

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

**“PROSPECÇÃO QUÍMICA DO METABOLISMO DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE MAÇÃ (*Malus domestica*) E
GOIABA (*Psidium guajava*)”**

Lívia Soman de Medeiros*

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues-Filho

*** bolsista FAPESP**

São Carlos - SP
2014

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

M488pq

Medeiros, Lívia Soman de.

Prospecção química do metabolismo de fungos endofíticos isolados de maçã (*Malus domestica*) e goiaba (*Psidium guajava*) / Lívia Soman de Medeiros. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
270 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Química. 2. Metabólitos secundários. 3. Micro-organismos. 4. Frutas. 5. Derreplicação. I. Título.

CDD: 540 (20^a)

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

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de Doutorado da candidata **Lívia Soman de Medeiros**, realizada em 31 de outubro de 2014:*



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Profa. Dra. Hosana Maria Debonsi



Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi



Dr. Rodrigo Facchini Magnani



Prof. Dr. João Batista Fernandes

Dedico este trabalho aos meus pais Sônia Soman, Sérgio Maury de Medeiros e ao meu irmão Lucas Soman, pela compreensão, incentivo, ajuda, suporte e amor incondicional. Meus verdadeiros mestres. Minha gratidão eterna.

Agradecimentos

À Deus por me guiar e presentear por tudo e todos que tenho.

Ao meu marido Thiago A. M. Veiga por me encorajar e fortalecer em todos os momentos. Pelo amor e felicidade que me oferece todos os dias. Pelo futuro em construção.

Ao Professor Dr. Edson Rodrigues-Filho pela orientação, amizade e conhecimentos transmitidos durante esses dez anos de LabioMMi.

À banca examinadora, Professora Dra. Jacqueline A. Takahashi, Professora Dra. Hosana M. Deboni, Professor Dr. João Batista Fernandes e ao Dr. e Pesquisador Rodrigo Facchini Magnani, pela generosa contribuição ao trabalho.

Aos meus amigos e colegas Gezimar, Enzo, Marília, Rodrigo Rincão, Carolina Santos, Gabriel, Zia, Monize, Heloísa(s), Juliana(s), Renata(s), Felipe, Taty, Alef, Thaís, Diego e a todos os demais que fizeram parte de minha história no grupo LabioMMi, pela convivência, amizade, e aprendizagem.

Em especial, aos meus queridos amigos Luciana Amaral, Taicia Fill, Diana Lopez, Zeh Vinícius da Silva, Héctor Koolen e Douglas Ferreira que me apoiaram nos momentos mais importantes desta jornada. Fizeram-me acreditar em mim, e não desistir. Obrigada pela solicitude, companheirismo e amizade.

Aos professores Kristian Fog Nielsen e Thomas O. Larsen e a todo grupo de pesquisa comandado por eles durante meu estágio no exterior, em especial aos amigos Olivera Magdenoska, Tanja Blatt, Silas Anselm, Sara Kildgaard, Lene Maj Petersen, M.Louise Klejenstrup e Andreas Klitgaard por representarem tão bem minha família dinamarquesa e me transmitirem todo o conhecimento necessário durante meu estágio de doutorado na Universidade Técnica da Dinamarca- DTU.

Em especial ao professor KFN, pelas risadas inesquecíveis e grande confiança a mim depositada, mesmo antes de me conhecer. Por me incentivar, respeitar e valorizar, mesmo ainda hoje, do outro lado do Atlântico.

Novamente, agradeço pelo auxílio e colaboração nos trabalhos de co-cultivo à Taicia Fill, todo o estudo relacionado aos alcaloides halogenados ao Zeh Vinícius e Carolina Lúcia, e pelos experimentos de biotransformação com a afidicolina, à Diana Lopez.

Ao programa de Pós-graduação em Química da UFSCar.

Aos professores e secretárias do programa de Pós-graduação em Química da UFSCar, por todo o auxílio oferecido em minha formação.

À Fapesp pela bolsa de doutorado e financiamento ao projeto.

À Capes e ao CNPq pela bolsa de estágio de doutorado no exterior e financiamento ao projeto.

Lista de Abreviaturas

<i>ECI</i>	Extracted Ion Chromatogram-Cromatograma de Íons Extraídos
<i>BPC</i>	Base Peak Chromatogram-Cromatograma de picos base
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
UHPLC-HRMS	Ultra High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry
UV	Ultravioleta
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
MRM	Multiple Reaction Monitoring
Q-ToF	Quadrupole-Time-of-Flight
MS	Mass spectrometry
ODS	Octadecilsilano
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
<i>J</i>	Constante de acoplamento em Hertz
Hz	Hertz
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
δ	Deslocamento químico em ppm
ppm	Partes por milhão
eV	Elétrons volt
1 D	Experimento de Experimento de RMN em uma dimensão
2 D	Experimento de Experimento de RMN em duas dimensões
<i>ESI+</i>	<i>Eletrospray</i> modo positivo
<i>ESI-</i>	<i>Eletrospray</i> modo negativo
OSMAC	<i>One Strain Many Compounds</i>

Lista de Tabelas

TABELA 3.1 - Condições de eluição para método cromatográfico A	36
TABELA 3.2 - Condições do espectrômetro de massas <i>ESI</i> (-) ou <i>ESI</i> (+), método A	36
TABELA 3.3 - Condições de eluição para método cromatográfico B	36
TABELA 3.4 - Condições de eluição para método cromatográfico C	37
TABELA 3.5 - Condições do espectrômetro de massas <i>ESI</i> (-) ou <i>ESI</i> (+), método B e C	37
TABELA 3.6 - Condições de eluição para método cromatográfico D	38
TABELA 3.7 - Condições do espectrômetro de massas <i>ESI</i> (-) ou <i>ESI</i> (+), método D	38
TABELA 3.8 - Condições de eluição para método cromatográfico E	39
TABELA 3.9 - Condições de eluição para método cromatográfico F	40
TABELA 3.10 - Condições do espectrômetro de massas <i>ESI</i> (-) ou <i>ESI</i> (+), método F	40
TABELA 3.11 - Condições de eluição para método cromatográfico G	40
TABELA 3.12 - Espécie, fonte de isolamento e código de depósito dos fungos isolados	43
TABELA 3.13 - Siglas e constituições referentes aos meios de cultura empregados para screening metabólico dos fungos investigados	44
TABELA 3.14 - Co-cultivos realizados entre as espécies indicadas e os respectivos parâmetros de cultivo	49
TABELA 3.15 - Soluções de substratos testados no experimento de biotransformação por <i>T. rugulosus</i>	57
TABELA 3.16 - Resumo dos parâmetros de análise otimizados para os metabólito rugulovasina B no experimento de MRM	62
TABELA 3.17 - Resumo dos parâmetros de análise otimizados para o metabólito 8-clororugulovasinas B no experimento de MRM	62
TABELA 4.1 - Principais íons detectados na região 2 – 5.5 minutos, no cromatograma de BPC referente ao micro-extrato de <i>Setophoma</i> sp. em meio YES (FIGURA 4.5)	72
TABELA 4.2 - Dados de RMN de ¹ H referentes aos compostos isolados 1-7. Metanol- <i>d</i> ₄ ; δH em ppm, mult. (<i>J</i> em Hz)	93
TABELA 4.3 - Dados de RN de ¹³ C e HMBC dos compostos 1- 4 em metanol- <i>d</i> ₄ , HMBC (¹ H → ¹³ C)	98
TABELA 4.4 - Dados de RMN de ¹³ C e HMBC dos compostos 5-7 em metanol- <i>d</i> ₄ , HMBC (¹ H → ¹³ C)	99
TABELA 4.5 - Massa exata calculada (calc.)/composição elementar (abaixo) e massa acurada (ac.) para cada íon produto indicado na FIGURA 4.55	118

TABELA 4.6 - MIC encontradas no ensaio dos compostos 1-6 frente às bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	121
TABELA 4.7 - Dados de RMN de ¹ H referente à esquirina relatada na literatura e dados obtidos a partir da substância isolada	144
TABELA 4. 8 - Dados de RMN de ¹ H referente à rugulosina A relatada na literatura e dados obtidos a partir da substância isolada	146
TABELA 4.9 - Dados RMN de 8-clororugulovasinas A e B isoladas (600 MHz, CD ₃ OD) e da literatura (300 MHz, CDCl ₃)	162
TABELA 4.10 - Dados da literatura de RMN de ¹ H e ¹³ C das rugulovasinas A e B.	163
TABELA 4.11 - Dados de RMN novas rugulovasinas isoladas de <i>T. rugulosus</i> (600 MHz, CD ₃ OD).....	167
TABELA 4. 12 - Resumo dos íons produtos para rugulovasinas e seus derivados obtidos em experimento de HRMS/MS	180
TABELA 4. 13 - Massas acuradas e respectivos desvios referentes a alguns íons produtos visualizados nos espectros de HRMS/MS das rugulovasinas e derivados halogenados	188
TABELA 4.14 - Dados de RMN de ¹ H e HMBC para o estenfiperilenol isolado e dados de RMN de ¹ H para estenfiperilenol reportado na literatura.....	209
TABELA 4.15 - Contagem do número de esporos nas regiões de crescimento C e D (FIGURA 4. 153) das espécies de <i>Penicillium</i> indicadas, após 7 dias de co-cultivo com o fungo <i>Setophoma</i> sp, em meio PDA	215
TABELA 4.16 - Dados de RMN de ¹³ C para 18-ácido carboxílico afidicolina	238
TABELA 4.17 - Resumo dos parâmetros otimizados e usados no experimento de MRM dinâmico para os compostos alvo	244

Lista de Figuras

FIGURA 1.1 - Exemplos da quimiodiversidade e bioatividade de metabólitos fúngicos (BRAKHAGE, 2012; KUSARI et al., 2013; MOUSA et al., 2013)	3
FIGURA 1.2 - Representação diagramática da dinâmica relacionada à associação de fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras (Adaptado de KUSARI et al., 2012a) 5	5
FIGURA 1.3 - a) Fonte de isolamento de cepas microbianas responsáveis pela produção dos 280 metabólitos relatados em estudos brasileiros; b) Porcentagem de metabólitos secundários isolados de fungos, bactérias e líquens no Brasil. (Retirado de IÓCA et al., 2014).....	6
FIGURA 1.4 - a) Localização das diferentes classes de endofíticos na planta hospedeira (Retirado de KUSARI et al., 2012b); b) Representação da infecção celular vegetal por fungos e sistemática metabólica entre micro-organismo e planta (Adaptado de RAFIQI et al., 2012)	7
FIGURA 1.5 - Ciclo reprodutivo de <i>Malus domestica</i> (macieira) e propagação da infecção fúngica no ciclo da planta.....	8
FIGURA 1.6 - Algumas micotoxinas produzidas por fungos patogênicos em frutos .	12
FIGURA 1.7 - Depsídeos produzidos pela co-cultura entre os fungos <i>Trichophyton rubrum</i> e <i>Bionectria ochroleuca</i> . Retirado de BERTRAND et al., 2013a.....	16
FIGURA 1.8 - Esquema ilustrativo para respostas sinalizadoras da ocorrência de interações interespecíficas microbianas. Retirado de SHANK & KOLTER, 2009	16
FIGURA 1.9 - Classificação das diferentes respostas fenotípicas para co-culturas fúngicas. Adaptado de BERTRAND et al., 2013b.....	17
FIGURA 1.10 - Corte de <i>plugs</i> a partir do crescimento fúngico em placa de Petri, para micro-extração de metabólitos secundários	18
FIGURA 1.11 - Exemplo de derreplicação de um extrato da espécie de bactéria marinha <i>Vibrio coralliitycus</i> por LC-UV/HRMS. Espectro de UV e <i>full scan</i> são extraídos da banda em 10,01 min indicada no cromatograma. No espectro de massas o íon pseudomolecular é atribuído baseado na presença do aduto $[M+Na]^+$ e das espécies diméricas $[2M+H]^+$ e $[2M+Na]^+$. A consulta no AntiBase 2012 sugere três possíveis identidades ao alvo de acordo com a busca massa acurada com 5 ppm de exatidão. A andramida pode ser considerada o alvo de maior potencial devido à origem taxonômica. Retirado e adaptado de MÅNSSON, 2011.	20
FIGURA 1.12 - Esquema do fluxo de trabalho para screening de extratos fúngicos pela aplicação software <i>Target Analysis</i> -Bruker no uso da abordagem de derreplicação. Adaptado de KLITGAARD et al., 2014	25
FIGURA 1.13 - Biotransformação da cafeína por <i>P. griseoroseum</i>	26
FIGURA 3.1 - Procedimento de isolamento de micro-organismos endofíticos a partir de maçã e fragmentos depositados de polpa de maçã em meio PDA com evidente crescimento fúngico	42
FIGURA 3.2 - Imagens de microscopia óptica do microcultivo de <i>T.rugulosus</i>	43

FIGURA 3.3 - Procedimento de micro-extração a partir de micro-cultivos fúngicos. Adaptado de NIELSEN et al., 2004	45
FIGURA 3.4 - Regiões de micro-extração dos co-cultivos realizados	48
FIGURA 3.5 - Indicação das regiões de medição de esporulação dos fungos do gênero <i>Penicillium</i> quando em co-cultivo com <i>Setophoma</i> sp..Figura ilustra um dos co-cultivos realizados.....	50
FIGURA 3.6 - Fluxograma referente ao fracionamento do extrato de <i>Setophoma</i> sp. em arroz para isolamento de depsídeos.....	53
FIGURA 3.7 - Fluxograma referente ao processo de isolamento do policetídeo estenfiiperinol.....	54
FIGURA 3.8 - Fluxograma referente ao processo de isolamento de 8-clororugulovasinas A/B; 2,8-clororugulovasinas A/B e antraquinonas produzidas por <i>T. rugulosus</i>	55
FIGURA 3.9 - Procedimento para o experimento de biotransformação de substratos endógenos da maçã por <i>T. rugulosus</i>	57
FIGURA 3.10 - Cromatogramas de MRM obtidos para os metabólitos rugulovasina A/B variando-se os valores de voltagem de aceleração do íon. Valores usados estão indicados em cada cromatograma.....	61
FIGURA 3.11 - Placa de ELISA com as diferentes concentrações testadas para as substâncias isoladas	63
FIGURA 3.12 - Reação de formação da resorufina (rosa) a partir do corante resasurina (azul).....	64
FIGURA 4.1 - a) Cepa purificada de <i>Setophoma</i> sp.; Crescimento fúngico a partir de fragmentos de polpa de maçã e respectivas cepas purificadas a) <i>T. rugulosus</i> , b) <i>C. cladosporioides</i> , d) <i>E. nigrum</i>	67
FIGURA 4.2 - Micro-cultivo de <i>Setophoma</i> sp. em diferentes meios de cultura.....	69
FIGURA 4.3 - Cromatogramas de UV referentes aos micro-extratos de <i>Setophoma</i> sp. nos meios de cultura indicados; método A. (*)Cloranfenicol adicionado no meio de cultura, método A.....	70
FIGURA 4.4 - Sobreposição dos cromatogramas de ECI para <i>m/z</i> 479,1728 (vermelho) e 351,0874(azul) referente aos micro-extratos de <i>Setophoma</i> sp. indicados, método A.....	71
FIGURA 4.5 - Sobreposição dos cromatogramas de ECI dos íons <i>m/z</i> 367.0817 (banda 1), 351.0869 (banda 2), 365.0667 (banda 3), 349.0721 (banda 4) (± 5 ppm) detectados nos micro-extratos de <i>Setophoma</i> sp., método A.....	72
FIGURA 4.6 - Espectros de full scan e UV referentes às bandas do cromatograma de BPC detectadas no micro-extrato de YES do fungo <i>Setophoma</i> sp., detalhadas na FIGURA 4.5	73
FIGURA 4.7 - Identidades geradas pela consulta ao banco AntiBase2012 para o íon <i>m/z</i> 367,0817 (± 5 ppm)	75
FIGURA 4.8 - Identidades geradas pela consulta ao banco AntiBase2012 para o íon <i>m/z</i> 351,0869 (± 5 ppm)	76

FIGURA 4.9 - Identidades geradas pela consulta ao banco AntiBase2012 para o íon m/z 365,0668 (\pm 5ppm)	77
FIGURA 4.10 - Identidades geradas pela consulta ao banco AntiBase2012 para o íon m/z 349,0721 (\pm 5ppm)	78
FIGURA 4.11 - Perilenequinonas de maior <i>score</i> sugeridas pelo banco AntiBase2012 para metabólitos alvo produzidos por <i>Setophoma</i> sp.	79
FIGURA 4.12 - Região de interesse para cromatogramas de BPC correspondentes aos micro-extratos de <i>Setophoma</i> sp. indicados. Em destaque bandas cromatográficas de (1) à (7) referentes aos íons detectados nos espectros de <i>full scan</i> visualizados na FIGURA 4.13: m/z 451.1393 (composto 1); m/z 465.1550; (composto 2); m/z 479.1708 (composto 3 e 4); m/z 287.0925; (composto 5 e 6) and m/z 301.1076 (composto 7). Demais bandas representam compostos identificados em estudos anteriores (DE MEDEIROS et al., 2013): Lecanorina B e C (composto 8 e 9); thielavina Q e R (composto 10 e 11). Método A	80
FIGURA 4.13 - Espectros de UV e <i>full scan</i> referentes aos sete metabólitos detectados nos cromatogramas de UV e BPC respectivamente, a partir do extrato de arroz de <i>Setophoma</i> sp.	81
FIGURA 4.14 - Espectro de íons produtos de m/z 451,1394, banda (1)	82
FIGURA 4.15 - Espectro de íons produtos de m/z 465,1544, banda (2)	83
FIGURA 4.16 - Espectro de íons produtos de m/z 479,1707, banda (3)	83
FIGURA 4.17 - Espectro de íons produtos de m/z 479,1708, banda (4)	84
FIGURA 4.18 - Espectro de íons produtos de m/z 301,1078, banda (5)	84
FIGURA 4.19 - Espectro de íons produtos de m/z 287,0920, banda (6)	85
FIGURA 4.20 - Espectro de íons produtos de m/z 287,0927, banda (7)	85
FIGURA 4.21 - Cultivo do fungo <i>Setophoma</i> sp. em arroz e amostra branco do meio de cultura	86
FIGURA 4.22 - Espectro de RMN de ^1H referente ao metabólito 1 (CD_3OD , 400 MHz)	87
FIGURA 4.23 - Espectro de RMN de ^1H referente ao metabólito 2 (CD_3OD , 400 MHz)	88
FIGURA 4.24 - Espectro de RMN de ^1H referente ao metabólito 3 (CD_3OD , 400 MHz)	88
FIGURA 4.25 - Espectro de RMN de ^1H referente ao metabólito 4 (CD_3OD , 400 MHz)	89
FIGURA 4.26 - Espectro de RMN de ^1H referente ao metabólito 5 (CD_3OD , 400 MHz)	89
FIGURA 4.27 - Espectro de RMN de ^1H referente ao metabólito 6 (CD_3OD , 400 MHz)	90
FIGURA 4.28 - Espectro de RMN de ^1H referente ao metabólito 7 (CD_3OD , 400 MHz)	90

FIGURA 4.1 - Novos depsídeos produzidos pelo endófito de goiaba, <i>Setophoma</i> sp.: (1) Thielavina S; (2) Thielavina T; (3) Thielavina U; (4) Thielavina V; (5) Lecanorina D; (6) Lecanorin E (7) Lecanorina F.....	92
FIGURA 4.30 - Espectro de RMN de ¹³ C referente ao metabólito 1 (CD ₃ OD, 100 MHz)	94
FIGURA 4.31 - Espectro de RMN de ¹³ C referente ao metabólito 2 (CD ₃ OD, 125 MHz)	95
FIGURA 4.32 - Espectro de RMN de ¹³ C referente ao metabólito 3 (CD ₃ OD, 125 MHz)	95
FIGURA 4.33 - Espectro de RMN de ¹³ C referente ao metabólito 4 (CD ₃ OD, 100 MHz)	96
FIGURA 4.34 - Espectro de RMN de ¹³ C referente ao metabólito 6 (CD ₃ OD, 200 MHz)	96
FIGURA 4.35 - Espectro de RMN de ¹³ C referente ao metabólito 7 (CD ₃ OD, 200 MHz)	97
FIGURA 4.36 - Mapa de contorno do experimento de HSQC referente ao metabólito 1 (CD ₃ OD, 400MHz).....	97
FIGURA 4.37 - Mapa de contorno do experimento de HMBC referente ao metabólito 1 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	101
FIGURA 4.38 - Ampliação do mapa de contorno do experimento de HMBC referente ao metabólito 1 (CD ₃ OD, 400MHz)	101
FIGURA 4.39 - Ampliação do mapa de contorno do experimento de HMBC referente ao metabólito 1 (CD ₃ OD, 400MHz)	102
FIGURA 4.40 - Correlações de HMBC observadas para os compostos de 1 à 7 ...	103
FIGURA 4.41 - Mapa de contorno do experimento de HSQC (e ampliação) referente ao metabólito 2 (CD ₃ OD, 500MHz)	104
FIGURA 4.42 - Mapa de contorno do experimento de HMBC (e ampliações) referente ao metabólito 2 (CD ₃ OD, 500MHz)	105
FIGURA 4.43 - Ampliação do mapa de contorno do experimento de HMBC referente ao metabólito 2 (CD ₃ OD, 500MHz)	105
FIGURA 4.44 - Ampliação do mapa de contorno do experimento de HMBC referente ao metabólito 2 (CD ₃ OD, 500MHz)	106
FIGURA 4.45 - Mapa de contorno do experimento de HSQC (e ampliação) referente ao metabólito 3 (CD ₃ OD, 800MHz)	106
FIGURA 4.46 - Mapa de contorno do experimento de HMBC (e ampliação)referente ao metabólito 3 (CD ₃ OD, 800MHz)	107
FIGURA 4.47 - Ampliação do mapa de contorno do experimento de HMBC referente ao metabólito 3 (CD ₃ OD, 800MHz)	107
FIGURA 4.48 - Mapa de contorno do experimento de HSQC referente ao metabólito 4 (CD ₃ OD, 400MHz).....	108
FIGURA 4.49 - Mapa de contorno do experimento de HMBC referente ao metabólito 4 (CD ₃ OD, 400MHz).....	108

FIGURA 4.50 - Ampliação do mapa de contorno do experimento de HMBC (e ampliações) referente ao metabólito 4 (CD ₃ OD, 400MHz)	109
FIGURA 4.51 - Ampliação do mapa de contorno do experimento de HMBC (e ampliações) referente ao metabólito 4 (CD ₃ OD, 400MHz)	109
FIGURA 4.52 - Mapa de contorno do experimento de HSQC referente ao metabólito 5 (CD ₃ OD, 500MHz).....	110
FIGURA 4.53 - Mapa de contorno do experimento de HMBC referente ao metabólito 5 (CD ₃ OD, 500MHz).....	110
FIGURA 4.54 - Mapa de contorno do experimento de HSQC (e ampliações) referente ao metabólito 6 (CD ₃ OD, 800MHz)	111
FIGURA 4.55 - Mapa de contorno do experimento de HMBC (e ampliações) referente ao metabólito 6 (CD ₃ OD, 800MHz)	111
FIGURA 4.56 - Mapa de contorno do experimento de HSQC (e ampliação) referente ao metabólito 7 (CD ₃ OD, 800MHz)	112
FIGURA 4.57 - Mapa de contorno do experimento de HMBC (e ampliações) referente ao metabólito 7 (CD ₃ OD, 800MHz)	112
FIGURA 4.58 - Espectro de íons produtos dos tridepsídeos indicados, com destaque para os íons de massa nominal <i>m/z</i> 149 e 163.....	114
FIGURA 4.59 - Espectro de íons produtos dos tridepsídeos indicados, com destaque para os íons de massa nominal <i>m/z</i> 177 e 163	115
FIGURA 4.60 - Espectro de íons produtos dos tridepsídeos indicados, com destaque para os íons de massa nominal <i>m/z</i> 301, 329 e 315	115
FIGURA 4.61 - a) Espectro de HRMS/MS composto 1 e quebras propostas para os íons correspondentes aos compostos 1- 4 . b) Espectro de HRMS/MS composto 5 e quebras propostas para os íons correspondentes aos compostos 5- 7 . c) Mecanismos de fragmentação propostos para justificativa dos íons produtos visualizados nos espectros de HRMS/MS dos compostos 1- 7 . (*) Indicação das possíveis espécies reativas	117
FIGURA 4.62 - Biossíntese do ácido orselínico, precursor biossintético de depsídeos (DEWICK, 2009)	119
FIGURA 4.63 - Resultados do ensaio antimicrobiano a partir dos depsídeos isolados de <i>Setophoma</i> sp. testados contra as bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	121
FIGURA 4.64 - Crescimento da recente espécie descoberta, <i>Talaromyces atroroseus</i> , em diferentes meios de cultura (frente e verso): CYA, MEA, YES e CREA respectivamente da esquerda para direita. Espécie produtora de pigmentos avermelhados e algumas azafilonas. Retirado de FRISVAD et al., 2013.....	123
FIGURA 4.65 - Micro-cultivo de <i>Talaromyces rugulosus</i> em diferentes meios de cultura indicados.....	124
FIGURA 4.66 - Cromatogramas de UV referentes aos micro-extratos indicados de <i>T.rugulosus</i> , método A	125
FIGURA 4.67 - Cromatogramas de <i>BPC</i> referentes aos micro-extratos indicados de <i>T.rugulosus</i> , método A	125

FIGURA 4.68 - Espectros de <i>full scan</i> e UV referentes às bandas dos cromatogramas de <i>BPC</i> (FIGURA 4.67) detectadas nos micro-extratos do fungo <i>T.rugulosus</i>	127
FIGURA 4.69 - Continuação dos espectros de <i>full scan</i> e UV referentes às bandas dos cromatogramas de <i>BPC</i> (FIGURA 4.67) detectadas nos micro-extratos do fungo <i>T.rugulosus</i>	128
FIGURA 4.70 - Diagrama representativo de alvos selecionados para o processamento dos micro-extratos de <i>T. rugulosus</i> pelo programa <i>Target Analysis</i> através da criação de uma biblioteca própria de dados relacionada ao gênero <i>Talaromyces</i>	129
FIGURA 4.71 - Resumo de dados gerado pelo programa <i>Target Analysis</i> aos micro-extratos avaliados de <i>T.rugulosus</i>	131
FIGURA 4.72 - Sobreposição dos cromatogramas de <i>ECl</i> ao cromatograma de <i>BPC</i> referente ao micro-extrato de PDA de <i>T. rugulosus</i> . Relações de íons extraídos seguem na parte inferior da figura bem como os metabólitos sugeridos correspondentes. Resultados gerado pelo programa <i>Target Analysis</i>	132
FIGURA 4.73 - Derreplicação de uma das wortimanolactonas produzidas por <i>T. rugulosus</i> (7,9 minutos). O espectro de <i>full scan</i> mostra a formação dos íons diagnósticos como adutos de sódio $[M+Na]^+$ e $[2M+H]^+$, bem como o íon oriundo de fragmentação na fonte de ionização $[M-H_2O+H]^+$	133
FIGURA 4.74 - Wortimanolactonas potencialmente produzidas por <i>T. rugulosus</i>	134
FIGURA 4.75 - a) Micro-cultivo de <i>T.rugulosus</i> e <i>T.wortmannii</i> em PDA; b) Cromatograma de <i>ECl</i> para m/z 409,2380 (\pm 5 ppm) correspondente às wortimanolactonas apontadas no processo de derreplicação; c) Comparação dos espectros de UV e <i>full scan</i> referentes à wortimanolactona eluída em 7,8 min, detectada nos micro-extratos de <i>T.rugulosus</i> e <i>T.wortmannii</i>	135
FIGURA 4.76 - Comparação dos espectros de UV e <i>full scan</i> referentes às wortimanolactonas eluídas em 7,5 e 8,1 min, detectadas nos micro-extratos de <i>T. rugulosus</i> e <i>T.wortmannii</i>	136
FIGURA 4.77 - Espectros de UV e <i>full scan</i> correspondentes às duas bandas cromatográficas indicadas no cromatograma de <i>ECl</i> do micro-extratos de PDA de <i>T.rugulosus</i> para m/z 413,1239	137
FIGURA 4.78 - Prováveis azafilonas produzidas por <i>T.rugulosus</i> e espectros de íons produto dos íons m/z 413 encontrados nos micro-extratos fúngicos, correspondentes às referidas substâncias, método D	138
FIGURA 4.79 - Mecanismo de fragmentação proposto para as hidroximitorubrininas apontadas como potenciais metabólitos de <i>T. rugulosus</i>	138
FIGURA 4.80 - Estrutura da Kasanosina C e espectro de íons produto referente à m/z 401 detectado nos micro-extratos de <i>T.rugulosus</i> , correspondente ao referido metabólito, método D	139
FIGURA 4.81 - Mecanismo de fragmentação proposto para a Kasanosina C, justificando os íons fragmentos visualizados no espectro ilustrados na FIGURA 4.79	139

FIGURA 4.82 - Ampliação da região de interesse para os cromatogramas referentes ao micro-extrato de <i>T. rugulosus</i> e dos padrões de metabólitos avaliados para comparação; ampliação do espectro de <i>full scan</i> das bandas alvo e dos padrões indicados.....	141
FIGURA 4.83 - Processo de cromatografia líquida de baixa pressão utilizado no isolamento da esquirina e da rugulosina A. Espectros de UV dos metabólitos são ilustrados na figura.....	142
FIGURA 4.84 - Espectro de ¹ H do metabólito esquirina (CD ₃ OD, 400 MHz)	143
FIGURA 4.85 - Estrutura da bisantraquinona esquirina produzida por <i>T. rugulosus</i>	144
FIGURA 4.86 - Espectro de RMN ¹ H da rugulosina A (400MHz, CD ₃ OD)	145
FIGURA 4.87 - Estrutura da bisantraquinona rugulosina A produzida por <i>T.rugulosus</i>	145
FIGURA 4.88 - Espectro de íons produto da rugulosina A, <i>m/z</i> 541, 20 eV, ESI - ..	146
FIGURA 4.89 - Proposta para a biogênese da rugulosina A, a partir da esquirina .	147
FIGURA 4.90 - a) Espectro de UV da rugulosina A; b) Identidades sugeridas para os íons <i>m/z</i> 559,1237 ± (5 ppm) encontrados nos micro-extratos de <i>T.rugulosus</i> e ampliação do cromatograma de <i>ECl</i> para tal íon; indicação dos espectros de UV obtidos para cada banda.....	149
FIGURA 4.91 - Espectros de <i>full scan</i> e de UV referentes às bandas cromatográficas indicadas.....	150
FIGURA 4.92 - Espectro de UV e de <i>full scan</i> das bandas cromatográficas indicadas para o micro-extrato de PDAdo <i>T. rugulosus</i> e do padrão de rugulovasinas A/B....	151
FIGURA 4.93 - a) Espectro de <i>full scan</i> e UV obtidos experimentalmente para a banda cromatográfica avaliada, fórmula molecular sugerida pelo programa de processamento de dados e estrutura molecular sugerida pelo banco AntiBase; b) Perfil isotópico teórico para a fórmula molecular sugerida.....	153
FIGURA 4.94 - Cromatogramas de <i>ECl</i> do micro-extrato de <i>T. rugulosus</i> do referentes às relações de <i>m/z</i> indicadas	154
FIGURA 4.95 - A) Espectro de <i>full scan</i> e U.V obtidos para a banda cromatográfica referente ao íon <i>m/z</i> 337 de menor retenção cromatográfica; fórmula molecular sugerida pelo programa de processamento de dados. B) Perfil isotópico teórico para a fórmula molecular sugerida	155
FIGURA 4.96 - A) Espectro de <i>full scan</i> e UV obtidos para a banda cromatográfica referente ao íon <i>m/z</i> 337 de maior retenção cromatográfica; fórmula molecular sugerida pelo programa de processamento de dados. B) Perfil isotópico teórico para a fórmula molecular sugerida	156
FIGURA 4.97 - Cromatograma referente a fração enriquecida com rugulovasinas, submetida ao sistema de LC-SPE. Indicação dos respectivos isômeros isolados, método D	158
FIGURA 4.98 - Espectro de ¹ H e ampliações referente à 8-clorrorugulovasina A, metanol- <i>d</i> ₄ , 600 MHz. * Contaminantes provenientes do cartucho de SPE	159

FIGURA 4.99 - Espectro de ^1H e ampliações referente à 8-clororugulovasina B, metanol- d_4 , 600 MHz. * Contaminantes provenientes do cartucho de SPE	159
FIGURA 4.100 - Espectro de ^1H e ampliações referente ao novo derivado da rugulovasina, isômero A, metanol- d_4 , 600 MHz. * Contaminantes provenientes do cartucho de SPE	160
FIGURA 4.101 - Espectro de ^1H e ampliações referente ao novo derivado da rugulovasina, isômero B, metanol- d_4 , 600 MHz. * Contaminantes provenientes do cartucho de SPE	160
FIGURA 4.102 - Alcaloides do tipo <i>ergot</i> produzidos por <i>T. rugulosus</i>	162
FIGURA 4.103 - Espectro de HSQC 8-clororugulovasina A, metanol- d_4 , 600MHz. 164	164
FIGURA 4.104 - Ampliação do espectro de HMBC 8-clororugulovasina A, metanol- d_4 , 600MHz.....	164
FIGURA 4.105 - Ampliação do espectro de HMBC 8-clororugulovasina B, metanol- d_4 , 600MHz.....	165
FIGURA 4.106 - Ampliação da região de interesse do espectro de RMN de ^1H de a) novo metabólito, isômero B; b) novo metabólito, isômero A; c) 8-clororugulovasina B; d) 8-clororugulovasina A	166
FIGURA 4.107 - Novos alcaloides indólicos diclorados produzidos por <i>T.rugulosus</i>	167
FIGURA 4.108 - Espectro de ^1H referente à 2,8-diclororugulovasina A em clorofórmio- d , 600 MHz e ampliação da região de interesse	168
FIGURA 4.109 - Espectro de ^1H encontrado na literatura referente à rugulovasina A, em clorofórmio- d , 300 MHz e ampliação da região de interesse, (ZHANG et al., 2013).	169
FIGURA 4.110 - Espectro de HSQC 2,8-clororugulovasina A, metanol- d_4 , 600MHz	170
FIGURA 4.111 - Ampliação do espectro de HMBC 2,8-clororugulovasina A, metanol- d_4 , 600MHz.....	170
FIGURA 4.112 - Ampliação do espectro de HMBC 2,8-clororugulovasina A, metanol- d_4 , 600MHz.....	171
FIGURA 4.113 - Espectro de <i>full scan</i> obtido para região cromatográfica de interesse do extrato relativo ao experimento com HBr, método E.....	172
FIGURA 4.114 - Cromatogramas de <i>ECl</i> correspondentes às massas nominais do íon pseudomolecular protonado a) m/z 337; b) m/z 303; c) m/z 347; d) m/z 269, método C	173
FIGURA 4.115 - Espectro de <i>full scan</i> simulado para o íon de composição elementar $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{N}_2\text{Br}$; b) Espectro de <i>full scan</i> referente ao íon detectado m/z 347,0388 no extrato de <i>T.rugulosus</i> , método C	174
FIGURA 4.116 - Perfil de fragmentação de rugulovasinas produzidas por <i>T.rugulosus</i> , método C	175
FIGURA 4.117 - Espectro de íons produto, 2,8-diclororugulovasina A, <i>ESI</i> +, 25 eV	177

FIGURA 4.118 - Ampliação da região de interesse do espectro de íons produto, 2,8-diclororugulovasina A, <i>ESI</i> +, 25 eV	177
FIGURA 4.119 - Espectro de íons produto, 2,8-diclororugulovasina B, <i>ESI</i> +, 25 eV	178
FIGURA 4.120 - Ampliação da região de interesse do espectro de íons produto, 2,8-diclororugulovasina B, <i>ESI</i> +, 25 eV	178
FIGURA 4.121 - Mecanismos de fragmentação sugeridos para rugulovasinas e seus derivados halogenados	179
FIGURA 4.122 - Proposta para o mecanismo de fragmentação das 2,8-diclororugulovasina A e B.....	181
FIGURA 4.123 - Espectro de íons produto, rugulovasina A , <i>ESI</i> +, 25 eV.....	182
FIGURA 4.124 - Espectro de íons produto, rugulovasina B , <i>ESI</i> +, 25 eV.....	182
FIGURA 4.125 - Espectro de íons produto, 8-clororugulovasina A , <i>ESI</i> +, 25 eV ...	183
FIGURA 4.126 - Ampliação da região de interesse do espectro de íons produto, 8-clororugulovasina A , <i>ESI</i> +, 25 eV.....	183
FIGURA 4.127 - Espectro de íons produto, 8-clororugulovasina B , <i>ESI</i> +, 25 eV ...	184
FIGURA 4.128 - Ampliação da região de interesse do espectro de íons produto, 8-clororugulovasina B , <i>ESI</i> +, 25 eV.....	184
FIGURA 4.129 - Espectro de íons produto, 8-bromorugulovasina A , <i>ESI</i> +, 25 eV.	185
FIGURA 4.130 - Ampliação da região de interesse do espectro de íons produto, 8-bromorugulovasina A , <i>ESI</i> +, 25 eV	186
FIGURA 4.131 - Espectro de íons produto, 8-bromorugulovasina B , <i>ESI</i> +, 25 eV.	186
FIGURA 4.132 - Ampliação da região de interesse do espectro de íons produto, 8-bromorugulovasina B , <i>ESI</i> +, 25 eV	187
FIGURA 4.133 - Mecanismo de fragmentação proposto para alcaloides monohalogenados produzidos por <i>T. rugulosus</i>	187
FIGURA 4.134 - Mecanismo de fragmentação proposto para justificativa do íon <i>m/z</i> 140.....	188
FIGURA 4.135 - Interconversão das rugulovasinas A e B (ZHANG et al., 2013)	189
FIGURA 4.136 - Gráfico para a curva estimada da produção de rugulovasinas halogenadas por <i>T.rugulosus</i> de acordo com o efeito de íons cloreto no meio de cultura	191
FIGURA 4.137 - Gráfico para a curva estimada da produção de rugulovasinas halogenadas por <i>T.rugulosus</i> de acordo com o efeito de íons brometo no meio de cultura	191
FIGURA 4.138 - Mecanismo proposto para a halogenação do triptofano. Adaptado de FLECKS et al., 2008 e CHEN & PÉE, 2008	193
FIGURA 4.139 - Metabólitos secundários halogenados derivados do triptofano: chondramida D e rebecamicina.....	194
FIGURA 4.140 - Resultado do <i>blast</i> referente ao fragmento obtido da PCR para <i>T.rugulosus</i> na detecção de halogenases	195

FIGURA 4.141 - Comparação da sequência de aminoácidos da radH com o fragmento obtido da PCR; Indicações: a) Sequência de aminoácidos referente a halogenase do organismo padrão “ <i>Aspergillus oryzae</i> RIB40”; b) Resultado do <i>blast</i> do fragmento de PCR obtido no estudo mostrando a amplificação de parte do gene que codifica a halogenase; C) Sequência de aminoácidos referente ao fragmento de PCR obtido no estudo do organismo <i>T.rugulosus</i>	196
FIGURA 4.142 - Alguns co-cultivos realizados entre as espécies isoladas de maçã e goiaba em diferentes meios de cultura	198
FIGURA 4.143 - Co-cultivo de <i>P.brasilianum</i> e <i>Setophoma</i> sp. Região indicada referente à micro-extração realizada	200
FIGURA 4.144 - Cromatogramas dos micro-extratos de a) <i>P. brasilianum</i> ; b) <i>Setophoma</i> sp. e c) co-cultivo entre as duas espécies. Método E.....	201
FIGURA 4.145 - Cromatogramas de <i>ECl</i> para <i>m/z</i> 367 dos micro-extratos de a) <i>P. brasilianum</i> ; b) <i>Setophoma</i> sp.; c) co-cultivo entre as duas espécies. Método E	202
FIGURA 4.146 - Cromatogramas de <i>ECl</i> para <i>m/z</i> 351 dos micro-extratos de a) <i>P. brasilianum</i> ; b) <i>Setophoma</i> sp.; c) co-cultivo entre as duas espécies. Método E	202
FIGURA 4.147 - Espectro de íons produto para <i>m/z</i> 367. Em destaque, espectro de UV do metabólito detectado, 30 eV	203
FIGURA 4.148 - Espectro de íons produto para <i>m/z</i> 351. Em destaque, espectro de UV do metabólito detectado, 30 eV	203
FIGURA 4.149 - Espectro de RMN de ¹ H do metabólito isolado a partir do co-cultivo de <i>Setophoma</i> sp. e <i>P.brasilianum</i> (CD ₃ OD, 400MHz).....	204
FIGURA 4.150 - Espectro de RMN de ¹ H e ampliações das regiões de interesse, do metabólito isolado a partir do co-cultivo de <i>Setophoma</i> sp. e <i>P.brasilianum</i> (CDCl ₃ , 400MHz)	205
FIGURA 4.151 - Espectro de RMN de ¹³ C do metabólito isolado a partir do co-cultivo de <i>Setophoma</i> sp. e <i>P.brasilianum</i> (CD ₃ OD, 400MHz).....	206
FIGURA 4.152 - Espectro de DEPT referente à perilenequinona isolada.....	206
FIGURA 4.153 - Espectro de COSY da substância isolada (CD ₃ OD, 400 MHz) e correlações observadas entre os núcleos de hidrogênio	207
FIGURA 4.154 - Espectro de HMBC da substância isolada (CD ₃ OD, 400 MHz) e correlações a longa distância observadas entre os núcleos de hidrogênio e carbono	208
FIGURA 4.155 - Estrutura da perilenequinona isolada a partir do co-cultivo entre os fungos <i>Setophoma</i> sp. e <i>P.brasilianum</i>	210
FIGURA 4.156 - Cromatogramas de <i>ECl</i> para <i>m/z</i> 351,0870 referentes ao experimento de co-cultivo investigados através de dados de HRMS. Em destaque espectros de <i>full scan</i> das bandas cromatográficas indicadas. Método B	211
FIGURA 4.157 - Cromatogramas de <i>ECl</i> para o íon de <i>m/z</i> 351,0868 referentes aos extratos indicados. Destaque para a proporção entre as intensidades das bandas dos potenciais isômeros. Método B	212

FIGURA 4.158 - Comparação entre o cromatograma de ECI para m/z 351 de: a) metabólito isolado (estenfiperilenol) b) Micro-extrato controle de <i>Setophoma</i> sp., Método B.....	212
FIGURA 4.159 - Co-cultivos entre o fungo <i>Setophoma</i> sp. e as espécies indicadas em meios MEA e PDA respectivamente. Em destaque, ampliação dos cultivos em meio PDA	213
FIGURA 4.160 - Indicação das regiões de medição de esporulação dos fungos do gênero <i>Penicillium</i> quando em co-cultivo com <i>Setophoma</i> sp. em meio PDA	214
FIGURA 4.161 - Experimentos para a verificação da inibição das espécies de <i>Penicillium</i> indicadas por voláteis possivelmente produzidos por <i>Setophoma</i> sp., em meio PDA.....	216
FIGURA 4.162 - a) Cromatogramas de ECI de m/z 351,0867 para as triplicatas do co-cultivos indicados; b) Cromatogramas de ECI de m/z 351,0867 para as replicatas do controle de <i>Setophoma</i> sp. Em destaque os valores médios das integrações das áreas das bandas detectadas. Método B	217
FIGURA 4.163 - Ensaio antifúngico para teste de inibição do estenfiperilenol contra <i>P. brasilianum</i> e <i>P. digitatum</i>	219
FIGURA 4.164 - Substratos administrados no experimento de biotransformação ao fungo <i>T. rugulosus</i>	222
FIGURA 4.165 - Cromatograma de DAD dos extratos referentes ao experimento de biotransformação do substrato epicatequina. Método D.....	223
FIGURA 4.166 - Espectros de full scan e de UV a) da banda detectada no experimento de biotransformação da epicatequina; b) epicatequina padrão.....	223
FIGURA 4.167 - Cromatogramas de DAD obtidos para os extratos dos substratos indicados, método F	225
FIGURA 4.168 - Cromatogramas de ECI para m/z 225 referentes aos extratos do experimento de biotransformação indicados, método F	225
FIGURA 4.169 - Espectro de full scan em HRMS do metabólito investigado	226
FIGURA 4.170 - Sugestões geradas pelo banco AntiBase ao metabólito de m/z 225,0770	227
FIGURA 4.171 - Comparação entre os cromatogramas de ECI para m/z 225,0770 correspondentes ao padrão de ácido terrétrico e ao micro-extrato de <i>T.rugulosus</i> . Método A.....	228
FIGURA 4.172 - a) Comparação entre os cromatogramas de ECI para m/z 225,0770 das amostras indicadas; b) Comparação entre os espectros de full scan das amostras indicadas. Método A.....	229
FIGURA 4.173 - Cromatogramas de ECI para m/z 609 a) rotina padrão, b)extrato de biotransformação. Método F.....	230
FIGURA 4.174 - Cromatogramas de ECI para m/z 301 a) quercetina padrão, b)extrato de biotransformação. Método F.....	230
FIGURA 4.175 - a) Meios reacionais do experimento de biotransformação da rotina.; b) Sobreposição dos cromatogramas de UV referentes ao experimento de	

biotransformação da rutina. Linha vermelha:rutina; linha preta: extrato de biotransformação; c) linha azul: extrato do controle fúngico. * ácido multicolânico. Método F.....	231
FIGURA 4.176 - Cromatogramas de <i>ECl</i> para <i>m/z</i> 609 a) hesperidina padrão, b)extrato de biotransformação. Método F.....	232
FIGURA 4.177 - Cromatogramas de <i>ECl</i> para <i>m/z</i> 174 a) ácido ascórbico padrão, b)extrato de biotransformação. Método F.....	232
FIGURA 4.178 - Cromatogramas de <i>ECl</i> para <i>m/z</i> 274 a) floretina padrão, b)extrato de biotransformação. Método F.....	232
FIGURA 4.179 - Cromatograma de íons totais a) controle; b) afidicolina padrão; c) extrato do experimento de biotransformação. d) Cromatograma de <i>ECl</i> para <i>m/z</i> 225 referente ao extrato do experimento de biotransformação. Método F.....	234
FIGURA 4.180 - Espectro de <i>full scan</i> da afidicolina padrão; b) Espectro de <i>full scan</i> da banda detectada para no experimento de biotransformação da afidicolina	235
FIGURA 4.181 - Espectro de íons produtos a) afidicolina padrão; b) Produto de biotransformação detectado a partir da afidicolina	235
FIGURA 4.182 - a) Espectro de RMN de ¹ H para o produto de biotransformação da afidicolina, metanol- <i>d</i> ₄ , 400 MHz; b) Espectro de RMN de ¹³ C e ampliação referente ao produto de biotransformação da afidicolina, metanol- <i>d</i> ₄ , 100 MHz.....	238
FIGURA 4.183 - Biotransformação realizada por <i>T. rugulosus</i>	238
FIGURA 4.184 - Resumo da origem, tipos de maçã e tipos de procedimento de extração utilizados para experimento de detecção de metabólitos secundários de <i>T.rugulosus</i> nestes frutos	239
FIGURA 4.185 - Exemplo de utilização do experimento de MRM dinâmico na detecção de diferentes compostos em pequenas concentrações na amostra analisada. Adaptado de STONE et al., 2009	241
FIGURA 4.186 - Cromatograma de MRM dinâmico, após otimização de parâmetros de análise, para os metabólitos indicados, método B, <i>ESI</i> +	243
FIGURA 4.187 - Cromatograma de MRM dinâmico, após otimização de parâmetros de análise, para os metabólitos indicados, método B, <i>ESI</i> -	243
FIGURA 4.188 - Cromatograma de MRM do extrato de maçã, tipo Fuji (Jáú®), extração E2, método B, <i>ESI</i> +	245
FIGURA 4.189 - Cromatograma de MRM do extrato de maçã, tipo Fuji, extração E1, método D, <i>ESI</i> -.....	246
FIGURA 4.190 - Cromatograma de MRM do extrato de maçã, tipo Fuji (Sonda®), extração E2, método D, <i>ESI</i> -.....	246
FIGURA 4.191 - Cromatograma de MRM do extrato de maçã, tipo Fuji (Sonda®), extração E3, método D, <i>ESI</i> -.....	247
FIGURA 4.192 - Cromatograma de MRM dinâmico referente à mistura de solventes utilizada nos procedimentos de extração de metabólitos a partir dos extratos de maçã	248

FIGURA 4.193 - Cromatograma de íons extraídos para m/z 564,3310 para os extratos indicados. Método A.....	248
FIGURA 4.194 - Cromatograma de íons extraídos para m/z 520,2688 para os extratos indicados. Método A.....	248
FIGURA 4.195 - Espectros de full scan referentes aos cromatogramas de íons extraídos para para m/z 520,2688 e 564,3310 em HRMS, relativos aos micro-extratos indicados. Método A.....	249
FIGURA 4.196 - Cromatograma de íons extraídos para m/z 564,3310 para amostras e extratos indicados. Método A	250
FIGURA 4. 197 - Cromatograma de íons extraídos para m/z 520,2688 para amostras e extratos indicados. Método A	251
FIGURA 4.198 - Sugestão de metabolitos para m/z 520,2688 sugerida pelo banco AntiBase 2012.....	252

Resumo

“Prospecção Química do Metabolismo Secundário de Fungos Endofíticos Isolados de maçã (*Malus domestica*) e goiaba (*Psidium guajava*)”. Poucos são os estudos dirigidos aos fungos endofíticos associados a frutos comestíveis no que tange a química do metabolismo secundário destes organismos. Neste sentido, esforços para o melhor conhecimento com relação à capacidade metabólica da microbiota fúngica existente nestes hospedeiros são relevantes já que, compostos das mais diversas classes biossintéticas e bioatividades podem ser potencialmente incorporados diretamente à dieta humana. Portanto, a proposta do trabalho envolveu a exploração química e metabólica de fungos isolados a partir de frutos saudáveis de maçã, a espécie *Talaromyces rugulosus* e a espécie *Setophoma* sp., isolada de goiaba. O estudo baseou-se na prospecção química do metabolismo fúngico aplicando-se a abordagem OSMAC. Neste enfoque, além do *screening* de compostos conhecidos, a investigação foi direcionada ao encontro de novos produtos naturais biossintetizados pelas espécies. Para uma detecção rápida e eficaz, a metodologia de derreplicação via UHPLC-HRMS e consultas a bancos de dados comerciais e *in house* foi amplamente utilizada. A prática destas abordagens integradas permitiu o estabelecimento do perfil químico inerente a cada micro-organismo o que conduziu à identificação de sete novos depsídeos produzidos por *Setophoma* sp. e novos alcaloides halogenados por *T. rugulosus* através de dados espectroscópicos de RMN e de HRMS-MS. Pela mesma abordagem, também houve o conhecimento sobre a indução da produção de conhecidas perilenequinonas por *Setophoma* sp. quando em co-cultivo a outras espécies fúngicas. Alguns dos novos policetídeos isolados deste micro-organismo apresentaram moderada atividade antimicrobiana frente à bactéria *S.aureus*, enquanto que a perilenequinona estenfiperilenol, demonstrou aparente inibição ao crescimento de espécies do gênero *Penicillium*. A capacidade do sistema enzimático de *T. rugulosus* em biotransformar substratos naturais à composição dos frutos de maçã, como alguns ácidos orgânicos e flavonóides também foi avaliada. Não foram detectados produtos de biotransformação, porém constatou-se alta indução metabólica de ácido multicolânico pela ação dos substratos testados, evidenciando um possível marcador da espécie quando em estresse ambiental. Por fim, considerando-se os frutos uma rica fonte nutricional à microbiota ali existente, podendo favorecer a biossíntese de metabólitos secundários *in loco* por estes organismos, foram monitorados alguns compostos comumente produzidos por *T. rugulosus* nos meios de cultura avaliados (que mimetizam o habitat natural microbiano). Através das técnicas analíticas de UHPLC-MS/MS via experimentos de MRM dinâmico, foram detectados dois metabólitos potencialmente produzidos por *T. rugulosus* nos extratos de maçãs comerciais avaliados.

Abstract

“Chemical Prospecting of the Secondary Metabolism of Endophytic Fungi Isolated From Apple (*Malus domestica*) and Guava Fruit (*Psidium guajava*)”. Few studies are targeted concerning the chemistry of the secondary metabolism from endophytic fungi associated to edible fruits. In this sense, it is worth to explore the the microbial metabolic skills, particularly from the fungi species naturally present in this host, since a plethora of compounds from different biosintetic groups with diverse bioactivities may have been directly introduced to human diet. Therefore, the aim of the work encompassed the chemical and metabolic investigation of the fungus isolated from symptomless apple fruits, the specie *Talaromyces rugulosus*, as well as the fungus *Setophoma* sp. isolated from healthy guava fruits. The study was based on the chemical prospecting of the fungal metabolism by means of OSMAC approach. In this step, besides the screening of known metabolites, the investigation was carried out in order to encounter new natural products biosintetized by the studied strains. Aiming to reach a fast and effective dectection, the UHPLC-HRMS based dereplication combined to dedicated database queries was extensively applied. The use of these integrated approaches allowed the establishment of a broad chemical profile owned to each microorganism and has led to the identification of seven new depsides produced by *Setophoma* sp. and novel halogenated alkaloids by *T. rugulosus* through spectroscopic data, chiefly NMR and HRMS-MS. In addition to these results, the induction of known perilenequinones produced by *Setophoma* sp. strain was observed when it was submitted to the co-cultive with other fungi species. Some of the novel poliketides showed moderate antimicrobial activity against *S.aureus*, while the perilenequinones comprised a seeming inhibition of some tested *Penicillium* species. Concerning *T. rugulosus*, it was also verified if the fungus showed to be skillfull in biotransformations of compounds naturally owned to apples chemical composition, such as flavonoids and organic acids. Whereas any product from this proposal was detected, a remarkable production of multicolanic acid was observed by the use of the tested substrates into the culture medium, suggesting a likely marker for this specie. Finally, taking into account the fact that fruits represent a rich source of nutrients for its associated microbial inhabitants, it is worth to consider that secondary metabolites biosynthesis *in loco* be favoured. Therefore it was proposed the monitoring of the most common metabolites produced by *T. rugulosus* into commercial apple extracts. The detection study was carried out by UHPLC-MS/MS via dynamic MRM experiments, which allowed the detection of compounds potentially produced by the fungus in the evaluated apple extracts.

Sumário

1 - Introdução	1
1.1 - Fungos e a aplicabilidade de seus metabólitos secundários	1
1.2 - Fungos Endofíticos e sua ocorrência em frutos comestíveis	4
1.3 - Fungos associados às frutas goiaba (<i>Psidium guajava</i>) e maçã (<i>Malus domestica</i>) e sua relação com o homem	10
1.4 - Abordagem OSMAC: Exploração do potencial metabólico de micro-organismos.....	13
1.5 - Prospecção química do perfil metabólico fúngico e abordagem da derreplicação.....	17
1.6 - Biotransformações de constituintes químicos de frutos pela microbiota associada a esses hospedeiros	26
2 - Objetivos.....	29
3 - Parte Experimental.....	31
3.1 - Reagentes e materiais	31
3.2 - Reagentes e meios de cultura	31
3.3 - Solventes empregados.....	33
3.4 - Equipamentos	33
3.5 - Suportes cromatográficos	35
3.6 - Parâmetros de análise para estudos realizados via UHPLC/DAD-HRMS, UHPLC-HRMS e HRMS/MS.....	35
3.7 - Parâmetros de análise para estudos realizados via UHPLC- MS/MS e modo MRM dinâmico	38
3.8 - Parâmetros de análise para estudos realizados via LC-MS e MS/MS	39
3.9 - Procedimento Experimental	41
3.9.1 - Isolamento e identificação de fungos endofíticos associados aos frutos goiaba (<i>Psidium guajava</i>) e maçã (<i>Malus domestica</i>).....	41
3.9.2 - Micro-extração de metabólitos secundários das espécies fúngicas estudadas a partir dos micro-cultivos em diferentes meios de cultura	43
3.9.3 - Cultivo escalonado dos micro-organismos em diferentes meios de cultura e obtenção dos extratos	46
3.9.3.1 - Cultivo de <i>Setophoma</i> sp. e obtenção do extrato fúngico em arroz	46

3.9.3.2 - Cultivo de <i>Talaromyces rugulosus</i> e obtenção do extrato fúngico em meio líquido batata-dextrose (BD).....	47
3.9.4 - Co-cultivos das espécies fúngicas investigadas.....	48
3.9.4.1 - Monitoramento da inibição da esporulação de <i>P. brasilianum</i> , <i>P. digitatum</i> e <i>T. rugulosus</i> durante o co-cultivo com <i>Setophoma</i> sp.....	50
3.9.4.2 - Experimento para avaliação da indução de perilenequinonas pelo efeito do co-cultivo de <i>Setophoma</i> sp. com <i>P. brasilianum</i> , <i>P. digitatum</i> e <i>T. rugulosus</i>	51
3.9.5 - Isolamento de metabólitos secundários produzidos por <i>Setophoma</i> sp., e <i>T. rugulosus</i>	52
3.9.5.1 - Isolamento de depsídeos produzidos pelo fungo <i>Setophoma</i> sp. em meio de arroz.....	52
3.9.5.2 - Isolamento do estenfiperilenol produzido pelo co-cultivo de <i>Setophoma</i> sp. e <i>Penicillium brasilianum</i> em meio de cultura batata-dextrose	54
3.9.5.3 - Isolamento das 8-clororugulovasinas A/B; 2,8-clororugulovasinas A/B, produzidas por <i>T. rugulosus</i> em meio de cultura batata-dextrose (BD)	55
3.9.6 - Estudo de biotransformação de substratos endógenos dos frutos de maçã e do diterpeno afidicolina por <i>Talaromyces rugulosus</i> em meio BD.....	56
3.9.6.1 - Isolamento do produto de biotransformação da afidicolina por <i>Talaromyces rugulosus</i> em meio BD.....	58
3.9.7 - Extração de metabólitos secundários fúngicos de <i>T. rugulosus</i> a partir de extratos de maçãs comerciais	58
3.9.8 - Parâmetros de análise para estudos realizados via UHPLC-MS/MS.....	60
3.9.9.2 - Ensaio antifúngico do estenfiperilenol frente às espécies <i>Penicillium brasilianum</i> e <i>Penicillium digitatum</i>	64
3.10 - Estimativa e comparação do perfil da curva de produção das rugulovasinas cloradas e bromadas produzidas por <i>T. rugulosus</i>	65
3.11 - Isolamento de DNA genômico para estudos de detecção da halogenase	65
3.11.1 - Construção dos oligonucleotídeos e amplificação do gene	66
4-Resultados e Discussão.....	67
4.1 - Isolamento de fungos endofíticos de goiaba e maçã e seleção de espécies talentosas.....	67
4.2 - Screening metabólico e derreplicação dos extratos <i>Setophoma</i> sp.....	68

4.2.1 - Elucidação estrutural de novos depsídeos produzidos por <i>Setophoma</i> sp.....	86
4.2.2 - Ensaio antimicrobiano de novos depsídeos produzidos por <i>Setophoma</i> sp. frente as bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	120
4.3 - Screening metabólico e derreplicação dos extratos <i>Talaromyces rugulosus</i>	122
4.3.1 - Detecção de rugulovasinas e novas rugulovasinas halogenadas produzidas por <i>T. rugulosus</i>	150
4.3.2 - Detecção de novas rugulovasinas bromadas produzidas por <i>T. rugulosus</i>	171
4.3.3 - Estudo das rugulovasinas e seus derivados halogenados produzidos por <i>T. rugulosus</i> via experimentos de HRMS/MS	176
4.3.4 - Estimativa e comparação do perfil da curva de produção das rugulovasinas cloradas e bromadas produzidas por <i>T. rugulosus</i>	190
4.3.5 - Detecção de halogenase em <i>T. rugulosus</i>	194
4.4 - Aplicação da abordagem OSMAC: co-cultivo entre espécies fúngicas	198
4.4.1 - Experimento de co-cultivo de <i>Setophoma</i> sp. e <i>P. brasilianum</i>	199
4.4.2 - Ensaio anfúngico para verificação da atividade do esfenfirilenol isolado de <i>Setophoma</i> sp. frente aos fungos <i>P. brasilianum</i> e <i>P. digitatum</i>	219
4.5 - Estudo de biotransformação de compostos endógenos de maçã pelo fungo <i>T. rugulosus</i>	221
4.6 - Estudo para detecção de metabólitos secundários de <i>Talaromyces rugulosus</i> em extratos de maçã comerciais	239
5- Conclusão	253

1 - Introdução

1.1 - Fungos e a aplicabilidade de seus metabólitos secundários

A habilidade da natureza em biossintetizar um conjunto excepcional de entidades químicas torna a química de produtos naturais um constante reservatório para descoberta de novos compostos, com potencial de exploração sem paralelos (HALABALAKI et al., 2014). Desde o final do século XIX até os dias atuais, gerações de pesquisadores aplicam esforços voltados à investigação de milhares de moléculas produzidas por organismos vivos, encorajando a sociedade ao uso de vários produtos naturais em diferentes frentes de aplicação (FIRN & JONES 2003). Neste sentido, os micro-organismos vêm representando uma sólida fonte de novos compostos, em especial os fungos.

As primeiras pesquisas envolvendo efetivamente metabólitos fúngicos, datam de meados da década de 1870, quando pigmentos biossintetizados por corpos de frutificação de basidiomicetos atraíram a atenção dos químicos orgânicos da época. A partir de 1950, companhias farmacêuticas começaram a investir intensivamente em programas de *screening* de produtos microbianos em especial, ao que concerne à produção de metabólitos secundários por fungos filamentosos (ALY et al., 2011a). Desde então, a exploração biotecnológica dos fungos vem sendo aplicada nas mais diversas áreas, como a química, ecológica, agroquímica, farmacêutica, alimentícia, dentre outras (HOFFMEISTER et al., 2007; SMEDSGAARD et al. 2004; ZAIN et al., 2014).

Dado o papel vital destes organismos no funcionamento de vários ecossistemas, bem como de atividades de valor agregado à sociedade, (KEMPKE & ROHLFS, 2010) estes são frequentemente aceitos como uma expressiva ferramenta biotecnológica, para processos fermentativos, transformação de matéria orgânica, geração de produtos químicos e bioquímicos úteis ao homem (IÓCA et al., 2014). Tal espectro de aplicação deve-se em parte, à capacidade biossintética e metabólica das espécies fúngicas existentes, e também devido a versatilidade com relação à manipulação genética e enzimática destes seres vivos.

Contudo, metodologias envolvendo sistemas de indução e engenharia metabólica, metagenômica, biossíntese combinatória, modificações epigenéticas e

biotransformações vem sendo amplamente exploradas visando-se o conhecimento de moléculas ainda desconhecidas. De modo geral, a utilização de tais abordagens biotecnológicas apontam para o aprimoramento das capacidades metabólicas fúngicas como um todo (IÓCA et al., 2014; KELLER et al. 2005; NIELSEN, 1998; OSBOURN, 2010) e conseqüentemente ao aumento da diversidade química fúngica ainda a ser investigada.

Os metabólitos secundários são em geral, caracterizados por pequenas biomoléculas menores a 3.000 Da (WILLIAMS et al., 1989) e que, embora não sejam obrigatórios ao metabolismo vital microbiano, oferecem vantagens em vários aspectos para a manutenção da sobrevivência das espécies produtoras. Durante milhares de anos, ao longo do processo evolutivo das espécies, tais moléculas parecem ter desempenhado funções de caráter adaptativo para as mesmas, em diversos habitats, envolvendo distintos ecossistemas (VINING, 1992; BRAKHAGE, 2012). Tal produção capacitou os micro-organismos à sobrevivência frente às competições interespecies por proporcionar o estabelecimento de mecanismos de defesa e facilitação de processos reprodutivos e de crescimento (VAISHNAV et al., 2010).

Por exemplo, além de sinalizadores de comunicação entre espécies coabitantes de uma mesma população (sistema de sinalização *quorum-sensing* que dispara mecanismos de diferenciação celular) (DEMAIN et al., 2008; MARTÍN et al., 2005), estes produtos naturais podem atuar no aumento da disponibilidade nutricional (sob a forma de agentes quelantes a exemplo dos sideróforos), na proteção natural a estresses ambientais (pigmentos), na regulação das interações competitivas e mecanismos de defesa (antibióticos, sinalizadores moleculares - *quorum-sensing* e toxinas) (BREITLING et al., 2013).

A diversidade de metabólitos fúngicos é uma consequência da evolução bioquímica e biológica destes organismos. Como já mencionado, a expressão das variadas rotas metabólicas é fundamental dentro dos ecossistemas e, especialmente, imprime grande valor agregado às atividades humanas na medida em que cada estrutura química pode representar um amplo espectro de aplicação e estudo, inerente às bioatividades em potencial (FIGURA 1.1).

É reconhecida a atuação de muitos bioativos fúngicos como agentes anti-infecciosos, antitumorais, imunossupressores, antiparasitários, bioinseticidas, herbicidas, mas também em atividades que envolvem mecanismos deletérios à vitalidade dos seres vivos, como os de patogenicidade, toxicidade e carcinogênica

(CALVO et al., 2002; DEACON, 2006; DEMAÏN et al., 2008; HOFFMEISTER et al., 2007; VAISHNAV et al., 2010; BRAKHAGE, 2012; WIEMANN e KELLER, 2014).

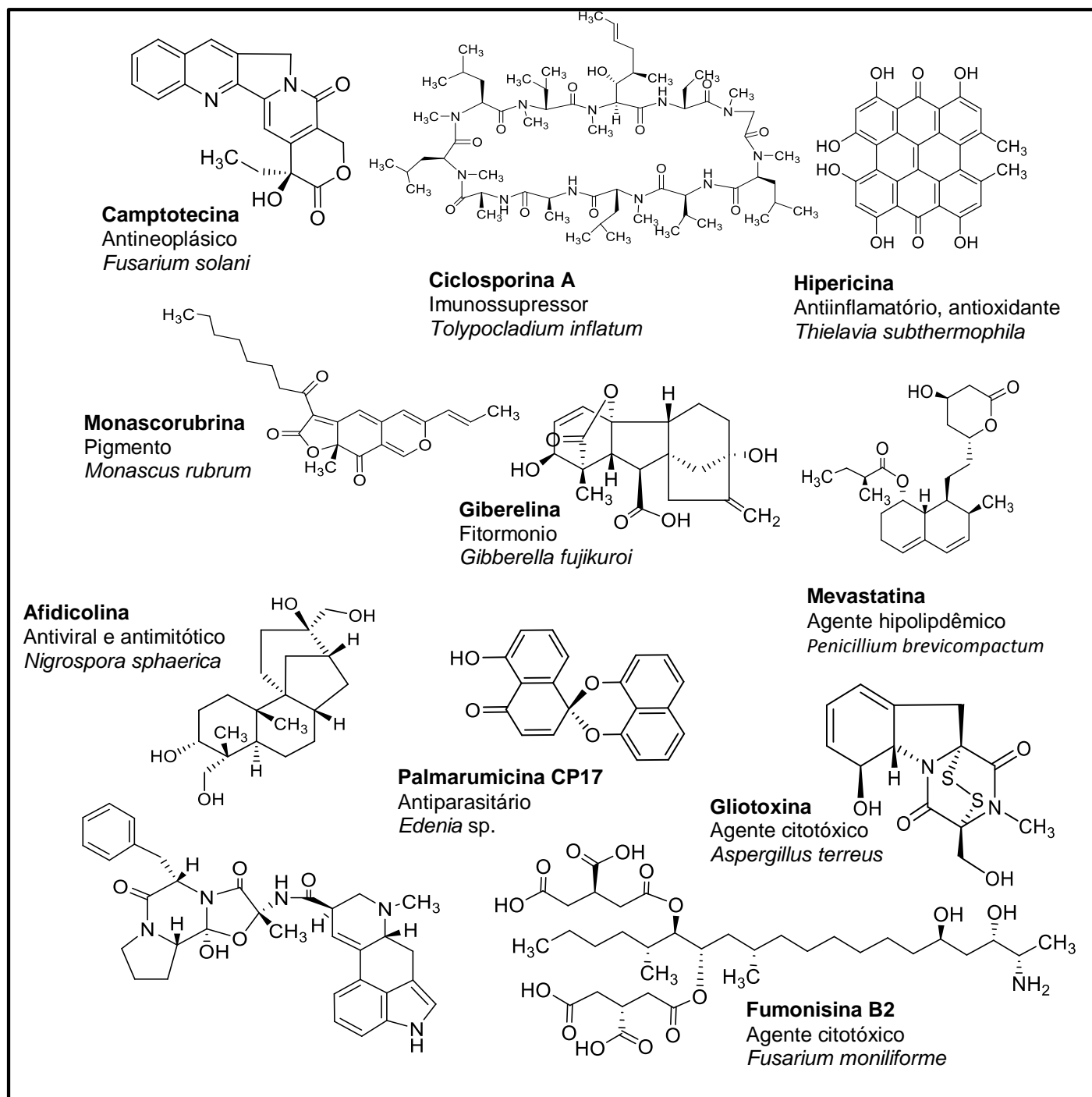


FIGURA 1.1 - Exemplos da quimiodiversidade e bioatividade de metabólitos fúngicos (BRAKHAGE, 2012; KUSARI et al., 2013; MOUSA et al., 2013)

1.2 - Fungos Endofíticos e sua ocorrência em frutos comestíveis

As plantas são consideradas um verdadeiro micro ecossistema habitado por uma vasta diversidade microbiana, pontuando o estabelecimento de alguns tipos de interações entre as espécies envolvidas como, por exemplo, o endofitismo (GUNATILAKA, 2006).

Por definição, endofíticos são micro-organismos que vivem dentro de tecidos vegetais em pelo menos um período do ciclo de vida, não manifestando sintomas deletérios visíveis ao hospedeiro (BACON e WHITE, 2000). O endofitismo é a única associação de custo benefício entre planta/micro-organismo definida pela “localização” e não pela “função”, que é transientemente assintomática, discreta e estabelece-se inteiramente dentro de tecidos vivos (KUSARI e SPITELLER, 2012).

A existência assintomática de fungos dentro de plantas foi primeiramente descrita em 1904 por FREEMAN (1904) nos tecidos de joio. Desde então, vários fungos têm sido isolados a partir de diferentes órgãos vegetais, oriundos de espécies variadas, desde os trópicos até o ártico.

Claramente, qualquer interação planta-fungo é precedida pelo encontro físico dos organismos. Depois, seguem-se várias barreiras químicas e físicas impostas pelo próprio ambiente que devem ser contornadas para o estabelecimento e sucesso das associações. Tal dinâmica é preconizada pela hipótese do “antagonismo balanceado” na qual, a colonização assintomática se dá pelo balanço de antagonismos entre o hospedeiro e o fungo colonizador (SCHULZ et al., 2002). Em verdade, o que parece se estabelecer nessa sistemática é que a condição endofítica em uma planta é intermitente, podendo haver em qualquer momento a manifestação patogênica, dependendo das interações benéficas e deletérias entre o micro-organismo e o hospedeiro, bem como as condições ambientais às quais eles são expostos (SAIKKONEN et. al, 2004; KOGEL et al., 2006).

Os fungos possuem vários fatores de virulência que são combatidos pelo mecanismo de defesa vegetal. Se a virulência fúngica e o sistema de defesa da planta estão em equilíbrio, remete-se a um período transitório aparentemente assintomático onde o endofitismo se estabelece. Neste ponto, os fatores ambientais desempenham um notável papel desestabilizador deste que se diz um “frágil equilíbrio”. Falta de nutrientes, mudanças climáticas, presença de predadores naturais, podem funcionar como o estopim do desequilíbrio, assim podendo sucumbir em atuações nocivas ou o

reestabelecimento de outras interações pré-existentes (SCHULZ et al., 2002; KUSARI et al., 2012a).

A ocorrência de períodos pré e pós-antagonismo balanceado dinamiza a existência fúngica, no que recentemente se estabeleceu como um “micobioma”. Ou seja, os endófitos podem tornar-se patógenos ativos, permanecerem como patógenos em latência, epifíticos, saprófitos, atuarem em colonizações micorrízicas ou até mesmo permanecerem ou retornarem ao estágio endofítico (FIGURA 1.2). (KUSARI et al., 2012a; PORRAS-ALFARO e BAYMAN, 2011).



FIGURA 1.2 - Representação diagramática da dinâmica relacionada à associação de fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras (Adaptado de KUSARI et al., 2012a)

Particularmente, durante os últimos trinta anos, devido a capacidade biossintética de muitos fungos endofíticos para a produção de metabólitos bioativos, houve um crescente interesse da comunidade científica na investigação de tais organismos (TAN e ZOU, 2001; MOUSA e RAIZADA, 2013; ALY et al., 2010; ALY et al., 2011b). Somente no período de 2008-2009, pesquisas em torno do metabolismo destes endófitos, levaram à descoberta de mais de 100 novos produtos naturais. Dentre os anos de 2000-2007 quase o mesmo número de novas substâncias, porém oriundas de outras fontes naturais, foram relatadas, apontando para a importância dos fungos endofíticos em futuras bioprospecções (ALY et al. 2008).

No Brasil, por exemplo, dos 280 metabólitos microbianos relatados na pesquisa nacional, 66 % foram produzidos por micro-organismos em associação com

plantas. Sob outra perspectiva, dos 280 compostos, 84% são oriundos de biogênese fúngica (FIGURA 1.3) (IÓCA et al., 2014).

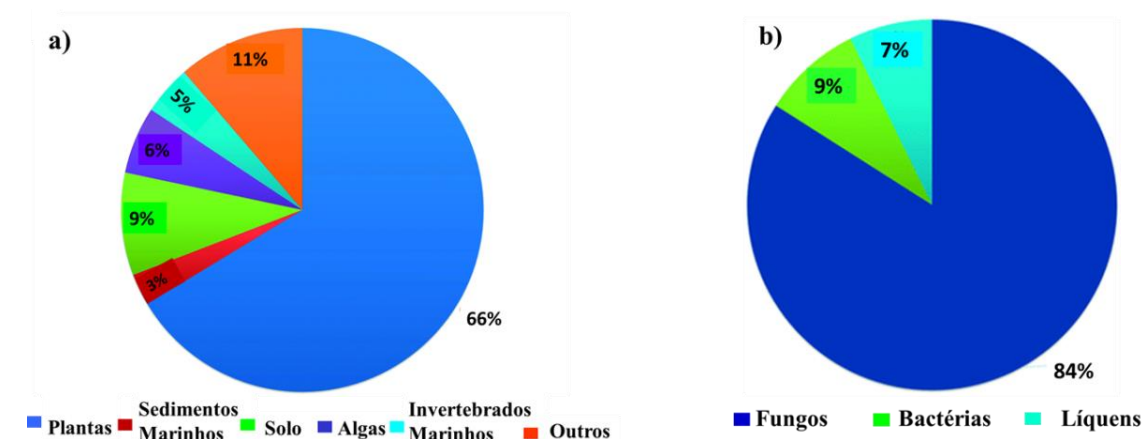


FIGURA 1.3 - a) Fonte de isolamento de cepas microbianas responsáveis pela produção dos 280 metabólitos relatados em estudos brasileiros; b) Porcentagem de metabólitos secundários isolados de fungos, bactérias e líquens no Brasil. (Retirado de IÓCA et al., 2014)

Recentemente os fungos endofíticos foram classificados em grupos do tipo I e II (KUSARI et al., 2012b). Os integrantes do tipo I (classe1) são creditados a todos àqueles pertencentes à família Clavicipitaceae. Neste caso, a transmissão dos organismos se dá apenas verticalmente, através das sementes, levando a uma infecção sistêmica dos hospedeiros.

Já o tipo II abrange as demais famílias fúngicas, havendo além do modo vertical, a transmissão horizontal dos organismos, de forma sexuada ou assexuada pelos fungos (PARTIDA-MARTÍNEZ et al., 2011). Ainda segundo Rodriguez (2009), pode-se considerar uma subdivisão do grupo do tipo II nas classes 2, 3 e 4 (FIGURA 1.4 a).

Os fungos de classe 2 podem colonizar o todo da planta hospedeira, desde raízes, rizomas, até caules e folhas. Em contrapartida, os fungos da classe 4 são encontrados apenas em raízes, enquanto que, para os micro-organismos da classe 3, destaca-se a colonização das partes aéreas.

Os frutos comercializados pelo homem são estruturas vegetais que possuem um importante papel na dieta humana, oferecendo nutrientes essenciais à

alimentação, como minerais, carboidratos, vitaminas, flavonoides, ácidos orgânicos, etc. Por isso desempenham um papel fundamental na manutenção da saúde e bem estar (MACIAS, 2007). Justamente por representarem uma fonte rica em diversos compostos (principalmente os açúcares), tornam-se um alvo fácil à infestação microbiana, podendo funcionar como hospedeiros naturais aos mesmos devido à disponibilidade nutricional oferecida.

Ainda neste contexto, não somente a abundância em carboidratos mas também a existência de outros compostos orgânicos, como os metabólitos secundários da própria planta, ou até mesmo compostos inorgânicos ali presentes, podem funcionar como substratos, efetores de virulência e reprodução fúngica ou agentes indução da biossíntese de diversas rotas metabólicas (RAFIQI et al., 2012). Sendo assim, os frutos representam uma possibilidade bastante viável ao fornecimento de nutrientes, cofatores, mediadores e indutores para a biossíntese de metabólitos secundários potencialmente produzidos pelos endófitos associados a estes tecidos vegetais (FIGURA 1.4 b).

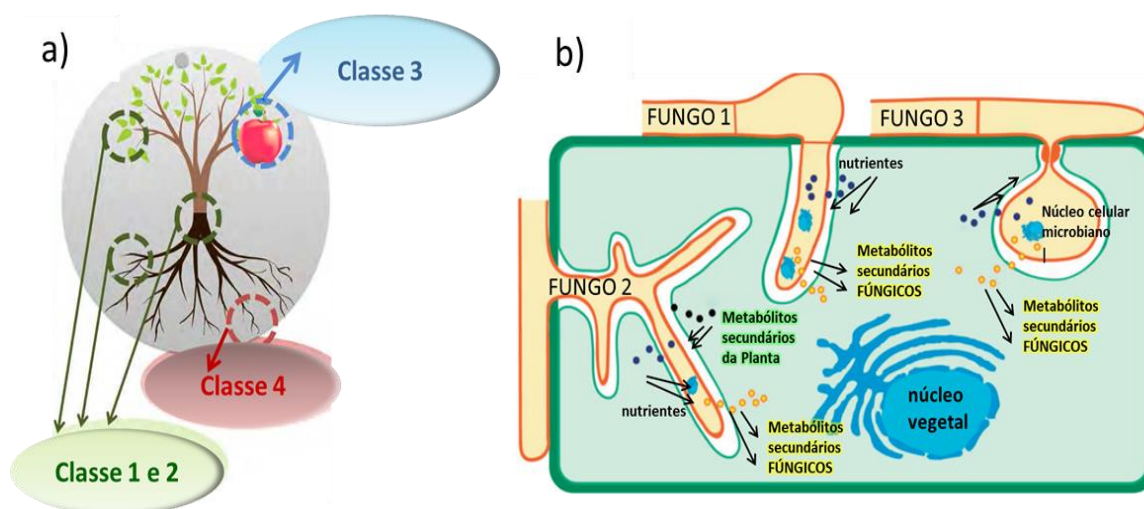


FIGURA 1.4 - a) Localização das diferentes classes de endófitos na planta hospedeira (Retirado de KUSARI et al., 2012b); b) Representação da infecção celular vegetal por fungos e sistemática metabólica entre micro-organismo e planta (Adaptado de RAFIQI et al., 2012)

Uma característica comum à maioria das frutas e que permite a permanência dos fungos às mesmas é a acidez. O pH destes produtos normalmente encontra-se entre 2,5 a 5,0. Esta faixa de acidez é considerada um fator determinante ao tipo de micro-organismo que pode adentrar, permanecer e se desenvolver nestes órgãos vegetais. Caracteristicamente, os fungos são em geral mais resistentes a

condições ácidas, sendo que valores baixos de pH são bem toleráveis, se não ótimos, para crescimento de algumas espécies (DRUSCH & RAGAB, 2003; MOSS 2008).

Considera-se que os endófitos encontram-se virtualmente presentes em todos os órgãos de todas as plantas. Os fungos podem entrar nos tecidos dos frutos através de mecanismos especializados envolvendo estruturas vegetativas e moléculas efetoras específicas (EBBOLE, 2007; RAFIQI et al., 2012). A infecção pode ocorrer por diminutas fissuras dos tecidos, desde as sementes, caules, raízes, brotos e folhas, podendo os esporos permanecer em estado latente por longos períodos, nas flores e em subsequente formação dos frutos, nas cavidades que aloca as sementes (SERDANI et al., 1998; FIRÁKOVÁ et al., 2007; TOURNAS e UPPAL, 2009). Quando o estado de latência é cessado, possibilita-se o desenvolvimento micelial, o que também promove a disseminação dos organismos nos mesmos órgãos. A propagação dos fungos se dá, portanto, de forma contínua, seja pela infecção direta dos tecidos, seja pelo desenvolvimento de sementes no ciclo de vida vegetal (FIRÁKOVÁ et al., 2007).

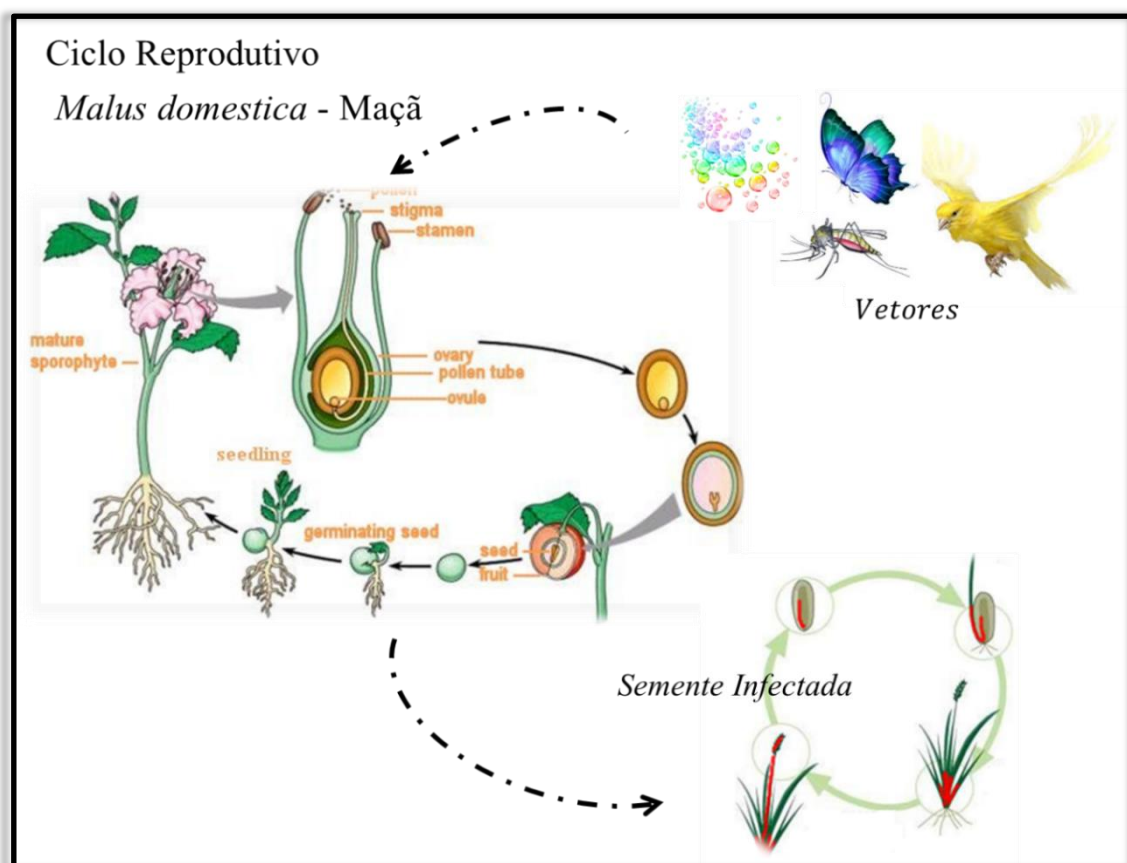


FIGURA 1.5 - Ciclo reprodutivo de *Malus domestica* (macieira) e propagação da infecção fúngica no ciclo da planta

Apesar de toda a literatura descrita sobre fungos isolados de tecidos internos de plantas alimentícias, a maioria relata a associação destes microorganismos em raízes, cascas e folhas. Este é um ponto intrigante tendo em vista as poucas investigações vinculadas a fungos endofíticos da classe 3 ou 4, oriundos de frutos, quando comparadas aos trabalhos existentes envolvendo interações de patogenia ou epifitismo destes organismos nestes órgãos vegetais.

É possível apontar alguns trabalhos envolvendo a microbiota endofítica de frutos, mas com algumas ressalvas. Muitos abordam o isolamento de bactérias endofíticas (SCHENA et al., 2003; DE MELO et al., 2012; KRISHNAN et al., 2012; PHUKON et al., 2013), outros de fungos em associação a plantas frutíferas de frutos para consumo humano, como é o caso do abacate, cereja, uva, banana, pimenta, etc, porém isolados de tecidos que não os frutos propriamente ditos, como já mencionado, as raízes, caules e folhas (CAZORLA et al., 2007; KAVINO et al., 2007, HADDADDERAFSHI et al., 2011; PANCHER et al., 2012, CHITHRA et al., 2014) e por fim, muitos abordam fungos isolados de plantas não alimentícias, especialmente de frutos selvagens não consumíveis (TANG et al., 2003; SUDARMONO et al. 2006) e/ou de caráter medicinal (HUANG et al., 2008; VERMA et al., 2011; ZHANG et al., 2012; SHWETA et al., 2013); ou apenas ornamental (MARINHO et al., 2005; MARINHO et al., 2009).

A exploração de fungos endofíticos de frutos comestíveis com um direcionamento mais focado ao estudo químico de suas capacidades metabólicas, parece ser menos frequente. No geral, quando citados, trabalhos envolvendo fungos isolados destes frutos, trazem contornos mais direcionados às áreas microbiológica, estatística ou agrônômica, como por exemplo, os estudos relatados por SERDANI et al. (1998) a respeito da frequência de fungos associados a maçãs africanas e por CAMATTI-SARTORI et al. (2005) envolvendo maçãs originárias do sudeste brasileiro, bem como a caracterização da microbiota fúngica associada aos frutos de café relatada por PRIHASTUTI et al. (2009).

Dentre os poucos exemplos relacionados à investigação química do metabolismo secundário de fungos endofíticos em frutos comestíveis, tem-se a produção de polienos furanosídicos e do ácido linoleico por *Chaetomium* sp., um fungo isolado de frutos de tomate (MARWAH e FATOPE, 2007), e de novas estirilpironas produzidas pelo endófito de frutos de romã, *Penicillium glabrum* (HAMMERSCHMIDT

et al., 2012). Já no campo das biotransformações pode-se citar o uso de fungos isolados de cupuaçu e jamelão para a bioconversão de terpenos (MOLINA et al., 2013).

Contudo, tendo em vista a aparente lacuna que há com relação a exploração química do metabolismo de fungos associados a frutos comestíveis, pode-se apontar os estudos químicos vinculados a estes micro-organismos um promissor alvo para descobertas na química de produtos naturais microbianos, especialmente ao encontro de novas moléculas.

1.3 - Fungos associados às frutas goiaba (*Psidium guajava*) e maçã (*Malus domestica*) e sua relação com o homem

A goiaba é considerada um produto agrícola de importância comercial principalmente em países tropicais e subtropicais (RAI et al., 2010). A planta como um todo (*Psidium guajava*) é amplamente utilizada na medicina popular mundial, o que reflete as várias propriedades bioativas de seus constituintes químicos (GUTIÉRREZ, 2008). Esta fruta é um alimento de grande valor nutritivo, apresentando em sua constituição sais minerais, como cálcio e fósforo e também quantidades consideráveis de vitaminas A, B1, B2, B6 e vitamina C (JIMÉNEZ-ESCRIG et al., 2001,). Em sua comercialização, o Brasil destaca-se como um dos maiores produtores mundiais da fruta, exportando principalmente para França, Reino Unido e Canadá (CHOUDBURY, 2001; BATISTA et al., 2012).

A maçã também apresenta expressivo consumo em vários países. Entre 2007 e 2008, sua produção mundial foi de cerca de 37.000.000 de toneladas ao ano. Mais da metade da produção americana é destinada ao consumo da fruta *in natura*; um quinto é utilizada para a produção de vinagres, sucos e geleias. No mercado europeu, grande parte da colheita é destinada ao setor de bebidas (cidras, vinhos e conhaques) (MISSURA, 2011).

Dentre os maiores produtores da maçã estão os Estados Unidos, China e França, assim como os maiores exportadores são França, Itália e Hungria (BNDES, 2010). No Brasil o consumo da fruta também é bastante significativo, sendo que a produção nacional tem aumentado expressivamente nas últimas décadas, permitindo a transformação do país de importador a exportador da fruta, além de ter atingido a

autossuficiência na produção (GONÇALVES, 2006). O país figura entre os dez principais países produtores de maçã mundial (RECH et al., 2014).

A associação de fungos a estas frutas é recorrentemente abordada quando a expressão patogênica já é manifestada por estes micro-organismos. No caso da goiaba, por exemplo, algumas espécies como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis destructum* e principalmente *Fusarium oxysporium* são apontadas como os principais causadores de doenças a estes frutos (RAO et al., 1976; PANDEY et al., 1993; KEITH et al., 2006; RAI et al., 2010).

Para a maçã, a abrangência das investigações no âmbito de fungos patogênicos é ainda maior, sendo inúmeros os estudos vinculados a esta fruta. *Alternaria alternata* e *Penicillium expansum* são espécies comumente associadas à processos de deterioração da maçã além de espécies de *Fusarium*, *Aspergillus* (FRISVAD et al., 2006; SØRENSEN et al., 2009). Estes fungos apresentam-se como patógenos comuns também em outras variedades vegetais, como tomate, tangerina, morangos, etc. (FRISVAD et al., 2006; MAGNANI et al., 2007; GROSS et al., 2011; KOIKE et al. 2009)

Neste contexto muitos trabalhos são encontrados no que diz respeito a metabólitos secundários produzidos por micro-organismos isolados destas frutas, quase na totalidade, referindo-se às micotoxinas produzidas pelos micro-organismos em estágio patogênico. A espécie *A. alternata*, por exemplo, é produtora de várias micotoxinas que comprovadamente atuam como agentes mutagênicos, como o ácido tenuazônico e derivados, o alternariol e o alternariol monometil éter (MAGNANI et al., 2007; GROSS et al., 2011).

Já o fungo *Penicillium expansum* é um potente produtor de patulina. Esta substância é reconhecida por sua alta toxicidade e ação mutagênica, e sendo devido a estas características, hoje uma das micotoxinas mais controladas em alimentos derivados de maçã, principalmente em sucos da fruta (KARLSHØJ et al., 2007; WELKE, 2009; DESMARCHELIER et al., 2011).

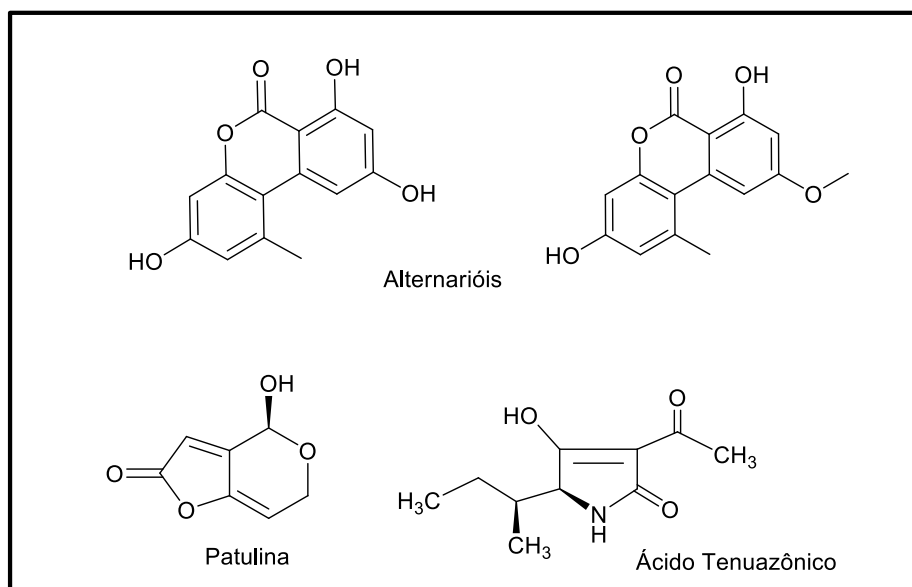


FIGURA 1.6 - Algumas micotoxinas produzidas por fungos patogênicos em frutos

Embora a ocorrência de micro-organismos patogênicos em maçã assim como a produção de micotoxinas nesta matriz, seja de extrema relevância, estudos envolvendo a microbiota endofítica deste tipo de fruta possuem importância não só científica, mas também com relação à saúde humana. Como já mencionado anteriormente, micro-organismos endofíticos podem em um período de seu ciclo de vida, apresentarem-se como patógenos em latência. Logo, a incorporação à dieta humana não somente de micotoxinas, mas também de metabólitos com outros tipos de bioatividade também é eminente.

Obviamente que, o fato da ocorrência de toxicidade em alguns metabólitos não deve ser minimizado, já que estes podem influenciar tanto na saúde humana quanto no desenvolvimento de plantas, porém, a carência de estudos com relação a endofíticos de frutas e de seus compostos, leva a crer que muito ainda pode ser descoberto, tanto com relação à micotoxinas, quanto à substâncias com demais atividades biológicas. Haja vista o caso da própria patulina, cuja atividade antimicrobiana também foi relatada (BAERT, 2007).

Apesar de ser difícil localizar precisamente o início da conscientização humana sobre a presença e o papel dos micro-organismos nos alimentos, as evidências disponíveis indicam que esse conhecimento procedeu o estabelecimento da microbiologia, haja vista o uso de processos fermentativos e de agentes probióticos em laticínios (JAY, 2005). A contaminação de alimentos por micro-organismos, é também há tempos, alvo de muitos estudos científicos, justamente por sua relação

íntima com o homem. Porém, surpreendentemente, no que se refere ao estudo de endofíticos em alimentos, especificamente em frutas, ainda há muito a ser indagado e investigado.

1.4 - Abordagem OSMAC: Exploração do potencial metabólico de micro-organismos

A busca por novos compostos trata-se de um dos pilares investigativos das indústrias farmacêuticas, e da mesma forma no ramo acadêmico, apresenta considerável foco de exploração dentro da química de produtos naturais. Várias metodologias para a descoberta de tais compostos têm sido descritas na literatura (como química combinatória e *high-throughput screening* de diferentes fontes biológicas).

Embora vários metabólitos fúngicos tenham sua biossíntese e sistema de regulação conhecida, a evolução na área da biologia molecular e suas ferramentas de estudo genômico, permitiu a constatação de que a potencialidade em produção de metabólitos secundários fúngicos esteja ainda subestimada (WIEMMAN & KELLER, 2014). Isto porque recentemente descobriu-se que a expressão de muitos genes (havendo a subsequente produção de metabólitos que estes codificam) encontra-se oculta ou silenciada, levando à condição no que se denomina de rotas biossintéticas “silenciadas” ou “órfãs” (GROSS, 2007; SCHERLACH & HERTWECK, 2009).

Nesse sentido estratégias para a ativação de novos compostos “escondidos” pela não expressão gênica do sistema fúngico, são essenciais para a descoberta de novos produtos naturais (SCHERLACH & HERTWECK, 2009). Ferramentas vem sendo desenvolvidas em estudos recentes para a descoberta de novas rotas metabólicas visando o aumento da quimiodiversidade microbiana pela ativação de genes ocultos. Neste contexto, atualmente pode-se pontuar três principais estratégias: a abordagem OSMAC, a manipulação genética e a modulação epigenética (WILLIAMS et al., 2008; GERKE et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2013).

Embora a manipulação gênica seja considerada extremamente promissora para o controle de rotas biossintéticas, a utilização de sistemas de expressão heteróloga pode ser limitada por problemas de locação e clonagem de

genes, dificuldades em transformações e inativação destes, além de incompatibilidade de vetores (WILLIAMS et al., 2008).

No mesmo viés, na medida em que moduladores epigenéticos afetam a transcrição de vários e diferentes clusters gênicos, tal interferência pode afetar de forma negativa a sobrevivência dos micro-organismos alvo. A diversidade de alvos relacionados ao epigenoma em fungos é ampla, porém nem todas as espécies respondem positivamente aos modificadores epigenéticos conhecidos, sendo o sucesso desta abordagem considerado ainda imprevisível (CICHEWICZ, 2010; BERTRAND et al., 2014). Em complementaridade às estratégias atreladas ao mecanismo genômico do organismo, o uso de inibidores e indutores enzimáticos específicos também são aplicados na busca da diversidade metabólica, porém, como no caso dos modificadores epigenéticos, não conduzem a resultados totalmente previsíveis, exceto quando a regulação do cluster gênico tenha sido completamente descrita (BERTRAND et al., 2014).

Por vezes, tais abordagens também demandam um considerável suporte financeiro, trazendo à tona alguns entraves a este tipo de pesquisa realizadas pela academia. Um caminho alternativo para superar as desvantagens mencionadas trata-se da aplicação da abordagem OSMAC (*One Strain Many Compounds- Uma Cepa Muitos Compostos*) (BODE, 2002).

Esta prática sugerida por Bode e colaboradores (2002), implica em pequenas mudanças bióticas e abióticas nas condições de cultivo. Como por exemplo, pode-se variar a luminosidade, pH, temperatura durante o crescimento microbiano, mas principalmente pode-se testar variações na composição do meio de cultura, bem como a realização de culturas mistas entre micro-organismos (igualmente denominadas como co-culturas, co-cultivos ou fermentação mista).

A ciência da fermentação, desde seu início, já conhece que a escolha dos parâmetros de cultivo é crucial quanto ao número de metabólitos secundários biossintetizados (SCHERLACH & HERTWECK, 2009). Mesmo pequenas modificações no meio de cultura, podem mudar completamente o perfil metabólico de vários micro-organismos. Não apenas a quantidade, mas todo o mecanismo celular, em todos os níveis atrelados à biossíntese de metabólitos secundários (genoma, epigenoma, transcriptoma, proteoma, metaboloma) podem ser influenciados por esta abordagem aleatória (FOX & HOWLETT, 2008; BERTRAND et al., 2014).

Condições ótimas para a produção de determinados metabólitos secundários podem variar consideravelmente de micro-organismo para micro-organismo inclusive podendo estas condições estarem correlacionadas quimio e fisicamente às modificações ambientais às quais eles estão expostos em seu habitat natural (KNIGHT et al., 2003; MIAO et al., 2006). Com esta inspiração, tal prática visa ativar rotas biossintéticas ditas silenciadas, através da mimetização de mudanças que podem ocorrer no ambiente natural microbiano, de forma não específica, porém menos onerosa em termos econômicos (BODE, 2002).

Na natureza, os micro-organismos não existem isoladamente. Eles fazem parte de pequenos, mas engenhosos ecossistemas e, por isso, as comunidades microbianas carregam um imenso potencial para a produção de novos compostos. Há uma diversidade de sinalizações e interações ocorrendo entre os micro-organismos que são capazes de instigar a produção de novos compostos. A sobrevivência em um ambiente competitivo certamente exige estratégias que provavelmente culminam na produção de compostos bioativos. (KNIGHT et al., 2003; BRAKHAGE & SCHROECKH, 2011).

Sendo assim, a estratégia de mimetização da natureza, ou seja, o crescimento conjunto de espécies microbianas aliada à exploração investigativa destas interações, pode tornar-se uma importante ferramenta na descoberta de novos produtos naturais (PETTIT, 2009; SHANK & KOLTER, 2009). Exemplos bem sucedidos desta prática vem sendo cada vez mais citados (BERTRAND et al., 2014). Como exemplo pode-se destacar a produção de formil alcaloides (novos e conhecidos) induzidos pelo co-cultivo entre o fungo *Aspergillus fumigatus* e a bactéria *Streptomyces peucetius* (ZUCK, 2011), bem como da indução do depsídeos 4-hidroxisulfoxi-2,2''-dimetilthielavina P e sua forma não sulfatada (FIGURA 1.7) pela cultura mista entre os fungos *Trichophyton rubrum* e *Bionectria ochroleuca* (BERTRAND et al., 2013a). Interessantemente, para ambos os casos, a investigação dos metabólitos foi guiada pela zona de inibição entre os micro-organismos.

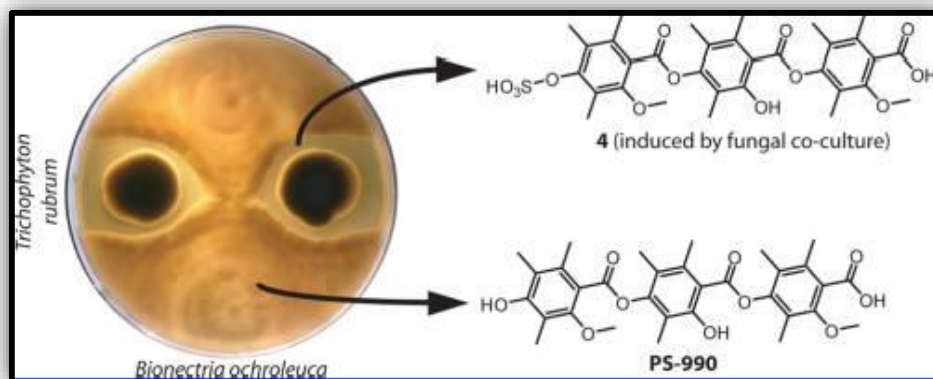


FIGURA 1.7 - Depsídeos produzidos pela co-cultura entre os fungos *Trichophyton rubrum* e *Bionectria ochroleuca*. Retirado de BERTRAND et al., 2013a

Historicamente o estudo da interação entre as espécies focava interações de inibição de crescimento. No entanto, ao longo dos anos, percebeu-se que outras respostas além da antibiose poderiam estar sinalizando a concomitante produção de metabólitos secundários. Como por exemplo alterações no processo de desenvolvimento, como diferenciações na esporulação e desenvolvimento de hifas, formação de biofilmes e até mesmo aumento do metabolismo primário (FIGURA 1.8) (SHANK & KOLTER, 2009). A diferenciação morfológica dos organismos em co-cultura, foi classificado por BERTRAND e colaboradores (2013b) em diferentes tipos de interação conforme ilustra a FIGURA 1.8.

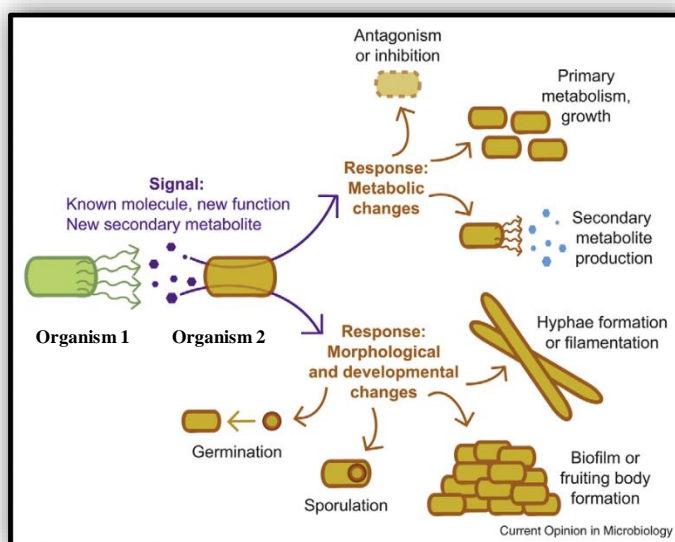


FIGURA 1.8 - Esquema ilustrativo para respostas sinalizadoras da ocorrência de interações interespecíficas microbianas. Retirado de SHANK & KOLTER, 2009

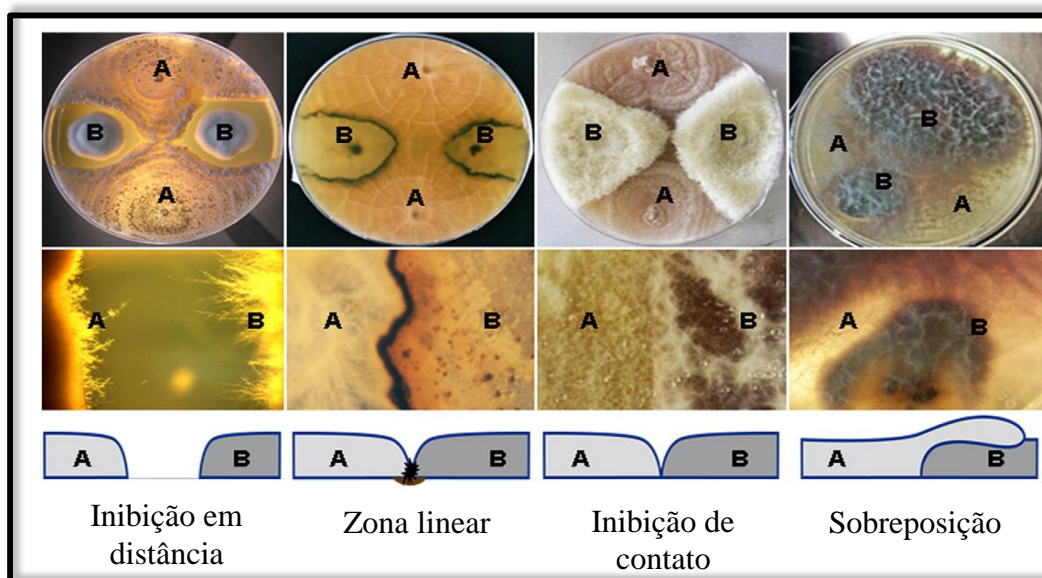


FIGURA 1.9 - Classificação das diferentes respostas fenotípicas para co-culturas fúngicas. Adaptado de BERTRAND et al., 2013b

A visualização das diferentes respostas fenotípicas ou o que se denomina de biomodulação do desenvolvimento entre dois micro-organismos, pode ser um ponto indicativo quando há comunicação e interação entre os mesmos, com potencial quanto a biossíntese de compostos conhecidos e/ou ainda inéditos (SHANK & KOLTER, 2009).

1.5 - Prospecção química do perfil metabólico fúngico e abordagem da derreplicação

Dependendo da diversidade microbiana a ser estudada, faz-se necessário o uso de diversos tipos de meio de cultura e condições para a seleção de cepas ditas “talentosas”, que levariam às descobertas mais promissoras quanto a quimiodiversidade, levando à efetividade da abordagem OSMAC (LARSEN et al., 2005). Desde que o *screening* a partir de um amplo número de culturas pode ser requerido neste tipo de metodologia, seria pertinente desenvolver uma técnica rápida e menos onerosa para procedimentos de extração visando a obtenção de um perfil metabólico completo de cada uma.

Neste contexto, a metodologia de extração em micro-escala, ou mais reconhecidamente denominada como “micro-extrações” vem sendo empregada há

bastante tempo. Através dela, uma gama de espécies fúngicas podem ser desenvolvidas em diversos meios de cultura de modo concomitante, possibilitando a obtenção do *pool* metabólico em pequenas porções, sem a necessidade de extensos procedimentos de *clean up* dos extratos obtidos (SMEDSGAARD, 1997).

Este método consiste em uma extração simples, rápida e padronizada, a partir de 3 à 5 plugs (6-mm) do crescimento microbiano em placas de Petri contendo o meio de cultura testado (FIGURA 1.10) e em seguida, do uso de 0.5 mL de solvente em banho de ultrassom, com posterior filtração da mistura obtida (contendo os metabólitos de interesse). Desta forma, as amostras podem ser diretamente injetadas e analisadas em sistemas analíticos LC ou LC-MS (SMEDSGAARD, 1997; NIELSEN & SMEDSGAARD, 2003).



FIGURA 1.10 - Corte de *plugs* a partir do crescimento fúngico em placa de Petri, para micro-extração de metabólitos secundários

A prospecção do perfil metabólico (ou químico) refere-se às análises qualitativas da maioria dos metabólitos produzidos por um organismo através de uma metodologia específica, com o objetivo de traçar o perfil destes compostos conhecidos ou desconhecidos, pelo estabelecimento de fórmulas moleculares ou outras características espectrais (VILLAS-BÔAS et al., 2005).

Para o reconhecimento de novas substâncias em extratos microbianos complexos, é relevante que a prospecção química dos mesmos seja realizada através um procedimento rápido e eficaz, já que etapas posteriores de isolamento de metabólitos alvo, podem ser laboriosas e onerosas em tempo e economicamente. Neste sentido, para o cumprimento desta meta, a aplicação da metodologia de derreplicação vem sendo amplamente executada (WOLFENDER et al. 2010).

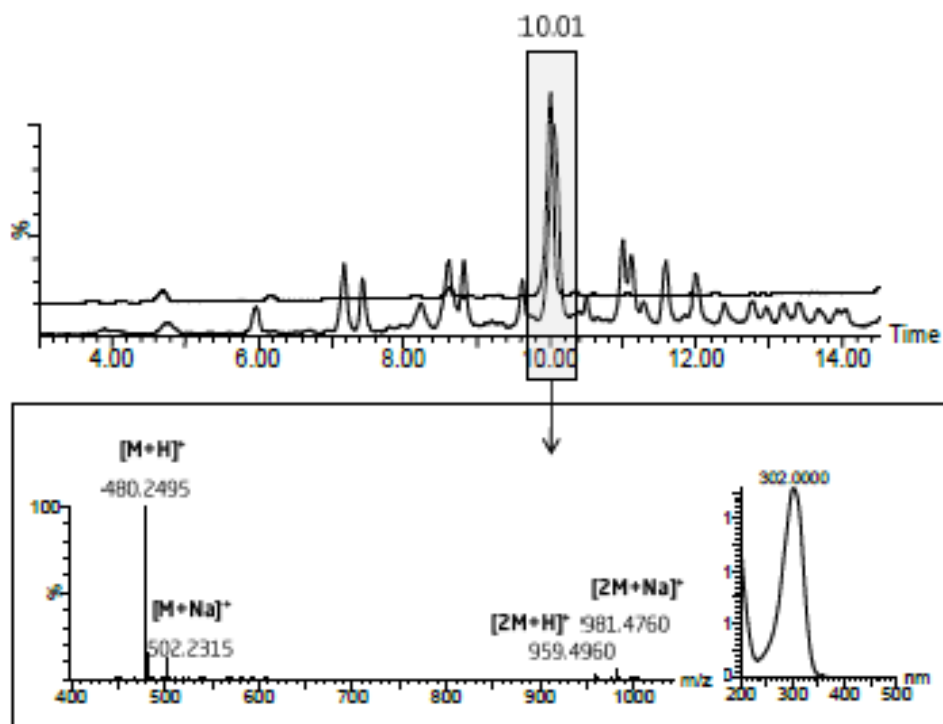
Originalmente, a metodologia de derreplicação é definida como a análise de um produto natural, fração ou extrato sem a realização de isolamento, através de informações espectrocópicas, estruturais ou de atividades biológicas, utilizando-se comparações dos dados obtidos com bancos de dados internos e/ou comerciais. Com isto, visa-se excluir compostos conhecidos e assim a proposição de estratégias adicionais para o isolamento de metabólitos ainda desconhecidos presentes no material investigado (DINAN, 2005).

A realização da derreplicação desde os estágios iniciais do processo investigativo, possibilita que seja minimizado o risco potencial de re-isolamento de compostos já conhecidos, assegurando o investimento e esforços dispendidos para isolamento e elucidação de um novo composto (SASHIDHARA et al., 2007).

Várias abordagens dentro do processo de derreplicação são encontradas, fundamentalmente baseadas na combinação de métodos cromatográficos, espectroscópicos e dedicadas consultas a banco de dados (KLITGAARD et al. 2014). Os métodos mais modernos incluem vários tipos de hifenação, LC-UV, LC-MS, LC-MS/MS, LC-NMR (WOLFENDER et al., 2010, XU et al., 2014), destacando-se que atualmente, a técnica LC-MS mostra-se bastante executada. (ITO et al., 2011; SMITH et al., 2012; BOUSLIMANI et al., 2014; KILDGAARD et al., 2014).

Para compostos microbianos, um dos bancos de dados mais abrangentes trata-se do banco AntiBase (LAATSCH, H, 2012), versão 2012, no qual encontram-se gravados cerca de 41.000 metabólitos conhecidos. No entanto, para uma utilização mais eficaz e seletiva deste e dos demais bancos conhecidos atualmente (Chemspider, Dictionary of Natural Products, Marlint, etc) a obtenção da composição elementar trata-se do primeiro passo a ser executado (NIELSEN et al., 2011).

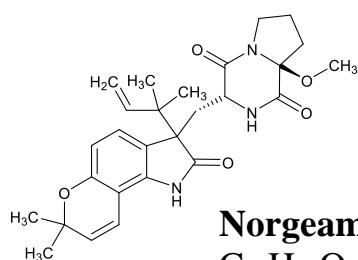
O conhecimento da fórmula molecular exata (inferida pela massa acurada) pode reduzir de 3 à 10 vezes o número de identidades sugeridas pelo banco de dados com relação ao analito alvo, em detrimento às investigações envolvendo massas nominais (FIGURA 1.11). Neste sentido, o poder de distinção entre massas monoisotópicas, ou seja, o poder de resolução, assim como a alta exatidão das massas obtida para os íons alvo são fundamentais para o sucesso da derreplicação baseada em dados de espectrometria de massas (NIELSEN et al., 2011).



Número de candidatos com mesma massa nominal : **30**

5 ppm de exatidão :

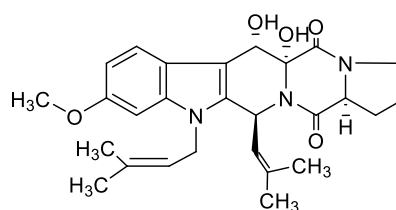
3



Norgeamida A

$C_{27}H_{33}O_3N_5$

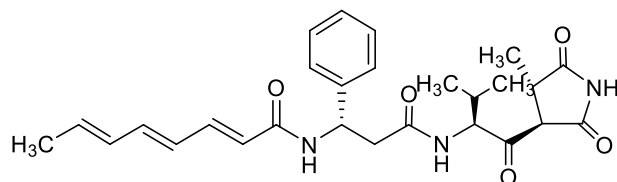
Aspergillus sp. marinho



Fumitremorgina B

$C_{27}H_{33}O_3N_5$

Aspergillus fumigatus



Andrimida A

$C_{27}H_{33}O_3N_5$

Vibrio sp. marinho

FIGURA 1.11 - Exemplo de derreplicação de um extrato da espécie de bactéria marinha *Vibrio coralliiticyus* por LC-UV/HRMS. Espectro de UV e *full scan* são extraídos da banda em 10,01 min indicada no cromatograma. No espectro de massas o íon pseudomolecular é atribuído baseado na presença do aduto $[M+Na]^+$ e das espécies diméricas $[2M+H]^+$ e $[2M+Na]^+$. A consulta no AntiBase 2012 sugere três possíveis identidades ao alvo de acordo com a busca massa acurada com 5 ppm de exatidão. A andrimida pode ser considerada o alvo de maior potencial devido à origem taxonômica. Retirado e adaptado de MÅNSSON, 2011.

Segundo IUPAC, a definição de massa acurada abrange a medição de massas (valor empírico) com erros menores a 5 ppm (MURRAY et al., 2013). Os equipamentos em espectrometria de massas de alta resolução (HRMS), como por exemplo aqueles com analisadores de massas do tipo TOF, Q-TOF ou Orbitrap oferecem além da alta resolução, a alta exatidão de massa necessária para o encontro das massas acuradas (KIND & FIEHN, 2010).

A derreplicação via LC-MS é baseada na determinação das massas acuradas dos íons pseudomoleculares $[M+H]^+$, $[M-H]^-$ ou outras espécies identificadas de íons. Geralmente apresenta-se como um método bastante sensível, fornecendo resultados confiáveis em uma faixa de massa que vai de nanogramas à fentogramas (10^{-9} g – 10^{-15} g) (NIELSEN et al., 2011). Neste sistema, os sinais obtidos durante as análises podem ser facilmente deconvoluídos, o que garante que a técnica de LC-MS seja adequada à derreplicação de misturas complexas (FUNARI et al., 2012, EL-ELIMAT et al., 2013).

A correta interpretação dos dados de LC-MS é essencial para a correta atribuição das massas moleculares e subsequente investigação nos bancos de dados disponíveis. O modo de ionização do tipo *eletrospray* (ESI) é a técnica mais utilizada em espectrometria de massas na atualidade por apresentar alta eficiência na ionização de analitos para a interpretação de resultados. Além dos íons pseudomoleculares, outros tipos de íons podem ser detectados durante uma mesma análise, dependendo da natureza do analito, dos parâmetros internos do equipamento (vtagens e energias aplicadas) e do uso de solventes e aditivos (NIELSEN & SMEDSGAARD, 2003; NIELSEN et al., 2011).

Tais espécies podem validar a atribuição do íon pseudomolecular, especialmente para compostos lábeis, que fragmentam facilmente e àqueles que formam adutos. Os adutos mais comumente visualizados no modo positivo são os íons $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+CH_3CN]^+$, $[M+CH_3OH]^+$ e no modo negativo $[M-H+HCOOH]^-$, além dos respectivos dímeros e trímeros $[2M + H]^+$, $[2M + Na]^+$, $[3M + H]^+$, and $[2M - H]^-$. Já as perdas mais comuns provenientes das fragmentações já na fonte de ionização são as perdas de HCOOH, CH₃COOH, uma ou mais moléculas de H₂O, CO e CO₂ (WOLFENDER et al., 2010; NIELSEN et al., 2011).

Apesar de bastante informativas, tais espécies podem levar a erros de interpretação (NIELSEN et al., 2005; NIELSEN et al., 2011), levando a falsos resultados quanto à identidade do composto alvo. Por isso, no processo de

derreplicação, todos os resultados devem ser exaustivamente e criteriosamente avaliados.

A derreplicação pode se tornar uma tarefa bastante laboriosa quando os bancos de dados sugerem muitos candidatos para uma mesma massa. Mesmo que uma análise de um analito seja obtida com exatidão de massa abaixo de 1ppm, as fórmulas moleculares encontradas podem culminar em resultados redundantes, devido a ocorrência de estruturas com mesma fórmula.

Para a superação deste tipo de entrave na identificação metabólica, e exclusão dos candidatos menos prováveis, torna-se útil lançar mão de outros dados espectrais que possam ser obtidos a partir do analito alvo, como por exemplo, dados de UV-vis, MS/MS ou até mesmo o conhecimento taxonômico do organismo investigado e espécies correlatas próximas (MÅNSSON, 2011; NIELSEN et al., 2011; EL-ELIMAT et al., 2013).

O uso de experimentos HRMS/MS pode fornecer fragmentos com alta exatidão de massa e assim aumentando as informações estruturais inerentes ao alvo investigado. No entanto é válido que a espectrometria de massas por si só não apresenta-se como um método discriminatório único e inequívoco. Por isso, informações adicionais devem ser exploradas para a exclusão de compostos conhecidos durante o processo.

Comparações de dados de UV podem ser muito úteis, fornecendo indicações a respeito da composição estrutural do metabólito com potenciais cromóforos. Em contrapartida, para compostos não conjugados, este tipo de informação não é relevante e adicionalmente a este fato, dados de UV são raramente completos ou disponíveis pelos bancos de dados, havendo-se a necessidade da busca de cada informação, uma a uma na literatura (MÅNSSON, 2011).

Neste sentido, o tempo de retenção pode funcionar em complementaridade ao processo de derreplicação, quando padrões encontram-se disponíveis para o estudo, sendo um parâmetro confirmatório inequívoco à identidade dos metabólitos desconhecidos. Embora o uso de padrões seja extremamente ideal, o acesso a eles é obviamente não factível para a maioria dos compostos microbianos, especialmente quando não há a disponibilidade e acessibilidade de compra ou de um banco de padrões próprio.

Devido à vasta quantidade de dados cromatográficos e espectros de massas adquiridos em estudos metabolômicos, vários e distintos métodos de

screening informatizados têm sido desenvolvidos e aplicados (FREDENHAGEN et al., 2005; ROJAS-CHERTO et al., 2012; HORAI et al., 2010; HALABALAKI et al., 2014). Um dos softwares disponíveis à comunidade científica para a determinação de compostos fúngicos conhecidos, a partir de extratos complexos, trata-se do software *Target Analysis* formulado pela Bruker Daltonics (GMBH, 2009),

Tal ferramenta computacional foi desenvolvida para o processamento de análises forenses, de toxinas, drogas, pesticidas e outros compostos de interesse (GMBH, 2009), podendo ser utilizada para o *screening* de extratos contendo até 3000 compostos baseando-se em parâmetros como exatidão de massa, tempo de retenção e valores de mSigma. Este último trata-se de um fator de classificação desenvolvido pela Bruker Daltonics, no qual avalia através de um *score*, se o desvio padrão das massas isotópicas medidas estão em concordância com às massas isotópicas teóricas, em perfil e intensidade. O *score* deve apresentar valores menores a 50 para indicar maior concordância à fórmula molecular proposta pelo banco de dados.

O funcionamento do software se dá através do cruzamento de informações obtidas a partir dos espectros de massas e cromatograma adquiridos para uma amostra alvo, com as informações inerentes aos metabólitos vinculados a um banco de dados utilizado durante o processamento.

Em primeira instância, o programa verifica se há a existência dos compostos pertencentes no banco de dados através da comparação da massa acurada do íon pseudomolecular do metabólito conhecido, via a informação de massa exata do mesmo. Havendo o encontro do íon de interesse, o *software* então analisa o valor de mSigma para todos os íons encontrados. Caso a biblioteca utilizada apresente tempos de retenção registrados para os compostos de interesse (para o mesmo método cromatográfico) também há o cruzamento e comparação dos valores medidos e teóricos.

Baseado nesses parâmetros, a existência dos compostos de interesse é verificada ou não detectada. Após o processamento pelo programa, é gerada uma lista contendo os resultados do *screening* para a amostra avaliada como fórmula molecular sugerida, desvios de massa, mSigma, etc (FIGURA 1.12). Como uma das ferramentas do software, também é possível gerar o cromatograma de íons extraídos (EIC – *Extract Ions Chromatogram*) para todas os íons detectados e confirmados pela comparação com o banco de metabólitos utilizado (FIGURA 1.12)

A intensidade e a forma das bandas geradas são correspondentes ao score de mSigma obtido após tratamento algorítmico do programa. Com isto, quanto menor o valor de mSigma, mais próxima à intensidade e ao perfil real da banda correspondente no cromatograma de pico base (*BPC-Base Peak Chromatogram*), do extrato analisado. Como o software não é capaz de gerar um *ECl* contendo tanto os íons de identificação conhecida pelo cruzamento de dados, como dos íons desconhecidos, o cromatograma de *ECl* contendo os íons identificados é geralmente sobreposto ao cromatograma de BPC do extrato investigado. Sendo assim, torna-se fácil a visualização as bandas cromatográficas de compostos não identificados, como é o caso das bandas visualizadas na cor cinza, no cromatograma exibido na FIGURA 1.12.

Para a criação de um banco de dados a ser processado e vinculado à análise de um extrato de interesse, não apenas massas exatas ou fórmulas moleculares podem ser utilizadas, mas também pode-se construir listas agrupando grupos taxonômicos, ou conjuntos de classes de metabólitos a partir dos dados gravados em um arquivo Chemfolder®. As listas criadas, a partir do Chemfolder (banco de dados construído) na verdade são convertidos em tabelas do programa Excel (Microsoft®) e deste modo são “lidas”/processadas pelo software *Target Analysis* (KLITGAARD et al., 2014).

Embora as ferramentas apresentadas sejam bastante úteis no processo de derreplicação, sua utilização não é comprobatória quanto à identidade dos metabólitos fúngicos, fundamentalmente quando não se tem um banco de dados criado com padrões que confirmem tempos de retenção dos compostos de interesse. No entanto, funcionam como um poderoso guia para a determinação de compostos conhecidos, mesmo que posteriormente seja necessário agregar a derreplicação manual ao estudo, investigando-se parâmetros como perfil de fragmentação e espectro de UV de cada composto.

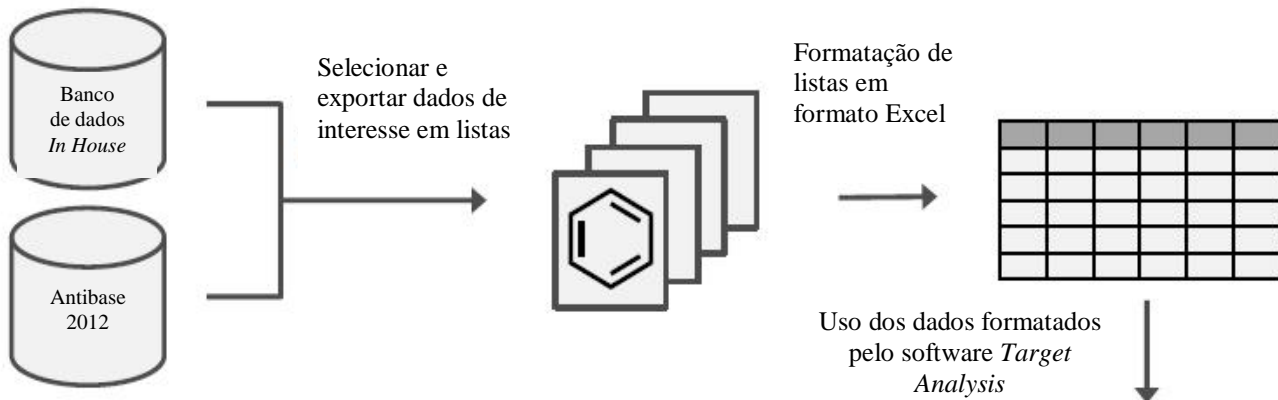


Tabela contendo dados de *Screening* da amostra avaliada

+++	Chloramphenicol IS	O	C 11 H 12 Cl 2 N 2 ...	[M++]+	0.069	0.9	0.3	3.3	519133	125123	4.120	4.051	323.0196	323.0193
+++	Pestalotamide B	O	C 18 H 18 N 2 O 5	[M++]+	0.136	0.0	-0.0	12.9	138063	29033	4.455	4.319	343.1288	343.1288
+	Carbonarone B	O	C 13 H 11 N 1 O 3	[M++]+	-4.422	0.3	-0.1	1.0	419988	100203	0.000	4.422	230.0812	230.0812
+	Carbonarone A	O	C 13 H 11 N 1 O 3	[M++]+	-4.422	0.3	-0.1	1.0	419988	100203	0.000	4.422	230.0812	230.0812
+++	Tensidol A	O	C 13 H 11 N 1 O 3	[M++]+	0.138	0.3	-0.1	1.0	419988	100203	4.560	4.422	230.0812	230.0812
+	7-Hydroxy-4-methoxy-5-methylcoumarin	O	C 11 H 10 O 4	[M++]+	-4.469	0.7	0.1	11.7	24707	6182	0.000	4.469	207.0652	207.0650
+++	Unknown in <i>A. niger</i> 22 MW186	O	C 12 H 10 O 2	[M++]+	0.146	0.0	0.0	3.5	278120	66933	4.616	4.470	187.0754	187.0754
+++	Orlandin	O	C 22 H 18 O 8	[M++]+	0.101	0.1	-0.0	5.7	286078	67889	4.850	4.749	411.1074	411.1075
+	Bicoumanigrin	O	C 22 H 18 O 8	[M++]+	-4.749	0.1	-0.0	5.7	286078	67889	0.000	4.749	411.1074	411.1075
+++	S847-Funalenone	O	C 15 H 12 O 6	[M++]+	0.046	0.3	-0.1	3.2	3229445	206891	4.816	4.770	289.0707	289.0707

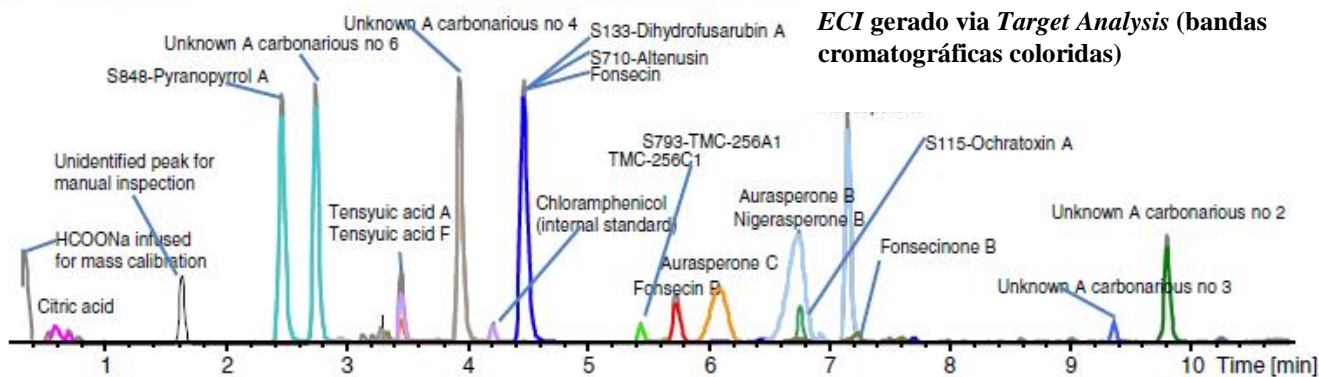


FIGURA 1.12 - Esquema do fluxo de trabalho para screening de extratos fúngicos pela aplicação software *Target Analysis*-Bruker no uso da abordagem de derreplicação. Adaptado de KLITGAARD et al., 2014

1.6 - Biotransformações de constituintes químicos de frutos pela microbiota associada a esses hospedeiros

O uso de micro-organismos para a modificação estrutural de moléculas visando o melhoramento das propriedades farmacológicas e biológicas de vários produtos naturais têm atraído grande interesse científico e industrial devido à larga disponibilidade, baixos custos e variedade de substratos que podem ser transformados por esses organismos. Isto sem que haja a necessidade de adição de cofatores no meio reacional (WANG, 2010).

Tendo em vista a grande maquinaria enzimática pertencente aos micro-organismos, seria pertinente a investigação da capacidade destes em biotransformar substratos endógenos existentes no meio natural dos quais estes foram isolados. Neste sentido, o desenvolvimento da relação ecológica entre fungos e plantas pode ser visto como um vasto nicho de exploração para substâncias de interesse, ou talvez até mesmo de novas substâncias.

Um exemplo bem sucedido, trata-se da biotransformação da cafeína pelo fungo *Penicillium griseoroseum* isolado de frutos de café. Tal fungo foi capaz de desmetilar a cafeína, produzindo assim a teofilina, menos tóxica ao mesmo (RODRIGUES-FILHO, 2010).

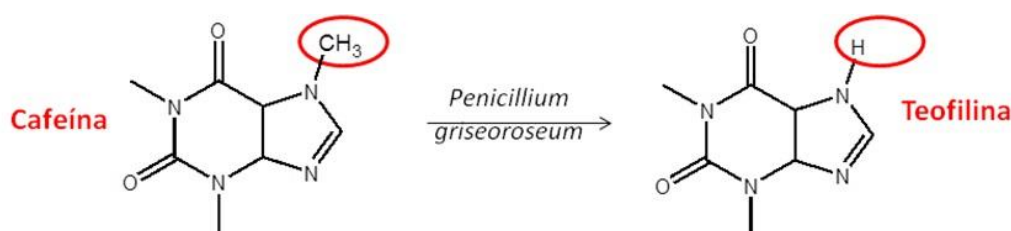


FIGURA 1.13 - Biotransformação da cafeína por *P. griseoroseum*

As frutas apresentam uma constituição química rica em nutrientes o que abrange carboidratos, ácidos orgânicos, flavonóides, aminoácidos, etc. A maçã por exemplo, é um fruto cuja composição contém flavonóides e ácidos orgânicos como por exemplo catequinas, rutina, floridizina, ácido clorogênico, ascórbico, etc. (GERHAUSER, 2008; AWAD et al., 2000; KAMMERER et al., 2011).

Em particular para os flavonóides, sabe-se que estes são naturalmente sintetizados por plantas. No entanto, também é reconhecido que estes estão

diretamente envolvidos nas interações fungo-planta (DIXON, 2001). Sua produção dentro do organismo vegetal pode ser expressivamente aumentada quando este é submetido a alguma sistemática de estresse, como por exemplo a infecção fúngica, passando a apresentarem a denominação de fitoalexinas, devido ao papel sinalizador ou de defesa sistêmica que passam a ter (TREUTTER, 2006).

De um modo similar, com o potencial aumento destes compostos quando há o desenvolvimento microbiano nos órgãos vegetais, pode ser considerada uma possível ativação do sistema enzimático fúngico direcionado às modificações químicas nas fitoalexinas lançadas, em uma tentativa de detoxificação destes substratos. Sendo assim, qualquer modificação estrutural, proporcionadas por oxidações, reduções, clivagens de ligações, metilações, desglicosilações, dentre diversas outras reações, poderia acarretar no aumento, diminuição ou anulação de algum efeito inerente ao substrato transformado (FABER, 2011).

Em um panorama mais amplo, tendo em vista a variedade de compostos disponíveis aos micro-organismos para biotransformações, torna-se viável a investigação da habilidade destes em biotransformar substratos de origem endógena aos frutos, não só para o reconhecimento de compostos de valor agregado, mas sim, para o reconhecimento de sua identidade. Tal investigação seria de interesse científico, mas também uma questão de saúde pública, já que, direta ou indiretamente o homem estaria incorporado à sua dieta produtos de biotransformação microbiana em potencial, com distintas propriedades biológicas.

2 - Objetivos

Em termos gerais, a meta principal do trabalho tratou da prospecção química do metabolismo secundário de fungos endofíticos isolados dos frutos comestíveis maçã (*Malus domestica*) e a goiaba (*Psidium guajava*), visando-se a execução de três principais vertentes: a descoberta de novos produtos naturais, a potencialidade dos micro-organismos em biotransformar substratos provenientes da composição natural dos frutos e por fim a detecção de possíveis metabólitos secundários destes micro-organismos em polpa de frutas comerciais. Como foco de estudo optou-se pela investigação de fungos associados a estes frutos por estes apresentarem alto consumo e comercialização em todo o mundo, sendo a goiaba com maior destaque em países de clima tropical, como é o caso do Brasil.

Dentro das metas mais específicas, buscou-se a exploração da potencialidade quanto a indução biossintética de novos produtos naturais pelos micro-organismos, através do uso da abordagem OSMAC. Nesta proposta foram estabelecidas modificações abióticas (variação de nutrientes) e bióticas (culturas combinadas) no processo de crescimento dos micro-organismos. A implementação da metodologia de derreplicação via UHPLC-HRMS e HPLC-MS/MS e consultas a banco de dados comerciais e *in house* foi proposta como estratégia para a obtenção mais rápida e eficiente dos resultados esperados.

As demais abordagens investigativas focaram a exploração das capacidades metabólicas do endófito de maçã *T. rugulosus*. Considerando-se o universo químico oferecido naturalmente à microbiota associada a frutos, foi proposta a avaliação do sistema enzimático deste micro-organismo em realizar biotransformações utilizando-se compostos inerentes à constituição natural da maçã, ou seja alguns ácidos orgânicos e flavonoides. Com isto, buscou-se o reconhecimento de produtos de biotransformação potencialmente produzidos pelo endófito já em seu habitat natural.

Por fim, tendo em vista a potencialidade dos micro-organismos associados a frutos em biossintetizar uma variedade de compostos *in loco*, devido a condições favoráveis de metabolização como a disponibilidade nutricional, temperatura e pH adequados, a investigação também teve como meta a detecção de possíveis metabólitos secundários produzidos por *T. rugulosus* em frutos de maçã

comerciais. Para tanto, foi proposto o monitoramento dos metabólitos reconhecidos no processo de *screening* metabólico deste fungo, pelo uso da técnica de LC-MS/MS via experimentos de MRM, visando-se o alcance de maior sensibilidade e seletividade nas análises propostas.

3 - Parte Experimental

3.1 - Reagentes e materiais

- # Alça de platina
- # Bico de Bunsen
- # Papel de filtro qualitativo ($\varnothing = 12,5$ cm) SATELIT[®]
- # Funil de Buchner
- # Placas de Petri Estéril
- # Lâminas de bisturi
- # *Drill* (furador de metal, $\varnothing = 5$ mm)
- # Filtro PTFE 0.25 μ m e 0.45 μ m Whatman International[®]
- # Batatas inglesas comerciais;
- # Goiabas vermelhas comerciais
- # Maçãs do tipo Gala e Fuji comerciais

3.2 - Reagentes e meios de cultura

- # (-) Epicatequina SIGMA-ALDRICH[®]
- # Ácido ascórbico - MERCK[®]
- # Hesperidina - SIGMA-ALDRICH[®]
- # Rutina - SIGMA-ALDRICH[®]
- # Phloretin - SIGMA-ALDRICH[®]
- # Quercetina - SIGMA-ALDRICH[®]
- # Ácido clorogênico - SIGMA-ALDRICH[®]
- # NaSO₄ - SYNTH[®]
- # NaOOCCH₃ - SIGMA-ALDRICH[®]
- # MgSO₄ - SIGMA-ALDRICH[®]
- # K₃PO₄ . H₂O - BHD[®]
- # ZnSO₄.7H₂O - MERCK[®]
- # CuSO₄, 5H₂O - RIEDEL-DE HAËN[®]
- # NaNO₃ - MERCK[®]

- # K₂HPO₄.3H₂O MERCK®
- # MgSO₄.7H₂O - MERCK®
- # FeSO₄.7H₂O - MERCK®
- # KCl - MERCK®
- # Ágar-ágar - SIGMA-ALDRICH®;
- # Ágar bacteriológico SIGMA-ALDRICH®
- # Dextrose U.S.P. MALLINCKRODT® Genar (anidro e granular)
- # Batata Dextrose Ágar- DIFCO®
- # Creatina.H₂O - BIO CHEMIKA®
- # Sucrose - BHD®
- # Púrpura de Bromocresol - SIGMA®
- # Ágar - BIE & BERENTSEN®
- # Peptona - BACTO®
- # Glucose - BHD®
- # *Corn Steep Liquor* - SIGMA®
- # Extrato de levedura - BOKAR®
- # Tetraciclina - TETRAMED®
- # Itraconazol - EMS®
- # Cicloheximida - SIGMA-ALDRICH®
- # Cloranfenicol - SIGMA-ALDRICH®
- # Mingal de Aveia
- # Extrato de Malte - DIFCO®
- # Extrato de Malte - OXOID®
- # *Czapek doxbroth* - DIFCO®
- # Ácido Fórmico 98%, grau LC-MS - FLUKA®
- # Padrões de metabólitos secundários pertencentes à coleção IBT-CMB -
DTU/Denmark (*Center for Microbial Biotechnology – Danmarks Tekniske
Universitet*)
- # Espécies fúngicas pertencentes à coleção IBT-CMB - DTU/Denmark

3.3 - Solventes empregados

Água destilada

Água Ultra-Pura (Purificada em Sistema Milli-Q®)

Solventes grau P.A. PANREAC®

Solventes grau HPLC: acetonitrila, isopropanol, metanol SIGMA- ALDRICH® e J. T. BAKER®

Solventes grau LC-MS: acetonitrila, isopropanol, metanol SIGMA- ALDRICH®

Solventes deuterados: clorofórmio e metanol-CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES® Inc.

3.4 - Equipamentos

Rotaevaporadores

Rotavapor R-200 com banho de aquecimento -BÜCHI® B-490

Rotavapor R-114 com banho de aquecimento- BÜCHI® B-480

Estufas

FANEM® 315-SE

Estufa incubadora com demanda bioquímica de oxigênio (D.B.O) FANEM® 347 CD

Autoclaves

#Autoclave vertical Phoenix AV 75 e Soc. FABBE® 103

Câmara de fluxo laminar

GE Healthcare®

VECO® VL FS-12M

Espectrômetros de RMN

Espectrômetro Bruker Avance III - 9,4 Tesla, equipado sonda de 5 mm

Espectrômetro Varian Unity Inova - 11,75 Tesla, equipado sonda de 5 mm

Espectrômetro Bruker Avance III - 14,1 Tesla, equipado com cryo-sonda TCI (1H/13C/15N) de 5 mm

Espectrômetro Bruker Avance - 18,8 Tesla, equipado com cryo-sonda TCI (1H/13C/15N) de 5 mm

Cromatógrafo acoplado a espectrômetro de massas

Cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC) - Alliance 2695-WATERS® combinado ao módulo WATERS® 2696 (DAD) e acoplado ao espectrômetro de massas (MS) QuattroLC- triplo-quadrupolo, ESI - MICROMASS®

Cromatógrafo líquido de ultra-alta pressão (UHPLC)-Ultimate 3000 Dionex® acoplado ao espectrômetro de massas (HRMS) maXis 3G Q-TOF, ESI - BRUKER®

Cromatógrafo líquido de ultra-alta pressão (UHPLC) 1290 Infinity Agilent® combinado ao módulo Agilent 1290 Infinity Flexible Cube e acoplado ao espectrômetro de massas (MS) Agilent 6490, triplo quadrupolo iFunnel Technology®, Agilent® Jet Stream ESI

Cromatógrafo líquido de ultra-alta pressão (UHPLC) Accela High Speed LC- Thermo Scientific® acoplado ao espectrômetro de massas (HRMS) LTQ Orbitrap Velos, ESI - Thermo Scientific®

Cromatógrafos

Cromatógrafo líquido de média pressão (MPLC) - Biotage Isolera combinado ao módulo UV- Biotage Isolera;

Cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC) semi-preparativo Waters® 600 combinado ao módulo Waters® 996 DAD

Cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC) Shimadzu® LC-10AD, auto injetor SIL-10ADVp, combinado ao módulo SPD-M10A-VP (DAD)

Cromatógrafo líquido de média pressão (MPLC) Biotage® Isolera One

Outros Aparatos

Centrifuga SORVALL MACH GR®

Pipetas automáticas - Eppendorf :10, 20, 100, 200 e 1000 µL

Sonicador - BRANDSON® 1510

3.5 - Suportes cromatográficos

Sílica gel 60 (70-230) - MERCK®

Colunas cromatográficas para *HPLC*

- Synergi Fusion RP 80A (250 x 4,60 mm, 5 µm), PHENOMENEX®
- Luna Phenyl Hexyl (250 x 4,60mm, 5µm), PHENOMENEX®
- Luna Phenyl Hexyl Preparativa (250 x 21,20mm, 10 µm), PHENOMENEX®
- Kinetex Core-shell C₁₈ (100 mm x 2,1mm, 2,6 µm), PHENOMENEX®
- Poroshell 120 Phenyl-Hexyl (100 mm x 2,1mm, 2,7 µm), AGILENT®
- Luna PFP (250 mm x 10 mm, 5µm), PHENOMENEX®
- Luna II C₁₈ (250 mm x 10 mm, 5µm), PHENOMENEX®
- Luna C₁₈ (150 x 4,60mm, 5µm), PHENOMENEX®
- XTerra C₁₈ (30 x 3,0mm, 3,5µm), WATERS®

3.6 - Parâmetros de análise para estudos realizados via UHPLC/DAD-HRMS, UHPLC-HRMS e HRMS/MS

O estudo de derreplicação foi realizado através dos dados obtidos pelas técnicas UHPLC-HRMS, no modo *full scan* ou MS/MS, com analisador de massas tipo Q-Tof ou Orbitrap, ambos com fonte de ionização *ESI*. Os parâmetros utilizados encontram-se resumidos nos métodos de análise A, B e C. Os métodos serão apontados para cada análise de acordo com os cromatogramas e espectros apresentados na seção de *Resultados e Discussão*.

Método A

Fluxo: 0,4 mL/min

Fase Móvel: H₂O e ACN, ambos contendo 20 µM de ácido fórmico

Fase Estacionária: Coluna Kinetex Core-shell C₁₈

Temperatura da Coluna: 40°C

λ: 200 a 600 nm

Analisador de Massas: Q-Tof; Maxis 3G Bruker®

TABELA 3.1 - Condições de eluição para método cromatográfico A

Tempo (min)	Porcentagem (ACN) (%)
0,01	15
10,00	100
13,00	100
13,10	15
15,50	15

TABELA 3.2 - Condições do espectrômetro de massas *ESI* (-) ou *ESI* (+), método A

Temperatura Drying Gas (°C)	220
Fluxo Drying Gas L/min	12
Pressão Nebulizer (bar)	2.4
Voltagem Capilar (kV)	4.5
Range de Massas (Da)	100-1000
Modo	<i>Full Scan</i>
Calibrante	Formiato de sódio

Método B

Fluxo: 0,4mL/min

Fase Móvel: H₂O e MeOH

Fase Estacionária: XTerra C₁₈

Temperatura da Coluna: Temperatura ambiente

Analizador de Massas: Orbitrap-Velos Thermo®

TABELA 3.3 - Condições de eluição para método cromatográfico B

Tempo (min)	Porcentagem (MeOH) (%)
0,01	50
6	70
8	100
10	100
10,1	50
13	50

Método C

Fluxo: 0,5 mL/min

Fase Móvel: H₂O e ACN, ambos contendo 20 µM de ácido fórmico

Fase Estacionária: Luna C₁₈

Temperatura da Coluna: Temperatura ambiente

Analizador de Massas: Orbitrap Velos Thermo®

TABELA 3.4 - Condições de eluição para método cromatográfico C

Tempo (min)	Porcentagem (ACN) (%)
0,01	30
25	100
33	100
34	30
40	30

TABELA 3.5 - Condições do espectrômetro de massas *ESI* (-) ou *ESI* (+), método B e C

	Método B	Método C
Temperatura <i>Drying Gas</i> (°C)	180	250
Fluxo <i>Drying Gas</i> L/min	12	12
Temperatura <i>Sheath Gas</i> (°C)	350	350
Pressão <i>Nebulizer</i> (psi)	20	32
Voltagem Capilar (kV)	3.5	3.5
<i>Fragmentor Voltage</i> (V)	380	380
<i>Dwell Time</i> (ms)	50	50
<i>Ciclo Time</i> (ms)	500	400
Q1 e Q2	Resolução unitária	Resolução unitária

3.7 - Parâmetros de análise para estudos realizados via UHPLC-MS/MS e modo MRM dinâmico

A investigação para detecção de possíveis metabólitos fúngicos em extratos de maçã foi realizada em sistema UHPLC-MS, no modo MS/MS ou MRM dinâmico, com analisador de massas tipo triplo-quadrupolo, com fonte de ionização *ESI*. Os parâmetros utilizados encontram-se resumidos no método de análise D:

Método D

Fluxo: 0,4mL/min

Fase Móvel: H₂O, (ACN:ISO ; 8:2 v/v) grau LC-MS, ambos contendo 20 µM de ácido fórmico grau LC-MS

Fase Estacionária: Coluna Poroshell 120 Phenyl-Hexyl

Temperatura da Coluna: 40 °C

Analisador de Massas: Triplo-quadrupolo, AGILENT 2900 Ion funnel-technology®

TABELA 3.6 - Condições de eluição para método cromatográfico D

Tempo (min)	Porcentagem (ACN/ISO) (%)
0,01	10
7,5	65
9,0	100
12,0	100
12,1	10
14,0	10

TABELA 3.7 - Condições do espectrômetro de massas *ESI* (-) ou *ESI* (+), método D

Temperatura Drying Gas (°C)	180
Fluxo Drying Gas L/min	12
Temperatura Sheath Gas (°C)	350
Pressão Nebulizer (psi)	20
Voltagem Capilar (kV)	3.5
Fragmentor Voltage (V)	380
Modo	MS/MS ou MRM
Dwell Time (ms)	50
Ciclo Time (ms)	500
Q1 e Q2	Resolução unitária

3.8 - Parâmetros de análise para estudos realizados via LC-MS e MS/MS

As análises obtidas via espectrometria de massas de baixa resolução foram realizadas com analisador tipo triplo-quadrupolo, combinado à fonte de ionização *ESI*. Os parâmetros utilizados encontram-se resumidos nos métodos de análise E, F.

Método E

Fluxo: 0,7mL/min

Fase Móvel: H₂O e MeOH

Fase Estacionária: Luna Phenyl Hexyl

λ : 190nm a 600nm

Analisador de Massas: Triplo-quadrupolo MICROMASS/WATERS®

TABELA 3.8 - Condições de eluição para método cromatográfico E

Tempo (min)	Porcentagem (MeOH) (%)
0,01	30
20,00	80
45,00	90
50,00	100
60,00	100

Método F

Fluxo: 0,7mL/min

Fase Móvel: H₂O e MeOH, 10 mM de acetato de amônio na fase aquosa

Fase Estacionária: Luna Phenyl Hexyl

λ : 190nm a 600nm

Analisador de massas: Triplo-quadrupolo, MICROMASS/WATERS®

TABELA 3.9 - Condições de eluição para método cromatográfico F

Tempo (min)	Porcentagem (MeOH) (%)
0,01	10
20,00	65
45,00	90
50,00	100
60,00	100

TABELA 3.10 - Condições do espectrômetro de massas *ESI* (-) ou *ESI* (+), método F

Temperatura da fonte (°C)	100 (método E); 150 (método F)
Temperatura do probe (°C)	180 (método E); 300 (método F)
Capilar (kV)	3,2 (método E); 3,7 (método F)
Cone (V)	20 (método E); 25 (método F)
Extrator (V)	3,5
Lentes RF (V)	0,75

Método G

Fluxo: 0,5mL/min

Fase Móvel: H₂O e ACN, ambos contendo 10 µM de ácido trifluoracético

Fase Estacionária: Luna C₁₈

Temperatura da Coluna: 40 °C

TABELA 3.11 - Condições de eluição para método cromatográfico G

Tempo (min)	Porcentagem (ACN) (%)
0,01	20
20,00	65
25,00	100
32,00	100
33,00	20
40,00	20

3.9 - Procedimento Experimental

3.9.1 - Isolamento e identificação de fungos endofíticos associados aos frutos goiaba (*Psidium guajava*) e maçã (*Malus domestica*)

O isolamento dos micro-organismos foi realizado de modo adaptado em relação à metodologia descrita por PETRINI e colaboradores (1993), devido às dimensões do material vegetal estudado. As frutas utilizadas foram adquiridas no mesmo dia da execução do procedimento.

Inicialmente as frutas foram lavadas com detergente comercial e em água corrente. Em seguida, já em capela de fluxo laminar, iniciou-se a sequência de esterilização superficial das frutas a fim de eliminar micro-organismos epifíticos e agentes contaminantes. O material vegetal foi sequencialmente mergulhado em etanol 70%; água destilada; solução aquosa de hipoclorito de sódio 11%; água destilada; etanol 70%; e por fim água destilada para a remoção de resíduos dos agentes esterilizantes, durando 2 minutos o tempo de cada imersão. Com o uso de bisturi e faca esterilizados em autoclave, os frutos foram cortados ao meio. Pequenos pedaços oriundos das regiões mais internas das polpas foram cortados e depositados em placas de Petri, meio BDA (FIGURA 3.1). As placas contendo os fragmentos de polpa foram incubados em estufa incubadora tipo B.O.D à 25 °C, sendo observadas diariamente. A fim de purificar as colônias fúngicas, foram realizados repiques sucessivos nas placas em que houve crescimento de mais de uma colônia de micro-organismo.

Os procedimentos para o isolamento de micro-organismos foram repetidos em diferentes dias, por mais uma vez com cada espécie de fruta. Para cada tipo de fruta utilizada, fragmentos foram cortados cuidadosamente em partes diferenciadas da polpa e depositados em diversas placas de Petri. Tal procedimento deveu-se às dimensões do material vegetal de trabalho, sendo que a colonização de possíveis micro-organismos endofíticos dentro da fruta poderia estar pontuada em certas regiões da polpa ou ao contrário, disseminada por toda ela.

Logo, foram necessários cortes que englobassem o máximo de pontos da polpa da fruta. Além deste fato, trabalhou-se com a possibilidade da existência de diferentes espécies microbianas no mesmo tipo de fruta, o que está interligado à região de cultivo da mesma e à sua sazonalidade. Sendo assim, além das placas de onde se obteve o isolamento dos endófitos de trabalho, houve muitas delas que não

apresentaram crescimento microbiano algum. Em contrapartida, em alguns casos, foi necessário o descarte das placas, pois houve o crescimento intenso e diversificado de várias espécies de micro-organismos, impossibilitando o isolamento. Foram escolhidos para o trabalho, apenas as culturas que se apresentaram puras após repicagem.

Os frutos de goiaba maduros utilizados no procedimento de isolamento de micro-organismos foram adquiridos em comércio local da cidade de São Carlos-outubro/2007. Os frutos de maçã dos tipos Gala e Fuji foram adquiridos em janeiro/2008. Os micro-organismos isolados e purificados encontram-se depositados na coleção de culturas microbianas LaBioMMi cujos números estão descritos na TABELA 3.12.

O fungo *Setophoma* sp. isolado de frutos de goiaba foi identificado com base no sequenciamento do fragmento da região 28S do rDNA, realizado pelo doutor Lucas M. Abreu, sendo que tal identificação pode ser encontrada com maior detalhamento em DE MEDEIROS et al., 2015. Os demais micro-organismos foram identificados por análise morfológica (FIGURA 3.2) e quimiotaxonômica através de comparação com espécies de mesma identificação pertencentes à coleção LaBioMMi e IBT-DTU (registro758 pela Federação Mundial de Coleções e Culturas).

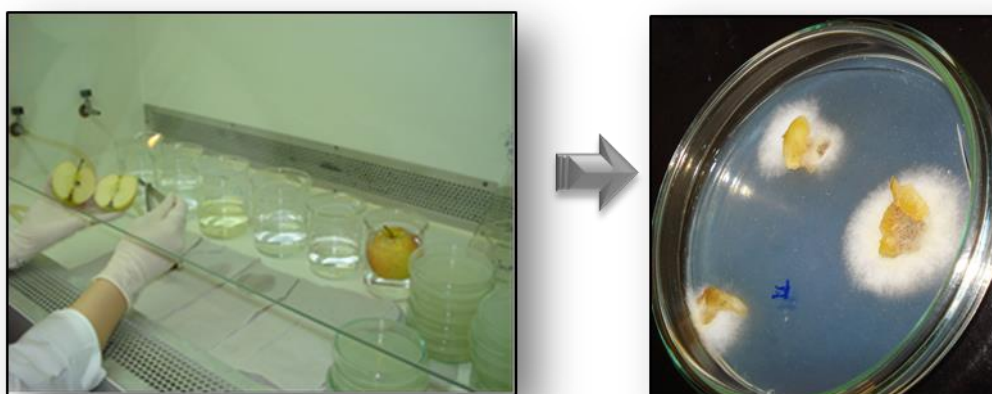


FIGURA 3.1 - Procedimento de isolamento de micro-organismos endofíticos a partir de maçã e fragmentos depositados de polpa de maçã em meio PDA com evidente crescimento fúngico

TABELA 3.12 - Espécie, fonte de isolamento e código de depósito dos fungos isolados

Fungo	Fruto	Nº LaBioMMi
<i>Setophoma</i> sp.	Goiaba	137
<i>Talaromyces rugulosus</i>	Maçã Gala	136
<i>Epicocum nigrum</i>	Maçã Fuji	135
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Maçã Fuji	-

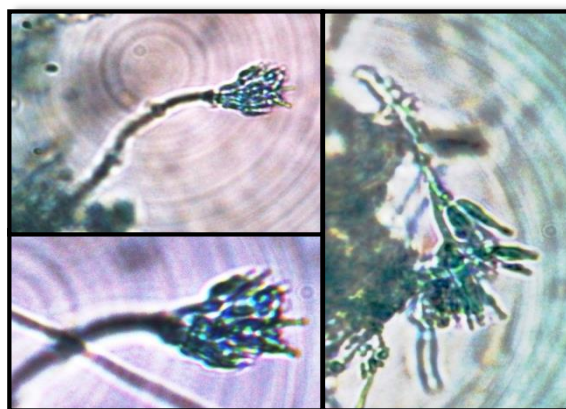


FIGURA 3.2 - Imagens de microscopia óptica do microcultivo de *T.rugulosus*

3.9.2 - Micro-extração de metabólitos secundários das espécies fúngicas estudadas a partir dos micro-cultivos em diferentes meios de cultura

O *screening* do metabolismo secundário dos fungos isolados a partir de frutos comerciais de goiaba e maçã foi realizado utilizando-se diferentes meios de cultura. A nomenclatura e constituição dos meios utilizados encontram-se descritos na TABELA 3.13. O procedimento para preparo dos mesmos encontra-se relatado em FRISVAD 2012.

TABELA 3.13 - Siglas e constituições referentes aos meios de cultura empregados para *screening* metabólico dos fungos investigados

Siglas dos Meios de Cultura	Constituição (FRISVAD, 2012)
PDA	Potato Dextrose Agar (Batata Dextrose Agar)
WATM	Wickerhams Antibiotic Test Medium (Wickerhams Meio Antibiótico)
OAT	Oatmeal Agar (Mingau de aveia Agar)
CYAS	Czapek Yeast Autolysate Salt (Czapeck Levedura Autolisada Sal)
CYA	Czapek Yeast Autolysate Agar (Czapeck Levedura Autolisada)
DRYES	Dichloran Rose Bengal Yeast Extract Sucrose (Dichloran Rose Bengal Extrato de Levedura Sucrose)
MEA	Malt Extract Agar (Extrato de Malte Agar)
MEAOX	Malt Extract Agar Oxoid® (Extrato de Malte Agar Oxoid®)
YES	Yeast Extract Sucrose Agar (Extrato de levedura Sucrose Agar)
CREA	Creatine Agar (Creatinina Agar)
ARROZ	Arroz comercial Uncle Bens®

O crescimento dos micro-organismos foi realizado em três pontos de inoculação na placa de Petri, com o auxílio de alça de platina estéril. Após inoculação, as placas permaneceram armazenadas no escuro, à temperatura controlada de 25 °C. Todos os cultivos foram realizados em 7, 14 e 21 dias a fim da comparação metabólica entre os diferentes tempos de cultivo.

Os micro-extratos de todos os meios de cultura investigados foram preparados de acordo com a metodologia adaptada de SMEDSGAARD (1997). Seis *plugs* de 5 mm em diâmetro (dois de cada colônia) foram cortados com o auxílio de um cortador cilíndrico (*drill*). Os *plugs* foram então transferidos para um vial de 2 mL. O volume de 0,6 mL da mistura de solventes MeOH:AcOEt:CH₂Cl₂ (1:3:2) com 0.1% de ácido fórmico foi inserido no *vial* e colocado em banho de ultrassom por 60 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro vial de 2 mL e evaporado por fluxo de nitrogênio. O conteúdo foi então ressuspensão em MeOH e filtrado em filtro PTFE 0,45µm e transferido para *vial* de 2 mL para análise em UHLC-HRMS (FIGURA 3.3).

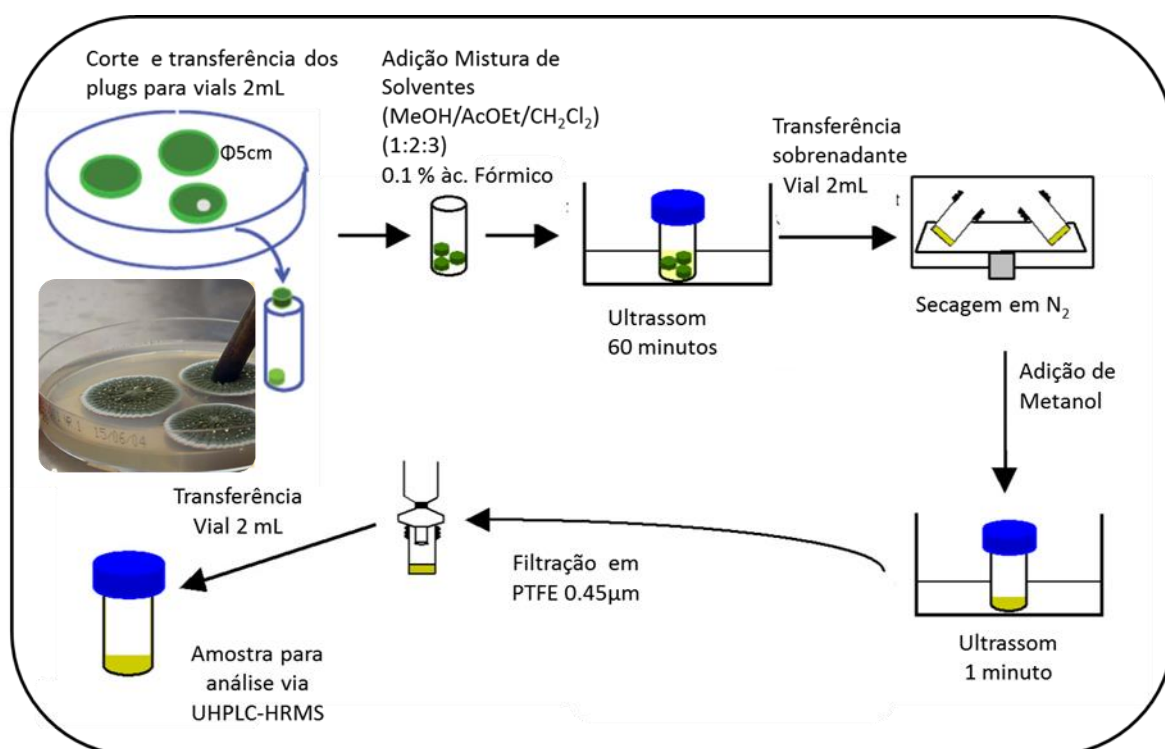


FIGURA 3.3 - Procedimento de micro-extração a partir de micro-cultivos fúngicos. Adaptado de NIELSEN et al., 2004

3.9.3 - Cultivo escalonado dos micro-organismos em diferentes meios de cultura e obtenção dos extratos

3.9.3.1 - Cultivo de *Setophoma* sp. e obtenção do extrato fúngico em arroz

Após a avaliação dos micro-extratos de *Setophoma* sp. em diferentes meios de cultura através de derreplicação via análises de UHPLC-HRMS, foi concluído que o meio de arroz seria o meio mais promissor ao isolamento dos metabólitos de interesse. Sendo assim, foi realizado o escalonamento do cultivo fúngico neste meio de cultura para a obtenção do extrato.

Para tanto, pesaram-se 90g de arroz parabolizado Uncle Ben's e adicionaram-se 80 mL de água destilada em 30 erlenmeyers de 500 mL, os quais foram autoclavados por 15 minutos, à 120 °C e 1 atm de pressão para a esterilização do meio de cultura. Em seguida, os frascos foram agitados vigorosamente a fim de desprender os grãos de arroz e transferidos à capela de fluxo laminar, previamente esterilizada. Após o meio atingir a temperatura ambiente, transferiu-se para os erlenmeyers 4 fragmentos, com cerca de 0,5 cm cada, do fungo em estudo, contido em placas de Petri em meio BDA. Além dos frascos com os inóculos, manteve-se também durante os experimentos 3 erlenmeyers contendo apenas o meio de cultura arroz, para controle microbiológico. Os frascos foram incubados durante 30 dias, a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C), em modo estático. Durante três dias, os frascos foram agitados manualmente duas vezes ao dia para homogeneizar o meio junto à massa micelial em crescimento.

Finalizado o período de incubação, em capela de fluxo laminar, foram adicionados 300 mL de EtOH absoluto aos frascos contendo o meio de cultura. Triturou-se completamente todo o conteúdo dos erlenmeyers e após 12 horas de extração todos foram filtrados à pressão reduzida. O filtrado etanólico foi reservado e acondicionado à - 20°C, adicionando-se novamente EtOH à massa micelial remanescente, um volume de 200 mL para cada frasco. Depois de 12 horas, o conteúdo foi novamente filtrado, e em seguida a fase líquida obtida foi reunida àquela reservada anteriormente. Todo o volume obtido foi evaporado em sistema de rotaevaporador, gerando o extrato etanólico do crescimento do fungo *Setophoma* sp. em arroz.

3.9.3.2 - Cultivo de *Talaromyces rugulosus* e obtenção do extrato fúngico em meio líquido batata-dextrose (BD)

O meio de cultura BD (batata-dextrose) foi preparado cozinhando-se 600 g de batata inglesa descascada e cortada em cubos, por 15 minutos em forno de micro-ondas (potência 60W) com 450 mL de água. Em seguida, filtrou-se com o auxílio de um filtro de algodão, transferindo o caldo para um erlenmeyer. Seguidamente, acrescentou-se 60 g de dextrose, homogeneizando-se a mistura e completando-se o volume para 3000 mL de água destilada. Um volume de 90 mL da mistura foi dispensado em erlenmeyers de 500 mL. O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm por 15 minutos. Os frascos foram em seguida direcionados à capela de fluxo laminar estéril.

Após o meio atingir a temperatura ambiente, transferiram-se para os erlenmeyers 4 fragmentos, com cerca de 0,5 cm cada, de *T. rugulosus* contido em placas de Petri em meio PDA. Além dos frascos com os inóculos, manteve-se também durante os experimentos 3 erlenmeyers contendo apenas o meio de cultura para controle microbiológico. Os frascos foram incubados durante 16 dias, a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) em modo estático. Durante três dias, os frascos foram agitados manualmente duas vezes ao dia para homogeneizar o meio junto à massa micelial em crescimento.

Finalizado o período de incubação, o conteúdo dos frascos foi filtrado, a pressão reduzida, em capela de fluxo laminar, resultando deste modo, na separação do filtrado e do micélio. Ao micélio de cada erlenmeyer adicionaram-se 200 mL de MeOH, e após um período de 12 horas de extração, o conteúdo metanólico foi filtrado e concentrado em rotaevaporador. A extração foi realizada por mais uma vez, gerando-se assim o extrato metanólico do micélio. Já o filtrado de todos os frascos erlenmeyers (separados anteriormente do micélio) foram reunidos e submetido à partição líquido-líquido com AcOEt na proporção de (1:1; v/v), por 3 vezes. A fase orgânica obtida foi evaporada em rotaevaporador, produzindo o extrato da partição líquido-líquido.

Para os meios de cultura controle, foi realizado apenas o processo de partição líquido-líquido com AcOEt.

3.9.4 - Co-cultivos das espécies fúngicas investigadas

Como mencionado na seção introdutória, uma das formas de indução metabólica microbiana trata-se da utilização de indutores bióticos à condição de crescimento das espécies em estudo. Sendo assim, neste trabalho alguns co-cultivos foram investigados utilizando-se as espécies fúngicas isoladas dos frutos de maçã e goiaba, bem como também foram testados alguns destes fungos em co-cultivo com as espécies *Penicillium brasilianum*, *Penicillium digitatum*, pertencentes à coleção de fungos LabioMMi.

Os cruzamentos foram realizados em micro-cultivo, em placas de Petri, em diferentes meios de cultura (TABELA 3.13) inoculando-se as espécies fúngicas em um distanciamento de 2 cm uma da outra. Após período de incubação (TABELA 3.14), os micro-extratos foram obtidos de acordo com a metodologia descrita no item 3.9.2. As regiões de micro-extração podem ser visualizadas na FIGURA 3.4 pontuadas em regiões de interface de crescimento entre os fungos (região B e C) e extremidades (região A e D). Um resumo, dos meios de cultura utilizados para cada co-cultivo, assim como os tempos de incubação, encontram-se descritos na tabela a seguir.

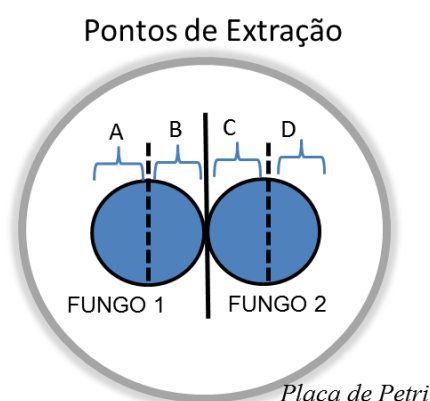


FIGURA 3.4 - Regiões de micro-extração dos co-cultivos realizados

TABELA 3.14 - Co-cultivos realizados entre as espécies indicadas e os respectivos parâmetros de cultivo

FUNGO 1	FUNGO 2	Meios de cultura testados	Período de incubação (dias)
<i>Setophoma</i> sp.	<i>E. nigrum</i>	DRYES, CYA, MEA, MEAOX, WATM, YES, PDA, OAT, CYAS	7,15, 21
<i>Setophoma</i> sp.	<i>T. rugulosus</i>	DRYES, CYA, MEA, MEAOX, WATM, YES, PDA, OAT, CYAS	7,15, 21
<i>Setophoma</i> sp.	<i>C. cladosporioides</i>	DRYES, CYA, MEA, MEAOX, WATM, YES, PDA, OAT, CYAS	7,15, 21
<i>Setophoma</i> sp.	<i>P. brasilianum</i>	PDA, MEA	7,15, 21
<i>Setophoma</i> sp.	<i>P. digitatum</i>	PDA, MEA	7,15, 21
<i>T. rugulosus</i>	<i>E. nigrum</i>	DRYES, CYA, MEA, MEAOX, WATM, YES, PDA, OAT, CYAS	7,15
<i>T. rugulosus</i>	<i>C. cladosporioides</i>	DRYES, CYA, MEA, MEAOX, WATM, YES, PDA, OAT, CYAS	7,15
<i>E. nigrum</i>	<i>C. cladosporioides</i>	DRYES, CYA, MEA, MEAOX, WATM, YES, PDA, OAT, CYAS	7,15

3.9.4.1 - Monitoramento da inibição da esporulação de *P. brasilianum*, *P. digitatum* e *T. rugulosus* durante o co-cultivo com *Setophoma* sp.

Durante os experimentos de co-cultivo referente ao endófito de goiaba *Setophoma* sp. com os fungos *P. brasilianum* e *P. digitatum* notou-se uma diminuição aparente da esporulação na zona de interface de crescimento entre os fungos.

Sendo assim, a taxa de esporulação referente às interfaces de crescimento das espécies de *Penicillium* foi medida pela determinação da concentração de esporos em câmara de *Neubauer* em 7 dias de cultivo (sextuplicata). Para a medição foram utilizados 3 *plugs* com 5mm de diâmetro, cortados com auxílio de *drill* nas regiões denominadas em C e D, conforme ilustra a figura abaixo:

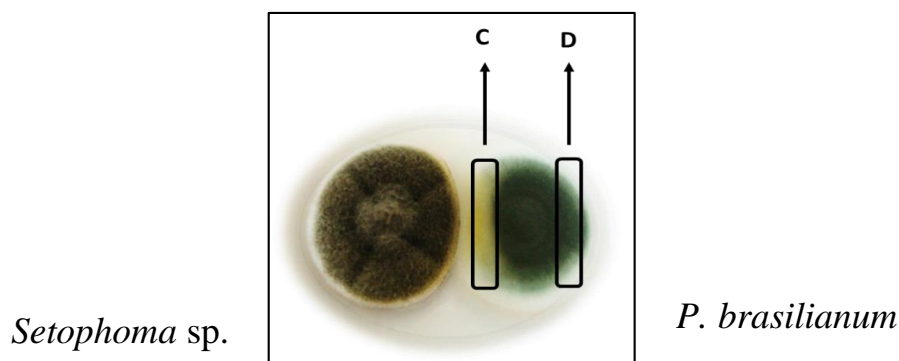


FIGURA 3.5 - Indicação das regiões de medição de esporulação dos fungos do gênero *Penicillium* quando em co-cultivo com *Setophoma* sp.. Figura ilustra um dos co-cultivos realizados

Os 3 *plugs* foram então inseridos em frasco eppendorf de 2 mL, adicionando-se posteriormente 500 μ L de água ultra-pura, sendo a mistura homogeneizada em seguida. 10 μ L da suspensão foi adicionada a 990 μ L em um novo eppendorf gerando a suspensão utilizada para a contagem de unidades germinativas. 10 μ L da suspensão diluída foi inserida na unidade da câmara de *Neubauer* e os esporos visualizados por microscopia eletrônica foram contados.

O valor obtido para cada contagem foi estipulado de acordo com a fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ esporos} = \text{unidades visualizadas} \times 1000 \times 100 \times 2.5$$

← profundidade x fator de diluição x fator de correção da câmara

3.9.4.2 - Experimento para avaliação da indução de perilenequinonas pelo efeito do co-cultivo de *Setophoma* sp. com *P. brasilianum*, *P. digitatum* e *T. rugulosus*

Objetivando-se constatar se a inibição da esporulação das espécies de *Penicillium* apresentava correlação com a produção de perilenequinonas por *Setophoma* sp., foi executada a extração dos metabólitos secundários produzidos durante o co-cultivo das através de metodologia de caráter mais quantitativo.

Para tanto, a totalidade do conteúdo das placas de Petri onde foram realizados os co-cultivos foram extraídos após a inoculação e período de incubação (7 dias). Cada co-cultivo foi realizado em triplicata nos meios MEA e PDA. Os controles nos mesmos meios, em duplicata.

O mesmo protocolo de extração descrito no item 3.9.2 foi realizado, porém utilizando-se tubos falcon de 50 mL e escalonando-se a mistura de solventes de extração para 50 mL em volume. 2 mL da mistura foram secos, posteriormente redissolvidos em 1,5 mL de metanol grau HPLC e finalmente submetidos a análise via UHPLC-HRMS.

3.9.5 - Isolamento de metabólitos secundários produzidos por *Setophoma* sp., e *T. rugulosus*

3.9.5.1 - Isolamento de depsídeos produzidos pelo fungo *Setophoma* sp. em meio de arroz

Inicialmente, foram realizados os procedimentos de 7.5 g do extrato etanólico *Setophoma* sp. em meio de arroz foi solubilizado em 400 mL da mistura MeOH-H₂O (90:10; v/v). O conteúdo foi então submetido a partição líquido-líquido adicionando-se 400 mL de heptano. A fase aquosa foi separada e novamente particionada, adicionando-se 320 mL de H₂O e 720 mL de CH₂Cl₂ à mesma. Após agitação em funil de separação, a fase hidroalcolica foi separada da fase diclorometano, sendo ambas evaporadas em rotaevaporador, gerando os respectivos extratos.

O extrato diclorometânico bem como as frações subseqüentes foram submetidos a cromatografia líquida de média (MPLC) e alta pressão modo semi-preparativo (HPLC), conforme segue o fluxograma descrito na FIGURA 3.6.

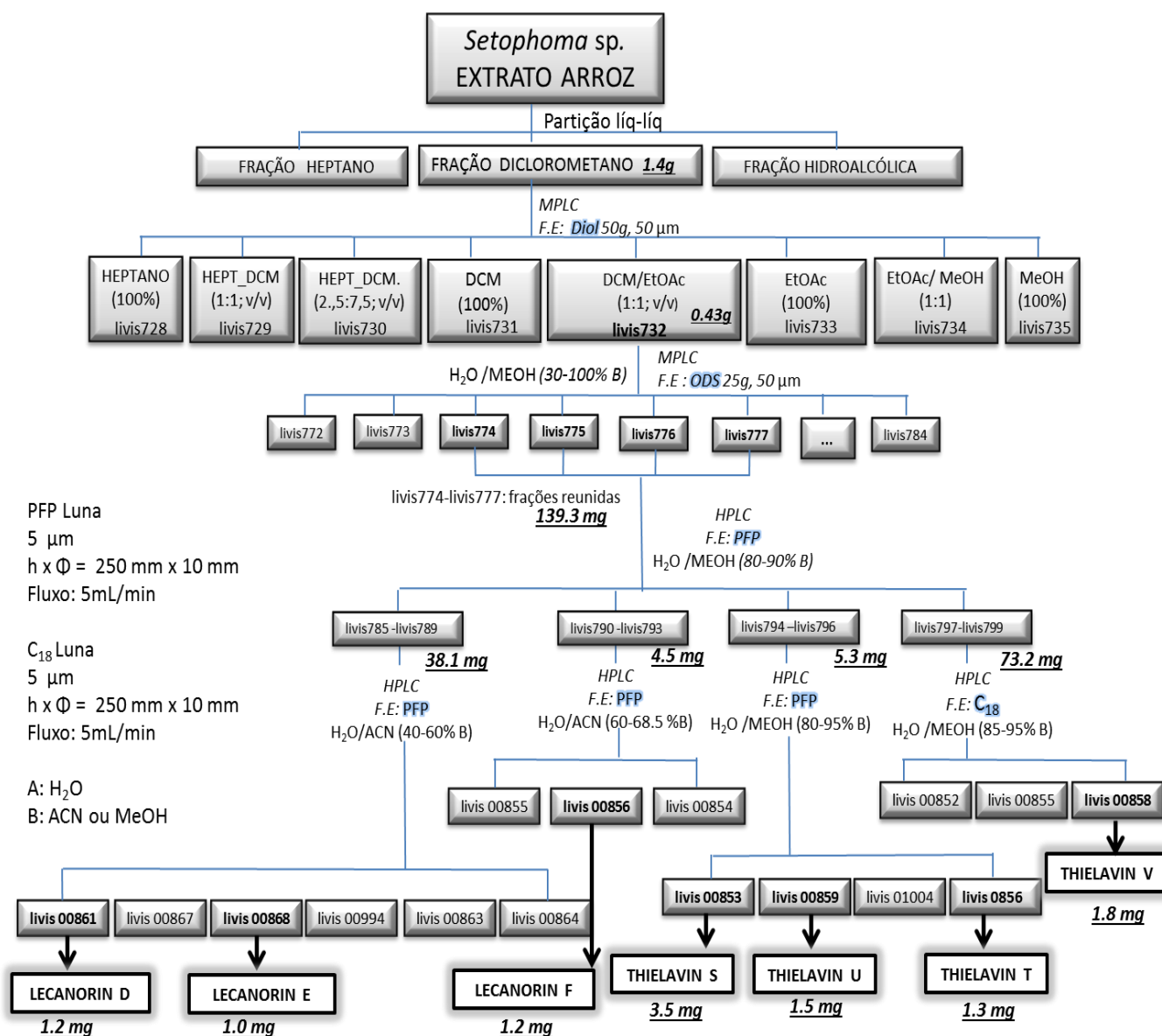


FIGURA 3.6 - Fluxograma referente ao fracionamento do extrato de *Setophoma* sp. em arroz para isolamento de depsídeos

3.9.5.2 - Isolamento do estenfiperilenol produzido pelo co-cultivo de *Setophoma* sp. e *Penicillium brasilianum* em meio de cultura batata-dextrose

O processo inicial de fracionamento do extrato de estudo foi realizado através de cromatografia líquida à vácuo. A fração de maior interesse (heptano: acetona (2:8; v/v)) foi submetida para separação do metabólito de interesse utilizando-se HPLC modo preparativo (FIGURA 3.7). O monitoramento das frações foi realizado via HPLC-DAD (180-600 nm).

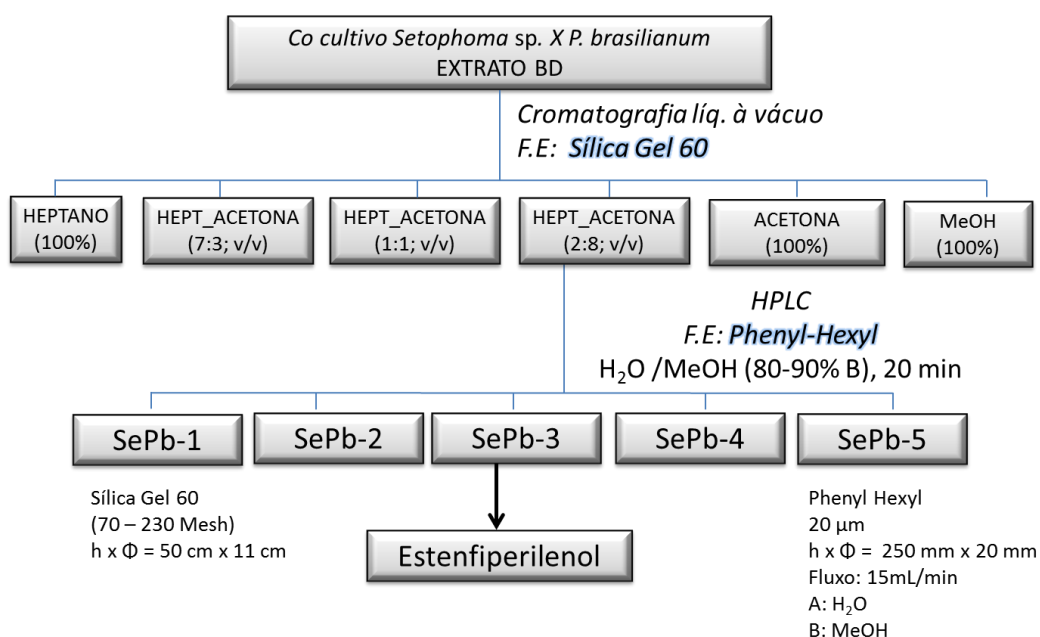


FIGURA 3.7 - Fluxograma referente ao processo de isolamento do policetídeo estenfiperinol

3.9.5.3 - Isolamento das 8-clororugulovasinas A/B; 2,8-clororugulovasinas A/B, produzidas por *T. rugulosus* em meio de cultura batata-dextrose (BD)

Os extratos metanólico e de acetato de etila (item 3.9.3.2) foram reunidos devido ao mesmo perfil químico encontrado nas análises vis LC-MS, gerando a massa de 56 g de extrato total. Este foi fracionado em quatro etapas utilizando-se cromatografia de média pressão e também cromatografia de alta pressão em modo preparativo conforme segue o fluxograma abaixo:

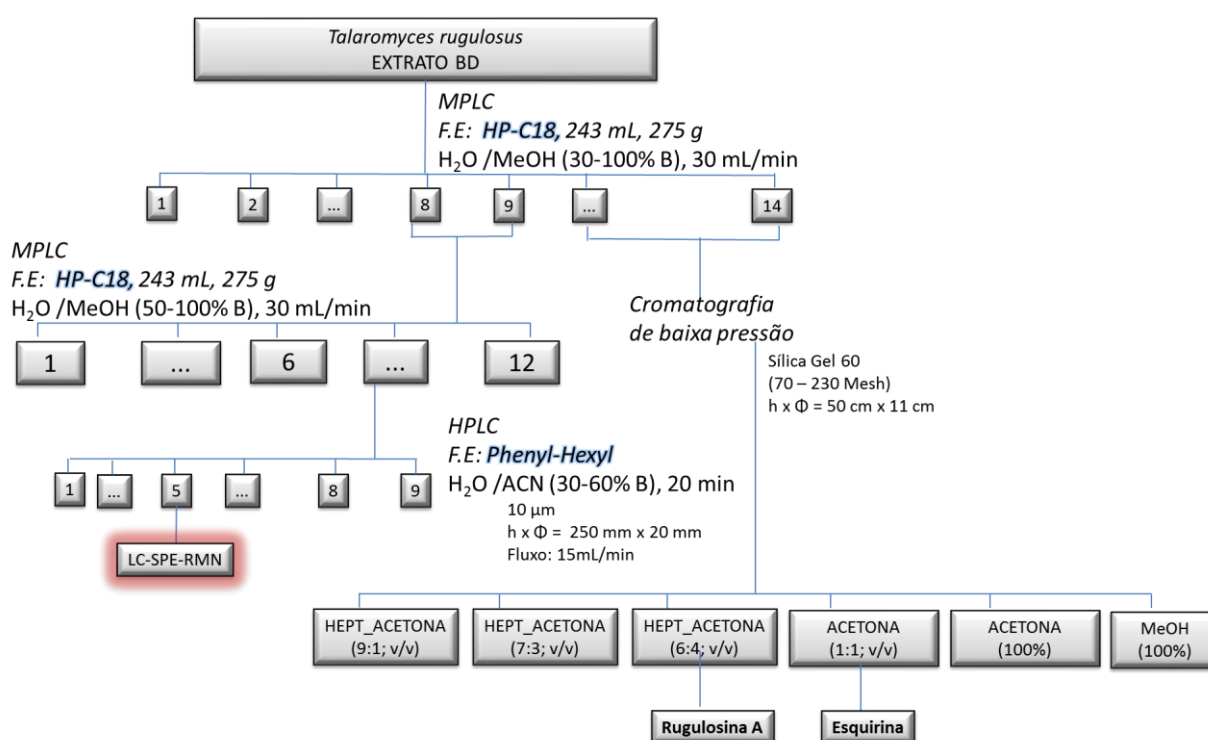


FIGURA 3.8 - Fluxograma referente ao processo de isolamento de 8-clororugulovasinas A/B; 2,8-clororugulovasinas A/B e antraquinonas produzidas por *T. rugulosus*

O monitoramento das frações foi realizado via HPLC-DAD (180-600 nm). A fração enriquecida nos alcaloides de interesse foi submetida à sistema HPLC, sendo eluída pelo uso do método **G** (item 3.8). 30 injeções foram realizadas em sequência, utilizando-se um volume de 20µl. Os metabólitos separados foram trapeados em sistema SPE, utilizando-se cartuchos de resina GP-polidivinilbenzeno (10mm X 2mm X 10 µm). Após secagem por jato de nitrogênio por um período de 30 minutos, a

eluição dos compostos foi realizada diretamente em tubo capilar utilizando-se metanol-*d*₄, submetendo-os em sequência à análise RMN 1 D e 2 D, 600 MHz.

3.9.6 - Estudo de biotransformação de substratos endógenos dos frutos de maçã e do diterpeno afidicolina por *Talaromyces rugulosus* em meio BD

Em concordância ao que é detalhado na parte de Resultados e Discussão, alguns substratos inerentes à constituição química dos frutos de maçã foram testados como compostos a serem biotransformados pelo endófito da fruta.

Também foi testado o diterpeno afidicolina como possível substrato a ser biotransformado pelo micro-organismo. Este composto na verdade trata-se de um metabólito de origem fúngica, diferentemente dos demais substratos testados. Todos os substratos avaliados seguem descritos na TABELA 3.15.

Com o auxílio de uma pipeta automática, adicionaram-se 100 µL de suspensão de esporos do fungo *T. rugulosus* em frasco Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio de cultura. Os frascos foram mantidos em sistema de rotação (shaker) durante 2 dias, à 120 rpm.

Após o período mencionado, os substratos testados (TABELA 3.15) foram separadamente pesados e inseridos em tubos falcon estéreis de 50 mL. Os substratos foram solubilizados em 20 mL de metanol ou água destilada estéril em filtro PTFE de 0,25 µm, a fim de se obter soluções estéreis, cujas concentrações seguem descritas na TABELA 3.15. Em capela de fluxo laminar, foi inserido 1 mL da solução referente a cada substrato em um Erlenmeyer contendo o fungo já em crescimento (para todos os substratos separadamente).

TABELA 3.15 - Soluções de substratos testados no experimento de biotransformação por *T. rugulosus*

SUBSTRATO	SOLVENTE	CONCENTRAÇÃO
Ácido Ascórbico	H ₂ O	20 mg/mL
Ácido clorogênico	H ₂ O	10 mg/mL
Hesperidina	MeOH	20 mg/mL
Rutina	MeOH	20 mg/mL
Quercetina	MeOH	20 mg/mL
Phloretin	MeOH	5 mg/mL
Afidicolina	MeOH	10 mg/mL

Os erlenmeyers foram então novamente mantidos em rotação, por mais 7 dias à 120 rpm. Todo o experimento foi realizado em triplicata para todo substrato avaliado, havendo o uso de frascos controles e brancos. O procedimento de extração encontra-se descrito no item 3.9.3.2, tendo gerado os extratos oriundos de partição com acetato de etila provenientes do meio de cultura e os extratos metanólicos advindos da extração micelial. O processo é ilustrado de forma esquemática na FIGURA 3.9.

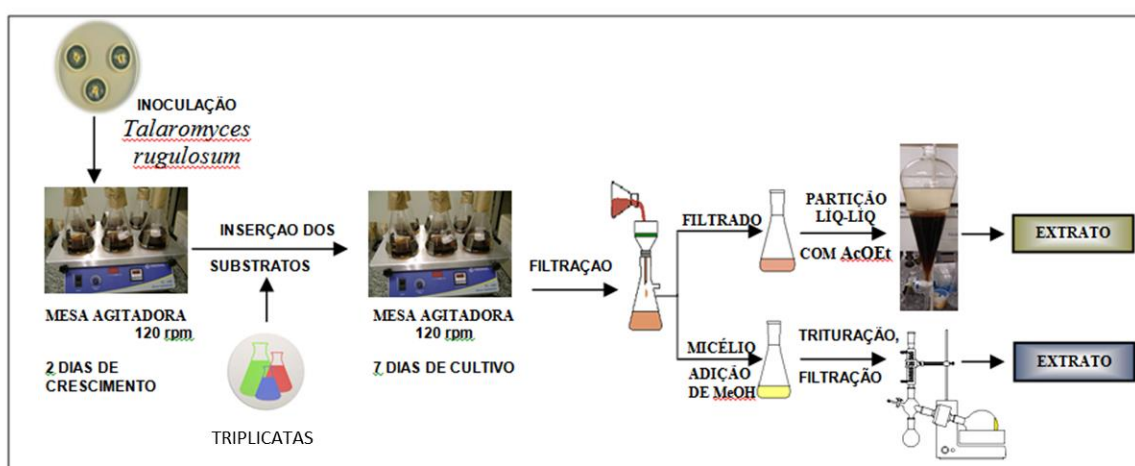


FIGURA 3.9 - Procedimento para o experimento de biotransformação de substratos endógenos da maçã por *T. rugulosus*

3.9.6.1 - Isolamento do produto de biotransformação da afidicolina por *Talaromyces rugulosus* em meio BD

Os extratos obtidos em triplicata para o experimento de biotransformação da afidicolina (item 3.9.6) foram reunidos e submetidos diretamente ao sistema de HPLC modo preparativo, executando-se o método cromatográfico **F** (item 3.8), o mesmo utilizado para as análises via LC-MS do experimento de biotransformação. O método foi escalonado em fluxo de 15 mL/min, para coluna Phenyl-hexyl preparativa.

Volumes de 15 mL foram recolhidos durante a separação cromatográfica, gerando 25 frações codificadas em AFD1-AFD25. As frações AFD10 e AFD11 foram correspondentes ao produto de biotransformação purificado.

3.9.7 - Extração de metabólitos secundários fúngicos de *T. rugulosus* a partir de extratos de maçãs comerciais

Amostras de maçã do tipo Gala e Fuji (*Malus domestica*) foram adquiridas no comércio local da cidade de São Carlos em três estabelecimentos distintos (Supermercados Jaú[®] (Maio/2011), Carrefour[®] (Novembro 2011) e Extra[®] (Março 2012) e um estabelecimento na cidade de São Paulo (Supermercado Sonda[®] (Dezembro 2012)).

Os frutos adquiridos em São Carlos foram picados e liofilizados, obtendo-se assim o extrato seco da fruta. Já os frutos oriundos da capital paulista foram analisados com a polpa da fruta fresca, pesada no momento da extração.

Para maior abrangência do estudo, a fim de se aumentar a probabilidade da detecção nos frutos de maçã de metabólitos secundários produzidos por *T. rugulosus*, foram realizados três diferentes procedimentos de extração, cujos códigos foram denominados em E1, E2 e E3, sendo que em todos os casos foi utilizado 1g de extrato ou polpa de maçã como material de partida. O material seco ou fresco foi então foi pesado e inserido em tubos falcon de 15mL. Para o procedimento E1, 5 mL da mistura ACN/H₂O (85:15 v:v) foi adicionada ao tubo, com posterior agitação em sistema rotativo horizontal (*shaker*) por 60 minutos, à 120 rpm. Em seguida, os tubos foram inseridos em um sistema de centrifugação, à 3.700 rpm, à temperatura de 20

°C. O sobrenadante então foi filtrado, transferido para outro tubo e seco em fluxo de nitrogênio. O extrato seco foi solubilizado em 1.5 mL de MeOH, filtrado em filtro PTFE 0.45µm diretamente em um vial de 2 mL e levado diretamente à análise via LC-MS/MS.

O procedimento E2 foi realizado da mesma maneira àquela relatada acima, porém utilizando-se a mesma mistura de solventes utilizada no procedimento de micro-extração, ou seja, MeOH:AcOEt:CH₂Cl₂ (1:3:2) com 0.1% de ácido fórmico.

Já para o procedimento 3, foi realizada metodologia adaptada do método *QUECERS*[®] (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*). Tal método vem sendo amplamente utilizado para extração e enriquecimento dos analitos de interesse, assim como remoção de interferentes oriundos da matriz em análises de resíduos, pesticidas, micotoxinas, entre outros analitos micromoleculares, principalmente na área de análise em alimentos (PAYÁ et.al, 2007; LUCCHI et.al, 2012).

Com o intuito de se enriquecer os extratos estudados de maçã para os metabólitos secundários potencialmente metabolizados por *T. rugulosus* quando em seu hospedeiro (fruto) e assim aumentar as chances de detecção dos mesmos, o procedimento E3 foi realizado como descrito a seguir. O extrato ou polpa da maçã foram pesados e inseridos em tubo falcon de 15 mL. O volume de 4,5 mL da mistura ACN/H₂O (2:1, v:v) com 1% de ácido acético em volume foi adicionado a cada tubo, juntamente a 0.5g de acetato de sódio tri-hidratado. A mistura foi agitada durante 2 minutos em shaker à 120 rpm. Em seguida, adicionaram-se 2 g de sulfato de magnésio anidro à mistura, homogeneizando-a. O conteúdo do tubo foi então centrifugado à 3.700 rpm, à temperatura de 20 °C. A fase superior do sistema bifásico formado foi separada em outro tubo falcon, sendo o solvente evaporado em sistema de nitrogênio. O extrato obtido foi solubilizado em 1 mL de MeOH, filtrado e inserido em vial de 2 mL para sequencial análise.

Em resumo, um total de 24 amostras foi obtido. Todas as amostras foram avaliadas através de análises realizadas em sistema UHPLC-MS/MS com analisador de massas Triplo Quadrupolo. O experimento de MRM dinâmico foi utilizado para a detecção dos metabólitos secundários aplicando-se a metodologia de otimização das melhores condições de análise como descrito a seguir.

3.9.8 - Parâmetros de análise para estudos realizados via UHPLC-MS/MS

Todos os experimentos de MS-MS para os estudos relatados neste trabalho, foram realizados em sistema UHPLC-MS, utilizando-se cromatógrafo Agilent 1290 Infinity combinado ao módulo Agilent 1290 Infinity Flexible Cube, com acoplamento ao espectrômetro de massas Agilent 6490 Triplo-Quadrupolo iFunnel Technology, equipado com fonte de ionização Agilent *Jet Stream ESI*.

A estratégia para otimização das transições de MRM foi realizada utilizando-se o próprio micro-extrato fúngico de PDA como padrão para os metabólitos investigados. Inicialmente partiu-se para a seleção das melhores energias de colisão para a quebra dos íons monitorados. As energias testadas foram de 10, 20, 30 e 40 eV. Após a seleção do valor de melhor energia, os íons fragmento de maior intensidade em sinal foram selecionados para a realização do experimento de MRM, criando-se assim os canais de transição de melhor sensibilidade em relação aos metabólitos de interesse.

Por fim, com as transições selecionadas, partiu-se para a otimização dos valores de voltagem de aceleração (*accelerator voltage*), testando-se 3V, 5V e 7V. Novamente os valores que geraram bandas cromatográficas de maior intensidade em termos de área (intrinsecamente para cada transição), foram utilizados para o experimento de MRM dinâmico (FIGURA 3.10). Os valores de área foram obtidos pelo sistema de integração automática do software *MassHunter*-Agilent.

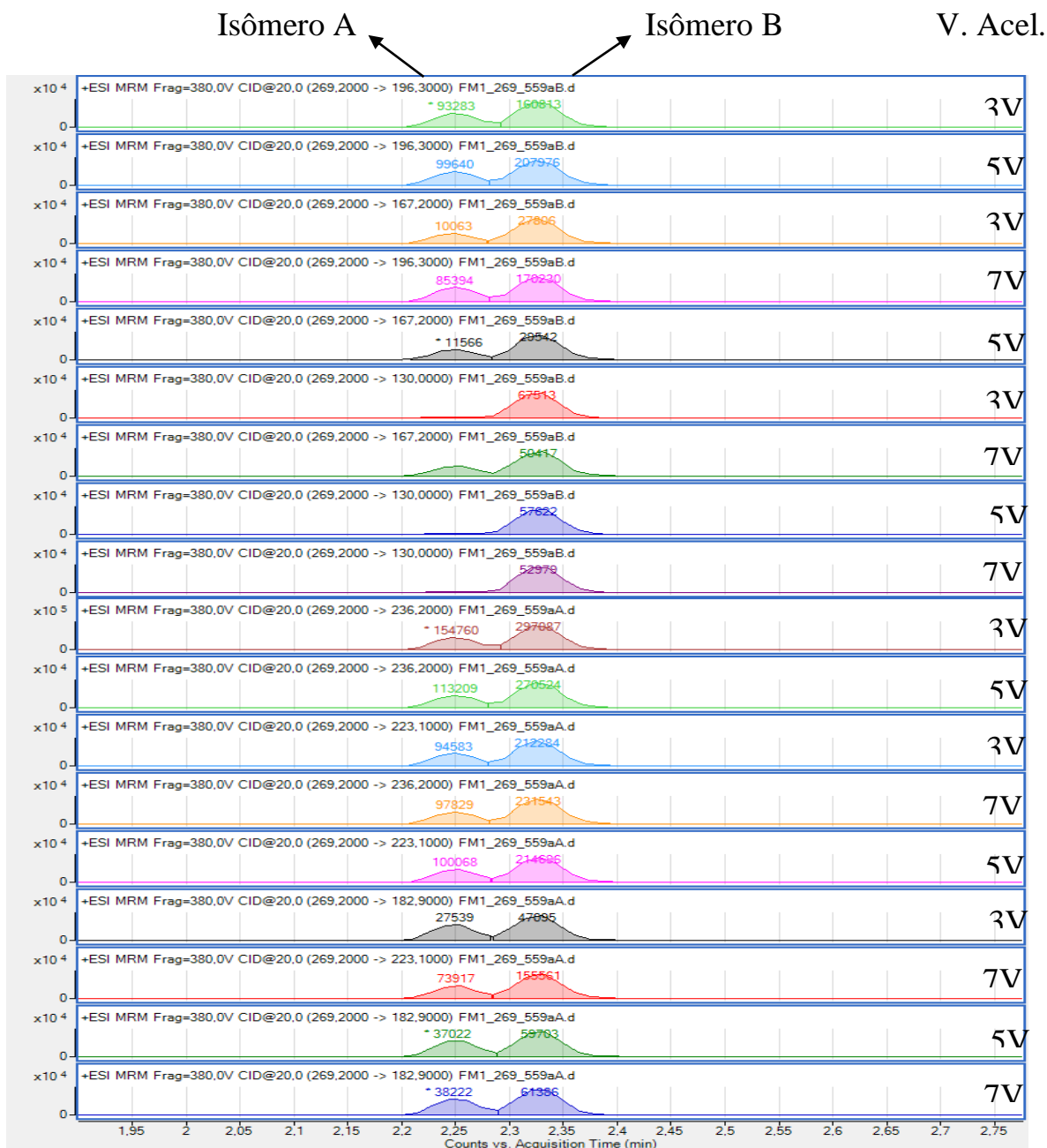


FIGURA 3.10 - Cromatogramas de MRM obtidos para os metabólitos rugulovasina A/B variando-se os valores de voltagem de aceleração do íon. Valores usados estão indicados em cada cromatograma

Todos os resultados obtidos para cada metabólito foram agrupados em tabelas para melhor visualização dos parâmetros otimizados. Como exemplo segue a tabela de resultados para a rugulovasina (m/z 269, isômero B - TABELA 3.16) e clororugulovasina (m/z 303, isômero B - TABELA 3.17). O conjunto de valores utilizados e obtidos para cada analito encontra-se na mesma linha cuja lacuna de algoritmo MRM está destacada em caixa de cor verde. Na seção de Resultados será

apresentada uma tabela resumida contendo os valores otimizados para todos os metabólitos monitorados.

TABELA 3.16 - Resumo dos parâmetros de análise otimizados para o metabólito rugulovasina B no experimento de MRM

m/z	m/z	Δm (Da)	Energia	Voltagem (V)	Área	Algoritmo	Tempo
$[M+H]^+$	íon produto		de colisão (eV)	de aceleração			de retenção (min)
269,2	182,9	86,3	20	3	47095	MRM	2,3
269,2	182,9	86,3	20	5	59703	MRM	2,3
269,2	182,9	86,3	20	7	61386	MRM	2,3
269,2	223,1	46,1	20	3	212284	MRM	2,3
269,2	223,1	46,1	20	5	214696	MRM	2,3
269,2	223,1	46,1	20	7	155561	MRM	2,3
269,2	236,2	33	20	3	297087	MRM	2,3
269,2	236,2	33	20	5	270524	MRM	2,3
269,2	236,2	33	20	7	231543	MRM	2,3
269,2	130	139,2	20	3	67513	MRM	2,3
269,2	130	139,2	20	5	57622	MRM	2,3
269,2	130	139,2	20	7	52979	MRM	2,3
269,2	167,2	102	20	3	27806	MRM	2,3
269,2	167,2	102	20	5	29542	MRM	2,3
269,2	167,2	102	20	7	50417	MRM	2,3
269,2	196,3	72,9	20	3	160813	MRM	2,3
269,2	196,3	72,9	20	5	207976	MRM	2,3
269,2	196,3	72,9	20	7	170230	MRM	2,3

TABELA 3. 17 - Resumo dos parâmetros de análise otimizados para o metabólito 8-clororugulovasina B no experimento de MRM

m/z	m/z	Δm (Da)	Energia	Voltagem (V)	Área	Algoritmo	Tempo
$[M+H]^+$	íon produto		de colisão (eV)	de aceleração			de retenção (min)
303,1	230	73,1	20	7	317313	MRM	3,2
303,1	230	73,1	20	5	405710	MRM	3,2
303,1	230	73,1	20	3	469533	MRM	3,2
303,1	217	86,1	20	7	150352	MRM	3,2
303,1	217	86,1	20	5	192588	MRM	3,2
303,1	217	86,1	20	3	195453	MRM	3,2
303,1	164	139,1	20	7	233885	MRM	3,2
303,1	164	139,1	20	5	203591	MRM	3,2
303,1	164	139,1	20	3	212899	MRM	3,2
303,1	270,1	33	20	7	389833	MRM	3,2
303,1	270,1	33	20	5	356726	MRM	3,2
303,1	270,1	33	20	3	424385	MRM	3,2
303,1	249,1	54	20	7	231225	MRM	3,2
303,1	249,1	54	20	5	248034	MRM	3,2
303,1	249,1	54	20	3	312826	MRM	3,2
303,1	203,8	99,3	20	7	58769	MRM	3,2
303,1	203,8	99,3	20	5	79068	MRM	3,2
303,1	203,8	99,3	20	3	58916	MRM	3,2

3.9.9 - Testes de antibiose

3.9.9.1 - Ensaio de depsídeos contra as bactérias *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922

Os ensaios antibacterianos foram realizados aplicando-se os testes de susceptibilidade para determinação da concentração mínima inibitória, segundo as normas descritas pelo NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS), 2006, tradução ANVISA Norma M100-S15.

O método aplicado foi o método de diluição em caldo para a verificação da MIC - *Minimal Inhibitory Concentration*). As concentrações avaliadas dos compostos testados e respectivos controles, encontram-se esquematizados na FIGURA 3.11.

Os testes foram realizados em placas de ELISA, contendo 96 poços, através de diluições sucessivas em triplicata das substâncias puras e dos antibióticos de referência em caldo Mueller Hinton. Foram utilizadas soluções de antibiótico tetraciclina comercial. Um controle positivo contendo apenas caldo com células bacterianas e um controle negativo, contendo apenas caldo de cultivo foram aplicados em todos os testes. Como controle em relação à atividade do solvente DMSO, foi utilizada uma linha de poços (linha G), contendo apenas DMSO (5%) e caldo com células bacterianas.

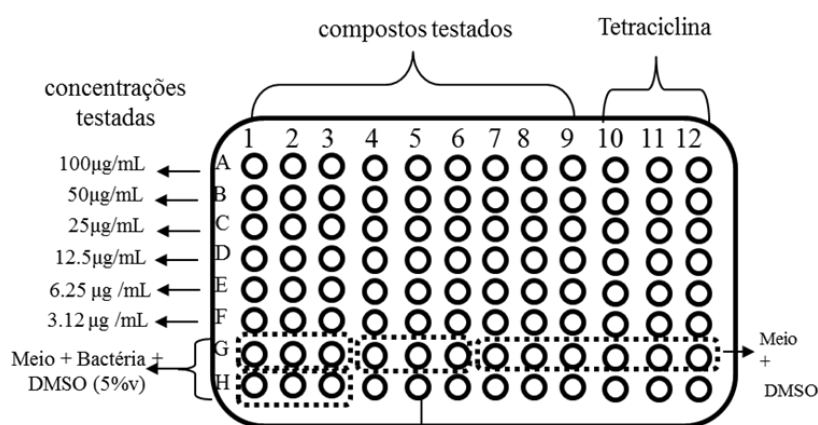


FIGURA 3.11 - Placa de ELISA com as diferentes concentrações testadas para as substâncias isoladas

O corante utilizado para revelação da atividade antibiótica dos metabólitos foi a resazurina. Na presença de células vivas, o corante resazurina, que é azul, torna-se rosa intenso, devido a uma reação de oxi-redução proporcionada por oxireductases presentes na célula bacteriana. Ou seja, quando há a oxidação da coenzima NADH à NAD⁺ nas reações metabólicas de oxiredução, a resazurina é oxidada à resorufina, mudando a coloração da solução teste de azul para rosa (FIGURA 3.12) indicando assim a presença de células vivas (SARKER et al., 2007).

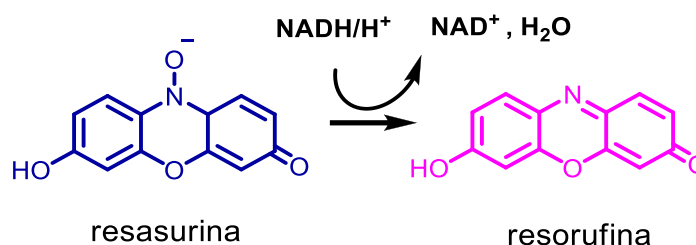


FIGURA 3.12 - Reação de formação da resorufina (rosa) a partir do corante resasurina (azul)

3.9.9.2 - Ensaio antifúngico do estenfiperilenol frente às espécies *Penicillium brasilianum* e *Penicillium digitatum*

O ensaio de inibição do estenfiperilenol contra as espécies *P. brasilianum* e *P. digitatum* foram realizados de acordo com o protocolo publicado por OUEDRAOGO et al. 2013 para *screening* de compostos antifúngicos.

Foram utilizados como antibióticos comerciais a cicloheximida e o itraconazol. O teste foi realizado em placas de ELISA, contendo 96 poços, através de diluições sucessivas em triplicata das substâncias puras e dos antibióticos referência. As concentrações testadas de estenfiperilenol frente às espécies *P. brasilianum* e *P. digitatum* foram 500, 250, 125, 62,5 e 31,2 µg/mL.

3.10 - Estimativa e comparação do perfil da curva de produção das rugulovasinas cloradas e bromadas produzidas por *T. rugulosus*

Para a determinação da estimativa do perfil da curva de produção das rugulovasinas halogenadas produzidas pelo endófito de maçã, baseada na disponibilidade de átomos de cloro e bromo no meio de cultura, foi realizado o crescimento microbiano em frascos Erlenmeyer de 150 mL em volume, contendo 50 mL e meio de cultura BD. O experimento foi realizado em triplicata, em cada ponto de extração, para cada espécie de halogênio testada. Para o teste realizado com cloro, o pH do meio de cultura foi ajustado com HCl (pH=5,6). Já para o teste com a presença de bromo no meio de crescimento, executou-se o ajuste de pH com HBr (pH=5,6).

Os pontos de extração foram realizados em intervalos de 0, 3, 6, 10, 15, 21, 25 e 30 dias. Após período de incubação, para cada replicata, a fase líquida foi separada do micélio por filtração à vácuo. Uma alíquota de 5 mL (de cada replicata) foi seca em sistema de *speed-vac* à 15 °C, em tubos falcon de 15 mL. As amostras foram solubilizadas em 2 mL de MeOH grau HPLC, filtradas e submetidas à análise de UHPLC-HRMS. O software Xcalibur 2.1 foi utilizado para aquisição e processamento de dados. Os cromatogramas de íons extraídos correspondentes aos analitos de interesse foram gerados a partir de um pequeno range (± 5 ppm) centrados na massa exata dos íons específicos.

3.11 - Isolamento de DNA genômico para estudos de detecção da halogenase

O DNA de *T. rugulosus* foi isolado através de um protocolo modificado para obtenção de DNA de origem fúngica. O micélio fresco (100 mg) foi macerado em nitrogênio líquido. Após a adição de 500 μ L de tampão de extração (100 mM TrisHCl, 10 mM EDTA, 2% SDS, 1% 2-mercaptoethanol, 100 μ g/mL proteinase K) a solução foi incubada por 1h a 60°C e 350 rpm. A concentração final de sal foi ajustada com 5 M de NaCl para 1,4 M e 1/10 volume de 10% CTAB foi adicionado.

A solução foi incubada a 65°C por 10 min sob agitação ocasional. As proteínas foram degradadas adicionando 1 vol de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) com agitação. A solução foi incubada por 30 min em banho de gelo e centrifugada a

12000 rpm, 4°C por 10 min. A fase superior foi recolhida e incubada com ½ vol de NH₄Ac por 1 h em banho de gelo e centrifugada a 12000 rpm, 4°C por 10 min.

O RNA presente no meio foi digerido com RNase A (concentração final 0,02 µg/µl) por 30 min a 37 °C. A precipitação do DNA ocorreu após a adição de mesmo volume de isopropanol e incubação a -20 °C *overnight*. O DNA foi obtido após a centrifugação a 12000 rpm, 4°C por 15 min. O *pellet* de DNA foi lavado com 70% de etanol resfriado, seco a 37°C por 10 min e solubilizados em 20 µL de água destilada estéril (CENIS, 1992).

3.11.1 - Construção dos oligonucleotídeos e amplificação do gene

Oligonucleotídeos degenerados foram construídos para detecção do gene halogenase no DNA total de *T. rugulosus*. Estes foram derivados de quatro regiões conservadas presentes na sequência de amino ácidos das halogenases já relatadas de organismos eucariotos. Os oligonucleotídeos foram utilizados na tentativa de obter fragmentos amplificados por meio de PCR utilizando o DNA genômico de *T. rugulosus* como *template*.

A sequência dos oligonucleotídeos utilizados foram: J5 5'-GTGGTTGGTGGTGGCCCTGGAGGG-3', J6 5'-TCGACCGCTGGCATCGACCAA-33, J7 5'-TGGGCATGGTTCATTCCTCTCCACAAC-3' e J8 5'-CCCAGATGAGAAGAATGGGTCAATGAA-3'.

A mistura para PCR foi feita da seguinte maneira: 50 ng de DNA genômico de *T. rugulosus*, 20 pmol de cada *primer*, 1 mM MgCl₂, 1.75 U Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific), 5% DMSO e 0.2 mM dNTP-mix.

As condições de amplificação compreenderam uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos constituídos de desnaturação a 94°C por 0,5 min, hibridização (anealing) a 50°C por 0,5 min, e extensão dos primers a 68°C por 3 min, com extensão final a 68°C por 5 min. Ao final da reação a mesma foi interrompida por resfriamento a 4°C.

Os produtos das amplificações foram analisados aplicando-se 10 µL das misturas de reação em gel de agarose 1%, em tampão 1X TAE (80 mM Tris, 40 mM ácido acético glacial, 2,5 mM EDTA, pH 8,3) e em seguida foi submetido a uma tensão de 120 V por 45 min. Em seguida, o gel permaneceu em repouso em solução de 0,5 µg/mL de brometo de etídeo por 15 minutos e visualizado sob luz UV.

4-Resultados e Discussão

4.1 - Isolamento de fungos endofíticos de goiaba e maçã e seleção de espécies talentosas

Como resultado do procedimento de isolamento de fungos endofíticos a partir das frutas de goiaba e maçã (item foram purificada as cepas fúngicas de *Setophoma* sp. a partir dos frutos de goiaba e os fungos *Talaromyces rugulosus*, *Epicoccum nigrum* e *Cladosporium cladosporioides* dos frutos de maçã FIGURA 4.2.

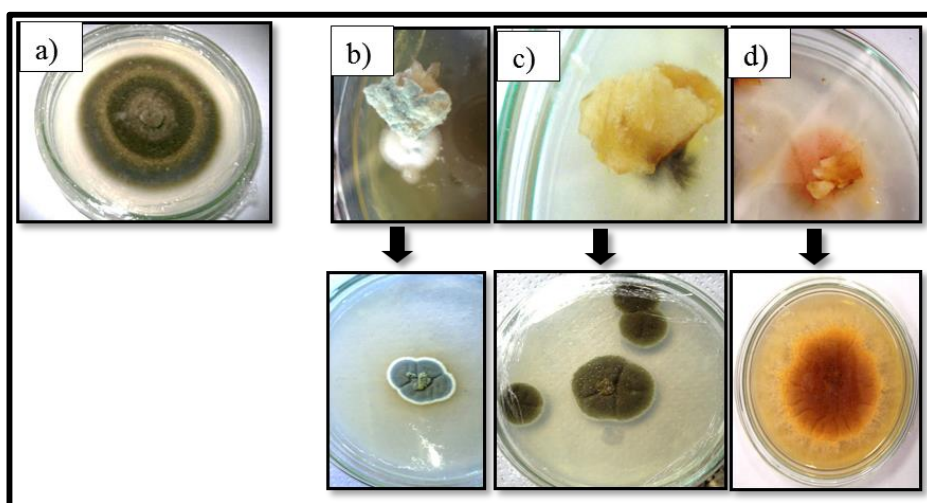


FIGURA 4.2 - a) Cepa purificada de *Setophoma* sp.; Crescimento fúngico a partir de fragmentos de polpa de maçã e respectivas cepas purificadas a) *T. rugulosus*, b) *C. cladosporioides*, d) *E. nigrum*

Desde que o isolamento e caracterização de novos compostos podem refletir em processos dispendiosos em tempo e custos, torna-se necessário a seleção das espécies ditas “mais talentosas” para que a o objetivo do processo investigativo seja bem sucedido (LARSEN *et al.*, 2005). Neste sentido foi executada uma triagem preliminar das espécies fúngicas isoladas através da avaliação dos resultados obtidos nas análises de UHPLC-HRMS dos micro-extratos referentes às quatro espécies.

Como critério de avaliação, foi escolhida a diversidade metabólica expressa pelas espécies em cada meio de cultura. Ou seja, o número de metabólitos produzidos e detectados em cada micro-extrato. Portanto, tendo em vista o metabolismo menos pronunciado do fungo *C. cladosporioides* em comparação aos

demais (menor número de íons detectados nos cromatogramas de pico base, *BPC*), a investigação metabólica deste micro-organismo foi menos explorada.

Notavelmente, os resultados preliminares obtidos, mostraram a maior expressão metabólica, nos meios de cultura testados, principalmente dos fungos *Setophoma* sp. e *T. rugulosus* e portanto estas podem ser apontadas como as “espécies mais talentosas” do presente estudo.

4.2 - Screening metabólico e derreplicação dos extratos *Setophoma* sp.

Estudos previamente realizados no grupo LabioMMi apontaram a potencialidade do fungo *Setophoma* sp. como produtor de novos metabólitos secundários de interesse. Isto porque a partir do cultivo do micro-organismo em meio de arroz, foram isolados quatro novos policetídeos de ação antimicrobiana (DE MEDEIROS et al., 2011) e herbicida moderadas (DE MEDEIROS et al., 2012).

Logo, tendo como inspiração os resultados anteriormente mencionados e a possibilidade da utilização da abordagem definida por BODE et al. (2002) como OSMAC (*One Strain Many Compounds*), foi realizado o *screening* metabólico de *Setophoma* sp. em diferentes meios de cultura. Com isto objetivou-se que mudanças aleatórias na composição dos meios de cultura pudessem induzir a biossíntese de novos compostos a partir do micro-organismo em estudo. Concomitantemente, com o intuito de se obter uma análise rápida e eficaz para avaliação e confirmação da identidade química dos compostos produzidos, fez-se o uso da metodologia de derreplicação via UHPL-HRMS vinculada a consultas a banco de dados específicos.

Em todo o processo de derreplicação, não só para o fungo *Setophoma* sp., mas também para os demais micro-organismos em estudo que serão relatados posteriormente, foram utilizados o banco de dados de padrões microbianos *in house* pertencentes ao grupo de pesquisa CMB (*Central for Microbial Biotechnology*) que contém cerca de 1.450 padrões de metabólitos microbianos e 19.000 espécies fúngicas, e também extensivas consultas ao banco de dados comercial AntiBase2012 (anteriormente descrito na seção introdutória). O uso destas ferramentas analíticas e investigativas foi proporcionado pela parceria de trabalho estabelecida entre o grupo LabioMMi e os professores Kristian Fog Nielsen e Thomas O. Larsen da Universidade Técnica de Dinamarca (DTU- *Danmarks Tekniske Universitet*).

Durante a investigação, treze diferentes meios de cultura foram testados para o endófito de goiaba: DRYES, CYA, MEA, MEAOX, SNA, DG18, WATM, YES, PDA, OAT, V8, CYAS (micro-cultivo em placa de Petri, FIGURA 4.3) e arroz em grão (micro-cultivo em Erlenmeyer 125mL). Como descrito em parte experimental, o procedimento de micro-extração foi empregado para a realização do *screening* inicial referente ao metabolismo secundário microbiano.

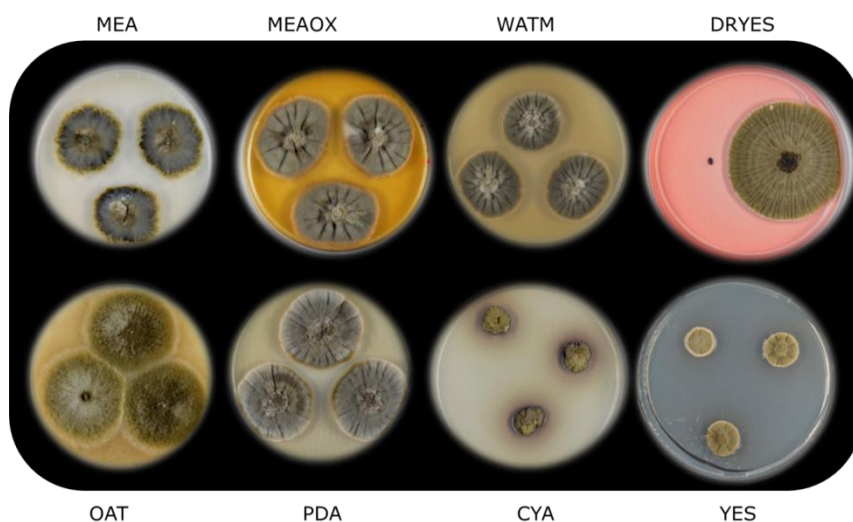


FIGURA 4.3 - Micro-cultivo de *Setophoma* sp. em diferentes meios de cultura

Como ilustra a figura 4.4, a análise dos cromatogramas de U.V dos micro-extratos estudados revelou duas regiões de destaque com relação ao aparecimento de bandas cromatográficas de maior evidência.

A análise dos espectros de *full scan* de cada banda, para cada meio avaliado revelou de forma geral o mesmo perfil químico em todos os casos, com exceção dos meios de cultura SNA, V8 e DG18, nos quais o micro-organismo não apresentou crescimento significativo, mostrando produção metabólica diminuta.

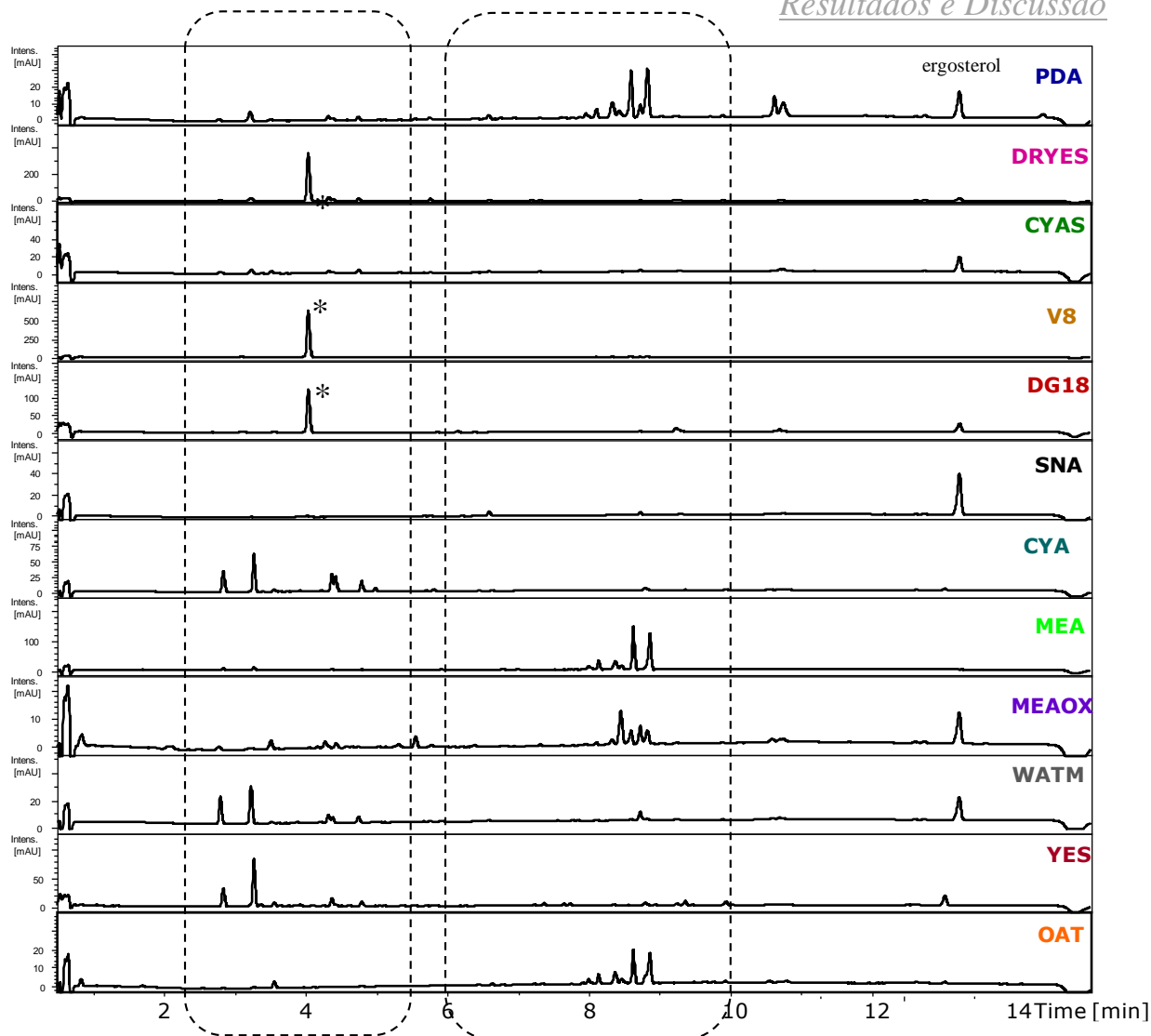


FIGURA 4.4 - Cromatogramas de UV referentes aos micro-extratos de *Setophoma* sp. nos meios de cultura indicados; método A. (*)Cloranfenicol adicionado no meio de cultura, método A

Através do processamento de dados, o que se observou foi a predominância quanto a produção de um grupo de compostos em relação a outro quando houve a mudança de meio de cultura. Os cromatogramas de íon selecionados para cada m/z selecionada é ilustrativo para este resultado (Figura 4.5). Por exemplo, em meio batata-água-dextrose (PDA), a ocorrência de íons m/z 479,1728 foi mais acentuada em relação ao íon de m/z 351,0874, o que é inversamente visualizado para meio WATM (Figura 4.5). Deve-se destacar que a comparação entre as intensidades relativas dos referidos íons é válida desde que a obtenção dos micro-extratos foi realizada a partir do mesmo procedimento e principalmente, os parâmetros de análise do espectrômetro de massas foram idênticos em para todas as amostras analisadas, conforme descrito na seção de procedimento experimental.

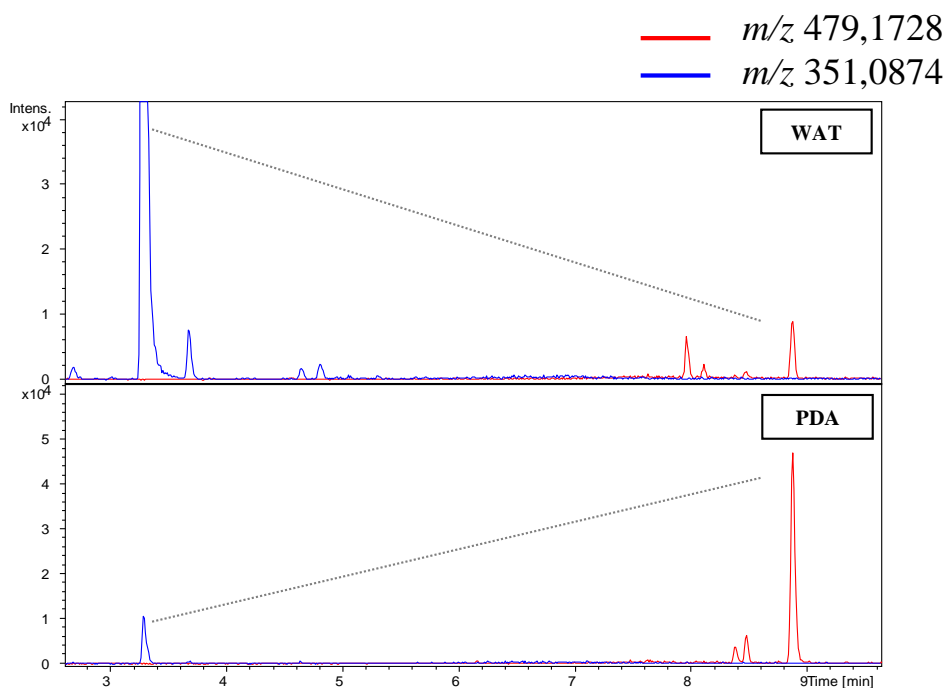


FIGURA 4.5 - Sobreposição dos cromatogramas de *ECI* para m/z 479,1728 (vermelho) e 351,0874 (azul) referente aos micro-extratos de *Setophoma* sp. indicados, método A

Para a investigação quanto à identidade dos metabólitos produzidos (derreplicação), partiu-se para a análise individual do espectro de *full scan* intrínseco a cada banda cromatográfica. O micro-extrato de meio YES foi o escolhido para ilustrar os resultados a seguir, tendo em vista a existência de todos os metabólitos alvo (íons de interesse) neste meio de cultura.

Após criteriosa avaliação dos íons observados para cada banda, ou seja, a averiguação de adutos e íons oriundos de fragmentação já na fonte de ionização do espectrômetro de massas, (por exemplo, perdas de unidades de H₂O, CO, CO₂, etc), os prováveis íons pseudomoleculares [M-H]⁻ de cada metabólito em potencial foram selecionados.

Com relação às bandas de menor retenção cromatográfica (região de 2 - 5,5 minutos), foram detectados quatro íons majoritários cujas bandas estão destacadas na FIGURA 4.6 pela sobreposição dos cromatogramas de íons extraídos de cada íon, ao cromatograma de pico base *BPC* (base peak chromatogram), em linha cinza. Os valores de cada relação de massa detectada encontram-se descritos na TABELA 4.1.

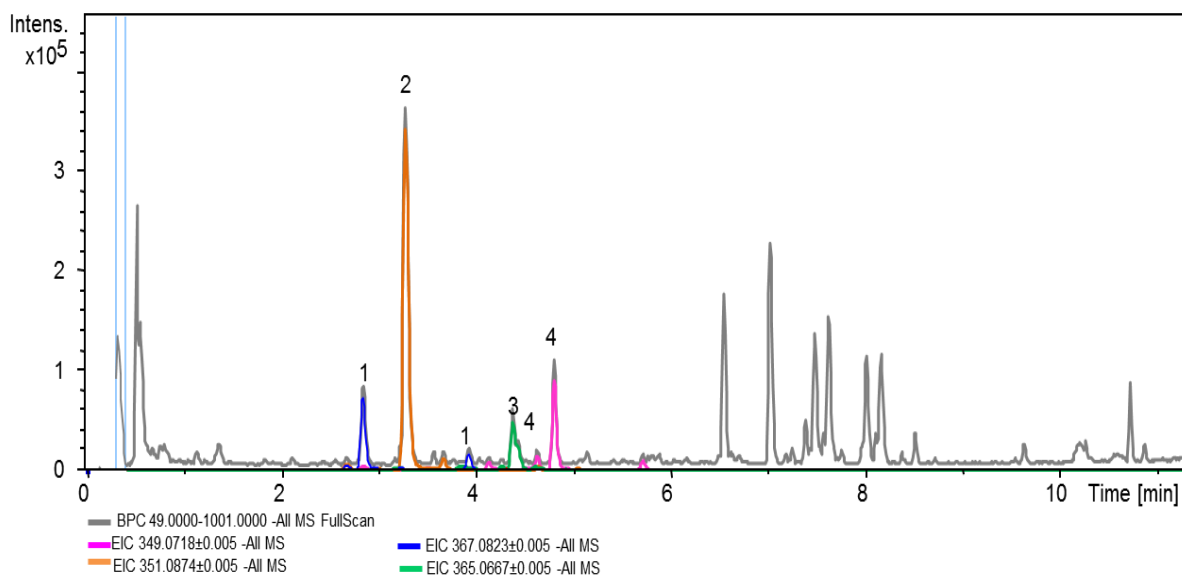


FIGURA 4.6 - Sobreposição dos cromatogramas de ECI dos íons m/z 367.0817 (banda 1), 351.0869 (banda 2), 365.0667 (banda 3), 349.0721 (banda 4) (± 5 ppm) detectados nos micro-extratos de *Setophoma* sp., método A

TABELA 4.1 - Principais íons detectados na região 2 – 5,5 minutos, no cromatograma de *BPC* referente ao micro-extrato de *Setophoma* sp. em meio YES (FIGURA 4.6)

Número do Íon Detectado	RT [min]	m/z , [M-H] ⁻	Records de maior probabilidade
1	2,84/3.95	367,0817	Alterlosina II, / Estenfitriol
2	3,28	351,0869	Altertoxina I/ Dihydroalterperyleneol / Estenfiperilenol
3	4,37	365,0667	Alterlosina I Estenfitoxina I
4	4,75/ 4,80	349,0721	Altertoxina II / Estenfitoxina II Alterperilenol / Alteicina

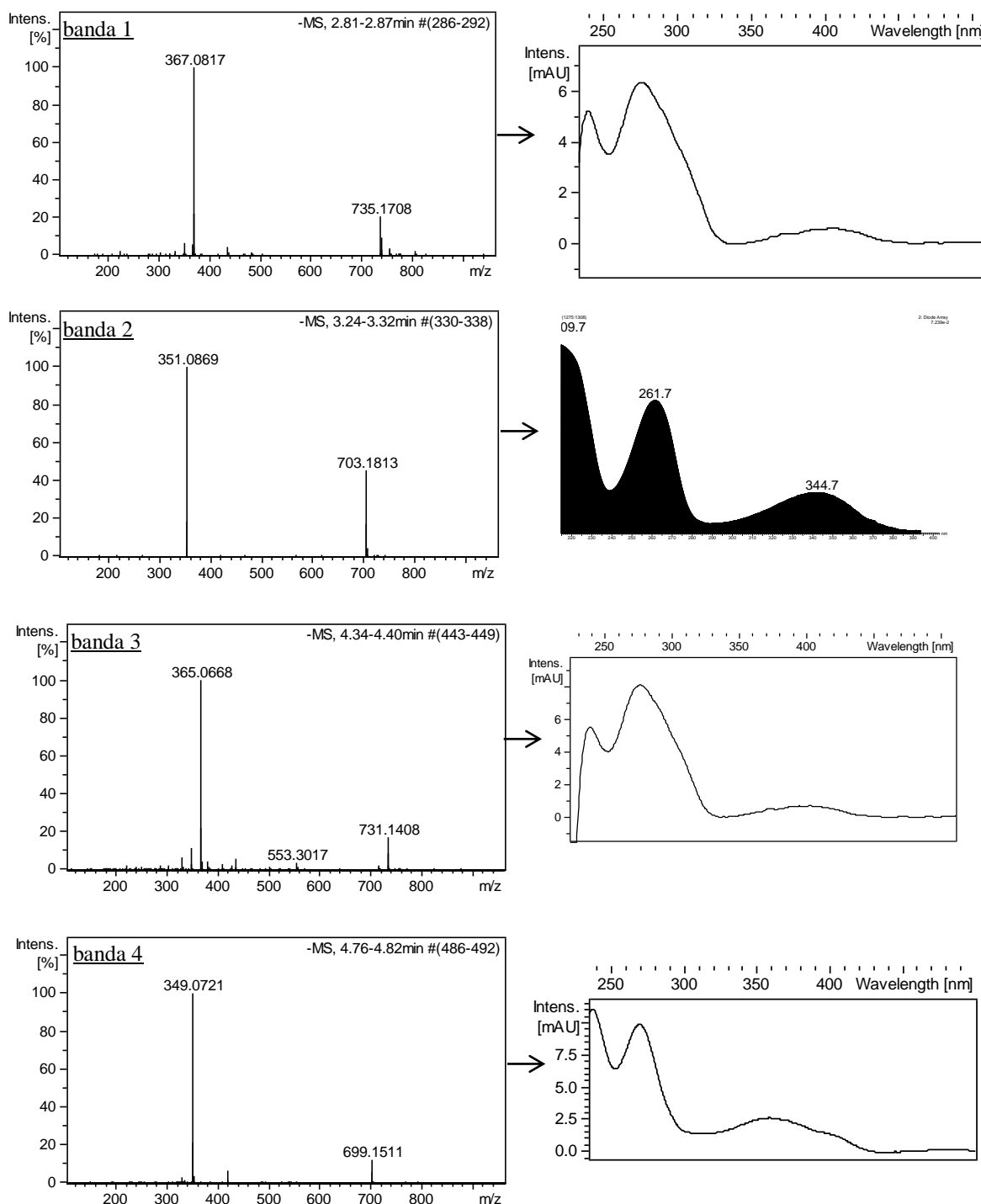


FIGURA 4.7 - Espectros de full scan e UV referentes às bandas do cromatograma de BPC detectadas no micro-extrato de YES do fungo *Setophoma* sp., detalhadas na FIGURA 4.6

Como estratégia principal, a massa molecular exata, inerente a cada relação m/z de interesse, foi utilizada como parâmetro principal de busca de metabólitos conhecidos no banco AntiBase2012. Para maior confiabilidade da

consulta utilizou-se o padrão de ± 5 ppm de erro em exatidão de massa para todos os valores consultados.

De acordo com a consulta ao banco de dados, um número considerável de metabólitos conhecidos foi gerado para os íons investigados: 13 possibilidades para o íon m/z 349,0721 (FIGURA 4.8), 25 sugestões para m/z 367,0817 (FIGURA 4.9), 18 possibilidades para os íons de m/z 365,0668 (FIGURA 4.10) e m/z 351,0869 (FIGURA 4.11).

Com base nos dados da literatura, os perfis dos espectros de UV referentes aos *hits* gerados, foram avaliados e comparados àqueles correspondentes aos compostos alvo. Através deste processo, foram considerados os metabólitos de maior compatibilidade quanto às características estruturais e os perfis de UV observados. Com isso, puderam-se restringir as possibilidades de maior probabilidade com relação às identidades dos metabólitos produzidos por *Setophoma* sp.

Os compostos de maior compatibilidade de acordo com as características espectrais avaliadas pertencem a policetídeos do grupo perilenequinonas de classe A (MULROONEY et al., 2012). Tais compostos encontram-se destacados nas figuras que ilustram os records obtidos através do banco AntiBase (FIGURA 4.8 à FIGURA 4.11).

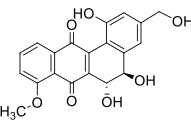
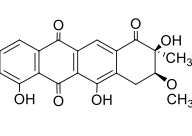
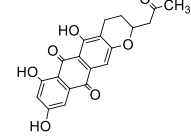
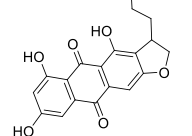
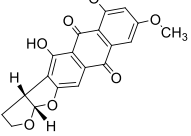
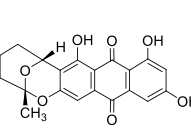
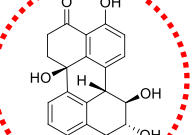
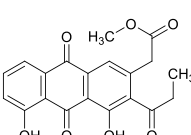
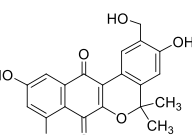
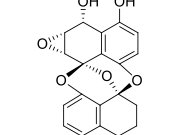
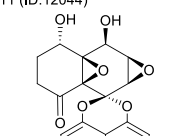
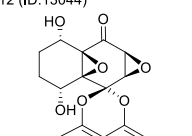
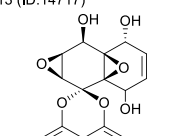
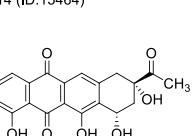
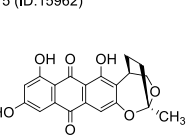
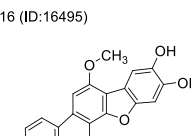
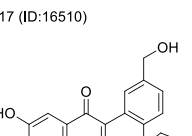
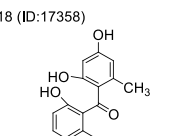
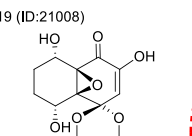
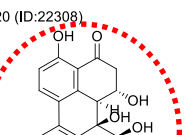
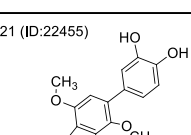
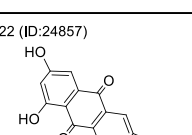
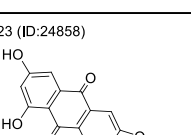
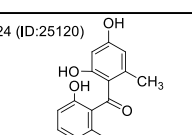
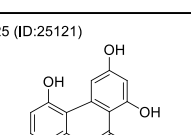
ANTIBASE2012				
1 (ID:895) 	2 (ID:942) 	3 (ID:1395) 	4 (ID:3838) 	5 (ID:3933) 
PD-116740 C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	SM-173-B C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	Deoxyaverufinone C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	Versicolorone C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	(-)-Aversin C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089
6 (ID:4162) 	7 (ID:6210) 	8 (ID:6772) 	9 (ID:8532) 	10 (ID:8626) 
Averufin C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	Alterlosin II C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	S 383-O; 4,5-Dihydroxy-2-me C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	Naphthgeranine E C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	Preussomerin-B C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089
11 (ID:12044) 	12 (ID:13044) 	13 (ID:14717) 	14 (ID:15464) 	15 (ID:15962) 
Diepoxine eta; Sch-53516; Pa C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	Sch-49210 C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	Palmarumycin C15 C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	11-Deoxycarminomycinone C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	Paeciloinone-E C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089
16 (ID:16495) 	17 (ID:16510) 	18 (ID:17358) 	19 (ID:21008) 	20 (ID:22308) 
Candidusin B C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	Naphthgeranine F C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	Deoxy-SEK-15; 2-(2,4-Dihyd C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	Sch-49212 C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	Stemphitriol C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089
21 (ID:22455) 	22 (ID:24857) 	23 (ID:24858) 	24 (ID:25120) 	25 (ID:25121) 
6'-Desmethylcandidusin B C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	UCT-1072-M2 C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	UCT-1072-M3 C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	SEK-43 C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089	UWM-4 C ₂₀ H ₁₆ O ₇ 368,089

FIGURA 4.8 - Identidades geradas pela consulta ao banco AntiBase2012 para o íon m/z 367,0817 (\pm 5ppm)

ANTIBASE2012

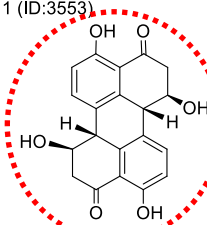
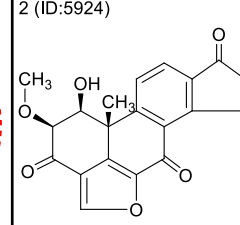
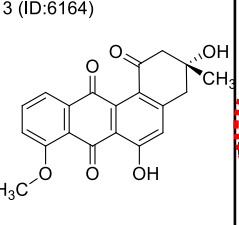
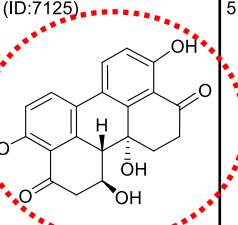
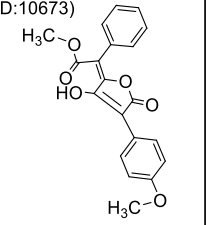
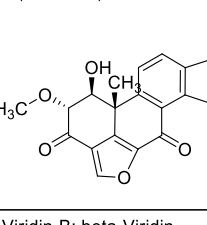
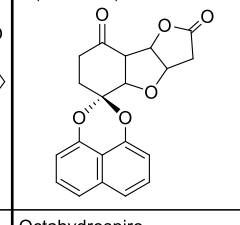
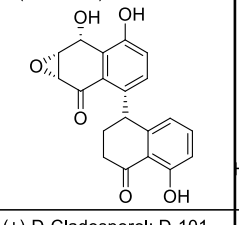
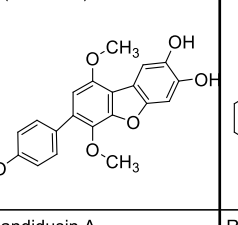
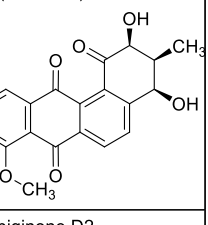
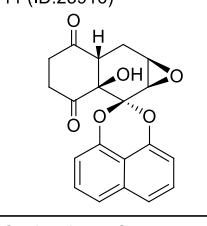
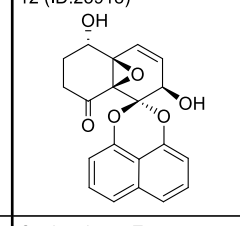
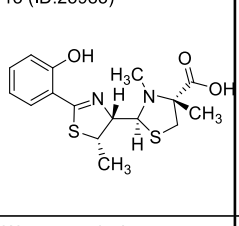
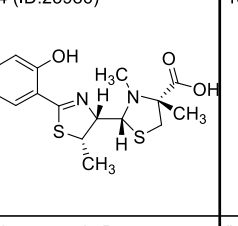
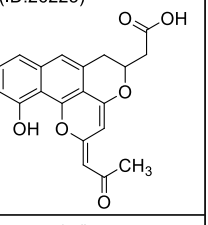
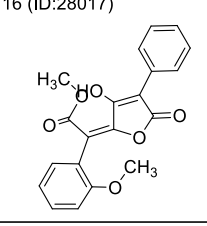
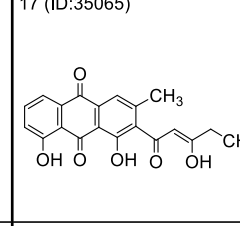
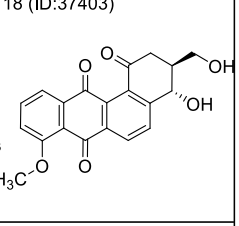
1 (ID:3553) 	2 (ID:5924) 	3 (ID:6164) 	4 (ID:7125) 	5 (ID:10673) 
Stemphyliol $C_{20}H_{16}O_6$ 352,094	Viridin; Viridin-A' $C_{20}H_{16}O_6$ 352,094	8-O-Methylrabelomycin $C_{20}H_{16}O_6$ 352,094	Altertoxin I; ATX-I; Dihydroalt $C_{20}H_{16}O_6$ 352,094	Pinatric acid; Chrysocetraric $C_{20}H_{16}O_6$ 352,094
6 (ID:14131) 	7 (ID:15203) 	8 (ID:15524) 	9 (ID:16494) 	10 (ID:25773) 
Viridin-B; beta-Viridin $C_{20}H_{16}O_6$ 352,094	Octahydrospiro $C_{20}H_{16}O_6$ 352,094	(+)-D-Cladosporol; D-101 $C_{20}H_{16}O_6$ 352,094	Candidusin A $C_{20}H_{16}O_6$ 352,094	Rubiginone D2 $C_{20}H_{16}O_6$ 352,094
11 (ID:25916) 	12 (ID:25918) 	13 (ID:25985) 	14 (ID:25986) 	15 (ID:26223) 
Cladospirone C $C_{20}H_{16}O_6$ 352,094	Cladospirone E $C_{20}H_{16}O_6$ 352,094	Watasemycin A $C_{16}H_{20}N_2O_3S_2$ 352,091	Watasemycin B $C_{16}H_{20}N_2O_3S_2$ 352,091	"compound 5" $C_{20}H_{16}O_6$ 352,094
16 (ID:28017) 	17 (ID:35065) 	18 (ID:37403) 		
Leprapic acid; Leprapinic acid $C_{20}H_{16}O_6$ 352,094	Aklanone $C_{20}H_{16}O_6$ 352,094	Fujianmycin C $C_{20}H_{16}O_6$ 352,094		

FIGURA 4.9 - Identidades geradas pela consulta ao banco AntiBase2012 para o íon m/z 351,0869 (± 5 ppm)

ANTIBASE2012.CFD

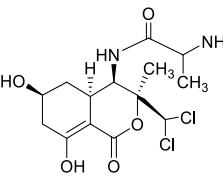
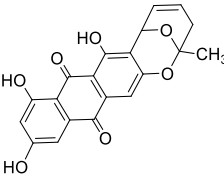
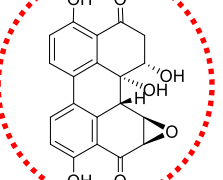
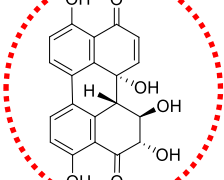
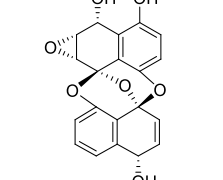
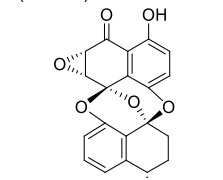
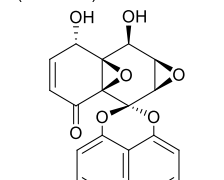
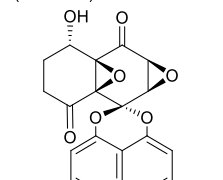
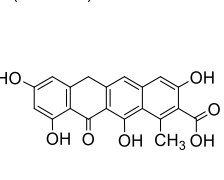
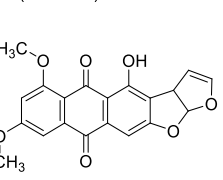
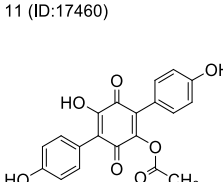
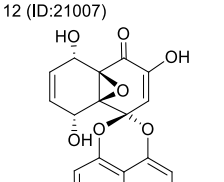
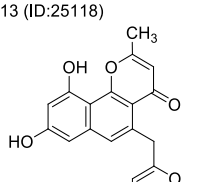
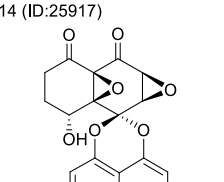
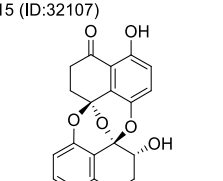
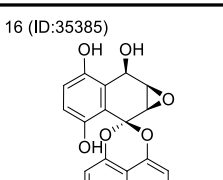
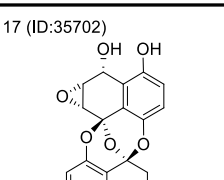
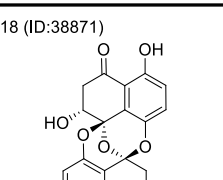
1 (ID:499) 	2 (ID:1390) 	3 (ID:3559) 	4 (ID:6209) 	5 (ID:7674) 
Bactobolin-C; Y-14556 $C_{14}H_{20}Cl_2N_2O_5$ 366,074	Dehydroaverufin $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073	Stemphytoxin I $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073	Alterlosin I $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073	Preussomerin A $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073
6 (ID:8630) 	7 (ID:11873) 	8 (ID:12043) 	9 (ID:13970) 	10 (ID:15447) 
Preussomerin-F $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073	Cladospirone bisepoxide; Die $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073	Diepoxina-a $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073	Tetracenomycin-F1 $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073	Versicolorin A 6,8-dimethyl et $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073
11 (ID:17460) 	12 (ID:21007) 	13 (ID:25118) 	14 (ID:25917) 	15 (ID:32107) 
2-O-Acetylaltromentin; 3-O-A $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073	Sch-49211 $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073	RM-80b $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073	Cladospirone D $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073	Preussomerin EG2 $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073
16 (ID:35385) 	17 (ID:35702) 	18 (ID:38871) 		
Ascochytatin $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073	Ymf 1029D $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073	Preussomerin BG1 $C_{20}H_{14}O_7$ 366,073		

FIGURA 4.10 - Identidades geradas pela consulta ao banco AntiBase2012 para o íon m/z 365,0668 (\pm 5ppm)

ANTIBASE2012

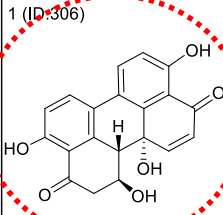
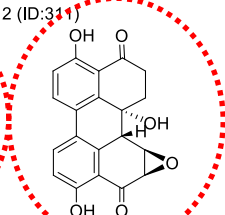
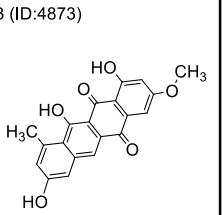
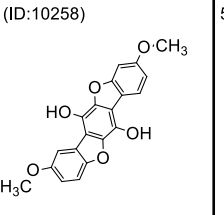
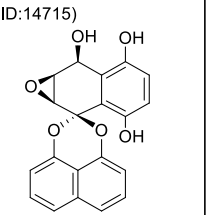
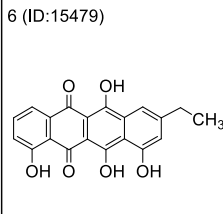
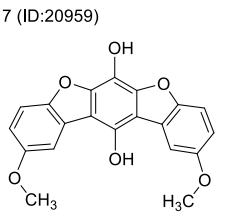
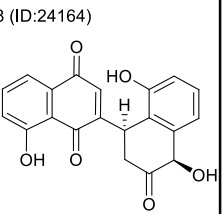
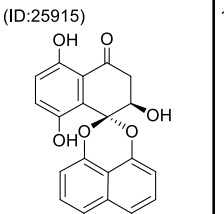
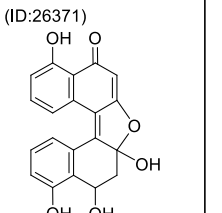
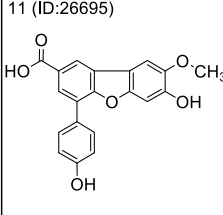
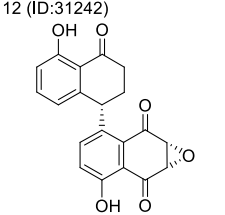
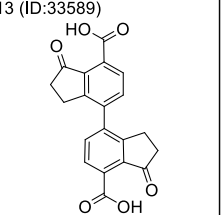
1 (ID:306) 	2 (ID:311) 	3 (ID:4873) 	4 (ID:10258) 	5 (ID:14715) 
Alterperylene A Atelchin	Altertoxin I Stemphytoxin II	Tetragenomycin B1	Corticin C	Palmarumycin C12
$C_{20}H_{14}O_6$ 350,078	$C_{20}H_{14}O_6$ 350,078	$C_{20}H_{14}O_6$ 350,078	$C_{20}H_{14}O_6$ 350,078	$C_{20}H_{14}O_6$ 350,078
6 (ID:15479) 	7 (ID:20959) 	8 (ID:24164) 	9 (ID:25915) 	10 (ID:26371) 
Anthracyclinone 1PI	Corticin C	8,1',5'-Trihydroxy-3',4'-dihydro	Cladospirone B	Dihydrosphaerolone
$C_{20}H_{14}O_6$ 350,078	$C_{20}H_{14}O_6$ 350,078	$C_{20}H_{14}O_6$ 350,078	$C_{20}H_{14}O_6$ 350,078	$C_{20}H_{14}O_6$ 350,078
11 (ID:26695) 	12 (ID:31242) 	13 (ID:33589) 		
Dictyomedin B	Cladosporol B	Nodulisporin C		
$C_{20}H_{14}O_6$ 350,078	$C_{20}H_{14}O_6$ 350,078	$C_{20}H_{14}O_6$ 350,078		

FIGURA 4.11 - Identidades geradas pela consulta ao banco AntiBase2012 para o íon m/z 349,0721 (\pm 5ppm)

Logo, foram sugeridos dois produtos fúngicos conhecidos para cada íon de interesse avaliado, o que também veio ao encontro do número de picos detectados no cromatogramas de íons extraídos, ou seja, um total de 2 picos para cada m/z selecionada (contabilizando-se os picos de menor e maior intensidade). Um resumo das estruturas químicas de maior score de acordo com os dados espectrais avaliados segue na FIGURA 4.12.

As evidências a respeito da produção de perilenequinonas pelo fungo foram corroboradas pelo isolamento e identificação do estenfiperilenol referente ao

íon de m/z 351,0869. Este metabólito foi isolado durante experimentos de co-cultivo com o fungo *Setophoma* sp., sendo que todo o processo de caracterização será detalhado na seção 4.4.1.

Contudo, mesmo não se sabendo inequivocamente quais perilenequinonas de fato são metabolizadas por *Setophoma* sp., a estratégia de derreplicação permitiu que o universo de possibilidades estruturais fosse consideravelmente reduzido, evitando-se assim o isolamento de metabólitos já conhecidos.

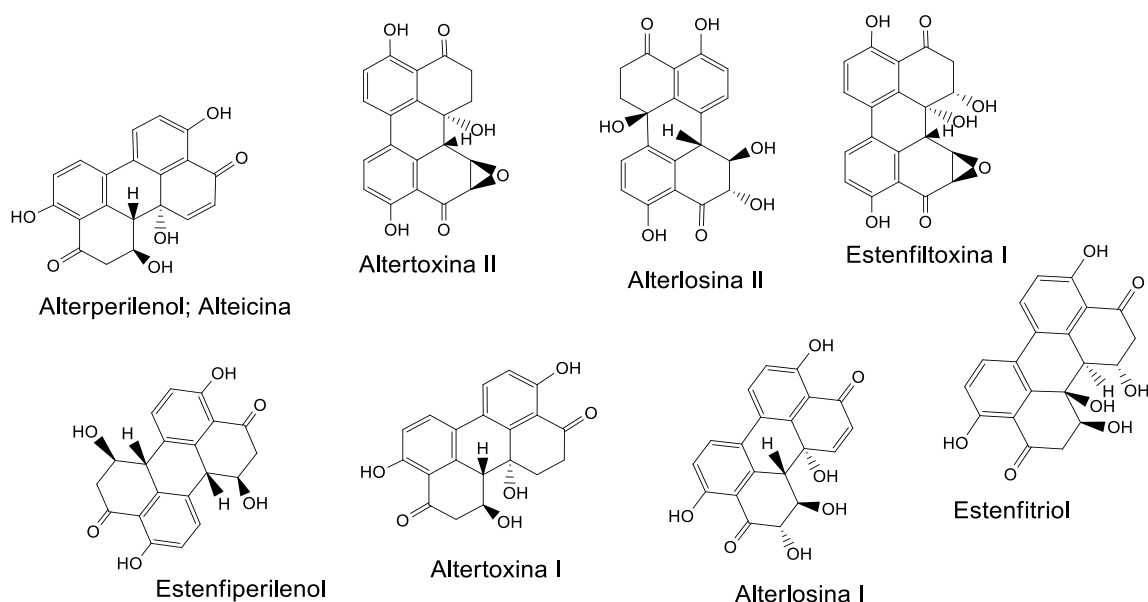


FIGURA 4.12 - Perilenequinonas de maior *score* sugeridas pelo banco AntiBase2012 para metabólitos alvo produzidos por *Setophoma* sp.

O processo de derreplicação também foi adotado para os demais íons detectados na região de maior retenção cromatográfica (de 6-9 min). Além dos meios de cultura mencionados, também foi avaliado o extrato obtido em menor escala de *Setophoma* sp. cultivado em meio de arroz.

Através das análises dos cromatogramas de *BPC* referentes aos meios de cultura mais promissores, alguns íons de maior interesse foram selecionados. Pelo processamento dos espectros de *full scan* de cada banda (FIGURA 4.14), foram detectados os íons (1) m/z 451,1393 (8,1min), (2) m/z 465,1557 (7,9min), (3) m/z

479,1702 (8,3min); (4) m/z 479,1699 (8,5min); (5) m/z 287,0930 (6,5min); (6) m/z 287,0932 (6,1min); (7) m/z 301,1087 (6,4min).

Como ilustra a FIGURA 4.13, o meio de arroz destacou-se pela ocorrência de todos os metabólitos selecionados em detrimento aos demais meios. Tal resultado pode ser confirmado pela visualização das bandas cromatográficas nos respectivos cromatogramas de *BPC*.

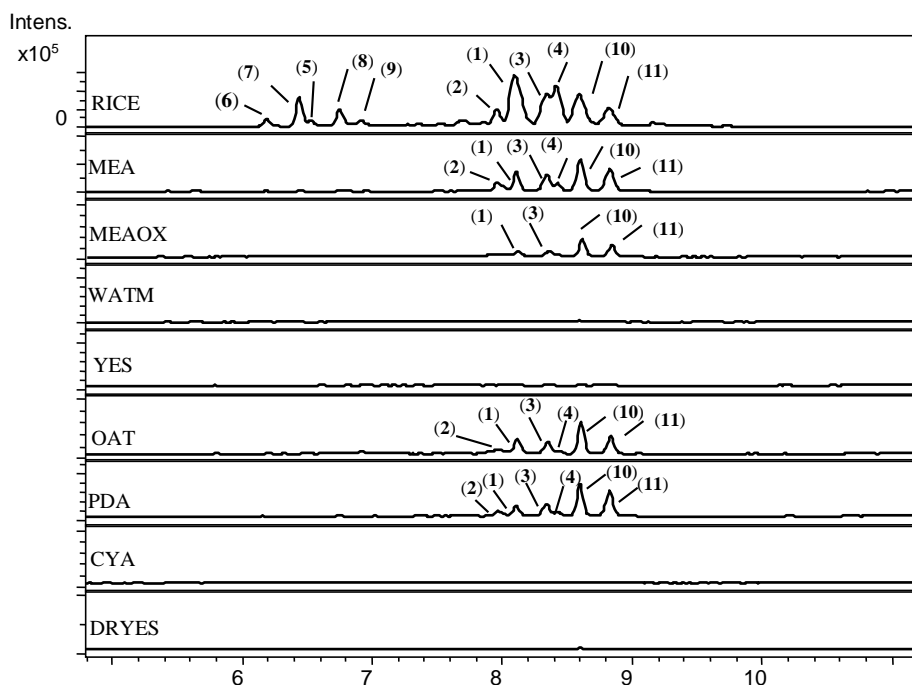


FIGURA 4.13 - Região de interesse para cromatogramas de *BPC* correspondentes aos micro-extratos de *Setophoma* sp. indicados. Em destaque bandas cromatográficas de (1) à (7) referentes aos íons detectados nos espectros de *full scan* visualizados na FIGURA 4.14: m/z 451,1393 (composto 1); m/z 465,1550; (composto 2); m/z 479,1708 (composto 3 e 4); m/z 287,0925; (composto 5 e 6) and m/z 301,1076 (composto 7). Demais bandas representam compostos identificados em estudos anteriores (DE MEDEIROS et al., 2013): Lecanorina B e C (composto 8 e 9); thielavina Q e R (composto 10 e 11). Método A

Cabe aqui ressaltar que as bandas cromatográficas 8, 9, 10 e 11, também visualizadas nos cromatogramas de *BPC*, tratavam-se de compostos previamente já conhecidos e relatados pelo grupo LabioMMi em estudos químicos anteriores do fungo *Setophoma* sp. (DE MEDEIROS et al., 2013). Tais metabólitos tratam-se dos depsídeos lecanorinas B (8) e C (9), e dos tridepsídeos thielavinas Q(10) e R (11). A identificação e confirmação destes quatro metabólitos nos extratos foi

realizada através de comparações dos espectros de *full scan* de padrões isolados no estudo mencionado.

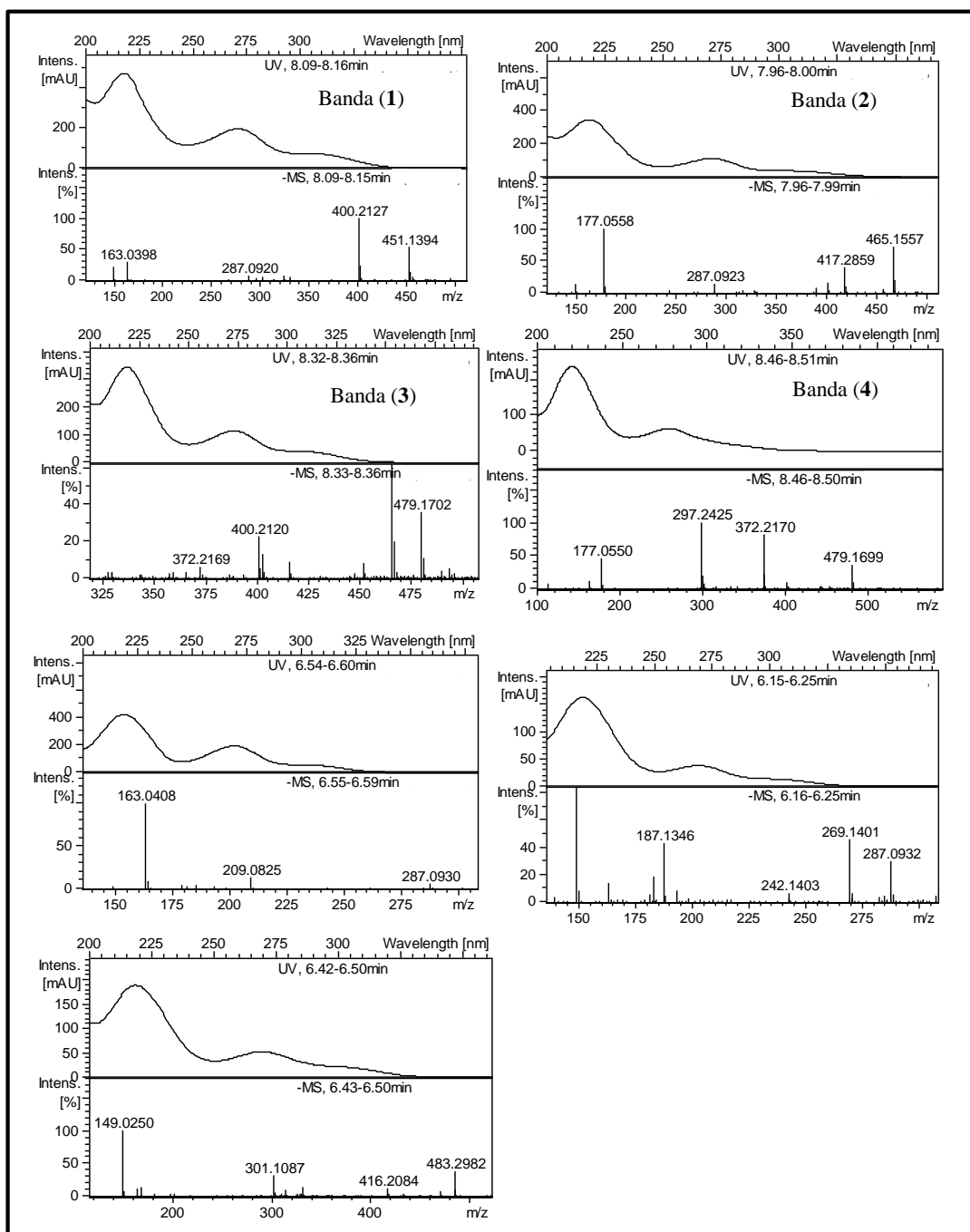


FIGURA 4.14 - Espectros de UV e *full scan* referentes aos sete metabólitos detectados nos cromatogramas de UV e BPC respectivamente, a partir do extrato de arroz de *Setophoma* sp.

A busca das massas monoisotópicas acuradas obtidas nos espectros de *BPC* foram consultadas no banco AntiBase (± 5 ppm), gerando-se novamente possíveis candidatos aos íons investigados. Novamente, após criteriosa comparação de dados, estabeleceu-se a incompatibilidade estrutural da maioria dos *Hits* gerados com os dados espectrais observados para os metabólitos investigados, delineando-se um universo de procura mais restrito para a identidade dos mesmos.

Como primeiro critério de comparação, os perfis dos espectros no UV dos compostos detectados apresentaram grande similaridade entre si, sendo que em linhas gerais, os espectros no UV mostraram máximos de absorção em torno de 272, 223 e 315 nm (FIGURA 4.14), podendo-se assim, excluir alguns dos candidatos gerados pelo banco de dados.

No mesmo viés investigativo, um segundo parâmetro de avaliação foi determinante na derreplicação dos compostos: os resultados obtidos a partir do experimento de HRMS/MS para os íons alvo. De acordo com o espectro de íons produtos para cada alvo, é possível observar a presença de relações de massa em comum entre os fragmentos visualizados como, por exemplo, os valores de massa nominais m/z 149, 163, 177, 287, 301, 315. Todos os espectros foram adquiridos com 20 eV, pelo método de análise A.

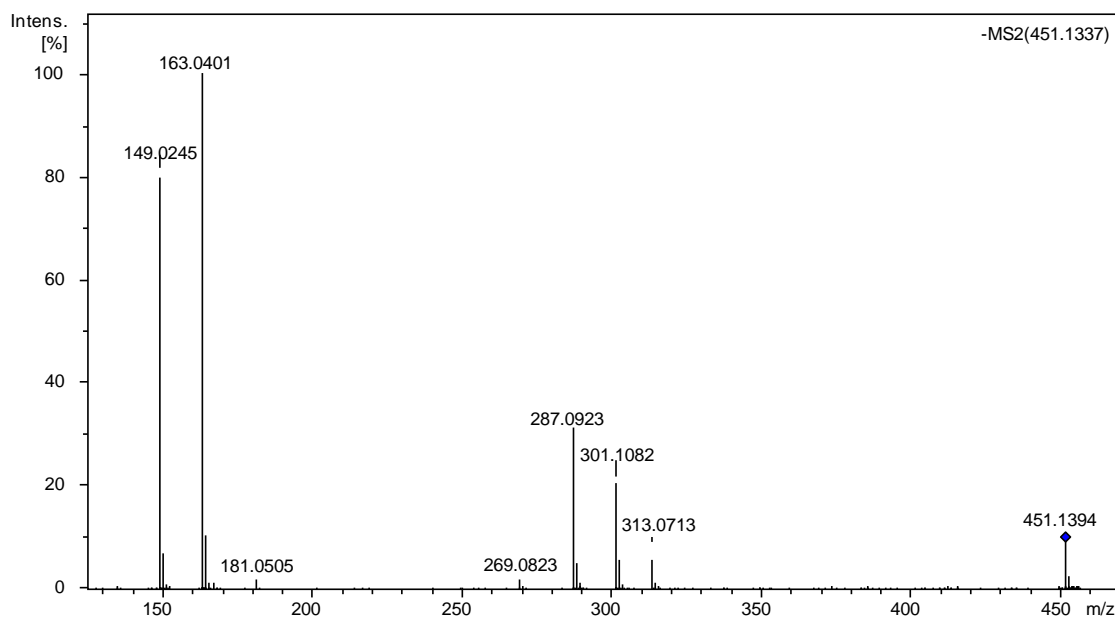


FIGURA 4.15 - Espectro de íons produtos de m/z 451,1394, banda (1)

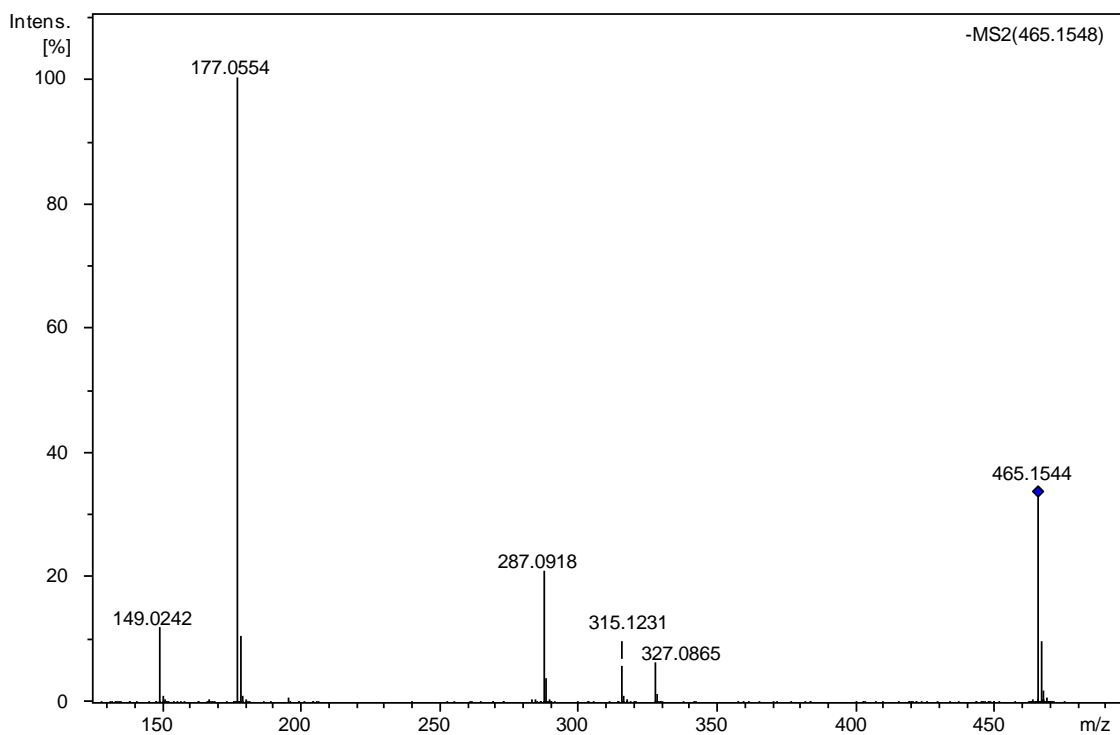


FIGURA 4.16 - Espectro de íons produtos de m/z 465,1544, banda (2)

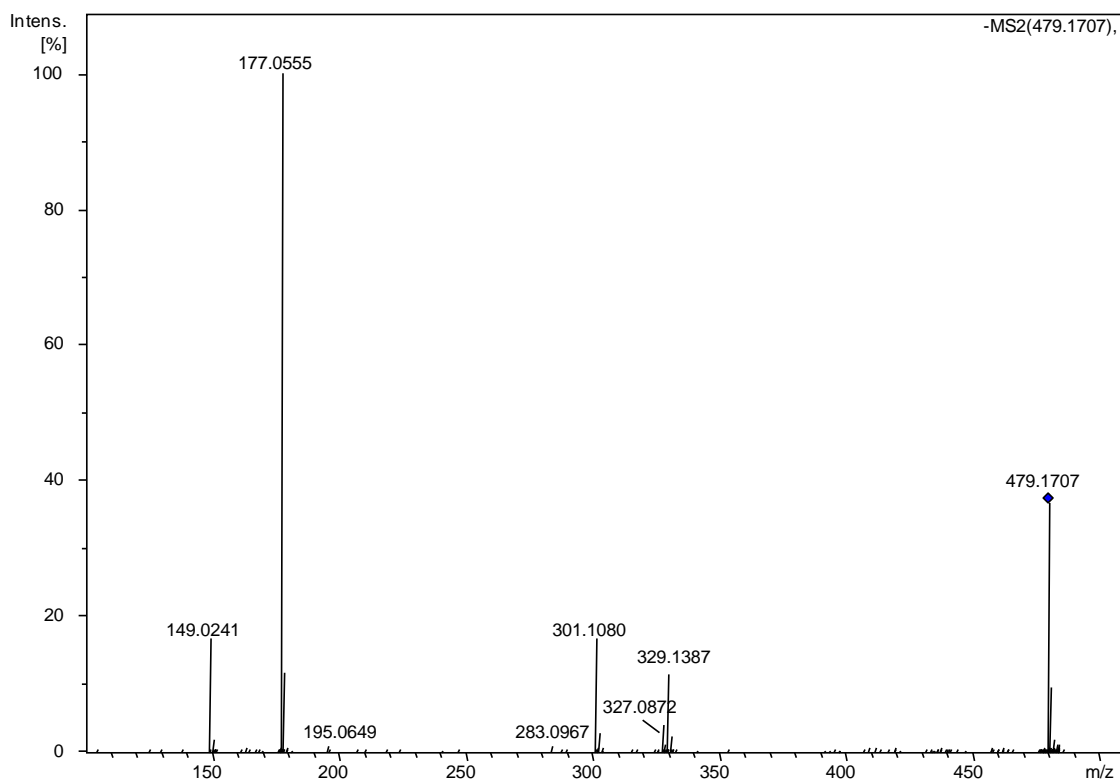


FIGURA 4.17 - Espectro de íons produtos de m/z 479,1707, banda (3)

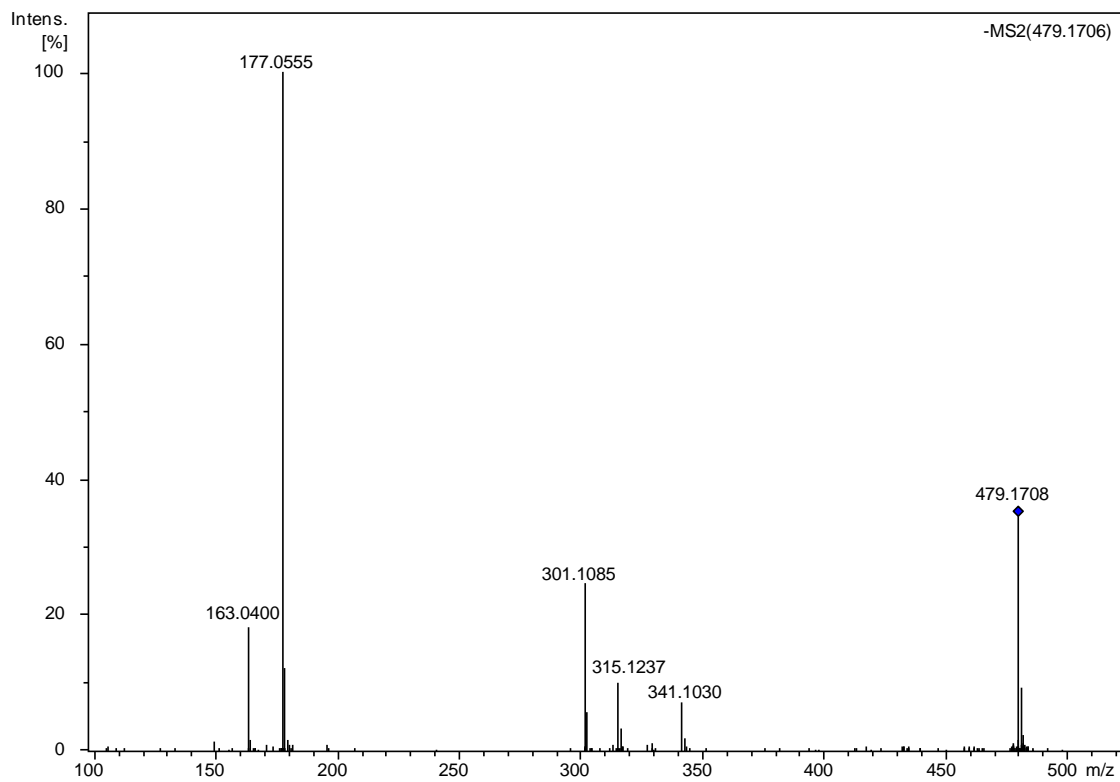


FIGURA 4. 18 - Espectro de íons produtos de m/z 479,1708, banda (4)

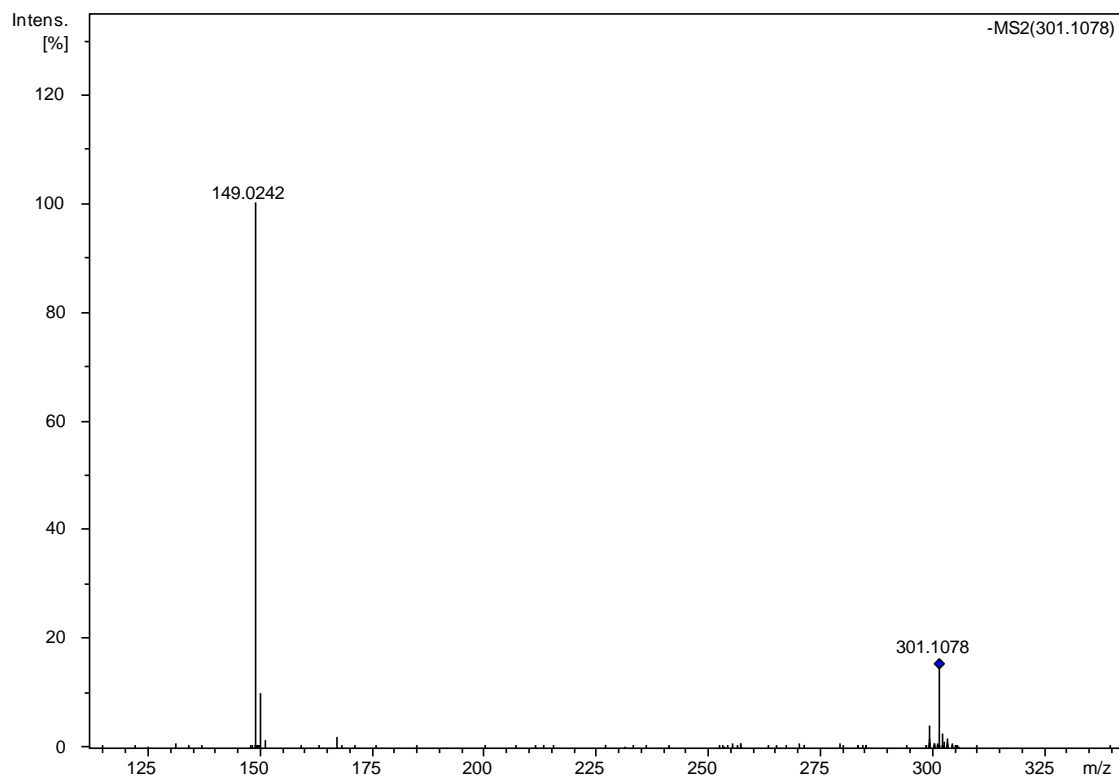


FIGURA 4. 19 - Espectro de íons produtos de m/z 301,1078, banda (5)

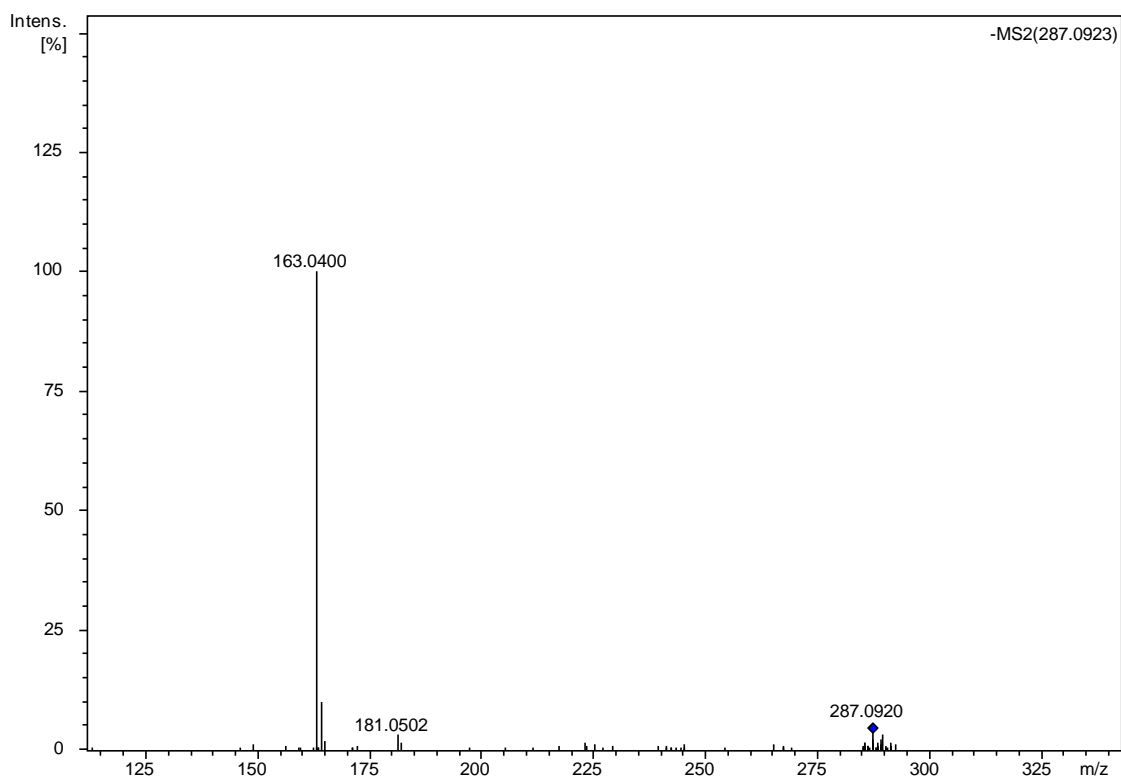


FIGURA 4.20 - Espectro de íons produtos de m/z 287,0920, banda (6)

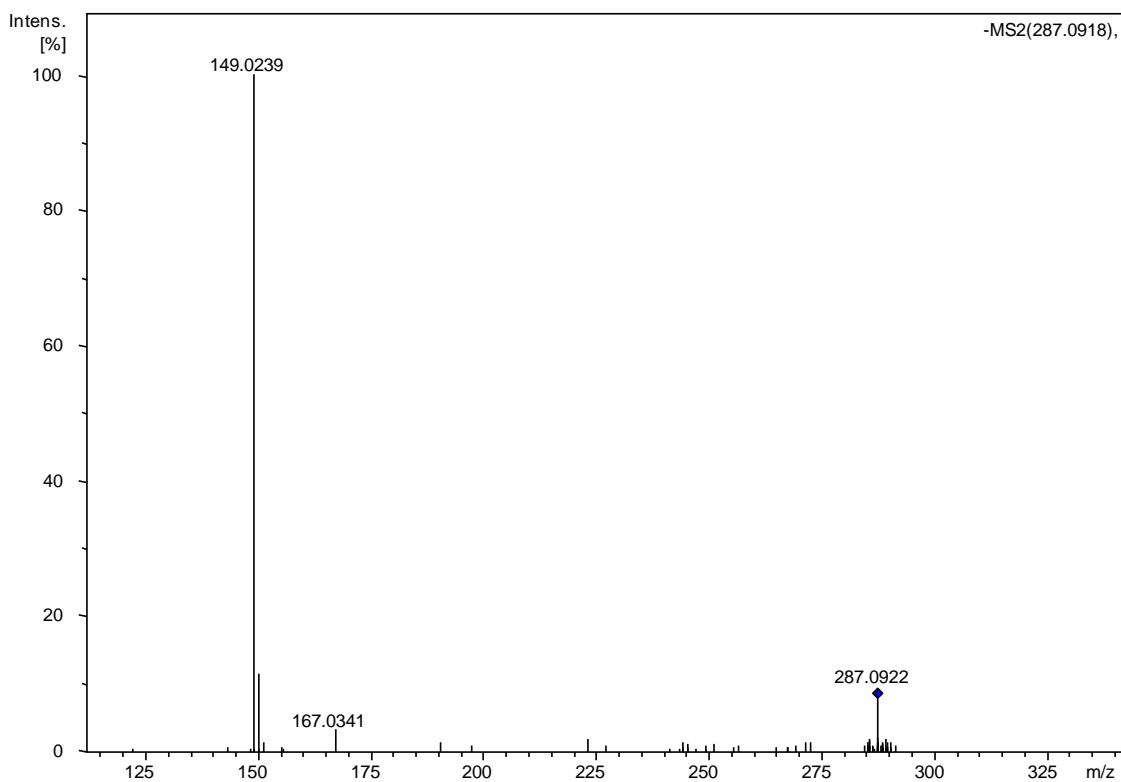


FIGURA 4.21 - Espectro de íons produtos de m/z 287,0927, banda (7)

Contudo, devido à correspondência entre as massas monoistotópicas de alguns dos compostos do extrato fúngico e os depsídeos lecanorina B e C, thielavina Q e R (produzidos pelo fungo) estes também foram listados como possíveis identidades pelo banco de dados. A alta compatibilidade entre os dados de UV e HRMS/MS com estes policetídeos excluiu as demais possibilidades de compostos conhecidos indicadas no processo anterior e principalmente trouxe evidências de que os metabólitos alvos poderiam se tratar de novos depsídeos produzidos por *Setophoma* sp. sendo inclusive alguns deles, formas isoméricas dos mesmos.

4.2.1 - Elucidação estrutural de novos depsídeos produzidos por *Setophoma* sp.

Com a definição da potencialidade de novos metabólitos produzidos pelo endófito de goiaba, partiu-se para o isolamento e caracterização dos mesmos. Como anteriormente mencionado, o meio de arroz apresentou melhor resposta à produção metabólica dos compostos alvos e portanto a cultura de *Setophoma* sp. foi escalonada neste meio.



FIGURA 4.22 - Cultivo do fungo *Setophoma* sp. em arroz e amostra branco do meio de cultura

Após a realização de procedimentos de extração, purificação detalhados no item 3.9.5.1, os sete compostos de interesse, as thielavinas S (1), T (2), U (3) e V (4) e as lecanorinas D (5), E (6) e F (7) foram isolados em sistema HPLC semi-preparativo.

A elucidação estrutural foi realizada através dos resultados obtidos via experimentos de RMN 1D e 2D, bem como o estudo das fragmentações de cada metabólito de acordo com os dados obtidos por HRMS/MS.

Em uma análise preliminar, novamente foi constatada grande similaridade no perfil químico dos compostos isolados. De forma geral, os respectivos espectros de RMN de ^1H mostraram um expressivo número de singletos em duas regiões específicas: de δ_{H} 6,17 à δ_{H} 6,69 e na região de núcleos mais blindados de δ_{H} 1,98 à δ_{H} 2,68. O desdobramento de sinais foi visualizado em apenas alguns casos, caracterizando poucos acoplamentos de spins entre os núcleos.

Os espectros de RMN de ^1H são ilustrados a seguir, a partir da FIGURA 4.23 à FIGURA 4.29. Todo o detalhamento dos sinais observados, para todos os compostos, encontra-se descrito na TABELA 4.2.

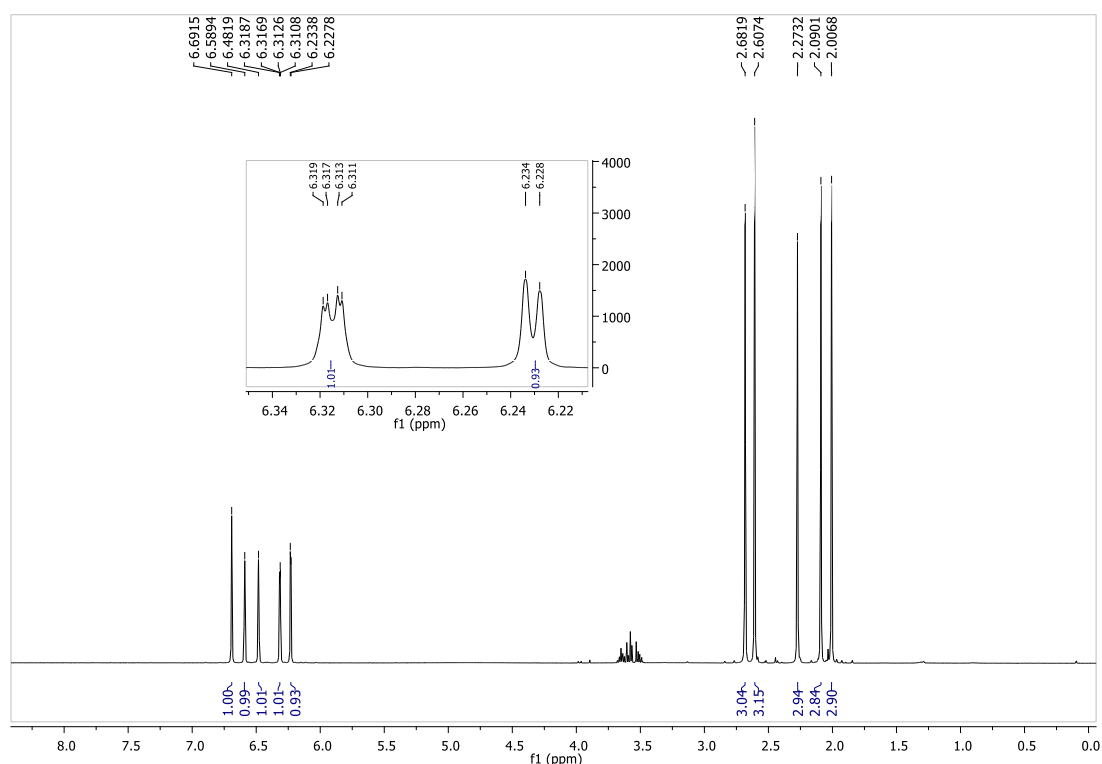


FIGURA 4.23 - Espectro de RMN de ^1H referente ao metabólito **1** (CD_3OD , 400 MHz)

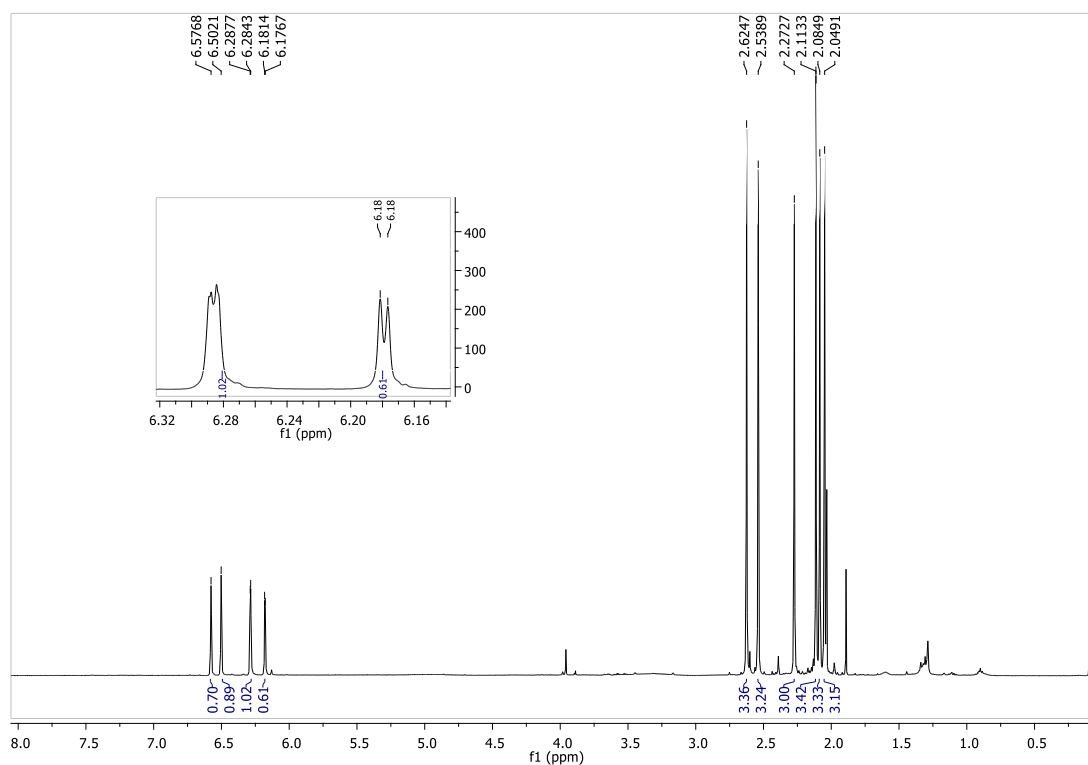


FIGURA 4.24 - Espectro de RMN de ^1H referente ao metabólito **2** (CD_3OD , 400 MHz)

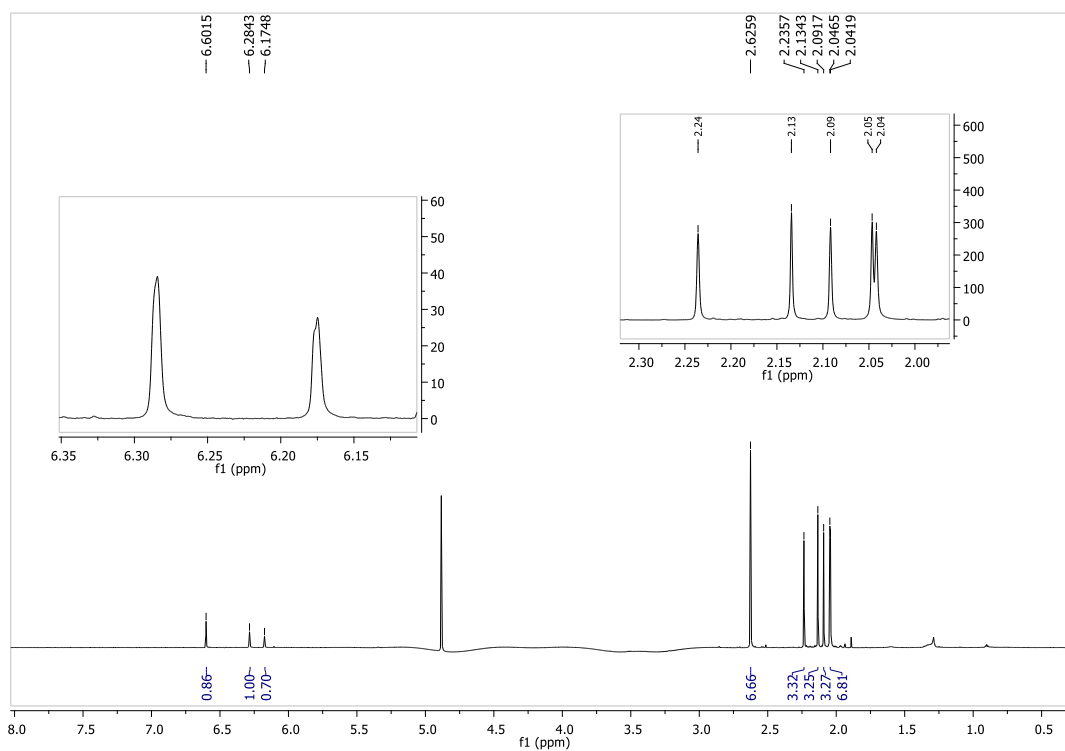


FIGURA 4.25 - Espectro de RMN de ^1H referente ao metabólito **3** (CD_3OD , 400 MHz)

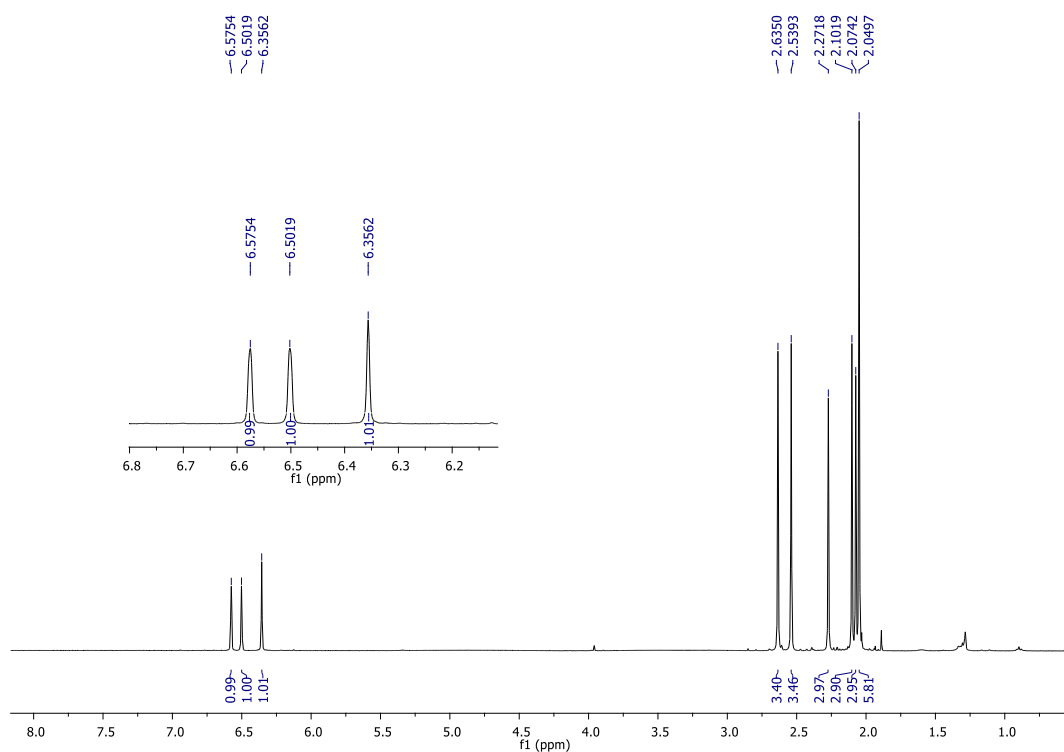


FIGURA 4.26 - Espectro de RMN de ^1H referente ao metabólito **4** (CD_3OD , 400 MHz)

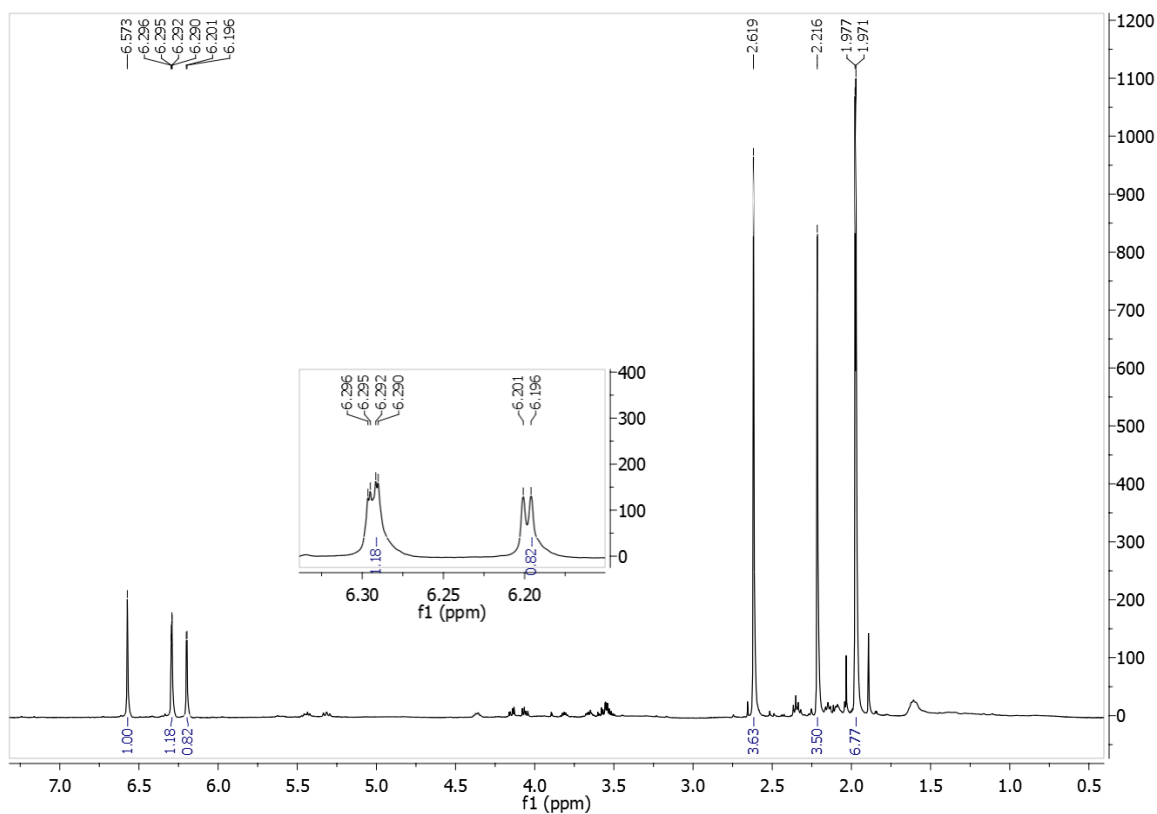


FIGURA 4.27 - Espectro de RMN de ^1H referente ao metabólito **5** (CD_3OD , 400 MHz)

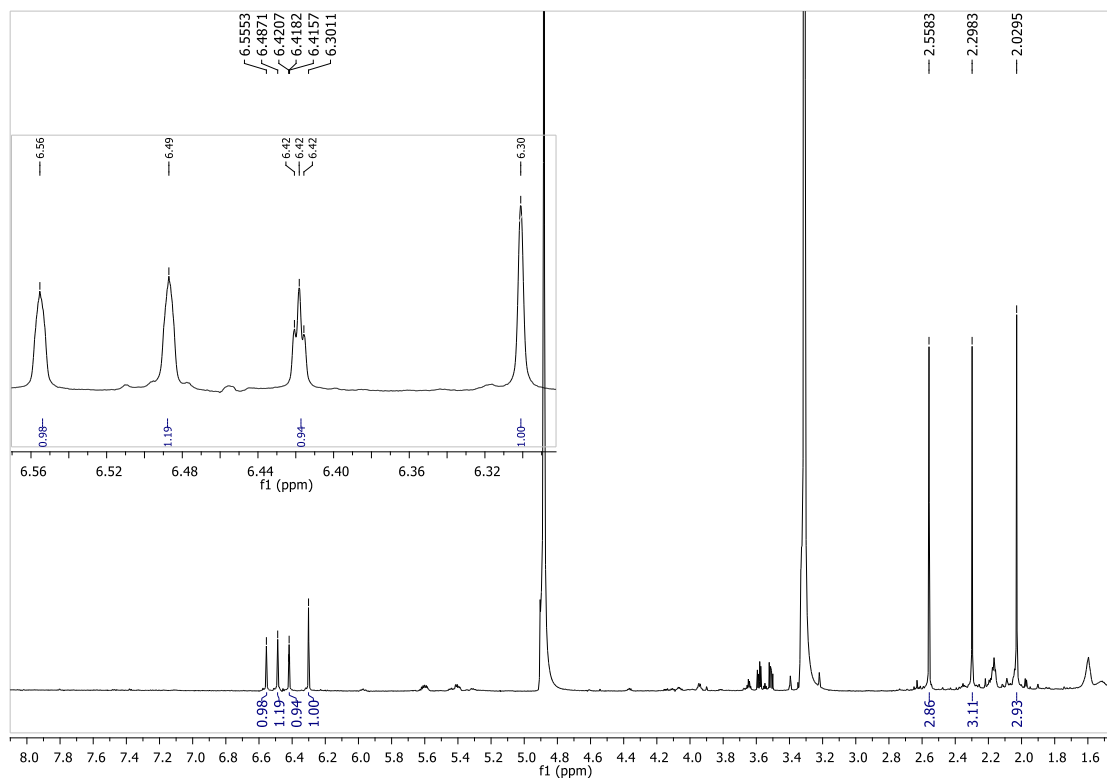


FIGURA 4.28 - Espectro de RMN de ^1H referente ao metabólito **6** (CD_3OD , 400 MHz)

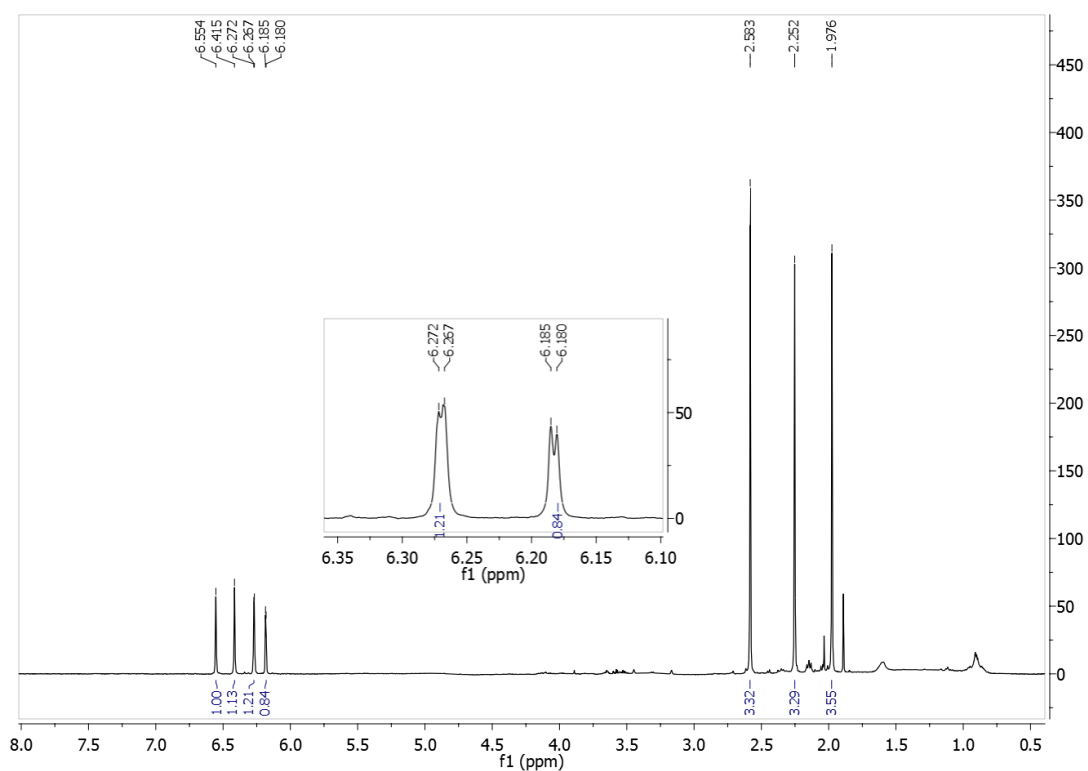


FIGURA 4.29 - Espectro de RMN de ^1H referente ao metabólito **7** (CD_3OD , 400 MHz)

Para os sete compostos, os valores de integração dos sinais de mais baixo campo magnético, revelaram a presença de apenas um núcleo para cada sinal, caracterizando assim, a ocorrência de hidrogênios aromáticos. Já para a região espectral de campo mais alto, três prótons foram evidenciados para todos os singletos. Portanto, em conformidade aos deslocamentos químicos observados, identificaram-se hidrogênios típicos de grupamentos metila. Tais informações corroboraram para que as estruturas moleculares dos metabólitos isolados de fato fossem atribuídas ao grupo dos depsídeos, haja vista o mesmo perfil espectral observado no estudo publicado anteriormente (DE MEDEIROS, et al., 2011) para os policetídeos produzido pelo fungo *Setophoma* sp.

Lançando-se mão das informações adicionais obtidas com os experimentos de ^{13}C e de RMN 2D, foram elucidadas as estruturas químicas dos sete metabólitos isolados conforme é exibido na figura (FIGURA 4.30). A nomenclatura destes compostos obedeceu a ordem alfabética dos compostos de maior similaridade estrutural encontrados na literatura, ou seja, as thielavinas e lecanorinas.

O detalhamento da continuidade do processo de elucidação estrutural é dado a seguir.

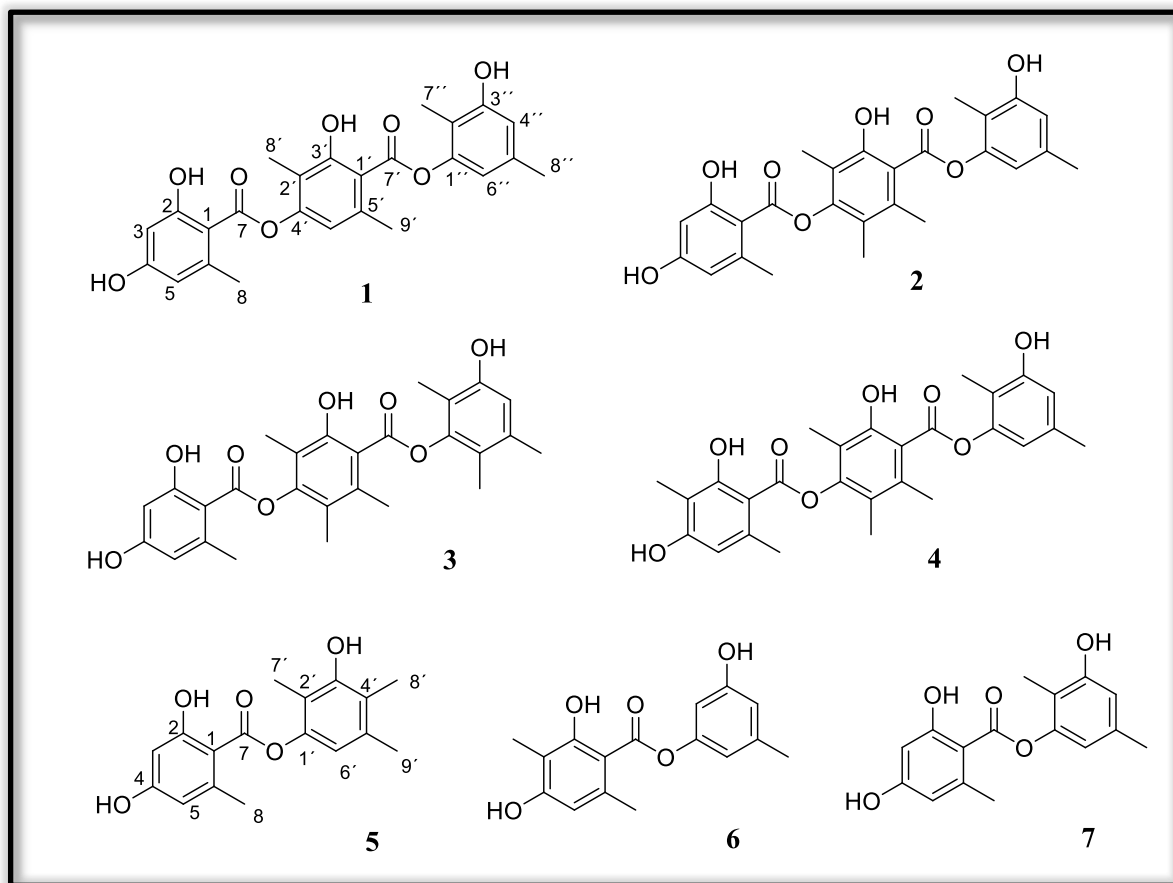


FIGURA 4.30 - Novos depsídeos produzidos pelo endófito de goiaba, *Setophoma* sp.: (1) Thielavina S; (2) Thielavina T; (3) Thielavina U; (4) Thielavina V; (5) Lecanorina D; (6) Lecanorin E (7) Lecanorina F

TABELA 4.2 - Dados de RMN de ^1H referentes aos compostos isolados 1-7. Metanol- d_4 ; δH em ppm, mult. (J em Hz)

Posição	1 ^{a)}	2 ^{b)}	3 ^{c)}	4 ^{a)}	5 ^{b)}	6 ^{c)}	7 ^{c)}
3	6.23, d_1 (2.4)	6.18, d_1 (2.3)	6.17, s	-	6.20, d_1 (2.5)	-	6.18, d_1 (2.5)
5	6.31, dd_1 (0.8, 2.4)	6.28, d_1 (1.7)	6.28, s	6.36, s	6.29, dd (1.0, 2.5)	6.30, s	6.27, d_1 (2.5)
6	-	-	-	-	-	-	2.58, s
8	2.60, s	2.62, s	2.63, s	2.05, s	2.61, s	2.03, s	-
9	-	-	-	2.63, s	-	2.56, s	-
2'	-	-	-	-	-	6.42, t_1 (2.0)	-
4'	-	-	-	-	-	6.49, s_1	6.41, s_1
5'	6.69, s	-	-	-	-	-	-
6'	-	-	-	-	6.57, s	6.56, s_1	6.55, s_1
7'	-	-	-	-	1.97, s	2.30, s	1.98, s
8'	2.09, s	2.09, s	2.09, s	2.07, s	1.98, s	-	2.25, s
9'	2.68, s	2.11, s	2.13, s	2.10, s	2.21, s	-	-
10'	-	2.54, s	2.63, s	2.54, s	-	-	-
4''	6.59, s	6.57, s	6.60, s	6.58, s	-	-	-
6''	6.48, s	6.50, s	-	6.50, s	-	-	-
7''	2.00, s	2.05, s	2.04, s	2.05, s	-	-	-
8''	2.27, s	2.27, s	2.24, s	2.27, s	-	-	-
9''	-	-	2.05, s	-	-	-	-

Experimento adquirido em a) 400 MHz, b) 500 MHz, c) 800 MHz; l = sinal alargado

Da mesma maneira, os espectros de RMN de ^{13}C obtidos para cada metabólito (FIGURA 4.31 à FIGURA 4.36), também confirmaram características espectrais típicas desta classe de compostos. Sinais observados entre os deslocamentos químicos de δc 102,3 à δc 144,4 puderam ser atribuídos aos núcleos carbônicos aromáticos sp^2 , bem como os sinais de δc 8,1 à δc 25,2 aos núcleos metílicos sp^3 , bastante blindados devido ao efeito de corrente de anel. Adicionalmente, os núcleos observados na faixa de δc 150,1 à δc 169 foram coerentes com a ocorrência de carbonos tipicamente ligados a heteroátomos, que no caso em questão, tratam-se de hidroxilas livres e em ligação de hidrogênio com carboxilas de éster. Tal

função orgânica pode ser confirmada na constituição estrutural dos policetídeos isolados, devido ao aparecimento de sinais cujos deslocamentos típicos de carboxila de éster apresentaram-se na faixa de 170 à 179 ppm. As atribuições dos núcleos carbônicos seguem detalhadas na TABELA 4.3 e na TABELA 4.4, detacando-se que para a substância lecanorin D (**5**), foram utilizados os espectros de projeção de RMN de ^{13}C referentes aos experimentos de HMBC e HSQC, ilustrados nas FIGURA 4.53 e FIGURA 4.54 respectivamente.

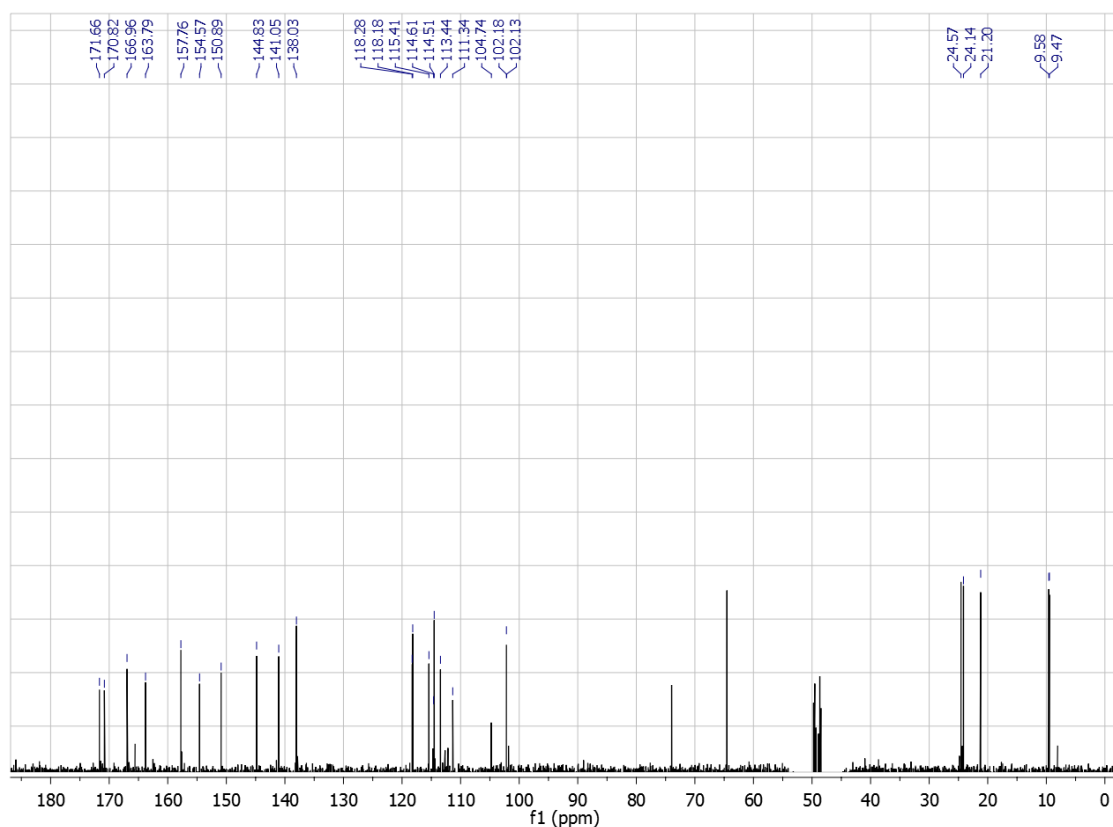


FIGURA 4.31 - Espectro de RMN de ^{13}C referente ao metabólito **1** (CD_3OD , 100 MHz)

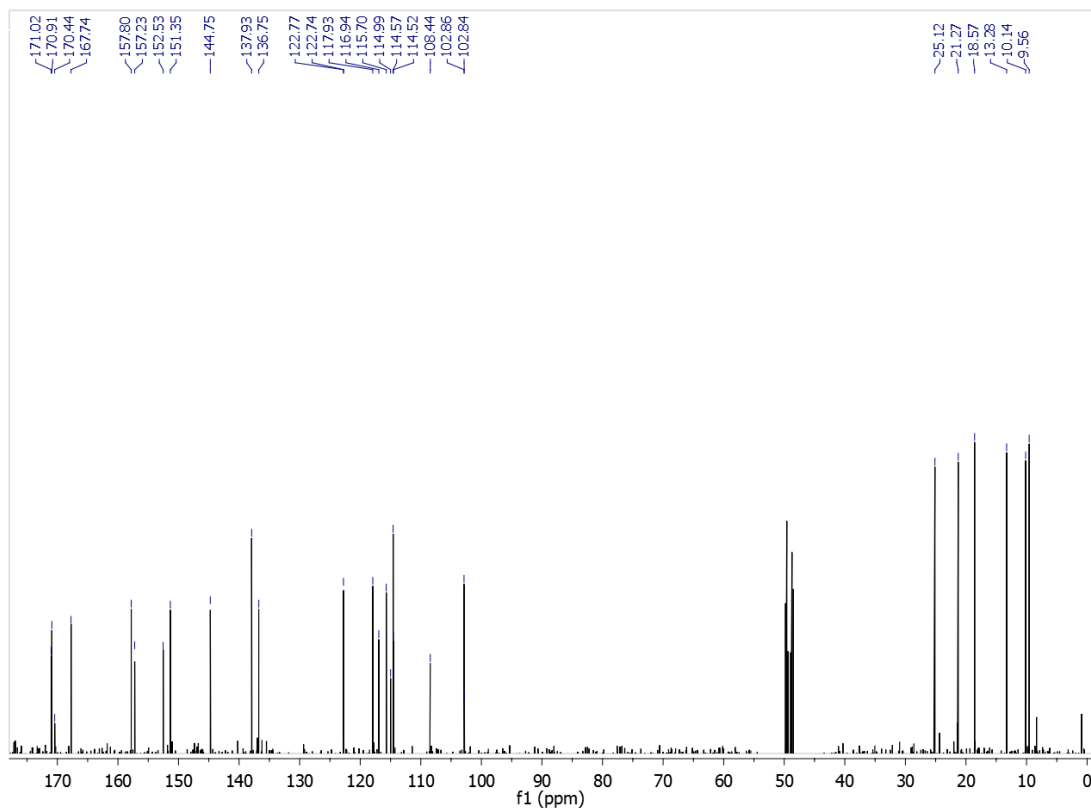


FIGURA 4.32 - Espectro de RMN de ^{13}C referente ao metabólito 2 (CD_3OD , 125 MHz)

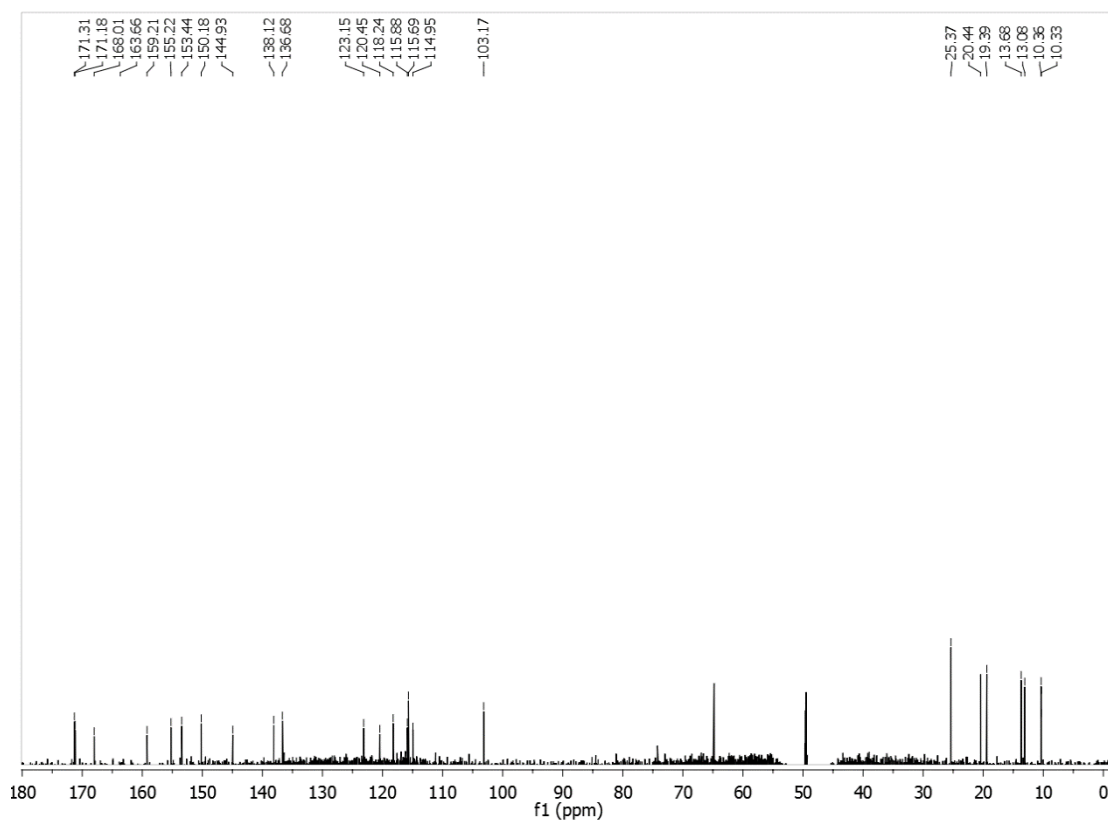


FIGURA 4.33 - Espectro de RMN de ^{13}C referente ao metabólito 3 (CD_3OD , 125 MHz)

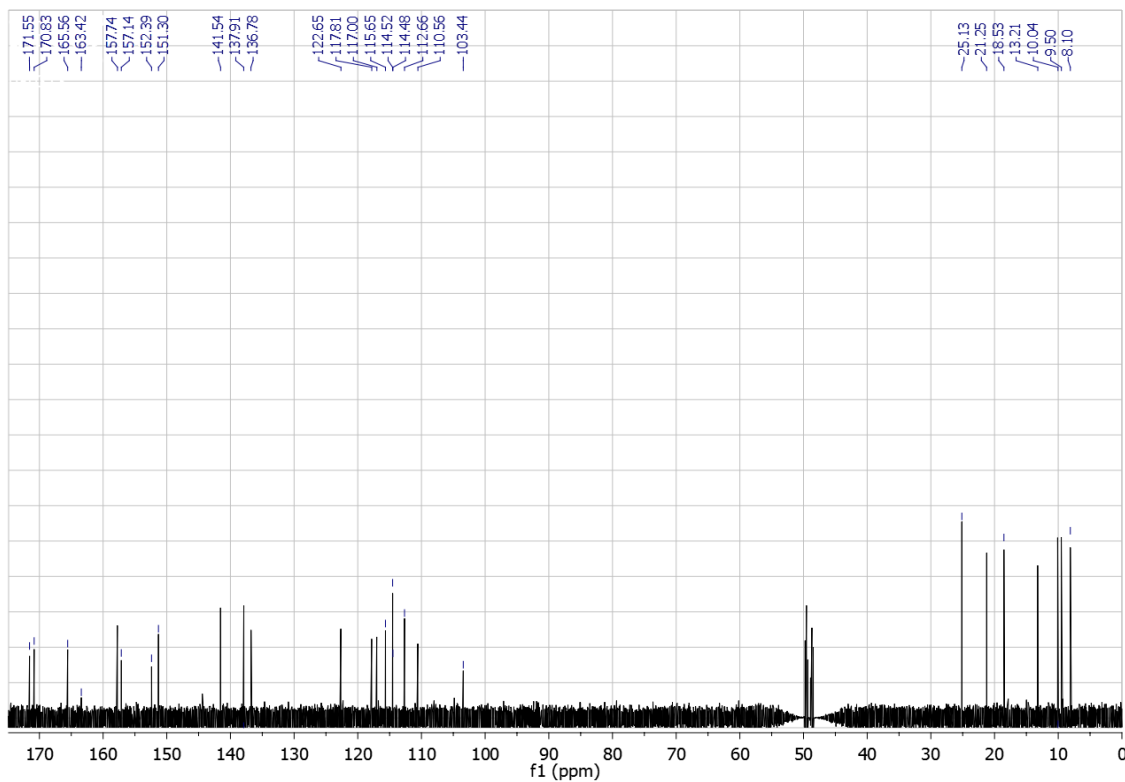


FIGURA 4.34 - Espectro de RMN de ^{13}C referente ao metabólito **4** (CD_3OD , 100 MHz)

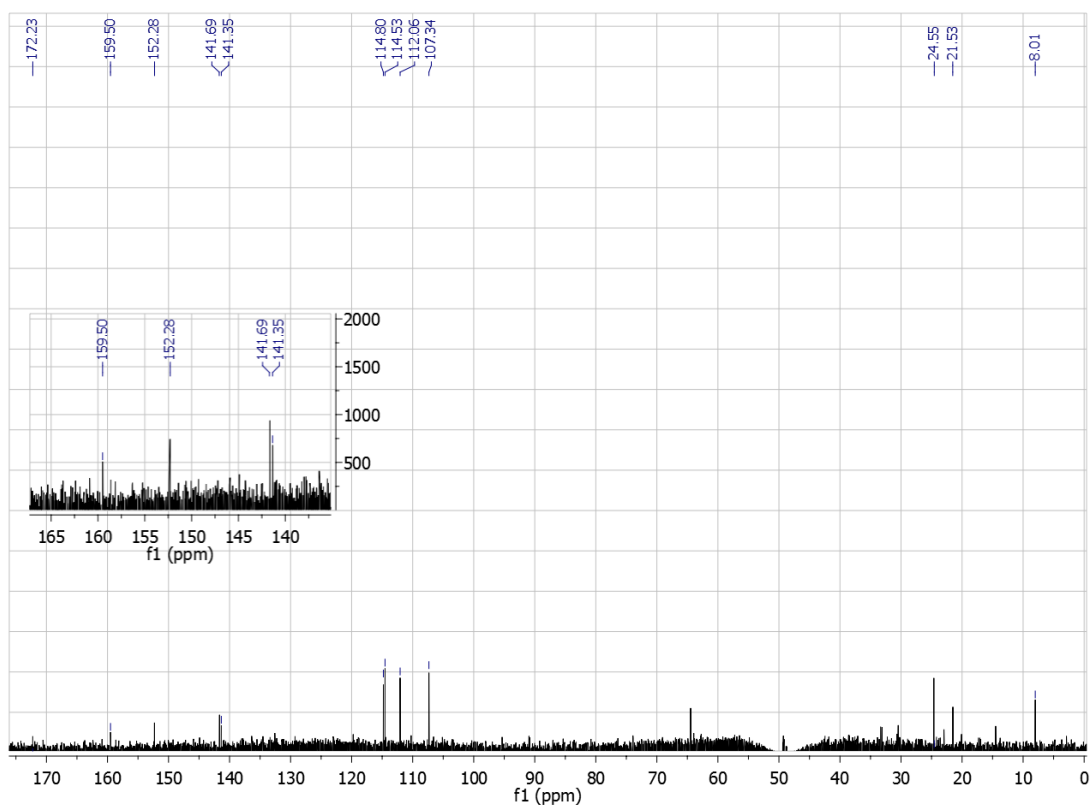


FIGURA 4.35 - Espectro de RMN de ^{13}C referente ao metabólito **6** (CD_3OD , 200 MHz)

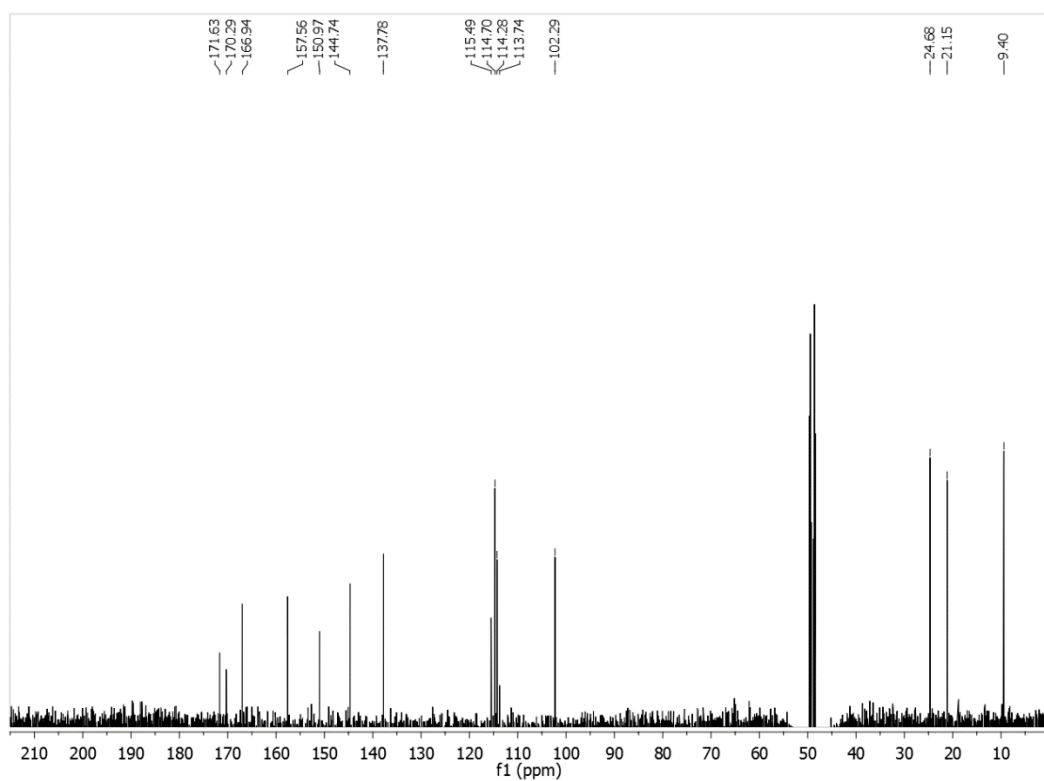


FIGURA 4.36 - Espectro de RMN de ^{13}C referente ao metabólito 7 (CD_3OD , 200 MHz)

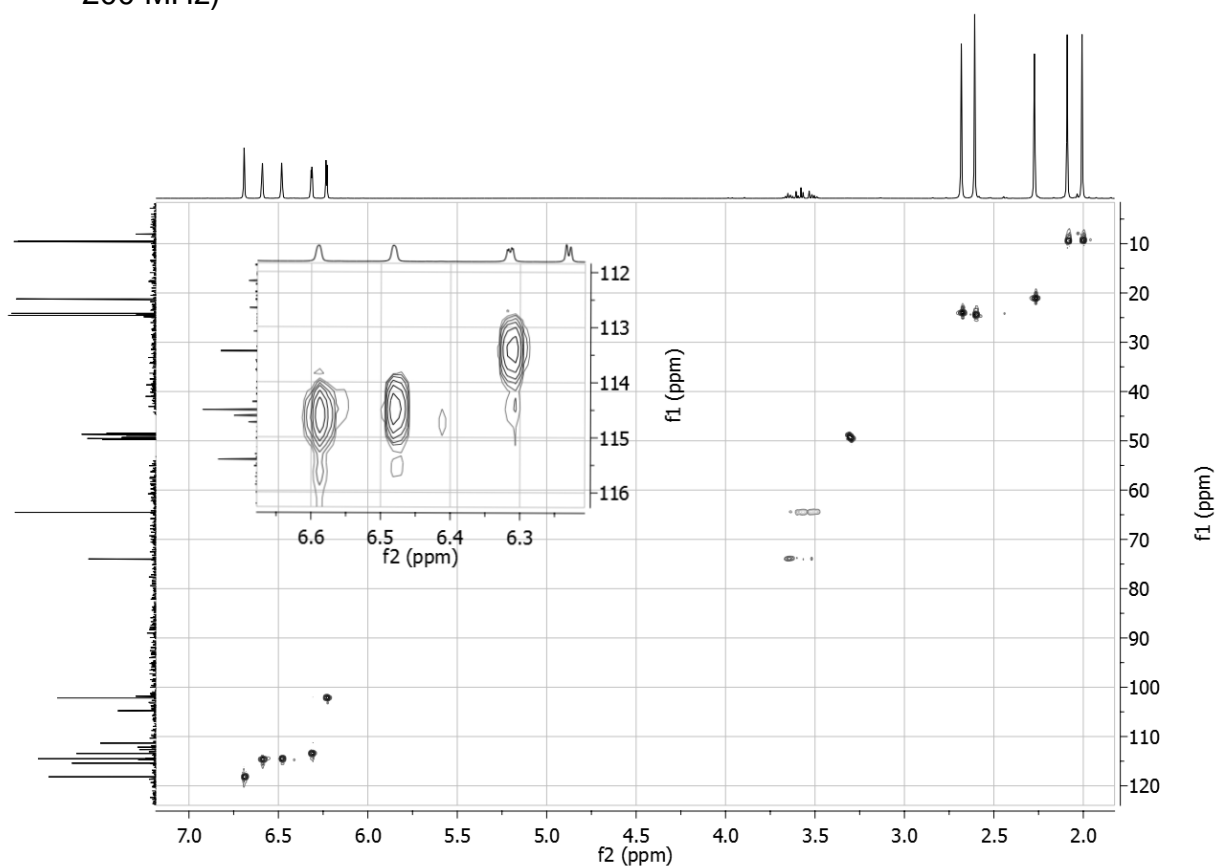


FIGURA 4.37 - Mapa de contorno do experimento de HSQC referente ao metabólito 1 (CD_3OD , 400MHz)

TABELA 4.3 - Dados de RN de ^{13}C e HMBC dos compostos **1-4** em metanol- d_4 , HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)

Position	1 ^{a)}		2 ^{b)}		3 ^{c)}		4 ^{a)}	
	δ_{C}	HMBC	δ_{C}	HMBC	δ_{C}	HMBC	δ_{C}	HMBC
1	104.8, C	-	102.7, C	-	102.7, C	-	103.5, C	-
2	167.0, C	-	167.7, C	-	168.0, C	-	165.6, C	-
3	102.2, CH	1, 2, 4, 5	102.8, CH	1, 5	103.1, CH	1, 2	110.6, C	-
4	165.6, C	-	170.4, C	-	163.6, C	-	163.4, C	-
5	113.4, CH	1, 3, 4, 8	114.9, CH	3, 8	115.0, CH	3, 8	112.7, CH	1, 3, 4, 9
6	144.9, C	-	144.7, C	5	144.9, C	-	141.6, C	-
7	170.8, C	-	171.0, C	-	171.3, C	-	171.6, C	-
8	24.6, CH ₃	1, 5, 6	25.1, CH ₃	1, 5, 6	25.4, CH ₃	1, 5, 6	9.5, CH ₃	2, 3, 4
9	-	-	-	-	-	-	25.2, CH ₃	1, 5, 6
1'	111.3, C	-	116.9, C	-	118.2, C	-	117.0, C	-
2'	163.8, C	-	157.2, C	-	159.2, C	-	157.1, C	-
3'	118.3, C	-	117.9, C	-	118.2, C	-	117.8, C	-
4'	154.6, C	-	152.5, C	-	153.4, C	-	152.4, C	-
5'	118.2, CH	1', 3', 4', 9'	122.7, C	-	123.1, C	-	122.7, C	-
6'	141.1, C	-	136.7, C	-	138.1, C	-	136.8, C	-
7'	171.7, C	-	170.9, C	-	171.2, C	-	170.8, C	-
8'	9.6, CH ₃	2', 3', 4'	10.1, CH ₃	2', 3', 4'	10.4, CH ₃	2', 3', 4'	10.1, CH ₃	2', 3', 4'
9'	24.2, CH ₃	1', 5', 6'	13.3, CH ₃	4', 5', 6'	13.7, CH ₃	4', 5', 6'	13.2, CH ₃	4', 5', 6'
10'	-	-	18.6, CH ₃	1', 5', 6'	19.3, CH ₃	1', 5', 6'	18.5, CH ₃	1', 5', 6'
1''	157.8, C	-	151.3, C	-	150.1, C	-	151.3, C	-
2''	115.4, C	-	115.6, C	-	115.9, C	-	115.7, C	-
3''	150.9, C	-	157.7, C	-	155.2, C	-	157.8, C	-
4''	114.7, CH	2'', 8''	114.5, CH	6'', 8''	115.7, CH	2'', 3'', 6'', 8''	114.5, CH	2'', 3'', 6'', 8''
5''	138.0, C	-	137.9, C	4'', 5''	136.7, C	-	137.9, C	-
6''	114.6, CH	1'', 2'', 8''	114.6, CH	1'', 8''	120.3, C	-	114.6, CH	1'', 2'', 4'', 8''
7''	9.5, CH ₃	1'', 2'', 3''	9.6, CH ₃	1'', 2'', 3''	10.3, CH ₃	1'', 2'', 3''	8.10, CH ₃	1'', 2'', 3''
8''	21.2, CH ₃	4'', 5''	21.3, CH ₃	4'', 6''	20.4, CH ₃	4'', 5'', 6''	21.3, CH ₃	5''
9''	-	-	-	-	13.0, CH ₃	1'', 5'', 6''	-	-

Dados adquiridos em: ^{a)} 100 MHz, ^{b)} 125 MHz, ^{c)} 200 MHz

TABELA 4.4 - Dados de RMN de ^{13}C e HMBC dos compostos **5-7** em metanol- d_4 , HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)

Position	5 ^{b)}		6 ^{c)}		7 ^{c)}	
	δ_{C}	HMBC	δ_{C}	HMBC	δ_{C}	HMBC
1	103.5, C	-	104.4, C	-	104.4, C	-
2	166.8, C	-	164.8, C	-	170.3, C	-
3	102.3, CH	1, 2, 5	110.2, C	-	102.3, CH	1, 5
4	166.3, C	-	162.3, C	-	167.0, C	-
5	113.9, CH	1, 3, 8	112.0, CH	1, 3,4, 9	113.8, CH	1, 3, 8
6	144.8, C	-	141.3, C	-	144.7, CH ₃	8
7	-	-	172.2, C	-	171.7, C	-
8	24.7, CH ₃	1, 5, 6	8.0, CH ₃	2, 3, 4	24.6, C	1,5,6
9	-	-	24.7, CH ₃	1,5,6	-	-
1'	155.2, C	-	159.0, C	-	157.6, C	-
2'	115.1, C	-	107.3, CH	3', 6'	115.5, C	-
3'	149.4, C	-	152.0, C	-	151.0, C	-
4'	114.5, CH	-	114.5, CH	-	114.7, C	3', 6', 8'
5'	121.6, C	-	141.6, C	2', 3', 6', 7'	137.8, C	-
6'	115.0, CH	1', 2', 5', 9'	114.7, CH	2', 4'	114.3, C	4', 8'
7'	9.7, CH ₃	1', 2', 3'	21.5, CH ₃	4', 6'	9.4, CH ₃	1', 2', 3'
8'	12.3, CH ₃	4', 5'	-	-	21.1, CH ₃	4', 5', 6'
9'	19.8, CH ₃	4', 5', 6'	-	-	-	-

Recorded at a) 100 MHz, b) 125 MHz, c) 200 MHz

Remetendo-se às análises de *full scan* em HRMS, a composição elementar encontrada nas para os íons pseudomoleculares $[\text{M}-\text{H}]^-$ de cada analito, forneceram quatorze graus de instauração para os compostos **1** ($\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{O}_8$), **2** ($\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{O}_8$), **3** e **4** ($\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{O}_8$) enquanto que para os demais compostos, **5** ($\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_5$), **6** e **7** ($\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_5$), nove graus de instauração foram sugeridos. Com relação a **1**, **2**, **3** e **4**, tais informações corresponderam a propostas de três anéis aromáticos conectados por ligações éster, contendo quatro grupos hidroxilas como substituintes. De maneira semelhante, para os metabólitos **5**, **6** e **7**, as composições elementares confirmam a disposição de dois anéis conectados por uma unidade carboxílica e três hidroxilas como substituintes.

Deve-se enfatizar que as correlações heteronucleares observadas nos experimentos de HSQC e HMBC foram fundamentais para a elucidação estrutural dos compostos, tendo em vista a inviabilidade de outros experimentos, já que estes seriam pouco informativos devido à configuração espacial e estrutural dos metabólitos

isolados. Os resultados de correlações em longa distância J^2 , J^3 e J^4 HMBC observadas, bem como as atribuições de sinais de RMN de ^{13}C encontram-se detalhados na TABELA 4.3 para os compostos **1**, **2**, **3** e **4**, e na TABELA 4.4 para **5**, **6** e **7**.

Devido a notável similaridade espectral entre os dados de RMN obtidos para os metabólitos isolados, o detalhamento da atribuição dos sinais referente à thielavina S (**1**) será tomado com referência para os demais depsídeos.

Como ponto de partida, foram atribuídos os sinais dos hidrogênios diretamente ligados aos carbonos sp^2 aromáticos e também os núcleos metílicos através das correlações evidenciadas nos mapas de HSQC. Todas as atribuições podem ser verificadas pelo detalhamento do posicionamento dos núcleos de ^1H aos núcleos de ^{13}C (TABELA 4.3 e TABELA 4.4).

Na sequência, um ponto chave para a elucidação estrutural do composto Thielavin S (**1**) e dos demais depsídeos e tridepsídeos (denominação comum de depsídeos constituídos por três anéis) foi a atribuição inicial dos sinais referentes aos núcleos carbônicos responsáveis pela ligação entre os anéis aromáticos, C1, C-4', C-1' e C-1'' como ponto de partida. Ou seja, o estabelecimento dos sinais intrínsecos aos núcleos diretamente ligados às carboxilas de éster, conectoras dos anéis A e B, bem como do anel B com o sistema C.

Especificamente para o composto **1**, os deslocamentos químicos visualizados em 104,8 e 111,3 ppm puderam ser atribuídos aos núcleos vizinhos à porção carbonílica de éster (carbonos C-1 e C-1'' respectivamente), enquanto que os sinais mais desblindados, 154,6 e 157,8 ppm corresponderam aos átomos ligados aos heteroátomos remanescentes da porção fenólica que origina a unidade de éster.

Na continuidade do processo de elucidação estrutural, o mapa de contorno de HMBC de **1** (FIGURA 4.38) mostrou correlações a longa distância pertinentes a um sistema 6-metil benzeno-2,4-dioxigenado, o qual foi atribuído ao anel aromático A do esqueleto policetídeo. A oxigenação dos substituintes em C-2 e C-4 foi confirmada pelos deslocamentos típicos de carbonos carbinólicos sp^2 em δ_{C} 167,0 e δ_{C} 165,6 respectivamente. Conjuntamente, a proposta para tal disposição foi corroborada pelas correlações do próton H-3 (δ_{H} 6,23) com C-1 (δ_{C} 104,8), C-2 (δ_{C} 167,0), C-4 (δ_{C} 165,6), C-5 (δ_{C} 113,4), H-5 (δ_{H} 6,31) com C-1 (δ_{C} 104,8), C-3 (δ_{C} 102,2), C-4 (δ_{C} 165,6), C-8 (δ_{C} 24,6) e finalmente dos núcleos metílicos CH_3 -6 (δ_{H} 2,60) com C-1 (δ_{C} 154,6), C-5 (δ_{C} 113,4), C-6 (δ_{C} 144,9).

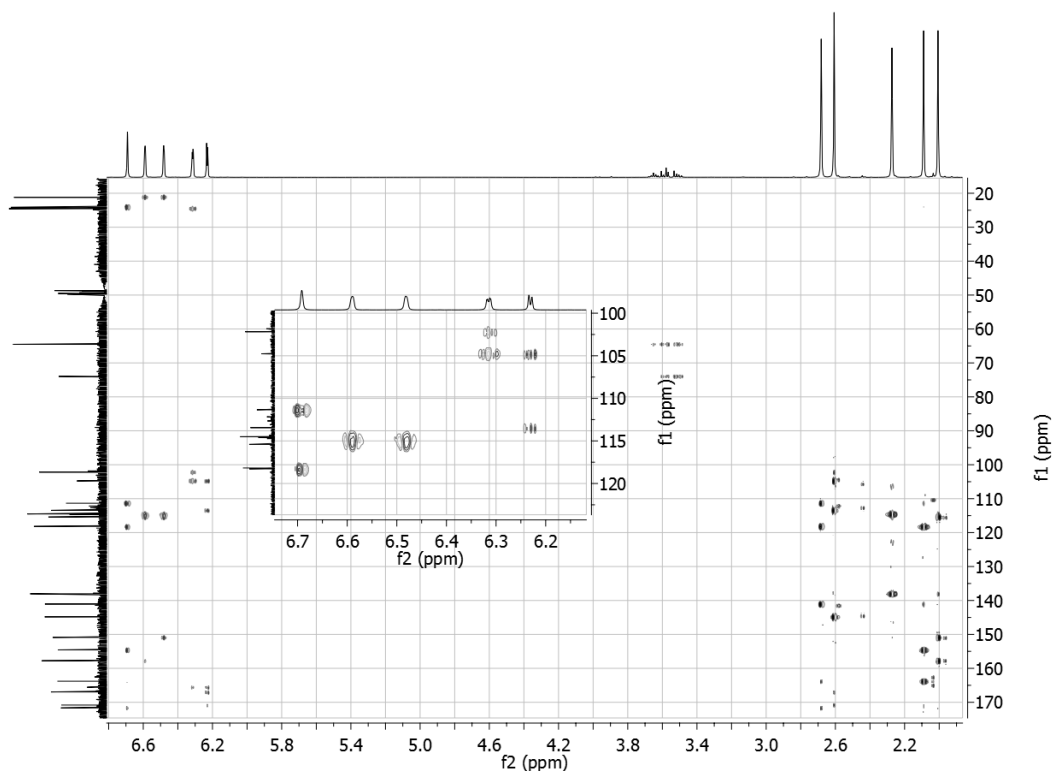


FIGURA 4.38 - Mapa de contorno do experimento de HMBC referente ao metabólito 1 (CD_3OD , 400 MHz)

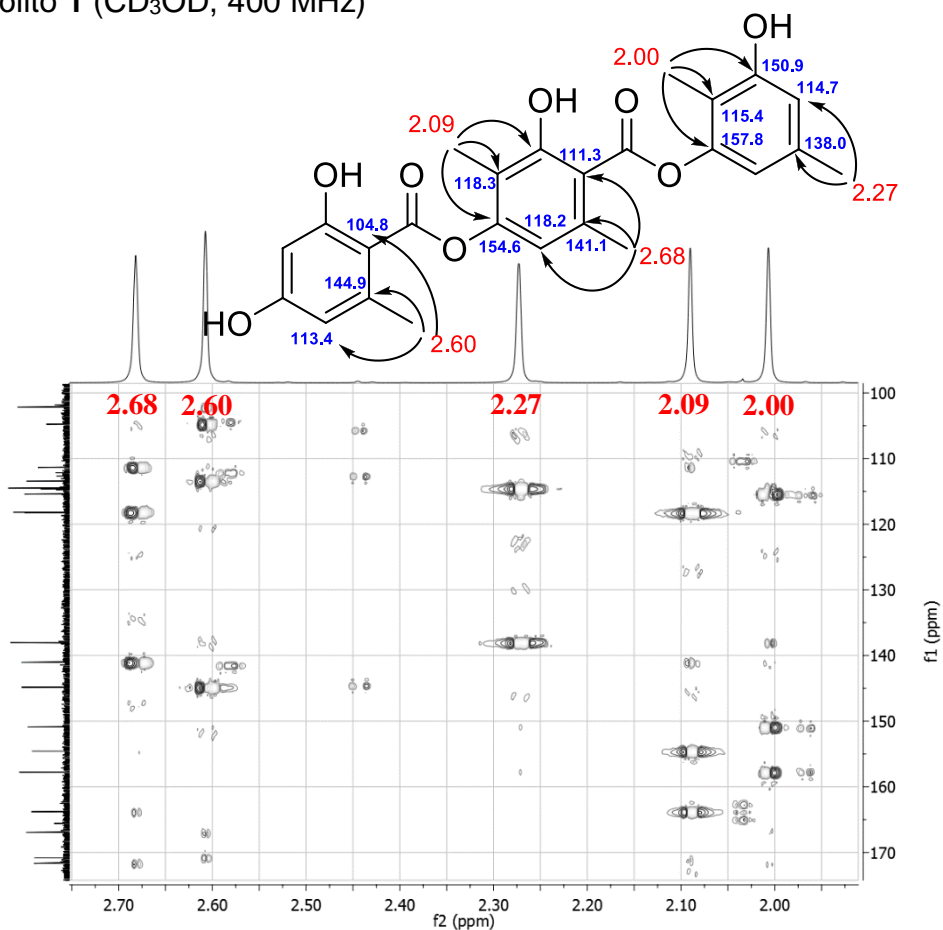


FIGURA 4.39 - Ampliação do mapa de contorno do experimento de HMBC referente ao metabólito 1 (CD_3OD , 400MHz)

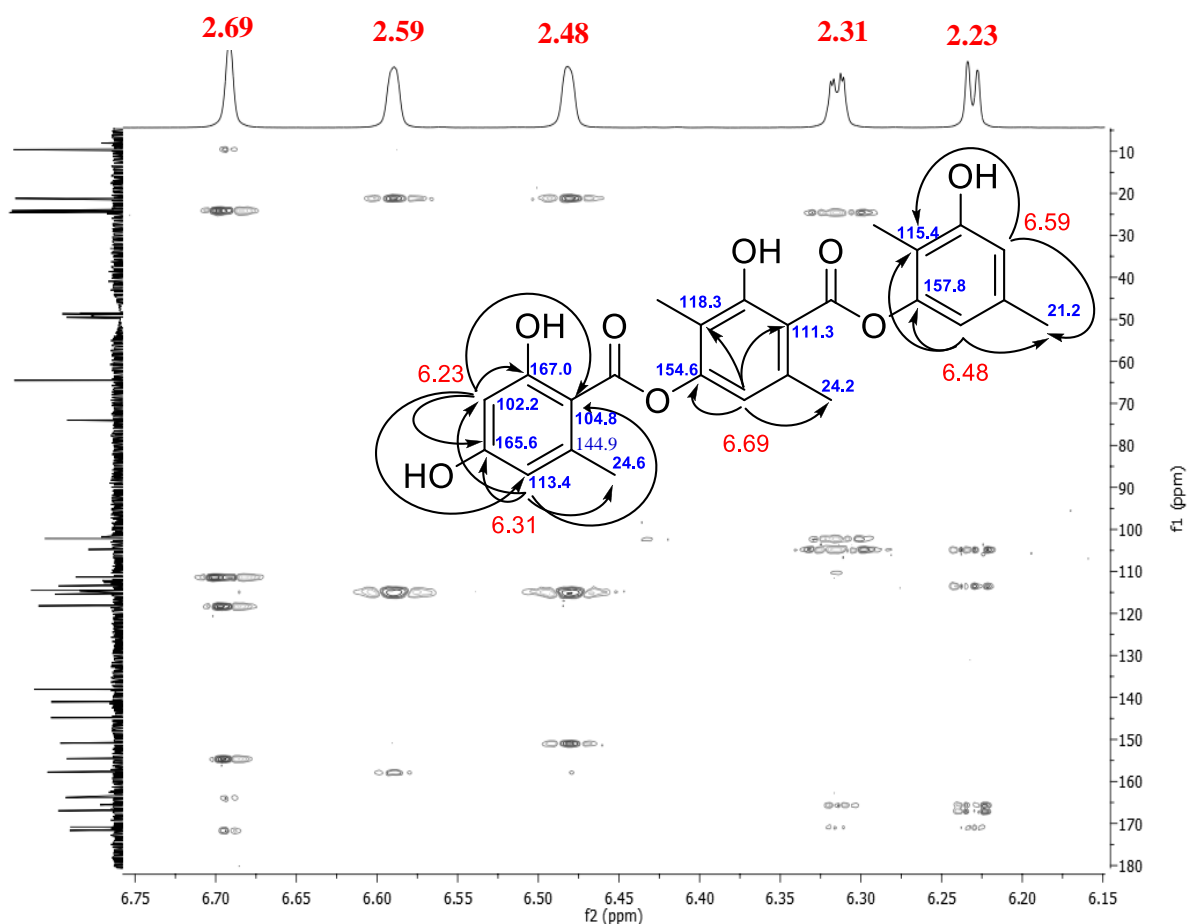


FIGURA 4.40 - Ampliação do mapa de contorno do experimento de HMBC referente ao metabólito 1 (CD₃OD, 400MHz)

Um duplo dubleto em δ_H 6,31 ($J = 2.4, 0.8$ Hz) foi caracterizado pelo acoplamento em *meta* do núcleo H-5 com os núcleos H-3 (δ_H 6,23) e CH₃-8 (δ_H 2,60), sugerindo o a posição relativa do próton H-5 entre os carbonos C-4 (δ_C 165,6) e C-6 (δ_C 144,9) diretamente ligados aos núcleos substituintes mencionados (HO-3 e CH₃-8).

Já o posicionamento do único grupo metílico CH₃-8 em conexão ao carbono C-6 (δ_C 144,9), pôde ser atribuído pelas correlações α e β dos hidrogênios de CH₃-8 com C-1 (δ_C 104,8), C-5 (δ_C 113,4) e C-6 (δ_C 144,9).

As interações remanescentes encontradas no mapa de HMBC indicaram o posicionamento da metila CH₃-8' (δ_H 2,09) em orientação *para* com a metila CH₃-9' (δ_H 2,8), no anel aromático B. Tal constatação deveu-se às correlações de CH₃-8' com C-2' (δ_C 163,8), C-3' (δ_C 118,3) e C-4' (δ_C 154,6), o que permitiu o posicionamento de tal grupo metílico em ligação direta ao carbono C-3'. De forma

adicional, as correlações de CH₃-9' (δ_H 2,68) com C-1' (δ_C 111,3), C-5' (δ_C 118,2) e C-6' (δ_C 141,1), caracterizaram a ligação de tal metila junto ao núcleo C-6'.

De forma análoga, ao que se refere à disposição dos substituintes no anel C, pôde-se sugerir a disposição em orientação *para* das metilas remanescentes devido às correlações a longa distância de CH₃-7'' (δ_H 2,00) com C1'' (δ_C 157,8), C-2'' (δ_C 115,4) e C-3'' (δ_C 150,9), o que lhe conferiu ser grupo substituinte do carbono C-2'', e por fim, as correlações de CH₃-8'' (δ_H 2,27) com C4'' (δ_C 114,7) e C-5'' (δ_C 138,0), localizando tal grupo metílico ligado ao núcleo C-5''. As interações encontradas para os hidrogênios adjacentes H-4'' e H-6'' (FIGURA 4.40) também corroboraram para a proposta.

Com relação aos demais compostos isolados, os espectros de HSQC e HMBC apresentados a seguir, mostram os dados obtidos nos experimentos de RMN em 2 dimensões para os metabólitos **2** à **7**. Estes foram utilizados para a elucidação das respectivas moléculas, cujo detalhamento da atribuição de sinais encontra-se nas TABELA 4.3 e TABELA 4.4. Um resumo de todas as correlações de HMBC observadas para todos os metabólitos mencionados, pode ser visualizado na figura abaixo:

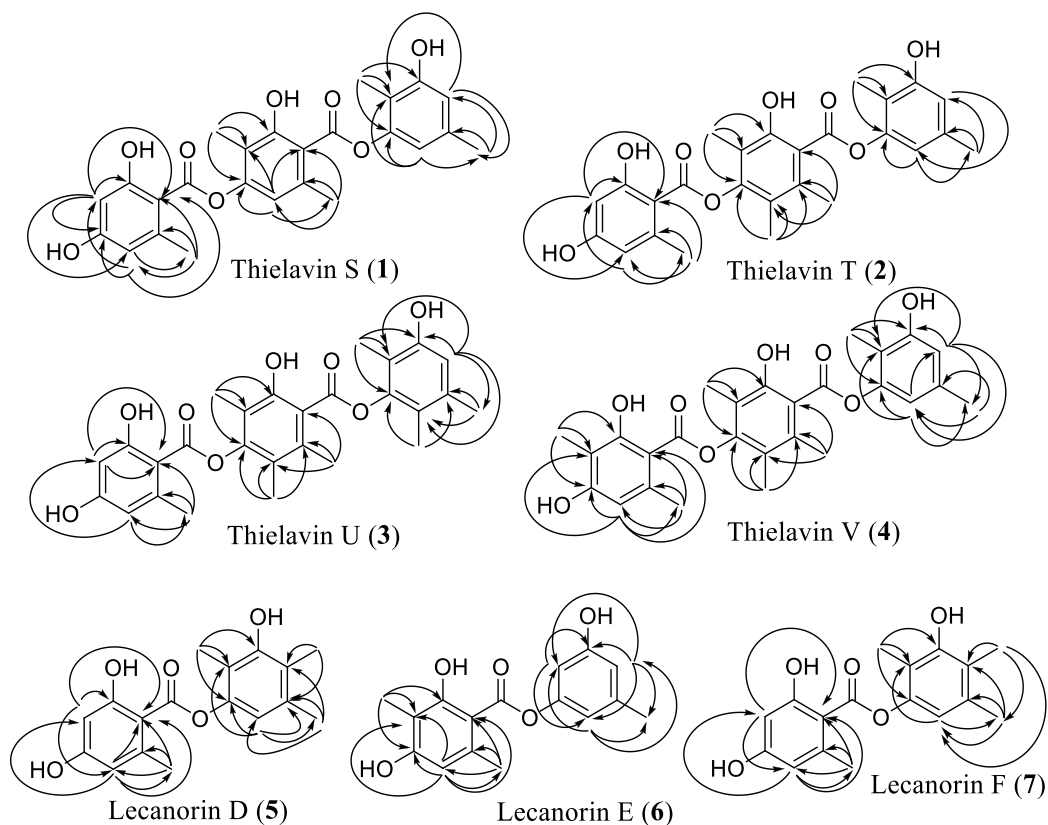


FIGURA 4.41 - Correlações de HMBC observadas para os compostos de **1** à **7**

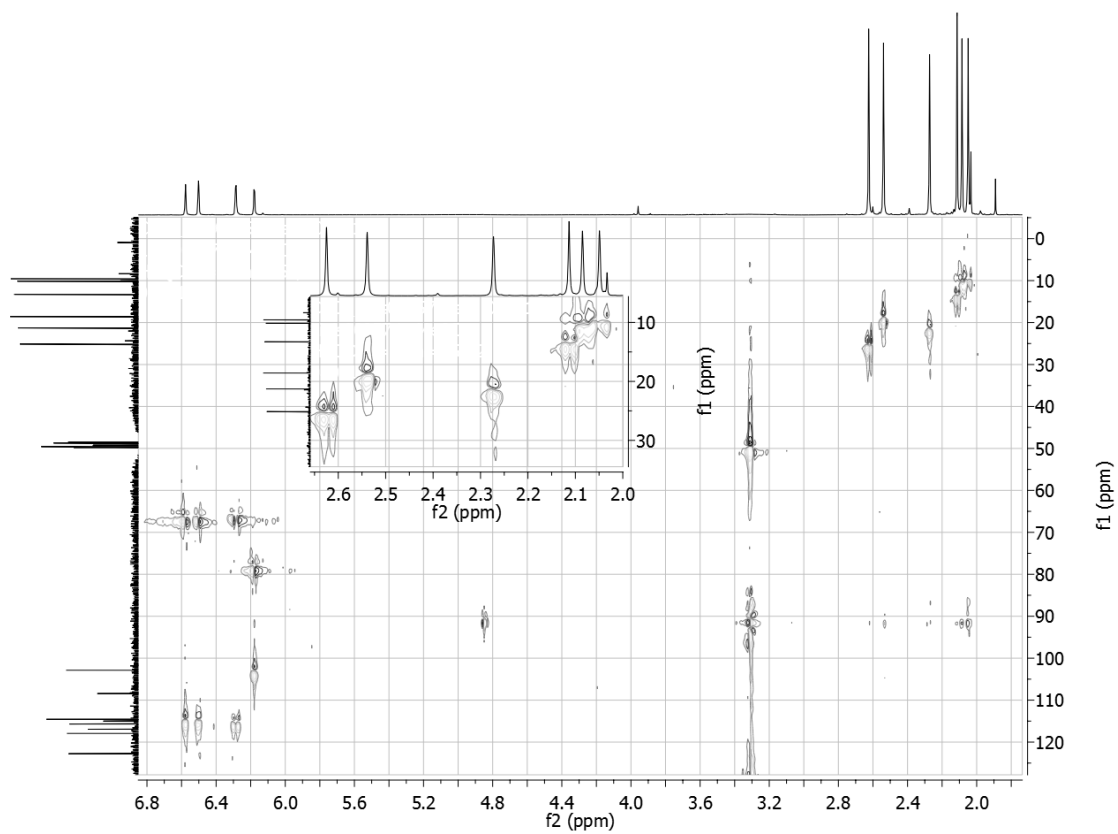


FIGURA 4.42 - Mapa de contorno do experimento de HSQC (e ampliação) referente ao metabólito **2** (CD₃OD, 500MHz)

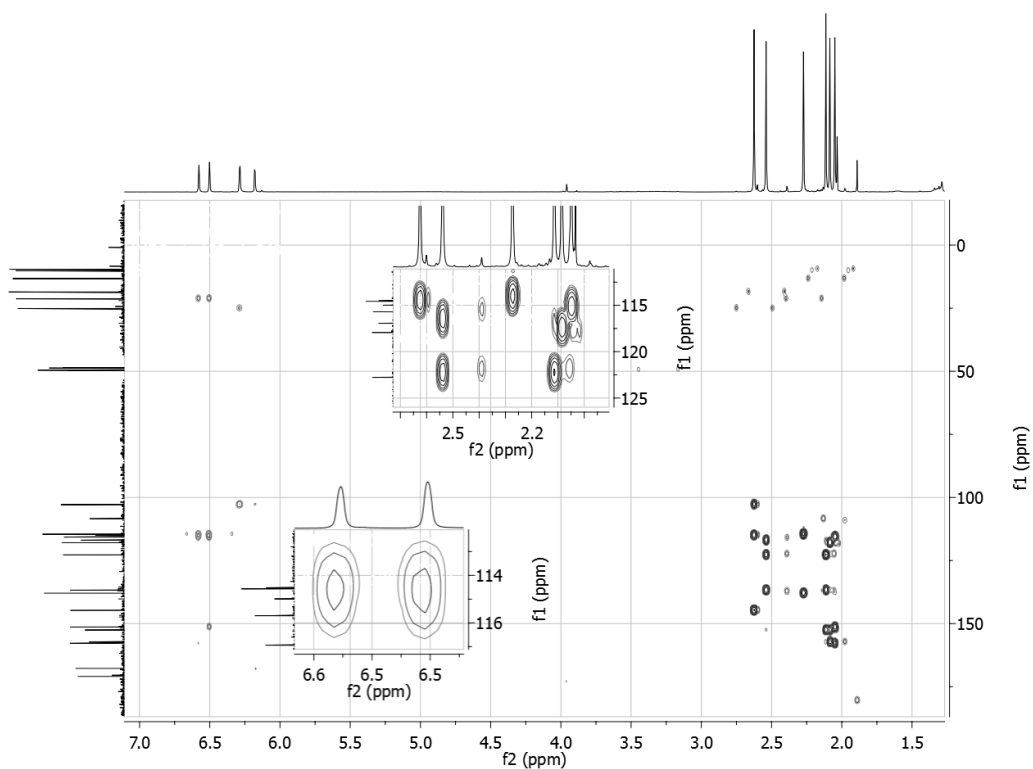


FIGURA 4.43 - Mapa de contorno do experimento de HMBC (e ampliações) referente ao metabólito 2 (CD₃OD, 500MHz)

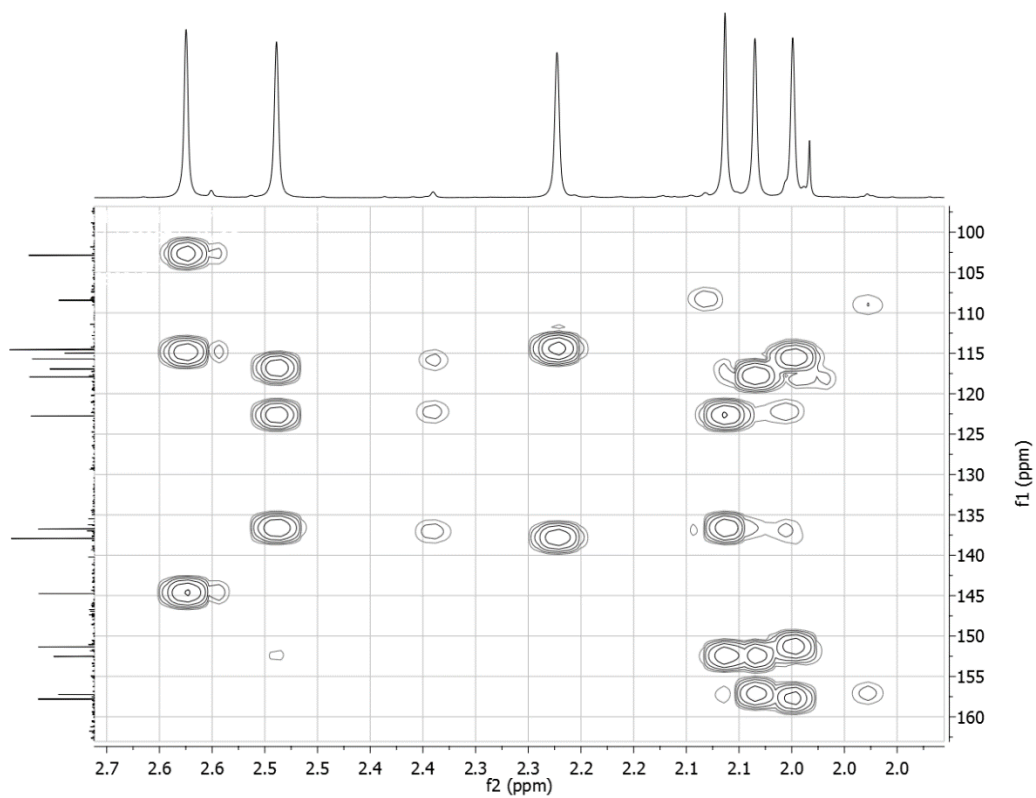


FIGURA 4.44 - Ampliação do mapa de contorno do experimento de HMBC referente ao metabólito 2 (CD₃OD, 500MHz)

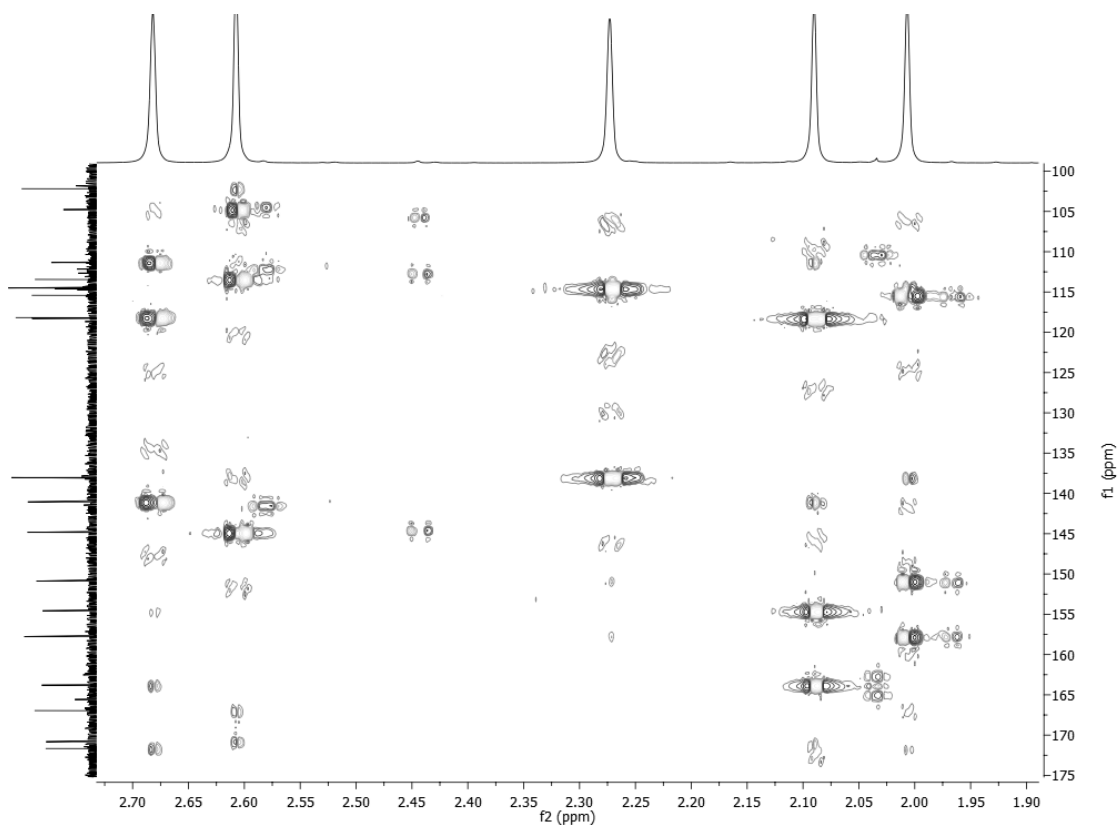


FIGURA 4.45 - Ampliação do mapa de contorno do experimento de HMBC referente ao metabólito **2** (CD₃OD, 500MHz)

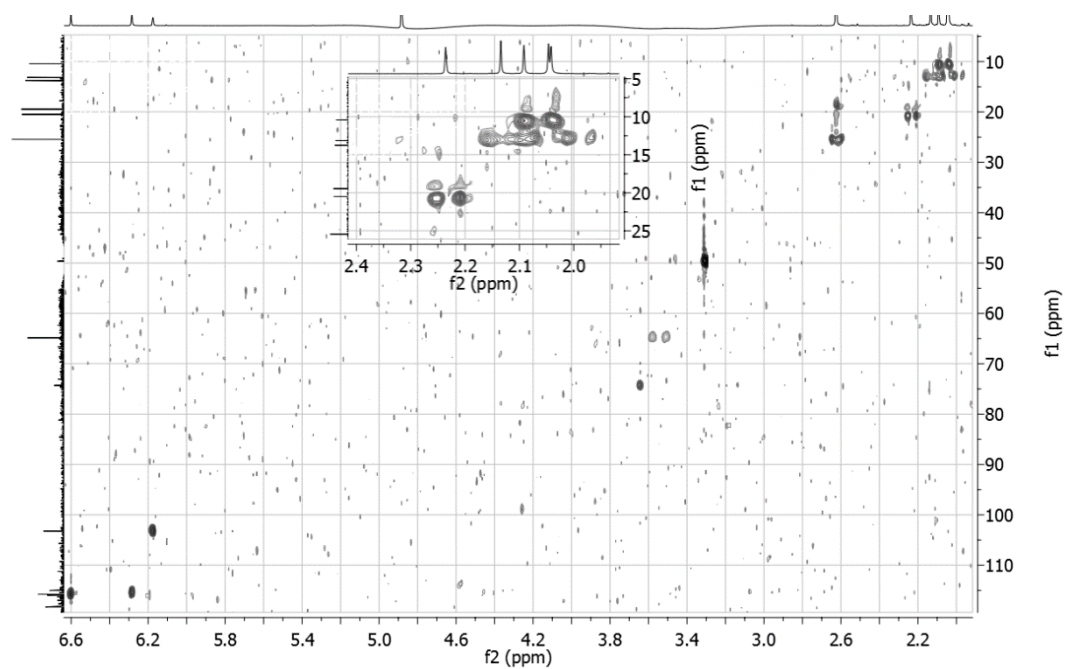


FIGURA 4.46 - Mapa de contorno do experimento de HSQC (e ampliação) referente ao metabólito **3** (CD₃OD, 800MHz)

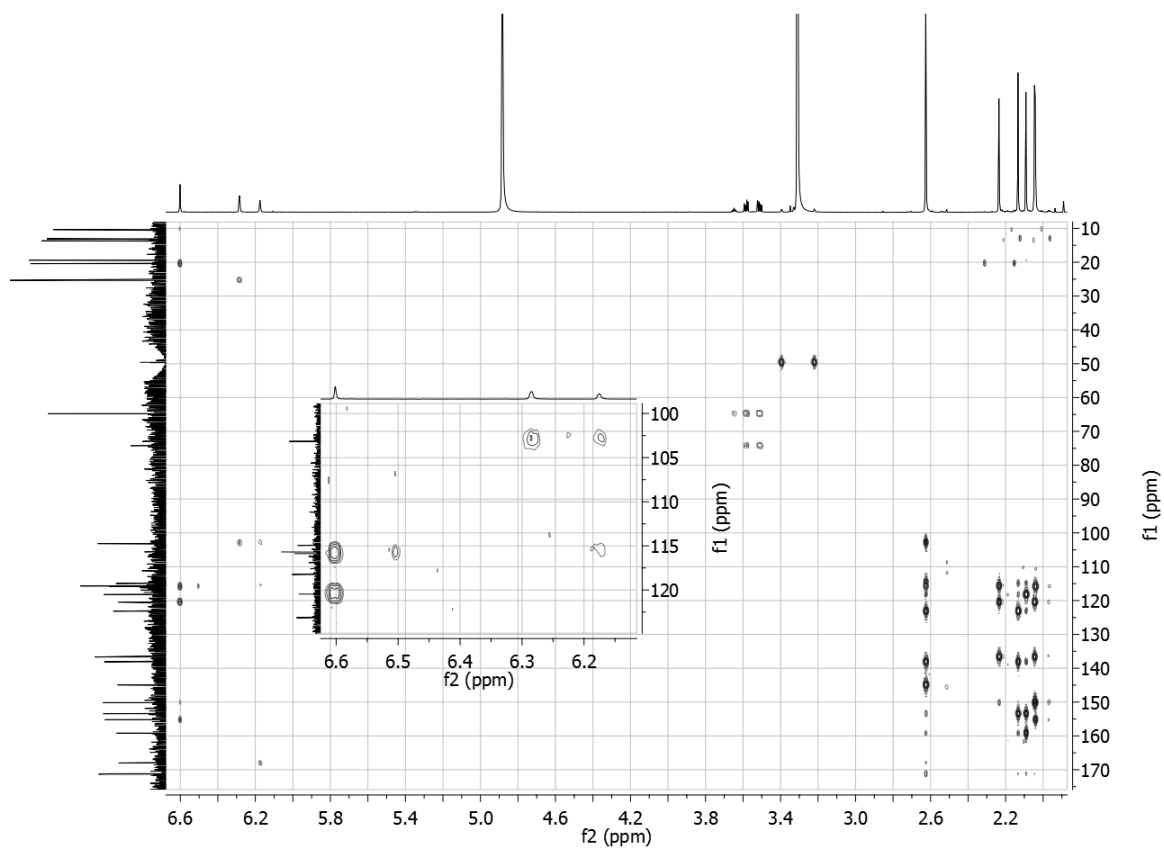


FIGURA 4.47 - Mapa de contorno do experimento de HMBC (e ampliação) referente ao metabólito **3** (CD₃OD, 800MHz)

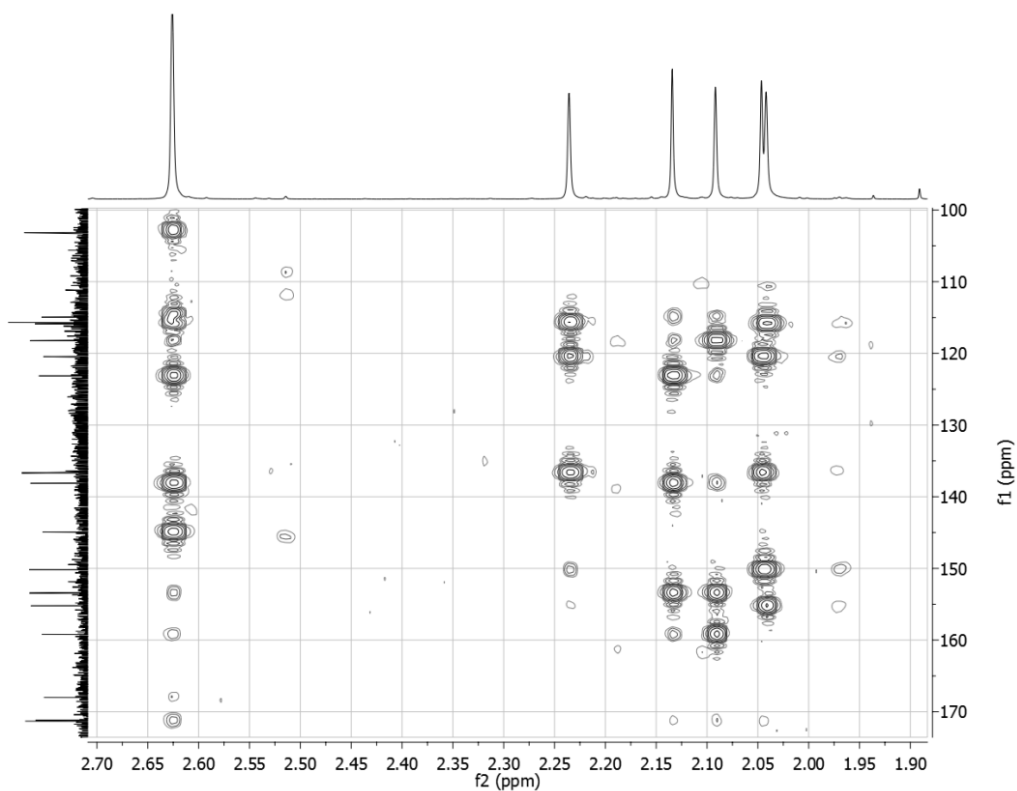


FIGURA 4.48 - Ampliação do mapa de contorno do experimento de HMBC referente ao metabólito **3** (CD₃OD, 800MHz)

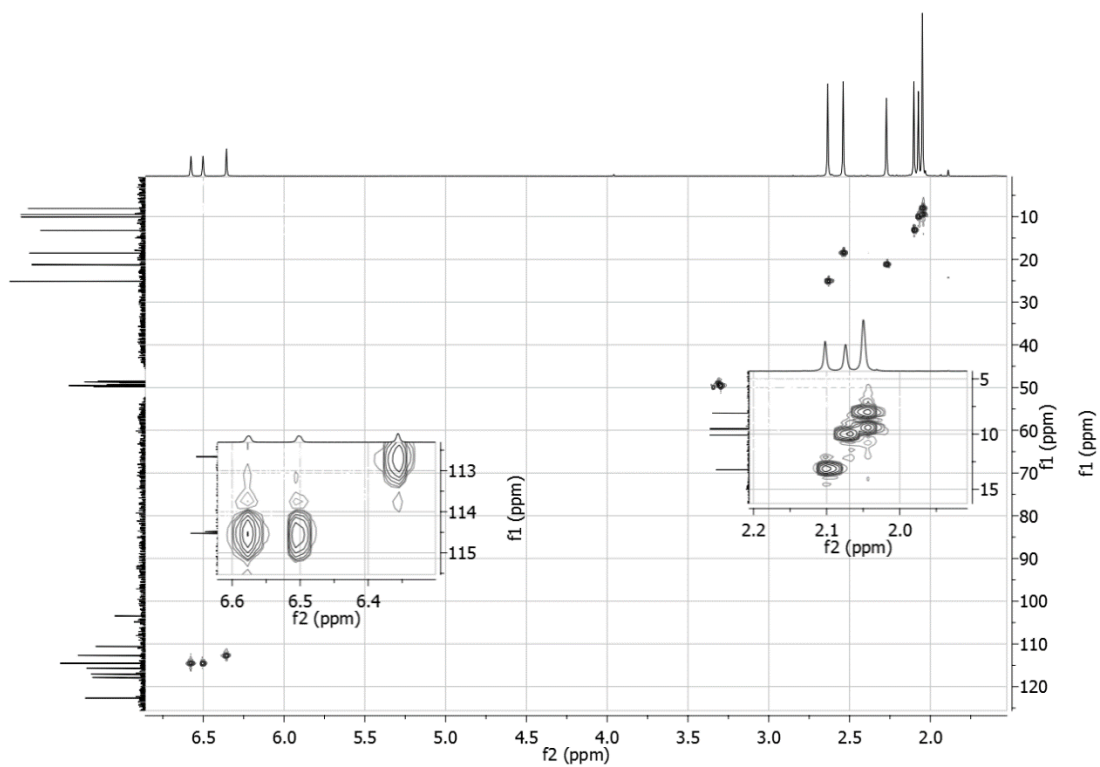


FIGURA 4.49 - Mapa de contorno do experimento de HSQC referente ao metabólito **4** (CD₃OD, 400MHz)

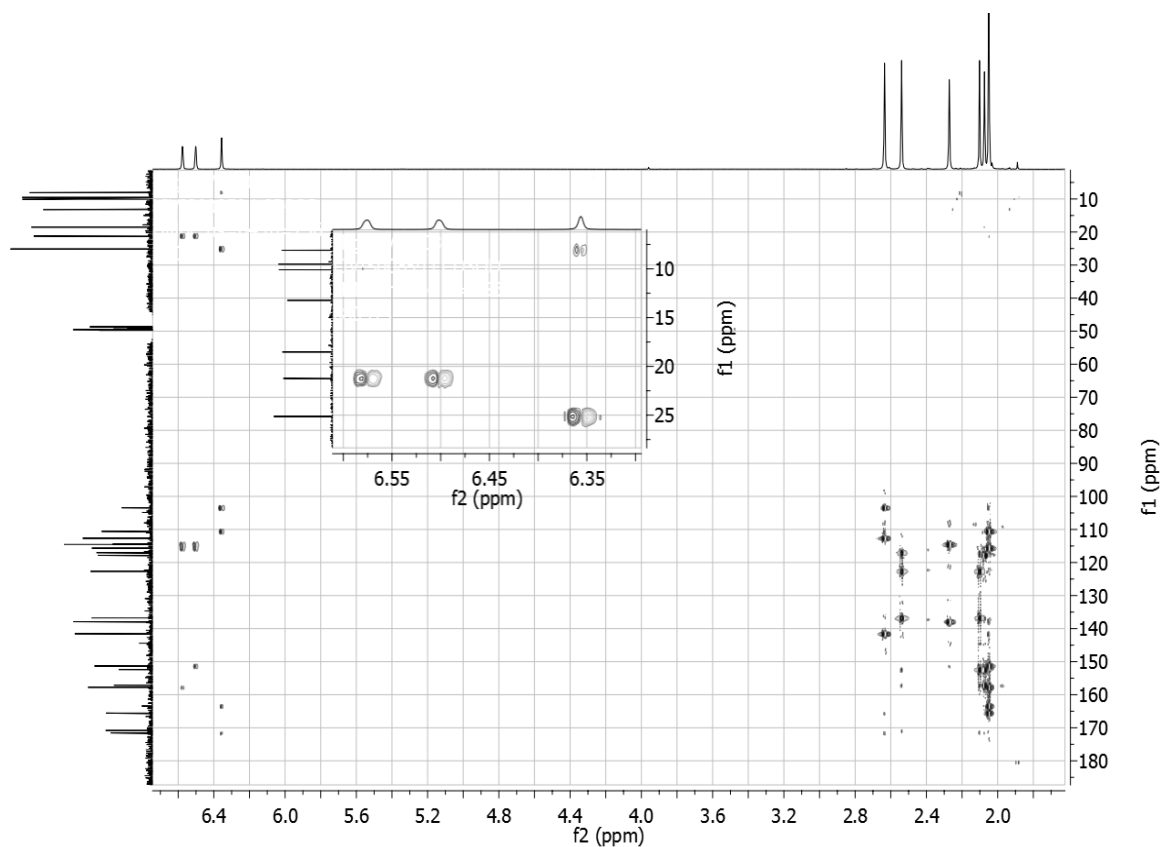


FIGURA 4.50 - Mapa de contorno do experimento de HMBC referente ao metabólito **4** (CD₃OD, 400MHz)

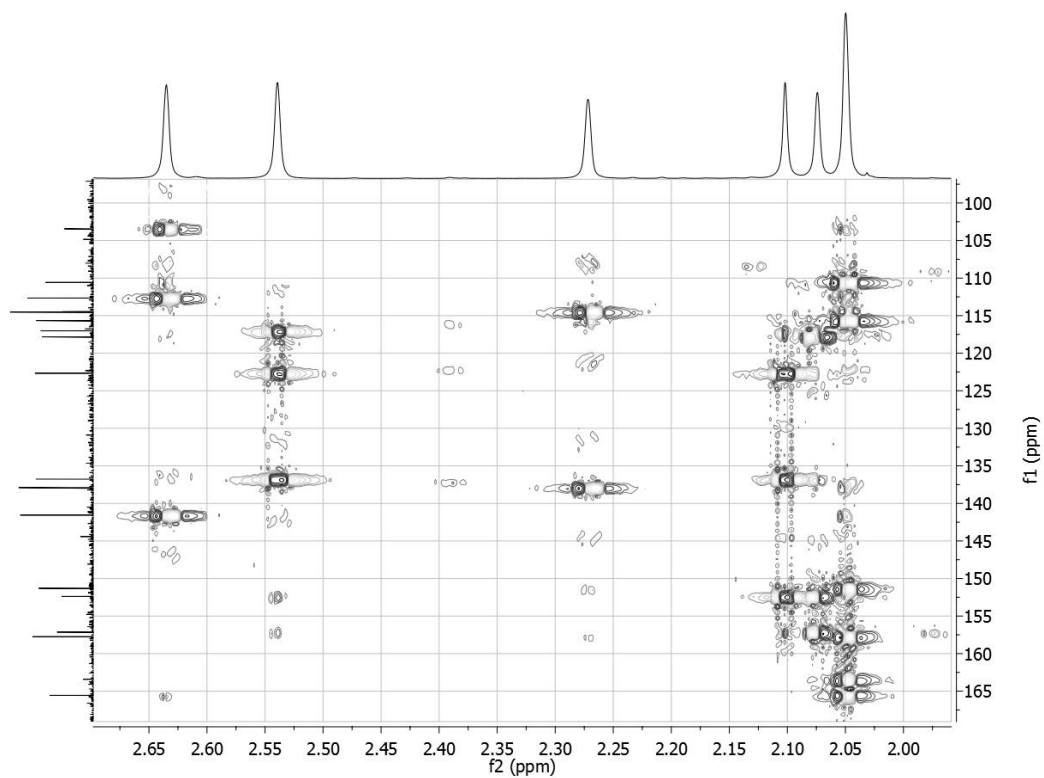


FIGURA 4.51 - Ampliação do mapa de contorno do experimento de HMBC (e ampliações) referente ao metabólito **4** (CD₃OD, 400MHz)

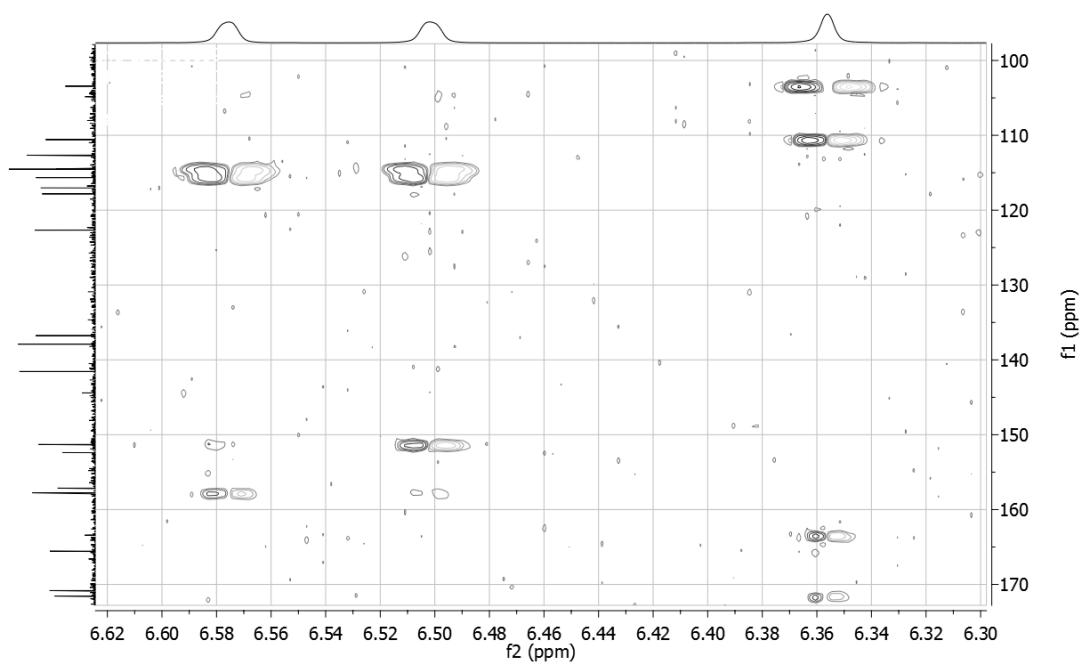


FIGURA 4.52 - Ampliação do mapa de contorno do experimento de HMBC (e ampliações) referente ao metabólito **4** (CD₃OD, 400MHz)

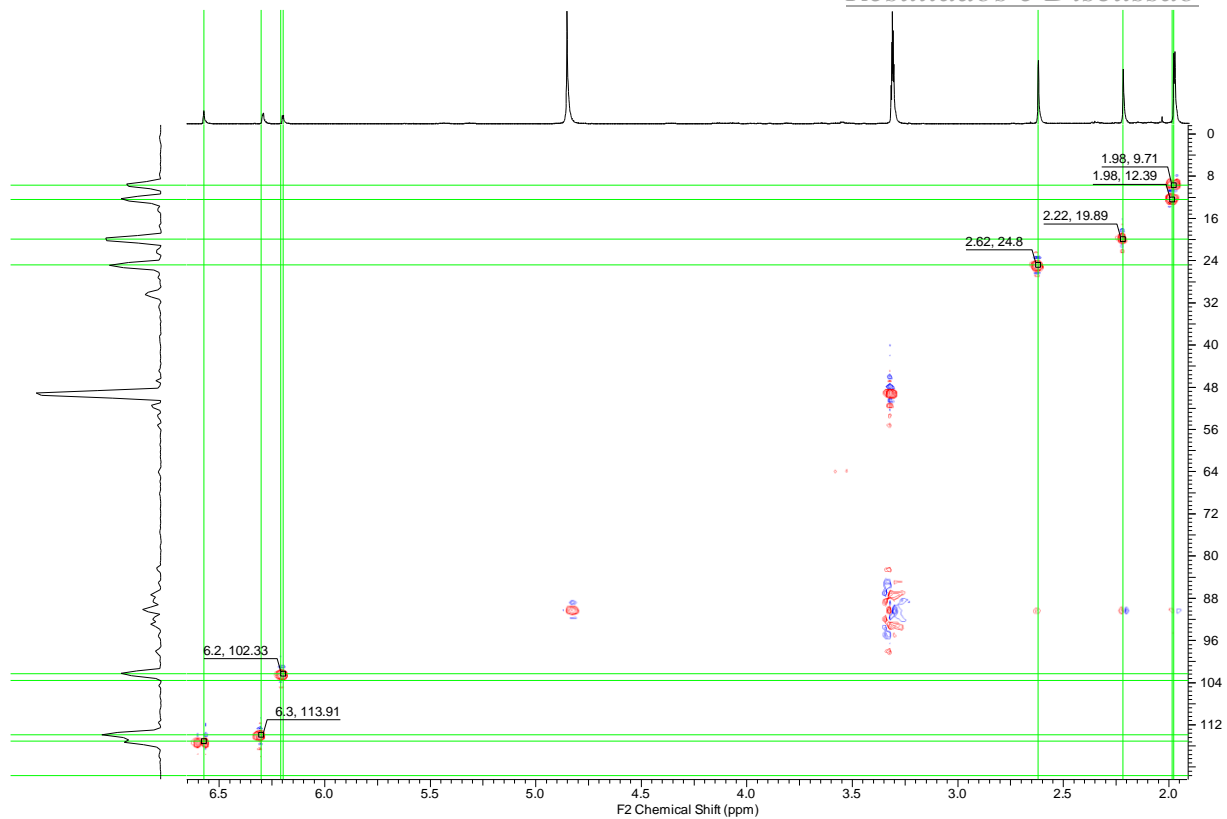


FIGURA 4.53 - Mapa de contorno do experimento de HSQC referente ao metabólito **5** (CD₃OD, 500MHz)

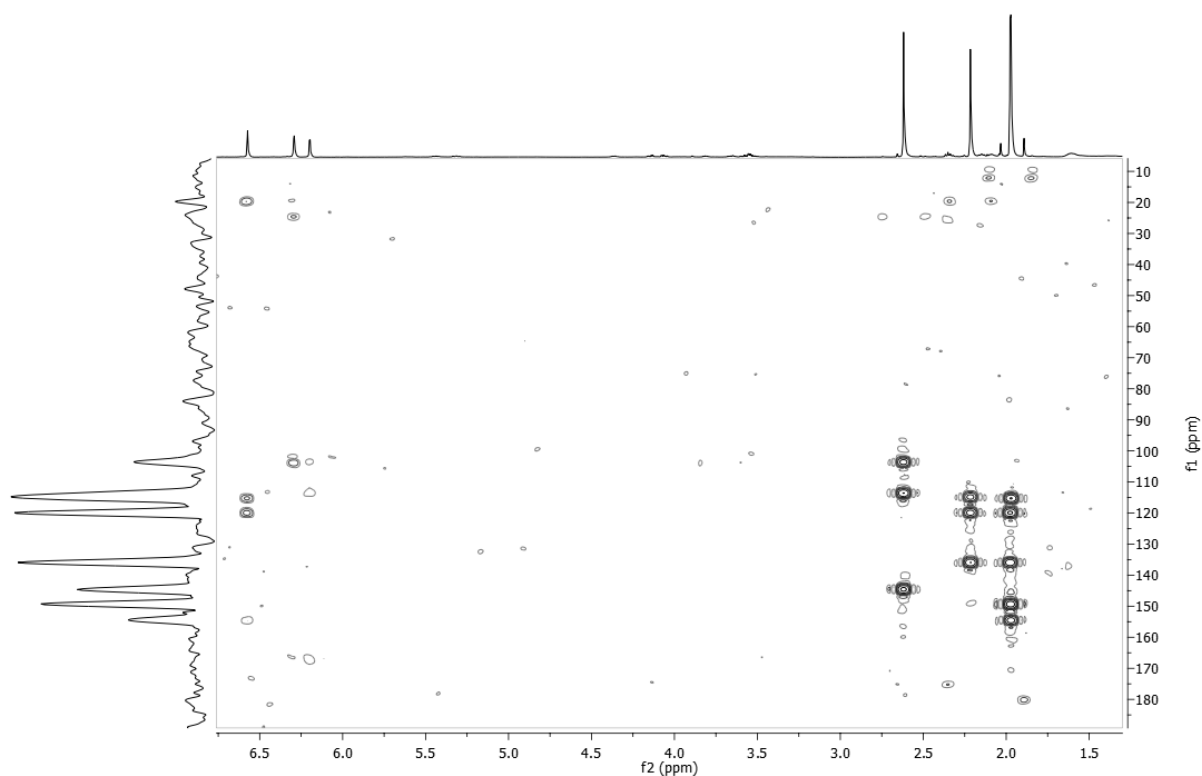


FIGURA 4.54 - Mapa de contorno do experimento de HMBC referente ao metabólito **5** (CD₃OD, 500MHz)

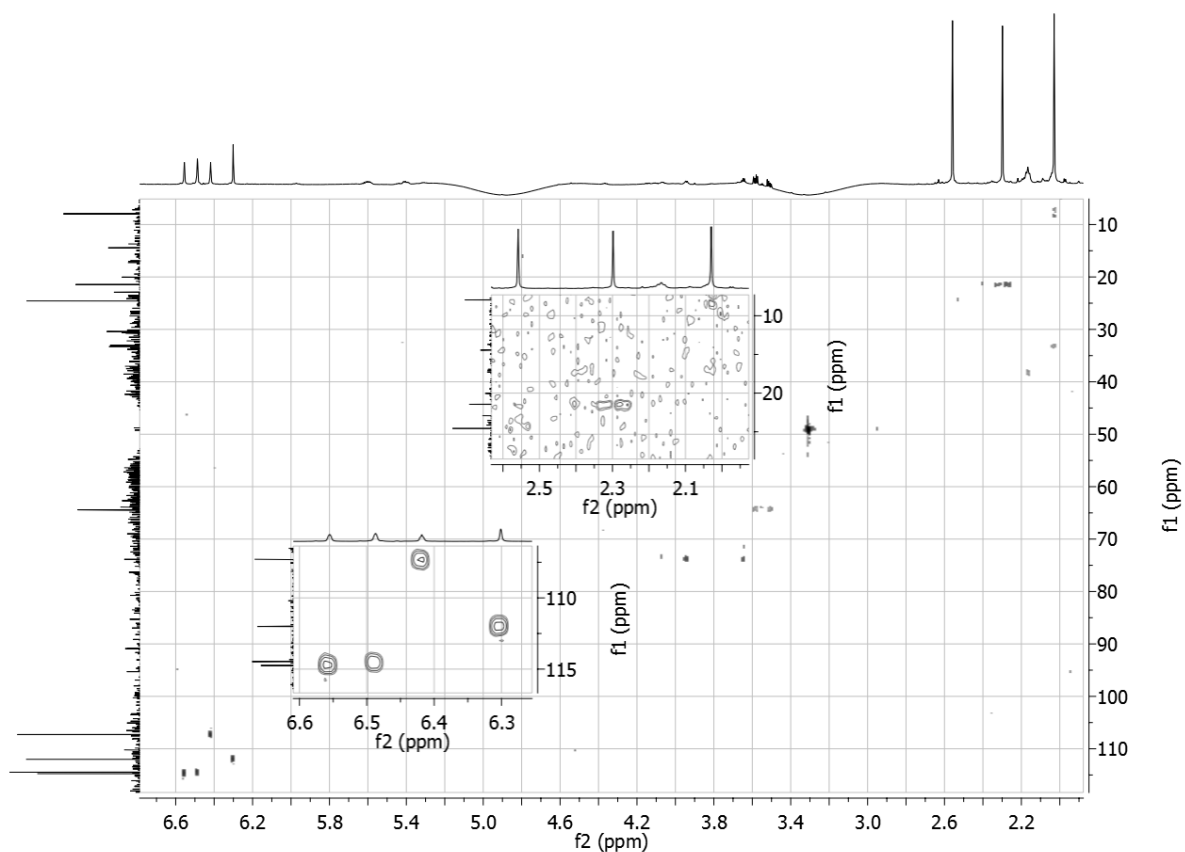


FIGURA 4.55 - Mapa de contorno do experimento de HSQC (e ampliações) referente ao metabólito **6** (CD₃OD, 800MHz)

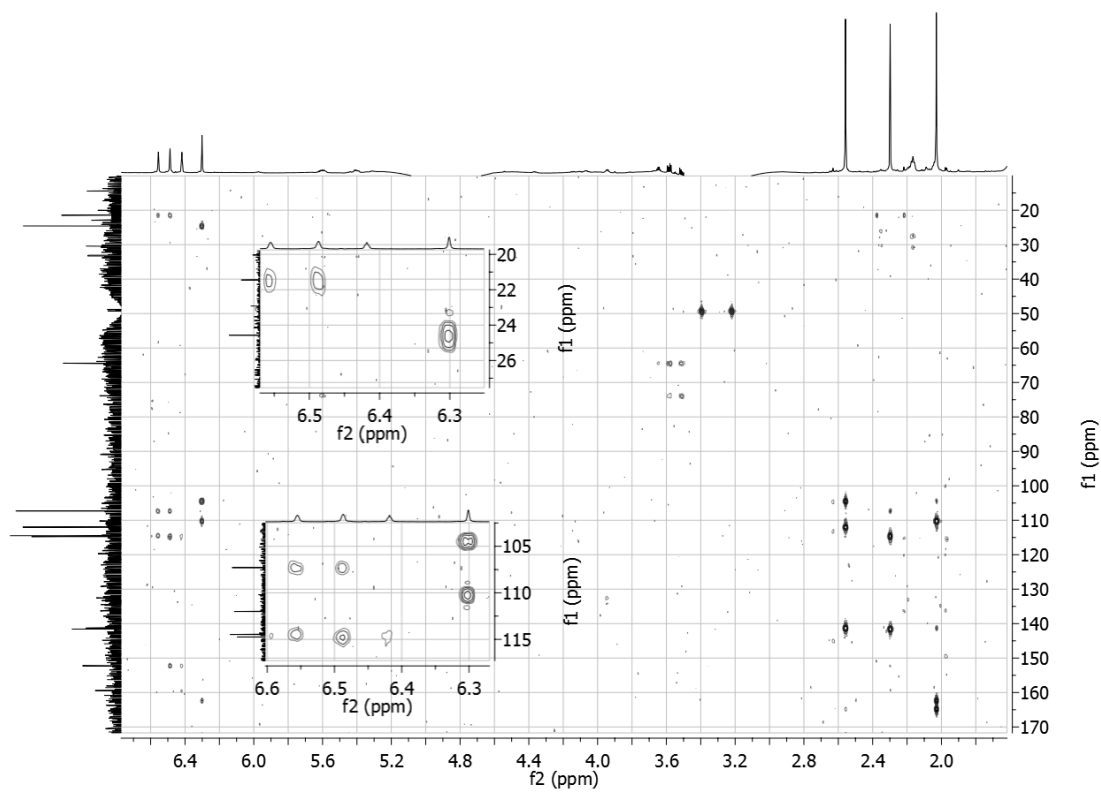


FIGURA 4.55 - Mapa de contorno do experimento de HMBC (e ampliações) referente ao metabólito **6** (CD₃OD, 800MHz)

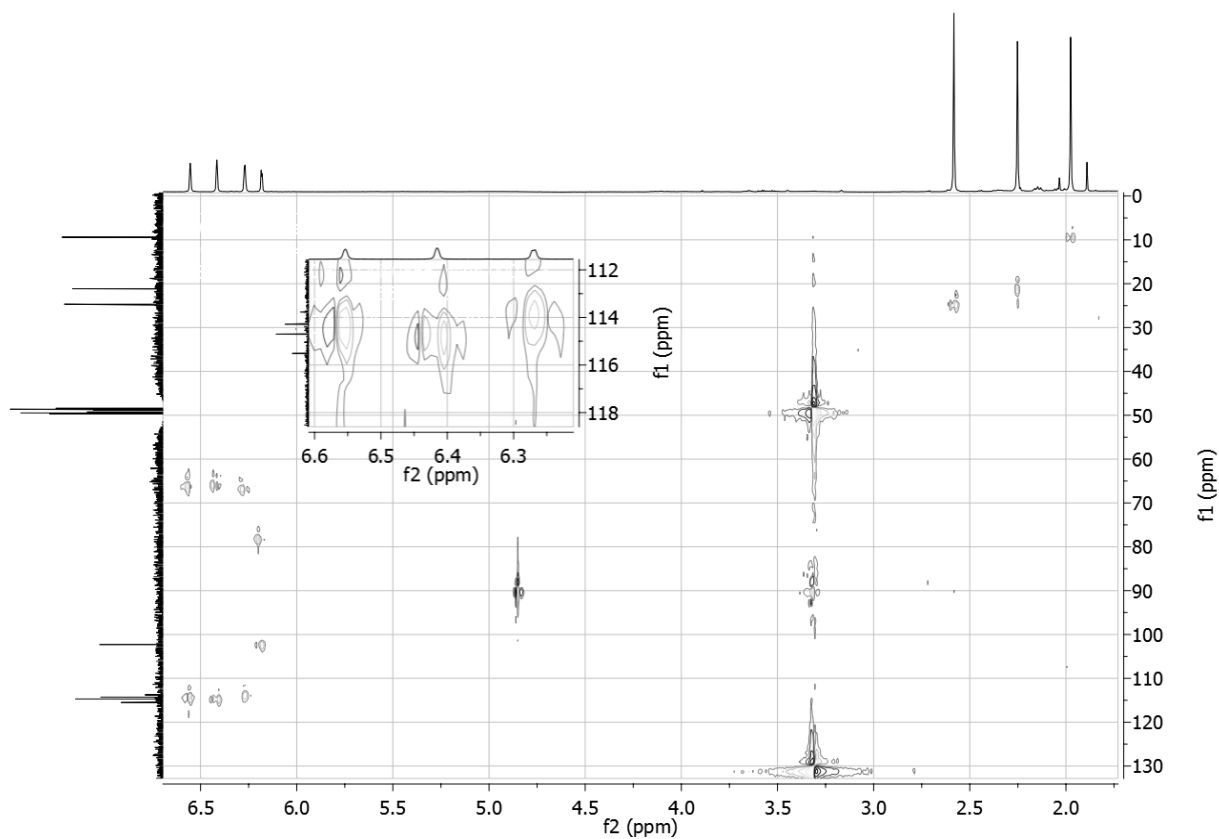


FIGURA 4.56 - Mapa de contorno do experimento de HSQC (e ampliação) referente ao metabólito 7 (CD₃OD, 800MHz)

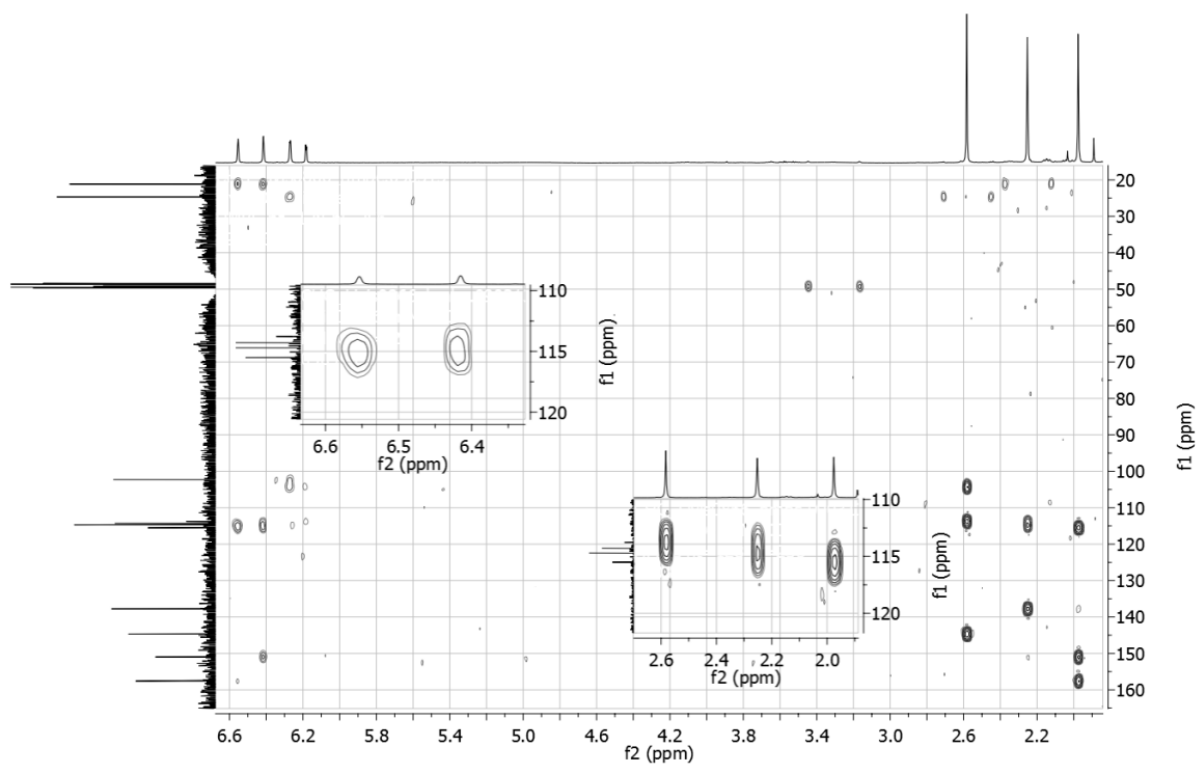


FIGURA 4.57 - Mapa de contorno do experimento de HMBC (e ampliações) referente ao metabólito 7 (CD₃OD, 800MHz)

Em resumo, além de um mesmo perfil encontrado para as correlações de HMBC referentes todos os metabólitos elucidados, alguns dos poucos desdobramentos de sinais presentes nos respectivos espectros de RMN de ^1H adquiridos, também mostraram-se bastante similares. Exemplificando tal constatação, é possível visualizar nos referidos espectros de prótons, a ocorrência de largos dubletos em δ_{H} 6,18 ($J = 2.3\text{Hz}$) e δ_{H} 6,28 ($J = 1.7\text{ Hz}$) para o tridepsídeo thielavina T (2) (FIGURA 4.24) bem como em δ_{H} 6,18 ($J = 2.5\text{ Hz}$) e δ_{H} 6,27 ($J = 2.5\text{ Hz}$) para o depsídeo lecanorina F (7) (FIGURA 4.29). Um largo dubleto em δ_{H} 6,20 ($J = 2.5\text{ Hz}$) e um duplo dubleto em δ_{H} 6,29 ($J = 1,0; 2.5\text{ Hz}$) também são visualizados para a lecanorina D. A exemplo do da atribuição de sinais feita anteriormente para o composto thielavina S (1), tais desdobramentos também representam o acoplamento dos núcleos H-5 com H-3 e CH_3 -8, sugerindo a mesma disposição estrutural ao sistema aromático A para estes quatro compostos. Haja vista os valores das constantes de acoplamento obtidas, coerentes a sistemas de spins com acoplamento do tipo *meta* ou *W*.

Os compostos thielavina V (4) e lecanorina E (6) não apresentaram o mesmo perfil químico, corroborando com a proposta de apenas um próton no mesmo sistema aromático A. No entanto, foi interessante notar o aparecimento de um largo tripleto em 6,42 no espectro de H do depsídeo lecanorina E (6), o que se mostrou condizente a um provável acoplamento do tipo *orto* entre o núcleo H-2' (δ_{H} 6,42) demais prótons do sistema aromático B, H-4' (δ_{H} 6,49) e H-6' (δ_{H} 6,56). Os singletos igualmente alargados observados para os prótons H-4' e H-6' também evidenciam tal acoplamento.

Todos as atribuições de sinais realizadas para os novos depsídeos e tridepsídeos produzidos pelo endófito *Setophoma* sp. encontram-se em concordância com dados espectrais relatados para seus modelos estruturais mais próximos, a lecanorina A (ROJAS et al., 2000) e a thielavina I (SAKEMI et al., 2002). Portanto, através da análise detalhada dos dados mencionados, foram confirmadas as estruturas dos sete novos policetídeos produzidos por *Setophoma* sp.

Os dados obtidos via experimentos de HRMS/MS para os novos metabólitos identificados, ofereceram maior respaldo às estruturas propostas aos mesmos pelo estudo dos dados espectrais de RMN. O experimento de íons produtos foi adquirido no modo negativo de ionização, devido a maior facilidade de deprotonação oferecida pelas hidroxilas fenólicas, gerando-se assim os íons pseudomoleculares $[M-H]^-$. Destacando-se, por exemplo, os espectros de HRMS/MS das thielavinas S, T, U e V, a presença de relações de massa em comum para os íons visualizados justificou a similaridade estrutural entre estes compostos, principalmente com relação a alguns arranjos entre o número de metil substituintes e os sistemas aromáticos A, B e C (FIGURA 4.59 à FIGURA 4.61). Não só pra os tridepsídeos mencionados, mas também para as lecanorinas D, E e F, pôde-se estabelecer um mesmo perfil de fragmentação que auxiliou na confirmação estrutural dos compostos. A FIGURA 4.62, exibe uma representação esquemática para a proposta dos mecanismos de fragmentação mais viáveis, que justifiquem os resultados espectrais obtidos para todos os novos depsídeos.

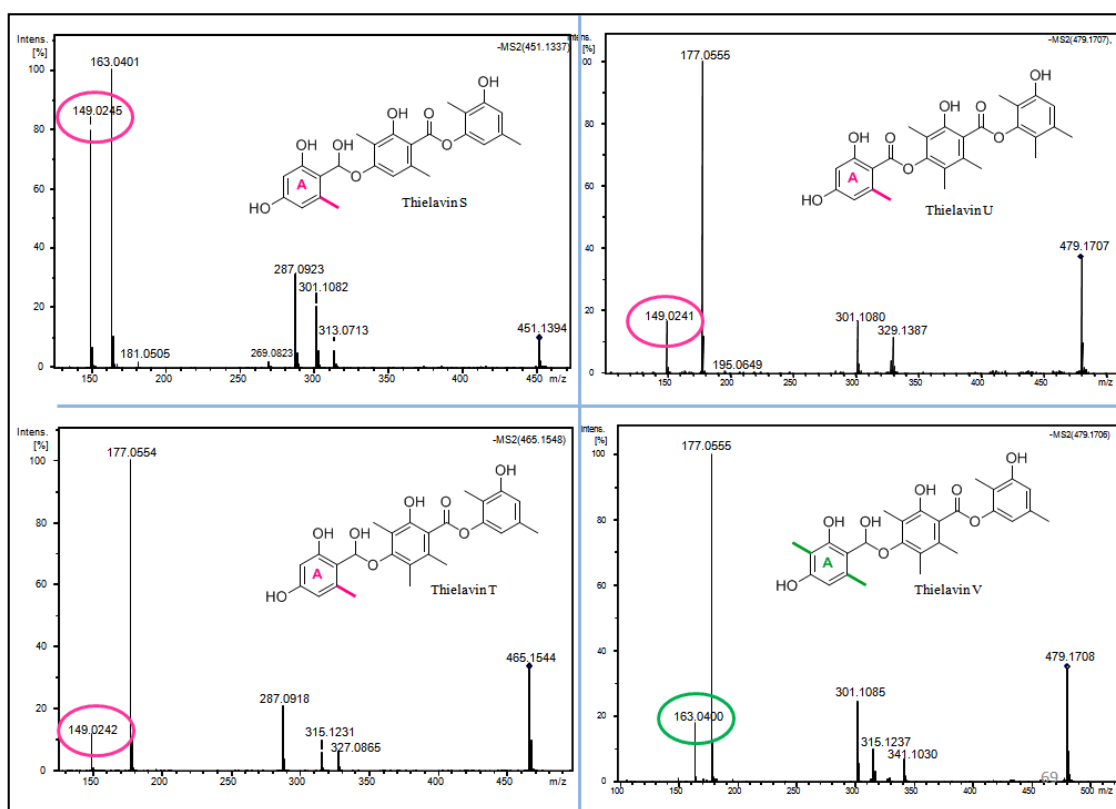


FIGURA 4.59 - Espectro de íons produtos dos tridepsídeos indicados, com destaque para os íons de massa nominal m/z 149 e 163

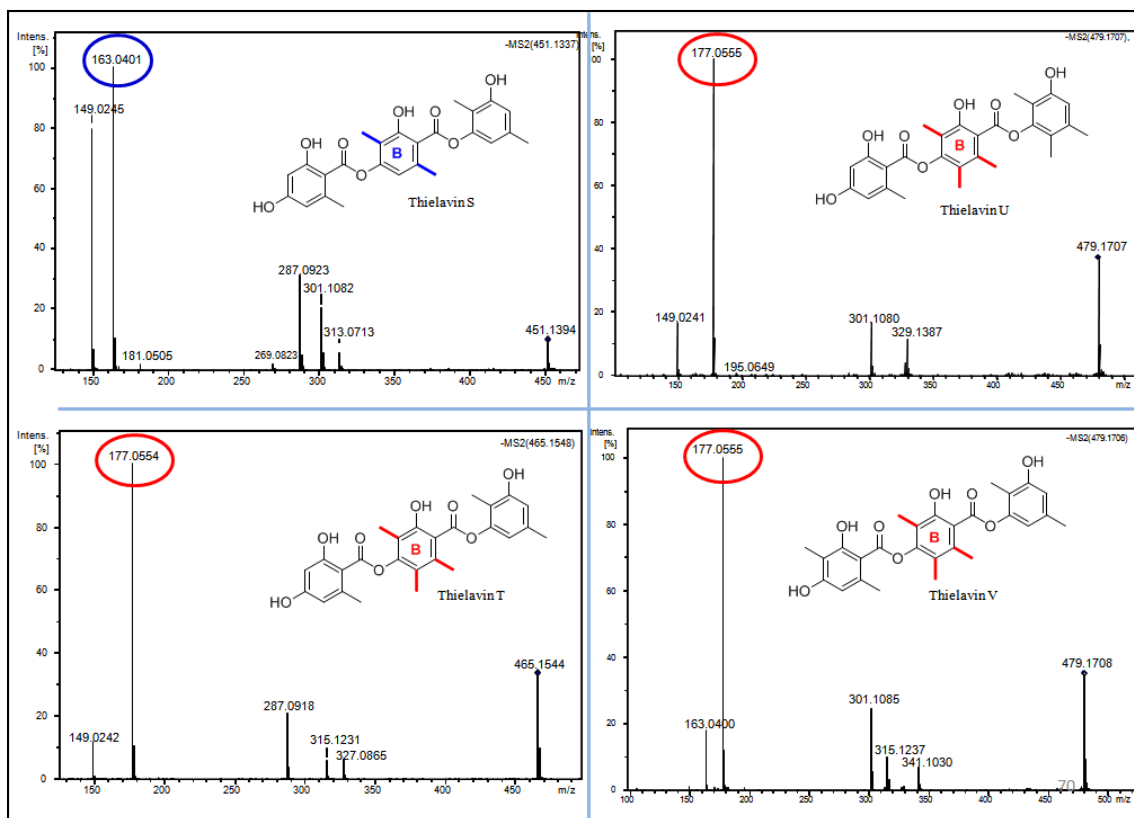


FIGURA 4.60 - Espectro de íons produtos dos tridepsídeos indicados, com destaque para os íons de massa nominal m/z 177 e 163

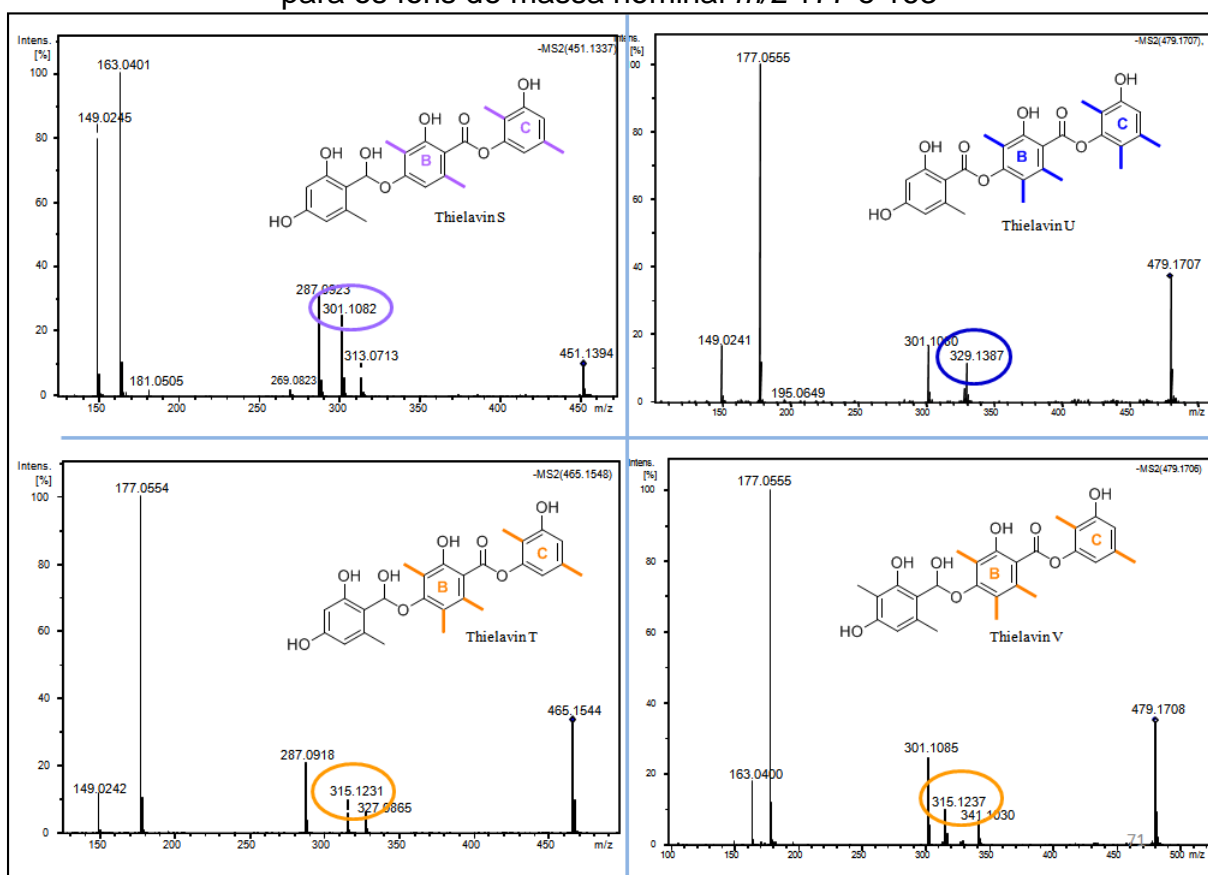


FIGURA 4.61 - Espectro de íons produtos dos tridepsídeos indicados, com destaque para os íons de massa nominal m/z 301, 329 e 315

O primeiro mecanismo é ilustrado a partir do passo **(a)**, no qual é conduzido pela delocalização eletrônica iniciada na porção do ânion fenolato. Como resultado há a perda do grupamento aromático A, gerando assim os íons fragmentos representados por **(I)**. O segundo mecanismo, trata-se do rearranjo do tipo *McLafferty* **(b)** seguido de clivagem da ligação acila **(c)**, o que leva à formação dos fragmentos iônicos representados **(II)**. Analogamente, este tipo de clivagens consecutivas pode ocorrer em todas as unidades éster que constituem a estrutura policetídica dos compostos, pontuando assim os passos representados por **(d)**, **(e)**, **(f)**, e levando à formação dos íons **(IV)**, **(V)** e **(VI)** respectivamente.

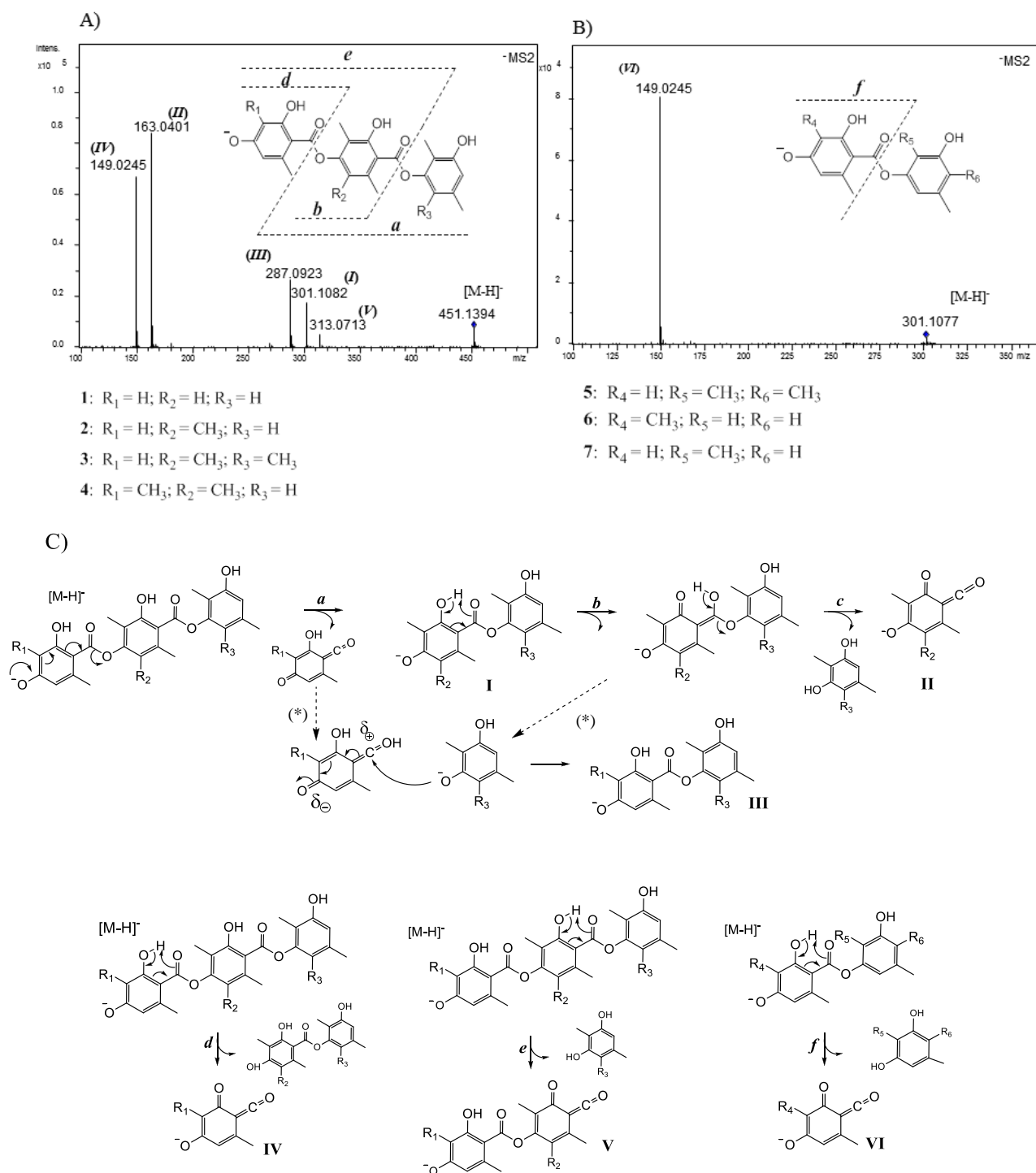


FIGURA 4.62 - a) Espectro de HRMS/MS composto **1** e quebras propostas para os íons correspondentes aos compostos **1- 4**. b) Espectro de HRMS/MS composto **5** e quebras propostas para os íons correspondentes aos compostos **5- 7**. c) Mecanismos de fragmentação propostos para justificativa dos íons produtos visualizados nos espectros de HRMS/MS dos compostos **1- 7**. (*) Indicação das possíveis espécies reativas

Como um todo, as massas acuradas referentes aos íons produtos obtidos no experimento de HRMS/MS foram compatíveis às massas exatas encontradas para cada fragmento proposto, sugerindo a viabilidade dos mecanismos ilustrados. Estes resultados podem ser checados através dos valores de massas exata das e massas acuradas dos íons produto exibidos na TABELA 4.5.

TABELA 4.5 - Massa exata calculada (calc.)/composição elementar e massa acurada (ac.) para cada íon produto indicado na FIGURA 4.62

Composto	Íons produto (<i>m/z</i>)											
	<i>I</i> (calc.)	<i>I</i> (acc.)	<i>II</i> (calc.)	<i>II</i> (acc.)	<i>III</i> (calc.)	<i>III</i> (acc.)	<i>IV</i> (calc.)	<i>IV</i> (acc.)	<i>V</i> (calc.)	<i>V</i> (acc.)	<i>VI</i> (calc.)	<i>VI</i> (acc.)
1	301,1076	301.1082	163,0395	163,0401	287,0920	287.0923	149,0239	149,0245	313,0712	313,0713	-	-
	C ₁₇ H ₁₅ O ₅		C ₉ H ₇ O ₃		C ₁₆ H ₁₅ O ₅		C ₈ H ₅ O ₃		C ₁₇ H ₁₃ O ₆			
2	315,1232	315.1231	177,0552	177,0554	287,0920	287.0918	149,0239	149,0242	327,0869	327,0865	-	-
	C ₁₈ H ₁₉ O ₅		C ₁₀ H ₉ O ₃		C ₁₆ H ₁₅ O ₅		C ₈ H ₅ O ₃		C ₁₈ H ₁₅ O ₆			
3	329,1389	329.1387	177,0552	177,0555	301,1076	301.1080	149,0239	149,0241	327,0869	327,0872	-	-
	C ₁₉ H ₂₁ O ₅		C ₁₀ H ₉ O ₃		C ₁₇ H ₁₅ O ₅		C ₈ H ₅ O ₃		C ₁₈ H ₁₅ O ₆			
4	315,1232	315.1237	177,0552	177,0555	301,1076	301.1085	163,0395	163,0400	341,1025	341,1030	-	-
	C ₁₈ H ₁₉ O ₅		C ₁₀ H ₉ O ₃		C ₁₇ H ₁₅ O ₅		C ₉ H ₇ O ₃		C ₁₉ H ₁₇ O ₆			
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	149,0239	149,0242
											C ₈ H ₅ O ₃	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	163,0395	163,0400
											C ₉ H ₇ O ₃	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	149,0239	149,0239
											C ₈ H ₅ O ₃	

Embora como demonstrado, a maioria das identidades relativas aos íons produtos detectados estejam em concordância com os mecanismos propostos, os íons representados por (*III*) que são correspondentes à massa nominal *m/z* 287 para as thielavinas (**1**) e T (**2**), e *m/z* 301 para as thielavinas U (**3**) e V (**4**) não são facilmente racionalizados.

O que parece haver neste caso, trata-se de uma potencial espécie de reação íon molécula, na qual envolve o ataque da quinona (eletrofílica) eliminada após a fragmentação (**a**), pelo ânion representado por (*II*). Com isto, as massas exatas referentes às composições elementares das espécies sugeridas, apresentam-se em concordância às massas acuradas visualizadas nos espectros de HRMS/MS das

thielavinas ($III = C_{16}H_{15}O_5$, $\pm 1,0$ e $0,7$ ppm em **1** e **2** respectivamente; $III = C_{17}H_{17}O_5$, $\pm 1,3$ e $3,0$ ppm para **3** e **4**). No entanto, este tipo de reação não é facilmente provado considerando-se o processo tanto na fonte de ionização, quanto na interface ao analisador de massas.

As principais variações estruturais dos depsídeos conhecidos na natureza estão vinculadas ao tamanho das cadeias laterais substituintes, do grau de oxidação de oxidação das mesmas refletindo em características notavelmente conservadas. Grupos hidroxila são comumente atrelados aos carbonos C-2/C-4/C-3'/C-4' bem como outros tipos de grupamentos com tal heteroátomo (oxigênio) em sua constituição. De encontro a este perfil, os depsídeos produzidos por *Setophoma* sp. apresenta um esqueleto bastante reduzido se comparado aos demais compostos da mesma classe.

Depsídeos são moléculas biossintetizadas por um complexo enzimático multifuncional do tipo I (PKS) utilizando-se de sítios ativos interativamente. Embora seja conhecido que a origem biossintética destes compostos seja proveniente de derivados do ácido orselínico/orcinol e β -orcinol (FIGURA 4.62), a totalidade do sistema enzimático reponsável pela produção destes compostos ainda não é totalmente esclarecida. Interessantemente, isto ocorre devido a dificuldade de se manipular geneticamente as espécies liquênicas (associações de fungos e algas). Estas representam na verdade a maioria dos organismos produtores de depsídeos. Até o momento, poucas espécies fúngicas são relatadas como produtoras desta classe de compostos. Neste sentido, o fungo *Setophoma* sp. pode representar uma importante ferramenta para o estudo biossintético desta classe policetídica.

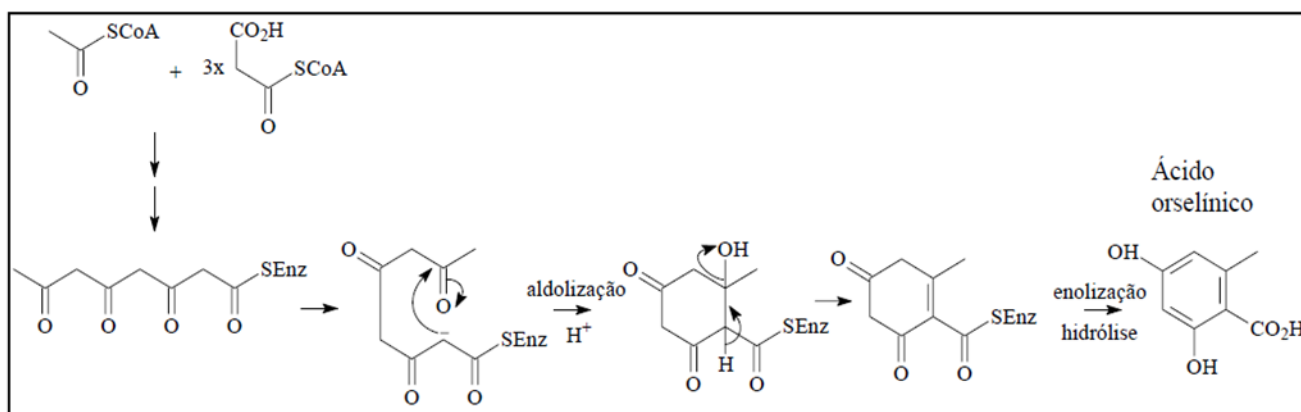


FIGURA 4.62 - Biossíntese do ácido orselínico, precursor biossintético de depsídeos (DEWICK, 2009)

4.2.2 - Ensaio antimicrobiano de novos depsídeos produzidos por *Setophoma* sp. frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus*

A classe policetídic dos depsídeos destaca-se por apresentar um amplo espectro de atividades biológicas relatadas na literatura. Dentre as principais podem ser citadas as atividades herbicida (DE MEDEIROS et al., 2012; ROJAS, 2000) anti-hiperglicemia (RIVERA-CHAVEZ et al., 2013), anti-inflamatória (BAUER et al., 2012; anticâncer e antibiótica (SHRESTHA & CLAIR, 2013).

Tendo como inspiração tais prognósticos, em conjunto a resultados positivos anteriormente relatados pelo grupo a respeito da atividade antimicrobiana dos depsídeos lecanorina B e thielavina Q e R (DE MEDEIROS et al., 2011), foram executados testes frente a bactéria Gram negativa *Escherichia coli* ATCC 25922 e Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

O método aplicado foi o método de diluição em caldo para a verificação da MIC) - *Minimal Inhibitory Concentration*). As concentrações avaliadas dos compostos testados e respectivos controles encontram-se esquematizados na TABELA 4.6 e os resultados de inibição dos depsídeos testados podem ser visualizados através da FIGURA 4.64.

Nota-se através da observação das placas de elisa que o composto (2), ou seja, a thielavina T, apresentou moderada atividade antimicrobiana contra a cepa de *S. aureus*, havendo o estabelecimento da MIC em 6,25 µg/mL. Já os demais tridepsídeos mostraram uma relação de MIC maior quando comparados à thielavina T como resume a TABELA 4.6. Os depsídeos lecanorinas D e E não mostraram atividade frente à bactéria gram positiva nas concentrações testadas. Da mesma forma, nenhum composto se mostrou ativo na inibição da bactéria *E. coli*.

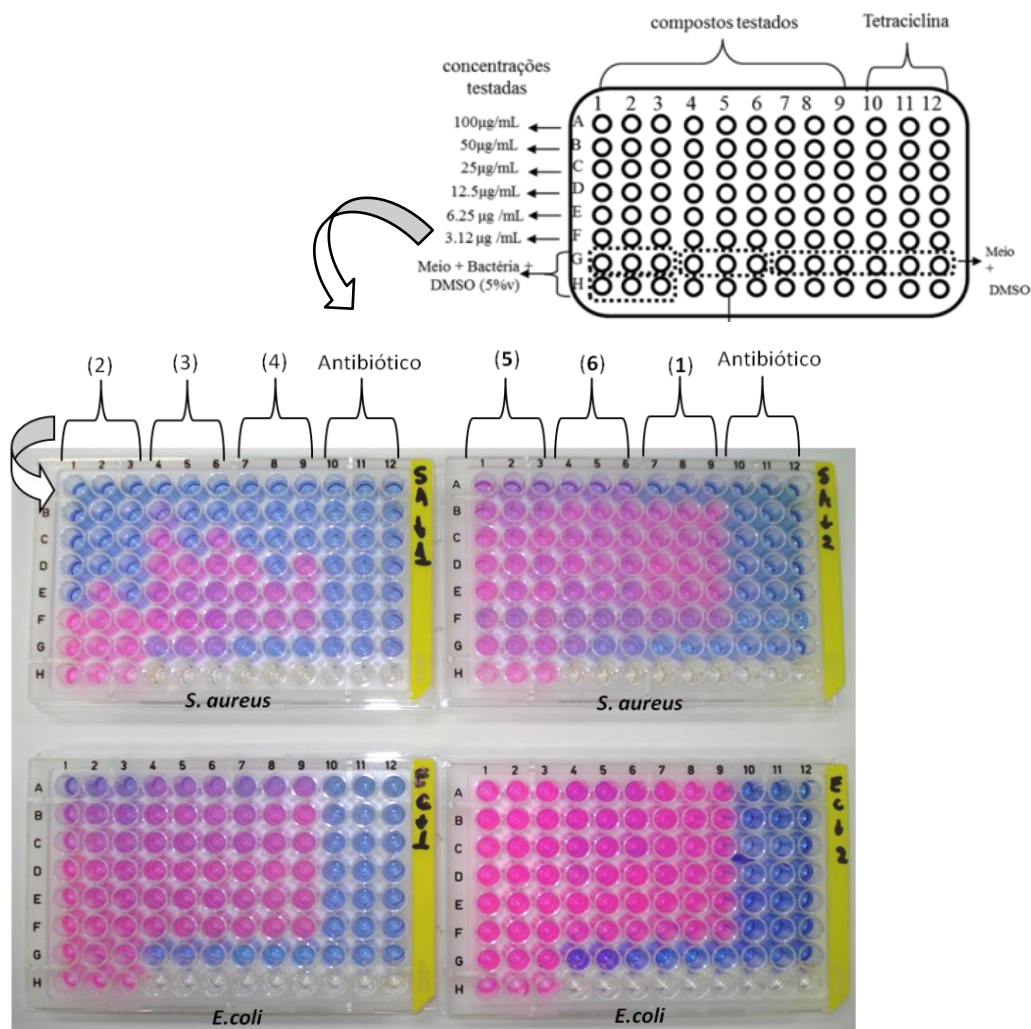


FIGURA 4.64 - Resultados do ensaio antimicrobiano a partir dos depsídeos isolados de *Setophoma* sp. testados contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli*

TABELA 4.6 - MIC encontradas no ensaio dos compostos 1-6 frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*

Compostos	MIC (µg/mL)	
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922
thielavina S (1)	100	>100
thielavina T (2)	6,25	>100
thielavina U (3)	50	>100
thielavina V (4)	25	>100
lecanorina D (5)	>100	>100
lecanorina E (6)	>100	>100
Tetraciclina	3,12	3,12

4.3 - Screening metabólico e derreplicação dos extratos *Talaromyces rugulosus*

Dentre os fungos isolados dos frutos saudáveis de maçã, está o fungo *Talaromyces rugulosus*. Espécies do gênero *Talaromyces* na verdade tratam-se de formas teleomórficas do gênero *Penicillium*, sendo até pouco tempo atrás, erroneamente caracterizadas como pertencente a este último. Apenas recentemente o gênero *Talaromyces* foi dado com um grupo monofilético distinto ao *Penicillium*, sendo que novas espécies vêm sendo re-classificadas e descobertas de acordo com a aplicação mais abrangente de ferramentas filogenéticas ao estudo deste grupo. Logo, é comum citações da espécie *T. rugulosus* com os nomes *Penicillium rugulosum*, *tardum* ou *chrysitis*. Todas na verdade são espécies conspecíficas, sendo atualmente considerada apenas a classificação *T. rugulosus* para o fungo (PETERSON & JURJEVIĆ, 2013; FRISVAD et al., 2013; SAMSON et al., 2011).

Em geral, as espécies de *Talaromyces* produzem compostos de mesma origem biossintética, envolvendo policetídeos e meroterpenóides. Poucas substâncias estão incluídas entre as classes de peptídeos não-ribossômicos e terpenos. Neste sentido, o gênero parece produzir uma série de metabólitos que são aparentemente únicos a ele (FRISVAD et al., 2013). As colorações amareladas e vermelhadas características em partes miceliais destas colônias fúngicas são usualmente causadas pelo acúmulo de mitorubrininas e outras azafilonas, bem como antraquinonas não encontradas por exemplo, no gênero *Penicillium* (SAMSON et al., 2011).

No entanto, alguns poucos exometabólitos podem ser produzidos pelos dois gêneros, como algumas emodinas, meleína, ácidos secalônicos, rugulosinas e rugulovasinas (SAMSON et al., 2011).

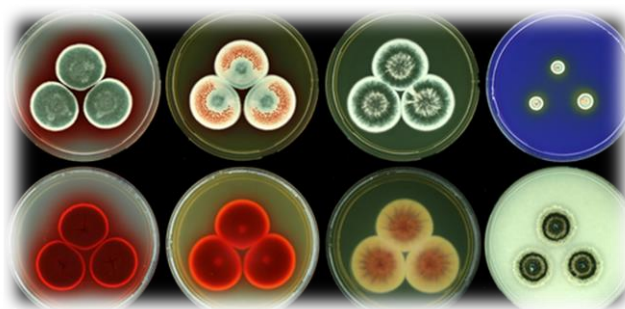


FIGURA 4.65 - Crescimento da recente espécie descoberta, *Talaromyces atroseus*, em diferentes meios de cultura (frente e verso): CYA, MEA, YES e CREA respectivamente da esquerda para direita. Espécie produtora de pigmentos avermelhados e algumas azafilonas. Retirado de FRISVAD et al., 2013

Contudo, considerando-se a potencialidade de tal panorama metabólico apresentado pelo gênero, uma das metas deste trabalho foi traçar o perfil químico da cepa isolada dos frutos de maçã, para o conhecimento dos compostos produzidos por ele e principalmente, focando-se o encontro de novos compostos. Para tanto, a implementação da abordagem OSMAC foi realizada através da administração de dez diferentes meios ao cultivo do micro-organismo, sendo estes: OAT, CYA, DRYES, MEAOX, MEA, CREA, WATM, YES, PDA e CYAS. O desenvolvimento morfológico do mesmo pode ser visualizado na FIGURA 4.66

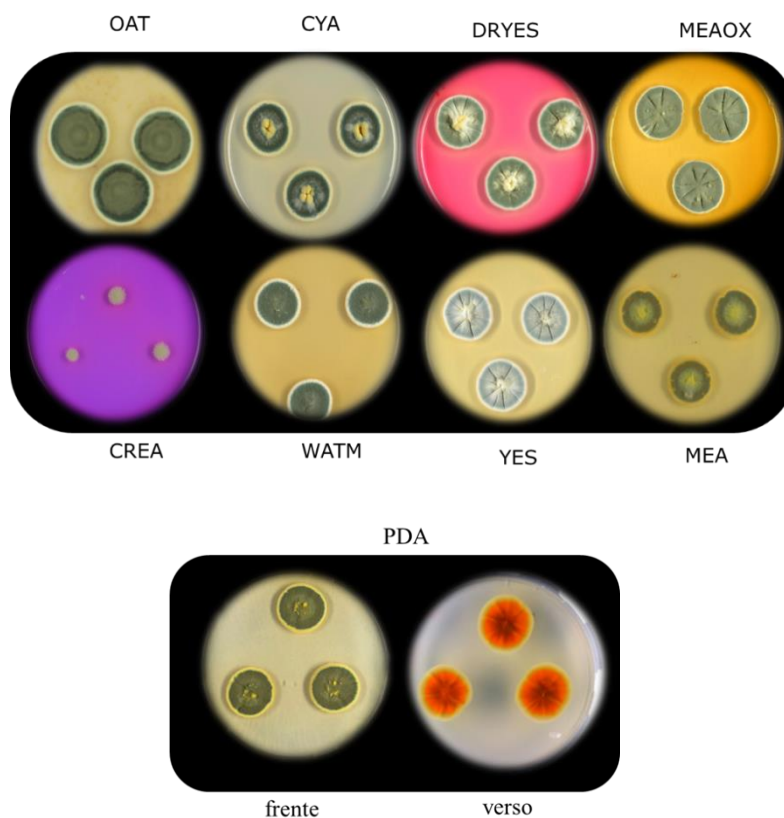


FIGURA 4.66 - Micro-cultivo de *Talaromyces rugulosus* em diferentes meios de cultura indicados

O screening do metabolismo fúngico nos meios de cultura foi realizado aplicando-se a metodologia de derreplicação via UHPLC-HRMS assim como no estudo relatado anteriormente para o endófito *Setophoma* sp. Os perfis dos espectros de UV, as massas exatas dos possíveis íons pseudomoleculares, o perfil de fragmentação de cada metabólito alvo, e em alguns casos o uso de padrão (coleção IBT de padrões e cepas fúngicas-DTU/Dinamarca) foram critérios de análise para a obtenção das possibilidades mais confiáveis às identidades dos compostos produzidos por *T. rugulosus* como será detalhado a seguir.

A análise dos cromatogramas de UV e espectros de *full scan* (processamento dos cromatogramas de *BPC*) FIGURA 4.6666 e FIGURA 4.67, mostraram novamente que o fungo estudado parece apresentar um metabolismo padrão indistinto ao meio de cultura utilizado. Isto porque, qualitativamente, os mesmos íons e bandas cromatográficas estão de forma geral, presentes em todos os meios de cultura.

Mesmo quando algumas bandas não foram passíveis de visualização com nitidez, seja no cromatograma de UV, seja no de *BPC* em determinado extrato, o processamento dos espectros de massas revelou o aparecimento dos íons alvo, mesmo que em diminuta intensidade. Apenas os meios CREA e CYAS proporcionaram uma produção metabólica pouco expressiva.

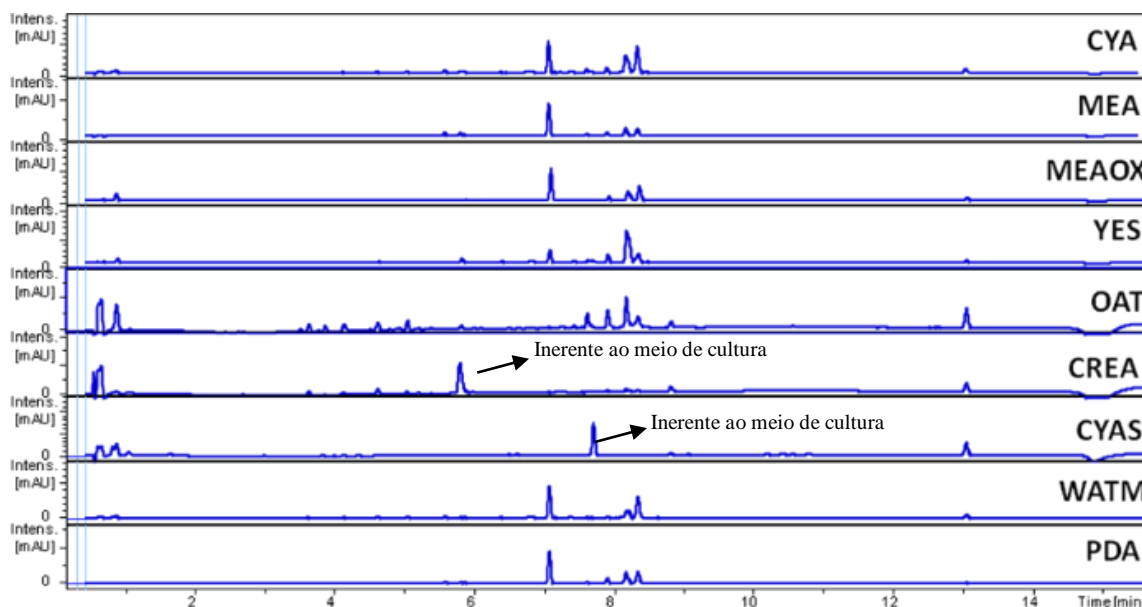


FIGURA 4.66 - Cromatogramas de UV referentes aos micro-extratos indicados de *T. rugulosus*, método A

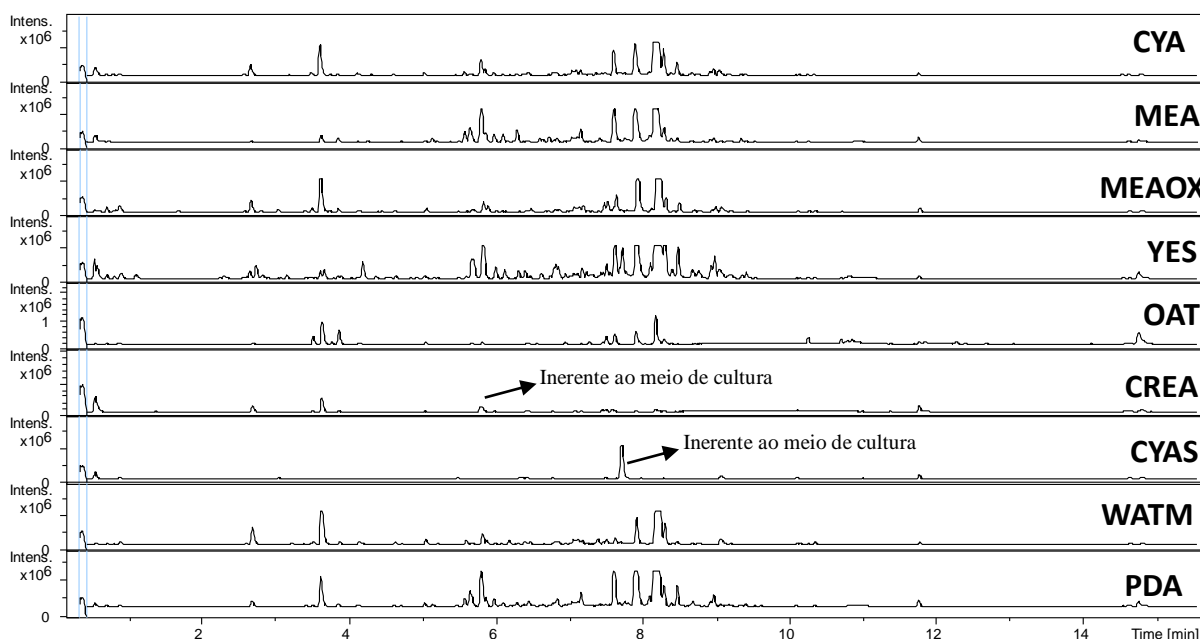


FIGURA 4.67 - Cromatogramas de *BPC* referentes aos micro-extratos indicados de *T. rugulosus*, método A

O processamento de dados para as bandas cromatográficas mais expressivas e de maior interesse é exibido nas FIGURA 4.68 e FIGURA 4.69. Nelas são expostos respectivamente os espectros de UV e de *full scan* de cada composto alvo. As massas nominais detectadas correspondentes aos íons pseudomoleculares $[M+H]^+$ são: m/z 227, 269, 303, 337, 401, 413, 417, 427, 559, 543, 539.

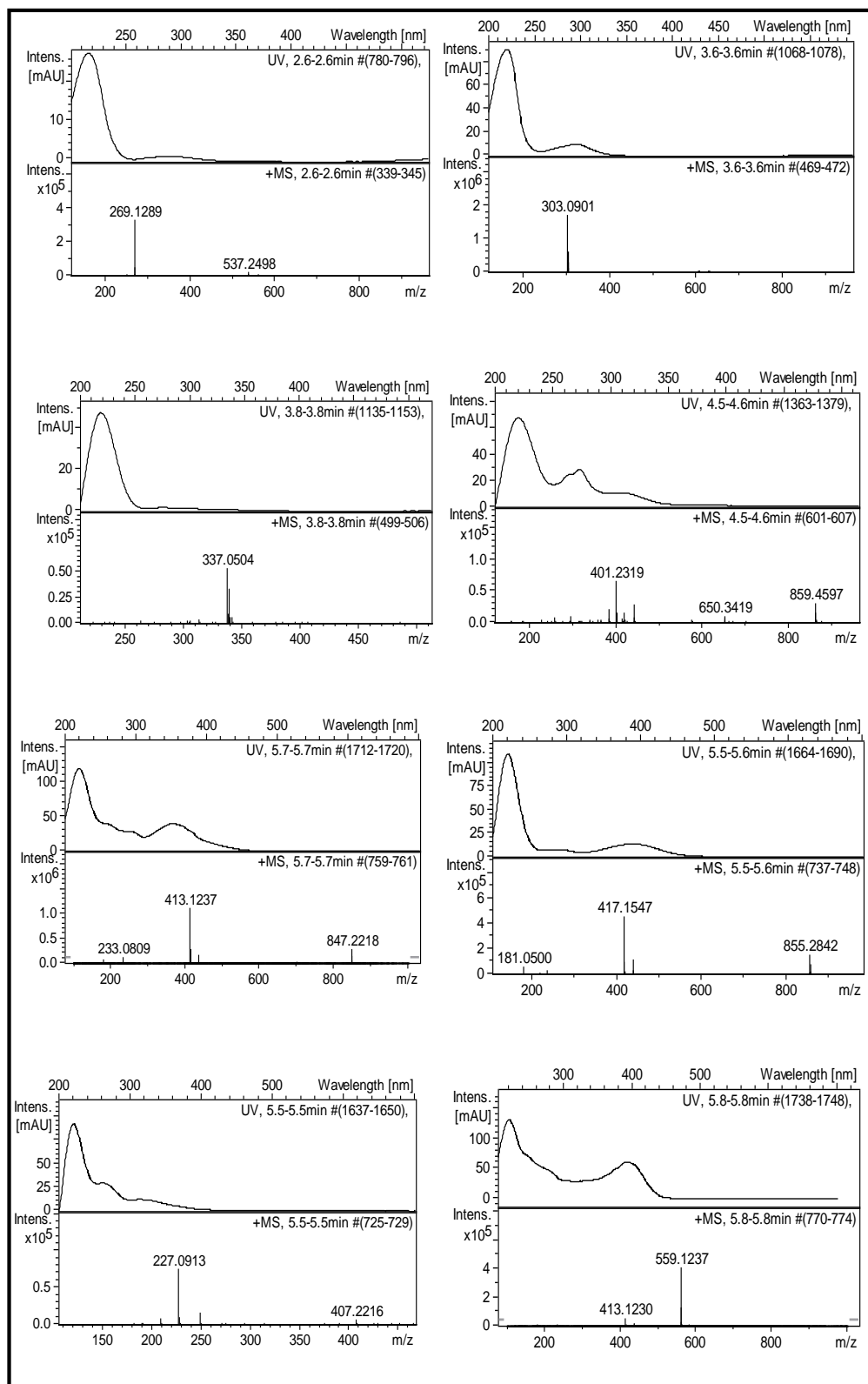


FIGURA 4.68 - Espectros de *full scan* e UV referentes às bandas dos cromatogramas de BPC (FIGURA 4.67) detectadas nos micro-extratos do fungo *T.rugulosus*

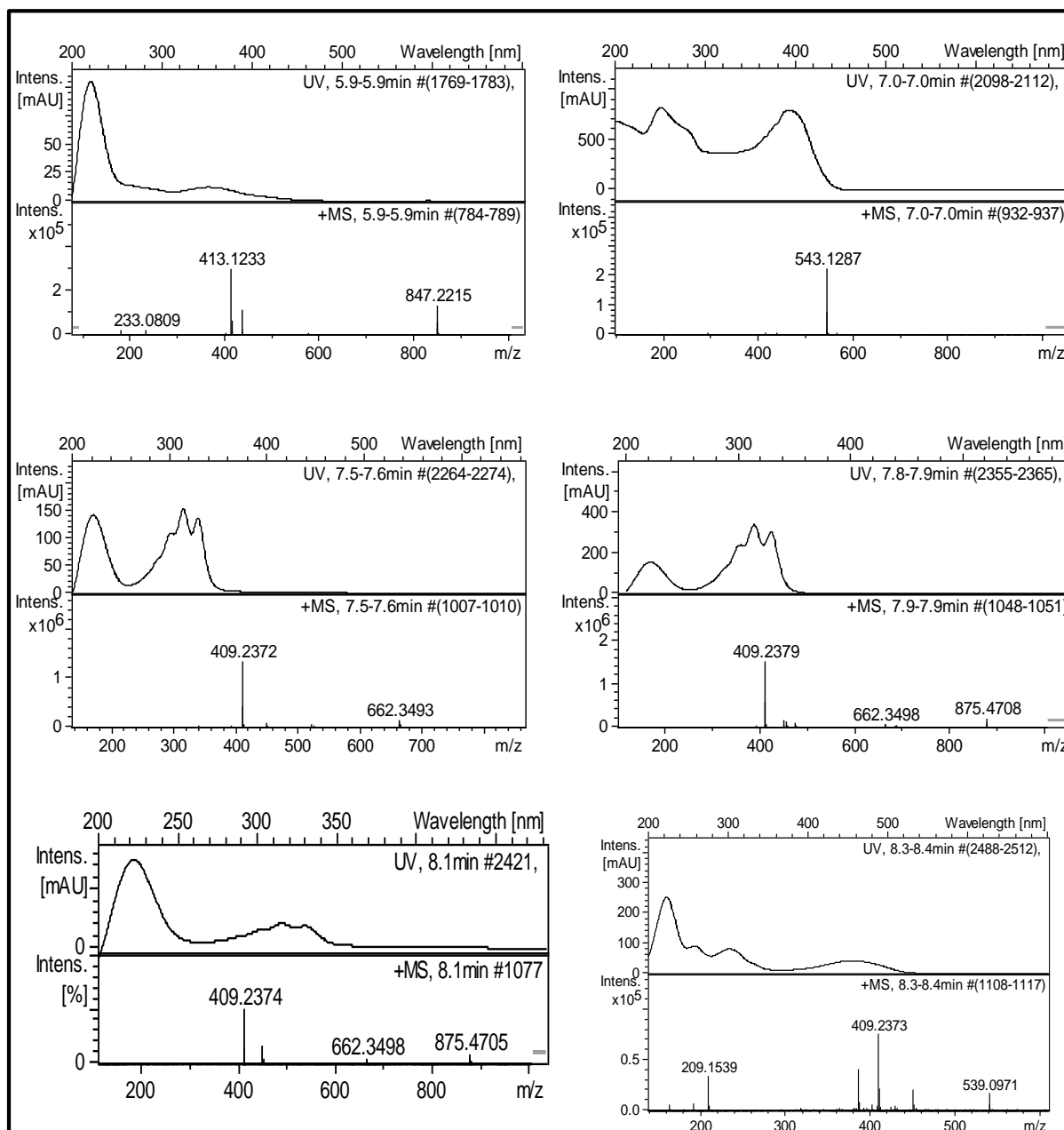


FIGURA 4.69 - Continuação dos espectros de *full scan* e UV referentes às bandas dos cromatogramas de *BPC* (FIGURA 4.67) detectadas nos micro-extratos do fungo *T. rugulosus*

Especificamente no caso do endófito *T. rugulosus*, conforme o conhecimento da variabilidade metabólica relatada ao gênero considerou-se pertinente a elaboração de um pequeno banco de dados próprio, que viabilizasse a comparação e o cruzamento de informações sobre os metabólitos secundários já conhecidos ao gênero fúngico. Para tanto, foi realizado o agrupamento das informações contidas no banco AntiBase inerentes ao grupo *Talaromyces* e algumas espécies de *Penicillium*. Dentre os 1750 possíveis *hits* contidos no AntiBase para este

último gênero, foram selecionados apenas os compostos vinculados às espécies *P. rugulosum*, *chrysitis* e *tardum*, (basiônimos de *T. rugulosum*) em conjunto àqueles associados às espécies *P. islandicum*, *radicum* e *multicolor* que representam espécies próximas, taxonomicamente ao micro-organismo estudado (PETERSON & JURJEVIĆ, 2013; FRISVAD et al., 2013; SAMSON et al., 2011).

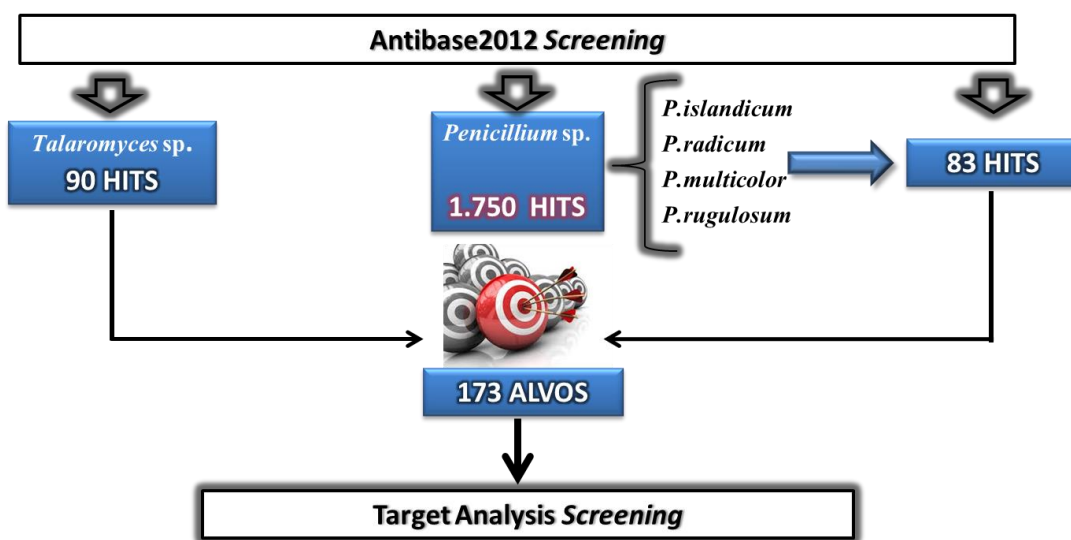


FIGURA 4.71 - Diagrama representativo de alvos selecionados para o processamento dos micro-extratos de *T. rugulosus* pelo programa *Target Analysis* através da criação de uma biblioteca própria de dados relacionada ao gênero *Talaromyces*

Portanto, através desse agrupamento de informações, criou-se uma pequena biblioteca de dados condizente aos compostos com maior probabilidade de produção pelo fungo, num total de 173 possíveis alvos. Os resultados obtidos a partir dos cromatogramas de *BPC* referentes aos micro-extratos fúngicos foram então cruzados com a biblioteca criada para *T. rugulosus* através da utilização do software *Target Analysis*.

Na sequência, foi gerada pelo programa, uma lista contendo os compostos de maior *score* com relação às massas detectadas nos extratos de *T. rugulosus*. Como já descrito na parte introdutória, este *score* é estabelecido de acordo com fatores de comparação dos dados medidos, aos dados teóricos, como por exemplo, faixa de erro, composição elementar, e o parâmetro *mSigma*. Os elementos que não alcançaram valores satisfatórios ou compatíveis às faixas determinadas como aceitáveis, por exemplo, *mSigma* maior a 50, erros e maiores a 5 ppm, foram automaticamente descartados na consulta.

A lista gerada para o micro-extrato referente ao meio de cultura PDA, encontra-se descrita na FIGURA 4.7171 e é representativa para os resultados obtidos com os demais cultivos do micro-organismo.

Multi Target Screening with 'C:\Methods\fm1.csv'											
Found	Compound Name	Mol.Formula	PMI	Err [ppm]	Err [mDa]	mSigma	Intens.	RT,meas.[min]	m/z,calc.	m/z,meas.	
+	Wortmannilactone H	C 26 H 34 O 5	[M+H] ⁺	0.7	0.3	12.3	11120	6.32	427.2479	427.2476	
+	Wortmannilactone F	C 26 H 34 O 5	[M+H] ⁺	0.7	0.3	12.3	11120	6.32	427.2479	427.2476	
+	Wortmannilactone E	C 26 H 34 O 5	[M+H] ⁺	0.7	0.3	12.3	11120	6.32	427.2479	427.2476	
+	Prugosin C1 Prugosene C1	C 27 H 36 O 3	[M+H] ⁺	5.6	2.3	4.3	13718	10.35	409.2737	409.2714	
+	mais -Rugulosin Rugulosin A Ra...	C 30 H 22 O 10	[M+H] ⁺	2.1	1.2	7.8	13588	7.54	543.1286	543.1274	
+	mais-Rugulosin Rugulosin A Radicali...	C 30 H 22 O 10	[M+H] ⁺	2.1	1.2	7.8	13588	7.54	543.1286	543.1274	
+	8-Chlororugulosine A	C 16 H 15 Cl 1 N 2 O 2	[M+H] ⁺	0.4	0.1	21.8	16559	3.46	303.0895	303.0894	
+	8-Chlororugulosine B	C 16 H 15 Cl 1 N 2 O 2	[M+H] ⁺	0.4	0.1	21.8	16559	3.46	303.0895	303.0894	
+	Wortmannilactone C	C 24 H 34 O 6	[M+H] ⁺	1.5	0.6	6.6	15536	5.15	419.2428	419.2422	
+	Wortmannilactone A	C 24 H 34 O 6	[M+H] ⁺	1.5	0.6	6.6	15536	5.15	419.2428	419.2422	
+	S - mais -Skyrin Endothianin 1...	C 30 H 18 O 10	[M+H] ⁺	0.4	0.2	11.8	15500	6.58	539.0973	539.0971	
+	mais-Iridoskyrin	C 30 H 18 O 10	[M+H] ⁺	0.4	0.2	11.8	15500	6.58	539.0973	539.0971	
+	S-mais-Skyrin Endothianin 1-linha...	C 30 H 18 O 10	[M+H] ⁺	0.4	0.2	11.8	15500	6.58	539.0973	539.0971	
+	mais-Oxyskyrin	C 30 H 18 O 11	[M+H] ⁺	1.2	0.7	10.2	14727	7.66	555.0922	555.0915	
+	mais-Iridoskyrin	C 30 H 18 O 10	[M+H] ⁺	1.1	0.6	43.9	15166	8.28	539.0973	539.0967	
+	S - mais -Skyrin Endothianin 1...	C 30 H 18 O 10	[M+H] ⁺	1.1	0.6	43.9	15166	8.28	539.0973	539.0967	
+	S-mais-Skyrin Endothianin 1-linha...	C 30 H 18 O 10	[M+H] ⁺	1.1	0.6	43.9	15166	8.28	539.0973	539.0967	
+	Wortmannilactone C	C 24 H 34 O 6	[M+H] ⁺	1.4	0.6	9.4	19165	4.57	419.2428	419.2422	
+	Wortmannilactone A	C 24 H 34 O 6	[M+H] ⁺	1.4	0.6	9.4	19165	4.57	419.2428	419.2422	
+	Rasfonin	C 25 H 38 O 6	[M+H] ⁺	4.5	1.9	7.2	20540	10.42	435.2741	435.2722	
+	OF-4949-II	C 22 H 24 N 4 O 8	[M+H] ⁺	0.2	-0.1	8.4	14567	1.00	473.1667	473.1668	
+	9-Amino-12- 2-amino-1-hydroxy-2-oxo...	C 22 H 24 N 4 O 8	[M+H] ⁺	0.2	-0.1	8.4	14567	1.00	473.1667	473.1668	
+	4 6-Dihydroxy-5-methyl-1 3H-isobenz...	C 9 H 8 O 4	[M+H] ⁺	0.2	-0.0	5.5	18865	5.91	181.0495	181.0496	
+	4 6-Dihydroxy-5-methyl-1 3H-isobenz...	C 9 H 8 O 4	[M+H] ⁺	0.1	-0.0	5.8	15268	6.08	181.0495	181.0496	
+	Emodin Frangula emodin Archin Fr...	C 15 H 10 O 5	[M+H] ⁺	0.5	0.1	13.4	17571	7.12	271.0601	271.0600	
+	1-4-5-Trihydroxy-2-methylantraquino...	C 15 H 10 O 5	[M+H] ⁺	0.5	0.1	13.4	17571	7.12	271.0601	271.0600	
+	4 6-Dihydroxy-5-methyl-1 3H-isobenz...	C 9 H 8 O 4	[M+H] ⁺	0.2	-0.0	7.2	15055	1.04	181.0495	181.0496	
+	8-O-Methyl-epiaustdiol	C 13 H 14 O 5	[M+H] ⁺	8.9	2.2	8.4	18054	2.30	251.0914	251.0892	
+	8-Chlororugulosine A	C 16 H 15 Cl 1 N 2 O 2	[M+H] ⁺	0.3	0.1	14.5	26826	3.16	303.0895	303.0894	
+	8-Chlororugulosine B	C 16 H 15 Cl 1 N 2 O 2	[M+H] ⁺	0.3	0.1	14.5	26826	3.16	303.0895	303.0894	
+	mais-Rugulosin Rugulosin A Radicali...	C 30 H 22 O 10	[M+H] ⁺	0.6	0.3	2.3	20461	6.78	543.1286	543.1282	
+	mais -Rugulosin Rugulosin A Ra...	C 30 H 22 O 10	[M+H] ⁺	0.6	0.3	2.3	20461	6.78	543.1286	543.1282	
+	mais-Oxyskyrin	C 30 H 18 O 11	[M+H] ⁺	0.2	0.1	18.0	18246	6.70	555.0922	555.0921	
+	S-mais-Skyrin Endothianin 1-linha...	C 30 H 18 O 10	[M+H] ⁺	0.4	0.2	19.1	20278	8.33	539.0973	539.0970	
+	S - mais -Skyrin Endothianin 1...	C 30 H 18 O 10	[M+H] ⁺	0.4	0.2	19.1	20278	8.33	539.0973	539.0970	
+	mais-Iridoskyrin	C 30 H 18 O 10	[M+H] ⁺	0.4	0.2	19.1	20278	8.33	539.0973	539.0970	
+	Flavomannin-A Flavomannin	C 30 H 26 O 10	[M+H] ⁺	0.3	0.2	4.0	41417	5.52	547.1599	547.1597	
+	Rugulosin B	C 30 H 22 O 11	[M+H] ⁺	0.4	0.2	7.2	48488	7.19	559.1235	559.1232	
+	--Deoxyrubroskyrin	C 30 H 22 O 11	[M+H] ⁺	0.4	0.2	7.2	48488	7.19	559.1235	559.1232	
+	--Deoxyluteoskyrine 8-Hydroxyrugul...	C 30 H 22 O 11	[M+H] ⁺	0.4	0.2	7.2	48488	7.19	559.1235	559.1232	
+	--Deoxyluteoskyrine 8-Hydroxyrugul...	C 30 H 22 O 11	[M+H] ⁺	0.1	-0.1	4.2	55744	6.14	559.1235	559.1236	
+	Rugulosin B	C 30 H 22 O 11	[M+H] ⁺	0.1	-0.1	4.2	55744	6.14	559.1235	559.1236	
+	--Deoxyrubroskyrin	C 30 H 22 O 11	[M+H] ⁺	0.1	-0.1	4.2	55744	6.14	559.1235	559.1236	
+	Kasanosin C	C 22 H 24 O 7	[M+H] ⁺	0.3	-0.1	1.3	83187	6.04	401.1595	401.1596	
+	mais -Mitorubrinol acetate	C 23 H 20 O 9	[M+H] ⁺	0.4	-0.2	3.8	81101	6.22	441.1180	441.1182	
+	Prugosin B1 Prugosene B1	C 28 H 38 O 6	[M+H] ⁺	0.0	0.0	12.4	80744	8.22	471.2741	471.2741	
+	--Deoxyrubroskyrin	C 30 H 22 O 11	[M+H] ⁺	0.1	-0.1	5.9	90212	6.39	559.1235	559.1236	
+	Rugulosin B	C 30 H 22 O 11	[M+H] ⁺	0.1	-0.1	5.9	90212	6.39	559.1235	559.1236	
+	--Deoxyluteoskyrine 8-Hydroxyrugul...	C 30 H 22 O 11	[M+H] ⁺	0.1	-0.1	5.9	90212	6.39	559.1235	559.1236	
+	mais -Mitorubrin	C 21 H 18 O 7	[M+H] ⁺	0.1	0.0	4.7	101074	6.67	383.1125	383.1125	
+	4 6-Dihydroxy-5-methyl-1 3H-isobenz...	C 9 H 8 O 4	[M+H] ⁺	0.9	-0.2	8.5	97277	5.59	181.0495	181.0497	
+	BE-24811	C 18 H 21 Cl 1 O 4	[M+H] ⁺	0.3	0.1	22.5	131165	7.95	337.1201	337.1200	
+	Monomethyl- mais -mitorubrin Mon...	C 22 H 20 O 7	[M+H] ⁺	0.5	-0.2	9.5	152146	6.23	397.1282	397.1284	
+	Monomethyl-mitorubrin Monomethyl-S...	C 22 H 20 O 7	[M+H] ⁺	0.5	-0.2	9.5	152146	6.23	397.1282	397.1284	
+	4 6-Dihydroxy-5-methyl-1 3H-isobenz...	C 9 H 8 O 4	[M+H] ⁺	0.8	-0.1	11.2	178207	5.74	181.0495	181.0497	
+	mais-Rugulosin Rugulosin A Radicali...	C 30 H 22 O 10	[M+H] ⁺	0.3	-0.2	3.8	265204	6.98	543.1286	543.1287	
+	mais -Rugulosin Rugulosin A Ra...	C 30 H 22 O 10	[M+H] ⁺	0.3	-0.2	3.8	265204	6.98	543.1286	543.1287	
+	6-Hydroxy-3-methoxy-mitorubrin	C 22 H 20 O 8	[M+H] ⁺	0.6	-0.3	11.7	362435	5.91	413.1231	413.1234	
+	4-Hydroxy-3-methoxy-S-mitorubrin	C 22 H 20 O 8	[M+H] ⁺	0.6	-0.3	11.7	362435	5.91	413.1231	413.1234	
+	mais-Rugulosin Rugulosin A Radicali...	C 30 H 22 O 10	[M+H] ⁺	0.0	-0.0	5.6	275907	7.04	543.1286	543.1286	
+	mais -Rugulosin Rugulosin A Ra...	C 30 H 22 O 10	[M+H] ⁺	0.0	-0.0	5.6	275907	7.04	543.1286	543.1286	
+	Rugulosine-B	C 16 H 16 N 2 O 2	[M+H] ⁺	1.2	-0.3	18.6	407911	2.62	269.1285	269.1288	
+	Rugulosine-B	C 16 H 16 N 2 O 2	[M+H] ⁺	1.2	-0.3	18.6	407911	2.62	269.1285	269.1288	
+	Rugulosine-A	C 16 H 16 N 2 O 2	[M+H] ⁺	1.2	-0.3	18.6	407911	2.62	269.1285	269.1288	
+	Rugulosine-A	C 16 H 16 N 2 O 2	[M+H] ⁺	1.2	-0.3	18.6	407911	2.62	269.1285	269.1288	
+	Rugulosin B	C 30 H 22 O 11	[M+H] ⁺	0.3	-0.1	6.8	478292	5.80	559.1235	559.1236	
+	--Deoxyrubroskyrin	C 30 H 22 O 11	[M+H] ⁺	0.3	-0.1	6.8	478292	5.80	559.1235	559.1236	
+	--Deoxyluteoskyrine 8-Hydroxyrugul...	C 30 H 22 O 11	[M+H] ⁺	0.3	-0.1	6.8	478292	5.80	559.1235	559.1236	
+	Kasanosin B	C 22 H 24 O 8	[M+H] ⁺	0.9	-0.4	19.7	752979	5.59	417.1544	417.1548	
+	Kasanosin A	C 22 H 24 O 8	[M+H] ⁺	0.9	-0.4	19.7	752979	5.59	417.1544	417.1548	
+	8-Chlororugulosine A	C 16 H 15 Cl 1 N 2 O 2	[M+H] ⁺	1.5	-0.5	9.3	1724310	3.58	303.0895	303.0899	
+	8-Chlororugulosine B	C 16 H 15 Cl 1 N 2 O 2	[M+H] ⁺	1.5	-0.5	9.3	1724310	3.58	303.0895	303.0899	
+	4-Hydroxy-3-methoxy-S-mitorubrin	C 22 H 20 O 8	[M+H] ⁺	2.0	-0.8	31.2	1844907	5.74	413.1231	413.1239	
+	6-Hydroxy-3-methoxy-mitorubrin	C 22 H 20 O 8	[M+H] ⁺	2.0	-0.8	31.2	1844907	5.74	413.1231	413.1239	

FIGURA 4.71 - Resumo de dados gerado pelo programa *Target Analysis* aos microextratos avaliados de *T.rugulosus*

A representação gráfica dos resultados também foi fornecida pelo uso do programa *Target Analysis*. Esta representação é dada na forma de sobreposição dos cromatogramas de íons extraídos *EIC* referentes à cada metabólito alvo, encontrados durante o cruzamento das informações espectrais. Alguns dos *hits* de maior score selecionados para algumas bandas detectadas de maior interesse, encontram-se resumidos na FIGURA 4.72, e destacados por diferentes cores.

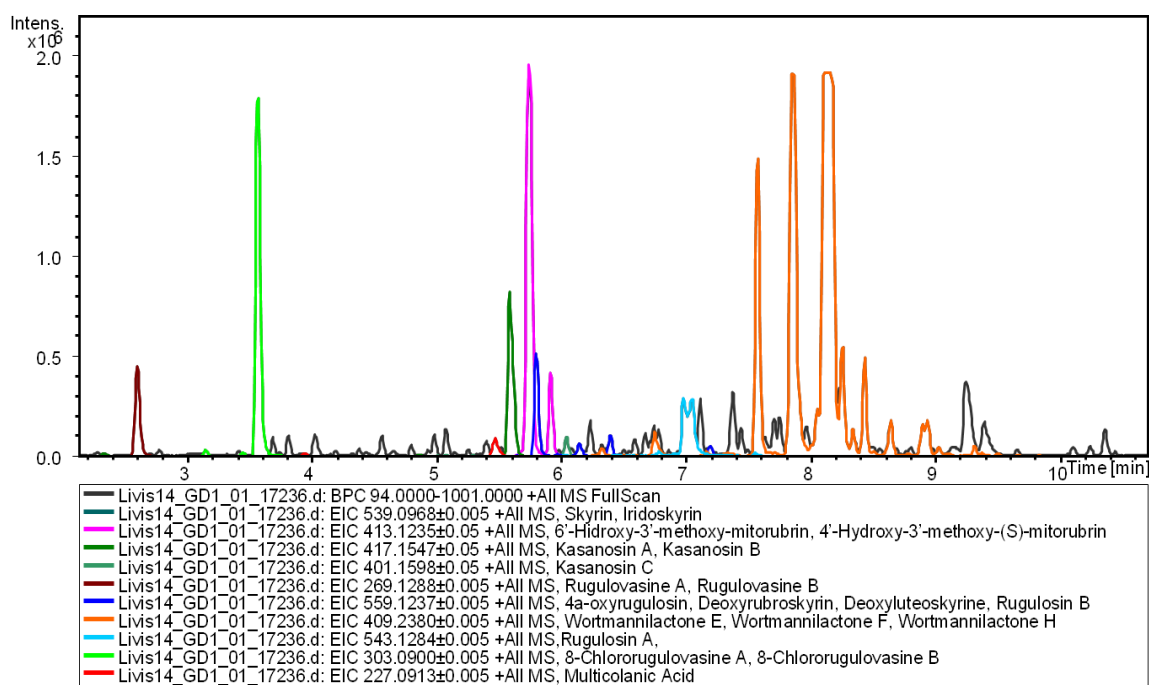


FIGURA 4.72 - Sobreposição dos cromatogramas de *EIC* ao cromatograma de *BPC* referente ao micro-extrato de PDA de *T. rugulosus*. Relações de íons extraídos seguem na parte inferior da figura bem como os metabólitos sugeridos correspondentes. Resultados gerado pelo programa *Target Analysis*

Contudo, com um universo mais restrito para investigação, as identidades sugeridas foram criteriosamente avaliadas considerando-se novamente os perfis espectrais de UV e as massas acuradas dereplicadas (perfil isotópico e o aparecimento dos íons adutos diagnósticos). No processo de confirmação foram utilizados e explorados padrões de compostos microbianos pertencentes à coleção IBT-DTU ou alternativamente, padrões de micro-organismos da mesma coleção.

Pontualmente, uma das presenças que mais chamou atenção nos extratos de *T. rugulosus* foram os íons de massa nominal m/z 409 para três bandas cromatográficas majoritárias, eluídas na região entre 7,9 min e 8,4 min. Por exemplo, o espectro de *full scan* relativo à banda cromatográfica caracterizada em 7,9 minutos

revelou o íon bastante intenso de m/z 409,2381. No entanto, com uma avaliação mais criteriosa, constatou-se que a massa monoisotópica do metabólito de interesse tratava-se de m/z 427,2482, o que foi confirmado pela ocorrência dos adutos de sódio formados $[M+Na]^+ = 449,2297$ e $[2M+Na]^+ = 875,4710$. A identidade do íon m/z 409 pôde ser atribuída ao íon pseudomolecular desidratado $[M+H-H_2O]^+$, devido a perda de uma molécula de H_2O já na fonte de ionização do espectrômetro de massas (FIGURA 4.74).

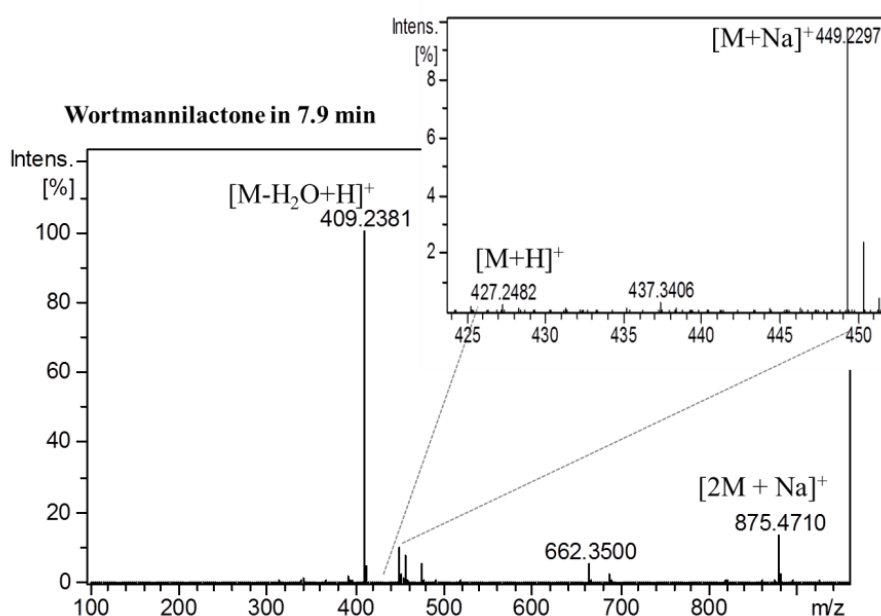


FIGURA 4.74 - Derreplicação de uma das wortimanolactonas produzidas por *T. rugulosus* (7,9 minutos). O espectro de full scan mostra a formação dos íons diagnósticos como adutos de sódio $[M+Na]^+$ e $[2M+Na]^+$, bem como o íon oriundo de fragmentação na fonte de ionização $[M-H_2O+H]^+$

Dentre as opções de maior score visualizadas na lista obtida via *Target Analysis*, foram indicadas as wortimanolactonas E, F e H. As wortimanolactonas são comumente produzidas pelo fungo *Talaromyces wortimannii* (DONG et al., 2006), podendo existir na forma macrocíclica ou constituídas por hexo ou pentaciclos terminais a uma cadeia tetraênica aberta, como ocorre nas wortimanolactonas em questão (DONG et al., 2009) (FIGURA 4.74).

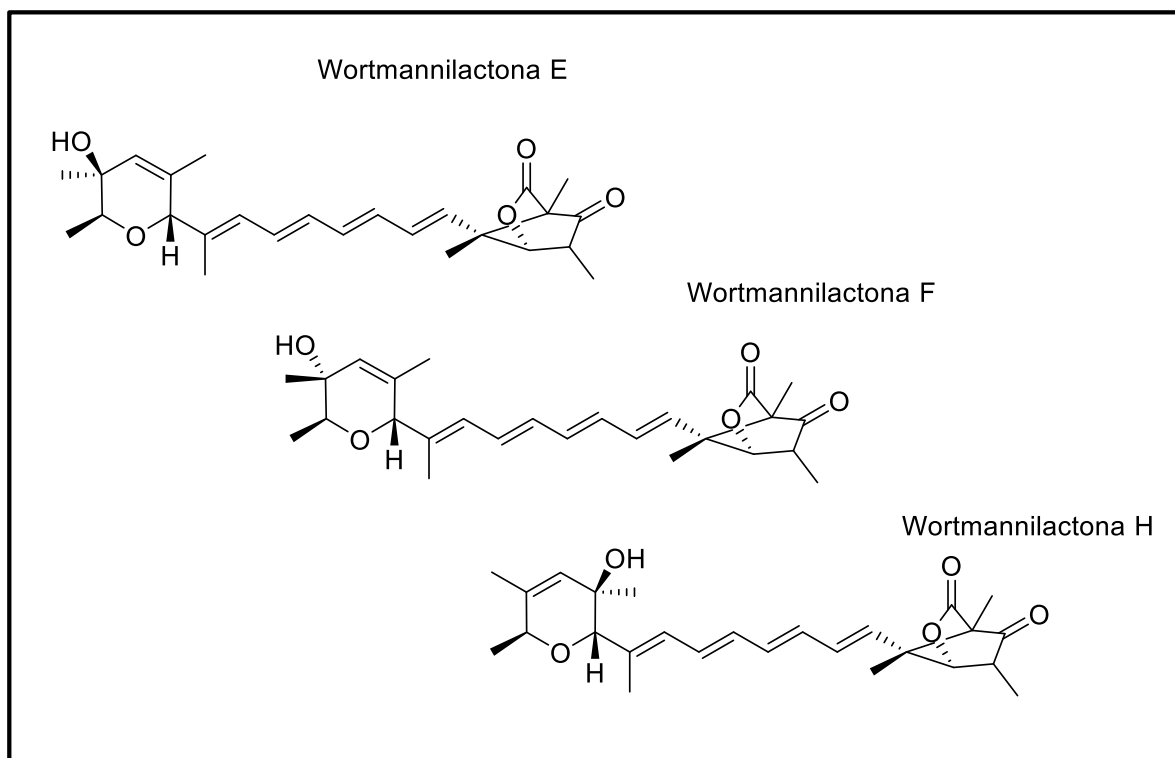


FIGURA 4.74 - Wortmannilactonas potencialmente produzidas por *T. rugulosus*

Para aumentar a confiabilidade às identidades sugeridas aos íons de m/z 427, o micro-extrato referente ao meio PDA de *T. wortmannii* (IBT-28732) foi comparado ao micro-extrato de *T. rugulosus*.

Embora não tenha sido possível atribuir qual dos isômeros indicados eram correspondentes a cada banda cromatográfica de modo específico, a produção das três wortmannilactonas foi confirmada pela comparação entre os dados espectrais provenientes dos micro-extratos das espécies de *Talaromyces*. Claramente, as bandas visualizadas em 7,5min, 7,8 min 8,1 sugerem a produção dos três isômeros por ambas as cepas fúngicas, haja vista a alta compatibilidade entre as massas exatas acuradas e os espectros de UV. Estes últimos, inclusive, tiveram seu perfil confirmado através da comparação com dados da literatura (DONG et al., 2009).

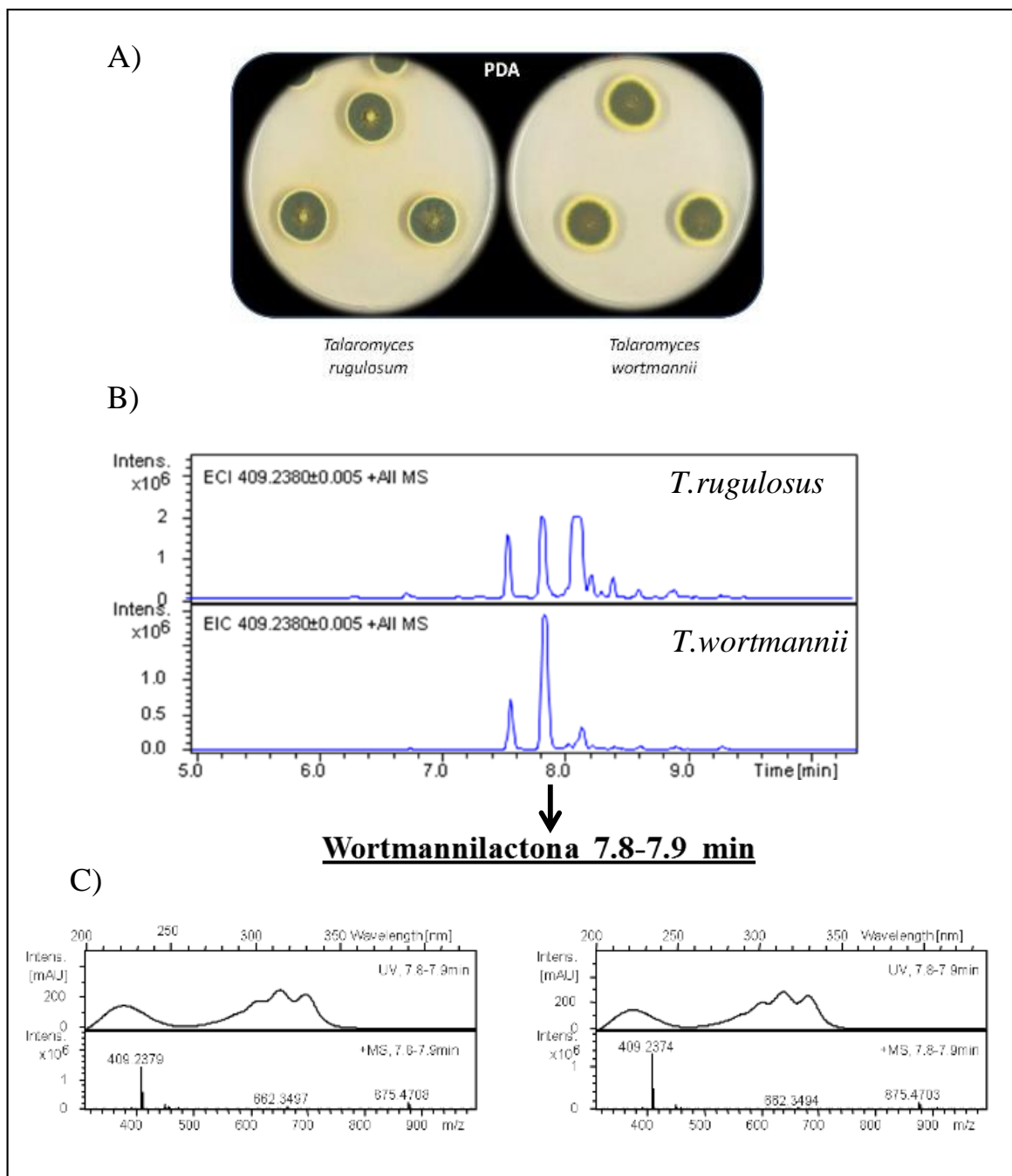


FIGURA 4.75 - a) Micro-cultivo de *T.rugulosus* e *T.wortmannii* em PDA; b) Cromatograma de ECI para m/z 409,2380 (\pm 5 ppm) correspondente às wortimannilactonas apontadas no processo de derreplicação; c) Comparação dos espectros de UV e *full scan* referentes à wortimannilactona eluída em 7,8 min, detectada nos micro-extratos de *T.rugulosus* e *T.wortmannii*

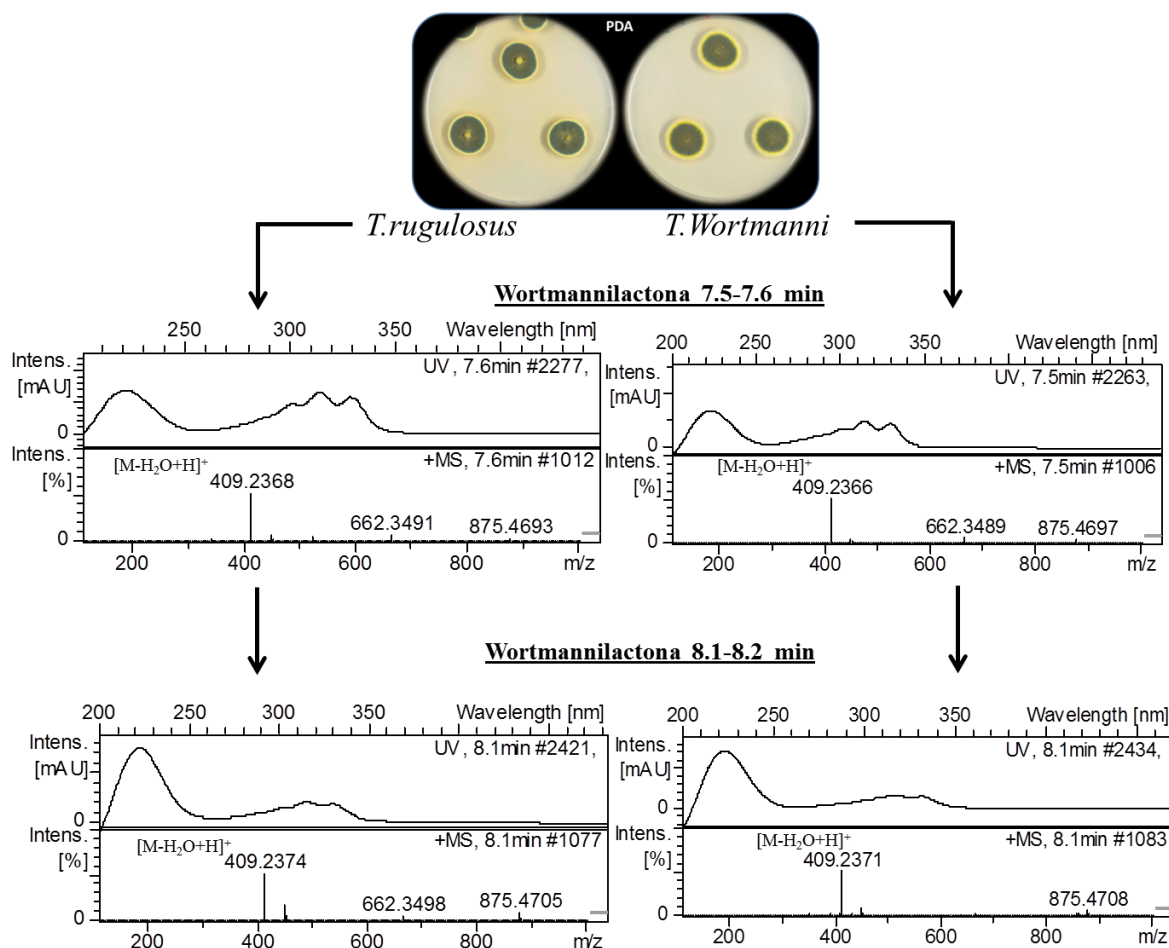


FIGURA 4.77 - Comparação dos espectros de UV e *full scan* referentes às wortmannilactonas eluídas em 7,5 e 8,1 min, detectadas nos micro-extratos de *T. rugulosus* e *T. wortmannii*

Como já explicitado anteriormente, o gênero *Talaromyces* abrange hábeis produtores de metabólitos pertencentes à classe das azafilonas. Não diferente foi o perfil químico observado a partir dos extratos do endófito de maçã. Para a massa monoisotópica m/z 413,1235 foi conferida duas possibilidades: a 6'-hidroxi-3'-metoxi-mitorubrina e a 4'-hidroxi-3'-metoxi-(S)-mitorubrina. Tal sugestão deu-se condizente ao número de bandas cromatográficas correspondentes ao íon mencionado, já que o cromatograma de *EIC* (\pm 5ppm de desvio) apresentou a detecção 2 compostos FIGURA 4.7777.

O espectro de UV também foi compatível ao perfil descrito na literatura para tais metabólitos, cujos máximos de absorção encontram-se em 250 e 347 nm

(YAMAZAKI et al., 2010), dando indícios de que, de fato, estes compostos sejam biossintetizados por *T. rugulosus*.

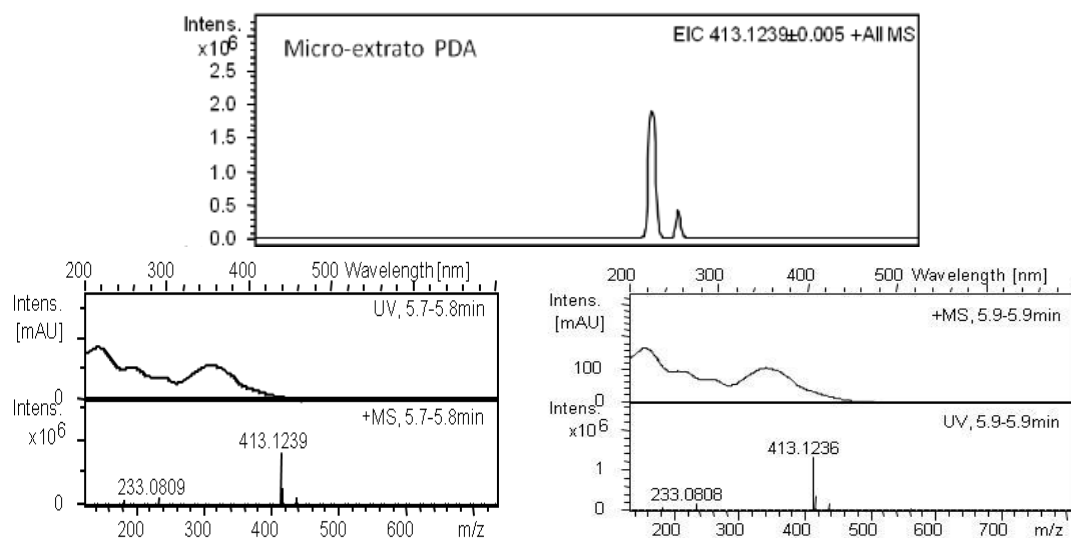


FIGURA 4.77 - Espectros de UV e *full scan* correspondentes às duas bandas cromatográficas indicadas no cromatograma de *EIC* do micro-extrato de PDA de *T.rugulosus* para *m/z* 413,1239

Outra ferramenta utilizada para confirmação destes metabólitos no extrato fúngico, foi a realização de experimentos de MS/MS. Como pode ser visualizado no espectro de íons produtos para *m/z* 413 (FIGURA 4.78), o aparecimento dos íons diagnósticos *m/z* 233, 215 e 181 sugerem a provável produção das hidroximitorubinas para os isômeros detectados no micro-extrato, conforme segue o mecanismo de fragmentação proposto para o íon pseudomolecular nominal $[M+H]^+ = 413$.

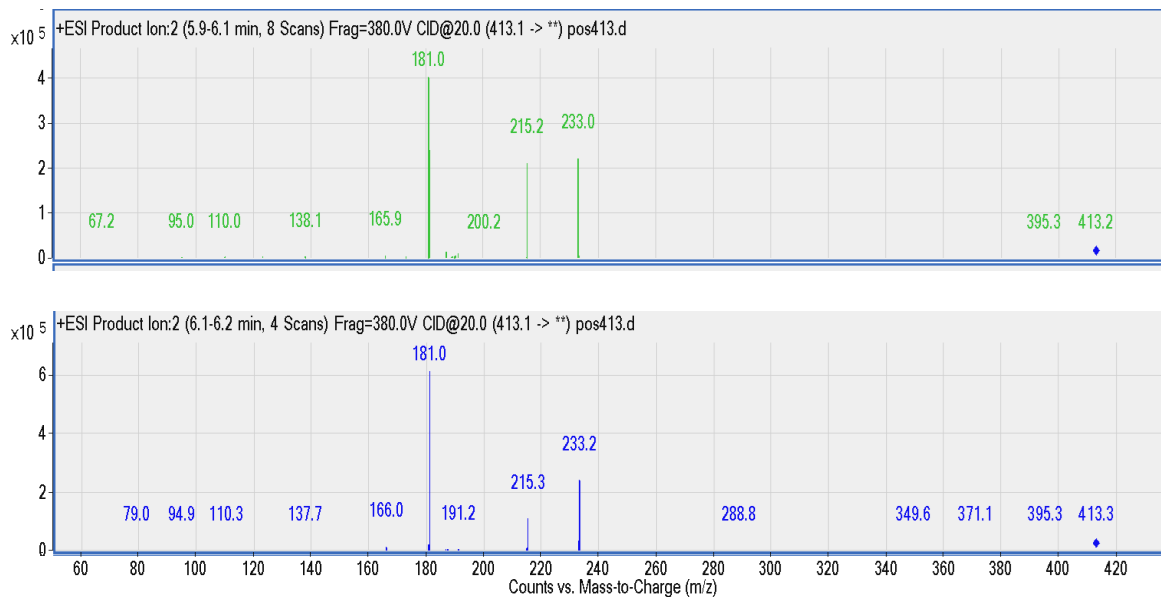
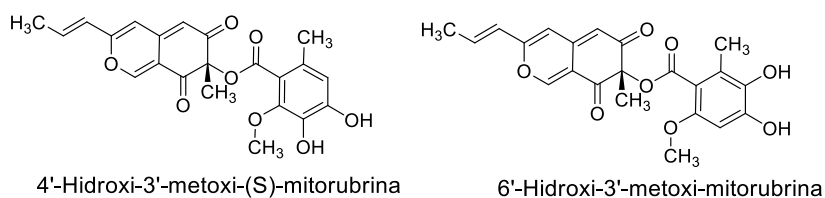


FIGURA 4.78 - Prováveis azafilonas produzidas por *T.rugulosus* e espectros de íons produto dos íons m/z 413 encontrados nos micro-extratos fúngicos, correspondentes às referidas substâncias, método D

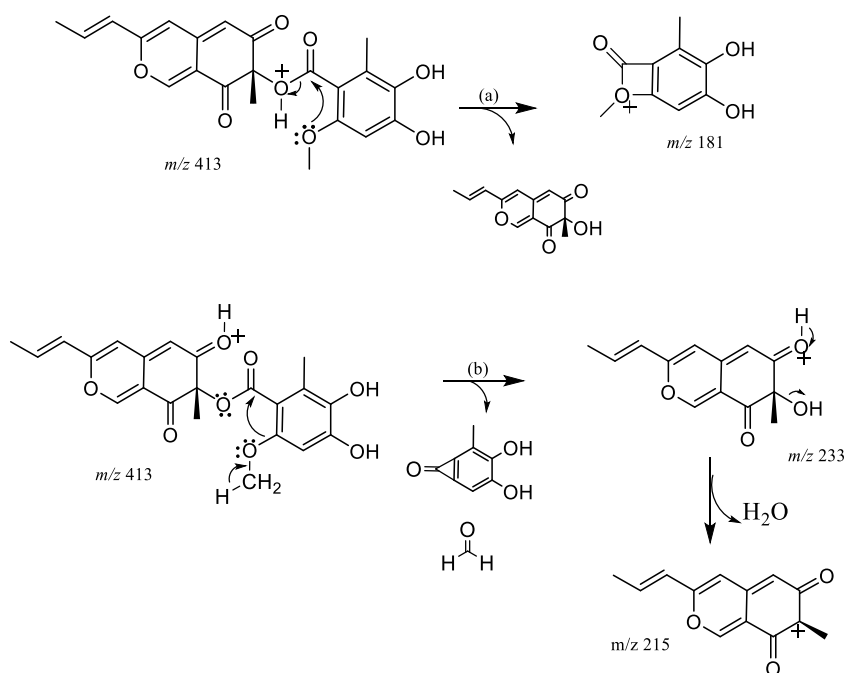


FIGURA 4.79 - Mecanismo de fragmentação proposto para as hidroxi-mitorubrin apontadas como potenciais metabólitos de *T. rugulosus*

Da mesma forma, o perfil de fragmentação encontrado para a kasanosina C, outra azafilona sugerida no processo de derreplicação, corroborou para que houvesse evidências de sua produção por *T. rugulosus*.

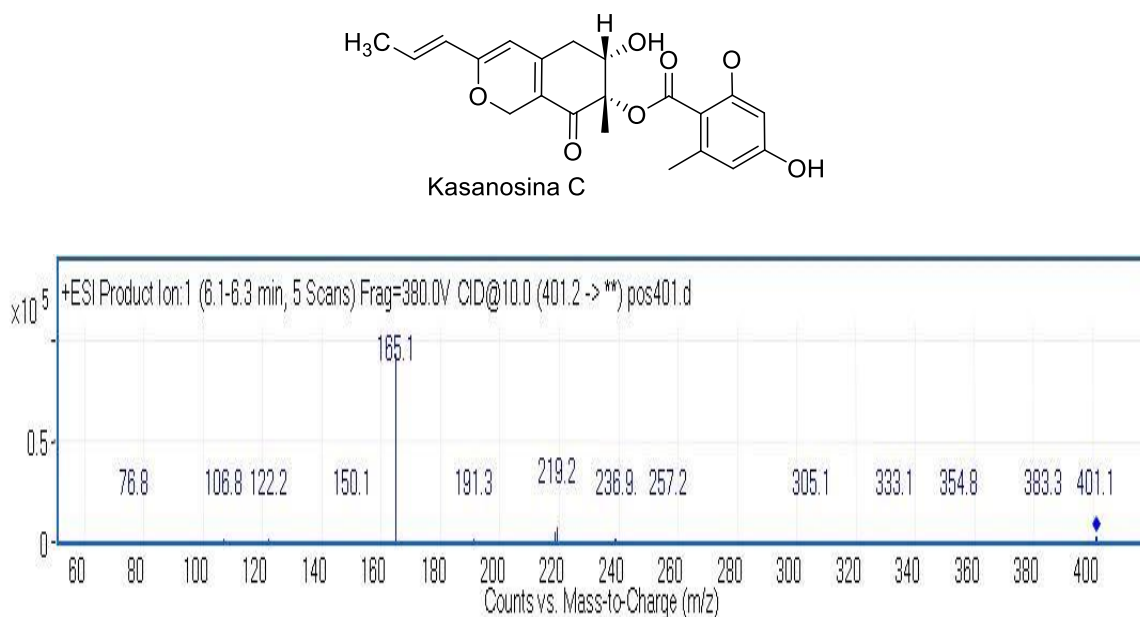


FIGURA 4.80 - Estrutura da Kasanosina C e espectro de íons produto referente à m/z 401 detectado nos micro-extratos de *T. rugulosus*, correspondente ao referido metabólito, método D

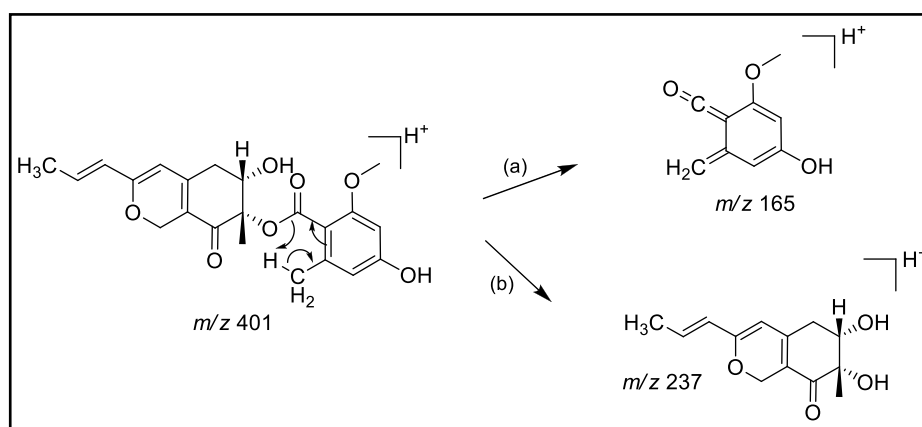


FIGURA 4.81 - Mecanismo de fragmentação proposto para a Kasanosina C, justificando os íons fragmentos visualizados no espectro ilustrados na FIGURA 4.80

Tendo em vista a produção de hidróxi mitorubrininas pelo endófito em estudo, alguns padrões relativos à mitorubrina e seus derivados biossintéticos (coleção IBT-DTU), foram analisados nas mesmas condições cromatográficas do micro-extrato de *T. rugulosus*. Como padrões foram avaliados a (+)-mitorubrina, (-)-ácido mitorubrínico, (-)-mitorubrinol, e o (+)-acetato de rubrinol.

Os resultados apresentados na FIGURA 4.83 mostram a ampliação dos cromatogramas de *EIC* e espectros de *full scan* do micro-extrato fúngico para cada metabólito, associados aos mesmos dados de seus respectivos padrões. É possível observar que de fato, tais compostos são produzidos pelo micro-organismo, já que claramente são visualizados os mesmos tempos de retenção para as bandas de *EIC* e também alta similaridade entre as massas exatas acuradas para os metabólitos alvo e seus respectivos padrões.

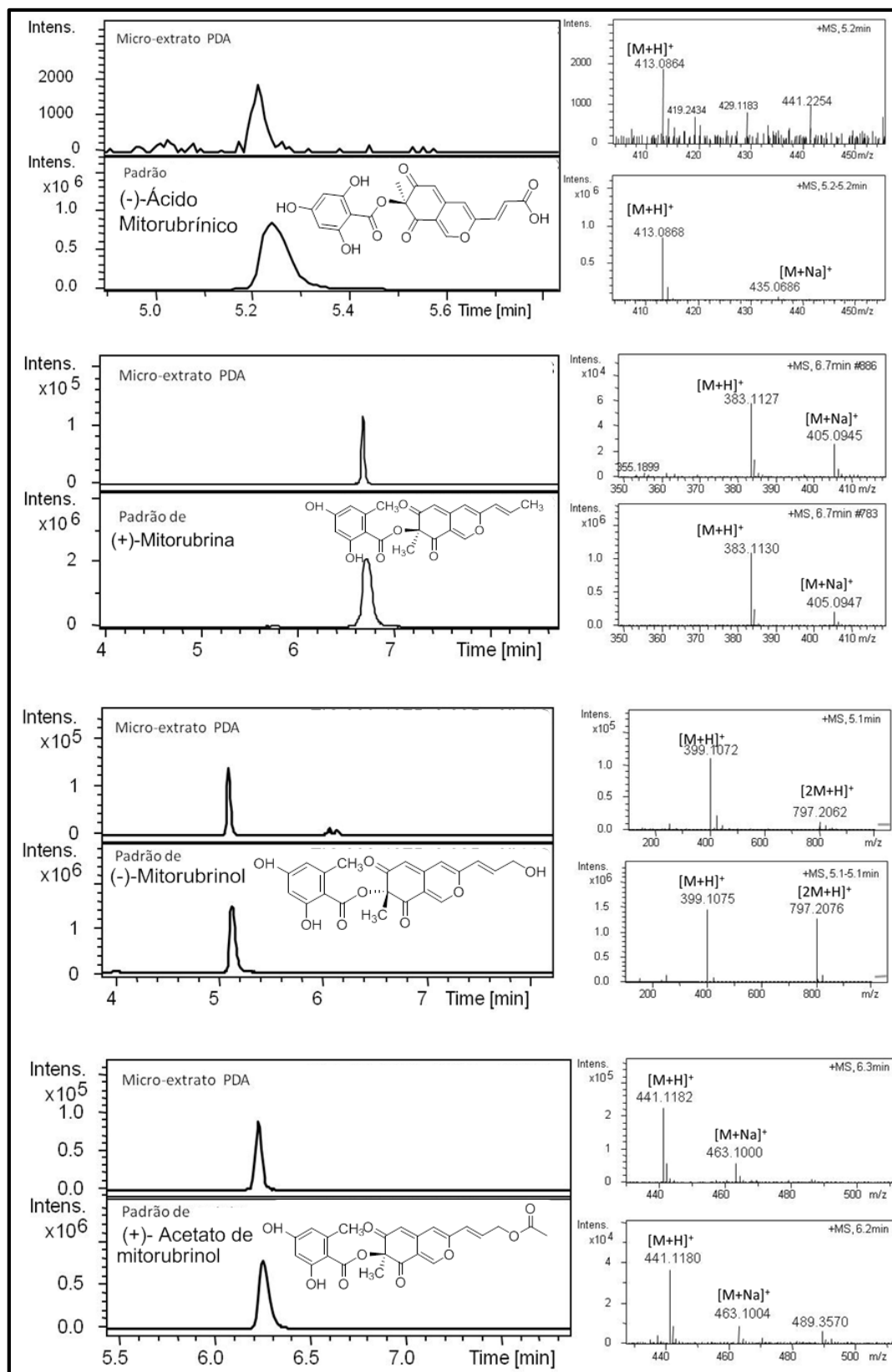


FIGURA 4.83 - Ampliação da região de interesse para os cromatogramas referentes ao micro-extrato de *T. rugulosus* e dos padrões de metabólitos avaliados para comparação; ampliação do espectro de *full scan* das bandas alvo e dos padrões indicados

Outro ponto de destaque revelado pelo screening metabólico de *T. rugulosus* foi a potencial habilidade do fungo em biossintetizar compostos policetídicos. Durante o processo de derreplicação, por exemplo, houve a detecção dos íons de massa monoisotópica m/z 539,0971 (FIGURA 4.69) e 543,1287. Dentre os *hits* encontrados para estes alvos, foram apontados para o primeiro metabólito a esquirina, e para o segundo, a bisantraquinona rugulosina A. A identificação destes compostos foi confirmada pelo isolamento dos mesmos durante o processo de isolamento de outros compostos de interesse.

Conforme descrito na parte de procedimento experimental, a esquirina e a rugulosina A, foram isoladas a partir do extrato do fúngico em meio BD (batata-dextrose). A fração enriquecida nos compostos, de onde estes foram isolados, foi submetida à cromatografia de baixa pressão, processo que pode ser visualizado na FIGURA 4.84. Caracteristicamente, a esquirina apresenta coloração avermelhada intensa, e a rugulosina A, coloração amarela. Tal propriedade física é compatível às informações relatadas na literatura sobre os compostos, bem como os respectivos espectros de UV, igualmente bastante característicos às espécies.

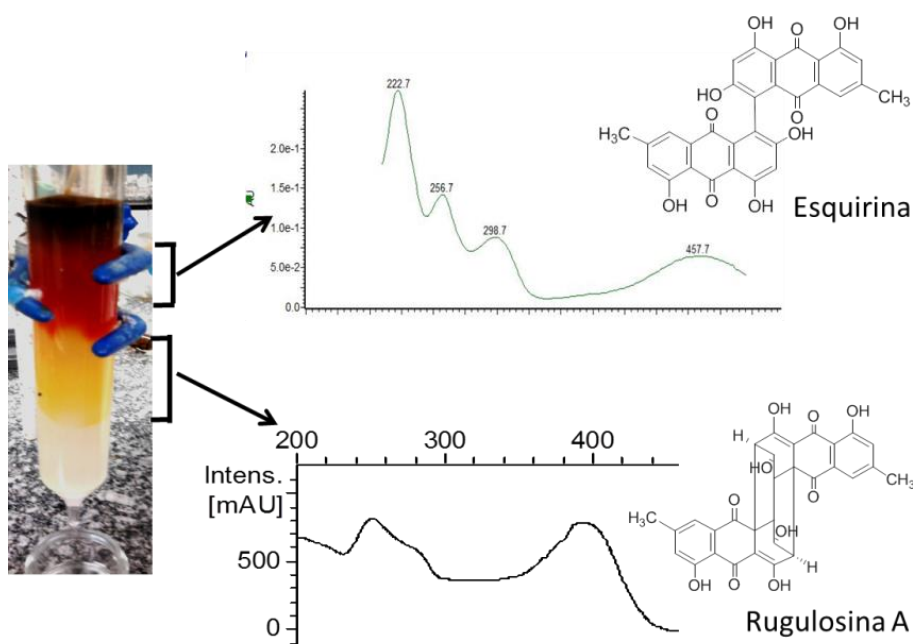


FIGURA 4.84 - Processo de cromatografia líquida de baixa pressão utilizado no isolamento da esquirina e da rugulosina A. Espectros de UV dos metabólitos são ilustrados na figura

O espectro de RMN de ^1H referente à bisantraquinona esquirina (FIGURA 4.84), revelou o aparecimento de três núcleos na região de hidrogênios aromáticos, com deslocamentos químicos em δ 6,90, 7,05 e 7,36. Outros três singletos são encontrados no espectro. Dois deles bastante desblindados, com deslocamentos em δ 12,05 e δ 12,93, indicando prótons oriundos de hidroxilas em ligação de hidrogênio com unidades carboxílicas. O terceiro sinal, na região de núcleos metílicos em δ 2,35 com valor de integração para três hidrogênios.

Contudo, o número relativamente baixo de sinais em contraposição a uma massa molecular de valor médio (massa nominal = 538 Da) refletiram na confirmação de uma estrutura extremamente simétrica, como é o caso da esquirina. A confirmação desta identidade ao metabólito isolado foi obtida através da comparação dos dados espectrais descritos para este polictídeo na literatura aos dados experimentais obtidos, cujo resumo encontra-se na TABELA 4.7.

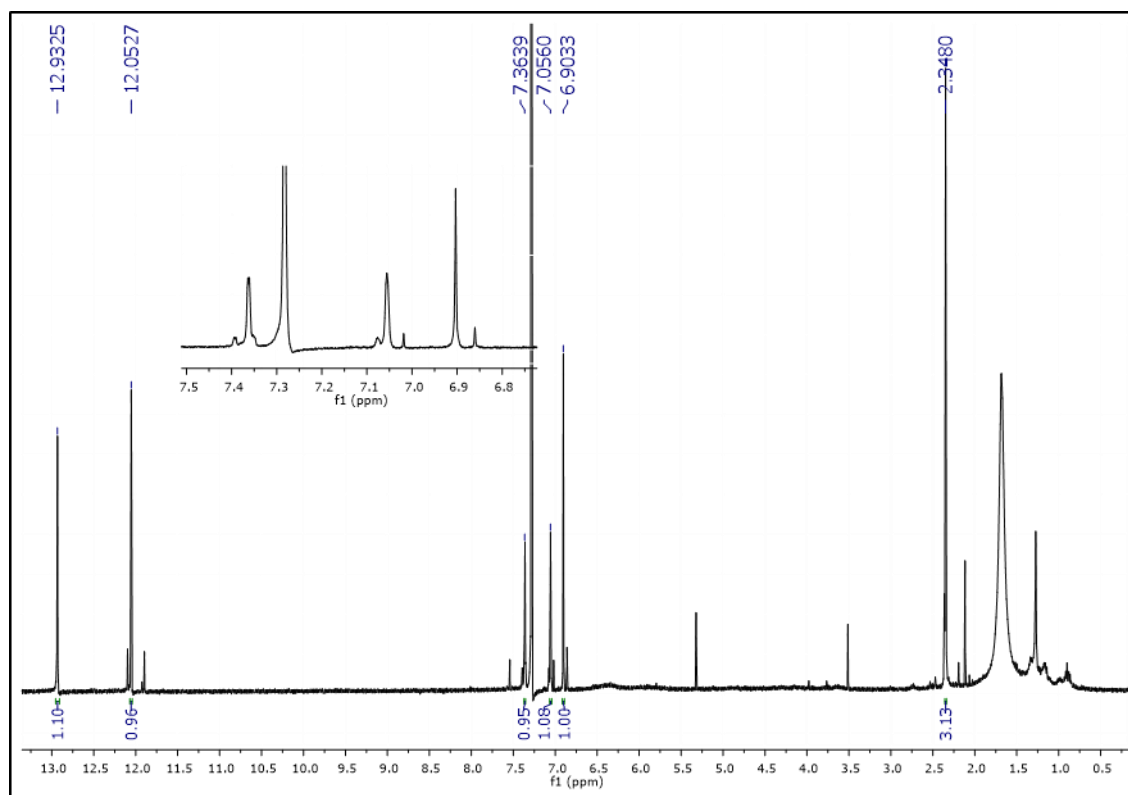


FIGURA 4.84 - Espectro de ^1H do metabólito esquirina (CD_3OD , 400 MHz)

TABELA 4.7 - Dados de RMN de ^1H referente à esquirina relatada na literatura e dados obtidos a partir da substância isolada

Posição	δ_{H} (n_{H} , m) (VARGAS et al., 2008)	δ_{H} (n_{H} , m) (Substância isolada)
2, 2'	7,10 (2, si)	7,05 (2, si)
4, 4'	7,24 (2, si)	7,36 (2, si)
7, 7'	6,59 (2, s)	6,90 (2, s)
11, 11'	2,30 (6, s)	2,35 (6, s)
OH- 1, 1'	12,13 (2, s)	12,05 (2, s)
OH- 8, 8'	12,80 (2, s)	12,93 (2, s)

n_{H} = número de núcleos; m = multiplicidade

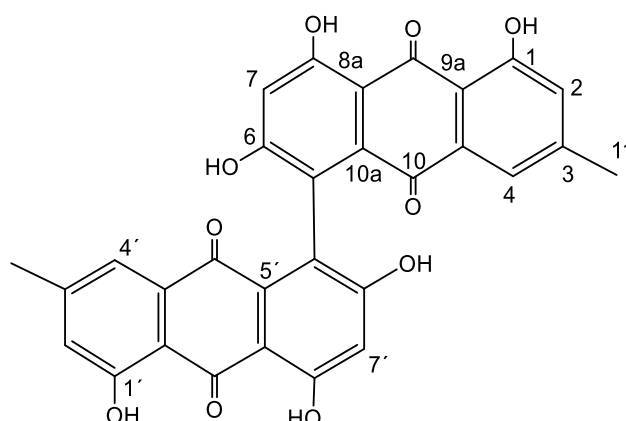


FIGURA 4.86 - Estrutura da bisantraquinona esquirina produzida por *T. rugulosus*

O espectro de RMN de ^1H referente à rugulosina A (FIGURA 4.86), mostrou grande similaridade ao espectro da esquirina, apresentando reduzido número de sinais em oposição à massa molecular relativamente alta (542 Da), evidenciando novamente a simetria estrutural característica a este metabólito. Os dados obtidos também se apresentaram em conformidade aos dados espectrais relatados para esta bisantraquinona na literatura (ZHOU, 2010), como pode ser visto na TABELA 4.8.

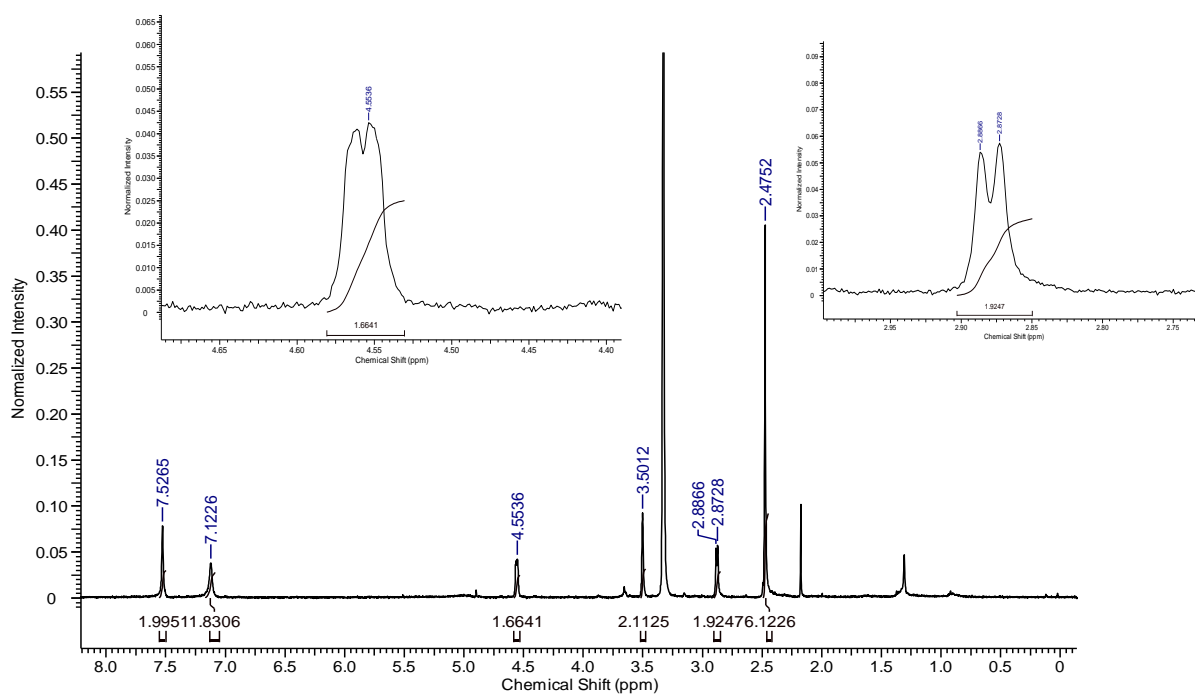


FIGURA 4.86 - Espectro de RMN ^1H da rugulosina A (400MHz, CD_3OD)

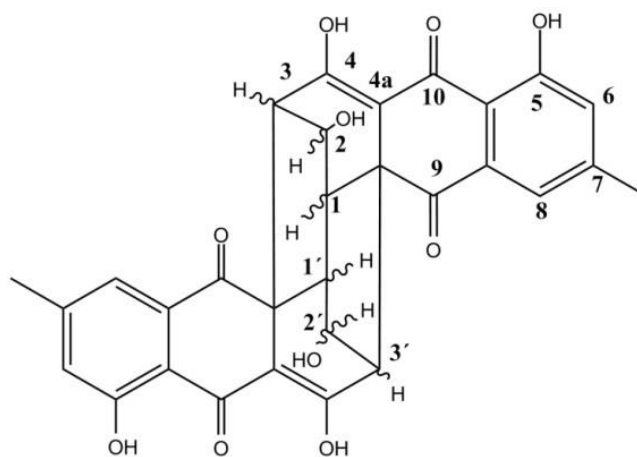


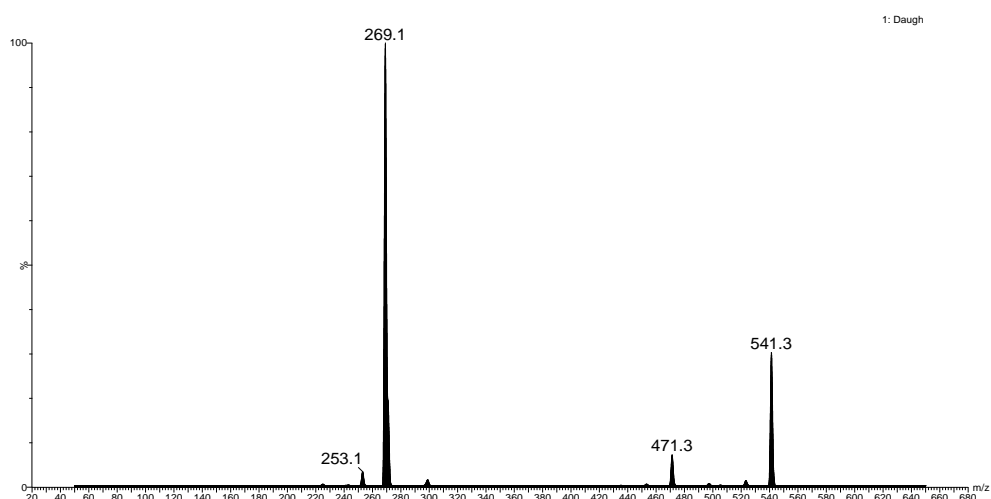
FIGURA 4.87 - Estrutura da bisantraquinona rugulosina A produzida por *T.rugulosus*

TABELA 4.8 - Dados de RMN de ^1H referente à rugulosina A relatada na literatura e dados obtidos a partir da substância isolada

Posição	$\delta(\text{H})^{\text{a}}$; (mult, nH); $J(\text{Hz})$ (Substância isolada)	$\delta(\text{H})^{\text{b}}$; (mult, nH); $J(\text{Hz})$ ZHOU,2010
1	3,50 (s,2H)	3,37 (s,2H)
2	4,55 (d,2H); 4	4,39 (d,2H); 6
3	2,88 (d,2H); 6,4	2,78 (d,2H); 6
6	7,12 (s, 2H)	7,20 (d,2H); 2,3
8	7,52 (s,2H)	7,46 (d,2H); 2,3
C=O(9)	-	-
C=O(10)	-	-
11	2,14 (s,6H)	2,43 (s,6H)

δ = deslocamento químico; mult.=multiplicidade; n^{H} = número de núcleos; J = constante de acoplamento; d=dubleteo; s_l singlete largo
a) CD_3OD , 400MHz; b) DMSO-d_6 , 500MHz

O espectro de íons produtos da substância isolada de m/z 541 no modo negativo de ionização, também mostra-se pertinente com a proposta, já que poucos fragmentos são encontrados no referido espectro, possivelmente devido a existência de anéis fundidos e poucas ligações lábeis, gerando predominantemente o pico base de m/z 269 (FIGURA 4.88).

FIGURA 4.88 - Espectro de íons produto da rugulosina A, m/z 541, 20 eV, ESI -

A rugulosina tem sido alvo de investigações químicas e biológicas por se tratar de um metabólito comumente encontrado como contaminante de produtos agrícolas como arroz, milho e cereais. Pesquisas realizadas revelaram a

hepatotoxicidade e atividade carcinogênica deste pigmento amarelo, mas também em contraste aos seus efeitos deletéreos, alguns estudos vêm demonstrando interesse em outros tipos de atividades que ela também parece apresentar, como antibiótica, antiviral, e principalmente inseticida (ZHOU, 2010).

Além de suas características biológicas, outro fator que chama atenção para a rugulosina é sua forma estrutural composta por um número considerável de centros estereogênicos, além três ligações C-C responsáveis pela junção de duas unidades antraquinônicas. A biogênese deste metabólito pode ser sugerida pela ocorrência de reações do tipo condensação de Michael, favorecidas pela existência de uma base que irá retirar um hidrogênio alfa carbonílico de um possível intermediário reduzido da bisantraquinona esquirina.

Após a reação ácido-base, ocorre o ataque nucleofílico do enolato formado ao centro eletrofílico alfa-beta carbonílico. O novo enolato formado irá recapturar o próton antes perdido, restabelecendo a base ao meio, formando assim a rugulosina (FIGURA 4.89).

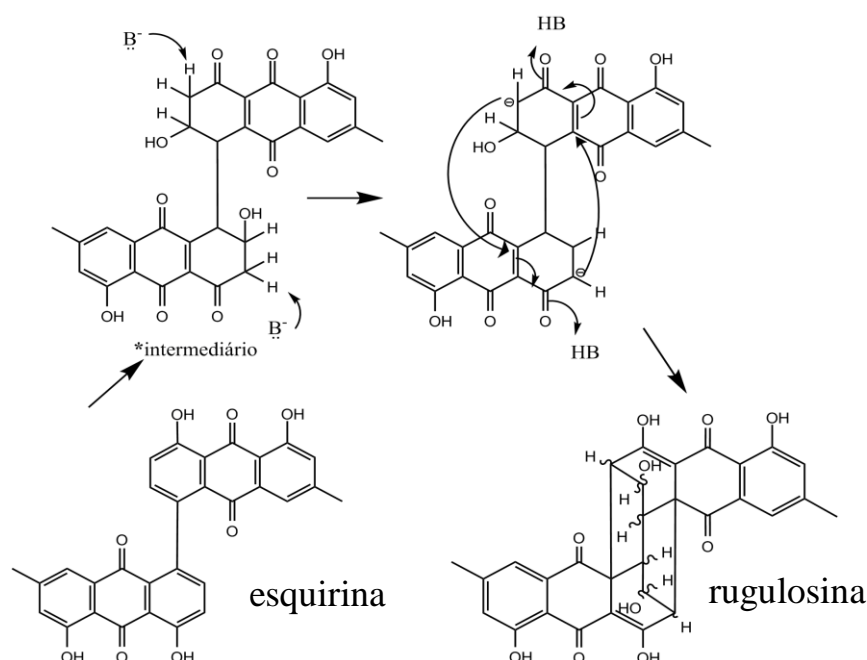


FIGURA 4.89 - Proposta para a biogênese da rugulosina A, a partir da esquirina

Na continuidade do processo de derreplicação, quatro íons relativos à massa monoisotópica m/z 559,1237 (\pm 5ppm) foram detectados nos micro-extratos de *T. rugulosus*, conforme indica o cromatograma de *EIC*, referente à seleção da massa do íon alvo. Novamente, com o auxílio do programa *Target Analysis*, os índices de maior score a estes íons foram atribuídos, coincidentemente, a quatro derivados biossintéticos da rugulosina A: 4-oxirugulosina, (-)-deoxiluteoesquirina, deoxirubroesquirina e a rugulosina B.

Apesar da inviabilidade de uma identificação mais concreta a respeito destes metabólitos, o processamento do espectro de UV das respectivas bandas, apontaram significativamente para a produção de compostos de esqueleto bisantraquinônico derivado da rugulosina. Isto porque, o perfil espectral observado, abrange grande similaridade àquele do precursor biossintético proposto, como pode ser verificado na FIGURA 4.90. Os máximos de absorção são pontuados na região em cerca de 265 e 390 nm, para a rugulosina A.

Contudo, levando-se em questão as evidências sobre o potencial de produção destes policetídeos, considerou-se pertinente que os metabólitos alvo fossem descartados para o procedimento de isolamento futuro, evitando-se assim o re-isolamento de produtos naturais já conhecidos.

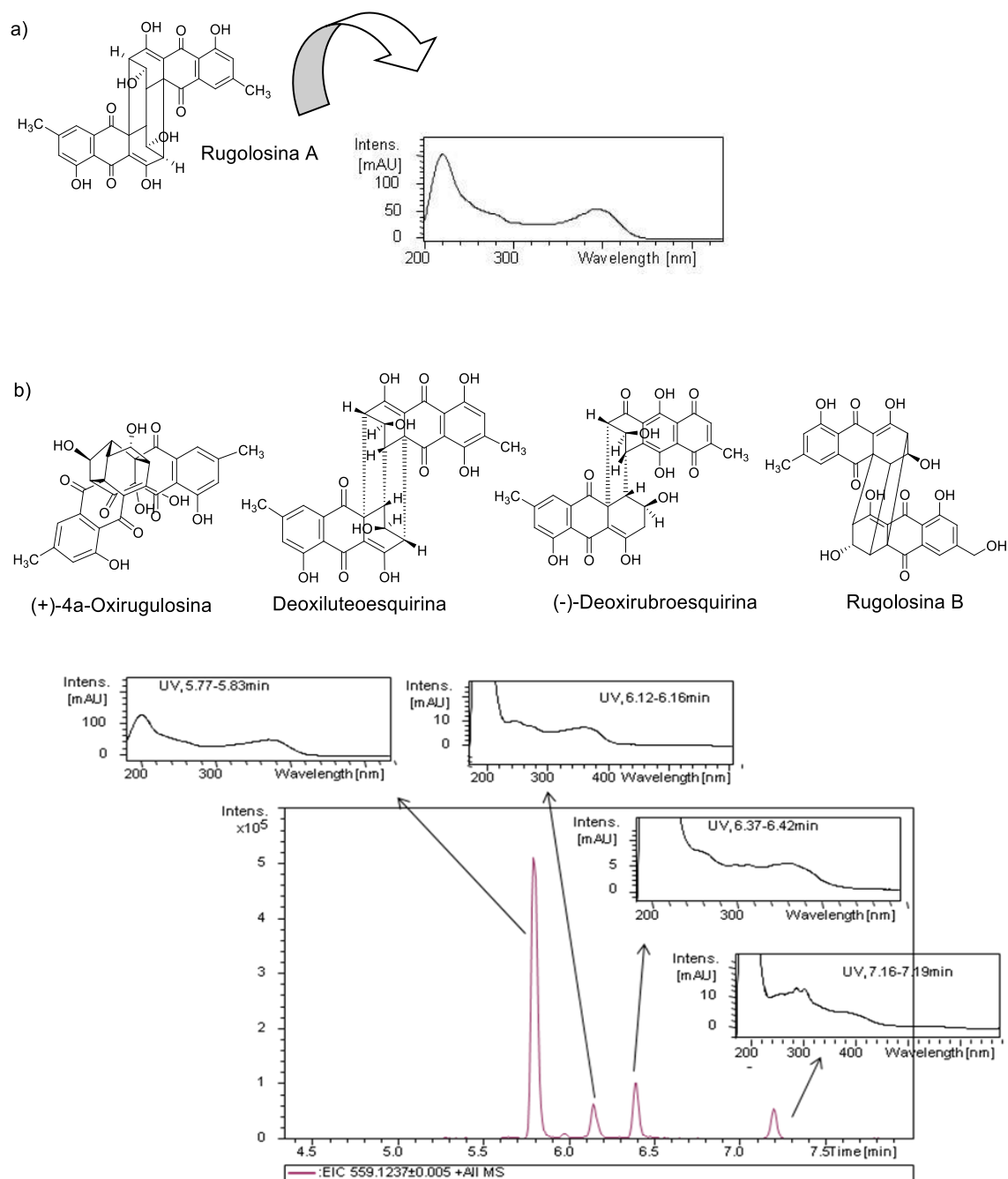


FIGURA 4.90 - a) Espectro de UV da rugulosina A; b) Identidades sugeridas para os íons m/z 559,1237 \pm (5 ppm) encontrados nos micro-extratos de *T.rugulosus* e ampliação do cromatograma de *EIC* para tal íon; indicação dos espectros de UV obtidos para cada banda

4.3.1 - Detecção de rugulovasinas e novas rugulovasinas halogenadas produzidas por *T. rugulosus*

Finalizando a série de íons detectados que sugerem metabólitos potencialmente produzidos por *T. rugulosus*, destaca-se a presença das bandas referentes os íons m/z 269,1289, m/z 303,0901 e m/z 337,0507 (FIGURA 4.91).

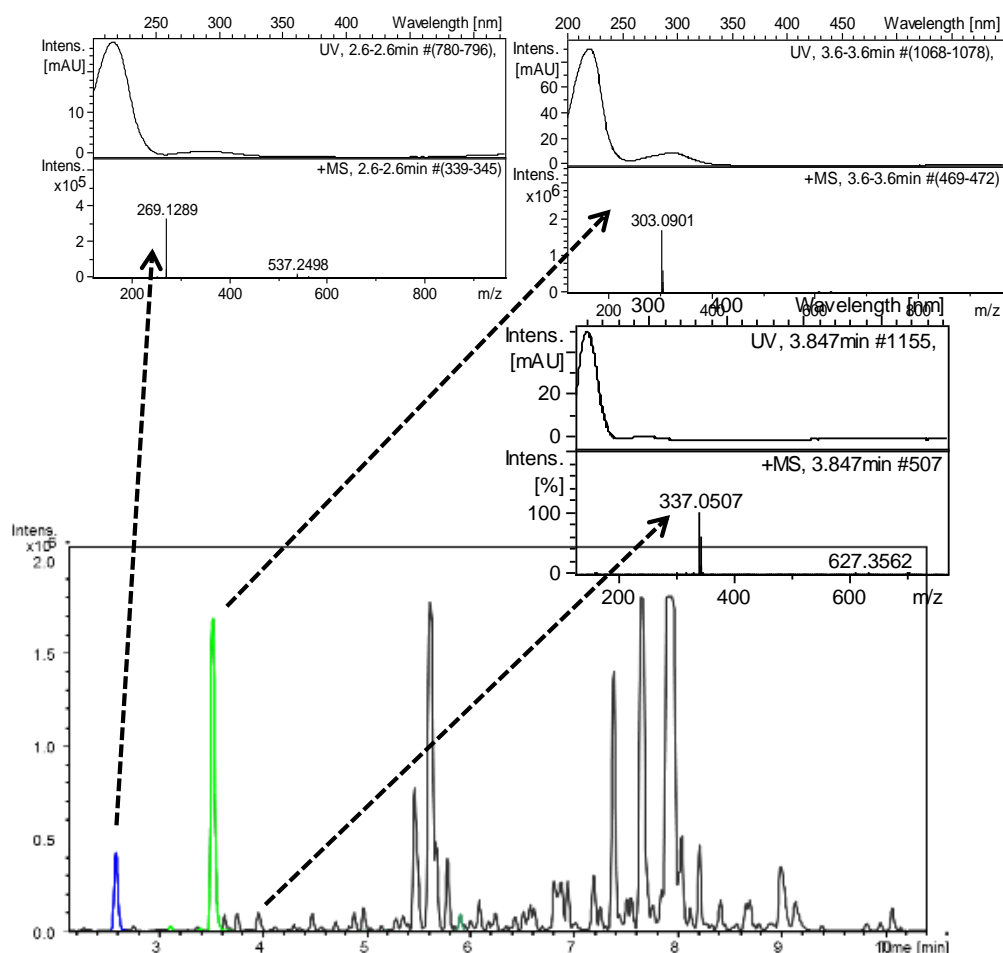


FIGURA 4.91 - Espectros de *full scan* e de UV referentes às bandas cromatográficas indicadas

O processamento do cromatograma de íons extraídos para as relações de massa detectadas (intervalo de seleção com ± 5 ppm de erro) revelou a existência de duas bandas cromatográficas com tempos de retenção muito próximos, para cada íon selecionado. Tal informação sugeriu a ocorrência de possíveis formas isômericas aos metabólitos detectados. Este indicativo foi corroborado com o

resultado gerado através do cruzamento de dados do banco AntiBase e o software *Target Analysis*. Os alcaloides indólicos rugulovasinas A e B (massa nominal m/z 225) e as 8-cloro rugulovasinas A e B (massa nominal m/z 303) foram apontados como hits de maior score aos íons detectados.

Cabe aqui destacar que os potenciais isômeros correlacionados à relação de massa nominal m/z 337 não tiveram correspondência a nenhum metabólito conhecido averiguado na metodologia aplicada através do software *Target Analysis*. O processo de confirmação das identidades sugeridas pelo programa, foi iniciado avaliando-se a compatibilidade das rugulovasina A e B aos respectivos padrões da coleção IBT-DTU. Novamente, foram comparados os parâmetros como tempo de retenção, massa exata acurada, perfis isotópicos e do espectro de UV. De acordo com os resultados apresentados na FIGURA 4.920 pôde-se notar a convergência dos dados espectroscópicos obtidos para o padrão de rugulovasinas A/B e dos metabólitos oriundo do micro-extrato de *T. rugulosus*.

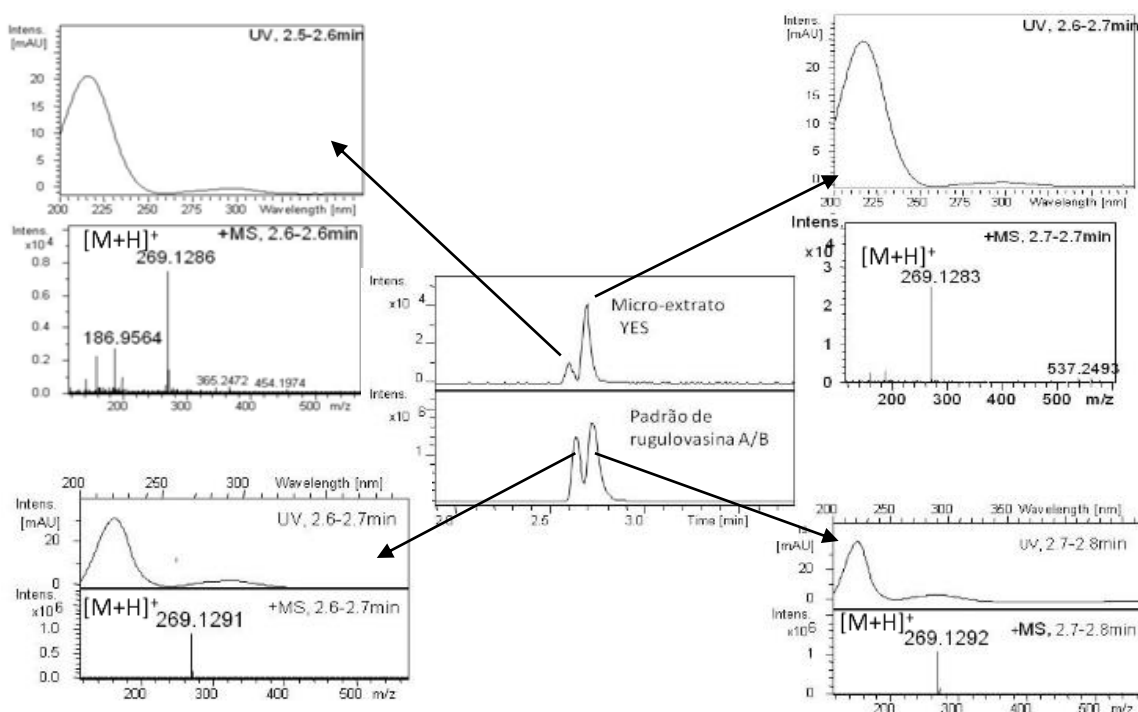


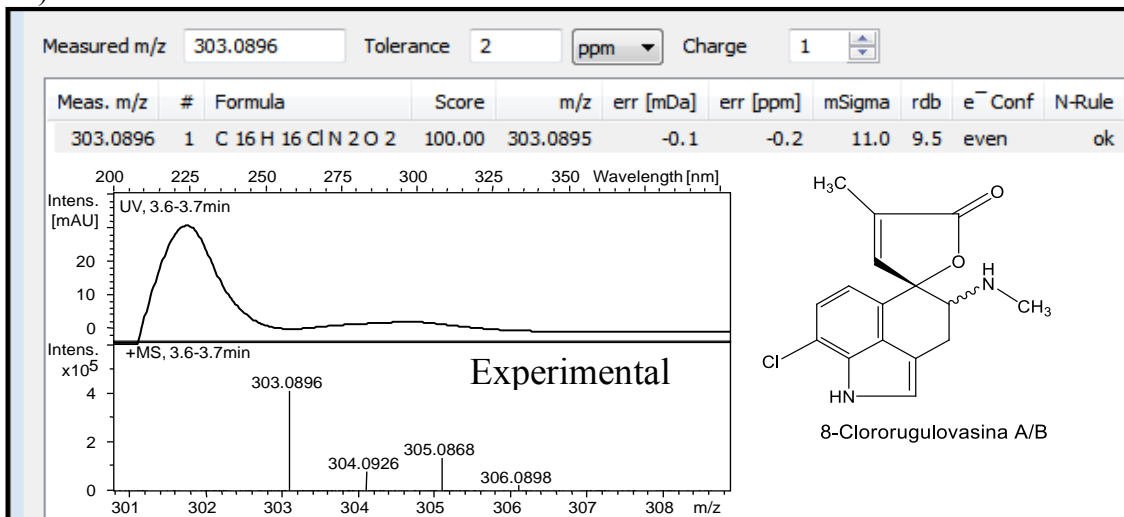
FIGURA 4.92 - Espectro de UV e de *full scan* das bandas cromatográficas indicadas para o micro-extrato de PDAd e *T. rugulosus* e do padrão de rugulovasinas A/B

No geral, pode-se confirmar grande similaridade entre os espectros de UV visualizados, cujos máximos de absorção apresentam-se em 225 e 300 nm, bem como erros entre às massas monoisotópicas detectadas menores a 5 ppm, no micro-extrato quando comparado aos respectivos padrões avaliados. Os tempos de retenção das bandas cromatográficas no micro-extrato, mostram-se idênticos aos tempos de eluição dos padrões, confirmado assim a produção destes alcaloides isoméricos pelo endófito de maçã.

No que se refere aos íons de massa nominal m/z 303, a fórmula $C_{16}H_{16}O_2N_2Cl$ foi atribuída à composição elementar dos compostos alvo, pelo software de processamento de dados. Esta informação encontrou-se em concordância à fórmula estrutural relatada aos compostos monohalogenados 8-clororugulovasinas A e B, com altos índices de acerto para tal sugestão. Como observa-se na FIGURA 4.9391a, é pontuado um alto valor de score (100%) à composição elementar sugerida ao íon detectado, bem como baixos desvios de massa entre os dados experimentais e teóricos encontrados.

O perfil isotópico visualizado para os referidos íons também representou um importante critério de avaliação (FIGURA 4.9391a). Claramente, a detecção do isótopo $[(M+2)+H]^+$ em 33% de intensidade relativa, apontou para a ocorrência de um átomo de cloro nos metabólitos alvo. A comparação do dado experimental ao dado gerado pelo simulador de perfil isotópico (software DataAnalysis-Bruker) (FIGURA 4.9391b) permitiu verificar a compatibilidade quanto a confirmação de uma unidade do halogênio às moléculas investigadas.

A)



B)

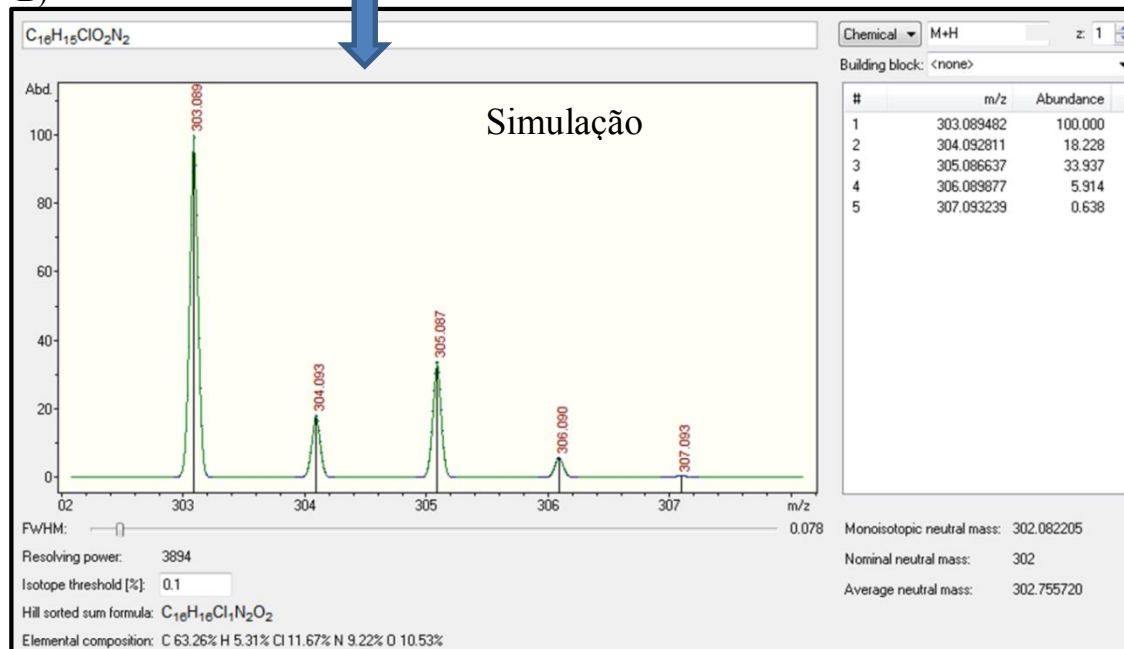


FIGURA 4.93 - a) Espectro de full scan e UV obtidos experimentalmente para a banda cromatográfica avaliada, fórmula molecular sugerida pelo programa de processamento de dados e estrutura molecular sugerida pelo banco AntiBase; b) Perfil isotópico teórico para a fórmula molecular sugerida

Além dos espectros de UV apresentarem-se em concordância aos dados fornecidos pela literatura para os compostos monohalogenados, destaca-se os bons índices de acerto para a proposição da composição elementar, como a obtenção de 100% de score, baixo desvio à massa exata e equivalência ao padrão isotópico teórico. Portanto, pôde-se inferir a produção dos isômeros (clororugulovasina A/B) pelo micro-organismo.

Como destaque no processo de derreplicação dos micro-extratos avaliados, houve a detecção de dois metabólitos de mesma massa acurada m/z 337,0510, trazendo a sugestão de que possivelmente tratavam-se novamente de prováveis isômeros. Interessantemente, na sequência do processo investigativo, os resultados iniciais, apontaram para a produção de possíveis novos produtos naturais no caso destes íons.

O processamento de dados referente ao micro-extrato avaliado (através da biblioteca criada no programa *Target Analysis*), revelou a inexistência de sugestões à relação de massa acurada detectada. Sendo assim, uma nova consulta ao banco de dados AntiBase foi realizada, porém comparando-se as massas exatas de todos os 40.065 compostos contidos no banco, utilizando-se 5 ppm de intervalo de erro. Novamente nenhuma possibilidade foi encontrada como resposta, corroborando aos indícios para a produção de metabólitos ainda inéditos por *T. rugulosus* FIGURA 4.95.

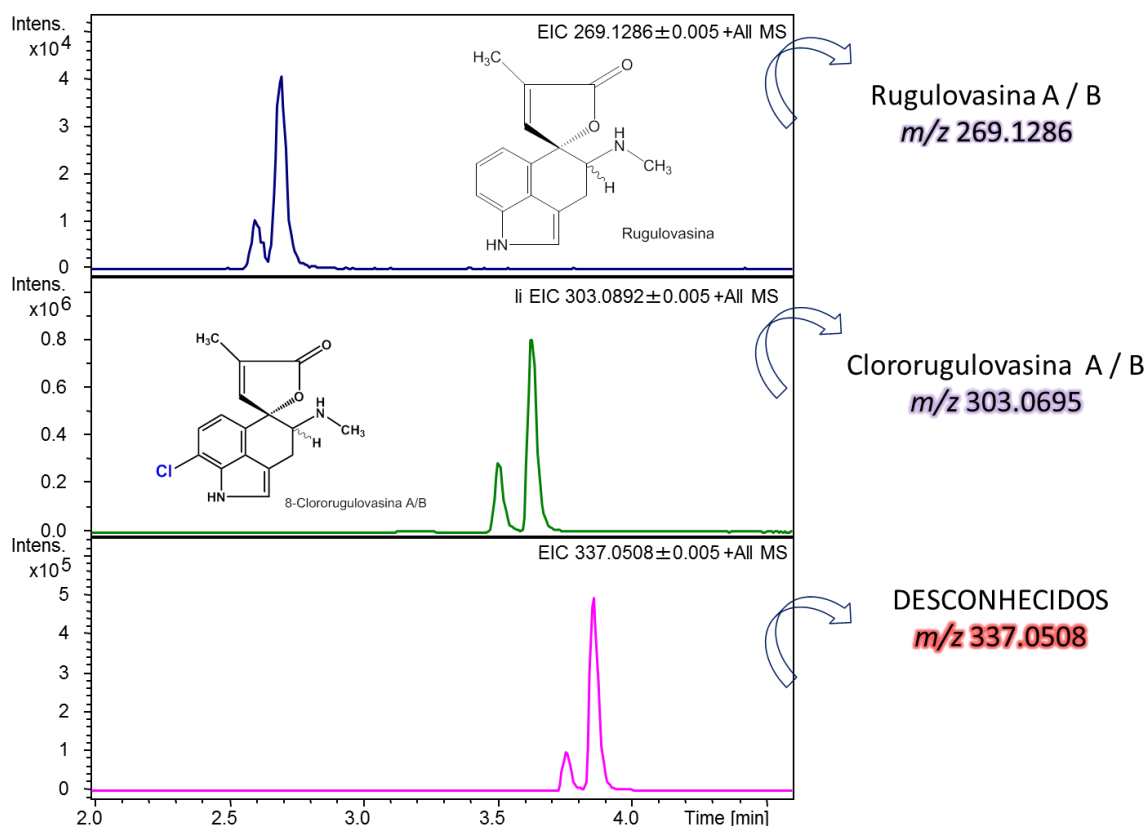


FIGURA 4.95 - Cromatogramas de *EIC* do micro-extrato de *T. rugulosus* do referentes às relações de m/z indicadas

Além da possibilidade de novos compostos, os dados espectroscópicos obtidos durante o estudo evidenciaram que os íons detectados poderiam ser correlacionados à mesma classe das rugulovasinas produzidas pelo endófito.

Como pode ser verificado nas FIGURA 4.95 e FIGURA 4. 97, o perfil isotópico encontrado para o íon $m/z = 337$, sugere a existência de dois átomos de cloro para ambos os possíveis isômeros detectados, fato justificado pelo íon $[(M+2)+H]^+ = m/z 339$ em 65% de intensidade relativa. Novamente, os dados experimentais foram condizentes aos dados teóricos simulados, confirmando-se a composição elementar constituída de dois halogênios para os metabólitos.

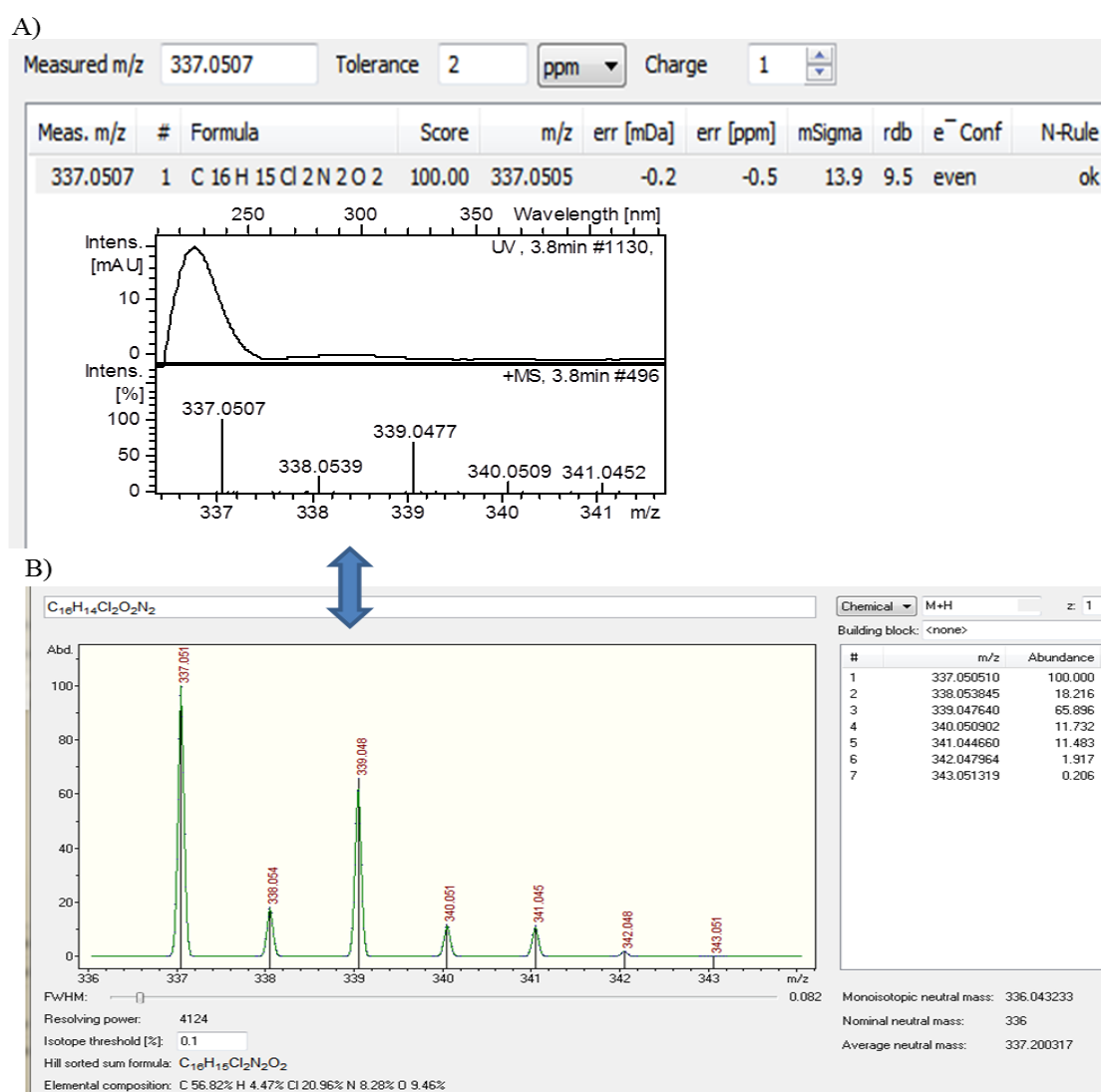
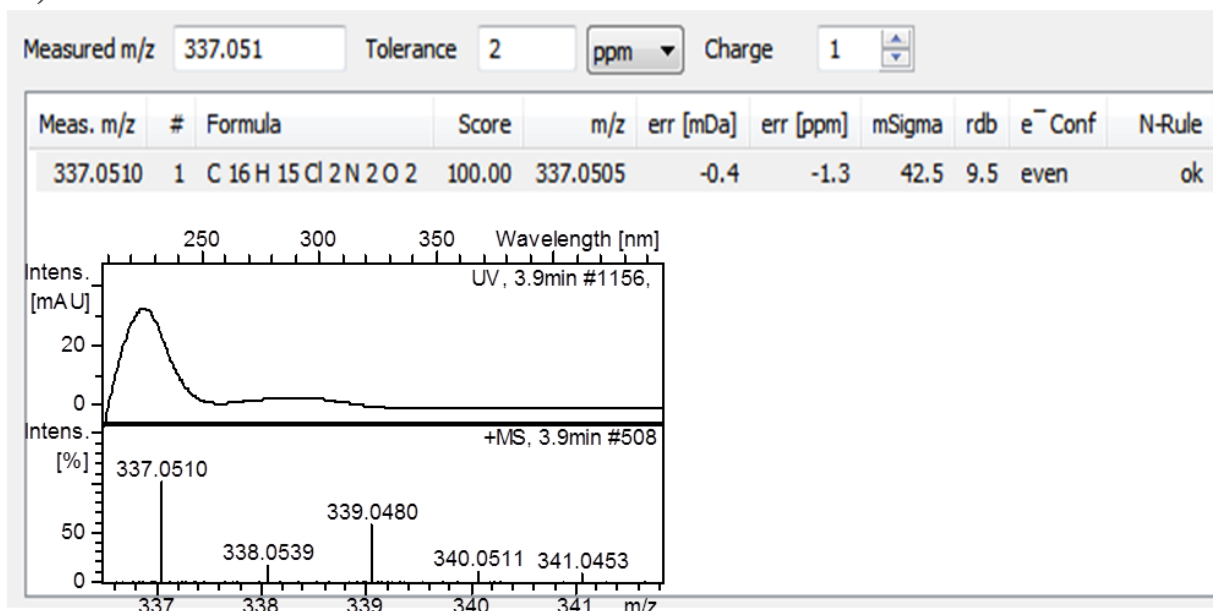


FIGURA 4.95 - A) Espectro de *full scan* e U.V obtidos para a banda cromatográfica referente ao íon $m/z 337$ de menor retenção cromatográfica; fórmula molecular sugerida pelo programa de processamento de dados. B) Perfil isotópico teórico para a fórmula molecular sugerida

A)



B)

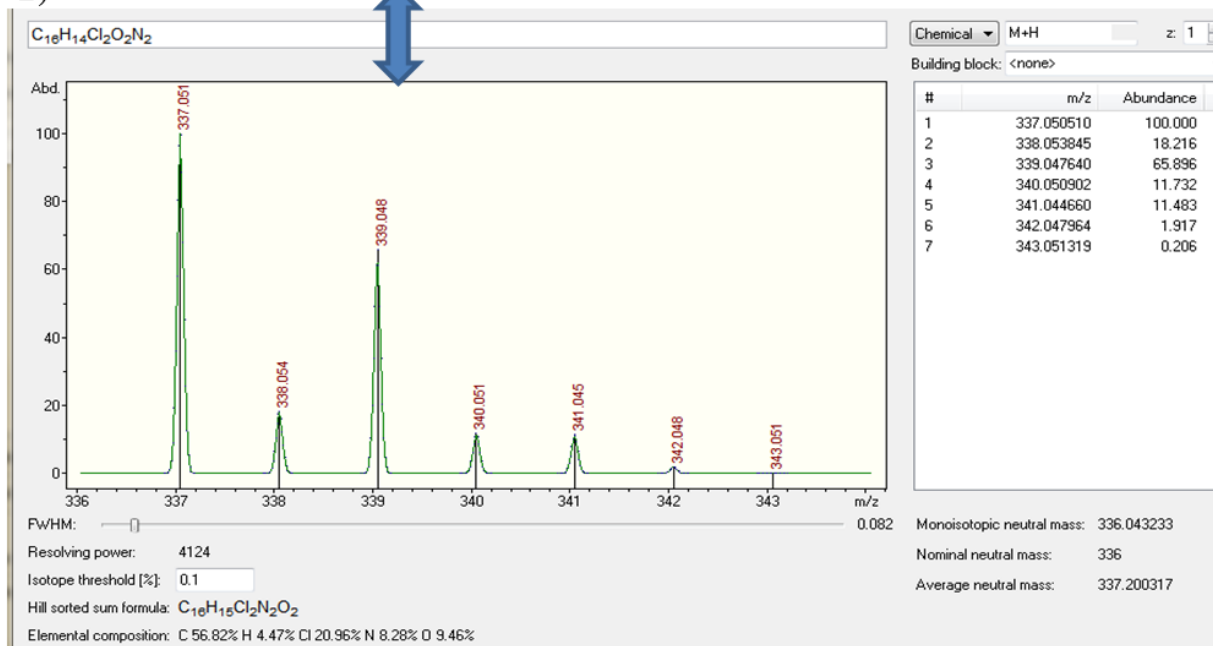


FIGURA 4. 97 - A) Espectro de *full scan* e UV obtidos para a banda cromatográfica referente ao íon m/z 337 de maior retenção cromatográfica; fórmula molecular sugerida pelo programa de processamento de dados. B) Perfil isotópico teórico para a fórmula molecular sugerida

Com tal informação, notou-se grande similaridade entre as fórmulas moleculares das rugulovasinas monocloradas aos compostos de massa nominal m/z 337. Ou seja, a comparação das fórmulas para as 8-clororugulovasinas A e B de (C₁₆H₁₆O₂N₂Cl) às fórmulas detectadas para os metabólitos desconhecidos (C₁₆H₁₅O₂N₂Cl₂), sugere a troca de um próton por um átomo de cloro nas moléculas.

Outro critério determinante para a suposição de que tais compostos seriam derivados biossintéticos das rugulovasinas, tratou-se do perfil dos espectros de UV. Tanto as rugulovasinas, como as 8-clororugulovasinas detectadas, apresentaram espectros de alta similaridade aos espectros referentes aos potenciais novos alcaloides, abrangendo máximos de absorção em 225 e 290 nm.

Contudo, mesmo com todas as evidências de que os novos metabólitos tratavam-se de alcaloides halogenados, com um átomo de cloro extra em relação às já conhecidas 8-clororugulovasinas, seria necessário o conhecimento do sítio de halogenação para a constatação inequívoca da estrutura dos isômeros produzidos por *T. rugulosus*. Para tanto, o isolamento dos novos compostos de interesse, bem como das 8-clororugulovasinas, foi realizado a partir da obtenção do extrato fúngico em maior escala. O isolamento dos metabólitos conhecidos deu-se como estratégia para comparação dos dados espectroscópicos destes com os novos compostos.

O meio líquido PD (*potato-dextrose*) foi escolhido para o desenvolvimento do endófito e obtenção do extrato. O procedimento de purificação e isolamento encontra-se detalhado no item 3.9.5

Deve-se ressaltar que devido a grande tendência do micro-organismo em produzir outros compostos, principalmente os derivados de esquirina mencionados anteriormente, em quantidades bastante superiores em relação às rugulovasinas, o processo de isolamento apresentou-se bastante laborioso, havendo-se dificuldades na total purificação dos alcaloides. Portanto, para a obtenção dos dados de RMN dos compostos alvo, optou-se pelo uso da técnica analítica de LC-SPE-RMN para separação e análise dos analitos respectivamente. A fração enriquecida nos compostos de interesse (8-clororugulovasinas e novas rugulovasinas dicloradas) foi submetida à separação cromatográfica, havendo posterior trapeamento dos 4 compostos separados em cartuchos de SPE.

Desde sua descoberta, as rugulovasinas e as clororugulovasinas A e B foram sempre isoladas e relatadas como formas racêmicas interconvertíveis. Neste sentido, nas bases dos dados espectrais de RMN, foi assumida a mesma configuração para os derivados de rugulovina isolados. De acordo com os dados relatados na literatura, os epímeros nomeados como B, demonstram ser menos polares em relação aos epímeros A devido às interações diferenciais dos núcleos de hidrogênio H-10 e H-11 com a lactona espirocíclica (COLE et al., 1976b). Logo, este efeito leva a eluição diferencial dos diastereoisômeros B, de forma que estes fiquem mais retidos em fase

estacionária de modo reverso, como por exemplo fase ODS, sendo eluídos posteriormente aos diastereoisômeros A. Por isso, por analogia dos dados obtidos e encontrados na literatura, as rugulovasinas detectadas e seus derivados isolados foram atribuídos com a denominação A e B de acordo com a ordem de eluição no sistema cromatográfico utilizado como mostra a figura abaixo:

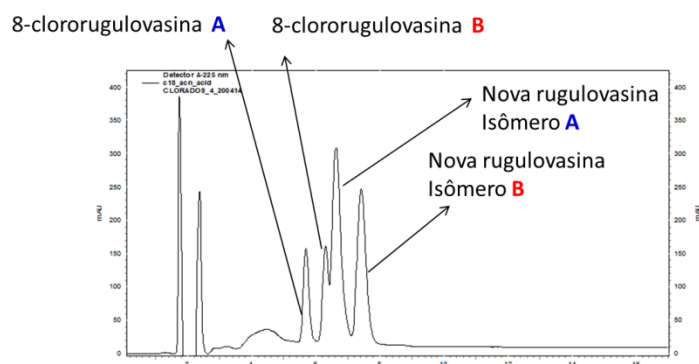


FIGURA 4.97 - Cromatograma referente a fração enriquecida com rugulovasinas, submetida ao sistema de LC-SPE. Indicação dos respectivos isômeros isolados, método D

Após separação em coluna cromatográfica e trapeamento nos cartuchos de SPE utilizados no processo, os compostos foram eluídos em tubos capilares utilizando-se solvente deuterado apropriado, e submetidos à experimentos de RMN de 1 D e 2 D, em campo magnético de 600 MHz.

Como previsto, os espectros de RMN de ^1H correspondentes às 8-clororugulovasinas A e B (FIGURA 4.98 e FIGURA 4.99) apresentaram sinais muito similares em multiplicidade e deslocamentos químicos com relação aos espectros inerentes aos novos compostos isolados (FIGURA 4.100 e FIGURA 4.101), corroborando a suposição quanto a identidade da origem biossintética destes novos metabólitos.

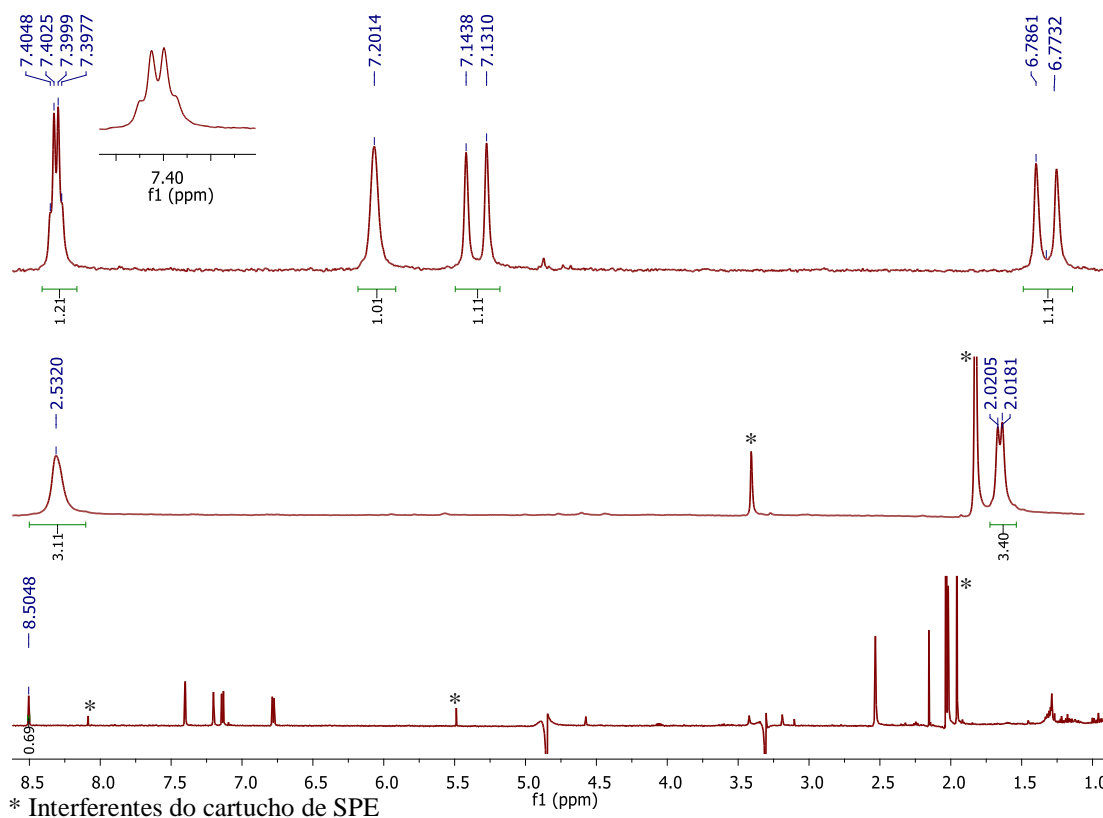


FIGURA 4.98 - Espectro de ^1H e ampliações referente à 8-clorrorugulovasina A, metanol- d_4 , 600 MHz. * Contaminantes provenientes do cartucho de SPE

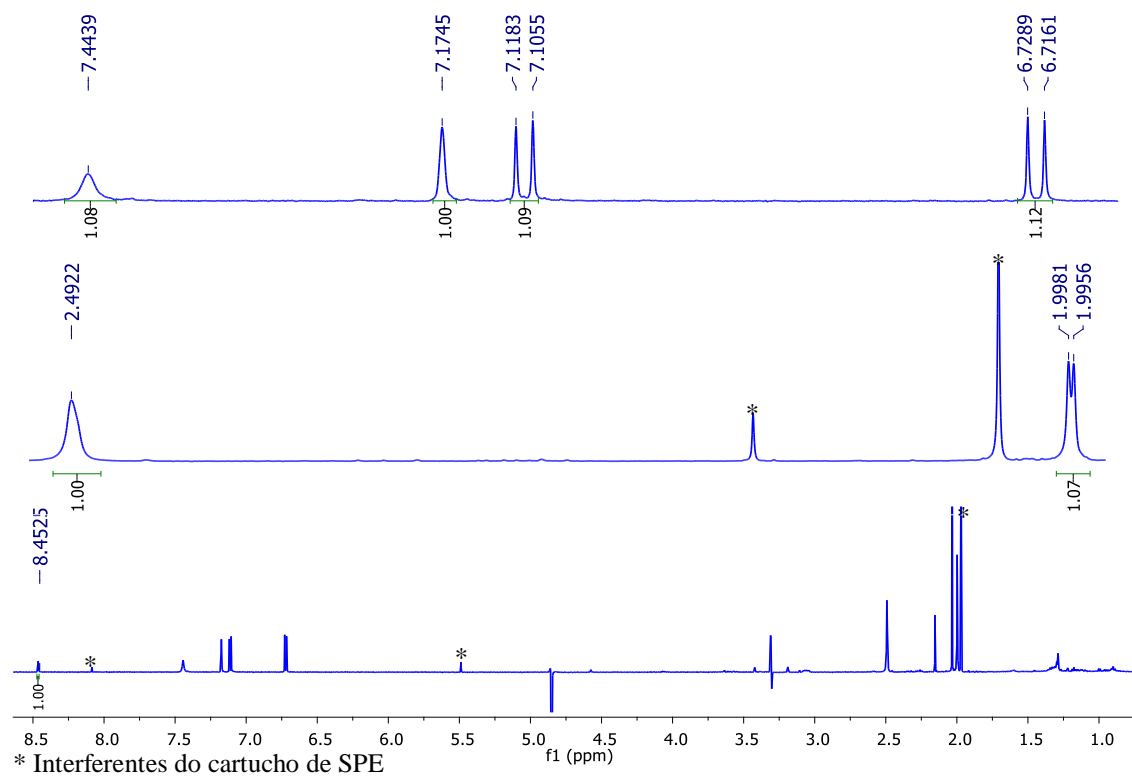
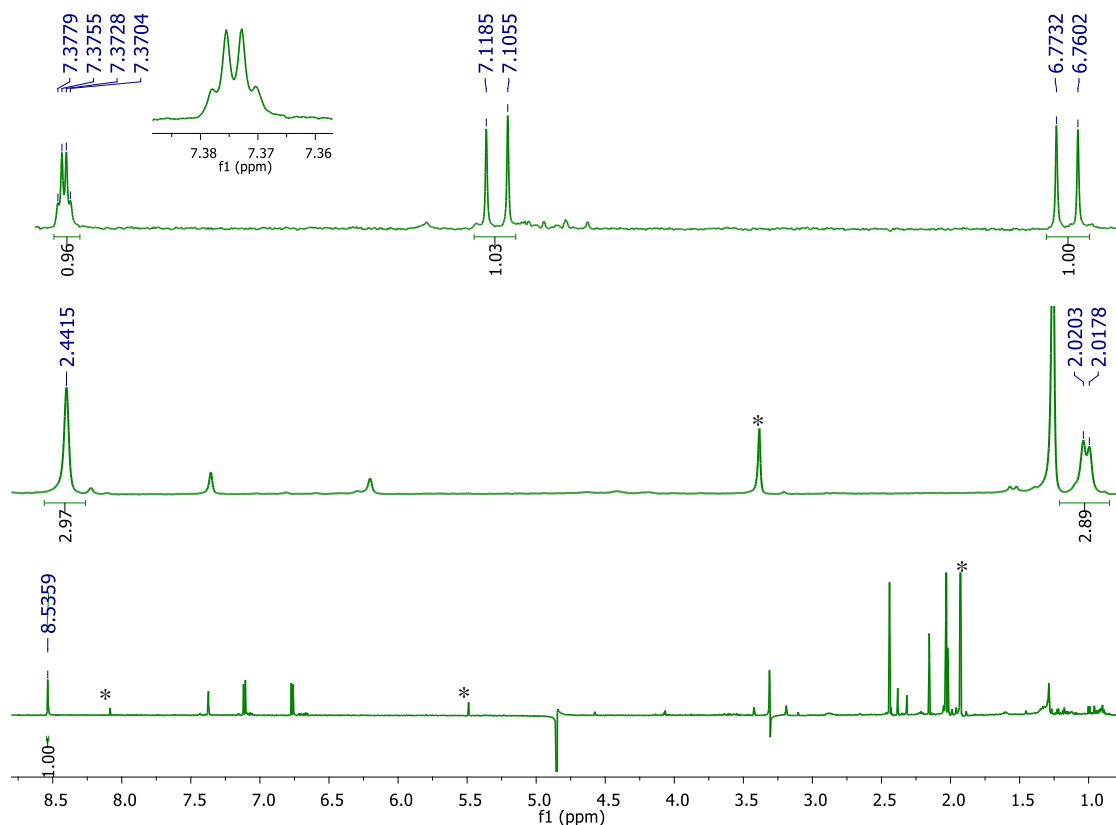
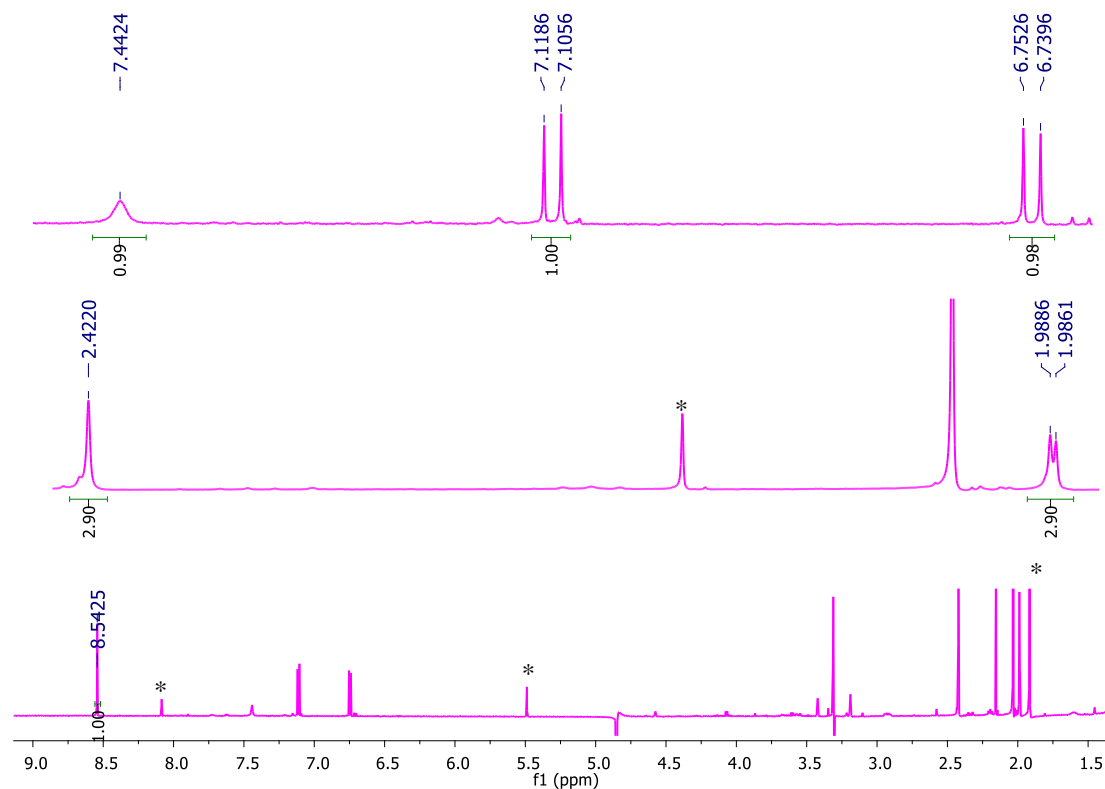


FIGURA 4.99 - Espectro de ^1H e ampliações referente à 8-clorrorugulovasina B, metanol- d_4 , 600 MHz. * Contaminantes provenientes do cartucho de SPE



* Interferentes do cartucho de SPE

FIGURA 4.100 - Espectro de ^1H e ampliações referente ao novo derivado da rugulovasina, isômero A, metanol- d_4 , 600 MHz. * Contaminantes provenientes do cartucho de SPE



* Interferentes do cartucho de SPE

FIGURA 4.101 - Espectro de ^1H e ampliações referente ao novo derivado da rugulovasina, isômero B, metanol- d_4 , 600 MHz. * Contaminantes provenientes do cartucho de SPE

Como um todo, os espectros de RMN de ^1H de todos os compostos isolados mostraram sinais na região de hidrogênios aromáticos e vinílicos em torno de $\delta_{\text{H}} 7,0$, bem como sinais característicos de grupamentos metila na região entre $\delta_{\text{H}} 2,0$ e $2,5$, com valores de integração para três núcleos. Em comum nos espectros, também foram observados sinais em $\delta_{\text{H}} 8,5$ indicando a ocorrência de grupamento NH, coerente aos anéis indólicos presentes nas estruturas. Os sinais esperados para os hidrogênios metilênicos e metínicos não foram passíveis de observação em nenhum caso, devido à interferência do sinal do solvente utilizado (CD_3OD) na região correspondente aos respectivos sinais (entre $\delta_{\text{H}} 3,0$ e $\delta_{\text{H}} 3,5$).

A atribuição de sinais com relação às já conhecidas 8-clororugulovasinas foi condizente aos dados encontrados na literatura para as mesmas no tocante aos sinais de hidrogênio (TABELA 4.9).

Devido a inexistência de dados quanto aos sinais de carbono para estas moléculas, foram considerados a título de comparação, os dados relatados para seus precursores biossintéticos, ou seja, a rugulovasina A e B (TABELA 4.10).

Cabe aqui ressaltar que, devido ao baixo rendimento de massa obtido no processo de purificação dos compostos, não foi possível a realização dos espectros de RMN de ^{13}C de nenhum metabólito. Pela mesma razão, apenas os espectros de RMN de 2D da 8-clororugulovasina A e do novo metabólito correspondente ao isômero A, foram passíveis de análise. Para a comparação dos dados de carbono, foram utilizadas as projeções dos sinais de ^{13}C nos espectros de HSQC e HMBC dos analitos mencionados (FIGURA 4.103 à FIGURA 4.105102; FIGURA 4.110 à FIGURA 4.112).

Contudo, a atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C encontrados no espectro da 8-clororugulovasina A mostrou-se em concordância aos dados teóricos obtidos como pode ser visualizado, comparando-se os valores dos núcleos correspondentes na TABELA 4.9 e na TABELA 4.10.

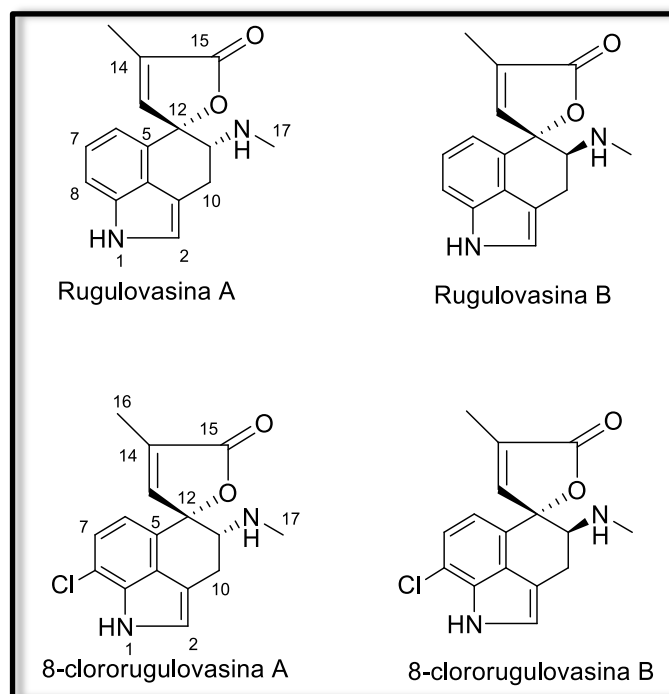


FIGURA 4.103 - Alcaloides do tipo *ergot* produzidos por *T. rugulosus*

TABELA 4.9 - Dados RMN de 8-clororugulovasinas A e B isoladas (600 MHz, CD₃OD) e da literatura (300 MHz, CDCl₃)

Posição	8-clororugulovasina A (Isolada)			8-clororugulovasina A (Literatura, COLE et al., 1976a)	8-clororugulovasina B (Isolada)	8-clororugulovasina B (Literatura, COLE et al., 1976a)
	δ_H (J em Hz)	δ_C^*	HMBC	δ_H (J em Hz)	δ_H (J em Hz)	δ_H (J em Hz)
1	8,50 (s)	-	-	9,03(s)	8,45(s)	8,70 (s)
2	7,20 (sl)	122,9	9	6,99 (d, 1,5)	7,17 (sl)	7,30 (d, 1,5)
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	129,1	-	-	-	-
6	6,77 (d, 7,7)	116,7	5	6,74 (d, 7,0)	6,72 (d, 7,7)	6,92 (d, 7,0)
7	7,13 (d, 7,7)	123,3	9	7,10 (d, 7,0)	7,10 (d, 7,7)	7,24 (d, 7,0)
8	-	-	-	-	-	-
9	-	132,7	-	-	-	-
10	***	-	-	3,15 (m)	-	3,2 (m)
11	***	63,7	-	3,15 (m)	-	3,2 (m)
12	-	88,5	-	-	-	-
13	7,40 (ql, 1,4)	150,2	12	7,36 (d, 1,5)	7,44 (sl)	7,47 (d, 1,5)
14	-	131,4	-	-	-	-
15	-	175,3	-	-	-	-
16	2,02 (d1, 1,3)	10,4	13, 14, 15	1,98 (d, 1,0)	1,98 (d1, 1,5)	2,05 (d, 1,0)
17	2,53 (sl)	34,3	11	2,40 (s)	2,49 (sl)	2,43 (s)

*Data obtida a partir dos sinais de projeção de ¹³C nos experimento de HSQC e HMBC.

** Não detectado em CD₃OD devido a interferência do sinal do solvente

TABELA 4.10 - Dados da literatura de RMN de ^1H e ^{13}C das rugulovasinas A e B

Posição	Rugulovasina A		Rugulovasina B	
	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}
	(REBEK et al., 1984)	(DORNER et al., 1980)	(REBEK et al., 1984)	(DORNER et al., 1980)
1	8,06 (sl)	-	8,08 (sl)	-
2	7,00 (sl)	119,4	7,03 (sl)	120,0
3	-	109,8	-	108,4
4	-	129,2	-	129,2
5	-	128,2	-	125,8
6	6,87 (d, 7.0)	114,8	6,87 (d, 7,3)	114,4
7	7,16 (t, 7.7)	122,8	7,18 (t, 8,0)	122,,7
8	7,31 (d, 8)	111,4	7,32 (d, 8,0)	111,2
9	-	133,9	-	133,9
10	3,03-3,27 (m)	25,4	3,04-3,27 (m)	24,3
11	3,03-3,27 (m)	63,1	3,04-3,27 (m)	63,6
12	-	88,5	-	88,2
13	7,16 (d, 1,4)	150,6	7,37 (d, 1,6)	150,8
14	-	131,4	-	126,0
15	-	173,4	-	174,0
16	2,05 (d, 1,4)	10,8	2,05 (d, 1,6)	10,7
17	2,49 (s)	35,1	2,46 (s)	34,7

Os resultados obtidos através do experimento de HMBC contribuíram para a confirmação da disposição do grupamento metila CH_3 -16 (δ_{H} 2,05) no anel lactônico, através das correlações a longa distância dos respectivos núcleos aos carbonos C-13 (δ_{C} 150,6), C-14 (δ_{C} 131,4) e C-15 (δ_{C} 173,4) (FIGURA 4.105102). Também se constatou a proximidade da metil amina ao centro estereogênico C-11 pela correlação dos núcleos CH_3 -17 (δ_{H} 2,49) a este centro carbônico e a correlação a três ligações do próton H-2 (δ_{H} 7,00) com o núcleo C-9 (δ_{C} 132,7) (FIGURA 4.104).

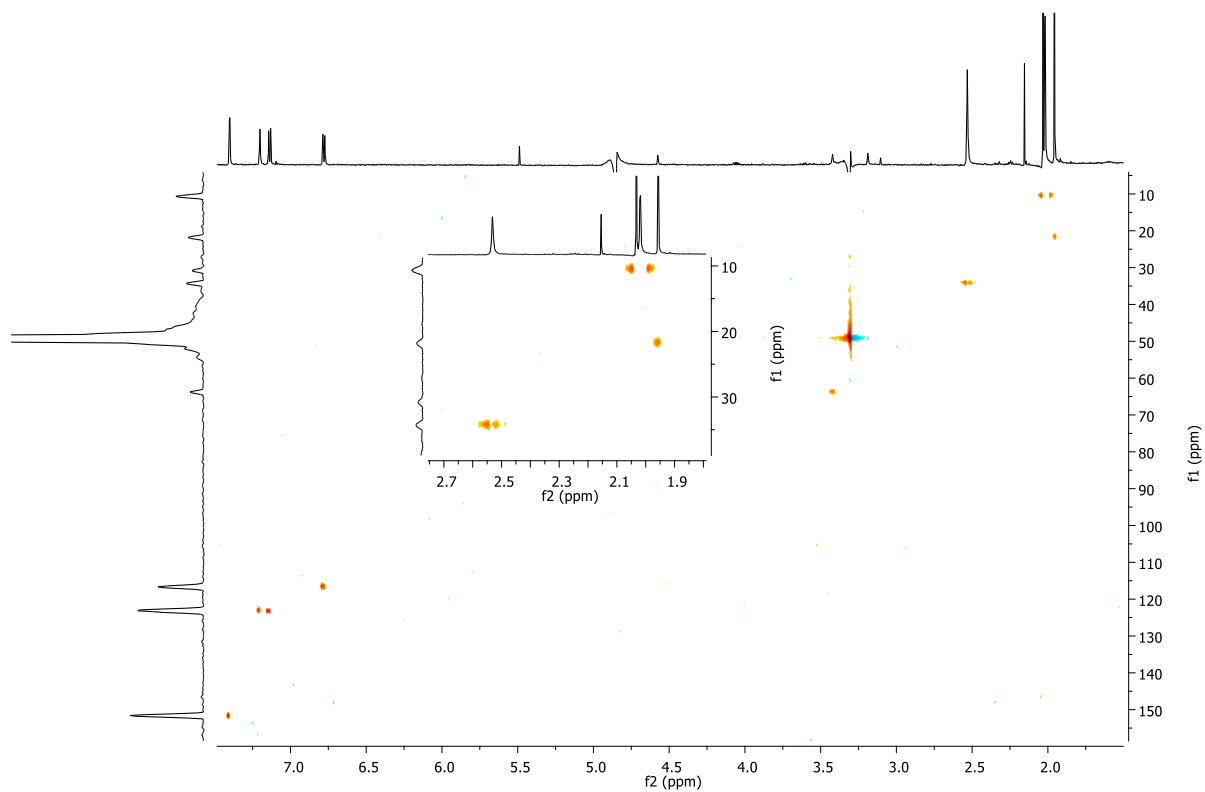


FIGURA 4.103 - Espectro de HSQC 8-clororugulovasina A, metanol-*d*₄, 600MHz

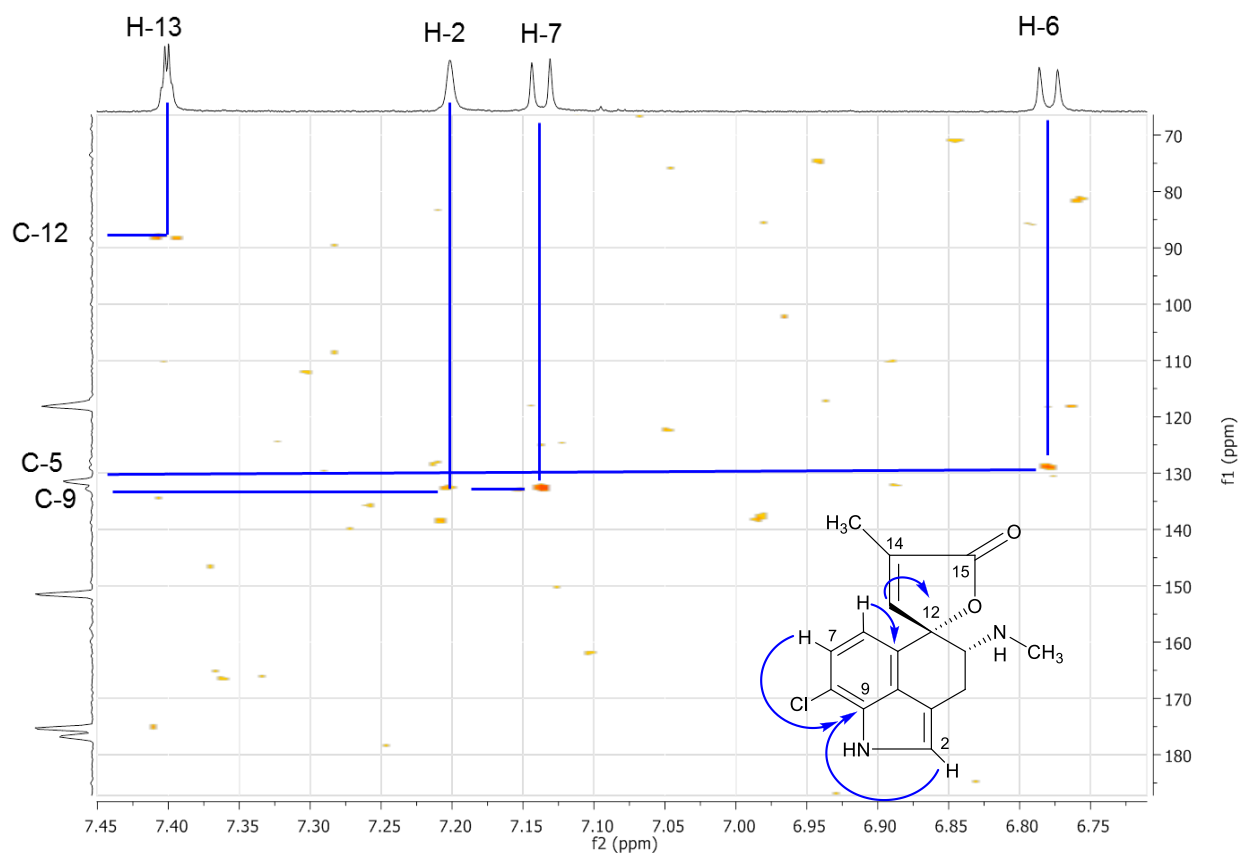


FIGURA 4.104 - Ampliação do espectro de HMBC 8-clororugulovasina A, metanol-*d*₄, 600MHz

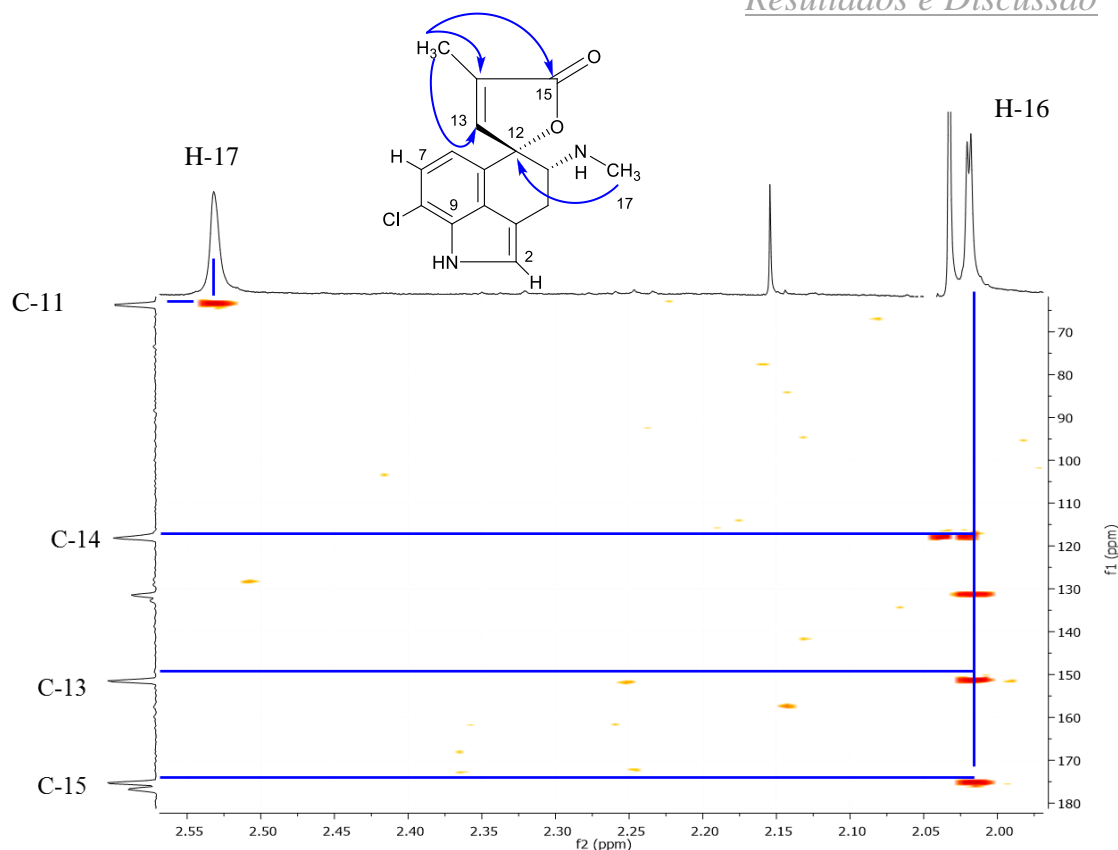


FIGURA 4.105 - Ampliação do espectro de HMBC 8-clororugulovasina B, metanol- d_4 , 600MHz

Com relação aos novos alcaloides isoméricos, o ponto de maior relevância para a elucidação estrutural dos mesmos, tratou-se da localização do átomo de cloro adicional em relação às 8-clororugulovasinas. Claramente, ao se comparar os espectros de hidrogênio das 8-clororugulovasinas aos espectros dos novos alcaloides diclorados, notou-se a ausência do singlete alargado em torno de 7,20 ppm, antes presente nos espectros dos metabólitos monoclorados (FIGURA 4.106). Como esperado, este resultado corroborou para a confirmação da troca de um próton pelo núcleo halogenado, e ainda mais, em um dos carbonos sp^2 existentes nas moléculas devido ao deslocamento químico característico do sinal não mais existente.

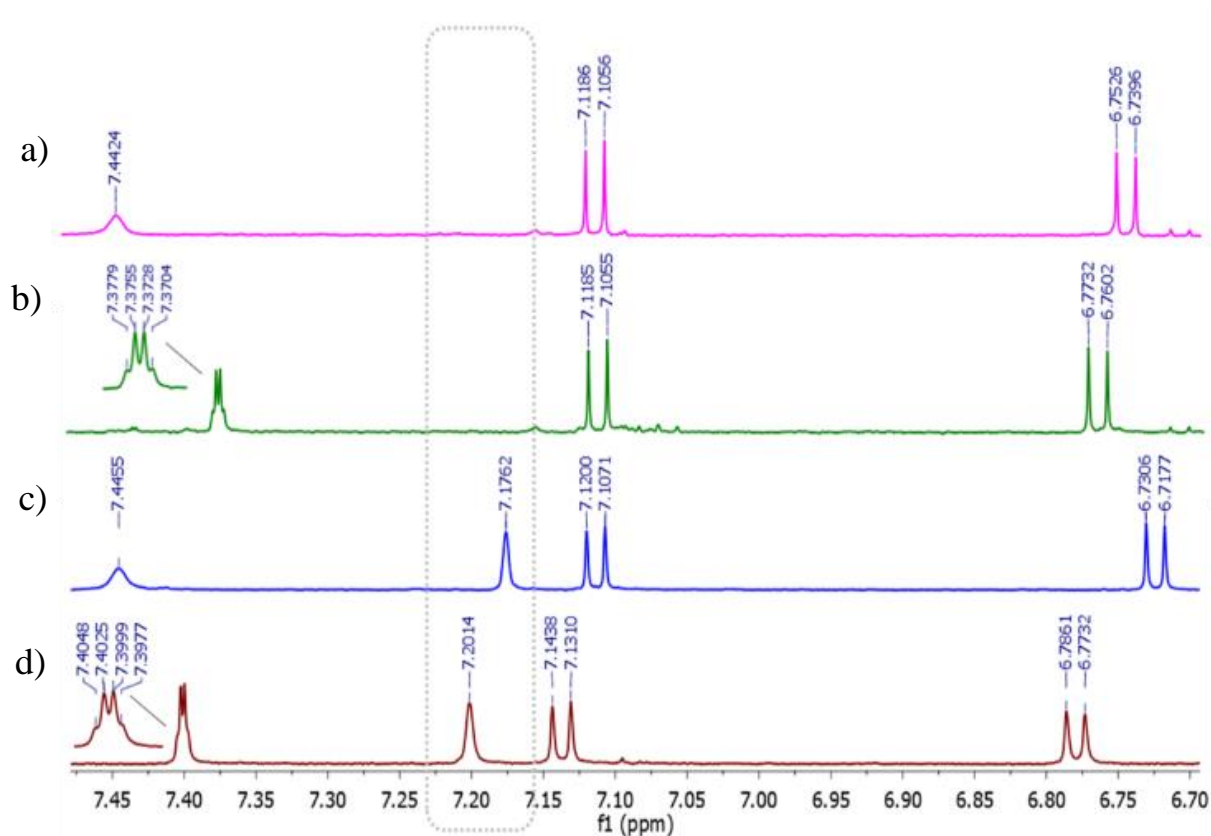


FIGURA 4.106 - Ampliação da região de interesse do espectro de RMN de ^1H de a) novo metabólito, isômero B; b) novo metabólito, isômero A; c) 8-clororugulovasina B; d) 8-clororugulovasina A

A avaliação dos espectros de RMN de ^1H de ambos revelou a presença de dois prótons aromáticos em disposição *orto*, com constante de acoplamento típica, de 7,8 Hz. Tais sinais foram justificados pelo par de dubletos em 7,11 ppm e 6,77 ppm para o isômero A e 7,11 ppm e 6,74 ppm para B, sendo estes correspondentes aos núcleos H-5 e H-6. Esta informação, portanto, excluiu a possibilidade de uma segunda unidade de cloro no anel aromático constituinte.

O largo quadrupletto visualizado no espectro do epímero A em 7,37 ppm e o singleto alargado em 7,44 ppm no espectro do isômero B, permitiram a atribuição dos sinais aos substituintes da dupla ligação pertencente ao anel espiro. O alargamento destes sinais, bem como dos dubletos de metila em torno de 2,0 ppm, evidenciaram o acoplamento entre os núcleos H-13 e CH_3 -16, com baixo valor de constante de acoplamento, em torno de 1.4 Hz.

Contudo, tendo em vista que o posicionamento do segundo átomo de cloro nos novos alcaloides dava-se em umas das duplas ligações existentes, este foi atribuído ao carbono sp^2 remanescente. Sendo assim, foi confirmada a substituição do núcleo H-2 presente nas clororugulovasinas por um novo átomo de cloro, levando

às estruturas dos metabólitos 2,8-diclororugulovasinas A e B (FIGURA 4.107). O detalhamento de atribuição de sinais para os alcaloides halogenados produzidos por *T. rugulosus* encontra-se na TABELA 4.9 (metabólitos conhecidos) e na TABELA 4.11 (novos metabólitos).

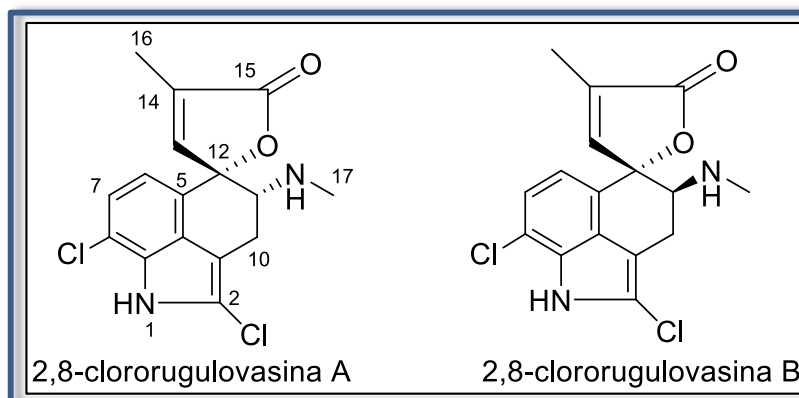


FIGURA 4.107 - Novos alcaloides indólicos diclorados produzidos por *T.rugulosus*

TABELA 4.11 - Dados de RMN novas rugulovasinas isoladas de *T. rugulosus* (600 MHz, CD₃OD)

Posição	2,8-diclororugulovasina A			2,8-diclororugulovasina B
	δ_H (J em Hz)	δ_C^*	HMBC	δ_H (J em Hz)
1	8,53 (s)	-	-	8,54(s)
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	129,3	-	-
6	6,77 (d, 7,8)	117,7	5	6,74 (d, 7,8)
7	7,11 (d, 7,8)	123,6	123	7,11 (d, 7,8)
8	-	125,4	125	-
9	-	-	-	-
10	***	-	-	***
11	***	63,4	64	***
12	-	88,5	-	-
13	7,37 (ql, 1,4)	151,8	151	7,44 (sl)
14	-	131,6	131	-
15	-	175,8	175	-
16	2,02 (d1, 1,5)	11,4	10	1,98 (d, 1,5)
17	2,44 (sl)	35,6	11	2,42 (sl)

*Data obtida a partir dos sinais de projeção de ¹³C nos experimento de HSQC e HMBC.

** Não detectado em CD₃OD devido a interferência do sinal do solvente

Na tentativa da confirmação para os sinais de núcleos metilênicos e metínicos, H-10 e H-11 respectivamente, foi realizado o experimento de RMN de ^1H utilizando-se CDCl_3 como solvente. Devido à baixa solubilidade dos compostos neste solvente, os sinais observados nos espectros apresentaram-se em baixa resolução e definição (FIGURA 4.108). No entanto, ainda sim, notou-se considerável similaridade entre os sinais referentes aos referidos prótons quando a região do espectro correspondente, entre 3,0 e 3,5 ppm é comparada à mesma região pertencente ao espectro mais recentemente relatado na literatura para o precursor rugulovasina A (ZHANG et al., 2013) (FIGURA 4.109).

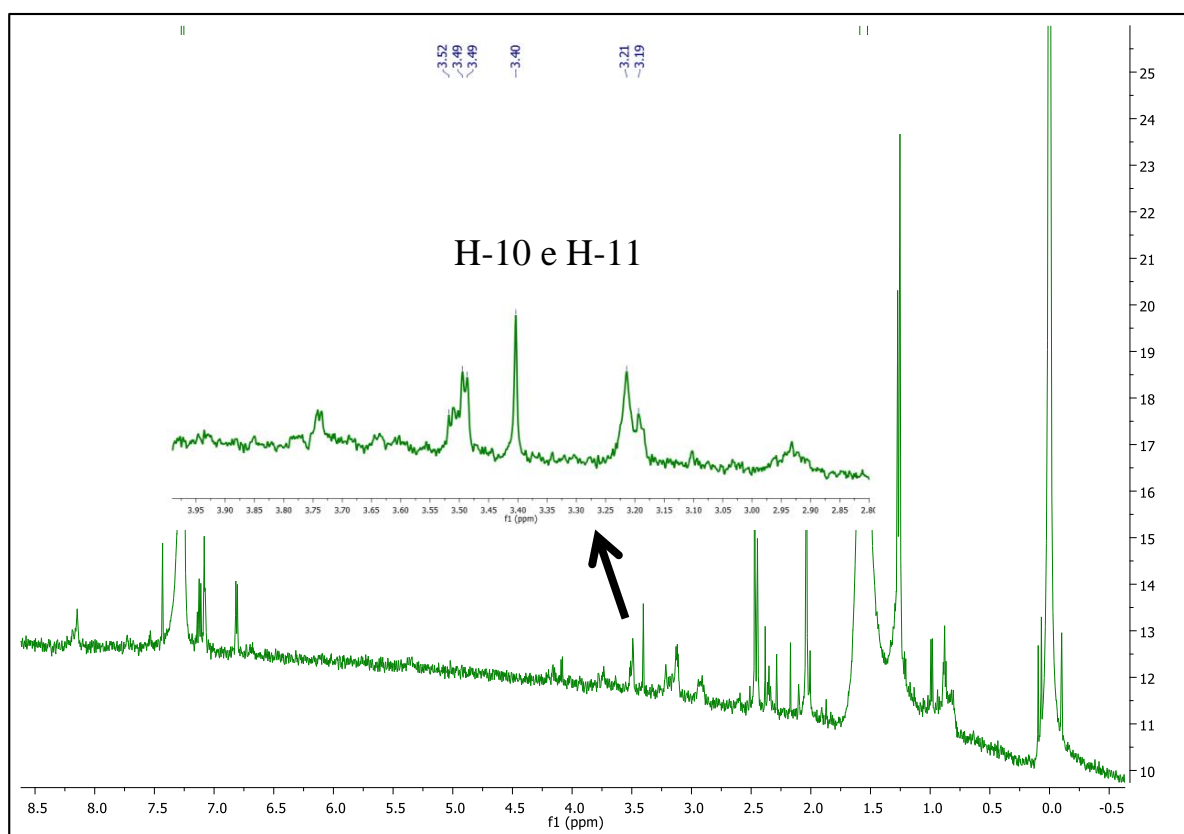


FIGURA 4.108 - Espectro de ^1H referente à 2,8-diclororugulovasina A em clorofórmio-*d*, 600 MHz e ampliação da região de interesse

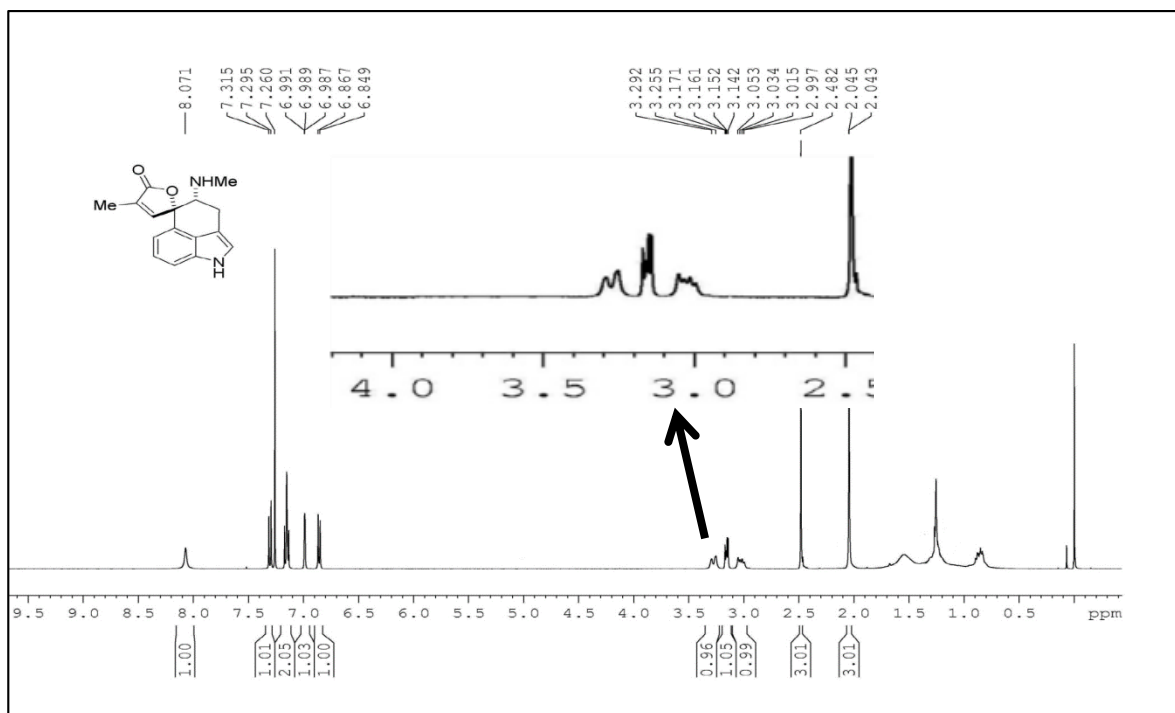


FIGURA 4.109 - Espectro de ^1H encontrado na literatura referente à rugulovasina A, em clorofórmio-*d*, 300 MHz e ampliação da região de interesse, (ZHANG et al., 2013).

Assim como no caso da 8-clororugulovasina A, os resultados obtidos através do experimento de HMBC para a 2,8-clororugulovasina A confirmaram a disposição do grupamento metila $\text{CH}_3\text{-16}$ (δ_{H} 2,02) no anel lactônico, através das correlações a longa distância dos respectivos núcleos aos carbonos C-13 (δ_{C} 151,8), C-14 (δ_{C} 131,6) e C-15 (δ_{C} 175,8) (FIGURA 4.111). Também se constatou a proximidade da metil amina ao centro estereogênico C-11 (δ_{C} 63,4) pela correlação dos núcleos $\text{CH}_3\text{-17}$ (δ_{H} 2,44) a este centro carbônico, bem como foram detectadas as correlações do núcleo aromático H-6 (δ_{H} 6,77) ao carbono C-5 (δ_{C} 129,3) e H-7 (δ_{H} 7,11) à C-8 (δ_{C} 125,4) (FIGURA 4.112).

A correlação de H-2 com C-9 antes presente para a rugulovasina monoclorada não foi mais detectada no caso da molécula diclorada, corroborando assim para a confirmação do átomo de cloro no carbono C-2.

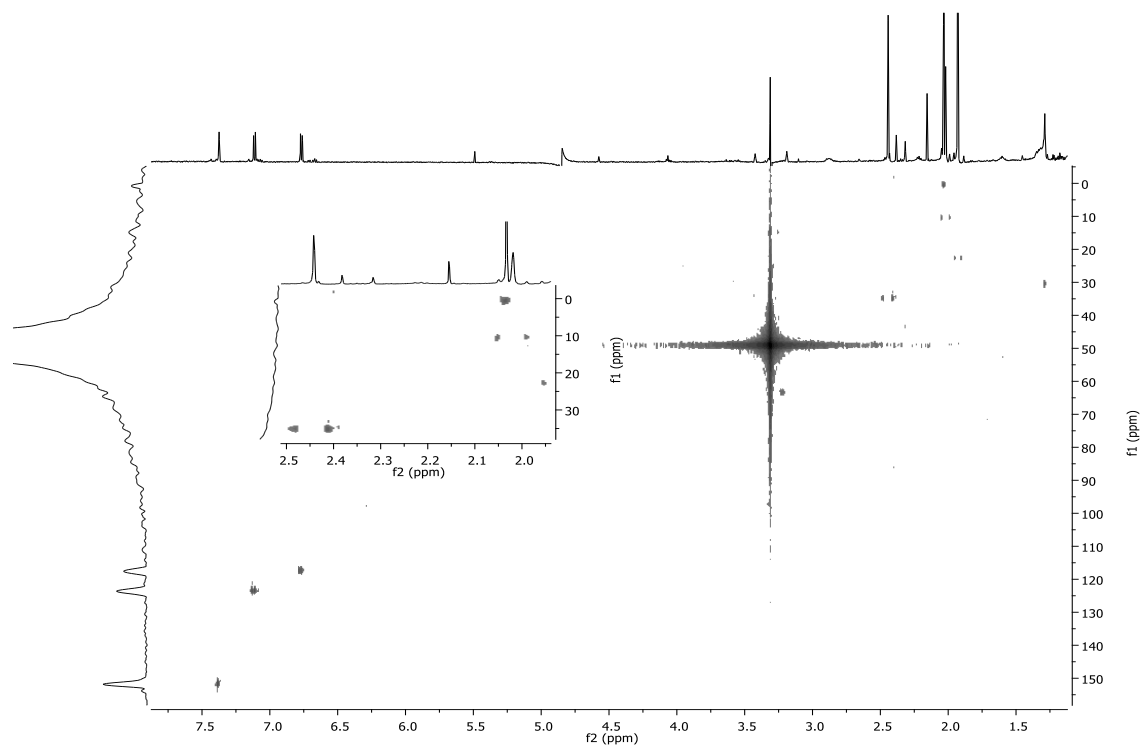


FIGURA 4.110 - Espectro de HSQC 2,8-clororugulovasina A, metanol-*d*4, 600MHz

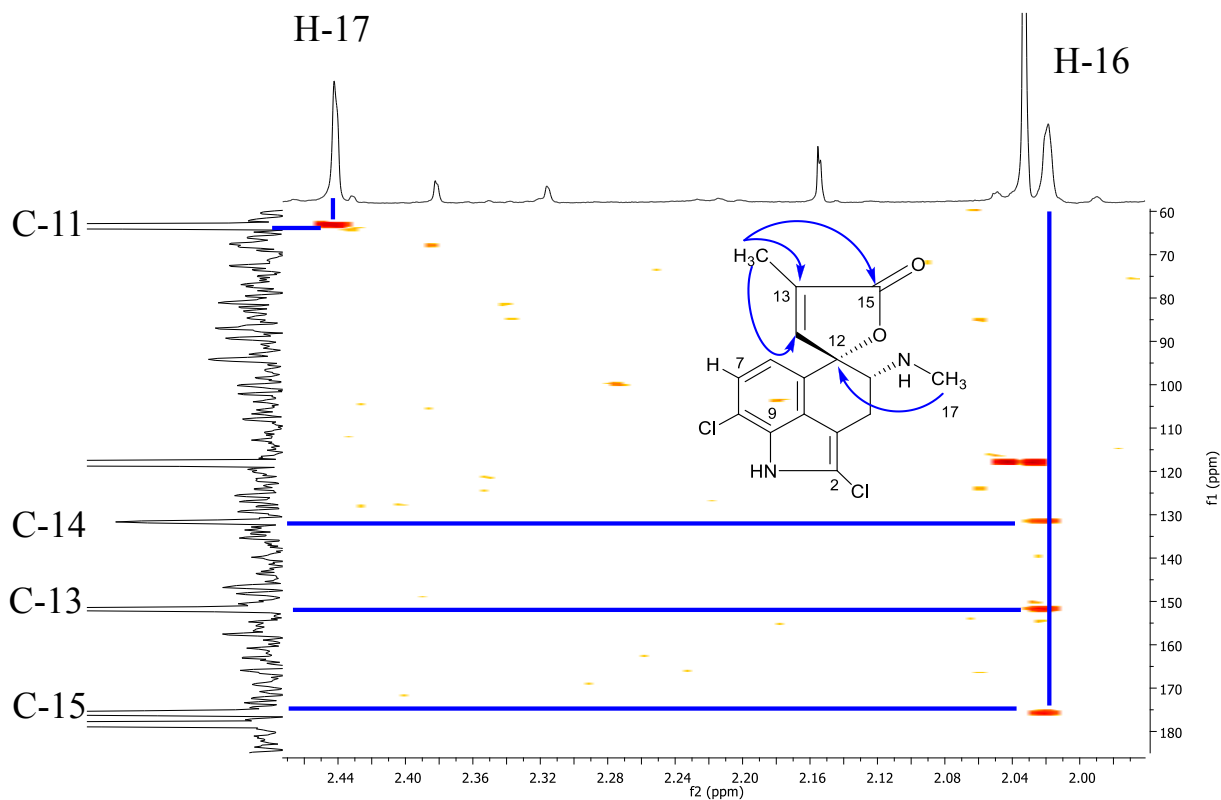


FIGURA 4.111 - Ampliação do espectro de HMBC 2,8-clororugulovasina A, metanol-*d*4, 600MHz

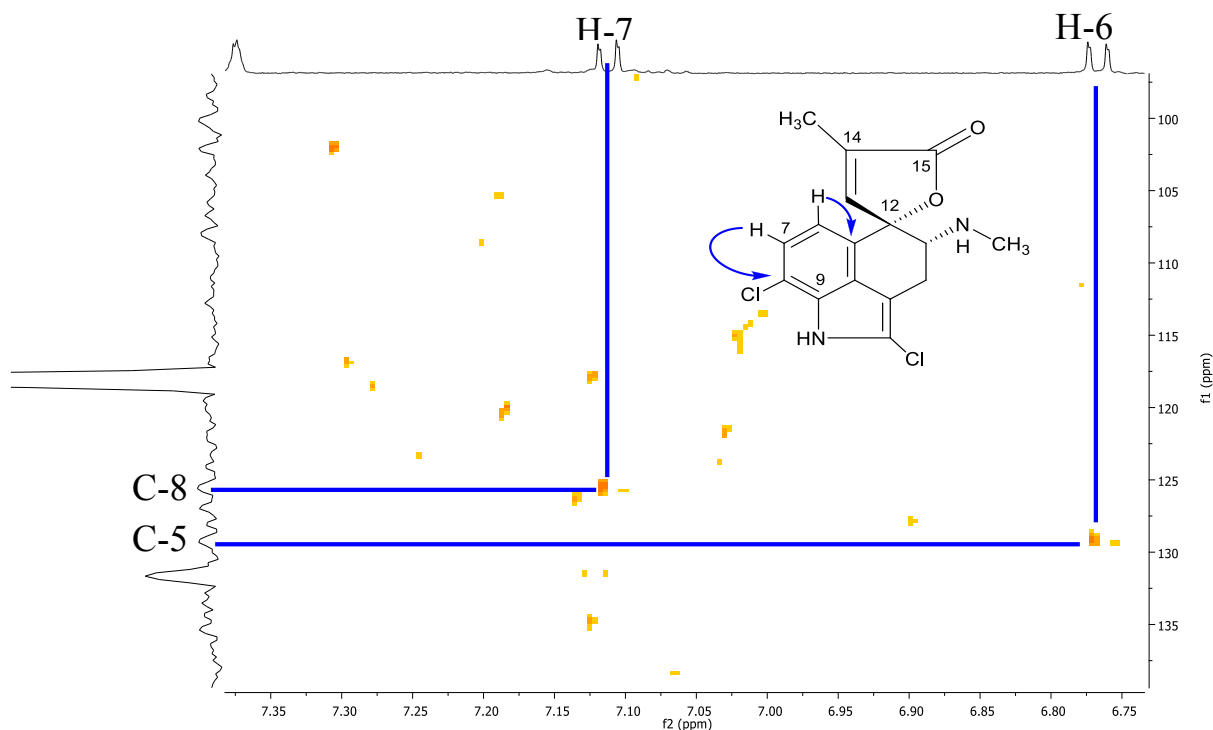


FIGURA 4.112 - Ampliação do espectro de HMBC 2,8-clororugulovasina A, metanol- d_4 , 600MHz

4.3.2 - Detecção de novas rugulovasinas bromadas produzidas por *T. rugulosus*

Tendo em vista a potencialidade do fungo *T. rugulosus* em biossintetizar rugulovasinas cloradas, foi proposto um experimento teste para verificação da produção de possíveis alcaloides bromados pelo endófito. Para tanto, aditivos bromados foram testados junto ao meio de cultura ministrado ao fungo.

Em primeira instância, substituiu-se para ajuste de pH do meio de cultura PD, o ácido clorídrico (HCl) por ácido bromídrico (HBr), mantendo-se o valor de pH usual a este meio de cultura (pH = 5.6). Alternativamente, um outro teste foi realizado adicionando-se o sal brometo de potássio (KBr) (2mg/mL) ao meio PD. Sendo assim, para ambos experimentos houve o fornecimento de ânions brometo ao micro-organismo.

Os extratos obtidos respectivamente a cada aditivo foram analisados primeiramente via LC-MS (baixa resolução). Surpreendentemente, o resultado que é visualizado na FIGURA 4.112 foi o mesmo obtido para ambos os experimentos. A figura traz o processamento do espectro de *full scan* de uma ampla região cromatográfica de interesse para o extrato do experimento com HBr.

Foi notório que para ambos os extratos, o processamento do espectro de *full scan* mostrou fortes indícios da produção de compostos bromados por *T. rugulosus*. O aparecimento do íon de massa m/z 347 referente à $[M+H]^+$, bem como de seu isótopo correspondente $[(M+2) + H]^+$ com intensidade relativa de 100% , delimitou a existência de um átomo do halogênio no analito alvo detectado.

Através da análise espectral, também foi possível notar a detecção dos íons de massa m/z 269, 303 e 337 cuja identidade era correspondente à rugulovasina e seus congêneros clorados, mostrando que, mesmo com a adição de íons brometo ao meio de cultura, o micro-organismo ainda sim, produziu os alcaloides clorados durante o experimento.

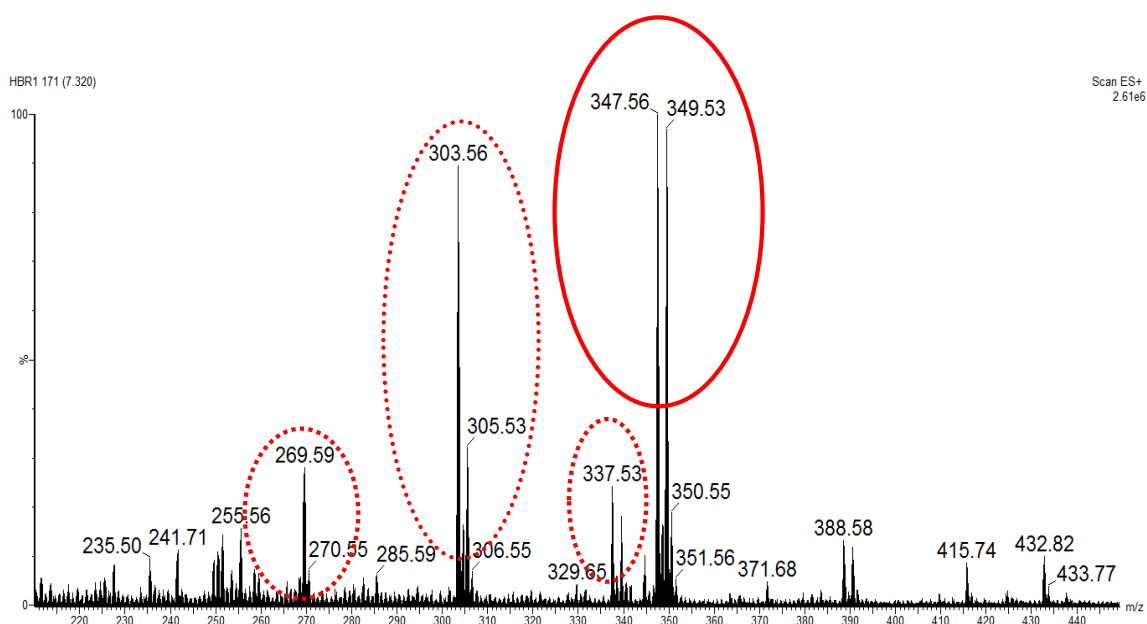


FIGURA 4.113 - Espectro de *full scan* obtido para região cromatográfica de interesse do extrato relativo ao experimento com HBr, método E

Ao se comparar a massa m/z 347 referente ao novo íon detectado, com os íons correspondente às rugulovasinas (m/z 269) e às clororugulovasinas, (m/z 337) notou-se uma diferença de massa de respectivamente 78 Da e 44 Da. Tal constatação corresponderia a troca de um próton na rugulovasina e de um cloro na clororugulovasina por um átomo de bromo. Além destes dados, observou-se que os tempos de retenção dos metabólitos mencionados eram bastante próximos, o que adicionalmente às informações anteriores, levou-se a sugestão quanto a possibilidade da produção de rugulovasinas monobromadas pelo fungo.

Para a confirmação desta suposição, os mesmos extratos foram analisados por HRMS e HRMS/MS, objetivando-se um estudo mais detalhado a respeito das rugulovasinas produzidas por *T. rugulosus*, principalmente com relação às novas moléculas dicloradas isoladas anteriormente e às potenciais novas rugulovasinas bromadas. Diferentemente dos demais estudos mencionados até aqui abrangendo o uso de HRMS, os resultados demonstrados a seguir foram obtidos por análises realizadas em espectrômetro de massas com analisador do tipo Orbitrap.

Em concordância com os resultados anteriores, observou-se a detecção dos isômeros correlacionados aos alcaloides produzidos pelo fungo como pode ser visualizado através dos cromatogramas de *EIC* correspondentes a cada massa monoisotópica de interesse (FIGURA 4.114).

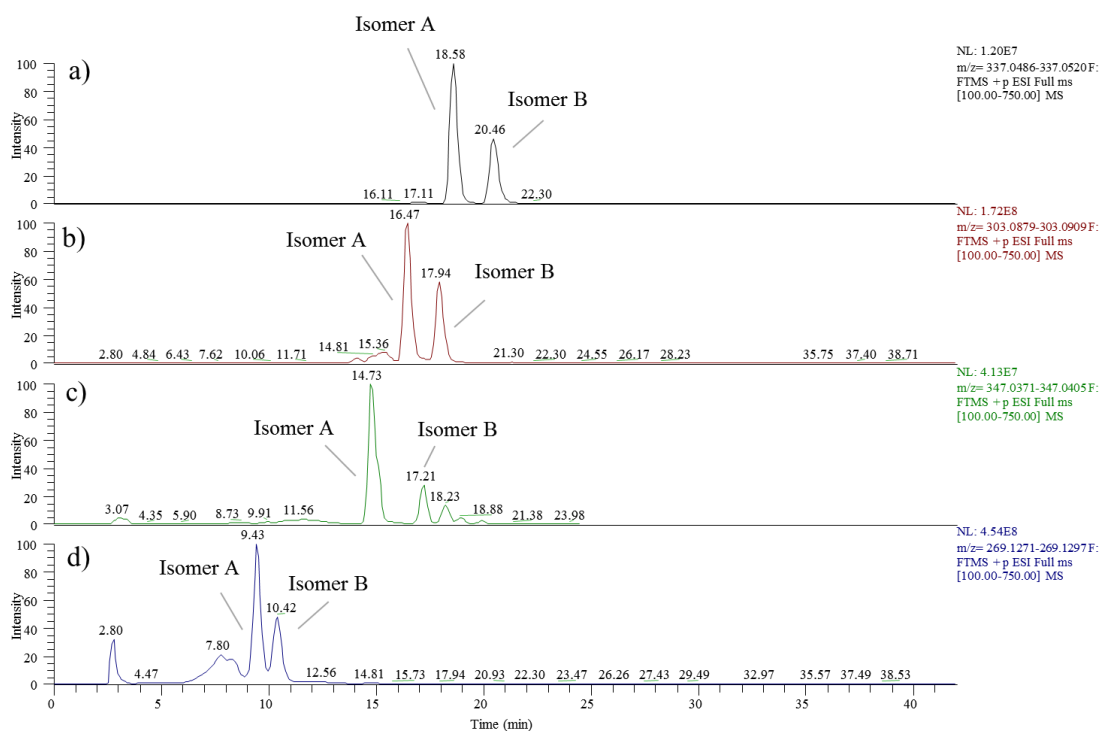


FIGURA 4.114 - Cromatogramas de *EIC* correspondentes às massas nominais do íon pseudomolecular protonado a) m/z 337; b) m/z 303; c) m/z 347; d) m/z 269, método C

Com relação aos compostos potencialmente bromados, os dados preliminares do espectro de *full scan* exibiu a massa acurada de m/z 347,0389 (- 0,1 ppm de erro) para o isômero A e m/z 347,0388 (- 0,3 ppm de erro) para B. A fórmula molecular fornecida para os íons alvo foi estabelecida em $C_{16}H_{16}O_2N_2Br$, o que correspondeu às indicações quanto à substituição de um próton ($C_{16}H_{17}O_2N_2$) e de um átomo de cloro ($C_{16}H_{16}O_2N_2Cl$) com relação aos seus congêneros biossintéticos rugulovasinas e clororugulovasinas.

O perfil isotópico encontrado foi confirmatório para a monobromação dos metabólitos alvo tendo em vista a alta compatibilidade de dados quanto ao espectro obtido ao simulado para o íon e seu isótopo. Como mostra a FIGURA 4.115, pode-se notar alta exatidão nos dados experimentais e observados para processamento da banda cromatográfica relativa ao isômero B.

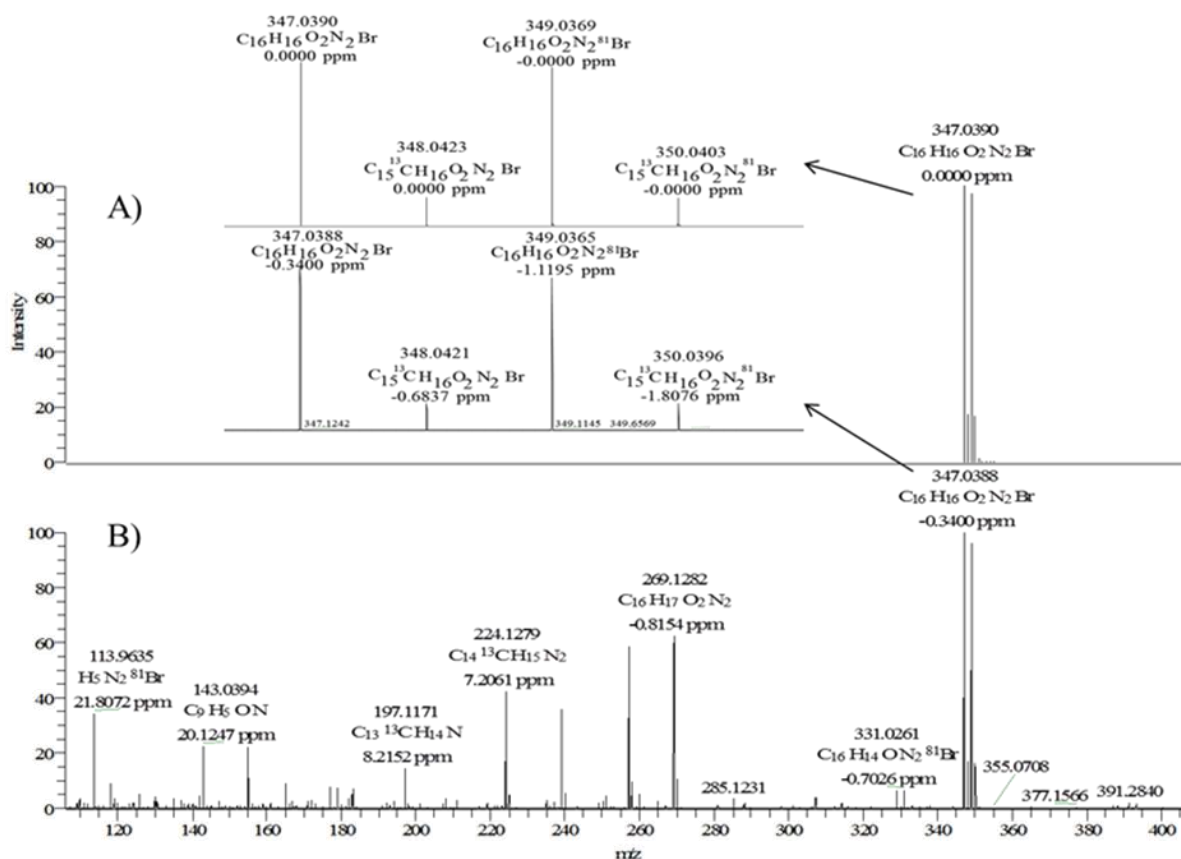


FIGURA 4.115 - Espectro de *full scan* simulado para o íon de composição elemental $C_{16}H_{16}O_2N_2Br$; b) Espectro de *full scan* referente ao íon detectado m/z 347,0388 no extrato de *T. rugulosus*, método C

Para a pré-identificação estrutural dos isômeros bromados detectados, optou-se pelo estudo dos compostos via experimentos de HRMS/MS. Uma visão geral dos espectros de HRMS/MS obtidos para as rugulovasinas e seus derivados biossintéticos, bem como dos metabólitos bromados pode ser obtida na FIGURA 4.116. Com ela, foi sinalizado que de fato, estes últimos pertenciam a classe de alcaloides mencionada, haja vista a grande similaridade no perfil de fragmentação dos correspondentes íons. Os mecanismos que justificam tais fragmentos serão discutidos a seguir.

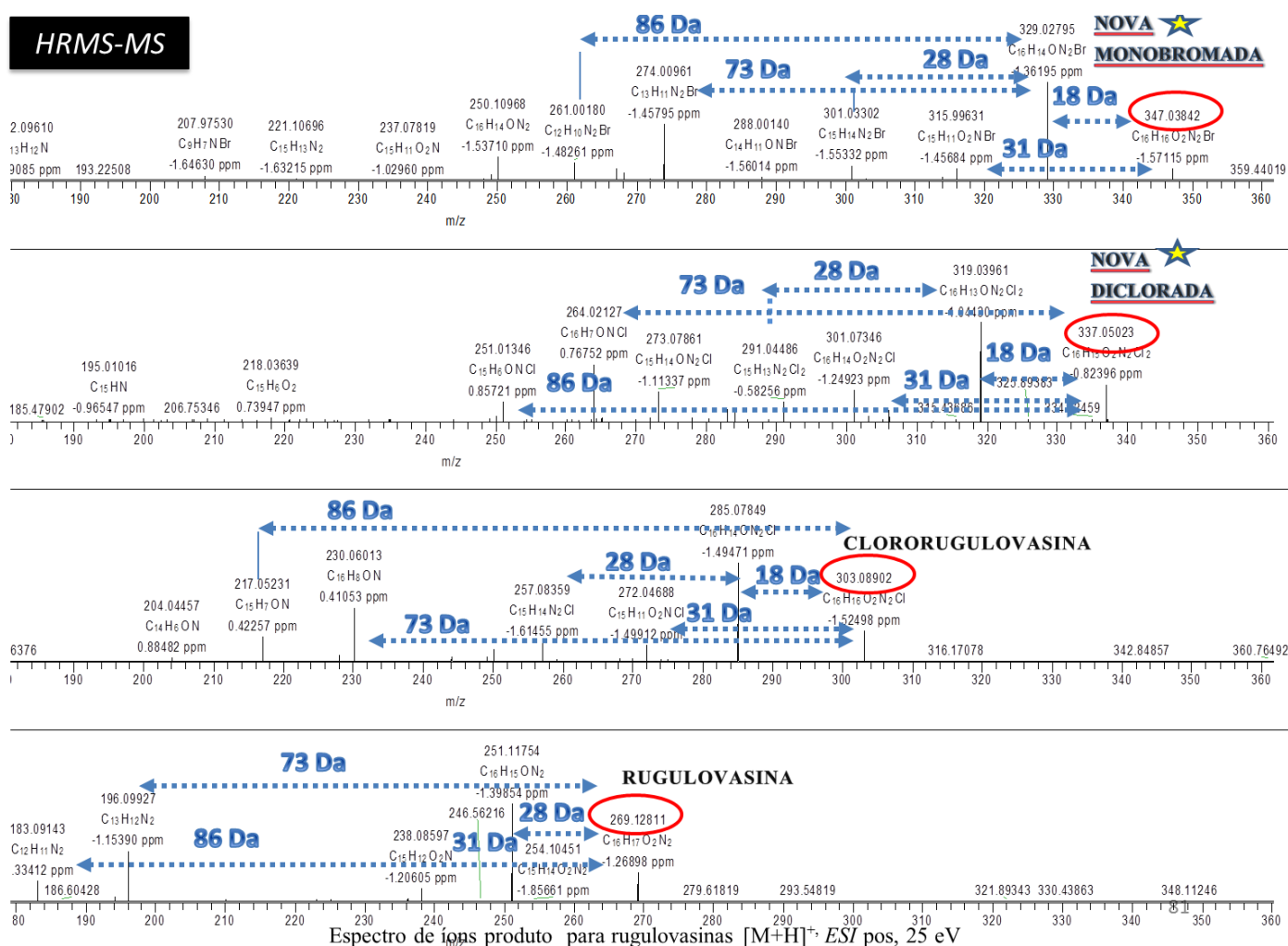


FIGURA 4.116 - Perfil de fragmentação de rugulovasinas produzidas por *T.rugulosus*, método C

4.3.3 - Estudo das rugulovasinas e seus derivados halogenados produzidos por *T. rugulosus* via experimentos de HRMS/MS

O estudo de fragmentação das rugulovasinas e seus derivados halogenados produzidos por *T. rugulosus* corroborou de forma efetiva para a proposição estrutural das estruturas das rugulovasinas monobromadas e para a confirmação estrutural das novas 2,8-diclororugulovasinas.

Como um todo, o perfil de fragmentação foi bastante informativo quanto à confirmação do esqueleto básico da rugulovasina em todos os casos. Através da análise dos espectros de íons produto dos metabólitos alvo, cada íon precursor apresentou basicamente as mesmas perdas de massa, gerando os íons produto que seguem resumidos na TABELA 4.12.

Todos os desvios relativos para as massas acuradas em relação as massas exatas de cada íon, são encontrados nos próprios espectros de HRMS/MS, indicados acima de cada relação de massa (m/z).

Devido à similaridade estrutural, as propostas para os mecanismos de fragmentação para as 2,8-clororugulovasinas A e B, cujos espectros de íons produto são visualizados na FIGURA 4.117 e FIGURA 4.119, serão representativas para os demais alcaloides.

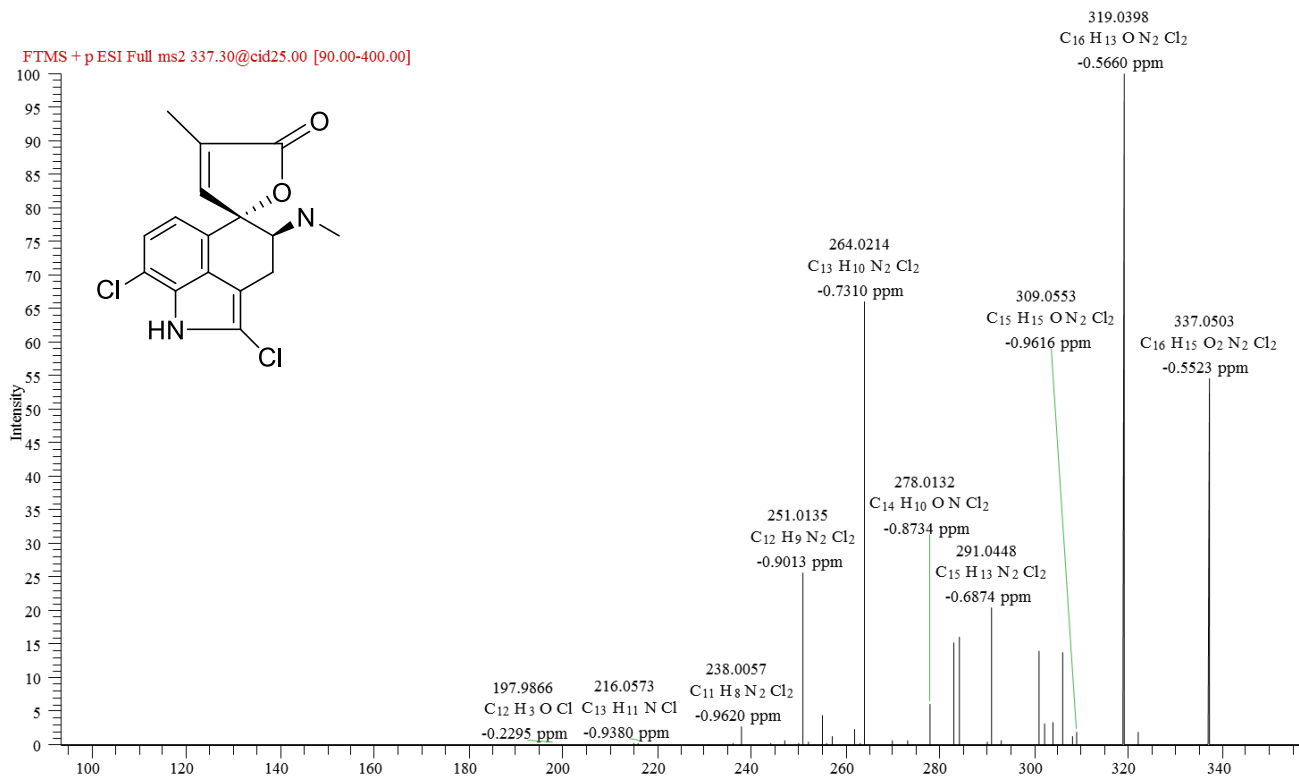


FIGURA 4.117 - Espectro de íons produto, 2,8-diclororugulovasina A, ESI +, 25 eV

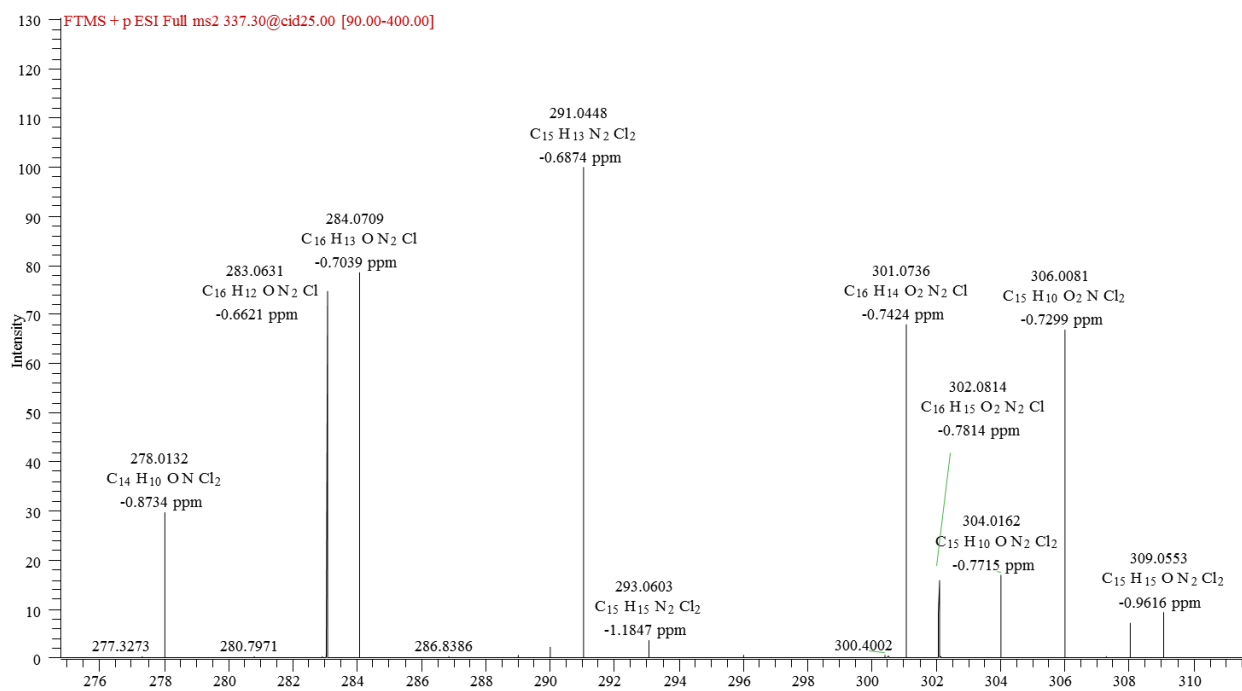


FIGURA 4.118 - Ampliação da região de interesse do espectro de íons produto, 2,8-diclororugulovasina A, ESI +, 25 eV

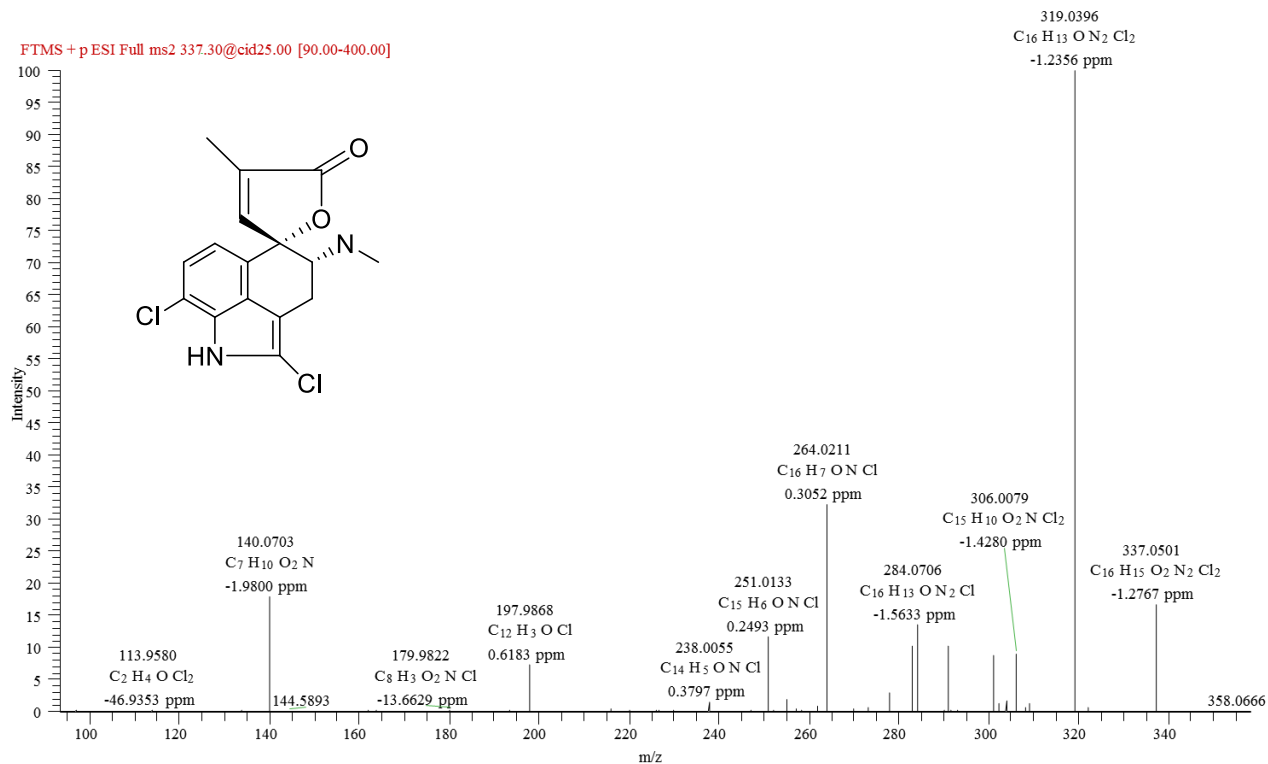


FIGURA 4.119 - Espectro de íons produto, 2,8-diclororugulovasina B, ESI +, 25 eV

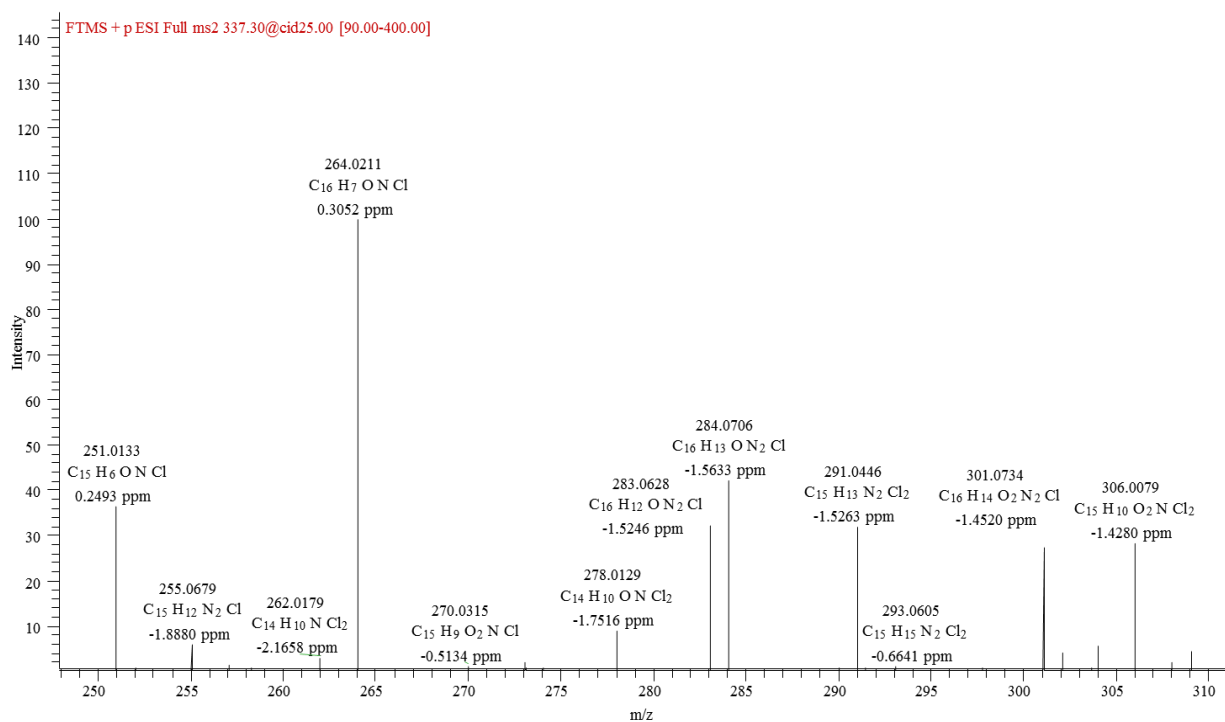


FIGURA 4.120 - Ampliação da região de interesse do espectro de íons produto, 2,8-diclororugulovasina B, ESI +, 25 eV

Parte dos íons produtos encontrados nos espectros anteriores são justificados através das propostas mecanísticas descritas na FIGURA 4.121. Em um primeiro passo, assumiram-se dois possíveis caminhos de fragmentação inicial, pontuados por **a** e **b**. Ambos apresentam como ponto de partida a delocalização eletrônica oriunda dos pares de elétrons do oxigênio carboxílico, levando à abertura do anel lactônico.

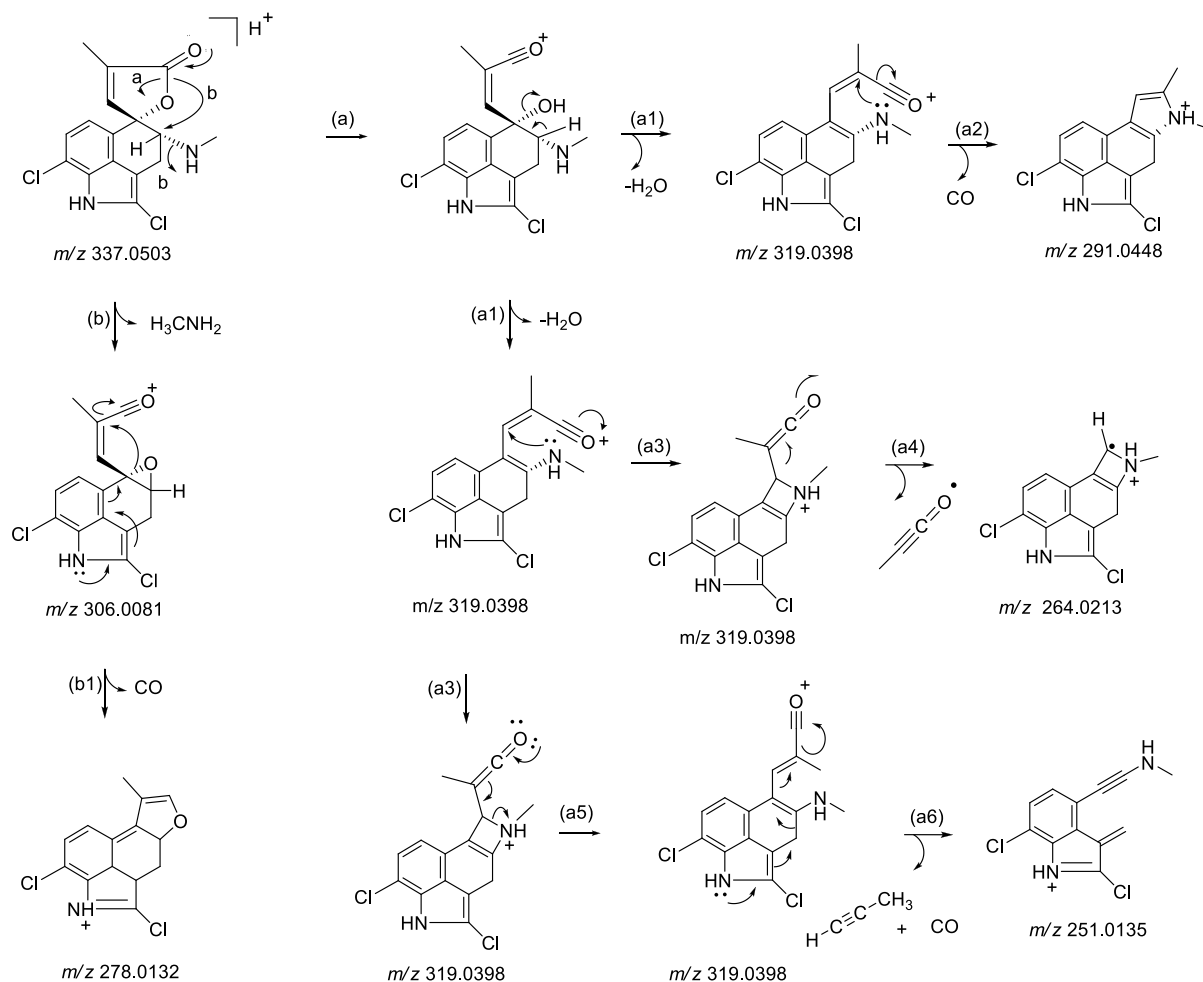


FIGURA 4.121 - Mecanismos de fragmentação sugeridos para rugulovasinas e seus derivados halogenados

TABELA 4.12 - Resumo dos íons produtos para rugulovasinas e seus derivados obtidos em experimento de HRMS/MS

Compound	[M+H] ⁺	[M+H-H ₂ O] ⁺	[M+H-CH ₂ O ₂] ⁺	[M+H-CH ₅ N] ⁺	[M+H-C ₂ H ₅ ON] ⁺	[M+H-C ₃ H ₅ O ₂] ⁺	[M+H-C ₄ H ₆ O ₂] ⁺
Rugulovasin A	269,1284	251,1179	223,1220	238,0863	210,0913	196,0995	183,0917
Rugulovasin B	269,1284	251,1179	223,1230	238,0863	210,0913	196,0995	183,0916
8-clororuhulovasine A	303,0894	285,0789	257,0840	272,0472	244,0523	230,0604	217,0526
8-clororuhulovasine B	303,0894	285,0788	257,0839	272,0472	244,0523	230,0604	217,0526
2,8-diclororuhulovasine A	337,0503	319,0398	291,0448	306,0081	278,0132	264,0214	251,0135
2,8-diclororuhulovasine B	337,0501	319,0396	291,0446	306,0081	278,0129	264,0211	251,0133
8-bromorugulovasine A	347,0388	329,0283	301,0334	315,9966	288,0017	274,0099	261,0021
8-bromorugulovasine B	347,0387	329,0283	301,0333	315,9966	288,0016	274,0099	261,0021

No caso do isômero A, a rota representada por **a1**, origina o íon de pico base m/z 319,0398 através da perda da unidade de água. A saída sequencial de uma unidade de CO é favorecida pela formação do sistema amino pentacíclico, que fornece o íon m/z 291,0448 (passo **a2**). O fechamento de um anel amino de quatro membros também é sugerido alternativamente ao mecanismo anterior para o íon m/z 319,0398 através de **a3**, gerando um grupamento ceteno como substituinte para o íon em questão.

Embora a ocorrência de formas radicalares seja menos frequente no modo de ionização por ESI, estas são plausíveis no mecanismo de fragmentação das rugulovasinas e seus derivados. Em decorrência da saída do radical ceteno em **a4**, o íon m/z 264,0214 é favorecido, sendo detectado.

Alternativamente, a delocalização eletrônica proveniente do átomo de oxigênio localizado no grupo ceteno, pode ser favorecida para a estabilização do nitrogênio carregado positivamente, orientando o passo assinalado por **a5**. Consequentemente, uma nova delocalização eletrônica no sistema pode ocorrer, porém iniciada a partir do nitrogênio indólico, assistindo a detecção do íon m/z 251,0135 pela saída concomitante de uma molécula de CO e do fragmento neutro metilacetileno.

No passo mecanístico **b**, a delocalização eletrônica a partir novamente do oxigênio carboxílico, é assistida pela saída do grupo metil amina formando a porção epoxidada. A formação do epóxido que culminou na abertura do anel espiro, é seguida pela saída de uma molécula de CO (**b1**). Esta saída, por sua vez, é garantida pela

delocalização eletrônica proveniente dos pares de elétrons do nitrogênio indólico para a estabilização do sistema, formando o anel oxidado de cinco membros.

Ainda de acordo com os dados obtidos nos espectros de HRMS/MS das novas rugulovasinas dicloradas, foi observada uma perda de massa a partir do íon pseudomolecular, correspondente a 36 unidades de massa, gerando o íon produto m/z 301,0501. Tal perda representa a saída de HCl e formação do carbocátion terciário, justificando o posicionamento do átomo de cloro no anel indólico dos novos alcaloides produzidos por *T. rugulosus* como pode ser verificado FIGURA 4.122. Após a saída de HCl, a detecção dos demais íons é favorecida por perdas sequenciais de água e CO respectivamente, gerando a espécie representada pelo anel pirrólico m/z 255,0681.

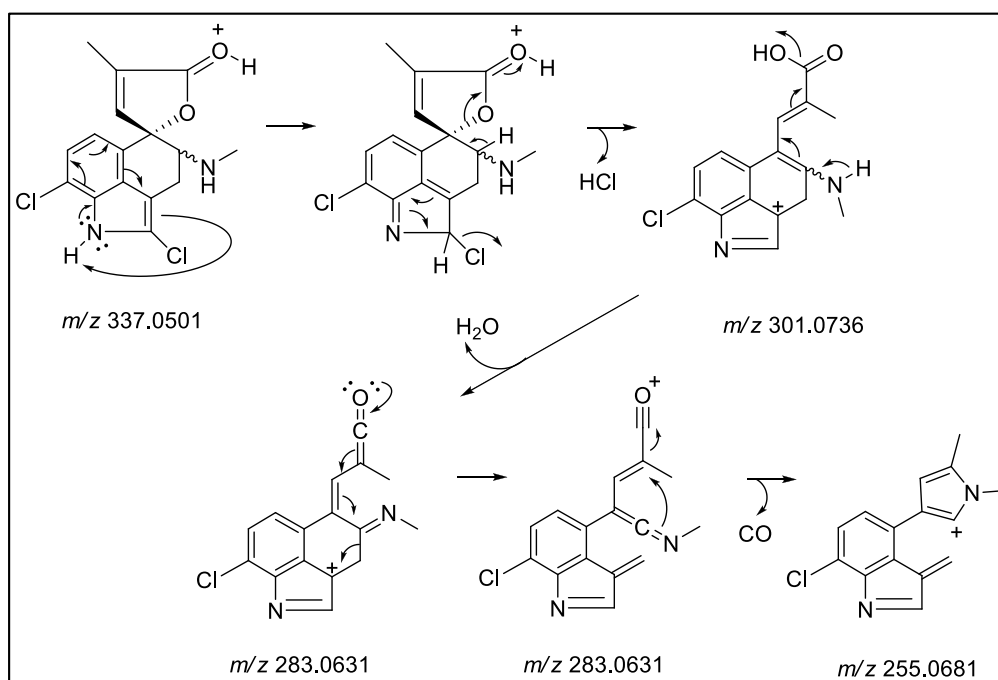


FIGURA 4.122 - Proposta para o mecanismo de fragmentação das 2,8-diclororugulovasina A e B

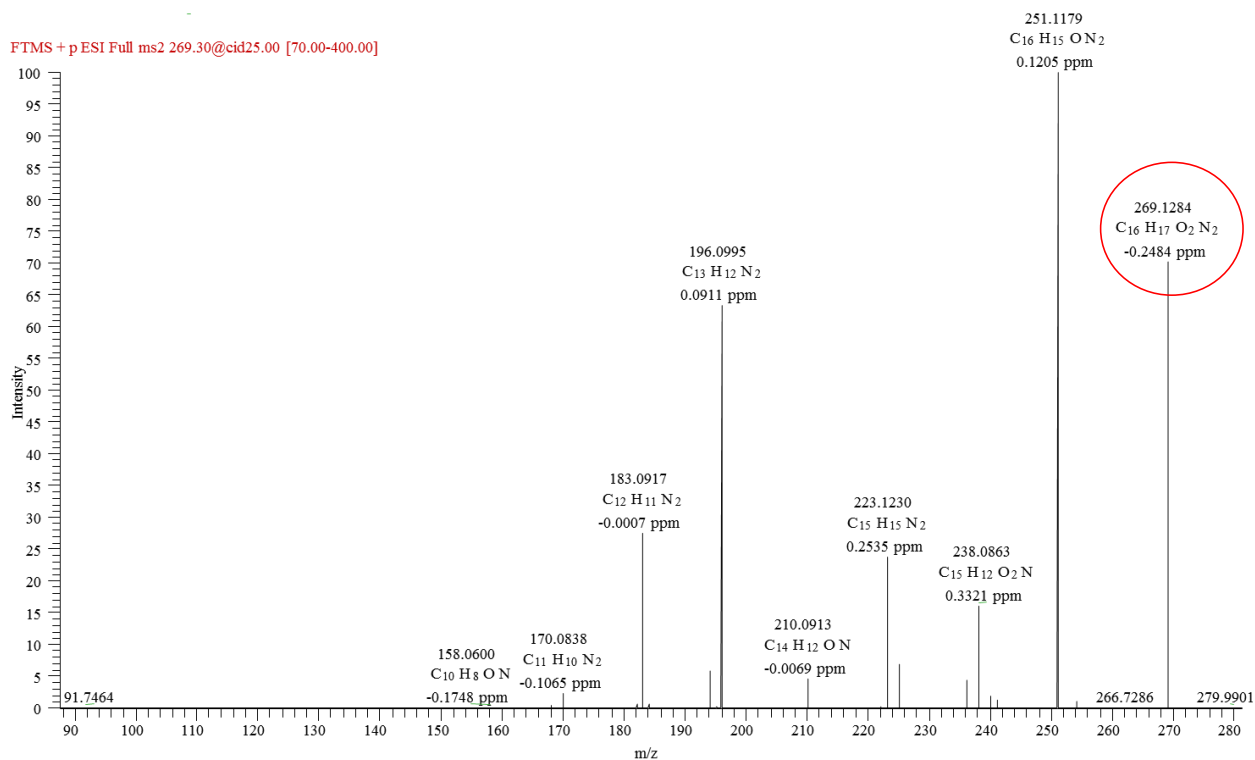


FIGURA 4.123 - Espectro de íons produto, rugulovasina A, ESI +, 25 eV

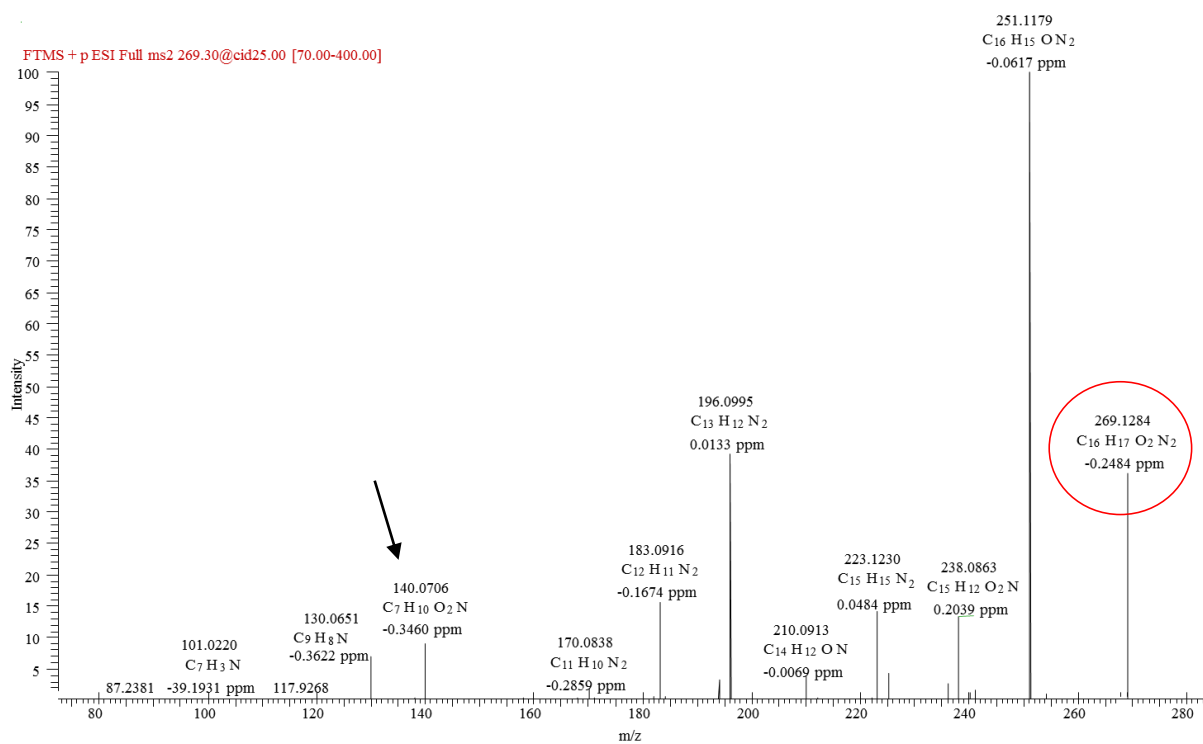


FIGURA 4.124 - Espectro de íons produto, rugulovasina B, ESI +, 25 eV

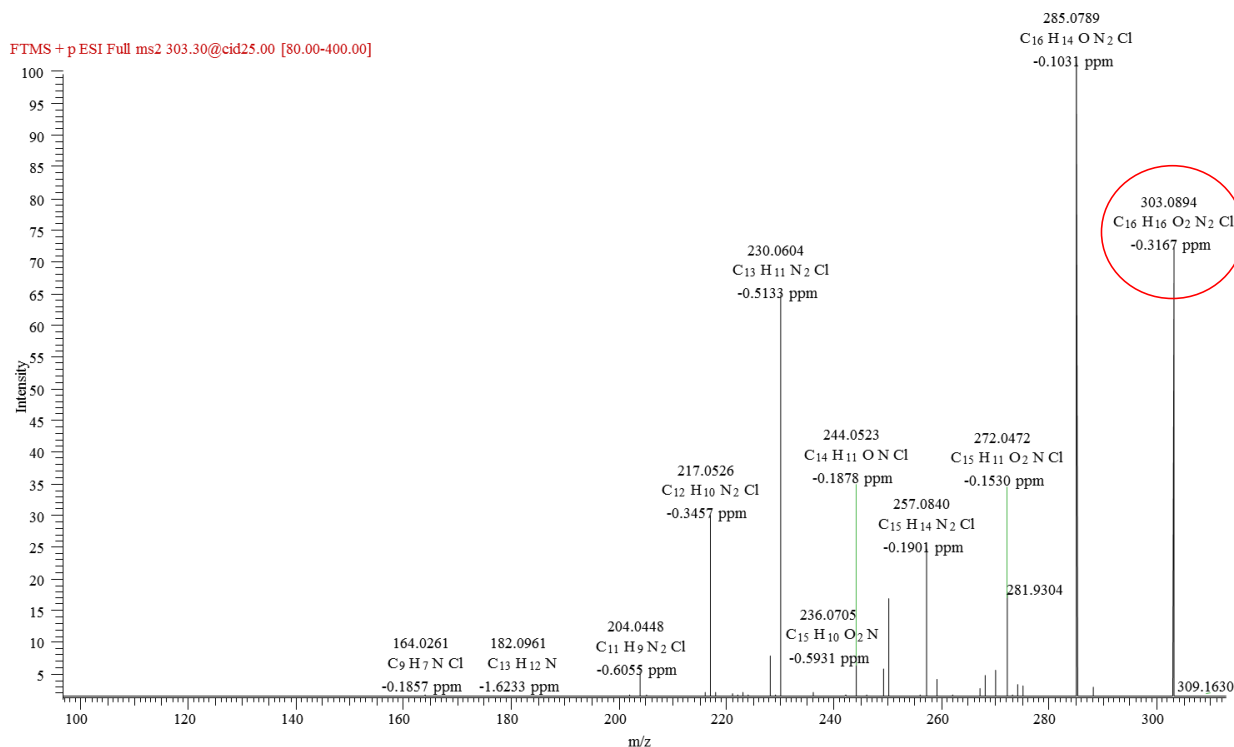


FIGURA 4.125 - Espectro de íons produto, 8-clororugulovasina A, ESI +, 25 eV

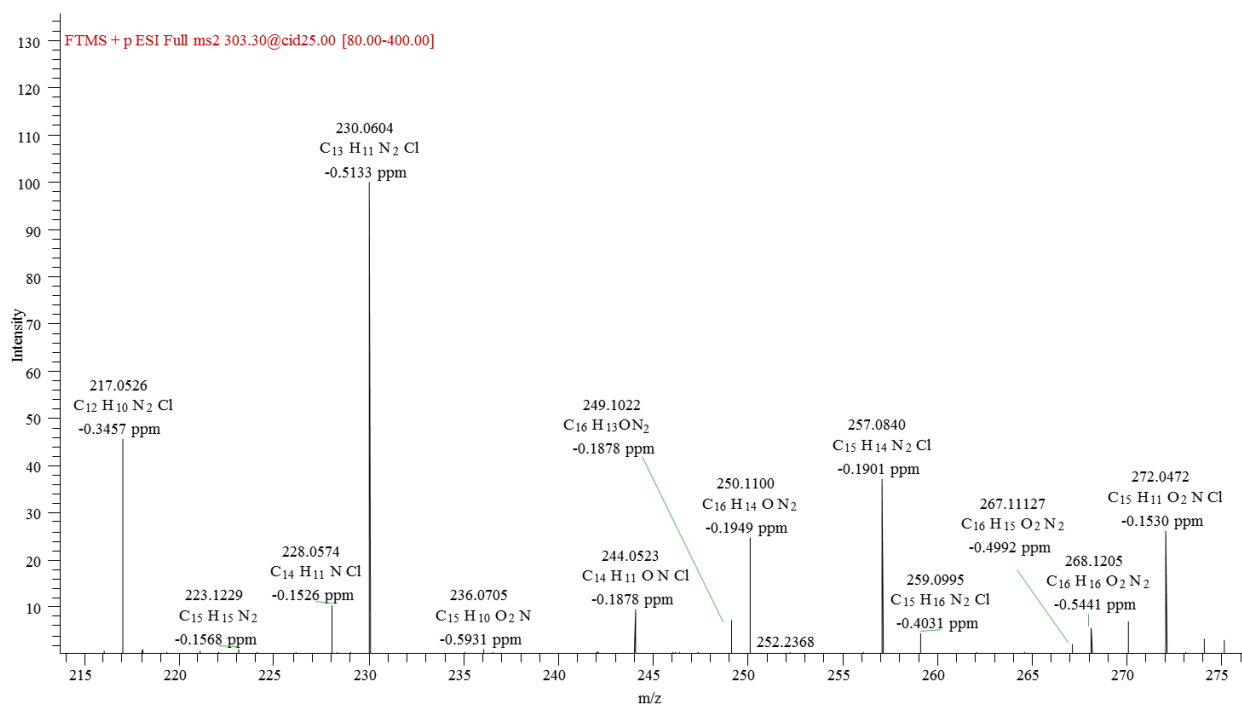


FIGURA 4.126 - Ampliação da região de interesse do espectro de íons produto, 8-clororugulovasina A, ESI +, 25 eV

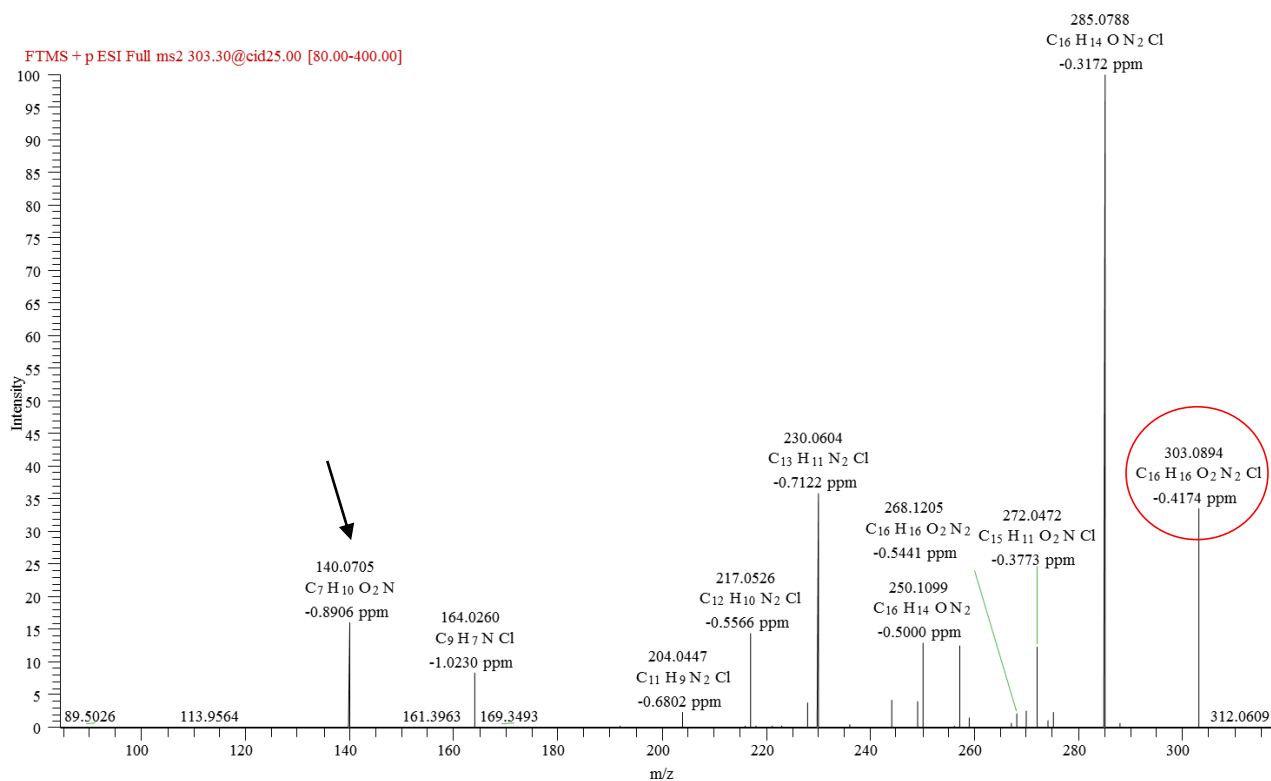


FIGURA 4.127 - Espectro de íons produto, 8-clororugulovasina **B**, ESI+, 25 eV

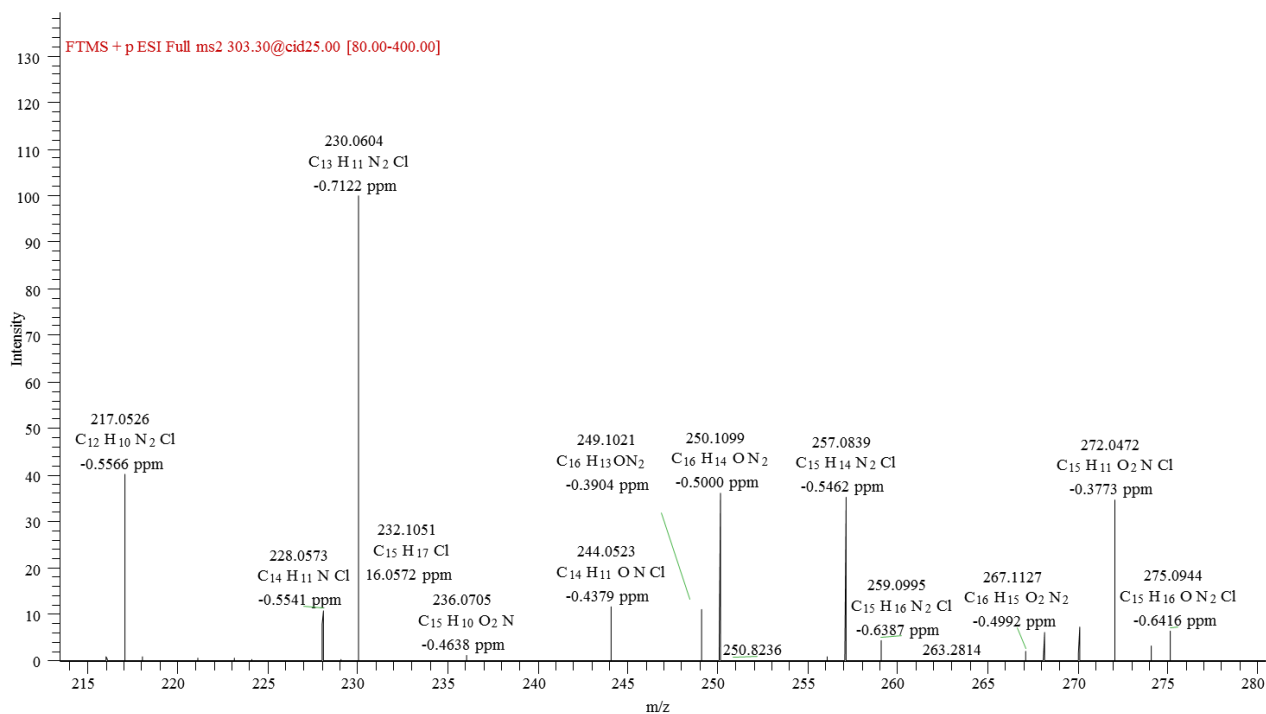


FIGURA 4.128 - Ampliação da região de interesse do espectro de íons produto, 8-clororugulovasina **B**, ESI+, 25 eV

Nas bases das informações geradas pelo estudo de fragmentação, foi possível sugerir que os compostos bromados produzidos pelo endófito estudado seguem a mesma configuração estrutural das 8-clororugulovasinas. Além do mesmo esqueleto *ergot*, o posicionamento do halogênio é pontuado no mesmo núcleo carbônico, ou seja, no carbono sp^2 aromático localizado em C-8.

A confirmação de tal sugestão é fornecida pelos íons produtos encontrados em correspondência entre os espectros obtidos das 8-clororugulovasinas (FIGURA 4.125 à FIGURA 4.128) e dos compostos bromados (FIGURA 4.129 à FIGURA 4.132). Todos os íons correlacionados à perda do halogênio ligado ao núcleo C-8 são resumidos na TABELA 4.13.

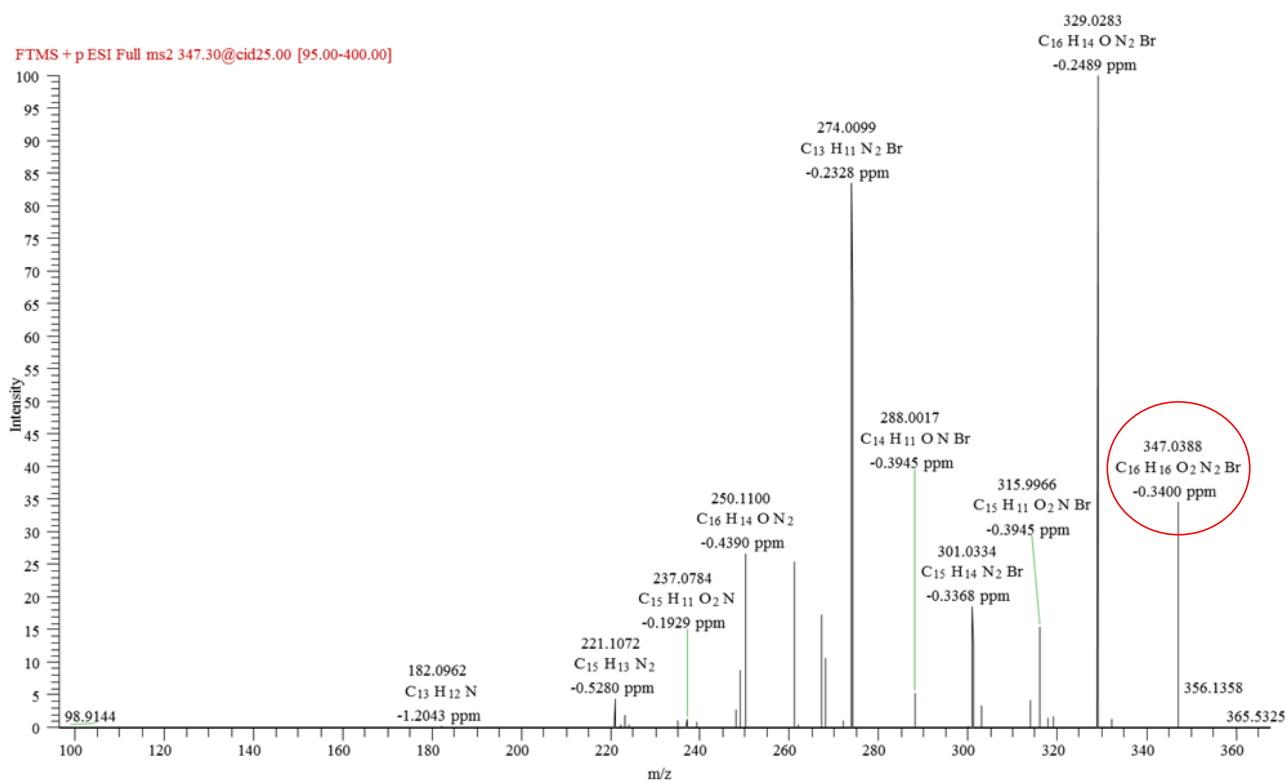


FIGURA 4.129 - Espectro de íons produto, 8-bromorugulovasin A, ESI +, 25 eV

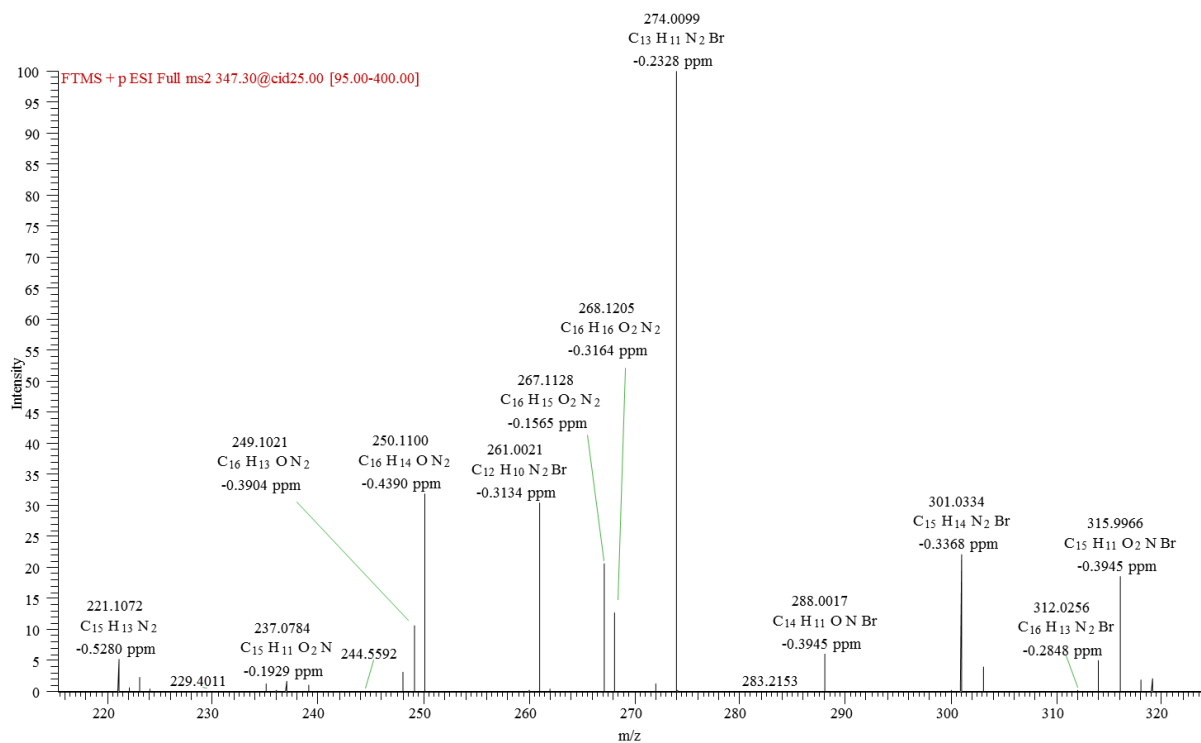


FIGURA 4.130 - Ampliação da região de interesse do espectro de íons produto, 8-bromorugulovasina **A**, ESI +, 25 eV

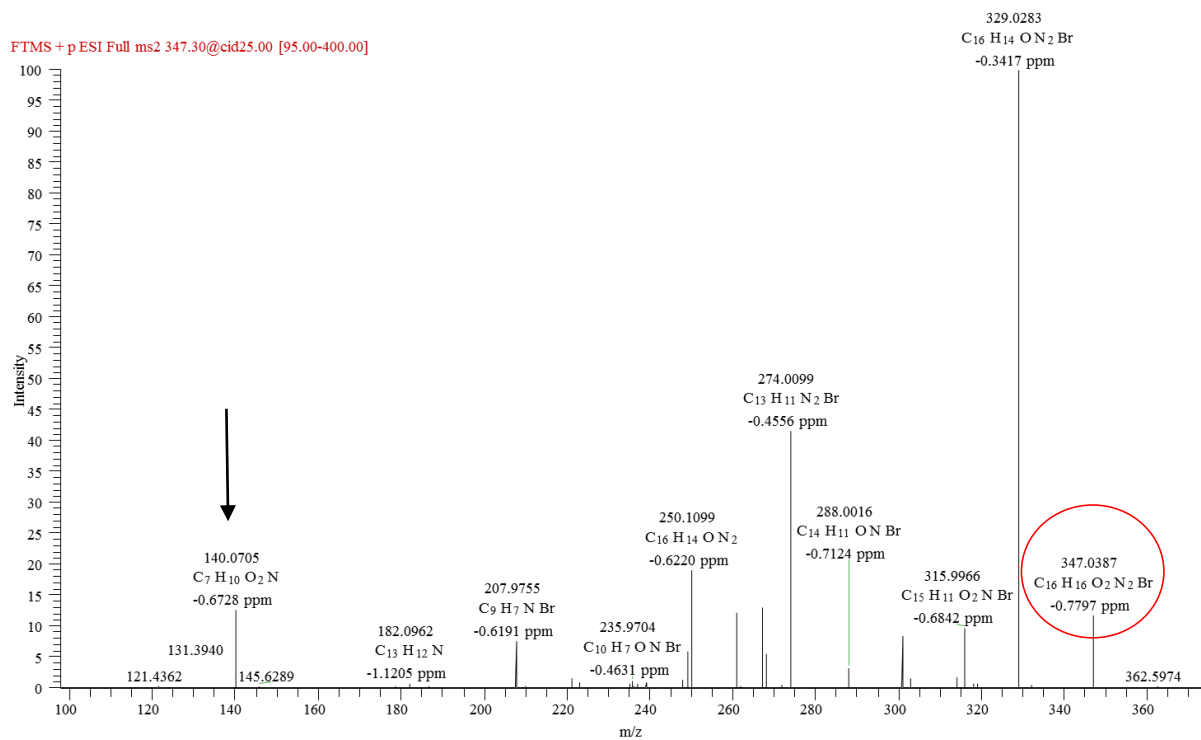


FIGURA 4.131 - Espectro de íons produto, 8-bromorugulovasina **B**, ESI +, 25 eV

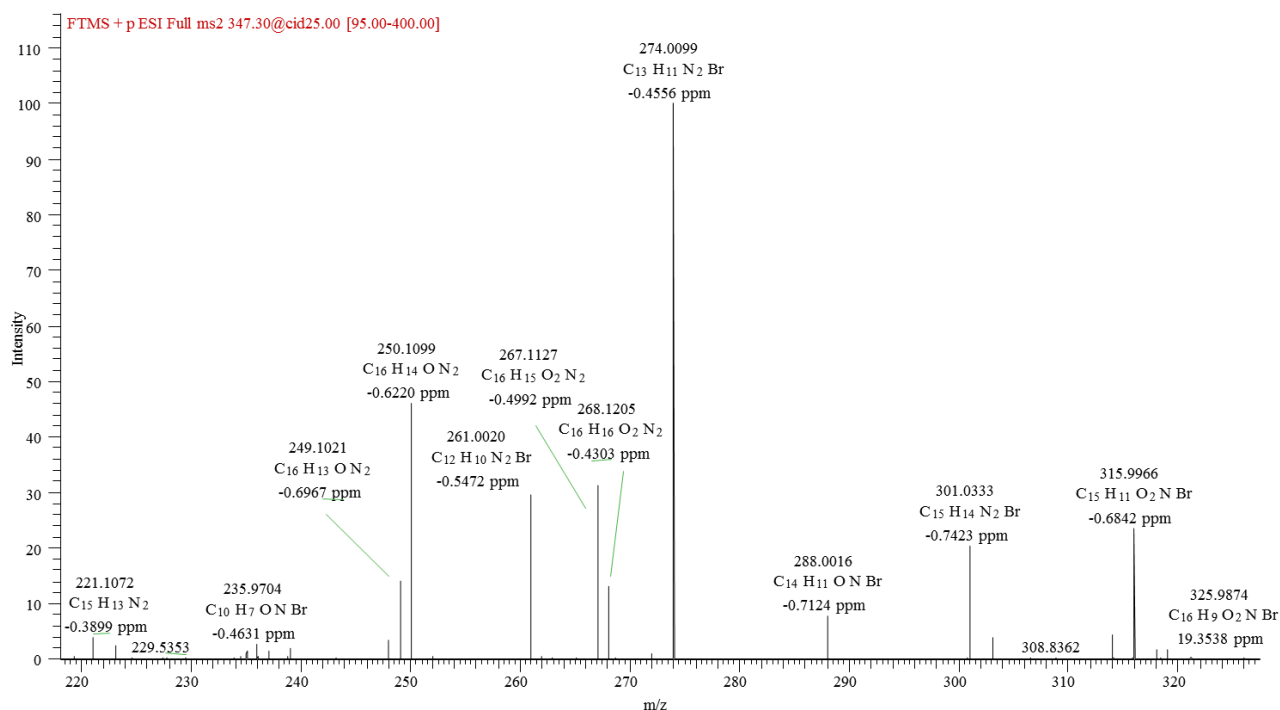


FIGURA 4.132 - Ampliação da região de interesse do espectro de íons produto, 8-bromorugulovasina **B**, ESI +, 25 eV

Um dos possíveis mecanismos para justificar o átomo de bromo como substituinte no núcleo C-8 é sugerido pela protonação da ligação dupla onde localiza-se o halogênio assistida pela delocalização eletrônica dos pares de elétrons do heteroátomo indólico. O reestabelecimento do sistema aromático é conduzido pela perda de HBr como mostra o mecanismo proposto na FIGURA 4.133.

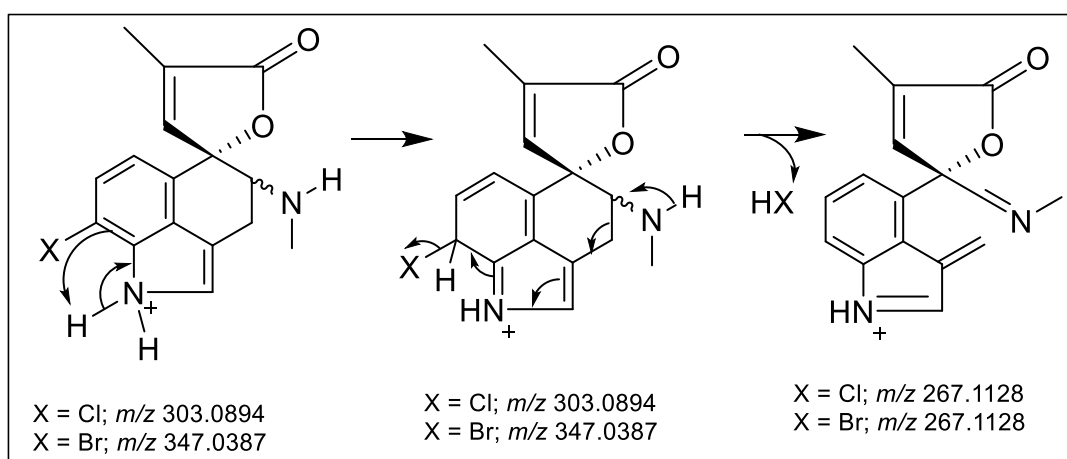


FIGURA 4.133 - Mecanismo de fragmentação proposto para alcaloides monohalogenados produzidos por *T. rugulosus*

Um outro ponto relevante quanto aos dados de fragmentação obtidos para todas as rugulovasinas e derivados produzidas por *T. rugulosus* foi o aparecimento do íon de relação m/z 140 apenas para os isômeros B, conforme pode ser visualizado nos correspondentes espectros de íons produtos destes compostos.

Tais íons podem ser justificados através de um mecanismo do tipo “retro Diels-Alder (RDA)”, que ocorre diretamente a partir do íon pseudomolecular protonado, levando à perda da porção correspondente à amina livre destes alcaloides (FIGURA 4.134). Possivelmente a configuração espacial que é assumida pelos congêneros B das rugulovasinas em questão levam ao favorecimento deste tipo de rearranjo em detrimento às formas isoméricas A.

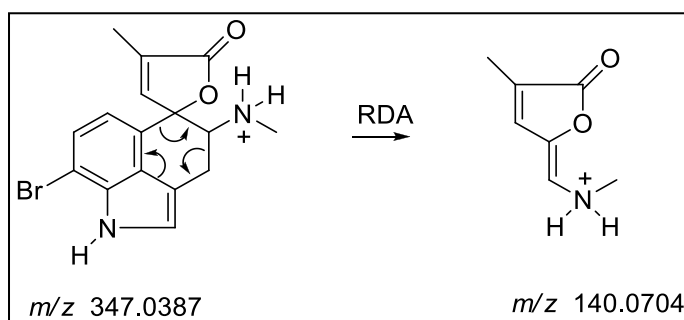


FIGURA 4.134 - Mecanismo de fragmentação proposto para justificativa do íon m/z 140

TABELA 4.13 - Massas acuradas e respectivos desvios referentes a alguns íons produtos visualizados nos espectros de HRMS/MS das rugulovasinas e derivados halogenados

Composto	[M + H – produto de RDA] ⁺	[M + H - H ₂ O - X] ⁺	[M+H-X] ⁺	[M+H-HX] ⁺
rugulovasine A	-	-	-	-
rugulovasine B	140,0706 (-0,3 ppm)	-	-	-
8-clororuhulovasine A, X = Cl	-	250,1100 (-0,2 ppm)	268,1208 (-0,5 ppm)	267,1127 (-0,5 ppm)
8-clororuhulovasine B, X = Cl	140,0705 (-0,8 ppm)	250,1099 (-0,6 ppm)	268,1205 (-0,5 ppm)	267,1122 (-0,5 ppm)
2,8-diclororuhulovasine A, X = Cl	-	284,0709 (-0,7 ppm)	302,0814 (-0,7 ppm)	301,0736 (-0,7 ppm)
2,8-diclororuhulovasine B, X = Cl	140,0703 (-1,9 ppm)	284,0706 (-1,5 ppm)	302,0812 (-1,5 ppm)	301,0734 (-1,4 ppm)
8-bromorugulovasine A, X = Br	-	250,1101 (-0,4 ppm)	268,1205 (-0,3 ppm)	267,1128 (-0,2 ppm)
8-bromorugulovasine B, X = Br	140,0705 (-0,7 ppm)	250,1099 (-0,6 ppm)	268,1206 (-0,4 ppm)	267,1128 (-0,5 ppm)

Rugulovasinas são alcaloides do tipo *ergot* derivados de um pequeno grupo de compostos derivados do aminoácido triptofano prenilado no carbono C-4, produzidos usualmente por espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, e também, reconhecidos por sua alta toxicidade (SCHARDL et al., 2006, LIRAS et al., 2011).

Elas também são conhecidas por conter a unidade espirolactônica única dentre os alcaloides ergot, tendo sido até hoje, isoladas na forma de racemato, devido a provável interconversão através de aquecimento. Na literatura é hipotetizado que as rugulovasinas A e B, bem como seus análogos monoclorados se interconvertem através de intermediários aquirais. A ciclização do intermediário, fornece a mistura racêmica das rugulovasinas através de uma reação de Mannich tipo vinílica. (LIRAS et al., 2001; ZHANG et al., 2013).

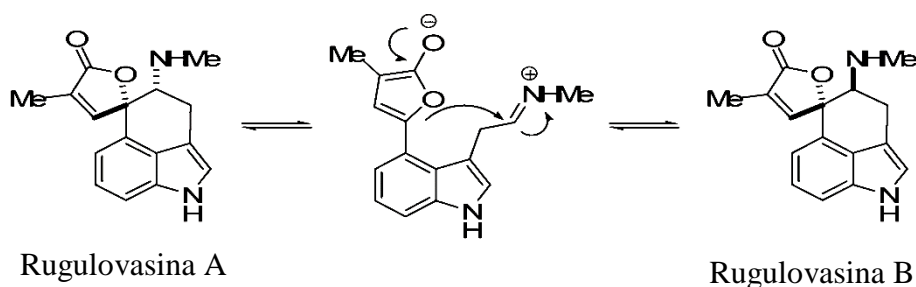


FIGURA 4.135 - Interconversão das rugulovasinas A e B (ZHANG et al., 2013)

As 8-clororugulovasinas A e B produzidas por *P. islandicum* foram relatadas pela primeira vez por COLE (1976 a), sendo esta a primeira e única ocorrência de uma rugulovasina halogenada. Portanto o isolamento das 2, 8-diclororugulovasinas bem como a detecção das 8-bromorugulovasinas são os únicos representantes halogenados desta classe de alcaloides encontrados até o momento após a descoberta de COLE (1976 a).

Por vezes no passado, compostos organohalogenados eram considerados artefatos, porém, o número de estudos vinculados a este tipo de metabólito, já considerados naturalmente biossintetizados, cresce vertiginosamente (atualmente por volta de 5.000 compostos relatados). Desde que compostos nitrogenados representam uma excelente plataforma para biohalogenações, como por exemplo, precursores biossintéticos indólicos, tem-se que 25% de metabólitos halogenados conhecidos sejam alcaloides. A produção destes compostos é

particularmente destacada por se dar em grande parte dos casos, em ambientes marinhos, provavelmente devido a alta disponibilidade de átomos de halogênios (GRIBBLE 2008).

Neste sentido é interessante notar que no presente estudo, a espécie fúngica investigada é associada a um habitat terrestre, similarmente, às espécies produtoras das primeiras rugulovasinas cloradas relatadas na literatura.

É evidente que o endófito de maçã possui um hábil sistema enzimático em incorporar halogênios em sítios específicos. O carbono C-8, originário da porção aromática do triptofano foi reconhecido como um dos pontos de halogenação preferencial, o que é ilustrado pela detecção das 8-cloro e bromorugulovasinas produzidas pelo fungo. Já o carbono sp^2 , referente à porção indólica, apresentou-se como o outro sítio preferencial de halogenação, porém sendo este exemplo encontrado menos frequentemente na literatura.

4.3.4 - Estimativa e comparação do perfil da curva de produção das rugulovasinas cloradas e bromadas produzidas por *T. rugulosus*

Com a finalidade de comparação entre os efeitos dos ânions brometo e cloreto na produção das rugulovasinas halogenadas por *T. rugulosus*, uma estimativa do perfil da curva de produção destes compostos foi realizada durante um período de 30 dias. Para tal proposta, conforme descrito na seção de procedimento experimental, foram utilizados os ácidos HBr e HCl apenas para a correção do pH do meio de cultura (BD). O procedimento de extração dos pontos avaliados, seguem descritos na seção experimental.

As análises foram realizadas em sistema de analisador de massas do tipo Orbitrap e os resultados estabelecidos pela medida das áreas das bandas de *ECI* correspondentes aos íons das rugulovasinas cloradas e bromadas. Este parâmetro foi utilizado em moldes quantitativos em concordância à estabilidade e extatidão do sinal oferecidas pelo sistema utilizado (ZHANG, 2009).

Destaca-se que, para excluir possíveis efeitos de interconversão molecular entre os isômeros, e melhor visualização dos resultados, cada barra representa a soma dos resultados obtidos para o isômero A e B.

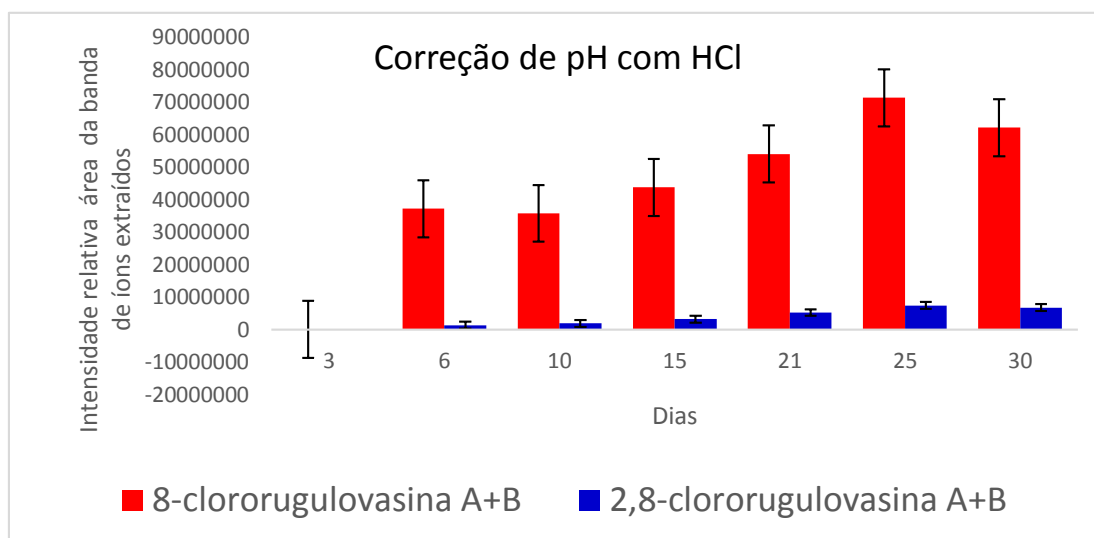


FIGURA 4.136 - Gráfico para a curva estimada da produção de rugulovasinas halogenadas por *T.rugulosus* de acordo com o efeito de íons cloreto no meio de cultura

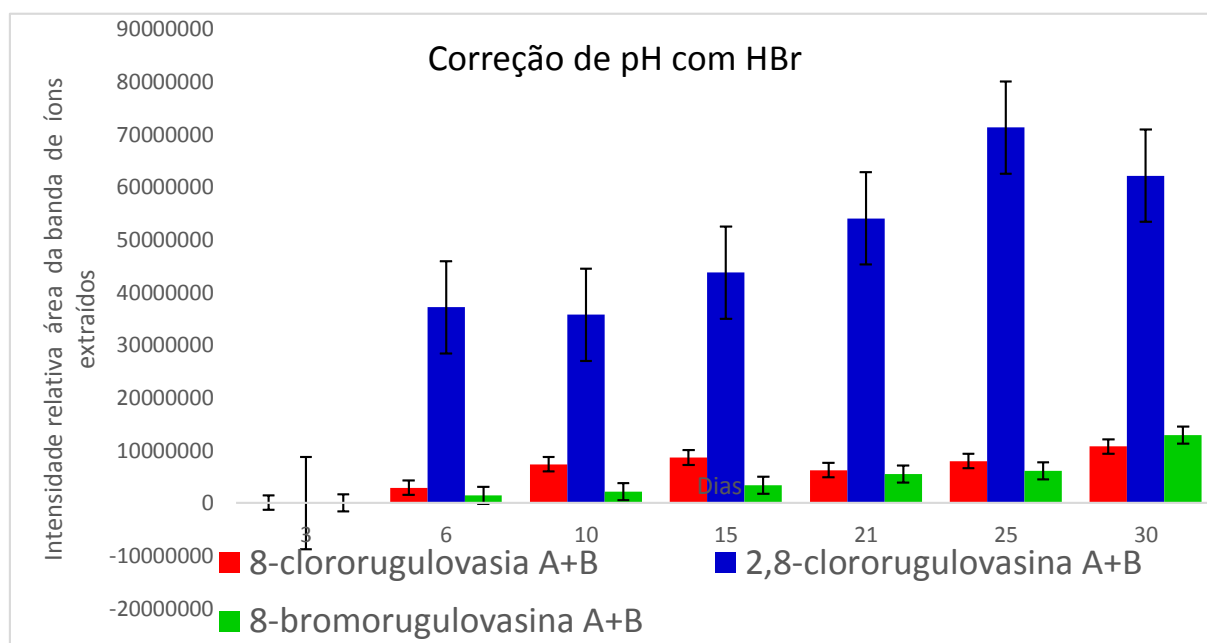


FIGURA 4.137 - Gráfico para a curva estimada da produção de rugulovasinas halogenadas por *T.rugulosus* de acordo com o efeito de íons brometo no meio de cultura

De acordo com os resultados visualizados nos gráficos das FIGURA 4.136 e FIGURA 4.137, nota-se uma inversão na intensidade relativa de produção das rugulovasinas monocloradas e dicloradas quando compara-se a atuação dos dois ácidos. Ou seja, claramente há um aumento das moléculas dicloradas quando o íon brometo é utilizado no meio de crescimento fúngico, o que é notado pelo aumento das

barras azuis correspondentes a estes alcaloides, no gráfico da FIGURA 4.137 em relação ao gráfico ilustrado na FIGURA 4.136.

Este resultado obtido foi inesperado, na medida em que não é óbvia a correlação entre a adição de bromo no meio de cultura e a produção das 2,8-diclororugulovasinas, até mesmo porque, rugulovasinas dibromadas não foram detectadas neste estudo. Talvez, possa ser hipotetizada uma espécie de competição entre os átomos durante o processo biossintético dos alcaloides monohalogenados, que poderia refletir indiretamente em um aumento relativo das 2,8 diclororugulovasinas. Porém, são necessários estudos mais profundos quanto a expressão e atuação de potenciais halogenases presentes no genoma fúngico para o entendimento de tal resultado.

Diferentemente do que ocorre em sistemas procariotos, a halogenação do triptofano é uma reação não usual em fungos. É conhecido que as enzimas expressas em procariontes, denominadas halogenases dependente de FADH, são responsáveis por halogenações nos sítios C-6, C-7 e C-8 do triptofano (DONG et al., 2005). Nos organismos eucarióticos há a mesma classe de enzimas, com alta similaridade àquelas encontradas em bactérias, mas não há especificidade tão restrita. Por exemplo, um cluster biossintético do composto radicicol, que contém uma halogenase putativa (rdc2 ou radH) foi isolado a partir de vários fungos, que demonstraram capacidade de halogenação em diferentes posições de derivados desta lactona halogenada. Estas enzimas foram caracterizadas e mostraram atividade de halogenação em centros ricos em elétrons (WANG et al., 2008; ZHOU et al., 2010).

Na biossíntese de sistemas derivados do triptofano, a entrada do halogênio decorre de uma substituição eletrofílica aromática. Na realidade, o mecanismo é iniciado pela oxidação do FADH₂ pela atuação inicial da halogenase na presença de oxigênio. Na sequência, os íons cloreto existentes também no meio reacional, sofrem oxidação, formando o ácido hipocloroso (HClO) e consequentemente havendo uma nova redução que regenera o FADH₂. O ácido hipocloroso formado interage com o resíduo de lisina K79 e glutamato E346 da halogenase por ligações de hidrogênio. Neste ponto ocorre o ataque da dupla ligação aromática ao ácido hipocloroso, havendo a regeneração da enzima livre e a formação do triptofano halogenado. Pelo fato dos átomos de cloro e de bromo serem similares em reatividade, o comportamento para a biossíntese de compostos bromados com origem a partir do triptofano é o mesmo (CHEN & PÉE, 2008; FLECKS et al., 2008).

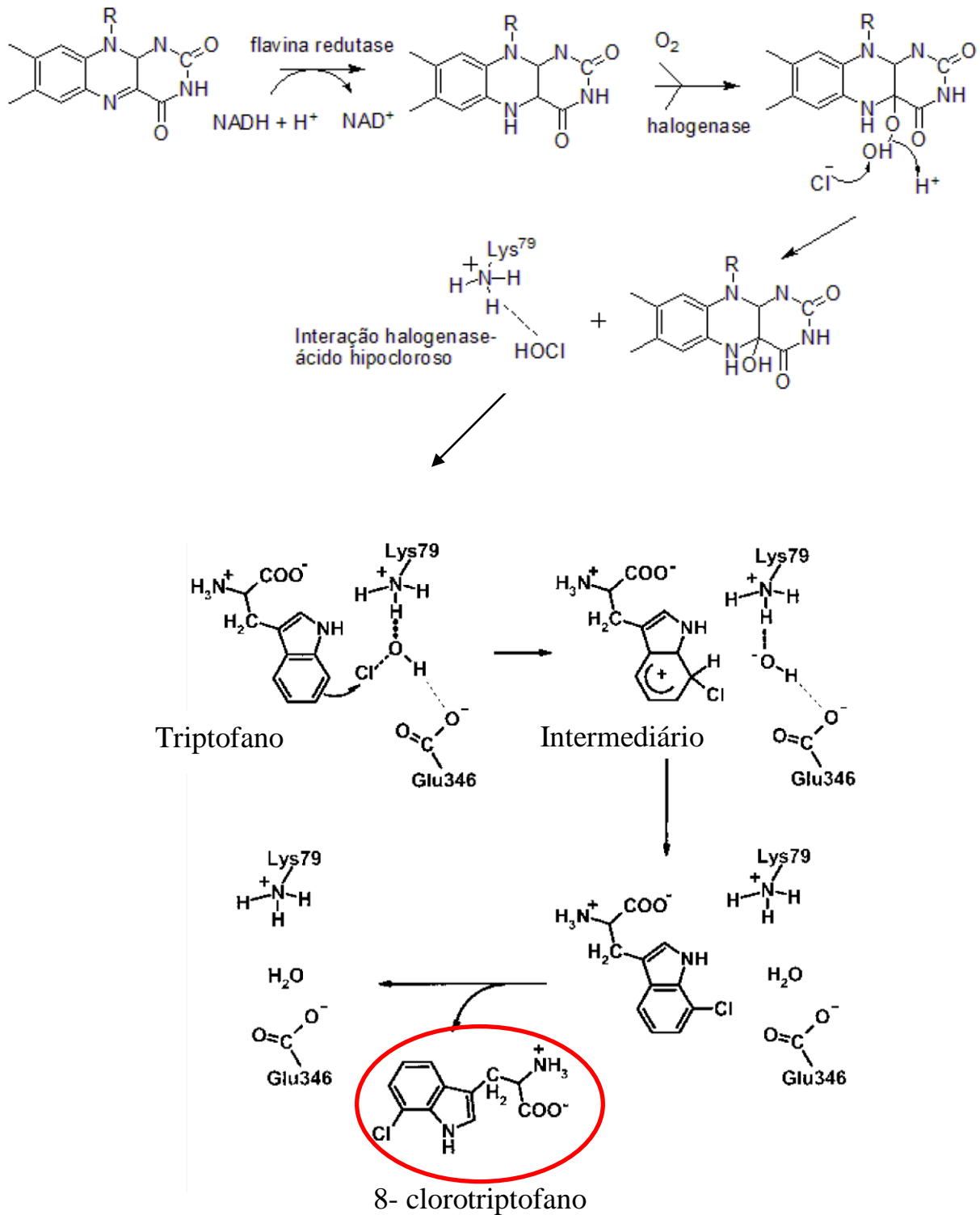


FIGURA 4.138 - Mecanismo proposto para a halogenação do triptofano. Adaptado de FLECKS et al., 2008 e CHEN & PÉE, 2008

4.3.5 – Detecção de halogenase em *T. rugulosus*

Enzimas específicas de halogenação para os sítios C-8 e C-2 respectivamente às porções derivadas do triptofano já são conhecidas e exploradas. Por exemplo, as enzimas RebH responsável por halogenações em núcleos C-8 e a CmdE em núcleos C-2, que proporcionam a biossíntese dos metabólitos secundários bacterianos rebecamicina e chondramida-D respectivamente (YEH et al., 2005; RACHID et al., 2006).

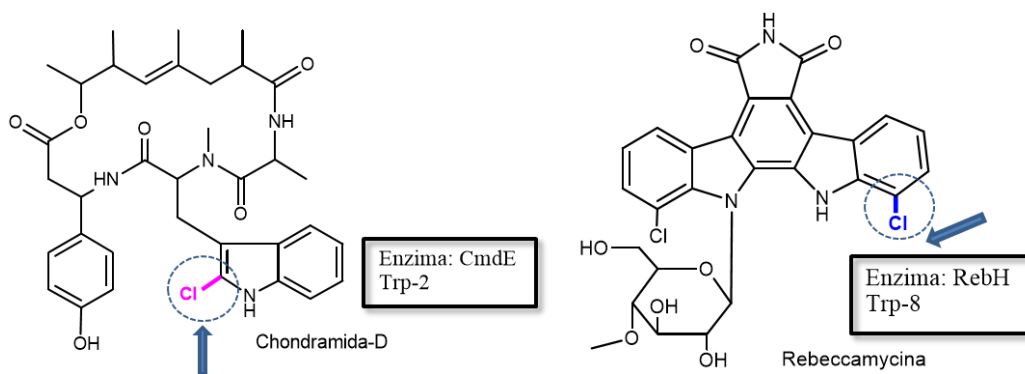


FIGURA 4.139 - Metabólitos secundários halogenados derivados do triptofano: chondramida D e rebecamicina

Tendo como inspiração tais exemplos da literatura, buscou-se a confirmação da existência de enzimas halogenases presentes no endófito de maçã *T. rugulosus* através de ensaios específicos. Para tanto, foi estabelecida uma parceria com o aluno de doutorado do grupo LabioMMi, José Vinícius da Silva, juntamente ao grupo de pesquisa do doutor Karl-Heinz van Pée, da Universidade Técnica de Dresden-Alemanha, especialista em estudos de halogenases de micro-organismos. Os resultados obtidos serão detalhados a seguir.

Comparações de dados publicados sobre sequências de amino ácidos de halogenases produzidas por organismos eucarióticos permitiram a identificação de quatro regiões conservadas e adequadas para a construção de quatro primers degenerados de PCR. Usando tais primers em quatro combinações com o DNA genômico de *T. rugulosus* como template, um fragmento de aproximadamente 1.134 kbp pôde ser amplificado em uma combinação de primers J5 e J7 (seção 3.11). O sequenciamento e análise do produto de PCR de 1.1 kbp mostrou identidade entre 35

à 45% às halogenases descritas na literatura (base de dados NCBI) provenientes de organismos eucarióticos (FIGURA 4.140).

<input type="checkbox"/> conserved hypothetical protein [Aspergillus flavus NRRL3357]	244	244	78%	2e-71	45%	XP_002379998.1
<input type="checkbox"/> radH flavin-dependent halogenase [Aspergillus oryzae RIB40]	243	243	78%	3e-71	44%	XP_001818590.1
<input type="checkbox"/> radH flavin-dependent halogenase [Aspergillus oryzae RIB40]	239	239	85%	6e-70	42%	XP_001822295.2
<input type="checkbox"/> Aromatic-ring hydroxylase-like [Penicillium roqueforti FM164]	237	237	84%	5e-69	41%	CDM28722.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein V498_08440 [Pseudoqymnoascus pannorum VKM F-4517 (FW-2822)]	235	235	85%	5e-68	42%	KFY82826.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein V492_04596 [Pseudoqymnoascus pannorum VKM F-4246]	235	235	84%	1e-67	42%	KFY11174.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein V494_02020 [Pseudoqymnoascus pannorum VKM F-4513 (FW-928)]	234	234	85%	2e-67	42%	KFY43371.1
<input type="checkbox"/> putative flavin-dependent halogenase/O-methyltransferase bifunctional protein [Chaetomium chiversii]	239	239	85%	3e-67	43%	ACM42411.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein TRV_06074 [Trichophyton verrucosum HKI 0517]	231	231	61%	6e-67	50%	XP_003019876.1
<input type="checkbox"/> FAD/NAD-binding domain-containing protein [Fomitiporia mediterranea MF3/22]	229	229	82%	5e-66	42%	XP_007269931.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein BOTBODRAFT_137937 [Botryobasidium botryosum FD-172_SS1]	224	224	84%	2e-64	43%	KDO09292.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein CHGG_08144 [Chaetomium globosum CBS 148.51]	231	231	84%	3e-64	43%	XP_001225800.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein CHGG_09588 [Chaetomium globosum CBS 148.51]	224	224	84%	4e-64	41%	XP_001227515.1
<input type="checkbox"/> predicted protein [Trichoderma reesei QM6a]	227	227	85%	7e-63	42%	XP_006969188.1
<input type="checkbox"/> FAD/NAD-binding domain-containing protein [Fomitiporia mediterranea MF3/22]	221	221	82%	1e-62	42%	XP_007270069.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein NECHADRAFT_37333 [Nectria haematococca mpVI 77-13-4]	220	220	84%	1e-62	39%	XP_003040677.1
<input type="checkbox"/> putative RadH flavin-dependent halogenase [Colletotrichum sublineola]	219	219	85%	2e-62	40%	KDN68163.1

FIGURA 4.140 - Resultado do *blast* referente ao fragmento obtido da PCR para *T.rugulosus* na detecção de halogenases

O resultado de maior destaque foi a similaridade obtida com o alinhamento da sequência de aminoácidos do fungo referência *Aspergillus oryzae*, referente a enzima radH halogenase, como ilustra a figura a seguir:

Download ▾ GenPept Graphics

radH flavin-dependent halogenase [Aspergillus oryzae RIB40]
 Sequence ID: [ref|XP_001818590.1](#) Length: 549 Number of Matches: 1
 ▶ See 3 more title(s)

Range 1: 42 to 272 GenPept Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
243 bits(621)	3e-71	Compositional matrix adjust.	132/300(44%)	169/300(56%)	70/300(23%)	+2
Query 161		RYHIGESMLASMRHLLRIVDLDSVFDNYGFTKKVITVTQVAKGVMPFVEFVFPDINHVFRL			340	→ A
		RYHIGESML S+RH LR +DLDS FD+YG		FV F+L		→ B
Sbjct 42		RYHIGESMLPSIRHFLRFIDLDSKFDSDY-----FVNKNGAAFKL			81	→ C
Query 341		AQLSS*IQKSDRDVRLITLYLLTFTKIY*LLFQDTDFLAAGGPENYAWNVRSEADHLMFK			520	
		+ + Y TDF+AAGGP ++AWNVRSEADHLMFK				
Sbjct 82		-----NSKPEAY-----TDFIAAGGPGSHAWNVRSEADHLMFK			115	
Query 521		HAANS GAKTIDGQVQIKTIKFDVVPYKGPVALPH-EYPGRPISATWIRKEDGITGEIKFDF			697	
		HA +GA+ FDGV++ +I+FE + G P GRP+SATW+ K G G I F++				
Sbjct 116		HAGENGAQVFDGQVKNVNSIEFEQI--DGLTVDPSLSELGRPVSATWSCKATGGKGSITFEY			173	
Query 698		VVDASGRVGLLSTKYLKNRRYNQGLKNVANWGYWKGCGTYAAGTIPRANSPFEEALQG*FI			877	
		++DA+GR GL+STKY+KNRRYNQGLKNVA+WGYW G+Y GTPR P+FEA++				
Sbjct 174		LIDATGRAGLVSTKYMKNRRYNQGLKNVASWGYWSNAGSYGVGTPREGDPYFEAIE----			229	
Query 878		VHI*LKIS*AQSLITETD ESGWAWAIPL SGTISVRIWMNQQLPTDRKRNPFVPLIQDFLL			1057	
		D SGW W IPL +GTIS+ + MNQ+ T +KR +D L				
Sbjct 230		-----ESGWVWLIPL NGTISIGVVMNQEAATAKRETGATTKDLYL			272	

FIGURA 4.141 - Comparação da sequência de aminoácidos da radH com o fragmento obtido da PCR; Indicações: a) Sequência de aminoácidos referente a halogenase do organismo padrão “*Aspergillus oryzae* RIB40”; b) Resultado do *blast* do fragmento de PCR obtido no estudo mostrando a amplificação de parte do gene que codifica a halogenase; c) Sequência de aminoácidos referente ao fragmento de PCR obtido no estudo do organismo *T.rugulosus*

Apesar da porcentagem relativamente baixa da identidade obtida entre a halogenase radH e a sequência de aminoácidos obtida para *T.rugulosus*, ainda sim, este resultado imprime um considerável indício para a existência de uma halogenase contida no genoma do fungo.

Aparentemente algumas regiões da sequência do fragmento de PCR mostraram possuir íntrons (regiões do DNA que não codificam para a síntese da proteína), podendo esta ser uma das razões para o baixo índice de similaridade. Entretanto, a região **GSWAWAIPL** destacada em linha vermelha na FIGURA 4.141, é

específica para a confirmação de enzimas halogenases, sendo uma região conservada para todas as halogenases dependentes de FADH₂ (ZEHNER et al., 2005).

Outro ponto que deve ser destacado trata-se de que com este estudo preliminar, não se pode inferir que as halogenações nos sítios C-2 e C-8 decorram da atividade de uma mesma enzima, ou talvez de duas diferentes halogenases.

Contudo, os resultados descritos mostram que a halogenação dos derivados biossintéticos das rugulovasina A e B, podem potencialmente ocorrer através de um processo enzimático. Após a detecção do fragmento amplificado explicitado anteriormente, os próximos passos deste estudo serão o isolamento e o teste de atividade da enzima halogenase, visando a comprovação do processo enzimático de halogenação.

4.4 - Aplicação da abordagem OSMAC: co-cultivo entre espécies fúngicas

Vias bioquímicas de indução e regulação do metabolismo secundário microbiano são estratégias cada vez mais utilizadas para a exploração e descobrimento de novos metabólitos secundários. A prática do co-cultivo de micro-organismos, uma vertente da abordagem OSMAC, pode funcionar como uma dessas vias, na medida em que a competição entre micro-organismos pode levá-los a produzir substâncias antes não biossintetizadas no ambiente antes não perturbado.

Neste sentido, a aplicação de tal estratégia no presente trabalho, visou a descoberta de novos metabólitos secundários a partir do co-cultivo entre os fungos isolados dos frutos de maçã e goiaba em diferentes meios de cultura. Considerando-se a aleatoriedade e o aumento da probabilidade em se obter respostas positivas na execução desta proposta, também foram submetidos a experimentos de co-cultivo com as espécies isoladas dos frutos comestíveis, outras espécies fúngicas pertencentes à coleção microbiana LaBioMMi, como por exemplo, as espécies *Penicillium brasilianum*, *Penicillium digitatum*.

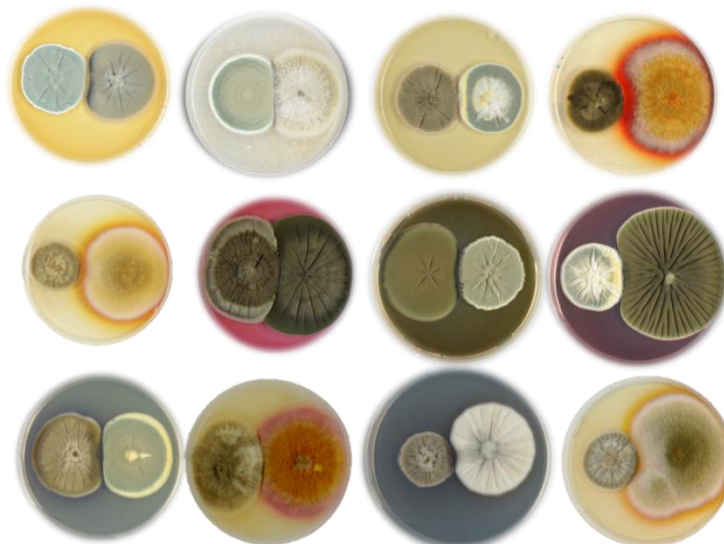


FIGURA 4.142 - Alguns co-cultivos realizados entre as espécies isoladas de maçã e goiaba em diferentes meios de cultura

Em todos os cruzamentos realizados, as amostras analisadas foram correspondentes às zonas de interface (região B e C) e de maior distanciamento entre os fungos (região A e D) como ilustrado na seção 3.9.4.1.

Com relação ao experimento com os endófitos de maçã e goiaba, embora tenha-se notado algumas diferenciações morfológicas em comparação aos respectivos controles, não foram detectados metabólitos produzidos exclusivamente pela realização do experimento durante o screening metabólico. Novamente o que observou-se, foi a intensificação da produção de alguns metabólitos perante outros, quando comparadas as intensidades relativas destes compostos nos cromatogramas de UV e *BPC* adquiridos.

Em contrapartida, estudos preliminares realizados através das técnicas hífenadas LC-MS, apontaram interessantes resultados frente a investigação dos micro-extratos do endófito de goiaba *Setophoma* sp. e *P. brasilianum* em meio de cultura PDA, como será descrito na seção seguir.

4.4.1 - Experimento de co-cultivo de *Setophoma* sp. e *P. brasilianum*

O co-cultivo das espécies *Setophoma* sp. e *P. brasilianum* teve como principal inspiração a possibilidade da indução de meroterpenos modificados. Isto porque o endófito da goiaba, como já demonstrado, é um hábil produtor de depsídeos, que apresentam o ácido orselínico como precursor. O ácido orselínico por sua vez, parece também estar relacionado à rota biossintética de meroterpenos, que são comumente produzidos por *P. brasilianum* (FILL et al., 2007).

Como mencionado anteriormente, as análises dos micro-extratos obtidos a partir da cultura mista de *Setophoma* sp. e *P. brasilianum*, bem como dos respectivos controles (crescimento de cada espécie separadamente uma da outra) foram realizados via técnica de LC-MS. Conforme descrito, a região de interface de crescimento entre os fungos foi utilizada para a obtenção dos micro-extratos de co-cultura, porém, neste caso em específico, as zonas B e C foram reunidas e extraídas de modo conjunto. Os micro-extratos controles foram obtidos através do crescimento axênico dos fungos.

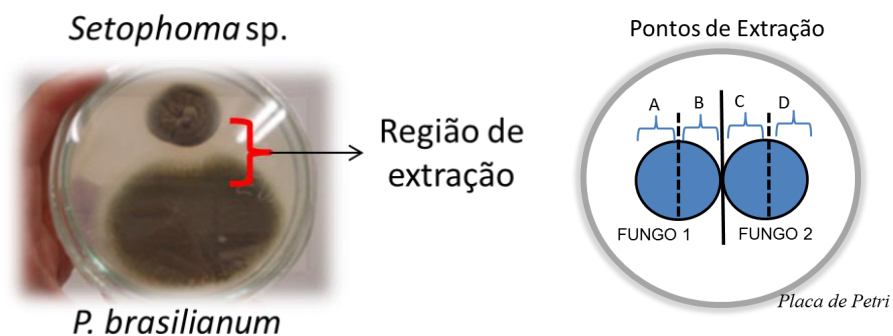


FIGURA 4.143 - Co-cultivo de *P. brasilianum* e *Setophoma* sp. Região indicada referente à micro-extração realizada

Como mostra a FIGURA 4.143, o crescimento concomitante dos fungos causou uma retração do fungo *P. brasilianum* frente ao endófito *Setophoma* sp. Em primeira instância, esta resposta foi considerada como um indicativo a uma potencial indução metabólica por parte do endófito de goiaba. Ou seja, considerou-se a hipótese de que em resposta à presença do outro micro-organismo o fungo *Setophoma* sp., pudesse estar produzindo metabólitos de ação inibitória ao crescimento de *P. brasilianum*.

A avaliação preliminar do cromatograma de *DAD* referente ao co-cultivo microbiano, evidenciou o aparecimento de duas bandas cromatográficas em cerca de 20 minutos em tempo de eluição, aparentemente inexistentes nos cromatogramas dos extratos controles para cada espécie fúngica FIGURA 4.144. Portanto, este dado corroborou para a sugestão quanto a potencialidade de indução metabólica de compostos antes não produzidos pelos micro-organismos quando em monocultura.

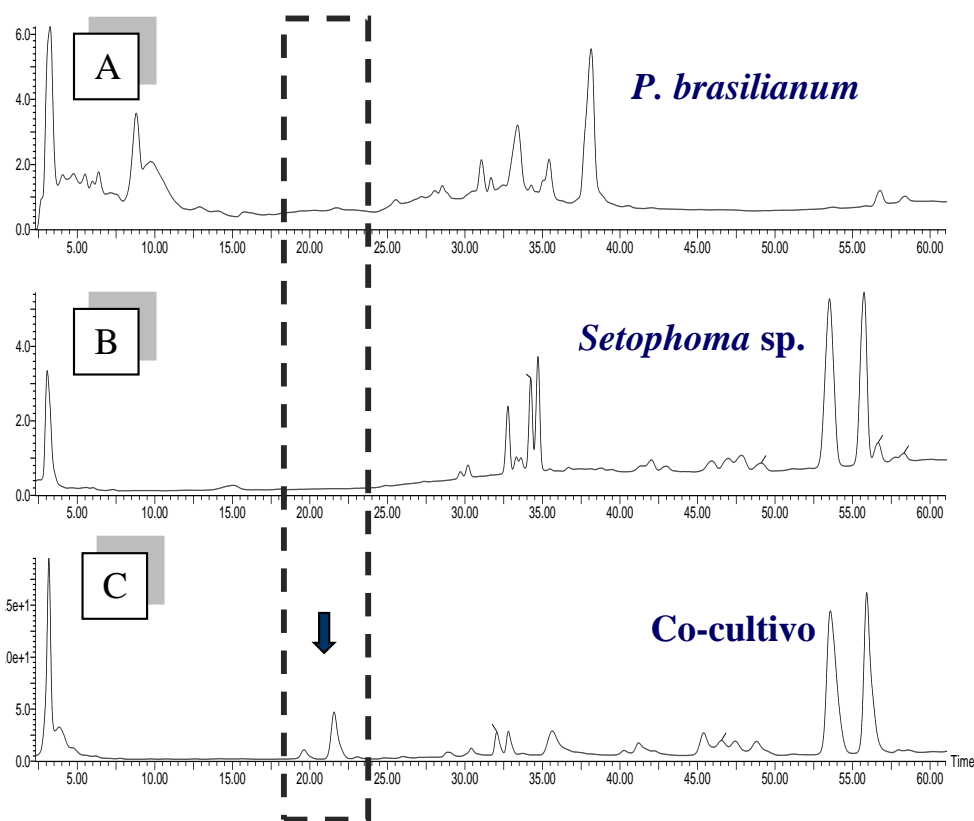


FIGURA 4.144 - Cromatogramas dos micro-extratos de a) *P. brasilianum*; b) *Setophoma sp.* e c) co-cultivo entre a duas espécies. Método E

Para a certificação deste resultado, realizou-se o experimento de *full scan* para verificação das massas relativas às bandas cromatográficas. As relações de massa nominal encontradas foram respectivamente m/z 367 e 351 para os íons pseudomoleculares no modo negativo de ionização, em 20 e 23 minutos no cromatograma avaliado.

Com o processamento do cromatograma de íons extraídos *EIC* para m/z 367 e 351, constatou-se novamente a ausência destes íons em ambos os controles fúngicos, sendo que a detecção de ambos ocorreu apenas no extrato de co-cultivo entre as espécies (FIGURA 4.145). Porém cabe aqui ressaltar que para íon m/z 351, foram notadas duas bandas cromatográficas inerentes a este valor de massa (FIGURA 4.146). Sendo assim, pôde-se inferir a possibilidade quanto à produção de possíveis isômeros pelo fungo *Setophoma sp.* com relação ao mencionado íon.

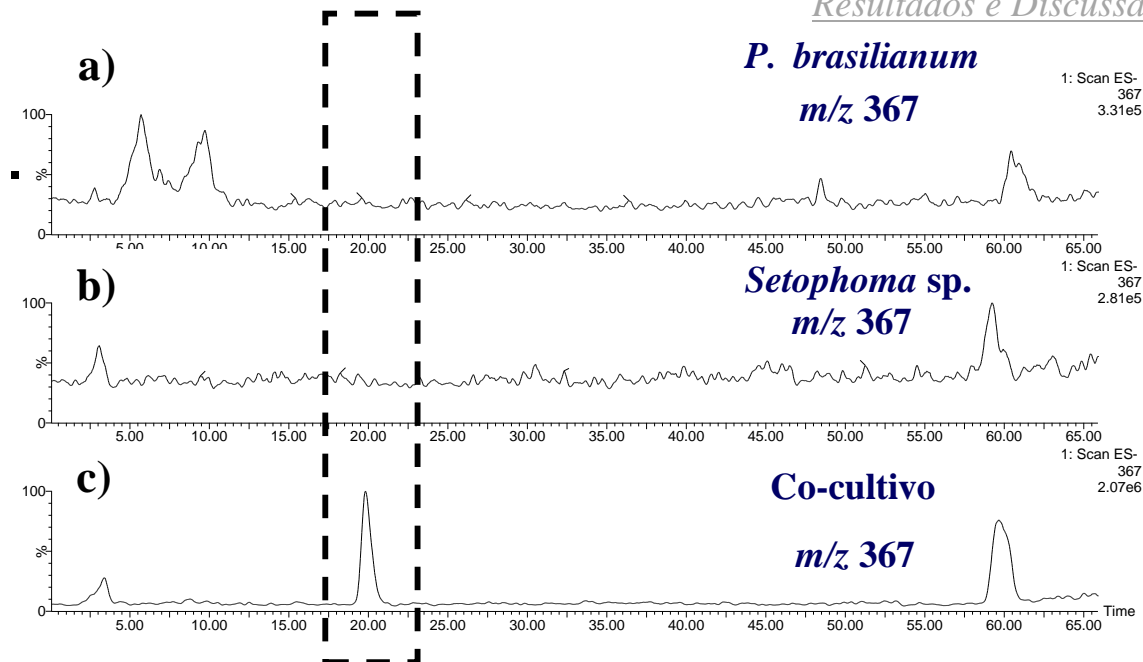


FIGURA 4.145 - Cromatogramas de ECI para m/z 367 dos micro-extratos de a) *P. brasilianum*; b) *Setophoma* sp.; c) co-cultivo entre a duas espécies. Método E

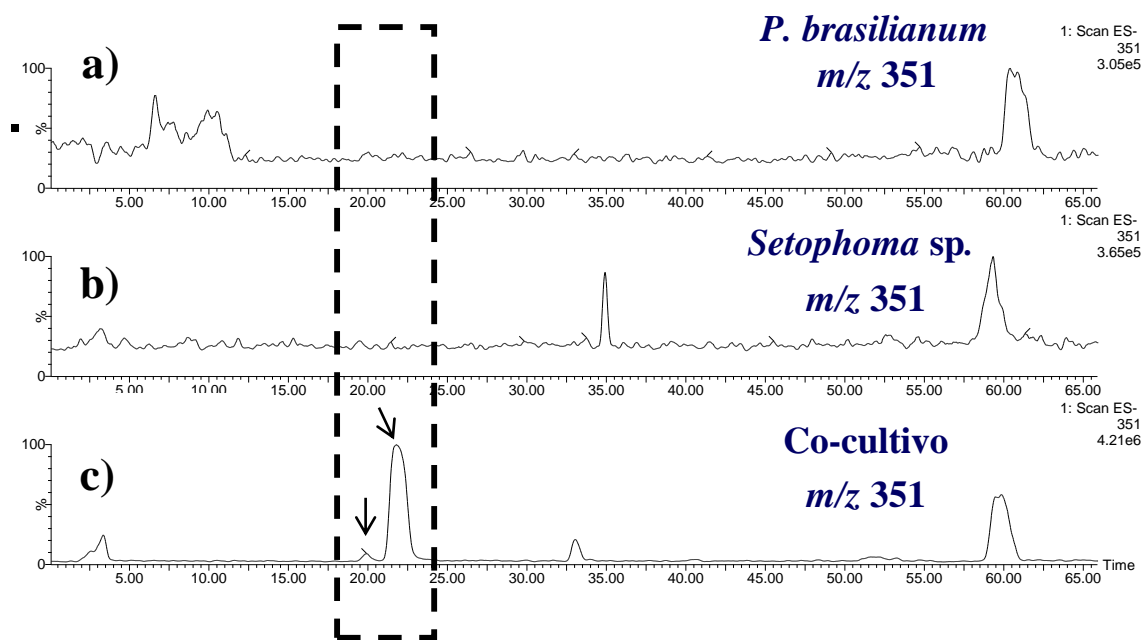


FIGURA 4.146 - Cromatogramas de ECI para m/z 351 dos micro-extratos de a) *P. brasilianum*; b) *Setophoma* sp.; c) co-cultivo entre a duas espécies. Método E

Os experimentos de íons produtos para o íon m/z 367 e m/z 351 (foi escolhido apenas o provável isômero de maior intensidade relativa), mostraram similaridade no que se refere ao perfil de fragmentação, mostrando poucos fragmentos, cuja ocorrência se dá por duas perdas consecutivas de unidades de água. O uso de

maiores energias de fragmentação, geraram espectros não factíveis à interpretação pelo excesso de ruído.

Outra similaridade entre ambos tratou-se do perfil do espectro de UV, abrangendo máximos de absorção em cerca de 260 e 350 nm. Tais informações trouxeram portanto indicativos de que tais metabólitos pertenciam a de uma mesma classe de compostos (FIGURA 4.147 e FIGURA 4.148).

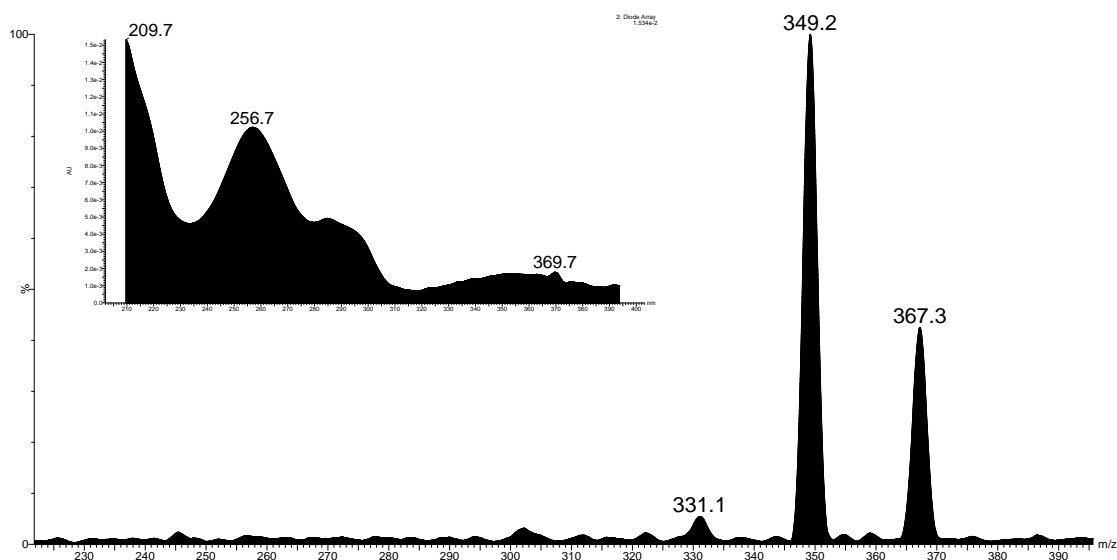


FIGURA 4.147 - Espectro de íons produto para m/z 367. Em destaque, espectro de UV do metabólito detectado, 30 eV

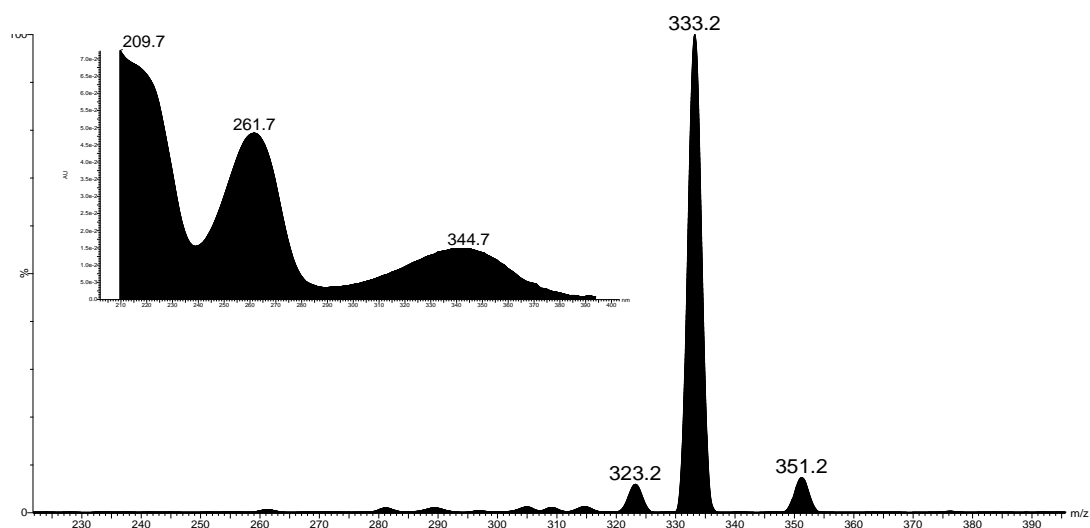


FIGURA 4.148 - Espectro de íons produto para m/z 351. Em destaque, espectro de UV do metabólito detectado, 30 eV

Objetivando-se a identificação dos metabólitos detectados, foi realizado o escalonamento do co-cultivo em questão como descrito no item 3.9.4.2 com posterior procedimento de isolamento dos compostos alvo. No entanto, apenas um dos metabólitos de massa nominal m/z 351 foi completamente purificado para determinação estrutural.

A identificação do composto isolado foi realizada através de experimentos de RMN em 1D e 2D. Como pode ser visualizado na FIGURA 4.149, o espectro de RMN de ^1H traz o aparecimento de dois dubletos na região típica de núcleos aromáticos. Um multiplete na região de δ_{H} 4,75, relacionado a prováveis núcleos ligados a carbono carbinólico, um dubleto alargado integrando para um próton em cerca de δ_{H} 3,69 e dois duplos dubletos em δ_{H} 3,04 e δ_{H} 3,08, com integração de para um próton cada um, também foram detectados. No espectro de RMN ^1H realizado em CDCl_3 , houve o aparecimento de sinal típico de hioxila em ligação de hidrogênio em δ_{H} 11,97 (FIGURA 4.150).

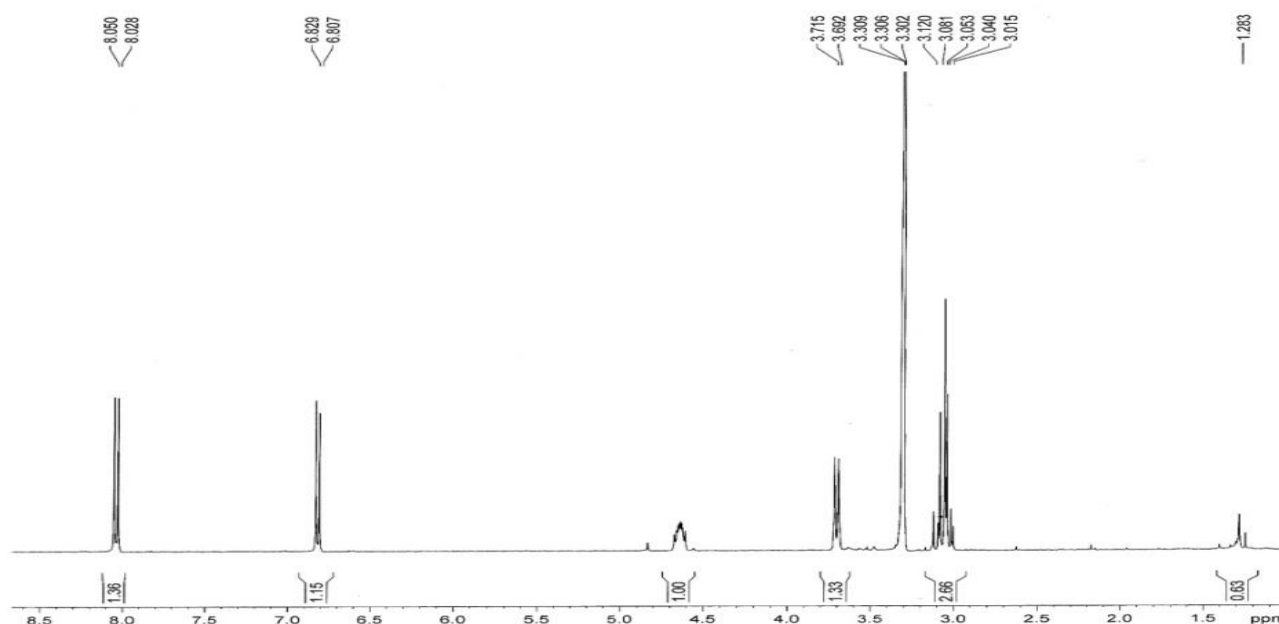


FIGURA 4.149 - Espectro de RMN de ^1H do metabólito isolado a partir do co-cultivo de *Setophoma* sp. e *P.brasilianum* (CD_3OD , 400MHz)

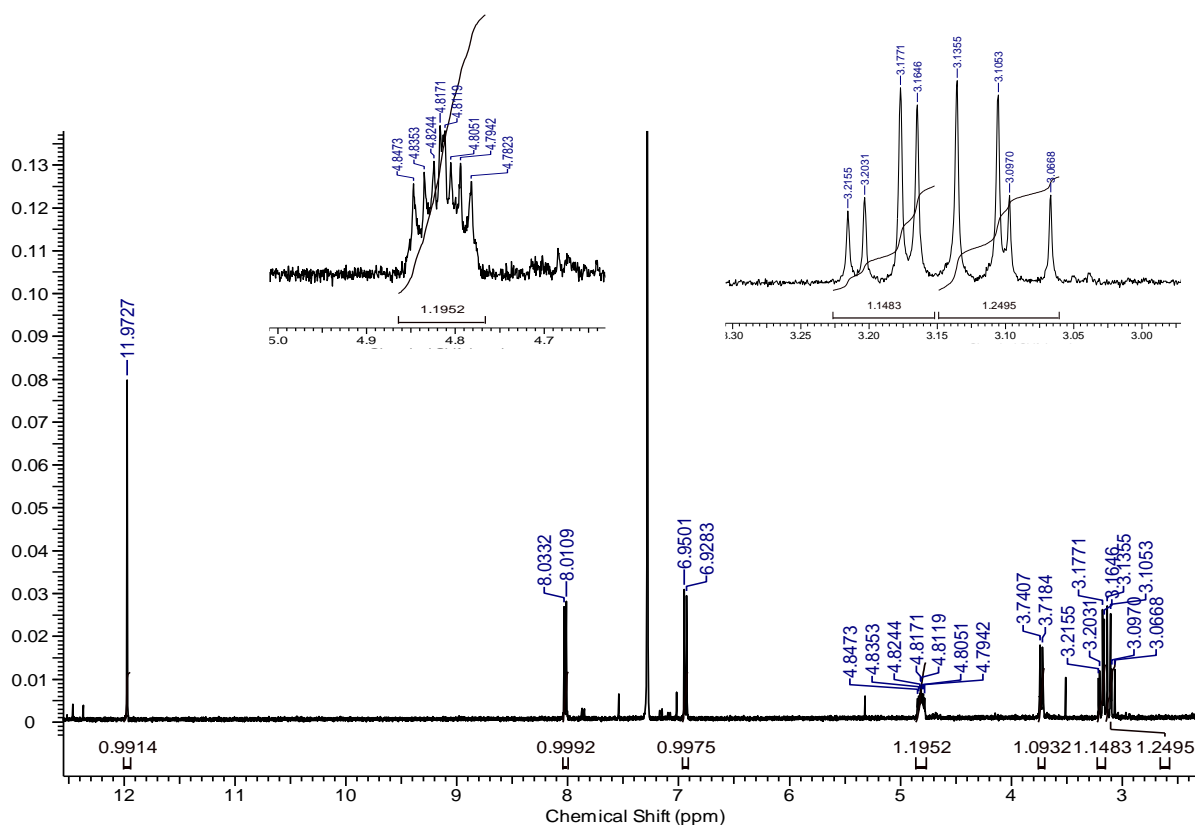


FIGURA 4.150 - Espectro de RMN de ^1H e ampliações das regiões de interesse, do metabólito isolado a partir do co-cultivo de *Setophoma* sp. e *P.brasilianum* (CDCl_3 , 400MHz)

Através de tais informações, foram contabilizados apenas seis núcleos de hidrogênio para a molécula. Relacionando-se com sua massa molecular obtida através dos experimentos de MS, ou seja, 352 Da, inferiu-se a propável caracterização de uma molécula extremamente simétrica. Corroborando com tal inferência, o espectro de RMN de ^{13}C mostrou o aparecimento de apenas dez núcleos de carbono (FIGURA 4.151).

Pelos sinais característicos, atribuiu-se um sinal de carbono carbonílico em δ_c 204,3, bem como 6 carbonos em região típica de carbonos de hibridização sp^2 , entre δ_c 116,0 e δ_c 144,0, destacando-se o núcleo de δ_c 161,3, característico de núcleo ligado a hidroxila fenólica.

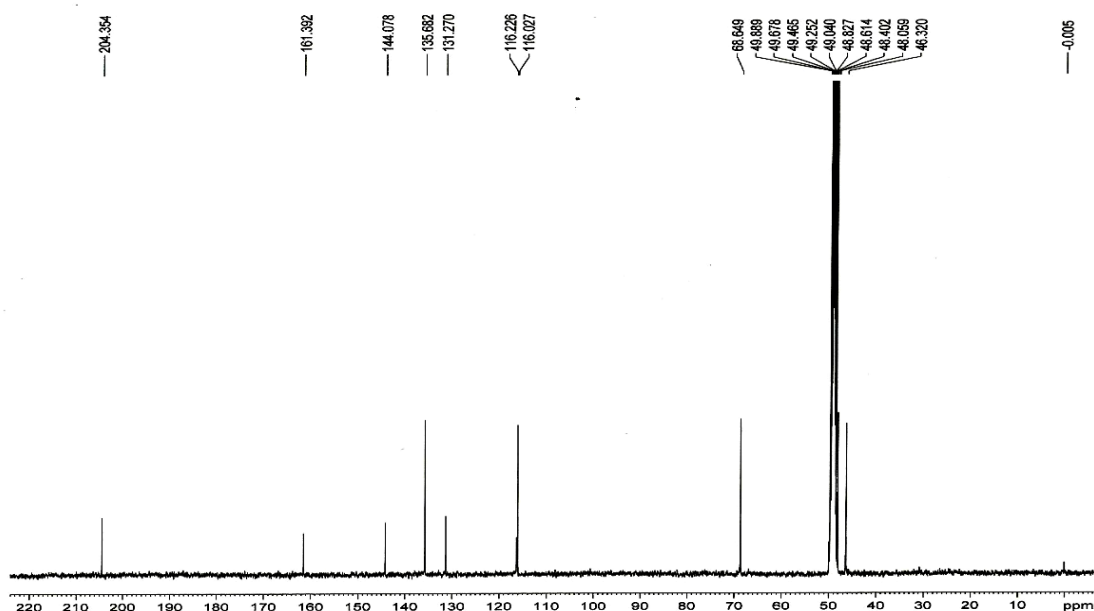


FIGURA 4.151 - Espectro de RMN de ^{13}C do metabólito isolado a partir do co-cultivo de *Setophoma* sp. e *P.brasilianum* (CD_3OD , 400MHz)

A existência de um carbono carbinólico em δ_{C} 68,8 e de carbonos de hibridização sp^3 também foi encontrada pela análise do espectro de acordo com os deslocamentos visualizados em δ_{C} 46,0 e δ_{C} 48,0. O experimento de DEPT 135° sinalizou a existência de apenas uma unidade metilênica na estrutura molecular, de acordo com o espectro exibido na FIGURA 4.152.

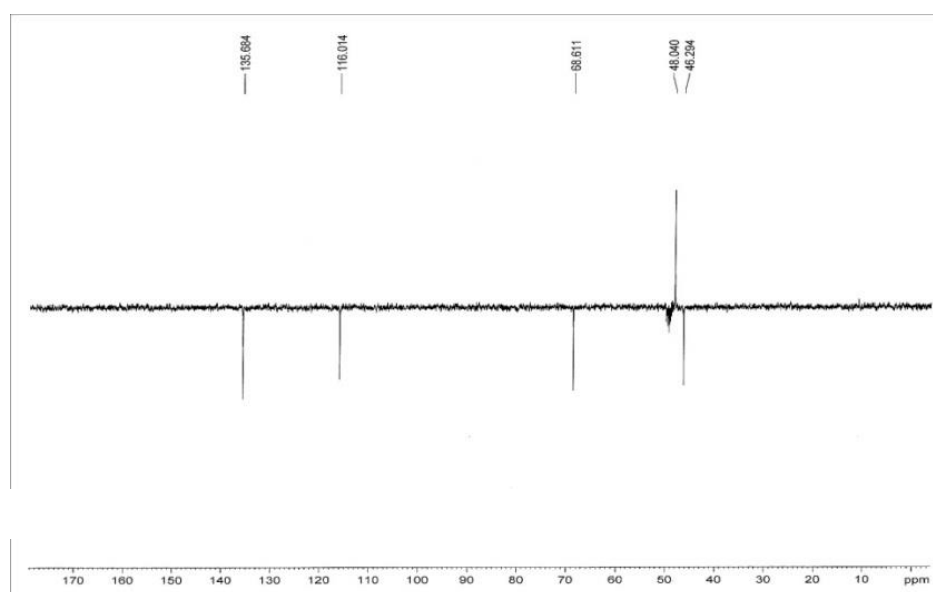


FIGURA 4.152 - Espectro de DEPT referente à perillenequinona isolada

Os sinais observados no espectro de COSY (FIGURA 4.153) retrataram o acoplamento entre os núcleos aromáticos δ_H 6,06 e δ_H 8,03, e entre o próton oximetínico em δ_H 4,79 com δ_H 3,69, e metilênicos em 3,04/3,08.

Com tais informações espectroscópicas inferiu-se que parte da estrutura apresentava um anel aromático fundido a pelo menos mais dois anéis saturados. O experimento de HMBC mostrou correlações à longa distância do núcleo H-6 em δ_H 8.03 com os carbonos C(4), C(5) e C(12b), do núcleo H-5 em δ_H 6,06 com os carbonos C(4), C(3a) e C(3a), assim como dos hidrogênios H-2a/2b em δ 3,08/3,04 aos carbonos C(1), C(3) e C(3a). Por fim, detectou-se também a correlação entre o núcleo H-12b em δ_H 3.69 com os carbonos C(1), C(6a) e C(12c). Todas as correlações observadas nos mapas de contorno do experimento de HMBC são exibidas na FIGURA 4.154.

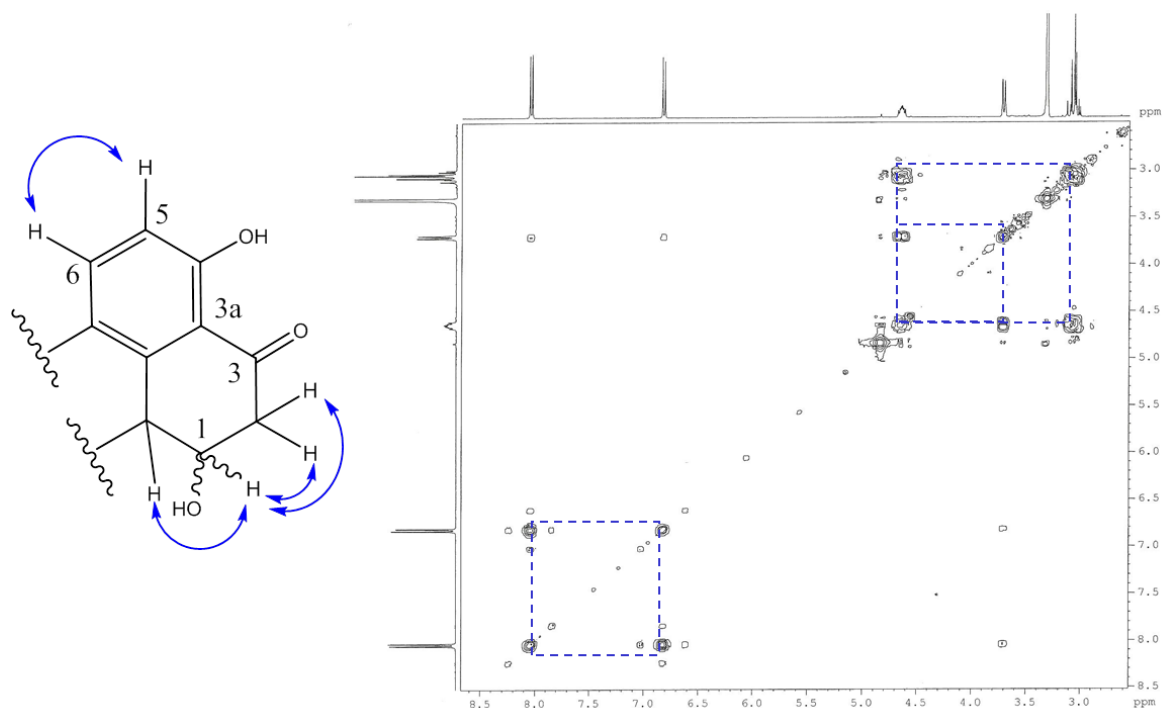


FIGURA 4.153 - Espectro de COSY da substância isolada (CD₃OD, 400 MHz) e correlações observadas entre os núcleos de hidrogênio

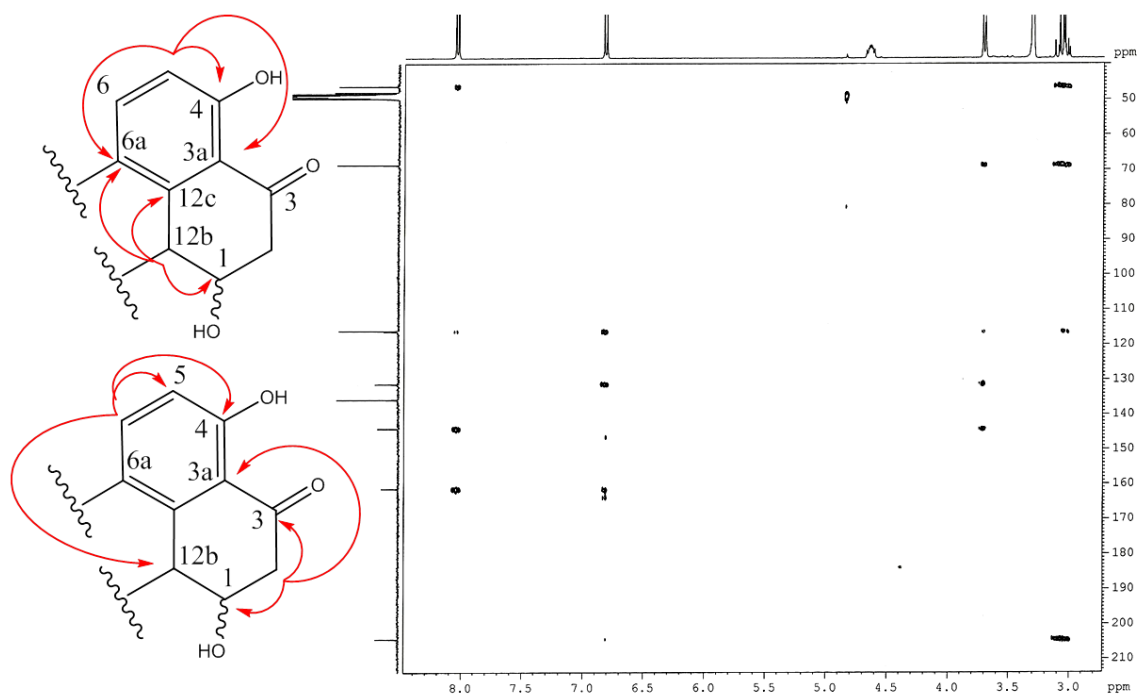


FIGURA 4.154 - Espectro de HMBC da substância isolada (CD_3OD , 400 MHz) e correlações a longa distância observadas entre os núcleos de hidrogênio e carbono

Tendo em vista o pouco número de sinais de RMN de ^1H e ^{13}C nos respectivos espectros e o valor de massa molecular do metabólito isolado, ou seja, 352 Da, novamente acreditou-se tratar de uma estrutura extremamente simétrica. Na verdade, os sinais visualizados nos espectros de RMN de 1D e 2D, estariam representando cada um, o dobro do número de núcleos de hidrogênio e carbono.

De acordo com a simetria encontrada, as correlações a longa distância dos núcleos constituintes da outra porção da molécula, são as mesmas quando comparadas à primeira parte (FIGURA 4.154) Isto porque, sendo a disposição dos núcleos idêntica, torna-se o ambiente químico em torno dos núcleos também idênticos. Contudo, a atribuição dos sinais detalhados anteriormente, levou à identificação da estrutura de uma perilenequinona conhecida, o estenfiperilenol. Os sinais detectados apresentaram-se de acordo com os sinais descritos na literatura (ARNONE et al., 1986) para a substância em questão como mostra a TABELA 4.14.

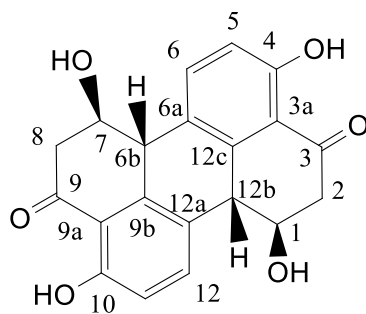
Anteriormente, na seção descritiva a respeito do *screening* metabólico do fungo *Setophoma* sp., tal perilenequinona havia sido referenciada do processo de derreplicação. Através do isolamento e caracterização deste metabólito, confirmou-se portanto a sugestão gerada pelo processo investigativo anterior.

TABELA 4.14 - Dados de RMN de ^1H e HMBC para o estenfiperilenol isolado e dados de RMN de ^1H para estenfiperilenol relatado na literatura

Posição	Estenfiperilenol Isolado			Estenfiperilenol literatura (ARNONE et al., 1986)	
	$\delta(\text{C})^{\text{a}}$	$\delta(\text{H})^{\text{a}}$; (mult, n^{H}); J (Hz)	HMBC ^a	$\delta(\text{C})^{\text{a}}$	$\delta(\text{H})^{\text{a}}$; (mult, n^{H}); J (Hz)
1	68,6	4,79(m, 1H)	-	68,3	4,76 (m)
2a	48,0	3,04 (dd,1H); 12,08/12,08	C(1), C(3), C(3a)	47,8	3,07 (dd)
2b		3,08 (dd, 1H); 4,9/4,9			3,17 (dd)
3	204,3	-	-	204,0	-
3a	116,1	-	-	115,9	-
4	161,3	-	-	161,0	-
5	115,9	6,06 (d,1H)	C(4), C(3a), C(6a)	115,5	6,81 (d)
6	135,6	8,03 (d,1H)	C(4), C(5), C(12b)	135,6	8,14 (d)
6a	131,2	-	-	130,9	
6b	46,0	3,69 (d _l , 1H); 8,8	C(7), C(9b), C(12a)	46,0	3,75 (d)
7	68,6	4,79 (m, 1H)	-	68,3	4,76 (m)
8a	48,0	3,04 (dd,1H); 12,08/12,08	C(7), C(9), C(9a)	47,8	3,07 (dd)
8b		3,08 (dd, 1H); 4,9/4,9	-		3,17 (dd)
9	204,3	-	-	204,0	-
9a	116,1	-	-	115,9	-
9b	144,0	-	-	143,7	-
11	115,9	6,06(d,1H)	C(10), C(9a), C(12a)	115,5	6,81 (d)
12	135,6	8,03(d,1H)	C(10), C(11), C(6b)	135,6	8,14 (d)
12a	131,2	-	-	130,9	
12b	46,0	3,69 (d _l , 1H); 8,8	C(1), C(12c), C(6a)	46,0	3,75
12c	144,0	-	-	143,7	4,76
HO-C(4) ^b	161,3	11,97(s)	-	161,0	12,09
HO-C(10) ^b	161,3	11,97(s)	-	161,0	12,09

^a)CD₃OD, ^b)CDCl₃

δ = deslocamento químico; mult.=multiplicidade; n^{H} = número de núcleos; J = constante de acoplamento; m=multipleteo, d=dubleteo;d_l=dubleteo largo; dd= duplo dubleteo



Estenfiperilenol

FIGURA 4.155 - Estrutura da perilenequinona isolada a partir do co-cultivo entre os fungos *Setophoma* sp. e *P.brasilianum*

Neste ponto cabe ressaltar um caso de contrariedade nos resultados apresentados: a perilenequinona em questão havia sido detectada no processo de derreplicação de metabólitos produzidos por *Setophoma* sp. em monocultura, porém nos controles deste fungo (igualmente em monocultura) no experimento de co-cultivo com *P. brasilianum*, não houve a detecção deste composto.

A explicação para este resultado deve-se provavelmente ao fato de que todo o processo descrito anteriormente para a avaliação do co-cultivo entre *Setophoma* sp. e *P. brasilianum* foi realizado através da técnica de espectrometria de massas de baixa resolução (MS), no analisador do tipo triplo quadrupolo. Entretanto, as análises de screening metabólico foram realizadas em instrumento de analisador de massas de alta resolução, do tipo Q-TOF. Além da alta resolução e exatidão nas análises dos analitos alvo, oferece considerável sensibilidade ao processo investigativo.

Para a constatação de que a não detecção do estenfiperilenol no experimento de co-cultivo tratava-se de um problema de sensibilidade, as triplicatas do experimento foram re-analisados em equipamento de alta resolução, agora no analisador tipo Orbitrap.

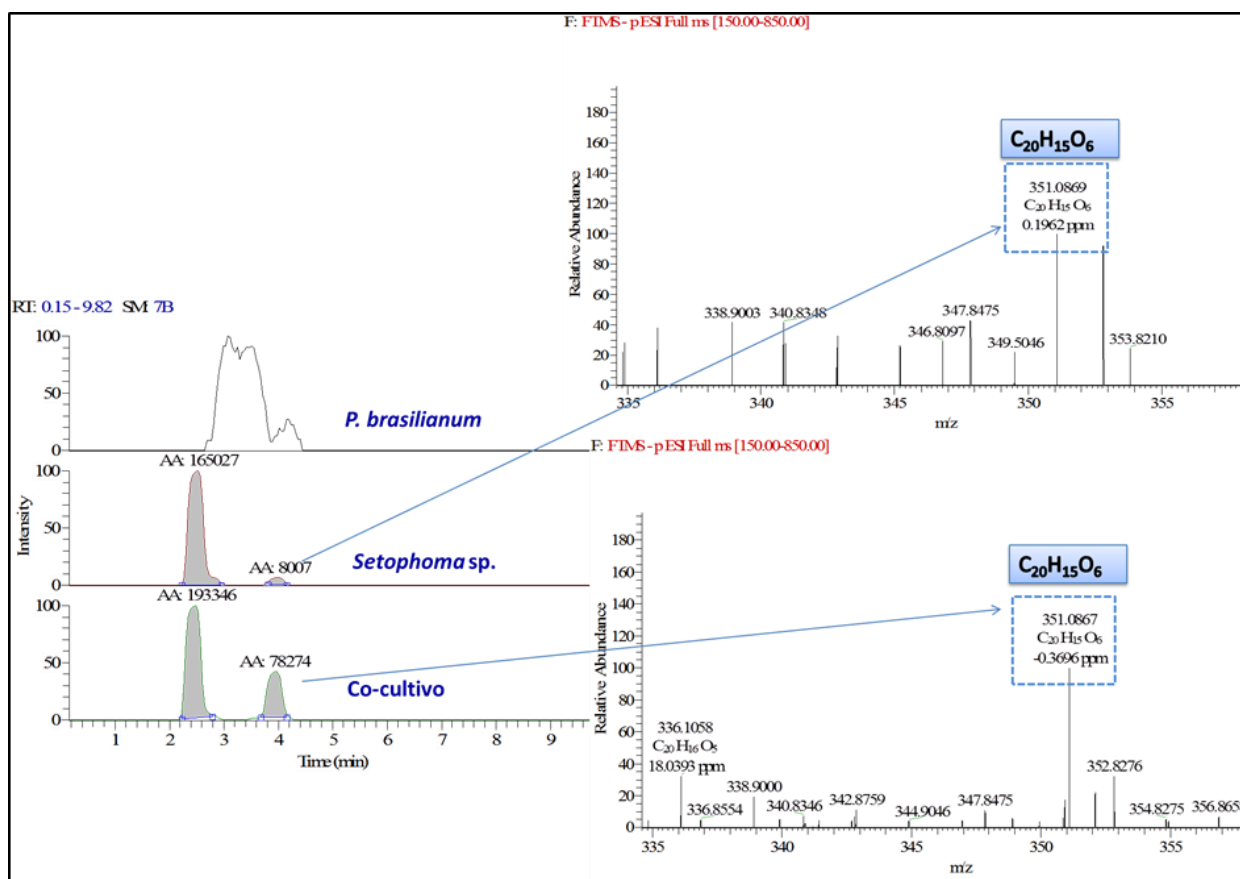


FIGURA 4.156 - Cromatogramas de *EIC* para m/z 351,0870 referentes ao experimento de co-cultivo investigados através de dados de HRMS. Em destaque espectros de *full scan* das bandas cromatográficas indicadas. Método B

De fato, através do processamento do espectro de *EIC* para a massa monoisotópica exata do estenfiperilenol, no modo negativo de ionização ($C_{20}H_{15}O_6 = [M-H]^- = 351.0868$ Da), foi possível verificar a detecção do metabólito tanto no cromatograma referente ao experimento de co-cultivo, quanto no extrato de *Setophoma sp.* (FIGURA 4.156).

Contudo, tal observação não inviabilizou os resultados obtidos anteriormente. Isto porque, mesmo que detectado no extrato controle do micro-organismo, se bem observado, o estenfiperilenol apresentou um aparente aumento no que se refere à intensidade da banda cromatográfica correspondente. Se comparados, o controle do fungo ao extrato de co-cultivo, é possível observar o aumento relativamente maior da intensidade deste metabólito em 4 min em relação ao potencial isômero em 2,5 min quando há a cultura mista (FIGURA 4.157). Em outras palavras, os dados obtidos indicaram a afirmativa para um aumento na

produção das perilenequinonas produzidas pelo fungo, em especial o isômero de maior retenção cromatográfica.

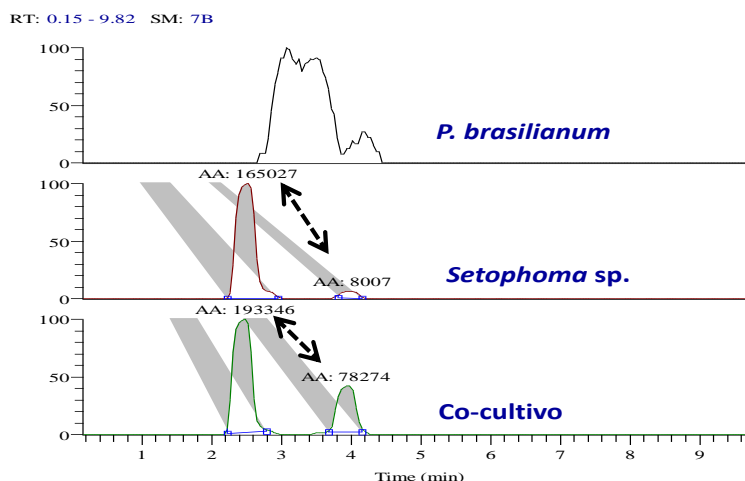


FIGURA 4.157 - Cromatogramas de ECI para o íon de m/z 351,0868 referentes aos extratos indicados. Destaque para a proporção entre as intensidades das bandas dos potenciais isômeros. Método B

Neste ponto cabe mencionar que para a identificação de qual banda era inerente ao estenfiperilenol, uma análise nas mesmas condições instrumentais foi realizada com o extrato controle de *Setophoma* sp. e a molécula isolada. O processamento do cromatograma de ECI do íon m/z 351,0870 confirmou que o metabólito cuja produção parecia ser intensificada ao se realizar o co-cultivo tratava-se exatamente do composto isolado, ou seja, o estenfiperilenol (FIGURA 4.158).

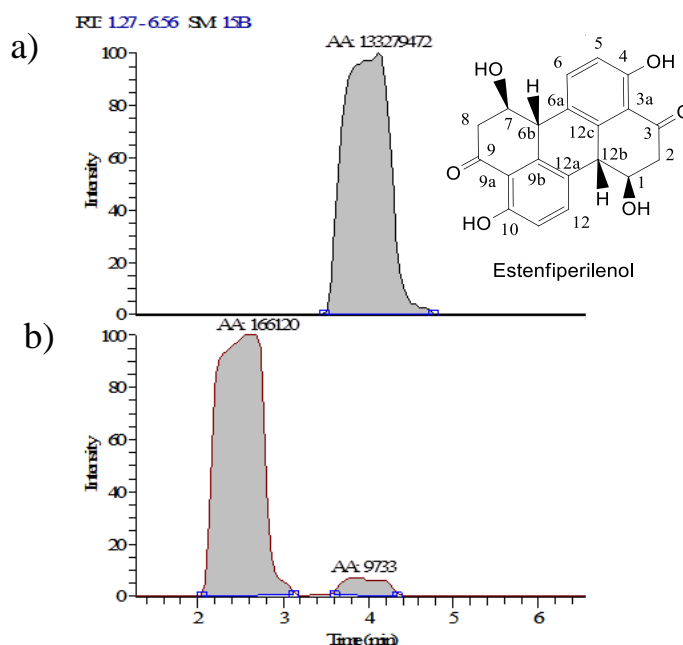


FIGURA 4.158 - Comparação entre o cromatograma de ECI para m/z 351 de: a) metabólito isolado (estenfiperilenol) b) Micro-extrato controle de *Setophoma* sp., Método B

Para a confirmação da hipótese quanto ao aumento da produção da perilenequinona, um experimento de caráter mais quantitativo foi proposto para a verificação da indução da biossíntese do estenfiperilenol quando a cultura mista é praticada. Neste experimento, além do fungo *P. brasilianum*, o patógeno *P. digitatum* isolado de laranja e o endófito de maçã, *T. rugulosus* também foram utilizados durante a investigação.

Como descrito na seção de procedimentos experimentais, os co-cultivos e seus respectivos controles foram realizados em meio de cultura PDA e MEA, e as extrações foram realizadas utilizando-se a totalidade do conteúdo das placas de Petri (item 3.9.4.2).

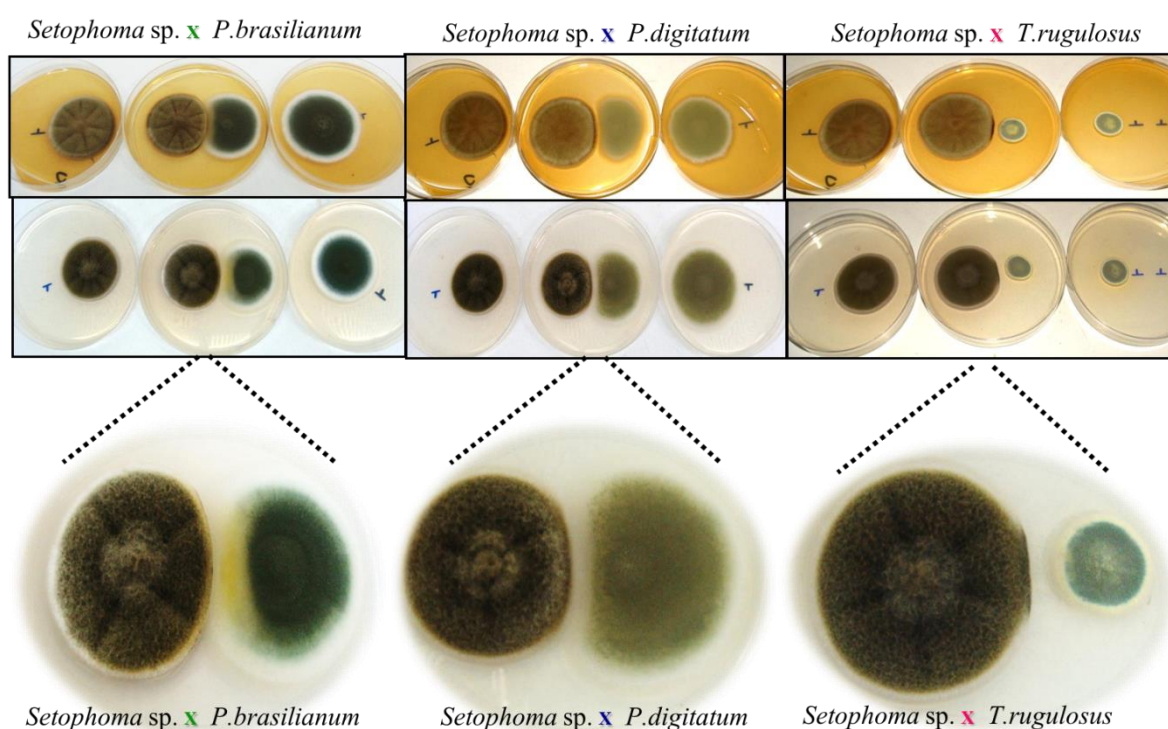


FIGURA 4.159 - Co-cultivos entre o fungo *Setophoma* sp. e as espécies indicadas em meios MEA e PDA respectivamente. Em destaque, ampliação dos cultivos em meio PDA

Foi interessante notar uma diminuição na esporulação dos fungos do gênero *Penicillium* na zona de contato com o fungo *Setophoma* sp. (FIGURA 4.159), evidenciando mais uma vez, uma possível ação inibitória do endófito de goiaba frente aos fungos *Penicillium*.

Já para o endófito de maçã *T. rugulosus*, não há aparente retração ou diminuição de esporulação na zona de interface com *Setophoma* sp. (*T. rugulosus* usualmente apresenta menor taxa de crescimento em relação a outros fungos, sendo

assim seu menor halo de crescimento foi considerado normal, em concordância ao respectivo controle).

Com inspiração neste resultado preliminar, anteriormente às análises dos extratos mencionados (análise semi-quantitativa da indução de estenfiperilenol), foi executada a contagem de esporos nas regiões de crescimento C e D dos fungos *Penicillium*, conforme o procedimento detalhado no item 3.9.4.1. Com isto, visou-se a confirmação da diminuição da esporulação fúngica pela interação destas espécies com o endófito *Setophoma* sp.

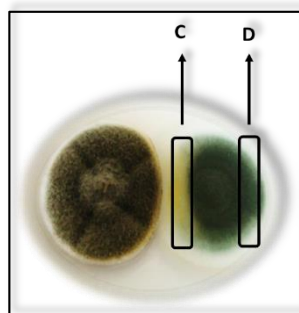


FIGURA 4.160 - Indicação das regiões de medição de esporulação dos fungos do gênero *Penicillium* quando em co-cultivo com *Setophoma* sp. em meio PDA

Os resultados exibidos na TABELA 4.15 para a contagem realizada, ilustram que de fato, as unidades germinativas das espécies de *Penicillium* diminuíram na zona de contato com o endófito de goiaba, tendo em vista as médias obtidas para o número de esporos produzidos na região C e D.

Para o fungo *P. brasilianum*, a esporulação é cerca de 11 vezes menor no lado de interação direta com *Setophoma* sp. (1.4×10^7 unidades) em detrimento à região oposta de crescimento (16.5×10^7 unidades unidades). Já para o patógeno de laranja, *P. digitatum*, esta proporção é menos evidente, porém, ainda sim, confirma-se uma diminuição de unidades germinativas de cerca de 2.4 vezes em relação ao crescimento fúngico na zona D.

TABELA 4.15 - Contagem do número de esporos nas regiões de crescimento C e D (FIGURA 4.160) das espécies de *Penicillium* indicadas, após 7 dias de co-cultivo com o fungo *Setophoma* sp., em meio PDA

Replicata	CONTAGEM DE ESPOROS (10 ⁷ unidades)			
	<i>P.brasilianum</i> Região C	<i>P.brasilianum</i> Região D	<i>P.digitatum</i> Região C	<i>P.digitatum</i> Região D
1	1,8	17,6	2,1	6,7
2	1,3	16,6	2,4	8,0
3	1,6	15,1	2,6	7,7
4	1,2	15,9	4,3	7,2
5	1,1	15,3	3,1	6,7
6	1,4	18,3	3,8	7,7
Média	1,4	16,5	3,0	7,3
Desvio Padrão	0,26	1,28	0,85	0,55

Ainda no decorrer da investigação, um segundo experimento foi executado para a verificação da possibilidade de voláteis produzidos por *Setophoma* sp., serem responsáveis pelo efeito inibitório aparente dos demais fungos, e não metabólitos difundidos através do meio sólido.

Para tanto, a região do meio de cultura intermediária ao crescimento dos micro-organismos foi destacada desde o dia de inoculação dos mesmos. Através das imagens exibidas na FIGURA 4.161, não são observadas diferenças no crescimento dos micro-organismos quando em cultura mista em comparação aos respectivos controles, indicando que de fato, a retração quanto ao crescimento em co-cultivo dos fungos do gênero *Penicillium* não se tratava da ação de voláteis, mas sim de compostos potencialmente produzidos no meio por *Setophoma* sp.

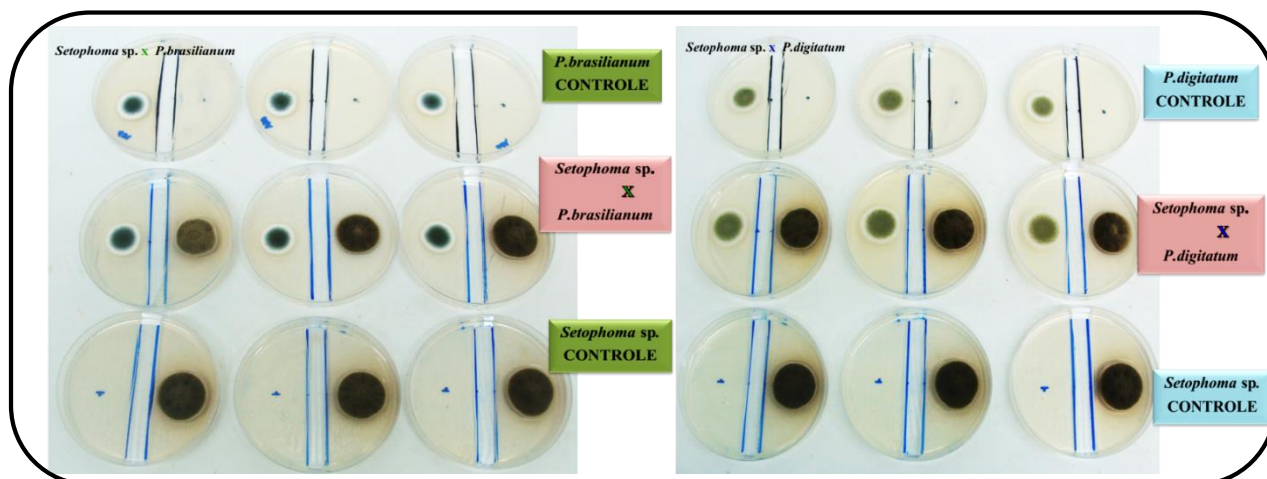


FIGURA 4.161 - Experimentos para a verificação da inibição das espécies de *Penicillium* indicadas por voláteis possivelmente produzidos por *Setophoma* sp., em meio PDA

Finalmente, com embasamento nos resultados mencionados anteriormente, o experimento envolvendo a estimativa quanto a intensidade relativa de produção de metabólitos alvo (perilenequinonas) foi analisado. Devido a similaridade nas respostas adquiridas para as co-culturas em meio MEA e PDA, os resultados com o experimento em meio PDA será representativo para os dois casos.

Novamente, foi executado como parâmetro comparativo as áreas das bandas de *ECl* para a massa exata m/z 351,0870 referente ao estenfiperilenol (AA= integração de área automática). Os valores médios de integração das áreas são indicados na própria figura (FIGURA 4.162).

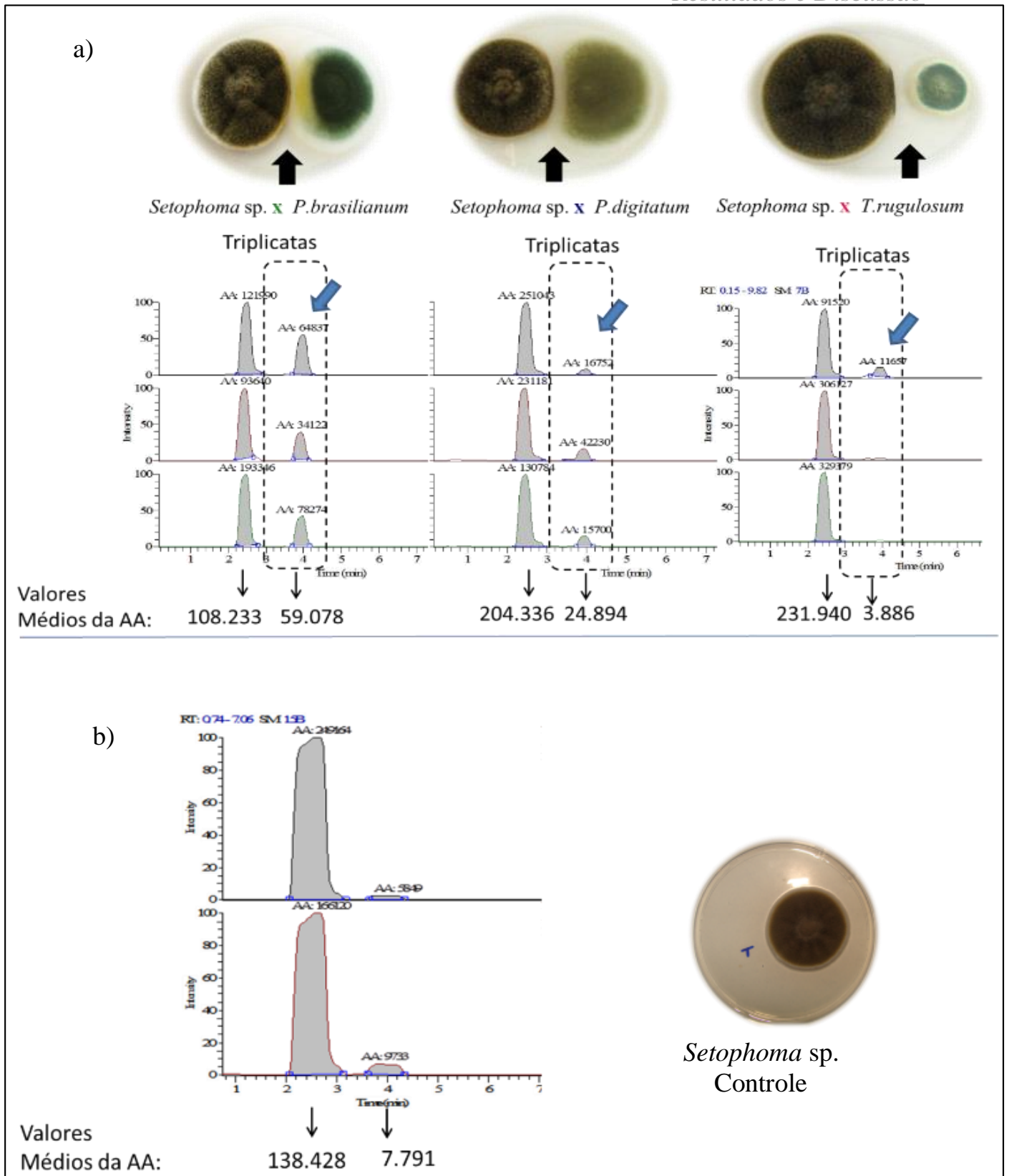


FIGURA 4.162 - a) Cromatogramas de *ECl* de m/z 351,0867 para as triplicatas do co-cultivos indicados; b) Cromatogramas de *ECl* de m/z 351,0867 para as replicatas do controle de *Setophoma* sp. Em destaque os valores médios das integrações das áreas das bandas detectadas. Método B

Pelos resultados dos cromatogramas de *ECl*, nota-se um significativo aumento das áreas relativas ao metabólito eluído em 4 minutos. Isto porque o experimento com *P. brasilianum* apresentou uma produção média do metabólito em questão em cerca de sete vezes mais intensa (AA = 59.078) em relação ao controle (AA = 7.791) (FIGURA 4.162). Já para *P. digitatum*, a área do íon correspondente resultou em um aumento de aproximadamente 3 vezes (AA = 24.894) em relação à área do experimento controle. Já para *T. rugulosus*, em correspondência à aparente insensibilidade à co-cultura, não se observou o aumento relativo do metabólito em questão.

Através dos mesmos dados, observou-se que o outro metabólito de massa nominal 351 (2,5 min), também apresentou um aparente aumento em sua produção no experimento com *P. digitatum*, porém bem menos intensificado.

Em resumo, com os resultados apresentados foi pertinente portanto inferir que, a perilenequinona altamente simétrica em termos estruturais, o estenfiperilenol, proporciona alguma ação inibitória em relação aos fungos do gênero *Penicillium*. O mesmo tipo de interação não é observado entre a co-cultura de seu produtor, o endófito *Setophoma* sp., com o endófito de maçã.

Devido a tal resposta talvez seja pertinente sugerir que, pelo fato destas espécies estarem associadas a um mesmo tipo de habitat (os frutos), em um mesmo período de seu ciclo vital (endofítico), possivelmente estas espécies possam estar habituadas ao mesmo meio ambiente não evoluindo entre si de forma competitiva, sem a ativação da sistemática de defesa através de indução metabólica.

4.4.2 - Ensaio anfúngico para verificação da atividade do estenfirilenol isolado de *Setophoma* sp. frente aos fungos *P. brasilianum* e *P. digitatum*

Tomando-se como inspiração os resultados explicitados até aqui, foi realizado um ensaio antifúngico para verificação deste tipo de atividade do estenfirilenol frente aos fungos que manifestaram inibição de seu crescimento quando detectou-se o aumento deste metabólito no meio de cultura.

Na FIGURA 4.163 são ilustrados os resultados obtidos para o ensaio. As concentrações testadas de estenfirilenol estão indicadas na figura, bem como os controles positivo e negativo utilizados.

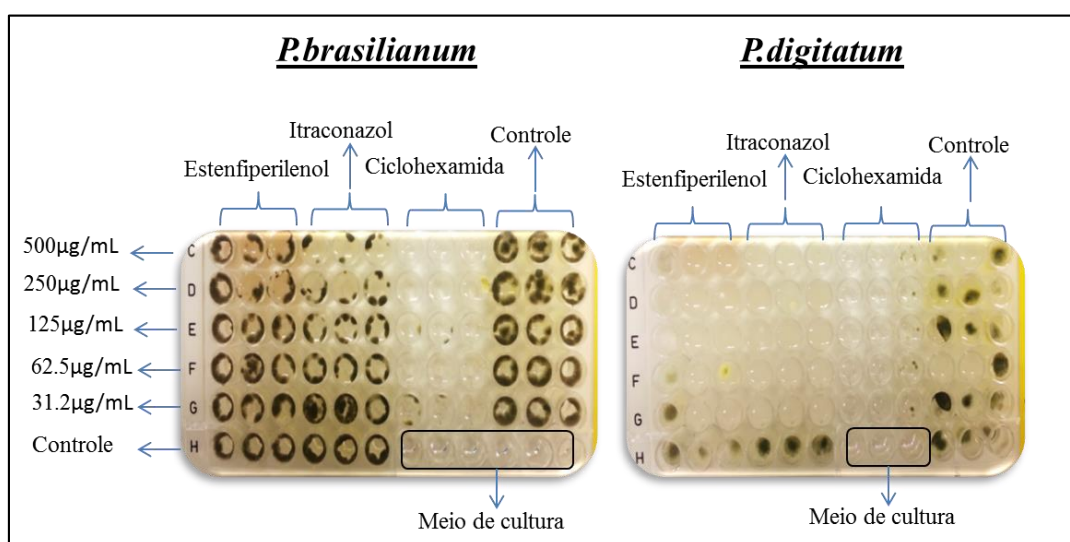


FIGURA 4.163 - Ensaio antifúngico para teste de inibição do estenfirilenol contra *P. brasilianum* e *P. digitatum*

As imagens mostram que para o fungo *P. brasilianum*, uma discreta inibição da esporulação é observada nas suas primeiras concentrações do policetídeo testado. Já para o patógeno de laranja, o fungo *P. digitatum*, a esporulação foi reduzida consideravelmente até a última concentração testada da perilenequinona, ou seja, 31.2 µg/mL. Estes resultados vêm ao encontro de constatações já relatadas a respeito da ação antifúngica de algumas perilenequinonas (XING et al., 2003), sendo tal propriedade possivelmente atribuída à capacidade destas moléculas em gerarem oxigênio radicalar em contato com luz ou algum sistema enzimático excitante específico (XING et al., 2003; MUROONEY, et al, 2012).

Buscas na literatura também mostraram que o estenfiperilenol já havia sido relatado como um produto de indução pela co-cultura entre os fungos *Alternaria tenuissima* e *Nigrospora sphaerica*, dois micro-organismos isolados como endófitos da planta *Smallanthus sonchifolius* (CHAGAS et al., 2013). Neste estudo foi comprovada a ação antifúngica do estenfiperilenol produzido por *Alternaria tenuissima* frente ao outro fungo, e a não fitotoxicidade do policetídeo quando testado nas células vegetais do hospedeiro.

Embora o trabalho de CHAGAS (2013) tenha revelado pela primeira vez o aumento da produção do estenfiperilenol através de experimentos de co-cultura fúngica, estes dados não invalidam a investigação realizada nos experimentos com o fungo *Setophoma* sp.. Isto porque, diferentemente do caso já relatado na literatura, o presente estudo comprova a indução de perilenequinonas através da cultura mista entre fungos endofíticos (*Setophoma* sp. - frutos de goiaba; *P. brasilianum* - caule de *Melia azedarach*) e um patógeno (*P. digitatum* - laranja) isolados de diferentes hospedeiros.

Nesse sentido, o trabalho contribui para o entendimento de que a produção deste grupo policetídeo, especialmente do estenfiperilenol, pode estar vinculado a uma sistemática de defesa entre micro-organismos muito mais ampla, não restrita a interações entre fungos de um único habitat.

Embora atividades antimicrobianas (antifúngica e antiviral) (HUDSON et al., 1997; MUROONEY, et al, 2012) sejam atribuídas a alguns compostos da classe das perilenequinonas, efeitos mutagênicos também são correlacionados a alguns dos compostos deste grupo (STACK et. al., 1986), incluindo as albertoxinas I e II potencialmente produzidas por *Setophoma* sp. como sugerido anteriormente no estudo de seu screening metabólico.

Portanto, a indução da produção de perilenequinonas, como por exemplo, o estenfiperilenol em frutos comestíveis pela possível interação entre a microbiota ali existente poderia ser sugerida, podendo representar um alvo a ser explorado futuramente em maior profundidade, na detecção desta classe metabólica em frutos de goiaba.

4.5 - Estudo de biotransformação de compostos endógenos de maçã pelo fungo *T. rugulosus*

Biotransformações microbianas são ferramentas eficazes que consistem em hábeis sistemas enzimáticos para modificação química estrutural de compostos sintéticos, mas também muito comumente de produtos naturais (WANG et al., 2010) como açúcares, flavonóides, ácidos orgânicos, etc. Tendo em vista que produtos naturais incluídos nestes grupos de compostos também estão presentes na composição de frutos comestíveis, é pertinente explorar a capacidade de micro-organismos isolados destes frutos em biotransformar tais substratos em meios de cultura artificial.

A intenção desta proposta envolveu não somente verificação das transformações químicas propriamente ditas nos substratos (encontrados no habitat natural de tais micro-organismos), mas também o conhecimento da identidade dos produtos potencialmente gerados. Caso tais transformações sejam passíveis de ocorrer em meio artificial, seria relevante a detecção de tais produtos de biotransformação nos próprios frutos, já que estes, indiretamente ou diretamente estariam sendo incorporados à dieta humana pela ingestão dos frutos e seus derivados.

A maçã, por exemplo, contém em sua constituição química flavonóides e ácidos orgânicos como por exemplo ácido ascórbico, ácido clorogênico, phloretina, hesperidina, quercetina e rutina (GERHAUSER, 2008; AWAD et al., 2000; KAMMERER et al., 2011). Tendo em vista a possibilidade de transformações químicas desses compostos pelos micro-organismos, estes foram submetidos a ensaios preliminares para a verificação quanto a viabilidade de possíveis biotransformações pelos fungos isolados de maçã, ou seja, os fungos *T. rugulosus*, *Epicoccum nigrum* e *C. cladosporioides*.

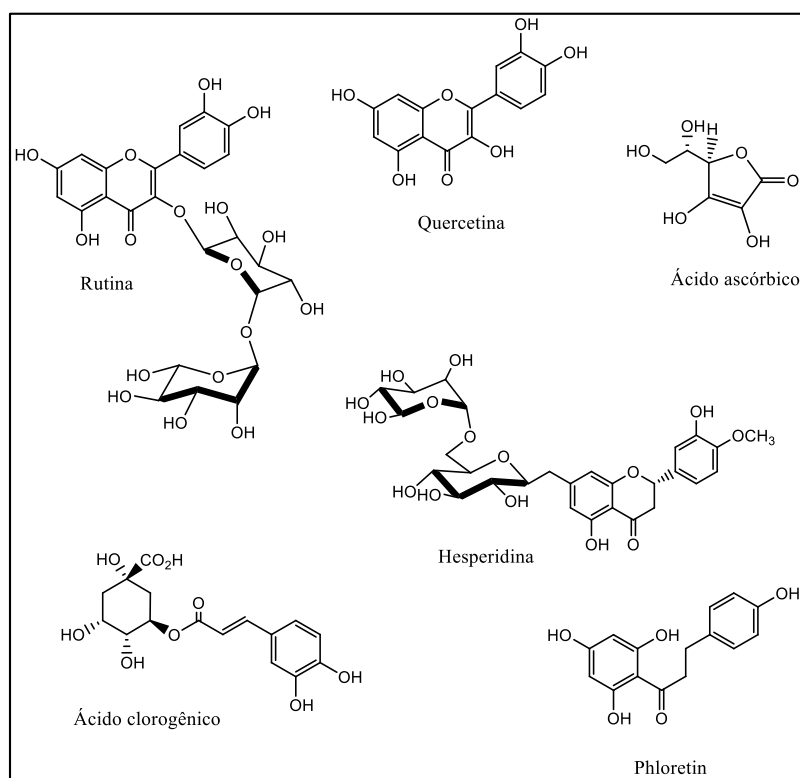


FIGURA 4.164 - Substratos administrados no experimento de biotransformação ao fungo *T. rugulosus*

Os extratos obtidos no estudo foram submetidos a análises via LC/DAD-MS. O experimento foi realizado em triplicata, com pontos retirados em 7 dias conforme descrito no item 3.9.6.

De acordo com os resultados iniciais, verificou-se que nos extratos de *Epicoccum nigrum* e *C.cladosporioides* que todos os substratos ministrados apresentavam-se ainda no meio de cultura no ponto de extração. O processamento dos respectivos cromatogramas também não indicaram nenhum possível produto de biotransformação e portanto tais micro-organismos não foram mais explorados no referido estudo.

Em contrapartida, para os extratos do fungo *T. rugulosus*, uma a análise preliminar envolvendo a (-) epicatequina como substrato pareciam apontar indícios quanto a ocorrência de um possível produto biotransformação. A análise dos extratos de partição líquido-líquido com acetato de etila, apresenta a detecção de uma intensa banda cromatográfica em cerca de 28 minutos (FIGURA 4.165-b) para o experimento contendo o micro-organismo e a epicatequina. Claramente, nota-se a ausência de tal

banda tanto no controle fúngico, como no cromatograma relativo ao padrão do substrato.

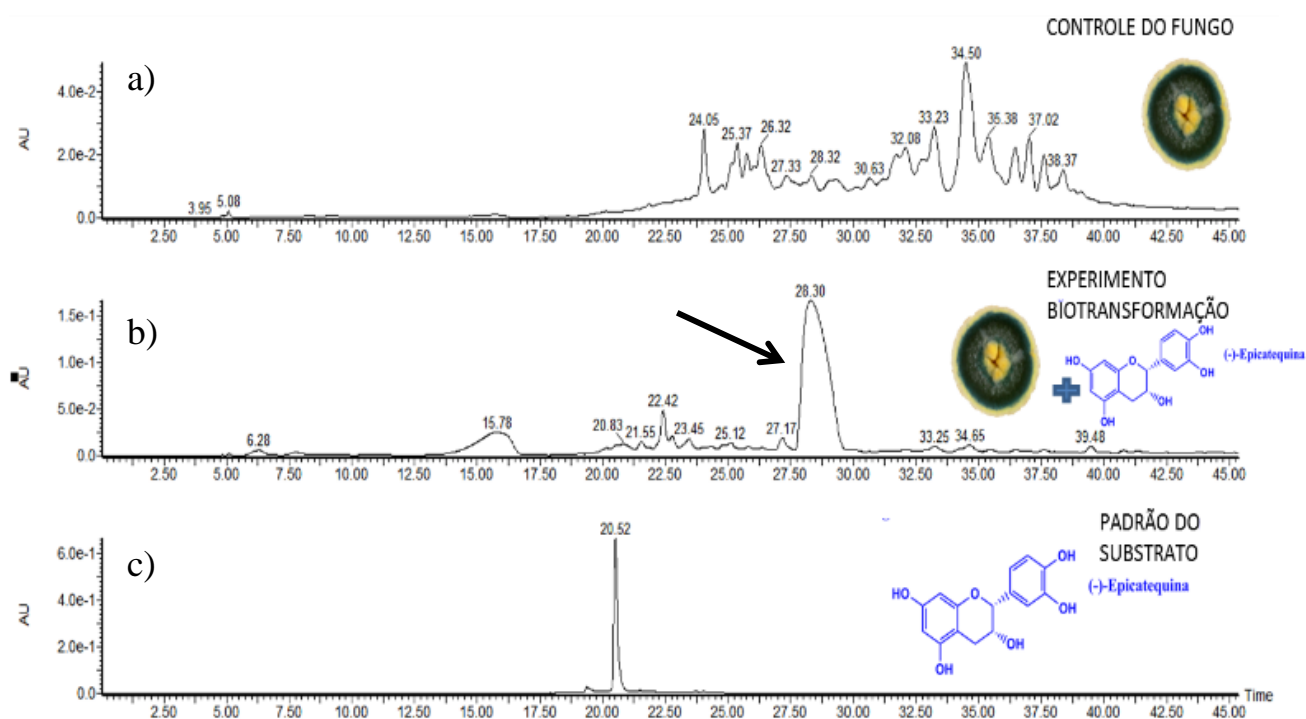


FIGURA 4.165 - Cromatograma de DAD dos extratos referentes ao experimento de biotransformação do substrato epicatequina. Método D

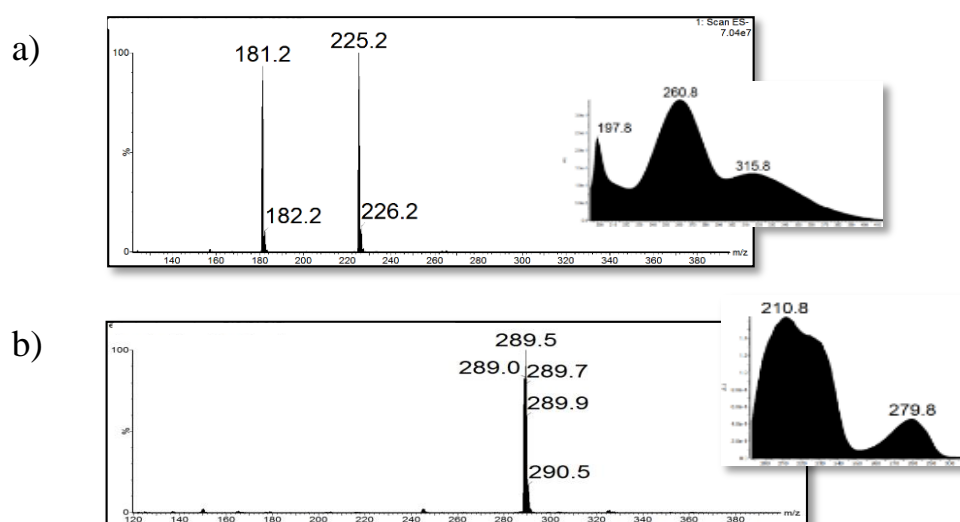


FIGURA 4.166 - Espectros de *full scan* e de UV a) da banda detectada no experimento de biotransformação da epicatequina; b) epicatequina padrão

Na sequência investigativa, os experimentos referentes aos demais substratos foram analisados, utilizando-se formiato de amônio para uma melhor resolução cromatográfica das bandas cromatográficas detectadas.

Surpreendentemente, o resultado obtido foi o mesmo verificado no caso detalhado para a epicatequina. Como pode ser visualizado na FIGURA 4.167, notou-se o aparecimento de uma expressiva banda cromatográfica em relação aos demais metabólitos quando comparados os resultados referentes ao controle fúngico e dos demais cromatogramas de DAD.

Para todos os substratos testados, o cromatograma de *ECl* relativo à *m/z* 225 confirmou que de fato, o metabólito detectado tratava-se do mesmo composto visualizado anteriormente, devido a detecção da banda cromatográfica visualizada em 17 minutos (FIGURA 4.168).

Os resultados que serão apresentados nas figuras referem-se aos extratos de partição com acetato de etila. Os extratos metanólicos dos micélios apresentaram as mesmas respostas com relação aos extratos de partição, porém mostrando espectros e cromatogramas mais ruidosos. Por isso, apenas os primeiros serão ilustrados.

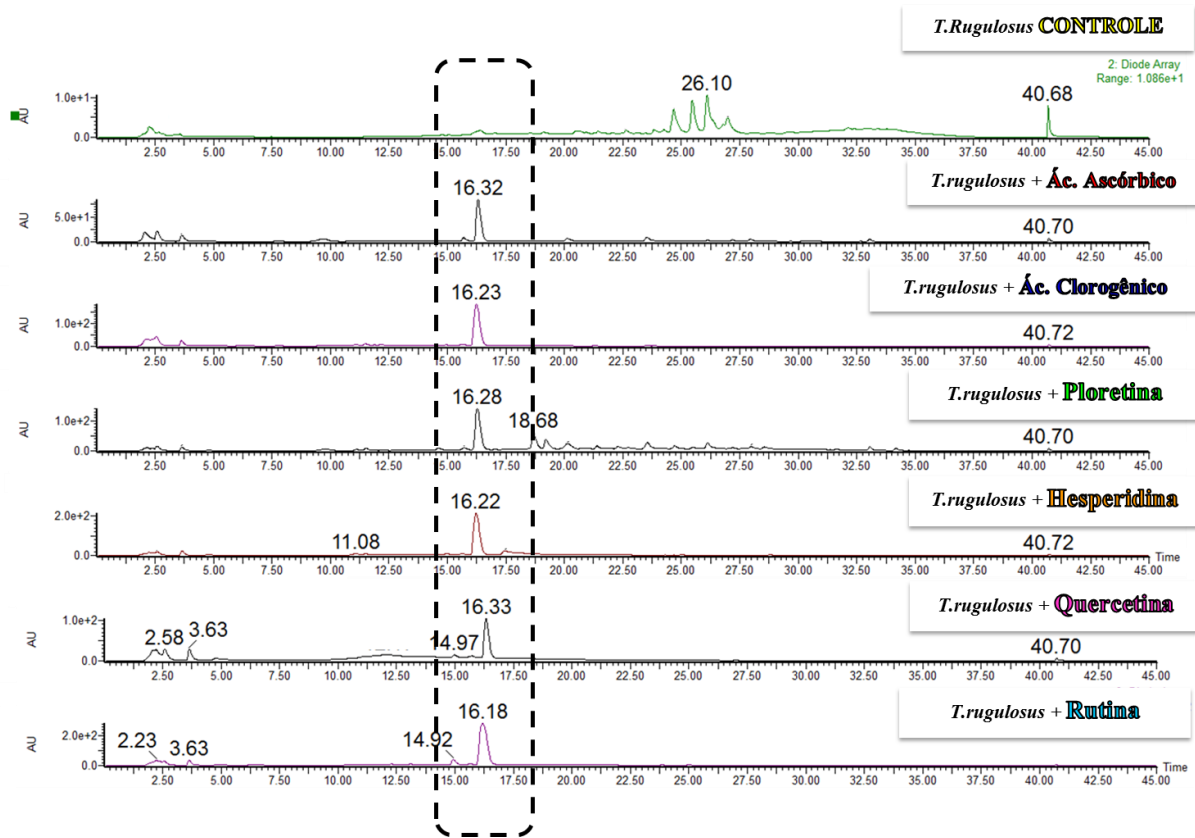


FIGURA 4.167 - Cromatogramas de DAD obtidos para os extratos dos substratos indicados, método F

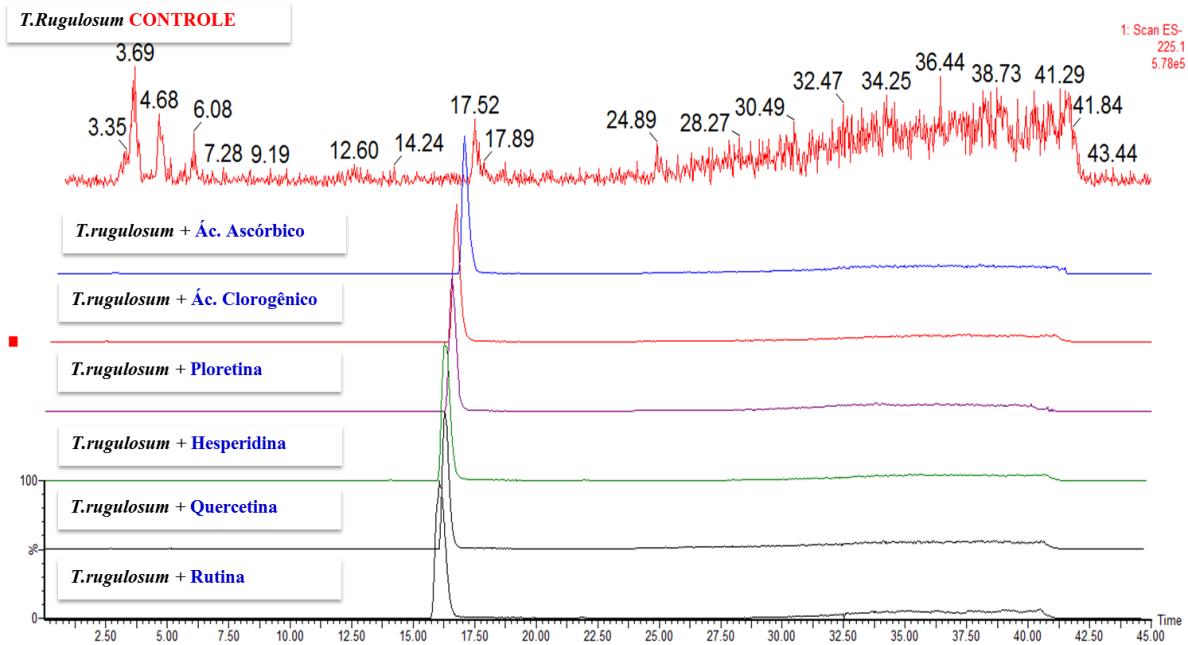


FIGURA 4.168 - Cromatogramas de ECI para m/z 225 referentes aos extratos do experimento de biotransformação indicados, método F

Com a avaliação dos cromatogramas foi possível verificar que o metabólito referente ao íon m/z 225, na verdade, tratava-se de um produto de indução metabólica e não de biotransformação. Isto porque os cromatogramas de UV e de *ECI* para m/z 225, correspondentes ao controle fúngico, mostram a detecção do metabólito alvo, que parece ser produzido em quantidades diminutas pelo fungo quando este não é submetido a ação dos substratos testados. Ou seja, a administração dos ácidos orgânicos e flavonoides junto ao meio de cultura induziram o aumento da produção deste metabólito.

Em etapa posterior, houve a tentativa de isolamento do composto a partir dos extratos obtidos durante experimento com a (-) epicatequina. Como o experimento foi realizado em pequena escala, tal metabólito foi isolado em baixa quantidade (100 μ g), sendo que o espectro de RMN de ^1H não foi passível de interpretação para determinação estrutural devido a baixa resolução de sinais obtida.

Sendo assim, mais uma vez, optou-se pela abordagem da derreplicação via dados de HRMS como estratégia de identificação do metabólito. O micro-extrato de PDA de *T. rugulosus* e o metabólito isolado foram submetidos à análise de HRMS e consultas ao banco AntiBase2012.

O espectro de *full scan* obtido para o composto alvo indicou a massa acuradada de 225,0771 no modo negativo para $[\text{M}-\text{H}]^-$ como exibe a FIGURA 4. 169.

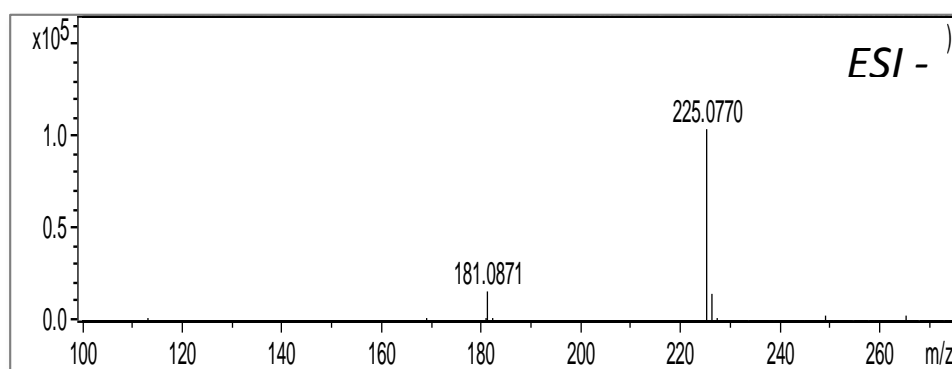


FIGURA 4.169 - Espectro de *full scan* em HRMS do metabólito investigado

A busca da respectiva massa monoisotópica (com ± 5 ppm de intervalo de erro) realizada no banco de dados, gerou 29 possibilidades quanto a identidade do metabólito. O resultado gerado pelo software pode ser observado na FIGURA 4.170.

Dentre os compostos apontados estavam os ácidos tetrônicos ácido

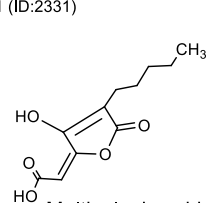
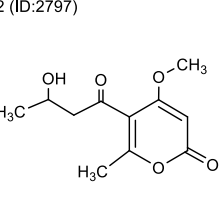
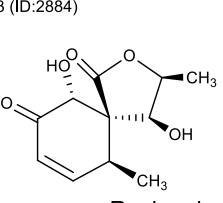
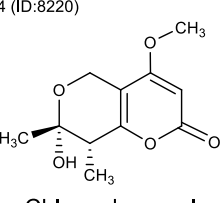
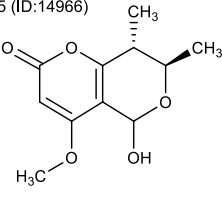
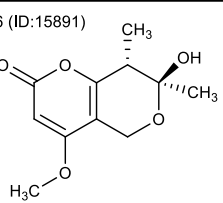
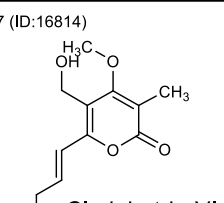
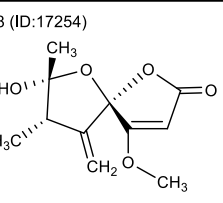
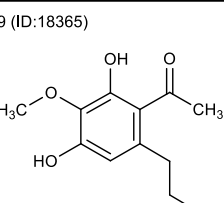
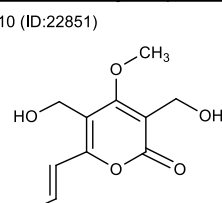
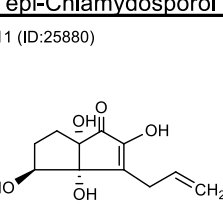
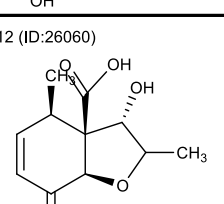
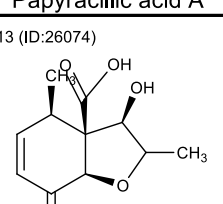
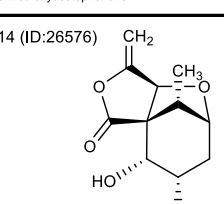
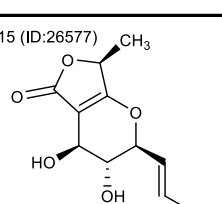
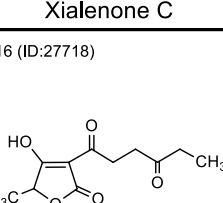
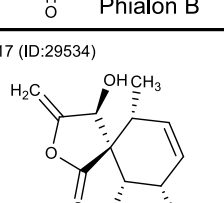
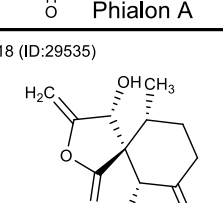
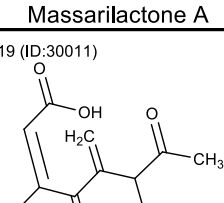
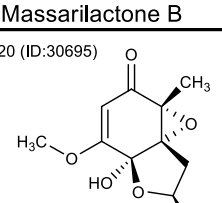
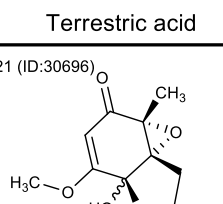
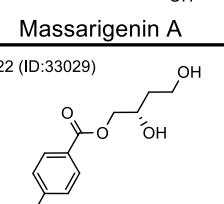
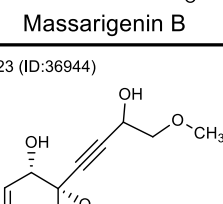
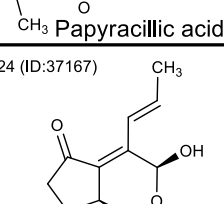
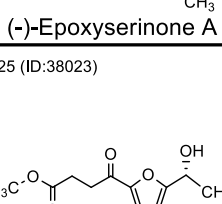
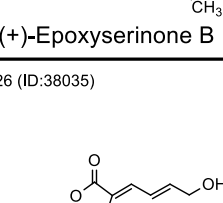
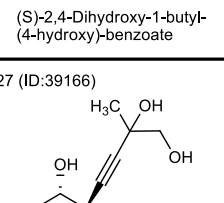
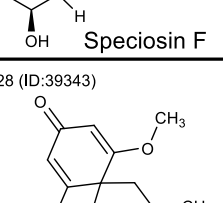
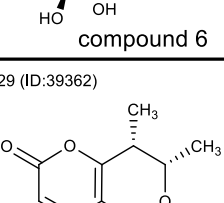
1 (ID:2331)  Multicolanic acid	2 (ID:2797)  Pyrenocine B	3 (ID:2884)  Rosigenin	4 (ID:8220)  Chlamydosporol	5 (ID:14966)  Isochlamydosporol
6 (ID:15891)  epi-Chlamydosporol	7 (ID:16814)  Cladobotrin-VI	8 (ID:17254)  Papyracillic acid A	9 (ID:18365)  2,4-Dihydroxy-6-(2-hydroxyethyl)-3-methoxyacetophenone	10 (ID:22851)  Multiforisin-I
11 (ID:25880)  Xialenone C	12 (ID:26060)  Phialon B	13 (ID:26074)  Phialon A	14 (ID:26576)  Massarilactone A	15 (ID:26577)  Massarilactone B
16 (ID:27718)  Terrestrial acid	17 (ID:29534)  Massarigenin A	18 (ID:29535)  Massarigenin B	19 (ID:30011)  Papyracillic acid	20 (ID:30695)  (-)-Epoxyserinone A
21 (ID:30696)  (+)-Epoxyserinone B	22 (ID:33029)  (S)-2,4-Dihydroxy-1-butyl-(4-hydroxy)-benzoate	23 (ID:36944)  Speciosin F	24 (ID:37167)  compound 6	25 (ID:38023)  Methyl 5-[(1R)-1-hydroxyethyl]-gamma-oxofuran-2-butanoate
26 (ID:38035)  Eutypellin B	27 (ID:39166)  Speciosin N	28 (ID:39343)  4-Acetyl-3,5-dimethoxy-p-quinol	29 (ID:39362)  Inflatin C	

FIGURA 4.170 - Sugestões geradas pelo banco AntiBase ao metabólito de m/z 225,0770

multicolânico e terréstrico. Tais compostos fazem parte da coleção CMB-DTU de metabólitos microbianos, o que permitiu que o metabólito desconhecido fosse comparado aos respectivos padrões. Sendo assim, foram realizadas análises via UHPLC-HRMS, em mesmas condições instrumentais para os padrões avaliados, para o micro-extrato fúngico de PDA e o metabólito isolado.

Conforme mostra a FIGURA 4.171, constatou-se que o metabólito em estudo não era compatível ao ácido terréstrico. O tempo de retenção bastante distinto entre os íons detectados nos cromatograma de ECI para m/z m/z 225,0770 com relação ao padrão e ao micro-extrato de PDA de *T. rugulosus*, excluiu a possibilidade deste ácido ser o composto investigado.

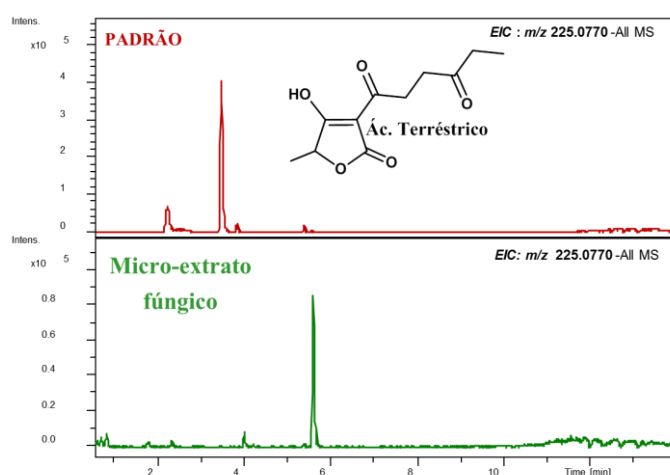


FIGURA 4.171 - Comparação entre os cromatogramas de *ECI* para m/z 225.0770 correspondentes ao padrão de ácido terréstrico e ao micro-extrato de *T.rugulosus*. Método A

Em contrapartida, a análise do padrão de ácido multicolânico junto às demais amostras, confirmou a identidade do metabólito produzido por *T. rugulosus*. Claramente, houve a equivalência para os tempos de retenção, perfil isotópico e também pequenos desvios entre as massas acuradas dos íons detectados (erro menor a 1ppm). Os cromatogramas de *ECI* para m/z 225 e os espectros de *full scan* das bandas detectadas são exibidos na FIGURA 4. 172 a e b respectivamente, evidenciando a produção deste ácido tetrônico pelo endófito de maçã.

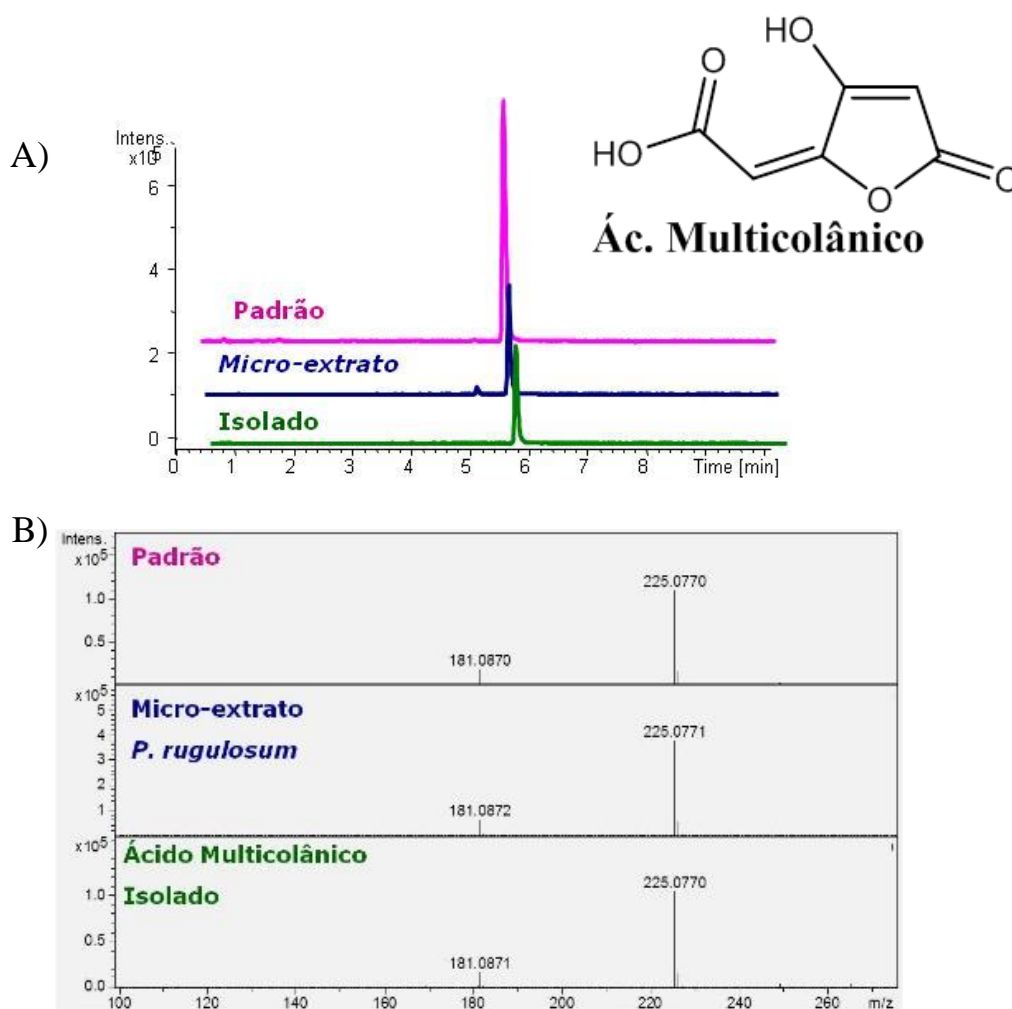


FIGURA 4.172 - a) Comparação entre os cromatogramas de *ECl* para *m/z* 225,0770 das amostras indicadas; b) Comparação entre os espectros de *full scan* das amostras indicadas. Método A

Embora tais investigações tenham levado à confirmação do aumento da produção de ácido multicolânico por *T. rugulosus* quando este é submetido a um meio de cultura contendo ácidos orgânicos e flavonóides, não foram encontrados indícios a respeito de biotransformações em potencial a partir destes substratos. Neste ponto, o mais intrigante foi notar que além da produção acentuada do ácido tetrônico, quando foram administrados a rutina, a quercetina e o ácido clorogênico, houve um total consumo destes substratos pelo fungo. Este dado pode ser verificado pela ausência dos íons correspondentes nos cromatogramas de *ECl* correspondente a cada composto (FIGURA 4.173, FIGURA 4.174).

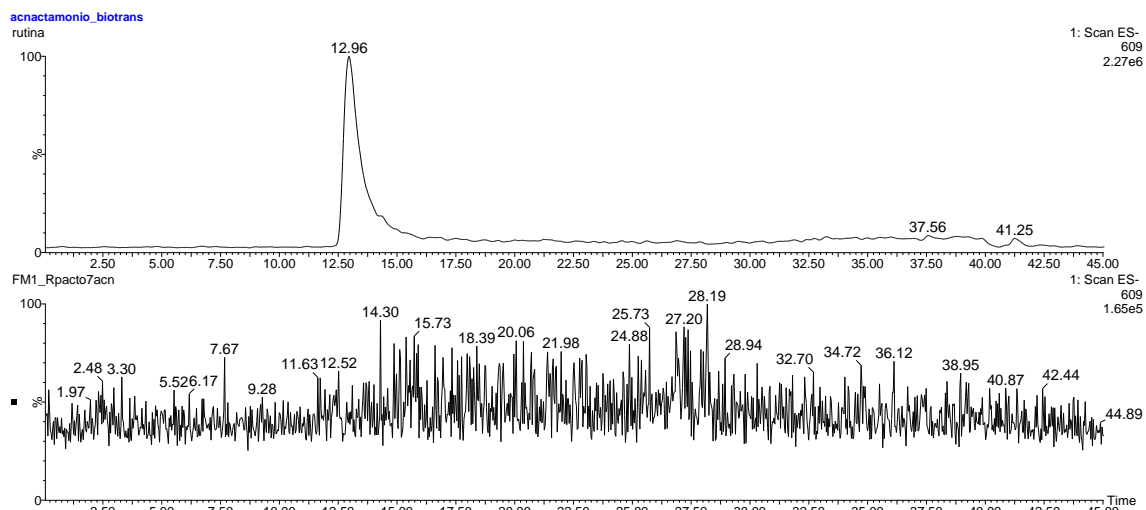


FIGURA 4.173 - Cromatogramas de ECI para m/z 609 a) rutina padrão, b) extrato de biotransformação. Método F

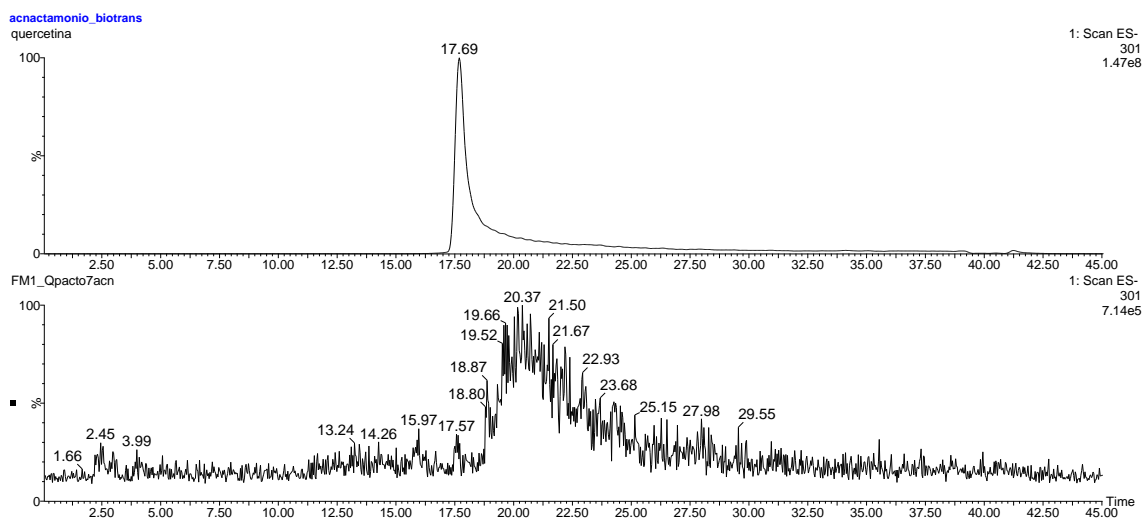


FIGURA 4.174 - Cromatogramas de ECI para m/z 301 a) quercetina padrão, b) extrato de biotransformação. Método F

Além da ausência observada, chamou atenção o fato dos meios reacionais com rutina e quercetina não mais apresentarem mais a coloração que estes substratos ofereciam quando solubilizados no meio de cultura. A sobreposição dos cromatogramas de UV referentes ao extrato fúngico controle, ao extrato de crescimento do fungo com rutina e ao padrão do flavonóide, exemplifica o resultado observado. O resultado visualizado vem ao encontro da ocorrência da descoloração do experimento, haja vista o consumo total do flavonóide durante o experimento FIGURA 4. 168 .

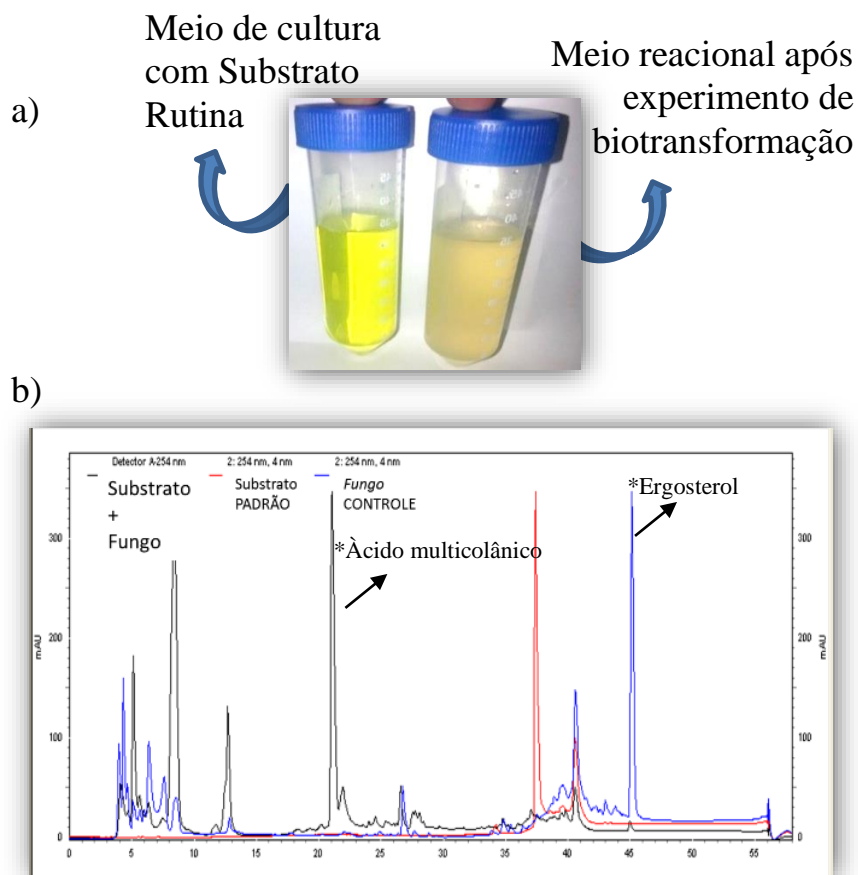


FIGURA 4.175 - a) Meios reacionais do experimento de biotransformação da rutina.; b) Sobreposição dos cromatogramas de UV referentes ao experimento de biotransformação da rutina. Linha vermelha:rutina; linha preta: extrato de biotransformação; c) linha azul: extrato do controle fúngico. * ácido multicolânico. Método F

Para os demais substratos, a detecção dos mesmos nos cromatogramas de *ECl* a partir dos correspondentes extratos prova que nestes casos, o fungo não consome totalmente tais compostos. No entanto, novamente, não foi possível a detecção de produtos de biotransformação.

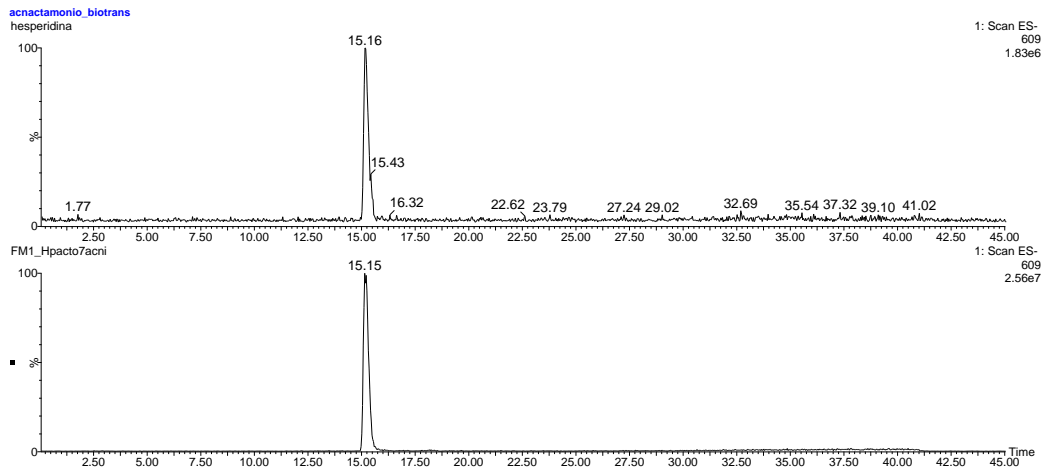


FIGURA 4.176 - Cromatogramas de *ECl* para *m/z* 609 a) hesperidina padrão, b) extrato de biotransformação. Método F

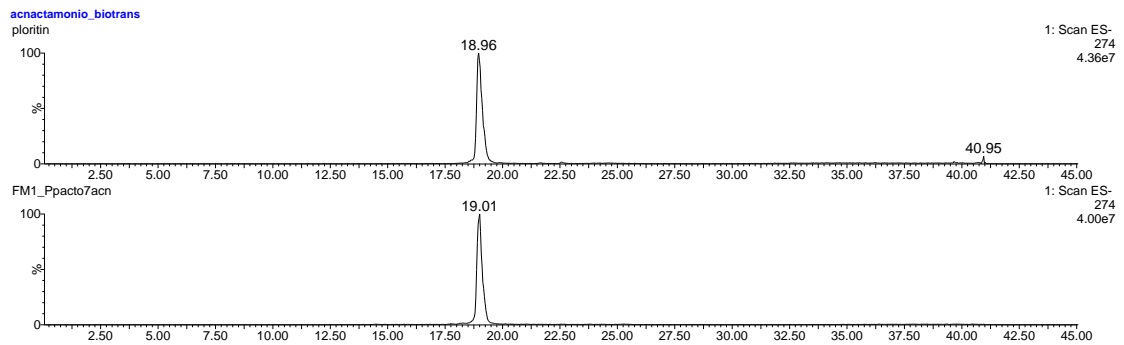


FIGURA 4.178 - Cromatogramas de *ECl* para *m/z* 274 a) floretina padrão, b) extrato de biotransformação. Método F

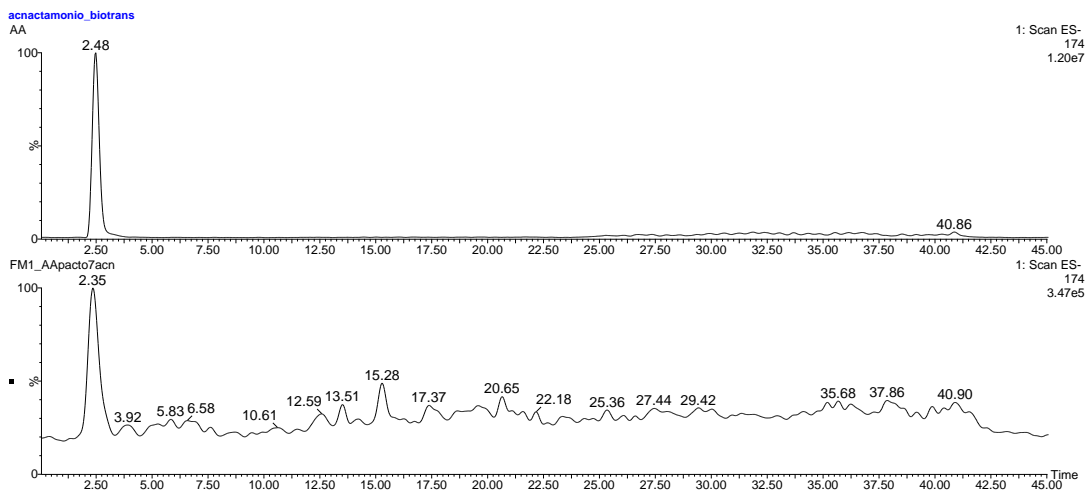


FIGURA 4.177 - Cromatogramas de *ECl* para *m/z* 174 a) ácido ascórbico padrão, b) extrato de biotransformação. Método F

Neste ponto cabe ressaltar que, o uso de tampão fosfato como meio reacional também foi testado no experimento de biotransformação. Porém, os mesmos resultados foram visualizados.

Tendo em vista os resultados apresentados, é possível formular algumas hipóteses a respeito dos mesmos. Primeiramente, deve-se considerar o sistema enzimático do micro-organismo. Talvez a forma com a qual este foi exposto aos substratos em estudo, não tenha possibilitado, ou talvez até mesmo inibido a ação de enzimas capazes de realizar possíveis reações químicas nos compostos administrados. Neste caso, outros testes, envolvendo mudanças no meio reacional, como por exemplo, tampões mais apropriados ao metabolismo e carga enzimática do micro-organismo, tempo de reação, temperatura, etc, são passíveis de serem executados.

Como uma segunda alternativa, pode-se sugerir que de fato, *T. rugulosus* não seja hábil em biotransformar estes tipos de compostos, sendo que a concentração a qual estes foram testados no experimento, simule a resposta que o micro-organismo apresentaria em seu ambiente natural como um sistema de defesa. Sabe-se que o aumento da concentração por exemplo de flavonoides em vegetais, pode representar uma sistemática de defesa contra ataques de outros organismos, no que se denomina como produção de fitoalexinas (TREUTTER, 2006). Por sua vez, o micro-organismo, neste caso o fungo, também sinaliza uma resposta de defesa, que pode ser a produção de metabólitos secundários específicos. No caso do ácido multicolânico em particular, sabe-se que sua produção é induzida pelo sistema de *quorum-sensing* do fungo *Penicillium esclerotium* ou *multicolor*, que é taxonomicamente próxima à espécie *T. rugulosus* (RAINA et al., 2010).

Sendo assim, no caso de *T. rugulosus*, o aumento da produção de ácido multicolânico pode representar tal mecanismo de interação entre ele e o vegetal hospedeiro.

Com inspiração nas hipóteses mencionadas, foi proposto um novo experimento de biotransformação, porém, com um substrato não pertencente à constituição de organismos vegetais. A afidicolina, um diterpeno produzido por fungos do gênero *Nigrospora*, foi testada como alvo de transformações químicas pelo sistema enzimático de *T. rugulosus*.

A mesma metodologia utilizada nos experimentos com flavonóides e ácidos orgânicos foi aplicada para a afidicolina como substrato teste e os resultados foram novamente proporcionados por análises via LC-MS.

De acordo com o processamento de dados, foi possível constatar evidências de que neste caso, houve a biotransformação do substrato administrado ao fungo. Comparando-se os cromatogramas de íons totais da afidicolina com o do extrato do experimento de biotransformação notou-se que, embora o substrato ainda estivesse presente no extrato, uma larga banda inexistente no experimento controle e na amostra de substrato padrão é detectada.

Outro dado bastante relevante foi a observação de que a produção do ácido multicolânico não foi acentuada, chegando a ser imperceptível no caso deste experimento. De acordo com a ausência da banda cromatográfica em torno de 16 minutos, referente ao íon extraído de m/z 225 no cromatograma de *ECI* (FIGURA 4.179-d), pode-se afirmar que diferentemente dos flavonoides e dos ácido orgânicos testados, a afidicolina não induziu a produção do ácido tetrônico por *T. rugulosus*.

O espectro de *full scan* referente à banda cromatográfica eluída em cerca de 12.6 minutos no cromatograma de íons totais (*TIC*) do experimento de biotransformação é exibido na FIGURA 4.180, mostrando a detecção da relação de m/z 351. Este valor, apresentou-se bem próximo ao valor do íon desprotonado correspondente à afidicolina $[M-H]^- = 337$ (FIGURA 4.180) e devido a este fato realizou-se o experimento de íons produto para o metabólito alvo a fim de comparações com o substrato utilizado (FIGURA 4.181).

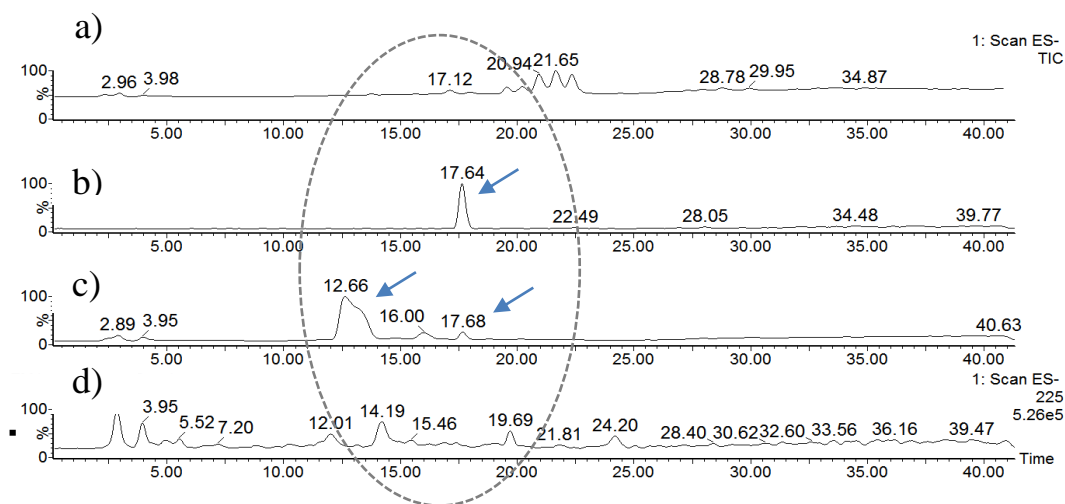


FIGURA 4.179 - Cromatograma de íons totais a) controle; b) afidicolina padrão; c) extrato do experimento de biotransformação. d) Cromatograma de *ECI* para m/z 225 referente ao extrato do experimento de biotransformação. Método F

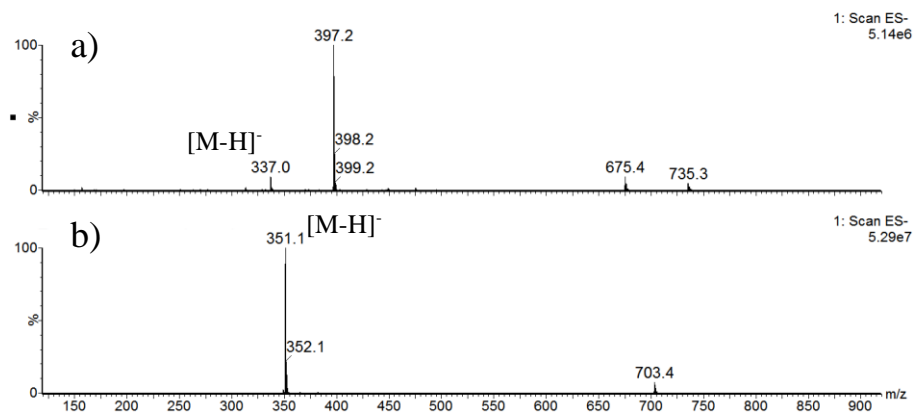


FIGURA 4.180 - Espectro de full scan da afidicolina padrão; b) Espectro de full scan da banda detectada para no experimento de biotransformação da afidicolina

O espectro de íons produto de m/z 351 exibiu grande um perfil bastante similar ao da afidicolina, apresentando perdas e fragmentos em comum como pode ser visualizado na figura a seguir:

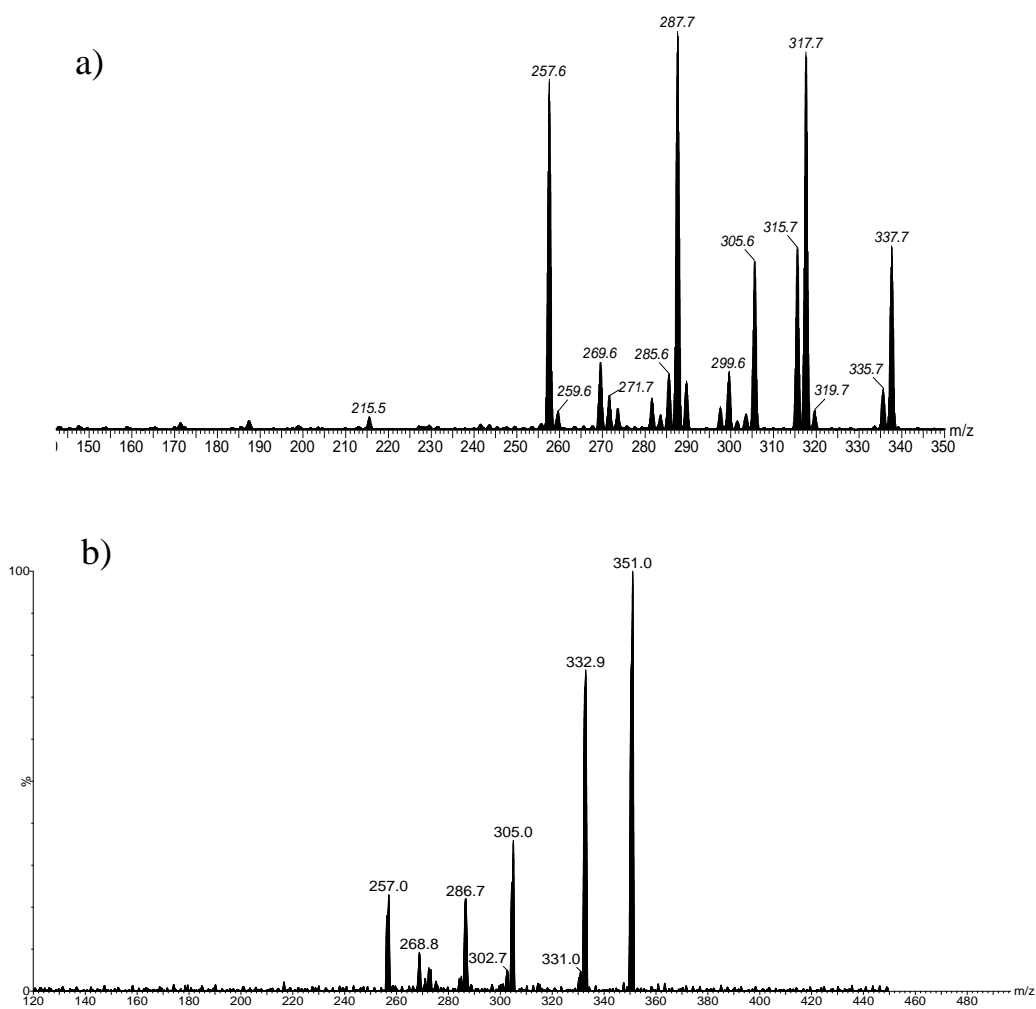


FIGURA 4.181 - Espectro de íons produtos a) afidicolina padrão; b) Produto de biotransformação detectado a partir da afidicolina

Tais resultados evidenciaram que, diferentemente do estudo anterior, o fungo *T. rugulosus* demonstrou-se hábil em biotransformar o substrato a ele administrado. Portanto, as triplicatas obtidas para a análise do experimento foram reunidas e submetidas diretamente ao sistema de HPLC modo preparativo para o isolamento do produto de biotransformação conforme descrito na seção 3.9.6.1. Para a identificação do metabólito isolado, este foi submetido a experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C .

Inicialmente, o espectro de RMN de ^1H do composto (FIGURA 4.182) mostrou um perfil de sinais muito similar ao da afidicolina, com a região de núcleos metínicos e metilênicos congestionada, dificultando-se precisar qual teria sido a modificação estrutural que o micro-organismo havia realizado. No entanto, a análise do espectro de ^{13}C exibiu claramente a presença de um núcleo de carboxila com deslocamento típico de unidade de ácido carboxílico em 183 ppm.

A informação obtida indicava uma potencial oxidação em um dos núcleos metilênicos da afidicolina, o que seria condizente a diferença de massa encontrada entre o substrato e o produto de biotransformação detectados nos respectivos espectros de *full scan*. Ou seja, a diferença de 14 Da (m/z 351 - m/z 337) corresponderia à troca de dois prótons por um oxigênio na estrutura da afidicolina.

Comparando-se os dados do espectro de RMN de ^{13}C obtido para o produto (FIGURA 4.182 - b) com dados encontrados em buscas na literatura, houve a confirmação quanto a oxidação do núcleo C-18, levando assim à identificação da 18-ácido carboxílico afidicolina. Como pode ser verificado através da comparação dos dados pontuados na TABELA 4.16, os dados de RMN do metabólito isolado foram correspondentes àqueles relatados para a o derivado da afidicolina, confirmando a identidade do composto.

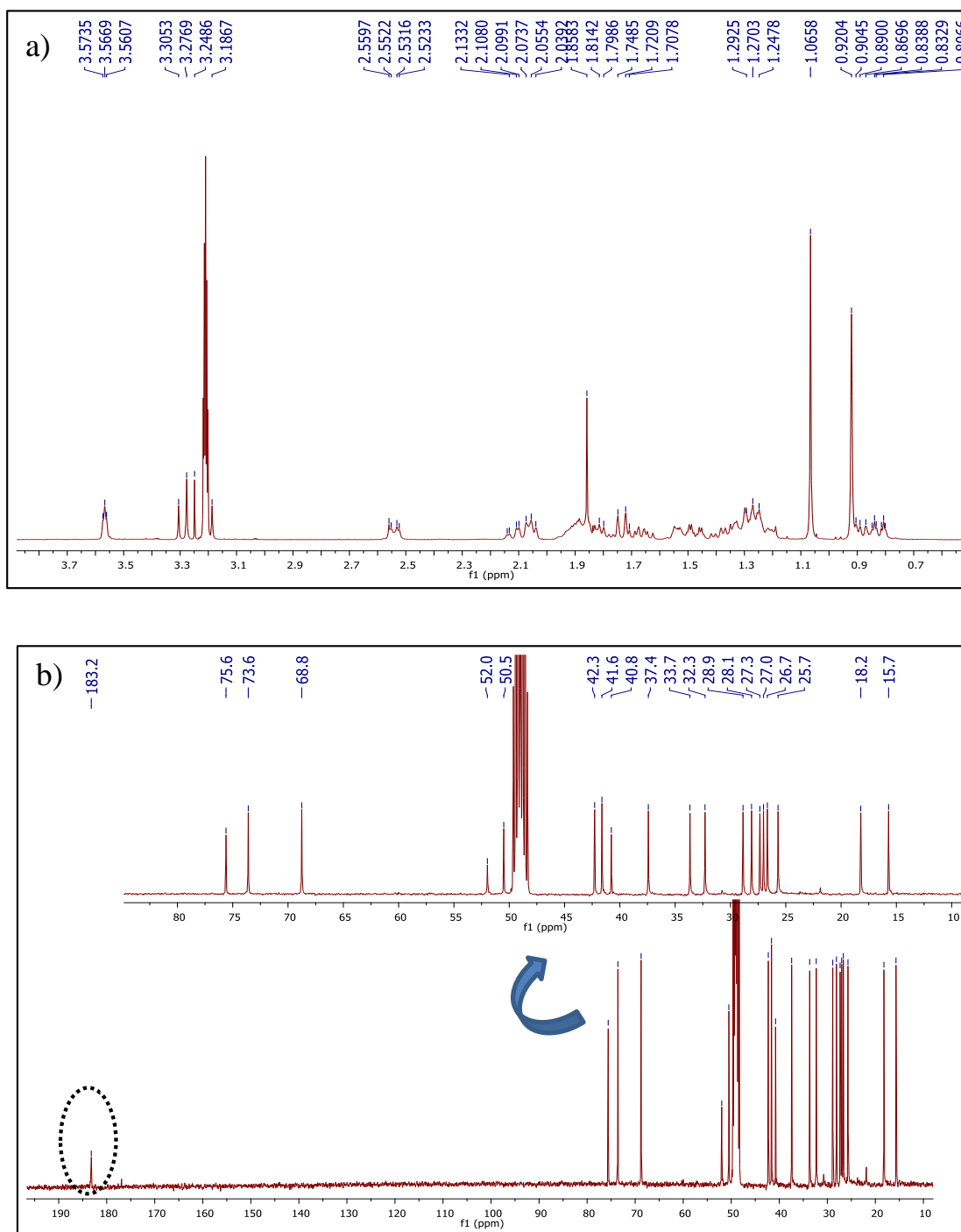
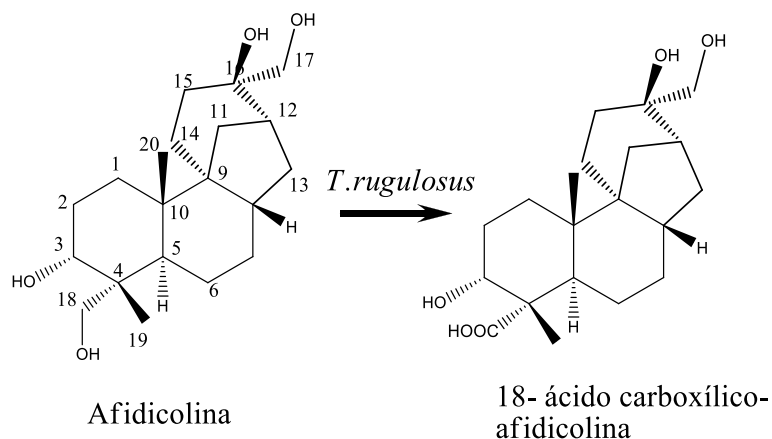


FIGURA 4.182 - a) Espectro de RMN de ^1H para o produto de biotransformação da afidicolina, metanol- d_4 , 400 MHz; b) Espectro de RMN de ^{13}C e ampliação referente ao produto de biotransformação da afidicolina, metanol- d_4 , 100 MHz

TABELA 4.16 - Dados de RMN de ^{13}C para 18-ácido carboxílico afidicolina

Posição	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$
	Afidicolina (Literatura; IPSEN, 1982)	18-ácido carboxílico afidicolina (Literatura; IPSEN, 1982)	18-ácido carboxílico afidicolina Isolada
1	27,1	26,8	28,1
2	27,2	27,6	27,02
3	76,1	73,0	73,6
4	40,8	51,8	50,5
5	33,9	35,9	37,43
6	23,4	26,6	25,7
7	27,2	26,8	28,87
8	40,3	40,8	41,6
9	49,5	49,8	51,98
10	40,0	40,0	40,77
11	33,2	33,2	33,67
12	41,9	42,0	42,29
13	31,6	31,6	32,3
14	25,4	25,6	26,67
15	28,9	29,0	27,34
16	74,2	74,2	75,6
17	68,1	68,2	68,77
18	71,1	179,9	183,2
19	17,9	18,0	18,22
20	15,3	15,6	15,7

^{a)} Dados adquiridos em piridina-*d*5, 22.6 MHz; ^{b)} metanol-*d*4, 100 MHz

FIGURA 4.183 - Biotransformação realizada por *T. rugulosus*

Contudo, este resultado mostra que o fungo *T. rugulosus* apresenta sim um mecanismo enzimático capaz de realizar biotransformações, porém com substrato não vinculado à composição química de seu hospedeiro. Este dado pode trazer a hipótese de que talvez, a acentuada produção de ácido multicolânico quando o micro-organismo é exposto a compostos que podem atuar como fitoalexinas na

natureza, seja uma resposta de defesa fúngica ao possível estresse ambiental ao qual ele é exposto.

4.6 - Estudo para detecção de metabólitos secundários de *Talaromyces rugulosus* em extratos de maçã comerciais

Um dos objetivos propostos no trabalho, tratou-se da detecção e identificação de metabólitos fúngicos em frutos de maçã comerciais disponíveis ao consumo humano. Mais especificamente, o estudo focou a detecção dos metabólitos produzidos pelo fungo *T. rugulosus* isolado a partir do fruto em questão.

A aplicação da abordagem de derreplicação visando a descoberta de novos metabólitos secundários produzidos por *T. rugulosus* permitiu o reconhecimento de parte significativa do perfil metabólico deste micro-organismo como já demonstrado anteriormente. Contudo, para a realização da investigação destes compostos nos frutos, buscou-se trabalhar com uma variedade amostral um pouco mais ampla, adquirindo-se maçãs comerciais em diferentes pontos de comercialização como ilustra a FIGURA 4.184. Dois cultivares da fruta foram selecionados, a maçã do tipo Gala e Fuji. As maçãs obtidas na cidade de São Carlos foram trabalhadas na forma liofilizada, já as adquiridas na cidade de São Paulo foram trabalhadas na forma na forma fresca, *in natura*.

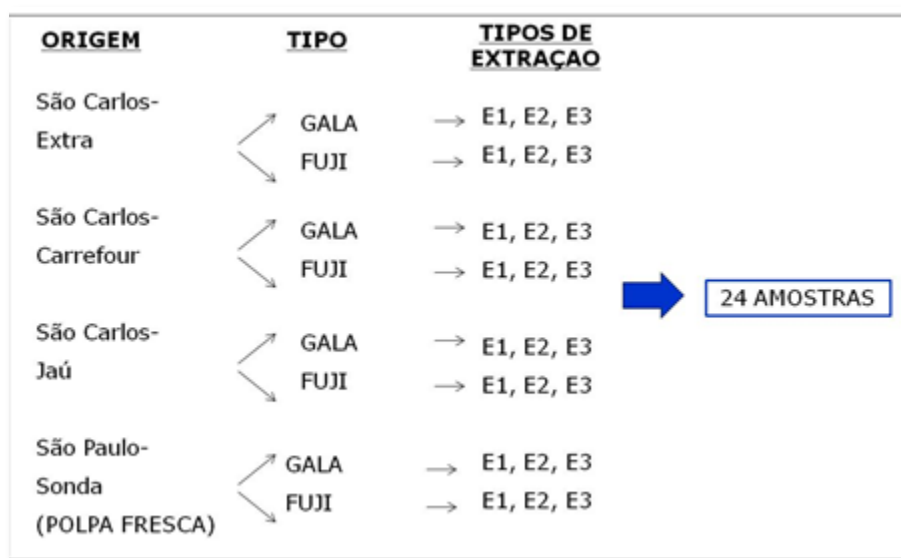


FIGURA 4.184 - Resumo da origem, tipos de maçã e tipos de procedimento de extração utilizados para experimento de detecção de metabólitos secundários de *T. rugulosus* nestes frutos

Além da variedade amostral, também buscou-se trabalhar com três modos de preparo de amostra, visando a maior concentração possível dos analitos requeridos para a detecção, caso estes estivessem presentes nas amostras de maçã. Isto porque, tendo em vista a complexidade deste tipo de matriz, deve-se levar em consideração o número substâncias endógenas ou exógenas, que poderiam atuar como interferentes à detecção do analito alvo. Outra questão bém relevante seria o grau de solubilidade diferencial dos metabólitos estudados em diferentes tipos de solventes.

Sendo assim, inferindo-se que os metabólitos monitorados estejam em concentrações diminutas na matriz estudada, já que o fungo produtor foi isolado como endofítico (período do ciclo de vida no qual não apresenta patogenicidade ao hospedeiro) buscou-se aumentar a probabilidade da detecção dos metabólitos secundários investigados, executando-se três procedimentos de extração/preparo de amostra codificados em E1, E2 e E3. Portanto, no total foi investigado um conjunto de 24 amostras distintas, variando-se origem e método de extração. A descrição detalhada das metodologias de extração encontra-se na seção de Procedimento Experimental.

Contudo, lançando-se mão dos resultados obtidos quanto à identificação dos metabólitos descritos em seção anterior, partiu-se para o estudo de detecção dos mesmos utilizando novamente as análises em MS/MS, porém desta vez, através de experimentos de MRM. Para realização desta investigação foi utilizado sistema UHPLC acoplado um espectrômetro de massas com analisador tipo triplo quadrupolo aplicando-se o modo MRM Dinâmico durante as análises.

No contexto da espectrometria de massas atual já é bastante difundido que o modo MRM de análise pode oferecer grande sensibilidade e principalmente seletividade às investigações químicas. Neste sentido, o modo MRM Dinâmico trata-se de uma otimização de hardware e software, na qual um número expressivo de transições de massas (mais de 1000 transições) pode ser monitorado, sem que haja a necessidade de utilização de segmentos de tempo e principalmente sem envolver a perda de sensibilidade mesmo quando há a coeluição de compostos (STONE et al., 2009). Com isto, é possível a investigação de um maior número de amostras em menor tempo, mantendo a efetividade dos resultados, como mostra a FIGURA 4.185, onde foi possível através deste tipo de experimento, a detecção de mais de 250

pesticidas misturados em 2,5 pg de amostra, através do monitoramento de 500 transições de massas diferenciadas (STONE et al., 2009).

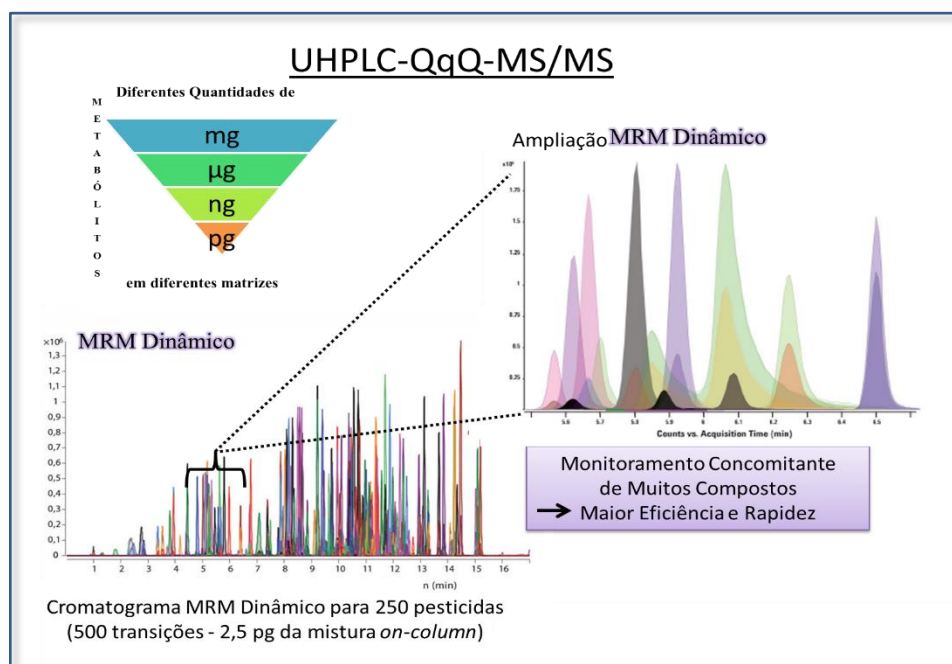


FIGURA 4.185 - Exemplo de utilização do experimento de MRM dinâmico na detecção de diferentes compostos em pequenas concentrações na amostra analisada. Adaptado de STONE et al., 2009

No entanto, mesmo com o uso tal de ferramenta, para o alcance do melhor grau de sensibilidade e eficácia na detecção dos analitos alvo, são necessárias otimizações de parâmetros internos do equipamento como, por exemplo, no caso dos experimentos MS/MS, a variação das energias de colisão, voltagem de aceleração do íon, dwell time, temperatura de vaporização e nebulização, etc.

Cada íon ou transição de massa são suscetíveis de forma diferencial à variação dos valores intrínsecos aos parâmetros mencionados, devido fundamentalmente à disposição química estrutural das moléculas analisadas, e portanto a otimização de tais parâmetros muitas vezes é essencial para o sucesso da detecção de um metabólito alvo, principalmente quando baixas concentrações estão sendo monitoradas.

Como descrito na seção de Procedimento Experimental, a estratégia para otimização das transições de MRM, nos dois modos de ionização (*ESI* positivo e negativo) foi iniciada primeiramente através da seleção das melhores energias de colisão para a quebra dos íons. As energias testadas foram de 10, 20, 30 e 40 eV.

Após a seleção do valor de melhor energia, os íons produto de maior intensidade em sinal foram selecionados para a realização do experimento de MRM, criando-se assim os canais de transição de melhor sensibilidade em relação aos metabólitos de interesse.

Por fim, com as transições selecionadas, partiu-se para a otimização dos valores de voltagem de aceleração (*accelerator voltage*). Novamente os valores que geraram bandas cromatográficas de maior intensidade em termos de área (intrinsecamente para cada transição), foram utilizados para o experimento de MRM dinâmico. Em geral, quando possível deu-se preferência pelas transições de maior diferença de massa entre íon precursor e produto. O detalhamento desta metodologia de escolha em melhores parâmetros de análise encontra-se descrito na seção 3.9.8.

É importante aqui mencionar que a esquirina e o ácido multicolânico foram avaliados no modo negativo de ionização devido à melhor resposta quanto à intensidade do sinal. A rugulosina foi avaliada nos dois modos de ionização e os demais metabólitos, apenas no modo positivo.

Alguns metabólitos de identidade desconhecida foram detectados em todos os micro-extratos de *T.rugulosum* e por isso não foram mencionados no *screening* metabólico do fungo. No entanto, estes também foram monitorados no estudo de detecção nos extratos de maçã. Um destes metabólitos apresentou ionização preferencial no modo *ESI* positivo, sendo sua relação de *m/z* 547. Os demais metabólitos não identificados produzidos pelo micro-organismo apresentaram melhor sensibilidade no modo *ESI* negativo, sendo as correspondentes relações de massa iguais a *m/z* 564 e 520.

A seguir são exibidos os cromatogramas de MRM dinâmico obtidos para os dois modos de ionização (FIGURA 4.187 e FIGURA 4.186), bem como a TABELA 4.17, contendo o resumo dos valores relacionados aos parâmetros otimizados e utilizados para o estudo de detecção dos compostos de interesse.

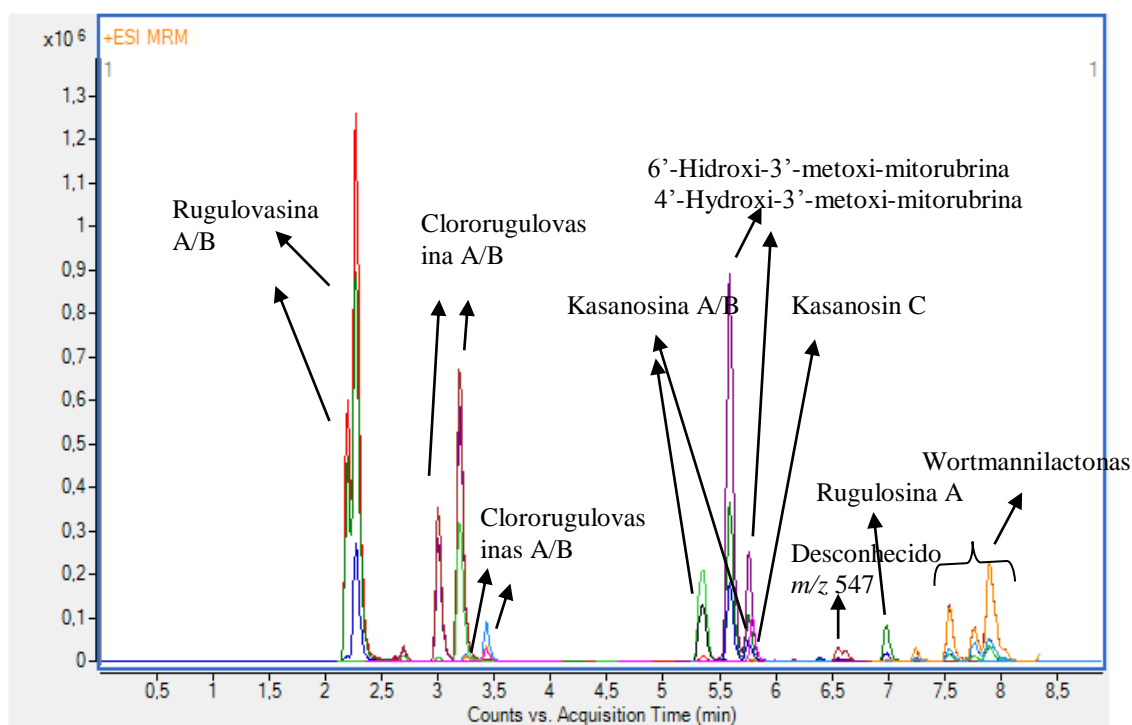


FIGURA 4.186 - Cromatograma de MRM dinâmico, após otimização de parâmetros de análise, para os metabólitos indicados, método B, *ESI* +

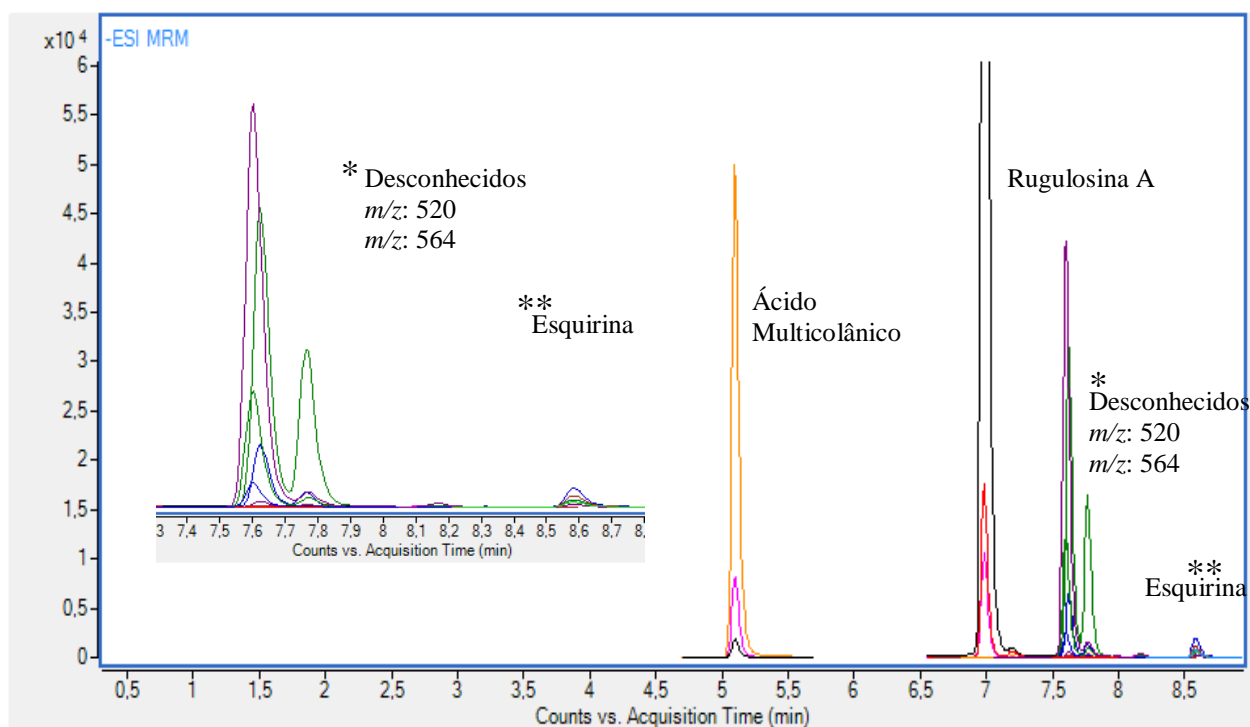


FIGURA 4.187 - Cromatograma de MRM dinâmico, após otimização de parâmetros de análise, para os metabólitos indicados, método B, *ESI* -

TABELA 4.17 - Resumo dos parâmetros otimizados e usados no experimento de MRM dinâmico para os compostos alvo

Metabólito Monitorado	m/z íon precursor	m/z íon produto	Δm (Da)	Energia de colisão (V)	Voltagem de aceleração (V)	Tempo de retenção (min)
Rugulovasinas A/B [M+H] ⁺	269,2	236,2	33	20	3	2,3/2,4
	269,2	130	139,2	20	3	2,3/2,4
	269,2	196,3	72,9	20	5	2,3/2,4
Clororugulovasinas A/ B[M+H] ⁺	303,1	230	73,1	20	3	3,0/3,2
	303,1	164	139,1	20	7	3,0/3,2
	303,1	270,1	33	20	3	3,0/3,2
Novos Derivados Rugulovasinas[M+H] ⁺	337,2	304	33,2	20	7	3,3/3,5
	337,2	284,1	53,1	20	7	3,3/3,5
	337,2	264,1	73,1	20	3	3,3/3,5
	337,2	198,1	139,1	20	5	3,3/3,5
Kasanosin C [M+H] ⁺	401,2	219,2	182	10	5	5,7
	401,2	165,1	236,1	10	5	5,7
Wortimannilactonas E/F/H [M+H] ⁺	409,2	337,2	72	30	5	7,5/ 7,8/8,0
	409,2	227,1	182,1	30	3	7,5/ 7,8/8,0
	409,2	145	264,2	30	3	7,5/ 7,8/8,0
6'-Hidroxy-3'-methoxy-mitorubrin [M+H] ⁺ /	413,2	233	180,2	20	3	5,5/5,7
4'-Hydroxy-3'-methoxy-mitorubrin [M+H] ⁺	413,2	215,2	198	20	3	5,5/5,7
	413,2	181	232,2	20	7	5,5/5,7
Kasanosin A/B [M+H] ⁺	417	237	180	10	3	5,3/5,7
	417	218,8	198,2	10	5	5,3/5,7
	417	181,2	235,8	10	7	5,3/5,7
Rugulosina A [M+H] ⁺	543,1	273,3	269,8	10	7	6,9
	543,1	255,1	288	10	3	6,9
	543,1	217,4	325,7	10	5	6,9
Metabólito Desconhecido [M+H] ⁺	547,2	385,3	161,9	30	5	7,4
	547,2	371,7	175,5	30	5	6,9
	547,2	177,2	370	30	5	7,4
Rugulosina A [M-H] ⁻	541,1	253	288,1	30	3	6,9
	541,1	269,1	272	30	3	6,9
	541,1	471,1	70	30	3	6,9
Metabólito Desconhecido [M-H] ⁻	520	152,9	367,1	25	3	7,5/7,9
	520	170,9	349,1	25	7	7,5/7,9
	520	433,1	86,9	25	7	7,5/7,9
	520	79	441	25	7	7,5/7,9
Metabólito Desconhecido [M-H] ⁻	564	279,5	284,5	20	3	7,5/7,9
	564	504,1	59,9	20	3	7,5/7,9
	564	242	322	20	3	7,5/7,9
	564	224	340	20	3	7,5/7,9
Ácido Multicolânico [M-H] ⁻	225,1	111,3	113,8	15	7	5,1
	225,1	124	101,1	15	5	5,1
	225,1	181,2	44	15	7	5,1
Esquirina [M-H] ⁻	537	281,1	255,9	45	3	8,6
	537	451,1	85,9	45	3	8,6
	537	469,2	67,8	45	3	8,6

Após a realização das otimizações instrumentais e dos procedimentos de extração diferenciais das amostras de maçãs, partiu-se para a análise das mesmas visando a detecção dos metabólitos de interesse através do experimento de MS/MS explicitado anteriormente.

Após minuciosa avaliação dos cromatogramas de MRM obtidos para as 24 amostras de extrato de maçã, não foi possível a detecção de nenhum metabólito secundário no modo positivo de ionização. Como exemplo tem-se o cromatograma representado na FIGURA 4.188, oriundo do extrato de maçã do tipo Fuji (supermercado Jaú®), extraído pelo método de extração E2. Os sinais presentes no

cromatograma representaram apenas ruído dos canais de transição selecionados, em tempos de retenção bastante distintos aos dos metabólitos aos quais representam. Em todas as 24 amostras avaliadas a resposta foi semelhante, ou seja, não houve a detecção nenhum metabólito produzido por *T. rugulosus*, monitorado no modo *ESI* positivo de ionização.

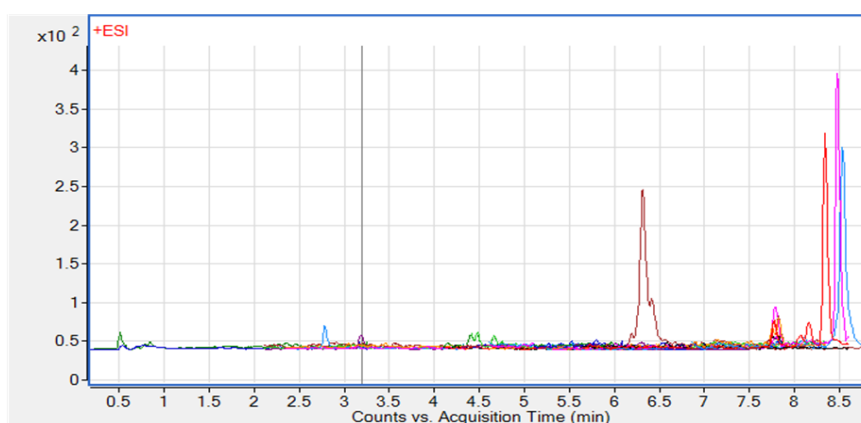


FIGURA 4.188 - Cromatograma de MRM do extrato de maçã, tipo Fuji (Jáú®), extração E2, método B, *ESI* +

No entanto, um resultado bastante promissor foi obtido através da avaliação dos cromatogramas de MRM no modo negativo de ionização já que estes mostraram o aparecimento evidente das bandas cromatográficas referentes às transições de massas intrínsecas aos íons m/z 520 e 564. (FIGURA 4.189 à FIGURA 4.191).

Surpreendentemente, para todas as amostras avaliadas houve tal detecção, independentemente da origem do fruto, ou do tipo de extração, havendo diferenças apenas em intensidade de sinal entre as análises.

Para visualização deste resultado, segue os cromatogramas referentes aos extratos do fruto de maçã fresca, do tipo FUJI, adquirida no comércio local de São Paulo, para os três procedimentos de extração avaliados (E1, E2, E3), (FIGURA 4.189 à FIGURA 4.191).

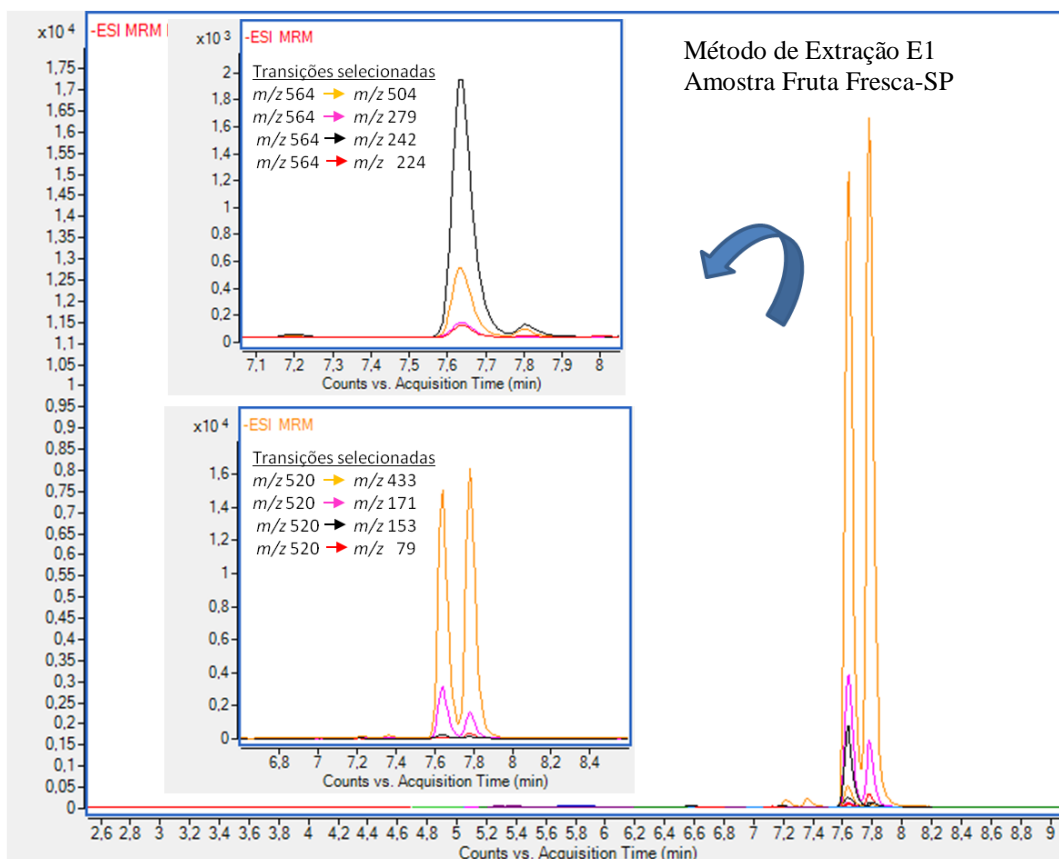


FIGURA 4.189 - Cromatograma de MRM do extrato de maçã, tipo Fuji, extração E1, método D, ESI -

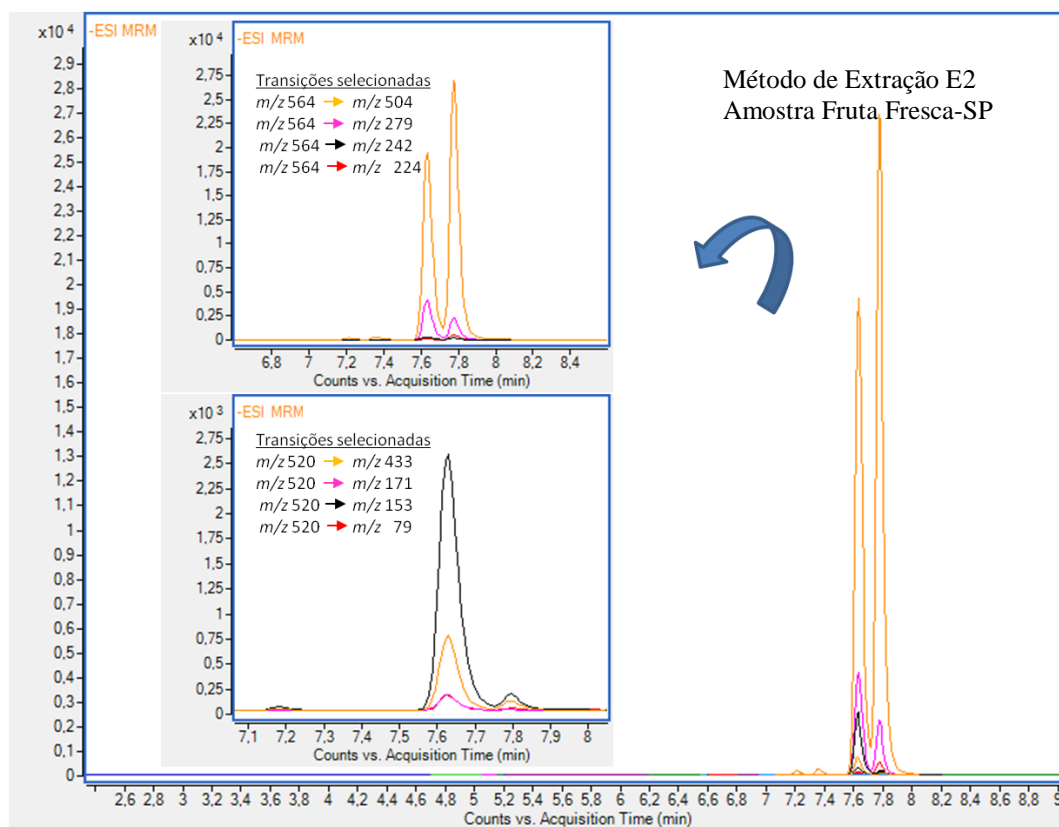


FIGURA 4.190 - Cromatograma de MRM do extrato de maçã, tipo Fuji (Sonda®), extração E2, método D, ESI -

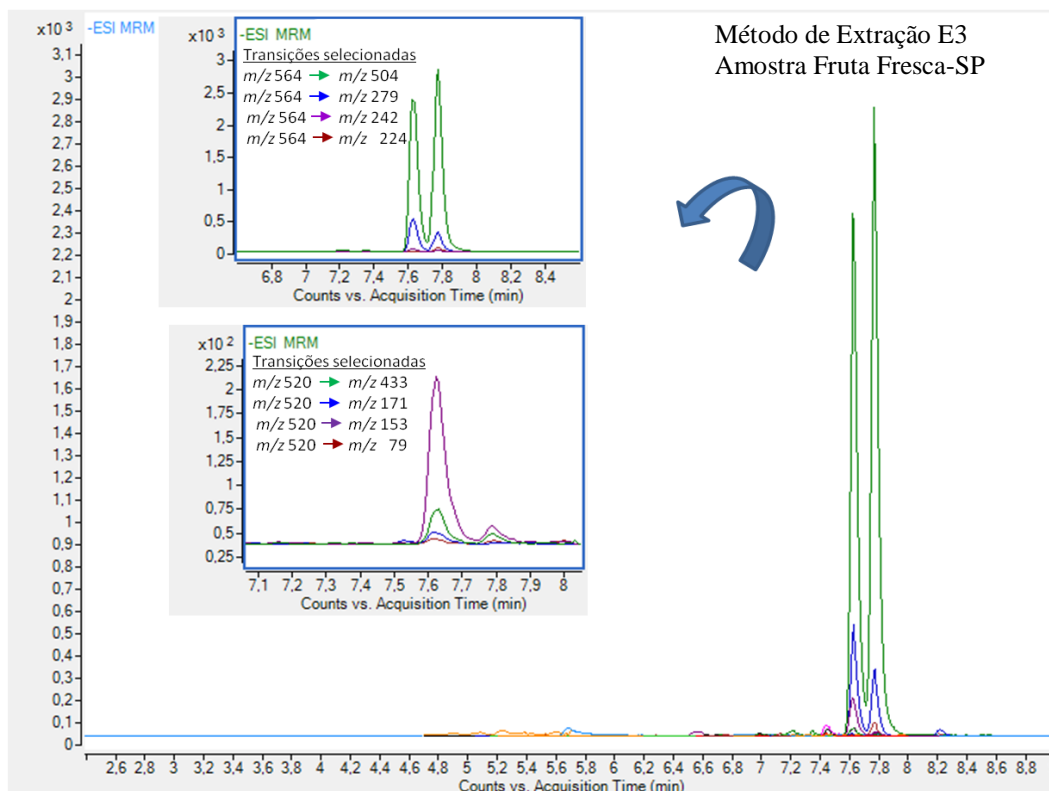


FIGURA 4.191 - Cromatograma de MRM do extrato de maçã, tipo Fuji (Sonda®), extração E3, método D, ESI -

Notou-se portanto, o aparecimento de dois possíveis metabólitos para cada relação de m/z selecionada, haja vista a obtenção de duas bandas cromatográficas para cada íon alvo.

Mesmo que a obtenção deste resultado tenha sido realizada através do monitoramento de quatro diferentes transições de massas para os dois íons de interesse (o que aumenta a certeza de detecção de um metabólito alvo), procurou-se investigar a possibilidade da existência de algum interferente nos micro-extratos de *T. rugulosus* que pudessem estar também nos extratos de maçã, induzindo a um falso positivo. Portanto, uma mistura contendo todos os solventes utilizados nos procedimentos de extração (MeOH, ACN, H₂O, CH₂Cl₂) foi injetada nas mesmas condições e sequência de análise das amostras em questão.

De acordo com o resultado mostrado no cromatograma da FIGURA 4.192, não houve a detecção das transições de massas referentes aos íons de m/z 564 e 520, havendo apenas o aparecimento de ruído na zona de interesse. Excluiu-se assim a possibilidade de haver interferentes durante o processo de extração ou no sistema de análise (cromatógrafo e espectrômetro).

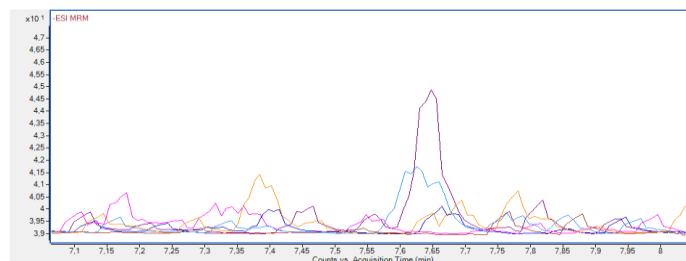


FIGURA 4.192 - Cromatograma de MRM dinâmico referente à mistura de solventes utilizada nos procedimentos de extração de metabólitos a partir dos extratos de maçã

A análise via HRMS também foi realizada a fim de se constatar as massas acuradas dos possíveis metabólitos em questão (FIGURA 4.193 e FIGURA 4.194). Através dos espectros de *full scan* obtidos para o micro-extrato em meio PDA e para o extrato de maçã (FUJI, procedimento E1), evidencia-se que os metabólitos eluídos em 7.5 minutos, cuja massa nominal é m/z 564, de fato podem ser os mesmos em ambos os extratos. Haja vista a pequena diferença de massa encontrada entre os íons detectados nos dois extratos (menor que 1 ppm) e tempos bastante similares em retenção cromatográfica como mostra a FIGURA 4.195.

Tal fato também pode ser constatado para o íon de massa nominal m/z 520, havendo diferença de massa em torno de 2 ppm em relação às massas acuradas nos espectros de *full scan* entre os metabólitos detectados nos extratos em 7,6 minutos (FIGURA 4.194).

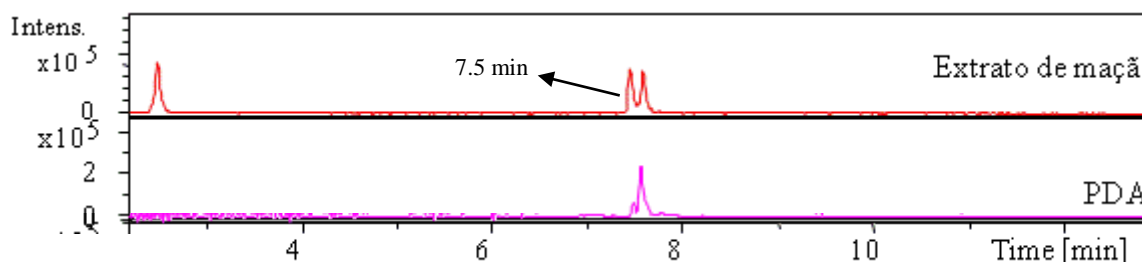


FIGURA 4.193 - Cromatograma de íons extraídos para m/z 564,3310 para os extratos indicados. Método A

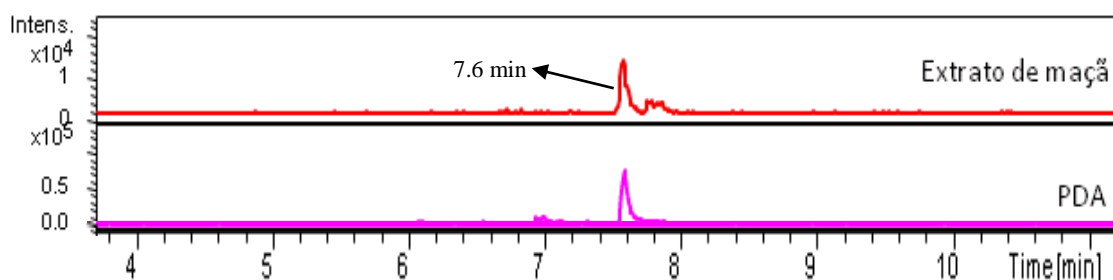


FIGURA 4.194 - Cromatograma de íons extraídos para m/z 520,2688 para os extratos indicados. Método A

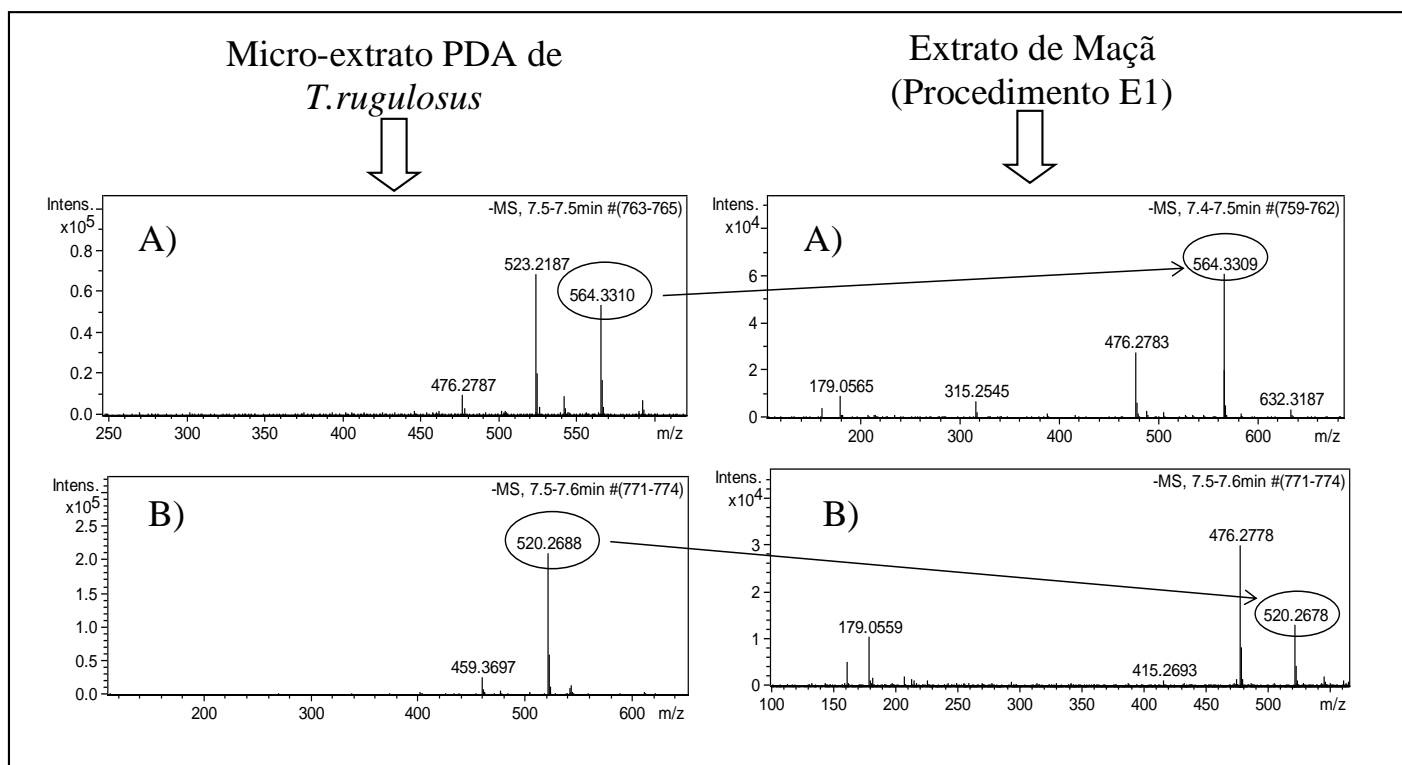


FIGURA 4.195 - Espectros de full scan referentes aos cromatogramas de íons extraídos para para m/z 520,2688 e 564,3310 em HRMS, relativos aos micro-extratos indicados. Método A

Conforme a massa nominal de cada íon de interesse, inicialmente suspeitou-se que o íon m/z 520 pudesse ser originário de uma possível perda de CO_2 não detectada no experimento de MS/MS em baixa resolução para o íon m/z 564.

Contudo com a exatidão de massa obtida pela análise no equipamento de alta resolução, pode-se concluir que o íon 520 não provém de uma perda de CO_2 do íon m/z 564. Isto porque, como é possível verificar nos respectivos espectros de *full scan* relatados na FIGURA 4.195 (por exemplo para o micro-extrato fúngico), a diferença de massa encontrada entre um íon e outro é de 44,0622 Da (m/z 564,3310 – m/z 520,2688). A massa exata intrínseca à molécula de CO_2 é de cerca de 43,9988 Da, o que implica em um erro de massa muito alto ao valor de 44,0622 encontrado.

Os cromatogramas de íons selecionados para as massas acuradas de m/z 564,3310 e m/z 520,2688 foram concomitantemente avaliados nos micro-extratos de *T. rugulosus*, na mistura de solventes de extração (mencionada anteriormente), e também para o micro-extrato referente apenas ao meio de cultura PDA, ou seja, sem a inoculação do micro-organismo (branco) (FIGURA 4.196 e FIGURA 4.197).

Como é possível notar nos cromatogramas de *ECl*, novamente há a ausência das bandas cromatográficas referentes aos íons selecionados na mistura de solventes, assim como no meio branco, indicando que tais íons não são artefatos ou

interferentes oriundos destas matrizes. Destaca-se aqui a presença dos íons alvo em praticamente quase todos os micro-extratos fúngicos, assim como no extrato de maçã selecionado para comparação.

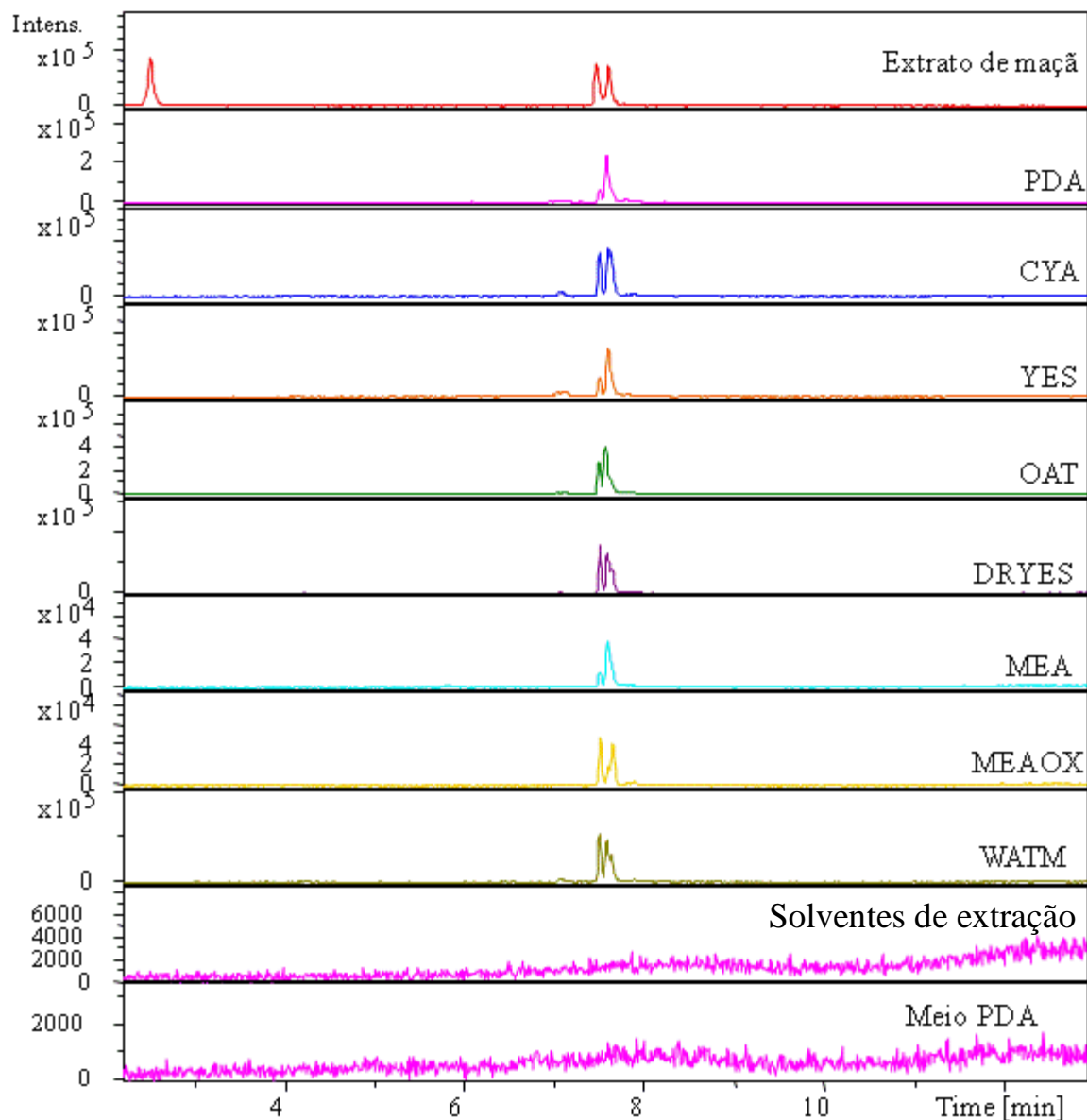


FIGURA 4.196 - Cromatograma de íons extraídos para m/z 564,3310 para amostras e extratos indicados. Método A

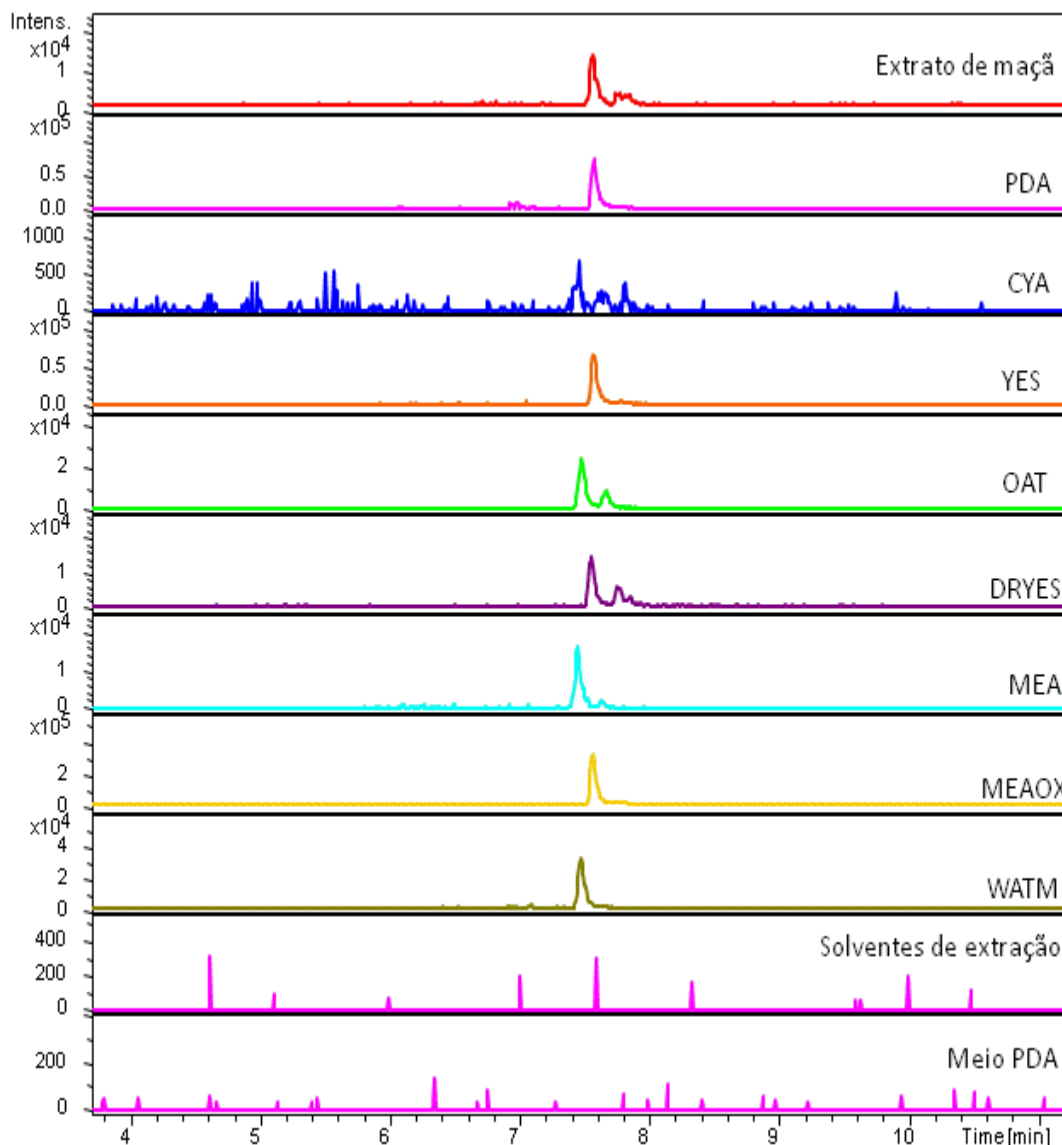


FIGURA 4. 197 - Cromatograma de íons extraídos para m/z 520,2688 para amostras e extratos indicados. Método A

Com o intuito de se obter informações a respeito da identidade dos compostos, foram realizadas consultas ao banco de dados AntiBase 2012, checando-se se as massas acuradas dos metabólitos alvo. Na consulta foram fornecidas três possibilidades estruturais à massa acurada de 520,2688 (FIGURA 4.198) enquanto para o outro íon investigado, não houve nenhuma indicação.

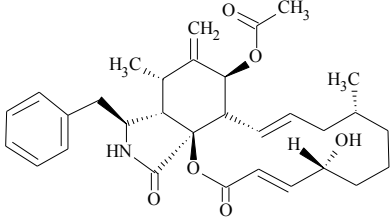
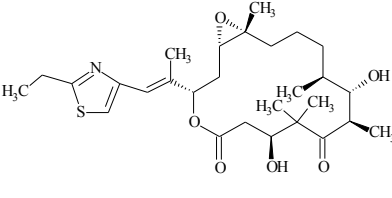
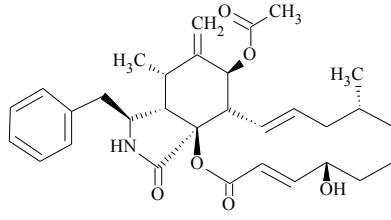
<p>1 (ID:8052)</p> 	<p>2 (ID:27425)</p> 	<p>3 (ID:30367)</p> 
<p>7-O-Acetyl-cytochalasin B $C_{31}H_{39}NO_6$ [F] <i>Phoma exigua</i> var. hetero 521,277</p>	<p>Epothilone B10 $C_{28}H_{43}NO_6S$ [M] myxobacterium Sorangiu 521,281</p>	<p>7-O-Acetyl-cytochalasin B $C_{31}H_{39}NO_6$ [F] <i>Phoma exigua</i> var. hetero 521,277</p>

FIGURA 4.198 - Sugestão de metabólitos para m/z 520,2688 sugerida pelo banco AntiBase 2012

Embora se tenha obtido tais sugestões, acredita-se que as possibilidades não correspondam aos metabólitos potencialmente detectados. Isto porque os micro-organismos produtores dos compostos apontados, são consideravelmente distintos em termos de taxonomia ao gênero *Talaromyces*. Além disso, não foi possível encontrar até o momento correspondência entre os íons produtos obtidos para a massa nominal m/z 520 e as estruturas químicas fornecidas. Devido à provável baixa concentração de tais metabólitos nos extratos estudados, a avaliação dos referentes espectros de UV não foi confiável.

Sendo assim, para a identificação inequívoca dos metabólitos em potencial encontrados concomitantemente nos extratos de maçã e de *T.rugulosum*, se faz necessário o isolamento dos mesmos para a elucidação estrutural através da técnica de RMN. Nesse sentido, mesmo que o isolamento e identificação de tais metabólitos não tenham sido realizados no presente estudo, ainda sim, este abre um promissor nicho investigativo na química de produtos naturais. Torna-se plausível a continuidade do trabalho para a identificação estrutural destes compostos potencialmente produzidos pelo fungo *T. rugulosus* em frutos de maçã *in natura*, haja vista o intenso consumo humano desta fruta e de seus produtos de valor agregado.

5- Conclusão

Conclui-se que a exploração química do metabolismo secundário dos micro-organismos isolados a partir de frutos de goiaba, o fungo *Setophoma* sp. e de maçã, *Talaromyces rugulosus*, foi realizada de forma abrangente. A metodologia de derreplicação via UHPLC-HRMS demonstrou ser uma ferramenta bastante útil neste contexto, permitindo que novos produtos naturais produzidos pelos micro-organismos investigados fossem isolados sem haver o re-isolamento de compostos conhecidos. Adicionalmente, tal abordagem também permitiu o estabelecimento do perfil químico metabólico amplo das espécies em distintos meios e modos de cultura, levando-se ao conhecimento das principais substâncias produzidas por eles.

A partir da prospecção química do endófito de goiaba, sete novos policetídeos da classe dos depsídeos foram isolados e caracterizados, as thielavinas S, T, U e V e as lecanorinas D, E e F, destacando-se a atividade antimicrobiana moderada da thielavina T, frente a bactéria *S. aureus*, com MIC de 6,25 µg/mL.

Ainda com relação a exploração do metabolismo deste micro-organismo, foi observado o aumento da biossíntese do estenfiperilenol produzido naturalmente pela espécie quando esta é submetida a crescimento em culturas combinadas com os fungos *Penicillium brasilianum* e *Penicillium digitatum*. Quando em co-cultura, o endófito de goiaba demonstrou aparente ação inibitória à esporulação destas espécies. Este dado foi corroborado pelo resultado obtido através do teste antifúngico realizado com a substância pura frente aos micro-organismos do gênero *Penicillium*, visualizando-se novamente a inibição aparente da esporulação dos mesmos.

A investigação do metabolismo secundário de *T. rugulosus*, levou ao isolamento e caracterização de novos alcaloides indólicos diclorados, bem como à detecção e à proposta estrutural de compostos monobromados de mesma classe (rugulovasinas) igualmente inéditos. A identificação de tais moléculas halogenadas passa a ser um ponto interessante de maior exploração tendo em vista o potencial sistema enzimático deste micro-organismo terrestre em halogenações.

Ainda com relação à exploração do sistema enzimático deste fungo, a proposta de verificação de suas potencialidades em biotransformar substratos endógenos inerentes ao seu hospedeiro, não evidenciou a detecção de possíveis produtos de biotransformação. No entanto, foi notável o aumento da produção do

ácido multicolânico quando este foi exposto ao experimento com os ácidos orgânicos e flavonóides naturais de maçã testados. Este dado evidencia a hipótese de uma provável sistemática de defesa do micro-organismo, por exemplo, em resposta a possíveis fitoalexinas às quais este pode ser exposto em seu ambiente natural.

O estudo de detecção de compostos oriundos do metabolismo fúngico de *T. rugulosus* em frutos de maçã, através de diferentes métodos de extração e experimentos de MRM, gerou a confirmação para possíveis metabólitos biossintetizados pelo fungo em extratos de maçã comercial. A identificação destes compostos produzidos por *T. rugulosus* não foi confirmada, porém dados de HRMS em conjunto a consultas a banco de dados microbianos, apontou evidências de que tais moléculas possam representa compostos ainda desconhecidos. A detecção destes metabólitos fúngicos nos extratos de maçã, abre caminhos para um promissor nicho investigativo junto à saúde pública e coletivamente à química de produtos naturais.

Referências Bibliográficas

ALY, A. H.; EDRADA-EBEL, R.; MÜLLER, W. E. G.; KOZYTSKA, S.; HENTSCHEL, U. & EBEL, R. "Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*". *Phytochemistry*, 69 (8): 1716, 2008.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; KJER, J. & PROKSCH, P. "Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products". *Fungal Diversity*, 41 (1): 1, 2010.

ALY, A. H.; DEBBAB, A. & PROKSCH, P. "Fifty years of drug discovery from fungi". *Fungal Diversity*, 50(1): 3, 2011.

ALY, A. H.; DEBBAB, A. & PROKSCH, P. "Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises". *Applied Microbiology Biotechnology*, 90 (6): 1829, 2011.

ARNONE, A.; NASINI, G.; MERLINI, L. & ASSANTE, G. "Stemphyllotoxins, new reduced perylenequinone metabolites from *Stemphylium botryosum* var. *Lactucum*". *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1: 525, 1986.

AWAD, M. A.; DE JAGER, A. & VAN WESTING, L. M. "Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation". *Scientia Horticulturae*, 83 (3), 249, 2000.

BACON, C. W. & WHITE, J. F. *Microbial Endophytes*. New York, Marcel Dekker Inc, 2000. p. 45.

BAERT, K.; DEVLIEGHERE, F.; FLYPS H.; OOSTERLINCK M.; AHMED M. M.; RAJKOVIĆ, A.; VERLINDEN, B.; NICOLAÏ, B.; DEBEVERE, J. & DE MEULENAER, B. "Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*". *International Journal of Food Microbiology*, 119: 170, 2007.

BATISTA, P.; DA TRINDADE, D. C. G.; ARAÚJO, A. & ALVES, R. "Chemical characterization of guava fruit produced in submiddle of São Francisco Valley, Brazil". *Anais do congresso International Symposium on Guava and Other Myrtaceae*, Petrolina: Embrapa Semiárido, 2012.

BAUER, J.; WALTENBERGER, B.; NOHA, S. M.; SCHUSTER, D.; ROLLINGER, J. M.; BOUSTIE, J. & WERZ, O. "Discovery of Depsides and Depsidones from Lichen as Potent Inhibitors of Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1 Using Pharmacophore Models". *ChemMedChem*, 7 (12): 2077, 2012.

BERTRAND, S.; SCHUMPP, O.; BOHNI, N.; MONOD, M.; GINDRO, K. & WOLFENDER, J. L. "De novo production of metabolites by fungal co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*". *Journal of Natural Products*, 76 (6): 1157, 2013.

BERTRAND, S.; SCHUMPP, O.; BOHNI, N.; BUJARD, A.; AZZOLLINI, A.; MONOD, M. & WOLFENDER, J. L. "Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry fingerprinting". *Journal of Chromatography A*, **1292**: 219, 2013.

BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S.; SCHUMPP, O.; GINDRO, K. & WOLFENDER, J. L. "Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery". *Biotechnology Advances*, **32** (6): 1180, 2014.

BNDES. Fruticultura: A produção de maçã no Brasil. Informativo Técnico Seagri. Nº2 Novembro/2010. www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galeria/Arquivos/conhecimento/informativo_SEAGRI/InformativoSEAGRI_02_2010.pdf. Acesso em: 04 mai. 2013.

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.

BOUSLIMANI, A.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N. & DORRESTEIN, P. C. "Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies". *Natural Product Reports*, **31** (6): 718, 2014.

BRAKHAGE, A. A. & SCHROECKH, V. "Fungal secondary metabolites—strategies to activate silent gene clusters". *Fungal Genetics and Biology*, **48** (1): 15, 2011.

BRAKHAGE, A. A. "Regulation of fungal secondary metabolism". *Nature Reviews Microbiology*, **11** (1): 21, 2012.

BREITLING, R.; CENICEROS, A.; JANKEVICS, A. & TAKANO, E. "Metabolomics for secondary metabolite research". *Metabolites*, **3**(4): 1076, 2013.

CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W. & KELLER, N. P. "Relationship between secondary metabolism and fungal development". *Microbiol. Mol. Biol. R.*, **66**(3): 447, 2002.

CAMATTI-SARTORI, V.; DA SILVA-RIBEIRO, R. T.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; PAGNOCCA, F. C.; ECHEVERRIGARAY, S. & AZEVEDO, J. L. "Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation". *Journal of Basic Microbiology*, **45** (5): 397, 2005.

CAZORLA, F. M.; ROMERO, D.; PÉREZ-GARCÍA, A.; LUGTENBERG, B. J. J.; VICENTE, A. D. & BLOEMBERG, G. "Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity". *Journal of Applied Microbiology*, **103** (5): 1950, 2007.

CENIS, J. L. "Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification". *Nucleic Acids Research*, **20** (9), 2380, 1992.

CHAGAS, F. O.; DIAS, L. G. & PUPO, M. T. "A Mixed Culture of Endophytic Fungi Increases Production of Antifungal Polyketides". *Journal of Chemical Ecology*, 39 (10): 1335, 2013.

CHEN, X. & PÉE, V. "Catalytic mechanisms, basic roles, and biotechnological and environmental significance of halogenating enzymes". *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40 (3): 183, 2008.

CHITHRA, S.; JASIM, B.; SACHIDANANDAN, P.; JYOTHIS, M. & RADHAKRISHNAN, E. K. "Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*". *Phytomedicine*, 21 (4): 534, 2014.

CHOODBURY, M. M. "Goiaba". IN: *Frutas do Brasil*. (Eds.) Pós-colheita, Embrapa, Frutas do Brasil, 2001, p.19.

CHOUDHURY, M. M.; DA COSTA, T. S. & ARAÚJO, J. L. P. "Agronegócio da goiaba". In: *Goiaba: Pós-Colheita* CHOUDHURY, M. M.(Eds.). Brasília, Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Semi-Árido, 2001. p.9-15.

CICHEWICZ, R. H. "Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners". *Natural Product Reports*, 27 (1): 11, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically"; Approved standard-seventh Edition. CLSI Publication M7-A7, Wayne, PA, USA. 2006.

COLE, R. J.; KIRKSEY, J. W.; CUTLER, H. G.; WILSON, D. M. & MORGAN-JONES, G. "Two toxic indole alkaloids from *Penicillium islandicum*". *Canadian Journal of Microbiology*, 22(5), 741, 1976.

COLE, R. J.; KIRKSEY, J. W.; CLARDY, J.; EICKMAN, N.; WEINREB, S. M.; SINGH, P. & KIM, D. "Structures of rugulovasine-A and-B and 8-chlororugulovasine-A and-B". *Tetrahedron Letters*, 17 (43): 3849, 1976.

DE MELO PEREIRA, G. V.; MAGALHÃES, K. T.; LORENZETTI, E. R.; SOUZA, T. P.; & SCHWAN, R. F. "A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion". *Microbial Ecology*, 63 (2): 405, 2012.

DE MEDEIROS, L. S.; MURGU, M.; DE SOUZA, A. Q & RODRIGUES-FILHO, E. "Antimicrobial depsides produced by *Cladosporium uredinicola*, an endophytic fungus isolated from *Psidium guajava* fruits". *Helvetica Chimica Acta*, 94 (6): 1077, 2011.

DE MEDEIROS, L. S.; MURGU, M.; DE SOUZA, A. Q & RODRIGUES-FILHO, E. "Erratum: Antimicrobial depsides produced by *Cladosporium uredinicola*, an endophytic fungus isolated from *Psidium guajava* fruits". *Helvetica Chimica Acta*, 96 (7): 1406, 2013.

DE MEDEIROS, L. S.; SAMPAIO, O. M.; DA SILVA, M. F. D. G.; RODRIGUES FILHO, E. & VEIGA, T. A. M. "Evaluation of herbicidal potential of depsides from *Cladosporium*

uredinicola, an endophytic fungus found in guava fruit". J. Braz. Chem. Soc., 23 (8): 1551, 2012.

DE MEDEIROS, L. S.; ABREU, L. M.; NIELSEN, A.; INGMER, H.; LARSEN, T. O.; NIELSEN, K. F; RODRIGUES-FILHO, E. "Dereplication-guided isolation of depsides thielavins S-T and lecanorins D-F from the endophytic fungus *Setophoma* sp." Phytochemistry, 2015, In Press. DOI: 10.1016/j.phytochem.2014.12.020.

DEACON, J. W. Fungal Biology, 4a ed. Malden, Blackwell Publishing, 2006. cap. 1.

DEMAIN, A. L. & ADRIO, J. L. "Contributions of microorganisms to industrial biology". Mol. Biotechnol., 38 (1): 41, 2008.

DESMARCHELIER, A.; MUJAHID, C.; RACAULT, L.; PERRING, L. & LANCOVA, K. "Analysis of patulin in pear-and apple-based foodstuffs by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (14): 7659, 2011.

DEWICK, P. M. "Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach", 3th ed. (Eds.) John Wiley & Sons, West Sussex, 2009.

DINAN, L. "Dereplication and partial identification of compounds". IN : *Natural Products Isolation* Vol. 20, 2nd ed. SARKER, S. D.; LATIF, Z. & GRAY, A. I. (Eds) Humana Press Inc. Totowa, NJ.2005. p.297-321.

DIXON, R. A. "Natural products and plant disease resistance". Nature, 411 (6839): 843, 2001.

DONG, C.; FLECKS, S.; UNVERSUCHT, S; HAUPT, C.; VAN PEE, K. H. & NAISMITH, J. H. "Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination". Science, 309 (5744): 2216, 2005

DONG, Y.; LIN, J.; LU, X.; ZHENH, Z.; REN, Z., REN, X.; ZHANG, H.; HE, J. & YANG, J. "Cathepsin B inhibitory tetraene lactones from the fungus *Talaromyces wortmannii*". Helvetica Chimica Acta, 92(3): 567, 2009.

DONG, Y.; YANG, J.; ZHANG, H.; LIN, J.; REN, X.; LIU, M.; LU, X.& HE, J. Wortmannilactones A-D, 22-membered triene macrolides from *Talaromyces wortmannii*. Journal of natural products, 69 (1), 128-130, 2006.

DORNER, J. W.; COLE, R. J.; HILL, R.; WICKLOW, D, & COX, R. H. "*Penicillium rubrum* and *Penicillium biforme*, new sources of rugulovasines A and B". Applied and Environmental Microbiology, 40(3): 685, 1980.

DRUSCH, S. & RAGAB, W. "Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits". Journal of Food Protection, 66 (8): 1514, 2003.

EL-ELIMAT, T,; FIGUEROA, M.; EHRMANN, B. M.; CECH, N. B.; PEARCE, C. J. & OBERLIES, N. H. "High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary

metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products". *Journal of Natural Products*, 76 (9): 1709, 2013.

EBBOLE, D. J. "Magnaporthe as a model for understanding host-pathogen interactions". *Annual Review of Phytopathology*, 45: 437, 2007.

FABER, K. "Biotransformations in organic chemistry: a textbook". 6th ed. (Eds.) Springer. 2011.

FILL, T. P.; PEREIRA, G. K.; DOS SANTOS, R. M. G. & RODRIGUES-FO, E. (2007). "Four additional meroterpenes produced by *Penicillium* sp found in association with *Melia azedarach*. Possible biosynthetic intermediates to austin". *Zeitschrift fur Naturforschung B*, 62 (8): 1035, 2007.

FIRÁKOVÁ, S.; ŠTURDÍKOVÁ, M.; & MÚČKOVÁ, M. "Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants". *Biologia*, 62(3): 251, 2007.

FIRN, R. D. & JONES, C. G. "Natural products – a simple model to explain chemical diversity". *Natural Products Reports*, 20(4): 382, 2003.

FLECKS, S.; PATALLO, E. P.; ZHU, X.; ERNYEI, A. J.; SEIFERT, G.; SCHNEIDER, A.; DONG, C.; NAISMITH, J. H. & VAN PÉE, K. H. "New insights into the mechanism of enzymatic chlorination of tryptophan". *Angewandte Chemie International Edition*, 47 (49): 9533, 2008.

FOX, E. M. & HOWLETT, B. J. "Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology". *Current Opinion in Microbiology*, 11 (6): 481, 2008.

FREDENHAGEN, A.; DERRIEN, C. & GASSMANN, E. "An MS/MS library on an ion-trap instrument for efficient dereplication of natural products. Different fragmentation patterns for $[M+ H]^+$ and $[M+ Na]^+$ ions". *Journal of Natural Products*, 68 (3): 385, 2005.

FREEMAN, E. M. "The seed-fungus of *Lolium temulentum*, L., the Darnel". *Philos. T. R. Soc. Lon. B.* **196**: 1, 1904.

FRISVAD, J. C., THRANE, U., SAMSON, R. A., & PITT, J. I. "Important mycotoxins and the fungi which produce them". IN: *Advances in Food Mycology* (Eds.) Springer US, 2006. p.3-31.

FRISVAD, J. C. "Media and growth conditions for induction of secondary metabolite production". IN: *Fungal Secondary Metabolism: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. KELLER, N.P.; TURNER, G. (Eds.). Humana Press, 2012. p. 47-58.

FRISVAD, J. C.; YILMAZ, N.; THRANE, U., RASMUSSEN; K. B., HOUBRAKEN, J. & SAMSON, R. A. "Talaromyces atroseus, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments". *PloS One*, 8(12): 1, 2013.

FUNARI, C. S.; EUGSTER, P. J.; MARTEL, S.; CARRUPT, P. A.; WOLFENDER, J. L. & SILVA, D. H. S. "High resolution ultra high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species". *Journal of Chromatography A*, **1259**: 167, 2012.

GENILLOUD, O.; GONZÁLEZ, I.; SALAZAR, O.; MARTÍN, J., TORMO, J. R. & VICENTE, F. "Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **38** (3): 375. 2011.

GERHAUSER, C. "Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components". *Planta Medica* **74**: 1608, 2008.

GERKE, J.; BAYRAM, Ö.; FEUSSNER, K.; LANDESFEIND, M.; SHELEST, E.; FEUSSNER, I. & BRAUS, G. H. "Breaking the silence: protein stabilization uncovers silenced biosynthetic gene clusters in the fungus *Aspergillus nidulans*". *Applied and Environmental Microbiology*, **78** (23): 8234, 2012.

GmbH, B. D. In *dataanalysis 4.0 - User manual*; Bremen, 2009 p. 139-196.

GONÇALVES, J. S.; AMARO, A. A.; MAIA, M. L. & SOUZA, S. A. M. "Produção, mercado e inserção Internacional da maçã brasileira". *Agricultura em São Paulo*, **43**(1): 95, 1996.

GRIBBLE, G. W. "Structure and biosynthesis of halogenated alkaloids". IN: *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology*. FATTORUSSO, E. & TAGLIALATELA-SCAFAT, O. (Eds.) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. 2008, p.591-618.

GROSS, H. "Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **75** (2): 267, 2007.

GROSS, M.; CURTUI, V.; ACKERMANN, Y.; LATIF, H. & USLEBER, E. "Enzyme immunoassay for tenuazonic acid in apple and tomato products". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59** (23): 12317, 2011.

GUNATILAKA, A. L. "Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence". *Journal of Natural Products*, **69** (3): 509, 2006.

GUTIÉRREZ, R. M. P.; MITCHELL, S. & SOLIS, R. V. "Psidium guajava: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology". *Journal of Ethnopharmacology* **117**: 1, 2008.

HADDADDERAFSHI, N.; HALÁSZ, K.; PÓSA, T.; PÉTER, G.; HROTKÓ, K.; GÁSPÁR, L. & LUKÁCS, N. "Diversity of endophytic fungi isolated from cherry (*Prunus avium*)". *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, **15** (2): 1, 2011.

HALABALAKI, M.; VOUGOGIANNPOULOU, K. MIKROS, E. & SKALTSOUNIS, A. L. "Recent advances and new strategies in the NMR-based identification of natural products". *Current Opinion in Biotechnology*, **25**: 1, 2014.

HAMMERSCHMIDT, L.; WRAY, V.; LIN, W.; KAMILOVA, E.; PROKSCH, P. & ALY, A. H. "New styrylpyrones from the fungal endophyte *Penicillium glabrum* isolated from *Punica granatum*". *Phytochemistry Letters*, 5 (3): 600, 2012.

HARVEY, A. "Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products". *Drug Discov. Today*, 5(7): 294, 2000.

HAWKSWORTH, D. L. "Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate?". *Biodiversity and conservation*, 21 (9): 2425, 2012.

HOFFMEISTER, D. & KELLER, N. P. "Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation". *Nat. Prod. Rep.*, 24 (2): 393, 2007.

HORAI, H.; ARITA, M.; KANAYA, S.; NIHEI, Y.; IKEDA, T.; SUWA, K. & NISHIOKA, T. "MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences". *Journal of Mass Spectrometry*, 45 (7): 703, 2010.

HUANG, W. Y.; CAI, Y. Z.; HYDE, K. D.; CORKE, H. & SUN, M. "Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants". *Fungal Diversity*, **33**: 61, 2008.

HUDSON, J. B.; IMPERIAL, V.; HAUGLAND, R. P. & DIWU, Z. "Antiviral activities of photoactive perylenequinones". *Photochemistry and Photobiology*, 65 (2): 352, 1997.

IÓCA, L. P.; ALLARD, P-M. & BERLINCK, R. G. S. "Thinking big about small beings – the (yet) underdeveloped microbial natural products chemistry in Brazil". *Natural Product Reports*, 31 (5): 646, 2014.

IPSEN, J.; FUSKA, J.; FOSKOVA, A. & ROSAZZA, J. P. "Microbial transformations of natural antitumor agents. 21. Conversions of aphidicolin." *The Journal of Organic Chemistry*, 47(17), 3278. 1982.

ITO, T.; ODAKE, T.; KATOH, H.; YAMAGUCHI, Y. & AOKI, M. "High-throughput profiling of microbial extracts". *Journal of Natural Products*, 74 (5): 983, 2011.

JAY, J. M. "Microbiologia de Alimentos", 6^a ed. (Eds.) Artmed, Porto Alegre. 2005, p. 19.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RINCÓN, M.; PULIDO, R. & SAURA-CALIXTO, F. "Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11): 5489, 2001.

KAMMERER, J.; BOSCHET, J.; KAMMERER, D. R. & CARLE, R. "Enrichment and fractionation of major apple flavonoids, phenolic acids and dihydrochalcones using anion exchange resins". *LWT-Food Science and Technology*, 44 (4), 1079, 2011.

KAVINO, M.; HARISH, S.; KUMAR, N.; SARAVANAKUMAR, D.; DAMODARAN, T.; SOORIANATHASUNDARAM, K. & SAMIYAPPAN, R. "Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus". *Soil Biology and Biochemistry*, 39 (5): 1087, 2007.

KARLSHØJ, K.; NIELSEN, P. V. & LARSEN, T. O. "Prediction of *Penicillium expansum* spoilage and patulin concentration in apples used for apple juice production by electronic nose analysis". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (11): 4289, 2007.

KEITH, L. M.; VELASQUEZ, M. E. & ZEE, F. T. "Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii". *Plant Disease*, 90 (1): 16, 2006.

KELLER, N. P.; TURNER, G. & BENNETT, J. W. "Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics". *Nature Reviews Microbiology*, 3 (12): 937, 2005.

KEMPKEN, F. & ROHLFS, M. "Fungal secondary metabolite biosynthesis—a chemical defence strategy against antagonistic animals?". *Fungal Ecology*, 3 (3):107, 2010.

KILDGAARD, S.; MANSSON, M.; DOSEN, I.; KLITGAARD, A.; FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O. & NIELSEN, K. F. "Accurate Dereplication of Bioactive Secondary Metabolites from Marine-Derived Fungi by UHPLC-DAD-QTOFMS and a MS/HRMS Library". *Marine Drugs*, 12 (6): 3681, 2014.

KIND, T. & FIEHN, O. "Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry". *Bioanalytical Reviews*, 2 (1): 23, 2010.

KNIGHT, V.; SANGLIER, J. J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D. & ZHANG, L. "Diversifying Microbial Natural Products for Drug Discovery". *Appl Microbiol Biotechnol*, 62(5-6): 446, 2003.

KOIKE, S. T.; KIRKPATRICK, S. C. & GORDON, T. R. "Fusarium wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum* in California". *Plant Disease*, 93 (10): 1077, 2009.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P. & HÜCKELHOVEN, R. "Endophyte or parasite—what decides?". *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4): 358, 2006.

KUSARI, S.; HERTWECK, C. & SPITELLER, M. "Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites". *Chemistry & biology*, 19 (7): 792, 2012.

KUSARI, S. & SPITELLER, M. "Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities". IN *Metabolomics*, ROESSNER U. (Eds). Rijeka, Croatia, InTech, p. 241-266. 2012.

KUSARI, S.; PANDEY, S. P. & SPITELLER, M. "Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites". *Phytochemistry*, 91: 81, 2013.

KUSARI, S., SINGH, S. & JAYABASKARAN, C. "Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype". Trends in Biotechnology, 32 (6): 297, 2014.

KRISHNAN, P.; BHAT, R.; KUSH, A. & RAVIKUMAR, P. "Isolation and functional characterization of bacterial endophytes from *Carica papaya* fruits". Journal of Applied Microbiology, 113 (2): 308, 2012.

LARSEN, T. O.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, K. F.; HANSEN, M. E. & FRISVAD, J. C. "Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery". Natural Product Reports, 22 (6): 672, 2005.

LIRAS, S.; LYNCH, C. L.; FRYER, A. M.; VU, B. T. & MARTIN, S. F. "Applications of vinylogous mannich reactions. Total syntheses of the ergot alkaloids rugulovasines A and B and setoclavine". Journal of the American Chemical Society, 123 (25), 5918, 2001.

LUCCI, P., PACETTI, D., NÚÑEZ, O., & FREGA, N. G. (2012). "Current trends in sample treatment techniques for environmental and food analysis". IN: Chromatography—the most versatile method of chemical analysis, Cap5, 127.

MAGNANI, R. F.; DE SOUZA, G. D. & RODRIGUES-FILHO, E. "Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether on flavedo and albedo tissues of tangerines (*Citrus reticulata*) with symptoms of *Alternaria* brown spot". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (13): 4980, 2007.

MÅNSSON, M. Discovery of Bioactive Natural Products from Marine Bacteria. Lyngby, Center for Microbial Biotechnology- DTU Systems Biology, 2011. PhD Thesis, 48.

MARINHO, A. M.; RODRIGUES-FILHO, E.; MOITINHO, M. D. L. R. & SANTOS, L. S. "Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*". Journal of the Brazilian Chemical Society, 16 (2): 280, 2005.

MARINHO, A. M.; MARINHO, P. S. B. & RODRIGUES FILHO, E. "Esteroides produzidos por *Penicillium herquei*, um fungo endofítico isolado dos frutos de *Melia azedarach* (*Meliaceae*)". Quimica Nova, 32 (7): 1710, 2009.

MARTÍN, J. F.; CASQUEIRO, J. & LIRAS, P. "Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication". Current Opinion in Microbiology, 8(3): 282, 2005.

MARWAH, R. G. & FATOPE, M. O. "Musanol: A New Aureonitol-Related Metabolite from a *Chaetomium* sp.". Tetrahedron, 63, 8174, 2007.

MIAO, L.; KWONG, T. F. & QIAN, P. Y. "Effect of Culture Conditions on Mycelial Growth, Antibacterial Activity, and Metabolite Profiles of the Marine-Derived Fungus *Arthrinium c.f. saccharicola*". Applied Microbiology and Biotechnology, 72 (5): 1063, 2006.

- MISSURA, L.C.; “Maçã”. *Hortifruti Brasil*- CEPEA- USP/ESALQ, p.99, março 2011.
- MOUSA, W. K. & RAIZADA, M. N. “The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective”. *Frontiers in Microbiology*, 4 (65): 1, 2013.
- MOLINA, G. & PASTORE, G. M. “Biotransformation of Monoterpenes by Endophytes Isolated From Brazilian Fruits”. *International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental Engineering*, **50**: 59, 2013.
- MOSS, M. O. “Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables”. *Journal of Applied Microbiology*, 104 (5): 1239, 2008.
- MULROONEY, C. A.; O'BRIEN, E. M.; MORGAN, B. J. & KOZLOWSKI, M. C. “Perylenequinones: isolation, synthesis, and biological activity”. *European Journal of Organic Chemistry*, 2012 (21): 3887, 2012.
- MURRAY, K. K.; BOYD, R. K.; EBERLIN, M. N.; LANGLEY, G. J.; LI, L. & NAITO, Y. “Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC recommendations 2013)”. *Pure and Applied Chemistry*, 85 (7): 1515, 2013.
- NIELSEN, J. “The role of metabolic engineering in the production of secondary metabolites”. *Current Opinion in Microbiology*, 1 (3): 330, 1998.
- NIELSEN, K. F. & SMEDSGAARD, J. “Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology”. *Journal of Chromatography A*, 1002 (1): 111, 2003.
- NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T. O.; LUND, F.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C. & ARORA, D. K. “Chemical identification of fungi: metabolite profiling and metabolomics”. *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*, 19, 2004.
- NIELSEN, K. F.; GRÄFENHAN, T.; ZAFARI, D. & THRANE, U. “Trichothecene production by *Trichoderma brevicompactum*”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (21): 8190, 2005.
- NIELSEN, K. F.; MÅNSSON, M.; RANK, C.; FRISVAD, J. C. & LARSEN, T. O. “Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS”. *Journal of Natural Products*, 74 (11): 2338, 2011.
- OSBOURN, A. “Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation”. *Trends in Genetics*, 26 (10): 449, 2010.
- OUEDRAOGO, J. P.; LAGENDIJK, E. L.; VAN DEN HONDEL, C. A.; RAM, A. F. & MEYER, V. (2013). IN: *Screening for Compounds Exerting Antifungal Activities. In Laboratory Protocols in Fungal Biology* (225-230). Springer New York.

PANCHER, M.; CEOL, M.; CORNEO, P. E.; LONGA, C. M. O.; YOUSAF, S.; PERTOT, I. & CAMPISANO, A. "Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera* L.) respond to crop management". *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (12): 4308, 2012.

PANDEY, R. R.; ARORA, D. K. & DUBEY, R. C. "Antagonistic interactions between fungal pathogens and phylloplane fungi of guava". *Mycopathologia*, 124 (1): 31, 1993.

PARTIDA-MARTÍNEZ, L. P. & HEIL, M. "The microbe-free plant: fact or artifact?". *Frontiers in Plant Science*, 2 (100): 1, 2011.

PAYÁ, P.; ANASTASSIADES, M.; MACK, D.; SIGALOVA, I.; TASDELEN, B., OLIVA, J. & BARBA, A. "Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection". *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389 (6), 1697, 2007.

PHUKON, M.; SAHU, P.; SRINATH, R.; NITHYA, A. & BABU, S. "Unusual occurrence of *Staphylococcus warneri* as endophyte in fresh fruits along with usual *Bacillus* spp". *Journal of Food Safety*, 33 (1): 102, 2013.

PETERSON, S. W. & JURJEVIĆ, Ž. "*Talaromyces columbinus* sp. nov., and Genealogical Concordance Analysis in *Talaromyces* Clade 2a". *PloS one*, 8 (10): e78084, 2013.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L. & VIRET, O. "Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi". *Natural Toxins*, 1 (3): 185, 1993.

PORRAS-ALFARO, A. & BAYMAN, P. "Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes". *Phytopathology*, 49 (1): 291, 2011.

PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E. H. C. & HYDE, K. D. "Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand". *Fungal Diversity*, 39: 89, 2009.

RACHID, S.; KRUG, D.; KUNZE, B., KOCHEMS, I.; SCHARFE, M.; ZABRISKIE, T. M.; BLÖCKER, H. & MÜLLER, R. "Molecular and biochemical studies of chondramide formation - highly cytotoxic natural products from *Chondromyces crocatus* Cm c5". *Chemistry & biology*, 13 (6), 667, 2006.

RAI, M. K.; ASTHANA, P.; JAISWAL, V. S. & JAISWAL, U. "Biotechnological advances in guava (*Psidium guajava* L.): recent developments and prospects for further research". *Trees*, 24 (1): 1, 2010.

RAINA, S.; ODELL, M. & KESHAVARZ, T. "*Quorum sensing* as a method for improving sclerotiorin production in *Penicillium sclerotiorum*". *Journal of Biotechnology*, 148 (2), 91-98, 2010.

RAFIQI, M.; ELLIS, J. G.; LUDOWICI, V. A.; HARDHAM, A. R., & DODDS, P. N. "Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant–fungal interactions". *Current Opinion in Plant Biology*, 15 (4): 477, 2012.

RAO, D. P. C.; AGRAWAL, S. C. & SAKSENA, S. B. "*Phomopsis destructum* on *Psidium guajava* fruits in India". *Mycologia*, 68 (5): 1132, 1976.

REBEK, J.; SHUE, Y. K. & TAI, D. F. "The rugulovasines: synthesis, structure and interconversions". "*The Journal of Organic Chemistry*", 49 (19): 3540, 1984.

RECH, S.; CARIO, S. A. F. & AUGUSTO, C. A. "Avaliação conjuntural da produção e comercialização da maçã em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul: aspectos comparativos". *Indicadores Econômicos FEE*, 42 (1): 81, 2014.

RIVERA-CHAVEZ, J.; GONZALEZ-ANDRADE, M.; GONZÁLEZ, M. D. C.; GLENN, A. E. & MATA, R. "Thielavins A, J and K: α -Glucosidase inhibitors from MEXU 27095, an endophytic fungus from *Hintonia latiflora*". *Phytochemistry*, **94**: 198, 2013.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE JR, J. F.; ARNOLD, A. E. & REDMAN, R. S. "Fungal endophytes: diversity and functional roles". *New Phytologist*, 182 (2): 314, 2009.

RODRIGUES-FILHO, E. IN: *Biocatálise e Biotransformação. Fundamentos e Aplicações*, vol. 1. MARSAIOLI, A. J.; PORTO, A. L. M. (Eds.) Schoba: Salto, 2010, p.194-249, 2010.

ROJAS, I. S.; LOTINA-HENNSEN, B. & MATA, R., 2000. "Effect of lichen metabolites on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts 1". *Journal of Natural Products*, 63: 1396, 2000.

ROJAS-CHERTO, M.; PEIRONCELY, J. E.; KASPER, P. T.; VAN DER HOOFT, J. J.; DE VOS, R. C.; VREEKEN, R. & REIJMERS, T. "Metabolite identification using automated comparison of high-resolution multistage mass spectral trees". *Analytical Chemistry*, 84 (13): 5524, 2012.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M. & FAETH, S. H. "Evolution of endophyte–plant symbioses". *Trends in Plant Science*, 9 (6): 275, 2004.

SAKEMI, S.; HIRAI, H.; ICHIBA, T.; INAGAKI, T.; KATO, Y.; KOJIMA, N.; NISHIDA, H., C.; PARKER, J. C.; SAITO, T., TONAI-KACHI; H., VOLKENBURG M.A.V., YOSHIKAWA, N. & KOJIMA, Y. "Thielavins as glucose-6-phosphatase (G6Pase) inhibitors: producing strain, fermentation, isolation, structural elucidation and biological activities. *Journal of Antibiotics*, 55: 94, 2002.

SAMSON, R. A.; YILMAZ, N.; HOUBRAKEN, J.; SPIERENBURG, H.; SEIFERT, K. A.; PETERSON, S. W.; VARGA, J. & FRISVAD, J. C. "Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology*, **70**: 159, 2011.

SARKER, S. D.; NAHAR, L. & KUMARASAMY, Y. "Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals". *Methods*, 42(4): 321, 2007.

SASHIDHARA, K. V. & ROSAIAH, J. N. "Various dereplication strategies using LC-MS for rapid natural product lead identification and drug discovery". *Natural Product Communications*, 2 (2): 193, 2007.

SHANK, E. A. & KOLTER, R. "New developments in microbial interspecies signaling". *Current Opinion in Microbiology*, 12 (2): 205, 2009.

SCHARDL, C. L.; PANACCIONE, D. G. & TUDZYNSKI, P. "Ergot alkaloids-biology and molecular biology. *Alkaloids*", 63: 45, 2006.

SCHENA, L.; NIGRO, F.; PENTIMONE, I.; LIGORIO, A. & IPPOLITO, A. "Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*". *Postharvest Biology and Technology*, 30 (3): 209, 2003.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A. K. & KROHN, K. "Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites". *Mycological Research*, 106 (9): 996, 2002.

SERDANI, M.; CROUS, P. W.; HOLZ, G. & PETRINI, O. "Endophytic fungi associated with core rot of apples in South Africa, with specific reference to *Alternaria* species". *South African Journal of Science*. 1: 257, 1998.

SHRESTHA, G. & CLAIR, L. L. S. "Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs". *Phytochemistry Reviews*, 12 (1): 229, 2013.

SHWETA, S.; GURUMURTHY, B. R.; RAVIKANTH, G.; RAMANAN, U. S. & SHIVANNA, M. B. "Endophytic fungi from *Miquelia dentata* Bedd., produce the anti-cancer alkaloid, camptothecine". *Phytomedicine*, 20(3): 337, 2013.

SMEDSGAARD, J., 1997. "Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures". *Journal of Chromatography A*, 760: 264, 1997.

SMEDSGAARD, J. & NIELSEN, J. "Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics". *Journal of Experimental Botany*, 56 (410): 273, 2005.

SMYTH, W. F.; SMYTH, T. J. P.; RAMACHANDRAN, V. N.; O'DONNELL, F. & BROOKS, P. "Dereplication of phytochemicals in plants by LC-ESI-MS and ESI-MS". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 33: 46, 2012.

SØRENSEN, J. L.; PHIPPS, R. K.; NIELSEN, K. F.; SCHROERS, H. J.; FRANK, J. & THRANE, U. "Analysis of *Fusarium avenaceum* metabolites produced during wet apple core rot". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (4): 1632, 2009.

STACK, M. E.; MAZZOLA, E. P.; PAGE, S. W., POHLAND; A. E., HIGHET, R. J.; TEMPESTA, M. S. & CORLEY, D. G. "Mutagenic perylenequinone metabolites of *Alternaria alternata*: altertoxins I, II, and III". *Journal of Natural Products*, 49 (5): 866, 1986.

STONE, P.; GLAUNER, T.; KUHLMANN, F.; SCHLABACH, T. & MILLER, K. "New dynamic MRM mode improves data quality and triple quad quantification in complex analyses". Agilent publication 2009.

SUDARMONO, P.; UTJI, R.; KARDONO, L. B. & KUMALA, S. "Cytotoxic assay of endophytic fungus 1.2.11 secondary metabolites from *Brucea javanica* (L) Merr towards cancer cell *in vitro*". Medical Journal of Indonesia, 15 (3): 137, 2006.

TAKAHASHI, J. A.; TELES, A. P. C.; BRACARENSE, A. D. A. P. & GOMES, D. C. "Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungi". Phytochemistry Reviews, 12 (4): 773, 2013.

TAN, R. X. & ZOU, W. X. "Endophytes: a rich source of functional metabolites". Natural Products Reports, 18 (4), 448, 2001.

TANG, A. M.; HYDE, K. D. & CORLETT, R. T. "Diversity of fungi on wild fruits in Hong Kong". Fungal Diversity, 14: 165, 2003.

TAYLOR, D. R. "Is there a rational basis for selection and/or design of chiral stationary phases for high performance liquid chromatography?". IN: Recent Advances in Chiral Separations. STEVENSON, D. & WILSON, I. D. (Eds.). Nova Iorque, Plenum Press, 1991. p. 5-14.

TOURNAS, V. H. & UPPAL MEMON, S. "Internal contamination and spoilage of harvested apples by patulin-producing and other toxigenic fungi". International Journal of Food Microbiology, 133(1): 206, 2009.

TREUTTER, D. "Significance of flavonoids in plant resistance: a review". Environmental Chemistry Letters, 4 (3), 147, 2006.

VAISHNAV, P., & DEMAIN, A. L. "Unexpected applications of secondary metabolites". Biotechnology Advances, 29 (2): 223, 2011.

VARGAS, F.; RIVAS, C.; ZOLTAN, T.; LÓPEZ, V.; ORTEGA, J.; IZZO, C.; PINEDA, M.; MEDINA, J. & ROSALES, L. "Antioxidant and scavenging activity of skyrin on free radical and some reactive oxygen species". Avances em Química, 3(1), 7, 2008.

VERMA, V. C.; GOND, S. K.; KUMAR, A., KHARWAR, R. N., BOULANGER, L. A. & STROBEL, G. A. "Endophytic fungal flora from roots and fruits of an Indian neem plant *Azadirachta indica* A. Juss., and impact of culture media on their isolation". Indian Journal of Microbiology, 51(4): 469, 2011.

VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, S.; ÅKESSON, M.; SMEDSGAARD, J. & NIELSEN, J. "Mass spectrometry in metabolome analysis". Mass Spectrometry Reviews, 24 (5): 613, 2005.

VINING, L. C. "Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity - a review". Gene, 115 (1): 135, 1992.

WANG, S.; XU, Y.; MAINE, E. A.; WIJERATNE, E. M.; ESPINOSA-ARTILES, P.; GUNATILAKA, A. A. & MOLNÁR, I. "Functional Characterization of the Biosynthesis of Radicol, an Hsp90 Inhibitor Resorcylic Acid Lactone from *Chaetomium chiversii*". *Chemistry & Biology*, 15 (12): 1328, 2008.

WANG, A.; ZHANG, F.; HUANG, L.; YIN, X.; LI, H.; WANG, Q.; ZENG, Z. & XIE, T. "New progress in biocatalysis and biotransformation of flavonoids". *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (10): 847, 2010.

WELKE, J. E. "Quantitative analysis of patulin in apple juice by thin-layer chromatography using a charge coupled device detector". *Food Additives and Contaminants*, 26 (5): 754, 2009.

WIEMANN, P. & KELLER, N. P. "Strategies for mining fungal natural products". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41 (2): 301, 2014.

WILLIAMS, D. H.; STONE, M. J.; HAUCK, P. R. & RAHMAN, S. K. "Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized?". *Journal of Natural Products*, 52 (6): 1189, 1989.

WOLFENDER, J. L.; MARTI, G. & FERREIRA QUEIROZ, E. "Advances in Techniques for Profiling Crude Extracts and for the Rapid Identification of Natural Products: Dereplication, Quality Control and Metabolomics". *Current Organic Chemistry*, 14 (16): 1808, 2010.

YAMAZAKI, H.; ŌMURA, S. & TOMODA, H. "6'-Hydroxy-3'-methoxy-mitorubrin, a new potentiator of antifungal miconazole activity, produced by *Penicillium radicum* FKI-3765-2". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58 (6), 829, 2010.

YEH, E.; GARNEAU, S. & WALSH, C. T. "Robust in vitro activity of RebF and RebH, a two-component reductase/halogenase, generating 7-chlorotryptophan during rebeccamycin biosynthesis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (11): 3960, 2005.

XING, M. Z.; ZHANG, X. Z.; SUN, Z. L. & ZHANG, H. Y. "Perylenequinones act as broad-spectrum fungicides by generating reactive oxygen species both in the dark and in the light". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (26): 7722, 2003.

XU, Y. J.; WANG, C.; HO, W. E. & ONG, C. N. "Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 56: 37, 2014.

ZAIN, M. E.; AWAAD, A. S.; AL-OTHMAN, M. R.; ALAFEEFY, A. M. & EL-MELIGY, R. M. "Biological activity of fungal secondary metabolites". *International Journal of Chemical and Applied Biological Sciences*, 1 (1): 14, 2014.

ZEHNER, S.; KOTZSCH, A.; BISTER, B.; SÜSSMUTH, R. D.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. & VAN PÉE, K. H. "A Regioselective Tryptophan 5-Halogenase Is Involved in Pyrroindomycin Biosynthesis in *Streptomyces rugosporus* LL-42D005". *Chemistry & Biology*, 12 (4): 445, 2005.

ZHANG, N. R.; YU, S.; TILLER, P.; YEH, S.; MAHAN, E. & EMARY, W. B. "Quantitation of small molecules using high-resolution accurate mass spectrometers—a different approach for analysis of biological samples". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23 (7), 1085, 2009.

ZHANG, Q.; WEI, X. & WANG, J. "Phillyrin produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus isolated from *Forsythia suspense*". *Fitoterapia*, 83(8): 1500, 2012.

ZHANG, Y. A.; LIU, Q.; WANG, C. & JIA, Y. "Total Synthesis of Rugulovasine A". *Organic Letters*, 15(14): 3662, 2013.

ZHOU, G. X.; MO, S. Y.; HE, H. X.; SHI, J. G.; YE, W. C.; LIU, Z. & JIANG, R. W. "Molecular structure and tautomerization of the 1: 1 complex of luteoskyrin and rugulosin". *Journal of Molecular Structure*, 979(1), 86, 2010.

ZHOU, H.; QIAO, K.; GAO, Z.; VEDERAS, J. C. & TANG, Y. "Insights into radicicol biosynthesis via heterologous synthesis of intermediates and analogs". *Journal of Biological Chemistry*, 285 (53): 41412, 2010.