

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

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE MICRO-ORGANISMOS  
ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS ÀS FRUTAS BANANA, PÊRA E  
GOIABA**

**LÍVIA SOMAN DE MEDEIROS\***

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

**Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho**

**\*BOLSISTA FAPESP**

**SÃO CARLOS-SP**

**2010**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M488eq

Medeiros, Lívia Soman de.

Estudo químico e biológico de micro-organismos endofíticos associados às frutas banana, pêra e goiaba / Lívia Soman de Medeiros. -- São Carlos : UFSCar, 2010. 164 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Química orgânica. 2. Microorganismos endofíticos. 3. Frutas. 4. Metabólitos secundários. 5. Depsídeos. I. Título.

CDD: 547 (20<sup>a</sup>)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Mestrado Acadêmico**

---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico da candidata Livia Soman de Medeiros, realizada em 05 de março de 2010:*




---

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



---

Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva



---

Prof. Dr. Wagner Vilegas

## **Agradecimentos**

A Deus, por tudo que me é concedido.

A meus pais, Sônia e Sérgio, por me darem todo amor incondicional, paciência, compreensão, sacrifícios, ensinamentos e incentivos infindáveis. Meu eterno amor, minha eterna gratidão...

A meu irmão Lucas, pela infância, juventude e companheirismo da idade adulta.

A minha avó, Maria, por estar sempre comigo.

Ao mestre e amigo, professor Dr Edson Rodrigues Filho, pelas oportunidades, pela orientação, paciência, carinho, e amizade.

A toda minha família, Soman e Medeiros, pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência.

As minhas ternas amigas, Luciana Amaral e Taicia Fill, por todos esses anos me ensinando, me dando suporte, me divertindo, me incentivando. Taicia...sempre no meu coração...

Ao Thiago A. M. Veiga, pelos ensaios de inibição da fotossíntese, pelos preciosos conselhos, pela companhia e carinho.

A Marília Trapp, pelos ensinamentos, principalmente nos ensaios antimicrobianos e análises em EM, assim como pela amizade.

A empresa Waters do Brasil, principalmente ao Dr. Michael Murgu, pelas análises em espectrometria de massas de alta resolução.

Aos amigos que passaram ou ainda fazem parte do LaBioMMi, pelas boas risadas e ensinamentos mútuos: Douglas, Marília, Amanda, Diana, Bianca, Mariana, Juliana, Malu, Thaís, Natália Ceará, Jucimar, Heloísa, Diego, José Vinícius, Thaísa, Florim, Enzo, Adriana, Lilian, Luís Fernando, Antonia e em especial, Rodrigo e Gezimar.

Aos amigos que passaram ou ainda fazem parte do PN-UFSCar, principalmente Bárbara, Kátia, Olívia e Diogo, pelos momentos de alegria e pelo apoio; Cristiane, Marcela, Nayara, Moacir Andrade, Lia, Sabá, Titi e Edson Azeite pelos bons momentos vividos.

Ao corpo técnico do DQ-UFSCar, Doraí, Paulo e principalmente a querida “Lu do RMN” e as secretárias do PPGQ-UFSCar, Cristina, Luciani e Ariane, pela paciência e dedicação

Aos professores Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva e Dr. Wagner Vilegas, pela participação na banca.

Ao programa de Pós Graduação em Química da UFSCar.

À FAPESP, pela bolsa concedida.

Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

## ABREVIACÕES

EM	- Espectrometria de Massas
ESI	- <i>Electrospray Ionization</i> (Ionização por Electrospray)
HPLC	- <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-MS	- <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas)
MS/MS	- Espectrometria de Massas Tandem
SRM	- <i>Selected Reaction Monitoring</i>
$m/z$	- Relação massa/ carga
UV	- Ultravioleta
ODS	- Octadecilsilano (C-18)
AcOEt	- Acetato de Etila
EtOH	- Etanol
MeOH	- Metanol
H <sub>2</sub> O	- Água
Hz	- Hertz
MHz	- Megahertz
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
RMN <sup>1</sup> H	- Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1
RMN <sup>13</sup> C	- Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
CD <sub>3</sub> OD	- Metanol deuterado
CDCl <sub>3</sub>	- Clorofórmio deuterado
δ	- Deslocamento químico em partes por milhão
$J$	- Constante de acoplamento em Hertz
s	- Singleto
sl	- Singleto largo
d	- Dubleto
t	- Tripleto

q	- Quadrupleteo
m	- Multipleteo
dd	- Duplo dubleteo
ddd	- Duplo duplo dubleteo
HMBC	- <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	- <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
DC	- Corrente Continua
RF	- Radiofrequencia
rpm	- Rotações por minuto
g	- Gramas
mg	- Miligramas
µg	- Microgramas
ng	- Nanogramas
pg	- Picogramas
L	- Litros
mL	- Mililitros
µL	- Microlitros
h	- Altura
Φ	- Diâmetro
Da	- Dalton
LaBioMMi	- Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos
BDA	- Batata, dextrose, ágar
BD	- Batata, dextrose
MIC	- <i>Minimum inhibitory concentration</i> (concentração mínima inibitória)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Transmissão genética no ciclo de vida do sistema grama-endófito (SAIKKONEN,2004).....	6
<b>Figura 1.2.</b> a) 6-isoprenilindole-3-ácido carboxílico, bactericida isolado de fungo endofítico <i>Artemisia annua</i> ; b) fitohormônio indole-3-ácidoacético; c) ácido coletotrico.....	8
<b>Figura 1.3</b> Metabólitos secundários produzidos por <i>Chaetomium</i> sp.....	11
<b>Figura 1.4.</b> Reações biossintéticas de formação do ácido orselínico por condensação de acetilSCoA e malonilSCoA (DEWICK,2002).....	12
<b>Figura 1.5.</b> Ácido orselínico e alguns exemplos de depsídeos.....	13
<b>Figura 3.1.</b> a) Procedimento de isolamento de micro-organismos; b) Fragmentos recém depositados de polpa de goiaba; c) crescimento de fungos em polpa de maçã.....	23
<b>Figura 3.2.</b> a) CCD das frações F4-14 à F4-20, modo normal; b) CCD da fração F4-14, modo reverso (ODS) para otimização do sistema de eluição para separação das substâncias da fração F4-16; c) HPLC/UV preparativo-SHIMADZU.....	35
<b>Figura 4.1.</b> Fungo isolado de goiaba FG1: <i>Cladosporium uredinicola</i> , a) fase inicial de desenvolvimento; b) fase avançada / frente; c) fase avançada / verso.....	56
<b>Figura 4.2.</b> a) Bactéria BB1 isolada de banana, crescimento em meio BDA; b) crescimento em meio MuellerHinton.....	57
<b>Figura 4.3.</b> a) Bactéria BP1 isolada de pêra, crescimento em meio BDA; b) crescimento em meio BHI.....	57
<b>Figura 4.4.</b> Micro-organismos isolados de maçã; a) FM1; b) FM4; c) BM1; d) FM2.....	57
<b>Figura 4.5.</b> a) Meio líquido Czapeck's controle; b) Cultivo do fungo FG1 em Czapeck's estático 80 mL de meio de cultivo; c) Czapeck's estático 250 mL de meio de cultivo.....	59
<b>Figura 4.6.</b> a) Cultivo do fungo FG1 em meio goiaba estático; e) Meio goiaba controle; f) Cultivo do fungo FG1 em meio arroz; g) Meio arroz controle.....	59
<b>Figura 4.7.</b> h) Cultivo do fungo FM1 em arroz; i) Meio arroz controle; j) Cultivo do fungo FM4 em arroz.....	59
<b>Figura 4.8.</b> i) Cultivo do fungo FM1 em meio Czapeck's estático ; i) Meio Czapeck's controle; j) Cultivo do fungo FM4 meio Czapeck's estático.....	59



<b>Figura 4.9.</b> o) Cultivo do fungo FM1 em meio maçã estático ; p) Meio maçã controle; q) Cultivo do fungo FM4 meio maçã estático.....	59
<b>Figura 4.10.</b> Cromatogramas do cultivo do fungo FM1 em meio de polpa de maçã: a) extrato etanólico do micélio, $\lambda=286\text{nm}$ ; b) meio controle $\lambda=286\text{nm}$ ; c) extrato da partição do filtrado, $\lambda=334\text{nm}$ , d) meio controle $\lambda=334\text{nm}$ ; método C.....	61
<b>Figura 4.11.</b> Cromatogramas do cultivo do fungo FM 4 em meio de polpa de maçã; a) extrato etanólico do micélio, $\lambda=264\text{nm}$ ; b) meio controle $\lambda=264\text{nm}$ ; c) extrato da partição do filtrado, $\lambda=264\text{nm}$ , d) meio controle $\lambda=264\text{nm}$ ; método C.....	62
<b>Figura 4.12.</b> Cromatogramas do cultivo do fungo FM 1 em meio Czapeck's: a) extrato da partição do filtrado, $\lambda=276\text{ nm}$ ; b) meio controle $\lambda=276\text{nm}$ ; c) extrato etanólico do micélio, $315\text{ nm}$ ; d) extrato da partição do filtrado, $\lambda=315\text{ nm}$ , e) meio controle $\lambda=315\text{nm}$ ; método C.....	63
<b>Figura 4.13.</b> Cromatogramas do cultivo do fungo FM 4 em meio Czapeck's: a) extrato etanólico do micélio, $\lambda=211\text{ nm}$ ; c) extrato da partição do filtrado, $\lambda=211\text{ nm}$ ; c) meio controle $\lambda=211\text{ nm}$ ; método C.....	64
<b>Fig. 4.14.</b> Cromatogramas do meio controle e do extrato do cultivo de BB1 em meio de polpa de banana, respectivamente; método C, $\lambda=234\text{nm}$ .....	65
<b>Figura 4.15.</b> Cromatogramas do meio controle e do extrato do cultivo de BP1 em meio de polpa de pêra, respectivamente; método C, $\lambda=204\text{nm}$ .....	65
<b>Figura 4.16.</b> Cromatograma da fração BP-2-C1-25 em HPLC/UV modo preparativo, $\lambda=254\text{nm}$ ; destaque para banda referente à substância P-3.....	66
<b>Figura 4.17.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ , $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz do alcalóide N-acetiltriptamina.....	67
<b>Figura 4.18.</b> Ampliações de regiões do espectro de RMN $^1\text{H}$ , $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz do alcalóide N-acetiltriptamina.....	68
<b>Figura 4.19.</b> Estrutura molecular do alcalóide indólico N-acetiltriptamina.....	69
<b>Figura 4.20.</b> Espectro de <i>Full Scan</i> , <i>ESI</i> modo positivo; fração P-3, N-acetiltriptamina.....	70
<b>Figura 4.21.</b> Espectro de íons produtos com energia de colisão de 10 eV, <i>ESI</i> modo positivo; fração P-3, N-acetiltriptamina.....	71
<b>Figura 4.22.</b> Proposta de fragmentação para o alcalóide isolado no modo positivo de ionização.....	71
<b>Figura 4.23.</b> CCD das frações F4-14 à F4-20.....	73
<b>Figura 4.24.</b> Cromatograma obtido da fração F4-16 em HPLC/UV preparativo.....	73
<b>Figura 4.25.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ e ampliações das regiões de interesse da substância isolada <b>D0</b> , o etil orselanato. $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz.....	76

<b>Figura 4.26.</b> Depsído atranorina e etil orselanato respectivamente.....	77
<b>Figura 4.27.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>D1</b> , ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	80
<b>Figura 4.28.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de <b>D1</b> , ( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (9,75:0,25)400 MHz).....	80
<b>Figura 4.29.</b> Espectro de HSQC de <b>D1</b> , ( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (9,75:0,25), 400 MHz).....	81
<b>Figura 4.30.</b> Espectro de HMBC de <b>D1</b> , ( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (9,75:0,25), 400 MHz).....	81
<b>Figura 4.31.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>D2</b> , ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	82
<b>Figura 4. 32.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ de <b>D2</b> , ( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (9,75:025), 100 MHz).....	82
<b>Figura 4.33.</b> Espectro de HMBC de <b>D2</b> , ( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (9,75:0,25) 400 MHz).....	83
<b>Figura 4.34.</b> Propostas estruturais para as substâncias <b>D1</b> e <b>D2</b> .....	84
<b>Figura 4.35.</b> Espectro de massas <i>full scan</i> , <i>ESI</i> modo negativo, depsído <b>D1</b> .....	85
<b>Figura 4.36.</b> Espectro de massas <i>full scan</i> , <i>ESI</i> modo negativo, depsído <b>D2</b> .....	86
<b>Figura 4.37.</b> Espectro de íons produtos, <i>ESI</i> modo negativo, 10 eV, depsído <b>D1</b> .....	87
<b>Figura 4.38.</b> Espectro de íons produtos, <i>ESI</i> modo negativo, 10 eV, depsído <b>D2</b> .....	87
<b>Figura 4.39.</b> Espectro de massas <i>full scan</i> em alta resolução, <i>ESI</i> modo negativo, depsído <b>D1</b> .....	89
<b>Figura 4.40.</b> Espectro de massas <i>full scan</i> em alta resolução, <i>ESI</i> modo negativo, depsído <b>D2</b> .....	89
<b>Figura 4.41.</b> Espectro de íons produtos em alta resolução, <i>ESI</i> modo negativo, depsído <b>D1</b> .....	90
<b>Figura 4.42.</b> Espectro de íons produtos em alta resolução, <i>ESI</i> modo negativo, depsído .....	90
<b>Figura 4.43.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>D3</b> , ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).....	93
<b>Figura 4.44.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ de <b>D3</b> , ( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (9,75:0,25), 100 MHz).....	93
<b>Figura 4.45.</b> Espectro de HSQC de <b>D3</b> , ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).....	94
<b>Figura 4.46.</b> Espectro de HMBC de <b>D3</b> , ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), 400 MHz).....	94
<b>Figura 4.47.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de <b>D4</b> , ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	95
<b>Figura 4.48.</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ de <b>D4</b> , ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).....	95
<b>Figura 4.49.</b> Espectro de HSQC de <b>D4</b> , ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	96
<b>Figura 4.50.</b> Espectro de HMBC de <b>D4</b> , ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	96
<b>Figura 4.51.</b> Propostas estruturais para as substâncias <b>D3</b> e <b>D4</b> .....	98
<b>Figura 4.52.</b> Espectro de massas <i>full scan</i> , <i>ESI</i> modo negativo, depsído <b>D3</b> .....	99
<b>Figura 4.53.</b> Espectro de massas <i>full scan</i> , <i>ESI</i> modo negativo, depsído <b>D4</b> .....	99
<b>Figura 4.54.</b> Espectro de íons produtos, <i>ESI</i> modo negativo, 10 eV, depsído <b>D3</b> .....	100
<b>Figura 4.55.</b> Espectro de íons produtos, <i>ESI</i> modo negativo, 10 eV, depsído <b>D4</b> .....	100

<b>Figura 4.56.</b> Espectro de massas <i>full scan</i> em alta resolução, <i>ESI</i> modo negativo, depsídeo <b>D3</b>	102
<b>Figura 4.57.</b> Espectro de massas <i>full scan</i> em alta resolução, <i>ESI</i> modo negativo, depsídeo <b>D4</b>	103
<b>Figura 4.58.</b> Espectro de íons produtos em alta resolução, <i>ESI</i> modo negativo, depsídeo <b>D3</b>	103
<b>Figura 4.59.</b> Espectro de íons produtos em alta resolução, <i>ESI</i> modo negativo, depsídeo <b>D4</b>	104
<b>Figura 4.60.</b> Cromatogramas referentes aos diferentes meios de cultura de <i>C.uredinicola</i> , método A, $\lambda=275\text{nm}$	106
<b>Figura 4.61.</b> Cromatograma do cultivo em arroz de <i>C. uredinicola</i> e indicação das bandas referentes a cada depsídeo isolado, método A, $\lambda=275\text{nm}$	107
<b>Figura 4.62.</b> Espectros de UV das bandas cromatográficas selecionadas	107
<b>Figura 4.63.</b> a) Cromatogramas sobrepostos referentes aos cultivos de <i>C.uredinicola</i> em arroz e meio BD. b) Ampliação dos cromatogramas sobrepostos na região de interesse, método A, $\lambda=275\text{nm}$	108
<b>Figura 4.64.</b> Espectros de UV referentes ao cromatograma do cultivo de <i>C.uredinicola</i> em meio BD	109
<b>Figura 4.65.</b> Cromatograma extrato do cultivo de <i>C.uredinicola</i> em meio goiaba, método A, $\lambda=275\text{nm}$	110
<b>Figura 4.66.</b> Espectros de UV referentes ao cromatograma extrato do cultivo de <i>C.uredinicola</i> em meio goiaba	110
<b>Figura 4.67.</b> Cromatogramas dos extratos branco: a) meio BD; b) meio goiaba. Método A, $\lambda=217\text{nm}$	111
<b>Figura 4.68.</b> Curva característica de crescimento microbiano	112
<b>Figura 4.69.</b> Curva de produção estimada para o depsídeo <b>D3</b> em meio de cultura de <i>C.uredinicola</i> em arroz	114
<b>Figura 4.70.</b> Curva de produção estimada para o depsídeo <b>D4</b> em meio de cultura de <i>C.uredinicola</i> em arroz	114
<b>Figura 4.71.</b> Cromatogramas referentes aos diferentes tempos de cultivo para <i>C.uredinicola</i> em arroz; sobreposição das curvas de produção estimadas para os depsídeos <b>D3</b> e <b>D4</b>	115
<b>Figura 4.72.</b> a) Cromatograma de íons selecionados para $m/z$ 465; b) cromatograma de íons selecionados para $m/z$ 479; c) cromatograma de íons totais do extrato do cultivo de FG1 em arroz	116

<b>Figura 4.73.</b> espectros de íons produtos referentes a relação $m/z$ 465 nos tempos de retenção em a) 33.55min; b) 34.29 min; c) 36.87 min.....	117
<b>Figura 4.74.</b> Espectros de íons produtos referentes a relação $m/z$ 479 nos tempos de retenção em a) 28.91min; b) 33.68 min; c) 38.67 min.....	118
<b>Figura 4.75.</b> a) Cromatograma de íons selecionados para $m/z$ 451; b) cromatograma de íons totais do extrato do cultivo de FG1 em arroz.....	119
<b>Figura 4.76.</b> Espectros de íons produtos referentes a relação $m/z$ 451 nos tempos de retenção em a) 30.33min; b)32.41 min; c) 34.45 min.....	119
<b>Figura 4.77.</b> Espectros de UV referentes a relação $m/z$ 451 nos tempos de retenção em a) 30.33min; b)32.41 min; c) 34.45 min.....	120
<b>Figura 4.78.</b> Espectros de íons produtos referentes a supostos depsídeos de íon molecular a) $m/z$ 373; b) 493.....	121
<b>Figura 4.79.</b> Proposta para o mecanismo de fragmentação da estrutura suposta (F), justificando o pico base $m/z$ 163.....	121
<b>Figura 4.80.</b> Proposta para o mecanismo de fragmentação da estrutura suposta (F), justificando o íon $m/z$ 209.....	122
<b>Figura 4.81.</b> Cromatogramas referentes às diferentes concentrações do depsídeo <b>D4</b> , método A, 275nm.....	123
<b>Figura 4.82.</b> Cromatogramas referentes aos extratos etanólico e de acetato de etila da fruta goiaba, método A, 275nm.....	124
<b>Figura 4.83.</b> Cromatogramas de SRM de <b>D4</b> puro,1 ng/mL. Transições específicas indicadas. Método E.....	125
<b>Figura 4.84.</b> Cromatogramas de SRM de <b>D3</b> puro,1 ng/mL. Transições específicas indicadas. Método E.....	126
<b>Figura 4.85.</b> Cromatogramas de SRM do extrato etanólico de goiaba. Transições específicas à <b>D4</b> indicadas. Método E.....	127
<b>Figura 4.86.</b> Cromatogramas de SRM do extrato etanólico de goiaba. Transições específicas à <b>D4</b> indicadas. Método E.....	128
<b>Figura 4.87.</b> Cromatogramas de SRM do solvente; transições selecionadas indicadas.....	133
<b>Figura 4.88.</b> Compostos aromáticos administrados em cultivo do fungo <i>C. uredinicola</i> em meio BD.....	129
<b>Figura 4.89.</b> a) Cromatograma referente ao cultivo de FG1 com adição de PABA; b) Cromatograma meio controle; c) e d) sobreposição dos cromatogramas anteriores e ampliação das regiões de interesse. Método B, 222nm, extrato FG1-6-M-et.....	130

<b>Figura 4.90.</b> Cromatogramas a) meio branco com adição de ácido salicílico; b) meio de cultivo de FG1 com adição de ácido salicílico; c) meio de cultivo controle, extratos FG1-6-P-ac, método B, $\lambda=222\text{nm}$ ; d) meio de cultivo de FG1 com adição de ácido salicílico; e) meio de cultivo controle, extratos FG1-6-M-et, método A, $\lambda=222\text{nm}$ .....	131
<b>Figura 4.91.</b> Cromatogramas a) meio de cultivo de FG1 com adição de triidoxiacetofenona; b) meio de cultivo controle, método B, extratos FG1-6-M-et , $\lambda=222\text{nm}$ .....	132
<b>Figura 4.92.</b> Cromatogramas sobrepostos do cultivo de FG1 com adição de ácido gálico e do meio de cultivo controle, método A, extratos FG1-6-M-et, $\lambda=275\text{nm}$ .....	133
<b>Figura 4.93.</b> Cromatogramas a) do cultivo de FG1 com adição de ácido gálico; b) do meio de cultivo controle, método B, extratos FG1-6-P-ac, $\lambda=275\text{nm}$ , c) espectros de UV referentes às bandas cromatográficas indicadas.....	133
<b>Figura 4.94.</b> Cromatogramas a) meio de cultivo de FG1 com adição de ácido ferúlico; b) meio de cultivo controle, método A, extratos FG1-6-M-et , $222\text{nm}$ .....	134
<b>Figura 4.95.</b> CCD frações F7-O38 à F7-O48.....	135
<b>Figura 4.96</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ da fração F7-O44 e ampliação da região de interesse $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ , 200 MHz.....	136
<b>Figura 4.97</b> Ampliações do espectro de RMN $^1\text{H}$ , fração F7-O44. $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ , 200 MHz.....	137
<b>Figura 4.98.</b> Modelo estrutural de uma cerebrosída.....	138
<b>Figura 4.99.</b> Proposta de mecanismos de fragmentação para perdas de unidades de $\text{H}_2\text{O}$ de uma cerebrosida.....	139
<b>Figura 4.100.</b> Proposta de mecanismos de fragmentação para perdas características de cerebrosidas a) 162 Da; b) 180 Da.....	139
<b>Figura 4.101.</b> Proposta de fragmentação para cerebrosidas.....	139
<b>Figura 4.102.</b> Cromatograma de íons totais, <i>ESI</i> modo negativo, fração F7-O48.....	140
<b>Figura 4.103.</b> Espectro de íons produtos de a) $m/z$ 785; b) $m/z$ 545; 20 eV.....	141
<b>Figura 4.104.</b> Espectro de íons produtos de a) $m/z$ 561; b) $m/z$ 769; c) $m/z$ 753; 20eV.....	143
<b>Figura 4.105.</b> Placas de Elisa referente ao ensaio antibacteriano de <b>D1</b> , <b>D3</b> e <b>D4</b> frente à bactérias indicadas.....	145
<b>Figura 4.106.</b> Placa de Elisa e resultados de semeadura referentes às bactérias a) <i>Escherichia coli</i> ; b) <i>Staphylococcus aureus</i> .....	146
<b>Figura 4.107.</b> Placa de Elisa e resultados de semeadura referentes às bactérias a) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; b) <i>Bacillus subtilis</i> .....	147

<b>Figura 4.108.</b> Efeito dos compostos <b>D1</b> e <b>D3</b> sobre o fluxo de elétrons (basal, fosforilante e desacoplado) de H <sub>2</sub> O – MV em cloroplastos isolados das folhas de espinafre. Valores das razões dos controles basal (■), fosforilante (●) e desacoplado (▲) foram 192, 345 e 686 $\mu\text{equiv e}^- \text{h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$ , respectivamente.....	149
<b>Figura 4.109.</b> Efeito dos compostos <b>D1</b> e <b>D3</b> sobre o fluxo de elétrons no FSII: H <sub>2</sub> O – DCBQ em cloroplastos isolados das folhas de espinafre. O valor da razão do controle foi de 545 $\mu\text{equiv e}^- \text{h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$ .....	150
<b>Figura 4.110.</b> Efeito dos compostos <b>D1</b> e <b>D3</b> sobre o fluxo de elétrons no FSII: H <sub>2</sub> O – SiMo em cloroplastos isolados das folhas de espinafre. O valor da razão do controle foi de 356 $\mu\text{equiv e}^- \text{h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$ .....	151

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1</b> Benefícios entre os simbioses (SAIKKONEN, 2004).....	7
<b>Tabela 1. 2.</b> Bactérias e fungos isolados de plantas comestíveis.....	10
<b>Tabela 3.1.</b> Códigos dos endofíticos isolados em frutas.....	24
<b>Tabela 3.2.</b> Dados dos cultivos em meios líquidos dos endofíticos isolados.....	27
<b>Tabela 3.3.</b> Códigos e identificação dos extratos.....	31
<b>Tabela 3.4.</b> Sistema de eluição para coluna cromatográfica à vácuo ( <b>a</b> ).....	33
<b>Tabela 3.5.</b> Sistema de eluição para coluna cromatográfica ( <b>b</b> ).....	34
<b>Tabela 3.6.</b> Sistema de eluição para coluna cromatográfica ( <b>d</b> ).....	36
<b>Tabela 3.7.</b> Sistema de eluição para coluna cromatográfica ( <b>e</b> ).....	36
<b>Tabela 3.8.</b> Sistema de eluição para coluna cromatográfica.....	38
<b>Tabela 3.9.</b> Condições do espectrômetro de massas ( <i>ESI</i> (+)).....	41
<b>Tabela 3.10.</b> Condições de eluição método cromatográfico A.....	41
<b>Tabela 3.11.</b> Condições de eluição método cromatográfico B.....	42
<b>Tabela 3.12.</b> Condições de eluição do método cromatográfico C.....	42
<b>Tabela 3.13.</b> Condições de eluição do método cromatográfico D.....	43
<b>Tabela 3.14.</b> Condições de eluição do método cromatográfico E.....	43
<b>Tabela 3.15.</b> Condições de eluição do método cromatográfico F.....	43
<b>Tabela 3.16.</b> Condições do espectrômetro de massas ( <i>ESI</i> (-)).....	44

<b>Tabela 3.17.</b> Condições do espectrômetro de massas para o monitoramento dos depsídeos D3 e D4, ( <i>ESI</i> (-)).....	46
<b>Tabela 3.18.</b> Condições do espectrômetro de massas ( <i>ESI</i> (-)).....	47
<b>Tabela 3.19.</b> Tempos referentes aos pontos de extração do cultivo fúngico em arroz.....	48
<b>Tabela 4.1.</b> Dados obtidos dos espectros de RMN <sup>1</sup> H da literatura e da fração pura isolada para a N-acetilriptamina. 400MHz e CDCl <sub>3</sub> .....	69
<b>Tabela 4.2.</b> Dados obtidos dos espectros de RMN <sup>1</sup> H da literatura para o propil orselanato e da fração pura isolada de etil orselanato. CDCl <sub>3</sub> , 200MHz.....	76
<b>Tabela 4.3.</b> Dados espectrais de RMN obtidos para <b>D1</b> e <b>D2</b> .....	84
<b>Tabela 4.4</b> Dados obtidos e calculados para a substância <b>D2</b> .....	91
<b>Tabela 4.5.</b> Dados espectrais de RMN obtidos para <b>D3</b> e <b>D4</b> .....	97
<b>Tabela 4.6.</b> Dados obtidos e calculados para as substâncias <b>D3</b> e <b>D4</b> .....	102
<b>Tabela 4.7</b> Intervalos de MIC para os depsídeos ensaiados.....	147
<b>Tabela 4.8.</b> Efeito dos compostos <b>D1</b> e <b>D3</b> sobre o transporte de elétrons do FSII desacoplado de DPC – DCPIP.....	151

### LISTA DE FLUXOGRAMAS

<b>Fluxograma 3.1.</b> Isolamento de metabólitos secundários e purificação de frações a partir do extrato FG1-4-Met.....	37
<b>Fluxograma 3.2.</b> Isolamento da N-Acetilriptamina a partir do extrato BP1-2-P-ac .....	39

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 3.1.</b> Procedimento de cultivo e extração dos micro-organismos endofíticos em meio líquido.....	29
<b>Esquema 3.2.</b> Procedimento de cultivo e extração do fungo em arroz.....	30
<b>Esquema 3.3.</b> Placa de ELISA com as diferentes concentrações testadas para as substâncias <b>D1, D3, D4</b> .....	52
<b>Esquema 3.4.</b> Placa de Petri utilizada na verificação do tipo de atividade antimicrobiana....	53
<b>Esquema 4.1.</b> Correlações do espectro de HMBC para os compostos <b>D1 e D2</b> .....	83
<b>Esquema 4.2.</b> Proposta para o mecanismo de fragmentação dos depsídeos <b>D1 e D2</b> .....	88
<b>Esquema 4.3.</b> Correlações do espectro de HMBC para os compostos <b>D3 e D4</b> .....	98
<b>Esquema 4.4.</b> Proposta para o mecanismo de fragmentação dos depsídeos <b>D3 e D4</b> , justificando o pico base $m/z$ 163.....	101
<b>Esquema 4.5.</b> Proposta para o mecanismo de fragmentação dos depsídeos <b>D3 e D4</b> , justificando a perda neutra de 164Da.....	101



## RESUMO

“Estudo químico de metabólitos secundários produzidos por micro-organismos endofíticos isolados de banana, pera e goiaba”. Estudos envolvendo a interação entre micro-organismos e plantas enfocam predominantemente tecidos vegetais como raízes, caules e folhas. Embora os frutos sejam alvos fáceis de ataques microbianos, micro-organismos endofíticos de frutos parecem não ser tão explorados do ponto de vista químico. Sendo assim, neste trabalho, buscou-se enfatizar o estudo químico do metabolismo referente à microbiota endofítica de frutos comestíveis popularmente consumidos no Brasil, a banana, a pêra, a maçã e a goiaba. Através de análises por HPLC/UV, foram verificados e comparados os desenvolvimentos metabólicos, em diferentes meios de cultura, dos micro-organismos isolados, incluindo àqueles constituídos com as próprias frutas hospedeiras. Foi isolado o alcalóide indólico N-acetiltriptamina a partir de um extrato da bactéria associada à pêra (BP1). Dos extratos do fungo *Cladosporium uredinicola* (FG1), associado à goiaba, foram isolados quatro novos depsídeos na literatura: 2,4-diidroxi-3,6-dimetilbenzoato de 3-hidroxi-2,5-dimetilfenila (**D1**), 2,4-diidroxi-3,6-dimetilbenzoato de 3-hidroxi-2,4,5-trimetilfenila (**D2**), 3-[(2,4-diidroxi-3,6-dimetilbenzoatoil)oxi]-6-hidroxi-2,4-dimetilbenzoato de 3-hidroxi-2,5-dimetilfenila (**D3**) e 3-[(2,4-diidroxi-3,6-dimetilbenzoatoil)oxi]-6-hidroxi-2,4-dimetilbenzoato de 3-hidroxi-2,4,5-trimetilfenila (**D4**). A identificação destes metabólitos foi realizada de acordo com os respectivos dados de RMN 1 D e 2D e EM de alta e baixa resolução. Foram verificados os intervalos de MIC para **D1**, **D3** e **D4**, frente a cinco bactérias testadas, destacando-se a atividade bactericida de **D1**, a 25µg/mL, contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*. Verificou-se também a atividade inibitória da fotossíntese de **D1** e **D3**. Contudo, o fungo *C.uredinicola*, mostrou-se como um potente produtor de depsídeos. Esta produção mostrou significativas alterações quando compostos fenólicos foram administrados ao fungo junto ao meio de cultura usual de crescimento. Foi também estabelecida a estimativa da curva de produção para os metabólitos **D3** e **D4** produzidos pelo fungo. A utilização da técnica LC-MS/MS permitiu a detecção seletiva dos depsídeos **D3** e **D4** em extrato da fruta goiaba em baixas faixas de concentração.

## ABSTRACT

**“Chemical study of the secondary metabolites produced by endophytic microorganisms isolated from banana, pear and guava fruit”.** Studies about interaction between microorganisms and plants are focused mainly in the vegetal tissues like roots, stem and leaves. Fruits are a right target for microorganism attacks. Nevertheless, endophytic microorganisms isolated from fruits, seems to be not so explored in chemical point of view. Thus, in this work, it was developed the chemical study about the metabolism referred to endophytic microorganisms from edible fruits, commonly consumed in Brazil: banana, pear, apple and guava fruit. Through HPLC/UV analysis, it were realized and compared, the isolated microorganisms metabolic development, in different media cultures. It was included the media with the proper host fruits. The indolic alkaloid n-acetyltryptamine was isolated from a extract of the bacteria associated to the pear fruit (BP1). From the extracts of guava fruit endophytic fungus, *Cladosporium uredinicola* (FG1), it were isolated four new depsides in literature: 3-hidroxi-2,5-dimetilfenil 2,4-diidroxi-3,6-dimetilbenzoate (**D1**), 3-hidroxi-2,4,5-trimetilfenil 2,4-diidroxi-3,6-dimetilbenzoate(**D2**), 3-hidroxi-2,5-dimetilfenil 3-[(2,4-diidroxi-3,6-dimetilbenzoatoil)oxi]-6-hidroxi-2,4-dimetilbenzoate (**D3**) e 3-hidroxi-2,4,5-trimetilfenil 3-[(2,4-diidroxi-3,6-dimetilbenzoatoil)oxi]-6-hidroxi-2,4-dimetilbenzoate (**D4**). The identification of these metabolites was performed according to the respective data from RMN 1 D and 2D, and MS of high and low resolution. It was checked the MIC intervals of **D1**, **D3** and **D4** against five tested bacteria. It was realized the bactericide activity of **D1** in a concentration of 25µg/mL against *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. It was also verified the photosynthesis inhibitory activity of depsides **D1** and **D3** produced by the fungus. The fungus *C.uredinicola*, showed a great depsides production ability. However, this production showed significant alterations when fenolic substrates were given to the fungus, in a usual culture media. The estimative of **D3** and **D4** production curve was also established. The LC-MS/MS technique use, allowed the selective depsides **D3** and **D4** detection in guava fruit extract, in low concentration ranges.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	2
1.1 . Micro-organismos e a importância de seus metabólitos secundários.....	2
1.2 Micro-organismos endofíticos e a associação com plantas.....	4
1.3 Micro-organismos endofíticos em frutas.....	9
1.4 Policetídeos e Depsídeos.....	11
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	14
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	16
3.1 Materiais e equipamentos.....	17
3.1.1 Material vegetal utilizado para o isolamento dos micro-organismos endofíticos.....	17
3.1.2 Materiais utilizados para o isolamento, cultivo e conservação dos micro-organismos endofíticos.....	17
3.1.3 Equipamentos utilizados para o isolamento e cultivo dos micro-organismos endofíticos.....	18
3.1.4 Equipamentos utilizados no isolamento e análises de metabólitos secundários.....	18
3.1.5 Suportes cromatográficos .....	20
3.1.6 Solventes empregados.....	20
3.1.7 Materiais e equipamentos utilizados no ensaio antimicrobiano.....	20
3.2 Procedimento experimental.....	21
3.2.1 Preparo do meio de cultura BDA .....	21
3.2.2 Isolamento de micro-organismos endofíticos de goiaba ( <i>Psidium guajava</i> ), pêra ( <i>Pyrus communis</i> ), banana ( <i>Musa paradisíaca</i> ) e maçã ( <i>Malus domestica</i> ).....	22
3.2.3 Códigos dos micro-organismos isolados.....	23
3.2.4 Cultivo dos micro-organismos em diferentes meios de cultura.....	24
3.2.4.1 Cultivo dos micro-organismos FG1, FM1, FM4 em meio líquido Czapeck's enriquecido extrato de levedura.....	24
3.2.4.2 Cultivo dos micro-organismos BB1 e BP1 em meio BHI e em meio Caldo Mueller Hinton.....	25
3.2.4.3 Cultivo do fungo FG1 em meio batata-dextrose (BD).....	25
3.2.4.4 Cultivo dos micro-organismos FG1, FM1, FM4, BB1, BP1 em meio líquido contendo	

polpa de fruta.....	26
3.2.4.5 Cultivo do fungo FG1 em meio sólido arroz.....	27
3.2.5 Extração de metabólitos fúngicos e bacterianos.....	28
3.2.5.1 Extração dos metabólitos microbianos a partir dos meios de cultura líquidos.....	28
3.2.5.2 Extração dos metabólitos microbianos a partir do meio de cultura sólido.....	29
3.2.5.3 Códigos dos extratos .....	30
3.2.6 Tratamento inicial dos extratos visando isolamento de metabólitos secundários.....	32
3.2.7 Isolamento de metabólitos secundários produzidos pelo fungo endofítico de goiaba FG1 no extrato FG1-4-M-et.....	32
3.2.7.1 Isolamento de Depsídeos a partir da fração F4-16 em HPLC preparativo.....	33
3.2.7.2 Purificação da fração F7 para detecção de substâncias co-produzidas por FG1.....	35
3.2.8 Isolamento de metabólitos secundários produzidos pela bactéria endofítica em pêra BP1 no extrato BP1-2-P-ac.....	38
3.2.8.1 Isolamento da N-acetilriptamina a partir da fração BP-2-25 em HPLC preparativo.....	39
3.2.9 Detecção e identificação das substâncias isoladas por análise em RMN 1D e 2D e Espectrometria de Massas.....	40
3.2.10 Condições de análise de extratos via HPLC/UV.....	41
3.2.11 Condições de análise de extratos e frações via HPLC-MS/MS.....	42
3.2.12 Análise de depsídeos via HPLC-MS/MS nos extratos do cultivo de FG1 em arroz.....	44
3.2.13 Detecção de depsídeos em extratos da fruta goiaba ( <i>Psidium guajava</i> ) via HPLC-MS/MS.....	45
3.2.14 Detecção de cerebrosidas nas frações F7-O38 e F7-O48 via HPLC-MS/MS.....	47
3.2.15 Estimativa da curva de produção dos depsídeos D3 e D4 em meio de arroz pelo fungo FG1 via análise em HPLC/UV.....	47

3.2.16 Estudo da influência de compostos fenólicos no metabolismo secundário de FG1.....	49
3.3 Ensaio Biológicos.....	50
3.3.1 Ensaio Antimicrobiano para determinação da concentração mínima inibitória (MIC) dos depsídeos <b>D1</b> , <b>D3</b> e <b>D4</b> .....	50
3.3.1.2 Ativação das bactérias.....	50
3.3.1.3 Padronização das culturas bacterianas.....	51
3.3.1.4 Preparo das amostras.....	51
3.3.1.5 Teste antibacteriano.....	51
3.3.1.6 Verificação do tipo de atividade .....	53
3.3.2 Ensaio de inibição da fotossíntese.....	53
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54
4.1 Isolamento de micro-organismos endofíticos de goiaba, pêra, maçã e banana.....	55
4.1.1 Isolamento de micro-organismos endofíticos em goiaba ( <i>Psidium guajava</i> ).....	55
4.1.2 Isolamento de micro-organismos endofíticos em banana ( <i>Musa paradisiaca</i> ) e em pêra ( <i>Pyrus communis</i> ).....	56
4.1.3 Isolamento de micro-organismos endofíticos em maçã ( <i>Malus domestica</i> ).....	57
4.2 Obtenção dos extratos.....	58
4.3 Estudo dos micro-organismos isolados de maçã ( <i>Malus domestica</i> ).....	60
4.3.1 Monitoramento de extratos obtidos a partir dos diferentes cultivos dos fungos FM1 e FM4 por HPLC/UV modo analítico.....	60
4.4 Estudo dos micro-organismos isolados de banana ( <i>Musa paradisiaca</i> ) e pêra ( <i>Pyrus communis</i> ).....	64
4.4.1 Monitoramento de extratos obtidos do cultivo de BB1 e BP1 nos meios Mueller Hinton e Czapeck's por HPLC/UV modo analítico.....	64
4.4.2 Monitoramento de extratos obtidos do cultivo de BB1 em meio banana e do cultivo de BP1 em meio pêra, por HPLC/UV modo analítico.....	65
4.5 Isolamento e identificação de metabólitos secundários produzidos por BP1.....	66
4.5.1 Isolamento de metabólito secundário do cultivo de BP1 em meio de cultura BHI.....	66
4.5.2 Identificação e caracterização da substância P-3.....	67
4.6 Isolamento e identificação de metabólitos secundários produzidos por <i>Cladosporium uredinicola</i> (FG1).....	72
4.6.1 Isolamento de metabólitos secundários do cultivo de <i>Cladosporium uredinicola</i> (FG1) em meio sólido de arroz.....	72

4.6.2 Identificação e caracterização dos metabólitos secundários produzidos por <i>Cladosporium uredinicola</i> (FG1).....	74
4.6.2.1 Identificação e caracterização da substância isolada D0.....	75
4.6.2.2 Identificação e caracterização das substâncias D1 e D2.....	77
4.6.2.2.1 Estudo de caracterização estrutural por espectrometria de massas das substâncias D1 e D2.....	85
4.6.2.3 Identificação e caracterização das substâncias D3 e D4.....	91
4.6.2.3.1 Estudo de caracterização estrutural por espectrometria de massas das substâncias D3 e D4.....	99
4.7 Estudo do perfil metabólico de <i>Cladosporium uredinicola</i> (FG1) em diferentes meios de cultivo, via HPLC/UV.....	104
4.8 Estimativa da curva de produção dos depsídeos D3 e D4 pelo fungo <i>C.uredinicola</i> (FG1) em meio de arroz.....	112
4.9 Detecção de depsídeos co-produzidos por <i>C.uredinicola</i> via HPLC-MS/MS.....	115
4.10 Detecção de depsídeos em extratos da fruta goiaba ( <i>Psidium guajava</i> ) via HPLC-MS/MS.....	122
4.11 Estudo da influência de compostos fenólicos no metabolismo secundário de <i>C.uredinicola</i> (FG1) por HPLC/UV.....	128
4.12 Detecção de compostos co-produzidos por <i>C. Uredinicola</i> (FG1) em meio de cultura de arroz .....	135
4.13 Ensaio biológicos.....	144
4.13.1 Ensaio Antibacteriano.....	144
4.13.2 Ensaio de Inibição da Fotossíntese.....	148
4.13.2.1 Efeito dos metabólitos D1 e D3 sobre o transporte de elétrons não cíclico: Reação de Hill.....	149
4.13.2.2 Localização dos ambientes de interação de D1 e D3 sobre FSII e FSI e suas reações parciais.....	150
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	153
5.1. Conclusões e considerações finais.....	154
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	157

# *1. INTRODUÇÃO*

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Micro-organismos e a importância de seus metabólitos secundários

Segundo BENTLEY (1999), os compostos que hoje são conhecidos como metabólitos secundários, foram definidos em 1891, como materiais de pouca importância à fisiologia geral de plantas. Até meados do século XX o termo “metabolismo secundário” era pouco usado e restrito apenas ao reino vegetal. Muito embora o termo tenha sido aplicado à produtos microbianos apenas em 1961 por BU’ LOCK, a bioatividade de produtos naturais de micro-organismos já havia começado a ser investigada por Pasteur no século XIX, envolvendo a descoberta da causa de processos fermentativos (STROBEL e DAISY, 2003).

Por definição, metabólitos secundários representam os produtos finais de processos biossintéticos vegetais e microbianos, não apresentando um papel óbvio para estes seres vivos (TURNER, 1971). Não exercer funções básicas para a manutenção dos respectivos ciclos de vida é o principal fator de distinção em relação aos metabólitos primários (NOSOV, 1994). Os metabólitos primários são em geral macromoleculares, possuem funções específicas e são produzidos pelos seres vivos independente da sua classificação taxonômica (HARBONE, 1991). Embora haja algumas notáveis exceções (por exemplo as palitoxinas), a maioria dos metabólitos secundários apresentam massas moleculares menores a 1.500 Da. A variedade de estruturas químicas é notória, abrangendo desde simples ácidos alifáticos até estruturas mais complexas, pertencentes a diversas classes de substâncias, por exemplo, os alcalóides, os policetídeos, e os terpenóides (BENTLEY, 1999; TAN, 2001).

Há milhares de anos, os micro-organismos são utilizados pelo o homem para diversas finalidades, como para a produção de pães, queijos e bebidas (DEMAIN, 2000). No entanto, somente após a segunda guerra mundial, com a descoberta da penicilina, um metabólito secundário produzido pelo fungo *Penicillium notatum*, foi que os micro-organismos começaram a ser



considerados como uma fonte promissora de substâncias com potencial bioativo (DREWS 2000; MASUREKAR, 1992).

Atualmente, os micro-organismos são considerados como um dos principais produtores de micro-moléculas com as mais diversas atividades biológicas. Devido à grande versatilidade da biossíntese microbiana, os produtos naturais advindos de fungos e bactérias são diversos, e podem apresentar um amplo espectro de utilização, abrangendo diferentes setores, desde o agroquímico até a indústria farmacêutica (CHOMCHEON, 2009). A evidente importância destes compostos tanto na saúde como na economia mundial, deve-se em especial, como mencionado, às diversas funcionalidades biológicas dos mesmos. Como exemplos mais comuns têm-se as atividades antibióticas, imunossupressora, antitumoral, biopesticida, anti-colesterol, citotóxica, entre outras (GUNATILAKA, 2006). Para exemplificar tal relevância, apenas no ano de 1996, o mercado voltado aos compostos antimicrobianos movimentou cerca de 23 bilhões de dólares (DEMAIN, 1999). Outros produtos terapêuticos como os já citados imunossupressores e anticâncer, assim como agentes antiolesterol e inibidores enzimáticos vêm movimentando um mercado de aproximadamente 1 bilhão de dólares ao ano (DEMAIN, 2000).

Com o impulso econômico e científico, a descoberta de novos compostos bioativos de origem microbiana vem crescendo a largos passos ao longo dos anos. Na década de setenta, cerca de 300 compostos eram descobertos ao ano, passando a 500 no final dos anos noventa (DEMAIN 1999). Os antibióticos, muito citados na literatura atual como “as drogas desejadas”, são o maior exemplo da aplicação de metabólitos de micro-organismos (PELÁEZ, 2006). Somente no ano de 1995, dentre os antibióticos conhecidos, 77% eram oriundos da produção por bactérias (actinomicetos) e fungos filamentosos (BERDY, 1995; STROHL, 1997).

Contudo, o uso de produtos naturais, principalmente oriundos de bactérias e fungos, tem sido a estratégia mais bem sucedida para a descoberta de novos

medicamentos. É notório que esta tendência, provavelmente, será estendida por muitos anos, haja vista a existência da grande biodiversidade mundial ainda inexplorada (HAVEY, 2000). Atualmente, estima-se que menos de 1% das espécies bacterianas e 5% das espécies fúngicas sejam conhecidas, sugerindo que milhares de micro-organismos ainda possam ser descobertos (GUNATILAKA, 2006).

## **1.2. Micro-organismos endofíticos e a associação com plantas**

As mais diversas relações existentes entre os seres vivos, sejam elas inter ou intraespecíficas, constituem uma importante e emergente área de pesquisa, de interesse científico e comercial. Um dos mais recentes sistemas químicos e bioquímicos estudados na natureza é a relação entre micro-organismos (fungos e bactérias) e suas plantas hospedeiras (STROBEL, 2003).

Os micro-organismos têm a habilidade de utilizar substratos sólidos para biossintetizar seus metabólitos, como consequência da sua diversidade evolutiva biológica e bioquímica (GUNATILAKA, 2006). Para alguns, a produção de metabólitos bioativos está intimamente ligada à relação que estes organismos apresentam com seu habitat natural.

As plantas são consideradas um complexo micro-ecossistema que inclui um dos diferentes habitats explorados por uma vasta diversidade microbiana. Há décadas, cientistas vêm notando que o mundo vegetal é um imenso reservatório destes importantes fabricantes de substâncias de aplicação biomédica (STROBEL, 2003).

O termo *endofítico* é originário do grego “endo” (dentro) e “phyte” (planta) e até recentemente era aplicado mais comumente a fungos (STURZ, 2000). Na atualidade, o termo é utilizado na designação daqueles organismos, independentemente, fungos, bactérias, vírus e nematóides, isolados de tecidos de plantas, vivendo nesses tecidos de forma assintomática, sem infecções aparentes,

ao menos em um período de seus respectivos ciclos de vida. (PETRINI, 1992; ZHANG, 2006).

No entanto, não somente os organismos mutualistas, isto é aqueles cuja associação traz benefícios mútuos, podem ser classificados como endofíticos. Considerando-se que muitos fitopatógenos têm estratégias de infecção evoluídas o suficiente para sobrepor as barreiras das plantas, deve-se admitir que muitos dos micro-organismos isolados como endofíticos podem ser fitopatógenos em estado de latência, aguardando que o sistema imunológico do hospedeiro seja insuficiente para combater a atividade de células exógenas e desenvolver doenças. Sendo assim, a classificação de um nicho ecológico para um micro-organismos não apresenta caráter estático, mas sim dinâmico. Um endofítico pode tornar-se um patógeno ativo; um epifítico pode penetrar na planta e tornar-se um endófito ou um patógeno (KLOEPPER, 1992; ANDREWS, 2000; SABARATNAM, 2003), dependendo do ambiente que os micro-organismos e as plantas hospedeiras estão inseridos (ROSENBLUETH, 2006).

Logo, alguns fitopatógenos existentes no meio ambiente são de origem endofítica. Muitos casos de fungos endofíticos inócuos tratam-se de fitopatógenos em latência que causam sintomas infecciosos caso a planta seja estressada, ou durante seu processo de envelhecimento. Por outro lado, durante a longa co-evolução dos fitopatógenos e de seus hospedeiros, um mutante endofítico talvez seja resultado de um antagonismo balanceado ou de mutação gênica horizontal ou vertical perpetuada na reprodução de seu hospedeiro (SAIKKONEN, 2004; TAN, 2001).

Neste caso, é também notório o fato de que a transmissão genética entre os organismos traz às várias espécies vegetais a capacidade de resistência a condições adversas assim como ao ataque de fitopatógenos (JOHORI, 2006). Em um interessante estudo realizado a respeito da adaptação de plantas associadas a endófitos mutualistas, verificou-se a melhor capacidade de resistência a altas temperaturas da espécie *Dichanthelium lanuginosum* quando

esta estava associada ao fungo *Curvularia* sp. (REDMAN, 2002). Em outro estudo, foi verificado que a necrose e mortalidade de folhas de *Theobroma cacao* associada a fungos endofíticos, eram diminuídas quando a planta encontrava-se infestada pelo patógeno *Phytophthora* sp. (ARNOLD, 2003).

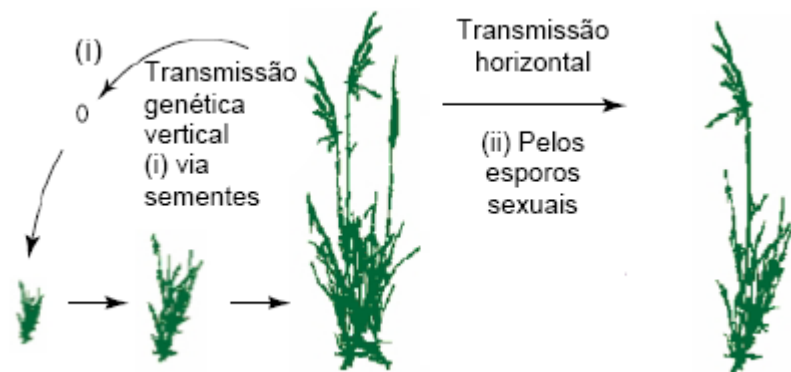


Figura 1.1. Transmissão genética no ciclo de vida do sistema grama-endófito (SAIKKONEN, 2004)

Os mecanismos de estabelecimento da associação endofítica são na verdade muito complexos e ainda desconhecidos. Porém, muitas hipóteses têm sido abordadas no intuito do esclarecimento de tal interação. Muitas hipóteses evidenciam que a infecção assintomática de um endofítico depende não somente das adaptações de um hospedeiro em particular, mas sim da capacidade de virulência do endofítico, da resposta de defesa do hospedeiro e do habitat (KULDAU, 2000). Ou seja, a colonização assintomática passa a ser fruto de um balanço entre o hospedeiro, o endófito e as condições ambientais nas quais estão submetidos. (SCHULZ, 2005).

O metabolismo secundário de plantas e micro-organismos também não é um processo estático, mudando constantemente em resposta a inúmeros fatores. A síntese química para a defesa do organismo implica em um fluxo de precursores, enzimas e moléculas de alta energia (NADH, ATP) provenientes do respectivo metabolismo primário, para os caminhos biossintéticos. O tipo de resposta às condições adversas é na verdade muito influenciada pela disponibilidade de recursos ambientais (MACIAS, 2007).

Os endofíticos podem produzir exoenzimas a fim de colonizar seu hospedeiro, assim como metabólitos diversos, seja para a manutenção de uma relação benéfica (mutualística), ou oportunamente, em malefício à planta (patogenicidade). Do mesmo modo, a planta também pode apresentar mecanismos de ação ou reação, através da produção de metabólitos. O estabelecimento do tipo de interação torna-se assim, dependente da estratégia e habilidades de sobrevivência de ambas as partes.

Há casos nos quais os endofíticos são especificamente adaptados aos seus hospedeiros, enquanto outros são oportunistas incidentais. As interações podem ser balanceadas ou antagonistas, refletindo a tolerância da coabitação. Contudo, no estabelecimento da interação simbiótica entre os organismos associados, a planta hospedeira protege e alimenta o endofítico, que em troca, pode produzir, por exemplo, metabólitos bioativos para promover o crescimento e a competitividade do hospedeiro, protegendo-o contra herbívoros e fitopatógenos, sendo estabelecido um equilíbrio ecológico-bioquímico cuja duração dependerá de diversos outros fatores (GUNATILAKA, 2006).

**Tabela 1.1** Benefícios entre os simbioses (SAIKKONEN, 2004)

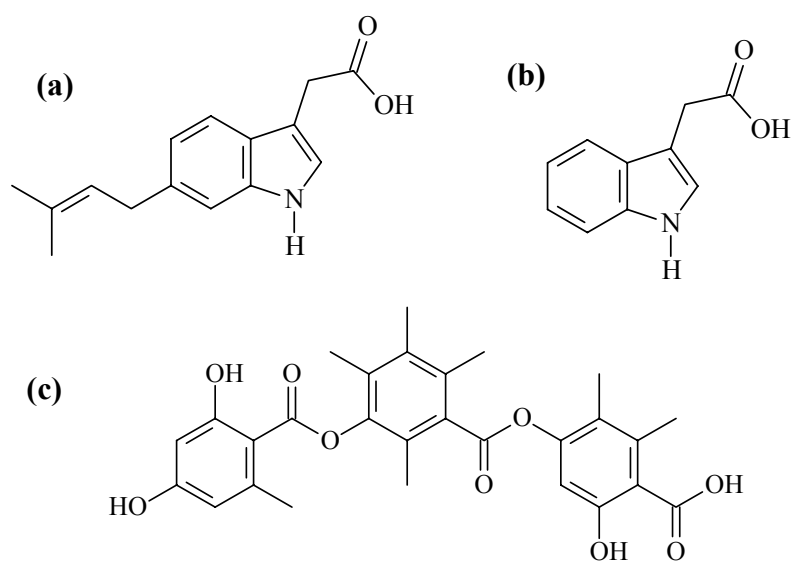
	Planta	Fungo
Benefícios	Aumento: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Crescimento</li> <li>• Reprodução</li> <li>• Resistência</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Refúgio</li> <li>• Nutrição</li> <li>• Transmissão genética</li> </ul>

Mais recentemente foi descoberto que um fungo (*Taxomyces andrenae*) isolado como endofítico em *Taxus brevifolia*, uma espécie produtora de paclitaxel (Taxol™), também produz a substância em meio de cultura artificial na ausência de células da planta (STIERLE, 1993, 1995). Essa descoberta

causou grande impacto no meio acadêmico, devido às propriedades anticancerígenas diferenciadas apresentadas por esse diterpeno (SCHIFF, 1979).

O rendimento de taxol na planta *T. brevifolia* é muito baixo, uma quantidade menor do que 0.02 % da planta seca (WANI, 1971). Devido à grande demanda dessa substância, certamente, e principalmente por razões ecológicas, a planta não será uma fonte sustentável de taxol. De fato, o taxol comercializado atualmente tem sua origem na semi-síntese usando outro diterpeno mais abundante na planta como material de partida. Por outro lado, muitas outras espécies de fungos produtores de taxol, em rendimentos bastante razoáveis, foram isoladas dos tecidos de *T. brevifolia* (STIERLE, 1993) e também de outras espécies de *Taxus* (BASHYAL, 1999; LI, 1996).

Outras importantes descobertas podem ser exemplificadas no estudo de endofíticos em plantas medicinais muito usadas na China. Um exemplo é a planta usada em tratamento antimalárico, *Artemisia annua*, cujos endófitos produzem metabólitos indólicos (Figura 1.2 a e b) que apresentam atividade contra bactérias gram-negativas e positivas, antifúngica e fito-hormonal. Outro metabólito antimicrobiano, da classe dos depsídeos, o ácido coletótrico (Figura 1.2 c), também foi isolado a partir de fungo endofítico de um mesmo gênero vegetal (OWEN, 2004).



**Figura 1.2.** a) 6-isoprenilindole-3-ácido carboxílico, bactericida isolado de fungo endofítico *Artemisia annua*; b) fitohormônio indole-3-ácidoacético; c) ácido coletotrico

### **1.3 Micro-organismos endofíticos em frutas**

As frutas são órgãos vegetais que possuem um importante papel na dieta humana, pois elas oferecem nutrientes essenciais à alimentação, como minerais, carboidratos e vitaminas, sendo consideradas muito importantes para a manutenção da saúde e bem estar do homem (MACIAS, 2007). No entanto, justamente por representarem uma rica fonte de açúcares e nutrientes, elas tornam-se muito atrativas ao ataque por micro-organismos, e então hospedeiros naturais dos mesmos.

O isolamento de bactérias e fungos é freqüente em trabalhos envolvendo plantas de caráter alimentício, como é mostrado na tabela 2.

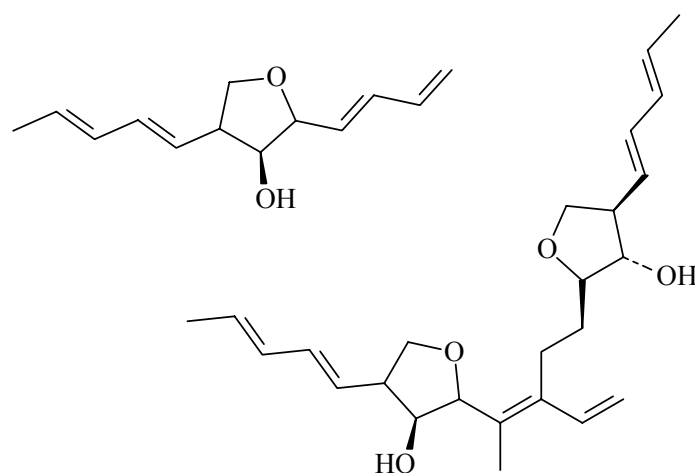
**Tabela 1. 2.** Bactérias e fungos isolados de plantas comestíveis.

<b>Cultura</b>	<b>Patógenos</b>	<b>Endófito</b>	<b>Referência</b>
Banana	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Cubense</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	SERAFINI, 2002
		<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Azospirillum amazonens</i> , <i>Herbaspirillum seropedicae</i> , <i>Citrobacter</i> sp, <i>Klebsiella variicola</i>	ROSENBLUETH, 2006
Pêra	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Erwinia amylovora</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>Erwinia herbicola</i>	SERAFINI, 2002
		<i>Pantoea agglomerans</i>	NUNES, 2001
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>		MORAGREGA, 2003
Mamão	<i>Erwinia papayae</i> sp., <i>Erwinia herbicola</i>		GARDAN, 2004
Feijão	<i>R. solani</i> , <i>P. ultimum</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>B. subtilis</i>	SERAFINI, 2002
Milho	<i>Fusarium moliniforme</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	SERAFINI, 2002
Alface		<i>Escherichia coli</i>	ROSENBLUETH, 2006
Batata	<i>Erwinia carotovora</i> var. <i>atroseptica</i> , <i>V. dahliae</i>	<i>Bacillus alcalophilus</i> fsp. <i>Halodurans</i> , <i>Pseudomonas tolaasii</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Serratia plymuthica</i>	SERAFINI, 2002
Pepino	<i>Colletotrichum orbiculare</i> , <i>Erwinia racheiphila</i> , <i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Bacillus pumilus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. fluorescens</i> ,	SERAFINI, 2002
Tomate	<i>F. oxysporum</i> , <i>V. dahliae</i>	<i>B. pumilus</i> , <i>P. fluorescens</i>	SERAFINI, 2002
Uva e framboesa	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> , <i>P. Fluorescens</i> .	SERAFINI, 2002
Morango		<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Xanthomonas</i> ssp.	LODEWYCKX, 2002

Apesar de toda a literatura descrita sobre endofíticos isolados a partir de plantas alimentícias, a maioria relata a existência destes micro-organismos em raízes, cascas e folhas. Poucos relatos são encontrados no que diz respeito aos frutos destas plantas. Metodologias utilizando a parte interna dos frutos, visando à obtenção de possíveis micro-organismos endofíticos, assim como propostas de estudos químicos para seus metabólitos, parecem ser pouco exploradas. Entre os raros exemplos, tem-se o estudo de um antibiótico lipopeptídico produzido pela



bactéria *Bacillus subtilis* isolada da polpa da maçã (BECHARD, 1998) e a identificação de polienos furanosídicos, com atividade antibacteriana produzidos pelo fungo *Chaetomium* sp., isolado de tomate (MARWAH, 2007).



**Figura 1.3.** Metabólitos secundários produzidos por *Chaetomium* sp.

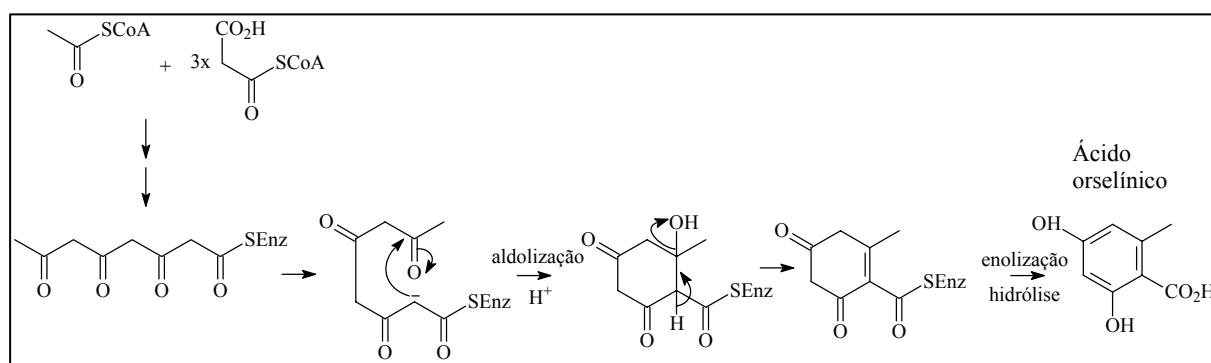
#### 1.4 Policetídeos e Depsídeos

Os policetídeos são um grupo de metabólitos secundários produzidos por muitos tipos de organismos como bactérias, fungos, plantas e animais. Estes compostos exibem notória diversidade estrutural, abrangendo muitas atividades biológicas (GAGUNASHVILI, 2009). Este grupo de substâncias são de grande interesse comercial devido a suas propriedades farmacológicas como antitumoral e redutora do colesterol. A biossíntese de policetídeos é catalisada por enzimas multifuncionais denominadas policetídeo sintases (PKSs), que constroem moléculas policetídicadas a partir de ácido carboxílico precursor e várias unidades de malonil Co-A, de uma maneira similar à síntese de ácidos graxos (GAGUNASHVILI, 2009).

Depsídeos são outros exemplos de policetídeos. Estes metabólitos secundários são isolados principalmente de líquens e de micro-organismos endofíticos associados a este tipo de vida. Sua característica química estrutural

básica são dois ou mais anéis aromáticos interligados por uma unidade carboxílica, sendo que o ácido orselínico (Figura 1.4) é o precursor de depsídeos derivados do orcinol (HONDA, 1998). A formação desses compostos ocorre por esterificação entre unidades derivadas desse ácido.

O ácido orselínico é a unidade fundamental da biossíntese de depsídeos e depsídonas. O processo biossintético inicia-se, como no caso dos ácidos graxos, com a condensação de 1 mol de acetilSCoA e 1 mol de malonilSCoA. A acetoacetilSCoA, resultante desta união, pode condensar com duas outras moléculas de malonilSCoA em etapas sucessivas, formando um policetídeo de 8 carbonos (HONDA, 1998). Este último pode ciclizar através de dois processos distintos: um deles por condensação aldólica produzindo ácido orselínico (DEWICK, 2002).

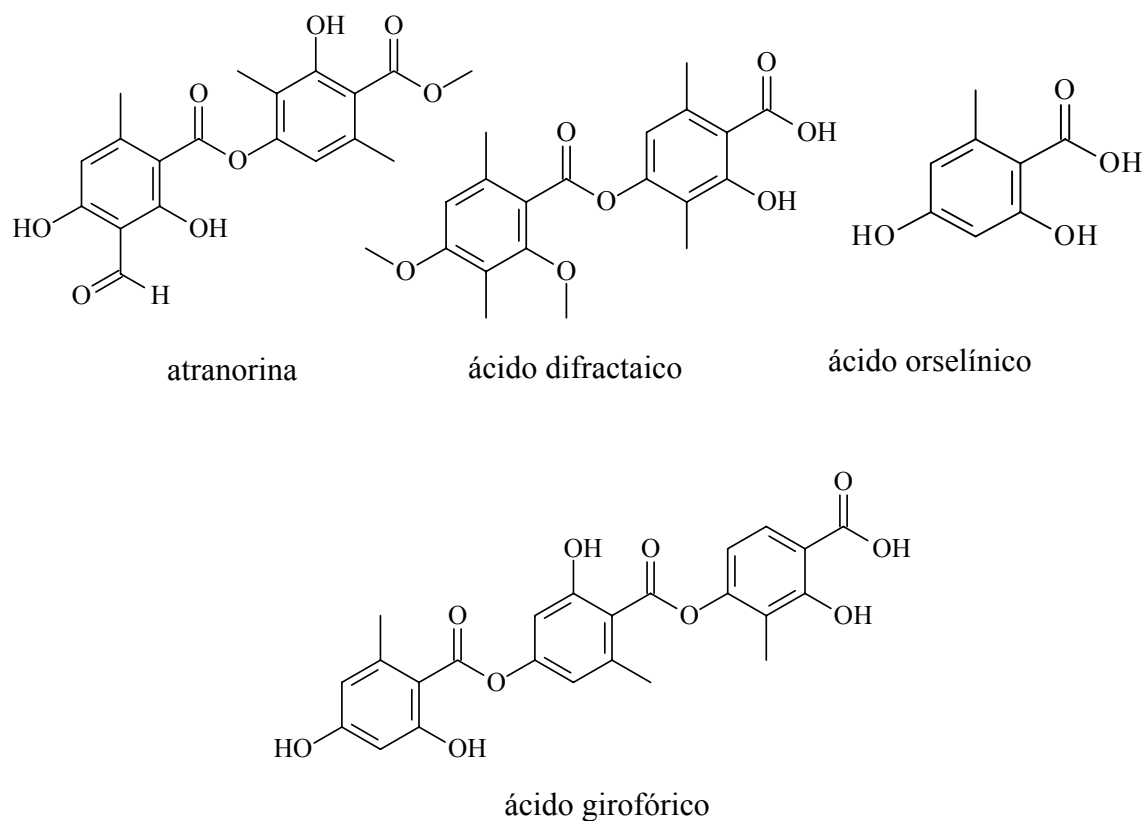


**Figura 1.4.** Reações biossintéticas de formação do ácido orselínico por condensação de acetilSCoA e malonilSCoA (DEWICK, 2002)

A reação biossintética de formação de ácido orselínico é catalisada pela enzima ácido orselínico sintase (VICENTE, 1988). O mecanismo de formação desse ácido envolve reação de desidratação somente na etapa final quando ocorre a ciclização da cadeia para formar o ácido orselínico.

A enzima ácido orselínico sintase tem sido caracterizada como um complexo enzimático contendo duas atividades transacetilases, uma proteína transportadora de grupos acil, uma enzima de condensação, uma de ciclização e uma atividade hidrolase (VICENTE, 1988).

Muitas propriedades já foram reportadas a respeito de alguns tipos de depsídeos como antipirética, antiinflamatória, analgésica, anticâncer, anti-HIV e antibiótica (LV, 2008), herbicida (ROJAS,2000). Devido a todas essas atividades mencionadas, muitos depsídeos vêm sendo sintetizados para avaliação de suas respectivas atividades biológicas e possibilidade de uso farmacológico (LV, 2009; KUMAR, 1999).



**Figura 1.5.** Ácido orselínico e alguns exemplos de depsídeos

## ***2.OBJETIVOS***

---

## 2.OBJETIVOS

O principal objetivo do trabalho foi explorar a microbiota endofítica associada às frutas banana, pêra e goiaba dos pontos de vista químico e biológico. Traçar um perfil químico dos micro-organismos isolados, correlacionando-o também, com os respectivos frutos hospedeiros. Averiguar as possíveis atividades das substâncias isoladas por meio de ensaios biológicos.

- Isolar micro-organismos associados às frutas banana (*Musa paradisiaca*), pêra (*Pyrus sp* ) e goiaba (*Psidium guajava*).
- Cultivar os micro-organismos em diferentes meios de cultura artificiais e meios preparados com as polpas dos frutos, buscando melhores condições de crescimento dos organismos assim como da produção de metabólitos secundários.
- Investigar o perfil metabólico dos micro-organismos nos diferentes meios de cultivos testados
- Otimizar os processos de extração e purificação das substâncias.
- Identificar os metabólitos isolados.
- Estabelecer condições ótimas de análise por cromatografia acoplada a espectrometria de massas para substâncias isoladas e detectadas.
- Estudar a fragmentação dos metabólitos isolados usando *electrospray* (ESI)/CID-MS, escolhendo os melhores experimentos para a detecção seletiva dessas substâncias nos meios de cultura e em frutas.
- Realizar bioensaios a fim de investigar o potencial antibiótico dos metabólitos.

## ***3. PARTE EXPERIMENTAL***

---

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Materiais e equipamentos**

##### **3.1.1 Material vegetal utilizado para o isolamento dos micro-organismos endofíticos**

Todo o material vegetal foi adquirido em comércio local da cidade de São Carlos (mercados e hortifrutis)

- Goiabas comerciais tipo vermelha;
- Pêras comerciais tipo portuguesa;
- Bananas comerciais tipo nanica;
- Maçãs comerciais tipo galla.

##### **3.1.2 Materiais utilizados para o isolamento, cultivo e conservação dos micro-organismos endofíticos**

- Água destilada;
- Álcool 70%;
- Funil de placa sinterizada;
- Alça de platina;
- Bico de Bunsen;
- Lâminas de bisturi;
- Pinça
- Papel de filtro qualitativo (80g Ø=12,5 cm) SATELIT<sup>®</sup>;
- Placas de Petri;
- Ágar-ágar SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>;
- Ágar bacteriológico SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>;
- Dextrose U.S.P. MALLINCKRODT<sup>®</sup> Genar (anidro e granular);
- Sulfato de sódio anidro SYNTH<sup>®</sup>;
- Ciclohexamida SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>;

- Ácido gálico, ácido ferúlico, 2,4,6 triidroxiacetofenona, ácido para-aminobenzóico, ácido salicílico SIGMA-ALDRICH®
- Batatas inglesas comerciais;
- Arroz parbolizado UNCLE BEN'S®;
- Caldo Mueller Hinton DIFCO®;
- Meio BHI (Brain Heart Infusion) ACUMEDIA®;
- Ágar Mueller Hinton ACUMEDIA®;
- Ágar BHI (Brain Heart Infusion) ACUMEDIA®;

### **3.1.3 Equipamentos utilizados para o isolamento e cultivo dos micro-organismos endofíticos**

- Mesa agitadora TECNAL®;
- Autoclave vertical Phoenix AV 75 e Soc. FABBE® 103;
- Microondas LG®, Smart Dial modelo MS 158DDA;
- Capela de fluxo laminar VECO®, VLFS -12M (motor/germicida);
- Estufa incubadora de laboratório com demanda bioquímica de oxigênio (D.B.O) FANEM® 347 CD;
- Liquidificador MALLORY®;

### **3.1.4 Equipamentos utilizados no isolamento e análises de metabólitos secundários**

- Rotavapor BÜCHI® R-200 com banho de aquecimento BÜCHI® B-490;
- Rotavapor BÜCHI® R-114 com banho de aquecimento BÜCHI® B-480;
- Sonicador BRANDSON® 1510;
- Bomba de vácuo TECNAL®
- Pipetas calibradas EPPENDORF®
- Agitador de tubos AP56 PHOENIX®;
- Moinho TEC 631 TECNAL®;



- Centrífuga Mobilispin VULCOTECHNOLOGIES<sup>®</sup>
- Reagente vanilina-ácido sulfúrico (1g de vanilina dissolvida em 100 mL de ácido sulfúrico);
- Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear
- Espectrômetro de RMN BRUKER DRX- 400 (9,4T);
- Espectrômetro de RMN BRUKER ARX- 200 (4,7 T)
- Espectrômetro de Massas
- Espectrômetro de Massas QuattroLC-MICROMASS<sup>®</sup>, Triplo-quadrupolo, *ESI*;
- Espectrômetro de Massas Synapt HDMS-WATERS<sup>®</sup>, Q-TOF, *ESI*;
- Espectrômetro de Massas Quattro Premier XE-WATERS<sup>®</sup>, Triplo-quadrupolo, *ESI*.

Cromatógrafo Líquido Alliance 2695-WATERS<sup>®</sup>:

- Detector de UV (PDA) para HPLC WATERS 2696

Cromatógrafo modo analítico SHIMADZU<sup>®</sup>:

- Bomba LC10AD gradient pumps SHIMADZU<sup>®</sup>;
- Bomba LC-8A SHIMADZU<sup>®</sup>;
- Detector de UV (PDA) para HPLC SHIMADZU<sup>®</sup> SPD-10A e SPD-6A UV-Vis;
- Módulo de comunicação detector/computador em CLAE SHIMADZU<sup>®</sup>, CBM-10A Communication BUS Module;
- Injetor para HPLC SHIMADZU<sup>®</sup> Auto Injector SIL-10ADVp.

Cromatógrafo modo preparativo:

- Bomba LC-6AD SHIMADZU<sup>®</sup>;
- Detector UV SPD-10AV SHIMADZU<sup>®</sup>;
- Controladora SCL-10A SHIMADZU<sup>®</sup>;
- Injetor manual Injector SIL-10ADVp.

### **3.1.5 Suportes cromatográficos**

- Cromatografia em camada delgada analítica: Sílica gel em folhas sobre alumínio (ALUGRAM<sup>TM</sup> SIL G/UV<sub>254</sub> – MACHEREY-NAGEL<sup>®</sup>);
- Coluna cromatográfica para cromatografia líquida de baixa pressão: sílica gel 230-400 mesh (flash), sílica gel 70-230 mesh (comum) ALDRICH<sup>®</sup>;
- Coluna cromatográfica para cromatografia líquida de baixa pressão : ODS
- Colunas cromatográficas para cromatografia líquida de alta pressão em modo analítico: Synergi 4 $\mu$  Fusion \_RP 80A (part number 00G-4424-E0), tamanho: 250 X 4.60 mm, PHENOMENEX<sup>®</sup>; Luna 5 $\mu$  Phenyl Hexyl (part number 00G 4257-E0) PHENOMENEX<sup>®</sup>, tamanho: 250 x 4,60mm;
- Coluna cromatográfica para cromatografia líquida de alta pressão em modo preparativo: ODS, Shim-Pack, SHIMADZU<sup>®</sup>, 3025340, tamanho 250 x 21,20mm.

### **3.1.6 Solventes empregados**

- Solventes para cromatografia líquida de baixa pressão, destilados no DQ-UFSCar: metanol, acetato de etila, acetona, diclorometano e hexano.
- Solventes grau HPLC para cromatografia de alta pressão: acetonitrila, isopropanol MALLINCKRODT<sup>®</sup>, metanol J. T. BAKER<sup>®</sup>, H<sub>2</sub>O purificada em sistema MILLI-Q<sup>®</sup>;
- Solventes deuterados para análise em RMN: clorofórmio e metanol CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES<sup>®</sup>, Inc.

### **3.1.7 Materiais e equipamentos utilizados no ensaio antimicrobiano**

- Ágar Mueller Hinton, ACUMEDIA<sup>®</sup>;
- Caldo Mueller Hinton, DIFCO<sup>®</sup>;

- Dimetilsulfóxido, SINTH<sup>®</sup>;
- Sulfato de bário, SINTH<sup>®</sup>;
- Tetraciclina, BRISTOL-MAYERS-SQUIBB<sup>®</sup>;
- Vancomicina, ABL<sup>®</sup>,
- Agitador de tubos, AP56 PHOENIX<sup>®</sup>,
- Estufa para crescimento de bactérias

## **3.2 Procedimento experimental**

### **3.2.1 Preparo do meio de cultura BDA**

Preparou-se o meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Ágar) cozinhando-se 60 g de batata inglesa descascada e cortada em cubos, por 15 minutos em forno de microondas (potência 60W) com 150 mL de água. Em seguida, filtrou-se com o auxílio de um filtro de algodão, transferindo o caldo para um Erlenmeyer. Seguidamente, acrescentou-se 6,0 g de dextrose e após dissolução adicionou-se 4,5 g de ágar-ágar à mistura, homogeneizando-a e completando-se o volume para 300 mL de água destilada.

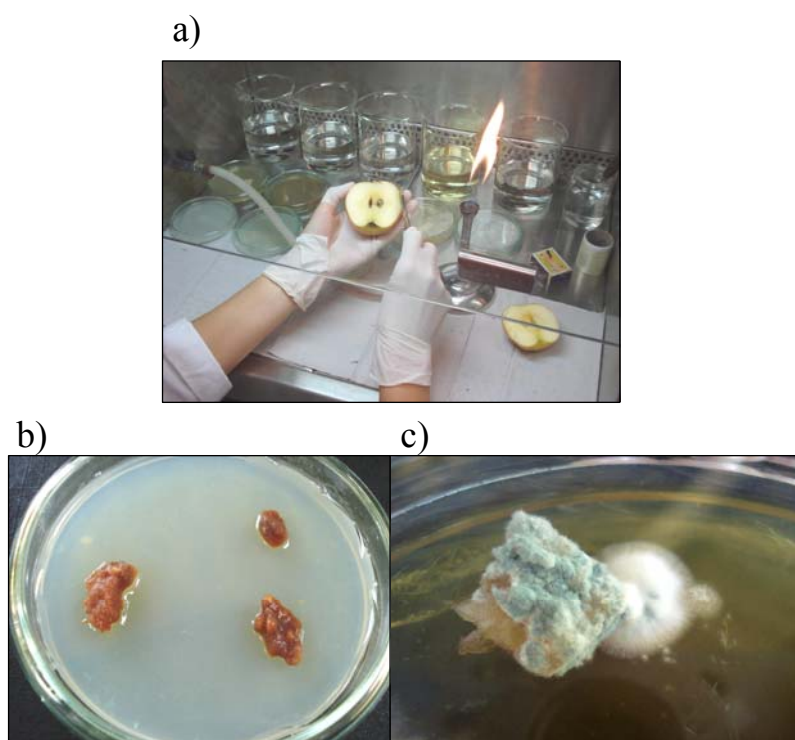
O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm de por 15 minutos e, a seguir, foi adicionado em placas de Petri, em ambiente estéril.

Às placas de Petri utilizadas no isolamento das bactérias endofíticas foram acrescidas suspensão antifúngica ciclohexamida ao meio de cultura (50µg/mL de meio).

### 3.2.2 Isolamento de micro-organismos endofíticos de goiaba (*Psidium guajava*), pêra (*Pyrus communis*), banana (*Musa paradisíaca*) e maçã (*Malus domestica*)

O isolamento dos micro-organismos foi realizado de modo adaptado em relação à metodologia descrita por (PETRINI, 1992), devido às dimensões do material vegetal estudado. As frutas utilizadas foram adquiridas no mesmo dia da realização do procedimento, sendo primeiramente lavadas com detergente comercial e em água corrente. Em seguida, já em capela de fluxo laminar, iniciou-se a sequência de esterilização superficial das frutas a fim de eliminar microorganismos epifíticos e agentes contaminantes. Mergulhou-se sequencialmente os frutos em etanol 70%; água destilada; solução aquosa de hipoclorito de sódio 11%; água destilada; etanol 70%; e por fim água destilada para a remoção de resíduos dos agentes esterilizantes, durando 2 minutos o tempo de cada imersão.

Com o uso de bisturi e faca esterilizados em autoclave e posteriormente em radiação ultravioleta, retirou-se cuidadosamente as cascas dos frutos, realizando-se cortes nas polpas para a obtenção de pequenos pedaços que foram depositados em placas de Petri contendo meio BDA (Figura 3.1). As placas contendo os fragmentos de polpa foram incubados em estufa incubadora a 25°C, sendo observadas diariamente. A fim de purificar as colônias fúngicas e bacterianas, realizaram-se repiques sucessivos nas placas em que houve crescimento de mais de uma colônia de micro-organismo. Além de meio BDA, foram testados os meios Ágar Miller Hinton e Ágar BHI nos repiques das bactérias isoladas.



**Figura 3.1.** a) Procedimento de isolamento de micro-organismos; b) Fragmentos recém depositados de polpa de goiaba; c) crescimento de fungos em polpa de maçã

### 3.2.3 Códigos dos micro-organismos isolados

Os fungos e as bactérias isoladas foram codificados de acordo com seu fruto de origem e numerados de acordo com a ordem de isolamento a fim de facilitar a manipulação dos mesmos (Tabela 3.1). Exemplo: FG1- Fungo Goiaba 1. Dos organismos isolados, o fungo referente ao código FG1 já teve sua taxonomia identificada através de análises realizadas no Laboratório de Produtos de Origem Microbiana, na Universidade Federal do Amazonas - ICB-DFCA/UFAM pela pesquisadora especialista Dra. Antonia Q. L. Souza.

**Tabela 3.1.** Códigos dos endofíticos isolados em frutas

<b>Código</b>	<b>Especificação</b>
FG1	Fungo da Goiaba 1
FG2	Fungo da Goiaba 2
BB1	Bactéria da Banana1
BP1	Bactéria da Pêra 1
FM1	Fungo da Maçã 1
FM4	Fungo da Maçã 4

### **3.2.4 Cultivo dos micro-organismos em diferentes meios de cultura**

#### **3.2.4.1 Cultivo dos micro-organismos FG1, FM1, FM4 em meio líquido**

##### **Czapeck's enriquecido extrato de levedura**

Os endofíticos em questão foram cultivados em meio líquido Czapeck's com 2% de extrato de levedura, o qual é composto pelos seguintes nutrientes: 3,0 g de  $\text{NaNO}_3$ ; 1,0 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5 g de  $\text{MgSO}_4$ ; 0,5 g de  $\text{KCl}$ ; 0,010 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 30 g de glicose; 20,0g de extrato de levedura; 1,0 L de  $\text{H}_2\text{O}$ . Dissolveu-se, sob agitação constante, os reagentes na devida proporção em água destilada. Em seguida, adicionou-se, separadamente, o volume pretendido de meio de cultura nos respectivos Erlenmeyers, os quais foram autoclavados por 15 minutos, à  $120^\circ\text{C}$  e 1 atm de pressão para a esterilização do meio de cultura.

Em seguida, os frascos foram transferidos à capela de fluxo laminar, previamente esterilizada e, após o meio atingir a temperatura ambiente, transferiu-se para os frascos Erlenmeyers 4 fragmentos, com cerca de 0,5 cm cada, do respectivo micro-organismo em estudo, conservado em placas de Petri em meio BDA. Além dos frascos com os inóculos, manteve-se também durante os experimentos 3 Erlenmeyers (para cada espécie) contendo apenas o meio Czapeck's, para controle microbiológico. Todo este procedimento foi adotado

para o cultivo de todas as espécies em estudo.

Cada micro-organismo foi cultivado em uma determinada escala, sendo de modo estático e/ou com agitação fazendo-se uso de mesa agitadora. (Tabela 3.2) Os frascos em modo estático e com agitação foram incubados a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C). A agitação foi controlada em 120 rpm.

#### **3.2.4.2 Cultivo dos micro-organismos BB1 e BP1 em meio BHI e em meio Caldo Mueller Hinton**

O meio foi preparado de acordo com as instruções dos fabricantes utilizando a proporção de 38 g de meio Mueller Hinton e 52g de meio BHI, para 1L de água destilada cada um, dissolvendo-se a mistura sob agitação constante. Após a distribuição dos meios nos respectivos Erlenmeyers, foram realizados os mesmos procedimentos detalhados para a inoculação e cultivo dos micro-organismos no item anterior. Os frascos foram incubados durante 15 dias, a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) sob agitação controlada a 120 rpm. (Tabela 3.2)

#### **3.2.4.3 Cultivo do fungo FG1 em meio batata-dextrose (BD)**

O meio BD foi preparado da mesma forma descrita na preparação de meio de cultura BDA, porém sem a adição de ágar-ágar. O meio de cultura foi transferido para os devido número de Erlenmeyers, realizando-se os mesmos procedimentos para inoculação do fungo, detalhados no item 3.2.4.1. Os frascos foram incubados durante 15 dias, a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) sob agitação controlada a 120 rpm.

#### **3.2.4.4 Cultivo dos micro-organismos FG1, FM1, FM4, BB1, BP1 em meio líquido contendo polpa de fruta**

Como um dos objetivos deste trabalho trata-se do cultivo microbiológico utilizando a própria polpa da fruta de onde foram isolados os endófitos, criaram-se meios simples com cada uma, utilizando-as como fonte de carbono e nutrientes aos micro-organismos.

As frutas utilizadas foram compradas no comércio local da cidade de São Carlos, estando todas, aparentemente, em boas condições para consumo humano, não havendo sinais de apodrecimento ou doença. O preparo dos meios foi realizado no mesmo dia da compra das frutas.

Descascaram-se as frutas e em seguida, as polpas foram cortadas em pequenos pedaços os quais foram pesados. Pesou-se 90g de polpa de goiaba, 40g de banana, 90 de pêra e 145g de maçã para cada referido experimento. Em um liquidificador doméstico, preparou-se separadamente cada um dos meios (referente a cada fruta), adicionando-se 1L de água destilada a polpa previamente pesada. A mistura foi triturada por 3 minutos formando-se o “suco” da fruta que foi utilizado como meio. Após a distribuição de cada meio nos respectivos Erlenmeyers, foram realizados os mesmos procedimentos detalhados para a inoculação e cultivo dos micro-organismos no item 3.2.4.1.

Novamente, cada micro-organismo foi cultivado em uma determinada escala, sendo de modo estático ou com agitação, como mostra a Tabela 3.2. Os frascos em ambos os modos de incubação foram mantidos a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C). A agitação foi controlada em 120 rpm.



**Tabela 3.2.** Dados dos cultivos em meios líquidos dos endofíticos isolados

<b>Endófito</b>	<b>Meio de cultivo</b>	<b>Volume de meio de cultura/ Volume do Erlenmeyer utilizado</b>	<b>Número de Erlenmeyers com inóculos</b>	<b>Modo de incubação</b>	<b>Tempo de incubação</b>
FG1	Czapeck's	80mL / 1L	25	estático	30 dias
FG1	goiaba	250mL / 1L	15	estático	20 dias
FM1	Czapeck's	200mL / 500mL	10	estático	20 dias
FM4	Czapeck's	200mL / 500mL	10	estático	20 dias
FM1	maçã	200mL / 500mL	3	estático	20 dias
FM4	maçã	200mL / 500mL	3	estático	20 dias
BB1	BHI	100mL / 250mL	12	com agitação	15 dias
BB1	MH	100mL / 250mL	12	com agitação	15 dias
BB1	banana	100mL / 250mL	12	com agitação	15 dias
BP1	BHI	100mL / 250mL	12	com agitação	15 dias
BP1	MH	100mL / 250mL	12	com agitação	15 dias
BP1	pêra	100mL / 250mL	12	com agitação	15 dias

### 3.2.4.5 Cultivo do fungo FG1 em meio sólido arroz

Pesou-se 90g de arroz parabolizado Uncle Ben's e adicionou-se 80mL de água destilada em 30 erlenmeyers de 500mL, os quais foram autoclavados por 15 minutos, à 120°C e 1 atm de pressão para a esterilização do meio de cultura. Em seguida, os frascos foram agitados vigorosamente a fim de desprender os grãos de arroz e transferidos à capela de fluxo laminar, previamente esterilizada. Após o meio atingir a temperatura ambiente, transferiu-se para os erlenmeyers 4

fragmentos, com cerca de 0,5 cm cada, do fungo em estudo, contido em placas de Petri em meio BDA. Além dos frascos com os inóculos, manteve-se também durante os experimentos 3 erlenmeyers contendo apenas o meio de cultura arroz, para controle microbiológico. Os frascos foram incubados durante 30 dias, a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C), de modo estático. Durante três dias, os frascos foram agitados manualmente duas vezes ao dia para homogeneizar o meio junto à massa micelial em crescimento.

### **3.2.5 Extração de metabólitos fúngicos e bacterianos**

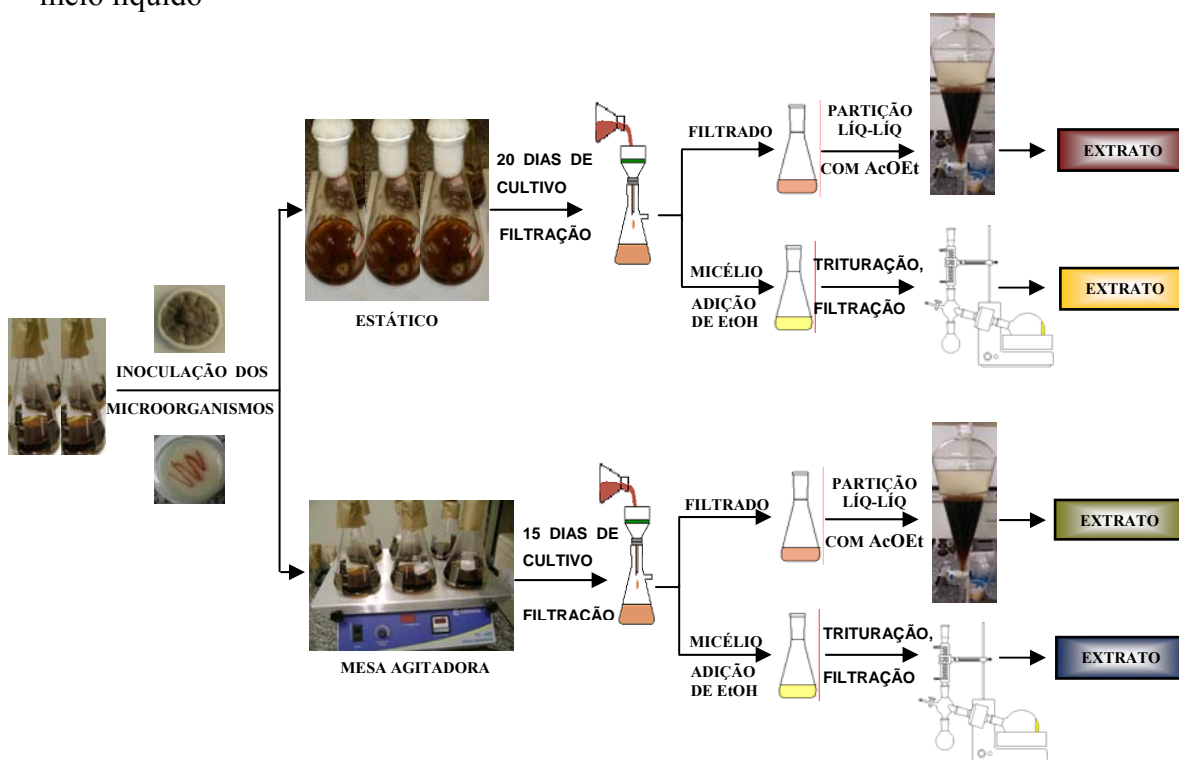
#### **3.2.5.1 Extração dos metabólitos microbianos a partir dos meios de cultura líquidos**

Para todos os experimentos com meios líquidos foi realizado o mesmo procedimento detalhado a seguir, sendo que para a extração dos cultivos de bactérias realizou-se apenas a partição líquido-líquido descrita.

Finalizado o período de incubação, o meio contendo o endofítico em fase desenvolvida de crescimento, bem como o frasco contendo o controle, foram filtrados, a pressão reduzida, em capela de fluxo laminar, resultando, deste modo, no filtrado e no micélio no caso dos fungos. Ao micélio (de cada erlenmeyer) adicionou-se 300 mL de EtOH absoluto, triturando-o a seguir. Após 24 horas, este foi filtrado e adicionou-se mais 200 mL de EtOH à massa micelial, filtrando-se novamente após 24 horas. O filtrado etanólico foi concentrado em rotaevaporador, levando ao extrato micelial para cada micro-organismo. Particionou-se o filtrado de cada endófito com AcOEt na proporção de 1:1, por 3 vezes, o qual produziu o extrato da partição líquido-líquido.

Para os meios de cultura controle, foi realizado apenas o processo de partição líquido-líquido com AcOEt. Um resumo do procedimento descrito de cultivo e extração encontra-se no Esquema 3.1.

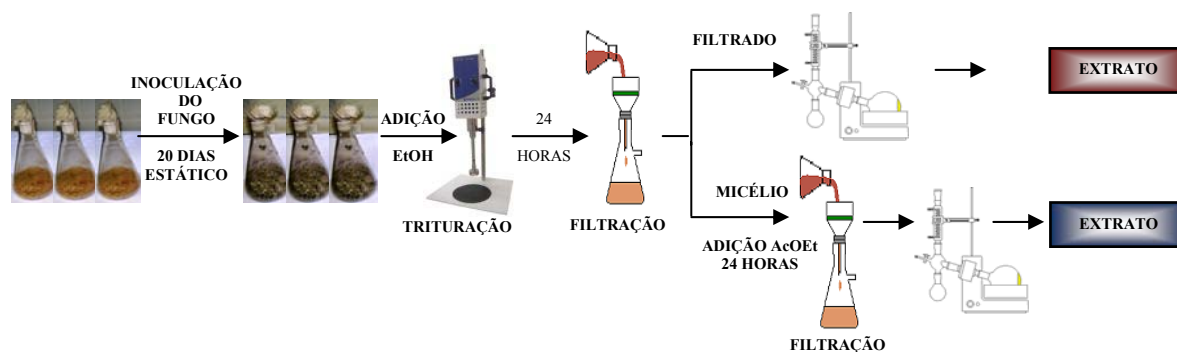
**Esquema 3.1.** Procedimento de cultivo e extração dos micro-organismos endofíticos em meio líquido



### 3.2.5.2 Extração dos metabólitos microbianos a partir do meio de cultura sólido

Finalizado o período de incubação, em capela de fluxo laminar, foram adicionados 300 mL de EtOH absoluto aos frascos contendo o meio de cultura. Triturou-se completamente todo o conteúdo dos erlenmeyers e após 24 horas de extração, filtrou-se a pressão reduzida. O filtrado etanólico foi reservado e adicionando-se novamente EtOH à massa micelial, um volume de 200mL. Depois de 24 horas, filtrou-se o conteúdo, reunindo o filtrado àquele reservado anteriormente. Ao micélio, adicionou-se 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. O procedimento de cultivo e extração em arroz é ilustrado no Esquema 3.2.

**Esquema3.2.** Procedimento de cultivo e extração do fungo em arroz



### 3.2.5.3 Códigos dos extratos

Com a finalidade de facilitar a manipulação dos extratos brutos fúngicos e bacterianos, codificou-se cada um, de acordo com o referente micro-organismo e meio de cultivo, como mostra a Tabela 3.3.

**Tabela 3.3.** Códigos e identificação dos extratos

<b>código</b>	<b>Micro-organismo</b>	<b>meio</b>	<b>Extrato</b>
FG1-1-P-ac	FG1	Czapeck's estático 30 dias	Particionado/ AcOEt
FG1-1-M-et	FG1	Czapeck's estático 30 dias	Micélio/etanólico
FG1-4-M-et	FG1	Arroz	Micélio/etanólico
FG1-4-M-ac	FG1	Arroz	Micélio/AcOEt
FG1-5-P-ac	FG1	Goiaba	Particionado/ AcOEt
FG1-5-M-et	FG1	Goiaba	Micélio/etanólico
FG1-6-M-et	FG1	BD	Micélio/etanólico
FG1-6-P-ac	FG1	BD	Particionado/ AcOEt
BB1-1-P-ac	BB1	Mueller Hinton com agitação	Particionado/ AcOEt
BB1-3-P-ac	BB1	Banana com agitação	Particionado/ AcOEt
BP1-1-P-ac	BP1	Mueller Hinton com agitação	Particionado/ AcOEt
BP1-2-P-ac	BP1	BHI com agitação	Particionado/ AcOEt
BP1-3-P-ac	BP1	Pêra com agitação	Particionado/ AcOEt
FM1-1-P-ac	FM1	Czapeck's estático 20 dias	Particionado/ AcOEt
FM1-1-M-et	FM1	Czapeck's estático 20 dias	Micélio/etanólico
FM1-2-P-ac	FM1	Maçã estático	Particionado/ AcOEt
FM1-2-M-et	FM1	Maçã estático	Micélio/etanólico
FM1-3-P-ac	FM1	Arroz	Particionado/ AcOEt
FM1-3-M-et	FM1	Arroz	Micélio/etanólico
FM4-1-P-ac	FM4	Czapeck's estático	Particionado/ AcOEt
FM4-1-M-et	FM4	Czapeck's estático	Micélio/etanólico
FM4-2-P-ac	FM4	Maçã estático	Particionado/ AcOEt
FM4-2-M-et	FM4	Maçã estático	Micélio/etanólico
FM4-3-P-ac	FM4	Arroz	Particionado/ AcOEt
FM4-3-M-et	FM4	Arroz	Micélio/etanólico

### **3.2.6 Tratamento inicial dos extratos visando isolamento de metabólitos secundários**

Para determinar quais extratos seriam trabalhados preferencialmente frente ao grande número de extratos obtidos, foi necessário adotar um método inicial simples e rápido para a investigação de mesmos. Logo, o critério adotado foi o resultado obtido com a análise dos extratos por cromatografia em camada delgada (CCD), selecionando os extratos que mostravam o maior número de *spots*. Tendo em vista os extratos de maior interesse através do monitoramento por CCD, partiu-se para o isolamento dos metabólitos secundários produzidos pelos micro-organismos nos primeiros meios escolhidos a serem investigados.

### **3.2.7 Isolamento de metabólitos secundários produzidos pelo fungo endofítico de goiaba FG1 no extrato FG1-4-M-et**

Com a análise das eluições em CCD dos extratos, foi possível caracterizar o extrato FG1-4-M-et como o extrato mais promissor para o isolamento de substâncias a serem investigadas. Sendo assim, partiu-se para a manipulação de tal extrato realizando um pré-tratamento em coluna à vácuo. A finalidade deste procedimento cromatográfico foi conseguir frações mais limpas, livres de algumas impurezas e principalmente a obtenção de frações com diferentes polaridades, delineando um perfil de separação para os metabólitos.

Durante o processo foi utilizada uma coluna de dimensões  $h = 30,0$  cm e  $\Phi = 7,0$  cm contendo sílica tipo comum, sendo 12,49 g de massa de extrato aplicado à coluna. O sistema de eluição encontra-se descrito na Tabela 3.4 e as frações resultantes foram monitoradas por CCD.

**Tabela 3.4.** Sistema de eluição para coluna cromatográfica à vácuo (a)

Sistema de eluentes	Proporção	Volume (L)	Códigos frações
Hex	100%	2,0	F1
Hex : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1:1	3,0	F2
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100%	3,0	F3
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : AcOEt	7:3	4,0	F4
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : AcOEt	4:6	4,0	F5
AcOEt	100%	3,0	F6
AcOEt MeOH	7:3	5,0	F7
AcOEt MeOH	1:1	5,0	F8
AcOEt MeOH	3:7	4,0	F9
MeOH	100%	4,0	F10

### 3.2.7.1 Isolamento de Depsídeos a partir da fração F4-16 em HPLC preparativo

O recurso de monitoramento por CCD foi novamente utilizado, evidenciando as frações F4 e F5 devido ao aparecimento de *spots* bem definidos quando revelados em radiação UV, apresentando boa absorção tanto em 365 nm quanto em 254 nm. Além de absorverem a radiação, um dos *spots* em cada fração apresentou coloração rósea avermelhada muito intensa quando revelados em vanilina, o que norteou o isolamento dos metabólitos.

Partiu-se então para a purificação das substâncias da fração F4. Em uma coluna de dimensões h= 25 cm e  $\Phi = 5$  cm, utilizando sílica 230-400 *mesh*, foram aplicados 4,00 g da fração. As frações foram recolhidas em um volume de 100 mL, rotaevaporadas e secas em capela. O sistema de eluição encontra-se descrito na tabela 3.5.

**Tabela 3.5.** Sistema de eluição para coluna cromatográfica (b)

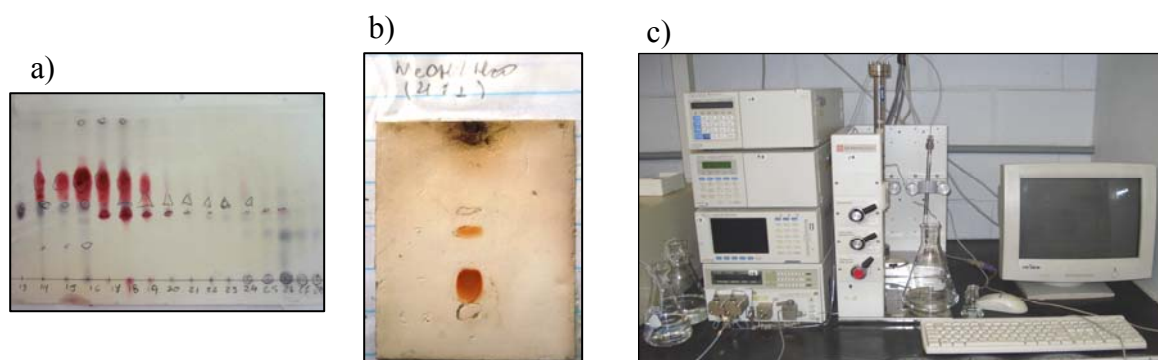
Sistema de eluentes	Proporção	Volume (L)
Hex	100%	0,5
Hex : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7:3	0,5
Hex : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1:1	1,0
Hex : CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7:3	0,5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100%	0,8
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : AcOEt	9,5:0,5	1,0
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : AcOEt	9:1	1,0
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : AcOEt	7:3	0,5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : AcOEt	1:1	0,5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : AcOEt	3:7	0,5
AcOEt	100%	1,0
MeOH	100%	1,0

As frações recolhidas foram numeradas de F4-1 a F4-41 e monitoradas por CCD. Com a análise das eluições em CCD notou-se que as frações de 14 a 20 encontravam-se quase puras (Figura 3.2a) Assim, na sequência, optou-se pela purificação das substâncias em HPLC preparativo.

Para o procedimento foram escolhidas as frações F4-16 a F4-19. As análises do procedimento de separação foram adquiridas e processadas empregando o programa Shimadzu Class-VP5.0. A figura 3.3 mostra o sistema empregado nas análises por HPLC/UV preparativo. O eluente utilizado na separação foi a mistura MeOH (grau HPLC) e H<sub>2</sub>O (purificada em sistema Milli-Q) na proporção 4:1 conforme otimização prévia em CCD fase reversa (ODS) (Figura 3.4). A mistura foi sonicada por 20 minutos antes do procedimento de separação. O fluxo aplicado foi de 5mL/min e os comprimentos de onda monitorados foram de 365nm e 254nm e o loop utilizado



foi de 500  $\mu$ L. Através do procedimento detalhado, foi possível a purificação das substâncias de interesse, os depsídeos codificados por **D0**, **D1**, **D2**, **D3**, **D4**.



**Figura 3.2.** a) CCD das frações F4-14 à F4-20, modo normal; b) CCD da fração F4-14, modo reverso (ODS) para otimização do sistema de eluição para separação das substâncias da fração F4-16; c) HPLC/UV preparativo-SHIMADZU

### 3.2.7.2 Purificação da fração F7 para detecção de substâncias co-produzidas por FG1

Tendo em vista a análise prévia por CCD, a fração F7 mostrou-se promissora para isolamento de metabólitos de interesse. Em uma coluna de dimensões  $h = 5,3$  cm e  $\Phi = 16$  cm, utilizando sílica 70-230 *mesh*, foram aplicados 2,30 g da fração. As frações codificadas em F7-1 à F7-80 foram recolhidas em um volume de 100 mL, rotaevaporadas e secas em capela. O sistema de eluição encontra-se descrito na tabela 3.6.

**Tabela 3.6.** Sistema de eluição para coluna cromatográfica (d)

Sistema de eluentes	Proporção	Volume (L)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100%	0.5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : AcOEt	9:1	0.5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : AcOEt	7:3	1,0
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : AcOEt	1:1	1,0
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : AcOEt	2:8	1,0
AcOEt	100%	1,0
AcOEt:MeOH	7;3	1,0
AcOEt:MeOH	1:1	2.0
MeOH	100%	0.3

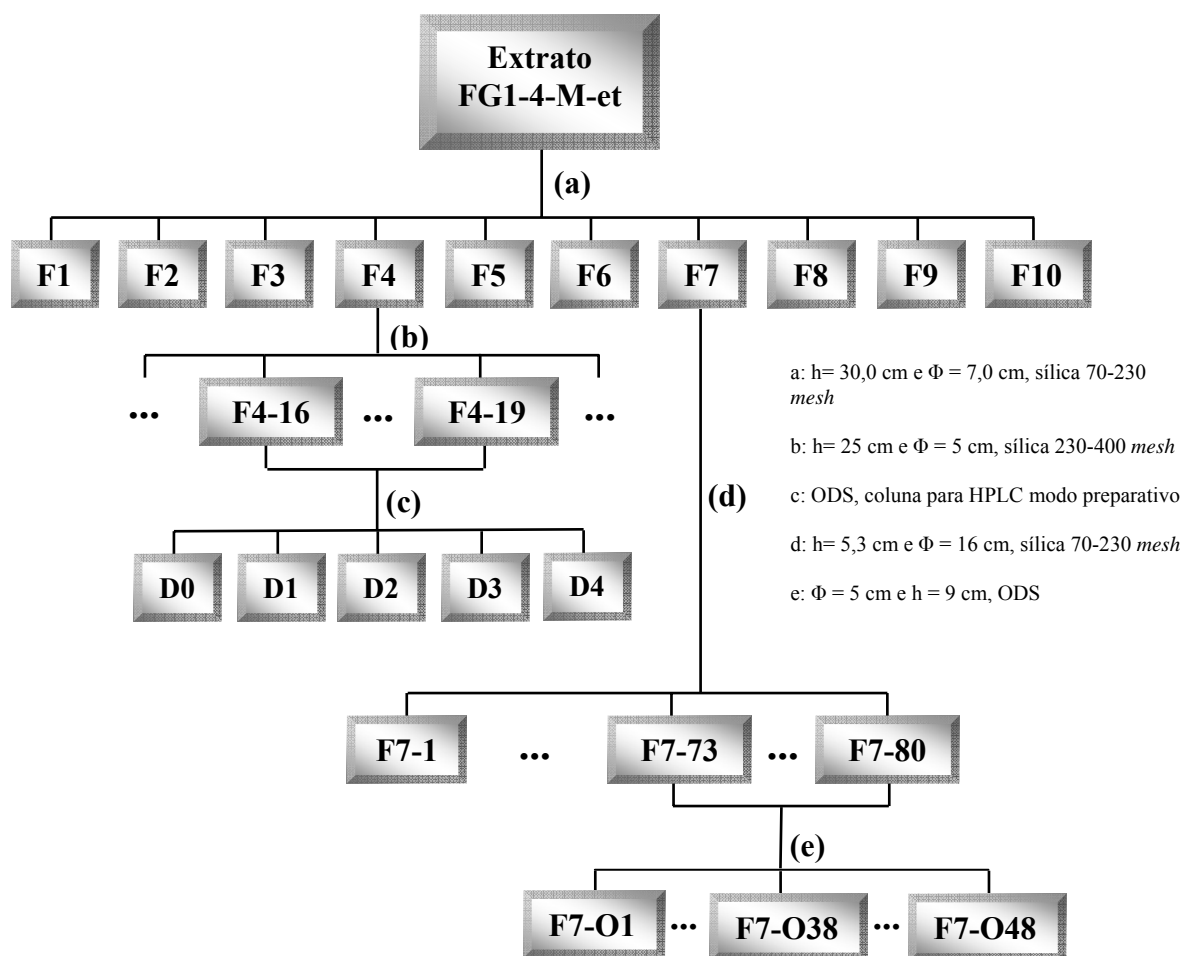
As frações F7-73 a F7-80 foram reunidas devido à similaridade dos respectivos perfis cromatográficos em CCD, sendo submetidas à cromatografia de baixa pressão em fase reversa (ODS). As dimensões da coluna utilizada foram de  $\Phi = 5$  cm e  $h = 9$  cm. As frações codificadas em F7-O1 à F7-O48 foram recolhidas em um volume de 30 mL e secas em capela. O sistema de eluição encontra-se descrito na tabela 3.7

**Tabela 3.7.** Sistema de eluição para coluna cromatográfica (e)

Sistema de eluentes	Proporção	Volume (L)
H <sub>2</sub> O: MeOH	6:4	0.1
H <sub>2</sub> O: MeOH	1:1	0.1
H <sub>2</sub> O: MeOH	4:6	0.3
H <sub>2</sub> O: MeOH	3:7	0.3
H <sub>2</sub> O: MeOH	2:8	0.5
MeOH	100%	0.7

O fluxograma 3.1 ilustrado a seguir, resume os procedimentos citados acima, aos quais o extrato FG1-4-M-et foi submetido, possibilitando a purificação de substâncias e frações de interesse durante o estudo.

**Fluxograma 3.1.** Isolamento de metabólitos secundários e purificação de frações a partir do extrato FG1-4-Met



### 3.2.8 Isolamento de metabólitos secundários produzidos pela bactéria endofítica em pêsca BP1 no extrato BP1-2-P-ac

Com a análise prévia por CCD partiu-se para o isolamento de substâncias de interesse existentes no extrato do cultivo bacteriano. Inicialmente foi realizado o processo de separação através de cromatografia líquida de bancada, fazendo-se uso de sílica 230- 400 *mesh* como fase estacionária. Uma massa de 0,49 g do extrato BP1-2-P-ac foram empregados em uma coluna de dimensões  $h = 19$  cm e  $\Phi = 3$  cm. As frações foram recolhidas em um volume de 100 mL, rotaevaporadas e secas em capela. O sistema de eluição encontra-se descrito na Tabela 3.8.

**Tabela 3.8.** Sistema de eluição para coluna cromatográfica

Sistema de eluentes	Proporção	Volume (L)
Hex : AcOEt	9:1	0,2
Hex : AcOEt	8:2	0,2
Hex : AcOEt	7:3	0,4
Hex : AcOEt	6,5:3,5	0,2
Hex : AcOEt	1:1	0,5
Hex : AcOEt	4,5:5,5	0,5
Hex : AcOEt	6:4	0,3
Hex : AcOEt	3,5:6,5	0,2
Hex : AcOEt	3:7	0,3
AcOEt	100%	0,4

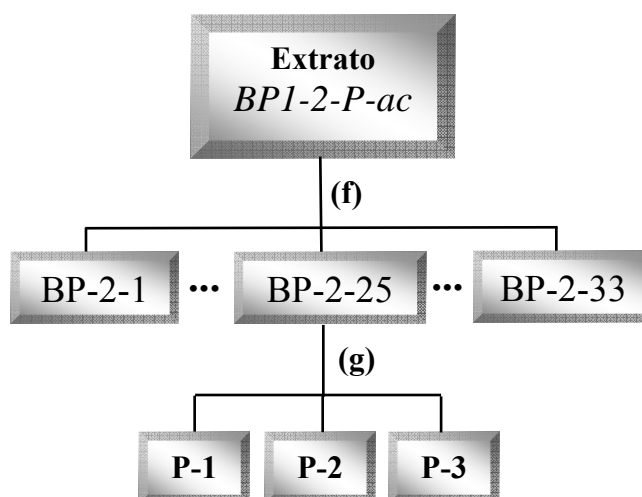
As frações recolhidas foram numeradas e codificadas em BP-2-1 a BP-2-33 e monitoradas por CCD. Com a análise das eluições em CCD e pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 25 notou-se a presença de um metabólito de interesse, encontrando-se quase puro. Assim, na sequência, optou-se pela purificação da

substância em HPLC preparativo, otimizando o sistema de eluição através do uso de CCD em fase reversa (ODS).

### 3.2.8.1 Isolamento da N-acetilriptamina a partir da fração BP-2-25 em HPLC preparativo

Para o procedimento de isolamento em HPLC modo preparativo, o eluente empregado e anteriormente otimizado foi a mistura MeOH (grau HPLC) e H<sub>2</sub>O (purificada em sistema Milli-Q) na proporção 1:1. O fluxo aplicado foi de 5 mL/min, o loop utilizado foi de 500 µL e o comprimento de onda monitorado foi de 254 nm. O Fluxograma 3.2 resume o procedimento realizado para o isolamento do metabólito N-acetilriptamina de código P-3.

**Fluxograma 3.2.** Isolamento da N-Acetilriptamina a partir do extrato BP1-2-P-ac



f: h= 19 cm e  $\Phi$  = 3 cm, sílica 230-400 mesh

g: ODS, coluna HPLC modo preparativo

### **3.2.9 Detecção e identificação das substâncias isoladas por análise em RMN 1D e 2D e Espectrometria de Massas**

Após separação e isolamento das substâncias de interesse, estas foram analisadas utilizando espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear em uma e duas dimensões (1D e 2D respectivamente). Os experimentos realizados em 1D foram os de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em equipamento Bruker de 200 MHz e de 400MHz. HSQC e HMBC foram os experimentos em 2D obtidos em equipamento de 400MHz.

As amostras foram previamente secas em capela, solubilizadas em solvente deuterado e inseridas em tubos para análise de RMN de 5 mm de diâmetro. Os solventes utilizados nas análises foram metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ).

As análises via espectrometria de massas de alta resolução para os depsídeos isolados, foram realizadas em equipamento Waters Synapt HDMS, por infusão direta, *ESI* modo positivo, cone 30 eV, e experimentos de MS/MS com energia de colisão entre 2-10 eV (gás Argônio).

As análises via espectrometria de massas de baixa resolução foram realizadas em equipamento triplo-quadrupolo QuattroLC-MICROMASS, sendo que os parâmetros utilizados variaram de acordo com a amostra analisada. Todas as análises referentes aos extratos e substâncias oriundos dos cultivos de FG1, foram realizadas pela técnica hifenada HPLC-MS/MS. Os parâmetros utilizados nestas análises serão descritos no item 3.2.11.

Para o metabólito N-acetilriptamina foi realizada inserção direta e as condições de análise estão descritas na Tabela 3.9:

**Tabela 3.9.** Condições do espectrômetro de massas (*ESI* (+))

Temperatura da fonte (°C)	100
Temperatura do probe (°C)	300
Capilar (kV)	3.32
Cone (V)	22
Extrator (V)	3
Lentes RF (V)	0.62

### 3.2.10 Condições de análise de extratos via HPLC/UV

Os perfis metabólicos dos micro-organismos nos diversos meios testados foram analisados e comparados através da técnica HPLC/UV. Outros experimentos reportados nas seções a seguir (estimativa da curva de produção de depsídeos e influência de compostos fenólicos ao metabolismo de FG1) também foram analisados através da técnica. Para tanto, otimizou-se alguns métodos cromatográficos para a obtenção de melhores condições de análise. Os métodos que ofereceram melhor resolução cromatográfica e que foram utilizados nas diversas análises estão listados nas tabelas seguir:

#### **Método A**

Fluxo: 0.7mL/min

Fase Móvel: H<sub>2</sub>O e MeOH

Fase Estacionária: Coluna Luna 5u Phenyl Hexyl, Phenomenex 250x4,60mm

$\lambda$ : 190nm à 600nm

**Tabela 3.10.** Condições de eluição método cromatográfico A

Tempo (min)	Porcentagem (MeOH) (%)
0.01	70
20.00	80
45.00	90
50.00	100
60.00	100

**Método B**

Fluxo: 0.7mL/min

Fase Móvel: H<sub>2</sub>O e MeOH

Fase Estacionária: Coluna Luna 5u Phenyl Hexyl, Phenomenex 250x4,60mm

 $\lambda$ : 190nm à 600nm**Tabela 3.11.** Condições de eluição método cromatográfico B

Tempo (min)	Porcentagem (MeOH) (%)
0.01	5
10.00	30
15.00	60
30.00	100
40.00	100

**Método C**

Fluxo: 0.7mL/min

Eluentes: H<sub>2</sub>O e Acetonitrila $\lambda$ : 190nm à 600nm**Tabela 3.12.** Condições de eluição do método cromatográfico C

Tempo (min)	Porcentagem (ACN) (%)
0.01	40
5.00	55
35.00	55
40.00	100
50.00	100
52.00	35
65.00	35
65.01	35

**3.2.11 Condições de análise de extratos e frações via HPLC-MS/MS**

Para a análise de extratos via HPLC-MS e HPLC-MS/MS foram necessárias otimizações de métodos cromatográficos visando a obtenção de melhores resultados. Os métodos utilizados durante os diversos estudos realizados encontram-se listados abaixo:



**Método D**

Fluxo: 0.7mL/min

Fase Móvel: H<sub>2</sub>O e MeOHFase Estacionária: Coluna Synergi 4 $\mu$  Fusion \_RP 80A, Phenomenex 250 X 4.60 mm $\lambda$ : 190nm à 600nm**Tabela 3.13.** Condições de eluição do método cromatográfico D

Tempo (min)	Porcentagem (MeOH) (%)
0.01	70
15.00	70
25.00	80
40.00	90
45.00	100
50.00	100

**Método E**

Fluxo: 0.7mL/min

Fase Móvel: H<sub>2</sub>O e MeOHFase Estacionária: Coluna Synergi 4 $\mu$  Fusion \_RP 80A, Phenomenex 250 X 4.60 mm $\lambda$ : 190nm à 600nm**Tabela 3.14.** Condições de eluição do método cromatográfico E

Tempo (min)	Porcentagem (MeOH) (%)
0.01	70
12.00	75
13.00	80
15.00	85
20.00	85
21.00	100
26.00	100

**Método F**

Fluxo: 0.7mL/min

Fase Móvel: H<sub>2</sub>O e MeOHFase Estacionária: Coluna Synergi 4 $\mu$  Fusion \_RP 80A, Phenomenex 250 X 4.60 mm $\lambda$ : 190nm à 600nm**Tabela 3.15.** Condições de eluição do método cromatográfico F

Tempo (min)	Porcentagem (MeOH) (%)
0.01	95
10.00	100
15.00	100

Em todos os casos foi utilizado um divisor de fluxo para a introdução de 0,3mL/min de amostra no espectrômetro de massas.

As melhores condições dos parâmetros de funcionamento do espectrômetro de massas foram distintas com relação a cada amostra estudada. As condições de análise utilizadas encontram-se relatadas nos itens a seguir, de acordo com cada estudo proposto.

### **3.2.12 Análise de depsídeos via HPLC-MS/MS nos extratos do cultivo de FG1 em arroz**

Para a otimização das condições de análise, foi utilizada a fração F4-16, rica nas substâncias de interesse, assim como do extrato bruto de arroz. Após a determinação das melhores condições dos respectivos parâmetros, os extratos do cultivo fúngico foram analisados a fim da detecção de depsídeos anteriormente isolados, assim como demais depsídeos possivelmente produzidos pelo micro-organismo. O volume de injeção nestas análises foi de 20 µL e o método D (item 3.2.11) foi o método cromatográfico utilizado. Assim, as condições de análise utilizadas encontram-se tabeladas abaixo:

**Tabela 3.16.** Condições do espectrômetro de massas (*ESI* (-))

Temperatura da fonte (°C)	100
Temperatura do probe (°C)	120
Capilar (kV)	3.18
Cone (V)	32
Extrator (V)	3
Lentes RF (V)	0.74

### **3.2.13 Detecção de depsídeos em extratos da fruta goiaba (*Psidium guajava*) via HPLC-MS/MS**

Com o objetivo de detectar a ocorrência de depsídeos na própria polpa da fruta de onde foi isolado o fungo FG1, inicialmente estudou-se a fragmentações características por *ESI* modo negativo de ionização e decomposição induzida por colisão (CID) de dois dos depsídeos isolados do extrato fúngico de arroz, os depsídeos codificados em **D3** e **D4**. A partir desses dados, pôde-se estabelecer os melhores experimentos para a detecção seletiva desses metabólitos na polpa da fruta. Com a observação dos fragmentos nos espectros de íons produtos referente a cada depsídeo, foi possível determinar os canais de SRM tanto para **D3** como para **D4**.

Foi realizado também um estudo para verificação dos limites de detecção do equipamento para os metabolitos de interesse. Para tanto, as análises foram realizadas injetando-se diferentes concentrações dos depsídeos puros no espectrômetro de massas. Foram injetadas soluções de concentração 1 g/mL, 0,1 µg/mL, 1 g/mL e 0,1 g/mL de **D3** e **D4**. As soluções foram preparadas por diluição a partir de uma solução mãe de 3 µg/mL. O volume de injeção durante as análises foi de 30µL.

As condições utilizadas para os parâmetros de análise foram os mesmos descritos no item 3.2.12. Para os experimentos de SRM foram selecionadas duas transições para cada analito: para o depsídeo **D3** foram selecionadas as transições 465→301 e 465→163; para o depsídeo **D4** foram selecionadas as transições 479→315 e 465→163. A energia de colisão também foi otimizada em 10 eV durante os experimentos de íons produtos. O método E (item 3.2.11) foi o método cromatográfico aplicado. As condições utilizadas nessas análises estão tabeladas a seguir:

**Tabela 3.17.** Condições do espectrômetro de massas para experimento de SRM para o monitoramento dos depsídeos D3 e D4, (ESI (-))

Íon precursor ( <i>m/z</i> )	Íon Produto ( <i>m/z</i> )	Inter channel-delay (s)	Dwell (s)	Energia de colisão (eV)
465	301	0,00	0,3	10
465	163	0,00	0,3	10
479	315	0,00	0,3	10
479	301	0,00	0,3	10

Assim, com o estabelecimento das melhores condições de análise para a detecção seletiva dos depsídeos monitorados, realizou-se as análises para a detecção dos mesmos em extratos da fruta da goiaba.

Os extratos foram preparados com as frutas *in natura*, adquiridas no comércio da cidade de São Carlos, próprias para consumo. Foram cortados em pequenos pedaços 300g da fruta inteira (casca, polpa e sementes) e transferidos a um Erlenmeyer de 3L. Foram inseridos junto à fruta 500mL de EtOH. Após 24 horas de extração dos metabólitos, filtrou-se o conteúdo do frasco, e em seguida, o filtrado foi rotaevaporado, obtendo-se assim o extrato etanólico da goiaba. O extratos foram solubilizado novamente em MeOH grau HPLC e injetados na concentração de 200µg/mL no equipamento, realizando-se os devidos experimentos, anteriormente relatados, para a detecção dos depsídeos monitorados.

### 3.2.14 Detecção de cerebrosidas nas frações F7-O38 e F7-O48 via HPLC-MS/MS

Com o intuito de detectar outras substâncias co-produzidas pelo fungo FG1, experimentos foram realizados visando a detecção de cerebrosidas em algumas frações oriundas do cultivo em arroz do micro-organismo, analisando-se relações de  $m/z$  e fragmentações características para tal classe de substância. Para tanto, as condições dos parâmetros de funcionamento foram otimizadas e encontram-se descritas na Tabela 3.18. O método F (item 3.2.11) foi o método cromatográfico utilizado e o volume de injeção foi de 30  $\mu$ L. Para os experimentos de íons produtos a energia de colisão foi otimizada em 15 eV.

**Tabela 3.18.** Condições do espectrômetro de massas (*ESI* (-))

Temperatura da fonte (°C)	100
Temperatura do probe (°C)	200
Capilar (kV)	3.50
Cone (V)	35
Extrator (V)	8
Lentes RF (V)	0.50

### 3.2.15 Estimativa da curva de produção dos depsídeos D3 e D4 em meio de arroz pelo fungo FG1 via análise em HPLC/UV

Baseando-se nas análises via HPLC/UV e HPLC-MS/MS dos extratos de FG1 em diferentes meios de cultivo, pôde-se constatar que o fungo apresenta-se como um grande produtor de metabólitos da classe dos depsídeos. Sendo assim, realizou-se o experimento visando a estimativa da curva de produção dos depsídeos **D3** e **D4**, com o intuito de verificar-se a evolução do metabolismo

fúngico com relação a tais compostos, determinando-se assim o período de máxima produção das substâncias monitoradas.

O experimento foi realizado em triplicatas sendo que o meio de cultivo foi preparado de acordo com o detalhamento no item 3.2.4.4. A extração foi realizada adicionando-se 200mL de EtOH em cada frasco Erlenmeyer, e após 24 horas de extração, sem trituração do meio, filtrou-se o conteúdo do frasco. Uma alíquota de 5 mL do filtrado foram transferidos a frascos de vidro e secos em capela. O conteúdo foi novamente solubilizado em MeOH grau HPLC e injetado em equipamento HPLC/UV. O método cromatográfico A (item 3.2.10) foi o método utilizado, o comprimento de onda monitorado de 275nm e volume de injeção de 20µL. A estimativa da curva de produção foi realizada de acordo com as integrações das bandas cromatográficas de cada depsídeo monitorado, em cada ponto da curva, utilizando-se as ferramentas do software Class Vp do próprio equipamento. Os pontos da curva referem-se aos pontos de integração das banda cromatográficas de cada depsídeo versus os pontos de tempo de cultivo de cada extração, listados na tabela abaixo:

**Tabela 3.19.** Tempos referentes aos pontos de extração do cultivo fúngico em arroz

<b>Ponto</b>	<b>Tempo de cultivo (dias)</b>
0	0
1	5
2	10
3	15
4	20
5	25
6	30
7	35
8	40
9	45

### **3.2.16 Estudo da influência de compostos fenólicos no metabolismo secundário de FG1**

Mediante a verificação da produção preferencial de depsídeos C-metilados com relação aos anéis aromáticos constituintes, investigou-se qual seria o comportamento metabólico do micro-organismo frente à adição de compostos fenólicos ao meio de cultura. Ou seja, pretendeu-se verificar possível capacidade do fungo em biotransformar os substratos administrados a ele (inserção de grupo metila, eliminação de hidroxilas, etc), em produzir compostos diferenciados quando comparado ao cultivo fúngico em meio controle e por fim, verificar a influência dos compostos fenólicos na produção dos metabólitos já conhecidos produzidos por FG1, os depsídeos.

Para a realização deste experimento, foi utilizado o meio de cultura líquido batata-dextrose. Para cada substrato fenólico administrado ao meio de cultura, foram utilizados 3 frascos Erlenmeyers contendo o inóculo do fungo e 3 frascos Erlenmeyers brancos (somente meio de cultura e substrato). Também foram cultivados 3 frascos Erlenmeyers controles, ou seja, somente meio e inóculo, sem a adição de substrato fenólico. Todos os frascos foram submetidos à agitação durante 15 dias, em mesa agitadora a 120 rpm. Os substratos utilizados foram:

Ácido para-aminobenzóico (PABA);

Ácido ferúlico;

Ácido salicílico;

2,4,6-trihidroxiacetofenona;

Ácido gálico

O procedimento de extração e obtenção de extratos é o mesmo descrito no item 3.2.5.1 para meios líquidos. As análises foram realizadas por HPLC/UV, aplicando-se os métodos cromatográficos A e B (item 3.2.10). Todos os extratos foram injetados na concentração de 3mg/mL.

### 3.3 Ensaio Biológicos

#### 3.3.1 Ensaio Antimicrobiano para determinação da concentração mínima inibitória (MIC) dos depsídeos D1, D3 e D4

Inicialmente foi realizado um ensaio preliminar verificando a ação antimicrobiana dos depsídeos **D3** e **D4** na concentração de 50µg/mL de meio de cultura frente a cinco espécies bacterianas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (gram negativas), *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus Aureus* e *Micrococcus luteus* (gram positivas).

Após a verificação da atividade destes compostos na referida concentração, realizou-se o ensaio para a determinação da MIC para os depsídeos anteriormente testados assim como para o depsídeo **D1** utilizando-se o método de diluição em caldo (microdiluição). Os procedimentos realizados serão detalhados a seguir.

##### 3.3.1.2 Ativação das bactérias

As bactérias conservadas à baixas temperaturas (geladeira) foram ativadas em placa de Petri contendo ágar Mueller Hinton, sendo incubadas por um período de 24 horas, a 33°C. Após esse intervalo, transferiu-se cerca de uma colônia de bactéria para um tubo contendo 3mL de caldo Mueller Hinton, com o auxílio de uma alça de platina estéril. Após a homogeneização do conteúdo do tubo, este foi incubado por cerca de 24 horas, a 33°C, até o momento da realização do teste.



### **3.3.1.3 Padronização das culturas bacterianas**

As bactérias utilizadas para o ensaio foram padronizadas a uma concentração de  $1 \times 10^8$  cel/mL, mediante comparação com padrão da escala de McFarland de turbidez. Para a obtenção do padrão, misturou-se 9,95 mL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1% e 0,05 mL de solução de BaCl<sub>2</sub> 1% . Quando necessário, diluições foram realizadas em meio Mueller Hinton a fim de se obter as concentrações de células desejadas.

### **3.3.1.4 Preparo das amostras**

Uma solução mãe em DMSO, de 3mg/mL foi inicialmente preparada para cada substância testada. Trabalhou-se com diluições sucessivas para a obtenção das concentrações de interesse para a realização do teste.

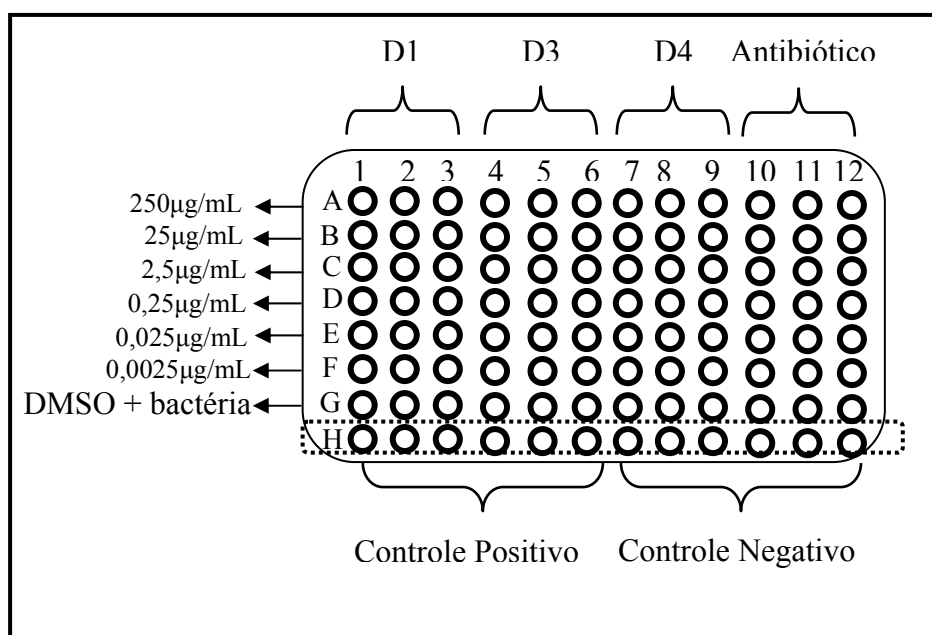
### **3.3.1.5 Teste antibacteriano**

Os ensaios antibacterianos foram realizados aplicando-se os testes de susceptibilidade para determinação da concentração mínima inibitória, segundo as normas descritas pelo NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS), 2005, tradução ANVISA Norma M100-S15.

Os testes foram realizados em placas de ELISA, contendo 96 poços, através de diluições sucessivas em triplicata das substâncias puras e dos antibióticos de referência em caldo Mueller Hinton. As substâncias foram transferidas para as placas de ELISA em 2 mL de DMSO no primeiro poço, acrescentando-se posteriormente 93 mL de caldo e 5mL da solução bacteriana padronizada, de tal forma que a concentração inicial da substância testada foi de 250µg/mL. Posteriormente realizou-se diluições sucessivas de um poço para

outro a fim de obter as concentrações indicadas no Esquema 3.3. Foram utilizadas soluções de antibiótico comerciais de mesma concentração inicial, sendo a vancomicina aplicada nos testes para *Pseudomonas aeruginosa* e tetraciclina para as demais bactérias. Um controle positivo contendo apenas caldo com células bacterianas e um controle negativo, contendo apenas caldo de cultivo foram aplicados em todos os testes. Como controle em relação à atividade do solvente DMSO, foi utilizada uma linha de poços (linha G), contendo apenas DMSO (4%) e caldo com células bacterianas.

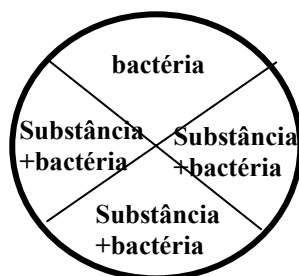
**Esquema 3.3.** Placa de ELISA com as diferentes concentrações testadas para as substâncias **D1**, **D3**, **D4**



### 3.3.1.6 Verificação do tipo de atividade dos metabólitos testados

Após verificar a concentração mínima inibitória da substância testada, é necessário saber o tipo de atividade apresentada em cada concentração (bactericida ou bacteriostático). Nas cavidades onde a coloração se apresentou azul devido à ação do corante, indicando mortalidade ou diminuição de crescimento das bactérias, houve a reinoculação das células bacterianas em placas de Petri contendo o meio Mueller Hinton e incubadas por 24 horas a 35°C. Nos locais onde houve baixo crescimento da bactéria, o efeito é denominado bacteriostático, enquanto onde não houve crescimento observado, o efeito é conhecido como bactericida. O tipo de atividade foi verificado em triplicatas, juntamente a um controle positivo (Esquema 3.4).

**Esquema 3.4.** Placa de Petri utilizada na verificação do tipo de atividade antimicrobiana



### 3.3.2 Ensaio de inibição da fotossíntese

O ensaio de inibição da fotossíntese foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, com o objetivo de verificar a atividade dos compostos **D1**, **D3** e **D4**. Os procedimentos utilizados são os relatados por VEIGA, 2007.

## ***4.RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Isolamento de micro-organismos endofíticos de goiaba, pêra, maçã e banana**

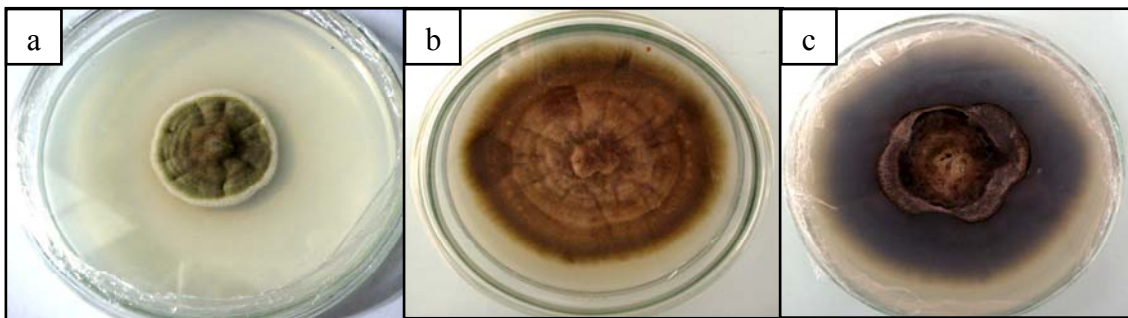
Os procedimentos para o isolamento de micro-organismos foram repetidos em diferentes dias, por mais uma vez com cada espécie de fruta. Para cada tipo de fruta utilizada, inocularam-se os fragmentos, cortados cuidadosamente em partes diferenciadas da polpa, em diversas placas de Petri. Foram necessários cortes que englobassem o máximo de pontos da polpa da fruta.

Além deste fato, trabalhou-se com a possibilidade da existência de espécies diferentes de micro-organismos endofíticos no mesmo tipo de fruta. Sendo assim, além das placas de onde se obteve o isolamento dos endófitos de trabalho, houve muitas delas que não apresentaram crescimento microbiano nenhum. Em contrapartida, em alguns casos, foi necessário o descarte das placas, pois houve o crescimento intenso e diversificado de várias espécies de micro-organismos, impossibilitando o isolamento.

#### **4.1.1 Isolamento de micro-organismos endofíticos em goiaba (*Psidium guajava*)**

Após o procedimento de isolamento, verificou-se a partir dos fragmentos da fruta, em um intervalo de três dias, o crescimento aparente de duas espécies fúngicas. Posteriormente aos repiques sucessivos, obteve-se o isolamento e

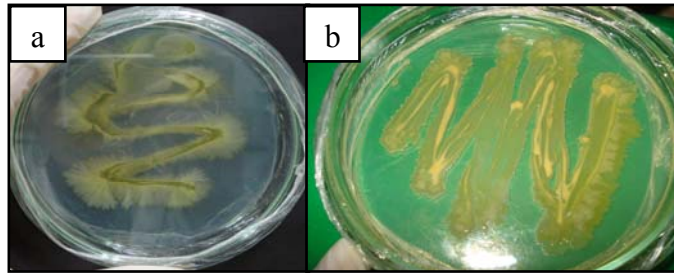
purificação dos dois fungos (Figura 4.1). Segundo os resultados enviados pela pesquisadora especialista Dra. Antonia Q. L. Souza da Universidade Federal do Amazonas, um dos micro-organismos isolado, de código FG1, foi identificado com 96% de identidade e 100% de confiabilidade como *Cladosporium uredinicola*, segundo comparações nos bancos de dados genéticos. Dentre as duas espécies microbianas isoladas, este fungo foi o escolhido para o desenvolvimento do trabalho.



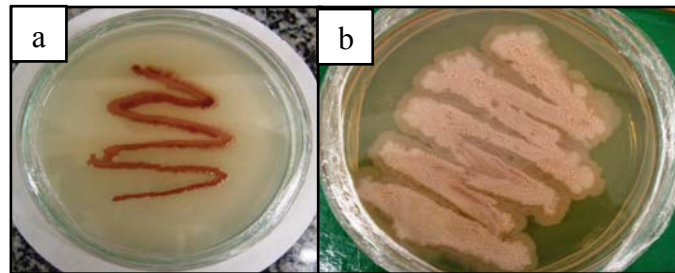
**Figura 4.1.** Fungo isolado de goiaba FG1: *Cladosporium uredinicola*, a) fase inicial de desenvolvimento; b) fase avançada / frente; c) fase avançada / verso

#### **4.1.2 Isolamento de micro-organismos endofíticos em banana (*Musa paradisíaca*) e em pêra (*Pyrus communis*)**

Em um intervalo de quatro dias após o procedimento de isolamento, foi detectado o crescimento bacteriano nos fragmentos da polpa de banana. Já para a polpa da pêra, a detecção visual ocorreu após seis dias ao procedimento. Uma espécie de bactéria foi isolada a partir de cada fruto (Figura 4.2 e 4.3). O repique destas em meios mais ricos em fonte de nutrientes (Mueller Hinton e BHI) promoveu um crescimento bacteriano mais acentuado e diferenciado em relação ao meio BDA.



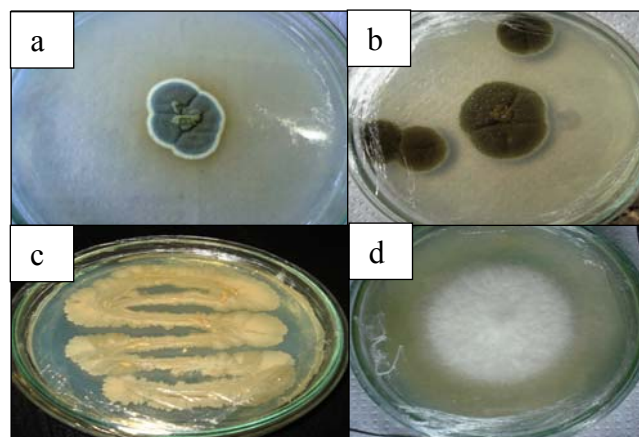
**Figura 4.2.** a) Bactéria BB1 isolada de banana, crescimento em meio BDA; b) crescimento em meio Mueller Hinton



**Figura 4.3.** a) Bactéria BP1 isolada de pêra, crescimento em meio BDA; b) crescimento em meio BHI

#### 4.1.3 Isolamento de micro-organismos endofíticos em maçã (*Malus domestica*)

A maçã foi a fruta que apresentou o maior número de micro-organismos que se desenvolveram em todas as tentativas de isolamento. O crescimento foi detectável sempre a partir do segundo dia de incubação da polpa, tendo-se isolado e purificado três fungos e uma bactéria (Figura 4.4), através de sucessivos repiques. No trabalho realizado em colaboração com aluna de iniciação científica do grupo, foram escolhidos os fungos de código FM1 e FM4.



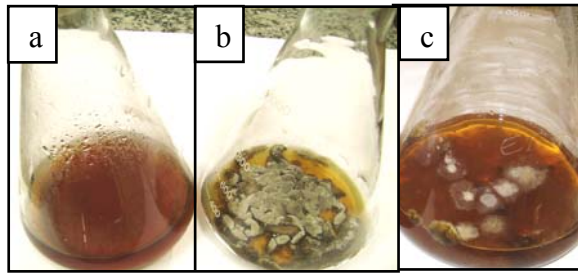
**Figura 4.4.** Micro-organismos isolados de maçã; a) FM1; b) FM4; c) BM1; d) FM2

## **4.2. Obtenção dos extratos**

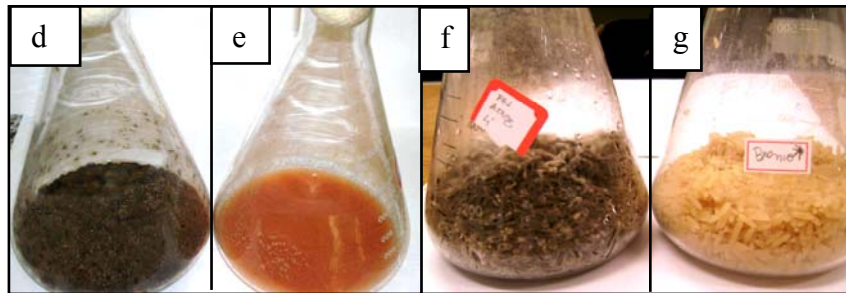
Assim como os demais seres vivos, fungos e bactérias necessitam de nutrientes para a manutenção de seu metabolismo e crescimento. Muitos deles necessitam de nutrientes específicos como vitaminas (PELCZAR, 1997), fontes diferenciadas e específicas de carbono e aminoácidos, como por exemplo a dextrose e as proteínas da soja. Por isso, buscou-se trabalhar com extratos diferenciados, buscando um meio ideal de crescimento aos micro-organismos isolados assim como a verificação dos metabólitos produzidos nestes meios. Um dos grandes diferenciais deste trabalho, está ligado ao estudo de um dos tipos de meio de cultura empregados, o meio com a própria polpa da fruta do qual o respectivo endófito foi isolado. O intuito desta escolha foi a máxima reprodução do meio ambiente e dos nutrientes aos quais o micro-organismo estava exposto anteriormente ao seu isolamento.

Durante o período de incubação dos endofíticos em estudo, foi possível verificar o crescimento diferencial dos micro-organismos nos diversos meios. No caso do fungo FG1, por exemplo, verificou-se a necessidade de uma grande superfície de contato com o ar quando cultivado em meio líquido Czapeck's para um bom desenvolvimento micelial, o que é notável na comparação das Figuras 4.5 b e c. Em arroz e meio contendo goiaba, o crescimento fúngico foi bom e intenso. Para as bactérias de pêra e banana, notou-se aparente multiplicação celular devido ao turvamento do meio de cultura em comparação com o meio branco nos dois casos. Já para os micro-organismos da maçã FM1 e FM4, houve um bom crescimento em meio sólido de arroz. Em meio líquido Czapeck's, o fungo FM1 apresentou um ótimo desenvolvimento, e o fungo FM4 um crescimento mediano. Já no caso do uso da polpa da maçã (Figura 4.9), diferentemente do fungo FG1 quando cultivado em meio goiaba, os endófitos FM1 e FM4 apresentaram desenvolvimento baixo, com esporulação fraca na superfície de contato com o ar para FM1 e micélio espaçado, com pouca massa fúngica para FM4.





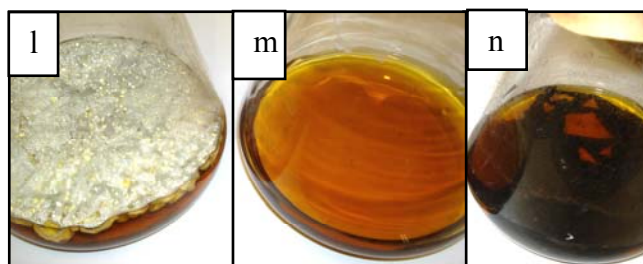
**Figura 4.5.** a) Meio líquido Czapeck's controle; b) Cultivo do fungo FG1 em Czapeck's estático 80 mL de meio de cultivo; c) Czapeck's estático 250 mL de meio de cultivo



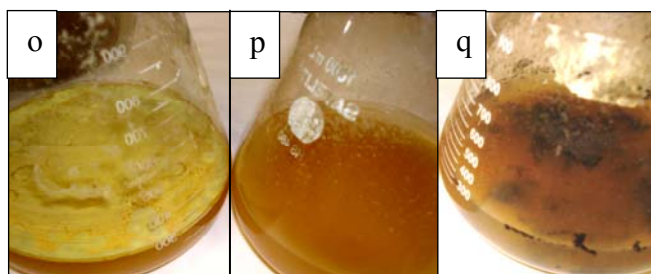
**Figura 4.6.** d) Cultivo do fungo FG1 em meio goiaba estático; e) Meio goiaba controle; f) Cultivo do fungo FG1 em meio arroz; g) Meio arroz controle



**Figura 4.7.** h) Cultivo do fungo FM1 em arroz; i) Meio arroz controle; j) Cultivo do fungo FM4 em arroz



**Figura 4.8.** i) Cultivo do fungo FM1 em meio Czapeck's estático ; i) Meio Czapeck's controle; j) Cultivo do fungo FM4 meio Czapeck's estático



**Figura 4.9.** o) Cultivo do fungo FM1 em meio maçã estático ; p) Meio maçã controle; q) Cultivo do fungo FM4 meio maçã estático

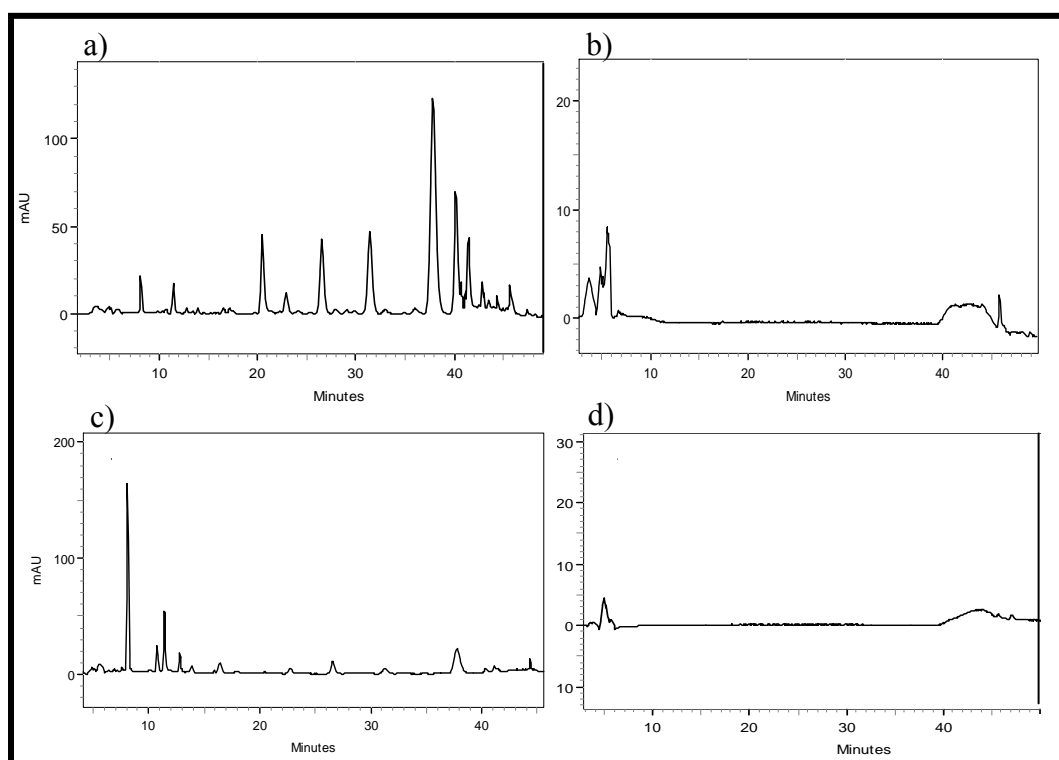
### **4.3 Estudo dos micro-organismos isolados de maçã (*Malus domestica*)**

#### **4.3.1 Monitoramento de extratos obtidos a partir dos diferentes cultivos dos fungos FM1 e FM4 por HPLC/UV modo analítico**

Como o estudo da microbiota endofítica de frutos comestíveis ainda é praticamente inexpolarado, torna-se relevante o conhecimento do metabolismo destes micro-organismos. A técnica de HPLC/UV apresenta-se de grande utilidade para tal finalidade, já que se pode associar o perfil metabólico microbiano ao perfil cromatográfico nos diferentes meios de cultura utilizados. Com tais análises, é possível estimar a potencialidade de cada espécie estudada em produzir metabólitos secundários de acordo com cada meio de cultivo testado.

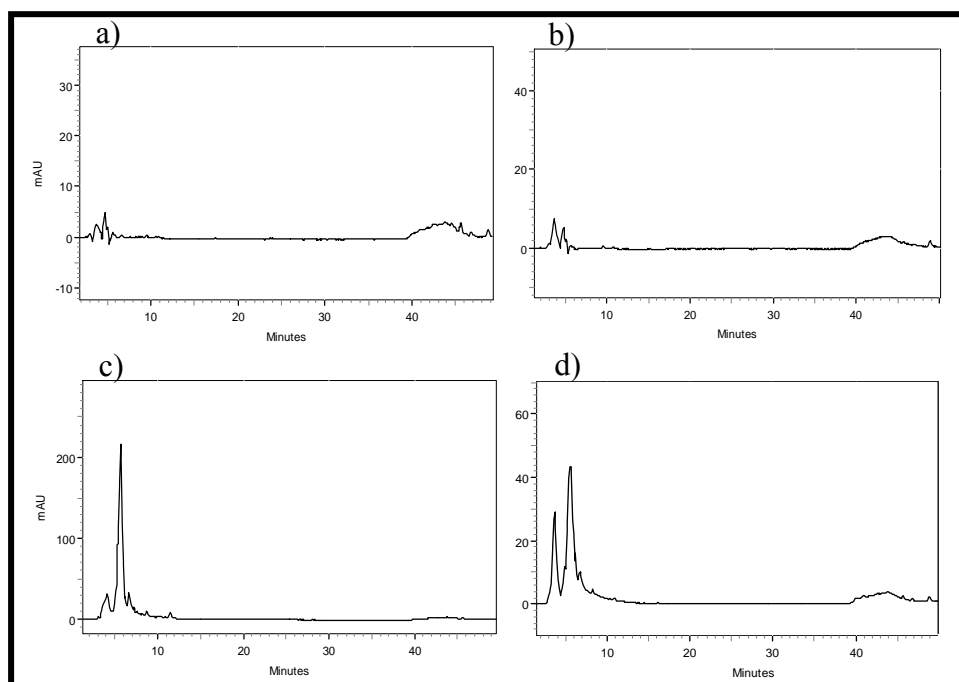
Os resultados mencionados neste trabalho a respeito dos micro-organismos isolados de maçã, são dados adicionais à investigação da microbiota endofítica de frutos. Estes resultados fazem parte do trabalho realizado em colaboração com aluno de iniciação científica do grupo LaBioMMi.

Para o fungo FM1, os cromatogramas referentes ao cultivo do fungo em meio de maçã, apresentam resultados positivos quanto à produção de substâncias. Quando comparados os cromatogramas do cultivo fúngico com o meio controle, principalmente na região de absorção de 286nm para o extrato etanólico micelial FM1-2-M-et, é notável a presença de bandas cromatográficas diferenciais (Figura 4.10 a e b). O extrato da partição líquido-líquido do filtrado FM1-2-P-ac também apresenta um cromatograma com bandas distintas em relação ao meio controle, o que sugere a produção de metabólitos pelo micro-organismo e assim boa adaptação ao meio de cultura utilizado (Figura 4.10 c e d).



**Figura 4.10.** Cromatogramas do cultivo do fungo FM1 em meio de polpa de maçã: a) extrato etanólico do micélio,  $\lambda=286\text{nm}$ ; b) meio controle  $\lambda=286\text{nm}$ ; c) extrato da partição do filtrado,  $\lambda=334\text{nm}$ , d) meio controle  $\lambda=334\text{nm}$ ; método C (item 3.2.10)

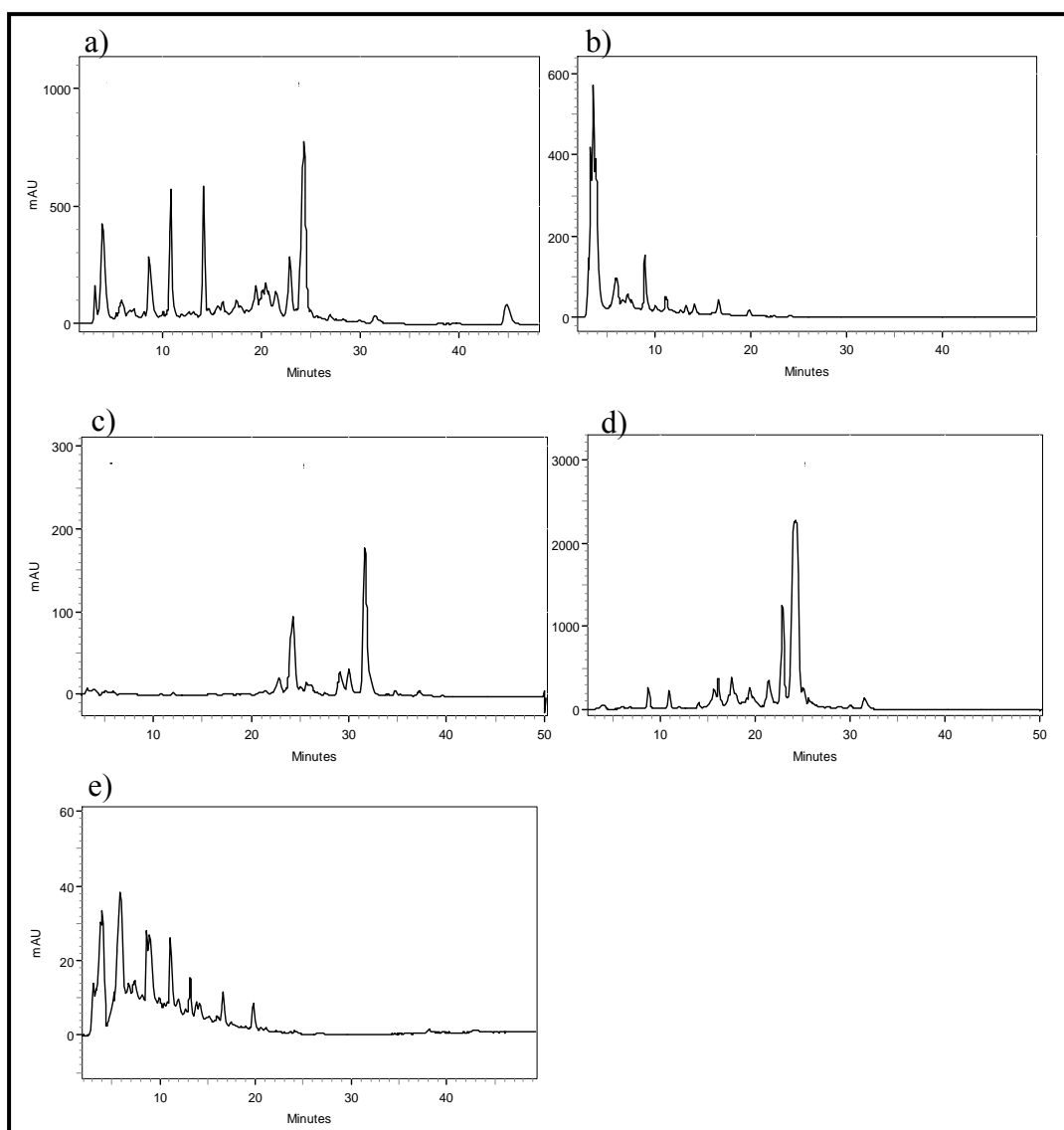
Já para o fungo FM4, os resultados do experimento em meio maçã não foram tão promissores em relação à produção metabólica. Quando se comparam ambos os cromatogramas, do extrato micelial e do extrato do meio particionado FM4-2-M-et e FM4-2-P-ac respectivamente (Figura 4.11), com o meio controle, nota-se a ausência de bandas diferenciais ao controle, sugerindo assim que este meio não é tão propício ao desenvolvimento e à produção de substâncias pelo fungo.



**Figura 4.11.** Cromatogramas do cultivo do fungo FM 4 em meio de polpa de maçã; a) extrato etanólico do micélio,  $\lambda=264\text{nm}$ ; b) meio controle  $\lambda=264\text{nm}$ ; c) extrato da partição do filtrado,  $\lambda=264\text{nm}$ , d) meio controle  $\lambda=264\text{nm}$ ; método C

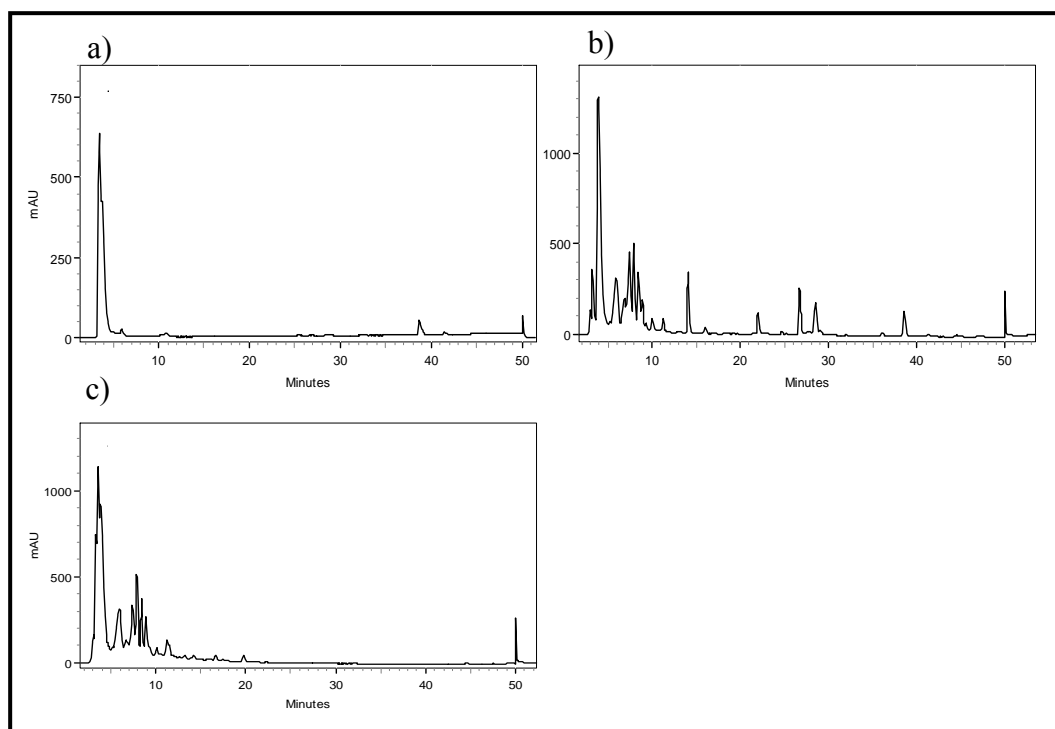
O cultivo do fungo FM1 em meio líquido Czapeck's também se mostrou promissor quanto à produção de metabólitos. Os cromatogramas monitorados em 276 nm e 315 nm dos extratos do micélio e da partição líquido-líquido, (FM1-1-M-et e FM1-1-P-ac respectivamente) evidenciam bandas cromatográficas distintas aos cromatogramas do meio controle, nos mesmos comprimentos de onda, principalmente entre os tempos de retenção entre 20 e 35 minutos (Figura 4.12 a, c, d).

Durante trabalho de iniciação científica realizado no grupo, foi detectada a produção de antraquinonas diméricas, no extrato de FM1 neste meio de cultivo.



**Figura 4.12.** Cromatogramas do cultivo do fungo FM 1 em meio Czapeck's: a) extrato da partição do filtrado,  $\lambda=276$  nm; b) meio controle  $\lambda=276$  nm; c) extrato etanólico do micélio, 315 nm; d) extrato da partição do filtrado,  $\lambda=315$  nm, e) meio controle  $\lambda=315$  nm; método C

Em meio Czapeck's, o fungo FM4 também não apresentou boa produção de metabólitos, porém mostrou um metabolismo mais pronunciado em relação ao meio de polpa de maçã. Analisando-se o cromatograma do extrato advindo da partição do filtrado FM4-1-P-ac (Figura 4.13 b), são observadas bandas cromatográficas inexistentes no controle, sugerindo a eluição de substâncias produzidas pelo endófito. Já no cromatograma do extrato micelial FM1-1-M-et (Figura 4.13 a), a ausência de bandas é predominante, indicando a não produção de metabólitos, pelo menos não em quantidade detectável pela técnica analítica utilizada.



**Figura 4.13.** Cromatogramas do cultivo do fungo FM 4 em meio Czapeck's: a) extrato etanólico do micélio,  $\lambda=211$  nm; b) extrato da partição do filtrado,  $\lambda=211$  nm; c) meio controle  $\lambda=211$  nm; método C

#### 4.4 Estudo dos micro-organismos isolados de banana (*Musa paradisiaca*) e pêra (*Pyrus communis*)

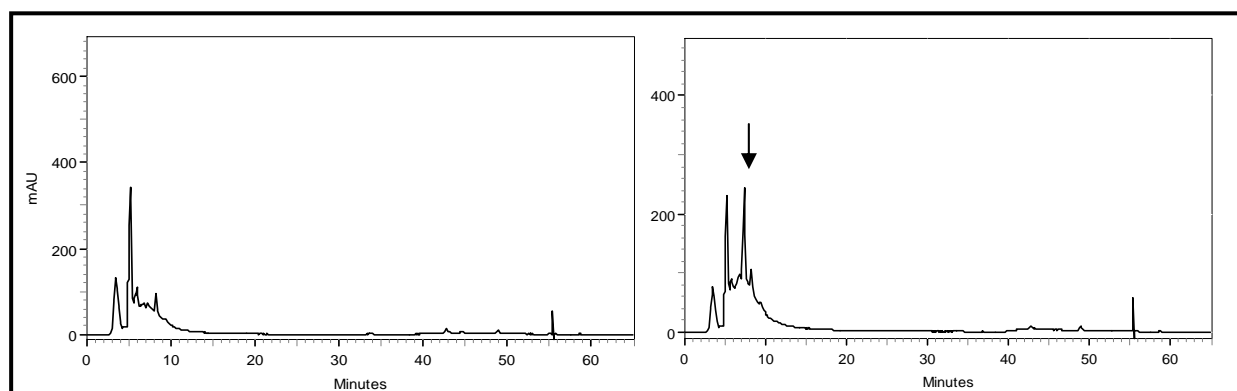
##### 4.4.1 Monitoramento de extratos obtidos do cultivo de BB1 e BP1 nos meios Mueller Hinton e Czapeck's por HPLC/UV modo analítico

Os cromatogramas obtidos durante as análises dos extratos bacterianos dos referidos meios de cultura, não evidenciaram bandas cromatográficas diferenciais em relação aos cromatogramas dos extratos controle nos diversos métodos cromatográficos testados. Com este resultado pode-se afirmar que tais meios de cultura não foram propícios ao bom desenvolvimento do metabolismo secundário dos endófitos. No entanto, não se pode excluir a possibilidade de produção de substâncias pelos micro-organismos nesses meios. Isto porque quantidades diminutas destas substâncias podem ter sido produzidas e assim, a

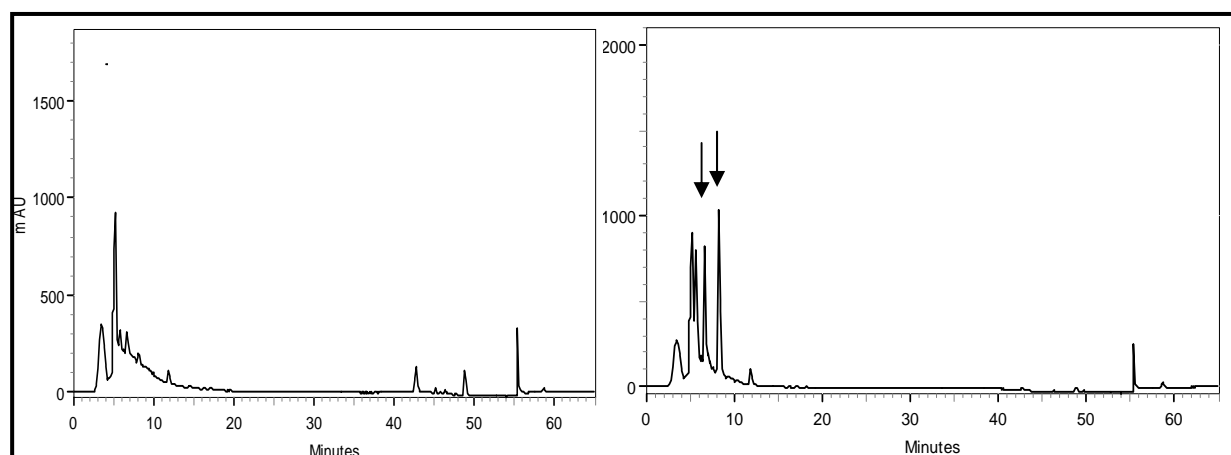
viabilidade da detecção de tais metabólitos está condicionada ao uso de uma técnica mais sensível, como no caso, a espectrometria de massas.

#### 4.4.2 Monitoramento de extratos obtidos do cultivo de BB1 em meio banana e do cultivo de BP1 em meio pêra, por HPLC/UV modo analítico

Dentre os métodos cromatográficos testados, o que gerou a melhor visualização de bandas tratou-se do método C. Mesmo não apresentando boa separação cromatográfica, é possível verificar através dos respectivos cromatogramas (Figuras 4.14 e 4.15), o aparecimento de bandas cromatográficas distintas ao meio controle, para os extratos de ambas as bactérias. As bandas encontram-se indicadas nas figuras a seguir:



**Fig. 4.14.** Cromatogramas do meio controle e do extrato do cultivo de BB1 em meio de polpa de banana, respectivamente; método C,  $\lambda=234\text{nm}$



**Figura 4.15.** Cromatogramas do meio controle e do extrato do cultivo de BP1 em meio de polpa de pêra, respectivamente; método C,  $\lambda=204\text{nm}$

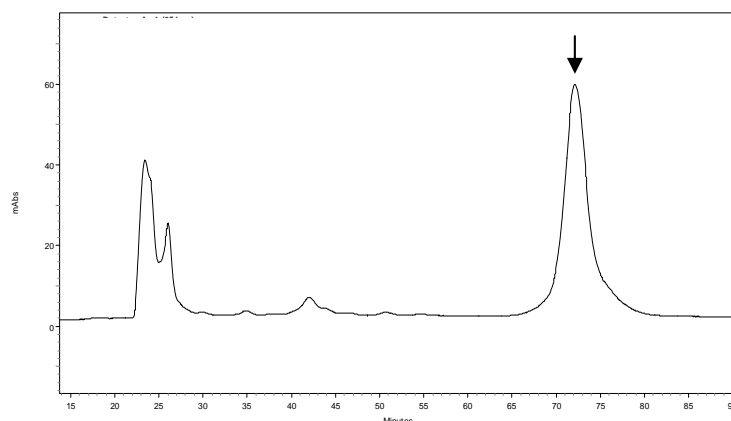
Este resultado indica não só que houve a produção de metabólitos pelas bactérias isoladas nos meios de cultura constituídos pelas próprias frutas hospedeiras, mas também, que estes meios apresentaram-se como os mais efetivos no desenvolvimento metabólico dos micro-organismos frente aos outros meios de cultura, mencionados no item anterior.

## 4.5 Isolamento e identificação de metabólitos secundários produzidos por BP1

### 4.5.1 Isolamento de metabólito secundário do cultivo de BP1 em meio de cultura BHI

De acordo com procedimentos já detalhados, foi possível o isolamento da substância de código P-3 a partir do cultivo da bactéria BP1 em meio de cultura BHI. A purificação total da substância foi realizada em HPLC modo preparativo fazendo-se uso de coluna em fase estacionária tipo reversa (ODS). A separação do metabólito foi obtida com êxito, já que houve a reprodução do resultado em CCD durante a corrida cromatográfica da fração *BP-2-C1-25* injetada no equipamento.

A partir do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração P-3 referente à banda mais retensiva visualizada no cromatograma (Figura 4.16), pôde-se constatar a pureza e a identidade da substância.



**Figura 4.16.** Cromatograma da fração *BP-2-C1-25* em HPLC/UV modo preparativo,  $\lambda=254\text{nm}$ ; destaque para banda referente à substância P-3



#### 4.5.2 Identificação e caracterização da substância P-3

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância isolada (Figura 4.17) mostra cinco sinais na região de hidrogênios aromáticos. Os sinais referentes aos hidrogênios H-6 em 7.13 ppm e H-7 em 7.21 ppm, apresentam multiplicidade de duplo duplo (J = 8.2; 7.2; 1.4 Hz) devido ao acoplamento diferenciado com seus hidrogênios vizinhos e ao acoplamento a longa distância tipo “W” (PAVIA 1996) com H-8 em 7.38 ppm e H-5 em 7.60 ppm respectivamente. Estes hidrogênios por sua vez, mostram multiplicidade de duplo duplo pelo acoplamento vicinal de H-5 com H-6 e pelo acoplamento tipo “W” de H-5 com H-7. Já para H-8 há o acoplamento com o núcleo vizinho H-7 e novamente do tipo “W” com H-6. Como o sinal apresenta-se com baixa resolução, apenas uma constante de acoplamento pode ser calculada para cada sinal, J = 8.4 Hz e J = 8.8 Hz respectivamente. O quinto sinal na região de aromáticos, um duplete em 7.04 ppm, refere-se ao hidrogênio do anel indólico H-2, que acopla com o núcleo H-1.

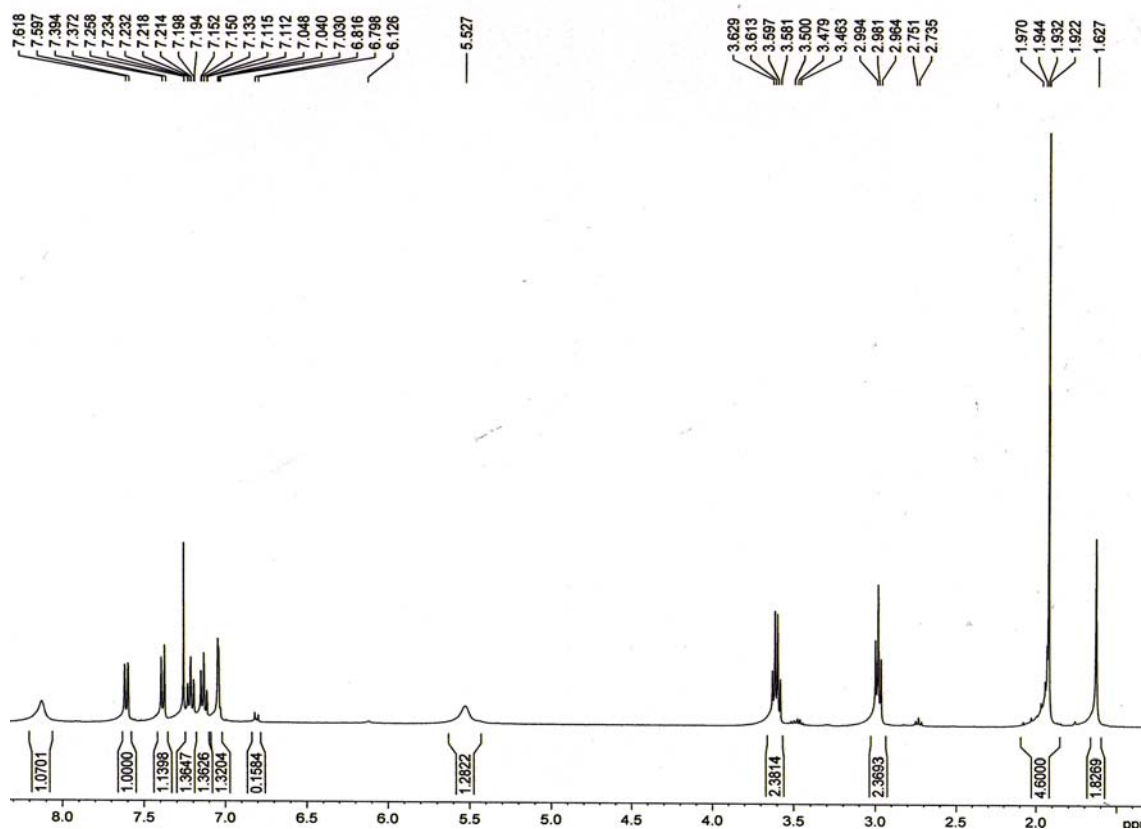
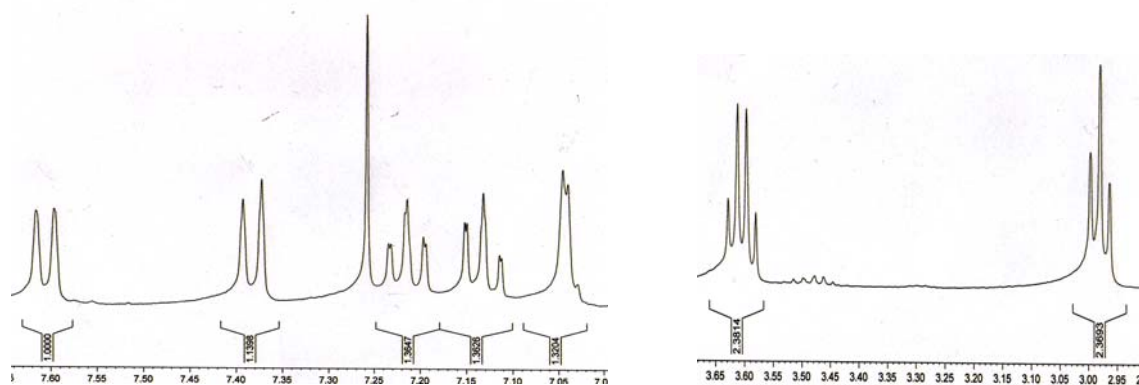


Figura 4.17. Espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz do alcalóide N-acetyltryptamina

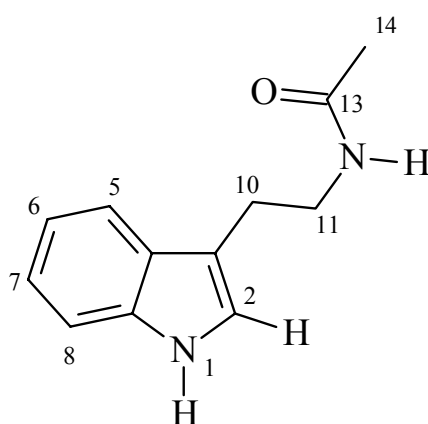
Um tripleto e um quadrupletto são encontrados na região do espectro de maior blindagem dos núcleos, que correspondem aos hidrogênios metilênicos H-10 em 2.98 ppm e H-11 em 3.60 ppm, respectivamente (Figura 4.18). Os núcleos H-11 acoplam com os núcleos de H-10 e H-12, mesmo este último estando ligado ao átomo de nitrogênio, levando à multiplicidade mencionada. Este fato decorre do mesmo fenômeno que leva ao aparecimento dos singletos alargados referentes ao próprio núcleo H-12 e ao núcleo H-1. A troca dos hidrogênios N-H com o deutério ocorre de forma lenta, proporcionando o acoplamento destes com os hidrogênios do carbono  $\alpha$  e assim, gerando os sinais alargados e a possibilidade de acoplamento de H-2 com H-1 e H-11 com H-12, resultando em um dubleto e um quadrupletto respectivamente. Há também o singletto na região de deslocamento característico de metilas, referente aos núcleos H-14. Os dados encontrados na literatura (Tabela 4.1) são praticamente idênticos no que diz respeito às multiplicidades e aos deslocamentos químicos dos núcleos, além de valores muito próximos das constantes de acoplamento, o que leva à constatação da estrutura molecular da N-acetiltriptamina. Este alcalóide é um análogo da melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), um derivado do aminoácido essencial triptofano, que apresenta inúmeras funções fisiológicas nos vertebrados, como atividade hormonal e antioxidante.



**Figura 4.18.** Ampliações de regiões do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz do alcalóide N-acetiltriptamina

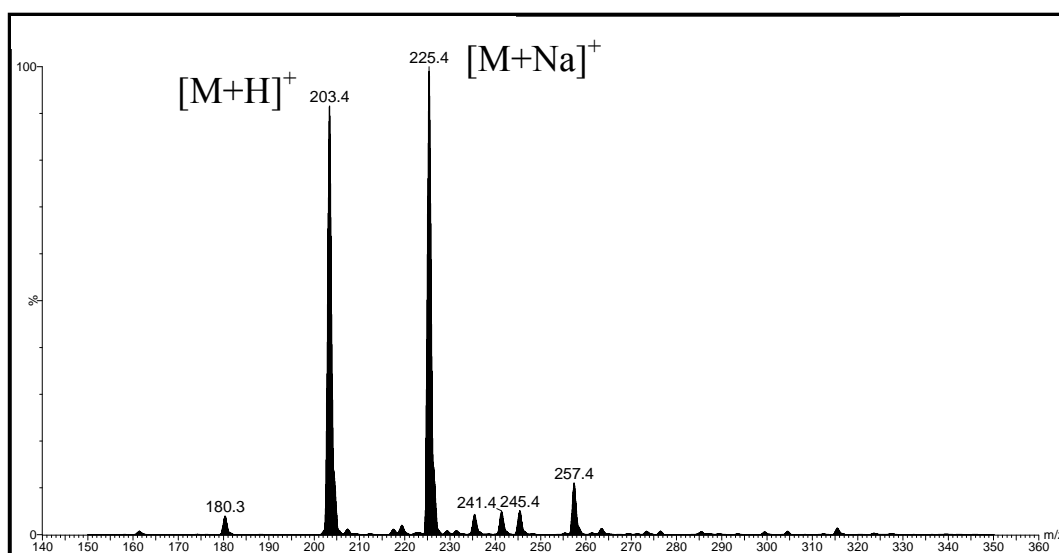
**Tabela 4.1.** Dados obtidos dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  da literatura e da fração pura isolada para a N-acetiltriptamina. 400MHz e  $\text{CDCl}_3$ 

H	$\delta_{\text{H,ppm}}(n_{\text{H}}, m, J_{\text{Hz}})$ (LI, 2003)	$\delta_{\text{H,ppm}}(n_{\text{H}}, m, J_{\text{Hz}})$ (Isolado)
1	8.14 (1, s)	8.12 (1, s)
2	7.04 (1, d, 2.2)	7.04 (1, d, 3.2)
5	7.60 (1, d, 8.0)	7.60 (1, dd, 8.4)
6	7.13 (1, dd, 8.0; 8.0)	7.13 (1, ddd, 8,2; 7.2; 1.4)
7	7.21 (1, dd, 8.0; 8.0)	7.21 (1, ddd, 8.2; 7.2; 1.4)
8	7.38 (1, d, 8.0)	7.38 (1, dd, 8.8)
10	2.98 (2, t, 6.5)	2.98 (2, t, 6.8)
11	3.60 (2, dt, 6.5; 6.0)	3.60 (2, q, 6.4)
14	1.92 (1,s)	1.92 (3,s)

**Figura 4.19.** Estrutura molecular do alcalóide indólico N-acetiltriptamina

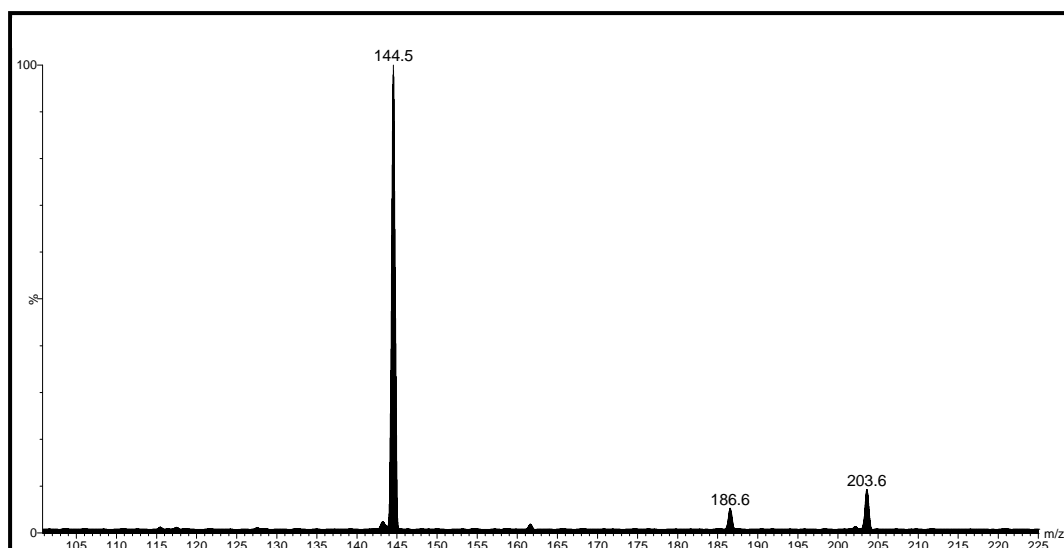
Com os dados obtidos através do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , identificou-se o metabólito isolado de BP1, como N-acetiltriptamina (Figura 4.19). Este alcalóide indólico foi obtido a partir da biotransformação da triptamina pela espécie *Streptomyces staurosporeus* (YANG, 1997), porém sua ocorrência na natureza foi relatada pela primeira vez somente em 2003 (LI, 2003), a partir de espécie fúngica desconhecida associada à algas vermelhas. Posteriormente, relatou-se sua produção pelo fungo marinho *Chromocleista* sp. (PARK, 2006) e pelo fungo *Cladosporium* sp., também associado à algas vermelhas (DING, 2008).

Para confirmação da estrutura proposta foram realizados experimentos de espectrometria de massas no modo *full scan* e íons produtos. No espectro de *full scan*, realizado no modo positivo de ionização, é possível observar o íon molecular protonado  $[M+H]^+$  com  $m/z$  203, assim como do íon  $[M+Na]^+$ , confirmando a massa molecular da estrutura proposta ( Figura 4.20).

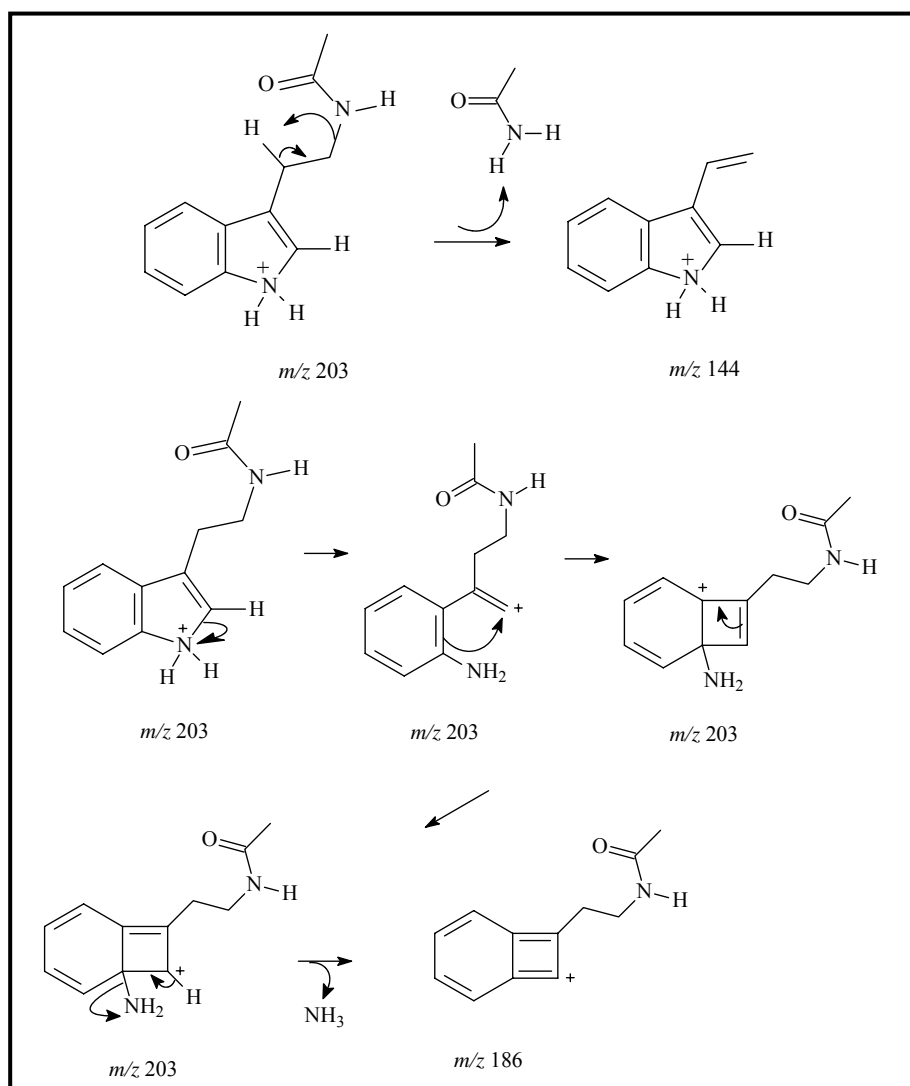


**Figura 4.20.** Espectro de *Full Scan*, ESI modo positivo; fração P-3, N-acetyltryptamina

O espectro de íons produto da substância (Figura 4.21), obtido com energia de colisão de 10 eV gerou poucos fragmentos, destacando-se o íon de  $m/z$  144, o qual é referente à perda neutra da unidade de acetamida conforme mostra o esquema de fragmentação proposto para a N-acetyltryptamina.



**Figura 4.21.** Espectro de íons produtos com energia de colisão de 10 eV, ESI modo positivo; fração P-3, N-acetiltryptamina



**Figura 4.22.** Proposta de fragmentação para o alcalóide isolado no modo positivo de ionização

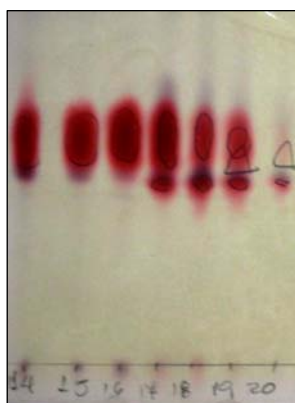
## **4.6 Isolamento e identificação de metabólitos secundários produzidos por *Cladosporium uredinicola* (FG1)**

O relato da existência do fungo do gênero *Cladosporium* em goiaba já foram reportados na literatura, porém, sendo considerado um patógeno ao fruto (TORREZAN, 2000). A condição de existência endofítica no fruto junto ao estudo químico do metabolismo secundário da espécie, ainda não são reportados na literatura, o que caracteriza o pioneirismo deste trabalho.

A busca e identificação de metabólitos em potencial foram inicializadas a partir de uma triagem entre os extratos obtidos do cultivo do fungo em diferentes meios. Como o objetivo do projeto não parte para busca e monitoramento de substâncias já pré-estabelecidas, mas sim da descoberta dos metabólitos (inéditos ou não) que são produzidos e também, devido ao grande número de extratos, a triagem inicial foi realizada utilizando-se CCD.

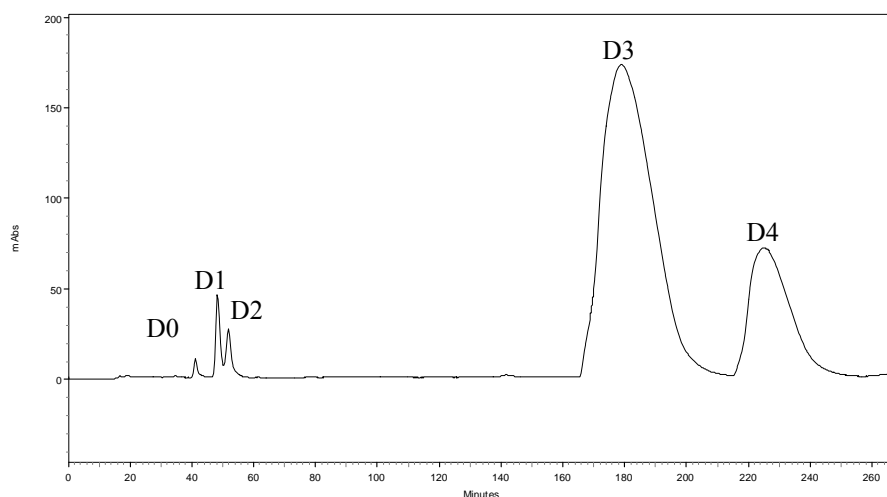
### **4.6.1 Isolamento de metabólitos secundários do cultivo de *Cladosporium uredinicola* (FG1) em meio sólido de arroz**

Após procedimentos já descritos anteriormente com relação ao extrato do cultivo fúngico em arroz, foi possível a obtenção de frações quase puras, que chamavam muita atenção quando reveladas tanto em luz UV (pela forte absorção), como em vanilina, devido ao aparecimento de manchas muito intensas, róseo avermelhadas (Figura 4.23).



**Figura 4.23.** CCD das frações F4-14 à F4-20

Inicialmente, pela análise do resultado em CCD, supôs-se que as frações eram compostas de duas a três substâncias. No entanto, ao submeter a fração F4-16 à separação em HPLC preparativo, obteve-se um cromatograma composto por cinco bandas principais (Figura 4.24). O comprimento de onda monitorado foi de 254nm levando-se em consideração os resultados em CCD.



**Figura 4.24.** Cromatograma obtido da fração F4-16 em HPLC/UV preparativo

Cada banda recolhida foi submetida à análise por RMN  $^1\text{H}$ , verificando-se o isolamento de cinco diferentes substâncias codificadas em **D0**, **D1**, **D2**, **D3** e **D4** como está indicado na figura acima.

#### 4.6.2 Identificação e caracterização dos metabólitos secundários produzidos por *Cladosporium uredinicola* (FG1)

Os espectros obtidos de RMN  $^1\text{H}$  referentes às substâncias isoladas de *Cladosporium uredinicola*, apresentaram sinais nas mesmas regiões, apontando, no geral, deslocamentos químicos e multiplicidades muito semelhantes, o que sugeriu pertencerem à mesma classe de substâncias. Através da determinação estrutural destas substâncias e da comparação com dados da literatura, pôde-se constatar que se tratavam de um grupo de policetídeos derivados do ácido orselínico, os depsídeos.

Os metabólitos isolados de *Cladosporium uredinicola* apresentam muita semelhança estrutural à vários depsídeos, diferindo-se da maioria destes pela ausência de unidades metoxílicas e ácidas nos substituintes dos anéis aromáticos. Das cinco substâncias identificadas neste trabalho, apenas uma foi encontrada na literatura (INGÓLFSDÓTTIR, 1985), como possível produto de hidrólise do depsídeo atranorina, o orselanato de etila (etil 2,4-dihidroxi-6-benzoato de metila) (Figura 4.26).

No caso dos metabólitos **D1**, **D2**, **D3** e **D4**, o grande desafio para a identificação dos mesmos, esteve em determinar a disposição dos substituintes nos respectivos anéis aromáticos, justamente devido ao perfil de multiplicidade dos sinais presentes nos espectros de hidrogênio, ou seja, a existência exclusiva de singletos. Para o êxito das identificações, as correlações obtidas em experimento de 2D de HSQC e principalmente de HMBC, foram ferramentas fundamentais para a elucidação estrutural das moléculas em questão, assim como a espectrometria de massas para a confirmação das massas referentes às estruturas propostas.



#### **4.6.2.1 Identificação e caracterização da substância isolada D0**

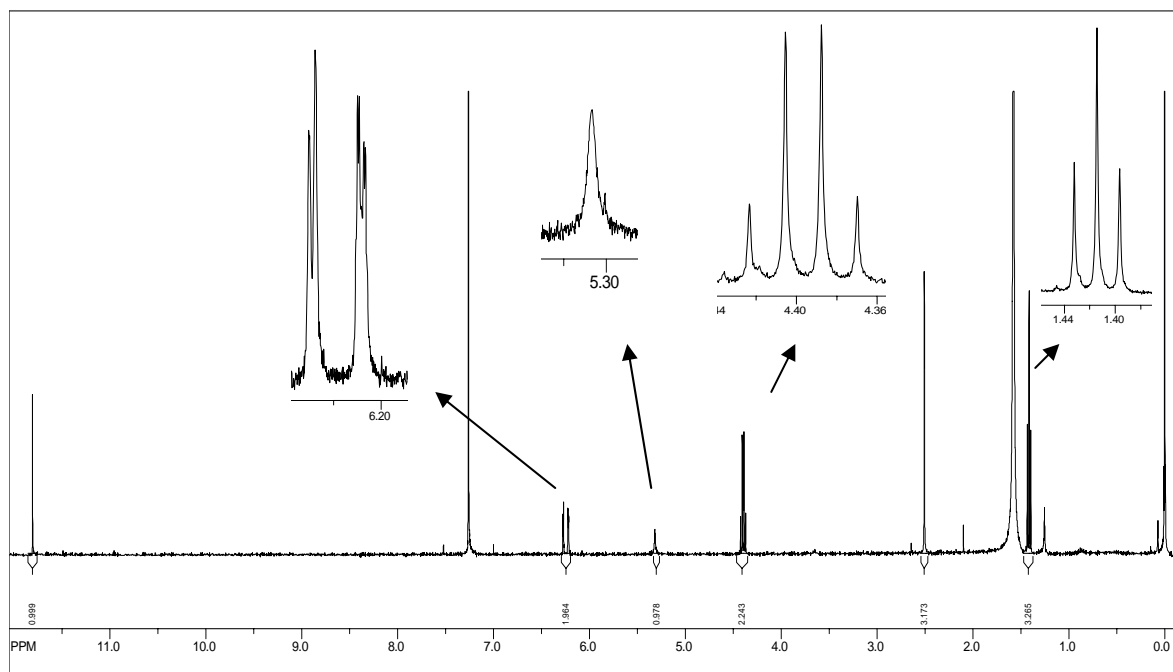
A substância codificada como **D0** foi caracterizada através do estudo dos respectivos dados do espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtidos em equipamento de 200MHz.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.25) há a presença de dois dubletos na região de hidrogênios aromáticos, correspondentes aos núcleos H-3 e H-5 que acoplam entre si, a longa distância (acoplamento em “W”) (PAVIA 1996). Um singlete bastante evidente na região mais desblindada do espectro, em 11,81 ppm é característico de hidroxilas com hidrogênios quelados junto à oxigênios carbonílicos. Um singlete largo, com deslocamento químico também característico, aparece na região de 5.3 ppm, indicando a existência de uma hidroxila não quelada. O quadrupeto e o triplete presentes na região de maior blindagem do espectro são referentes à parte etílica ligada à carboxila, correspondendo aos núcleos H-9 e H-10 respectivamente, que estão acoplando entre si.

A partir da caracterização realizada e comparação com dados da literatura, foi possível identificar a substância orselanato de etila, reportado como um possível produto de hidrólise do depsídeo atranorina, cujas estruturas estão ilustradas na Figura 4.16.

Devido ao método de extração do cultivo fúngico, com uso de etanol e provável variação de pH do meio, o etil orselanato provavelmente pode ter sido produto da hidrólise de algum derivado de ácido orselínico produzido pelo fungo, provavelmente dos próprios metabólitos **D1** e **D2** que serão detalhados posteriormente. No entanto, mesmo com a hipótese de se tratarem de artefatos de seus precursores, a mistura das substâncias etil orsilanato e metil orsilanato foi testada em ensaio antimicrobiano, apresentando atividade contra espécies fúngicas e bacterianas (INGÓLFSDÓTTIR, 1985).

Os dados citados, utilizados para comparação e caracterização estrutural do etil orselanato, são referentes ao propil orselanato, o sistema mais próximo encontrado na literatura (Tabela 4.2).



**Figura 4.25.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  e ampliações das regiões de interesse da substância isolada **D0**, orselanato de etila.  $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz

**Tabela 4.2.** Dados obtidos dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  da literatura para o orselanato de propila e da fração pura isolada de orselanato de etila.  $\text{CDCl}_3$ , 200MHz

Posição H	$\delta_{\text{H,ppm}}(n_{\text{H}}, m, J_{\text{Hz}})$ (KUMAR, 2000)	$\delta_{\text{H,ppm}}(n_{\text{H}}, m, J_{\text{Hz}})$ Isolado
3	6.28 (1, d, 2.6)	6.27 (1, d, 2.4)
5	6.21(1, d, 2.6)	6.22 (1, d, 2.4)
9	4.38 (2, t)	4.39 (2, q, 7.2)
10	1.79 (2,m)	1.41 (3, t, 7.2)
8	2.50 (3, s)	2.50 (3, s)
OH-2	11.86 (1,s)	11.81 (1, s)
OH-4	5.37 (1, s)	5.31 ( 1, s <sub>l</sub> )

s: singlete; s<sub>l</sub>: singlete largo; d:dublete  
t:triplete; q:quadruplete; m: multiplete

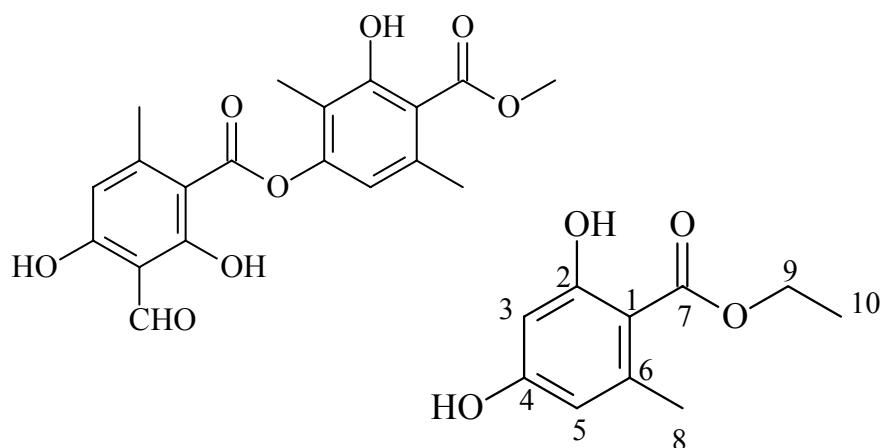


Figura 4.26. Depsídeo atranorina e orselanato de etila respectivamente

#### 4.6.2.2 Identificação e caracterização das substâncias D1 e D2

Como já mencionado, o grande número de singletos nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  responde pela principal característica com relação aos compostos analisados. Grupos metila ligados a carbonos  $\text{sp}^2$ , hidrogênios aromáticos sem acoplamentos e grupos hidroxila sem ou com interação do tipo ligação de hidrogênio são os substituintes responsáveis por este perfil característico observado nos metabólitos isolados.

Um total de dez sinais são atribuídos como substituintes aromáticos às estruturas, sete englobando núcleos de hidrogênio e de hidrogênios de metilas, um singlete com deslocamento típico de hidroxila quelada e dois sinais diminutos e alargados na região de hidroxilas não queladas para ambos os compostos **D1** e **D2**. Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figuras 4.28 e 4.32) das substâncias mostraram o aparecimento de 17 e 18 carbonos, respectivos a **D1** e **D2**, sendo que para cada composto, houve o aparecimento de um sinal com deslocamento químico de aproximadamente 170 ppm, típico de carbono carboxílico de éster. Sendo assim, num total de dez substituintes e a existência de uma possível unidade carboxílica, supôs-se uma estrutura composta por dois anéis aromáticos interligados por uma carboxila de éster nos dois casos.

Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN dos metabólitos **D1** e **D2** (Figuras 4.27 e 4.31) apresentam grande similaridade, diferindo apenas pela ocorrência de um grupo metila no lugar de um núcleo de hidrogênio no composto **D2**. Logo, os espectros de  $^1\text{H}$  trazem a presença de três singletos referentes a três núcleos de hidrogênios na região de deslocamento químico de metilas, referentes a H-7' em 2.05 ppm, H-8 em 2.13 ppm, H-8' em 2.30 ppm e H-9 em 2.62 ppm para o depsídeo **D1** e H-7' em 2.03 ppm, H-8 em 2.11 ppm, H-8' em 2.00 ppm, H-9 em 2.63 ppm e H9' em 2.23 ppm para o depsídeo **D2**, correspondendo a quatro e cinco grupos metila respectivamente, ligados a carbonos  $\text{sp}^2$  aromáticos. Esta diferença também corroborada pelos dados obtidos em EM de baixa e alta resolução que serão apresentados em item posterior.

Como esperado, os deslocamentos químicos pertencentes aos núcleos dos dois referidos depsídeos, apresentam valores semelhantes, em alguns casos quase idênticos. Isto deve-se aos ambientes químicos aos quais os núcleos de cada substância estão expostos, que são obviamente também muito semelhantes justamente devido a disposição estrutural quase idêntica entre **D1** e **D2**. Como exemplo, há os núcleos de hidrogênio H-5 em 6.30 ppm para **D1** e em 6.31 ppm para **D2**.

De acordo com os dados espectrais de **D1**, há um núcleo de hidrogênio aromático extra quando se compara os dados espectrais de **D2**. Esta diferença refere-se à existência do hidrogênio H-4' em 6.54 ppm para o primeiro metabólito, substituído pela unidade de metila, com os núcleos H-7' em 2,03 ppm na estrutura do segundo metabólito. Grupos hidroxila com deslocamentos químicos característicos são identificados para o núcleo 2-OH em 11.84 ppm para a hidroxila quelada e em 5.13 ppm e 4.77 ppm para os núcleos de hidroxilas sem interação do tipo hidrogênio de 4-OH e 3'-OH respectivamente, como singletos largos no depsídeo **D1**. Para **D2**, encontra-se o núcleo quelado 2-OH em 11.99 ppm, e os núcleos sem interação 4-OH em 5.34 ppm e 3'-OH em 4.74 ppm.

Esta similaridade estrutural entre os metabólitos isolados leva basicamente aos mesmos tipos de correlações entre os núcleos no anel aromático “A” em ambos os casos como pode ser notado no Esquema 4.1. O experimento de HMBC permitiu a detecção da correlação à longa distância do hidrogênio hidroxílico 2-OH com os núcleos de carbono C-1 e C-2 em 103.6 e 163.9 ppm respectivamente para a substância **D1**, assim como com os núcleos C-1 e C-2 em 103.4 e 164.0 ppm para a substância **D-2**.

Com relação ao anel “B” há correlações diferenciadas justamente devido a existência de um hidrogênio em **D1** e um grupo metila, na mesma posição em **D2**. No depsídeo **D1**, há a correlação do núcleo H-4’ com os núcleos C-8’ em 21.0 ppm, C-6’ em 114.0 ppm e C-3’ em 149.7 ppm. Já para a estrutura **D2**, o grupo metila existente na mesma posição de H-4’ no depsídeo **D1**, há a correlação dos núcleos H-8’ com os carbonos C-5’ em 119.8 ppm, C-4’ em 135.4 ppm e C-3’ em 148.3 ppm.

Os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos para ambos os compostos, permitiram atribuir os sinais referentes a todos os núcleos de carbono. O número de carbonos relativos a cada região de deslocamento químico característico apresenta-se de acordo com o número de carbonos aromáticos  $\text{sp}^2$  de CH e CO, carbonos  $\text{sp}^3$  de  $\text{CH}_3$ , assim como carbonos de deslocamento típico de grupo carboxílico de éster, grupo ligante entre os anéis aromáticos.

Contudo, as características estruturais apresentadas, são compatíveis com compostos da classe dos depsídeos, derivados do ácido orselínico. Com a realização da elucidação estrutural dos compostos isolados, pôde-se então propor as estruturas moleculares para **D1** e **D2**, cuja nomenclatura IUPAC encontra-se descrita na Figura 4.34. No entanto, no que se refere à existência dos depsídeos isolados de *C. uredinicola*, até o momento, não há relatos da produção de **D1**, **D2** na natureza.

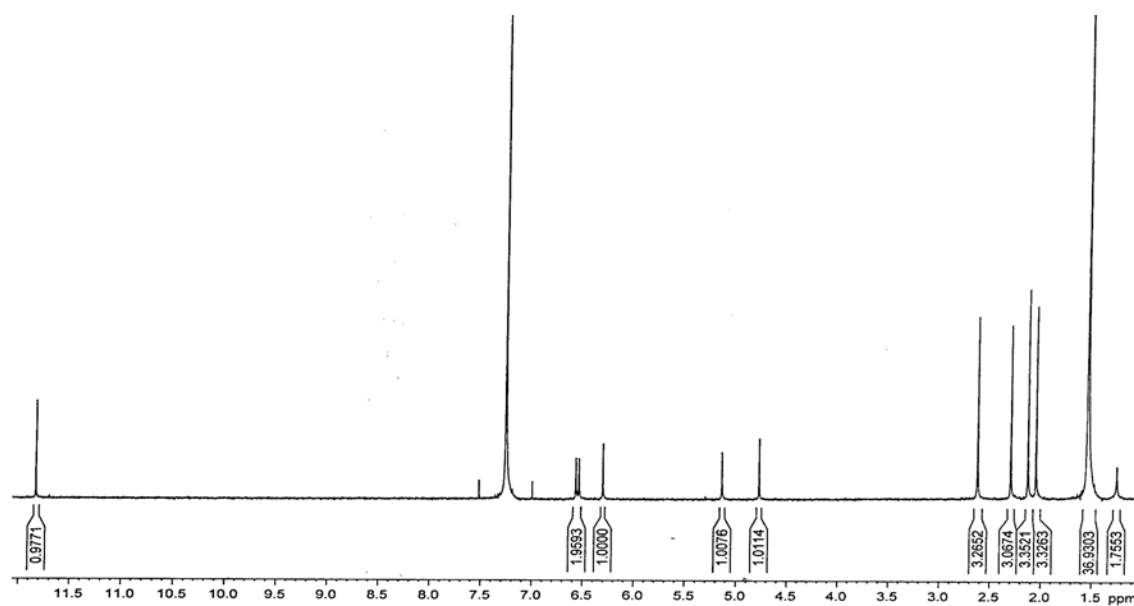


Figura 4.27. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **D1**, ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

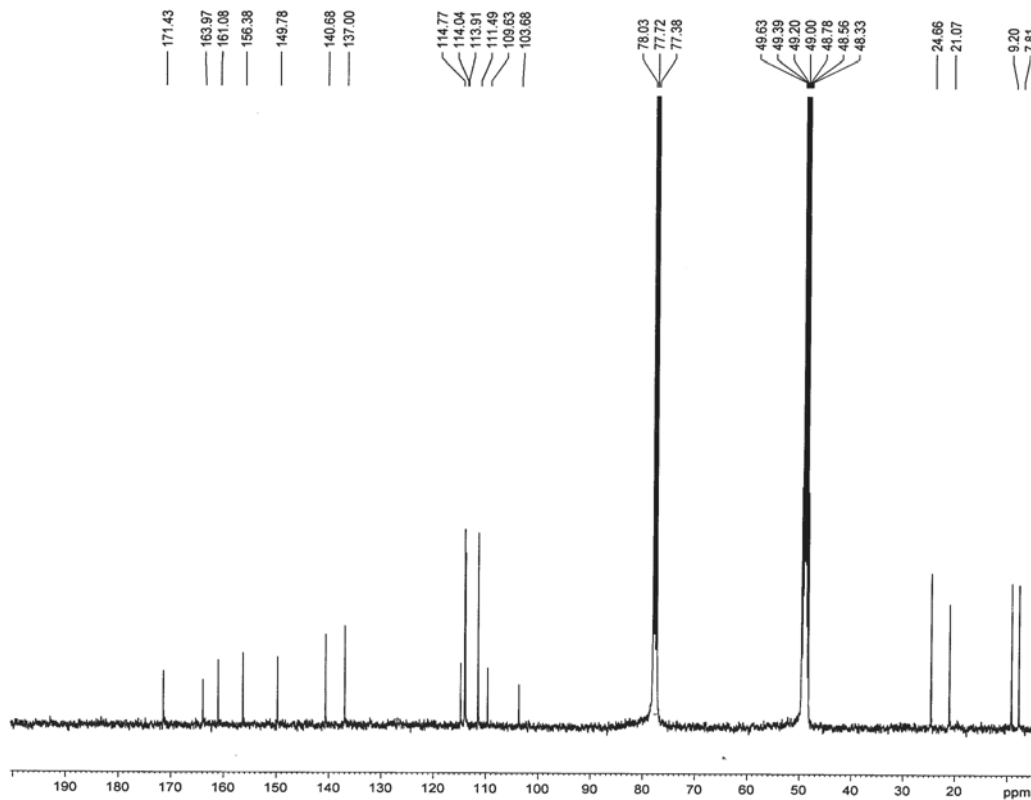


Figura 4.28. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **D1**, ( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  (9,75:0,25)400 MHz)

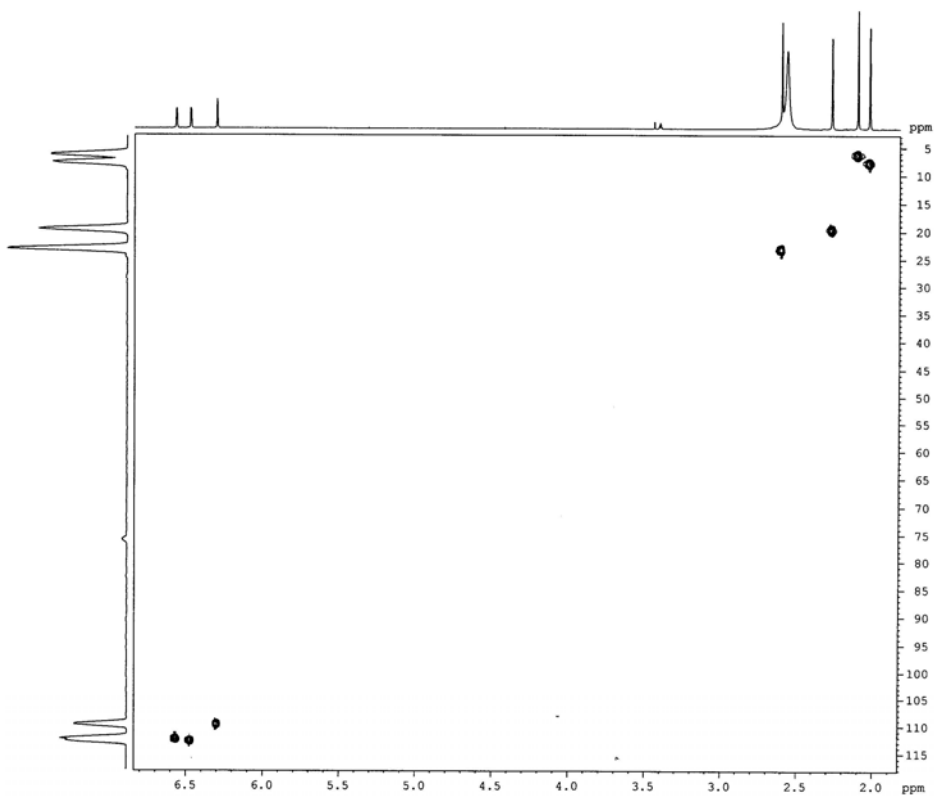


Figura 4.29. Espectro de HSQC de **D1**, ( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  (9,75:0,25), 400 MHz)

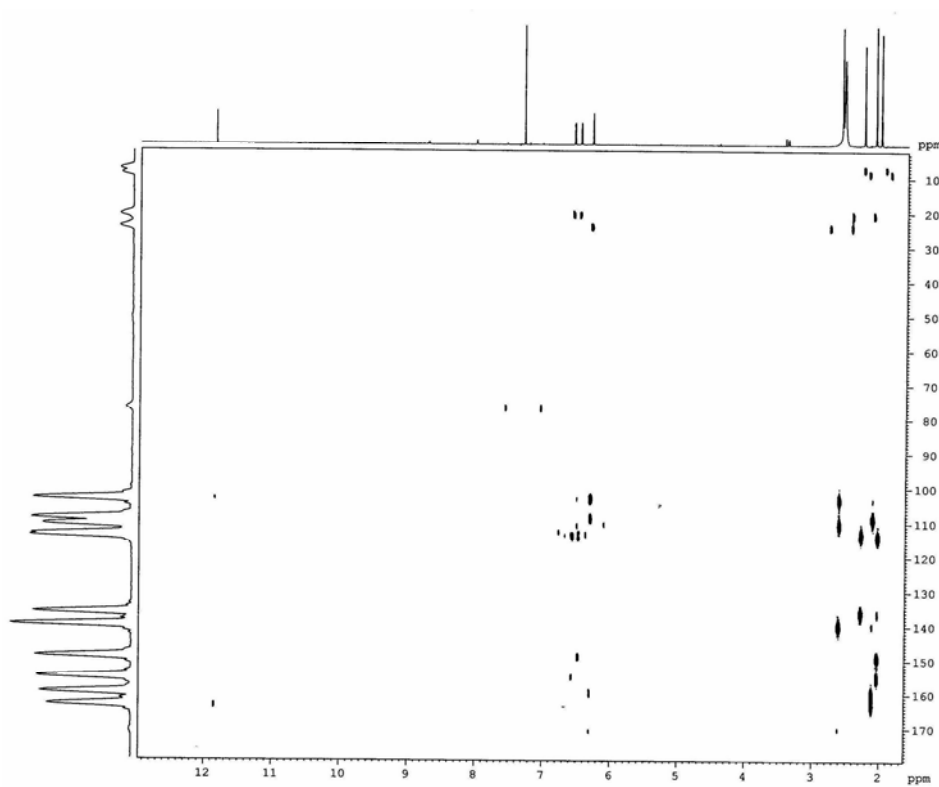


Figura 4.30. Espectro de HMBC de **D1**, ( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  (9,75:0,25), 400 MHz)

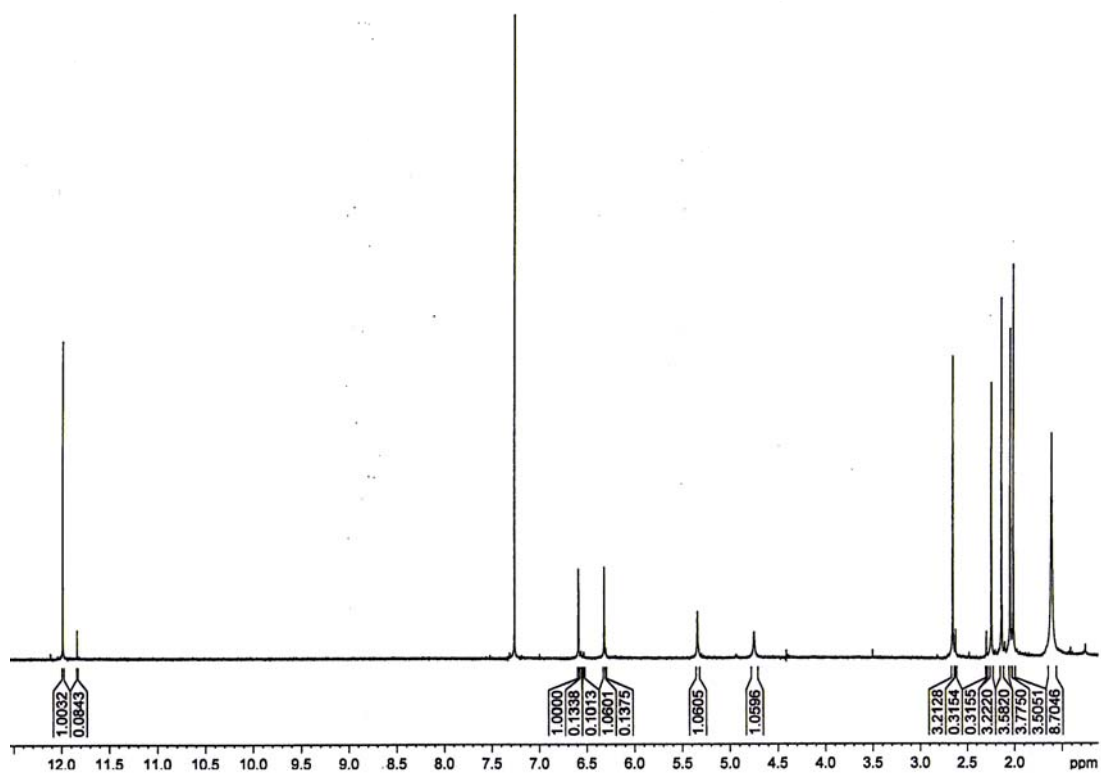


Figura 4.31. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **D2**, ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

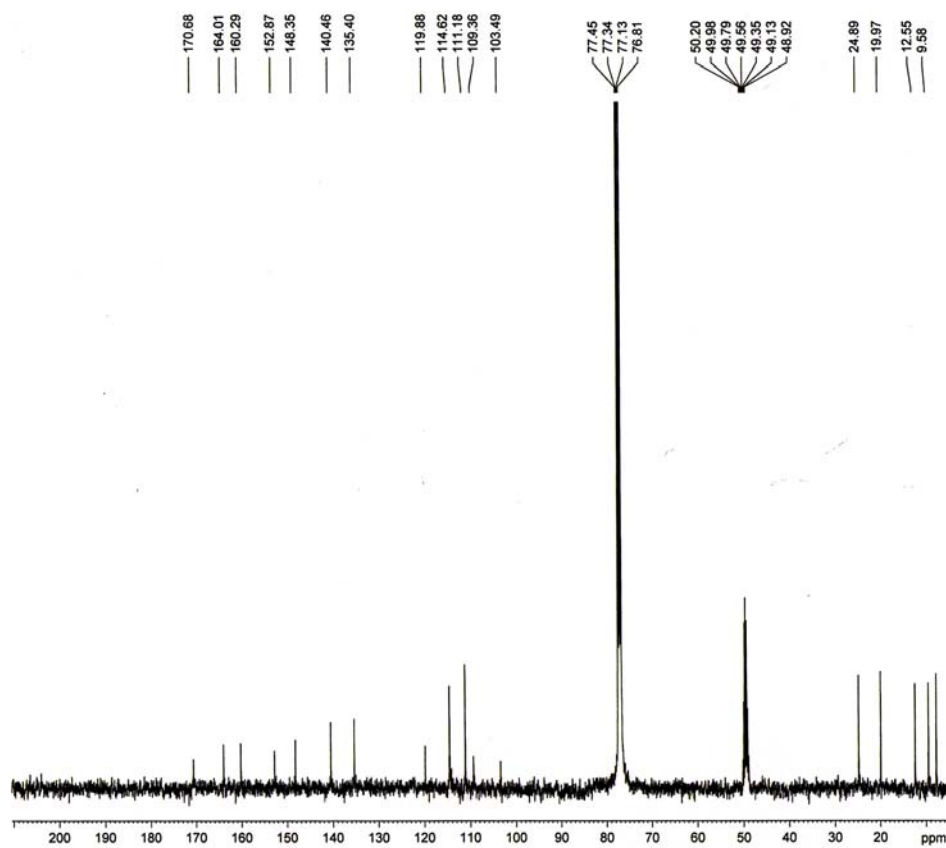


Figura 4. 32. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **D2**, ( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}(9,75:025)$ , 100 MHz)



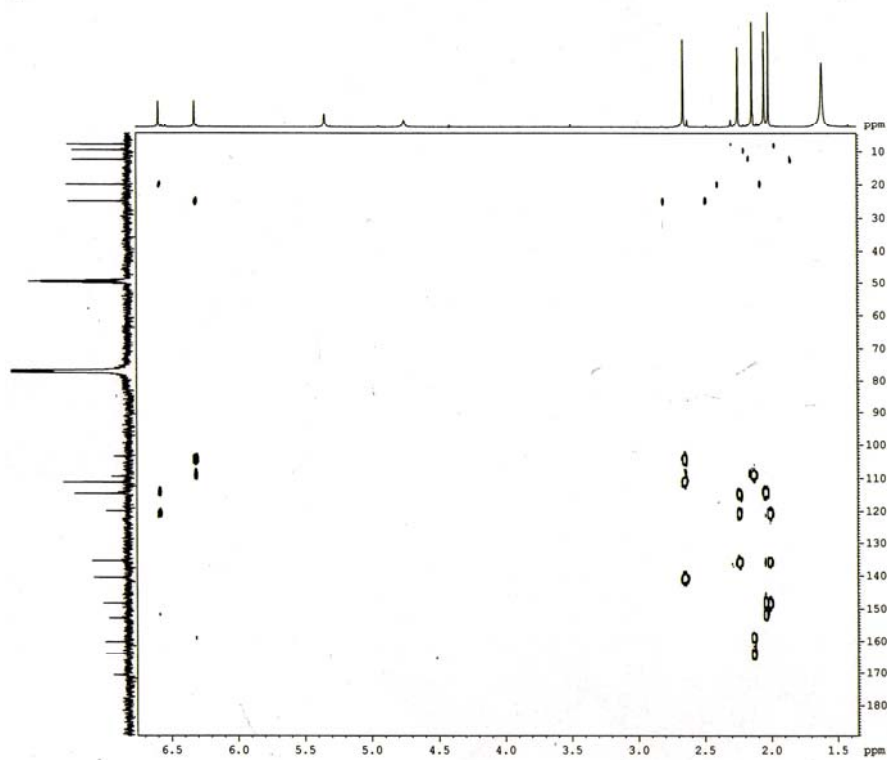
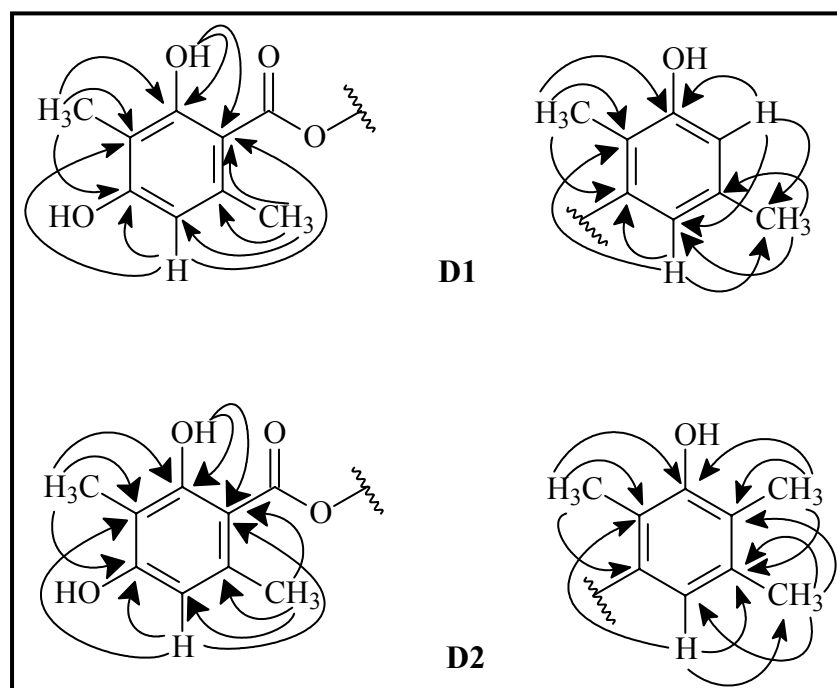


Figura 4.33. Espectro de HMBC de **D2**, ( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  (9,75:0,25) 400 MHz)



Esquema 4.1. Correlações do espectro de HMBC para os compostos **D1** e **D2**

Tabela 4.3. Dados espectrais de RMN obtidos para D1 e D2

position	1			2		
	$\delta_C^a$	$\delta_H, \text{mult.}^b$	HMBC <sup>b, d</sup>	$\delta_C^a$	$\delta_H \text{mult.}^a$	HMBC <sup>a, d</sup>
1	103.6 (C)	-	H-9; H-5; HO-2	103,4 (C)	-	HO-2; H-5; H-9
2	163.9 (C)	-	H-8; HO-2	164,0 (C)	-	HO-2; H-8
3	109.6 (C)	-	H-8; H-5	109,3 (C)	-	HO-2; H-5; H-8
4	161.0 (C)	-	H-8; H-5	160,2 (C)	-	H-8
5	111.4 (CH)	6,30 (1H, s)	H-9	111,1 (CH)	6,31 (1H, s)	H-9
6	140.6 (C)	-	H-9	140,4 (C)	-	H-9
7	171.4 (C)	-	-	170,6 (C)	-	-
8	7.8 (CH <sub>3</sub> )	2,13 (3H, s)	-	7,8 (CH <sub>3</sub> )	2,11 (3H, s)	-
9	24,6 (CH <sub>3</sub> )	2,62 (3H, s)	H-5'	24,8 (CH <sub>3</sub> )	2,63 (3H, s)	-
1'	156.3 (C)	-	H-7' ; H-6'	152,8 (C)	-	H-7'
2'	113.9 (C)	-	H7' ; H-6'	114,5 (C)	-	H-7'; H-6'
3'	149.7 (C)	-	H-7' ; H-4'	148,3 (C)	-	H-7'; H-8'
4'	114.7 (CH)	6,54 (1H, s)	-	135,4 (C)	-	H-8'; H-9'
5'	137.0 (C)	-	H-8'	119,8 (C)	-	H-8'; H-9'; H-6'
6'	114.0 (CH)	6,56 (1H, s)	H-8' ; H-4'	114,6 (CH)	6,59 (1H, s)	H-9'
7'	9.2 (CH <sub>3</sub> )	2,05 (3H, s)	-	9,5 (C)	2,03 (3H, s)	-
8'	21.0 (CH <sub>3</sub> )	2,30 (3H, s)	H-6' ; H-4'	12,5 (CH <sub>3</sub> )	2,00 (3H, s)	-
9'	-	-	-	19,9 (CH <sub>3</sub> )	2,23 (3H,s)	H6'
2 - OH	-	11,84 (1H,s)	-	-	11,99 (1H, s)	-
4 - OH	-	5,13 (1H,s)	-	-	5,34 (1H, s <sub>i</sub> )	-
3' - OH	-	4,77 (1H,s)	-	-	4,74 (1H, s <sub>i</sub> )	H-9

<sup>a</sup> Dados obtidos em CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD(9,75: 0,25), <sup>b</sup> Dados obtidos em CDCl<sub>3</sub>. <sup>c</sup> Dados obtidos em CD<sub>3</sub>OD. <sup>d</sup> Correlações de HMBC do respectivo próton ao carbono indicado

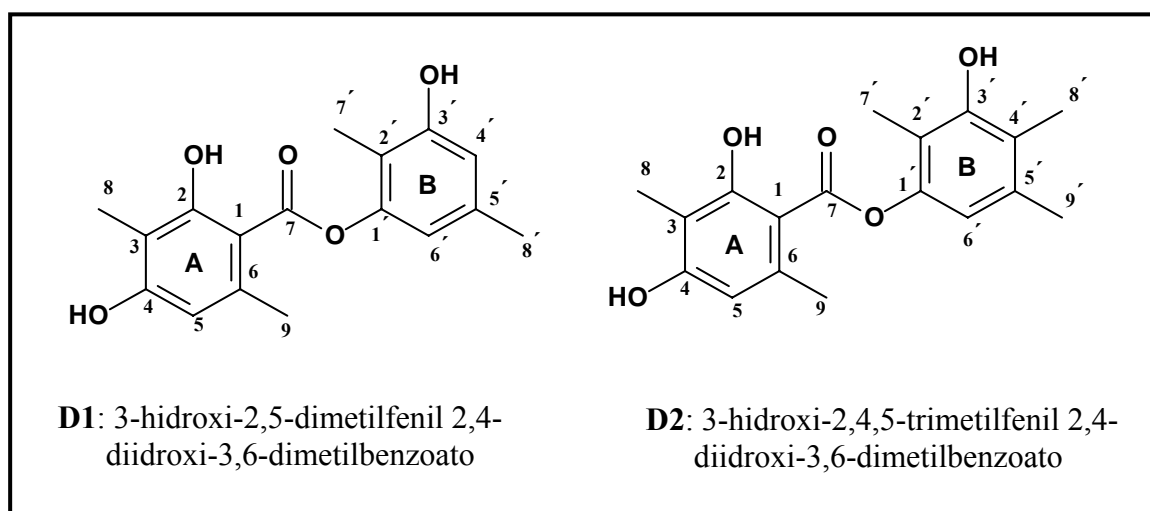


Figura 4.34. Propostas estruturais para as substâncias D1 e D2

#### 4.6.2.2.1 Estudo de caracterização estrutural por espectrometria de massas das substâncias D1 e D2

Através de análises via espectrometria de massas, várias informações estruturais podem ser obtidas a respeito do analito em estudo. Como exemplo, há os experimentos MS em *full scan*, que oferecem informação sobre a massa molecular de uma substância e os experimentos de MS/MS, como o caso dos experimentos de íons produtos, que permite informações a respeito da estrutura molecular de interesse.

Como não constam relatos na literatura a respeito dos depsídeos isolados de *C.uredinicola*, foram realizados experimentos em espectrometria de massas no intuito de se obter maiores dados a respeito destes metabólitos. Como por exemplo, a confirmação estrutural e a detecção destes, em diferentes meios de cultura.

A partir da realização dos experimentos de *full scan*, constatou-se que a ionização em *ESI* modo negativo, apresentou melhores resultados de análise para os depsídeos estudados. Sendo assim, foi possível detectar os íons  $[M-H]^-$  referentes aos íons moleculares desprotonados de **D1** e **D2**, como mostram as Figuras 4.35 e 4.36.

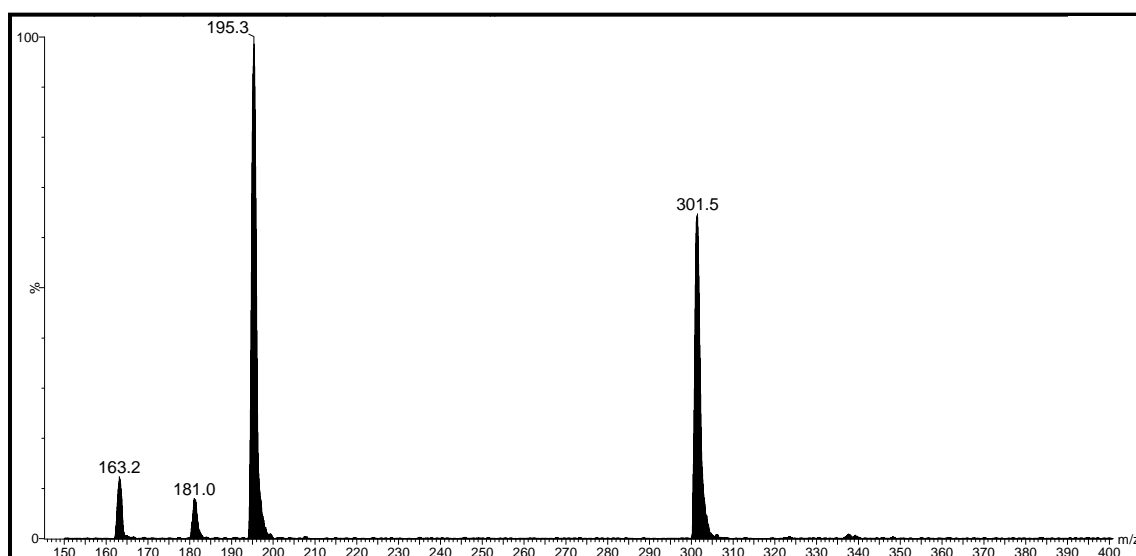
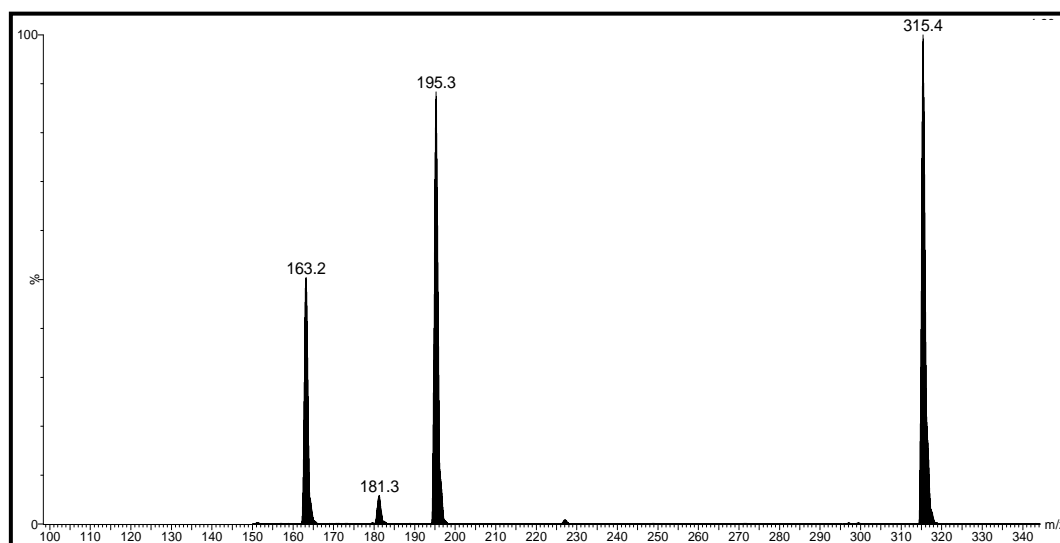


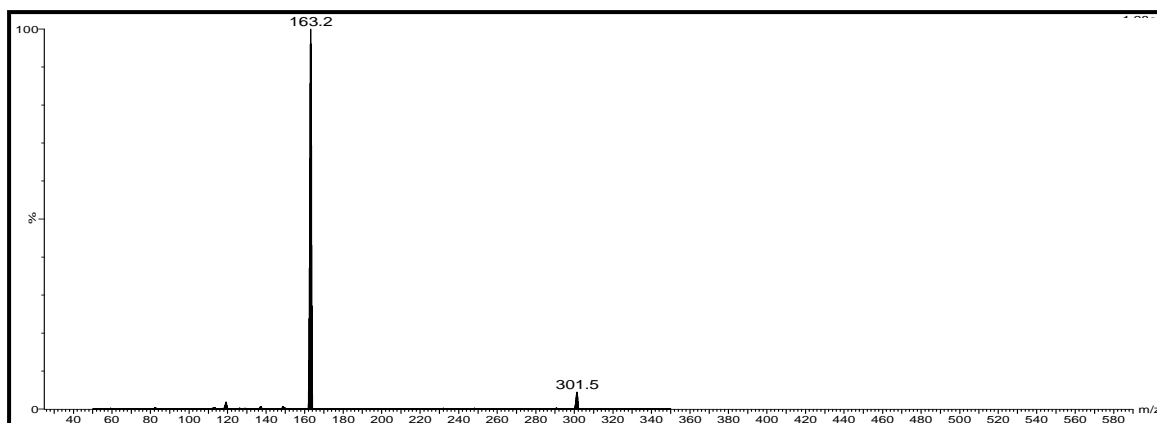
Figura 4.35. Espectro de massas *full scan*, *ESI* modo negativo, depsídeo **D1**



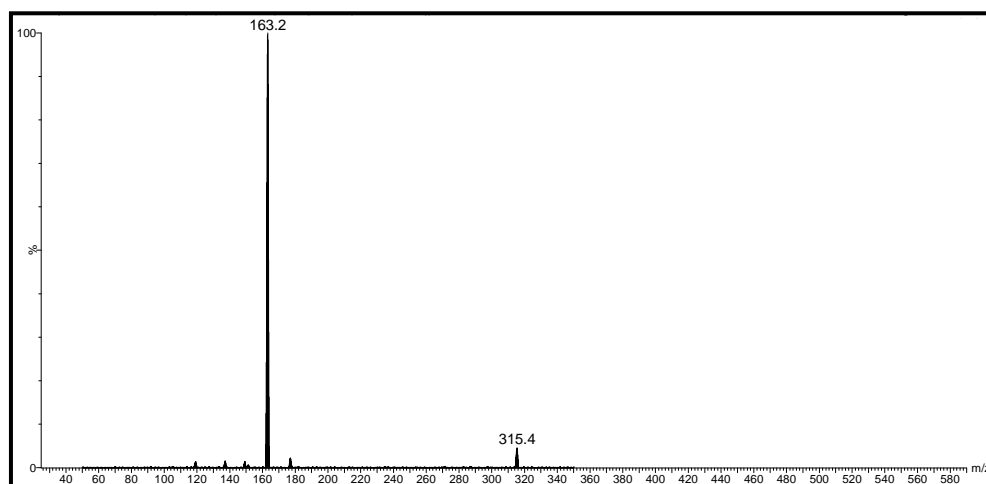
**Figura 4.36.** Espectro de massas *full scan*, ESI modo negativo, depsídeo **D2**

A fim de se obter maiores informações estruturais a respeito dos metabólitos isolados e assim corroborar com as estruturas propostas para os depsídeos **D1** e **D2**, realizou-se o experimento de íons produtos para ambos os casos. Neste experimento o íon de interesse observado no espectro de *full scan*, é fragmentado podendo-se assim obter informações estruturais do mesmo. O primeiro quadrupolo, operado à radiofrequência e voltagens de corrente contínua fixas, permite somente a passagem dos íons com uma determinada relação massa/carga, os quais são dirigidos à cela de colisão onde o gás introduzido geralmente argônio produz a fragmentação destes íons. Os fragmentos gerados são analisados no segundo quadrupolo e direcionados ao detector (SIUZDAK, 1996).

Sendo assim, selecionou-se a relação  $m/z$  301 e a relação  $m/z$  315 no primeiro quadrupolo, com a câmara de colisão em 10 eV, obtendo-se os íons produtos de cada substância estudada, que por fim, foram analisados no segundo quadrupolo. Os espectros de íons produtos gerados, podem ser visualizados nas figuras a seguir:



**Figura 4.37.** Espectro de íons produtos, *ESI* modo negativo, 10 eV, depsídeo **D1**

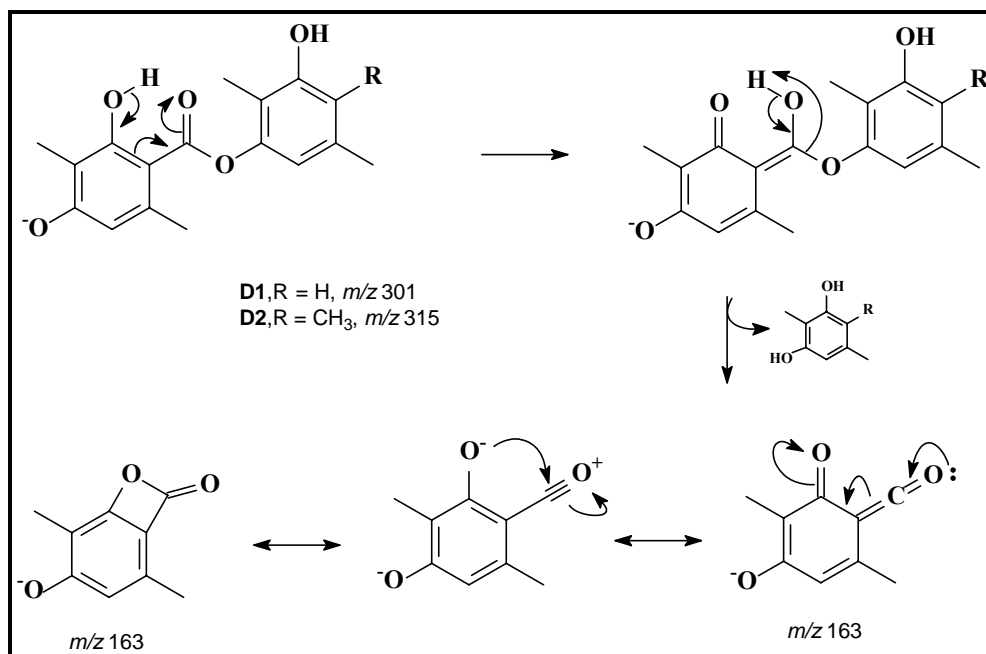


**Figura 4.38.** Espectro de íons produtos, *ESI* modo negativo, 10 eV, depsídeo **D2**

Com a obtenção de dados a partir dos referidos experimentos em MS e MS/MS, foram propostos mecanismos de fragmentação inerentes a cada depsídeo estudado (Esquema 4.2). Devido à grande similaridade estrutural dos compostos, há a ocorrência do fragmento mais estável de relação  $m/z$  163 (pico base), para todos os depsídeos isolados, incluindo **D3** e **D4**, como será detalhado adiante.

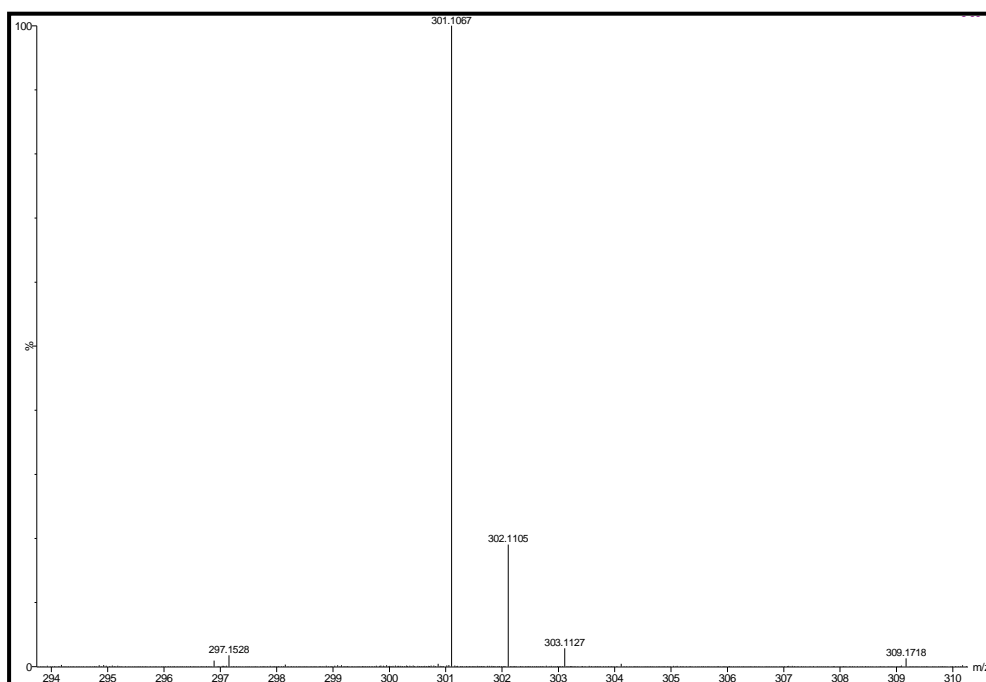
O mecanismo proposto para **D1** e **D2**, mostra inicialmente um rearranjo de McLafferty com posterior rearranjo 1,3 de hidrogênio, culminando na

formação do íon  $m/z$  163. Com a delocalização seqüencial de elétrons, a partir da unidade carbonílica formada anteriormente, há o fechamento do anel lactônico e assim a formação do íon fragmento mais estável.

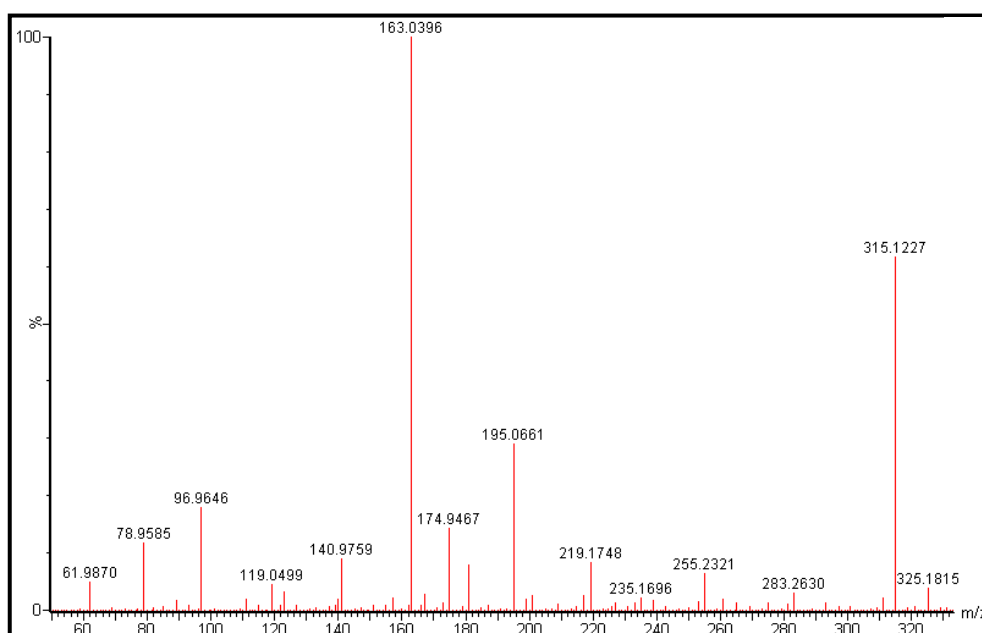


**Esquema 4.2.** Proposta para o mecanismo de fragmentação dos depsídeos **D1** e **D2**

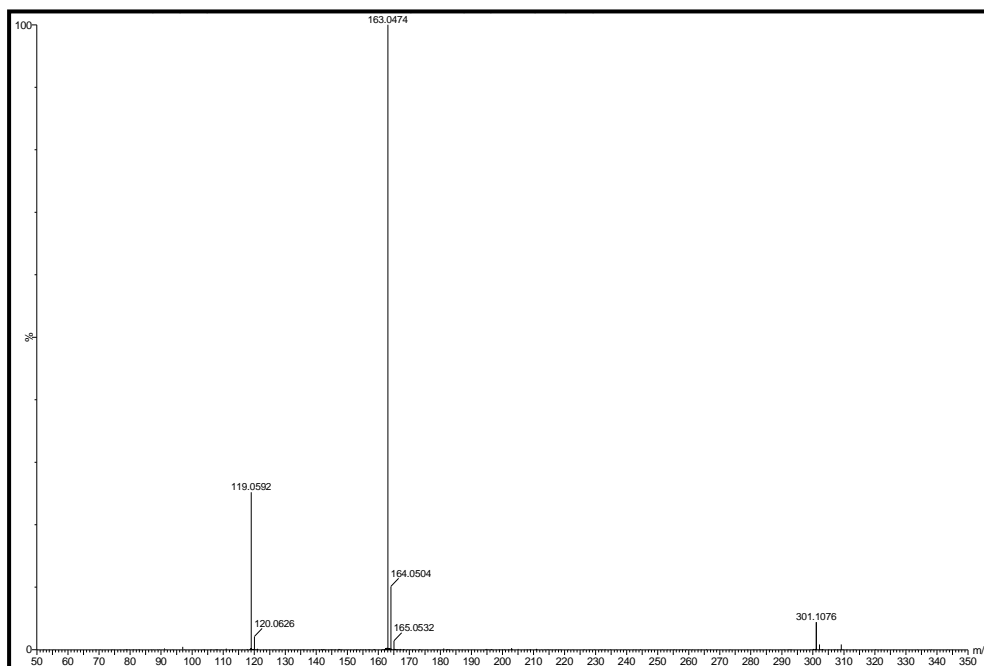
Devido ao fato de se tratarem de substâncias ainda inéditas na literatura, foram realizadas análises em espectrometria de massas de alta resolução para os depsídeos **D1** e **D2** a fim da comprovação inequívoca das massas moleculares propostas, assim como verificar se os mecanismos de fragmentação sugeridos são coerentes com os íons observados no espectro de MS/MS neste tipo de análise. Os espectros de *full scan* e de íons produtos das substâncias **D1** e **D2**, foram obtidos em equipamento de alta resolução (Synapt HDMS-WATERS-TOF) e podem ser visualizados a seguir:



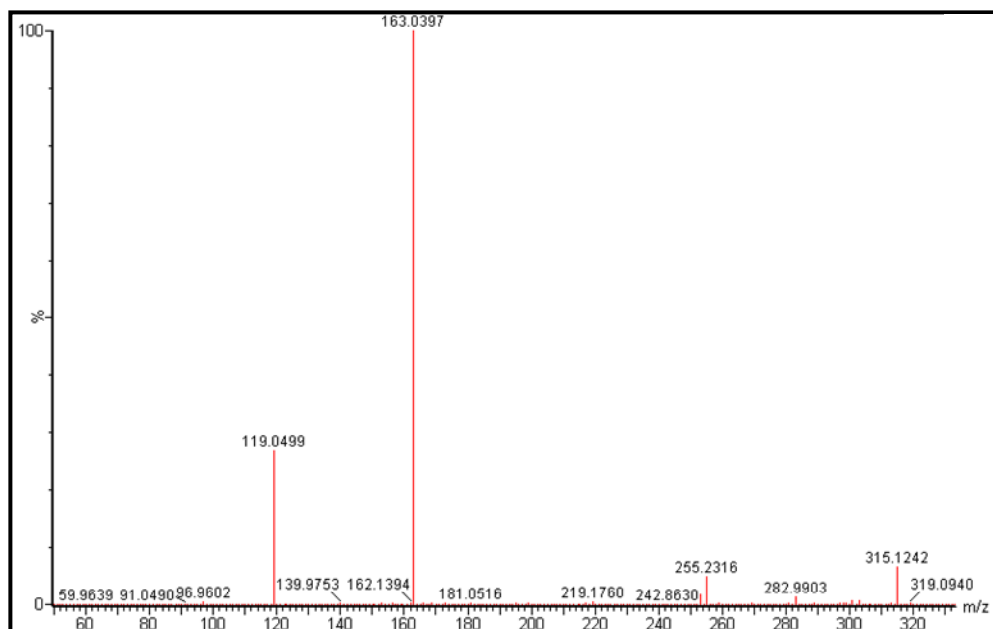
**Figura 4.39.** Espectro de massas *full scan* em alta resolução, *ESI* modo negativo, depsídeo **D1**



**Figura 4.40.** Espectro de massas *full scan* em alta resolução, *ESI* modo negativo, depsídeo **D2**



**Figura 4.41.** Espectro de íons produtos em alta resolução, *ESI* modo negativo, deprotonado **D1**



**Figura 4.42.** Espectro de íons produtos em alta resolução, *ESI* modo negativo, deprotonado **D2**



Nota-se que os valores obtidos para os íons moleculares de **D1** e **D2** foram compatíveis aos valores calculados (Tabela 4.4), assim como os valores relativos aos íons fragmento de  $m/z$  163, confirmando o mecanismo de fragmentação proposto para o depsídeo em questão.

Tabela 4.4 Dados obtidos e calculados para a substância **D1** e **D2**

Íon ( $m/z$ )	Fórmula	Valor Obtido (Da)	Valor calculado (Da)	Desvio (ppm)
301	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	301.1067	301.1071	- 1.5
163	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	163.0474	163.0393	+ 1.5
315	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	315.1227	315.1227	+/- 1.6
163	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	163.0397	163.0393	+ 1.6

#### 4.6.2.3 Identificação e caracterização das substâncias **D3** e **D4**

Apesar de não terem sido encontrados dados na literatura a respeito dos metabólitos **D3** e **D4**, utilizou-se como modelo mais próximo, para comparação de deslocamentos químicos, dados da literatura (CARVALHO, 2000) referentes ao depsídeo atranorina (Figura 4.26), devido às semelhanças estruturais às substâncias isoladas. Também foram utilizados para comparação, demais depsídeos reportados na literatura (NARUI, 1998). De acordo com as comparações, as atribuições dos sinais foram pertinentes em ambos os compostos.

Como nos casos apresentados anteriormente, o número expressivo de singletos é a principal característica dos espectros de <sup>1</sup>H RMN (Figuras 4.43 e 4.47) dos metabólitos **D3** e **D4**.

Um total de catorze sinais são atribuídos como substituintes aromáticos às estruturas, dez englobando núcleos de hidrogênio e de hidrogênios de metilas, dois singletos com deslocamento típico de hidroxila quelada e dois sinais diminutos e alargados na região de hidroxilas não queladas para ambos os

compostos **D3** e **D4**. Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figuras 4.44 e 4.48) das substâncias mostraram o aparecimento de 26 e 27 carbonos, respectivos a **D3** e **D4**, sendo que para cada composto, houve o aparecimento de dois sinais, quase coalescentes, com deslocamento químico de 170 ppm aproximadamente, típico de carbono carboxílico de éster. Sendo assim, num total de catorze substituintes e a possível existência de duas unidades carboxílica, supôs-se uma estrutura composta por dois anéis aromáticos interligados por uma carboxila de éster nos dois casos.

Novamente, a diferença estrutural entre os dois compostos se dá na existência de um grupo metila para **D4** cujos núcleos H-9'' estão em 2.25 ppm, enquanto que na mesma posição, localizada no anel **C**, há um núcleo de hidrogênio H-4'' em 6.51 ppm para **D3**.

Entre os três anéis aromáticos constituintes de **D3** e **D4**, o anel intermediário **B**, é idêntico no que diz respeito ao posicionamento dos substituintes para ambos os compostos. Em **D3** e **D4**, os núcleos H-8' (em 2.11 ppm e 2.14 ppm respectivamente) e H-9' (em 2.62 ppm e 2.63 ppm) são referentes aos hidrogênios dos grupos metila existentes no anel **B**, enquanto os núcleos H-3' (em 6.30 ppm e 6.32 ppm, respectivamente) representam hidrogênios aromáticos. A disposição dos substituintes para o anel intermediário em **D3** e **D4**, foram determinadas de acordo com as respectivas correlações dos núcleos H-3' com C-1' em 109.2 ppm e 108.9 ppm (respectivamente), C-6' em 103.6 ppm e 104.1 ppm, C-9' em 24.5 ppm e 24.6 ppm; assim como H-8' correlacionando com os núcleos C-1'; C-4' em 140.5 ppm e 140.7 ppm e por fim com C-6'. (Esquema 4.4)

Os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de **D3** e **D4**, permitiram a atribuição dos sinais referentes às unidades carboxílicas entre os anéis aromáticos, para o núcleo C-7 em 170.2 ppm (para ambos os compostos) e para o núcleo C-7' em 170.5 ppm para **D3** e em 170.3 ppm para **D4**.

De acordo com o número e o tipo de substituinte, assim como com as correlações de HSQC e HMBC, foi possível verificar grande similaridade entre **D3** e **D4** com os depsídeos **D1** e **D2**. Em **D3**, os anéis aromáticos **A** e **C**, são idênticos com relação à estrutura aos anéis **A** e **B**, respectivamente, pertencentes ao depsídeo **D1**, enquanto que para a estrutura de **D4**, os anéis **A** e **C**, são idênticos na disposição de seus substituintes, aos anéis em **D2**, **A** e **B**.

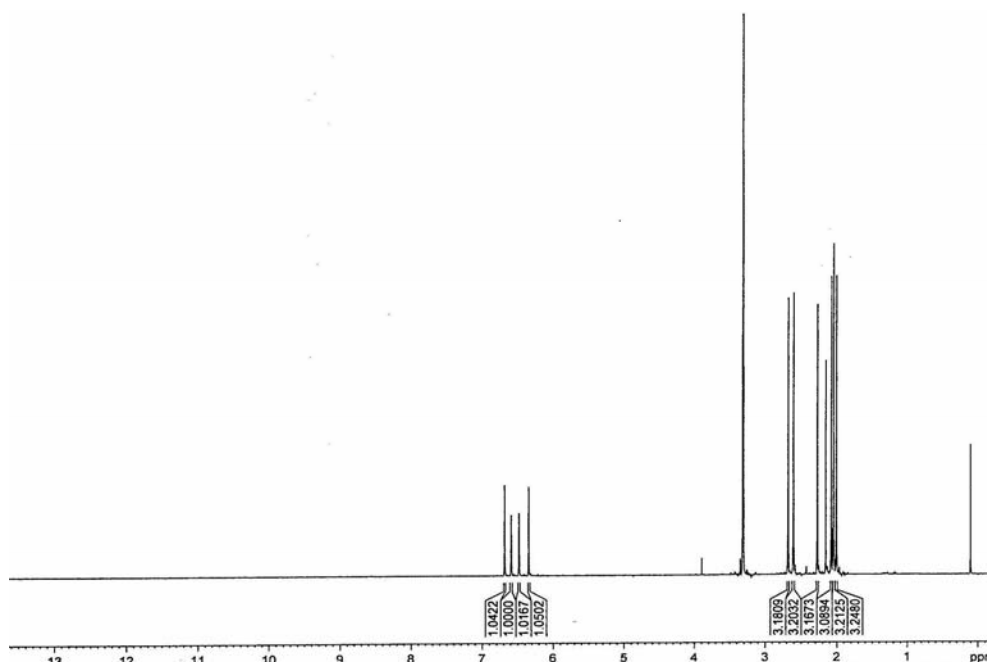


Figura 4.43. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **D3**, ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)

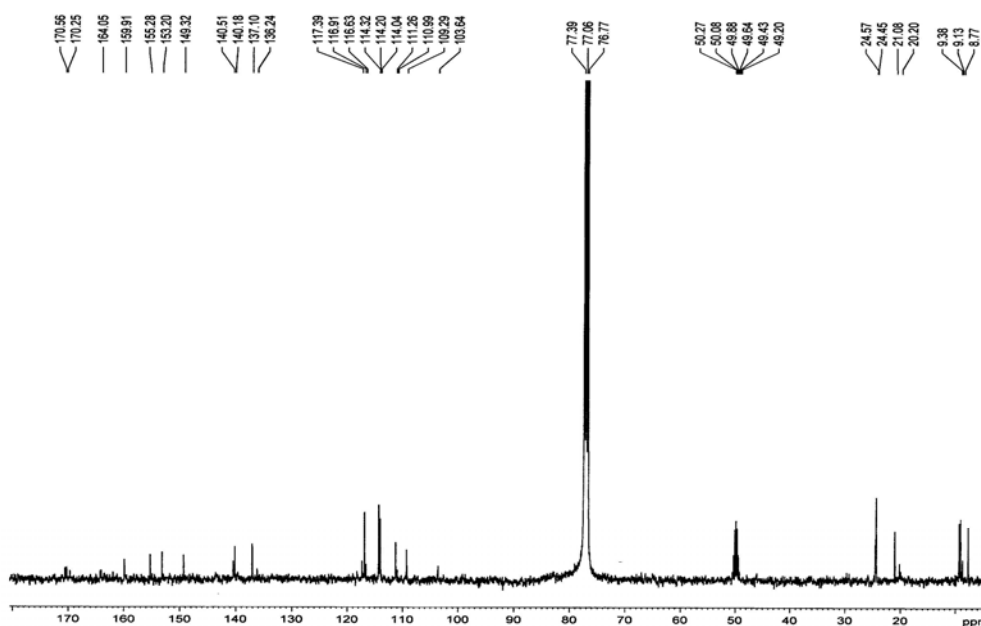


Figura 4.44. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **D3**, ( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  (9,75:0,25), 100 MHz)

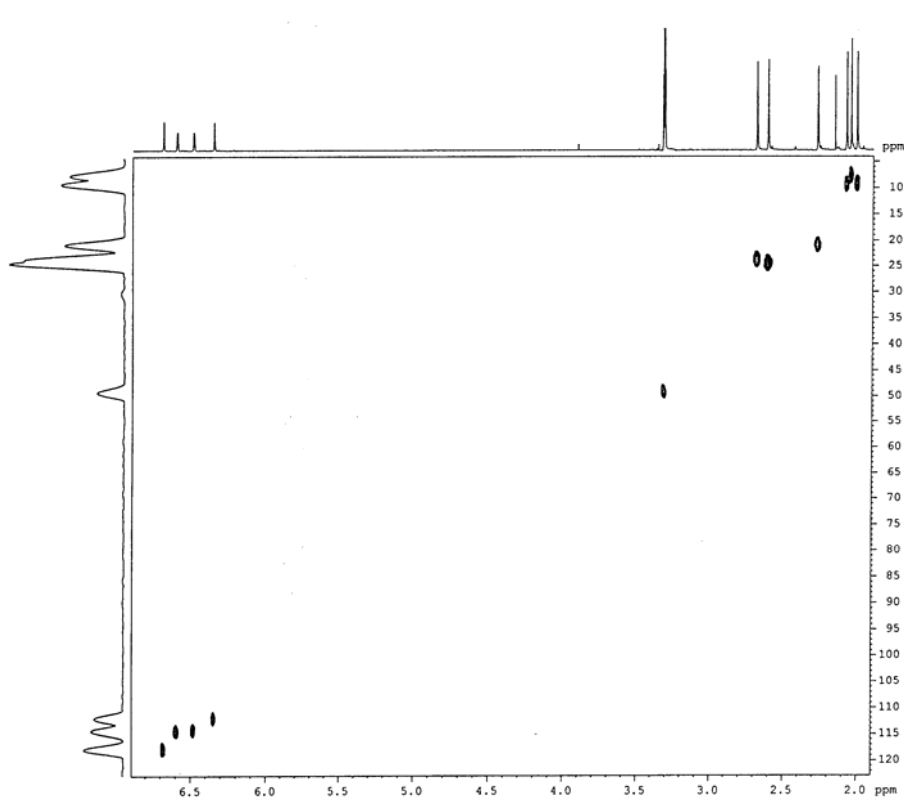


Figura 4.45. Espectro de HSQC de **D3**, ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)

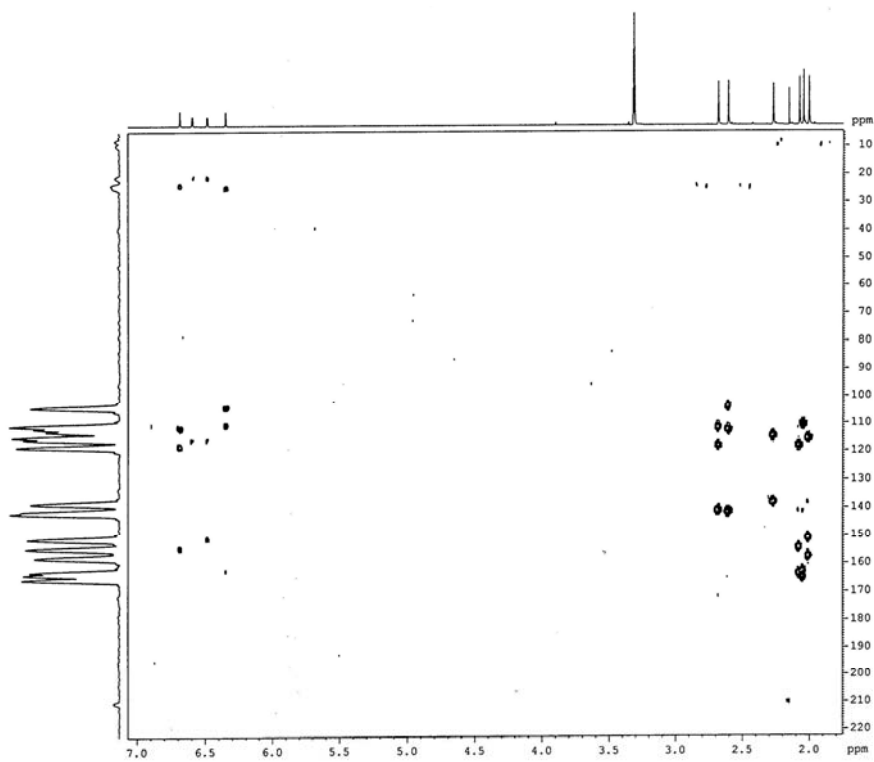


Figura 4.46. Espectro de HMBC de **D3**, ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), 400 MHz)

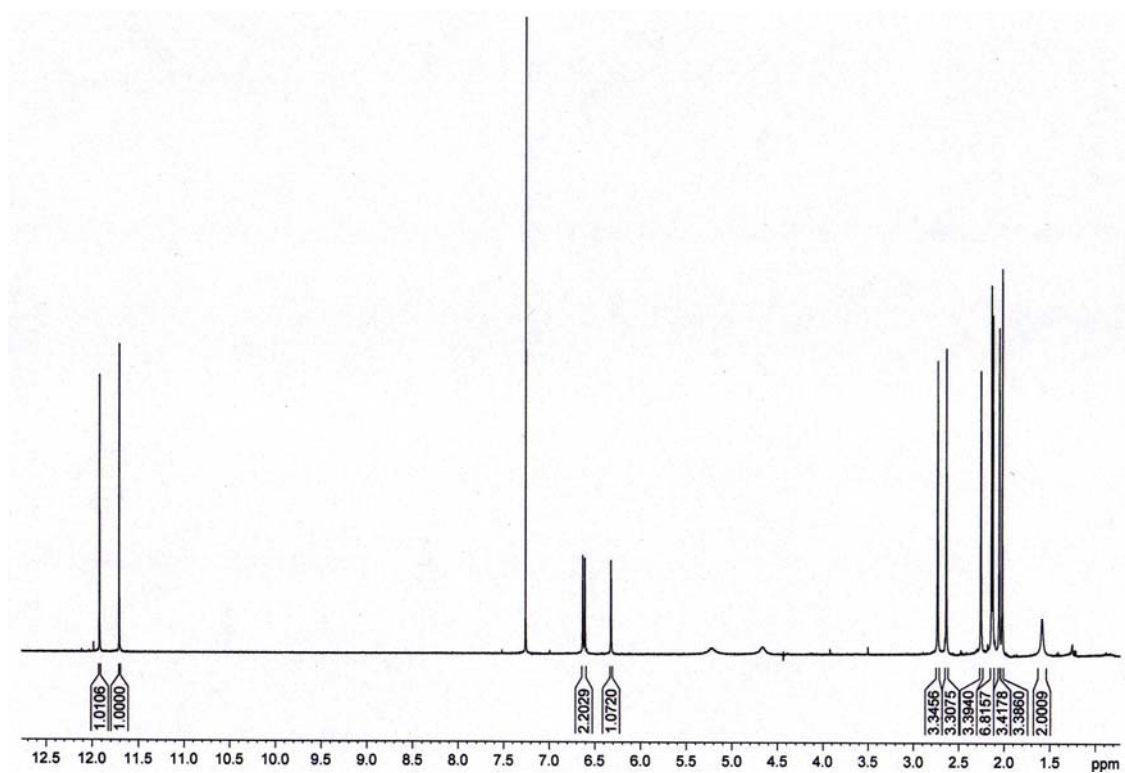


Figura 4.47. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **D4**, ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

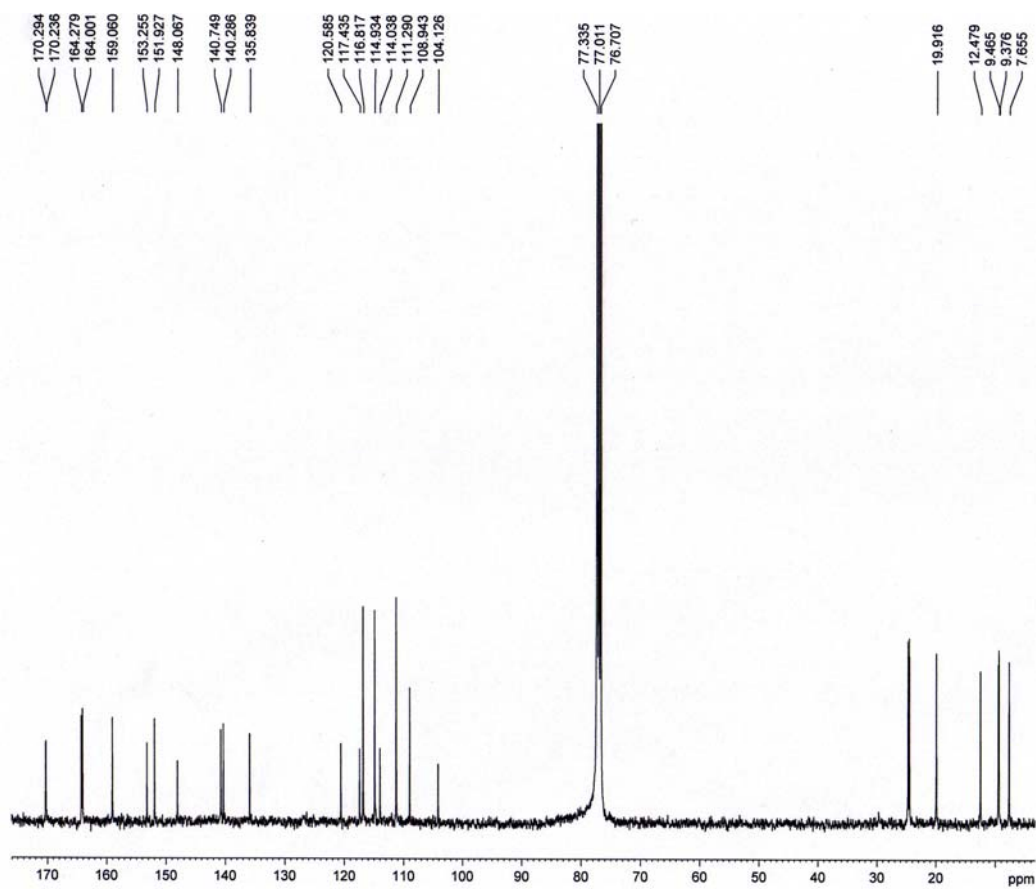


Figura 4.48. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **D4**, ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

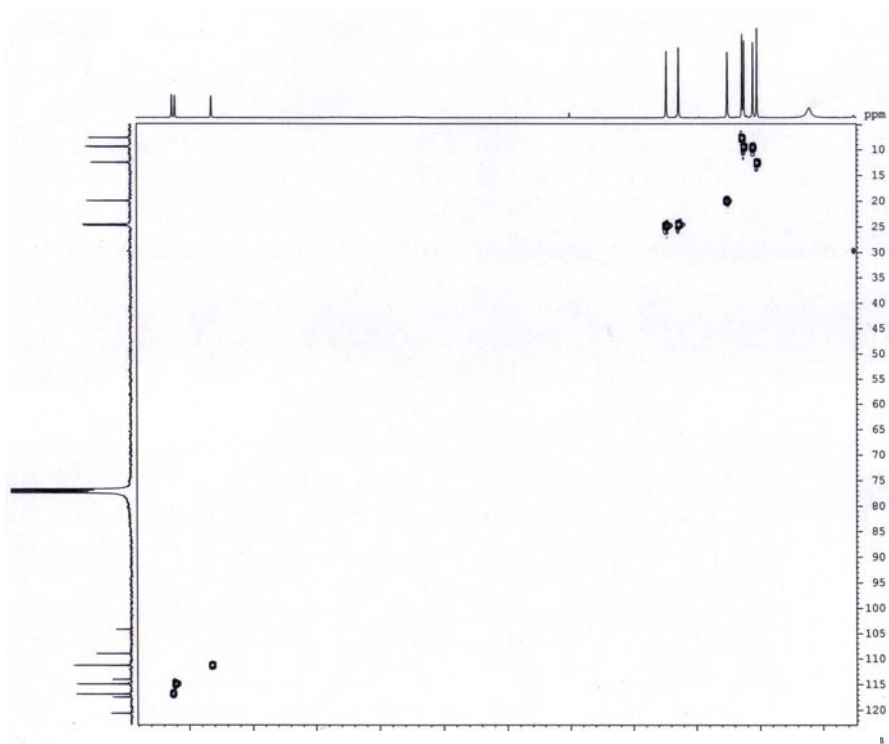


Figura 4.49. Espectro de HSQC de **D4**, (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

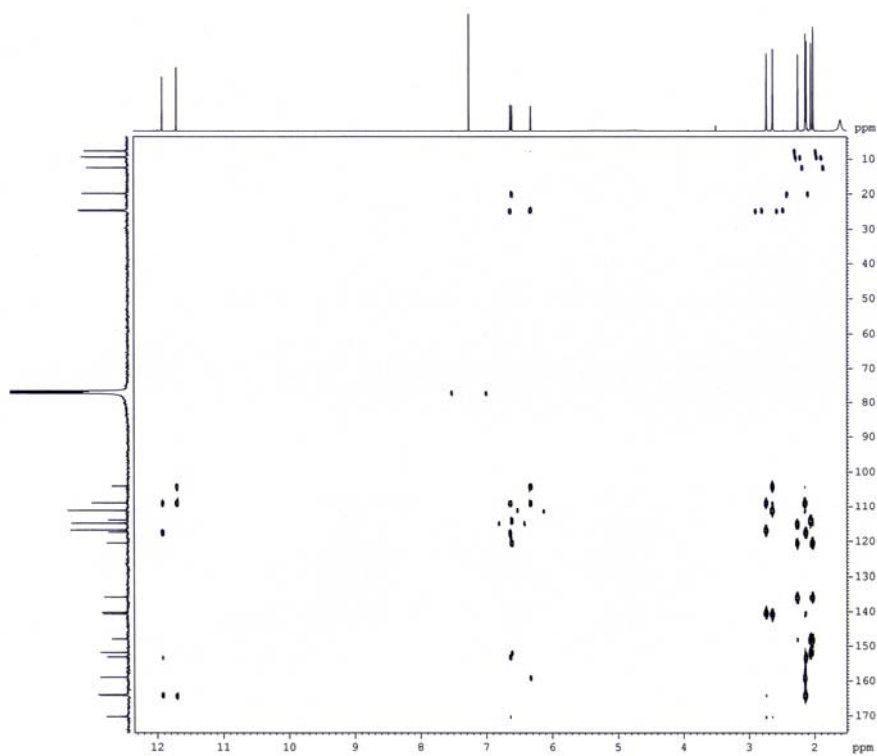
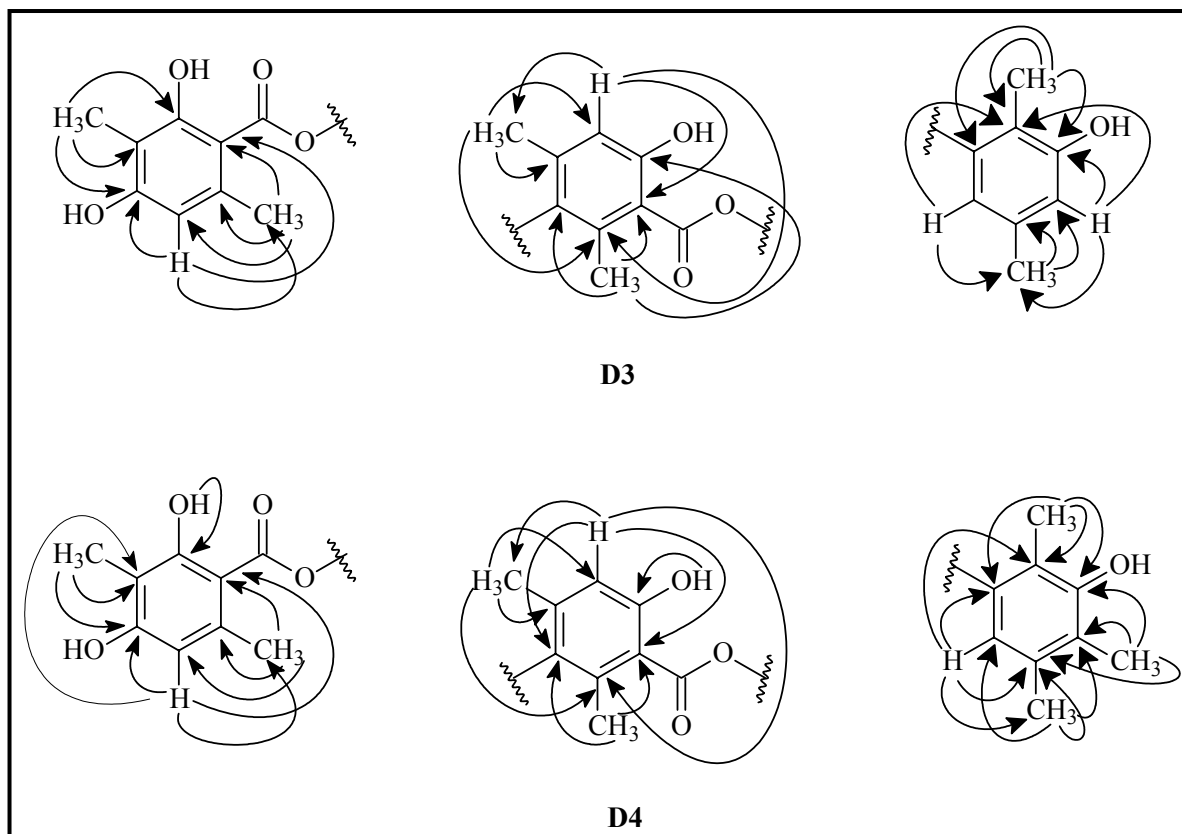


Figura 4.50. Espectro de HMBC de **D4**, (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

Tabela 4.5. Dados espectrais de RMN obtidos para D3 e D4

position	3			4		
	$\delta_C^a$	$\delta_H, \text{mult.}^c$	HMBC <sup>a,d</sup>	$\delta_C^b$	$\delta_H, \text{mult.}^b$	HMBC <sup>b,d</sup>
1	110,9 (C)	-	H-5	108,9 (C)	-	HO-2; H-9; H-5
2	164,0 (C)	-	HO-2; H-8	164,0 (C)	-	HO-2
3	117,3 (C)	-	H-8	117,4 (C)	-	HO-2; H-5; H-8
4	153,2 (C)	-	H-8; H-5	153,2 (C)	-	H-8; H-5
5	116,9 (CH)	6,31 (1H, s)	H-9	116,8 (CH)	6,63 (1H, s)	H-9
6	140,1 (C)	-	H-9	140,2 (C)	-	H-9
7	170,2 (C)	-	-	170,2 (C)	-	-
8	9,3 (CH <sub>3</sub> )	2,13 (3H, s)	-	9,3 (CH <sub>3</sub> )	2,12 (3H, s)	-
9	24,4 (CH <sub>3</sub> )	2,70 (3H, s)	H-5	24,8 (CH <sub>3</sub> )	2,73 (3H, s)	H-5
1'	109,2 (C)	-	H-8'; H-3'	108,9 (C)	-	HO-2'; H-8; H-3'
2'	164,1 (C)	-	H-8'	164,2 (C)	-	HO-2'
3'	111,2 (CH)	6,30 (1H,s)	H-9'	111,2 (CH)	6,32 (1H,s)	H-9'
4'	140,5 (C)	-	H-9'	140,7 (C)	-	H-9'
5'	159,9 (C)	-	H-8'	159,0 (C)	-	H-8'; H-3'
6'	103,6 (C)	-	H-9'; H-3'	104,1 (C)	-	H-9'; H-3'
7'	170,5 (C)	-	-	170,3 (C)	-	-
8'	7,7 (CH <sub>3</sub> )	2,11 (3H, s)	-	7,6 (CH <sub>3</sub> )	2,14 (3H, s)	-
9'	24,5 (CH <sub>3</sub> )	2,62 (3H, s)	H-3'	24,6 (CH <sub>3</sub> )	2,63 (3H, s)	H-3'
1''	155,2 (C)	-	H-7''	151,9 (C)	-	H-7''; H-6''
2''	114,3 (C)	-	H-7''; H-6''; H-4''	114,0 (C)	-	H-7''; H-6''
3''	149,3 (C)	-	H-7''; H-4''	148,0 (C)	-	H-8''; H-7''
4''	114,2 (CH)	6,51 (1H, s)	H-8''	135,8 (C)	-	H-9''; H-8''
5''	137,1 (C)	-	H-8''	120,5 (C)	-	H-9''; H-8''; H-6''
6''	114,0 (CH)	6,58 (1H, s)	-	114,9 (CH)	6,61 (1H, s)	H-9''
7''	9,1(C)	2,05 (3H, s)	-	9,4 (CH <sub>3</sub> )	2,05 (3H, s)	-
8''	21,0 (CH <sub>3</sub> )	2,30 (3H, s)	H-6''; H-4''	12,4 (CH <sub>3</sub> )	2,02 (3H, s)	-
9''	-	-	-	19,9 (CH <sub>3</sub> )	2,25 (3H, s)	H-6''
2 - OH	-	-	-	-	11,92 (1H, s)	-
2' - OH	-	-	-	-	11,70 (1H, s)	-
4 - OH	-	-	-	-	5,21 (1H, s <sub>i</sub> )	-
3'' - OH	-	-	-	-	4,67 (1H, s <sub>i</sub> )	-



Esquema 4.3. Correlações do espectro de HMBC para os compostos **D3** e **D4**

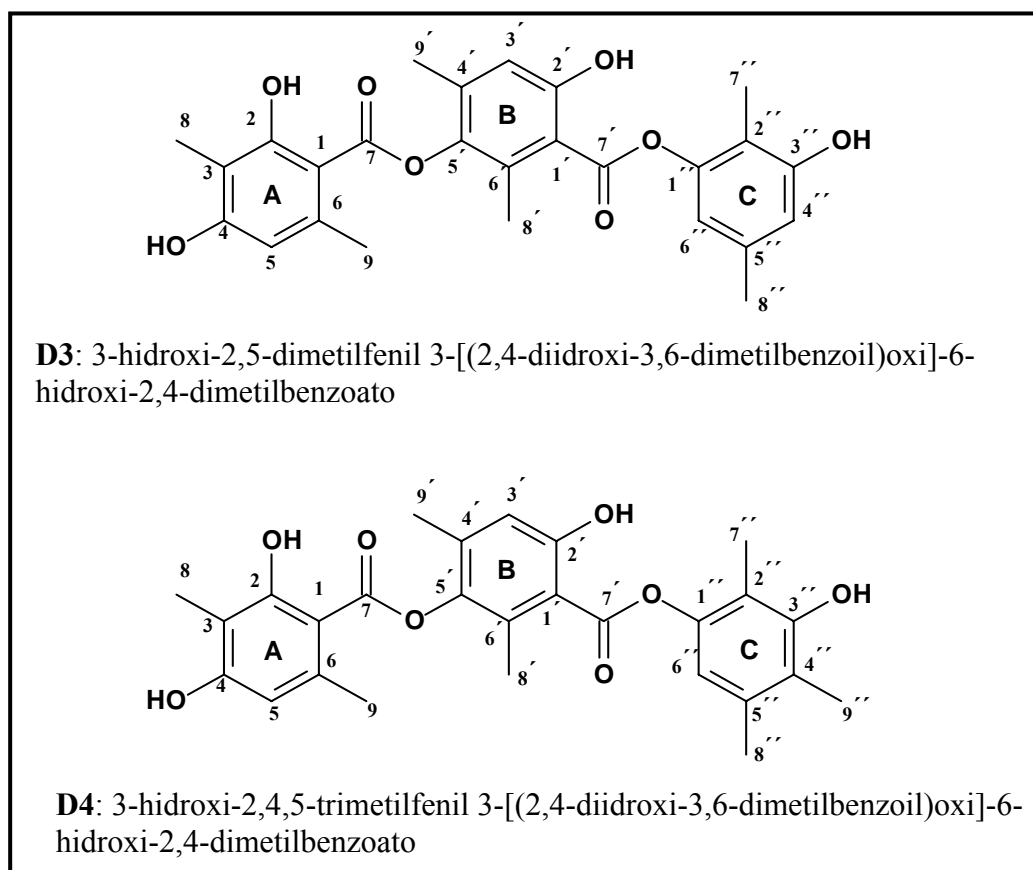


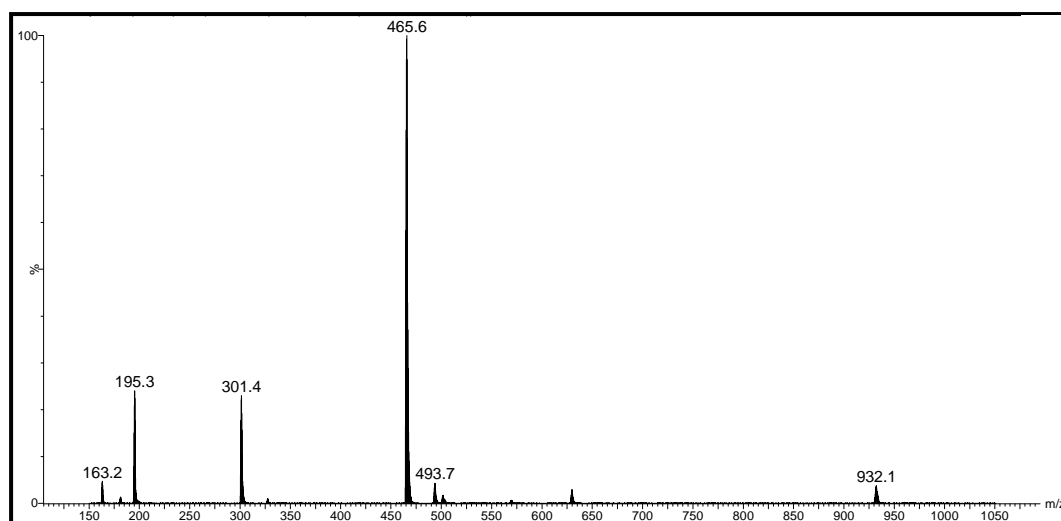
Figura 4.51. Propostas estruturais para as substâncias **D3** e **D4**



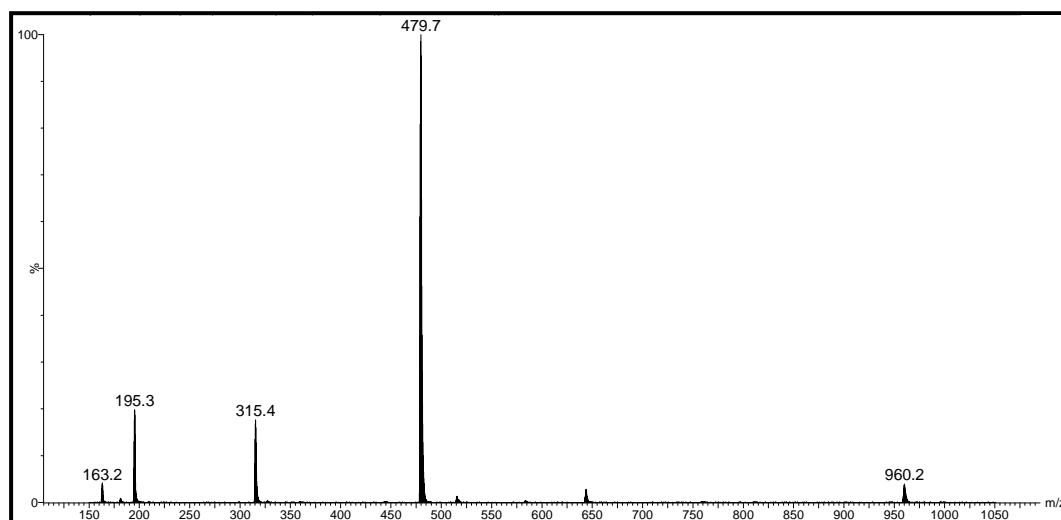
#### 4.6.2.3.1 Estudo de caracterização estrutural por espectrometria de massas das substâncias D3 e D4

Novamente, o uso da espectrometria de massas foi fundamental para a confirmação das estruturas moleculares propostas os depsídeos **D3** e **D4**.

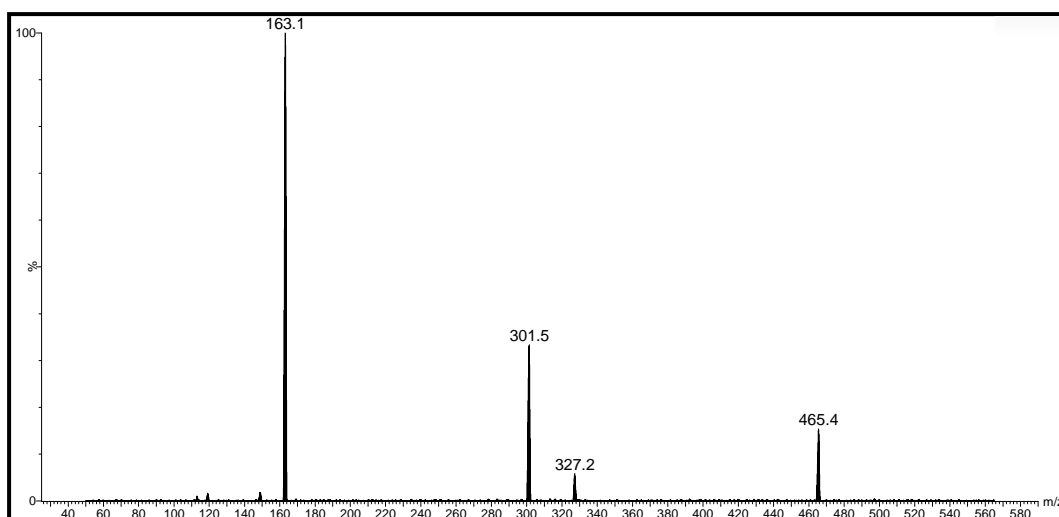
Inicialmente, com as análises em MS de baixa resolução, foi possível a detecção dos íons moleculares desprotonados  $[M-H]^-$  e dos íons fragmentos de cada depsídeo estudado, de acordo com os respectivos espectros de *full scan* e íons produtos mostrados a seguir:



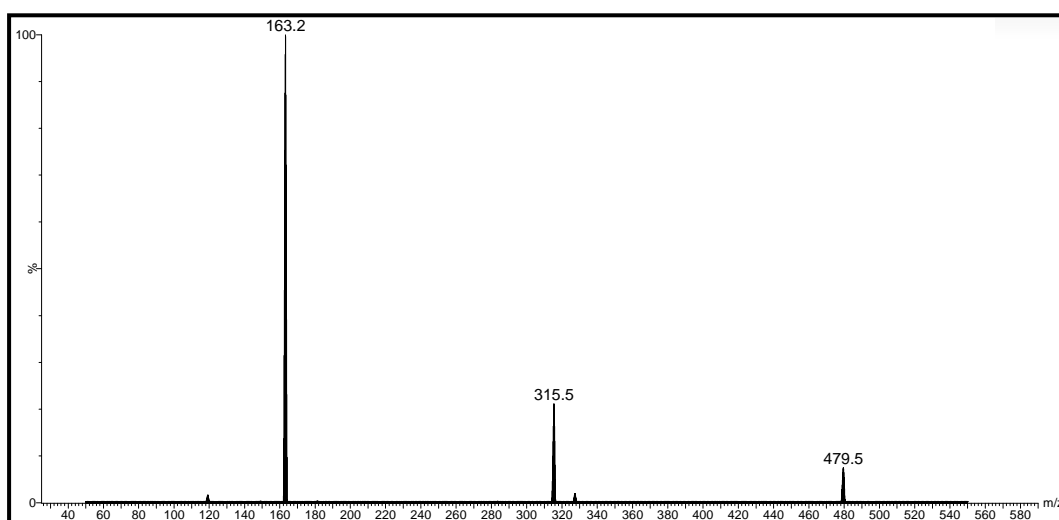
**Figura 4.52.** Espectro de massas *full scan*, *ESI* modo negativo, depsídeo D3



**Figura 4.53.** Espectro de massas *full scan*, *ESI* modo negativo, depsídeo D4



**Figura 4.54.** Espectro de íons produtos, *ESI* modo negativo, 10 eV, depsídeo **D3**



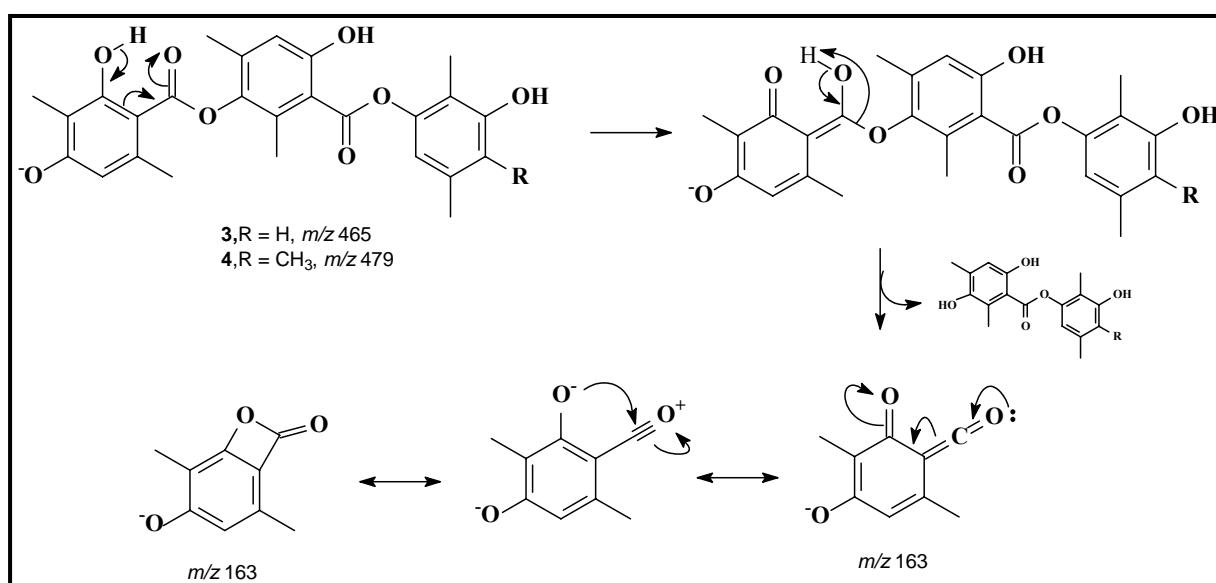
**Figura 4.55.** Espectro de íons produtos, *ESI* modo negativo, 10 eV, depsídeo **D4**

Assim como em **D1** e **D2**, nos espectros de íons produtos de **D3** e **D4**, observam-se poucos fragmentos, dos quais os íons 301, 315 e 163 foram justificados conforme as propostas de fragmentação visualizadas nos Esquemas 4.5 e 4.6.

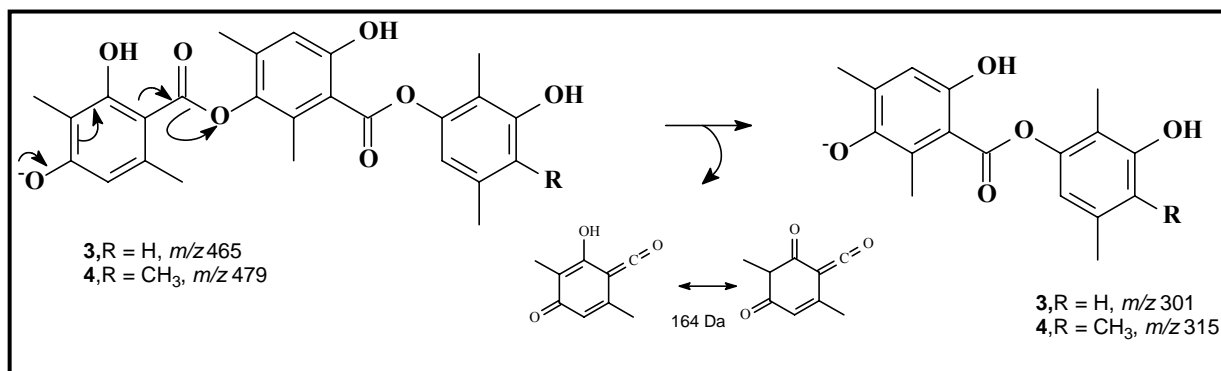
Há a formação do íon comum de  $m/z$  163 entre todos os depsídeos isolados, novamente justificado pela ocorrência de um rearranjo de McLafferty com posterior rearranjo 1,3 de hidrogênio, culminando na formação do íon  $m/z$  163. Com a delocalização seqüencial de elétrons, a partir da unidade carbonílica

formada anteriormente, há o fechamento do anel lactônico e assim a formação da estrutura iônica mais estável (pico base).

Já para os íons fragmentos menos estáveis de  $m/z$  301 e 315, inicialmente foi proposto o sítio de desprotonação na hidroxila não quelada do anel A, com seqüencial delocalização de elétrons, gerando assim a quebra da ligação do anel aromático com a unidade carboxílica. Este mecanismo justifica a perda neutra da estrutura ceto-enólica de 164 Da.



**Esquema 4.4.** Proposta para o mecanismo de fragmentação dos depsídeos **D3** e **D4**, justificando o pico base  $m/z$  163



**Esquema 4.5.** Proposta para o mecanismo de fragmentação dos depsídeos **D3** e **D4**, justificando a perda neutra de 164Da

As análises de **D3** e **D4** em MS e MS/MS de alta resolução em equipamento Synapt HDMS-WATERS- TOF, permitiu a confirmação das estruturas propostas para tais depsídeos, haja vista a coerência dos valores, obtidos e calculados, para os íons moleculares desprotonados no experimento de *full scan* e para os íons fragmentos no experimento de íons produtos, como mostra a Tabela 4.6

Tabela 4.6. Dados obtidos e calculados para as substâncias **D3** e **D4**

Íon ( $m/z$ )	Fórmula	Valor Obtido (Da)	Valor calculado (Da)	Desvio (ppm)
465	$C_{26}H_{26}O_8$	465.1512	465.1542	- 4.5
479	$C_{27}H_{28}O_8$	479.1674	479.1698	- 6.5
301	$C_{20}H_{18}O_5$	301.1068	301.1071	- 4.5
163	$C_9H_7O_3$	163.0397	163.0393	+ 4.5
315	$C_{18}H_{20}O_5$	315.1215	315.1227	- 6.5
163	$C_9H_7O_3$	163.0403	163.0393	+ 6.5

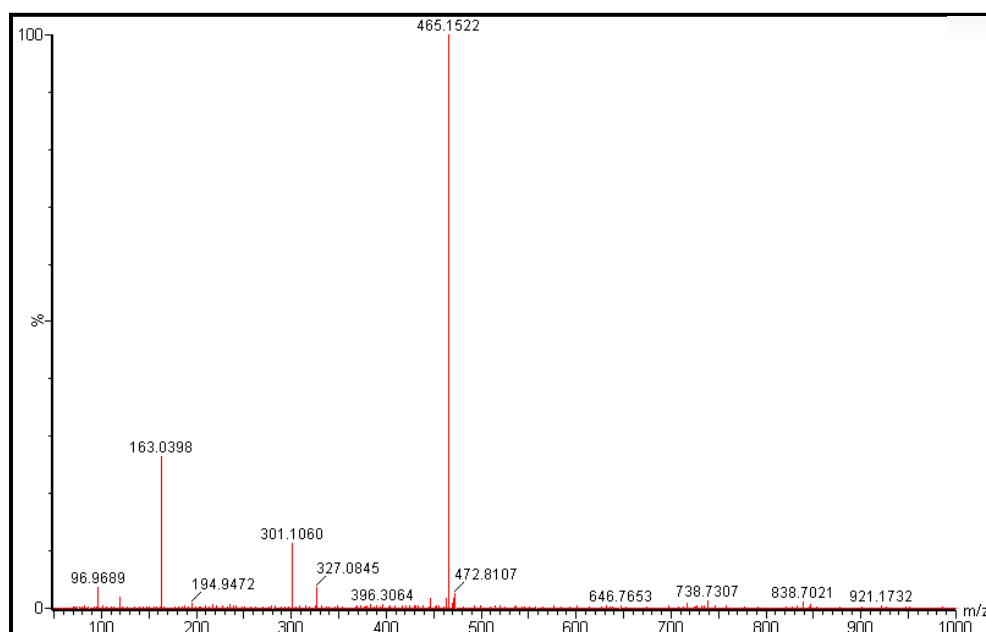
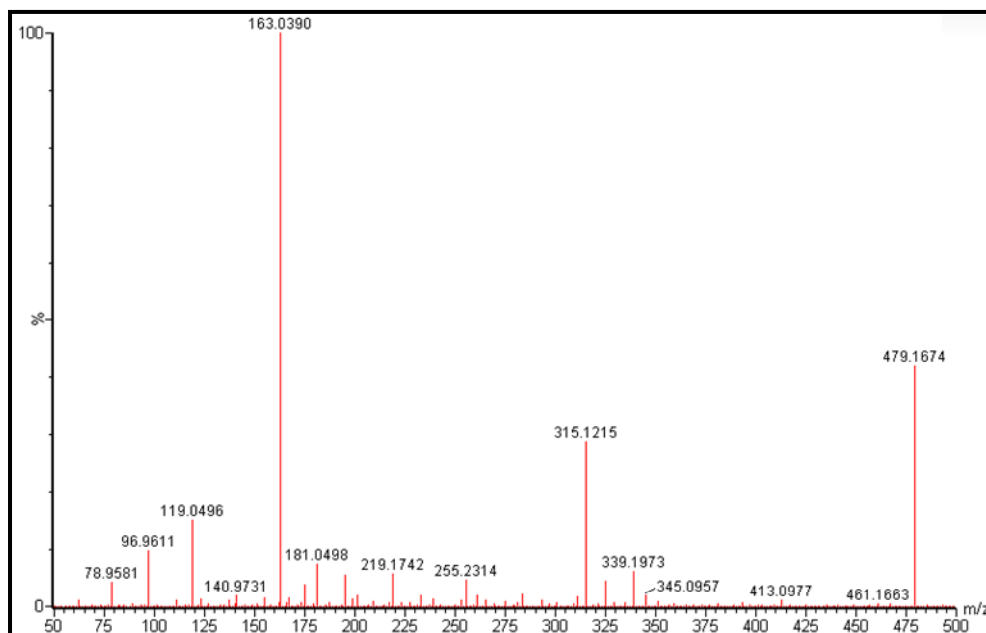
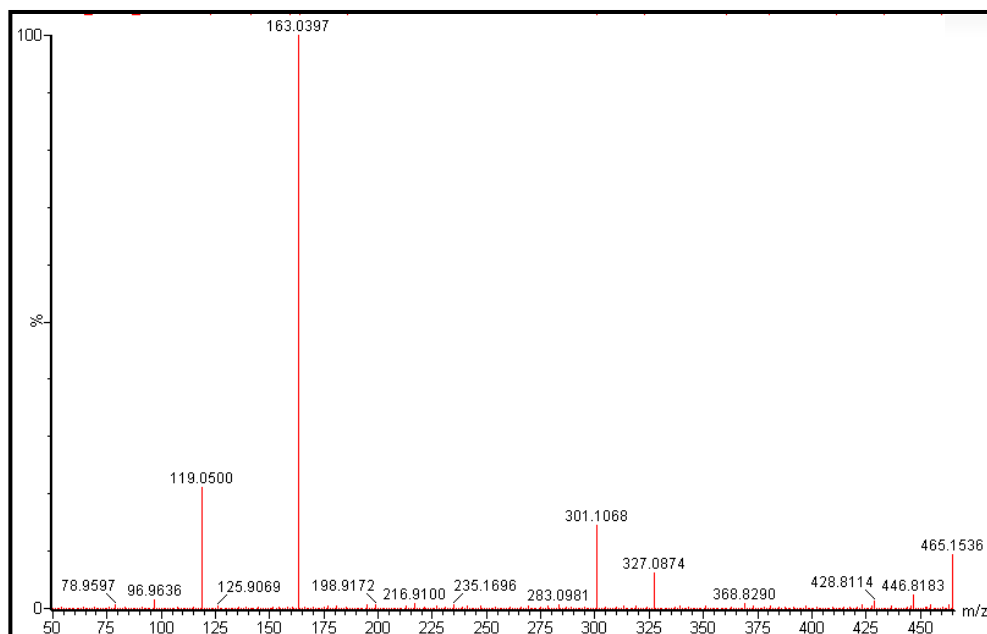


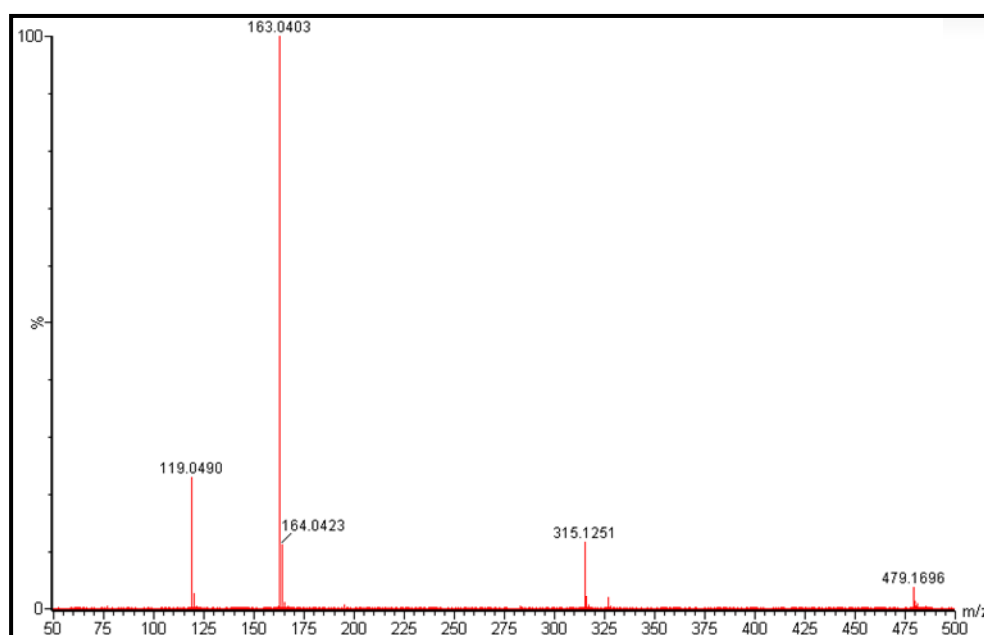
Figura 4.56. Espectro de massas *full scan* em alta resolução, *ESI* modo negativo, depsídeo **D3**



**Figura 4.57.** Espectro de massas *full scan* em alta resolução, *ESI* modo negativo, depsídeo **D4**



**Figura 4.58.** Espectro de íons produtos em alta resolução, *ESI* modo negativo, depsídeo **D3**



**Figura 4.59.** Espectro de íons produtos em alta resolução, *ESI* modo negativo, depsídeo **D4**

Contudo, os estudos de fragmentação dos depsídeos isolados, assim como as informações obtidas nas análises de espectrometria de massas de alta resolução, somados aos dados adquiridos nos experimentos de ressonância magnética nuclear, confirmam as estruturas propostas para os metabólitos produzidos por *C.uredinicola*.

#### **4.7 Estudo do perfil metabólico de *Cladosporium uredinicola* (FG1) em diferentes meios de cultivo via HPLC/UV**

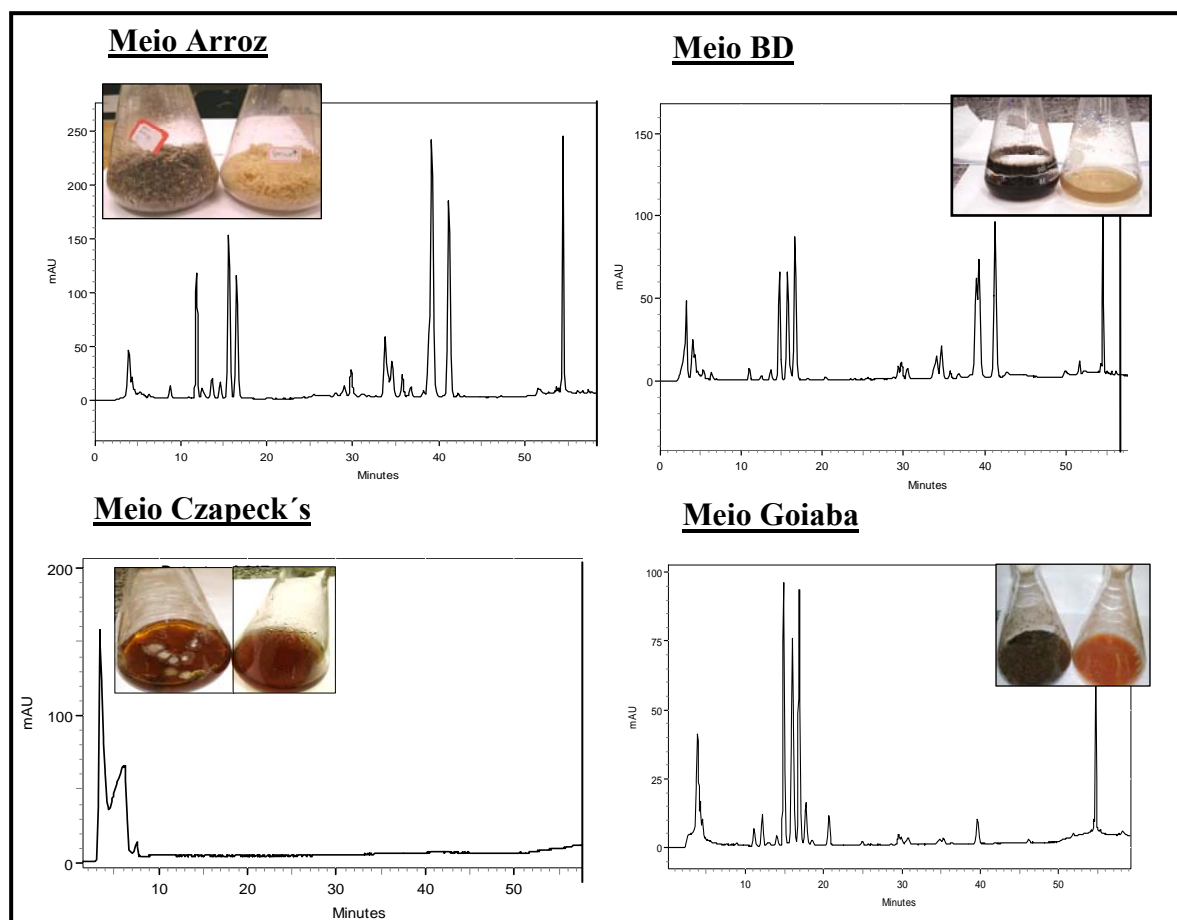
Muitos trabalhos relatam a capacidade de adaptação dos microorganismos mediante a oferta ou carência de nutrientes, sendo esta uma poderosa ferramenta na busca de metabólitos secundários ainda desconhecidos. Na própria natureza, a existência de diferentes meio ambientes, resulta em um diferente transcriptoma, proteoma e por fim, um diferente metaboloma, que

permite ao organismo sobreviver através da mediação de seus diferentes metabólitos secundários, seja pela ativação e/ou desativação de rotas biossintéticas (FIRN, 2000).

Sendo assim, através do cultivo de *C. uredinicola* em diferentes meios de cultura, buscou-se verificar as mudanças no perfil metabólico deste micro-organismo, visando-se otimizar a busca por diferentes metabólitos co-produzidos pelo fungo. Os meios de cultura empregados para o estudo foram os meios líquidos Czapeck's enriquecido com extrato de levedura, BD (batata-dextrose) e meio goiaba (fruta), assim como o meio sólido de arroz. Todos os extratos analisados neste item, referem-se aos extratos miceliais etanólicos de cada meio de cultura (códigos na Tabela 3.3)

Durante as análises em HPLC/UV, foram testados diversos métodos cromatográficos para os diferentes os diferentes tipos de cultivo, buscando-se englobar a detecção de compostos de baixa, média e alta polaridade. No entanto, ao longo das análises, notou-se que o método cromatográfico A (item 3.2.10) apresentou melhores resultados para os meios em arroz, goiaba e BD, mostrando melhor resolução cromatográfica.

Como pode ser visualizado na Figura 4.60, apenas o meio Czapeck's não apresentou boa produção de metabólitos secundários pelo fungo em estudo, tendo em vista a ausência de bandas no respectivo cromatograma, o que era esperado devido ao diminuto crescimento celular fúngico. Em contrapartida, os demais meios revelaram-se bastante promissores à produção metabólica, já que houve o aparecimento de uma quantidade considerável de bandas cromatográficas nas respectivas análises. Tal produção metabólica foi acompanhada pelo bom desenvolvimento micelial de *C. uredinicola* nos referidos meios de cultura.



**Figura 4.60.** Cromatogramas referentes aos diferentes meios de cultura de *C.uredinicola*, método A (item 3.2.10),  $\lambda=275\text{nm}$

Análises anteriores, realizadas nas mesmas condições cromatográficas com os depsídeos isolados puros **D0**, **D1**, **D2**, **D3** e **D4**, revelaram a mesma ordem e tempos de eluição das bandas cromatográficas referentes à 11,79 min (**D0**); 15.49 min (**D1**); 16.36 min (**D2**); 38.97 min (**D3**) e 40.89 min (**D4**) para o cromatograma do extrato de arroz. Os espectros de UV referentes às bandas cromatográficas de interesse também foram processados. Por apresentarem um perfil químico muito próximo, os comprimentos de onda de absorção máxima de cada substância e logo os espectros e UV (Figura 4.62) também são muito semelhantes. Averiguando-se os dados de UV adquiridos durante a análise, nota-se que os comprimentos de onda de maior absorção, em todos os casos, estão em torno de dois valores principais: 217nm e 275nm.



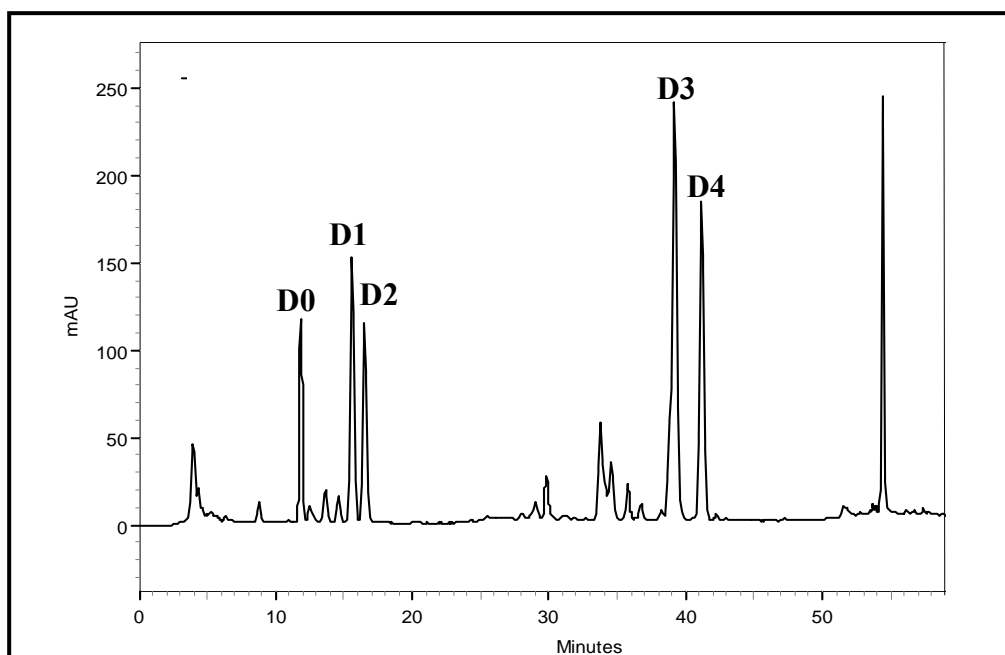


Figura 4.61. Cromatograma do cultivo em arroz de *C. uredinicola* e indicação das bandas referentes a cada depsídeo isolado, método A,  $\lambda=275\text{nm}$

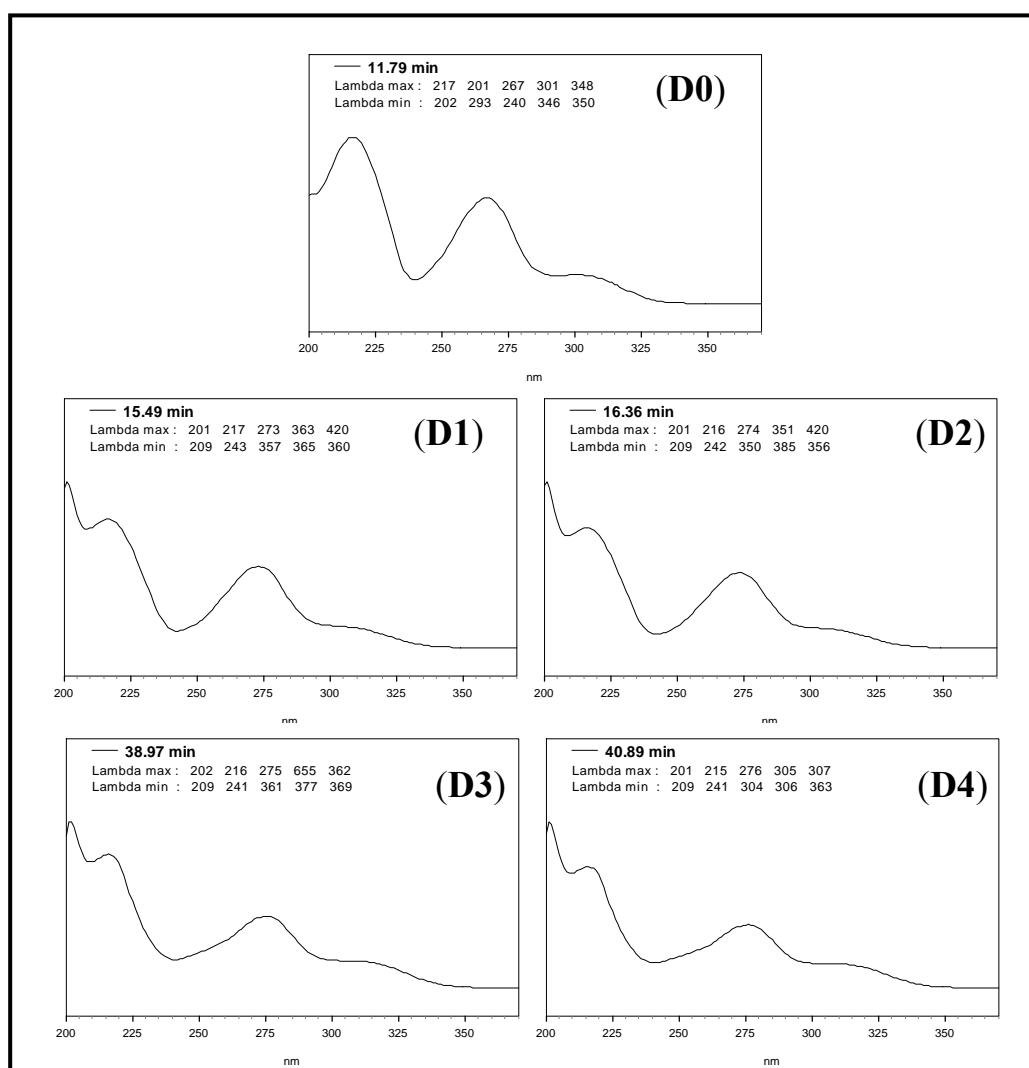
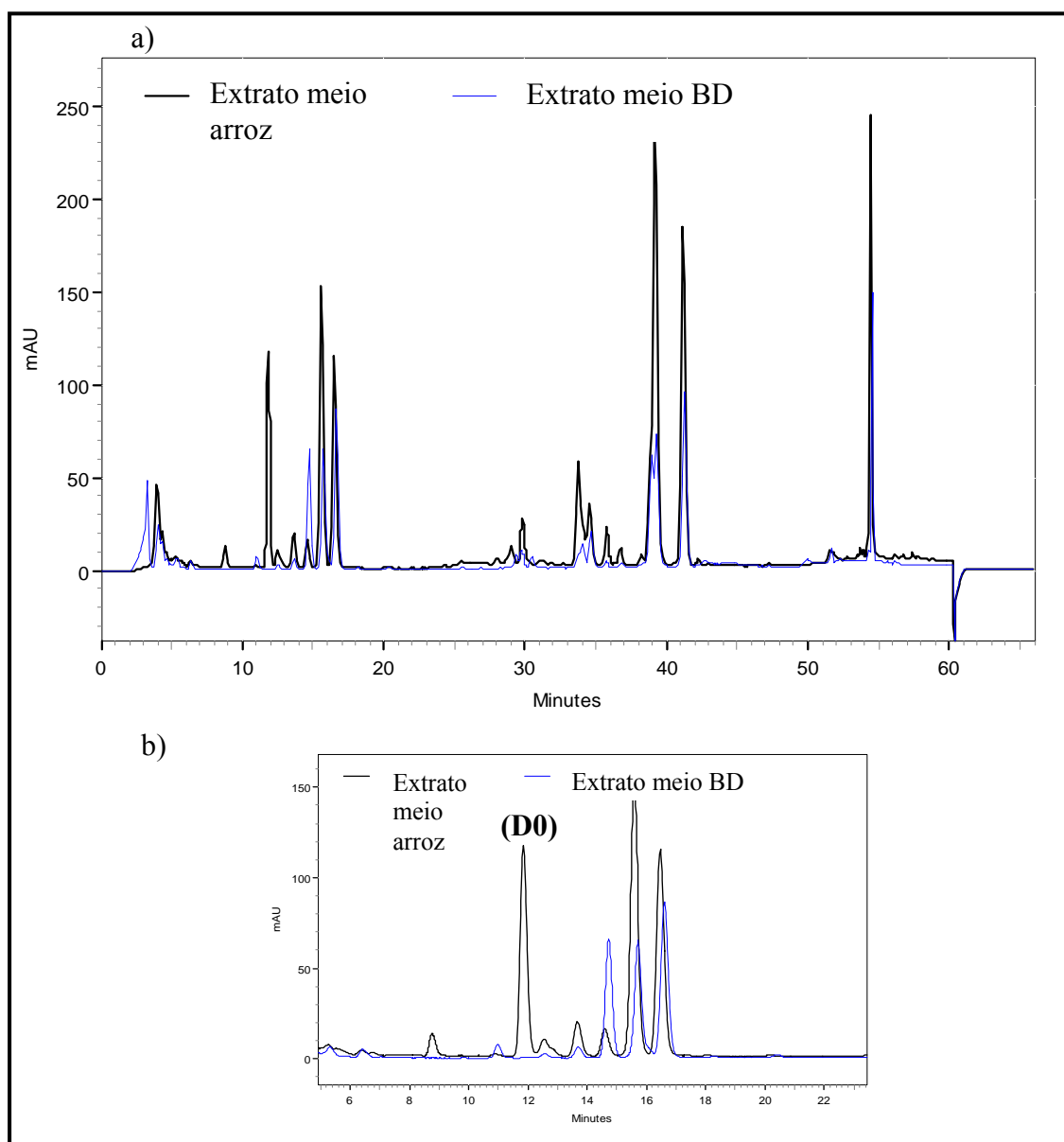


Figura 4.62. Espectros de UV das bandas cromatográficas selecionadas

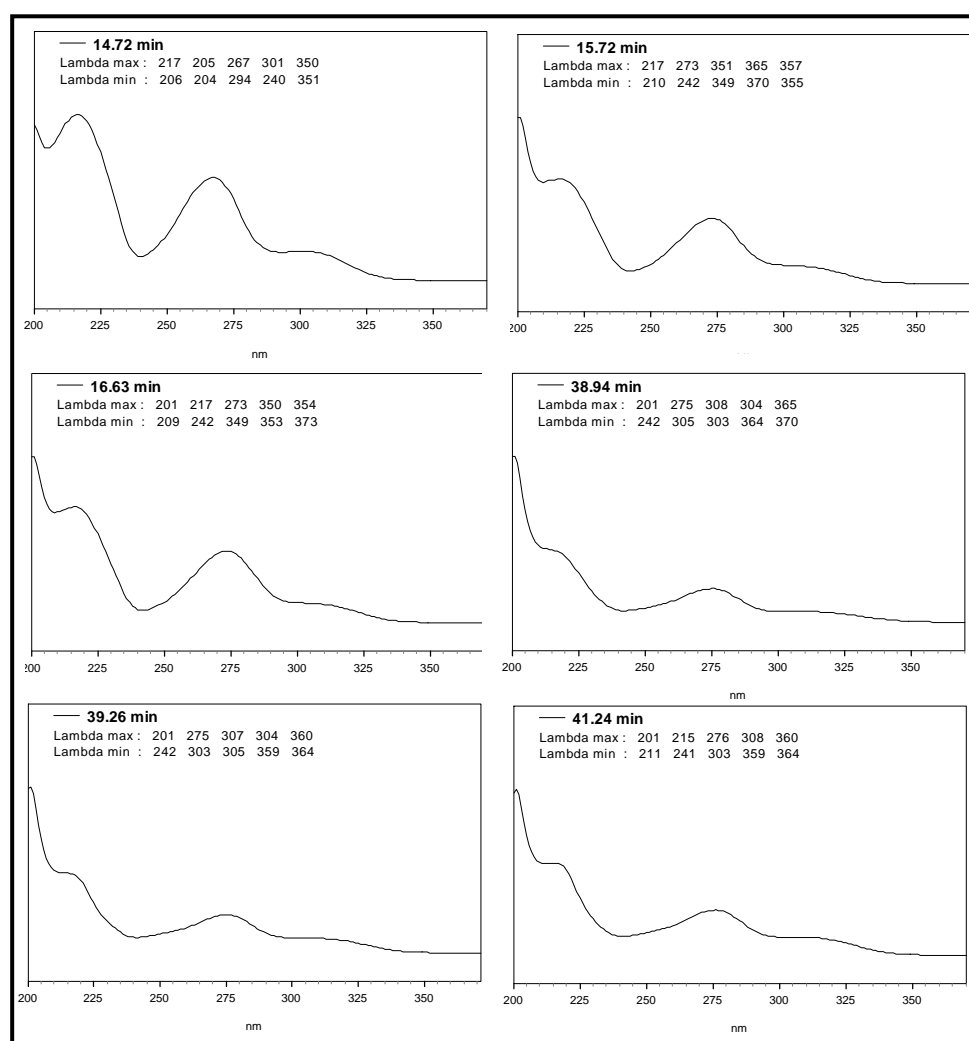
Quando comparados, os cromatogramas do cultivo fúngico em arroz e em batata-dextrose, mostram bandas nas mesmas regiões cromatográficas, com mesmos tempos de retenção, indicando assim, a produção dos mesmos tipos de depsídeos. Porém entre os tempos de retenção entre 10 e 20 minutos é notória a ausência da banda cromatográfica referente ao etil orselanato (**D0**) em meio de cultura BD. Esta evidência sugere que pode ser possível a produção deste composto pelo fungo, e não simplesmente este ser um produto de hidrólise. Isto porque ambos os extratos foram obtidos a partir do mesmo procedimento, ou seja, extração de 24 horas com etanol.



**Figura 4.63.** a) Cromatogramas sobrepostos referentes aos cultivos de *C.uredinicola* em arroz e meio BD. b) Ampliação dos cromatogramas sobrepostos na região de interesse, método A,  $\lambda=275\text{nm}$

No entanto, para a constatação da possível produção deste metabólito pelo micro-organismo, análises mais aprofundadas devem ser realizadas, incluindo extrações com outros solventes que não favoreçam tal reação (hidrólise).

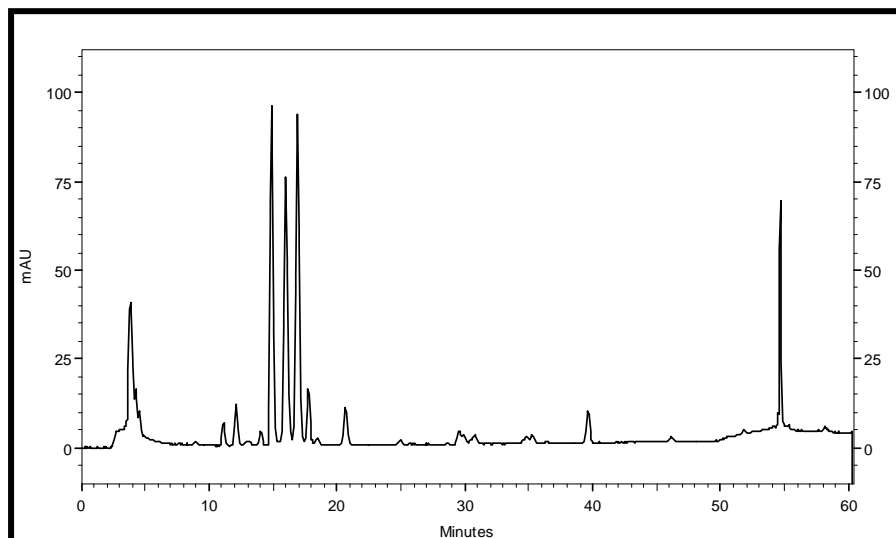
Por tratarem-se dos mesmos compostos, o processamento dos espectros de UV referentes às bandas cromatográficas do extrato em meio BD, apresentou o mesmo perfil de absorção (Figura 4.64):



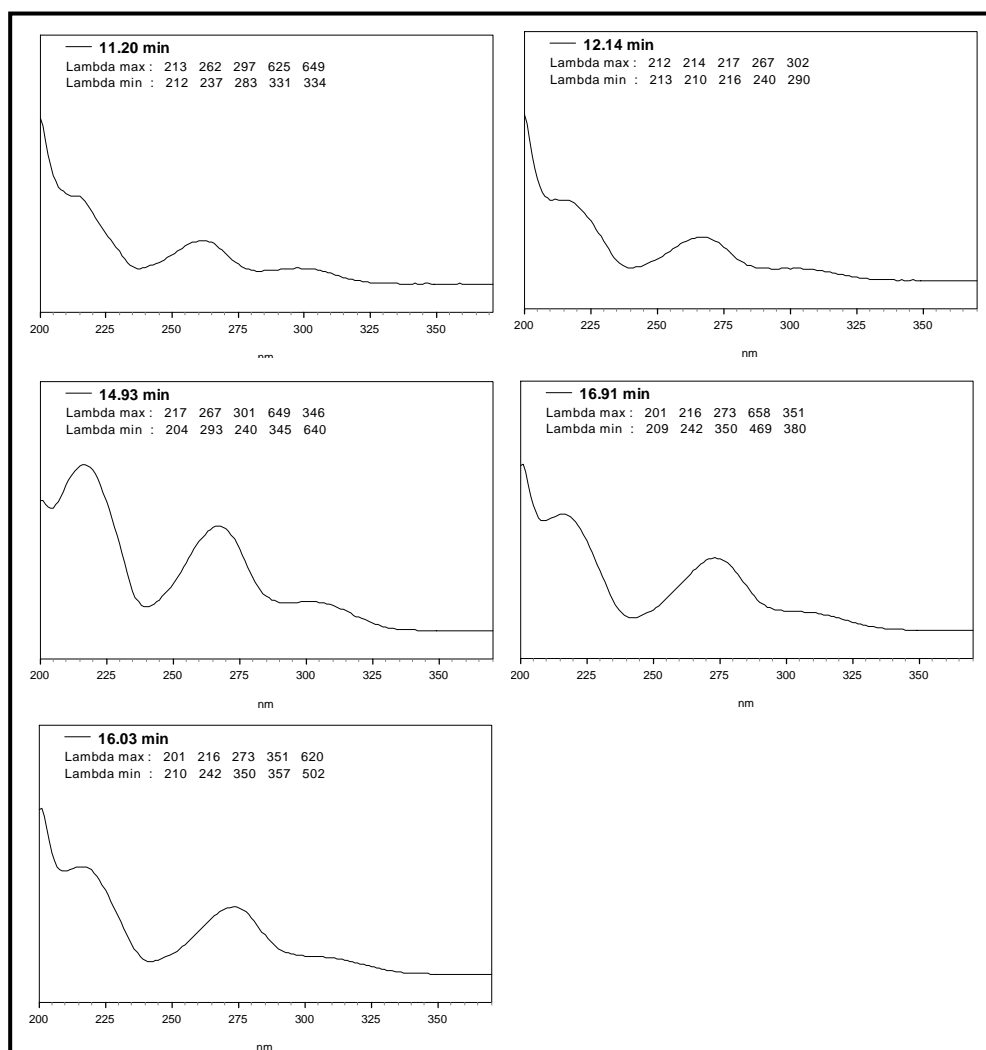
**Figura 4.64.** Espectros de UV referentes ao cromatograma do cultivo de *C.uredinicola* em meio BD

O perfil do cromatograma referente ao cultivo fúngico em meio de cultura utilizando a própria fruta da goiaba (Figura 4.65), revela o favorecimento da produção dos depsídeos com menores tempos de retenção quando comparado aos outros meios de cultura. O processamento dos espectros de UV referentes às

bandas do cromatograma, novamente revelam o mesmo perfil de absorção (Figura 4.66)

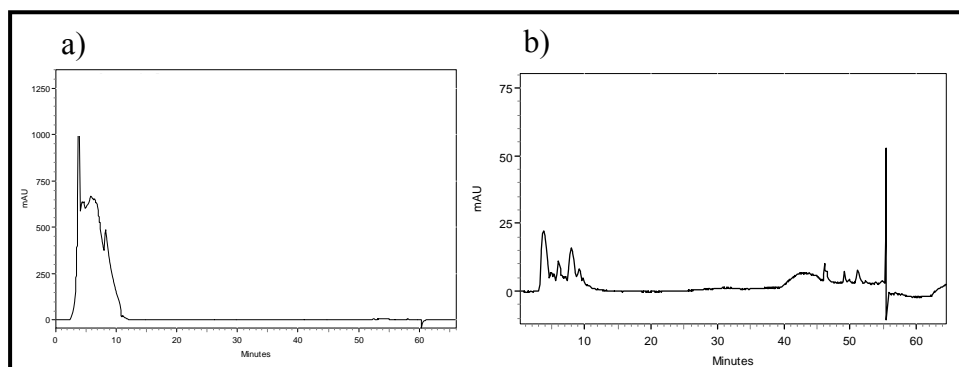


**Figura 4.65.** Cromatograma extrato do cultivo de *C.uredinicola* em meio goiaba, método A,  $\lambda=275\text{nm}$



**Figura 4.66.** Espectros de UV referentes ao cromatograma extrato do cultivo de *C.uredinicola* em meio goiaba

Em todas as análises também foram monitorados os extratos referentes aos meios brancos, ou seja, somente os meios de cultura, sem a adição do micro-organismo, constatando-se a ausência de bandas cromatográficas de interesse monitoradas nos cultivos do fungo como pode ser visualizado na Figura 4.67.



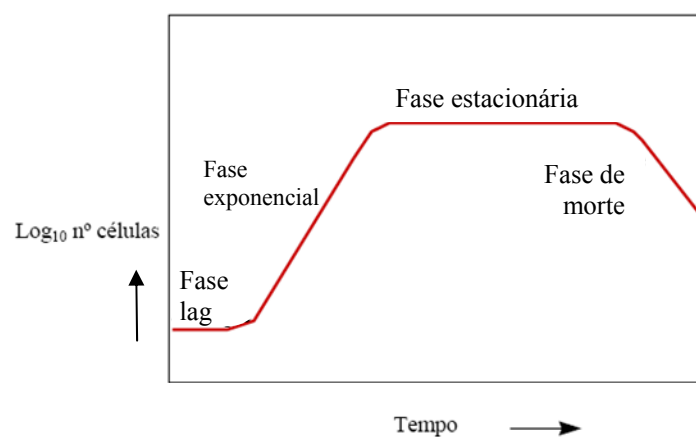
**Figura 4.67.** Cromatogramas dos extratos branco: a) meio BD; b) meio goiaba. Método A,  $\lambda=217\text{nm}$

Contudo, com as análises em HPLC/UV, pôde-se notar a produção metabólica preferencial de uma mesma classe de compostos pelo fungo *C.uredinicola* nos meios de cultura nos quais houve uma boa adaptação deste micro-organismo. O processamento dos espectros de UV referentes a maioria das bandas cromatográficas de menor intensidade, em todos os meios de cultivo, revelaram o mesmo perfil de máximos e mínimos de absorção com relação aos depsídeos já relatados, sugerindo a produção de outros metabólitos de mesma classe. A evidência de produção de outros depsídeos pelo micro-organismo, é corroborada pelos dados obtidos nas análises em espectrometria de massas, inclusive pela possível produção de isômeros, como será detalhado no item 4.9.

#### 4.8 Estimativa da curva de produção dos depsídeos D3 e D4 pelo fungo *C.uredinicola* (FG1) em meio de arroz

Tipicamente, o número de células vivas numa dada cultura, varia com o tempo de acordo com o próprio ciclo de vida microbiano, podendo ser este, dividido em quatro fases características para a maioria dos micro-organismos (BAILEY, 1986): fase lag, na qual há a adaptação do organismo ao meio de cultura, onde nenhum crescimento ocorre; fase log ou exponencial, caracterizada pela boa adaptação do micro-organismo ao meio de cultura, havendo o aumento exponencial do número de células; fase estacionária, na qual se atinge o máximo da população microbiana e a velocidade de crescimento passa a ser zero; e por fim, a fase de morte, na qual há a exaustão de nutrientes e/ou acúmulo de subprodutos metabólicos tóxicos ao próprio micro-organismo, sendo que a velocidade de morte celular supera a do crescimento celular .

O crescimento celular está associado à produção metabólica de forma que, no geral, o metabolismo primário relaciona-se à velocidade de crescimento celular na fase exponencial, assim como, a produção oriunda do metabolismo secundário está interligada à concentração celular, ocorrendo mais intensamente na fase estacionária do ciclo de vida microbiano.



**Figura 4.68.** Curva característica de crescimento microbiano

Tendo em vista a grande capacidade do fungo endofítico associado à goiaba, *C.uredinicola*, em produzir depsídeos, buscou-se investigar mais detalhadamente tal produção, permitindo-se o estabelecimento de uma estimativa para a curva de produção destes compostos. O intuito deste estudo, não foi obter dados quantitativos precisos (o que exigiria procedimentos analíticos e análises mais precisos e confiáveis), mas sim qualitativos, visando a obtenção de um perfil para a curva de produção pretendida, assim como o período aproximado referente à produção metabólica máxima de tais compostos.

Sendo assim, os depsídeos **D3** e **D4** foram escolhidos para o monitoramento da produção em meio de cultura de arroz, nos intervalos de tempo estipulados (item 3.2.15).

Através das análises realizadas em triplicata, via HPLC/UV, e dos devidos tratamentos de dados, foi possível traçar as curvas estimadas para a produção de **D3** e **D4**. Nota-se que o perfil das curvas para ambos os metabólitos é o mesmo, assim como o máximo de produção, que ocorre entre o período de 35 e 40 dias.

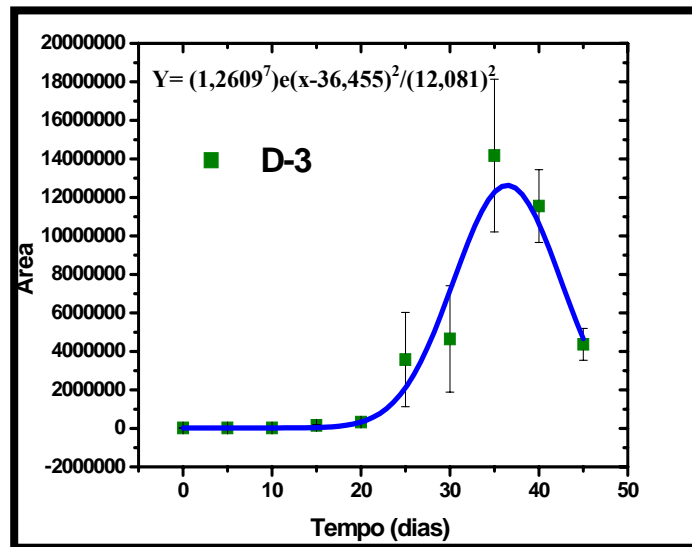


Figura 4.69. Curva de produção estimada para o depsído D3 em meio de cultura de *C.uredinicola* em arroz

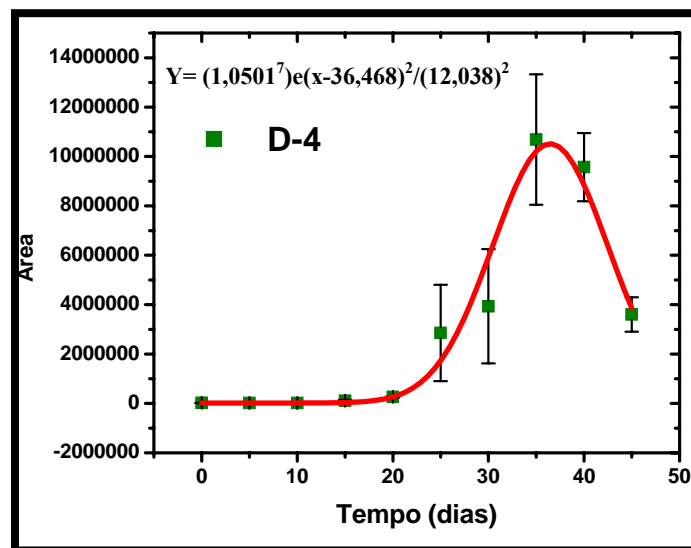
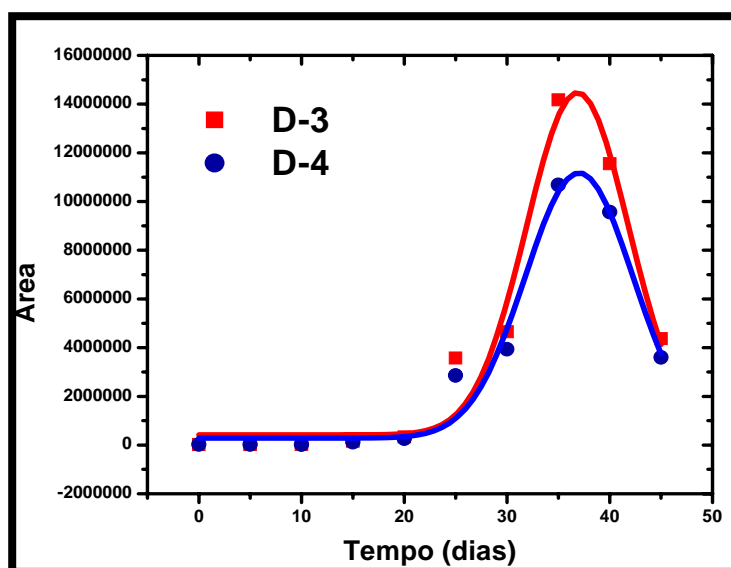


Figura 4.70. Curva de produção estimada para o depsído D4 em meio de cultura de *C.uredinicola* em arroz





**Figura 4.71.** Cromatogramas referentes aos diferentes tempos de cultivo para *C.uredinicola* em arroz; sobreposição das curvas de produção estimadas para os depsídeos **D3** e **D4**

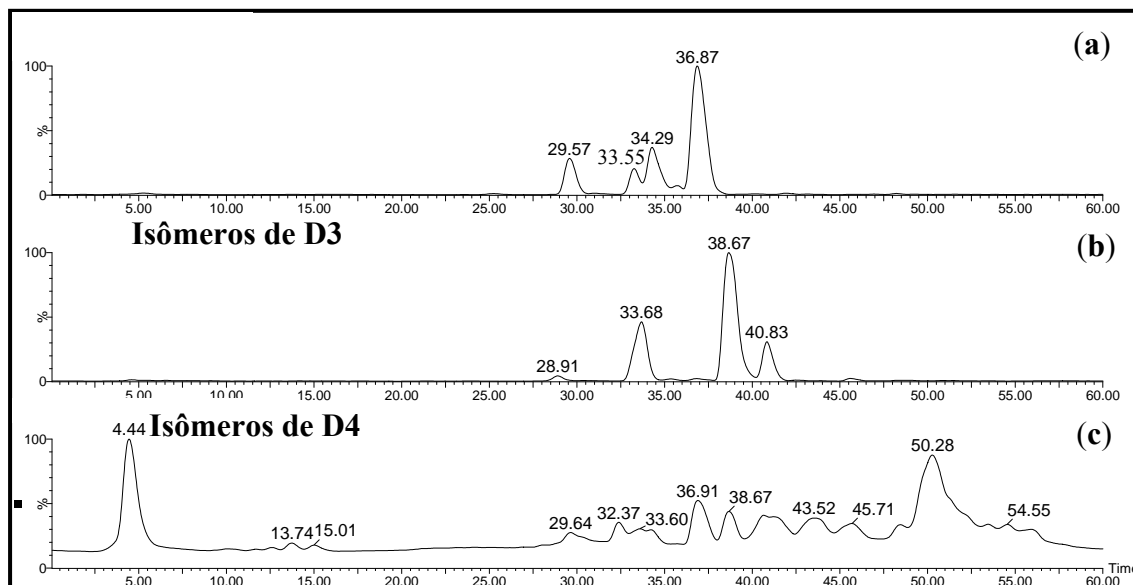
#### 4.9 Detecção de depsídeos co-produzidos por *C.uredinicola* via HPLC-MS/MS

Segundo as análises realizadas em HPLC/UV referentes ao extrato do cultivo de *C. uredinicola* em arroz, houve evidências de que outros possíveis depsídeos estariam presentes no extrato analisado, ou seja, outros depsídeos estariam sendo co-produzidos pelo fungo em relação àqueles já identificados.

Partindo-se destas evidências, investigou-se o extrato de arroz a fim da detecção dos demais depsídeos possivelmente produzidos pelo micro-organismo. Para tanto, utilizaram-se experimentos de MS e MS/MS no modo negativo de ionização, cujas condições de análise encontram-se descritas na seção 3.2.12.

Inicialmente, a investigação partiu para a detecção de possíveis isômeros dos metabólitos já isolados e identificados. Sendo assim, de acordo com os cromatogramas de íons selecionados processados a partir do cromatograma de íons totais do extrato analisado, pôde-se constatar o aparecimento de mais de

uma banda cromatográfica, em tempos de retenção distintos, para cada íon selecionado, ou seja, os íons de  $m/z$  465 e  $m/z$  479. Tal resultado encontra-se ilustrado na Figura 4.72.



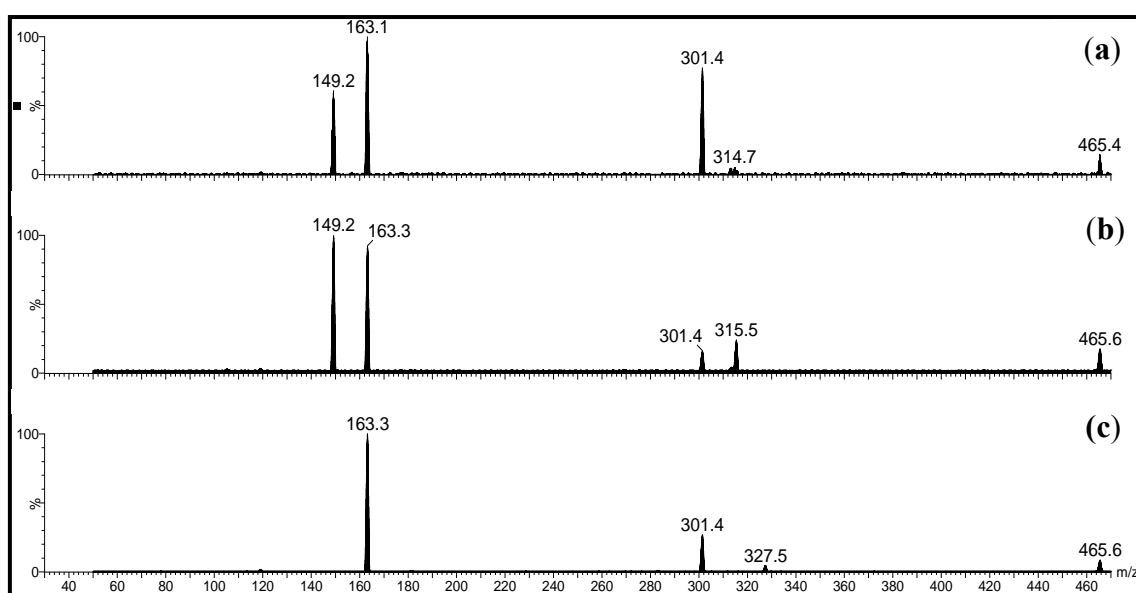
**Figura 4.72.** a) Cromatograma de íons selecionados para  $m/z$  465; b) cromatograma de íons selecionados para  $m/z$  479; c) cromatograma de íons totais do extrato do cultivo de FG1 em arroz.

Para correlacionar o perfil de cada íon de relação  $m/z$  específica, foi necessária a realização do experimento de íons produtos de cada relação  $m/z$ , selecionados de acordo com a respectiva banda cromatográfica de origem, no cromatograma de íons selecionados.

Quando comparados, os espectros de íons produtos  $m/z$  465 correspondentes a cada banda cromatográfica, apresentam diferenças com relação ao perfil de fragmentação e a intensidade dos íons formados. O depsídeo isolado **D3**, cuja banda possui retenção de 36.87min., apresenta em destaque dois íons fragmentos, de  $m/z$  301 e 163(Figura 4.73c). Neste caso, o íon de  $m/z$  163 é o íon mais estável. Já para o íon molecular cujo tempo de retenção é de 34.29min., há o aparecimento dos íons de  $m/z$  315 e 149(Figura 4.73b), inexistentes no espectro de íons produtos de **D3**. As estabilidades dos íons de

$m/z$  149 e 301, referente ao íon de tempo de retenção em 33.55 (Figura 4.73a), é o fator que o diferencia do íon molecular em 34.29 min. (Figura 4.73b).

Através da identificação de um perfil diferenciado de fragmentação nos espectros de íons produtos de relação  $m/z$  465, pode-se concluir que o fungo *C.uredinicola* foi capaz de produzir isômeros do depsídeo formado por 466 unidades de massa.

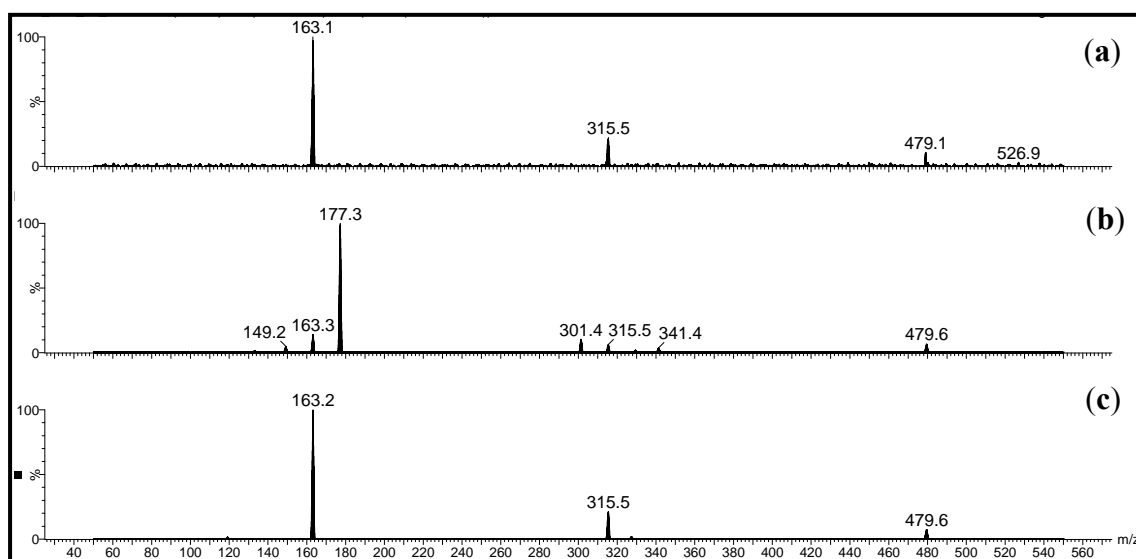


**Figura 4.73.** espectros de íons produtos referentes a relação  $m/z$  465 nos tempos de retenção em a) 33.55min; b) 34.29 min; c) 36.87 min

O mesmo procedimento de análise foi adotado para comparações entre os íons de relação  $m/z$  479, correspondente a mesma massa do depsídeo isolado **D4** desprotonado. Neste caso, o íon molecular de  $m/z$  479 referente à banda cromatográfica em 33.68 min. (Figura 4.63b), apresenta um perfil bastante diferenciado de fragmentação quando comparado à fragmentação do íon molecular de tempo de retenção em 38.67 (Figura 4.63c), ou seja, de **D4**. Isto porque há a existência do pico base de  $m/z$  177 em oposição à  $m/z$  163, pico base de **D4**. Além disto, também há a ocorrência dos fragmentos de  $m/z$  149 e 315, ausentes na fragmentação do depsídeo isolado. Tal perfil diferenciado não ocorre quando compara-se o espectro de íons produtos do íon de  $m/z$  479 em

28.91 min (Figura 4.74a) com o de **D4** (Figura 4.74c). Tanto os íons produtos como a estabilidade destes, é a mesma para ambos os íons moleculares de origem. Neste caso, a realização de outros tipos de experimentos seria necessária para a distinção dos possíveis isômeros.

Contudo, é possível sugerir a produção de isômeros de massa 480 Da produzidos pelo fungo isolado de goiaba.

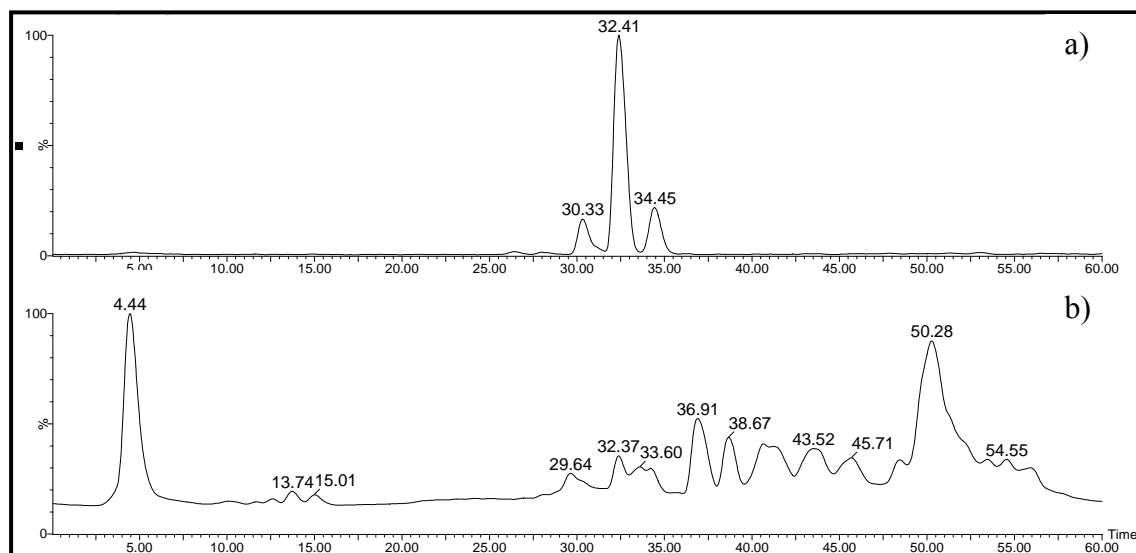


**Figura 4.74.** Espectros de íons produtos referentes a relação  $m/z$  479 nos tempos de retenção em a) 28.91 min; b) 33.68 min; c) 38.67 min

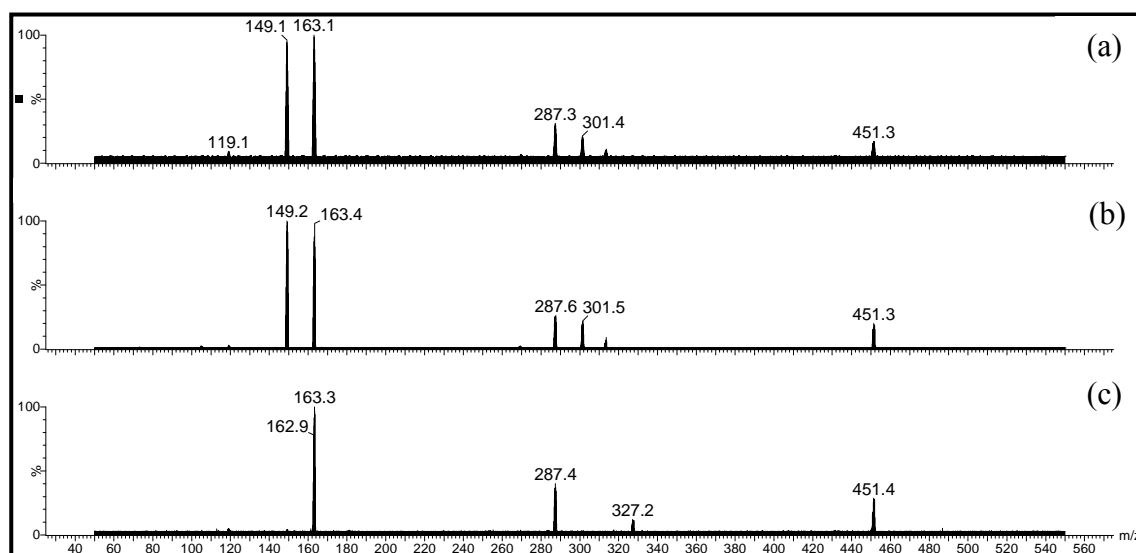
Posteriormente à busca pela detecção de possíveis isômeros dos depsídeos isolados a partir do cultivo de FG1 em arroz, investigou-se o extrato, a fim de se detectar outros depsídeos, de massas moleculares distintas àquelas conhecidas.

O procedimento de estudo foi o mesmo relatado anteriormente, no caso dos depsídeos isômeros. Foi possível através do estudo, detectar um possível depsídeo de relação  $m/z$  451. Esta suposição pode ser feita devido aos indícios encontrados, como por exemplo a ocorrência de íons produtos de  $m/z$  163, 149 e 301. Neste caso, foi detectado pela primeira vez, o íon de  $m/z$  287.

Como no caso anterior, foram detectadas diferentes bandas cromatográficas, relacionadas à mesma  $m/z$  (Figura 4.75a), sugerindo a existência de isômeros do íon molecular de  $m/z$  451, o que é evidenciado pelos distintos perfis de fragmentação, ilustrados nos espectros da Figura 4.76.

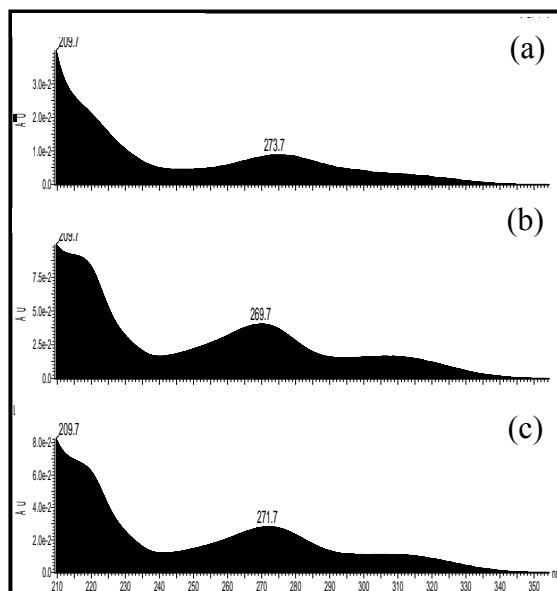


**Figura 4.75.** a) Cromatograma de íons selecionados para  $m/z$  451; b) cromatograma de íons totais do extrato do cultivo de FG1 em arroz



**Figura 4.76.** Espectros de íons produtos referentes a relação  $m/z$  451 nos tempos de retenção em a) 30.33min; b)32.41 min; c) 34.45 min

Os espectros de UV das respectivas bandas cromatográficas, corroboram para a suposição do íon molecular desprotonado  $m/z$  451 se tratar de um depsídeo ( Figura 4.77).

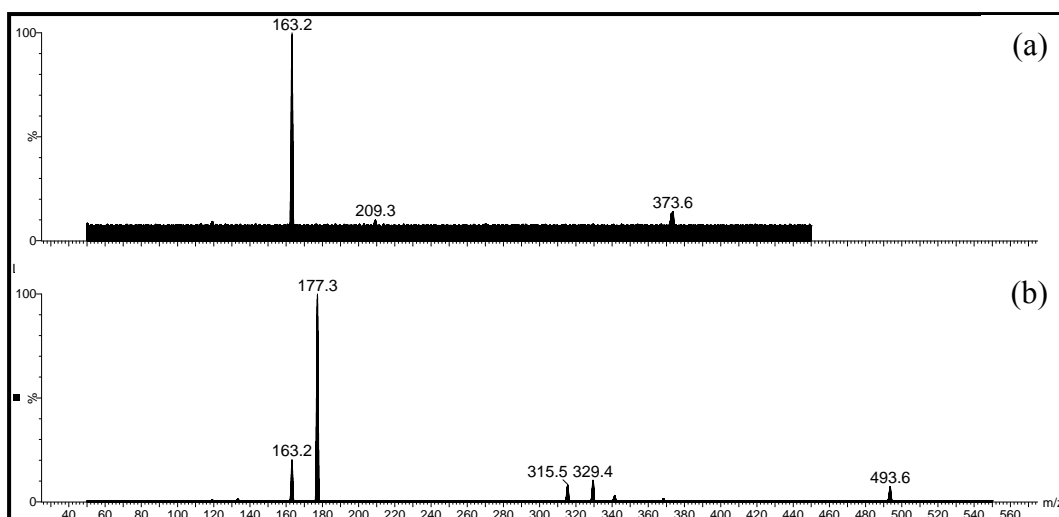


**Figura 4.77.** Espectros de UV referentes a relação  $m/z$  451 nos tempos de retenção em a) 30.33min; b)32.41 min; c) 34.45 min

Durante a continuidade dos estudos para detecção de depsídeos co-produzidos por *C.uredinicola*, verificou-se a presença de dois possíveis metabólitos dessa classe de substâncias em extrato de arroz. As relações  $m/z$  dos referidos íons moleculares encontrados são 493 e 373. De acordo com as informações obtidas via os respectivos espectros de íons produtos (Figura 4.78), pode-se fazer algumas suposições a respeito destes possíveis depsídeos.

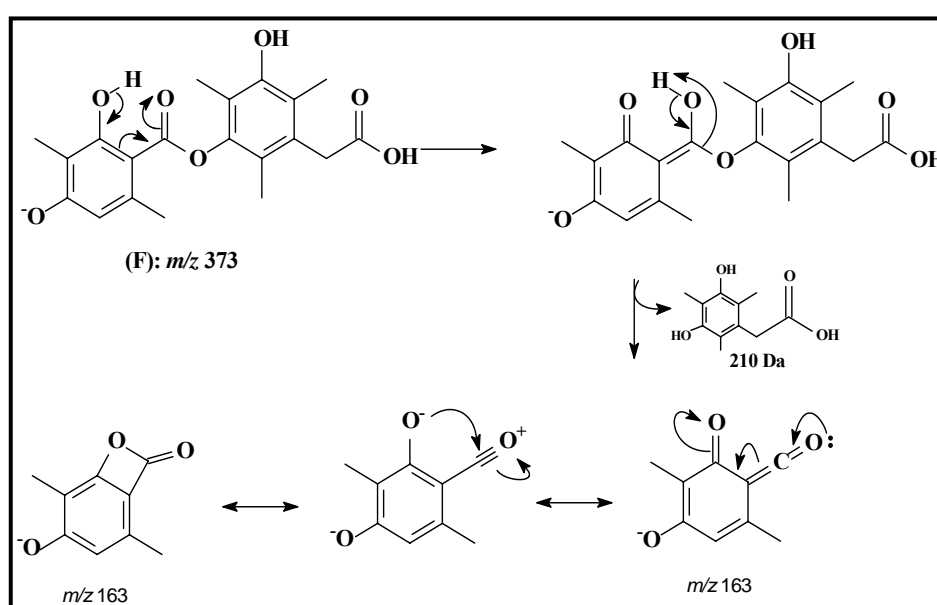
O íon de  $m/z$  493, possui 14 unidades de massa a mais em relação ao íon  $m/z$  479 e também possui o íon comum a todos os depsídeos detectados,  $m/z$  163. Logo, pode-se supor um provável depsídeo estruturalmente semelhante ao depsídeo **D4**, de  $m/z$  479, porém com uma metila substituindo um dos hidrogênios aromáticos de **D4**.

Já para o suposto metabólito de  $m/z$  373, a diferença com relação ao depsídeo **D2** é de 58 unidades de massa.

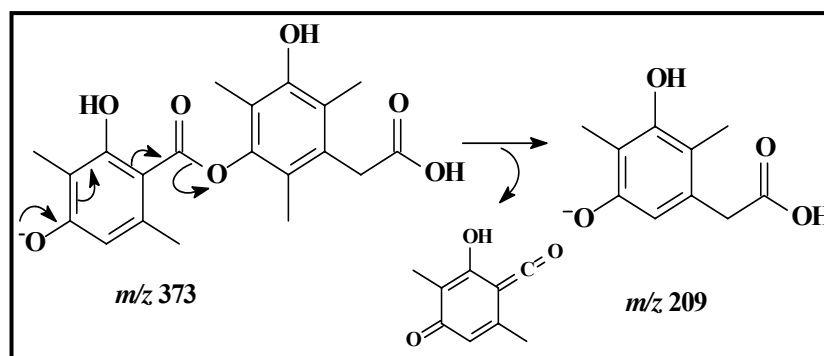


**Figura 4.78.** Espectros de íons produtos referentes a supostos depsídeos de íon molecular a)  $m/z$  373; b) 493

Esta diferença poderia corresponder a uma unidade de ácido carboxílico ( $-H_2CCO_2$ ) substituindo um hidrogênio diretamente ligado a um anel aromático. Corroborando para tal proposta, tem-se a presença dos íons produtos  $m/z$  209 e  $m/z$  163 a partir da fragmentação do íon molecular desprotonado. A ocorrência destes únicos íons no espectro de íons produtos, inclusive, tendo o íon  $m/z$  163 como pico base, assim como das perdas neutras de 164 Da e 210 Da, leva à suposição da estrutura (F), cujos mecanismos de fragmentação são propostos abaixo:



**Figura 4.79.** Proposta para o mecanismo de fragmentação da estrutura suposta (F), justificando o pico base  $m/z$  163



**Figura 4.80.** Proposta para o mecanismo de fragmentação da estrutura suposta (F), justificando o íon  $m/z$  209

Através das análises relatadas, é possível sugerir que o fungo *C.uredinicola* foi capaz de produzir outros depsídeos além daqueles isolados e identificados a partir do cultivo fúngico em arroz, incluindo um número expressivo de isômeros. Este fato, evidencia a grande capacidade deste fungo em produzir tal classe de compostos, sendo que o metabolismo deste micro-organismo parece estar voltado ao favorecimento da rota biossintética destes policetídeos.

#### 4.10 Detecção de depsídeos em extratos da fruta goiaba (*Psidium guajava*) via HPLC-MS/MS

A goiaba é considerada um produto agrícola de importância comercial principalmente em países tropicais e subtropicais. A planta em sua totalidade (*Psidium guajava*) é amplamente utilizada na medicina popular mundial, o que reflete as várias propriedades bioativas de seus constituintes químicos (GUTIÉRREZ, 2008). Muitos metabólitos já foram isolados a partir desta espécie pertencente à família Myrtaceae, porém nenhum policetídeo do grupo dos depsídeos ainda foi isolado ou detectado nesta planta.

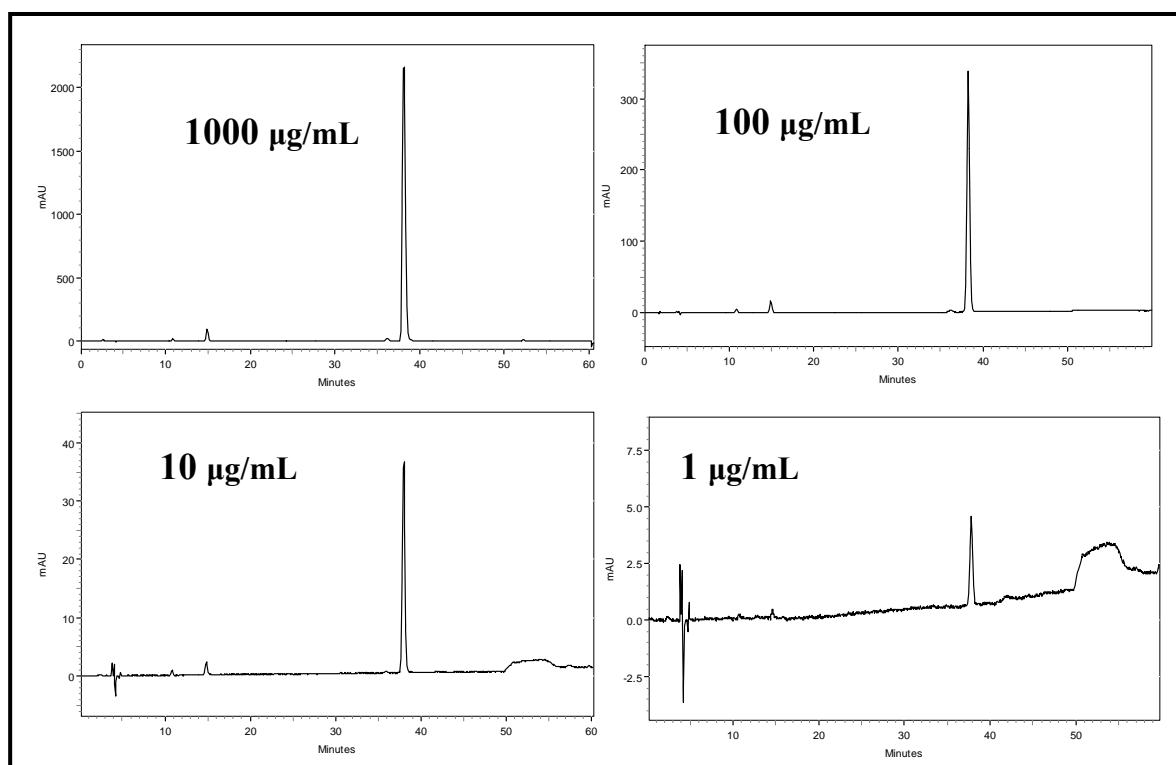
Sendo assim, pelo fato do fungo *C.uredinicola* ter sido isolado como um endofítico associado à fruta da goiaba, seria pertinente que estudos fossem realizados visando a detecção de depsídeos na mesma, tendo em vista a grande



capacidade deste micro-organismo em biossintetizar tais moléculas. A possibilidade de produção destes compostos na própria fruta pelo fungo em questão, além obviamente, do consumo de tais substâncias pelo homem, através da ingestão da fruta, são fatos que justificam a importância de tal estudo.

Com o intuito de detecção dos depsídeo **D3** e **D4** na fruta da goiaba, inicialmente realizaram-se análises via HPLC/UV. Para tanto, verificou-se o limite de detecção de cada depsídeo estudado para esta técnica, injetando-se diferentes concentrações das substâncias no equipamento. As concentrações injetadas foram de 1mg/mL, 100µg/mL, 10 µg/mL e 1 µg/mL, em triplicata. Os comprimentos de onda monitorados foram os de máxima absorção para os metabólitos estudados, 217 e 275nm.

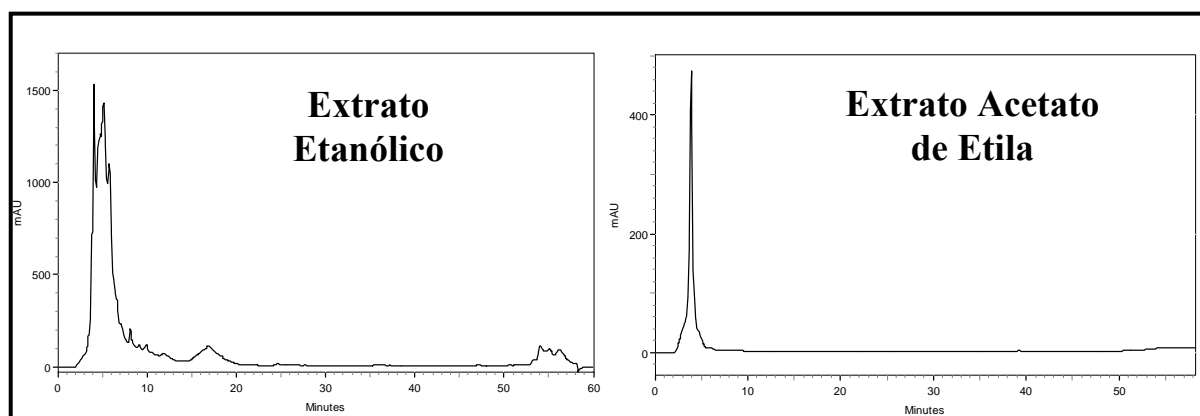
Os cromatogramas obtidos para os depsídeos **D3** e **D4** (Figura 4.81) apresentaram bandas com intensidades de absorção equivalentes. Para uma melhor margem de erro, utilizou-se o limite de detecção equivalente ao de quantificação, considerando-se a relação sinal/ruído igual a 10. Com a análise,



**Figura 4.81.** Cromatogramas referentes às diferentes concentrações do depsídeo **D4**, método A, 275nm

constatou-se que o equipamento apresentou um limite de detecção das substâncias monitoradas igual a  $1\mu\text{g/mL}$ , como pode ser visualizado na Figura 4.81.

Sequencialmente, foram realizadas as análises do extrato etanólico e de acetato de etila da fruta goiaba, obtendo-se os cromatogramas visualizados na Figura 4.82. Os extratos da fruta foram obtidos através dos procedimentos detalhados no item 3.2.13.



**Figura 4.82.** Cromatogramas referentes aos extratos etanólico e de acetato de etila da fruta goiaba, método A, 275nm

Portanto, devido à ausência das respectivas bandas cromatográficas, constatou-se que não houve a detecção dos depsídeos monitorados pela técnica HPLC/UV. Trabalhou-se então com duas possibilidades possíveis: não há de fato a existência de tais metabólitos na fruta, ou, as quantidades existentes dos depsídeos monitorados são inferiores ao limite de detecção da técnica analítica utilizada ( $1\mu\text{g/mL}$ ).

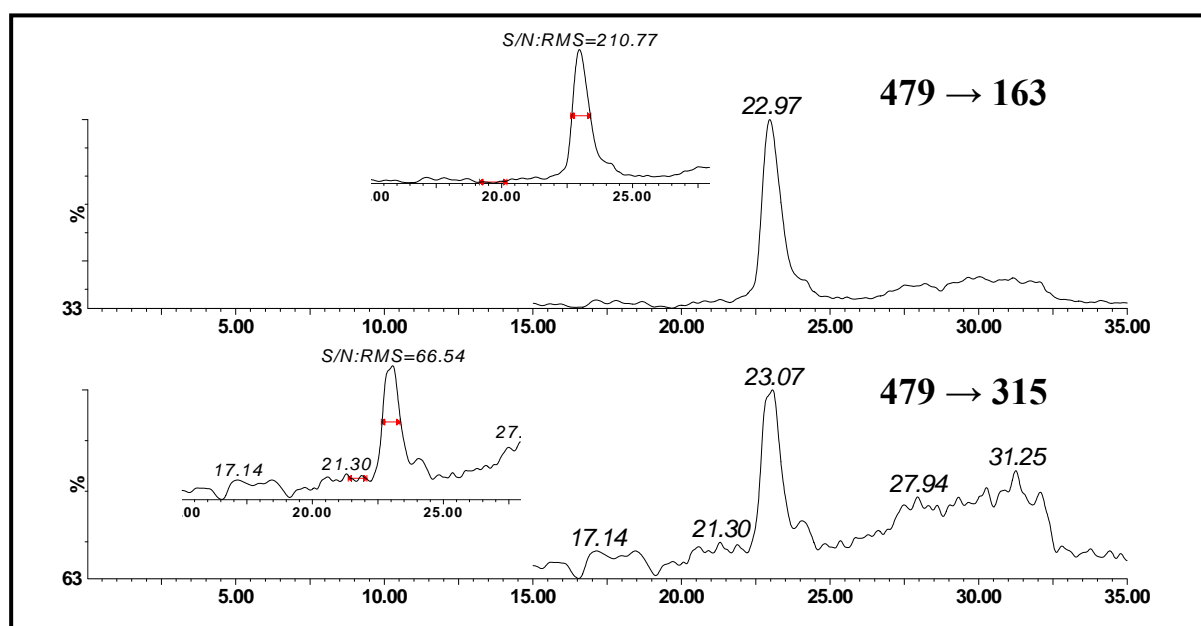
Logo, com o intuito de solucionar tal questão, partiu-se para a utilização da técnica analítica de maior sensibilidade e seletividade, a espectrometria de massas. Durante os estudos, fez-se uso de experimentos específicos, como por exemplo, o experimento de SRM. O experimento SRM “*Selected Reaction Monitoring*” é aquele no qual há maior seletividade nas análises. Neste experimento, o primeiro e o segundo quadrupolos são operados em radiofrequência e voltagens de corrente direta fixas. O primeiro quadrupolo

escaneia íons de uma relação massa/carga determinada. Estes íons serão fragmentados na cela de colisão e analisados no segundo quadrupolo.

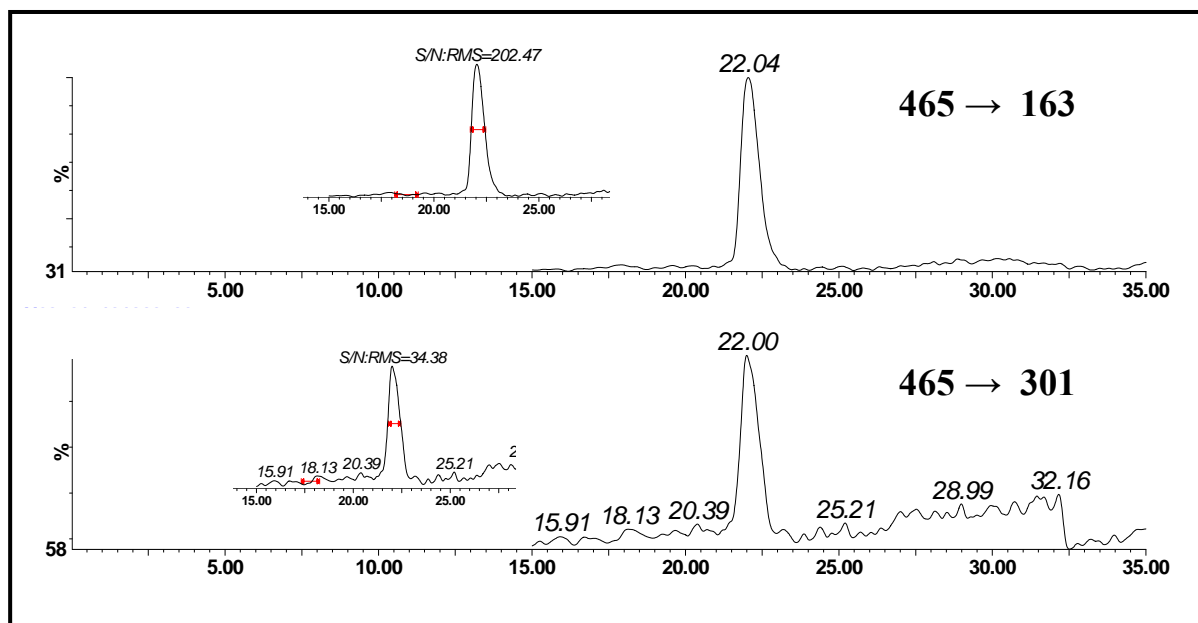
Assim, neste experimento alta seletividade é obtida, uma vez que, ambos os quadrupolos são programados para deixarem passar apenas uma determinada relação massa/carga. Pode-se analisar um íon oriundo de uma substância em pequenas concentrações, mesmo em uma matriz complexa e sem qualquer resolução cromatográfica, desde que se conheça alguma fragmentação específica do íon precursor (SIUZDAK, 1996).

As análises com relação aos depsídeos estudados, foram realizadas para o modo SRM nas respectivas transições:  $m/z$  479→315,  $m/z$  479→163 para o depsídeo **D4**, e  $m/z$  465→301,  $m/z$  465→163 para **D3**, como detalhado no item 3.2.13. As injeções das amostras foram realizadas em triplicata, para diferentes concentrações dos metabólitos isolados puros. Foram injetadas as concentrações de 100 ng/mL, 10 ng/mL, 1 ng/mL e 0.1 ng/mL.

Como resultado, constatou-se que a concentração de 0.1 ng/mL para ambos metabólitos monitorados, apresentaram relação sinal/ruído inferior a 10. Logo, a concentração mínima considerada para o limite de detecção do equipamento foi de 1 ng/mL.



**Figura 4.83.** Cromatogramas de SRM de **D4** puro, 1 ng/mL. Transições específicas indicadas. Método E.

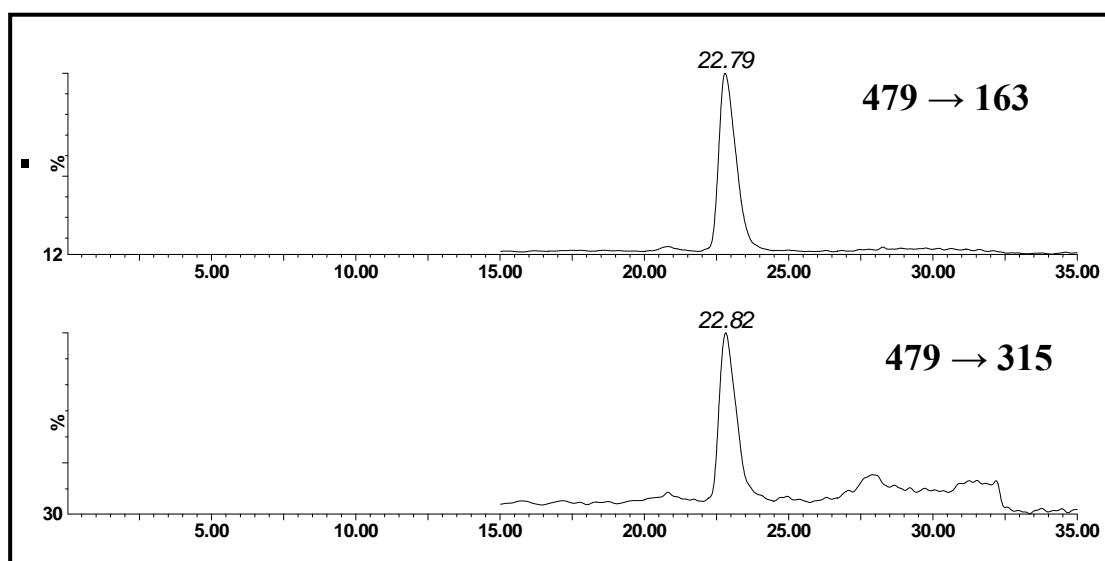


**Figura 4.84.** Cromatogramas de SRM de **D3** puro, 1 ng/mL. Transições específicas indicadas. Método E

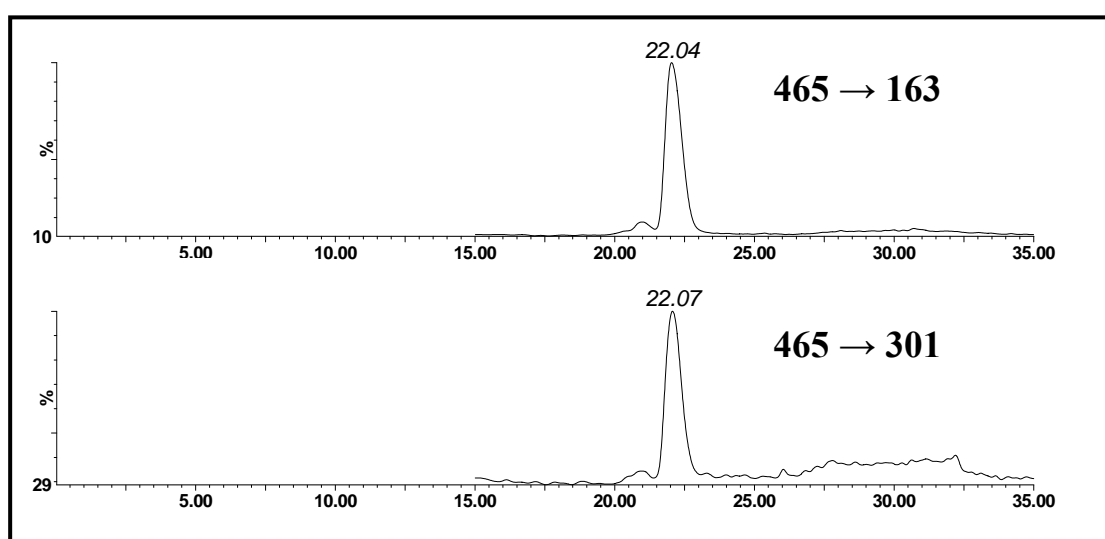
Garantindo uma boa margem de erro, considerou-se as transições com menor relação sinal ruído para estimar o limite de detecção das substâncias monitoradas. Por exemplo, para **D4**, foi considerada a transição  $m/z$  479→315, na qual, o valor da relação foi de 66. Sendo assim, dividindo o valor da concentração limite, de 1ng/mL por 6,6 consegue-se o valor estimado para a sensibilidade do equipamento, que é de aproximadamente 150pg/mL. Para **D3**, utilizando-se o mesmo raciocínio, foi estimada a sensibilidade em cerca de 300pg/mL.

Com o conhecimento da sensibilidade aproximada do equipamento para os depsídeos **D3** e **D4**, partiu-se para a investigação do extrato etanólico de goiaba. As injeções foram realizadas em triplicata, com concentração de 200 $\mu$ g/mL de extrato.

Através dos cromatogramas de SRM obtidos, verificou-se a presença das bandas características dos depsídeos padrões (substância pura isolada), nas duas transições selecionadas para ambas as substâncias. Este resultado pode ser visualizado nas Figuras 4.85 e 4.86.

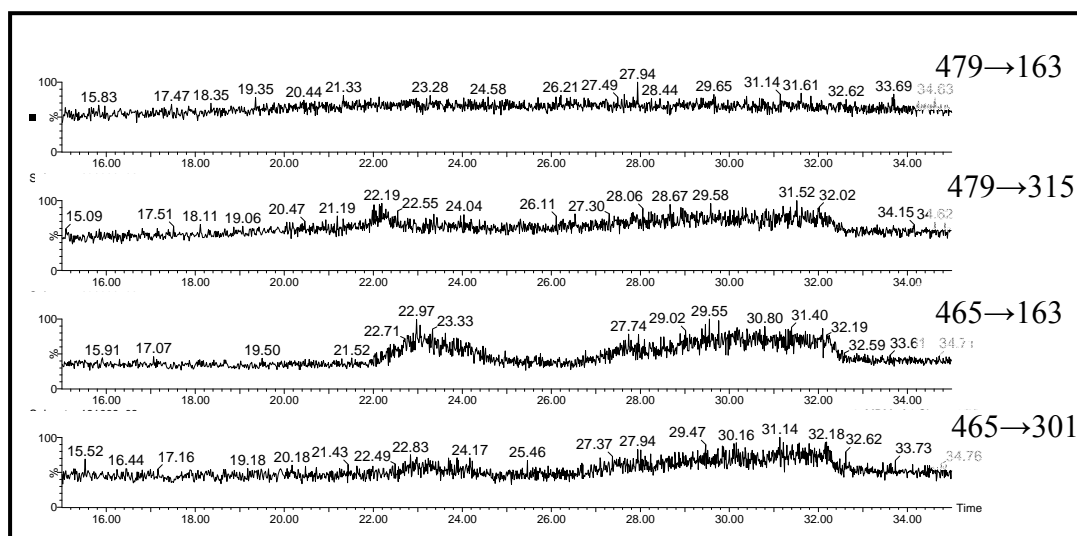


**Figura 4.85.** Cromatogramas de SRM do extrato etanólico de goiaba. Transições específicas à **D4** indicadas. Método E



**Figura 4.86.** Cromatogramas de SRM do extrato etanólico de goiaba. Transições específicas à **D4** indicadas. Método E

Para a certificação de que os compostos não estivessem retidos na coluna cromatográfica utilizada, e assim gerando um falso positivo, foi injetado solvente entre as análises. Os cromatogramas de SRM obtidos para os solventes, não revelam a presença de bandas cromatográficas (Figura. 4.87)



**Figura 4.87.** Cromatogramas de SRM do solvente; transições selecionadas indicadas

Com os resultados mencionados, pode-se sugerir que houve a detecção dos depsídeos **D3** e **D4** monitorados em extrato etanólico de goiaba. Além de alta sensibilidade, o uso da espectrometria de massas no modo tandem, ofereceu grande seletividade às análises realizadas, já que foi possível o monitoramento concomitante de dois canais de transição característicos de cada metabólito estudado. Contudo, pode-se inferir que a ocorrência dos depsídeos monitorados se dá à concentrações muito baixas, e por isso, não sendo detectáveis via HPLC/UV.

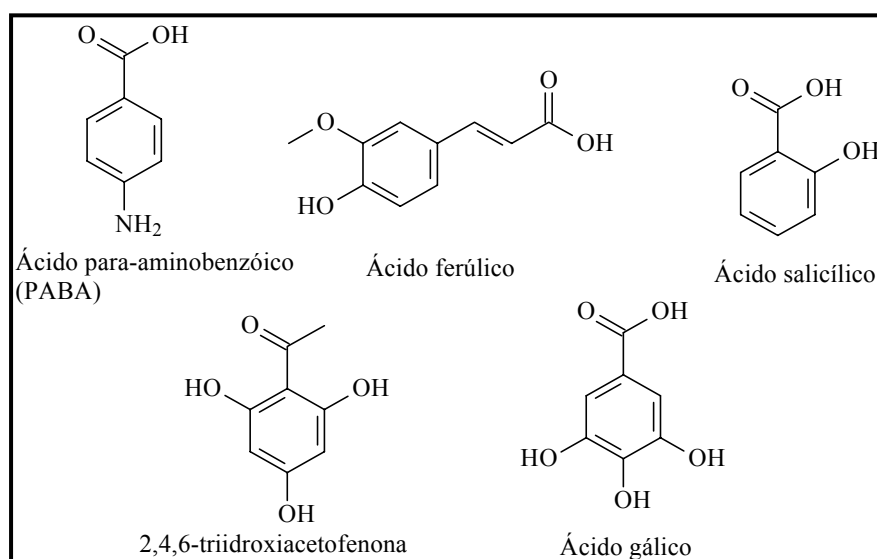
#### **4.11 Estudo da influência de compostos fenólicos no metabolismo secundário de *C. uredinicola* (FG1) por HPLC/UV**

Inicialmente a proposta do estudo buscou a verificação de possíveis biotransformações pelo micro-organismo, já que este aparenta possuir um sistema enzimático hábil em C-metilações, tendo em vista o perfil estrutural dos depsídeos isolados durante o trabalho. Na natureza, a ocorrência de O-metilações são mais comuns, inclusive entre a classe dos depsídeos, cuja grande maioria apresenta ao menos uma unidade metoxilada ou referente à carboxilas

de função ácida como grupo substituinte. Sendo assim, seria de se esperar possíveis biotransformações nos compostos fenólicos administrados ao fungo no sentido de haver alguma troca de grupos hidroxilados por algum grupo metila e assim gerando novos compostos. Outro fato que instigou tal investigação, decorreu da existência de compostos fenólicos na própria goiaba (GUTIÉRREZ, 2008), sugerindo a adaptação do micro-organismo a estes tipos de compostos.

No entanto, durante os estudos via HPLC/UV, o aparecimento de algumas bandas cromatográficas diferenciais foi constatado. Porém, as mudanças mais significativas decorreram da grande influência dos compostos fenólicos na produção dos próprios depsídeos produzidos pelo fungo.

Para a realização de tal investigação, foram utilizados os compostos detalhados na Figura 4.88. Com exceção ao ácido para aminobenzóico, todos apresentam anéis fenólicos em sua constituição.

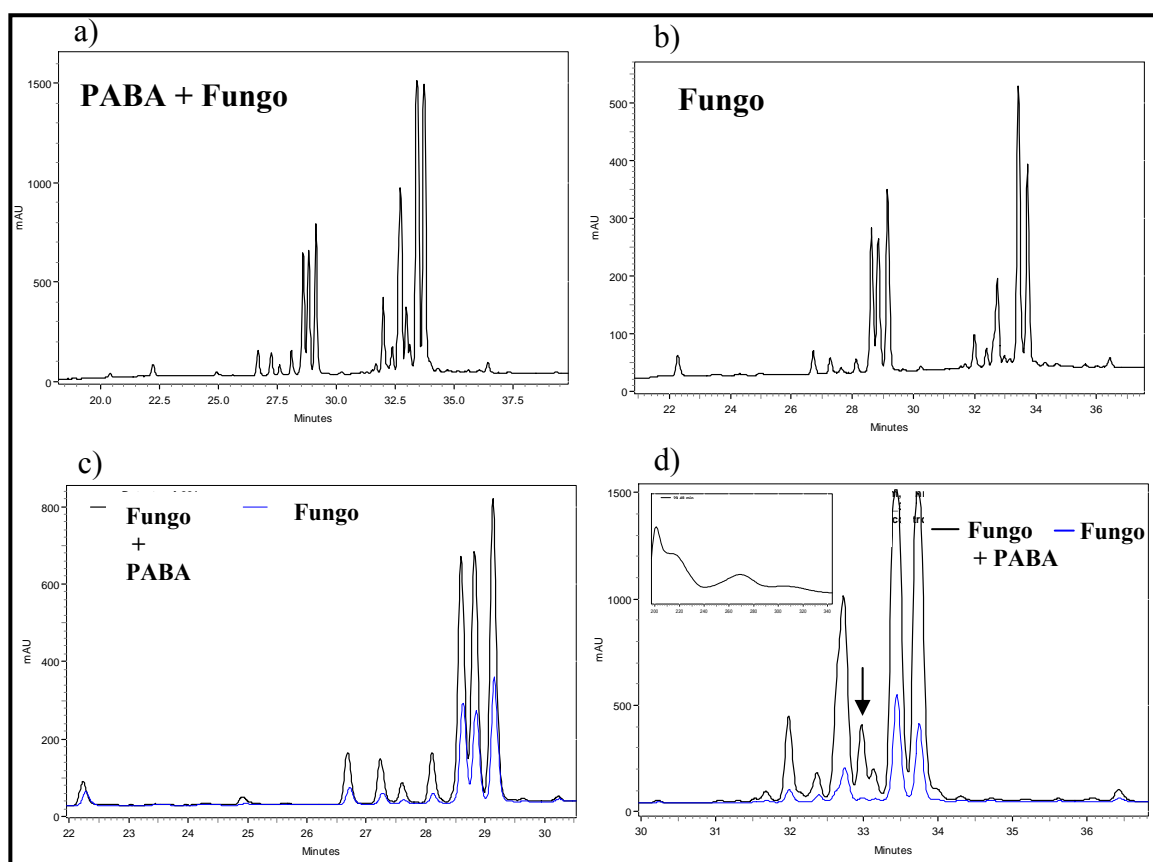


**Figura 4.88.** Compostos aromáticos administrados em cultivo do fungo *C. uredinicola* em meio BD

Para a comparação entre os meios de cultura contendo os aditivos aromáticos e o meio controle, ou seja, meio de crescimento fúngico sem a presença dos aditivos, foram realizadas análises dos perfis cromatográficos dos respectivos extratos em HPLC/UV.

A avaliação do perfil cromatográfico entre os cultivos com adição de ácido para-aminobenzóico (PABA) e do controle, (extrato etanólico do micélio para os dois), sugere grande similaridade entre ambos. No entanto, a sobreposição dos cromatogramas (figura 4.89 c e d) revela que em meio enriquecido com PABA, houve uma maior produção de depsídeos, haja vista o aumento relativo dos valores de intensidade de absorção. Este aumento é evidente tanto para os tridepsídeos, referentes aos maiores tempos de retenção, como para os depsídeos com duas unidades aromáticas, representados pelas bandas de menor retenção cromatográfica.

Com uma investigação mais minuciosa, notou-se também, a presença de bandas cromatográficas distintas em relação ao controle (indicação Figura 7.89d). O processamento a do espectro de UV referente a tais bandas revelou características típicas para estrutura de um depsídeo, com máximos de absorção em torno de 222 nm e 275 nm.

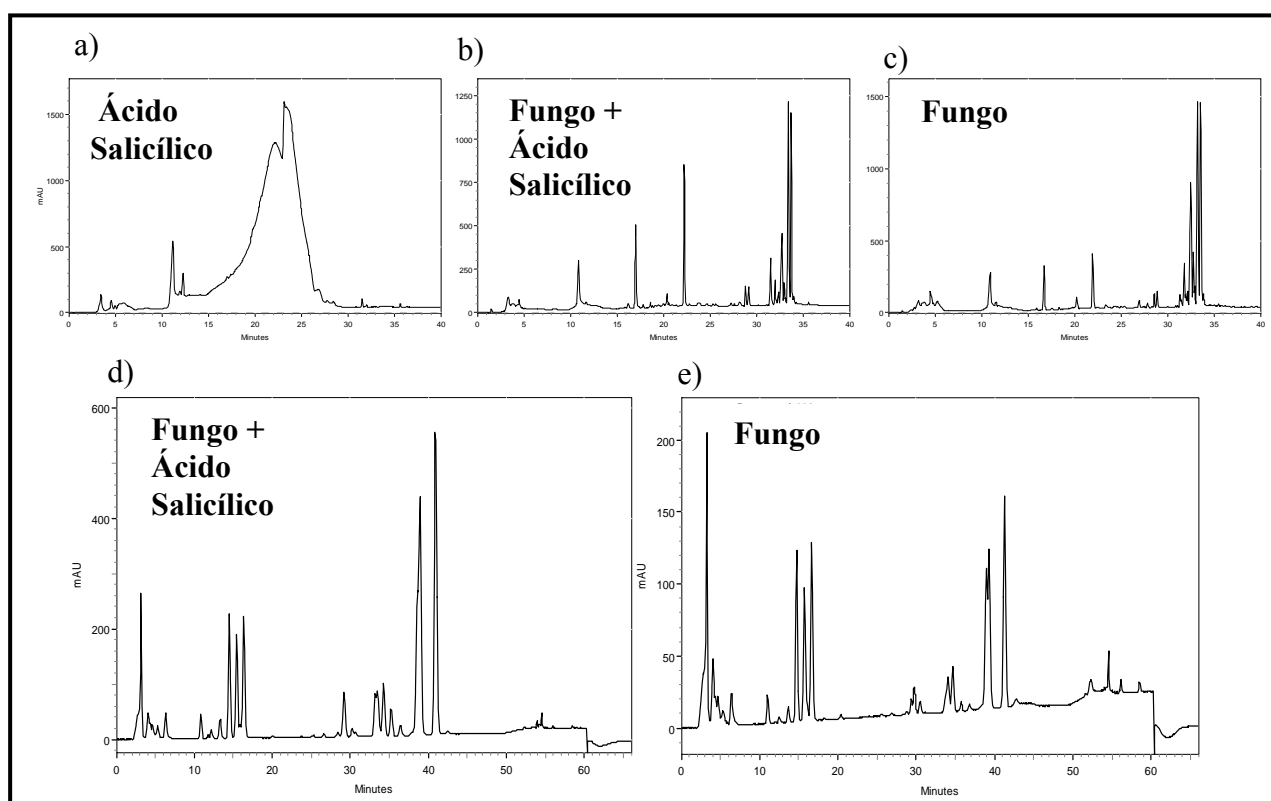


**Figura 4.89.** a) Cromatograma referente ao cultivo de FG1 com adição de PABA; b) Cromatograma meio controle; c) e d) sobreposição dos cromatogramas anteriores e ampliação das regiões de interesse. Método B,  $\lambda = 222\text{nm}$ , extrato FG1-6-M-et



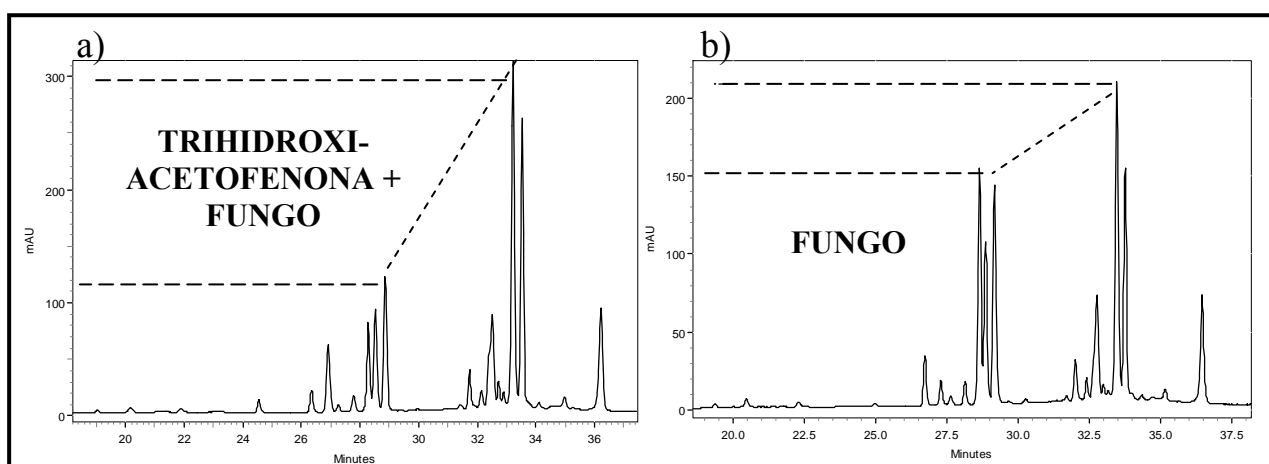
Para o estudo com relação à administração de ácido salicílico, não foram constatadas bandas cromatográficas diferenciais ao meio controle, porém, com análise do extrato particionado de acetato de etila, constatou-se o consumo do substrato administrado, levando-se em consideração a ausência da banda alargada (visível no cromatograma da Figura 4.90 a), no cromatograma referente ao cultivo fúngico com o respectivo ácido (Figura 4.90b).

Novamente, com a administração do substrato fenólico, a produção de depsídeos apresentou um visível aumento (Figura 4.90d), tendo em vista os valores de absorção das bandas cromatográficas com relação àquelas do meio controle (Figura 4.90e), nos extratos etanólicos miceliais do fungo.



**Figura 4.90.** Cromatogramas a) meio branco com adição de ácido salicílico; b) meio de cultivo de FG1 com adição de ácido salicílico; c) meio de cultivo controle, extratos FG1-6-P-ac, método B,  $\lambda=222\text{nm}$ ; d) meio de cultivo de FG1 com adição de ácido salicílico; e) meio de cultivo controle, extratos FG1-6-M-et, método A,  $\lambda=222\text{nm}$

No estudo da adição de 2,4,6-triidroxiacetofenona ao meio de cultura de FG1, constatou-se que, neste caso não houve aumento significativo da produção de depsídeos. No entanto, com a administração deste substrato fenólico, houve um favorecimento da produção dos metabólitos de dois anéis aromáticos em detrimento aos tridepsídeos. Inclusive, é possível visualizar através dos cromatogramas referentes ao extrato micelial (Figura 4.91), que aparentemente, enquanto a produção de tridepsídeos cai, a produção dos demais depsídeos permanece constante com relação ao meio controle.

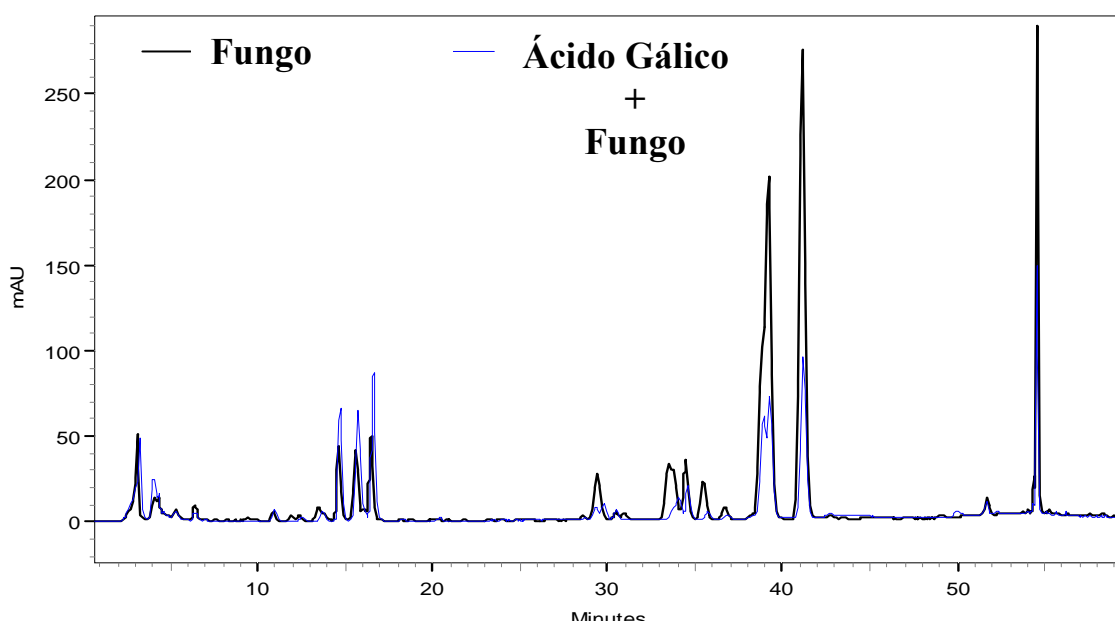


**Figura 4.91.** Cromatogramas a) meio de cultivo de FG1 com adição de triidroxiacetofenona; b) meio de cultivo controle, método B, extratos FG1-6-M-et,  $\lambda=222\text{nm}$

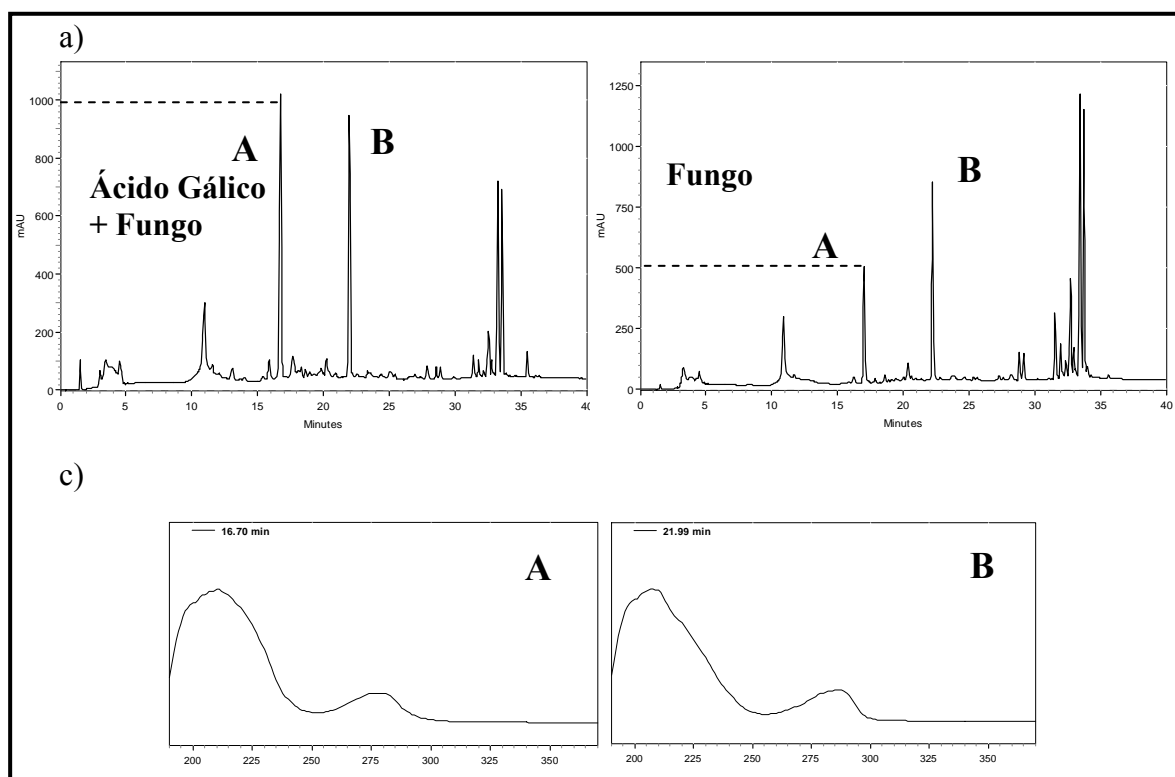
A investigação do perfil cromatográfico do extrato micelial de FG1, quando administrado ácido gálico ao meio de cultura, mostrou um decréscimo na produção na produção dos depsídeos produzidos pelo fungo em meio controle (Figura 4.92). Porém é notório o aumento da intensidade de absorção de outro metabólito produzido pelo fungo, indicado como banda cromatográfica **A** na Figura 4.93a.

O metabólito referente à banda **A**, apresenta o mesmo perfil do espectro de absorção de UV com relação ao metabólito indicado pela banda cromatográfica **B**, sugerindo tratarem-se de compostos de mesma classe de substâncias. Mas os respectivos cromatogramas dos extratos de partição, mostram que enquanto a intensidade de absorção da banda **B** permanece

praticamente a mesma, a banda A, aumenta significativamente, com o concomitante decréscimo das absorções dos depsídeos.

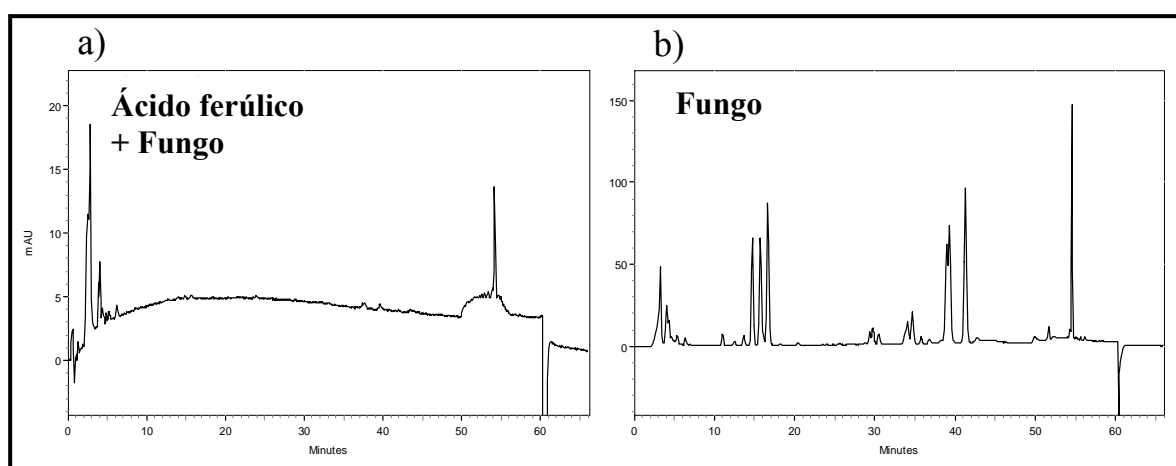


**Figura 4.92.** Cromatogramas sobrepostos do cultivo de FG1 com adição de ácido gálico e do meio de cultivo controle, método A, extratos FG1-6-M-et,  $\lambda=275\text{nm}$



**Figura 4.93.** Cromatogramas a) do cultivo de FG1 com adição de ácido gálico; b) do meio de cultivo controle, método B, extratos FG1-6-P-ac,  $\lambda=275\text{nm}$ , c) espectros de UV referentes às bandas cromatográficas indicadas

Por fim, o último substrato administrado ao meio de cultura de FG1, o ácido ferúlico, apresentou o perfil cromatográfico mais diferenciado com relação aos demais compostos estudados. Isto porque, este substrato diminuiu drasticamente, ou até mesmo inibiu a síntese de compostos pelo microorganismo. Este fato decorreu provavelmente da inibição do desenvolvimento fúngico pelo ácido, tendo em vista o baixo crescimento micelial para o cultivo em questão.

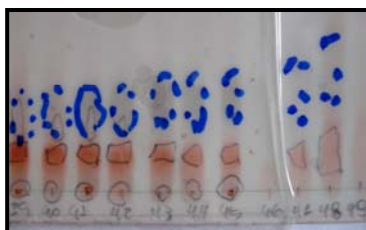


**Figura 4.94.** Cromatogramas a) meio de cultivo de FG1 com adição de ácido ferúlico; b) meio de cultivo controle, método A, extratos FG1-6-M-et ,222nm

Contudo, durante o processamento dos dados obtidos com as análises mencionadas, não houve a obtenção de dados que pudessem indicar uma possível biotransformação. Por exemplo, o aparecimento de bandas cromatográficas próximas às bandas referentes aos substratos, com possíveis deslocamentos das bandas de absorção dos respectivos espectros de UV. Porém, não se pode descartar tal possibilidade, já que quantidades diminutas de possíveis metabólitos de biotransformação podem ter sido produzidos por *C.uredinicola*. Sendo assim, a utilização de uma técnica analítica mais sensível, como a espectrometria de massas, deve ser aplicada em análises futuras.

#### 4.12 Detecção de compostos co-produzidos por *C. Uredinicola* (FG1) em meio de cultura de arroz

No intuito de isolar compostos de outras classes, potencialmente produzidos pelo endófito de goiaba, após sucessivos procedimentos para o fracionamento do extrato bruto referente ao cultivo de *C.uredinicola* em arroz, foram obtidas frações com características interessantes para investigação. Tais frações, de código F7-O38 à F7-O48 (Fluxograma 3.1), quando eluidas em CCD fase normal e reveladas em vanilina e luz UV, apresentavam majoritariamente, dois tipos de “spots” (Figura 4.95): um referente às substâncias mais retensivas em sílica, as quais somente revelavam-se pouco intensas em vanilina (indicação azul) e o outro, referente às substâncias menos retensivas, cuja revelação ocorria com absorção da luz UV em 254 nm e também em vanilina (coloração alaranjada). Segundo as características descritas, supôs-se que as frações possuíam ao menos dois grupos de substâncias, um de cromóforas e outro de substâncias não cromóforas.

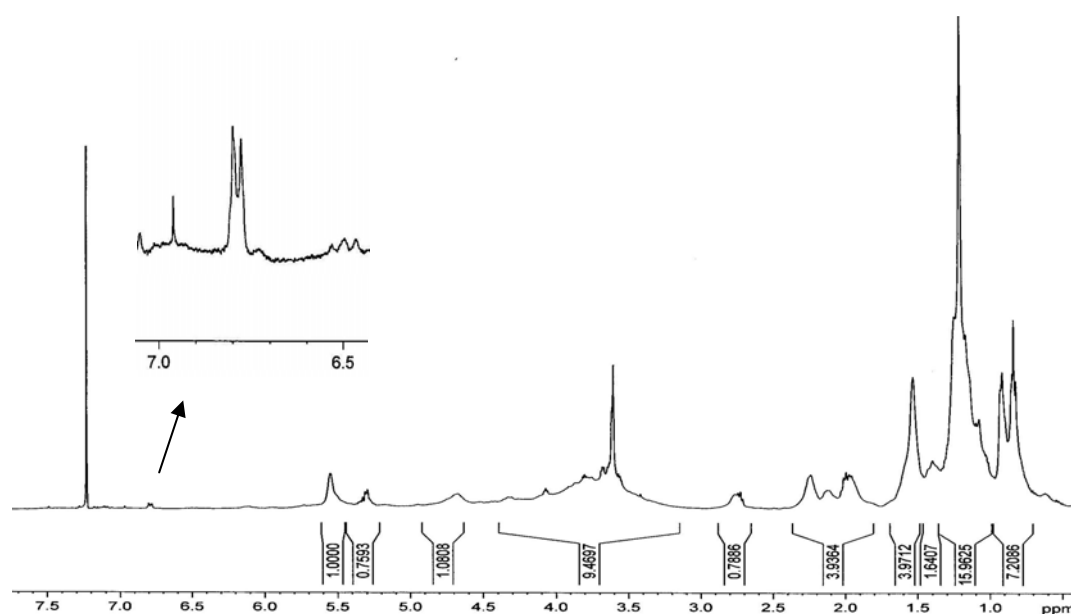


**Figura 4.95.** CCD frações F7-O38 à F7-O48

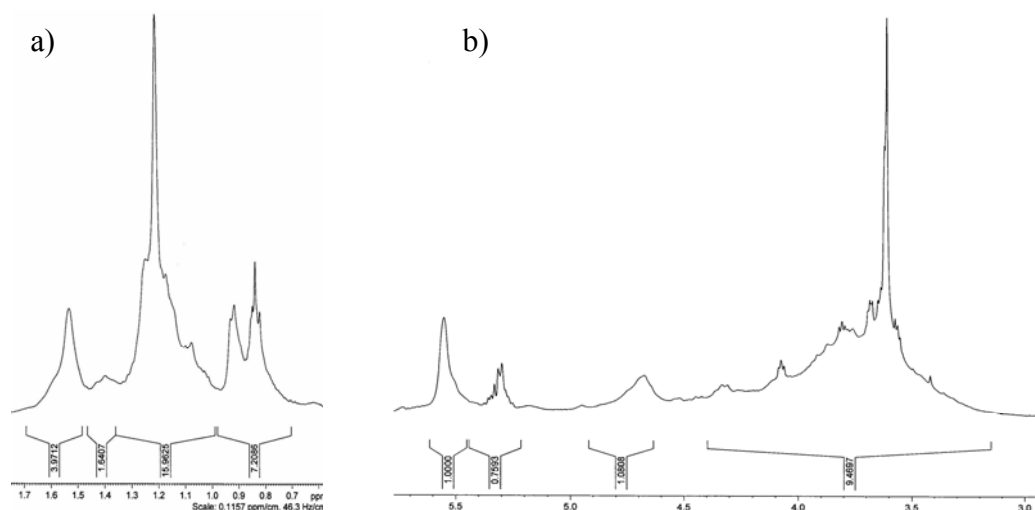
Quando submetidas à análise por  $^1\text{H}$  RMN, as frações mostraram o mesmo perfil para os respectivos espectros, porém em todos os casos, notou-se baixa resolução de sinais. Isto provavelmente deveu-se à baixa solubilidade das frações em todos os solventes testados para solubilização, o que pode estar ligado a possibilidade de tratarem-se de uma mistura complexa de compostos de caráter anfipático, como será detalhado a seguir.

Os sinais característicos presentes nos espectros de  $^1\text{H}$  RMN na região de maior blindagem dos núcleos, referem-se a um singlete típico de cadeia graxa em 1.23 ppm, um singlete largo relativo aos núcleos de hidrogênio de metila ligada a carbono com hibridização  $\text{sp}^2$  em 1.58 ppm, assim como um tripleto condizente à metila terminal de cadeia alquílica em 0.85 ppm (Figura 4.97a).

Os demais sinais estão localizados em região típica de deslocamento químico de hidrogênios carbinólicos e olefínicos, entre 3.6 e 4.0 ppm e 5.52 ppm respectivamente (Figura 4.97b). Outro sinal evidente tratou-se de um dubleto em 6.80 ppm (Figura 4.96), relativo a um provável núcleo de hidrogênio ligado a um nitrogênio.



**Figura 4.96** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração F7-O44 e ampliação da região de interesse  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ , 200 MHz



**Figura 4.97** Ampliações do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , fração F7-O44.  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ , 200 MHz

As informações obtidas através dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN, juntamente a comparações com a literatura, incluindo dados obtidos em estudos realizados no grupo LabioMMi (Tese MARINHO, 2005; Dissertação SANTOS, 2001), evidenciaram a possível existência de uma mistura de compostos da classe das cerebrosidas nas frações analisadas.

As cerebrosidas são compostos pertencentes ao grupo dos glicoesfingolípídios, sendo estruturalmente caracterizados por uma hexose ligada a uma ceramida (Figura 4.98). Esta última, geralmente constituída por uma base esfingóide (cadeia longa com função álcool, ligada a uma unidade amino) ligada a uma cadeia longa de ácido graxo, formando uma ligação amídica (TAN, 2003). Segundo relatos da literatura, a natureza anfipática destes compostos, parece ser a principal razão pela qual as cerebrosidas apresentem uma grande variedade de funções biológicas, como por exemplo a de reguladores neurológicos, sendo consideradas grandes promessas para o tratamento da doença de Alzheimer (TAN, 2003).

Logo, as características estruturais das substâncias supostamente produzidas pelo fungo *C.uredinicola*, seriam condizentes com as características das frações analisadas, ou seja, baixa solubilidade devido à existência de pontos

hidrofóbicos e hidrofílicos na mesma molécula, assim como a ausência de grupos conjugados, justificando assim a baixa absorção de radiação UV. A baixa resolução do espectro de  $^1\text{H}$  RMN também poderia ser justificado pela presença de uma mistura complexa de cerebrosidas nas frações analisadas.

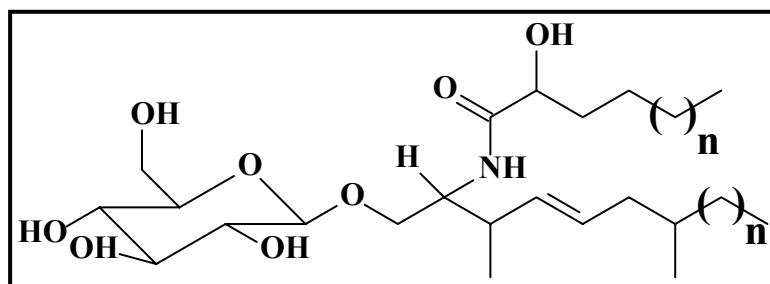
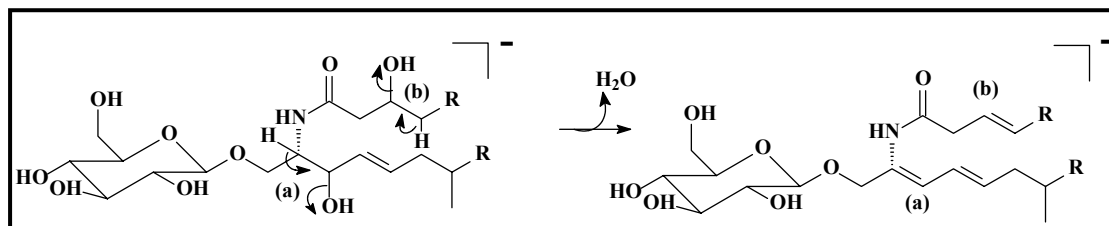


Figura 4.98. Modelo estrutural de uma cerebrosida

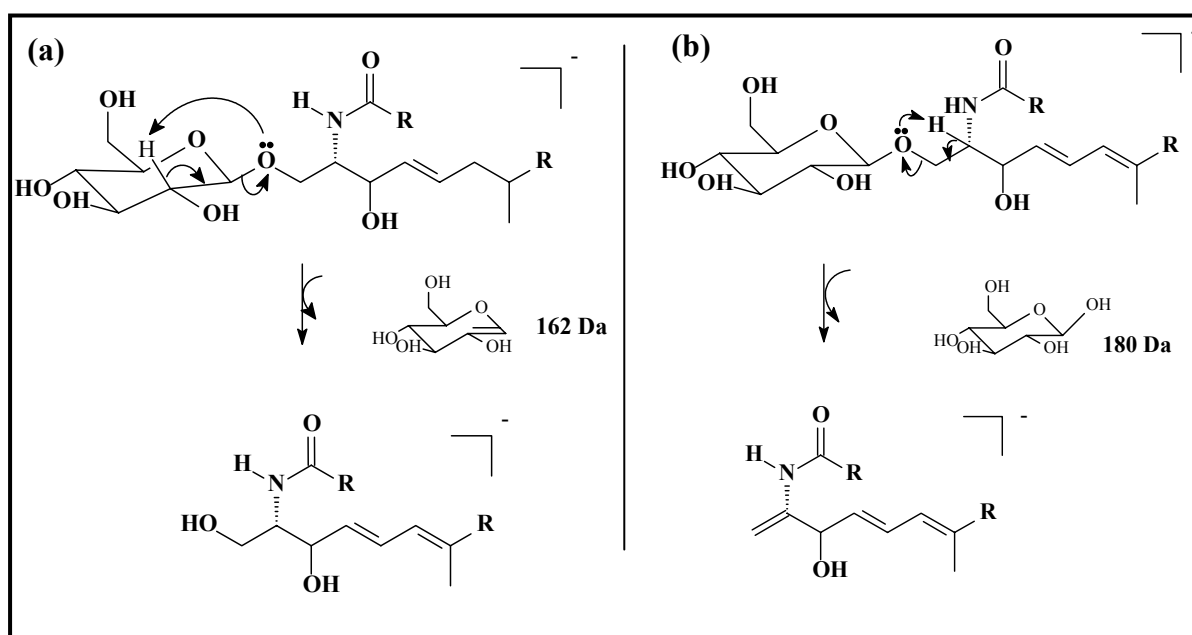
Na intenção de corroborar com a investigação a respeito da identidade dos metabólitos produzidos por *C.uredinicola*, realizaram-se análises via espectrometria de massas, a fim de se obter mais dados, que pudessem contribuir para a confirmação da produção de cerebrosidas pelo fungo em estudo.

Devido às características estruturais desta classe de compostos, pode-se esperar um perfil de fragmentação característico para muitos deles, já que são comuns nesses casos, perdas de unidades de massa como 180 e 162 Da, referentes às perdas características da unidade glicosilada (Figura 4.89) e de 18 Da, referentes à perdas de água (Figura 4.99). Há também a possibilidade de íons fragmentos de mesma relação  $m/z$ , principalmente devido à abertura do anel com perdas seqüenciais de 30 unidades de massa, referentes a perdas de  $\text{H}_2\text{CO}$  (HAN, 2005) (Figura 4.101) e assim, gerando a partir do íon de  $m/z$  179, os íons de  $m/z$  149, 119 e 89.

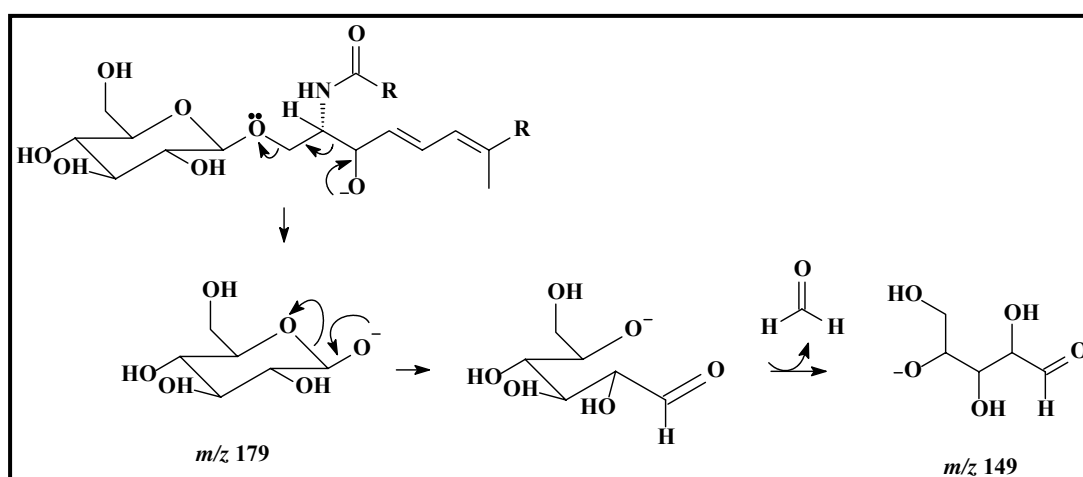




**Figura 4.99.** Proposta de mecanismos de fragmentação para perdas de unidades de  $H_2O$  de uma cerebroside

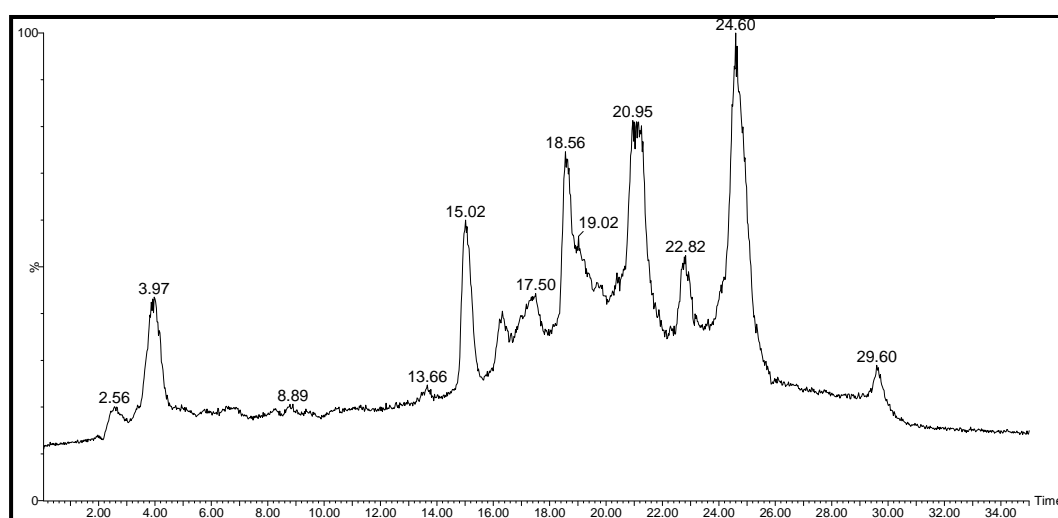


**Figura 4.100.** Proposta de mecanismos de fragmentação para perdas características de cerebroside a) 162 Da; b) 180 Da



**Figura 4.101.** Proposta de fragmentação para cerebroside

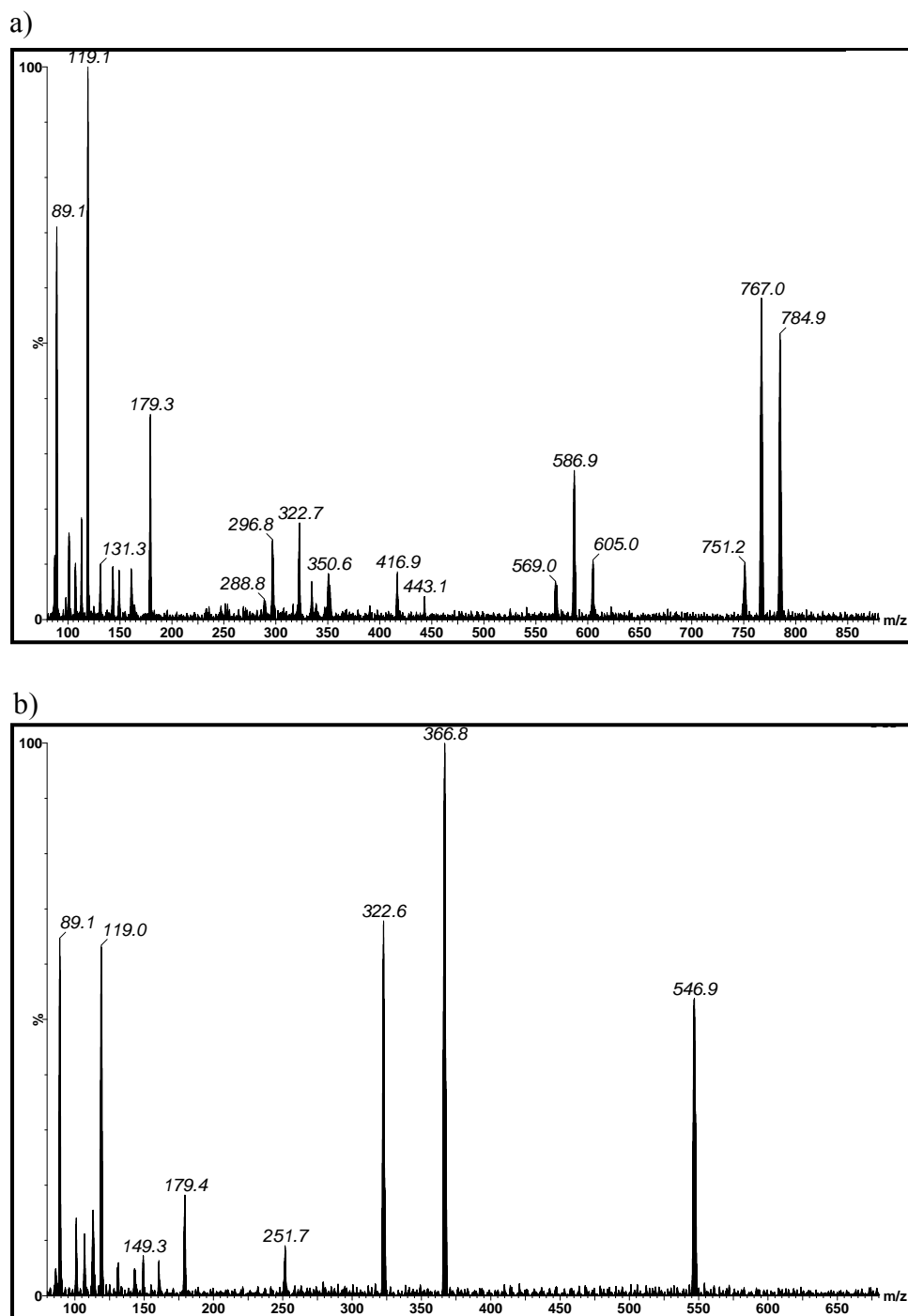
Através do processamento do cromatograma de íons totais das frações analisadas (Figura 4.102), foram selecionadas as relações  $m/z$  de interesse para posterior realização do experimento de íons produto, no intuito de verificar o perfil de fragmentação das massas selecionadas. O método cromatográfico F foi utilizado nas análises. Os parâmetros de funcionamento do espectrômetro de massas nos modos MS e MS/MS estão detalhados no item 3.2.14.



**Figura 4.102.** Cromatograma de íons totais, *ESI* modo negativo, fração F7-O48

Com a realização do experimento de íons produto, foi possível notar características de fragmentação comuns entre as massas selecionadas, sendo verificadas através das informações dos respectivos espectros, perdas de unidades glicosiladas, e de água, assim como o aparecimento dos íons de  $m/z$  89, 119, 149 e 179, o que seria pertinente para a estrutura das cerebrosidas.

O espectro de íons produtos referente ao íon de  $m/z$  785 ( Figura 4.103 b) fornece as principais fragmentações relatadas acima, como perda de água do íon  $m/z$  785 formando o íon produto  $m/z$  767, as perdas de 180Da a partir do íon molecular e do íon produto  $m/z$  767, gerando os fragmentos  $m/z$  605 e 587 respectivamente. Perdas de 162 Da também são evidenciadas, justificando a segunda forma de fragmentação da molécula para perda da unidade glicosídica, assim como a presença dos íons  $m/z$  179, 119 (pico base) e 89.



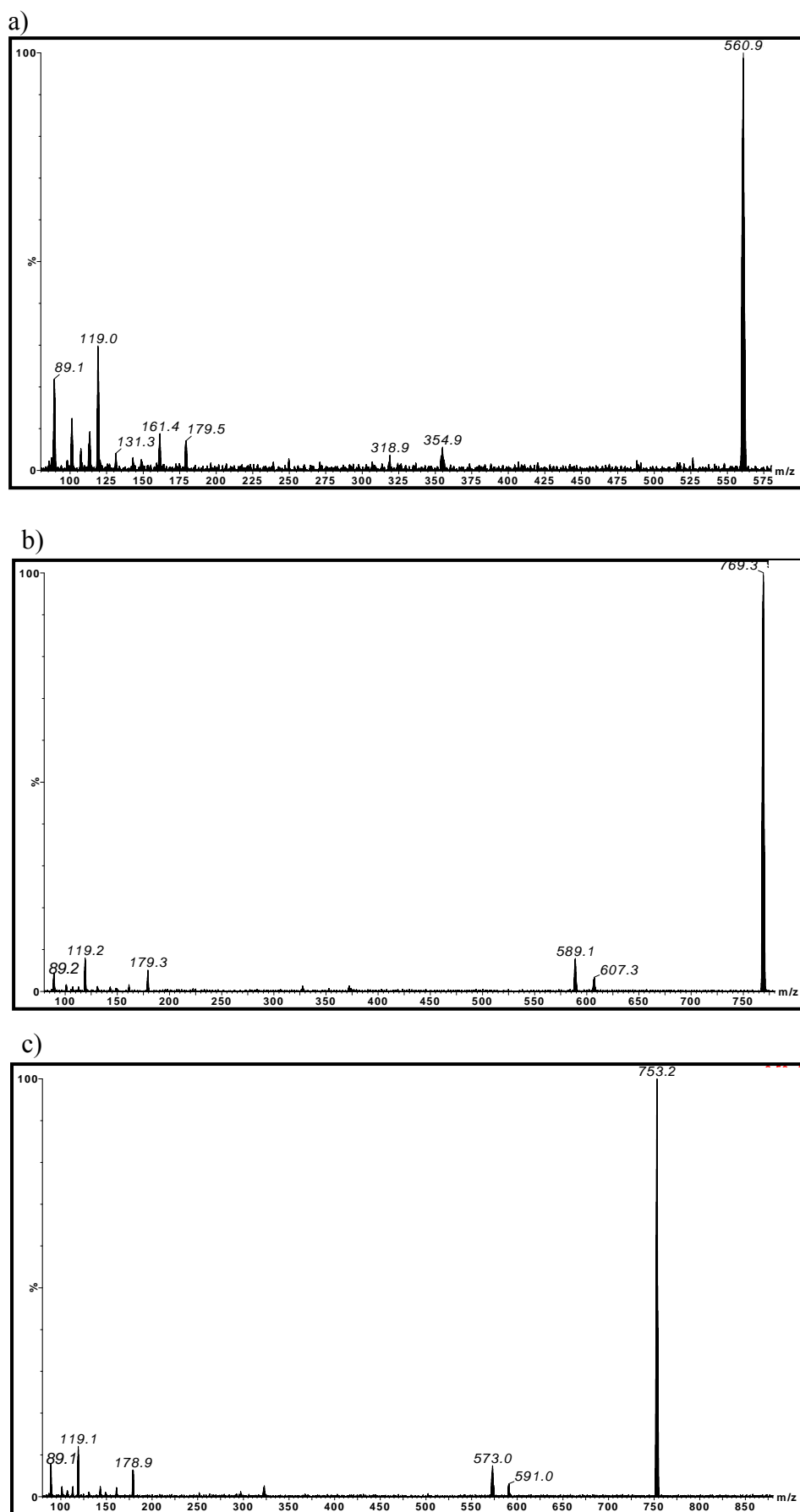
**Figura 4.103.** Espectro de íons produtos de a)  $m/z$  785; b)  $m/z$  547; 20 eV

O espectro de íons produtos de  $m/z$  547 apresenta perda da unidade glicosídica, como íons fragmentos decorrentes de sua abertura, revelando, como no caso anterior, o mesmo perfil de fragmentação esperado para as cerebrosidas.

Para os demais espectros de íons produtos obtidos, referentes aos íons moleculares de  $m/z$  561, 769 e 753 (Figura 4.104), a energia de colisão utilizada não foi a mais adequada, tendo em vista a baixa intensidade dos íons fragmentos e a alta intensidade do íon molecular desprotonado. Porém, ainda é possível verificar o perfil de fragmentação sugerido para as cerebrosidas. É válido ressaltar que as relações de massas de valor par, relativas aos íons moleculares desprotonados de algumas cerebrosidas ( $m/z$  546.9 e 784.9), devem-se à descalibração do equipamento, e por isso as relações  $m/z$  foram consideradas em 547 e 785, pertinentes à existência de um átomo de nitrogênio nas estruturas analisadas.

Outras relações  $m/z$  foram estudadas, porém, ajustes nos parâmetros de análise devem ser realizados para a verificação da presença de outras possíveis cerebrosidas nas frações investigadas.

Contudo, aliando-se as informações obtidas a partir das análises via RMN e EM, até mesmo com as características físicas das frações estudadas (baixa solubilidade em diversos solventes e baixa absorção da radiação UV), pode-se sugerir a produção de cerebrosidas pelo fungo *C.uredinicola*.



**Figura 4.104.** Espectro de íons produtos de a)  $m/z$  561; b)  $m/z$  769; c)  $m/z$  753; 20eV

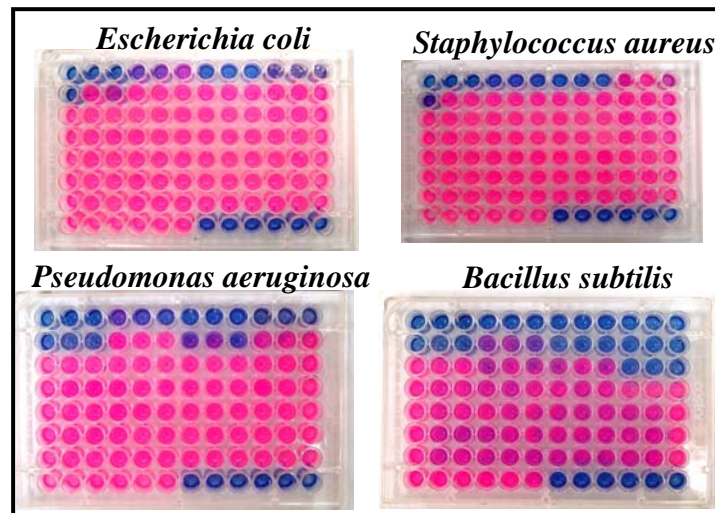
## **4.13 Ensaio biológicos**

### **4.13.1 Ensaio Antibacteriano**

Como já mencionado, os depsídeos apresentam muitas atividades biológicas reportadas, como atividade antiviral, anticâncer, antiinflamatória, bactericida, herbicida, fungicida entre outras. Tendo em vista a gama de atividades mencionadas, foram realizados testes antibacterianos com o intuito de investigar a ação dos metabólitos **D1**, **D3** e **D4** com relação a este tipo de atividade.

Ensaio preliminares foram realizados com as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (gram negativas), *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus Aureus* e *Micrococcus luteus* (gram positivas). O corante utilizado nos ensaios foi a Rezasurina, um indicador redox, que na forma oxidada apresenta a coloração rosa, indicando a presença de células vivas, enquanto que na forma reduzida, apresenta coloração azulada, indicando a presença de células mortas. A ordem de concentração das substâncias puras, nos poços, encontram-se descritas no item 3.3.1.4.

Foram testadas as substâncias **D3** e **D4**, na concentração de 50µg/mL, tendo sido verificada a atividade antibiótica de ambas as substâncias para todas as bactérias testadas. Partiu-se então para a verificação da atividade inibitória mínima (MIC) de tais metabólito. Foi acrescido no estudo o metabólito **D1**. Nesta etapa, a bactéria *Micrococcus luteus* não pode ser testada devido à inviabilidade da cepa.

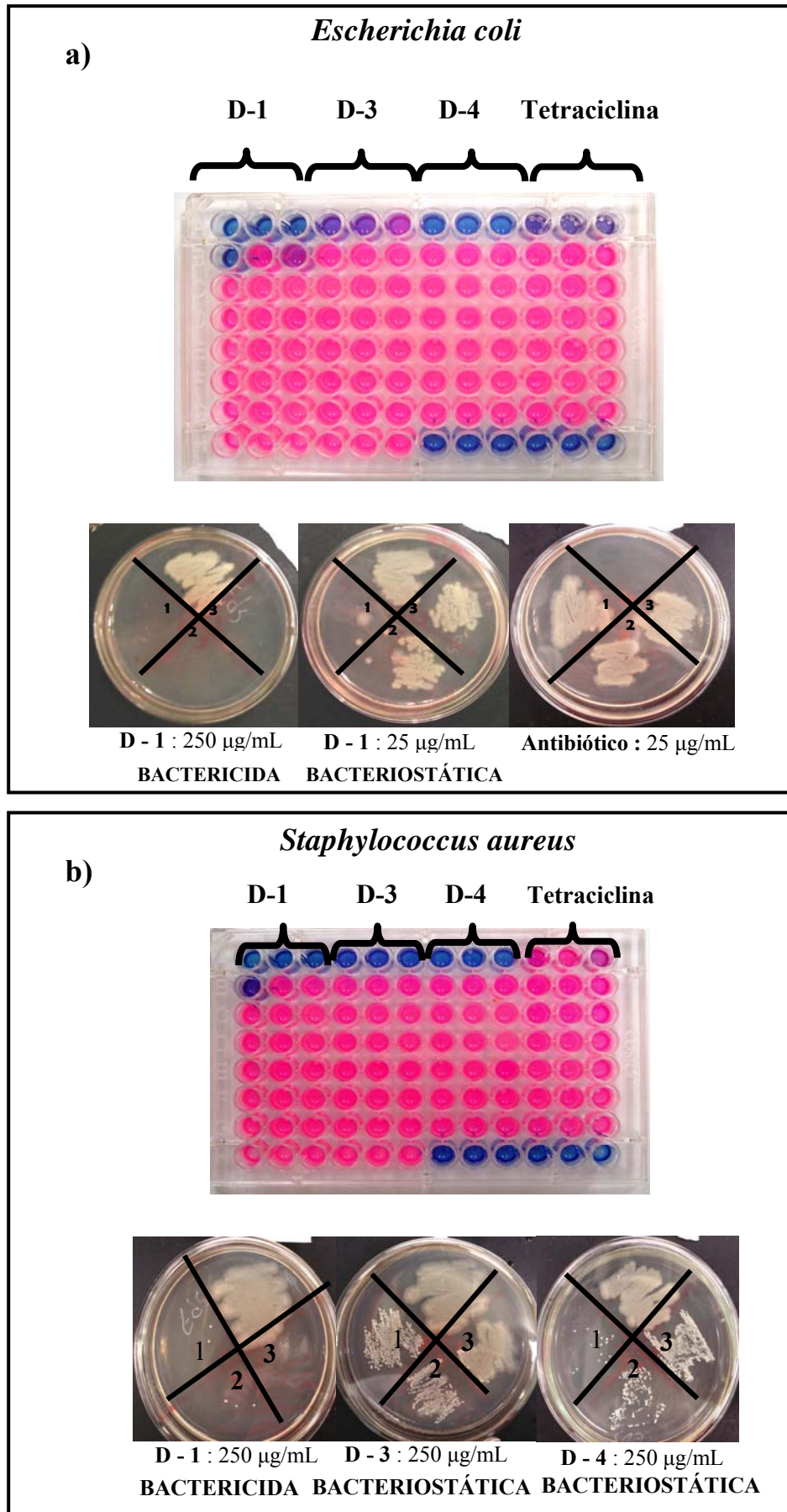


**Figura 4.105.** Placas de Elisa referente ao ensaio antibacteriano de **D1**, **D3** e **D4** frente à bactérias indicadas

Com base nos resultados obtidos, foi possível determinar as faixas de MIC referentes à atividade dos metabólitos testados (Tabela 4.7). Através da semeadura dos poços de crescimento bacteriano, verificou-se o tipo de atividade das substâncias em estudo.

Os melhores resultados obtidos foram correspondentes à substância **D1**, que apresentou atividade bactericida para as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* a uma concentração de 25µg/mL, e para a substância **D3**, cuja atividade bacteriostática foi constatada para as mesmas bactérias, também na concentração de 25µg/mL.

Alguns dos resultados obtidos para semeadura dos poços, para cada bactéria testada, podem ser visualizados nas figuras ilustradas a seguir.



**Figura 4.106.** Placa de Elisa e resultados de semeadura referentes às bactérias a) *Escherichia coli*; b) *Staphylococcus aureus*



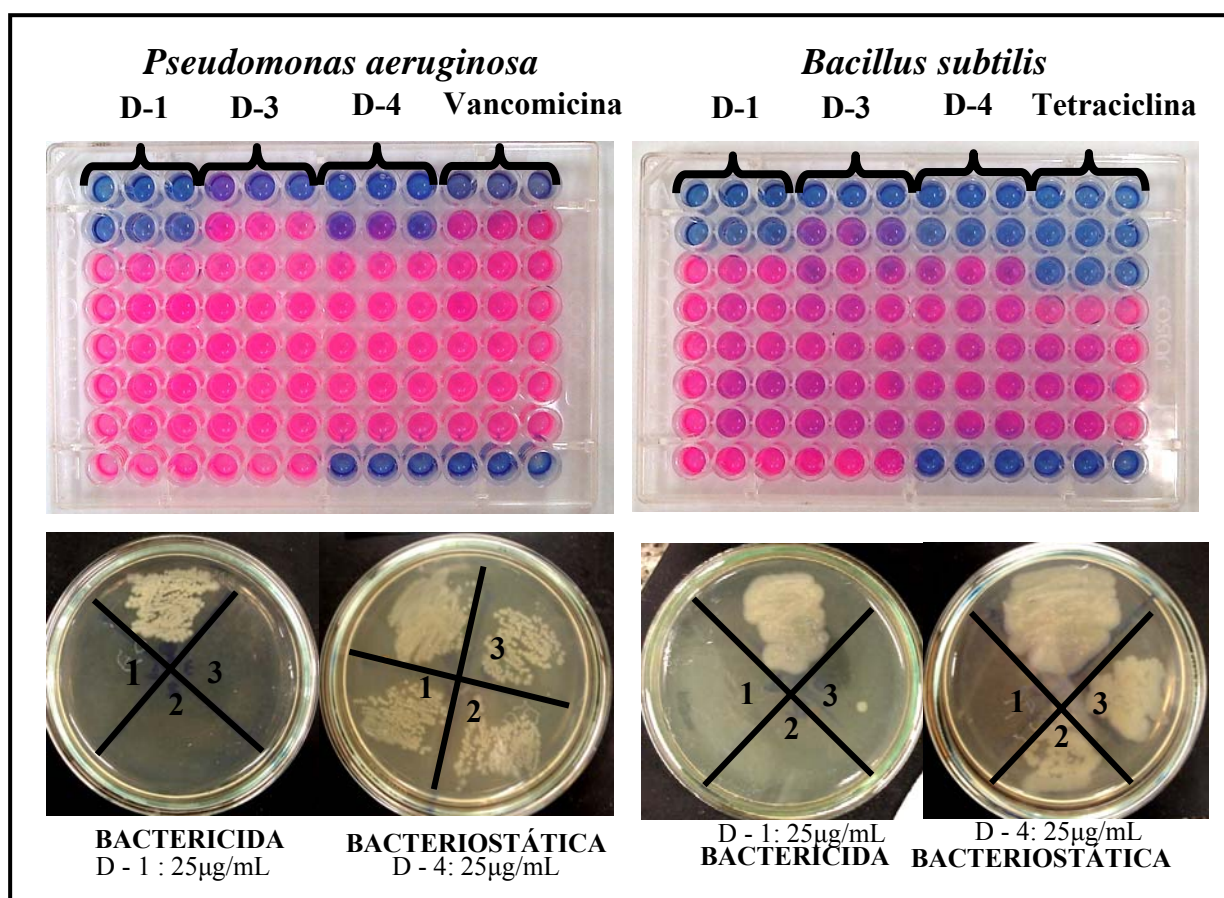


Figura 4.107. Placa de Elisa e resultados de semeadura referentes às bactérias a) *Pseudomonas aeruginosa*; b) *Bacillus subtilis*

Tabela 4.7 Intervalos de MIC para os depsídeos ensaiados

BACTÉRIA	SUBSTÂNCIA TESTADA		
	D-1	D-3	D-4
<i>Escherichia coli</i>	25 < MIC ≤ 50 µg/mL	25 < MIC ≤ 50 µg/mL	25 < MIC ≤ 50 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIC ≤ 50 µg/mL <b>BACTERICIDA</b>	25 < MIC ≤ 50 µg/mL	MIC ≤ 50 µg/mL <b>BACTERIOSTÁTICA</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	MIC ≤ 50 µg/mL <b>BACTERICIDA</b>	25 < MIC ≤ 50 µg/mL	MIC ≤ 50 µg/mL <b>BACTERIOSTÁTICA</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	25 < MIC ≤ 50 µg/mL	25 < MIC ≤ 50 µg/mL	25 < MIC ≤ 50 µg/mL
<i>Micrococcus luteus</i>	--	MIC ≤ 50 µg/mL	MIC ≤ 50 µg/mL

#### 4.13.2 Ensaio de Inibição da Fotossíntese

A fotossíntese é o processo bioquímico realizado por determinados organismos vivos (plantas, algas, algumas bactérias) para a síntese de compostos altamente energéticos como o ATP e NADPH, empregados sequencialmente na síntese de açúcares. A energia luminosa é convertida em energia química por meio dos fotossistemas FSII e FSI, que são complexos fotoquímicos que operam em série para realizar as reações de armazenamento de energia da fotossíntese, nos cloroplastos.

A luz absorvida é utilizada para impulsionar a transferência de elétrons por uma série de compostos que atuam como doadores e aceptores. A maioria dos elétrons, oxidam  $H_2O$  à  $O_2$  e reduzem  $NADP^+$  à NADPH. Também é originado um gradiente eletroquímico de prótons que será utilizado para formar ATP (TAIZ, 2006).

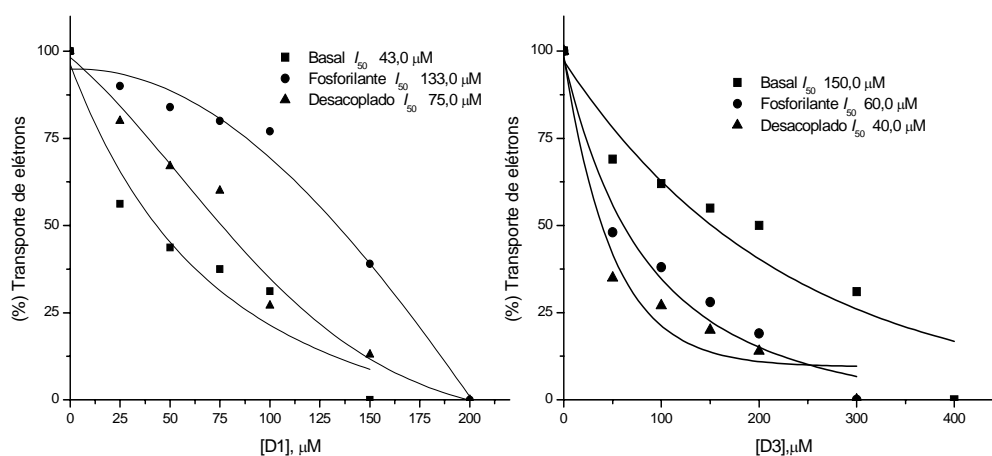
Dentre os tipos de herbicidas hoje utilizados, tem-se os herbicidas inibidores da fotossíntese que impedem a transferência de elétrons entre o FSII e o FSI. No intuito de combater e controlar as plantas daninhas, os produtos naturais, tem sido alvo de estudos, na inibição fotossintética, atuando como protótipos para a descoberta de possíveis herbicidas. Isto porque, algumas vantagens podem lhes ser conferidas, como a abrangência de um maior espectro de ação pelos produtos naturais, menor impacto ambiental frente à herbicidas sintéticos e maior eficiência em relação a controles mecânicos.

Em 2000, ROJAS e colaboradores, verificaram a inibição da germinação de sementes em plantas daninhas pela ação de metabólitos liquênicos, os depsídeos lecanorina e ácido girofórico. Estes metabólitos possuem grande similaridade estrutural respectivamente, aos depsídeos **D1**, **D3** e **D4**, isolados do fungo *C.uredinicola*. Este fato aliado à infraestrutura disponível junto ao Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, incentivou a realização dos testes de inibição da fotossíntese com os depsídeos isolados.

#### 4.13.2.1 Efeito dos metabólitos D1 e D3 sobre o transporte de elétrons não cíclico: Reação de Hill

De acordo com MITCHELL (1966), a formação de ATP pode ser inibida em qualquer uma das etapas da cadeia transportadora. Dessa forma, para conhecer o efeito dos depsídeos **D1**, **D3** e **D4** sobre a produção de energia, seus mecanismos de ação nas três etapas da cadeia de transporte de elétrons foram investigados. A inibição descrita da fosforilação produzida pelas substâncias **D1** e **D4** pode ser explicada pelo seu efeito em cada uma das etapas da cadeia transportadora através de reações de transferência de energia.

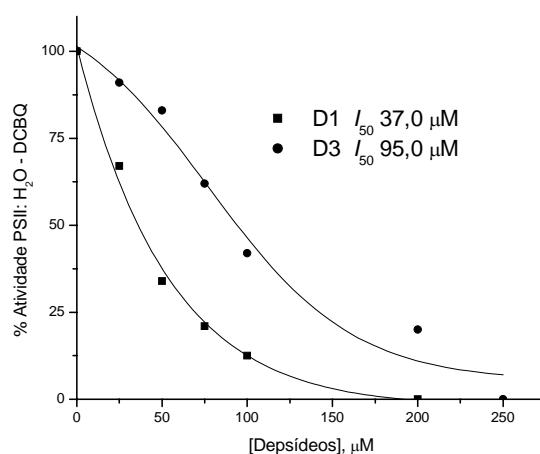
O efeito dos compostos **D1**, **D3** e **D4** sobre as razões de transporte de elétrons em diferentes condições (basal, fosforilante e desacoplado) foi avaliado. Na ausência (basal) ou presença (fosforilante) de ADP, Pi, ou NH<sub>4</sub>Cl (desacoplado) e usando MV como acceptor de elétrons, os compostos **D1** e **D3** inibiram a velocidade do transporte de elétrons em cloroplastos iluminados (Figura 4.108). Observou-se que todas as condições do fluxo de elétrons foram inibidas por **D1**, com valores de I<sub>50</sub> de 43,0; 133,0 e 75,0 μM para os transportes basal, fosforilante e desacoplado, respectivamente. O composto **D3** apresentou comportamento similar ao **D1**, pois apresentou valores de I<sub>50</sub> de 150,0; 60,0 e 40,0 μM. A partir desses resultados foi possível concluir que ambos os compostos podem ser classificados como inibidores da reação de Hill.



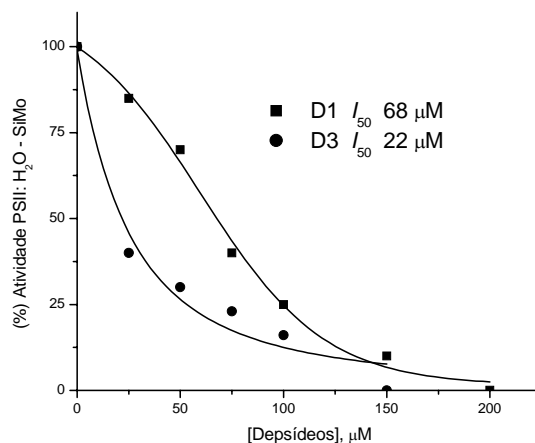
**Figura 4.108.** Efeito dos compostos **D1** e **D3** sobre o fluxo de elétrons (basal, fosforilante e desacoplado) de H<sub>2</sub>O – MV em cloroplastos isolados das folhas de espinafre. Valores das razões dos controles basal (■), fosforilante (●) e desacoplado (▲) foram 192, 345 e 686 μequiv e<sup>-</sup> h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> Chl, respectivamente.

#### 4.13.2.2 Localização dos ambientes de interação de D1 e D3 sobre FSII e FSI e suas reações parciais

Com o objetivo de determinar os sítios de interação na cadeia de transporte de elétrons nos tilacóides, os efeitos de **D1** e **D3** sobre o FSII desacoplado, FSI e suas respectivas reações parciais, foram analisados usando doadores e aceptores artificiais de elétrons, bem como os inibidores apropriados (KING, 2006). As reações parciais na cadeia de transporte de elétrons são medidas utilizando-se inibidores específicos como o 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia (DCMU); 2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-1,4-*p*-benzoquinona (DBMIB); e os seguintes doadores e aceptores de elétrons: 2, 5-dicloro-*p*-benzoquinona (DCBQ); 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP); silicomolibdato de sódio (SiMo Na<sup>+</sup>); difenilcarbazida (DPC); diaminodureno (DAD), e metilviologênio (MV). As substâncias **D1** e **D3** inibiram o fluxo de elétrons do FSII de H<sub>2</sub>O a DCBQ (Figura 4.109), de H<sub>2</sub>O a SiMo (Figura 4.110). Verificou-se ainda que **D1** e **D3** inibiram em 46 e 48%, respectivamente, a 300 μM a reação FSII: DPC – DCPIP (Tabela 4.8).



**Figura 4.109.** Efeito dos compostos **D1** e **D3** sobre o fluxo de elétrons no FSII: H<sub>2</sub>O – DCBQ em cloroplastos isolados das folhas de espinafre. O valor da razão do controle foi de 545 μequiv e<sup>-</sup> h<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> Chl



**Figura 4.110.** Efeito dos compostos **D1** e **D3** sobre o fluxo de elétrons no FSII: H<sub>2</sub>O – SiMo em cloroplastos isolados das folhas de espinafre. O valor da razão do controle foi de 356  $\mu\text{equiv e}^- \text{h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl}$ .

**Tabela 4.8.** Efeito dos compostos **D1** e **D3** sobre o transporte de elétrons do FSII desacoplado de DPC – DCPIP.

[ ]	<i>mols</i> DCPIP <sub>red</sub> /mg Chl h		<i>mols</i> DCPIP <sub>red</sub> /mg Chl h	
	<b>D1</b>	%	<b>D3</b>	%
0	240	100	240	100
50	202	84	228	95
100	173	72	184	76
200	170	70	150	62
300	130	54	125	52

Contudo, as medidas polarográficas indicaram que o transporte de elétrons no FSII é afetado na presença dos compostos **D1** e **D3** tanto pelo lado doador quanto pelo lado receptor de elétrons, prendendo-se ao sítio catalítico localizado entre P<sub>680</sub> – Q<sub>A</sub>. Com os resultados obtidos, pode-se sugerir que a criação de centros de reação “silenciosos” pode ser um dos mecanismos de ação de **D1** e **D3**, representando um caminho útil para o desenvolvimento de novos modelos para herbicidas contra a fotossíntese de plantas daninhas.

Como conclusões gerais para os ensaios de inibição da fotossíntese de **D1**, **D3**, têm-se que os depsídeos apresentam comportamentos semelhantes, pois ambos possuem os mesmos mecanismos de ação:

- Inibem a reação de Hill: **Reações basal, fosforilante e desacoplada;**
- Localizam-se no ambiente catalítico do PS II, tanto pelo lado doador de elétrons ( $P_{680}$ ) quanto pelo lado receptor de elétrons (quinona A,  $Q_A$ ).  
**Reações do lado doador:  $H_2O - DCBQ$  e  $H_2O - SiMo$ . Reação pelo lado receptor:  $DPC - DCPIP$ .** Em outras palavras o sítio de ação dos depsídeos se localiza entre  $P_{680} - Q_A$ ;
- Os depsídeos não apresentaram efeito significativo sobre o fotossistema I (FS I).

Por fim, o depsídeo **D4**, não apresentou atividade frente a inibição da fotossíntese.

## ***5. CONCLUSÕES***

---

## 5. CONCLUSÕES

### 5.1. Conclusões e considerações finais

Neste trabalho foram isolados 1 fungo endofítico de goiaba (FG1) e 2 (FM1, FM2) maçã, assim como 1 bactéria endofítica de pêra (BP1), 1 de banana (BB1). O fungo isolado a partir da goiaba foi identificado como sendo da espécie *Cladosporium uredinicola* e escolhido como principal alvo investigativo do trabalho;

O cultivo dos micro-organismos em diferentes meios de cultura resultou em extratos promissores quanto à existência de metabólitos secundários produzidos por eles no caso dos fungos FG1 e FM1. Os meios de cultura testados para as bactérias BB1 e BP1 e para o fungo FM2 revelaram pouca adaptação destes micro-organismos a eles, tendo em vista os resultados obtidos através dos estudos em HPLC/UV;

Apenas um metabólito foi isolado a partir de uma das bactérias estudadas, o alcalóide indólico n-acetiltriptamina, produzido pela bactéria associada à pêra em meio BHI;

Dos extratos investigados referentes aos cultivos de *C.uredinicola*, foram isoladas e detectadas substâncias predominantemente de mesma classe, os depsídeos. O isolamento decorreu do extrato sólido em arroz, porém, com os resultados das análises em HPLC/UV, detectou-se alguns dos isolados também no cultivo fúngico em meio líquido de polpa de goiaba e meio BD. Para o meio Czapeck's, houve pouca adaptação do micro-organismo, não sendo detectada produção metabólica expressiva;

O etil orselanato e mais quatro depsídeos foram isolados do cultivo de *C. uredinicola* em arroz; ainda não reportados na literatura.

Devido à grande habilidade do endófito de goiaba em produzir depsídeos, estimou-se a curva de produção para dois destes metabólitos isolados, **D3** e **D4**,



tendo-se determinado o período máxima produção entre 35 e 40 dias de crescimento fúngico;

A influência de compostos fenólicos no metabolismo de *C. uredinicola* também foi verificada, tendo-se constatado principalmente diferenças com relação à intensidade de produção de metabólitos já produzidos pelo fungo em meio de cultura padrão. Para a constatação da produção de metabólitos diferenciados será necessária a realização de estudo via HPLC- MS;

Depsídeos foram pela primeira vez detectados na fruta goiaba. O uso da técnica HPLC/MS-MS foi ferramenta fundamental para tal detecção. Este resultado induz ao questionamento da possível produção destes metabólitos pelo micro-organismo quando este ainda está associado de forma endofítica ao fruto;

A produção de uma mistura de cerebrosidas foi detectada no cultivo de *C. uredinicola* em arroz, via estudos e comparações entre dados de RMN, espectrometria de massas e dados reportados na literatura.

Os depsídeos **D1**, **D3** e **D4** foram investigados quanto à atividade antibacteriana, tendo sido determinadas as faixas de *MIC* de tais substâncias frente às bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus Aureus* e *Micrococcus luteus*. O depsídeo **D1** apresentou atividade bactericida frente às bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* na concentração 25 µg/mL.

A atividade de inibição da fotossíntese também foi verificada para os depsídeos **D1** e **D3**. O metabólito **D4** não apresentou resultado positivo para tal atividade.

A proposta do presente projeto é inovadora e instigante do ponto de vista científico. Descobrir a existência de micro-organismos endofíticos em frutas comuns ao cotidiano nutricional humano assim como o estudo químico de seus metabolismos abre porta para descobrimento de novas substâncias, assim como ocorreu neste estudo. Este trabalho permitiu o início de várias investigações que

ainda serão necessárias para a melhor compreensão e conhecimento a respeito da associação de micro-organismos e frutas.

## ***6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

## 6- Referências Bibliográficas

- ANDREWS J.H., HARRIS R.F. “The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces”. *Annu Rev Phytopathol.*, **38**: 145-180, 2000.
- ARNOLD, A. E.; MEFFA, L. C.; KYOLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. “Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 15649-15654, 2003.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. “*Biochemical Engineering Fundamentals*”, Mc.Graw-Hill, New York, 1986.
- BASHYAL, B.; LI, J. Y.; STROBEL, G.; HESS, W. M.; SIDHU, R. “*Seimatoantlerium nepalense*, an endophytic taxol producing coelomycete from Himalayan yew (*Taxus wallachiana*)”. *Mycotaxon*, **72**:33-42, 1999.
- BECHARD, J.; EASTWELL, K.C.; SHOLBERG, P.L.; SKURA, B. “Isolation and partial chemical characterization of an antimicrobial peptide produced by a strain of *bacillus subtilis*.” *J. Agric. Food Chem.*, **46**: 5355-5361, 1998
- BENTLEY, R. “Secondary metabolite biosynthesis: the first century”. *Critical Reviews in Biotechnology*, **19** (1): 1- 40, 1999.
- BERDY, J. “Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites?”. *Proceedings of the 9th International Symposium on The Biology of Actinomycetes Part 1*. Allerton Press, New York, 1995, 3-23.
- BU’LOCK, J. D. 1961. “Intermediary metabolism and antibiotic synthesis”. *Advances in Applied Microbiology*. **3**: 293-342.
- CARVALHO, M. G., CARVALHO, G. A., BRAZ FILHO, R. “Chemical constituents from *ouratea floribunda*: complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of atranorin and its new acetyl derivative”. *J.Braz. Chem. Soc.*, **11** (2): 143-147, 2000.
- CHOMCHEON, P; *et al.* “Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassiicola* L36”. *Phytochemistry* **70**: 407–413, 2009.
- DEMAIN, A. L. “Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms”. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**: 455-463, 1999.

- DEMAIN, A. L. “Small bugs, big business: the economic power of the microbe”. *Biotechnology Advance*, **18**: 499–514, 2000.
- DEWICK, M. P. “Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach”. 2<sup>a</sup> Ed. Wiley, 2002.
- DING L., *et al.* “Isolation, antimicrobial activity, and metabolites of fungus *Cladosporium* sp. associated with red alga *Porphyra yezoensis*”. *Curr Microbiol*, **56**: 229-235, 2008.
- DREWS, J. “Drug discovery: a historical perspective”. *Science*, **287**:1960-1964, 2000.
- FIRN, R. D., JONES, C.G. “The evolution of secondary metabolism - a unifying model”. *Molecular Microbiology*, **37**: 989-994, 2000.
- GAGUNASHVILI, A. N.; *et al.* “Cloning and heterologous transcription of a polyketide synthase gene from the lichen *Solorina crocea*”. *Mycological research*, **113**: 354-363, 2009.
- GARDAN, L., CHRISTEN, R., ACHOUAK, W., PRIOR, P. “*Erwinia papayae* sp. nov., a pathogen of papaya (*Carica papaya*)”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**: 107-113, 2004.
- GLISH, G. L., VACHET, R. W., “The basics of mass spectrometry in the twenty first century”. *Nature*, **2**: 140-150, 2003.
- GUANATILAKA, L. A. A. “Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence”. *J. Nat. Prod.*, **69**, 509-526, 2006.
- GUTIÉRREZ, R.M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. “*Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology” *J.Ethnopharmacology*, **117**: 1-27, 2008.
- HAN, X.; CHENG, H. “Characterization and direct quantitation of cerebroside molecular species from lipid extracts by shotgun lipidomics”. *Journal of Lipid Research*, **46**: 163-175, 2005.
- HARBORNE, J.B.; TOMAS-BARBERAN, F. A. *Ecological Chemistry and Biochemistry of plants terpenoids*. 1<sup>st</sup> ed. Oxford, Claredon Press, 1991.

- HAVEY, A. "Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products". *Drug Discovery Today*, **5**(7): 294-300, 2000.
- HONDA, N. K., VILEGAS W. "A química dos líquens". *Química Nova*, **21**(6): 110-125, 1998.
- INGÓLFSDÓTTIR, K.; BLOOMFIELD, S. F.; HYLANDS, P. J. "In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Lichen Metabolites as Potential Preservatives" *Antimicrob Agents Chemother*, **28**(2): 289-292, 1985.
- JOHRI, B. N. "Endophytes to the rescue of plants" *Current Science*, **90** (10): 1315-1316, 2006.
- KING, D. B.; MACIAS, R. N.; AGUILAR, M. M.; CALAMINICI, P.; LOTINA, H. B. "2-[(R-phenyl)amine]-1,4-naphthalendiones as photosystem I electron acceptors. Structure-activity relationship of *m*- and *p*-PAN compounds with QSAR analysis" *J. Photochem. Photobiol B.*, **83**: 105- 113, 2006.
- KULDAU, G. A.; YATES, I. E. "Evidence for Fusarium endophytes in cultivated and wild plants". *Microbial Endophytes*, 85-120, 2000.
- KUMAR, S. K.; MÜLLERB, K. "Depsidés as non-redox inhibitors of leukotriene B<sub>4</sub> biosynthesis and HaCaT cell growth. 1. Novel analogues of barbatic and diffractaic acid" *Eur. J. Med. Chem.*, **34**: 1035–1042, 1999.
- KUMAR, S. K.; MÜLLERB, K. "Depsidés as non-redox inhibitors of leukotriene B<sub>4</sub> biosynthesis and HaCaT cell growth, 2. Novel analogues of obtusatic acid" *Eur. J. Med. Chem.* **35**: 405–411, 2000.
- LI, J. Y.; STROBEL, G.; SIDHU, R.; HESS, W. M.; FORD, E. J. "Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*". *Microbiology*, **142**: 2223-2226, 1996.
- LI, Y., *et al.* "Indolyl Alkaloid Derivatives, Nb-Acetyltryptamine and Oxaline from a Marine-Derived Fungus". *Arch. Pharm. Res* , **26**(1): 21-23, 2003.
- LV, P. C., XIAO, Z. P., FANG R. Q., *et al.* "Synthesis, characterization and structure-activity relationship analysis of novel depsidés as potential antibacterials". *European Journal of Medicinal Chemistry*, **44**(4): 1779-17787, 2009.
- MACÍAS F. A., GALINDO J. L. G., GALINDO J. C. G. "Evolution and current status of ecological phytochemistry". *Phytochemistry* ,**68**: 2917–2936, 2007.

MARINHO, A. M. R. *Metabólitos Secundários e Biotransformações Feitas por Fungos Endofíticos Obtidos de Murraya Paniculata*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2005. Tese de doutorado.

MARWAH, R. G., FATOPE, M. O. "Musanol: a new aureonitol-related metabolite from a *Chaetomium* sp.". *Tetrahedron*, **63**: 8174-8180, 2007.

MASUREKAR, P. S. INFINKELSTEIN, D. B., BALL, C. "Biotechnology of filamentous fungi: technology and products. Boston: Butterworth-Heinemann, 241-301, 1992.

MCLAFFERTY, F. W.; TURECEK, F. "Interpretation of mass spectra." California, University Science Books, 1993.

MITCHELL, P. A. "Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation" *Biol. Rev. Cambridge Phil Soc.* **41**: 445-502, 1966.

MORAGREGA, C. I.; MANCEAU, C.; MONTESINOS, E. "Susceptibility of European pear cultivars to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* using immature fruit and detached leaf assays". *European Journal of Plant Pathology*, 109: 319-326, 2003.

NARUI, T.; *et al.* "NMR assignments of depsides and tridepsides of the lichen family umbilicariaceae". *Phytochemistry*, **48**(5): 815-822, 1998.

NOSOV, A. M. "Functions of plant secondary metabolites *in vivo* and *in vitro*". *Russian Journal of Plant Physiology*, **41** (6): 767-771, 1994.

NUNES. C.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; VINAS, I. "Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2". *International Journal of Food Microbiology*, **70**: 53-61, 2001.

OWEN, N. L., HUNDLEY, N. "Endophytes – the chemical synthesizers inside plants". *Science Progress*, **87** (2): 79-99, 2004.

PARK, Y. C., *et al.* "Metabolites from the Marine-Derived Fungus *Chromocleista* sp. Isolated from a Deep-Water Sediment Sample Collected in the Gulf of Mexico". *J. Nat. Prod.*, **69** (4): 580-584, 2006.

PAVIA D. L.; LAMPMAN G. M.; KRIZ G. S. "Introduction to Spectroscopy. A guide for students of organic chemistry." 2ª edição, Editora Saunders College Publishing, 1996.

- PELÁEZ, F. “The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat ?”. *Biochemical Pharmacology*, **71**: 981-990, 2006.
- PELCZAR, M.; CHAN, E. C. S. KRIEG, N. R. “Microbiologia”. Vol 1, 2ª edição, São Paulo, Makron Books, 1997.
- PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. “Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi” *Natural Toxins*, **1**: 185-196, 1992.
- REDMAN, R. S.; SHEEHAN, K. B.; STOUT, R. G.; RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J. M. “Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis” *Science*, **298**: 1581, 2002.
- ROJAS, I. S.; LOTINA H. B.; MATA, R. “Effect of Lichen Metabolites on Thylakoid Electron Transport and Photophosphorylation in Isolated Spinach Chloroplasts1” *J. Nat. Prod.*, **63**: 1396-1399, 2000.
- ROSENBLUETH, M., MARTINEZ, R. E. “Bacterial endophytes and their interactions with hosts”. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**(8): 827-837, 2006.
- SABARATNAM, S.; BEATTIE, G.A. “Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and *Pantoea agglomerans* BRT98 in Epiphytic and Endophytic Colonization of Leaves”. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(2): 1220-1228, 2003.
- SAIKKONEN K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S.H. “Evolution of endophyte–plant symbioses”. *TRENDS in Plant Science*, **9**, (6): 275-280, 2004.
- SANTOS, D. A. *Isolamento e Identificação de Substâncias Bioativas de Cogumelos Comestíveis*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar, 2001. Dissertação de mestrado.
- SCHIFF, P. B.; FANT, J.; HORWITZ, S. B. “Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol” *Nature*, **277**(5698): 665-667, 1979.
- SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. “Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria.”, EDUCS, Caxias do Sul, 2002.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. “ the endophytic continuum”. *Micological Reserch*, **109** (6): 661-686, 2005.



SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Rio de Janeiro, Wiley & Sons. 5ª. Edição, 1994.

SIUZDAK, G. Mass spectrometry for biotechnology. San Diego: Academic Press, 1996.

STIERLE, A., STROBEL, G. “The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*”. *Journal of Natural Products*, **58**(9): 1315-1324, 1995.

STIERLE, A., STROBEL, G., STIERLE, D. “Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew”. *Science*, **260**: 214-216, 1993.

STROBEL G.; DAISY B. “Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products”. *Microbiology and Molecular Reviews*, **67** (4): 491-502, 2003.

STROBEL, G. A. “Endophytes as sources of bioactive products”. *Microbes and Infection*, **5**: 535-544, 2003.

STROHL, W.R. “Industrial antibiotics: today and the future”. IN: *Biotechnology of antibiotics*, 2ª ed. Marcel Dekker, New York, 1997, 1-47.

STURZ, A. V., CHRISTIE B. R., NOWAK J. “Bacterial endophytes : potential role in developing sustainable systems of crop production”. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **19**(1): 1- 30, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Artmed, 3ª Ed., 2006.

TAN, R. X., ZOU, W. X. “Endophytes: a rich source of functional metabolites”. *Natural Products Rep.* **18**: 448-459, 2001.

TAN, R. X.; CHEN, J. H. “The cerebrosides”. *Nat. Prod. Rep.*, **20**: 509-534, 2003.

TORREZAN, R.; EIROA, M. N. U.; PFENNING L. “Identificação de microrganismos isolados em frutas, polpas e ambiente industrial”, *B.CEPPA*, Curitiba, **18**(1): 2000.

TURNER, W.B. *Fungal Metabolites*. Academic Press, New York, 1971.

VEIGA, T. A. M., SILVA, S. C., ARCHUNDIA-CAMACHO, F., VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; RODRIGUES FO, E.; MULLER, M.W.; SILVA, M.F. DAS G.F DA; HENSENN, B. L. "Inhibition of photophosphorylation and electron transport chain in thylakoids by lasiodiplodin, a natural product from *Botryosphaeria rhodina*". *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 4217-4221, 2007.

VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. "Lichen Enzymology; In CRC Handbook of Lichenology", Editora CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1988.

WANI, M. C., TAYLOR, H. L., WALL, M. E., COGOON, P., MCPHAIL, A. T. "AT. Plant antitumor agent. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*". *Journal of the American Chemical Society*, **93**(9): 2325, 1971.

YANG, S. W., CORDELL, G. A., "Further metabolic studies of indole and sugar derivatives using the staurosporine producer *Streptomyces staurosporeus*". *J. Nat. Prod.*, **60**: 230-235, 1997.

YOST, R.A.; ENKE, C.G; MACLAFFERTY, F.W. " In Tandem Quadrupole Mass Spectrometry". Ed Willey, New York, 1983.

ZHANG, H. W., SONG, Y.C., TAN, R.X., "Biology and chemistry of endophytes", *Nat. Prod. Rep.*, **23**: 753-771, 2006.