

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

**“ESTUDO QUÍMICO E ECOLÓGICO DE *ESCOVOPSIS* spp.,
INVASOR DO JARDIM DE FUNGOS DE FORMIGAS
CORTADEIRAS”**

ANA CAROLINA ALVES DOS SANTOS*

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Viera

***BOLSISTA CAPES**

São Carlos – SP

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Ana Carolina Alves dos Santos, realizada em 02/05/2018:

Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira
UFSCar

Profa. Dra. Taicia Pacheco Fill
UNICAMP

Prof. Dr. Felipe Christoff Wouters
UFSCar

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

Profa. Dra. Maysa Furlan
UNESP

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Paulo Cezar Vieira pela orientação e amizade durante todos esses anos. Sem sua orientação e apoio, a execução deste trabalho não seria possível!

Minha eterna gratidão a Deus pela oportunidade que me concedeu e pela maneira como tem dirigido a minha vida.

Ao Prof. André Rodrigues pela colaboração e pelos fungos cedidos para a execução desta pesquisa de doutorado.

À CAPES, CNPQ e FAPESP pelos auxílios à pesquisa.

Ao Leibniz Institute, especialmente ao Hans-Knöll Institute, pela bolsa de doutorado sanduíche.

Ao Prof. Dr. Christian Hertweck e ao seu grupo de pesquisa por todo o conhecimento, amizade, tempo e confiança a mim depositados.

Aos meus familiares, por todo apoio e incentivo. Em especial à minha mãe Heloisa, meus irmãos Matheus, Inara e Larissa e aos meus avós José e Magda. Amo vocês demais!

Aos grandes amigos que adquiri ao longo desses anos por toda amizade, compreensão, torcida e orações. Vocês são parte desta vitória!

Ao Anderson, pelo apoio, discussões, cuidado, amor e paciência. Te amo!

A todo o grupo de PN obrigada por toda ajuda, discussões científicas, contribuições, amizade e companheirismo ao longo desses anos.

À Priscila Lopes, pela parceria, ajuda e amizade durante esses anos.

À Taynara Lopes, pela amizade, apoio, discussões científicas e ensaios de IC₅₀;

À Doraí Periotto, pelos ensaios frente ao simbiote L. gongylophorus, discussões e amizade;

À Luciana Bueno dos Reis Fernandes, pelas análises de MEV ambiental;

À Andre Perner pelas análises de LC-HRMS realizadas no Hans-Knöll Institute.

À Heike Heinecke pelas análises de RMN realizadas no Hans-Knöll Institute.

À Kirstin Scherlach, Barbara Urbansky, Gülmire Sabir, Caroline Rückert por toda ajuda, colaboração e amizade ao longo da minha estadia na Alemanha.

PRINCIPAIS ABREVIACÕES

δ	-	Deslocamento químico
°C	-	Graus centígrados
$[M+H]^+$	-	Íon <i>quasi</i> molecular
$[M+Na]^+$	-	Aduto de sódio
1D	-	Experimento de RMN de uma dimensão
2D	-	Experimento de RMN de duas dimensões
ACN	-	Acetonitrila
AcOEt	-	Acetato de etila
BDA	-	Batata, dextrose e Agar
Calc	-	Calculado
CCD	-	Cromatografia de camada delgada
$CDCl_3$	-	Clorofórmio deuterado
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM	-	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
cm	-	Centímetro
COSY	-	<i>Correlation spectroscopy</i>
CR	-	Células residuais
d	-	Dupleto
DCM	-	Diclorometano
dd	-	Duplo dupleto
dt	-	Duplo tripleto
ESI	-	Ionização por electrospray
EtOH	-	Etanol
h	-	Altura
Hex	-	Hexano
HMBC	-	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HRMS	-	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HSQC	-	Heteronuclear Single Quantum Correlation
m	-	multiplato
m/z	-	Relação massa/carga

MeOH	-	Metanol
ODS	-	Octadecilsilano (C-18)
q	-	Quarteto
quint	-	Quinteto
RMN de ^{13}C	-	Ressonância Magnética Nuclear de carbono – 13
RMN de ^1H	-	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio - 1
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
s	-	Singleto
sept	-	Septeto
t	-	Tripleto
t_R	-	Tempo de retenção
UV-VIS	-	Detector nos comprimentos de onda Ultravioleta – visível
Φ	-	Diâmetro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-1 - Inibidores enzimáticos utilizados em uso clínico.....	14
Tabela 3-2 – Sistema de eluição utilizado para fracionamento dos extratos de acetato de etila.....	27
Tabela 3-3 – Método cromatográfico utilizado no isolamento das substâncias shearinine D e melinacidina IV.....	32
Tabela 3-4 - Método cromatográfico utilizado para estimativa de shearinine D e melinacidina IV.....	33
Tabela 3-5 - Método cromatográfico utilizado na análise do cocultivo entre <i>E. microspora</i> (LESF019) e <i>L. gongylophorus</i>	35
Tabela 4-1 - Micro-organismos cedidos pelo Prof. Dr. André Rodrigues	37
Tabela 4-2 - Ensaio de inibição enzimática dos extratos fúngicos diversos.....	38
Tabela 4-3 - Ensaio de inibição do crescimento de <i>L. gongylophorus</i>	39
Tabela 4-4 – Dados de deslocamento químico de ^1H (δ) para a substância emodina.	48
Tabela 4-5 – Dados de deslocamento químico de ^1H para a substância 6-O-demetil-5-deoxibostrycoidina.	53
Tabela 4-6 – Dados de deslocamento químico de ^1H (δ) para a substância ácido indol-3-carboxílico.	57
Tabela 4-7 – Dados de deslocamento químico de ^1H (δ) para o metabólito L019_A_Fr6	62
Tabela 4-8 – Dados de deslocamento químico de RMN de ^1H da substância majoritária (ciclo Trp-Ser) de L019_A_Fr10_6	67
Tabela 4-9 - Dados de deslocamento químico de ^1H da substância purpurfusarina .	71
Tabela 4-10 - Dados de deslocamento químico de ^1H da ciclo prolina-leucina.....	73
Tabela 5-1 – Meios líquidos e sólidos utilizados no cultivo de <i>E. weberi</i>	89
Tabela 5-2 - Dados de RMN de ^1H obtidos para a substância EwLh_prep_2 e aqueles encontrados para a substância shearinina D.....	99
Tabela 5-3 - Comparação entre os dados de RMN de ^{13}C obtidos para a substância EwLh_prep_1 e aqueles reportados para a substância melinacidina IV	102
Tabela 5-4 – Massa molar das shearininas já reportadas na literatura.....	112

Tabela 5-5 - Comparação entre os dados de RMN de ^1H obtidos para a substância EwLh_prep_3 e aqueles reportados para a substância shearinina A	115
---	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1 - À esquerda, <i>Atta sexdens</i> e à direita, <i>Acromyrmex coronatus</i>	1
Figura 1-2 - Imagens de <i>L. gongylophorus</i> em A) jardim de fungos de <i>Atta</i> e B) cultivado em Placa de Petri contendo meio de cultura artificial.....	2
Figura 1-3 - Algumas das relações ecológicas observadas no jardim de fungos de formigas cortadeiras.....	3
Figura 1-4 - Antifúngicos produzidos por <i>Pseudonocardia</i> a) candicina D, b) actinomycina D, c) antimycina A1 e d) pseudo-nocardona B.....	4
Figura 1-5 - Análise de bioinformática do genoma de <i>E. weberi</i> por AntiSmash 2.0...7	7
Figura 1-6 – Metabólitos secundários reportados para <i>Escovopsis weberi</i>	8
Figura 1-7 – Fusarielinas produzidas por <i>F. tricintum</i> através da abordagem OSMAC	10
Figura 1-8 - Novas citocalasinas obtidas para <i>Spicaria elegans</i> após suplementar o meio com D- e L-triptofano.....	10
Figura 1-9 – Peptídeo jagaricina, fator de virulência de <i>J. agaricidamnosum</i> , produzida após infecção da bactéria no cogumelo ao qual é patógena.....	12
Figura 1-10 – Policetídeos obtidos pelo cocultivo entre <i>A. nidulans</i> e uma actinomiceto	12
Figura 1-11 – Produção de nigerona por <i>A. niger</i> após adição do modificador epigenético SAHA.....	13
Figura 3-1 - Esquema geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA, mostrando o ponto de clivagem pelas catepsinas.....	24
Figura 3-2 – Sistema (“chamber”) utilizado para cocultivo em meio líquido.	30
Figura 3-3 -Representação das regiões extraídas no experimento de cocultivo entre <i>E. weberi</i> e <i>B. gladioli</i>	31
Figura 4-1 - À esquerda, <i>E. weberi</i> (LESF034) e à direita, <i>E. microspora</i> (LESF019), ambos com 15 dias de crescimento em meio BDA.....	40
Figura 4-2 - Cromatogramas dos extratos de acetato de etila fungos <i>E. microspora</i> a) LESF019, b) LESF054 e <i>E. weberi</i> c) LESF020 e d) LESF034 após 28 dias de cultivo ($\lambda=254$ nm).....	41
Figura 4-3 - Perfil químico de <i>E. microspora</i> (LESF019) com a) 14 dias, b) 21 dias, c) 28 dias e d) 40 dias de cultivo.....	43

Figura 4-4 - Perfil químico de <i>E. weberi</i> (LESF034) com a) 14 dias, b) 21 dias, c) 28 dias e d) 40 dias de cultivo.....	44
FIGURA 4-5 – Espectros de RMN de ¹ H obtido para a substância emodina (400 MHz, acetona- <i>d</i> ₆).	46
Figura 4-6 – Espectro de massas (ESI-) da substância L019_A_Fr2.....	47
Figura 4-7 – Espectro no UV da substância L019_A_Fr2.	47
FIGURA 4-8 – Estrutura química da antraquinona emodina.	48
Figura 4-9- Ensaio antibacteriano da substância emodina frente às bactérias <i>P. echinatifior</i> Ae 706 e <i>P. octospinosus</i> Ae707.....	49
Figura 4-10 - Ensaio de inibição do crescimento radial micelial de <i>L. gongylophorus</i> frente a antraquinona emodina: a) controle; b) meio contendo a substância emodina.	50
Figura 4-11 - Espectro de massas (ESI+) da substância L019_A_Fr3.....	51
Figura 4-12 - Espectro no UV da substância L019_A_Fr3.....	51
FIGURA 4-13 – Espectro de RMN de ¹ H da substância L019_A_Fr3 (acetona- <i>d</i> ₆ , 400 MHz).....	52
FIGURA 4-14 – Estrutura química da aza-antraquinona 6-O-demetil-5-deoxibostrycoidina.	53
FIGURA 4-15 – Rota biossintética de aza-antraquinonas em fungo marinho	54
Figura 4-16 - Ensaio de inibição do crescimento radial micelial de <i>L. gongylophorus</i> frente a aza-antraquinona 6-O-demetil-5-deoxibostrycoidina: a) controle, b) meio contendo a aza-antraquinona.....	54
Figura 4-17 – Espectro de massas da substância L019_A_Fr5.....	55
Figura 4-18 - Espectro de RMN de ¹ H da substância L019_A_FR5 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	56
Figura 4-19 - Espectro de RMN de ¹ H da substância ácido indol-3-carboxílico (padrão Sigma, CD ₃ OD, 400 MHz).	56
Figura 4-20- Estrutura química do ácido indol-3-carboxílico.	57
Figura 4-21 – Ensaio de inibição do crescimento radial micelial de <i>L. gongylophorus</i> frente ao ácido indol-3-carboxílico: a) controle; b) meio contendo a substância ácido indol-3-carboxílico.....	58
FIGURA 4-22 – Espectro de RMN ¹ H obtido para a substância L019_A_Fr6 (acetona- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)	59

Figura 4-23 - Espectro de RMN de HMBC da substância L019_A_Fr6 (acetona-d ₆ , 400 MHz).....	59
Figura 4-24 – Espectro de RMN de COSY da substância L019_A_Fr6 (acetona-d ₆ , 400 MHz).....	60
Figura 4-25 - Espectro de massas (ESI+) da substância L019_A_Fr6.....	61
Figura 4-26 - Estrutura da substância 3,4-diidro-3-(2-oxo-propil)- 6,8-triidroxi-1(2H)-naftalenona	61
Figura 4-27 – Espectro de RMN de ¹ H obtido para a fração L019_A_Fr10_6 (D ₂ O, 400 MHz).....	63
Figura 4-28 – Cromatograma (210 nm) da mistura L019_A_Fr10_6.....	63
Figura 4-29 – Espectros de massas (ESI+) obtidos no processamento das bandas em a) 3,79 e b) 4,19 minutos	64
Figura 4-30 - Espectro de RMN de ¹ H ampliado entre 2-5 ppm da amostra L019_A_Fr10_6 (D ₂ O, 400 MHz)	65
Figura 4-31 - Espectro de RMN de ¹ H ampliado entre 7-8 ppm da amostra L019_A_Fr10_6 (D ₂ O, 400 MHz)	65
Figura 4-32 - Espectro de RMN de HSQC da amostra L019_A_Fr10_6 (D ₂ O, 400 MHz).....	66
Figura 4-33 - Estrutura química da substância majoritária da fração L019_A_Fr10_6: dicetopiperazina ciclo Trp-Ser.....	67
Figura 4-34 - Espectro de RMN de ¹ H da substância L019_A_Fr12 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	68
Figura 4-35 - Espectro de RMN de HMBC da substância L019_A_Fr12 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	69
Figura 4-36 – Espectro de massas (ESI+) da substância L019_A_Fr12.....	70
Figura 4-37 - Estrutura química da substância purpurfugarina.....	70
Figura 4-38 - Espectro de RMN de ¹ H da substância L019_A_Fr49 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	71
Figura 4-39 - Espectro de RMN de COSY da substância L019_A_Fr49 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	72
Figura 4-40 – Estrutura química da substância ciclo Pro-Leu	72
Figura 4-41 - Espectro de massas (ESI+) da substância ciclo prolina-leucina.....	73
Figura 4-42 - Espectro de RMN de ¹ H da substância L019_E_7 (CDCl ₃ , 400 MHz) .	74
Figura 4-43 - Cromatograma de íons totais da amostra L019_E_7.....	75

Figura 4-44 - Espectro de massas (EI) obtidos para a amostra L019_E_7	75
Figura 4-45 Estrutura química do ácido 2,3-diidroxibenzóico.....	76
Figura 4-46 - Espectro de RMN de ¹ H da substância L019_E_19 (D ₂ O, 400 MHz) ..	76
Figura 4-47 - Espectro de RMN de ¹³ C da substância L019_E_19 (D ₂ O, 400 MHz).	77
Figura 4-48 - Espectro de massas (ESI+) da substância ácido 2,3-dihidrocarboxílico	77
Figura 4-49 – Espectro de RMN de ¹ H da substância L019_E_13 (CD ₃ OD, 400 MHz)	78
Figura 4-50 -Espectro de massas de alta resolução da substância L019_E_13 (ESI+)	79
Figura 4-51 - Estrutura da substância L019_E_Fr13 (catenarina).....	79
Figura 4-52 - Metabólitos secundários isolados a partir dos extratos de <i>E. weberi</i> (LESF034).....	80
Figura 4-53 Análise de bioinformática do genoma de <i>E. weberi</i> por AntiSmash 2.0.	81
Figura 4-54 -Cromatogramas obtidos para os extratos controle e do cultivo do fungo em meios suplementados ($\lambda=254$ nm).	83
Figura 4-55 - Cromatogramas obtidos para os extratos controle e do cultivo do fungo em meios suplementados ($\lambda= 254$ nm).	84
Figura 4-56 - Crescimento de <i>E. microspora</i> em meio contendo formigas cortadeiras.	85
Figura 4-57 - Imagens obtidas por MEV ambiental de <i>E. microspora</i> crescendo sob formiga cortadeira	86
Figura 5-1 – Modificadores epigenéticos utilizados nos experimentos de epigenética	88
Figura 5-2 - Análise dos <i>Base peak chromatogram</i> (BPC) da suplementação com os modificadores epigenéticos SAHA e NAA (ESI +).....	89
Figura 5-3 – Análise dos <i>Base peak chromatograms</i> (BPC) obtidos em vários meios de cultivos (ESI +).....	90
Figura 5-4 - Experimento de cocultivo entre <i>E. weberi</i> e <i>B. gladioli</i> e as diferentes regiões extraídas.....	93
Figura 5-5 - Cromatogramas (254 nm) referente às três regiões extraídas: a) lado de <i>B. gladioli</i> , B) região entre os micro-organismos e C) lado de <i>E. weberi</i>	93

Figura 5-6 - Cromatograma referente ao lado A, cromatograma de íons extraídos de m/z 641 e cromatograma de íons extraídos (m/z 641) da cultura axênica ($\lambda= 254$ nm).....	94
Figura 5-7 - Espectro de ions filhos de m/z 641	94
Figura 5-8 - Regiões de extração do cocultivo entre <i>E. weberi</i> (à esquerda da placa de Petri) e os micro-organismos do gênero <i>Leucoagaricus</i> (à direita da placa de Petri).....	95
Figura 5-9 - Cromatogramas a 254nm a partir dos extratos de cocultivo de: a) lado de <i>E. weberi</i> , B) regiões entre os micro-organismos e C) lado de <i>L. holoserinceus</i>	96
Figura 5-10 - Espectro de massas referente ao pico em 9,80 min (ESI+).....	97
Figura 5-11 – Espectro de RMN de ^1H da substância EwLh_prep_2 (CD_3OD , 500 MHz).....	98
Figura 5-12 - Estrutura química da substância shearinina D.....	98
Figura 5-13 -Espectro de massas da substância melinacidina IV (ESI-).....	100
Figura 5-14 -Ampliação do íon m/z 727	100
Figura 5-15 - Espectro de RMN de ^1H da substância melinacidina IV (CD_3OD , 500 MHz).....	101
Figura 5-16 - Estrutura química da substância melinacidina IV.....	101
Figura 5-17 - Análise do cluster biossintético 3 de <i>E. weberi</i>	103
Figura 5-18- Análise do cluster biossintético 15 de <i>E. weberi</i>	103
Figura 5-19 – À esquerda, cultura axênica de <i>E. weberi</i> (5 dias de cultivo) e à direita, cocultivo entre <i>E. weberi</i> e <i>L. gongylophorus</i> após 5 dias do inóculo de <i>E. weberi</i>	104
Figura 5-20 - Estimativa da produção de shearinine D por <i>E. weberi</i> (Ew) quando cocultivado com diferentes cepas de <i>Leucoagaricus</i> (Lg: <i>L. gongylophorus</i> , Lh: <i>L. holoserinceus</i> e Ll: <i>L. leucothites</i>)	105
Figura 5-21 - Imagens obtidas por MALDI-IMG no cocultivo entre <i>E. weberi</i> e <i>L. gongylophorus</i>	106
Figura 5-22 - Cromatograma (254 nm) do extrato de cocultivo de <i>E. weberi</i> (Esco724) e <i>L. gongylophorus</i> (UK). Pico 1 (22,8 min) trata-se da substância melinacidina IV e o pico 2 (27,6 min) da substância shearinina D.	107
Figura 5-23 - Comparação da produção de Melinacidina IV em diferentes tratamentos: cultura axênica, cocultivo de <i>E. weberi</i> (Esco 724) x <i>L.</i>	

<i>gongylophorus</i> (CBS 627.89), e cocultivo de <i>E. weberi</i> (Esco 724) x <i>L. gongylophorus</i> (UK)	108
Figura 5-24 - Comparação da produção de Shearinina D em diferentes tratamentos: cultura axênica, Colcultivo de <i>E. weberi</i> (Esco 724) x <i>L. gongylophorus</i> (CBS 627.89), e colcultivo of <i>E. weberi</i> (Esco 724) x <i>L. gongylophorus</i> (UK).....	108
Figura 5-25 - Ensaio antifúngico de 1) melinacidina IV e 2) shearinina D frente à <i>L. holoserinceus</i> . CP* = controle positivo (nystatina), CN** = controle negativo. .	110
Figura 5-26 - Ensaio antifúngico de 1) melinacidina IV e 2) shearinina D frente à <i>L. leucothites</i> . CP* = controle positivo (nystatina), CN** = controle negativo.	110
Figura 5-27 – Resultado dos ensaios antimicrobianos realizados para 1) melinacidina IV e 2) shearinina D. PC= controle positivo (ciprofloxacina 5µg/mL), NC = controle negativo (apenas meio), e MC = controle do meio (inóculo das bactérias em meio contendo 5% de metanol).....	111
Figura 5-28 - Cromatograma de íons extraídos detecta a produção de análogos de shearinina D nos extratos de cocultivo entre <i>E. weberi</i> X <i>L. gongylophorus</i>	113
Figura 5-29 - Espectro de RMN de ¹ H obtido para a substância Ew_Lh_prep3 (CD ₃ OD, 500 MHz).....	114
Figura 5-30 – Espectro de massas de alta resolução da substância Ew_Lh_prep3 (ESI+).	114
Figura 5-31 – Estruturas da shearinina A (à esquerda) e 22,23-desidroshearinina A (à direita).....	115
Figura 5-32 - Perfil isotópico das melinacidinas detectadas por UPLC-HRMS: 1) possível nova melinacidina, 2) melinacidina III e 3) melinacidina IV	116
Figura 5-33- Perfil de fragmentação das melinacidinas detectadas por UPLC-HRMS: 1) possível nova melinacidina, 2) melinacidina III e 3) melinacidina IV.....	117
Figura 5-34 – Estudo de fragmentação da substância melinacidina IV.....	118
Figura 5-35 - Proposta biossintética da melinacidina IV.....	119
Figura 5-36 - Possibilidades para o íon <i>m/z</i> 699	119
Figura 5-37 - Estudo do perfil de fragmentação da possibilidade A	120
Figura 5-38 -Estudo do perfil de fragmentação da possibilidade B	121
Figura 5-39 - Proposta estrutural para a substância desconhecida de <i>m/z</i> 699.....	122
Figura 5-40 - Imagens obtidas por MALDI-IMG no cocultivo entre <i>E. weberi</i> e <i>L. gongylophorus</i>	122
Figura 5-41 – Espectros de íons produtos dos íons de <i>m/z</i> 1032 e 1056	123

Figura 5-42 - Esqueleto base de um lipídeo betaínico	124
Figura 5-43 - Proposta de fragmentação para formação dos íons observados no espectro de íons produtos do íon m/z 736 (gerado pela fragmentação de m/z 1032).....	124
Figura 5-44 - Proposta de fragmentação para formação dos íons observados no espectro de íons produtos do íon m/z 736 (gerado pela fragmentação de m/z 1056).....	125
Figura 5-45 – Cromatogramas (254 nm) de a) cultura axênica de <i>E. microspora</i> (LESF019) e b) cocultivo entre <i>E. microspora</i> (LESF019) e <i>L. gongylophorus</i> . Pico 1 (27,8 min) é referente a melinacidina IV e pico 2 (330,2 min), a shearinina D.	127
Figura 5-46 - Espectro de massas das substâncias melinacidina IV (1) e shearinina D (2).....	128
Figura 5-47 – Cromatogramas (254 nm) de A) cultura axênica de <i>E. weberi</i> (LESF034) e B) cocultivo com uma levedura negra; em que 1: melinacidina IV, 2: shearinina D	130
Figura 5-48 - Valores de IC_{50} (μM) obtido para algumas substâncias isoladas.....	132

RESUMO

ESTUDO QUÍMICO E ECOLÓGICO DE *ESCOVOPSIS* SPP., UM INVASOR DO JARDIM DE FUNGOS DE FORMIGAS CORTADEIRAS. Os microorganismos associados às formigas cortadeiras compreendem uma rica fonte de substâncias antifúngicas e de agentes de controle biológico em virtude do ambiente em que estão inseridos. O jardim de fungos das formigas cortadeiras caracteriza-se como uma complexa rede microbiana em que participam, pelo menos, um fungo mutualista (*Leucoagaricus gongylophorus*), um fungo parasita especializado (do gênero *Escovopsis*), actinomicetos simbiotes (*Pseudonocardia* e *Streptomyces* spp.) e outros microrganismos com função ecológica ainda desconhecida. Dentre estes, destacam-se os fungos do gênero *Escovopsis*, devido a sua capacidade em levar ninhos à morte quando infectados. Apesar do seu potencial como produtor de agentes antimicrobianos, até o presente momento não há estudos dos mediadores químicos envolvidos nesta relação ecológica. Assim, visando progredir na ecologia-química de *Escovopsis* spp, duas espécies deste gênero (*E. microspora* e *E. weberi*) tiveram seus aspectos metabolômicos e quimio-ecológicos investigados. Através dos estudos metabolômicos, foi possível isolar e identificar diversos metabólitos secundários como antraquinonas, aza-antraquinonas, policetídeos, dicetopiperazinas, alcalóides terpeno-indólicos, dentre outros. Já os experimentos de cocultivo entre *E. weberi* e *L. gongylophorus* levaram ao isolamento e identificação de dois metabólitos (melinacidina IV e shearinina D) que são regulados na presença do fungo simbiote. Apesar de não apresentarem atividade antifúngica frente a *L. gongylophorus*, estes metabólitos inibem o crescimento de bactérias responsáveis pela proteção do ninho (*Pseudonocardia* spp.). Assim, essas substâncias revelam uma das maneiras de *Escovopsis* para enfrentar a guerra ecológica presente nos jardins de fungos de formigas cortadeiras.

ABSTRACT

STUDIES ON CHEMICAL AND ECOLOGY OF ESCOVOPSIS spp., AN INVADER OF LEAF-CUTTING ANTS. Microorganisms associated to leaf cutting ants comprise an important source of antifungal and antibacterial compounds due to the environment they are inserted in. The fungal garden is composed by a complex microbial network in which, can be found, at least, a mutualistic fungus (*Leucoagaricus gongylophorus*), a specialized parasite (*Escovopsis* spp.), symbionts actinomycetes (*Pseudonocardia* and *Streptomyces* spp.) and many other microbes with still unknown ecological functions. Among these, we highlight the fungi belonging to the genus *Escovopsis*, due to their ability to bring nests to death when infected. In spite of its potential to produce antimicrobial agents, until now there is no reports about the chemical mediators produced by *Escovopsis* that are involved in this ecological relationship. Thus, aiming to better understanding the chemical-ecology of *Escovopsis* spp., two species from this genus (*E. microspora* and *E. weberi*) were investigated on their metabolomics and chemical-ecology aspects. Through metabolomics studies, it was possible to isolate and identify several secondary metabolites such as anthraquinones, aza-anthraquinones, polyketides, diketopiperazines, terpene-indole alkaloid, among others. On the other hand, coculture experiments between *E. weberi* and *L. gongylophorus* led to the isolation and identification of two compounds (melinacidin IV and shearinine D) which are upregulated in the presence of the symbiont fungus. Despite the fact they don't display antifungal activity against *L. gongylophorus*, these metabolites inhibit the growth of bacteria responsible for the nest protection (*Pseudonocardia* spp.). Therefore, these substances may play a role in the ecological war between the microorganisms living in the leaf-cutting ants fungal garden.

SUMÁRIO

1. – Introdução	1
1.1 – Microbiota associada ao jardim de fungos de formigas cortadeiras	1
1.2 – O gênero <i>Escovopsis</i>	5
1.3 – Indução da expressão de metabólitos secundários crípticos.....	9
1.4 - Catepsinas como alvos moleculares	14
2. – Objetivos	17
3. - Procedimento experimental	19
3.1 – Materiais utilizados	19
3.2 – Equipamentos.....	20
3.3 – Manutenção do micro-organismo em placa de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar).....	21
3.4 – Cultivo dos micro-organismos em pequena escala	22
3.5 – Ensaio de inibição do crescimento micelial de <i>L. gongylophorus</i>	23
3.6 – Ensaio de inibição enzimática dos extratos frente às catepsinas L e V...23	
3.7 –Análise do perfil cromatográfico de <i>E. weberi</i> (LESF034) e <i>E. microspora</i> (LESF019) em diferentes tempos de cultivo	25
3.8 – Cultivo em larga escala dos micro-organismos <i>E. weberi</i> (LESF034) e <i>E. microspora</i> (LESF019).....	26
3.9 - Isolamento dos metabólitos secundários de <i>E. microspora</i> (LESF019) e <i>E. weberi</i> (LESF034) a partir dos extratos de acetato de etila	26
3.9.1 - Isolamento dos metabólitos secundários dos extratos etanólicos de <i>E. microspora</i> (LESF019) e <i>E. weberi</i> (LESF034)	27
3.10 - Cultivo dos micro-organismos <i>E. weberi</i> e <i>E. microspora</i> em diferentes meios de cultivo (abordagem OSMAC)	28
3.11 – Estudos de adição de modificadores epigenéticos - <i>E. weberi</i> (ARSEF5576)	29
3.12 – Cocultivo de <i>E. weberi</i> (ARSEF5576) e <i>Bulkholderia gladioli</i>	29
3.13 – Cocultivo de <i>E. weberi</i> (ARSEF5516) e micro-organismos do gênero <i>Leucoagaricus</i>	31
3.13.1 Isolamento e identificação dos metabólitos shearinine D e melinacidina	

3.14 - Estimativa da produção de shearinine D e melinacidina IV por HPLC-UV	.32
3.15 - Análise por MALDI-IMG do experimento de cocultivo entre <i>E. weberi</i> (ARSEF5574) e <i>L. gongylophorus</i> (CBS 627.89)	33
3.16 – Ensaio dos metabólitos isolados frente aos fungos <i>L. leucothites</i> e <i>L. holoserinceus</i>	34
3.17 - Ensaio dos metabólitos isolados frente às bactérias <i>Pseudonocardia echinator</i> Ae706 e <i>P. octospinosus</i> Ae707	34
3.18 - Cocultivo entre <i>E. microspora</i> (LESF019) e <i>L. gongylophorus</i>	35
3.19 - Cocultivo entre <i>E. weberi</i> (LESF034) e uma levedura negra isolada dos ninhos de <i>Atta sexdens</i>	36
3.20 – Ensaio dos metabólitos secundários isolados frente a catepsina V (IC ₅₀)	.36
4. Resultados e discussão	37
4.1 – Cultivo dos micro-organismos em pequena escala e ensaio dos extratos frente às catepsinas L e V	37
4.2 – Análise do perfil cromatográfico de <i>E. weberi</i> (LESF034) e <i>E. microspora</i> (LESF019)	39
4.3 – Isolamento e caracterização dos metabólitos secundários de <i>E. microspora</i>	45
4.3.1 - Substância L019_A_Fr2 (Emodina)	46
4.3.2– Substância L019_A_Fr3 (6-O-demetil-5-deoxibostrycoidina)	50
4.3.3 Substância L019_A_Fr5 (ácido indol-3-carboxílico)	54
4.3.4- Substância L019_A_Fr6 (3,4-diidro-3-(2-oxo-propil)-6,8-triidroxi-1(2H)-naftalenona)	58
4.3.5- Substância L019_A_Fr10_6 (Ciclo triptofano-serina)	62
4.3.6- Substância L019_A_Fr12 (Purpufusarina)	68
4.3.7- Substância L019_A_Fr49 (ciclo leucina-prolina)	71
4.3.8- Substância L019_E_7	74
4.3.9- Substância L019_E_19 (ácido 2,3-diidroxi-benzóico)	75
4.3.10 Substância L019_E_13 (catenarina)	77
4.4 – Isolamento e caracterização dos metabólitos secundários de <i>E. weberi</i> (LESF034)	80
4.5 - Aplicação da abordagem OSMAC como uma tentativa de variação dos perfis químicos de <i>Escovopsis</i> spp.	80

4.5.1 – Modificação do meio de cultura como estratégia para indução de rotas silenciadas (OSMAC).....	81
4.5.1.1 - Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	85
5. - Resultados obtidos durante período de doutorado sanduíche no Hans-Knöll Institute, Leibniz Institute (Jena, Alemanha).....	87
5.1 –Indução de metabólitos críticos de <i>E. weberi</i> (ARSEF5574)	87
5.1.1 - Indução dos metabólitos silenciados através da adição de modificadores epigenéticos.....	87
5.1.2- Indução dos metabólitos críticos através do cultivo em vários meios ..	89
5.2 - Estudos de cocultivo de <i>E. weberi</i> (ARSEF5574) e micro-organismos associados aos ninhos de formigas cortadeiras	91
5.2.1 - Cocultivo entre <i>E. weberi</i> (ARSEF5574) e <i>Burkholderia gladioli</i>	91
5.2.2- Cocultivo entre <i>E. weberi</i> (ARSEF5574) e os micro-organismos <i>Leucoagaricus leucothites</i> e <i>Leucoagaricus holoserinceus</i>	95
5.2.3- Cocultivo entre <i>E. weberi</i> (ARSEF5574), <i>L. gongylophorus</i> (CBS 627.89), <i>L. leucothites</i> e <i>L. holoserinceus</i>	103
5.2.3.1 - Estimativa da produção de shearinina D e melinacidina IV nos cocultivos de <i>E. weberi</i> (ESCO724) e cepas de <i>L. gongylophorus</i>	106
5.2.4– Função ecológica dos metabólitos shearinina D e melinacidina IV	109
5.2.4.1 - Ensaio frente aos fungos <i>L. holoserinceus</i> e <i>L. leucothites</i>	109
5.2.4.2 - Ensaio frente as bactérias <i>Pseudonocardia echinator</i> Ae706 e <i>P. octospinosus</i> Ae707	110
5.3 - Detecção e identificação de derivados de shearinina D e melinacidina IV	111
5.3.1 - Detecção dos análogos de shearinina D por UPLC-HRMS	112
5.3.2– Detecção e identificação dos análogos de melinacidina IV por UPLC-HRMS.....	116
5.4 - Detecção e identificação de lipídios betaínicos por MALDI-IMG	122
5.5 - Cocultivo entre <i>E. microspora</i> (LESF019) e <i>L. gongylophorus</i>	125
5.6 - Cocultivo entre <i>E. weberi</i> (LESF 034) e uma levedura negra.....	129
5.7 - Ensaio dos metabólitos isolados frente a catepsina V.....	131

7. Conclusões	135
8. Referências bibliográficas	137
APÊNDICE	148

1. – Introdução

1.1– Microbiota associada ao jardim de fungos de formigas cortadeiras

As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (Figura 1-1) são pertencentes à tribo Attini. Devido à sua capacidade de cultivar e de se alimentar de um fungo mutualista, elas são conhecidas também como jardineiras e formigas cultivadoras de fungo. (WEBER, 1955).



Figura 1-1 - À esquerda, *Atta sexdens* e à direita, *Acromyrmex coronatus*.

As formigas cortadeiras realizam a coleta de diversas espécies vegetais frescas a fim de cultivar e manter seu fungo mutualista. (LEAL e OLIVEIRA, 2000; MUELLER, 1998). Inicialmente pensava-se tratar do fungo *Rozites gongylophora* (MUELLER et al., 2001). Porém, estudos posteriores (PAGNOCCA et al., 2001) determinaram que este isolado correspondia, na verdade, a um basidiomiceto conhecido por *Leucoagaricus gongylophorus* (Figura 1-2).

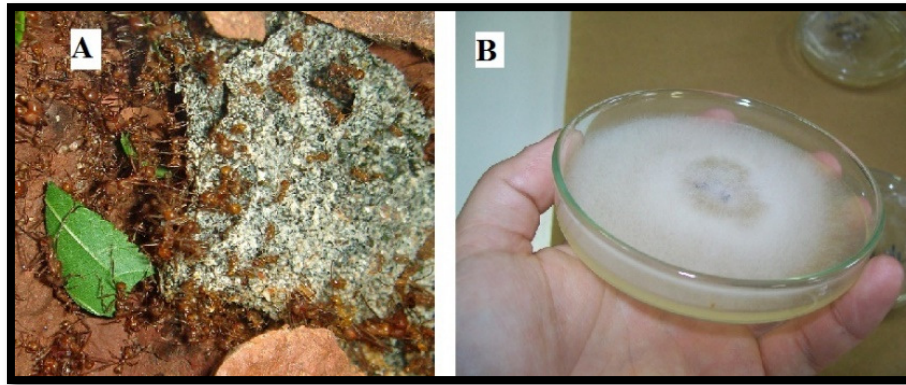


Figura 1-2 - Imagens de *L. gongylophorus* em A) jardim de fungos de *Atta* e B) cultivado em Placa de Petri contendo meio de cultura artificial.

Estudos realizados por STRADLING e POWELL (1986) mostraram que este fungo é um mutualista específico, ou seja, é a única espécie cultivada no jardim de fungos de formigas cortadeiras. O cultivo exclusivo nos ninhos evita que haja a competição entre micro-organismos.

No início, pensava-se que o jardim de fungos era composto apenas pelo fungo simbiote. (WEBER, 1955). Porém, atualmente sabe-se que há a ocorrência de pelo menos um parasita especializado do gênero *Escovopsis*, bactérias simbiotes (*Pseudonocardia* spp.) e possíveis patógenos (*Fusarium*, *Trichoderma*, etc.) (CURRIE et al., 1999; CURRIE e STUART, 2001, RODRIGUES et al., 2005). Assim, as interações-ecológicas que ocorrem neste ambiente são muito mais complexas do que o imaginado a princípio (Figura 1-3).

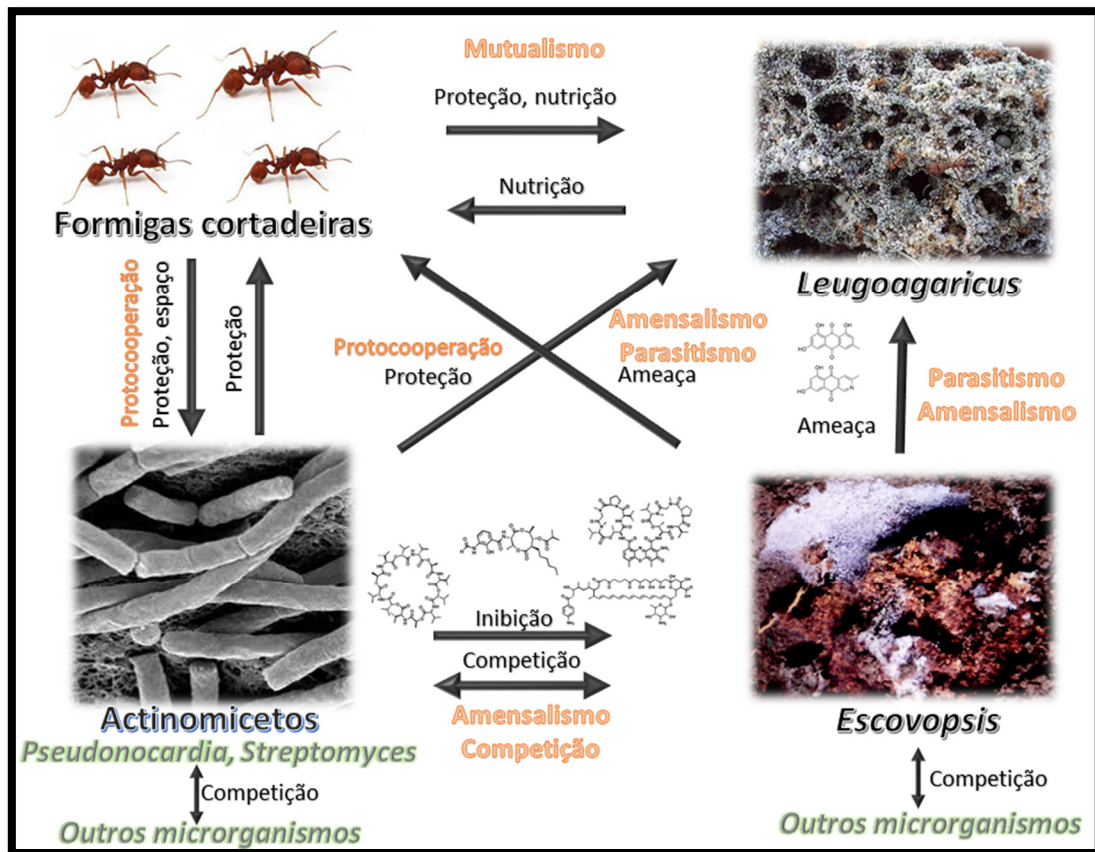


Figura 1-3 - Algumas das relações ecológicas observadas no jardim de fungos de formigas cortadeiras

O cultivo do fungo simbiote, *L. gongylophorus*, tem como finalidade prover alimento, proteção e espaço ao mesmo, além de nutrientes para as formigas trabalhadoras e larvas em crescimento. O micro-organismo, por sua vez, é responsável pela degradação do material vegetal por elas coletado (WEBER, 1955).

Já as actinomicetos, especialmente as bactérias do gênero *Pseudonocardia*, são responsáveis por produzir antifúngicos (SCHOENIAN et al., 2011) com intuito de proteger o jardim contra o ataque de parasitas, evitando que o formigueiro entre em colapso e venha à morte (HAEDER et al., 2009; SCHULTZ, 1999). Diversas bactérias deste gênero já foram isoladas e identificadas a partir dos jardins de fungos de formigas cortadeiras. Vários estudos já foram realizados para determinar as substâncias produzidas capazes de combater o invasor *Escovopsis* spp. (HOLMES et al., 2016). Por exemplo, candidicina D (HAEDER et al., 2009), actinomicina D (SCHOENIAN et al., 2011), antimicina A1 e pseudo-nocardona B (CARR et al., 2012) são alguns dos metabólitos já reportados (Figura 1-4).

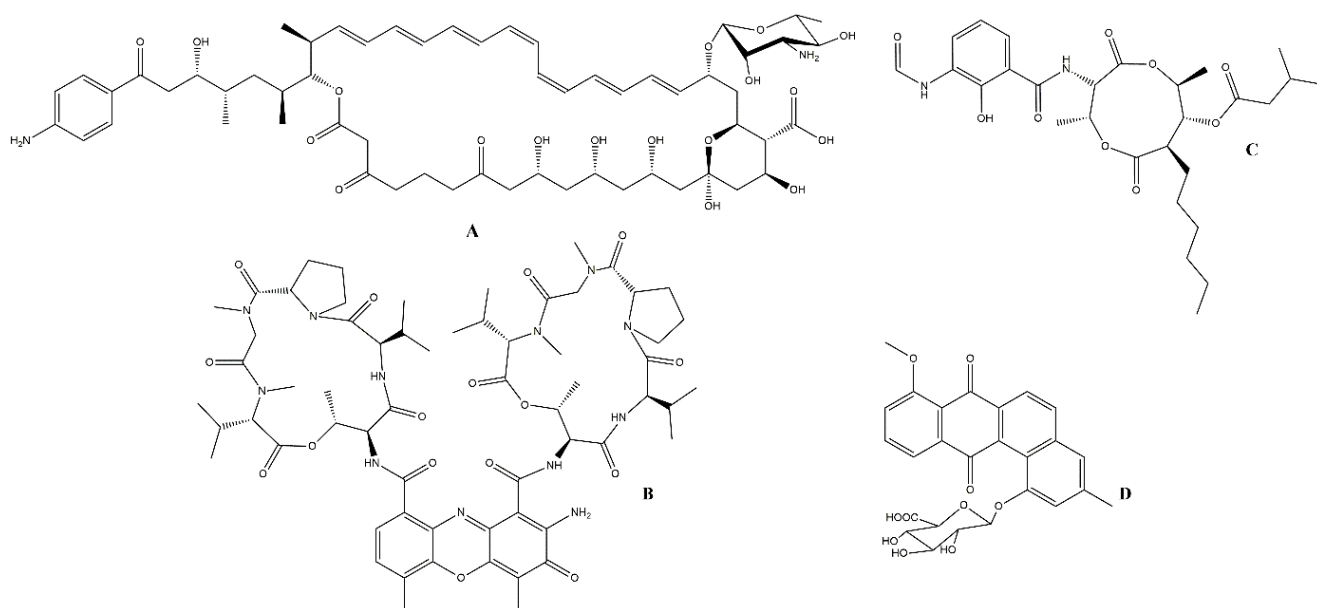


Figura 1-4 - Antifúngicos produzidos por *Pseudonocardia* a) candicina D, b) actinomycina D, c) antimycina A1 e d) pseudo-nocardona B

Além destes, muitos outros micro-organismos estão presentes no jardim de fungos dos ninhos de *Attini*. Em um levantamento de fungos filamentosos associados às colônias de formigas *Atta sexdens rubropilosa* realizado por RODRIGUES et al. (2005), observou-se a ocorrência de 54% do fungo *Syncephalastrum racemosum*, 21% de *Escovopsis weberi* em ninhos de laboratório e de 38% de *Trichoderma harzianum* e 23 % para *Fusarium oxysporum* em ninhos encontrados em áreas naturais. Ainda segundo RODRIGUES et al. (2008) , em um mapeamento da microbiota de ninhos de *Acromyrmex* spp. realizado no sul do Brasil, cerca de 8% dos ninhos continham um fungo denominado *Moniliella-like* (atualmente descrito como *Escovopsioides*), 27% continham *Escovopsis* spp. e 40,5% *Fusarium oxysporum*. Através destes estudos, observou-se que a microbiota varia em porcentagem e gênero, de acordo com a variação da espécie de formiga.

Apesar da grande variedade de organismos que coabitam o jardim de fungos de formigas cortadeiras, apenas alguns deles (como por exemplo, o fungo simbionte e as bactérias mutualistas) atraíram a atenção de pesquisadores das áreas de biologia, química e ecologia. Portanto, este ambiente ainda representa uma fonte repleta de “tesouros” microbianos inexplorados.

1.2 – O gênero *Escovopsis*

Os fungos pertencentes ao gênero *Escovopsis* são micoparasitas especializados de jardins de fungos de formigas cortadeiras, sendo encontrados apenas neste ambiente (CURRIE, 2001, CURRIE, 2003; CURRIE et al., 1999; CURRIE e STUART, 2001). Estes micro-organismos são capazes de permanecer nos ninhos por longos períodos de tempo, podendo ocasionar a redução da biomassa do jardim e eventualmente, levar colônias inteiras à morte (CURRIE, 2001, CURRIE, 2003).

Várias hipóteses já foram investigadas com relação à sua forma de transmissão. Através destes estudos, foi provado que *Escovopsis* é transmitido horizontalmente, ou seja, a infecção ocorre na formação de novos ninhos a partir daqueles já estabelecidos (CURRIE; et al., 1999; MOREIRA et al., 2015). Além desta, outras hipóteses para a transmissão de *Escovopsis* consistem em: 1) dispersão dos esporos de um ninho para outro pela água da chuva, 2) transmissão através de vetores (artrópodes) que circundam os ninhos, 3) forrageamento de material vegetal contaminado com esporos (AUGUSTIN et al., 2017).

REYNOLDS e CURRIE (2004) observaram que *Escovopsis* é um fungo necrotrófico que penetra as hifas de *Leucoagaricus gongylophorus*. Porém, antes que o contato entre as hifas ocorra, há a liberação de substâncias antifúngicas capazes de degradar o micélio de *L. gongylophorus*, ocasionando a morte do mesmo (REYNOLDS e CURRIE, 2004; VARANDA-HAIFIG et al., 2017). Como o bom funcionamento dos ninhos depende diretamente de *L. gongylophorus*, ao reduzir sua biomassa, *Escovopsis* ocasiona, indiretamente, a morte de todo o ninho (CURRIE, 2001; CURRIE et. al, 1999). Apesar de tais observações, as bases deste sinergismo/antagonismo ainda permanecem desconhecidas (CAFARO et al., 2011).

Devido à sua capacidade em produzir substâncias capazes de extinguir o mutualista e conseqüentemente o formigueiro como um todo, este gênero representa um importante e promissor agente produtor de antimicrobianos que podem vir a ser aplicados no controle de formigas cortadeiras (DE MAN et al., 2016; DHODARY et al., 2018).

Atualmente, cinco espécies são descritas deste parasita: *Escovopsis weberi* (isolado de *Atta* sp., MUCHOVEJ e DELLA LUCIA, 1990), *Escovopsis aspergilloides* (isolado de *Trachymyrmex ruthae*), *Escovopsis microspora*, *Escovopsis*

lentecrescens e *Escovopsis moelleri* (isolados de *Acromyrmex* spp., AUGUSTIN et al., 2013). Embora apenas estas espécies estejam descritas, acredita-se que há ainda outras a serem descobertas. Dentre estas, somente *E. weberi* já teve parte de seu perfil químico e ecológico estudado (BOYA P. et al., 2017; DE MAN et al., 2016; DHODARY et al., 2018).

Estudos genômicos realizados por Man e colaboradores (DE MAN et al., 2016) mostraram que *E. weberi* possui um genoma reduzido quando comparado ao fungo especializado mais próximo, *Trichoderma*. Este fato deve estar associado ao processo de evolução e especialização, em que *Escovopsis* perdeu parte dos genes não essenciais ao desenvolvimento de seu parasitismo, tais como aqueles associados à degradação de plantas. Por outro lado, *E. weberi* reteve os genes associados ao ataque de fungos hospedeiros, fundamentais para estabelecer sua virulência.

No que diz respeito à sua capacidade de produzir metabólitos secundários, através de análises de bioinformática por AntiSmash 2.0 (Figura 1-5) Man e colaboradores identificaram 17 clusteres biossintéticos putativos, dentre os quais destacam-se terpeno sintases, policetídeo sintases (PKS) e peptídeo sintetases não-ribossomais (NRPS). Eles também observaram que a expressão de alguns genes relativos a PKS eram superexpressados quando *E. weberi* era cultivado na presença do hospedeiro *L. gongylophorus*. Além destes, observou-se inclusive a superexpressão de clusteres que codificam para três β -lactamases e um gene de resistência à tetraciclina, que é responsável pela inativação de antibióticos produzidos pelas bactérias durante o processo de defesa (DE MAN et al., 2016).

Cluster 1	Indole-T1pks-Nrps	630849	707764
Cluster 2	Nrps	1614850	1658677
Cluster 3	Nrps	2242136	2288362
The following clusters are from record LGSR01000006.1:			
Cluster 4	Other	37373	80486
Cluster 5	T1pks	115408	180286
Cluster 6	Nrps	367254	422171
Cluster 7	T1pks	1134315	1181773
Cluster 8	Terpene	2492136	2513358
Cluster 9	Other	3071472	3116157
Cluster 10	T1pks	3606937	3653935
The following clusters are from record LGSR01000008.1:			
Cluster 11	Other	13730	55393
Cluster 12	Terpene	220627	241592
Cluster 13	Terpene	613924	635681
The following clusters are from record LGSR01000019.1:			
Cluster 14	Terpene	719153	740562
Cluster 15	Terpene-T1pks-Indole	901165	968965
The following clusters are from record LGSR01000020.1:			
Cluster 16	T1pks	1	41792
Cluster 17	Indole	2527607	2549243
Cluster 18	Terpene	4508687	4529730
The following clusters are from record LGSR01000022.1:			
Cluster 19	T1pks-Nrps	3505629	3558180
Cluster 20	Other	3654977	3698297
The following clusters are from record LGSR01000028.1:			
Cluster 21	T1pks	1310	49917
Cluster 22	Terpene	834345	856793

Figura 1-5 - Análise de bioinformática do genoma de *E. weberi* por AntiSmash 2.0

Recentemente, em um trabalho realizado pelo grupo do Prof. Dieter Spiteller (DHODARY et al., 2018), especialista no estudo de micro-organismos associados a formigas cortadeiras, foram identificados alguns metabólitos produzidos por *E. weberi*. Neste trabalho, observou-se que *E. weberi* foi capaz de produzir duas shearininas inéditas, L e M, além de metabólitos já conhecidos como emodina e cicloartropsona. Embora as novas substâncias não tenham apresentado atividade antifúngica ou antibacteriana, o policetídeo emodina apresentou atividade frente a *L. gongylophorus* e *Streptomyces* spp. Ademais, a detecção de alcalóides do tipo shearinina (D, F e J) nos extratos de *E. weberi* por LC-HRMS já foi reportada em um estudo de interação entre este micro-organismo e actinomicetos associadas às formigas cortadeiras (BOYA P. et al., 2017). Na Figura 1-6 estão representados os metabólitos já reportados para *E. weberi*.

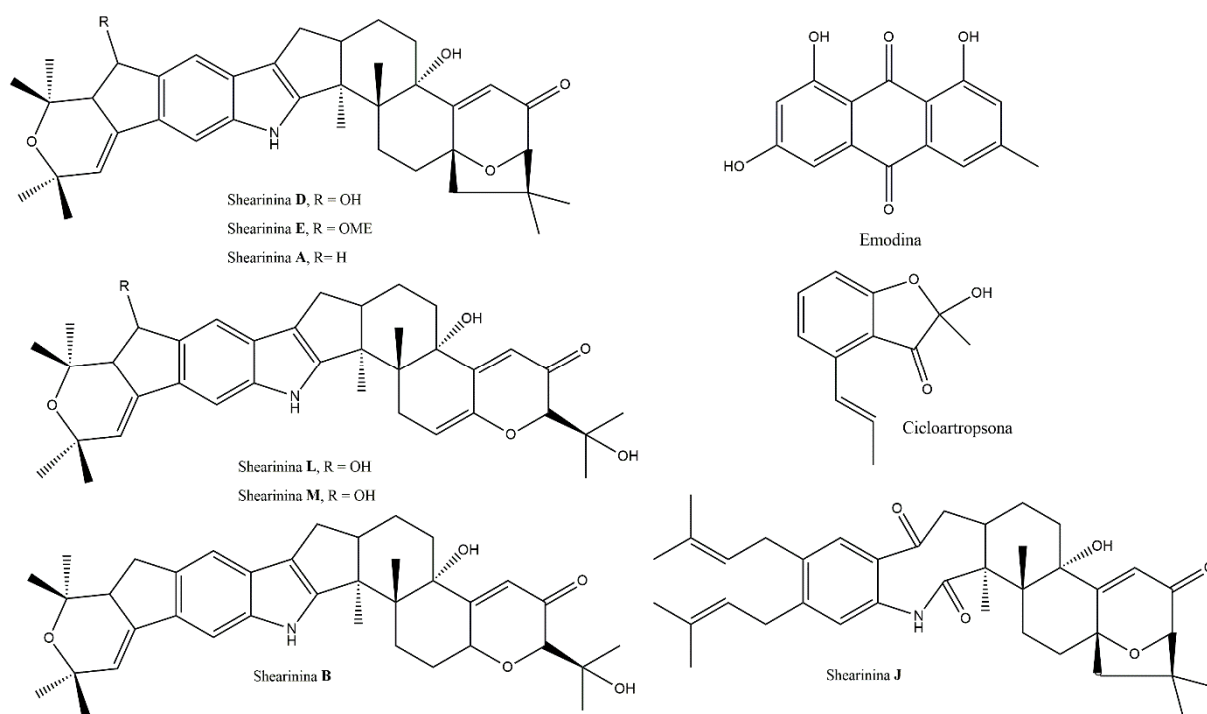


Figura 1-6 – Metabólitos secundários reportados para *Escovopsis weberi*

Embora muito recentemente tenham sido publicados artigos referentes a estudos metabolômicos de *Escovopsis* spp., o conhecimento sobre este assunto ainda é muito superficial. Assim, é necessário avançar no entendimento químico e ecológico das complexas relações em que este fungo está envolvido. A falta de informações quanto à sua diversidade química, fatores de virulência, respostas frente às interações com micro-organismos oriundos deste habitat, cuja função ecológica ainda permanece desconhecida, são argumentos irrefutáveis para a execução deste tipo de pesquisa. Apesar de se tratar de “ciência básica”, as aplicabilidades resultantes destes estudos se estendem desde a agronomia, no desenvolvimento de novos pesticidas ecologicamente corretos, até a medicina, no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Portanto, o gênero fúngico *Escovopsis*, bem como a microbiota de formigas cortadeiras, representam um sistema ideal para o estudo de interações quimio-ecológicas devido à riqueza de interações ali presentes e a falta de informações nas moléculas envolvidas. Deste modo, a execução desta pesquisa de doutorado veio de encontro com esta problemática, permitindo avançar nos aspectos químico e ecológicos de micro-organismos pertencentes ao gênero *Escovopsis*.

1.3 – Indução da expressão de metabólitos secundários crípticos

A busca por novos produtos naturais microbianos bioativos tem sido cada vez mais intensificada, à luz da crescente necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, agroquímicos e outros. De um lado, a diminuição do número de antibióticos disponíveis devido ao aumento de bactérias resistentes; de outro, o uso de pesticidas nocivos ao meio ambiente, demonstram a importância e urgência desta procura. Assim, o desenvolvimento de estratégias capazes de promover a variação dos metabólitos a partir dos micro-organismos à disposição é de fundamental importância.

Estudos têm demonstrado que, alterações nas condições bióticas (composição do meio, cocultivo, etc.), abióticas (iluminação, arejamento, temperatura, agitação, etc.) e/ou de estresse (exposição a luz UV) têm influência direta na expressão gênica e produção de metabólitos secundários. Esta estratégia tem sido referenciada pela sigla "OSMAC" ("One Strain Many Compounds", cuja tradução é "uma cepa, muitos compostos") (BILLS et al., 2008; BODE et al., 2002) e trata-se uma abordagem com respostas aleatórias. Nesse sentido, o uso da abordagem OSMAC implica em realizar modificações no modo de cultivo sem que se possa prever qual(is) rota(s) será(ão) induzida(s). Apesar da aleatoriedade nas respostas, a abordagem OSMAC é uma ferramenta muito eficiente na indução de metabólitos crípticos microbianos.

Diversos exemplos bem-sucedidos de abordagem OSMAC podem ser encontrados na literatura. Por exemplo, o fungo *Fusarium tricinctum* ao ser cultivado em meio de arroz suplementado com sucos de laranja, banana e/ou maçã, teve a produção de fusarielina J (Figura 1-7-1) aumentada cerca de 80 vezes, além de produzir duas substâncias inéditas da mesma classe: fusarielina K (Figura 1-7-2) e fusarielina J (Figura 1-7-3) (HEMPHILL et al., 2017).

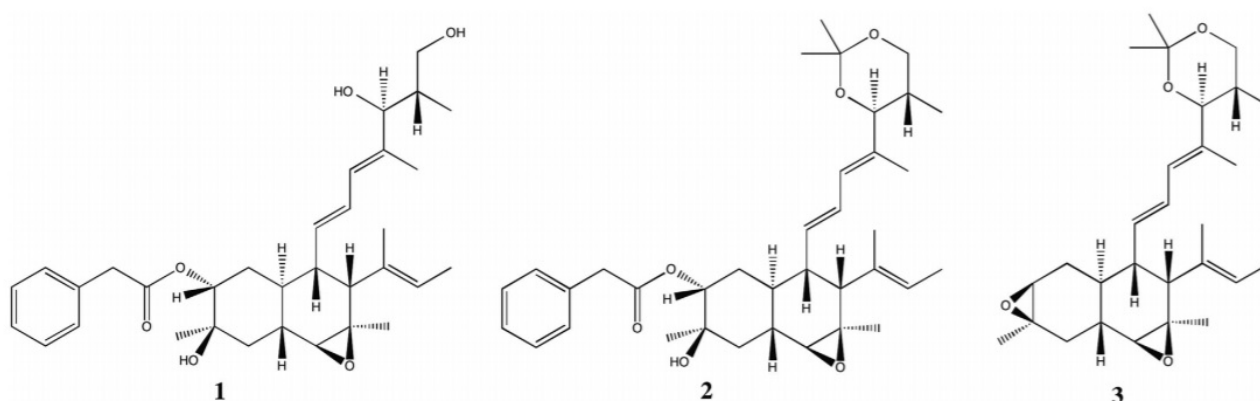


Figura 1-7 – Fusarielinas produzidas por *F. tricinctum* através da abordagem OSMAC

Em um outro estudo, a adição de D- e L-triptofano no meio de cultura do fungo marinho *Spicaria elegans* KLA03 (Figura 1-8) levou à produção de três novas citocalasinas, além de outros derivados (WANG et al., 2011).

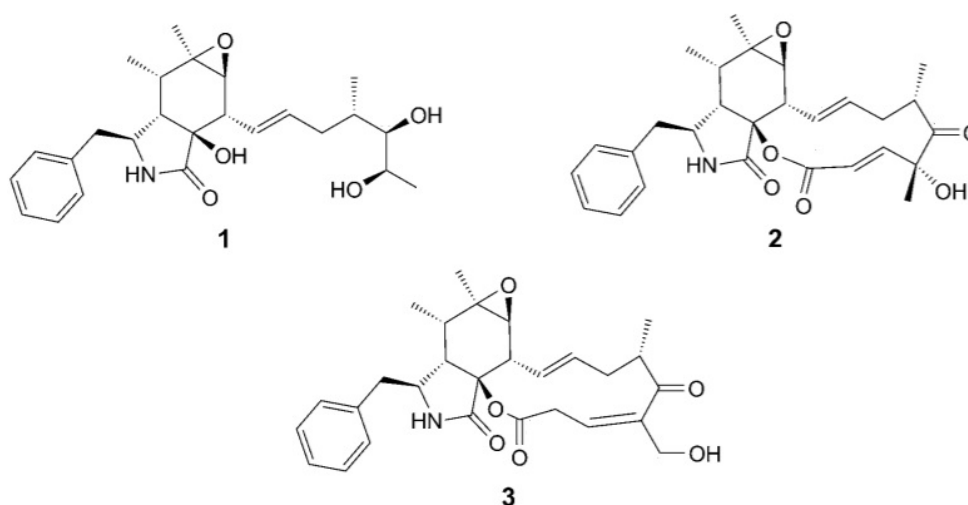


Figura 1-8 - Novas citocalasinas obtidas para *Spicaria elegans* após suplementar o meio com D- e L-triptofano.

Quando em conjunto com técnicas de bioinformática, bioquímicas e analíticas, a abordagem OSMAC permite a identificação de fatores/cofatores genéticos que podem estar envolvidos na indução/inibição de certos metabólitos secundários. Desta maneira, é possível determinar quais tipos de substâncias exógenas adicionadas no meio de cultura podem levar à indução/inibição da biossíntese de metabólitos desconhecidos (BODE et al., 2002). Por exemplo, a adição

de sais de Cu^{2+} e Mg^{2+} no meio de cultivo de *P. brasilianum* ocasionou o silenciamento da expressão de verruculogenina e ativou a rota de uma série de ciclodepsipeptídeos identificados como JBIR 113, JBIR 114 e JBIR115 (FILL et al., 2016).

Ainda que os micro-organismos sejam hábeis produtores dos mais variados metabólitos secundários sob diferentes circunstâncias, sabe-se que a expressão de alguns destes só ocorre em condições semelhantes ao habitat em que vivem. Frequentemente, estes metabólitos atuam como mediadores químicos ou fatores de virulência em relações mutualísticas e patogênicas. À vista disso, é mister o emprego de estratégias capazes de induzir a expressão destes mediadores químicos em condições laboratoriais para a obtenção de novas substâncias ativas.

Uma vertente que tem se mostrado muito eficaz na indução e expressão de rotas biossintéticas silenciadas é a mimetização das condições existentes no habitat original através de experimentos cocultivos (KÖNIG et al., 2013). Além de promover a ativação destas vias biossintéticas, estes estudos também permitem progredir no entendimento das relações químio-ecológicas. A associação desta abordagem à ferramentas de imagem, como técnicas de microscopia e espectrometria de massas, torna possível o mapeamento do fluxo destes mediadores e conseqüentemente, possibilita inferências e conclusões sobre o sistema original (KÖNIG et al., 2013; SCHERLACH et al., 2013; SCHOENIAN et al., 2011). Em um trabalho realizado por GRAUPNER et al. (2012), verificou-se que, sob condições padrões de cultivo, a bactéria *Janthinobacterium agaricidamnosum*, patogena de cogumelos, não era capaz de produzir seu fator de virulência, o peptídeo jagaricina (Figura 1-9). Porém, imagens obtidas por MALDI-IMG mostraram que, ao ser cultivada no corpo frutífero do cogumelo ao qual causa patogenia, a bactéria foi capaz de expressar seu fator de virulência.

As abordagens com base no genoma podem ser conduzidas através de procedimentos de sequenciamento do genoma ou com o genoma não-sequenciado. Ainda que os procedimentos baseados no sequenciamento do genoma pareçam mais adequados, estes também são muito dispendiosos e requerem muito tempo e esforço para que se obtenha algum resultado (SCHERLACH e HERTWECK, 2009). Logo, o uso de abordagens genômicas em que não há o sequenciamento do genoma muitas vezes é o único caminho viável para obter novos agentes terapêuticos de origem natural.

Segundo SCHERLACH e HERTWECK (2009) a transcrição de genes em fungos é, em geral, controlada por regulação epigenética (SCHERLACH e HERTWECK, 2009). A regulação epigenética consiste em uma abordagem de não-sequenciamento do genoma que pode induzir a produção de metabólitos secundários diferenciados. O termo epigenética é definido como sendo “alterações na expressão gênica sem que haja alterações nas sequências de DNA” (LÓPEZ-GARRIDO; et. al 2012). Estas alterações são divididas em efeitos relacionados ao DNA, cromatina (SMITH et al., 2012) ou RNA e são causadas pela adição de moduladores epigenéticos. São elas: metilação do DNA, silenciamento em sistemas de RNA, mudanças na estrutura da cromatina e localização de centrômero/telômeros (CICHEWICZ, 2010; WILLIAMS et al., 2008).

Estudos realizados por FISCH et al. (2009) mostraram que, a adição racional de moduladores epigenéticos levaram à produção de metabólitos secundários crípticos. Por exemplo, a adição do ácido hidroxâmico suberoilânilida (também conhecido como SAHA) no meio de cultura ocasionou a produção de nigeronas por *Aspergillus niger* (HENRIKSON et al., 2009).

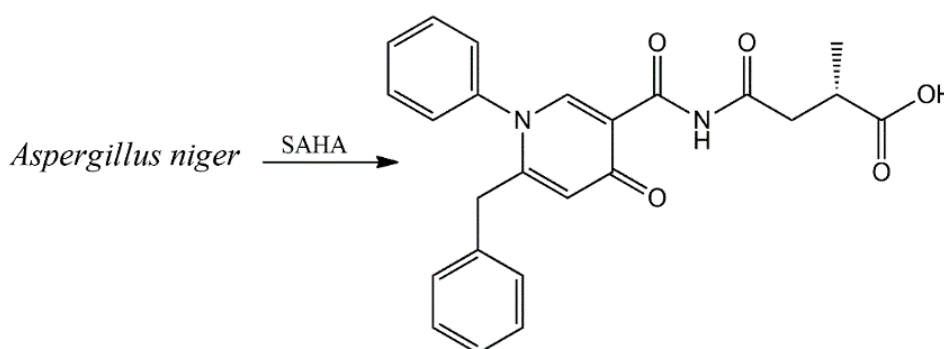


Figura 1-11 – Produção de nigerona por *A. niger* após adição do modificador epigenético SAHA

WILLIANS e colaboradores (2008) demonstraram o efeito dos diferentes modificadores epigenéticos na expressão de metabólitos secundários de *C. cladosporioides*. Neste estudo, o tratamento deste fungo com o modificador 5-azacitidina levou à produção de diversas oxilipinas. Por outro lado, o modificador SAHA induziu a produção de perilenoquinonas.

Isto posto, conclui-se que, tanto a abordagem OSMAC quanto epigenética são procedimentos capazes de ocasionar variação nos metabólitos secundários microbianos.

1.4 - Catepsinas como alvos moleculares

As enzimas são responsáveis por catalisar reações e intermediar processos bioquímicos essenciais à vida de todos os organismos vivos. Grande parte das patologias são causadas pela desregulação da atividade enzimática, ocasionando a superexpressão ou mutação de determinada enzima. A ocorrência de quaisquer desses eventos, provoca anormalidade na formação de produtos, ocasionando o aparecimento de diversas doenças (COPELAND, 2013). Assim, a inibição das enzimas envolvidas nestes processos é uma forma de prevenir ou curar diversas patologias.

Diversas enzimas humanas têm sido alvo de intervenções farmacológicas. O uso de antibióticos, antivirais e antiparasitários ocasionam a inibição destas enzimas, sendo uma estratégia eficaz no tratamento de determinadas doenças (Tabela 1-1) (COPELAND, 2013).

Tabela 1-1 - Inibidores enzimáticos utilizados em uso clínico

Medicamento	Enzima alvo	Uso clínico
Aspirina	Ciclo-oxigenases	Inflamação, dor, febre
Captopril	Conversão da angiotensina	Hipertensão
Fluorouracil	Timidilato sintase	Câncer
Lovastatina	HMG-CoA redutase	Redutor de colesterol
Nitecapone	Catecol- <i>O</i> -metiltransferase	Mal de Parkinson
Omeprazol	H ⁺ , K ⁺ ATPase	Úlceras pépticas

Segundo COPELAND (2013) cerca de 50% dos medicamentos comercializados atuam sobre um mecanismo de inibição enzimática. E em geral, estes medicamentos são compostos de baixo peso molecular, tal como os metabólitos secundários microbianos, propiciando sua perfeita união. Além do mais, o conhecimento dos mecanismos de inibição enzimática permite o desenvolvimento de novas drogas específicas, objeto de procura das indústrias farmacêuticas (ROBERTSON, 2005).

Dentre as diversas enzimas responsáveis por causarem patologias e que necessitam ser reguladas/inibidas, destaca-se uma família específica de peptidases: as catepsinas. Peptidases são proteases, enzimas responsáveis pela clivagem de ligações peptídicas. Sua classificação é feita com base no seu mecanismo de ação e suas características estruturais, sendo distribuídas entre serino, aspartil e cisteíno peptidases (TURK et al., 2012).

As cisteíno proteases são enzimas amplamente expressas, podendo ser encontradas em diversos organismos (vírus, bactérias, fungos, protozoários, plantas e mamíferos) e compreendem a importante família de enzimas do tipo papaína (OTTO e SCHIRMEISTER, 1997). Através do sequenciamento do genoma humano, onze catepsinas puderam ser descritas e caracterizadas: B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X (TURK et al., 2012). Embora apresentem grandes semelhanças estruturais, suas propriedades são distintas, bem como a especificidade de substratos. (TORKAR et al., 2013).

Essas enzimas encontram-se no interior dos lisossomos e possuem diversas funções biológicas, tais como clivagem proteolítica de proteínas (catepsinas B e K), ativação de pró-enzima (catepsinas B e C), maturação de hormônios (catepsinas B e K), homeostase epidermal (catepsina C e K), apresentação de antígeno e ativação de processos imune (catepsinas F, L, S e V); reabsorção óssea (catepsina K), etc. (LECAILLE et al., 2002).

Além de estarem envolvidas em processos fisiológicos de extrema importância, como a degradação proteolítica não-seletiva no interior dos lisossomos, estudos têm mostrado que estas atuam em outros sistemas bioquímicos importantes e quando desreguladas, são responsáveis por causar patologias diversas. Seu acúmulo pode, por exemplo, desencadear a progressão de tumores (catepsina L e V) (PALERMO e JOYCE, 2008), artrite reumatoide, osteoporose (catepsina K) (YASUDA et al. 2005), distrofia muscular e doenças infecciosas (KOMINAMI et al., 1987). Por

isso, as catepsinas vêm sendo reconhecidas como potentes alvos terapêuticos, atraindo assim a atenção da indústria farmacêutica e de pesquisadores (NOVINEC; et al., 2012).

Os atuais candidatos a inibidores de uso clínico para as catepsinas supracitadas não são seletivos às diversas enzimas destas classes ou são inibidores irreversíveis. Assim, a busca de inibidores seletivos e reversíveis, de baixa toxicidade e alta seletividade, é de fundamental importância e representa uma possibilidade de intervenção terapêutica de grande contribuição para a saúde humana.

Visando contribuir na busca de inibidores para estas enzimas, além de acrescentar aplicabilidade aos compostos isolados, os metabólitos secundários obtidos durante a execução do presente projeto de doutorado foram ensaiados frente à catepsina V.

2. – Objetivos

O objetivo deste trabalho consistiu em investigar o potencial metabólico de dois micro-organismos do gênero *Escovopsis* (*E. microspora* e *E. weberi*), isolados de jardim de fungos de *Atta sexdens*. Além disso, através de experimentos de interação química, almejava-se progredir no conhecimento dos mecanismos de virulência de *E. weberi*. Paralelamente, os metabólitos obtidos durante os estudos metabolômicos foram ensaiados frente a catepsina V, a fim de verificar seu potencial como inibidores enzimáticos de enzimas envolvidas em patologias humanas.

Para isso, alguns objetivos específicos foram determinados:

- ▶ Estabelecer protocolos de cultivo, extração e análise dos micro-organismos a serem estudados;
- ▶ Isolar e identificar os metabólitos secundários através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas diversas;
- ▶ Realizar experimentos de cocultivo e obtenção de imagens por MALDI-*imaging* (MALDI-IMG) entre micro-organismos do ninho a fim de identificar os metabólitos envolvidos nesta interação;
- ▶ Realizar ensaios para avaliação das atividades como inibidores enzimáticas dos metabólitos isolados.

3. - Procedimento experimental

3.1 – Materiais utilizados

a) Suportes cromatográficos:

- Sílica gel 70-230 Mesh
- Sephadex LH-20

b) Material para cromatografia em camada delgada

- Placas de CCD (Macherey-Nagel) ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄ für die DC

c) Colunas cromatográficas:

- Coluna analítica Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl 250 x 4.6mm (5µm);
- Coluna analítica Macherey-Nagel Nucleodur® C18 HTec 150 x 10 mm (5 µm)
- Coluna semipreparativa Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl 300 x 4,6 mm (5µ);
- Coluna semipreparativa Phenomenex Luna C18 300 x 4,6 mm (5µ);

d) Solventes:

- Solventes destilados no departamento de química;
- Solventes grau HPLC Tedia, JT Baker e Panreac;
- Solventes PA Panreac, Synth, Vetex;
- Solventes deuterados MERCK® e ALDRICH® (98,0 – 99,9 %), para a obtenção dos espectros de RMN;
- Água purificada em aparelho Milli-Q;

e) Meios de cultura:

- BDA (Batata, Dextrose e Agar);
- Czapek:
 - ✓ *D*-Glicose;
 - ✓ NaNO₃;
 - ✓ MgSO₄·7H₂O;
 - ✓ KCl;
 - ✓ FeSO₄·7H₂O;
 - ✓ K₂HPO₄;
 - ✓ Agar;
 - ✓ Extrato de Levedura;

- Meio LB (Luria-Bertani) – caldo e ágar (sólido)

3.2 – Equipamentos

a) Espectrômetro de RMN:

- BRUKER DRX 400 (400 MHz),
- BRUKER AVANCE III (500 MHz),
- BRUKER AVANCE III (600 MHz).

b) Espectrômetros de Massas acoplado a Cromatógrafo líquido de alta eficiência:

- Agilent 1200 serie equipado com bomba quaternária G1311A, injetor automático G1329A, detector arranjo de diodos G1314B e degaseificador G1322A, espectrômetro de massas equipado analisador QqQ API 200 (AB/MDS Sciex), fonte TurbolonSpray (ESI), *software* de processamento de dados: Analyst 1.5.1;

c) Cromatógrafos Líquido de Alta Eficiência

- Agilent Technologies 1200 series, equipado com bomba quaternária G1311A, injetor automático G1329A, detector UV-Vis G1314B e degaseificador G1322A
- Shimadzu LC-20AD: Cromatógrafo líquido de alta eficiência preparativo SHIMADZU composto por: Injetor para HPLC SHIMADZU SIL-20AP Vp, módulo de comunicação detector/computador em HPLC SHIMADZU CBM-20A Communication BUS Module, bomba SHIMADZU LC20AP gradient pumps, detector de UV para HPLC SHIMADZU SPD-20AV UV-Vis, degaseificador DGU-20A; *software*: LC SOLUTION;

d) Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência acoplado a espectrômetro de massas de

- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência Waters® Acquity UPLC H-class acoplado a um espectrômetro de massas Waters® Xevo® G2-XS QToF com interface eletrospray (ESI) (Waters Corporation).
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência Accela (Thermo Fischer Scientific), acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Q Exactive™ equipado

com analisador de massas do tipo híbrido quadrupolo-orbitrap e uma fonte de ionização do tipo ESI.

- e) Cromatógrafo gasoso acoplado à espectrômetro de massas:
 - GC-MS 17 A Shimadzu. Software utilizado para tratamento de dados: GCMS Real Time Analysis.
- f) Evaporadores Rotativos:U
 - Rotaevaporador Tecnal (TE 120)
 - Rotaevaporador Buchi 461-water bath (EL 131)
- g) Câmara de Fluxo Laminar:
 - Veco VL FS-12M;
 - Pachane.
- h) Autoclave Vertical:
 - Phoenix AV 70;
 - Phoenix AV 75;
- i) Mesa Incubadora Rotativa
 - Tecnal TE 140;
- j) Banho de ultrassom
 - Tecnal TE 140;
- k) Balança analítica
 - Tecnal;
 - Metler Toledo
- l) Estufa de secagem
 - Quimis
- m) Centrífuga
 - Eppendorf 5810 R
- n) Filtro Millipore 0.20 µm

3.3– Manutenção do micro-organismo em placa de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar)

Os micro-organismos escolhidos como objeto de estudo desta tese de doutorado foram cedidos pelo Prof. Dr. André Rodrigues do Instituto de Biociências,

UNESP, Campus Rio Claro. Todo o procedimento de isolamento e conserva dos micro-organismos foi realizado pelo grupo do Prof. André.

A manutenção de todos os micro-organismos foi feita em meio BDA. O preparo deste consistiu em pesar 39g de meio e dissolver em 1L de água destilada. Em seguida, o meio foi autoclavado por 15 minutos a 120°C. Cerca de 20 mL de meio foram vertidos para placas de Petri descartáveis e estéreis.

Depois de resfriadas e ainda no fluxo laminar, inoculou-se uma porção do micélio dos micro-organismos, separadamente, com auxílio de uma alça de platina previamente esterilizada. Após sete dias de crescimento, os micro-organismos foram repicados para novas placas e conservados em tubo inclinado contendo BDA e em solução 10% glicerol.

3.4 – Cultivo dos micro-organismos em pequena escala

O cultivo dos micro-organismos em pequena escala foi feito em meio líquido Czapek's enriquecido com 2% de extrato de levedura cuja composição consiste em: 0,5 g/L NaNO_3 , 1,0 g/L de K_2HPO_4 , 0,5 g/L de MgSO_4 , 0,5 g/L de KCl , 0,01 g/L de FeSO_4 e 30 g/L de glicose e 20 g/L de extrato de levedura

Preparou-se 1,5L de meio que foram repartidos igualmente em 36 Erlenmeyers de 125 mL de capacidade (40 mL meio/ Erlenmeyer). Em seguida os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C, 1 atm, por 15 minutos.

Depois de resfriados, 3 plugs de 10mm dos micro-organismos foram transferidos para cada Erlenmeyer, separadamente, sendo que os experimentos foram realizados em triplicatas. 3 Erlenmeyers contendo apenas meio foram mantidos como controle negativo.

Após 21 dias de crescimento, os experimentos foram interrompidos. Assim, fez-se a separação do micélio e da fase aquosa por filtração a vácuo. 50 mL de etanol foram adicionados ao micélio e deixados em repouso e no escuro por 24h. Após esse período, filtrou-se o conteúdo por filtração a vácuo e a fase etanólica foi concentrada em evaporador a pressão reduzida. Com relação à fase aquosa, esta foi submetida à partição líquido-líquido com DCM (3x30 mL) e AcOEt (3x30 mL), respectivamente. As fases orgânicas foram concentradas em evaporador à pressão reduzida e transferidas para frascos devidamente identificados.

Os extratos obtidos foram submetidos ao ensaio frente ao fungo simbiote *L. gongylophorus* e a ensaios de inibição enzimática frente as catepsinas L e V.

3.5– Ensaio de inibição do crescimento micelial de *L. gongylophorus*

Os ensaios de inibição do crescimento do fungo simbiote foram realizados em dois momentos desta pesquisa: no início, tendo em vista que um dos critérios de escolha dos micro-organismos a serem estudados seria baseado no seu potencial de inibição do fungo simbiote e após a obtenção dos metabólitos puros já identificados.

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais com auxílio da técnica MSc Dorai Periotto. O protocolo para realização do ensaio consiste em incorporar as substâncias a serem testadas no meio de cultura em que será feito o cultivo do micro-organismo simbiote. O meio de cultura foi preparado usando extrato de malte, (20 g/L), bacto-peptona (5 g/L), extrato de levedura (2 g/L) e agar (20 g/L). A adição das soluções das substâncias (5 mg/mL) previamente esterilizadas no meio de cultura foi feita após a transferência de 10 mL de meio a placas de Petri pequenas (80 × 15 mm). Depois de solidificados, plugs de 9 mm de diâmetro do fungo foram inoculados no centro da placa. Controles negativos (apenas meio e fungo) e de efeito de solvente sobre o crescimento do micro-organismo também são foram preparados. Todas as amostras, incluindo os controles, foram feitos em quintuplicatas.

Depois de 30 dias de crescimento a 25°C, mediu-se o crescimento do micélio de *L. gongylophorus* das amostras e dos controles, a fim de se calcular a porcentagem de inibição.

3.6– Ensaio de inibição enzimática dos extratos frente às catepsinas L e V

De maneira análoga aos ensaios de inibição do crescimento de *L. gongylophorus*, os ensaios de inibição enzimática também foram realizados em dois momentos distintos: no início, para seleção dos micro-organismos após obtenção dos compostos puros a fim de avaliar a sua potência inibitória. No primeiro momento,

soluções dos extratos a 1mg/mL em DMSO foram preparadas e ensaiadas frente as catepsinas L e V. Já para as substâncias puras, soluções a 100 μ M em DMSO foram testadas frente à catepsina V

A atividade enzimática foi determinada com base no aumento da fluorescência em função do tempo de reação, através da hidrólise do substrato ZFR-MCA. Este experimento foi realizado em um fluorímetro utilizando placas de ELISA de 96 poços pretas e opacas, com volume final de 200 μ L, temperatura 27 °C e comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) 380 nm e emissão (λ_{em}) 460nm. As enzimas foram pré-ativadas com DTE (2,5 mM) por 5 minutos, em seguida adicionou-se a solução do inibidor a ser testado, incubando-se por 5 minutos. Logo após adicionou-se o substrato Z-FR-MCA (10 μ M) e fez-se a leitura de fluorescência em tempo real. A determinação da atividade enzimática foi realizada através do monitoramento contínuo e direto da hidrólise do substrato fluorogênico (Z-FR-MCA) por 300 segundos (5 minutos). A Figura 3-1 mostra o esquema da metodologia utilizada no ensaio biológico

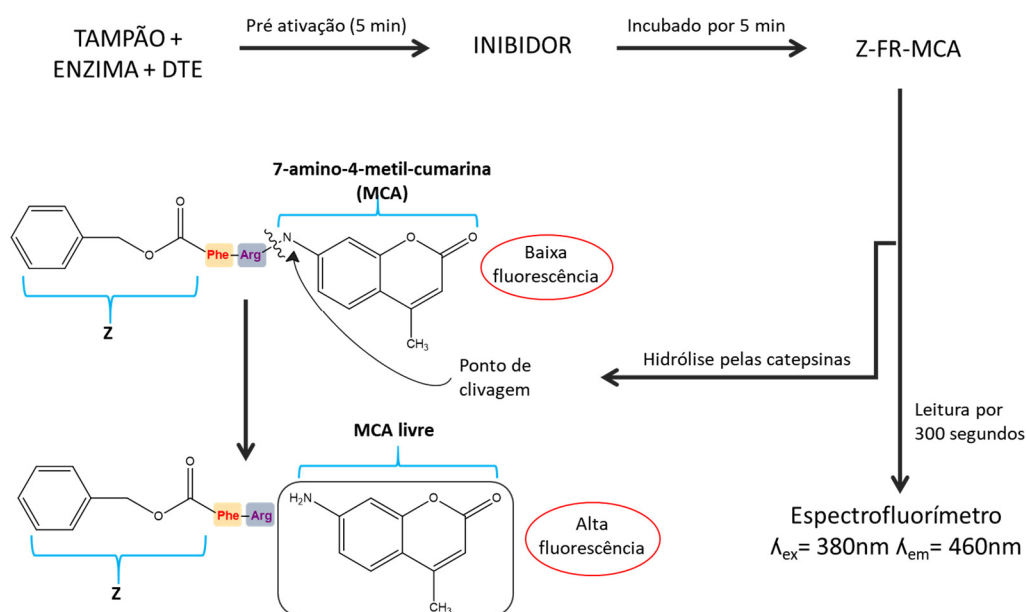


Figura 3-1 - Esquema geral dos ensaios enzimáticos com o substrato fluorogênico Z-FR-MCA, mostrando o ponto de clivagem pelas catepsinas

O percentual de inibição foi determinado a partir da atividade enzimática na ausência e na presença do inibidor sendo calculado pela equação:

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times (1 - V_i/V_0)$$

Sendo, V_i a velocidade de reação observada na presença de inibidor e V_0 a velocidade de reação observada na ausência do inibidor (velocidade controle).

A partir dos resultados de inibição enzimática e inibição do crescimento de *L. gongylophorus* determinou-se quais seriam os micro-organismos a serem utilizados na execução da pesquisa de doutorado.

3.7 –Análise do perfil cromatográfico de *E. weberi* (LESF034) e *E. microspora* (LESF019) em diferentes tempos de cultivo

Com o objetivo de definir um melhor tempo de cultivo para os micro-organismos, delinearam-se experimentos cujos tempos de cultivos seriam 7, 14, 21 e 28 dias. Os extratos obtidos referentes a cada um desses momentos seriam analisados por HPLC-UV a fim de observar quais cromatogramas possuíam maior diversidade metabólica.

Assim, placas de Petri (90 x 15 mm) estéreis foram preenchidas com 25 mL de meio Czapek's enriquecido com 2% de extrato de levedura preparado de maneira similar àquela descrita no tópico 3.4, porém com adição de 15 g/L ágar para que solidificasse. Para cada "ponto" a ser analisado, 8 placas de Petri foram preparadas, sendo três para cultivo de cada micro-organismo e duas para controle negativo.

Após os períodos de 7, 14, 21 e 28 dias, 20 plugs foram tirados das placas e transferidos para tubos de ensaio. A esses tubos foram adicionados 10 mL da seguinte mistura: MeOH: DCM: AcOEt 1:2:3(NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003; SMEDSGAARD; FRISVAD, 1996). Então os tubos foram colocados em banho de ultrassom por 1h. Depois disso, a fase orgânica foi transferida para frascos devidamente identificados e deixada para secar em capela.

Por fim, os extratos obtidos foram analisados por HPLC-DAD, seguindo as seguintes condições: vazão de 0,7 mL/min, coluna Luna Phenyl-Hexyl 250 x 4,6

mm (5 μ m) e o seguinte sistema de eluição composto por água e ACN, iniciando-se com 10% de ACN e indo até 100% em 20 minutos, seguido de 10 minutos de limpeza apenas com a fase orgânica (100%ACN) e depois acondicionamento da coluna cromatográfica para posterior análise por mais 17 minutos, totalizando 60 minutos.

3.8– Cultivo em larga escala dos micro-organismos *E. weberi* (LESF034) e *E. microspora* (LESF019)

O cultivo dos fungos *E. weberi* (LESF034) e *E. microspora* (LESF019) em larga escala foi realizado de maneira similar aos cultivos em pequena escala (ver item 3.4). Para tal, 12 L de meio Czapek's enriquecido com extrato de levedura foram preparados e distribuídos igualmente em 40 frascos de Erlenmeyer de 1 L de capacidade (250 mL por frasco).

Depois de esterilizados e já resfriados, 100 μ L de uma suspensão de esporos a 10^6 esporos/mL de cada micro-organismo foram adicionadas a 19 Erlenmeyers cada um. Dois Erlenmeyers contendo apenas meio foram mantidos como controle negativo.

Depois de 21 dias de crescimento em modo estático e à temperatura ambiente, fez-se a separação do micélio e da fase aquosa por filtração à vácuo. Os micélios foram reunidos de acordo com o micro-organismo em questão e 5 L de etanol foram adicionados e deixados para extrair por 24h. As fases aquosas também foram reunidas e extraídas por partição líquido-líquido com AcOEt (3x 5 L cada). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e concentrada em rota-evaporador. Os extratos foram então submetidos a separação cromatográfica.

3.9 - Isolamento dos metabólitos secundários de *E. microspora* (LESF019) e *E. weberi* (LESF034) a partir dos extratos de acetato de etila

Os extratos de acetato de etila (provenientes da partição da fase aquosa com AcOEt) de cada um dos micro-organismos foram submetidos à separação

cromatográfica por coluna. Os procedimentos realizados em ambos os casos foram similares.

A coluna cromatográfica utilizada possuía as seguintes especificações: h= 45cm, ϕ = 3 cm. Cerca de 80 g de sílica gel (230-400 mesh) e 100 mL de cada um dos eluentes foram utilizados:

Tabela 3-1 – Sistema de eluição utilizado para fracionamento dos extratos de acetato de etila

Eluentes utilizados
100% Hexano
AcOEt: Hexano 2:8
AcOEt: Hexano 1:1
AcOEt: Hexano 2:8
100% AcOEt
MeOH: AcOEt 3:7
MeOH:AcOEt 1:1
MeOH: AcOEt 7:3
100% MeOH

Quando necessário, para etapa posterior de purificação das substâncias utilizou-se cromatografia de exclusão molecular do tipo Sephadex LH-20 (h= 45cm, ϕ = 6 cm).

As substâncias isoladas foram identificadas por RMN e espectrometria de massas. (As análises por espectrometria de massas de alta resolução foram realizadas no grupo do Prof. Dr. Christian Hertweck. As condições dos equipamentos estão descritas no tópico 3.11.)

3.9.1 - Isolamento dos metabólitos secundários dos extratos etanólicos de *E. microspora* (LESF019) e *E. weberi* (LESF034)

Os extratos etanólicos provenientes da extração dos micélios de *E. microspora* (LESF019) e *E. weberi* (LESF034) foram fracionados em coluna de vidro contendo Sephadex LH-20 como fase estacionária (exclusão molecular). A coluna utilizada possuía as seguintes dimensões: h= 80cm, ϕ = 2,5 cm. Metanol foi utilizado como eluente (eluição isocrática).

Quando necessário, o procedimento foi repetido para purificação de frações em misturas/impuras. Os metabólitos secundários isolados foram identificados por RMN uni- e bidimensional e espectrometria de massas. As análises por espectrometria de massas de alta resolução dos compostos obtidos também foram realizadas no grupo do Prof. Dr. Christian Hertweck. As condições dos equipamentos estão descritas no tópico 3.11

3.10- Cultivo dos micro-organismos *E. weberi* e *E. microspora* em diferentes meios de cultivo (abordagem OSMAC)

Com o objetivo de induzir a maior quantidade possível de metabólitos secundários, fez-se o cultivo dos micro-organismos em meios variados. Para tal experimento, foram selecionados diferentes meios sólidos: Czapek's enriquecido com 2% de extrato de levedura e suplementado com a) NH₄Br, b) NH₄Cl, c) glutamina, d) formigas cortadeiras

A composição base do meio sólido Czapek's enriquecido com 2% de extrato de levedura consiste em: 0,5 g/L NaNO₃, 1,0 g/L de K₂HPO₄, 0,5 g/L de MgSO₄, 0,5 g/L de KCl, 0,01 g/L de FeSO₄ e 30 g/L de glicose e 20 g/L de extrato de levedura e 1 5g/L ágar. Para cada 250 mL de meio base preparados, foram adicionados 0,7 g de NH₄Br, 0,38 g de NH₄Cl, 1,03 g de glutamina e 1,5 g de formigas cortadeiras, separadamente. Então, 20 mL de meio previamente autoclavado (15 min, 120°C) foram transferidos para placas de Petri descartáveis e estéreis (90 X 15 mm). Este experimento foi realizado em triplicata além do controle negativo (sem inóculo dos micro-organismos).

O inóculo dos micro-organismos foi feito através da transferência de um plug de 10 mm de diâmetro de uma placa com 7 dias de crescimento para o centro das placas contendo os diferentes meios preparados.

O experimento foi interrompido após 21 dias de cultivo, e então os conteúdos das placas (meio + fungo) foram colocados em tubos de ensaio. Adicionou-se a esses tubos 10 mL a seguinte mistura de solvente: MeOH: DCM: AcOEt 1:2:3 e deixou-se em banho de ultrassom por 1h. Após esse tempo, a fase orgânica foi transferida para frascos devidamente identificados e deixada para secar em capela.

Em seguida, os extratos obtidos foram analisados por CLAE-UV, seguindo as mesmas condições descritas no tópico 3.4.

3.11 – Estudos de adição de modificadores epigenéticos - *E. weberi* (ARSEF5576)

Experimentos de epigenética utilizando os indutores ácido hidroxâmico suberoilânida (SAHA) e nicotinamida (NAA) foram conduzidos separadamente e em conjunto. Para isso, microplacas de Elisa de 48 poços foram utilizadas. Em cada poço foram adicionados 1 mL de meio BD, 100 µL de solução de esporos a 10⁶ esporos/mL e 5 µL de indutores epigenéticos cujas concentrações finais foram de 100 e 200 µM de NAA e SAHA, respectivamente. As culturas foram incubadas em agitação por 7 dias a 70 rpm e 30°C. A extração foi feita por partição líquido-líquido após transferência do conteúdo dos poços para funis de separação com acetato de etila (3x 2 mL). A fase orgânica foi seca a pressão reduzida e os extratos analisados por LC-HRMS.

As condições utilizadas nas análises por UPLC-HRMS realizadas no laboratório do Prof. Hertweck foram sempre as seguintes: voltagem do capilar: 3.2 kV, temperatura do capilar: 250 °C, coluna Accucore C18 (2.6 µm, 100 x 2.1 mm), vazão de 0,2 mL/min com o seguinte sistema de eluição (tanto água quanto acetonitrila contendo ácido fórmico a 0,1% como aditivo): ACN/H₂O 5/95 até 98/2 in 10 min, então 98/2 por mais 4 min.

3.12 – Cocultivo de *E. weberi* (ARSEF5576) e *Bulkholderia gladioli*

A primeira tentativa de cocultivo entre os micro-organismos *E. weberi* e *B. gladioli* foi realizada usando um dispositivo constituído por duas câmaras para cultura líquida (“*chamber*”), separadas por uma membrana Durapore. Inicialmente, os microrganismos foram pré-cultivados em frascos Erlenmeyer com 200 mL de meio BD durante 5 dias para *E. weberi* e 6 horas para *B. gladioli*, respectivamente. Então, metade do conteúdo de cada cultura foi transferido para as câmaras. As culturas restantes foram mantidas como controle. Os micro-organismos foram incubados durante 3 dias em agitador a 70 rpm com temperatura controlada a 30 ° C.



Figura 3-2 – Sistema (“chamber”) utilizado para cocultivo em meio líquido.

Após esse período, os conteúdos das câmaras foram transferidos para novos Erlenmeyers e adicionados 100 mL de AcOEt em cada um. Após 24h de extração, a fase orgânica foi concentrada em evaporador rotativo à pressão reduzida e transferida para frascos identificados. A análise das amostras foi feita por LC-HRMS (condições descritas no tópico 3.11).

A segunda tentativa foi realizada em placas de Petri contendo meio BDA. Inicialmente, *E. weberi* foi inoculado próximo a borda da placa e incubado a 30° C durante 3 dias. Após esses 3 dias, *B. gladioli* foi inoculada no lado oposto da placa. Uma placa de cada micro-organismo (culturas axênicas) e uma contendo apenas meio foram mantidas como controles. Os micro-organismos foram incubados em estufa a 30° C por mais 4 dias. A extração foi feita separando-se as placas em 3 regiões diferentes como mostrado na Figura 3-3e extraíndo-as com a seguinte mistura de solventes: AcOEt: DCM: MeOH 3: 2:1 em banho de ultrassom por 1 hora. Os extratos foram deixados para secar em capela e analisados por LC-HRMS (condições descritas no tópico 3.11). O mesmo procedimento foi realizado para os controles.

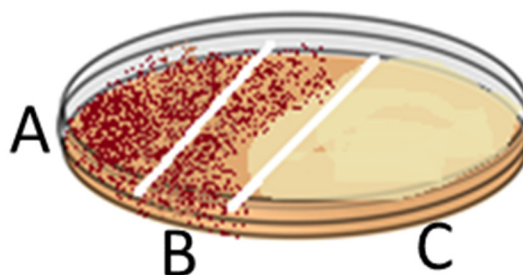


Figura 3-3 -Representação das regiões extraídas no experimento de cocultivo entre *E. weberi* e *B. gladioli*

3.13– Cocultivo de *E. weberi* (ARSEF5516) e micro-organismos do gênero *Leucoagaricus*

Experimentos de cocultivo entre fungos do gênero *Leucoagaricus* (*L. leucothites* e *L. holosericeus*) e *E. weberi* (ARSEF5574) foram conduzidos. Apesar das cepas não terem sido isoladas dos ninhos de formigas cortadeiras, decidiu-se realizar este experimento pois as cepas estavam disponíveis na micoteca do instituto Hans-Knöll enquanto que a cepa de *L. gongylophorus* ainda não havia sido entregue.

O procedimento adotado foi baseado naquele realizado por Man e colaboradores (Man, 2016). Inicialmente, um plug de 10 mm de cada cepa de *Leucoagaricus* foi inoculado próximo à borda das placas de Petri contendo meio BDA. Após 5 dias de incubação a temperatura ambiente, foi adicionado um plug (10 mm) de *E. weberi* no centro da placa. A extração foi realizada após 5 dias adicionais de cultivo, seguindo o mesmo procedimento descrito no tópico acima para o cultivo entre *E. weberi* e *B. gladioli* (tópico 3.12). Os extratos foram analisados por LC-HRMS seguindo as condições descritas anteriormente.

3.13.1 Isolamento e identificação dos metabólitos shearinine D e melinacidina IV

Para isolamento dos metabólitos shearinine D e melinacidina IV, 100 placas de cocultivo entre *E. weberi* (ARSEF5574) e *L. holoserinceus* foram preparadas e extraídas seguindo a metodologia já utilizada anteriormente. (Vale ressaltar, porém, que neste experimento a extração das placas não foi feita por regiões, mas sim da

placa toda). O extrato obtido (100 mg) foi submetido a isolamento e purificação por HPLC preparativo.

O sistema de HPLC preparativo contava com uma coluna semipreparativa Luna C18 (250 x 10 mm, 5 µm) e estava configurado da seguinte maneira: vazão: 5 mL/min, volume de injeção: 250 µL, sistema de eluição composto por água e ACN, iniciando-se com 40% de ACN com eluição isocrática por 1 minuto, e indo até 55% em 7 minutos, depois subindo até 82% de ACN em 13 minutos, seguido de 6 minutos de limpeza apenas com a fase orgânica (ACN) e depois recondicionamento da coluna cromatográfica para posterior análise por mais 11 minutos, totalizando 37 minutos.

Tabela 3-2 – Método cromatográfico utilizado no isolamento das substâncias shearinine D e melinacidina IV.

Tempo (min)	%ACN (83%)
0.01	40
1	40
7	55
20	82
21	100
26	100
31	40
37	40

As substâncias isoladas foram submetidas à análise por RMN e LC-HRMS.

3.14 - Estimativa da produção de shearinine D e melinacidina IV por HPLC-UV

Para a estimativa de produção de shearinine D e melinacidina IV, experimentos entre: a) *E. weberi* (ARSEF5574) vs *L. leucotithes*; *L. holoserinceus*; *L. gongylophorus* (CBS 627.89) e b) *E. weberi* (ESCO724) e *L. gongylophorus* (CBS 627.89 e UK) foram conduzidos em triplicata de igual maneira àquele descrito no tópico 3.13. O conteúdo total da placa de Petri foi extraído com acetato de etila (25 mL) e seco com sulfato de sódio anidro. Após filtração, o solvente foi removido sob

pressão reduzida a partir de uma alíquota de 4 mL. O extrato resultante dessa alíquota foi dissolvido em 1 mL de MeOH para análise posterior por HPLC. A análise quantitativa foi realizada utilizando uma coluna Macherey-Nagel Nucleodur® C18 HTec (5 µm, 150 x 10,0 mm) e vazão de 1 mL/min. O método cromatográfico utilizado nestas análises está resumido na Tabela 3-3: inicia-se com 0,5% de ACN com 0,1% ácido fórmico, mantendo-se este gradiente por 1 minuto. Em seguida, aumenta-se a proporção do solvente orgânico 100% em 35 minutos, seguido de 5 minutos de limpeza apenas com a fase orgânica (100% ACN) e depois recondicionamento da coluna cromatográfica para posterior análise por mais 18 minutos, totalizando 48 minutos de corrida.

Tabela 3-3 - Método cromatográfico utilizado para estimativa de shearinine D e melinacidina IV.

Tempo (min)	%ACN (0,1% ácido fórmico)
0.01	0,5
1	0,5
35	100
40	100
41	0,5
48	0,5

3.15 - Análise por MALDI-IMG do experimento de cocultivo entre *E. weberi* (ARSEF5574) e *L. gongylophorus* (CBS 627.89)

As lâminas utilizadas na análise por MALDI foram colocadas no centro de placas de Petri e cobertas com 12 mL de meio BDA. Após solidificação do meio, fez-se o inóculo de um plug do fungo *L. gongylophorus* (CBS 627.89) na extremidade da placa que foi incubado em temperatura ambiente por 5 dias. Após esse período, um plug de *E. weberi* (ARSEF5574) foi inoculado no lado oposto. O mesmo procedimento foi realizado com os controles (cultura axênica de cada micro-organismo). A lâmina foi novamente incubada à temperatura ambiente durante mais 5 dias. Em seguida, as lâminas foram removidas da placa de Petri e após adição de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, as lâminas foram secas em estufa a 37°C.

Depois de secas, as lâminas foram adaptadas a um adaptador do tipo MTP II e analisadas por MALDI-ToF. A fonte estava configurada para operar no modo positivo de ionização e os analisadores programados no modo *reflectron* com varredura de m/z 100 – 1200. O processamento das imagens foi feito através do *software* flexImaging 3.0.

3.16– Ensaio dos metabólitos isolados frente aos fungos *L. leucothites* e *L. holoserinceus*

Soluções estéreis de shearinina D e melinacidina IV em meio PDA foram preparados na faixa de diluição de 100-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em seguida, 195 μl destas foram transferidas para placa de Elisa de 96 poços e adicionados 5 μL de culturas fúngicas. Após 4 dias de incubação a temperatura, fez-se a leitura visual das placas considerando como mínima concentração inibitória aquela em que não houve crescimento fúngico. Nystatin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi utilizada como controle positivo e todos os ensaios foram feitos em triplicata.

3.17 - Ensaio dos metabólitos isolados frente às bactérias *Pseudonocardia echinator* Ae706 e *P. octospinosus* Ae707

Soluções estoque estéreis de melinacidina IV e shearinine D foram preparadas em metanol e posteriormente diluídas em caldo Luria-Bertani (LB) para obter soluções na faixa de concentração de 1,5 ng mL^{-1} a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Alíquotas de cada solução (100 μl) foram transferidas para microplacas de 96 poços, seguido da inoculação de 5 μl de uma suspensão 1:10 (v / v) 0,5 McFarland de duas cepas de *Pseudonocardia* (*Pseudonocardia echinator* Ae706 e *P. octospinosus* Ae707) isoladas de colônias de *Acromyrmex echinator* (Gamboa, Panamá). A concentração final das bactérias foi de aproximadamente 5×10^4 CFU/mL por poço. Após 20 h de incubação a 30 °C e 150 rpm, 5 μL de solução de uma solução de resazurina a 6,75 mg/mL (em água deionizada) foram adicionados aos poços e as mudanças de coloração foram observadas após 4h de incubação. A MIC (mínima concentração inibitória) foi considerada no ponto em que não houve mudança da coloração de

violeta para púrpura. O antibiótico ciprofloxacina (5 µg/mL) foi usado como controle positivo. Para excluir efeitos inibitórios do solvente, experimentos de controle com metanol em LB (5% v/v) foram realizados. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.18 - Cocultivo entre *E. microspora* (LESF019) e *L. gongylophorus*

Com a finalidade de avaliar o potencial de *E. microspora* (LESF019) em produzir shearinina D e melinacidina IV em condições axênicas e em presença de *L. gongylophorus*, realizou-se o experimento de cocultivo entre os micro-organismos de maneira idêntica àqueles realizados para *E. weberi* descrito no tópico 3.14.

O preparo das amostras foi feito de maneira padronizada adicionando-se 1 mL de metanol às amostras e transferindo-se o conteúdo para vials. A análise foi feita por LC-MS utilizando uma coluna Luna Phenyl-Hexyl (5 µm, 250 x 4,6 mm), volume de injeção de 15 µL e vazão de 1mL/min. O sistema de eluição utilizado para essa análise foi um sistema ternário constituído de água, ACN e MeOH variando nas seguintes proporções:

Tabela 3-4 - Método cromatográfico utilizado na análise do cocultivo entre *E. microspora* (LESF019) e *L. gongylophorus*.

Tempo (min)	%MeOH	%ACN
0.01	3	3
30	45	45
31	50	50
41	50	50
42	3	3
55	3	3

As condições do espectrômetro de massas foram: modo negativo de ionização (ESI-), temperatura da fonte de íons em 350°C, gás de cortina (CUR): 25, gás nebulizador (GS1): 30, gás de aquecimento (GS2): 25, energia do TurbolonSpray (IS): -4,5 kV, potencial de desagregação: -70V, potencial de focalização -400 V, potencial de entrada (EP): -10V.

3.19- Cocultivo entre *E. weberi* (LESF034) e uma levedura negra isolada dos ninhos de *Atta sexdens*

A fim de verificar a especificidade dos fatores de virulência de *E. weberi*, realizou-se o experimento de cocultivo entre *E. weberi* (LESF034) e uma levedura negra isolada dos ninhos de *Atta sexdens* os micro-organismos de maneira idêntica àquela descrita nos tópicos 3.14.

O preparo bem como a análise das amostras foi feito de maneira idêntica ao procedimento descrito no tópico acima (3.19).

3.20 – Ensaio dos metabólitos secundários isolados frente a catepsina V (IC₅₀)

Alguns metabólitos secundários de *E. microspora* e *E. weberi* foram submetidos aos ensaios de inibição enzimática frente a catepsina V a fim de determinar a sua potência inibitória (IC₅₀). Infelizmente não foi possível realizar estes ensaios com a enzima catepsina L devido à indisponibilidade da mesma no laboratório.

A determinação do IC₅₀ foi realizada de maneira direta utilizando o ensaio cinético apresentado com a utilização do substrato fluorogênico. Para a obtenção do IC₅₀ utilizaram-se dados de inibição do composto quando testado na concentração de 100µM. Desta forma, determinaram-se os percentuais de inibição utilizando quinze diferentes concentrações de inibidor, construindo assim uma curva concentração vs inibição. Os dados cinéticos foram obtidos e tratados para a determinação do valor de IC₅₀ através do método de regressão não linear empregando o programa Sigmaplot 12.

4. Resultados e discussão

4.1 – Cultivo dos micro-organismos em pequena escala e ensaio dos extratos frente às catepsinas L e V

Os micro-organismos utilizados na execução desta pesquisa de doutorado foram isolados pelo Prof. Dr. André Rodrigues, responsável pelo Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), UNESP, Rio Claro.

Inicialmente foram cedidas 11 cepas de micro-organismos:

Tabela 4-1 - Micro-organismos cedidos pelo Prof. Dr. André Rodrigues

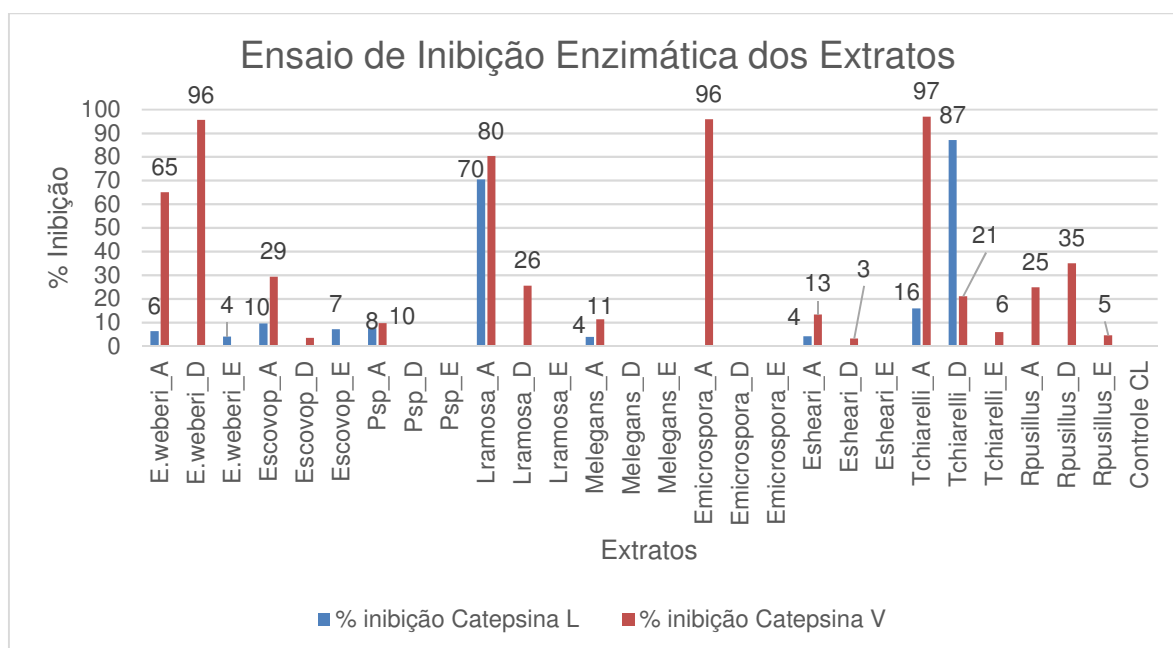
Micro-organismo	Isolado de:
<i>Escovopsioides sp.</i>	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>
<i>Mariannea elegans</i>	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>
<i>Trichosporon chiarellii</i>	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>
<i>Penicillium sp.</i>	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>
<i>Eupenicillium shearii</i>	<i>Atta bisphaerica</i>
<i>Escovopsis microspora</i> (LESF019)	<i>Atta sexdens</i>
<i>Escovopsis weberi</i> (LESF034)	<i>Atta sexdens</i>
<i>Escovopsis microspora</i> (LESF054)	<i>Acromyrmex balzanii</i>
<i>Escovopsis weberi</i> (LESF020)	<i>Acromyrmex balzanii</i>
<i>Lichtemia ramosa</i>	-
<i>Rhizomucor pusillus</i>	-

Estes micro-organismos foram cultivados em pequena escala a fim de se obter os extratos para posterior ensaio frente à catepsinas L e V e ao micro-organismo *L. gongylophorus*. Assim, adotou-se como critério de seleção os micro-organismos cujo potencial de inibição enzimático e de inibição do crescimento de *L. gongylophorus* apresentassem perfis parecidos.

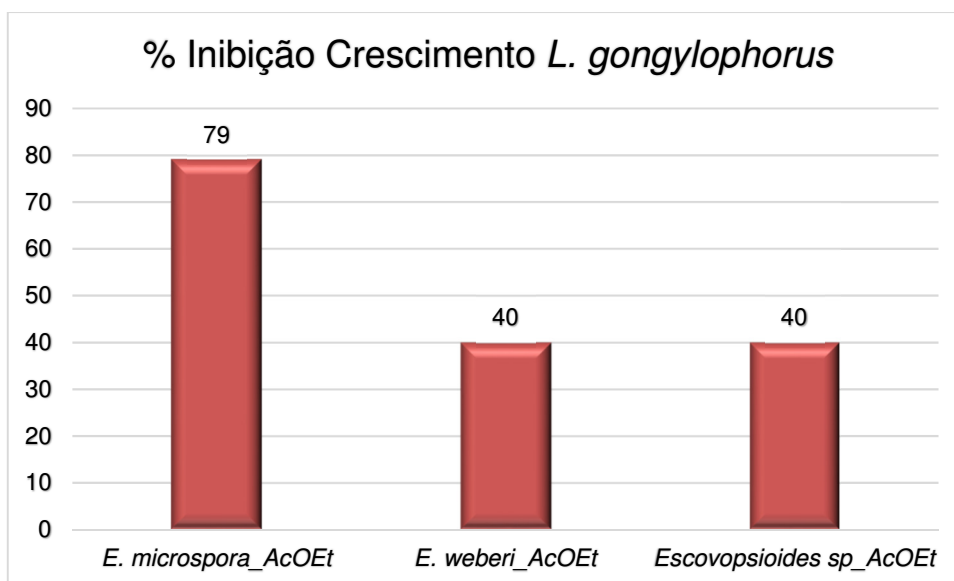
Para isso, os extratos provenientes da partição da fase aquosa com acetato de etila e extração do micélio com etanol tiveram suas atividades de inibição enzimática e antifúngica testados.

Através do ensaio de inibição enzimática frente às catepsinas L e V na concentração inicial de 1 mg/mL (concentração no poço de 250 µg/mL), foi possível verificar que os extratos de *E. weberi* (LESF034) (96%), *E. microspora* (LESF019) (96%) e *T. chiareli* (97%) foram os responsáveis pela maior porcentagem de inibição da catepsina V. Com relação à catepsina L, os extratos de *L. ramosa* e *T. chiarelli* foram os que apresentaram maior taxa de inibição: 70 e 87%, respectivamente. O extrato do controle negativo (“Controle CL”), isto é, sem cultivo do fungo, também foi ensaiado e não apresentou inibição frente às enzimas testadas.

Tabela 4-2 - Ensaio de inibição enzimática dos extratos fúngicos diversos



Por outro lado, o ensaio antifúngico frente a *L. gongylophorus* revelou que os únicos extratos que apresentaram atividade antifúngica foram os de *E. microspora*, *E. weberi* e *Escovopsioides sp.* O gráfico a seguir apresenta os resultados obtidos neste ensaio.

Tabela 4-3 - Ensaio de inibição do crescimento de *L. gongylophorus*

Baseados nos resultados obtidos nos ensaios de inibição enzimática e antifúngico, decidiu-se trabalhar com os fungos *E. weberi* (LESF034) e *E. microspora* (LESF019). Assim, estes micro-organismos foram selecionados como objeto de estudo deste trabalho.

4.2 – Análise do perfil cromatográfico de *E. weberi* (LESF034) e *E. microspora* (LESF019)

Quando cultivados em placa de Petri contendo meio BDA, os micro-organismos *E. weberi* e *E. microspora* apresentam fenótipos muito semelhantes, com micélio de coloração branca e esporos marrons, como pode ser visto na Figura 4-1.

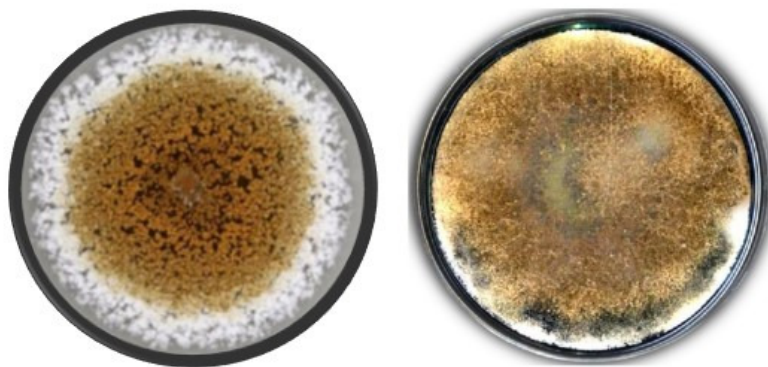


Figura 4-1 - À esquerda, *E. weberi* (LESF034) e à direita, *E. microspora* (LESF019), ambos com 15 dias de crescimento em meio BDA

Inicialmente, os perfis químicos dos micro-organismos de mesmas espécies, porém isolados de diferentes ninhos foram comparados: *E. microspora* LESF019 vs *E. microspora* LESF054 e *E. weberi* LESF020 vs *E. weberi* LESF034. Como pode ser visto na Figura 4-2, sob as mesmas condições de cultivo, os micro-organismos apresentam perfil químico muito semelhante. Portanto, decidiu-se trabalhar apenas com uma cepa de cada espécie. A escolha das cepas foi feita de modo aleatório, sendo escolhidas as cepas isoladas a partir de ninhos de *Atta sexdens* (LESF019 e LESF034).

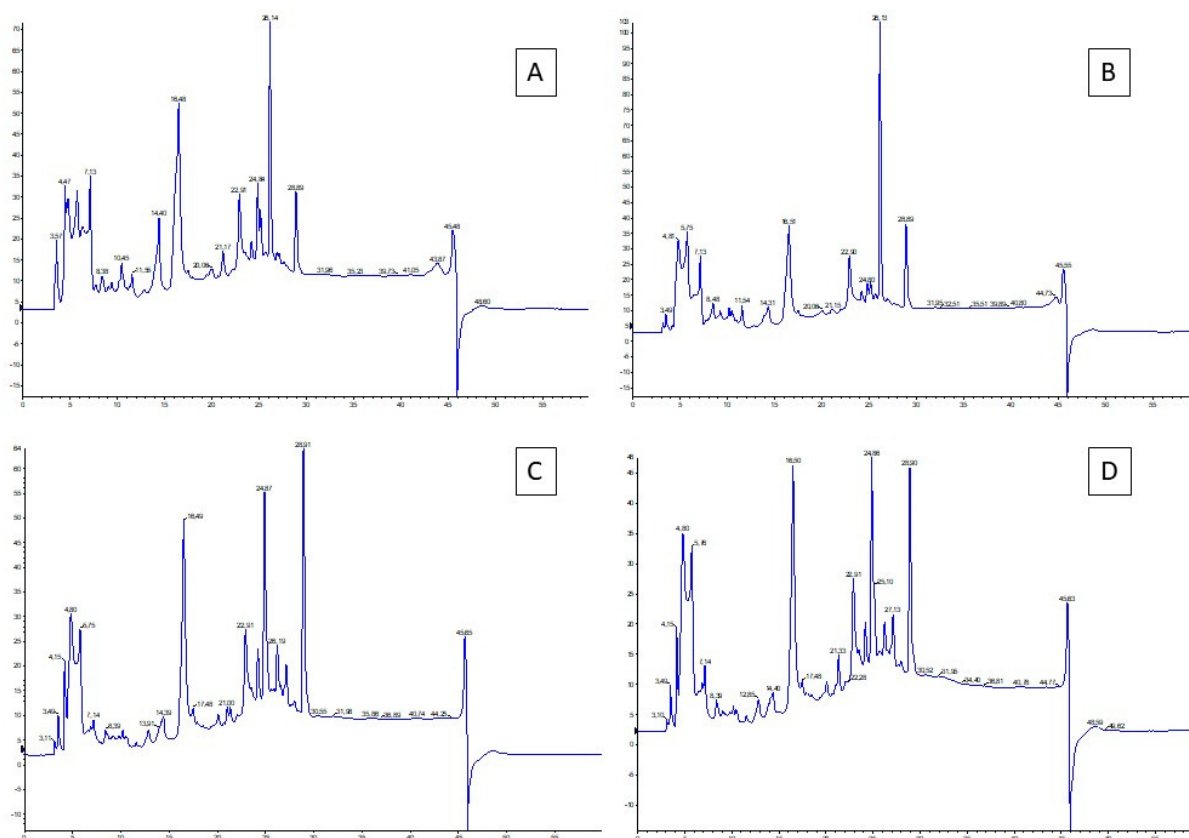


Figura 4-2 - Cromatogramas dos extratos de acetato de etila fungos *E. microspora* a) LESF019, b) LESF054 e *E. weberi* c) LESF020 e d) LESF034 após 28 dias de cultivo ($\lambda=254$ nm).

Visando estimar um tempo de cultivo que levasse a uma maior expressão de metabólitos secundários, os micro-organismos *E. weberi* (LESF034) e *E. microspora* (LESF019) foram cultivados em meio sólido de Czapek's enriquecido com 2% extrato de levedura e extraídos durante o período de 14, 21, 28 e 40 dias. Os extratos obtidos para cada um destes tempos de cultivo foram analisados por HPLC a fim de observar em qual momento o fungo tinha seu metabolismo secundário mais expresso. As Figura 4-3 e Figura 4-4 a seguir apresentam os cromatogramas obtidos para cada um dos micro-organismos.

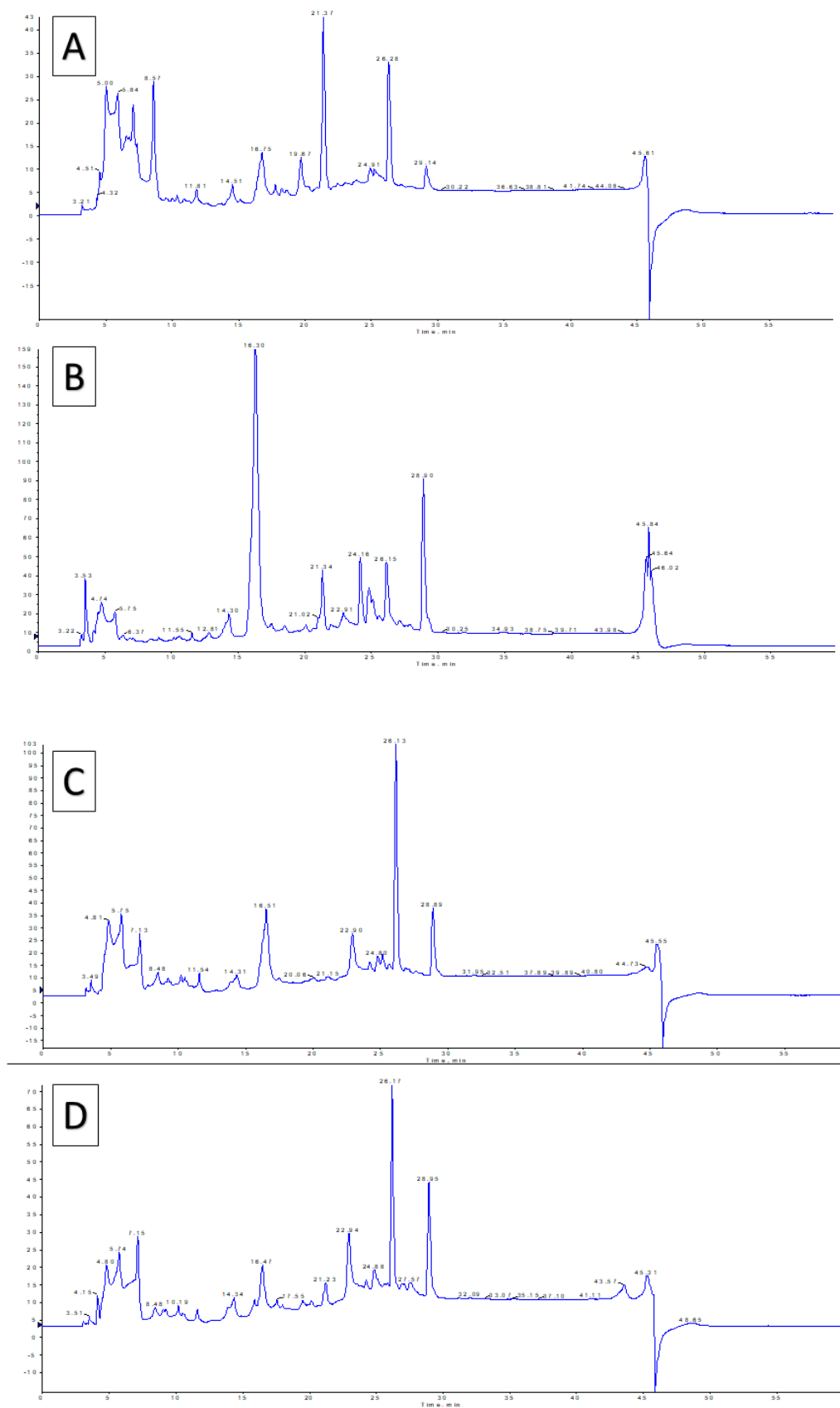


Figura 4-3 - Perfil químico de *E. microspora* (LESF019) com a) 14 dias, b) 21 dias, c) 28 dias e d) 40 dias de cultivo.

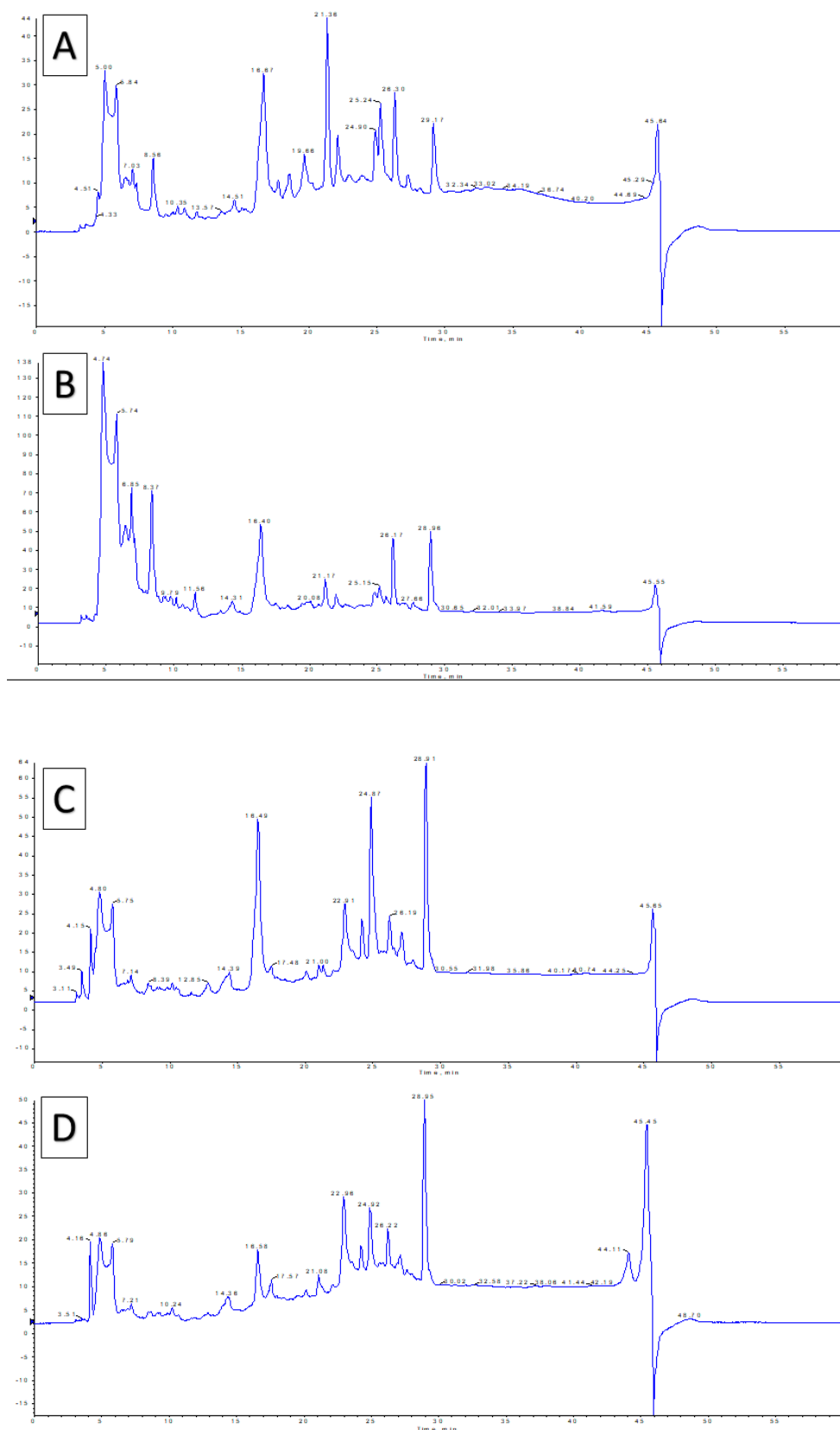


Figura 4-4 - Perfil químico de *E. weberi* (LESF034) com a) 14 dias, b) 21 dias, c) 28 dias e d) 40 dias de cultivo.

A análise dos cromatogramas obtidos para os dois micro-organismos do gênero *Escovopsis* revelou que: 1) os micro-organismos possuem perfil químico bastante semelhante entre si e 2) há uma maior diversificação no perfil químico destes após 21 dias de cultivo, uma vez que há um maior número de bandas nos cromatogramas. Além disso, a intensidade das bandas também é maior neste período, ou seja, há uma maior concentração dos metabólitos. Estes fatores indicavam que 21 dias de crescimento seria um tempo de cultivo adequado dos micro-organismos em termos de expressão de metabólitos secundários. Após 21 dias de crescimento, observa-se um declínio na intensidade dos picos.

4.3– Isolamento e caracterização dos metabólitos secundários de *E. microspora*

A fim de obter um maior conhecimento do perfil químico de *E. microspora*, o micro-organismo foi cultivado em larga escala para posterior isolamento e caracterização de seus metabólitos secundários.

O cultivo em larga escala de *E. microspora* gerou dois extratos, sendo um proveniente da partição líquido-líquido da fase aquosa com AcOEt e o outro da extração do micélio com etanol. As massas obtidas para cada extrato foram de 185,6 mg para o extrato de acetato de etila e 983,5 mg para o extrato etanólico.

Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia de camada delgada (CCD) e através desta análise foi possível concluir que o extrato de acetato de etila proveniente da fase aquosa era menos complexo e possuía melhor separação cromatográfica. Assim, decidiu-se iniciar o isolamento a partir deste extrato, apesar de possuir uma quantidade de massa menor.

Desta forma, este extrato foi fracionado em coluna contendo sílica como fase estacionária. O fracionamento deste extrato levou à coleta de 76 frascos (cerca de 15-20 mL por frasco) que foram reunidos por similaridade após análise por CCD da seguinte maneira:

- | | |
|----------------------------------|---------------------------------|
| - Frascos 1-14: Fração 1 (Fr1) | - Frascos 33-35: Fração 5 (Fr5) |
| - Frascos 15 -21: Fração 2 (Fr2) | -Frascos 36-41: Fração 6 (Fr6) |
| - Frascos 22-24: Fração 3 (Fr3) | - Frascos 42-48: Fração 7 (Fr7) |
| - Frascos 25-32: Fração 4 (Fr4) | - Frasco 49: Fr49 |

- Frascos 50-51: Fração 8 (Fr8)
- Frascos 52-57: Fração 9 (Fr9)
- Frascos 59-63: Fração 10 (Fr10)
- Frascos 54-67: Fração 11 (Fr11)
- Frascos 68-70: Fração 12 (Fr12)
- Frascos 71-76: Fração 13 (Fr13)

Depois de secas, as frações foram submetidas à análise por RMN de ^1H a fim de checar quais frações deveriam dar continuidade a este estudo. Os dados obtidos para cada amostra seguem descritos a seguir.

4.3.1 - Substância L019_A_Fr2 (Emodina)

A fração 2 (7,69 mg) apresentava cristais de coloração alaranjada solúveis em acetona e acetato de etila. A solubilidade dos cristais diminuía com o aumento da polaridade do solvente. A FIGURA 4-5 abaixo é referente ao espectro de RMN de ^1H em acetona deuterada e apresenta quatro sinais de hidrogênios aromáticos na região de 6,60 a 7,70 ppm. Além destes sinais, é possível verificar a presença de um singlete em 2,43 ppm que integrava para 3 hidrogênios.

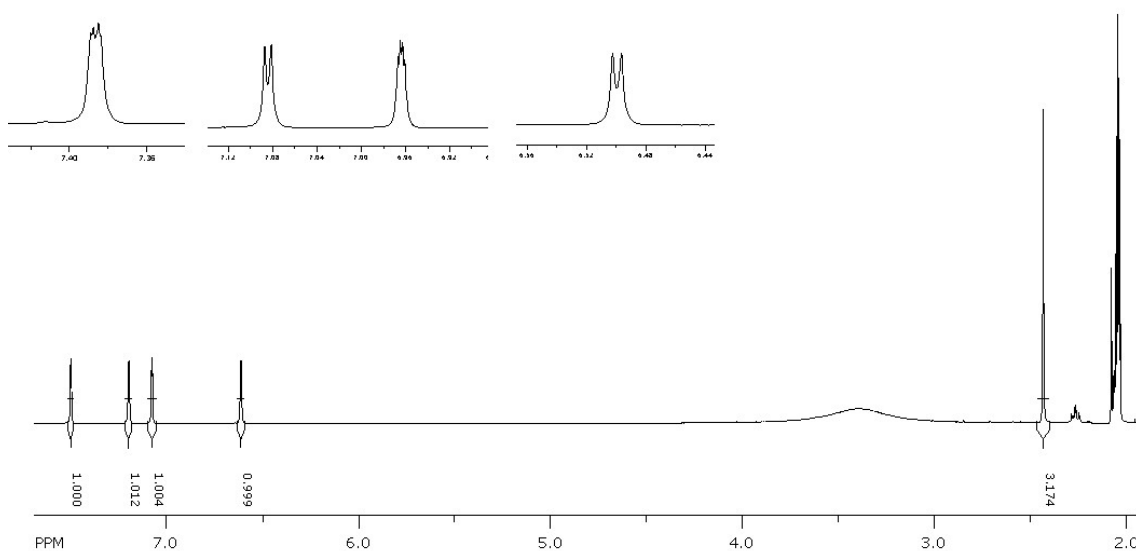


FIGURA 4-5 – Espectros de RMN de ^1H obtido para a substância emodina (400 MHz, acetona- d_6).

Além da análise por RMN de ^1H , realizou-se também a análise por LC-HRMS deste metabólito a fim de obter mais informações sobre tal. O espectro de massas obtido no modo negativo de ionização (ESI-) para esta substância apresentava um pico de íon $[\text{M}+\text{H}]^-$ de m/z 269,0451. A massa molecular desprotonada calculada foi $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_5$. A presença do aduto $[\text{2M}-\text{H}]^-$ de m/z 539.0976 confirma estas informações.

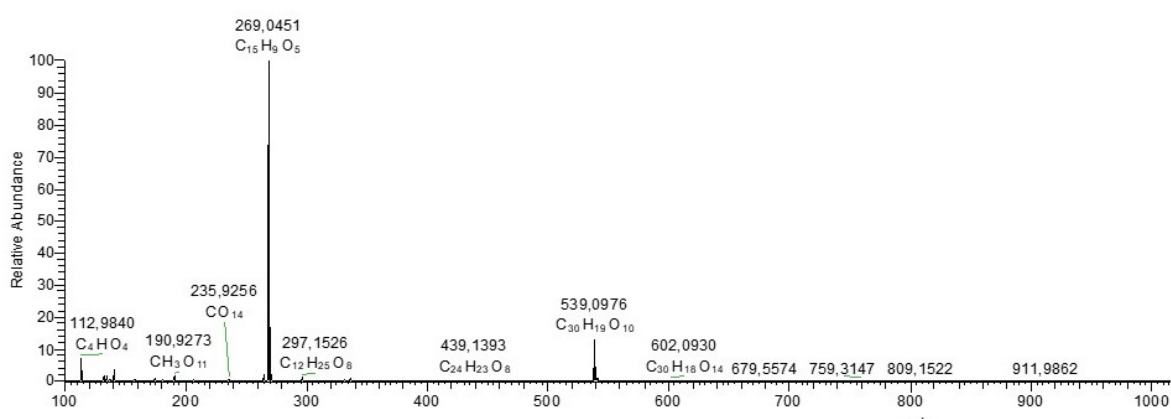


Figura 4-6 – Espectro de massas (ESI-) da substância L019_A_Fr2.

O espectro no UV desta substância revelou uma absorção máxima em $\lambda_{\text{máx}} = 223$ nm. Picos de absorção também foram observados em 266, 287 e 438 nm, indicando a presença de um sistema altamente conjugado.

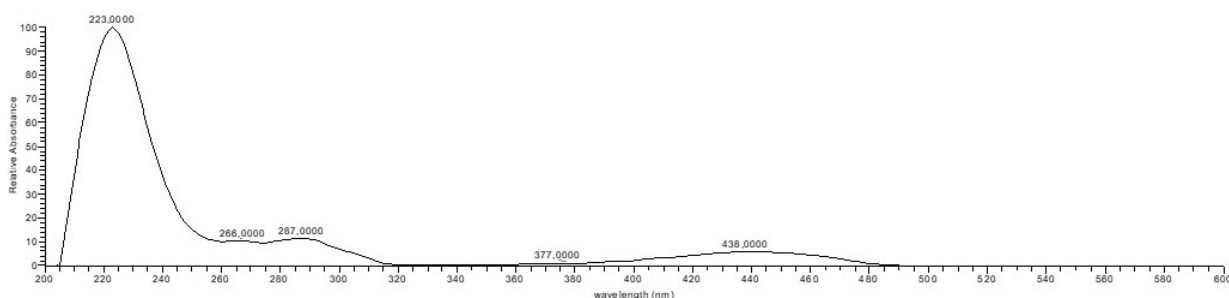


Figura 4-7 – Espectro no UV da substância L019_A_Fr2.

Os dados obtidos a partir dos experimentos de LC-HRMS e RMN de ^1H para a substância L019_A_Fr2 juntamente com a comparação com os dados encontrados literatura (DANIELSEN; AKSNES; FRANCIS, 1992) levaram à

identificação do composto como sendo a antraquinona emodina, já reportada como metabólito secundário de *Escovopsis weberi* (DHODARY et al., 2018).

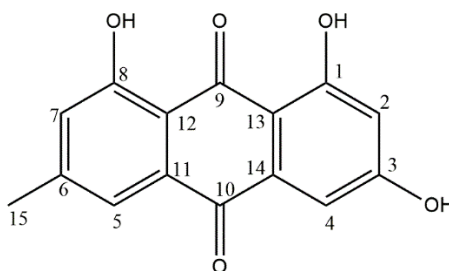


FIGURA 4-8 – Estrutura química da antraquinona emodina.

Os dados obtidos bem como aqueles encontrados na literatura seguem sumarizados na Tabela 4-4 a seguir.

Tabela 4-4 – Dados de deslocamento químico de ^1H (δ) para a substância emodina.

Posição	δ , multiplicidade e J (Hz) - observados	δ e multiplicidade - literatura
2	6,61 (d; 2,4)	6,59 (d; 2,4)
4	7,19 (d; 2,4)	7,12 (d; 2,3)
5	7,50 (dq; 1,6 e 0,6)	7,49 (dq; 0,35 e 0,6)
7	7,70 (dq; 1,6 e 0,7)	7,16 (dq; 0,35 e 0,7)
15	2,43 (t; 0,7)	2,41 (t; 0,7)
OH-1	12,1 (s)	12,08 (s)

A substância emodina é uma antraquinona de rota biossintética derivada dos policetídeos e bastante comum em fungos. Embora já tenha sido reportada para outros micro-organismo do gênero *Escovopsis* (*E. weberi* e *E. aspergilloides*) (DHODARY et al., 2018), este é o primeiro relato desta antraquinona para *E. microspora*.

Emodina já foi reportada como possuindo um amplo espectro de atividades biológicas, tais como anti-inflamatória (LI et al., 2005), sinalizadora (SANDHOLT et al., 2009); antibiótica (CHUKWUJEKWU et al., 2006), construtora óssea (LEE et al., 2008) e anti-angiogênica (KWAK et al., 2006). Além destas, suas atividades antifúngica e antibacteriana frente a micro-organismos oriundos dos ninhos de formigas cortadeiras também foram testadas. Nestes ensaios, emodina apresentou

atividade moderada frente a *L. gongylophorus* e a bactérias do gênero *Streptomyces*, porém mostrou-se inativa frente à *Pseudonocardia* (DHODARY et al., 2018). Estes resultados corroboram os resultados obtidos durante a execução deste projeto de doutorado, em que não se observou atividade frente às bactérias *P. echinatio* e *P. octospinosus* (Figura 4-9). Ensaio de inibição do crescimento de *L. gongylophorus* realizados no Laboratório de Produtos Naturais permitiram verificar que a substância emodina afetou negativamente o crescimento de *L. gongylophorus*, apresentando assim, atividade antifúngica moderada (45% de inibição, Figura 4-10).

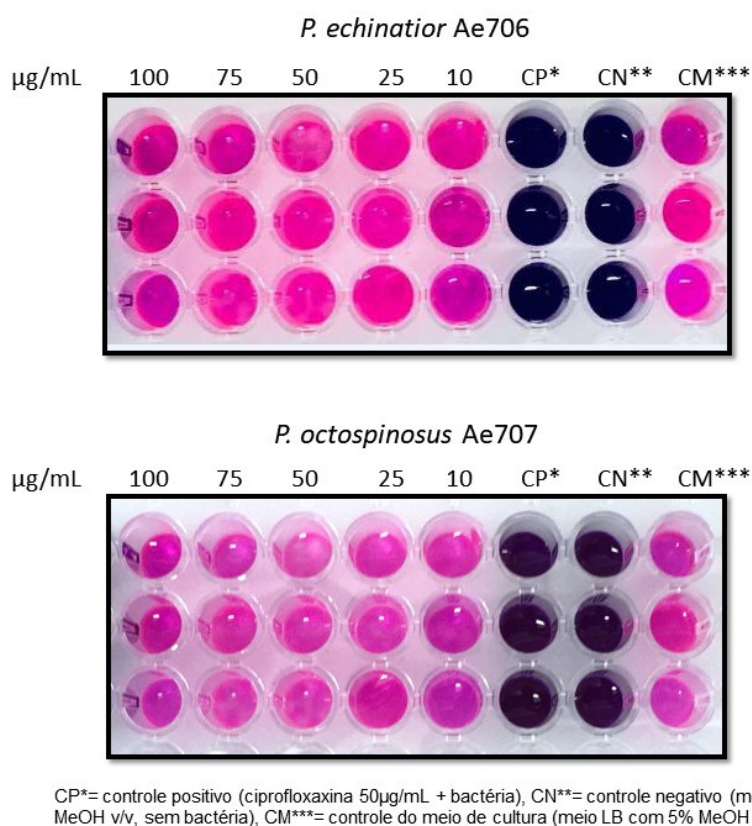


Figura 4-9- Ensaio antibacteriano da substância emodina frente às bactérias *P. echinatio* Ae 706 e *P. octospinosus* Ae707.

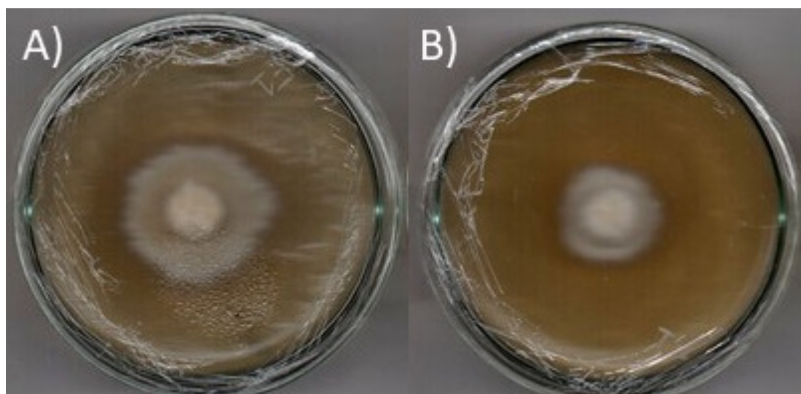


Figura 4-10 - Ensaio de inibição do crescimento radial micelial de *L. gongylophorus* frente a antraquinona emodina: a) controle; b) meio contendo a substância emodina.

4.3.2 – Substância L019_A_Fr3 (6-O-demetil-5-deoxibostrycoidina)

A substância L019_A_Fr3 (2,03 mg) possuía aparência sólida com coloração amarelada. Assim como a substância discutida no tópico anterior, esta fração também possuía alta solubilidade em solventes de média polaridade como acetona e acetato de etila e tinha sua solubilidade diminuída ao aumentar a polaridade do solvente.

A análise por LC-HRMS (ESI+) desta substância gerou um espectro de massas cujo pico do íon $[M+H]^+$ possuía m/z 256,0601. Sabendo que a massa real deste composto é ímpar (255,0532 Da), logo concluiu-se que este deveria possuir números ímpares de átomos de nitrogênio em sua fórmula molecular. A dedução da fórmula molecular protonada ($[M+H]^+$) a partir das informações obtidas no espectro de massas para essa substância foi $C_{14}H_{10}NO_4$.

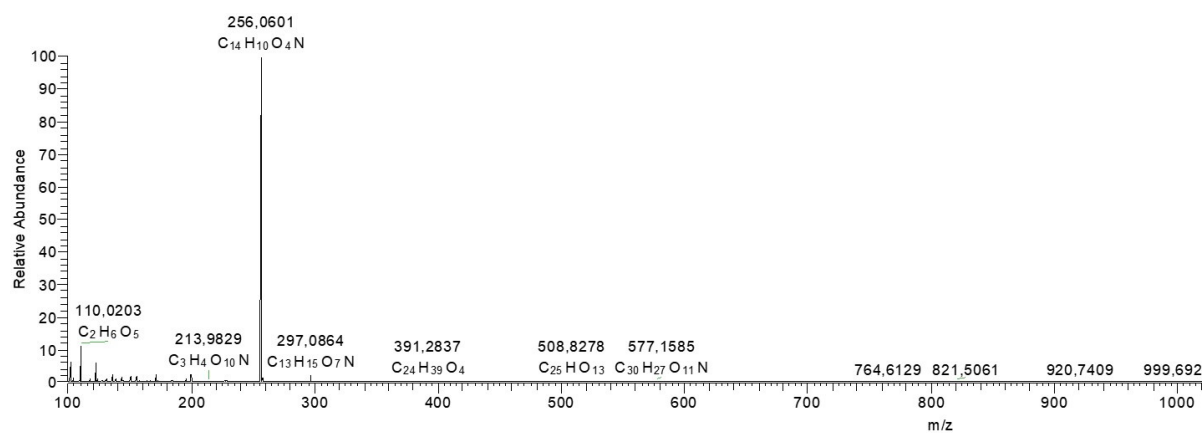


Figura 4-11 - Espectro de massas (ESI+) da substância L019_A_Fr3.

Semelhantemente ao espectro no UV obtido para a substância emodina, o espectro no UV deste metabólito também apresentava um máximo de absorção em 223 nm e outros picos de absorção em 272 e 284 nm. A alta similaridade entre as fórmulas moleculares, espectros no UV e de RMN de ¹H obtidas para as substâncias L019_A_Fr2 (emodina) e L019_A_Fr3 permitiu concluir que se tratavam de substâncias com alta similaridade estrutural.

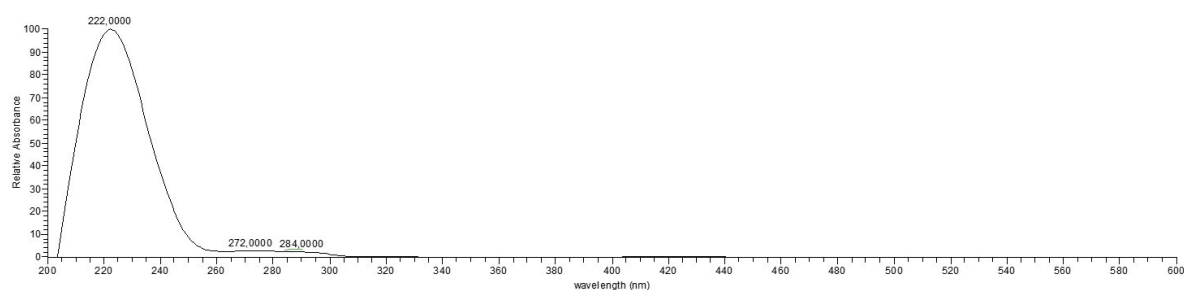


Figura 4-12 - Espectro no UV da substância L019_A_Fr3.

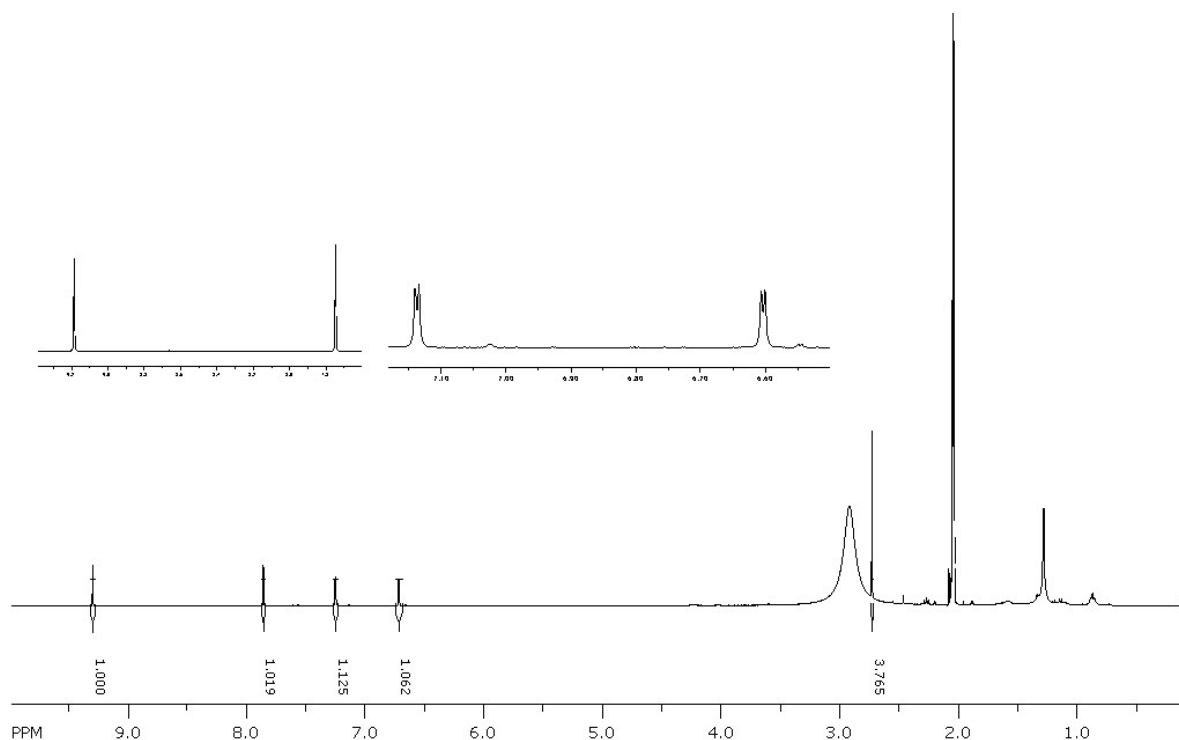


FIGURA 4-13 – Espectro de RMN de ¹H da substância L019_A_Fr3 (acetona-*d*₆, 400 MHz).

O espectro de RMN de ¹H obtido para L019_A_Fr3 em acetona-*d*₆ revelou a presença de hidrogênios aromáticos na região entre 6,70 e 9,30 ppm. É interessante destacar a presença de um hidrogênio desblindado em 9,30 ppm, atípico para sistemas aromáticos “comuns”. Assim, considerando-se que a estrutura de L019_A_Fr3 possuía alta similaridade com a substância emodina exceto pela presença de um átomo de nitrogênio, propôs-se que esta substância se tratava de uma aza-antraquinona. Através de comparação com dados da literatura (PARISOT; DEVYS; BARBIER, 1990) pôde-se determinar a estrutura referente ao espectro mostrado na FIGURA 4-13 como sendo 6-O-demetil-5-deoxibostricoidina. Os dados seguem sumarizados na tabela a seguir.

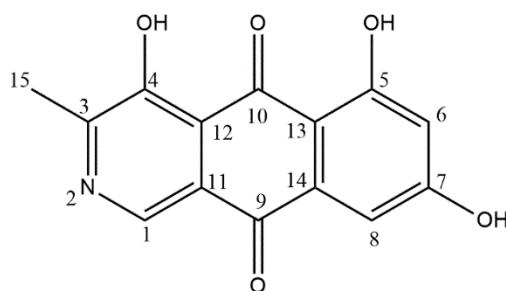


FIGURA 4-14 – Estrutura química da aza-antraquinona 6-O-demetil-5-deoxybostrycoidina.

Tabela 4-5 – Dados de deslocamento químico de ^1H para a substância 6-O-demetil-5-deoxybostrycoidina.

Posição	δ , multiplicidade e J (Hz) - observados	δ e multiplicidade - literatura
1	9,30 (s; l)	9,20 (s; l)
4	7,86 (s; l)	7,80 (s; l)
5	7,25 (d; 2,4)	7,10 (d; 2,0)
7	6,71 (d; 2,4)	6,60 (d; 2,0)
15	2,70 (s)	2,70 (s)

A produção de aza-antraquinonas por micro-organismos é pouco comum. A biossíntese desta classe de substâncias é similar à rota biossintética de antraquinonas, diferenciando apenas na etapa de incorporação do átomo de nitrogênio. Estudos biossintéticos destas substâncias em um fungo marinho (VAN WAGONER; MANTLE; WRIGHT, 2008) mostraram que a inserção do nitrogênio na estrutura ocorre após a condensação de sete unidades de acetato, pela ação de uma enzima do tipo amino transferase. Outra possibilidade para a formação de aza-antraquinonas se dá a partir da condensação de seis unidades de acetato e uma unidade de alanina seguida da ciclização deste intermediário.

[M+H]⁺confirmou tal proposta. (A formação deste aduto a partir da redução de nitrilas, como por exemplo ACN, já foi estudada e confirmada por Gu e colaboradores (GU et al., 2006). A busca em bases de dados (Antibase e Dictionary of Natural Products) para esta fórmula gerou candidatos derivados do ácido indol-carboxílico.

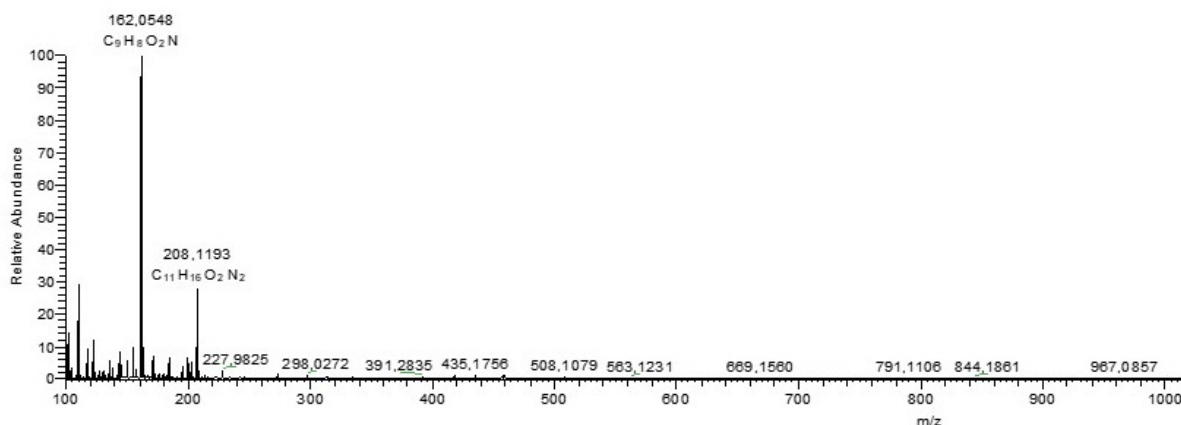


Figura 4-17 – Espectro de massas da substância L019_A_Fr5.

A fim de confirmar qual dos possíveis candidatos se tratava este metabólito, adquiriu-se o espectro de RMN de ¹H desta amostra. A análise deste espectro e sua comparação com dados encontrados na literatura e um padrão de ácido indol-3-carboxílico disponível no laboratório permitiram identificar essa substância como sendo o ácido indol-3-carboxílico.

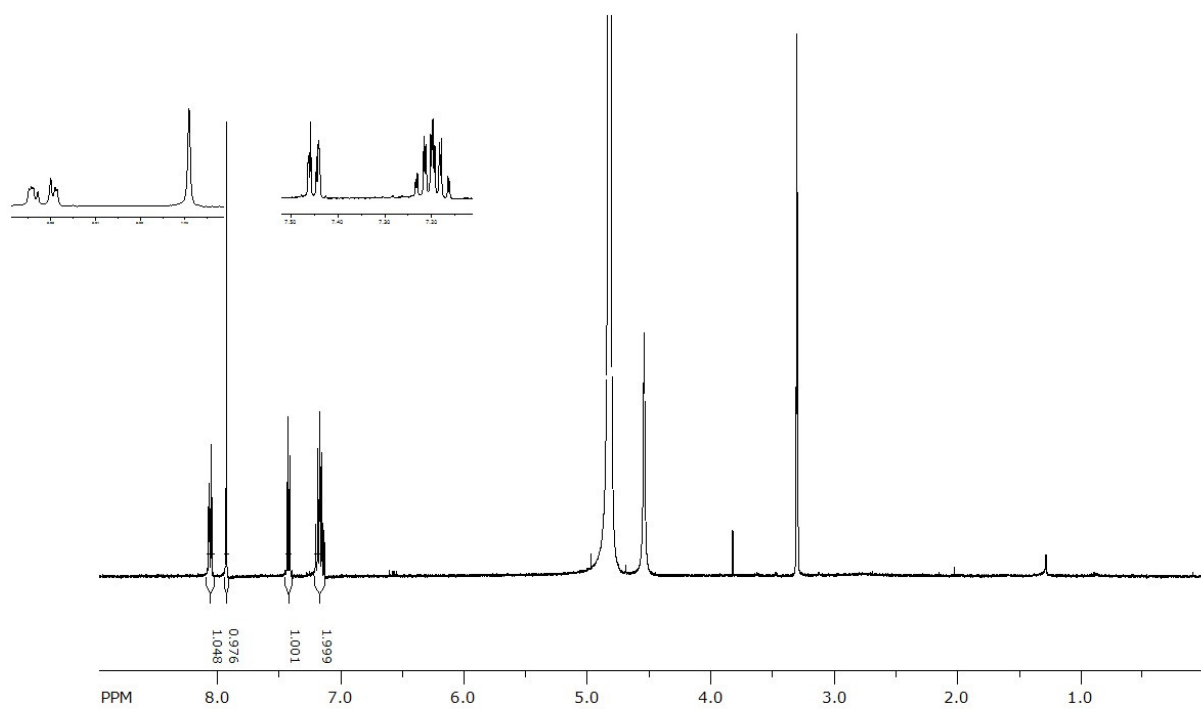


Figura 4-18 - Espectro de RMN de ^1H da substância L019_A_FR5 (CD_3OD , 400 MHz)

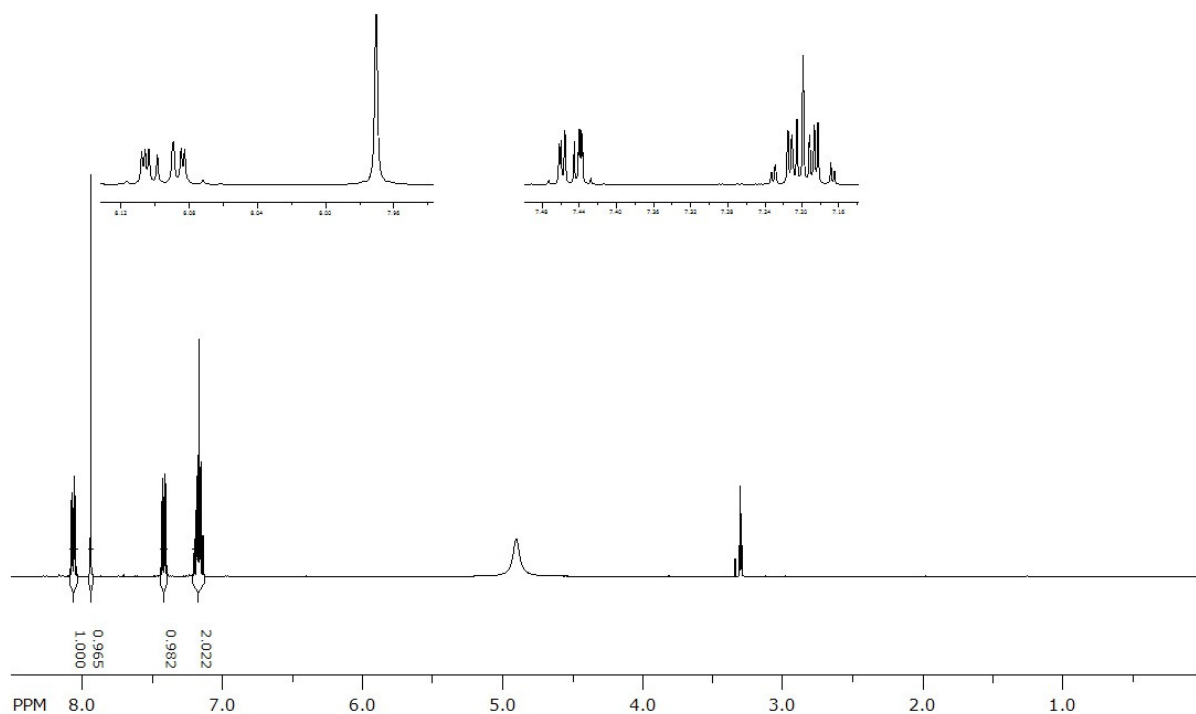


Figura 4-19 - Espectro de RMN de ^1H da substância ácido indol-3-carboxílico (padrão Sigma, CD_3OD , 400 MHz).

Tabela 4-6 – Dados de deslocamento químico de ^1H (δ) para a substância ácido indol-3-carboxílico.

Posição	δ , multiplicidade e J (Hz)- observado	δ (, multiplicidade e J (Hz)– Padrão Sigma-Aldrich
2	7,91 (s)	7,94 (s)
4	8,02 (ddd; 7,5/2,0/0,8)	8,07 (ddd; 7,9/1,2/0,8)
5	7,07 (m)	7,17 (m)
6	7,07 (m)	7,17 (m)
7	7,38 (7,2/2,0/0,8)	7,41 (ddd; 7,9/1,2/0,8)

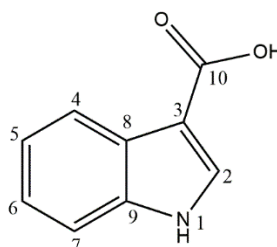


Figura 4-20- Estrutura química do ácido indol-3-carboxílico.

O ácido indol-3-carboxílico já foi reportado como possuindo atividade antimicrobiana (KAVITHA et al., 2010) e fitotóxica (artigo submetido). Devido à quantidade de massa disponível do padrão comercial deste metabólito, decidiu-se testar o seu potencial como inibidor do crescimento de *L. gongylophorus* a fim de checar a função ecológica do mesmo. Após 30 dias foi possível verificar que este metabólito secundário inibiu o crescimento radial micelial do fungo simbiote em 84%. Assim, é possível que este metabólito possa estar envolvido nos mecanismos de ataque de *Escovopsis spp.* a *L. gongylophorus*.

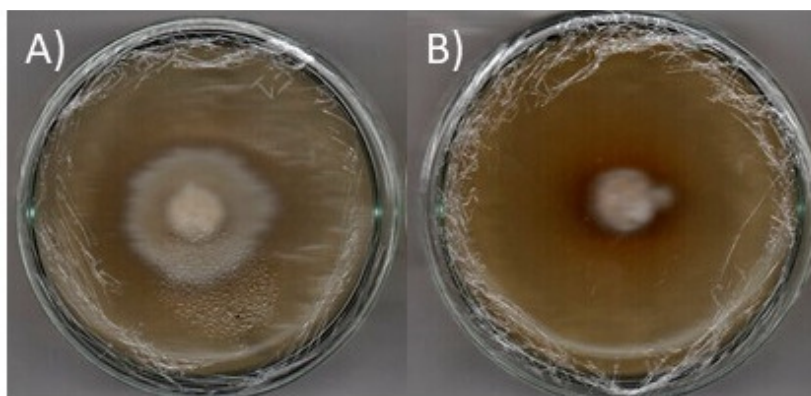


Figura 4-21 – Ensaio de inibição do crescimento radial micelial de *L. gongylophorus* frente ao ácido indol-3-carboxílico: a) controle; b) meio contendo a substância ácido indol-3-carboxílico.

4.3.4 - Substância L019_A_Fr6 (3,4-diidro-3-(2-oxo-propil)-6,8-triidroxi-1(2H)-naftalenona)

O composto obtido na fração 6 (2,79 mg) apresentava-se como um pó de cor alaranjada. Seu espectro de RMN de ^1H revelou pares de sinais de hidrogênios metilênicos em 2,57 (1H, dd; 16,9 e 2,0 Hz) e 2,77 (1H, d; 16,6 Hz) ppm; 2,72 (2H, m) ppm, e 2,83 (1H, dd; 16,4 e 1,7 Hz) e 3,01 (1H, d; 15,6 Hz) ppm que acoplavam com os carbonos em 50,3; 53,2 e 42,1 ppm, respectivamente. Além destes, o espectro ainda apresentava um sinal de metila em 2,07 (s), sinais de hidrogênios aromáticos em 6,03 (d, 2,0 Hz) e 6,13 (m) ppm e um sinal alargado em 12,6 (1H), característico de hidroxila quelada.

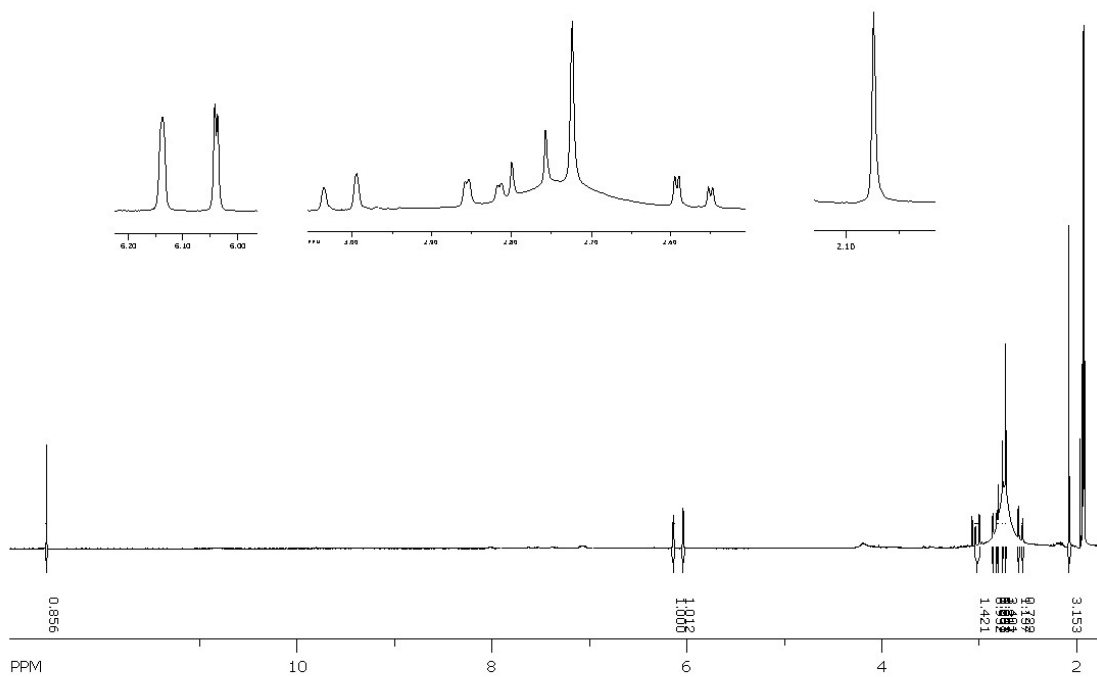


FIGURA 4-22 – Espectro de RMN ^1H obtido para a substância L019_A_Fr6 (acetona- d_6 , 400 MHz)

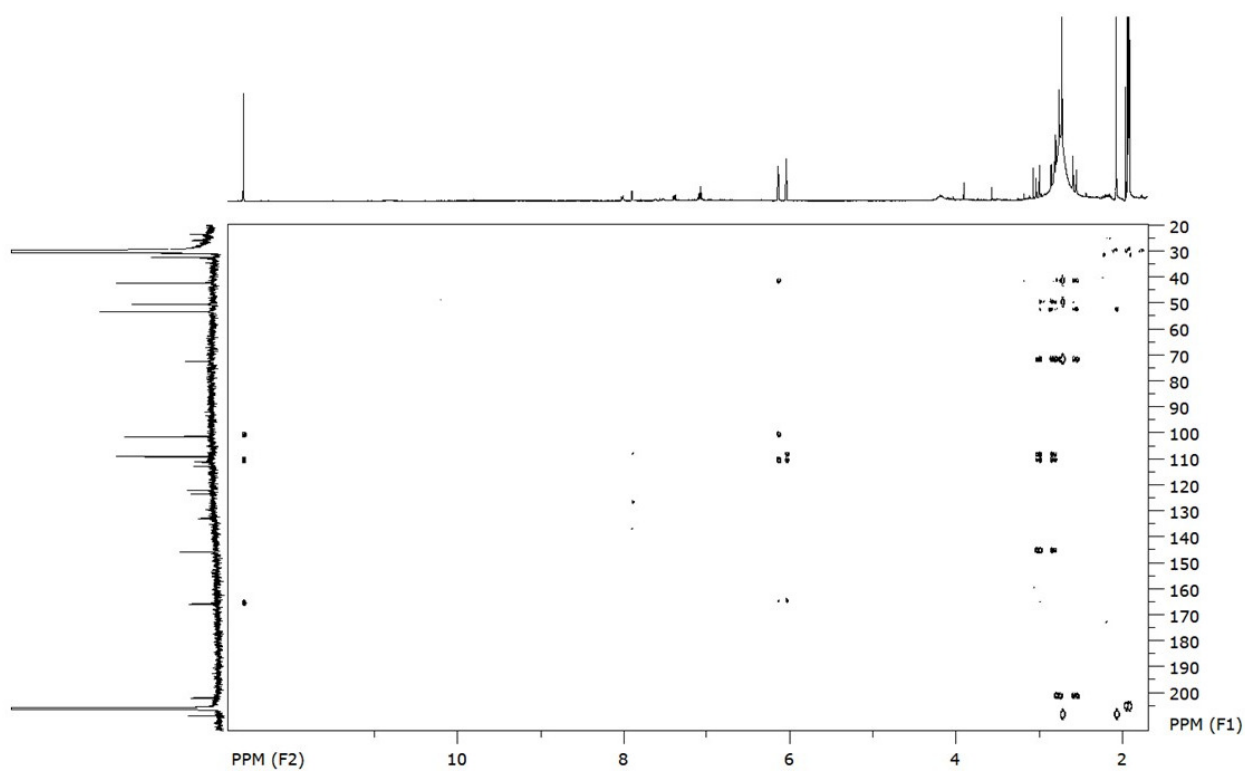


Figura 4-23 - Espectro de RMN de HMBC da substância L019_A_Fr6 (acetona- d_6 , 400 MHz)

O espectro de COSY (FIGURA 4-22) revelou a presença de quatro sistemas que acoplavam entre si, isoladamente: a) hidrogênios metilênicos em 2,57 e 2,77 ppm; b) hidrogênios metilênicos em 2,77 ppm c) hidrogênios metilênicos em 2,83 e 3,01 ppm e d) hidrogênios aromáticos em 6,03 e 6,13 ppm.

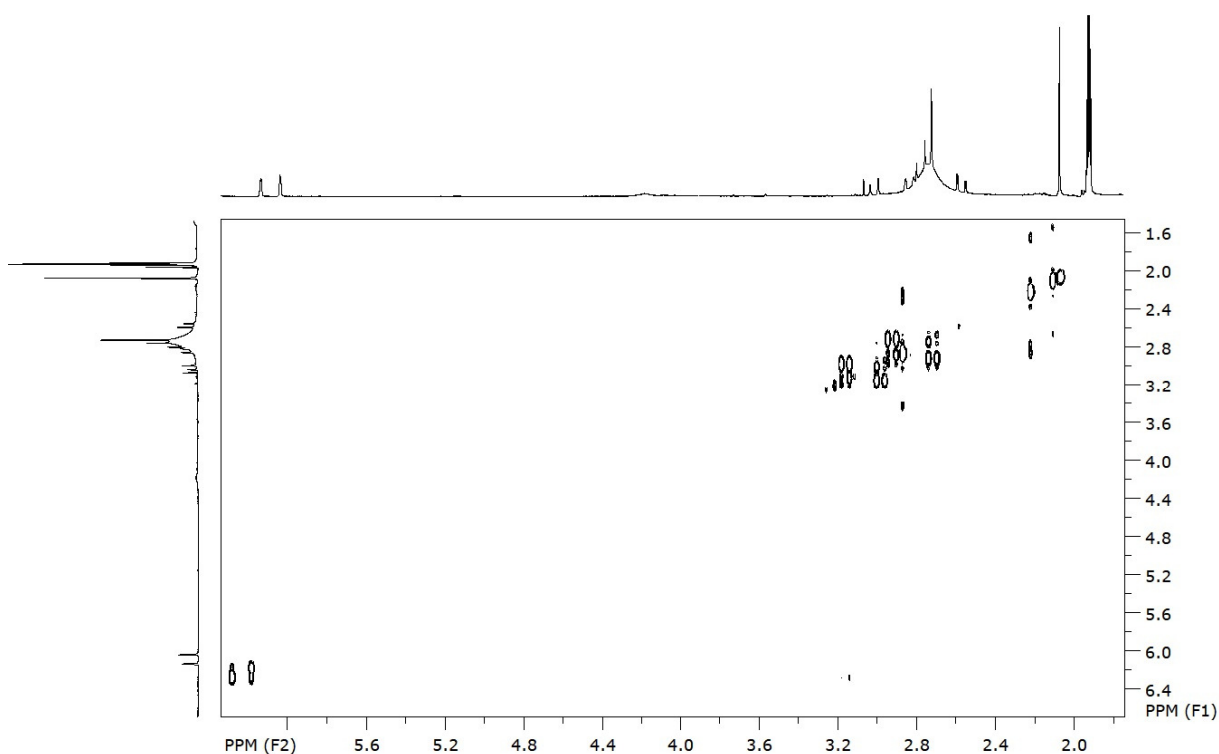


Figura 4-24 – Espectro de RMN de COSY da substância L019_A_Fr6 (acetona- d_6 , 400 MHz)

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios metilênicos em 2,57 e 2,77 ppm e 2,72 ppm permitiram concluir que estes deveriam ter como vizinhança algum grupo que os desblindassem, como carbono carbinólico. Por sua vez, os deslocamentos químicos dos hidrogênios em 2,83 e 3,01 ppm permitiram estabelecer que estes deviam possuir como vizinhança um carbono ligado a hidroxila (carbono carbinólico). Assim, os quatro sistemas citados anteriormente deveriam se tratar de dois sistemas α -carbonílicos, uma parte referente a um sistema aromático e uma última parte referente à vizinhos de carbono carbinólico.

Através do espectro de massas de alta resolução obtido para essa substância, observou-se que uma m/z 251,0909 referente ao pico do íon $[M+H]^+$. A

fórmula molecular protonada calculada foi $C_{13}H_{15}O_5$, cujo grau de insaturações é igual a 7. Sabendo que a molécula em questão possui um sistema aromático (4 insaturações), apenas duas carbonilas (2 insaturações) e não possuía outro tipo de insaturação como ligação dupla, este último grau de insaturação só poderia ser associado à presença de um sistema cíclico. A análise comparativa dos dados obtidos por RMN de 1H e espectrometria de massas com os dados da literatura (ISAKA et al., 2009) indicou que a estrutura proposta para a substância L019_A_Fr6 se tratava da naftalenona mostrada a seguir.

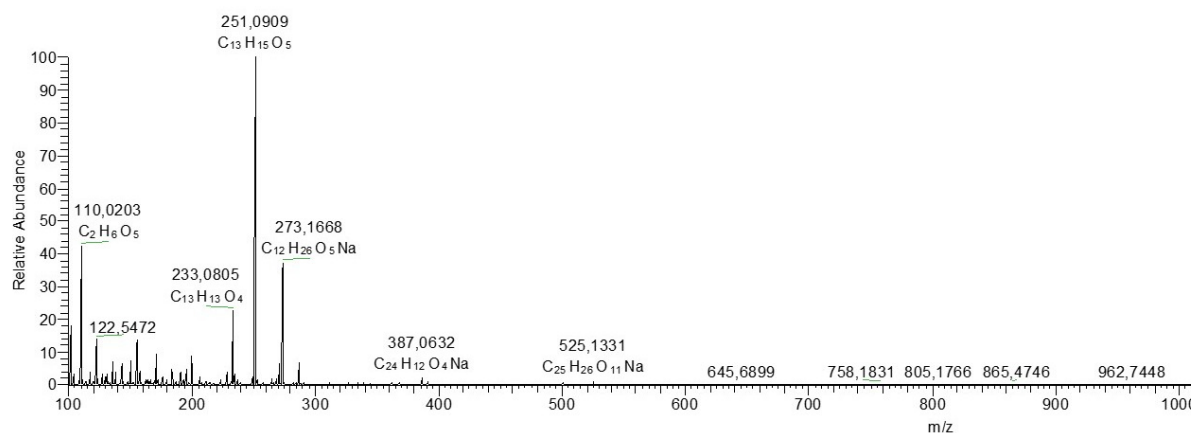


Figura 4-25 - Espectro de massas (ESI+) da substância L019_A_Fr6.

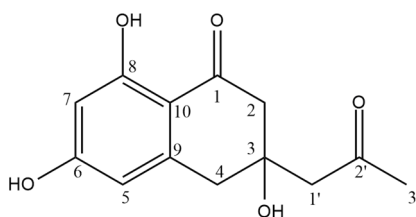


Figura 4-26 - Estrutura da substância 3,4-diidro-3-(2-oxo-propil)- 6,8-triidroxi-1(2H)-naftalenona

Tabela 4-7 – Dados de deslocamento químico de ^1H (δ) para o metabólito L019_A_Fr6

Posição	δ , multiplicidade e J (Hz) - observados	δ e multiplicidade - literatura
2	2,57 (dd; 16,9, 2,0) e 2,77 (d; 16,9)	2,69 (dd; 17,0, 2,0) e 2,89 (d; 17,0)
4	2,83 (dd; 16,4; 1,7) e 3,01 (d; 15,6)	2,96 (dd; 16,3; 2,0) e 3,13 (d; 16,3)
5	6,13 (s, l)	6,26 (s, l)
7	6,03 (d; 2,0)	6,16 (d; 2,1)
1'	2,72 (s, l)	2,86 (m)
3'	2,07 (s)	2,20 (s)

A produção de naftalenonas por fungos já foi reportada na literatura (ISAKA et al., 2009; LIU et al., 2002) sendo este o primeiro relato para micro-organismo do gênero *Escovopsis*. Estudos realizados por ISAKA (2009) e colaboradores reportaram a produção desta mesma substância por um fungo endofítico pertencente ao gênero *Botryosphaeria*. Ainda neste trabalho, as atividades citotóxicas, antiparasitária, antifúngica e antibiótica foram relatadas. Para os ensaios citotóxicos, três linhagens de células tumorais foram selecionadas (células pulmonares NCI-H187, células mamárias MCF-7 e da cavidade oral humana KB). Já no caso dos demais ensaios, foram utilizados o plasmódio *Plasmodium falciparum* K1, a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra e o fungo *Magnaporthe grisea* TH16. Apesar de todos os esforços realizados pelo grupo, a substância em questão não apresentou atividade frente a nenhum dos ensaios realizados.

4.3.5 - Substância L019_A_Fr10_6 (Ciclo triptofano-serina)

A fração L019_A_Fr10_6 (1,07 mg) foi isolada a partir do refração da fração L019_A_Fr10 em coluna de exclusão molecular (Sephadex). Esta subfração apresentava-se como um sólido amarelado. O espectro de RMN de ^1H apontou que, na verdade, esta fração tratava-se de uma mistura de duas substâncias em proporção 1:2,5. A análise por UPLC-HRMS confirmou a presença de duas substâncias na mistura.

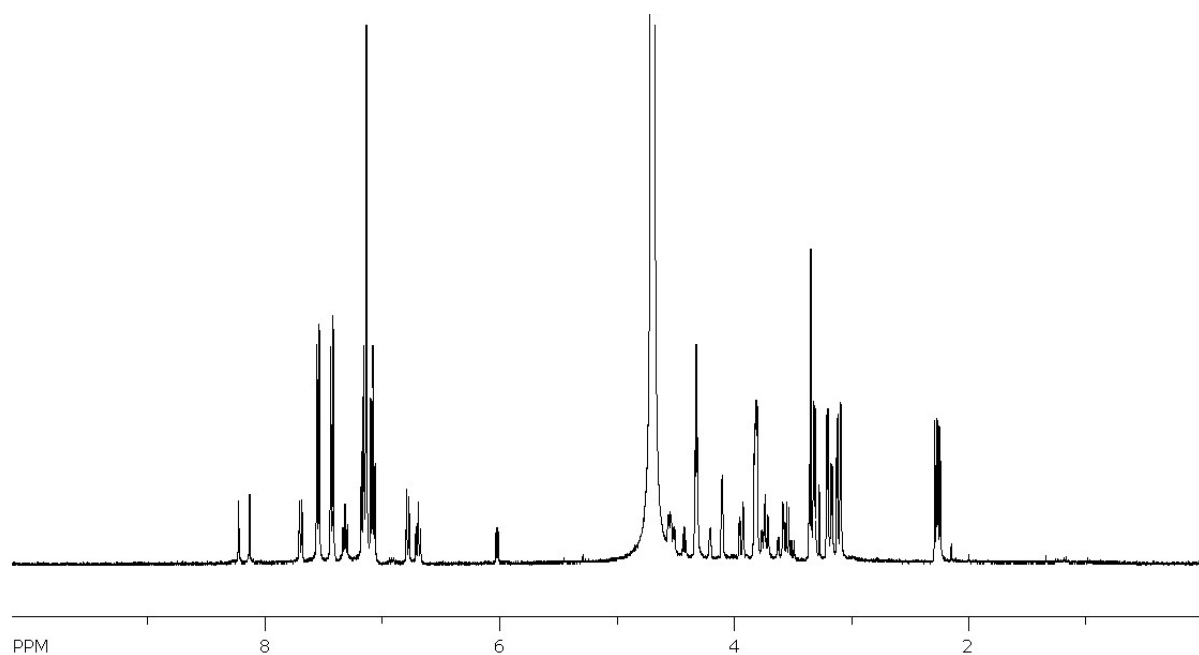


Figura 4-27 – Espectro de RMN de ^1H obtido para a fração L019_A_Fr10_6 (D_2O , 400 MHz).

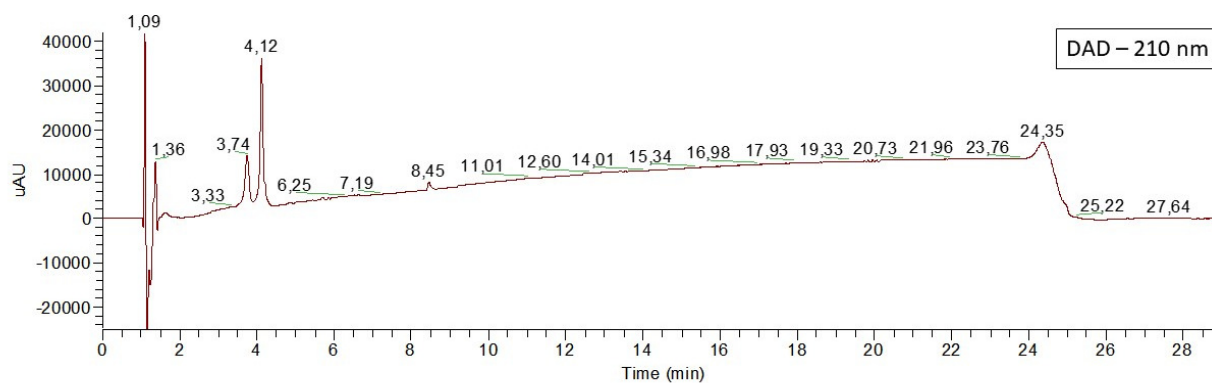


Figura 4-28 – Cromatograma (210 nm) da mistura L019_A_Fr10_6.

O processamento das bandas em 3,74 e 4,12 minutos do TIC gerou os seguintes espectros de massas:

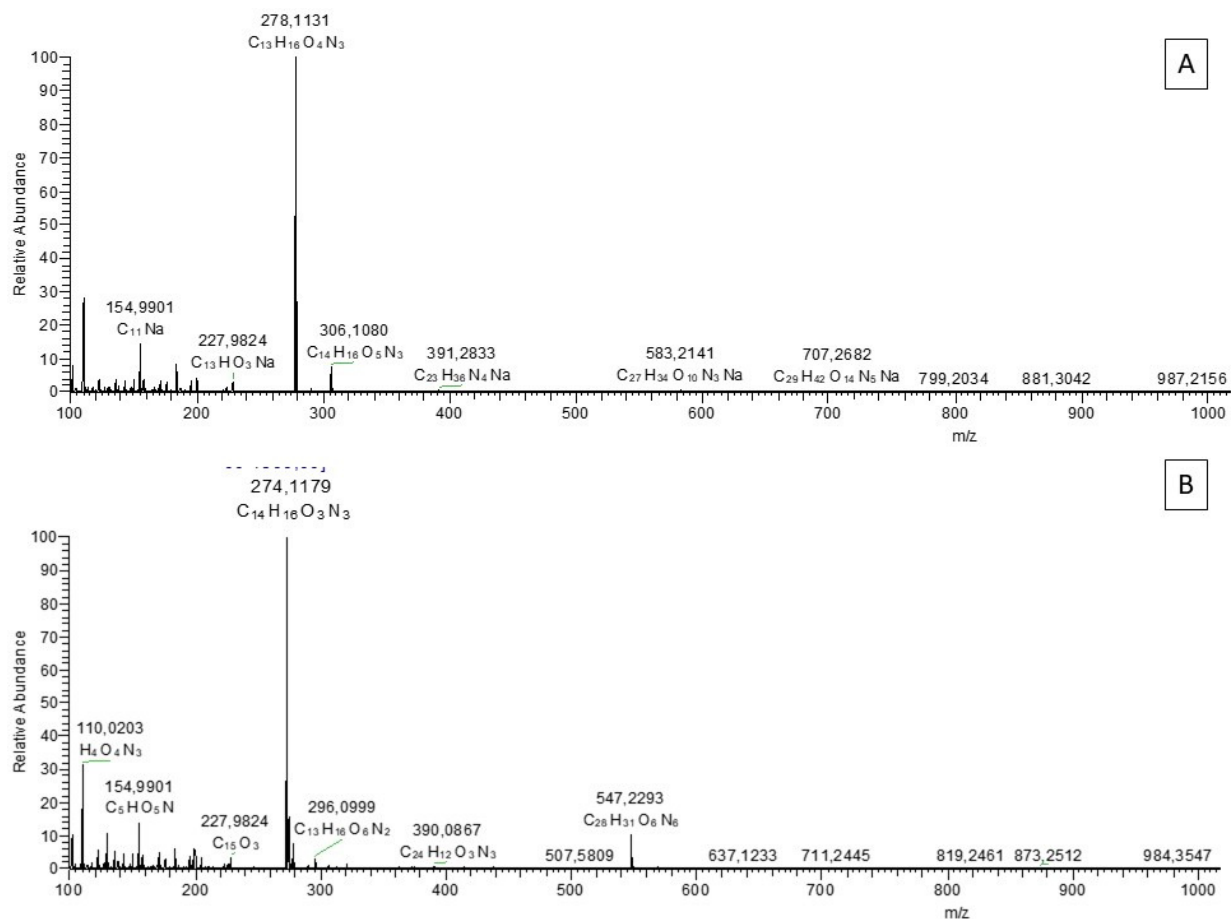


Figura 4-29 – Espectros de massas (ESI+) obtidos no processamento das bandas em a) 3,79 e b) 4,19 minutos

Assim, determinou-se a fórmula molecular da substância majoritária como sendo $C_{14}H_{15}O_3N_3$, confirmada pela presença do aduto $[2M+H]^+$ de m/z 547,2293. Os espectros de RMN de 1H e HSQC revelaram a presença de hidrogênios metínicos em $\delta = 3,81$ (1H, m); 4,31 (1H, t), metilênicos em $\delta = 2,26$ (1H, dd) e 3,10 (1H, dd); 3,18 (1H, dd) e 3,33 (1H, dd) e aromáticos em $\delta = 7,08$ (t); 7,15 (s); 7,18 (t); 7,43 (d); 7,55 (d).

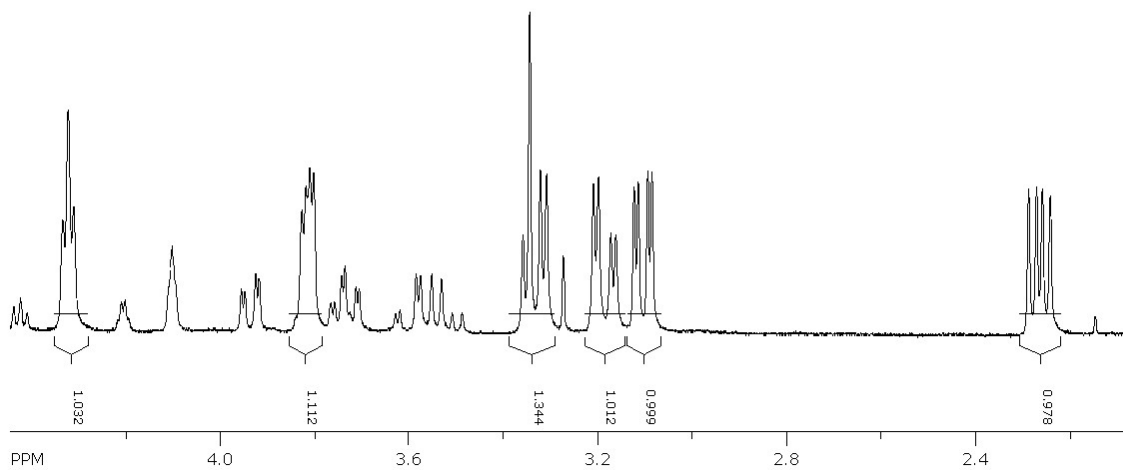


Figura 4-30 - Espectro de RMN de ^1H ampliado entre 2-5 ppm da amostra L019_A_Fr10_6 (D_2O , 400 MHz)

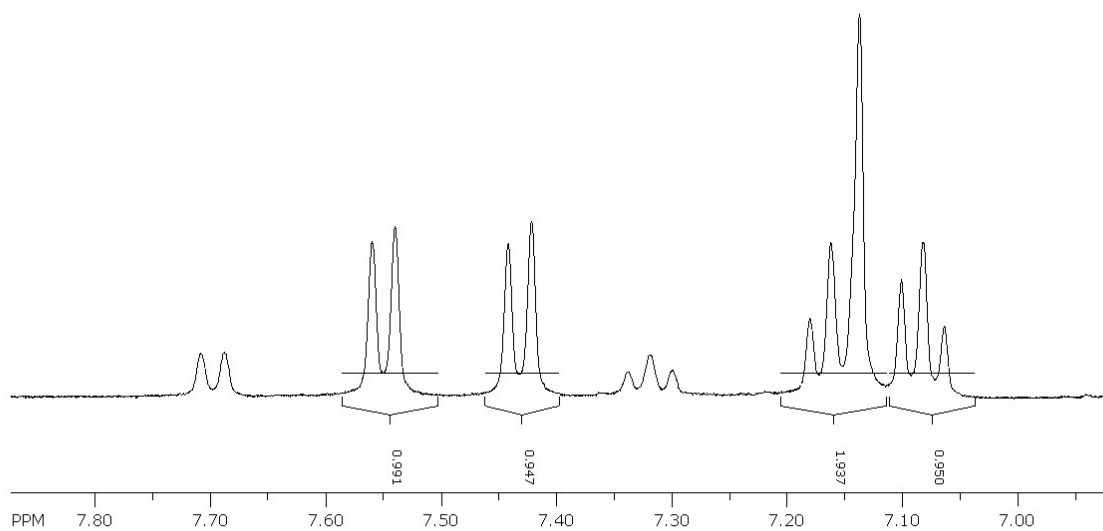


Figura 4-31 - Espectro de RMN de ^1H ampliado entre 7-8 ppm da amostra L019_A_Fr10_6 (D_2O , 400 MHz)

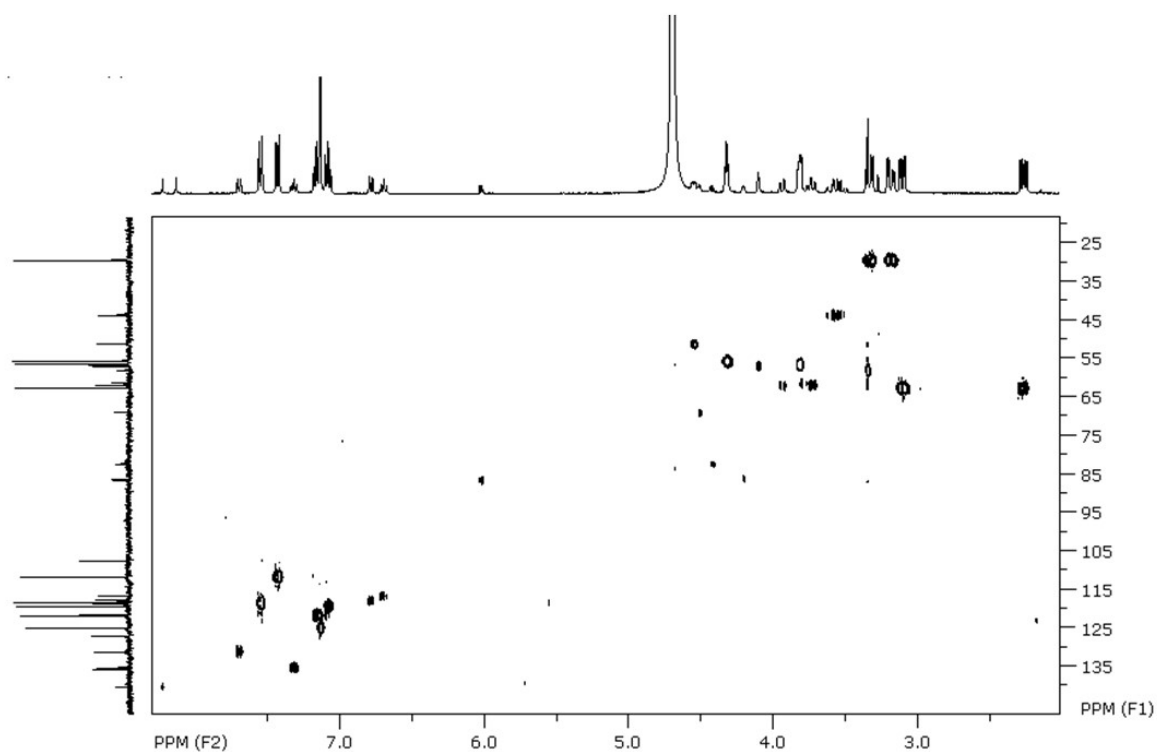


Figura 4-32 - Espectro de RMN de HSQC da amostra L019_A_Fr10_6 (D₂O, 400 MHz)

Através do espectro de COSY foi possível notar os acoplamentos entre os hidrogênios 2,26; 3,10 e 3,81 ppm, 3,33 e 4,31 ppm; 7,05 e 7,55 ppm; 7,15 e 7,43 ppm, indicando a presença de três sistemas de acoplamento de spins distintos nesta molécula. A presença de três átomos de nitrogênio, três de oxigênio (sendo duas carboxilas com deslocamento químico em 167,3 e 169,7 ppm) e um índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a 9 levaram à conclusão de que esta molécula deveria possuir um sistema indólico (IDH= 6) além de um sistema cíclico do tipo dicetopiperazínico (TULLBERG; LUTHMAN; GRØTLI, 2006). Desta maneira, concluiu-se que a molécula em questão tratava-se da dicetopiperazina ciclo triptofano-serina.

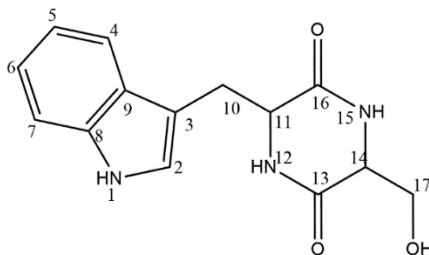


Figura 4-33 - Estrutura química da substância majoritária da fração L019_A_Fr10_6: dicetopiperazina ciclo Trp-Ser.

Tabela 4-8 – Dados de deslocamento químico de RMN de ^1H da substância majoritária (ciclo Trp-Ser) de L019_A_Fr10_6

Posição	δ , multiplicidade e J (Hz) - observados	δ e multiplicidade - literatura
2	7,15 (s)	6,98-7,04 (m)
4	7,55 (d; 7,9)	7,60 (d; 8,1)
5	7,18 (t; 6,5)	7,05-7,13 (m)
6	7,05 (t; 7,3)	7,05-7,13 (m)
10	3,18 (dd; 15,0, 4,3) e 3,33(d; 15,0, 5,1)	2,85-2,91 (m) e 3,23-3,30 (m)
7	7,43 (d; 7,8)	7,34 (d; 8,1)
11	4,31 (t; 5,1)	4,19-4,24 (m)
14	3,81 (m)	3,81-3,83 (m)
17	2,26 (dd; 11,9; 2,0) e 3,10 (dd; 12,0, 4,3)	3,33-3,41 (m)

Embora não tenham sido encontrados ensaios de atividade biológica reportados para esta dicetopiperazina especificamente, ela já foi reportada como um fator anti-*quorum sensing* da bactéria *Rheinheimera aquimaris* QSI02 (SUN et al., 2016), inibindo o crescimento de bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*. Apesar de não termos realizado ensaios antimicrobianos com esta substância, levando-se em consideração seu papel previamente citado, é possível que o micro-organismo *E. microspora* produza essa substância com intuito de inibir o crescimento de bactérias associadas ao ninho de formigas cortadeiras. Portanto, essa poderia ser uma forma de ataque aos ninhos a fim de estabelecer sua virulência.

A substância minoritária ainda segue em identificação.

4.3.6 - Substância L019_A_Fr12 (Purpufusarina)

O metabólito obtido na fração L019_A_Fr12 (1,42 mg) possuía coloração violeta intenso e solubilidade em solventes mais polares como MeOH e DMSO. Seu espectro de RMN de ^1H era relativamente “simples”, isto é, apresentava apenas 4 sinais de hidrogênios em 2,36 ppm (s, 3H), 6,05 (s, 1H), 7,41 (s, 1H) e 9,27 (s, 1H). A presença do sinal em $\delta = 9,27$ sugeriu que se tratava de outra aza-antraquinona.

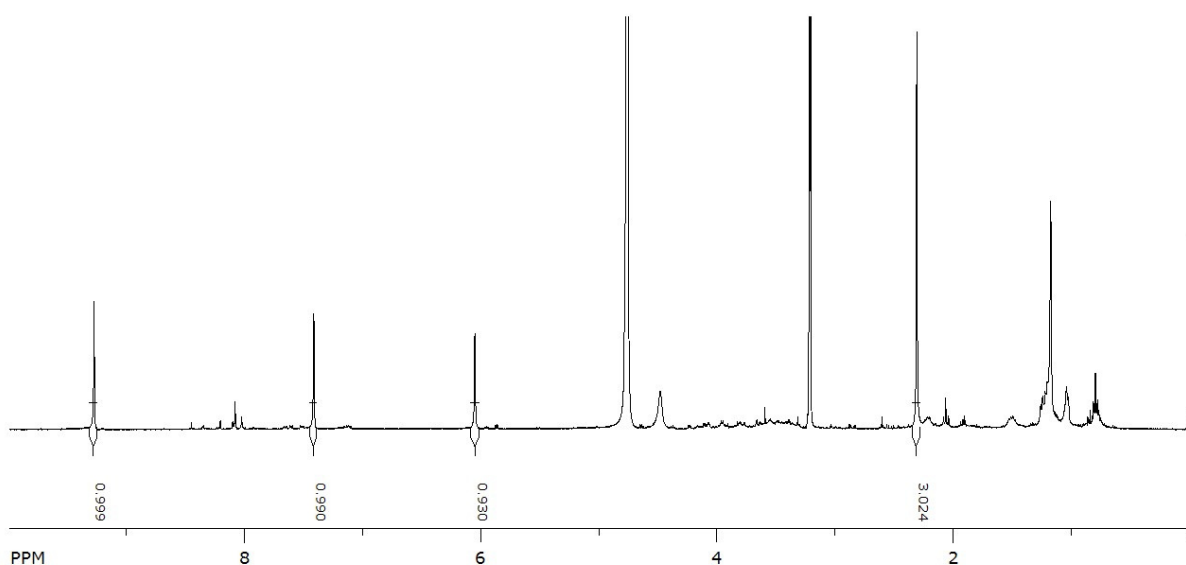


Figura 4-34 - Espectro de RMN de ^1H da substância L019_A_Fr12 (CD_3OD , 400 MHz)

A despeito da falta de informações sobre a estrutura química obtida no espectro de RMN de ^1H , seu espectro de RMN de ^{13}C mostrava a correlação dos quatro sinais de hidrogênios com 14 carbonos, como pode ser visto na Figura 4-35a seguir.

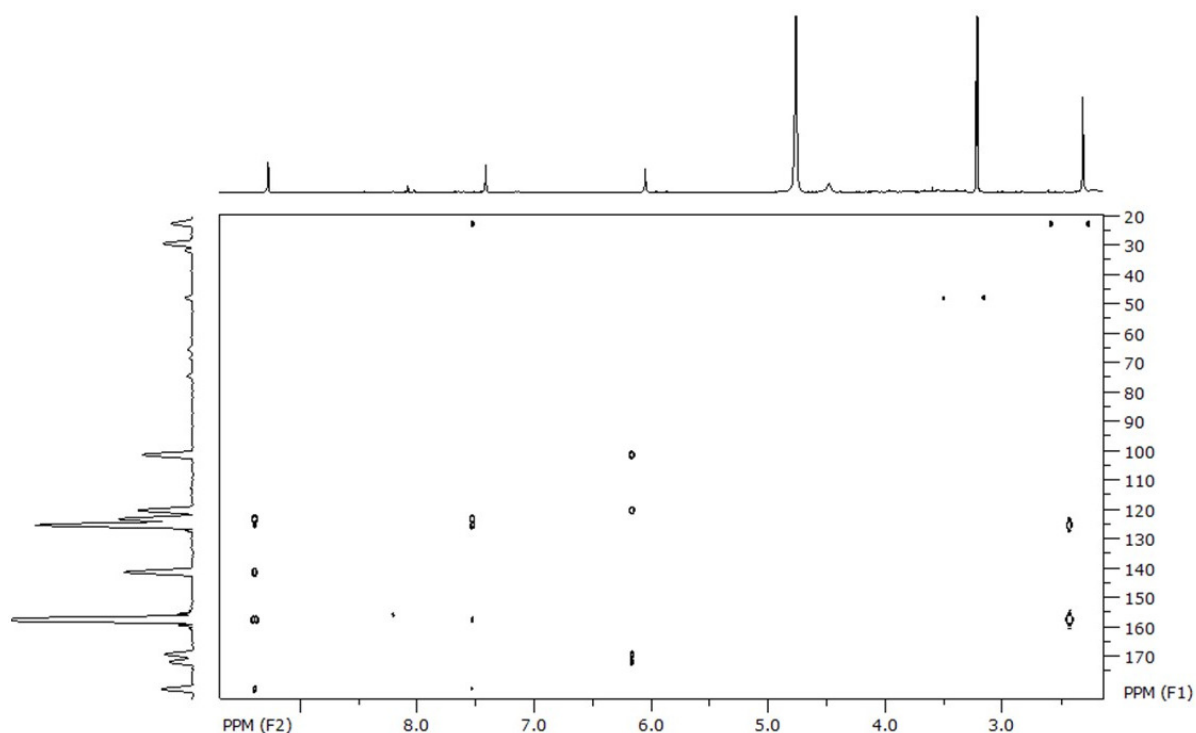


Figura 4-35 - Espectro de RMN de HMBC da substância L019_A_Fr12 (CD₃OD, 400 MHz)

Por sua vez, seu espectro de massas revelou um pico do íon $[M+H]^+$ de m/z 477,1074, cuja fórmula molecular protonada calculada foi C₂₈H₁₇O₆N₂. O íon $[2M+H]^+$ de m/z 953.2086 confirmava esta dedução. Assim, valendo-se dos dados de RMN de ¹H e de RMN de ¹³C e espectrometria de massas, concluiu-se que esta substância era um dímero de aza-antraquinona. A busca na base de dados Dictionary of Natural Products a partir da fórmula molecular obtida apresentou a substância purpurfusarina como possível candidato.

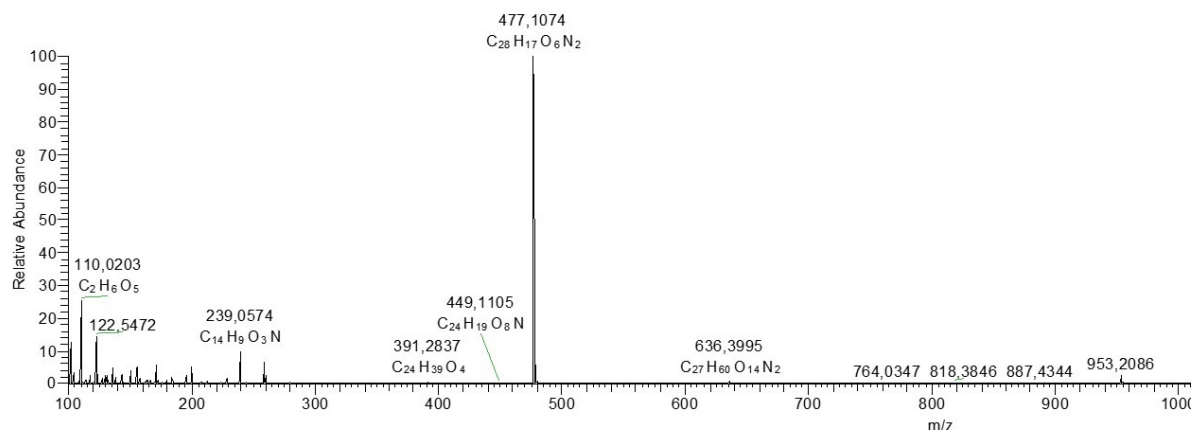


Figura 4-36 – Espectro de massas (ESI+) da substância L019_A_Fr12

O confrontamento dos dados obtidos com aqueles disponíveis na literatura (FRANSEN et al., 2016) permitiu confirmar que a substância L019_A_Fr12 era a substância purpurfusarina. Em um trabalho realizado por FRANSEN et al. (2016) a partir de do fungo *Fusarium graminearum* obteve-se uma m/z 477,1080 para esta substância, além dos sinais do espectro de ^1H em 2,37 ppm (H-15/15'), 6,39 (H-7/7'), 7,72 (H-4/4') e 9,43 (H-1/1') ppm. Essa substância é, na verdade, um pigmento peritecial escuro com função análoga à melanina presente nos corpos frutíferos de alguns micro-organismos.

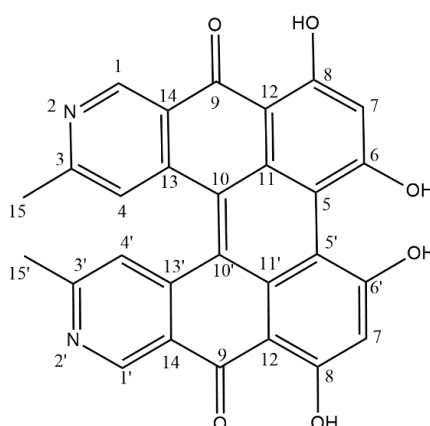


Figura 4-37 - Estrutura química da substância purpurfusarina.

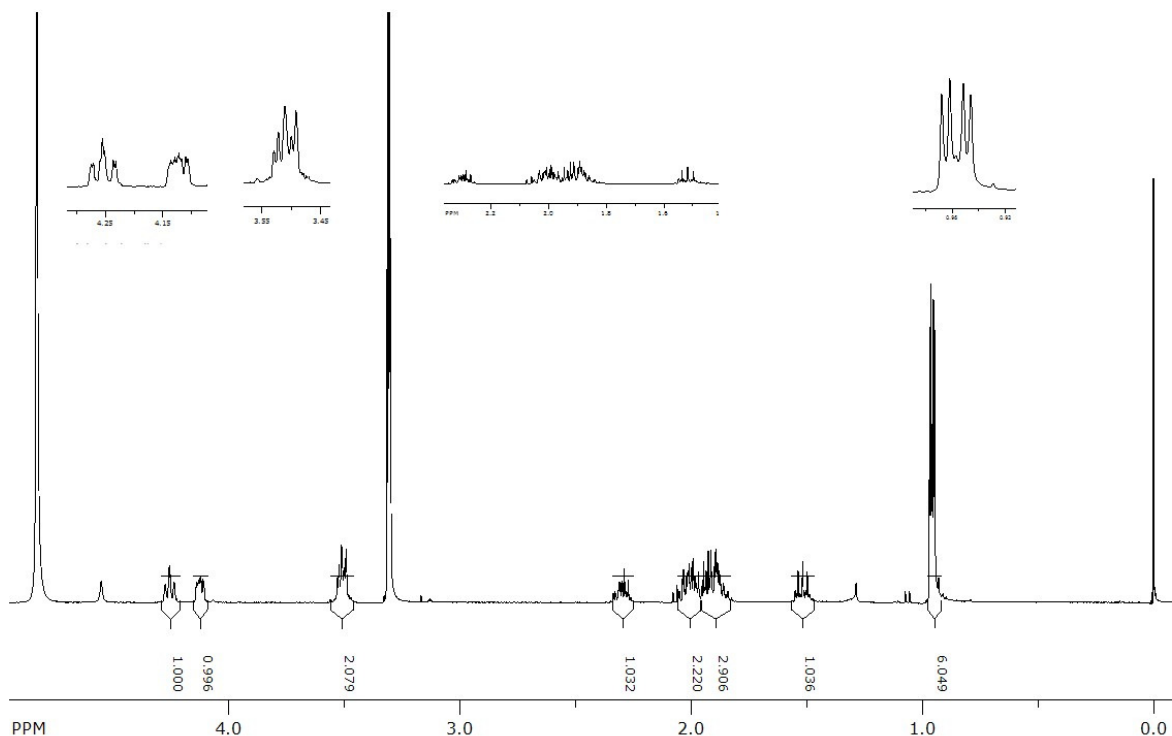
Tabela 4-9 - Dados de deslocamento químico de ^1H da substância purpurfusarina

Posição	δ , multiplicidade e J (Hz) - observados	δ e multiplicidade - literatura
1/1'	9,27 (s)	9,43 (s)
4/4'	6,05 (s)	6,39 (s)
7/7'	7,41 (s)	7,72 (s)
15/15'	2,36 (s)	2,37 (s)

Seu potencial como agente antifúngico foi testado frente a *Candida albicans*, obtendo-se uma potência inibitória de IC_{50} de $8.0 \pm 1.9 \mu\text{M}$ (FRANSEN et al., 2016).

4.3.7 - Substância L019_A_Fr49 (ciclo leucina-prolina)

A substância L019_A_Fr49 (1,77mg) tinha aparência sólida amarelada e era muito solúvel em solventes de maior polaridade, tais como metanol e DMSO. Seu espectro de RMN de ^1H revelou a presença de sinais apenas entre as regiões de 1 - 4,5 ppm, típico de dicetopiperazinas derivadas de aminoácidos não-aromáticos.

Figura 4-38 - Espectro de RMN de ^1H da substância L019_A_Fr49 (CD_3OD , 400 MHz)

Os sinais de hidrogênios de metila em 0,85 e 0,86 ppm que tinham como multiplicidade um dubleto e a presença dos hidrogênios metilênicos em 1,42 (1H, m) e 1,80 (1H, m) ppm que acoplavam com os hidrogênios metílicos e com um hidrogênio em 4,01 ppm (1H, m) permitiram deduzir ser esta porção vinda do aminoácido leucina. Por outro lado, a presença de sinais relativos somente à hidrogênios metínicos e metilênicos levou à conclusão de que o outro aminoácido se tratava de um resíduo de prolina. Desta forma, propôs-se que este metabólito era a dicetopiperazina ciclo leucina-prolina ($C_{11}H_{18}O_2N_2$).

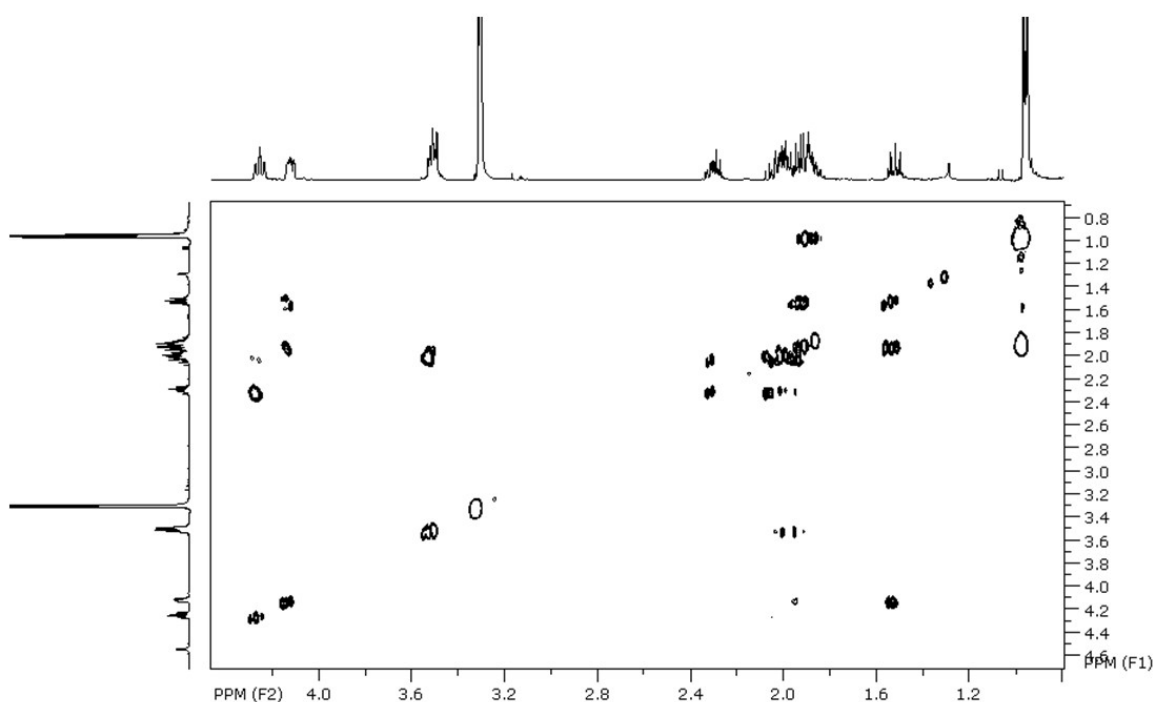


Figura 4-39 - Espectro de RMN de COSY da substância L019_A_Fr49 (CD_3OD , 400 MHz)

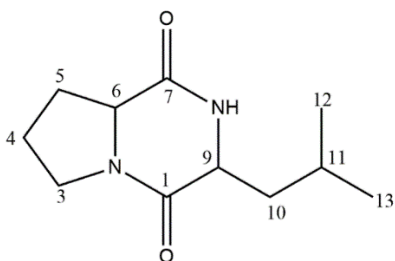


Figura 4-40 – Estrutura química da substância ciclo Pro-Leu

O espectro de massas desta amostra apresentou um íon $[M+H]^+$ de m/z 211,1439, cuja fórmula molecular protonada correspondente era $C_{11}H_{19}O_2N_2$. Os íons de m/z 252,1703 e m/z 421,2603 referentes aos adutos de $[M+H+ACN]^+$ e $[2M+H]^+$, respectivamente, também confirmam tal proposta.

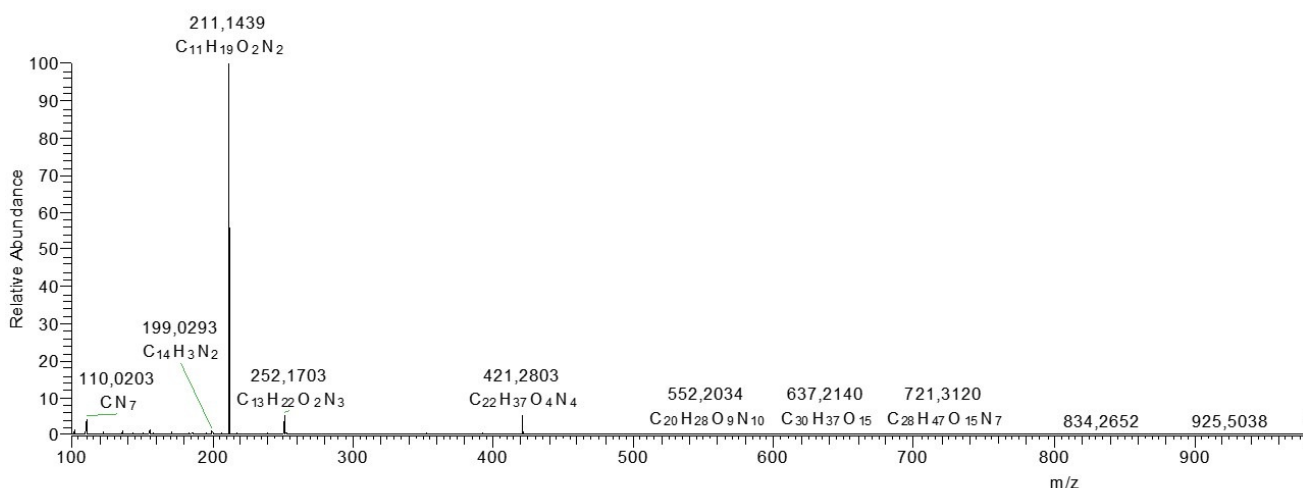


Figura 4-41 - Espectro de massas (ESI+) da substância ciclo prolina-leucina

Tabela 4-10 - Dados de deslocamento químico de 1H da ciclo prolina-leucina

Posição	δ , multiplicidade e J (Hz) - observado	δ , multiplicidade e J (Hz) - literatura (ADAMCZESKI; REED; CREWS, 1995)
3	3,41 (m)	3,51 (m)
4	1,82 (m) e 1,88 (m)	1,90 (m) e 2,00 (m)
5	1,90 (m) e 1,92 (m)	2,13 (m) e 2,33 (m)
6	4,15 (t)	4,12 (t)
9	4,01 (m)	4,01 (m)
10	1,42 (m) e 1,80 (m)	1,52 (m) e 2,01 (m)
11	1,78 (m)	1,77 (m)
12*	0,85	0,94
13*	0,86	1,00

* valores intercambiáveis

Este tipo de dicetopiperazina é bastante comum para micro-organismos. Ela já foi reportada como possuindo atividade antifúngica frente aos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$ (KUMAR, NAMBISAN, 2013).

Embora não tenha sido ensaiada frente ao micro-organismo *L. gongylophorus*, a atividade antifúngica já reportada para este metabólito secundário dá evidências que *Escovopsis* possa estar produzindo este metabólito como um dos meios de estabelecer sua patogenia no jardim de fungos de formigas cortadeiras.

4.3.8 - Substância L019_E_7

A fração L019_E_7 foi isolada a partir do fracionamento do extrato etanólico por cromatografia de exclusão molecular e possuía coloração amarronzada e aspecto oleoso. O espectro de RMN de ^1H obtido para essa amostra (Figura 4-42) revelou sinais característicos de ácido graxo. Assim, a fim de facilitar sua identificação, a amostra foi submetida a análise por CG-EM.

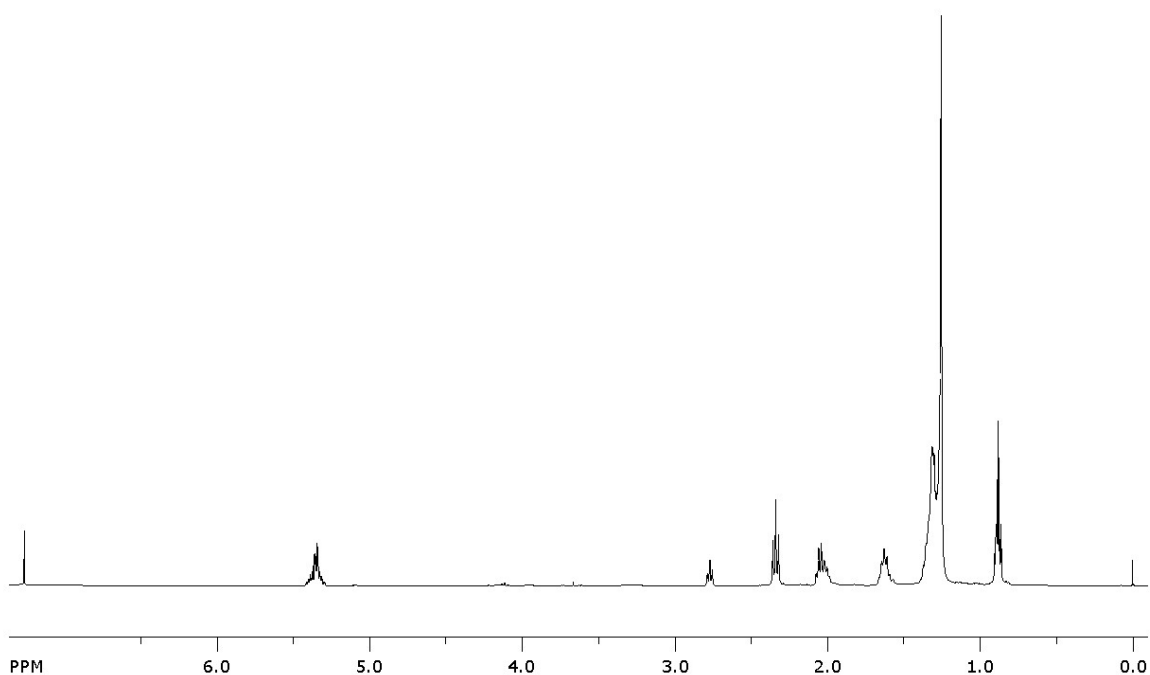


Figura 4-42 - Espectro de RMN de ^1H da substância L019_E_7 (CDCl_3 , 400 MHz)

O cromatograma de íons totais obtido através da análise de CG-EM era composto por 3 picos nas proporções 1:1:0,5, como mostrado na imagem abaixo.

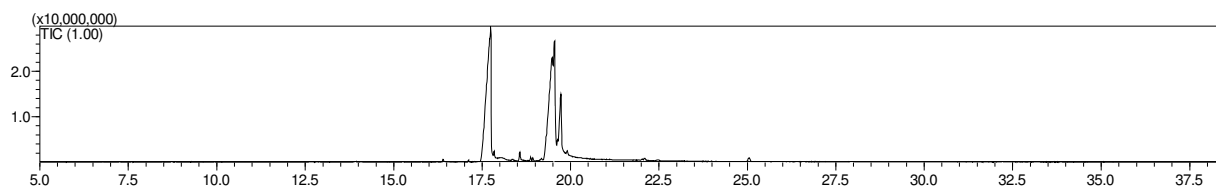


Figura 4-43 - Cromatograma de íons totais da amostra L019_E_7

O processamento dos picos e posterior comparação do espectro com a biblioteca NIST permitiu identificar as bandas majoritárias em 17,76 min como sendo ácido hexadecanoico (95% similaridade) e em 19,49 min como sendo ácido oleico. A banda minoritária em 19,76 min apresentou 90% de similaridade com o ácido esteárico.

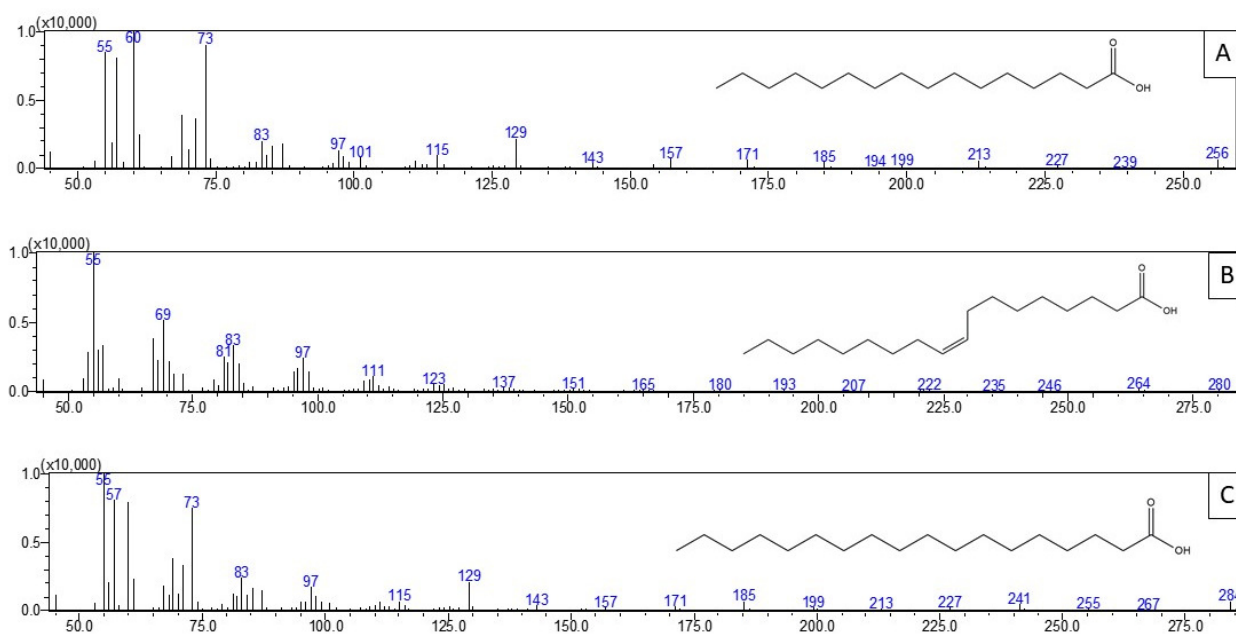


Figura 4-44 - Espectro de massas (EI) obtidos para a amostra L019_E_7

4.3.9 - Substância L019_E_19 (ácido 2,3-diidroxibenzóico)

Proveniente do fracionamento do extrato etanólico por coluna de exclusão molecular, de aspecto sólido e coloração marrom escuro intenso, a substância L019_E_19 era solúvel em solventes de alta polaridade como metanol, água e DMSO. Seu espectro de hidrogênio tinha apenas 3 sinais de hidrogênios aromáticos em $\delta = 6,72(t)$, $6,95(d)$ e $7,22(d)$. Por sua vez, seu espectro de RMN de

^{13}C apresentava 6 sinais de carbonos aromáticos e uma carboxila. Baseados nos dados de RMN obtido, propôs-se que esse composto era o ácido 2,3-diidroxibenzoico (Figura 4-45).

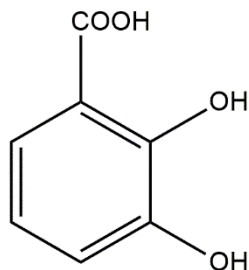


Figura 4-45 Estrutura química do ácido 2,3-diidroxibenzoico

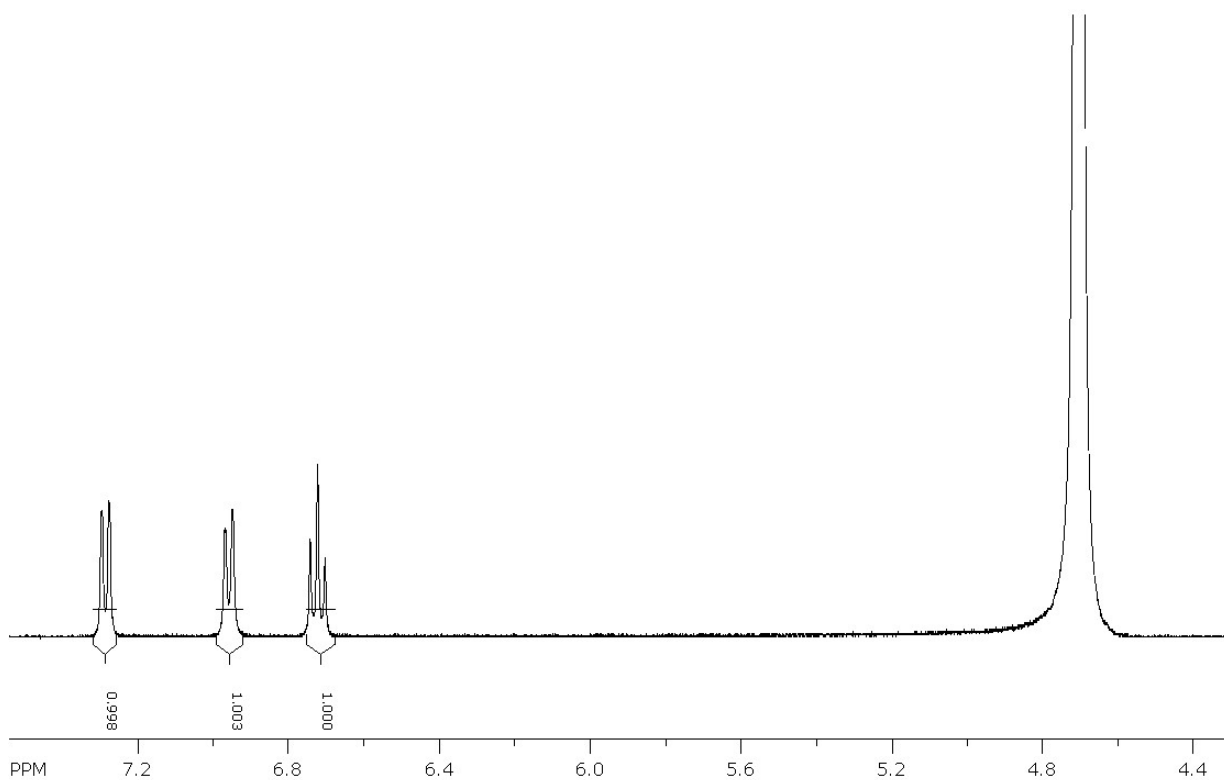


Figura 4-46 - Espectro de RMN de ^1H da substância L019_E_19 (D_2O , 400 MHz)

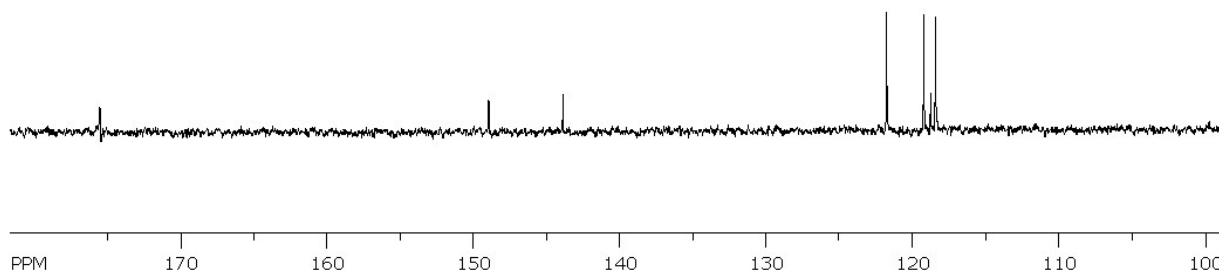


Figura 4-47 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância L019_E_19 (D_2O , 400 MHz)

A fim de confirmar a estrutura, fez-se análise desta por massas de alta resolução. A fórmula calculada para o íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ de m/z 153,0179 foi $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4$, que corrobora com os dados obtidos por RMN.

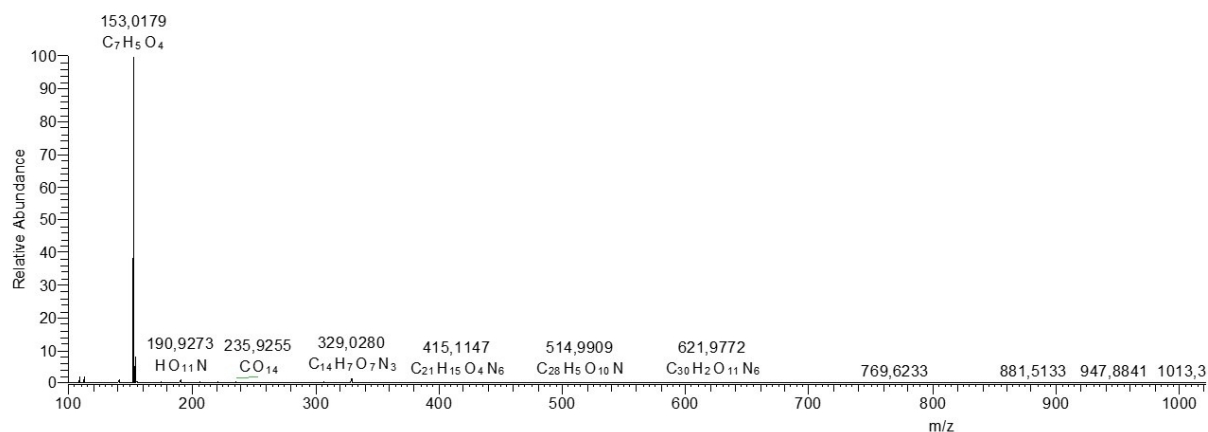


Figura 4-48 - Espectro de massas (ESI+) da substância ácido 2,3-dihidrocarboxílico

O ácido 2,3-diidroxibenzoico é conhecido por ser um dos sideróforos produzidos por fungos. Em geral, a produção de sideróforos está também relacionada ao ataque de patógenos a seus hospedeiros, uma vez que visa diminuir a biodisponibilidade de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} , essenciais à sobrevivência destes (JOHNSON, 2008). Assim sendo, a produção deste sideróforo por *Escovopsis* pode estar relacionada aos meios químicos utilizados para estabelecer sua virulência nos ninhos de formigas cortadeiras.

4.3.10 Substância L019_E_13 (catenarina)

A substância L019_E_13 (0,89 mg) tinha aspecto sólido de coloração púrpura. Assim como os espectros obtidos para a antraquinona emodina, seu espectro de RMN de ^1H apresentava sinais de hidrogênios aromáticos entre 6-8 ppm e um sinal de metila 2,43 ppm – indicando se tratar de uma antraquinona novamente. Seu espectro de massas de alta resolução tinha pico $[\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 285,0400 cuja fórmula calculada foi $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_6$. A comparação dos dados obtidos com aqueles encontrados na literatura (ANKE et al., 1980) permitiram identificar este metabólito como sendo a antraquinona catenarina.

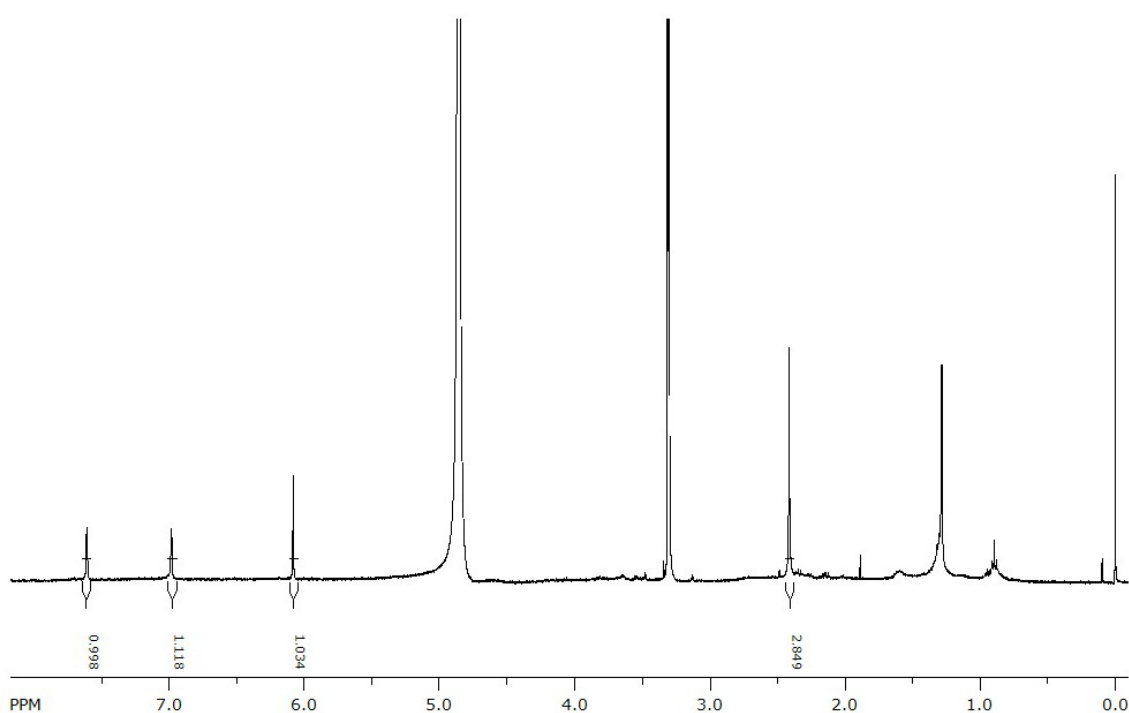


Figura 4-49 – Espectro de RMN de ^1H da substância L019_E_13 (CD_3OD , 400 MHz)

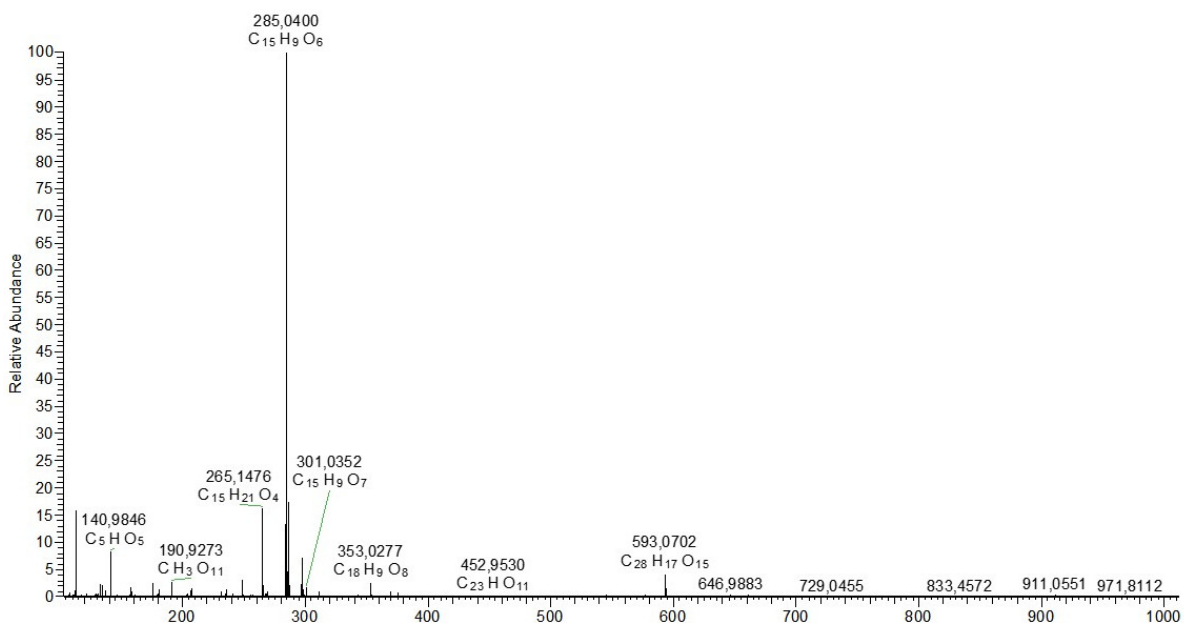


Figura 4-50 -Espectro de massas de alta resolução da substância L019_E_13 (ESI+)

Posição	δ , multiplicidade e J (Hz) - observado	δ , multiplicidade e J (Hz) - literatura (ADAMCZESKI; REED; CREWS, 1995)
2	6,05 (s, l)	6,73 (d, 2,5)
5	7,61 (s, l)	7,40 (d; 2,5)
7	6,98 (s, l)	7,14 (s)
15	2,43 (s, l)	2,37 (d; 0,8)

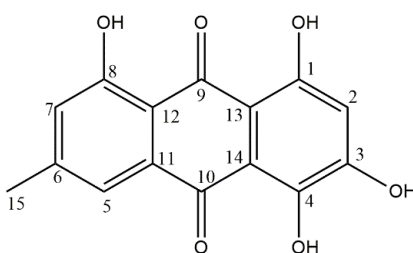


Figura 4-51 - Estrutura da substância L019_E_Fr13 (catenarina)

Assim como a antraquinona emodina, a substância catenarina também é comum em micro-organismos diversos. Ela já foi reportada como apresentando atividade anti-inflamatória (PANSANIT et al, 2013), antitumoral (LIN et al, 2001) e antibacteriana.

4.4 – Isolamento e caracterização dos metabólitos secundários de *E. weberi* (LESF034)

Uma vez que os micro-organismos mostraram possuir perfil químico muito parecidos (vide tópico 4.2), assim como esperado, o estudo metabolômico de *E. weberi* (LESF034) levou ao isolamento e identificação de algumas substâncias anteriormente obtidas para *E. microspora* (LESF019). A figura 4-51 resume os metabólitos obtidos para *E. weberi* (LESF034). Os dados de RMN e espectrometria de massas de cada uma destas substâncias seguem mostrados no Apêndice.

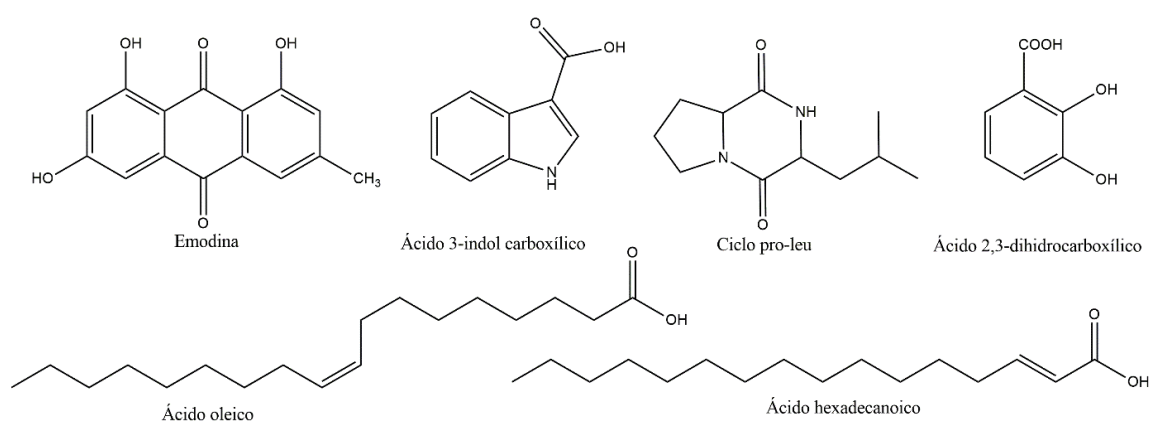


Figura 4-52 - Metabólitos secundários isolados a partir dos extratos de *E. weberi* (LESF034)

4.5 - Aplicação da abordagem OSMAC como uma tentativa de variação dos perfis químicos de *Escovopsis* spp.

Através dos estudos metabolômicos realizados previamente, foi possível isolar e identificar diversas substâncias pertencentes a diferentes classes nos extratos de *Escovopsis* spp., tais como antraquinonas, dicetopiperazinas, aza-antraquinonas, policetídeos, ácidos graxos, dentre outros.

No entanto, baseados nos estudos realizados por Man e colaboradores, sabe-se que o micro-organismo *E. weberi* possui em seu genoma clusters biossintéticos que codificam para a produção de metabólitos ainda não isolados e

identificados, como por exemplo, aqueles de rota mista envolvendo enzimas do tipo terpeno sintase.

Cluster 1	Indole-T1pks-Nrps	630849	707764
Cluster 2	Nrps	1614850	1658677
Cluster 3	Nrps	2242136	2288362
The following clusters are from record LGSR01000006.1:			
Cluster 4	Other	37373	80486
Cluster 5	T1pks	115408	180286
Cluster 6	Nrps	367254	422171
Cluster 7	T1pks	1134315	1181773
Cluster 8	Terpene	2492136	2513358
Cluster 9	Other	3071472	3116157
Cluster 10	T1pks	3606937	3653935
The following clusters are from record LGSR01000008.1:			
Cluster 11	Other	13730	55393
Cluster 12	Terpene	220627	241592
Cluster 13	Terpene	613924	635681
The following clusters are from record LGSR01000019.1:			
Cluster 14	Terpene	719153	740562
Cluster 15	Terpene-T1pks-Indole	901165	968965
The following clusters are from record LGSR01000020.1:			
Cluster 16	T1pks	1	41792
Cluster 17	Indole	2527607	2549243
Cluster 18	Terpene	4508687	4529730
The following clusters are from record LGSR01000022.1:			
Cluster 19	T1pks-Nrps	3505629	3558180
Cluster 20	Other	3654977	3698297
The following clusters are from record LGSR01000028.1:			
Cluster 21	T1pks	1310	49917
Cluster 22	Terpene	834345	856793

Figura 4-53 Análise de bioinformática do genoma de *E. weberi* por AntiSmash 2.0

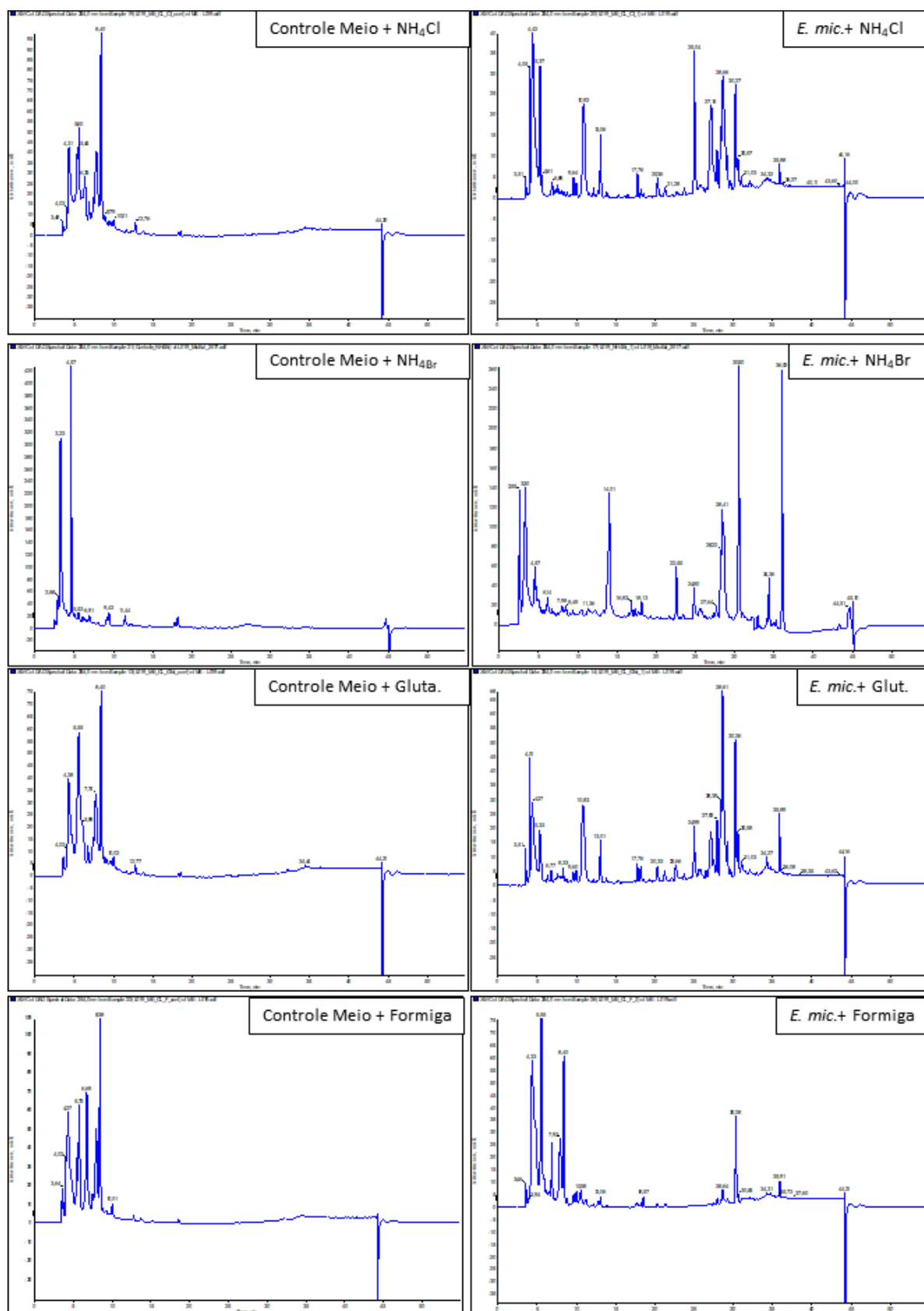
Com o objetivo de tentar induzir aleatoriamente as rotas biossintéticas até então silenciadas, experimentos baseados na abordagem OSMAC, epigenética e dereplicação foram realizados. Os resultados obtidos estão descritos nos tópicos a seguir.

4.5.1 – Modificação do meio de cultura como estratégia para indução de rotas silenciadas (OSMAC)

Baseado em relatos da literatura em que a adição de substâncias exógenas ocasionou a indução aleatória de rotas anteriormente silenciadas, decidiu-se realizar modificações no meio de cultivo dos micro-organismos utilizando-se reagentes disponíveis no laboratório.

Assim, aditivos como NH₄Cl, NH₄Br, glutamina e formigas cortadeiras foram suplementados ao meio Czapek's com 2% de extrato de levedura em ágar (meio

sólido) e os micro-organismos foram cultivados por 21 dias. Os extratos foram obtidos aplicando-se protocolos de micro-extração desenvolvidos por KLITGAARD et al.(2014) e analisados por CLAE-UV.



A comparação dos cromatogramas obtidos para *E. microspora* e *E. weberi* levaram às seguintes conclusões: 1) o perfil químico de *E. weberi* é menos susceptível a variações do que o de *E. microspora*; 2) o meio suplementado com NH_4Br foi o que, aparentemente, causou maior variação no perfil químico de *E. microspora*.

A análise dos micro-extratos por técnicas mais sensíveis e informativas como UPLC-HRMS será realizada a fim de confirmar e identificar os metabólitos induzidos.

4.5.1.1 - Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Um fato intrigante ocorreu durante a execução do experimento utilizando-se a abordagem OSMAC: no cultivo do micro-organismo *E. microspora* em meio suplementado com formigas cortadeiras, notou-se que o fungo tinha crescimento pronunciado nos pontos da placa que continham formigas, apesar de seu metabolismo não ter sofrido alterações na presença das mesmas. A imagem abaixo mostra exatamente o ocorrido.



Figura 4-56 - Crescimento de *E. microspora* em meio contendo formigas cortadeiras.

A fim de investigar melhor o que poderia estar ocasionando esta situação, inoculou-se o fungo em formiga cortadeira previamente esterilizada. Após 5 dias de crescimento, fez-se análise da amostra por MEV ambiental.

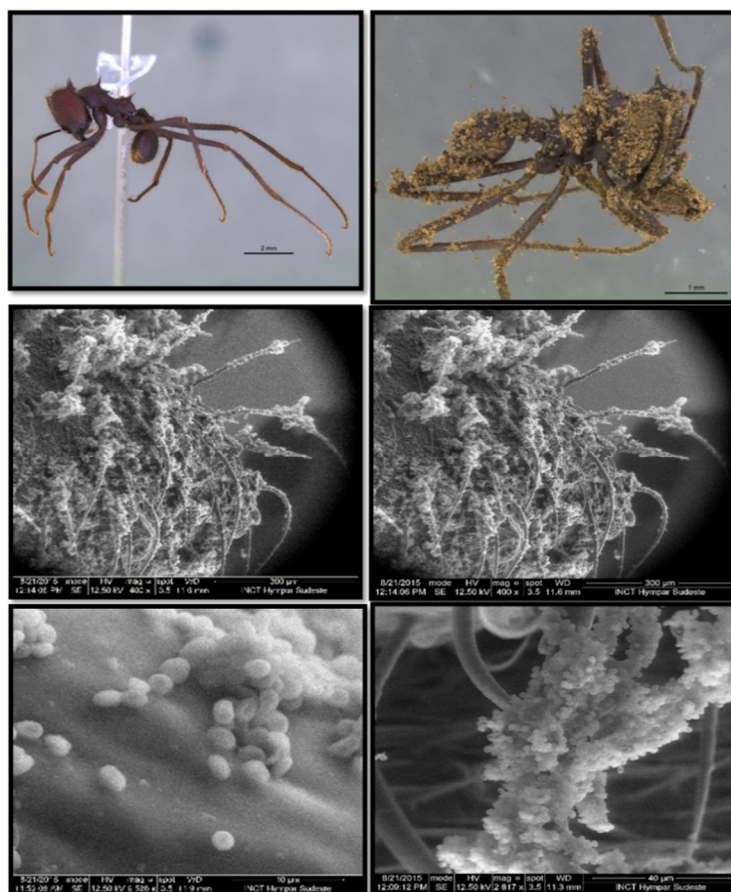


Figura 4-57 - Imagens obtidas por MEV ambiental de *E. microspora* crescendo sob formiga cortadeira

As imagens obtidas mostram que apesar de não ser o melhor tipo de substrato para crescimento fúngico uma vez que o exoesqueleto de formiga é constituído basicamente de quitina, o fungo *E. microspora* cresceu substancialmente sob o corpo da formiga cortadeira. Uma explicação plausível para o evento observado é a produção de enzimas do tipo quitinase pelo micro-organismo, garantindo assim a clivagem deste substrato para seu aproveitamento. A capacidade de produzir esse tipo de enzimas já foi relatado por DE MAN et al. (2016).

As quitinases são particularmente atraentes na indústria de pesticidas, uma vez que têm atividades fungicidas, inseticidas e nematicidas. Assim, a busca por micro-organismos produtores destas enzimas vem crescendo em face da necessidade de se encontrar alternativas ecologicamente corretas para o controle de pragas. Assim sendo, estudos aprofundados de micro-organismos do gênero *Escovopsis* como

potenciais produtores de quitinases e como agentes de controle biológico devem ser realizados.

5. - Resultados obtidos durante período de doutorado sanduíche no Hans-Knöll Institute, Leibniz Institute (Jena, Alemanha)

Durante o período de estágio de doutorado sanduíche no Hans-Knöll Institute (Leibniz Institute, Jena, Alemanha), estudos químico e ecológico de *E. weberi* (ARSEF5574), adquirido da ARSEF Collection, EUA, foram realizados. Os experimentos lá realizados visavam progredir no conhecimento metabolômico de *E. weberi* haja visto a falta de informações sobre este assunto. Ademais, avançar no conhecimento químico permitiria também o melhor entendimento das funções ecológicas destes metabólitos referentes ao ataque, defesa e virulência deste gênero fúngico até então negligenciado. O conhecimento das funções ecológicas é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas formas de controle de pragas, uma vez que os metabólitos podem vir a ser utilizados como pesticidas.

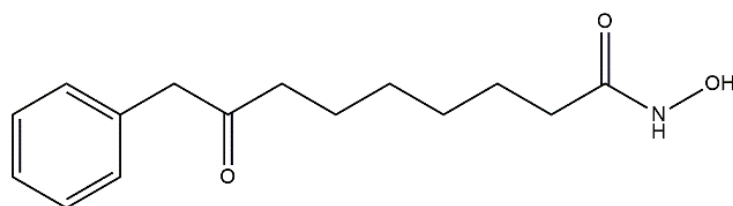
5.1 –Indução de metabólitos crípticos de *E. weberi* (ARSEF5574)

Os experimentos realizados durante o período de doutorado sanduíche consistiram na adição de: a) modificadores epigenéticos ao meio, b) cultivo do micro-organismos em meios variados associado ao uso de ferramentas como desreplicação para verificar os resultados obtidos e c) cocultivo. Os tópicos a seguir tratam destes assuntos.

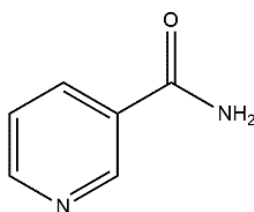
5.1.1 - Indução dos metabólitos silenciados através da adição de modificadores epigenéticos

Micro-experimentos de epigenética utilizando os indutores ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA) e nicotinamida (NAA) foram conduzidos separadamente e em conjunto. A análise das amostras obtidas foi feita por UPLC-

HRMS e o processamento e análise dos dados feito pelo uso do *software* quimiomimético SIEVE.



Ácido hidroxâmico suberoilânida (SAHA)



Nicotinamida (NAA)

Figura 5-1 – Modificadores epigenéticos utilizados nos experimentos de epigenética

Segundo descrição encontrada no site da empresa, “o *software* SIEVE usa as intensidades de MS a partir de dados brutos de LC-MS ou GC-MS para encontrar diferenças de abundância sem a necessidade de manipular ou “modelar” picos, um processo que arbitrariamente simplifica ou descarta dados potencialmente valiosos. Em vez disso, o *software* SIEVE usa-se um processo proprietário - Recursive Base-Peak Framing - para gerar um “quadro” exclusivo para cada grupo de picos dentro de uma m/z específica e intervalos de tempo de retenção. Coletando todos os picos acima de um determinado limite de todos os dados brutos, e, portanto, nenhuma informação é perdida. O uso de dados brutos proporciona maior confiança nos resultados qualitativos e quantitativos. Quadro por quadro, o algoritmo determina se existe diferença de abundância estatisticamente significativa entre o controle e as amostras tratadas. O relatório de quadros exibe informações importantes, como cromatogramas de íons reconstruídos, tempos de retenção e valores m/z em uma interface interativa que facilita a avaliação de quadros. Os usuários avançados têm a capacidade de interrogar os dados com muito mais detalhes e podem avaliar como os dados espectrais de massas são interpretados.”

Através da comparação dos *Base Peak Chromatogram* (BPC) e análises dos dados pelo *software* SIEVE (Figura 5-2) a presença dos modificadores SAHA e

NAA não ocasionou mudanças no perfil metabólico de *E. weberi*. Apesar de ser útil e proporcionar a indução de metabólitos crípticos em diversos micro-organismos, alguns micro-organismos podem apresentar resistência a certos modificadores, como foi o caso do fungo *E. weberi*.

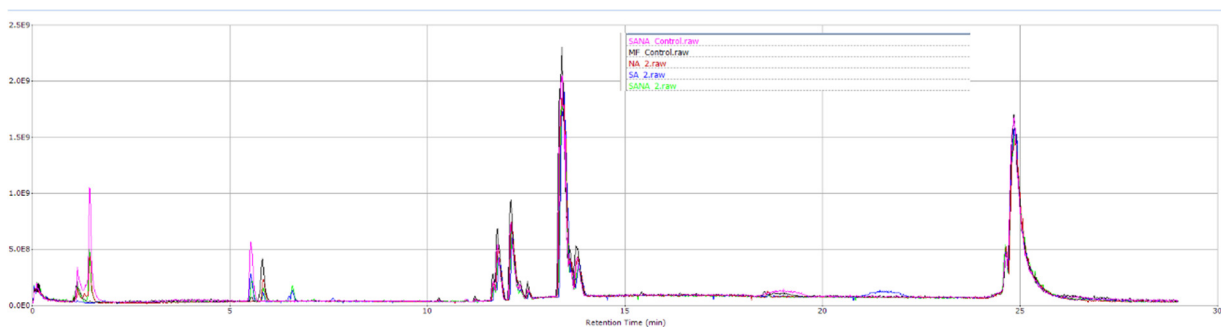


Figura 5-2 - Análise dos *Base peak chromatogram* (BPC) da suplementação com os modificadores epigenéticos SAHA e NAA (ESI +).

5.1.2 - Indução dos metabólitos crípticos através do cultivo em vários meios

O cultivo do micro-organismo *E. weberi* (ARSEF5574) em diversos meios líquidos e sólidos foi realizado na tentativa de verificar a produção de algum metabólito ainda não isolado/identificado.

Tabela 5-1 – Meios líquidos e sólidos utilizados no cultivo de *E. weberi*

Meios sólidos	Meios líquidos
MA 2%	Czapek + ext. lev. 2%
Aveia	Czapek Dox
BDA	BD

YES (ext. lev. + sucrose)

Os extratos bem como seus respectivos controles foram analisados por UPLC-HRMS. Os dados obtidos foram processados e comparados utilizando o

software SIEVE a fim de verificar se houve variação no perfil químico do fungo quando cultivado em diferentes meios de cultura.

Ao comparar os cromatogramas de pico de base (*Base Peak Chromatogram*, BPC) obtidos tanto no modo de ionização positivo quanto negativo, não foram observadas alterações no perfil químico de *E. weberi*.

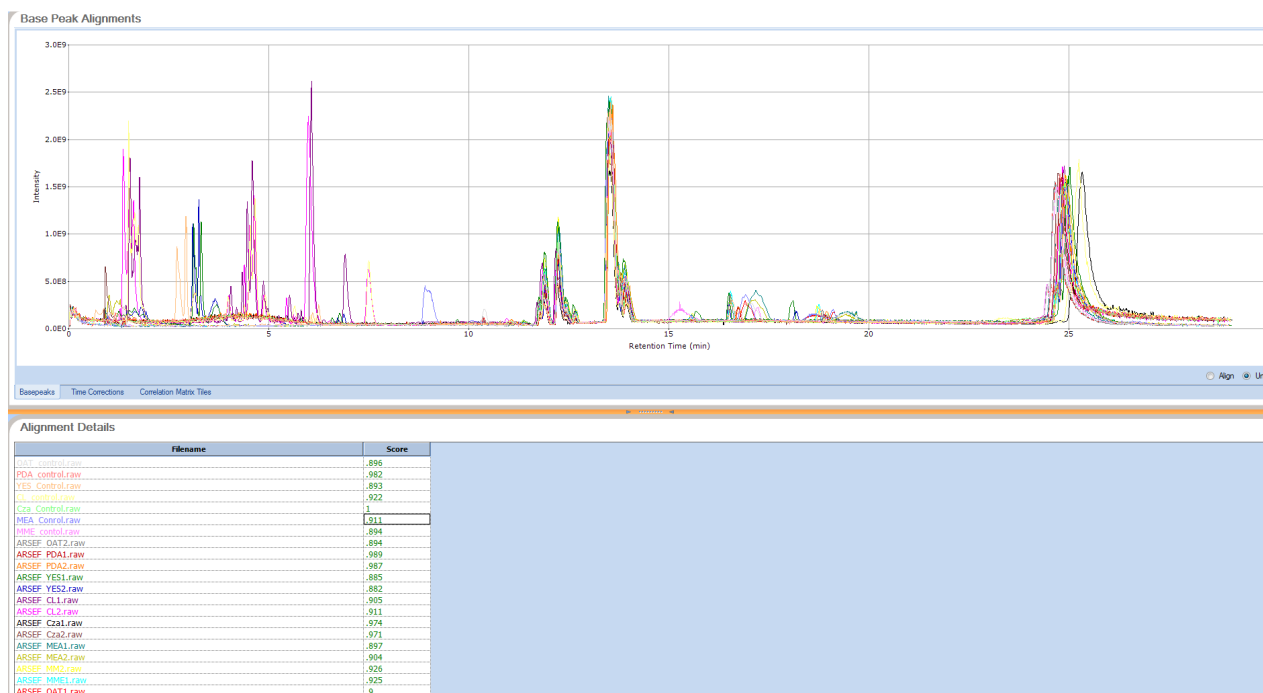


Figura 5-3 – Análise dos *Base peak chromatograms* (BPC) obtidos em vários meios de cultivos (ESI +).

O fato do perfil metabólico de *E. weberi* não ser susceptível a variações externas e a nível genômico deve estar associado à sua restrição genômica, uma vez que este possui genoma reduzido. Segundo DE MAN et al. (2016), a redução do genoma se deu a fim de manter apenas clusters biossintéticos essenciais que garantissem a sua especialização na invasão e ataque dos ninhos. Logo, como consequência da redução do seu material genômico e especialização, quando comparado a outros micro-organismos *E. weberi* não possui significativa variação na expressão de seus metabólitos secundários.

5.2 - Estudos de cocultivo de *E. weberi* (ARSEF5574) e micro-organismos associados aos ninhos de formigas cortadeiras

Sabe-se que a expressão de alguns metabólitos secundários por micro-organismos pode ocorrer apenas em condições semelhantes ao habitat em que vivem. Estes metabólitos secundários são mediadores químicos ou fatores de virulência em relações mutualísticas e patogênicas. O desenvolvimento de estratégias em condições laboratoriais que sejam capazes de induzir a produção destes mediadores químicos é de fundamental importância. A abordagem que tem se mostrado muito eficaz na indução e expressão de rotas biossintéticas silenciadas é a mimetização das condições ambientais presentes no habitat original através de experimentos de cocultivo (KÖNIG et al., 2013). Além de promover a ativação de vias biossintéticas silenciadas, estes estudos também permitem o avanço no entendimento das relações químico-ecológicas. Ao mapear o fluxo destes mediadores químicos por técnicas de imagem (microscopia, espectrometria de massas) algumas inferências e conclusões podem ser obtidas (KÖNIG et al., 2013; SCHERLACH et al., 2013; SCHOENIAN et al., 2011). Com o propósito duplo de: a) obter a indução de algum metabólito silenciado e b) avançar no entendimento da ecologia química de *E. weberi*, estudos de cocultivo foram realizados sob a supervisão do Prof. Christian Hertweck. A seguir estão descritos os resultados obtidos em cada experimento realizado.

5.2.1 - Cocultivo entre *E. weberi* (ARSEF5574) e *Burkholderia gladioli*

Bactérias do gênero *Burkholderia* são do tipo gram-negativa e conhecidas como produtoras de substâncias antimicrobianas. Elas são frequentemente encontradas em solo e associadas a micro-organismos, como por exemplo, *Burkholderia rhizoxinica* que invade as hifas de *Rhizopus microsporus*, (agente causador de patogenias no arroz) (EBERL; VANDAMME, 2016).

Apesar de incomum, a bactéria *Burkholderia sp.* foi isolada dos ninhos de formigas de corte de folhas. Santos e colegas observaram que *Burkholderia sp.*, isolada de *Atta sexdens rubropilosa* foi capaz de inibir o crescimento de *E. weberi* quando cocultivados em ágar. No entanto, o crescimento do fungo mutualista (*L.*

gongylophorus) não foi afetado, indicando que esta bactéria deve participar do processo de defesa do jardim, desempenhando papel contra o patógeno *E. weberi* (SANTOS et al., 2004).

A fim de conseguir melhor compreensão dos mecanismos de ataque de *E. weberi* e defesa de *Burkholderia*, decidiu-se realizar experimentos de cocultivo entre o micro-organismo *E. weberi* (ARSEF5576) e *B. gladioli*, uma cepa já bastante estudada no grupo do Prof. Dr. Christian Hertweck. Duas metodologias foram testadas: cocultivo em meio líquido e em meio sólido (placa de Petri).

Após o período de incubação, observou-se que o micélio de *E. weberi* estava completamente destruído, enquanto a bactéria permanecera intacta. A extração foi feita com acetato de etila por 24h. Após análise dos extratos e controles por LC-HRMS, fez-se a comparação dos dados utilizando-se o software SIEVE. Contudo, não foram observadas diferenças entre os metabólitos produzidos nos controles (culturas axênicas) e cocultivo.

A segunda tentativa foi realizada em placas de Petri contendo meio PDA. Inicialmente, *E. weberi* foi inoculado próximo a borda da placa e incubado a 30° C durante 3 dias. Mais tarde, *B. gladioli* foi inoculada no lado oposto. Uma placa de cada micro-organismo (culturas axênicas) e uma contendo apenas meio foram mantidas como controles. Os micro-organismos foram incubados em estufa a 30° C por mais 4 dias. A extração foi feita separando-se as placas em 3 regiões diferentes como mostrado na figura abaixo e extraíndo-as com a seguinte mistura de solventes: AcOEt: DCM: MeOH 3: 2: 1 (v / v) em banho de ultrassom por 1 hora. Os extratos foram secos a vácuo e analisados por CLAE-UV e CLAE-HRMS. O mesmo procedimento foi realizado para os controles.

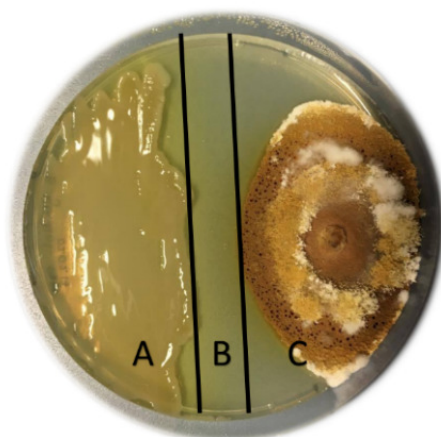


Figura 5-4 - Experimento de cocultivo entre *E. weberi* e *B. gladioli* e as diferentes regiões extraídas

Como pode ser visto na Figura 5-4, após 3 dias de incubação, *B. gladioli* foi capaz de inibir o crescimento de *E. weberi*, corroborando os experimentos realizados por Santos. Além disso, é possível observar também a produção de um pigmento amarelo que se estende de *E. weberi* até *B. gladioli*. As regiões destacadas nos cromatogramas mostram os possíveis metabolitos que estão sendo produzidos durante essa interação.

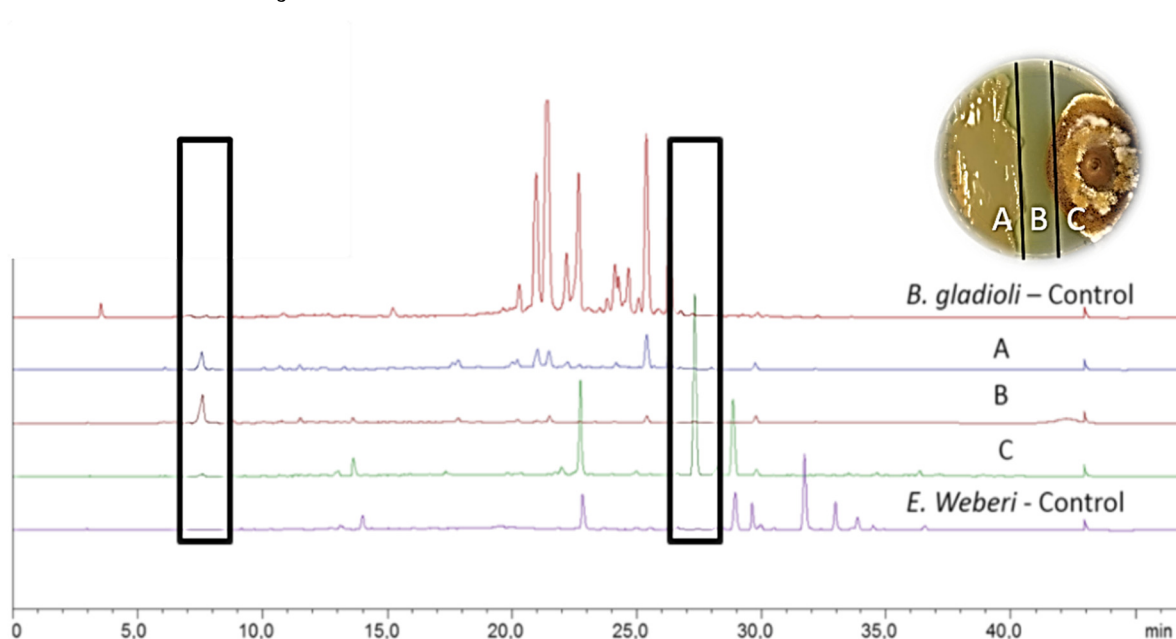


Figura 5-5 - Cromatogramas (254 nm) referente às três regiões extraídas: a) lado de *B. gladioli*, B) região entre os micro-organismos e C) lado de *E. weberi*.

A análise por LC-HRMS dos extratos e posterior comparação dos dados pelo *software* SIEVE revelou que o pigmento produzido pelo micro-organismo tratava-se de um metabólito já isolado anteriormente: emodina. Além do mais, também foi possível notar que o cocultivo dos micro-organismos em meio sólido levou à produção de uma substância de m/z 641 pela bactéria, não observada na cultura axênica.

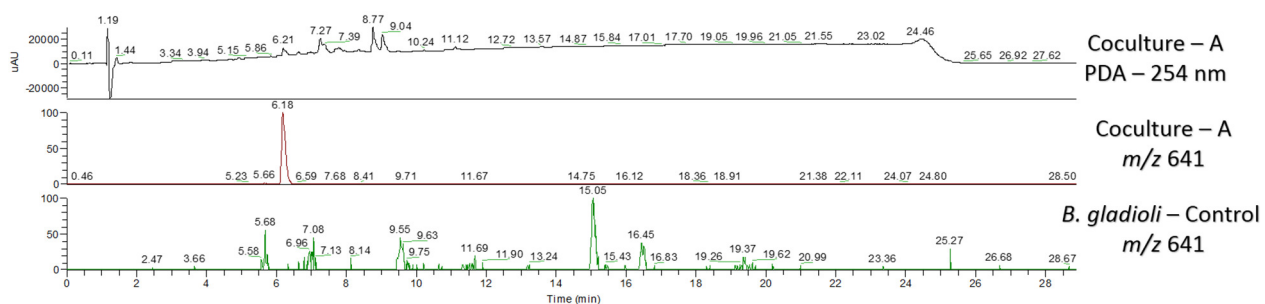


Figura 5-6 - Cromatograma referente ao lado A, cromatograma de íons extraídos de m/z 641 e cromatograma de íons extraídos (m/z 641) da cultura axênica ($\lambda = 254$ nm)

Experimentos de MS/MS foram realizados a fim de obter maiores informações sobre a substância m/z 641, porém o espectro obtido mostrou-se pouco informativo (apenas dois fragmentos foram gerados: m/z 448 e 195).

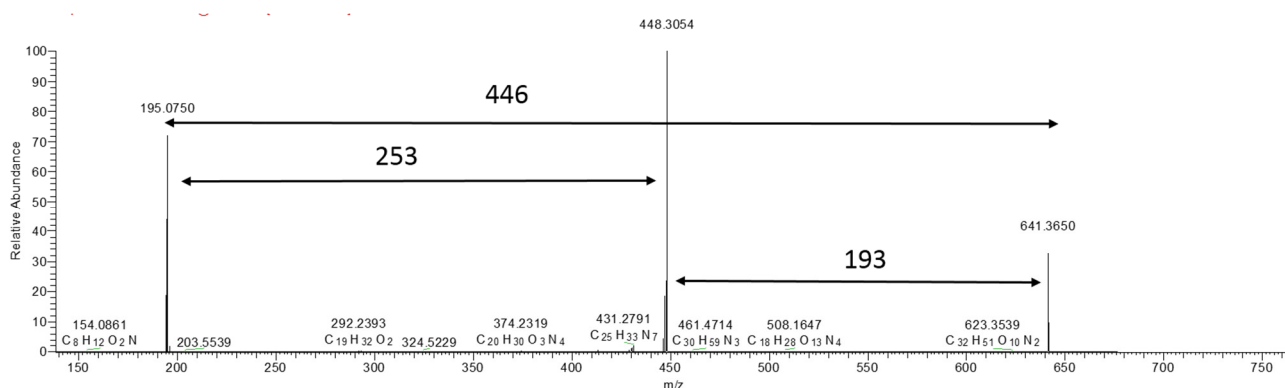


Figura 5-7 - Espectro de íons filhos de m/z 641

Buscas em bases de dados como SciFinder, Dictionary of Natural Products and Antibase foram feitas com o objetivo de encontrar possíveis candidatos

para esta substância. Como não foram encontrados candidatos para a mesma, decidiu-se repetir o experimento realizado em escala aumentada.

O mesmo procedimento foi realizado, sendo a única diferença a quantidade de placas utilizadas para tal (80 placas). Após análise do extrato por LC-HRMS, observou-se que a bactéria não produzira a substância anteriormente observada. Sabe-se que o metabolismo microbiano pode ser sensível a pequenas variações levando a expressão ou silenciamento de metabólitos já produzidos anteriormente. Assim, variações na temperatura, composição do meio de cultura, quantidade de inóculo podem ter causado este fato. Infelizmente devido ao tempo restrito, não foi possível repetir o experimento a fim de isolar e identificar o metabólito críptico produzido por *B. gladioli*.

5.2.2 - Cocultivo entre *E. weberi* (ARSEF5574) e os micro-organismos *Leucoagaricus leucothites* e *Leucoagaricus holoserinceus*

Os experimentos de cocultivo entre os fungos do gênero *Leucoagaricus* e *E. weberi* (ARSEF5574) foram fundamentais para estabelecimento das condições de cultivo e análise a serem utilizadas posteriormente. Semelhantemente ao experimento realizado entre *E. weberi* e *B. gladioli*, a extração das placas se deu por regiões, como mostrado na imagem a seguir.

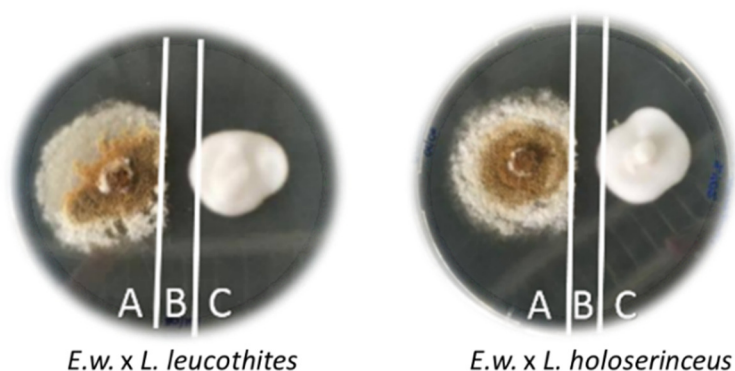


Figura 5-8 - Regiões de extração do cocultivo entre *E. weberi* (à esquerda da placa de Petri) e os micro-organismos do gênero *Leucoagaricus* (à direita da placa de Petri)

As análises por UPLC-HRMS dos extratos de cada uma das regiões revelaram a presença de um pico em 9,80 min com intensidade mais pronunciada próximo ao lado em que *E. weberi* cresceu (região A), indicando ser este metabólito produzido por ele. Este composto não foi detectado nas culturas axênicas, porém foi detectado em ambos os cocultivos entre *E. weberi* e *L. leucothites* e *L. holoserinceus*. O espectro de massas referente a este pico revelou um íon de m/z 600, cuja fórmula molecular não-protonada $C_{37}H_{45}NO_6$ foi atribuída.

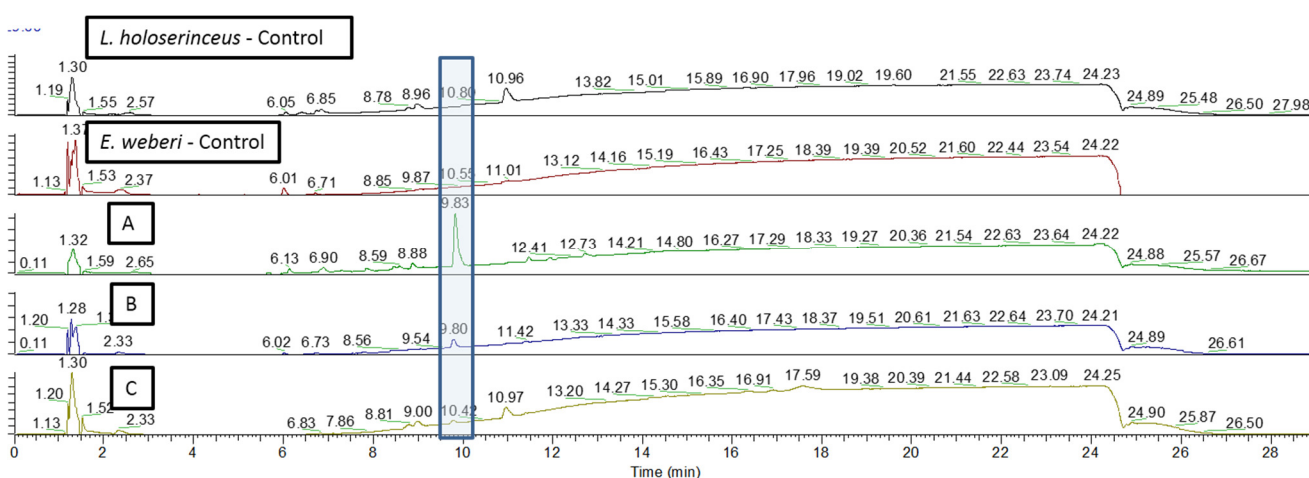


Figura 5-9 - Cromatogramas a 254nm a partir dos extratos de cocultivo de: a) lado de *E. weberi*, B) regiões entre os micro-organismos e C) lado de *L. holoserinceus*.

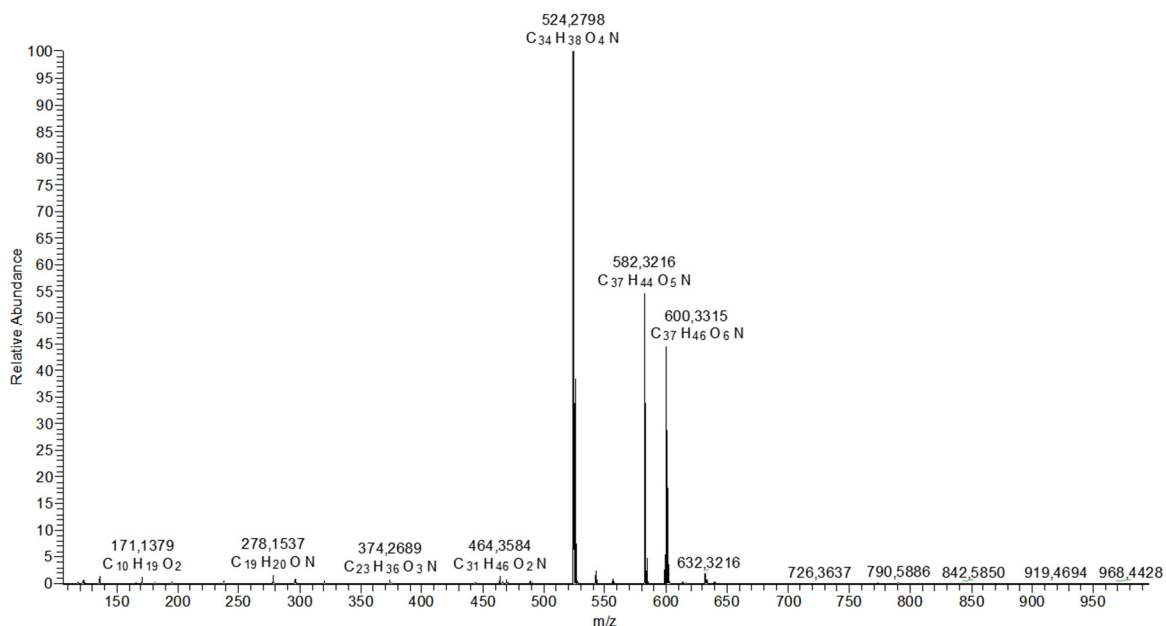


Figura 5-10 - Espectro de massas referente ao pico em 9,80 min (ESI+).

O extrato obtido a partir do experimento em “larga escala” entre *L. holoserinceus* e *E. weberi* tinha cerca de 100 mg cada e foi submetido a isolamento e purificação por HPLC preparativo. A partir desse extrato, 1,0 mg desta substância foi obtido. Esta substância foi inicialmente denominada EwLh_prep_2.

O espectro ¹H de EwLh_prep_2 revelou a presença de hidrogênios aromáticos, metilênicos e metílicos.

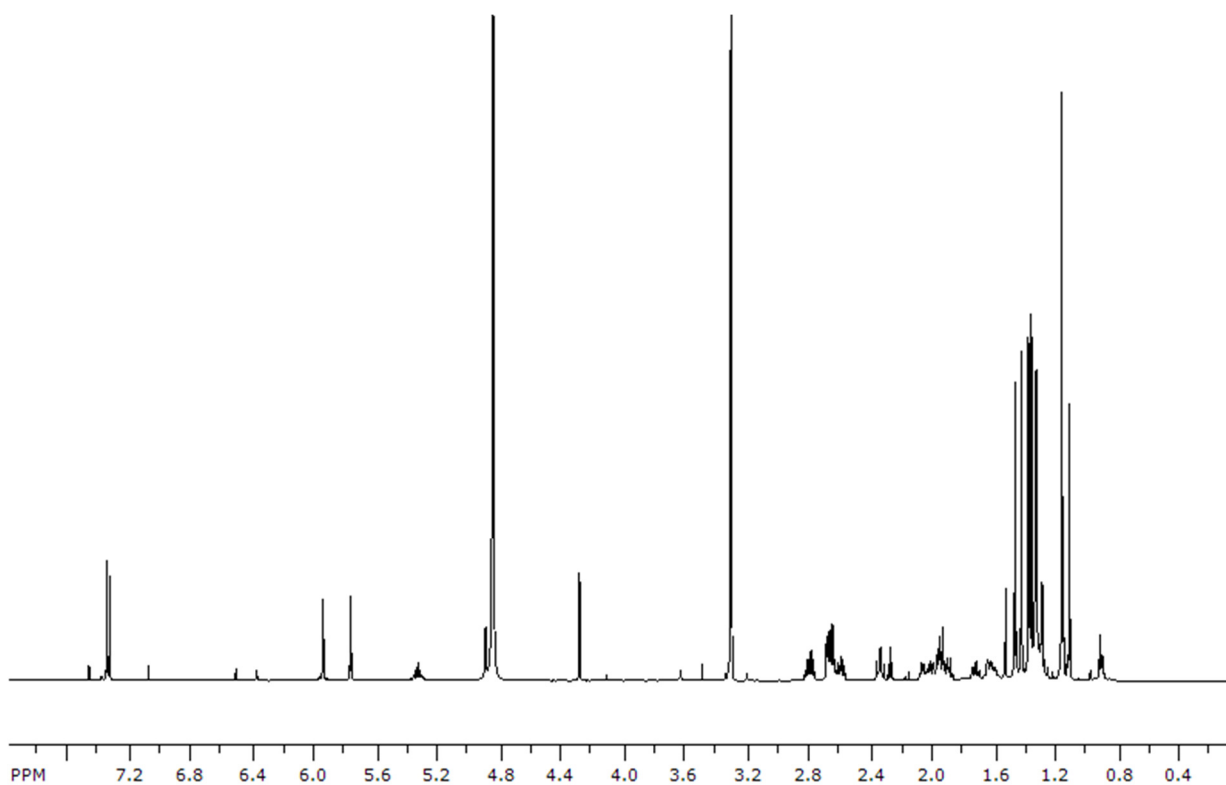


Figura 5-11 – Espectro de RMN de ^1H da substância EwLh_prep_2 (CD_3OD , 500 MHz)

Ao buscar por tal fórmula molecular no Dictionary of Natural Products, foi sugerida a substância shearinine D como candidato. A comparação dos dados de RMN de ^1H com a literatura confirmou a sugestão.

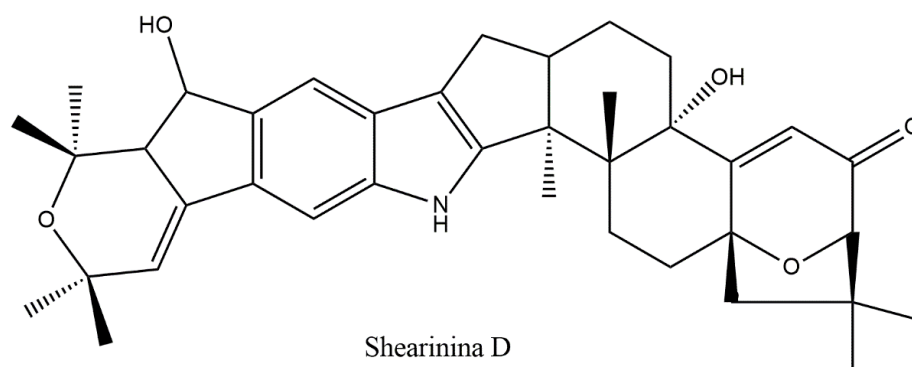


Figura 5-12 - Estrutura química da substância shearinine D

Tabela 5-2 - Dados de RMN de ^1H obtidos para a substância EwLh_prep_2 e aqueles encontrados para a substância shearinina D

δ e multiplicidade - observados	δ , multiplicidade e J (Hz) - literatura (XU et al., 2007)
7,75 (s)	-
1,85 2,70 (m)	2,05 (m) e 2,32 (m)
2,08 (m) e 2,85 (m)	1,91 (m) e 2,79 (m)
4,33 (s)	4,28 (s)
5,85 (s)	5,77(s)
1,93, (ddd; 3,0; 3,5; 13,5) e 2,01 (m)	1,71 (m) e 1,92 (ddd; 4,3; 4,6; 13,0)
1,82 (m) e 2,07 (m)	1,61 (m) e 1,98 (m)
2,83 (m)	2,63 (m)
2,45 (dd; 10,5, 13,0) e 2,75 (dd; 6,5; 13,0)	2,32 (dd; 13,0; 14,9) e 2,64 (m)
7,50 (s)	7,35 (s)
4,98 (d; 5,6)	4,89 (d; 5,6)
2,69 (dd; 2,8; 5,6)	2,67 (dd; 2,9; 5,9)
5,98 (d; 2,8)	5,95 (d; 2,9)
7,36 (s)	7,33 (s)
1,41 (s)	1,36 (s)
1,25 (s)	1,15 (s)
1,20 (s)	1,15 (s)
1,46 (s)	1,41 (s)
1,51(s)	1,45 (s)
1,14 (s)	1,10 (s)
1,36 (s)	1,34 (s)
1,37 (s)	1,31 (s)

A substância shearinina D também foi encontrada no extrato de *Penicillium jantinellum* (XU et al., 2007), porém este é o primeiro relato da produção deste composto por *Escovopsis* spp. Com relação às suas propriedades biológicas, shearinine D já foi reportado como portadora atividade anticancerígena (SMETANINA et al., 2007), inibidora da formação de biofilmes de *C. albicans* (VALENZUELA et al., 2003) e inibidora da atividade na condutância de canais de potássio ativado por cálcio (XU et al., 2007).

O outro metabólito isolado foi inicialmente nomeado de EwLh_prep_1 e apresentou um íon $[\text{M-H}]^-$ de m/z 727.0782 confirmado pela presença do íon $[2\text{M-H}]^-$ de m/z 1455,1634. A ampliação da região do íon $[\text{M-H}]^-$ revelou um padrão isotópico bastante interessante: os íons $\text{M}+1$ e $\text{M}+2$ tinham suas intensidades aumentadas, comportamento típico de moléculas que contém átomos de S em sua estrutura. Assim, obteve-se uma fórmula molecular de $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_8\text{S}_4$ para a substância Ew_Lh_prep1.

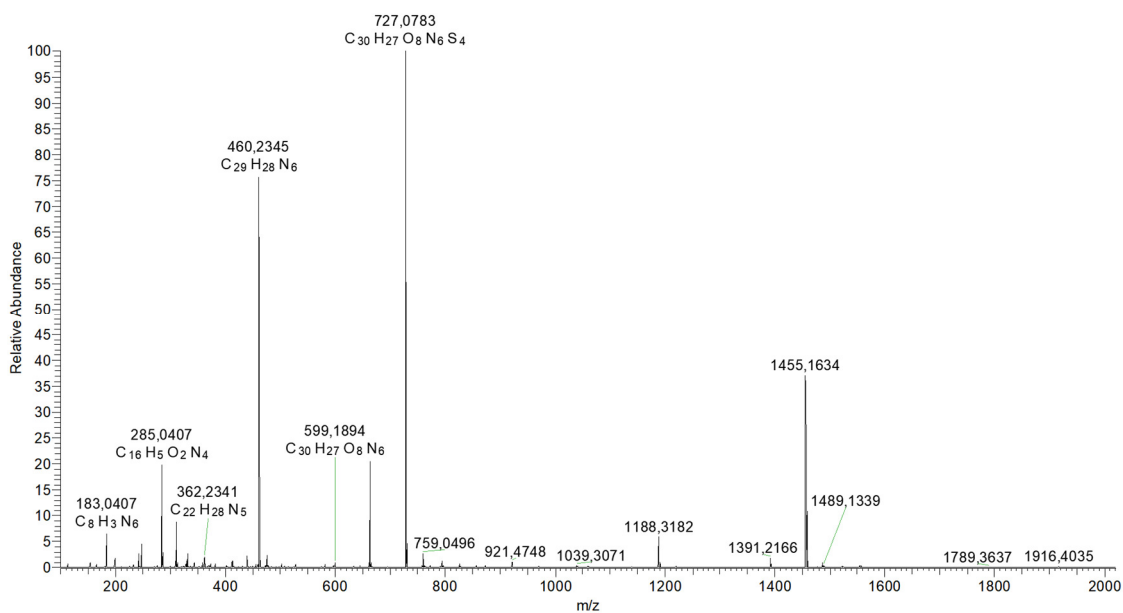


Figura 5-13 -Espectro de massas da substância melinacidina IV (ESI-)

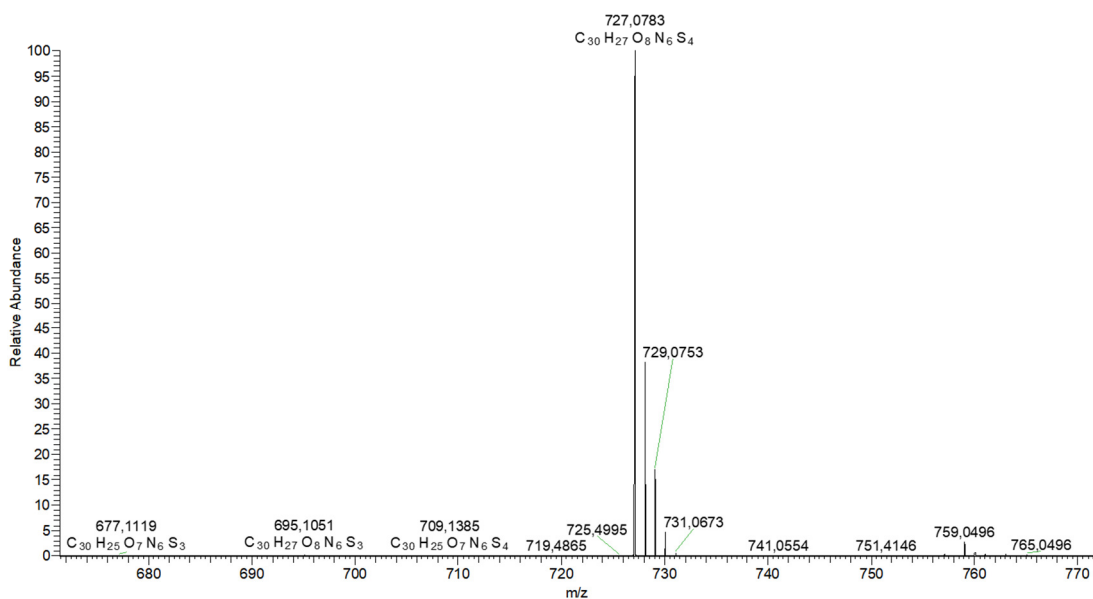


Figura 5-14 -Ampliação do íon m/z 727

A busca por esta fórmula molecular no Dictionary of Natural Products teve como candidato a substância melinacidina IV. Os dados de RMN obtidos foram confrontados com a literatura e confirmaram tal sugestão (ARGOUEDELIS; MIZSAK, 1977).

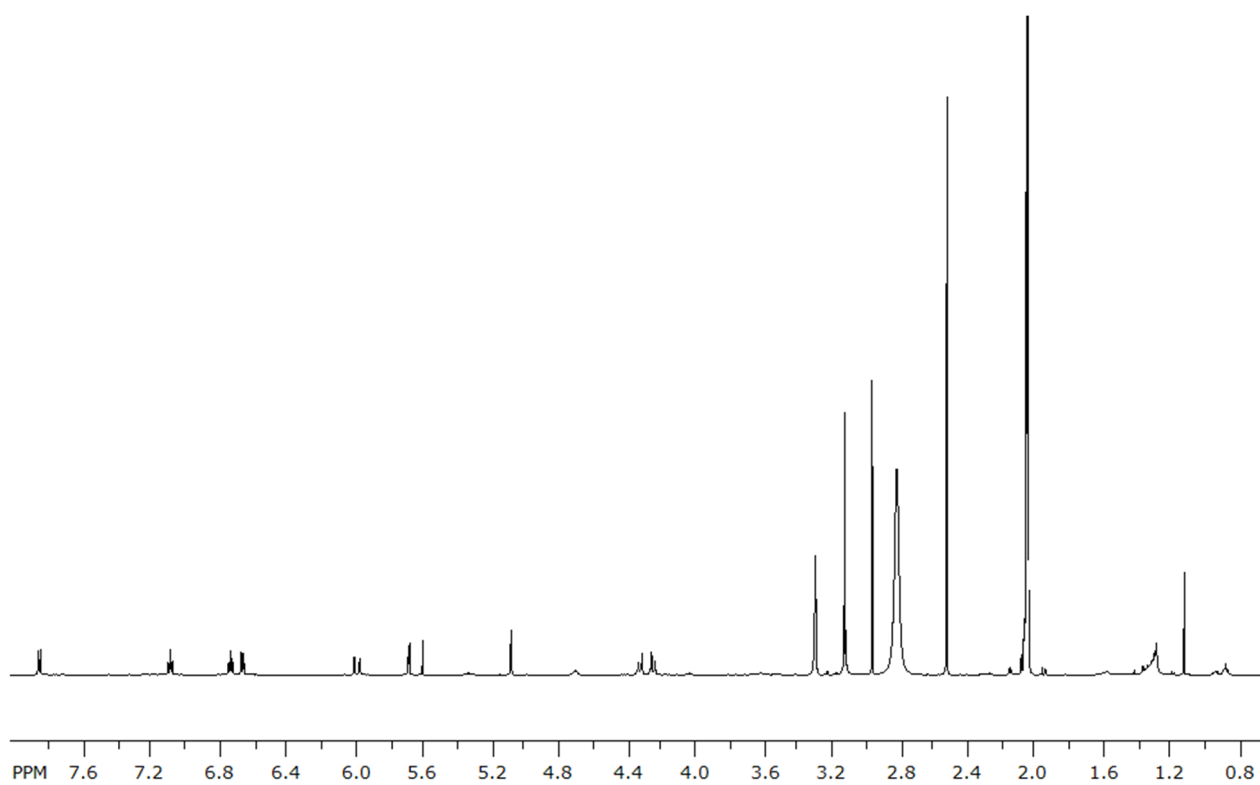


Figura 5-15 - Espectro de RMN de ^1H da substância melinacidina IV (CD_3OD , 500 MHz)

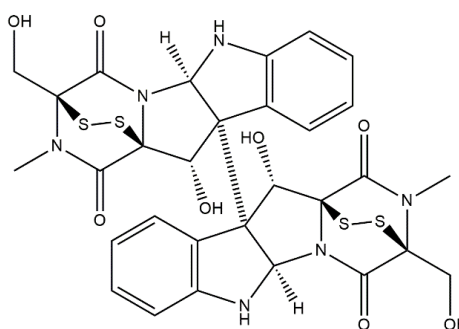


Figura 5-16 - Estrutura química da substância melinacidina IV

Tabela 5-3 - Comparação entre os dados de RMN de ^{13}C obtidos para a substância EwLh_prep_1 e aqueles reportados para a substância melinacidina IV

δ (ppm) - observado	δ (ppm) - literatura
167,2	165,7
162,5	161,4
150,8	150,5
130,6	129,9
130,3	129,9
128,9	128,2
119,9	118,9
110,7	109,9
83,1	82,3
83,0	81,8
77,0	78,4
72,8	78,0
67,9	66,9
60,1	59,1
27,5	28,0

Através da análise dos BGCs que poderiam estar envolvidos na expressão destes metabólitos, foi possível identificar os clusteres 3 (NRPS, Figura 5-17) e 15 (Terpene-T1PKS-Indole, Figura 5-18) envolvidos na biossíntese de melinacidina IV e shearinina D, respectivamente. Portanto, o isolamento e identificação das substâncias melinacidina IV e shearinina D corrobora as previsões computacionais de metabólitos secundários no genoma de *Escovopsis weberi*.

Select Gene Cluster:
 Overview 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

LGSR01000002 - Cluster 3 - Nrps

Gene cluster description
 LGSR01000002 - Gene Cluster 3. Type = nrps. Location: 2242136 - 2285362 nt. Click on genes for more information. [Download cluster GenBank file](#)
 Show PHMM detection rules used

Legend:
 ■ core biosynthetic genes ■ additional biosynthetic genes ■ transport-related genes ■ regulatory genes ■ other genes

Detailed annotation
 ESCO_003943
 ESCO_003945

MIBIG Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster

Select Genomic Locus:
 Overview 1

BGC0000321, chaetocin biosynthetic gene cluster from Chaetomium virescens, Locus 1. Partial MIBIG entry.

Gene cluster description
 chaetocin (BGC0000321). Gene Cluster 1. Biosynthetic class = NRP. GenBank KF496217. Click on genes for more information. [Download cluster GenBank file](#)

Legend:
 ■ biosynthetic genes ■ transport-related genes ■ regulatory genes ■ other genes

Domain annotation
 ctg1_orf10
 ctg1_orf12

Homologous known gene clusters
 All hits
 Query sequence
 BGC0000292_c1 Acetylvanillin biosynthetic gene cluster

Chemical compounds
 Compound: chaetocin
 PubChem ID: 242294
 SMILES string: Copy to clipboard
 Molecular formula: C20H28N2O4
 Average molecular mass: 396.47992 Da

Class-specific details
 Biosynthetic class(es):
 NRP

Figura 5-17 - Análise do cluster biossintético 3 de *E. weberi*

LGSR01000019 - Cluster 15 - Terpene-t1pk-indole

Gene cluster description
 LGSR01000019 - Gene Cluster 15. Type = terpene-t1pk-indole. Location: 901165 - 968965 nt. Click on genes for more information. [Download cluster GenBank file](#)
 Show PHMM detection rules used

Legend:
 ■ core biosynthetic genes ■ additional biosynthetic genes ■ transport-related genes ■ regulatory genes ■ other genes

Detailed annotation
 ESCO_005795

BGC0001260, terpendole E biosynthetic gene cluster from Tolypocladium album, Locus 1. Partial MIBIG entry.

Gene cluster description
 terpendole E (BGC0001260). Gene Cluster 1. Biosynthetic class = Terpene. GenBank AB725916. Click on genes for more information. [Download cluster GenBank file](#)

Legend:
 ■ biosynthetic genes ■ transport-related genes ■ regulatory genes ■ other genes

Homologous known gene clusters
 All hits
 Query sequence
 BGC0001081_c2 Lolitrem biosynthetic gene cluster
 BGC0001082_c1 Pavilline biosynthetic gene cluster
 BGC0001081_c1 Lolitrem biosynthetic gene cluster
 BGC0000129_c1 Pyrropropane biosynthetic gene cluster

Chemical compounds
 Compound: terpendole E
 PubChem ID: 15094631
 SMILES string: Copy to clipboard
 Molecular formula: C28H39O3
 Average molecular mass: 437.61416 Da

Class-specific details
 Biosynthetic class(es):
 Terpene

Figura 5-18- Análise do cluster biossintético 15 de *E. weberi*

5.2.3 - Cocultivo entre *E. weberi* (ARSEF5574), *L. gongylophorus* (CBS 627.89), *L. leucothites* e *L. holoserinceus*

O cocultivo de micro-organismos que pertencem às mesmas comunidades microbianas é uma boa estratégia de mimetizar as interações ecológicas que ocorrem na natureza. Essa estratégia pode levar à produção de novos compostos ou à regulação de alguma expressão gênica que causa o aumento e/ou diminuição de alguns metabólitos secundários (MARMANN et al., 2014). A regulação da expressão gênica de um dado micro-organismo (e consequentemente da produção de metabólitos secundários produzidos por tais genes) em presença de outro já foi reportada na literatura. Essa regulação ocorre devido a excreção de sinalizadores químicos envolvidos nas interações microbianas e pode ocorrer de maneira positiva ou negativa. Em caso de *upregulation*, isto é, regulação positiva, pode haver a expressão de genes silenciados e consequente produção de metabólitos crípticos e/ou super expressão gênica e consequente aumento na concentração de um dado metabólito. Por exemplo, a regulação positiva de metabólitos secundários foi demonstrada no colcultivo entre os micro-organismos *Fusarium tricinctum* e *Bacillus subtilis* 168trpC2. Neste experimento, lateropirona, depsipeptídeos cíclicos do tipo enniatin e lipopeptídeo fusaristatina A foram relatados sendo com aumento em cerca de 70 vezes em comparação com a cultura axênica (MARMANN et al., 2014). Além disso, o cultivo de *Corallocooccus coralloides* com micobactérias competidoras resultaram em uma produção mais rápida e aumentada de Red em cerca de 60 vezes da concentração intracelular (SCHÄBERLE; ORLAND; KÖNIG, 2014).

Assim, o cocultivo entre duas cepas do simbionte *L. gongylophorus* (CBS 627.89 e UK) e o invasor *E. weberi* (ARSEF5574) foi realizado a fim de obter uma maior compreensão dos metabólitos envolvidos nesta interação quimio-ecológica.



Figura 5-19 – À esquerda, cultura axênica de *E. weberi* (5 dias de cultivo) e à direita, cocultivo entre *E. weberi* e *L. gongylophorus* após 5 dias do inóculo de *E. weberi*.

Tomando por base os resultados obtidos nos cocultivos com os outros micro-organismos do gênero *Leucoagaricus*, no início pensou-se que apenas o metabólito shearinine D era regulado quando em cocultivo. Assim, experimentos de cocultivo entre as cepas *E. weberi* (ARSEF5576), *L. leucothites*, *L. holoserinceus* e *L. gongylophorus* (CBS 627.89) foram realizados a fim de estimar a regulação positiva deste metabólito nas três diferentes situações.

O cocultivo de *E. weberi* (ARSEF5574) com os fungos supracitados mostrou que na presença de seu hospedeiro, *L. gongylophorus*, *E. weberi* cresce consideravelmente mais rápido (Figura 5-19) e tem a produção da substância shearinine D aumentada em todos os casos (Figura 5-20). Porém, a produção desta substância é ainda mais intensificada quando em presença do hospedeiro *L. gongylophorus* (CBS 627.89), indicando que *E. weberi* é “mais sensível” a este fungo, possivelmente devido ao contexto ecológico e evolutivo desses micro-organismos.

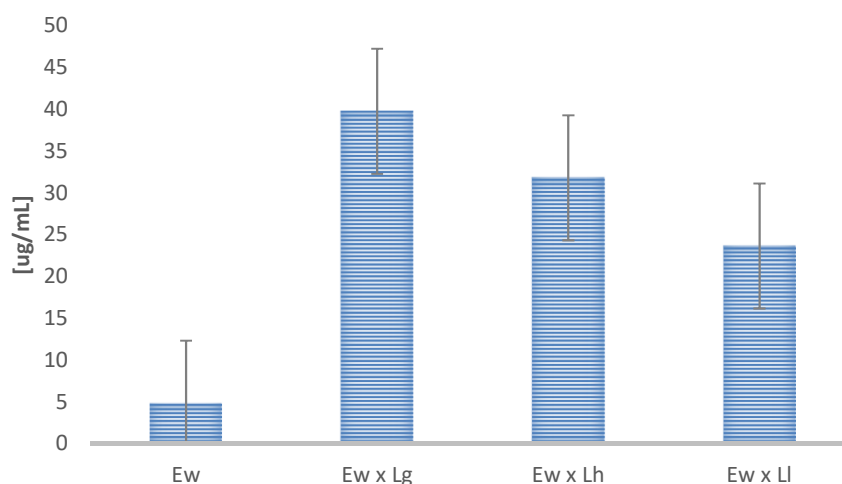


Figura 5-20 - Estimativa da produção de shearinine D por *E. weberi* (Ew) quando cocultivado com diferentes cepas de *Leucoagaricus* (Lg: *L. gongylophorus*, Lh: *L. holoserinceus* e Ll: *L. leucothites*)

Paralelamente a estes experimentos, imagens por MALDI-IMG do cocultivo entre *E. weberi* (ARSEF557) e *L. gongylophorus* (CBS 627.89) foram adquiridas. A princípio pretendia-se avaliar a dispersão de shearinina D quando em presença do hospedeiro e em cultura axênica, porém, a substância não é ionizável

por esta técnica. Assim, decidiu-se realizar uma varredura de 400 a 2000 Da a fim de verificar a possível regulação de outros metabólitos.

As análises por MALDI-IMG revelaram que a substância melinacidina IV (m/z 729) e seus análogos (m/z 713 e 699) também eram super-expressadas na presença do hospedeiro *L. gongylophorus*, como pode ser visto na Figura 5-21.

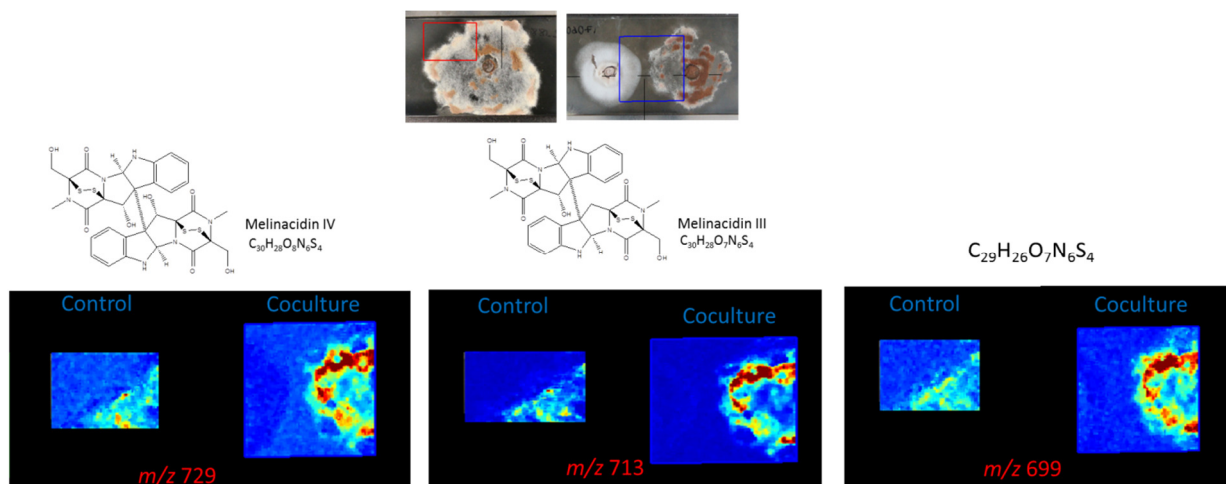


Figura 5-21 - Imagens obtidas por MALDI-IMG no cocultivo entre *E. weberi* e *L. gongylophorus*.

5.2.3.1 - Estimativa da produção de shearinina D e melinacidina IV nos cocultivos de *E. weberi* (ESCO724) e cepas de *L. gongylophorus*

A fim de testar a reprodutibilidade destes experimentos, cepas de *E. weberi* (Esco 724) e *L. gongylophorus* (UK) distintas das estudadas até então foram cedidas pelo grupo do Prof. Dr. Barrie Wilkinson (John Innes Centre). Experimentos de cocultivo cruzados entre *E. weberi* (Esco 724) e *L. gongylophorus* (CBS 627.89 e UK) foram realizados seguindo os protocolos já estabelecidos anteriormente. Felizmente, os resultados obtidos nestes experimentos reforçaram os dados obtidos anteriormente, isto é, havia superexpressão dos metabólitos shearinina D e melinacidina IV em todos os casos. Logo, decidiu-se estimar a produção dos metabólitos shearinina D e melinacidina IV nestes cocultivos.

Através da análise por HPLC, foi possível verificar o aumento da produção de ambos os metabólitos (shearinina D e melinacidina IV) em comparação com as culturas axênicas, atestando-se assim a reprodutibilidade dos resultados adquiridos anteriormente.

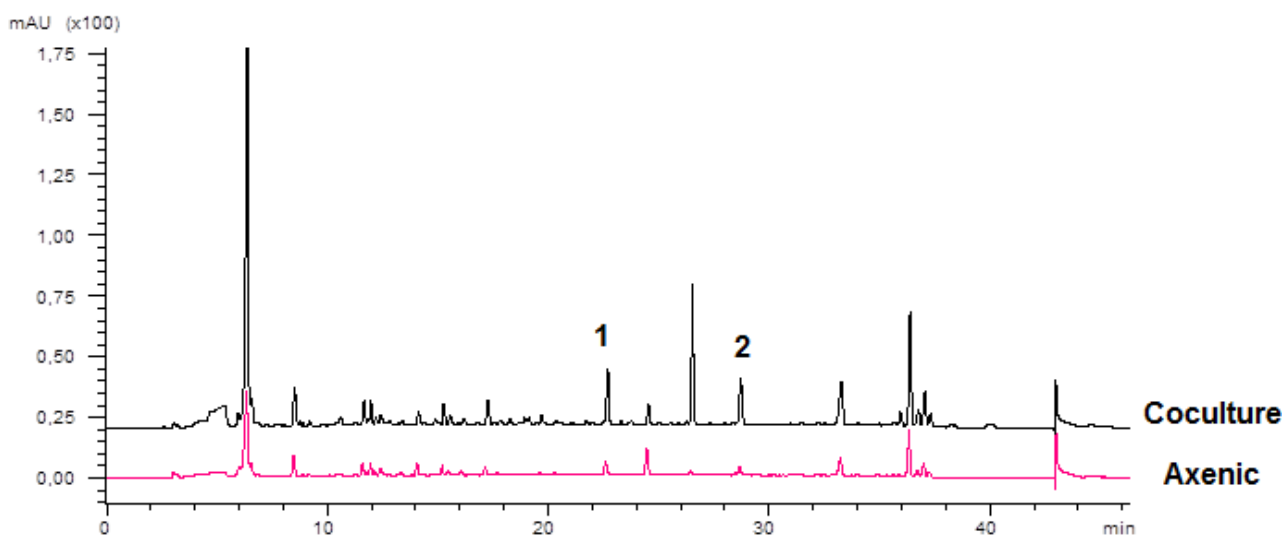


Figura 5-22 - Cromatograma (254 nm) do extrato de cocultivo de *E. weberi* (Esco724) e *L. gongylophorus* (UK). Pico 1 (22,8 min) trata-se da substância melinacidina IV e o pico 2 (27,6 min) da substância shearinina D.

A estimativa da produção de melinacidina IV foi feita através da integração das áreas deste pico nas amostras de cocultivo entre *E. weberi* (ESCO724) e os simbiossitos *L. gongylophorus* (CBS 627.89 e UK). A estimativa mostrou que houve aumento da produção em ambos cocultivos realizados, sendo que o aumento foi mais expressivo no caso dos micro-organismos oriundos do mesmo ninho (*E. weberi* Esco724 x *L. gongylophorus* UK).

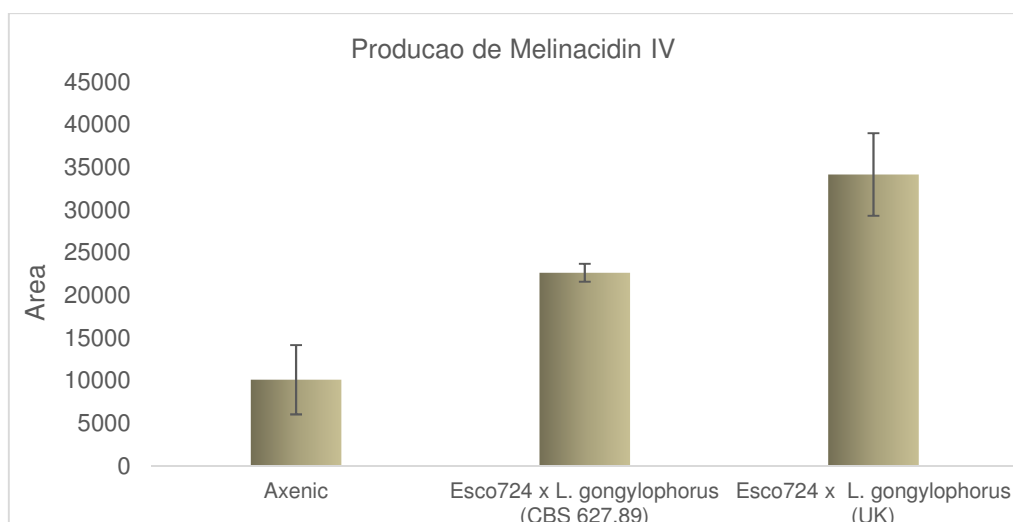


Figura 5-23 - Comparação da produção de Melinacidina IV em diferentes tratamentos: cultura axênica, cocultivo de *E. weberi* (Esco 724) x *L. gongylophorus* (CBS 627.89), e cocultivo de *E. weberi* (Esco 724) x *L. gongylophorus* (UK)

De forma similar àquela realizada para a substância melinacidina IV, estimou-se a produção de shearinina D através da integração das áreas das bandas deste analito nas amostras de cocultivo e cultura axênica. O gráfico abaixo mostra um incremento de cerca de 9 vezes na produção de shearinina D em condições de cocultivo quando comparado à cultura axênica.

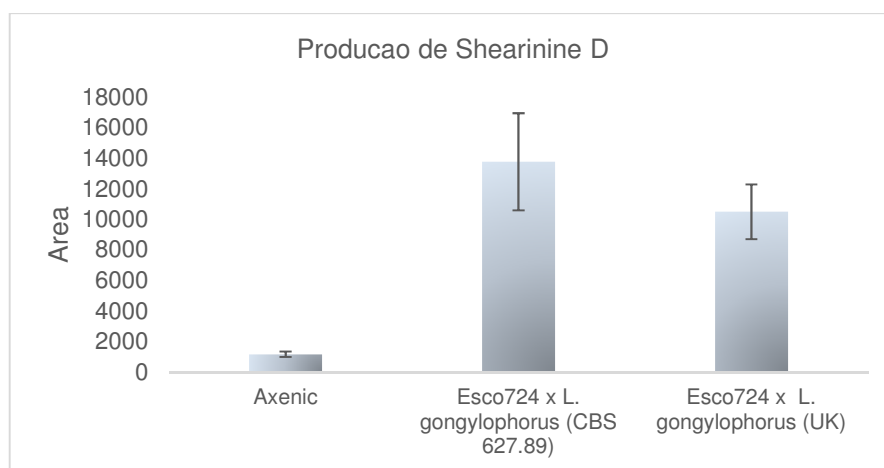


Figura 5-24 - Comparação da produção de Shearinina D em diferentes tratamentos: cultura axênica, Colcultivo de *E. weberi* (Esco 724) x *L. gongylophorus* (CBS 627.89), e colcultivo of *E. weberi* (Esco 724) x *L. gongylophorus* (UK)

Esses experimentos permitiram concluir que tanto o metabólito shearinina D quanto o metabólito melinacidina IV são super-expressados na presença do fungo simbionte *L. gongylophorus*, evidenciando que estes podem estar envolvidos nos mecanismos de virulência de *E. weberi*.

5.2.4 – Função ecológica dos metabólitos shearinina D e melinacidina IV

Ensaio antimicrobianos frente aos fungos *L. leucothites* e *L. holoserinceus* e às bactérias *Pseudonocardia echinator* Ae706 e *P. octospinosus* Ae707 foram realizados a fim de entender o papel ecológico dessas substâncias na natureza. Os resultados obtidos em cada um dos ensaios estão descritos nos tópicos a seguir.

5.2.4.1 - Ensaio frente aos fungos *L. holoserinceus* e *L. leucothites*

O fato de as substâncias melinacidina IV e shearinina D terem sua expressão regulada na presença de *L. gongylophorus* indicavam que *E. weberi* poderia estar produzindo esses metabólitos secundários como forma de resposta direta à presença de seu hospedeiro. Não foi isto o observado, ao contrário do que se esperava, as substâncias shearinina D e melinacidina IV não apresentaram atividade antifúngica frente aos micro-organismos do gênero *Leucoagaricus* em nenhuma das concentrações testadas. Portanto o metabólito não possui ação antifúngica, não atuando diretamente na morte do fungo simbionte.

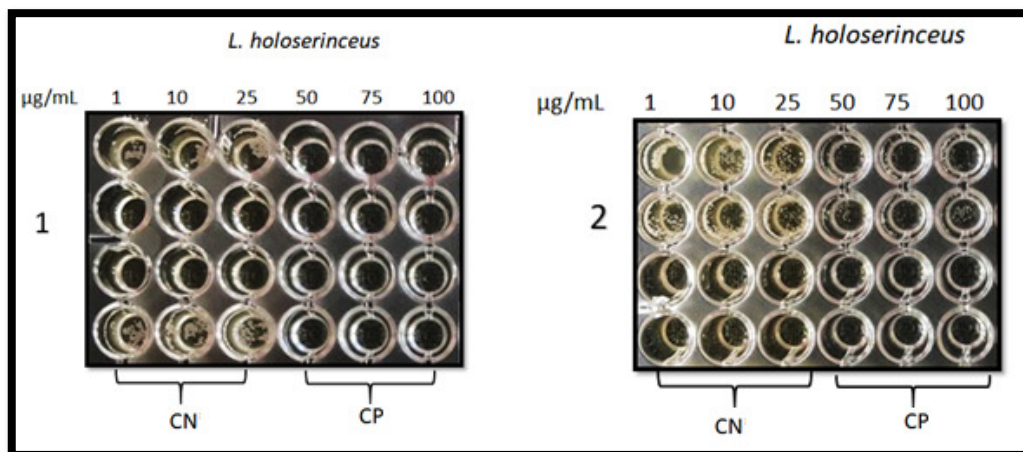


Figura 5-25 - Ensaio antifúngico de 1) melinacidina IV e 2) shearinina D frente à *L. holosericeus*. CP* = controle positivo (nystatina), CN** = controle negativo.

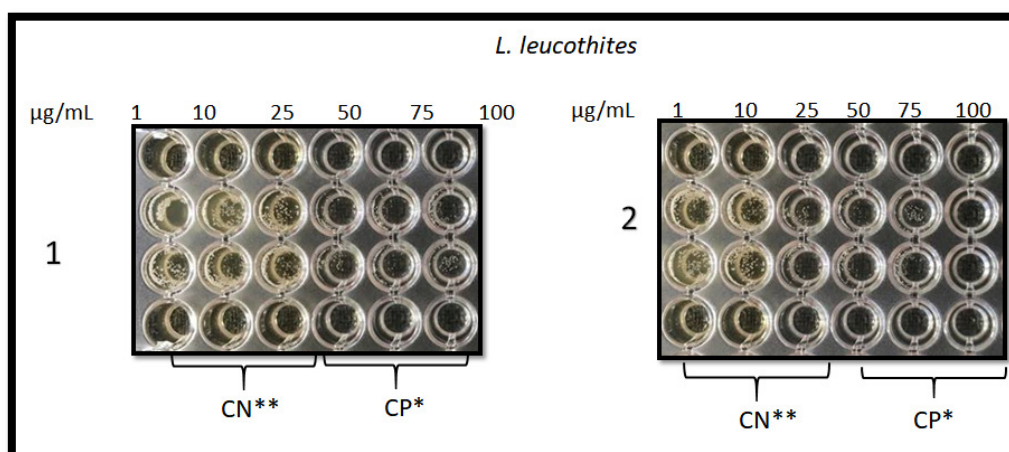


Figura 5-26 - Ensaio antifúngico de 1) melinacidina IV e 2) shearinina D frente à *L. leucothites*. CP* = controle positivo (nystatina), CN** = controle negativo.

5.2.4.2 - Ensaio frente as bactérias *Pseudonocardia echinator* Ae706 e *P. octospinosus* Ae707

Embora os compostos não tenham apresentado atividade antifúngica frente às duas espécies de *Leucoagaricus*, eles se mostraram consideravelmente ativos frente a cepas de *P. echinator* Ae706 e *P. octospinosus* Ae707. Foram obtidas MIC de 5 e 10 µg/mL para melinacidina IV e shearinina D, respectivamente, no ensaio

contra *P. echinatio* Ae706, enquanto que se obteve uma MIC de 0,5 e 10 µg/mL frente a *P. octospinosus* Ae707. Através deste e dos demais resultados obtidos, pode-se sugerir que tais metabólitos são produzidos por *E. weberi* a fim de reduzir a população de bactérias no ninho. Uma vez que as bactérias são responsáveis diretas na proteção do jardim contra patógenos, como consequência dessa redução, *Leucoagaricus gongylophorus* passa a estar susceptível ao ataque de *E. weberi*. Dessa maneira, *Escovopsis* consegue estabelecer o seu parasitismo em *Leucoagaricus* e manter sua existência. Portanto, shearinina D e melinacidina IV podem ser considerados fatores de virulência de *E. weberi*.

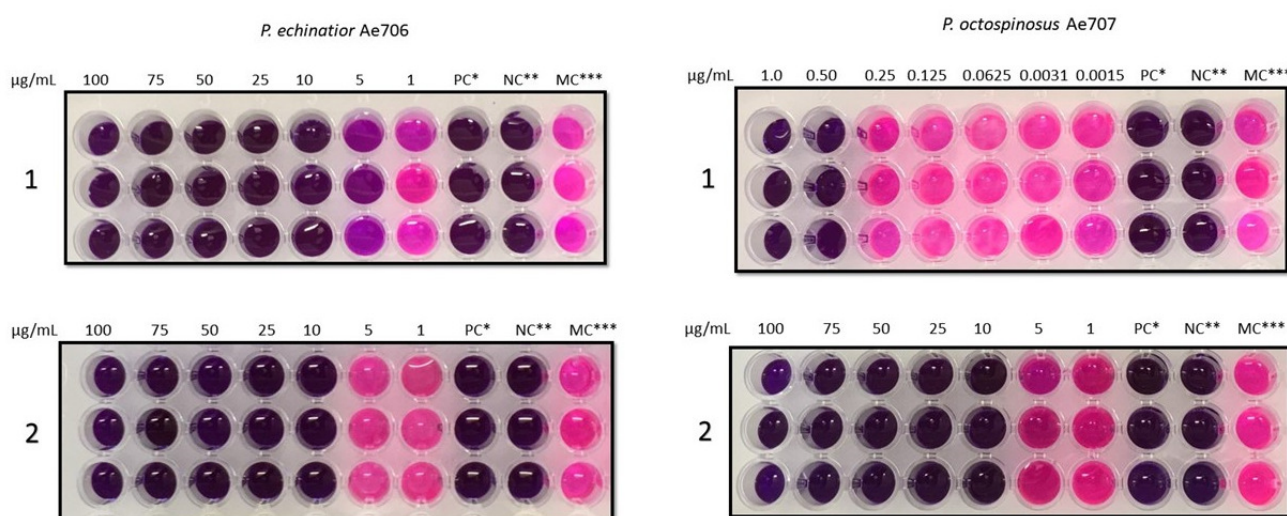


Figura 5-27 – Resultado dos ensaios antimicrobianos realizados para 1) melinacidina IV e 2) shearinina D. PC= controle positivo (ciprofloxacina 5µg/mL), NC = controle negativo (apenas meio), e MC = controle do meio (inóculo das bactérias em meio contendo 5% de metanol).

5.3 - Detecção e identificação de derivados de shearinina D e melinacidina IV

5.3.1 - Detecção dos análogos de shearinina D por UPLC-HRMS

Baseados nos resultados obtidos por MALDI-IMG em que foi possível detectar a produção e regulação positiva de análogos de melinacidina IV, decidiu-se avaliar a produção de análogos de shearinina nos extratos de cocultivo entre *E. weberi* (ARSERF5576) e *L. gongylophorus* (CBS 627.89) por UPLC-HRMS, uma vez que esta classe de metabólitos não ioniza por MALDI.

Embasados nas massas das shearininas já reportadas na literatura (Tabela 5-4), fez-se a busca destes íons no extrato de cocultivo.

Tabela 5-4 – Massa molar das shearininas já reportadas na literatura

Substância	Massa (g/mol)
Shearinina A	583,3
Shearinina B	582,3
Shearinina C	617,5
Shearinina D	599,3
Shearinina E	599,3
Shearinina F	569,3
Shearinina G	597,3
Shearinina H	615,5
Shearinina I	615,5
Shearinina J	601,4
Shearinina K	569,3

Os cromatogramas de íons extraídos do extrato de cocultivo indicaram a presença das shearinina A, D e H.

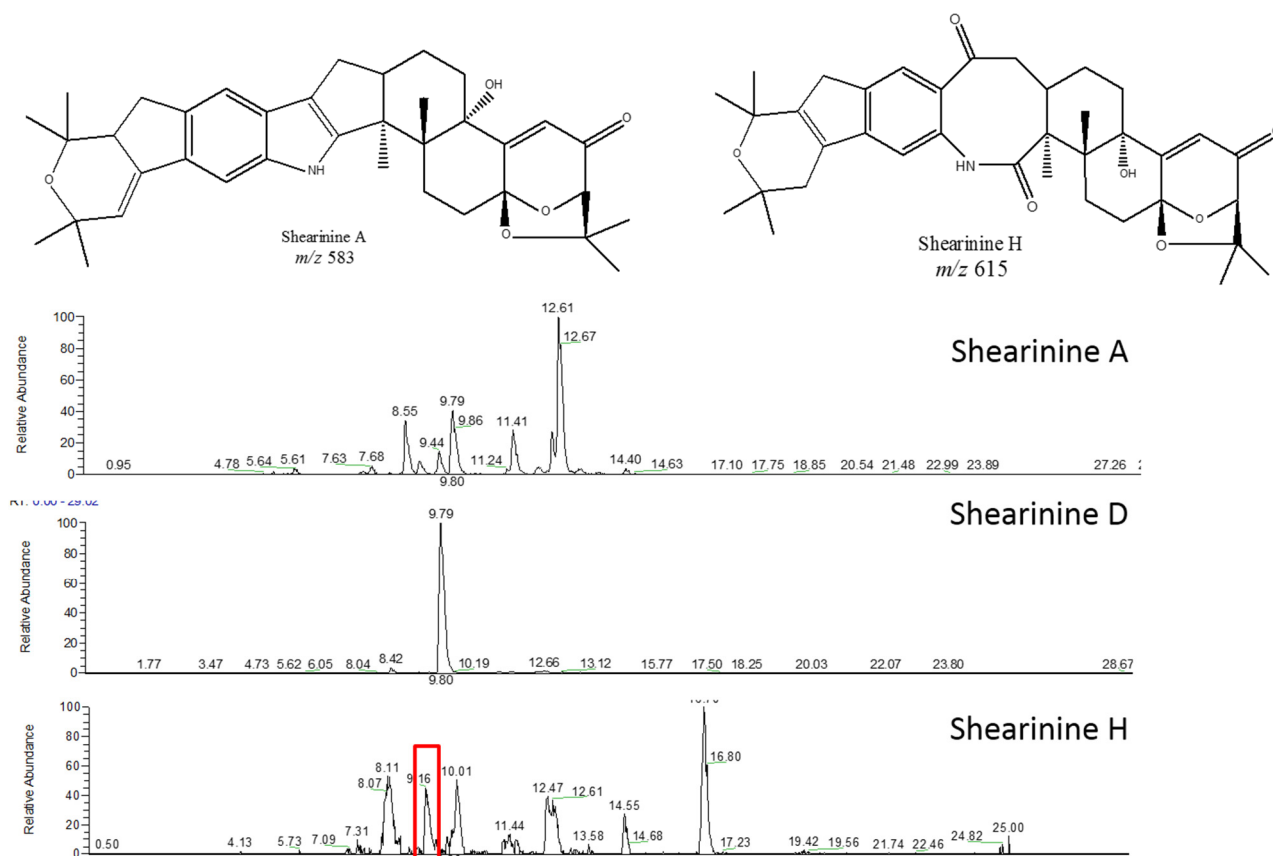


Figura 5-28 - Cromatograma de íons extraídos detecta a produção de análogos de shearinina D nos extratos de cocultivo entre *E. weberi* X *L. gongylophorus*

Além destas, uma outra shearinina ($C_{37}H_{44}NO_5$, $[M+H]^+ = 582,3217$) também foi isolada. Seu espectro de RMN de 1H mostrou certa similaridade com o espectro obtido anteriormente para shearinina D, confirmando se tratar de outra shearinina.

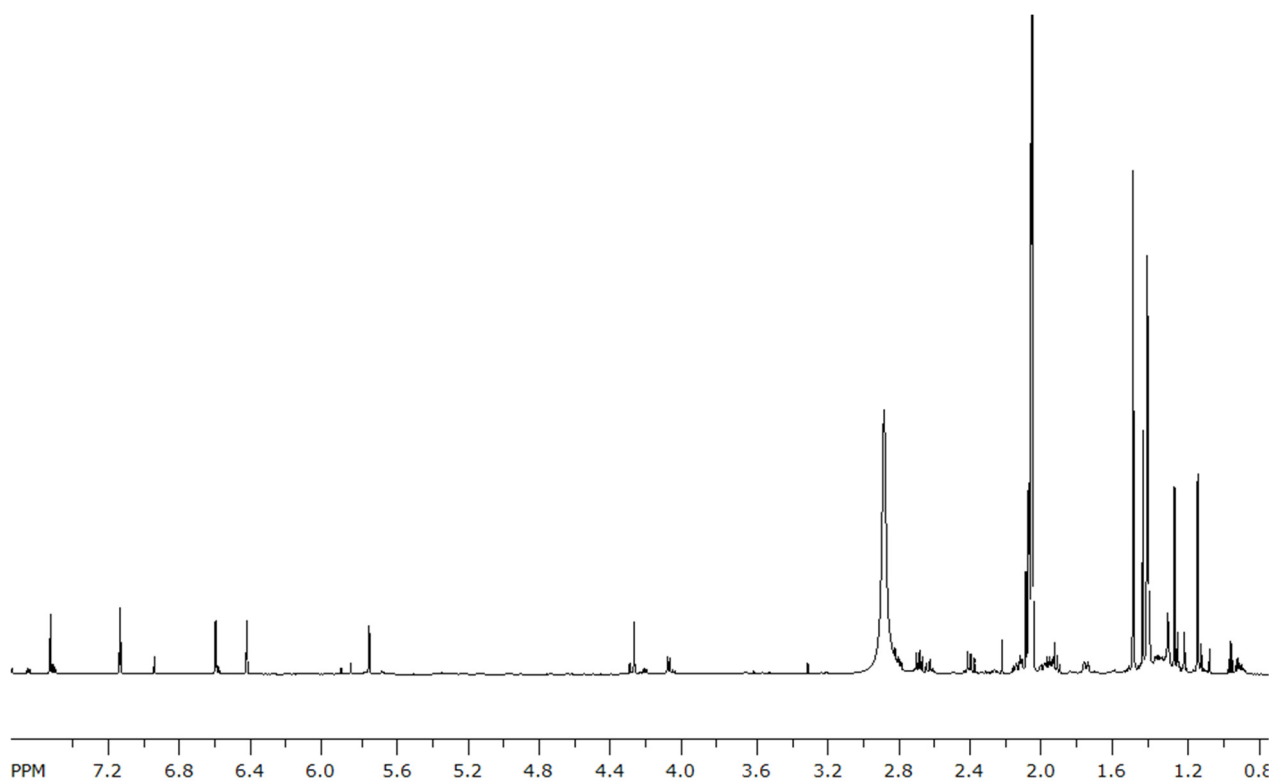


Figura 5-29 - Espectro de RMN de ^1H obtido para a substância Ew_Lh_prep3 (CD_3OD , 500 MHz).

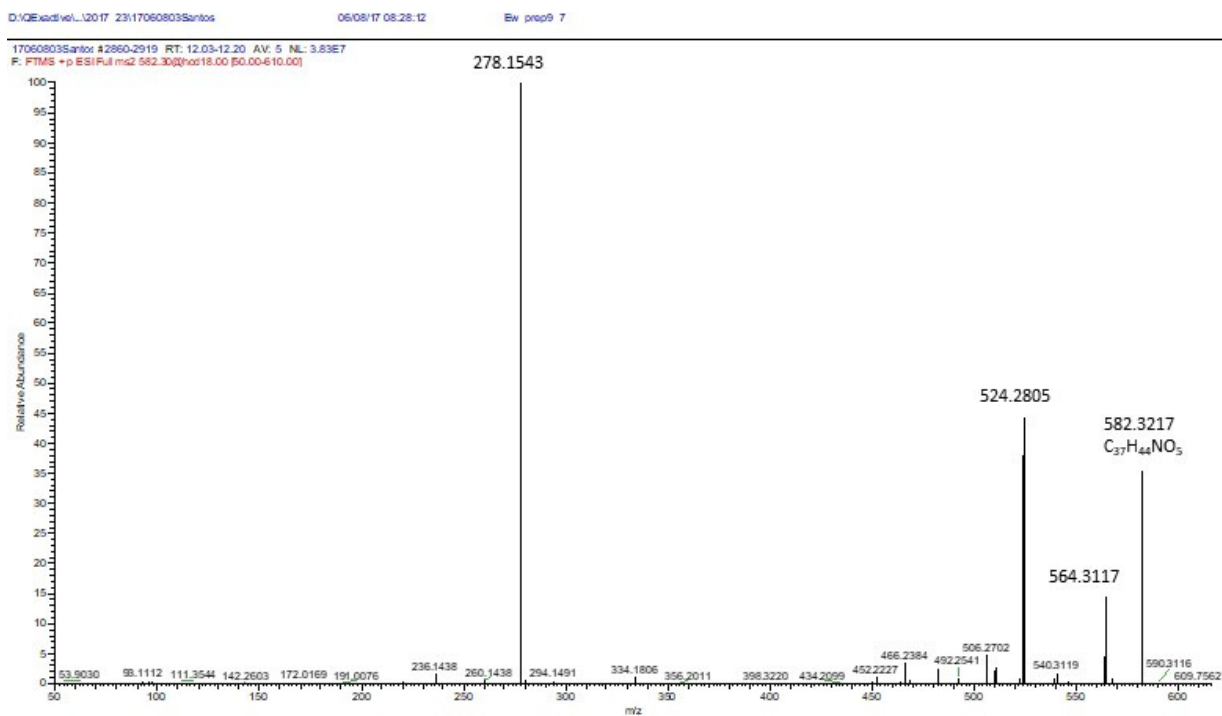


Figura 5-30 – Espectro de massas de alta resolução da substância Ew_Lh_prep3 (ESI+).

A comparação com dados da literatura permitiu aferir que este composto possuía um sinal de hidrogênio de ligação dupla a mais que a substância shearinina A ($C_{37}H_{45}NO_5$), como pode ser visto na Tabela 5-5. Além disso, a fórmula molecular obtida para esta substância apresentava dois átomos de hidrogênio a menos do que a shearinina A.

Tabela 5-5 - Comparação entre os dados de RMN de 1H obtidos para a substância EwLh_prep_3 e aqueles reportados para a substância shearinina A

Shearinina A	22,23-desidro-shearinina A
7,57 (s)	7,60 (s)
7,32 (s)	7,41 (s)
7,24 (s)	7,19 (s)
-	6,49 (d; 1,8)
5,91 (d; 3,0)	6,36 (d; 1,8)
5,83 (m)	5,83 (m)
4,30 (d, 1,1)	4,30 (m)
3,10 (dd; 15,3; 9,3)	2,80 (m)
2,91 (m)	2,77 (m)
2,71 (m)	2,67 (m)
2,40 (dd, 13,1; 10,7)	2,04 (m)
2,01 (m)	2,00 (m)
1,88 (m)	1,88 (m)
1,43 (m)	1,78 (m)
1,37 (s)	1,52 (s)
1,35 (s)	1,45 (s)
1,32 (s)	1,43 (s)
1,21 (s)	1,36 (s)
1,17 (s)	1,23 (s)
1,07 (s)	1,17 (s)

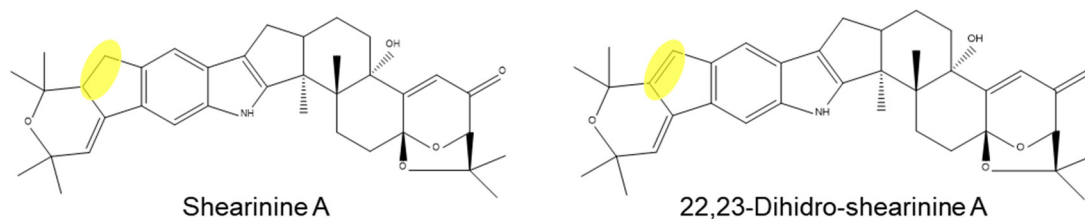


Figura 5-31 – Estruturas da shearinina A (à esquerda) e 22,23-desidroshearinina A (à direita)

5.3.2 – Detecção e identificação dos análogos de melinacidina IV por UPLC-HRMS

Com relação aos análogos de melinacidina IV, através da busca pelas massas observadas nos experimentos de MALDI-IMG, foi possível confirmar a presença de melinacidina III (m/z 713) bem como um possível novo análogo devido à grande similaridade entre seu perfil isotópico (característico pela presença de 4 átomos de enxofre) e de fragmentação com as demais melinacidinas.

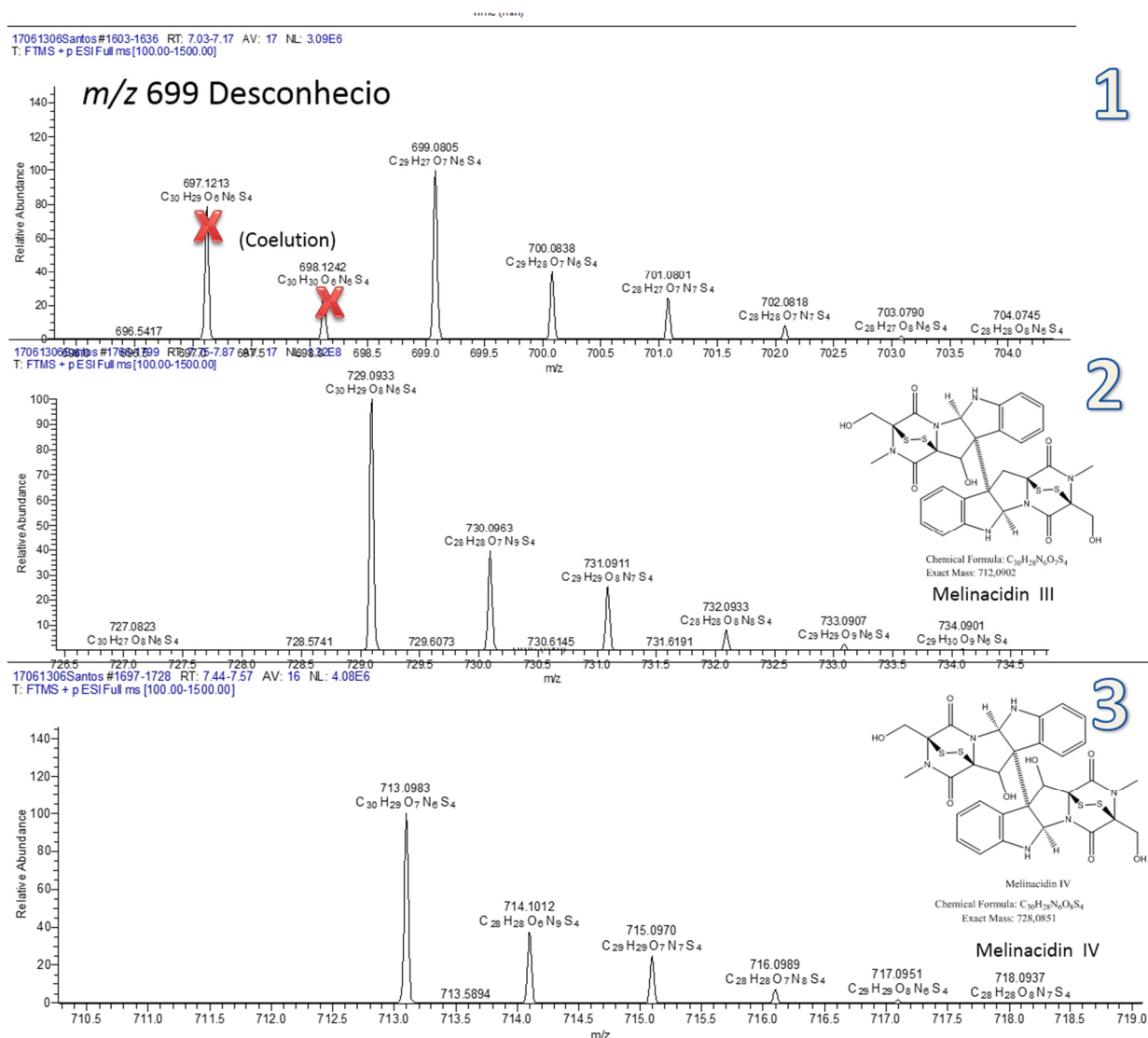


Figura 5-32 - Perfil isotópico das melinacidinas detectadas por UPLC-HRMS: 1) possível nova melinacidina, 2) melinacidina III e 3) melinacidina IV

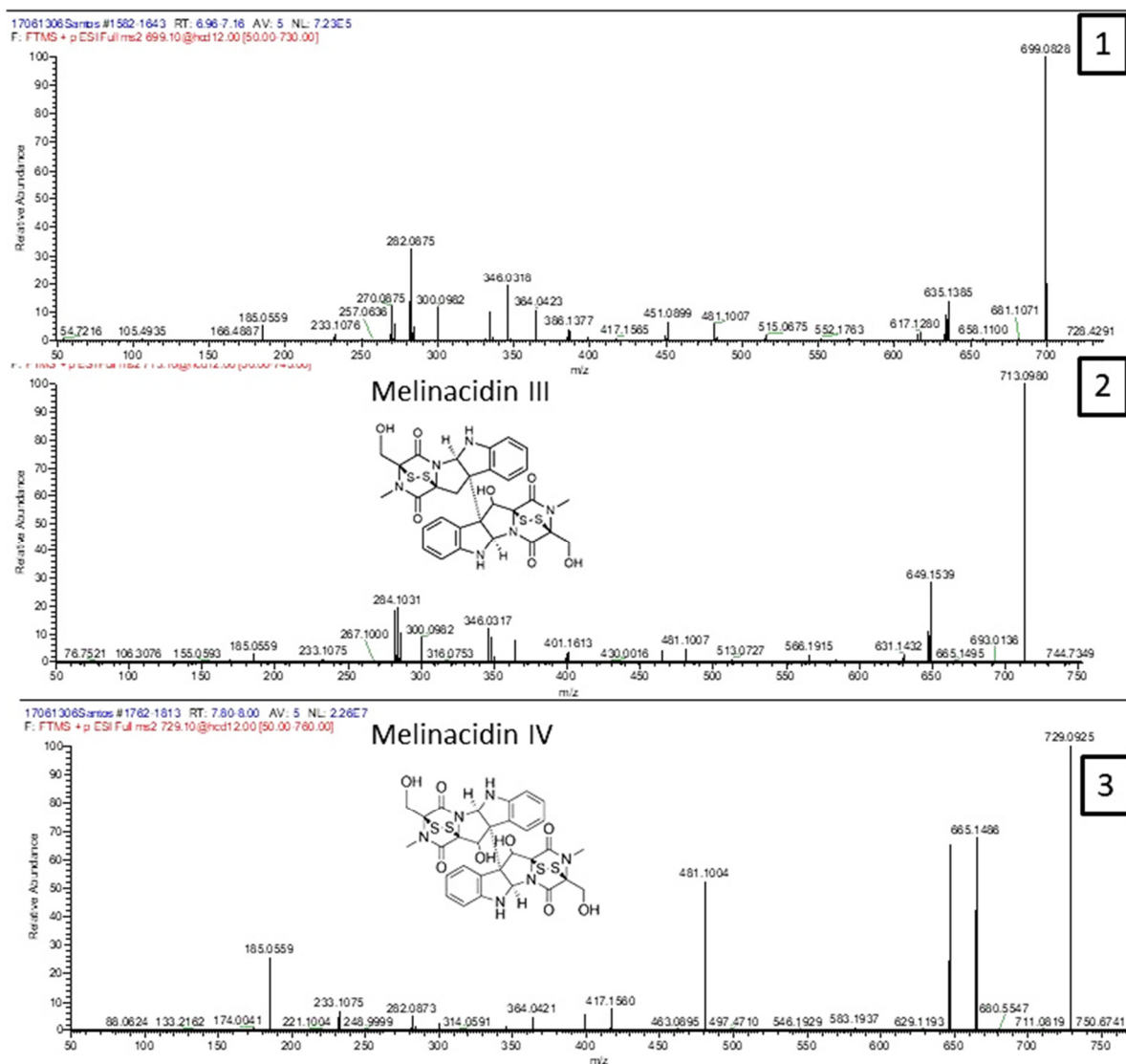


Figura 5-33- Perfil de fragmentação das melinacidinas detectadas por UPLC-HRMS: 1) possível nova melinacidina, 2) melinacidina III e 3) melinacidina IV.

Através da comparação dos espectros de íons produtos da substância desconhecida (Figura 5-33 – 1), da melinacidina III (Figura 5-33 – 2) e melinacidina IV (Figura 5-33 – 3) nota-se que vários íons são característicos para estas três substâncias, tais como: m/z 481, 401, 364, 346, 300, 282, 233 e 185. Além disso, algumas perdas também são comuns entre elas (não necessariamente nessa ordem): I) 64 unidades de massas (S_2), II) 335 unidades de massa, III) 365 unidades de massa, dentre outros. Desta forma, ao entender o perfil de fragmentação das substâncias já conhecidas (melinacidina III e IV), é possível prever a estrutura da substância desconhecida.

Assim, baseados nos fragmentos de alta resolução observados no espectro de íons produtos de melinacidina IV, chegou-se na seguinte proposta de fragmentação:

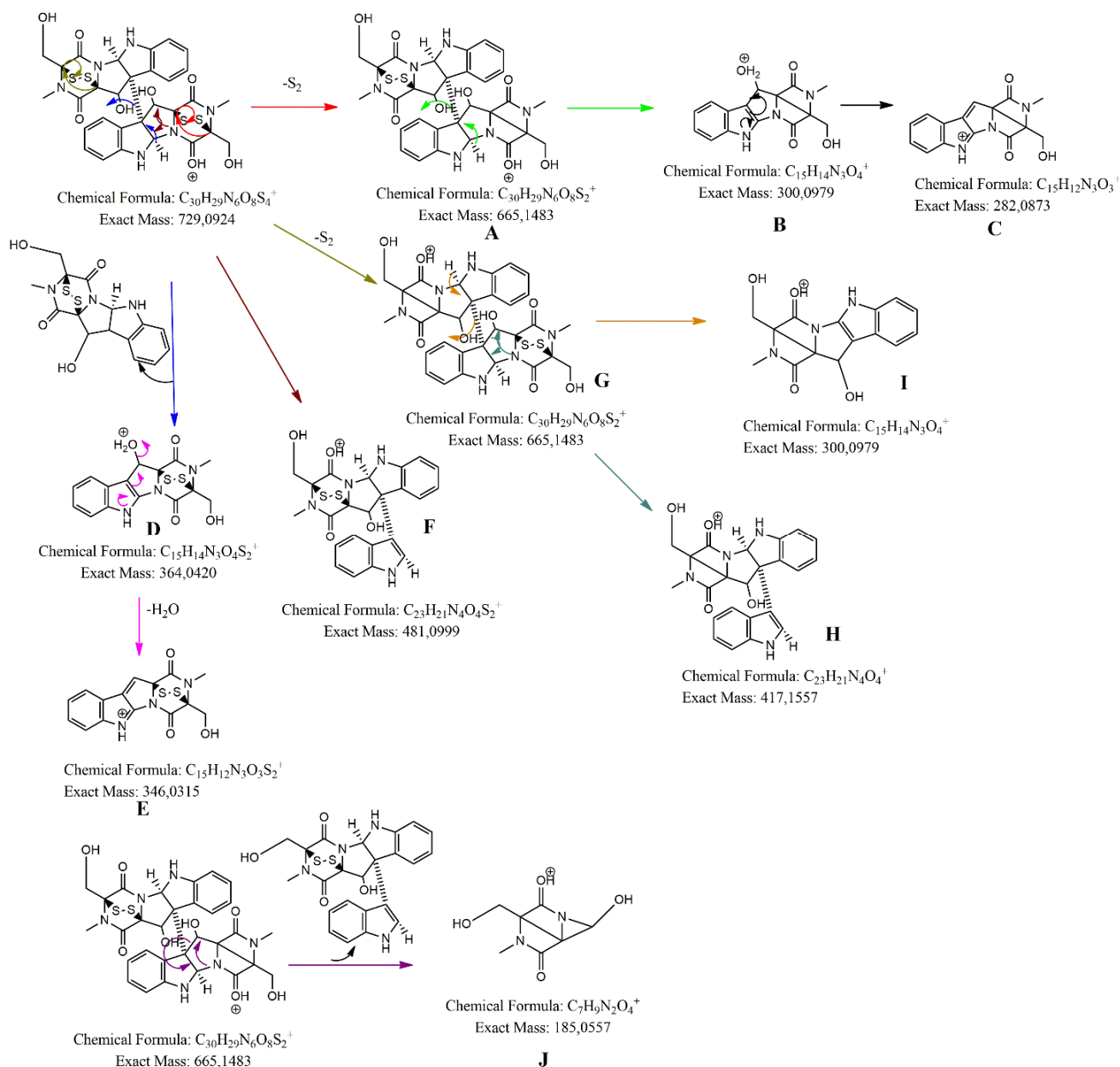


Figura 5-34 – Estudo de fragmentação da substância melinacidina IV.

Sabendo que a substância desconhecida possuía 14 Da a menos que melinacidina III e 30 Da a menos que melinacidina IV referentes a um grupo CH_2 e CH_2 e um átomo de oxigênio, respectivamente, fez-se um rápido estudo da sua

proposta biossintética a fim de avaliar em que partes da molécula poderia estar ocorrendo essa diferenciação:

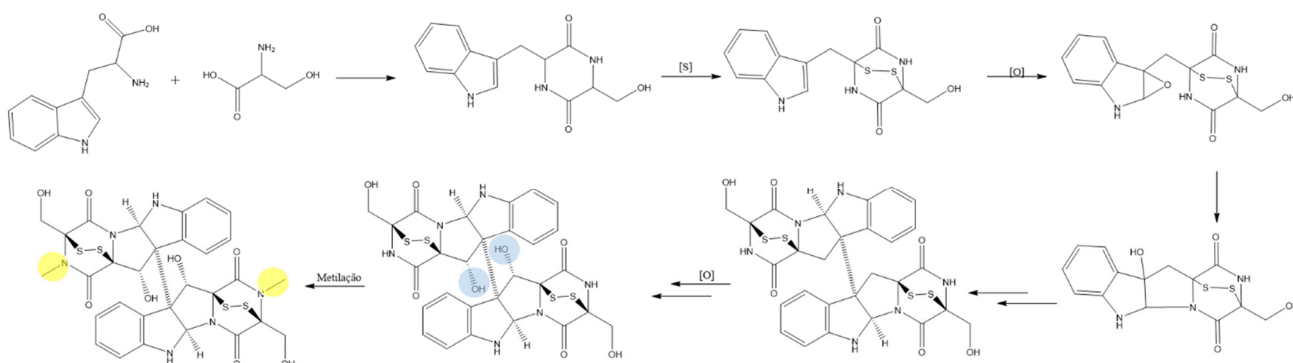


Figura 5-35 - Proposta biossintética da melinacidina IV

Pela rota biossintética acima mostrada, concluiu-se que a metilação do nitrogênio do anel dicetopiperazínico (em amarelo) e as hidroxilações (em azul) são etapas independentes das demais, isto é, não fazem parte do esqueleto dos aminoácidos de partida. As metilações podem ocorrer em um, dois ou nenhum dos átomos de nitrogênio do anel dicetopiperazínico. Por sua vez, as hidroxilações também podem ou não ocorrer. Embasados nos dados de massas e na proposta biossintética, propôs-se que o íon de m/z 699 referente à melinacidina desconhecida só poderia se tratar de uma das duas possibilidades abaixo: uma melinacidina que contém apenas uma das hidroxilação e uma metilação no N-dicetopiperazínico.

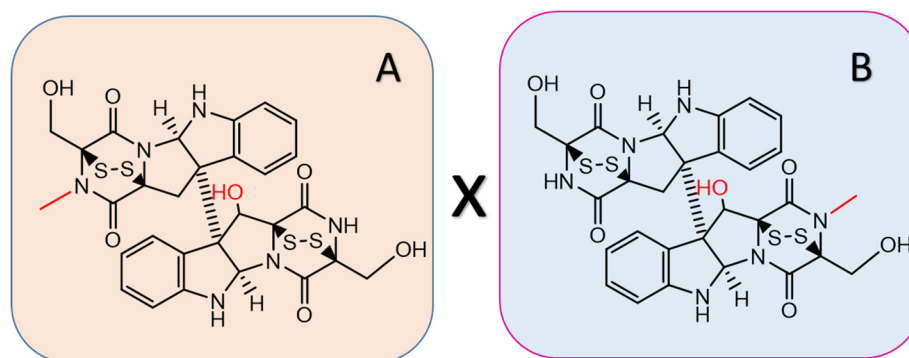


Figura 5-36 - Possibilidades para o íon m/z 699

De acordo com os estudos de fragmentação para a substância melinacidina IV, ao prever os fragmentos que cada possibilidade A e B podem gerar,

é possível deduzir qual das duas possibilidades gerou o espectro de íons produtos acima mostrado na Figura 5-33-1.

ESTUDO DE FRAGMENTAÇÃO DA POSSIBILIDADE A:

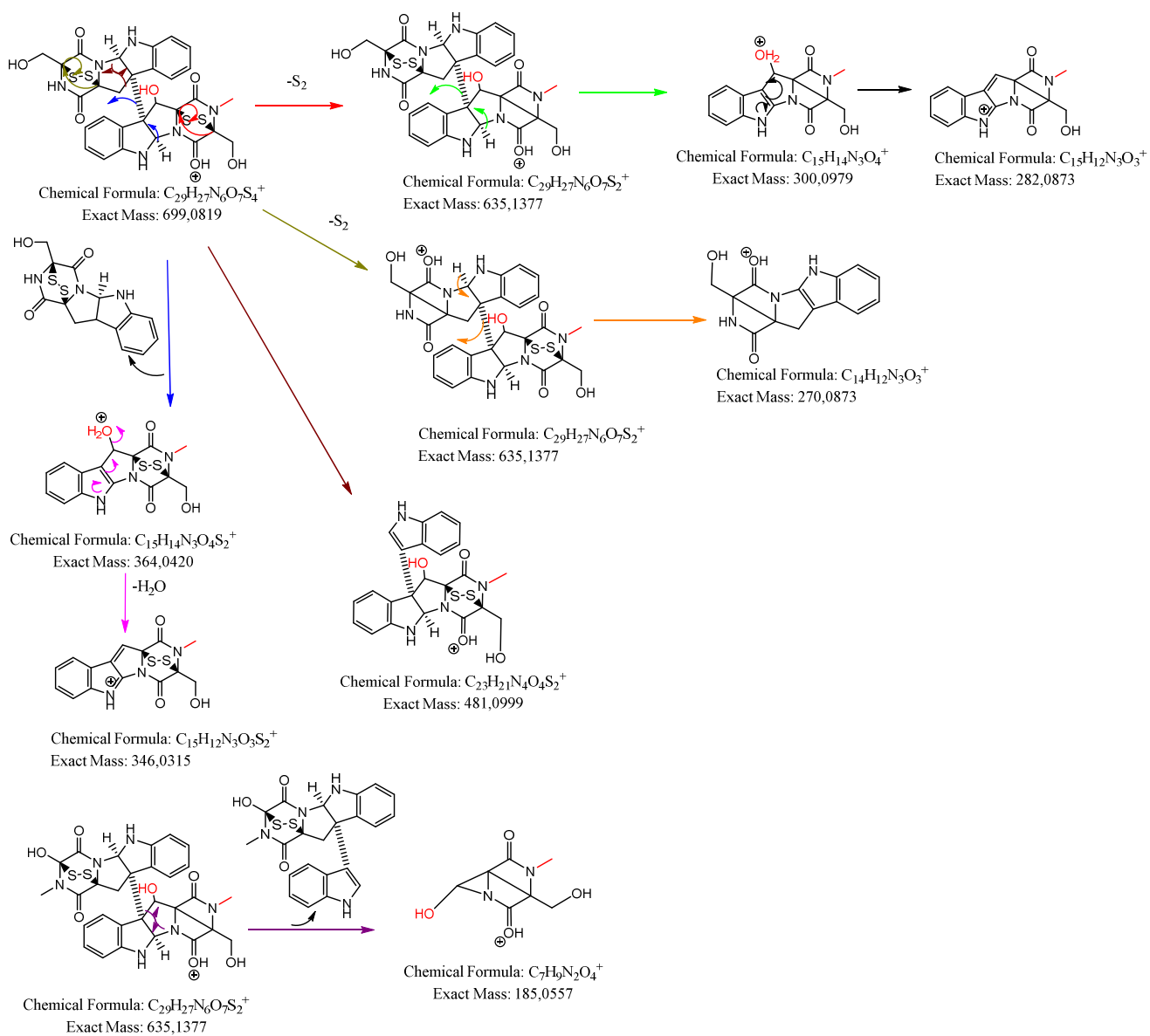


Figura 5-37 - Estudo do perfil de fragmentação da possibilidade A

ESTUDO DE FRAGMENTAÇÃO DA POSSIBILIDADE B

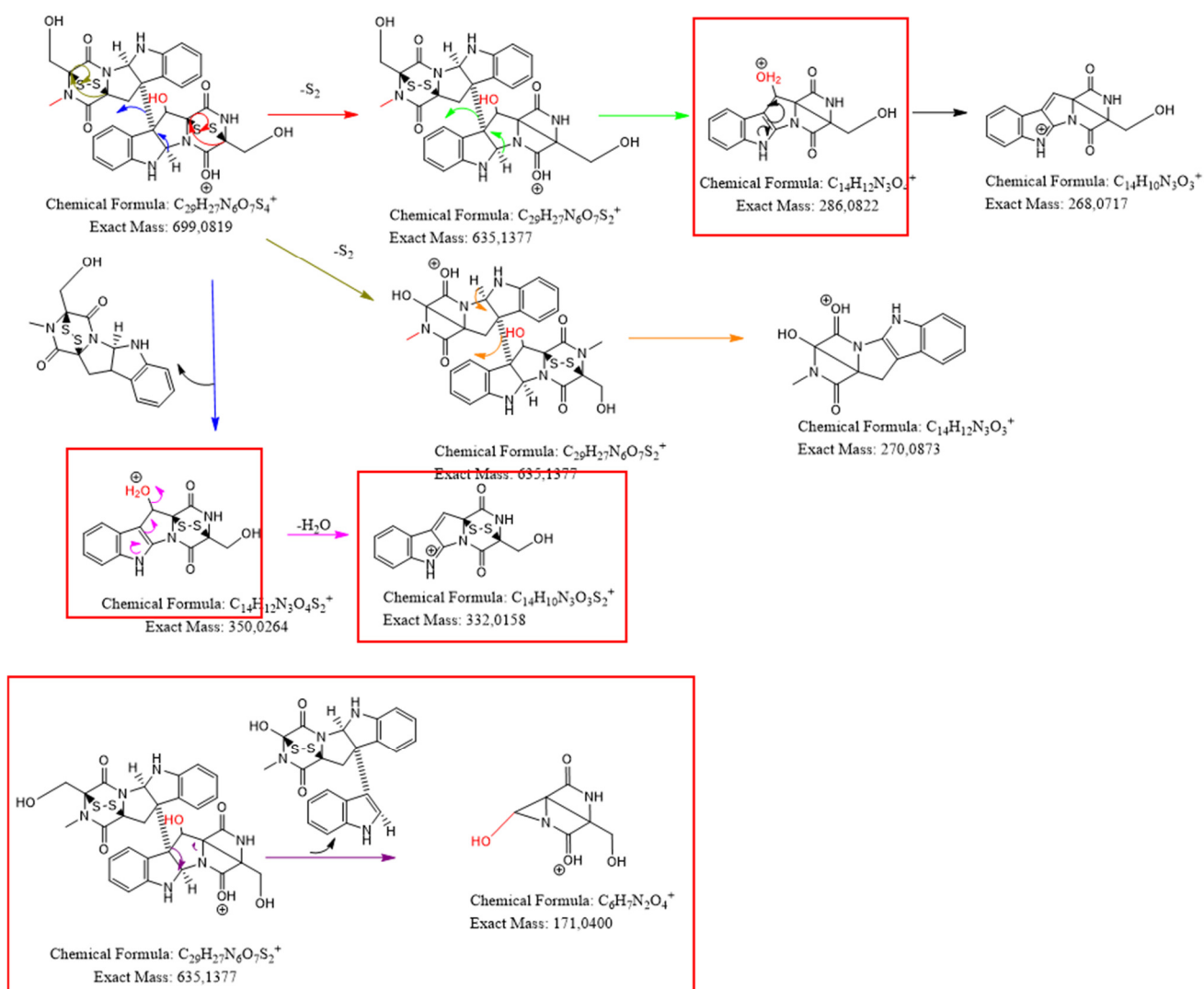


Figura 5-38 -Estudo do perfil de fragmentação da possibilidade B

Um olhar cuidadoso das propostas anteriores mostra que a possibilidade B geraria fragmentos não observados no espectro de massas: m/z 171, 286, 332 e 350 (íons destacados em vermelho). Por outro lado, seguindo o mesmo perfil de fragmentação de melinacina IV, a possibilidade A gera todos os fragmentos observados no seu espectro de íons produtos. Assim, concluiu-se que A referia-se à nova melinacina detectada por LC-HRMS e MALDI-IMG.

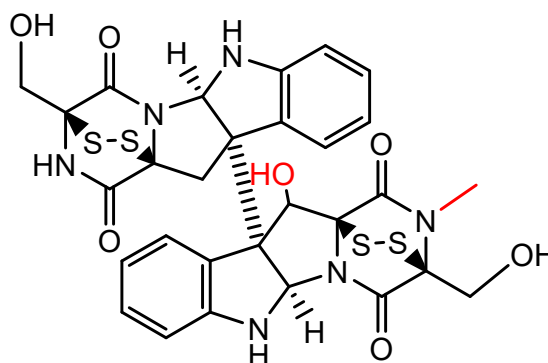


Figura 5-39 - Proposta estrutural para a substância desconhecida de m/z 699

5.4 - Detecção e identificação de lipídios betaínicos por MALDI-IMG

As análises por MALDI-IMG do experimento de cocultivo entre *E. weberi* (ARSEF5574) e *L. gongylophorus* (CBS 627.89) permitiram verificar também o aumento da intensidade dos íons de m/z 1032 e m/z 1056 quando comparados à cultura axênica, como pode ser visto na figura a seguir.

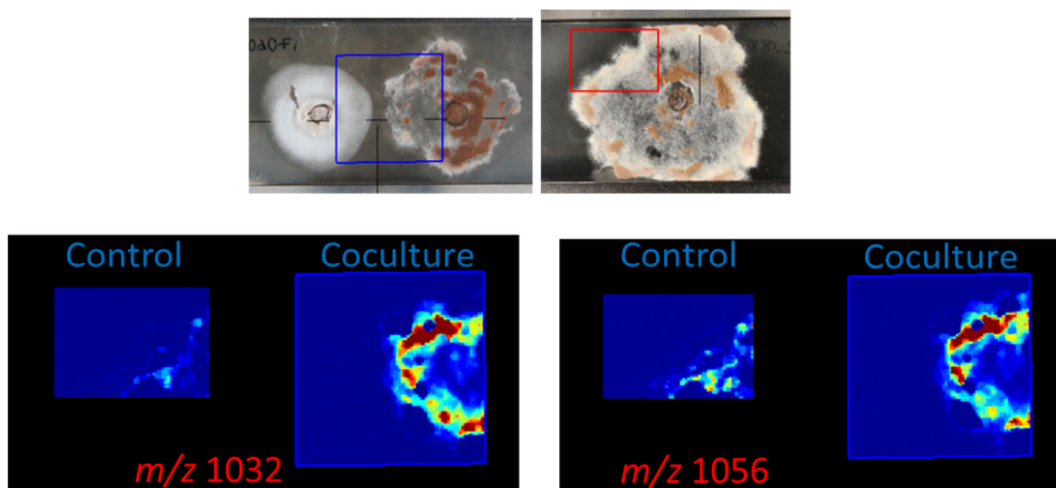


Figura 5-40 - Imagens obtidas por MALDI-IMG no cocultivo entre *E. weberi* e *L. gongylophorus*.

Com a finalidade obter mais informações sobre essas substâncias, realizaram-se experimentos de íons produtos destes íons, como mostrado nos espectros a seguir.

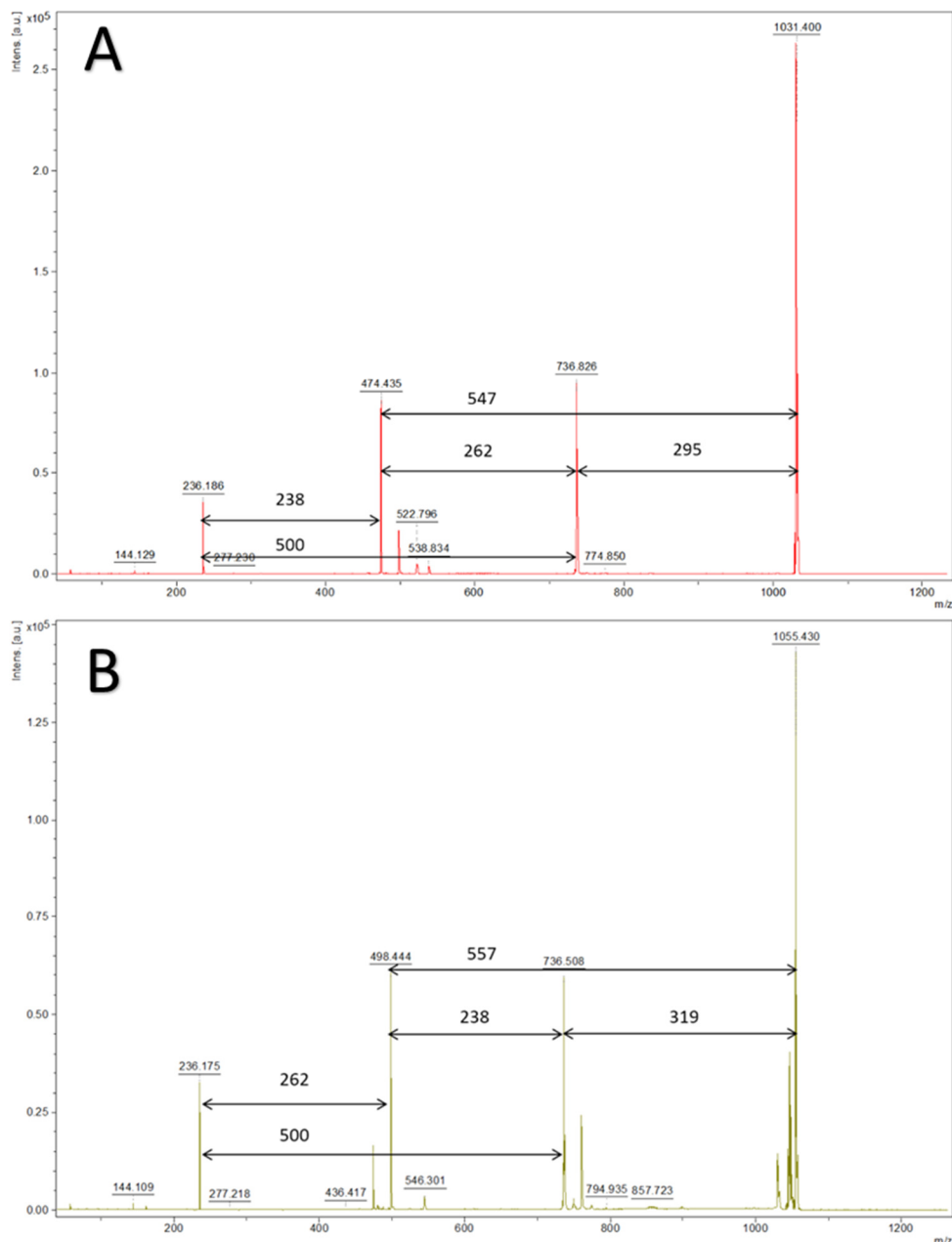


Figura 5-41 – Espectros de íons produtos dos íons de m/z 1032 e 1056

Uma busca detalhada na literatura permitiu encontrar um artigo (FREITAG et al., 2012) em que o estudo de fragmentação de lipídios betaínicos foi realizado, gerando parte dos fragmentos observados: m/z 736 \rightarrow 498; 480; 474; 456 e 236.

Esse tipo de fragmentação é característica de lipídeos betaínicos, isto é, lipídeos que possuem uma cabeça polar carregada e uma cadeia alquílica longa.

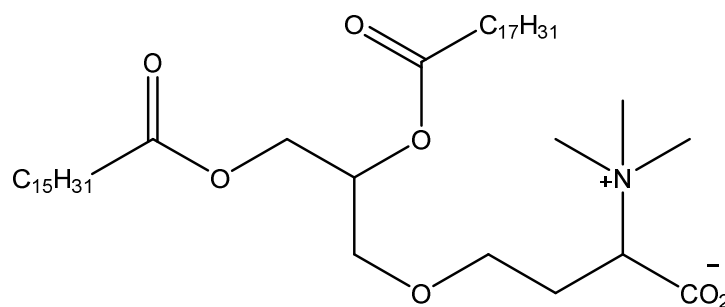


Figura 5-42 - Esqueleto base de um lipídeo betaínico

Baseados nos dados obtidos nos experimentos de íons filhos e aqueles encontrados na literatura, propõe-se as seguintes fragmentações:

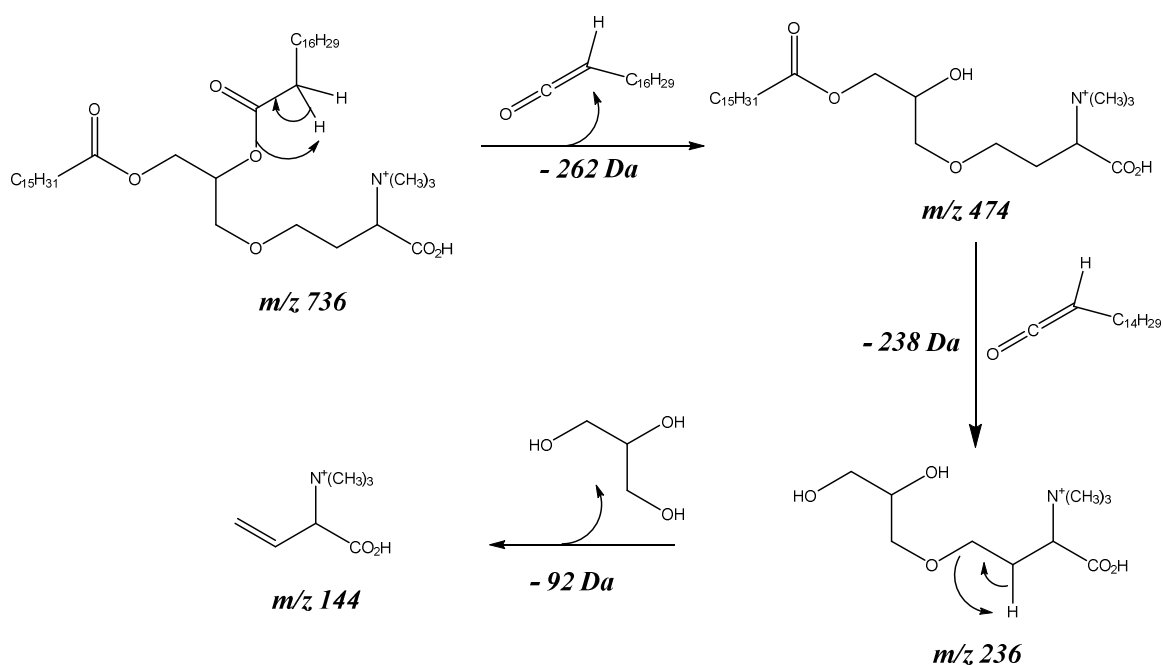


Figura 5-43 - Proposta de fragmentação para formação dos íons observados no espectro de íons produtos do íon m/z 736 (gerado pela fragmentação de m/z 1032).

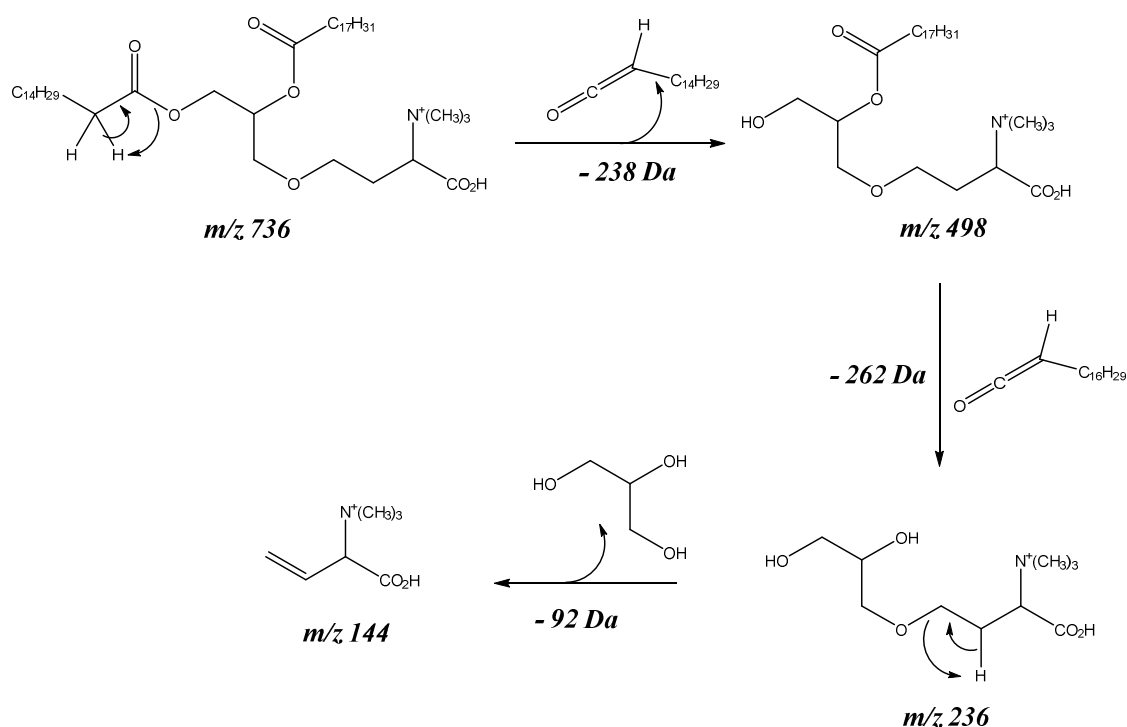


Figura 5-44 - Proposta de fragmentação para formação dos íons observados no espectro de íons produtos do íon m/z 736 (gerado pela fragmentação de m/z 1056).

A perda dos fragmentos neutros de 262 e 238 Da para os íons de m/z 1032 e 1056, gera, respectivamente, os íons de m/z 474 e 478. Em seguida, estes sofrem uma nova perda de um fragmento neutro que varia em ± 24 unidades de massa com relação ao primeiro fragmento neutro perdido, gerando o íon de m/z 236. Então, m/z 236 através da perda de glicerina (92 u), forma-se o íon m/z 144, característico de lipídeos betaínicos.

Por meio destes estudos de fragmentação, concluiu-se que os íons de m/z 1036 e 1052 tratavam-se de lipídeos betaínicos com cadeias alquílicas mais longas do que aqueles referenciados na literatura encontrada.

5.5 - Cocultivo entre *E. microspora* (LESF019) e *L. gongylophorus*

O cocultivo entre o micro-organismo *E. microspora* (LESF 019) e *L. gongylophorus* foi realizado com o propósito de checar se haveria a produção de melinacidina IV e shearinina D por *E. microspora* quando em cocultivo e em cultura axênica.

Para isso, o experimento foi conduzido de maneira similar àquela realizada anteriormente. Os micro-extratos obtidos foram analisados por LC-MS. A figura a seguir mostra os cromatogramas (Figura 5-45) e os espectros de massas obtidos. É possível observar que *E. microspora* (LESF019) também é hábil produtor de melinacidina IV (1) e shearinina D (2), tanto em cultura axênica como em cocultivo.

Além disso, nota-se que as intensidades dos picos no experimento de cocultivo (Figura 5-45B) são maiores, indicando uma maior quantidade destas substâncias no extrato. Estes dados vêm de encontro com os resultados obtidos para *E. weberi*.

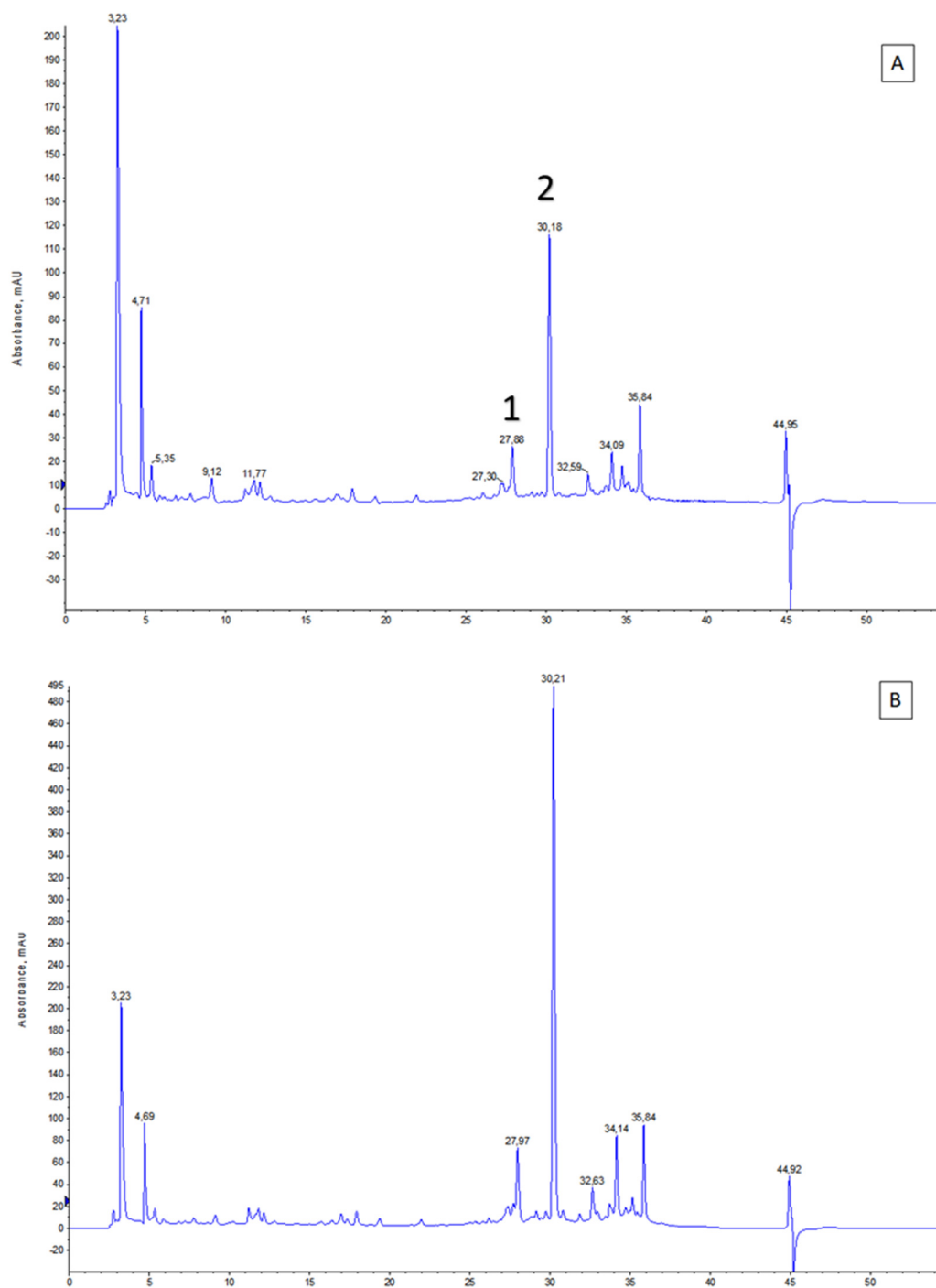


Figura 5-45 – Cromatogramas (254 nm) de a) cultura axênica de *E. microspora* (LESF019) e b) cocultivo entre *E. microspora* (LESF019) e *L. gongylophorus*. Pico 1 (27,8 min) é referente a melinacidina IV e pico 2 (330,2 min), a shearinina D.

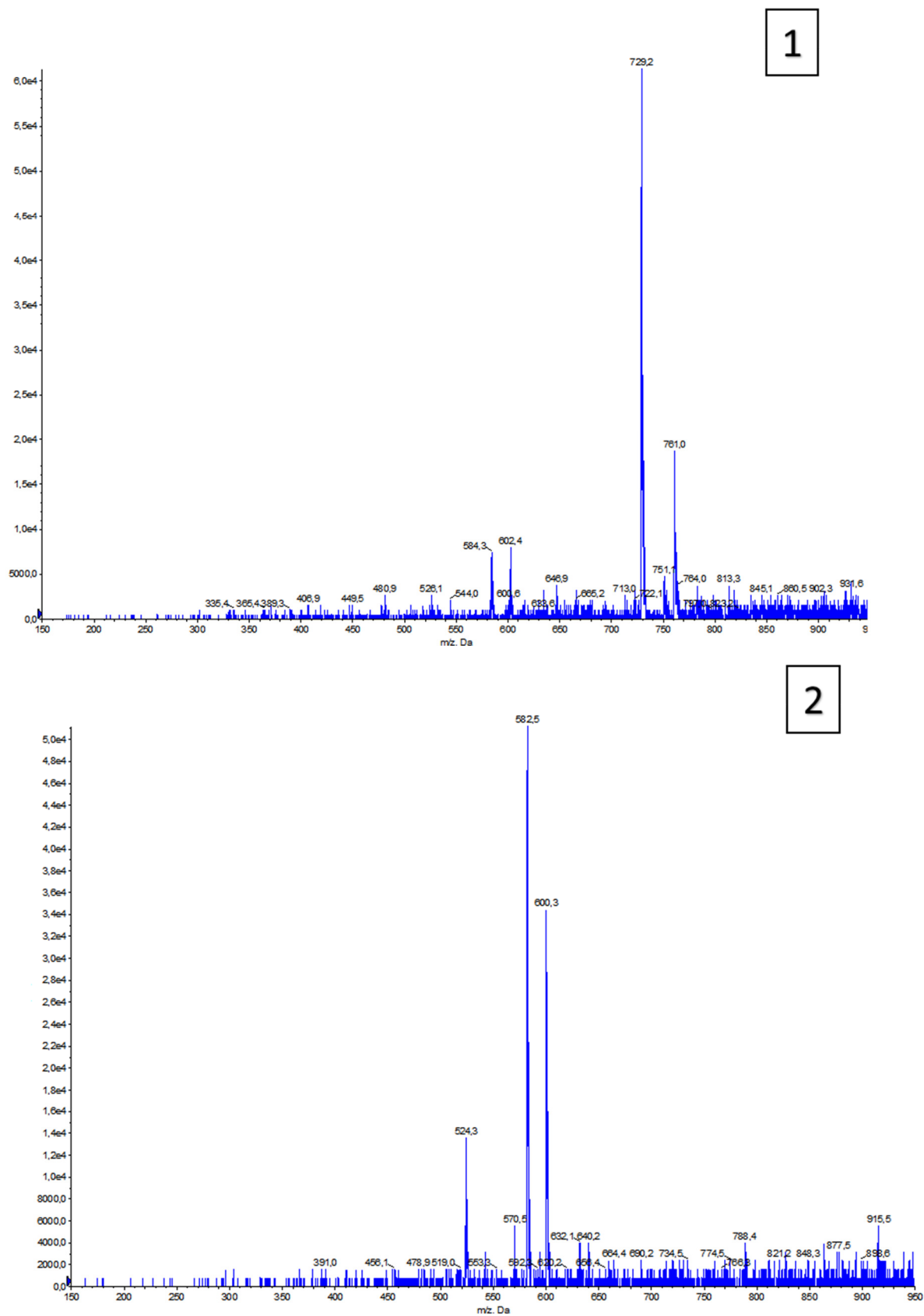


Figura 5-46 - Espectro de massas das substâncias melinacidina IV (1) e shearinina D (2)

5.6 - Cocultivo entre *E. weberi* (LESF 034) e uma levedura negra

Este experimento foi realizado a fim de verificar a especificidade de *E. weberi*, isto é, em avaliar a produção e e/ou superexpressão de seus fatores de virulência (melinacidina IV e shearinina D) frente a outros fungos, que não o micro-organismo simbiote. Para isso, realizou-se o cocultivo entre *E. weberi* (LESF034) e uma levedura negra isolada dos ninhos de *Atta sexdens* pelo Prof. André Rodrigues.

Os cromatogramas obtidos para cultura axênica e de cocultivo estão mostrados na Figura 5-47.

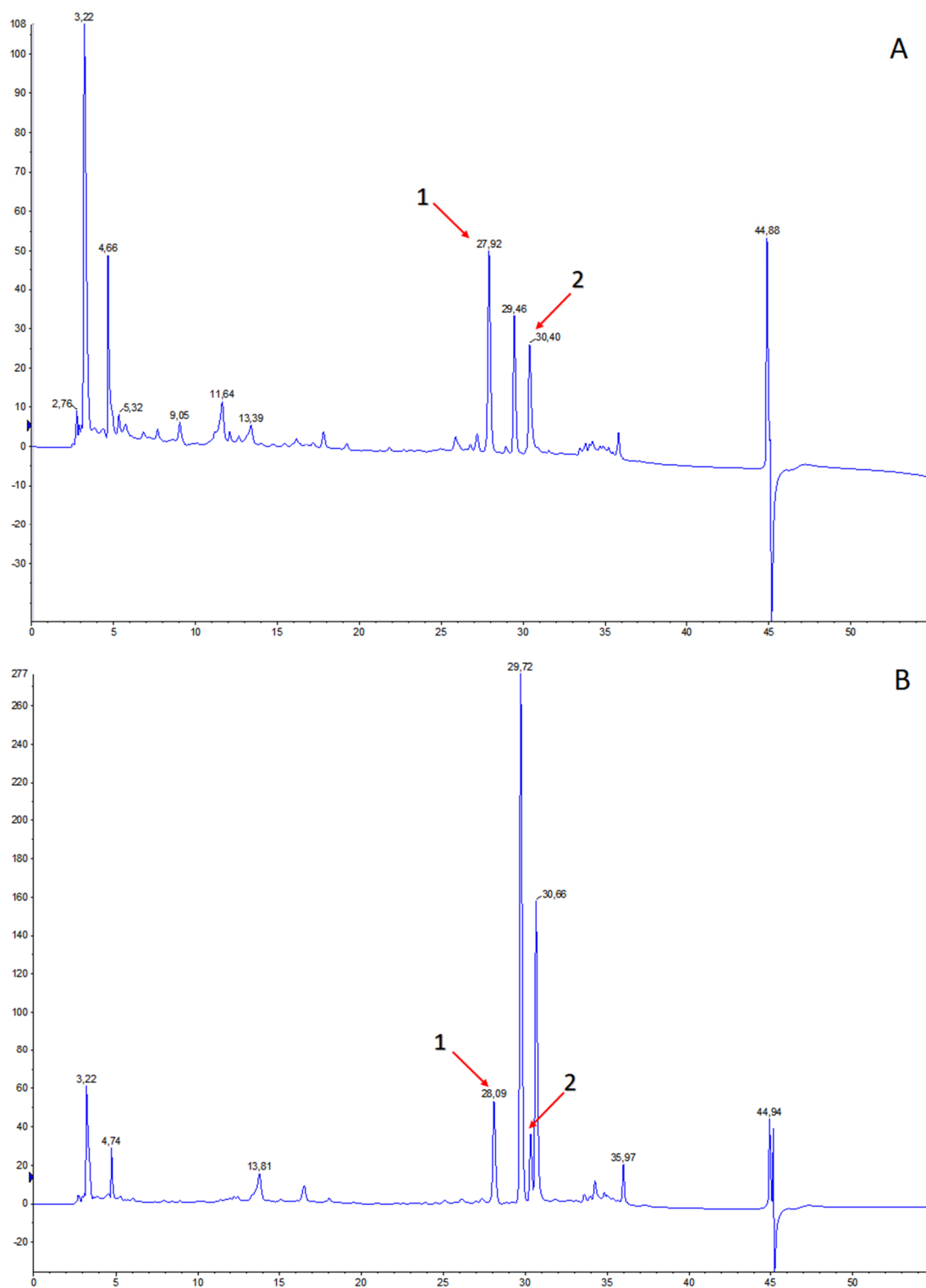


Figura 5-47 – Cromatogramas (254 nm) de A) cultura axênica de *E. weberi* (LESF034) e B) cocultivo com uma levedura negra; em que 1: melinacidina IV, 2: shearinina D

Como pode ser visto nos cromatogramas acima, *E. weberi* (LESF034) não tem a expressão dos metabólitos shearinina D e melinacidina IV aumentada em presença de outros micro-organismos, uma vez que a intensidade dos picos se mantém praticamente inalterada. Isso indica que os fatores de virulência de *E. weberi* podem ser específicos a micro-organismos do gênero *Leucoagaricus*.

5.7 - Ensaio dos metabólitos isolados frente a catepsina V

Apesar de não possuir relação direta com os estudos realizados anteriormente, decidiu-se ensaiar alguns dos metabólitos ensaiados frente à catepsina para testar seu potencial como inibidor enzimático e determinar sua potência inibitória. Esse ensaio foi realizado em parceria com a doutoranda Taynara Lopes Silva e visava buscar novas aplicabilidades para os metabólitos isolados, tal como a possibilidade de serem utilizados como fármacos.

O valor de IC_{50} é definido como concentração de inibidor que provoca uma queda de 50% na atividade da enzima. Este valor é uma convenção criada e utilizada com o objetivo de se comparar a potência entre inibidores.

As substâncias testadas obtiveram os seguintes valores de IC_{50} :

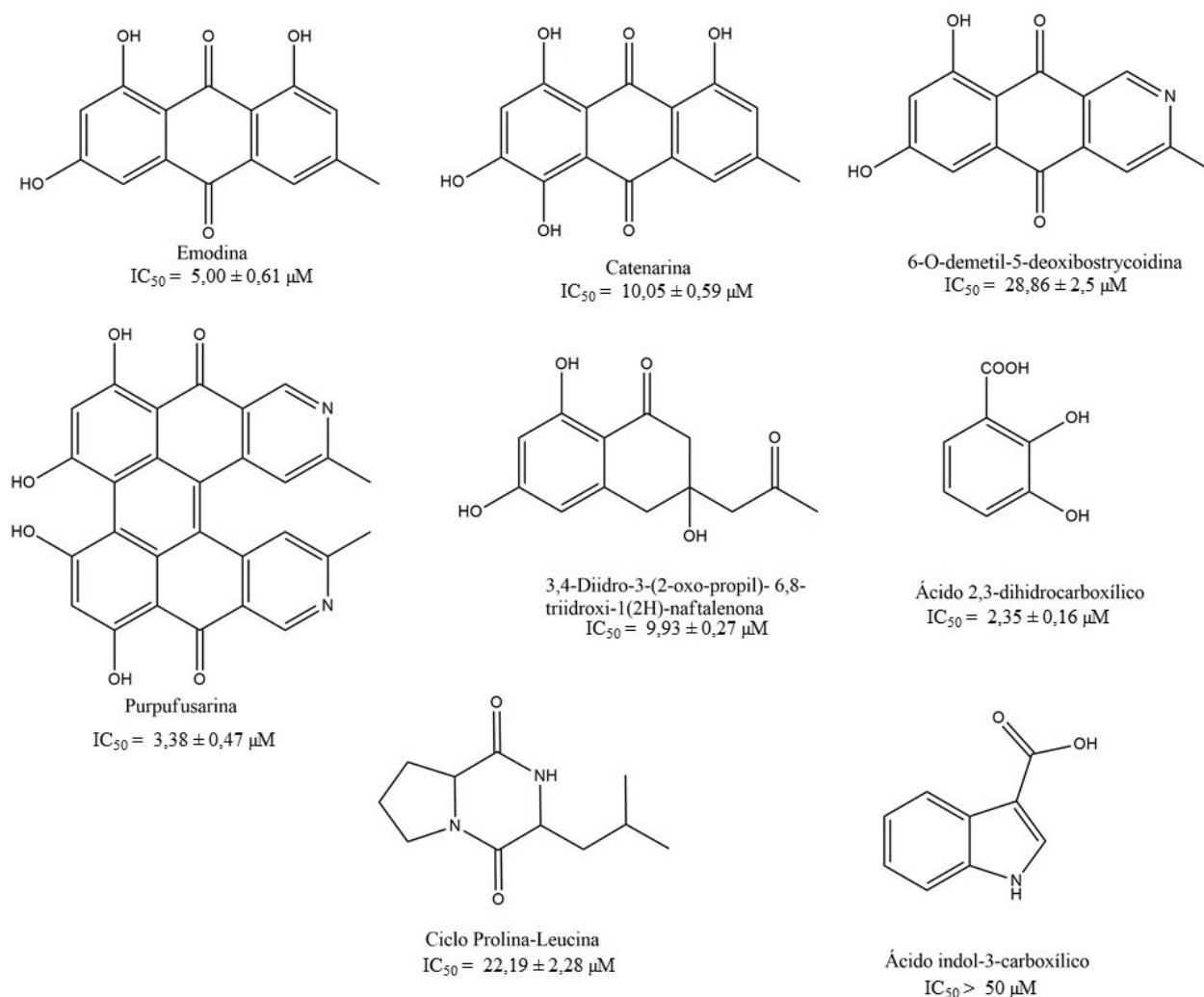


Figura 5-48 - Valores de IC₅₀ (μM) obtido para algumas substâncias isoladas

Os resultados de potência inibitória obtidos mostraram que a antraquinona catenarina teve valor de IC₅₀ dobrado quando comparado à antraquinona emodina. Essa diferença pode ser atribuída a presença da hidroxila na posição 4 da antraquinona catenarina, que fez com o que a sua potência inibitória fosse diminuída. Com relação a substância 6-O-demetil-5-deoxibostrycoidina, esta também apresentou potência inibitória 6 vezes menor quando comparada à emodina, o que indica que a presença do anel fenólico C na emodina ao invés de um anel contendo nitrogênio é importante para inibir a atividade enzimática. Por outro lado, a presença de dois anéis fenólicos na substância purpufusarina fez com que essa

apresentasse um IC_{50} menor comparado à emodina e 6-O-demetil-5-deoxibostrycoidina, ressaltando a importância da presença de anéis fenólicos na inibição enzimática de catepsina V.

O mesmo comportamento é observado em estruturas menores, porém que também contém anéis fenólicos em sua estrutura: 3,4-Diidro-3-(2-oxo-propil)-6,8-triidroxi-1(2H)-naftalenona apresentou uma potência inibitória de 9,93 μM e o ácido 2,3-dihidrocarboxílico, 2,35 μM . Já as substâncias que não contém anéis fenólicos em sua estrutura (ciclo leucina-prolina e ácido indol-3-carboxílico) apresentaram maior valor de IC_{50} , e, portanto, menor potência inibitória.

Assim, vê-se que o ácido 2,3-dihidrocarboxílico (2,35 μM) apresentou maior potência inibitória, seguido por purpurfusarina (3,38 μM), emodina (5,00 μM), 3,4-Diidro-3-(2-oxo-propil)-6,8-triidroxi-1(2H)-naftalenona (9,93 μM), catenarina (10,05 μM), ciclo prolina-leucina (22,2 μM) e ácido indol-3-carboxílico (>50 μM). Portanto, metabólitos microbianos podem ser considerados promissores inibidores de enzimas do tipo proteases, como por exemplo, catepsina V.

7. Conclusões

Através dos estudos realizados, foi possível concluir que os micro-organismos *E. microspora* e *E. weberi* são potenciais produtores de diversos metabólitos secundários, tais como, antraquinonas, aza-antraquinonas, policetídeos, alcalóides, terpenos, etc. Além disso, o perfil químico de cepas de mesmas espécies, porém isoladas de diferentes ninhos tendem a possuir perfil químico bastante semelhante.

Dentre as substâncias ensaiadas frente a micro-organismos do gênero *Leucoagaricus*, a substância emodina apresentou atividade moderada, inibindo o crescimento fúngico do simbiote em 45%. Além desta, a aza-antraquinona 6-O-demetil-5-deoxibostrioidina e o ácido 3-indolcarboxílico ocasionaram uma inibição do crescimento de *L. gongylophorus* em 30 e 85%, respectivamente. Por sua vez, as substâncias shearinina D e melinacidina IV não foram ativas. Desta forma, estes metabólitos emodina, 6-O-demetil-5-deoxibostrioidina e ácido 3-indolcarboxílico podem estar envolvidos na ação direta de ataque de *Escovopsis* ao simbiote.

Experimentos baseados na abordagem OSMAC, epigenética e dereplicação não foram capazes de induzir a expressão de rotas biossintéticas silenciadas em *E. weberi*. Por outro lado, a adição de sal de amônio (NH₄Br) no meio de cultura promoveu a indução de metabólitos em *E. microspora*. Uma explicação plausível para a não-variação do metaboloma de *E. weberi* se deve à sua redução do genoma devido à sua especialização como micoparasita.

Através de experimentos de cocultivo e análises por MALDI-IMG foi possível estabelecer dois fatores de virulência de *Escovopsis* que são super-expressados na presença de seu hospedeiro: shearinina D e melinacidina IV. Apesar de não terem atividade antifúngica, esses compostos apresentaram potente atividade antibacteriana frente a bactérias protetoras do ninho (*P. aeruginosa* e *P. octospinosus*). Assim, concluiu-se que uma das vias utilizadas por *E. weberi* para estabelecer sua virulência, é o ataque indireto às bactérias a fim de reduzir sua população. Curiosamente, *E. weberi* é estimulado a produzir esses compostos quando crescido juntamente com *L. gongylophorus*, revelando um elo evolutivo entre os dois fungos e a bactéria.

A especificidade dos fatores de virulência descobertos foi testada e parece ser específica frente a *L. gongylophorus*. É possível que haja um outro

mecanismo direto de ataque, porém até o presente momento não há na literatura informações adicionais sobre o assunto. Esta é a primeira vez que são reportadas informações sobre os fatores de virulência deste gênero fúngico.

Os experimentos de cocultivos associados a ferramentas de espectrometria de massas (UPLC-HRMS e MALDI-IMG) permitiram detectar e identificar a presença de análogos de shearinina D e melinacidina IV nos extratos de cocultivo de *E. weberi* (ARSEF5574) e *L. gongylophorus* (CBS 627.89).

Os ensaios enzimáticos frente a catepsina V revelaram que os compostos testados apresentaram atividade frente a esta enzima com valores de IC₅₀ na faixa de micromolar baixa, exceto para o ácido indol-3-carboxílico (>50 µM). Através destes ensaios, foi possível concluir que a presença de anéis fenólicos faz com que essas apresentem maior potência inibitória. As potências inibitórias das seguintes substâncias: ácido 2,3-dihidrocarboxílico (2,35 µM), purpurfusarina (3,38 µM), emodina (5,00 µM), 3,4-diidro-3-(2-oxo-propil)-6,8-triidroxi-1(2H)-naftalenona (9,93 µM), catenarina (10,05 µM), ciclo prolina-leucina (22,2 µM) permitem concluir que micro-organismos são também importantes fontes potenciais de inibidores enzimáticos.

8. Referências bibliográficas

ADAMCZESKI, M.; REED, A. R. & CREWS, P. New and known diketopiperazines from the caribbean sponge, *Calyx cf. podatypa*. Journal of Natural Products, 58 (2): 201, 1995.

ARGOUEDELIS, A D. & MIZSAK, S. A. Melinacidins II, III, and IV structural studies. Journal of Antibiotics, 1595: 468, 1977.

AUGUSTIN, J.O., GROENEWALD, J.Z., NASCIMENTO, R.J., MIZUBUTI, E.S.G. & BARRETO, R.W. Yet more “weeds” in the garden: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. PLoS ONE, 8 (12): 82265, 2013.

AUGUSTIN, J. O., SIMÕES, T. G., DIJKSTERHUIS, J., ELLIOT, S. L., & EVANS, H. C.. Putting the waste out: a proposed mechanism for transmission of the mycoparasite *Escovopsis* between leafcutter ant colonies. Royal Society Open Science, 4 (5): 161013, 2017.

BILLS, G. F.; PLATAS, G.; FILLOLA, A.; JIMÈNEZ, M. R.; COLLADO, J.; VICENTE, F.; MARTIN, J.; GONZÁLEZ, A.; BUR-ZIMMERMANN, L.; TORMO, J. R. & PELÁEZ, F. Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from filamentous fungi by growth on nutritional arrays. Journal of Applied Microbiology, 104 (6): 1644, 2008.

BODE, H. B.; BETHE, B.; HÖFS, R. & ZEECK, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature’s chemical diversity. ChemBioChem, 3(7): 619, 2002.

BOYA P., C. A.; FERNÁNDEZ-MARÍN , H.; MEJÍA, L. C.; SPADAFORA, C.; DORRESTEIN, P. C. & GUTIÉRREZ, M. Imaging mass spectrometry and MS/MS molecular networking reveals chemical interactions among cuticular bacteria and pathogenic fungi associated with fungus-growing ants. Scientific Reports, 7(1): 5604, 2017.

CAFARO, M. J., POULSEN, M., LITTLE, A. E. F., PRICE, S. L., GERARDO, N. M., WONG, B., STUART, A. E., LARGET, B., ABBOT, P. & CURRIE, C. Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, **278**: 1814, 2011.

CARR, G. DERBYSHIRE, E. R.; CALDERA, E.; CURRIE, C. R. & CLARDY, J. Antibiotic and antimalarial quinones from fungus-growing ant-associated

Pseudonocardia sp. Journal of Natural Products, 75 (10): 1806, 2012.

CHUKWUJEKWU, J. C.; COOMBES, P. H.; MULHOLLAND, D. A. & VAN STADEN, J. Emodin, an antibacterial anthraquinone from the roots of *Cassia occidentalis*. South African Journal of Botany, 72 (2): 295, 2006.

CICHEWICZ, R. H. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. Nat. Prod. Rep., 27 (1): 11, 2010.

COPELAND, R. A. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013.

CURRIE, C. R., SCOTT, J. A., SUMMERBELL, R. C. & MALLOCH, D. Erratum: fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. Nature, 398 (6729): 701, 1999.

CURRIE, C. R. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. Oecologia, 128(1): 99, 2001.

CURRIE, C. R. Ancient Tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. Science, 299 (5605): 386, 2003.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G. & MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(14): 7998, 1999.

CURRIE, C. R. & STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 268 (471): 1033, 2001.

DANIELSEN, K.; AKSNES, D. W. & FRANCIS, G. W. NMR study of some anthraquinones from rhubarb. Magnetic Resonance in Chemistry, 30(4): 359, 1992.

DE MAN, T. J. B.; STAJIH, J. E.; KUBICEK, C. P.; TEILING, C.; CHENTHAMARA, K. ATANASOVA, L. DRUZHININA, I. S.; LEVENKOVA, N.; BIRNBAUM, S. S. L.; BARRIBEAU, S. M.; BOZICK, B. A.; SUEN, G.; CURRIE, C. R. & GERARDO, N. M. Small genome of the fungus *Escovopsis weberi*, a specialized disease agent of ant agriculture. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(13): 3567, 2016.

DHODARY, B.; SCHILG, M.; WIRTH, R. & SPITELLER, D. Secondary metabolites from *Escovopsis weberi* and their role in attacking the garden fungus of leaf-cutting ants. Chemistry - A European Journal, 24(17): 4445, 2018.

EBERL, L. & VANDAMME, P. Members of the genus *Burkholderia*: good and bad guys. F1000Research, 5 :1007, 2016.

FILL, T. P.; PALLINI, H. F.; AMARAL, L. S.; SILVA, J. V.; BIDÓIA, D. L.; PERON, F.; GARCIA, F. P.; NAKAMURA, C. V. & RODRIGUES-FILHO, E. Copper and manganese cations alter secondary metabolism in the fungus *Penicillium brasilianum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(8): 1444, 2016.

FISCH, K. M.; GILLASPY, A. F.; GIPSON, M.; HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; JACKSON, L.; NAJAR, F. Z.; WÄGELE, H. & CICHEWICZ, R. H. Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(9): 1199, 2009.

FRANSEN, R. J. N.; RASMUSSEN, S. A., KNUDSEN, P. B., UHLIG, S., PETERSEN, D., LYSØE, E., GOTFREDSEN, C. H. & GIESE, H. Black perithecial pigmentation in *Fusarium* species is due to the accumulation of 5-deoxybostrycoidin-based melanin. *Scientific Reports*, 6(1): 26206, 2016.

FREITAG, S.; FELDMANN, J.; RAAB, A.; CRITTENDEN, P. D.; HOGAN, E. J.; SQUIER, A. H.; BOYD, K. G. & THAIN, S. Metabolite profile shifts in the heathland lichen *Cladonia portentosa* in response to N deposition reveal novel biomarkers. *Physiologia Plantarum*, 146(2): 160, 2012.

GANIHIGAMA, D. U.; SURERAM, S.; SANGHER, S.; HONGMANEE, P.; AREE, T.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S. & KITTA KOOP, P. Antimycobacterial activity of natural products and synthetic agents: pyrrolodiquinolines and vermelhotin as anti-tubercular leads against clinical multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Med Chem*. 89:1, 2014.

GRAUPNER, K.; SCHERLACH, K.; BRETSCHEIDER, T.; LACKNER, G.; ROTH, M.; GROSS, H. & HERTWECK, C. Imaging mass spectrometry and genome mining reveal highly antifungal virulence factor of mushroom soft rot pathogen. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51(52):1317, 2012.

GU, Z.; MA, J.; ZHAO, X. G.; WU, J. & ZHANG, D. Reduction of nitriles to amines in positive ion electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(19): 2969, 2006.

HAEDER, S., WIRTH, R., HERZ, H. & SPITELLER, D. Candididin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(12): 4742, 2009.

HEMPHILL, C. F. P.; SUREECHATCHAIYAN, P.; KASSACK, M. U.; ORFALI, R. S.; LIN, W.; DALETOS, G. & PROKSCH, P. OSMAC approach leads to

new fusarielin metabolites from *Fusarium tricinctum*. The Journal of Antibiotics, 70(6): 726, 2017.

HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; JOYNER, P. M. & CICHEWICZ, R. H. A chemical epigenetics approach for engineering the in situ biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. Org. Biomol. Chem., 7(3): 435, 2009.

HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. Nature chemical biology, 5 (7): 450, 2009.

HOLMES, N. A.; INNOCENT, T. M.; HEINE, D.; BASSAM, M. A.; WORSLEY, S. F.; TROTTMANN, F.; PATRICK, E. H.; YU, D. W.; MURRELL, J. C.; SCHIØTT, M.; WILKINSON, B., BOOMSMA, J. J & HUTCHINGS, M. I. Genome analysis of two *Pseudonocardia* phylotypes associated with *Acromyrmex* leafcutter ants reveals their biosynthetic potential. Frontiers in Microbiology, 7, 26 dez. 2016.

ISAKA, M.; YANGCHUM, A.; RACHTAWEE, P.; KHOYAIKLANG, P.; BOONYUEN, N. & LUMYONG, S. Dihydronaphthalenones from the endophytic fungus *Botryosphaeria* sp. BCC 8200. Phytochemistry Letters, 2(4): 207, 2009.

JOHNSON, L. Iron and siderophores in fungal–host interactions. Mycological Research, 112(2): 170, 2008.

KAVITHA, A.; PRABHAKAR, P.; VIJAYALAKSHMI, M. & VENKATESWARLU, Y. Purification and biological evaluation of the metabolites produced by *Streptomyces* sp. TK-VL_333. Research in Microbiology, 161(5): 335, 2010.

KLITGAARD, A.; IVERSEN, A.; ANDERSEN, M. R.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C. & NIELSEN, K. F. Aggressive dereplication using UHPLC-DAD-QTOF: screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406(7): 1933, 2014.

KOMINAMI, E.; KUNIO, I. & KATUNUMA, N. Activation of the intramyofibrillar autophagic-lysosomal system in muscular dystrophy. The American Journal of Pathology, 127(3): 461, 1987.

KÖNIG, C.; SCHERLACH, K.; SCHROECKH, V.; HORN, F.; NIETZSCHE, S.; BRAKHAGE A. A. & HERTWECK, C. Bacterium Induces cryptic meroterpenoid pathway in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. ChemBioChem, 14(8): 938, 2013.

KUMAR, N., MOHANDAS, C. & NAMBISAN, B. Purification of an antifungal compound, cyclo(l-Pro-d-Leu) for cereals produced by *Bacillus cereus*

subsp. *thuringiensis* associated with entomopathogenic nematode. *Microbiol Res.* 168(5):278, 2013.

KWAK, H. J.; PARK, M. J.; PARK, C. M.; MOON, S.I.; YOO, D. H.; LEE, H. C.; LEE, S. H.; KIM, M.S.; LEE, H. W.; SHIN, W.S.; PARK, I. C.; RHEE, C. H & HONG, S. I. Emodin inhibits vascular endothelial growth factor-A-induced angiogenesis by blocking receptor-2 (KDR/FIk-1) phosphorylation. *International Journal of Cancer*, 118(11): 2711, 2006.

LEAL, I. R. & OLIVEIRA, P. S. Foraging ecology of attine ants in a Neotropical savanna: seasonal use of fungal substrate in the cerrado vegetation of Brazil. *Insectes Sociaux*, 47 (4): 376, 2000.

LECAILLE, F.; KALETA, J. & BRÖMME, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chemical Reviews*, 102(12): 4459, 2002.

LEE, S. U.; SHIN, H. K. & MIN, Y. I. Emodin accelerates osteoblast differentiation through phosphatidylinositol 3-kinase activation and bone morphogenetic protein-2 gene expression. *International Immunopharmacology*, 8(5): 741, 2008.

LI, H. L.; CHEN, H. L.; LI, H.; ZHANG, K. L.; CHEN, X. Y.; WANG, X. W.; KONG, Q. Y. & LIU, J. Regulatory effects of emodin on NF- κ B activation and inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *International Journal of Molecular Medicine*, 16(1):41, 2005.

LIU, C. H.; MENG, J. C.; ZOU, W. X.; HUANG, L. L.; TANG, H. Q. & TAN, R. X. Antifungal metabolite with a new carbon skeleton from *Keissleriella* sp. YS4108, a marine filamentous fungus. *Planta Medica*, 68(4): 363, 2002.

LIN L. C.; CHOU, C. J. & KUO, Y. C. Cytotoxic principles from *Ventilago leiocarpa*. *J Nat Prod.*, 64(5):674, 2001.

LÓPEZ-GARRIDO, J.; COTA, I. & CASADESÚS, J. Epigenetic gene regulation in bacteria. In: *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012.

MARMANN, A.; ALY, A. H.; LIN, W.; WANG, B. & PROKSCH, P. Co-cultivation—a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Marine Drugs*, 12(2): 1043, 2014.

MOREIRA, S. M.; RODRIGUES, A.; FORTI, L. C. & NAGAMOTO, N. S. Absence of the parasite *Escovopsis* in fungus garden pellets Carried by Gynes of *Atta*

sexdens. *Sociobiology*, 62(1): 34, 2015.

MUCHOVEJ, J. J. & DELLA LUCIA, T. M. C. *Escovopsis*, a new genus from leaf cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomen invalidum. *Mycotaxon*, **37**: 191, 1990.

MUELLER, U. G. The evolution of agriculture in ants. *Science*, 281(5385): 2034, 1998.

MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M. & MALLOCH, D. The origin of the attine ant-fungus mutualism. *The Quarterly Review of Biology*, 76(2): 169, 2001.

NOVINEC, M.; PAVŠIČ, M. & LENARČIČ, B. A simple and efficient protocol for the production of recombinant cathepsin V and other cysteine cathepsins in soluble form in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 82 (1): 1, 2012.

OTTO, H.-H. & SCHIRMEISTER, T. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chemical Reviews*, 97(1): 133, 1997.

PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. J.; FUNGARO, M. H.; BUENO, C. O.; HEBLING, M. J.; SANT'ANNA, A. & CAPELARI, M. RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by the leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus fallax*. *Mycological Research*, 105(2) 173, 2001.

PALERMO, C. & JOYCE, J. A. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(1): 22, 2008.

PANSANIT, A.; PARK, E. J.; KONDRATYUK, T. P.; PEZZUTO, J. M.; LIRDPRAPAMONGKOL, K. & KITTAKOOP, P. Vermelhotin, an anti-inflammatory agent, suppresses nitric oxide production in RAW 264.7 cells via p38 inhibition. *J Nat Prod*. 76(9):1824, 2013.

PARISOT, D.; DEVYS, M. & BARBIER, M. 6-O-demethyl-5-deoxybostrycoidin, A 2-aza-anthraquinone produced by the fungus *Nectria haematococca*. *Phytochemistry*, 29(10): 3364, 1990.

REYNOLDS, H. T. & CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: the parasite of the Attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. *Mycologia*, 96(5): 955, 2004.

ROBERTSON, J. G. Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. *Biochemistry*, 44(15): 5561, 2005.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. J.; HEBLING, M. J.;

BUENO, O. C. & PFENNING L. H. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. *Folia Microbiol*, 50(5): 421, 2005.

RODRIGUES, A.; BACCI, M. J.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A. & PAGNOCCA, F. C. Microfungal "weeds" in the leafcutter ant symbiosis. *Microbial Ecology*, 56(4): 604, 2008.

SANDHOLT, I. S.; OLSEN, B. B.; GUERRA, B. & ISSINGER, O. G. Resorufin: a lead for a new protein kinase CK2 inhibitor. *Anti-Cancer Drugs*, 20(4): 238, 2009.

SANTOS, A. V.; DILLON, R. J.; DILLON, V. M.; REYNOLDS, S. E. & SAMUELS, R. I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 239(2): 319, 2004.

SCHÄBERLE, T. F.; ORLAND, A. & KÖNIG, G. M. Enhanced production of undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* by co-cultivation with the corallopyronin A-producing myxobacterium, *Coralloccoccus coralloides*. *Biotechnology Letters*, 36(3): 641, 2014.

SCHERLACH, K.; LACKNER, G.; GRAUPNER, K.; PIDOT, S.; BRETSCHNEIDER, T. & HERTWECK, C. Biosynthesis and mass spectrometric imaging of tolaasin, the virulence factor of brown blotch mushroom disease. *ChemBioChem*, 14(18): 2439, 2013.

SCHERLACH, K. & HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 7(9): 1753, 2009.

SCHOENIAN, I.; SPITELLER, M.; GHASTE, M.; WIRTH, R.; HERZ, H. & SPITELLER, D. Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(5): 1955, 2011.

SCHROECKH, V.; SCHERLACH, K.; NÜTZMANN, H. W.; SHELEST, E.; SCHMIDT-HECK W.; SCHUEMANN, J.; MARTIN, K.; HERTWECK, C. & BRAKHAGE, A. A. Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34): 14558, 2009.

SCHULTZ, T. R. Ants, plants and antibiotics. *Nature*, 398(6730): 747, 1999.

SMETANINA, O. F.; KALINOVSKY, A. I.; KHUDYAKOVA, Y. V.; PIVKIN,

M. V.; DMITRENOK, P. S.; FEDOROV, S. N.; JI, H.; KWAK, J. Y. & KUZNETSOVA, T. A. indole alkaloids produced by a marine fungus isolate of *Penicillium janthinellum* biourge. *Journal of Natural Products*, 70(6): 906, 2007.

SMITH, K.; PHATALE, P. A.; BREDEWEG, E. L.; CONNOLLY, L. R.; POMRANING, K. R. & FREITAG, M. Epigenetics of filamentous fungi. in: encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012.

STRADLING, D. J. & POWELL, R. J. The cloning of more highly productive fungal strains: a factor in the speciation of fungus-growing ants. *Experientia*, 42(8): 962, 1986.

SUN, S.; DAI, X.; SUN, J.; BU, X.; WENG, C.; LI, H. & ZHU, H. A diketopiperazine factor from *Rheinheimera aquimaris* QSI02 exhibits anti-quorum sensing activity. *Scientific Reports*, 6(1): 39637, 2016.

TORKAR, A.; LENARČIČ, B.; LAH, T.; DIVE, V. & DEVEL, L. Identification of new peptide amides as selective cathepsin L inhibitors: The first step towards selective irreversible inhibitors? *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(10): 2968, 2013.

TULLBERG, M.; LUTHMAN, K. & GRØTLI, M. Microwave-assisted solid-phase synthesis of 2,5-diketopiperazines: solvent and resin dependence. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 8(6): 915, 2006.

TURK, V.; STOKA, V., VASILJEVA, O., RENKO, M., SUN, T., TURK, B. & TURK, D. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824,(1): 68, 2012.

VALENZUELA, J. G.; FRANCISCHETTI, I. M.; PHAM, V. M.; GARFIELD, M. K. & RIBEIRO; J. M. Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(7): 717, 2003.

VAN WAGONER, R. M.; MANTLE, P. G. & WRIGHT, J. L. C. Biosynthesis of scorpinone, a 2-azaanthraquinone from *Amorosia littoralis*, a fungus from marine sediment. *Journal of Natural Products*, 71(3): 426, 2008.

VARANDA-HAIFIG, S. S; ALBARICI, T. R., NUNES, P. H; HAIFIGI, I.; VIERIA, P. C. & RODRIGUES, A. Nature of the interactions between hypocrealean fungi and the mutualistic fungus of leaf-cutter ants. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(4):

593, 2017.

WANG, F. Z.; WEI, H. J.; ZHU, T. J.; LI, D. H.; LIN, Z. J. & GU, Q. Q. Three new cytochalasins from the marine-derived fungus *Spicaria elegans* KLA03 by supplementing the cultures with L- and D-tryptophan. *Chem Biodivers.* 8(5):887, 2011.

WEBER, N. A. Pure cultures of fungi produced by ants. *Science*, 121(3134): 109, 1955.

WILLIAMS, R. B.; HENRIKSON, J. C., HOOVER A. R., LEE A. E. & CICHEWICZ R. H. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 6(11): 1895, 2008.

XU, M.; GESSNER, G.; LANGE, C.; CHRISTNER, A.; BRUHN, T. DENG, Z.; LI, X.; HEINEMANN, S. H.; GRABLEY, S.; BRINGMANN, G. SATTLER, I. & LIN, W. Shearinines D–K, new indole triterpenoids from an endophytic *Penicillium sp.* (strain HKI0459) with blocking activity on large-conductance calcium-activated potassium channels. *Tetrahedron*, 63(2): 435, 2007.

YASUDA, Y.; KALETA, J. & BROMME, D. The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: Rationale for the design of new therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(7): 973, 2005.

APÊNDICE

1. Emodina

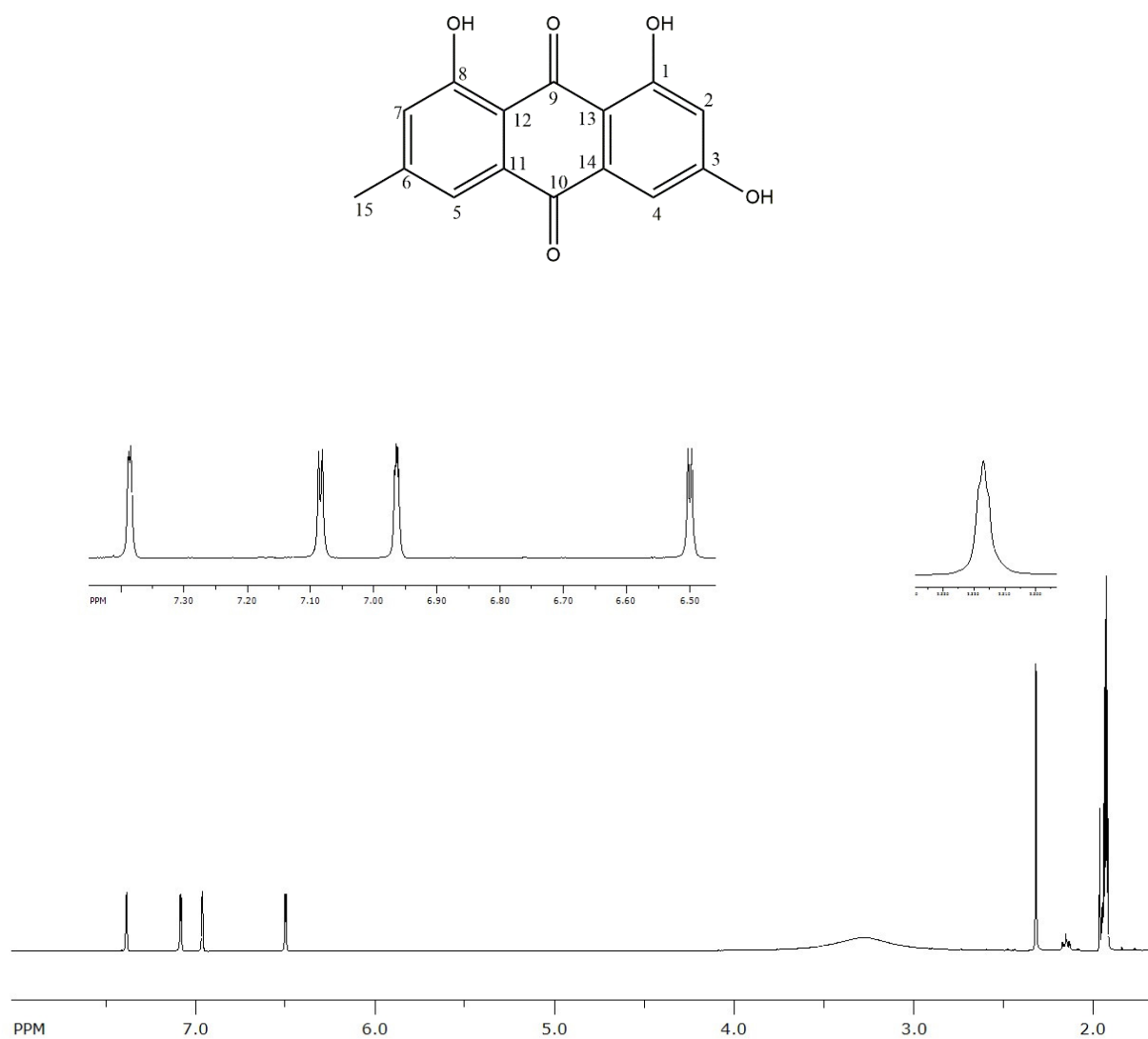


Figura A. 1 Espectro de RMN de ^1H da substância emodina (acetona- d_6 , 400 MHz).

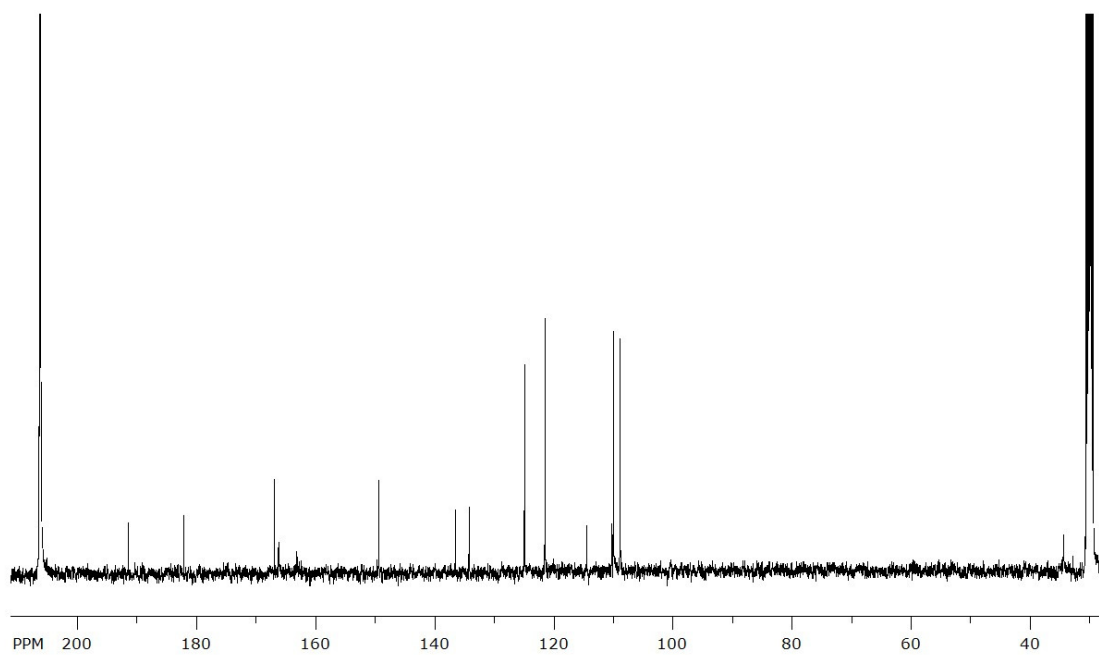


Figura A.2 Espectro de RMN de ^{13}C da substância emodina (acetona- d_6 , 100 MHz).

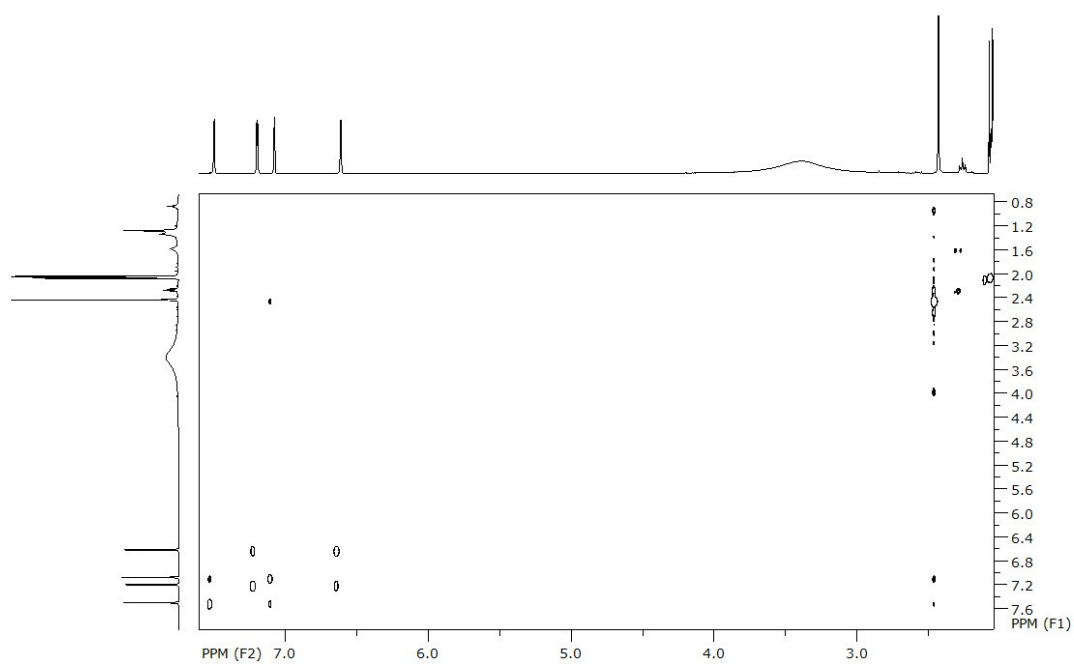


Figura A. 3 Espectro de RMN de COSY da substância emodina (acetona- d_6).

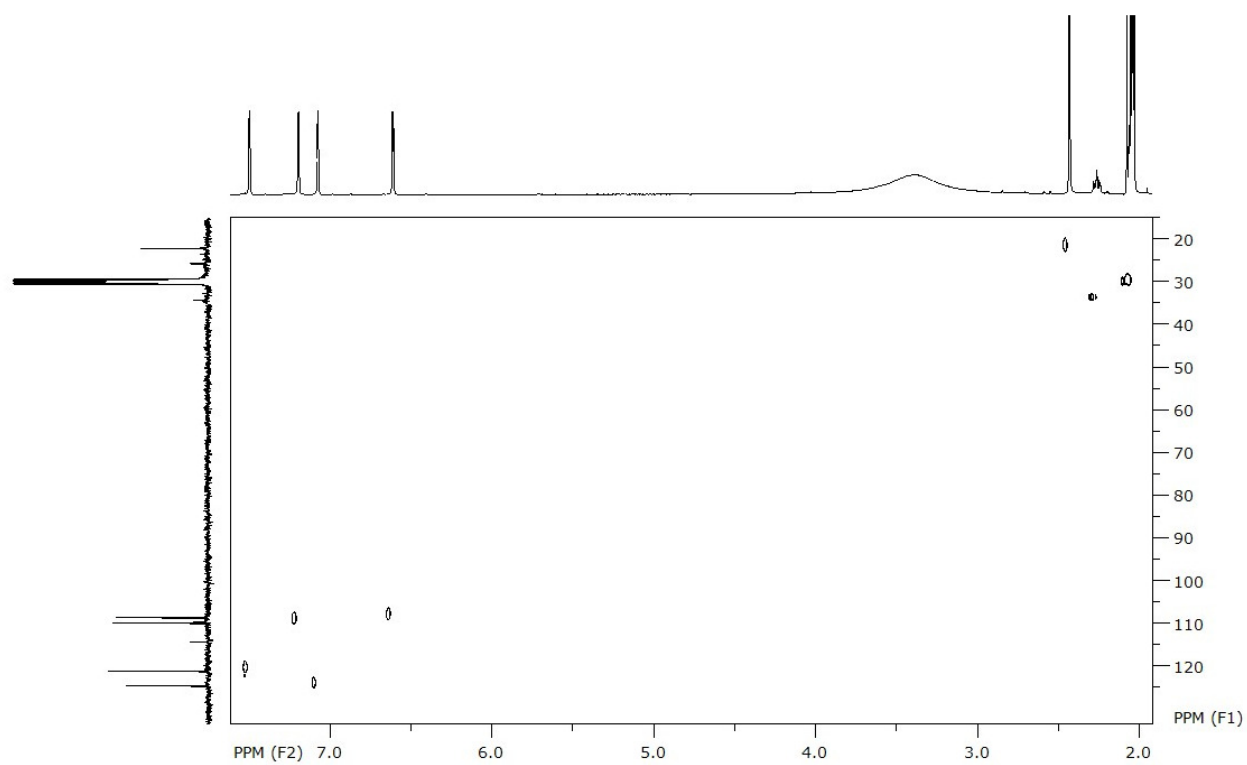


Figura A. 4 Espectro de RMN de HSQC da substância emodina (acetona-d₆).

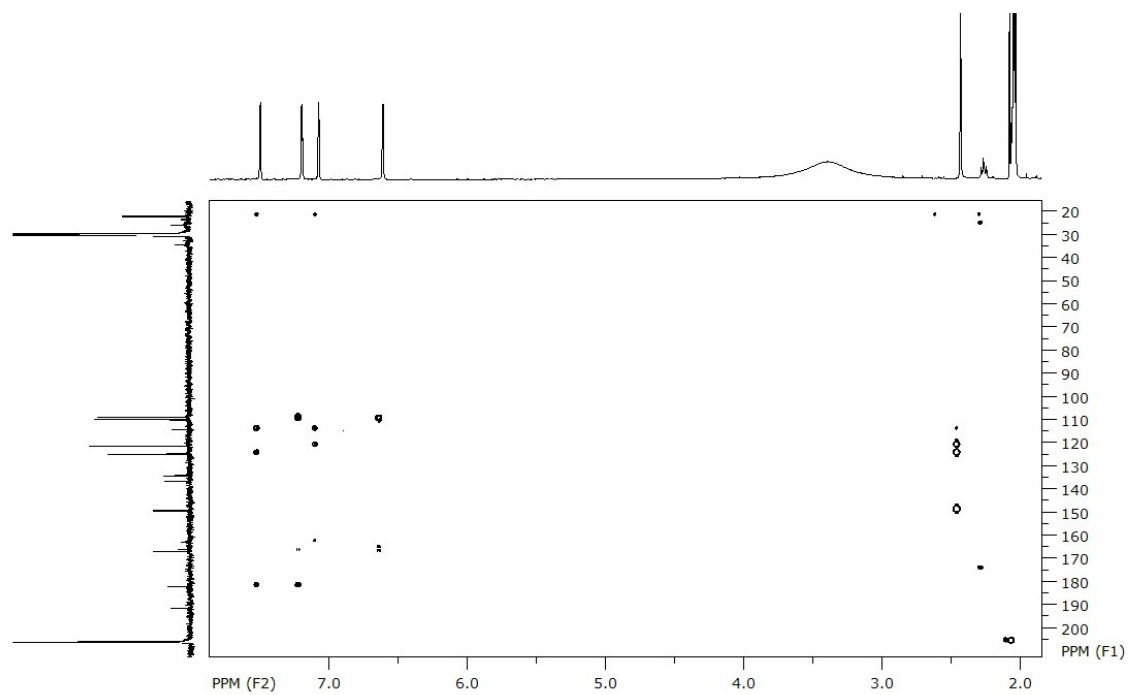


Figura A. 5 Espectro de RMN de HMBC da substância emodina (acetona-d₆).

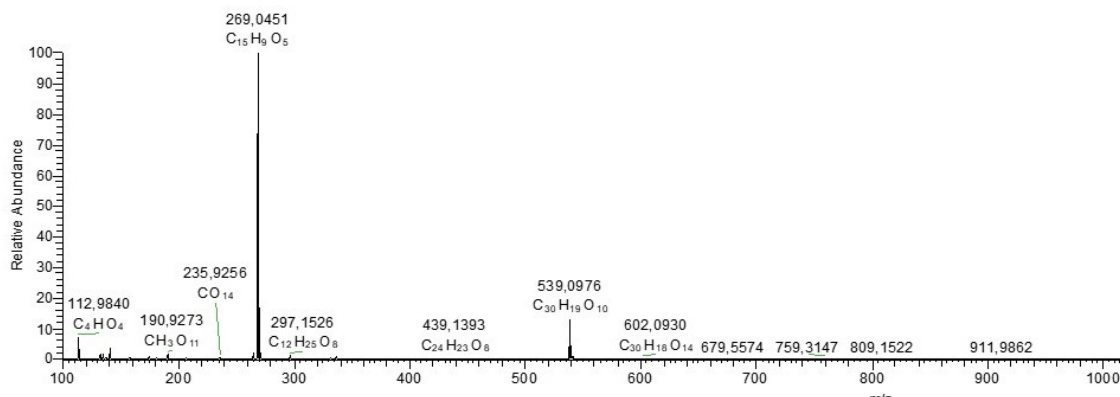


Figura A. 6 Espectro de massas de alta resolução da substância emodina (ESI -).

2. 6-O-demetil-5-deoxibostrycoidina

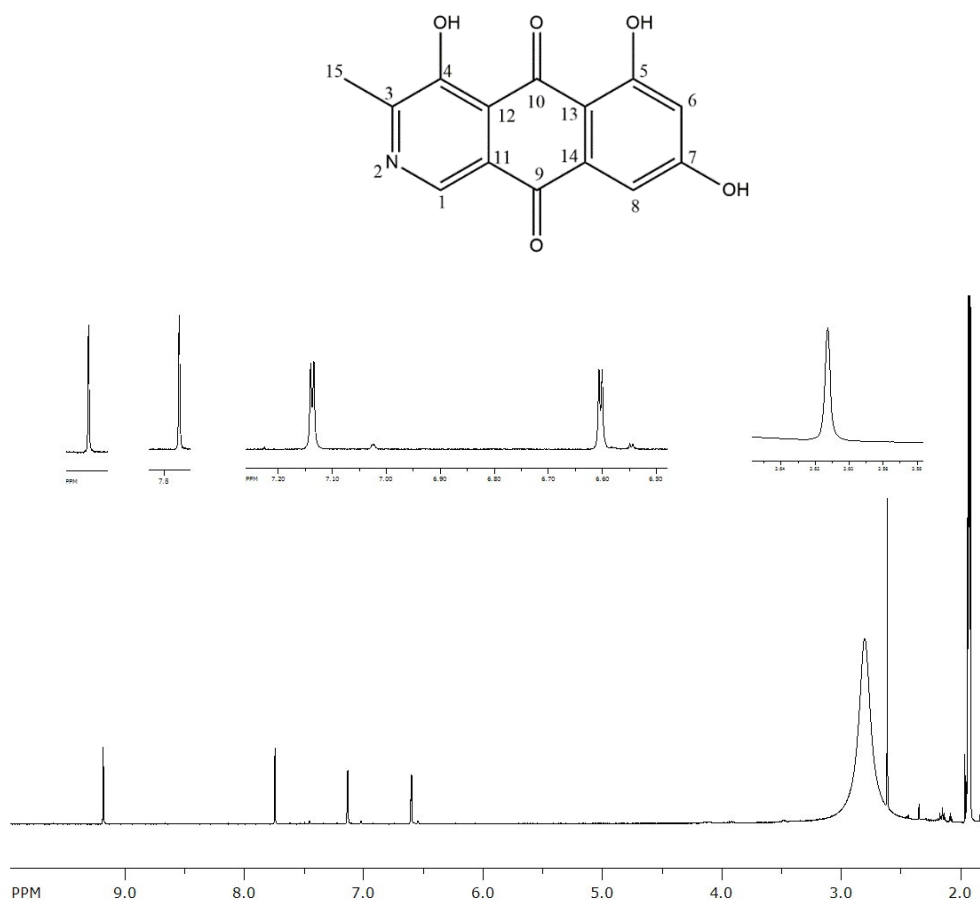


Figura A. 7 Espectro de RMN de ^1H da substância 6-O-demetil-5-deoxibostrycoidina (acetona- d_6 , 400 MHz).

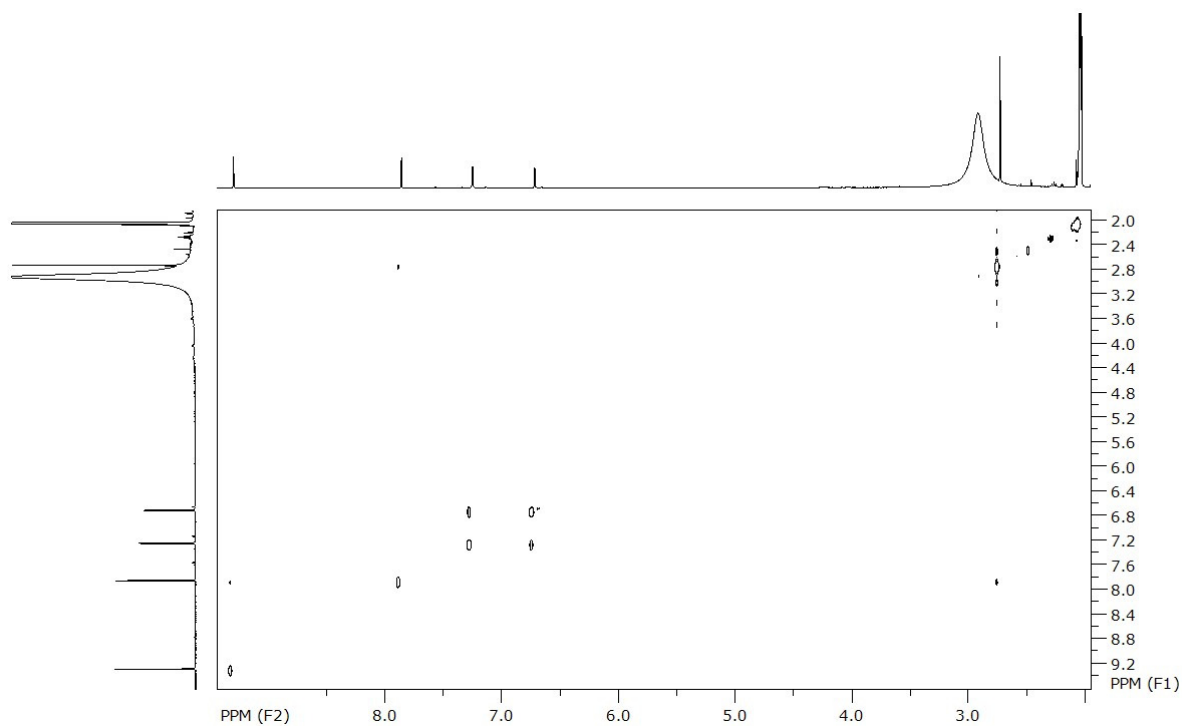


Figura A. 8 Espectro de RMN de COSY da substância 6-O-demetil-5-deoxibostrycoidina (acetona-d₆).

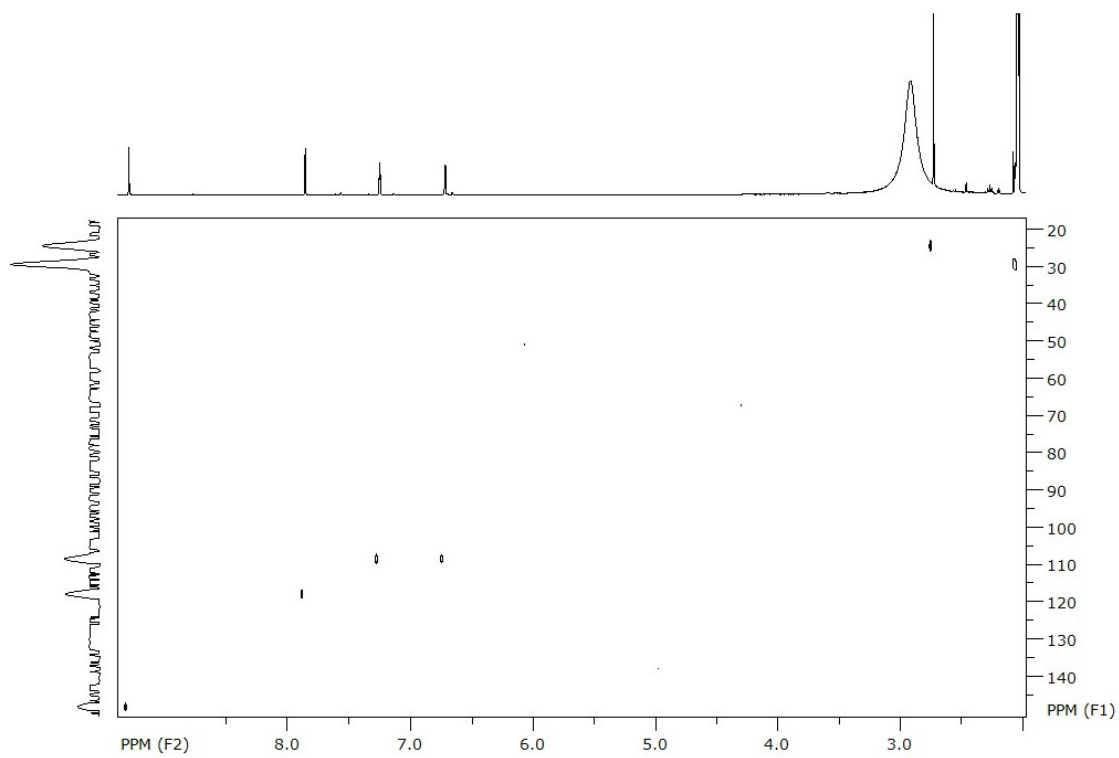


Figura A. 9 Espectro de RMN de HSQC da substância 6-O-demetil-5-deoxibostrycoidina (acetona-d₆).

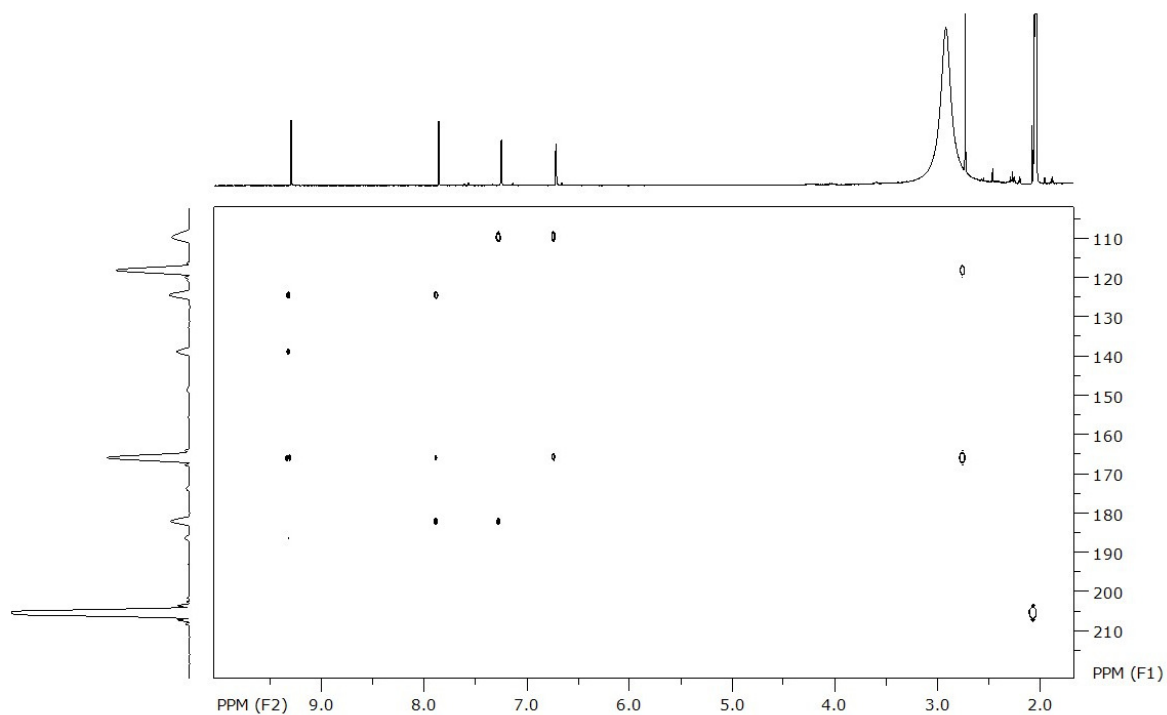


Figura A. 10 Espectro de RMN de HMBC da substância 6-O-demetil-5-deoxybostrycoidina (acetona- d_6).

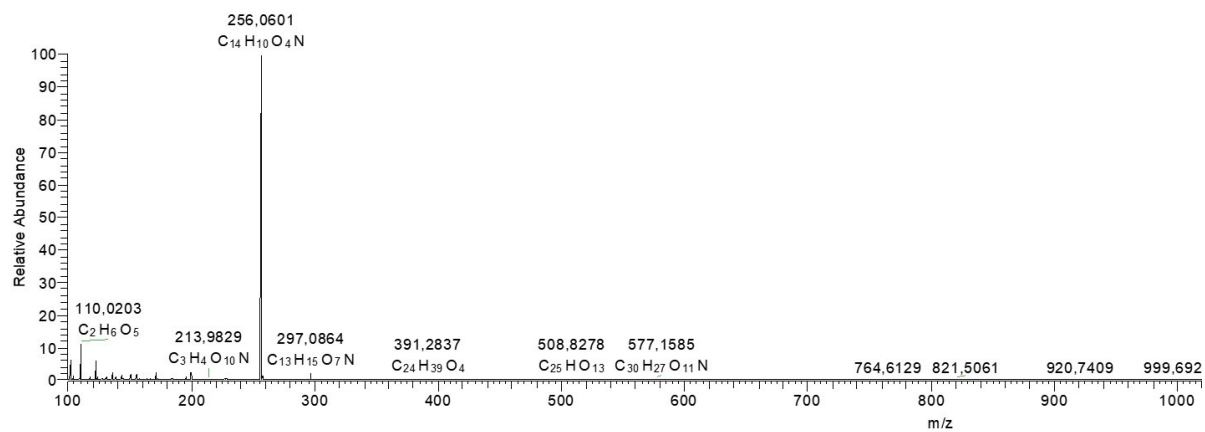


Figura A. 11 Espectro de massas (ESI+) da substância

3. Ácido indol-3-carboxílico

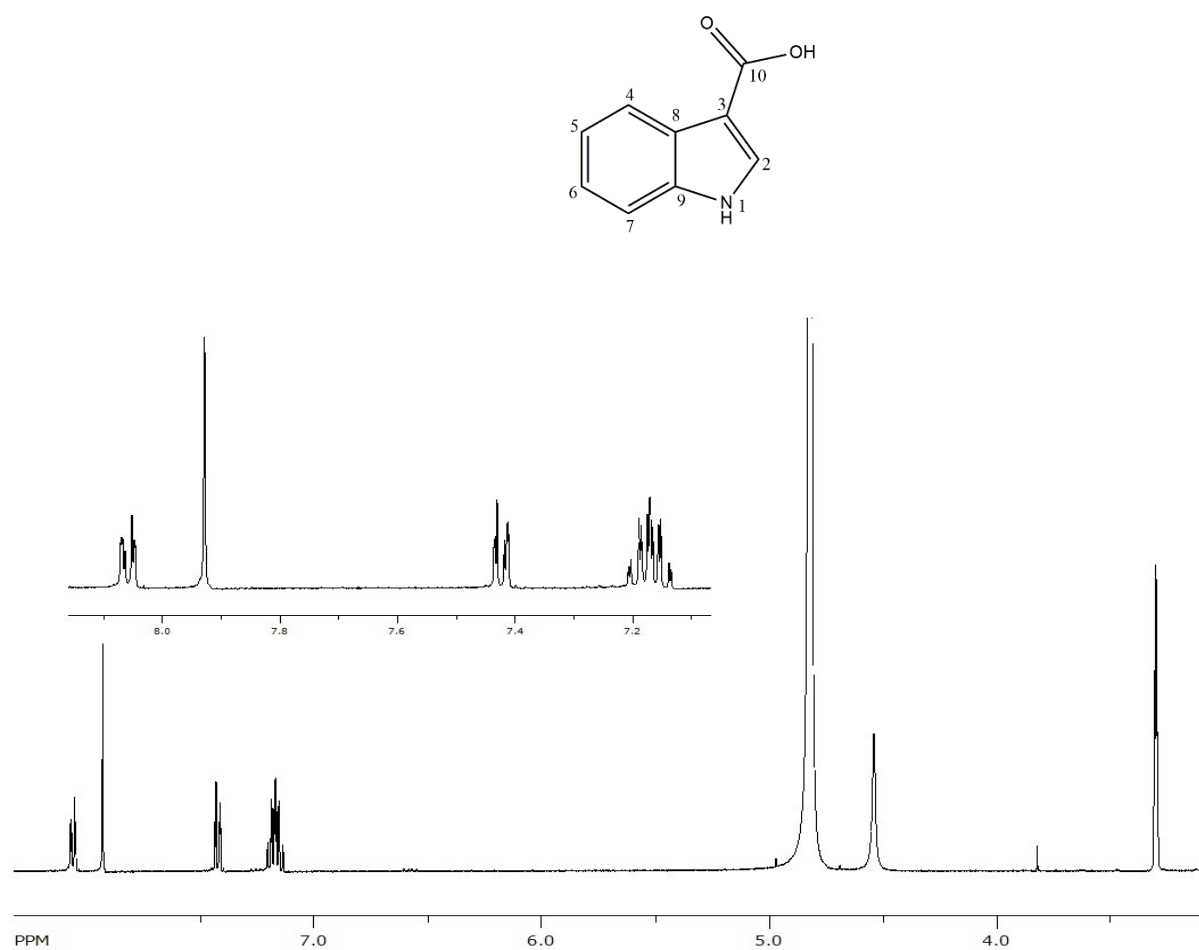


Figura A. 12 Espectro de RMN de ¹H da substância ácido indol-3-carboxílico (CD₃OD, 400 MHz).

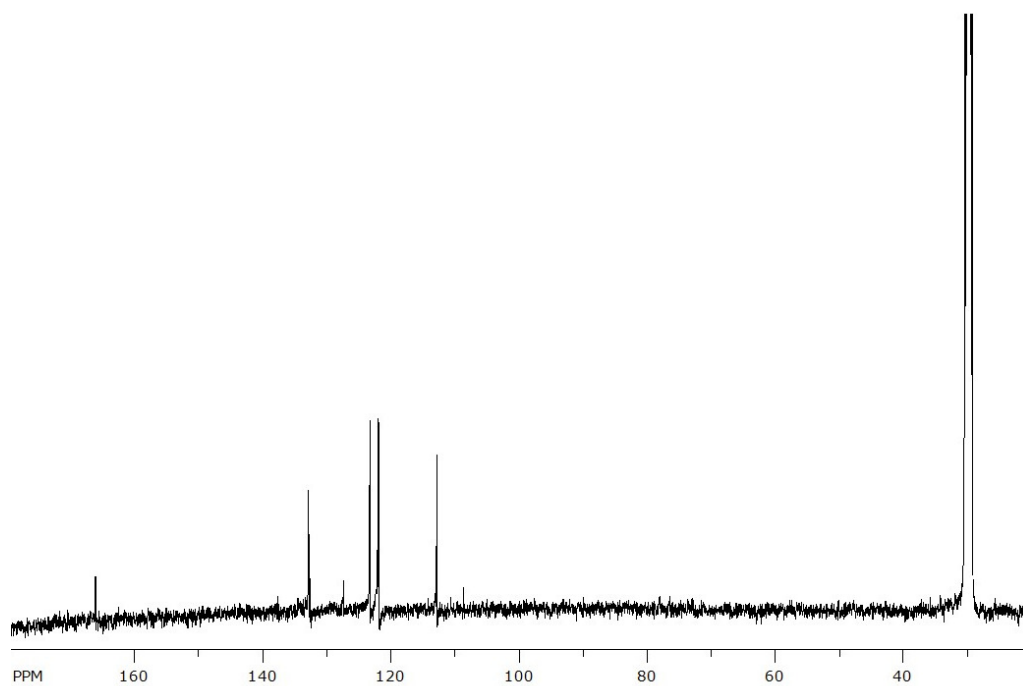


Figura A. 13 Espectro de RMN de ^{13}C da substância ácido indol-3-carboxílico (CD_3OD , 100 MHz).

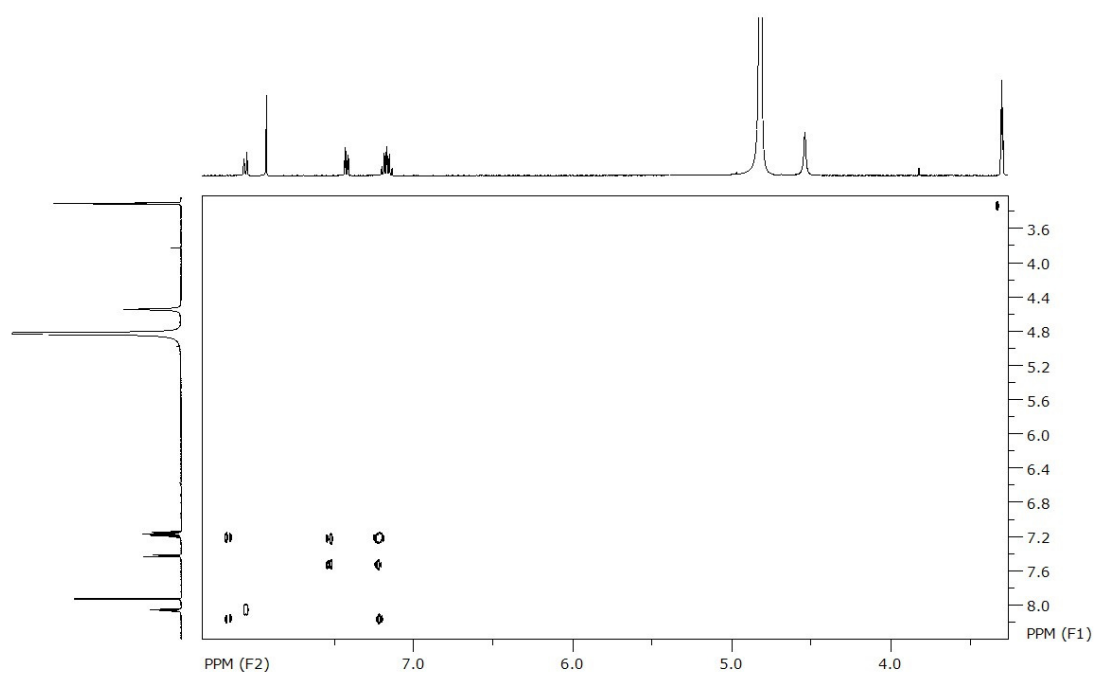


Figura A. 14 Espectro de RMN de COSY da substância ácido indol-3-carboxílico (CD_3OD).

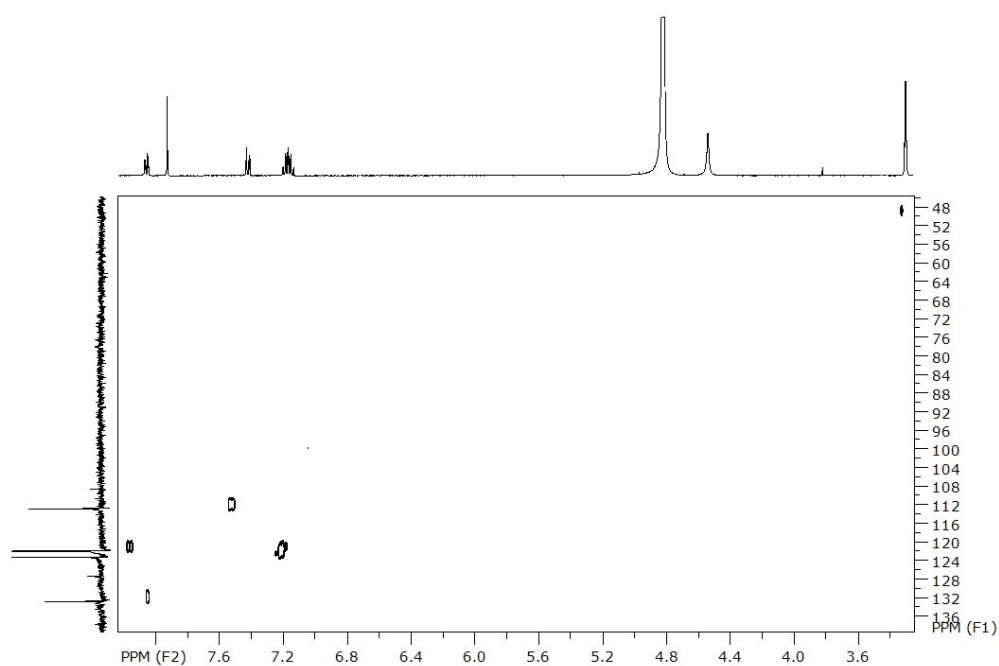


Figura A. 15 Espectro de RMN de HSQC da substância ácido indol-3-carboxílico (CD₃OD).

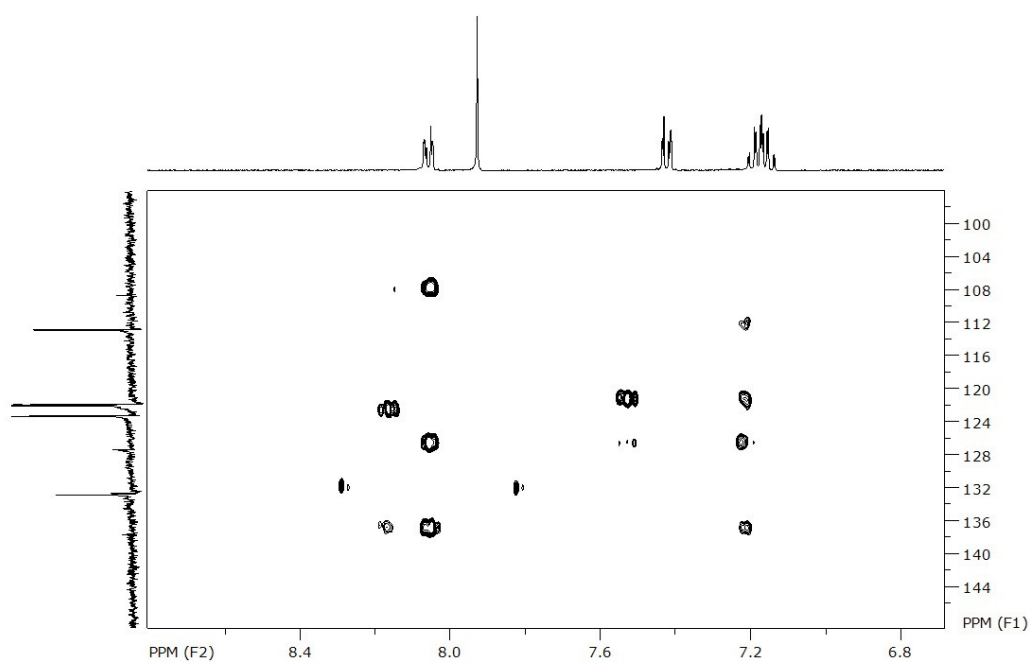


Figura A. 16 Espectro de RMN de HMBC da substância ácido indol-3-carboxílico (CD₃OD).

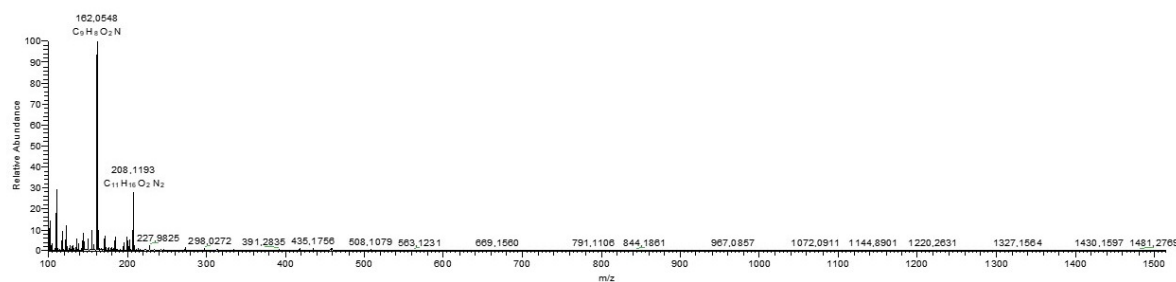


Figura A. 17 Espectro de HRMS da substância ácido indol-3-carboxílico (ESI+).

4. 3,4-Diidro-3-(2-oxo-propil)- 6,8-triidroxi-1(2H)-naftalenona

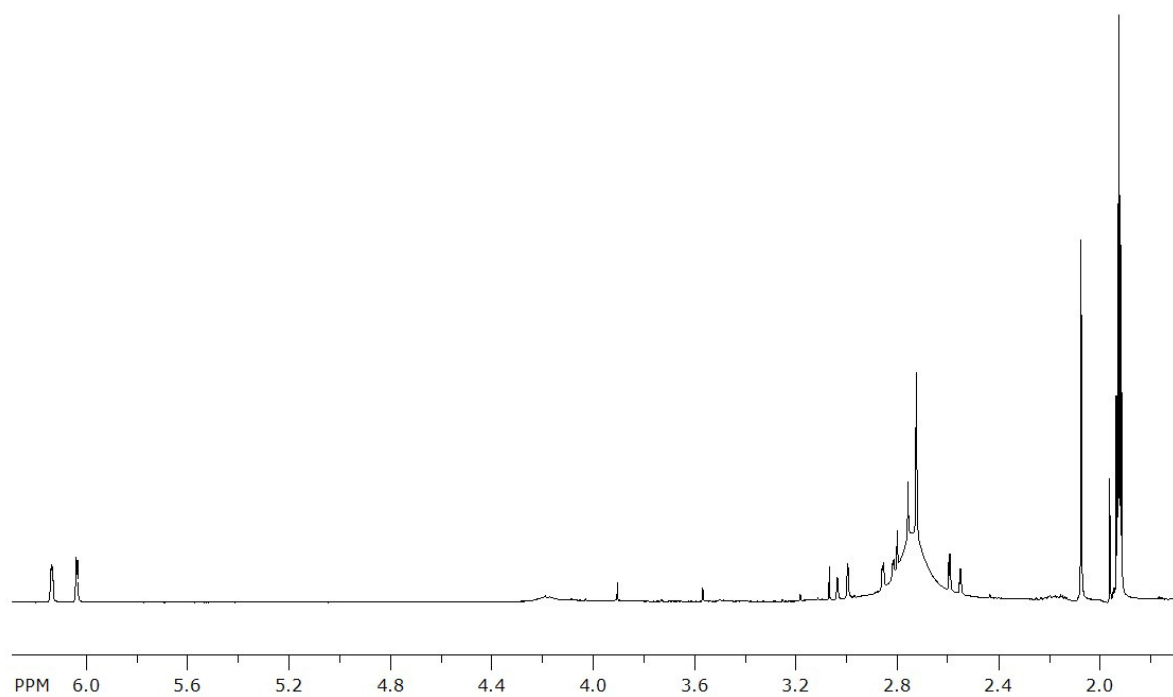
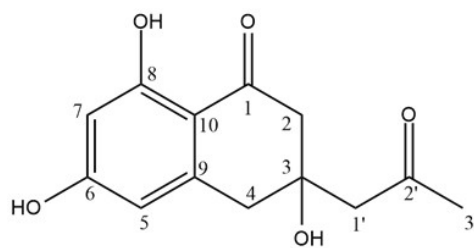


Figura A. 18 Espectro de RMN de ¹H da substância 3,4-Diidro-3-(2-oxo-propil)- 6,8-triidroxi-1(2H)-naftalenona (acetona-d₆, 400 MHz)..

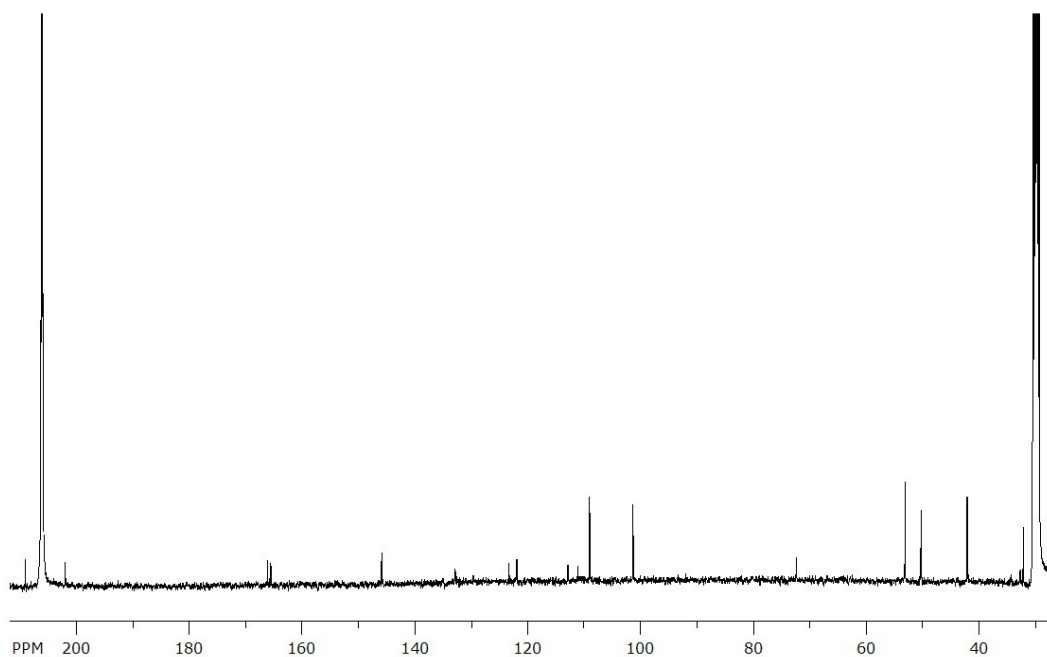


Figura A. 19 Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3,4-Diidro-3-(2-oxo-propil)- 6,8-triidroxi-1(2H)-naftalenona (acetona- d_6 , 100 MHz)..

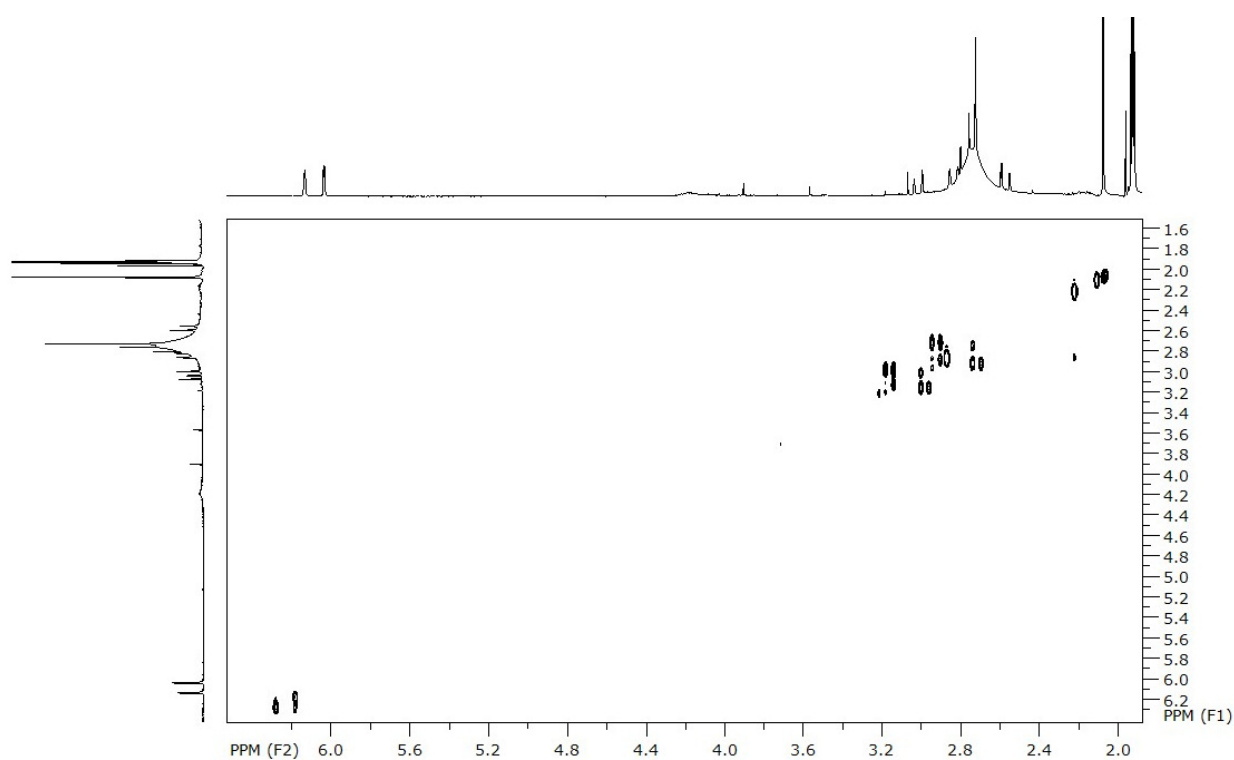


Figura A. 20 Espectro de RMN de COSY da substância 3,4-Diidro-3-(2-oxo-propil)- 6,8-triidroxi-1(2H)-naftalenona (acetona- d_6).

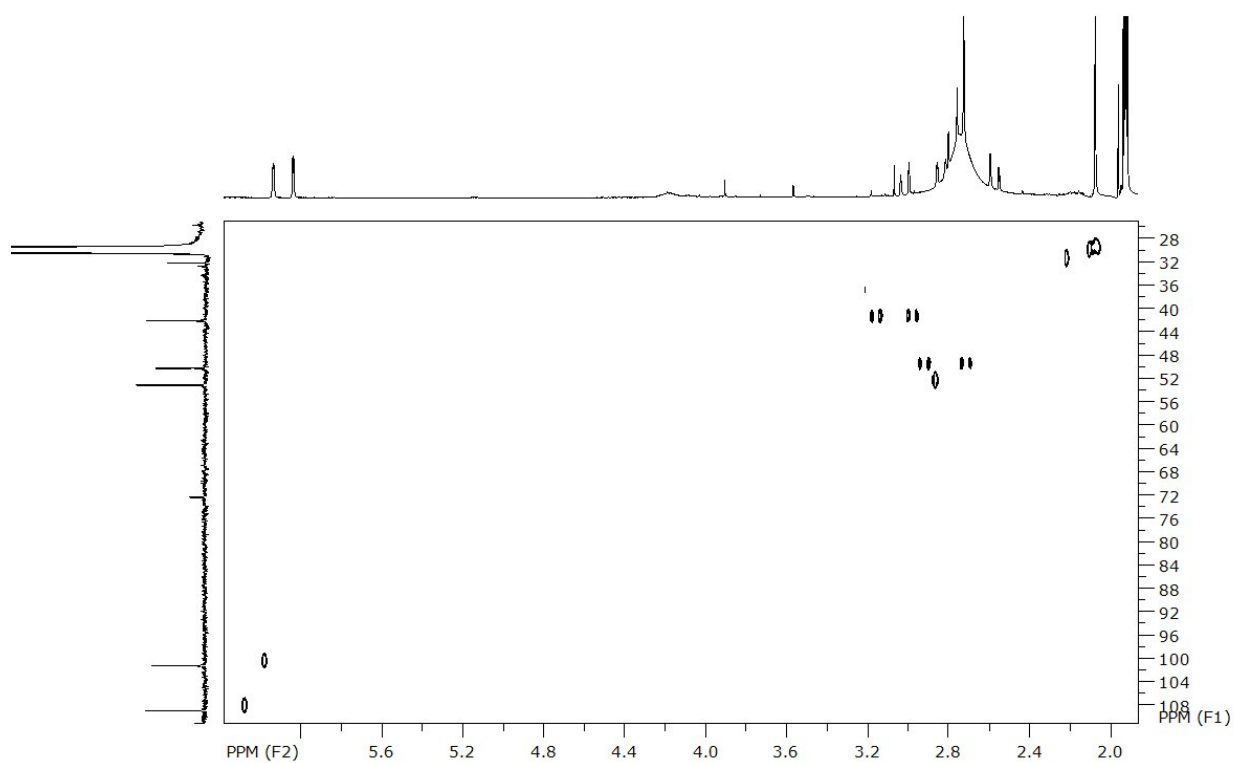


Figura A. 21 Espectro de RMN de HSQC da substância 3,4-Diidro-3-(2-oxo-propil)-6,8-triidroxi-1(2H)-naftalenona (acetona-d₆).

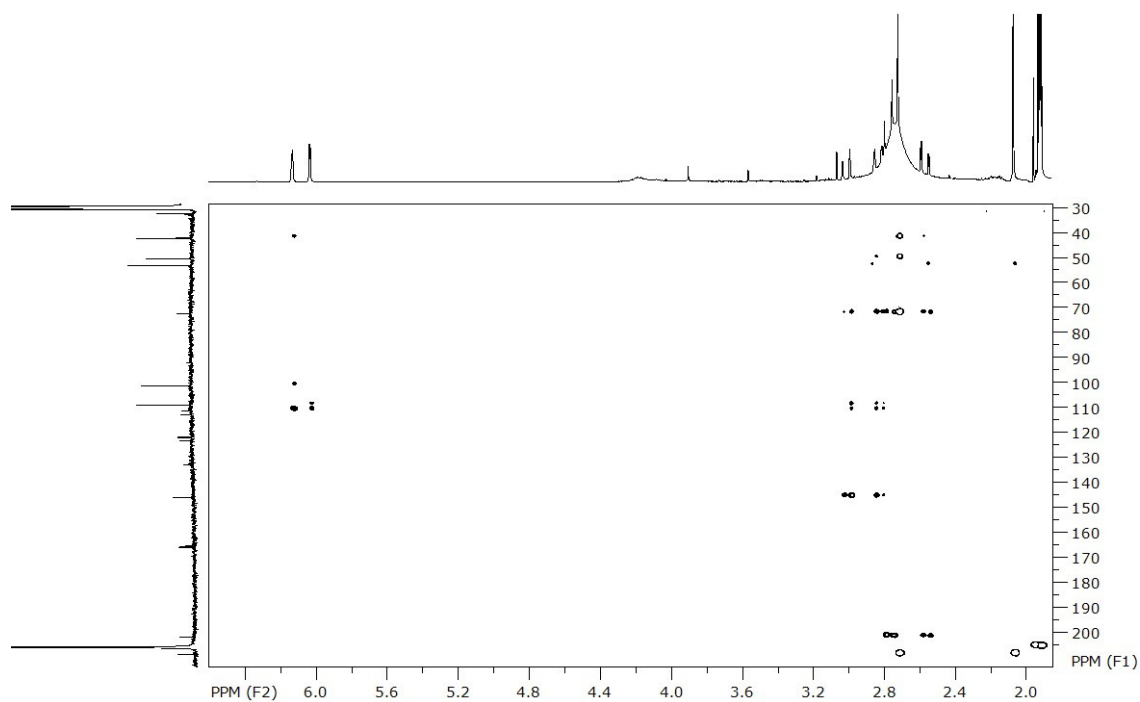


Figura A. 22 Espectro de RMN de HMBC da substância 3,4-Diidro-3-(2-oxo-propil)-6,8-triidroxi-1(2H)-naftalenona (acetona-d₆).

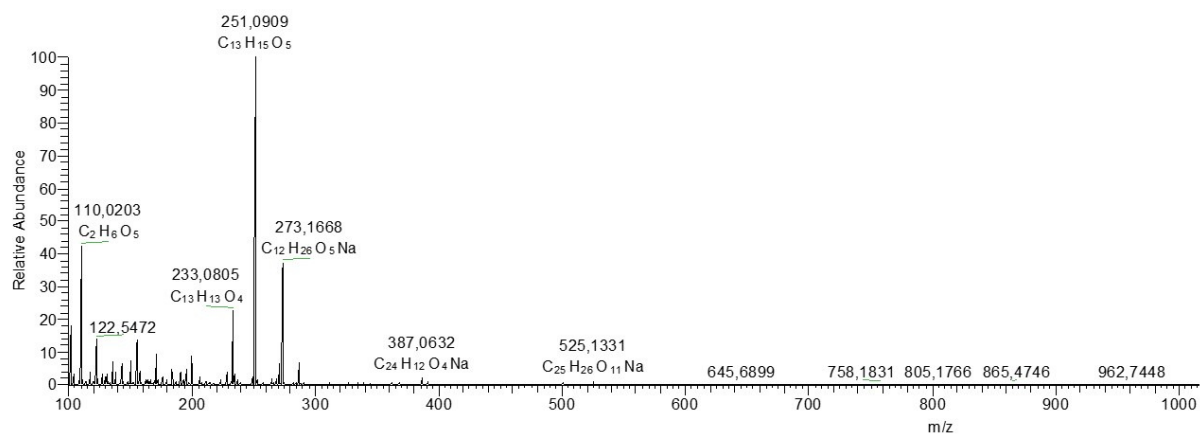
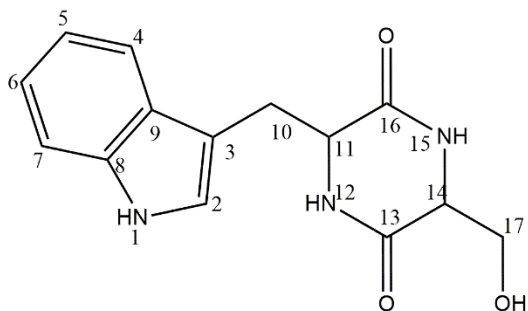


Figura A. 23 Espectro de HRMS (ESI+) da substância 3,4-Diidro-3-(2-oxo-propil)- 6,8-triidroxi-1(2H)-naftalenona.

5. Ciclo Triptofano-Serina



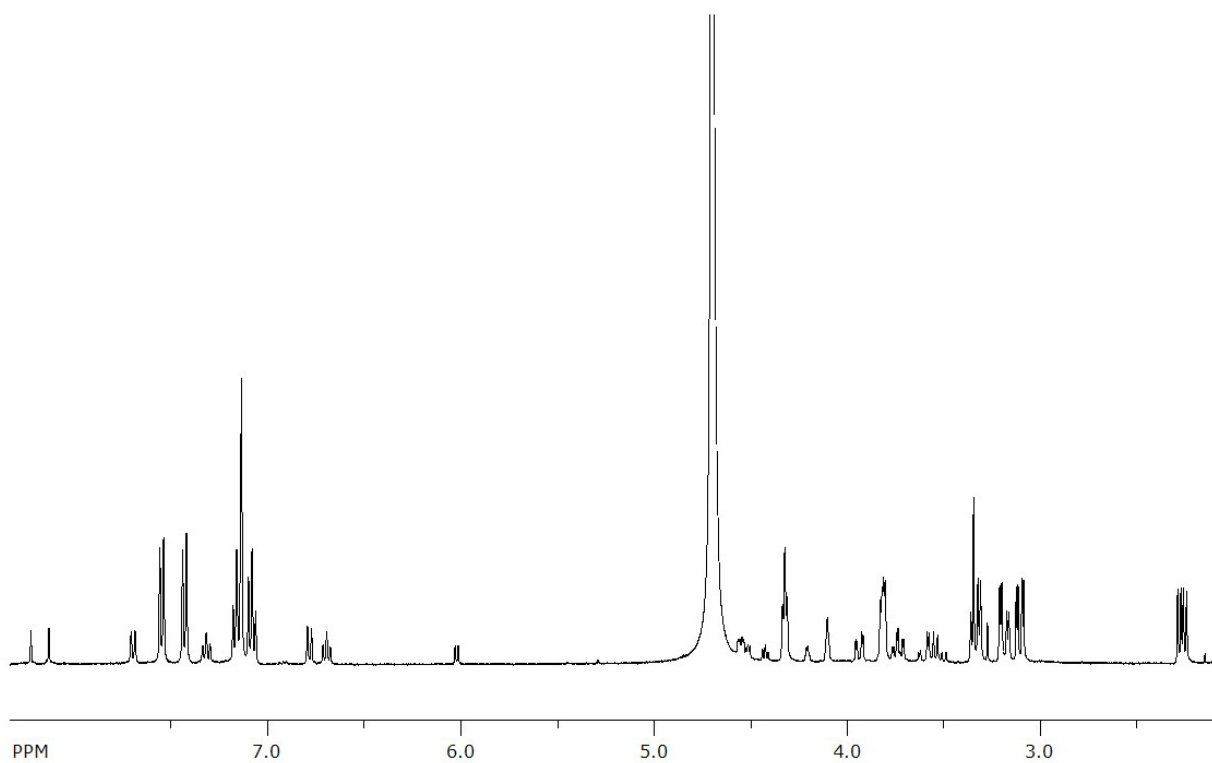


Figura A. 24 Espectro de RMN de ^1H da substância ciclo triptofano-serina (D_2O , 400 MHz)

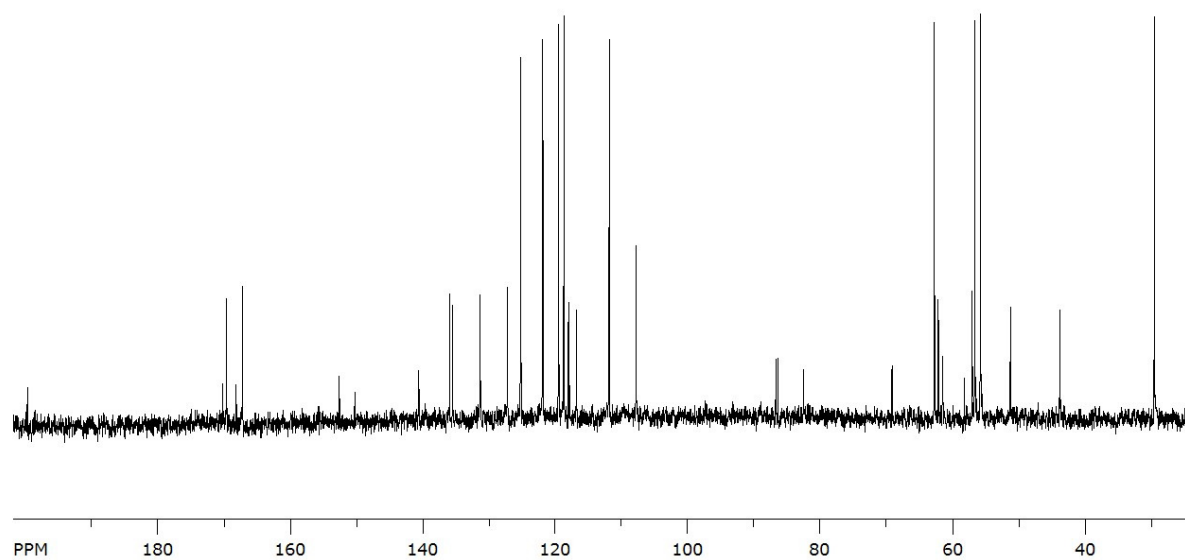


Figura A. 25 Espectro de RMN de ^{13}C da substância ciclo triptofano-serina (D_2O , 100 MHz).

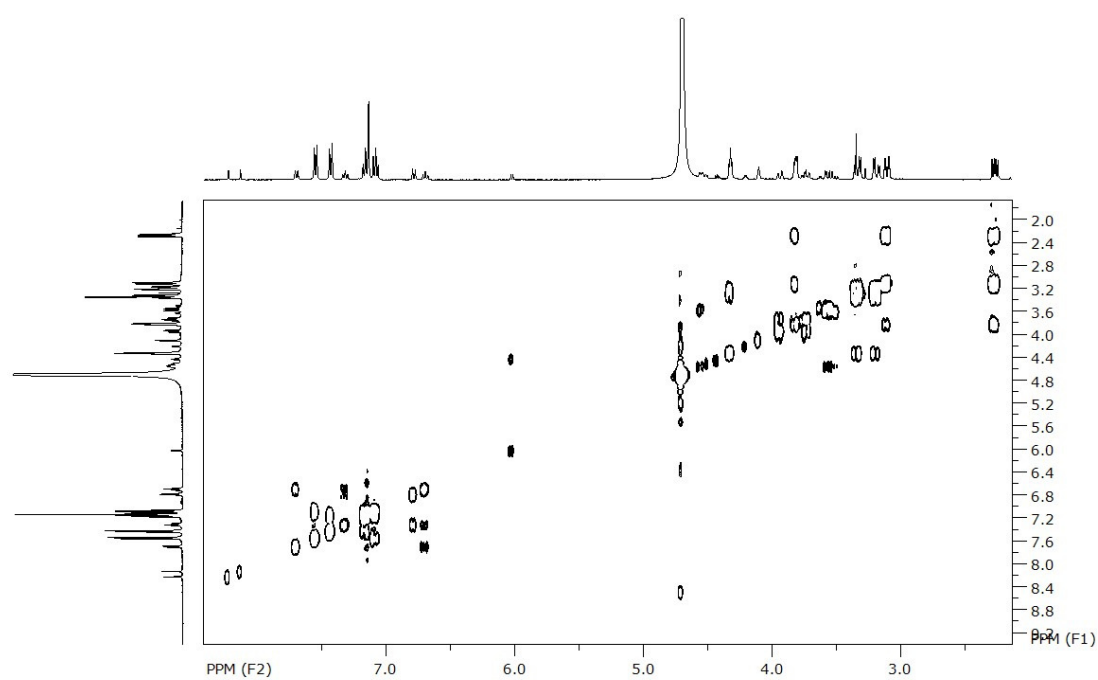


Figura A. 26 Espectro de RMN de COSY da substância ciclo triptofano-serina (D₂O)

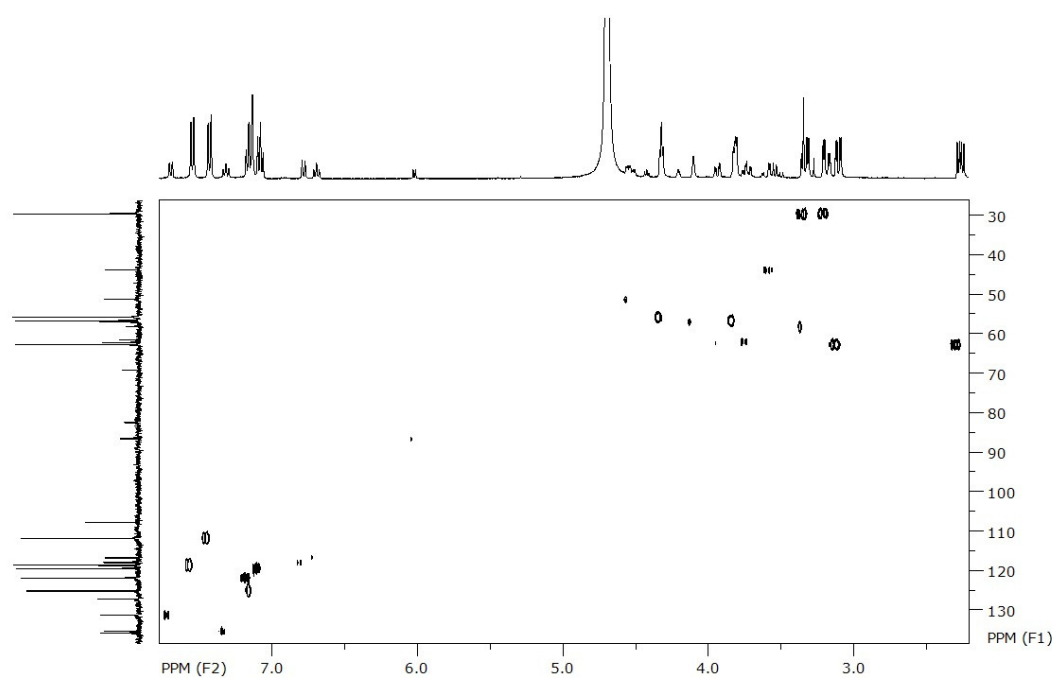


Figura A. 27 Espectro de RMN de HSQC da substância ciclo triptofano-serina (D₂O)

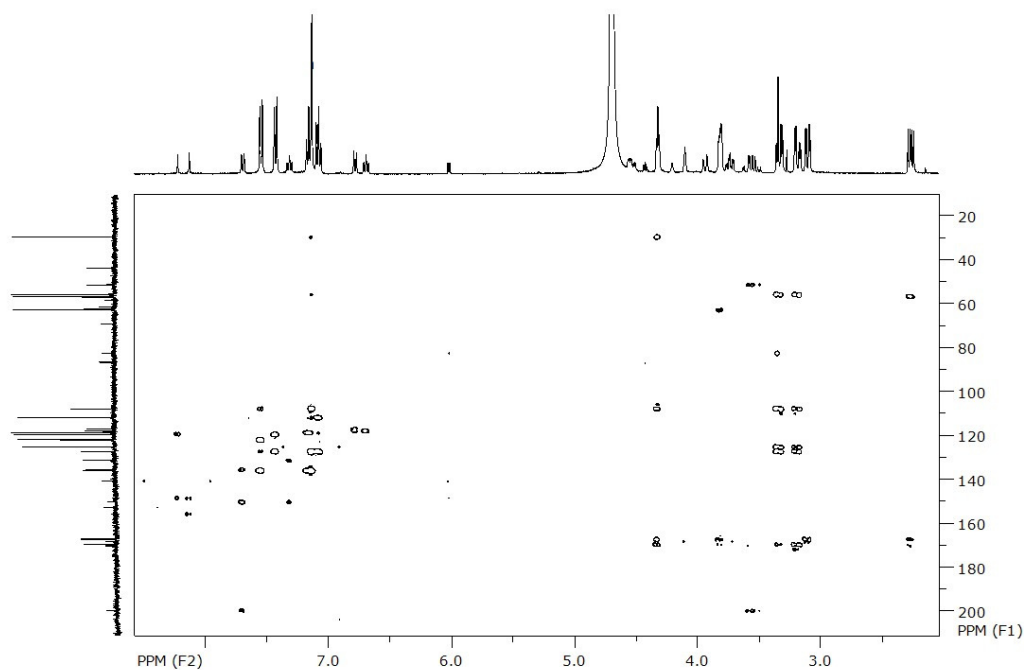
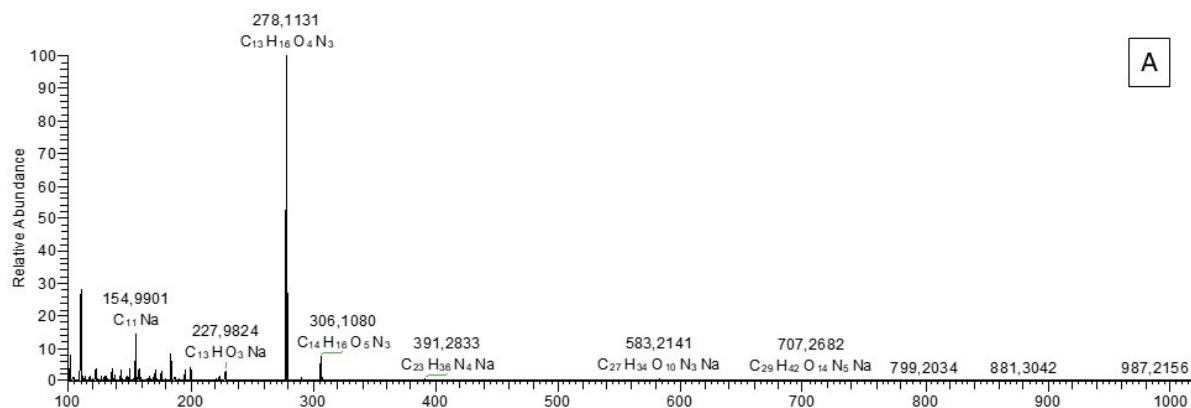


Figura A. 28 Espectro de RMN de HMBC da substância ciclo triptofano-serina (D_2O).



A

Figura A. 29 Espectro de HRMS da substância ciclo triptofano-serina.

6. Purpufusarina

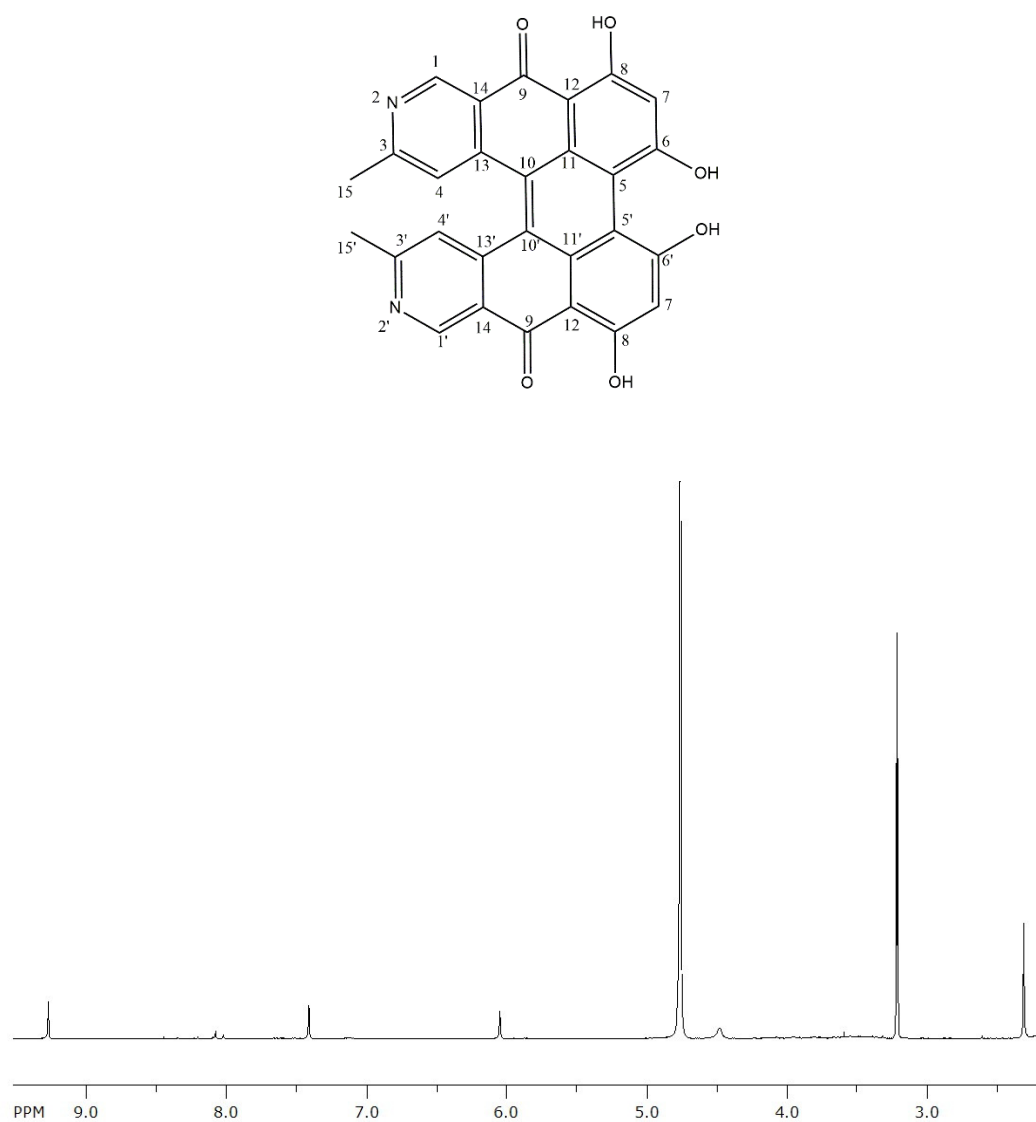


Figura A. 30 Espectro de RMN de ^1H da substância purpufusarina (CD_3OD , 400 MHz).

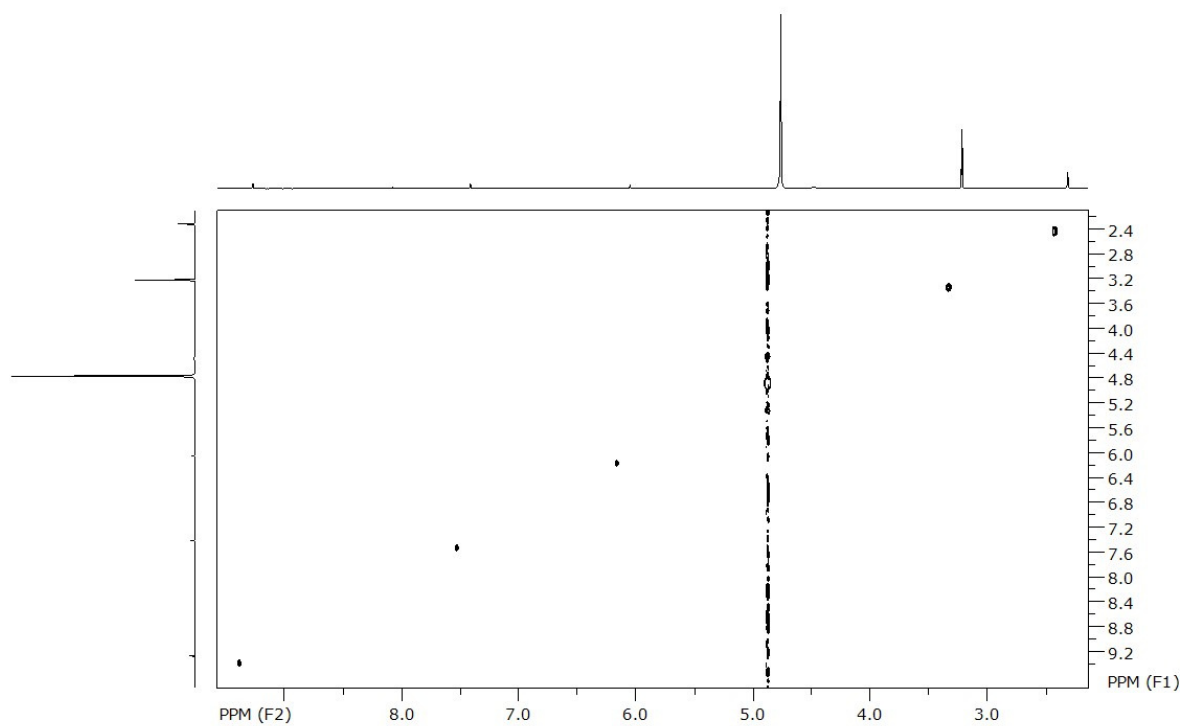


Figura A. 31 Espectro de RMN de COSY da substância purpurufusarina (CD₃OD).

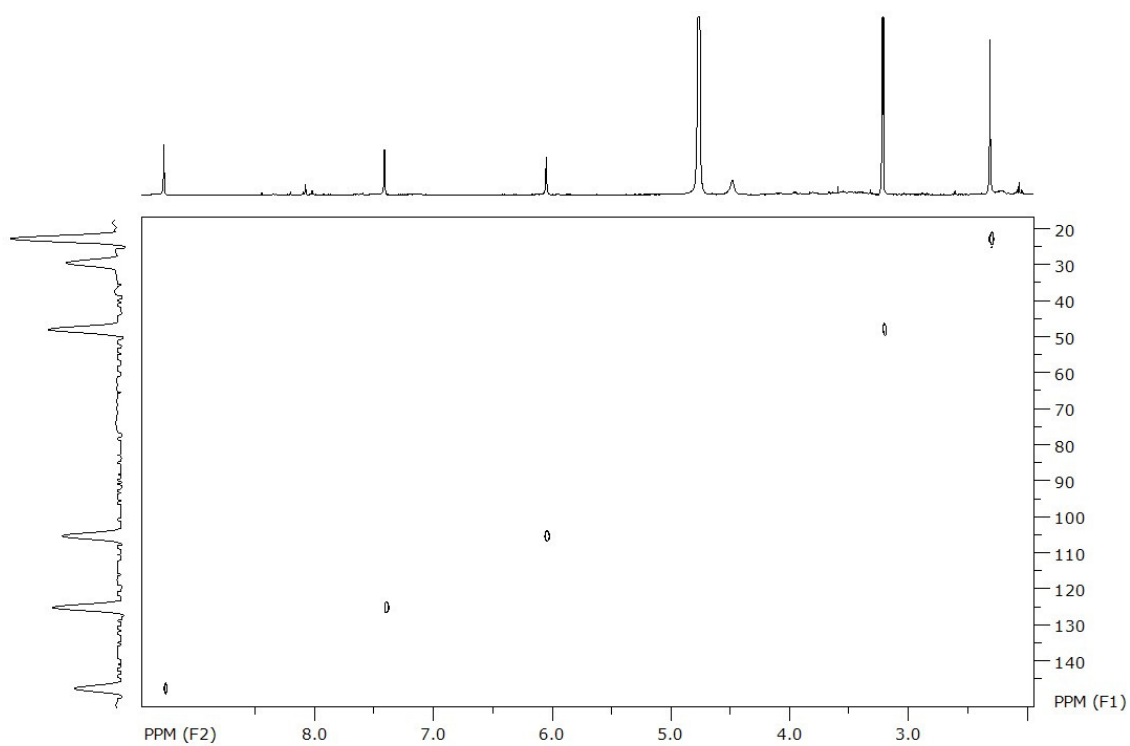


Figura A. 32 Espectro de RMN de HSQC da substância purpurufusarina (CD₃OD).

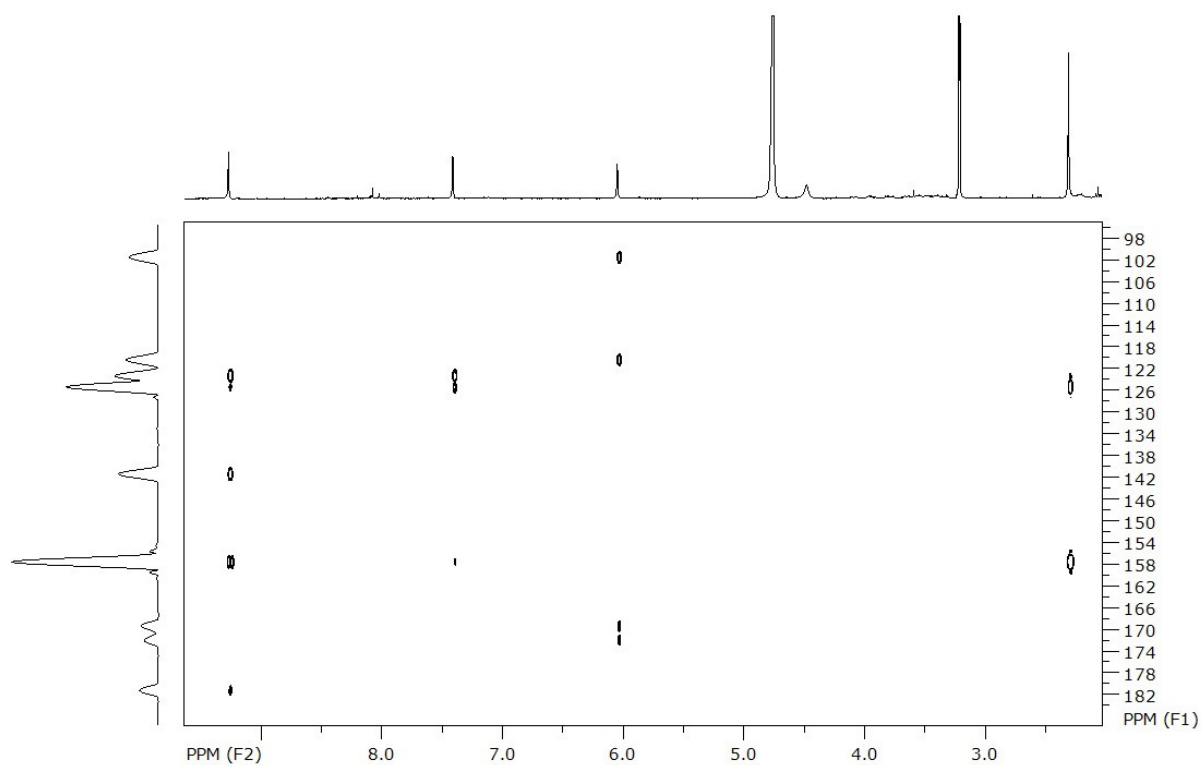


Figura A. 33 Espectro de RMN de HMBC da substância purpurufusarina (CD₃OD).

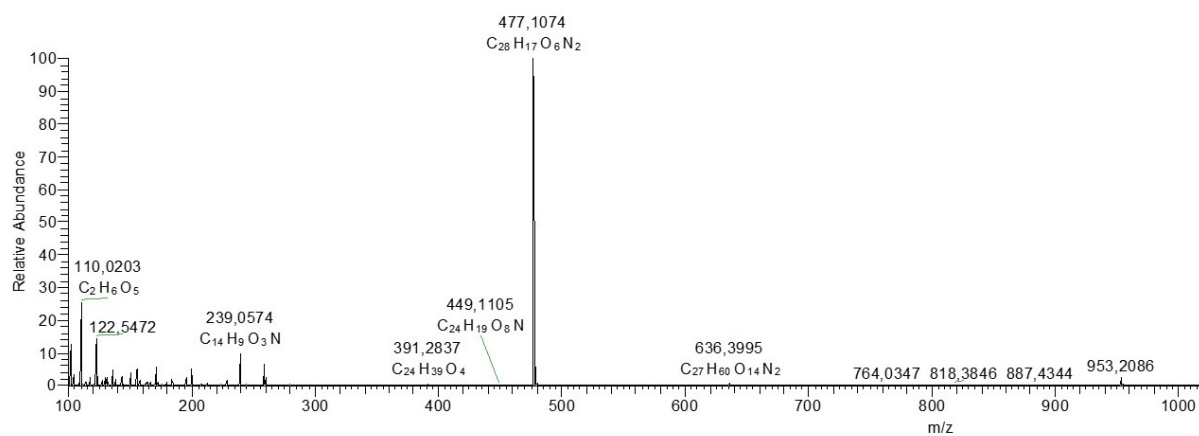


Figura A. 34 Espectro de HRMS (ESI-) da substância purpurufusarina (CD₃OD).

7. Ciclo leucina-prolina

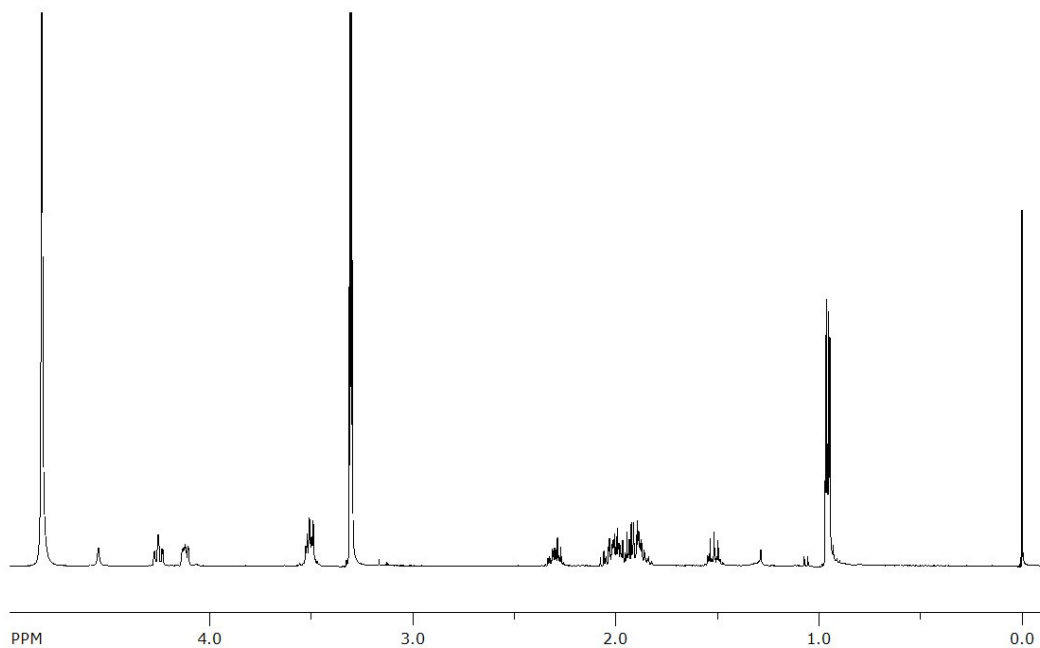
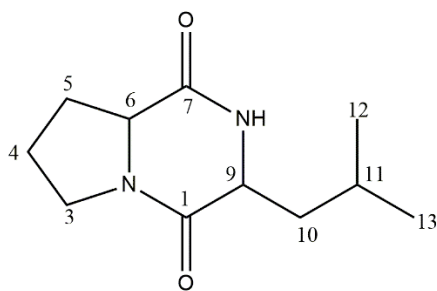


Figura A. 35 Espectro de RMN de ¹H da substância ciclo pro-leu (CD₃OD, 400 MHz).

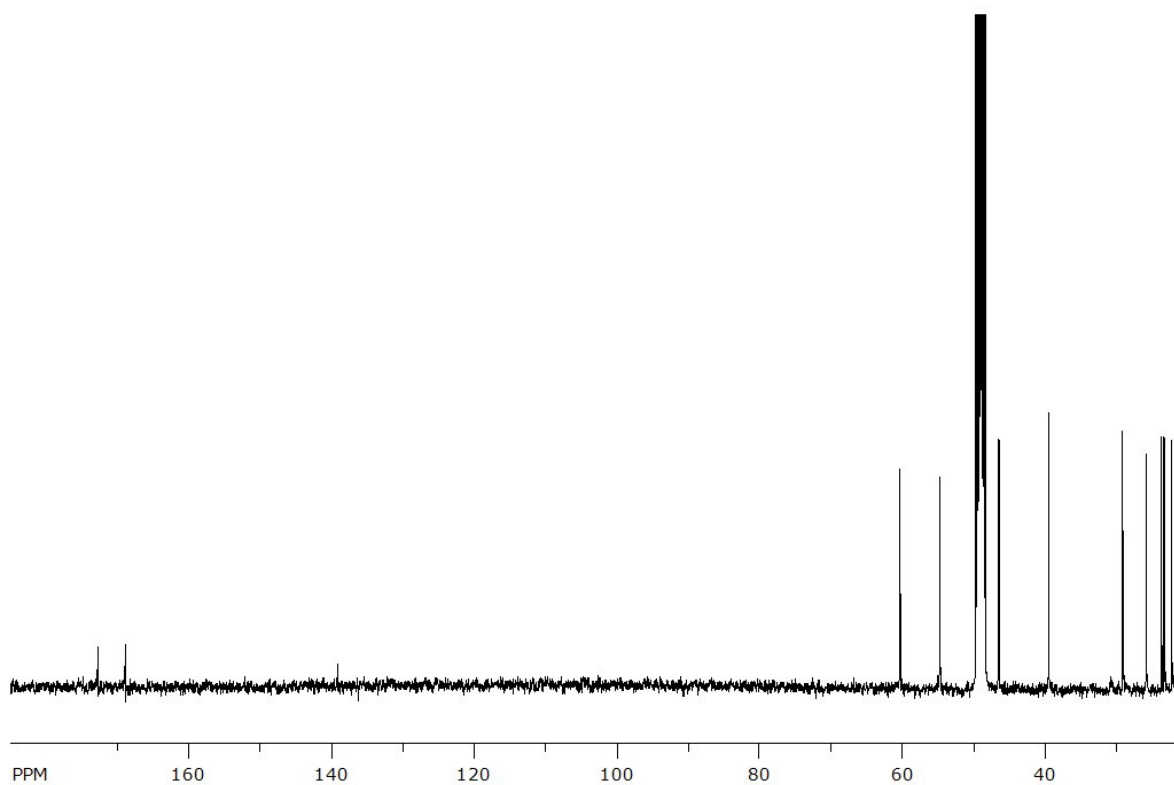


Figura A. 36 Espectro de RMN de ^{13}C da substância ciclo pro-leu (CD_3OD , 400 MHz).

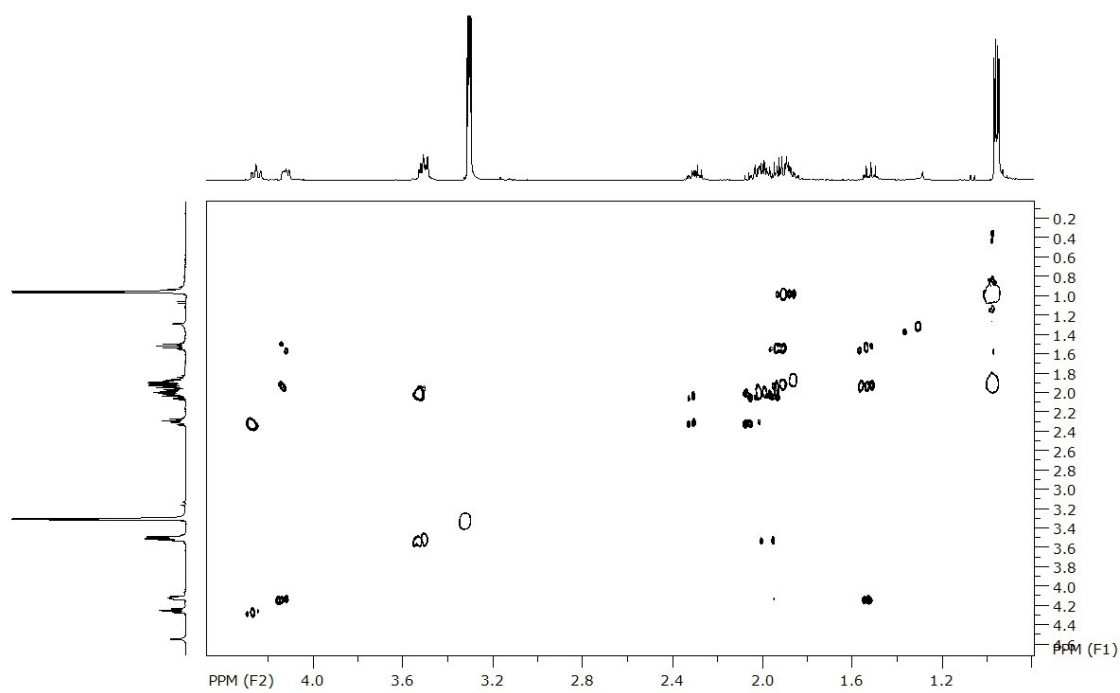


Figura A. 37 Espectro de RMN de COSY da substância ciclo pro-leu (CD_3OD).

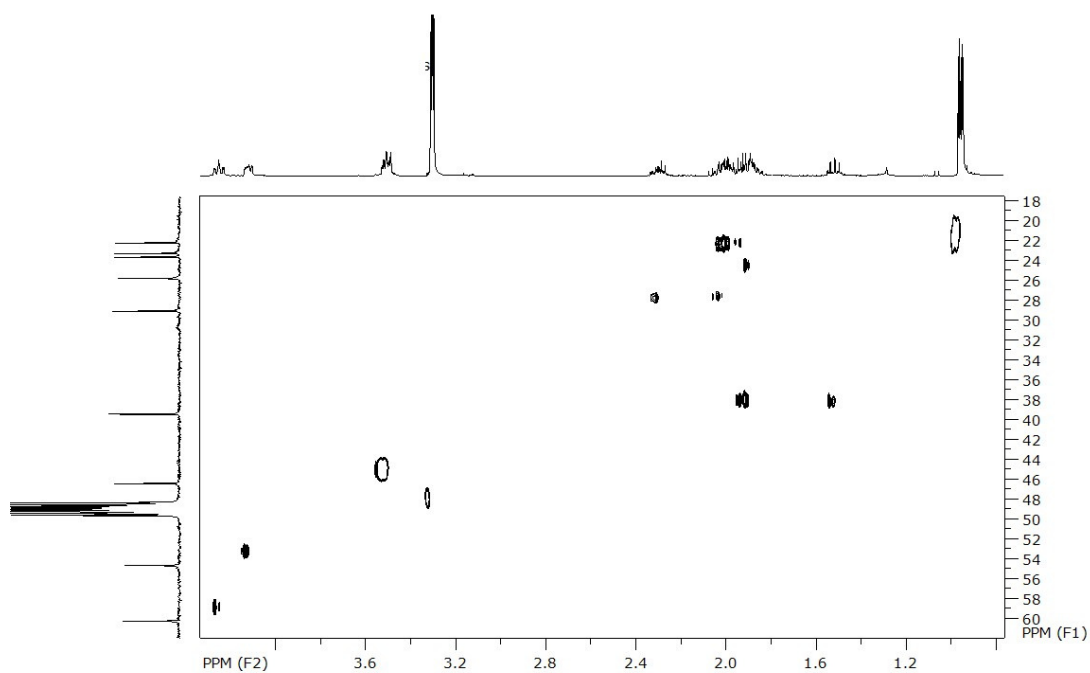


Figura A. 38 Espectro de RMN de HSQC da substância ciclo pro-leu (CD_3OD).

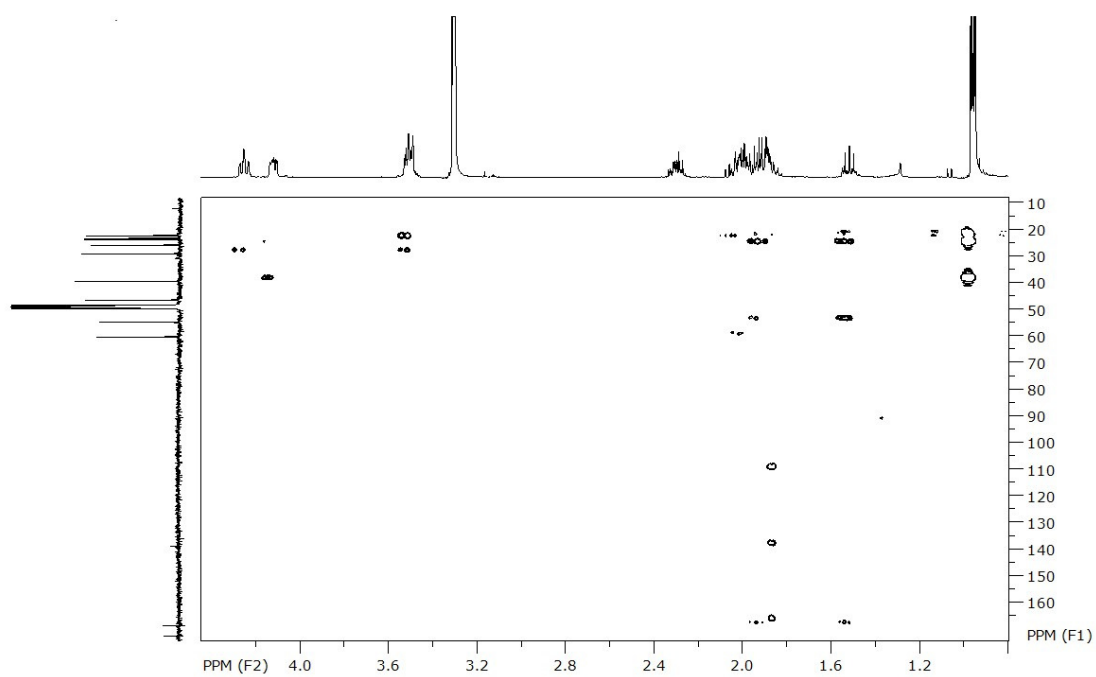


Figura A. 39 Espectro de RMN de HMBC da substância ciclo pro-leu (CD_3OD).

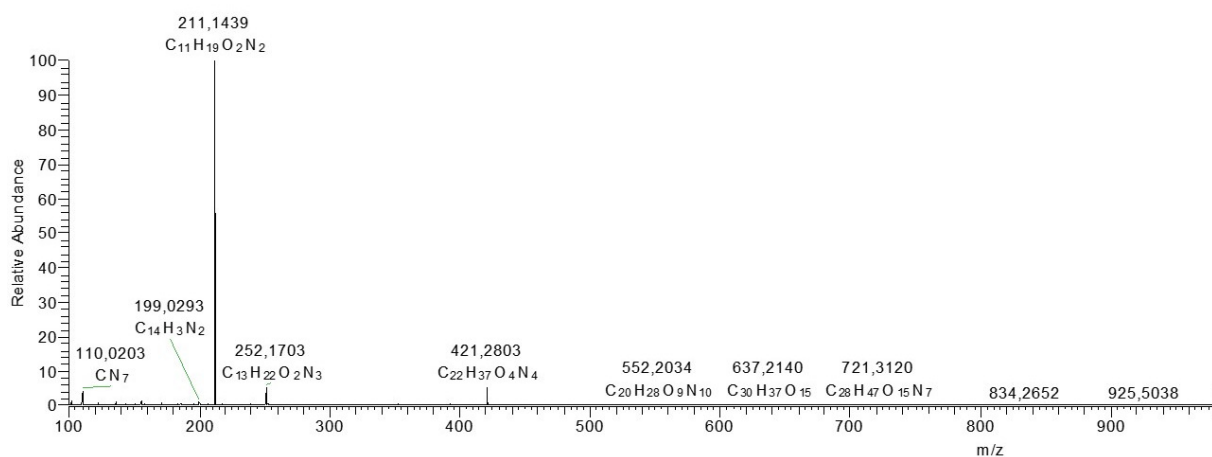


Figura A. 40 Espectro de HRMS (ESI+) da substância ciclo pro-leu.

8. Catenarina

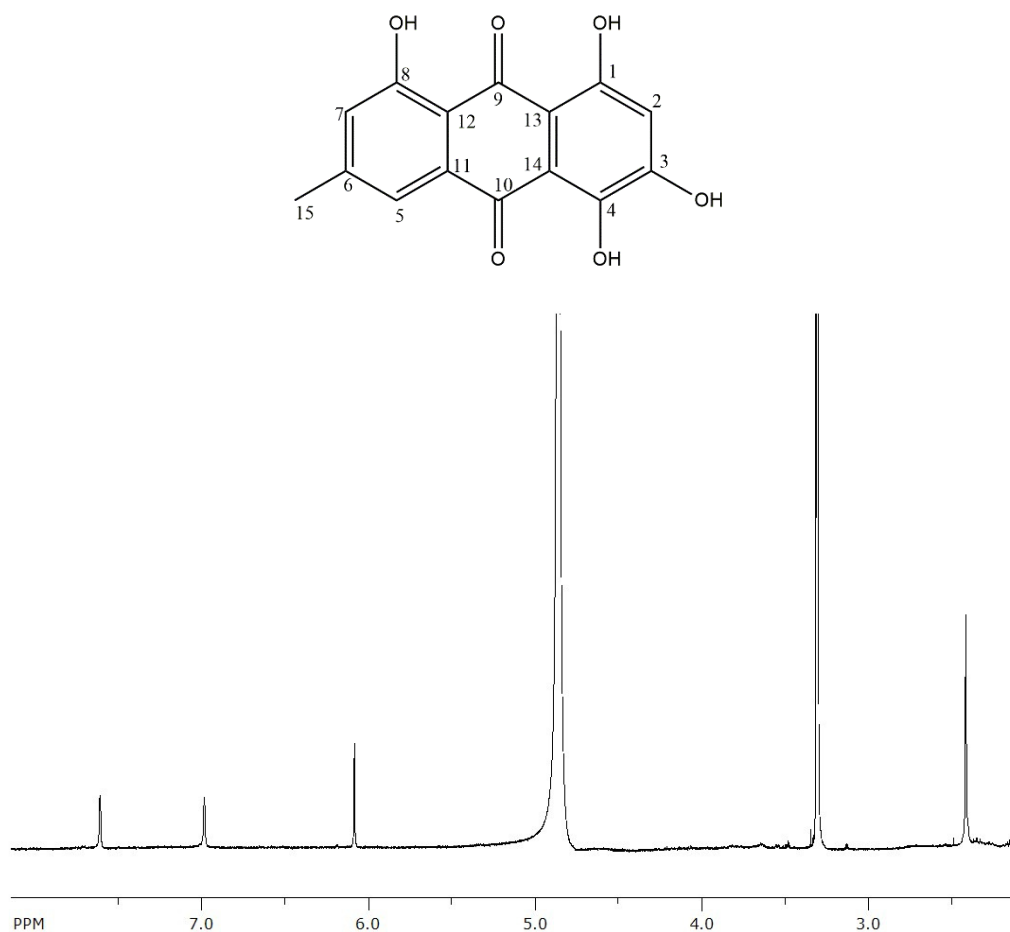


Figura A. 41 Espectro de RMN de ¹H da substância catenarina (CD₃OD, 400 MHz).

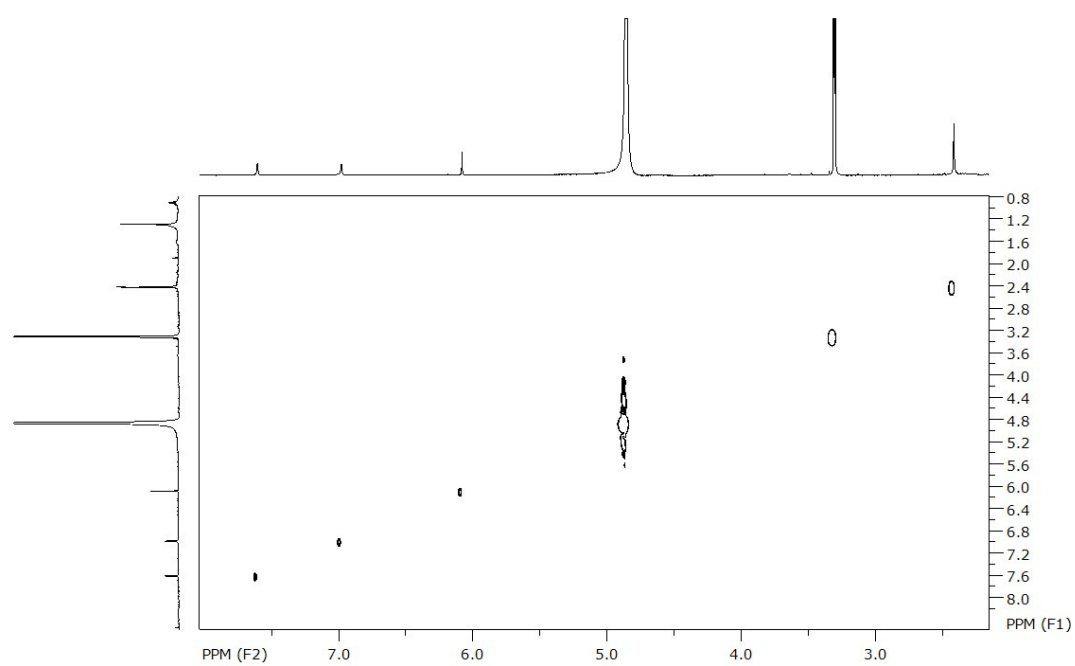


Figura A. 42 Espectro de RMN de COSY da substância catenarina (CD₃OD).

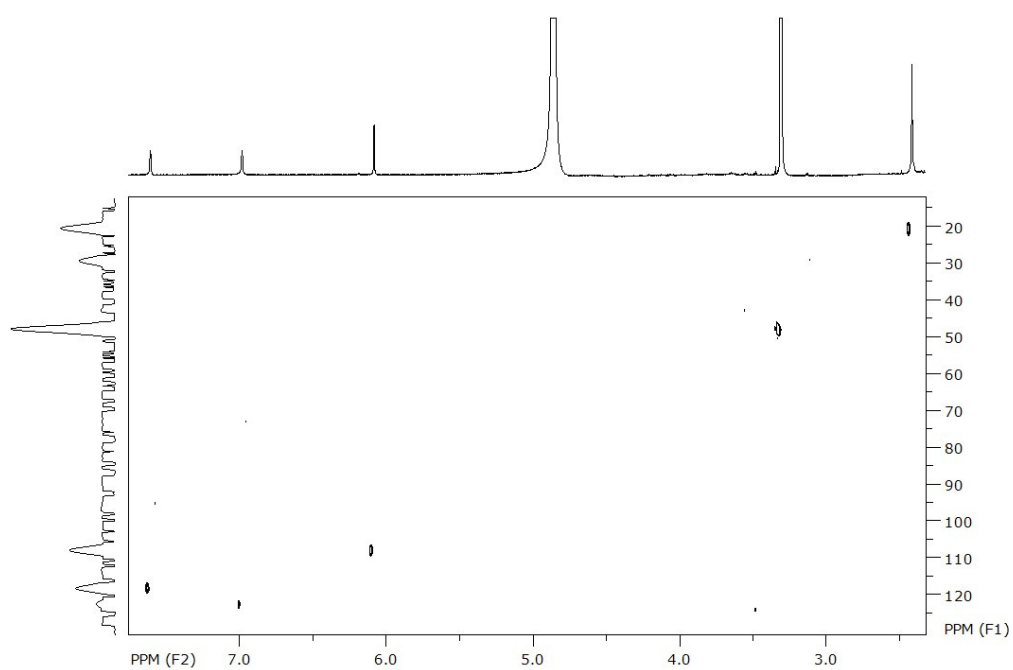


Figura A. 43 Espectro de RMN de HSQC da substância catenarina (CD₃OD).

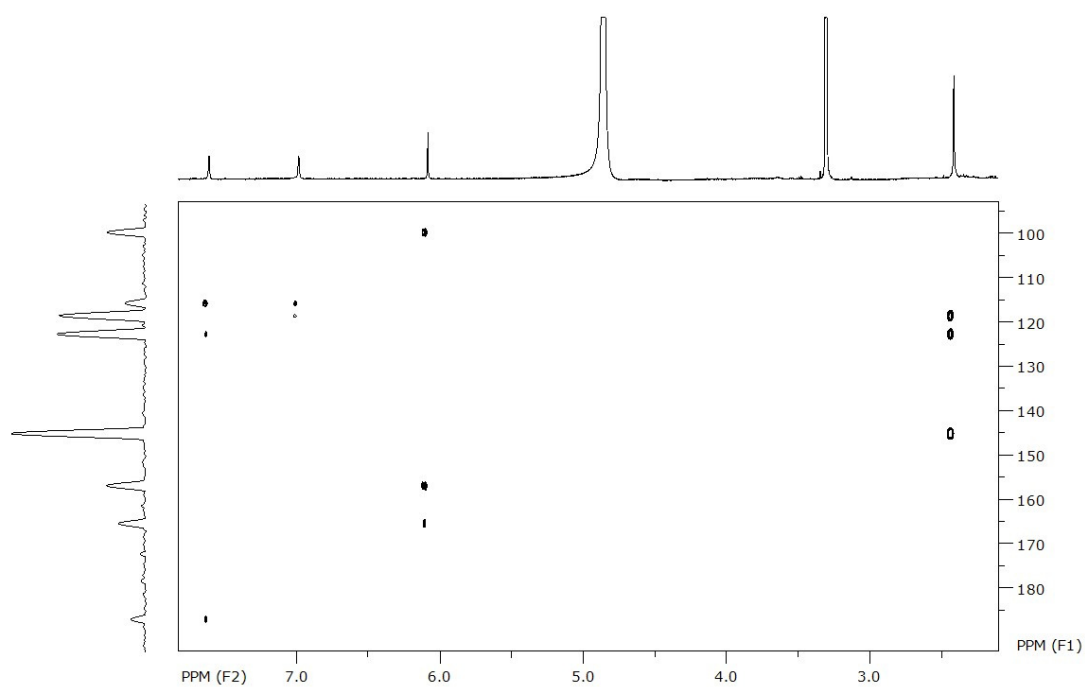


Figura A. 44 Espectro de RMN de HMBC da substância catenarina (CD_3OD).

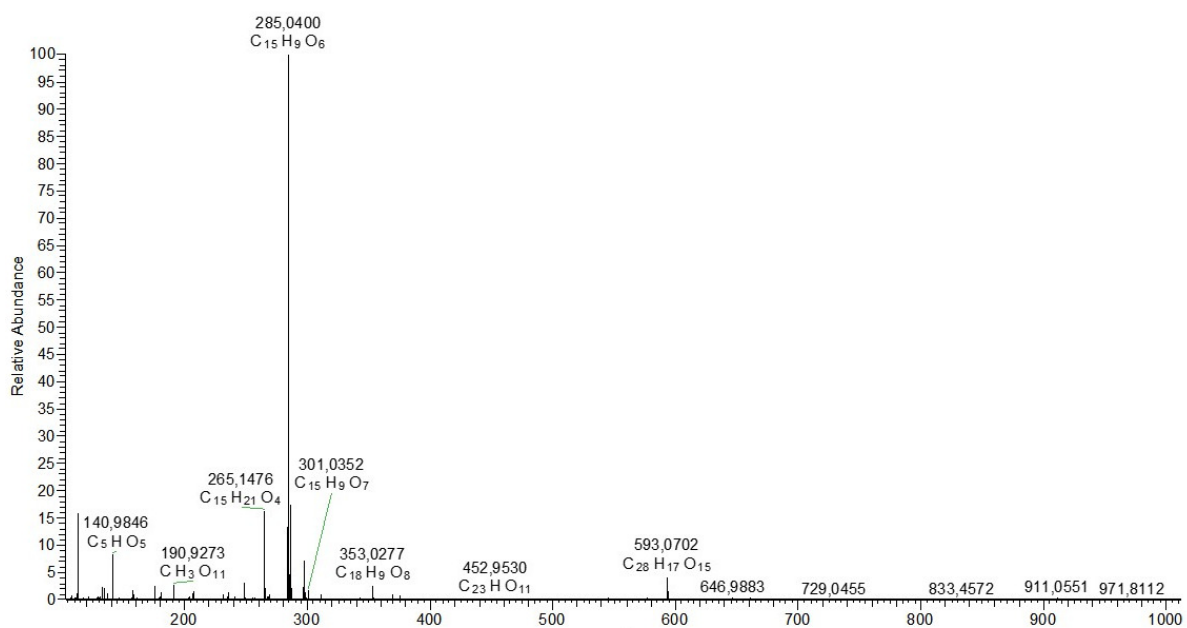


Figura A. 45 Espectro de HRMS (ESI-) da substância catenarina.

9. Shearinina D

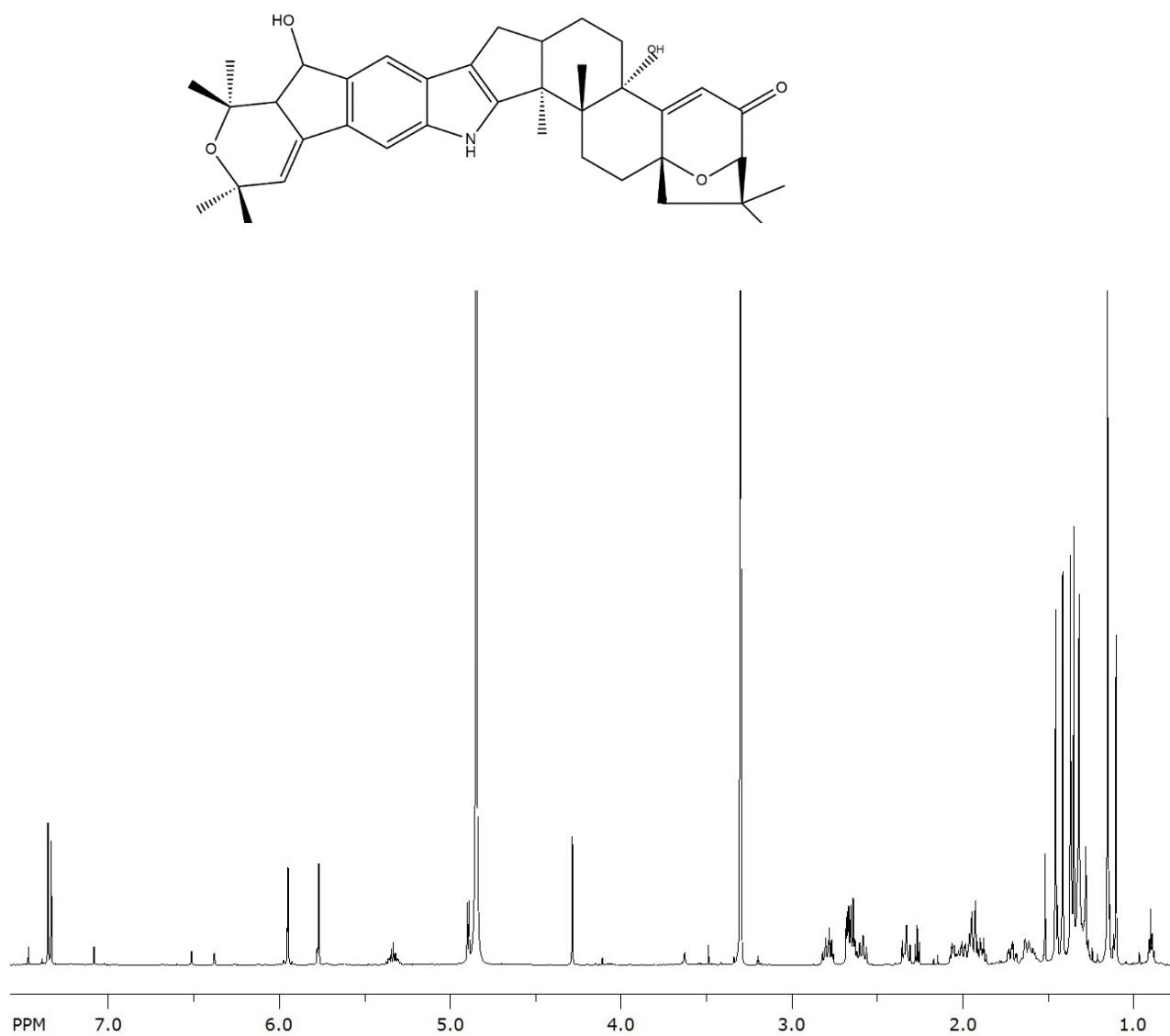


Figura A. 46 Espectro de RMN de ¹H da substância shearinine D (CD₃OD, 600 MHz).

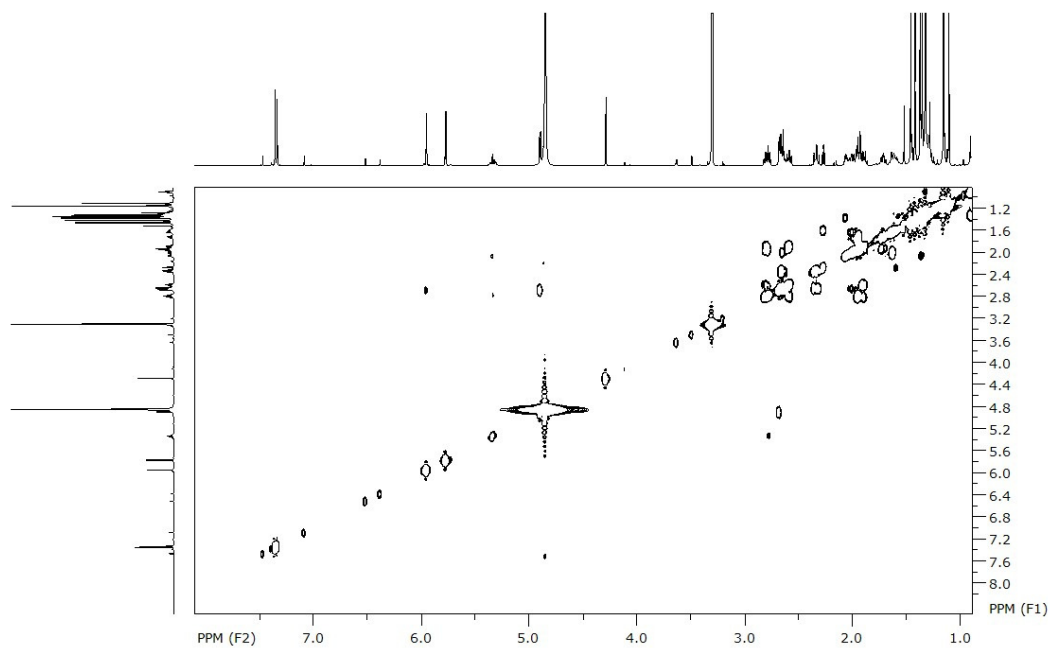


Figura A. 47 Espectro de RMN de COSY da substância shearinina D (CD₃OD).

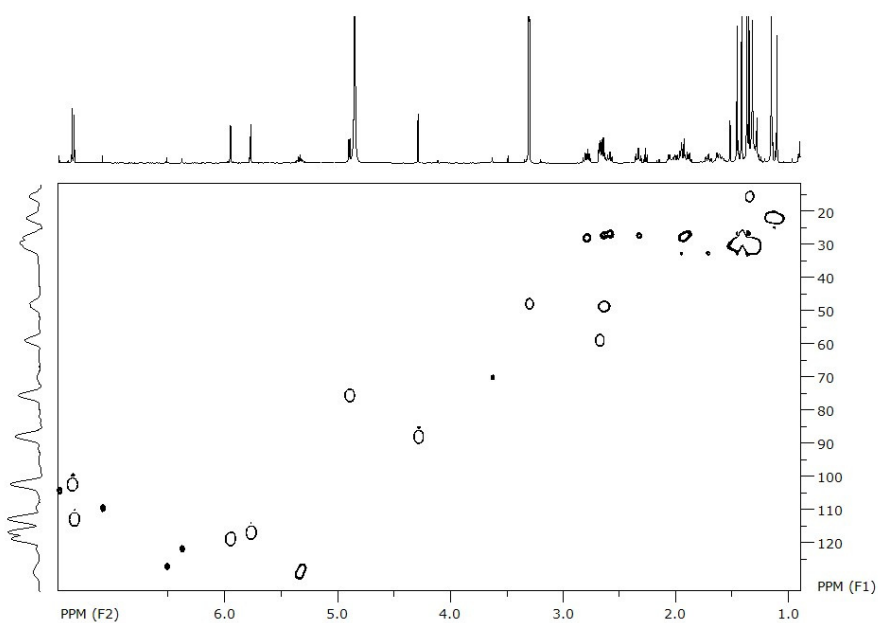


Figura A. 48 Espectro de RMN de HSQC da substância shearinina D (CD₃OD).

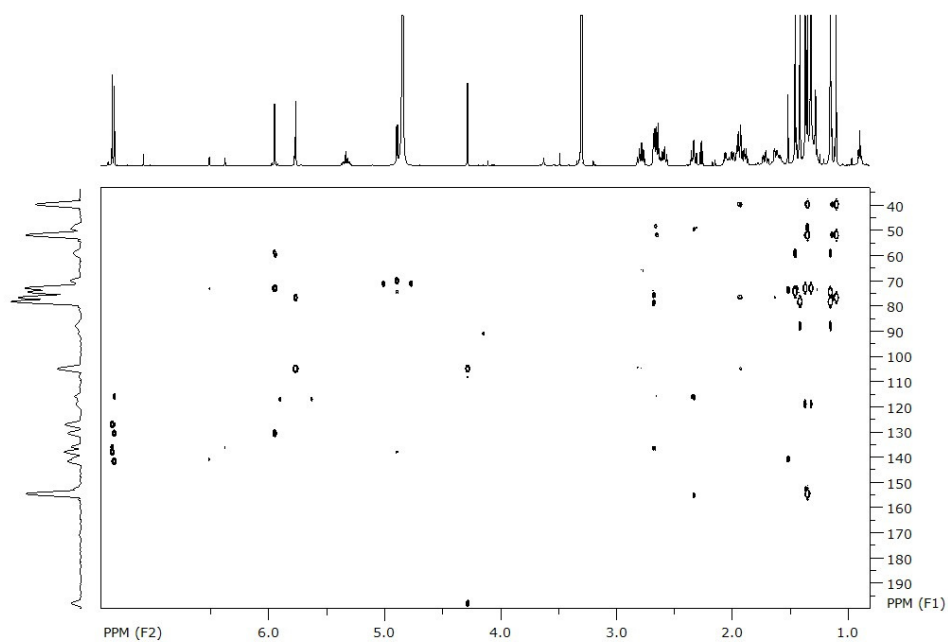


Figura A. 49 Espectro de RMN de HMBC da substância shearinina D (CD_3OD).

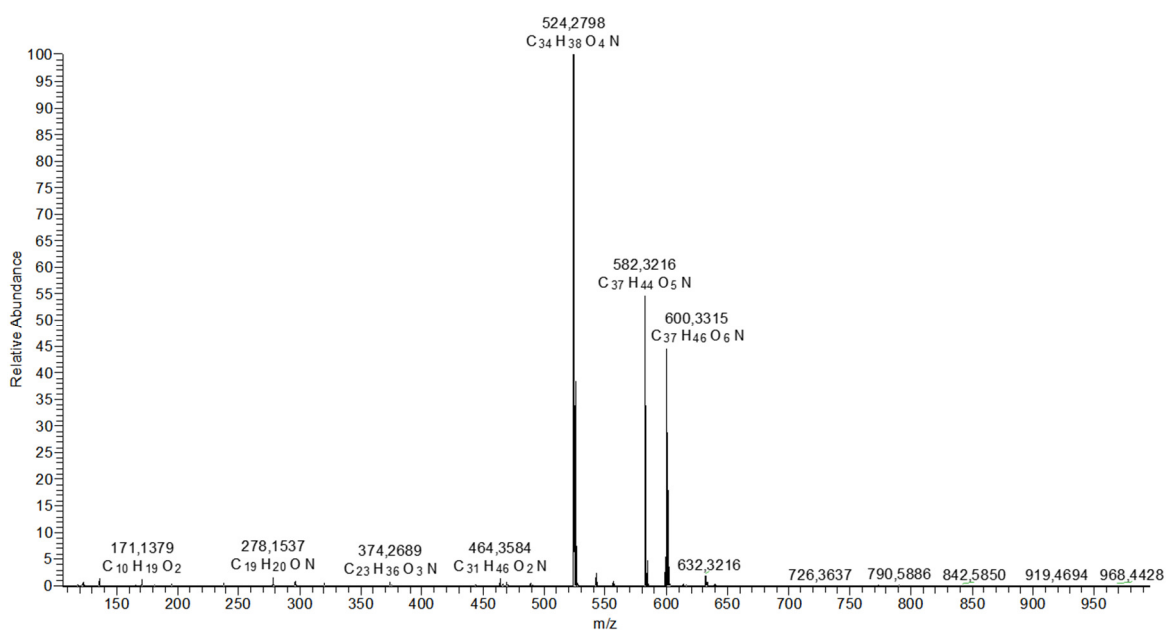


Figura A. 50 Espectro de HRMS (ESI+) da substância shearinina D.

10. Melinacidina IV

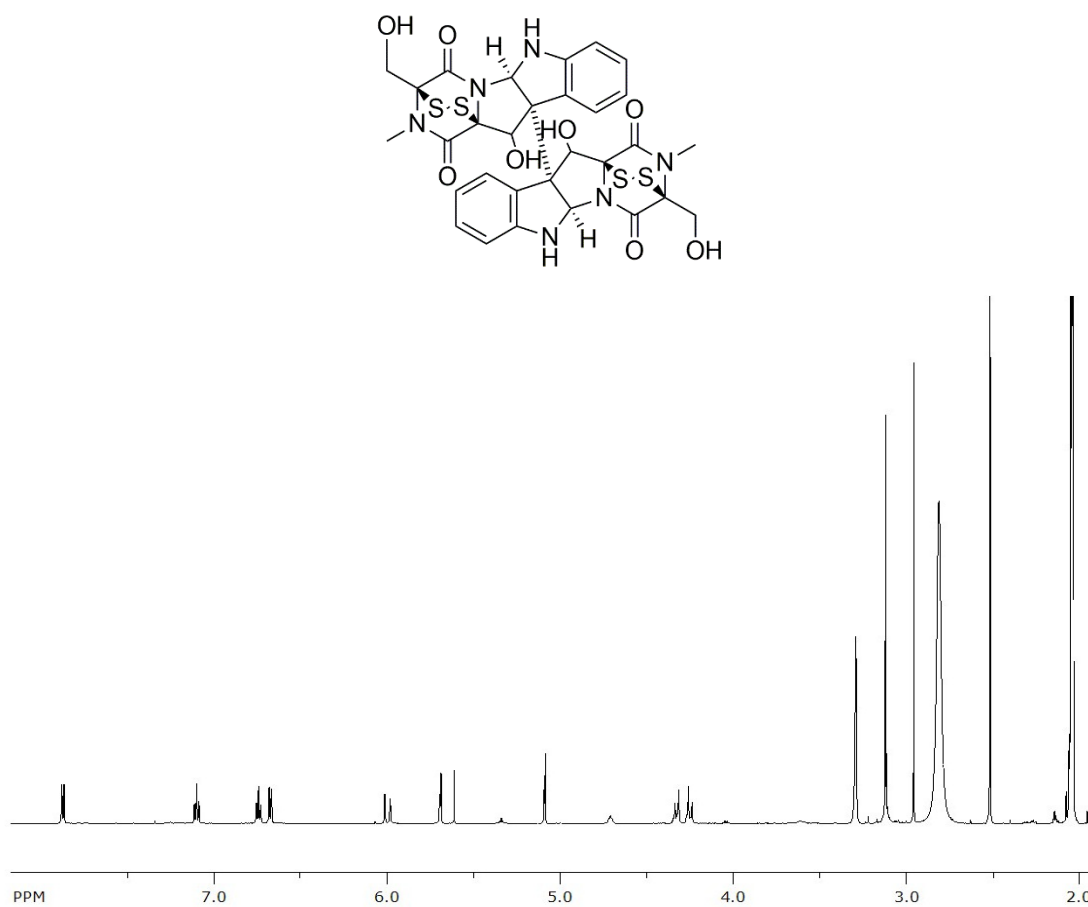


Figura A. 51 Espectro de RMN de ^1H da substância melinacidina IV (acetona- d_6 , 600 MHz).

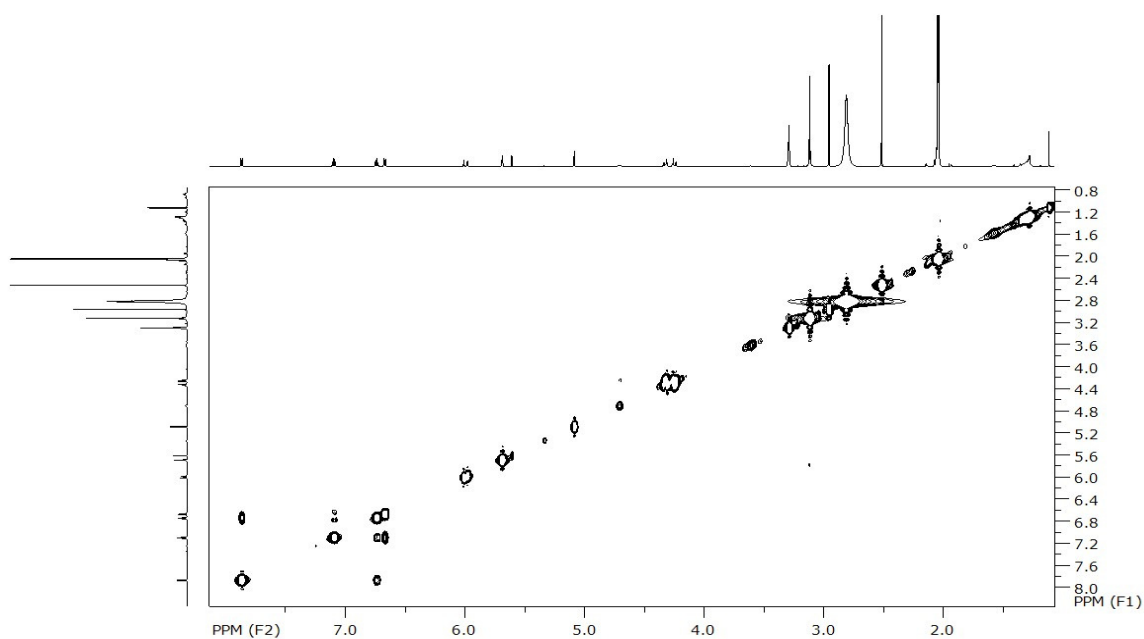


Figura A. 52 Espectro de RMN de COSY da substância melinacidina IV (acetona- d_6).

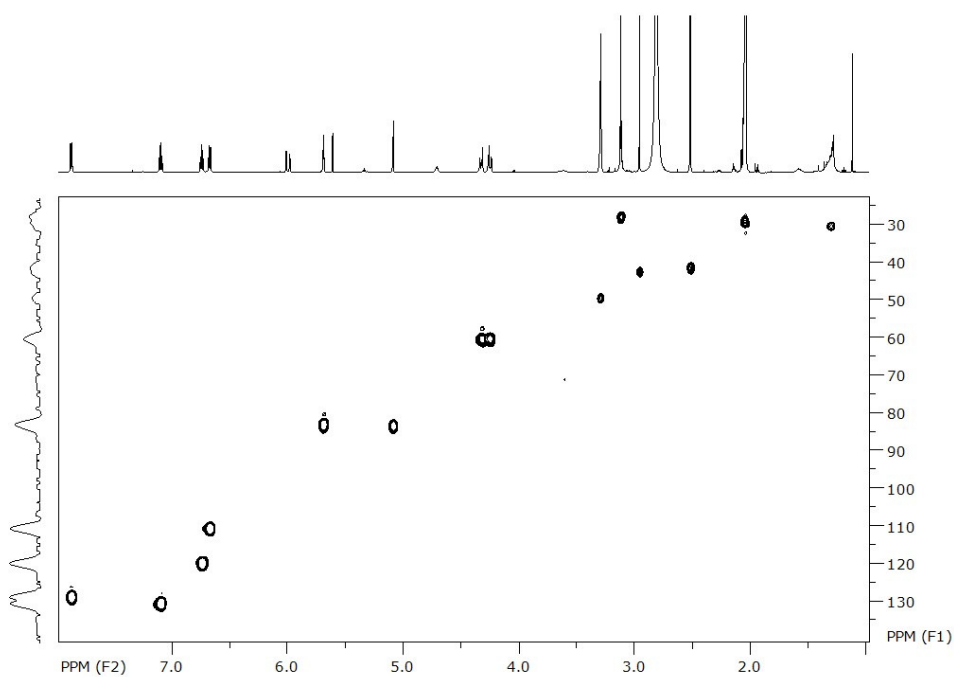


Figura A. 53 Espectro de RMN de HSQC da substância melinacidina IV (acetona-d6).

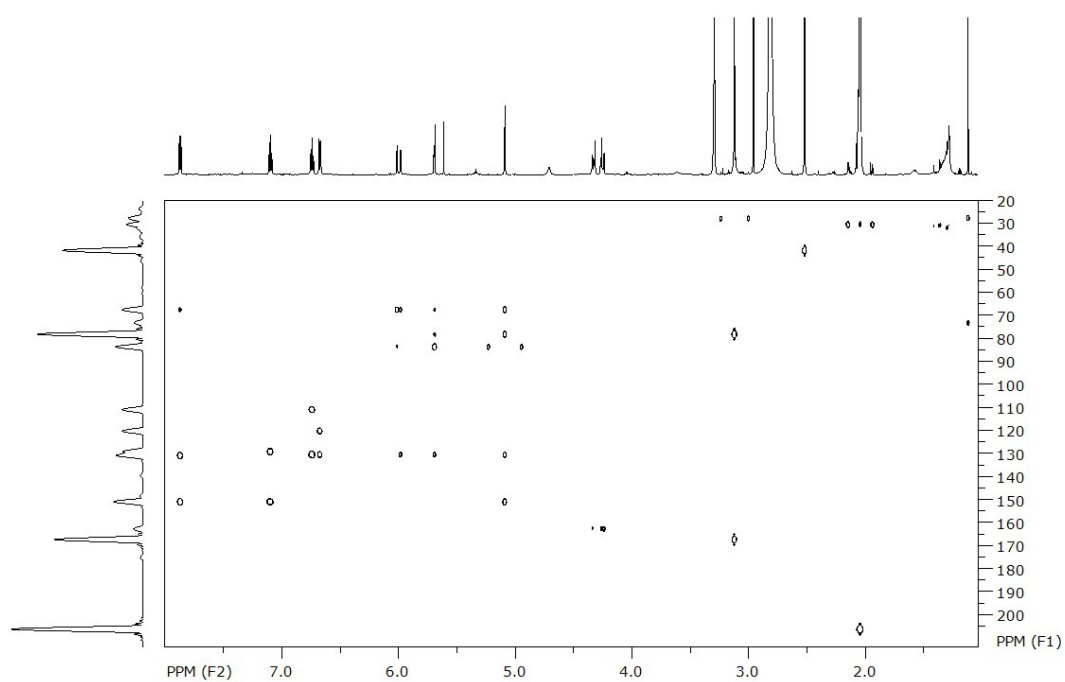


Figura A. 54 Espectro de RMN de HMBC da substância melinacidina IV (acetona-d6).

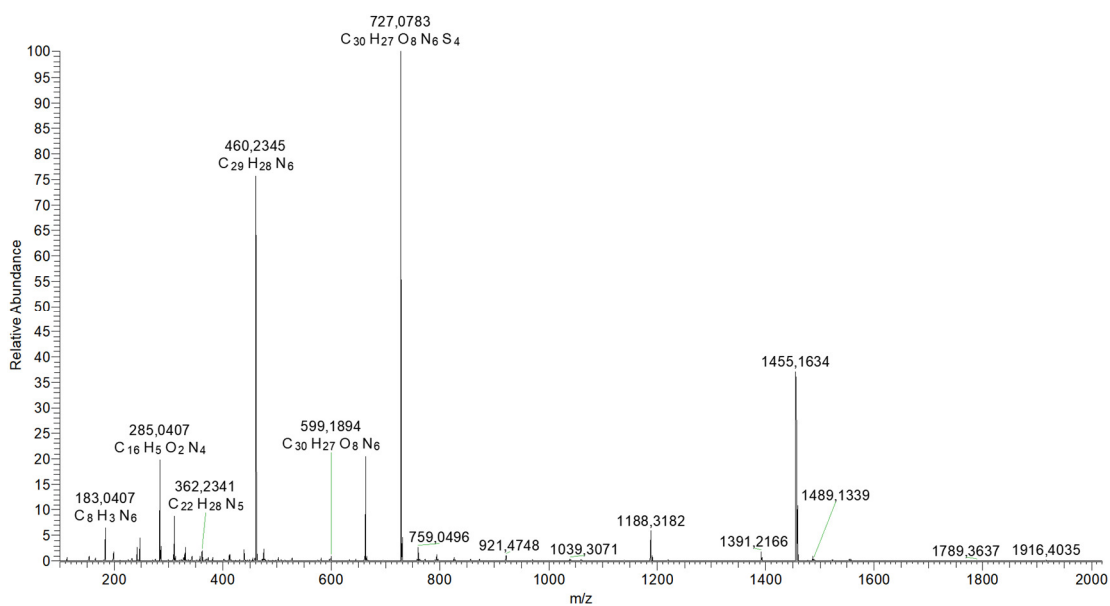


Figura A. 55 Espectro de HRMS (ESI+) da substância melinacidina IV.

11. 22,23-desidro-shearinina A

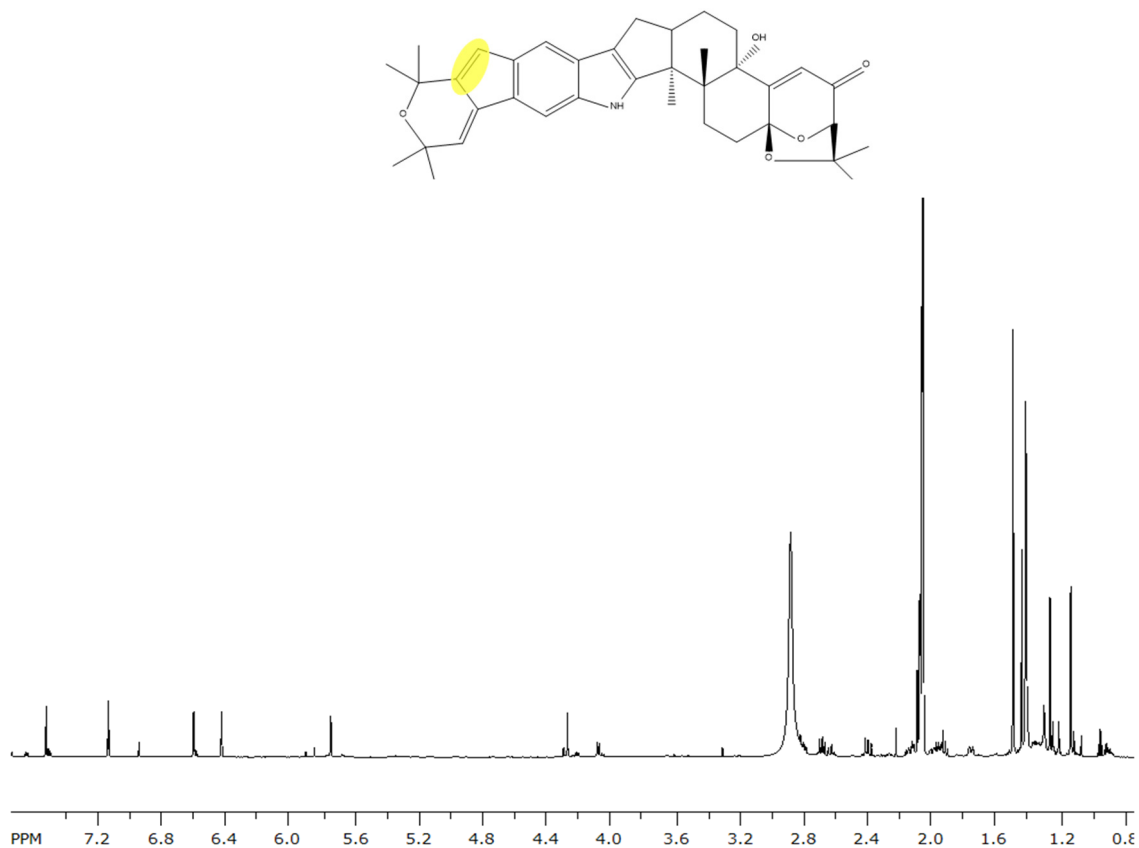


Figura A. 56 Espectro de RMN de ¹H da substância 22,23-desidro-shearinina A (CD₃OD, 600 MHz).

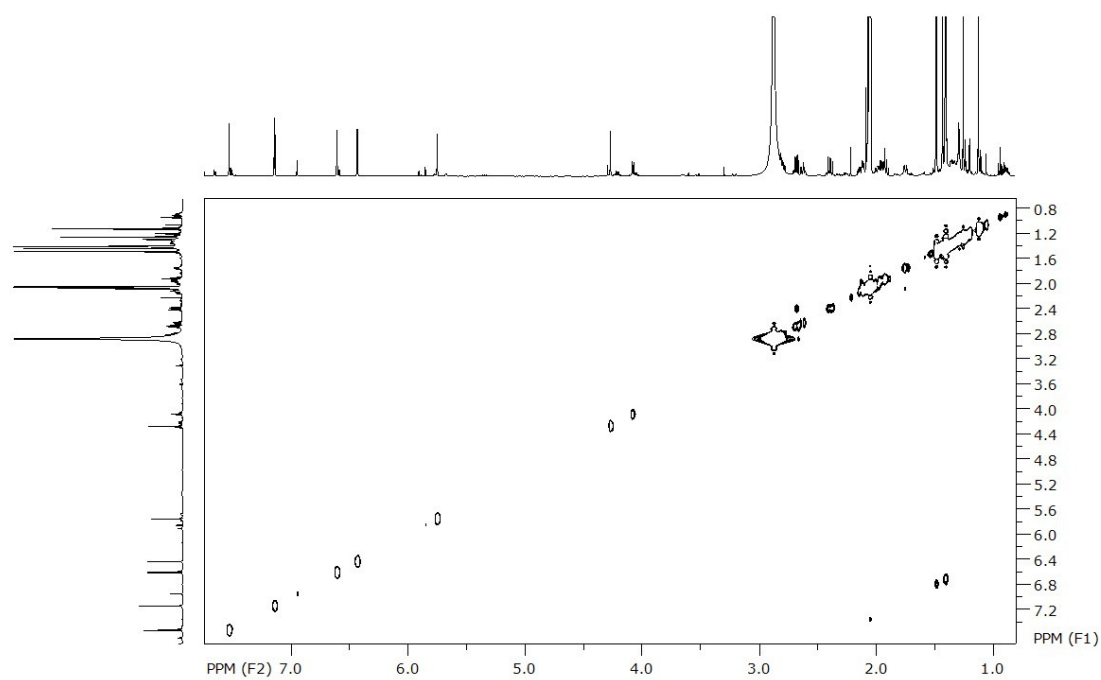


Figura A. 57 Espectro de RMN de COSY da substância 22,23-desidro-shearinina A (CD₃OD).

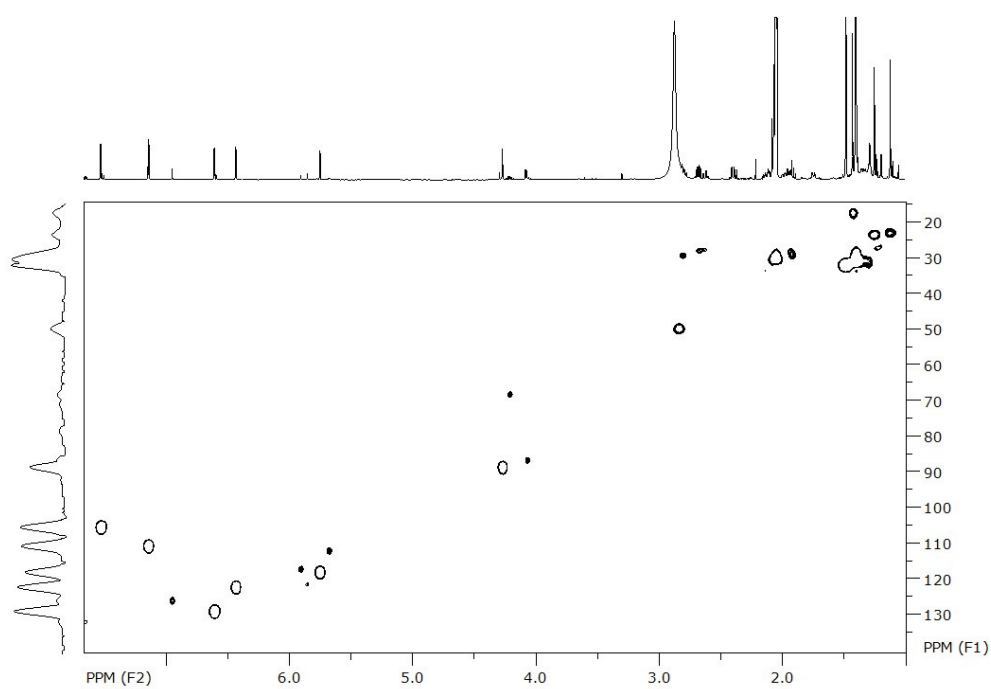


Figura A. 58 Espectro de RMN de HSQC da substância 22,23-desidro-shearinina A (CD₃OD).

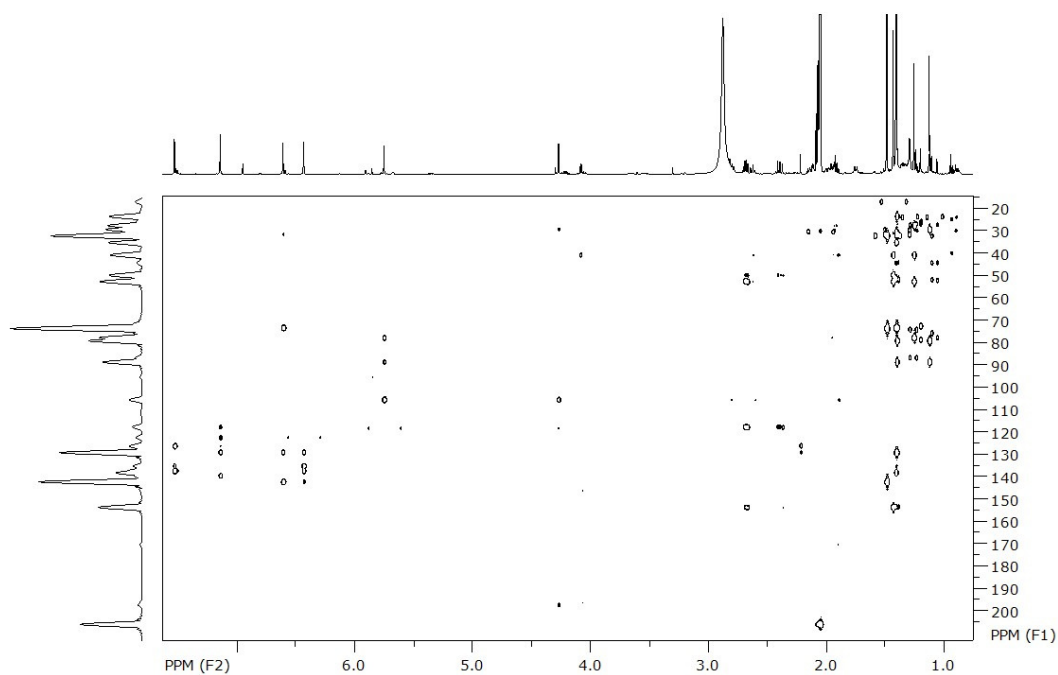


Figura A. 59 Espectro de RMN de HMBC da substância 22,23-desidro-shearinina A (CD₃OD).

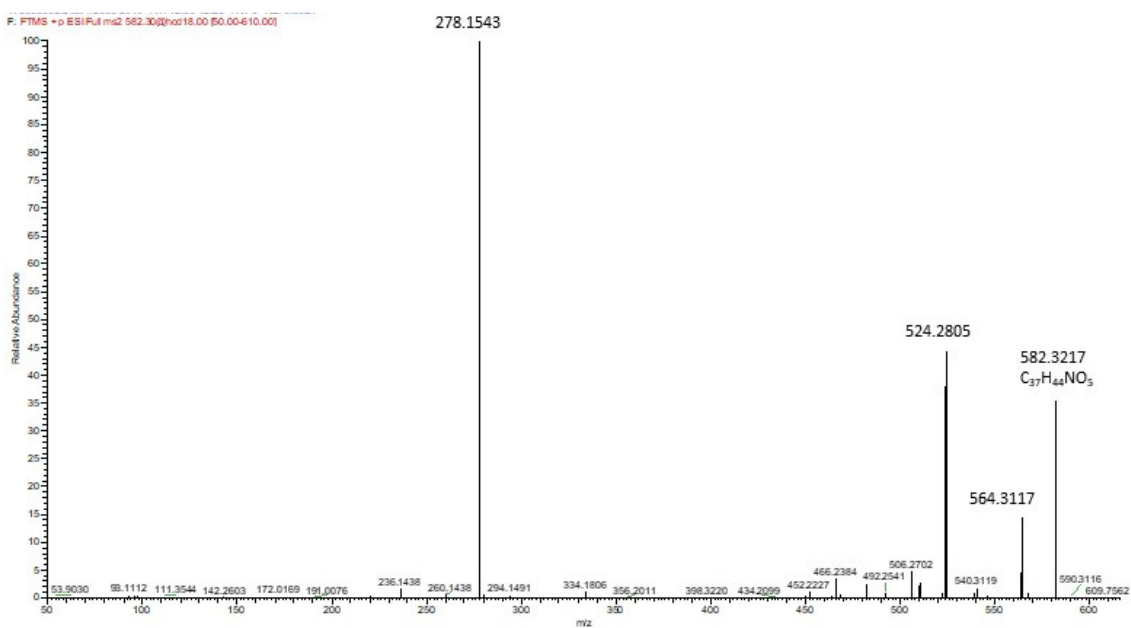


Figura A. 60 Espectro de HRMS (ESI+) da substância 22,23-desidro-shearinina A.