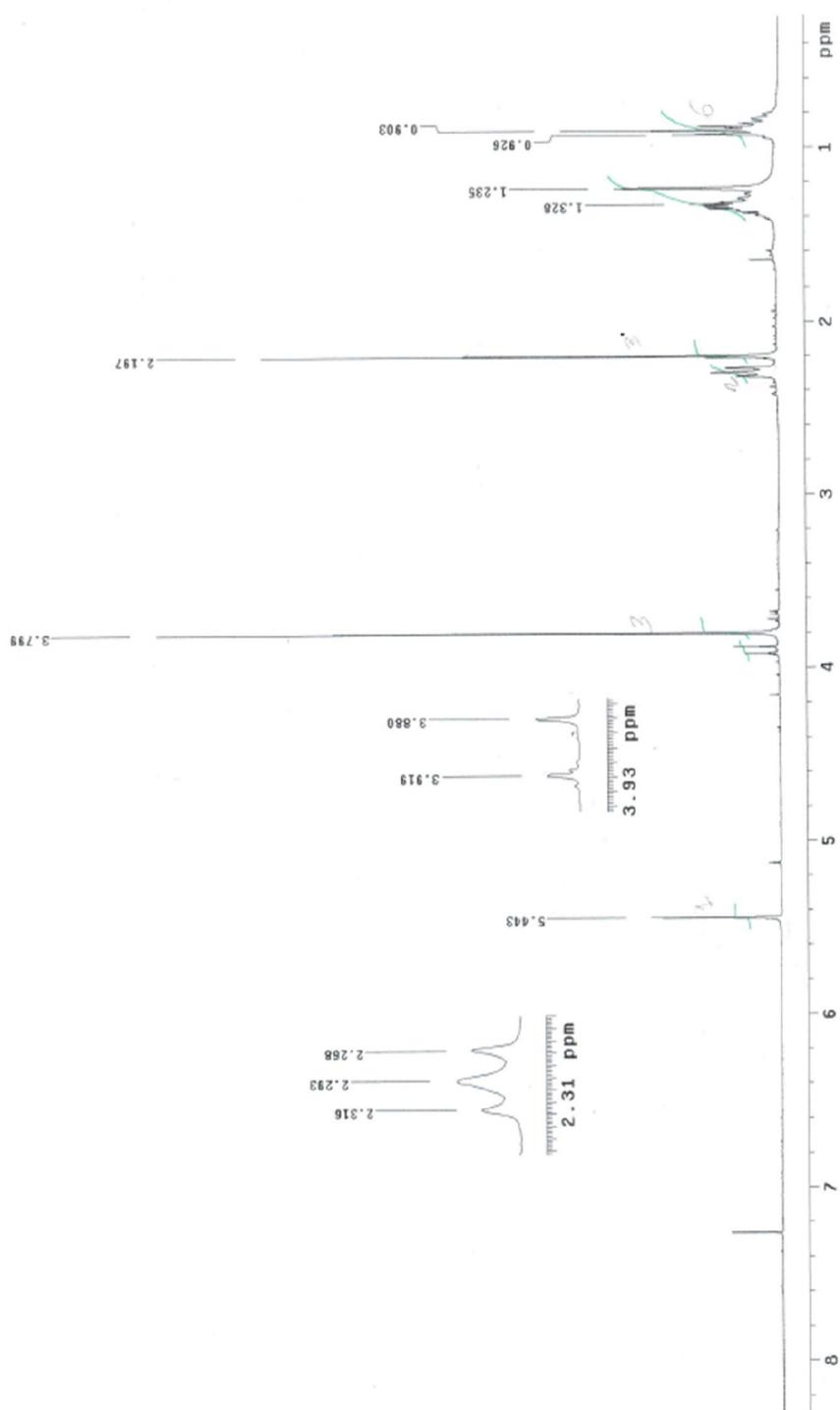
FIGURA 131 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **S-8**.

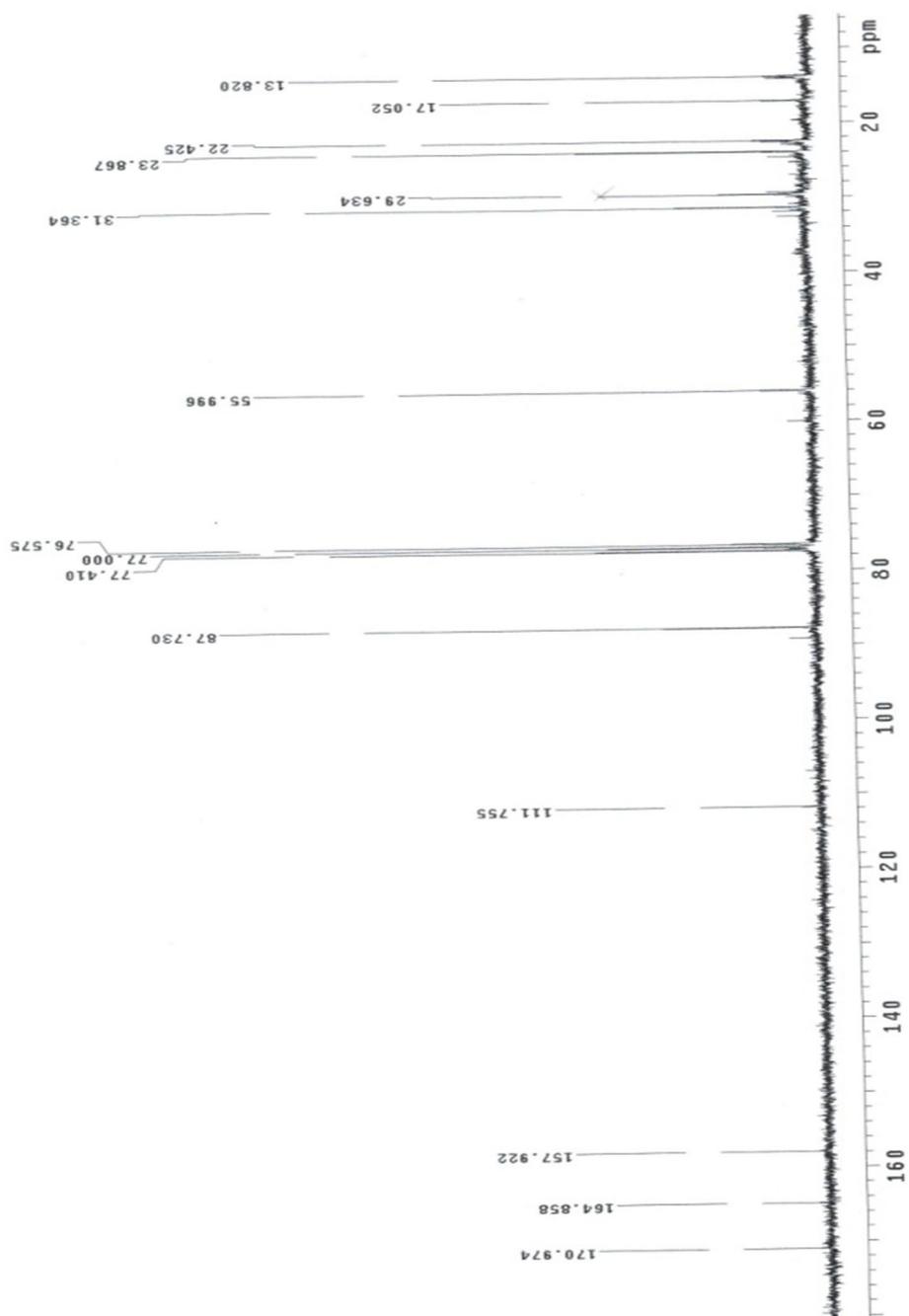
FIGURA 132 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **S-8**.

Figura 133- Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl_3) de **S-8**.

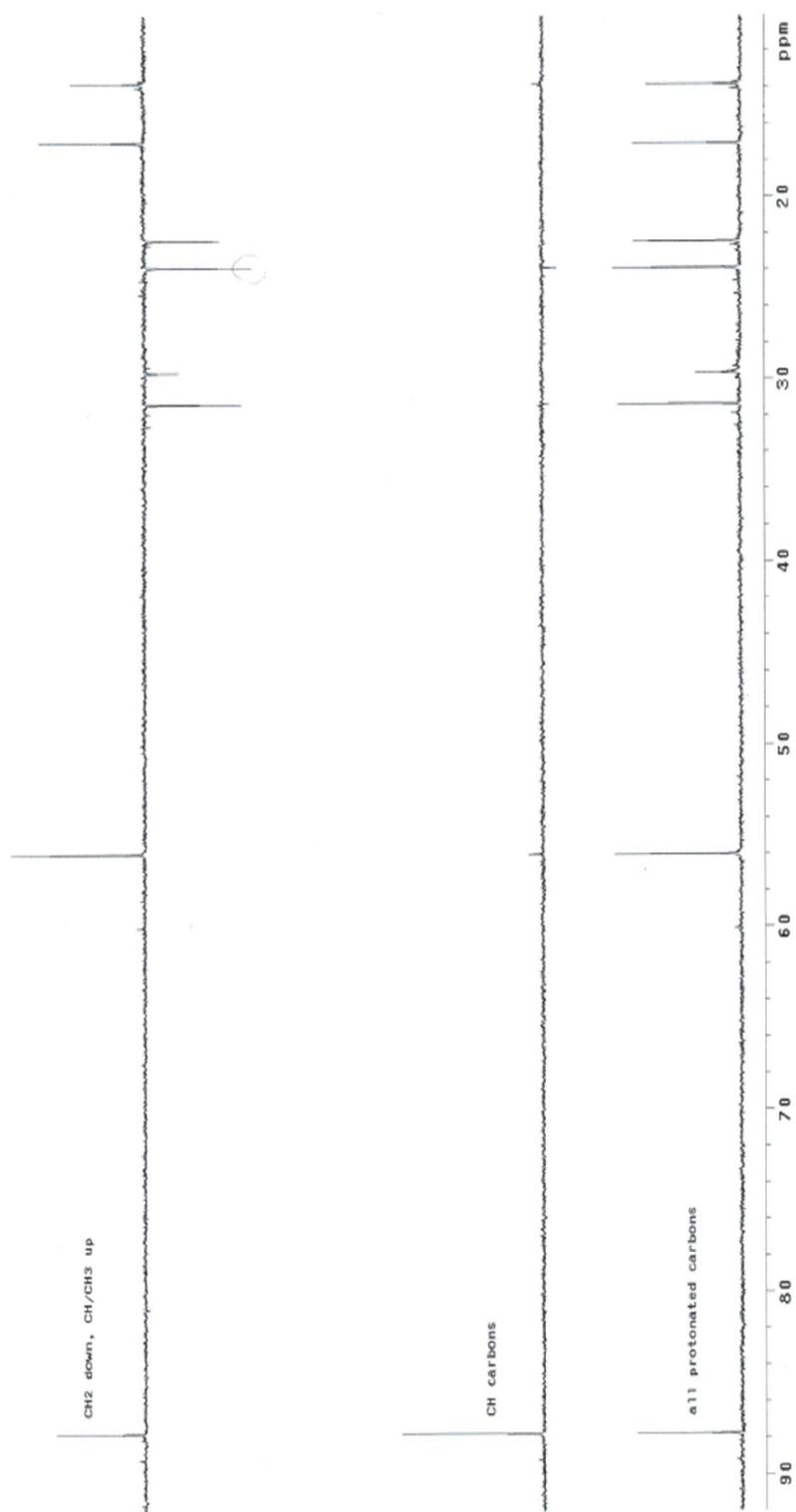


Figura 134- Espectro de COSY (300 MHz, CDCl_3) de **S-8**.

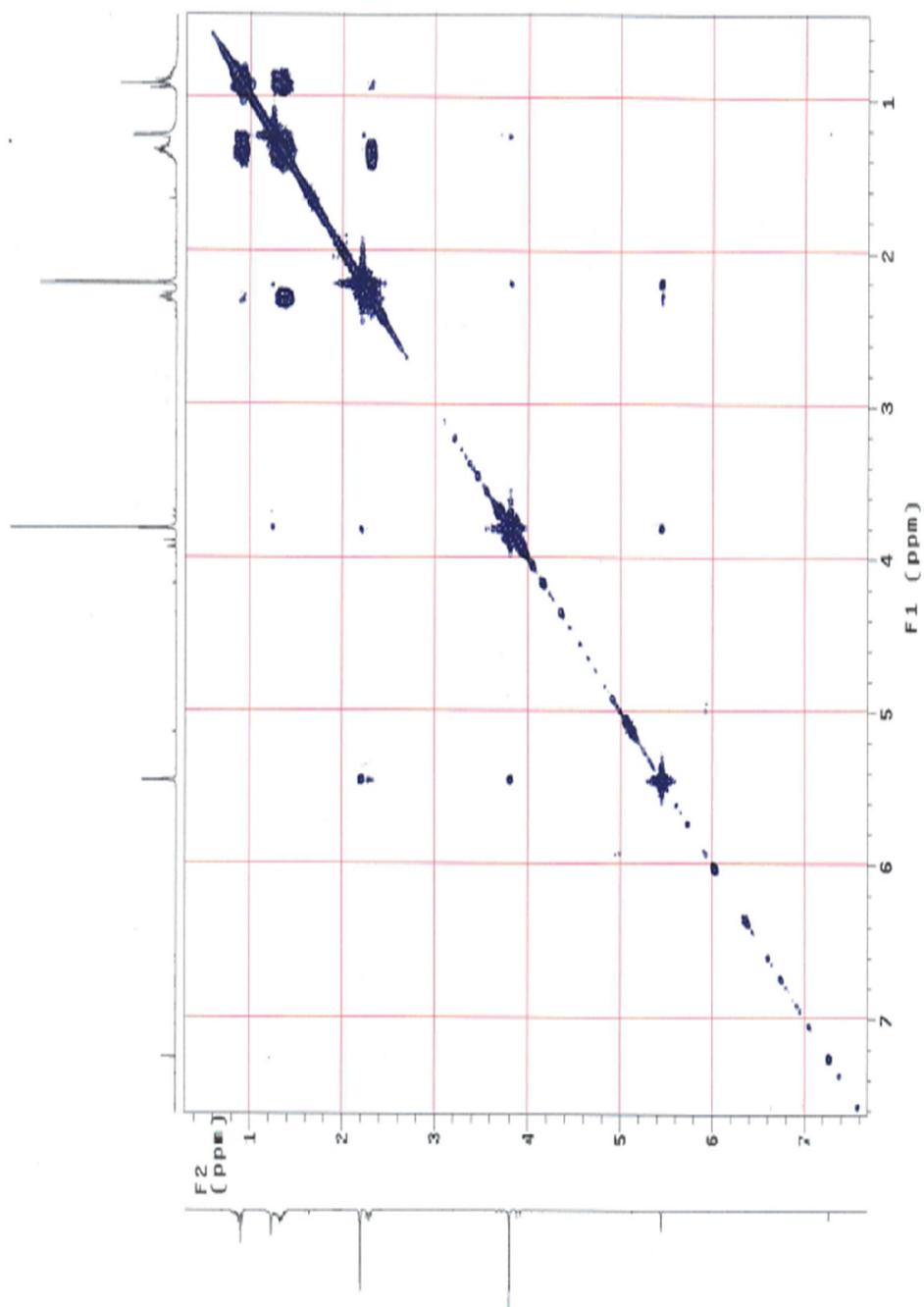


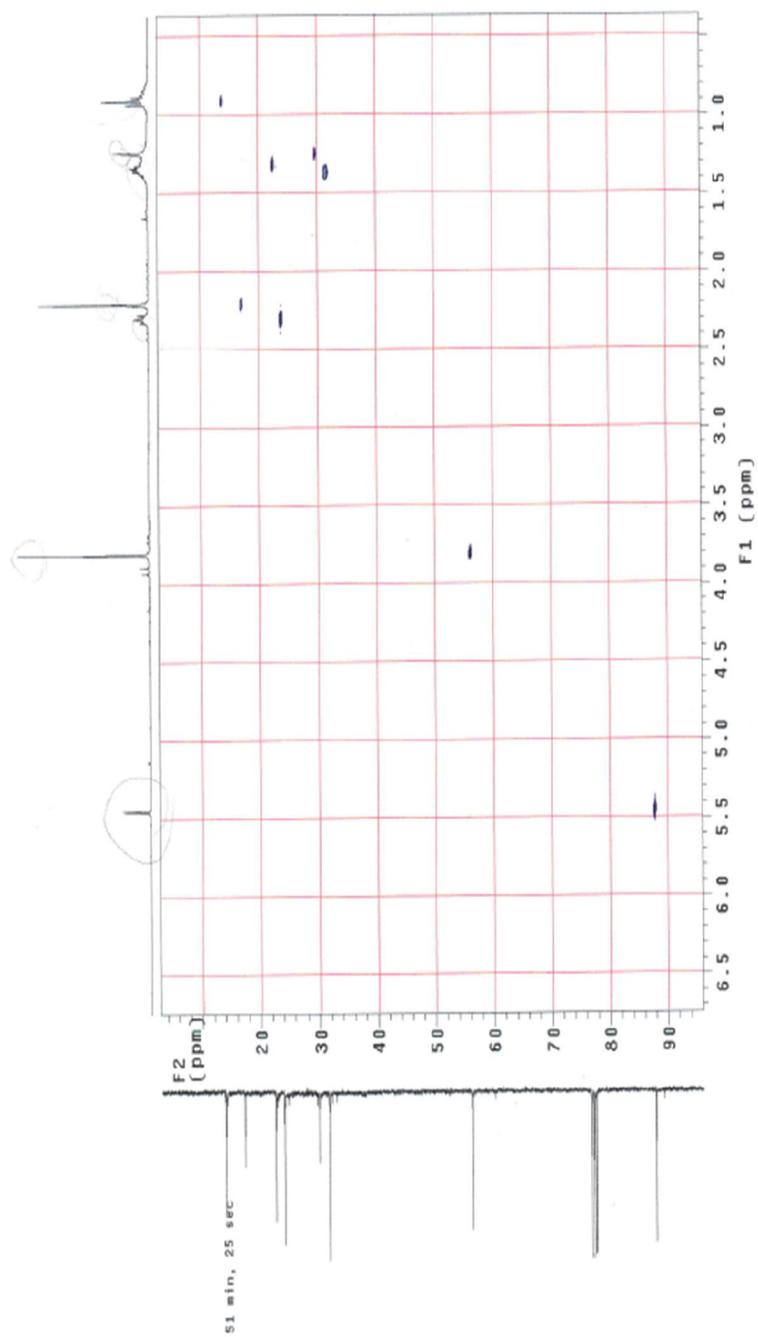
Figura 135- Espectro de HETCOR (75 MHz, CDCl_3) de **S-8**.

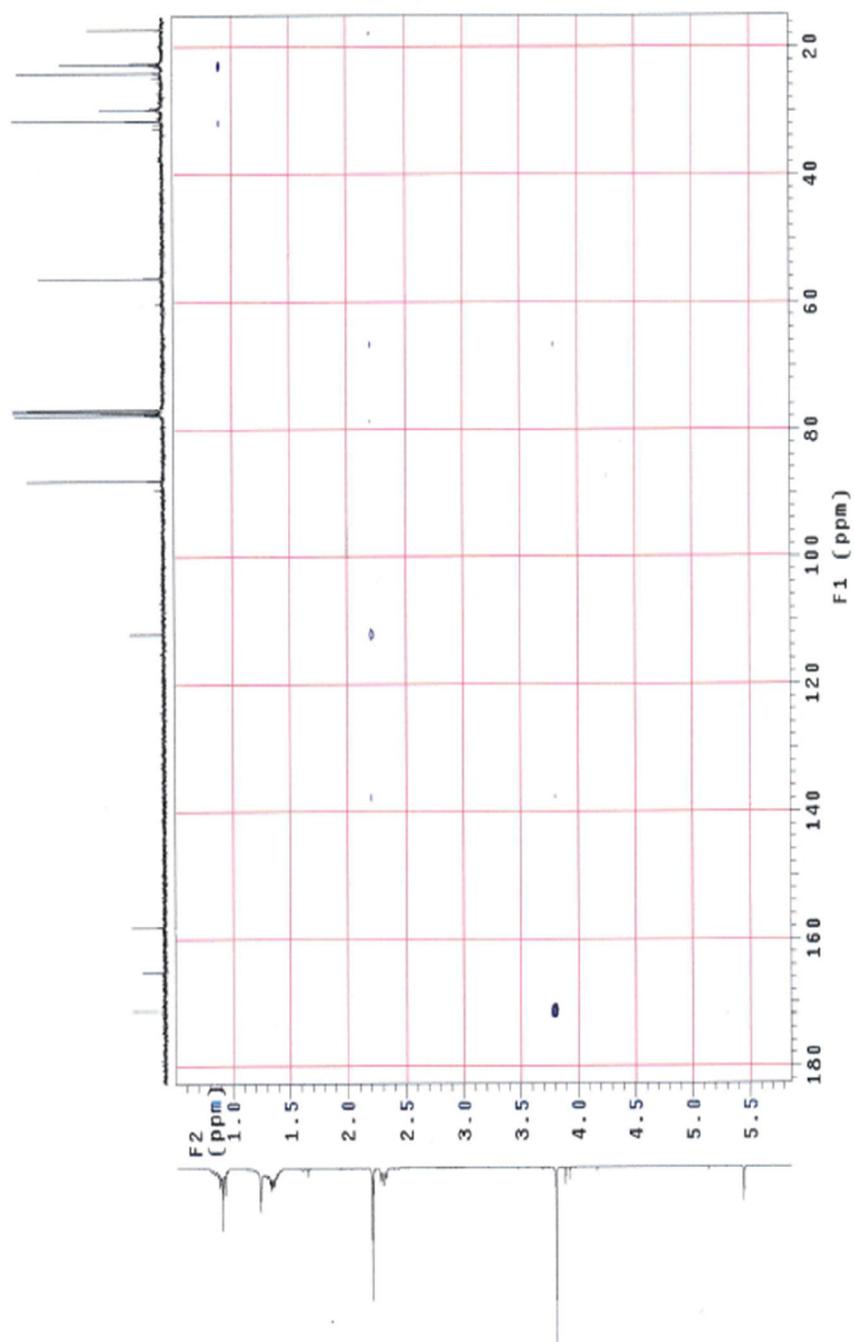
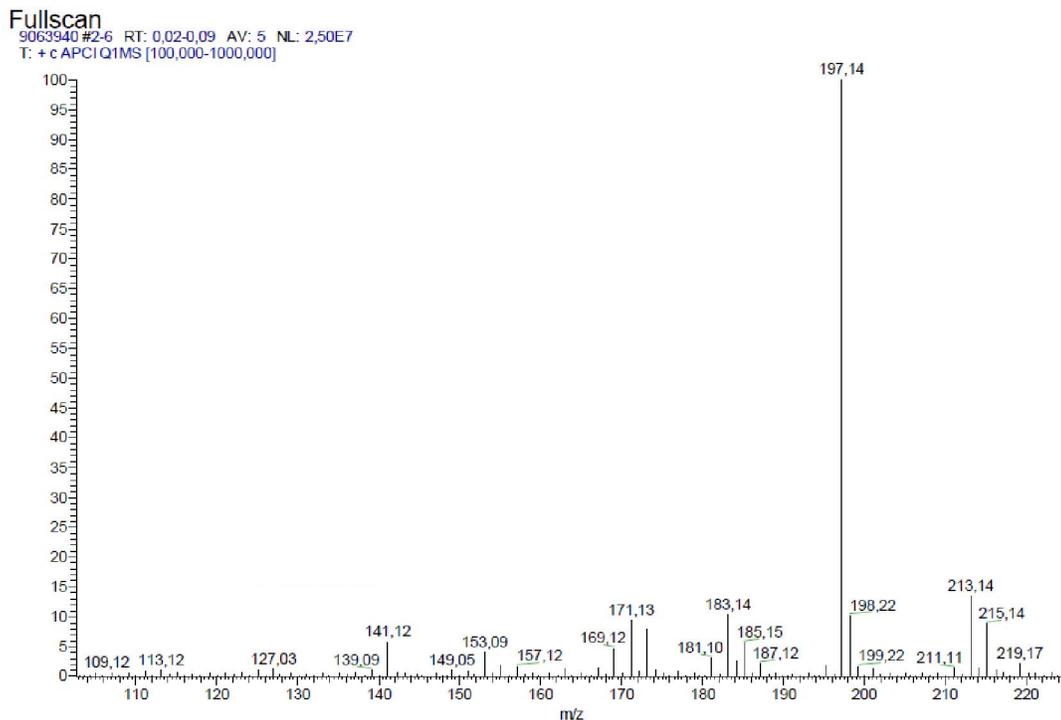
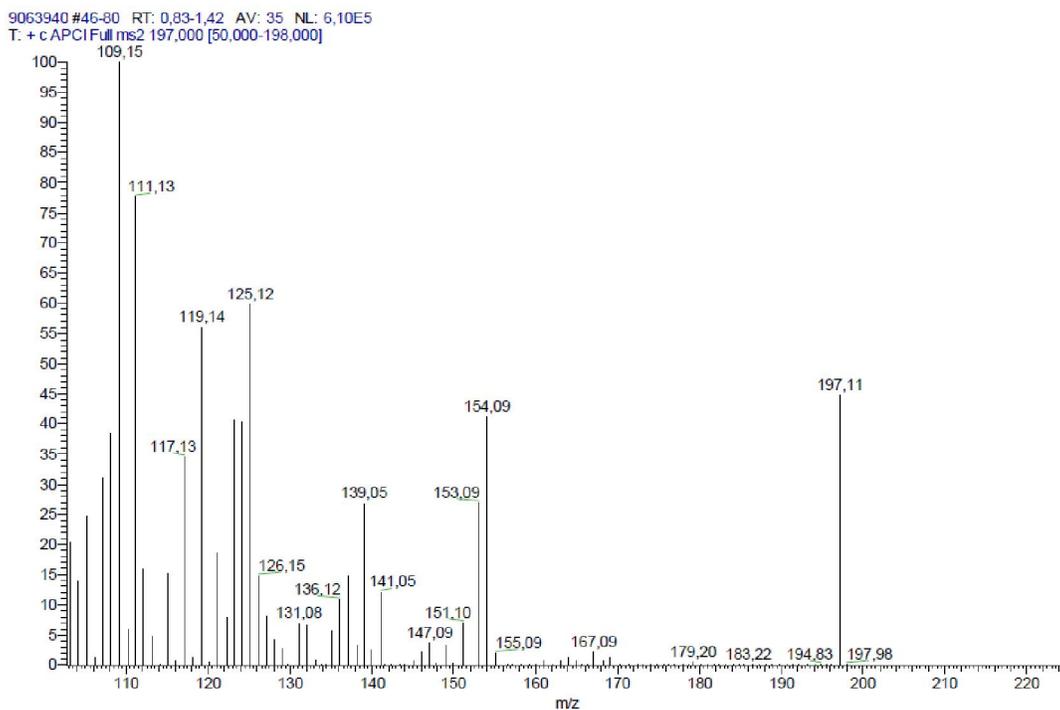
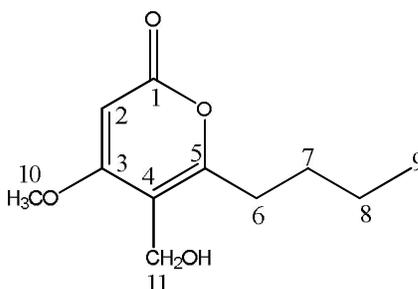
Figura 136- Espectro de HMBC (75 MHz, CDCl_3) de **S-8**.

Figura 137- Espectro de massas (full scan) ESI (+) de m/z 197 de **S-8**.**Figura 138-** Espectro de massas dos íons filhos de m/z 197 de **S-8**.

5.9.6.2 Elucidação estrutural da annularina J (**S-9**)

A annularina J (**S-9**) (Figura 139) foi isolada do fungo *Exserohilum rostratum* 1.11 Er na forma de um sólido amorfo esbranquiçado, solúvel em diclorometano.

Figura 139- Annularina J (**S-9**).



Os espectros de RMN ^1H (Figura 144, p. 200) e de RMN ^{13}C (Figura 145, p. 202) de **S-9** são muito semelhantes aos espectros de **S-8**, onde se nota a presença dos sinais tripletos em δ_{H} 0,91 ($J= 6,9$ Hz) atribuído aos hidrogênios H-9 das metilas terminais e δ_{H} 2,37 ($J= 6,9$ Hz) atribuído aos hidrogênios alílicos H-6. Semelhante ao espectro de RMN ^1H de **S-8**, observa-se ainda a presença de sinais multipletos centrados em δ_{H} 1,35 (2H, H-8) e δ_{H} 1,39 (2H, H-7) atribuídos aos hidrogênios metilênicos da cadeia lateral. No espectro de RMN ^1H , há ainda a presença de um sinal singlete em δ_{H} 3,83 (3H, H-10) relativo aos hidrogênios do grupo metoxila. O espectro de COSY (Figura 147, p. 204) confirma as correlações dos sinais dos hidrogênios H-9 com os sinais dos hidrogênios H-8 e H-7 e destes com o sinal de hidrogênios H-6.

No espectro de RMN ^1H de **S-9**, observa-se a ausência do sinal singlete em δ_{H} 2,19 (3H, H-11) atribuído ao grupo metílico sobre ligação dupla em **S-8** e o aparecimento do sinal singlete em δ_{H} 4,44 (2H) sugestivo de oxidação no C-11.

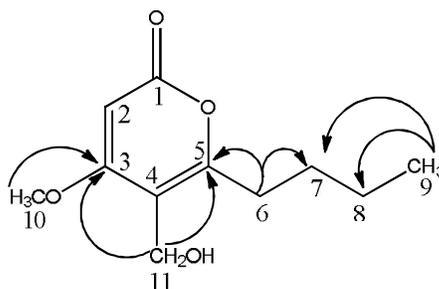
Na análise do espectro RMN ^{13}C de **S-9** são observados 11 sinais de carbono assim como no espectro de **S-8**, sendo o sinal de carbono em δ_{C} 164,1 característico de carbonila de grupo lactônico (LI *et al.*, 2003). Os sinais em δ_{C} 32,1; 23,3; δ_{C} 22,4 e δ_{C} 13,8 são atribuídos aos carbonos da cadeia alquílica e os sinais referentes em δ_{C} 89,3 e δ_{C} 113,1 são atribuídos aos carbonos alifáticos C-2 e C-4, respectivamente. Diferente do espectro de RMN ^{13}C de **S-8**, no espectro de carbono de **S-9** aparece dois sinais na região de carbono alifático oxigenado, sendo que o

sinal em δ_c 56,2 foi atribuído ao carbono do grupo metoxila e o sinal em δ_c 58,8, que de acordo com o espectro de DEPT (Figura 146, p. 203) é um CH_2 , foi atribuído ao carbono C-11, confirmando a oxidação do grupo metila presente em **S-8**.

O espectro de HETCOR (Figura 148, p. 205) mostra sete correlações, sendo o sinal em δ_H 0,91 (H-9) com o sinal em δ_c 13,8 (C-9); os sinais dos hidrogênios metilênicos em δ_H 1,35 (H-8), δ_H 1,39 (H-7) e em δ_H 2,37 (H-6) com os sinais em δ_c 22,4 (C-8), δ_c 32,1 (C-7) e δ_H 23,3 (C-6), respectivamente. Ainda há a correlação dos hidrogênios oximetilênicos em δ_H 4,44 (H-11) com o sinal em δ_c 58,8 (C-11), a correlação do sinal do hidrogênio do anel lactônico insaturado em δ_H 5,51 (H-2) com o sinal em δ_c 89,3 (C-2) e a correlação do sinal dos hidrogênios metoxílicos em δ_H 3,83 (H-10) com o sinal em δ_c 56,2 (C-10).

A análise conjunta do RMN ^{13}C com o espectro de HMBC (Figura 149, p. 206) permitiu determinar que o grupo metoxílico encontra-se ligado ao C-3, pois o sinal dos hidrogênios oximetilênicos em δ_H 4,44 (CH_2OH -11) correlaciona-se com os sinais em δ_c 170,7 (C-3) a 3J e em δ_c 157,5 (C-5) a 3J . São observadas ainda as correlações do sinal em δ_H 0,91 (H-9) com o sinal em δ_c 22,4 (C-8) a 2J e com o sinal em δ_c 32,1 (C-7) a 3J e há também o a correlação do sinal dos hidrogênios metilênicos em δ_H 2,37 (H-6) com o sinal em δ_c 32,1 (C-7) a 2J e com o sinal em δ_c 157,5 (C-5) a 2J , confirmando a presença de um grupo alquílico ligado ao anel lactônico. Por fim, nota-se ainda a correlação entre o sinal de hidrogênios em δ_H 4,44 (OCH_3 -10) com o sinal em δ_c 170,7 (C-3) a 3J . Na figura 140, seguem as correlações de HMBC de **S-9**.

Figura 140 – Correlações de HMBC de **S-9**.



Os dados de RMN de **S-9** foram comparados com os dados da literatura (Tabela 06) e mostraram que pertencem a classe dos policetídeos conhecida como annularinas (Li *et al.*, 2003), sendo que **S-9** difere da annularina B (Figura 141) por um carbono adicional na sua cadeia lateral. Esta diferença foi confirmada pelos dados de RMN uni e bidimensionais e ratificada pelos dados dos espectros de massas ESI (+) (Figuras 150-151, p. 207) onde o pico pseudomolecular de m/z 213 $[M+H]^+$ é condizente com a fórmula molecular $C_{11}H_{16}O_4$. A substância **S-9** trata-se de um produto natural inédito e foi denominado de annularina J.

Figura 141- Annularina B.

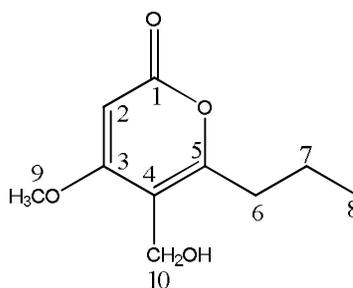


Tabela 06: Atribuição dos dados de RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) e RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) de **S-8** e **S-9**.

Posições	S-8	S-9	S-8	S-9
	H (δ , mult., J em Hz)	H (δ , mult., J em Hz)	C	C
1			164,8	164,1
2	5,44(s)	5,51(s)	87,8	89,3
3			170,7	170,7
4			111,7	113,1
5			157,9	157,5
6	2,30 (t, 6,9)	2,37 (t, 6,9)	23,9	23,3
7	1,35 (m)	1,39 (m)	31,4	32,1
8	1,30 (m)	1,35 (m)	22,6	22,4
9	0,90 (t, 6,9)	0,91 (t, 6,9)	13,8	13,8
10	3,80 (s)	3,83 (s)	56,0	56,2
11	2,19 (s)	4,44 (s)	17,1	58,8

Nas Figuras 142 e 143 (p. 200), seguem as propostas de fragmentação e de rota biossintética da annularina J (**S-9**) respectivamente.

Figura 142- Proposta de fragmentação de **S-9**.

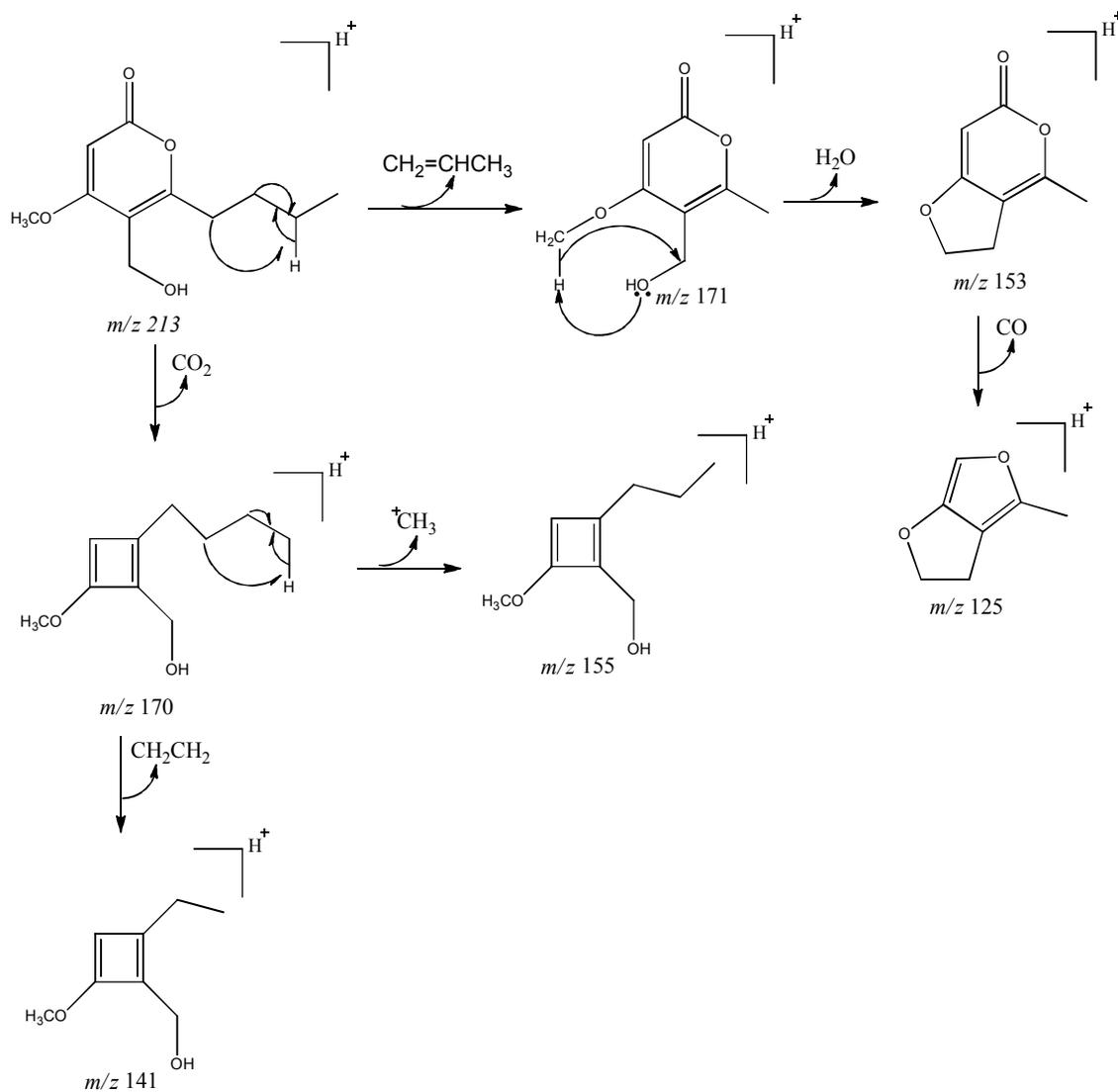


Figura 143- Proposta de rota biossintética de **S-8** e **S-9**.

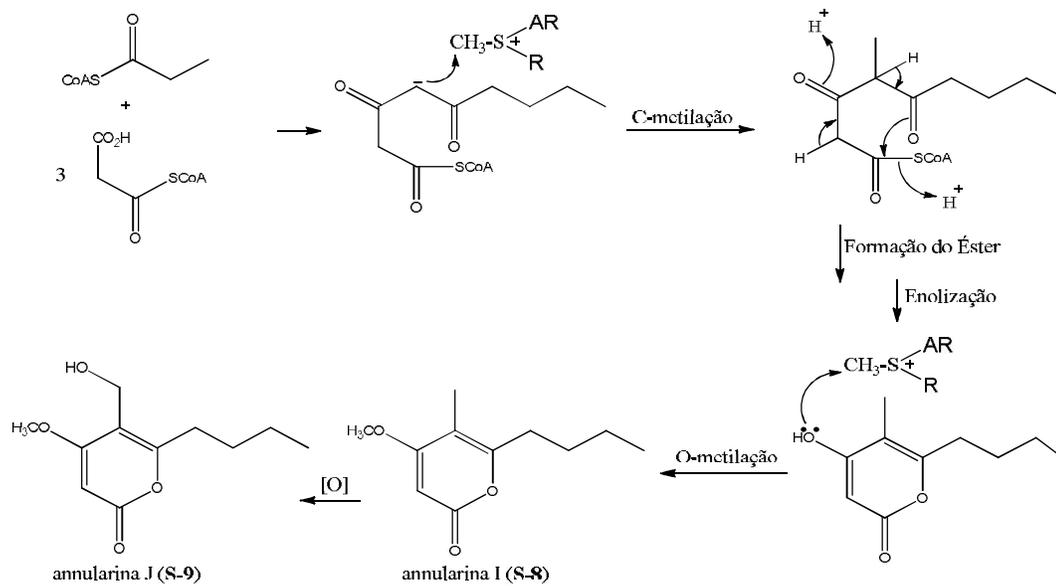


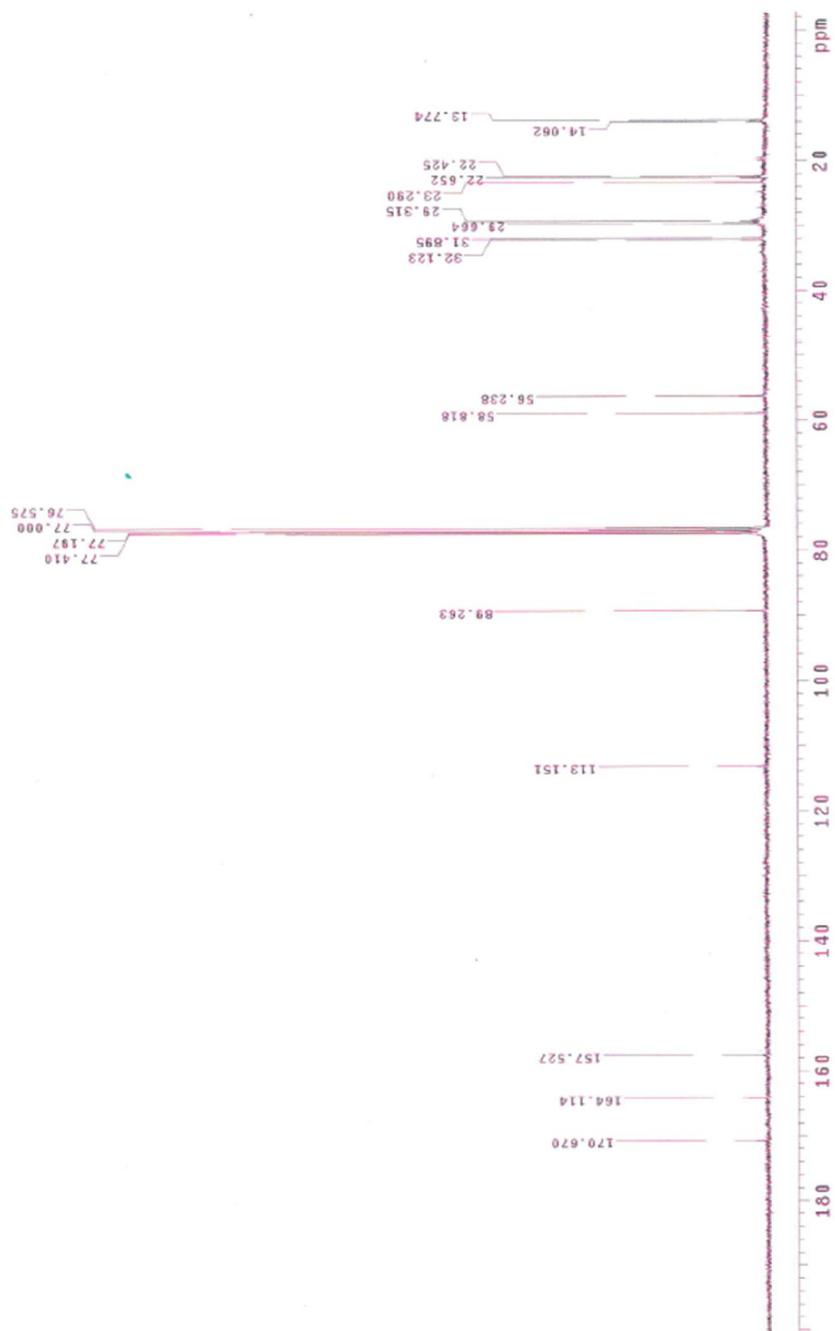
FIGURA 145 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **S-9**.

Figura 146- Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl_3) de **S-9**.

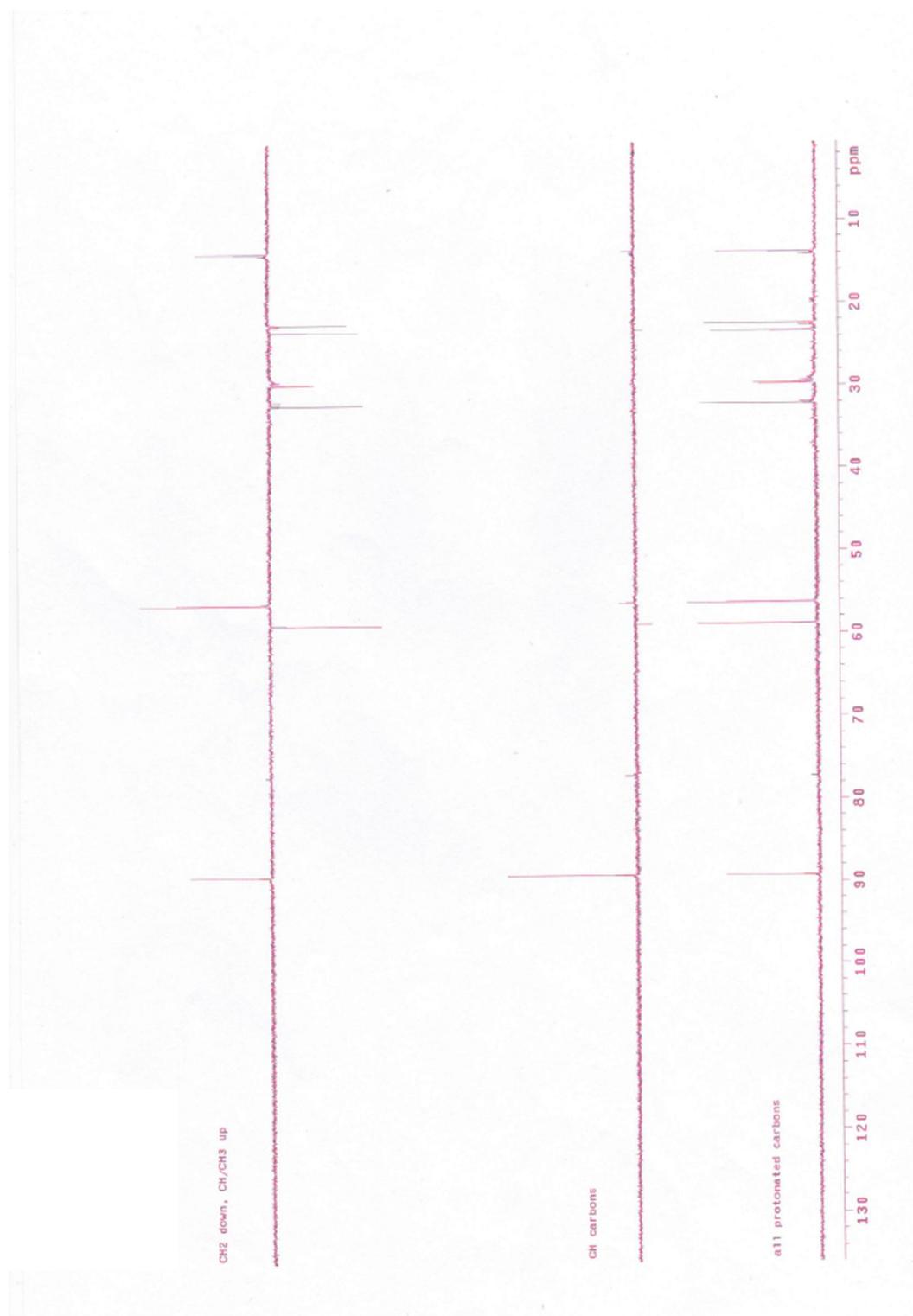


Figura 147- Espectro de COSY (300 MHz, CDCl_3) de **S-9**.

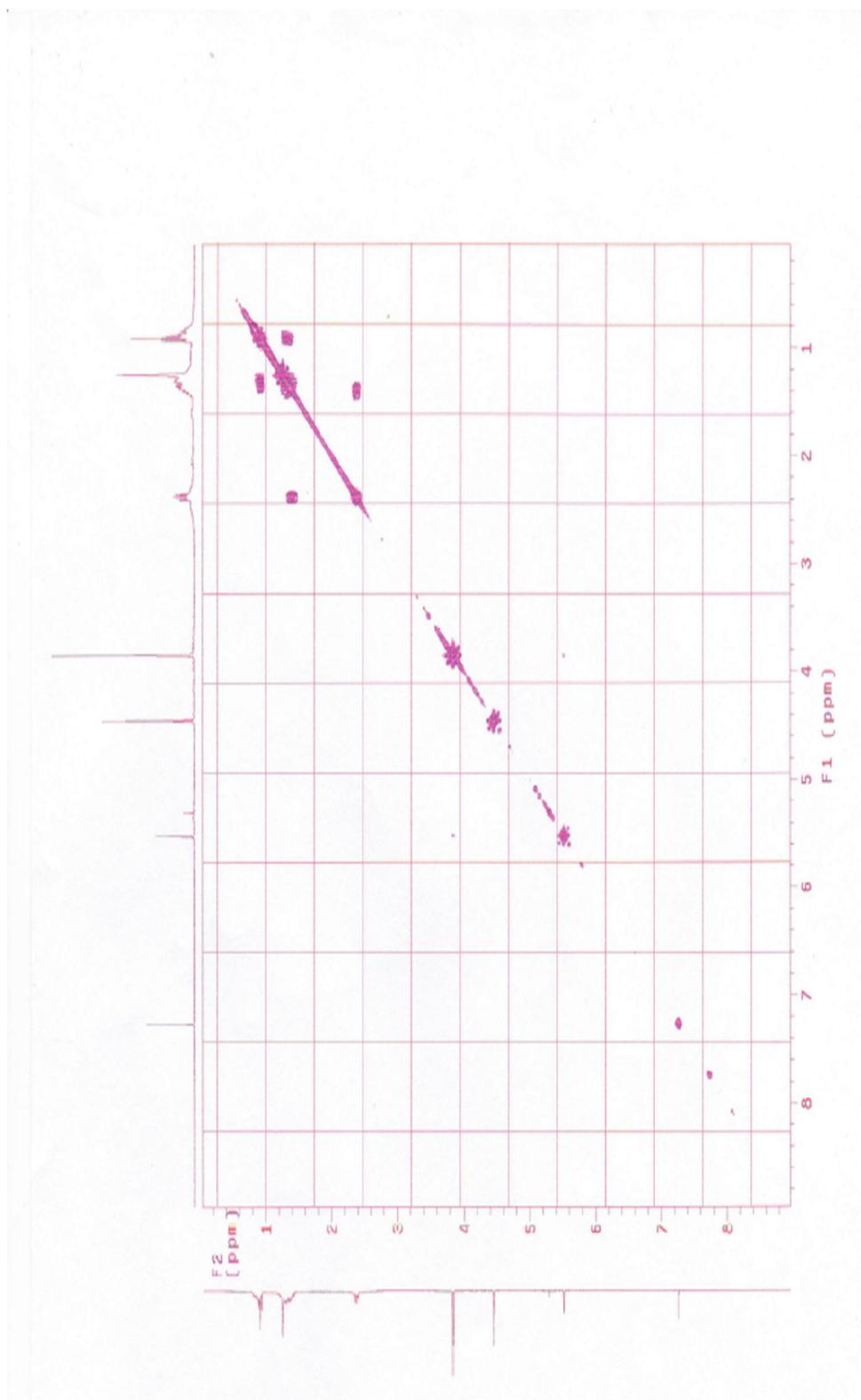


Figura 148- Espectro de HETCOR (75 MHz, CDCl_3) de S-9.

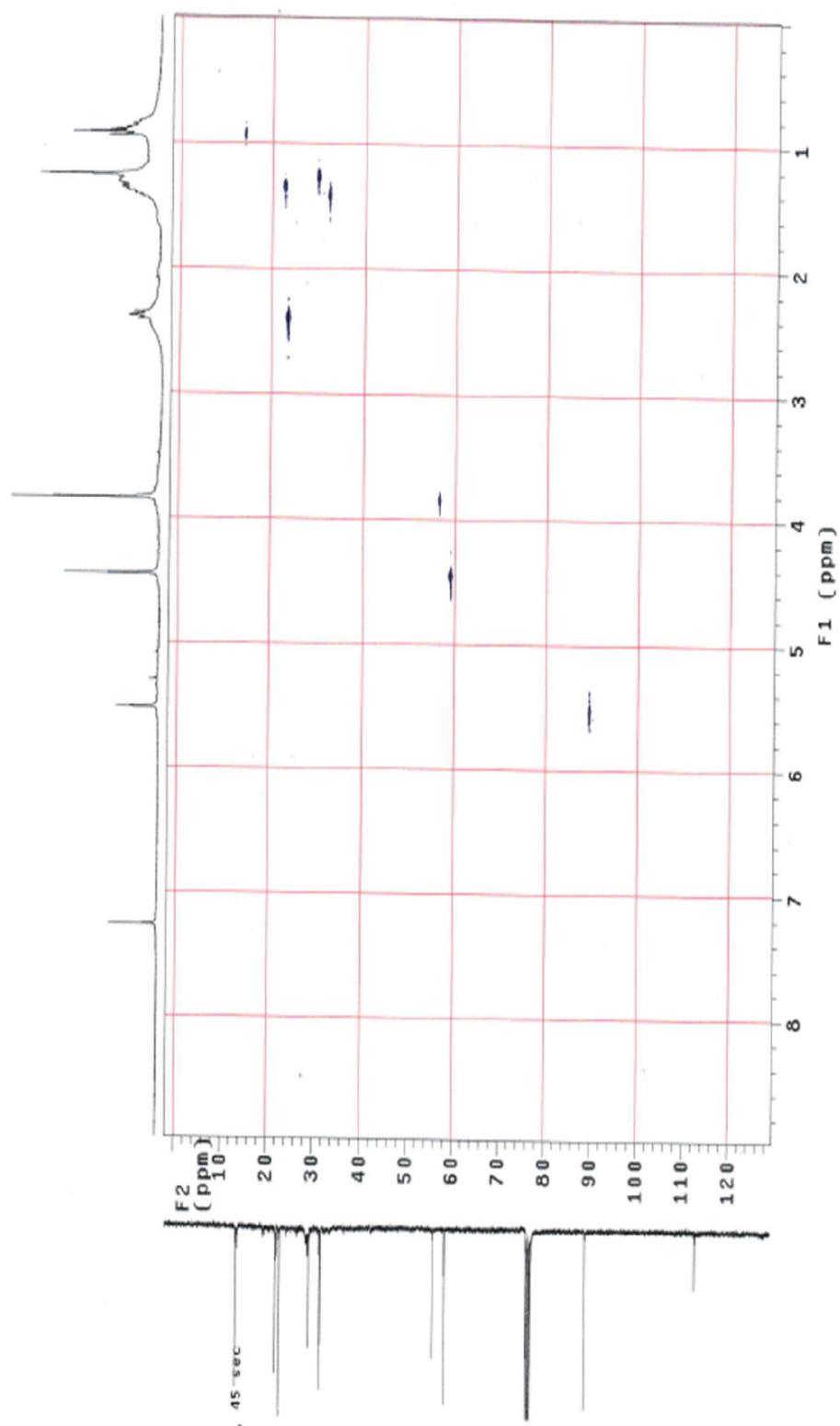


Figura 149- Espectro de HMBC (75 MHz, CDCl_3) de **S-9**.

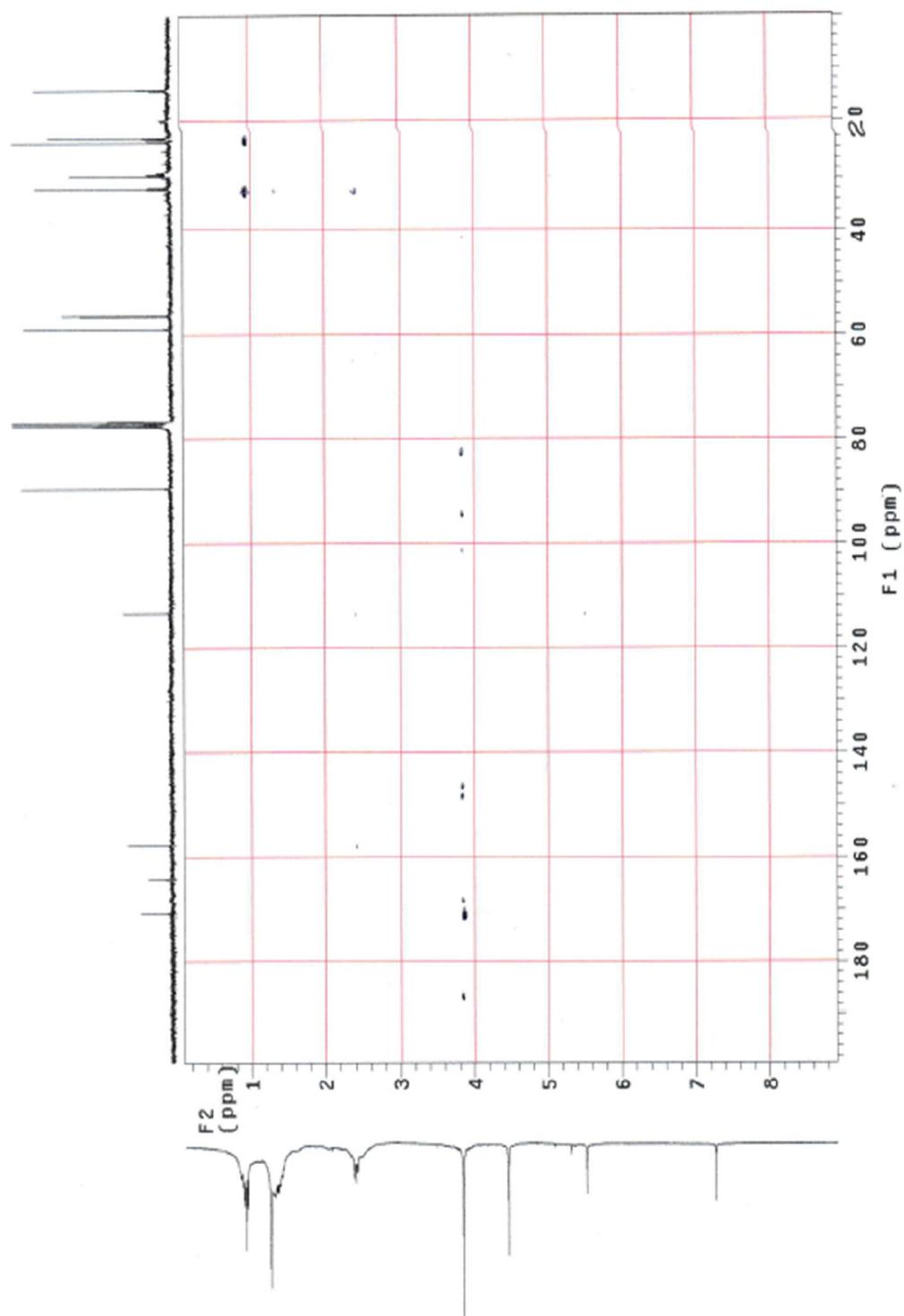
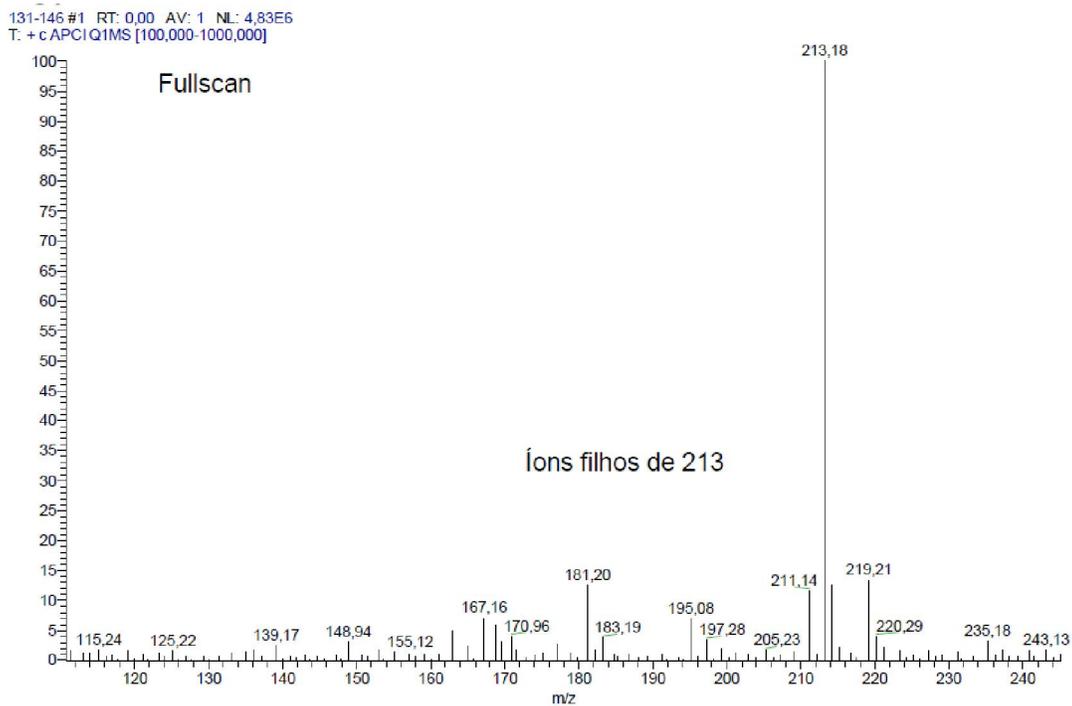
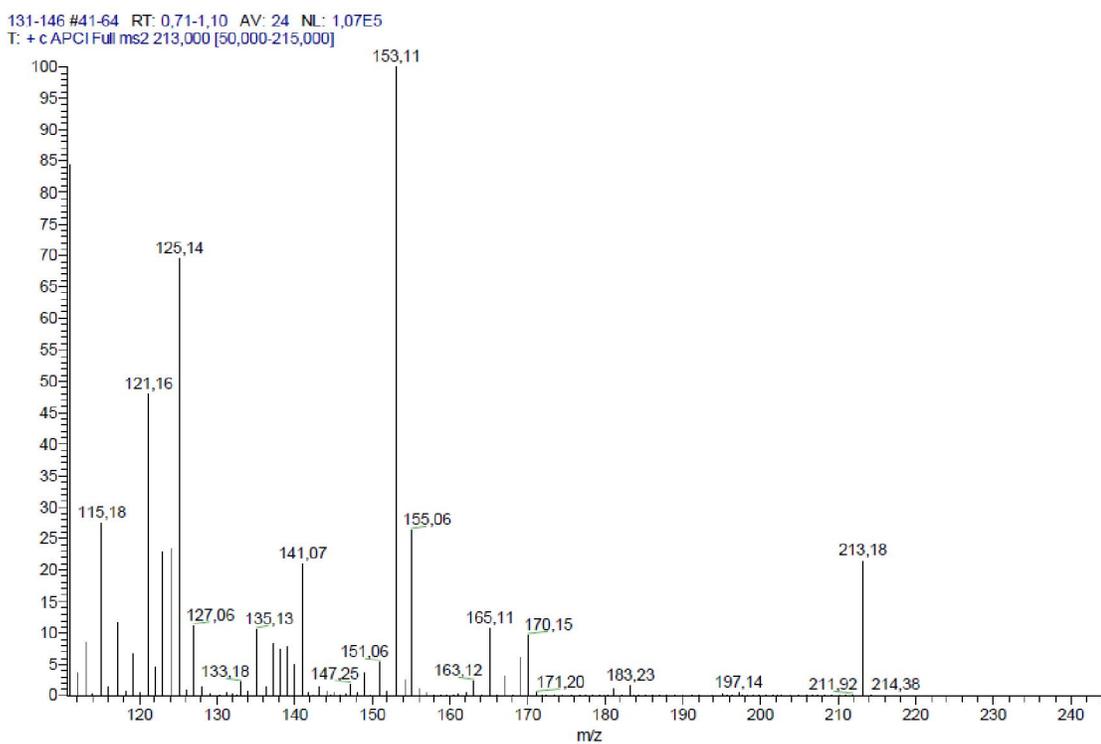
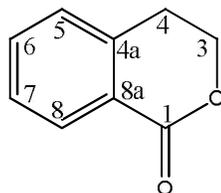


Figura 150- Espectro de massas (full scan) ESI (+) de **S-9**.**Figura 151-** Espectro de massas dos íons filhos de m/z 213 de **S-9**.

5.9.7 Isocumarina

As isocumarinas compreendem uma classe de compostos que são, em geral, biologicamente ativas de ocorrência limitada em bactérias, fungos e líquens (OLIVEIRA, 2011). A estrutura básica de uma isocumarina (Figura 152) é um anel lactônico ligado ao anel aromático, como mostrado abaixo:

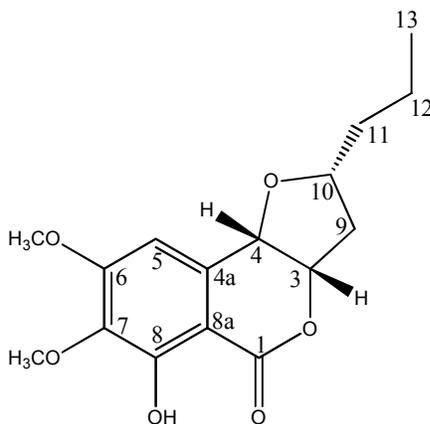
Figura 152- Esqueleto básico das isocumarinas.



5.9.7.1 Elucidação estrutural da monocerina (**S-10**)

A monocerina (**S-10**) (Figura 153) foi isolada como um óleo avermelhado do fungo endofítico *Exserohilum rostratum* 1.11 Er, solúvel em diclorometano.

Figura 153- Monocerina (**S-10**).

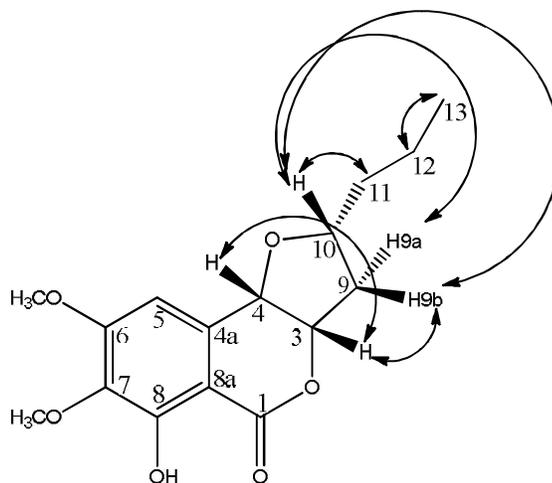


No espectro de RMN ^1H (Figura 157, p. 214), observa-se um sinal singlete em δ_{H} 11,27 (s, 1H, OH-8) referente ao hidrogênio de hidroxila quelada à carbonila, tipicamente da classe das isocumarinas (NUNES, 2008). No espectro de RMN ^1H , há ainda um sinal singlete em δ_{H} 6,59 (s, 1H, H-5) atribuído ao hidrogênio do anel aromático, um sinal duplo duplo duplete em δ_{H} 5,04 (*ddd*, 1H, $J = 4,2\text{Hz}$; 3,0 Hz e 1,2 Hz; H-3), um sinal duplete em δ_{H} 4,53 (*d*, 1H, $J = 3,0\text{ Hz}$, H-4), dois singletos em δ_{H}

3,94 (s, 3H, OCH₃-6) e δ_{H} 3,88 (s, 3H, $J = 6,6$ Hz, OCH₃-7) referentes aos átomos de hidrogênios de duas metoxilas aromáticas. O padrão espectral destes sinais de hidrogênios é típico de isocumarinas trissubstituídas no anel aromático (SAPPAPAN *et al.*, 2008).

Na análise conjunta do RMN ¹H com o espectro de COSY (Figura 160, p. 217) de **S-10**, foram observadas as correlações do sinal de hidrogênio metínico em δ_{H} 5,04 (H-3) com o sinal do hidrogênio metínico em δ_{H} 4,53 (H-4) e com o sinal do hidrogênio diastereotópico em δ_{H} 2,14 (H-9a) e as correlações do sinal de hidrogênio metínico em δ_{H} 4,12 (*m*, 1H, H-10) com os sinais dos hidrogênios diastereotópicos em δ_{H} 2,58 (H-9b) e em δ_{H} 2,14 (H-9a) e com o sinal de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 1,62 (*m*, 2H, H-11). Observam-se também as correlações dos sinais de hidrogênios diastereotópicos em δ_{H} 2,14 (H-9a) e δ_{H} 2,58 (H-9b) entre si, assim como a correlação do sinal de hidrogênio metilênico em δ_{H} 1,39 (*m*, 2H, H-12) com o sinal em δ_{H} 0,91 (s) referente aos hidrogênios da metila terminal. Essas correlações relatam a presença de um anel furânico com uma cadeia alquílica ligado ao anel lactônico de isocumarinas (SAPPAPAN *et al.*, 2008). As principais correlações de COSY de **S-10** estão na Figura 154.

Figura 154- Correlações de COSY de **S-10**.



Na análise do espectro de RMN ¹³C (Figura 158, p. 215) são observados sinais referentes a 16 carbonos, sendo o sinal de carbono em δ_{C} 167,8 característico de carbonila de grupo lactônico (ZHANG *et al.*, 2008). A análise conjunta do

espectro de RMN ^{13}C com o espectro de DEPT (Figura 159, p. 216) de **S-10** confirma a presença dos sinais metoxílicos aromáticos em δ_{C} 56,2 (OCH₃-6) e δ_{C} 60,7 (OCH₃-7); dos sinais carbonos metilênicos alquílicos em δ_{C} 19,0 (C-12) e δ_{C} 38,0 (C-11) e do sinal de carbono metilênico diastereotópico em δ_{C} 39,0 (C-9); dos sinais de carbonos metínicos em δ_{C} 74,4 (C-4); δ_{C} 78,7 (C-10) e δ_{C} 81,2 (C-3) e do sinal de carbono metínico aromático em δ_{C} 104,3 (C-5).

O espectro de HETCOR (Figura 161, p. 218) mostra nove correlações: a correlação do sinal em δ_{H} 0,91 (H-9) com o sinal em δ_{C} 13,9 (C-9); as correlações dos sinais diastereotópicos em δ_{H} 2,14 (H-9a) e δ_{H} 2,58 (H-9b) com o sinal de carbono em δ_{C} 39,0 (C-9). Há ainda as correlações dos sinais de hidrogênios metoxílicos aromáticos em δ_{H} 3,88 (OCH₃-6) e δ_{H} 3,94 (OCH₃-7) respectivamente com os sinais de carbonos metoxílicos aromáticos em δ_{C} 56,2 (OCH₃-6) e δ_{C} 60,7 (OCH₃-7) e a correlação do sinal de hidrogênio metilênico alquílico em δ_{H} 4,53 (H-11) com o sinal em δ_{C} 74,4 (C-11), além da correlação do sinal de hidrogênio metínico em δ_{H} 4,12 (H-10) com o sinal em δ_{C} 78,7 (C-10). Por fim, nota-se também que os sinais de hidrogênios metínicos em δ_{H} 5,04 (H-3) e δ_{H} 6,59 (H-5) correlacionam-se com os sinais de carbonos metínicos em δ_{C} 81,1 (C-3) e δ_{C} 104,3 (C-5).

No espectro de HMBC (Figura 162, p. 219) são observadas as seguintes correlações, o sinal dos hidrogênios metílicos em δ_{H} 0,91 (H-13) com o sinal de carbono metilênico alquílico em δ_{C} 19,0 (C-12) a 2J e com o sinal de carbono metilênico alquílico em δ_{C} 38,0 (C-11) a 3J , assim como a correlação do sinal do hidrogênio metínico aromático em δ_{H} 6,59 (H-5) com o sinal de carbono metínico em δ_{C} 74,4 (C-4) a 3J , com o sinal de carbono aromático em δ_{C} 102,0 (C-8a) a 3J e com o sinal de carbono aromático em δ_{C} 137,3 (C-7) a 2J e por fim o sinal do hidrogênio da hidroxila (OH-8) em δ_{H} 11,27 com os sinais de carbonos aromáticos em δ_{C} 137,3 (C-7) a 3J , δ_{C} 102,0 (C-8a) a 3J e δ_{C} 156,2 (C-8) a 2J . As principais correlações de HMBC de **S-10** encontram-se na Figura 155 (p. 211).

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-10** foram comparados com os dados da literatura (Tabela 07, p. 213) (ZHANG *et al.*, 2008) que em conjunto com a interpretação dos espectros de DEPT, RMN 2D e do espectro de massa ESI (+) (Figuras 163-164, p. 219) que apresentou o pico do íon pseudomolecular em m/z

309 $[M+H]^+$ condizente a fórmula molecular $C_{16}H_{20}O_6$, permitiu chegar a conclusão que **S-10** tratava-se da isocumarina monocerina. A monocerina (**S-10**) apresentou um valor de $[\alpha]_D^{25} = +53^\circ$ condizente com a literatura (FANG *et al.*, 2013) e esta substância já foi isolada anteriormente de diversas espécies fúngicas, dentre elas o fungo *Exserohilum turcicum* (AXFORD *et al.*, 2004).

A proposta de fragmentação dos íons filhos de **S-10** está descrita na Figura 156 (p. 212).

Figura 155- Correlações de HMBC de **S-10**.

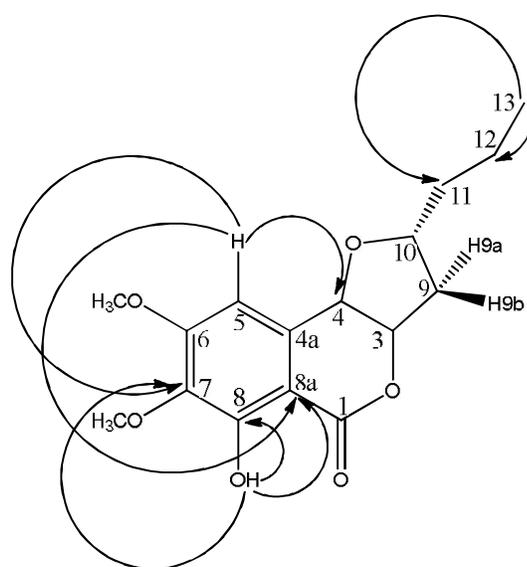


Figura 156- Proposta de fragmentação dos íons filhos de **S-10**.

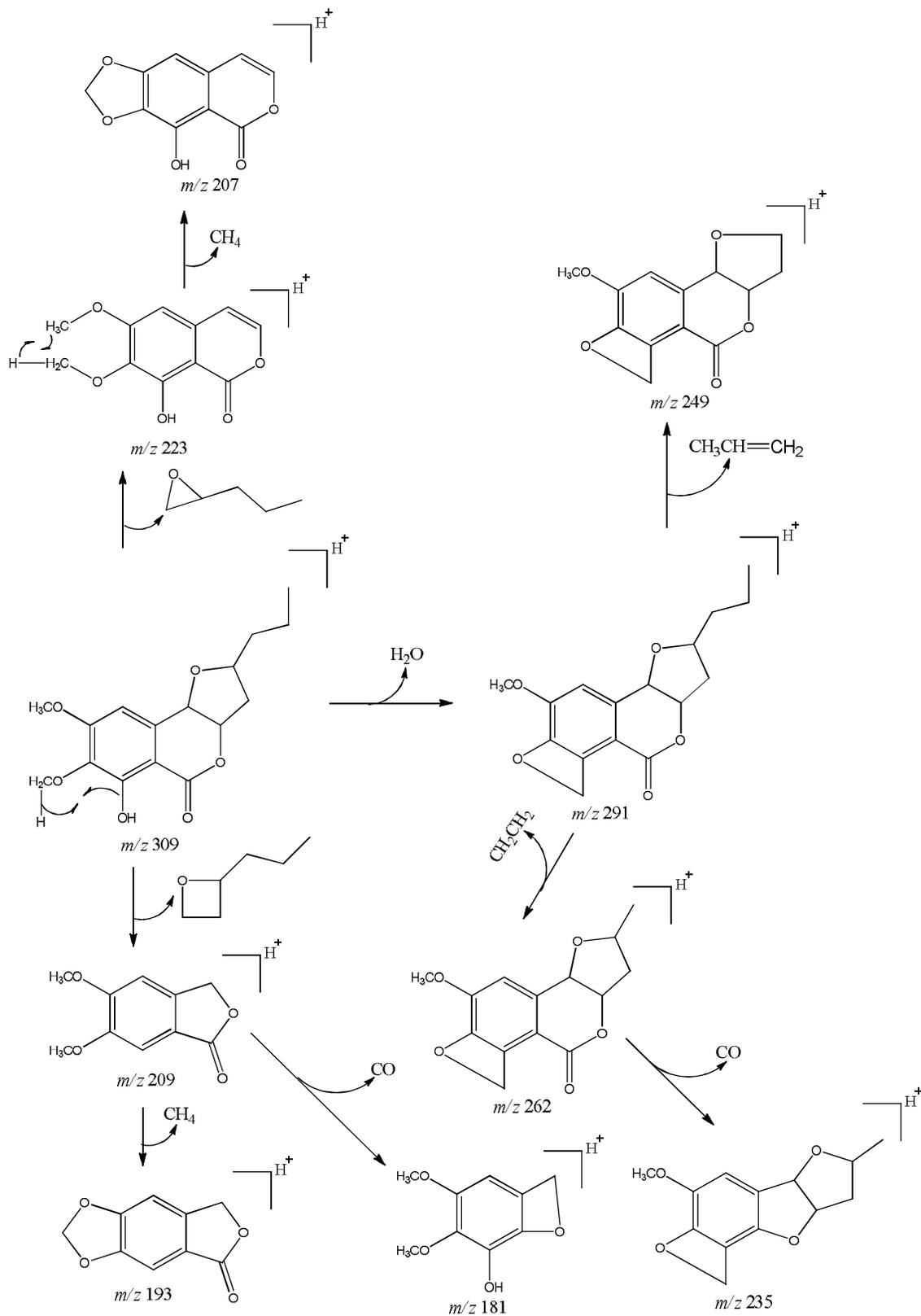


Tabela 07. Atribuição dos dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **S-10** juntamente com os dados descritos na literatura para a monocerina.

	S-10	Lit^{a,b}	S-10	Lit^{a,b}
	H (δ, mult., J em Hz)	H (δ, mult., J em Hz)	C	C
1			167,8	167,8
3	5,04 (<i>ddd</i> ; 4,2; 3,0 e 1,2)	5,04 (<i>ddd</i> ; 5,4 e 3,0)	81,2	81,3
4	4,53 (<i>d</i> , 3,0)	4,53 (<i>d</i> , 3,0)	74,4	74,3
4a			131,1	131,3
5	6,59 (<i>s</i>)	6,59 (<i>s</i>)	104,3	104,5
6			158,7	158,6
7			137,3	137,2
8			156,2	156,0
8a			102,0	101,9
9a	2,14 (<i>ddd</i> , 14,7; 6,4 e 1,2)	2,14 (<i>ddd</i> , 14,6; 6,0 e 1,1)	39,0	39,0
9b	2,58 (<i>ddd</i> , 14,7; 6,3 e 8,8)	2,58 (<i>ddd</i> , 14,6; 6,0 e 8,4)		
10	4,12 (<i>m</i>)	4,11 (<i>m</i>)	78,7	78,5
11	1,65 (<i>m</i>)	1,65 (<i>m</i>)	38,0	38,1
12	1,39 (<i>m</i>)	1,38 (<i>m</i>)	19,0	19,0
13	0,91 (<i>t</i> , 7,2)	0,91(<i>t</i> , 7,2)	13,9	13,9
OCH₃-6	3,94 (<i>s</i>)	3,94 (<i>s</i>)	56,2	56,2
OCH₃-7	3,88 (<i>s</i>)	3,88 (<i>s</i>)	60,7	60,6
OH-8	11,27 (<i>s</i>)	11,27 (<i>s</i>)		

^a[ZHANG *et al.*, 2008];

^bDados da literatura de RMN ^1H e ^{13}C em CDCl_3 .

Figura 158 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S-10.

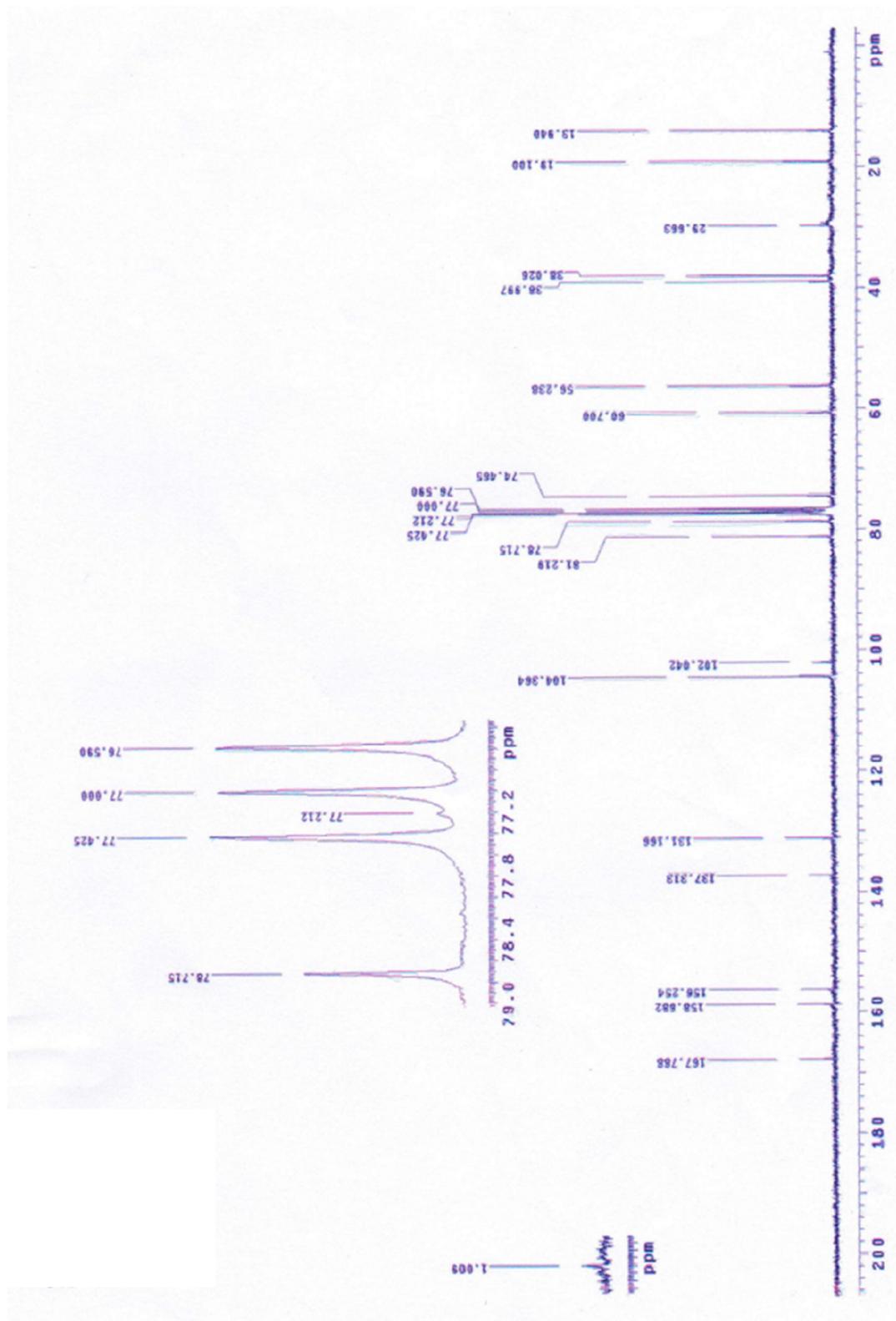


Figura 159 – Espectro de DEPT (75MHz, CDCl_3) de **S-10**.

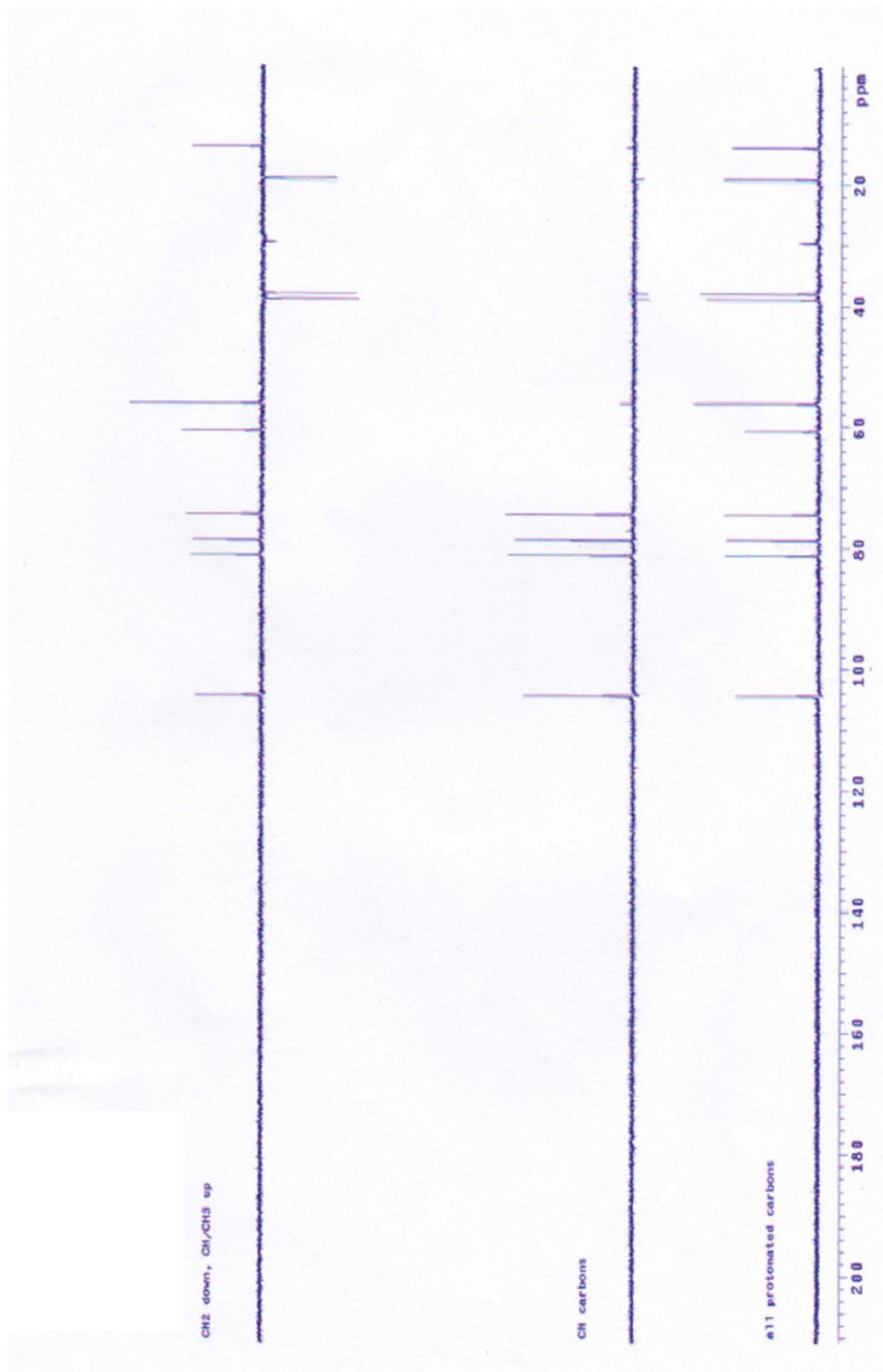


Figura 160– Espectro de COSY (300 MHz, CDCl_3) de **S-10**.

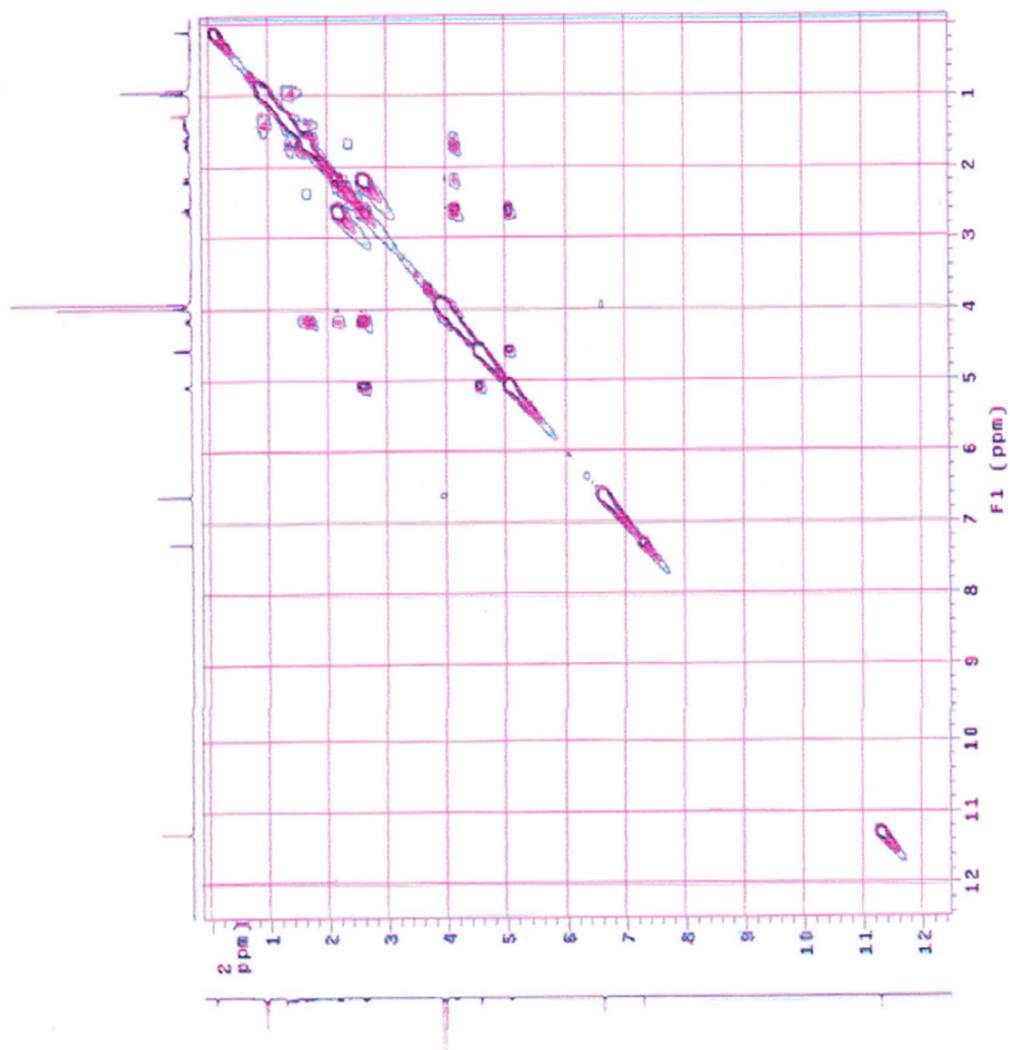


Figura 161 – Espectro de HETCOR (75 MHz, CDCl_3) de S-10.

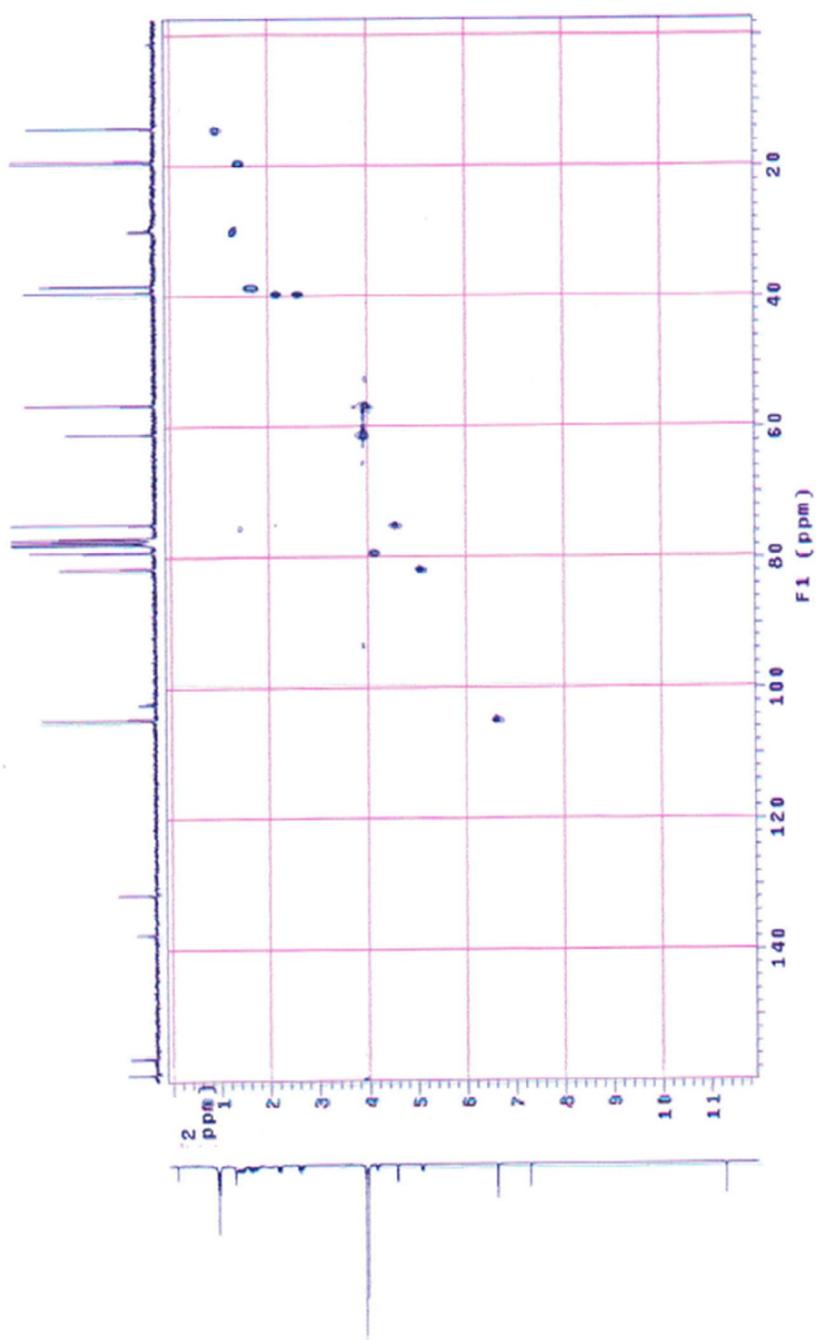


Figura 162 – Espectro de HMBC (75 MHz, CDCl_3) de **S-10**.

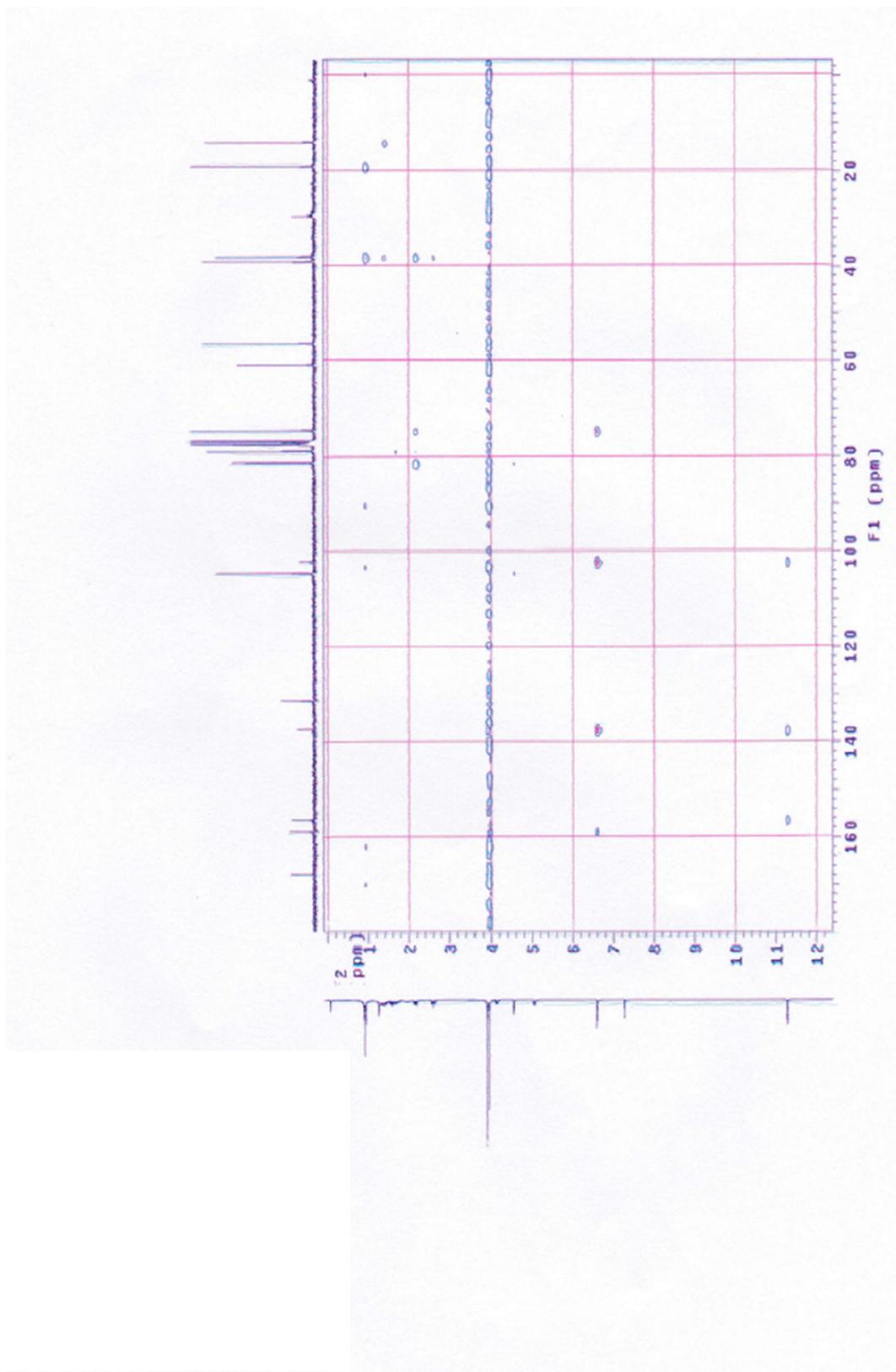
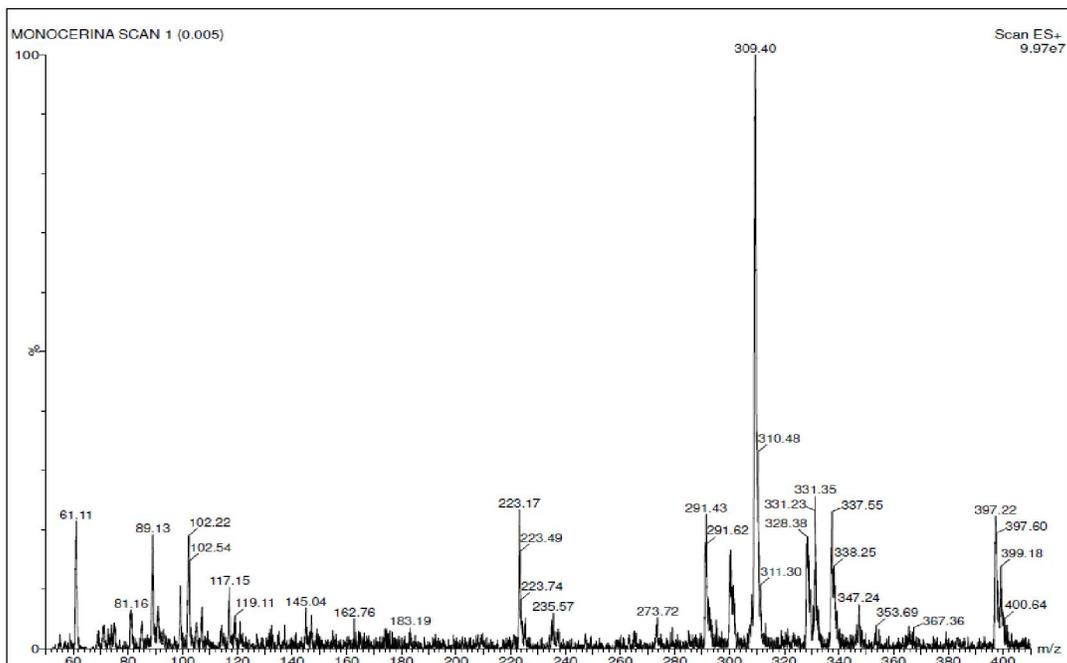
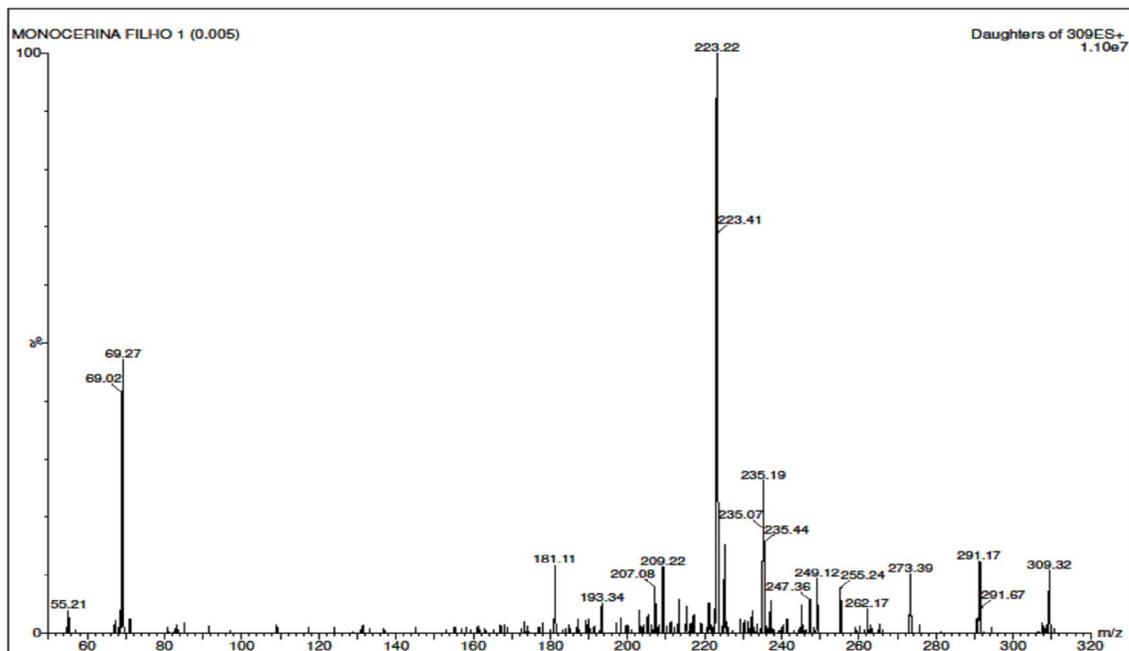


Figura 163- Espectro de massas (full scan) ESI (+) de **S-10**.**Figura 164-** Espectro de massas dos íons filhos de m/z 309 de **S-10**.

5.9.8 Carboidrato

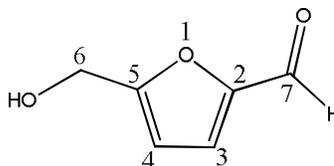
Carboidratos são poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas ou substâncias que liberam tais compostos por hidrólise. O termo sacarídeo é derivado do grego *sakcharon* que significa açúcar. Por isso, são assim denominados, embora nem todos apresentem sabor adocicado. O termo *carboidrato* denota hidratos de carbono, designação oriunda da fórmula geral $(\text{CH}_2\text{O})_n$ apresentada pela maioria dessas moléculas (FRANCISCO JUNIOR, 2007).

Apesar dos carboidratos comporem 75% da biomassa da Terra, representando a maior fonte renovável do planeta (LICHTENTHALER; PETERS, 2004), são poucas substâncias desta classe que possuem efetivamente potencial econômico para atrair o investimento das indústrias químicas (FERREIRA *et al.*, 2013). Dos diversos carboidratos existentes no mundo, foi isolado o 5-(hidroximetil)furfural do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ 12.

5.9.8.1. Elucidação estrutural da 5-(hidroximetil)furfural (**S-11**)

O 5-(hidroximetil)furfural (**S-11**) (Figura 165) foi isolado do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ 12 como um sólido cristalino branco, solúvel em diclorometano.

Figura 165- 5-(hidroximetil)furfural (**S-11**).



No espectro de RMN ^1H (Figura 168, p. 225), é observado um sinal de hidrogênio aldeídico em δ_{H} 9,51 (s, 1H, H-7) e dois dubletos em δ_{H} 7,19 (d, 1H, H-3) e δ_{H} 6,48 (d, 1H, H-4) acoplado entre si com uma constante de 3,6 Hz e este acoplamento foi confirmado pelas correlações no espectro de COSY (Figura 171, p. 228), peculiares de hidrogênios orto-acoplados de um penta heterociclo aromático, podendo ser do tipo furano ou pirol (SILVA, 2007). Há, ainda, um sinal singlete em δ_{H} 4,66 atribuído aos hidrogênios metilênicos.

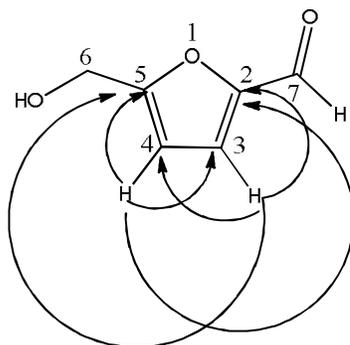
Na análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 169, p. 226), são observados sinais referentes a 6 átomos de carbonos, sendo um sinal de carbono em δ_{C} 177,7

que a princípio poderia ser atribuído a carbono de um grupo carboxila aldeídico conjugado (SILVERSTEIN, 2007).

A análise conjunta do espectro de RMN ^{13}C com o de DEPT (Figura 170, p. 227) e o de HSQC (Figura 172, p. 228) confirmou a presença de dois carbonos sp^2 em δ_c 109,9 (C-4) e δ_c 123,3 (C-3) e de um carbono oximetínico em δ_c 57,3 (C-6), integrando para dois hidrogênios. Nos espectros de RMN ^{13}C e de HSQC, é possível também observar a presença de outros dois carbonos sp^2 em δ_c 161,0 (C-5) e 152,1 (C-2), sendo que o C-5 está mais desblindado em relação ao C-2 em virtude do efeito de ressonância.

A análise do espectro de HMBC (Figura 173, p. 230) observa-se que o sinal do hidrogênio olefínico em δ_H 7,19 (H-3) correlaciona-se com o sinal de carbono em δ_c 152,1 (C-2) a 2J e a correlação do sinal de hidrogênio δ_H 6,48 (H-4) com os sinais de carbonos em δ_c 123,3 (C-2) a 2J e em δ_c 161,0 (C-5) a 2J . Outras correlações observadas no espectro de HMBC foram do sinal de hidrogênio em δ_H 7,19 (H-3) com o sinal de carbono em δ_c 109,9 (C-4) a 2J e com o sinal de carbono em δ_c 161,0 (C-5) a 3J e as correlações do sinal de hidrogênio em δ_H 6,48 (H-4) com o sinal de carbono em δ_c 123,3 (C-3) a 2J e com o sinal de carbono em δ_c 161,0 (C-5) a 2J . As correlações observadas no espectro de HMBC do 5-(hidroximetil)furfural (**S-11**) encontram-se na Figura 166.

Figura 166- Correlações de HMBC de **S-11**.



Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **S-11** foram comparados com os dados da literatura (Tabela 08, p. 224) (GALLO, 2005) que em conjunto com a interpretação dos espectros de RMN 2D e do espectro de massa ESI(+) (Figuras 174-175, p. 231)

que apresentou o pico relativo ao respectivo íon pseudomolecular em m/z 127 $[M+H]^+$ condizente com a fórmula molecular $C_6H_4O_3$, permitiram chegar a conclusão que **S-11** tratava-se do 5-(hidroximetil)furfural ou 5-hidroxi-2-furfuraldeído. A proposta de fragmentação dos íons filhos de **S-11** encontra-se na Figura 167.

Figura 167 – Proposta de fragmentação de **S-11**.

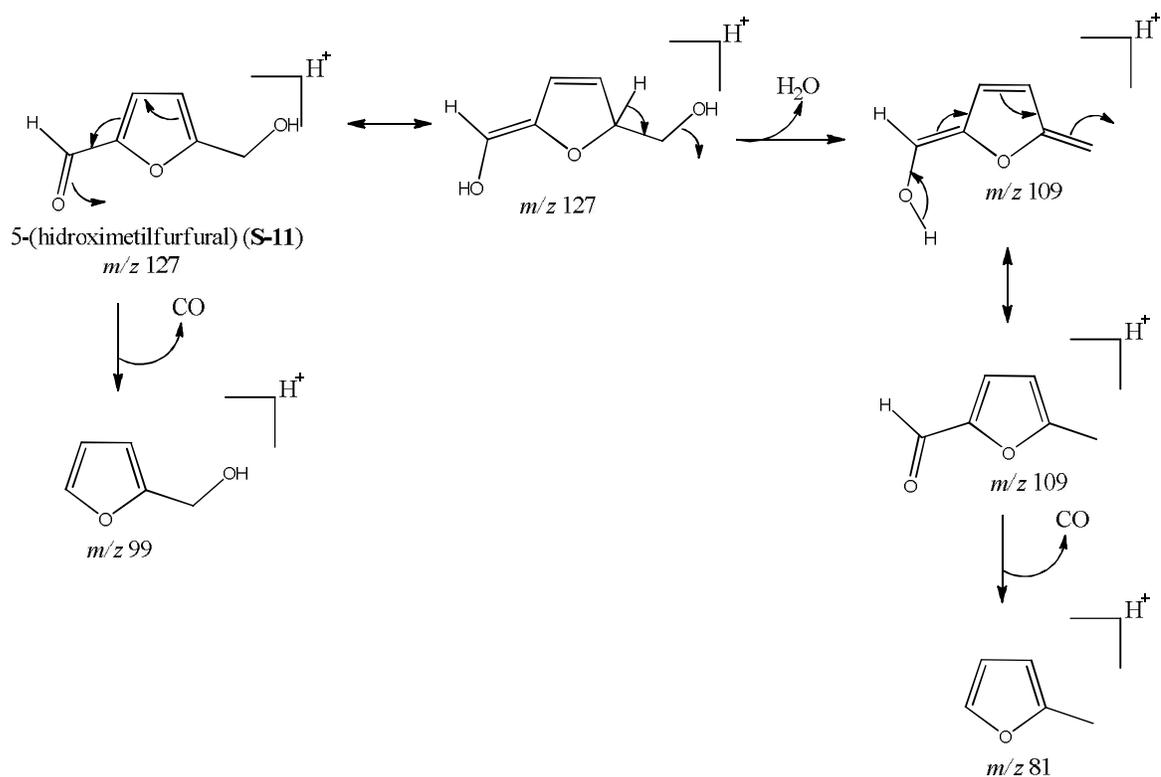


Tabela 08: Atribuição dos dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **S-11** juntamente com os dados descritos na literatura para o 5-(hidroximetil)furfural.

Posições	S-11	Lit ^{a,b}	S-11	Lit ^{a,b}
	H (δ , mult., J em Hz)	H (δ , mult., J em Hz)	C	C
1	-	-	-	-
2	-	-	152,1	-
3	7,19 (d; 3,6)	7,38 (d; 3,5)	123,3	123,7
4	6,48 (d; 3,6)	6,58 (d; 3,5)	109,9	110,2
5	-	-	161,0	162,9
6	4,66 (s)	4,63 (s)	57,3	57,5
7	9,50 (s)	9,59 (s)	177,7	178,1

^a[SILVA, 2007];

^bDados da literatura de RMN ^1H e ^{13}C em CDCl_3 .

Os carboidratos contendo o fragmento furânico em sua estrutura, tal como o 5-hidroximetilfurfural (HMF), são importantes para a produção da química fina (FERREIRA *et al.*, 2013). Esta substância já foi isolada anteriormente das raízes de *Cirsium albescens* (LI, 2006) e *Siphoneugena densiflora* (GALLO, 2005), entre outras plantas. Ela é formada pela clivagem da sacarose e precursora de aminoácidos e proteínas; produto de degradação de glicose em infusão e também pela clivagem da glicose pelo nitrato cérico amoniacelem DMF (CARUSO *et al.*, 2006). Ela já foi isolada de espécies fúngicas como *Botryosphaeria rhodina* (SILVA, 2007), mas este é o primeiro relato de isolamento desta substância de fungos de solo.

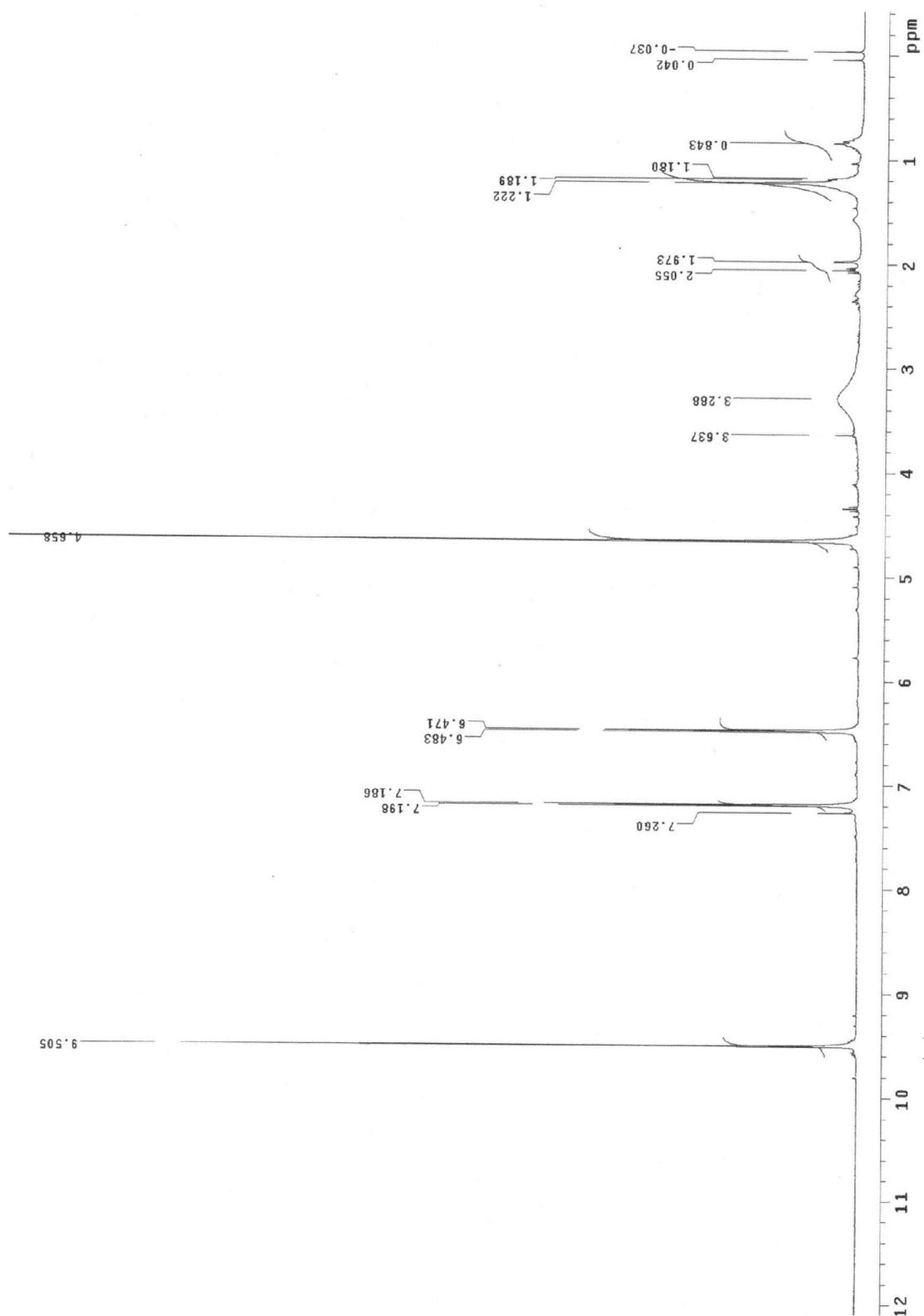
Figura 168 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **S-11**.

Figura 169 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S-11.

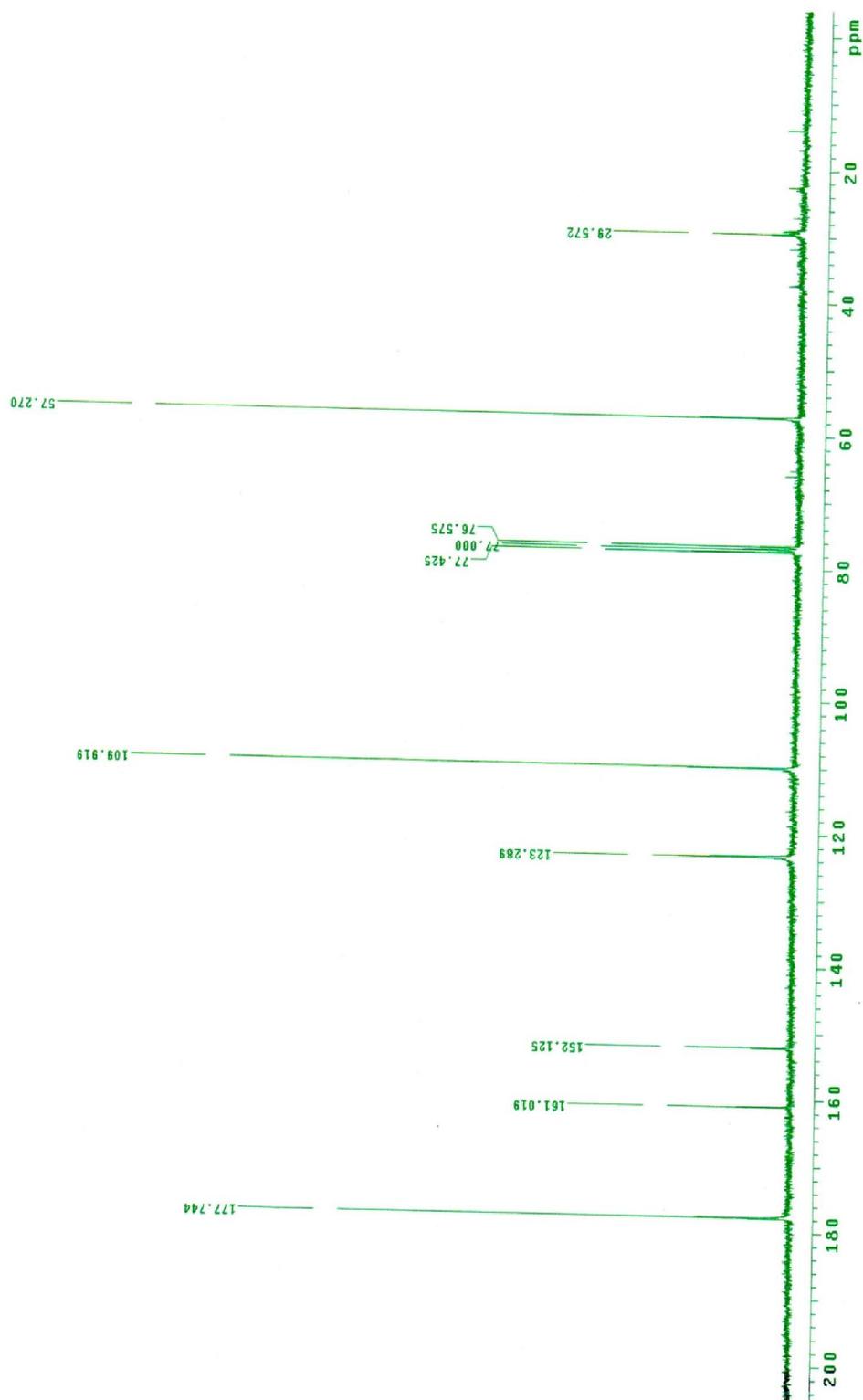


Figura 170- Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl_3) de S-11.

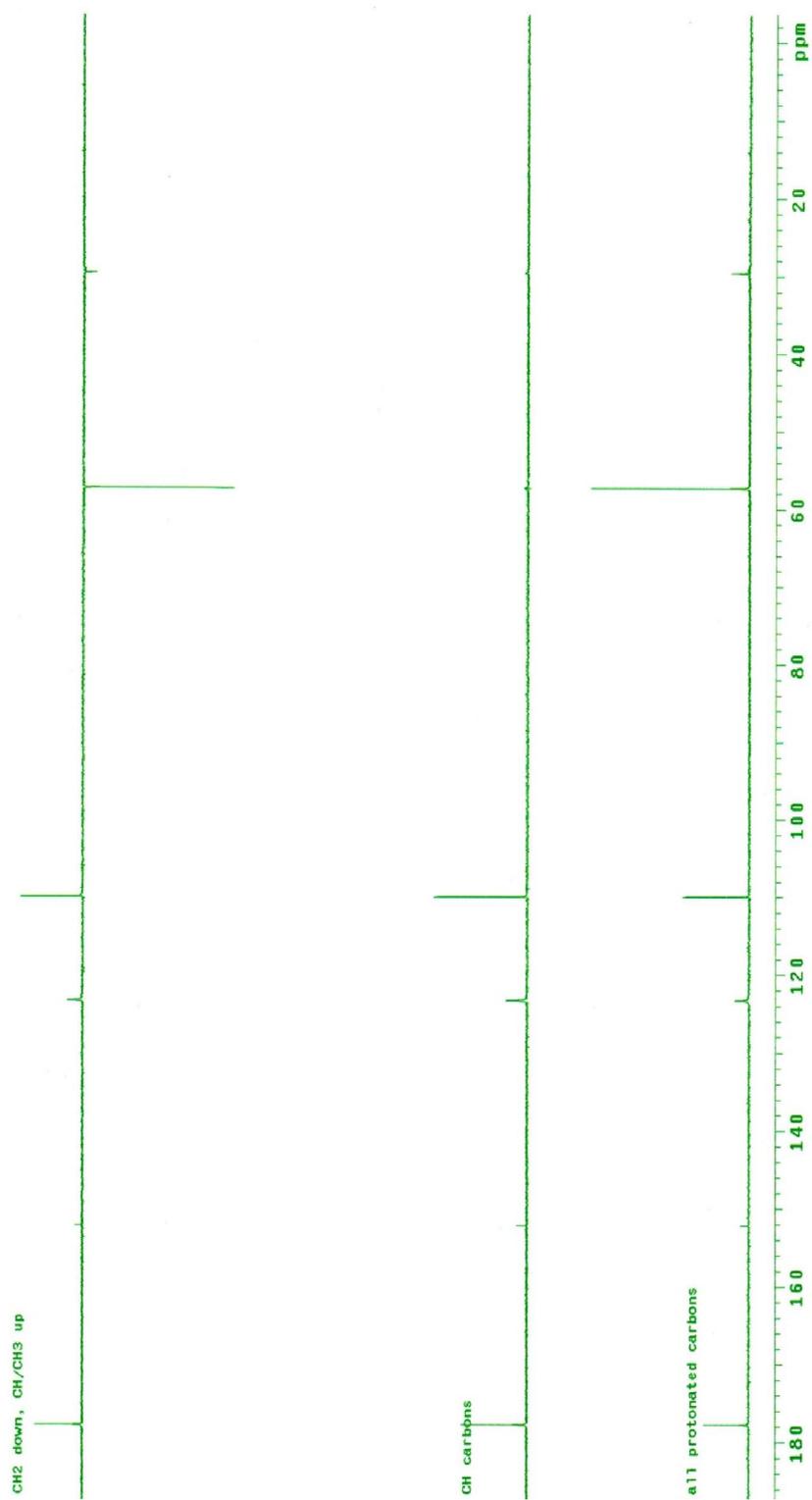


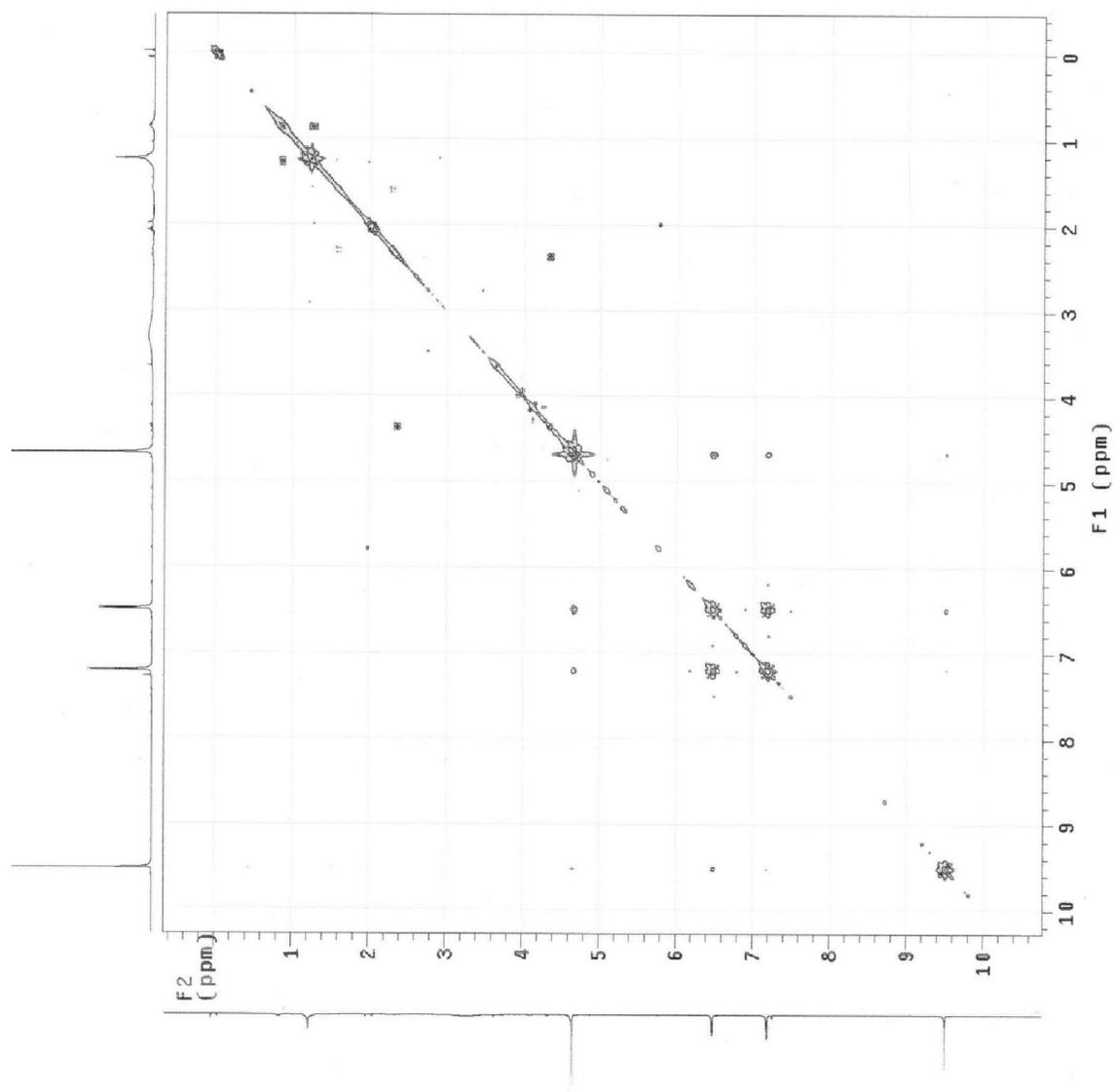
Figura 171- Espectro de COSY (300 MHz, CDCl_3) de **S-11**.

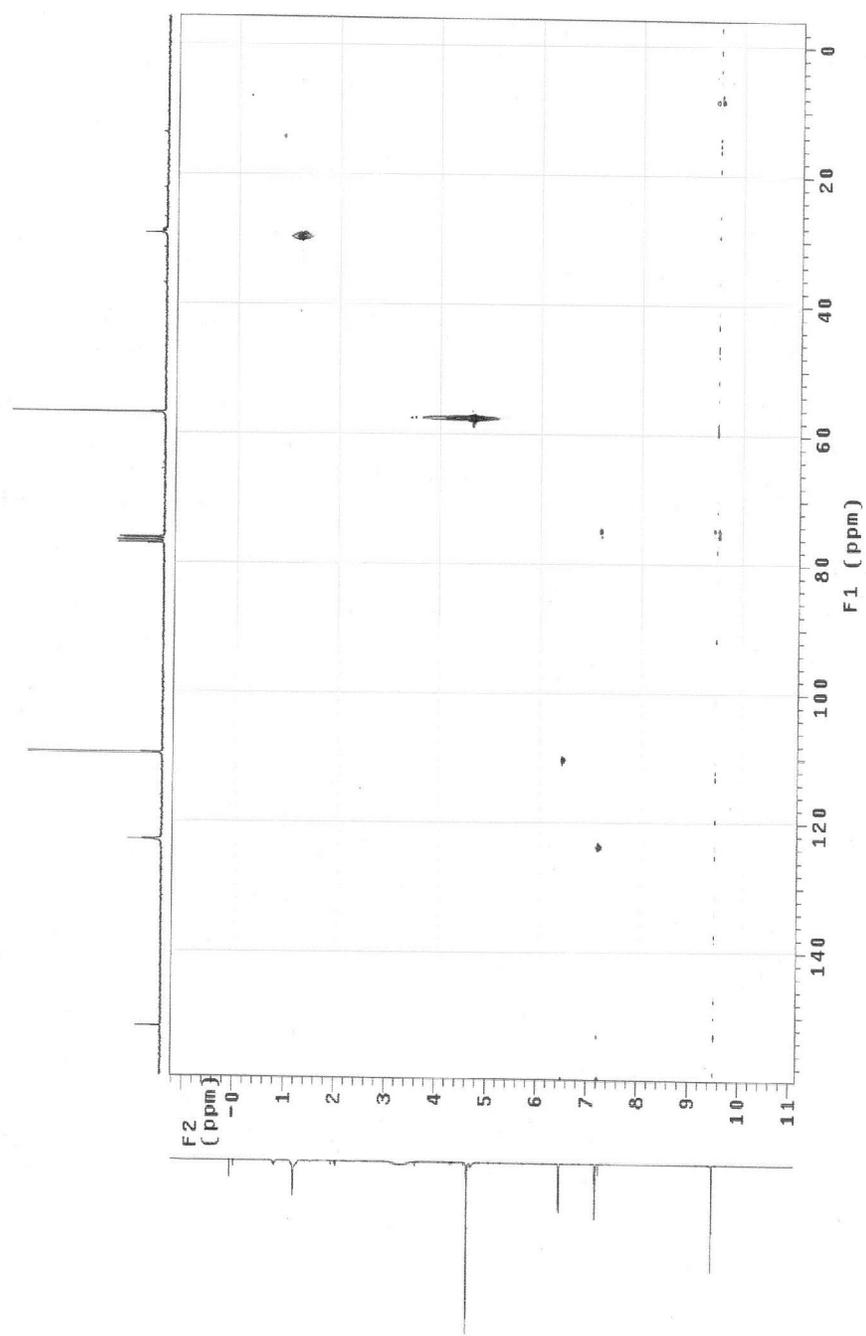
Figura 172- Espectro de HSQC (300 MHz, CDCl_3) de **S-11**.

Figura 173- Espectro de HMBC (75 MHz, CDCl_3) de **S-11**.

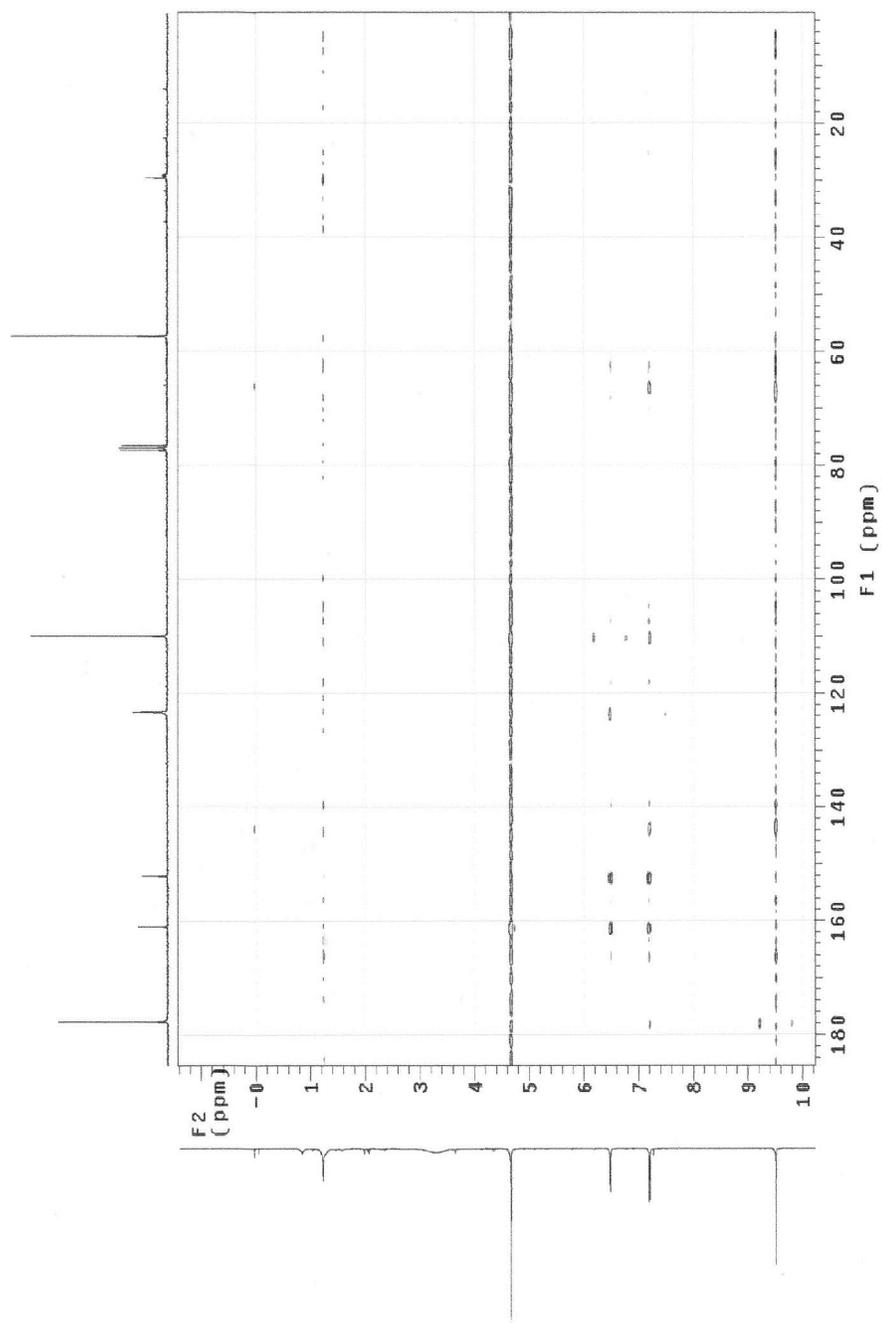


Figura 174- Espectro de massas (full scan) ESI (+) de S-11.

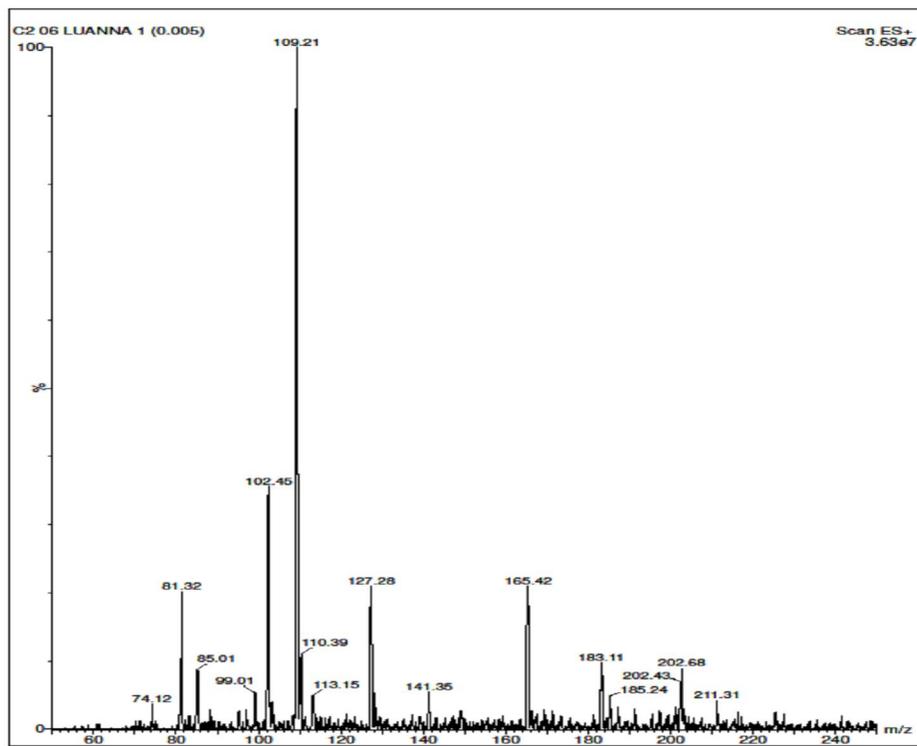
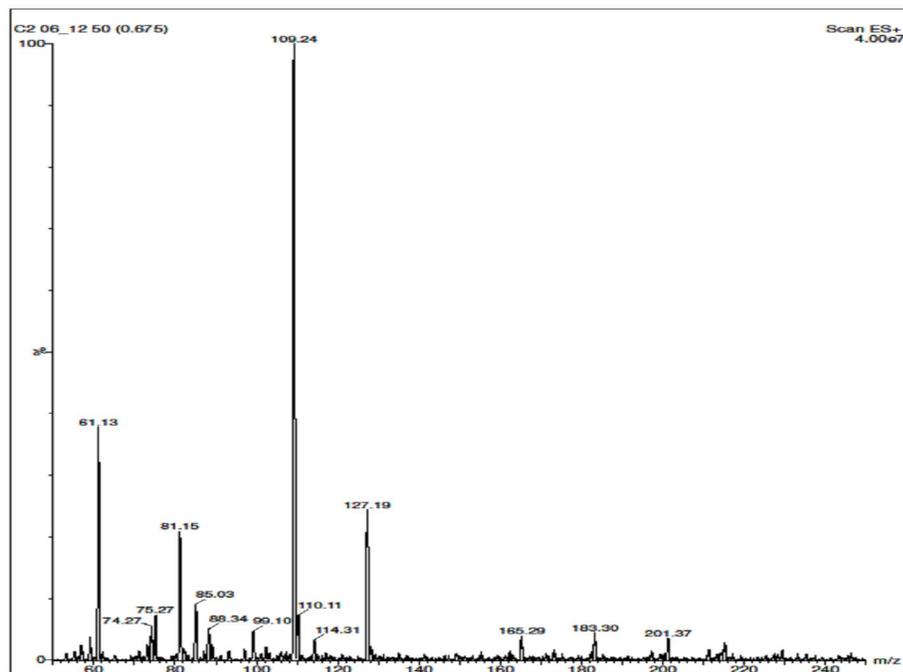


Figura 175- Espectro de massas dos íons filhos de m/z 127 de S-11.



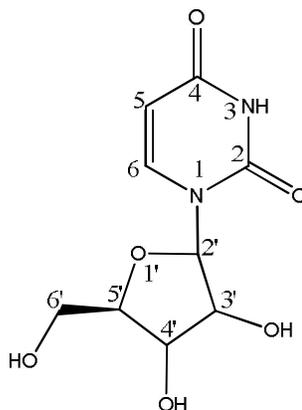
5.9.9 Nucleosídeo

Os nucleotídeos são compostos por uma base nitrogenada, um grupo fosfato e uma ribose ou desoxiribose. Quando na ausência do grupo fosfato, são chamados de nucleosídeos. A base nitrogenada, juntamente com a pentose formam compostos heterocíclicos, sendo que a primeira pode ser derivada de compostos de purina ou pirimidina. São tidas como purinas a adenina (A) e a guanina (G), e as pirimidinas são constituídas pela citosina (C), uracila (U) e timina (T) (SOLOMONS, 2012). Dentre os nucleosídeos, a uridina foi isolada do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ 12.

5.9.9.1 Elucidação estrutural da uridina (**S-12**)

A uridina (**S-12**) (Figura 176) foi isolada do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 como um sólido cristalino branco, solúvel em metanol.

Figura 176- Uridina (**S-12**).

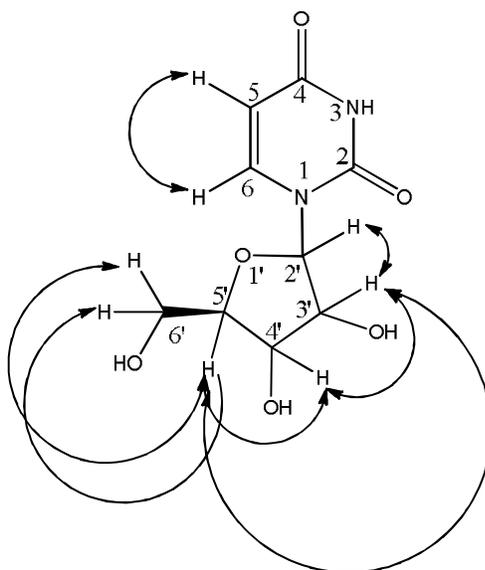


Na análise conjunta do espectro de RMN ^1H (Figura 179, p. 236) com o espectro de COSY (Figura 182, p. 239), é observada a ocorrência de dois sinais de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,68 (*d*, 1H; H-5) e em δ_{H} 8,00 (*d*, 1H; H-6) acoplado entre si com constante de acoplamento de aproximadamente 8,02 Hz, sendo que H-6 está mais desblindado que H-5 por causa do efeito de ressonância.

Na análise conjunta do espectro de RMN ^1H como espectro de COSY, é possível notar também as correlações do sinal de hidrogênio em δ_{H} 5,88 (*d*, 1H; $J= 4,5$ Hz; H-2') como os sinais de hidrogênio em δ_{H} 4,16 (*t*, 1H; $J= 4,5$ Hz; H-3') e δ_{H} 4,14 (*t*, 1H; $J= 4,5$ Hz; H-4') e destes entre si e com o sinal de hidrogênio em δ_{H} 3,99

(*m*, 1H, H-5'). Essas correlações permitem afirmar que há uma unidade de açúcar ligada à base nitrogenada de **S-12**. No espectro de RMN ^1H , há ainda a presença de sinais de dois hidrogênios diasterotópicos em δ_{H} 3,81 (*dd*, 1H; $J= 12,3$ e $3,0$ Hz; H-6'a) e δ_{H} 3,74 (*dd*, 1H; $J= 12,3$ e $3,0$ Hz; H-6'b), confirmando que a unidade de açúcar ligada à base nitrogenada de **S-12** se trata da 2'-desoxi-D-ribose (FERREIRA *et al.*, 2010). As correlações de COSY de **S-12** encontram-se na Figura 177.

Figura 177- Correlações de COSY de **S-12**.



No espectro de RMN ^{13}C (Figuras 180-181, p. 237-238), observou-se dois sinais de carbono característicos de carbamidas em δ_{C} 152,5 e 166,2 (PRIETO *et al.*, 2012) que foram atribuídos aos hidrogênios C-2 e C-4 respectivamente. Foram verificados ainda a presença dos sinais de carbonos olefínicos C-5 em δ_{C} 102,6 e C-6 em δ_{C} 142,7. A análise conjunta do espectro de RMN ^{13}C com o espectro de HETCOR (Figura 183, p. 240) permitiu afirmar que há a presença de cinco sinais de carbonos carbinólicos, sendo quatro sinais de carbonos metínicos em δ_{C} 90,7; δ_{C} 75,5; δ_{C} 71,3 e δ_{C} 86,4 que se correlacionam, respectivamente, com os sinais de hidrogênios H-2', H-3', H-4' e H-5' e também um sinal de carbono metilênico em δ_{C} 62,3 que se correlaciona com os sinais de hidrogênios diasterotópicos em δ_{H} 3,81 (H-6'a) e δ_{H} 3,74 (H-6'b). Essas correlações referem-se à presença da unidade 2'-desoxi-D-ribose na estrutura de **S-12**.

No espectro de HMBC (Figura 184, p. 241), há as correlações do sinal do hidrogênio olefínico em δ_H 5,68 (H-5) e do sinal de hidrogênio em δ_H 5,88 (H-2') correlacionam-se com o sinal de carbono olefínico em δ_C 142,7 (C-6) a 2J e 3J . É observado também a correlação do sinal de hidrogênio em δ_H 5,88 (H-2') com o sinal de carbono carbinólico metínico em δ_C 75,5 (C-3') a 2J e as correlações do sinal do hidrogênio olefínico em δ_H 8,00 (H-6) com o sinal de carbono carbinólico metínico em δ_C 90,7 (C-2') a 3J e com o sinal de carbono olefínico em δ_C 102,6 (C-5) a 2J . Há ainda as correlações do sinal de hidrogênio em δ_H 4,14 (H-4') com sinais de carbonos oximetínicos em δ_C 90,7 (C-2') a 3J , δ_C 86,4 (C-5') a 2J e o sinal de carbono oximetilênico em δ_C 62,3 (C-6') a 3J . Por fim, nota-se também os acomplamentos do sinal de hidrogênio em δ_H 4,16 (H-3') com os sinais de carbonos oximetínicos em δ_C 86,4 (C-5') a 3J e em δ_C 90,7 (C-2') a 2J e as correlações dos hidrogênios diastereotópicos em δ_H 3,81 (H-6'a) e δ_H 3,74 (H-6'b) com o sinal de carbono carbinólico metilênico em δ_C 86,4 (C-5') a 2J e com o sinal de carbono oximetínico em δ_C 71,3 (C-4') a 3J . Na Figura 178, segue as correlações de HMBC de **S-12**.

Os dados de RMN 1H e ^{13}C de **S-12** foram comparados com os dados da literatura (Tabela 09, p. 235) (PRIETO, 2012) que em conjunto com a interpretação dos espectros de RMN 2D permitiu afirmar que a substância **S-12** é o nucleosídeo uridina.

Figura 178- Correlações de HMBC de **S-12**.

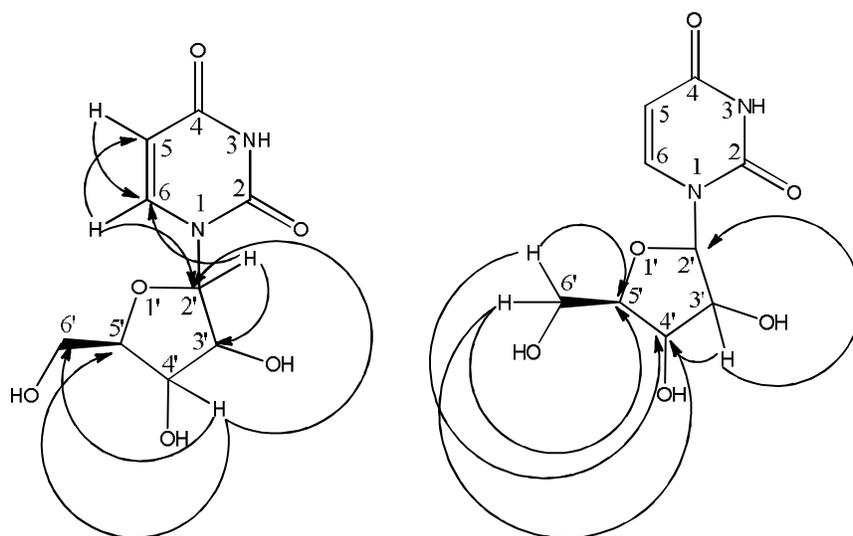


Tabela 09: Atribuição dos dados de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) e RMN ^{13}C (300 MHz, CD_3OD) de **S-12** juntamente com os dados descritos na literatura para a uridina.

Posições	S-12	Lit ^{a,b}	S-12	Lit ^{a,b}
	H (δ , mult., <i>J</i> em Hz)	H (δ , mult., <i>J</i> em Hz)	C	C
2	-	-	152,5	152,8
4	-	-	166,2	166,3
5	5,68 (<i>d</i> ; 8,4)	5,68 (<i>d</i> . 8,0)	102,6	102,8
6	8,00 (<i>d</i> ; 8,1)	7,99 (<i>d</i> ; 8,0)	142,7	142,8
2'	5,88 (<i>d</i> ; 4,5)	5,88 (<i>d</i> ; 5,0)	90,7	90,8
3'	4,16 (<i>d</i> ; 4,5)	4,17 (<i>d</i> ; 5,0)	75,5	75,9
4'	4,14 (<i>d</i> ; 4,5)	4,13 (<i>d</i> ; 5,0)	71,3	71,4
5'	3,99 (<i>m</i>)	3,99 (<i>m</i>)	86,4	86,6
6'a	3,81 (<i>dd</i> ; 12,0 e 3,0)	3,82 (<i>dd</i> ; 12,0 e 3,0)	62,3	62,3
6'b	3,74 (<i>dd</i> ; 12,0 e 3,0)	3,72 (<i>dd</i> ; 12,3 e 3,0)	62,3	62,3

^a [PRIETO, 2012];

^b Dados da literatura de RMN ^1H e ^{13}C em CD_3OD .

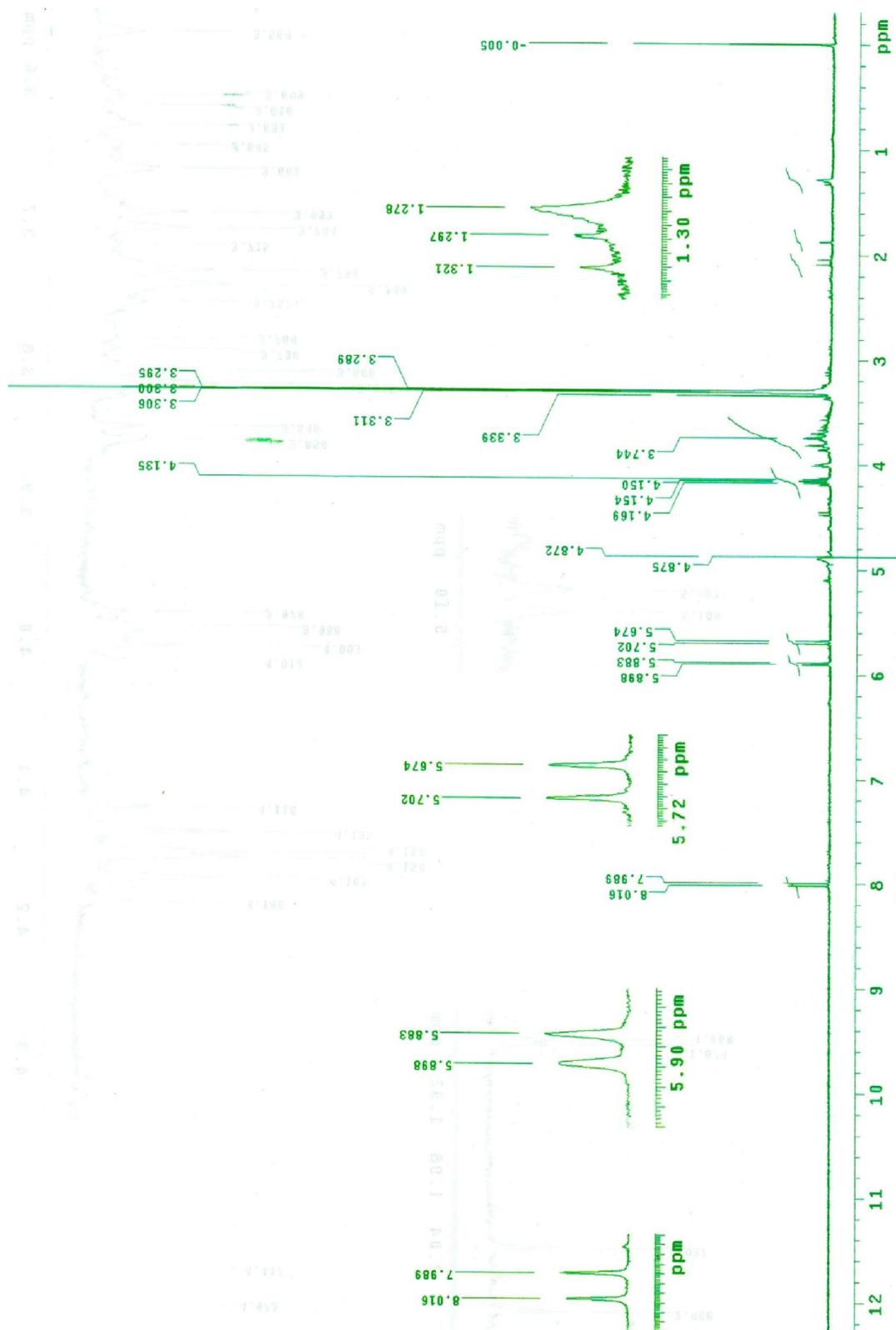
FIGURA 179 – Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) de **S-12**.

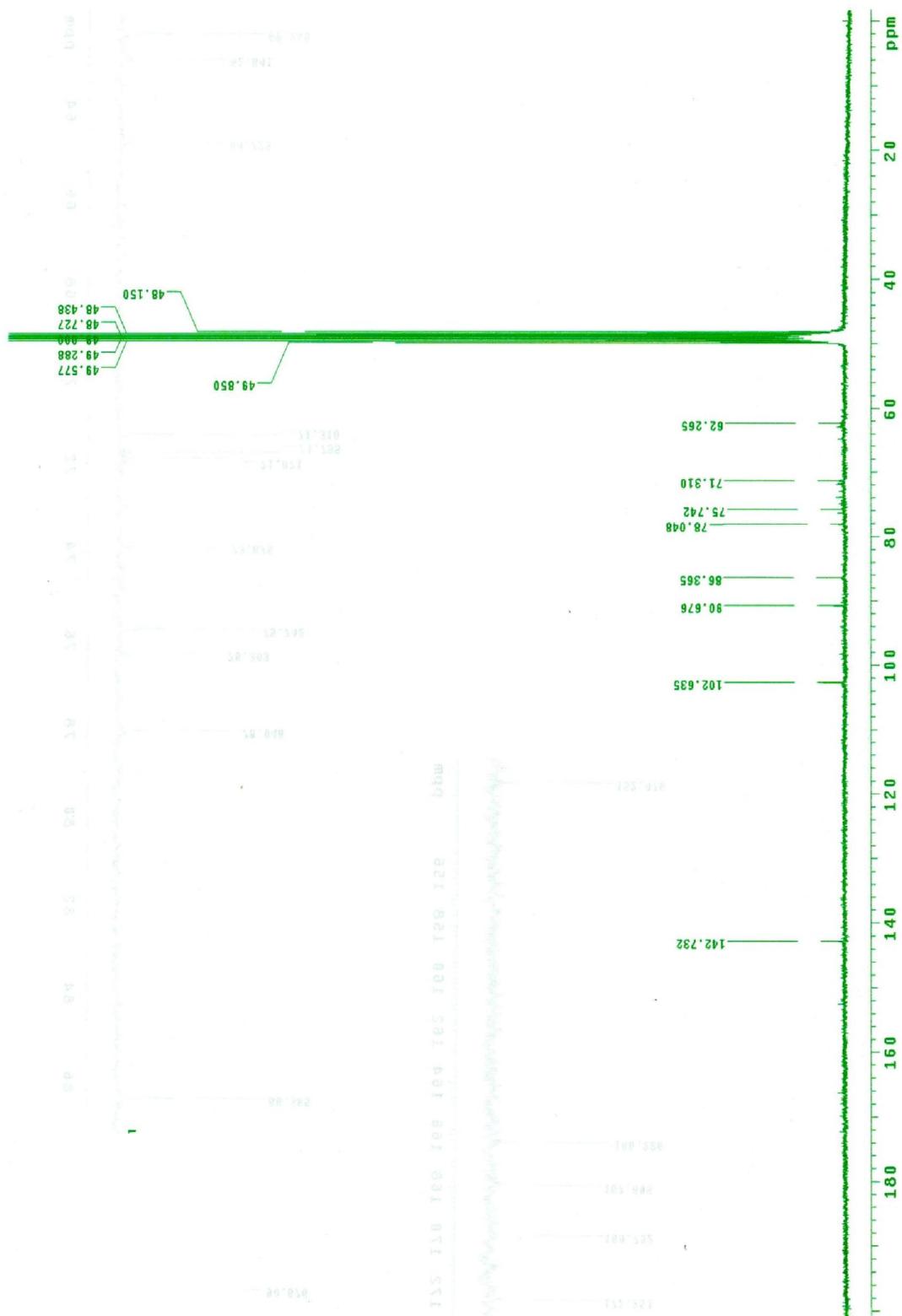
FIGURA 180 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de **S-12**.

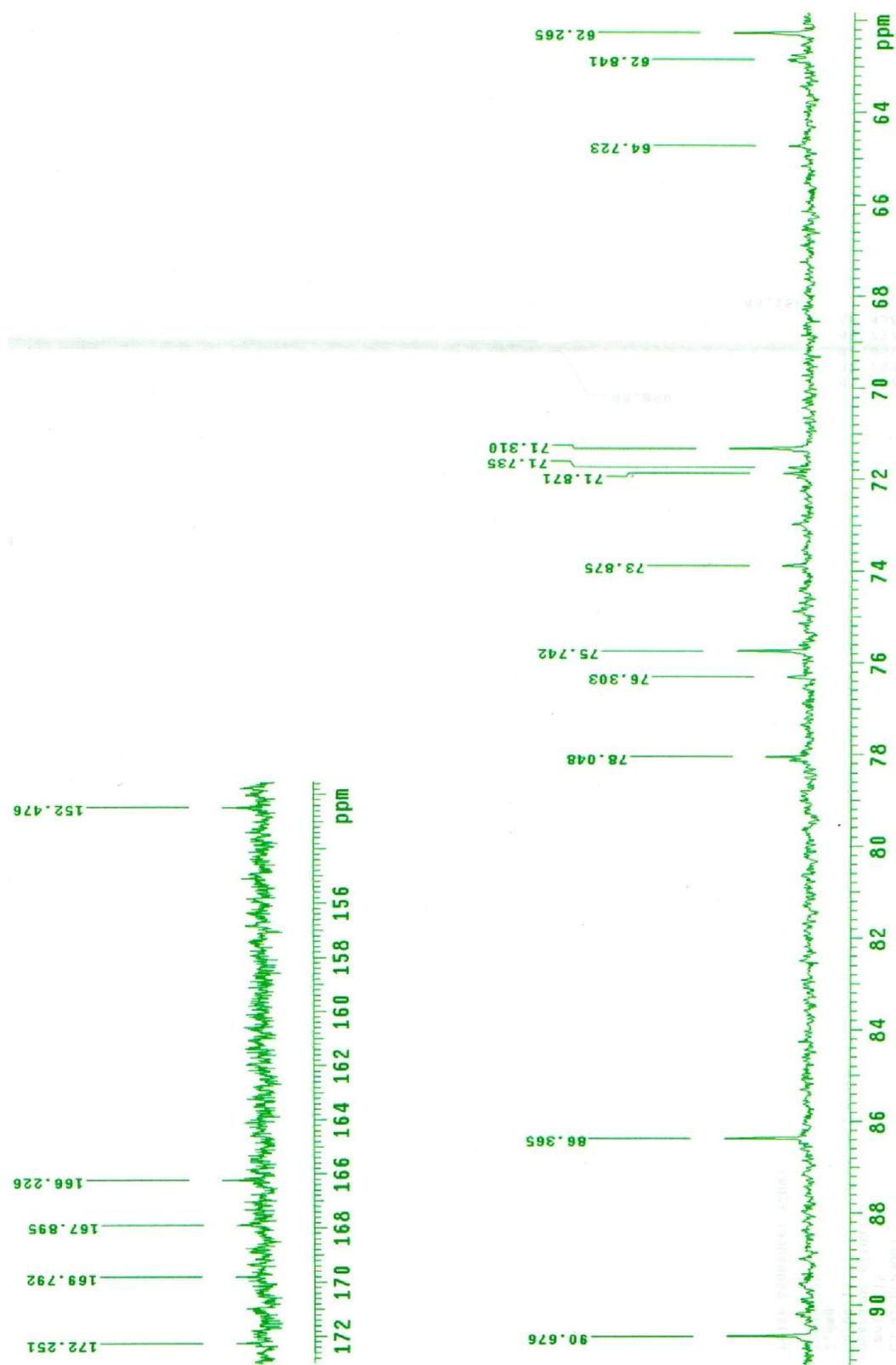
FIGURA 181– Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de S-12.

Figura 182- Espectro de COSY (300 MHz, CD₃OD) de S-12.

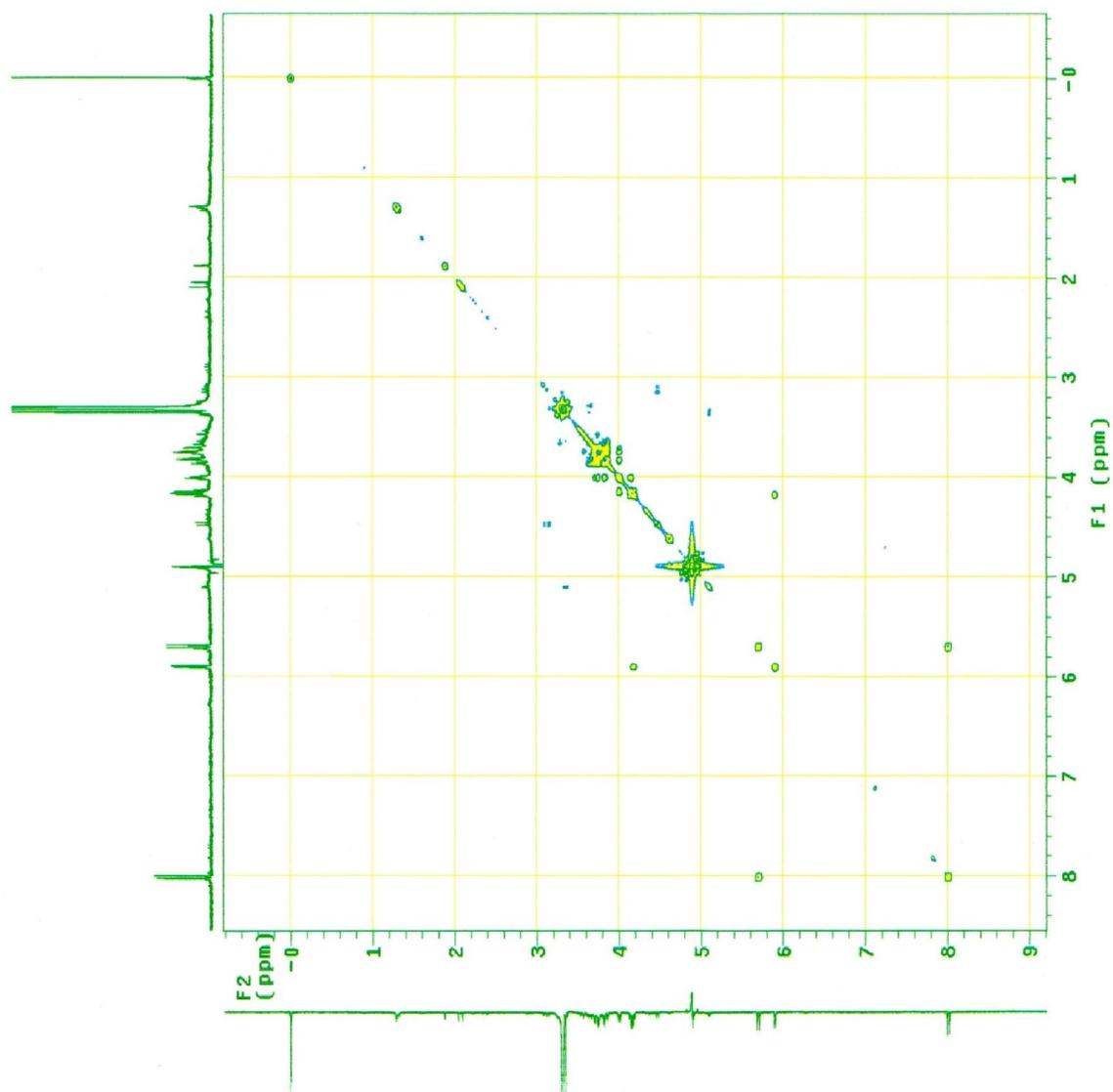


Figura 183- Espectro de HETCOR (75 MHz, CD₃OD) de S-12.

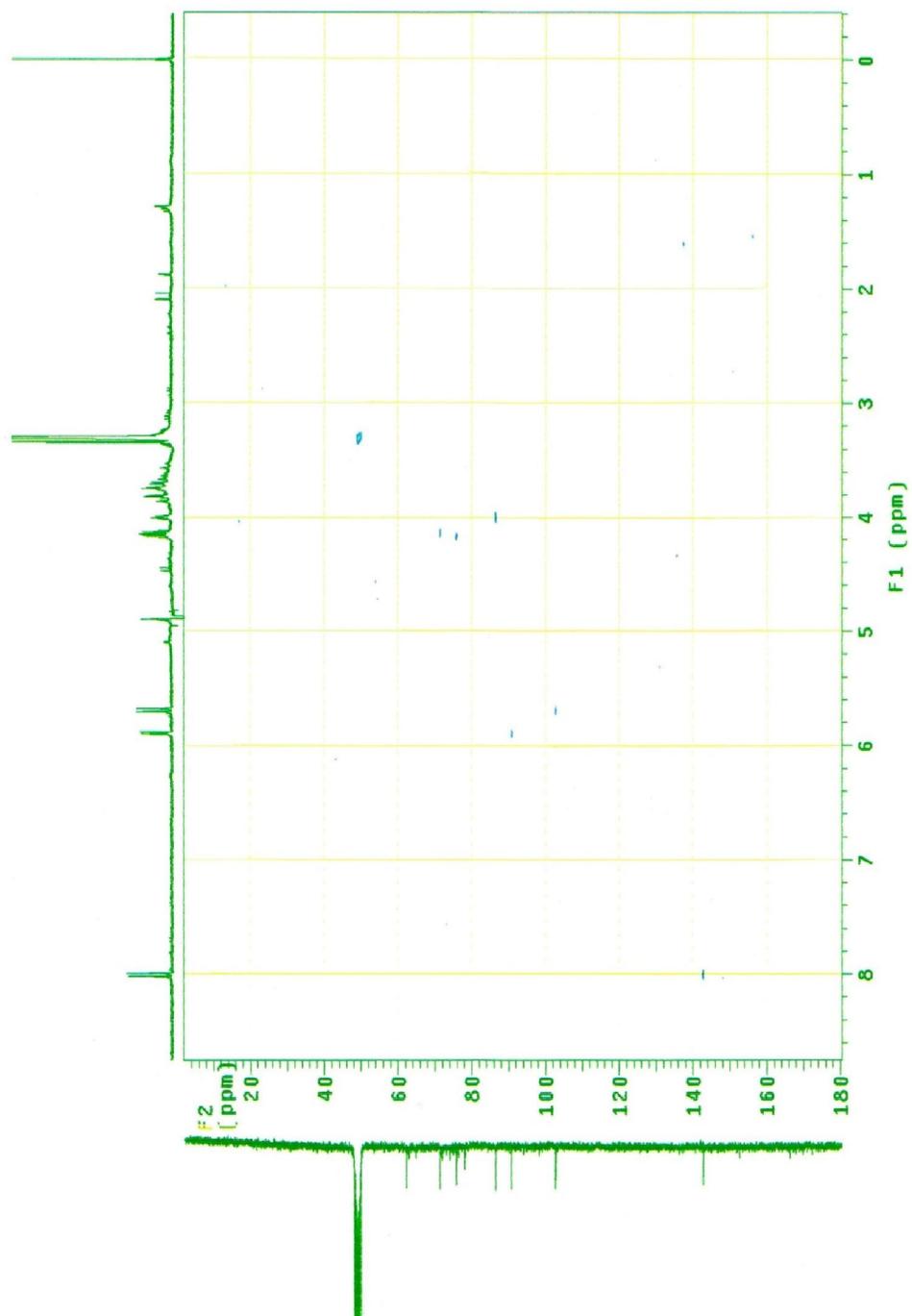
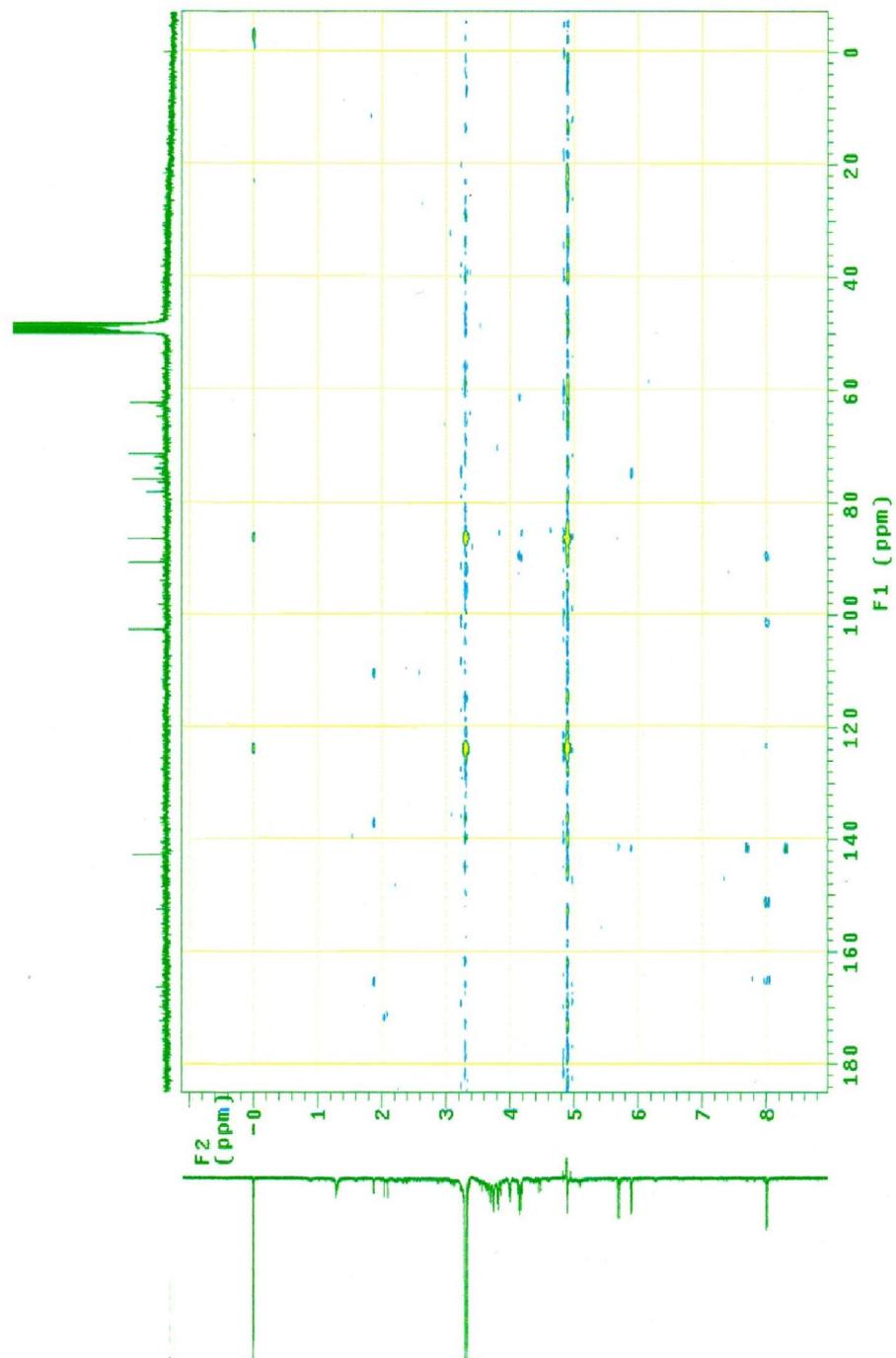


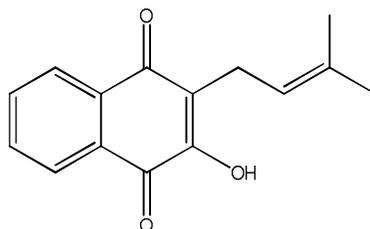
Figura 184- Espectro de HMBC (75 MHz, CD₃OD) de S-12.



5.10 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS E DE CITOTOXICIDADE PRELIMINAR FRENTE À *Artemia salina* PARA OS COMPOSTOS ISOLADOS

O teste de citotoxicidade preliminar parte da premissa que uma substância ativa pode ser tóxica dependendo da dose (BOHLIN; BRUHN, 1999). Para substâncias puras ou extratos onde DL_{50} menor que 80 $\mu\text{g/mL}$ consideram-se altamente tóxico, entre 80 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ moderadamente tóxico e acima de 250 $\mu\text{g/mL}$ com baixa toxicidade (DOLABELA, 1997). Foi utilizado o lapachol ($DL_{50}= 64,85\pm 0,05$ $\mu\text{g/mL}$) (Figura 185) (SIMÕES *et al.*, 2013) como controle positivo das substâncias isoladas para a atividade citotóxica preliminar frente à *Artemia salina*. Foi utilizado o antibiótico terramicina como controle positivo para a avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias isoladas.

Figura 185– Lapachol.



5.10.1. Ensaios antimicrobianos e de citotoxicidade preliminar frente à *A. salina* para a monocerina (S-10), a annularina I (S-9) e a annularina J (S-8)

A monocerina (S-10) (Figura 153, p. 208) apresentou atividade bacteriostática até a concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ frente à bactéria *S.aureus*, no entanto a isocumarina exserolídeo F isolado de *Exserohilum* sp. apresentou CIM= 5 $\mu\text{g/mL}$ (Li *et al.*, 2014).

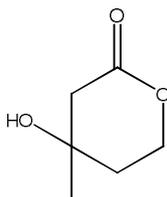
A monocerina (S-10) apresentou atividade bactericida até a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ e atividade bacteriostática até a concentração de 15,62 $\mu\text{g/mL}$ frente à *E.coli*. Frente à bactéria Gram-positiva *B. subtilis*, o composto S-10 apresentou atividade bactericida até a concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e atividade bacteriostática até a concentração de 15,62 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de CIM de S-10 são semelhantes aos do exserolídeo F que apresentou CIM de 20,0 $\mu\text{g/mL}$ para ambas as bactérias *B. subtilis* e *E. coli* acima com a metodologia certificada pelo CLSI. A monocerina (S-

10) apresentou atividades bacteriostáticas até a concentração de 31,25 µg/mL e 15,62 µg/mL frente às bactérias *S.typhimurium* e *P.aeruginosa*, respectivamente.

Quanto ao ensaio de citotoxicidade preliminar frente à *A. salina*, a monocerina (**S-10**) apresentou atividade citotóxica baixa com valor de DL₅₀ de 270,99±0,66 µg/mL, cujo valor é muito superior ao DL₅₀ do lapachol (Figura 188, p. 242). As isocumarinas versicolols A e B apresentaram valores respectivos de DL₅₀ de 8,8 µg/mL e 6,8 µg/mL para linhagem de célula cancerígena MCF-7 (ZHOU *et al.*, 2015). O Quadro 10 (p. 250) resume os resultados das atividades antimicrobianas e de citotoxicidade preliminar frente à *A.salina*.

A annularina I (**S-8**) (Figura 127, p. 185) apresentou atividade bactericida até a concentração de 500 µg/mL e atividade bacteriostática até a concentração de 7,81 µg/mL frente à bactéria *Bacillus subtilis*, enquanto que a annularina J (**S-9**) (Figura 139, p. 196) apresentou atividade bactericida até a concentração de 62,5 µg/mL e atividade bacteriostática até a concentração de 15,62 µg/mL frente à *B. subtilis*. Comparando-se com o controle positivo, a annularina I (**S-8**) apresentou atividade de CIM até a mesma concentração da ampicilina, enquanto que a annularina J (**S-9**) apresentou um valor de CIM maior em relação à ampicilina frente à bactéria *B. subtilis*, sugerindo que a oxidação do grupo metila em **S-8** para a função álcool em **S-9** diminui a atividade bacteriostática frente esta bactéria. Os valores de CIM da atividade antibacteriana das lactonas annularinas I (**S-8**) e J (**S-9**) estão condizentes com o resultado de delta-lactonas isoladas de espécies fúngicas em relação ao ensaio antimicrobiano frente à referida bactéria Gram-positiva, uma vez que a mevalactona (Figura 189, p. 244) apresentou atividade bacteriostática até a concentração de 7,81 µg/mL frente esta bactéria (PINHEIRO *et al.*, 2013).

A annularina I (**S-8**) e J (**S-9**) apresentaram atividades bactericidas até as concentrações de 500 µg/mL e de 250 µg/mL, respectivamente, frente à *E. coli*, sendo que ambas ainda apresentaram atividade bacteriostática até a concentração de 15,62 µg/mL frente à *E. coli*. Comparando-se os valores de CIM, pode-se afirmar que as duas annularinas apresentaram valores superiores de CIM em relação ao antibiótico utilizado como controle positivo e valores inferiores em relação à mevalactona, uma vez que esta teve atividade bacteriostática até a concentração de 62,5 µg/mL (PINHEIRO *et al.*, 2013b).

Figura 189- Mevalactona.

As annularinas I (**S-8**) e J (**S-9**) apresentaram atividade bacteriostática até as concentrações de 31,25 µg/mL e 62,2 µg/mL, respectivamente, frente à *S. typhimurim*, enquanto que a mevalactona apresentou atividade bactericida até a concentração de 31,25 µg/mL e atividade bacteriostática até a concentração de 7,81 µg/mL frente à *S. typhimurim* (PINHEIRO, 2012). Por fim, As annularinas I (**S-8**) e J (**S-9**) não apresentaram atividades antimicrobianas frente às bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*, enquanto que a mevalactona apresentou atividade bacteriostática até as concentrações de 7,81 µg/mL e 31,25 µg/mL frente às bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* respectivamente (PINHEIRO *et al.*, 2013b) .

Quanto ao ensaio preliminar de citotoxicidade frente à *A. salina*, as annularinas mostraram-se praticamente inativas com valores de DL₅₀ de 581,73±0,32 µg/mL e de 603,01±0,14 µg/mL para as annularinas I e J, respectivamente, estes valores que são muito superiores ao do controle positivo (Figura 188, p.246) e à mevalactona (333,47±0,29). Os altos valores de DL₅₀ das annularinas estão condizentes com os resultados apresentados para outras lactonas como, por exemplo, multiplolídeos A e B que não apresentaram atividade citotóxica para linhagens de células cancerígenas BC-1 e KB (BOONPHONG *et al.*, 2001). Os resultados dos ensaios antimicrobianos e de citotoxicidade preliminar frente à *A. salina* de **S-8** e de **S-9** estão expressos no Quadro 11 (p. 245) de forma resumida.

Quadro 11 Resultados dos ensaios antimicrobianos e de citotoxicidade preliminar frente à *A. salina* para a annularina I (**S-8**), annularina J (**S-9**) e monocerina (**S-10**).

Substâncias	Bactérias (CIM em µg/mL)					DL ₅₀ em µg/mL
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>A. salina</i>
S-8	7,81 (-)	15,62 (-)	>500	31,25 (-)	>500	581,73±0,32
S-9	15,62 (-)	15,62 (-)	>500	62,5 (-)	>500	603,1±0,14
S-10	15,62 (-)	15,62 (-)	15,62 (-)	31,25 (-)	62,5 (-)	270,99,1±0,66
Mevalactona	7,81 (-)	62,5 (-)	31,25 (-)	7,81 (-)	7,81 (-)	333,47±0,29
Terramicina	7,81 (=)	7,81 (=)	7,81 (-)	7,81 (-)	7,81 (-)	
Lapachol						64,85±0,05

Legenda: CIM; - Bacteriostático, = Bactericida. *DOLABELA (1997), MEYER *et al.* (1982); DL₅₀ Dose Letal para matar 50% dos indivíduos; ±Desvio padrão.

5.10.2. Ensaio antimicrobianos e de citotoxicidade preliminar frente à *A. salina* para a 2-benzil-4H-piran-4-ona (**S-6**), flavasperona (**S-7**) e uridina (**S-12**)

As substâncias 2-benzil-4H-piran-4-ona (**S-6**) (Figura 102, p. 159) e flavasperona (**S-7**) (Figura 114, p. 171) apresentaram atividades bacteriostáticas até as concentrações de 7,81 µg/mL e 7,81 µg/mL frente às bactérias *B. subtilis* e *E. coli*, apresentando os mesmos valores de CIM do grupo controle terramicina em relação às duas bactérias. Os resultados dos ensaios antimicrobianos das pironas **S-6** e **S-7** estão condizentes com os resultados antimicrobianos da fonsecinona A frente às bactérias *B. subtilis* e *E. coli* (SONG *et al.*, 2004).

A 2-benzil-4H-piran-4ona (**S-6**) e flavasperona (**S-7**) apresentaram atividades bacteriostáticas até as concentrações de 31,25 µg/mL e 15,62 µg/mL, respectivamente, frente à bactéria *S. aureus*. Comparando-se os valores de CIM, pode-se afirmar que as duas pironas apresentam valores de CIM superiores em relação ao antibiótico utilizado como controle positivo.

A 2-benzil-4H-piran-4ona (**S-6**) e flavasperona (**S-7**) apresentaram atividades bacteriostáticas até as respectivas concentrações de 62,5 µg/mL e 15,62 µg/mL, frente à bactéria *S. typhimurium*. Por fim, ambas pironas apresentaram atividades bacteriostáticas até as concentrações de 7,81 µg/mL frente à *P. aeruginosa*. Comparando-se os valores de CIM, pode-se afirmar que as duas pironas

apresentam valores de CIM superiores em relação ao antibiótico utilizado como controle positivo frente às bactérias Gram-negativas.

A uridina (**S-12**) (Figura 176, p. 232) apresentou atividade bacteriostática até a concentração de 15,62 µg/mL frente à *S. aureus*. Comparando-se, é possível observar que o nucleosídeo apresenta valor de CIM superior em relação ao antibiótico utilizado como controle positivo. O composto **S-12** apresenta um valor aproximado de MIC em relação ao ensaio antimicrobiano das kipukasinas H e I (CIM = 12,5 µg/mL) que são nucleosídeos derivados da uridina e isolados do fungo *Aspergillus versicolor* (CHEN *et al.*, 2014b). Por fim, o nucleosídeo uridina apresentou atividade antimicrobiana frente às outras bactérias testadas.

Quanto ao ensaio preliminar de citotoxicidade preliminar frente à *Artemia salina*, os compostos 2-benzil-4H-piran-4-ona (**S-6**) e flavasperona (**S-7**) apresentaram atividades citotóxicas moderadas com os valores de DL₅₀ 247,02±0,83 µg/mL e 235,65±0,78 µg/mL, sendo estes valores superiores ao do lapachol que foi utilizado como controle positivo. Por fim, a uridina (**S-12**) mostrou-se inativo (DL₅₀ 1.511,06±0,99), uma vez que as larvas de *A. salina* mantiveram-se vivas na presença do nucleosídeo após a realização deste ensaio. Os resultados dos ensaios antimicrobianos e de citotoxicidade preliminar frente à *A.salina* de **S-6**, **S-7** e **S-12** estão resumidos no Quadro 12.

Quadro 12 Resultados dos ensaios antimicrobianos e de citotoxicidade preliminar frente à *A. salina* para a 2-benzil-4H-piran-4-ona (**S-6**), flavasperona (**S-7**) e uridina (**S-12**).

Substâncias	Bactérias (CIM em µg/mL)					DL ₅₀ em µg/mL
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S.aureus</i>	<i>A.salina</i>
S-6	7,81 (-)	7,81(-)	7,81 (-)	62,5 (-)	31,25 (-)	247,02±0,83
S-7	7,81 (-)	7,81(-)	7,81 (-)	15,62 (-)	15,62 (-)	235,65±0,78
S-12	>500	>500	>500	>500	15,62 (-)	1.511,06±0,99
Terramicina	7,81 (=)	7,81 (=)	7,81 (-)	7,81 (-)	7,81 (-)	
Lapachol						64,85±0,05

Legenda: CIM; - Bacteriostático, = Bactericida. *DOLABELA (1997), MEYER *et al.* (1982); DL₅₀ Dose Letal para matar 50% dos indivíduos; ±Desvio padrão.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo do metabolismo secundário de fungos é muito fascinante devido à diversidade das classes estruturais encontradas em uma única espécie do Reino Fungi e também a complexidade das substâncias isoladas, que exigem um bom desempenho de técnicas espectrométricas como o RMN para a elucidação estrutural delas. As espécies fúngicas são ainda grande produtores de substâncias biologicamente ativas, devido elas viverem em diversos habitats e estarem sempre em competição com outras espécies (seja com fungos ou com as bactérias, entre outras) pela sobrevivência.

Foram isoladas 56 linhagens fúngicas endofíticas da matriz vegeal *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* e 47 fungos de solo a partir deste trabalho. Após o isolamento, as linhagens foram avaliadas em bioensaio de atividade antimicrobiana e citotóxica preliminar frente à *Artemia salina* e preservadas e refrigeradas de acordo com o método descrito por Castellani (1967).

Os métodos utilizados (meio sólido-arroz- para os fungos endofíticos isolados da *B. guianensis* em estudo realizado por SANTOS (2010) e CORREA (2010) e método de Smedsgaar adaptado para as espécies fúngicas isoladas do solo e da matriz vegetal *M. acutistipula* var. *ferrea*) para seleção das linhagens de interesse mostraram-se eficientes, onde foi possível selecionar 17 linhagens fúngicas com atividades biológicas e perfil químico que evidenciaram a presença de metabólitos secundários nos extratos ativos.

Os cromatogramas obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) dos micro-extratos fúngicos evidenciam a variedade de metabólitos produzidos tanto por fungos de solo como por fungos endofíticos de *M. acutistipula* var. *ferrea*., sugerindo a presença de substâncias de diferentes classes químicas.

Na análise microbiológica dos micro-extratos dos fungos estudados, foi possível observar que os fungos de solo apresentaram melhores atividades que os fungos endofíticos da espécie vegetal *M. acutistipula* var. *ferrea* tanto nos ensaios antimicrobianos como no ensaio citotóxico preliminar frente à *Artemia salina*.

Dentre os micro-extratos, destacaram-se os dos fungos da Canga que apresentaram os melhores resultados em relação aos ensaios biológicos presentes

nesta Tese de Doutorado. Os resultados foram surpreendentes porque os fungos da Canga habitam uma região pobre em recursos para o desenvolvimento de espécies fúngicas e rica em minérios. Comparando os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD com os resultados dos ensaios biológicos, deve ser ressaltada a importância de se estudar os fungos FCN01 e FCN02 porque apresentaram compostos de classes químicas diferentes segundo a análise do perfil cromatográfico por CLAE/DAD e os micro-extratos destes fungos da Canga apresentaram boas atividades antimicrobianas e altas toxicidades.

Nos ensaios antimicrobianos, os micro-extratos dos fungos rizosféricos apresentaram boas atividades, destacando-se o fungo *Aspergillus* sp. FRIZ12. O fungo *Aspergillus* sp. FRIZ 12 mostrou-se bioativo até os últimos valores testados de CIM frente às bactérias *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* e também apresentou atividade bacteriostática até a concentração de 15,62 µg/mL frente à *Escherichia coli*. A referida espécie fúngica mostrou-se inativa frente ao ensaio citotóxico preliminar frente à *A. salina* e rico em metabólitos secundários na análise do seu perfil cromatográfico.

Observou-se também que o micro-extrato do fungo FMIC01 é pobre em seu perfil cromatográfico, não apresentando nem atividades antimicrobianas frente às bactérias testadas nem atividade citotóxica preliminar frente à *Artemia Salina*.

O método de extração das amostras fúngicas apresentou reprodutibilidade o que viabilizou a posterior utilização da ferramenta de análise quimiométrica (PCA) utilizando o conjunto de dados do espectrômetro de massas. O método de eluição gradiente desenvolvido se mostrou satisfatório; já que, após a obtenção dos fingerprints dos micro-extratos fúngicos, foi possível, não só o alinhamento das relações m/z , mas também sua utilização no modelo quimiométrica de separação por componentes principais.

Com a ferramenta de análise quimiométrica de classificação por componentes principais, observou-se que as amostras se reuniram em dois grupos com 7 micro-extratos em cada agrupamento conforme visualizado no gráfico de *scores*. Existiu um terceiro grupo formado somente pelo micro-extrato FRIZ11, significando que este fungo possui metabólitos secundários de classes químicas diferentes dos demais. O gráfico de *spots* confirma a tendência dos micro-extratos fúngicos agruparem-se de

acordo com o gráfico de *scores*, uma vez que a maioria dos *spots* ocupou basicamente dois quadrantes.

Na análise microbiológica dos extratos e/ou fases orgânicas do fungo endofítico *Aspergillus* sp. EJC08, os extratos EHA, EAA e FHIDROEMA-2 foram os mais ativos mediante as bactérias utilizadas. Em relação ao fungo endofítico *Exserohilum rostratum* 1.11 Er, destacam-se o extrato orgânico EAER e a fase orgânica FAEMER que apresentaram atividades moderadas nos ensaios antimicrobianos. Por fim, os extratos orgânicos hexânico e acetato de etila do fungo de solo *Aspergillus* sp. FRIZ12 apresentaram boas atividades antimicrobianas frente às bactérias testadas. Todos os extratos e/ou fases orgânicas dos fungos, que tiveram seu potencial químico estudado neste trabalho, mostraram-se inativos no ensaio de citotoxicidade preliminar frente à *A. salina*.

Os métodos de fermentação, extração e purificação empregados neste trabalho mostraram-se adequados para o isolamento de doze compostos, sendo dois inéditos. Outras substâncias já haviam sido isoladas de fungos endofíticos, mas foram os primeiros relatos de isolamento de alguns metabólitos secundários isolados de fungo de solo. Foram identificadas as seguintes substâncias:

- ✓ Cinco esteroides: ergosterol (**S-1**), peróxido de ergosterol (**S-2**), cerivisterol (**S-3**) e mistura de β -sitosterol (**S-4**) e estigmasterol (**S-5**);
- ✓ Duas pironas: 2-benzil-4H-piran-4-ona (**S-6**) e flavasperona (**S-7**);
- ✓ Duas lactonas: annularina I (**S-8**) e annularina J (**S-9**);
- ✓ Uma isocumarina: monocerina (**S-10**);
- ✓ Um carboidrato: 5-(hidroximetil)furfural (**S-11**);
- ✓ Um nucleosídeo: uridina (**S-12**).

Com exceção dos esteroides e do carboidrato por serem classes de substâncias de pouco relato na literatura com atividades biológicas significativas em relação aos ensaios biológicos realizados nesta Tese de Doutorado, todos os outros compostos isolados foram avaliados nos ensaios antimicrobianos e no ensaio de citotoxicidade preliminar frente à *A. salina*.

As annularinas I (**S-8**) e (**S-9**) e a monocerina (**S-10**) apresentaram atividades antimicrobianas moderadas e fracas atividades citotóxicas preliminares frente à *A. salina*, cujas atividades biológicas foram compatíveis com compostos da mesma

classe química. É importante destacar que **S-8** e **S-9** são produtos naturais inéditos e parece que a oxidação do C-11 em **S-9** diminuiu seu potencial biológico, visto que **S-8** mostrou-se ser um pouco mais ativa biologicamente que **S-9**.

A 2-benzil-4H-piran-4-ona (**S-6**) e a flavasperona (**S-7**) apresentaram boas atividades antimicrobianas e moderadas atividades citotóxicas preliminares frente à *A. salina*. É importante destacar que foi o segundo relato de isolamento de **S-6** como produto natural, já que é um composto obtido de síntese orgânica. O composto **S-7** é típico de linhagens fúngicas do gênero *Aspergillus*, mas foi a primeira vez que ele foi isolado de um fungo de solo. Já, a uridina (**S-12**) mostrou-se ativa somente no ensaio antimicrobiano frente à *Staphylococcus aureus*.

Assim sendo, torna-se imprescindível o desenvolvimento de novos métodos cromatográficos que permitam o isolamento de produtos naturais de diversas classes químicas de origem fúngica, uma vez que os fungos são fontes promissoras de metabólitos secundários com atividades biológicas de grande interesse para indústrias farmacêuticas. Além disso, é fundamental também estudar a influência dos diversos habitats para a absorção de nutrientes por parte dos fungos, levando os mesmos a produzirem uma variedade de compostos bioativos responsáveis por diversos tipos de atividades, dentre elas a antimicrobiana e a citotóxica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, ed. 3. Academic Presse: Nova Iorque, 1988.
- ALEXANDER, M.. **Introduction to Soil Microbiology**. John Wiley: Nova Iorque, 1977.
- ALLSOP, D.; SEAL, K.J. **Introduction to Biodeterioration**. Edward Arnold: Londres, 1986.
- ALMEIDA, S.S.M.S. Estudo químico e biológico das folhas e das cascas do caule de *Bauhinia guianensis*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2003.
- AMINOV, R.I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in Microbiology**, v. 01, n. 134, p.01-07, 2010.
- AN, C-Y.; LI, X-M.; LI, C-S.; WANG, M-H.; XU, G-M.; WANG, B-G. Phenyl-3,4-dihydroquinolone derivatives from *Aspergillus nidulans* MA-143, an endophytic fungus isolated from the mangrove plant *Rhizophora stylosa*. **Journal of Natural Products**, v.76, n.10, p. 1896-1901, 2013a.
- AN, C-Y.; LI, X-M.; LI, C-S.; WANG, M-H.; XU, G-M.; WANG, B-G. Aniquinazolines A-D, four new quinazolinone alkaloids from marine-derived endophytic fungus *Aspergillus nidulans*. **Marine Drugs**, v. 11, p. 2682-2694, 2013b.
- ANDRIOLLI, A.C.; SANTOS, D.S.; TEIXEIRA, S.C.G.; TEIXEIRA, L.R.; BERALDO, H.; ZIOLLI, R.L. Avaliação do potencial citotóxico de 2-piridinoformamida tiossemicarbazonas e de seus complexos de Fe(III) utilizando *Artemisa salina*. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 08, n. 02, p. 19-23, 2007.
- ANDREOLA, F.; FERNANDES, S.A.P. A microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo das culturas, cap. 02, p. 21-37 in SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**, 2007.
- ARAUJO, M. **Bacillus subtilis**. 2010. Disponível em: <http://www.infoescola.com/reino-monera/bacillus-subtilis/>. Acesso em 25 Mai. 2014.
- ARBIQUE, J. **Commensals and Pathogens: E. coli and E. coli O157**. 2007. Disponível em: http://microbiology.suite101.com/article.cfm/e_coli_and_e_coli_O157#ixzz0YwVte7z. Acesso em: 27 Jan. 2014.
- ARDUÍNO, M.J. **Staphylococcus aureus**. 2010. Disponível em: "http://www.extension.org/pages/28432/staphylococcus-aureus#.UzDxu_IdX_k". Acesso em: 25 Mar. 2014.
- AXFORD, L.C.; SIMPSON, T.J.; WILLIS, C.L. Synthetis and incorporation of the polyketide synthase free intermediate in monocerin biosynthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 06, p. 727-730, 2004.

BARBIERI, C.; BOSSI, L.; D'ARRIGO, P.; FANTONI, G.P.; SERVI, S. Bioreduction of aromatic ketones: Preparation of chiral benzyl alcohols in both enantiomeric forms. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 04, p. 415-421, 2001.

BARNEBY, C.R. **Sensitive Censitae: a description of the genus *Mimosa* L. (Mimosaceae) in the New World**. New York Botanical Garden: Nova Iorque, 1991.

BASHYAL, B. P.; BURNS, A. M.; LIU, M. X.; PARANAGAMA, P. A.; SELIGA, C. J.; TURBYVILLE, T. J.; WIJERATNE, E. M. K.; ZHAN, J.; GUNATILAKA, M. K.; ARNOLD, A.E.; FAETH, S. H.; WHITESELL, L.; GUNATILAKA, A. A. L.; Discovery of small molecule bioactive agents from endophytic fungi of the Sonoran Desert. **Grassland Research and Practice Series**, v. 13, p. 211-214, 2007.

BATTA, A.K.; XU, G.; HONDA, A.; MIYAZAKI, T.; SALEN, G. Stigmasterol reduces plasma cholesterol levels and inhibits hepatic synthesis and intestinal absorption in the rat. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 55, n. 03, p. 292-299, 2006.

BEEBE, K.R.; PELL, R.J.; SEAHOLTZ, M.B. **Chemometrics: a principal guide**. John Wiley and Sons: New York, 1998.

BEISSWENGER, C.; HESS, C.; BALS, R. *Aspergillus fumigatus* conidia induce interferon- β signalling in respiratory epithelial cells. **European Respiratory Journal**, v. 39, p. 411-418, 2012.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 03, p. 497-516, 2003.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v.58, n. 01, p. 01-26, 2005.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 03, p. 426-438, 2011.

BLUNDELL, K.B.E. **Collins Photo Guide to the wild flowers of the East Africa**. Harer Collins Publshers, 1992 *apud* COSTA, E.V.M. Estudo fitoquímico e farmacológico de *Bauhinia guianensis* Aubl. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 1999.

BOHLIN, L.; BRUHN, J. **Biossay Methods in natural product research and drug development**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999.

BOONPHONG, S.; KITTA KOOP, P.; ISAKA, M.; PITTAYAKHAJONWUT, D.; TANTICHAOREN, M.; THEBTARANONTH, Y. Multiplolides A and B, new antifungal 10-membered lactones from *Xylaria multiplex*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 07, p. 965-967, 2001.

BORGES, F.C. Estudo químico do fungo *Exserohilum rostratum* (1.11 Er) isolado como endofítico de *Bauhinia guianensis*, ensaios antimicrobianos e avaliação do potencial de biotransformação. **Tese de Doutorado**. Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará. Belém-PA: 2012.

BOSSCHE, H.V.; MACKENZIE, D.W.R.; CAUWENBERGH, G. **Aspergillus and Aspergillosis**. Plenum Press: New York., 1988.

BRASILEIRO, B.G.; PIZIOLO V.R.; RASLAN, D.S.; JAMAL, C.M.; SILVEIRA D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 195-202, 2006.

BUNYAPAIBOONSRI, T.; YOIPROMMARAT, S.; SRIKITIKULCHAI, P.; SRICHOMTHONG, K.; LUMYONG, S. Oblongolides from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. BCC 9789. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 01, p. 55 - 59, 2010.

CABRAL, G. **Staphylococcus aureus**. Equipe Brasil escola. 2008. Disponível em: <http://www.brasilecola.com/biologia/staphylococcus-aureus.htm>. Acesso em: 06 Mar. 2014.

CÂMARA, M.R. Biomassa de Artêmia na carcinicultura: repercussões ambientais, econômicas e sociais. **Panorama da Aquicultura**, v. 14, n. 82, p. 40-45, 2004.

CAMARGO-RICALDE, S.L.; GREYER, R. Germinación, dispersión y establecimiento de plântulas de *Mimosa tenuiflora* (Leguminosae) em México. **Revista de biologia tropical**, v. 46, p. 543-554, 1998.

CAMARGO-RICALDE, S.L.; GARCÍA-GARCÍA, V. El género *Mimosa* L. (Fabaceae) y la restauración ecológica. **Contactos**, v. 39, p. 34-42, 2001.

Canga hematítica. Disponível em "<http://www.forumcarajas.org.br/>". Acesso em: 31 Jan. 2015.

CARVALHO, J.M. Estudo químico do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* e avaliação da atividade leishmanicida e antimicrobiana de extratos de fungos endofíticos isolados de *Virola michelli*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais. Belém-PA, 2014.

CARVALHO, V.A.P. Caracterização química por cromatografia líquida e análise quimiométrica de espécies de *Bauhinia* com aplicação em controle de qualidade de amostras comerciais de "pata-de-vaca". **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Exatas e de Tecnológicas, Departamento de Química. São Carlos, 2011.

CARVALHO, P.O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M, CONTESSINI, F. J. E BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28, n. 04, p. 614-621, 2005.

CARVALHO, V.A.P. Caracterização química por cromatografia líquida e análise quimiométrica de espécies vegetais de *Bauhinia* com aplicação em controle de qualidade de amostras comerciais de "pata-de-vaca". **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Química, São Carlos-SP: 2011.

CARVALHO, W.; CANILLHA, L.; DA SILVA, S.S. Uso de biocatalisadores imobilizados: Uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, v. 23, p. 60-70, 2006.

CARUSO, T.; BEDINI, E.; CASTRO, C.; DE PARRILLI, M. Bronsted acidity of ceric ammonium nitrate in anhydrous DMF. The role of salt solvent in sucrose cleavage. **Tetrahedron**, v. 62, n. 10, p. 2350-2356, 2006.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in man in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 08, p. 181-184, 1967.

CAVALCANTE, M.F.; OLIVEIRA, M.C.C.; VELANDIA, J.R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 23, n. 01, p. 20-22, 2000.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos. **Química Nova**, v. 23, p. 680-885, 2000.

CECHINEL FILHO, V. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 10, p. 1347-1354, 2002.

CHAGAS, J.F.N.; VIANNA FILHO, M.D.M.; PESSÔA, L.M.; COSTA, S.S. Aspectos químicos e ecológicos de espécimes masculinos e femininos de *Cecropia* Loeffl. (Urticaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 06, n. 02, p. 432-452, 2014.

CHATURVEDULA, V.S.P.; PRAKASH, I. Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. **International Current Pharmaceutical Journal**, v. 01, n. 09, p. 239-242, 2012.

CHEN, B.; SHEN, Q.; ZHU, X.; LIN, Y.; The anthraquinone derivatives from the fungus *Alternaria* sp. XZSBG-1 from the Saline Lake in Bange, Tibet, China. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16529-16542, 2014a.

CHEN, M.; FU, X-M.; KONG, C-J.; WANG, C-Y. Nucleoside derivatives from the marine-derived fungus *Aspergillus versicolor*. **Natural Product Research**, v. 28, n. 12, p. 895-900, 2014b.

CHENG, M-J.; WU, M-D.; CHEN, Y-C.; CHEN, J-J.; HISIEH, S-Y.; YUAN, G-F.; SU, Y-S. Metabolites isolated from an endophytic fungus of *Annulohyphoxylon elevatidiscus*. **Chemical of Natural Compounds**, v. 51, n. 01, p. 67-70, 2015.

CLARDY, J.; FISCHBACH, M.; CURRIE, C. The natural history of antibiotics. **Current Biology**, v. 19, n. 11, p. 437-441, 2009.

CLARK, F. E. Agar-plate method for total microbial count. Madison: **American Society of Agronomy**, v. 02, p. 1460-1466, 1965.

CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with Grasses. **American Naturalist**, v.160, p.99-127, 2002.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution and Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, ed.04, CLSI Approved Standard M7-A4: Wayne-PA, 1997.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution and Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, v.23, n.02, CLSI Approved Standard M7-A4: Wayne-PA, 2003.

CORRÊA, R.B. Perfil químico e avaliação de atividade antimicrobiana de extratos de fungos endofíticos de *Bauhinia guianensis*. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Belém-PA, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D.J. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 01, p. 07-24, 2005.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural Products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 03, p. 311-335, 2012.

CRAPEZ, M.A.C. Bactérias marinhas. *IN*: PEREIRA & SOARES-GOMES (Orgs). **Biologia Marinha**, ed. 01, p. 83-101. Editora Interciência: Rio de Janeiro, 2002.

CUI, C-M.; LI, X-M.; MENG, L.; LI, C-S.; HUANG, C-G.; WANG, B-G. 7-Nor-ergosterolide, a Pentalactone-Containing Norsteroid and Related Steroids from the marine-derived endophytic *Aspergillus ochraceus* EN-31. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 11, p. 1780-1784, 2010.

CÚNDOM, M.A.; GUTIÉRREZ, S.A.; CEJAS, P.; CABRERA, M.G. *Exserohilum rostratum* patógeno de *Caryota mitis* en Argentina. **Summa Phytopathol**, v. 32, n. 03, p. 277-279, 2006.

DECAMP, O.; MORIARTHY, D.J.W.P. A segurança dos probióticos para a aquicultura. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, v. 08, n. 02, p. 40-41, 2006.

DE-EKNAMKUL, W.; POTDUANG, B. Byosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. **Phytochemistry**, v. 62, n. 03, p. 389-398, 2003.

DEMAIN, A.L. Prescription for an ailing pharmaceutical industry. **Nature Biotechnology**, v. 20, n. 04, p. 231-235, 2002.

DING, G.; SONG, Y.C.; CHEN, J.R.; XU, C.; GE, H.M.; WANG, X.T.; TAN, R.X. Chaetoblobsin U, a cytochalasin alkaloid from endophytic *Chaetomium globosum* IFB-E019. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 02, p. 302-304, 2006.

DOCEGEO, R. AMAZÔNIA MINERAÇÃO S. A. **O Minério de Ferro da Serra dos Carajás**. IN: Amazônia Mineração S. A. Revisão litoestratigráfica da Província Mineral de Carajás: Proceedings of Congresso Brasileiro de Geologia 35th, p. 11-54, Sociedade Brasileira de Geologia: Belém, 1988.

DOLABELA, M. F. Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti Trypanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, 1997.

DONGLIANG, W.; TURGEON, G. *Setosphaeria rostrata*: Insights from the sequenced genome of *Setosphaeria turcica*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 61, p. 158-163, 2013.

DOURADO, D.A.O.; CONCEIÇÃO, A.S.; SANTOS-SILVA, J. O gênero *Mimosa* L. (Leguminosae-Mimosoideae) na APA Serra Branca/ Raso de Catarina, Bahia, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 04, p. 225-240, 2013.

DUTRA, V.F.; MORIM, M.P. *Mimosa*. IN.: Lista de Espécies da Flora do Brasil. 2010. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB023084>. Acesso em 31 Jan. 2015.

EAMVIJARN, A.; GOMES, N.M.; DETHOUP, T.; BUARUANG, J.; MANOCH, L.; SILVA, A.; PEDRO, M.; MARINI, I.; ROUSSIS, V.; KIJJOA, A. Bioactive meroditerpenes and indole alkaloids from the soil fungus *Neosartorya fischeri* (KUFC 6344), and the marine-derived fungi *Neosartorya laciniosa* (KUFC 7896) and *Neosartorya tsunodae* (KUFC 9213). **Tetrahedron**, v. 69, p. 8583-8591, 2013.

ENDALE, M.; EKBERGM A.; ALAO, J.P.; AKALA, H.M.; NDAKALA, A.; SUNNERHAGEN, P.; ERDÉLYI, M.; YENESEW, A. Anthraquinones of the roots of *Pentas micranta*. **Molecules**, v. 18, p. 311-321, 2013.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Springer-Verlag: Berlin, 1997.

FANG, B.; XIE, X.; LI, H.; JING, P.; GU, J.; SHE, X. Asymmetric total synthesis of (+)-monocerin. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 6349-6351, 2013.

FAO / OIE / WHO. Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. *IN: Report of a joint FAO /OIE/ WHO expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance*, p. 107. Seul South Korea, 2006.

FARIA, S.M.; MORAES, L.F.D.; LIMA, H.C.; RIBEIRO, R.D.; MATTOS, C.M.J.; RODRIGUES, T.M.; CASTILHO, A.F., CANOSA, G.A.; SILVA, M.A.P. Composição florística de leguminosas com potencial para fixação biológica de nitrogênio em áreas de vegetação de Canga (savana metalófito) do entorno do complexo minerador de Carajás. **Comunicado Técnico**. Seropédica: Rio de Janeiro, 2011.

FEDRIZZI, S. M. G. Produção de metabólitos antimicrobianos e sideróforos isolados provenientes de Terra Preta Antropogênica da Amazônia Ocidental. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. Piracicaba-SP, 2006.

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

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 05, p. 724-731, 1999.

FERREIRA, M.M.C. Multivariate QSAR. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 06, p. 742-753, 2002.

FERREIRA, C.S.; ROCHA, I.C.M.; NETO, R.L.M.; MELO, M.N.; FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. Influence of the nucleobase on the physicochemical characteristics and biological activities of the Sb^V -ribonucleoside complexes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 07, p. 1258-1265, 2010.

FERREIRA, V.F.; SILVA, F.C.; FERREIRA, P.G. Carboidratos como fonte de compostos para a indústria da química fina. **Química Nova**, v. 36, n.10, p.1514-1519, 2013.

FIDÊNCIO, P.H. Análise de solo por espectroscopia no infravermelho próximo e aplicação de métodos quimiométricos. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Química, Campinas-SP: 2001.

FONSECA, A.P.N.D.; SILVA, G.D.F.; CARVALHO, J.J.; SALAZAR, G.D.C.M.; DUARTE, L.P.; SILVA, R.P.; JROGE, R.M.; TAGLIATI, C.A.; ZANI, C.L.; ALVES, T.M.A.; PERES, V.; VIEIRA FILHO, S.A. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. **Química Nova**, v. 30, n. 04, p. 842-847, 2007.

FONTENELE, A.J.; CARVALHO, U.; MELO, V.M.M.; BRAGA, L.M.; AGUIAR, A.; MATOS, F.J.A. A avaliação da toxicidade de extratos de plantas medicinais através de bioensaio com *Artemia salina* Leach. **Ciência e Cultura**, v. 40, n. 11, p. 1109-1111, 1988.

FORGO, P.; KÖVER, K. Gradient enhanced selective experiments in the 1H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. **Steroids**, v. 69, n. 01, p.43-50, 2004.

FRANCISCO JUNIOR, W.E. Carboidratos: Estruturas, Propriedades e Funções. **Química Nova na Escola**, p. 08-13, 2008.

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

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**, ed. 02, p. 510-520. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro-RJ, 1999.

GALLO, M.B.C. Busca de produtos naturais bioativos em plantas das famílias Myrtaceae (*Siphonneugena densiflora* Berg) e Verbanaceae (*Vitex polygama* Cham.). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2005.

GALLO, M.B.C.; CHAGAS, F.O.; ALMEIDA, M.O.; MACEDO, C.C.; CAVALCANTI, B.C.; BARROS, F.W.A.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, V.; PESSOA, C.; BASTOS, J.K.; PUPO, M.T. Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, p. 142-151, 2009.

GAO, H.; GUO, W.; WANG, Q.; ZHANG, L.; ZHU, M.; ZHU, T.; GU, Q.; WANG, W.; LI, D. Aspulvinones from a mangrove rhizosphere soil-derived fungus *Aspergillus terreus* GWq-8 with anti-influenza A viral (H1N1) activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 1776-1778, 2013a.

GAO, H.; ZHU, T.; LI, D.; GU, Q.; LIU, W. Prenylated indole diketopiperazine alkaloids from a mangrove rhizosphere soil derived fungus *Aspergillus effuses* H1-1. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, p. 952-956, 2013b.

GAUTHIER, G.M.; KELLER, N.P. Crossover fungal pathogens: the biology and pathogenesis of fungi capable of crossing kingdoms to infect plants and humans. **Fungal Genetics and Biology**, v. 61, p. 146–157, 2013.

GEO-CONCEIÇÃO. **Recursos Minerais**. Disponível em: <http://geoconceicao.blogspot.com.br/2010/05/recursos-minerais.html>. Acesso em: 31 Jan. 2015.

GHOSH, T.; MAITY, T.K.; SINGH, J. Evaluation of antitumor activity of stigmasterol, a constituent isolated from *Bacopa monnieri* Linn aerial parts against Ehrlich Ascites Carcinoma in mice. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v. 11, n. 01, p. 41-49, 2011.

GOEL, A.; RAM, V.J. Natural and synthetic 2H-pyran-2-ones and their versatility in organic synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 65, n. 38, p. 7865-7913, 2009.

GOMES, R.L.; MEREDITH, W. Conjugated steroids: analytical approaches and applications. **Anal Bioanal Chemistry**, v. 393, n. 02, p. 453-458, 2009.

GORST-ALLMAN, D.P.; STERN, P.S.; RABIE, C.J. Structural elucidation of the nigerones, four new naphthopyrones from cultures of *Aspergillus niger*. **Journal of Chemistry Society**, p. 2474-2479, 1980.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 03, p. 667-679, 2010.

HAIR, J.F.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L.; BLACK, W.C. **Análise multivariada de dados**. Ed. 05. Editora Bookman: São Paulo, 2005.

HASSAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 06, p. 782-798, 2009.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**, v. 95, p. 641-655, 1991.

HEMBERGER, Y.; XU, J.; WRAY, V.; PROKSCH, P.; WU, J.; BRINGMANN, G. Pestalotiopsis A and B: Stereochemically challenging flexile sesquiterpene-cyclopaldic acid hybrids from *Pestalotiopsis* sp. **Chemistry a European Journal**, v. 19, p. 15556-15564, 2013.

HIRATA, L. **Superbactérias em ação**. 2008. Disponível em: www.revistavivaasaude.uol.com.br. Acesso em: 12 Fev. 2014.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D. Screening of some plants used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 07, p. 1027-1031, 2002.

HUANG, X.; HUANG, H.; LI, H.; SUN, X.; HUANG, H.; LU, Y.; LIN, Y.; LONG, Y.; SHE, Z. Asperterpenoid A, a new sesterterpenoid as an inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase B from the culture of *Aspergillus* sp. 16-5c. **Organic Letters**, v. 15, n. 04, p. 721-723, 2013.

HUANG, Z.; SHAO, C.; CHEN, Y.; SHE, Z.; LIN Y. Pyrones in metabolites of marine mangrove endophytic fungus (No ZZF79) from the South China Sea. **School of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 46, n. 04, p. 113-115, 2007.

INOUE, M.H.; SANTANA, D.C.; VILHUENA, K.S.S.; SOUZA FILHO, A.P.S.; GUILHON G.M.S.P.; POSSAMAI, A.C.S.; SILVA, L.E.; DALLACORT, R. Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas em sementes de *Araticum* (*Annona crossiflora*). **Planta Daninha**, v. 28, n. 04, p. 735-741, 2010.

ISHII, T.; NONAKA, K.; SUGA, T.; MASUMA, R.; OMURA, S. Cytosporone S with antimicrobial activity, isolated from the fungus *Trichoderma* sp. FKI-6626. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 679-681, 2013.

JAMAL, A.K.; YAACOB, W.A.; DIN, L.B. A chemical study on *Phyllanthus columnaris*. **European Journal of Scientific Research**, v. 28, n. 01, p. 76-81, 2009.

JIANG, Z.; WANG, Y.; JIANG, Y.; XU, Y.; MENG, B. Vertebral osteomyelitis and epidural abscess due to *Aspergillus nidulans* resulting in spinal cord compression: Case report and literature review. **Journal of International Medical Research**, v. 41, n. 02, p. 502-510, 2013.

JOUDA, J-B.; KUSARI, S.; LAMSHÖFT, M.; TALONTSI, F.M.; MELI, C.D.; WANDJI, J.; SPITELLER, M. Peniadilins A-C with strong antibacterial activities from *Penicillium sp.*, an endophytic fungus harboring leaves of *Garcinia nobilis*. **Fitoterapia**, v. 98, p. 209-214, 2014.

KAHLOS, K.; HILTUNEN, R. Antitumor activity of extracts and compounds from *Inonotus radiatus*. **Fitoterapia**, v. 60, n. 02, p. 166-168, 1989.

KEARNS, K. S.; LOUDIS B. *Aspergilosis aviar*. IN.: Recent Advances in Avian Infectious Diseases. **International Veterinary Information Service**. Ithaca: New York, 2003.

KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNETT, J. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 03, p. 937-947, 2005.

KIM, J.A.; TAY, D.; BLANCO, E.C. NF-KB inhibitory activity isolated from *Cantharellus cibarius*. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 1104-1106, 2008.

KJER, J.; WRAY, V.; EDRADA-EBEL, R.; EBEL, R.; PRETSCH, A.; LIN, W.H.; PROKSCH, P. Xanalteric acids I and II and related phenolic compounds from an endophytic *Alternaria sp.* isolated from the mangrove plant *Sonneratia alba*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n.11, p. 2053–2057, 2009.

KOWALSKI, B.R. **Chemometrics: Mathematical and Statistics in Chemistry**. Riedel Publishing Company: Dordrecht, 1984.

KOWALSKI, B.R.; BENDER, C.F. Pattern recognition. A powerful approach to interpreting chemical data. **Journal of the American Chemical Society**, v. 94, p. 5632-5639, 1972.

KUMAR, T.; CHANDRASHEKAR, K.S. *Bauhinia purpurea* Linn.: A review of its ethnobotany, pharmacology, phytochemical and pharmacological profile. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 05, n. 04, p. 420-431, 2011.

KURAKOV, A. V.; NECHITAILO, T. Y.; GOLYSHIN, P. N.; ZVYAGINTSEV, D.G. Diversity of facultatively anaerobic microscopic mycelial fungi in soils. **Microbiology**, v. 77, n. 01, p. 90-98. 2008.

LAFORET, E.P. El género *Aspergillus*: Métodos, claves y referencias actuales para las especies comunes em clínica diversos. **Boletín Micológico**, v. 23, 2008.

LAGE, G.A. Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Exatas, Belo Horizonte: 2011.

LÀSZLÓ, F. **O milagroso óleo de abacate extravirgem**, 2012. Disponível em http://laszlo.ind.br/admin/artigos/arquivos/Oleo_de_Abacate_Laszlo.pdf. Acesso em 03 Jun. 2015.

LEDNICER, D. **Strategies for Organic Drug Synthesis and Design**. John and Sons: Toronto, 1998.

LEWIS, G.; SCHRINE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World**. Kew: Royal Botanic Gardens, p.577, 2005.

LI, C.; NITKA, M.V.; GLOER, J.B.; CAMPBELL, J.; SHEARER, C.A. Annularins A-H: new polyketide metabolites from the freshwater aquatic fungus *Annulatascus triseptatus*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1302-1306, 2003.

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

LI, R.; CHEN, S.; NIU, S.; GUO, L.; YIN, J.; CHE, Y. Exserolides A-F, new isocoumarin derivatives from the plant endophytic fungus *Exserohilum sp.* **Fitoterapia**, v. 96, p. 88-94, 2014.

LI, T.S.C. **Taiwanese native medicinal plants: phytopharmacology and therapeutic values**. New York: Taylor and Francis, 2006.

LI, X.; GUO, Z.; DENG, Z.; YANG, J.; ZOU, K. A new α -pyrone derivative from endophytic fungus. **Record of Natural Products**, v. 09, n. 04, p. 503-508, 2015.

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

LIANDA, R.L.P. Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Química, Rio de Janeiro: 2009.

LIANG, Z.; ZHANG, T.; ZHANG, X.; ZHANG, J.; ZHAO, C. An alkaloid and a steroid from the endophytic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Molecules**, v. 20, n. 01, p. 1424-1433, 2015.

LICHTENTHALER, F.W.; PETERS, S. Carbohydrates as green raw materials for the chemical industry. **Comptes Rendus Chimie**, v. 07, n. 02, p. 65-90, 2004.

LIMA, S.M.A. Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria ACTMS-9H isolada da rizosfera de *Paullinia cupana* Kunth. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2013.

LIU, D.; LI, X-M.; MENG, L.; LI, C-S.; GAO, S-S.; SHANG, Z.; PROKSCH, P.; HUANG, C-G.; Nigrapyrone derivatives A-H, α -pyrone derivatives from the marine mangrove-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* MA-132. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1787-1791, 2011.

LONGO JUNIOR, L.S.; BOMBONATO, F.I.; FERRAZ, H.M.C. Métodos de preparação de lactonas de anel médio. **Química Nova**, v. 30, n. 02, p. 415-424, 2007.

LUCAS, E.M.F.; CASTRO, M.C.M.; TAKAHASHI, J.A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* VAN BEYMA. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 785-789, 2007.

LUCAS, A.S. Propriedades antitumorais do cogumelo do sol. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Fundação Herbário de Saúde e Pesquisa. Frederico Westphalen, 2008.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G.. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. [Journal of Ethnopharmacology](#), v. 97, n. 02, p. 199-206, 2005.

LUO, Z.; HE, F.; FAN, H.Y.; WANG, X.H.; HUA, M.; HU, F.C.; LI, X.H. First report of leaf spot disease caused by *Exserohilum rostratum* on pineapple in Hainan Province, China. **Plant Disease**, v. 96, n. 03, p. 458-459, 2012.

MA, Y.Q.; YE, X.Q.; FANG, Z.X.; CHEN, J.C.; XU, G.H.; LIU, D.H. Phenolic compounds and antioxidante activity of extracts from ultrasonic treatment of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5682-5690, 2008.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J. **Brock Biology of Microorganisms**, ed.11, Prentice Hall, 2005.

MAHAJAN, G.B.; BALACHANDRAN, L. Antibacterial agents from actinomycetes- A review. **Frontiers in Bioscience**, n. 01, p. 240-253, 2012.

MARINHO, A.M.R.; MARINHO, P.S.B.; FILHO, E.R. Constituintes químicos de *Penicillium* sp., um fungo endofítico isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Revista de Ciências Exatas e Naturais**, v. 09, n. 02, p. 190-199, 2007.

MARINHO, A.M.R.; RODRIGUES-FILHO, E. Dicitrinol, a citrinin dimer, produced by *Penicillium janthinellum*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 94, n. 05, p. 835-841, 2011.

MARTINS, L.R.R.; PEREIRA, E.R.; CASS, Q.B. Chromatographic profiles of *Phyllanthus* aqueous extracts samples: a proposition of classification using chemometric models. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 02, p. 469-481, 2011.

MARTINS, J.E.C.; MELO, N.T.; HEINS-VACCARI, E.M. **Atlas de micologia médica**, p. 39-45. Edltora Manole: Barueri – SP, 2005.

MBAMBO, B.; ODHAV, B.; MOHANLALL, V. Antifungal activity of stigmasterol, sitosterol and ergosterol from *Bulbine natalensis* Baker (Asphodelaceae). **Journal of Medicinal Plants**, v. 06, n. 38, p. 5135-5141, 2012.

McDONALD, K.L.; COHEN, M.L.; HARGETT-BEAN, N.; WELLS, I.G.; PUHR, N.D.; COLLIN, S.F.; BLAKE, P.A. Changes in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from humans in the United States. **Journal of the American Medical Association**, v. 258, n. 11, p. 1496-1499, 1987.

McGARVEY, P.B.; HUANG, H.; MAZUMDER, R.; ZHANG, J.; CHEN, Y.; ZHANG, C.; CAMMER, S.; WILL, R.; ODLE, M.; SOBRAL, B.; MOORE, M.; WU, C.H. **Systems integration of biodefense omics data for analysis of pathogen-host interactions and identification of potential targets**, 2009. Disponível em: <http://www.proteomicsresource.org/Resources/viewOrganismSt.aspx>. Acesso em: 13 Mar. 2014.

McLAUGHLIN, J.L.; ROGERS, L.L.; ANDERSON, J.E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p. 513-524, 1998.

METWALY, A.M.; KADRY, H.A.; EL-HELA, A.A.; MOHAMMAD, A-E.I.; MA, G.; CUTLER, S.J.; ROSS, S.A. Nigrosphaerin A a new isochromene derivative from the endophytic fungus *Nigrospora sphaerica*. **Phytochemistry Letters**, v. 07, p. 01-05, 2014.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 456-460, 1982.

MILLER, J.N.; MILLER, J.C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. Ed. 06. Pearson Education Limited: Harlow, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria MS no 518/2004**. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/portaria_518_2004.pdf. Acesso em 29 Abr. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE Brasil. **Resolução- RDC nº 275 de 22 de setembro de 2005**. Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília-DF, 23 de setembro de 2005. Acesso em 27 Mar. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. Acesso em 23 Ago. 2015.

MIRZAEI, M.R.; ZARE, R. HEYDARI, A.; NARAGHI, L.; MOHAMMADI, M. First report of boll and lint rot disease of cotton caused by *Exserohilum rostratum* in Iran. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, n. 04, p. 107-122, 2010.

MISIEK, M.; HOFFMEISTER, D. Fungal genetics, genomics, and secondary metabolites in pharmaceutical sciences. **Planta Medica**, v. 73, n. 02, p. 103-115, 2007.

MOLINARI, G. Natural products in drug discovery: Present status and perspectives. **Pharmaceutical Biotechnology – Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 655, p. 13-27, 2009.

MONTEIRO, M. A. Meio século de mineração industrial na Amazônia e suas implicações para o desenvolvimento regional. **Estudos Avançados**, v. 19 n. 53, p. 187-207, 2005.

MORAES, M.D'A. **Mimosa acutistipula var. ferrea Barbeby**. 2012. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/ptbr/profile/Mimosa%20acutistipula%20var.%20ferrea> Acesso em 28 Mai. 2015.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**, ed.2, v.7, Editora UFLA: Lavras (MG), 2006.

MORGANO, M.A.; QUEIROZ, S.C.N.; FERREIRA, M.M.C. Application of exploratory analysis to the differentiation of vegetables. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 02, p. 73-79, 1999.

MOSADEGHZAD, Z.; ZURIATI, Z.; ASMAT, A.; GIRES, U.; WICKNESWARI, R.; PITTAYAKHAJONWUT, P.; FARAHANI, G.H.N. Chemical constituents and bioactivity of the marine-derivative fungus *Paecilomyces* sp. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 49, n. 04, p. 621-625, 2013.

MOURA, A.C.S.; VILEGA, W.; SANTOS, L.C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, n. 07, p. 1136-1140, 2011.

MOUTINHO, S. **Nem tão pura assim**, 2011. Disponível em: <http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/2011/05/nem- tao-pura- assim> [?searchterm=Nem%20t%C3%A3o%20pura%20assim](http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/2011/05/nem- tao-pura- assim?searchterm=Nem%20t%C3%A3o%20pura%20assim) . Acesso em 25 Mar. 2014.

MOUTINHO, S. Ação Implacável. **Ciência Hoje**, 2015. Disponível em: <http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/2015/01/acao-implacavel>. Acesso em 28 Mai. 2015.

MUELLER, G.M.; SCHMIT, J.P.; LEACOCK, P.R.; CIFUENTES, J.; DESJARDIN, D.E.; HALLING, R.E.; HJORSTAM, K.; ITURRIAGA, T.; LARSSON, K-H.; LODGE, D.J.; WAY, T.W.; MINTER, D.; RAJCHENBERG, M.; REDHEAD, R.A.; RYVARDEN, L.; TRAPPE, J.M.; WATLING, R.; WU, Q. Global diversity and distribution of macrofungi. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 01, p. 37-48, 2007.

MUNDAY-FINCH, S.C.; WILKINS, A.L.; MILES, C.O. Isolation of lolicine A, lolicine B and lolitrem N from *Lolium perenne* infected with *Neotyphodium lolii* and evidence for

the natural occurrence of 31-epilobem N and 31-epilobem F. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 02, p. 590-598, 1998.

MURRAY, P.R.; ROSSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**, ed.06, Elsevier Editora Ltda: 2009.

MURRAY, P.R.; ROSSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**, ed.05, Elsevier Editora Ltda: 2006.

MUSSI-DIAS, V.; ARAÚJO, A.C.O.; SILVEIRA, S.F.; ROCABADO, J.M.A.; ARAÚJO, K.L. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 14, n. 02, p. 261-266, 2012.

NASSER, A.L.M.; PAVAN, F.R.; BORALLE, N.; ZOCCOLO, G.J.; SANTOS, L.C.; MARCHI, M.R.R.; LEITE, C.Q.F.; VILEGAS, W. Esteróide e triterpenos de espécies de *Quaera* – Bioatividade sobre *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 34, n. 04, p. 513-517, 2013.

NAUMANN, D. **Infrared Spectroscopy in Microbiology**. IN.: Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley and Sons: Chichester, 2000.

NETO, B.D.B.; SCARMINO, I.C.S.; BRUNS, R.E. 25 years of chemometrics in Brazil. **Química Nova**, v. 29, n. 06, p. 1401-1406, 2006.

NICOLAOU, K.C.; MONTAGNON T. **Molecules that changed the world**, cap. 13, Wiley VCH: Weinheim, 2009.

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

NIÑO, J.; NARVÁEZ, D. M.; MOSQUERA, O. M.; CORREA, Y. M.. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from colombian biodiversity. [Brazilian Journal of Microbiology](#), v. 37, p. 566-570, 2006.

NOGUEIRA, A.C.O.; SABINO, C.V.S. Revisão do gênero *Bauhinia* abordando aspectos científicos das espécies *Bauhinia forficata* Link e *Bauhinia variegata* L. de interesse para a indústria farmacêutica. **Revista Fitos**, v. 07, n. 02, p. 77-84, 2012.

OHM, R.A.; FEAU, N.; HENRISSAT, B.; SCHOCH, C.L.; HORWITZ, B.A.; BARRY, K.W.; CONDON, B.J.; COPELAND, A.C.; DHILLON, B.; GLASER, F.; HESSE, C.N.; KOSTI, I.; LABUTTI, K.; LINDQUIST, E.A.; LUCAS, S.; SALAMOV, A.A.; BRADSHAW, R.E.; CIUFFETTI, L.; HAMELIN, R.C.; KEMA, G.H.; LAWRENCE, C.; SCOTT, J.A.; SPATAFORA, J.W.; TURGEON, B.G.; DE WIT, P.J.; ZHONG, S.; GOODWIN, S.B.; GRIGORIEV, I.V., Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen dothideomycetes fungi. **PLoS Pathogens**, v. 08, n.12, 2012.

OLIVEIRA, B.H.; OLIVEIRA, K.B. Obtenção de substâncias bioativas através da biotransformação de produtos naturais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.9, n.1, p.89-99, 2012.

PATRICK, G.L. **An introduction to medicinal chemistry**, 4th ed, cap.10 e cap.16, Oxford University Press: Nova Iorque, 2009.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil Microbiology and Biochemistry**. Academic Press: São Diego, 1989.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, ed.2, Makron Books: São Paulo, 1996.

PENG, W.; YOU, F.; LI, X-L.; JIA, M.; ZHENG, C-J.; HAN, T.; QIN, L.P. A new diphenyl eter from the endophytic fungus *Verticillium sp.* isolated from *Rehmannia glutinosa*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 05, p. 673-675, 2013.

PHILIPS, A.J. Treatment of non-albicans *Candida* vaginitis with amphotecerin B vaginal suppositories. **American Journal of Obsterics and Gynecology**, v. 192, n. 06, p. 2009-2012, 2005.

PIMENTA, E.F. Investigação das condições de crescimento e de produção de metabólitos secundários das linhagens de fungos *Penicillium citrinum* e *Penicillium oxalicum*. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos-SP, 2010.

PINHEIRO, E.A.A.; CARVALHO, J.W.; SANTOS, D.C.P.; FEITOSA, A.O.; MARINHO, P.S.B.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, L.S.; SOUZA, A.D.L.; MARINHO, A.M.R. Chemical constituents of *Aspergillus sp.* EJC 08 isolated an endophyte from *Bauhinia guianensis* and their antimicrobial activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 85, n. 04, p. 1247-1252, 2013.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**, ed. 02, Blackie Academic: London, 1997.

POLTRONIERI, L.S.; VERVIGNASSI, J.R.; BENCHIMOL, R.L.; FREIRE, F.C.O. Primeiro registro de *Exserohilum rostratum* (anamorfo de *Setosphaeria rostrata*) causando manchas foliares em açaizeiro no Brasil. **Summa Phytopathol**, v. 34, n. 02, p. 195, 2008.

POPPI, R.J. Quantificação de picos cromatográficos superpostos por métodos de calibração multivariada. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Química, Campinas-SP: 1989.

POWELL, K.A.; RENWICK, A.; PEBERDY, J. **The genus *Aspergillus*: from taxonomy and genetics to industrial application**, 1994.

PRADO, A.G.S. Química Verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, n. 05, p. 738-74, 2003.

PRIETO, K.R. Estudo químico de *Alternaria alternata* patótipo tangerina em meio artificial e na interação com *Guignardia citricarpa*. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2012.

PROJETO FERRO CARAJÁS S11D. 2013. Disponível em: <http://www.vale.com/PT/initiatives/innovation/s11d/Documents/book-s11d-2013-pt.pdf>. Acesso em 28 Mai. 2015.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C.; VIEIRA, P.C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 06, p. 1446-1455, 2007.

QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da caatinga**. Editora Universitária da Universidade Estadual de Feira de Santana: Feira de Santana, 2009.

QUINTANILLA, R.H.R.; PINTO, A.C. Constituintes químicos e propriedades biológicas do gênero *Serjania*. **Revista Virtual de Química**, v. 06, n. 06, p. 1583-1606, 2014.

RAHBAEK, L.; CHRISTOPHERSEN, C.; FRISVAD, J.; BENGAARD, H.S.; LARSEN, S.; RASSING, B.R. Insulicolide A: a new nitrobenzoyloxy-substituted sesquiterpene from the marine fungus *Aspergillus insulicola*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 08, p. 811-813, 1997.

RAKOTONIRIANA, E.F.; MUNAUT, F.; DECOCK, C.; RANDRIAMAMPIONONA, D.; ANDRIAMBOLOLOLONIAINA, M.; RAKOTOMALALA, T.; RAKOTONIRINA, E. J.; RABEMANANTSOA, C.; CHEUK, K.; RATSIMAMANGA, S. U.; MAHILLON, J.; EL-JAZIRI, M.; QUETIN-LECLERCQ, J.; CORBISIER, A. M. Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 93, n. 01-02, p. 27-36, 2007.

RAMLI, I.; HAMZAH, A.S.; AIMI, N.; LAHS, N.H. Chemical constituents of *Vitex ovata* (Verbenaceae). **Pertanika Journal of Science and Technology**, v. 05, n. 01, p. 105-109, 1997.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1109-1143, 2005.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; BRESOLIN, R.A.C. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. Ed. 02, Graphel Gráfica e Editora Lages: Lages, 2004.

REETZ, E.R. **Anuário brasileiro de fruticultura 2007 / ERNA**. Editora Gazeta: Santa Cruz do Sul, 2007.

RIBEIRO, F.A.L.; MANTOVANI, G.A.; POPPI, R.J. PCA: Uma ferramenta para identificação de traçadores químicos para água de formação e água de injeção associadas à produção de petróleo. **Química Nova**, v. 36, n. 09, p. 1281-1287, 2013.

RIBEIRO, M.; PINTO, I.; PEDROSA, C. Comportamento da população do concelho de Vizela no consumo de antibióticos. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 27, n. 02, p. 57-70, 2009.

RINALDO, D. Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores- *Neea theifera* Oersted (Nyctaginaceae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara-SP: 2007.

RODRIGUEZ JR., R.J.; WHITE, F.J.F.; ARNOLD, A.E.; REDMAN, R.S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 182, n. 02, p. 314–330, 2009.

RODRIGUES, L.H. Análise de metabólitos em culturas de *Pestalotiopsis sp.* e *Aspergillus aculeatus*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2006.

ROSTIROLLA, D.C. Uridina monofosfato quinase (EC 2.7.4.22) de *Mycobacterium tuberculosis* como alvo para desenvolvimento de drogas. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

RUBEL, R. Produção de compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação em estado sólido: Avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba: 2006.

RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 02, p. 205-211, 2004.

SAKAI, K.; OHTE, S.; OHSHIRO, T.; MATSUDA, D.; MASUMA, R.; RUDEL, L.L.; TOMODA, H. Selective inhibition of Acyl-CoA: cholesterol Acyltransferase 2 Isozyme by Flavasperone and Sterigmatocystin from *Aspergillus* species. **The Journal of Antibiotics**, v. 61, n. 09, p. 568-572, 2008.

SALLES, J.M.C.; SALLES, M.J.C. **Antimicrobianos (Antibacterianos, Antifúngicos, Antivirais, Antiparasitários)- Quando indicar, Como usar**. Editora Universitária da Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2000.

SANT'ANNA Jr., G.L. Produção de enzimas microbianas In: BOLZANI, W.; SCHIMIDEL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. Editora Edgar Blücher, São Paulo, p. 351-362, 2001.

SANTOS, D.C.P. Perfil químico e ensaios antimicrobianos de fungos endofíticos isolados de *Bauhinia guianensis*. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade do Estado do Pará, Centro de Ciências Sociais e de Educação, Belém-PA: 2010.

SANTOS-SILVA, J.; SALES, M.F. **Diversidade e potencial econômico de *Mimosa L.* (Leguminosae-Mimosoideae) em Pernambuco, Brasil**. IN: Biodiversidade,

potencial econômico e processos ecofisiológicos em ecossistemas nordestinos, p. 283-313. NUPEEA: Recife, 2010.

SAPPAPAN, R.; SOMMIT, D.; NGAMROJANAVANICH, N.; PENGPRRECHA, S.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PUDHOM, K. 11-Hydroxymonocerin from the plant endophytic fungus *Exserohilum rostratum*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1657-1659, 2008.

SCHARDL, C.L.; LEUCHTMANN, A.L.; SPIRRING, M.J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. **Annual Reviews Plant Biology**, v. 55, p. 315-340, 2004.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 06, p. 661 - 686, 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A-K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 09, p. 996 - 1004, 2002.

SECCO, R.S.; MESQUITA, A.L. Nota sobre a vegetação de Canga da Serra do Norte. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, Nova Série Botânica, v. 59, p. 01-13, 1983.

SHAABAN, M.; NASR, H.; HASSAN, A.Z.; ASKER, M. *Aspergillus fumigatus*: structural elucidation and bioactivity studies. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 41, n. 01, p. 50-60, 2013.

SHAN-HAI, L.; SI-LIANG, H.; QI-QIN, L.; CHUN-JIN, H.; GANG, F.; LI-PING, Q.; YUE-FENG, M.; LING, X.; ZHEN-LU, C.; WEI-HONG, Y. Characterization of *Exserohilum rostratum*, a new causal agent of banana leaf spot disease in China. **Australian Plant Pathology**, v. 40, n. 03, p. 246-259, 2011.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, ed. 01, p.388. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004.

SILVA, F.F.M. Distribuição de metais pesados na vegetação metalófila de Carajás. **Acta Botânica Brasileira**, v. 06, n. 01, p. 107-122, 1992.

SILVA, G.H. Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria sp.*, *Phomopsis cassiae* e *Acremomyium sp.* associados com espécies vegetais de cerrado. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2005.

SILVA, K.L.; CECHINEL-FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 03, p. 449-454, 2002.

SILVA, M.E. Comunidades fúngicas endofítica, epifítica e rizosférica em diferentes ecossistemas. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2006.

SILVA, N.L.; ZOBIOLE, N.N.; SILVA, D.B.; SARTORI, A.L.B.; OLIVEIRA, R.J.; PINTO, M.E.A.; SANTOS, F.J.L.; SIQUEIRA, J.M. Constituintes químicos e atividade fitotóxica das folhas de *Annona nutans*. **Química Nova**, v. 38, n. 05, p. 640-644, 2015.

SILVA, S.C. Estudo químico de micro-organismos associados a *Khaya ivorensis* (Meliaceae). **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2007.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Ed 07. LTC: Rio de Janeiro, 2007.

SIMÕES, V.N.; FAVARIN, L.R.V.; CABEZA, N.A.; OLIVEIRA, T.D.; FIORUCCI, A.R.; STROPA, J.M.; RODRIGUES, D.C.M.; CAVALHEIRO, A.A.; ANJOS, A. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga(III). **Química Nova**, v. 36, n. 04, p. 495-501, 2013.

SIMON, M.F.; GREYER, R.; QUEIROZ, L.P.; SARKINEN, T.E.; DUTRA, V.F.; HUGHES, C.E. The evolutionary history of *Mimosa* (Leguminosae): Toward a phylogeny of the sensitive plants. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 07, p. 1201-1221, 2011.

SIQUEIRA, F.S.A. Mecanismos de resistência a β -Lactâmicos em *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista do Biomédico**, v. 24, p. 275-278, 2002.

SIRIWARDANE, A.M.D.A.; KUMAR, N.S.; JAYASINGHE, L.; FUJIMOTO, Y. Chemical investigation of metabolites produced by an endophytic *Aspergillus* sp. isolated from *Limonia acidissima*. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 29, p. 14, p. 01-04, 2015.

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

SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, p. 273 - 286, 2005.

SMITH, M.B. **March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure**, ed 07. John Wiley and Sons: New York, 2013.

SOARES, I.A.; FLORES, A.C.; ZANETTIN, L.; PIN, H.K.; MENDONÇA, M.M.; BARCELOS, R.T.; TREVISOL, L.R.; CARVALHO, R.D.; SCHAUREN, D.; ROCHA, C.L.M.S.; BARONI, S. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 03, p. 700-705, 2010.

SOLOMONS, T.W.G. **Química Orgânica**, v. 02, ed. 10, Editora LTC: Rio de Janeiro, 2012.

SONG, X-Q.; ZHANG, X.; HAN, Q-J.; LI, X-B.; LI, G.; LI, R-J.; JIAO, Y.; ZHOU, J-C.; LOU, H-X. Xanthone derivatives from *Aspergillus sydowii*, an endophytic fungus from the livewort *Scapania ciliata* S. Lac and their immunosuppressive activities. **Phytochemistry Letters**, v. 06, p. 318-321, 2013.

SONG, Y.C.; LI, H.; YE, Y.H.; SHAN, C.Y.; YANG, Y.M.; TAN, R.X. Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. **Microbiology Letters**, v. 241, p. 64-72, 2004.

SOUZA, E.M.C. Estudo químico e investigação do potencial biocatalítico do fungo endofítico *Pestalotiopsis sp.* EJC 07 isolado de *Bauhinia guianensis*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2014.

SPINDOLA, S. Ocorrência de *Escherichia coli* em culturas de urina no setor de microbiologia do Pam Antônio Ribeiro Netto. **Ambulatório do Pam Antônio Ribeiro Netto**, p. 01-12, 2006.

STADLER, M.; SCHULZ, B. High energy biofuel from endophytic fungi? **Trends Plant Science**, v. 14, n. 07, p. 353–355, 2009.

STINSON, E.E.; OSMAN, S.F. PFEFFER, P.E. Structure of altertoxin I, a mycotoxin from *Alternaria*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 47, n. 21, p. 4110-4113, 1982.

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

STROHL, W.A.; ROUSE, H.; FISHER, B.D. **Microbiologia ilustrada**. Artmed: Porto Alegre, 2004.

TAN, R.X.; JENSEN, P.R.; WILLIAMS, P.G.; FENICAL, W. Isolation and structure assignments of rostratins A-D, cytotoxic disulfides produced by the marine-derived fungus *Exserohilum rostratum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 08, p. 1374-1382, 2004.

TANIWAKI, M.H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Núcleo de Microbiologia / ITAL: Campinas, 2001.

TANJI, T. Elas estão por toda a parte. **Galileu**, 2015. Disponível em <http://revistagalileu.globo.com/Revista/noticia/2015/02/elas-estao-por-toda-parte.html>. Acesso em 02 Jun. 2015.

TASSINARI, C.C.G.; BETTENCOURT, J.S.; GERALDES, M.C.; MACAMBIRA, M.J.C.; LAFON, J.M.. The Amazonian Craton, In CORDANI, U.G.; MILANI, E.J.; THOMAZ-FILHO, A.; CAMPOS, D.A. (eds.). **Tectonic Evolution of South America**, p. 41-99, International Geological Congress: Rio de Janeiro, 2000.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**, ed.3. Editora Atheneu: São Paulo, 2001.

TEVA, A.; MORAES, A.M.L.; RIBEIRO, F.C.; FERNANDEZ, J.C.C.; NOGUEIRA, J.M.R.; CARNEIRO, L.A.D.; MIGUEL, L.F.S.; OLIVEIRA, M.B.S.C.; STEPHENS, P.R.S.; PAES, R.A.; SILVA, V.L.; HOLANDA, V.L. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**, EPSJC: Rio de Janeiro, 2009.

TRISUWAN, K.; RUKACHAISIRIKUL, V.; BORWORNWIRIYAPAN, K.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J. Benzopyranone, benzophenone, and xanthone derivatives from the soil fungus *Penicillium citrinum* PSU-RSPG95. **Tetrahedron letters**, v. 55, p. 1336-1338, 2014.

VALADÃO, I.B.; Estudo químico e biológico de fungos endofíticos associados com a alga vermelha *Dichotomaria marginata* (Galaxauraceae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara-SP: 2012.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 09, n. 04, p. 113-148, 2008.

VIMAL, V.; RAJAN, B.M.; KANNABIAN, K. Antimicrobial activity of marine actinomycete, *Nocardioopsis* sp. VITSVK 5 (FJ973467). **Asian Journal of Medical Sciences**, v. 01, n. 02, p. 57-63, 2009.

WANG, F.; HAN, S.; HU, S.; XUE, Y.; WANG, J.; XU, H.; CHEN, L.; ZHANG, G.; ZHANG, Y. Two new secondary metabolites from *Xylaria* sp. cfcc 87468. **Molecules**, v. 19, n. 01, p. 1250-1257, 2014.

WEI, W.; JIANG, N.; MEI, Y.N.; CHU, Y.L.; GE, H.M.; SONG, Y.C.; NG, S.W.; TAN, R.X. An antibacterial metabolite from *Lasiodiplodia pseudotheobromae* F2. **Phytochemistry**, v. 100, p. 103-109, 2014.

WESCHENFELDER, W.J. **Cidadania Ambientalativa**, 2009. Disponível em: http://biowilson.blogspot.com/2009_04_12_archive.html. Acesso em: 28 Fev. 2014.

WOLD, S.; SJÖSTROM, M. Chemometric, present and future success. **Chemometric and Intelligent Laboratory Systems**, v. 44, p. 03-14, 1998.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 02, n. 01-03, p. 37-52, 1987.

WU, B.; OESKER, V.; WIESE, J.; SCHMALJOHANN, R.; IMHOLF, J.F. Two new antibiotics pyridines produced by a marine fungus *Trichoderma* sp. strain MF106. **Marine Drugs**, v. 12, n. 03, p. 1208-1219, 2014.

WULANSARI, D.; JAMAL, Y.; PRAPTIWI, A.A. Pachybasin, a major metabolite from the culture broth of endophytic Coelomyceteous AFKR-18 fungus isolated from a yellow moonseed plant, *Arcangelisia flava* (L.) Merr. **Journal of Biosciences**, v. 21, n. 02, p. 95-100, 2014.

XIAO, Z.; HUANG, H.; SHAO, C.; XIA, X.; MA, L.; HUANG, X.; LU, Y.; LI, Y.; LONG, Y.; SHE, Z. Asperterpenols A and B, new sesterterpenoids isolated from a mangrove endophytic fungus *Aspergillus sp.* 085242. **Organic Letters**, v. 15, n. 10, p. 2522-2525, 2013.

ZAWACKI, F.J.; CRIMMINS, M.T. A convenient synthesis of unsymmetrical substituted γ -pyrones from Meldrum's acid. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 36, p. 6499-6502, 1996.

ZAMBONI-PINOTTI, M. M. Seleção de antagonistas para o controle de *Botrytis cinerea* em Framboeseiro, Amoreira e Morangueiro. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul-RS, 2005.

ZHANG, M.; ZHAO, Q.; LIANG, Y-Y.; MA, J-H.; CHEN, L-X.; ZHANG, X.; DING, L-Q.; ZHAO, F.; QIU, F. Stereo- and regioespecific biotransformation of curcumenol by four fungal strains. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 13-19, 2015.

ZHANG, Q.; WANG, S-Q.; TANG, H-Y.; LI, X-J.; ZHANG, L.; XIAO, J.; GAO, Y-O.; ZHANG, A-L.; GAO, J-M. Potential allelopathic indole diketopiperazines produced by the plant endophytic *Aspergillus fumigatus* using the one strain-many compounds method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 47, p. 11447-11452, 2013.

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

ZHENG, L.; WATSON, D.G.; JOHNSTON, D.F.; CLARK, R.L.; ELSEHERI, W. A chemometric study of chromatograms of tea extracts by correlation optimization warping in conjunction with PCA, support vector machines and random forest data modeling. **Analytica Chimica Acta**, v. 642, n. 01-02, p. 257-265, 2009.

ZHOU, M.; LOU, J.; LI, Y-K.; WANG, Y-D.; ZHOU, K.; JI, B-K.; DONG, W.; GAO, X-M.; DU, G.; HU, Q-F. Versicolos A and B, two new prenylated isocoumarins from endophytic fungus *Aspergillus versicolor* and their cytotoxic activity. **Archives of Pharmacal Research**, p.01-05, 2015.