



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

JORGEFFSON DA SILVA CORDEIRO*

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO FUNGO ENDOFÍTICO
SCEDOSPORIUM APIOSPERMUM DE *Bauhinia guianensis* E DE FUNGOS DA
SERRA DE CARAJÁS.**

Orientador: Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Santana Barbosa Marinho.

*Bolsista FAPESPA/ VALE

BELÉM-PA

2016



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

JORGEFFSON DA SILVA CORDEIRO

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO FUNGO ENDOFÍTICO
SCEDOSPORIUM APIOSPERMUM DE *Bauhinia guianensis* E DE FUNGOS DA
SERRA DE CARAJÁS.**

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



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

JORGEFFSON DA SILVA CORDEIRO

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO FUNGO ENDOFÍTICO
SCEDOSPORIUM APIOSPERMUM DE *Bauhinia guianensis* E DE FUNGOS DA SERRA DE
CARAJÁS.**

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

Data: 17/06/2016

Banca Examinadora

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

Prof. Dr^a. Patrícia Santana Barbosa Marinho
Instituto de Ciências Exatas e Naturais/UFPA – Co-orientadora

Prof. Dr. Agnaldo da Silva Carneiro
Instituto de Ciências da Saúde/UFPA – Membro

Prof. Dr. Alcy Favacho Ribeiro
Universidade Federal do Pará/ Ananideua – Membro

Prof. Dr. Heriberto Rodrigues Bitencourt
Instituto de Ciências Exatas e Naturais/UFPA – Membro

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

Belém-PA

2016

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

Cordeiro, Jorgeffson da Silva, 1976-

Estudo químico e atividade antibacteriana do fungo endofítico *scedosporium apiospermum* de *bauhinia guianensis* e de fungos da serra de carajás. / Jorgeffson da Silva Cordeiro. - 2016.

Orientador: Andrey Moacir do Rosario Marinho;

Coorientadora: Patrícia Santana Barbosa.

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

1. Fungos. 2. Fungos de solo. 3. Fungo endofítico. 4. Fitoquímicos. 5. Agentes antiinfeciosos. I. Título.

CDD 22. ed. 579.5

AGRADECIMENTOS

Certamente estes parágrafos não conseguirão abranger todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase da minha vida. Assim, peço desculpas caso algum nome não seja mencionado, mas dedico meu sincero agradecimento a todos aqueles que me auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho.

Primeiramente agradeço a Deus pelo seu amor infinito e por ter me dado força e sabedoria para continuar nos meus momentos mais difíceis. Agradeço a minha esposa Ericka Ingrid dos Santos Magno Cordeiro, por toda sua dedicação e força que me deu, neste período e em toda nossa vida juntos.

A meus filhos, Wesley, Welyson e Eshila Cordeiro, que trazem tanta luz e gosto para minha vida, um amor especial. Vocês são a lição mais profunda que vivi de ética, dignidade e amor... Os mesmos souberam compreender todas as minhas buscas – as existenciais e as teóricas – sendo atentos, ternos, poemas.

Quero agradecer, em especial, ao Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho, que sem entender porque, aceitou e deu voto de confiança a algo que alguns acharam uma loucura, outros impossível e outros sonho. Sua paciência, incentivo e amizade, juntamente com a Prof. Dr^a. Patrícia Santana Barbosa Marinho, mudaram minha vida acadêmica e tornaram tudo isso possível.

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

À VALE e À FAPESPA, pelo apoio financeiro.

À SEDUC-PA, por me conceder a licença aprimoramento.

Aos meus colegas do LaBQuiM, André de Oliveira Feitosa, Josiwander Miranda Carvalho, José Edson S. Siqueira, Eleane Monaliza de Cerqueira de Souza, Luciano Almeida Watanabe, Gisele da Costa Ramos, pelo companheirismo, paciência e ajuda nos momentos de pesquisa e parte laboratorial do trabalho.

Em especial, agradeço a Eduardo Antonio Abreu Pinheiro, pelo auxílio prestado no dia a dia do laboratório e, principalmente, pelas orientações e sugestões ao meu trabalho.

. Muito Obrigado!

“Sem luta não pode haver vitória. Se não existissem as dificuldades, os esforços seriam inúteis; se não houvesse o sofrimento e provações, não existiriam a paciência e a resignação”

Alberto Montalvão

“Quando morremos, nada pode ser levado conosco, com exceção das sementes lançadas por nosso trabalho e do nosso conhecimento”

Dalay Lama

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B.D.A	Batata-Dextrose-Ágar
B.H.I	Brain Heart Infusion
B.O.D	Biochemical oxygen demand
CBM	Concentração bactericida mínima
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCVU	Cromatografia em Coluna por Via Úmida
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CDDEP	Center for Disease Dynamics, Economics e amp; Policy
CD₃OD	Metanol deuterado
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjos de diodos
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CNPJ	Cadastro Nacional de Pessoa Jurídica
COSY	Correlation Spectroscopy
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
<i>dddd</i>	Duplo duplo duplo dupleto
<i>dt</i>	Duplo tripleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAMS	Extrato acetato de etila meio sólido
EHMS	Extrato hexânico meio sólido
EMMS	Extrato metanólico meio sólido
EJC	Escada de Jabuti (caule)
EJCP	Escada de Jabuti (cipó)
EJF	Escada de Jabuti (folha)
MS	Espectrometria de Massas

EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por electrospray
FAPESPA	Fundação Amazônica de Amparo a Estudos e Pesquisas do Pará
FCMC	Fungos do caule da <i>Mimosa acutistipula var. férrea</i>
FCN	Fungos da Canga
FDA	Food and Drug Administration
FFMC	Fungos das folhas da <i>Mimosa acutistipula var. férrea</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FMFe	Fungos da mina FeN ₄ W Norte
FMIC	Fungo Micorrízico
FRIZ	Fungo Rizosférico
FSF	Fungo do Solo da Floresta
HETCOR	Heteronuclear Correlated Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
J	Constante de acoplamento em Hz
LABQuiM	Laboratório de Bioensaio e Química de Micro-organismos
m	Multiplete
MHz	Mega Hertz
MPEG	Museu Paraense Emílio Goeldi
MRM	Monitoramento de Reação Múltipla
MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
m/z	Relação Massa/Carga
ng	Nanograma
nm	Nanometro
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.	Página
P.A.	Para Análise
pH	Potencial Hidrogeniônico
PN	Produtos Naturais
ppm	Partes por Milhão
quint.	Quinteto

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
r	Coeficiente de correlação
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
δ_C	Deslocamento dos sinais de carbono em ppm
δ_H	Deslocamento dos sinais de hidrogênio em ppm
s/	Singleto largo
t	Tripleto
t_R	Tempo de retenção
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
UEPA	Universidade do Estado do Pará
UFPA	Universidade Federal do Pará
UV	Ultravioleta
v.	Volume
var.	Variedade

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Paclitaxol, substância anticancer produzida pelo fungo <i>T. andreanae</i>	28
Figura 02 – Metabólitos secundários isolados de <i>P. esclerotiorum</i>	33
Figura 03 – Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos.	38
Figura 04 – Metabólitos secundários voláteis produzidos por <i>Trichoderma sp.</i>	43
Figura 05 – Peptaibol produzido por <i>Trichoderma pseudokoningi</i>	44
Figura 06 – Gêneros de Leguminosae com maior número de espécies depositadas no Herbário da Amazônia Meridional, Alta Floresta, Mato Grosso.	48
Figura 07 – Presença de <i>Mimosa acutistipula var. ferrea</i> nos diferentes estratos da vegetação xerofítica na Floresta Nacional de Carajas, Pará.	51
Figura 08 – Fisionomia abustiva (A) e Graminoide (B) de Canga de carajas.	51
Figura 09 – Principais serras ferríferas inseridas na Floresta Nacional de Carajás e seus respectivos corpos de minério de ferro.	55
Figura 10 – Diagrama de um espectrômetro de massas	56
Figura 11 – Fotografias da espécie vegetal <i>Mimosa acutistipula var. ferrea</i> e dos solos estudados.	72
Figura 12 – Processo de assepsia das folhas e dos caules de <i>Mimosa acustistipula var. ferrea</i>	73
Figura 13 – Processo de isolamento de fungos endofíticos de <i>Mimosa acustistipula var. ferrea</i>	74
Figura 14 – Processo de isolamento dos fungos de solo (Método de Clark adaptado)	76
Figura 15 – Processo de isolamento de fungos do solo em placas de Petri	76
Figura 16 – Extração de metabólitos secundários em micro-escala.	76
Figura 17 – Placa de Petri inoculada com o fungo endofítico <i>Scedosporium apiospermum</i> . com cinco dias de idade frente (A) e verso (B) em BDA.	78
Figura 18 – Placa de Petri inoculada com o fungo de solo <i>Trichoderma sp.</i> Com cinco dias de idade frente (A) e verso (B) em BDA.	78
Figura 19 – Crescimento das colônias do fungo endofítico <i>Scedosporium apiospermum</i> . em meio sólido (arroz) no dia da incubação.....	79
Figura 20 – Crescimento das colônias do fungo endofítico <i>Scedosporium apiospermum</i> . EJCP13 em meio sólido (arroz) após 28 dias de incubação.	79
Figura 21 – Reação de redox do TCC.	95

Figura 22 – Gráficos de fungos da <i>M. acutistipula var. ferrea</i> e de solo da Serra de Carajás.	100
Figura 23 – Banda de integração gerada pelo equipamento da substância brefeldina A do extrato AcOEt.	105
Figura 24 – Banda de integração gerada pelo equipamento da substância brefeldina A do extrato hexânico	105
Figura 25 – Banda de integração gerada pelo equipamento da substância brefeldina A do extrato MeOH-1	106
Figura 26 – Banda de integração gerada pelo equipamento da substância brefeldina A do extrato MeOH-2	106
Figura 27 – Curva de calibração da Brefeldina A (50-1000 ng mL ⁻¹) a 760 nm.....	107
Figura 28 – Resíduo da curva de calibração da Brefeldina A (50-1000 ng mL ⁻¹) a 760 nm.....	107
Figura 29 – Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FRIZ07 em gradiente exploratório em 268 nm	109
Figura 30 – Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FRIZ08 em gradiente exploratório em 268 nm.	110
Figura 31 – Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FRIZ09 em gradiente exploratório em 268 nm.	110
Figura 32 – Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FRIZ13 em gradiente exploratório em 268 nm	111
Figura 33 – Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FRIZ14 em gradiente exploratório em 268 nm	111
Figura 34 – Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FSF11 em gradiente exploratório em 268 nm	112

Figura 35 – Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FSF12 em gradiente exploratório em 268 nm	112
Figura 36 – Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FCN03 em gradiente exploratório em 268 nm.	113
Figura 37 – Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FCN05 em gradiente exploratório em 268 nm	114
Figura 38 – Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FMIC04 em gradiente exploratório em 268 nm	114
Figura 39 – Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FMIC15 em gradiente exploratório em 268 nm	115
Figura 40 – Substância E1	118
Figura 41 – Espectro de RMN de ^1H da substância E1 (CDCl_3 , 300 MHz)	119
Figura 42 – Estrutura da substância E2	121
Figura 43 – Espectro de RMN de ^1H de E2 (D_2O , 300 MHz).	123
Figura 44 – Espectro de RMN de ^{13}C 5'-inosil (D_2O /gotas de CD_3OD , 75 MHz).	124
Figura 45 – Estrutura da substância E3	125
Figura 46 – Espectro de RMN de ^1H de E3 (CDCl_3 , 300 MHz).	128
Figura 47 – Espectro de RMN de ^{13}C de E3 (CDCl_3 , 75 MHz).	129
Figura 48 – Estrutura da substância E4	130
Figura 49 – Correlações observadas no HMBC.	131
Figura 50 – Espectro de RMN de ^1H de E4 (CDCl_3 , 300 MHz)	133
Figura 51 – Espectro de RMN de ^{13}C de E4 (CDCl_3 , 75 MHz).	134
Figura 52 – Mapa de contorno HMBC de E4	135
Figura 53 – Estrutura da substância E5	136
Figura 54 – Espectro de RMN de ^1H de E5 (CD_3OD , 300 MHz)	138
Figura 55 – Espectro de RMN de ^{13}C de E5 (CD_3OD , 75 MHz).	139
Figura 56 – Espectro de COSY de E5	140
Figura 57 – Mapa de contorno de HETCOR de E5	141

Figura 58 – Estrutura da substância J1	142
Figura 59 – Espectro de RMN de ^1H de J1 (CDCl_3 , 300 MHz)	144
Figura 60 – Estrutura da substância J2	145
Figura 61 – Espectro de RMN de ^1H de J2 (CDCl_3 , 300 MHz)	147
Figura 62 – Espectro de RMN de ^{13}C de J2 (CDCl_3 , 75 MHz).....	148
Figura 63 – Estrutura da substância JA19	149
Figura 64 – Espectro de RMN de ^1H de JA19 (CDCl_3 , 300 MHz).....	151
Figura 65 – Espectro de RMN de ^{13}C de JA19 (CDCl_3 , 75 MHz).....	152
Figura 66 – Estrutura da substância JA29	153
Figura 67 – Espectro de RMN de ^1H de JA29 (CDCl_3 , 300 MHz).....	155
Figura 68 – Espectro de RMN de ^{13}C de JA29 (CD_3OD , 75 MHz).....	156
Figura 69 – Estrutura da substância JA24	159
Figura 70 – Espectro de RMN de ^1H de JA24 (CDCl_3 , 300 MHz).....	160
Figura 71 – Estrutura da substância D	161
Figura 72 – Espectro de RMN de ^1H de D (D_2O , 300 MHz).....	163
Figura 73 – Espectro de RMN de ^{13}C de D (D_2O , 75 MHz)	164
Figura 74 – Espectro de DEPT de D	165
Figura 75 – Substância JA e as principais correlações em COSY	167
Figura 76 – Substância JA e as principais correlações em HMBC.....	168
Figura 77 – Estrutura da substância JA	168
Figura 78 – Proposta de fragmentação de JA	169
Figura 79 – Espectro de RMN de ^1H de JA (CD_3OD , 300 MHz).....	171
Figura 80 – Espectro de RMN de ^{13}C de JA (CD_3OD , 75 MHz)	172
Figura 81 – Mapa de contornos COSY de JA	173
Figura 82 – Espectro de HSQC de JA	174
Figura 83 – Mapa de correlação HSQC ampliado de JA	175
Figura 84 – Mapa de correlação H-C a longa distancia (HMBC) de JA	176
Figura 85 – Espectro de massas dos íons filhos de m/z 281 de JA	177

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 01 - Obtenção dos extratos da biomassa produzida por <i>Scedosporium apiospermum</i>	81
Fluxograma 02 – Fracionamento do extrato hexânico do fungo endofítico <i>Scedosporium apiospermum</i>	83
Fluxograma 03 – Fracionamento do extrato AcOEt do fungo <i>Scedosporium apiospermum</i>	85
Fluxograma 04 – Partição líquido-líquido do extrato metanólico de EJCP13	86
Fluxograma 05 – Obtenção dos extratos da biomassa produzida por <i>Trichoderma</i> sp. FSF12.	89
Fluxograma 06 – Fracionamento do extrato AcOEt do fungo <i>Trichoderma</i> sp.	91
Fluxograma 07 – Fracionamento das frações juntas F11-F12	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Eluição em modo gradiente.....	88
Tabela 02 – Condições do espectrômetro de massas para (ESI+)	88
Tabela 03 – Determinação da atividade antibacteriana ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) do extrato MeOH de <i>S. apiospermum</i> e Brefeldina A contra cepas padrão de bactérias Gram positivas e Gram negativas.....	99
Tabela 04 – Determinação da atividade antimicrobiana ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) dos micro-extratos de fungos endofíticos da <i>M acutistipula var. ferrea</i> e de fungos de solo.....	102
Tabela 05 – Determinação da atividade antimicrobiana ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) da fração dos extratos orgânicos contra cepas padrão de bactérias Gram positivas e Gram negativas.	103
Tabela 06 – Valores obtidos de absorvância, concentrações e desvios padrão residuais para brefeldina A.....	108
Tabela 07 – Possíveis classes de metabólitos presentes nos micro-extratos dos fungos da Serra de Carajás correspondentes aos picos assinalados nos cromatogramas.	117
Tabela 08 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de E2 e comparação com dados da literatura.....	122
Tabela 09 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de E3 e comparação com dados da literatura.....	127
Tabela 10 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de E4 e comparação com dados da literatura.....	132
Tabela 11 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de E5 e comparação com dados da literatura.....	137
Tabela 12 – Atribuição dos sinais de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) para JA19 , J2 e JA29 juntamente com a comparação dos dados descritos na literatura de ergosterol, peróxido de ergosterol e cerivisterol, respectivamente.	157
Tabela 13 – Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) para JA19 , J2 e JA29 juntamente com a comparação dos dados descritos na literatura de ergosterol, peróxido de ergosterol e cerivisterol, respectivamente.	158

Tabela 14 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de D e comparação com dados da literatura	162
Tabela 15 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de JA e comparação com dados da literatura.....	170

RESUMO

CORDEIRO, J. S. **Estudo químico e atividade antibacterina do fungo endofítico *Scedosporium apiospermum* de *Bauhinia guianensis* e de fungos da Serra de Carajás**. Tese. Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2016.

Fungos endofíticos são micro-organismos que vivem em associação com a espécie hospedeira, e são uma promissora fonte de produtos naturais importantes. Não menos importantes os fungos de solo também, são capazes de produzir muitas substâncias de valor econômico. Deste modo, o trabalho a seguir teve como objetivo a obtenção de compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos de *M. acutistipula* var. *ferrea* e do solo da Serra de Carajás, além do endófito *S. apiospermum* do cipó da *Bauhinia guianensis* Aublet. da espécie *M. acutistipula* var. *ferrea*, foram isolados 56 fungos endofíticos e 64 fungos de solo. Foram selecionados, aleatoriamente, 12 fungos para serem reativados em placas de Petri contendo meio BDA. Após a reativação, foram obtidos os micro-extratos dos 12 fungos conforme a metodologia adaptada de Smedsgaar. Os micro-extratos foram avaliados por CLAE-DAD para determinação do perfil cromatográfico e, também, submetidos a ensaios antimicrobianos. O fungo FSF12 (*Trichoderma* sp.), selecionado após a triagem do perfil químico e biológica foi cultivado em escala ampliada em meio sólido (arroz) e levou ao isolamento de cinco substâncias: ácido graxo poliinsaturado (E1), 5'-inosil (E2), tirosol (E3), harzialactona A (E4) e 2-anidromevalônico (E5). Já em relação ao fungo EJCP13 (*S. apiospermum*), foram isolados os compostos triacil (J1), peróxido de ergosterol (J2), ergosterol (JA19), cerivisterol (JA29) e éster metílico (JA24), dulcitol (D) e Brefeldina A (JA). O composto brefeldina A apresentou importante atividade antimicrobiana e, também, mostrou ser o metabolito secundário majoritário nos extratos de *S. apiospermum*. Assim, resolveu-se quantificar essa substância nos extratos, o que corroboraram com os resultados, indicando a presença da brefeldina A somente nos extratos AcOEt e hexânico. O isolamento das substâncias foi realizado através de técnicas cromatográficas, como CCVU e, monitoramento, por CCDA. As estruturas químicas foram elucidadas com auxílio de técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H e ^{13}C , HMQC, HMBC) e espectrométrica (ESI-MS).

Palavras chaves: Fungos endofíticos e de solo, estudo químico e ensaio antimicrobiano.

ABSTRACT

CORDEIRO, J. S. **Study chemical and activity antibacterina fungus endophytic *Scedosporium apiospermum* of *bauhinia guianensis* and fungi of Carajás Saw.**

Thesis. Institute of Exact and Natural Sciences, the Graduate Program in Chemistry - Federal University of Pará, Belém - PA, 2016.

Endophytic fungi are microorganisms that lives in association with the host species, and they're a promising source of important natural products. With a equal importance, the soil fungi also are capable of producing so many substances of economic value. Thus, the following work was objective to obtain bioactive composts produced by endophytic fungi *M. acutistipula* var. *ferrea* and soil Carajás Saw, besides the endophytic *S. apiospermium* from liana of *Bauhinia guianensis* Auble. The species *M. acutistipula* var. *ferrea*, were isolated 56 endophytic and 64 soil fungi. They were randomly, selected, 12 fungi to be reactivated in Petri dishes containing PDA medium. After reactivating the micro-extracts of 12 fungi were obtained as the adapted methodology Smedsgaar. The micro-extracts were evaluated by HPLC-DAD to determine the chromatographic profile and, also, submitted antimicrobial testing. The FSF 12 (*trichoderma* sp.), selected after the screening of chemical and biological profile was grown on a large scale in a solid medium (rice) and led to the isolation of five substances: fatty acid polyunsaturated (E1), 5'-inosil (E2), tyrosol (E3), harzialactone A (E4) and 2-anhydro mevalonic (E5). In relation to the fungus EJCP13 (*S. apiospermium*) where compounds isolated, triacyl (J1), ergosterol peroxide (J2), ergosterol (JA19), cerivisterol (JA29), methylester (JA24), dulcitol (D), and brefeldin A (JA). The compound Brefeldin A showed significant antimicrobial activity and, also, proved to be the major secondary metabolite in extracts from *S. apiospermium*. Thus, it decides to quantify a substance in the extract, which corroborate results, which indicate the presence of brefeldin A only in AcOEt and the hexane extracts. The isolation of the substances was performed by chromatographic techniques, such as CCVU and, monitoring, by ADCC. The chemical structures were elucidated with the aid of spectroscopic (^1H and ^{13}C NMR, HMQC, HMBC), and spectrometric (ESI-MS).

Keywords: endophytic and soil fungi, chemical and antimicrobial test.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 PRODUTOS NATURAIS.....	27
3.2 FUNGOS.....	30
3.3 FUNGOS DO SOLO	31
3.3.1 Produtos naturais obtidos de fungos do solo	32
3.4 O POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS FUNGOS PRESENTES NO SOLO DA AMAZÔNIA	34
3.5 FUNGOS ENDOFÍTICOS	36
3.5.1 Produtos naturais obtidos de fungos endofíticos	37
3.5.2 Fungos do gênero <i>Trichoderma</i>	40
3.5.3 Produtos naturais produzidos por <i>Trichoderma</i>	42
3.5.4 <i>Scedosporium apiospermum</i>	45
3.6 MÉTODO DE MANUTENÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS	46
3.7 FAMÍLIAS DAS LEGUMINOSAE (FABACEAE)	47
3.7.1 Espécie hospedeira - <i>Bauhinia guianensis</i>	49
3.7.2 Espécie hospedeira - <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> Barneby	50
3.8 SERRA DE CARAJÁS	52
3.8.1 Inserção geográfica de Carajás	52
3.8.2 Histórico de estudos sobre a flora de Carajás	53
3.9 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	55
3.10 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD).....	57
3.11 ESTUDO DA QUANTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	58
3.12 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS	59
3.13 BACTÉRIAS.....	61
3.13.1 <i>Bacillus subtilis</i>	62
3.13.2 <i>Escherichia coli</i>	63
3.13.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
3.13.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	65
3.13.5 <i>Salmonella typhimurium</i>	65

3.14 MÉTODOS ANTIMICROBIANOS.....	66
3.14.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	67
4 METODOLOGIA.....	68
4.1 MATERIAIS.....	68
4.1.1 Equipamentos técnicos.....	68
4.1.2 Vidrarias e outros materiais.....	69
4.1.3 Meios de cultura.....	70
4.1.4 Solventes e substratos.....	70
4.2 MÉTODOS.....	71
4.2.1 Coleta da espécie <i>Bauhinia guianensis</i>	71
4.2.2 Processo de assepsia e de isolamento dos fungos endofíticos da <i>Bauhinia guianensis</i>	71
4.2.3 Coleta da <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> e do solo da Serra dos Carajás (PA).....	72
4.2.4 Processo de isolamento dos fungos endofíticos de <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i>	73
4.2.5 Processo de assepsia e de isolamento dos fungos do solo.....	74
4.2.6 Preservação e armazenamento dos fungos.....	75
4.2.7 Obtenção dos extratos em micro-escala para fungos da Serra de Carajás..	75
4.2.8 Obtenção do perfil químico dos micro-extratos por CLAE-PDA.....	77
4.2.9 Reativação do fungo endofítico <i>S. apiospermum</i> . e do fungo de solo <i>Trichoderma</i> sp. FSF12 do acervo da Micoteca do LaBQuiM.....	77
4.2.10 Cultivo do fungo <i>Scedosporium apiospermum</i> . isolado de <i>B. guianensis</i> .	78
4.2.11 Cultivo do fungo <i>Trichoderma</i> sp. FSF12 isolado de solo da Serra dos Carajás.....	80
4.2.12 Obtenção dos extratos do fungo <i>S. apiospermum</i> . EJCP13.....	80
4.2.13 Fracionamento do extrato bruto hexânico do fungo <i>Scedosporium apiospermum</i> . EJCP13.....	82
4.2.14 Fracionamento do extrato bruto AcOEt do fungo <i>Scedosporium apiospermum</i> . EJCP13.....	84
4.2.15 Fracionamento do extrato bruto MeOH-1 do fungo <i>Scedosporium apiospermum</i> . EJCP13.....	86
4.2.16 Análises Quantitativas.....	87
4.2.16.1 Quantificação da Brefeldina A nos extratos brutos de EJCP13.....	87
4.2.17 Obtenção dos extratos do fungo <i>Trichoderma</i> sp. FSF12.....	88

4.2.18 Fracionamento do extrato bruto AcOEt do fungo <i>Trichoderma</i> sp	89
4.2.19 Ensaios Antimicrobianos	93
4.2.19.1 Ativação das bactérias	93
4.2.19.2 Padronização da suspensão	94
4.2.19.3 Preparo das amostras	94
4.2.19.4 Ensaio para medir a concentração inibitória mínima (CIM).....	94
4.2.19.5 Leitura com revelador.....	95
4.2.19.6 Tipos de atividades antimicrobianas.....	96
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
5.1 RESULTADOS CONTRA BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS	97
5.1.1 Avaliação da atividade antibacteriana para o extrato MeOH e o etabólito secundário brefeldina A isolado do <i>S. apiospermum</i>	97
5.1.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	97
5.1.1.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)).....	98
5.2 RESULTADOS DO ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> E DE FUNGOS DE SOLO	100
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS MICRO-EXTRATOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> E DE FUNGOS DE SOLO	101
5.3.1 Resultados dos ensaios antimicrobianos para os extratos orgânicos do fungo do solo <i>Trichoderma</i> sp FSF12	103
5.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DO TEOR DE BREFELDINA A NOS EXTRATOS ORGÂNICOS	104
5.5 PERFIL CROMATGRÁFICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> E DE FUNGOS DE SOLO	109
5.5.1 Determinação das possíveis classes de metabólitos secundários presentes nos extratos fúngicos por meio de CLAE- DAD	109
5.6 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS PRODUZIDAS PELO ENDÓFITO DO GÊNERO <i>Thichoderma</i> sp.	118
5.6.1 Determinação estrutural da substância E1	118
5.6.2 Determinação estrutural da substância E2	120

5.6.3 Determinação estrutural da substância E3	125
5.6.4 Determinação estrutural da substância E4	130
5.6.5 Determinação estrutural da substância E5	136
5.7 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS PRODUZIDAS PELO ENDÓFITO <i>Scedosporium apiospermum</i>	142
5.7.1 Determinação estrutural da substância J1	142
5.7.2 Determinação estrutural da substância J2	145
5.7.3 Determinação estrutural da substância JA19	149
5.7.4 Determinação estrutural da substância JA29	153
5.7.5 Determinação estrutural da substância JA24	159
5.7.6 Determinação estrutural da substância D	161
5.7.7 Determinação estrutural da substância J	166
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	178
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	180

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a dificuldade e alto custo do desenvolvimento de novos fármacos, com diferenciado poder de atuação, tornou-se um grande desafio para a indústria farmacêutica o que desencadeou em um declínio no lançamento de novos fármacos no mercado (DEMAIN, 2014). Juntamente, com este problema, está o aparecimento de resistência aos medicamentos já utilizados, o surgimento de novas doenças e problemas com a toxicidade de alguns fármacos (reações adversas a medicamentos). Isto demonstra a enorme necessidade e aplicabilidade da triagem de micro-organismos para o descobrimento de novas classes de antimicrobianos (CAMPOS, 2009).

Os fungos têm sido bastante explorados como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico, tais como: enzimas, ácidos orgânicos, antibióticos, vitaminas, aminoácidos, esteróides e pigmentos (CHAKRABORTY et al., 2010). Esses pigmentos fúngicos, por sua vez, encontram aplicação como potenciais corantes para a indústria, além de apresentarem importantes propriedades farmacológicas, como atividade antimicrobiana, antioxidante, imunossupressora, antiviral, anticancerígena e redutora do colesterol (MOHARRAM et al., 2012).

Os fungos estão presentes em quase todos os ambientes da terra, onde a maior diversidade é encontrada. Nas regiões tropicais, o clima quente e úmido favorece a sua multiplicação (BLACKWELL, 2011). Entre os biomas tropicais, a floresta Amazônica contém a mais rica biodiversidade existente, com um grande número de plantas, animais e micro-organismos pouco conhecidos (CALDERON et al., 2009). O solo da floresta Amazônica, ao contrário do que se imagina, é pobre em nutrientes, e o que garante a manutenção de uma floresta tão rica é a inumerável diversidade microbiana presente no solo, que permite que a floresta se alimente dos seus próprios componentes vegetais e animais, através da reciclagem da matéria orgânica (MELO et al., 2012; PETIT et al., 2009; DE SOUZA et al., 2011). Por serem metabolicamente muito ativos, os fungos do solo são capazes de produzir muitas substâncias de valor econômico, incluindo enzimas de interesse industrial (KULKARNI; GUPTA, 2013), metabólitos com atividade farmacológica (TAKAHASHI, 2008) e, também, pigmentos (GUNASEKARAN; POORNIAMMAL, 2008).

Nas últimas décadas, diversas classes de produtos naturais foram isoladas e suas estruturas identificadas. A descoberta destas estruturas, juntamente com a elucidação dos mecanismos biológicos, bioquímicos e a ação terapêutica, tem permitido uma abordagem importante usada pelos químicos orgânicos e medicinais no desenvolvimento de novos fármacos. Os produtos naturais são fontes inestimáveis para o desenvolvimento de novos fármacos, sendo isolados principalmente de micro-organismos e plantas (CLARDY; WALSH, 2004; NEWMAN; CRAGG, 2004).

Nas últimas décadas os cientistas começaram a perceber que as plantas podem servir como reservatório de um número muito grande de organismos conhecidos, como endófitos (BACON; WHITE, 2000). Estes são, principalmente, fungos e bactérias (AZEVEDO et al., 2000) que habitam o interior de tecidos vegetais durante todo ou parte do seu ciclo de vida, sem causar-lhes danos visíveis (PETRINI, 1991; AZEVEDO et al., 2000).

Existem cerca de 300 mil espécies de plantas em nosso planeta, em todas as estudadas até o momento tem sido detectados micro-organismos endofíticos (STROBEL, 2003). Dentre as vantagens da interação endófito-hospedeiro está o fato do micro-organismo se beneficiar com proteção, alimentação e transmissão na planta, enquanto esta se favorece da promoção de crescimento, reprodução e resistência às alterações do ambiente (SAIKKONEN et al., 2004). Os benefícios obtidos pela planta hospedeira resultante das interações com os endófitos têm sido foco de diversos estudos, inclusive sobre a produção de metabólitos secundários que possuem propriedades de interesse (STROBEL; DAISY, 2003).

Por tudo isso, a grande diversidade de espécies de fungos amazônicos com potencial biotecnológico, somada à necessidade de buscar novos fármacos de fontes naturais e à carência de trabalhos que busquem o aproveitamento industrial de seus metabólitos, reforçam a importância de mais estudos para o conhecimento e desenvolvimento de nossa região.

Dentre as diversas fontes naturais, os metabólitos secundários de micro-organismos são citados como componentes estruturais e compostos biologicamente ativos importantes, o que torna os micro-organismos fontes promissoras na contínua busca de novas substâncias protótipos ao desenvolvimento de fármacos (DONADIO et al., 2002; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; STROBEL, 2003).

A vantagem em se trabalhar com produtos naturais produzidos por micro-organismos, e dentre eles os fungos, é a facilidade em cultivá-los em laboratório e em alterar suas condições de cultivo, além disso, ressalta-se que possuem rápido crescimento quando comparados com espécies vegetais e animais.

Neste contexto o grupo de pesquisa do LABQuiM da UFPA - Campu/Belém tem estudado fungos isolados do solo e das espécies vegetais da Amazônia e verificando através do estudo químico o potencial destas espécies na produção das mais diversas classes de produtos naturais, muitos com atividade biológica relevante. O presente trabalho teve por objetivo contribuir para o estudo químico e biológico do fungo *Scedosporium apiospermum* isolado do cipó da espécie *Bauhinia guianensis* Aublet., além dos fungos de solo e da espécie vegetal *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* Barneby da Serra de Carajás, no Estado do Pará.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo químico e antibacteriano dos extratos fúngicos metanólico, hexânico e acetato de etila, provenientes do fungo *Scedosporium apiospermum*, isolado do cipó da espécie *Bauhinia guianensis Aublet.*, além dos fungos de solo e da espécie vegetal *Mimosa acutistipula var. férrea* isolados da Serra de Carajás, no Estado do Pará.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar os fungos de solo e da espécie vegetal *Mimosa acutistipula var. ferrea* da Serra de Carajás;
- Selecionar os fungos que serão estudados através de uma triagem (*screening*) do perfil químico;
- Obter substâncias com atividade biológica do fungo endofítico *Scedosporium apiospermum* isolado da *Bauhinia guianensis Aublet.*;
- Isolar os compostos presentes nos extratos fúngicos do solo;
- Identificar os compostos isolados;
- Verificar a atividade antibacteriana dos extratos fúngicos das plantas e do solo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais são em geral, de origem pré-biótica ou originam-se de micro-organismos, plantas ou animais e incluem classes de compostos tais como terpenos, poliketídeos, aminoácidos, peptídeos, proteínas, carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos, ácido ribonucleico, ácido desoxirribonucleico, e assim por diante. Produtos naturais não são apenas acidentes ou produtos de conveniência de natureza, mais do que provável, uma expressão natural do aumento da complexidade dos organismos (SPAINHOUR, 2005).

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade há milhares de anos, e estão associados à medicina por igual período, pela utilização de medicamentos populares e venenos naturais (BUTLER, 2004; STROBEL; DAISY, 2003). A Organização Mundial da Saúde estima que aproximadamente 80% da população terrestre recorrem à medicina popular como fonte dos primeiros tratamentos farmacológicos (SPAINHOUR, 2005).

A descoberta dos antibióticos sulfonamidas e β -lactâmicos na década de 1930 levou a um profundo impacto na saúde humana, por tornar possível o tratamento rápido de pacientes com infecções bacterianas, que previamente eram consideradas fatais (BUTLER; COOPER, 2011).

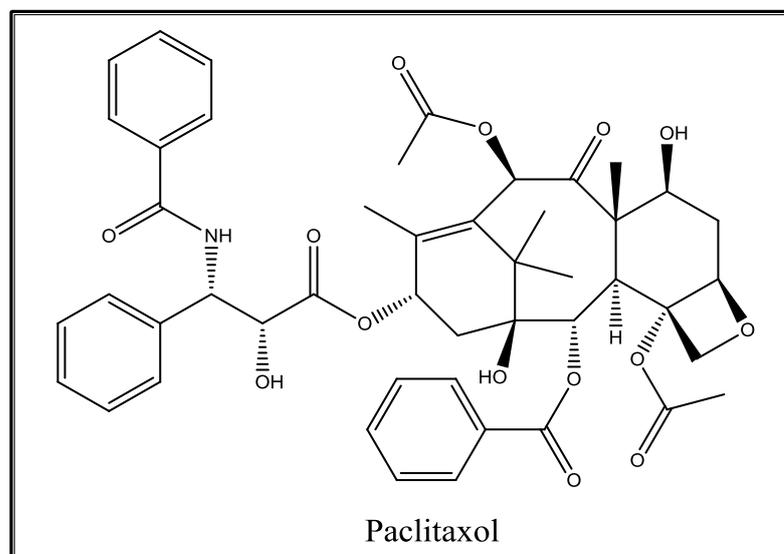
Os produtos naturais são produzidos em um específico estágio de desenvolvimento da planta, condições específicas do ambiente, estresse ou disponibilidade de nutrientes, dificultando a extração de uma quantidade suficiente dos produtos de interesse. Indiscriminado desmatamento de plantas medicinais para extração dos mesmos tem ameaçado de extinção algumas espécies, tornando-as vulneráveis ou em perigo de extinção (CHANDRA, 2012).

Considerando todas as limitações associadas com a produtividade e vulnerabilidade de espécies de plantas, como fontes de novos metabólitos, os micro-organismos servem como a mais nova, renovável e reprodutível fonte inesgotável de novas estruturas com potencial farmacêutico. Os micro-organismos, especialmente

os fungos, desde há muito tempo são considerados uma fonte importante de metabólitos bioativos com atividades antibacterianas, antimicóticas e antivirais (CHANDRA, 2012).

Alguns exemplos de metabólitos secundários produzidos por endofíticos ilustram que algumas cepas são capazes de produzir os mesmos compostos produzidos pelas plantas hospedeiras. O paclitaxol (Figura 01) é um diterpenóide que apresenta atividade citotóxica e é utilizado na clínica como agente anticâncer. O paclitaxol foi originalmente encontrado em espécies vegetais do gênero *Taxus* (STIERLE, A.; STROBEL; STIERLE, D., 1993). Para a surpresa dos pesquisadores, em 1993, outro paclitaxol foi produzido pelo fungo endofítico *Taxonomyces andreanae* obtido de *Taxus brevifolia* (GRAGG; NEWMAN, 2012). Tan e Zou, (2001) acreditam que alguns fungos endofíticos produzem certas substâncias químicas de origem vegetal e, que esses produtos seriam originalmente característicos da planta hospedeira. Segundo estes autores, os produtos poderiam estar relacionados a uma recombinação genética do endofítico com a planta hospedeira que ocorre durante a evolução dos mesmos. Esta é uma ideia que estava originalmente proposta como um mecanismo para explicar por que o fungo endofítico *T. andreanae* produz o paclitaxol (STIERLE, A.; STROBEL; STIERLE, D., 1993).

Figura 01. Paclitaxol, substância anticancer produzida pelo fungo *T. andreanae*.



Fonte: Strobel; Daisy (2003)

Deste modo, caso o endofítico tenha habilidade de produzir, assim como sua planta hospedeira, o mesmo metabólito bioativo, isto só não reduziria a necessidade de coletar plantas raras, de crescimento reduzido e ameaçadas de extinção, mas

também preservaria a biodiversidade. Além disso, é reconhecido que uma fonte microbiana de um produto valorizado pode ser mais fácil e econômico para produzir, reduzindo eficazmente seu custo no mercado (STIERLE, A.; STROBEL; STIERLE, D., 1993). Dessa forma, mais informações sobre a biologia de uma determinada espécie de planta e seus micro-organismos seriam essencialmente úteis para dirigir a procura por produtos bioativos. De acordo com a literatura, o papel dos endofíticos na natureza não está claro, mas sua relação de hospedeiro com várias espécies de plantas é bem conhecida (STROBEL; DAISY, 2003).

Vários isolados de endofíticos pertencentes à mesma espécie têm sido obtidos da mesma planta e apenas um dos isolados tem a capacidade de produzir substância biologicamente ativa *in vitro* (LI et al., 1996). Além disso, existe uma grande incerteza em relação ao que os endofíticos produzem *in vitro* e o que podem produzir na natureza. A produção de certas substâncias bioativas pelo endofítico pode facilitar a dominação de seu nicho biológico dentro da planta e/ou também oferecer proteção para a planta contra micro-organismos patogênicos prejudiciais e invasores. Entretanto, esta afirmação só pode ser considerada verdadeira se o produto bioativo do endofítico for produzido somente por este e não pelo hospedeiro (LI et al., 1996).

Aparentemente, essas informações facilitariam o estudo da função do endofítico e o seu papel na planta, mas poucas informações existem referentes à bioquímica e fisiologia das interações do endofítico com a planta hospedeira. Fatores que alteram a biologia do hospedeiro como, por exemplo, a estação do ano, idade, ambiente e local podem influenciar na fisiologia do endofítico, bem como nas espécies de endofíticos presentes (STROBEL; DAISY, 2003). Estas interações químicas são provavelmente mediadas para algum propósito no ciclo biológico. Uma definição do papel destes organismos na natureza fornecerá as melhores informações para um alvo particular com grande potencial para a bioprospecção (STROBEL; DAISY, 2003).

3.2 FUNGOS

Acredita-se que aproximadamente 100.000 espécies de fungos foram registradas, mas estima-se que exista entre 1,5-5,1 milhões de espécies no planeta (HAWKSWORTH, 2001; O'BRIEN et al., 2005). Alguns autores estimam que levará 4000 anos até que todas as espécies de fungos sejam descritas (MUELLER; SCHMIT, 2007). Os fungos constituem um grupo de micro-organismos eucarióticos, uni ou multicelulares, em geral, com parede celular e cujas estruturas reprodutivas apresentam uma variedade de formas. São organismos que não possuem pigmentos fotossintetizantes, sendo heterotróficos com nutrição por absorção. Os fungos podem ser filamentosos, constituídos por filamentos longos e ramificados denominados hifas; leveduriformes, constituídos por células individuais que se reproduzem por brotamento ou fissão binária; ou dimórficos, podendo ser filamentoso ou leveduriforme dependendo das condições ambientais, principalmente a temperatura (ARAUJO et al., 2010; ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Os fungos em geral são benéficos, sendo importantes na cadeia alimentar por decomporem matéria vegetal morta, reciclando elementos vitais, pelo uso de enzimas extracelulares como a celulase. A maioria das plantas depende das simbioses com fungos, conhecidas como micorrizas, que auxiliam as raízes das plantas a absorverem minerais e água do solo. Os fungos são utilizados pelo homem como alimentos e também para a produção de fármacos. Das mais de 100 mil espécies conhecidas de fungos, apenas cerca de 200 são patogênicas ao homem e aos animais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A descoberta acidental da penicilina, por Fleming em 1928, isolada do fungo *Penicillium notatum*, levou a um acréscimo aos estudos investigativos dos fungos como fontes de produtos naturais (TULP; BOHLIN, 2004; STROBEL et al., 2004). A partir do estudo químico destes organismos, ocorreu um grande avanço nas áreas dos antibióticos, imunossupressores e medicamentos antineoplásicos. Alguns fármacos bem conhecidos e derivados de fungos são os antibióticos da classe das penicilinas e cefalosporinas, os redutores de colesterol como a mevastatina e lovastatina, imunossupressores como a ciclosporina e rapamicina, entre outros. Pesquisas têm demonstrado o enorme potencial dos fungos em produzir diversas

classes de substâncias que podem ser utilizadas na indústria farmacêutica (humana e animal), alimentícia e agrícola (GREVE et al., 2010; GUO et al., 2008).

Dentro das classes de organismos investigados como fonte de produtos naturais, existem os fungos que vivem em associação com espécies vegetais. Estes são classificados como epifíticos, que são os fungos que vivem na superfície do material vegetal, os fitopatógenos, que causam doenças, os da micorriza que vivem nas raízes e os endofíticos que vivem dentro dos tecidos vegetais.

Os micro-organismos lideram a produção de compostos naturais úteis (DEMAIN, 2014). Uma diversidade de classes de compostos é produzida por micro-organismos, tornando-os importante segmento investigativo para a bioprospecção. Inseridos nesse contexto, os fungos endofíticos apresentam interessante produtividade, capazes de biossintetizar grande parte dos grupos de compostos, inclusive diversas classes de substâncias antimicrobianas (MOUZA; RAIZADA, 2013).

3.3 FUNGOS DO SOLO

Os fungos podem ser classificados na Divisão Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; LEGAZ et al., 1995). Os gêneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pythium*, *Verticillium* e *Alternaria* são fungos tidos considerados os mais comuns encontrados no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Os eucariontes apresentam características distintas como a organização do seu material genético dentro do núcleo, presença de organelas citoplasmáticas e divisão do corpo por mitose (TORTORA, FUNKE, CASE, 2004). Ao contrário dos procariotos, estes não apresentam a capacidade de usar compostos inorgânicos e de fixar nitrogênio atmosférico (TORTORA, FUNKE, CASE, 2004). Mesmo não sendo um grupo predominante no solo, os fungos representam entre 70 e 80% da biomassa microbiana do solo e sua ocorrência está condicionada a fatores como pH, umidade e quantidade de matéria orgânica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Os fungos apresentam grande capacidade de adaptação à presença de metais pesados no solo. Este mecanismo pode ser explicado por mutações

genéticas e adaptações fisiológicas dos fungos em contato com o metal pois a capacidade de um organismo sobreviver em condições adversas depende da rapidez de suas respostas fisiológicas as condições ambientais (GAAD, 2000).

Os processos de agregação do solo, decomposição de resíduos orgânicos, mineralização de nutrientes, controle de pragas, doenças e estabelecimento de relações simbióticas são realizados com a participação efetiva dos fungos. Participam também de processos de degradação de pesticidas e podem servir como compartimentalizadores de metais pesados do solo, diminuindo a sua toxidez para o ambiente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

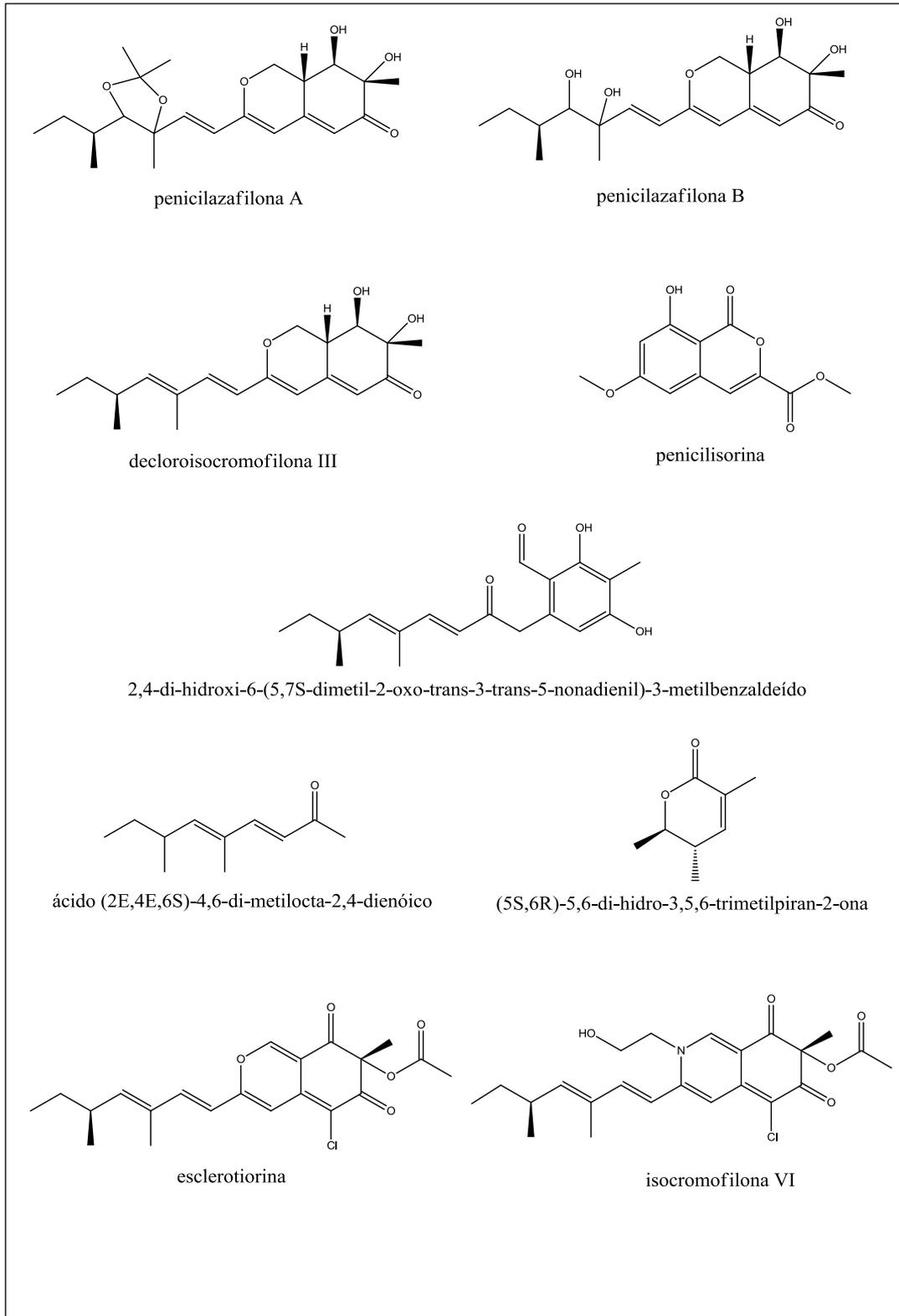
3.3.1 Produtos naturais obtidos de fungos do solo

Tem sido demonstrado que novas moléculas produzidas por endofíticos (51%) e seus extratos contendo atividades biológicas (80%) ocorrem em número consideravelmente mais elevadas do que as produzidas por micro-organismos do solo (38% das novas moléculas e 64% de extratos bioativos) (SCHULZ et al., 2002; YANG; ZHANG; LUO, 2012).

Muitas espécies do gênero *Penicillium* possuem a capacidade de produzir substâncias bioativas, como a xestodecalactona, que possui propriedades antifúngicas (EDRADA et al., 2002) e a metilacetalatrovetinona, substância com atividade anti-HIV (SHIOMI et al., 2005).

A investigação química dos extratos do fungo de solo *Penicillium esclerotiorum* por Lucas, Castro e Takahashi (2007) e Arunpanichlert et al. (2010) levou à identificação de quatro azafilonas: penicilazafilona A e B, decloroisocromofilona III, esclerotiorina, além de outras substâncias: penicilisorina, 2,4-di-hidroxi-6-(5,7S-dimetil-2-oxo-trans-3-trans-5-nonadienil)-3-metilbenzaldeído, ácido (2E,4E,6S)-4,6-di-metilocta-2,4-dienóico e (5S,6R)-5,6-di-hidro-3,5,6-trimetilpiran-2-ona, isocromofilona VI. As estruturas moleculares se encontram representadas na Figura 02.

Figura 02 – Metabólitos secundários isolados de *P. esclerotiorum*



3.4 O POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS FUNGOS PRESENTES NO SOLO DA AMAZÔNIA

Os fungos estão presentes em quase todos os ambientes da Terra, e a maior diversidade é encontrada nas regiões tropicais do mundo, cujo clima quente e úmido é favorável a sua multiplicação (BLACKWELL, 2011). Entre os biomas tropicais, a floresta Amazônica compreende a mais rica biodiversidade existente, com um grande número de plantas, animais e micro-organismos pouco conhecidos (CALDERON et al., 2009).

Os fungos destacam-se pela produção de alimentos, enzimas, álcoois, ácidos orgânicos e produtos farmacêuticos, entre eles os medicamentos (CHAKRABORTY; GHOSH, 2010). Os micro-organismos presentes no solo são particularmente importantes porque frequentemente degradam moléculas complexas presentes nesse meio, como tecidos de plantas, animais, e até mesmo pesticidas e outros xenobióticos (GADD, 2007). O ambiente afeta diretamente o metabolismo microbiano. Por isso, os fungos do solo são capazes de ativar muitas rotas metabólicas para a degradação de variados componentes, dependendo das condições do meio em que se encontram e da disponibilidade de nutrientes (PETIT et al., 2009). Eles liberam enzimas extracelulares, as quais degradam essas substâncias antes de serem internalizadas por suas células, e utilizam-nas como fonte de energia (ŠNAJDR et al., 2011).

O solo Amazônico é pobre em matéria orgânica, e o que garante a manutenção de uma floresta tão rica é a inúmera diversidade microbiana presente no solo, que reutiliza os componentes dos próprios vegetais e animais presentes no ambiente (MELO et al., 2012; SOUZA et al., 2011). Com o uso dessas substâncias ocorre a redistribuição de elementos primários, como carbono, nitrogênio, oxigênio, fósforo e outros, entre os organismos e o ambiente (GADD, 2007). Logo, os micro-organismos são muito importantes porque participam da reciclagem dos componentes da natureza através dos ciclos biogeoquímicos (PETIT et al., 2009).

Os fungos do solo têm sido extensamente isolados da natureza por sua reconhecida capacidade de produzir moléculas farmacologicamente ativas, como os antibióticos (TAKAHASHI et al., 2008). Entre os organismos vivos, os fungos filamentosos são os principais produtores de bioativos microbianos com atividade

biológica (42%), seguidos dos *Streptomyces* (32,1%) (BRAKHAGE; SCHROECKH, 2011). Trata-se de substâncias que são produtos do metabolismo secundário, ou seja, são formadas a partir dos produtos do metabolismo primário, e, em geral, são produzidos em resposta às condições de estresse sofridas pelo micro-organismo (NGUYEN et al., 2012). Esses metabólitos geralmente são produzidos durante a fase estacionária do crescimento microbiano, em que se inicia a escassez de nutrientes, e esses produtos do metabolismo começam a ser liberados por algumas cepas para bloquear o crescimento dos competidores (RUIZ et al., 2010). Por isso, muitas substâncias com potencial antimicrobiano e inibidor do crescimento celular são produzidas na disputa com organismos vizinhos em ambientes pobres em nutrientes, para matar ou atrasar o crescimento dos competidores, ou até mesmo para reduzir o seu próprio metabolismo, e assim suas necessidades energéticas (O'BRIEN; WRIGHT, 2011). Fungos que habitam em simbiose com artrópodes ou organismos marinhos podem produzir metabólitos para afugentar os predadores, seja através de toxicidade ou simplesmente pela produção de substâncias com sabor desagradável (DEBBAB; ALY; PROKSCH, 2012; LIU et al., 2012; ROHLFS; CHURCHILL, 2011; ZHONG; XIAO, 2009). Como essas moléculas têm sido fonte de novas drogas para o mercado farmacêutico, os esforços para a purificação desses compostos têm sido maiores do que a busca pela compreensão de sua real função para o organismo produtor (O'BRIEN; WRIGHT, 2011).

Entre os fungos Amazônicos, existem trabalhos apontando a produção de compostos com atividade sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas (ATHAYDE, 2011; GARBIN, 2011; LIMA et al., 2011; SILVA., 2010; SILVA et al., 2010; SIQUEIRA, 2011; SOUZA et al., 2004; TONIAL, 2010), leveduras de interesse médico (GARBIN, 2011; SILVA et al., 2010; TONIAL, 2010), fitopatógenos (FIGUEIREDO, 2006; SIQUEIRA, 2011) e também herbicida (SANTOS et al., 2008).

Vários fármacos existentes hoje no mercado foram obtidos a partir de produtos do metabolismo de fungos, como os antibióticos do grupo dos β -lactâmicos, tais como penicilinas, cefalosporinas e griseofulvina (CHAKRABORTY; GHOSH, 2010), drogas anticâncer como o paclitaxel, vincristina, podofilotoxina, camptotecina e hipericina (GUIMARÃES et al., 2010; KHARWAR et al., 2011), imunossupressoras como a ciclosporina A (SURVASE et al., 2011) ou antilipêmicas como as estatinas (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Entre os metabólitos secundários

estão inclusos também peptídeos, carboidratos, lipídios, esteróides e pigmentos (O'BRIEN; WRIGHT, 2011; ROHLFS; CHURCHILL, 2011).

3.5 FUNGOS ENDOFÍTICOS

De acordo com Schulz e Boyle (2005), micro-organismos endofíticos são aqueles que se situam no interior de plantas e que, naquele momento específico, não demonstram sintomas de doenças visíveis em seus hospedeiros. Santamaría e Bayman (2005) denominam micro-organismos que residem dentro de plantas como endofíticos, e os que residem fora como epifíticos.

A palavra endofítico vem do grego, que quer dizer, literalmente, “dentro da planta”. Foi conhecido pela primeira vez em 1887, quando M. L. V. Galippe relatou a presença de micro-organismos no tecido de plantas (SCHULZ; BOYLE, 2005; COMPANT; SESSITSCH; MATHIEU, 2012).

Endofíticos colonizam todos os tecidos de diferentes órgãos da planta, tais como raízes, flores, folhas, sementes, frutos, pecíolos e caule, podendo ser específica a colonização em diferentes órgãos, como em raízes e folhas (FISHER; PETRINI, 1992; KUMAR; HYDE, 2004; SHIMIZU, 2011; QIN et al. 2012).

Dentre os micro-organismos endofíticos, podem ser encontrados fungos e bactérias (PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011). Porém, de acordo com Gunatilaka (2006), os fungos são os mais comumente isolados. Já Zhang, Song e Tan (2006) afirmam que fungos endofíticos produzem metabólitos secundários em maiores quantidades do que qualquer outra classe de micro-organismos endofíticos.

Como parte de uma comunidade de fungos, fungos endofíticos podem ter um ou vários papéis funcionais durante seus ciclos de vida ou em resposta a estímulos ambientais e de plantas (PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011). Podem hospedar em plantas que crescem em diferentes regiões ambientais, como a do Ártico e da Antártida, os solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas, manguezais e florestas costeiras, colonizando uma gama de hospedeiros, que incluiu algas, briófitas, esponjas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas (KHARWAR et al., 2011; CHOWDHARY et al., 2012).

Além disso, endofíticos formam relações simbióticas com seu hospedeiro, por algum tempo. Estas relações podem trazer como vantagem para o fungo, o fornecimento de nutrientes e compostos necessários para o término de seu ciclo de vida. Já para a planta, os compostos produzidos por endofíticos podem tornar as plantas mais resistentes a nematóides, insetos e animais, bem como levá-las a um rápido crescimento, devido à produção de fitormônios (KAUL et al., 2012).

Há um equilíbrio na relação endofítico-planta que varia do mutualismo ao antagonismo, havendo sempre um grau de infecção por parte do fungo e, ao mesmo tempo, defesa por parte da planta (SCHULZ; BOYLE, 2005). Fatores que determinam as interações endofítico-planta incluem o modo de transmissão, o padrão de infecção, idade da planta, condições ambientais e os antecedentes genéticos (SAIKKONEN et al., 1998).

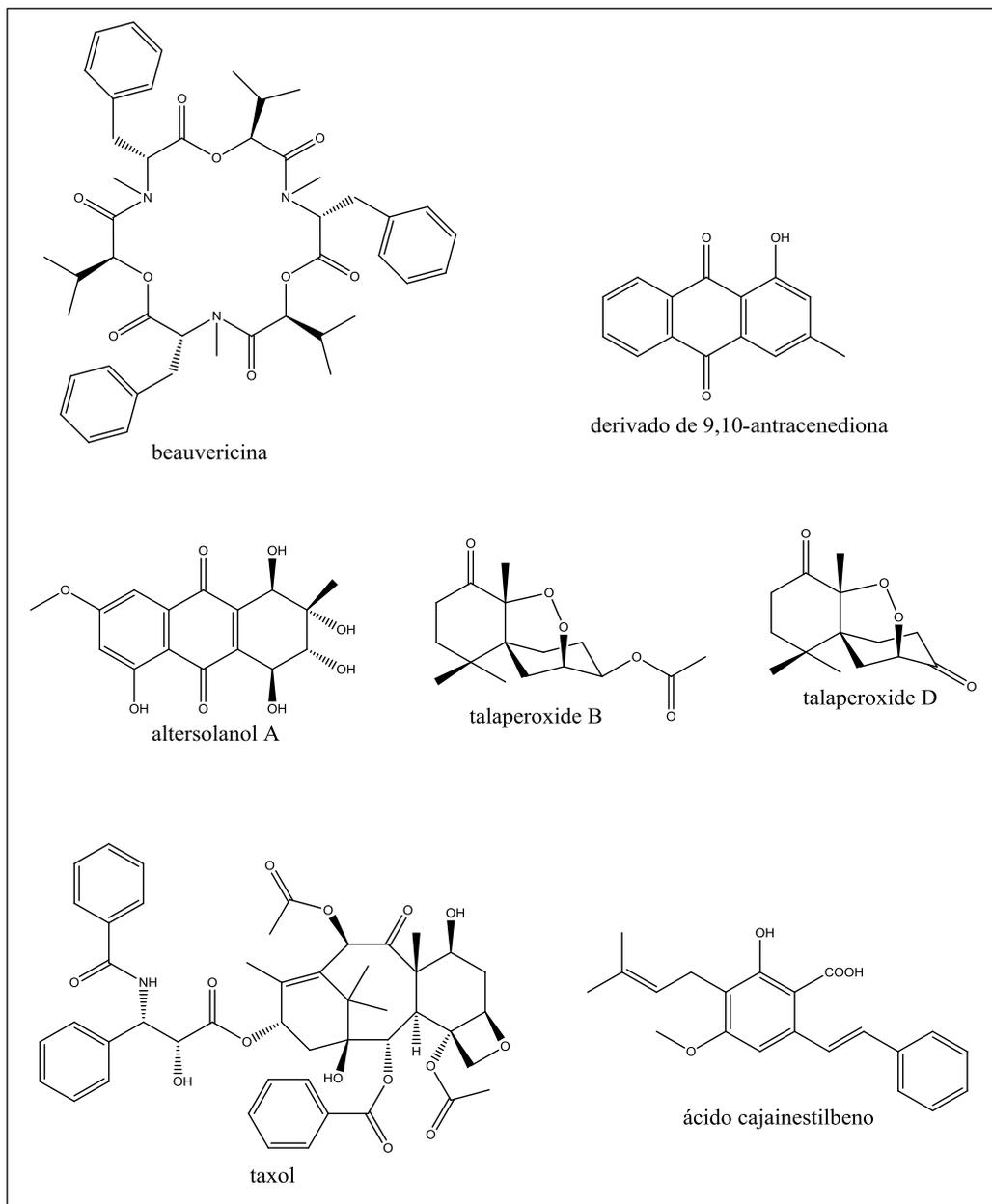
3.5.1 Produtos naturais obtidos de fungos endofíticos

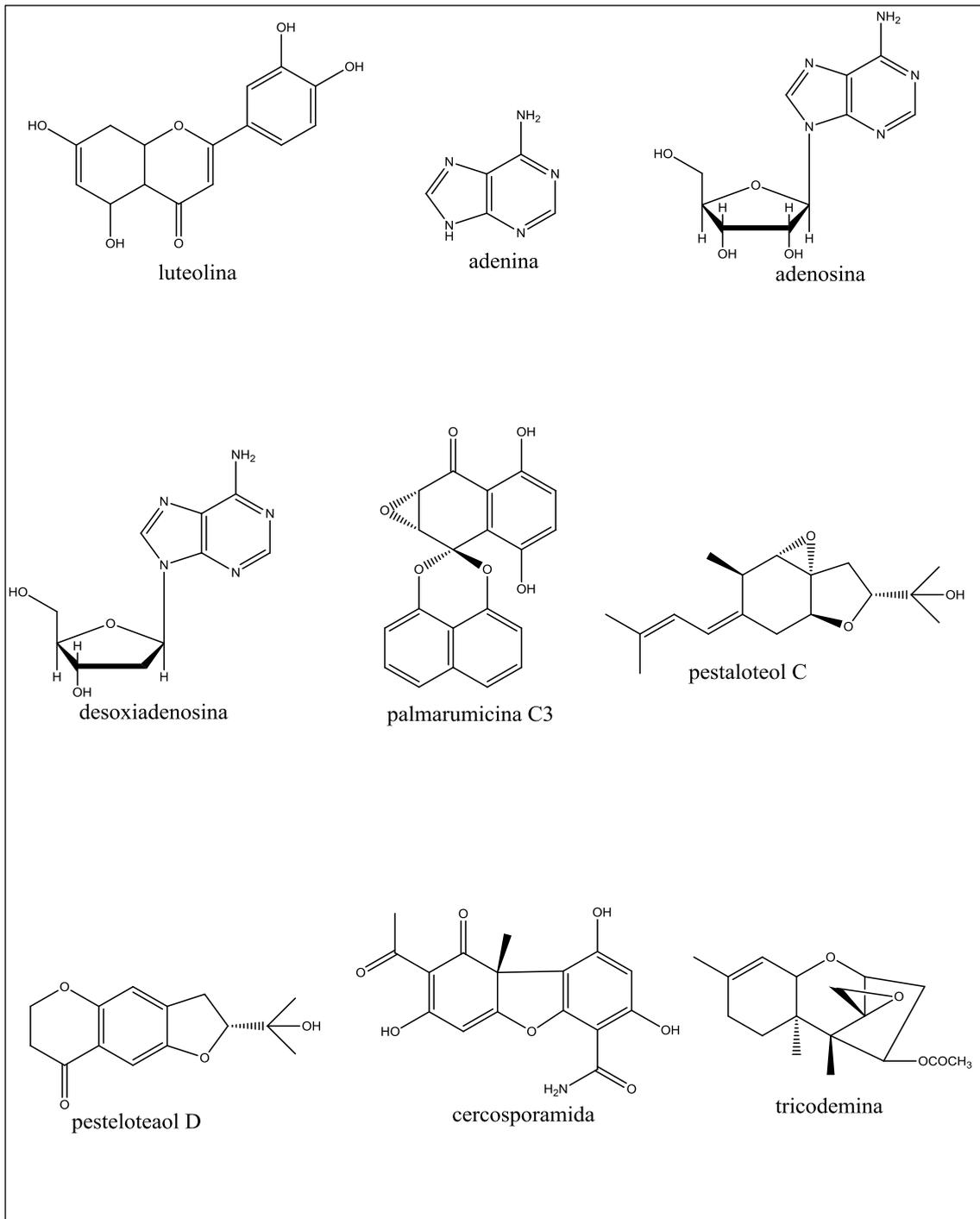
Os micro-organismos endófitos associados a plantas representam uma fonte inexplorada de produtos naturais novos e bioativos, com mais de 20.000 substâncias descritas, sendo que destas 51% apresentam estruturas inéditas e 80% atividade biológica. Isto pode ser explicado pela teoria ecológica, que estabelece que esta produção metabólica depende do nicho ecológico no qual o micro-organismo está inserido e das conseqüentes interações bióticas e abióticas. Estes relatos sugerem que a seleção do endófito para estudo deve ser realizada com espécies vegetais de diferentes biotas, principalmente as que enfrentam frequentes e intensas interações no ambiente como plantas de regiões áridas, florestas tropicais, entre outras (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013).

Os metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos compreendem uma diversidade de classes químicas, com atividade biológica, como por exemplo, atividade anticancerígena beauvericina, derivado de 9,10-antracenediona, altersolanol A, talaperoxide B, talaperoxide D e taxol (WANG et al., 2011; ZHANG et al., 2010; TEITEN et al., 2013; LI et al., 2011; PANDI et al., 2011; KUMARA et al., 2012), antioxidante ácido cajainestilbeno, luteolina, adenina, adenosina, desoxiadenosina e palmarumicina C3 (ZHAO et al., 2012b; SRINIVASAN et al.,

2010; ZHAO et al., 2014; YUAN et al., 2014; MOU et al., 2013), antimicrobiano pestaloteol C, pestaloteol D, cercosporamida e tricodemina (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; WANG et al., 2012) (Figura 03). Inúmeras substâncias, biologicamente ativas como isocumarinas, xantonas, quinonas, terpenoides e citocalasinas já foram isoladas de extratos brutos obtidos do cultivo de fungos endofíticos (SCHULZ et al., 2002).

FIGURA 03 – Metabolitos secundários produzidos por fungos endofíticos.





Estas evidências atraem a atenção dos químicos de produtos naturais e de biólogos, conforme indicado pelo aumento constante de publicações dedicadas a este tema nos últimos anos (113 artigos científicos sobre metabólitos secundários de fungos endofíticos no período de 2008-2009, 69 de 2006-2007, 36 de 2004-2005, 14 de 2002-2003 e 18 de 2000-2001) (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013).

3.5.2 Fungos do gênero *Trichoderma*.

Os fungos do gênero *Trichoderma* são saprófitos, ubíquos e altamente interativos na raiz e no solo, bem como no interior de plantas (POMELLA; RIBEIRO, 2009). Reproduzem-se assexuadamente, tendo a sua fase teleomófica pertencente ao gênero *Hypocrea*. Embora sejam considerados fungos de vida livre, já há evidências de que espécies de *Trichoderma* podem ser oportunistas, simbiontes avirulentos de plantas, bem como parasitas de outros fungos (SAMUELS, 2006). São encontrados com mais frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical (HARMAN et al., 2004), sendo algumas espécies cosmopolitas, enquanto outras são limitadas à sua distribuição geográfica (SAMUELS, 2006).

Trichoderma sp. caracteriza-se pelo crescimento rápido em meio de cultura, com a produção de um micélio aéreo e esparso, com a formação de pústulas conidiogênicas brancas ou verdes (BISSET, 1991). Em geral as fiálides são hialinas e são formadas sobre os conidióforos. O tipo de ramificação dos conidióforos e o modo de disposição das fialídes são bastante característicos (BISSET, 1991). Os conídios são geralmente lisos, dificilmente ornamentados, com formato elipsoidal a quase oblongo, sendo raramente globosos. Possuem coloração verde ou hialina, sendo, às vezes, amarelos. Quando presentes, os clamidósporos são tipicamente globosos para subglobosos e são formados dentro ou nas pontas das hifas (CHAVERRI; SAMUELS, 2004).

A grande importância econômica desses fungos para a agricultura se deve à capacidade de atuarem como antagonistas a uma gama de fitopatógenos de várias plantas cultivadas, como promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doenças (AGUIAR et al., 2013; AKRAMI et al., 2013; FORTES et al., 2007; SILVA et al., 2011; STEFANELLO; BONETT, 2013). O antagonismo é baseado em diferentes mecanismos como a competição por espaço e nutrientes o micoparasitismo, a produção de metabolitos antifúngicos (MOTLAGH; SAMIMI, 2013).

Trichoderma sp. compete com outros microrganismos de solo por exsudatos de sementes que estimulam a germinação de propágulos de fungos fitopatogênicos no solo, e mais comumente, competem por nutrientes e/ou espaço, mas podem ainda degradar pectinases e outras enzimas que são essenciais para fungos fitopatogênicos (HARMAN et al., 2004). A competição por nutrientes é um

mecanismo importante, pois muitos fungos fitopatogênicos são sensíveis à falta de alguns nutrientes (BENÍTEZ et al., 2004). Ainda segundo Herman et al. (2004), *Trichoderma* sp. tem uma capacidade superior em mobilizar e absorver os nutrientes do solo comparativamente a outros organismos. Outro importante mecanismo de biocontrole é o micoparasitismo. Fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de reconhecer as hifas de outros fungos e crescer em sua direção, presumivelmente em resposta a estímulos químicos produzidos pela hifa hospedeira. Ao encontrá-las, enrolam em torno delas, desenvolvem haustórios e penetram por meio de enzimas degradadoras de parede celular, como glucanases, quitinases e proteases. Assim, utilizam o conteúdo das hifas do hospedeiro como fonte de nutrientes (HARMAN et al., 2004). Silva et al. (2011) demonstraram que isolados de *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. strigosum*, *T. longibrachiatum* e *T. koningiopsis* atuaram como promotores do crescimento de plantas e como indutores de resistência à antracnose em pepineiro. Em outro trabalho, Aguiar et al. (2013) demonstraram que isolados de *T. viride* promoveram o crescimento de plântulas de feijão e reduziram o processo de doença causado por *Sclerotinia sclerotiorum*.

A promoção de crescimento de plantas pela aplicação de isolados de *Trichoderma* spp. foi inicialmente relacionada ao controle de microrganismos prejudiciais as plantas. Entretanto pesquisas mostraram que tal efeito está relacionado à produção de hormônios ou fatores de crescimento; à maior eficiência no uso de alguns nutrientes e ao aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta (AGUIAR et al., 2013; CONTRERAS-CORNEJO, 2009; SILVA et al., 2011). *Trichoderma* pode solubilizar vários nutrientes, tais como fosfato de rocha, Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{4+} e Zn, que podem estar indisponíveis para determinadas plantas (HARMAN et al., 2000).

A associação de *Trichoderma* com as raízes pode ainda induzir mecanismos de defesa na planta, protegendo-a de vários patógenos (BENÍTEZ et al., 2004). Os isolados de *Trichoderma* sp. colonizam a epiderme e as células do córtex das raízes e, dessa forma, ativam vias de sinalização, desencadeando respostas de defesa nas plantas (BROTMAN; GUPTA; VITERBO, 2010). Essas produzem depósitos de parede celular e fatores bioquímicos que limitam tanto o crescimento do próprio *Trichoderma*, quanto a entrada de agentes patogênicos (HARMAN et al., 2004; MOTLAGH; SAMIMI, 2013). De acordo com Romeiro (2007), plantas levadas ao estado de indução de resistência apresentam aumento nas atividades de enzimas,

tais como quitinases, glucanases e peroxidases, envolvidas nas rotas de percepção da presença de patógenos em potencial e nas rotas de sinalização bioquímica a pontos distantes do sítio onde o sinal foi originado.

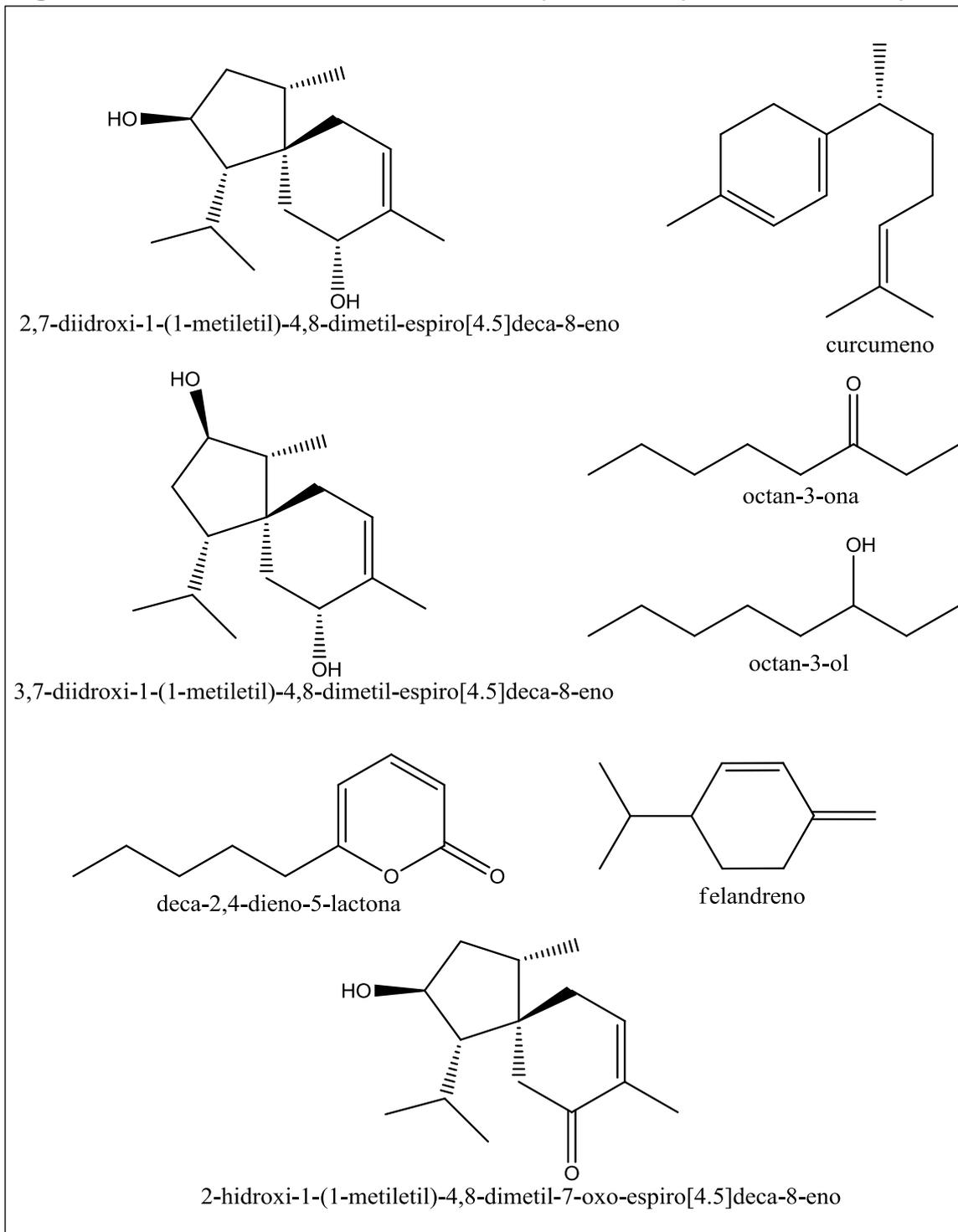
3.5.3 Produtos naturais produzidos por *Trichoderma*.

A maioria das cepas de *Trichoderma* pode produzir metabólitos tóxicos, os quais podem ser voláteis e não voláteis (BENÍTEZ et al., 2004; STOPPACHER et al., 2011; SIDDIQUEE et al., 2012, VINALE et al., 2008a). Zhang et al. (2014) observaram que compostos orgânicos voláteis produzidos pelo isolado T-E5 de *T. harzianum* mostraram significativa atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Em outro estudo, foi observada a inibição do crescimento micelial de *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*, por meio de compostos não voláteis presentes em filtrados de *Trichoderma* spp. (ZAFARI; KOUSHKI; BAZGIR, 2008).

Os compostos voláteis de *Trichoderma* sp. (Figura 04, p. 43) são de especial importância no estudo dos metabólitos destes fungos, principalmente devido à rápida ação biocida. Compostos como etileno, cianeto de hidrogênio, sesquiterpenos acoranos: 2,7-diidroxi-1-(1-metiletil)-4,8-dimetil-espiro[4.5]deca-8-eno, 3,7-diidroxi-1-(1-metiletil)-4,8-dimetil-espiro[4.5]deca-8-eno e 2-hidroxi-1-(1-metiletil)-4,8-dimetil-7-oxo-espiro[4.5]deca-8-eno, monoterenos: felandreno e curcumeno, álcoois: octan-3-ol, cetonas: octan-3-ona e ésteres acima de 4 átomos de carbono têm sido isolados e testados em diversos tipos de bactérias, pragas e outros fungos (KESZLER; FORGÁCS; KÓTAI, 2000; STOPPACHER et al. 2011). Em trabalho de Arjona-Girona (2014), foi observado que o composto deca-2,4-dien-5-lactona produzido por isolados de *Trichoderma* spp. foi eficiente na inibição do crescimento micelial de *Rosellinia necatrix*, mesmo nas concentrações mais baixas.

Os metabólitos voláteis, têm certa vantagem na capacidade de atuar sinergisticamente com as enzimas extracelulares, também secretadas por *Trichoderma* sp., mostrando um mecanismo de ação complexo, mas eficiente (BENÍTEZ et al. 2004; DOS SANTOS 2008).

Figura 04: Metabólitos secundários voláteis produzidos por *Trichoderma* sp.

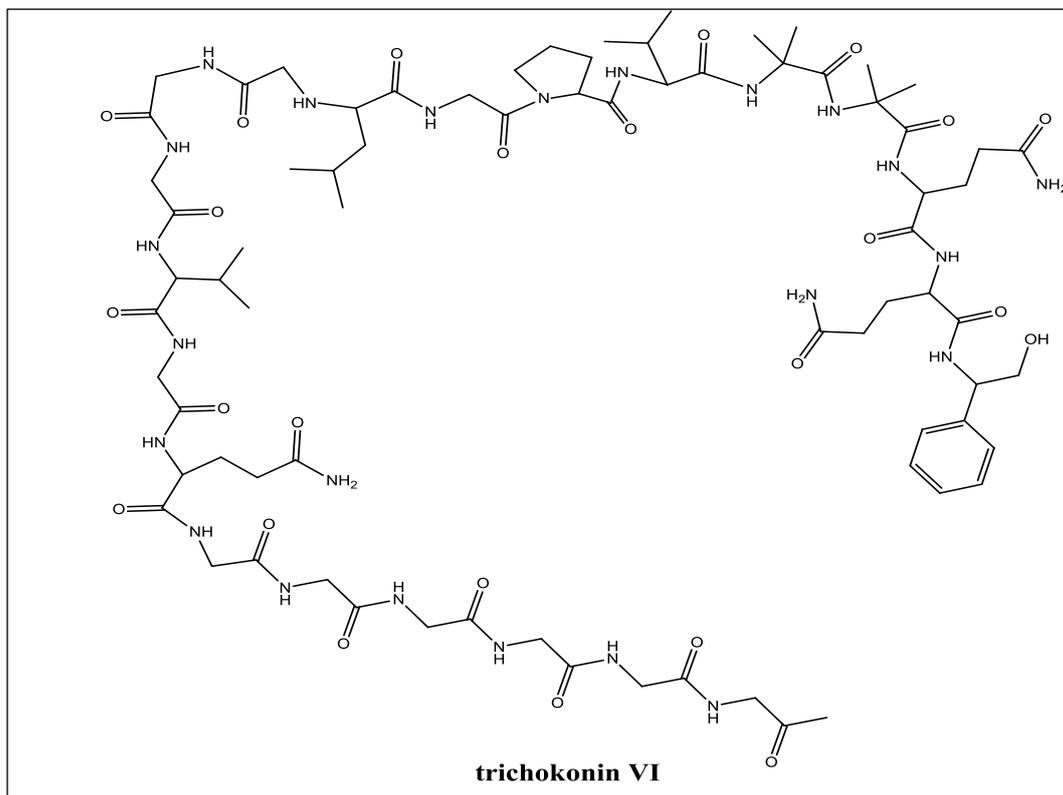


Compostos não voláteis envolvem os peptaibols, que são uma grande família de peptídeos antibióticos produzidos por fungos de solo, incluindo *Trichoderma* (DANIEL; RODRIGUES FILHO, 2007). São oligopeptídeos lineares de 7 a 20 aminoácidos, ricos em ácido α -aminoisobutírico, com uma extremidade N-acilo,

geralmente acetil e contendo um amino-álcool no C-terminal, tal como fenilalaninol ou leucinol (WIEST et al., 2002).

Shi et al. (2012) demonstraram que a *Trichokonin VI* (Figura 05), um tipo de peptaibol produzido por *Trichoderma pseudokoningi*, induz apoptose em células de *Fusarium oxysporum*, o que revelou o mecanismo antibiótico desse peptídeo contra fungos fitopatogênicos. Antibióticos não voláteis, como gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina e dermadina têm a capacidade de inibir o desenvolvimento de outros fungos (DENNIS; WEBSTER, 1971c).

Figura 05 - Peptaibol produzido por *Trichoderma pseudokoningi*



Além da capacidade de paralisar o crescimento de fitopatógenos, os metabolitos secundários produzidos por *Trichoderma* spp. podem desempenhar um papel na regulação do crescimento de plantas e atuar como elicitores na indução de respostas de defesa da planta (VINALE et al., 2008a). O tipo de composto orgânico e as quantidades produzidas podem variar de acordo com a espécie ou isolado (ARJONA-GIRONA et al., 2014; VINALE et al., 2008a).

Embora inúmeros micro-organismos tenham sido considerados como antagonistas a patógenos oriundos do solo, poucos evoluíram para uso em escala comercial (HARMAN et al., 2004). Em relação aos fungicidas, o mercado mundial de produtos contendo agentes biológicos representa apenas 1% (BETTIOL et al., 2012). No Brasil, a baixa disponibilidade de produtos à base de *Trichoderma* devidamente registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a falta de divulgação sobre os seus princípios e vantagens restringem a sua utilização (MACHADO et. al., 2012).

3.5.4 *Scedosporium apiospermum*

A taxonomia do gênero *Scedosporium* é complexa. Pertencem ao Reino Fungi, Filo *Ascomycota*, Classe *Euascomycetes*, Ordem *Microascales*, Família *Microascaceae*, espécie *apiospermum*.

Espécies do gênero *Scedosporium* crescem em colônias brancas algodonosas, cinza e marrom. Os conídios presente na forma livre ou em células conidiogênicas que pode ser cilíndrica ou em forma de garrafa. Se eles têm células conidiogênicas eles podem ser separados ou agregados. Os conídios são unicelulares e sua cor varia de claro a marrom (DE HOOG et al., 2000).

A infecção pelo *Scedosporium* pode tornar-se grave quando afeta pacientes imunodeprimidos, onde diagnóstico e tratamento são geralmente difíceis, sendo também resistentes aos antifúngicos (BONAMIGO et al., 2007). Em pacientes imunossuprimidos (leucemia, transplantes, etc), podem ocorrer processos inflamatórios, os quais se enquadram no conceito de hialo-hifomicose (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991). Relatos recentes de associação com a infecção em pacientes com *diabetes mellitus* e artrite reumatóide (BONAMIGO et al., 2007).

Poucos trabalhos descreveram a utilização do *S. apiospermum* no isolamento de metabólitos secundários.

3.6 MÉTODO DE MANUTENÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

Os processos de isolamento, identificação, conservação e a utilização de micro-organismos vêm sendo considerados como rotina para o desenvolvimento de pesquisas e obtenção de produtos de interesse econômico (ABREU; TUTUNJI, 2004).

No âmbito da ciência, a implantação e manutenção de coleções de culturas permitem a formação de estoques de cepas que podem ser utilizadas experimentalmente em diferentes momentos (GIRÃO et al., 2004).

O objetivo da manutenção de um micro-organismo não é somente conservar seu estado inicial evitando mutações indesejáveis, mas também garantir ao máximo a vitalidade das células e a quantidade de células viáveis (PAOLI, 2005; OKAFOR, 2007).

Segundo Costa e Ferreira (1991), os métodos de manutenção de micro-organismos podem ser classificados de acordo com tempo máximo de preservação: métodos de curto prazo: repique contínuo; Métodos de médio prazo: preservação em óleo mineral, preservação em água esterilizada, congelamento a -20°C e Métodos de longo prazo: liofilização, criopreservação.

No grupo de pesquisa da UFPA orientado pelos professores Andrey Moacir do Rosario Marinho e Patrícia Santana Barbosa Marinho, o método utilizado na preservação das cepas dos fungos é o de preservação em água esterilizada ou também conhecida pelo método de Castellani.

Esta técnica deve ser utilizada preferencialmente com culturas jovens, com cerca de 10 a 15 dias, e busca redução do metabolismo, com consequente latência das células diante da restrição de fontes nutritivas (COSTA; FERREIRA, 1991; ABREU; TUTUNJI, 2004).

O método se baseia na transferência de culturas para frascos contendo uma solução de água esterilizada, com posterior armazenamento sob temperatura ambiente. Pimentel e Figueiredo (1989), Costa e Ferreira (1991) e Romeiro (2006) sugerem a utilização de suspensões bem concentradas de células, a partir de um crescimento em meio sólido ou a inclusão de blocos de ágar contendo os micro-organismos.

Apesar do baixo custo e reprodutibilidade, notam-se os riscos de contaminação das culturas e um possível comprometimento na estabilidade genética de alguns micro-organismos. Aparecido, Egydio e Figueiredo (2001) afirmaram que este método além de garantir a preservação das características originais da cultura por longos períodos, promove a ausência de contaminação por ácaros, apresenta baixo custo por utilizar somente água destilada e revela a necessidade de pequeno espaço físico para acondicionar os frascos, além de ser empregado para um grande número de gêneros e espécies de fungos.

Neufeld e Oliveira (2008) também observaram eficiência na aplicação desta técnica, ao avaliarem a manutenção de 15 cepas de dermatófitos por um longo período. Após 11 anos de conservação destes espécimes, observaram que 93,3% (14 cepas) foram avaliadas como viáveis e sem alterações morfológicas, demonstrando assim, a efetividade deste método de conservação sob água destilada esterilizada na manutenção de cepas de dermatófitos por longos períodos de tempo.

3.7 FAMÍLIAS DAS LEGUMINOSAE (FABACEAE)

Leguminosae Adans. com 36 tribos, 727 gêneros e cerca de 19.325 espécies, é considerada a terceira maior família de angiospermas, com distribuição cosmopolita (LEWIS et al., 2005), considerada monofilética e incluída na ordem Fabales (APG III, 2009). As sinapomorfias da família são: folha composta, alterna e com pulvino, uma pétala adaxial diferenciada, ovário monocarpelar e fruto do tipo legume (CHAPPILL, 1995). Está tradicionalmente dividida nas subfamílias *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* e *Papilionoideae* (POLHILL, 1994).

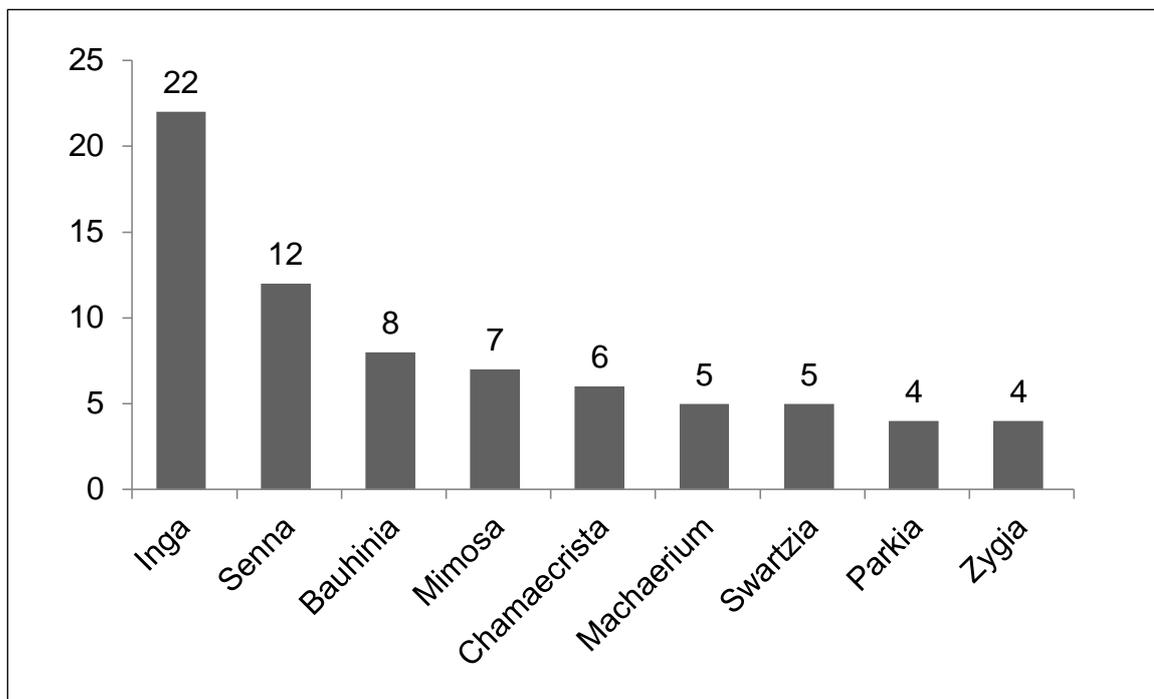
A família ocupa desde os picos das serras montanhosas até o litoral arenoso, da floresta tropical úmida até desertos, ocorrendo também em ambientes aquáticos (LEWIS, 1987). Apresenta várias formas de vida como ervas, trepadeiras, subarbustos, arbustos, árvores e lianas com ou sem gavinhas (JUDD et al., 2009). No Brasil, ocorrem cerca de 210 gêneros e 2.801 espécies, sendo 1.458 consideradas endêmicas, tornando-se a família com maior número de espécies no país (LIMA et al., 2015). Está presente em todos os domínios fitogeográficos

brasileiros, em especial no Cerrado, com 135 gêneros e 1.237 espécies; Floresta Amazônica, com 167 gêneros e 1.147 espécies; e Floresta Atlântica, com 154 gêneros e 997 espécies; Caatinga, com 127 gêneros e 620 espécies, Pantanal, com 63 gêneros e 161 espécies (LIMA et al., 2015).

As espécies de Leguminosae apresentam resultados florísticos dominantes na Amazônia, e desempenham papéis ecológicos diversos e contribuem de forma significativa para a diversidade regional (SILVA; SOUZA-LIMA, 2013). Ducke (1949) publicou “*As Leguminosae da Amazônia Brasileira*”, com chave de identificar nomes populares de 785 espécies.

Os gêneros com maior número de espécies depositadas no Herbário da Amazônia Meridional (HERBAM) são *Inga* Mill., com 22 espécies, *Senna*, com 12 espécies, *Bauhinia*, com oito espécies, *Mimosa*, com sete espécies, *Chamaecrista*, com seis espécies, *Machaerium* e *Swartzia*, com cinco espécies cada, *Zygia* e *Parkia*, com quatro espécies cada, como mostra a Figura 06 (p. 49). Os demais gêneros estão representados por uma, duas ou três espécies.

Figura 06 - Gêneros de *Leguminosae* com maior número de espécies depositadas no Herbário da Amazônia Meridional, Alta Floresta, Mato Grosso.



Fonte: Enciclopédia Biosfera, 2015.

O terceiro gênero mais representado foi *Bauhinia*, que segundo LEWIS et al. (2005) apresenta cerca de 160 espécies com distribuição pantropical e subtropical. No Brasil, está representado por cerca de 57 espécies nativas, sendo 19 na Amazônia (VAZ, 2015). Dentre as Caesalpinioideae pode ser facilmente reconhecido por apresentar folhas unifolioladas, inteiras a bilobadas, bipartidas até bifolioladas, com nervação palminérvia, fruto com deiscência elástica ou indeiscente (VAZ, 2003).

Ainda entre os principais gêneros de Leguminosae na coleção do HERBAM está a *Mimosa*. Este gênero, com 510 espécies é um dos maiores em número da família, com distribuição nos trópicos, mas estendendo-se até regiões temperadas (LEWIS et al., 2005). No Brasil estão representadas 358 espécies e apenas 39 na Amazônia (DUTRA; MORIM, 2015). O Brasil Central é um dos maiores centros de diversidade e endemismo do gênero (SIMON; PROENÇA, 2000). É caracterizado por apresentar folhas bipinadas, foliólulos sésseis, o primeiro par de cada pina comumente diferenciado em parafilídios, flores 3-5-6-meras, isostêmones ou diplostêmones, filetes alvos, róseos ou amarelos, livres ou curtamente monadelfos e frutos do tipo craspédio ou sacelo (DUTRA, 2009).

3.7.1 Espécie hospedeira - *Bauhinia guianensis*

A *Bauhinia guianensis* Aublet. (Fabaceae), vulgarmente conhecida como “Cipó-escada-de-Jaboti” é uma espécie com atividades biológicas. Sendo que da casca do caule a atividade é anti-inflamatória, analgésica (CARVALHO; SANTOS; VIANA, 1999) e antimalárica (MUÑOZ et al., 2000) das folhas, raízes a atividade é alelopática (MOURÃO JÚNIOR, SOUZA FILHO, 2010) e do córtex se extrai atividades antioxidante (TAIPE, GÓMEZA, CAYCHO, 2008).

Compostos químicos encontrados no gênero pertencente a diversas classes, entre elas os terpenoides, alcaloides, esteroides, triterpenos, taninos, quininas, cumarinas e flavonoides. Na espécie *Bauhinia guianensis*, da casca do caule foram isolados os compostos β – Sitosterol; estigmasterol; 3-O- β -glucopiranosil- β – sitosterol; 3-O- β -glucopiranosil-stigmasta-5,22-dieno; 49-hidroxi-7-metoxiflavona; lapachol (VIANA et al., 1999); 5,6,7-trimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona; 2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-5,7,7-trimetoxi-4H-1-benzopirano-4-ona (ALMANZA et al., 2001).

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 Aublet.* 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.

3.7.2 Espécie hospedeira - *Mimosa acutistipula var. ferrea* Barneby

Mimosa L. é pantropical, distribuindo-se, principalmente, na região neotropical, em florestas de baixa a alta altitudes, savanas e formações campestres, muito diversificado em vegetações abertas e rico em endemismos (BARNEBY, 1991). Caracteriza-se por apresentar folhas bipinadas, paripinadas, foliólulos oblíquos, flores trímeras a hexâmeras, com 6 a 12 estames, e frutos do tipo craspédio ou sacelo. É monofilético e atualmente, são estimadas aproximadamente 536 espécies (SIMON et al., 2011). Para o Brasil, são listadas 342 espécies, dentre as quais 74% endêmicas da flora brasileira (DUTRA; MORIM, 2013). O Cerrado, incluindo o Campo Rupestre, é um dos três principais centros de diversidade e endemismo com aproximadamente 215 spp, em que 74% são endêmicas (DUTRA; MORIM, 2013). A Floresta Atlântica também se destaca por sua riqueza e endemismos, com cerca de 110 spp onde 55% são endêmicas (DUTRA; MORIM, 2013). Estudos florísticos e taxonômicos desse gênero para o Brasil ainda são pontuais, principalmente na Floresta Atlântica.

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 de Carajás, no Estado do Pará (MORAES, 2016). 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* como mostra a Figura 07.

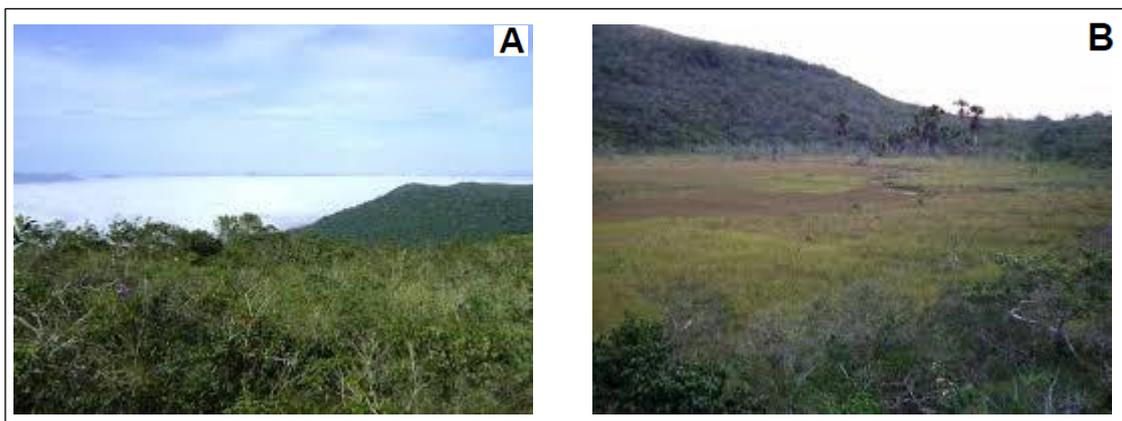
Figura 07: Presença de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* nos diferentes estratos da vegetação xerofítica na Floresta Nacional de Carajás, Pará.



Fonte: Rayol, 2006

Segundo Silva (1992), a espécie *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* localiza-se também na Serra de Carajás, em um tipo especial de vegetação conhecida como “canga hematítica”. A canga apresenta diversas fisionomias, que variam de áreas florestais a campos graminoides, podendo ser inundadas ou não (Figura 08). 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 de Carajás (ferro, manganês, cobre, cromo, chumbo) (SILVA, 1992).

Figura 08 – Fisionomia abustiva (A) e Graminoide (B) de Canga de Carajás.



Fonte: STCP, 2003

3.8 SERRA DE CARAJÁS

3.8.1 Inserção geográfica de Carajás

Constituindo parte dos estados do Pará, Maranhão e Tocantins, a Província Mineral de Carajás ocupa ampla extensão nas bacias dos rios Araguaia, Tocantins e Xingu (SANTOS, 1986). Neste território com ocorrência de diversos tipos de rochas, insere-se o complexo montanhoso Serra de Carajás, localizado no sudeste do Estado do Pará ($5^{\circ}54'-6^{\circ}33'$ S e $49^{\circ}53'-50^{\circ}34'$ W), nos municípios de Parauapebas, Canaã dos Carajás e Água Azul do Norte (SECCO; MESQUITA 1983; SILVA 1991; SILVA; SECCO; LOBO, 1996; GOLDER 2010). Essas serras situam-se na bacia hidrográfica do Rio Itacaiúnas, afluente do Rio Tocantins, cuja confluência ocorre na cidade de Marabá (GOLDER, 2006, 2010). Além das Serras dos Carajás, a região engloba as Serras do Bacajá, ao norte, dos Gradaús e Andorinhas, ao sul (SANTOS 1986). A região é predominantemente composta por formações florestais, sob o domínio da Floresta Amazônica, havendo manchas de vegetação aberta no topo de serras, as quais ocupam menos de 5% da paisagem (AB'SABER 1986).

As maiores serras da Floresta Nacional de Carajás (Flona Carajás) são constituídas por rochas ferríferas expostas há milhares de anos, formando densa carapaça laterítica, também conhecida como canga. Montanhas ferruginosas na região também são observadas fora de qualquer unidade de conservação, a exemplo da Serra da Bocaina, separada da Flona apenas pelo leito do Rio Parauapebas, e as Serras do Cristalino e Leste, situadas em um raio de cerca de 30 km a leste da Flona Carajás. A exceção da Serra do Cristalino, que possui pequena extensão de afloramento ferruginoso, as outras duas encontram-se bastante antropizadas.

As formações ferríferas da Serra dos Carajás são formadas principalmente por dois grandes blocos: a Serra Sul e a Serra Norte, ambos com extensão aproximada de 20 km de comprimento no sentido leste-oeste e larguras que variam entre 1 e 3 km, além de diversas outras serras de menores dimensões em meio a

estas. Além destes blocos destacam-se a Serra do Tarzan e Serra da Bocaina, as quais são por vezes consideradas como pertencentes à Serra Sul, apesar de disjuntas.

O conjunto de serras ferríferas inseridas na Floresta Nacional de Carajás ocorre de forma descontínua na paisagem, sendo que os principais corpos de minério que compõem essas geoformas podem ser identificados em blocos menores. Na Serra Norte os corpos de minério são organizados por blocos intitulados N1, N2, N3... N9; e na Serra Sul, identificados como S11A, S11B, S11C, S11D e Tarzan (Figura 09, p. 56). Com altitudes médias entre 600 e 800 m, essas formações rupestres ferríferas são recobertas por uma vegetação peculiar, denominada vegetação rupestre sobre canga, formada predominantemente por espécies vegetais de porte herbáceo-arbustivo com elevado grau de especialização para este ambiente (SILVA 1991; GOLDBERG, 2010). Caracteriza-se por elevada riqueza vegetal, sendo muitas espécies consideradas endêmicas deste ambiente (KIRKBRIDE 1980; PLOWMAN 1984; LOURTIEG 1987; KRAL 1988; SILVA; SECCO; LOBO, 1996; KRAL; STRONG 1999). Apesar do predomínio da feição arbustiva nestas formações rupestres, feições campestres, lagos, brejos e florestas de porte variado também se fazem presentes nas serras.

3.8.2 Histórico de estudos sobre a flora de Carajás

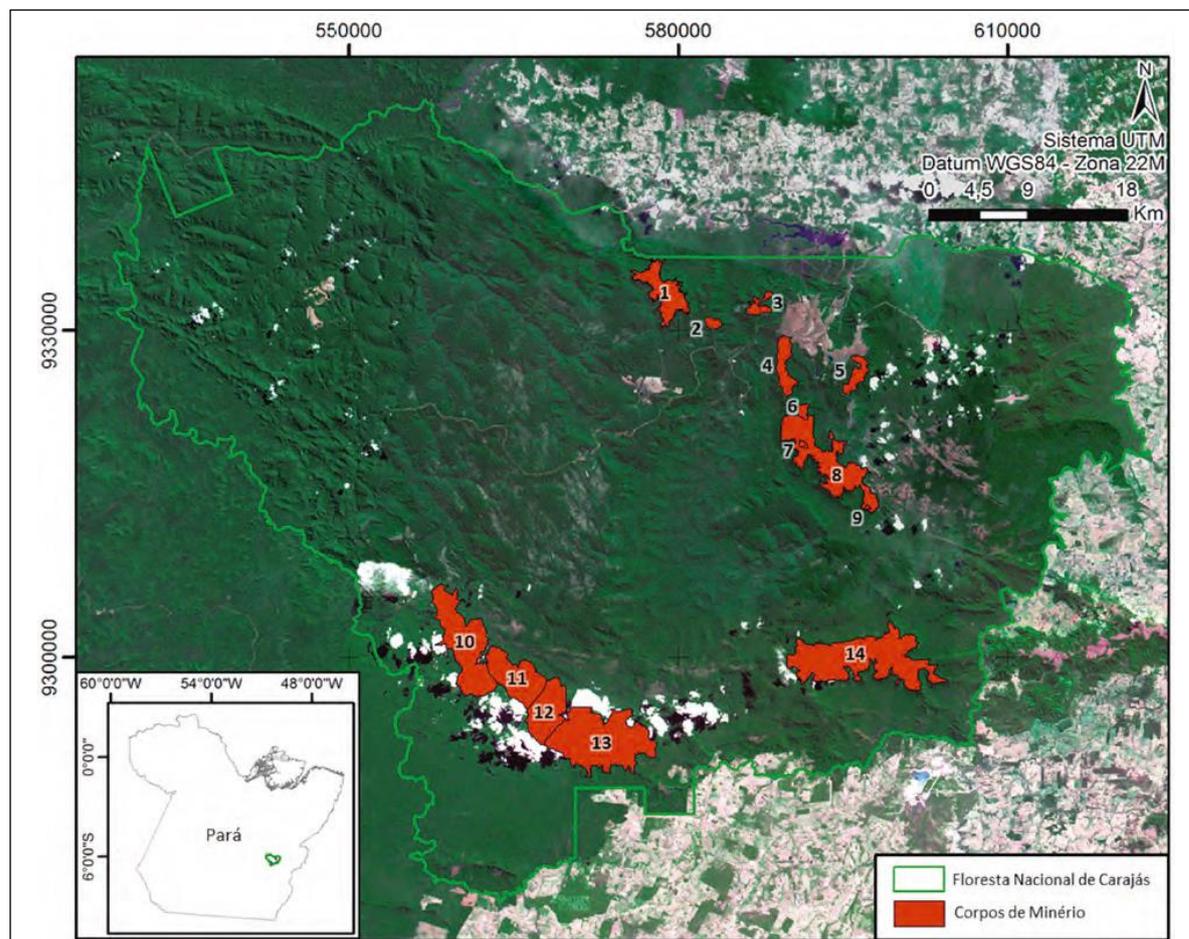
As investigações sobre a flora da região de Carajás iniciaram-se em 1969, quando o botânico Paulo Bezerra Cavalcante, do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), realizou as primeiras coletas botânicas na região. No ano seguinte foi publicada *Centrosema carajasensis* Cavalcante, a primeira espécie nova proveniente da região. Nos anos subsequentes foram descritas diversas espécies novas para a ciência, como as endêmicas *Parapiqueria cavalcantei* R.M.King e H.Rob., *Cavalcantia glomerata* (G.M.Barroso e R.M.King) R.M.King e H.Rob. (KING; ROBINSON 1980), *Monogereion carajensis* G.M.Barroso e R.M.King (Asteraceae) (BARROSO; KING, 1971) e *Ipomoea cavalcantei* D.F.Austin, além de *I. carajasensis* D.F.Austin (Convolvulaceae) (AUSTIN, 1981).

Pesquisadores do MPEG prosseguiram, nas décadas de 1970 e 80, com coletas botânicas na região, especialmente nas formações rupestres, resultando na publicação da primeira listagem florística para esse tipo de vegetação em Carajás (SECCO; MESQUITA, 1983). A listagem de Secco e Mesquita foi então incrementada em publicações subsequentes (SILVA et al., 1986a; SILVA; ROSA; SALOMÃO, 1986b; SECCO; LOBO 1988; PORTO; SILVA, 1989) e, oito anos depois, um nova lista de espécies de plantas vasculares da Serra Norte foi publicada por Silva (1991), baseada quase exclusivamente em coletas da referida autora. Esta listagem, mais completa, apresenta 231 espécies de Angiospermas e uma espécie de Pteridófita, com destaque para as famílias *Poaceae* e *Fabaceae*, as mais ricas neste levantamento.

No início dos anos 2000, herbários voltaram a receber coletas provenientes da Serra dos Carajás com maior intensidade, quando pesquisadores vinculados ao herbário BHCB da Universidade Federal de Minas Gerais participaram de estudos sobre a flora da região financiados pela Vale S/A em processos de licenciamento de empreendimentos minerários (GOLDER, 2010).

Algumas espécies são consideradas de ampla distribuição nas serras de Carajás, como *Perama carajensis* J.H. Kirkbr., *Monogereion carajensis*, *Ipomoea marabaensis* D.F. Austin & Secco, *Picramnia ferrea* Pirani & W.W. Thomas, *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* Barneby, *M. skinneri* var. *carajarum* Barneby, *Erythroxylum nelson-rosae* Plowman, *Utricularia physocera* P.Taylor e *Xyris brachysepala* Kral, outras são mais restritas, ocorrendo em uma ou duas serras. Por exemplo, *Daphnopsis filipedunculata* Nevling & Barringer (*Thymelaeceae*) e *Ipomoea cavalcantei* foram encontrados apenas em alguns blocos da Serra Norte (GOLDER, 2010), enquanto *Carajasia cangae* foi encontrada apenas no bloco S11, Serra Sul (SALAS et al., 2015).

Figura 09 – Na Serra Norte os corpos de minério são organizados pelos blocos 1-9 (N1-N9). Na Serra Sul os corpos de minério são organizados pelos blocos 10-14 (S11A, S11B, S11C, S11D e Tarzan). Mapa da ocorrência de corpos de minério na Floresta Nacional de Carajás.



Fonte: Adaptado do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, 2014).

3.9 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

A investigação química e farmacológica dedicada a desvendar os metabólitos secundários de espécies quimicamente desconhecidas faz com que as técnicas de elucidação estrutural de compostos orgânicos se tornem cada vez mais importantes (STURM; SEGER, 2012).

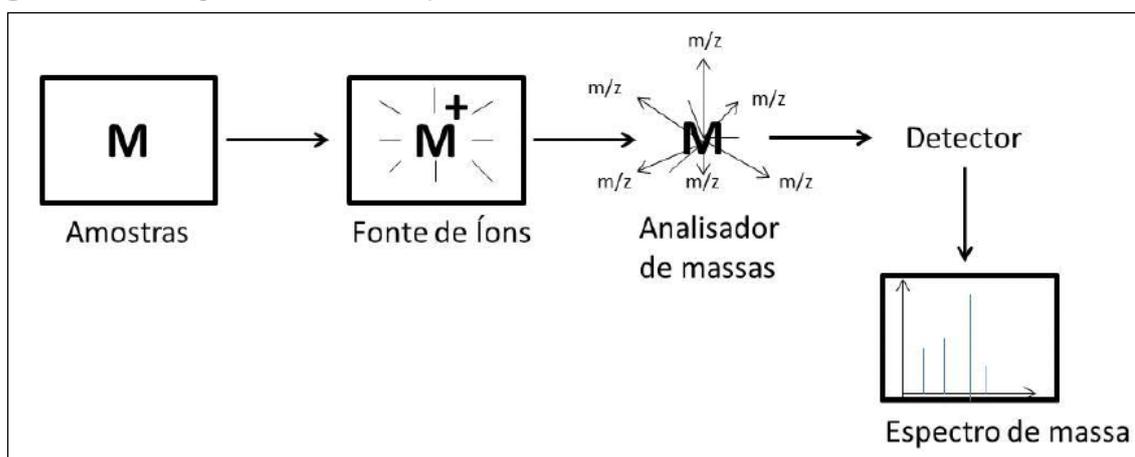
A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear é de grande importância para a elucidação estrutural de produtos naturais provenientes do metabolismo secundário (STURM; SEGER, 2012). Essa técnica mede a absorção de radiação

eletromagnética na região de radiofrequência entre 4 e 750 MHz, fornecendo um “mapa” do esqueleto de carbono-hidrogênio de uma molécula orgânica. É bom lembrar que, diferente da absorção no ultravioleta visível e no infravermelho, neste tipo de espectroscopia os núcleos de átomos e não os elétrons estão envolvidos no processo de absorção de energia (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; VOGEL, 2008; MCMURRY, 2010).

Outra técnica que ajuda a identificar e a elucidar estruturas de substâncias orgânicas é a espectroscopia de massas. Juntas essas duas técnicas frequentemente possibilitam a determinação das estruturas de moléculas muito complexas (VESSECCI et al., 2008; MCMURRY, 2010).

Espectrometria de massas é uma técnica que fornece massa atômica e molecular, além de informações estruturais das moléculas estudadas. Para isso, a amostra é ionizada por meio de uma fonte de íons, em seguida os íons são separados de acordo com suas razões m/z e por fim, passam por um detector que os transforma em um sinal elétrico amplificado que então é convertido em um espectro para ser analisado, como mostra a Figura 10 (VOGEL, 2008).

Figura 10 - Diagrama de um espectrômetro de massas



Fonte: Adaptado de Vogel (2008).

Essa técnica é utilizada para a análise de compostos orgânicos em diversas áreas da ciência, principalmente química, biologia e farmácia, pois auxilia na identificação da constituição química de uma substância. Em alguns casos ela fornece a fórmula molecular, permite também a identificação de certos grupos

funcionais e muitas vezes a determinação de parte da estrutura (VESSECCI et al., 2008).

3.10 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD)

As técnicas cromatográficas são utilizadas para separar os constituintes de uma mistura de substâncias seja para identificação ou obtenção da substância pura, sendo empregadas para a investigação química dos extratos brutos e caracterização dos metabólitos secundários de interesse. (STREGE, 1999). As técnicas espectroscópicas são utilizadas para a identificação estrutural destas moléculas.

A CLAE-DAD consiste em um importante método de investigação de perfil químico de metabólitos de fungos. A associação com detectores de diodo permite a seleção do melhor comprimento de onda, para cada componente da amostra. Trata-se de um método simples e rápido que pode ser utilizado para análise de pequenas quantidades de amostras, permitindo avaliar o perfilamento de poucas gramas de extratos de culturas ou de amostras vegetais em curto espaço de tempo (ABREU, 2010). Os limites de detecção alcançados na técnica são a níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$. O método permite também a realização de análises comparativas entre extratos submetidos a diferentes condições de cultivo. (SMEDSGAARD; NIELSEN, 2005).

A técnica de CLAE-DAD é amplamente utilizada em análises quantitativas e qualitativas avaliando o efeito de diferentes solventes orgânicos utilizados na extração dos compostos (CARDOZO et al, 2011). A CLAE pode ser utilizada para a purificação dos compostos extraídos de fungos usando diferentes sistemas de solventes, como metanol e água. (LI et al., 2010).

A técnica baseada em CLAE está entre os métodos de escolha para a determinação do perfil de metabólitos secundários de fungos isolados de plantas e do solo tem sido estudados extensivamente através da técnica analítica, pela determinação do perfil químico dos componentes majoritários e minoritários das amostras. As análises baseiam-se nos tempos de retenção característicos e nos espectros de absorção no UV (STADLER et al., 2004).

Métodos cromatográficos são extremamente úteis para avaliar a quimiotaxonomia de fungos. Pigmentos e outros metabólitos secundários podem ser

separados de acordo com suas polaridades. A introdução do método de extração de metabólitos em micro-escala, por Smeedgaard em 1997, fez da CLAE-DAD um método efetivo para a caracterização quimiotaxonômica de um grande número de fungos. Neste método, poucos fragmentos das colônias (plugs) são retirados e extraídos com uma pequena quantidade de solvente.

3.11 ESTUDO DA QUANTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Atualmente, buscam-se ferramentas que facilitem e promovam agilidade na obtenção de concentração de parâmetros químicos, dos quais são analisados frequentemente em laboratórios. O desenvolvimento de curvas de calibração torna-se de essencial importância no processo de quantificação das concentrações de compostos. Para obtenção dessa curva é seguida a Lei de Beer-Lambert, a qual descreve a obrigatoriedade da concentração e a absorvância seguirem um padrão linear. Ainda, pode ser extraído um coeficiente que expresse a confiabilidade da mesma.

A linearidade da curva corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ICH, 2005; USP, 2011; SWARTZ e KRULL, 1988).

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie (AUGUSTO; ANDRADE; CUSTÓDIO, 2000). Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta, obtida por análise de regressão linear, chamada de curva analítica (BARROS NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002).

O coeficiente de correlação (r) varia de -1 a 1. O sinal indica direção positiva ou negativa do relacionamento e o valor sugere a força da relação entre as variáveis. Uma correlação perfeita (-1 ou 1) indica que o escore de uma variável

pode ser determinado exatamente ao se saber o escore da outra. No outro oposto, uma correlação de valor zero indica que não há relação linear entre as variáveis (ALDRICH, 1995; HAIG, 2007; KOZAK, 2009).

Todavia, como valores extremos (0 ou 1) dificilmente são encontrados na prática é importante discutir como os pesquisadores podem interpretar a magnitude dos coeficientes. Para Cohen (1988), valores entre 0,10 e 0,29 podem ser considerados pequenos; escores entre 0,30 e 0,49 podem ser considerados como médios; e valores entre 0,50 e 1 podem ser interpretados como grandes. Dancey e Reidy (2006) apontam para uma classificação ligeiramente diferente: $r = 0,10$ até $0,30$ (fraco); $r = 0,40$ até $0,6$ (moderado); $r = 0,70$ até 1 (forte). Seja como for, o certo é que quanto mais perto de 1 (independente do sinal) maior é o grau de dependência estatística linear entre as variáveis. No outro oposto, quanto mais próximo de zero, menor é a força dessa relação.

3.12 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS

A Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou em abril de 2014 o relatório intitulado “Antimicrobial Resistance: Global Report on surveillance” no qual descreve a atual situação da problemática da resistência bacteriana no mundo. Segundo o documento, o mundo está prestes a entrar em uma era "pós-antibióticos", uma vez que em algumas regiões, o uso de antibióticos não é eficaz. Ainda segundo o relatório, o problema também parece ser particularmente agudo nos países de economias emergente, conhecidos como estados do ‘BRIC’: Brasil, Rússia, Índia e China. Países desenvolvidos também são afetados em grande escala por estes micro-organismos. No entanto, nos Estados Unidos da América, *S. aureus* resistente à metilina provocou uma taxa de mortalidade maior que os casos de morte por HIV e Hepatite B somados (CDDEP, 2014).

Um panorama mundial, a partir da análise de dados oficiais nacionais, mostra que o quadro é preocupante. A começar pela falta de informações dos países sobre a situação de seus territórios, uma vez que apenas 114 dos 194 países forneceram dados nacionais sobre resistência aos antibióticos (OMS, 2014). No Brasil – embora seja o maior país da América Latina e apresente centros médicos de excelência – a

resistência bacteriana nos hospitais representa um grande problema e um desafio na terapia das infecções bacterianas (ROSSI, 2011).

O uso de antibióticos na pecuária, o lançamento de águas residuais das indústrias farmacêuticas em rios utilizados pela população, falta de saneamento básico e, principalmente, uso descontrolado de antibióticos, são as prováveis causas para o acelerado aumento da resistência bacteriana. Na China, por exemplo, hospitais e clínicas recebem incentivos financeiros para a prescrição de medicamentos, e os antibióticos são a sua maioria (REARDON, 2014).

As taxas de resistência estão aumentando mundialmente, novos mecanismos de resistência estão surgindo e infecções causadas por bactérias multi-resistentes estão cada vez mais difíceis de tratar. Nosso arsenal atual de antibióticos está constantemente a perder a sua eficácia e há poucos sinais de que será devidamente repostos em um futuro próximo (WRIGHT; SEIPLE; MYERS, 2014).

O surgimento de cepas de *S. aureus* resistente a uma ampla distribuição de antibióticos – incluindo *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) da classe dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas, fluoroquinolonas, cloranfenicol, sulfonamidas, estreptomicina e tetraciclina – é uma causa de preocupação crescente em todo mundo e tornou-se um problema de pandemia devido a limitadas opções terapêuticas disponíveis (SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013; FERREIRA et al., 2014).

O desenvolvimento da resistência é um processo evolutivo normal para os micro-organismos, mas é acelerado pela pressão seletiva exercida pela utilização generalizada de agentes antibacterianos. Cepas resistentes são capazes de se propagar onde há descumprimento de medidas de prevenção e controle de infecções (OMS, 2014).

A introdução dos antibióticos na quimioterapia das infecções bacterianas em meados do século XX revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas. Esses agentes antimicrobianos podem eliminar as bactérias (atividade bactericida) ou evitar o seu crescimento (atividade bacteriostática) atacando principalmente três alvos básicos dos sistemas bacterianos: biossíntese da parede celular, síntese de proteínas, reparo e replicação do DNA (WALSH, 2000).

A forma mais comumente descrita de resistência ocorre por mutação genética ou através da aquisição de nova informação genética que codifica para o elemento

da resistência. Os mecanismos conhecidos de resistência incluem: **1)** inativação da droga catalisada por enzima – por hidrólise ou a formação de derivados inativos; **2)** mutação, destruição ou superprodução do alvo – a molécula alvo pode ser alterada por mutação ou modificação enzimática de tal modo que a afinidade do antibiótico para o alvo está reduzida; **3)** diminuição das concentrações intracelulares de drogas – absorção prejudicada ou bombas de efluxo dependentes de energia que promovem a eliminação de agentes antimicrobianos para o meio extracelular mais rápido que a difusão pela membrana plasmática de maneira que a concentração intracelular do agente se mantém insuficiente para bloquear as funções celulares; **4)** redução da permeabilidade da membrana externa – a droga não consegue penetrar eficientemente na célula bacteriana (ABREU; MCBAIN; SIMÕES, 2012; SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013).

3.13 BACTÉRIAS

Bactérias são micro-organismos unicelulares, procariontes (desprovidos de envoltório nuclear e organelas membranosas), com organização celular relativamente simples (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

As bactérias são microscópicas e apresentam tamanho médio de 1 a 2 μm por 1 a 4 μm , com membrana plasmática sem esteróis apresentando cadeias de peptidoglicanos que vão influenciar na forma da bactéria dependendo do tamanho destas cadeias e da quantidade de interligações existentes entre os peptidoglicanos. As bactérias não possuem núcleo delimitado e seu material genético (DNA) encontra-se disperso no núcleo da célula, sendo uma molécula em fita de fita dupla circular, altamente compactada (SARTORI, 2005).

As bactérias podem ser encontradas na forma isolada ou em colônias. Podem viver na presença de ar (aeróbias), na ausência de ar (anaeróbias) ou, ainda, serem anaeróbias facultativas. Ainda podem ser autotróficas (fotossintéticas ou quimiossintéticas) ou heterotróficas (saprófitas e parasitas).

Estão entre os organismos mais antigos, com evidência encontrada em rochas de 3,8 bilhões de anos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

As bactérias Gram positivas e Gram negativas apresentam diferenças marcantes sendo relevante ao estudo dos mecanismos de ação dos agentes antibacterianos (SARTORI, 2005).

Uma das diferenças em relação às células bacterianas é que as Gram-positivas possuem uma única camada de peptidoglicanos e as Gram-negativas têm uma segunda membrana lipídica na exterior da parede celular. Dessa forma, as bactérias que não possuem a camada com lipídios associados a polissacarídeos, Gram-positiva, são coradas com violeta de genciana, que impregna a camada peptidoglicana, adquirindo uma coloração roxo-azul. Já as bactérias que em sua morfologia apresentam as três camadas, Gram-negativa, não são coradas pelo corante, devido a não afinidade entre a pigmentação e a camada de lipopolissacarídeos, que também impede a fixação do corante com a camada de peptidoglicana subjacente, adquirindo uma coloração rosa-vermelho (SILVEIRA, 1995; MADIGAN et al., 2004; BARBOSA; TORRES; FURLANETO, 1998).

3.13.1 *Bacillus subtilis*

O *Bacillus subtilis* é um bastonete Gram positivo, aeróbio facultativo, não patogênico, produtor de ácido acético, formador de esporos e pode ser isolado do solo (MAZZA, 1994). Segundo Teo et al. (2006), as células de *B. subtilis* podem suportar o aquecimento até 100°C durante vários minutos, e os esporos podem sobreviver em 0,5% de sais biliares e germinar como células vegetativas novamente. Além disso, esporulam logo que as condições não são favoráveis (um só esporo por célula vegetativa), sendo muito resistentes no meio ambiente.

O principal modo de ação do *B. subtilis* é que seus esporos tem a capacidade de criar um ambiente anaeróbico dentro do intestino após a germinação, dessa forma, favorece o crescimento e proliferação dos lactobacilos microflora nativa, o que pode levar à exclusão competitiva a colonização de bactérias patogênicas e produção de ácido lático para controlar e limitar as bactérias patogênicas no intestino (LATORRE et al., 2014).

Algumas espécies de *Bacillus* são produtoras de substâncias estruturalmente semelhantes aos antibióticos, conhecidas como bacteriocinas, que são capazes de

inibir ou matar uma grande variedade de outros microrganismos. A subtilina, uma das bacteriocinas produzidas pelo *B. subtilis* e descoberta por Dirmick et al., (1947), é estável em ambientes ácidos e possui resistência térmica suficiente para suportar a tratamentos de 121°C, durante 30 a 60 minutos.

Possuem ainda, a capacidade de produzir diferentes enzimas exógenas, como a protease, lipase, celulase, xilanase, fitase e queratinase (LATORRE et al., 2014). Estas enzimas ajudam a melhorar a absorção de nutrientes, diminuem a viscosidade dos polissacarídeos não amiláceos no intestino, e diminuem a quantidade de substratos disponíveis para o crescimento de bactérias patogênicas. Além disso, tem sido mostrado que a presença de *Bacillus* isolados, tais como *Bacillus subtilis*, aumentam o crescimento de outros micro-organismos benéficos, tais como *Lactobacillus* pela produção de subtilisina e catalase diminuindo pH intestinal (HOSOI et al., 2000).

3.13.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é encontrada em esgotos, efluentes tratados e águas naturais sujeitas a contaminação recente por seres humanos, atividades agropecuárias, mamíferos selvagens e pássaros (OMS, 2014). É a principal bactéria do grupo de coliformes termotolerantes, sendo abundante nas fezes humanas e de animais de sangue quente, sendo utilizada como indicador de contaminação exclusivamente fecal (VON SPERLING, 2011)

São visualizadas como bacilos Gram-negativos isolados, aos pares ou em cadeias curtas. Podem ou não ser bactérias encapsuladas, não esporuladas, com motilidade variável e anaeróbia facultativas. Caracterizam-se também por não utilizarem o citrato como fonte única de carbono e por fermentarem a glicose, sendo denominadas fermentadoras e patógenas oportunistas (RESENDE, 2009; HAUSER, 2010).

A espécie *E. coli*, também é descrita por Hauser (2010), como comumente responsáveis por infecções do trato urinário, infecções intra-abdominais, gastroenterite, pneumonias adquiridas em hospitais e infecções de feridas.

Clark (2010) também cita essas bactérias como potencialmente resistentes a múltiplos fármacos, isso devido a seu amplo contato com estes agentes químicos. Hauser (2010) classifica esta bactéria como produtora de β -lactases especialmente resistente, chamadas de β -lactamases de espectro expandido.

A maioria das infecções e possíveis contaminações com agravo a saúde de seres humanos estão particularmente associadas aos cuidados e tratamento de saúde, sendo por contaminação direta ou indireta, ou mesmo por desenvolvimento de virulência das bactérias no corpo do paciente tratado em ambientes hospitalares (HAUSER, 2010).

3.13.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Classificada como um dos micro-organismos mais ubiqüitários, pelo fato de ser encontrado no solo, na água, nos vegetais, nos animais, nos alimentos e nos mais diversos ambientes hospitalares (HAUSER, 2010; TRABULSI; ALTERHUM, 2005). Taxonomicamente, dentro da família Pseudomonadacea, é uma bactéria definida como um bacilo Gram-negativo reto, não esporulado, móvel por um simples flagelo polar (TRABULSI; ALTERHUM, 2005). Sua obtenção de energia ocorre a partir de carboidratos por meio de metabolismo oxidativo (dependente de O_2), o que o inclui no grupo dos micro-organismos não fermentadores, podendo ser observados como células isoladas, aos pares, ou em cadeias curtas (NOVAES, 2009).

Descrita como a bactéria de maior importância médica e frequente em infecções hospitalares, sendo responsável em especial por pneumonia, infecção do trato urinário e infecção de feridas. Além disso, o tratamento é extremamente complicado, devido ao arranjo de mecanismos de resistência que ela alberga a múltiplos antibióticos (HAUSER, 2010, CLARK, 2010, LIM et. al., 2015).

As características com maior influência para a resistência dessa bactéria são, ter membrana externa relativamente impermeável, que contém porinas altamente seletivas, produzindo múltiplas bombas de efluxo e além disso, possuir cromossomo contendo uma β -lactamase induzível, além de colonizar superfícies formando biofilme (TRABULSI; ALTERHUM, 2005; HAUSER, 2010, LIM et. al, 2015).

3.13.4 *Staphylococcus aureus*

Bactéria de proveniência bucal e na pele. As bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* pertencem ao grupo dos cocos Gram-positivos, aeróbios, catalase positiva, possuem ácido teóico na parede celular (CLARK, 2010; HAUSER, 2010). Santos (2007) descreve que essa bactéria pode apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (com aspecto semelhante a um cacho de uvas), devido à sua divisão celular, que ocorre em três planos perpendiculares. Frequentemente esta espécie de bactéria forma colônias amarelo-ouro nas placas de ágar (daí o nome “aureus”, que significa ouro).

Santos (2007) também cita que essas bactérias são responsáveis por bacteremia, endocardite, osteomielite, pneumonia, infecção de pele e tecidos moles, além de responsável por pneumonias, também cita que por razões históricas *S. aureus*, são resistentes à penicilina, devido a sua ampla utilização para tratamento por um amplo período de tempo, isso devido à essa bactéria ter a capacidade de modificar parte do peptídeoglicano.

3.13.5 *Salmonella typhimurium*

Dentre os micro-organismos causadores de infecções no trato intestinal, que geraram as enterocolites, podemos destacar a *Salmonella Typhimurium*. Esta pertence à família Enterobacteriaceae, sendo anaeróbia facultativa, produtora de gás, capaz de usar o citrato como única fonte de carbono.

A infecção alimentar é a principal causa de enterocolites por tal bactéria, uma vez que a *S. Typhimurium* sobrevive em alimentos com alto teor de umidade e grande porcentagem de proteínas. Quando o indivíduo ingere o alimento contaminado pela *Salmonella*, esta penetra no epitélio intestinal causando a inflamação. Das manifestações clínicas, podemos destacar os vômitos, as náuseas, as diarreias, cefaleia e calafrios, sendo que a doença pode manifestar-se entre 12 e 36 horas, podendo apresentar variações durante o tempo (FORSYTHE, 2002; SILVA

JR., 1995; GERMANO, P; GERMANO, M, 2008; BAÚ; SIQUEIRA; MOOZ, 2012). A *Salmonella* spp. está amplamente distribuída na natureza, podendo ser um patógeno de aves domésticas, bovinos, suínos, pássaros, ovinos, focas, macacos, lagartos e outros répteis, além dos humanos (KONEMAN et al., 1997).

3.14 MÉTODOS ANTIMICROBIANOS

Segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003a), os testes de sensibilidade a antimicrobianos, são indicados para qualquer organismo que cause um processo infeccioso e exija uma terapia antimicrobiana, quando for possível prever a sensibilidade deste organismo, podem ser utilizados para verificar a sensibilidade *in vitro* dos micro-organismos frente aos agentes antimicrobianos.

Uma grande variedade de métodos pode ser empregada para medir a atividade *in vitro* de micro-organismos contra os agentes antimicrobianos (SILVEIRA et al., 2009). Atualmente, existem vários métodos disponíveis para a detecção da atividade antimicrobiana de produtos naturais. Estes métodos são classificados em três grupos, incluindo os métodos de difusão em ágar, bioautográfico e diluição. Os métodos de bioautografia e difusão são conhecidos como técnicas qualitativas uma vez que estes métodos apenas demonstram a presença ou ausência de substâncias com atividade antimicrobiana. Por outro lado, os métodos de diluição são considerados ensaios quantitativos, uma vez que determinam a concentração inibitória mínima (VALGAS et al., 2007).

Segundo Ostrosky et al. (2008), existem diversos fatores que afetam a suscetibilidade do método de difusão e de diluição, tais como: meios de cultura, disponibilidade de oxigênio, inóculo, pH e condições de incubação; diante disso existe a necessidade do conhecimento das condições experimentais e padronização rigorosa na execução do teste.

3.14.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM corresponde à menor concentração de agente capaz de inibir completamente o crescimento do organismo teste (RICARDO, 2008; MADIGAN et al., 2010).

O ensaio para a determinação da CIM é obtido através da macro ou microdiluição de compostos que consiste em se preparar diluições sucessivas do antimicrobiano a ser testado, em meios de cultura sólida ou líquida, semear o micro-organismo e após a incubação verificar a menor concentração (maior diluição) do antimicrobiano que inibiu o crescimento do micro-organismo (CLSI, 2002; 2003a).

Ensaio de diluição são aqueles nos quais os extratos ou substâncias a serem testadas são adicionados a um meio de cultura líquido, previamente inoculado com o micro-organismo teste (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991). No método de diluição em caldo podem ser empregadas as metodologias: macro ou microdiluição; esse teste considera a relação entre a densidade da turbidez de crescimento do micro-organismo testado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada; a avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

Após incubação, o crescimento do micro-organismo é determinado pela leitura visual direta ou turbidimétrica pelo uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado (SILVEIRA et al., 2009), assim como, pode-se mensurar a viabilidade e proliferação das células através de corantes indicadores de oxi-redução como Alamar blue e Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (DUARTE et al., 2005).

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;

Banho ultrassônico QUIMIS;

Espectrômetro de Ressonância Nuclear Varian Mercury 300;

Cromatógrafo líquido WATERS Alliance 2695;

Detector de UV (PDA) para HPLC 2998 e Water 2695 Separations Module;

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;

Silica gel SILICYCLE 70-230 mesh;

SephadexTM 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;

Caldo 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 ultrapurificada em aparelho GEHAKA;

Reveladores para cromatografia em camada delgada analítica: solução ácida de sulfato cério, 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 da espécie *Bauhinia guianensis*.

Um espécime de *B. guianensis* foi coletada na Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, pelo professor Andrey Moacir do Rosario Marinho, e uma exsicata está depositada no Herbário IAN - Embrapa Amazônia Oriental com o código IAN-177.179.

4.2.2 Processo de assepsia e de isolamento dos fungos endofíticos da *Bauhinia guianensis*.

Antes do isolamento dos fungos endofíticos, as folhas, galhos e cipós foram selecionados e submetidos a um procedimento de desinfestação superficial, seguindo o método padronizado por Santos (2003). O objetivo deste procedimento é eliminar a sujeira e grande parte dos fungos epifíticos e saprófitos que possam estar presentes na superfície dos tecidos vegetais. Assim, o material foi lavado, abundantemente, com água corrente para retirar o excesso de poeira e de epifíticos. Posteriormente, em câmara asséptica o material vegetal foi mergulhado duas vezes, por 2 minutos, em hexano para retirada de gordura existente na superfície. Em seguida, o material foi imerso em álcool etílico a 70% v/v por 2 minutos, e depois mergulhado, em hipoclorito de sódio a 3% m/v por 4 minutos. Após este procedimento, as folhas foram lavadas três vezes com água destilada estéril, por 1 minuto cada, para retirar o excesso das soluções esterilizantes.

Após a assepsia, pequenos fragmentos de *B. guianensis* foram plaqueados em meio de batata, dextrose e ágar (BDA), acrescido de terramicina (1mg/mL), para inibir o crescimento bacteriano no decorrer do processo de isolamento dos fungos endofíticos. As placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo os fragmentos, foram incubadas, a 25 °C, em estufa de B.O.D e o crescimento dos fungos foi monitorado diariamente. Os fungos foram isolados e purificados através de repiques sucessivos.

4.2.3 Coleta da *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* e do solo da Serra dos Carajás (PA).

As amostras foram coletadas em janeiro de 2013, em Parauapebas/PA, na Floresta Nacional de Carajás, área da Companhia Vale S/A. Na ocasião foram realizadas coletas da espécie *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* e coletas do solo. A Figura 11 mostra as coletas da *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*, da rizosfera, da Canga, da floresta e da mina de ferro N4W Norte. O material recém-coletado foi envolvido em jornal e acondicionado em caixas de isopor e transportado para o laboratório da Universidade Federal do Pará (UFPA), onde foram processadas, sob a responsabilidade do grupo de pesquisa dos professores Andrey Moacir do Rosario Marinho e Patrícia Santana Barbosa Marinho.

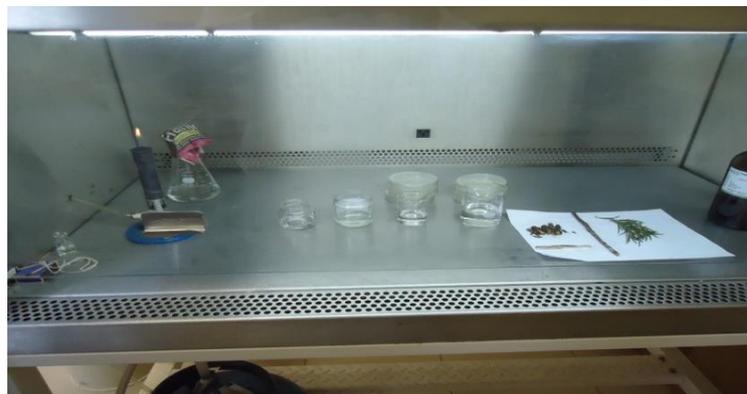
Figura 11- Fotografias da espécie vegetal *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* e dos solos estudados.



4.2.4 Processo de isolamento dos fungos endofíticos de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*

Após a coleta da espécie *M. acutistipula* var. *ferrea*, o material botânico foi dividido em folhas, raízes e caules. As amostras foram lavadas em água corrente, cuidadosamente, com descarte das danificadas. A desinfecção superficial das folhas e dos caules deu-se por imersão em câmara asséptica, como mostra a Figura 12. 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 3% por 4 minutos. Posteriormente, foram expostas em solução de álcool etílico a 70%, por 30 segundos, para matar os fungos epifíticos e, três vezes, em água destilada, esterilizada por 1 minuto, para retirar os resquícios dos agentes esterilizantes (SANTOS, 2003). Já, as raízes foram tratadas somente com água destilada esterilizada, por 5 minutos, e após secagem, foram maceradas.

Figura 12 - Processo de assepsia das folhas e dos caules de *Mimosa acustistipula* 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 13, p. 76) contendo meio de cultivo BDA (infuso de 200 g de batata; dextrose, 20 g; ágar, 15 g). O meio BDA foi adicionado a 1000 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 antibacteriano tetraciclina (a

100 mg/L) ao meio. Por fim, as placas de Petri contendo os fragmentos foram incubadas à temperatura ambiente de 25°C, em estufa BOD, durante 3 dias.

Figura 13- Processo de isolamento de fungos endofíticos de *Mimosa acustistipula* var. *ferrea*.



4.2.5 Processo de assepsia e de isolamento dos fungos do solo

Para o isolamento de fungos do solo, aplicou-se a técnica de suspensão seriada de acordo com Clark (1965) modificado, no qual 1 g de solo úmido, previamente, peneirado em malha de 2 mm é transferidos para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada esterilizada (com diluição 1:10), (Figura 14, p. 78) e agitados em agitador de tubos do tipo Vortex (100 rpm), por 10 minutos. Desta solução, 1 mL foi retirado e adicionado a 99 mL de água destilada esterilizada (com diluição 1:100), da qual, realizou-se uma nova diluição (1:1000). Da diluição 1:1000 retirou-se 0,1 mL para semear em placas de Petri, contendo meio de cultivo BDA e em outras placas de Petri, contendo o meio de cultivo Sabouraud, acrescido de tetraciclina a 100 mg/L (LACAZ et al., 1991), (Figura 15, p. 78).

4.2.6 Preservação e armazenamento dos fungos

Depois de purificados, os isolados foram transferidos para frascos de 10 mL contendo água destilada estéril, os quais foram, em seguida lacrados, e mantidos em estoques a temperatura ambiente, para a preservação conforme a metodologia de Castellani (1939). As cepas conservadas encontram-se armazenadas no Laboratório de Bioensaio e Química de Micro-organismo (LaBQuiM) da UFPA.

4.2.7 Obtenção dos extratos em micro-escala para fungos da Serra de Carajás

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 aproximadamente, 6 mm de diâmetro que foram transferidos para frascos de penicilina estéril contendo 10 mL do sistema de extração (Acetato de etila-Diclorometano-Metanol 3:2:1) (Figura 16, p. 78). 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, com solventes, por 2 vezes, com o mesmo intervalo de extração por vez. As amostras contidas nos potes foram secadas em capela de exaustão e, após secos, submetidos à análise de seus perfis cromatográficos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Figura 14- Processo de isolamento dos fungos de solo (Método de Clark adaptado).



Figura 15- Processo de isolamento de fungos do solo em placas de Petri.

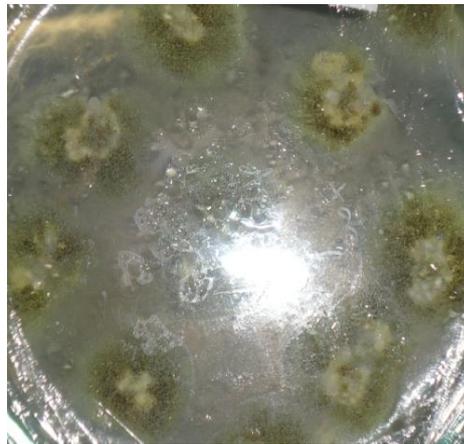


Figura 16- Extração de metabólitos secundários em micro-escala.



4.2.8 Obtenção do perfil químico dos micro-extratos por CLAE-PDA

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 °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 H₂O e MeOH. O gradiente exploratório linear de eluição usado foi de H₂O-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. Os cromatogramas foram obtidos em dois comprimentos de onda 248 nm e 268 nm.

4.2.9 Reativação do fungo endofítico *S. apiospermum*. e do fungo de solo *Trichoderma* sp. FSF12 do acervo da Micoteca do LaBQuiM

Após o preparo e da esterilização em autoclave vertical a 125° C do infuso BDA, deixou-se o mesmo atingir a temperatura ambiente para verter em placas de Petri dentro da capela de fluxo laminar. Das cepas dos micro-organismos *Scedosporium apiospermum*. e *Trichoderma* sp., foi transferido um pequeno fragmento de cada fungo e depositado no centro de cada placa de Petri com aproximadamente 20mL de BDA. Todas as placas foram mantidas em câmara de crescimento do tipo BOD, nas mesmas condições de temperatura e luminosidade. A avaliação do crescimento micelial consistiu da leitura, a cada 24 h. No quinto dia de

crescimento, as colônias de colorações brancas, algodonosas e opacas cobriam completamente o diâmetro das placas (Figuras 17 e 18).

Figura 17- Placa de Petri inoculada com o fungo endofítico *Scedosporium apiospermum*. com cinco dias de idade frente (A) e verso (B) em BDA.



Figura 18- Placa de Petri inoculada com o fungo de solo *Trichoderma sp.* Com cinco dias de idade frente (A) e verso (B) em BDA.



4.2.10 Cultivo do fungo *Scedosporium apiospermum*. isolado de *B. guianensis*.

Após o quinto dia de incubação em meio BDA, foi feito o cultivo em meio sólido (arroz Tio João[®] parbolizado). Foram usados 3800g do cereal que foram distribuídos uniformemente em 19 frascos de Erlenmeyers de 1.000 mL, 200 g de cereal por frasco, em seguida adicionou-se 150 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 discos de micélio de, aproximadamente, 5mm de diâmetro de *S.*

apiospermum. para 17 dos 19 frascos de Erlenmeyer utilizados como mostra a Figura 19. A figura 20 mostra o fungo após 28 dias de crescimento, em modo estático e conservado na ausência de luz, com a mesma macro morfologia de quando em BDA, ou seja, coloração branca, algodonosa e opaca. Dois controles foram preparados utilizando a mesma metodologia, sendo que nestes não foram acrescentados os fungos.

Figura 19 - Crescimento das colônias do fungo endofítico *Scedosporium apiospermum*. em meio sólido (arroz) no dia da incubação.



Figura 20- Crescimento das colônias do fungo endofítico *Scedosporium apiospermum*. EJCP13 em meio sólido (arroz), após 28 dias de incubação.



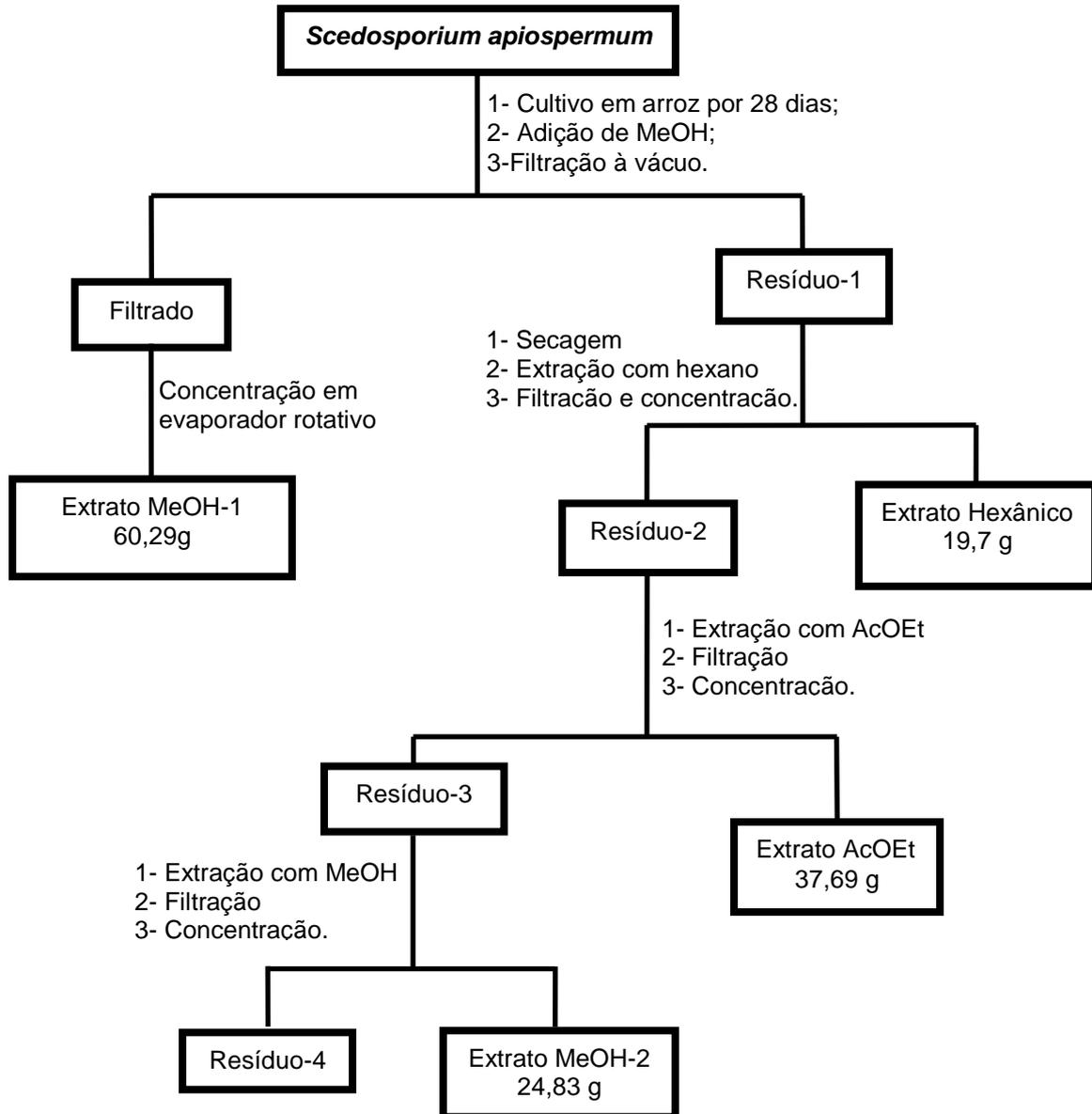
4.2.11 Cultivo do fungo *Trichoderma* sp. FSF12 isolado de solo da Serra dos Carajás.

Após o quinto 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 100mL 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 discos de micélio de aproximadamente 5mm de diâmetro de *Trichoderma* sp. para 13 dos 15 frascos de Erlenmeyer utilizados. O fungo de solo *Trichoderma* sp. FSF12 foi incubado em modo estático sem presença de luz por 25 dias, tempo estipulado para o crescimento do fungo. Dois controles foram preparados utilizando a mesma metodologia, sendo que nestes não foram acrescentados os fungos.

4.2.12 Obtenção dos extratos do fungo *S. apiospermum*. EJCP13

Depois de transcorridos os 28 dias de cultivo em meio sólido (arroz), foi acrescentado 300 mL de metanol aos frascos de Erlenmeyers por um período de 24 horas. O metanol, por ser tóxico, destrói os esporos, o que evita o risco de contaminação durante o manuseio da amostra. O sistema foi filtrado a vácuo com o uso de papel de filtro e de funil de Büchner, e a solução obtida foi concentrada em evaporador rotativo, fornecendo o extrato metanólico-1 (MeOH-1). Após a filtração, a massa fúngica foi seca e, em seguida, submetido à extração por 72 horas em hexano, posteriormente em acetato de etila e por último em metanol, fornecendo, respectivamente, os extratos hexânico, acetato de etila (AcOEt) e metanólico-2 (MeOH-2). A obtenção dos extratos é descrita no fluxograma 01 (p.83).

Fluxograma 01 - Obtenção dos extratos da biomassa produzida por *Scedosporium apiospermum*.



Posteriormente, os extratos brutos obtidos (hexânico, AcOEt, MeOH-1 e MeOH-2) foram analisados através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e via ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e, assim, foi escolhido o extrato hexânico para dar início aos estudos, seguido do extrato AcOEt e MeOH-1.

4.2.13 Fracionamento do extrato bruto hexânico do fungo *Scedosporium apiospermum*. EJCP13

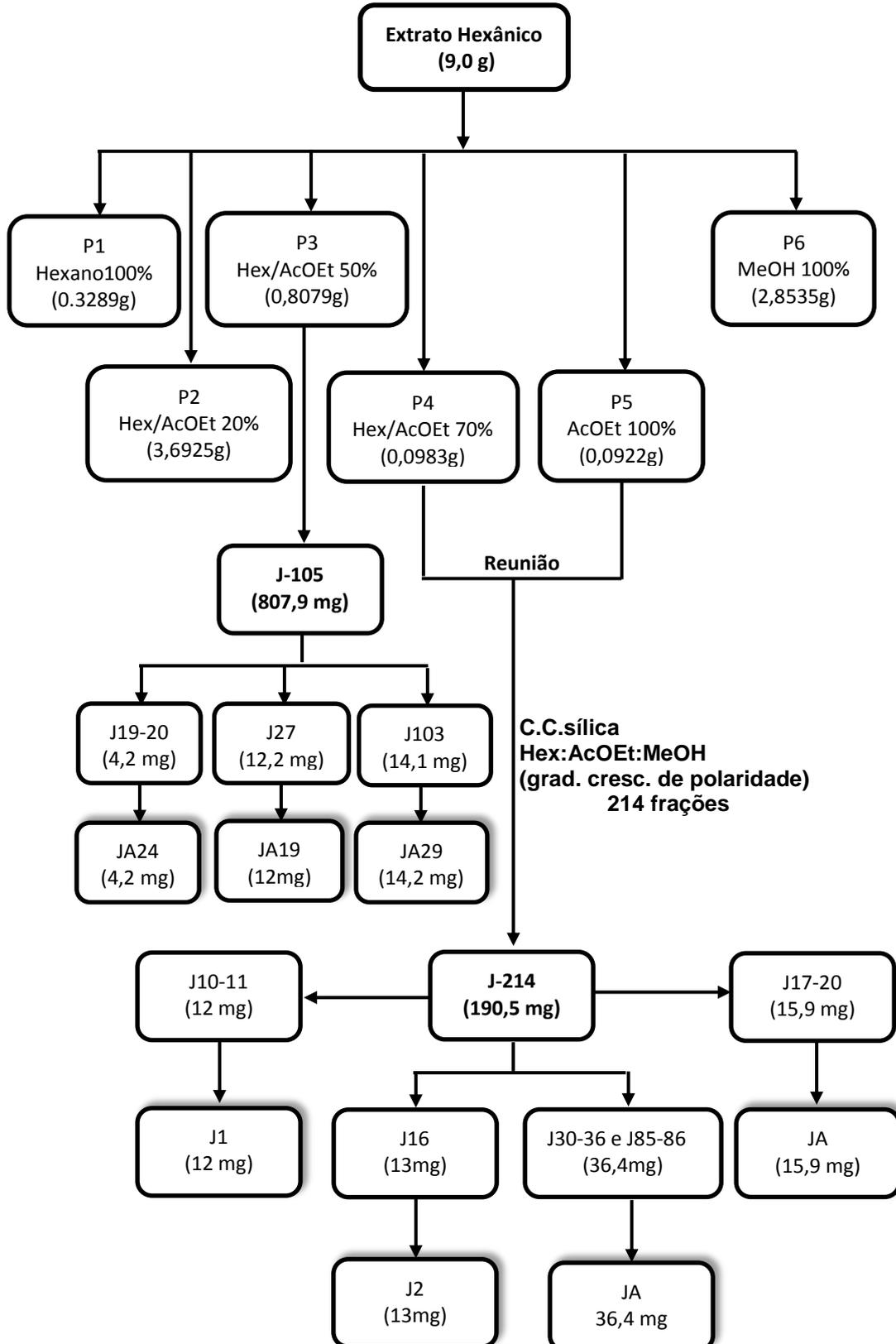
Parte do extrato bruto (9,0 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica filtrante em gel de sílica (70-230 mesh) utilizando como eluentes hexano, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de polaridade, obtendo-se seis frações, conforme mostrado no fluxograma 02 (p. 85).

Após a evaporação do solvente a escolha das frações para posteriores fracionamentos foi baseada, principalmente, nas análises cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e nos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H).

As frações: P4 e P5 foram analisadas por CCDA e por comparação dos fatores de retenção (R_f 's). Estas foram reunidas e submetidas a fracionamentos cromatográficos em sílica, utilizando-se como eluentes: hexano, acetato de etila e metanol em gradiente crescente de polaridade. Dessa reunião foram coletadas 214 frações (J-214). Das frações J10-11, J16, J17-20, J30-36 e J85-96 foram isolados as substâncias J1(m = 12 mg), J2 (m = 13 mg), JA(m = 15,9 mg) e JA (m = 36,4 mg) respectivamente (Fluxograma 02, p. 85).

A fração P3 (m = 807,9 mg) foi submetida a novo fracionamento cromatográfico utilizando como eluentes: hexano, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de polaridade e foram obtidas 105 frações (J-105). Das frações J19-20, J27, J103 foram isolados as substâncias JA24 (m = 4,2 mg), JA19 (m = 12 mg) e JA29 (m = 14,2 mg), respectivamente, (Fluxograma 02, p. 85).

Fluxograma 02: Fracionamento do extrato hexânico do fungo endofítico *Scedosporium apiospermum*.

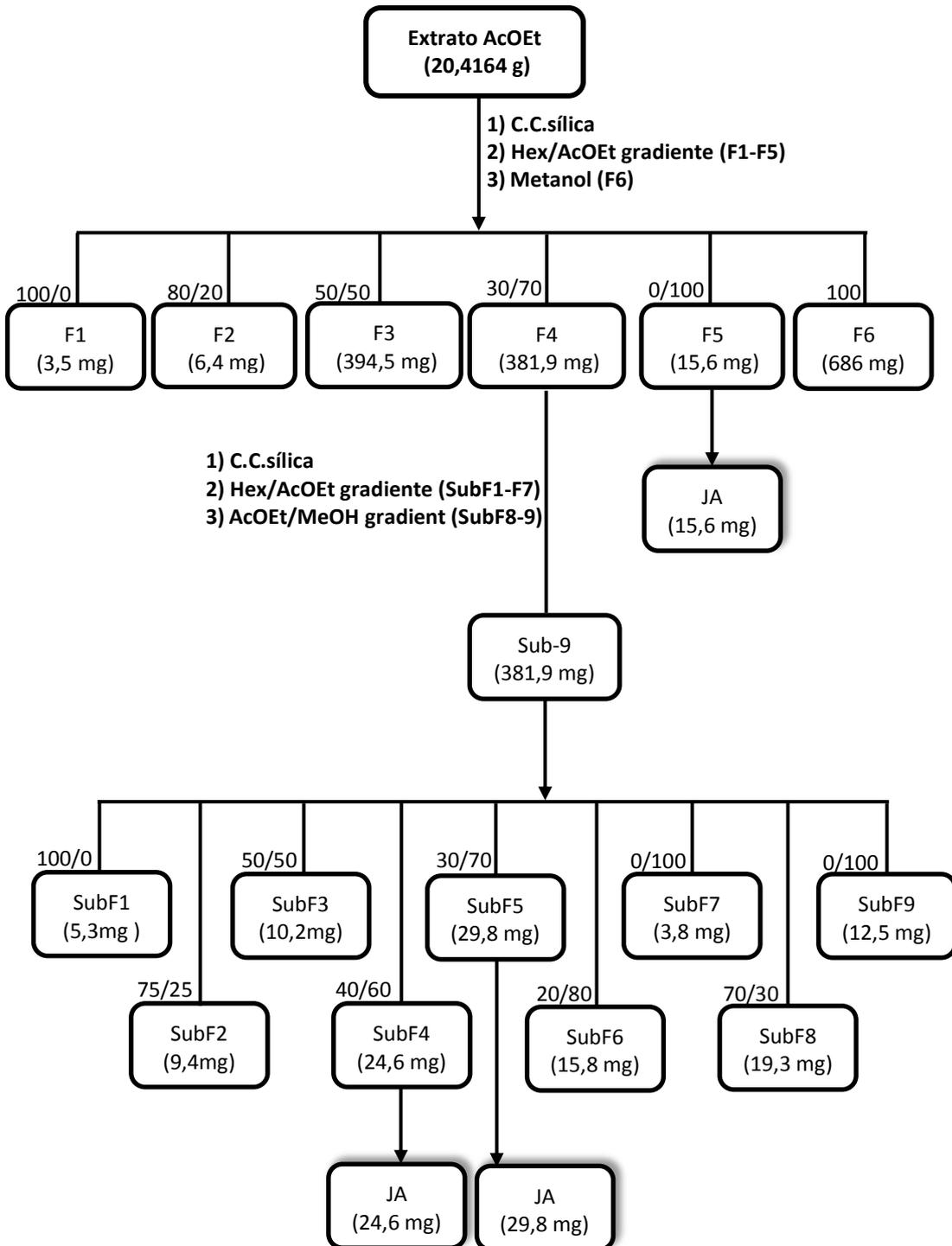


4.2.14 Fracionamento do extrato bruto AcOEt do fungo *Scedosporium apiospermum*. EJCP13

O extrato bruto foi fracionado (Fluxograma 03, p. 87) em CC (coluna 10 x 2,5 cm, sílica gel) usando um gradiente Hex/AcOEt nas seguintes proporções: 100/0, 80/20, 50/50, 30/70, 0/100 e, por fim, em metanol 100, usando 1000 mL de cada sistema de solvente.

Após evaporação do solvente as frações foram avaliadas por CCDA, resultando na substância JA (F5; 0/100 Hex/AcOEt). A fração F4 (m = 381,9 mg) foi submetida a novo fracionamento cromatográfico utilizando como gradiente Hex/AcOEt nas seguintes proporções: 100/0, 75/25, 50/50, 40/60, 30/70, 20/80, 0/100 e AcOEt/MeOH 70/30, 0/100 resultando em 9 frações (Sub-9). Das frações SubF4 e SubF5 foi isolado, novamente, a substância JA.

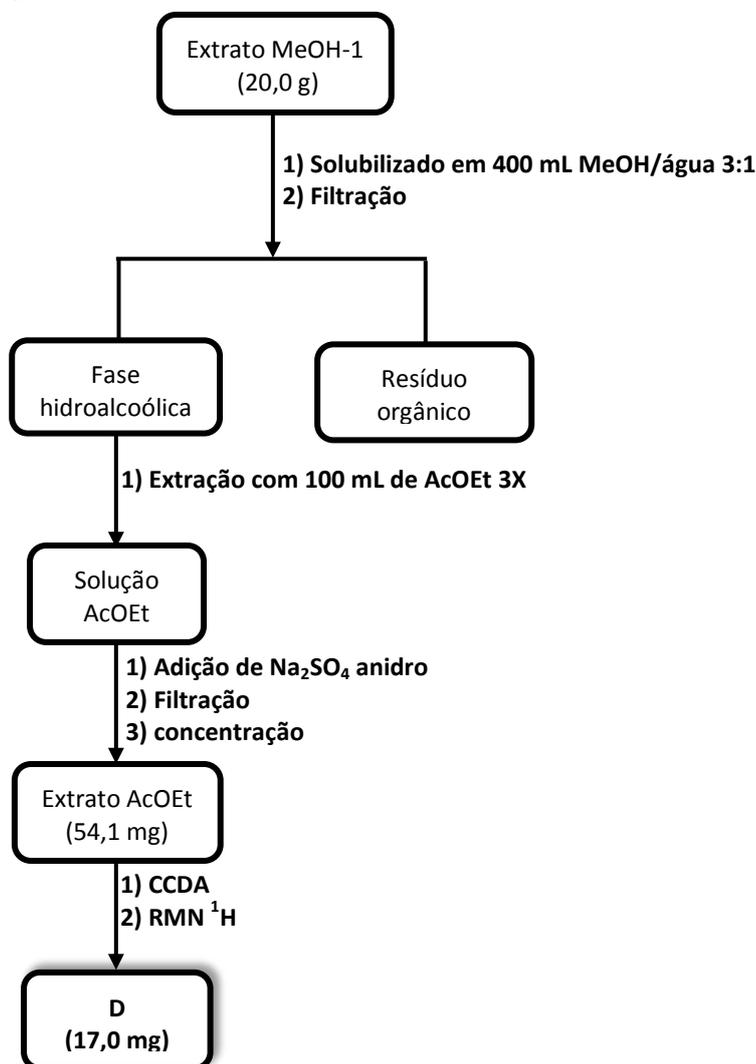
Fluxograma 03: Fracionamento do extrato AcOEt do fungo *Scedosporium apiospermum*.



4.2.15 Fracionamento do extrato bruto MeOH-1 do fungo *Scedosporium apiospermum*. EJCP13

Cerca de 10 g do extrato metanólico foi fracionado, através de uma partição líquido-líquido, utilizando uma solução metanol/água (3:1 v/v) para solubilizar o extrato, e logo em seguida submetido à filtração simples de onde se obteve uma fase hidroalcoólica e um resíduo orgânico. A fase hidroalcoólica foi particionada com 100 mL de acetato de etila, por três vezes, e na solução obtida foi adicionado um agente dessecante (sulfato de sódio anidro) para eliminar a máxima quantidade de água. Depois de filtrado e seco a massa do extrato AcOEt obtida foi de 54,1 mg. Em seguida, parte do extrato (17 mg) foi submetido a RMN ^1H e identificada a substância D (Fluxograma 04).

Fluxograma 04: Partição líquido-líquido do extrato metanólico de EJCP13



4.2.16 Análises Quantitativas

4.2.16.1 Quantificação da Brefeldina A nos extratos brutos de EJCP13

Para o preparo da solução padrão, 1,00 mg de brefeldina A foi pesado em balança analítica e solubilizado em 999 μL de metanol. Desta forma temos uma solução padrão estoque na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Da solução padrão foi retirada uma alíquota de 10 μL e acrescentado 495 μL de água e 495 μL de metanol, perfazendo-se uma solução de concentração $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A partir da última concentração foram feitas diluições de forma a obter soluções nas seguintes concentrações de $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Cada solução foi injetada no sistema cromatográfico em triplicata.

A quantificação da brefeldina A foi realizada a partir dos extratos acetato de etila, hexânico, metanol-1 e metanol-2, produzidos a partir do fungo endofítico *Scedosporium apiospermum*. Dessa maneira, construiu-se uma curva de calibração, variando-se a concentração de brefeldina A, mantendo-se fixas as concentrações dos extratos em $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A curva de calibração construída foi analisada no espectrômetro de massas, utilizando-se uma coluna analítica Acquity UPLC BEH[®] C18 de 50 mm x 2,1 mm, (1,7 μm de diâmetro de poro) e água e metanol com a adição de 0,1% de TFA como fase móvel em condições gradientes (Tabela 01, p. 90). O fluxo utilizado foi de 0.4 mL/min (água e metanol) e o solvente utilizado para dissolução dos extratos foi metanol. Dessa maneira, realizaram-se experimentos de inserção direta no modo de ionização positivo, utilizando-se ESI/MS e as condições estão descritas na Tabela 02 (p. 90)

Tabela 01: Eluição em modo gradiente

Tempo (minutos)	Água (%)	Metanol (%)
0,0	30	70
1,5	1	99
2,0	1	99
2,1	30	70
3,5	30	70

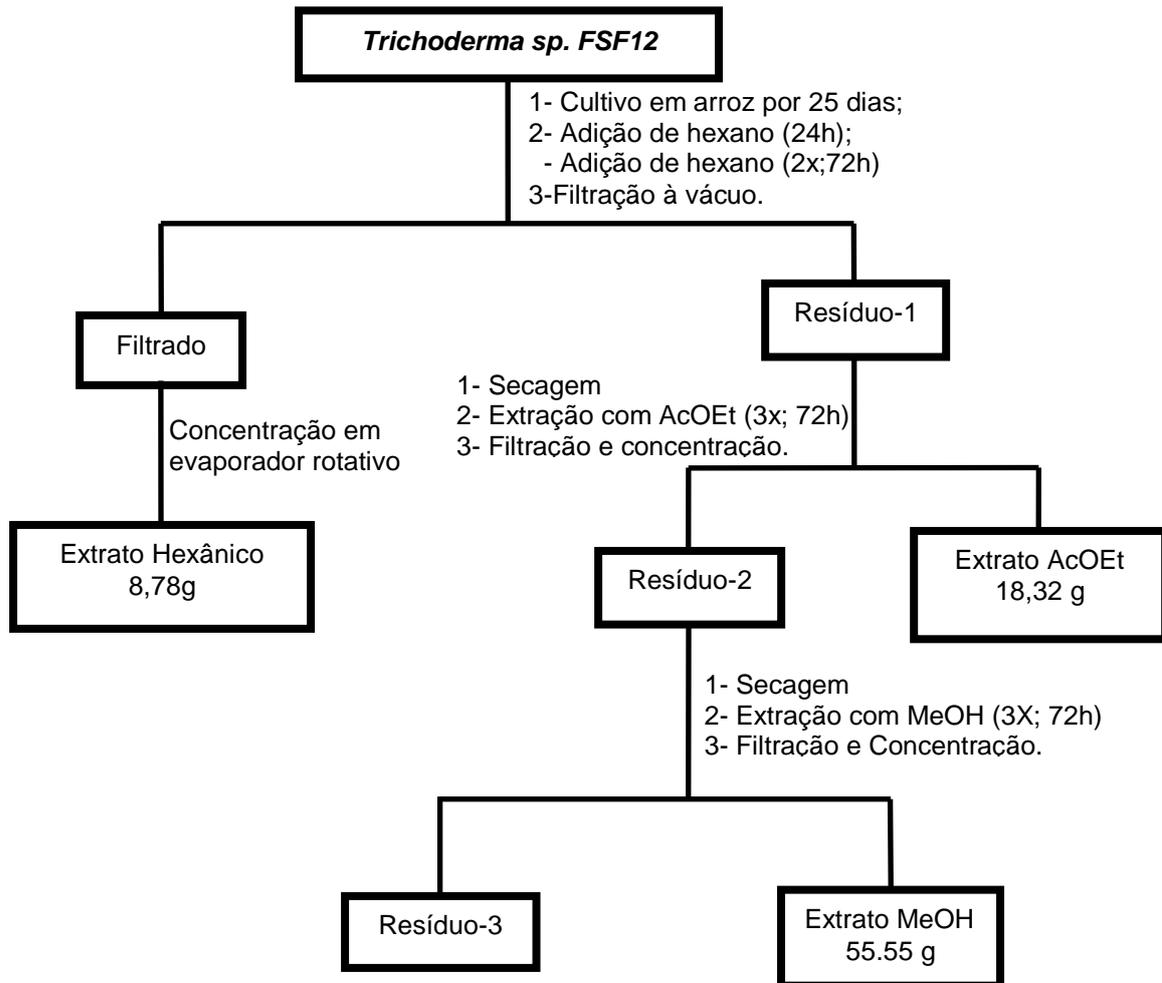
Tabela 02: Condições do espectrômetro de massas para (ESI+).

Temperatura da fonte (°C)	150
Temperatura do probe (°C)	350
Capilar (KV)	3,5
Cone (V)	30
Extrator (V)	3
Extrator (V)	0,1

4.2.17 Obtenção dos extratos do fungo *Trichoderma* sp. FSF12

Depois de transcorridos os 25 dias de cultivo em meio sólido (arroz), foram realizadas três extrações com hexano (300 mL) por frascos de Erlenmeyer, sendo que a primeira extração teve por objetivo eliminar os esporos do fungo para evitar possíveis contaminações. O sistema foi filtrado a vácuo com o uso de papel de filtro e de funil de Büchner. Após a filtração, a massa fúngica (resíduo) foi seca e, em seguida, submetido à extração por 72 horas em acetato de etila e por último em metanol e após evaporação dos solventes foram obtidos os extratos hexânico, acetato de etila (AcOEt) e metanólico (MeOH), conforme descrito no Fluxograma 05 (p. 91)

Fluxograma 05- Obtenção dos extratos da biomassa produzida por *Trichoderma* sp. FSF12.



Posteriormente, os extratos obtidos (hexânico, AcOEt e MeOH) foram analisados através de CCDA e via RMN de ^1H e assim escolhido o extrato AcOEt para dar início aos estudos.

4.2.18 Fracionamento do extrato bruto AcOEt do fungo *Trichoderma* sp

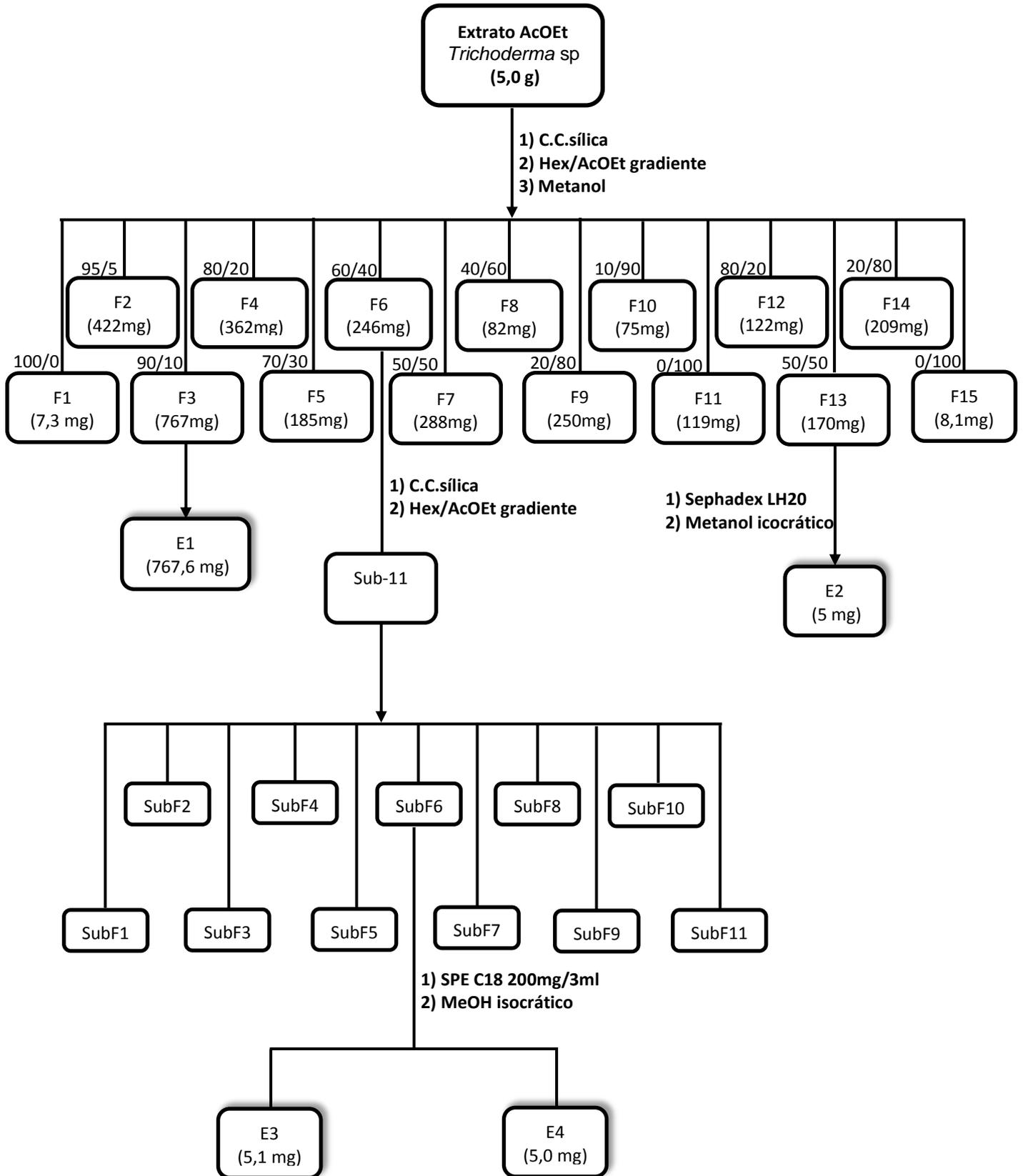
O extrato bruto foi fracionado (Fluxograma 06, p. 93) em cromatografia em coluna (coluna 10 x 2,5 cm, sílica gel) usando um gradiente Hex/AcOEt nas seguintes proporções: 100/0, 95/5, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50, 40/60, 20/80,

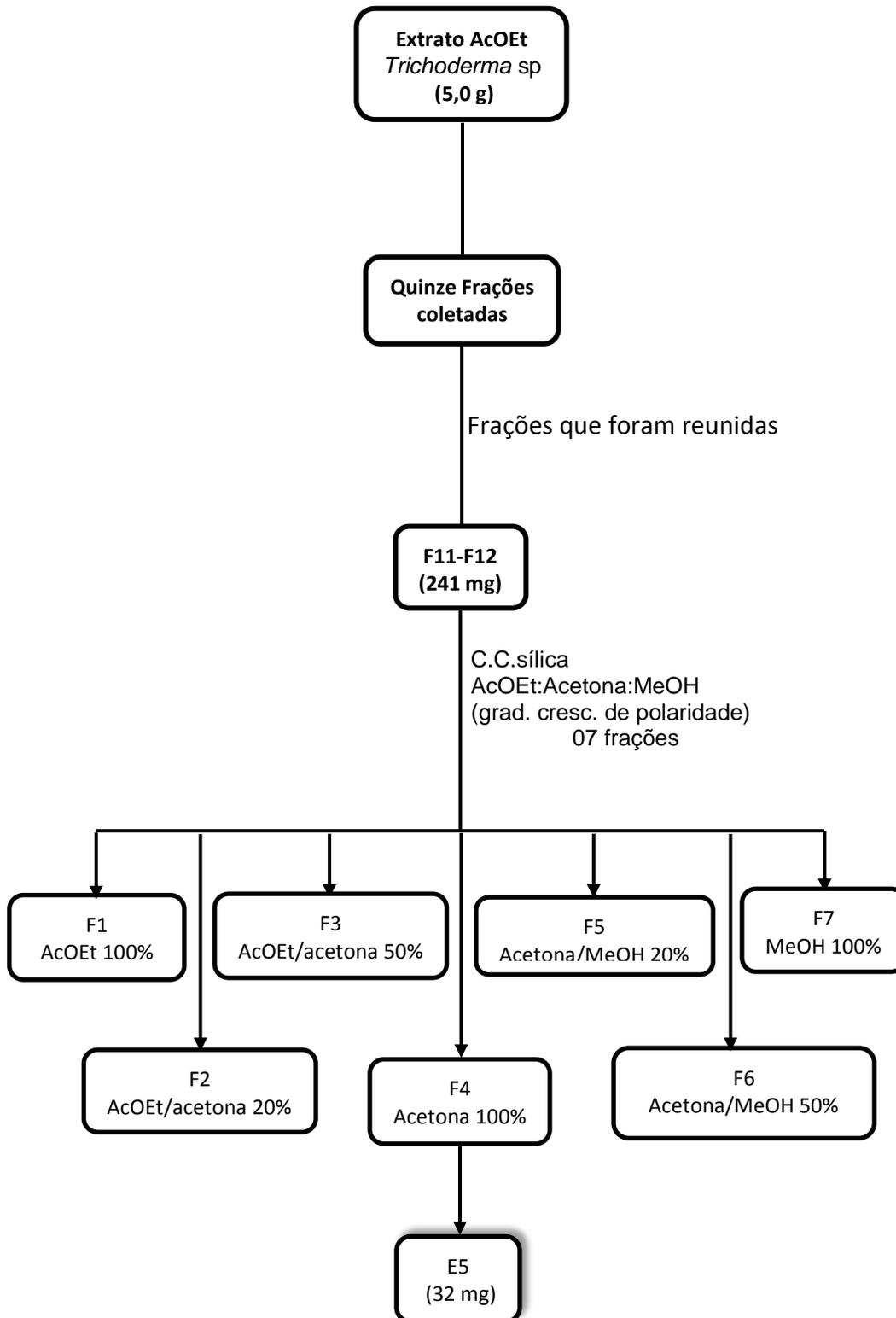
10/90, 0/100 e AcOEt/MeOH 80/20, 50/50, 20/80, 0/100, usando 400 mL de cada sistema de solvente.

Após evaporação dos solventes as frações foram analisadas por CCDA, resultando na substância E1 (F3; 90/10 Hex/AcOEt). F13 (50/50 AcOEt/MeOH foi cromatografada em coluna de sephadex-LH20 com eluição isocrática em MeOH e as frações obtidas foram submetidas a CCDA, sendo possível o isolamento do composto E2, como apresentado no Fluxograma 06 (p. 93). Posteriormente, a fração F6 (m = 245,8 mg) foi submetida a novo fracionamento cromatográfico em CC (sílica gel), utilizando como gradiente Hex/AcOEt nas seguintes proporções: 100/0, 90/10, 85/15, 80/20, 70/30, 60/40, 55/45, 50/50, 40/60, 20/80 e 0/100, resultando em 11 frações (Sub-11). A fração SubF6 foi adicionada em cartucho de extração em fase sólida C18 200mg/3mL obtendo-se as substâncias E3 (m = 5,1 mg) e E4 (5,0 mg).

As Frações F11 e F12 foram reunidas devido à semelhança apresentadas na análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e fracionadas, em cromatografia em coluna (sílica gel) utilizando como eluentes acetato de etila, acetona e metanol, em gradiente crescente de polaridade, usando 100 mL de cada sistema de solvente e obtendo-se sete frações. Da fração F4 (acetona 100%) foi isolada a substância E5 (m = 32 mg), como representado na Fluxograma 07 (p. 94).

Fluxograma 06: Fracionamento do extrato AcOEt do fungo *Trichoderma* sp.



Fluxograma 07: Fracionamento das frações juntas F11-F12

4.2.19 Ensaios Antimicrobianos

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no 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, houve a necessidade de se preparar o caldo de B.H.I. (Infuso Cérebro Coração), seguindo as recomendações do fabricante: para cada 1 (um) litro de caldo foram utilizados 37g de meio de cultura em um frasco de Erlenmeyer. Além disso, 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 autoclavado, a 121°C, por 15 minutos, para garantir total esterilidade e deixou-se atingir à temperatura ambiente para suas posteriores utilizações, conforme explicado nos itens a seguir.

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

4.2.19.1 Ativação das bactérias

As bactérias testadas 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.

4.2.19.2 Padronização da suspensão

Obteve-se, por meio de uma mistura das soluções de H_2SO_4 0,18 Mol/L (9,95mL) e BaCl_2 0,048 Mol/L (0,05mL) em 10 mL de água purificada, uma solução de BaSO_4 com padrão de turvação da McFarland número 0,5, que corresponde aproximadamente 1×10^8 UFC/mL (unidades formadas de colônias por mililitros). Após este processo comparou-se o tubo de ensaio contendo a solução bacteriana padronizada com o tubo de ensaio que continha a solução de sulfato de bário, e observou-se igual turvação. Por fim, a solução bacteriana foi diluída, sucessivamente, até a concentração de 1×10^4 UFC/mL, a qual foi a utilizada no ensaio antimicrobiano tanto dos extratos como das substâncias (CLSI, 2003).

4.2.19.3 Preparo das amostras

Foram utilizados 5 mg dos extratos orgânicos a serem testados, 1 mg dos micro-extratos orgânicos dos fungos endofíticos de *Mimosa acutistipula var. ferrea* e de fungos de solo e 1 mg de cada composto puro para serem dissolvidas 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.

4.2.19.4 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, 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

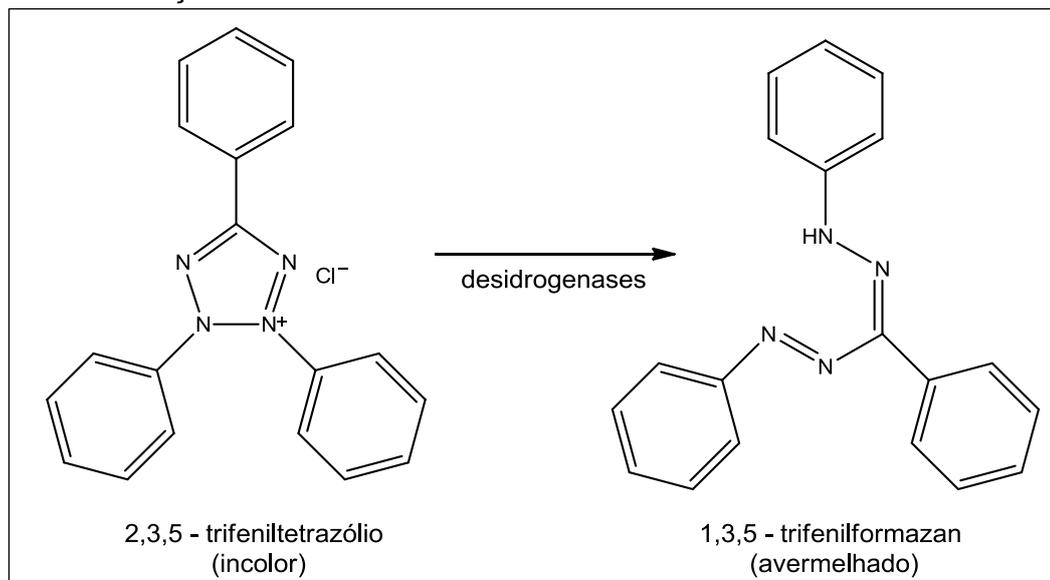
feita adicionando-se 10 μL do TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio) em cada cavidade da placa de Elisa.

4.2.19.5 Leitura com revelador

Foram realizadas leituras com o revelador TTC a 2%, do qual 10 μL foi adicionado em cada orifício das microplacas. No decorrer de 24 horas os poços que apresentaram atividade permanecem incolores, enquanto os poços nos quais houve crescimento microbiano coram de vermelho (DUARTE et al., 2005).

O TTC é um indicador de oxirredução utilizado para diferenciar tecidos metabolicamente ativos daqueles não ativos, principalmente, viabilidade celular. O mecanismo baseia-se na redução enzimática do cloreto de 2,3,5 – trifeniltetrazólio (incolor) em 1,3,5 – trifenilformazan (cor avermelhada), mostrado na Figura 21, em tecidos vivos devido à atividade de várias desidrogenases, enzimas importantes na oxidação de compostos orgânicos e, portanto, no metabolismo celular (GABRIELSON et al., 2002).

Figura 21: Reação de redox do TTC



4.2.19.6 Tipos de atividades antimicrobianas

Através da utilização da CIM foi possível demonstrar de forma quantitativa a concentração dos extratos e/ou substância que inibiu cada micro-organismo, mas este teste indica apenas a concentração capaz de causar a inibição do crescimento microbiano, e não identifica se a inibição foi bacteriostática ou bactericida. Nos poços de microdiluição que houve mudança na coloração, isto é, mudança de cor para vermelho, o resultado foi negativo, ou seja, houve crescimento bacteriano, já nos poços em que a coloração permaneceu inalterada, ou seja, de cor azul, o resultado foi positivo, indicando que não houve crescimento bacteriano.

Nos poços em que não houve mudança de cor do corante TTC, ou seja, permaneceram incolores, foi considerada a ausência de bactérias viáveis. Qualquer mudança da coloração foi considerada que houve crescimento bacteriano.

Para identificar se a inibição foi bacteriostática ou bactericida, foi utilizado o teste da Concentração Bactericida Mínima (CBM). A CBM é a quantidade mínima de agente antimicrobiano necessária para inviabilizar a célula microbiana, ou seja, provocar danos irreversíveis a célula bacteriana, sendo possível avaliar se o composto é bacteriostático ou bactericida (BARON; FINEGOLD, 1990).

Para determinar a CBM, foram selecionadas as cavidades que apresentaram inibição do desenvolvimento de bactérias no ensaio de CIM. Os micro-organismos foram isolados dessas cavidades e inoculados em meio ágar BHI isento de composto e incubados, por 24 horas, a 37 °C. Após a incubação, as culturas foram inspecionadas para a verificação visual do crescimento microbiano. Os testes foram feitos em duplicata.

Para a interpretação dos resultados foram considerados os seguintes critérios:

- ✓ Crescimento do micro-organismo no meio de cultura, significou ação bacteriostática;
- ✓ Ausência de crescimento do micro-organismo no meio de cultura, significou ação bactericida.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS CONTRA BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS

As bactérias utilizadas nos ensaios para determinação da atividade antimicrobiana das substâncias e/ou extratos foram Gram positivas: *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* e Gram negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*.

5.1.1 Avaliação da atividade antibacteriana para o extrato MeOH e metabólito secundário brefeldina A isolado do *S. apiospermum*.

A fração do extrato bruto e composto isolado do fungo *S. apiospermum* apresentaram atividade frente às bactérias. O extrato foi diluído e avaliado nas concentrações que variaram de 39,6 a 2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Já o composto isolado foi testado nas concentrações 7,81 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.1.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima é definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano nos poços de microdiluição conforme foi detectado macroscopicamente nas placas de Elisa.

O fungo *S. apiospermum* seguiu para o cultivo em meio sólido de arroz por 28 dias. Após este período, foi obtido o extrato metanólico bruto do fungo endofítico e determinadas as concentrações inibitória mínimas (CIM) e bactericida (CBM) através do método de microdiluição em caldo.

Na literatura não há uma classificação consensual sobre os valores de CIM. Aligiannis et al. (2001) apresentaram a seguinte classificação: CIM até 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são inibidores potentes; CIM entre 600 e 1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são inibidores moderados;

CIM acima de $1600 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são inibidores fracos. Enquanto Webster et al. (2008) propuseram um valor de CIM satisfatório entre $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ou menos. Seguindo a primeira classificação, o extrato do *S. apiospermum* é inibidor potente com CIM = $156,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *B. subtilis* e *S. aureus*. Frente às bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* o extrato apresentou-se moderado (CIM = $625 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e fraco (CIM = $2500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) respectivamente. Adicionalmente, todos estes resultados são satisfatórios (com CIM $\leq 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), exceto a *P. aeruginosa* segundo Webster e colaboradores.

Estes resultados concordam com os dados encontrados na literatura, os quais demonstram que as bactérias Gram negativas são mais resistentes à ação de produtos naturais, como extratos e óleos essenciais, pois a membrana externa presente nessas bactérias forma um envelope complexo, protegendo-as contra a ação desses agentes antimicrobianos (OLADIMEJI; ORAFIDIYA; OKEKE, 2004; HOLLEY; PATTEL, 2005; VERAS, 2011).

Os valores obtidos para os extratos fúngicos de *S. apiospermum* neste estudo, por serem descritos pela primeira vez, não permitiram uma comparação direta com os dados de outros autores. No entanto estes resultados podem ser considerados importantes, pois ajudam a classificar as possíveis atividades antimicrobianas presentes nesses extratos.

Já o composto purificado (brefeldina A) obtido dos extratos hexânico e AcOEt do *S. apiospermum* apresentou atividade antibacteriana potente para *B. subtilis* (CIM = $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), *E. coli* (CIM = $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e *S. typhimurium* (CIM = $7,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e foi inativo contra as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

5.1.1.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A concentração bactericida mínima (CBM) é a quantidade mínima de agente antibacteriano necessária para inviabilizar a célula microbiana, sendo possível avaliar se o composto é bactericida ou bacteriostático. Estas características dependem da origem do extrato fúngico e suas propriedades biológicas, e das linhagens bacterianas testadas.

As Concentrações Bactericidas Mínimas foram realizadas para o extrato metanólico e o composto isolado, brefeldina A, que apresentaram atividades a pelo menos um dos micro-organismos.

Na tabela 3 são apresentados os resultados da determinação da atividade antibacteriana do extrato MeOH e do composto isolado do *S. apiospermum* contra cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Observa-se que o extrato apresenta CBM somente contra cepa de *S. aureus* em 1250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Dessa forma, o extrato pode ser considerado um bactericida para esta bactéria nas concentrações maiores que 1250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Frente à bactéria *B. subtilis*, o extrato apresentou atividade bacteriostática na concentração de 156,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Já com a bactéria *P. aeruginosa* o extrato se mostrou bacteriostático na concentração de 2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Finalizando os ensaios do extrato metanólico frente à bactéria *E. coli*, observa-se atividade bacteriostática na concentração 625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Em relação ao metabólito secundário brefeldina A, observa-se na Tabela 03 que as concentrações estudadas não apresentaram ação bactericida sobre as cepas. Às bactérias *E. coli* e *B. subtilis*, apresentaram atividade bacteriostática nas concentrações de 62,5-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Já com a bactéria *S. typhimurium* a brefeldina A se mostrou bacteriostática nas concentrações de 7,81 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

TABELA 03 - Determinação da atividade antibacteriana ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) do extrato MeOH de *S. apiospermum* e Brefeldina A contra cepas padrão de bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Concentração Inibitória ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
Extrato MeOH	156,25 (-)	156,25 (-) 1250 (=)	625 (-)	2500 (-)	NR
Brefeldina A	62,5 (-)	(+)	62,5 (-)	(+)	7,81(-)
Bactérias	Bs	Sa	Ec	Pa	St

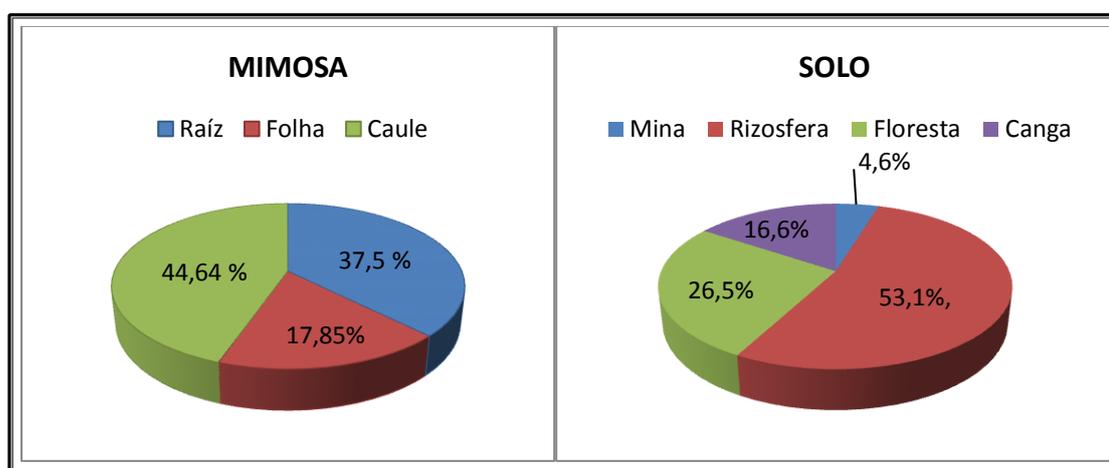
Legenda: *Bacillus subtilis* (Bs); *Staphylococcus aureus* (Sa); *Escherichia coli* (Ec); *Pseudomonas aeruginosa* (Pa); *Salmonella typhimurium* (St); sem atividade (+); Bacteriostático (-); bactericida (=); não realizado (NR).

5.2 RESULTADOS DO ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* E DE FUNGOS DE SOLO

A principal porta de entrada para micro-organismos endofíticos na planta é a raiz. Contudo, ao penetrar nesta, os endofíticos se disseminam para outros tecidos vegetais, e assim, conseguem colonizar regiões distantes como as folhas (AZEVEDO; MELO, 1998).

Foram obtidos 56 isolados de fungos endofíticos da planta *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*, sendo que 21 isolados fúngicos foram das raízes codificados como FMIC, correspondendo a 37,5% dos isolados, 10 isolados fúngicos foram das folhas (FFMC), o que representa 17,85%, e 25 fungos do caule (FCMC), equivalendo a 44,64% do total. Além disso, ainda foram isolados 3 (4,6%) fungos do solo da mina FeN₄W Norte (FMFe), 34 (53,1%) fungos rizosféricos (FRIZ) , 17 (26,5%) fungos do solo da floresta (FSF), 10 (16,6%) fungos do solo da Canga (FCN). Os gráficos das porcentagens dos fungos da mimosa e de solo da Serra de Carajás estão representados na Figura 22.

Figura 22: Gráficos quantitativos de fungos da *M. acutistipula* var. *ferrea* e de solo da Serra de Carajás.



Os fungos codificados como FRIZ06, FRIZ07, FRIZ08, FRIZ09, FRIZ13 e FRIZ14; FCN03 e FCN05; FMIC04 e FMIC15; FSF11 e FSF12 foram escolhidos, aleatoriamente, para ser objeto do presente estudo.

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS MICRO-EXTRATOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Mimosa acutistipula var. ferrea* E DE FUNGOS DE SOLO

Os micro-extratos dos 12 isolados escolhidos, aleatoriamente, foram submetidos ao ensaio antimicrobiano. Os micro-organismos testes foram: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

A resistência aos antimicrobianos sintéticos representa grande desafio no tratamento das infecções. O uso indiscriminado e irregular de antibióticos faz com que as bactérias se adaptem e se multipliquem, aumentando o problema da resistência aos antimicrobianos (CHAVES et al., 2008).

Esta situação tem impulsionado a busca de novas formas terapêuticas mais eficientes e menos agressivas ao organismo humano. Os produtos naturais representam uma alternativa extremamente viável, uma vez que sempre serviram de protótipo para o descobrimento de novos fármacos, pelas propriedades encontradas em seus constituintes químicos (SILVA et al., 2007).

A análise de amostras de extratos biológicos é um modo rápido para se identificar compostos com atividade inibitória. Dessa forma, foram testados 12 micro-extratos oriundos de fungos endofíticos da *M. acutistipula var. ferrea* e de fungos de solo contra Bactérias Gram positivas e Gram negativas. Os resultados das CIM para esses micro-organismos teste variaram entre 7,81 - 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A classificação sobre os valores de CIM estão propostos por Aligiannis e colaboradores (2001). Seguindo esta classificação, todos os micro-extratos são inibidores potentes frente à bactéria Gram positiva *B. subtilis*, exceto FSF11, FCN03, FCN05 e FMIC15 onde se observou a cor avermelhada na presença do revelador TTC, indicando assim o crescimento microbiano. Os melhores resultados foram apresentados pelos extratos FRIZ09 e FRIZ13 com CIM = 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, FRIZ06 (CIM = 15,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e FSF12 (CIM = 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Frente a bactéria *E. coli*, somente 50% dos micro-extratos se mostraram inibidores, sendo que os melhores resultados foram o FRIZ06 (CIM = 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e FSF12 (CIM = 15,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os micro-extratos FRIZ07, FRIZ09 e FCN03 obtiveram as mesmas concentrações 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para as inibições.

Dos 12 micro-extratos fúngicos testados frente à bactéria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*, nove (75%) são inibidores potentes. Destacando-se os

extratos fúngicos FRIZ 06, FRIZ 07, FRIZ 08 com CIM 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e o FSF12 com CIM = 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A análise da CBM de amostras de extratos biológicos é um modo rápido para se identificar compostos com atividade inibitória. Dessa forma, foram testados 12 micro-extratos fúngicos contra bactérias Gram positivas e Gram negativas.

De acordo com a Tabela 04, para *E. coli* foi observado, que dos 12 micro-extratos testados, quanto ação antibacteriana, os melhores resultados bacteriostáticos foram apresentados pelo FRIZ06 e FSF12. Para a bactéria Gram positiva *B. subtilis*, os que apresentaram os melhores resultados bacteriostáticos foram FRIZ06, FRIZ09 e FRIZ13, sendo que o FRIZ13 apresentou atividade bactericida na CBM 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Frente à bactéria *P. aeruginosa*, destacam-se os extratos fúngicos de FRIZ 06, FRIZ 07 e FRIZ 08, os quais apresentaram atividade bacteriostática nas menores concentrações testadas, e FSF 12 com concentração mínima de 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A interferência mais evidente ocorreu em relação ao micro-extrato fúngico FRIZ13, que apresentou atividade bactericida na CBM de 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados da concentração inibitória para esse micro-organismo teste variaram entre 7,81- 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

TABELA 04 - Determinação da atividade antimicrobiana ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) dos micro-extratos de fungos endofíticos da *M acutistipula var. ferrea* e de fungos de solo.

	FRIZ 06	FRIZ 07	FRIZ 08	FRIZ 09	FRIZ 13	FRIZ 14	FSF 11	FSF 12	FCN 03	FCN 05	FMIC 04	FMIC 15
Ec	7,81 (-)	125 (-)	(+)	125 (-)	(+)	(+)	(+)	15,62 (-)	125 (-)	(+)	250 (-)	(+)
Bs	15,62 (-)	62,5 (-)	62,5 (-)	7,81 (-)	7,81(-) 500(=)	125 (-)	(+)	31,25 (-)	(+)	(+)	125 (-)	(+)
Pa	7,81 (-)	7,81 (-)	7,81 (-)	500 (-)	125 (=)	125 (-)	(+)	31,25 (-)	250 (-)	(+)	125 (-)	500 (-)

Legenda: *Bacillus subtilis* (Bs); *Escherichia coli* (Ec); *Pseudomonas aeruginosa* (Pa); Bacteriostático (-); bactericida (=); sem atividade (+).

5.3.1 Ensaio antimicrobianos para os extratos do fungo do solo *Trichoderma sp.*

A atividade antimicrobiana (bacteriostática ou bactericida) dos extratos orgânicos, em meio sólido, foi analisada frente a 3 cepas bacterianas: *E. coli*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa* (Tabela 05).

A classificação sobre os valores de CIM são propostos por Aligiannis e colaboradores (2001). Seguindo esta classificação, os extratos EAMS (CIM = 2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e EHMS (CIM = 1250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) são inibidores fracos e moderados, respectivamente, frente à bactéria Gram negativa *P. aeruginosa*. Já com o EMMS o teste de microdiluição em placas do tipo Elisa foi observado a cor vermelha na presença do revelador TTC, indicando, assim, o crescimento microbiano. Frente as cepas de *E. coli* e *B. subtilis*, o EHMS apresentou atividade moderada com CIM de 625 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os extratos EMMS e EAMS não apresentaram atividade na presença da *E. coli* e *B. subtilis*. Os resultados das CIM para esses micro-organismos teste variaram entre 39,06 - 2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Em relação ao EMMS, demonstrou atividade bacteriostática na concentração de 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, frente a *E. coli*. O EHMS apresentou ação bacteriostática na presença das bactérias *B. subtilis* e *E. coli* nos mesmos valores de concentração, e bactericida na CBM de 1250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a bactéria *P. aeruginosa*. Em relação à *P. aeruginosa* o EAMS apresentou atividade bactericida na CBM de 2500 $\mu\text{g/mL}$.

TABELA 05 - Determinação da atividade antimicrobiana ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) da fração dos extratos orgânicos contra cepas padrão de bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Concentração Inibitória ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
EMMS	(+)	(+)	2500 (-)
EAMS	2500 (=)	(+)	(+)
EHMS	1250 (=)	625 (-)	625 (-)
Bactérias	Pa	Bs	Ec

Legenda: EMMS (Extrato metanólico meio sólido); EAMS (Extrato acetato meio sólido); EHMS (Extrato hexânico meio sólido); *Bacillus subtilis* (Bs); *Escherichia coli* (Ec); *Pseudomonas aeruginosa* (Pa); sem atividade (+); Bacteriostático (-); bactericida (=).

5.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DO TEOR DE BREFELDINA A NOS EXTRATOS ORGÂNICOS

O composto brefeldina A apresentou importante atividade antimicrobiana e, também, mostrou ser o metabolito secundário majoritário nos extratos de *S. apiospermum*. Assim, resolveu-se quantificar essa substância nos extratos brutos.

A determinação do teor de brefeldina A presentes nos extratos brutos do fungo endofítico *S. apiospermum* foi realizada através de espectrômetro de massas. As condições referentes às análises são descritas na seção 4.2.16 (p. 89)

Foram realizados, inicialmente, experimentos de íons produtos para, a partir do estudo de fragmentação, determinar os canais de Monitoramento de Reação Múltipla (MRM) para o composto, para posterior quantificação no espectrômetro de massas. Os canais de MRM utilizados para a quantificação da brefeldina A foram $281.4 > 245.2$, $281.4 > 263.2$ e $281.4 > 199.2$.

A curva de calibração foi construída com os valores de áreas e concentrações gerados a partir da integração das bandas referentes à brefeldina A nos extratos AcOEt, hexânico, MeOH-1 e MeOH-2 (Figuras 23-26, p. 107-108), onde o pico cromatográfico foi identificado com o tempo de retenção de 0,56 minutos.

Figura 23 - Banda de integração gerada pelo equipamento da substância brefeldina A do extrato AcOEt

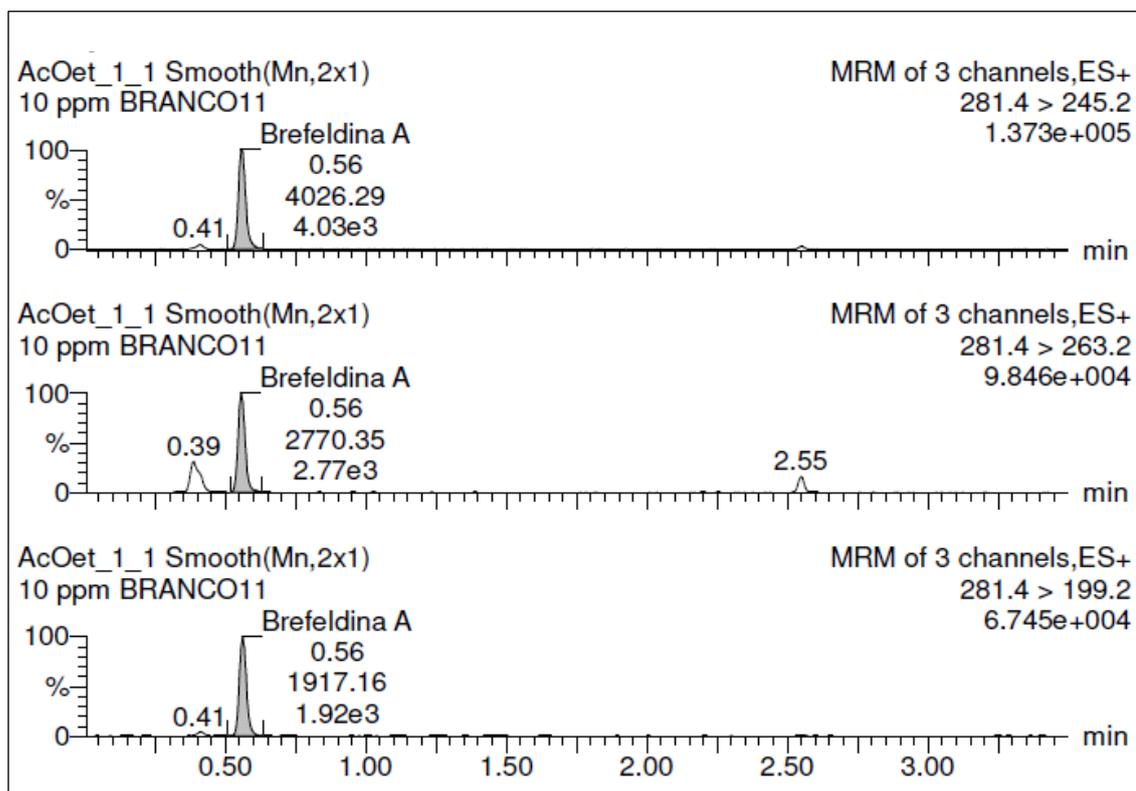


Figura 24 - Banda de integração gerada pelo equipamento da substância brefeldina A do extrato hexânico

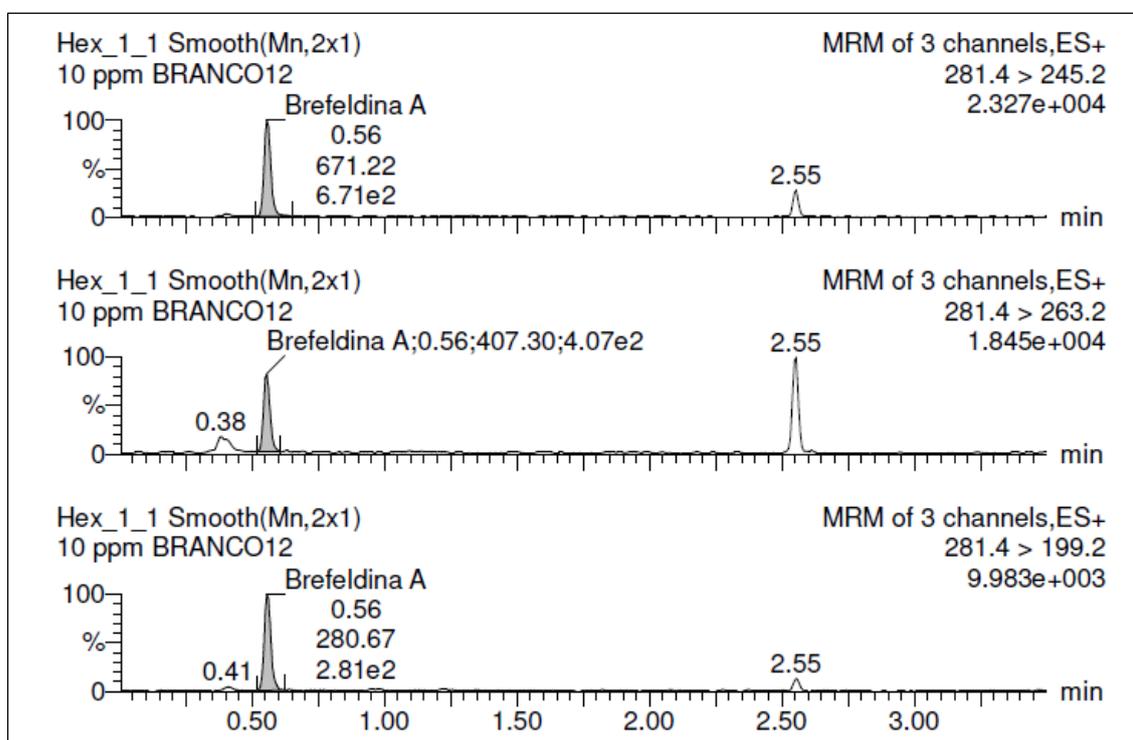


Figura 25 - Banda de integração gerada pelo equipamento da substância brefeldina A do extrato MeOH-1

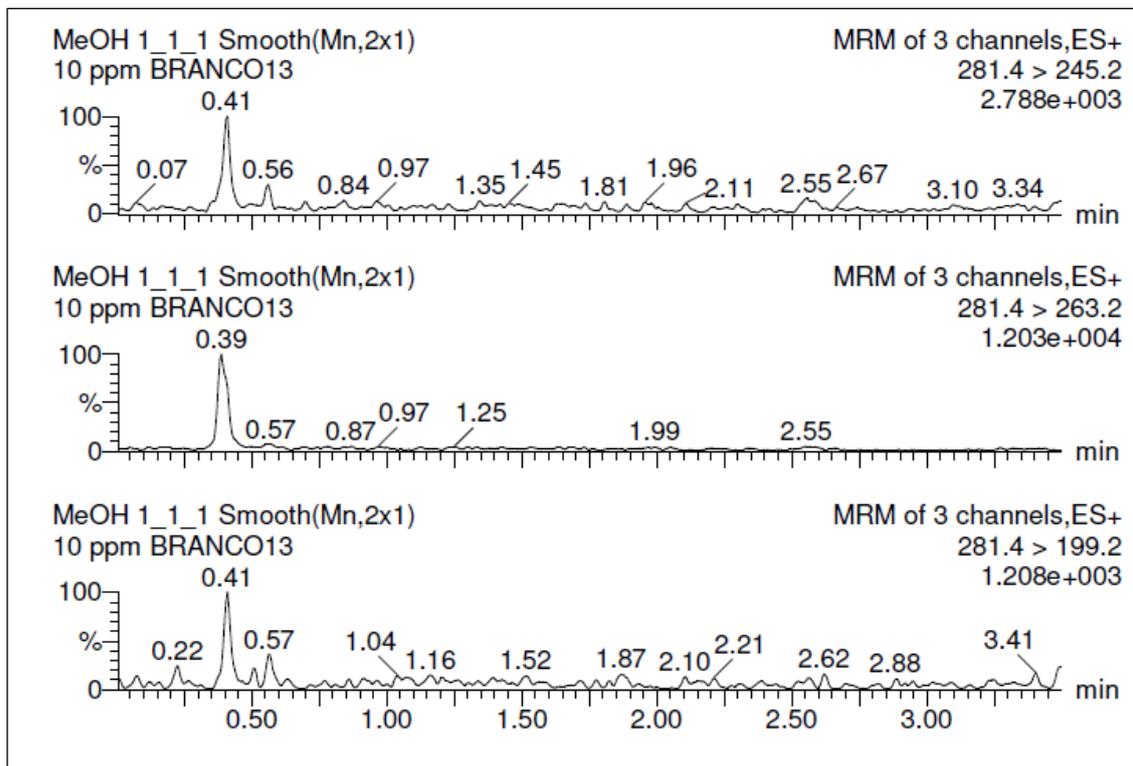
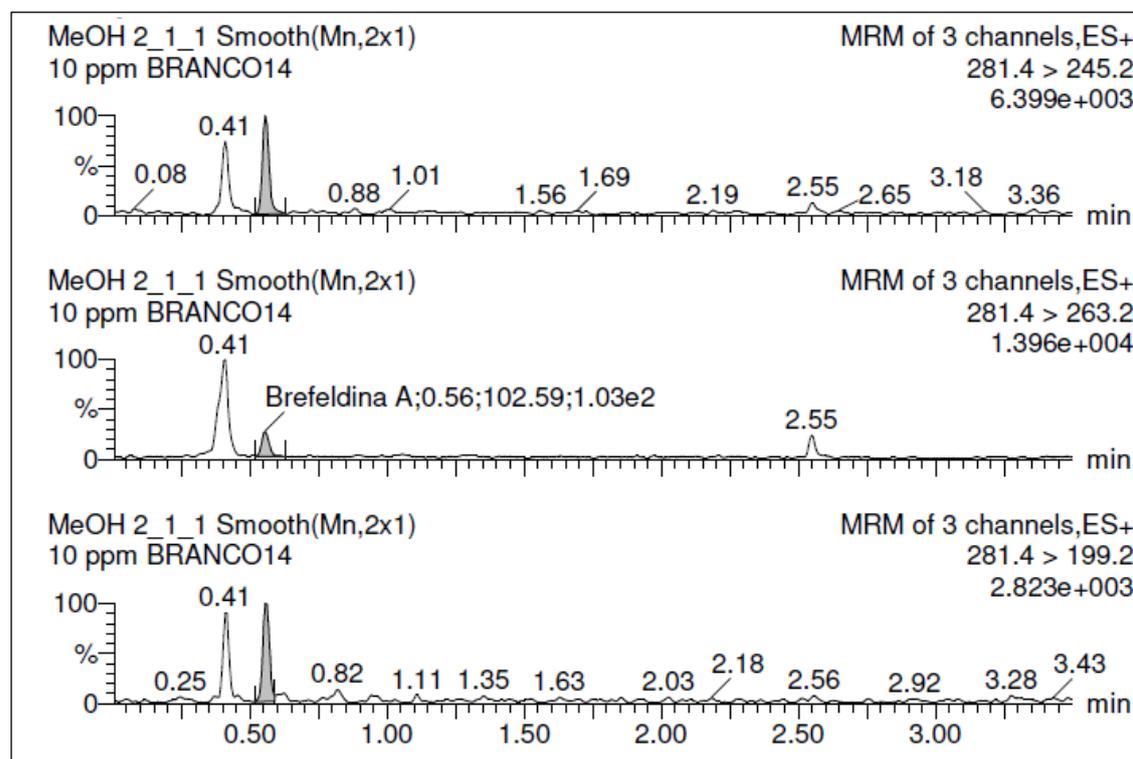
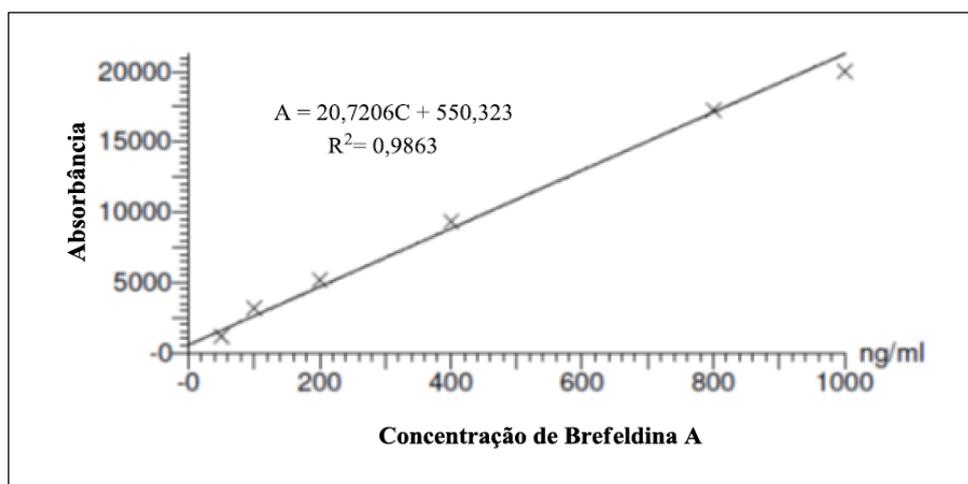


Figura 26 - Banda de integração gerada pelo equipamento da substância brefeldina A do extrato MeOH-2



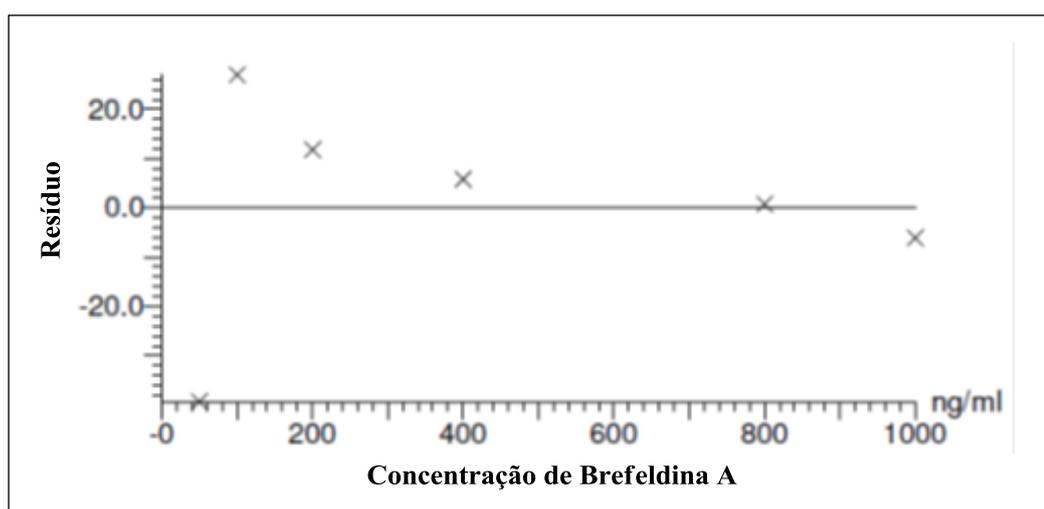
A partir dos dados obtidos, foi plotada a curva de calibração da brefeldina A, com a seguinte equação da reta: $A = 20,7206C + 550,323$, onde A é a absorbância a 760 nm e C é a concentração de brefeldina A, e o coeficiente de relação foi de $R = 0,9863$ (Figura 27). Recomenda-se que o coeficiente de correlação linear (R) seja igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003). Para o traçado da curva de calibração as injeções foram realizadas em triplicata.

Figura 27: Curva de calibração da Brefeldina A (50-1000 ng.mL⁻¹) a 760 nm.



O erro padrão mede a dispersão dos desvios, denominados resíduos, ao redor da reta de regressão. Como pode ser observado na Figura 28 e na Tabela 06 (p. 110), os resultados mais afastados da curva é o de concentração 50 ng.mL⁻¹ (resíduo - 39,3%) e 100 ng.mL⁻¹ (resíduo - 26,9%), ou seja, mais de 50% estão com resíduos abaixo de 20%.

Figura 28: Resíduo da Curva de calibração da Brefeldina A (50-1000 ng.mL⁻¹) a 760 nm.



Através da interpolação da absorção dos extratos analisados, com a curva de calibração, foi possível determinar o teor brefeldina A em nanograma (ng) por mililitro (mL) de extrato. Estes resultados estão expressos na Tabela 06.

Tabela 06: Valores obtidos de absorbância, concentrações e desvios padrão residuais para brefeldina A.

	Concentração projetada	Concentração experimental	Absorbância	Resíduos
Brefeldina A	50	30,4	1179.554	- 39,3
Brefeldina A	100	126,9	3180.466	26,9
Brefeldina A	200	223,5	5182.283	11,8
Brefeldina A	400	423,2	9320.154	5,8
Brefeldina A	800	806,3	17257.174	0,8
Brefeldina A	1000	939,6	20019.760	- 6,0
AcOEt	10000	394,0	8713.799	
Hexânico	10000	39,0	1359.189	
MeOH-1	10000	-	-	
MeOH-2	10000	-	355.440	

Os resultados apresentados na análise quantitativa do teor de brefeldina A nos extratos orgânicos confirmaram a presença desse metabólito secundário nos extratos AcOEt e hexânico. A brefeldina A, codificada como JA foi isolada do fracionamento dos extratos AcOEt e hexânico, conforme foi mostrado pelos Fluxogramas 02 (p. 85) e 03 (p. 87). Em relação aos extratos MeOH-1 e MeOH-2 não foi possível observar a presença da brefeldina A.

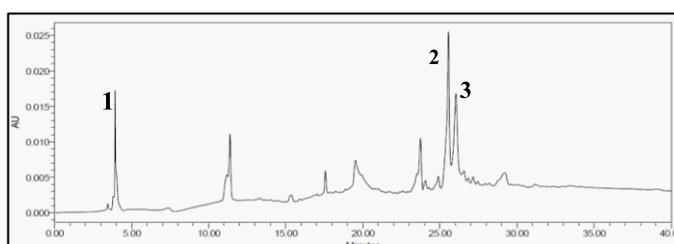
5.5 PERFIL CROMATGRÁFICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* E DE FUNGOS DE SOLO

Para os 12 fungos codificados anteriormente (p. 102), realizaram-se os perfis cromatográficos via HPLC no modo analítico em gradiente exploratório H₂O/MeOH 5 – 95%, coluna C-18, fluxo de 0,5 mL/min e $\lambda = 200$ a 600 nm dos extratos fúngicos. Os perfis apresentados para os extratos apresentaram uma variedade de classes de compostos químicos, conforme os cromatogramas (Figuras 29-39, p. 111-117).

5.5.1 Determinação das possíveis classes de metabólitos secundários presentes nos extratos fúngicos por meio de CLAE-DAD.

A escolha do melhor comprimento de onda para a análise das classes foi realizada através do monitoramento da faixa de comprimento de onda de 200 a 600 nm, por meio do sistema de detecção por arranjo de diodos. O comprimento de onda selecionado para as análises foi de 268 nm, o qual obteve-se boa sensibilidade para a maioria das substâncias presentes nos micro-extratos.

Figura 29: Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FRIZ07 em gradiente exploratório em 268 nm.



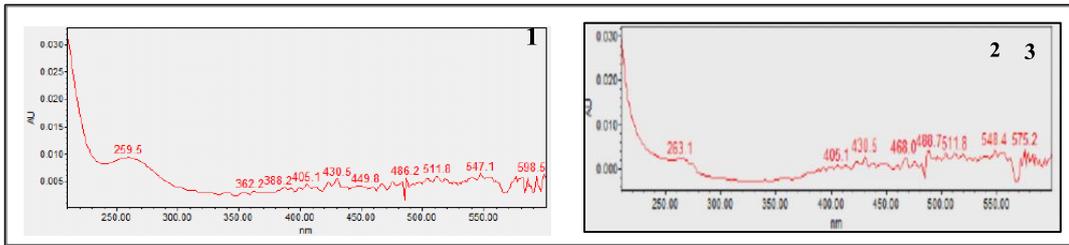


Figura 30: Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FRIZ08 em gradiente exploratório em 268 nm.

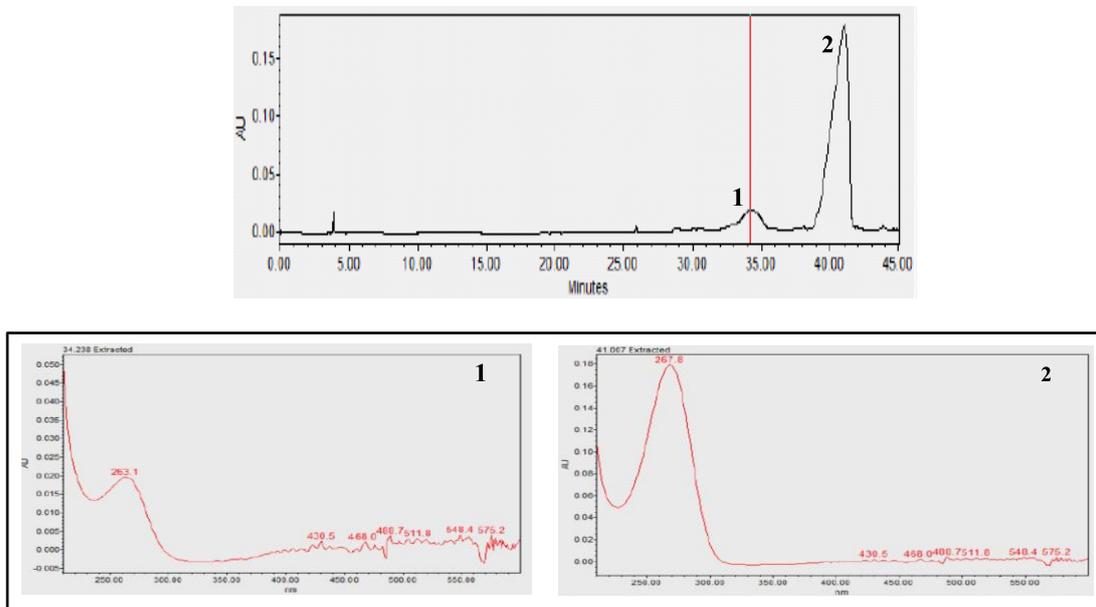
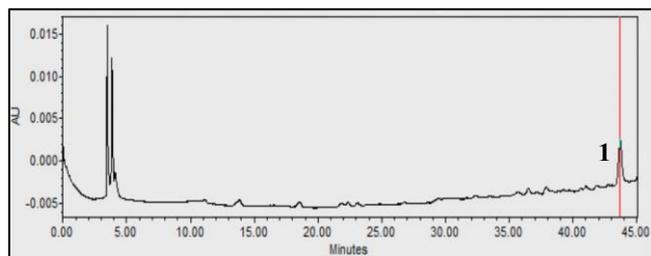


Figura 31: Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FRIZ09 em gradiente exploratório em 268 nm.



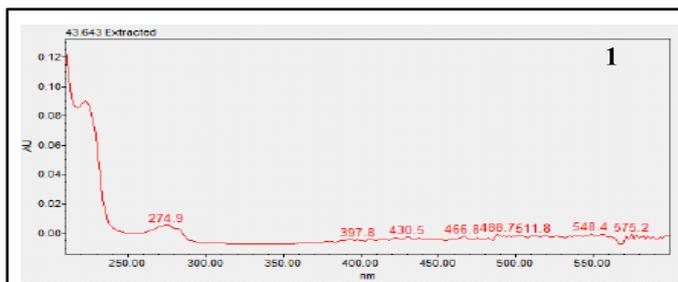


Figura 32: Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FRIZ13 em gradiente exploratório em 268 nm.

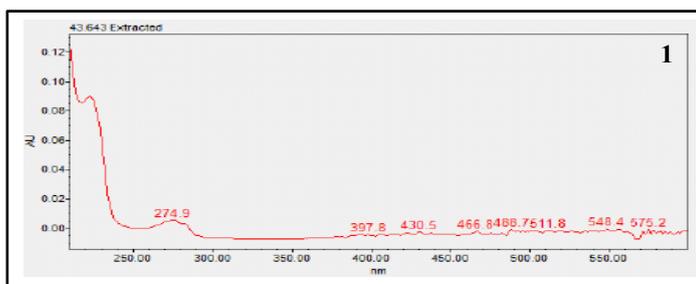
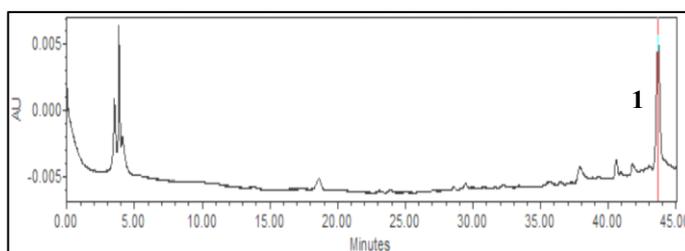
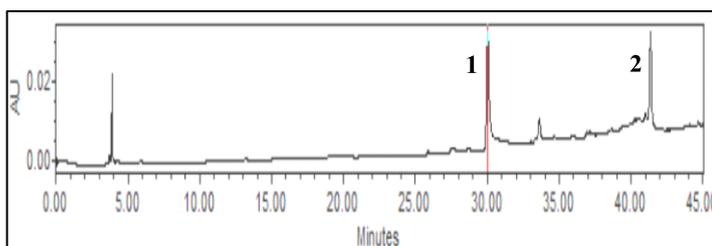


Figura 33: Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FRIZ14 em gradiente exploratório em 268 nm.



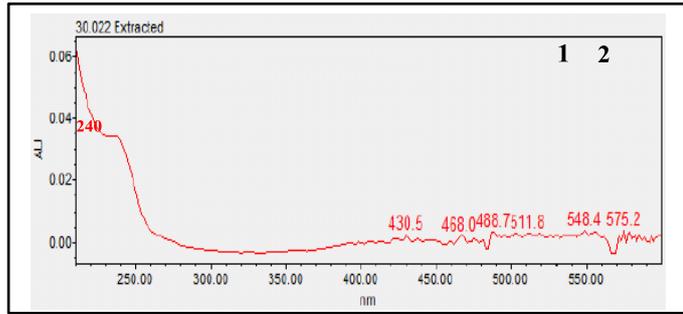


Figura 34: Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FSF11 em gradiente exploratório em 268 nm.

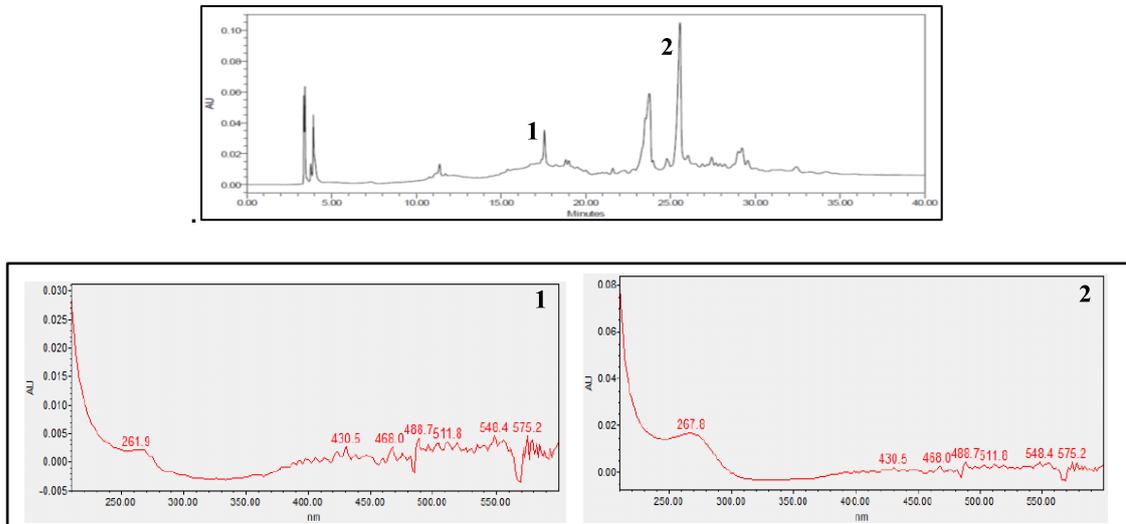
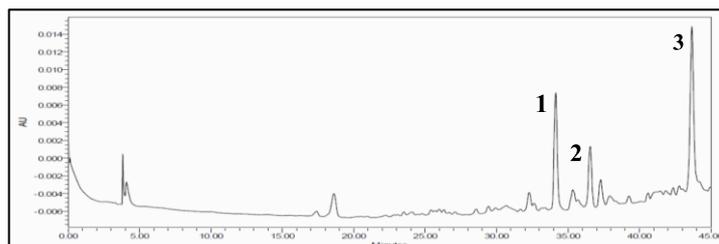


Figura 35: Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FSF12 em gradiente exploratório em 268 nm.



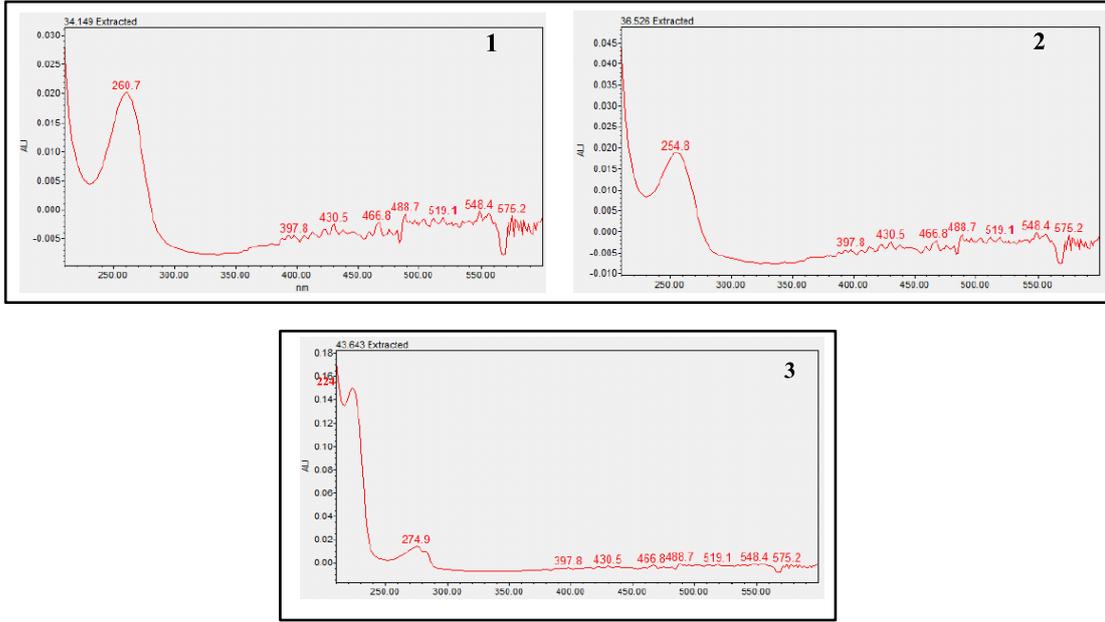


Figura 36: Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FCN03 em gradiente exploratório em 268 nm.

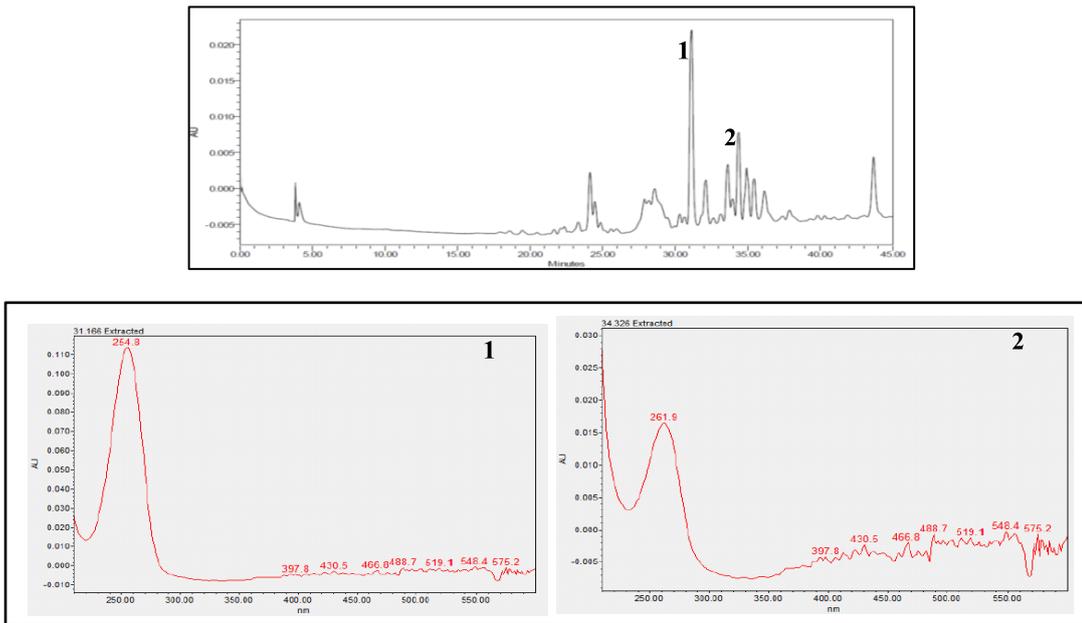


Figura 37: Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FCN05 em gradiente exploratório em 268 nm.

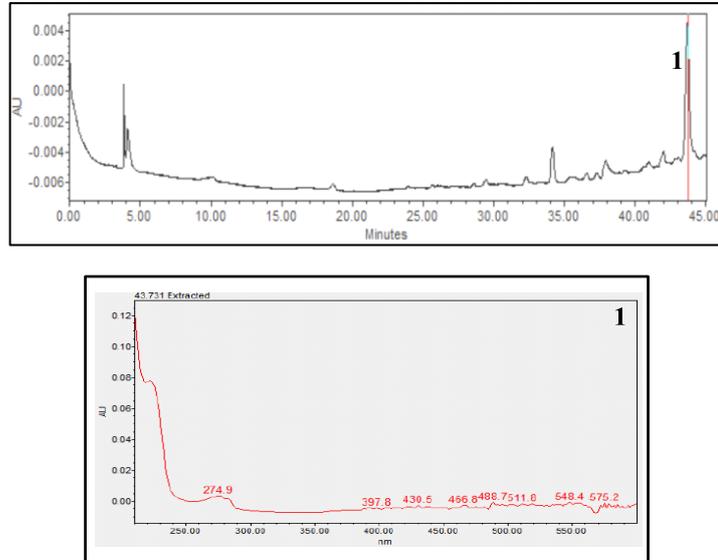
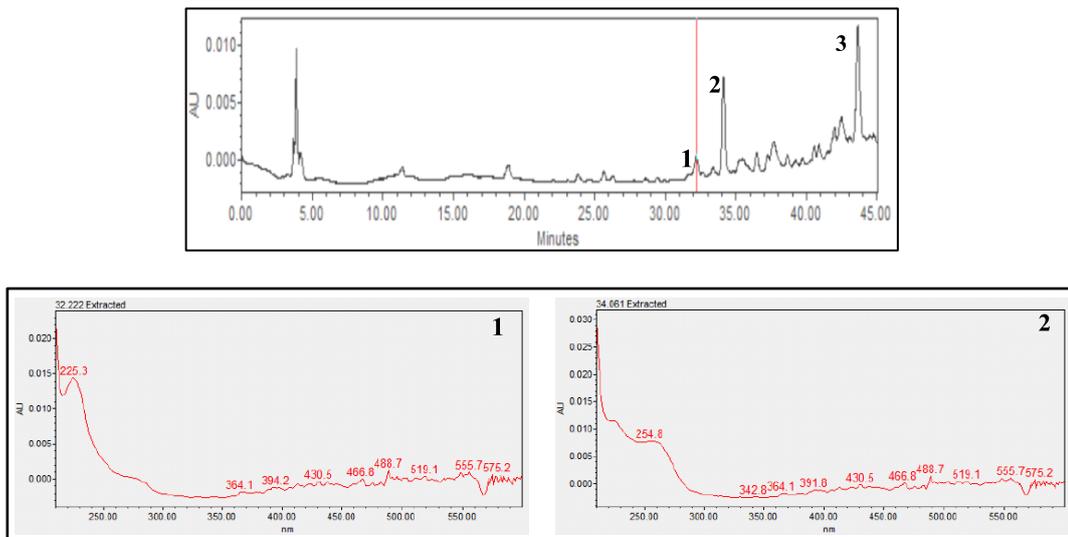


Figura 38: Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FMIC04 em gradiente exploratório em 268 nm.



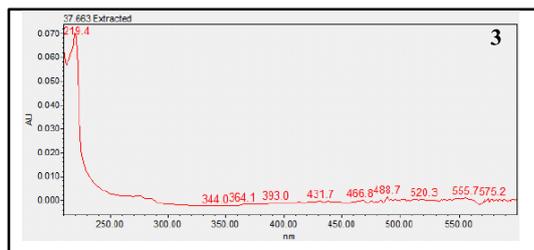
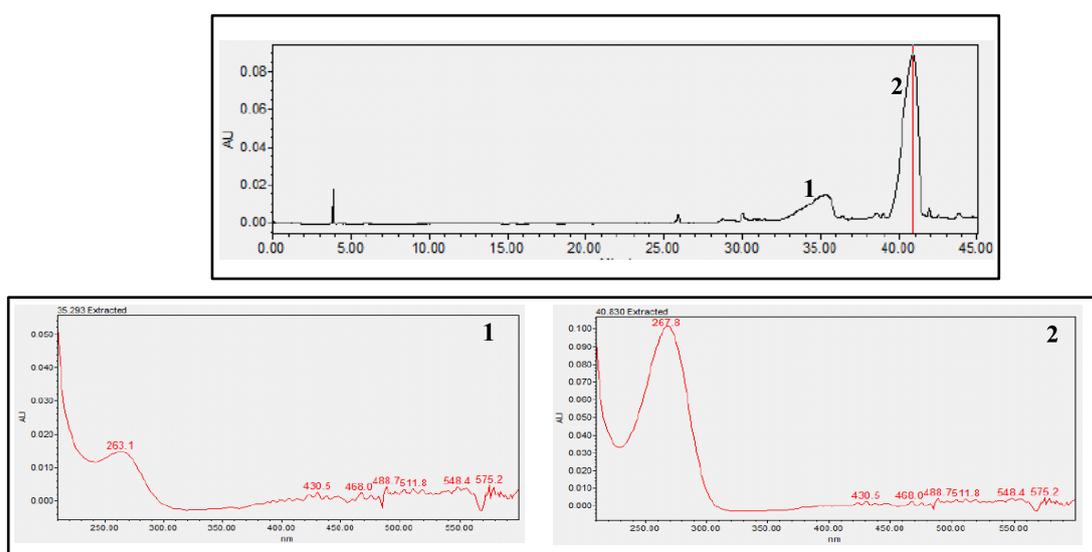


Figura 39: Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos do extrato do fungo de solo FMIC15 em gradiente exploratório em 268 nm.



Dentre os extratos analisados por CLAE-DAD, verificou-se que, o extrato FSF12 possuía maior número de compostos com absorção no ultravioleta. O cromatograma obtido (Figura 35. p. 91) mostrou constituintes com tempo de retenção entre 34 e 44 minutos. No tempo de retenção (t_R) de 43,6 minutos, observou-se as absorções máximas em comprimentos de onda a 224 e 274,9 nm, sugerindo a presença das roquefortinas e/ou alcalóides da cravagem do centeio e seus derivados (NIELSEN; SMEDSGAAR, 2003), assim como, o tirosol (GUIMARÃES et al., 2009). O cromatograma apresenta, também, um pico relativo à constituinte com t_R de 34,1 minutos, que no UV apresentou absorção em λ_{max} . 260,7 nm, sugerindo a presença de macrociclo tricotecenos e precursores (NIELSEN; SMEDSGAAR, 2003), além de ácidos graxos (CZAUDERNA et al., 2008). Para o t_R

36,5 min foi observado no UV uma absorção λ_{max} 254,8 nm, propondo a presença da toxina PR (NIELSEN; SMEDSGAAR, 2003).

Os cromatogramas dos micro-extratos FCN05 (Figura 37, p. 93), FRIZ09 (Figura 31, p. 89) e FRIZ13 (Figura 32, p. 90) apresentaram um comparativo na faixa de absorção no UV de λ_{max} 274,9 nm, insinuando a presença da micotoxina patulina (NIELSEN; SMEDSGAAR, 2003), (-)-galocatequina ou (-)-epigalocatequina (SUN et al., 2007).

O cromatograma do micro-extrato FMIC04 (Figura 38, p. 93), apresentou picos relativos à constituintes com tempo de retenção de 34,0, 32,2 e 37,6 minutos com absorções máximas em λ_{max} , 254,8, 225,3 e 219,4 nm, respectivamente, sendo que o primeiro é possivelmente a toxina PR, e os dois últimos característico da classe dos tricotecenos (NIELSEN; SMEDSGAAR, 2003).

Os cromatogramas dos micro-extratos FMIC15 (Figura 39, p.94), FRIZ07 (Figura 30, p.88) e FRIZ08 (Figura 31, p.89) apresentaram bandas com os respectivos tempos de retenção de 35,3 min; 26,0 min e 34,2 min que no espectro de UV possui $\lambda_{\text{máx}}$ de 263,1 nm, sugerindo a presença de ácido abscísico (NIELSEN; SMEDSGAAR, 2003). Foi possível também verificar uma banda com o t_R de 40,8 min e que no espectro de UV possuem $\lambda_{\text{máx}}$ de 267,8 nm, sugerindo a presença de nigragilina.

O cromatograma do micro-extrato FRIZ14 (Figura 33, p. 90) apresentou uma banda com o t_R de 30 min que no espectro de UV possui $\lambda_{\text{máx}}$ de 240,0 nm, sugerindo a presença de ácido arabenóico (NIELSEN; SMEDSGAAR, 2003).

Os cromatogramas dos micro-extratos FCN03 (Figura 36, p.92) e FSF11 (Figura 34, p. 91) apresentaram bandas com t_{RS} de 34,3 e 15,5 min, respectivamente, e que no espectro de UV possui $\lambda_{\text{máx}}$ de 261,9 nm, sugerindo a presença da classe dos macrociclo tricotecenos e precursores (NIELSEN; SMEDSGAAR, 2003). Na análise cromatográfica por CLAE dos micro-extratos FCN03 e FSF11, foi possível também verificar bandas com o t_R de 31,1 e 25,5 min e que no espectro de UV possuem $\lambda_{\text{máx}}$ de 267,8 e 254,8 nm, sugerindo a presença de nigragilina e toxina PR, respectivamente (NIELSEN; SMEDSGAAR, 2003).

Através dos dados apresentados na literatura (NIELSEN; SMEDSGAAR, 2003; SUN et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2009) e, com base nos resultados obtidos, pode-se localizar os picos referentes a possíveis classes de metabólitos

secundários encontrados nos micro-extratos fúngicos, conforme indicado na Tabela 07.

TABELA 07: Possíveis classes de metabólitos presentes nos micro-extratos dos fungos da Serra de Carajás correspondentes aos picos assinalados nos cromatogramas.

Micro-extratos	Pico	t _R (min)	Dados UV/DAD (nm)		Possíveis classes de metabólitos
			Banda I	Banda II	
FSF12	1	34,1	254,8	-	Toxina PR
	2	36,5	260,7	-	Macrociclo tricotecenos e precursores Ácidos graxos
	3	43,6	224	274,9	Roquefortinas e/ou Acalóides da cravagem do centeio e seus derivados Tirosol
FCN05	1	43,7	274,9	-	Micotoxina patulina Galocatequina Epigalocatequina
FRIZ09	1	43,6			
FRIZ13	1	43,6			
FMIC15	1	35,2	263,1	-	Nigragilina Macrociclo tricotecenos e precursores Ácido abscísico
	2	40,8	267,8		
FRIZ08	1	34,2	263,1		
	2	41,0	267,8		
FRIZ14	1	30,0	240,0	-	Ácido arabenóico
FMIC04	1	32,2	225,3	-	Toxina PR Tricotecenos
	2	34,0	254,8		
	3	37,6	219,4		
FSF11	1	15,5	261,9	-	Macrociclo tricotecenos e precursores Nigragilina Toxina PR
	2	25,5	254,8		
FRIZ07	1	26,0	263,1	-	Ácido abscísico
FCN03	1	31,1	267,8	-	Macrociclo tricotecenos e precursores Nigragilina
	2	34,3	261,9		

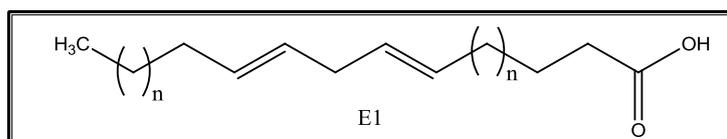
5.6 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS PRODUZIDAS PELO ENDÓFITO DO GÊNERO *Thichoderma* sp.

O fungo do gênero *Thichoderma* sp. foi submetido a crescimento em escala ampliada para isolamento e caracterização dos metabólitos secundários produzidos. Após a obtenção dos extratos brutos estes foram fracionados utilizando técnicas cromatográficas adequadas. Após análise prévia de RMN de ^1H das frações coletadas foi possível identificar e determinar a estrutura de cinco substâncias.

5.6.1 Determinação estrutural da substância E1

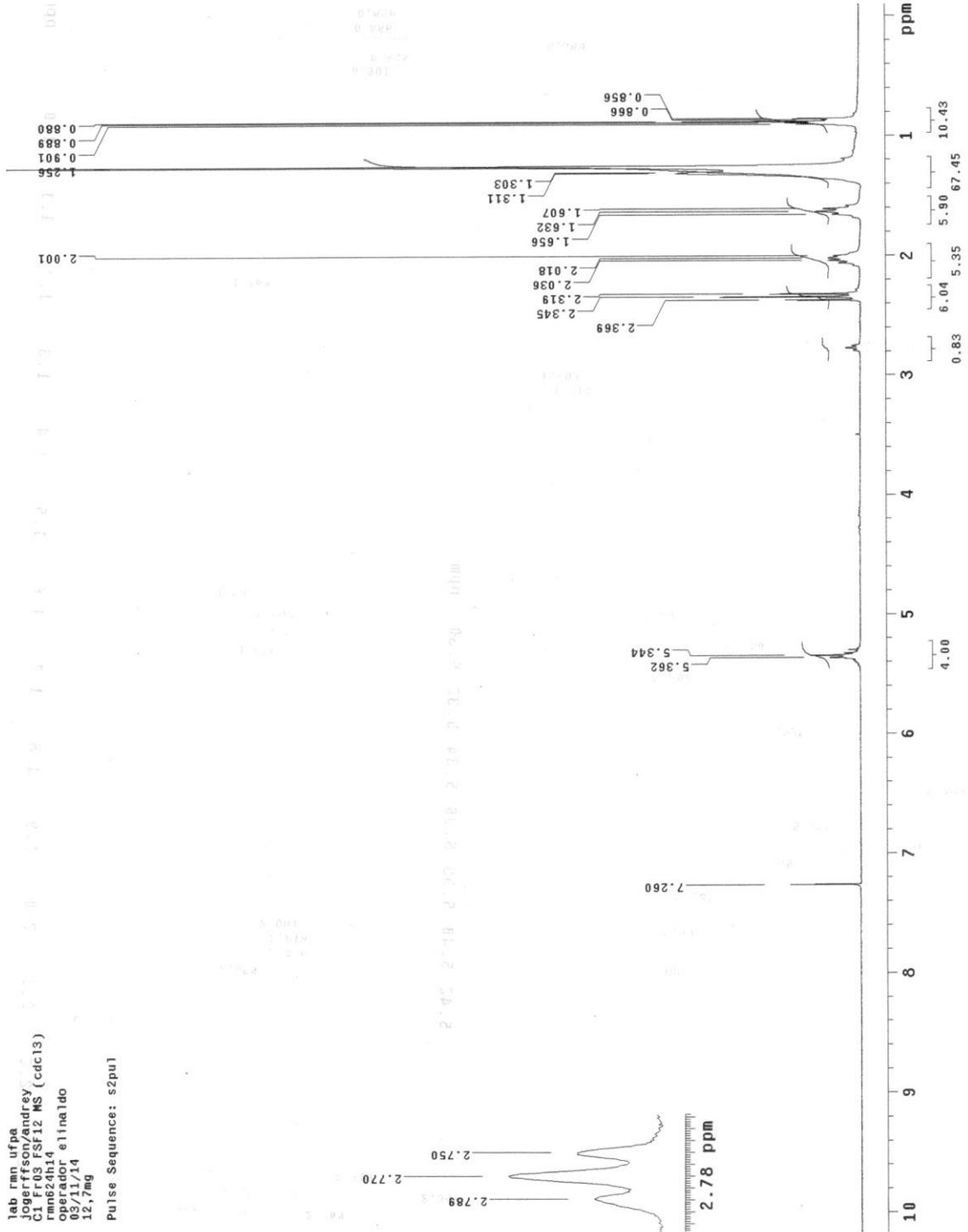
No espectro de RMN de ^1H (Figura 41, p. 121) da fração F3 (767,6 mg) proveniente do extrato AcOEt do fungo FSF12 (5,0 mg) foi observado a presença de sinais característicos de ácidos graxos poliinsaturados E1 (Figura 40). O sinal mais intenso no espectro de RMN de ^1H foi observado em δ_{H} 1,25, característicos dos hidrogênios metilênicos de cadeia alquílica longa, e os sinais em δ_{H} 5,35, referente aos hidrogênios olefínicos. Os hidrogênios metílicos são observados em δ_{H} 0,86, e os hidrogênios dialílicos e alílicos são observados em δ_{H} 2,78 e 2,01, respectivamente. Além disso, observam-se sinais de hidrogênios α e β -carboxílicos em δ_{H} 2,34 e 1,63, respectivamente. O padrão espectral apresentado no RMN de ^1H é típico de substância da classe dos ácidos graxos poliinsaturados.

FIGURA 40- Substância E1



Estudos realizados por Guimarães (2006) revelam a alta atividade antitumoral de extratos de fungos endofíticos ricos em ácidos graxos.

Figura 41: Espectro de RMN de ¹H da substância E1 (CDCl₃, 300 MHz)



5.6.2 Determinação estrutural da substância E2

A substância **E2**, foi isolada do extrato acetato de etila do fungo FSF12 cultivado em meio sólido de arroz. A determinação estrutural desse composto foi realizada com o auxílio dos espectros de RMN ^1H (Figura 43, p. 125) e ^{13}C (Figura 44, p. 126), por se tratar de uma substância já conhecida, sendo que seus dados foram comparados com os já existentes na literatura (Tabela 08, p. 124) (SILVA, 2007).

Analisando o espectro de RMN de ^1H , observa-se dois singletos cada um integrando para um hidrogênio, com deslocamentos químicos de δ_{H} 8,25 e δ_{H} 8,16 os quais foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos H-2 e H-8, respectivamente. Foi observado, também, um dubleto, em δ_{H} 6,00 ($J = 6,0$ Hz) referente ao hidrogênio H-2'; embora o sinal não esteja bem definido sugere um dupleto em δ_{H} 4,35 ($J = 4,8$ Hz), o qual pode ser atribuído ao hidrogênio H-3'; um dubleto em δ_{H} 4,23, podendo esse ser atribuído ao H-4'. Ainda analisando o espectro de RMN de ^1H , observa-se um duplo dubleto em δ_{H} 3,81 ($J = 2,4$ e $3,9$) referente ao hidrogênio H-5' e um dubleto em δ_{H} 3,29 referente ao hidrogênio carbínolico H-6'.

No espectro de RMN de ^{13}C observa-se um sinal de carbono característico de lactama com um deslocamento químico de δ_{C} 153,56, o qual foi atribuído ao carbono C-4. Foi observado, também, um sinal de carbono olefínico referentes ao C-8 em δ_{C} 141,62. Outros cinco sinais de carbonos carbinólicos, sendo quatro metínicos (δ_{C} 89,38; δ_{C} 86,89; δ_{C} 74,64 e δ_{C} 71,65) e um metilénico com deslocamento de δ_{C} 62,50 foram observados, indicando, portanto a presença de uma unidade de ribose ligada à estrutura. Ainda em relação ao RMN de ^{13}C não foi possível observar sinais dos carbonos 2, 5, 6 e 4' devido a pouca massa e pouco tempo de máquina.

De acordo com essas informações, pode-se concluir que o composto **E2** (Figura 42, p. 123) é conhecido na literatura como nucleosídeo 5'-inosil ou inosina.

Evidências indicam que a inosina apresenta um papel modulatório sobre a inflamação (RAHIMIAN et al., 2010). A inosina é formada pelo metabolismo da adenosina pela adenosina deaminase (GARCIA SORIANO et al., 2001; LIAUDET et al., 2002; ELTZSCHIG et al., 2006; FREDHOLM et al., 2011) em situações de

inflamação, hipóxia e lesão tecidual (GARCIA SORIANO et al., 2001; GOMEZ, SITKOVSKY, 2003).

Muitos outros trabalhos, também, demonstram o efeito anti-inflamatório da inosina e seus análogos como a INO-2002, em modelos de lesão pulmonar aguda (LIAUDET et al., 2002; MABLEY et al., 2003), colite induzida por 2,4,6-trinitrobenzeno (TNBS) e dextran sulfato de sódio (DSS) (MABLEY et al., 2003; RAHIMIAN et al., 2010), modelo de choque séptico induzido por ligadura cecal e LPS (GARCIA SORIANO et al., 2001; LIAUDET et al., 2001).

FIGURA 42- Estrutura da substância **E2**

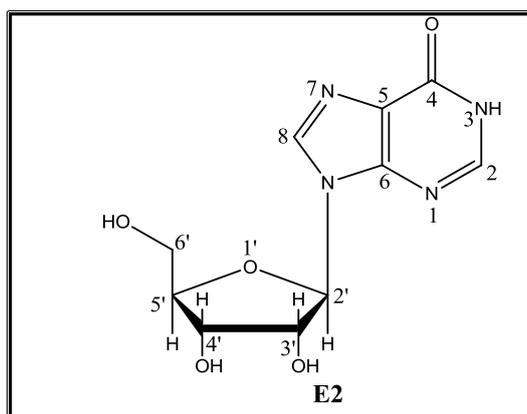


TABELA 08- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **E2** e comparação com dados da literatura.

Posição H e C	Substância E2 (300 MHz ^1H / 75 MHz ^{13}C , D_2O)		SILVA, 2007 (400 MHz para ^1H DMSO/ 100 MHz para ^{13}C , MeOD)	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
2	8,25 (s, 1H)		8,34 (s, 1H)	149,1
4	-	153,5	-	156,2
5	-		-	119,4
6	-		-	152,4
8	8,16 (s, 1H)	141,6	8,13 (s, 1H)	140,0
1'	-	-	-	-
2'	6,00 (d, $J = 6,0$ Hz, 1H)	89,3	5,86 (d, $J = 6,4$ Hz, 1H)	87,9
3'	4,35 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H)	74,6	4,59 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H)	73,9
4'	4,23 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H)	71,6	4,12 (t, $J = 4,4$ Hz, 1H)	70,7
5'	3,81 (dd, $J = 3,2$ e 12,6)	86,8	3,95 (dd, $J = 3,2$ e 6,4 Hz, 1H)	86,0
6'	3,29	62,5	3,65 (d, $J = 12,1$ Hz, 1H)	61,7

FIGURA 43- Espectro de RMN de ¹H de E2 (D₂O, 300 MHz).

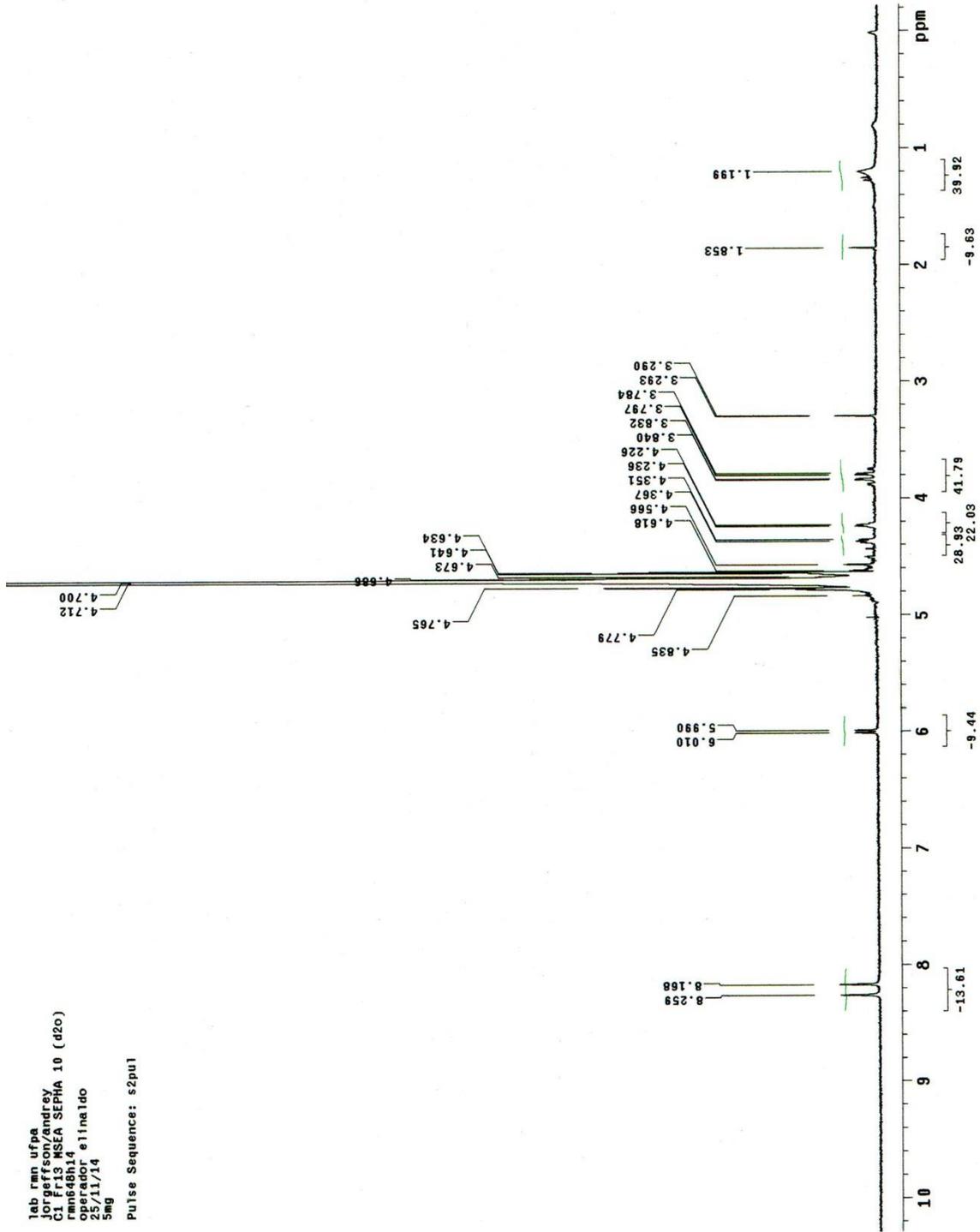
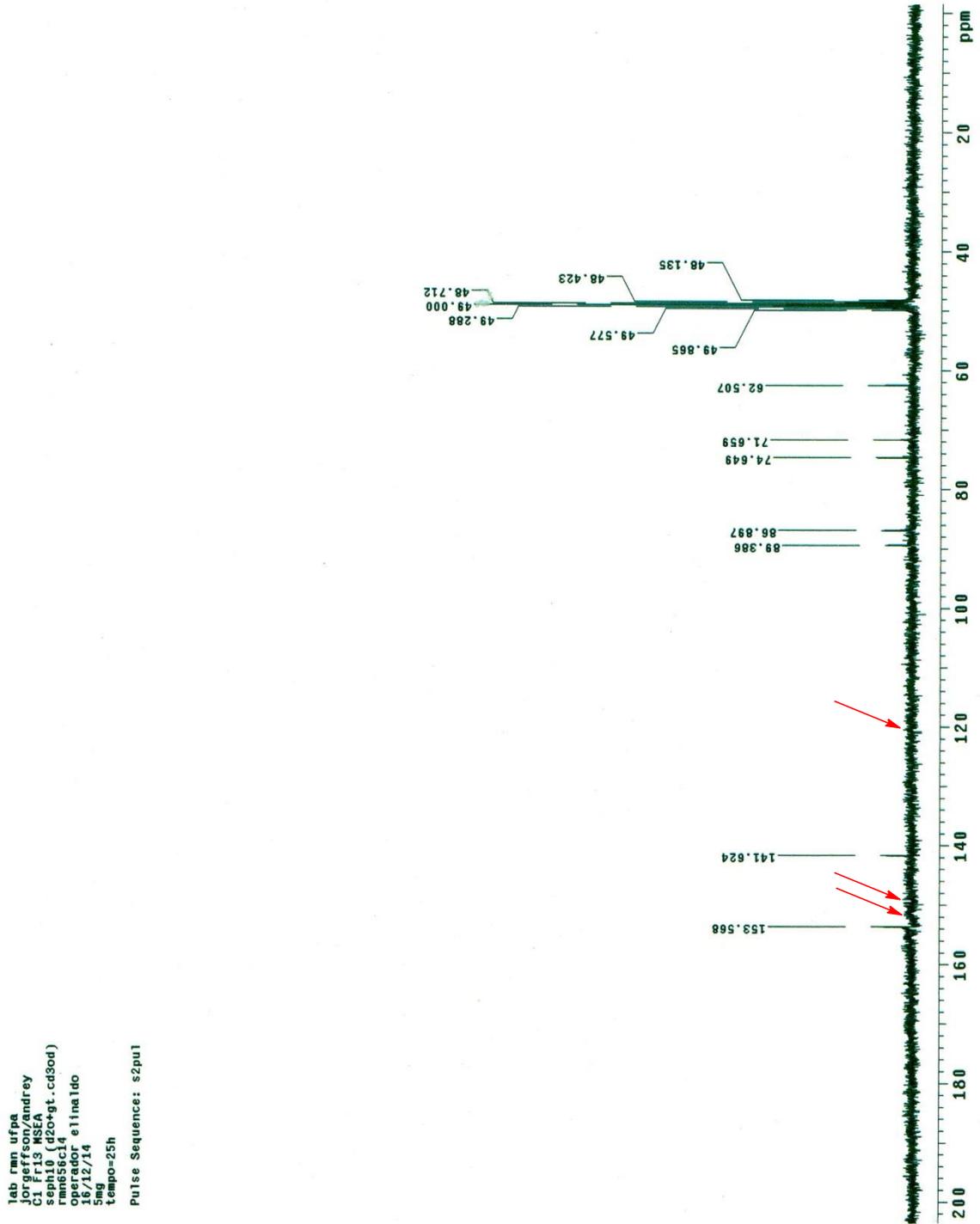
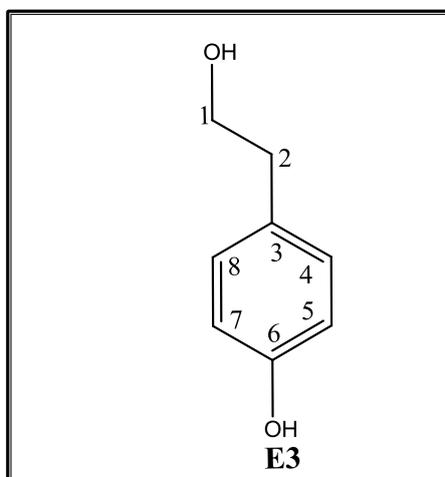


FIGURA 44- Espectro de RMN de ^{13}C de **E2** (D_2O /gotas de CD_3OD , 75 MHz).

5.6.3 Determinação estrutural da substância E3

A determinação estrutural desse composto foi realizada apenas com o auxílio dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C por se tratar de uma substância já conhecida, sendo que seus dados foram comparados com os já existentes na literatura (SILVA, 2007) e reconhecida como sendo o tirosol.

FIGURA 45- Estrutura da substância **E3**



A substância **E3** (Figura 45) foi obtida em mistura. Análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 46, p.130) evidenciou dois hidrogênios característicos de anel aromático *para* substituído em δ_{H} 7,08 (d, 2H; 8,5 Hz) referente aos hidrogênios H-4 e H-8 e δ_{H} 6,68 (d, 2H; 8,5 Hz) referente aos hidrogênios H-5 e H-7, além de dois tripletos ambos integrando para dois hidrogênios em δ_{H} 3,67 (t, 2H; 6,6 Hz) e δ_{H} 2,70 (t, 2H; 6,6 Hz) de hidrogênios metilênicos H-1 e H-2, respectivamente. O sinal em δ_{H} 3,67 é característico de hidrogênio metilênico ligado à hidroxila.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 47, p. 131) mostrou seis sinais, sendo dois de carbonos metilênicos em δ_{C} 63,81 e δ_{C} 38,22. O primeiro sinal é de carbono metilênico carbinólico. O espectro de carbono, também, registrou a presença de

quatro sinais de carbonos aromáticos em δ_C (154,23; 115,42; 130,42; 130,14), os quais foram atribuídos aos carbonos C-6, C-5/7, C-4/8 e C-3, respectivamente, sendo isto uma característica dos sistemas aromáticos *para* substituído, devido à simetria dos núcleos nesse sistema. O sinal em δ_C 154,23 indica a presença de uma hidroxila liga a carbono aromático. Portanto, pela análise dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura (Tabela 09, p. 129) foi possível identificar a estrutura da substância **E3** como sendo a do tirosol.

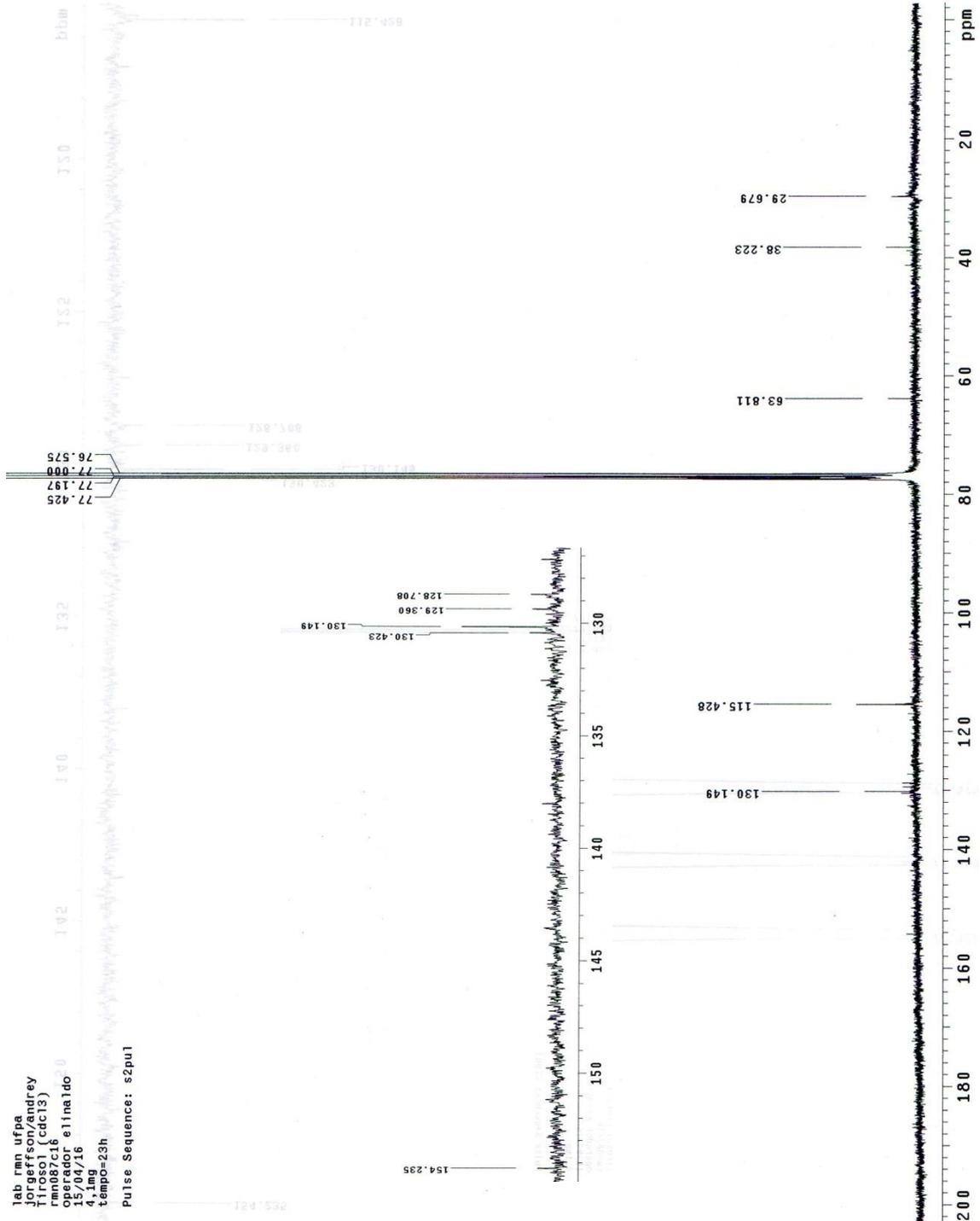
O tirosol é uma substância sinalizadora na regulação da dinâmica de crescimento e morfogênese em *Candida albicans* e foi identificada por Chen em 2004 (GUIMARÃES et al., 2009; GUIMARÃES, 2010). Esta substância atua estimulando a formação do tubo germinativo, contribuindo na aceleração da conversão da fase leveduriforme para a fase filamentosa, contribuindo para proteção de *Candida albicans* contra morte por fagocitose (GUIMARÃES et al., 2009; GUIMARÃES, 2010).

Esse composto possui diversas atividades biológicas entre elas: atividade antioxidante, antifúngica contra os fungos *Lagenidium callinectes* e *Gibberella pulicaris* e atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (GUIMARÃES, 2006). Adicionalmente, o tirosol apresenta interesse farmacológico como antioxidante e tem sido utilizado em tratamento da aterosclerose, protegendo as lipoproteínas de baixa densidade da oxidação, a qual desempenha um papel importante na iniciação e na progressão de doenças cardiovasculares. A literatura também relata a ação fitotóxica desse metabólito em folhas de alface e sua toxicidade a certos camundongos (GUZMÁN-LÓPEZ et al., 2007).

TABELA 09: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **E3** e comparação com dados da literatura

Posição H e C	Substância E3 (300 MHz ^1H /75 MHz ^{13}C , CDCl_3)		SEVERINO, 2011 (400 MHz ^1H /100 MHz ^{13}C , CDCl_3)	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
1	3,67 (t, 2H; 6,6 Hz)	63,8	3,73 (2H, t, $J=6,6$)	63,8
2	2,70 (t, 2H; 6,6 Hz)	38,2	2,71 (2H, t, $J=6,6$)	38,2
3	-	130,1	-	130,1
4/8	7,08 (d, 2H; 8,5 Hz)	130,4	7,00 (2H, m)	130,1
5/7	6,68 (d, 2H; 8,5 Hz)	115,4	6,70 (2H, m)	115,4
6	-	154,2	-	154,7
OH	-		-	-

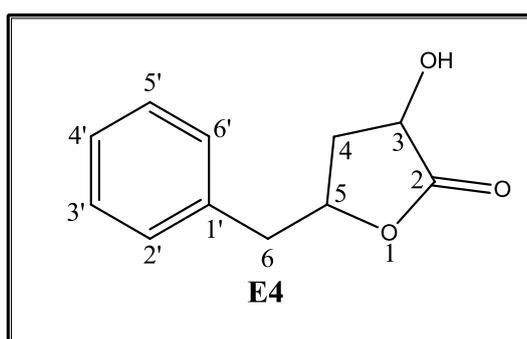
FIGURA 47- Espectro de RMN de ^{13}C de E3 (CDCl_3 , 75 MHz).



5.6.4 Determinação estrutural da substância E4

A substância **E4** (Figura 48), foi isolado do subextrato AcOEt, do meio sólido em arroz, sendo que sua estrutura foi identificada através dos experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC.

Figura 48: Estrutura da substância **E4**.

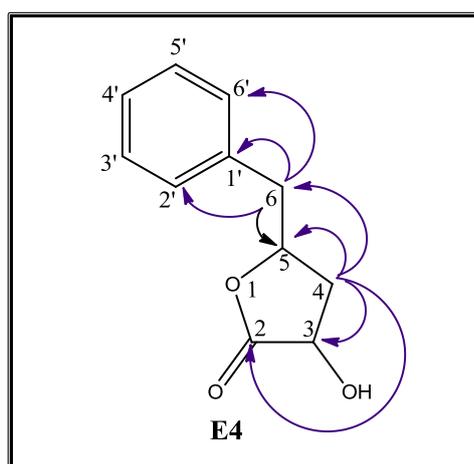


O espectro de RMN de ^1H (Figura 50, p.135) mostrou um tripleto em δ_{H} 3,99, o qual corresponde ao H-3, bem como dois multipletos em δ_{H} 2,36-2,27 e 4,92 referentes aos hidrogênios H-4 α , H-4 β e H-5, respectivamente. Foi observado também, um dubleto em δ_{H} 2,98 com constante de acoplamento de 6.0 Hz, o qual foi atribuído ao H-6. Os sinais referentes ao anel aromático foram observados como multipletos na região de δ_{H} 7,33–7,19.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 51, p. 136) da substância **E4** registrou quatro sinais de carbonos aromáticos δ_{C} (135,2; 129,6; 128,9; 127,2), os quais foram atribuídos aos carbonos C-1', C-2'/6', C-3'/5' e C-4', respectivamente, sendo isto uma característica dos sistemas aromáticos *mono* substituído. Além destes sinais, foi possível observar um sinal com valor de deslocamento em δ_{C} 67,0, referente de carbono carbinólico (C-3), sinais em δ_{C} 177,1, referentes à carboníla do anel da lactona, também foram identificados sinais em δ_{C} 41,1 atribuído ao carbono metilênicos benzílico (C-6) e sinais em δ_{C} 34,8 referente ao carbono β -lactâmico (C-4).

As correlações observadas em HMBC (Figura 49) e Figura 52 (p. 137) entre os hidrogênios metilênicos H-4 (δ_H 2,27 e 2,36) com o carbono carbonílico da lactona C-2 (δ_C 177,1) e os carbonos C-3 (δ_C 67,0), C-5 (δ_C 78,1) e C-6 (δ_C 41,15); os átomos de hidrogênios benzílicos H-6 (δ_H 2,98) com o C-4 (δ_C 34,8), C-5 e os carbonos aromáticos C1' (δ_C 135,2) e C2'/6' (δ_C 129,6), ajudaram a fazer as atribuições dos sinais e determinar a estrutura de E4.

Figura 49: Correlações observadas no HMBC.



Comparação com dados presente na literatura (Tabela 10, p. 134) (KOTKAR; SURYAVANSHI; SUDALAI, 2007) auxiliaram na identificação da substância **E4**, como sendo a harzialactona A.

A harzialactona A é um metabólito com potencial aplicação contra leucemia (CHEN et al., 2010) isolado por Amagata et al. (1998), de um fungo da espécie *Trichoderma harianium* OUPS-N115. Apesar da potencial aplicação no tratamento de câncer que esse metabólito apresenta, poucas rotas sintéticas são descritas na literatura. Além disso, as rotas descritas apresentam condições reacionais complexas (KUMAR et al., 2009), ou partem de intermediários avançados (HE et al., 2011), baixo excesso diastereoisomérico (KOTKAR; SURYAVANSHI; SUDALAI, 2007) ou necessitam de métodos especiais para a separação dos isômeros (CHEN et al., 2010).

TABELA 10: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **E4** e comparação com dados da literatura

Posição H e C	Substância E4 (300 MHz ^1H / 75 MHz ^{13}C , CDCl_3)		KOTKAR, SURYAVANSHI, SUDALAI, 2007 (200 MHz para ^1H CDCl_3 / 50 MHz para ^{13}C , CDCl_3)	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
2	-	177,1	-	177,2
3	3,99 (t, 1H)	67,0	3,96 (t, J = 8,1 Hz, 1H)	67,0
4	2,27-2,36 (m, 2H)	34,8	2,27-2,43 (m, 2H)	34,3
5	4,92 (m, 1H)	78,1	4,91(m, 1H)	78,1
6	2,98 (d, J = 6,0 Hz, 2H)	41,1	2,96 (d, J = 5,7 Hz, 2H)	41,1
1'	-	135,2	-	135,2
2'	7,19 (m)	129,6	7,19 (m)	129,5
3'	7,33 (m)	128,9	7,34 (m)	128,4
4'	7,30 (m)	127,2	7,31 (m)	127,2
5'	7,33(m)	128,9	7,34 (m)	128,4
6'	7,19 (m)	129,6	7,19 (m)	129,5

FIGURA 51- Espectro de RMN de ^{13}C de **E4** (CDCl_3 , 75 MHz).

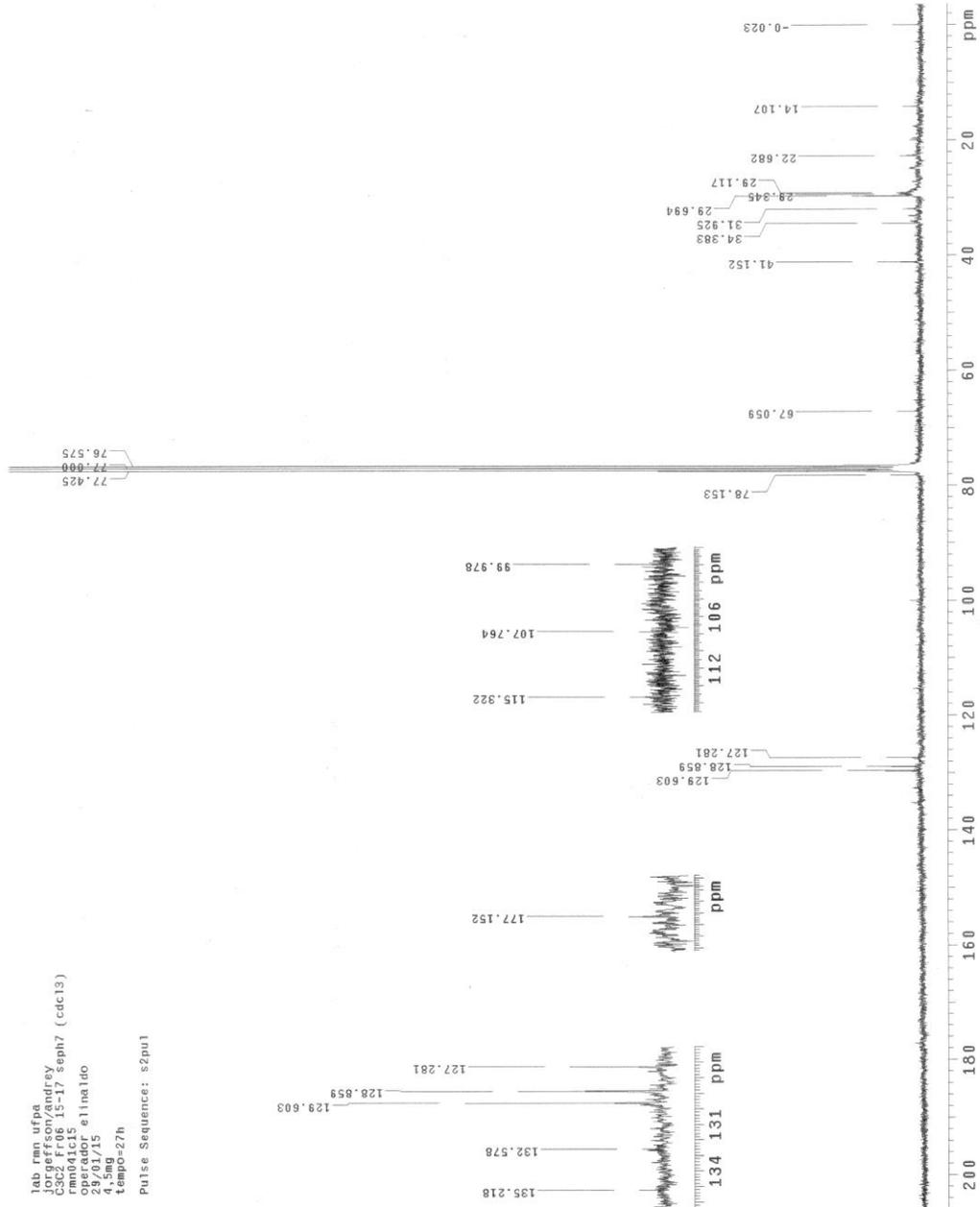
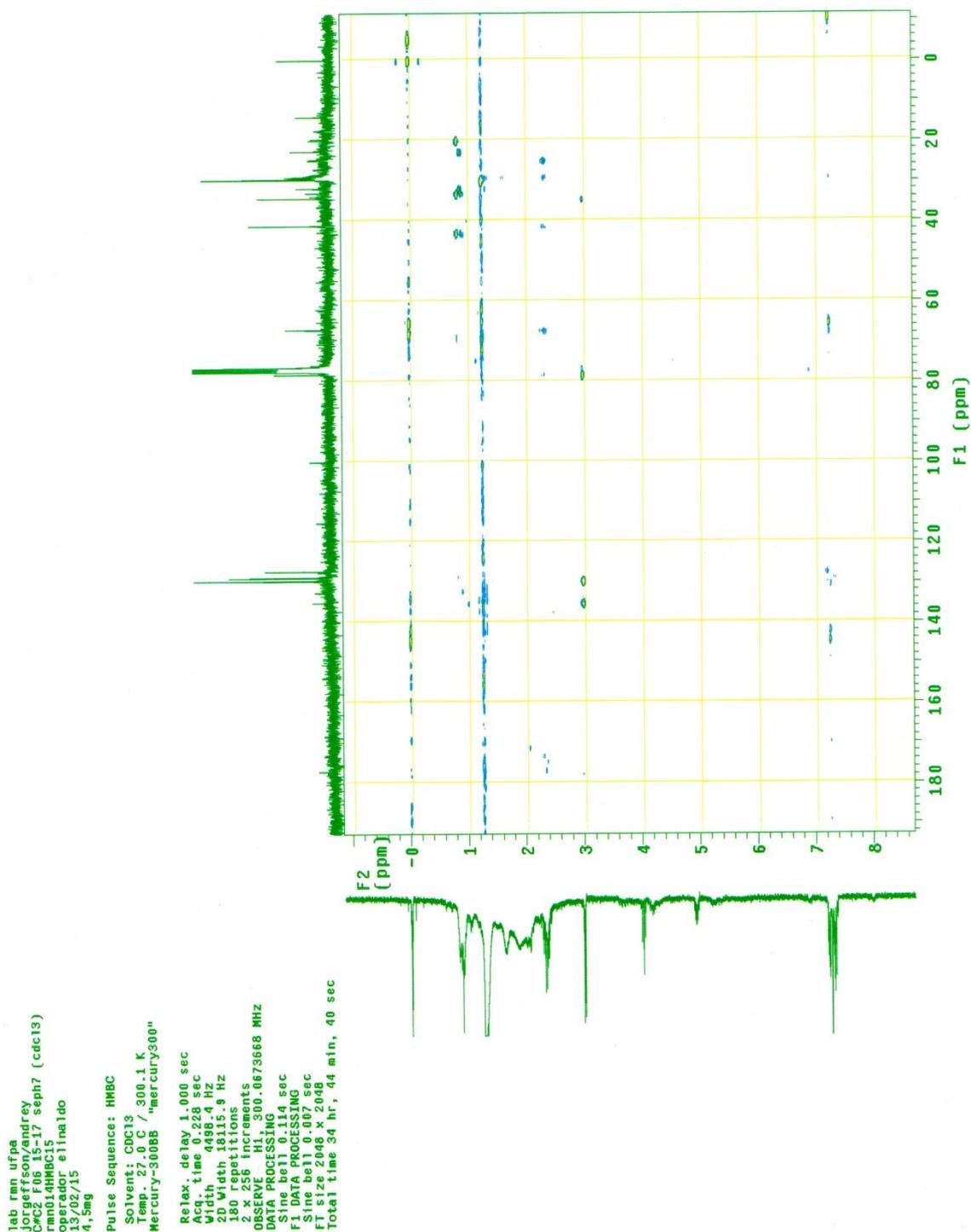


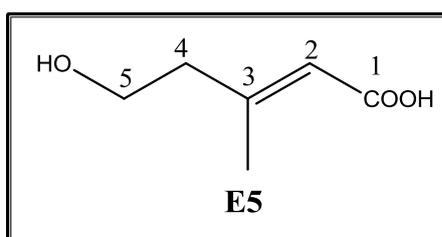
Figura 52: Mapa de contorno HMBC de E4.



5.6.5 Determinação estrutural da substância E5

A substância **E5** (Figura 53) foi obtida em mistura do extrato AcOEt do cultivo do fungo em meio sólido. Sua estrutura foi identificada através de experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , HETCOR, COSY e, por ser uma substância conhecida, seus valores foram comparados com dados da literatura.

Figura 53: Estrutura da substância **E5**



A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 54, p. 140) mostrou dois tripletos acoplado entre si em δ_{H} 3,69 e 2,32 com constante de acoplamento de, aproximadamente 6,6 Hz, os quais foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos H-5 e H-4, respectivamente. Observou-se, também, dois singletos: um em δ_{H} 5,76 referente ao hidrogênio olefínico H-2 e o outro, em δ_{H} 2,10, referente aos hidrogênios metílicos.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 55, p. 141) observou-se um sinal de carbono característico de carboxila em δ_{C} 172,1, o qual foi atribuído ao carbono C-1. Além destes, observou-se, ainda os sinais de carbonos olefínicos C-2 em δ_{C} 120,3 e C-3 em δ_{C} 152,8, um sinal de carbono carbinólico metilênico C-5 em δ_{C} 60,76

Os dados de RMN de **E5** e a análise conjunta dos espectros de COSY (Figura 56, p. 142) e HETCOR (Figura 57, p. 143) indicam a presença de átomo metínico olefínico [δ_{H} 5,76, (s, δ_{C} 120,2), um grupo etoxi 1,2-dissubstituído [δ_{H} 2,32 (t, $J = 6,6$ Hz), δ_{C} 44,47; δ_{H} 3,69 (t, $J = 6,6$ Hz), δ_{C} 60,7], e um grupo metílico (δ_{H} 2,10, s, δ_{C} 18,5).

Comparação com dados de RMN de ^1H e ^{13}C presentes na literatura (Tabela 11) (XU et al., 2011) auxiliaram na identificação da substância **E5** como sendo 2-anidromevalônico.

TABELA 11: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **E5** e comparação com dados da literatura

Posição H e C	Substância E5 (300 MHz ^1H / 75 MHz ^{13}C , CD_3OD)		Xu, 2010 (500 MHz ^1H /125 MHz ^{13}C , CD_3OD)	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
1	-	172,1	-	172,7
2	5,76 (s)	120,3	5,71	120,6
3	-	152,8	-	151,8
4	2,32 (t, $J = 6,6$ Hz)	44,4	2,36 (t, $J = 6.3$ Hz)	40,4
5	3,69 (t, $J = 6,6$ Hz)	60,8	3,69 (t, $J = 6.3$ Hz)	63,1
6	2,10 (s)	18,5	2, 15 (s)	18,3

Figura 54: Espectro de RMN de ^1H de E5 (CD_3OD , 300 MHz).

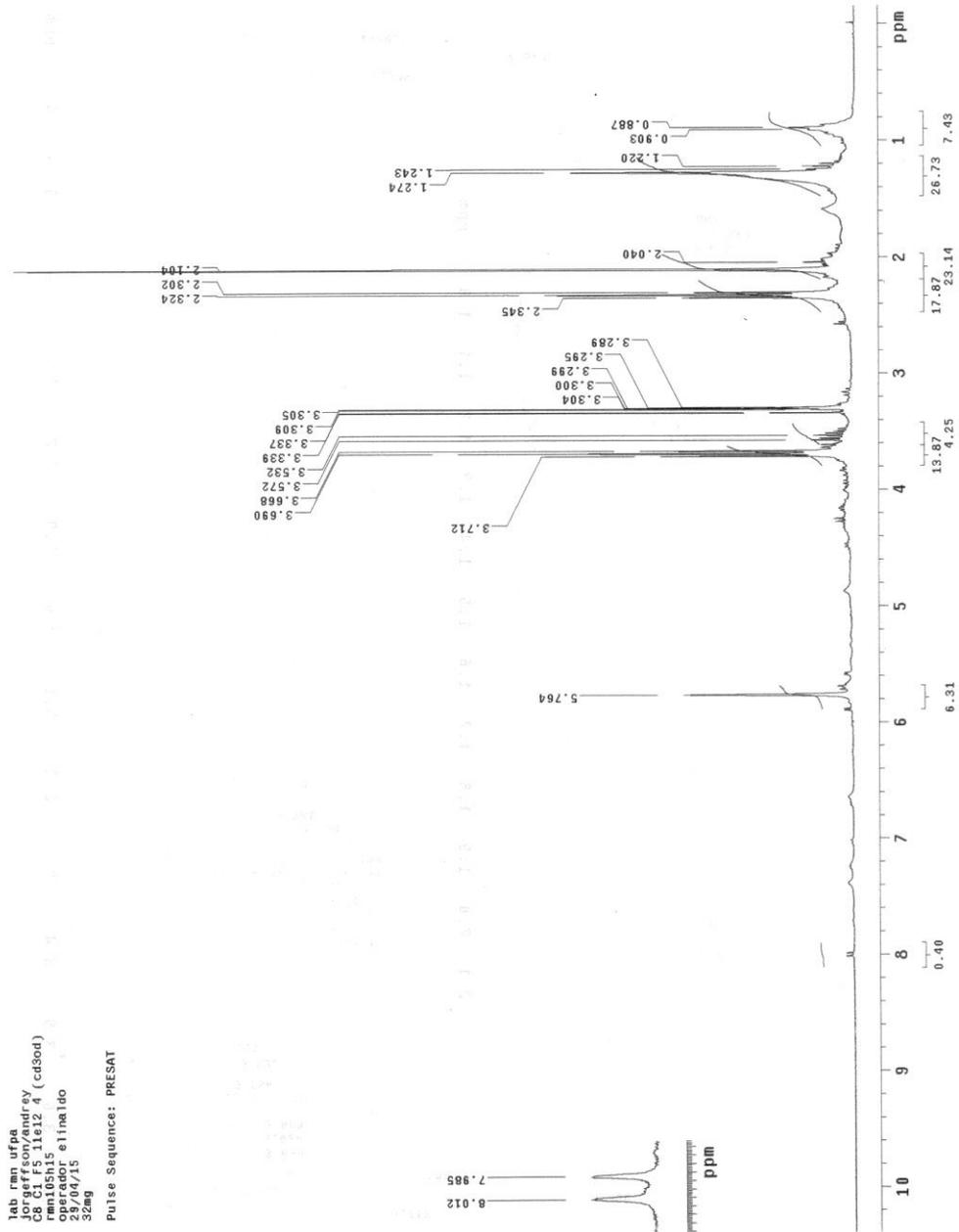


Figura 55: Espectro de RMN de ^{13}C de E5 (CD₃OD, 75 MHz).

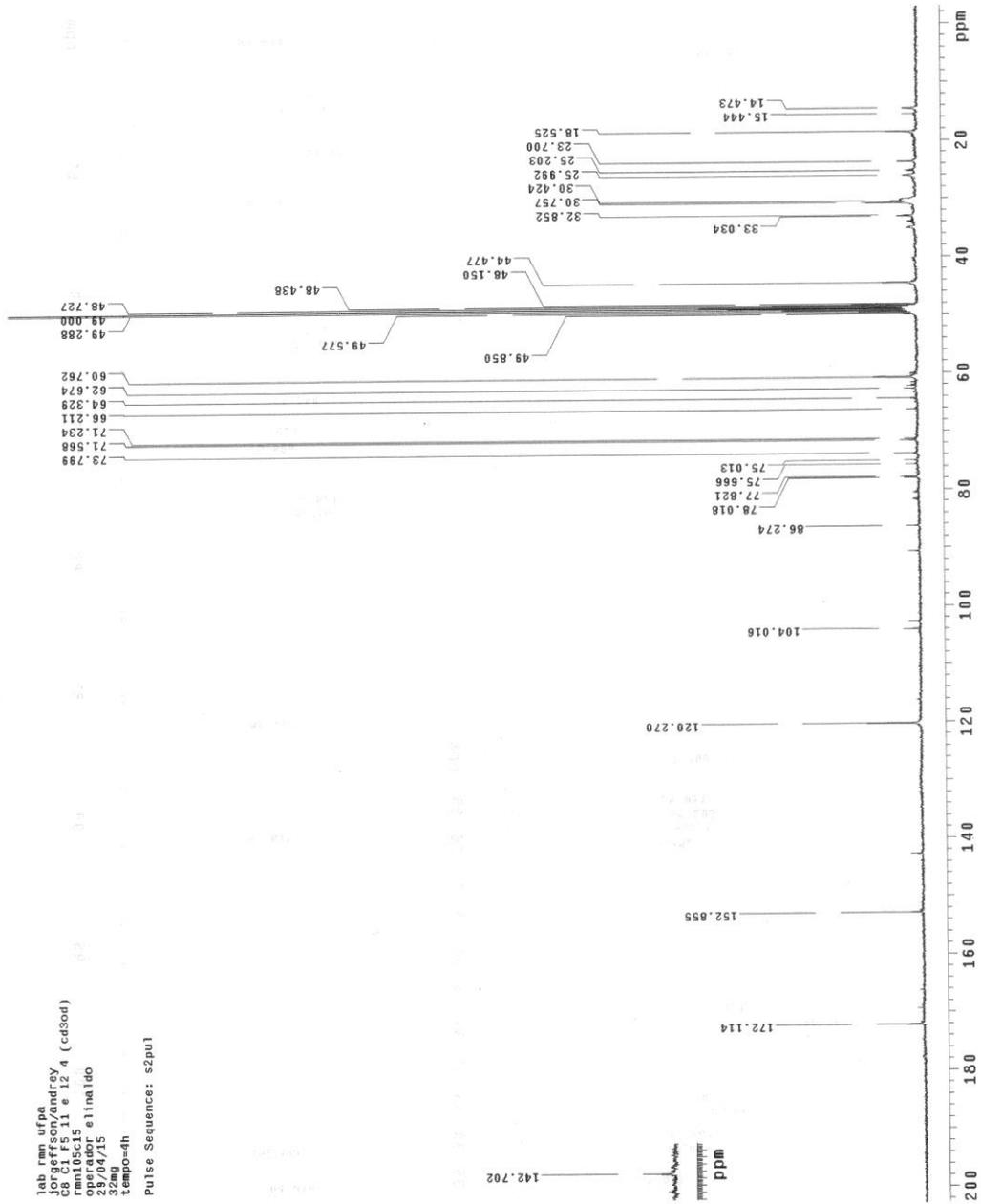
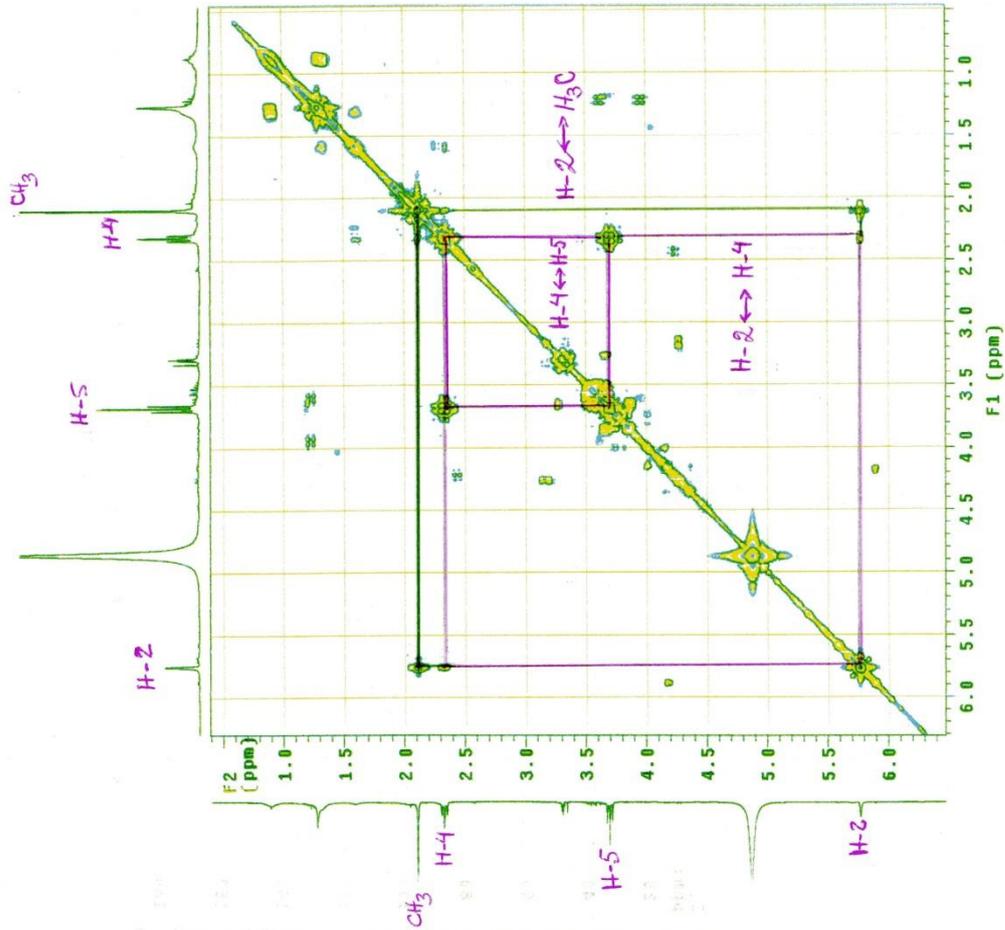


FIGURA 56: Espectro de COSY de E5.

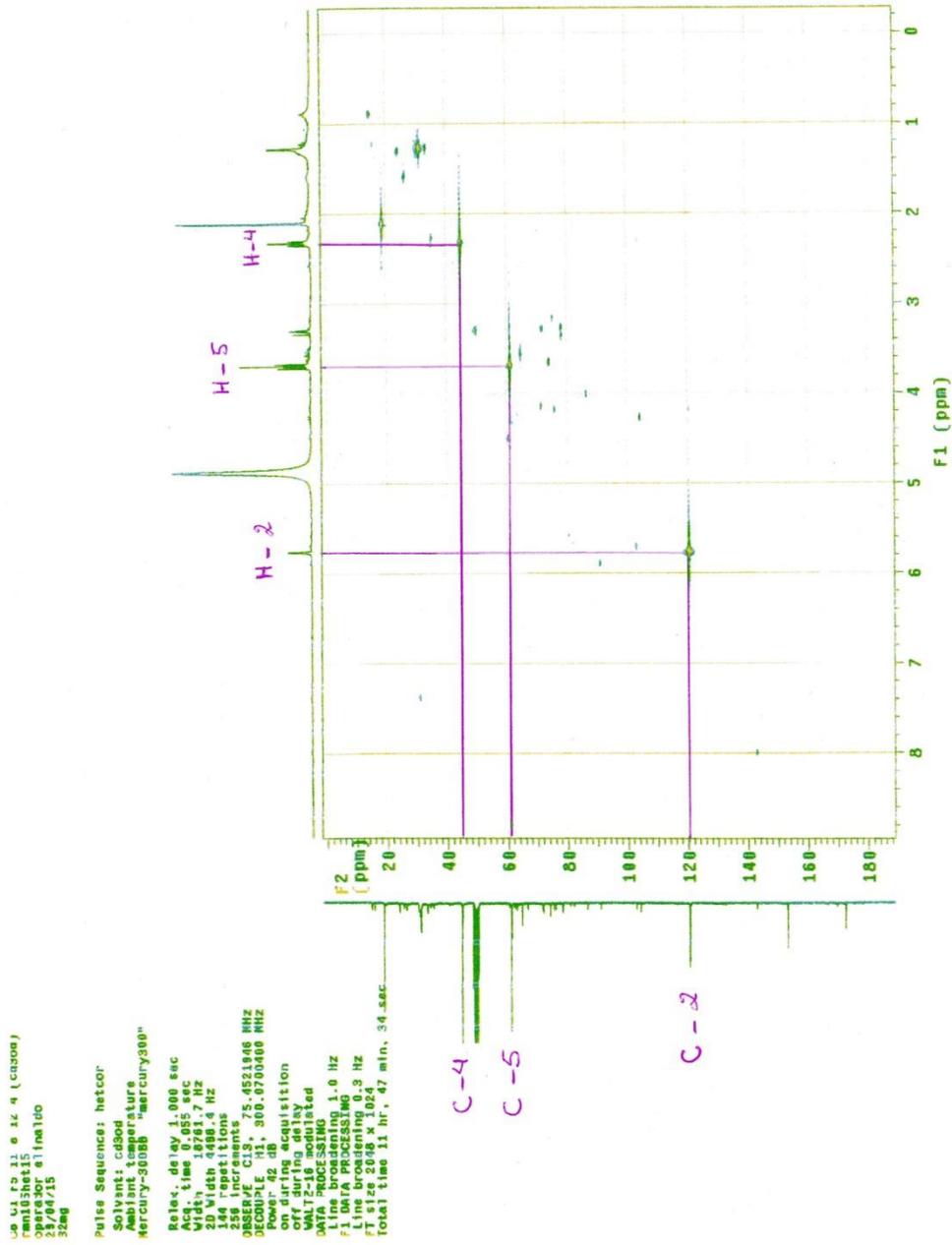


```

lab_ran utms
jorgafson/amrvey
C8 C1 F5 11.e 12.4 (cdsod)
ren105cosy15
23/04/15 811ml1d0
32mg
Pulse Sequence: relay/h
Solvent: cdsod
Ambient temperature
Mercury-3000B "mercury90h"
Relay_delay 1.000 sec
COSY 90-90
Acq. time 0.228 sec
Width 4480.4 Hz
S repetitions 8
512 increments
OBSERVE H1, 300.0685508 MHz
DATA PROCESSING
F1 DATA PROCESSING
F1 size 2048 x 2048
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 10 min, 32 sec
    
```

1.000 sec
 4480.4 Hz
 8 repetitions
 512 increments
 OBSERVE H1, 300.0685508 MHz
 DATA PROCESSING
 F1 DATA PROCESSING
 F1 size 2048 x 2048
 FT size 2048 x 2048
 Total time 1 hr, 10 min, 32 sec

FIGURA 57: Mapa de contorno de HETCOR de E5.



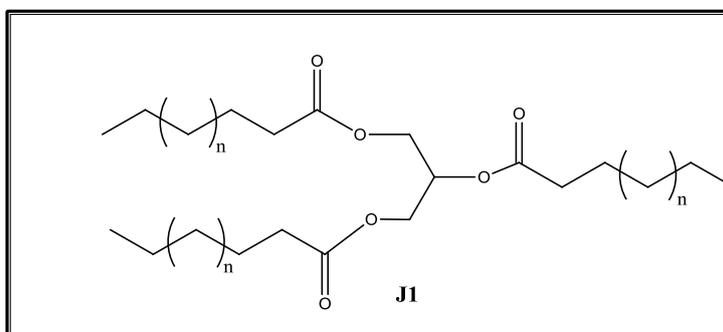
5.7 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS PRODUZIDAS PELO ENDÓFITO *Scedosporium apiospermum*

O fungo *S. apiospermum* foi submetido a crescimento em escala ampliada para isolamento e caracterização dos metabólitos secundários produzidos por este. Após a obtenção dos extratos brutos estes foram fracionados utilizando técnicas cromatográficas adequadas. Após análise prévia de RMN de ^1H das frações coletadas foi possível identificar e determinar a estrutura de 7 substâncias.

5.7.1 Determinação estrutural da substância J1

A substância **J1** (Figura 58), foi isolada do extrato hexânico com o fungo sendo cultivado no meio sólido de arroz. A determinação estrutural desse composto foi realizada apenas com o auxílio dos espectros de RMN de ^1H por se tratar de uma substância já conhecida, sendo que seus dados foram comparados com os já existentes na literatura (MARINHO et al., 2005).

Figura 58: Estrutura da substância J1



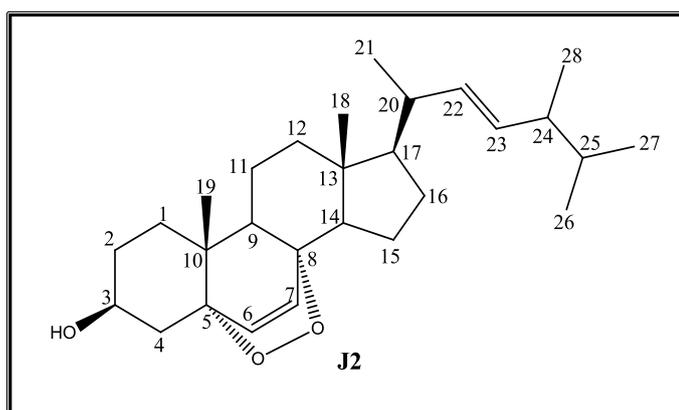
O padrão espectral apresentado no espectro de RMN ^1H (FIGURA 59, p. 146) mostrou um sinal referente à metila terminal do ácido graxo em δ_{H} 0,87, um sinal singlete intenso em δ_{H} 1,25 referente aos hidrogênios metilênicos de cadeia alquílica, sinais em δ_{H} 2,32 e δ_{H} 1,59 referentes aos hidrogênios metilênicos α e β -

carbonílicos respectivamente, um multiplete em δ_H 2,00 característico de hidrogênios alílicos. Foram observados ainda dois sinais δ_H 4,13 (*dd*, $J = 6,0$ Hz) e em δ_H 4,28 (*dd*, $J = 4,2$ e $4,5$ Hz) referentes a hidrogênios metoxílicos, um sinal multiplete em δ_H 5,33, referente aos hidrogênios olefínicos.

5.7.2 Determinação estrutural da substância J2

A substância **J2** (Figura 60), denominada peróxido de ergosterol, foi isolada do extrato hexânico com o fungo cultivado no meio sólido de arroz. Por tratar-se de uma substância conhecida, sua identificação foi feita utilizando os dados de RMN de ^1H e ^{13}C , e comparados aos dados da literatura.

Figura 60: Estrutura da substância **J2**



No espectro de RMN de ^1H (Figura 61, p. 149) foi observado um multipletto em δ_{H} 3,94, sugerindo a presença de hidrogênio ligado a carbono carbinólico, confirmado pela presença do sinal em δ_{C} 66,4 observado no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 62, p. 150). Na região de menor proteção foi observado dois dupletos em δ_{H} 6,23 (H-6) e em δ_{H} 6,50 (H-7), acoplado entre si com constante de 8,4 Hz, sugerindo a presença de ligação dupla carbono-carbono em configuração *cis*; além de dois duplos dupletos em δ_{H} 5,14 ($J = 7,8$ Hz e 15,3 Hz, H-23) e em δ_{H} 5,22 ($J = 6,9$ e 15,3 Hz, H-22), sugerindo a presença de hidrogênios olefínicos em configuração *trans*. O espectro de RMN de ^{13}C confirmou a presença de duas ligações duplas através dos sinais observados em: δ_{C} 130,7, 132,3, 135,2 e 135,4.

O espectro de RMN de ^1H apresentou, na região de maior proteção, sinais correspondentes a hidrogênios metílicos, sendo eles: dois singletos em δ_{H} 1,25 (H-18) e δ_{H} 0,88 (H-19), além de quatro dupletos em δ_{H} 0,81 ($J = 6,9$ Hz, H-27), δ_{H} 0,82 ($J = 6,6$ Hz, H-26), δ_{H} 0,90 ($J = 6,6$ Hz, H-21) e δ_{H} 0,99 ($J = 6,6$, H-28).

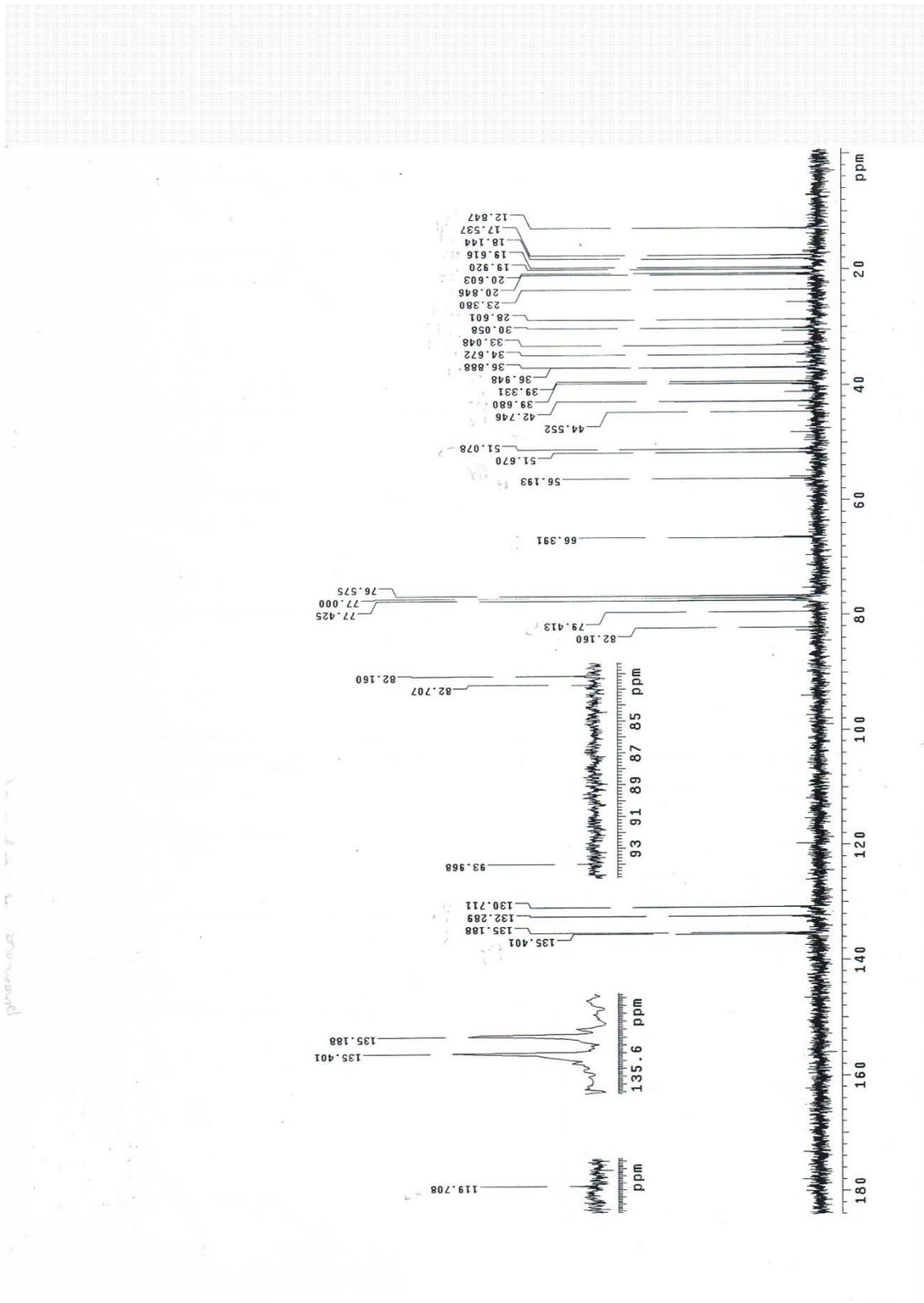
No espectro de RMN de ^{13}C foi confirmada a presença de seis sinais de

grupos metílicos em: δ_c 12,9 (C-18), δ_c 17,5 (C-28), δ_c 18,1 (C-19), δ_c 19,6 (C-21), δ_c 19,9 (C-26) e δ_c 20,6 (C-27). Além desses, o espectro de RMN de ^{13}C apresentou dois sinais desprotegidos característicos de carbono carbinólico em δ_c 82,2 (C-5) e δ_c 79,4 (C-8).

Comparação dos dados da literatura (MARINHO, A; MARINHO, P; RODRIGUES FILHO, 2007) com todos os valores encontrados no espectro de RMN de ^1H (Tabela 12, p. 159) e ^{13}C (Tabela 13, p. 160) da substância J2, sugeriu tratar-se do peróxido de ergosterol, um esteróide comum em fungos (SUBBIAH; ABPLANALP, 2003) e com atividade inibidora de células cancerígenas em ensaios realizados “in vitro”.

Este esteróide já havia sido isolado de outras espécies de fungos como *Penicillium janthinellum* isolado dos frutos da espécie *Melia azedarach* (MARINHO et al., 2005). No gênero *Xylaria*, foi isolado nas espécies *X. nigripes* (GONG et al., 2008) e *X. longipes* (MA; RUAN; LIU, 2008).

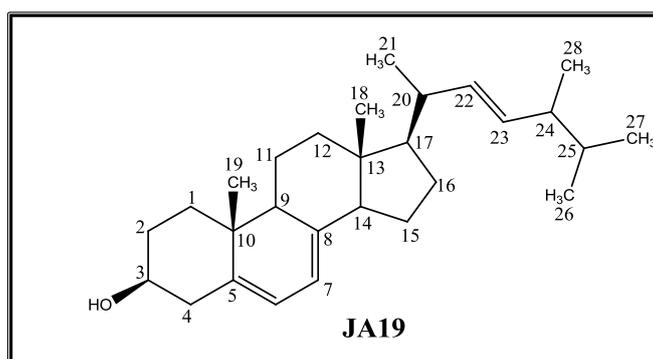
Uma análise dos lipídios de *Sporothrix* spp. utilizando métodos espectroscópicos identificou peróxido de ergosterol em leveduras. Este composto pode ser convertido em ergosterol quando em contato com uma enzima extraída do fungo. O peróxido de ergosterol foi encontrado em um fungo patogênico pela primeira vez em *Sporothrix* spp., e age como um mecanismo de proteção para escapar de espécies reativas de oxigênio durante a fagocitose e também pode representar um fator de virulência. Aparentemente, no entanto, a sobrevivência de leveduras virulentas de *Sporothrix* spp. após a fagocitose por polimorfonucleares hospedeiros é baseada, além desta, em outras estratégias de escape (SGARBI et al., 1997; CARLOS et al., 2009).



5.7.3 Determinação estrutural da substância JA19.

A substância **JA19** (Figura 63) foi identificada como um sólido cristalino, obtido das subfrações do extrato hexânico do fungo, cultivado em meiode arroz. A identificação desta substância foi feita através da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e por comparação com os dados descritos na literatura (MARINHO, A; MARINHO, P; RODRIGUES FILHO, 2007).

Figura 63: Estrutura da substância **JA19**



O espectro de RMN de ^1H (Figura 64, p. 153) apresentou sinais semelhantes aos observados para substância **J2**, indicando que a substância **JA19** poderia ser um esteróide. O espectro de RMN de ^1H mostrou um multipletto em δ_{H} 3,63 (H-3), sugerindo a presença de hidrogênio ligado a carbono carbinólico. Na região de menor proteção foram observados dois duplos dupletos em δ_{C} 5,58 ($J = 2,5$ e $5,5$ Hz, H-6) e em δ_{C} 5,38 ($J = 2,5$ e $5,5$ Hz, H-7), sugerindo a presença de hidrogênios olefínicos; além de um multipletto em δ_{C} 5,19 (H-22/23), sugerindo a presença de mais uma ligação dupla carbono-carbono.

Na região de maior proteção, o espectro de RMN de ^1H apresentou singletos referentes a hidrogênios metílicos em δ_{H} 0,62 (H-19) e em δ_{H} 0,94 (H-18), assim como, dupletos em δ_{H} 0,82 ($J = 6,6$ Hz, H-26), δ_{H} 0,83 ($J = 6,9$ Hz, H-27), δ_{H} 0,92 ($J = 6,9$ Hz, H-28) e δ_{H} 1,04 ($J = 6,6$ Hz, H-21).

Através da análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 65, p. 154) de **JA19** pode-se observar sinais referentes a 28 carbonos, sendo seis referentes a carbonos metílicos (δ_{C} 12,0; δ_{C} 16,2; δ_{C} 17,5; δ_{C} 19,6; δ_{C} 21,0 e δ_{C} 33,0), sete metilênicos (δ_{C} 21,1; δ_{C}

23,0; δ_C 28,2; δ_C 31,9; δ_C 38,3; δ_C 39,0 e δ_C 40,7), sete metínicos (δ_C 19,9; δ_C 40,4; δ_C 42,8; δ_C 46,2; δ_C 54,5; δ_C 55,6 e δ_C 70,4;), além de seis sinais referentes a carbonos olefínicos (δ_C 116,2; δ_C 119,5; δ_C 132,0; δ_C 135,5; δ_C 139,7 e δ_C 141,3) e dois sinais referentes a carbonos quaternários (δ_C 37,0 e δ_C 42,8). Com essas informações resolveu-se, então, comparar os dados espectroscópicos de **JA19** com dados obtidos na literatura para esteróides, comumente, isolados de fungos. Observou-se a total similaridade dos deslocamentos químicos dos sinais de RMN ^1H e RMN ^{13}C de **JA19** com o ergosterol (MARINHO, A; MARINHO, P; RODRIGUES FILHO, 2007) conforme mostra as Tabelas 12 (p. 159) e 13 (p. 160)

Na bicamada fosfolipoproteica da membrana está presente um esterol único aos fungos chamado ergosterol. A própria molécula de ergosterol, ou as enzimas utilizadas na sua rota biossintética são importantes alvos para a ação de alguns antifúngicos (ONYEWU; BLANKENSHIP; POETA, 2003).

Figura 64: Espectro de RMN de ^1H de JA19 (CDCl_3 , 300 MHz).

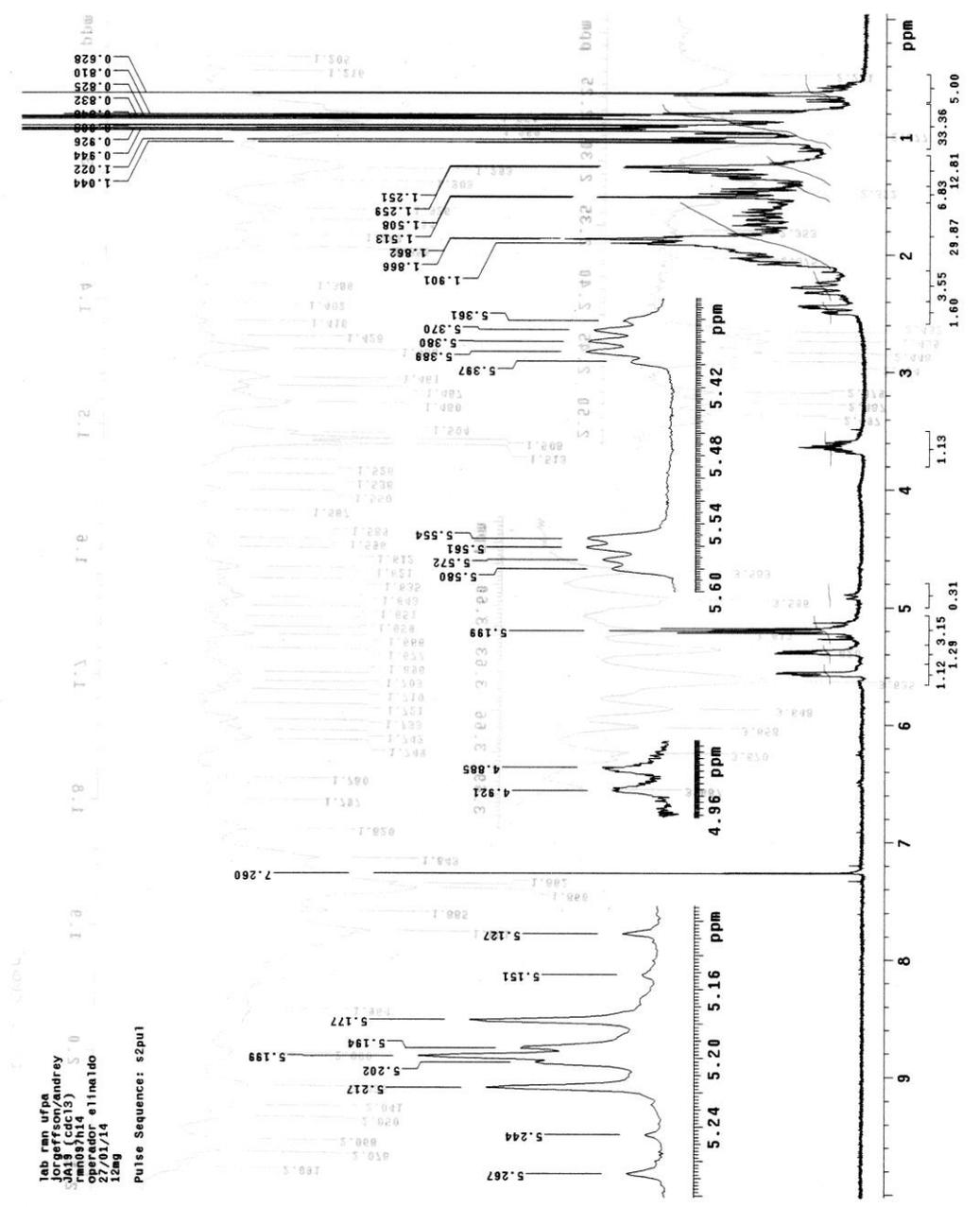
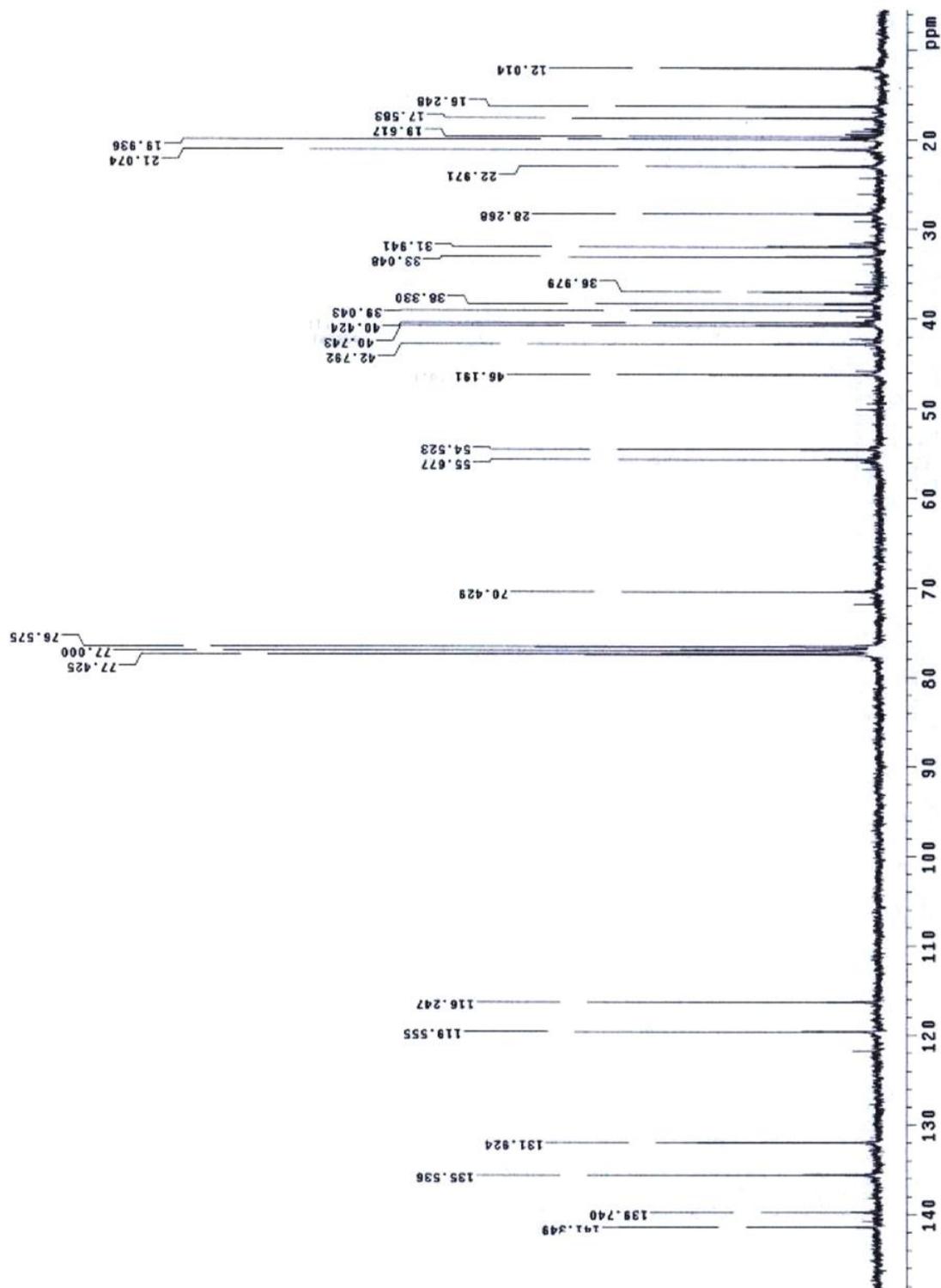


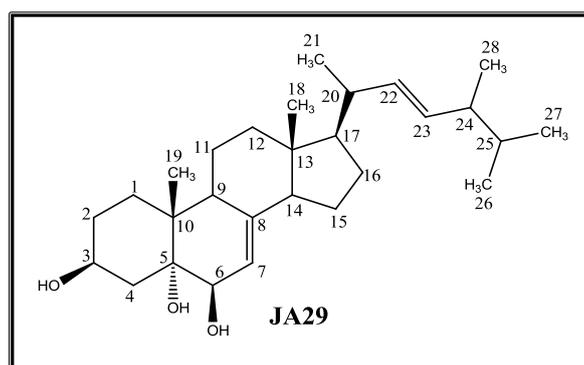
Figura 65: Espectro de RMN de ^{13}C de JA19 (CDCl_3 , 75 MHz).



5.7.4 Determinação estrutural da substância JA29

A substância JA29 (Figura 66) foi isolada do extrato hexânico da fração hex/AcOEt 50%, com o fungo sendo cultivado no meio sólido de arroz. A determinação estrutural desse composto foi realizada com o auxílio dos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , por se tratar de uma substância já conhecida, sendo que seus dados foram comparados com os já existentes na literatura.

Figura 66: Estrutura da substância **JA29**



De acordo com os dados de RMN de ^1H (Figura 67, p.157), foi possível observar sinais na região das metilas em δ_{H} 0,58 (s, 3H, H-18), δ_{H} 0,81 (d, 3H, 6,6 Hz, H-26), δ_{H} 0,83 (d, 3H, 6,6 Hz, H-27), δ_{H} 0,91 (d, 6,9 Hz, H-28), δ_{H} 1,02 (d, 3H, 6,6 Hz, H-21) e δ_{H} 1,06 (s, 3H, H-19), dois sinais de hidrogênios oximetínicos em δ_{H} 3,63 (m, 1H, H-6) e δ_{H} 4,06 (m, 1H, H-3) e três sinais de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,19 (t, 1H, 7,5 Hz, H-22/ H-23) e δ_{H} 5,33 (sl, 1H, H-7). O perfil do espectro de RMN de ^1H de **JA29** apresenta características de esteróides semelhantes a **J2** e **JA19**.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 68, p.158) apresentou características de substância com esqueleto esteroidal confirmando os dados de RMN de ^1H . Os sinais em δ_{C} 143,7; δ_{C} 136,9; δ_{C} 133,2 e δ_{C} 119,0 que foram atribuídos aos carbonos C-8, C-23, C-22 e C-7, respectivamente, atribuídos às ligações duplas na cadeia. Sinais de carbonos carbinólicos, em δ_{C} 76,9; δ_{C} 74,2 e δ_{C} 68,3 como no RMN de ^1H só há dois sinais atribuídos a hidrogênios oximetínicos um dos sinais é 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, A; MARINHO, P;

RODRIGUES FILHO, 2007) para o cerivisterol, o qual mostrou-se total similaridade conforme pode ser observado nas Tabelas 12 (p.159) e 13 (p.160).

O cerivisterol é uma 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; TAY; BLANCO, 2008).

Figura 67: Espectro de RMN de ^1H de JA29 (CDCl_3 , 300 MHz).

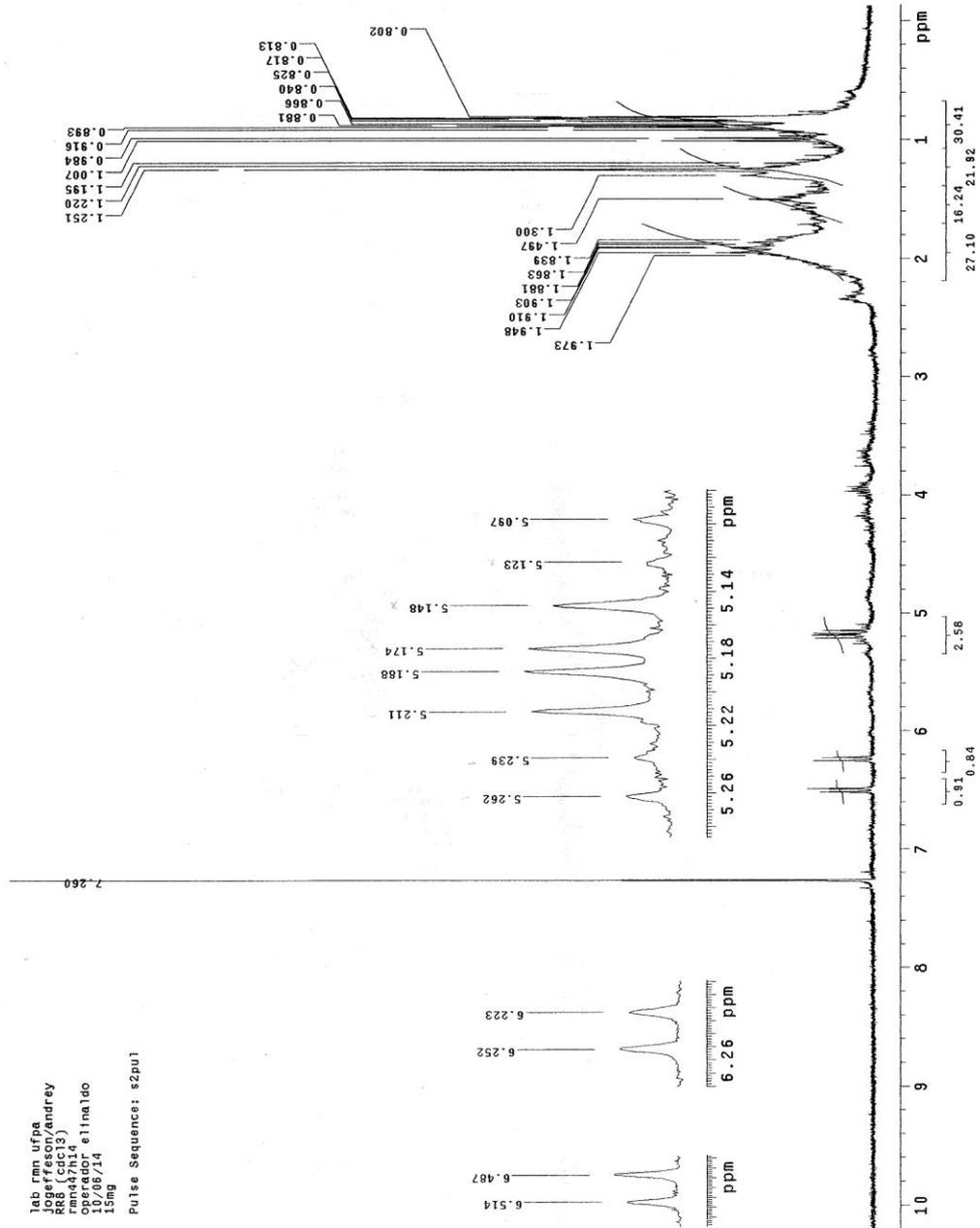


Figura 68: Espectro de RMN de ^{13}C de JA29 (CD_3OD , 75 MHz).

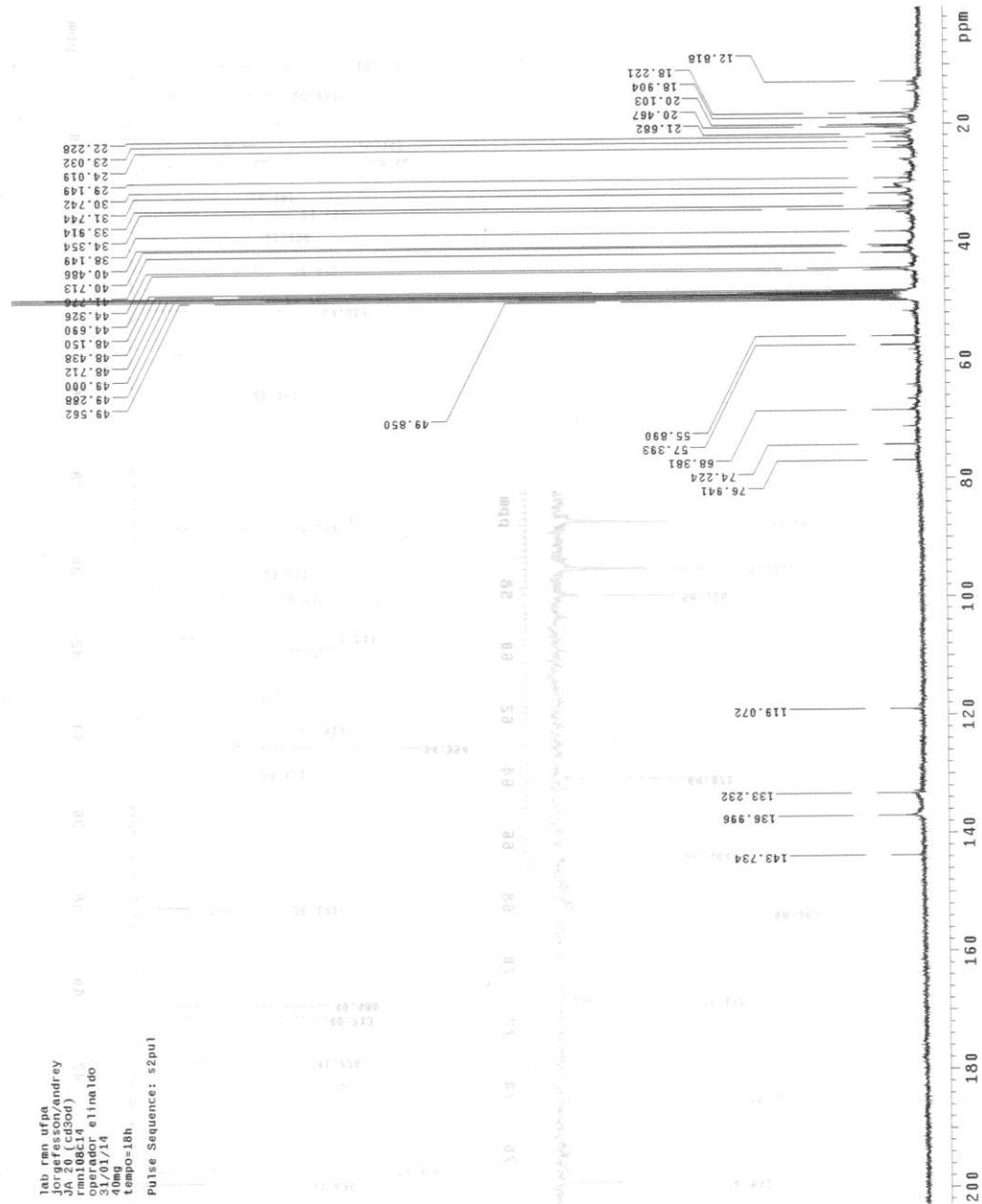


Tabela 12- Atribuição dos sinais de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) para **JA19**, **J2** e **JA29** juntamente com a comparação dos dados descritos na literatura de ergosterol, peróxido de ergosterol e cerivisterol, respectivamente.

	JA19	JA19^a	J2	J2^a	JA29	JA29^a
H	δ ^1H	δ ^1H	δ ^1H	δ ^1H	δ ^1H	δ ^1H
3	3,63 (m)	3,63 (m)	3,94 (m)	3,95 (m)	4,06 (m)	4,07 (m)
6	5,58 (dd; 5,5 e 2,5)	5,56 (m)	6,23 (d; 8,4)	6,22 (d; 8,0)	3,63 (m)	3,63 (m)
7	5,38 (dd; 5,5 e 2,5)	5,38 (m)	6,51 (d; 8,4)	6,49 (d; 8,0)	5,33 (sl)	5,34 (sl)
18	0,94 (s)	0,95 (s)	1,25 (s)	1,22 (s)	0,58 (s)	0,59 (s)
19	0,62 (s)	0,63 (s)	0,88 (s)	0,88 (s)	1,06 (s)	1,07 (s)
21	1,04 (d; 6,6)	1,04 (d; 6,7)	0,90 (d; 6,6)	0,89 (d; 6,9)	1,02 (d; 6,6)	1,02 (d; 6,4)
22	5,19 (m)	5,20 (m)	5,22 (dd; 15,3 e 6,9)	5,21 (m)	5,19 (t; 7,5)	5,19 (t; 7,2)
23	5,19 (m)	5,20 (m)	5,14 (dd; 15,3 e 7,8)	5,15 (m)	5,19 (t; 7,5)	5,20 (m)
26	0,82 (d; 6,6)	0,82 (d; 6,8)	0,82 (d; 6,6)	0,83 (d; 6,7)	0,81 (d; 6,6)	0,81 (d; 6,7)
27	0,83 (d; 6,9)	0,84 (d; 6,8)	0,81 (d; 6,9)	0,80 (d; 6,5)	0,83 (d; 6,6)	0,83 (d; 6,5)
28	0,92 (d; 6,9)	0,92 (d; 6,8)	0,99 (d; 6,6)	0,98 (d; 6,8)	0,91 (d; 6,9)	0,90 (d; 6,8)

Fonte: ^aMARINHO, A; MARINHO, P; RODRIGUES FILHO, 2007 (200 MHz em CDCl_3).

Tabela 13- Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) para **JA19**, **J2** e **JA29** juntamente com a comparação dos dados descritos na literatura de ergosterol, peróxido de ergosterol e cerivisterol, respectivamente.

C	JA19	JA19^a	J2	J2^a	JA29	JA29^a
1	38,3	38,3	30,0	29,6	32,0	33,0
2	31,9	31,9	34,6	34,6	33,9	33,9
3	70,4	70,4	66,4	66,4	68,3	67,8
4	40,7	40,7	39,3	39,7	40,3	39,3
5	141,3	141,3	82,1	82,1	76,9	76,0
6	119,5	119,6	135,1	135,1	74,2	73,1
7	116,2	116,3	130,7	130,7	119,0	117,3
8	140,1	139,7	79,4	79,4	143,7	144,0
9	46,2	46,2	51,0	51,0	44,3	43,5
10	37,0	37,0	36,9	36,9	38,1	37,2
11	21,1	21,1	20,6	20,6	22,2	22,1
12	28,2	28,3	36,8	36,9	40,7	39,5
13	42,8	42,8	44,5	44,5	44,7	43,8
14	54,5	54,5	51,6	51,6	55,9	54,8
15	23,0	23,0	23,3	23,3	23,0	22,9
16	39,0	39,1	28,6	28,6	29,1	27,9
17	55,6	55,7	56,1	56,1	57,4	56,0
18	12,0	12,0	12,8	12,9	12,8	12,3
19	16,2	16,2	18,1	18,2	18,9	18,8
20	40,4	40,5	39,6	39,7	41,7	40,4
21	19,6	19,4	20,8	20,9	20,1	19,6
22	131,9	132,0	132,3	132,3	133,2	132,2
23	135,5	135,5	135,4	135,4	136,9	135,4
24	42,8	42,8	42,7	42,8	42,8	42,8
25	19,9	19,9	33,0	33,1	33,0	33,1
26	33,0	33,2	19,6	19,6	20,4	19,9
27	21,0	21,0	19,9	19,9	21,2	21,1
28	17,5	17,5	17,5	17,5	18,2	17,6

Fonte: ^aMARINHO, A; MARINHO, P; RODRIGUES FILHO, 2007 (50 MHz em CDCl_3).

5.7.5 Determinação estrutural da substância JA24

A substância **JA24** (Figura 69), foi isolada do extrato hexânico da fração hex/AcOEt 50% com o fungo sendo cultivado no meio sólido de arroz. A determinação estrutural desse composto foi realizada apenas com o auxílio do espectro de RMN ^1H por se tratar de uma substância já conhecida, sendo que seus dados foram comparados com os já existentes na literatura.

A Figura 70 (p. 162) mostra o espectro de RMN de ^1H do **JA24**, onde se observou um sinal em δ_{H} 5,29 relativo aos hidrogênios ligados ao carbonos olefínicos, um singlete em δ_{H} 3,66 referente aos hidrogênios metoxílicos, sinal característico dos ésteres metílicos, um trípleto em δ_{H} 2,29 referente aos hidrogênios metilênicos α -carbonílicos, um sinal em δ_{H} 1,61 referente aos hidrogênios metilênicos β -carbonílicos. Os hidrogênios metilênicos estão em δ_{H} 1,21 e em δ_{H} 0,90 referente aos hidrogênios metílicos terminal da cadeia graxa.

Figura 69: Estrutura da substância **JA24**

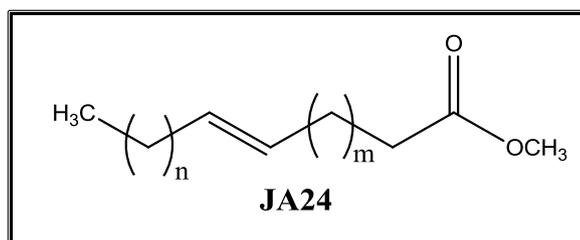
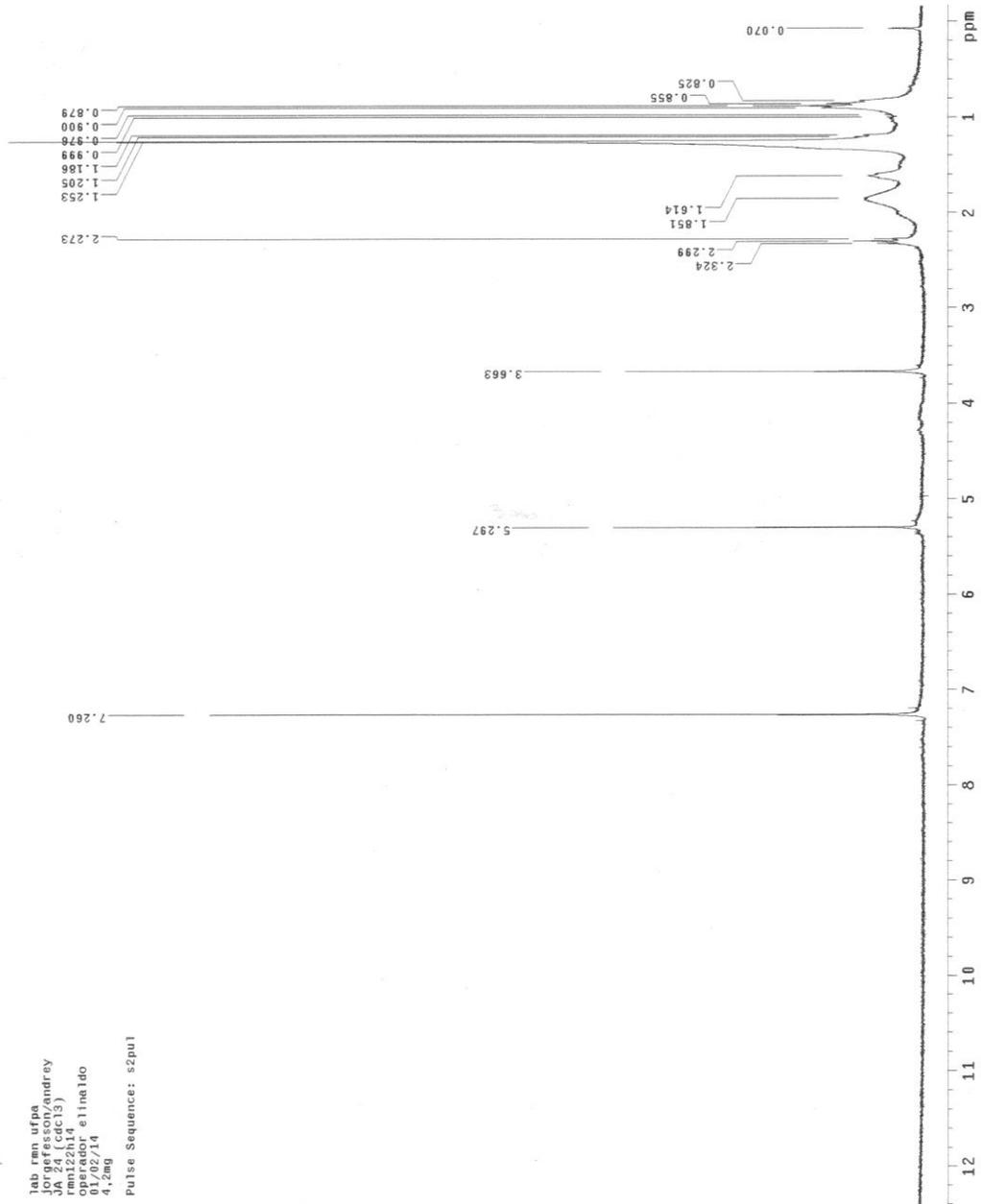


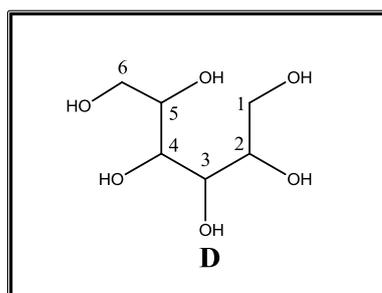
Figura 70: Espectro de RMN de ^1H de **JA24** (CDCl_3 , 300 MHz).



5.7.6 Determinação estrutural da substância D

A substância D foi isolado do extrato metanólico do fungo *S. apiospermum*, durante a remoção do solvente e se apresentou como um sólido esbranquiçado e solúvel em água.

Figura 71: Estrutura da substância D



O espectro de RMN de ^1H (Figura 72, p. 165) mostrou a presença de dois sinais largos em δ_{H} 3,67 (atribuído a H-1 e H-6) e em δ_{H} 3,74 (atribuído aos hidrogênios H-3 e H-4). O sinal em δ_{H} 3,78 ($J = 6,0$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios H-2 e H-5.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 73, p. 166) indica a presença de três sinais, mostrando a simetria da molécula, sendo um CH_2 e dois CH , pela análise do DEPT (Figura 74, p. 167). O sinal em δ_{C} 63,2 foi atribuído a C-1 e C-6, o sinal em δ_{C} 69,3 atribuído a C-3 e C-4 e o sinal em δ_{C} 70,8 atribuído a C-2 e C-5. A identificação desta substância foi feita através da análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT e por comparação com os dados descritos na literatura (Tabela 14, p. 164) (SILVA, 2007). Desta maneira, a análise dos espectros indicou que a substância **D** poderia tratar-se de um poliol do tipo dulcitol.

O dulcitol, um monossacarídeo amplamente distribuído na Natureza, também foi anteriormente isolado em *M. ebenifolia* Reissek. O dulcitol revelou propriedades antitumorais interessantes, inibindo a leucemia, sem demonstrar citotoxicidade em células não leucémicas (SHIROTA et al., 1998)

TABELA 14: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de D e comparação com dados da literatura

Posição H e C	Substância D (300 MHz ^1H / 75 MHz ^{13}C , D_2O)		SILVA, 2007 (400 MHz para ^1H / 100 MHz para ^{13}C , D_2O)	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
1	3,67	63,2	3,69	63,2
2	3,78	70,8	3,99 (t, J = 6,0 Hz)	70,1
3	3,74	69,3	3,72	69,3
4	3,74	69,3	3,72	69,3
5	3,78	70,8	3,99 (t, J = 6,0 Hz)	70,1
6	3,67	63,2	3,69	63,2

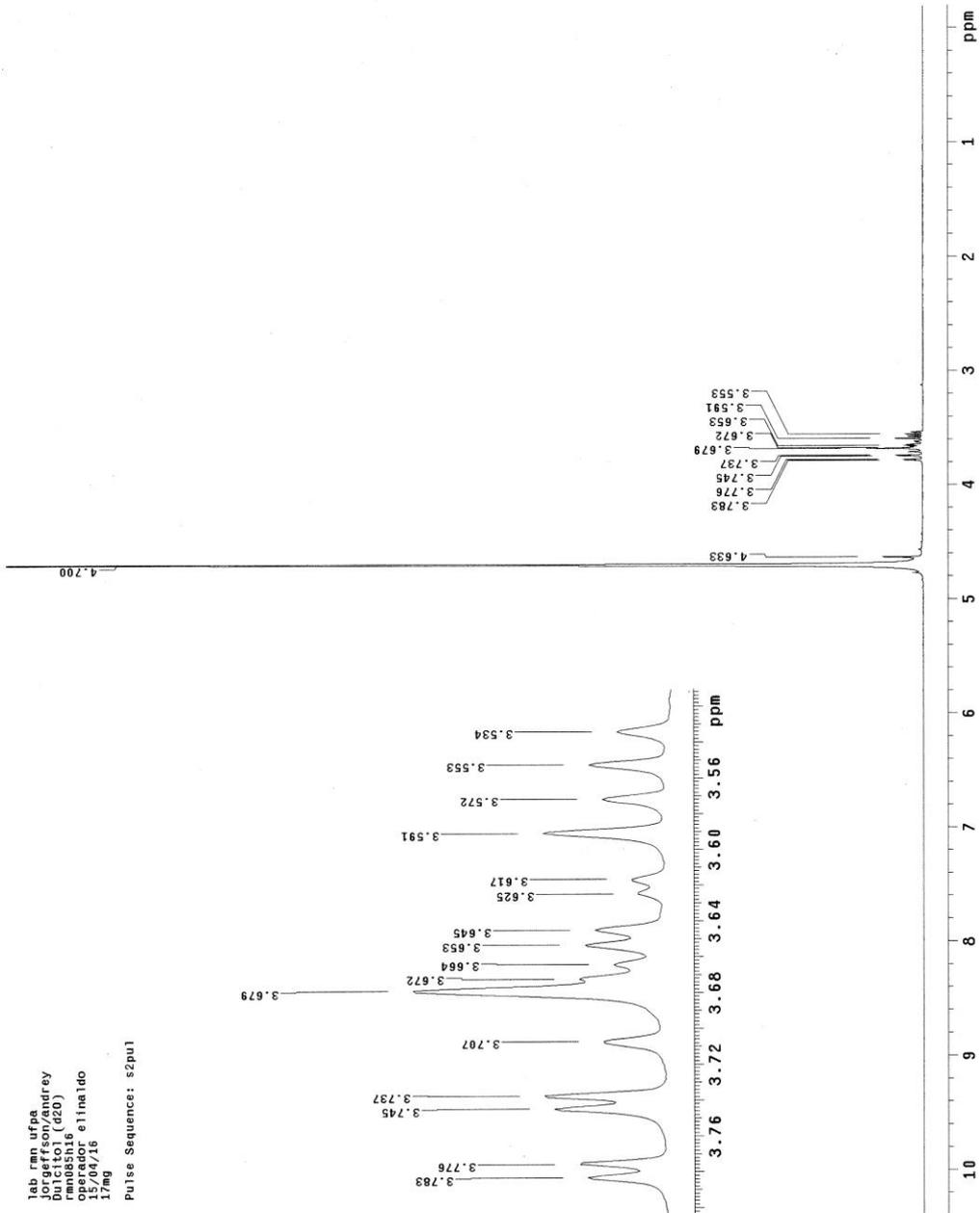
Figura 72: Espectro de RMN de ^1H de **D** (D_2O , 300 MHz).

Figura 73: Espectro de RMN de ^{13}C de D (D₂O, 75 MHz).

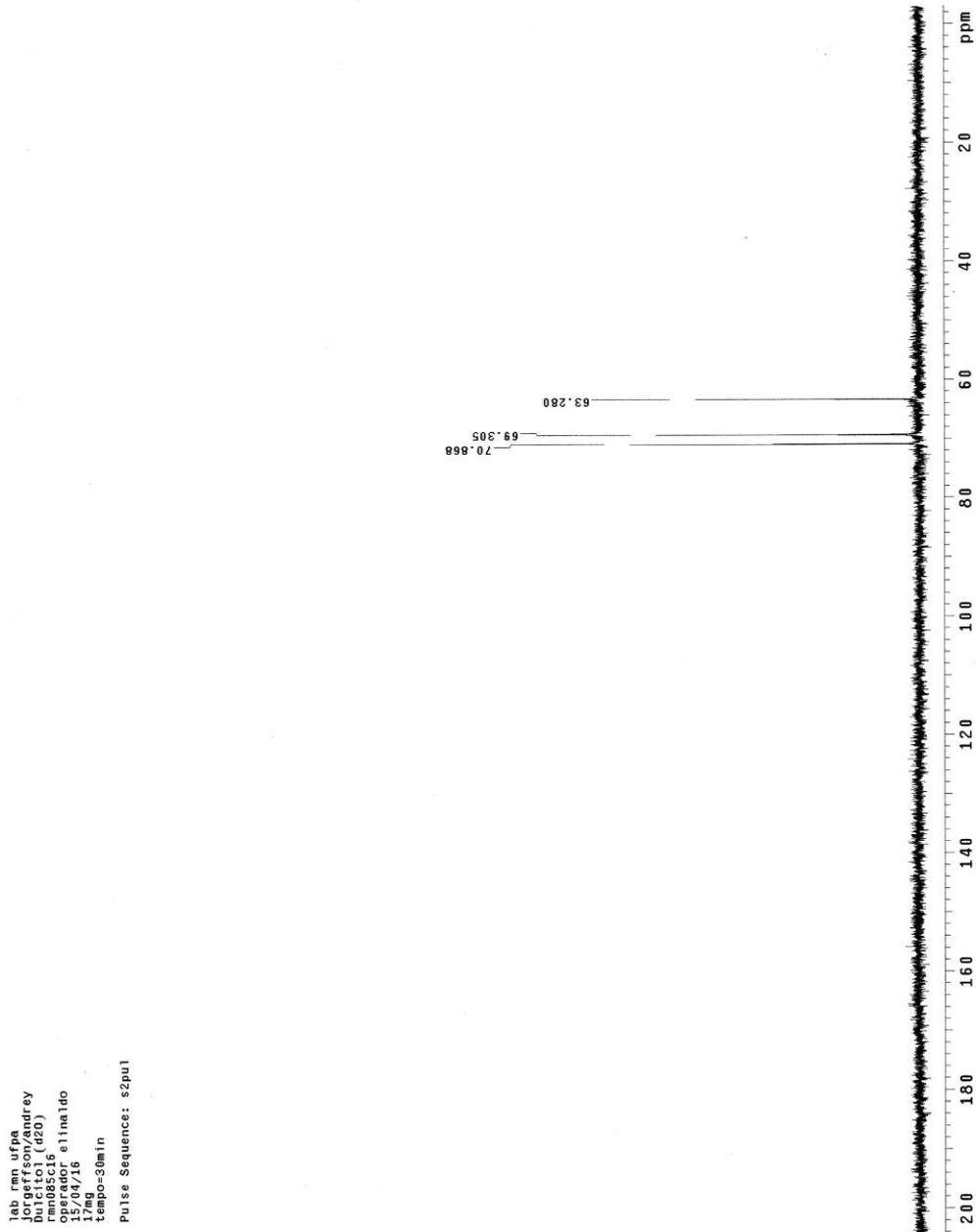
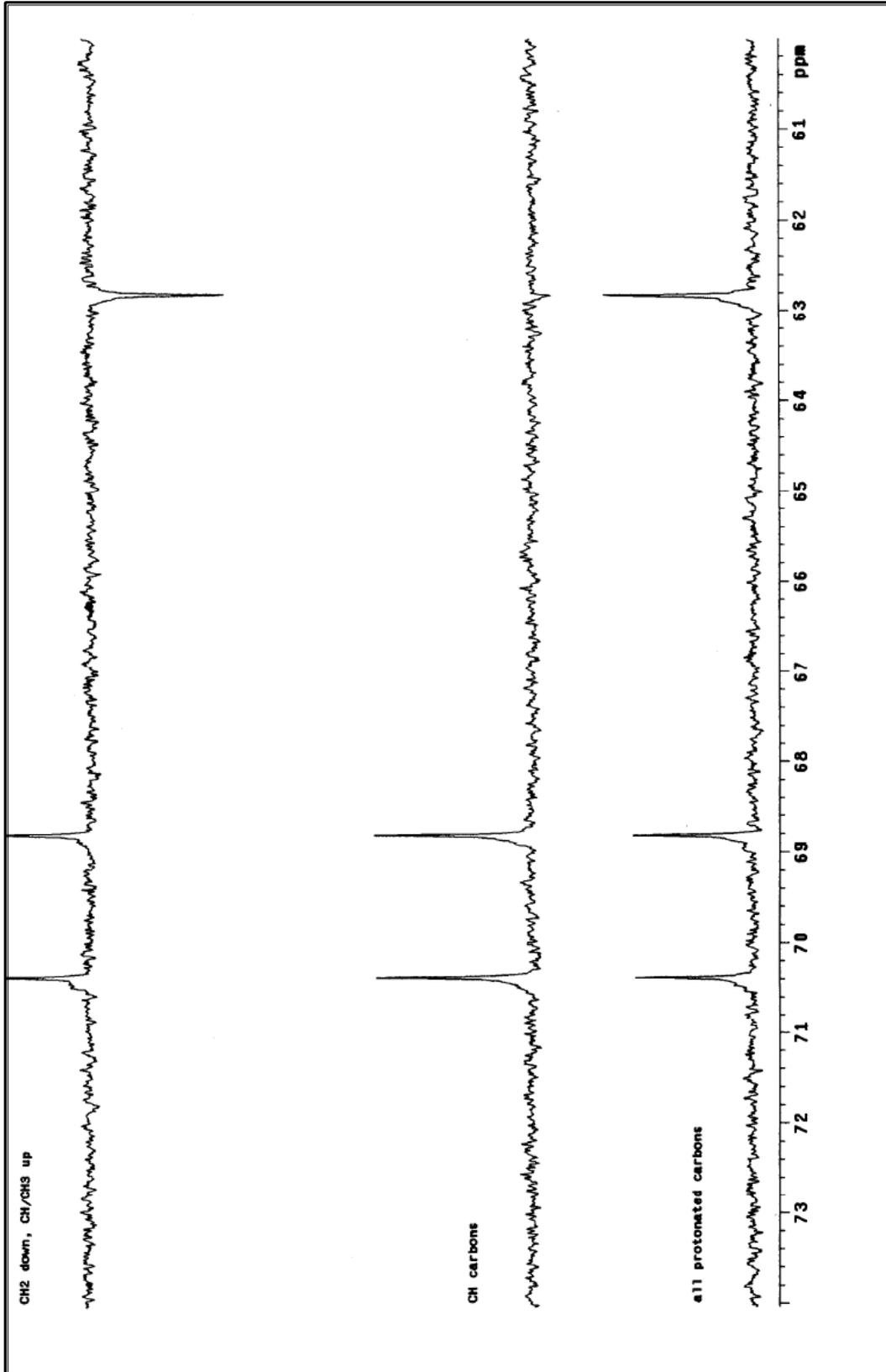


Figura 74- Espectro de DEPT de D.



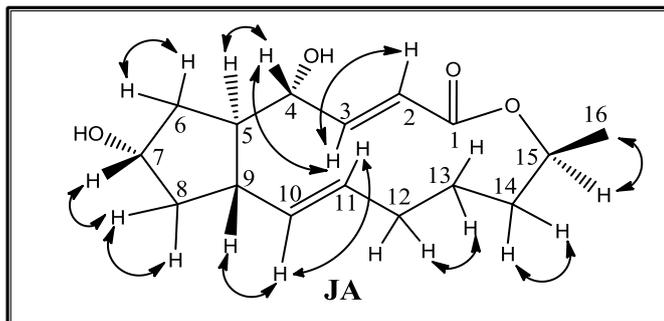
5.7.7 Determinação estrutural da substância JA

A substância **JA** foi isolada dos extratos hexânico e AcOEt do fungo endofítico *S. apiospermum* e teve sua estrutura determinada através de experimento de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY e EM. A determinação estrutural também foi baseada em comparação dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 15, p. 172) (WANG et al., 2007).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 79, p. 173) apresentou para a substância **JA** sinais em δ_{H} 4,02 (*m*, H-4), δ_{H} 4,20 (*quint.*, $J = 5,2$ Hz, H-7) e δ_{H} 4,80 (*m*, H-15) característicos de hidrogênios carbinólicos. Apresentou também sinais em δ_{H} 5,81 (*dd*, $J = 15,6$ e $2,1$ Hz, H-2), δ_{H} 7,44 (*dd*, $J = 15,6$ e $3,0$ Hz, H-3), δ_{H} 5,26 (*dd*, $J = 15,0$ e $9,6$ Hz, H-10) e δ_{H} 5,74 (*ddd*, $15,1$; $10,1$; $5,1$ Hz, H-11) característicos de hidrogênios olefínicos, sendo que o H-3 apresenta um sinal em δ_{H} 7,44, devido a dupla ligação conjugada a carboníla. A geometria das ligações duplas foram inferidas como sendo *E*, baseando-se nos valores característicos das constantes de acoplamento.

Análise do experimento de COSY (Figura 81, p. 175) evidenciou quase todas as correlações entre os hidrogênios vizinhos e geminados, como por exemplo, os acoplamentos entre os hidrogênios geminados H-6 α (δ_{H} 2,03) e H-6 β (δ_{H} 1,83), H-8 α (δ_{H} 2,16) e H-8 β (δ_{H} 1,43), além do H-14 α (δ_{H} 1,62) e H-14 β (δ_{H} 1,56). Outras correlações também puderam ser observada, como a dos H-13 α (δ_{H} 1,89) e H-14 β (δ_{H} 1,56), H-12 β (δ_{H} 1,86) e H-13 β (δ_{H} 0,90). O sinal de hidrogênio carbinólico em H-4 (δ_{H} 4,02) correlacionou-se com os sinais dos hidrogênios H-5 (δ_{H} 1,70) e H-3 (δ_{H} 7,44). Observou-se também os acoplamentos entre os hidrogênios olefínicos H-2 (δ_{H} 5,81) e H-3, H-10 (δ_{H} 5,26) e H-11 (δ_{H} 5,74). As correlações de COSY de JA encontram-se na Figura 75 (p. 169)

Figura 75- Substância **JA** e as principais correlações em COSY.

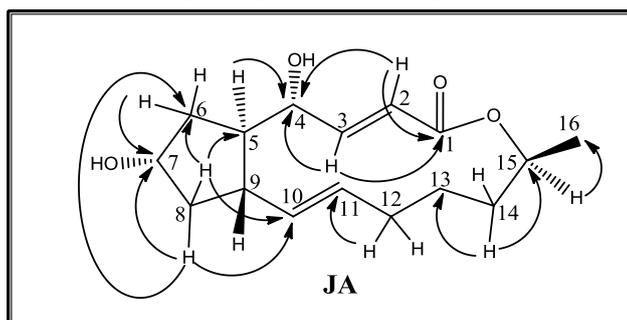


Na análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 80, p.174) são observados sinais referentes a 16 átomos de carbonos. Alguns sinais são descritos, o sinal de carbono em δ_{C} 168,4 característico de carbonila de grupo lactônico. Os sinais de carbono em δ_{C} 155,1, δ_{C} 138,1, δ_{C} 131,4 e δ_{C} 117,8 foram atribuídos aos carbonos olefínicos em C-3, C-10, C-11 e C-2 respectivamente, enquanto que os sinais em δ_{C} 76,6, δ_{C} 73,2 e δ_{C} 73,0 foram atribuídos aos carbonos carbinólicos em C-4, C-15 e C-7 respectivamente.

Com auxílio do experimento de HSQC (Figura 82, p. 176) e através da ampliação (Figura 83, p. 177), foi possível atribuir todos átomos de hidrogênios aos respectivos carbonos.

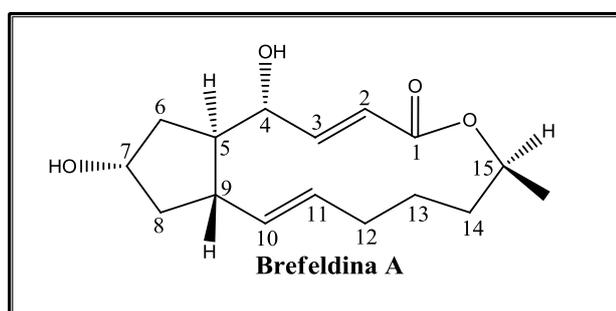
Na análise dos mapas de correlação no experimento de HMBC (Figura 84, p. 178), foi possível observar que os sinais de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 7,44 (H-3) e δ_{H} 5,81 (H-2) se correlacionam com o sinal de carbono carbinólico em δ_{C} 76,6 (C-4) a J^{β} e J^{α} , respectivamente. Estes mesmos hidrogênios olefínicos, por sua vez, correlacionam-se com o sinal de carbono em δ_{C} 160,4 (C-1) a J^{β} e J^{α} , foi constatado também a correlação do sinal de hidrogênio carbinólico em δ_{H} 4,8 (H-15) com o sinal de carbono metílico em δ_{C} 1,23 (C-16) a J^{α} . foi possível observar correlações entre o sinal do hidrogênio em δ_{H} 1,43 (H-8 β) com o carbono olefínico em δ_{C} 138,1 (C-10) a J^{β} , com o sinal do carbono carbinólico em δ_{C} 73,0 (C-7) a J^{α} e também com o carbono metilênico em δ_{C} 41,8 (C-6) a J^{β} . Já o hidrogênio metilênico em sinal δ_{H} 2,16 (H-8 α) correlaciona-se com o carbono metínico em δ_{C} 53,1 (C-5) a 3J e com os carbonos C-6 e C-10. Na Figura 76 (p. 170), encontram-se algumas das correlações de HMBC de **JA**.

Figura 76- Substância **JA** e as principais correlações em HMBC.



Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **JA** que em conjunto com a análise dos espectros de RMN 2D e do espectro de massa ESI-MS (Figura 85, p.179), no modo positivo, que apresentou o pico do íon em m/z 281 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Verificou-se também a presença dos picos em m/z 263 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ e 245 $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$, confirmando a massa molecular da substância. Após analisarmos todas essas informações confirmamos a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$. A proposta de fragmentação dos íons filhos de **JA** está na Figura 78 (p.171). Desta maneira, a análise dos espectros indicou que a substância **JA** poderia tratar-se da brefeldina A (Figura 77).

Figura 77: Estrutura da substância **JA**



A substância brefeldina A, isolada anteriormente do fungo endofítico *Aspergillus clavatus*, apresenta atividade antifúngica e antiviral, e uma atividade citotóxica maior que a apresentada pelo taxol (WANG et al., 2007).

Figura 78- Proposta de fragmentação de JA.

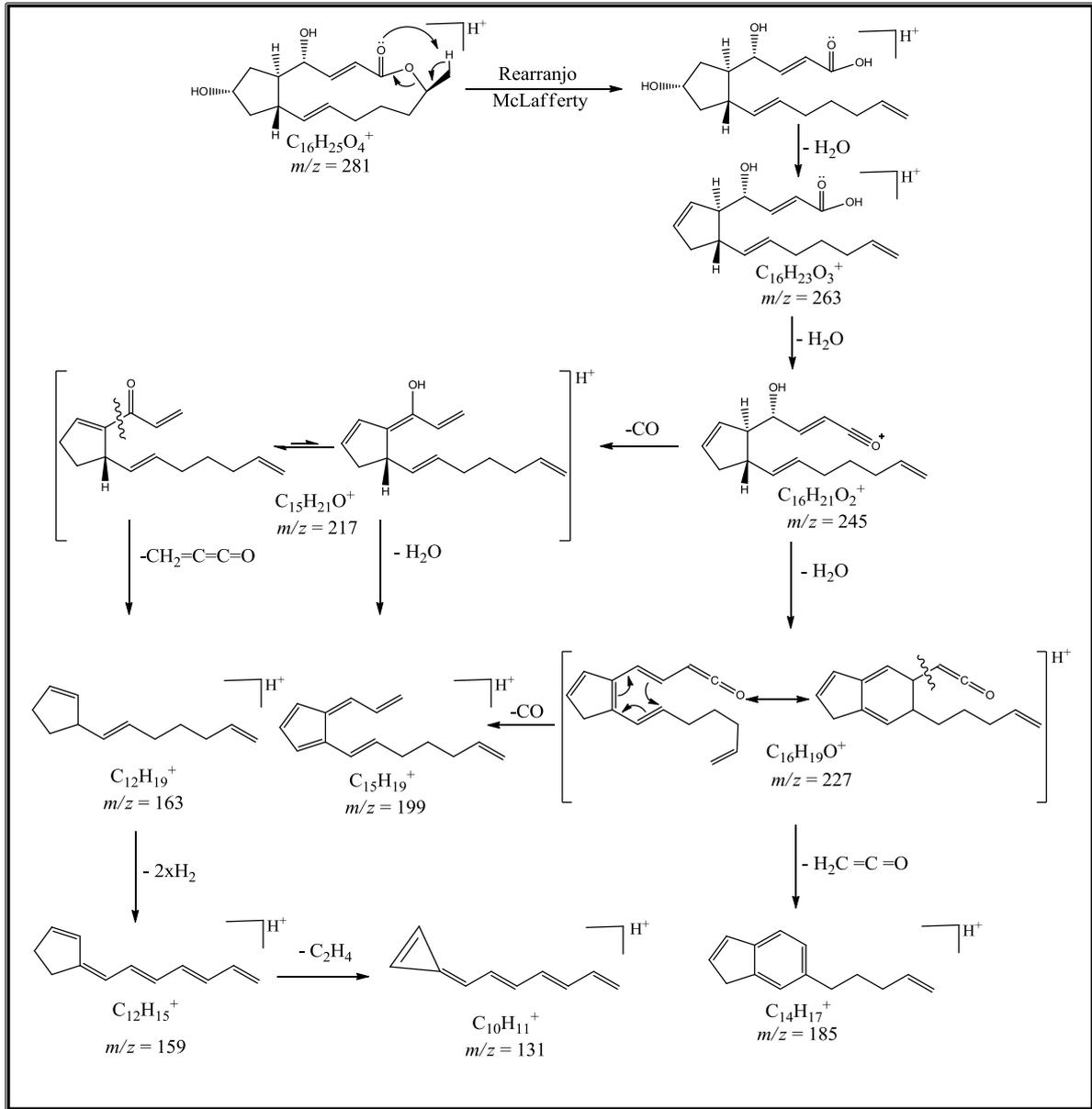


TABELA 15: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **JA** e comparação com dados da literatura

Posição H e C	Substância JA (300 MHz ^1H / 75 MHz ^{13}C , CD_3OD)		WANG et al., 2007 (500 MHz ^1H / 125 MHz ^{13}C , DMSO)	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
1	-	168,4	-	166,5
2	5,81 (<i>dd</i> , 15,6 e 2,1 Hz)	117,8	5,71 (<i>dd</i> , 15,7 e 1,8 Hz)	117,1
3	7,44 (<i>dd</i> , 15,6 e 3,0 Hz)	155,1	7,38 (<i>dd</i> , 15,7 e 2,8 Hz)	155,3
4	4,02 (<i>m</i>)	76,6	3,92 (<i>ddd</i> , 9,8; 2,8 e 1,8)	75,1
5	1,70 (<i>m</i>)	53,1	1,66 (<i>dddd</i> , 9,8; 9,0; 9,0 e 8,5)	52,5
6 α 6 β	2,03 (<i>m</i>) 1,83	41,8	1,83 (<i>m</i>) 1,69 (<i>m</i>)	41,7
7	4,21 (<i>quint.</i> , 5,2 Hz)	73,0	4,03 (<i>dddd</i> , 5,2; 5,2; 5,2 e 5,2)	71,3
8 α 8 β	2,16 (<i>m</i>) 1,43 (<i>m</i>)	44,0	2,30 (<i>ddd</i> , 13,8; 9,0 e 5,2) 1,29 (<i>m</i>)	43,9
9	2,37 (<i>m</i>)	45,4	2,30 (<i>dddd</i> , 9,6; 9,0; 9,0; 8,5)	44,2
10	5,26 (<i>dd</i> , 15,0 e 9,6 Hz)	138,1	5,20 (<i>dd</i> , 15,7 e 9,6)	138,0
11	5,74 (<i>ddd</i> , 15,1; 10,1; 5,1 Hz)	131,4	5,66 (<i>ddd</i> , 15,7; 10,2 e 4,6)	130,0
12 α 12 β	2,10 (<i>m</i>) 1,86 (<i>m</i>)	32,9	1,94 (<i>m</i>) 1,72 (<i>m</i>)	32,3
13 α 13 β	1,89 (<i>m</i>) 0,90 (<i>m</i>)	28,0	1,76 (<i>m</i>) 0,74 (<i>m</i>)	27,3
14 α 14 β	1,62 (<i>m</i>) 1,56 (<i>m</i>)	35,0	1,70 (<i>m</i>) 1,40 (<i>m</i>)	34,3
15	4,80 (<i>m</i>)	73,2	4,71 (<i>ddq</i> , 12,0; 6,3 e 1,7)	71,3
16	1,23 (<i>d</i> , 6,3 Hz)	21,0	1,17 (<i>d</i> , 6,2)	21,6

Figura 79: Espectro de RMN de ^1H de JA (CD_3OD , 300 MHz).

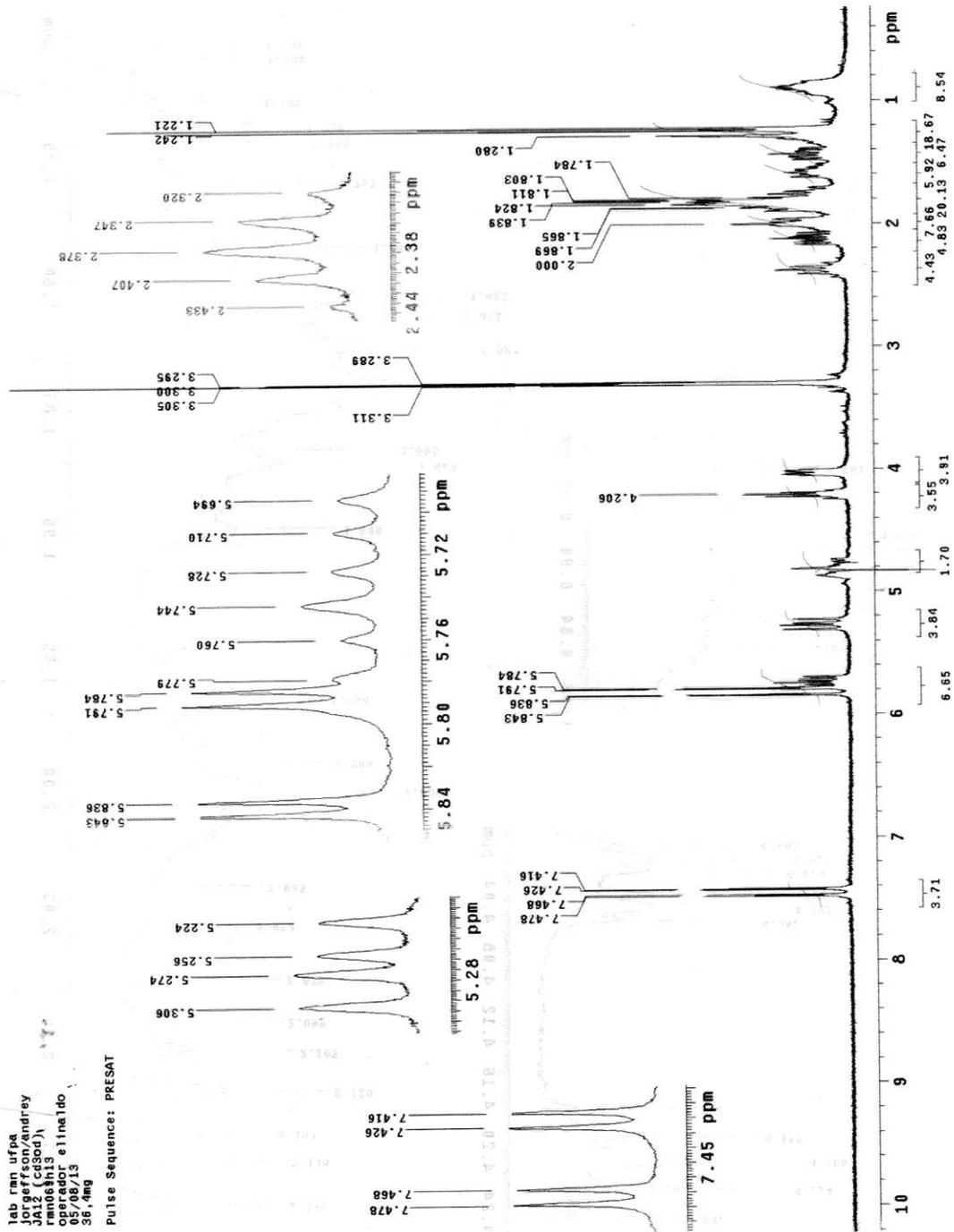


Figura 80: Espectro de RMN de ^{13}C de JA (CD_3OD , 75 MHz).

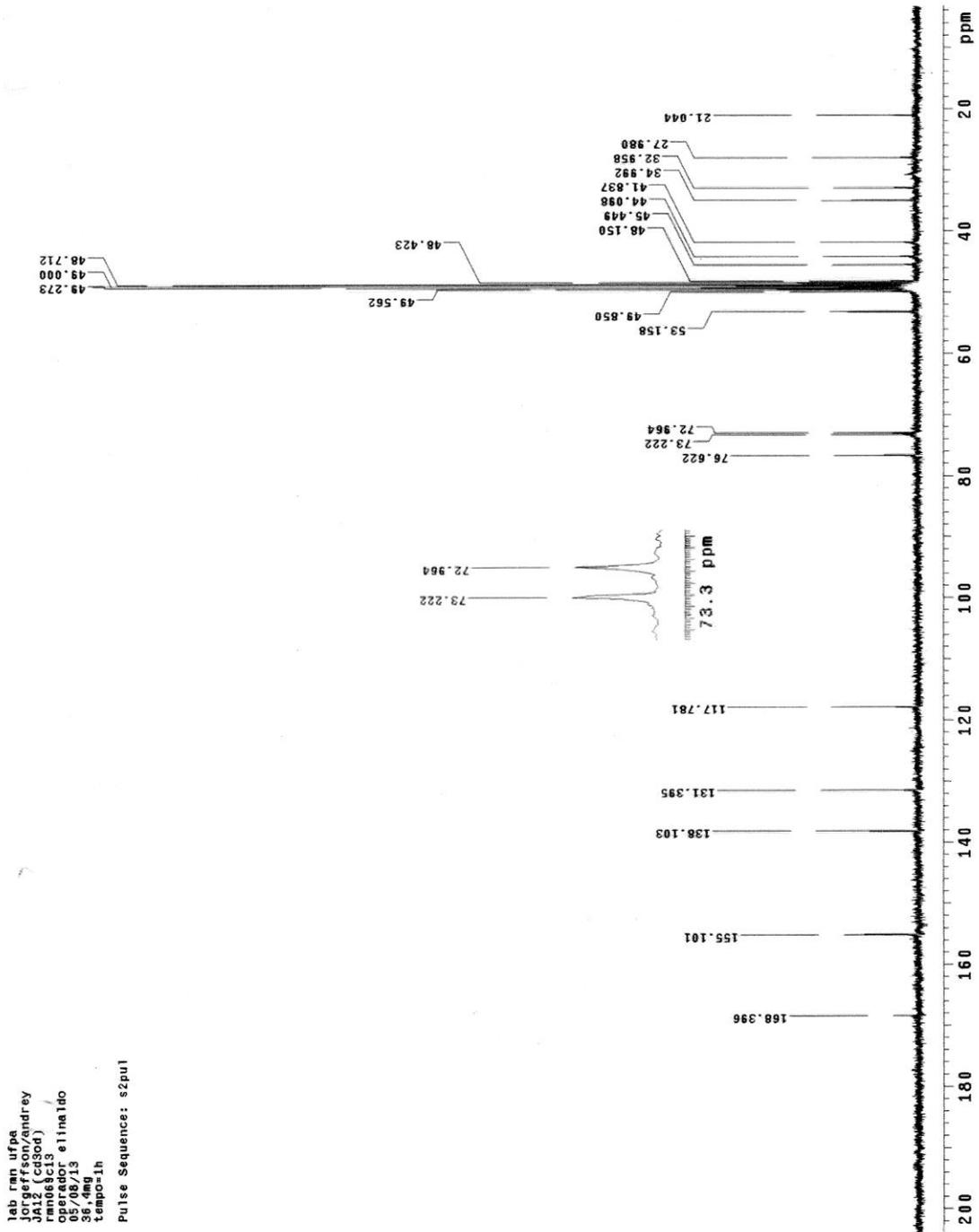


Figura 82- Espectro de HSQC de JA.

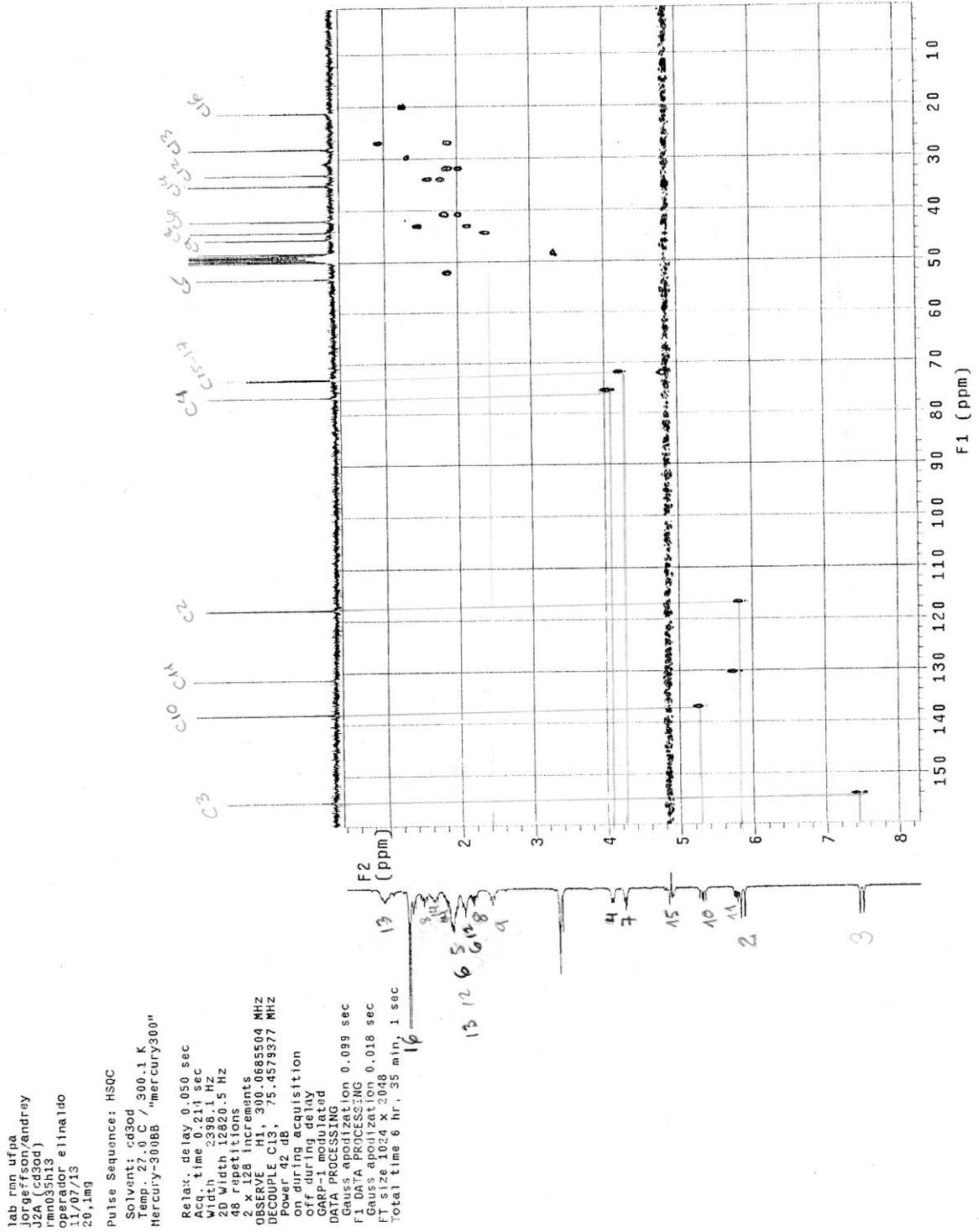


Figura 83- Mapa de correlação HSQC ampliado de JA.

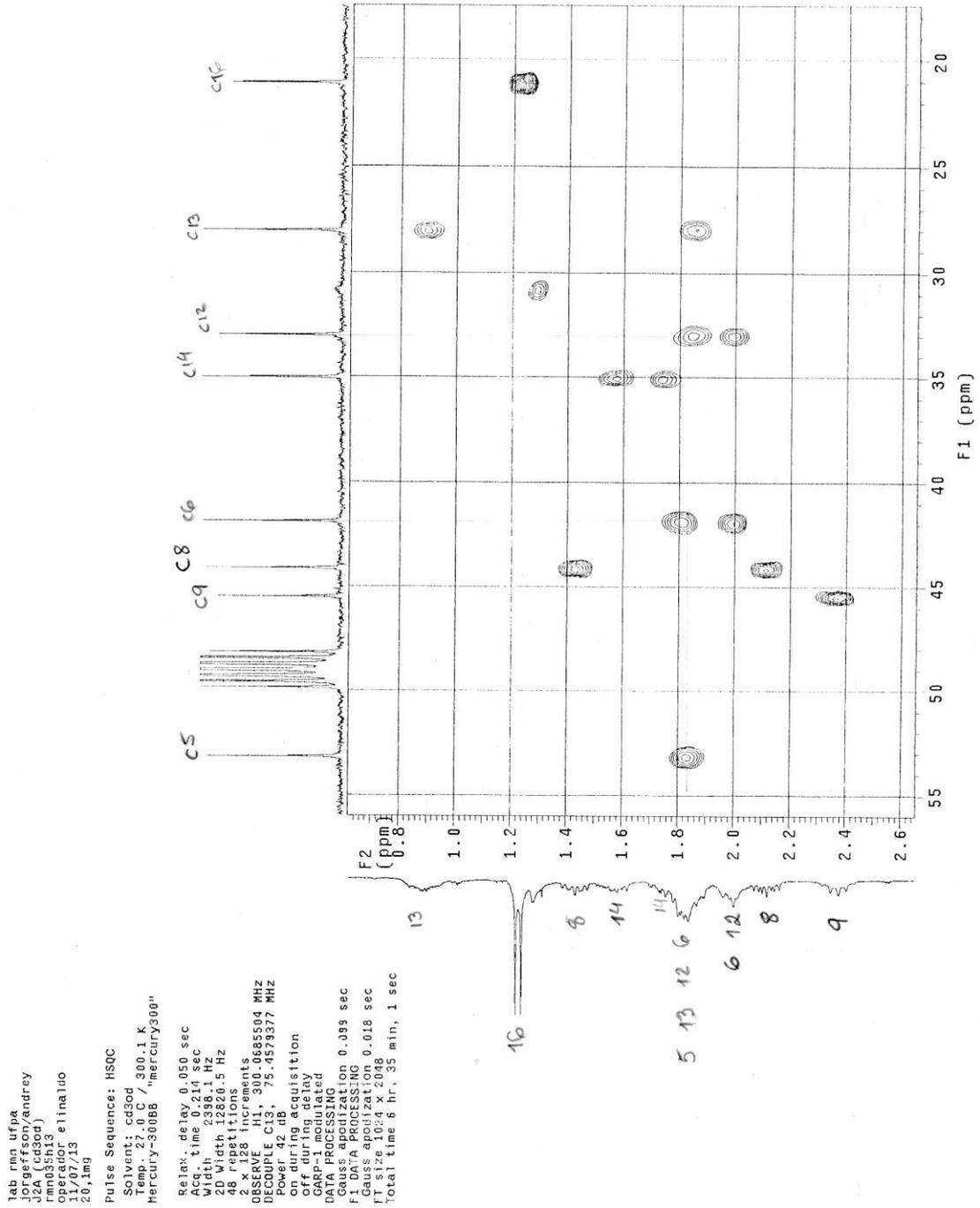


Figura 84: Mapa de correlação H-C a longa distancia (HMBC) de JA

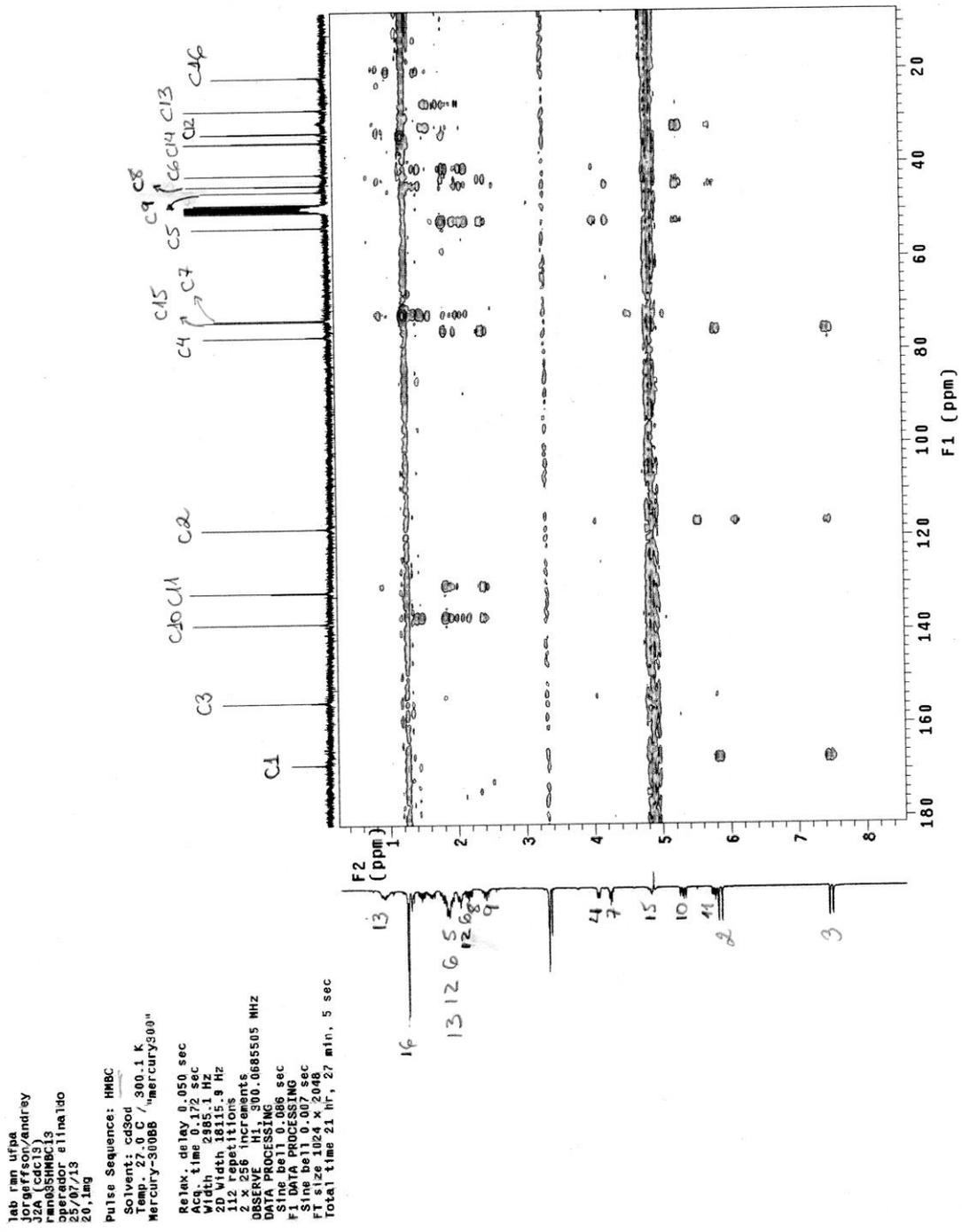
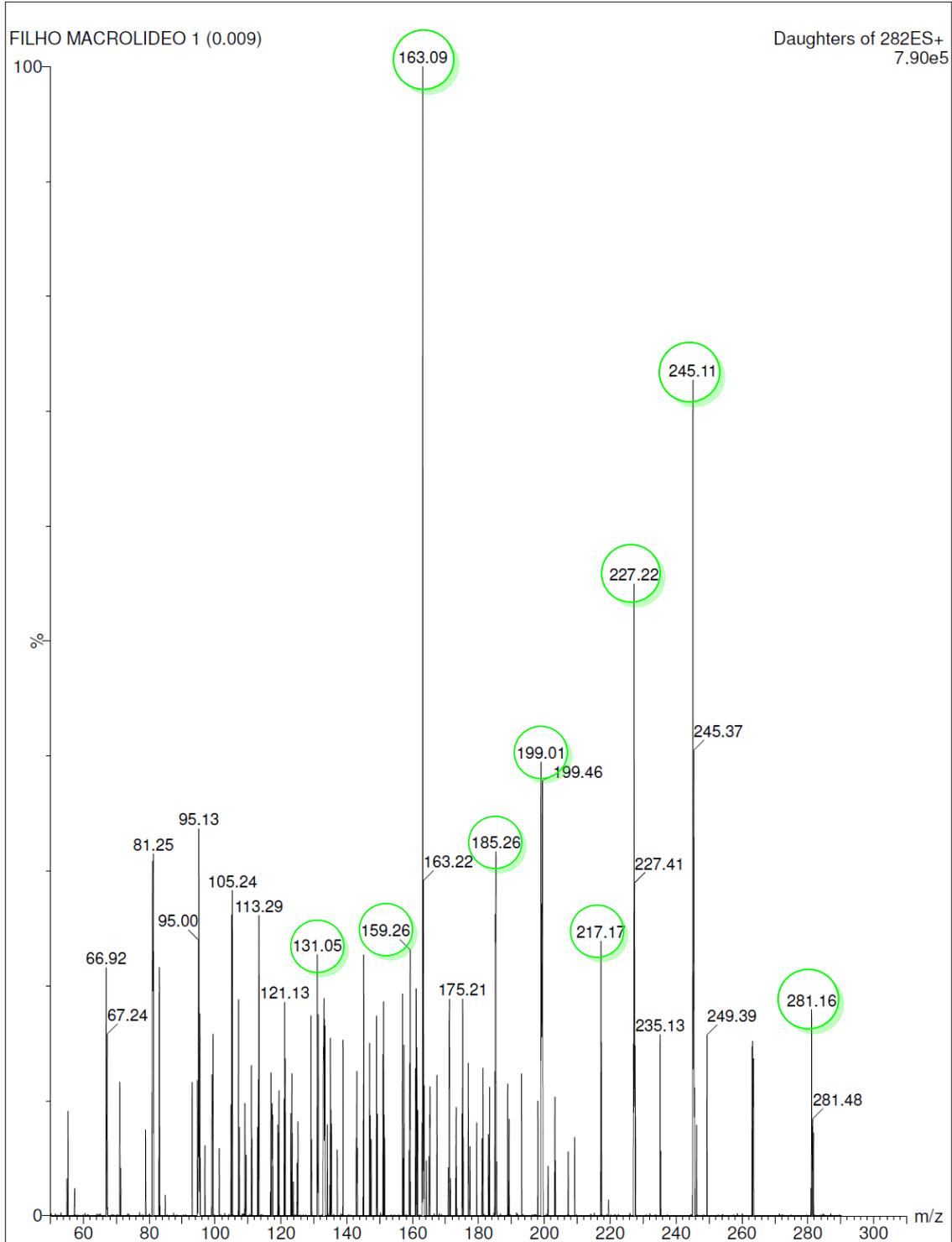


Figura 85 - Espectro de massas dos íons filhos de m/z 281 de **JA**.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho desenvolvido com a espécie vegetal *M. acutistipula var. ferrea* e do solo da região da Serra de Carajás conduziu ao isolamento e purificação de 120 fungos. Sendo que 56 foram endofíticos e 64 de solo. Foram escolhidos aleatoriamente 12 fungos, sendo 10 de solo e 2 endofíticos que primeiramente foram cultivados em placa de Petri em meio BDA e posteriormente extraídos de acordo com o método de extração em micro-escala, descrito por Smedsgaar adaptado e forneceram os respectivos micro-extratos brutos. A metodologia para triagem, desenvolvida para avaliar o perfil químico por CLAE-DAD e a bioatividade frente aos ensaios antimicrobianos, foi fundamental para a seleção do extrato bruto estudado.

Os micro-extratos brutos foram testados contra as bactérias *E. coli*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*. Os melhores resultados de CIM frente a bactéria *E. coli* foram FRIZ06 e FSF12. Para a bactéria *B. subtilis* os melhores resultados foram FRIZ06 e FRIZ09. Frente a *P. aeruginosa* as melhores CIM foram FRIZ06, FRIZ07, FRIZ08. O micro-extrato FRIZ13 apresentou atividade bactericida na CBM de 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a bactéria *B. subtilis* e CBM de 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente a bactéria *P. aeruginosa*. Na análise dos micro-extratos dos fungos estudados, foi possível observar que os fungos de solo apresentaram melhores atividades que os fungos endofíticos da espécie vegetal *Mimosa acutistipula var. ferrea* nos ensaios antimicrobiano.

O fungo de solo *Trichoderma* sp. FSF12 foi selecionado após a triagem do perfil químico e biológica. Em seguida foi cultivado em escala ampliada em meio sólido (arroz) com quantidade suficiente para o isolamento de metabólitos secundários dos extratos, seguido do estudo químico resultou no isolamento de 5 substâncias como o ácido graxo poliinsaturado (E1), 5'-inosil (E2), tirosol (E3), harzialactona A (E4) e 2-anidromevalônico (E5).

Na análise microbiológica do extrato metanólico micelial do fungo endofítico *S. apiospermum*. EJCP13 as CIM variaram de fraca a potente, contra as bactérias utilizadas. Logo em seguida foi cultivado em escala ampliada em meio sólido (arroz) com quantidade suficiente para o isolamento de metabólitos secundários dos extratos. A partir do extrato hexânico do fungo endofítico EJCP13 foram isoladas cinco substâncias, triacil (J1), peróxido de ergosterol (J2), ergosterol (JA19), cerivisterol (JA29) e éster metílico (JA24). O dulcitol (D) foi isolado do extrato MeOH,

e a Brefeldina A (JA) foi isolada dos extratos AcOEt e hexânico. O composto brefeldina A apresentou importante atividade antimicrobiana e também mostrou ser o metabolito secundário majoritário nos extratos de *S. apiospermum*. Assim, resolveu-se quantificar essa substância nos extratos, o que corroboraram com os resultados, indicando a presença da brefeldina A somente nos extratos AcOEt e hexânico.

Estes resultados são relevantes e promissores, pois evidenciam os fungos de solo e endofíticos como fontes de substâncias com diversidade estrutural e potencialmente bioativas, justificando a necessidade do estudo químico desta classe de micro-organismos. Esta observação é condizente com a teoria ecológica a qual prediz que micro-organismos que vivem sob alto nível de “stress” ambiental e intensas e frequentes interações com outros micro-organismos, apresentam alta diversidade metabólica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER, A. N. Geomorfologia da região. *In*: Carajás: **Desafio Político, Ecologia e Desenvolvimento**. São Paulo: Brasiliense / Brasília: CNPq. p. 88-124, 1986
- ABREU, A. C.; McBAIN, A. J.; SIMÕES M. **Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents**. *Natural Product Reports*, v. 29, p. 1007–1021, 2012.
- ABREU, L. M. **Perfilamento de metabólitos secundários, prospecção química e estudos taxonômicos de fungos endófitos**. 2010. 301f. Tese (Doutorado em Química)- UFMG, Belo Horizonte - MG.
- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. **Implantação e manutenção da coleção de culturas de micro-organismos do UniCEUB**. *Universitas: Ciências da Saúde*, Brasília, v. 02, n. 2, p. 236-25, 2004.
- AGUIAR, A. R.; MACHADO, D. F. M.; PARANHOS, J. T.; SILVA, A. C. F. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de mudas do feijoeiro cv. Carioca e controle de *Sclerotinia sclerotiorum***. *Ciência e Natura*, v. 34, n. 2, 2013.
- AKRAMI, M.; KHIAMI, H. K.; SHIKHLINSKI, H.; KHOSHVAGHTEI, H. **Bio controlling two pathogens of chickpea *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* by different different combinations of *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma virens* under field condition**. *International Journal of Agricultural Science Research*, v. 1, n. 3, p. 041-045, 2013.
- ALDRICH, J. H. **“Correlations Genuine and Spurious in Pearson and Yule”**. *Statistical Science*, 10, 4: p. 364-376, 1995.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. **Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.40, p. 4168-4170, 2001.
- ALMANZA, G. R.; MOLLINEDO, P. A.; VILA, J. L.; CALLAPA, G.; SAUVAIN, M. **“Flavonoids of *Bauhinia guianensis*”**. *Revista Boliviana de Química*, v. 18, n. 1, p. 47-52, 2001.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. **Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises**. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.
- AMAGATA, T.; USAMI, Y.; MINOURA, K.; ITO, T.; NUMATA, A., **Cytotoxic substances produced by a fungal strain from a sponge: Physico-chemical properties and structures**. *J Antibiot*, v.51, p.33-40, 1998.

APARECIDO, C. C.; EGYDIO, A. P. M.; FIGUEIREDO, M. B. **Avaliação de três diferentes métodos utilizados na Micoteca do Instituto Biológico de São Paulo para preservação de fungos fitopatogênicos.** Summa Phytopathologica, Jaguariúna, v. 27, p. 421-424, 2001.

APG III. **An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III.** Botanical Journal of the Linnean Society, v. 161, p. 105-121, 2009.

ARAUJO, W. L. et al. **Guia prático: isolamento e Caracterização de Microorganismos endofíticos.** Piracicaba: CALO, p.167, 2010.

ARJONA-GIRONA, I.; VINALE, F.; RUANO-ROSA, D.; LORITO, M.; LÓPEZ-HERRERA, C. J. **Effect of metabolites from different *Trichoderma* strains on the growth of *Rosellinia necatrix*, the causal agent of avocado white root rot.** European Journal of Plant Pathology, v. 140, p. 385-397, 2014.

ARUNPANICHLERT, J., et al. **Azaphilone and Isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13.** Chem Pharm Bull. v. 58, p. 1033-1036, 2010.

ATHAYDE, M. **Citotoxicidade e atividade antimicrobiana de extratos de duas cepas do fungo *Pycnoporus sanguineus* oriundas da Amazônia.** 2011. 51f. Tese (Doutorado em Odontologia na área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas. Piracicaba.

AUGUSTO, F.; ANDRADE, J. C.; CUSTÓDIO, R. **Faixa linear de uma curva de calibração.** Chemkeys, 2000.

AUSTIN, D. F. **Novidades nas Convolvulaceae da flora amazônica.** Acta Amazonica, 11(2): 291–295, 1981.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. **Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants.** EJB: Eletronic Journal of Biotechnology, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; **Microrganismos Endofíticos: Ecologia Microbiana.** EMBRAPA-CNPMA, Jaguariúna, ed.1, v. 1, p. 117-137, 1998.

BACON, C. W.; WHITE JUNIOR., J. F. **Microbial Endophytes.** New York: Marcel Dekker Inc., 2000.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B.; FURLANETO, M. C. **Microbiologia básica.** São Paulo: Atheneu, 196p, 1998.

BARNEBY, R. C. **Sensitivae censitae: a description of the genus *Mimosa* Linnaeus (*Mimosaceae*) in the New World.** Bronx, N.Y., New York Botanical Garden, p. 835, 1991

BARON, E. J.; FINEGOLD, S. M. Bailey e Scott's - **Diagnostic microbiology**, 8 ed. The C. V. Mosby Co: St. Louis, 1990.

BARREIRO, E; BOLZANI, V. **Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos**. Química Nova, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. **Recomendações para calibração em química analítica - Parte I**. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). Química Nova 25, 856, 2002.

BARROSO, G. M.; KING, R. M.. **New taxa of Compositae (Eupatorieae) from Brazil**. Brittonia, 23(2): 118-121, 1971.

BAÚ, D.; SIQUEIRA, M. R.; MOOZ, E. D. **Salmonella - agente epidemiológico causador de Infecções alimentares: uma revisão**. Disponível em: Acesso em 17 out. 2012

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C. E; CONDÓN, A. C. **Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains**. International Microbiology, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.

BETTIOL, W. et al. **Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas** Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP, p. 155, 2012.

BISSET, J. A. **Revision of the genus *Trichoderma*: II infrageneric classification**. Canadian Journal of Botany, v. 69, n.11, p. 2357-2372, 1991.

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

BONAMIGO, R. R.; AULER, A.; DURO, K. M.; CARTELL, A. **Infecção por *Scedosporium apiospermum* e tratamento com Voriconazol**. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 82, n. 6, p. 572-574, 2007.

BRAKHAGE, A; SCHROECKH, V. **Fungal secondary metabolites – strategies to activate silent gene clusters**. Fungal Genetics and Biology, v. 48, n. 1, p. 15-22, 2011.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília - DF.

BROTMAN, Y.; GUPTA, K. J.; VITERBO, A. ***Trichoderma***. Current Biology, v. 20, p. 390-391, 2010.

BUTLER, M. S. **The role of natural product chemistry in drug discovery**. Journal of Natural Products, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

BUTLER, M. S.; COOPER, M. A. **Antibiotics in the clinical pipeline in 2011**. The Journal of Antibiotics, v. 64, n. 6, p. 413-425, 2011.

CALDERON, L; SILVA-JARDIM, I; ZULIANI, J; SILVA, A; CIANCAGLINI, P; SILVA, L; STÁBELI, R. **Amazonian Biodiversity: A View of Drug Development for Leishmaniasis and Malaria**. Journal of the Brazillian Chemical Society, v. 20, n. 6, p. 1011-1023, 2009.

CAMPOS, F. F. **Isolamento e identificação de substâncias produzidas por fungos endofíticos associados a Piptadenia adiantoides (Fabaceae)**. 2009, 172p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte - MG

CARDOZO, K.H.M. et al. **Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast**. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 21, n. 2, p. 202-208, 2011.

CARLOS I. Z.; SASSA M.F.; SGARBI D. B. G.; PLACERES M.C.; MAIA D.C.; **Current research on the immune response to experimental sporotrichosis**. Mycopathologia, v. 168, p. 1-10, 2009

CARVALHO, J. C. T.; SANTOS, L. S.; VIANA, E. P. **Anti-inflammatory and analgesic activities of the crude extracts from stem bark of Bauhinia guianensis**. Pharmaceutical biology, v. 37, p. 281–284, 1999.

CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M, CONTESINI, F. J. E BIZACO, R. **Potencial de Biocatálise Enantiosseletiva de Lipases Microbianas**. Química Nova, v.28, n. 4, p.614-621, 2005.

CASTELLANI, A. **Viability of mold culture of fungi in destiled water**. J. Trop. Med. Hyg., v. 42, p. 225, 1939.

CDDEP – Center for Disease Dynamics, Economics e Policy. Resistance Map: disponível em <<http://www.cddep.org/map>> Acesso em setembro de 2014.

CHAKRABORTY, S; GHOSH, U. Fungi: Its importance in biotechnology -A review on its past, present and future prospects. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 12, p. 3059-3060, 2010.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 95, p. 47-59, 2012.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos uma nova fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.

CHAPPILL, J.A. **Cladistic analysis of the Leguminosae: the development of an explicit phylogenetic hypothesis**. In: Crisp, M.; Doyle, J. J. (eds.). Advances in Legume Systematic 7: Phylogeny. Royal Botanic Gardens, Kew, p. 1-9, 1995.

CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea* / *Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. **Studies in Mycology**. v. 48, p. 1-116, 2004.

CHAVES, E. M. C; QUEIROZ, M. V. O; ALMEIDA, P. C; MOREIRA T. M. M; VASCONCELOS, S. M. M. Problemática da administração de antimicrobiano em recém-nascidos. *Rev Rene*, v. 9(3), p. 62-7, 2008;.

CHEN, B.; YIN, H.-F.; WANG, Z.-S.; XU, J.-H., New synthesis of harzialactone A via kinetic resolution using recombinant *Fusarium proliferatum* lactonase. *Tetrahedron-Asymmetr*, v. 21, p. 237-240, 2010.

CHOWDHARY, K.; KAUSHIK, N.; COLOMA, A. G.; RAIMUNDO, C. M. Endophytic fungi and their metabolites isolated from Indian medicinal plant. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 11, n. 4, p. 467–485, 2012.

CLARDY, J.; WALSH, C. **Lessons from natural molecules**. *Nature* v. 432, p. 829-837, 2004.

CLARK, David P; MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; DUNLAP, Paul V; **Microbiologia de Brock**. 12^a Edição Artmed São Paulo – SP, 2010.

CLARK, F. E. **Agar-plate method for total microbial count**. **Madison**: American Society of Agronomy, v.2, p. 1460-1466, 1965.

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.

_____. **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.

_____. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document M7-A6 (ISBN 1- 56238-486-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898 USA. 2003a.

_____. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada – Segunda Edição. CLSI document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos. 2002.

COHEN, J., **Statistical power analysis for the behavioral sciences**. Hillsdale, NJ, Erlbaum. 1988

COMPANT, S.; SESSITSCH, A.; MATHIEU, F. **The 125th anniversary of the first postulation of the soil origin of endophytic bacteria – a tribute to M . L . V . GALIPPE**. *Plant and Soil*, v. 356, n. 1-2, p. 299–301, 2012.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. **Trichoderma virens, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis.** *Plant Physiology*, v. 149, n. 3, p. 1579-1592. 2009.

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

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. **Preservação de microrganismos:** revisão. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.

COVALETTI, L.; SOSIO, M.; PUGLIA, A. M. **Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites.** *Journal of Biotechnology*, v. 99, p. 187-198, 2002.

CZAUADERNA, M.; KOWALCZYK, J.; NIEDŹWIEDZKA, K. M.; MIECZKOWSKA, A. **An original method for derivatization of fatty acids with emphasis on short chain organic acids.** XXIII ARS SEPARATORIA – Toruń, Poland, 2008

DANCEY, C.; REIDY, J. *Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows.* Porto Alegre, Artmed. 2006

DANIEL, J. F. S.; RODRIGUES FILHO, E. Peptaibols of *Trichoderma*. **Natural product reports**, v. 24, n. 5, p. 1128-1141, 2007.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ J.; FIGUERAS, M. J. *Atlas of Clinical Fungi.* 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Universitat Rovira I Virgili, 305 309, 899 901, 2000

DE SOUZA J. V.; LIMA A. M.; MARTINS E. S. D. J.; SALEM J. I. **Anti-mycobacterium activity from culture filtrates obtained from the dematiaceous fungus C10.** *J Yeast Fungal Res*, 2: 39–43, 2011

DEBBAB, A; ALY, A; PROKSCH, P. **Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi.** *Fungal Diversity*, v. 49, n. 1, p. 1-12, 2012.

DEMAIN, A. L. **Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery.** *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 41, p. 185–201, 2014.

DENNIS, C.; WEBSTER J. **Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions.** *Transactions of the British Mycological Society.* v. 57, p. 363-369, 1971c.

DIRMICK, K. P. et al. **Purification and properties of subtilin.** *Archive Biochemistry*, v.51, p.1-11, 1947.

DONADIO, S.; MONCIARDINI, P.; ALDUINA, R.; MAZZA, P.; CHIONCHINI, C.; COVALETTI, L.; SOSIO, M.; PUGLIA, A. M. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v.99, p.187-198, 2002.

DOS SANTOS, H. ***Trichoderma spp.* como promotores de crescimento em plantas e como antagonistas a *Fusarium oxysporum***. 2008. Tese Universidade de Brasília.

DUARTE, M. C. T. et al. **Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants**. J. Ethnopharmacol., v. 97, p. 305-311, 2005.

DUCKE, A.. Notas sobre a Flora Neotropica. 11. **As Leguminosas da Amazônia Brasileira**. Bol. Tee. Inst. Agron. Norte. Belém, 18. 248p, 1949.

DUTRA, V. F.; MORIM, M. P. ***Mimosa* in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acessado: jun. 2013.

DUTRA, V. F. **Diversidade de *Mimosa* L. (Leguminosae) nos Campos Rupestres de Minas Gerais: taxonomia, distribuição geográfica e filogeografia**. Tese de Doutorado. 2009. 294 f. Universidade Federal de Viçosa - MG.

DUTRA, V. F.; MORIM, M. P. ***Mimosa* in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23084>>. Acesso em: 30 Mar. 2015.

EDRADA R.A et al. **Online analysis of Xestodecalactones A-C, novel bioactive metabolites from the fungus *Penicillium cf. montanense* and their subsequent isolation from the sponge *Xestospongia exigua***. J Nat Prod. v. 65, p. 1598-1604, 2002.

ELTZSCHIG, H. K et al. **Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26**. Blood, v. 108, n. 5, p. 1602-10, 2006.

ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11, n. 21, p. 2293, 2015.

ENDOPHYTES: A Continuum of Interactions with Host Plants. Annual Review of Ecology and Systematics, Palo Alto, v. 29, p. 319–343, 1998.

ESPOSITO, E. AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Ed. UCS, 2010.

FERREIRA, J. S.; COSTA, W.L.R.; CERQUEIRA, E.S.; CARVALHO, J.S.; OLIVEIRA, L.C.; ALMEIDA, R.C.C. **Food handler-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in public hospitals in Salvador, Brazil**. Food Control, v. 37, p. 395-400. 2014.

FIGUEIREDO, J. **Bioprospecção, caracterização morfológica e molecular de endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com ênfase em *Pestalotiopsis* spp.** 2006. 152f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Patologia e Parasitologia) – Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

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

FORSYTHE, S. J. traduzido por GUIMARÃES, M. C. M., LEONHARDT, C. **Microbiologia da segurança alimentar.** Porto Alegre: Artmed., 76 p, 2002.

FORTES, F. O. SILVA, A. C. F., ALMANÇA, M. A. K. TEDESCO, S. B. **Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp.** *Revista Árvore*, v. 31, n. 2, p.221-228, 2007.

FREDHOLM, B. B. et al. **International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors- -an update.** *Pharmacol Rev*, v. 63, n. 1, p. 1-34, 2011.

GAAD, G. M. Bioremedial potential of microbial mechanism of metal mobilization and immobilization. **Current Opinion in Biotechnology.** v. 11, p. 271-279. 2000.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELÖV, A.; KUHN, I.; MCKENZIE, D.; MÖLLBY, R. **Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates.** *Journal of Microbiological Methods*, v. 50, p. 63-73, 2002.

GADD, G. **Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation.** *Mycological Research*, v. 111, n. 1, p. 3-49, 2007.

GARBIN, V. **Análise da atividade antimicrobiana dos extratos dos frutos, óleos das sementes e fungos isolados da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius 1824).** 2011. 86f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Patologia e Parasitologia) – Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GARCIA SORIANO, F. et al. **Inosine improves gut permeability and vascular reactivity in endotoxic shock.** *Crit Care Med*, v. 29, n. 4, p. 703-8, 2001.

GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos.** São Paulo: Manole, 317 p, 2008.

GIRÃO, M. D et al. **Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v.37, n.3,p. 229-233, mai/jun. 2004.

GOLDER Associates Brasil. 2006. *Estudos de Impacto Ambiental / Relatório de Impacto Ambiental EIA/RIMA do Projeto Serra Leste de Carajás*. No Golder: RT-059-5130-1310- 0012-01-J. Belo Horizonte.

GOLDER Associates Brasil. 2010. *Projeto Ferro Carajás S11D / Estudos de Impacto Ambiental EIA/RIMA*. No Golder: RT-079-515-5020-0029-02-J. Belo Horizonte.

GOMEZ, G.; SITKOVSKY, M. V. **Differential requirement for A2a and A3 adenosine receptors for the protective effect of inosine in vivo**. *Blood*, v. 102, n. 13, p. 4472-8, 2003.

GONG, Q.; ZHANG, Y.; TAN, N.; CHEN, Z. **“Chemical constituents in fermental mycelium of *Xylaria nigripes*”**. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, **33**(11): 1269-1272, 2008.

GRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. **Natural products as sources of new drugs over the last 25 years**. *J. Nat. Prod.*, v. 70, p. 461-477, 2012.

GREVE, H.; MOHAMED, I. E.; PONTIUS, A.; KEHRAUS, S.; GROSS, H.; KONIG, G. **M. Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development**. *Phytochemistry Review*, v. 9, n. 4, p. 537-545, 2010.

GUILLÉN^b, M. D.; RUIZ, A. **¹H nuclear magnetic resonance as a fast tool for determining the composition of acyl chains in acylglycerol mixtures**. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 105, p. 502-507, 2003.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; PUPO, M. T. **A Simple Method for the Quantitative Analysis of Tyrosol by HPLC in Liquid Czapek Cultures from Endophytic Fungi**. *J. Braz. Chem. Soc.*, V. 20, n. 1, p. 188-194, 2009.

GUIMARÃES, D.O. **Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção em "*Caenorhabditis elegans*"**. 2010. 186p. Tese-Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto.

GUIMARÃES, D.O. **Prospecção química e biológica de fungos endofíticos associados à *Viguiera arenaria* (Asteraceae)**. 2006. 200 p. Dissertação-Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto.

GUIMARÃES, D et al. **Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species**. *Phytochemistry*, v. 71, n. 11, p. 1423–1429, 2010.

GUNASEKARAN S, POORNIAMMAL R. **Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation**. *Afr J Biotechnol*, v. 7, p.1894–8, 2008.

GUNATILAKA, A A L. **Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence.** *Journal of natural products, Cincinnati* , v. 69, n. 3, p. 509–26, 2006.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. **Bioactive natural products from endophytes: a review.** *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.

GUZMÁN-LÓPEZ, O.; TRIGOS, Á.; FERNÁNDEZ, F. J.; YANÑEZ-MORALES, M. DE J.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. **Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adiposa*.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 23, p. 1473-1477, 2007.

HAIG, B. D. **“Spurious correlation”**, in N. J. Salkind (ed.), *Encyclopedia of Measurement and Statistics*, Thousand Oaks, Sage, 2007.

HARMAN, G. E. **Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22.** *Plant disease*, v. 84, n. 4, p. 377-393, 2000.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. ***Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HAUSER, A. R. **Antibióticos na prática clínica: fundamentos para escolha do agente antibacteriano correto.** Porto Alegre: Artmed, 2010.

HAWKSWORTH, D. L. **The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited.** *Mycological Research*, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HE, L.; ZHANG, S.; WU, Y.; LI, Y., **Synthesis of (-)-Harzialactone A from a Readily Accessible Epoxy Chiral Building Block.** *Chinese J Chem.*,v. 29, p. 2664-2668, 2011.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. **Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials.** *Food Microbiology*, v. 22, n. 4, p. 273-292, 2005.

HOSOI, T. et al. **Improved growth and viability of lactobacilli in the presence of *Bacillus subtilis* (natto), catalase, or subtilisin.** *Canadian Journal of Microbiology*. 46:892–897, 2000.

ICMBio. **Plano de manejo do Parque Nacional do Viruá.** 626p, 2014.

ICH - International Conference on Harmonization; **Q2R1- Validation of Analytical procedure: Text and Methodology**, Food and Drug Administration, USA, 2005.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed. 632 p., 2009.

KAUL, S.; GUPTA, S.; AHMED, M.; DHAR, M. K. **Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites**. *Phytochemistry Reviews*, v. 11, n. 4, p. 487–505, 2012.

KESZLER, Á.; FORGÁCS, E.; KÓTAI, L. **Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry**. *Journal of Chromatographic Science*, v. 38, p. 421-424, 2000.

KHARWAR, R; MISHRA, A; GOND, S; STIERLE, A; STIERLE, D. **Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges**. *Natural Product Reports*, v. 28, n. 7, p. 1208–1228, 2011.

KIM, D. H et al “**Ergosterol peroxide from flowers of *Erigeron annuus* L. as an anti-atherosclerosis agent**”. *Arch Pharm. Res.*, **28**(5): 541-545, 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.

KING, R.M.; ROBINSON, H. **Studies in the Eupatorieae (Asteraceae)**. CXCIV. A new genus *Parapiqueria*. *Phytologia*, v. 47(2), p. 110-112, 1980.

KIRKBRIDE JUNIOR, J. H. **Manipulus rubiacearum–I**. *Acta Amazonica*, v. 10(1), p. 97-118, 1980.

KONEMAN, E. W et al. *Diagnóstico microbiológico*. 5ª ed., Rio de Janeiro: Medsi, p. 1465, 2001.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, J. R. W. C. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. Philadelphia: Lippincott, 1395 p, 1997

KOTKAR, S. P.; SURYAVANSHI, G. S.; SUDALAI, A. **A short synthesis of (+)-harzialactone A and (R)-(+)-4-hexanolide via proline-catalyzed sequential aminooxylation and Horner-Wadsworth-Emmons olefination of aldehydes**. *Tetrahedron-Asymmetr*, v. 18, p. 1795-1798, 2007.

KOZAK, M. “**What is strong correlation?**” *Teaching Statistics*, v. 31, p. 85-86, 2009.

KRAL, R.; STRONG, M.T. **Eight novelties in *Albildgaardia* and *Bulbostylis* (Cyperaceae) from South America**. *Sida*, v. 18(3), p. 837-859, 1999.

KRAL, R. **The genus *Xyris* (Xyridaceae) in Venezuela and contiguous Northern South America**. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 75(2): 522-722, 1988.

KULKARNI P, GUPTA N. **Screening and evaluation of soil fungal isolates for xylanase production**. *Rec Res Sci Tech*, 5:33–6, 2013.

KUMAR, A. N.; BHATT, S.; Chattopadhyay, S., Chemoenzymatic asymmetric synthesis of harzia lactone A stereomers. *Tetrahedron-Asymmetr*, v. 20, p. 205-209, 2009.

KUMAR, D. S. S.; HYDE, K. D. **Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii***. *Fungal Diversity*, Kunming, v. 17, p. 69–90, 2004.

KUMARA, P. M et al. ***Fusarium proliferatum*, an endophytic fungus from *Dysoxylum binectariferum* Hook.f, produces rohitukine, a chromane alkaloid possessing anticancer activity**. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v. 101, n. 2, p. 323-329, 2012.

LACAZ, C. S; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8. ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

LATORRE, J. D. et al. **Evaluation of germination, distribution, and persistence of *Bacillus subtilis* spores through the gastrointestinal tract of chickens**. *Poultry Science*, v. 93, p. 1793–1800, 2014.

LEGAZ, M. E. et al. **A Esperança Biotecnológica**. João Pessoa: A União. 171 p. 1995.

LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. Kew: Royal Botanical Gardens, 369 p., 1987.

LEWIS, G.; SCHRINE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the world**. Royal Botanic Gardens, Kew, 577 p., 2005.

LI, H. et al. **Cytotoxic norsesquiterpene peroxides from the endophytic fungus *Talaromyces flavus* isolated from the mangrove plant *Sonneratia apetala***. *Journal of natural products*, Cincinnati, v. 74, n. 5, p. 1230–5, 2011.

LI, J. Y.; STROBEL, G.; SIDHU, R.; HESS, W. M.; FORD, E. J. **Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum***. *Microbiology-Uk* 142: 2223-2226, 1996.

LI, K-K. et al. **The metabolites of mangrove endophytic fungus Zh6-B1 from the South China Sea**. *Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters*, v. 20, p. 3326-3328, 2010.

LIAUDET, L. et al. **Inosine exerts a broad range of antiinflammatory effects in a murine model of acute lung injury**. *Ann Surg*, v. 235, n. 4, p. 568-78, 2002

_____. **Inosine reduces systemic inflammation and improves survival in septic shock induced by cecal ligation and puncture**. *Am J Respir Crit Care Med*, v.164, n. 7, p.1213-20, 2001.

LIM, T. K; KO, F. W. S.; THOMAS, P. S.; GRAINGE, C.; YANG, I. A. **Year in review 2014: Chronic obstructive pulmonary disease, asthma and airway biology**. *Respiratory*, v. 20, p. 510-518, 2015.

LIMA, A.M. et al. **Effects of culture filtrates of endophytic fungi obtained from *Piper aduncum* L. on the growth of *Mycobacterium tuberculosis***. Electronic Journal of Biotechnology, v. 14, n. 4, p. 1-6, 2011.

LIMA, H.C. de. et al. **Fabaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 04 Fev. 2015.

LIU, X. et al. **Exploring anti-TB leads from natural products library originated from marine microbes and medicinal plants**. Antonie Van Leeuwenhoek, v. 102, n. 3, p. 447-461, 2012.

LOURTIEG, A. Lythraceae austroamericanae. Addenda et corrigenda II. *Sellowia*, v. 39, p. 5-48, 1987.

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, 785-789p, 2007.

MA, B.; RUAN, Y.; LIU, J. **“Study on chemical constituents from the fruiting bodies of *Xylaria longipes*”**. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, v. 20(1), p. 63-65, 2008.

MABLEY, J. G. et al. **Inosine reduces inflammation and improves survival in a murine model of colitis**. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v. 284, n. 1, p. 138-44, 2003.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F. D.; ANTONIOLLI, Z. I. **Trichoderma no Brasil: o fungo e o bioagente**. Revista de Ciências Agrárias, v. 35, n.1, p. 274-288, 2012.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**, 12^a ed. São Paulo: Artmed, 1128p, 2010.

MADIGAN, MICHAEL T.; MARTINKO, JOHN M.; PARKER, JACK. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice-Hall, 608p, 2004.

MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E. **Constituintes Químicos de *Penicillium* sp, um Fungo Endofítico isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae)**. Revista Ciências Exatas e Naturais, v- 9, n. 2, p. 189-199, 2007.

MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES, E. F.; FERREIRA, A. G. & SANTOS, L. S. **“C25 steroid epimers produced by *Penicillium janthinellum*, a fungus isolated from fruits *Melia azedarach*”**. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(6B), p. 1342-1346, 2005.

MAZZA, P. **The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism**. Bollettino Chimico Farmaceutico, n. 133, p. 3–18, 1994.

MCMURRY, John. **Química Orgânica**. 6º ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

MELO, V. S.; DESJARDINS, T.; SILVA JUNIOR, M. L.; SANTOS, E. R.; SARRAZIN, M.; SANTOS M. M. L. S. **Consequences of forest conversion to pasture and fallow on soil microbial biomass and activity in the eastern Amazon**. *Soil Use Manage*, v. 28, p. 530–5, 2012.

MOHARRAM, A; MOSTAFA, E; ISMAIL, M. **Chemical profile of *Monascus ruber* strains**. *Food Technology and Biotechnology*, v. 50, n. 4, p. 490-499, 2012.

MORAES, M.D'A. **Mimosa acutistipula var. ferrea Barbeby**. 2012. Disponível em: <http://cncflora.ibri.gov.br/portal/ptbr/profile/Mimosa%20acutistipula%20var.%20ferrea>
Acesso em 15 jan. 2016.

MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Editora UFLA, 623 p, 2002.

MOTLAGH, M. R. S.; SAMIMI, Z. **Evaluation of *Trichoderma* spp. as biological agents in some of plant pathogens**. *Annals of Biological Research*, v. 4, n. 3, p. 173-179, 2013.

MOU, Y. et al. **Antimicrobial and Antioxidant Activities and Effect of 1-Hexadecene Addition on Palmarumycin C2 and C3 Yields in Liquid Culture of Endophytic Fungus *Berkleasium* sp. Dzf12**. *Molecules*, Basel, v. 18, n. 12, p. 15587–15599, 2013.

MOURÃO JÚNIOR, M.; SOUZA FILHO, A.P.S. **Diferenças no padrão da atividade alelopática em espécies da família leguminosae**. *Planta Daninha*, v. 28, p. 939-951, 2010.

MOUZA, W. K.; RAIZADA, M. N. **The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective**. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, art. 65, 2013.

MUELLER, G.M.; SCHMIT, J.P. **Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?** *Biodiversity and Conservation*, London, v. 16, p. 1–5, 2007.

MUÑOZ, V. et al. **A search for natural bioactive compounds in Bolívia through a multidisciplinary approach Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 69, p. 127-137, 2000.

NEUFELD, P. M.; OLIVEIRA, P. C. **Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril**. *Revista Brasileira Análises Clínicas*, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 167-169, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials**. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 1216-1238, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER K.M. **Natural Products as source of new drugs over period 1981-2002**. Natural Products Reports, v.66, p.1022-1037, 2003.

NGUYEN, Q; MERLO, M; MEDEMA, M; JANKEVICS, A; BREITLING, R; TAKANO, E. **Metabolomics methods for the synthetic biology of secondary metabolism**. FEBS Letters, v. 586, n. 15, p. 2177-2183, 2012.

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

NOVAES, R. M. P. de. **Avaliação da Eficiência de uma Estação de Tratamento de Efluente Hospitalar através da Detecção e Caracterização molecular de *Pseudomonas aeruginosa*, na cidade do Rio de Janeiro**. Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientais e Serviços vinculados à Vigilância Sanitária – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, p. 60, 2009.

O'BRIEN, H.E.; PARRENT, J.L.; JACKSON, J.A.; MONCALVO, J.M.; VILGALYS, R. **Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples**. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 71, n. 9, p. 5544-5550, 2005.

O'BRIEN, J; WRIGHT, G. **An ecological perspective of microbial secondary metabolism**. Current Opinion in Biotechnology, v. 22, n. 4, p. 552-558, 2011.

OKAFOR, N. **The Preservation of the Gene Pool in Industrial Organisms: Culture Collections**. In: **Modern industrial microbiology and biotechnology**. Science Publishers, p. 171-178, 2007.

OLADIMEJI, F. A.; ORAFIDIYA, L. O.; OKEKE, I. N. **Physical properties and antimicrobial activities of leaf essential oils of *Lippia multiflora* Moldenke**. The International Journal of Aromatherapy, v. 14, p. 162-168, 2004.

OLIVEIRA, C. M. et al. **Xylarenones C–E from an Endophytic Fungus Isolated from *Alibertia macrophylla***. Journal of Natural Products, v.74, p. 1353- 1357, 2011.

OMS – Organização Mundial de Saúde. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**, 2014.

ONYEWU, C. et al. **Ergosterol Biosynthesis Inhibitors Become Fungicidal when Combined with Calcineurin Inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei***. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 47, n.3, p. 956–964, 2003.

OSTROSKY, E. A. et al. **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais.** Rev. Bras. Farmacogn. v. 18, p. 301-307, 2008.

PANDI, M.; KUMARAN, R. S.; CHOI, Y. K.; KIM, H. J.; MUTHUMARY, J. **Isolation and detection of taxol , an anticancer drug produced from *Lasiodiplodia theobromae*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Morinda citrifolia*.** African Journal of Biotechnology, Nairobi, v. 10, n. 8, p. 1428–1435, 2011.

PAOLI, DE P. **Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research.** FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v. 29, p. 897- 910, 2005.

PELAEZ, F. **The historical delivery of antibiotics from microbial natural products-Can history repeat?** Biochemical Pharmacology, v.71, p.981-990, 2006.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia. Conceitos e Aplicações.** v. 1. 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 524p, 1996.

PETIT, P.; LUCAS, E. M. F.; ABREU, L. M.; PFENNING, L. H.; TAKAHASHI, J. A. **Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil.** Electron J Biotechn; v. 12, p. 8–9, 2009.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (Eds.). Microbial ecology of leaves. New York: Springer Verlag, p. 179-197, 1991.

PIMENTEL, C. P. V.; FIGUEIREDO, M. B. **Métodos de preservação de fungos em meio de cultura.** Biológico, São Paulo, v.55, n.1/2, p.27-33, 1989.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.** 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 325p, 2003.

Plantas que curam. Disponível em:

<<http://www.plantasquecuram.com.br/ervas/escada-de-jaboti.html>> acesso em: 22/09/2011 às 20:45.

PLOWMAN, T. New taxa of *Erythroxyllum* (Erythroxyllaceae) from the Amazon Basin. *Acta Amazonica*, v. 14(1/2), p. 117-143, 1984.

POLHILL, R. M. **Classification of the Leguminosae.** In: Bisby, F. A.; Buckingham, J. and Harborne, J. B. (editors). Phytochemical dictionary of the Leguminosae. Chapman and Hill, Cambridge, 1994.

POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. **Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas – Uma visão empresarial.** In: BETTIOL,W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas – usos e perspectivas.** Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 341p, 2009.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. **Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes**. Annual review of phytopathology, Palo Alto, v. 2011, n. 49, p. 291–315, 2011.

PORTO, M. L.; SILVA, M.F.F. Tipos de vegetação metalófila em áreas da Serra de Carajás e de Minas Gerais. *Acta Botanica Brasilica*, v. 3, p. 13-21, 1989.

QIN, S. et al. **Abundant and diverse endophytic actinobacteria associated with medicinal plant *Maytenus austroyunnanensis* in Xishuangbanna tropical rainforest revealed by culture-dependent and culture-independent methods**. Environmental microbiology reports, v. 4, n. 5, p. 522–31, 2012.

RAHIMIAN, R. et al. **Adenosine A2A receptors and uric acid mediate protective effects of inosine against TNBS-induced colitis in rats**. Eur J Pharmacol, v. 649, n. 1-3, p. 376-81, 2010.

RAYOL, B. P. **Análise florística e estrutural da vegetação xerifítica das savanas metalófilas na Floresta Nacional de Carajás: subsídios à conservação**. 2006. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural da Amazônia e Museu Paraense Emílio Goeldi. Belém-PA,.

REARDON, S. **Antibiotic resistance sweeping developing world: Bacteria are increasingly dodging extermination as drug availability outpaces regulation**. Nature: News Infocus, v. 509, p.141, 2014.

RESENDE, A. C. **Deteção de Microrganismos Presentes no Efluente Hospitalar e na Estação de Tratamento de Esgoto de Goiânia: Presença de Bactérias Gram-negativas Residentes aos Antimicrobianos**. 2009. Universidade Católica de Goiás. Curso de Pós-graduação Stricto Sensu (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde). Goiânia-GO

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. Microbiologia prática: roteiro e manual. Atheneu, São Paulo, 2002.

RICARDO, S. B. **Elevação de MIC para a vancomicina no *S. aureus***. Prática Hospitalar. Ano X, n. 60, p. 46-48, 2008.

ROHLFS, M; CHURCHILL, A. **Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods**. Fungal Genetics and Biology, v. 48, n. 1, p. 23-34, 2011.

ROHLFS, M; CHURCHILL, A. **Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods**. Fungal Genetics and Biology, v. 48, n. 1, p. 23-34, 2011.

ROMEIRO, R. S. - **Controle biológico de doenças de plantas – procedimentos**. Viçosa, Editora UFV, 172 p, 2007.

ROMEIRO, R. S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

ROSSI, F. **The challenges of antimicrobial resistance in Brazil**. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 52, p. 1138–43, 2011.

RUBEL, R. **Produção de compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação em estado sólido: Avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR

RUIZ, B. et al. **Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source**. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 36, n. 2, p. 146-167, 2010.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. **FUNGAL ENDOPHYTES: A Continuum of Interactions with Host Plants**. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Palo Alto, v. 29, p. 319–343, 1998.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S. H. **Evolution of endophyte-plant symbioses**. *Trends in Plant Science*, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.

SALAS, S. M., VIANA, P. L., CABRAL, E. L., DESSEIN, S.; JANSSENS, S. ***Carajasia* (Rubiaceae), a new and endangered genus from Carajás mountain range, Pará, Brazil**. *Phytotaxa*, v. 206(1), p. 14-29, 2015.

SAMUELS, G. J. ***Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology**. *Phytopathology*, v. 96, n. 2, p. 195-206, 2006.

SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P. **Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*)**. *Microbial ecology*, v. 50, n. 1, p. 1–8, 2005.

SANTOS, A. L. dos. ***Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar**. *Bras Patol Med Lab*. v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, B. A. **Recursos minerais**. In: **Carajás: Desafio Político, Ecologia e Desenvolvimento**. São Paulo: Brasiliense / Brasília: CNPq. p. 294-361, 1986.

SANTOS, D. C. P. **Perfil químico e ensaios antimicrobianos de fungos endofíticos isolados de *Bauhinia guianensis***. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade do Estado do Pará, Centro de Ciências Sociais e de Educação, Belém-PA.

SANTOS, L; et al. **Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii***. *Planta Daninha*, v. 26, n. 3, p. 539-548, 2008.

SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES-Fo, E.; ROCHA, W. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 19, 767p, 2003

SARTORI, M. R. K. **Atividade Antimicrobiana de Frações de Extratos e Compostos Puros Obtidos das Flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (*Asteraceae*)**. 2005. Mestrado em ciências farmacêuticas, Centro de ciências da saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

SCHINDLER, B.D.; JACINTO, P. E.; KAATZ, G.W. Inhibition of drug efflux pumps in *Satphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. **Future Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 491–507. 2013.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, CAMBRIDGE, v. 109, n. 6, p. 661–686, 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A.; KROHN, K. **Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites**. *Mycological Research*, Cambridge, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SECCO, R. S.; LOBO, M. G. A. **Considerações taxonômicas e ecológicas sobre a flora dos campos rupestres da serra dos Carajás**. *Boletim Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza*, v. 23, p. 30-44, 1988.

SECCO, R. S.; MESQUITA, A. L. Nota Sobre a Vegetação de Canga da Serra Norte. I. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Nova Série Botânica*, v. 59, p. 1-13, 1983.

SEVERINO, V. G. P. **Estudo químico de plantas do gênero *Hortia*, do fungo *Guignardia citricarpa* e avaliação de seus potenciais efeitos biológicos**. 2011. 394 p. Tese de doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, São Carlos.

SGARBi, D. B.; SILVA A. J, CARLOS I. Z.; SILVA C. L.; ANGLUSTER J.; ALVIANO C.S.; **Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii***. *Mycopathologia*; v. 139, p. 9-14. 1997.

SHAANKER, U. R. ***Fusarium proliferatum*, an endophytic fungus from *Dysoxylum binectariferum* Hook. f, produces rohitukine, a chromane alkaloid possessing anticancer activity**. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v. 101, n. 2, p. 323-329, 2012.

SHI, M. et al. **Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens**. *Microbiology*, v. 158, n. 1, p. 166-175, 2012.

SHIMIZU, M. **Endophytic Actinomycetes: Biocontrol Agents and Growth Promoters**. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*. Maheshwari: D. K. p. 201–220, 2011.

SHIOMI, K. et al. **Fungal *phenalenones* inhibit HIV-1 integrase**. *J Antibiot*. v. 58. 65-68p, 2005.

SHIROTA O, MORITA H, TAKEYA K, ITOKAWA H. **Isolation of antitumor substance, dulcitol, from *Maytenus ebenifolia***. Natural Medicines. v. 52(2), p. 184-186, 1998.

SIDDIQUEE, S., CHEONG, B. E., TASLIMA, K., KAUSAR, H., HASAN, M. M. **Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns**. Journal of chromatographic science, v. 50, n. 4, p. 358-367, 2012.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de Controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. São Paulo: Varela, 1995.

SILVA, F.F.M. **Distribuição de metais pesados na vegetação metalófila de Carajás**. Acta Botânica Brasílica, v. 06, n. 01, p. 107-122, 1992.

SILVA, J. G; SOUZA, I. A; HIGINO, J. S; SIQUEIRA-JR, J. P; PEREIRA, J. V; PEREIRA, M. S. V. **Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus***. Rev Bras Farmacogn.; v. 17(4), p. 572-7, 2007

SILVA, J; FERNANDES, O; MARTINS, M; RODRIGUES JR, A; TEIXEIRA, M. **Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação**. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia, v. 30, n. 1, p. 48-54, 2010.

SILVA, K. L.; CECHINEL FILHO, V. **Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico**. Quím. Nova [online]. v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

SILVA, M. F. F. **Análise Florística da Vegetação que Cresce sobre Canga Hematítica em Carajás-PA (Brasil)**. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, *Série Especial*, v. 7(1), p. 79-108, 1991.

SILVA, M. F. F., SECCO, R. S.; LOBO, M. G. A. **Aspectos ecológicos da vegetação rupestre da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil**. *Acta Amazonica*, v. 26(1/2), p. 17-44, 1996.

SILVA, M. F. F.; MENEZES, N. L.; CAVALCANTE, P. B.; JOLY, C. A. **Estudos Botânicos: Histórico, Atualidade e Perspectivas**. In: *Carajás: Desafio Político, Ecologia e Desenvolvimento*. São Paulo: Brasiliense / Brasília: CNPq. p. 184-207, 1986a.

SILVA, M. F. F.; ROSA, N. A.; SALOMÃO, R. P. **Estudos Botânicos na Área do Projeto Ferro Carajás. 3 -Aspectos Florísticos da Mata do Aeroporto de Serra Norte-PA**. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, *Série Botânica*, v. 2(2): 169-187, 1986b.

SILVA, N. **Avaliação do potencial antimicrobiano, enzimático e crescimento de um isolado amazônico do fungo *Pycnoporus sanguineus***. 2010. 157f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.

SILVA, R. R.; SOUZA-LIMA, E. S. **Fabaceae in the São Francisco River sub-basin, Nova Marilândia, Mato Grosso, Brazil**. *Biota Neotropica*, v. 13, n. 2, p. 297-302, 2013.

SILVA, S. C. **Estudo Químico de Micro-organismos Associados a *Khaya ivorensis* (Meliaceae)**. 2007. 242 p. Tese de doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, São Carlos.

SILVA, S. R. S. **Estudo Químico e Avaliação do Potencial Farmacológico e Herbicida de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek**. 2007. Xxf...il. Tese de doutorado - UFMG/ICEx/Química, Belo Horizonte.

SILVA, V. N.; GUZZO, S. D.; LUCON, C. M. M. ; HAKAKAVA, R. **Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro**. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v. 46, n.12, p. 1609-1618, 2011.

SILVEIRA, L. M. S. et al. **Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão**. *Rev. Bras. Farm.* v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SILVEIRA, V. D. **Microbiologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 336p, 1995.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6º ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SIMON, M.F., R. GREYER, L.P. de QUEIROZ, T.E SÄRKINEN, V.F. DUTRA; C.E. HUGHES. **The evolutionary history of *Mimosa* (Leguminosae): toward phylogeny of the sensitive plant**. *American Journal of Botany*. v. 98 (7), p. 1201-1221, 2011.

SIMON, M. F; PROENÇA, C. **Phytogeographic patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado biome of Brazil: an indicator genus of high altitude center of endemism?** *Biological Conservation*, v.96, p. 279-296, 2000.

SIQUEIRA, D. **Bioprospecção de fungos amazônicos com atividade antifúngica frente aos fitopatógenos de pau-rosa (*Aniba rosaedora* Ducke)**. 2011. 73f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas,

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.

ŠNAJDR, J. et al. **Saprotrophic basidiomycete mycelia and their interspecific interactions affect the spatial distribution of extracellular enzymes in soil.** *FEMS Microbiology Ecology*, v.78, n. 1, p. 80-90, 2011.

SOUZA, J; LIMA, A; MARTINS, E; SALEM, J. **Anti-mycobacterium activity from culture filtrates obtained from the dematiaceous fungus C10.** *Journal of Yeast and Fungal Research*, v. 2, n. 3, p. 28-32, 2011.

SPAINHOUR, C. B. Natural products. In: GAD, S. C. **Drug discovery handbook.** New York: Wiley-Interscience, Cap. 1, p. 12-72, 2005.

SRINIVASAN, K.; JAGADISH, L. K.; SHENBHAGARAMAN, R.; MUTHUMARY, J. **Antioxidant activity of endophytic fungus *Phyllosticta* sp. isolated from *Guazuma tomentosa*.** *Journal of Phytology, Humnabad*, v. 2, n. 6, p. 37–41, 2010.

STADLER, M. et al. **Chemotaxonomy of *Entonaema*, *Rhopalostroma* and other Xylariaceae.** *Micological Research*, v. 3, p. 239-256, 2004.

STCP, Engenharia de projetos Ltda. Sumário Executivo do Plano de Manejo para Uso Múltiplo da Floresta Nacional de Carajás, 71p, 2003.

STEFANELLO, L.; BONETT, P. L. **Avaliação do desenvolvimento de milho com *Trichoderma spp.*, Cultivando o Saber.** Cascavel, v. 6, n. 1, p. 121-127, 2013.

STIERLE, A. A.; STROBEL, G. A.; STIERLE, D. B. Investigation of fungi associated with the pacific yew tree *taxus-brevifolia*. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 205: 8, 1993.

STOPPACHER, N.; KLUGER, B.; ZEILINGER, S.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. **Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS.** *Journal of microbiological methods*, v. 81, n. 2, p. 187-193, 2011.

STREGE, M. A. **High-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening.** *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 725, n. 1, p. 67-78, 1999.

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

STROBEL, G. **Endophytes as sources of bioactive products.** *Microbes and Infection*, v. 5, p. 535-544, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B. **Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. **Natural products from endophytic microorganisms**. *Journal of Natural Products*, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

STURM, Sonja; SEGER, Christoph. **Liquid chromatography–nuclear magnetic resonance coupling as alternative to liquid chromatography–mass spectrometry hyphenations: Curious option or powerful and complementary routine tool?** *Journal of Chromatography A*, v. 1259, p. 50– 61, 2012.

SUBBIAH, M. T.; ABPLANALP, W. **Ergosterol (major sterol of baker' s and brewer' s yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and the potential role of its oxidation products**. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, v. 73, p. 19-23, Jan. 2003.

SUN, J.; LIANG, F.; BIN, Y.; LI, P.; DUAN, C. **Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries**. *Molecules*, v. 12, p. 679-693, 2007.

SURVASE, S; KAGLIWAL, L; ANNAPURE, U; SINGHAL, R. **Cyclosporin A - A review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications**. *Biotechnology Advances*, v. 29, n. 4, p. 418-435, 2011.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. **Validação de métodos cromatográficos**. *Pharmaceutical Technology* 2(3): 12-20, 1998.

TAIPE, G. M.; GÓMEZA, A. L. R. T.; CAYCHO, J. R. **Evaluación electroquímica de la actividad antioxidante del extracto alcohólico de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl.** *Revista de la Sociedad Química del Perú*, v. 74, n. 4, 233-246, 2008.

TAKAHASHI, J. A. et al. **Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes***. *J. Mycol Med*, v. 18, p. 98–204, 2008

TAKAHASHI, J; LUCAS, E. **Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica**. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. **Endophytes: a rich source of functional metabolite**. *Natural Product Report*, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

TEITEN, M.-H.; MACK, F.; DEBBAB, A.; ALY, A. H.; DICATO, M.; PROKSCH, P.; DIEDERICH, M. **Anticancer effect of altersolanol A, a metabolite produced by the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*, mediated by its pro-apoptotic and antiinvasive potential via the inhibition of NF- κ B activity**. *Bioorganic & medicinal chemistry*, Oxford, v. 21, n. 13, p. 3850–3858, 2013.

TEO, A. Y. L.; TAN H. M. **Effect of Bacillus subtilis PB6 (CloSTAT) on Broilers Infected with a Pathogenic Strain of Escherichia coli**. Journal Applied Poultry Research. 15:229–235, 2006.

TONIAL, F. **Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *Schinus terebenthifolius* Raddi (Aroeira)**. 2010. 138f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Patologia e Parasitologia) – Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**: an introduction. E. Pearson, 8^a ed. p.83, 2004.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4^a. ed. revista e atualizada. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

TULP, M.; BOHLIN, L. **Unconventional natural sources for future drug discovery**. Drug Discovery Today, v. 10, n. 9, p. 450-458, 2004.

USP (United States Pharmacopeia Convention); 34 ed., **Validation of Compendial Methods** <1225>, Rockville, 2011.

VALGAS, C. et al. **Screening methods to determine antibacterial activity of natural products**. Braz. J. Microbiol., v. 38, p. 369-380, 2007.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. **Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants**. In: DEY, P.M.; HARBONE, J.D. (Eds.). Methods in Plant Biochemistry. London: Academic Press, p. 47-69, 1991.

VAZ, A. M. S. F. *Bauhinia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22811>>. Acesso em: 30 Mar. 2015.

VAZ, A.M.S.F. **Leguminosae Caesalpinioideae: Cercideae: *Bauhinia***. Flora dos Estados de Goiás e Tocantins. Coleção Rizzo, v. 30, p. 11-120, 2003.

VERAS, H. N. H. **Caracterização química e avaliação da atividade antimicrobiana e antiinflamatória tópica do óleo essencial de *Lippia sidoides* cham. (*verbenaceae*)**. 2011. Dissertação (Mestre em Bioprospecção Molecular) - Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular. Universidade Regional do Cariri, Crato.

VESSECCHI, R.; GALEMBECK, S. E.; LOPES, N. P.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; CROTTI, A. E. M. **Aplicação da Química Quântica Computacional no Estudo de Processos Químicos Envolvidos em Espectrometria de Massas**. Química Nova, v. 31, n. 4, p. 840-853, 2008.

VIANA, E. P.; SANTA-ROSA, R. S.; ALMEIDA, S. S. M. S.; SANTOS, L. S. **Constituents of the stem bark of *Bauhinia guianensis***. Fitoterapia, v. 70, n. 1, p. 111- 112, 1999.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; BARBETTI, M. J.; LI, H.; WOO, S. L.; LORITO, M. **A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants**. Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 72, n. 1, p. 80-86, 2008 a.

VOGEL, Arthur I. **Análise Química Quantitativa**. 6^o ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

VON SPERLING, Marcos. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3^a Edição, Belo Horizonte – MG, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

WALSH, C. **Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance**. Nature, v. 406, p. 775-781. 2000.

WANG, F. W.; JIAO, R. H.; CHENG, A. B.; TAN, S. H.; SONG, Y. C. **Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp.** World J Microbiol Biotechnol, v. 23, p. 79–83, 2007.

WANG, L.; XU, B.; WANG, J.; SU, Z.; LIN, F.; ZHANG, C.; KUBICEK, C. P. **Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens***. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 93, n. 3, p. 1231-1239, 2012.

WANG, Q. X.; LI, S.; ZHAO, F.; DAI, H.; BAO, L.; DING, R.; GAO, H.; ZHANG, L.; WEN, H.; LIU, H. **Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum***. Fitoterapia, Milano, v. 82, n. 5, p. 777–81, 2011.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R.J.; SAND, C.; RENNIE, R.P. **Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies**. Journal of Ethnopharmacology, v. 115, p. 140–146, 2008.

WIEST, A.; GRZEGORSKI, D.; XU, B. W.; GOULARD, C.; REBUFFAT, S.; EBBOLE, D. J.; BODO, B.; KENERLEY, C. **Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase**. Journal of Biological Chemistry, v. 277, n. 23, p. 20862-20868, 2002.

WRIGHT, P. M., SEIPLE, I. B., & MYERS, A. G. **The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery**. Angewandte Chemie International Edition, v. 53, p.8840–8869. 2014.

XU J. **Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus *Pestalotiopsis* sp. JCM2A4 and its Microbe-Host Relationship with the Mangrove Plant *Rhizophora mucronata*.** Aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, 2010.

XU, J.; ALY, H. A.; Wray, V.; PROKSCH, P., **Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. Isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*.** Tetrahedron, v. 52, p. 21-25, 2011

YANG, X.; ZHANG, J.; LUO, D. **The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus.** Natural Products Reports, v. 29, n. 6, p. 622-641, 2012.

YU, H. et al. **Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes.** *Microbiological Research*, v. 165, p. 437-449, 2010.

YUAN, Y.; TIAN, J. M.; XIAO, J.; SHAO, Q.; GAO, J. M. **Bioactive metabolites isolated from *Penicillium* sp. YY-20, the endophytic fungus from *Ginkgo biloba*.** Natural Product Research, v. 28, n. 4, p. 278-281, 2014.

YUE, J. -M.; CHEN, S. -N.; LIN, Z. -W. & SUN, H. -D. **"Sterol from the fungus *Lactarium volemus*".** *Phytochemistry*, v. 56, p. 801-806, 2001.

ZAFARI, D.; KOUSHKI, M. M.; BAZGIR, E. **Biocontrol evaluation of wheat take-all disease by *Trichoderma* screened isolates.** African Journal of Biotechnology, v. 7, n. 20, 2008.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. **Biology and chemistry of endophytes.** Natural Products Reports, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006

ZHANG, J. et al. **Anthracenedione derivatives as anticancer agents isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi.** Marine drugs, v. 8, n. 4, p. 1469-81, 2010.

ZHANG. F.; YANG , X. ; RAN, W.; SHEN, Q. ***Fusarium oxysporum* induces the production of proteins and volatile organic compounds by *Trichoderma harzianum* T-E5.** FEMS Microbiology Letters, v. 359, p.116-123, 2014.

ZHAO, J.; FU, Y.; LUO, M.; ZU, Y.; WANG, W.; ZHAO, C.; GU, C. **Endophytic fungi from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] produce antioxidant Cajaninstilbene acid.** Journal of agricultural and food chemistry, Washington, v. 60, n. 17, p. 4314-4319, 2012b.

ZHAO, J. et al. **In vitro antioxidant activities and antioxidant enzyme activities in HepG2 cells and main active compounds of endophytic fungus from *Pigeon pea* [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.].** Food Research International, Essex, v. 56, p. 243-251, 2014.

ZHONG, J; XIAO, J. **Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction.** *Biotechnology in China I*, v. 113, p. 79-150, 2009.