

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO QUÍMICO DO FUNGO ENDOFÍTICO ISOLADO DE
HORTIA SUPERBA (RUTACEAE) NA PRODUÇÃO DE
COMPOSTOS SECUNDÁRIOS.**

Dianne Dominguez Formoso

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientadora: Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

*** bolsista PEC – PG/ CNPQ**

**São Carlos - SP
2018**

Dominguez , Dianne

Estudo Químico do Fungo Endofítico isolado de Hortia Superba
(Rutaceae) na produção de compostos secundários. / Dianne Dominguez . --
2018.

122 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São
Carlos, São Carlos

Orientador: Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

Banca examinadora: Prof. DrTiago Venâncio, Profa. Dra Angela Regina
Araujo

Bibliografia

1. Xylareaceae. 2. Griseofulvina. 3. Atividade Biológica. I. Orientador.
II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

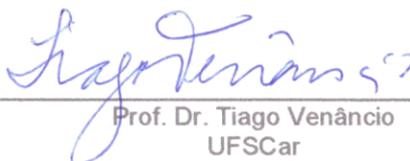
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Dianne Dominguez Formoso, realizada em 06/03/2018:



Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva
UFSCar



Prof. Dr. Tiago Venâncio
UFSCar



Profa. Dra. Angela Regina Araujo
UNESP

Dedico este trabalho a minha mãe Nilda Formoso, é o bem mais valioso que Deus me deu. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

Agradecimento

A toda a minha família por todo o apoio, a pesar da distância, em especial a minha mãe, que é meu motor impulsor.

À professora e orientadora Profa. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, pela orientação e por sempre ter provido condições excelentes para o desenvolvimento deste trabalho, bem como por suas contribuições em minha formação acadêmica. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ), pelo esforço na tentativa de manter um nível de excelência do curso de pós-graduação. Às secretárias do PPGQ, pela paciência e gentileza com as quais eu sempre fui tratada.

Ao Laboratório de Produtos Naturais-UFSCAR, e um-especial agradecimento ao professor Tiago Venâncio e Alany por o quais grande parte deste trabalho foi desenvolvida.

A meus colegas do laboratório e meus amigos que sempre ficaram ali para mim.

Lista de Abreviaturas e siglas

ACN-Acetonitrila

ACOEt-Acetato de Etila

BD-Batata Dextrose

DOSY-Diffusion-Ordered Spectroscopy

COSY-Correlation Spectroscopy Homonuclear

CZA-Czapeck

ESI-EM-Espectrometria de Massas

HMBC- Heteronuclear Multiple Bond-

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HSQC- (Heteronuclear Single-Quantum Correlation

EM- Extrato Malta

MeOH-Metanol

MHz/Hz Mega hertz/ Hertz

nm- nanômetro

NOESY-Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

PDA- Potato-Dextrose- Agar

RMN ¹H- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C-Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

UV-Ultravioleta

Lista de Símbolos

δ –Deslocamento Químico

μ -Micro

$[M]^+$ Ion Molecular

J-Constante de Acoplamento

S-Singlete

d-Dubleto

dd-Duplo Dubleto

m-Multipleto

m/z- Relação massa-carga

Lista de tabelas

TABELA 1.1 - Azafilonas do grupo A produzidas por ascomicetos da Família Xylariaceae.....	17
TABELA 1.2 - Azafilonas do grupo D produzidas por ascomicetos da Família Xylariaceae.....	19
TABELA 1.3 - Azafilonas do grupo E produzidas por ascomicetos da Família Xylariaceae.....	20
TABELA 3.1 – Constituintes do Meio de Cultivo.....	35
TABELA 3.2 – Sistema de Eluição do HPLC	39
TABELA 3.3 – Mistura de solventes	42
TABELA 3.4- Sistema de Eluição para a análise em HPLC.	43
TABELA 4.1- Extratos obtidos e suas respectivas massas (g).....	52
TABELA 4.2 - Dados de RMN ¹ H (400 MHz, MeOH-d ₄) do composto 1	55
TABELA 4.3 - Dados de RMN ¹ H (600 MHz, MeOH-d ₄) - Composto 2	59
TABELA 4.4 - Correlações observadas nos experimentos de HSQC e HMBC (600 MHz, MeOD-d ₄) para o compost 2	59
TABELA 4.5 - Dados de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) - Composto 3	68
TABELA 4.6 - Dados de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) - Composto 4	78
TABELA 4.7 - Dados de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) - Composto 5	78

Lista de Figuras

FIGURA 1.1- Imagem representativa do gênero <i>Hortia</i>	2
FIGURA 1.2-Biogênese dos precursores dos limonoides de <i>Hortia</i>	6
FIGURA 1.3- Cumarinas isoladas de espécies de <i>Hortia</i>	7
FIGURA 1.4-Derivados do ácido diidrocinâmico isolados de espécies de <i>Hortia</i>	8
FIGURA 1.5- Alcaloides isolados de espécies de <i>Hortia</i>	8
FIGURA 1.6- Imagem representativa de uma hifa septada	11
FIGURA 1.7- Imagem ilustrativa da Família Xylareaceae.....	14
FIGURA 1.8- Esqueleto básico das azafilonas na Família Xylariaceae	16
FIGURA 1.9-Esqueleto básico das azafilonas do grupo B da Família Xylariaceae	18
FIGURA 1.10: Esqueletos básicos das azafilonas do grupo C da Família Xylariaceae	18
FIGURA 1.11- Esqueleto básico das benzofenonas.....	21
FIGURA 1.12- Esqueleto básico das (11) -citocalasinas da Família Xylariaceae	22
FIGURA 1.13- Esqueleto básico de Cromona da Família Xylareaceae.....	22
FIGURA 1.14- Esqueleto básico de Isocumarina da Família Xylareaceae.....	23
FIGURA 1.15- Exemplos básicos de Lactonas da Família Xylareaceae	23
FIGURA 1.16- Exemplo básico de Naftaleno da Família Xylareaceae	24
FIGURA 1.17- Esqueleto básico das Quinonas da Família Xylareaceae	24
FIGURA 1.18- Exemplo de Terpeno da Família Xylareaceae	25
FIGURA 1.19- Representação do isolado de griseofulvina.....	26
FIGURA 3.1- Representação esquemática do MALDI-TOF MS.....	34
FIGURA 3.2- Meios com 2 e 10 dias de crescimento respectivamente	36
FIGURA 3.3- Meios líquidos com fungos inoculados aos 10 dias.....	37
FIGURA 3.4- Diagrama da extração do fungo inoculado.....	41
FIGURA 4.1-Espectro de Massa pela técnica do MALDI-TOF MS.....	45
FIGURA 4.2Cromatograma do fungo:Linha verde: fungo. Linha cor rosa: controle do meio	46
FIGURA 4.3- Espectro de RMN 1H 400 MHz do meio líquido de BDA.....	47
FIGURA 4.4- Cromatograma do fungo. Línea verde: fungo, Línea cor rosa: controle do meio	48

FIGURA 4.5- Espectro de RMN ¹ H 400 MHz do extrato fúngicos em meio sólido de BDA	48
FIGURA 4.6- Meio Malta líquido do fungo: Linha verde: fungo. Linha cor rosa: Controle do meio	49
FIGURA 4.7- Espectro de RMN ¹ H 400 MHz do extrato fúngicos em meio líquido de Malta	50
FIGURA 4.8- Meio Malta sólido do fungo. Linha verde: fungo. Linha cor rosa: Controle do meio	50
FIGURA 4.9- Espectro de RMN ¹ H 400 MHz do extrato fúngicos em meio sólido de Malta.....	51
FIGURA 4.10- Espectro de RMN ¹ H 400 MHz amostra obtida com 80% ACOEt e 20%Hexano.....	52
FIGURA 4.11- Cromatograma HPLC-UV.....	53
FIGURA 4.12- Estrutura química da Declorogriseofulvina.....	54
FIGURA 4.13: Espectro de RMN ¹ H 400 MHz, MeOD-d ₄ da Substância 1	55
FIGURA 4.14- Ampliação da região dos aromáticos do espectro de RMN ¹ H. Composto 1	56
FIGURA 4.15- Ampliação da região das metilas. Espectro de RMN ¹ H 400 MHz MeOD-d ₄ . Composto 1	56
FIGURA 4.16- Espectro de RMN ¹ H 400 MHz, MeOD-d ₄ . Composto 1 Ampliação da região do multipeto.....	57
FIGURA 4.17- Espectro de Massas do Composto 1 (ESI-MS).....	57
FIGURA 4.18-Estrutura química da Griseofulvina	58
FIGURA 4.19- Espectro de RMN ¹ H 400 MHz, MeOD-d ₄ da Substância 2	60
FIGURA 4.20- Ampliação da região dos aromáticos e alifáticos do espectro de RMN ¹ H, MeOD-d ₄ . Substância 2	61
FIGURA 4.21- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, MeOH) do Composto 2 , ampliação da região dos sinais das metilas	61
FIGURA 4.22- Espectro de RMN ¹ H-2D 600MHz, MeOH-d ₄ . Substância 2	62
FIGURA 4.23- Mapa de contorno HSQC (600 MHz, MeOH-d ₄) do Composto 2	63
FIGURA 4.24- Mapa de contorno HMBC (600 MHz, MeOH-d ₄) do Composto 2	64

FIGURA 4.25- Espectro de Massas no modo positivo do Composto 2 (ESI-MS).....	65
FIGURA 4.26- Espectro de Massas ESI-MS/MS (MS2 de 353) no modo positivo do Composto 2	66
FIGURA 4.27- Fragmentação do íon 353 no modo positivo do composto 2	66
FIGURA 4.28 Estrutura química da Isocumarina.....	67
FIGURA 4.29- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) da fração referente à banda cromatográfica 4	68
FIGURA 4.30 Ampliação do Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD), da região dos aromáticos. Composto 3	69
FIGURA 4.31 Ampliação do Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD), da região das metilas. Composto 3	69
FIGURA 4.32- Ampliação do Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD), da região dos aromáticos. Composto 3	70
FIGURA 4.33 - Espectro de RMN Cosy-2D (400 MHz, CD ₃ OD) Composto 3	71
FIGURA 4.34 -Espectro de Massa da Composto 3 (LC-MS).....	72
FIGURA 4.35- Pérdida neutra do CO ₂ do Composto 3 (LC-MS).....	72
FIGUERA 4.36-Substância 4.....	73
FIGURA 4.37- Substância 5	73
FIGURA 4.38-Cromatograma de íons totais em ionização no modo positive	75
FIGURA 4.39-Espectro do íon extraído da banda cromatográfica de 2,70 a 2,95 min.....	75
FIGURA 4.40- Espectro do íon extraído da banda cromatográfica de 3,09 a 3,29 min.....	76
FIGURA 4.41- Espectro do íon extraído da banda cromatográfica De 3,52 a 3,62.....	77
FIGURA 4.42- Espectro de RMN ¹ H (600 MHz,CD ₃ OD) da fração referente à banda cromatográfica 5	79
FIGURA 4.43-Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da fração referente à banda cromatográfica 5, expansão da região de sinais de hidrogênio aromáticos.....	80
FIGURA 4.44-Espectro de RMN ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da fração referente à banda Cromatográfica 5, expansão da região de sinais de metoxilas... ..	80
FIGURA 4.45- Espectro de RMN Dovy-2D (600 MHz, CD ₃ OD) Substância 4 e 5.....	81
FIGURA 4.46- Espectro de NOESY-2D (600 MHz,CD ₃ OD) da fração referente à banda cromatográfica 5.....	82

FIGURA 4.47- Espectro de NOESY-2D (600 MHz,CD ₃ OD) da fração referente à Banda cromatográfica 5, expansão de δ 6,5 a 3,6.....	83
FIGURA 4.48- Espectro de RMN Cosy-2D (600 MHz,CD ₃ OD)Substância 4 e 5	84
FIGURA 4.49- Mapa de contorno HMBC (600 MHz,CD ₃ OD) a fração referente à Banda cromatográfica 5.....	85
FIGURA 4.50- Mapa de contorno HSQC (600 MHz,CD ₃ OD) a fração referente à Banda cromatográfica 5.....	86
FIGURA 4.51- Mapa de contorno HSQC (600 MHz,CD ₃ OD) a fração referente à Banda cromatográfica 5, expansão da região das metoxilas.....	87
FIGURA 4.52- Valores e gráfico da viabilidade celular dos eritrócitos. Composto 1	89
FIGURA 4.53- Valores e gráfico da viabilidade celular dos eritrócitos. Composto 2	90
FIGURA 4.54- Placa de microtitulação onde se inocula o <i>S. aureus</i>	92

Resumo

ESTUDO DO FUNGO ENDOFÍTICO ISOLADO DA HORTIA SUPERBA (RUTACEAE) NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS. A ordem Sapindales, composto pelas famílias Rutaceae, Meliaceae, Burseraceae, Simaroubaceae, Bierbersteiniaceae, Kirkiaceae, Anacardiaceae, Sapindaceae e Nitrariaceae, é rica em várias classes de metabolitos específicos, sendo os mais freqüentes: cumarinas, alcalóides, flavonóides, quassinoides e limonoides. A família Rutaceae caracteriza-se por uma grande diversidade dos metabólitos não comuns em outras famílias, a ordem (Silva et al., 1988) é constituída por diferentes gêneros, destacando-se Hortia, composto por cinco espécies distribuídas do Panamá até o estado de São Paulo e alguns lugares da Amazônica (Groppo e Pirani 2012), além de serem endêmicos na área de Minas Gerais, onde tomamos a planta como amostra para o estudo de pesquisa. Neste trabalho, isolou-se o fungo endofítico pertencente à família Xylaria. Este fungo foi inoculado no meio de cultura de agar de extrato de malte, onde foram produzidos vários metabolitos secundários e entre eles foram separados e identificados três compostos: Declorogriseofulvin, Griseofulvina, 3, Ácido 4-dihidro-8-hidroxi-3-metilisocouarina-5-carboxílico, Spiro [benzofuran-2 (3H), 1' - [2] ciclohexeno] -3,4'-diona, 5-cloro-7-declorogriseofulvina, citado pela primera vez nesta tese e 5-clorogriseofulvina. O segundo composto é isómero desta última substância e foi identificado pelas técnicas de RMN e Massa Spectrometry. A atividade hemolítica no sangue foi medida pelas substâncias, resultando em griseofulvina sendo menos tóxico no sangue do que seu análogo, como declorogriseofulvin. Além disso, a atividade biológica dos compostos foi analisada contra a estirpe *Staphylococcus aureus*, pelo Método de Concentração Inibitória para bactérias (MIC) (Barbosa. S et al, 2016), concluindo como resultado que as substâncias não possuem atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram- positiva.

Abstract

STUDY OF THE ENDOPHYTIC FUNGUS ISOLATED FROM *HORTIA SUPERBA* (RUTACEAE) IN THE PRODUCTION OF SECONDARY COMPOUNDS. The order Sapindales, composed for the families Rutaceae, Meliaceae, Burseraceae, Simaroubaceae, Bierbersteiniaceae, Kirkiaceae, Anacardiaceae, Sapindaceae and Nitrariaceae, is rich in various classes of special metabolites, being the most frequent: coumarins, alkaloids, flavonoids, quassinoids and limonoids. The family Rutaceae is characterized by a great diversity of those metabolites not common in other families the order (Silva et al., 1988) and is constituted by different genera, of which stands out *Hortia*, composed for five species distributed from Panama to the state of São Paulo, and some of the area Amazônica (Groppo and Pirani 2012), besides of to be endemic in the area of Minas Gerais, where take the plant as a sample. In this work the endophytic fungus belonging to the family Xylaria, was isolated. This fungus was inoculated in the malt extract agar culture medium, where was produced several secondary metabolites, and between they were separated and identified three compounds: Decolorgriseofulvin, Griseofulvina, 3,4-Dihydro-8-hydroxy-3-methylisocouarin-5-carboxylic acid, Spiro[benzofuran-2(3H),1'-[2] cyclohexene]-3,4'-dione, 5-cloro-7-decolorgriseofulvina, a compound that is still unpublished and 5-clorogriseofulvin. The second compound is isomer of this last substance and was identified by the NMR and Massa Spectrometry techniques. The hemolytic activity in blood was measured for the substances, resulting the griseofulvin being less toxic in blood than your analogue, as decolorgriseofulvin. In addition, the biological activity of the compounds was analyzed against to the strain *Staphylococcus aureus*, by the Inhibitory Concentration Method for bacteria (MICs) (Barbosa. S et al, 2016), concluding as result that the substances do not have antimicrobial activity against the Gram- positive bacteria.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	Posicionamento taxonômico do gênero <i>Hortia</i>	2
1.2	Perfil químico do gênero <i>Hortia</i>	5
1.3	Reino	
	Fungi	10
1.4	Fungi: Família Xylariaceae	14
1.5	Metabólitos secundários produzidos por fungos da família Xylariaceae	15
1.6	Exemplos de metabólitos produzidos por Xylariaceae	16
	1.6.1 Azafilonas	16
	1.6.2 Derivados da Benzofenona	21
	1.6.3 Citocalasinas	21
	1.6.4 Cromonas	22
	1.6.5 Isocumarinas	22
	1.6.6 Lactonas	23
	1.6.7 Derivados do naftaleno	23
	1.6.8 Quinonas	24
	1.6.9 Terpenos	24
1.7	A importância da atividade biológica dos constituintes químicos	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivo específico	28
3	PARTE EXPERIMENTAL	30
3.1	Solventes	30
3.2	Materiais utilizados para identificação e conservação do microrganismo	30
3.3	Meios de cultivo	30
3.4	Equipamentos	31
	3.4.1 Evaporadores rotativos	31
	3.4.2 Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC)	31
	3.4.3 Espectrômetro de massas	31
	3.4.4 Ressonância magnética nuclear	31
	3.4.5 Balança	32
	3.4.6 Câmara de fluxo laminar	32
	3.4.7 Autoclaves	32
	3.4.8 Estufa Incubadora	32
	3.4.9 Banho de Ultrassom B.O.D)	32
3.5	Procedimento experimental	32
	3.5.1 Coleta do material vegetal	32
	3.5.2 Isolamento do fungo das raízes de <i>H. superba</i>	32
	3.5.3 Identificação do fungo	33
	3.5.4 Cultivo do fungo em diferentes meios de Cultivo	35
	3.5.4.1 Meios Sólidos	35
	3.5.4.2 Meios Líquidos	36
	3.5.5 Extração de metabólitos fúngicos	37
	3.5.5.1 Extração dos metabólicos fúngicos dos meios líquidos	37
	3.5.5.2 Extração dos metabólicos fúngicos dos meios sólidos	38

3.5.6	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	38
3.5.7	Crescimento do fungo em Larga Escala	40
3.5.8	Separação do Extrato Bruto	41
3.5.9	Análise da mistura de 80% ACOEt e 20% Hexano.....	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44
4.1	Identificação do Fungo.....	45
4.2	Análises do Meio de cultivo Batata Dextrose (BD).....	45
4.2.1	Meio Líquido.....	45
4.2.2	Meio sólido	47
4.3	Análises do Meio de cultivo MALTA	49
4.3.1	Meio Líquido.....	49
4.3.2	Meio sólido	50
4.4	Estudo de crescimento do Fungo em larga escala	51
4.4.1	Separação do Extrato de Acetato de Etila por CD.....	52
4.4.2	Análise da fração F1 por HPLC-UV	53
4.5	Identificação estrutural dos metabólitos isolados.....	54
4.5.1	Ilustração da Substância 1	54
4.5.2	Ilustração da Substância 2	58
4.5.3	Ilustração da Substância 3	67
4.5.4	Ilustração da Substância 4 e 5	73
4.6	Atividade biológica dos constituintes químicos	88
4.6.1	Atividade hemolítica	88
4.6.2	Avaliação microbiológica	91
5	CONCLUSÃO.....	93
6	REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Posicionamento taxonômico do gênero *Hortia*



FIGURA 1.1- Imagem representativa do gênero *Hortia*

Fonte: www.tropicos.org/name28100200

O gênero *Hortia* (Figura 1.1) pertence à família Rutaceae, comumente incluído na subtribo Toddaliinae, subfamília Toddalioideae. A Família Rutaceae é um tipo de planta das Angiospermas, as quais constituem o maior grupo de plantas verdes, vasculares e com sementes, constituindo acima de 257.000 espécies atualmente (Judd *et al*,2009). Caracteriza-se por ser um gênero Neotropical com uma extensa distribuição desde o Panamá até os estados de Minas Gerais e São Paulo, predominando na região da Amazônia. *Hortia* se identifica por apresentar hábito arbustivo ou arbóreo, folhas concentradas nos ápices dos ramos, inflorescências avermelhadas do tipo corimbo terminais, as flores são tipo rosáceas e os frutos do tipo baga com presença de inúmeras glândulas de óleos (Groppo *et al* ,2012).

A ordem Sapindales consiste em aproximadamente 5.800 espécies distribuídas em nove famílias, sendo as principais: Anacardiaceae, Burseraceae, Meliaceae, Rutaceae, Sapindaceae e Simaroubaceae (Judd et al. 2009). A ordem é rica em diversas classes de metabólitos especiais, sendo os de maior ocorrência cumarinas, alcaloides, flavonoides, quassinóides e limonóides, destacando-se a família *Rutaceae* por ter uma das maiores variedades desses metabólitos que nas outras famílias da mesma ordem (da Silva et al. 1988).

A família *Rutaceae* destaca-se por conter diferentes espécies as quais podem ser utilizadas em diferentes tratamentos como: distúrbios gastrointestinais, dor abdominal, regurgitação ácida, náusea, diarreia, hérnia. Como exemplo temos a espécie *Spiranthera odoratissima*, cujas raízes na forma de chá podem ser utilizadas nos tratamentos contra o reumatismo (Tresvenzol et al., 2006). Além de ter efeitos positivos nos tratamentos contra dores de estômago, dores de cabeça, musculares, disfunções hepáticas e para estimular o apetite (Matos et al, 2009). Diferentes estudos fitoquímicos descrevem de maneira específica como os alcalóides indolopiridoquinazolinico presentes em espécies desta família, se relacionam com a atividade gastroprotetora e antiúlcera, incluindo o alcalóide rutaecarpina isolado na família *Rutaceae* nos gêneros *Evodia*, *Hortia*, *Zanthoxylum*, *Phellodendron*, *Tetradium*, *Spiranthera*, *Vepris*, *Metrodorea*, *Bouchardatia* e *Fagara* da família *Rutaceae* (Yarosh et al., 2006), além de ter ação cardioprotetora (HU et al., 2003), anti-hipertensiva (Deng et al., 2004), antitrombóticas (Sheu et al., 2000) e anti-*Helicobacter pylori* (Tominaga et al., 2002).

O primeiro botânico a identificar e descrever ao gênero *Hortia* foi Vandelli, em 1788, através de amostras enviadas por Joaquim Veloso de Miranda, correspondente da Real Academia de Ciência (Portugal). Já no ano 1824 De Candolle seguindo os estudos feitos por Vandelli determinou que a família *Rutaceae* fosse dividida em duas tribos: Diosmeae e Cusparieae, estabelecendo *Hortia* nesta última, além de coletar exemplares nas regiões de Minas Gerais e Rio de Janeiro denominando-as como *Hortia brasiliensis*. Foram sugeridas modificações taxonômicas no ano 1862 pelos botânicos Bentham e Hooker, tornando a família *Rutaceae* mais extensa, onde sete tribos foram formadas, adotando-se Cusparieae, de onde o gênero *Hortia* foi excluído e posicionado na tribo Toddalieae, mas com comentários de que a classificação era duvidosa. Atualmente os botânicos aceitam o sistema proposto por Engler em 1931 com as modificações feitas por Scholz, e o mesmo é altamente parecido com aquele de Bentham e Hooker, e do mesmo modo não esclarecem a classificação de *Hortia*, conservando-a em Toddalieae. (Scholz, 1964).

Por diferentes aspectos tem-se mostrado que a divisão das subfamílias de Engler em 1931 é artificial, em particular ao reconhecimento de Toddalioideae. Isto levou da Silva et al. (1988) a unir Rutoideae e Toddalioideae em uma única subfamília, Rutoideae, subdividindo-a em 17 tribos.

Os gêneros americanos de *Toddalioideae* resultaram três tribos dentro de Rutoideae e posteriormente *Hortia* foi reclassificada em *Cusparieae*. Entretanto as alegações para isto não foram convincentes, realçando novamente que os dados químicos mostram a mesma complexidade no estabelecimento de *Hortia*. A única justificativa plausível para reclassificá-lo seria que *Hortia* é o único representante americano na subtribo Toddaliinae. Em 1988 se determinou que Cuspariae (tribo informal "Cusparia") compreende além de *Hortia* o gênero *Galipea*, o qual é Neotropical (da Silva et al. 1988). Engler em 1931 designou gêneros da África, Austrália e América em Toddaliinae, os quais eram filogeneticamente muito bem correlacionados entre si. Finalmente *Hortia* ficou melhor reclassificada entre os gêneros de Cusparieae do que junto aos membros de Toddaliinae.

Diferentes estudos e fontes de dados de plantas do gênero *Hortia*, estabeleceram que *H. brasiliiana*, *H. arborea*, *H. colombiana* e *H. chocoensis* constituem as mesmas espécies arborescentes, e que *H. brasiliiana* Vand. ex DC. é o nome correto (Groppo et al, 2005, 2012). *H. badinii* MA Lisboa foi usado para denominar indivíduos de *Hortia*, não obstante esse equívoco foi corrigido e se reconheceu como *H. brasiliiana*. Em 1824 Saint-Hilaire colocou o nome *H. brasiliiana*, de forma errada a uma espécie arbustiva do Brasil central, e hoje é admitida como *H. oreadica* Groppo, Kallunki & Pirani (Groppo et al., 2005). *H. superba* Ducke, *H. regia* Sandwith e *H. longifolia* Spruce (ex. Engl) são espécies aceitas no gênero *Hortia* de acordo com Groppo e Pirani (2012).

1.2 Perfil químico do gênero *Hortia*

Segundo levantamento bibliográfico realizado recente, há relato de estudo químico das seguintes espécies de *Hortia*, *H. arborea* (sinon. *H. brasiliiana*, Pachter et al., 1957, 1960; Ferracin, 1992; Monache et al., 1976, 1977), *H. badinii* (sinon. *H. brasiliiana*, Corrêa et al., 1975, 1979), *H. longifolia* (Corrêa et al., 1976; Pádua, 1976), *H. brasiliiana* (Pachter et al., 1961.), *H. colombiana* (sinon. *H. brasiliiana*, Suarez et al., 1998, 2002.), *H. regia* (Jacobs et al., 1986.), *H. oreadica* (Braga, 2012; Severino, 2012) e *H. superba* (Braga, 2012; Severino, 2012). É conhecido para este gênero metabólitos secundários como derivados do ácido diidrocinâmico, derivado do ácido cinâmico, alcaloides (furoquinolínicos, 2-quinolonas e β -indolopiridoquinazolínicos), cumarinas (simples, furanocumarinas e piranocumarinas), terpenóides (sesquiterpenos, triterpenos e limonoides), amidas e flavonoides (flavonas e flavanona). Esta revisão indicou que limonoides, cumarinas, ácidos diidrocinâmico, e alcaloides são os grupos mais abundantes no gênero. As tabelas 1 e 2 e as Figuras 1.2 incluem os diferentes tipos de compostos isolados de espécies de *Hortia*, e em cada classe os compostos foram incluídos na ordem da sua complexidade, limonoides (Figura e 1.3.), cumarinas (Figura 1.4), ácidos diidrocinâmicos (Figura 1.5).

Os limonoides têm sua origem biogenética nos triterpenos do tipo tirucalanos (H-20/C-20R) ou eufanos (H-20/C-20S). Conforme com a biogênese comumente descrita, há formação de epóxido entre C-7 e C-8 que abre levando a uma hidroxila na posição C-7 e induzindo a formação da ligação dupla em C-14. Em seguida há a ciclização da cadeia lateral, com perda de 4 unidades de carbono levando a formação do anel furano em C-17, como mostra a Figura 1.2. Em seguida o anel D é oxidado a lactona, via uma oxidação Baeyer- Villager (Silva e Gottlieb, 1987). Todos os limonoides descritos para o gênero *Hortia* apresentam o anel D lactonizado e derivam do esqueleto1.

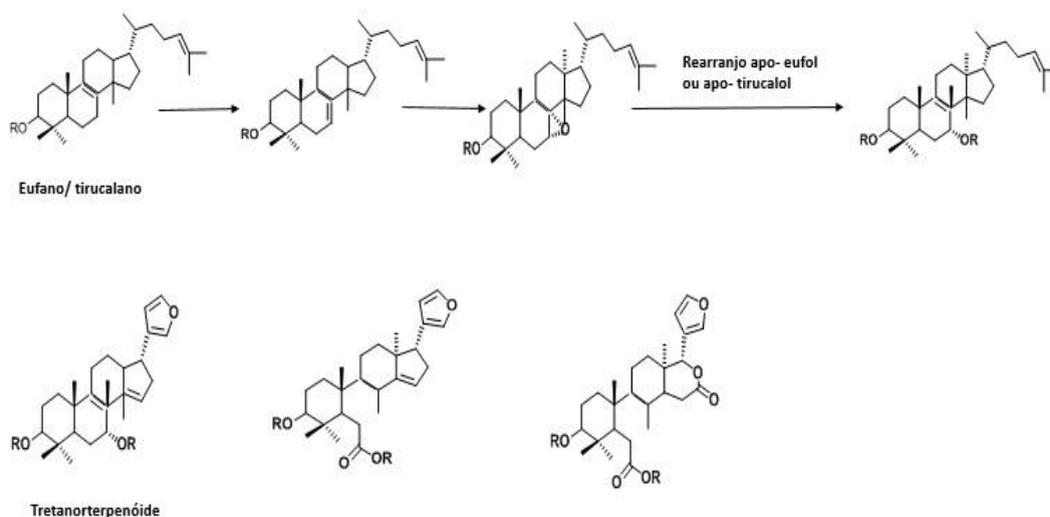


FIGURA 1.2-Biogênese dos precursores dos limonoides de *Hortia*

Há pouco trabalho de marcação isotópica sobre a biossíntese dos limonoides, e a proposta para a sua biogênese é derivada a partir de relações químicas hipotéticas entre os compostos que têm sido isolados.

Como comentado acima a taxonomia de *Hortia* vem sendo discutida e ainda encontra-se em dúvida. Groppo e colaboradores em 2008 realizou uma análise genômica de 65 espécies de 59 gêneros, mostrando todas as subfamílias e tribos de Rutaceae, e recomendaram que *Adiscanthus* e *Hortia* constituem um grupo muito sólido em todas suas análises efetuadas.

As cumarinas e alcaloides isolados de *Hortia* estão extensamente distribuídos em outros gêneros de (Silva et al., 1988, 2013; Murray,2002). Alcaloides furo- e piranoquinolinos verificam-se em gêneros de Rutoideae, Toddalioideae e Flindersioideae, contudo em proporção limitada em Aurantioideae. O grupo menor de alcaloides, os indolopiridoquinazolinos ocorrem em alguns gêneros de Rutoideae e Toddalioideae. Furo e piranocumarinas ocorrem entre os gêneros de *Rutoideae* e *Aurantioideae*, e em números menores em Toddalioideae e Flindersioideae. Assim, *Hortia* mostrada tem os alcaloides e perfil de Cumarinas comparáveis aos de Rutoideae e Toddalioideae. Portanto, a importância sistemática das cumarinas e alcaloides não foram robustos para esclarecer a classificação do genero *Hortia*.

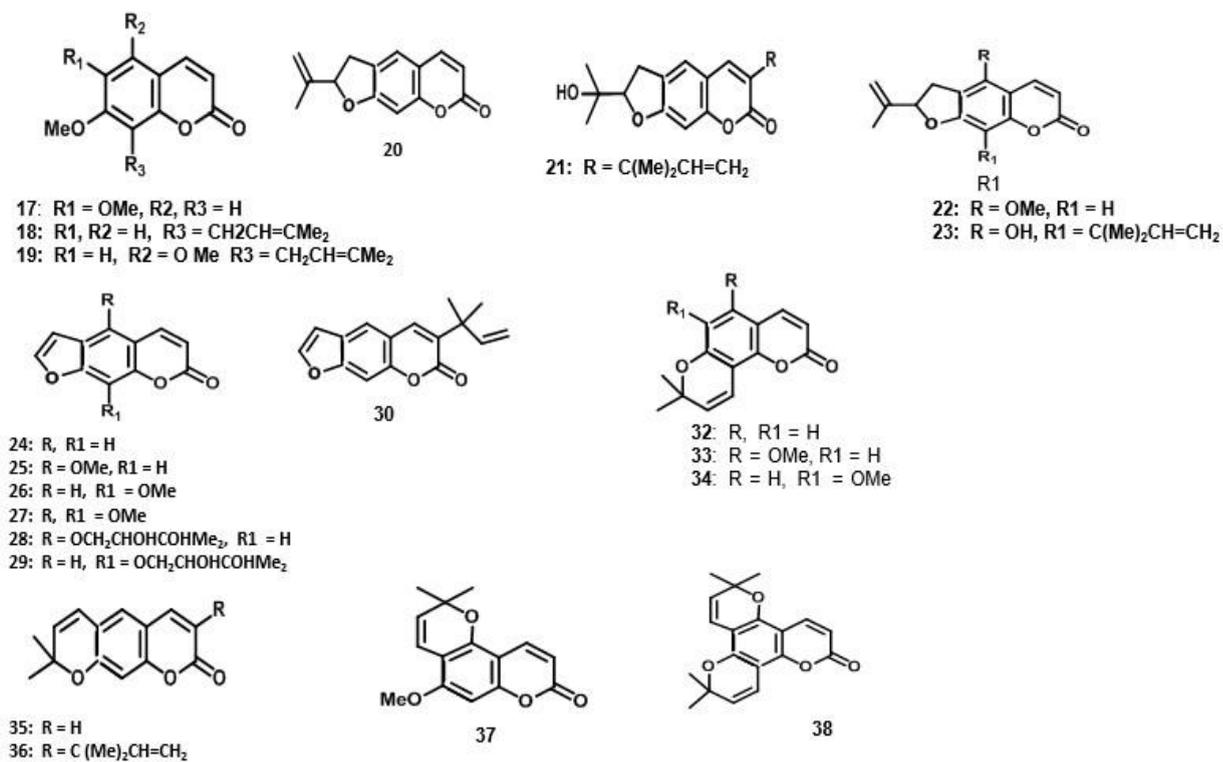


FIGURA 1.3- Cumarinas isoladas de espécies de *Hortia*.

As similaridades entre os derivados de ácido diidrocinâmico de espécies de *Hortia* (Toddaliioideae) e espécies de Rutoideae apontam obviamente as correlações fitoquímicas desse gênero com esta última subfamília, (Braga *et al*, 2012).

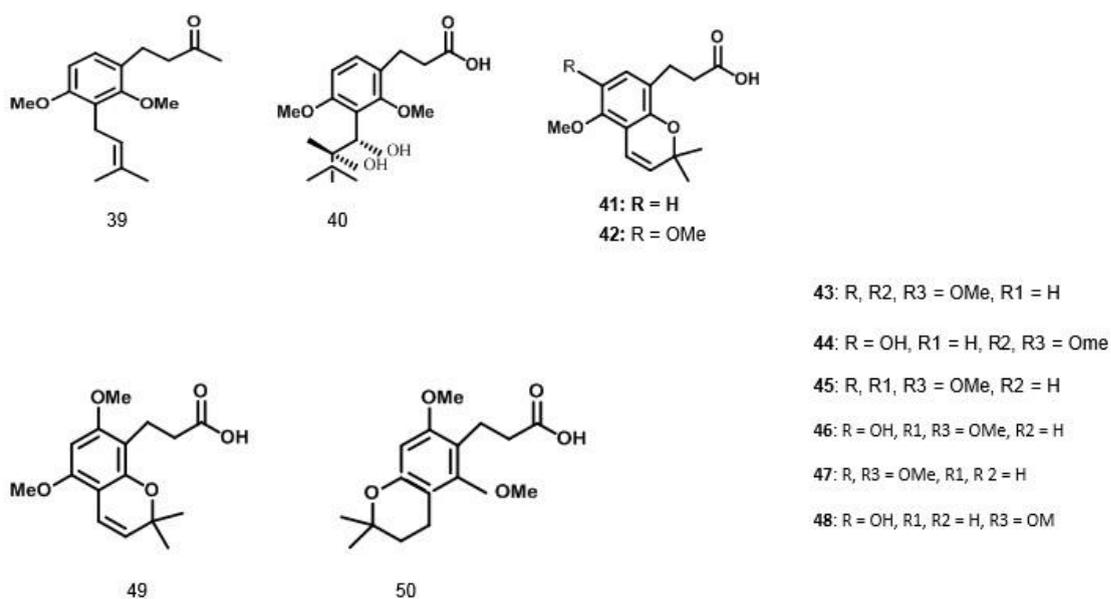


FIGURA 1.4-Derivados do ácido diidrocinâmico isolados de espécies de *Hortia*

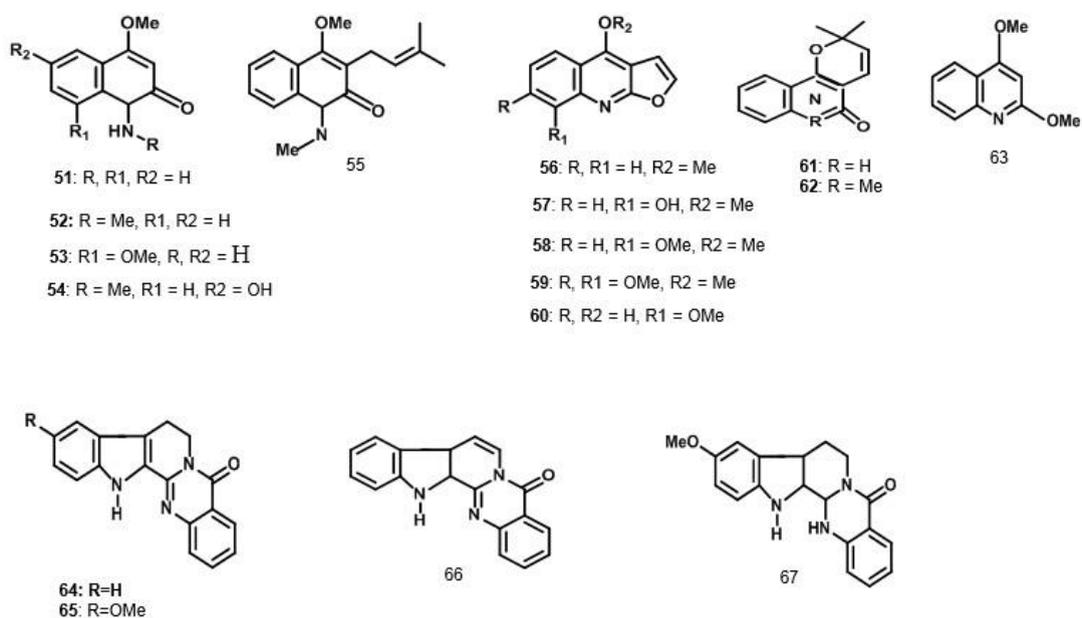


FIGURA 1.5-Alcaloides isolados de espécies de *Hortia*

Analisando os limonoides o gênero produz compostos específicos, com os anéis A, B e C, modificados principalmente em *H. oreadica* e *H. regia* (Suarez et al., 1998, 2002; Severino et al., 2012; Jacobs e Ramdayal, 1986). Estas alternâncias estruturais não acontecem em outro membro de Rutaceae, sendo claro que os limonoides de *Hortia* sugerem posicioná-lo isolado dentro da família. Os limonoides foram isolados anteriormente nas diferentes espécies de todas as subfamílias de Rutaceae, destacando-se em Aurantioideae, Toddalioideae e Rutoideae (Silva et al., 1987, Hill e Connolly, 2012). Contudo, se *Hortia* deve ser tratada como gênero de Rutoideae ou Toddalioideae é um assunto de interesse pessoal dos botânicos, pois há uma conclusão unânime de estudos moleculares sobre a necessidade de se mesclar Rutoideae e Toddalioideae em uma única subfamília (Chase et al., 1999; Scott et al., 2000; Samuel et al., 2001; Araújo et al., 2003; Poon et al., 2007; Groppo et al., 2008; But et al., 2009). Finalmente, todos os compostos isolados de espécies de *Hortia* reforçam a sua posição em Rutaceae.

1.2 Reino fungi

A classificação dos seres vivos é um procedimento notoriamente histórico. Desde a Grécia antiga os filósofos buscaram agrupar os seres vivos segundo suas semelhanças que apresentavam entre si, sendo reconhecidos os grupos animal e vegetal. (Rodrigues, 2010).

Já em meados do século XX, o biólogo americano Herbert F. Copeland (1902- 1968), professor de Biologia do Colégio da Cidade de Sacramento (Sacramento City College), na Califórnia, sugeriu a classificação dos seres vivos em quatro reinos: Animalia, Plantae, Protista (bolor, cogumelos, licoperdos, entre outros, foram incluídos dentro o nome *Inophyta*) e Monera (bactérias). A clássica divisão dos organismos em cinco Reinos – Animalia, Plantae, Fungi, Monera e Protista – foi proposta por Robert H. Whittaker (1924- 1980) da Universidade de Cornell, e o mesmo estabeleceu o mais útil de todos os agrupamentos, quando retirou os fungos dos protistas e os reconheceu como o quinto reino diferente (Rodrigues, 2010). No entanto, na década de 1980, as biólogas Lynn Margulis e Karlene Schwartz delimitaram e melhoraram os limites do reino Protista, propondo a inclusão de todas as algas, independentemente do seu tamanho, no reino Protista – termo cunhado por John Hogg, em 1860 que compreendia seres unicelulares não considerados plantas nem animais (Margulis & Schwartz, 2001).

A ciência que estuda os fungos se denomina Micologia (*Mykes=Fungo e Logos=Estudos*). Os fungos são um grupo de seres vivos diferentes das plantas e dos animais, e se classificam no reino como singular e extraordinário chamado Fungi. Estes possuem uma grande capacidade de adaptação e podem desenvolver-se na parte superior ou em cima de qualquer meio ou superfície, intensamente nas florestas ou em cidades.

Muitas vezes podemos encontrar os fungos parasitando plantas ou causando problemas de saúde associados a alergias e micoses em animais. Os fungos têm uma característica marcante em promover a decomposição de combustível e de grande variedade de materiais. A reprodução dos fungos ocorre por meio de esporas, as quais são disseminadas principalmente por ar e por água, apresentando uma grande variedade de formas, comportamentos e ciclos da vida. (Webster, 1989). Todos os dias as pessoas são favorecidas por produtos originados direta ou indiretamente de fungos, por exemplo, a fermentação dos fungos levando a síntese de álcool etílico e dióxido de carbono, importantes na

produção de bebidas e alimentos como vinho, cerveja, e pães respectivamente. (da Silva e Coelho, 2006).

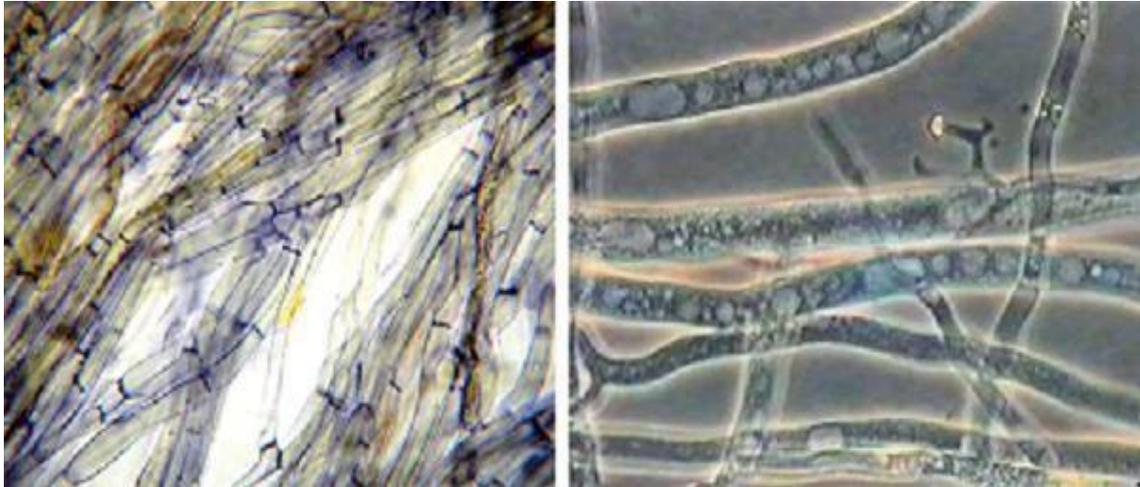


FIGURA1.6- Imagem representativa de uma hifa septada

Fonte:<http://www.micomania.rizoazul.com/microscopia%20las%20hifas.html>

O reino fungi caracteriza-se pôr não ter clorofila em suas células, portanto são incapazes de desenvolver a fotossíntese. Classificados como eucariontes, podendo ser unicelulares (leveduras, quitrídias), ou multicelulares. Geralmente contém dois núcleos em suas células visualizados através de técnicas microscópicas. O micélio é constituído por filamentos cujo agrupamento denominam-se hifas, - Hypha, Gr =teia – (Figura 1.6).

Importante destacar que os micélios dos fungos não representam os tecidos, já as mitocôndrias caracterizam-se por conter cristas planas. Outra característica dos fungos é a presença da estrutura de Golgi e os peroxissomos. A parede celular dos fungos é constituída por quitina e β -glucanos, a membrana celular é formada por ergosterol, característico de fungos, estando presente em diversas microalgas. A reprodução deste reino é sexuada e/ou assexuada de diversas formas, assim como o fenômeno de parassexualidade (recombinação genética na mitose). As algas abastecem os fungos de compostos carbônicos de grande energia, e os fungos vão fornecer às algas de diferentes minerais provenientes do ambiente, além de proteção às variações inóspitas do ambiente. Os fungos endofíticos caracterizam-se por serem microrganismos que vivem nos tecidos inter ou intracelularmente, de sua planta hospedeira, em parte ou em todo o seu ciclo de vida sem causar qualquer sintoma visível de sua presença.

Referente à função dos fungos endófitos na interação com seu hospedeiro, Arnold (2007), Sieber (2007) e Slippers e Wingfield (2007) atribuíram que um dos tipos de interação pode ser do modo mutualista diminuindo o efeito de depredação das plantas, aumentando com isto a resistência a condições de estresse (Rubini *et al.* (2005)), concedendo proteção frente à microrganismos fitopatogênicos. Em orquídeas a função dos fungos é como promotores de crescimento melhorando a aclimatação (Yuan *et al.* 2009, Chen *et al.* 2010).

Os fungos podem formar associações de benefício mútuo com raízes das plantas (micorrizas); aumentando a capacidade das plantas de tolerar diferentes condições de estresse como o déficit hídrico (Laura *et al.*, 2014). A maioria dos fungos habitam na terra, e apresenta uma forma de vida saprófita, parasita ou simbiótica. Sua importância é muito notável desde o ponto de vista ecológico, já que atuam decompondo a madeira (saprófitos), atacando as plantas, considerando-se parasitos ou propiciando associações com diferentes vegetais e animais como os cupins denominando-se simbióticos, que proporcionam determinadas substâncias que os animais são incapazes de produzir. Os fungos endofíticos caracterizam-se pela produção de metabólitos secundários em resposta as condições ambientais bióticas ou abióticas produzidas pelo hospedeiro (Aly *et al.* 2011), contendo propriedades antimicrobianas, antiparasitárias e anticancerígenas (Pilar *et al.* 2015).

Os fungos utilizam diferentes substratos como fontes de carbono, entretanto alguns grupos se especializaram em degradar substratos, tornando-se mais competitivos perante outros microrganismos. Esta é uma das razões principais pelo que os fungos são encontrados em praticamente todos os ambientes no planeta. Apesar de estarem presentes na natureza em maior número que os animais, passa despercebidas a importante ação desses organismos na manutenção e ciclagem de nutrientes na natureza (da Silva *et al.* 2006).

Os fungos são importantes para manutenção da vida no planeta já que, por exemplo, a lignina, celulosa (Cabezas *et al.* 2012) e hemicelulosa são moléculas persistentes na natureza e de grande interesse industrial e estão presentes no tecido dos vegetais, mas sem a intervenção dos fungos não seria possível a renovação e aperfeiçoamento desse material. Portanto, as atividades dos fungos na natureza são tão necessárias e importantes para a continuidade da existência do planeta, quanto são aquelas desempenhadas pelos organismos produtores.

Os fungos endofíticos caracterizam-se por serem microrganismos que vivem nos tecidos inter ou intracelularmente, de sua planta hospedeira, em parte ou em

todo o seu ciclo de vida sem causar qualquer sintoma visível de sua presença. (Petrini *et al.*, 1992; Gubiani *et al.*, 2014). A diversidade entre estes microrganismos, incluindo os fitopatógenos (os quais provocam danos ao hospedeiro), depende de vários fatores entre eles: estado, viabilidade do fungo e da planta a época do ano e seu desenvolvimento e de condições ambientais. Fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio estreitamente relacionadas com plantas também são considerados microrganismos endofíticos (Azevedo, 1998).

O grupo de endofíticos de uma planta específica pode variar com o estado de vitalidade da planta indicando uma grande ação protetora de alguns destes microrganismos (REITER *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2001). Esta característica protetora dos endófitos pode ocorrer por conflito de espaço e nutrientes suficientes e disponível na planta, pela produção de compostos antimicrobianos (PLEBAN *et al.*, 1995), ou indução de resistência sistêmica (M'PIGA *et al.*, 1997). Um estudo realizado na China confirmou que a sazonalidade interfere, na população dos endófitos. Amostras coletadas na primavera de *Heterosmilax japonica* Kunth apresentaram uma maior abundância, da qual se encontra uma quantidade maior de espécies, em comparação aos obtidos no verão (GAO *et al.*, 2005).

No início dos anos 90 os fungos endofíticos atraiu atenção biotecnológica crescente ainda nesta época. Vem se observado que os metabólitos integralmente isolados de plantas foram recentemente isolados de fungos endofíticos. Exemplo disto foi o composto taxol, isolado do meio de cultura de crescimento do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (Strobel *et al.*, 1996).

Outro exemplo é a podofilotoxina, composto inicialmente extraída das raízes de *Podophyllum* e utilizada no tratamento de verrugas genitais (causada por alguns tipos de papilomavírus humanos-HPV), e a mesma é produzida por um fungo endofítico, *Alternaria* sp., isolado da espécie vegetal *Sabina vulgaris* (Chithra *et al.*, 2014). Esses exemplos ilustram que os fungos endofíticos podem eventualmente ser os verdadeiros produtores de metabólitos isolados de plantas, evidenciando múltiplas consequências desde o ponto de vista científico e tecnológico. Estudos com metabólitos secundários de microrganismos endofíticos, especialmente de fungos, se tornam importantes por se mostrarem uma fonte simples e completa que supram a necessidade humana nas mais diversas áreas. Um desses fungos endofíticos de muita importância e está chamando a atenção dos pesquisadores, é a Família *Xylariaceae* o qual é objeto principal do estudo descrito nessa dissertação, seus metabólitos secundários produzidos e a atividade biológica dos mesmos.

1.3 Família Xylariaceae



FIGURA 1.7- Imagem ilustrativa da Família: Xylariaceae

Fonte: <http://naturewatch.org.nz/observations/1011324>

A família Xylariaceae (Figura 1.7) pertence à ordem Xylariales (Sphaeriales), compreende 81 gêneros, 738 espécies (<http://www.catalogueoflife.org>) e indica uma ampla variedade nos trópicos e subtropicais (Whalley & Edwards, 1995). A maioria dos seus gêneros é detectada em madeira, mas há um número significativo em lixo, estrume e correlacionados com insetos, sendo estes últimos limitados a algumas espécies do gênero *Xylaria* [Whalley, 1996].

O conhecimento sobre Xylariaceae no Brasil iniciou-se com o registro de *Thamnomycetes chamissonis* Ehrenb. e *Sphaeriae* sp. sob o estudo investigativo pelo biólogo germânico Christian Gottfried Ehrenberg, em 1815, na ilha de Santa Catarina. A micobiota brasileira durante o século XIX foi observada e analisada por naturalistas e biólogos estrangeiros, principalmente europeus, que deram suas primeiras contribuições à micologia brasileira. Dentre eles destacam-se: Berkeley (1851, 1856, 1880), Berkeley e Cooke (1877), Dennis (1956, 1957, 1959), Hennings (1895, 1897, 1900, 1902, 1904a, 1904b, 1904c), Möller (1901), Rehm (1901a, 1901b, 1904), Theissen (1908a, 1908b, 1909a, 1909b, 1909c, 1909d, 1910). (Cruz, 2015).

Os ascomicetos foram classificados por apresentar estroma, geralmente, por ser desenvolvido e preto, e internamente branco, ascos cilíndricos, de parede mais ou menos engrossada, mas sem camadas separáveis, a maioria das vezes com uma estrutura apical elevada, ascósporos usualmente marrom

escuro e asseptados [Putzke, 1998]. As espécies da família Xylariaceae mostram uma apreciável variabilidade morfológica, as quais são responsáveis, em parte, pela contrariedade em classificar, taxonomicamente, os gêneros xylariáceos [Whalley & Edwards, 1995]. Estudos contemporâneos justificam que a diversidade em relação ao fato de metabólitos secundários característicos parece estar relacionada à sua morfologia clássica, assim como, a filogenia molecular destes organismos [Quang *et al.*, 2005c].

1.4 Metabólitos secundários produzidos por fungos da Família Xylariaceae

Os metabólitos secundários são as substâncias de natureza química variável, produzidas por espécies biológicas normalmente na fase tardia de seu crescimento. Contrariamente dos metabólitos primários, os metabólitos secundários mostram incompatibilidade para que sejam incorporados à fisiologia geral do microrganismo que os produz, portanto, não são produtos essenciais para o crescimento vegetativo do microrganismo produtor (Santana *et al.*, 1994). Estes últimos representam uma valiosa fonte de metabólitos secundários biologicamente ativos, e eles são amplamente utilizados como antibióticos, imunossupressores, antiparasitários e anticancerígenos (Gunatilaka, 2006), além de serem utilizados na proteção de colheitas e safras. Pesquisas realizadas recentemente com os microrganismos no desenvolvimento de modernos e recentes fármacos são as estatinas, as quais são aplicadas no controle das elevadas taxas de colesterol plasmático prevenindo, portanto, o risco de doenças cardiovasculares (Viegas & Bolzani, 2006).

Entre os produtores de metabólitos secundários, os fungos filamentosos são capazes de biossintetizar em maior quantidade estas substâncias, alcançando muitas vezes uma produção 73% superior de outras classes de microrganismos. Investigações sugerem que menos de 5% das espécies de fungos têm sido estudadas, apontando que milhões de espécies continuam desconhecidas [Hawksworth, 1991 citado por Guanatilaka, 2006].

1.5 Exemplos de metabólitos produzidos por Xylariaceae:

1.5.1 Azafilonas

São características de policetídeos produzidos por ascomicetos e tem sido encontrado em alguns gêneros da família Xylariaceae, tais como: *Annulohyphoxylon*, *Daldinia*, *Hypoxylon* e *Creosphaeria*. O nome trivial

“azafilonas” se relaciona à similitude destes compostos pela amônia: os pigmentos reagem com aminas (proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos) substituindo o oxigênio pirano por nitrogênio [Osmanova *et al.*, 2010; Quang *et al.*, 2005b). As azafilonas descobertas nas espécies da família Xylariaceae, são estruturalmente caracterizadas pela presença de um sistema heterocíclico oxigenado com uma metila na posição 7, podendo apresentar grupos carbonílicos nas posições 6 e/ou 8 e ligações duplas variando entre as posições 1, 3 e 4^a, ou 3 e 4^a, ou 3 e 4^a. (Figura 1.8).

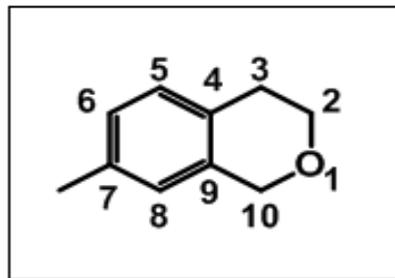
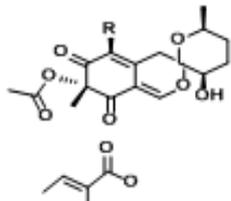
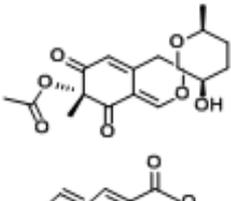
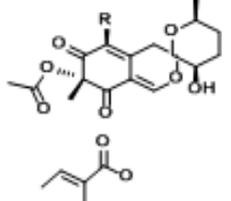


FIGURA 1.8- Esqueleto básico das azafilonas encontradas na Família Xylariaceae

As azafilonas são divididas em cinco grupos em conformidade com o grupamento funcional unido ao esqueleto principal (Quang *et al* (2006b).

Grupo A: constituído por derivados espiro-tricíclico. Na família Xylariaceae este grupo apresenta em seu esqueleto básico um terceiro anel na posição 3, duas carbonilas (posições 6 e 8), um grupo acetato ou acetoxi na posição 7 e duas ligações duplas nas posições 1 e 4. Este grupo contém as daldininas C, E e F encontradas nos gêneros *Daldinia* e *Hypoxylon*. (Tabela 1.1).

TABELA 1.1 - Azafilonas do grupo A produzidas por ascomicetos da Família Xylariaceae.

Estruturas	Espécies	Referências
 <p data-bbox="367 716 486 750">Daldinia C</p>	<p data-bbox="638 492 798 582"><i>D. concentrica</i> <i>H. Fuscum</i> <i>H. rubiginosum</i></p>	<p data-bbox="981 492 1220 660">Hashimoto <i>et al</i>, 1994 Quang <i>et al</i>, 2004 Quang <i>et al</i>, 2006 Stadler <i>et al</i>, 2001 Osmanova <i>et al</i>, 2010</p>
 <p data-bbox="367 1030 486 1064">Daldinia E</p>	<p data-bbox="670 795 790 828"><i>H. fuscum</i></p>	<p data-bbox="981 795 1220 918">Quang <i>et al</i>, 2004 Quang <i>et al</i>, 2005 Quang <i>et al</i>, 2006 Osmanova <i>et al</i>, 2010</p>
 <p data-bbox="367 1344 486 1377">Daldinia E</p>	<p data-bbox="670 1131 790 1164"><i>H. fuscum</i></p>	<p data-bbox="981 1131 1220 1254">Quang <i>et al</i>, 2004 Quang <i>et al</i>, 2005 Quang <i>et al</i>, 2006 Osmanova <i>et al</i>, 2010</p>

Grupo B: Constituído pelas azafilonas que têm anel lactônico na sua estrutura. Neste grupo de azafilonas o esqueleto básico com o anel lactônico é nas posições 7 e 8, uma carbonila na posição 6, além de ligações duplas nas posições 1, 3 e 4a. Este grupo das azafilonas foi encontrado nos gêneros *Annulohypoxylon*, *Creosphaeria* e *Hypoxylon* da Família Xylariaceae (Figura 1.9).

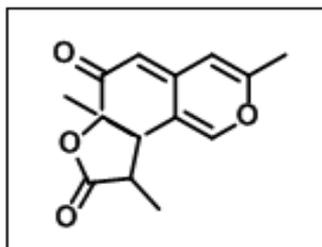


FIGURA 1.9-Esqueleto básico das azafilonas do grupo B da Família Xylariaceae

Grupo C: Neste grupo vamos ter o ácido orselínico ligado ao anel bicíclico central através de uma ligação éster. Em Xylarias, as azafilonas do grupo C vão ter uma carbonila na posição 8, junto de uma ligação éster a qual pode acontecer nos carbonos 6 ou 7, além de ligações duplas nas posições 1, 3 e 4a(5) ou 3 e 4a(8a). Estas azafilonas foram encontradas apenas no gênero *Hypoxylon*. (Figura 1.10).

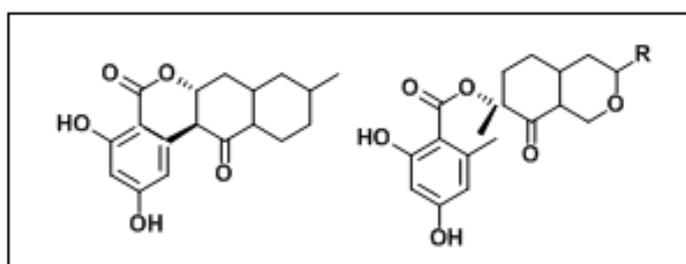
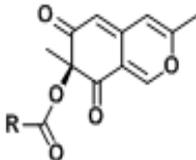
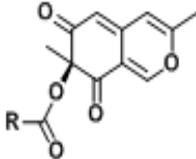
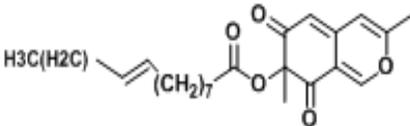
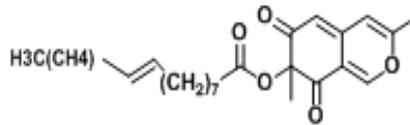


FIGURA 1.10: Esqueletos básicos das azafilonas do grupo C da Família Xylariaceae

Grupo D: Caracteriza-se por uma molécula de ácido graxo ligado ao anel bicíclico por uma ligação éster. Em Xylarias, este grupo apresenta carbonilas nas posições 6 e 8, com a ligação éster no carbono 7, assim como, ligações duplas nas posições 1, 3 e 4a(5) As azafilonas encontradas foram: cohaerina A-

B e rubuginosina C, característico do gênero *Hypoxylon* e as daldininas A1-3 e B1-2 na espécie *Daldinia concêntrica*. (Tabela 1.2).

TABELA 1.2 - Azafilonas do grupo D produzidas por ascomicetos da Família Xylariaceae.

Estruturas	Espécies	Referências
 <p data-bbox="416 745 544 808">R=(CH₂)₁₄CH₃ Daldinia A1</p>	<i>Daldinia concêntrica</i>	Osmanova et al, 2010
 <p data-bbox="416 1023 544 1086">R=(CH₂)₁₃CH₃ Daldinia E</p>	<i>Daldinia concêntrica</i>	Osmanova et al, 2010
 <p data-bbox="437 1290 600 1319">Daldinia A3, B3</p>	<i>Daldinia concêntrica</i>	Osmanova et al, 2010
 <p data-bbox="464 1491 600 1507">Daldinia A3, B4</p>	<i>Daldinia concêntrica</i>	Osmanova et al, 2010

Grupo E: Constituído por duas unidades de azafilonas. Nos membros da família Xylariaceae foram encontradas as azafilonas rutilinas A e B, no gênero *Hypoxylon*.

Esta classe de metabólitos secundários foi encontrada apenas em quatro gêneros da família Xylariaceae, sendo eles, *Annulohypoxylon*, *Creosphaeria*, *Daldinia* e *Hypoxylon*. Nas espécies do gênero *Daldinia* (*D. childiae*, *D. concentrica* e *D. cf loculata*) foram encontradas azafilonas dos grupos A e D. Já nas espécies *Annulohypoxylon cohaerens*, *A. deflectus* e *Creosphaeria sassafras* foram encontradas apenas azafilonas do grupo B. Por outro lado, o gênero *Hypoxylon*, por sua vez, foi o que apresentou maior diversidade em relação a esta classe de compostos com azafilonas classificadas em todos os cinco grupos variando entre mais de 20 espécies (*H. aucklandiae*, *H. carneum*, *H. cohaerens*, *H. crocopleum*, *H. dingleyae*, *H. fendleri*, *H. fragiforme*, *H. fuscopurpureum*, *H. fuscum*, *H. haematostroma*, *H. howeianum*, *H. julianii*, *H. laschii*, *H. multiforme*, entre outras. (Tabela 1.3).

TABELA 1.3 - Azafilonas do grupo E produzidas por ascomicetos da Família Xylariaceae.

Estruturas	Espécies	Referências
<p>Rutilina A</p> <p>Rutilina B</p>	<p><i>Hypoxylon rutilum</i></p>	<p>Quang <i>et al.</i>, 2005a; Quang <i>et al.</i>, 2006b; Quang <i>et al.</i>, 2006d; Osmanova <i>et al.</i>, 2010</p>

1.5.2 Derivados da Benzofenona

Estes metabólitos secundários foram encontrados somente no gênero *Daldinia*, o qual compreende 39 espécies de ascomicetos associados a angiospermas [Stadler *et al.*, 2001]. Os primeiros derivados de benzofenonas identificados na família Xylariaceae pertencem à espécie *Daldinia concentrica* coletado em Tokushima em 1993 (Hashimoto *et al.*, 1994b). (Figura 1.11).

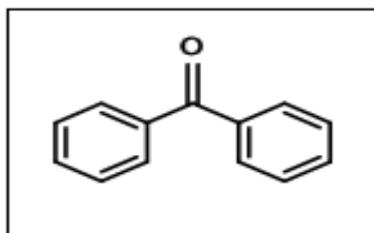


FIGURA 1.11- Esqueleto básico das benzofenonas

1.5.3 Citocalasinas

As citocalasinas possuem um grupo de metabólitos tóxicos que apresentam uma grande diversidade das atividades biológicas [Edwards & Whalley, 1989]. Foram inicialmente isolados e caracterizados por Aldrich e Turner na Indústria Química Imperial e, seguido de maneira independente, por Tamm em Zurech e, desde aquele momento, tem sido caracterizados e identificados como metabólitos de fungos (Edwards & Whalley, 1989^a).

As citocalasinas são identificadas quimicamente por apresentar o sistema isoindolinona altamente substituído, combinado em um anel macrocíclico com 11 ou 14 membros (Wagenaar *et al.*, 2000), (Figura 1.12).

As citocalasinas de maneira geral contém um grupo fenila na posição 10, e algumas moléculas com similitude tem grupos indólicos ou isopropílicos nesta posição (Dombrowski, *et al.* 1992). Sua variedade e abundância é por causa das substituições no C-3, sobre o anel peridroisoindoil-1-ona, e ao tamanho do anel macrocíclico [Feng *et al.*, 2002]. As citocalasinas são distribuídas entre muitos grupos de ascomicetos, incluindo a ordem Xylariales, mas não são encontrados em bactérias ou plantas .

A primeira citocalasina da espécie *Rosellia necatrix*, foi isolada em 1972 desde aquele momento, outras citocalasinas foram isoladas em membros da mesma família, [Albridge *et al.*, 1972] como nos gêneros, *Ascotricha*, *Daldinia*, *Engleromyces*, *Halorosellinia*, *Hypoxylon*, *Rosellinia* e *Xylaria*.

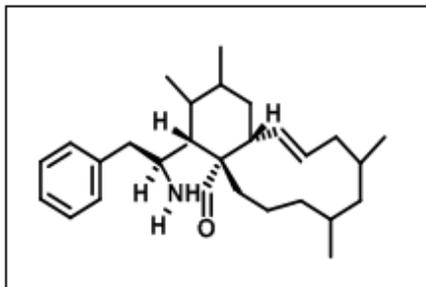


FIGURA 1.12- Esqueleto básico das (11) -citocalasinas da família
Xylariaceae

1.5.4 Cromonas

As cromonas são metabólitos importantes e notáveis biologicamente já que apresentam atividade inseticida e têm a capacidade de compreender um pequeno grupo de compostos fenólicos de ocorrência natural especialmente em plantas. [Harborner & Barter, 1993]. Esta classe de metabólitos possui um anel aromático fundido em um anel pirano heterocíclico de 6 membros.

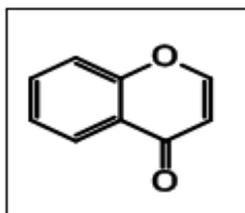


FIGURA 1.13- Esqueleto básico de Cromonas da Família
Xylariaceae

1.5.5 Isocumarinas

As isocumarinas possuem uma classe de compostos que na maioria das vezes são biologicamente ativas de ocorrência limitada em bactérias, fungos e líquens [Oliera, 2011]. A primeira isocumarina isolada foi a meleína da espécie *Aspergillus melleus* e, na atualidade está extensamente difundida na natureza [Thomson, 1993]. Na família *Xylariaceae*, esta substância foi relatada nos gêneros *Biscogniauxia*, *Hypoxylon*, *Nodulisporium* e *Xylaria*; porém alguns derivados também se encontram distribuídos nesta família, incluindo os gêneros: *Halorosellinia*, *Nummularia* e *Daldinia*. Nesta família, as isocumarinas encontram

distribuídas no gênero *Hypoxylon*, onde foi encontrada em 23 espécies, seguido do gênero *Xylaria* (*X. hypoxylon*, *X. longiana*, *X. polymorpha*, *X. mellisii* e de outras espécies não identificadas).

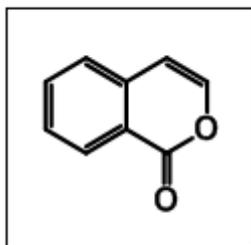


FIGURA 1.14- Esqueleto básico de Isocumarina da família Xylariaceae

1.5.6 Lactonas

Dentro da família Xylariaceae encontra-se uma ampla variedade de lactonas: lactonas macrocíclicas, sendo estas últimas, comparativamente, raras em estudos químicos e podendo ser evidenciadas no micélio subterrâneo de fungos superiores que crescem em meio natural (Thomson, 1993). Já no gênero *Xylaria*, as lactonas estão amplamente distribuídas, encontradas nas espécies: *X. globosa*, *X. hypoxylon*, *X. longiana*, *X. multiplex*, *X. obovata*, *X. polymorpha* e *Xylaria* sp.

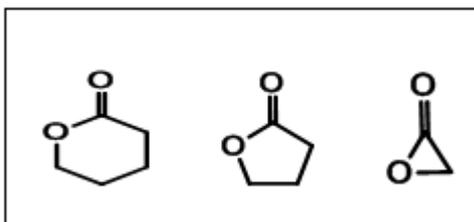


FIGURA 1.15- Exemplos de Lactonas da família Xylariaceae

1.5.7 Derivados do naftaleno

Os gêneros da família Xylariaceae que apresentaram compostos derivados do naftaleno são *Annulohypoxylon*, *Daldinia*, *Hypoxylon*, *Nemania*, *Nodulisporium* e *Xylaria*. Dentre as espécies do gênero *Xylaria*, somente na espécie *Xylaria mellisii* foi encontrado derivado naftaleno (1-O-glucopiranosídeo). □

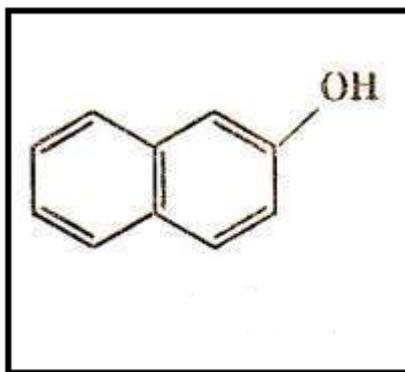


FIGURA 1.16- Exemplo do Naftaleno da família Xylariaceae

1.5.8 Quinonas

As quinonas estão formadas por dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas C-C [Simões *et al.*, 2007]. Nas espécies da família Xylariaceae esses compostos foram encontrados nos gêneros *Daldinia*, *Halorosellinia*, *Hypoxylon*, *Nodulisporium* e *Xylaria*. As quinonas com esqueleto do tipo benzoquinona apresentaram seus grupos carbonílicos nas posições 1 e 4 e foram relatadas nas espécies *D. concentrica*, *N. hinnuleum* e *Xylaria sp.*, destacando a quinona clorada relatada nesta última.

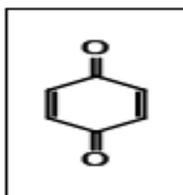


FIGURA 1.17- Esqueleto básico das Quinonas da família Xylariaceae

1.5.9 Terpenos

Os terpenos são identificados por ser a mais ampla e diversa classe de produtos naturais [Thomson, 1993]. Estes metabólitos são comuns em muitas plantas e fungos, porém são raramente encontrados em bactérias [Seigler, 1998]. Eles são derivados de cinco carbonos e são conhecidos como isoprenóides [Harborner & Barter, 1993]. Na família Xylariaceae encontramos sesterterpenos nos gêneros *Ascotricha*, *Daldinia*, *Halorosellinia*, *Hypoxylon*, *Nodulisporium*, *Poronia*, *Virgaria* e *Xylaria*.

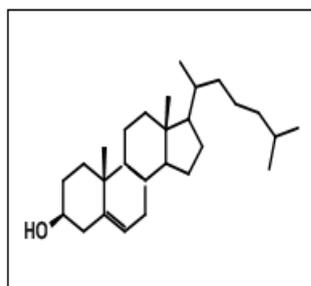


FIGURA 1.18- Exemplo de terpeno da Família Xylareaceae

No gênero *Xylaria*, na espécie *Xylaria persicaria*, bem como em outras espécies deste gênero, os sesquiterpenos apresentaram seu esqueleto básico bicíclico do tipo eremofilano com um grupo carboxilato na posição 1, duas metilas nas posições 14 e 15 e um grupo carbonílico na posição 8. Dentre eles, o ácido intégrico, isolado de uma espécie não identificada do gênero *Xylaria*, o qual tem atividade inibitória contra a enzima integrase, responsável pela replicação viral do vírus HVI-1, agente causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) [Singh *et al.*, 1999].

1.5.10 Classe das Griseofulvinas

A Griseofulvina foi originalmente isolado de *Penicillium griseofulvum* por Oxford e colaboradores em 1939 (Figura 4.11). O produto natural griseofulvina, (2S, 6'R) -7-cloro-4,6-dimetoxibenzofuran-3-ona-2-espiro-1'- (2'- metoxi-6'-metilciclo-hex-2'-en-4'-ona), foi identificado no início da década de 1950 e foi o primeiro produto natural antifúngico isolado a partir de fungos filamentosos (Petersen, *et al.*, 2014). Griseofulvinas são produzidas por *P. griseofulvum* *Penicillium* incluindo *P. janczewski*, *P. nigrum* and *P. patulum* (DEWICK, *et al.*, 2009). A Griseofulvina constitui um antifúngico tópico, com um amplo espectro frente ao fungus causadores de micoses superficiais em animais e seres humanos. Seu mecanismo de ação é exercido destruindo totalmente o aparato mitótico da célula fúngica, portanto inibe a produção das proteínas influentes na divisão celular (PANDA, *et al.*, 2015).

Além da ação antifúngica, recentes estudos mostram que as griseofulvinas e diferentes análogos das mesmas foram identificados como inibidores do agrupamento centrosomático em um ensaio recentemente desenvolvido. O agrupamento centrosomático é um evento celular importante que permite a mitosis bipolar para linhas celulares de câncer que abrigam centrosomas supernumerários, por tanto possuem bioatividade anti- cancerígeno. (Ronnest *et al.*, 2009).

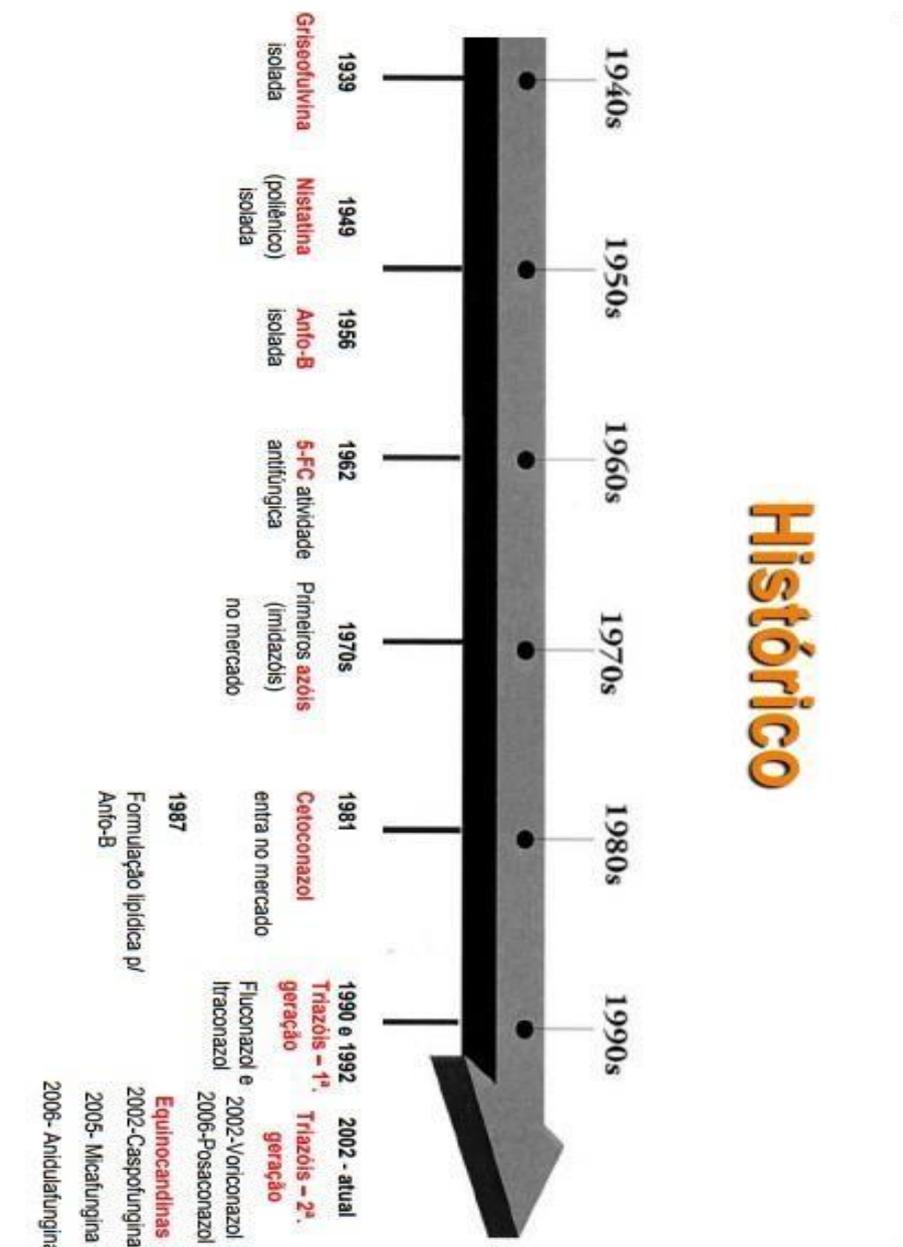


FIGURA: 1.19- Representação do isolamento de griseofulvina de 1939-1990.

Fonte: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3622622/mod_resource/content/1/Antif%C3%BAngicos.pdf

1.6 A Importância da atividade biológica dos constituintes químicos

Estudos comprovam que os fungos endofíticos isolados de plantas produzem e acumulam compostos fisiologicamente ativos reconhecidos como metabólitos secundários como são os alcalóides, compostos fenólicos, glicosídeos, terpenóides, saponinas, estas últimas se caracterizam por ter atividade antibacteriana, como sedante, anticancerígena, entre outras (Lovkova et al., 2001). A avaliação biológica desses metabólitos secundários identificados e caracterizados a partir dos fungos, isolados de plantas, é de grande importância já que as drogas naturais possuem uma variedade molecular superior daquelas derivadas de produtos sintéticos, proporcionando por tanto a diminuição eminente de microrganismos resistentes.

A utilização de metabólitos de endofíticos é de um alto valor já que permitem a produção de compostos essenciais na indústria, que favorecem a diminuição de pessoas afetadas por diferentes doenças. Exemplo destes compostos com uma imensa e notável importância é o diterpenóide taxol isolado do fungo *Taxomyces andreanae*, (o qual é extraído de espécies vegetais do gênero *Taxus*) e o mesmo constitui um complexo antitumoral com atividade citotóxica, utilizado principalmente para o tratamento do câncer de mama, pulmão e ovário. (Specian et al, 2014).

Na medicina, os fungos recebem muita atenção a partir do desenvolvimento de alguns antibióticos, destacando-se a penicilina sintetizada a partir dos metabólitos do fungo *Penicillium chrysogenum*, como também é o caso do ácido micofenólico, ativo contra bactérias Gram-positivas e são produzidos por várias espécies do gênero *Penicillium*. Os esteroides e hormônios para crescimento vegetal são oriundos também de metabólitos desses organismos. Um dos exemplos mais importantes na medicina é a administração de ciclosporina em pessoas submetidas a transplantes e esta substância foi isolada a partir de fungos de solo (*Tolyposcladium inflatum* e *Cylindrocarpon lucidum*) na década de 70. As enzimas fúngicas também vêm sendo investigadas na indústria alimentícia e em outros processos biotecnológicos envolvidos na produção de sucos de frutas e também na indústria papelreira. É importante destacar que a partir de certas espécies de fungos é possível sintetizar substâncias inseticidas que previnem diferentes tipos de pragas.

Nas últimas décadas os fungos vêm sendo estudado quanto sua aplicação para recuperação de ambientes degradados por poluentes químicos.

Na agricultura, os compostos antifungicidas são extremamente conhecidos por evitar maiores prejuízos econômicos, causados pela presença de fungos, mostrando-se como exemplo a triagem de extratos antifúngicos para evitar o crestamento gomoso causado pelo fungo *Didymella bryoniae*, como é também no Japão a triagem de isolados fúngicos para o combate de infecções da fruta pera pelo fitopatógeno *Alternaria*. Dentro do gênero *Aspergillus* indicam-se sete dictopirazines (24 a 30), substâncias que apresentam atividade inibitória do crescimento de *S. aureus* e *M. luteus*.

A relação aspectos químicos e propriedades biológicas dos metabólitos fúngicos têm conduzido numerosos resultados, fomentado, portanto a pesquisa, tanto nacional como internacionalmente, e permite com ele fortalecer e ampliar os conhecimentos já obtidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Isolar e identificar fungos endofíticos das raízes de *H. superba* e realizar o estudo químico das substâncias isoladas e identificadas.

2.1 Objetivos específicos

Para alcançar os objetivos gerais mencionados, os objetivos específicos serão:

- Coletar as raízes de *H. superba* com o Prof. Dr. José Rubens Pirani e Maria Fátima das Graças da Silva.
- Isolar e identificar fungos endofíticos das raízes de *H. superba*.
- Avaliar o efeito de diferentes meios de cultivo na produção de metabólitos pelo fungo.
- Definido o meio de cultura ideal, desenvolver o fungo em larga escala para o isolamento e identificação dos constituintes químicos.
- Avaliar a atividade biológica dos constituintes químicos identificados.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3. Parte experimental

A parte experimental foi desenvolvida no Laboratório de Produtos Naturais dentro de Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.1 Solventes

- Solventes Grau HPLC: (Merck, Tedia, HoneyWell, J. T. Baker, Panreac).
- Solventes Deuterados para RMN:METHANOL D4 (Merck e Aldrich)
- Água ultrapura - Ultra purificador de Água Master System MS2000 (Gehaka)

3.2 Materiais utilizados para identificação, cultivo e conservação do micro-organismo

- INLAB Tipo, porosidade 3,0 μm
- Álcool 70%
- Água destilada
- Alça de platina
- Alça de Drigalski
- Lâminas de bisturi
- Pinça;
- Funil analítico;
- Placas de Petri;
- Erlemney

3.3 Meios de Cultivo

- Czapeck (Himedia®)

- Batata Dextrose (Himedia®)
- Extrato de malte (Himedia®)
- Ágar (Himedia®)

3.4 Equipamentos

3.4.1 Evaporadores rotativos

-BUCHI, rota evaporador R-114 equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C.

-BUCHI, rota evaporador R-200 equipado com banho BUCHI B-490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C.

3.4.2 Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC)

-Agilent Technologies modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, Amostrador automático G1329A, e detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (VWD) G1314B, forno de coluna G1316A. Software: EZCromElite.

-Cromatográfico líquido de alta eficiência 1260 – Agilent Technologie, no modo reverso de eluição, cujo princípio da retenção baseia-se na hidrofobia e na interação entre a parte não polar do soluto e a fase estacionária (CASS, et al., 2009). Para a análise utilizou-se uma com coluna C18- zorbax eclipse e XDB-analytical 4.6 X 150 mm 5 microm

3.4.3 Espectrômetro de Massas

-API (Applied Biosystems) 2000 com analisador —tríplo quadrupolol, fonte de ionização por elétron-spray (ESI).

- Espectrômetro de massas Autoflex Speed - MALDI-TOF, Bruker.

3.4.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

-Bruker DRX - 9,4 T (400 MHz para RMN 1H), equipado com trocador automático de amostra, sonda de 5 mm BFO (smart probe com ATMA®).

-Brucker Avance III - 14,1 T (600 MHz para RMN ^1H), equipado com trocador automático de amostra, cryo-sonda TCI ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) de 5 mm com (Automatic Tuning Matching) sonda BBI de 5 mm.

3.4.5 Balança

Balança Analítica - Sartorius modelo BP 210S

3.4.6 Câmara de Fluxo Laminar

Veco VL FS-12M

3.4.7 Autoclaves Verticais

-Phoenix AV 30

-Phoenix AV 50

-Phoenix AV 75

3.4.8 Estufa Incubadora (B.O.D.)

Fanem – 347 CD

3.4.9 Banho de Ultra-som:

Branson 1510, Danburcy, CT

3.5 Procedimentos experimental

3.5.1 Coleta do Material Vegetal

As raízes de *H. superba* foram coletadas em Minas Gerais pela professora Maria Fátima das Graças da Silva.

3.5.2 Isolamento do (s) fungo (s) das raízes de *H. superba*

Para desinfecção superficial e retirada de possível microrganismos epifíticos das amostras coletadas, as raízes foram previamente lavadas com água destilada e detergente. Em seguida, já em capela de fluxo laminar, estas foram esterilizada por 30 minutos sob radiação ultravioleta, e em seguida colocadas em sequência de esterilização superficial das raízes com a finalidade de eliminar qualquer agente contaminante. As raízes seguidamente

foram mergulhadas sequencialmente em etanol 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 5% por 2 minutos, etanol 70% por um minuto, água destilada previamente autoclavada por dois minutos, a fim de remover resíduos dos agentes esterilizantes, e novamente água destilada estéril a fim de remover todos os possíveis vestígios dos agentes esterilizantes.

Após esse procedimento as raízes foram colocadas sobre papel de filtro com a finalidade de remover todo o excesso de líquidos existentes no processo de esterilização. Com a utilização de um bisturi previamente autoclavado foi retirado quatro pequenos pedaços das raízes de 1,5 cm aproximadamente e colocados em placas de Petri contendo meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA), colocadas para incubar a $28^{\circ}\text{C} \pm 2$, durante 15 dias, e uma vez crescido o micélio do fungo foram realizados repiques sucessivos até obter o microrganismo completamente puro. Estes repiques se realizaram em meio BDA com presença do antibiótico cloranfenicol para evitar o crescimento bacteriano.

Para preservação do fungo endofítico obtido, discos de meios de cultura de 5mm de diâmetro do isolado foi mantido submerso em 10 ml de água destilada estéril em frascos lacrados à temperatura ambiente e em duplicata (Castelani, 1967). O mesmo fungo também foi preservado em glicerol 30% a -80°C e incluídos na coleção de fungos da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR).

3.5.3 Identificação do Fungo

São diversos os métodos para a identificação de microrganismos, como são as técnicas de identificação fenotípica, podendo ser através na determinação do cor das colônias, textura, presença de septos, a produção de esporas (Whitman *et al.*, 2012). Também se utiliza muito o uso de provas bioquímicas determinando a atividade metabólica duma cepa indicando qualitativamente a presença ou ausência de sistema enzimáticos (Truu *et al.*, 1999). Afortunadamente existe hoje em dia a disponibilidade de técnicas moleculares para complementar os estudos taxonômicos de fungos, o qual é uma ferramenta na identificação de fungos endofíticos, ainda na ausência de esporas. (Huang *et al.*, 2009).

É de grande importância dentro as técnicas de identificação o método conhecido como MALDI-TOF (Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight), técnica de Espectrometria de Massas. (CROXATTO *et al.*, 2012).

Para a identificação do fungo foi realizado o análise no Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Química, na UFSCAR, através da técnica de MALDI-TOF. O processo foi desenvolvido utilizando um concentrado do cultivo puro do fungo, o qual foi colocado em uma placa com matriz polimérica. Posteriormente a amostra foi irradiada com um laser que tem como função vaporizar a amostra junto com a ionização de várias moléculas, as quais são absorvidas num tubo de vácuo e levadas a um detector: a chegada da molécula ao detector (*time of flight*) vai depender do tipo de molécula. Foi obtido um gráfico com vários sinais, o qual vai corresponder a um tipo de fungo específico, e esses é comparado com a base de dados correspondentes para identificação do mesmo.

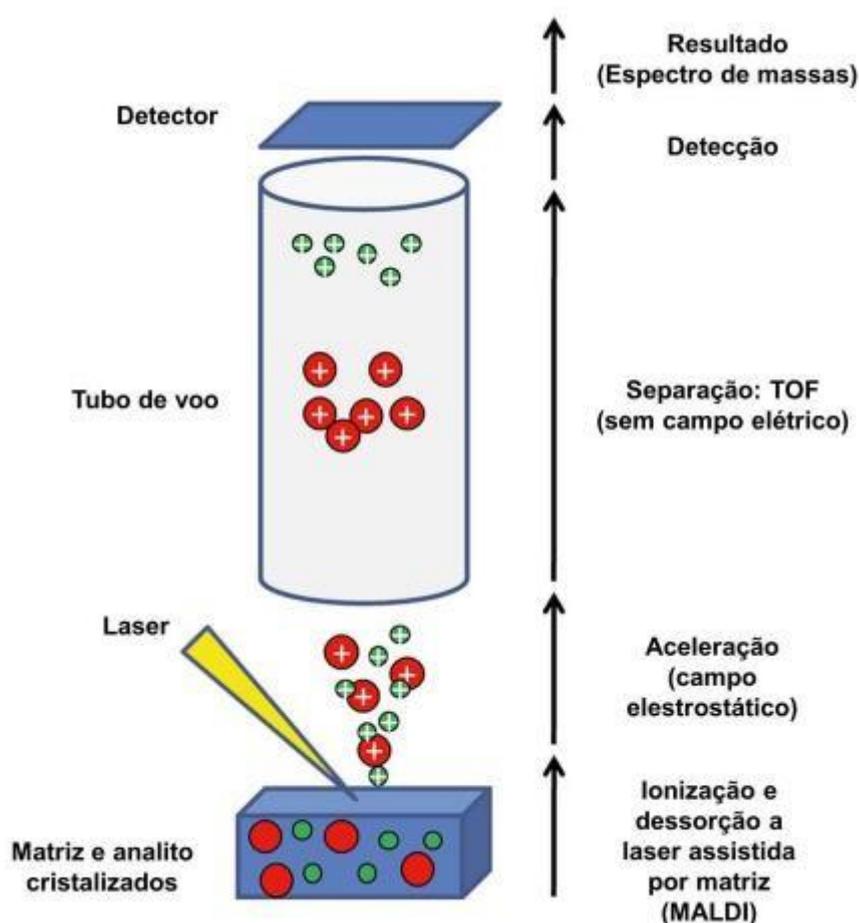


FIGURA 3.1- Representação esquemática do funcionamento da técnica de MALDI-TOF MS. (Adaptado de CROXATTO *et al.*, 2012).

3.5.4 Cultivo do fungo em diferentes Meios de Cultura

Um dos principais fatores no crescimento de todo tipo de microrganismos é o carbono presente no lugar determinado com o propósito de sobrevivência, visualizando o comportamento nutricional dos fungos os quais cumprem distintas funções no ecossistema e de igual forma dependendo do substrato onde eles se encontram, portanto para o crescimento favorável do fungo é necessário utilizar diferentes meios de cultivo, fornecendo as condições físicas, químicas e nutricionais adequadas para que elas possam se multiplicar de maneira controlada. Em geral, podemos distinguir culturas líquidas e sólidas dependendo das características do meio e culturas descontínuas e contínuas, dependendo da disponibilidade de nutrientes no meio ambiente.

Os meios habituais utilizados para recuperar os fungos são o BDA, Sabouraud, extrato de Malte (TABELA 3.1) e, menos frequentemente, o caldo de coração do cérebro. Para evitar a contaminação do meio com bactérias, o cloranfenicol é utilizado, mas impede o crescimento de Actinomyces. Para reduzir a contaminação ambiental das placas de cultura de fungos, utiliza-se cicloheximida, mas reduz a recuperação de muitos fungos oportunistas, incluindo *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* neoformans e *Mucorales*. Portanto, se a cicloheximida for usada, uma placa sem ela deve ser incluída em paralelo.

TABELA 3.1- Constituintes dos Meios de Cultivo:

Meio MALTA	Meio Czapeck	Meio BDA
Extrato de Malta 20/L	Nitrato de Sódio 2g/L	Ágar-ágar 15 g/L
Sulfato de Estreptomicina 0,02 %	Cloruro de Pótasio 0,5 g/L	Dextrosa 20 g/L
Ágar 20 g/L	Sulfato de Magnésio 0,5 g/L	Infusão de Batata 4 g/L
pH: 5,4	Sulfato de Ferro Heptahidratado 0,01 g/L	Água Destilada 1L
	Sacarosa 30 g/L	
	Ágar-ágar 15 g	

3.5.4.1 Meios sólidos

O fungo foi cultivado em meio sólido de BDA, MALTA e Czapeck's, este último enriquecido com extrato de levedura autoclavados previamente. Em cada meio colocou-se discos do isolado de aproximadamente 5mm cada um, de maneira asséptica, e em seguida as placas Petri foram deixadas sob temperaturas de 28°C, durante 15 dias, (Figura 3.2). Para o branco, foi vertido apenas o meio de cultura e Ágar, sem adição do fungo.

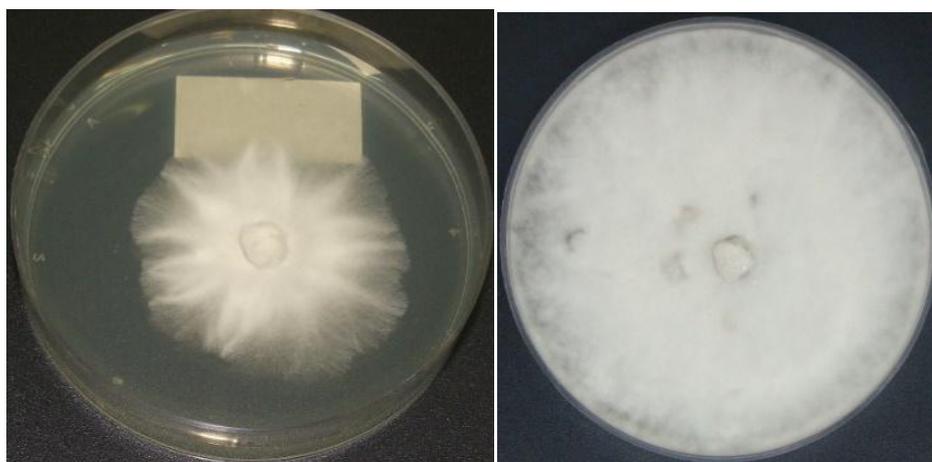


FIGURA 3.2- Meios com 2 e 10 dias de crescimento respectivamente.

3.5.4.2 Meios Líquidos

Paralelamente ao crescimento do fungo em meio sólido, foi realizado o mesmo experimento para meio líquido utilizando os meios Batata-dextrose (BD) e Malta. Para isso, quatro discos de 5 mm de diâmetro da colônia foram transferidos assepticamente para 3 erlenmeyers de 500 mL, contendo 250 mL de água destilada e os meios de cultura BD e Malta pesados separadamente (Figura 3.3). Para o controle, foi vertido apenas o meio de cultura sem ágar, sem adição do fungo. Todos os meios de cultivo corretamente pesados e misturados à água, foram previamente autoclavados antes da transferência dos discos do fungo aos erlenmeyers.



FIGURA 3.3- Meios líquidos com fungos inoculados aos 10 dias.

3.5.5 Extração de Metabólitos Fúngicos.

3.5.5.1 Extração dos metabólitos fúngicos a partir dos meios de cultura líquidos

Para todos os experimentos com meios líquidos foram realizados o mesmo procedimento detalhado a seguir. Finalizado o período de incubação, ao meio contendo o fungo endofítico em fase desenvolvida de crescimento foi adicionado metanol para matar o fungo, e deixado por 30 minutos para que o processo fosse concluído. Uma vez feito este procedimento o meio contendo o fungo já morto, bem como o frasco contendo o controle, foi realizada a separação do micélio da parte líquida, através da filtração a vácuo, utilizando-se papel de filtro. Ao micélio (de cada Erlenmeyer) foram adicionados 300 mL de EtOH absoluto, triturando-o a seguir. Após 24 horas, este foi filtrado e adicionado mais 200 mL de EtOH à massa micelial, filtrando-o novamente após 24 horas. O filtrado etanólico foi concentrado em rotaevaporador, levando ao extrato micelial para cada fungo. O meio líquido fermentado (filtrado de cada endófito) foi particionado com AcOEt e posteriormente n - butanol, na proporção de 1:1, por 3 vezes, o qual produziu o extrato da partição líquido-líquido. Os solventes orgânicos foram evaporados em rotaevaporadores, fornecendo os extratos de Acetato de Etila, n-Butanólico e Hidroalcolico e seus respectivos controles.

3.5.5.2 Extração dos metabólitos fúngicos a partir do meio de cultura sólido

Finalizado o período de incubação, em capela de fluxo laminar, foi adicionado 300 mL de EtOH absoluto aos frascos contendo o meio de cultura. Foi triturado completamente todo o conteúdo dos Erlenmeyers e após 24 horas de extração, filtrados a pressão reduzida. O filtrado etanólico foi reservado e adicionado novamente EtOH à massa micelial, um volume de 200mL. Depois de 24 horas, foi reservado o conteúdo, reunindo o filtrado aquele reservado anteriormente. Ao micélio, foi adicionado 200 mL de AcOEt, realizando-se a extração também em 24 horas e em seguida a filtração. Ambos os filtrados foram rotaevaporados, gerando o extrato etanólico e de acetato de etila.

3.5.6 HPLC: Cromatografia Líquida de alta Eficiência

Visando à produção de metabólitos secundários produzidos pelo fungo pertencente à família Xylariaceae em meios sólido e líquido, selecionou-se diferentes meios de cultura diferentes, BDA, BDL, Malta (sólido e líquido). Para a confirmação que os metabólitos encontrados em cada meio eram produzidos pelo fungo e não pelo meio de cultivo, foi feito um comparativo entre os extratos obtidos e seus respectivos controles. As análises foram feitas comparando-se sinais nos espectros de RMN e o perfil cromatográfico do tempo de retenção de cada banda de absorção de UV obtidos via HPLC-UV, utilizando um cromatográfico líquido de alta eficiência 1260 – Agilent Technologie, no modo reverso de eluição, cujo princípio da retenção baseia-se na hidrofobia e na interação entre a parte não polar do soluto e a fase estacionária (CASS, et al., 2009). Para a análise utilizou-se uma coluna C18- zorbax eclipse e XDB- analytical 4.6 X 150 mm 5 microm e fase móvel uma mistura de água (A) e Aceto nitrila (B), acidificado com 0.1% de ácido fórmico e fluxo de 1ml/min. O volume de injeção dos extratos foi de 30µl e concentração de 1mg/ml e detector UV foi com um comprimento de onda de 254 nm. Utilizou-se o sistema de eluição (Tabela 3.2).

TABELA 3.2- Sistema de eluição do HPLC

Tempo	Agua + 1% Ac. Fórmico	ACN + 1% Ac. Fórmico
0	95%	5%
5	95%	15%
15	85%	25%
20	65%	35%
30	65%	35%
35	0%	100%
40	95%	5%
50	95%	5%

3.5.7 Crescimento do Fungo em larga escala para o estudo químico

O fungo isolado foi cultivado em meio líquido no meio Malta em escala ampliada, o qual demonstrou ser mais efetivo para o crescimento dos microrganismos e em consequência para uma melhor produção de constituintes químicos, favorecendo-se a obtenção do extrato. O cultivo foi feito em Erlenmeyers de 1000 ml e 2000 ml, os quais foram previamente esterilizados em autoclave a 120°C, sob pressão de 1 atm. por aproximadamente 20 minutos com o meio de cultura. Em seguida foram adicionados aos frascos com o meio 5 discos de 5 mm de diâmetro das extremidades da colônia. A escolha da retirada do disco da extremidade foi baseada na atividade que esta zona apresenta quando comparada com as zonas mais ao centro (antigas), isso se deve ao fato do crescimento das hifas ocorrerem apenas nas extremidades, podendo as zonas mais antigas estar livres do conteúdo citoplasmático. Esse material permaneceu estático, sob temperatura controlada de 25°C. Após o período de crescimento (25 dias) foi realizada a extração do fungo. (Figura 3.4).

Foi obtido um total de 6 extratos, sendo eles: Extrato Acetato de Etila (AE): + Branco AE, Extrato Butanólico (BU): + Branco BU, Extrato Hidroalcolico (HOH):+ Branco, (HOH). Para cada extrato se obteve uma concentração específica.

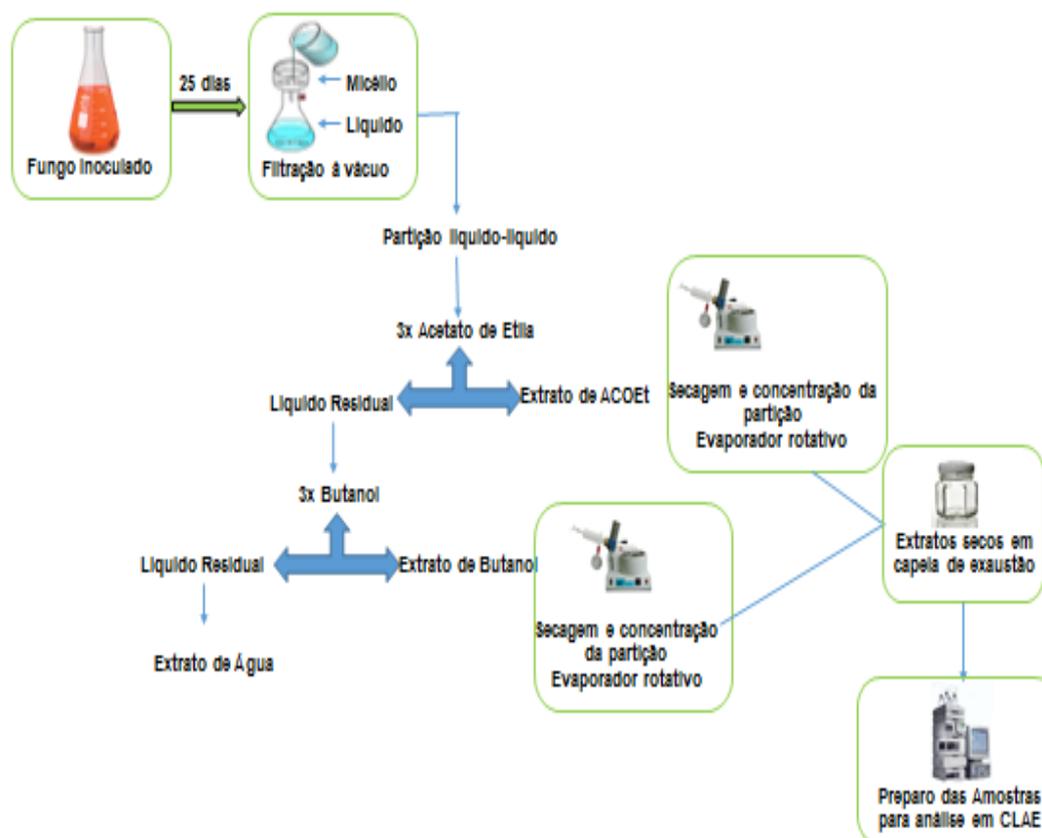


FIGURA 3.4- Diagrama da extração do fungo inoculado.

3.5.8 Separação do Extrato Bruto

Para a separação das misturas do extrato foi utilizado o extrato de acetato de etila do meio, o qual levou a uma maior massa. Primeiro foi feita a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), cuja técnica analítica permite determinar e, muitas vezes separar, compostos de diferentes polaridades. Este procedimento foi feito em sílica comum, a qual constitui a fase estacionária, onde é aplicada a amostra e em seguida utilizado uma mistura de solventes (Tabela 3.3), (chamada de fase móvel), até conseguir uma boa partição do extrato bruto.

TABELA 3.3 - Mistura de solventes

Tempo	Hexano	Acetato	Metanol
1	100%	-	-
2	90%	10%	-
3	85%	15%	-
4	80%	20%	-
5	70%	30%	-
6	50%	50%	-
7	40%	60%	-
8	30%	70%	-
9	20%	80%	10%
10	-	100%	20%
11	-	90%	
12	-	80%	

3.5.9 Análise da amostra obtida com 80% ACOEt e 20%Hexano.

Realizou-se outro perfil cromatográfico, de gradiente exploratório no Cromatógrafo Líquido 1260 Agilent Technologies, no modo reverso de eluição, para conseguir separar os compostos do fungo e utilizando o mesmo comprimento de onda (254 nm). O sistema de eluição para o HPLC, foi: água(A) e acetonitrila (B) com 1% de ácido fórmico em cada um (Tabela 3.4), obtendo ao final o cromatograma da Figura 4.11.

TABELA 3.4 - Sistema de eluição para a análise em HPLC

Tempo	Água + 1% Ac. Fórmico	ACN + 1% Ac. Fórmico
0	70%	30%
10	70%	30%
20		100%
25		100%
30	70%	30%
35	70%	30%

4. Resultados e Discussões

4.1 IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO

Devido á dificuldade de esporular deste fungo como limitante comum da maior parte dos fungos endofítico, e a ausência de septos, foi possível identificar só até Família, concluindo que pertence á Família Xylareaceae. Importante destacar que a presença das dois únicas sinais no espectro é característico da Família descrita anteriormente : Xylareaceae.

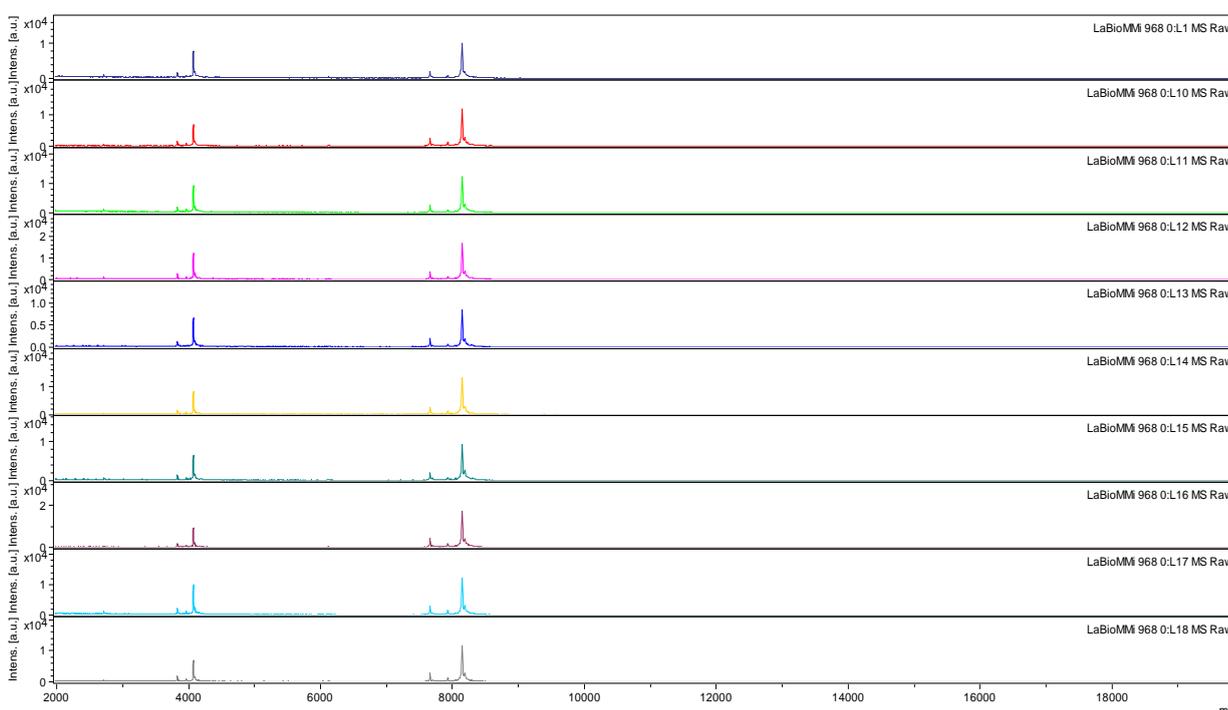


FIGURA 4.1: Espectro de Massa pela da técnica de MALDI-TOF MS.

4.2 Análises do Meio de cultivo Batata Dextrose (BD).

4.2.1 Meio Líquido

O meio líquido BD é conhecido por sua composição bem definida e é normalmente utilizado para o isolamento e o crescimento de uma vasta gama de fungos em laboratórios. É feito basicamente de nutrientes proveniente da batata (carboidratos) e açúcar simples (dextrose), permitindo assim fornecer ao fungo uma fonte de carbono. Observa-se na Figura 4.2, o crescimento do fungo, ainda desconhecido o qual levou a um perfil químico pouco significativo. Com intensidades foram observadas relevantes 7 picos com diferentes absorvâncias e tempos de retenção (TR) variados, sugerindo uma polaridade de média à alta para os metabolitos produzidos pelo fungo e a ocorrência de uma diversidade metabólica para este fungo, (Figura 4.2).

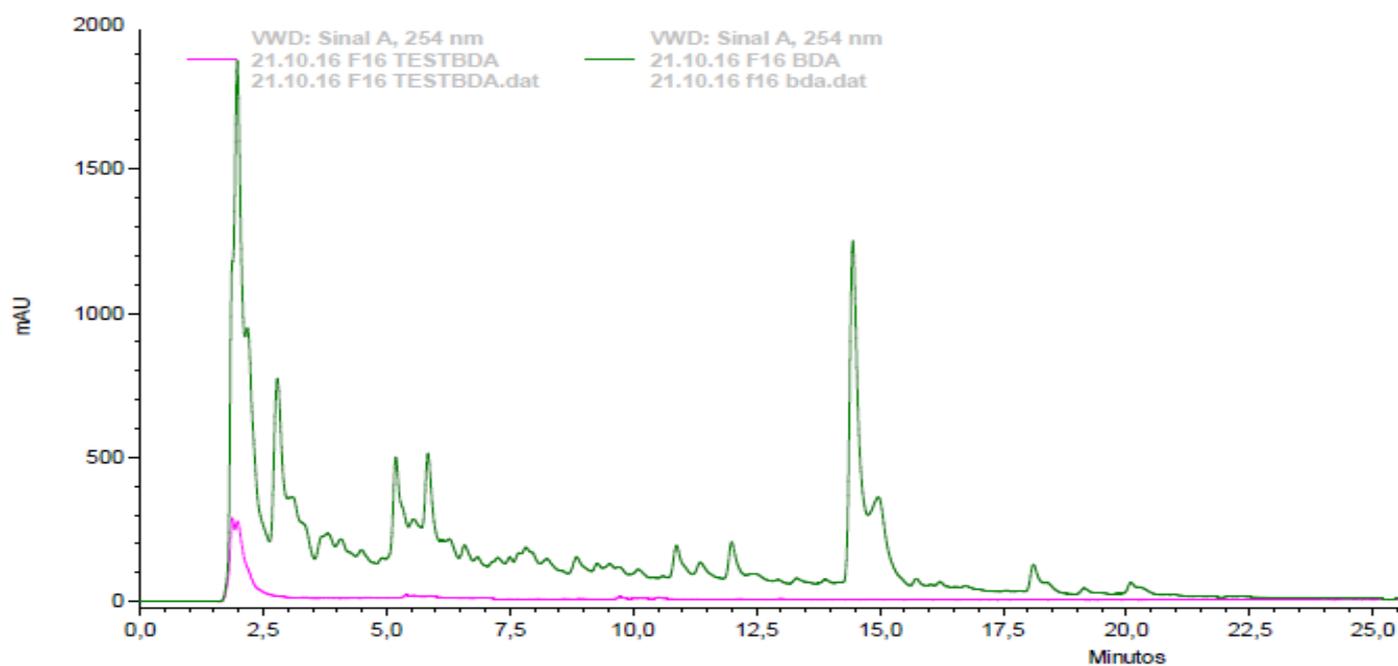


FIGURA 4.2-Cromatograma do fungo. Linha verde: fungo. Linha cor rosa: controle do meio. Condições cromatográficas: 254 nm, 1ml/min.Amostra 1g/ml em H₂O:ACN (90:10).

O espectro de RMN ¹H (Figura 4.3) dos extratos de BD mostrou um perfil químico do mesmo, a pesar do que no cromatograma do HPLC mostrar a presença de diferentes bandas com diferentes tempos de retenção.

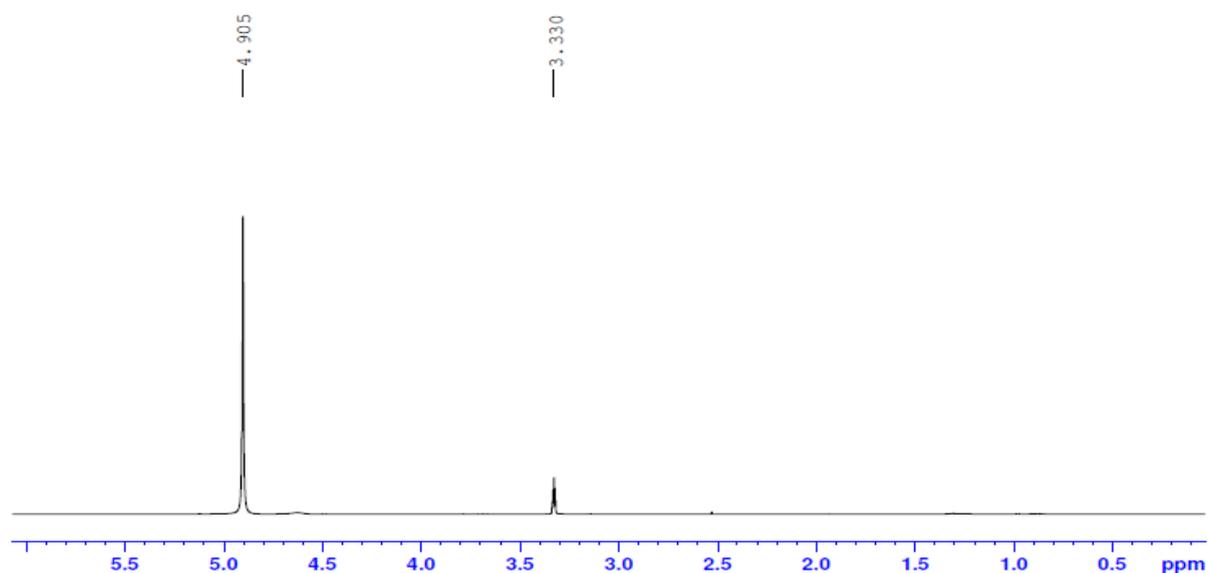


FIGURA 4.3- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD-d4) do meio líquido de BDA .

4.2.2 Meio Sólido

Os meios sólidos foram preparados da mesma maneira que os meio líquidos, porém com a adição de Ágar (Ag). O Ágar é constituído por um carboidrato complexo extraído de algas marinhas que se solidifica em temperaturas abaixo de 45°C , ou seja, ingrediente responsável pelo aspecto sólido do meio. Observa-se, que não houve um crescimento muito significativo do fungo neste meio, já que se observou um micélio muito pequeno, mostrando como informação que não aconteceu um bom esporulamento do fungo. O cromatograma em gradiente exploratório (Figura 4.4), da sobreposição do extrato bruto em BDA e o controle após o processo de micro extração, apresentou um possível perfil químico melhor que aqueles crescidos em meio líquido. O RMN ^1H 400MHz para o extrato fúngicos em meio sólido mostrou um perfil químico bem melhor que aquele obtido em (Figura 4.5).

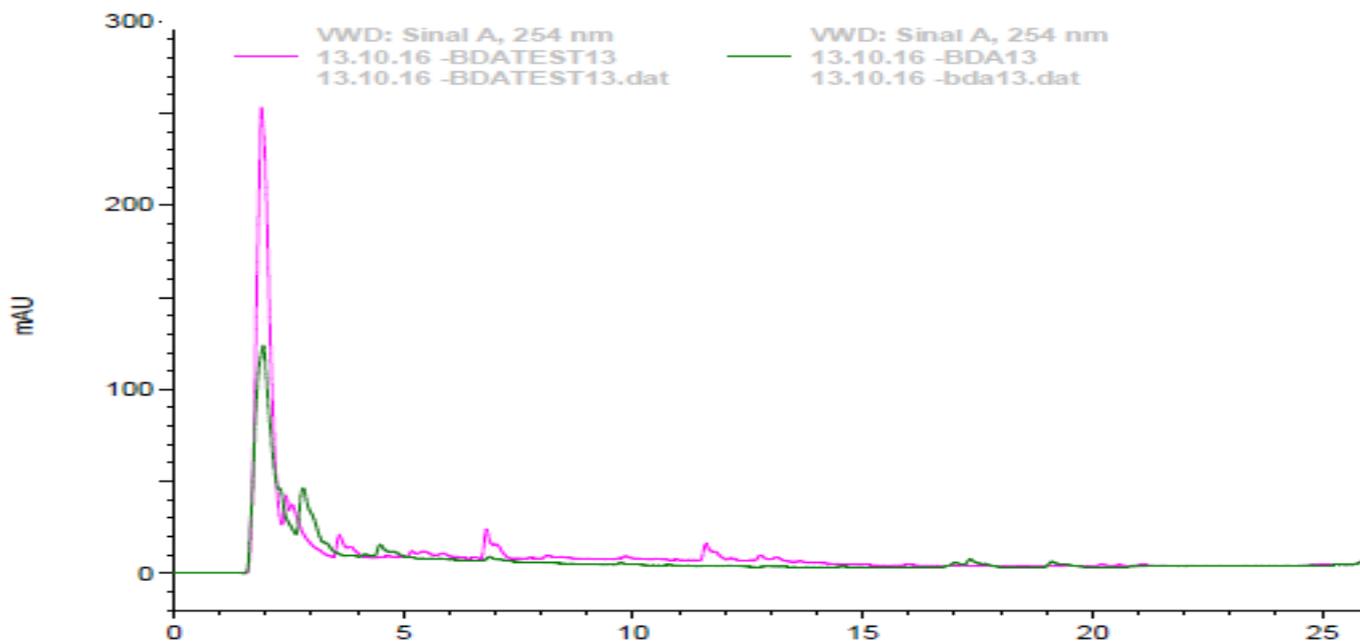


FIGURA 4.4-Cromatograma do fungo. Linha verde: fungo. Linha cor rosa: controle do meio. Cromatograma do fungo. Linha verde: fungo. Linha cor rosa: controle do meio. Condições cromatográficas: 254 nm, 1ml/min.Amostra 1g/ml em H₂O:ACN (90:10).

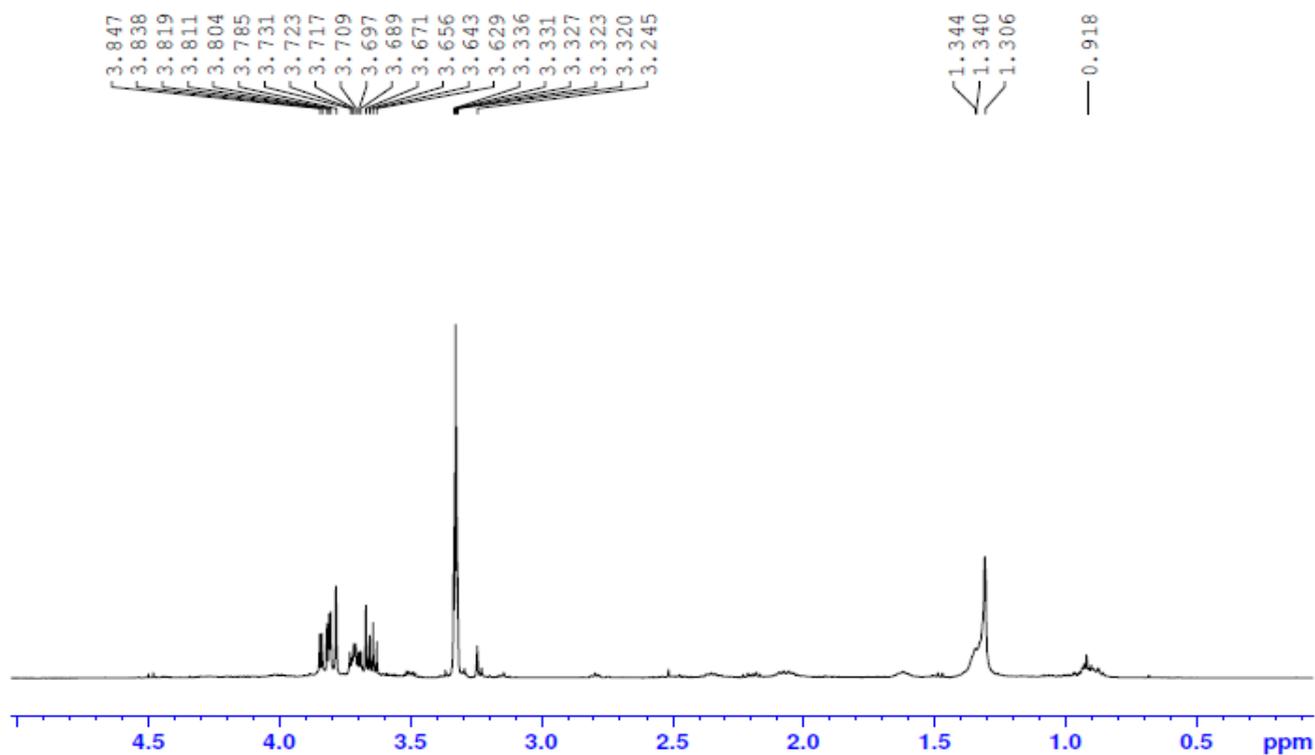


FIGURA 4.5- Espectro de RMN ¹H (400 MHz, MeOD-d₄) do meio sólido de BDA.

4.3 Análises do Meio de cultivo MALTE.

4.3.1 Meio Líquido

A parte líquida do meio MALTE é complexa, cuja composição é rica em carboidratos, peptonas e substâncias nitrogenadas, fornecendo ao fungo fontes de carbono e nitrogênio orgânico, além de outras vitaminas. Realizou-se também um gradiente exploratório nas análises dos extratos fúngicos em meio líquido de Malta (Figura 4.6) e o análise pelo método do RMN (Figura 4.7).

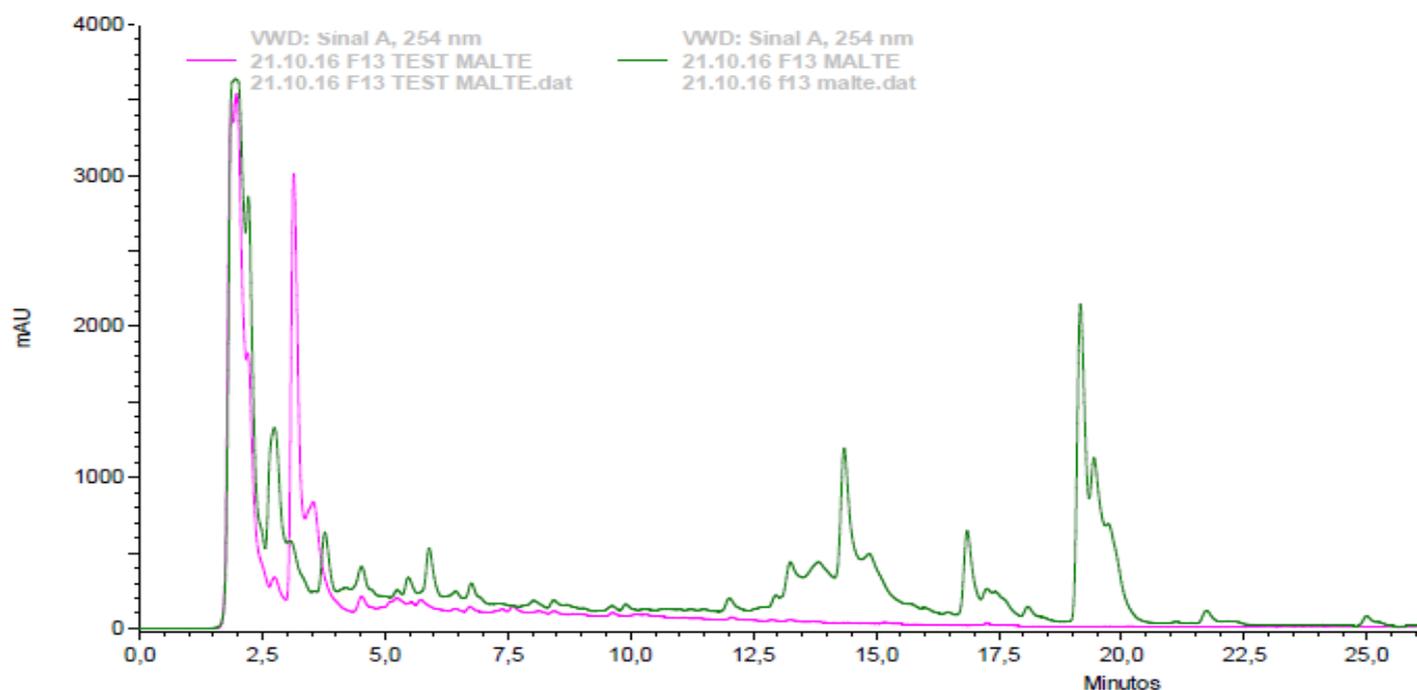


FIGURA 4.6-Meio Malta líquido do fungo. Linha verde: fungo. Linha cor rosa: controle do meio. Condições cromatográficas: 254 nm, 1ml/min.Amostra 1g/ml em H₂O:ACN (90:10).

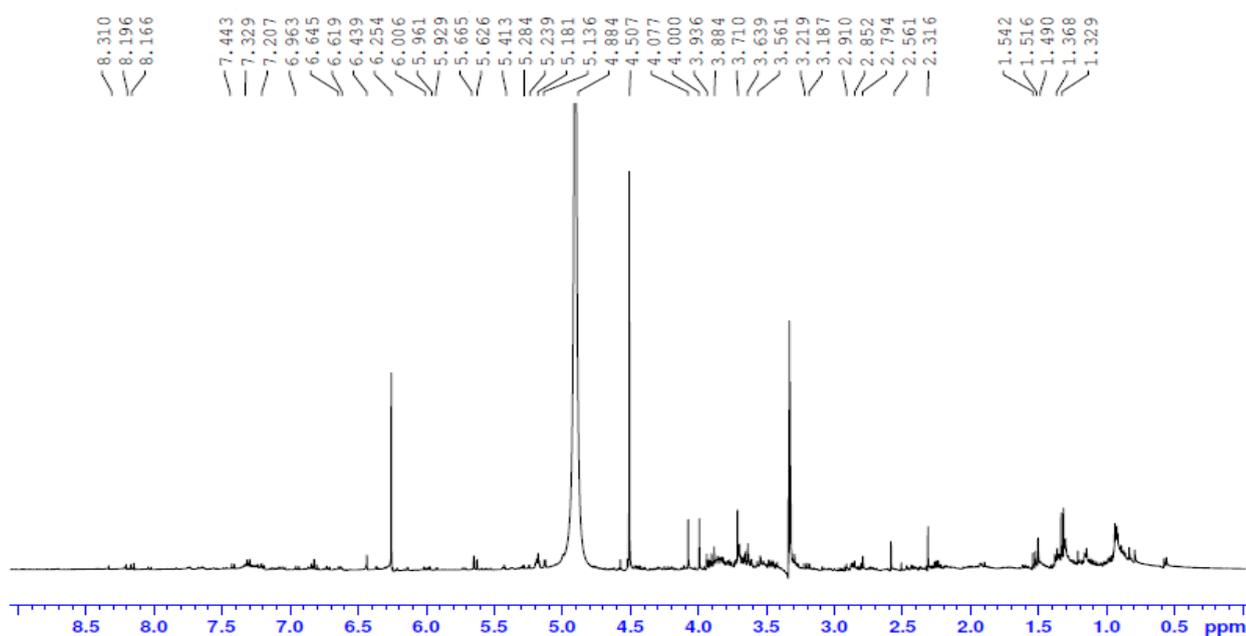


FIGURA 4.7-Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD- d_4) do extrato de acetato de etila obtido do fungo em meio líquido Malta.

4.3.2 Meio Sólido

O cromatograma em gradiente exploratório mostrou na (Figura 4.8) que o crescimento do fungo não levou a uma boa produção de metabólitos secundários, uma vez que não foram observadas bandas de intensidade significativas.

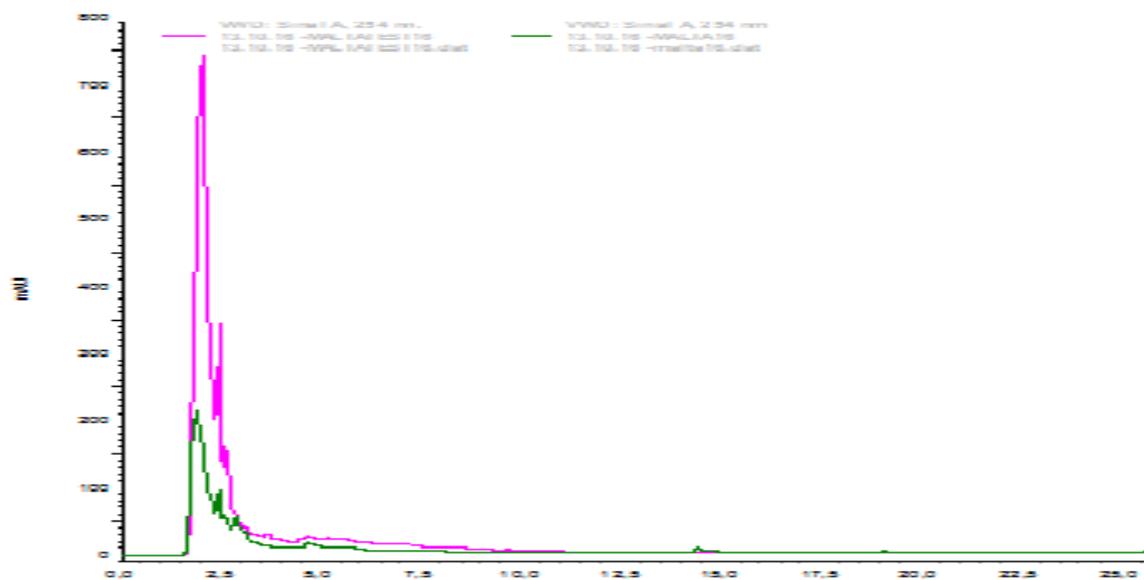


FIGURA 4.8- Meio Malta sólido do fungo. Linha verde: fungo. Linha cor rosa: controle do meio. Condições cromatográficas: 254 nm, 1 ml/min. Amostra 1g/ml em $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (90:10).

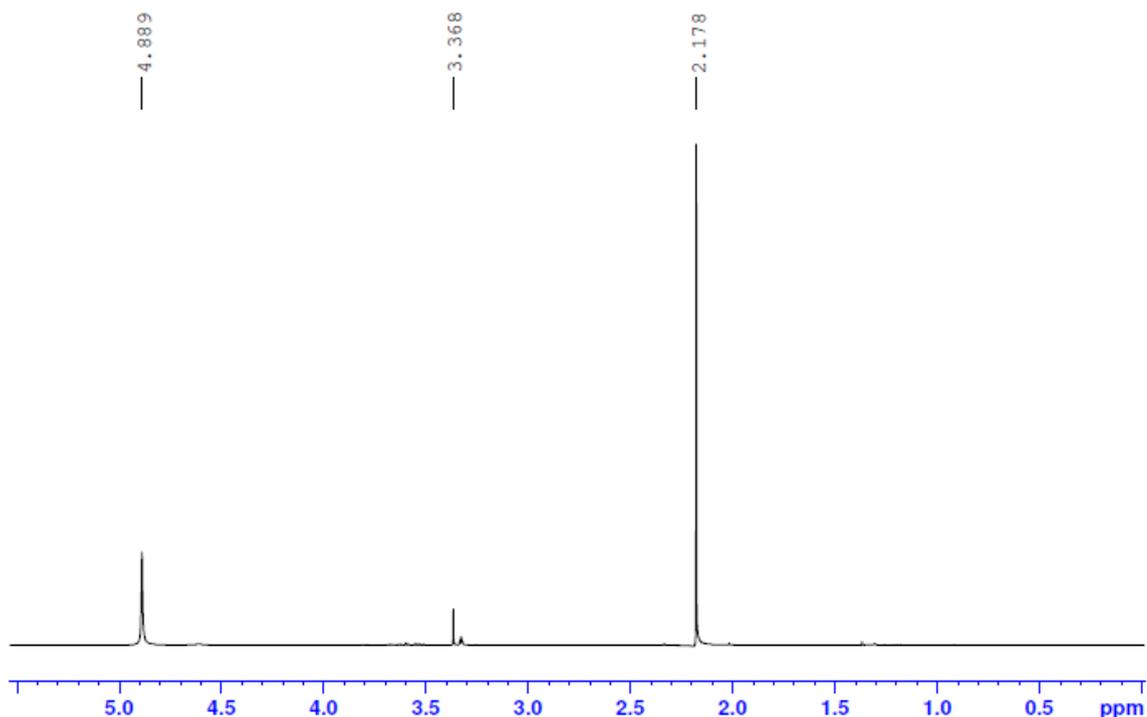


FIGURA 4.9- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD- d_4) do extrato fúngicos em meio sólido de Malta.

O espectro de RMN ^1H confirma o perfil químico pobre para o extrato obtido do meio sólido Malta.

4.4 Estudo do Crescimento do Fungo em larga escala

Como se evidenciou o melhor meio para o crescimento do fungo foi em Meio Líquido de Malta onde foi obtido os seguintes resultados (Tabela 4.1), onde nota-se claramente que o extrato de acetato de etila foi o melhor, o qual levou a uma maior concentração do extrato bruto e um possível perfil químico mais rico.

TABELA 4.1-Extratos obtidos e suas respectivas massas (g)

Extrato	Massa (g)
Extrato de ACOEt	6.07
Branco de ACOEt	3.20
Extrato de Butanol	3.80
Branco de Butanol	0.30
Extrato Hidroalcolico	5.30
Branco Hidroalcolico	2.60

4.4.1 Separação do Extrato de Acetato de Etila

Posteriormente o extrato de acetato de etila foi fracionado com o uso de uma coluna cromatográfica com sílica de gel na bancada, e cada fração foi avaliada por cromatografia em camada delgada de sílica de gel, utilizando uma mistura de solventes descrita na tabela. A fração obtida com ACOEt 80% e Hexano 20% foi analisada por cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica de gel mostrou-se quase pura.

Para confirmar o nível dessa pureza foi realizado o espectro de RMN ^1H 400MHz utilizando como solvente metanol deuterado, (Figura 4.10). Este mostrou a necessidade de uma melhor purificação dessa fração denominada F1, já que no espectro se mostrava pequenas sinais, que poderiam considerarse impurezas da amostra.

WATER MeOD C:\NMRData fatima_dianna

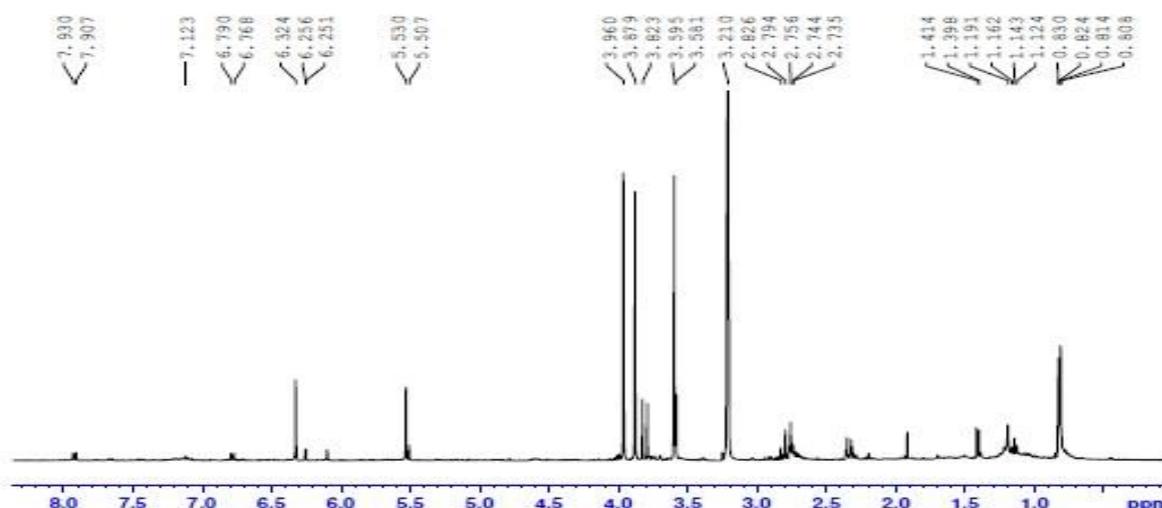


FIGURA 4.10- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD-d₄) amostra obtida com 80% ACOEt e 20% Hexano.

4.4.2 Análise da fração F1 por HPLC-UV

Utilizou-se o cromatógrafo 1260– Agilent Technologies, no modo reverso de eluição, no comprimento de onda 254 nm, e o mesmo sistema de eluição descrito na tabela (Tabela 3.3), obtendo-se o cromatograma da Figura 4.11.

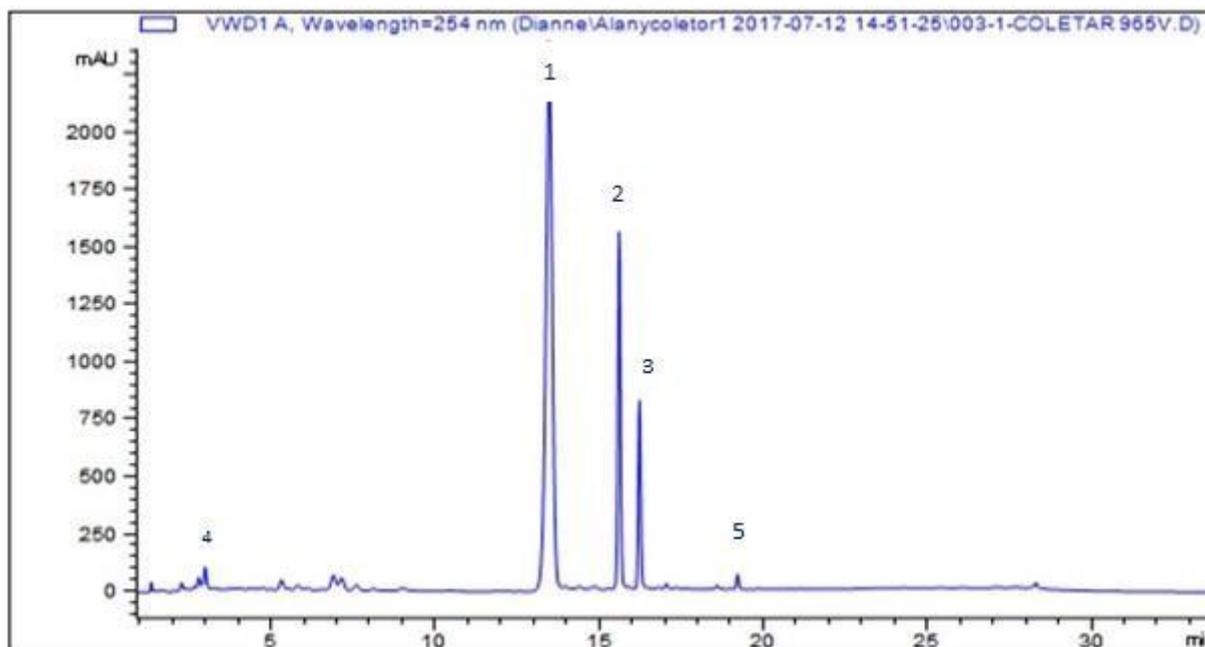


FIGURA 4.11- Cromatograma da fração F1 por HPLC-UV. Condições cromatográficas: 254 nm, 1ml/min. Amostra 1g/ml em H₂O:ACN (90:10).

As bandas cromatográficas e numeradas na Figura 4.11 foram coletadas utilizando o cromatógrafo Agilent Technologies modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, Amostrador automático G1329A, e detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (VWD) G1314B, forno de coluna G1316A. Software: EZCromElite, utilizando um comprimento de onda de 254 nm.

4.5 Identificação estrutural dos metabólitos isolados

4.5.1 Ilustração da Substância 1

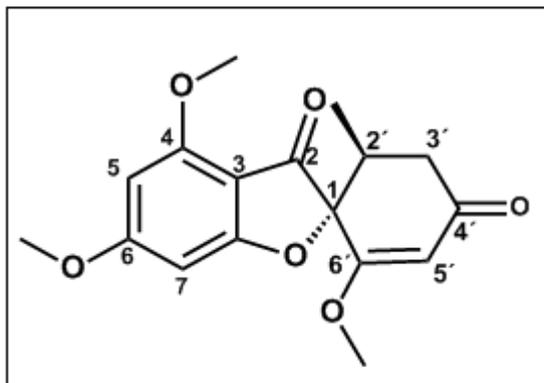


FIGURA 4.12- Estrutura química da Decolorgriseofulvina

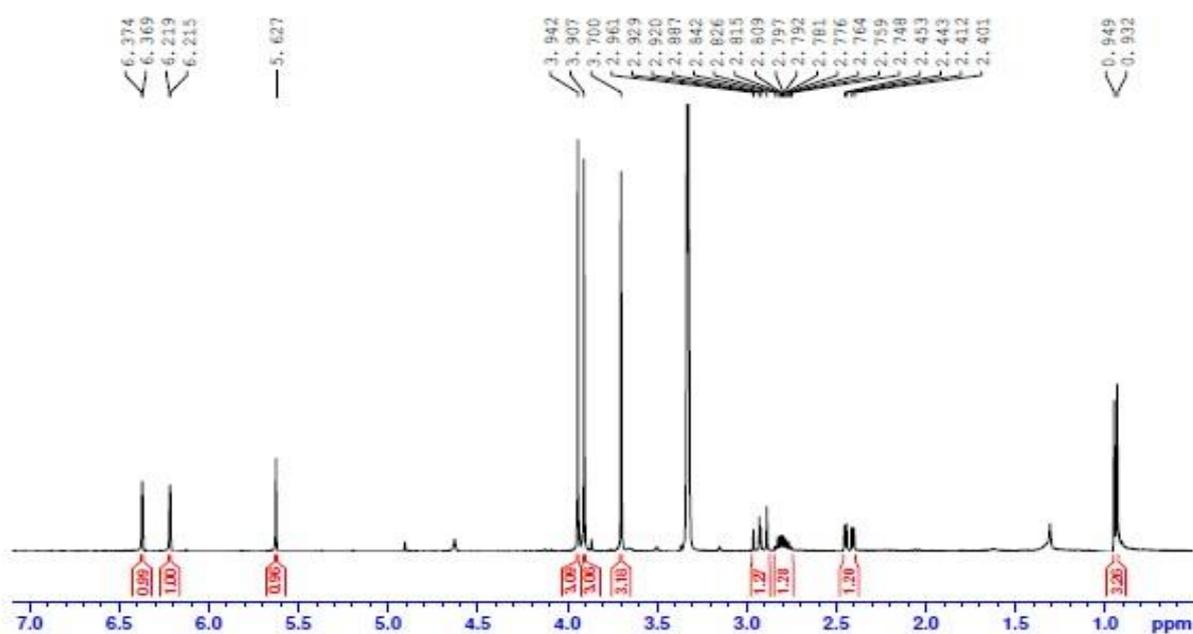
A substância 1 (FIGURA 4.12) apresentou tempo de retenção de (TR) 13.62 min representada pela banda 1 no cromatograma de HPLC-UV (Figura 4.11). A determinação estrutural foi realizada comparando-se os dados obtidos por experimentos de RMN e espectrometria de massas com a literatura (Cafêu *et al.*, 2005; WUBSHET, et al., 2013).

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4-13) apresentou sinais para dois dubletos em δH 6,37 e 6,22 na região de aromáticos, cuja constante de acoplamento indica relação meta entre eles ($J = 1,8$ Hz) (ampliação na região dos aromáticos, FIGURA 4.14). Ao analisar as regiões mais blindadas do espectro, nota-se um sinal de hidrogênio com deslocamento químico de δH 5,62, representado por um singleto característico de hidrogênios olefínicos (H-5'). Também observa-se a presença de 3 singletos bem definidos em δH 3,94, 3,90 e 3,70 cuja integração (3H) aponta para a presença de 3 metoxilas na estrutura, sendo esta última (mais blindado) ligada ao carbono C-6'. No deslocamento em δH 2,80 (H-2', 1H) nota-se um multipletto, que sugere um hidrogênio metínico, o qual realiza acoplamento com outros hidrogênios. A complexidade desse sinal sugere o acoplamento com uma metila e um metilênico. A metila corresponde ao sinal em δH 0,94 ($d = 6,5$, 3H) e atribuída a aquela ligada a C-2'. Os sinais metilênicos seria aqueles em δH 2,92 (dd, $J = 16,5$; 4,6) e δH 2,42 (dd, $J = 16,5$; 13,0), desblindados por uma possível carbonila. Estes dados sugerem a presença de um derivado griseofulvina, e considerando os sinais do anel aromático em relação *meta* (δH 6,37 e 6,22; $J = 1,8$ Hz), atribuir a banda cromatográfica em 13,62 min ao composto decolorgriseofulvina (Tabela 4.2 e Figura 4-12).

TABELA 4.2: Dados de RMN ^1H (400 MHz, MeOH- d_4) para o composto 1

Posição	^1H (ppm)
4	
5	6,22 (d, J=1,8)
6	
7	6,37 (d, J=1,8)
8	
9	
1'	
2'	2,80 (m)
3'	2,42 (dd=16,7; 4,6) 2,92 (dd=16,7;13)
4'	
5'	5,62 (s)
6'	
3 (C=O)	
4 (OCH ₃)	3,94 (s)
6 (OCH ₃)	3,90 (s)
6'(OCH ₃)	3,70 (s)
2'(CH ₃)	0,94 (d, J=6,5)

WATER MeOD C:\NMRData fatima_dianne

FIGURA 4.13: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD- d_4) do Composto 1

WATER MeOD C:\NMRData fatima_dianne

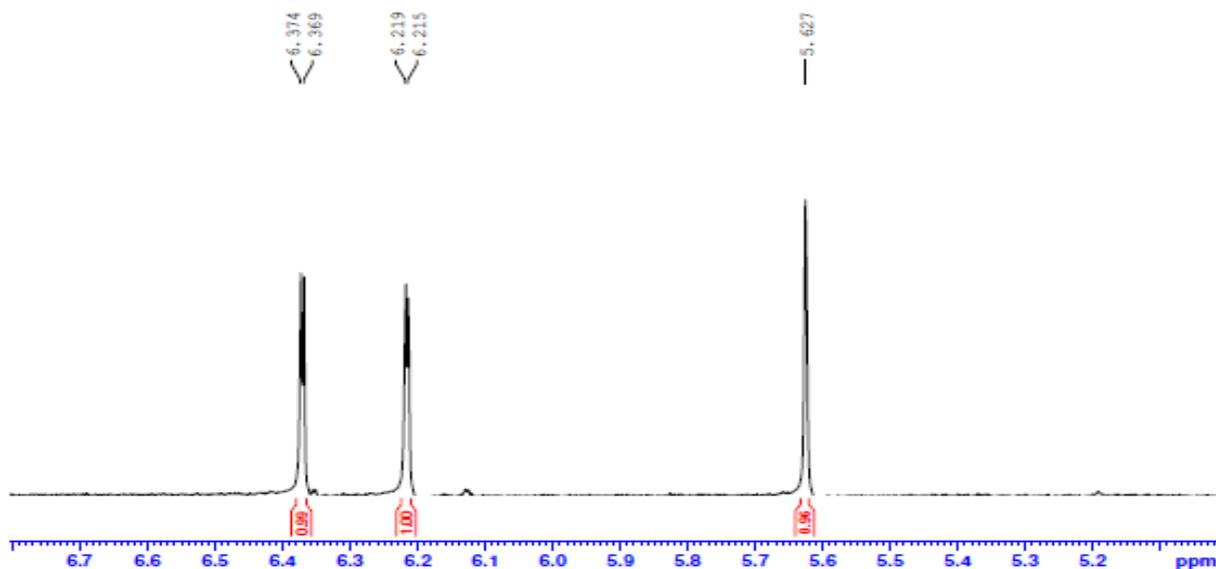


FIGURA 4.14- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOH-d₄) do Composto 1, ampliação da região dos sinais de hidrogênios aromáticos e hidrogênios alifáticos.

WATER MeOD C:\NMRData fatima_dianne

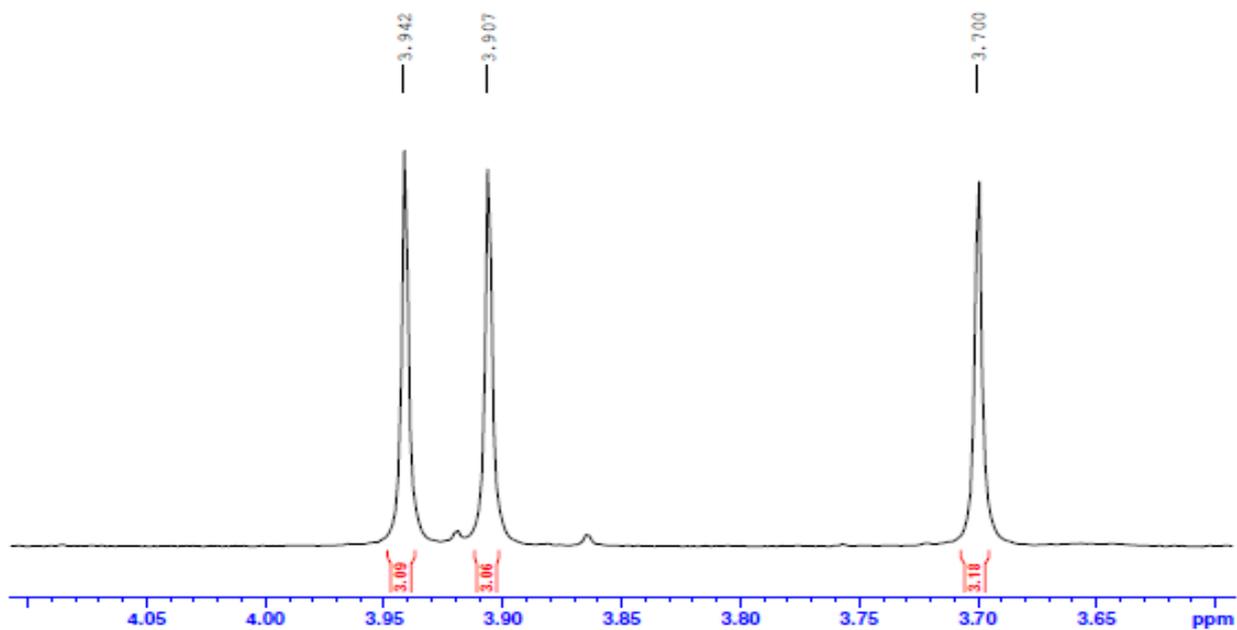


FIGURA 4.15- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOH-d₄) do Composto 1, ampliação da região das metilas.

WATER MeOD C:\NMRData Fatima_diana

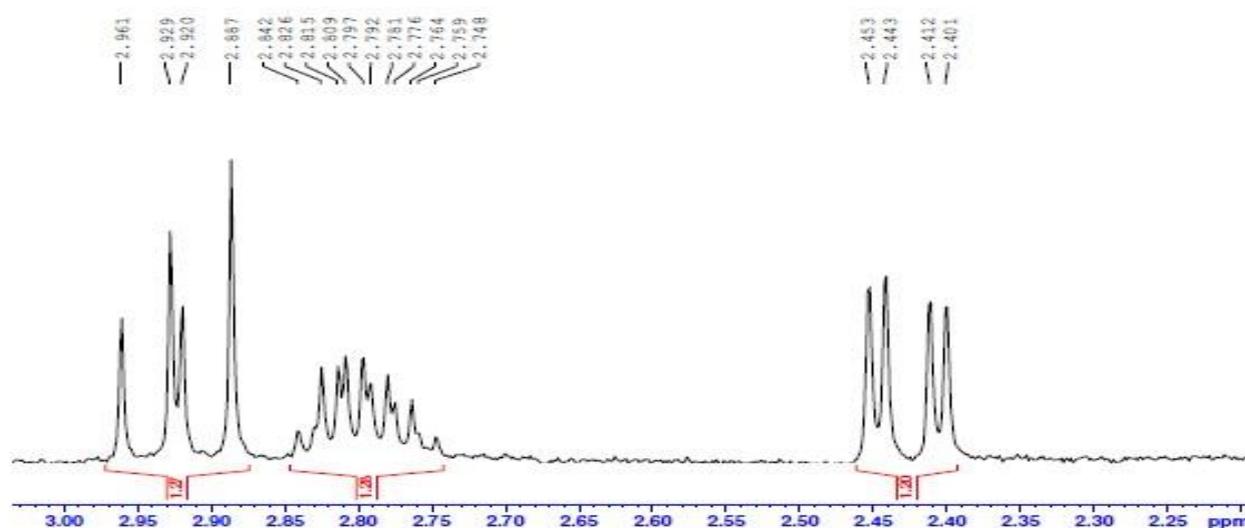


FIGURA 4.16- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOH- d_4) do Composto **1**, ampliação da região do multipleteo.

O espectro de massas obtidos por ESI-MS (Figura 4.17), indicam que a substância **1** com sinal de m/z , 319, sugerindo, portanto, que a molécula está protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$. No espectro também mostra-se de maneira clara formação de um aduto $[\text{M}+\text{Na}]^+$, representado pelo íon m/z 341, sinal além característica do sodio. O tempo de retenção da substância foi de 5.617 min. Os dados obtidos de RMN junto com os dados da literatura (Mariana *et al*, 2005), apontam para o composto **1** sendo a Declorogriseofulvina.

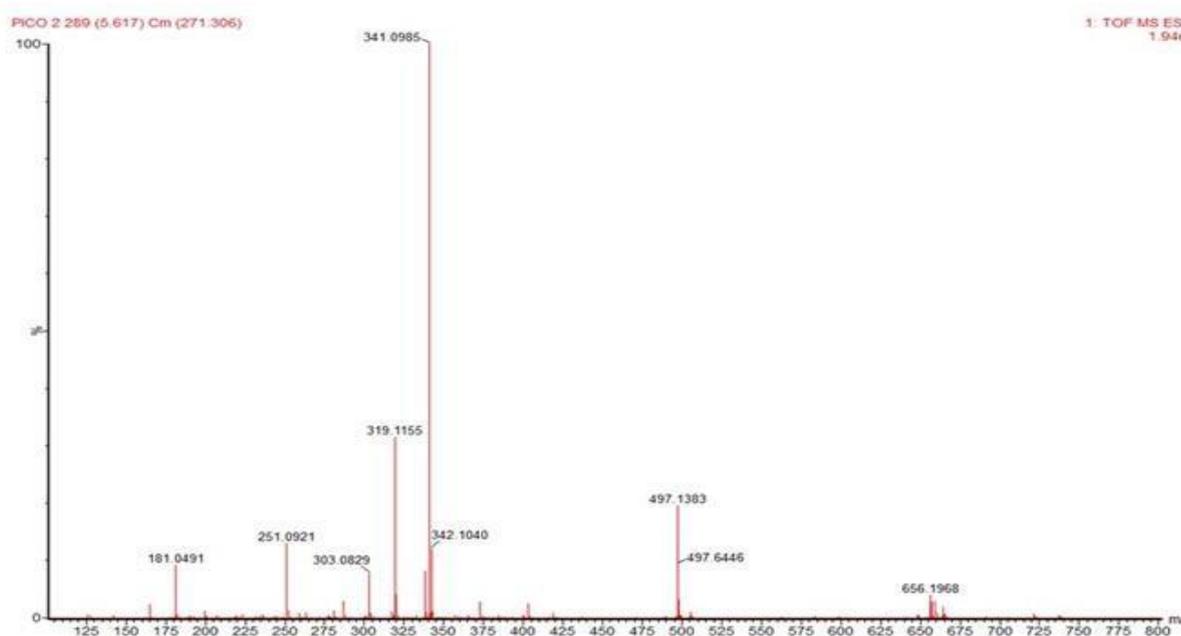


FIGURA 4.17- Espectro de Massas ESI-MS no modo positivo do composto **1**.

4.5.2 Ilustração da Substância 2

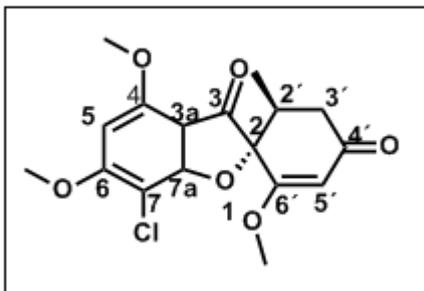


FIGURA 4.18- Estrutura química da Griseofulvina.

A substância 2 (FIGURA 4.18) apresentou tempo de retenção de (TR) 15.40 min representada pela banda 2 no cromatograma de HPLC-UV (Figura 4.11). A determinação estrutural foi realizada comparando-se os dados obtidos por experimentos de RMN e espectrometria de massas com a literatura (Cafêu *et al.*, 2005; WUBSHET, et al., 2013).

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.19) apresentou semelhança com aquele da substância 1. No entanto, difere nos sinais referentes ao anel aromático. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.19) apresentou um sinal singlete em δH 6,44 (1H), região característica de hidrogênios aromáticos. Sendo um único sinal nessa região e singlete propõe-se a presença de um anel aromático pentassubstituído. Sendo esta a única diferença no espectro de RMN ^1H quando comparado com aquele da substância 1, sugere-se a presença de um substituinte a C-5 ou C-7. Nas regiões mais blindadas do espectro, foi evidenciado um hidrogênio com enlace sp^2 (H-5') com deslocamento químico: δH 5,65. Nota-se a presença de três metoxilas com sinais: δH 4,07, 3,99 e 3,71.

No deslocamento em δH 2,87 (H-2', 1H) nota-se um multiplete, o qual foi confirmado pelo espectro 1H-1H – COSY (Tabela 4.3).

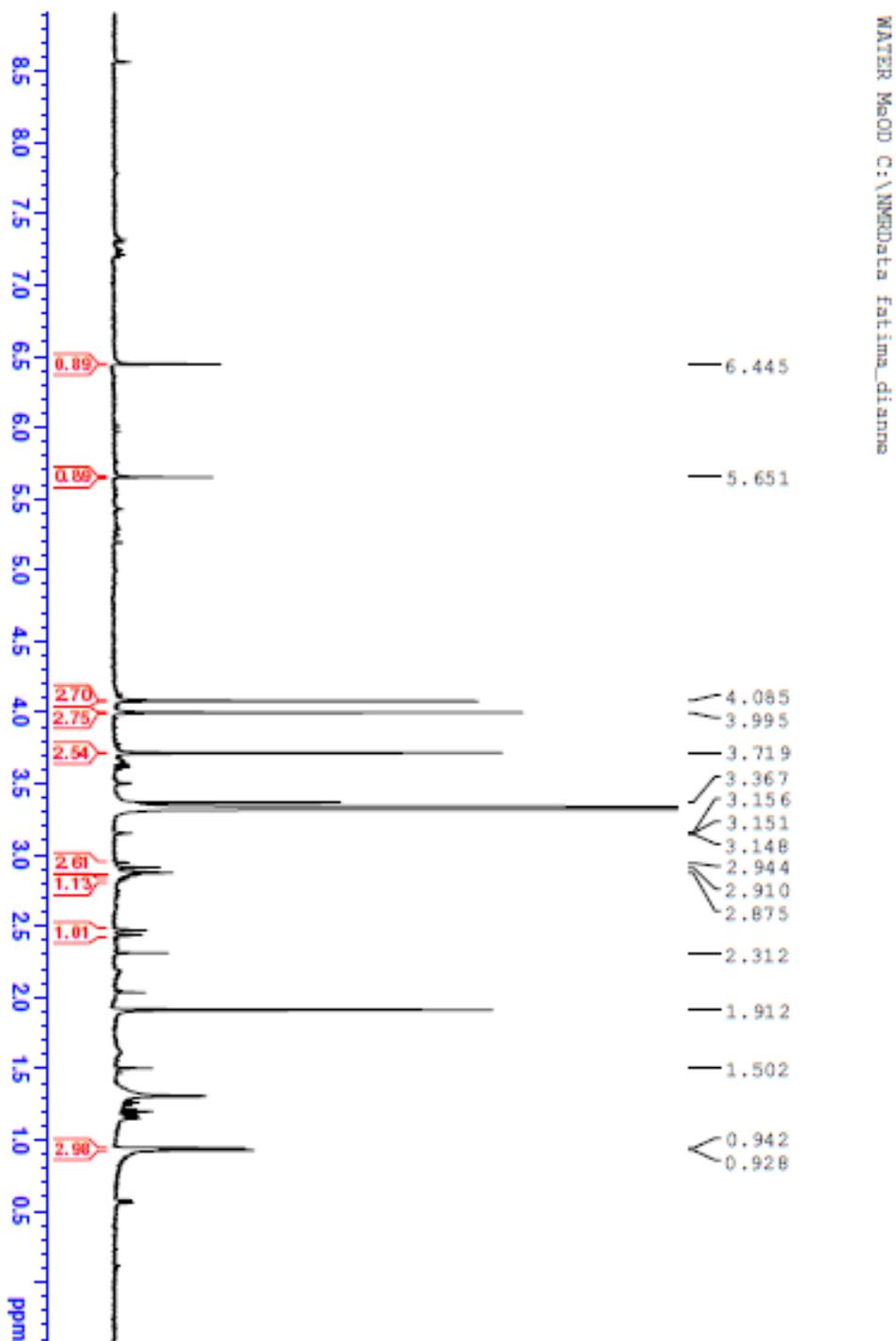
Através dos experimentos ^1H -2D (Figura 4.19), HSQC (Figura 4.24) e HMBC (Figura 4.25), foi possível determinar que hidrogênios estão unidos aos carbonos. O experimento HMBC além permite determinar relações entre prótons e carbonos à maior distância (2 ou 3 enlaces) conforme apresentados na (Tabela 4.4).

TABELA 4.3 - Dados de RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4) – Composto2.

Posição	^1H (ppm)
4	
5	6,44 (d, J=2,8)
6	
7	
8	
9	
1'	
2'	2,87 (m)
3'	3,04(dd=16,1; 13,5) 2,92 (dd=16,1;4,7)
4'	
5'	5,65 (s)
6'	
3 (C=O)	
4 (OCH ₃)	4,08 (s)
6 (OCH ₃)	3,99 (s)
6'(OCH ₃)	3,71 (s)
2'(CH ₃)	1,91 (d, J=6,5)

TABELA 4.4 - Correlações observadas nos experimentos de HSQC e HMBC (600 MHz, MeOD- d_4) para o composto 2

	HSQC	HMBC
6,44 (s, 1H)	91,2	96,8 104,5 158,9 192,48 166,76
5,65 (s, 1H)	10,5	38,8 89,9 172,3 198
4,07 (s, 3H)	58,1	165,7
3,99 (s, 3H)	57,1	158,6
3,73 (s, 3H)	57,6	172,5
1,91 (3H)	17,4	179,1

FIGURA 4.19- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD-d₄) do Composto 2

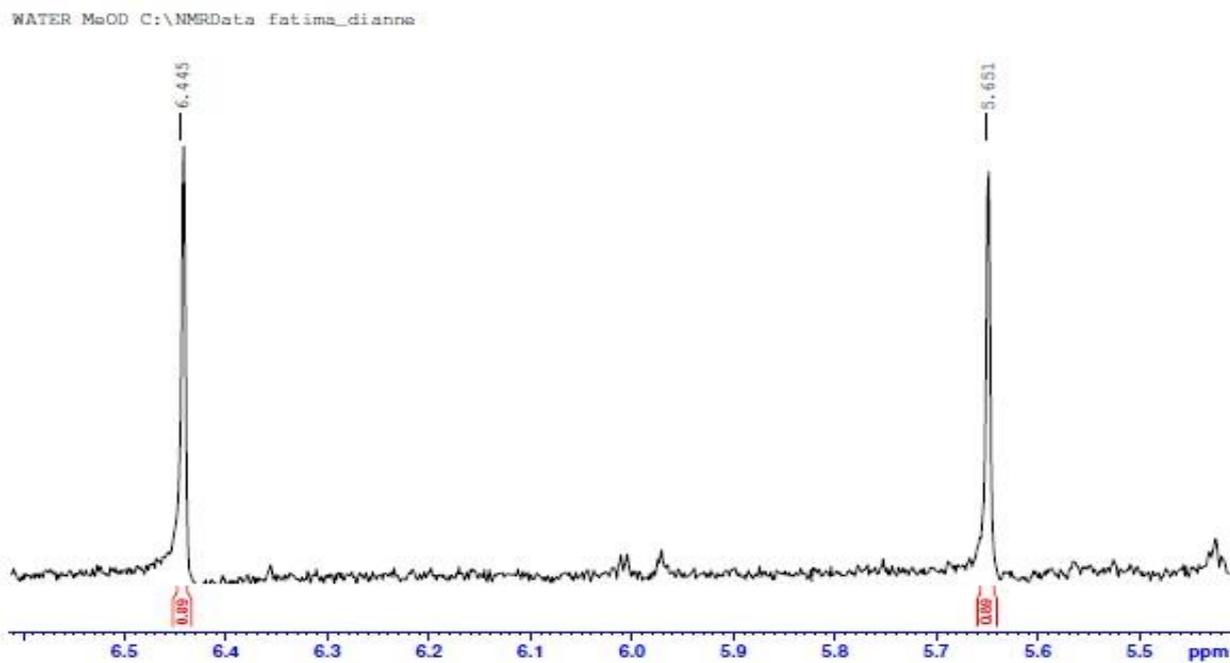


FIGURA 4.20- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD-d₄) do Composto **2**, ampliação da região dos sinais de hidrogênios aromáticos e hidrogênios alifáticos.

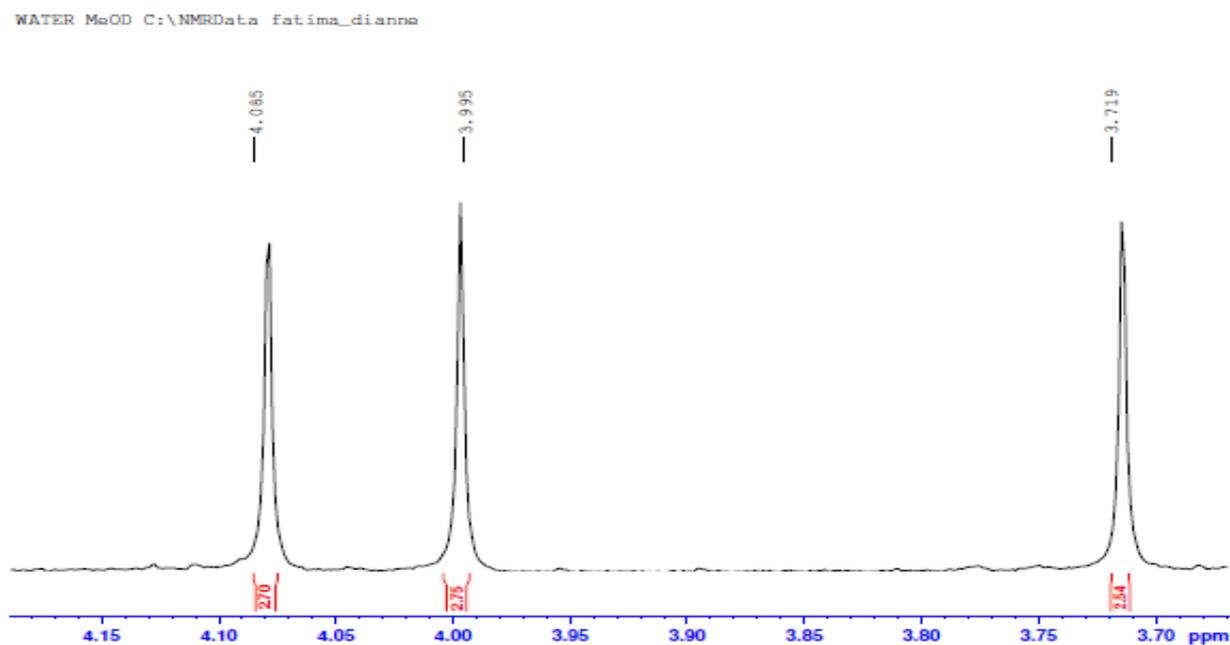


FIGURA 4.21- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOH) do Composto **2**, ampliação da região dos sinais das metilas.

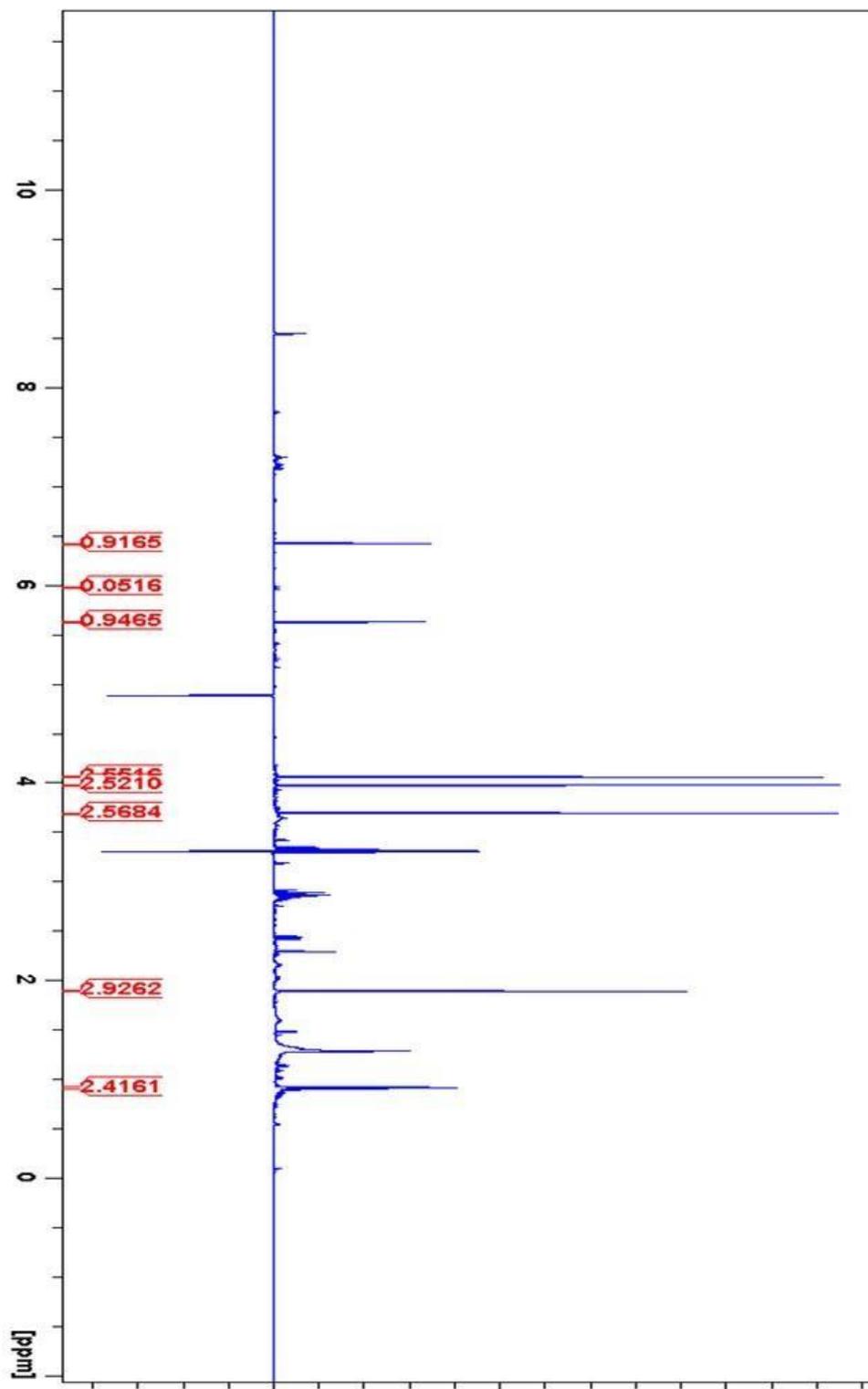


FIGURA 4.22- Espectro de RMN ^1H (600 MHz, MeOH- d_4) do Composto 2

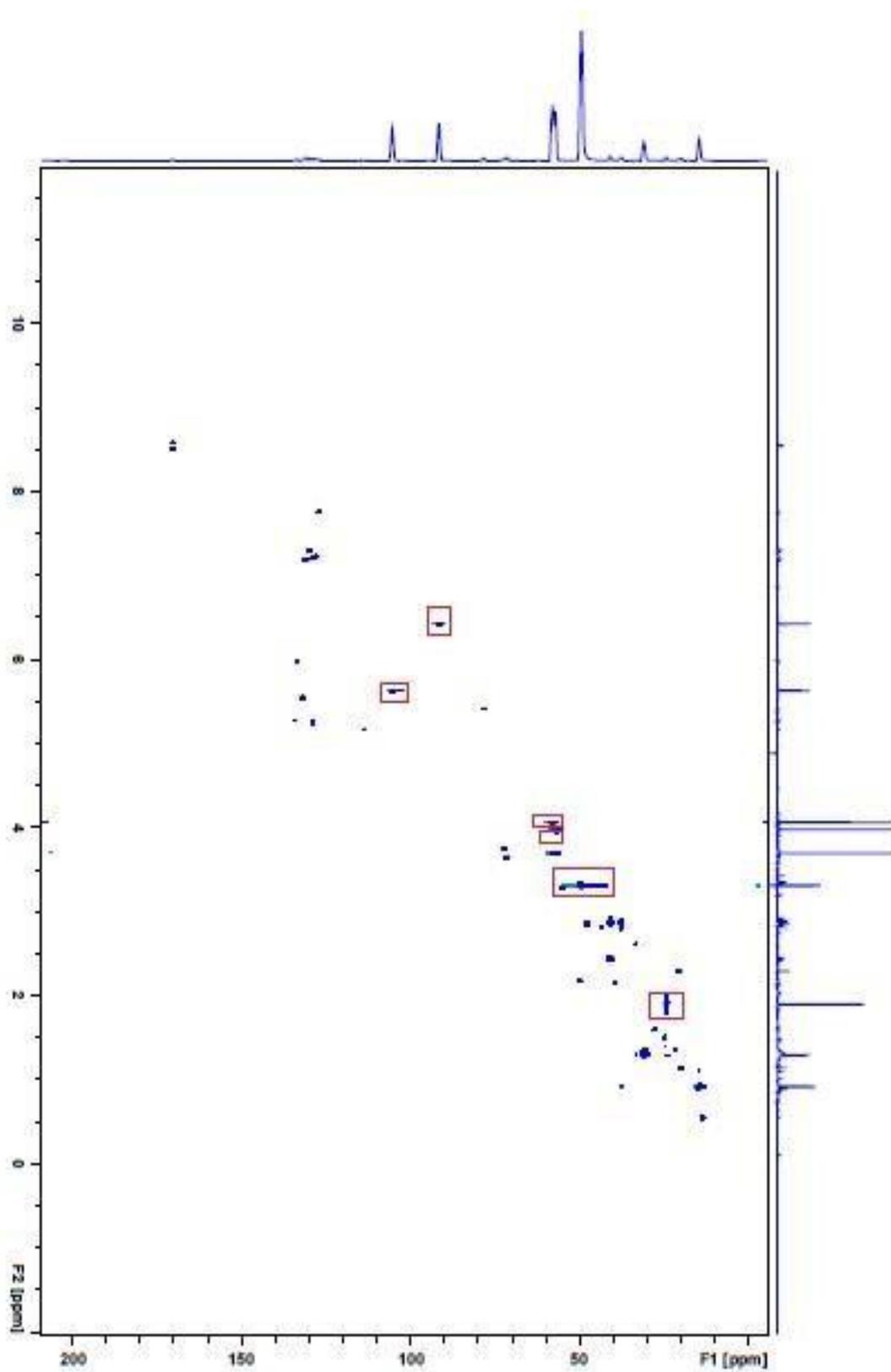


FIGURA 4.23- Mapa de contorno HSQC (600 MHz, MeOH-d₄) do Composto 2

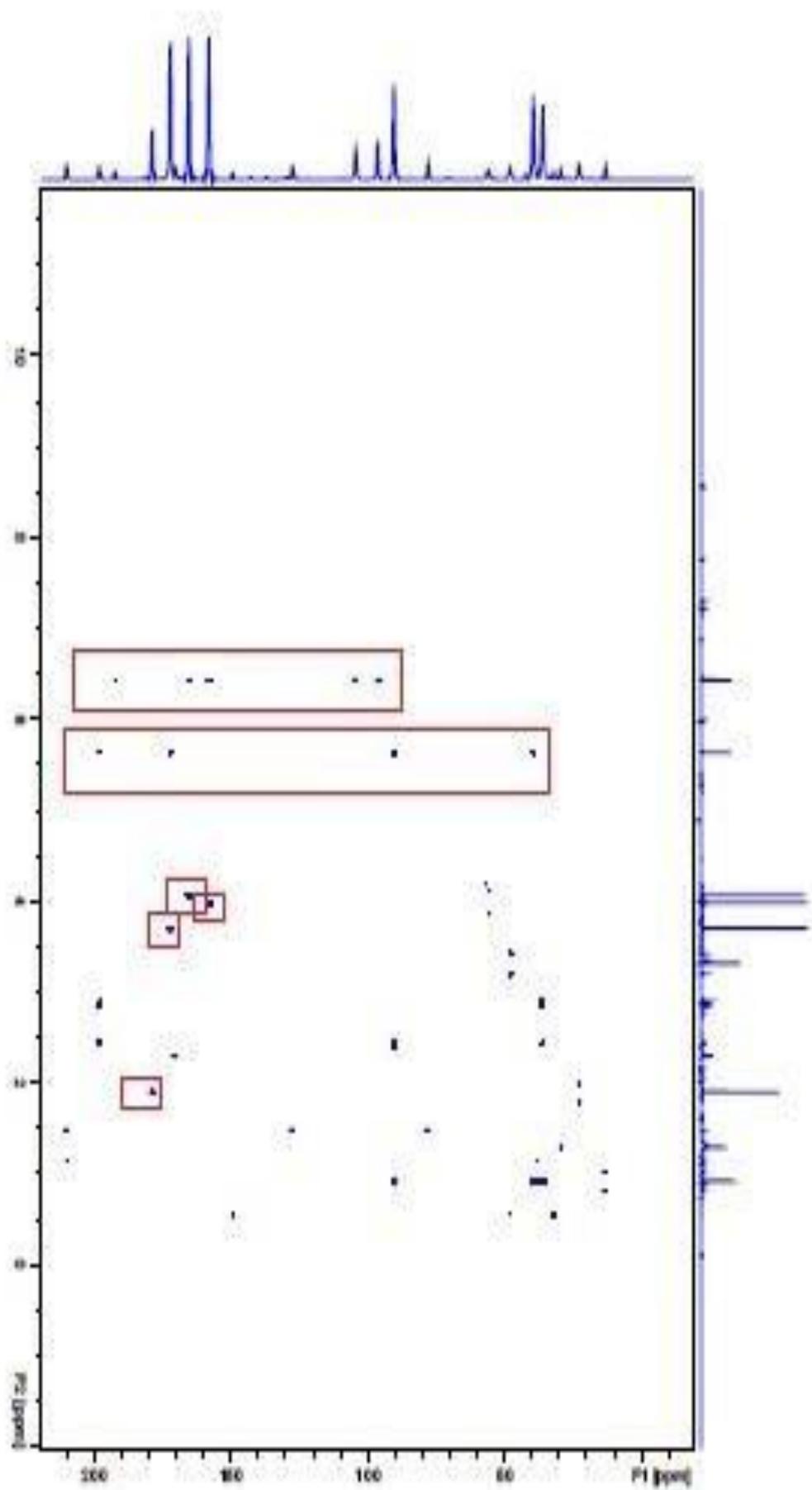


FIGURA 4.24- Mapa de contorno HMBC (600 MHz, MeOD-d₄) do Composto 2.

O do espectro de massas obtido por ESI-MS no modo (+) (FIGURA 4. 26) apresentou o pico do íon molecular $[M+H]^+$ a m/z 353, assim como um $[M+2]$ a m/z 355, também mostrou o aduto $[M+Na]^+$ a m/z 375 e m/z 377, cujas intensidades dos $[M+2]$ são características da presença do elemento cloro.

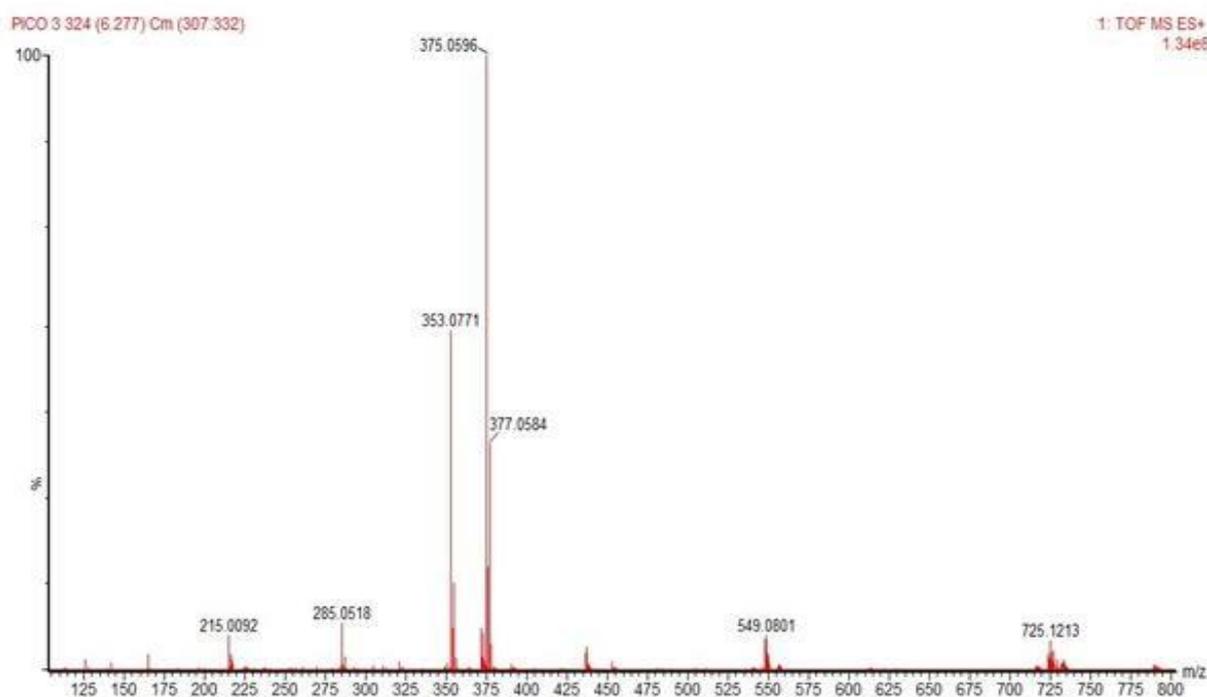


FIGURA 4.25- Espectro de Massas ESI-MS no modo positivo do composto 2

O espectro de fragmentação do íon 353 (Figura 4.27) mostra os fragmentos a m/z 215 (m/z 217) correspondendo ao anel aromático, o qual novamente apresenta o $M+2$, indicando o cloro nesse anel. O fragmento em m/z 165, correspondente ao pico base e não apresenta o $M+2$, e corresponde ao anel contendo a carbonila α,β -insaturada, ou seja, confirma o substituinte cloro a C-5 ou C-7 (o exemplo abaixo mostra o cloro a C-7),(FIGURA 4.28).

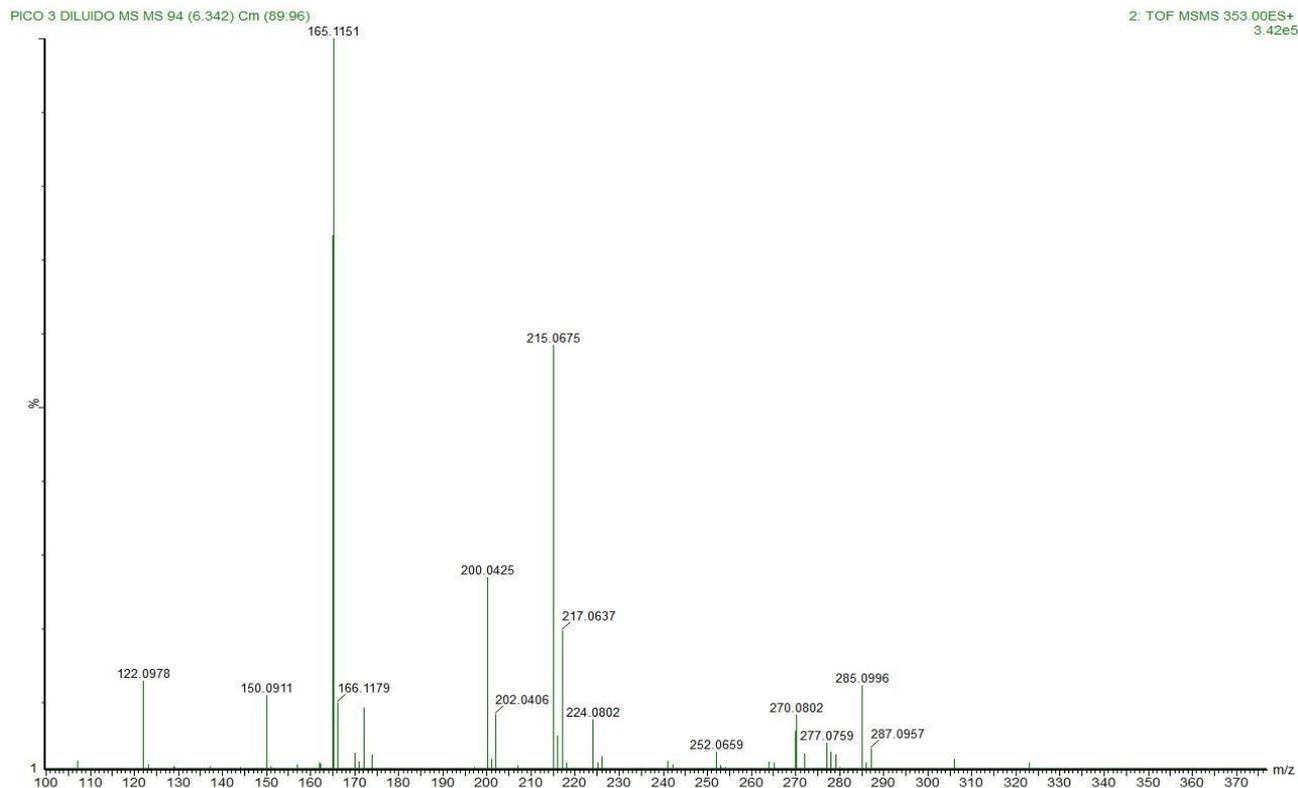


FIGURA 4.26- Espectro de Massas ESI-MS/MS (MS2 de 353) no modo positivo do composto **2**

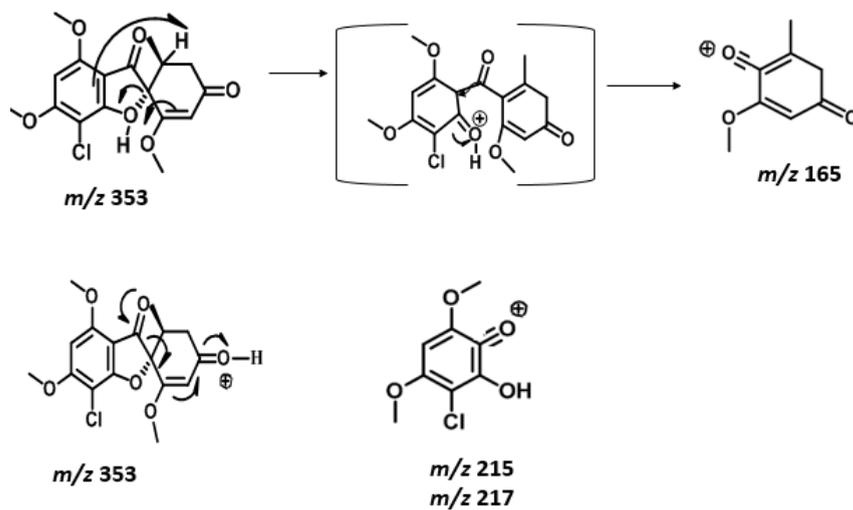


FIGURA 4.27- Fragmentação do íon 353 no modo positivo do composto **2**

4.5.3 Ilustração da Substância 3

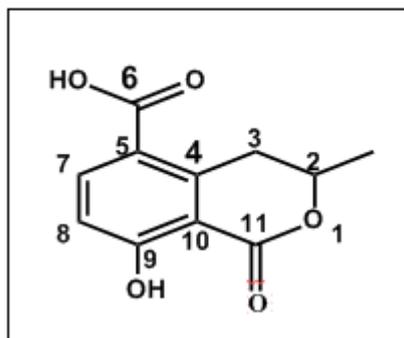


FIGURA 4.28-Estrutura química da Isocumarina

A substância **3** (FIGURA 4.29) apresentou tempo de retenção de (TR) 2.20 min representada pela banda 4 no cromatograma de HPLC-UV (Figura 4.11). A determinação estrutural foi realizada comparando-se os dados obtidos por experimentos de RMN e espectrometria de massas com a literatura (Cafêu *et al.*, 2005; WUBSHET, et al., 2013).

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.30-4.33) mostra que essa banda cromatográfica refere-se a uma mistura de vários compostos, mas analisando os sinais mais intensos podem-se ver dois dubletos em δH 8,13 e 6,93 na região de aromáticos, cuja constante de acoplamento indica relação *orto* entre eles ($J = 9,0$ Hz) (ampliação na região dos aromáticos, FIGURA 4.31). Também se observa um singleto em região bem desblindada δH 11,86, sugerindo uma hidroxila cujo hidrogênio mostra ligação a uma carbonila. Um sinal multiplete complexo em δH 4,62 (m) mostra acoplamentos com três sinais, dois em δH 3,86 (1H, dd $J = 18, 3,5$) e 3.03 (1H, dd $J = 18, 12$) e um terceiro de uma possível metila em δH 0,81 (3H, d $J = 6,5$). Esses dados sugerem a presença de um grupo arila tetrasubstituído, sendo entre esses substituintes uma hidroxila e uma carbonila ou carboxila vizinha, permitindo propor uma hidroxil- isocumarina como esqueleto. O quarto substituinte do grupo arila deve corresponder a um grupo sem sinal no espectro de RMN ^1H , sugerindo uma carboxila.

TABELA 4.5 - Dados de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) - Composto 3

Posição	^1H (ppm)
1	
2	4,62 (1H,m) 2,27 (1H,dd, J=18;12)
3	3,87(1H,dd,J=18;3,5) 3,02 (1H,dd,J=18;12)
4	
5	
6	
7	8,13 (1H,d,J=9)
8	6,93 (1H,d,J=9)
9	11,80 (s,1H)
10	
11	

ORIENTADOR Fatima
GRUPO PN
WATER CDCl3 C:\NMRData fatima_dianna

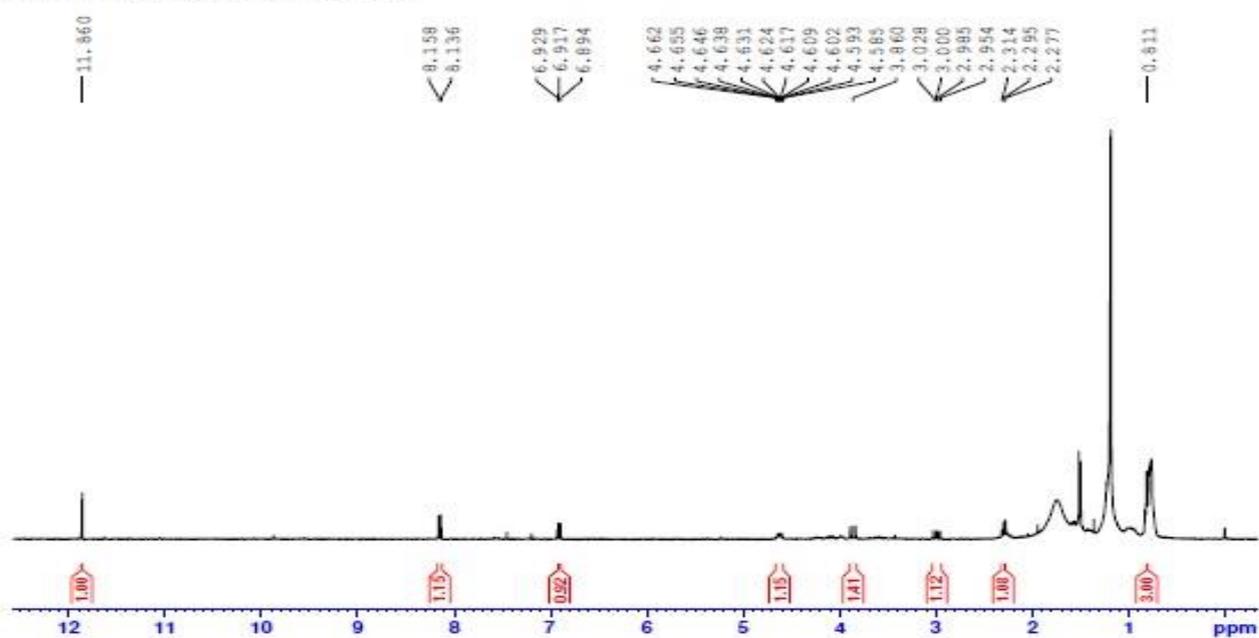


FIGURA 4.29- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da fração referente à banda cromatográfica 4.

ORIENTADOR Fatima
GRUPO PN
WATER CDC13 C:\NMRData fatima_dianne

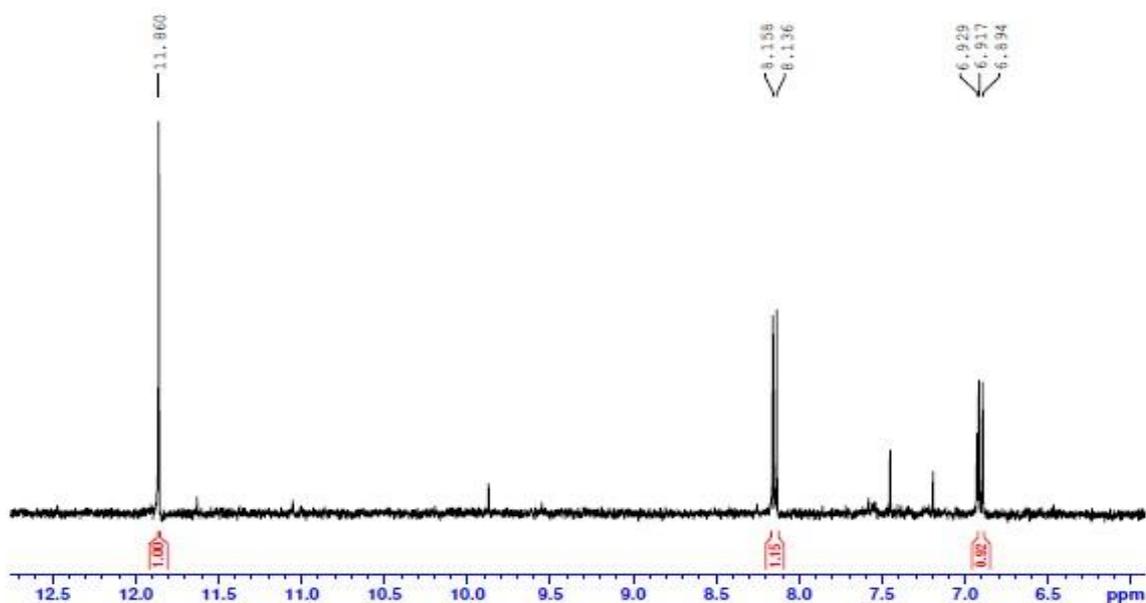


FIGURA 4.30-Ampliação do Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD), da região dos aromáticos. Composto **3**

ORIENTADOR Fatima
GRUPO PN
WATER CDC13 C:\NMRData fatima_dianne

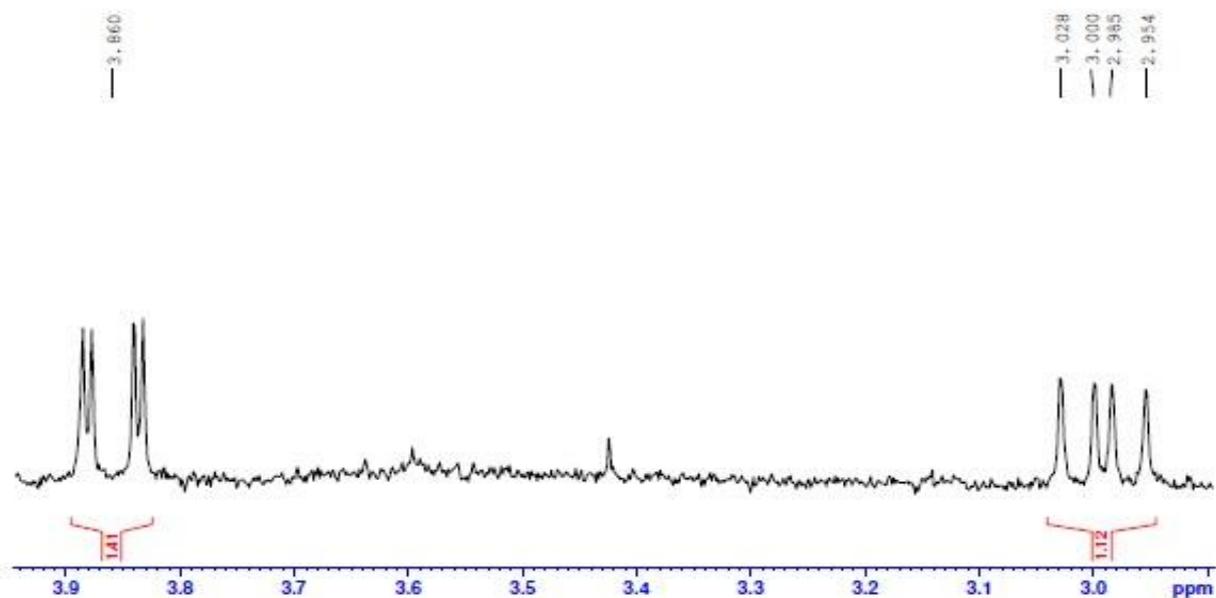


FIGURA 4.31- Ampliação do Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da região das Metilas. Composto **3**

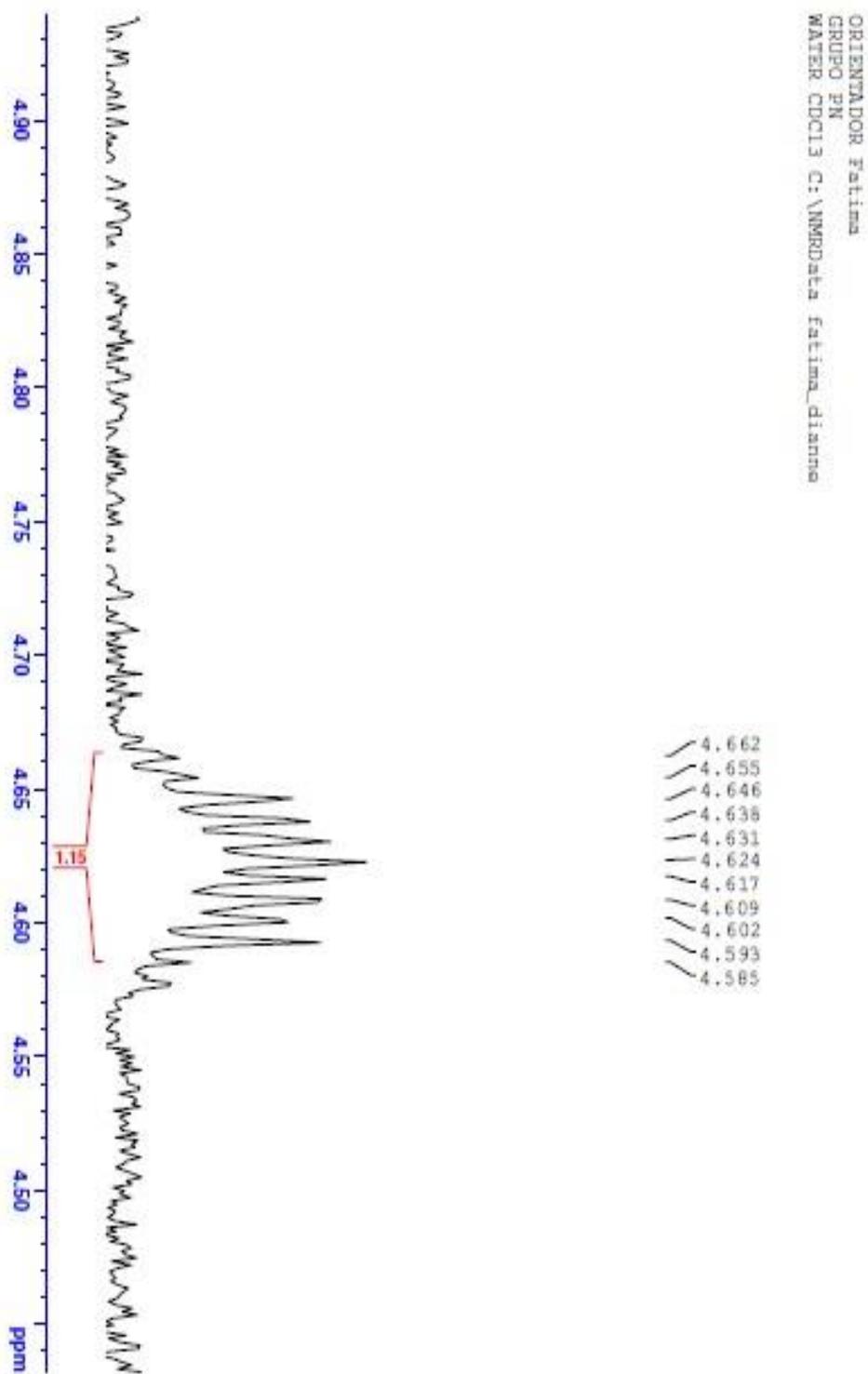


FIGURA 4.32- Ampliação do Espectro de da região RMN 1H (400 MHz, CD₃OD) da região do multipeto. Composto 3.

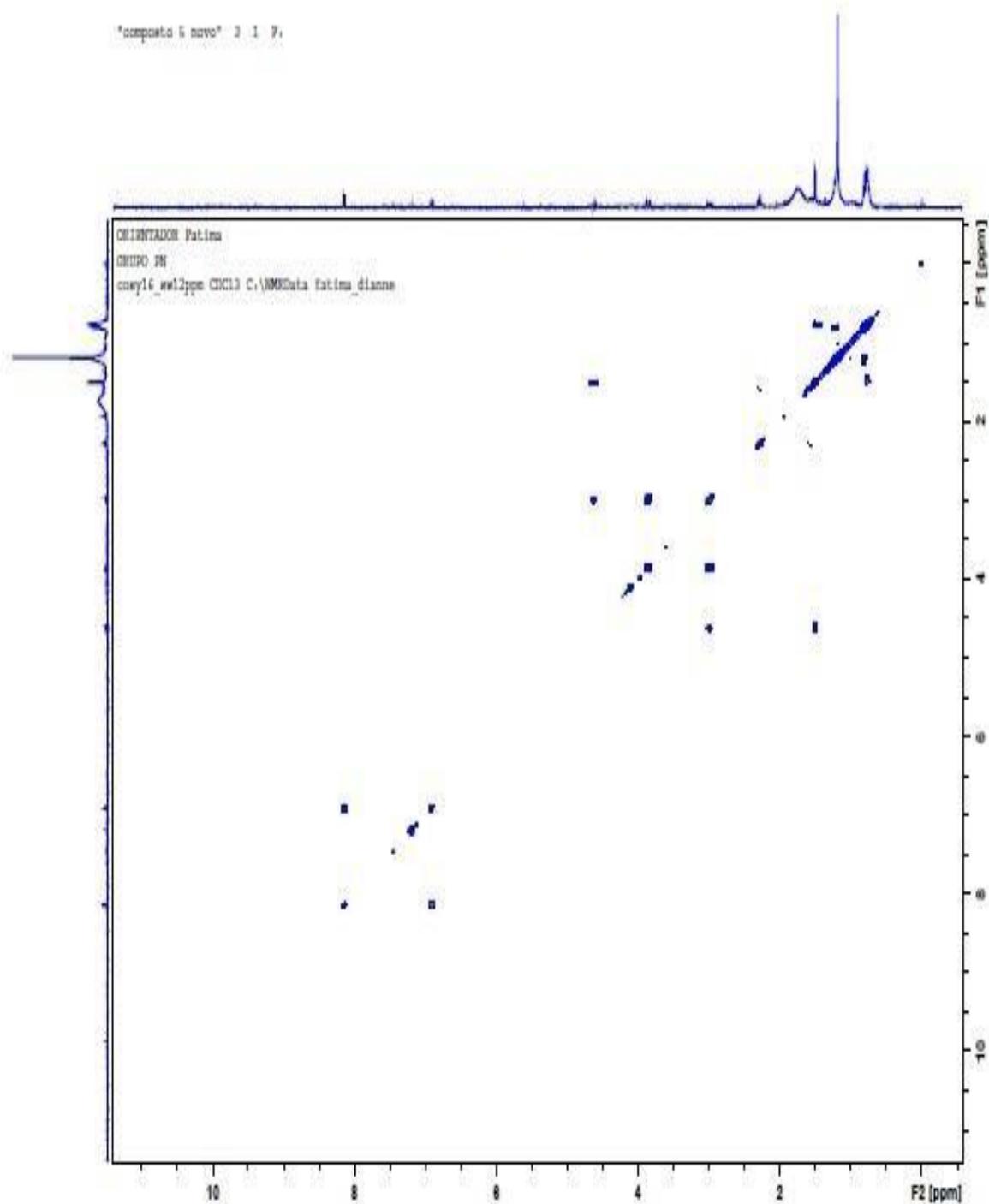


FIGURA 4.33-Espectro de RMN 2D- ^1H - ^1H -COSY (400 MHz, CD_3OD) para o Composto **3**.

Na tentativa de se identificar esse substituinte analisou-se essa amostra por LC-MS (FIGURA 4.34) no modo negativo e obteve-se um espectro de uma banda a 11.3 min mostrando um íon negativo em m/z 221 e 177, onde este último corresponde à perda neutra de CO_2 como mostra a proposta abaixo (FIGURA 4.35)

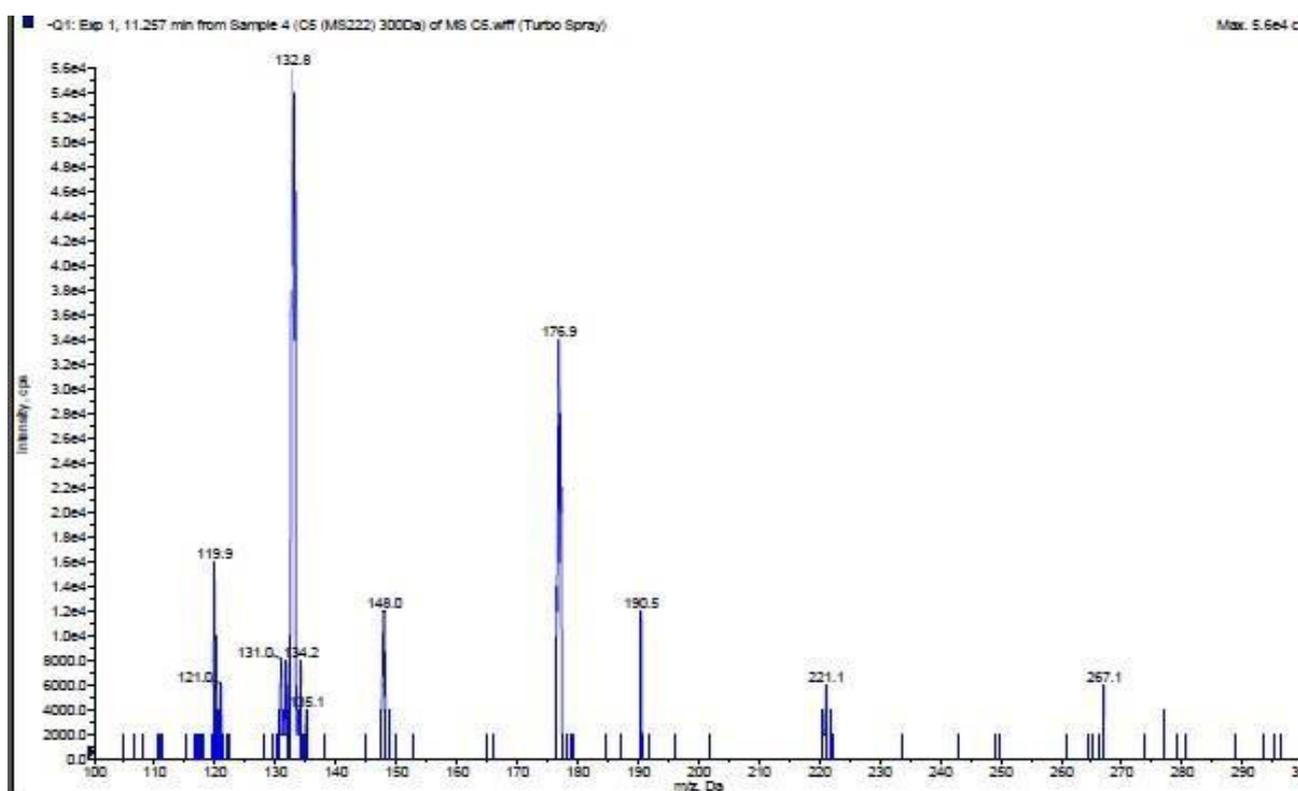


FIGURA 4.34-Espectro de Massas do Composto 3 (LC-MS).

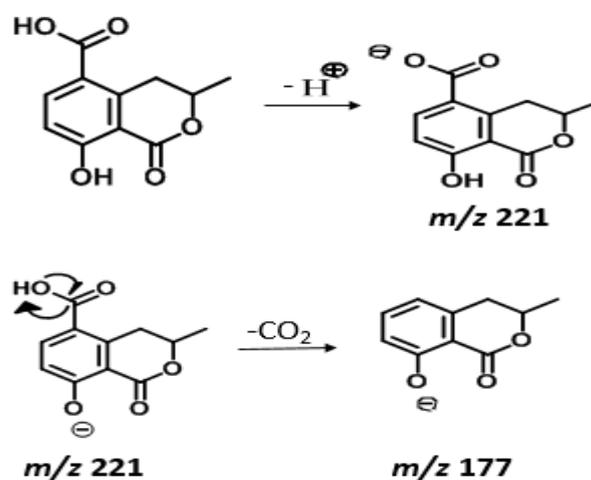


FIGURA 4.35-Perda neutra do CO_2 do Composto 3 (LC-MS). CO_2

Concluindo, entre os diferentes compostos na fração correspondendo à banda cromatográfica em 2.20 min, e junto com os dados de RMN (Huang, et al., 2007) pode-se dizer que há a 5-carboxil-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metilisocumarina (3).

4.5.4 Ilustração da Substância 4 e Substância 5

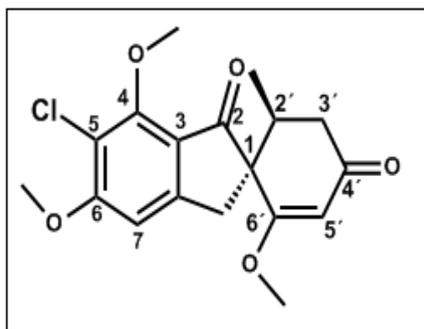


FIGURA 4.36-Substância 4

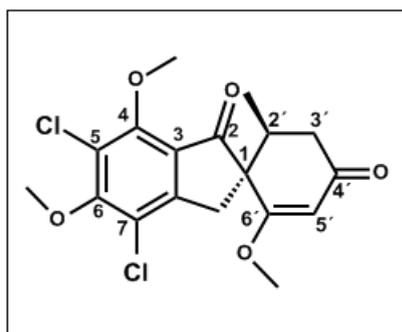
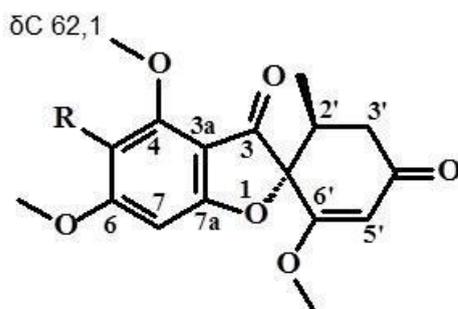
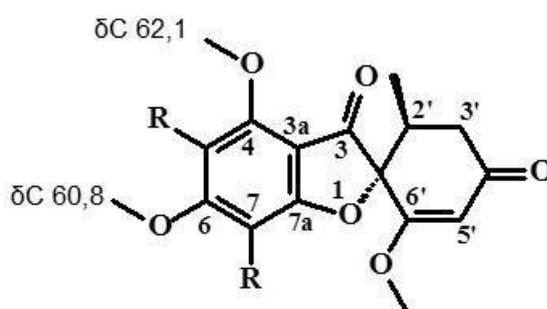


FIGURA 4.37-Substância 5

O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.36 e FIGURA 4.37) e DOSY-2D da fração correspondente à banda cromatográfica 5 em 19, 50 min refere-se a uma mistura de no mínimo 3 compostos. O experimento de NOESY-2D mostrou correlação entre o sinal em δH 6.13 (s, 1H) com os sinais de duas metoxilas em δH 4,03 e 3,98, e aquele em δH 5,55 com o sinal de metoxila em δH 3,62 (sinais traçados em verde na FIGURA 4.42). Esses sinais sugerem a presença da griseofulvina (2) (deslocamentos ligeiramente diferentes daqueles mostrado no item 4.4.3 devido ao fato de nesta fração haver outros derivados da griseofulvina). O NOESY-2D também mostra a correlação entre o sinal em δH 6.46 (s, 1H) com o sinal de uma metoxila em δH 4,00, e aquele em δH 5,57 com o sinal de metoxila em δH 3,58 (sinais traçados em vermelho na FIGURA 4.42). Em comparação com a griseofulvina, a correlação do sinal em δH 6.46 com somente uma metoxila, sugere substituinte em C-5 e esse deslocamento atribuído ao H-7. A metoxila em δH 4.16 não mostrou NOESY (correlação) no experimento de NOESY-2D (FIGURA 4.42), e este deslocamento no experimento de HSQC (em vermelho na FIGURA 4.47 corresponde ao deslocamento químico em δC 62,1, ou seja, *orto* disubstituída, e permitindo atribuí-la à metila em C-4. Analisando os demais sinais do espectro de RMN ^1H , os experimentos de HSQC e HMBC, pode-se sugerir para esses deslocamentos a presença da 5-R-declorogriseofulvina, não sendo possível atribuir o substituinte a C-5.



No experimento de NOESY-2D (FIGURA 4.42) ainda pode-se observar a correlação de uma sinal em $\delta H 5,58$ com o sinal de metoxila em $\delta H 3,65$ (sinais pontilhado na FIGURA 4.43). Duas metoxila em $\delta H 4,15$ e $4,06$ não mostraram NOE no experimento de NOESY-2D (pontilhado na FIGURA 4.42), e estes deslocamentos no experimento de HSQC (em pontilhado na FIGURA 4.47) correspondem ao deslocamento químico em $\delta C 62,1$ e $60,8$, respectivamente, ou seja, *orto* disubstituída, e permitindo atribuí-las às metilas em C-4 e C-6. No espectro de RMN 1H não há outro sinal de hidrogênio aromático para ser atribuído, sugerindo um anel totalmente substituído, ou seja, um derivado da griseofulvina com substituintes em C-5 e C-7. Assim, analisando os demais sinais do espectro de RMN 1H , os experimentos de HSQC e HMBC, pode-se sugerir para esses deslocamentos a presença de 5-R-7-R'-declorogriseofulvina, não sendo possível atribuir o substituinte a C-5 e C-7.



Com o intuito de definir os substituintes em C-5 e C-7, a fração correspondente à banda cromatográfica em 19,50 min foi analisada por LC-MS/MS, e o cromatograma de íons totais em ionização modo positivo, confirmando a presença de no mínimo 3 compostos, Figura 4.38.

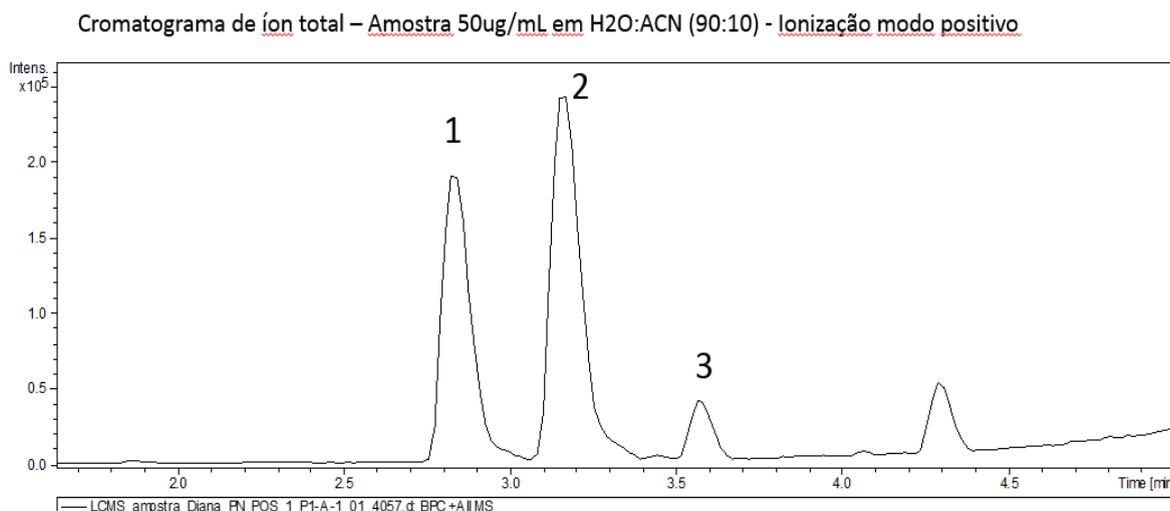


FIGURA 4.38-Cromatograma de íons totais em ionização no modo positivo [amostra 50ug/mL em H₂O:ACN (90:10)].

O espectro do íon extraído da banda cromatográfica de 2,78 a 2,95 min (banda 1), confirmou a presença da griseofulvina (**2**), cujo íon molecular a [M+H] m/z 353,0814; 354,0848 e 355,0789, este ultimo em maior intensidade que o segundo, confirmam a presença de cloro na molécula, Figura 4.39.

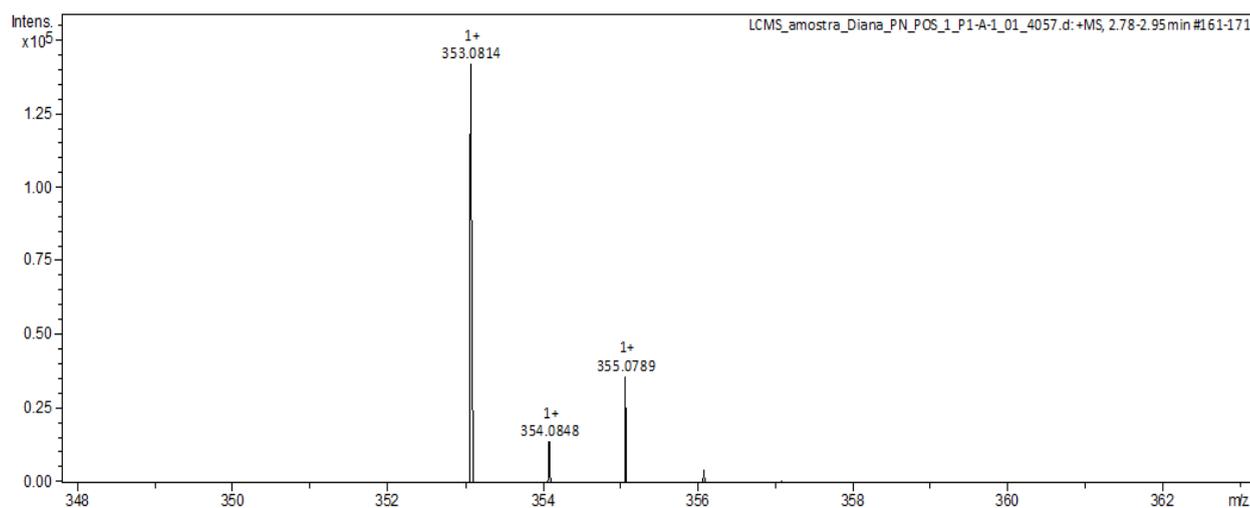


FIGURA 4.39:- Espectro do íon extraído da banda cromatográfica de 2,78 a 2,95 min.

O íon extraído da banda cromatográfica de 3,09 a 3,29 min (banda 2),⁷⁶ mostra a presença de um isômero da griseofulvina (**2**), ou seja, o íon molecular a $[M+H]$ m/z 353,0809; 354,0841 e 355,0785, confirma a presença de somente um substituinte cloro Figura 4.40. Considerando os comentários anteriores sobre o deslocamento químico no espectro de RMN para a metoxilas em C-4, pode-se dizer que o fungo em estudo produziu a 5-cloro-7-declorogriseofulvina, q a qual está sendo citada pela primeira vez na presente dissertação.

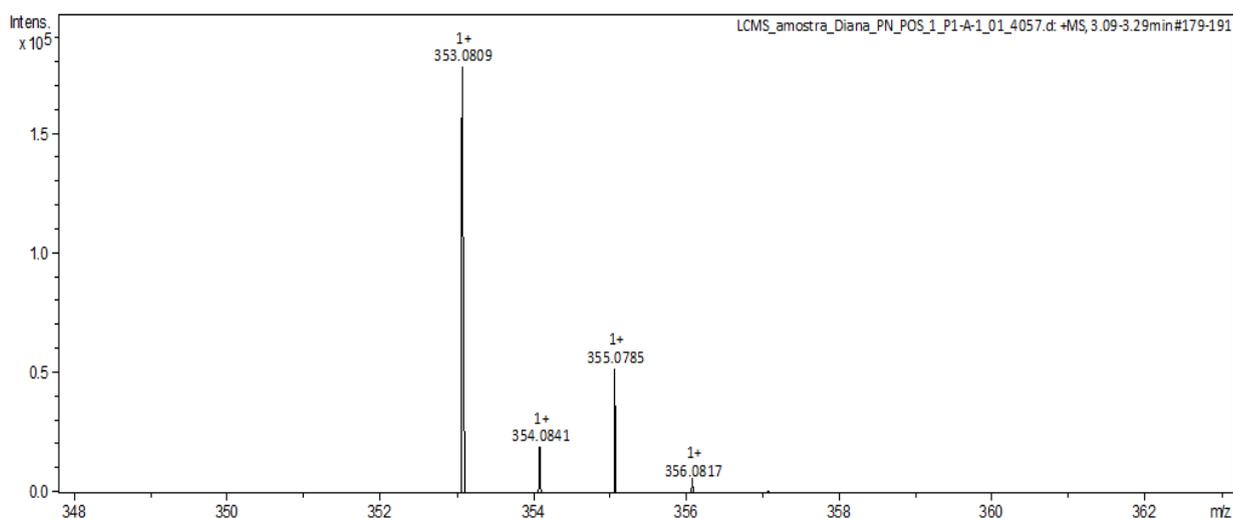


FIGURA 4.40: Espectro do íon extraído da banda cromatográfica de 3,09 a 3,29 min.

O espectro de íon extraído da banda cromatográfica de 3,53 a 3,62 min (banda 3), mostra o íon molecular a $[M+H]$ m/z 387,0416; 388,0449, indicando em comparação ao composto anterior a presença de mais um substituinte cloro ($352-H+35= 386$; $M+H$ 387) Figura 4.41. Portanto, esses dados permitem concluir a presença de 5-clorogriseofulvina, a qual foi isolada anteriormente por Roullier *et al*, 2016.

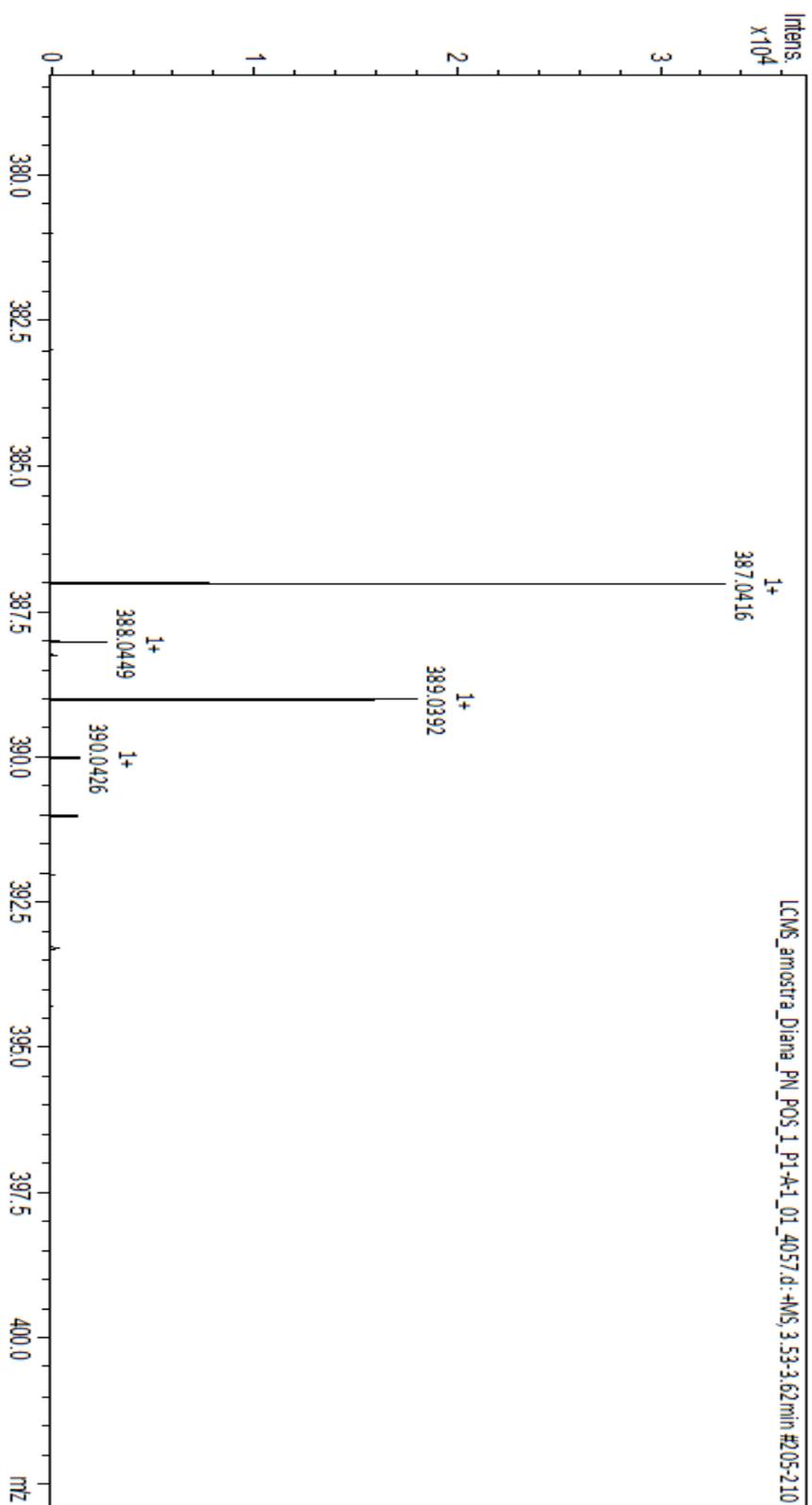


FIGURA 4.41: Espectro do íon extraído da banda cromatográfica de 3,53 a 3,62 min.

TABELA 4.6 - Dados de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD). Substância 4

Posição	^1H (ppm)	HMBC	HSQC
4			
5			
6			
7	6,46 (s,1H)	106,7; 109,6; 164,7;172,0	90,1
8			
9			
1'			
2'	0,95 (m)	36,6; 40,2;89,6; 90,9	14,0
3'			
4'			
5'	5,57 (s,1H)	90,3; 170,9	104,5
4(OCH ₃)	4,16 (s,3H)	154,8	62,1
6(OCH ₃)	4,00(s,3H)	164,6	56,5
6'(OCH ₃)	3,64 (s,3H)	170,9	56,2

TABELA 4.7 - Dados de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD). Substância 5

Posição	^1H (ppm)	HMBC	HSQC
4			
5			
6			
7			
8			
9			
1'			
2'	0,95 (m)	36,6; 40,2;89,6; 90,9	14,0
3'			
4'			
5'	5,58 (s,1H)	90,3	104,6
4(OCH ₃)	4,15 (s,3H)	154,8	62,1
6(OCH ₃)	4,06(s,3H)	161,6	60,8
6'(OCH ₃)	3,65 (s,3H)	170,9	56,2

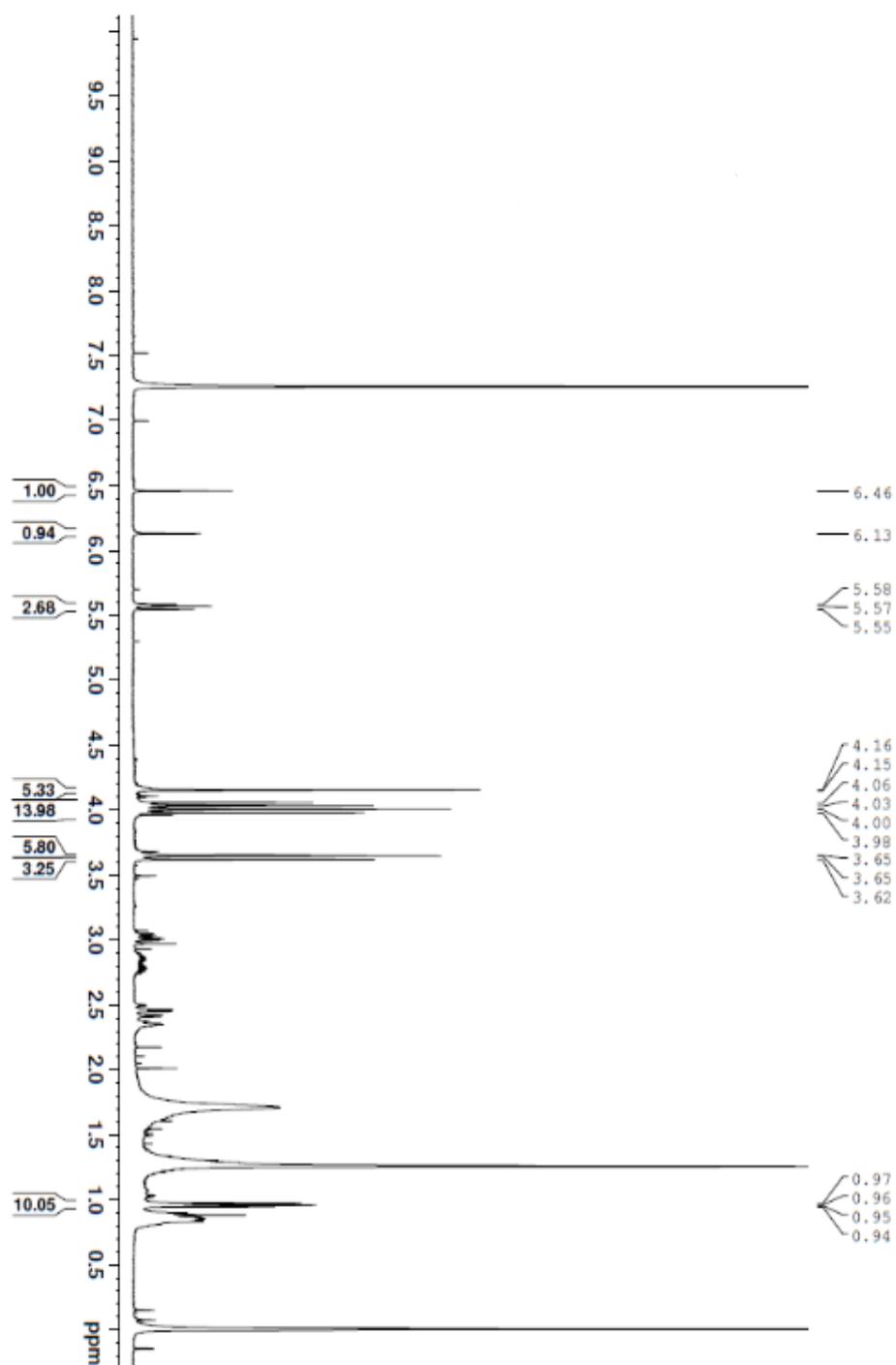


FIGURA 4.42 -Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) da fração referente à banda cromatográfica **5**

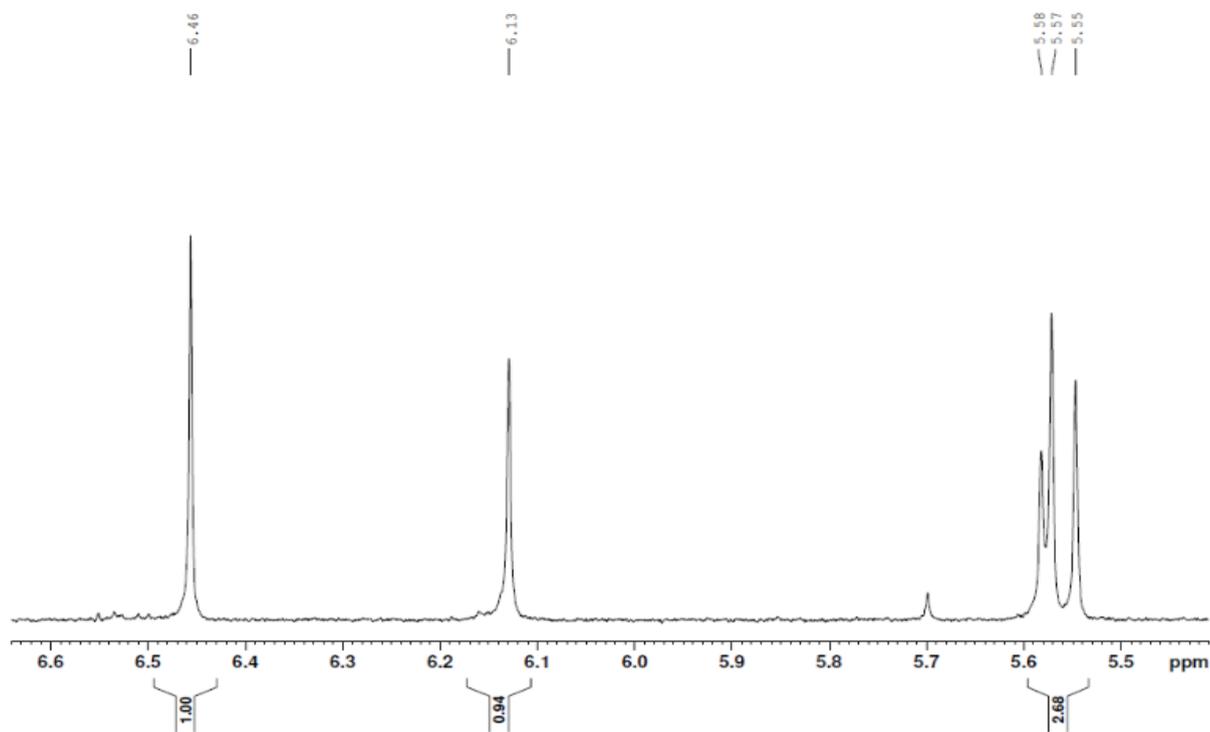


FIGURA 4.43- Espectro de RMN ¹H (600 MHz, CD₃OD) da fração referente à banda cromatográfica 5, expansão da região de sinais de hidrogênio aromáticos.

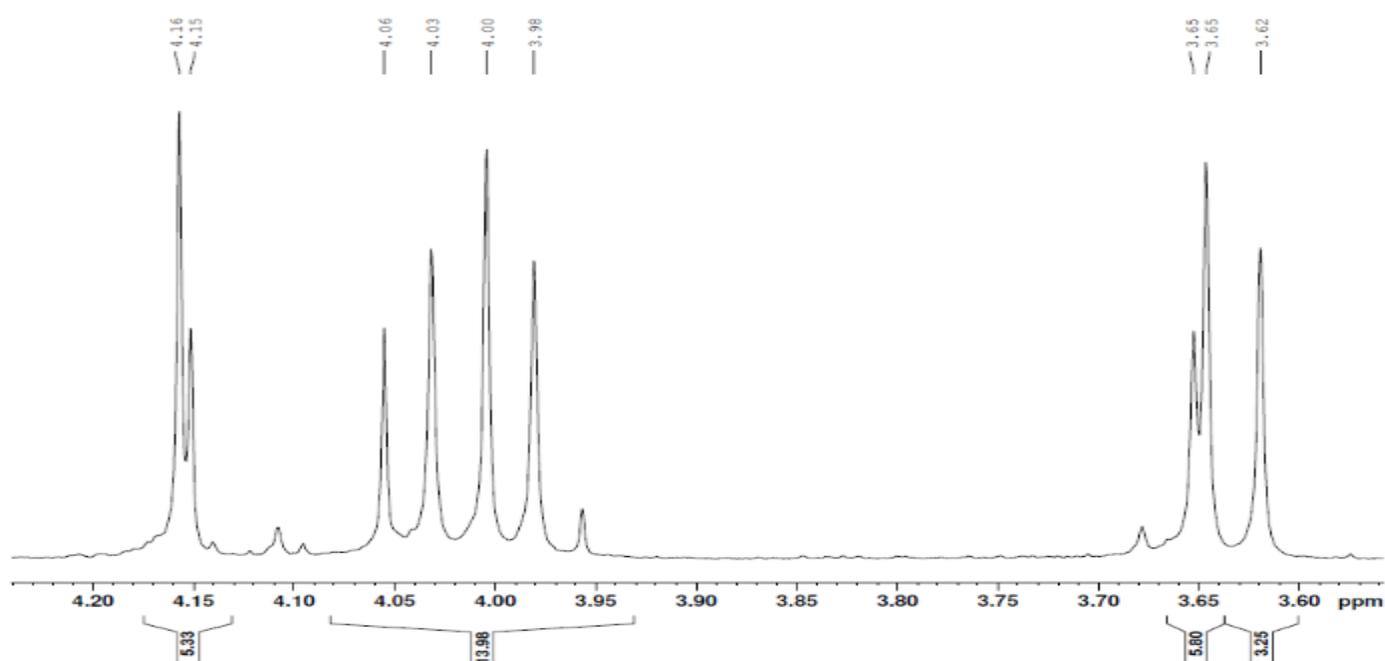


FIGURA 4.44- Espectro de RMN ¹H (600 MHz, CD₃OD) da fração referente à banda cromatográfica 5, expansão da região de sinais de metoxilas.

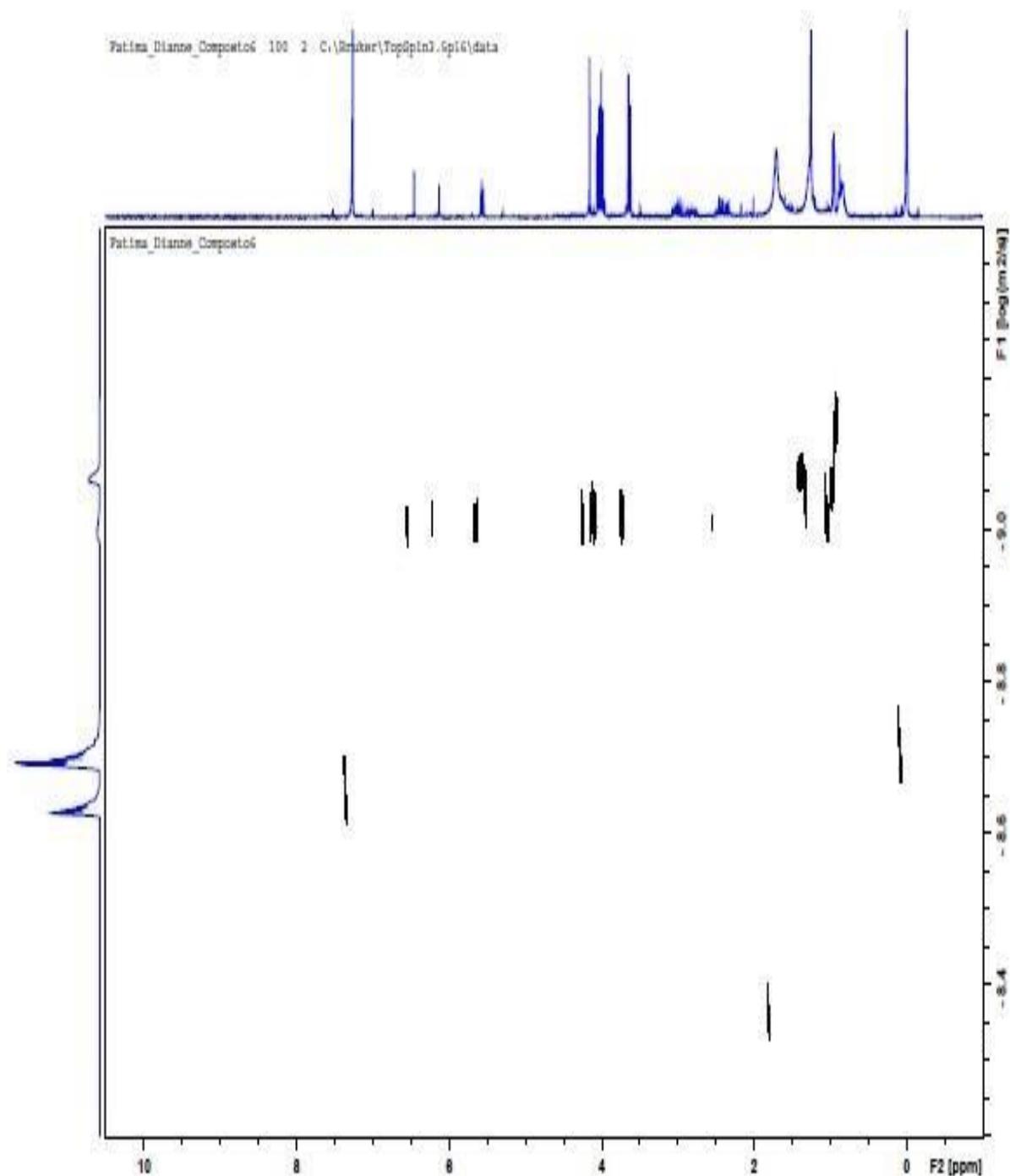


FIGURA 4.45 -Espectro de RMN DQSY-2D (600 MHz, CD₃OD). Substância **4** e **5**.

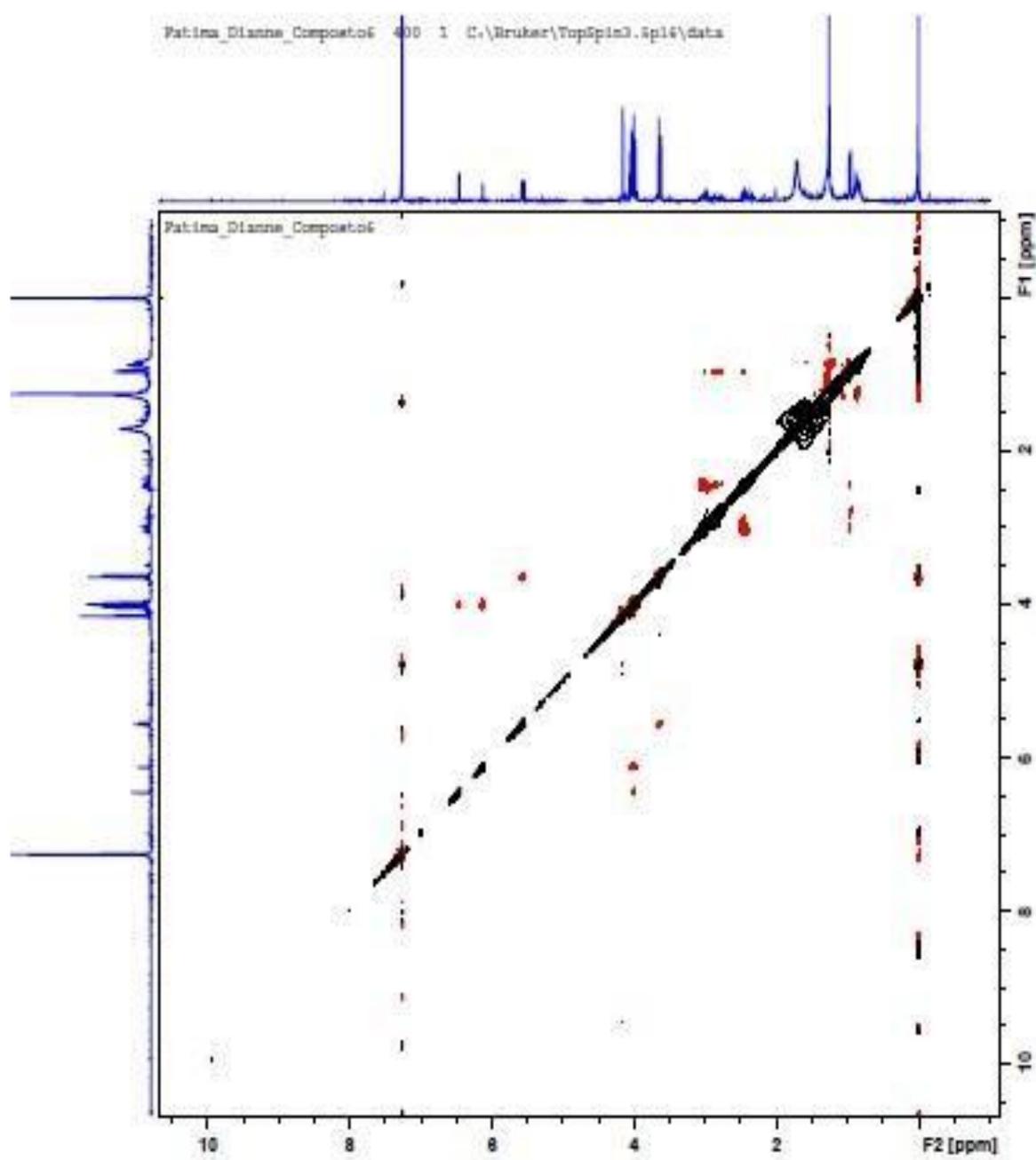


FIGURA 4.46-Espectro de NOESY-2D (600 MHz,CD₃OD) da fração referente à banda cromatográfica 5.

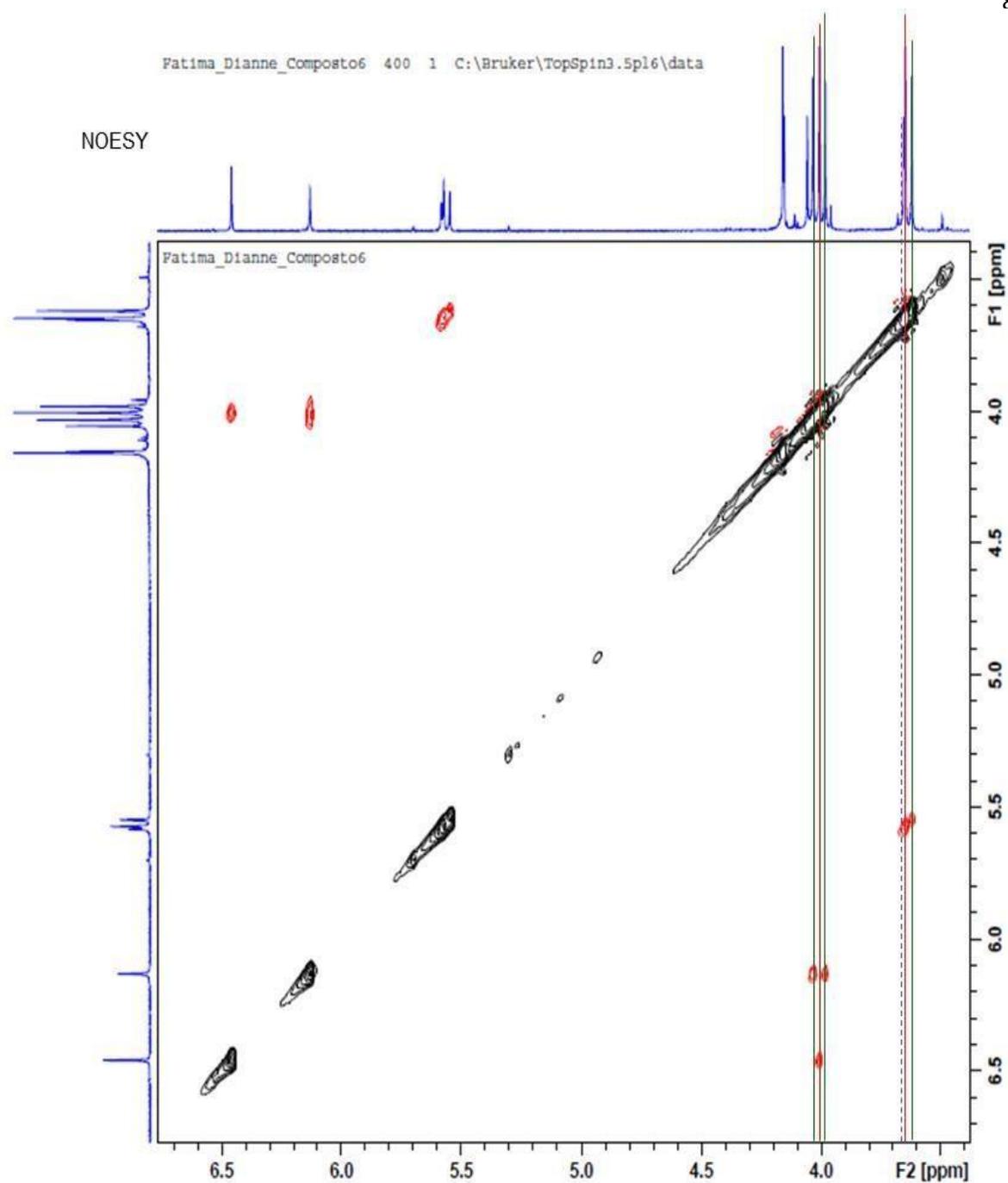


FIGURA 4.47- Espectro de NOESY-2D (600 MHz, CD₃OD) da fração referente à banda cromatográfica 5, expansão da região de δ 6,5 a 3,6.

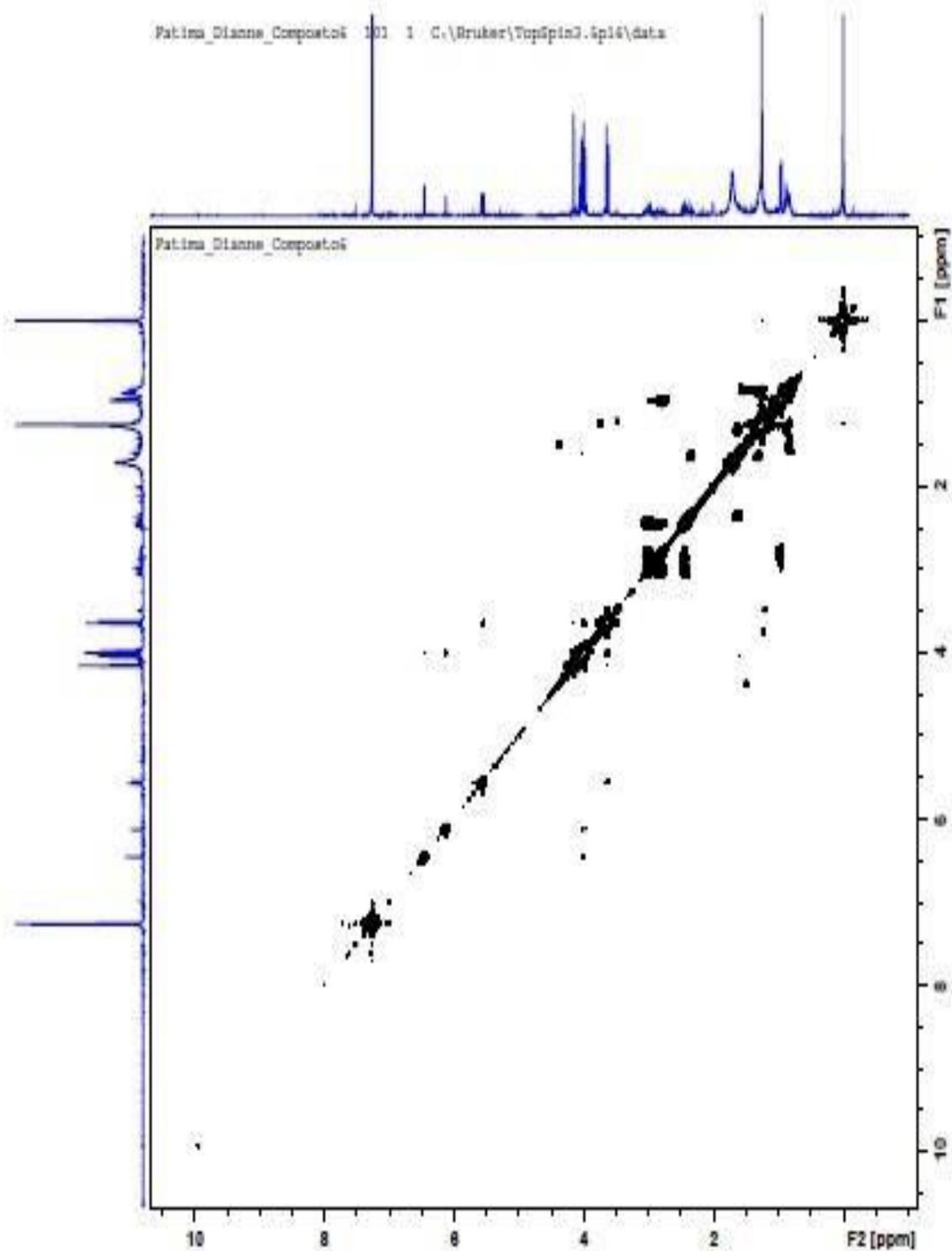


FIGURA 4.48- Espectro de RMN Cosy-2D (600 MHz, CD₃OD)Substância 4 e 5.

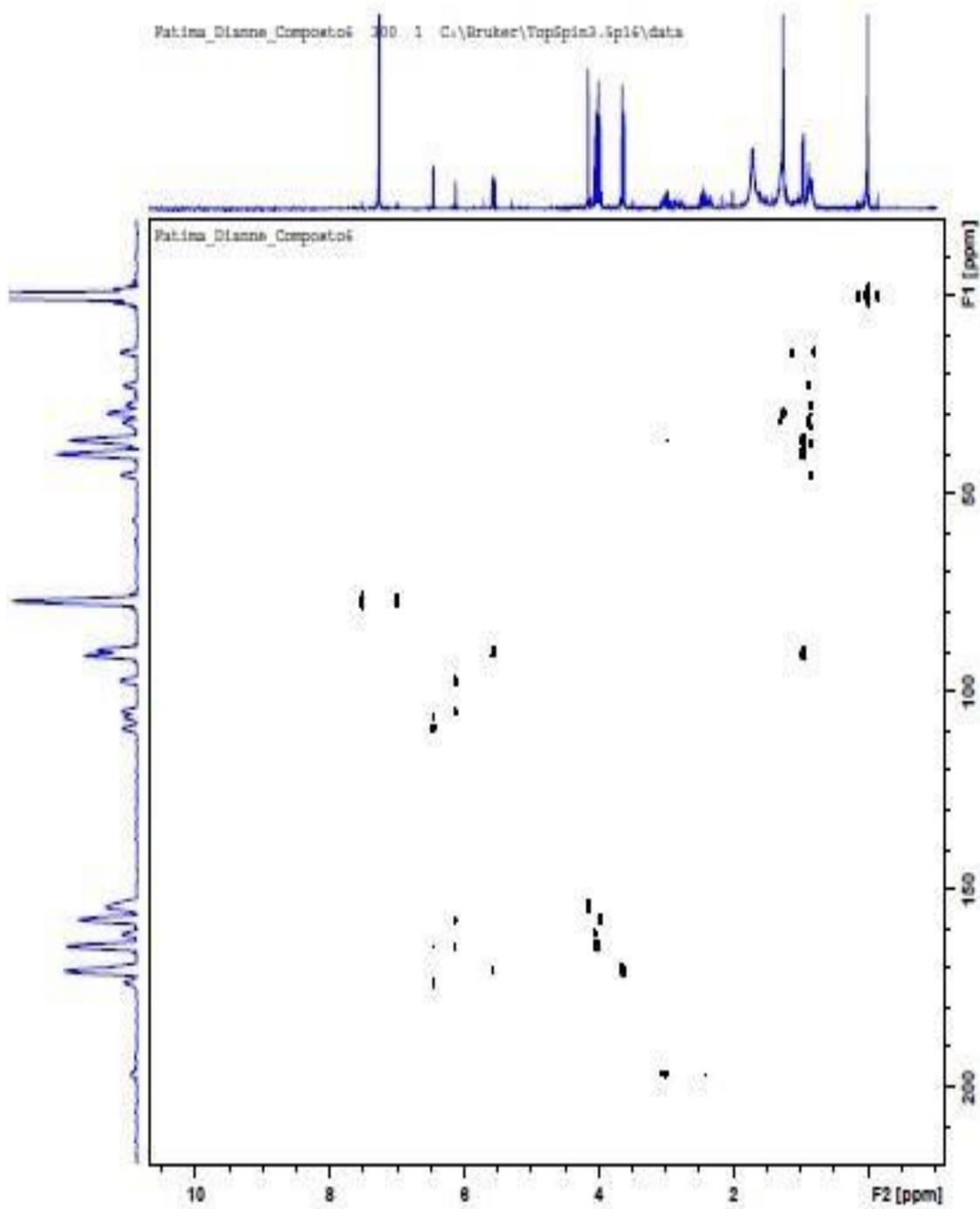


FIGURA 4.49- Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD₃OD) da fração referente à banda cromatográfica 5.

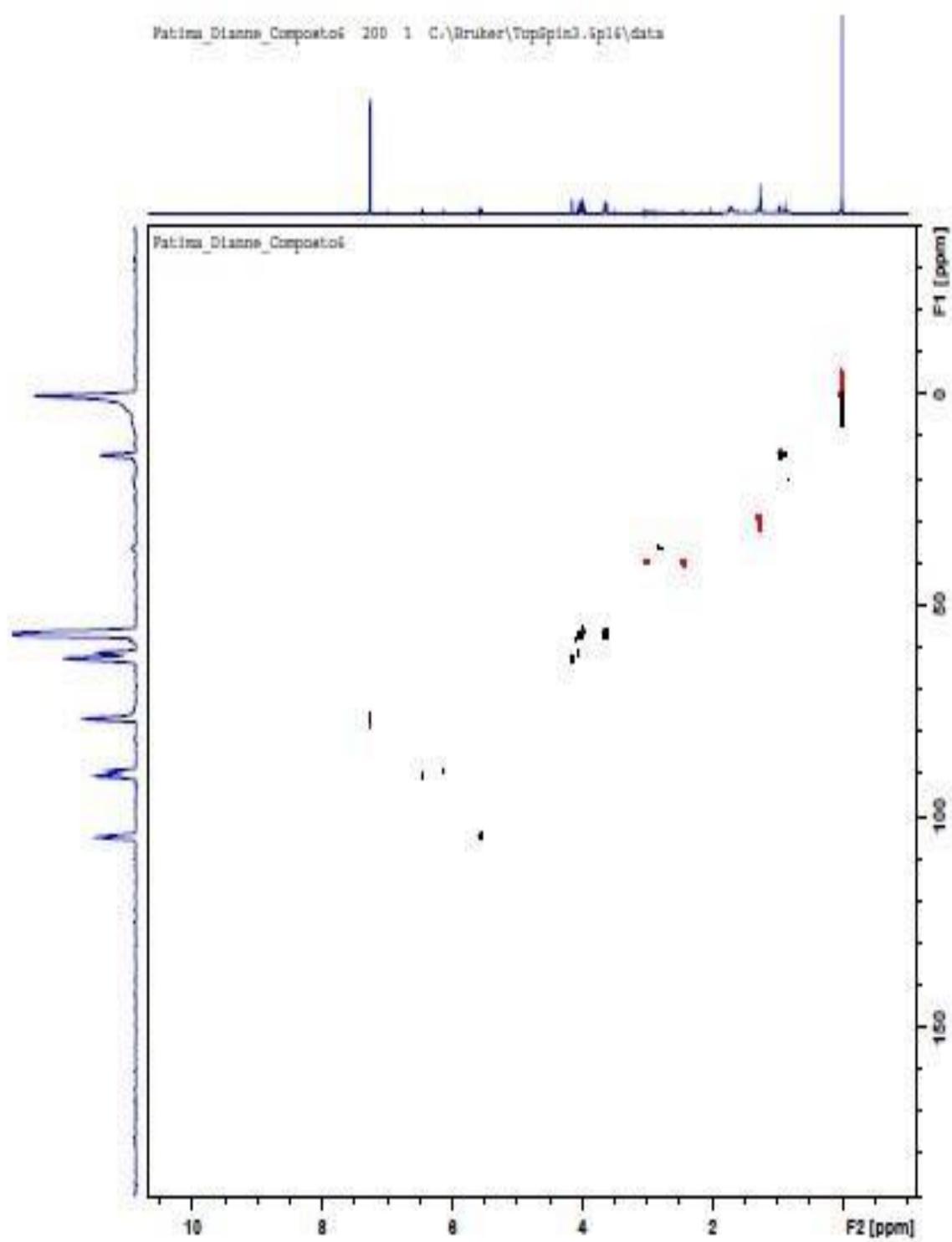


FIGURA 4.50- Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CD_3OD) da fração referente à banda cromatográfica 5, expansão da região de sinais de hidrogênio aromáticos.

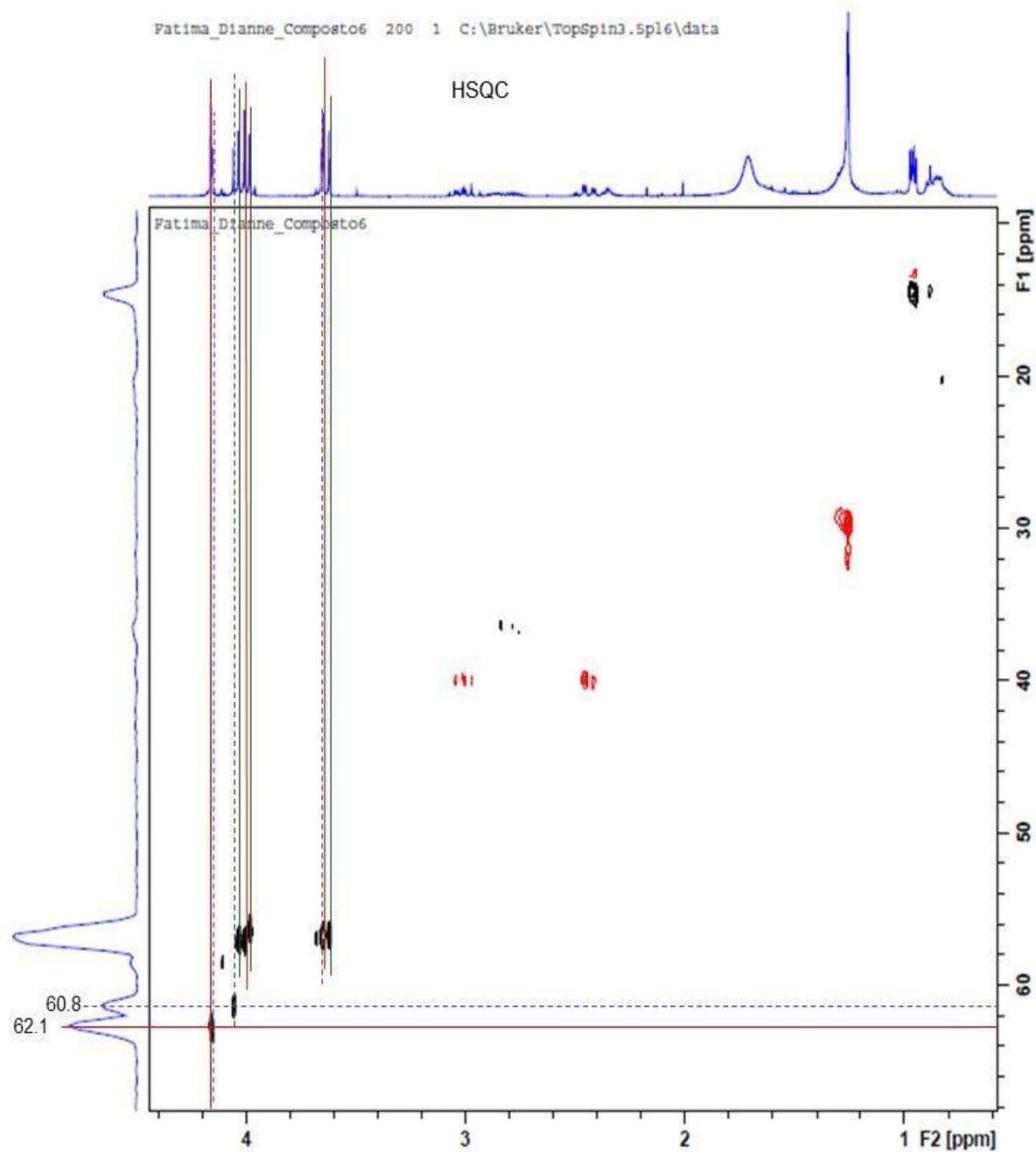


FIGURA 4.51- Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CD_3OD) da fração referente à banda cromatográfica 5, expansão da região das metoxilas.

4.6 Atividade biológica dos constituintes químicos

4.6.1 Atividade hemolítica

A avaliação da atividade citotóxica permite muitas vezes identificar compostos antitumorais de origem natural, vegetal e marinho. O ensaio das hemólises é uma prova fácil de realizar no laboratório mediante a qual se pode determinar a atividade lítica das substâncias quando estão em contato com os eritrócitos, provocando sintomas similares aos da anemia: fadiga, palidez na pele e expulsão da urina de cor roxa ou marrom, pelo que é de suma importância avaliar todas as reações para evitar diagnósticos errados que conduzam a um mau tratamento.

A atividade hemolítica dos compostos obtidos (Declorogriseofulvina-Figura 4.13, Griseofulvina-Figura 4.19) foram testadas contra *Eritrócitos*: eritro(sangue) + cito(células) isolado de sangue humano. O sangue foi centrifugado (4,7309g por 15 min a 4°C) em citrato de sódio 3.8% (1:4 v/v), o sedimento obtido foi posteriormente lavado três vezes usando a mesma solução. Após, a solução resultante foi resuspendida em Tampão Fosfato Salino (PBS) (10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl, pH 7.4). A concentração de eritrócitos foi de 10⁷ determinada por câmara de Neubauer. A solução das células sanguíneas foi incubada em PBS e com diferentes concentrações dos metabólitos previamente isolados por 30 min a 37°C. A solução se por 10 min, 4°C) para remover as células lisadas. Finalmente se determinou a concentração das células lisadas através da medida da absorvância do sobrenadante a 414 nm. O máximo da célula (100%) é obtido através da incubação dos eritrócitos com 0.1% (v/v) de Triton X-100. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

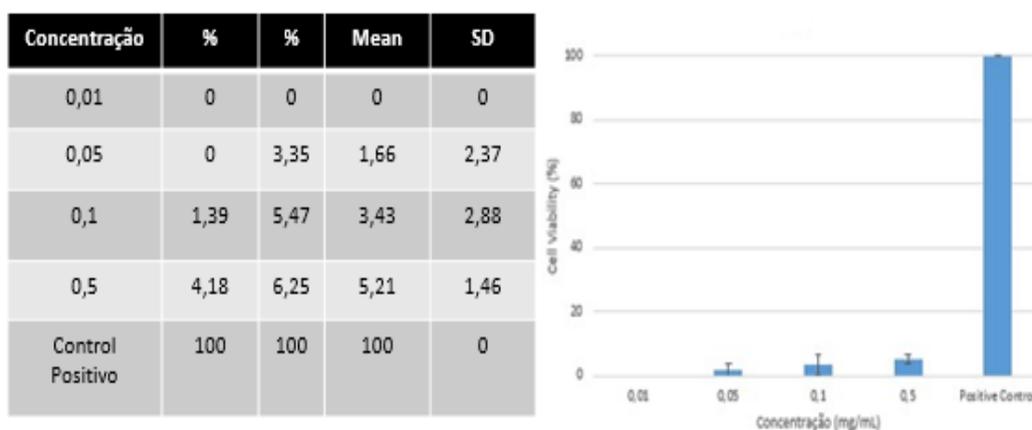


FIGURA 4.52-Valores e gráfico da viabilidade celular dos eritrócitos.Composto 1

Para a substância 1 denominada como Declorogriseofulvina demonstrou-se que a mesma é bem tóxica em sangue, como o mostrado na (Figura 4.50) Verifica-se que a medida que vai diminuindo a concentração do composto vai diminuir a viabilidade celular dos glóbulos vermelhos (eritrócitos), até não permitir por completo a produção dos mesmos, comparando-o por tanto com o controle positivo que é de soro fisiológico (os eritrócitos aumentam quando os valores são próximos aos fisiológicos) tendo uma viabilidade celular máxima. Portanto esta diminuição dos eritrócitos pode levar à morte do organismo, já que estes são os principais portadores de oxigênio às células e tecidos do corpo. A Diclorogriseofulvina é de uma grande importância já que apesar de ser um análogo da Griseofulvina, não se conhecia atividade biológica da mesma e, portanto, é importante saber pois o sangue permite a realização de todos os processos biológicos no interior do organismo e qualquer alteração manifestada na mesma pode provocar enfermidades provocadas de diferentes etiologias ou mau funcionamento de algum órgão ou estrutura corporal. Nestes e n s a i o s a via de administração intravenosa da substância com alta atividade hemolítica, pode-se dizer tóxica além, pode induzir morte das células do sangue e causar efeitos secundários graves.

A (Figura 4.53), mostra os resultados da atividade hemolítica da substância 2.

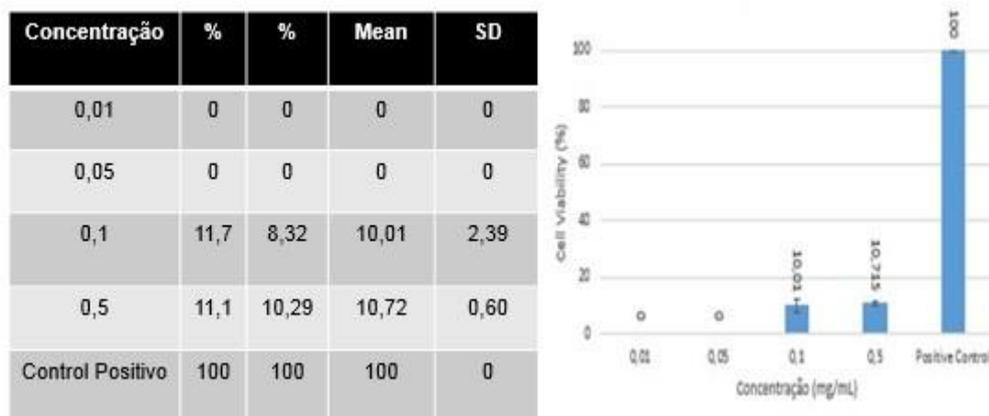


FIGURA 4.53-Valores e gráfico da viabilidade celular dos eritrócitos.Composto 2

Na atividade hemolítica com a substância 2 (Griseofulvina), vemos como a concentrações de 0,1-0,5 mg/mL, vai aumentar a viabilidade celular, em diferença com o controle positivo, mas bem maior que a substância 1, por tanto vai ser menos tóxica em sangue, mas os valores obtidos não a favorece muito, já que ainda estão muito por sob do controle positivo da viabilidade celular dos eritrócitos, considerando-se também uma substância tóxica para a sangue no corpo.

4.6.2 Avaliação microbiológica

Método de Concentração Inibitória para bactérias (MICs).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva que pode causar várias enfermidades e é também a principal causa da bacteriemia mortal. O tratamento destas enfermidades é importante devido ao desenvolvimento da resistência bacteriana. Um caso clássico é *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Isto requer o descobrimento de novos antibióticos cujo mecanismo de ação difere dos convencionais, normalmente relacionados com objetivos metabólicos específicos. Por estas características e outras utilizamos o *S. aureus* como padrão neste trabalho.

Os valores de MICs foram determinados pelo descrito por NCCLS, 1993. Cabe destacar que não é uma medida qualitativa, mas sim quantitativa, onde são determinados os números de microrganismos presentes, que devem estar de acordo com os padrões microbiológicos.

Primeiramente foi pesado uma concentração de 600 ug para cada composto. Posteriormente foi dissolvido numa solução de Metanol e Água 1:1, em frascos de vidro de 5 ml. As MICs para cada substância foram obtidas pelo método “broth microdilution”. Numa concentração 5×10^5 unidade formadora de colônia (CFU) MI. A bactéria foi inoculada em uma placa estéril de microtitulação 96-poços (em poliestireno) (Figura 4.54) na ausência (controle positivo) e em presença de crescentes concentrações das substâncias (compostos 1, 2 e 3) para 0.25 – 128µg/mL. A bactéria inoculada foi *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) a qual pertence à coleção de culturas microbianas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Posteriormente a placa foi incubada a 37°C por 18h (Barbosa. S *et al*, 2016). A MIC é definida como a menor concentração do composto em que não se observa crescimento de células planctônicas. Os testes foram efetuados em duplicata. As soluções do controle negativo foram separadas só com o solvente. As suspensões do inóculo bacteriano foi ajustado para $1,5 \times 10^6$ UFC/ML. Como branco utilizou-se solução salina estéril.

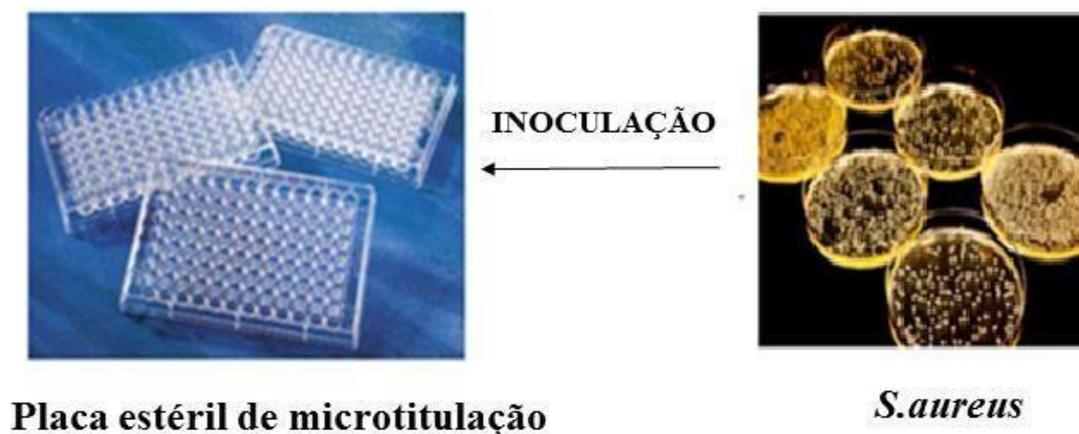


FIGURA 4.54- Placa de microtitulação onde se inocula o *S. aureus*.

Uma vez transcorrido às 18 horas de incubação verifica-se que as três substâncias apresentaram MICS de 128 Unidades Formadoras de Colônias (UFC/ML), portanto foi bem alta mostrando-se que a atividade biológica que exercem cada uma das substâncias sobre a bactéria é praticamente nula, indicando que não tem atividade antimicrobiana frente *S. aureus* e se pode afirmar que não vão exercer função antimicrobiana frente ao grupo de bactérias Gram Positivas. O estafilococo dourado, comumente conhecido assim, é um padrão para bactérias Gram Positivas.

Conclusão

O trabalho desenvolvido permitiu estudar o fungo pertencente à Família Xylariaceae, isolado da região de Minas Gerais. Através dos dados obtidos se evidenciou que o fungo é uma fonte promissora na produção de metabólitos com alta atividade hemolítica, mas não evidenciam atividade antimicrobiana contra bactérias Gram Positivas. O estudo do fungo, permitiu o isolamento e identificação de 5 compostos, através dos análises de LC-NMR, LC-MS-MS, ESI-MS, os quais contribuem à fração correspondente de 80% de acetato de etila com 20% de hexano. As substâncias identificadas são Griseofulvinas e análogas, e a presença de uma Isòcumarina, o qual contribuiu ao fortalecimento do trabalho. Uma das substâncias isoladas (griseofulvina) foi testada na produção de eritrócitos em sangue apresentando uma citotoxicidade mediana no sangue. Foi possível traçar o perfil químico de uma substância pouco conhecida (Declorogriseofulvina), assim como analisar sua atividade biológica. Foi possível a determinação de uma substâncias análogas da Griseofulvina, o qual vai permitir desenvolver trabalhos em linhas de pesquisas de células tumorais mamarias, permitindo portanto que ampliemos e fortaleçemos nossos conhecimentos

6. REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRIDGE, D. C., BURROWS, B. F. & TURNER, W. B. “The structures of the fungal metabolites cytochalasins E and F”. Chem. Commun:148-149, 1972.

ALY A.H, DEBBAB A, PROKSCH P. “Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises”. Appl. Microbiol. Biotechnol, 90 (6): 1829- **1845, 2011.**

ARAÚJO, E.F. DE, DE QUEIROZ, L.P., MACHADO, M.A. “What is *Citrus*? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe Citreae (Rutaceae subfamily Aurantioideae)”. Org. Divers. Evol. 3: 55-62, 2003.

ARNOLD, E., MEJÍA, L., KYLLO, D., ROJAS, E., MAYNARD, Z., ROBBINS, N. “Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree”. PNAS, 100 (26):15649-15654, 2003.

ARNOLD A.E. “Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges and frontiers”. Fungal Biol Rev, 2: 51-66, 2007.

AZEVEDO, J.L.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. Microrganismos Endofíticos. Ecologia Microbiana. Editora EMBRAPA, Jaguariúna-SP, 1998 .p. 117-137.

BARBOSA. S; NOBRE. T; VOLPATI. D; CIANCAGLINI. P; CILLI. E.M; LORENZÓN. E; OLIVEIRA JR.O. “The importance of cyclic structure for Labaditin on its antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*”. Colloids Surf. B :148 453–459, 2016.

BARRERA, CAC, BARRERA, EDC, FALLA, DSG, MURCIA, GD, SUAREZ, LEC. “Seco-Limonoids and quinoline alkaloids from *Raputia heptaphylla* and their antileishmanial activity”. Chem. Pharm. Bull. 59 :855-859, 2011.

BRAGA, P.A.C.; SEVERINO, V.G.P.; DE FREITAS, S.D.L.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; PIRANI, J.R.; GROppo, M.; DA SILVA, M.F.G.F. “Dihydrocinnamic acid derivatives from *Hortia* species and their chemotaxonomic value in the *Rutaceae*”. Biochem. Syst. Eco (43): 142-151, 2012.

BOONPHONG, S.; KITTAkoop, P.; ISAKA, M.; PITTAYAKHAJONWUT, D.; TANTICHAROEN, M. & THEBTARANONTH, Y. “Multiplolides A and B, new antifungal 10-membered lactones from *Xylaria multiplex*”. J. Nat. Prod, 64(7): 965-967,2001.

BUT, P.P-H., POON A.W-S, SHAW, P-C., SIMMONS, M.P., GREGER, H. “Contribution of molecular cladistics to the taxonomy of *Rutaceae* in China”. J. Syst. Evol. 47:144-150, 2009.

CABEZAS L, CALDERÓN C, MEDINA L, BAHAMÓN MI, CÁRDENAS M, BERNAL AJ, GONZÁLEZ A RESTREPO S. “Characterization of cellulases of fungal endophytes isolated from *Espeletia* spp”. J. Microbiol, 50 (6): 1009-1013, 2012.

CAFÊU, M.C; SILVA, G.H; HELDER L. TELES, BOLZANI, V; ARAÚJO, A.R PFENNING, L.H. “Substâncias antifúngicas de *xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *palicourea marcgravii* (rubiaceae)”. *Quim. Nova*, Vol. 28, 6:991-995, 2005.

CHASE, M.W., MORTON, C.M., KALLUNKI, J.A. “Phylogenetic relationship of Rutaceae: A cladistic analysis of the subfamilies using evidence from *rbcL* and *atpB* sequence variation”. *Am. J. Bot.* 86:1191-1199, 1999.

CHEN X.M, DONG H.L, HU K.X, SUN Z.R, CHEN J, GUO S.X. “Diversity and antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe”. *J Plant Growth Regul*, 29 (3): 328-337, 2010.

CHITHRA.A. “Comparative study of antiretroviral therapy induced CD4T-cell changes among HIV infected patients”. *Int J Pharm Techno*, 2230 –8407, 2014.

CORREA, D.B.; GOTTLIEB, O.R.; PADUA, A.P. “Dihydrocinnamic acids from *Hortia badinii*”. *Phytochemistry* 14: 2059-2060, 1975.

CORREA, D. B.; GOTTLIEB, O. R.; PADUA, A. P.; ROCHA, A. I. “Constituents of *Hortia longifolia*”. *Rev. Latinoamer. Quím.*, 7: 43, 1976.

CORREA, D.B.; GOTTLIEB, O.R.; PADUA, A.P. “Dihydrocinnamyl alcohols from *Hortia badinii*”. *Phytochemistry* 18: 351, 1979.

CROXATTO, A.; PROD’HOM, G. & GREUB, G. “Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology.” *FEMS Microbiol. Rev.* 36 : 380, 2012.

DAVIS, C., FRANKLIN, J., SHAW, J. & VILGALYS, R. “Endophytic Xylaria (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: Phylogenetics, distribution and symbiosis”. *Am. J. Bot.* 90 (11):1661-1667, 2003.

DE CANDOLLE, A.P. “*Prodromus systema naturalis regni vegetabilis I*”. Treuttel et Wurtz, Paris, 1824.

DENG, P. Y. ET AL. “Stimulation of calcitonin gene-related peptide synthesis and release: mechanisms for a novel antihypertensive drug rutaecarpine”. *J. Hypertens.*, 2004.p. 819 –1829.

DEWICK P.M. “Medicinal natural products”: JOHN WILEY & SONS, 2009. p. 2

DOMBROWSKI, A. W.; BIÇLLS G. F.; SABNIS, G.; KOUPAL, L. R.; MEYER, R.; ONDEYKA, J. G.; GIACOBRE, R. A.; MONAGHAN, R. L. & LINGHAM, R. B. "L- 696,474, A Novel Cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease I. The producing organism and its fermentation" *J. Antibio.* (5): 671-678, 1992.

EDWARDS, R. L. & WHALLEY, A. J. S. "Metabolites of the fungi. Part 24. Cytochalasin N, O, P, Q and R. new cytochalasins from the fungus *Hypoxylon terricola* Mill". *J. Org. Chem Society-Perkin Transactions* 1:57-65, 1989.

FERRACIN, R. J. "Estudo fitoquímico de *Hortia arborea*: Uma contribuição a quimiosistemática de Cusparieae". São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química – UFSCar, 1992.

FENG, Y.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J. & MUNRO, M. H. G. "Three novel cytochalasins X, Y and Z from *Pseudeurotium zonatum*". *J. Nat. Prod.*, 65: 1274-1277, 2002.

GAO, X. X.; ZHOU, H.; XU, D. Y.; YU, C. H.; CHEN, Y. Q.; QU, L. H. "High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach". *FEMS Microbiol Lett*, 249: 255–266, 2005.

GROPPO, M., KALLUNKI, J.A., PIRANI, J.R. "Synonymy of *Hortia arborea* with *H. brasiliiana* (Rutaceae) and a new species from Brazil". *Brittonia* 57:28-34 2005.

GROPPO, M., PIRANI, J.R., SALATINO, M.L.F., BLANCO, S.R., KALLUNKI, J.A. "Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA". *Am. J. Bot.* 95:985-1005, 2008.

GROPPO M.; PIRANI J.R. "A Revision of *Hortia* (Rutaceae)". *Syst. Bot.* 37(1) 197–212, 2012.

GUBIANI ET AL. "Critical values of soil bulk density evaluated by boundary conditions". *C.R.*, 6:994-1000, 2014.

GUNATILAKA, A. A. L. "Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence". *J. Nat. Prod.*, 69:509-526, 2006.

HASHIMOTO, T.; TAHARA, S.; TAKAOKA, S.; TORI, M. & ASAKAWA, Y. "Structures of a novel binaphthyl and three novel benzophenone derivatives with plant-growth inhibitory activity from the fungus *Daldinia concentrica*". *Chem. Pharm. Bull.*, 42(7):1528-1530, 1994.

HARBORNE, J. B. & BARTER, H. "Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants". TAYLOR & FRANCIS (Eds), 1993.

HERRERA-CORRALES, L.C; OSPINA-ALZATE, D.F, OCAMPO-JIMÉNEZ, O, O. "Efecto de gremios de hongos micorrícicos arbusculares aislados de un ambiente desértico sobre el crecimiento de frijol *Phaseolus vulgaris* bajo una condición de déficit hídrico". *Actu Biol* vol.36 (100), 2014.

HILL, R.A., CONNOLLY, J.D. "Triterpenoids". *Nat. Prod. Rep.*, 29(7):780-818, 2012.

HUANG WY, CAI YZ, SURVESWARAN S, HYDE KD, CORKE H, SUN M. "Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species". *Fungal Diver.*36(1):69-88, 2009.

JACOBS, H.; RAMDAYAL, F "Guyanin, a novel tetranortriterpenoid. Structure elucidation by 2D NMR spectroscopy". *Tetrahedron Lett.* 27:1453-1456, 1986.

JAFFE, W.P. "Effect of Feeding Griseofulvin on Rate of Growth of Chicks". *Nat.*, 192:469-470, 1961.

KALLUNKI, J.A., PIRANI, J.R. "Synopsis of *Angostura* Roem. & Schult. and *Conchocarpus*". *Mikan. Kew. Bull.* 53:257-334, 1998.

LIZARAZO-MEDINA, P.X; MENDOZA-SALAZAR, M.M; GUTIÉRREZ-GALLO A.I "Diversidad de la micobiota endófito de *Cattleya percivaliana* e *Cattleya trianaei* de cultivadas en invernadero". *Actu Biol* vol.37, (102), 2015.

LOVKOVA, M. Y., BUZUK, G. N., SOKOLOVA, S. M., & KLIMENT'EVA, N. I. "Chemical Features of Medicinal Plants". *Appl. Biochem. Microbiol.*, 37:229-237, 2001.

MARGULIS, L. E SCHWARTZ K. V. "Cinco reinos: um guia ilustrado dos filos da vida na Terra". 3ª Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001.

MATOS, L.G.; FIUZA, T.S.; TRESVENZOL, L.M.F.; REZENDE, M.H.; BARA, M.T.F.; SILVEIRA, E.N.; COSTA, E.A.; PAULA, J.R. "Estudo farmacognóstico de folhas e raízes da *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. (Rutaceae)". *Rev. bras. Planta med.* (16), 2014

MIYAKE, M.; AYANO, S.; OZAKI, Y.; MAEDA, H.; IFUKU, Y.; HERMAN, Z.; FONG, C.H.; HASEGWA, S. "Limonoids in seeds of karatachi plant (*Poncirus trifoliata*)". *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 65:1347-9, 1991.

M'PIGA, P.; BÉLANGER, R. R.; PAULITZ, T. C.; BENHAMOU, N. "Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-licopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28". *Physiol Mol Plant Pathol.*, 1997, 301-320.

MONACHE, F. D., MARLETTI, F., MARINI-BETTOLO, G. B. "Coumarins of *Hortia arborea* (Rutaceae): Hortiline and Hortiolone". *Gazz. Chim. Ital.* 106: 681, 1976.

MONACHE, F. D., VALERA, G. C., MARINI-BETTOLO, G. B., MELLO, J. F., DE LIMA, O. G. "Coumarins of *Hortia arborea* (Rutaceae). II. Hortiolone and Hortionone". *Gazz. Chim. Ital.* 107: 399, 1977.

MURRAY, R.D.H. "The naturally occurring coumarins". *Prog Chem Org Nat Prod.*, 83:1-673, 2012.

OLIEIRA, C. M.; REGASINI, L. O.; SILVA, G. H.; PFENNING, L. H.; YOUNG, M. C. M.; BERLINCK, R. G. S.; BOLZANI, V. S. & ARAUJO, A. R. "Dihydroisocoumarins produced by *Xylaria* sp. and *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with *Piper aduncum* and *Alibertia macrophylla*". *Phytochemistry Letters*, 4: 93-96, 2011.

OSMANOVA, N.; SCHULTZE, W. & AYOUB, N. "Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities" *Phytochem Rev.*, 9: 315-342, 2010.

PACHTER, I.J.; RAFFAUF, R.F.; ULLYOT, G.E; RIBEIRO, O. "The alkaloids of *Hortia arborea*". *Engl. J. Am. Chem. Soc.*, 82: 5187-5193, 1960.

PACHTER, I.J.; MOHRBACHER, J.; ZACHARIAS, D.E. "The chemistry of hortiamine and 6-metoxyrhetsinine". *J. Am. Chem. Soc.*, 63: 635-642, 1961.

PÁDUA, A. P. "Estudo químico de *Hortia badinii* e *Hortia longifolia*" Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 1976. Dissertação de Doctorado, 250p.

PANDA D., RATHINASAMY, K. E SANTRA, M.K, WILSON L. KINECT "Suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: implications for its possible use in the treatment of cancer". *Proc Natl Acad Sci.*, 28, 2015.

PETERSEN, A.B; RØNNEST, M.H; T.O; CLAUSEN, M.H. "The Chemistry of Griseofulvin". *Chem. Rev.*, (24):12088–12107, 2014.

PETRINI, O. "Ecology metabolites production and substrato utilization in endophytic fungi". *Nat.Tox.*, 1:185-196, 1992.

PLEBAN, S.; INGEL, F.; CHET, I. "Control of *Rhizoctnia solani* and *Sclerotium rolfsii* in greenhouse using endophytic *Bacillus* spp". *Eur J Plant Patho.*, 1: 665-672, 1995.

POON, W-S., SHAW, P-C., SIMMONS, M.P., BUT, P. P-H. "Congruence of molecular, morphological, and biochemical profiles in Rutaceae: a cladistic analysis of the subfamilies Rutoideae and Toddaliodeae". *Syst. Bot.* 32:837- 846, 2007.

QUANG, D. N.; HASHIMOTO, T.; NORUMA, Y.; WOLLWEBER, H.; HELLWIG, V.; FOURNIER, J.; STADLER, M. & ASAKAWA, Y. "Cohaerins A and B, azaphilones from the fungus *Hypoxylon cohaerens*, and comparison of HPLC-

based metabolite profiles in *Hypoxyylon* sect. *Annulata*". *Phytochem.*, 66: 797-809, 2005.

QUANG, D. N.; HASHIMOTO, T.; NORUMA, Y.; WOLLWEBER, H.; HELLWIG, V.; FOURNIER, J.; STADLER, M. & ASAKAWA, Y. "Sassafrins A-D, new antimicrobial azaphilones from the fungus *Creosphaeria sassafras*". *Tetrah.*, 61: 1743-1748, 2005.

QUANG, D. N.; HASHIMOTO, T.; NORUMA, Y.; WOLLWEBER, H.; HELLWIG, V.; FOURNIER, J.; STADLER, M. & ASAKAWA, Y. "Inhibition of nitric oxide production in raw 264.7 cells by azaphilones from xylariaceous fungi' *Biol. Pharm. Bull.*, 29(1): 34-37, 2006.

RØNNEST, M.H.; REBACZ, B.; MARKWORTH, L.; TERP, A.H.; LARSEN, H.; KRÄMER, A.; CLAUSEN, M.H. "Synthesis and Structure-Activity Relationship of Griseofulvin Analogues as Inhibitors of Centrosomal Clustering in Cancer Cells s". *J. Med. Chem.*, 10:3342-3347, 2009.

REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. "Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*". *Appl Environ Microbiol.*, 68:2261-2268, 2002.

RODRIGUES, S. P. "Uma contribuição para o ensino da sistemática na sala de aula: relato de experiência sobre a classificação dos animais de Aristóteles e Linné. *História da Ciência e Ensino: construindo interface*" s,2, 2010, pp.89-97 Disponível em: <http://revistas.pucsp.br/index.php/hcensino/article/view/4156> Acesso em 01 out 2013.

ROULLIER, C.; GUITTON, Y.; VALERY, M.; ARMAND, S.; PRADO, S.; DU PONT, T.R.; GORVEL, O.; POUCHUS, I.F. Automated Detection of Natural Halogenated Compounds from LC-MS Profiles- Application to the Isolation of Bioactive Chlorinated Compounds from Marine-Derived Fungi. *Anal. Chem.*, 88: 9143-9150, 2016.

RUBINI M, SILVA-RIBEIRO R, POMELLA A, MAKI C, ARAÚJO W, SANTOS D, AZEVEDO JL. "Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom disease". *Int. J. Biol. Sci.* , 1 (1): 24-33, 2005.

SAMUEL, R., EHRENDORFER, F., CHASE, M.W., GREGER, H. "Phylogenetic analyses of Aurantioideae (Rutaceae) based on non-coding plastid DNA sequences and phytochemical features". *Plant Biol.* 3: 77-87, 2001.

SANTANA, C.; SEGURA, D. & SÁNCHEZ, S. "Síntesis, función y origen evolutivo de los metabolitos secundários producidos por microorganismos". *Ver. Lat.-Amer. Microbiol.*, 36: 139-158, 1994.

SCHNEIDER, G.; ANKE, H. & STERNER, O. "Xylaramide, a new antifungal compounds, and other secondary metabolites from *Xylaria longipes*". *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 51: 802-806, 1996.

SCOTT, K.D., MCINTYRE, C.L., PLAYFORD, J. "Molecular analyses suggest a need for a significant rearrangement of Rutaceae subfamilies and minor reassessment of species relationship within *Flindersia*". *Plant Syst. Evol.* 223:15-27, 2000.

SEIGLER, D. S. "Plant Secondary Metabolism". Kluwer Academic Publisher(Eds), London, 1998.

SIEBER T. "Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists?" *Fungal Biol Rev*, 21 (2): 75-89, 2007.

SLIPPERS B, WINGFIELD M. "Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact". *Fungal Biol Rev*, 21 (2): 90-106, 2007.

SEVERINO, V.G.P.; BRAGA, P.A.C.; DA SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; THEODORO, J.E.; ELLENA, J.A. "Cyclopropane- and spirolimonoids and related compounds from *Hortia oreadica*". *Phytochem.*, 76:52-59, 2012.

SILVA, M.F. DAS G.F. DA; GOTTLIEB, O.R. "Evolution of Quassinoids and Limonoids in the Rutales". *Biochem. Syst. Ecol.* 15: 85-103, 1987.

SILVA, M.F. DAS G.F. DA; GOTTLIEB, O.R.; EHRENDORFER, F. "Chemosystematics of the Rutaceae: Suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family". *Plant Syst. Evol.* 161: 97-134, 1988.

SMITH, C.J., MORIN, N.R., BILLS, G.F., DOMBROWSKI, A.W., SALITURO, G.M., SMITH, S.K. "Novel sesquiterpenoids from the fermentation of *Xylaria persicaria* and selective ligands for the NPY Y5 receptor". *J. Org. Chem.*, 65: 001-5004, 2002.

SHEU, J. R. "Antithrombotic effect of rutaecarpine, an alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*, on platelet plug formation in in vivo experiments". *Br. J. Haematol.*, 110:110-115, 2000

SINGH, S. B.; ZINK, D.; POLISHOOK, J.; VALENTINO, D.; SHAFIEE, A.; SILVERMAN, K.; FELOCK, P.; TERAN, A.; VILELLA, D.; HAZUDA, D. J. & LINGHAM, R. B. "Structure and Absolute Stereochemistry of HIV-1 Integrase inhibitor integrin acid. A novel eremophilane sesquiterpenoid produced by a *Xylaria* sp.". *Tetrahedron Letters*, 40: 8775-8779, 1999.

STADLER, M.; WOLLWEBER, H.; HASHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y.; JU, Y-M.; ROGERS, J. D.; WETZSTEIN, H-G. & TICHY, H-V. "Secondary metabolite profiles, genetic fingerprints and taxonomy of *Daldinia* and allies". *Mycotaxon*, LXXVII: 379-429, 2001.

STROBEL, G.; YANG, X.; SEARS, I.J.; KRAMER, R.; SIDHU, R.S.; HESS, W.M. "Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*". *Microb.* 142,43: 5-440, 1996.

SUAREZ, L.E.C.; CASABÓ, J.; MONACHE, F.D.; MOLINS, E.; ESPINOSA, E.; MIRAVITLLES, C. "Hortiolida A, a novel limonoid from *Hortia colombiana*". *Anales de Química*, 94:307, 1998.

SUAREZ, L.E.C.; MENICHINI, F.; MONACHE, F.D. "Tetranorterpenoids and dyhydrocinnamic Acid from *Hortia colombiana*". *J. Braz. Chem. Soc*, 13,3: 339, 2002.

TAKAHASHI, J, LUCAS. E.M. "Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica". *Quim. Nov.*,31, 7:1807-1813, 2008.

TRUU, J.; TALPSEP, E.; HEINARU, E.; STOTTMEISTER, U.; WAND, H. & HEINARU, A. "Comparison of API 20NE and Biolog GN identification systems assessed by techniques of multivariate analyses". *J. Microbiol. Meth.*, 36 (3):193, 1999.

TOMINAGA, K. "In vivo action of novel alkyl methyl quinolone alkaloids against *Helicobacter pylori*". *J. Antimicrob.Chemother.*,50: 547–552, 2002.

VIEGAS, C. JR.; BOLZANI, V. DA S. & BARREIRA E. J. "Os produtos naturais e a química medicinal moderna". *Quím. Nova.*, 29, 2: 326-337, 2006.

WAGENAAR, M. M.; CORWIN, J.; STROBEL, G. & CLARDY, J. "Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinocladiella*". *J. Nat. Prod.*, 63: 1692-1695, 2000.

WHALLEY, A. J. S. & EDWARDS, R. L. "Secondary metabolites and systematic arrangement within the Xylariaceae". *Can J Bot.*, 73:802-810, 1995.

WHALLEY, A. J. S. "The xylariaceous way of life" *Mycopathol Res*, 100,8: 897-922,1996.

WHITMAN, W. B.; GOODFELLOW, M.; KÄMPFER, P.; BUSSE, H.-J.; TRUJILLO, M.E.; LUDWIG, W. & SUZUKI, K.-I. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 5, parts A and B, Nova York, Springer-Verlag, 2012.

WUBSHET S. G. "Targeting high-performance liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry–solid-phase extraction–nuclear magnetic resonance analysis 145 with high-resolution radical scavenging profiles—Bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus *Penicillium*": *Elsev.*,1302: 34-39, 2013.

XING-NA, W., REN-XIANG, T. & JI -KAI, L. "Xylactam, a New Nitrogen-containing Compound from the Fruiting Bodies of Ascomycete *Xylaria euglossa*." *J Antibiot.*,58: 268–270, 2005.

YAROSH, D. B. "Anti-inflammatory activity in skin by biomimetic of *Evodia rutaecarpa* extract from traditional Chinese medicine". *J. Dermatol. Sci.*,42: 13–21, 2006.

YANG, C.; CROWLEY, D. E.; MENGE, J. A. "16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots". *FEMS Microbiology Ecology*, 35: 129-136, 2001.

YUAN ZL, CHEN YC, YANG Y. "Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization ". *World J Microbiol Biotechnol*, 25 (2): 295-303, 2009.