

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

**“ESTUDOS METABOLÔMICOS E BIOSINTÉTICOS
VISANDO CONTRIBUIÇÕES PARA A QUÍMICA E
TAXONOMIA DE MICRO-ORGANISMOS DA FAMÍLIA
XYLARIACEAE”**

Luciana da Silva Amaral*

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 /CNPq**

**São Carlos - SP
2014**

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

A485em

Amaral, Luciana da Silva.

Estudos metabolômicos e biossintéticos visando contribuições para a química e taxonomia de microorganismos da família Xylariaceae / Luciana da Silva Amaral. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
209 f.

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

1. Química. 2. Fungo endofítico. 3. Citocalasinas. 4. Biossíntese. 5. Química microbiana. I. Título.

CDD: 540 (20^a)



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de Doutora em Ciências da candidata Luciana da Silva Amaral, realizada em 11/11/2014:

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
UFSCar

Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes
FFCLRP/USP

Profa. Dra. Maysa Furlan
UNESP

Profa. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre
UNESP

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

Curriculum resumido – Luciana da Silva Amaral

1. AMARAL, L. S.; MURGU, M.; RODRIGUES-FO, E.; SOUZA, A. Q. L. & SARQUIS, M. I. M. “A saponin tolerant and glycoside producer Xylariaceous fungus isolated from fruits of *Sapindus saponaria*”. World J. Microbiol. Biotechnol., **24**: 1341, 2008.
2. AMARAL, L.S. & RODRIGUES-FO, E. “Two novel eremophilane sesquiterpenes from an endophytic Xylariaceous fungus isolated from leaves of *Cupressus lusitanica*”. J. Braz. Chem. Soc., **21**: 1446, 2010.
3. SANTOS-Fo, F. C.; AMARAL, L. S. & RODRIGUES-Fo, E. “Composition of essential oils from *Cupressus lusitanica* and a Xylariaceous fungus found on its leaves”. Biochem. Syst. Ecol., **39**: 485, 2011.
4. AMARAL, L. S.; RODRIGUES-Fo, E.; SANTOS, A. C. A.; ABREU, L. M. & PFENNING, L. H. “An HPLC evaluation of cytochalasin D biosynthesis by *Xylaria arbuscula* cultivated in different media”. Nat. Prod. Com., **9**: 1279, 2014.
5. AMARAL, L. S. & RODRIGUES-Fo, E. “Aryl carboxylic acid reduction and further reactions with GABA and glucose promoted by whole cells of *Xylaria arbuscula*” - submetido ao *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*
6. KUBO, A. M. GORUP, L. F. CAMARGO, E. R. TOFFANO, L. LEITE, E. R. LONGO, E. AMARAL, L.S. RODRIGUES-FO, E. MOHAN, H. AROCA, R. Gold and silver nanoparticles assemblies obtained using living biotemplates with potential use for SERS substrates – submetido à *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*
7. KUBO, A. M.; GORUP, L. F.; AMARAL, L. S.; RODRIGUES-FILHO, E. & CAMARGO, E. “Multilayers of self-assembled noble-metal nanoparticles in biotemplates” submetido à revista *Chemical Communications*.
8. AMARAL, L. S.; SANTOS, A. C. A.; FILL, T. P.; SANTOS, L. F. A. & RODRIGUES-FO, E. “De novo biosynthesis of ¹³C and ¹⁵N labeled cytochalasin produced by *Xylaria arbuscula*” - em redação para ser submetido ao *J. Mass Spectrometry*.
9. AMARAL, L. S.; RODRIGUES-Fo, E.; MARCHETTI-DESCHMANN, M. & ALLMAIER, G. “Optimization of sample preparation for MALDI TOF MS of *Xylariaceae* fungi”- em redação para ser subemtido ao *J. Mass Spectrometry*.
10. AMARAL, L.S. RODRIGUES-Fo, E. Cyclodepsipeptides produced by *Xylaria arbuscula*, eremophilane sesquiterpenes and cyclic peptide produced by *Nemania aff. primolutea*, endophytic fungi isolated from *Cupressus lusitanica* – em redação.

Aos meus pais, Arnaldo e Maria
Helena, pelo amor, dedicação e apoio
durante todas as etapas de minha vida.

Amo vocês!

Agradecimentos

A Deus por simplesmente tudo.

Ao professor Dr. Edson Rodrigues Filho pela orientação, ensinamentos, amizade e pelos 10 anos de convivência!

Aos meus pais, Arnaldo e Maria Helena, aos meus irmãos Reginaldo e Juliana e aos meus sobrinhos Bruno, Isis, Danilo, Amanda e Enzo por ser a melhor parte do meu viver!

Ao meu marido Fabio, pelo amor, carinho, dedicação e paciência. Amo você!

A banca examinadora, Profas. Dras. Cintia F. D. Milagre, Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Maysa Furlan e Maria da Conceição Ferreira de Oliveira e aos Profs. Drs. Luiz Alberto Beraldo de Moraes e Tiago Venâncio pelo aceite e pelas valiosas sugestões.

Ao prof. Dr. Günter Allmaier pela orientação e aprendizado durante o estágio na Universidade de Tecnologia de Viena e todo o seu grupo de pesquisa.

Ao corpo técnico do Departamento de Química, em especial a Luciana Vizotto.

Ao prof. Dr. Ludwig Heinrich Pfenning e ao Dr. Lucas Magalhães Abreu pela identificação dos micro-organismos;

A família LaBioMMi; Alef, Felipe, Zia, Zé, Yaíma, Diana, Thieres, Tati, Marília, Rodrigo, Diego, Gabriel, Enzo, Carol roxa, pelo companheirismo, amizade e valiosas sugestões e tantos outros alunos que passaram pelo grupo.

Um agradecimento especial ao Douglas e a Carol por terem contribuído diretamente no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos que encontrei em Viena, Tati, Pauli, Uschi, Schule, Sra. Rita, Lylian e família, Pabline, und die best Deutschkurse Kollegen pela ótima convivência.

Às minhas irmãzinhas de jornada, Taícia e Lívia, por estes 10 anos de amizade, companheirismo, divagações, discussões científicas, etc....

A Dra Kenia Vanzoline e a prof. Dra Quezia Cass pelos ensaios de inibição da acetilcolinaesterase.

Ao Luiz Fernando Arruda Santos e a Bruker do Brasil pela atenção e pela cordial ajuda nas análises com marcadores isotópicos.

Ao Michael Murgo e a Waters do Brasil pela solicitude nas análises de HRMS da coleção de fungos Xylariaceae.

Ao programa de Pós-graduação em Química da UFSCar.

Aos órgãos de fomento pelo apoio financeiro.

Ao CNPq pela bolsa concedida no período de 2009-2013.

A FAPESP pela bolsa concedida (processo 2013/18603-3) no período de 2013-2014.

Danke schön!!!

Lista de Abreviaturas

<i>OSMAC</i>	<i>One Strain Many Compounds</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>J</i>	Constante de acoplamento em Hertz
COSY	Correlated Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
δ	Deslocamento químico em ppm
MS	Mass Spectrometry
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
SRM	Selected Reaction Monitoring
Q-TOF	Quadrupole-Time of Flight
ESI+	<i>Eletrospray</i> modo positivo
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
eV	Eletronvolt
UHPLC-HRMS	Ultra High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry
UPLC-MS	Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LC-UV-MS	High Performance Liquid Chromatography - diode array UV - Mass Spectrometry
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight
ICMS	Intact Cell Mass Spectrometry
CHCA	α -ciano-4-hidroxi ácido benzóico
DHB	2,5 dihidroxi ácido benzóico
FA	Ácido ferúlico
SA	Ácido Sinapínico
TFA	Ácido trifluoroacético
ODS	Octadecilsilano

Lista de Tabelas

TABELA 3.1 - Composição do meio Czapek modificado (1,0 L) e aminoácidos empregados no estudo de aditivos nitrogenados frente ao metabolismo do fungo NICK5.....	36
TABELA 3.2 - Condições empregadas nas análises por LC-UV-MS (ESI+)....	37
TABELA 3.3 - Substratos N-halogenados.....	38
TABELA 3.4 - Eluição gradiente utilizada na separação da fração LSA_apBrb	40
TABELA 3.5 - Condições empregadas nas análises por UHPLC/MS (ESI+) ...	42
TABELA 3.6 - Eluição gradiente utilizada na separação das frações MCL5_pAfDA e MCL5_pAfA.....	44
TABELA 3.7 - Concentração de matrizes avaliadas na análise por MALDI-TOF MS de espécies de <i>Xylaria</i>	48
TABELA 3.8 - Protocolos de preparo de amostra fúngica avaliados na análise por MALDI-TOF MS.....	49
TABELA 3.9 - Condições empregadas nas análises por UPLC/MS (ESI+).....	52
TABELA 4. 1- Dados de RMN da citocalasina da 4-hidroximetil citocalasina C	72
TABELA 4.2 - Dados de RMN de acpBrb11 (metanol).....	83
TABELA 4.3 - Dados de RMN de LSA_apBrb40 (400 MHz, CDCl ₃).....	87
TABELA 4.4 - Dados de RMN do composto presente na fração LSA_apBrb793	
TABELA 4.5 - Massas acuradas dos íons produtos dos produtos de biotransformação bromados e clorados.....	95
TABELA 4.6 - Influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de citocalasina D	102
TABELA 4.7 - Dados de RMN obtidos para a fração MCL5_pAfDA_13	121
TABELA 4.8 - Dados espectroscópicos de MCL3_pAfD_13.....	142
TABELA 4.9 - Identificação dos micro-organismos pertencentes a coleção de fungos da família Xylariaceae.....	176
TABELA 4.10 - Coleção de Xylariaceae e respectiva identificação.....	178

Lista de Figuras

FIGURA 1.1 - (A) <i>Xylaria telfairii</i> (STADLER et al., 2008) (B) <i>Xylaria grammica</i> (C) <i>Xylaria badia</i> (CHEN et al., 2013), (D) <i>Xylaria feejeensis</i> (BARABAN et al., 2013), (E) <i>Xylaria sp.</i> (CAI et al., 2013), (F) <i>Xylaria atrodivaricata</i> (JU e HSIEH, 2007), (G) <i>Xylaria plebeja</i> (RUKACHAISIRIKUL et al., 2013), (H) <i>Xylaria schweinitzii</i> (OKANE et al., 2008), (I) <i>Xylaria hypoxylon</i> (PERŠOH et al., 2009), (J) <i>Xylaria cinerea</i> , (K) <i>Xylaria karticola</i> , (L) <i>Xylaria vasconica</i> (FOURNIER et al., 2011)	2
FIGURA 1.2 - Fungos endofíticos NICL3 e NICL5 isolados de <i>Cupressus lusitanica</i>	3
FIGURA 1.3 - Estruturas químicas de terpenóides produzidos por espécies de <i>Xylaria</i> : 1-6: sesquiterpenos eremofilanos, 7-12: diterpenos, 13-16: triterpenos.	6
FIGURA 1.4 - Exemplo de algumas estruturas químicas de compostos aromáticos produzidos por <i>Xylaria</i>	11
FIGURA 1.5 - Estruturas químicas de peptídeos produzidos por <i>Xylaria</i>	11
FIGURA 1.6 - Estruturas químicas de policetídeos produzidos por <i>Xylaria cubensis</i> , <i>Xylaria berteri</i> , <i>Xylaria multiplex</i> e <i>Xylaria grammica</i>	12
FIGURA 1.7 - Estruturas químicas das citocalasinas A e B produzidas por <i>Phoma S298</i> e <i>Helminthosporium dematiodeum</i>	13
FIGURA 1.8 - Exemplo de estruturas químicas das classes de citocalasinas	14
FIGURA 1.9- Exemplo de citocalasinas estruturalmente incomuns.....	15
FIGURA 1.10 - Proposta da rota biossintética das citocalasinas E e K	19
FIGURA 1.11 - Citocalasinas produzidas por espécies de <i>Xylaria</i>	20
Figura 1.12 - Metabólitos secundários obtidos através da abordagem OSMAC 25	
FIGURA 1.13 - Representações esquemática da análise por MALDI-TOF (Adaptado de CLARK et al., 2013)	26
FIGURA 1.14 - Matrizes comumente utilizadas em análises de biomoléculas	27
FIGURA 3.1- Fluxograma representativo das etapas de pré-purificação e isolamento dos compostos produzidos em meio de cultura Czapek suplementado com NH ₄ Br	39
FIGURA 3.2 - Fluxograma das etapas de extração, análise e purificação dos compostos de interesse presentes no extrato LSA_apBrb	40
FIGURA 3.3 Cromatograma a 220 nm da fração LSA_apBrb representativo do isolamento dos compostos presentes nas frações 7, 11, 16 e 40.....	41

FIGURA 3.4 - Fluxograma das etapas de extração, pré-purificação e isolamento dos compostos de interesse presentes no extrato MCL3_pAfDA	44
FIGURA 3.5 - Fluxograma das etapas de extração, pré-purificação e isolamento dos compostos de interesse presentes no extrato MCL5_pAfDA e MCL5_pAfA	45
FIGURA 3.6 - Cromatograma a 210 e 220 nm da fração MCL5_pAfDA	45
FIGURA 3.7 - Cromatograma a 210 e 220 nm da fração MCL5_pAfA	45
FIGURA 3.8 - Técnicas de co-cristalização matriz/amostra	48
FIGURA 3.9 - Representação do processo de micro-extração dos metabólitos secundários e análise por UPLC-MS	52
FIGURA 4.1 - Citocalasinas C, D e Q produzidas por N1CL5, xylarina produzida por <i>X. sp.</i> PSU-F100 e penocalasina B2 produzida por <i>X. euglossa</i> .	53
FIGURA 4.2 - Cromatograma a 220 nm dos extratos correspondentes aos meios Czapek suplementados com: (A) extrato de levedura, (B) alanina, (C) ácido glutâmico, (D) glicina, (E) fenilalanina, (F) leucina, (G) prolina, (H) serina, (I) tirosina e (J) triptofano	55
FIGURA 4.3 - Cromatograma a 220 nm dos extratos correspondentes aos meios Czapek suplementados com (A) extrato de levedura, (B) <i>p</i> -bromo fenilalanina e (C) Czapek <i>p</i> -cloro fenilalanina	57
FIGURA 4.4 - Espectros de massas <i>full scan</i> , dos compostos presentes nas bandas: (A) 10,08 min, (B) 19,52 min e (C) 25,47 min.....	58
FIGURA 4.5 - Espectros de íons produtos de: (A) <i>m/z</i> 286 - 10,08 min, (B) <i>m/z</i> 328 - 19,52 min e (C) <i>m/z</i> 458 - 25,47 min.....	58
FIGURA 4.6 - Estrutura química proposta para o composto em 10,08 min	59
FIGURA 4.7 Proposta de fragmentação de <i>m/z</i> 286	60
FIGURA 4.8 - Cromatograma de íon extraídos <i>m/z</i> 508 referente as citocalasinas D, C e Q.....	61
FIGURA 4.9 - Adição de precursor halogenados ao meio de cultivo de <i>C. globosum</i> e consequente produção de chaetoglobosinas halogenas (Adaptado de GE et al., 2011).....	61
FIGURA 4.10 - Cromatograma a 220 nm dos extratos dos meios Czapek: (A) extrato de levedura, (B) NH ₄ Br e (C) NH ₄ Cl.....	62
FIGURA 4.11 - Espectros de massas <i>full scan</i> dos novos metabólitos produzidos por N1CL5 mediante o uso de NH ₄ Br como fonte de nitrogênio.....	63
FIGURA 4.12 - Espectro de íons produtos de <i>m/z</i> 508 referente a citocalasina D obtidos com 15 eV.....	64
FIGURA 4.13 - Proposta de fragmentação de <i>m/z</i> 508 - citocalasina D	64

FIGURA 4.14 - Espectro de íons produtos de m/z : (A) 538, (586, (C) 604 e (D) 618 obtidos com energia de colisão de 15 eV.....	65
FIGURA 4.15 - Representação esquemática da produção de HOX no sítio ativo da enzima halogenase dependente de flavina (Adaptado de DONG, et al., 2005 e YEH, et al., 2007).....	66
FIGURA 4.16 Espectro de massas de alta resolução do composto presente na fração LSA_CL5_NH ₄ Br_C13	67
FIGURA 4.17 - Estruturas químicas das citocalasinas C, D e Q divididas em três porções.....	67
FIGURA 4.18 - Espectro de RMN de hidrogênio da fração LSA_NH ₄ Br-C13 (MeOH, 600MHz).....	68
FIGURA 4.19 - Espectro de COSY da fração LSA_NH ₄ Br_C13.....	69
FIGURA 4.20 - Espectro de HSQC da fração LSA_NH ₄ Br_C13.....	69
FIGURA 4.21 - Espectro de HMBC da fração LSA_NH ₄ Br_C13 (MeOH).....	70
FIGURA 4.22 - Estrutura química proposta para a substância presente na fração LSA_CL5_NH ₄ Br_C13 com base nas principais correlações observadas no COSY e HMBC.....	70
FIGURA 4.23 - Proposta de fragmentação para m/z 538	71
FIGURA 4.24 - Estrutura química da 4-hidroximetil citocalasina C	73
FIGURA 4.25 - Cromatogramas em 220 nm dos extratos fúngicos provenientes dos meios de cultura (A) Czapek, (B) Czapek suplementado com ácido <i>p</i> -Br benzoico - LSA_P_apBrb, (C) Czapek suplementado com ácido <i>p</i> -Br benzoico - LSA_M_apBrb	75
FIGURA 4.26 - Espectros de massas <i>full scan</i> dos compostos produzidos devido à influência de ácido <i>p</i> -Br benzoico no meio de cultivo de NICL5.....	75
FIGURA 4.27 - Espectro de RMN de hidrogênio em clorofórmio da fração apBrb16 (600 MHz)	76
FIGURA 4.28 - Estrutura química do álcool <i>p</i> -bromo benzílico produzido por NICL5 devido a redução do ácido <i>p</i> -Br benzoico.....	77
FIGURA 4.29 - (A) Espectro de massas de alta resolução do álcool <i>p</i> -bromo benzílico. (B) Desidratação do álcool <i>p</i> -bromo benzílico e consequente formação do íon tropílio bromado.....	77
FIGURA 4.30 - Ciclo catalítico da redução do ácido benzoico ao álcool correspondente (Adaptado de VENKITASUBRAMANIAN et al., 2007).....	79
FIGURA 4.31 - Espectro de RMN de hidrogênio em metanol de apBrb11	80
FIGURA 4.32 - Espectro de COSY de LSA_apBrb11 em metanol.....	80
FIGURA 4.33 - Espectro de HMBC de LSA_apBrb11.....	81
FIGURA 4.34 - Espectro de massas, <i>full scan</i> , de LSA_apBrb11	81

FIGURA 4.35 - Estrutura química proposta para LSA_apBrb11	81
FIGURA 4.36 - Espectro de íons produtos de m/z 286,0089.....	82
FIGURA 4.37 - Proposta de fragmentação do composto presente na fração LSA_apBrb11.....	83
FIGURA 4.38 - Conjugação de aminoácido com ácido <i>p</i> -bromo benzoico (Adaptado de DARNELL E WEIDOLF, 2013).....	84
FIGURA 4.39 - Espectro de massas <i>full scan</i> da amostra LSA_apBrb40.....	85
FIGURA 4.40 - Espectro de RMN de hidrogênio da substância contida na fração LSA_apBrB40 (CDCl ₃ , 400 MHz)	85
FIGURA 4.41 - Espectro de COSY da substância contida na fração LSA_apBrB40 (CDCl ₃).....	86
FIGURA 4.42 - Espectro de HMBC da substância contida na fração LSA_apBrB40 (CDCl ₃).....	86
FIGURA 4.43 - Estrutura proposta para a substância presente na fração apBrb40	87
FIGURA 4.44 - Espectro de íons produtos com energia de colisão de 10 eV....	88
FIGURA 4.45 - Proposta de fragmentação de m/z 453,9637.....	88
FIGURA 4.46 - Espectro de massas <i>full scan</i> do composto presente na fração LSA_apBrb7.....	89
FIGURA 4.47 - Espectro de RMN de hidrogênio da fração LSA_apBrb7	90
FIGURA 4.48 - Espectro de RMN ¹³ C da fração LSA_apBrb7	91
FIGURA 4.49 - Espectro de COSY da fração LSA_apBrb7 (MeOH).....	91
FIGURA 4.50 - Espectro de HMBC da fração apBrb7 (MeOH)	92
FIGURA 4.51- Estrutura química proposta para o composto presente na fração LSA_apBrb7.....	92
FIGURA 4.52 - Espectros de massas <i>full scan</i> dos produtos de biotransformação derivados do substratos ácido <i>p</i> -cloro benzoico	95
FIGURA 4.53 - Espectro de massas <i>full scan</i> do álcool <i>p</i> -nitro benzílico	96
FIGURA 4.54 - Produtos de biotransformação promovidos por NiCl ₅ frente a ácidos benzoicos <i>p</i> -substituídos	97
FIGURA 4.55 - Curvas de calibração externa para a citocalasina D:	98
FIGURA 4.56 - Influência das fontes de C frente a produção de citocalasina D99	
FIGURA 4.57 - Estrutura química da celobiose, maltose e sacarose	100
FIGURA 4.58 - Influência das fontes de N frente a produção de citocalasina D	102
FIGURA 4.59 - Espectro de massas <i>full scan</i> referente à citocalasina D nos meios de cultura Czapek suplementado com (A) NaNO ₃ - controle, (B) Na ¹⁵ NO ₃ , (C) ¹⁵ NH ₄ Cl e (D) ¹⁵ N-glicina	104

FIGURA 4.60 - Espectro de íons produtos de m/z 508 (A) e de m/z 509 - meio de cultura suplementado com (B) $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$, (C) $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e (D) $^{15}\text{-N}$ glicina ...	105
FIGURA 4.61 - Espectro de massas <i>full scan</i> referente à citocalasina D em extrato oriundo do meio de cultura Czapek suplementado com: (A) fenilalanina, (B) $1\text{-}^{13}\text{C}$ fenilalanina e (C) $2\text{-}^{13}\text{C}$ fenilalanina	106
FIGURA 4.62 - Espectro de íons produtos de m/z 509 - meio de cultura suplementado com (A) $1\text{-}^{13}\text{C}$ fenilalanina e (B) $2\text{-}^{13}\text{C}$ fenilalanina.....	107
FIGURA 4.63 - Mecanismo de fragmentação de m/z 509 evidenciando a perda do carbono marcado proveniente da $1\text{-}^{13}\text{C}$ fenilalanina.....	107
FIGURA 4. 64 - Representação da via catabólica dos aminoácidos glicina e alanina (Adaptado de NELSON & COX, 5ª ed).....	109
FIGURA 4.65 - Proposta hipotética da biossíntese da fenilalanina a partir do fosfoenolpiruvato (oriundo da $2\text{-}^{13}\text{C}$ glicina e $3\text{-}^{13}\text{C}$ alanina) e eritrose 4-fosfato. (*) Processo biossintético dependente das enzimas: (1) 2-ceto-3-dexosi D-arabinoeptulose 7-fosfato sintase, (2) desidroquinato sintase, (3) 3-desidroquinato desidratase, (4) chiquimato desidrogenase, (5) chiquimato quinase, (6) 5-enolpiruvil chiquimato 3-fosfato sintase, (7) corismato sintase, (8) corismato mutase, (9) prefenato desidrogenase (10) prefenato desidratase (Adaptado de NELSON & COX, 5ª ed).....	110
FIGURA 4.66 - Proposta hipotética da incorporação de carbono marcado na biossíntese da citocalasina D a partir da $2\text{-}^{13}\text{C}$ glicina (vermelho) e $3\text{-}^{13}\text{C}$ alanina (rosa). Detecção por MS de m/z 510 e MS/MS m/z 122	111
FIGURA 4.67 - Espectro de massas <i>full scan</i> - (A) alanina e (B) extrato suplementado com $3\text{-}^{13}\text{C}$ alanina.....	111
FIGURA 4.68 - Espectro de íons produtos de m/z 510 quando o micro-organismo é cultivado em meio suplementado com $3\text{-}^{13}\text{C}$ alanina.....	112
FIGURA 4.69 - Espectro de massas <i>full scan</i> - (A) glicina e (B) extrato suplementado com $2\text{-}^{13}\text{C}$ glicina	112
FIGURA 4.70 - Espectro de íons produtos de m/z 511 quando o micro-organismo é cultivado em meio suplementado com (A) glicina e (B) $2\text{-}^{13}\text{C}$ glicina	113
FIGURA 4. 71 - Cromatograma a 220 e 240 nm obtido na separação da citocalasina D oriunda do extrato Czapek enriquecido com $2\text{-}^{13}\text{C}$ glicina.....	114
FIGURA 4.72 - Espectro de RMN ^{13}C da citocalasina D: (A) sem marcação isotópica (B) produzida em meio de cultura suplementado com $2\text{-}^{13}\text{C}$ glicina (CDCl_3 , 150 MHz)	115

FIGURA 4.73 - (A) Catabolismo da glicina. (B) Ciclo biossintético da metionina e da S-adenosil metionina e consequente mecanismo de metilação (adaptado de NELSON & COX, 5 ^a ed).....	116
FIGURA 4.74 - Espectros de massas de MCL5_pAfDA_13: (A) <i>Full scan</i> e (B) íons produtos de <i>m/z</i> 492.....	117
FIGURA 4.75 - Espectro de RMN de hidrogênio de MCL5_pAfDA_13.....	118
FIGURA 4.76 - Espectro de HSQC de MCL5_pAfDA_13	119
FIGURA 4.77 - Espectro de COSY de MCL5_pAfDA_13	120
FIGURA 4.78 - Espectro de HMBC de MCL5_pAfDA_13	120
FIGURA 4.79 - Estrutura química da 18-desoxi citocalasina Q	121
FIGURA 4.80 - Espectros de massas de MCL5_pAfDA_15: (A) <i>Full scan</i> e (B) íons produtos de <i>m/z</i> 492.....	122
FIGURA 4.81 - Espectros de massas de MCL5_pAfDA_19: (A) <i>Full scan</i> e (B) íons produtos de <i>m/z</i> 689.....	123
FIGURA 4.82 - Espectro de RMN de hidrogênio da fração MCL5_pAfDA_19	124
FIGURA 4.83 - Espectro de COSY da fração LSA_MCL5_pAFA_19.....	125
FIGURA 4.84 - Espectro de HSQC da fração LSA_MCL5_pAFA_19.....	125
FIGURA 4.85 - Espectro de HMBC da fração LSA_MCL5_pAFA_19.....	126
FIGURA 4.86 - Principais correlações que permitiram identificar o resíduo de fenilalanina	126
FIGURA 4.87 - Principais correlações que permitiram identificar o resíduo de leucina N-metilada	127
FIGURA 4.88 - Principais correlações que permitiram identificar o resíduo de leucina.....	127
FIGURA 4.89 - Principais correlações que permitiram identificar o resíduo de serina.....	128
FIGURA 4.90 - Principais correlações que permitiram identificar o resíduo de O-valina	129
FIGURA 4.91 - Principais correlações que permitiram identificar o resíduo de O-leucina	129
FIGURA 4.92 - Correlações observadas no espectro de HMBC para a substância da fração MCL5_pafDA_19.....	130
FIGURA 4.93 - Estrutura química proposta para o composto presente na fração MCL5_pAfDA_19	131
FIGURA 4.94 - Possibilidades de abertura do tricodepsipeptídeo.....	132
FIGURA 4.95 - Proposta de fragmentação de <i>m/z</i> 689.....	133

FIGURA 4.96 - Espectro de íons produtos de <i>m/z</i> (A) 689,4122 (B) 621,3850 e (C) 721,4357.....	134
FIGURA 4.97 - Metabólitos secundários produzidos por NILC3 em meio Czapek enriquecido com extrato de levedura	135
FIGURA 4.98 - Espectro de massas <i>full scan</i> de MCL3_pAfD_13	136
FIGURA 4.99 - Espectro de RMN de hidrogênio da fração MNICL3_pAfD_4 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	137
FIGURA 4.100 - Espectro de DEPT 135 de MNICL3_pAfD_4.....	137
FIGURA 4.101 - Espectro de HSQC da fração MCL3_pAfD_13 (CDCl ₃)	138
FIGURA 4.102 - Espectro de HMBC da fração MCL3_pAfD_13	138
FIGURA 4.103 - Espectro de COSY da fração MCL3_pAfD_13	139
FIGURA 4.104 - Estrutura química parcial da substância presente na fração LSA_MCL3_pAfD_13.....	140
FIGURA 4.105 - Estrutura química proposta para a substância pertencente a fração LSA_MCL3_pAfD_13 e as principais correlações observadas nos experimento de COSY e HMBC.....	140
FIGURA 4.106 - Espectro de NOE de LSA_MCL3_pAfD_13; irradiação da metila H-15 em δ 1,10.....	141
FIGURA 4.107- Estrutura química proposta para a substância da fração MCL3_pAfD_13	141
FIGURA 4.108 - (A) Cromatograma de íons totais da fração MCL3_pAfDA_22. Espectros de massas <i>full scan</i> referente ao pico: (B) em 22,4 e (C) 22,5 min..	143
FIGURA 4.109 - Espectro de íons produtos de <i>m/z</i> 534.....	143
FIGURA 4.110 – Espectro de RMN de hidrogênio da fração MCL3_pAfDA_22	144
FIGURA 4.111 - Espectro de COSY da fração MCL3_pAfDA_22	145
FIGURA 4.112 - Espectro de HSQC da fração MCL3_pAfDA_22	145
FIGURA 4.113 Espectro de HMBC da fração MCL3_pAfDA_22.....	146
FIGURA 4.114 - Correlações observadas nos experimentos de RMN de duas dimensões (setas azuis HMBC/ ligação em negrito COSY).....	147
FIGURA 4.115 - Estrutura química proposta para o composto presente na fração MCL3_pAfDA_22	148
FIGURA 4.116 - Proposta de fragmentação para os compostos presentes na fração MCL3_pAfDA_22	149
FIGURA 4.117 - Imagem microscópica do <i>spot</i> micélio/matriz e espectro de massa de N1CL3 e N1CL5 respectivamente. As linhas tracejadas evidenciam a deformidade dos picos quando o espectro de massas é gerado utilizando o	

micro-organismo intacto. Solução de matriz 30 mg SA dissolvidos em 1 mL ACN:0.1% TFA (7:3).....	151
FIGURA 4.118 - (A) imagem microscópica do <i>spot</i> da matriz/amostra usando 10 mg DHB dissolvido em 1 mL ACN:0.1%TFA (7:3), (B) espectro de massas de NICL5	151
FIGURA 4.119 - Espectro de massas de NICL5 gerado utilizando a matriz CHCA nas concentrações de 6 e 10 mg/mL, respectivamente, e a técnica de co-cristalização da matriz/amostra: (A) e (B) <i>dried droplet</i> , (C) e (D) <i>sandwich</i> , (E) e (F) <i>thin layer</i> , (G) e (H) <i>volume technique</i>	152
FIGURA 4.120 - Espectro de massas de NICL5 adquirido utilizando a matriz FA nas concentrações de 10 e 30 mg/mL, respectivamente, e a técnica de co-cristalização da matriz/amostra: (A) e (B) <i>dried droplet</i> , (C) e (D) <i>sandwich</i> , (E) e (F) <i>thin layer</i> , (G) e (H) <i>volume technique</i>	152
FIGURA 4.121 - Espectro de massas de NICL5 produzido a partir a matriz SA nas concentrações de 10 e 30 mg/mL, respectivamente, e a técnica de co-cristalização da matriz/amostra: (A) e (B) <i>dried droplet</i> , (C) e (D) <i>sandwich</i> , (E) e (F) <i>thin layer</i> , (G) e (H) <i>volume technique</i>	153
FIGURA 4.122 - Placa de Petri com o fungo endofítico NICL5 dividido em três diferentes regiões e respectivos espectros de massas.....	154
FIGURA 4.123 - Representação da região micelial estabelecida para todas as análises seguintes e espectro de massas de NICL5 corresponde a esta região .	155
FIGURA 4.124 - Espectros de massas de NICL5 quando exposto ao protocolo A empregando diferentes tempos de extração com e sem sonicação: (A) extração por 10 min, (B) extração por 10 min com sonicação, (C) extração por 20 min, (D) extração por 20 min com sonicação, (E) extração por 30 min, (F) extração por 30 min com sonicação.....	157
FIGURA 4.125 - Ampliação dos espectros de massas de NICL3 obtidos através do protocolo A: (A) região de m/z 2600-4100; (B) região de m/z 5200-8100; (C) região de m/z 10400-20000	158
FIGURA 4.126 - Espectros de massas de NICL5 quando exposto ao protocolo A empregando diferentes tempos de extração com e sem sonicação: (A) extração por 10 min, (B) extração por 10 min com sonicação, (C) extração por 20 min, (D) extração por 20 min com sonicação, (E) extração por 30 min, (F) extração por 30 min com sonicação.....	159
FIGURA 4.127 - Ampliação dos espectros de massas de NICL5 obtidos através do protocolo A de extração: (A) região de m/z 2600-4059; (B) região de m/z 5200-8099; (C) região de m/z 10400-20000	159

FIGURA 4.128 - Espectros de massas de NiCl_3 e NiCl_5 obtidos através do protocolo B em pH 7,5; 8,0 e 8,5	160
FIGURA 4.129 - Ampliação dos espectros de massas de NiCl_3 e NiCl_5 obtidos através do protocolo B de extração: (A) região de m/z 2600-4059; (B) região de m/z 5200-8099; (C) região de m/z 10400-20000.....	161
FIGURA 4.130 - (A) Espectros de massas de NiCl_3 em BDA obtido através do protocolo B pH 8.0 com diferentes tempos de extração: (A1) 10 min, (A2) 10 minutos com sonicação, (A3) 20 min, (A4) 20 minutos com sonicação, (A5) 30 min, (A6) 30 minutos com sonicação. (B) Ampliação dos espectros massas entre m/z 7100 a 8170. (C) Ampliação dos espectros de massas entre m/z 1100 a 18000	162
FIGURA 4.131 - A) Espectros de massas de NiCl_3 em MEA obtido através do protocolo B pH 8.0 com diferentes tempos de extração: (A1) 10 min, (A2) 10 minutos com sonicação, (A3) 20 min, (A4) 20 minutos com sonicação, (A5) 30 min, (A6) 30 minutos com sonicação. (B) Ampliação dos espectros de massas entre m/z 6000 a 8200. (C) Ampliação dos espectros de massas entre m/z 1150 a 17500	164
FIGURA 4.132 - (A) Espectros de massas de NiCl_5 em BDA obtido através do protocolo B pH 8.0 com diferentes tempos de extração: (A1) 10 min, (A2) 10 minutos com sonicação, (A3) 20 min, (A4) 20 minutos com sonicação, (A5) 30 min, (A6) 30 minutos com sonicação. (B) Ampliação dos espectros de massas entre m/z 7200 a 8140. (C) Ampliação dos espectros de massas entre m/z 11000 a 18000	165
FIGURA 4.133 - (A) Espectros de massas de NiCl_5 em MEA obtido através do protocolo B pH 8.0 com diferentes tempos de extração: (A1) 10 min, (A2) 10 minutos com sonicação, (A3) 20 min, (A4) 20 minutos com sonicação, (A5) 30 min, (A6) 30 minutos com sonicação. (B) Ampliação dos espectros de massas entre m/z 7200 a 8140.....	166
FIGURA 4.134 - (A) Protocolo D - espectros de massas de NiCl_3 em BDA - 12 mM timol em: (A1) EtOH:0.1%TFA, (A2) ACN:0.1%TFA, (A3) EtOH:ACN (1:1): 0.1%TFA, (A4) PrOH:0.1%TFA, (A5) EtOH:0.1%BCA, (A6) ACN:0.1%BCA, (A7) EtOH:ACN (1:1):0.1%BCA, iPrOH:0.1%BCA. (B) Ampliação dos espectros de massas na faixa de m/z 6400 a 8170.....	168
FIGURA 4.135 -(A) Espectros de massas de NiCl_5 em BDA obtido através do protocolo C, solução 12 mM timol em: (A1) EtOH:0.1%TFA, (A2) ACN:0.1%TFA, (A3) EtOH:ACN (1:1): 0.1%TFA, (A4) PrOH:0.1%TFA, (A5) EtOH:0.1%BCA, (A6) ACN:0.1%BCA, (A7) EtOH:ACN (1:1):0.1%BCA, iPrOH:0.1%BCA. (B) Ampliação dos espectros de massas na faixa de m/z 3500	

a 6200. (C) Ampliação dos espectros de massas na faixa de m/z 11000 a 18000	169
FIGURA 4.136 - Espectros de massas de N1CL3 obtidos a partir do protocolo D, sendo o fungo cultivado em: (A1-A5) BDA e (A6-A10) MEA. (B) ampliação dos espectros de massas na faixa de m/z 2700-4100. (C) ampliação dos espectros de massas na faixa de m/z 11000-18000.	171
FIGURA 4.137 - (A) Espectros de massas de N1CL5 obtidos a partir do protocolo D, sendo o fungo cultivado em: (A1-A5) BDA e (A6-A10) MEA. (B) ampliação dos espectros de massas na faixa de m/z 5200-8100	173
FIGURA 4.138 - Obtenção do perfil de biomoléculas de fungos pertencentes a família Xylariaceae através do protocolo A: (A) N1CL3, (B) N1CL5, (C) fungo endofítico F26 isolado de <i>Alternantera brasiliiana</i> , (D) fungo endofítico CJ isolado de <i>Taxus</i> , (E) fungo endofítico Pinus p1A isolado de <i>Pinus taeda</i> , (F) fungo endofítico Ara_fv3A isolado de <i>Araucaria angustifolia</i> , (G) fungo endofítico Ara_fj3A Pinus p-1a isolado de <i>Araucaria angustifolia</i>	174
FIGURA 4.139 - Obtenção do perfil de biomoléculas de fungos pertencentes a família Xylariaceae através do protocolo B: (A) N1CL3, (B) N1CL5, (C) fungo endofítico F26 isolado de <i>Alternantera brasiliiana</i> , (D) fungo endofítico CJ isolado de <i>Taxus</i> , (E) fungo endofítico Pinus p1A isolado de <i>Pinus taeda</i> , (F) fungo endofítico Ara_fv3A isolado de <i>Araucaria angustifolia</i> , (G) fungo endofítico Ara_fj3A Pinus p-1a isolado de <i>Araucaria angustifolia</i>	174
FIGURA 4.140 - Representantes da coleção de fungos da família Xylariaceae	175
FIGURA 4.141 MSP Dendrograma obtido com espectros principais (MSPs) de 46 fungos pertencentes à família Xylariaceae analisados via MALDI-TOF ..	180
FIGURA 4.142 - Cromatograma de íons totais de: (A) LaBioMMi 445, (B) LaBioMMi 466 e (C) LaBioMMi 467. Espectros de massas associados aos picos em: (D) 1,83 min, (E) 2,30 min, (F) 2,49 min.....	182
FIGURA 4.143 - Cromatograma de íons totais de: (A) LaBioMMi 434, (B) LaBioMMi 436 e (C) LaBioMMi 437. (D)-(F): Espectros de massas associados aos picos em 4,50 min.	182
FIGURA 4.144 - Cromatograma de íons totais de: (A) LaBioMMi 436, (B) LaBioMMi 445, (C) LaBioMMi 461 e (D)) LaBioMMi 470. Espectros de massas associados aos picos: (E) 2,49 referente a citocalasina D, (F) 3,12 referente a citocalasina C, espectro de massa do tricodopsipeptídeo produzido por (G) LaBioMMi 445 e (H) LaBioMMi 470	183

FIGURA 4.145 - Cromatograma de íons totais de: (A) LaBioMMi 459, (B) LaBioMMi 463. Espectros de massas associados aos picos: (C) 2,66 min (D) 4,56 min; (E) 4,72 min; (F) 5,07min; (G) 5,31 min e (H) 5,63 min	184
FIGURA 4.146 - Cromatograma de íons totais de (A) LaBioMMi 455, (B) LaBioMMi 464, (C) LaBioMMi 465 e (D) LaBioMMi 460. Espectros de massas associados as bandas: (E) 3,78 e (F) 3,86 min	185
FIGURA 4. 147 – Perfil metabolômico de (A) LaBioMMi 428 e (B) LaBioMMi 471	186
FIGURA 4.148 - Espectro de íons produtos dos compostos presentes nos picos: (A) 1,42 min; (B) 1,52 min; (C) 2,13 min; (D) 2,49; (E) 2,79 e (F) 3,12 min..	186
FIGURA 4.149 - Cromatograma de íons totais de: (A) LaBioMMi 451, (B) LaBioMMi 458 e (C) LaBioMMi 469. Espectro de massas <i>full scan</i> de: (D) pico em 4,11 min e (F) pico em 4,19 min. Espectro de íons produtos: (E) m/z 536,3823 e (G) m/z 584,3839	187

Resumo

“ESTUDOS METABOLÔMICOS E BIOSINTÉTICOS, VISANDO CONTRIBUIÇÕES PARA A QUÍMICA E TAXONOMIA DE MICRO-ORGANISMOS DA FAMÍLIA XYLARIACEAE”. O trabalho de doutorado visou a exploração do metabolismo fúngico de N1CL3 e N1CL5, ambos inicialmente identificados como *Xylaria* sp., isolados como endofítico de *Cupressus lusitanica*. A investigação do metabolismo dos fungos permitiu o isolamento e identificação de novos metabólitos, pois N1CL3 produziu um novo sesquiterpeno eremofilano e uma mistura de dois peptídeos cíclicos. Já de N1CL5 foram isolados além das citocalasinas C, D e Q, a 18-desoxicitolasina Q e o tricodepsipeptídeo. O isolamento deste depsipeptídeo por N1CL5 é algo muito relevante, dado que na literatura há somente um trabalho que relata a produção desta classe de composto por fungos do gênero *Xylaria*. Outra vertente aplicada neste trabalho foi o emprego da abordagem OSMAC, através da suplementação de diferentes fontes nitrogenadas ao meio de cultivo de N1CL5, visando obter novas citocalasinas. No entanto, somente a administração de NH₄Br se mostrou promissora, pois permitiu o isolamento da 4-hidroximetil citocalasina C, metabólito inédito. O metabolismo secundário de N1CL5 se mostrou fortemente direcionado para a produção das citocalasinas C, D e Q, independente da fonte nitrogenada administrada ao meio de cultura, o que sugeriu que o micro-organismo fosse capaz de realizar biossíntese *de novo* destes metabólitos. Estudos por espectrometria de massas mostraram que a administração de Na¹⁵NO₃, ¹⁵NH₄Cl e ¹⁵N-glicina levou a incorporação do nitrogênio marcado na citocalasina D. Já a suplementação do meio de cultivo do micro-organismo com 2-¹³C glicina apontou a incorporação do carbono marcado nas posições em que a enzima S-adenosil metionina é responsável por introduzir dois grupos metilas e um metileno. Entretanto, estudos genômico e proteômico são fundamentais para comprovar este processo. O fungo N1CL5 possui um potencial enzimático muito interessante, pois promoveu a redução do ácido carboxílico ao álcool correspondente, além de realizar a incorporação do GABA e glicose ao substrato. Este potencial enzimático parece estar intimamente relacionado com a natureza eletrônica do substrato, pois reações semelhantes aconteceram com o ácido *p*-cloro benzoico e a redução do ácido *p*-nitro benzoico ao álcool. Foi criada uma coleção de fungos da família *Xylariaceae*, os quais foram identificados de acordo com técnicas moleculares. Curiosamente N1CL3 foi classificado como *Nemania* aff. *primolutea* e N1CL5 como *Xylaria* aff. *arbuscula*. Foram confrontadas as técnicas de identificação baseadas em biologia molecular, perfil de biomoléculas por MALDI-TOF e o perfil metabólico por espectrometria de massas de alta resolução de todos os representantes da coleção de *Xylariaceae*, pôde-se verificar um bom nível de concordância entre as diferentes técnicas.

Abstract

“METABOLOMIC AND BIOSYNTHETIC STUDIES FOR THE CHEMICAL AND TAXONOMIC CONTRIBUTION OF XYLARIACEAE FAMILY MICROORGANISMS”.The PhD work aimed the exploration of fungal metabolism of NICL3 and NICL5, both initially identified as *Xylaria* sp., isolated as endophytic fungi from *Cupressus lusitanica*. The investigation of the NICL3 metabolism allowed the isolation and identification of new compounds, one unpublished eremophilane sesquiterpene and a mixture of two cyclic peptides. In addition, from NICL5 were isolated cytochalasins C, D, Q, 18-desoxy cytochalasin Q and trichodepsipeptide. The production of this depsipeptide by NICL5 is very relevant, since there is only one paper in the literature that reports the production of this class of compound by fungi belonging to *Xylaria* genus. Another aspect applied in this work was the use of OSMAC approach, through supplementation of different nitrogen sources in the culture medium of NICL5, to obtain new cytochalasins. However, only the administration of NH_4Br was promising since it allowed the isolation of 4-hydroxymethyl cytochalasin C a new metabolite. The secondary metabolism NICL5 is strongly guided to the production of cytochalasins C, D and Q, independently of the nitrogen source administered in the culture medium, suggesting that the microorganism is able to perform *de novo* biosynthesis. Mass spectrometry studies demonstrated that administration of $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$, $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ and ^{15}N -glycine led to incorporation of labeled nitrogen into cytochalasin D. Supplementation of the culture medium with 2- ^{13}C glycine showed the incorporation of labeled carbon in positions in which the enzyme S-adenosyl methionine is responsible for introducing two methyl groups and one methylene. However, genomic and proteomic studies are essential to prove this process. The NICL5 fungus has an interesting enzymatic potential because it was able to promote reductions of carboxylic acid into alcohol and performs the incorporation of GABA and glucose to the substrate core, when the substrate was *p*-bromo benzoic acid. This enzymatic potential appears to be closely related to the electronic nature of the substrate, since similar reaction occurred with *p*-chloro benzoic acid and bioreduction occurred also with *p*-nitro benzoic acid. A collection of fungi belonging to Xylariaceae family, which were identified according to molecular techniques was created. Interestingly NICL3 was classified as *Nemania* aff. *primolutea* and NICL5 as *Xylaria* aff. *arbuscula*. The identification techniques based on molecular biology, biomarkers profile by MALDI-TOF and metabolic profile by high resolution mass spectrometry of all members of the collection were confronted, and it was verified a good level of agreement between three different techniques.

1. Sumário

1. Introdução	1
1.1. A família Xylariaceae e o gênero <i>Xylaria</i>	1
1.2 Metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero <i>Xylaria</i>	4
1.3 A classe das citocalasanas & citocalasinas produzidas por <i>Xylaria</i>	13
1.4 Estratégias para o aumento da diversidade metabólica – abordagem OSMAC.....	21
1.5 A espectrometria de massas na identificação de micro-organismos	26
2. Objetivos	31
3. Parte Experimental.....	33
3.1 Materiais e equipamentos.....	33
3.1.1 Materiais utilizados para o isolamento e cultivo dos fungos endofíticos	33
3.1.2 Equipamentos utilizados para o isolamento e cultivo dos fungos endofíticos	33
3.1.3 Equipamentos utilizados em preparação e análises de amostras	33
3.2 Suportes cromatográficos e solventes utilizados	34
3.2.1 Suportes cromatográficos.....	34
3.3 Solventes empregados.....	35
3.4 Procedimento experimental.....	35
3.4.1 Cultivo dos fungos <i>NICL3</i> e <i>NICL5</i> isolados de <i>Cupressus lusitanica</i> ..	35
3.4.2 Estudo da influência de aminoácidos livres no metabolismo de <i>NICL5</i>	36
3.4.3 Efeito da influência das fontes de C e N na produção de citocalasina D	37
3.4.4 Cultivo do fungo <i>NICL5</i> frente a substratos halogenados.....	38
3.4.5 Cultivo do fungo <i>NICL5</i> em meio Czapek suplementado com derivados do ácido benzoico.....	39
3.4.6 Cultivo do fungo <i>NICL5</i> em meio Czapek suplementado com precursores marcados isotopicamente.....	41
3.4.7 Estudo do metabolismo de <i>NICL3</i> e <i>NICL5</i> em meio de cultivo Czapek suplementado com extrato de levedura.....	43
3.4.7.1 Avaliação da atividade biológica dos metabólitos secundários isolados frente à inibição da enzima acetilcolinaesterase	46
3.4.8 Análise por MALDI-TOF	46

3.4.8.1 Cultivo dos fungos para estudo do perfil das biomoléculas por MALDI-TOF.....	46
3.4.8.2 Matrizes e cristalização.....	47
3.4.8.3 Protocolos de preparo de amostra.....	48
3.9 Estudo do perfil químico dos representantes da coleção de micro-organismos da família Xylariaceae.....	50
3.9.1 Preparo de amostra para aquisição do perfil de biomoléculas por MALDI-TOF.....	50
3.9.2 Extração dos metabólitos secundários via micro-extração.....	51
4. Resultados e discussão.....	53
4.1 Aplicação da abordagem OSMAC frente a NICL5 visando o aumento da diversidade metabólica.....	53
4.1.1 Administração de aminoácidos livres ao meio de cultura.....	53
4.1.2 Administração de substratos halogenados ao meio de cultura.....	55
4.1.3 Cultivo do fungo NICL5 em meio Czapek suplementado com derivados do ácido benzoico.....	74
4.2 Influência das fontes de C e N na produção de citocalasinas.....	97
4.3 Administração de precursores marcados isotopicamente frente ao fungo NICL5.....	103
4.4 Estudo do metabolismo de NICL5 e NICL3 em meio Czapek enriquecido com extrato de levedura.....	117
4.4.1 Metabolismo secundário de NICL5.....	117
4.4.2 Metabolismo secundário de NICL3.....	135
4.5 Estudo do perfil das biomoléculas dos fungos do gênero <i>Xylaria</i> por MALDI-TOF.....	149
4.5.1 Escolha da matriz, técnica de co-cristalização e amostragem fúngica.....	150
4.5.2 Análise por MALDI-TOF dos fungos do gênero <i>Xylaria</i> , isolados como endofíticos de <i>Cupressus lusitanica</i>	155
4.6 Coleção de fungos pertencentes a família Xylariaceae.....	175
4.6.1 Construção da coleção de fungos da família Xylariaceae.....	175

4.6.2 Comparação entre os dados filogenéticos, MALDI-TOF e metabólico da coleção fúngica pertencente à família Xylariaceae.....	177
5. Conclusão.....	189
6. Referências bibliográficas.....	191

1. Introdução

1.1. A família Xylariaceae e o gênero *Xylaria*

A família Xylareaceae é uma das maiores e diversa dentre as famílias dos Ascomycotas. Ela é relativamente bem conhecida, compreendendo cerca de 85 gêneros (KIRK et al., 2008), com representantes distribuídos por todo globo terrestre, embora sua maior concentração aconteça em regiões tropicais (ROGERS, 2000, STADLER et al., 2013). Estes fungos desempenham significativo papel ecológico, pois estão, de forma direta, envolvidos na decomposição vegetal, a qual, provavelmente, deve ser fruto de um longo processo co-evolutivo com as sementes das plantas (LEE et al., 2000, FOURNIER et al., 2011).

O gênero *Xylaria* foi o primeiro gênero descrito da família Xylareaceae (MARTIN, 1970), sendo atualmente catalogadas cerca de 300 espécies (KIRK et al., 2008). Muitas espécies de *Xylaria* desenvolvem-se em galhos mortos, frutas, sementes e folhas caídas, provavelmente para o desempenho da atividade saprofítica. Algumas espécies são encontradas em ninhos de cupim, as quais podem ser provenientes da ingestão de material vegetal e, este ao passar pelo sistema digestivo é depositado no cupinzeiro (HSIEH et al., 2010). Há diversos relatos sobre o isolamento de fungos do gênero *Xylaria* como endofítico de coníferas, monocotiledôneas, dicotiledôneas, samambaias e organismos marinhos, no entanto, ainda não se sabe qual a função destes em relação ao hospedeiro (BRUNNER & PETRINI, 1992).

Espécies de *Xylaria* são de difícil identificação e classificação, pois suas características morfológicas são muito variáveis e, estão relacionadas com o estágio de desenvolvimento do micro-organismo (WALLEY, 1996). A FIGURA 1.1 ilustra as diferenças morfológicas inerentes às espécies de *Xylaria*, uma vez

que, em condições padronizadas de cultivo algumas espécies podem desenvolver estroma (FIG. 1.1 A/E/F/I e J) enquanto outras não (FIG. 1.1 B/C/D/G/H/K e L).

Outro fator que deve ser levado em consideração é o de que muitas espécies de *Xylaria* possuem distribuição cosmopolitana e, a complexidade referente ao polimorfismo pode levar a descrição de uma espécie mais de uma vez (ROGERS, 1985).

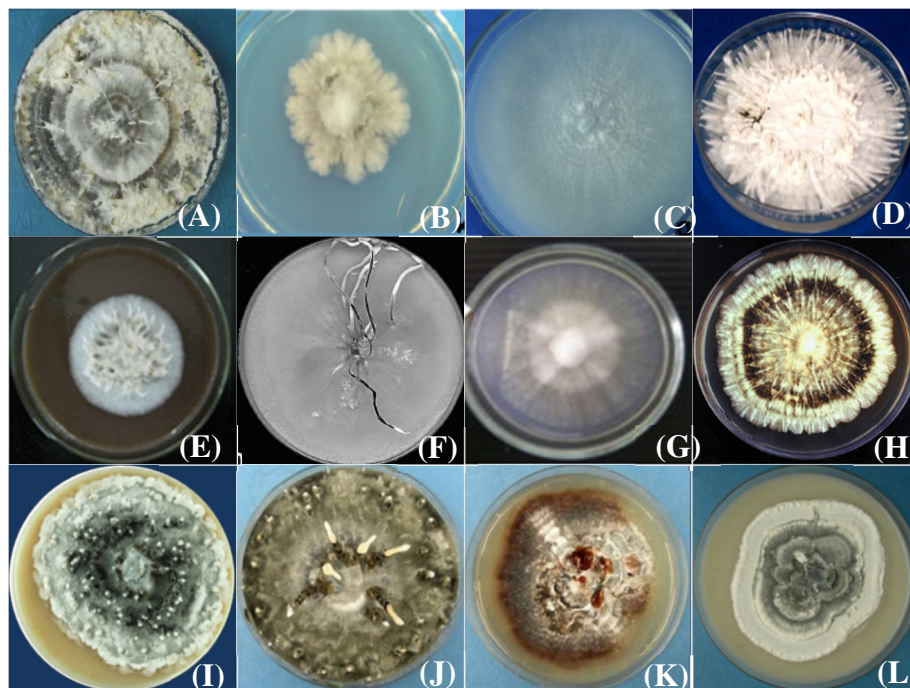


FIGURA 1.1 - (A) *Xylaria telfairii* (STADLER et al., 2008) (B) *Xylaria grammica* (C) *Xylaria badia* (CHEN et al., 2013), (D) *Xylaria feejeensis* (BARABAN et al., 2013), (E) *Xylaria* sp. (CAI et al., 2013), (F) *Xylaria atrodivaricata* (JU e HSIEH, 2007), (G) *Xylaria plebeja* (RUKACHAISIRIKUL et al., 2013), (H) *Xylaria schweinitzii* (OKANE et al., 2008), (I) *Xylaria hypoxylon* (PERŠOH et al., 2009), (J) *Xylaria cinerea*, (K) *Xylaria karticola*, (L) *Xylaria vasconica* (FOURNIER et al., 2011)

Métodos moleculares baseados em regiões específicas do DNA como as regiões 5.8S/ITS rDNA, β -tubulina, actina, RPB2 estão sendo empregadas para auxiliar na classificação e identificação de espécies de *Xylaria* (TANG et al., 2007, OKANE & NAGARI, 2007, PERŠOH et al., 2009, VISSER et al., 2009, HSIEH et al., 2010). No entanto, PERŠOH et al. (2009) mostraram, em um estudo correlacionando técnicas moleculares e morfológicas,

que sequências de DNA depositadas no GenBank associadas a uma grande número de fungos identificados como *Xylaria hypoxylon* correspondem a diferentes espécies de *Xylaria* e, desta forma, mesmo utilizando-se um método mais assertivo de identificação, erros continuam sendo propagados.

Fungos do gênero *Xylaria* tem despertado interesse em diversas áreas, inclusive em biotecnologia e na indústria madeireira, reflexo de sua relação ecológica, devido a sua inerente capacidade de decompor a matéria orgânica, pois são produtores de enzimas, glicosidase e lacase, capazes de degradar celulose e lignina (NGHI et al., 2012, KUMAR et al.2013, MATHIEU et al., 2013, LIERS et al., 2007, POINTING et al., 2003).

Os fungos do gênero *Xylaria* são também explorados na química de produtos naturais, pois são hábeis produtores de metabólitos secundários, muitos dos quais possuem atividades biológicas relevantes para a descoberta de novas drogas, incluindo as atividades citotóxica, antimalárica, antiviral, antimicrobiana, dentre outras.

Recentemente, AMARAL (2009) isolou, de *Cupressus lusitanica*, duas cepas diferentes de *Xylaria* sp. (codificadas como N1CL3 e N1CL5), as quais foram identificadas com base na técnica de 18S ribossomal da região ITS. Estes micro-organismos mostraram-se hábeis produtores de metabólitos secundários como sesquiterpenos eremofilanos e citocalasinas, respectivamente.

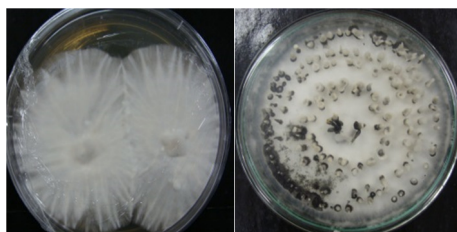


FIGURA 1.2 - Fungos endofíticos N1CL3 e N1CL5 isolados de *Cupressus lusitanica*

1.2 Metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Xylaria*

Os micro-organismos apresentam uma elevada capacidade metabólica, a qual reflete diretamente na diversidade estrutural de metabólitos secundários produzidos. Atualmente, na busca desses compostos consideram-se as interações metabólicas entre o fungo e o meio ambiente. É reportado que as interações entre fungos e seus hospedeiros resultam no incremento da produção dos metabólitos sintetizados por estes micro-organismos. Este é um exemplo de uma estratégia inteligente para a exploração do potencial de produção do metabolismo que um fungo pode oferecer (SCHULZ et al., 2002). Desta forma, os fungos pertencentes ao gênero *Xylaria*, que estão amplamente distribuídos na natureza, são fontes promissoras de novos produtos naturais. Na literatura há inúmeros relatos destes micro-organismos como produtores de várias classes de metabólitos secundários, tais como, terpenos (WU et al. 2014, ISAKA et.al, 2014) xantonas (HEALY et al., 2004), benzoquinonas (TANSUWAN et al., 2007), isocumarinas (WANG, et al.,2014), ciclopeptídeos (WU et al., 2011), citocalasinas (LI et al., 2012), dentre outros.

Dentre os terpenóides produzidos por *Xylaria* destacam-se os sesquiterpenos eremofilanos, sendo atualmente conhecidas 24 estruturas, as quais estão relacionadas a oito cepas distintas de *Xylaria* sp (SINGH et al., 1999, HU et al., 2008, AMARAL & RODRIGUES-Fo, 2010, ISAKA et al., 2010, LI et al., 2010, SILVA et al., 2010, ISAKA, et al., 2012 e SONG et al., 2012), uma cepa de *X. persicaria* (SMITH et al., 2002) e uma cepa de *X. allantoidea* (ISAKA et al., 2014). A FIGURA 1.3 exemplifica alguns destes metabólitos (1-6). Os sesquiterpenos eremofilanos **1** e **2** apresentam atividade antimálarica contra *Plasmodium falsiparum* K1 com IC_{50} de 8.1 e 13 μ M, respectivamente, além disso, **2** exibe também atividade contra *Candida albicans* (ISAKA et al., 2010). O composto **3** possui atividade moderada contra células HeLa (HU et al., 2008) e o seu isômero fomenona (**4**) apresenta atividade antifúngica com limite

de detecção de 10 µg, comparável com a mesma quantidade de nistatina (SILVA et al., 2010). Já o ácido intéglico, composto **5**, inibe a atividade da enzima HIV-1 integrase, sendo este um potente alvo contra a ação do vírus (SINGH, et al., 1999). O composto **6** promoveu a ativação da enzima α -glicosidade a 0,15 µM e, depois passou a inibir a atividade enzimática com valor de IC_{50} de 6,65 µM (SONG et al., 2012). A biossíntese de sequiterpenos por *Xylaria* não se limita aos eremofilanos, pois é reportada a produção de compostos com esqueletos eudesmanos (ISAKA et al., 2012 e PITTAYAKHAJONWUT, et al., 2009), guainos (LI et al., 2010), brasilanos (HU et al., 2008), tujopisanos e bisabolanos (YIN et al., 2011). Há na literatura relatos da produção de diterpenos pimaranos por espécies de *Xylaria*, exemplificados na FIGURA 1.3 pelos compostos **7-10** (LI et al., 2010, SHIONO et al., 2013, ISAKA et al., 2011, 2012 e 2014). O composto **10** possui uma estrutura bastante interessante e, segundo SHIONO et al. (2013) este é o primeiro diterpeno contendo um anel spiro com esqueleto C6/C5/C6 na natureza. Além disso, a sordacinina (**11**) e seu derivado xilarina (**12**), apresentam atividade antifúngica (SCHNEIDER et al., 1995).

O fungo *Xylaria* sp., isolado da madeira em decomposição, produziu triterpenos glicosilados (12-15), sendo o primeiro e único relato desta classe de compostos por micro-organismos deste gênero (DEYRUP et al., 2007).

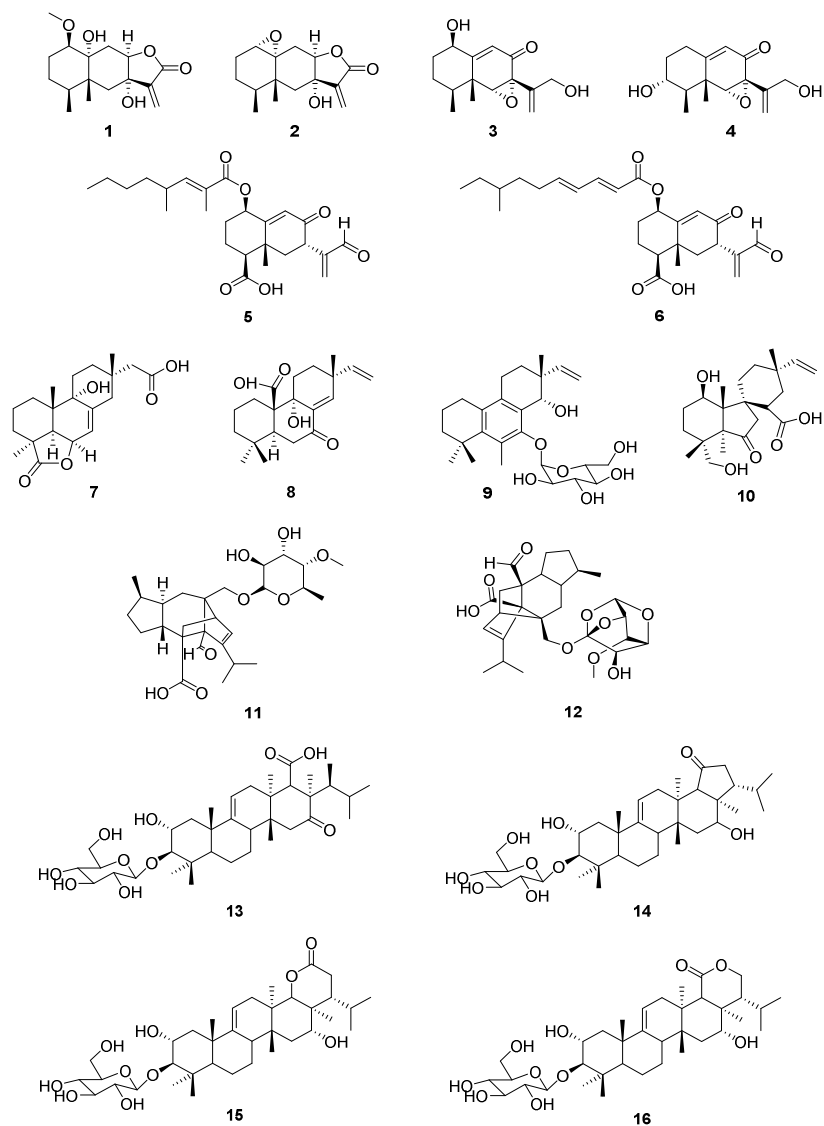


FIGURA 1.3 - Estruturas químicas de terpenóides produzidos por espécies de *Xylaria*: **1-6**: sesquiterpenos eremofilanos, **7-12**: diterpenos, **13-16**: triterpenos

Há inúmeros trabalhos relatando a produção de diversos compostos aromáticos por *Xylaria*, a FIGURA 1.4 mostra alguns destes metabólitos.

Xantonas são metabólitos produzidos majoritariamente por plantas, no entanto, fungos e líquens são também fontes destes compostos. O fungo *Xylaria* sp. produziu uma série de seis xantonas, representada na FIGURA 1.3 pelo composto **17**, no entanto, este composto não apresenta atividade antimicrobiana (HEALY et al., 2004).

O composto xiloalenolideo B (**18**) apresenta uma estrutura bastante interessante, devido à presença do grupo alênico, o qual em estudos de estrutura

atividade está relacionado ao aumento da atividade antitumoral (XU et al., 2008).

TANSUWAN et al. (2007) reportaram o isolamento de três benzoquinonas, sendo uma delas o composto **19**, a qual apresenta atividade moderada contra uma cepa resistente de *Plasmodium falciparum*.

Isocumarinas são metabólitos secundários produzidos por diferentes organismos, possuem um grande painel de atividades biológicas, destacando-se as atividades citotóxica (HEYNEKAMP et al., 2006), antimicrobiana, (PONGCHAROEN et al., 2007) inibição da acetilcolina esterase (OLIVEIRA et al., 2011), além de atuarem como precursoras de muitos metabólitos secundários (SUN et al., 2012). Diferentes cepas de *Xylaria* sp. são produtoras de isocumarinas, sendo reportadas dez estruturas (RUKACHAISIRIKUL et al., 2007, 2009 e 2013, PONGCHAROEN et al., 2007, YAN et al., 2011 e WANG et al., 2014). O composto **20** representa a mais recente isocumarina relatada na literatura (WANG et al., 2014), no entanto, os autores não mencionam ensaios biológicos.

Cumarinas são metabólitos comumente biossintetizadas por plantas, no entanto, bactérias e fungos também produzem esta classe de compostos (VENUGOPALA et al., 2013). LIU et al. (2008) mostraram pela primeira vez a produção da 7-amino-4-metilcumarina pelo fungo *Xylaria* sp. YX-28(**21**), a qual exibiu um amplo espectro antimicrobiano contra dez gêneros de bactérias e três gêneros de fungos. Segundo os pesquisadores o composto **21** apresenta um excelente potencial no controle da deterioração de alimentos.

Os compostos fenólicos **22** e **23** foram isolados de *Xylaria mellisii* (PITTAYAKHAJONWUTE et al., 2005) e *Xylaria hypoxylon* (GU & DING, 2008), respectivamente. Ensaio biológicos destes compostos demonstraram que **22** apresentou atividade contra o vírus da herpes (HSV-1) de 8.4 µg/mL enquanto o composto de referência, aciclovir, exibiu atividade antiviral com IC_{50}

de 2.0-5.0 µg/mL. O metabólito **23** exibiu atividade citotóxica moderada frente linhagem de célula hepática Hep-G2.

Os xilocetais, constituídos por uma estrutura singular, são caracterizados por um sistema benzopirano fundido a um anel tetrahydrofurano, estão intimamente relacionados aos produtos naturais originários do fungo *Xylaria* sp., isolado de um manguezal chinês (LIN, et al., 2001, WU et al., 2005 e 2008, YIN, et al., 2008, XU, et al., 2008). A FIGURA 1.4 apresenta três de seus representantes, o xilocetal A (**24**), xilocetal B (**25**) e F (**26**). Estes compostos estão sendo tratados como potentes alvos no tratamento de doenças cardíacas e neurológicas, uma vez que, possuem acentuada atividade antioxidante (LI, et al., 2013), além de atuarem na inibição da enzima acetilcolina esterase e bloquear o canal de cálcio em células do hipocampo, podendo ser utilizado no tratamento da doença de Alzheimer (LIN, et al., 2001 e WU, et al., 2008). O grande desafio dos pesquisadores fundamenta-se na obtenção de maiores rendimentos destes compostos, pois o cultivo em larga escala, cerca de 200 L, resultou na produção de 1,2 g do xilocetal A, 2,3 g do xilocetal B e 30 mg do xilocetal F. Deste modo, além da otimização do cultivo do micro-organismo, diversas estratégias sintéticas vêm sendo desenvolvidas, para obtenção destes compostos e seus análogos.

A maioria dos compostos organohalogenados é encontrada em organismos de origem marinha, no entanto, organismos terrestres são também fontes de produtos naturais halogenados. Espécies de *Xylaria* são reportadas como produtoras de metabólitos secundários clorados, sendo conhecidas 7 estruturas contendo o átomo de cloro (ADEBOYA, et al., 1996, DAVIS 2005, JOONG-HYEOP, et al., 2005, TANSUWAN et al., 2007 e RICHARDSON, et al., 2014). Os compostos de **27- 30**, apresentados na FIGURA 1.4, representam algumas destas estruturas. ADEBOYA et al. (1996) foram os primeiros a relatar a produção de compostos clorados por *Xylaria*, aqui exemplificados pela maldoxona (**27**) e maldoxina (**28**), com características estruturais interessantes,

uma vez que, **27** exibe grande semelhança aos depsídeos, compostos produzidos majoritariamente por líquens e **28** constituído por um sistema spirociclohexadienona, o qual não é muito comum em fungos.

Estruturalmente semelhante ao composto **28**, a griseofulvina (**29**), um antifúngico comercial utilizado no tratamento de doenças dermatológicas (DI SANTO 2010), metabólito já conhecido de *Penicillium griseofulvum* (OXFORD et al., 1939), foi isolada pela primeira vez de *Xylaria* sp. por JOONG-HYEOP e colaboradores (2005). No entanto, a produção deste metabólito por fungos desta espécie ainda é mal definida, porém RICHARDSON et al. (2014) acreditam que a presença de fungos do gênero *Xylaria* e a consequente produção de metabólitos secundários com atividade antifúngica desempenha um papel ecológico conferindo resistência a planta hospedeira.

A xilariamida A (**30**) é outro exemplo de metabólito halogenado produzido por *Xylaria*. Segundo DAVIS (2005) o composto **30** tem uma homologia estrutural ao depsipeptídeo criptoficina A, potente agente antitumoral. A comparação da toxicidade da amida e do depsipeptídeo, mostrou que a xilariamida A, não apresentou atividade biológica (DAVIS & KOTIW, 2005).

Curiosamente, WANG e colaboradores (2004), isolaram aphlegmacina A (**31**) pela primeira vez de um ascomiceto, visto que esta classe é comum em basidiomicetos.

Xilopiridina A (**32**), uma azoxantona, isolada em 2009 do fungo *Xylaria* sp. foi reportada como uma potente capacidade de se ligar ao DNA (FANG, et al., 2009). Xantonas e azoxantonas tem uma rica história na química medicinal com aplicações em diversas áreas, o que torna este composto um forte candidato em terapias contra o câncer (RARIG et al., 2013).

Há alguns relatos na literatura sobre a propensão de alguns fungos endofíticos em produzir os mesmos metabólitos secundários que suas plantas

hospedeiras. As pesquisas de LIU e colaboradores (2009 e 2010) mencionam espécies de *Xylaria* em casos bastante peculiares, nos quais os fungos endofíticos isolados de *Taxus chinensis* e *Camptotheca acuminata* produziam os metabólitos taxol e 10-hidroxicamptotecina (**33**), respectivamente, os quais são potentes agentes antitumorais comerciais. Os autores apontam a necessidade de otimizar as condições de cultivo dos micro-organismos, devido aos baixos rendimentos, o que seria uma alternativa para suprir a demanda na produção destes metabólitos, uma vez que, os produtos comerciais, são ainda extraídos das plantas. Vale mencionar que os autores detectaram, por LC-MS, estes compostos nos referidos meios de cultura e que nenhuma outra análise foi executada para comprovar a produção destas substâncias.

Fungos do gênero *Xylaria* são também produtores dos peptídeos cíclicos, representados na FIGURA 1.5. Os ciclopentapeptídeos **34** e **35** foram produzidos por *Xylaria* sp., isolado como endofítico de líquen, sendo que **34** apresenta atividade antifúngica contra *Candida albicans* (SC5314) devido ao sinergismo com 0,004 µg/ mL de cetoconazol. O fungo marinho *Xylaria* sp. produziu o ciclotripeptídeo X-13 (**36**), cuja estrutura bastante incomum, possui um grupo 2,3-dienil éter derivado do ácido *p*-hidroxicinâmico (LIN, et al., 2001). Além disso, (**36**) exibiu uma potente atividade angiogênica, sendo um promissor candidato para o tratamento de desordens cardíacas (LU, et al. 2012). Os compostos **37** e **38** foram isolados do fungo decompositor da madeira *Xylaria* sp. BCC9653 (PONGCHAROEN et al, 2007) e *Xylaria euglossa* (WANG, et al.; 2005) e os autores não os associaram a nenhuma atividade biológica.

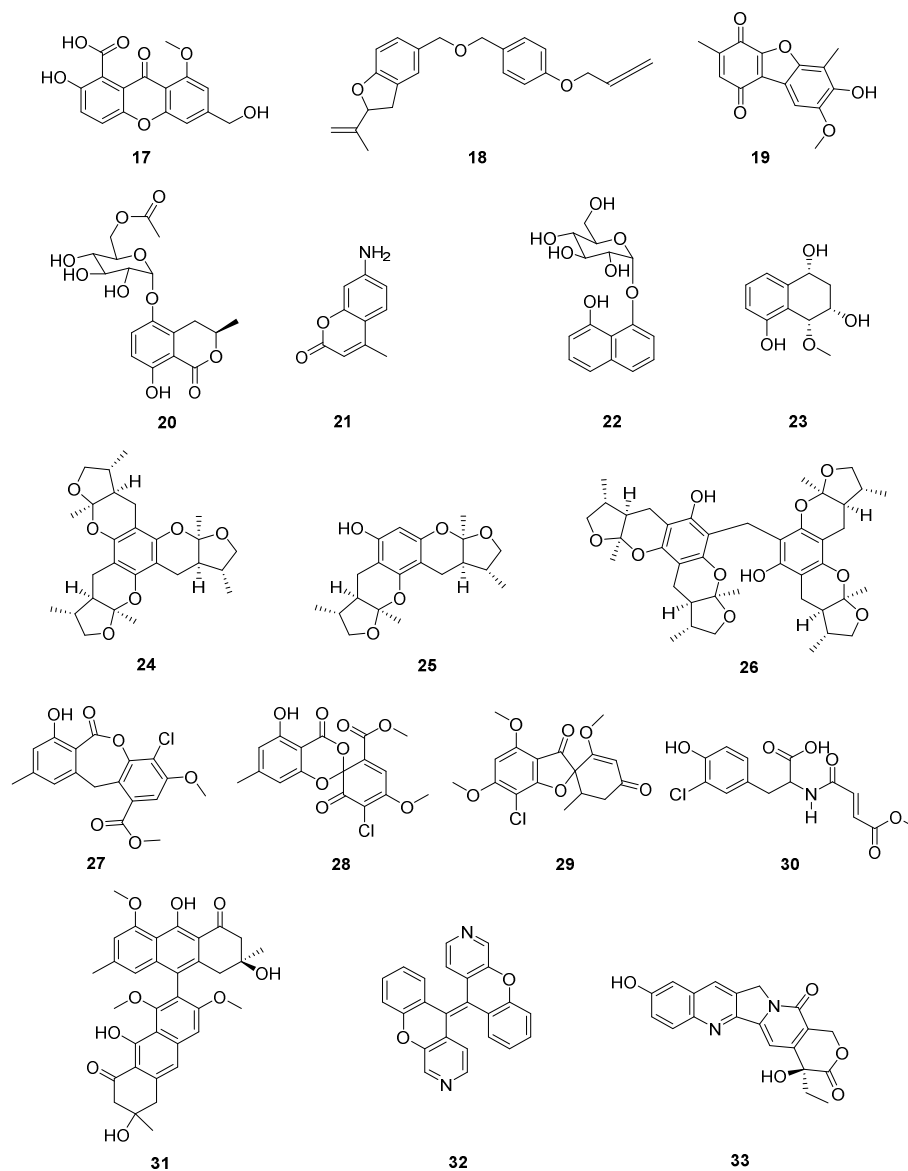


FIGURA 1.4 - Exemplo de algumas estruturas químicas de compostos aromáticos produzidos por *Xylaria*

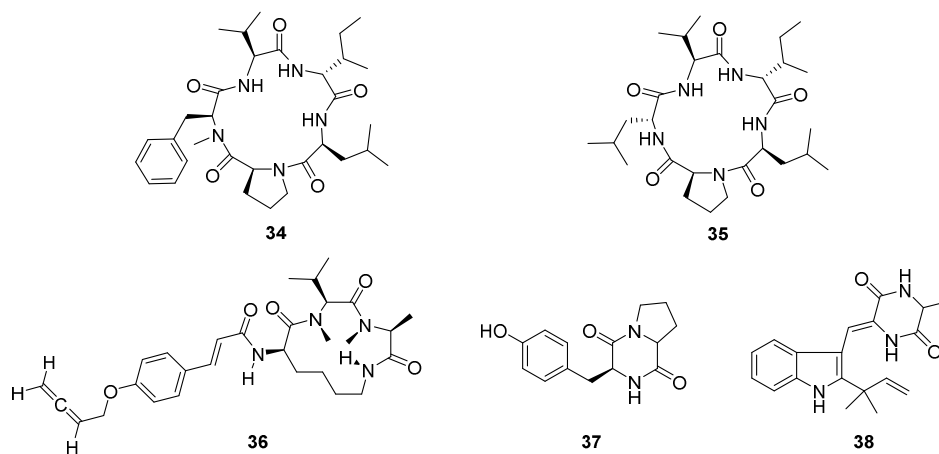


FIGURA 1.5 - Estruturas químicas de peptídeos produzidos por *Xylaria*

Fungos do gênero *Xylaria* são também produtores de ácidos carboxílicos de cadeia curta e cadeia longa, como pode ser visto na FIGURA 1.6. O micro-organismo *Xylaria cubensis* foi relatado como produtor dos ácidos xilacínicos A (**39**) e B (**40**) (KLAIKLAY et al., 2012), bem como o ácido graxo ácido cubensico (**41**) (EDWARDS et al., 1991). *Xylaria berteri* foi reportada como produtora do ácido bertérico (**42**). As lactonas cíclicas de dez membros multiplolídeos A (**43**) e B (**44**) possuem atividade antifúngica contra *Candida albicans* e são os únicos compostos produzidos pelo fungo *Xylaria multiplex* (BOONPHONG et al., 2001). Existe somente um trabalho na literatura que menciona a produção da gramicina (**45**) um isômero da micotoxina patulina, pelo fungo *Xylaria grammica*, no entanto, este trabalho não faz um paralelo entre a toxicidade dos isômeros (EDWARDS et al., 2001).

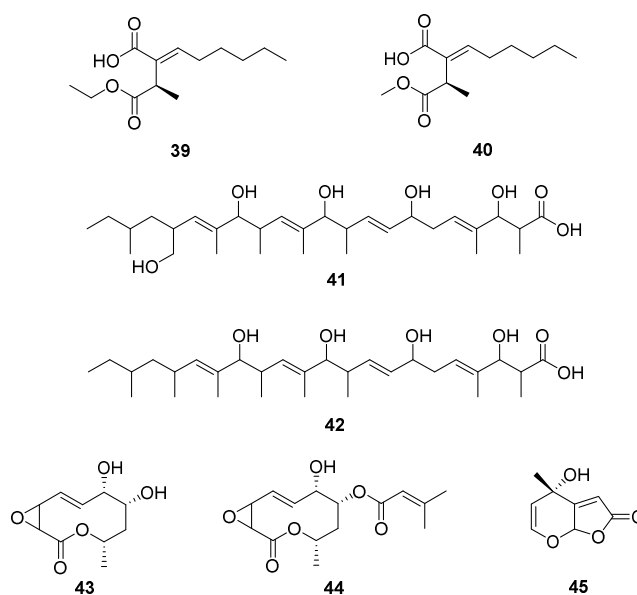


FIGURA 1.6 - Estruturas químicas de policetídeos produzidos por *Xylaria cubensis*, *Xylaria berteri*, *Xylaria multiplex* e *Xylaria grammica*

Dentre os metabólitos produzidos por *Xylaria*, as citocalasinas merecem destaque, desta forma, estas serão tratadas em uma sessão dedicada a somente a elas.

Diante da diversidade estrutural apresentada, muito ainda deve ser desenvolvido no estudo do metabolismo secundários destes fungos, porém, visando conhecer e entender as enzimas envolvidas na biossíntese destes compostos. Este é ainda um universo inexplorado, pois há somente um trabalho na literatura, no qual JIRAKKAKUL et al. (2007) mostraram a grande potencialidade na exploração de micro-organismos do gênero *Xylaria*, pois identificaram nove enzimas putativas PKS, uma PKS-NRPS, e sete correlacionados a enzima NRPS.

1.3 A classe das citocalasanas & citocalasinas produzidas por *Xylaria*

As primeiras citocalasanas, citocalasina A e B (FIG. 1.7), foram descobertas simultaneamente por dois grupos de pesquisa independentes. ROTHWEILER e TAMM (1966) isolaram ambos os metabólitos de *Phoma* S298, enquanto ALDRIDGE et al. (1967) obtiveram os mesmos compostos da cultura de *Helminthosporium dematioideum*. A partir desta data, tanto ascomicetos como basiomicetos, foram relatados como produtores de citocalasanas, sendo atualmente conhecidos mais de cem membros desta classe.

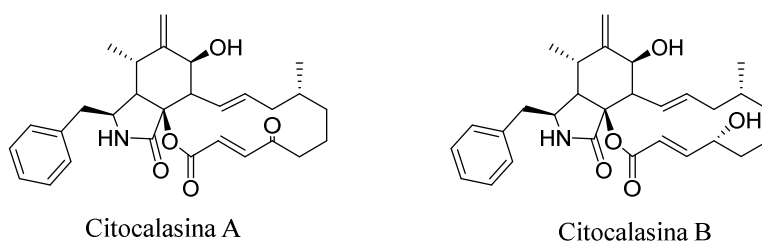


FIGURA 1.7 - Estruturas químicas das citocalasinas A e B produzidas por *Phoma* S298 e *Helmintosporium dematioideum*

As citocalasanas são caracterizadas pela presença de um biciclo isoindolona, fundido a um macrociclo que pode variar de onze a quinze carbonos e pela presença de um aminoácido. A classe das citocalasanas está

subdividida de acordo com o aminoácido incorporado ao esqueleto policetídeo, desta forma, quando o precursor é a fenilalanina têm-se as citocalasinas (ALDRIDGE et al., 1967), quando o aminoácido é o triptofano têm-se as chaetoglobosinas (SEKITA et al., 1982a/b), já quando o precursor é a tirosina têm-se as piricalasinas (NUKITA 1987), se a leucina for incorporada têm-se as aspochalasininas (ZHOU et al.; 2004 e ROCHFORD et al., 2005) e por fim, se a alanina for precursora têm-se as alacalasininas (ZHANG, et al., 2008 e 2009). A FIGURA 1.8 ilustra as diferentes classes de citocalasinas, nas quais os aminoácidos precursores estão destacados em vermelho.

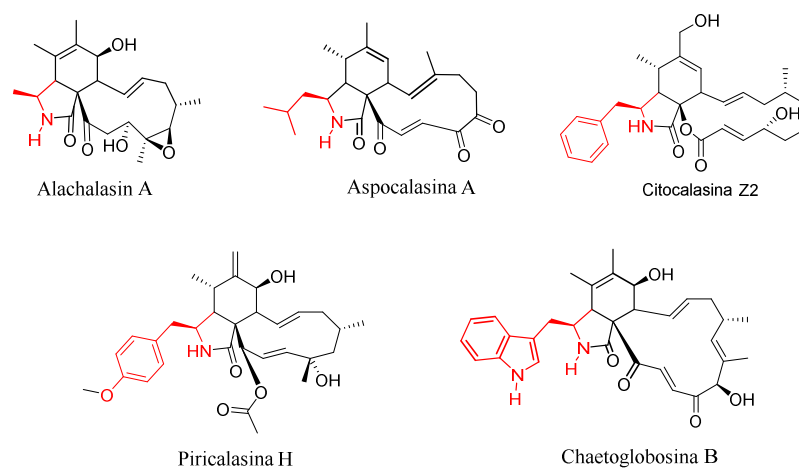


FIGURA 1.8 - Exemplo de estruturas químicas das classes de citocalasinas

A diversidade estrutural das citocalasinas não se restringe apenas a incorporação dos aminoácidos mencionados, mas também por intrigantes modificações ao longo de seu esqueleto, como mostrada na FIGURA 1.9. O fungo *Spicaria elegans* produziu uma série de citocalasinas de cadeia aberta no lugar do macrociclo, a qual está exemplificada na FIGURA 1.9 pela citocalasina Z10 (LIU et al.; 2008). A espicocalasina A, também produzida por *Spicaria elegans*, é uma aspochalasinina incomum, uma vez que, apresenta uma unidade cicloheptanona (LIN et al., 2009). A fomopsicalasina difere da maioria das citocalasinas por apresentar um sistema tricíclico composto por treze carbonos no lugar do macrociclo (HORN et al., 1995). Em contraste, a penocalasina possui uma unidade pirrol pertencente ao macrociclo (NUMATA et al., 1995).

Outra alteração estrutural bastante interessante foi reportada em cultura de *Aspergillus niveus* LU9575, produtor das aspocalaminas A-D (GERBHARDT et al., 2004), as quais possuem peptídeos ligados ao macrocíclo, exemplificado pela aspocalamina A na FIGURA 1.9.

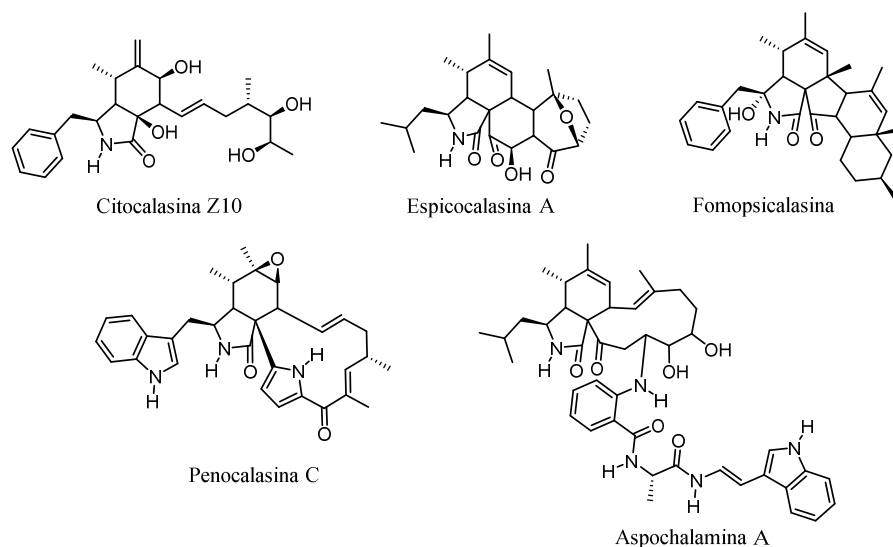


FIGURA 1.9- Exemplo de citocalasinas estruturalmente incomuns

Curiosamente os organismos produtores de citocalasinas ocupam os diferentes nichos ecológicos e, desta forma, a secreção destes compostos deve desempenhar algum papel importante no estabelecimento da interação, seja ela benéfica ou não. O fungo saprofítico *Penicillium expansum*, frequentemente encontrado em frutas em estágio de apodrecimento, produz chaetoglobosinas (ANDERSEN et al., 2004). Existem inúmeros relatos da produção de citocalasinas por fungos endofíticos isolados dos mais diversos ambientes, o que permite a muitos pesquisadores discutir a possibilidade destes compostos estarem envolvidos no balanço da relação hospedeiro-simbionte (TAN e ZOU, 2001). Um exemplo desta situação envolve a citocalasina F, produzida pelo fungo endofítico isolado de *Teucrium scorodonia*, a qual possui atividade algicida e também inibição da fotossíntese. Desta forma, esta citocalasina confere a planta proteção contra fitopatógenos (KONIG, et al., 1999). A formação de citocalasinas pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*

pode implicar que estes metabólitos secundários atuem como mediadores de patogenicidade (FUJII et al., 2000).

Citocalasinas exercem um papel amplo de atividades biológicas. Devido a sua capacidade de se ligarem à actina, elas interferem nos mais variados processos celulares, como na citocinese e motilidade intracelular. A actina é uma proteína presente em todas as células eucarióticas e a polimerização de seus monômeros leva à formação de microfilamentos, os quais estão intimamente relacionados ao comportamento dinâmico do citoesqueleto. As citocalasinas interagem com os filamentos de actina e, alteram suas propriedades, conseqüentemente, a citocinese é inibida, prejudicando o processo de divisão celular; gerando células multinucleadas. Este efeito é amplamente usado no estudo de processos celulares (COOPER, 1987 e PETERSON e MITCHISON, 2002).

Devido ao seu mecanismo de interferir em ciclos celulares, as citocalasinas exercem um alto efeito citotóxico. O isolamento dos primeiros representantes da classe foi biomonitorado pela ação citostática dos extratos *in vitro*. Estudos posteriores mostraram forte atividade citotóxica contra um painel de linhagens de células cancerígenas humanas e de murinos. A potente atividade antitumoral das citocalasinas tem despertado muito interesse, tornando-as candidatas a drogas anticâncer (ALVI et al., 1997, UDAGAWA et al., 2000, GAN et al., 1998). No entanto, nenhuma droga com capacidade de interferir na actina entrou em fase de testes clínicos, em razão da severa ou não seletiva citotoxicidade (STEHN, et al., 2006).

Às citocalasinas são também atribuídas propriedades antibacteriana e antifúngica. BETINA et al. (1972) reportaram que a citocalasina A exerce atividade contra *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, bem como atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea*. Já à citocalasina D foi atribuída somente a atividade antimicótica.

Várias citocalasinas exibem uma gama de atividades biológicas, muitas das quais não estão diretamente associadas à interação com os filamentos de actina. Algumas citocalasinas como a citocalasina B, interferem no transporte de glicose (RAMPAL et al., 1980 e GRIFFIN et al., 1982) e influenciam na atividade da tireóide na liberação dos hormônios do crescimento (SCHOFIELD et al., 1971).

As citocalasinas A e L-696,474 atuam na inibição da HIV-1 protease, enzima que desempenha um papel crucial na maturação do vírus. Logo, esta inibição resulta na redução da propagação viral (ONDEIKA, et al., 1992, LINGHAM et al., 1992 e DOMBROWSKI et al., 1992).

A complexa estrutura das citocalasinas sugere uma rota biossintética mista, envolvendo um aminoácido e blocos construtores malonil. Os primeiros estudos biossintéticos envolvendo as citocalasinas foram realizados por TAMM e colaboradores (1974, 1975, 1976, 1989). Nestes estudos uma série de precursores marcados isotopicamente ^{13}C , ^{14}C e ^3H foi administrada aos meios de cultivos de *Phoma* sp. e *Zygosporium masonii*, visando compreender a biossíntese das citocalasinas B e D, respectivamente, através de degradação química. O padrão alternado da distribuição radioisotópica nos produtos de degradação apontou que, a citocalasina B é formada a partir uma unidade policetídica composta por dezoito carbonos, e a citocalasina D por dezesseis carbonos (GRAF, et al. 1974, VEDERAS, et al. 1975). Experimentos posteriores revelaram que a S-adenosil metionina (SAM) é a doadora dos grupos metila nas posições C-12 e C-16 da citocalasina B e do metileno C-12 e dos dois grupos metila ligados a C-16 e C-18 na citocalasina D (GRAF, et al. 1974). Experimentos com ^{14}C em C-1 e C-2 fenilalanina mostraram que a incorporação da unidade do aminoácido ocorre de forma intacta (VEDERAS, et al. 1976 e HÄDENER et al., 1989).

Estudos baseados em genética e biologia molecular, mostraram que a biossíntese da chaetoglobosina A, de *Penicillium expansum*, envolve o gene

cheA, o qual codifica a enzima policetídeo sintase-peptídeo não ribossomal sintetase (PKS-NRPS) e, a rota biossintética pode ser generalizada para as demais citocalasinas (SCHUMANN e HERTWECK, 2007). Recentemente QIAO et al. (2011) descobriram o gene *ccs* de *Aspergillus clavatus*, o qual está envolvido na biossíntese das citocalasinas E e K e propuseram a via biossintética representada na FIGURA 1.10. Primeiramente o octacetídeo é formado na unidade iterativa da PKS. Os pesquisadores propõem que domínio ER é inativo e, subsequentemente, uma molécula de fenilalanina é ativada no domínio A do módulo da NRPS e transferida ao braço da fosfopanteteína no domínio T. O domínio C catalisa o ataque nucleofílico do grupo amina da fenilalanina a carboxila eletrofílica do octacetídeo, levando a um intermediário tetraédrico no domínio T. O domínio R na extremidade do módulo NRPS deve catalisar a libertação reductiva do nascente aminoacil-tioéster gerando um aldeído intermediário, o qual pode sofrer uma condensação de Knoevenagel intramolecular para originar o 3,5-dissubstituído 3-pirrolin-2-ona. Em seguida, é proposta uma reação de Diels-Alder [4+2] intramolecular entre o dieno da cadeia policetílica e a unidade 3-pirrolin-2-ona, formando, deste modo, um intermediário de 11 membros. Vale ressaltar que, ainda não existe nenhuma comprovação do fechamento do anel pela enzima Diels-Alderase, sendo este um universo a ser explorado. Posteriormente acontecem diversas etapas de oxidações, incluindo hidroxilações em C-17 e C-18, uma oxidação do álcool em C-17, uma epoxidação entre C-6 e C-7 e duas oxidações de Baeyer-Villiger, levando finalmente as citocalasinas E e K.

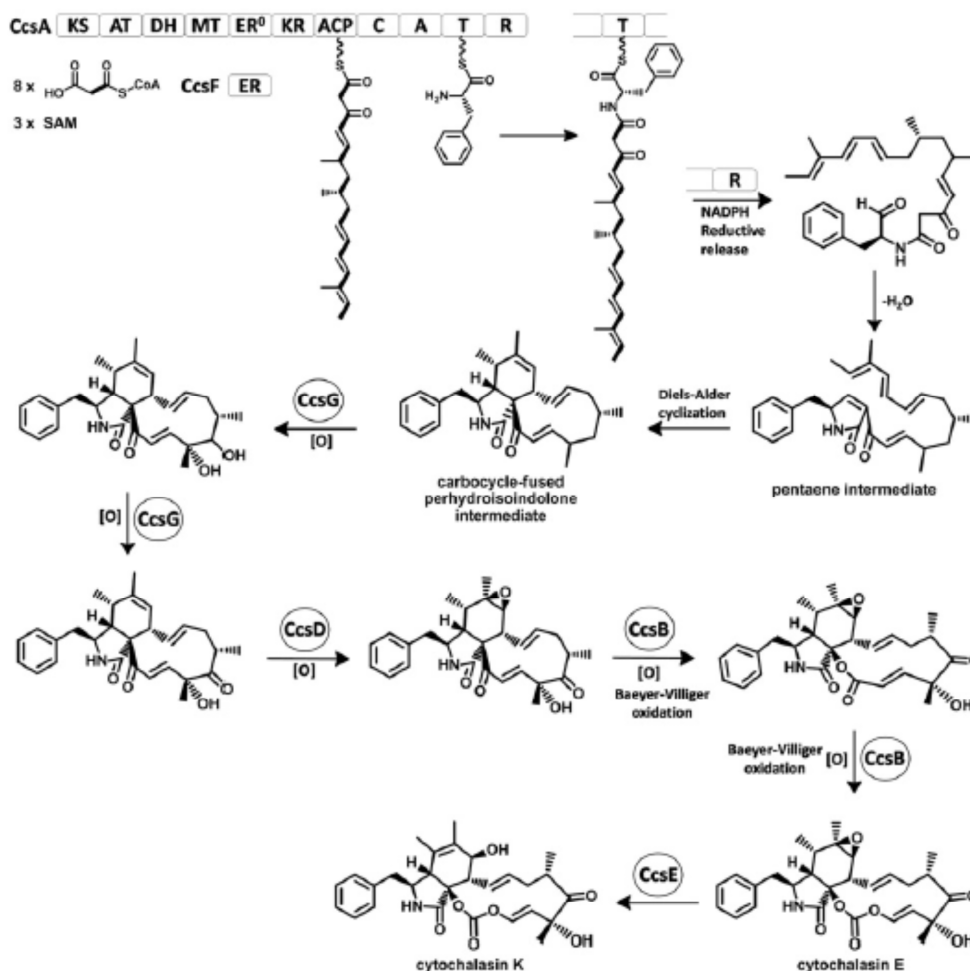


FIGURA 1.10 - Proposta da rota biossintética das citocalasinas E e K (QIAO et al., 2011)

Os principais produtores de citocalasinas são pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Zygosporium*, *Phoma*, *Metarhizium*, *Chaetomium*, *Rosellinia*, *Ascochyta*, *Hypoxylon*, *Phomopsis* e *Xylaria* (SCHERLACH et al., 2010).

Fungos do gênero *Xylaria* são hábeis produtores de citocalasinas, sendo atualmente reportadas vinte e duas estruturas destes compostos. Dentre as espécies produtoras das citocalasinas, apresentadas na FIGURA 1.11, destacam-se *Xylaria obovata* (ABATE, et al., 1997), *Xylaria hypoxylon* (ESPADA et al., 1997), *Xylaria mellisii* (PITTAYAKHAJONWUT et al., 2005), *Xylaria cubensis* (EDWARDS et al., 1991), *Xylaria cubensis* PSU-MA34 (KLAIKLAY et al., 2012), *Xylaria* sp. BCC9653 (PONGCHAROEN et al., 2007), *Xylaria* sp.

SCSIO 156 (CHEN et al., 2011), *Xylaria* sp. A23 (LI et al., 2012) e *Xylaria* sp. PSU-G12 (RUKACHAISIRIKUL et al., 2013).

A biossíntese das citocalasinas representadas por **46-67** tem como aminoácido precursor a fenilalanina, no entanto, verifica-se uma diversidade metabólica em relação a esta classe de compostos, uma vez que, *Xylaria* sp. PSU-F100 (RUKACHAISIRIKUL et al., 2009) é capaz de produzir a aspocalasina xylarisina (**66**) e *Xylaria euglossa* a penocalasina B2 (**67**), uma chaetoglobosina, pois o aminoácido incorporado é o triptofano. (WANG, et al., 2005).

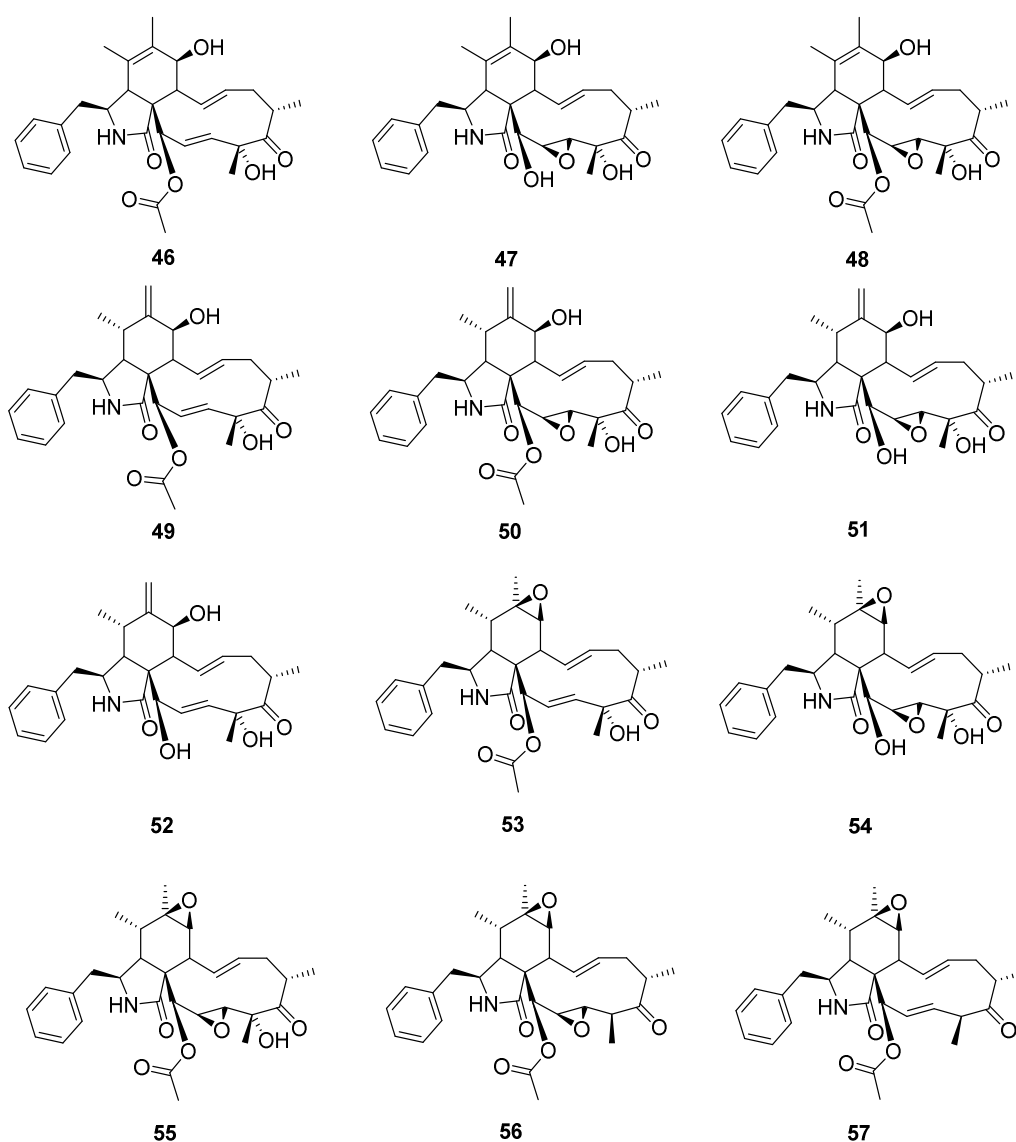


FIGURA 1.11 - Citocalasinas produzidas por espécies de *Xylaria*

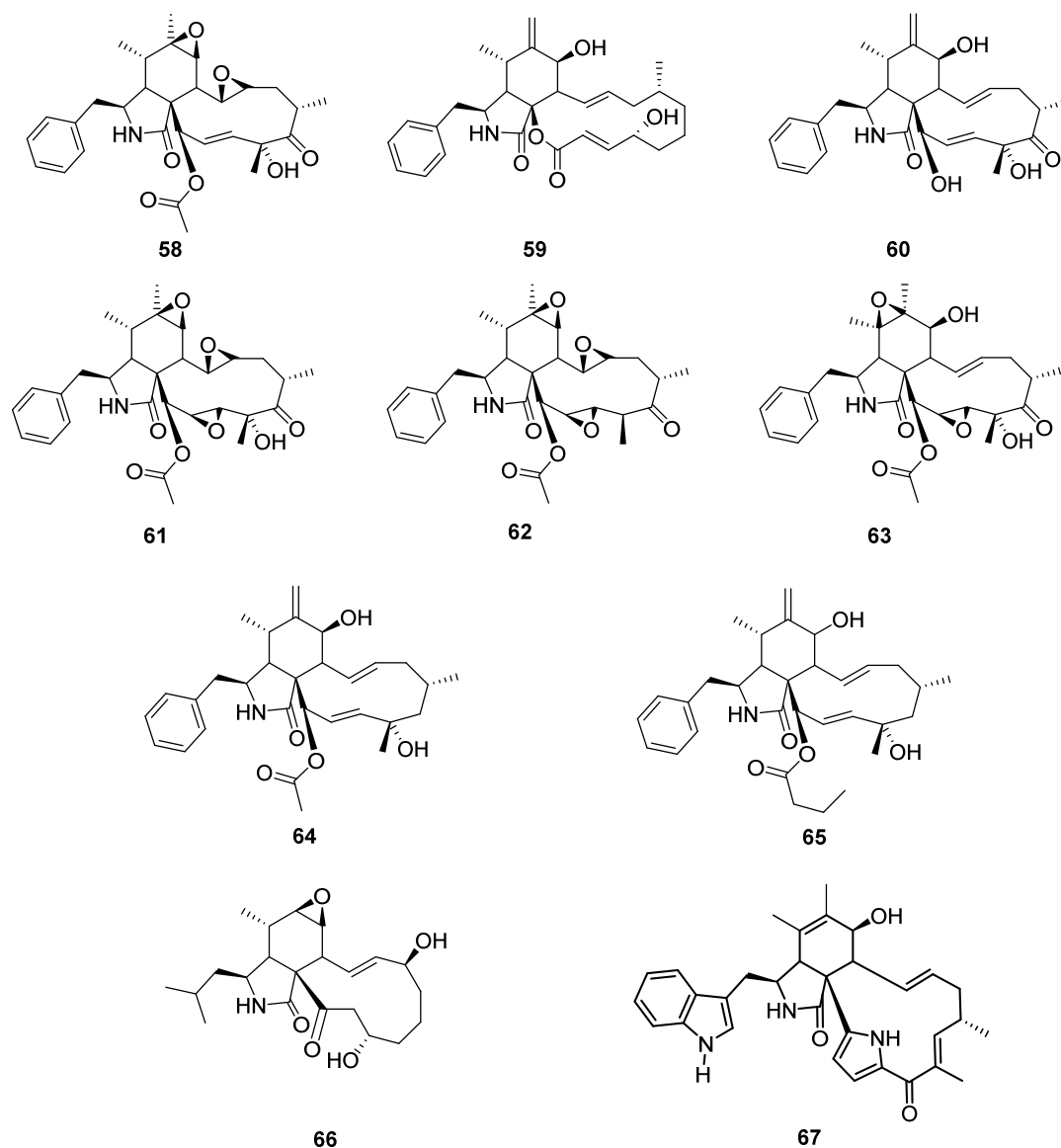


FIGURA 1.11 - Citocalasinas produzidas por espécies de *Xylaria* - continuação

1.4 Estratégias para o aumento da diversidade metabólica – abordagem OSMAC

Os micro-organismos são excelentes fontes de novas moléculas, as quais podem ter aplicabilidade como protótipo nas áreas farmacêutica, agroquímica, alimentícia e cosmética. O metabolismo secundário fúngico é estruturalmente bastante diversificado e sua função baseia-se, principalmente, na autodefesa contra outros micro-organismos, uma vez que, o seu habitat natural

os levas a desafios ecológicos pela condição dinâmica que o ambiente lhes oferece (SHWAB e KELLER 2008, SUN et al., 2011).

Micro-organismos endofíticos representam um significativo reservatório de diversidade genética e uma fonte importante para a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos. Inúmeros e importantes metabólitos descritos na literatura são produzidos por estes organismos. Entre estes, destacam-se agentes anticancerígenos, imunossupressivos, antiparasitários, antibióticos, entre outros (GUNATILAKA, 2006). As interações entre o fungo e o meio ambiente refletem no aumento da produção de seus metabólitos. Dessa forma, os fungos endofíticos são uma fonte importante para a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos, uma vez que crescem nos tecidos internos de plantas e seu crescimento envolve contínua interação metabólica entre os organismos.

Uma estratégia inicial traçada para a exploração do metabolismo fúngico, e conseqüente, busca de novos compostos, consistia em isolar um amplo número de fungos dos mais variados ambientes como florestas tropicais, desertos, áreas glaciais e/ou isolar estes micro-organismos de diversas fontes, tais como plantas, líquens, insetos, dentre outros. No entanto, estudos recentes mostraram que os micro-organismos possuem um potencial genético inexplorado para a produção de metabólitos secundários, uma vez que, em condições padronizadas de cultivo muitos desses genes estão “silenciados” (SCHERLACH e HERTWECK, 2009).

BODE et al. (2002) propuseram a abordagem denominada OSMAC (One Strain Many Compounds), na qual uma única cepa de micro-organismo é capaz de produzir uma infinidade de compostos. Esta abordagem consiste em mimetizar o meio ambiente, através de modificações nas condições de cultivo, sejam elas bióticas ou abióticas.

O fator biótico baseia-se nas interações entre os micro-organismos no meio ambiente, as quais estão relacionadas à competição por espaço e

nutrientes e que está diretamente envolvida na indução de metabólitos secundários. Desta forma, o cultivo de um ou mais micro-organismos no mesmo frasco fermentativo, pode levar a produção de novos metabólitos que não eram previamente observados nas culturas individuais de cada micro-organismo (SCHERLACH e HERTWECK, 2009). Recentemente, OLA et al. (2013) mostraram a influência da bactéria *Bacillus subtilis* 168 trpC2 no metabolismo de *Fusarium tricinctum*. A interação entre ambos levou a um incremento nos metabólitos já produzidos pelo fungo, além da produção de três novos compostos, macrocaporna C, N-(carboximetil) ácido antranílico e citreoisocumarinol, conforme pode ser visto na FIGURA 1.12. Os autores mostraram que a produção destas substâncias ocorre de forma específica, uma vez que, o co-cultivo do fungo com *Streptomyces lividans* não promoveu a produção dos compostos mencionados.

Os fatores abióticos estão relacionados a modificações química e/ou físicas do meio de cultura. As modificações referentes aos parâmetros físicos relacionam-se com a temperatura, aeração e a incidência luminosa (MIAO, 2006) já, dentre os parâmetros químicos podem-se citar a variação da concentração de fontes de carbono e nitrogênio, a alteração de pH, salinidade (GOGOI et al., 2008, HUANG, et al., 2001) e a adição de precursores e inibidores da biossíntese de metabólitos de interesse (CHRISTIAN et al., 2005).

Alteração do meio de cultura através da suplementação de diferentes fontes de carbono pode promover um incremento na diversidade química, uma vez que, este elemento é a principal fonte de energia. Recentemente, foi relatada a produção de nafto- γ -pironas diméricas pelo fungo *Aspergillus tubingensis* em meio BD (batata-dextrose) (HUANG et al., 2010), no entanto, quando o micro-organismo foi cultivado em arroz foram isoladas quatro novas estruturas desta classe de compostos, rubasperona D, rubasperona E, rubasperona F e a rubasperona G, conforme mostra a FIGURA 1.12 (HUANG et al., 2011).

A fonte de nitrogênio é outro fator importante na produção de metabólitos secundários. Os micro-organismos são capazes de utilizar uma grande quantidade de compostos orgânicos e inorgânicos, bem como misturas complexas, como peptonas, extratos de soja, levedura como fonte de nitrogênio, para produzir as proteínas que são necessárias ao seu desenvolvimento e também na biossíntese do metabolismo secundário. XIAOBO e colaboradores (2006) demonstraram que altas concentrações de extrato de levedura (composto por vitaminas, aminoácidos, lipídeos, e outras substâncias) prejudicaram o desenvolvimento fúngico e, por sua vez, suprimiu a biossíntese de metabólitos secundários. Em contrapartida, alguns pesquisadores relatam que meios de cultura contendo altas concentrações de extrato de levedura ou extrato de malte, suplementados com minerais e quantidades traço de metais, geralmente, levam a um incremento na variedade e na produção de produtos naturais (FRISVAD et al., 2008). ARAI et al. (2012) verificaram a resposta de *Penicillium* sp. AZ, produtor do pigmento PP-V (FIG. 1.12), frente à variação de compostos nitrogenados. Os experimentos mostraram que o íon amônio é mais eficiente na produção do pigmento quanto comparado ao nitrato, no entanto, o extrato de levedura não levou a produção da substância.

WANG e colaboradores (2014) cultivaram o fungo marinho *Ascotricha* sp. em meio Czapek, porém substituindo o sal $MgSO_4$ por $MgCl_2$, além disso, verificaram a influência da concentração do sal no metabolismo secundário fúngico. Os pesquisadores mostraram que a aplicação da abordagem OSMAC promoveu o aumento da diversidade química microbiana, uma vez que, além dos metabólitos já conhecidos, o micro-organismo produziu, em baixas concentrações do sal, três novos sesquiterpenos cariofilenos, 6-O-desmetil pestalotiopsina A, 6-O-desmetil pestalotiopsina C e 6-O-desmetil pestalotiopsina B, conforme ilustra a FIGURA 1.12. Este foi o primeiro relato da produção desta classe de compostos por fungo do gênero *Ascotricha*, sendo que análogos

destas substâncias são comumente isolados dos fungos *Humicola fuscoatra*, *Pestalotiopsis* sp. e *Cytospora* sp..

A abordagem OSMAC representa uma ferramenta de extrema utilidade para elucidar o metaboloma dos diversos micro-organismos, ou seja, detecção e identificação dos metabólitos secundários produzidos por um determinado organismo (BODE et al., 2002). Embora uma alteração sistemática nos parâmetros de cultivo possa ser aplicada para linhagens selecionadas, a abordagem OSMAC é aleatória e não permite o desenvolvimento de uma regra comum para todos os micro-organismos, uma vez que, cada um terá uma resposta particular definida pelo seu genoma (BODE, et al., 2002). O objetivo subsequente da OSMAC está relacionado com a identificação dos genes responsáveis pela indução ou alteração do padrão metabólico, cuja meta seria a avaliação e determinação de quais compostos de um determinado meio de cultivo seriam responsáveis pela indução da biossíntese de metabólitos desconhecidos (BODE et al., 2002).

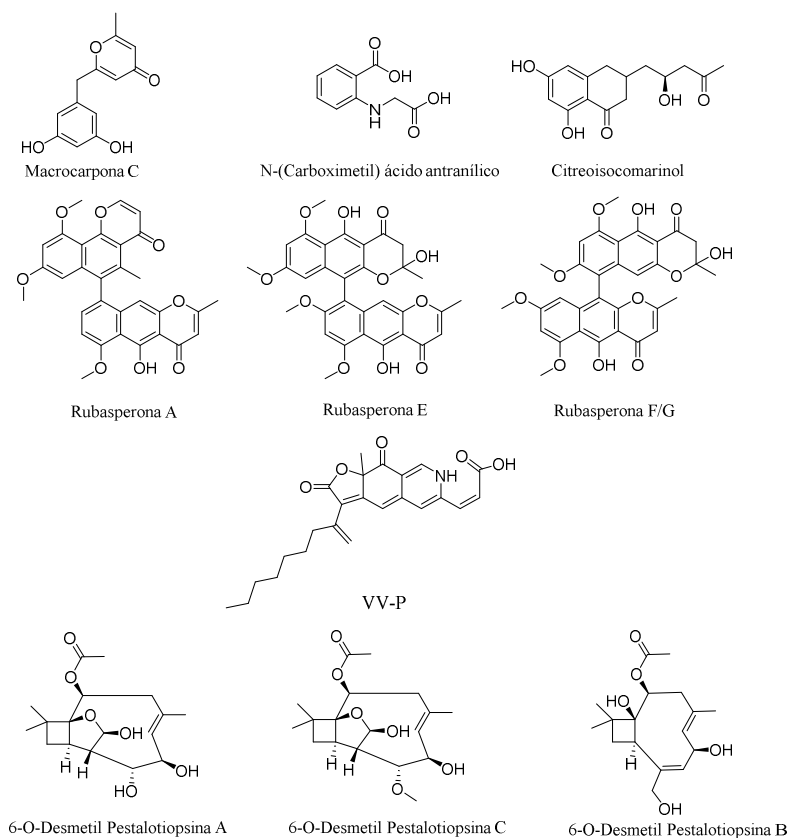


Figura 1.12 - Metabólitos secundários obtidos através da abordagem OSMAC

A característica aleatória da abordagem OSMAC para despertar a biossíntese de novos produtos naturais é fortemente dependente de se encontrar as condições ideais para que os genes silenciados sejam expressos em laboratório. Recentemente, técnicas modernas de genômica, regulação gênica, bio-informática e epigenética vêm sendo utilizadas para se compreender e promover a expressão destes genes.

1.5 A espectrometria de massas na identificação de micro-organismos

A análise por MALDI-TOF consiste em adicionar uma solução da matriz, geralmente um composto orgânico de baixa massa molecular, ao analito e após a secagem e co-cristalização da amostra-matriz, o “target” é introduzido ao espectrômetro de massas. O sistema amostra-matriz é irradiado com um feixe de laser pulsado, o qual promoverá a dessorção e ionização da amostra (também da matriz). Através da aplicação de uma diferença de potencial os íons são encaminhados para a câmara de voo (TOF), os quais serão separados de acordo com suas respectivas relação massa-carga (m/z) e, ao chegarem ao detector o resultado é registrado em um gráfico de m/z versus intensidade, conforme pode ser visto na FIGURA 1.13.

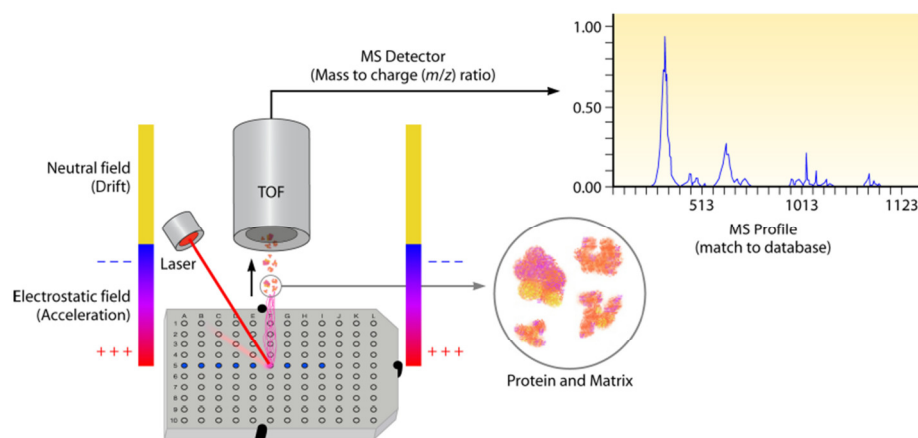


FIGURA 1.13 - Representações esquemática da análise por MALDI-TOF (Adaptado de CLARK et al., 2013)

A matriz tem um papel fundamental nas análises por MALDI-TOF. Estas são geralmente sólidos cristalinos com baixa pressão de vapor e, devem apresentar como característica absorver energia no comprimento de onda do laser, promovendo, desta forma, a ionização da amostra. Além disso, devem ser estáveis em região de alto vácuo, solúveis em solventes compatíveis com a amostra, e misturarem-se com a amostra para que ocorra a co-cristalização. Nos casos em que são empregados laser na região do UV, a matriz deve possuir grupo cromóforo para auxiliar na absorção do laser, prevenindo a degradação da amostra.

As matrizes mais comumente utilizadas em análises de biomoléculas estão representadas na FIGURA 1.14. Para análises de triacilgliceróis emprega-se, corriqueiramente, a matriz α -ciano-4-hidroxi ácido cinâmico (BEAVES et al., 1989). A matriz 2,5-dihidroxi ácido benzoico (DHB) é frequentemente utilizada em análises de proteínas digeridas, carboidratos, glicopeptídeos, proteínas e peptídeos com massa inferior a 10 kDa (ALBRETHSEN, 2007). As matrizes ácido ferúlico e sinapínico são utilizadas em análises de proteínas de elevada massa molecular (maior que 10 kDa), além de melhorar a resolução de massa (BEAVES et al., 1989).

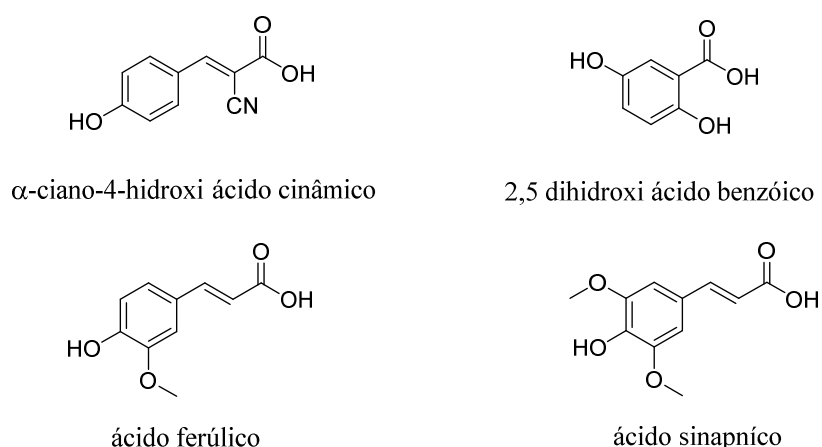


FIGURA 1.14 - Matrizes comumente utilizadas em análises de biomoléculas

Uma estratégia bastante inovadora e que vem ganhando destaque no meio científico é a utilização da espectrometria de massas para identificação, diferenciação e classificação de micro-organismos, uma vez que, biomoléculas específicas presentes nas células ou esporos microbianos, são utilizadas como biomarcadores. A capacidade de registrar “íons biomarcadores”, em uma ampla faixa de relação massa-carga (m/z), que são únicos e representativos para cada micro-organismo, forma a base das aplicações atuais de espectrometria de massa em microbiologia (FENSELAU e DEMIREV, 2011). Durante a última década, a espectrometria de massas empregando ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI) e analisador de massas por tempo de voo (TOF) tem se mostrado uma ferramenta útil para classificação e identificação de micro-organismos. A facilidade de interpretação dos dados, devido à presença majoritária de íons monocarregados e a geração de íons moleculares na região de alta relação massa-carga, fazem com que MALDI-TOF seja uma excelente estratégia para a caracterização de células intactas de micro-organismos.

Esta instrumentação tem alcançado êxito para diferenciação e identificação de bactérias intactas, através da utilização do perfil de proteínas como biomarcadores específicos, dessa forma, diferentes espectros de massas são obtidos para espécies distintas (VALENTINE et al., 2002).

A aplicação da técnica de identificação de fungos por MALDI-TOF de células intactas, ICMS (espectrometria de massas de células intactas), iniciou-se por volta do ano 2000, através das análises dos fungos *Aspergillus Niger* (LI et al., 2000), *Penicillium* spp., *Scytalidium dimidiatum*, *Trichophyton rubrum* (WELHAM et al., 2000), sendo a metodologia de preparo de amostra baseada em análise de bactérias.

Diferentemente das bactérias, as células fúngicas são maiores e apresentam parede celular rígida, a qual é composta por diferentes polissacarídeos, peptídeos, proteínas, lipídeos, polifosfatos e sais inorgânicos. Diferentes espécies apresentam distinção na composição da parede celular e,

consequentemente, este fato pode ser usado como pré-requisito para classificação e diferenciação de espécies fúngicas por MALDI-TOF (KEMPTNER et al.; 2009).

A qualidade do espectro de massas de MALDI-TOF é altamente dependente do preparo de amostra, especialmente devido à complexidade dos micro-organismos, uma vez que, não existe um protocolo padronizado que possa ser aplicado. Desta forma, pequenas variações durante o preparo de amostra-matriz, podem afetar o resultado de forma significativa.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi contribuir com o estudo químico de fungos da família Xylariaceae. Neste sentido, explorou-se o metabolismo secundário de dois micro-organismos endofíticos codificados como N1CL3 e N1CL5, isolados de *Cupressus lusitanica*. Aplicou-se a abordagem OSMAC frente o metabolismo do fungo N1CL5, pela adição de diferentes fontes nitrogenadas, visando aumentar a diversidade metabólica, especialmente em relação à produção de novas citocalasinas. Visou-se compreender a biossíntese das citocalasinas, especialmente da citocalasina D, através da administração de precursores marcados isotopicamente tanto com ^{15}N e ^{13}C . Além disso, empregou-se a técnica de MALDI-TOF com o objetivo de se traçar um perfil de biomoléculas que fosse capaz de diferenciar os fungos pertencentes a esta família. Por fim, visou-se a criação de uma coleção de Xylariaceae, e aplicou-se o perfil de biomoléculas marcadoras criados por MALDI-TOF e o perfil metabolômico obtido por HRMS para discriminar os membros desta família.

3. Parte Experimental

3.1 Materiais e equipamentos

3.1.1 Materiais utilizados para o isolamento e cultivo dos fungos endofíticos

- Ágar bacteriológico SIGMA[®];
- Água destilada;
- Álcool 70%;
- Alça de platina;
- Batata inglesa;
- Bico de Bunsen;
- Dextrose Mallinckrodt[®];
- Lâminas de bisturi;
- Papel de filtro qualitativo (80g Ø=12,5 cm) SATELIT[®];
- Placas de Petri;

3.1.2 Equipamentos utilizados para o isolamento e cultivo dos fungos endofíticos

- Autoclave vertical Phoenix AV 75 e Soc. FABBE 103;
- Capela de fluxo laminar VECO VLFS -12M;
- Estufa de secagem e incubação FANEM 347 CD

3.1.3 Equipamentos utilizados em preparação e análises de amostras

- Agitador de tubos AP56 Phoenix
- Bomba LC10AD gradient pumps, Shimadzu;
- Cromatógrafo a líquido (escala preparativa) LCL-10A, Shimadzu;

- Detector de UV (PDA) para HPLC Shimadzu SPD-10A UV-Vis;
- Espectrômetro triplo quadrupolo ESI, QuattroLC (Micromass) acoplado ao HPLC Alliance 2605
- Espectrômetro de massas Q-TOF impact HD -Bruker- acoplado ao UHPLC Shimadzu Nexera (Bruker/Indaiatuba);
- Espectrômetro de massas Synapt G2-S (Waters) acoplado ao UPLC Acquity Class (Waters/Barueri);
- Espectrômetro de massas Micro Tof-Q II -Bruker- acoplado ao sistema de cromatografia líquida Shimadzu Prominence - (USP/São Carlos);
- Espectrômetro de massas Axima-CFR MALDI-TOF, Shimadzu Biotech Kratos Analytical (Universidade de Tecnologia de Viena);
- Espectrômetro de massas Autoflex Speed - MALDI-TOF, Bruker
- Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear ARX-200;
- Injetor para HPLC Shimadzu Auto Injector SIL-10ADVp;
- Liofilizador, Analítica;
- Microondas LG Smart Dial modelo MS 158DDA;
- Módulo de comunicação detector/computador em HPLC Shimadzu CBM-10A Communication BUS Module;
- Rotaevaporador Büchi R-200 com banho de aquecimento Büchi B-490 e rotaevaporador Büchi R-114 com banho de aquecimento Büchi B-480;
- Sonicador Btandson 1510.

3.2 Suportes cromatográficos e solventes utilizados

3.2.1 Suportes cromatográficos

- Cromatografia em camada delgada analítica: Sílica gel em folhas sobre alumínio (AlugramTM SIL G/UV₂₅₄ – Macherey-Nagel);
- Coluna cromatográfica analítica Luna Phenyl-Hexyl 5 µm, (250 X 4.60 mm);

- Coluna cromatográfica Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm (2.1 x 50 mm);
- Coluna cromatográfica analítica Shimpack XR-ODS III 2.2 μm (150 x 2.0 mm);
- Coluna cromatográfica preparativa: Luna Phenyl-Hexyl 10 μm (250 X 21,20 mm).

3.3 Solventes empregados

- Solventes para cromatografia em bancada: destilados no DQ-UFSCar;
- Solventes grau HPLC: acetonitrila, isopropanol Mallinckrodt, metanol J. T. Baker, ácido trifluoroacético TEDIA, H₂O purificada MILLI-Q;
- Solventes deuterado: clorofórmio, metanol e ácido trifluoro acético Cambridge Isope LaboratoriesTM

3.4 Procedimento experimental

3.4.1 Cultivo dos fungos *NICL3* e *NICL5* isolados de *Cupressus lusitanica*

Preparou-se o meio de cultura BDA cozinhando-se 60 g de batatas descascadas e cortadas em cubos por 15 minutos em forno de microondas (potência 60W) com 150 mL de água. Em seguida, filtrou-se com o auxílio de uma gaze transferindo o caldo para um Erlenmeyer. Acrescentou-se 6,0 g de dextrose e após sua dissolução adicionou-se 4,5 g de ágar à mistura, homogeneizando-a e completando-se o volume para 300 mL de água destilada.

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

Os fungos *NICL3* e *NICL5* foram isolados anteriormente das folhas de *Cupressus lusitanica* e depositado na micoteca do LaBioMMI com o código

de LABIOMMI 455 e 445, respectivamente. Uma amostra do material fúngico foi retirada da micoteca e ativada em placas de Petri contendo o meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar).

3.4.2 Estudo da influência de aminoácidos livres no metabolismo de NICL5

Os ensaios foram realizados em meio líquido Czapek modificado, variando-se os aminoácidos como fonte de nitrogênio. A TABELA 3.1 apresenta a composição do meio e lista os aditivos nitrogenados e as suas respectivas massas empregadas neste experimento. Para cada fonte nitrogenada descrita na TABELA 3.1, o micro-organismo foi cultivado em triplicata em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura. Após a esterilização do meio, o fungo NICL5 foi inoculado e cultivado por 20 dias. Após este período, interrompeu-se o cultivo do micro-organismo por meio de filtração do micélio, sendo o filtrado particionado com acetato de etila (3 x 50 mL).

TABELA 3.1 - Composição do meio Czapek modificado (1,0 L) e aminoácidos empregados no estudo de aditivos nitrogenados frente ao metabolismo do fungo e NICL5

<i>Composição do meio Czapek</i>		<i>Aminoácido</i>	<i>Massa (g)</i>
Constituinte	Massa (g)		
		Alanina	1,740
K ₂ HPO ₄	1,0	Glicina	0,980
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	Glutamato	3,320
KCl	0,5	Histidina	0,400
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,010	Isoleucina	1,120
glicose	30	Leucina	1,520
		Prolina	0,800
		Serina	0,940
		Tirosina	0,460
		Triptofano	0,240

Para estudar a possível diferenciação metabólica ocasionada pelos aminoácidos utilizados neste experimento, realizaram-se análises utilizando LC-

MS. As análises cromatográficas foram realizadas com coluna Luna 5 μ Phenyl Hexyl, eluição gradiente e no modo reverso, empregando água e acetonitrila como fase móvel. O gradiente utilizado encontra-se descrito na Tabela 3.2.

As análises por espectrometria de massas empregaram fonte de ionização *Electrospray* no modo positivo e as condições de sintonia do equipamento estão descritas na TABELA 3.2.

O volume de injeção de amostra foi de 25 μ L e, a vazão foi de 1,0 mL/min., porém, necessitou-se de um divisor de fluxo para introdução de 0,2 mL da amostra no espectrômetro de massas.

TABELA 3.2 - Condições empregadas nas análises por LC-UV-MS (ESI+)

HPLC	Tempo	Concentração	Espectrômetro de massas	Experimento <i>Full scan</i>	
	(min.)	B (%)			
	0	30		Capilar	3,36 V
	10	50		Cone	20 V
	30	80		Extrator	3,0 V
	31	100		Lentes de radiofrequência	0,68 V
	35	100		Temperatura da fonte	50°C
	36	30		Temperatura do probe	300°C
	45	30			

* (A) água/ (B) acetonitrila

3.4.3 Efeito da influência das fontes de C e N na produção de citocalasina D

Para verificar a influência da fonte de N cultivou-se N1CL5 em meio Czapek de acordo com o mostrado na TABELA 3.1. Já para verificar a influência da fonte de carbono, o micro-organismo também foi cultivado em meio Czapek, tomando como fonte de nitrogênio o nitrato de sódio na concentração de 3.0 g/L, variando-se a fonte de C (30 g/L): amido, celobiose, frutose, glicerol, glicose, maltose, rafinose, ramnose e sacarose.

3.4.4 Cultivo do fungo NICL5 frente a substratos halogenados

Promoveu-se o cultivo de NICL5 em meio Czapek modificado, cuja composição está descrita na TABELA 3.1, porém, substituindo o extrato de levedura e o NaNO₃ pelas fontes nitrogenadas apresentadas na TABELA 3.3. O experimento foi realizado em triplicata em frascos de Erlenmeyer de 25 mL contendo 5 mL de meio de cultivo. A TABELA 3.3 apresenta os substratos halogenados e as massas utilizadas em 15 mL de meio de cultura.

TABELA 3.3 - Substratos N-halogenados

Substrato N-halogenado	Massa (mg)
NH ₄ Cl	480
NH ₄ Br	480
<i>p</i> -Cl-fenilalanina	15
<i>p</i> -Br-fenilalanina	15

Para avaliar o comportamento do micro-organismo frente aos substratos mencionados, analisaram-se os extratos fúngicos por LC-UV-MS, empregando as condições cromatográficas e de ionização reportadas na TABELA 3.2.

Cultivou-se o micro-organismo em larga escala (10 L) visando o isolamento dos novos metabólitos produzidos a partir do meio de cultivo Czapek enriquecido com NH₄Br. O isolamento baseou-se no fluxograma representado na FIGURA 3.1.

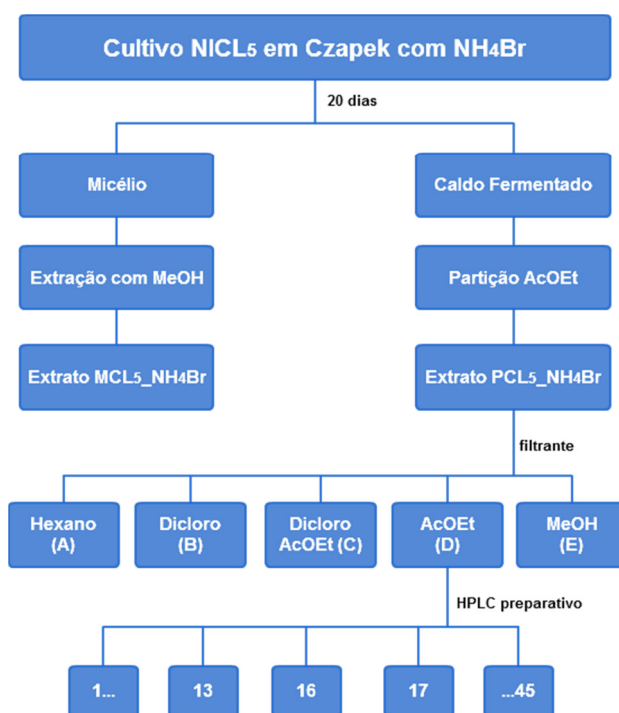


FIGURA 3.1- Fluxograma representativo das etapas de pré-purificação e isolamento dos compostos produzidos em meio de cultura Czapek suplementado com NH_4Br

3.4.5 Cultivo do fungo NICL5 em meio Czapek suplementado com derivados do ácido benzoico

Aplicando-se a abordagem OSMAC no cultivo do fungo NICL5 visando à produção de uma maior diversidade química, adicionou-se no meio de cultura Czapek, sem extrato de levedura, o ácido *p*-bromo benzoico. O experimento foi realizado em sextuplicata, sendo o micro-organismo cultivado em erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio de cultura suplementado com 25 mg do ácido. Após o período de 20 dias de incubação, o crescimento fúngico foi interrompido através da filtração do meio de cultivo, sendo este particionado com AcOEt (3x 600 mL) e o micélio extraído com EtOH. Ambos os extratos foram analisados por LC-UV-MS, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.2, TABELA 3.2, e comparados com o extrato fúngico proveniente do meio Czapek. Após a análise por LC-UV-MS os extratos fúngicos foram reunidos e, posteriormente fracionados empregando-se HPLC em escala

preparativa. Para a separação dos compostos utilizou-se como fase estacionária Phenyl-Hexyl 10 μm (250 X 21,20 mm) e fase móvel constituída por água e acetonitrila e modo de eluição gradiente conforme mostra a TABELA 3.4. O volume de injeção foi de 500 μL , a vazão de 12 mL/min e monitorados os comprimentos de onda de 220 e 300 nm.

O procedimento de tratamento da amostra e o cromatograma da separação em escala preparativa são mostrados nas FIGURAS 3.2 e 3.3, respectivamente.

TABELA 3.4 - Eluição gradiente utilizada na separação da fração LSA_apBrb

Tempo (min)	%B
0	30
15	50
25	80
30	100
35	100
35,1	30
45	30

* (A) água/ (B) acetonitrila

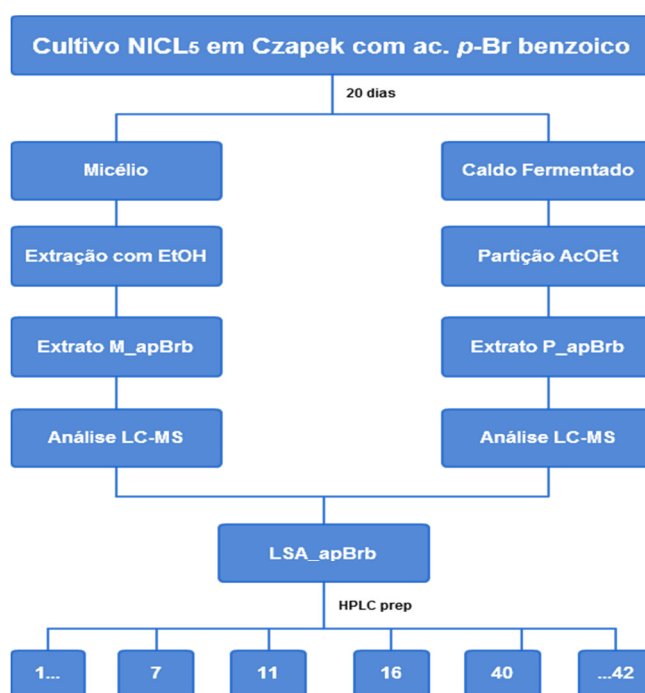


FIGURA 3.2 - Fluxograma das etapas de extração, análise e purificação dos compostos de interesse presentes no extrato LSA_apBrb

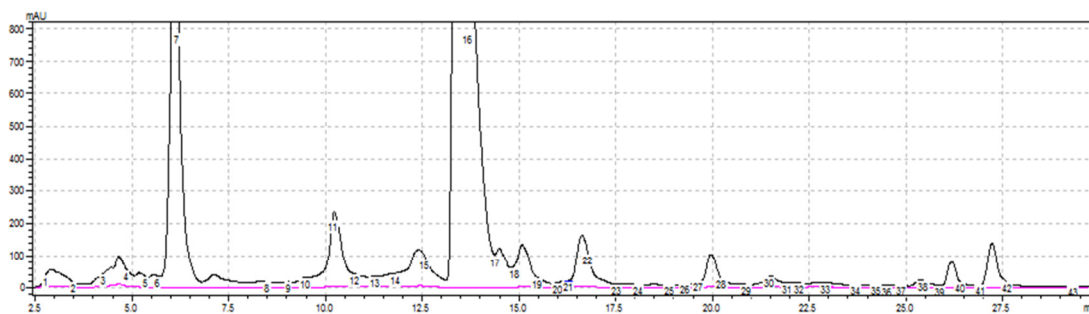


FIGURA 3.3 Cromatograma a 220 nm da fração LSA_apBrb representativo do isolamento dos compostos presentes nas frações 7, 11, 16 e 40

Para verificar a influência do substituinte no substrato frente ao metabolismo fúngico, novos experimentos foram realizados utilizando-se os ácidos *p*-cloro, hidroxí, amino e nitro benzoicos. A metodologia de cultivo do micro-organismo com estes substratos foi idêntica àquela efetuada com o ácido *p*-bromo benzoico.

3.4.6 Cultivo do fungo N1CL5 em meio Czapek suplementado com precursores marcados isotopicamente

O fungo N1CL5 foi cultivado em meio Czapek enriquecido com 0,3 g/L dos seguintes precursores marcados isotopicamente:

- Na¹⁵NO₃
- ¹⁵NH₄Cl
- 1-¹³C fenilalanina
- 2-¹³C fenilalanina
- 2-¹³C glicina
- 3-¹³C alanina

Cada experimento foi realizado em triplicata, sendo o fungo cultivado em frascos de Erlenmeyer de 25 mL, contendo 5 mL de meio de cultura. Após o período de 20 dias, separou-se a massa micelial do meio de cultivo. Os caldos fermentados de cada experimento foram particionados com

AcOEt (3 x 15 mL) e após a evaporação do solvente os extratos foram armazenados em freezer a -5°C.

O preparo de amostra consistiu em solubilizar os extratos em 5 mL de MeOH, os quais foram posteriormente submetidos a banho de ultrassom por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram filtradas empregando-se filtros de 0,45 µm e transferidas para vials de 2,0 mL. Deste modo, as amostras foram analisadas por UHPLC-MS. As análises cromatográficas foram realizadas em coluna Shimpack XR-ODS III 2.2 µm (150 x 2.0 mm) e modo reverso de eluição utilizando-se água e acetonitrila acidificados com 0,1% de ácido fórmico como fase móvel. O gradiente utilizado encontra-se descrito na TABELA 3.5. O volume de injeção de amostra foi de 2 µL e, a vazão foi de 0,2 mL/min.

As análises por espectrometria de massas empregaram o espectrômetro de massas Bruker maXis Impact QTOF com fonte de *Electrospray* e modo positivo de ionização. As condições de sintonia do equipamento estão descritas na TABELA 3.5

TABELA 3.5 - Condições empregadas nas análises por UHPLC/MS (ESI+)

UHPLC	Tempo	Concentração	Espectrômetro de massas	Experimento <i>Full scan</i>	
	(min.)	B (%)			
	0,0	15		Capilar	4,5 kV
	20	98		Varredura de massa	80-1080
				Calibrante	10 mmol/L CHO ₂ Na

* (A) água/ (B) acetonitrila ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico

3.4.7 Estudo do metabolismo de N1CL3 e N1CL5 em meio de cultivo Czapek suplementado com extrato de levedura

Promoveu-se o cultivo de N1CL3 e N1CL5 em meio Czapek (composição TABELA 3.1), no entanto, foi utilizado nitrato de s3dio (3,0 g/L) al3m de extrato de levedura (20 g/L). O experimento foi realizado empregando-se 16 erlenmeyers de 1000 mL contendo 300 mL de meio de cultivo.

Ap3s 20 dias de cultivo de N1CL3, o micro-organismo foi separado do caldo fermentativo, atrav3s de filtra3o a press3o reduzida. O mic3lio foi extra3do com MeOH (3x 500 mL) e concentrado em rotaevaporador. Em seguida, foi realizada parti3o com acetato de etila (3 x 500 mL). Os 5,0 L de caldo fermentativo foram congelados em ultra freezer (-80°C) overnight e, na sequ3ncia, liofizados at3 reduzir o volume para cerca de 1,0 L. Em seguida, o meio de cultura foi particionado com acetato de etila (3 x 1000 mL).

O extrato proveniente do mic3lio f3ngico foi submetido a processos de pr3-purifica3o, no qual este foi fracionado em coluna filtrante empregando como eluentes hexano, diclorometano, diclorometano:acetato de etila (1:1), acetato de etila e acetato de etila:metanol (1:1).

A fra3o MCL3_pAfDA foi submetida a cromatografia l3quida de bancada, empregando-se ODS (10 x 45 cm) como fase estacion3ria e metanol como eluente. O processo desenvolvido na pr3-purifica3o e isolamento dos metab3litos de N1CL3 est3o representados na FIGURA 3.4

J3 o estudo do metabolismo de N1CL5 envolveu processo de pr3-purifica3o da amostra similar ao desenvolvido para N1CL3, no entanto, empregou-se HPLC preparativo. Para a separa3o dos compostos utilizou-se como fase estacion3ria Phenyl Hexyl 10 μm (250 X 21,20 mm) e fase m3vel constitu3da por 3gua e acetonitrila. A separa3o ocorreu com modo de elui3o gradiente, conforme mostra a TABELA 3.6. Foi utilizada vaz3o de 17 mL/min e monitorados os comprimentos de onda 210 e 220 nm.

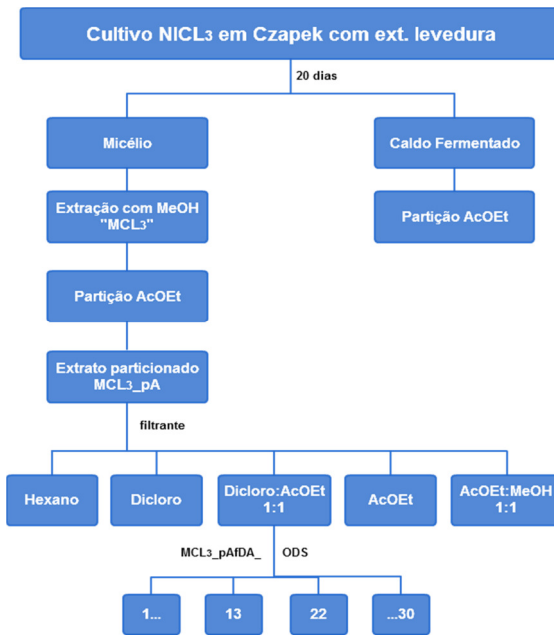


FIGURA 3.4 - Fluxograma das etapas de extração, pré-purificação e isolamento dos compostos de interesse presentes no extrato MCL3_pAfDA

TABELA 3.6 - Eluição gradiente utilizada na separação das frações MCL5_pAfDA e MCL5_pAfA

Tempo (min)	%B
0	40
10	50
25	80
35	100
50	100
52	40
62	40

*(A) água/ (B) acetonitrila ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico

Além das citocalasinas já produzidas pelo fungo, foram isolados de MCL5_pAfDA as frações, 13, 15 e 19. Já de MCL5_pAfA isolou-se a fração 9. Estes metabólitos foram analisados, posteriormente, por RMN e espectrometria de massas. A FIGURA 3.5 mostra um fluxograma que resume as etapas de cultivo, pré-purificação e isolamento dos compostos.

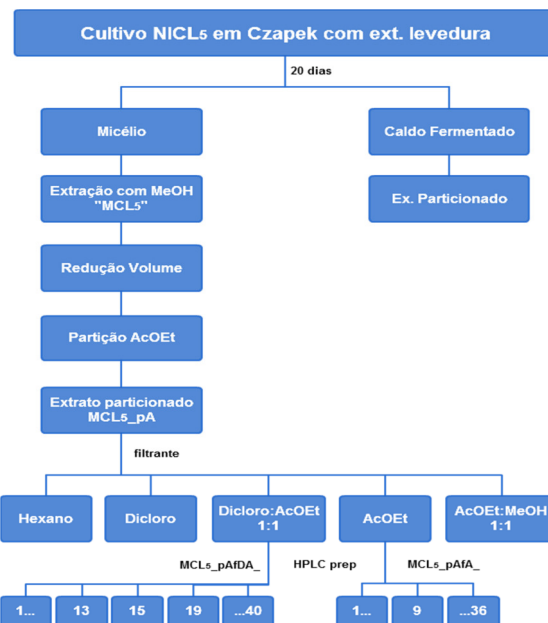


FIGURA 3.5 - Fluxograma das etapas de extração, pré-purificação e isolamento dos compostos de interesse presentes no extrato MCL5_pAfDA e MCL5_pAfA

As FIGURAS 3.6 e 3.7 representam os cromatogramas a 210 e 220 nm referentes às separações dos compostos 13, 15 e 19 de MCL5_pAfDA e 9 de MCL5_pAfA.

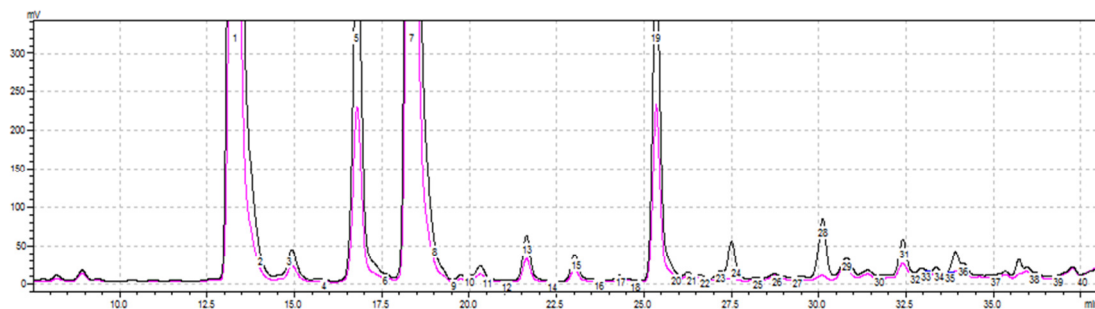


FIGURA 3.6 - Cromatograma a 210 e 220 nm da fração MCL5_pAfDA

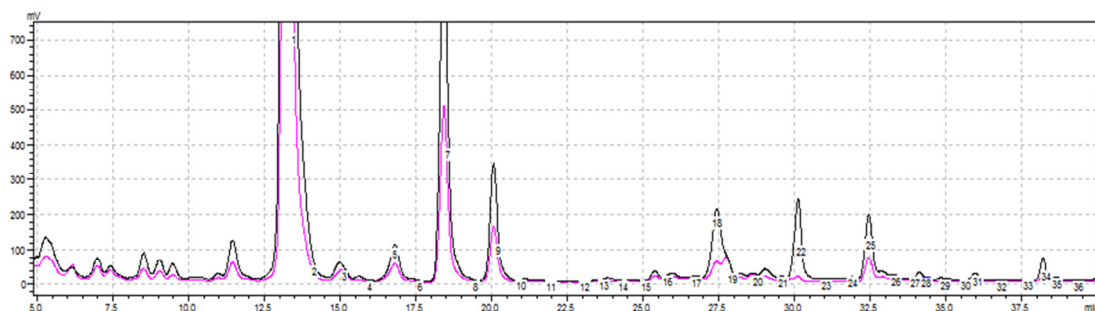


FIGURA 3.7 - Cromatograma a 210 e 220 nm da fração MCL5_pAfA

3.4.7.1 Avaliação da atividade biológica dos metabólitos secundários isolados frente à inibição da enzima acetilcolinaesterase

Os metabólitos secundários isolados de N1CL3 e N1CL5 foram avaliados frente à inibição da enzima acetilcolinaesterase, de acordo, com o descrito por VANZOLINE et al., 2003 e consistiu em monitorar por espectrometria de massas a inibição da conversão da acetilcolina em colina, tendo como referência a substância tacrina como inibidor. Desta forma, soluções de cada metabólito foram preparadas na concentração de 1mg/mL e diluídas para 200 μ M para os ensaios de inibição.

3.4.8 Análise por MALDI-TOF

As análises das amostras fúngicas foram adquiridas no equipamento AXIMA CFR⁺ da companhia Shimadzu Biotech Kratos Analytical, equipado com laser de nitrogênio ($\lambda= 337$ nm). Todos os espectros de massas foram gerados no modo positivo linear, usando *delayed extraction* otimizado para m/z 8000, intensidade do laser 83 unidades arbitrárias (escala relativa de 0-180). *Gate device* utilizado foi de m/z 1500 para remover os íons de m/z abaixo deste valor, os quais podem estar relacionados a cluster de matriz, pequenos peptídeos e contaminantes desconhecidos. Calibrou-se o equipamento através de calibração externa utilizando as proteínas insulina, citocromo C e apomiglobina na concentração de 4 pmol/ μ L.

3.4.8.1 Cultivo dos fungos para estudo do perfil das biomoléculas por MALDI-TOF

Ambos os micro-organismos foram cultivados tanto em meio de cultura sólido BDA (batata-dextrose-agar), AA (aveia-agar), MEA (extrato de malte-peptona agar), como em meio líquido Czapek, Czapek enriquecido com 2% de

extrato de levedura, ME (extrato de malte). Após o crescimento dos micro-organismos estes foram submetidos aos experimentos de MALDI-TOF.

3.4.8.2 Matrizes e cristalização

Para avaliar qual matriz forneceria a melhor obtenção dos picos foram testadas quatro matrizes em diferentes concentrações (TABELA 3.7).

O solvente para solubilizar a matriz também é um fator importante para obter bons resultados por MALDI-TOF, no entanto, este fator não foi avaliado, uma vez que diversos trabalhos realizados no grupo do Prof. Günter Allmaier apontam o sistema acetonitrila, 0,1% de TFA aquoso (7:3) como ótimo para cristalização e ionização da amostra/matriz (KEMPTNER, et al., 2009).

Quatro técnicas de cristalização foram empregadas, *thin-layer*, *dried droplet*, *volume technique* e *sandwich*. A técnica *thin-layer* consistiu em depositar a solução de matriz (0,75 µL) no *sample target* e após secagem a temperatura ambiente, aplicou-se o mesmo volume da amostra. Na técnica *sandwich*, procede-se de maneira igual ao preparo *thin-layer*, no entanto, aplica-se uma segunda camada de matriz (0,75 µL) sobre a amostra. Já na técnica *dried-droplet*, aplicou-se primeiramente a amostra (0,75 µL) e, na sequência, igual volume de solução de matriz, sendo a mistura amostra-matriz homogeneizada diretamente no *sample target* utilizando a ponteira da pipeta. Na cristalização denominada de *volume technique* misturou-se igual volume de matriz e amostra em um micro tubo EppendorfTM e, após a homogeneização, aplicou-se a mistura no *sample target*. A co-cristalização em todas as quatro técnicas de preparo de amostra foi monitorada utilizando-se o microscópio óptico (Nikon) e as imagens registradas com a câmera DS-5M (Nikon).

A FIGURA 3.8 ilustra as quatro técnicas de co-cristalização da amostra/matriz utilizadas neste trabalho.

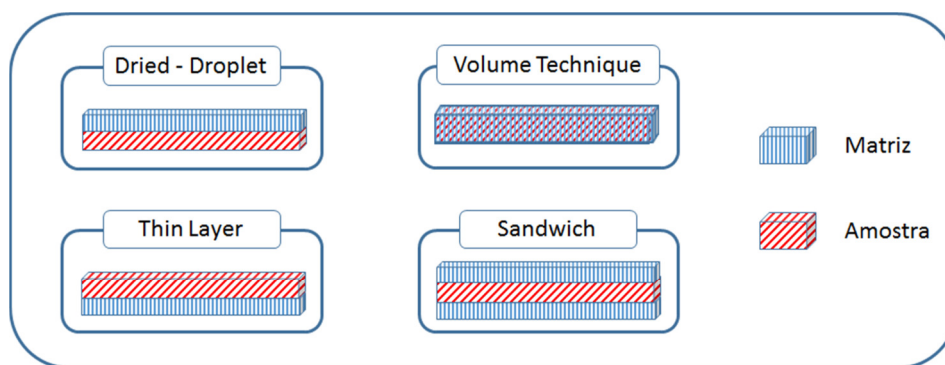


FIGURA 3.8 - Técnicas de co-cristalização matriz/amostra

TABELA 3.7 - Concentração de matrizes avaliadas na análise por MALDI-TOF MS de espécies de *Xylaria*

Matriz	Abreviatura	Concentração mg/mL
ácido sinapínico	SA	10; 30
ácido ferúlico	FA	10; 30
ácido 2,5-dihidroxi benzoico	DHB	10
ácido α -ciano-4-hidroxi cinâmico	CHCA	6; 10

3.4.8.3 Protocolos de preparo de amostra

Além de analisar o micro-organismo de forma intacta, ou seja, transferindo a massa micelial diretamente ao *sample target*, foram também avaliados diferentes protocolos de extração das biomoléculas microbianas. A TABELA 3.8 lista os protocolos utilizados no desenvolvimento do projeto.

O protocolo A caracterizou-se por empregar uma solução ácida composta por ácido fórmico 70%. Inicialmente transferiu-se o material fúngico a um tubo de Eppendorf previamente contendo 500 μ L de água ultra pura. Em seguida, adicionou-se 900 μ L de etanol e homogeneizou-se a mistura com o auxílio de um vortex. Após a agitação, a mistura biológica contendo água e etanol foi centrifugada a 13000 rpm por 1 minuto. Em seguida, a solução hidroalcoólica foi removida e transferiu-se ao Eppendorf, 500 μ L da solução aquosa de ácido fórmico. Após agitação, foi adicionado volume igual de acetonitrila e a mistura novamente agitada. Logo depois deste procedimento, 0,75 μ L da

solução extratora foi analisada. Foram também avaliados três tempos de extração (10, 20 e 30 minutos) bem como a utilização ou não de banho de ultrassom.

O protocolo B empregou como extrator uma solução aquosa de bicarbonato de amônio, preparada em pH 7,5; 8,0 e 8,5. Este protocolo consistiu em expor o material fúngico à solução básica em três diferentes tempos, 10; 20 e 30 minutos, sob agitação com ou sem utilização de banho de ultrassom. Após os períodos de tempo avaliados a solução foi analisada.

TABELA 3.8 - Protocolos de preparo de amostra fúngica avaliados na análise por MALDI-TOF MS

Protocolo	Característica	Referência
A	Extração com ác. fórmico	SZABADOS et al., 2010
B	Extração com NH_4HCO_3	WANG et al., 1998
C	Uso do produto natural timol	
D	Solução de matriz com diferente concentração de TFA	CHALUPOVÁ et al., 2012

O protocolo C consistiu em submeter às células fúngicas a uma solução 12 mM de timol. Foram preparadas oito soluções, sendo que a diferença entre elas consistiu na variação do solvente. Cada solução foi preparada através da pesagem de 18 mg de timol, o qual foi solubilizado em: etanol:0,1%TFA (7:3), acetonitrila:0,1%TFA (7:3), etanol e acetonitrila (1:1):0,1%TFA (7:3), isopropanol:0,1%TFA (7:3), etanol:0,1% $\text{NH}_4\text{HCO}_{3(\text{aq})}$ (7:3), acetonitrila:0,1% $\text{NH}_4\text{HCO}_{3(\text{aq})}$ (7:3), etanol e acetonitrila (1:1): 0,1% $\text{NH}_4\text{HCO}_{3(\text{aq})}$ (7:3), isopropanol:0,1% $\text{NH}_4\text{HCO}_{3(\text{aq})}$ (7:3).

O material fúngico foi transferido a um micro tubo da marca EppendorfTM e a ele adicionados, separadamente, 30 μL de cada solução de timol. O material foi centrifugado por 15 minutos e, em seguida, 0,75 μL do material extraído foi depositado no *sample target*.

O protocolo D empregou como solução extratora a própria solução de matriz (SA), acetonitrila e água (7:3), no entanto, variando-se a concentração do ácido. Desta forma, foram avaliadas as concentrações de 0,1; 0,3; 0,5; 1,0 e 2,5% v/v). Após 20 minutos de exposição das células fúngicas, a solução extratora foi analisada.

3.9 Estudo do perfil químico dos representantes da coleção de micro-organismos da família Xylariaceae

3.9.1 Preparo de amostra para aquisição do perfil de biomoléculas por MALDI-TOF

O preparo de amostra para análise dos fungos pertencentes à família Xylariaceae foi baseado no protocolo implementado pelo Dr. Douglas Ferreira para a construção da biblioteca de micro-organismos do Laboratório de Bioquímica Micro-molecular de Micro-organismos (LaBioMMi). Este protocolo emprega a técnica do esfregaço, a qual consiste em friccionar o material microbiano diretamente na placa de MALDI. Além disso, a biblioteca de dados espectrais foi construída com espectros de massas adquiridos utilizando-se a matriz CHCA.

Os micro-organismos analisados foram previamente cultivados, em duplicata, em placas de Petri contendo meio de cultura malte 2%.

O primeiro passo executado foi o preparo da solução de matriz CHCA (Sigma-Aldrich) na concentração de 20 mg/mL. À matriz foi adicionada uma solução composta por água/acetonitrila (1:1) acidificada com 0,1% de ácido trifluoro acético e, posteriormente, a mistura foi colocada em banho de ultrassom por cinco minutos para a total solubilização. Em seguida, o micro-organismo foi friccionado em nove *spots* do *sample target* (placa de aço ground steel MTP 384 Bruker Daltonics) com auxílio de uma haste de madeira esterilizada. Vale ressaltar que a análise foi realizada empregando-se duplicatas

de placas de cultivo dos micro-organismos sendo, desta forma 18 pontos amostrados para cada isolado da coleção. Após a aplicação do material fúngico, 1,0 µL da solução de matriz foi adicionado sobre a amostra. Após a secagem, a temperatura ambiente, os dados foram adquiridos em duplicata no espectrômetro de massas Autoflex Speed (Bruker Daltonics) controlado pelo software FlexControl 3.3.

A análise dos micro-organismos foi executada no modo positivo de ionização, empregando-se a fonte de ionização montada com laser 1 KHz Smartbeam-II laser (355 nm) no modo linear. Cada réplica foi adquirida no modo automático com movimento randômico do feixe de laser, sendo a cada movimento utilizado 250 tiros, onde 1500 disparos com resolução e intensidade pré-definidos no software “fuzzy logic” foram somados para cada espectro adquirido. Para a calibração do equipamento foi utilizado o padrão PCSI (Protein Calibration Standard, Bruker Daltonics)

3.9.2 Extração dos metabólitos secundários via micro-extração

A metodologia de micro-extração baseia-se na difusão dos metabólitos através do meio de cultura. Desta forma, foram removidos seis discos do meio de cultura contendo o micro-organismo, sendo estes transferidos a um tubo de vidro. Na sequência, adicionou-se uma mistura de solventes, metanol, acetato de etila e diclorometano (1:2:3) e após 20 minutos de extração em banho de ultrassom, o extrato foi transferido a um frasco de vidro limpo, sendo posteriormente evaporado em capela de exaustão. Os frascos foram armazenados em freezer a -5°C até serem analisados. Vale ressaltar que a micro-extração foi realizada em duplicata de placas de cultivo para cada isolado.

O preparo de amostra consistiu em ressuspender os extratos em 5mL de metanol. Em seguida, uma alíquota de 500 µL de cada amostra foi transferida para frascos de vial. Posteriormente, as amostras foram diluídas para 1,5 mL, empregando-se uma mistura de água: metanol (1:1). Só então, as

amostras foram analisadas por UPLC-HRMS. A FIGURA 3.9 ilustra um esquema simplificado da metodologia utilizada.

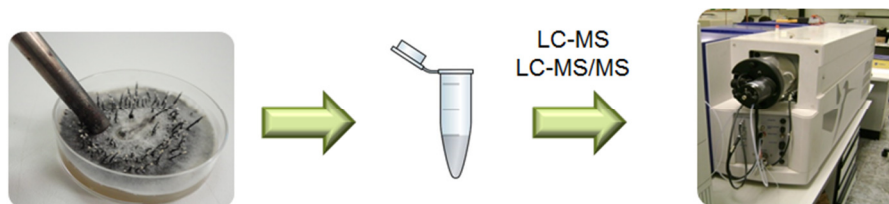


FIGURA 3.9 - Representação do processo de micro-extração dos metabólitos secundários e análise por UPLC-MS

As análises cromatográficas foram realizadas em coluna Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm (2,1 x 50 mm), eluição gradiente e no modo reverso, empregando água e acetonitrila acidificados com 0,1% de ácido fórmico como fase móvel. O gradiente utilizado encontra-se descrito na TABELA 3.9.

As análises por espectrometria de massas empregaram fonte de ionização *Electrospray* no modo positivo e as condições de sintonia do equipamento estão descritas na TABELA 3.9. O volume de injeção de amostra foi de 5 μL e a vazão foi de 0,5 mL/min.

TABELA 3.9 - Condições empregadas nas análises por UPLC/MS (ESI+)

	Tempo	Concentração	Espectrômetro de massas	Experimento <i>Full scan</i>	
	(min.)	B (%)			
UPLC	0,0	25		Capilar	3,0 kV
	8,0	90		Cone	30 V
	9,0	98		Temperatura da fonte	120°C
	9,1	25		Temperatura de dessolvatação	550°C
	10,0	25		Varredura de massa	100-1500
			Calibrante	10 mmol/L CHO ₂ Na	

* (A) água/ (B) acetonitrila ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico

4. Resultados e discussão

4.1 Aplicação da abordagem OSMAC frente a NICL5 visando o aumento da diversidade metabólica

4.1.1 Administração de aminoácidos livres ao meio de cultura

Trabalhos anteriores realizados no grupo LaBioMMI mostraram que o metabolismo de NICL5 em meio Czapek enriquecido com extrato de levedura é fortemente direcionado para a produção de citocalasinas, principalmente as citocalasinas C, D e Q (AMARAL, 2009 e AMARAL et al., 2014), as quais têm como precursor biossintético o aminoácido fenilalanina. Há na literatura relatos da produção de citocalasinas por duas espécies distintas de *Xylaria*, nos quais os aminoácidos precursores são a leucina e o triptofano (RUKACHAISIRIKUL et al., 2009 e WANG et al., 2005), desta forma, fungos deste gênero são aptos a produzirem aspocalasinas e chaetoglobosinas. A FIGURA 4.1 ilustra as citocalasinas produzidas por NICL5, além da xylarina e da penocalasina B2, produzidas por *X. sp.* PSU-F100 e *X. euglossa*, respectivamente.

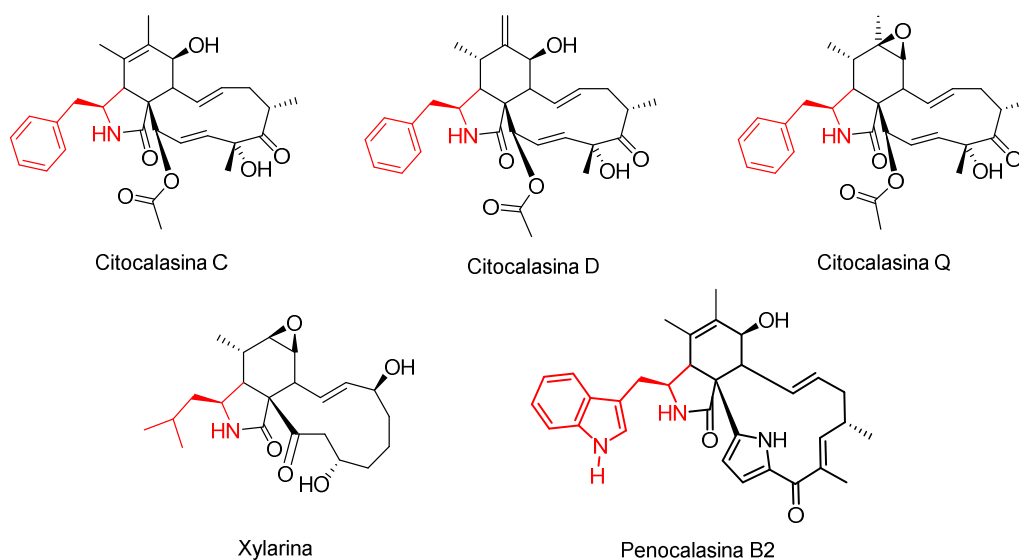


FIGURA 4.1 - Citocalasinas C, D e Q produzidas por NICL5, xylarina produzida por *X. sp.* PSU-F100 e penocalasina B2 produzida por *X. euglossa*

A abordagem OSMAC tem como premissa induzir a expressão do metabolismo secundário e/ou “despertar” genes silenciados através de pequenas modificações no meio de cultivo e, desta maneira, aumentar a diversidade química produzida pelo micro-organismo. Com esta finalidade e inspirados pelo fato da produção de aspocalasina e chaetoglobosina por fungos do gênero *Xylaria*, avaliou-se o efeito da administração de aminoácidos livres ao meio de cultura de NICL5, a fim de averiguar a incorporação destes e consequente produção de novas citocalasinas.

A área destacada em vermelho da FIGURA 4.2 evidencia a produção das citocalasinas D (16,48 min), C (20,97 min) e Q (23,08) nos diferentes extratos. Na análise por LC-UV-MS verificou-se que a aplicação da abordagem OSMAC frente a NICL5 não promoveu um aumento da diversidade metabólica, uma vez que, não foi observado o aparecimento de novas bandas cromatográficas nos extratos suplementados com os aminoácidos, sendo o perfil cromatográfico destes similares ao perfil do extrato proveniente do meio de cultura controle (Czapek enriquecido com extrato de levedura). Vale mencionar que as pequenas diferenças na intensidade das bandas são de cunho quantitativo em relação às substâncias já produzidas pelo micro-organismo.

Em dissonância com o resultado mostrado na FIGURA 4.2, WANG e colaboradores (2011) observaram um incremento na diversidade química do fungo marinho *Spicaria elegans*, também produtor de citocalasinas, ao administrarem o aminoácido triptofano. Contudo, o micro-organismo não incorporou o precursor, mas produziu três novas citocalasinas com a cadeia policetídica aberta. Vale mencionar que a abordagem OSMAC é aleatória e não permite a criação de uma regra comum aplicável para todos os micro-organismos, pois a resposta ao estímulo é intimamente dependente do genoma de cada organismo (BODE et al., 2002).

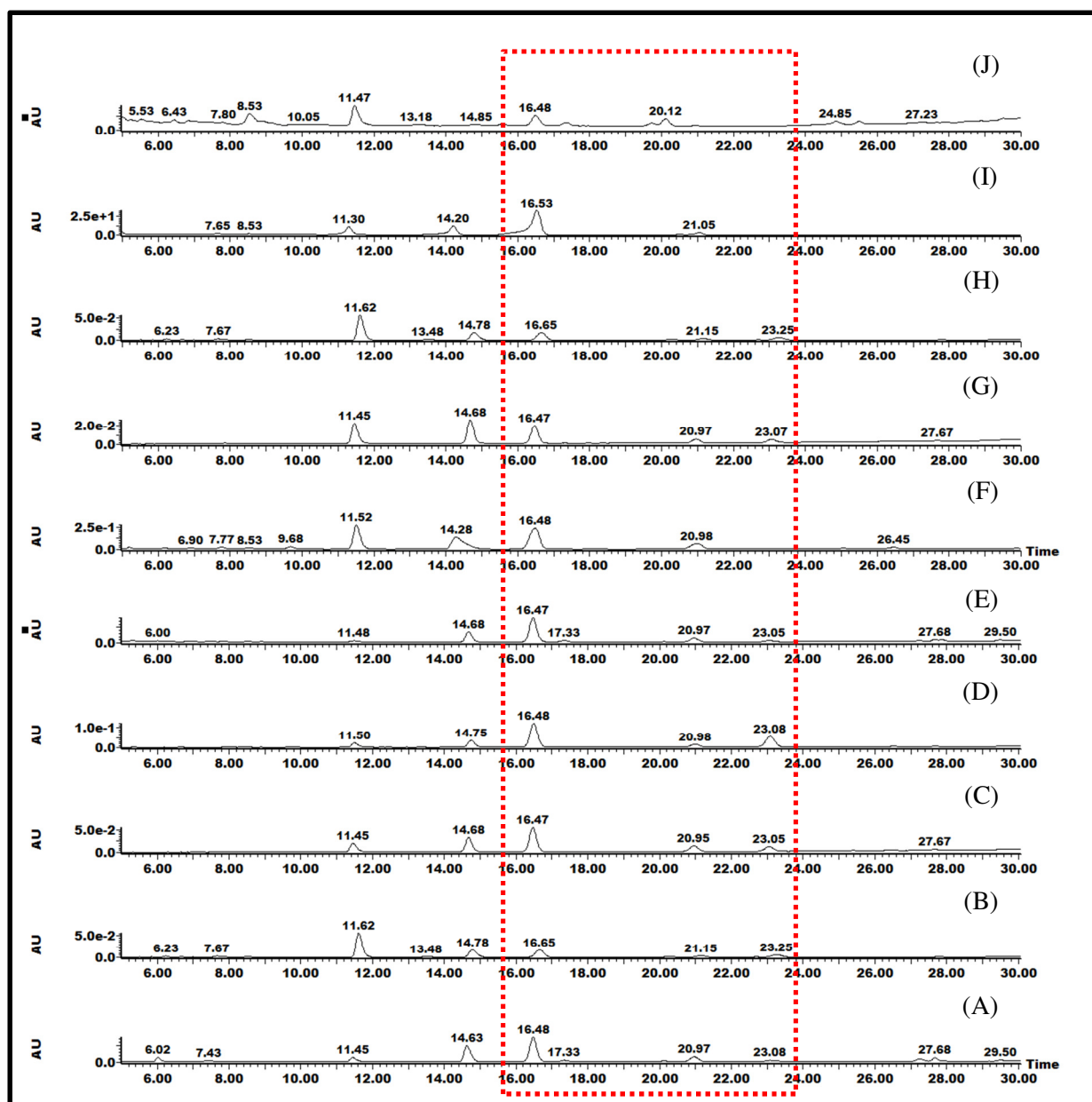


FIGURA 4.2 - Cromatograma a 220 nm dos extratos correspondentes aos meios Czapek suplementados com: (A) extrato de levedura, (B) alanina, (C) ácido glutâmico, (D) glicina, (E) fenilalanina, (F) leucina, (G) prolina, (H) serina, (I) tirosina e (J) triptofano

4.1.2 Administração de substratos halogenados ao meio de cultura

Outra estratégia visando aumentar a diversidade química de NICL5 foi a suplementação do meio de cultura do micro-organismo com fonte de nitrogênio contendo átomo de halogênio, uma vez que, fungos do gênero *Xylaria* tem a habilidade de produzir compostos organoclorados (JOONG-ADEBOYA et al., 1996, DAVIS, 2005 e JOONG-HYEOP et al., 2005).

A adição de precursores halogenados é um método prático na obtenção de produtos naturais halogenados. A introdução de átomos de F, Cl e Br na estrutura química de um produto natural pode melhorar a estabilidade, biodisponibilidade e bioatividade e, conseqüentemente, estes compostos são de grande valor em química medicinal (GOSS et al., 2003).

Dessa forma, para avaliar o efeito da adição de precursores halogenados no metabolismo de NICL5, administraram-se, separadamente, os aminoácidos *p*-bromo fenilalanina e *p*-cloro fenilalanina ao meio de cultura do fungo. Os extratos brutos foram analisados por LC-UV-MS nas condições descritas na sessão 3.4.2 de acordo com a TABELA 3.2. A FIGURA 4.3 ilustra os cromatogramas a 220 nm, no qual (A) representa o experimento controle, em comparação com os extratos obtidos dos meios suplementados com *p*-bromo fenilalanina (B) e *p*-cloro fenilalanina (C).

Notam-se diferenças consideráveis entre os cromatogramas, entretanto, a distinção mais significativa é observada no cromatograma referente ao meio suplementado com *p*-bromo fenilalanina (FIGURA 4.4B), pois observou-se o aparecimento de bandas cromatográficas em 10,08 min, 19,52 min e 25,47 min. As demais diferenças são de natureza quantitativa em relação aos compostos já produzidos pelo micro-organismo e não serão discutidas, pois o objeto de estudo é a indução da biossíntese de novos metabólitos.

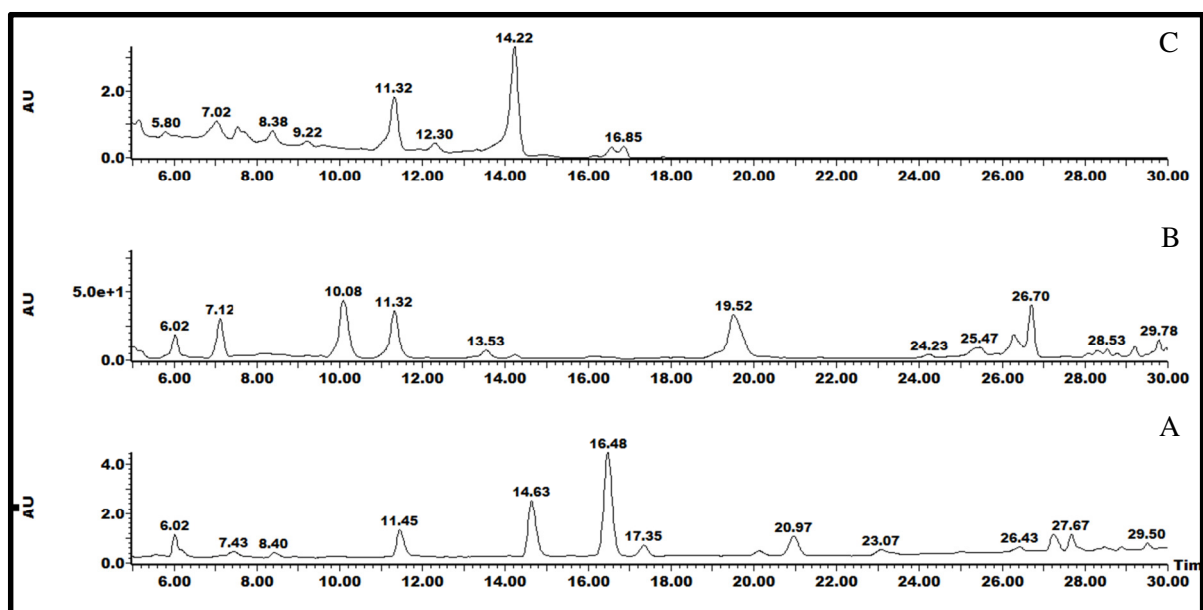


FIGURA 4. 3- Cromatograma a 220 nm dos extratos correspondentes aos meios Czapek suplementados com (A) extrato de levedura, (B) *p*-bromo fenilalanina e (C) Czapek *p*-cloro fenilalanina

A análise por LC-UV-MS permitiu correlacionar cada uma das novas bandas com seus respectivos espectros de massas, como mostra a FIGURA 4.4. A simples inspeção dos espectros de massas informa que o micro-organismo não utilizou o precursor *p*-bromo fenilalanina para a produção de citocalasinas bromadas, uma vez que, os íons moleculares protonados mostrados nos espectros de *full scan*, têm massa inferior em comparação as citocalasinas C, D e Q. (507 Da). No entanto, constata-se a presença de três derivados bromados, em razão dos espectros A e B possuem perfil isotópico característico de um átomo de bromo, pois $[M+H+2]^+$ tem intensidade de 98% de $[M+H]^+$. Já o espectro C apresenta perfil isotópico intrínseco de dois átomos de Br, devido a presença de $[M+H]^+$, $[M+H+2]^+$ e $[M+H+4]^+$ na proporção de 1:2:1. Desta maneira, o micro-organismo deve ter biotransformado o aminoácido bromado.

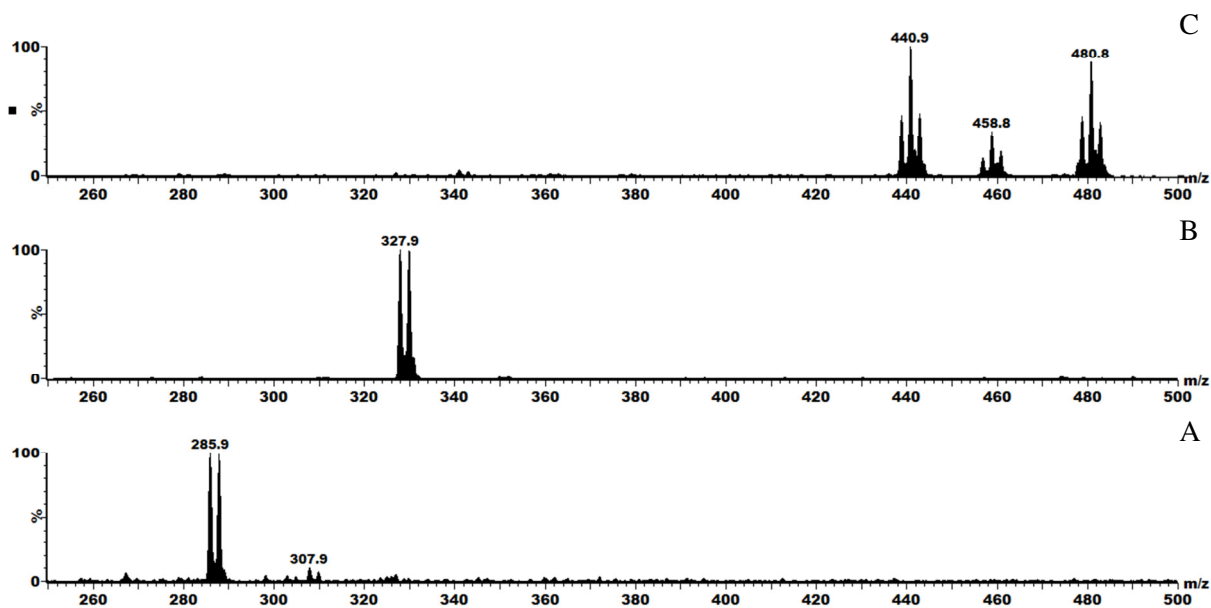


FIGURA 4.4 - Espectros de massas *full scan*, dos compostos presentes nas bandas: (A) 10,08 min, (B) 19,52 min e (C) 25,47 min

Para obter informação estrutural dos compostos bromados e tentar presumir as modificações que o fungo desenvolveu na estrutura do precursor, realizaram-se experimentos de íons produtos, empregando ESI+, de m/z 268, 328 e 458, conforme pode ser visto na FIGURA 4.5.

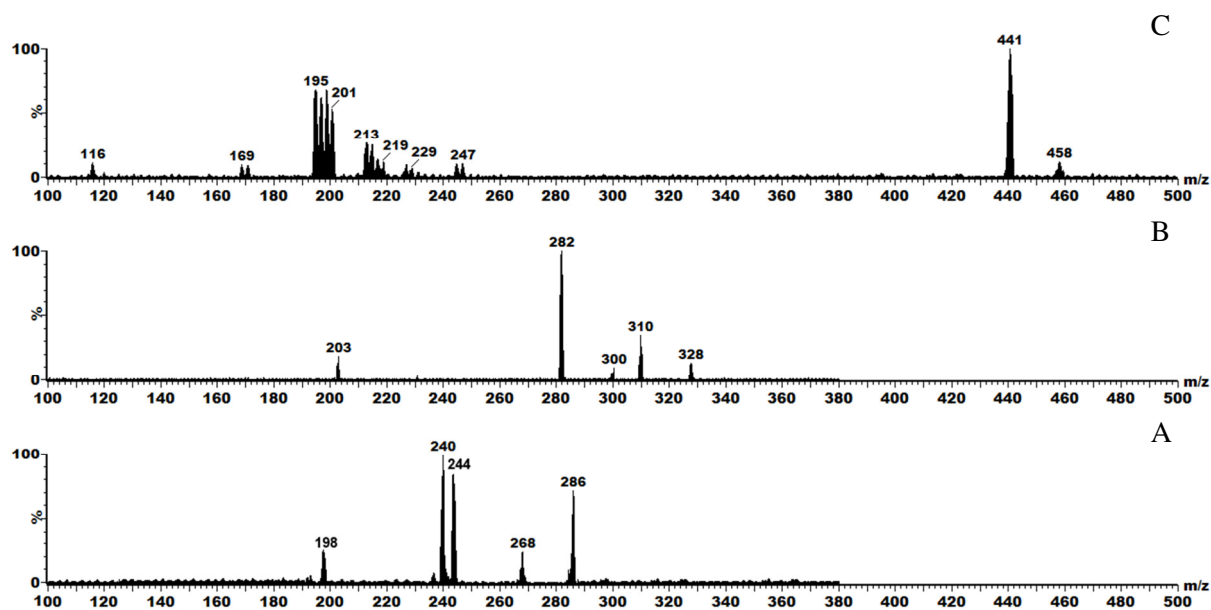


FIGURA 4.5 - Espectros de íons produtos de: (A) m/z 286 - 10,08 min, (B) m/z 328 - 19,52 min e (C) m/z 458 - 25,47 min

No espectro de íons produtos de m/z 286, FIGURA 4.5A, notam-se perdas características de água (18 Da), ceteno (42 Da) e ácido fórmico (46 Da). A partir destas informações, propôs-se a ocorrência de uma N-acetilação, pois a perda de ácido fórmico indica que a porção ácida da molécula não sofreu alteração, desta forma, propôs-se a estrutura representada na FIGURA 4.6. Para justificar os demais íons observados no espectro de íons produtos, sugeriu-se o mecanismo de fragmentação representado na FIGURA 4.7.

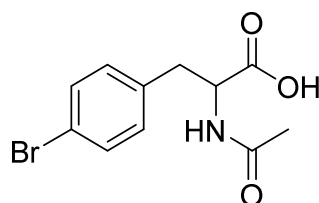


FIGURA 4.6 - Estrutura química proposta para o composto em 10,08 min

A protonação da hidroxila leva a formação de m/z 286 e o par de elétrons não ligante do oxigênio carboxílico assiste a saída de água, levando ao íon acílium de m/z 268. Em seguida, o par de elétrons não ligante do nitrogênio assiste a saída de CO, gerando m/z 240, pico base do espectro de íon produtos. A partir de m/z 240 ocorre uma eliminação neutra de ceteno e consequente formação do íon de m/z 198. A perda direta de ácido fórmico (46 Da) também leva ao íon de m/z 240. A perda neutra de ceteno a partir de m/z 286 produz m/z 244.

Os dados experimentais são compatíveis com aqueles obtidos por FILL (2014), no qual o fungo *Penicillium brasilianum* promoveu a N-acetilação da fenilalanina bromada, mecanismo este que o autor correlaciona com o metabolismo secundário fúngico, pois os compostos majoritariamente produzidos são N-acetilados.

Há relatos na literatura de que organismos procariontes e eucariontes realizam reações de N-acetilação para detoxificar compostos xenobióticos (TAKENAKA et al., 2013). Logo, acredita-se que NICL5

promoveu a N-acetilação da fenilalanina bromada como estratégia para tornar o substrato menos tóxico ao seu metabolismo.

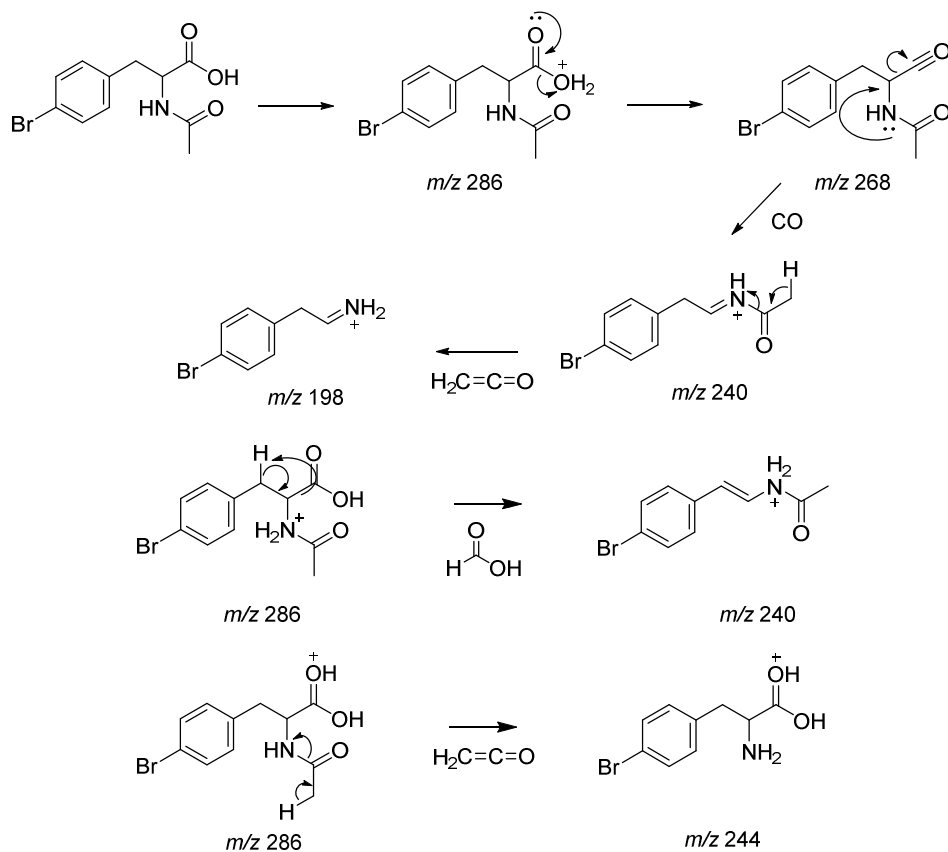


FIGURA 4.7 Proposta de fragmentação de m/z 286

Infelizmente não foi possível sugerir estruturas para os compostos representados nos espectros de massas B e C da FIGURA 4.5. Embora, no espectro de íons produtos de m/z 328 (FIGURA 4.5B) sejam observadas perdas de água e CO ou perda direta de ácido fórmico, que o grupo ácido do substrato não sofreu modificação.

Vale mencionar que as citocalasinas D, C e Q foram produzidas neste experimento. Este fato sugere que o micro-organismo “prefere” produzir a sua própria fenilalanina, a partir do precursor administrado, e direcioná-la para a biossíntese destes compostos, logo, a biossíntese das citocalasinas pelo fungo em estudo não aparenta ser flexível. A FIGURA 4.8 ilustra o cromatograma de íons extraídos de m/z 508.

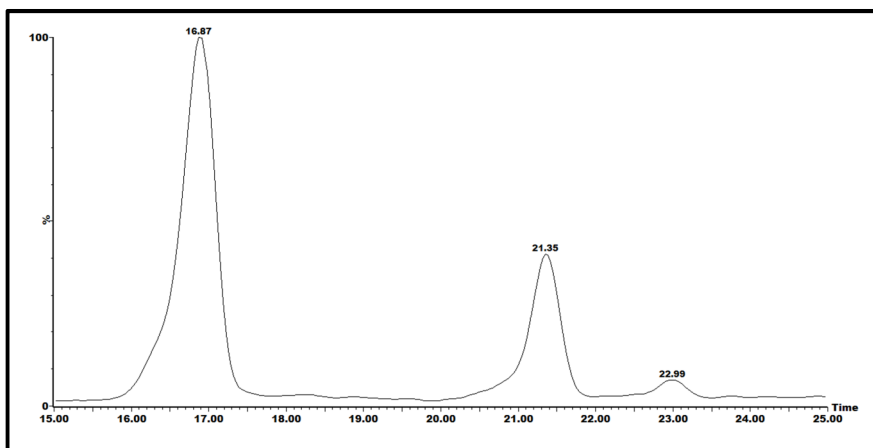


FIGURA 4.8 - Cromatograma de íon extraídos m/z 508 referente as citocalasinas D, C e Q

Em contraste com o resultado obtido neste estudo, GE e colaboradores (2011) induziram a biossíntese de chaetoglobosinas halogenadas (FIG. 4.9), através da suplementação do meio de cultura de *Chaetomium globosum* com 5-F, 5-Cl e 5-Br triptofano. Os derivados halogenados apresentaram melhor atividade imunossupressora em comparação com as moléculas originais.

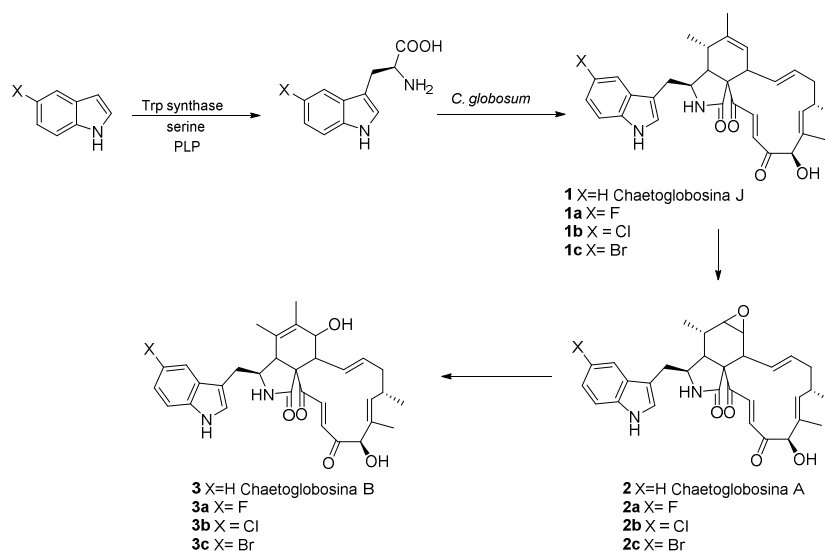


FIGURA 4.9 - Adição de precursor halogenados ao meio de cultivo de *C. globosum* e consequente produção de chaetoglobosinas halogenas (Adaptado de GE et al., 2011)

Outra abordagem ainda visando obter citocalasinas halogenadas consistiu em substituir o extrato de levedura e o NaNO_3 (fontes de nitrogênio do

meio de cultura Czapek) por NH_4Br e NH_4Cl , de acordo com o procedimento descrito no item 3.4.2. Após a obtenção dos extratos, análises por LC-UV-MS foram implementadas, e os resultados obtidos confrontados com o experimento controle.

Comparando-se os cromatogramas em 220 nm dos extratos Czapek enriquecido com extrato de levedura (controle), Czapek suplementado com NH_4Br e NH_4Cl , verificou-se uma diferença no perfil da produção dos metabólitos secundários, no entanto, a maior diversidade metabólica é evidenciada no meio de cultura com adição de NH_4Br , devido ao aparecimento de três bandas cromatográficas na região compreendida entre 18,0-21,0 min e uma banda em 27,68 min, como pode ser visto na FIGURA 4.10. Observou-se ainda a produção das citocalasinas D e C em ambos os extratos suplementados com o íon amônio como fonte de nitrogênio.

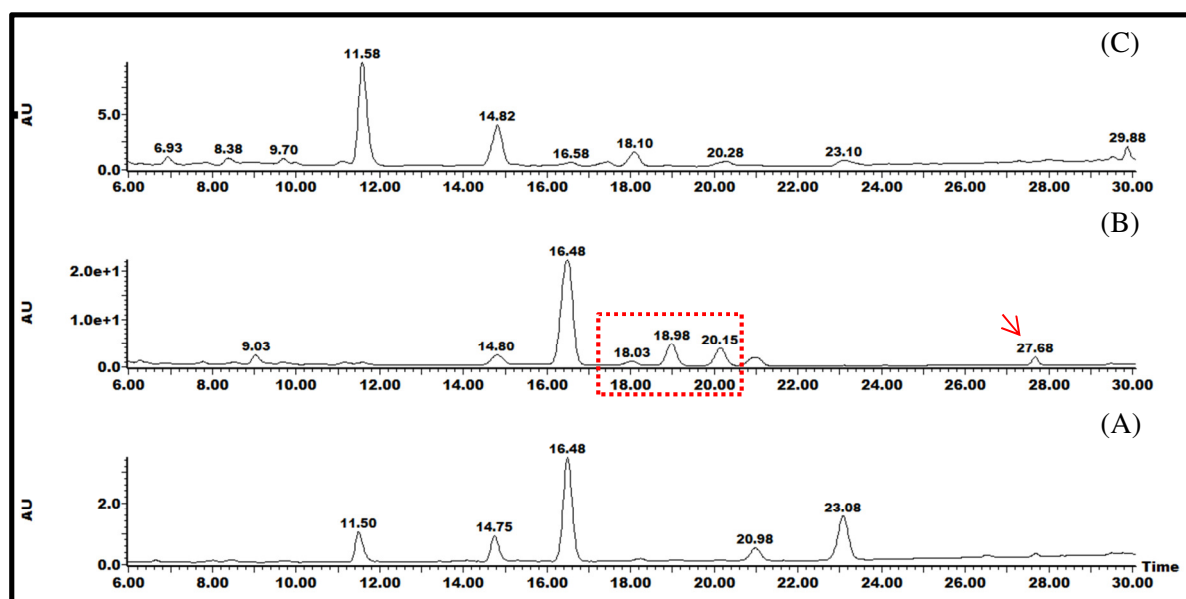


FIGURA 4.10 - Cromatograma a 220 nm dos extratos dos meios Czapek: (A) extrato de levedura, (B) NH_4Br e (C) NH_4Cl

Processando o cromatograma de íons totais do extrato suplementado com NH_4Br , constatou-se a presença de quatro novos metabólitos, três dos quais com proporção isotópica característica da presença de bromo, conforme ilustra a FIGURA 4.11.

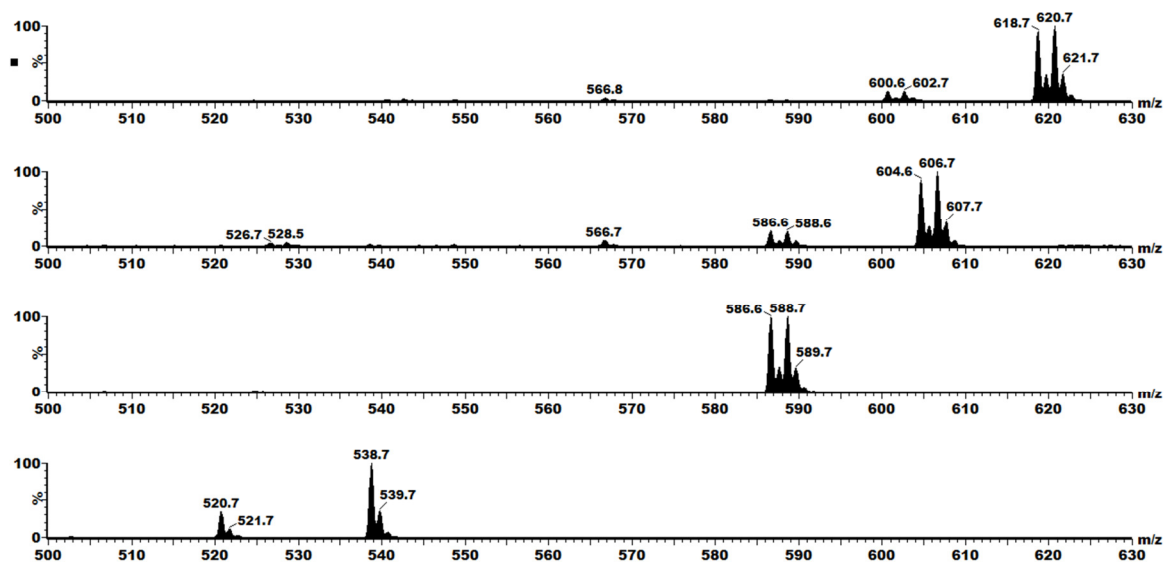


FIGURA 4.11 - Espectros de massas *full scan* dos novos metabólitos produzidos por NICL5 mediante o uso de NH_4Br como fonte de nitrogênio

Os elevados valores de $[\text{M}+\text{H}]^+$ associados aos novos metabólitos sugerem a produção de citocalasinas diferentes das já conhecidas. Para averiguar esta proposição comparou-se o perfil de fragmentação da citocalasina D com os compostos alvos. Deste modo, a FIGURA 4.12 ilustra o espectro de íons produtos de m/z 508. De acordo com o mecanismo de fragmentação proposto, representado pela FIGURA 4.13, a protonação do oxigênio carboxílico do éster levou ao íon de m/z 508. No caminho (a) observou-se a perda de 60 Da, referente ao ácido acético, devido a delocalização dos elétrons da dupla ligação, levando ao íon de m/z 448. No caminho (b) verificou-se a formação de m/z 490 devido a uma desidratação e a subsequente perda de ácido acético levou ao íon de m/z 430, pico base do espectro. No caminho (c) tem-se a protonação no nitrogênio da lactona, o qual teve sua carga restabelecida devido à assistência do par de elétrons não ligantes do oxigênio da carboxila e, em consequência, ocorreu a abertura do anel lactâmico. Em seguida, através da conjugação dos elétrons não ligantes do nitrogênio ocorrem as perdas sucessivas de CO e da porção policetílica, gerando, desta forma, o íon de m/z 120, característico do aminoácido fenilalanina.

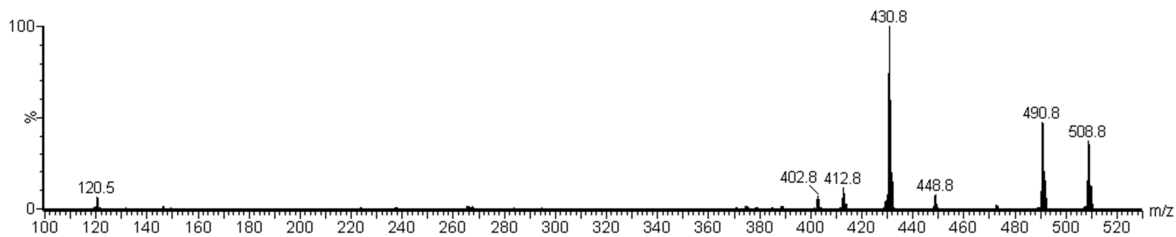


FIGURA 4.12 - Espectro de íons produtos de m/z 508 referente a citocalasina D obtidos com 15 eV

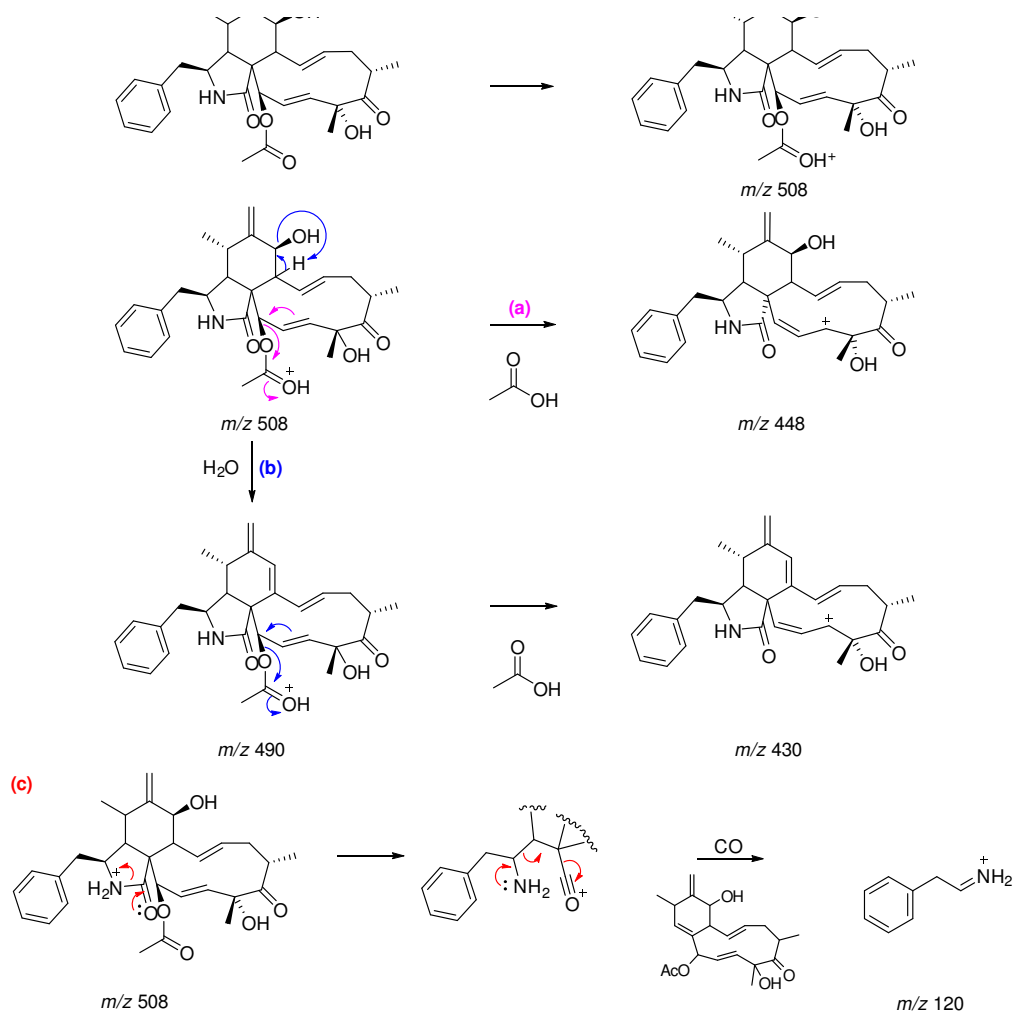


FIGURA 4.13 - Proposta de fragmentação de m/z 508 - citocalasina D

A FIGURA 4.14 representa os espectros de íons produtos de m/z 538, 586, 604 e 618, respectivamente. A comparação destes com o espectro de íons produtos da citocalasina D evidencia um perfil de fragmentação idêntico, com perdas de água (18 Da), ácido acético (60 Da), perda concomitante de água

e ácido acético (78 Da), além da presença do íon de m/z 120, diagnóstico das citocalasinas biossintetizadas a partir do aminoácido fenilalanina. Mediante estas informações, tem-se que a substituição da fonte nitrogenada por NH_4Br induziu o metabolismo fúngico a produzir novas citocalasinas, inclusive citocalasinas bromadas.

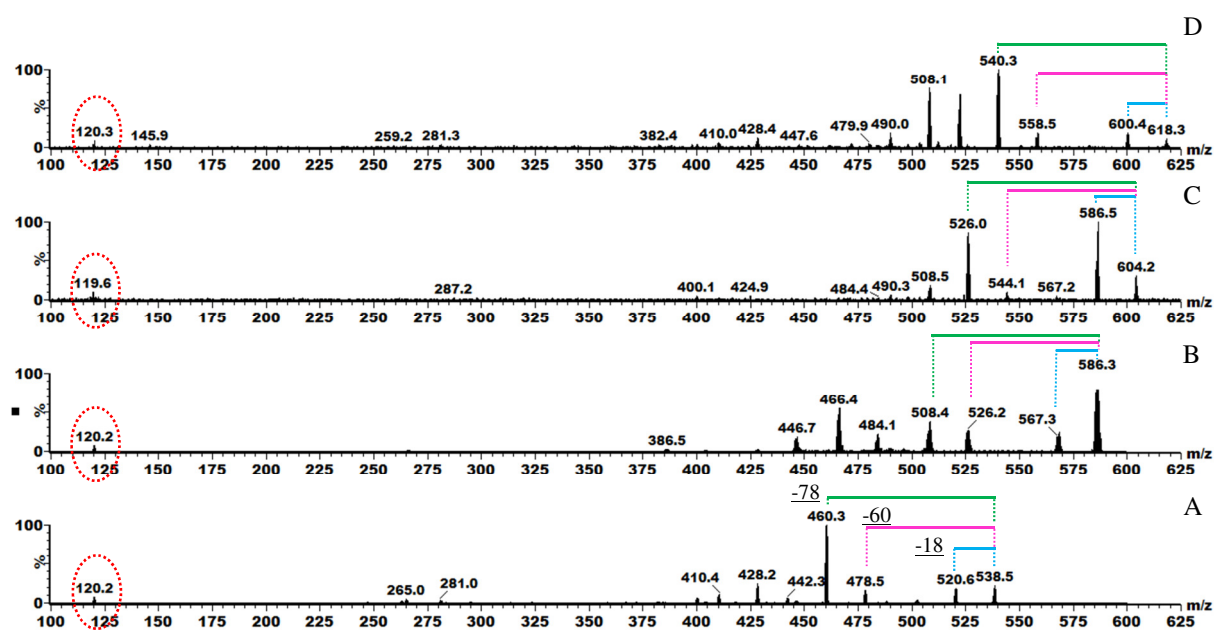


FIGURA 4.14 - Espectro de íons produtos de m/z : (A) 538, (B) 586, (C) 604 e (D) 618 obtidos com energia de colisão de 15 eV

A halogenação da maioria dos produtos naturais como os antibióticos vancomicina e cloranfenicol, bem como do agente quimioterápico rebecamicina, deve-se a ação da enzima halogenase dependente de flavina, a qual catalisa a formação de uma ligação carbono-halogênio usando FADH_2 fornecido pela flavina redutase, um íon haleto e O_2 . A reação entre o FADH_2 e o oxigênio leva a formação de um intermediário $\text{FAD}(\text{C}4\text{a})\text{-OOH}$ e este por sua vez reage com haleto (X^-), resultando na produção do X^+ . A espécie eletrofílica X^+ irá atuar como agente de halogenação. A FIGURA 4.15 ilustra a formação de X^+ pela ação da enzima halogenase dependente de flavina (adaptado de DONG, et al., 2005 e YEH, et al., 2007).

Do espectro de íons produtos da FIGURA 4.13B-D, referente às citocalasinas bromadas, extrai-se a informação de que a bromação não ocorreu no anel aromático, pois se a incorporação do bromo tivesse acontecido nesta posição, observar-se-ia um incremento de 79 Da no íon diagnóstico da fenilalanina.

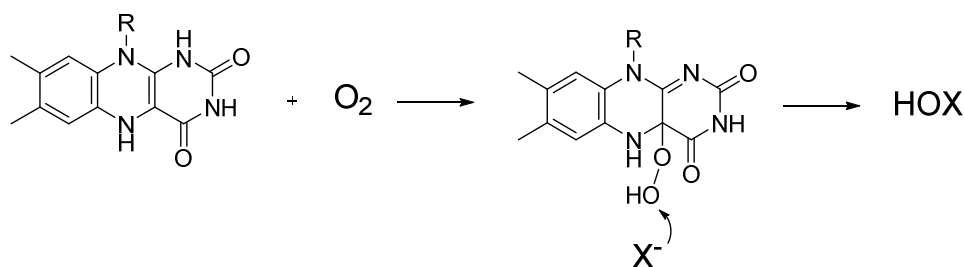


FIGURA 4.15 - Representação esquemática da produção de HOX no sítio ativo da enzima halogenase dependente de flavina (Adaptado de DONG, et al., 2005 e YEH, et al., 2007)

Visando o isolamento, purificação, e elucidação estrutural das novas citocalasinas produzidas por NICL5, promoveu-se o cultivo do micro-organismo em 10 L de meio de cultura. Após o desenvolvimento fúngico o extrato foi obtido e fracionado mediante a descrição na seção 3.4.4. Através de novos fracionamentos foram obtidas frações ricas nos compostos alvo, no entanto, inúmeros problemas com o equipamento de HPLC preparativo resultaram na perda da grande maioria dos compostos, restando somente uma parte da fração LSA_CL5_NH₄Br_C13, a qual continha o composto de *m/z* 538. Esta fração foi submetida à análises por espectrometria de massas de alta resolução e RMN de uma e duas dimensões. A diferença de massa de 30 Da observada entre o composto de *m/z* 538 e as citocalasinas C, D e Q (*m/z* 508), sugere que o micro-organismo deve ter incorporado um grupo -CH₂OH em alguma destas estruturas. Esta proposição é consistente com a fórmula molecular C₃₁H₃₉NO₇ ([M+H]⁺ exp 538,2785, calc 538,2799), segundo mostra o espectro de massas de alta resolução na FIGURA 4.16.

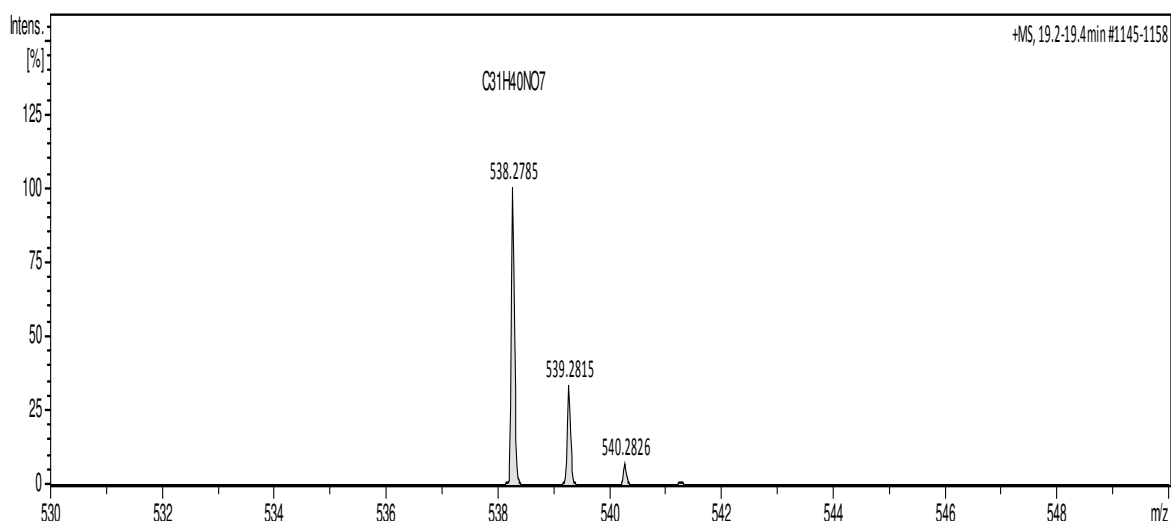


FIGURA 4.16 Espectro de massas de alta resolução do composto presente na fração LSA_CL5_NH₄Br_C13

Para realizar uma identificação mais direcionada, dividiu-se as estruturas das citocalasinas C, D e Q em três porções distintas, como pode ser visto na FIGURA 4.17. Nota-se que as porções destacadas em preto e azul, referentes ao aminoácido fenilalanina e ao macrociclo, são idênticas para as três substâncias. Pelo espectro de íons produtos de m/z 538, verifica-se, devido à presença de m/z 120, que a porção relacionada ao aminoácido não sofreu alteração.

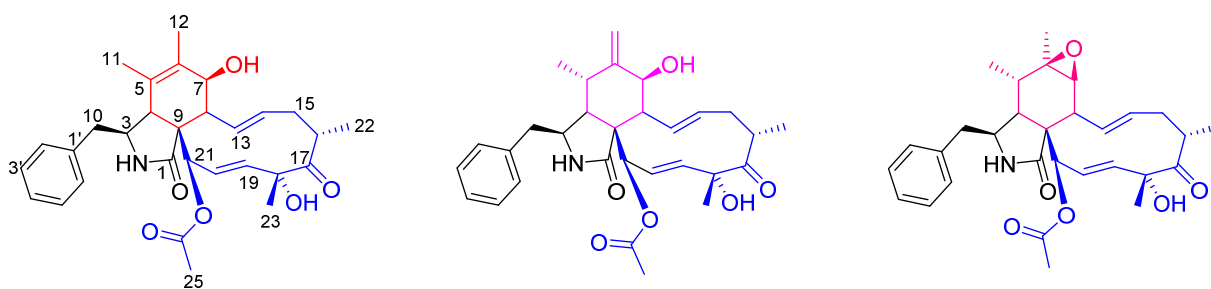


FIGURA 4.17 - Estruturas químicas das citocalasinas C, D e Q divididas em três porções

No espectro de ¹H RMN, representado na FIGURA 4.18 verificou-se a presença de dois hidrogênios metilênicos em δ 4,12 (d; 10,8 Hz) e δ 3,91 (d; 10,8), os quais, no COSY (FIGURA 4.19), correlacionam-se somente entre si,

desta forma, devem estar ligados a um carbono quaternário. A análise do espectro de HMBC permitiu identificar a posição na qual o grupo $-CH_2OH$ foi introduzido, pois além de apresentar acoplamento com os carbonos C-9 em δ 56,5; C-3 em δ 59,2; C-4 em δ 67,1 apresenta também correlação com um carbono quaternário sp^2 C-11 em δ 133,4. Deste modo, o grupo $-CH_2OH$ foi introduzido na posição 4 da citocalasina C. A FIGURA 4.22 ilustra a estrutura química da nova citocalasina produzida por N1CL5, com as principais correlações observadas nos espectros de COSY e HMBC.

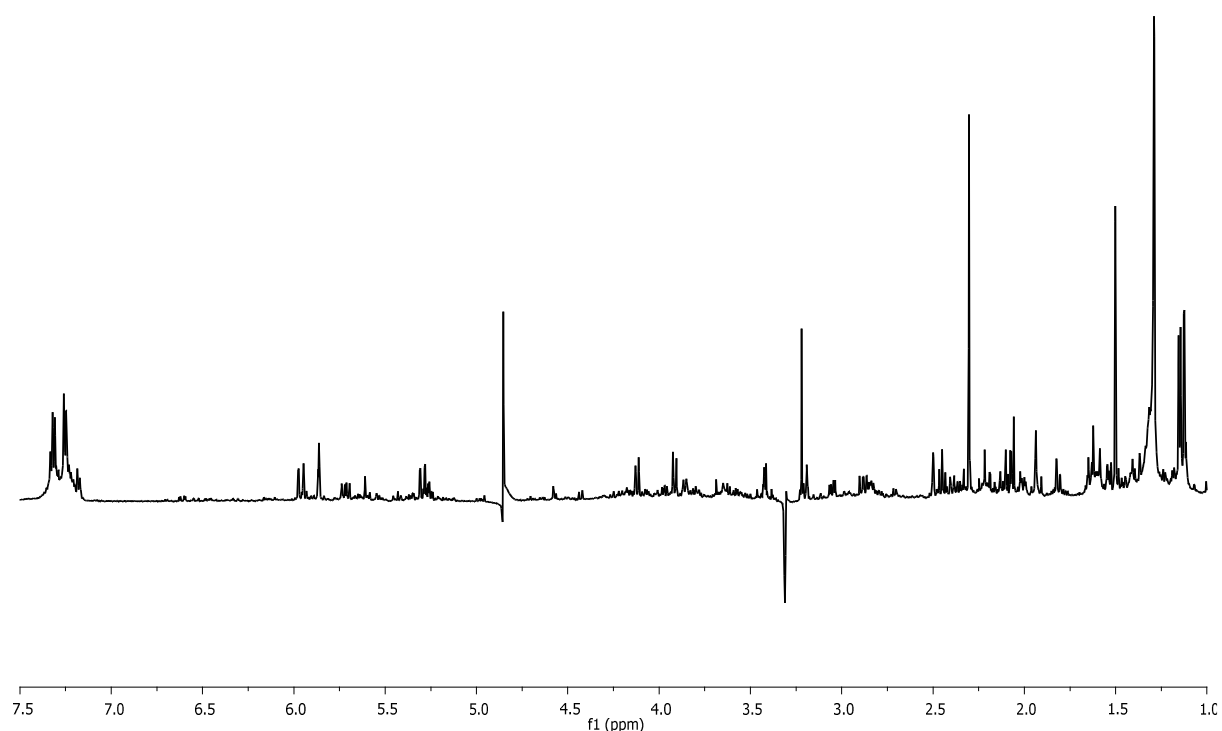


FIGURA 4.18 - Espectro de RMN de hidrogênio da fração LSA_NH₄Br_C13 (MeOH, 600MHz)

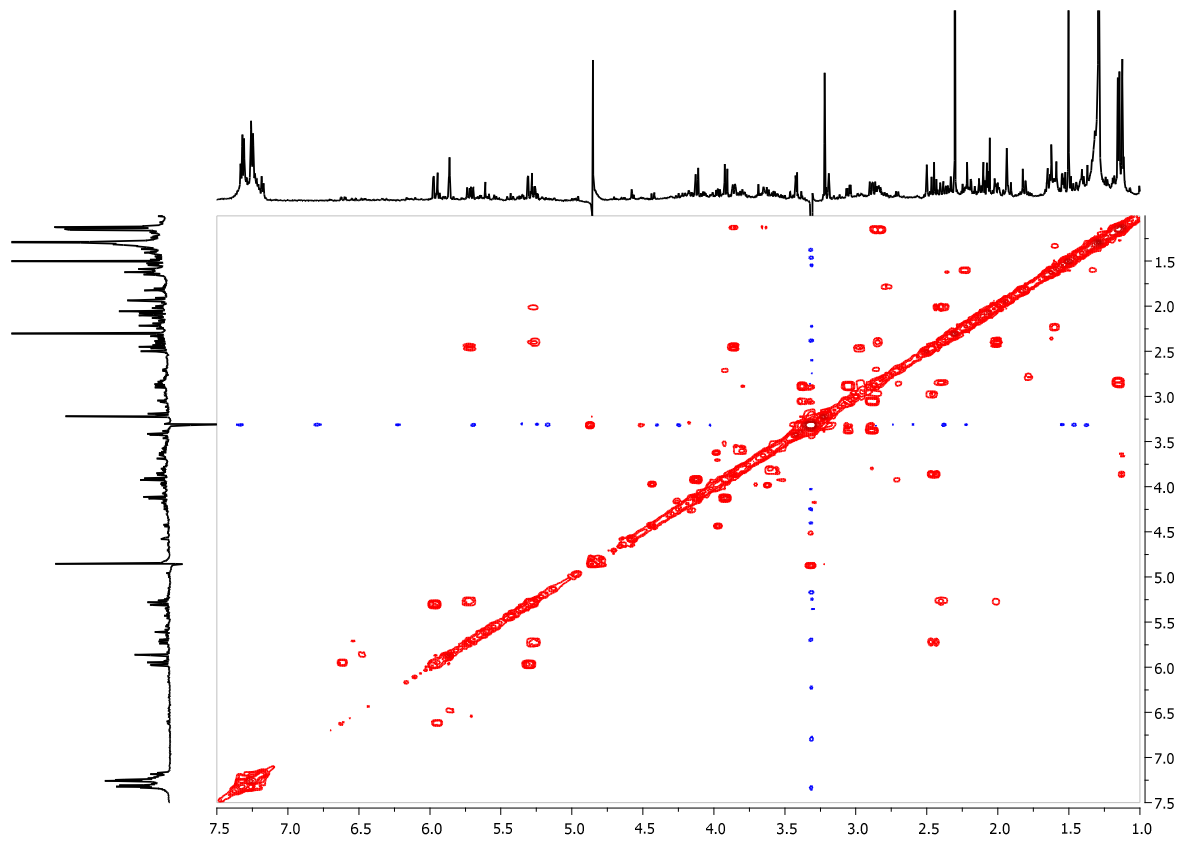


FIGURA 4.19 - Espectro de COSY da fração LSA_NH₄Br_C13

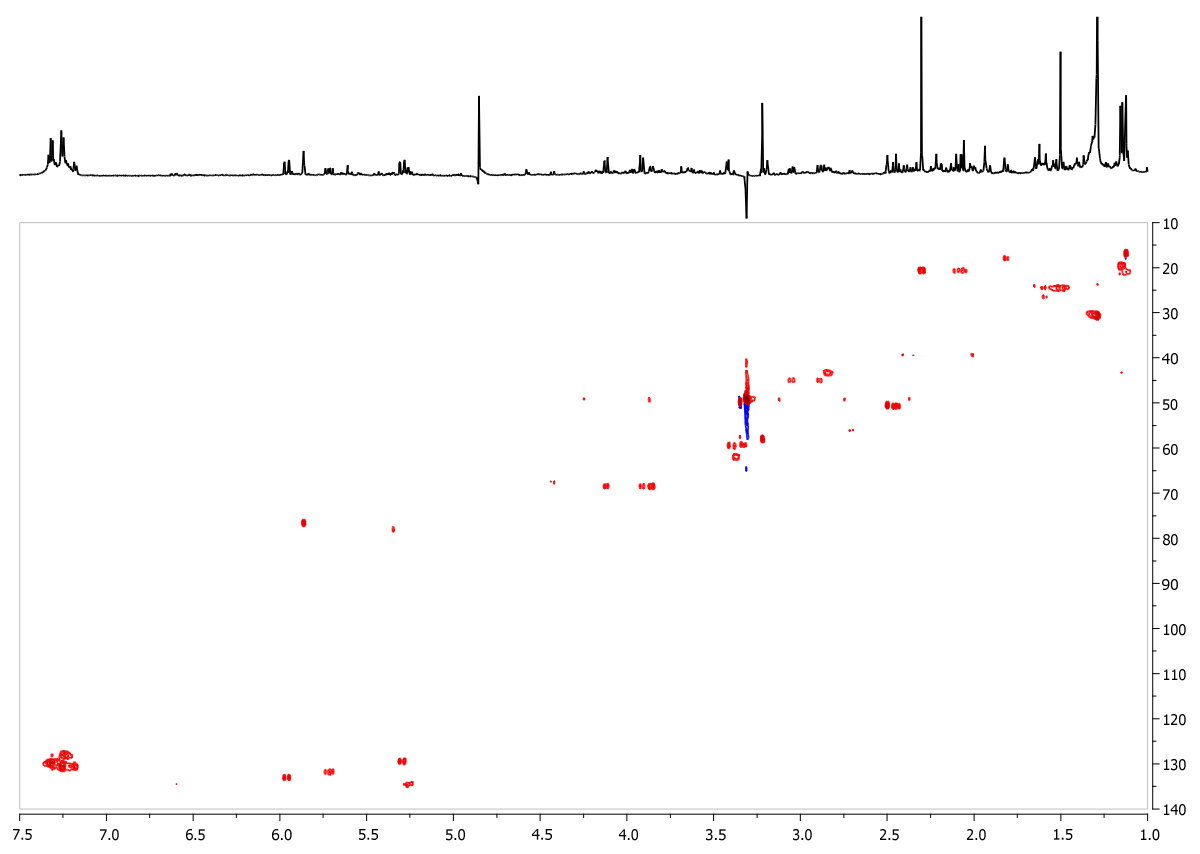


FIGURA 4.20 - Espectro de HSQC da fração LSA_NH₄Br_C13

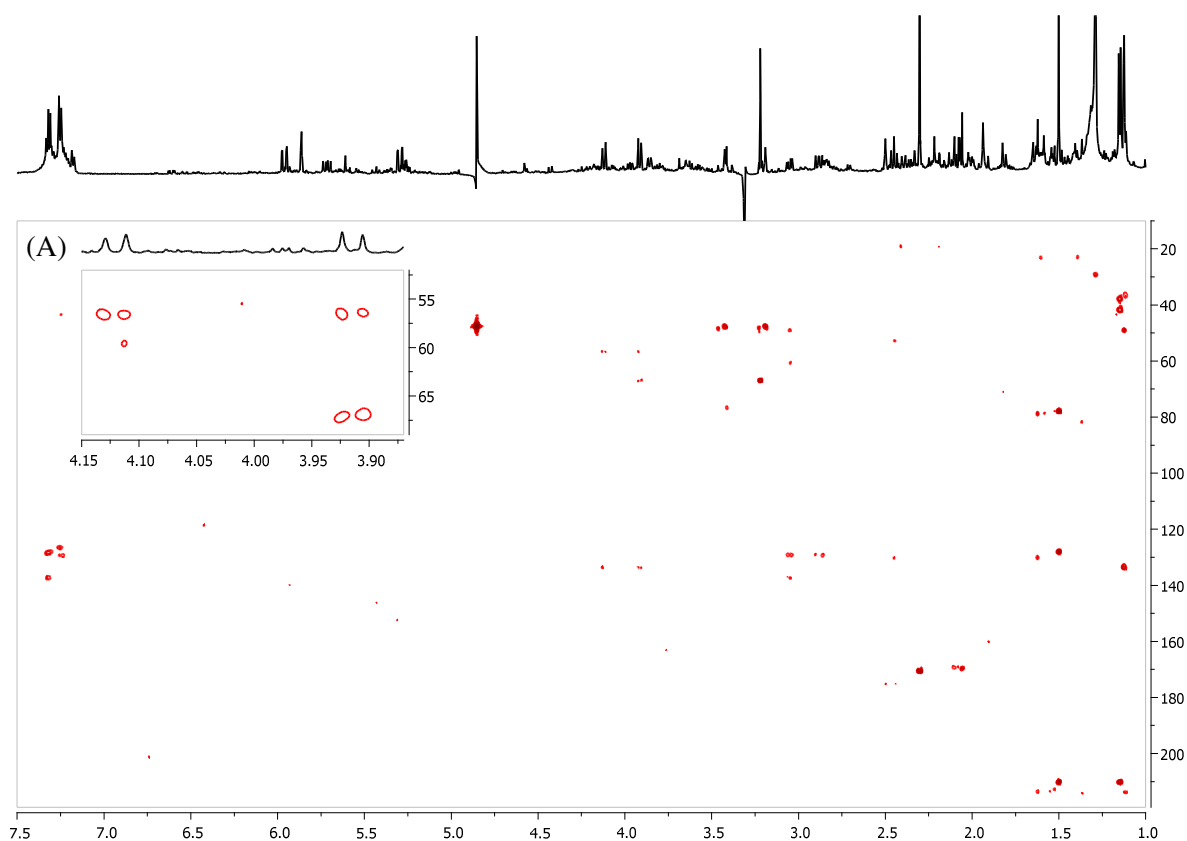


FIGURA 4.21 - Espectro de HMBC da fração LSA_NH₄Br_C13 (MeOH).

(A) Ampliação das correlações entre δ_H 4,15-3,86/ δ_C 69,0-52,0

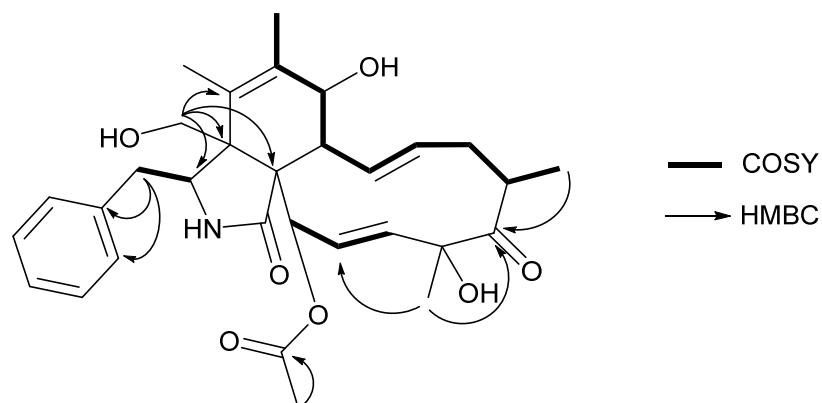


FIGURA 4.22 - Estrutura química proposta para a substância presente na fração LSA_CL5_NH₄Br_C13 com base nas principais correlações observadas no COSY e HMBC

As citocalasinas pertencem a uma ampla classe de metabólitos secundários, cujas estruturas são muito diversificadas, porém este é o primeiro relato de uma modificação estrutural na posição 4.

A fim de checar a viabilidade da estrutura proposta, propôs-se um mecanismo de fragmentação para justificar os íons observados no espectro de íons produtos de m/z 538 mostrado na FIGURA 4.14A.

De acordo com o mecanismo sugerido na FIGURA 4.23, ocorreram perdas de 18, 60 e 78 Da de forma idêntica ao mecanismo proposto para a citocalasina D. No entanto, ao observar o mecanismo indicado no caminho (b), verificou-se, após a perda de ácido acético, um rearranjo de hidrogênio, o qual levou a perda de metanol e consequente formação do íon de m/z 428. Nota-se no caminho (c) que a presença do grupo $-CH_2OH$ não interferiu no mecanismo de formação de m/z 120.

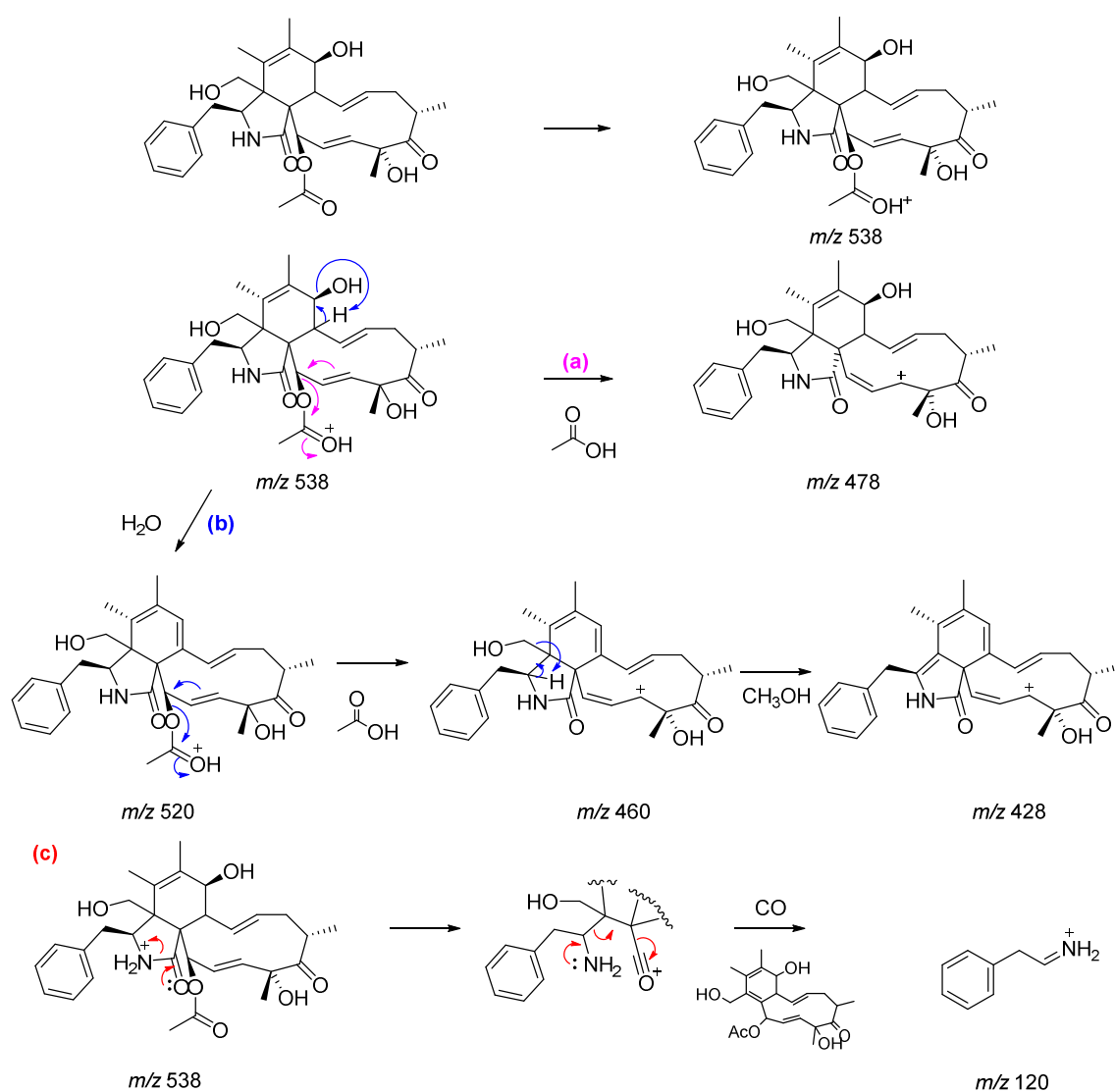


FIGURA 4.23 - Proposta de fragmentação para m/z 538

A sintonia entre os dados de espectrometria de massas e RMN, comprovam que NICL5 produziu uma estrutura inédita, na qual foi introduzido o grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ na citocalasina C. Esta estrutura pode ser denominada de 4-hidroximetil citocalasina C, conforme mostra a FIGURA 4.24. A TABELA 4.1 sumariza os dados de RMN que permitiram identificar a nova citocalasina.

TABELA 4. 1- Dados de RMN da citocalasina da 4-hidroximetil citocalasina C

Posição	^1H (*)	HSQC	COSY	HMBC
1	-	175,1	-	8
2	-	-	-	-
3	3,38 (m)	59,2	10a/b	10
4	-	67,1	-	10
5	-	133,5	-	26
6	-	133,5	-	-
7	3,81(d, 10,2)	65,5	H8, 12	-
8	2,43 (t, 10,2)	50,7	7, 13	13
9	-	56,5	-	-
10a	2,88 (dd, 13,2 e 9,8)	45,0	3, 10b	1', 2'
10b	3,05 (dd; 13,2 e 5,2)	-	3, 10a	1'
11	1,14 (s)	16,8	-	8, 12
12	1,14 (s)	16,8	7	8, 11
13	5,72 (dd; 15,5 e 10,3)	131,6	8, 14	-
14	5,27 (m)	134,6	13, 15b	-
15a	2,02 (m)	38,8	14, 15b, 16	-
15b	2,40 (d, 12,9)	-	14, 16	-
16	2,85 (m)	43,37	15a/b, 22	-
17	-	210,1	-	-
18	-	78,6	-	-
19	5,97 (dd; 15,9 e 2,4)	133,0	20	-
20	5,31 (15,9 e 2,4)	129,4	19, 21	-
21	5,86 (t, 2,4)	76,7	20	-
22	1,15 (s)	19,6	-	17
23	1,50 (s)	24,5	-	17, 19
24	-	170,5	-	-
25	2,30 (s)	20,6	-	24
26a	4,13 (d, 10,8)	68,4	26b	3, 4; 9, 11
26b	3,92 (d, 10,8)	-	26a	3, 4, 11

(*) entre parênteses estão representados a multiplicidade, constante de acoplamento e a integração, respectivamente.

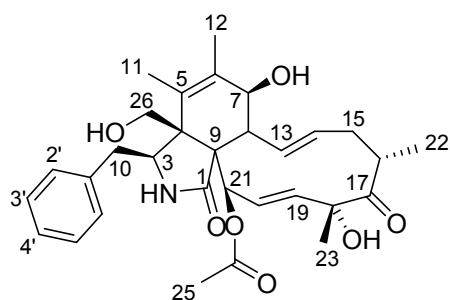


FIGURA 4.24 - Estrutura química da 4-hidroximetil citocalasina C

Na tentativa de “forçar” o micro-organismo a produzir novamente os compostos bromados, diferentes meios de cultivo foram preparados, variando-se a fonte de nitrogênio entre NaNO_3 suplementado com KBr e NH_4Br , além de variar o pH entre 7,0 e 5,0. No entanto, os compostos bromados não foram produzidos. Sabe-se que a padronização das condições de cultivo é de extrema importância, pois qualquer variação seja nos constituintes do meio de cultura, temperatura de cultivo, aeração, pH pode afetar a reprodutibilidade do experimento.

Mediante os espectros de *full scan* e de íons produtos observados nas FIGURAS 4.11 e 4.14, pode-se inferir que o micro-organismo deve ter bromado uma das citocalasinas C, D ou Q resultando, desta forma, no metabólito de m/z 586. Já a bromação de uma citocalasina que possua uma hidroxila a mais do que as citocalasinas C, D e Q pode ter produzido o metabólito de m/z 604, enquanto que a introdução do átomo de bromo na 4-hidroximetil citocalasina C pode ter levado ao íon de m/z 618.

Analisando o extrato proveniente do meio de cultura suplementado com NH_4Cl , verificou-se a produção das citocalasinas já produzidas pelo fungo. Processando os espectros de massas em busca das diferenças metabólicas, verificou-se que não houve a produção de compostos clorados, visto que, a presença de cloro pode ser facilmente reconhecida devido à sua proporção isotópica característica, ou seja, $[\text{M}+\text{H}+2]^+$ com intensidade de 30% em relação a $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4.1.3 Cultivo do fungo N1CL5 em meio Czapek suplementado com derivados do ácido benzoico

Aplicando-se a abordagem OSMAC frente ao fungo N1CL5 visando à produção de uma maior diversidade metabólica, adicionou-se no meio de cultivo o ácido *p*-bromo benzoico. A fim de se verificar o metabolismo fúngico os extratos P_apBrb (partição) e M_apBrb (micélio) foram analisados por LC-UV-MS, de acordo com a metodologia descrita no item 3.4.2 TABELA 3.2, e comparados com o extrato fúngico proveniente do meio Czapek enriquecido com extrato de levedura.

A FIGURA 4.25 mostra os cromatogramas em 220 nm de ambos os extratos suplementados com o ácido *p*-bromo benzoico e o extrato fúngico oriundo do meio Czapek enriquecido com extrato de levedura. Verifica-se um perfil cromatográfico diferente na região compreendida entre 10 e 20 minutos, o qual indica a influência do composto aromático no metabolismo fúngico. Processando-se a bandas dos extratos P_apBrb e M_apBrb, constatou-se a produção de quatro derivados bromados, pois os espectros de A-C, mostrados na FIGURA 4.26, possuem perfil isotópico característico da presença de um átomo de bromo. Já o espectro D apresenta perfil isotópico característico de dois átomos de Br, devido a presença de $[M+H]^+$, $[M+H+2]^+$ e $[M+H+4]^+$. Vale mencionar que o micro-organismo produziu também as citocalasinas já observadas neste estudo.

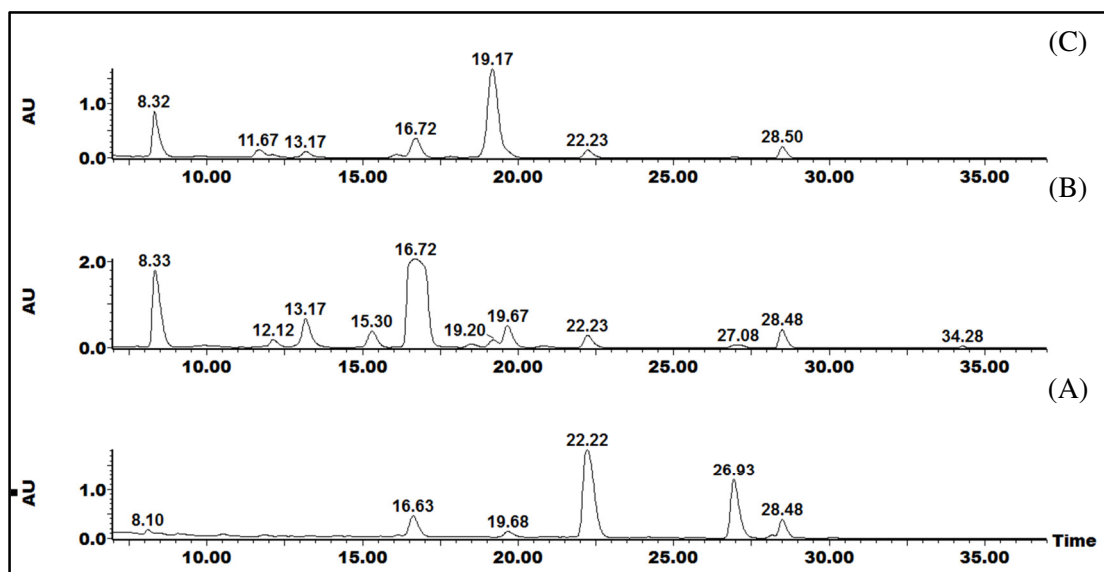


FIGURA 4.25 - Cromatogramas em 220 nm dos extratos fúngicos provenientes dos meios de cultura (A) Czapek, (B) Czapek suplementado com ácido *p*-Br benzoico - LSA_P_apBrb, (C) Czapek suplementado com ácido *p*-Br benzoico - LSA_M_apBrb

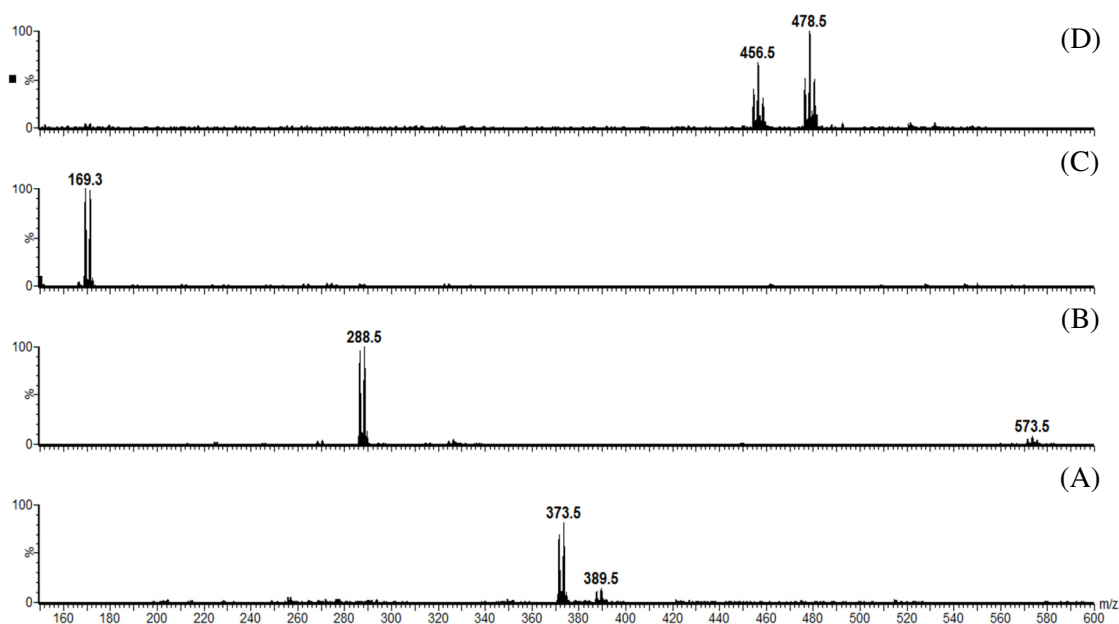


FIGURA 4.26 - Espectros de massas *full scan* dos compostos produzidos devido à influência de ácido *p*-Br benzoico no meio de cultivo de N1CL5

O isolamento dos compostos bromados consistiu em ajustar os parâmetros cromatográficos visando à separação por HPLC em escala preparativa. Deste modo foi empregada coluna Phenyl Hexyl com eluição gradiente, utilizando-se como fase móvel água e acetonitrila e detecção por UV

no comprimento de onda 220 nm. Este sistema permitiu isolar os quatro compostos bromados codificados como LSA_apBrb7, LSA_apBrb11, LSA_apBrb16 e LSA_apBrb40. A caracterização estrutural das substâncias isoladas baseou-se em análises de RMN de uma e duas dimensões, além de experimentos de LC-MS e LC-MS/MS. Vale mencionar que a elucidação estrutural não seguirá a ordem de eluição dos compostos.

O espectro de ^1H RMN da fração LSA_apBrb16, representado na FIGURA 4.27, possui apenas três sinais, dois dos quais são dubletos na região de hidrogênios aromáticos, referentes a H-2 e H-6 em δ 7,48 (d, 8,2 Hz, 2H) e H-3 e H-5 em δ 7,24 (d, 8,2 Hz, 2H). As constantes de acoplamento de 8,2 Hz, características de acoplamento *orto* entre os hidrogênios, indicam que o anel é *para* substituído e, desta forma, o micro-organismo deve ter incorporado o ácido *p*-bromo benzoico. O singlete em δ 4.64 (s, 2H), região desblindada do espectro, deve estar na vizinhança de um grupo retirador de elétrons como o oxigênio de um álcool, deste modo, sugere-se que o micro-organismo promoveu uma redução no ácido *p*-bromo benzoico levando ao álcool correspondente, como pode ser visto na FIGURA 4.28.

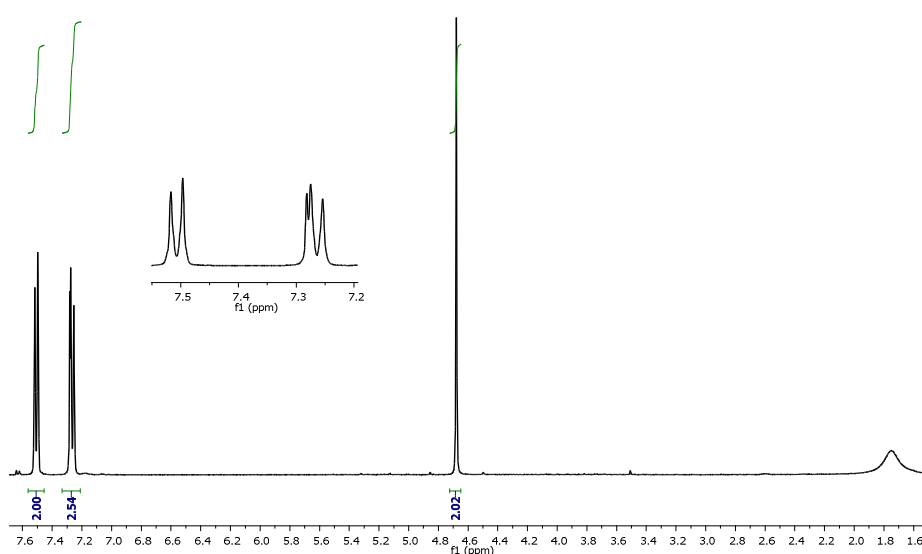


FIGURA 4.27 - Espectro de RMN de hidrogênio em clorofórmio da fração apBrb16 (600 MHz)

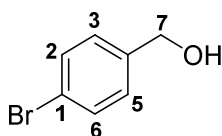


FIGURA 4.28 - Estrutura química do álcool *p*-bromo benzílico produzido por NICL5 devido a redução do ácido *p*-Br benzoico

Confrontando os dados de RMN e espectrometria de massas de alta resolução, percebeu-se que a massa do composto identificado é maior do que a observada no espectro de massas representado na FIGURA 4.29A. No entanto, a desidratação do álcool na fonte de ionização do espectrômetro de massas, leva ao íon observado, o qual é um derivado do íon aromático tropílio, conforme mostra a FIGURA 4.29B.

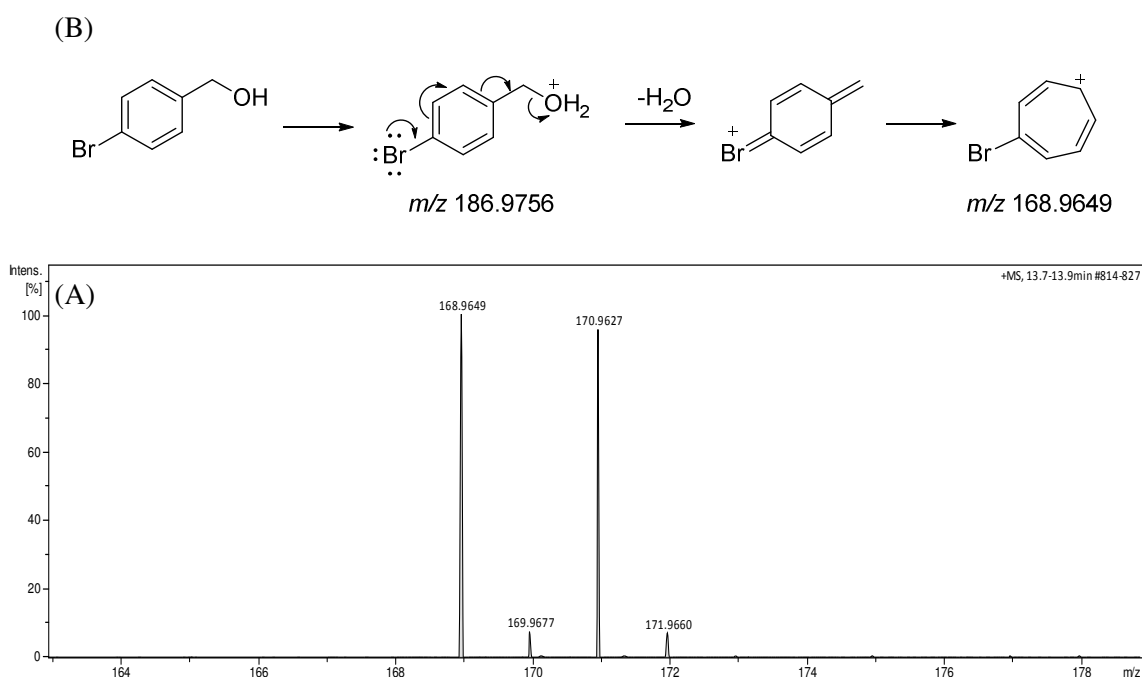


FIGURA 4.29 - (A) Espectro de massas de alta resolução do álcool *p*-bromo benzílico. (B) Desidratação do álcool *p*-bromo benzílico e consequente formação do íon tropílio bromado

Os dados espectroscópicos mostraram que o micro-organismo promoveu a redução do ácido *p*-bromo benzoico ao seu correspondente álcool, evidenciando, desta forma, que o fungo deve possuir um sistema enzimático

capaz de promover esta reação. Este resultado é de grande importância, uma vez que, para ocasionar esta reação em condições laboratoriais se faz necessário o uso de um agente redutor forte como o LiAlH_4 .

Biorreduções microbianas de ácidos carboxílicos estão intimamente relacionadas à natureza do micro-organismo. Micro-organismos anaeróbios como *Clostridium thermoaceticum*, *C. formicoaceticum*, *Pyrococcus furiosus*, promovem a redução do ácido ao aldeído devido à ação da enzima aldeído oxireductase (AOR), uma enzima altamente sensível a oxigênio e dependente de tungstênio ou molibdênio (WHITE et al., 1989, 1991, 1993 van der BAN, 1999). A redução ao álcool é catalisada por desidrogenases dependentes de NAD(P)H. Por outro lado, biorreduções de ácidos carboxílicos em condição aeróbica tem sido extensivamente estudada por ROSAZZA e colaboradores (1997, 1998, 2004, 2007, 2008). Esta bioconversão está relacionada à enzima ácido carboxílico redutase (CAR), a qual é dependente de ATP e NADPH.

A redução do ácido *p*-bromo benzoico ao álcool correspondente evidencia que o fungo N1CL5 deve possuir a enzima CAR. Baseado nas pesquisas de ROSAZZA propôs-se o mecanismo catalítico da biorredução do ácido *p*-bromo benzoico, como representado na FIGURA 4.30. O ciclo catalítico inicia-se pela ligação do ácido ao ATP, formando um intermediário acila-AMP (ROSAZZA, 1998). A unidade sulfidril do grupo prostético da fosfopanteteína representada por HS-CAR reage com o intermediário acila-AMP, eliminando adenosil monofosfato e gerando uma ligação covalente entre o ácido *p*-bromo benzoico e a CAR. O tioéster é reduzido na porção C terminal da CAR pelo NADPH levando ao aldeído e deixando a CAR livre para iniciar outro ciclo catalítico (VENKITASUBRAMANIAN et al., 2007). A redução do aldeído ao álcool provavelmente é catalisada por NAD(P)H.

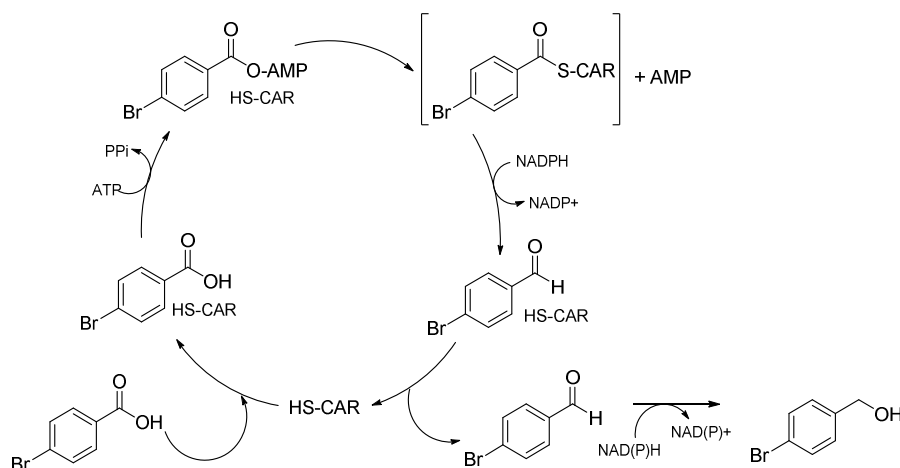


FIGURA 4.30 - Ciclo catalítico da redução do ácido benzoico ao álcool correspondente (Adaptado de VENKITASUBRAMANIAN et al., 2007)

A integração do espectro de ressonância de ^1H RMN do composto LSA_apBrb11, mostrado na FIGURA 4.31, apresentou dez hidrogênios. É possível observar a presença de quatro hidrogênios aromáticos, H-2 e H-6 em δ 7,72 (d; 8,7; 2H) e H-3 e H-5 em δ 7,62 (d; 8,7; 2H). As constantes de acoplamento dos hidrogênios indicam substituição *para*. Além disso, verificam-se hidrogênios metilênicos, H-8 em δ 3,42 (t, 7,0 Hz, 2H), H-9 em δ 1,91 (quint; 7,0 Hz; 2H) e H-10 em δ 2,38 (t; 7,0 Hz; 2H), sendo que o quintupeto em δ 1,91 correlaciona-se com os outros dois metilenos no espectro de COSY, mostrado na FIGURA 4.32. A análise do espectro de HMBC, FIGURA 4.33, evidencia a presença de dois carbonos com deslocamento químico característico de carboxila. Pelo espectro de massas de alta resolução, mostrado na FIGURA 4.34, constata-se que, além da presença de um átomo de Br, o composto deve possuir um átomo de N, pois $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 286,0074, é par. Desta maneira, a molécula deve possuir um grupo amida, o qual deve estar adjacente ao anel aromático e ao metileno em δ 3,42, pois observa-se no HMBC as correlações de H-2 e H-6 em δ 7,72 e de H-8 em δ 3,42 com o carbono carboxílico C-7 em δ 167,6; como mostram as linhas tracejadas em azul na FIGURA 4.33. Já o segundo grupo carboxila deve estar adjacente a H-10 em δ 2,38, dado o

acoplamento deste hidrogênio com o carbono C-11 em δ 176,1, com deslocamento químico característico de ácido carboxílico. Ademais, o quintupletto em δ 1,91 também correlaciona-se com esta carboxila (acoplamentos representados pelas linhas tracejadas em verde). Desta forma, propõe-se a estrutura mostrada na FIGURA 4.35 com as principais correlações observadas no COSY e no HMBC destacadas.

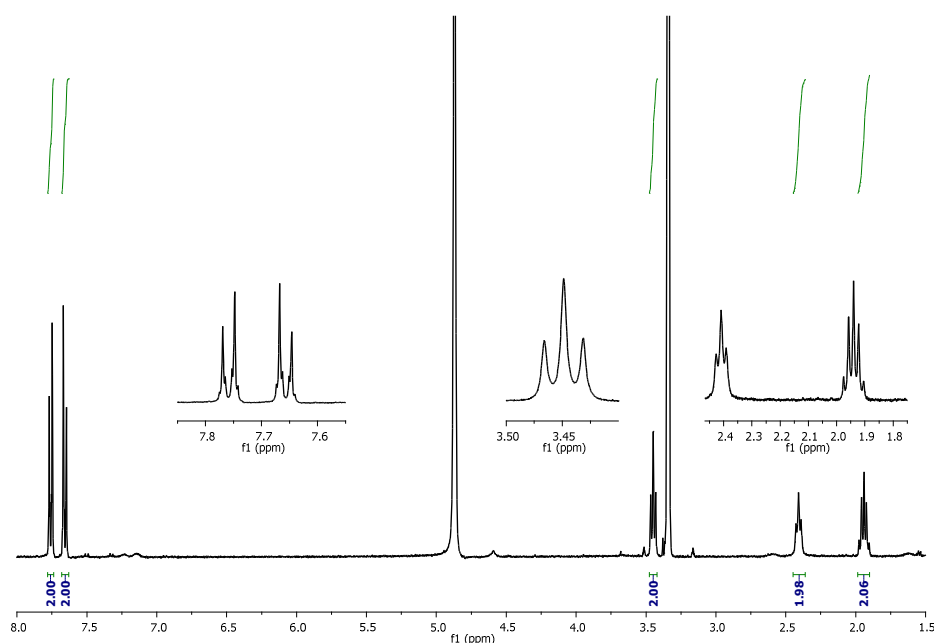


FIGURA 4.31 - Espectro de RMN de hidrogênio em metanol de apBrb11

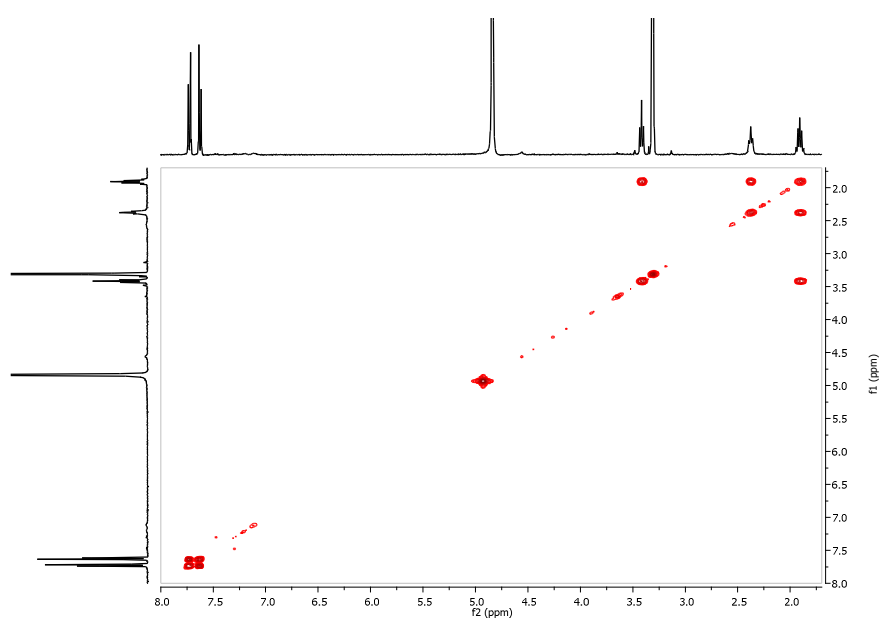


FIGURA 4.32 - Espectro de COSY de LSA_apBrb11 em metanol

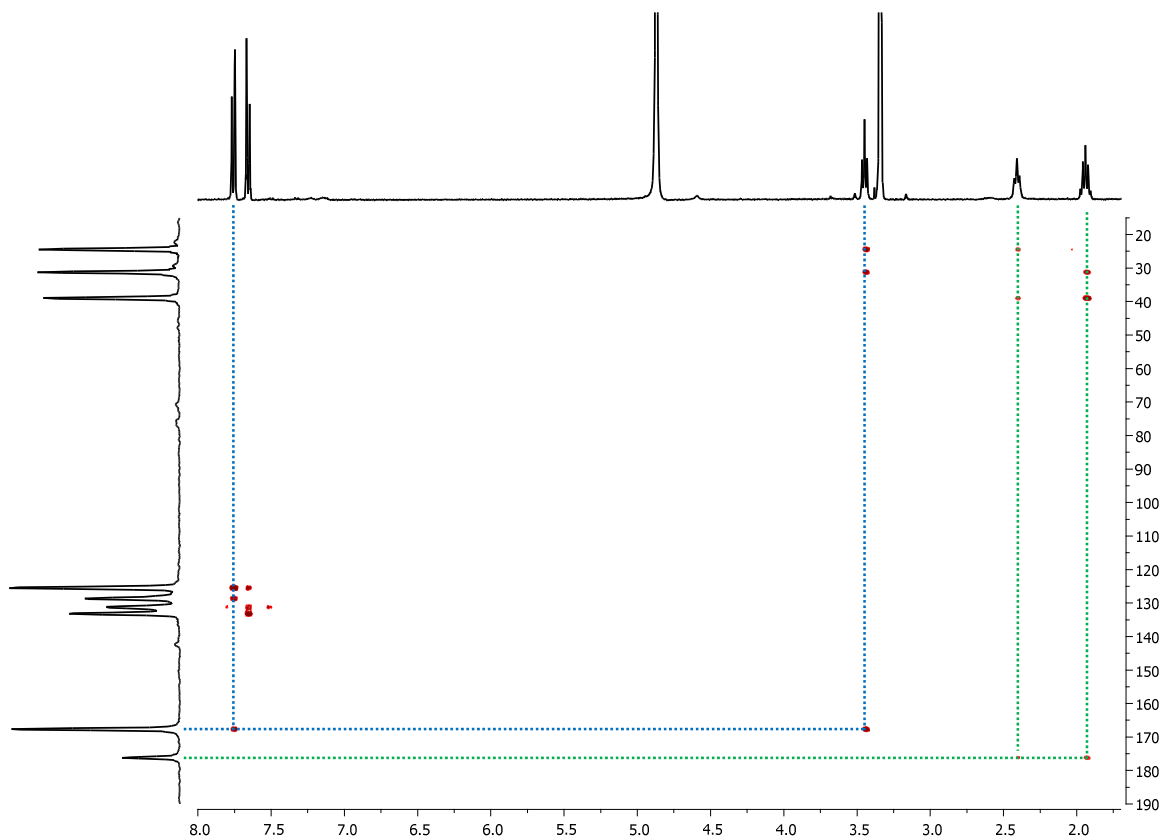


FIGURA 4.33 - Espectro de HMBC de LSA_apBrb11

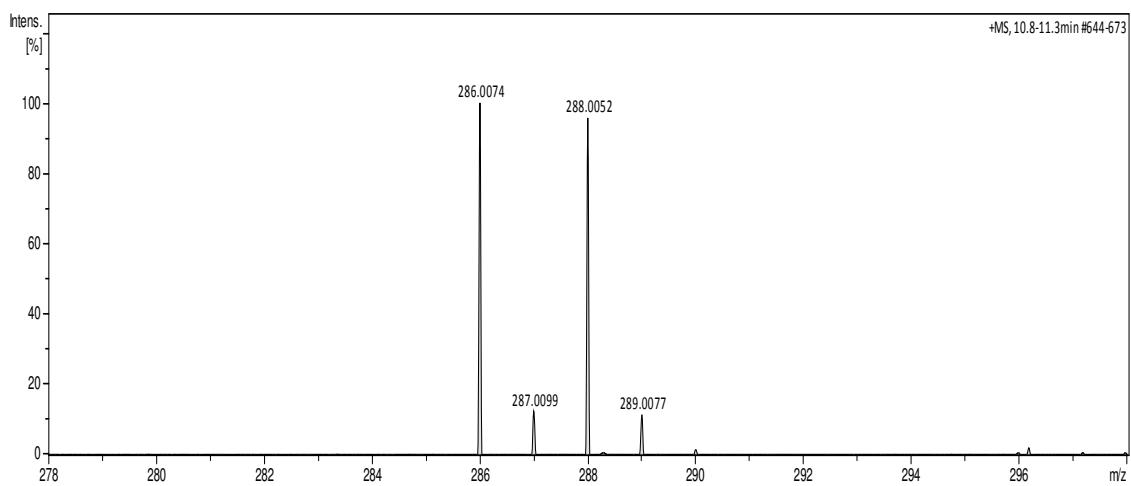


FIGURA 4.34 - Espectro de massas, *full scan*, de LSA_apBrb11

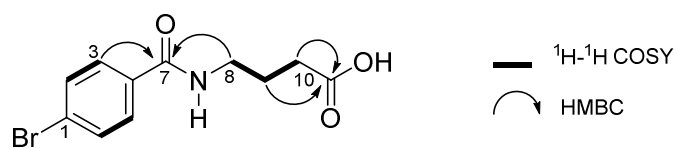


FIGURA 4.35 - Estrutura química proposta para LSA_apBrb11

A observação da estrutura proposta mostra que o micro-organismo foi capaz de incorporar o ácido γ -aminobutírico. O GABA é produzido por fungos filamentosos e desempenha diversas funções, como fonte de carbono e nitrogênio, além de estar envolvido em mecanismos de esporulação (KUMAR e PUNECAR, 1997). No entanto, há poucos trabalhos na literatura sobre metabólitos secundários contendo este composto (LAATSCH, 1991, MALMSTRØM, 1999 e MALMSTRØM et al., 2002] e, desta forma, este é o primeiro relato da produção do GABA por fungos do gênero *Xylaria*.

Os dados de espectrometria de massas de alta resolução corroboram com a estrutura proposta, uma vez que, a fórmula molecular sugerida é $C_{11}H_{12}BrNO_3$ (m/z 286,0074 $[M+H]^+$, calc 286,0073). No entanto, para confirmar esta informação foi realizado experimento de íons produto de $[M+H]^+$, com energia de colisão de 10 eV, como mostra a FIGURA 4.36.

Na proposta de fragmentação observada na FIGURA 4.37, visualiza-se, inicialmente, a perda de água, levando ao íon de m/z 267,9991. Porém, se a protonação ocorrer no N da amida, a assistência do par de elétrons não ligante do O da carboxila da amida leva a estabilização da carga positiva no nitrogênio e a saída do GABA, formando o fragmento de m/z 182,9450, justificando, desse modo, a estrutura proposta.

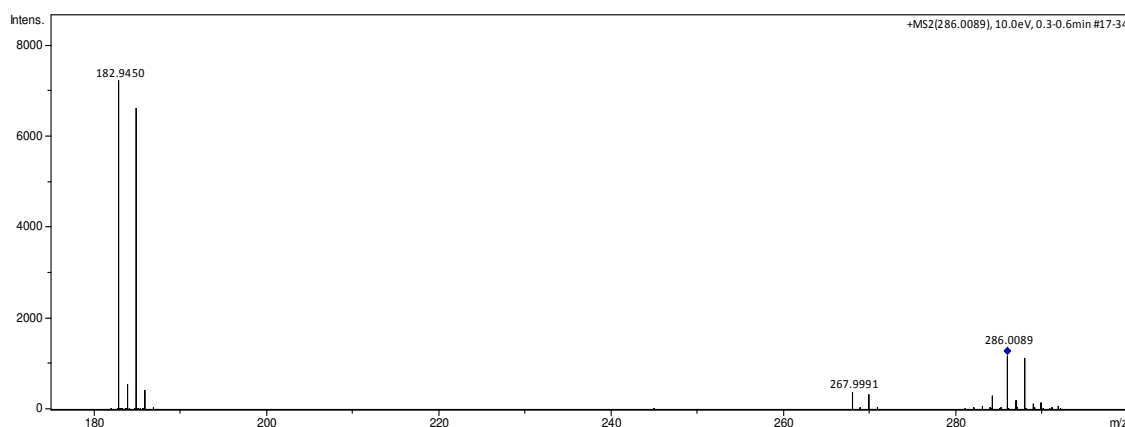


FIGURA 4.36 - Espectro de íons produtos de m/z 286,0089

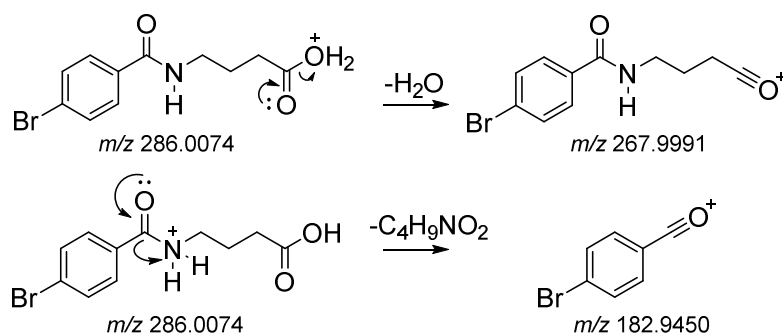


FIGURA 4.37 - Proposta de fragmentação do composto presente na fração LSA_apBrb11

A TABELA 4.2 sumariza a atribuição dos dados de RMN que permitiram identificar o composto presente na fração LSA_apBrb11.

TABELA 4.2 - Dados de RMN de acpBrb11 (metanol)

Posição	1H (*)	COSY	HMBC
1	-	-	-
2	7,72 (d; 8,7; 2H)	3	1, 7
3	7,62 (d; 8,7; 2H)	2	1, 4
4	-	-	-
5	7,62 (d; 8,7; 2H)	6	1, 4
6	7,72 (d; 8,7; 2H)	5	1, 7
7	-	-	-
8	3,42 (t; 6,9; 2H)	7	7, 9, 10
9	1,91 (quint; 7,1; 2H)	5, 6	8, 10, 11
10	2,38 (t; 6,8; 2H)	7	8, 7, 11
11	-	-	-

(*) entre parênteses estão representados a multiplicidade, constante de acoplamento e a integração, respectivamente.

Através dos dados de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, verificou-se que o micro-organismo promoveu a incorporação de uma unidade do ácido γ -aminobutírico, o qual é derivado do aminoácido ácido glutâmico. Sabe-se que plantas e mamíferos são capazes de incorporar unidades de aminoácidos a ácidos carboxílicos aromáticos, como forma de detoxificar substâncias exógenas a seus organismos (KORTE, et al., 2000 e DARNELL e WEIDOLF, 2013). Baseado em DARNEL e WEIDOLF (2013) propôs-se o mecanismo catalítico mostrado na FIGURA 4.38, o qual consiste em três etapas. Na primeira etapa, catalisada pela acyl-CoA sintetase

(ACS), ocorre a ativação do ácido *p*-bromo benzoico pelo ATP, gerando um intermediário acila adenilado (acil-AMP). Na segunda etapa o grupo acil-AMP é substituído pela CoA, formando um intermediário entre o ácido carboxílico aromático e a CoA. Já a última etapa envolve a troca da CoA por um aminoácido, reação esta catalisada pela enzima N-aciltransferase, produzindo, desta forma, um aminoácido conjugado ao ácido carboxílico aromático. Deste modo, sugere-se que o fungo deve ter promovido a conjugação do ácido glutâmico ao ácido *p*-bromo benzoico e após uma descarboxilação, levou ao composto presente na fração LSA_apBrb11.

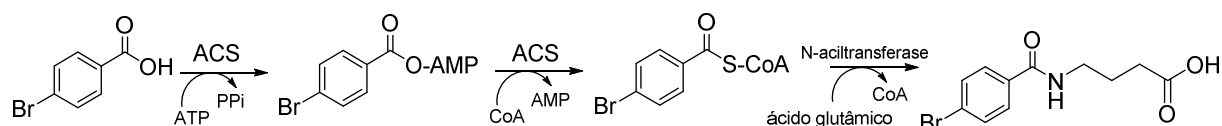


FIGURA 4.38 - Conjugação de aminoácido com ácido *p*-bromo benzoico (Adaptado de DARNELL E WEIDOLF, 2013)

Com base em experimentos de espectrometria de massas de alta resolução, espectro de massas representado na FIGURA 4.39, estabeleceu-se a fórmula molecular do composto presente na fração LSA_apBrb40 como $C_{18}H_{17}Br_2NO_3$ (m/z 453.9637 $[M+H]^+$, calc 453.9648), requerendo 10 graus de insaturação. A comparação do espectro de 1H RMN, FIGURA 4.40, com os dos compostos presentes nas frações LSA_apBrb16 e LSA_apBrb11 mostra grande similaridade entre eles. O espectro de 1H RMN de LSA_apBrb40 permite identificar dois sistemas aromáticos *para* substituídos, com os hidrogênios H-2/H-6 em δ 7,57 (*d*; 8,2 Hz; 2H), H-3/H-5 em δ 7,63 (*d*; 8,2 Hz; 2H), H-14/H-18 em δ 7,18 (*d*; 8,3 Hz; 2H) e H-15/H-17 em δ 7,48 (*d*; 8,3 Hz; 2H). Observa-se também a presença de quatro grupos metilênicos H-9 δ 1,19 (quint; 7,1 Hz; 2H), H-10 δ 2,51 (t; 6,9 Hz; 2H), além de outros dois ligados a heteroátomos, H-8 δ 3,52 (t; 6,9 Hz; 2H) e H-12 em δ 5,08 (s). O espectro de COSY (FIGURA 4.41) mostra as correlações entre H-9 e H-8 e H-10, assim como no caso do composto

da fração LSA_apBrb11, indicando, desta forma, a presença do ácido γ -aminobutírico. Os hidrogênios H-12 δ 5,08 devem estar ligados a um oxigênio de um éster, devido ao deslocamento químico, pois no espectro de HMBC, mostrado na FIGURA 4.42 observa-se a correlação de H-12 com o carbono carboxílico C-11 em 173,6. Verifica-se ainda a correlação de H-12 com C-13 em δ 134,5 e C-14 em δ 129,9, indicando que este está adjacente ao anel aromático.

De acordo, com todas as informações obtidas por espectrometria de massas e por RMN, propôs-se a estrutura representada na FIGURA 4.43, na qual as principais correlações de COSY e HMBC estão destacadas.

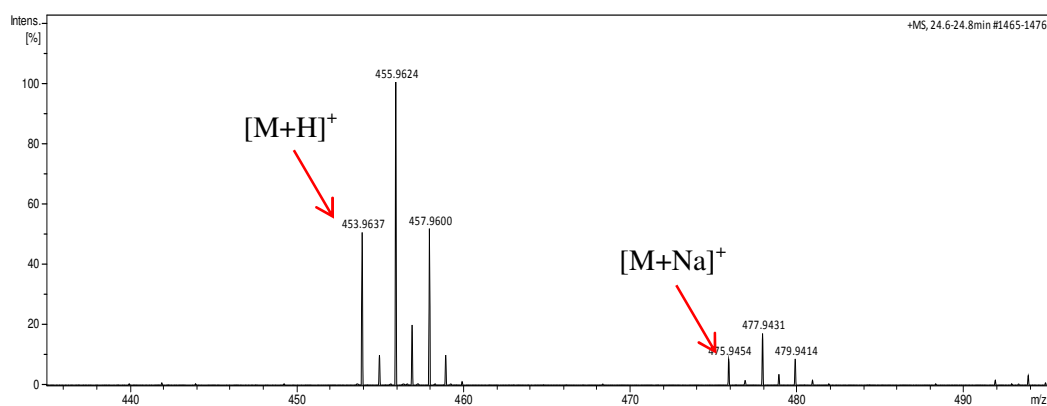


FIGURA 4.39 - Espectro de massas *full scan* da amostra LSA_apBrb40

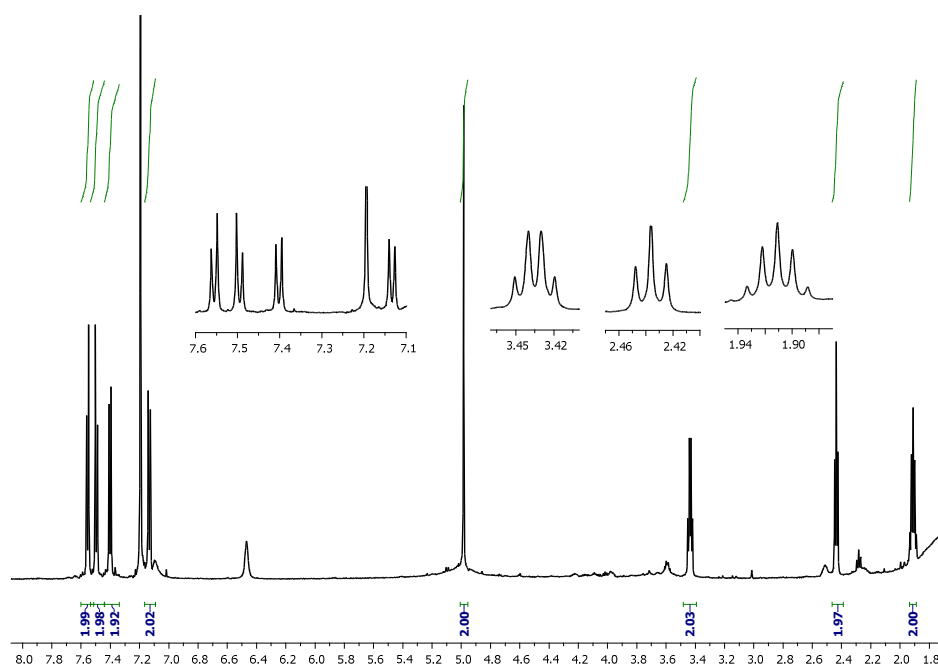


FIGURA 4.40 - Espectro de RMN de hidrogênio da substância contida na fração LSA_apBrB40 (CDCl_3 , 400 MHz)

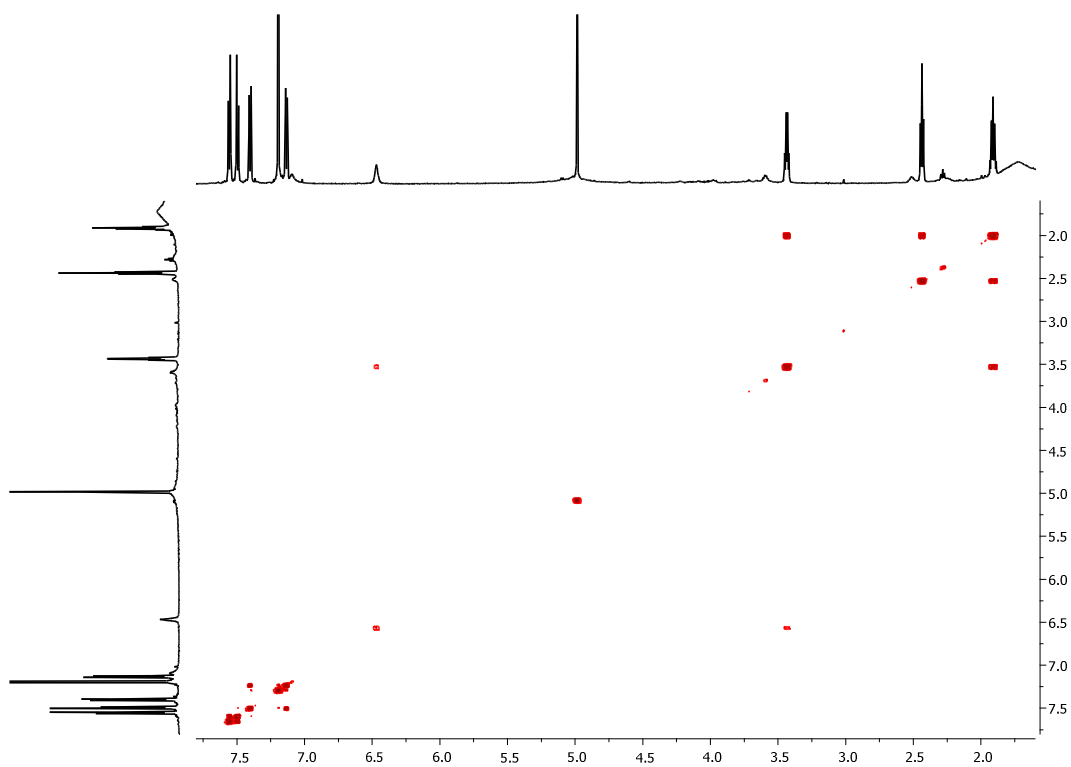


FIGURA 4.41 - Espectro de COSY da substância contida na fração LSA_apBrB40 (CDCl₃)

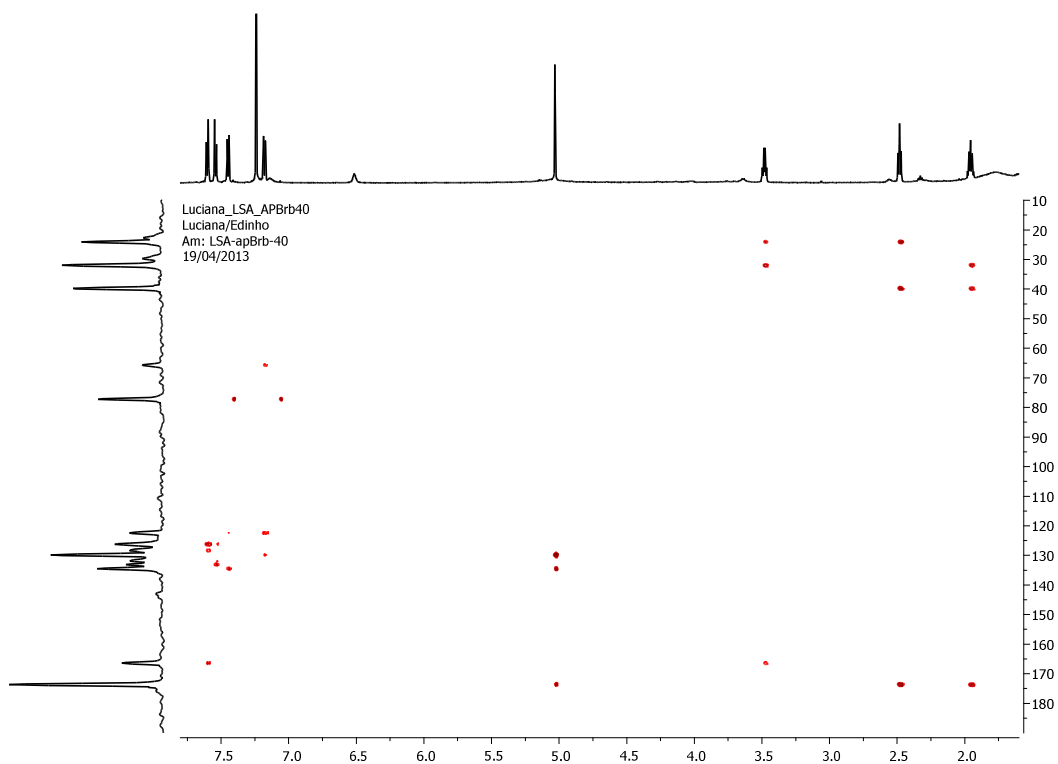


FIGURA 4.42 - Espectro de HMBC da substância contida na fração LSA_apBrB40 (CDCl₃)

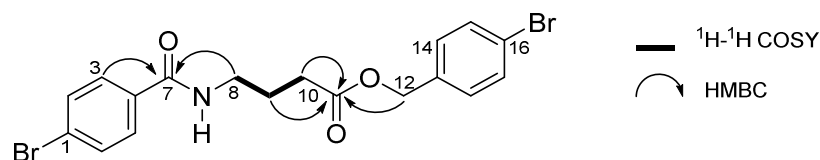


FIGURA 4.43 - Estrutura proposta para a substância presente na fração apBrb40

A TABELA 4.3 apresenta os dados de RMN que permitiram a identificação da amostra presente na fração LSA_apBrb40.

TABELA 4.3 - Dados de RMN de LSA_apBrb40 (400 MHz, CDCl₃)

Posição	¹ H (*)	COSY	HMBC
1	-	-	-
2	7,57 (d; 8,2; 2H)	3	1, 4
3	7,63(d; 8,2; 2H)	2	1, 7
4	-	-	-
5	7,63(d; 8,2; 2H)	6	1, 4
6	7,57 (d; 8,2; 2H)	5	1, 7
7	-	-	-
8	3,52 (q; 6,2; 2H)	9	7, 9, 10
9	1,91 (quint; 6,7; 2H)	6, 10	8, 10, 11
10	2,51 (t; 6,9; 2H)	9	8, 9, 11
11	-	-	-
12	5,08 (s)	-	11, 13, 14
13	-	-	-
14	7,18 (d; 8,3; 2H)	15	12, 16,
15	7,48 (d; 8,3; 2H)	14	13, 16
16	-	-	-
17	7,48 (d; 8,3; 2H)	18	13, 16
18	7,18 (d; 8,3; 2H)	17	12, 16

(*) entre parênteses estão representados a multiplicidade, constante de acoplamento e a integração, respectivamente.

Realizou-se também experimento de íons produtos, conforme pode ser visto na FIGURA 4.44.

Para justificar os fragmentos observados no espectro de íons produtos, foi realizada uma proposta de fragmentação, a qual está representada na FIGURA 4.45. Verifica-se a ionização da substância através da protonação do O do éster, levando ao íon molecular protonado de m/z 453,9637. O primeiro

fragmento observado é o íon de m/z 267,9955, o qual possui proporção isotópica característica de um átomo de Br. Através do efeito mesomérico o par de elétrons não ligante do O carboxílico assiste a saída do álcool *p*-bromo benzílico, levando ao íon acílium de m/z 267,9955. Já o íon de m/z 168,9649 é gerado de maneira análoga ao íon anterior, no entanto, a delocalização eletrônica no anel aromático é quem assiste a saída do ácido carboxílico, conduzindo a formação do íon tropílio bromado.

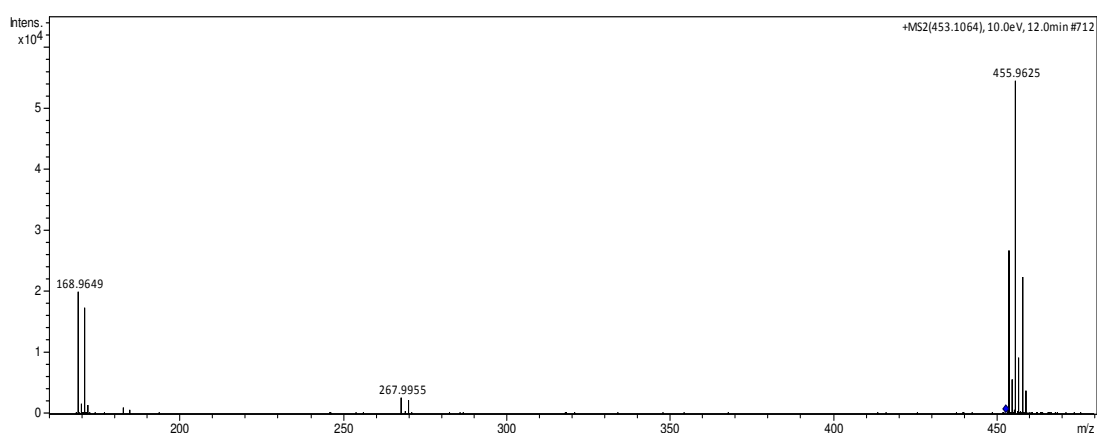


FIGURA 4.44 - Espectro de íons produtos com energia de colisão de 10 eV

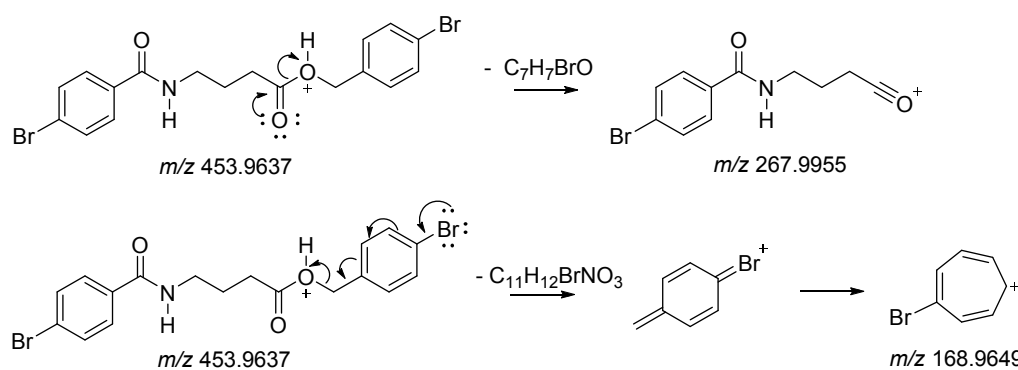


FIGURA 4.45 - Proposta de fragmentação de m/z 453,9637

Através das análises espectroscópicas mencionadas conclui-se que o micro-organismo utilizou os compostos presentes nas frações LSA_apBrb11 e LSA_apBrb16 para produzir o composto presente na fração LSA_apBrb40, o qual é uma substância inédita.

A análise da fração LSA_apBrb7 por espectrometria de massas de alta resolução mostrou o íon de m/z 349,0274 (calc. 349,0281) correspondente a $[M+H]^+$, indicando a massa molecular de $C_{13}H_{17}BrO_6$ (FIGURA 4.46) e 6 graus de instauração.

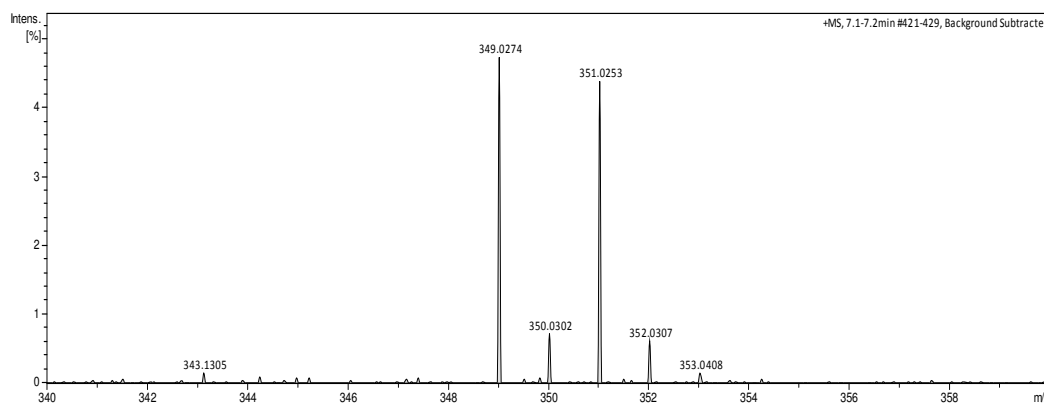


FIGURA 4.46 - Espectro de massas *full scan* do composto presente na fração LSA_apBrb7

Os dados de 1H RMN, representado na FIGURA 4.47, mostram a existência de um sistema aromático *para* substituído com os hidrogênios H-2/H-6 em δ 7,49 (d; 8,4 Hz; 2H) e H-3/H-5 em δ 7,35 (d; 8,4 Hz; 2H), além de dois hidrogênios oximetilênicos H-7a em δ 4,63 (d; 12,2 Hz; 1H) e H-7b em δ 4,43 (d; 12,2 Hz; 1H), indicando a presença de um sistema semelhante ao observado para o álcool *p*-bromo benzílico. Ademais, observam-se cinco hidrogênios metínicos referentes a H-1' em δ 4,80 (d; 3,8 Hz; 1H), H-2' em δ 3,32 (dd; 9,7 e 3,8 Hz; 1H), H-3' em δ 3,57 (dd; 9,7 e 9,1 Hz; 1H), H-4' em δ 3,20 (m) e H-5' em δ 3,50 (ddd; 9,8; 5,6 e 2,3 Hz; 1H) e dois hidrogênio metilênicos H-6'a em δ 3,70 (dd; 11,8 e 2,3 Hz; 1H) e H-6'b em δ 3,56 (dd; 11,8 e 5,6 Hz; 1H). A FIGURA 4.48 ilustra o espectro de ^{13}C RMN, no qual são observados seis carbonos, C-1' em δ 99,4, C-2' em δ 73,5, C-3' em δ 75,0, C-4' em δ 71,8, C-5' em δ 74,0 e C-6' em δ 62,7, os quais podem ser atribuídos a uma unidade de açúcar com anel de 6 membros. As correlações observadas no COSY confirmam esta atribuição, conforme mostra a FIGURA 4.49.

O hidrogênio anomérico H-1' δ 4,80 (d; 1H) possui constante de acoplamento de 3,8 Hz, característica de um anômero α . As constantes de acoplamento de H-2' (dd; 9,7 e 3,8 Hz; 1H) indicam que os prótons H-2', H-3', H-4', e H-5' ocupam posição axial, desta forma, a unidade de açúcar foi designada como α -glicopirranose. No espectro de HMBC, FIGURA 4.50, a correlação entre H-1' (δ 4,80) com C-7 (δ 69,4) e C-5' (δ 71,8), sugere que a glicose esteja ligada a C-6.

A análise dos dados de espectrometria de massas e RMN mostraram que o micro-organismo possui um potencial enzimático muito interessante, pois além de promover a redução do ácido *p*-bromo benzoico, bem como incorporar o GABA, NICK5 também realizou reação de glicosilação. A FIGURA 4.51 ilustra a estrutura do composto glicosilado com as principais correlações observadas no COSY e HMBC destacadas.

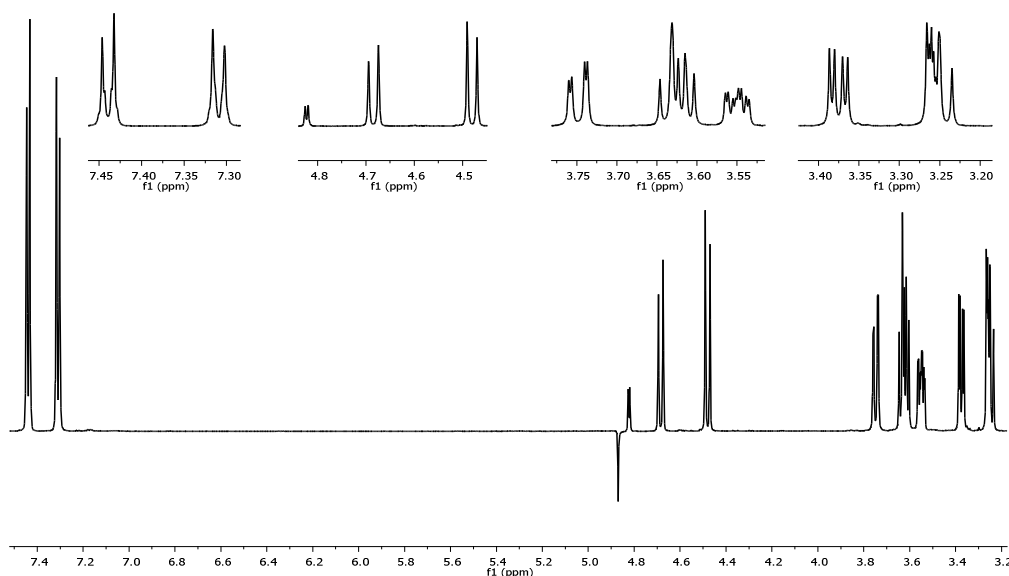


FIGURA 4.47 - Espectro de RMN de hidrogênio da fração LSA_apBrb7 (MeOH, 600 MHz)

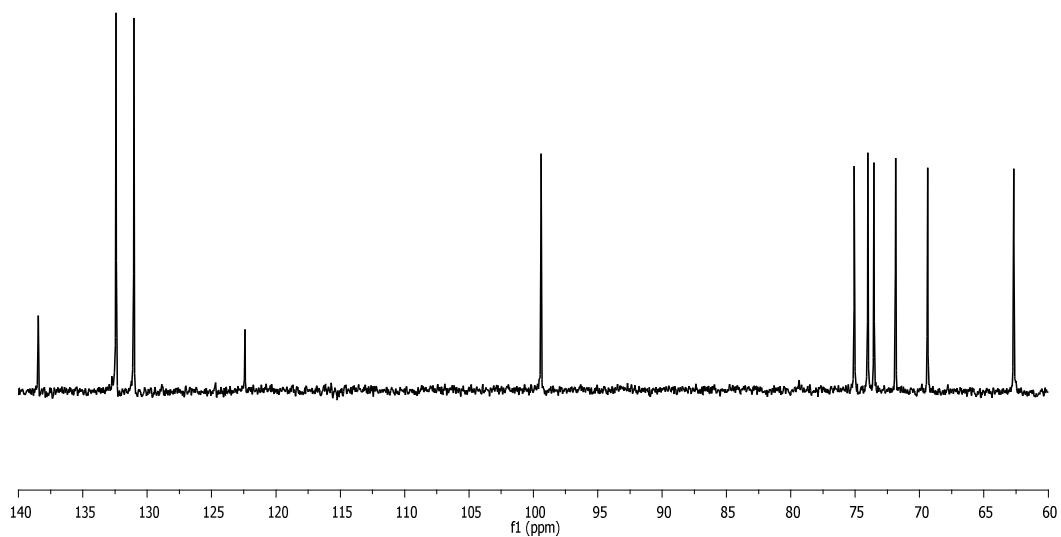


FIGURA 4.48 - Espectro de RMN ^{13}C da fração LSA_apBrb7 (MeOH, 150 MHz)

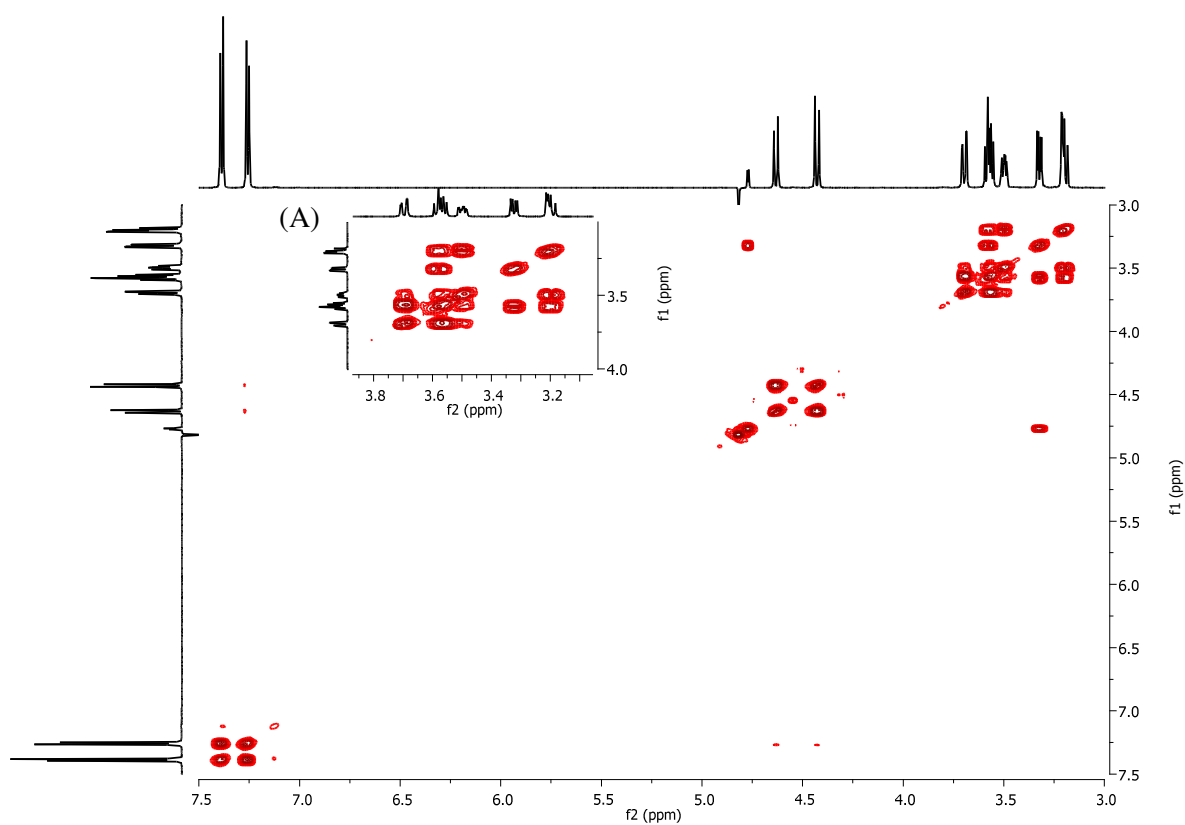


FIGURA 4.49 - Espectro de COSY da fração LSA_apBrb7 (MeOH).
(A) Ampliação das correlações entre δ_{H} 3,1-3,8

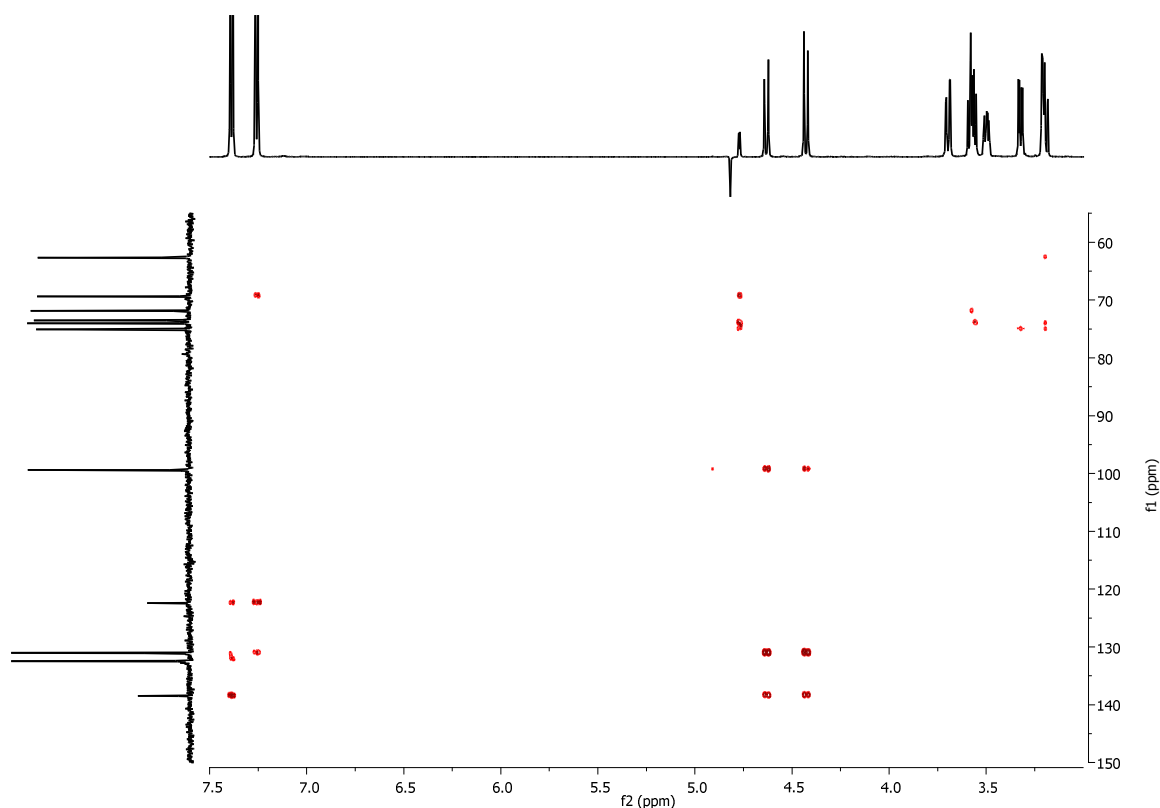


FIGURA 4.50 - Espectro de HMBC da fração apBrb7 (MeOH)

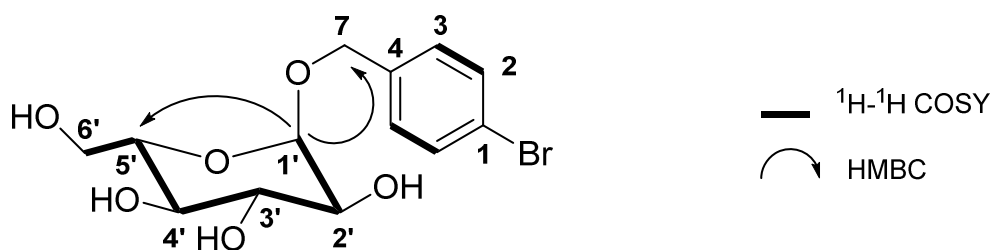


FIGURA 4.51- Estrutura química proposta para o composto presente na fração LSA_apBrb7

A TABELA 4.4 mostra a atribuição dos sinais de RMN do produto de biotransformação glicosilado presente na fração LSA_apBrb7.

O rendimento dos produtos de biotransformação LSA_apBrb7, LSA_apBrb11, LSA_apBrb16 e LSA_apBrb40 foi 8,0; 2,8; 10,8 e 1,4%.

O experimento da adição do ácido *p*-bromo benzoico ao meio de cultivo de N1CL5 mostrou que o micro-organismo tem um potencial enzimático a ser explorado, uma vez que, foi hábil em promover biotransformações, como a

redução do ácido carboxílico aromático, a incorporação do GABA, além de realizar glicosilação.

TABELA 4.4 - Dados de RMN do composto presente na fração LSA_apBrB7

Posição	¹ H (*)	¹³ C	COSY	HMBC
1	-	138,5	-	-
2/6	7,49 (d; 8,4; 2H)	132,5	3	1, 4
3/5	7,35 (d; 8,4; 2H)	131,2	2, 7a, 7b	1, 7
4	-	122,4	-	-
7a	4,69 (d; 12,2; 1H)	69,4	7b, 3	1, 3, 1'
7b	4,50 (d; 12,2; 1H)		7a	1, 3, 1'
1'	4,80 (d; 3,8; 1H)	99,4	2'	7, 3', 5'
2'	3,32 (dd; 9,7, 3,8; 1H)	73,5	1', 3'	3', 4'
3'	3,57 (t; 9,7; 1H)	75,1	2', 4'	2', 5'
4'	3,20 (m; 9,7; 1H)	71,8	3', 5'	3', 5', 6'
5'	3,50 (ddd, 9,8, 5,7, 2,1, 1H)	74,0	4', 6'a, 6'b	4', 3', 6'
6'a	3,70 (dd; 11,8; 2,3; 1H)	62,7	5', 6'b	
6'b	3,56 (dd; 11,8; 5,6; 1H)		5', 6'a	4', 5'

(*) entre parênteses estão representados a multiplicidade, constante de acoplamento e a integração, respectivamente.

Devido à biotransformação do ácido *p*-bromo benzoico, avaliou-se a capacidade do micro-organismo em biotransformar outros derivados do ácido benzoico *para* substituídos. Logo, suplementou-se o cultivo de N1CL5 com os ácidos *p*-cloro, *p*-hidroxi, *p*-amino e *p*-nitro benzoicos e, após o desenvolvimento fúngico os extratos foram analisados por LC-HRMS, utilizando-se ESI+.

No extrato fúngico suplementado com ácido *p*-cloro benzoico foram detectados [M+H]⁺ de *m/z* 125,0154 e [M+H+2]⁺ de *m/z* 127,0145 com proporção de 30% em relação ao pico do íon molecular protonado, característico da presença de um átomo de cloro na molécula, como mostra o espectro de massas representado na FIGURA 4.52A. Este íon refere-se ao íon tropílio clorado (calc 125,0152) e, deste modo, tem-se o mesmo comportamento observado com o álcool *p*-bromo benzílico. Logo, infere-se que o micro-organismo também reduziu o ácido *p*-cloro benzoico ao álcool. Ademais,

visualiza-se na FIGURA 4.52 B e D outros dois íons com o mesmo perfil isotópico que o anterior, $[M+H]^+$ de m/z 242,0581 e m/z 305,0796, os quais correspondem a $C_{11}H_{12}ClNO_3$ (calc 242,0578) e $C_{13}H_{17}ClNO_6$ (calc 305,0786), equivalentes aos produtos de biotransformação contendo o GABA e a glicose, respectivamente. Observando a FIGURA 4.52C nota-se um perfil isotópico diferente dos compostos anteriores, com $[M+H]^+$ de m/z 366,0661, $[M+H+2]^+$ 368,0461 e $[M+H+4]^+$ 370,0618 com proporção de 60 e 10% em relação ao íon molecular protonado, evidenciando da presença de dois átomos de cloro. Assim, estabeleceu-se a fórmula molecular $C_{18}H_{17}Cl_2NO_3$ (calc 366,0641), correspondente ao produto de biotransformação contendo as unidades de GABA e do álcool. Foram realizados experimentos de MS/MS dos candidatos a produtos de biotransformação contendo o GABA e, observou-se um perfil de fragmentação idêntico em relação aos produtos contendo o bromo. A TABELA 4.5 mostra as massas acuradas dos íons produtos.

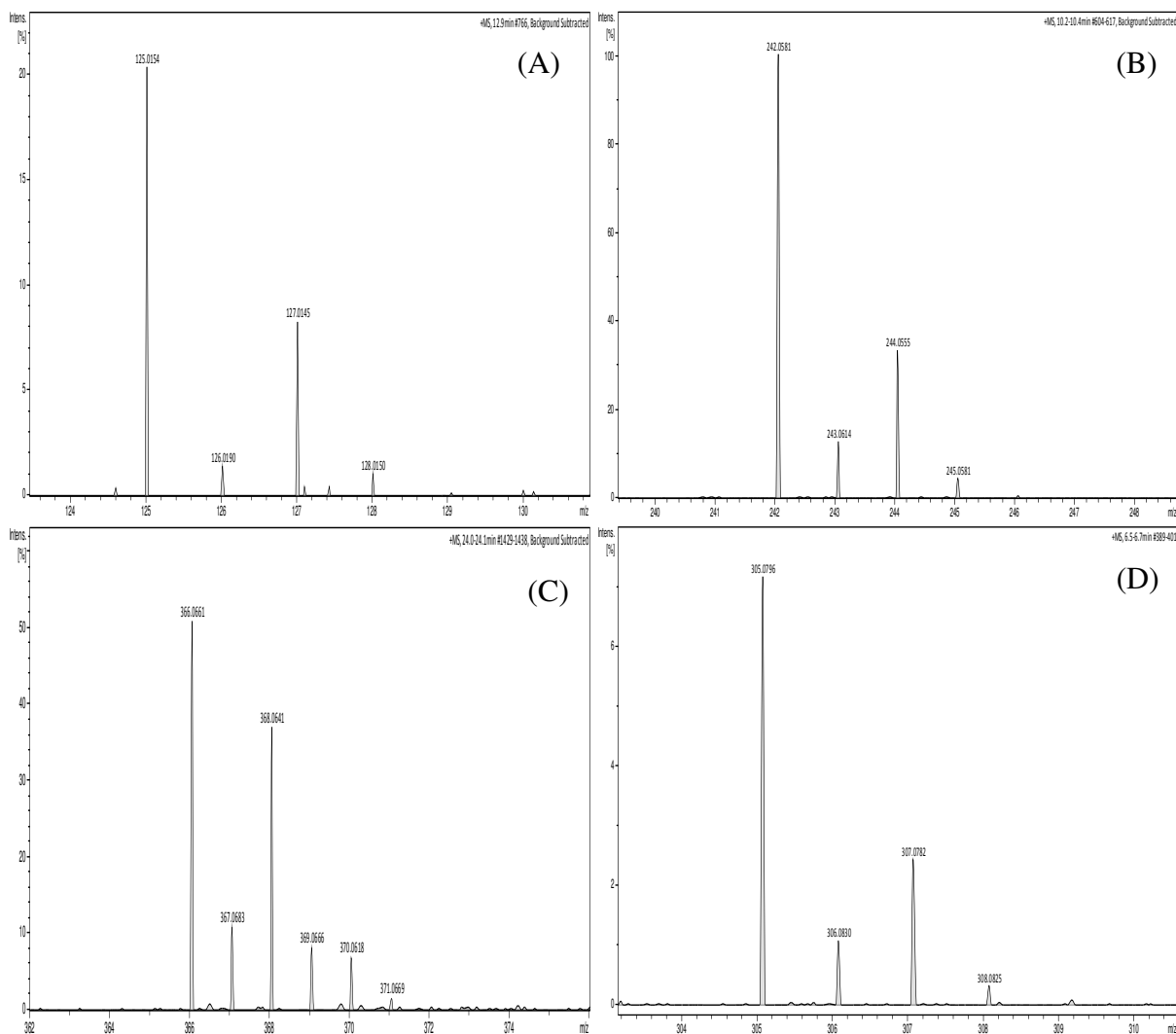


FIGURA 4.52 - Espectros de massas *full scan* dos produtos de biotransformação derivados do substrato ácido *p*-cloro benzoico

TABELA 4.5 - Massas acuradas dos íons produtos dos produtos de biotransformação bromados e clorados

Produto de biotransformação	Íon produto	Substituinte (R)	<i>m/z</i> observado	<i>m/z</i> calculado
		Br	168,9649	168,9647
		Cl	125,0154	125,0152
		Br	182,9450	182,9440
		Cl	138,9958	138,9945
		Br	267,9991	267,9968
		Cl	224,0472	224,0471
		Br	168,9649	168,9647
		Cl	125,0165	125,0153
		Br	267,9955	267,9968
		Cl	224,0493	224,0473

Por outro lado, na análise do extrato suplementado com ácido *p*-nitro benzoico visualizou-se a presença de $[M+H]^+$ com m/z 154,0493, (FIGURA 4.53) correspondente a fórmula molecular $C_7H_7NO_3$ (calc 154,0499), demonstrando a biorredução do substrato ao álcool *p*-nitro benzílico.

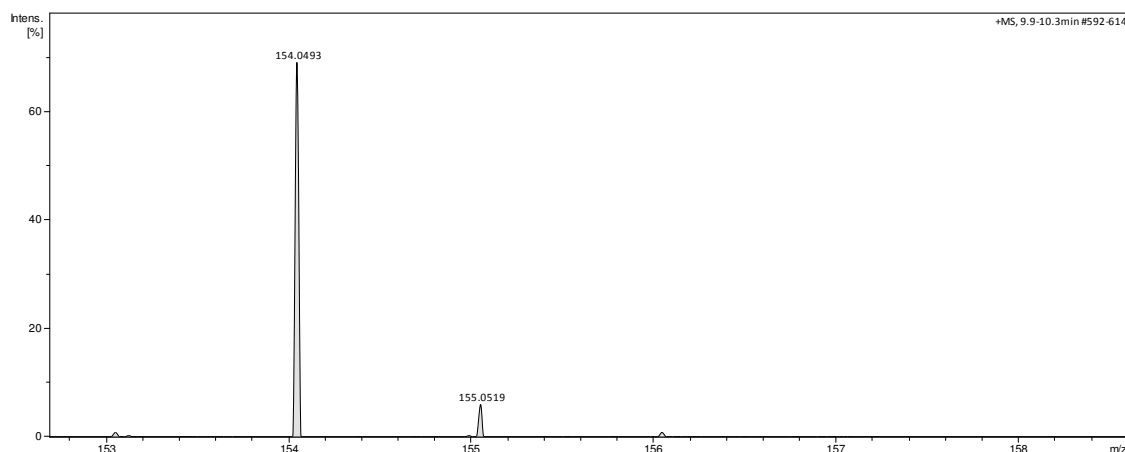


FIGURA 4.53 - Espectro de massas *full scan* do álcool *p*-nitro benzílico

Nas análises por LC-HRMS não se detectou produtos de biotransformação com os substratos ácido *p*-amino benzoico e *p*-hidroxi benzoico.

As atividades biocatalíticas observadas neste estudo devem estar intimamente relacionadas à natureza eletrônica do substrato, pois os derivados do ácido benzoico com efeito retirador de elétrons mais pronunciado, foram os responsáveis por levarem aos produtos de biotransformação, como sumariza a FIGURA 4.54.

Os resultados mostrados são muito promissores, pois fungos do gênero *Xylaria* são pouco explorados em experimentos de biotransformação, além de que, os poucos estudos empregando micro-organismos deste gênero mostram o seu potencial para reações de oxidação (AMARAL, et al., 2008, MURGU, et al., 2008 e PINEDO-RIVILLA, et al., 2009).

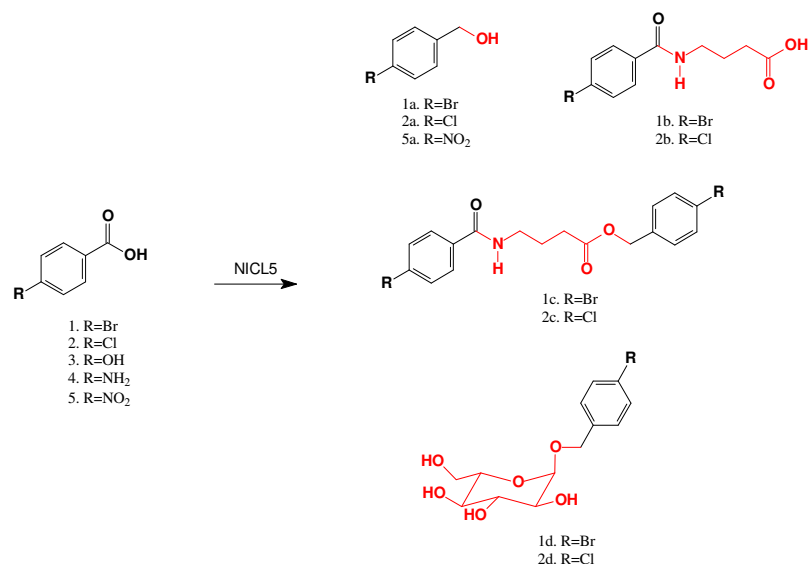


FIGURA 4.54 - Produtos de biotransformação promovidos por NICL5 frente a ácidos benzoicos *p*-substituídos

4.2 Influência das fontes de C e N na produção de citocalasinas

Os experimentos visando aumentar a diversidade metabólica através da modificação da fonte nitrogenada, seja ela orgânica ou inorgânica, mostraram que o metabolismo de NICL5 é fortemente direcionado para a produção das citocalasinas C, D e Q. Logo, experimentos variando as fontes de carbono e nitrogênio foram implementados para averiguar a influência destes na produção das citocalasinas. Desta maneira, utilizou-se o experimento de SRM (*Selected Reaction Monitoring*), o qual consiste em selecionar um determinado íon no primeiro quadruplo, sendo este fragmentado na câmara de colisão, e somente o íon de m/z desejado é detectado no terceiro quadrupolo.

Baseado na fragmentação da citocalasina D, o qual utilizou ionização por ESI+, determinou-se o canal de SRM (508 > 430) para posterior estimativa da produção da citocalasina D sob a influência das diferentes fontes de carbono e nitrogênio. No caso de experimentos de íons produtos, o primeiro quadrupolo é programado de maneira que apenas uma determinada relação m/z passe, filtrando-se todos os demais íons. Assim, este íon pode ser fragmentado

com uma energia conhecida na cela de colisão e todos seus fragmentos podem ser analisados no segundo quadrupolo e direcionados ao detector (SIUZDAK, 1996). Em seguida, conforme pode ser visto na FIGURA 4.55, construiu-se duas curvas de calibração externa com o padrão de citocalasina D isolado de N1CL5, no intervalo de 0,2-3,12 µg/mL e 12,5 a 400 µg/mL. Ambas as curvas apresentam boa linearidade, curva (A) $R^2=0,9948$ e curva (B) $R^2=0,9906$.

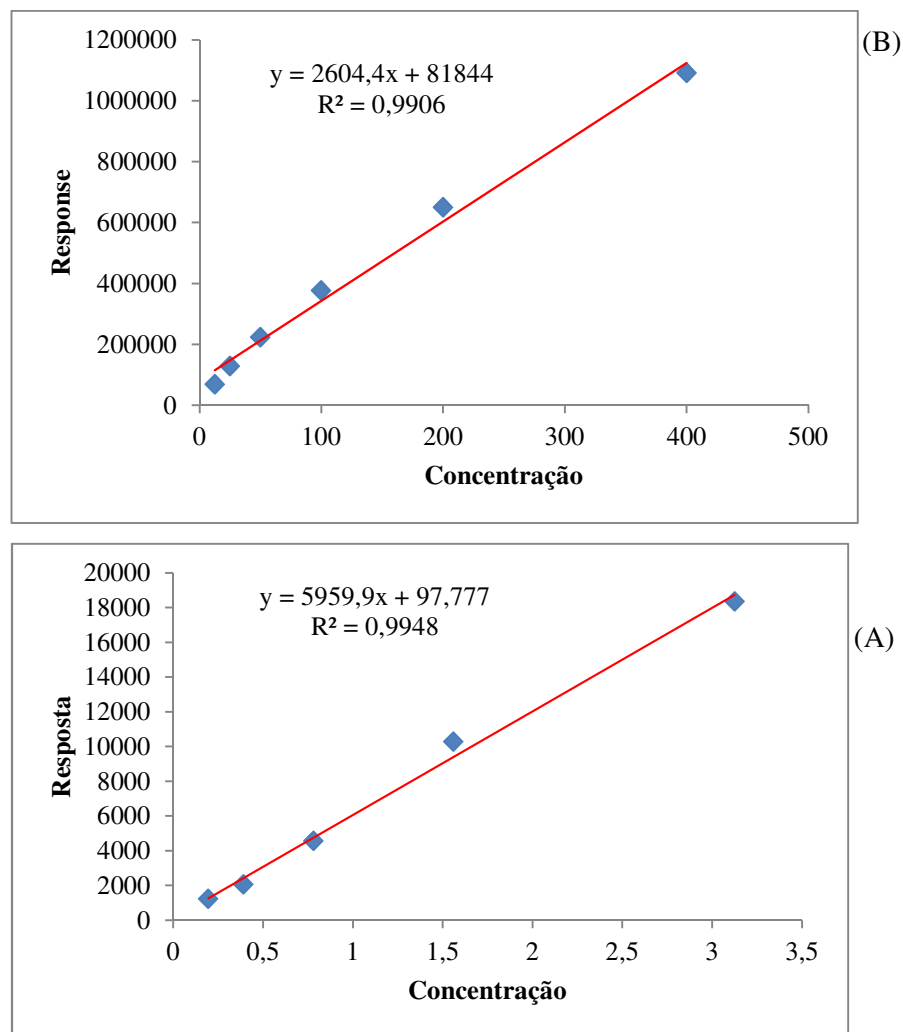


FIGURA 4.55 - Curvas de calibração externa para a citocalasina D: (A): 0,2 a 3,12 µg/mL e (B): 12,5 a 400 µg/mL

A partir das equações das retas estimou-se a produção da citocalasina D nos diferentes meios de cultura.

Como pode ser visto no gráfico de barras representado na FIGURA 4.56, a administração de diferentes fontes de carbono como frutose, glicose, ramnose, celobiose, sacarose e rafinose influenciou fortemente na produção da

citocalasina D, já o amido, maltose e glicerol exerceram um efeito extremamente menor na produção deste metabólito.

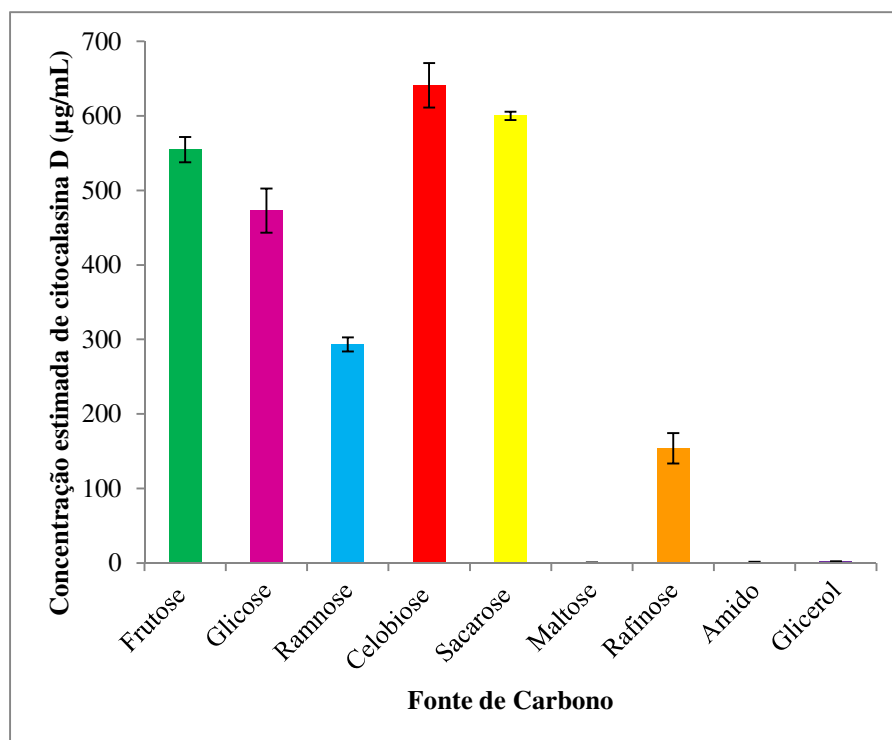


FIGURA 4.56 - Influência das fontes de C frente a produção de citocalasina D

Dentre os monossacarídeos a frutose foi a responsável por produzir $554,5 \pm 16,9 \mu\text{g/mL}$ de citocalasina D, enquanto que a rafinose refletiu em uma menor concentração deste metabólito ($154,1 \pm 20,5 \mu\text{g/mL}$).

Comparando-se a influência dos dissacarídeos celobiose, maltose e sacarose na produção de citocalasina D, verificou-se uma grande discrepância, pois celobiose e sacarose levam a produção de citocalasina D de $640,9 \pm 29,9$ e $599,8 \pm 5,61 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, enquanto que a maltose somente $0,47 \pm 0,50 \mu\text{g/mL}$. Conforme pode ser visto na FIGURA 4.57, estruturalmente celobiose e maltose são compostas por unidades de glicose, no entanto, o que as diferenciam é o tipo de ligação, ou seja, a celobiose é composta por duas unidades de glicose unidas através de ligação β -1,4- glicosídica, enquanto que, a ligação na maltose é α -1,4- glicosídica. Os fungos do gênero *Xylaria* são conhecidos por participarem de processos degradativos da matéria orgânica, inclusive celulose, sendo esta um polissacarídeo formado por diversas unidades

de β -glicose através de ligações β -1,4- glicosídica. Este resultado mostra que o fungo é apto em metabolizar carboidratos formados por ligações β -1,4- glicosídica, porém a metabolização de fonte de carbono composta por ligações α -1,4- glicosídica não deve ser muito eficiente, ou um processo mais lento. A sacarose, um dissacarídeo, produzido pelas plantas em virtude da fotossíntese, é formada por uma unidade de glicose e uma unidade de frutose através de ligação α -1,2- glicosídica. Este carboidrato deve ser a principal fonte de carbono para os micro-organismos enquanto estes vivem conjuntamente com as plantas, logo deve ser natural, o fungo endofítico em estudo ter metabolizado a sacarose, a qual levou a uma excelente produção de citocalasina D.

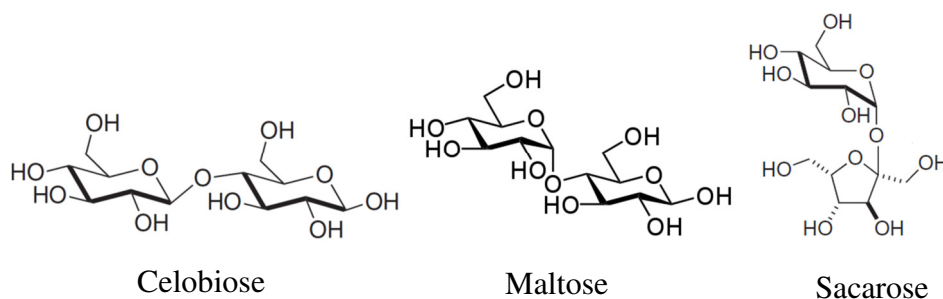


FIGURA 4.57 - Estrutura química da celobiose, maltose e sacarose

O trissacarídeo rafnose é formado por galactose, glicose e frutose e sua hidrólise fornece galactose e sacarose. O fungo deve ter promovido a degradação da fonte de carbono e, como visto anteriormente, utilizado a sacarose para produzir $154,1 \pm 20,5 \mu\text{g/ mL}$ de citocalasina D.

O polímero amido é composto por dois polissacarídeos, amilose e amilopectina, ambos polímeros de glicose. A amilose é formada por ligações α -1,4- glicosídica enquanto que, a amilopectina é formada por ligações α -1,4 e também por ligações ramificadas α -1,6. Como visto anteriormente, o micro-organismo parece não ser muito eficiente na degradação de ligações do tipo α -1,4, o que vem de encontro com a ínfima produção de citocalasina D ($0,93 \pm 0,81 \mu\text{g/mL}$) quando comparado às demais fontes de carbono com ligação β -1,4. Este dado tem concordância com o publicado por AMARAL et al. (2014), no qual foi avaliado o melhor meio de cultura para a produção de citocalasina D.

Os autores mostraram que a produção do composto em milho era superior ao arroz e a justificativa foi justamente a fonte de carbono disponível em cada meio, uma vez que, o milho é dez vezes mais rico em açúcares livres quando comparado ao arroz e, este por sua vez apresenta maior percentagem de amido em relação ao milho.

A produção de citocalasina D quando se emprega a fonte de carbono glicerol foi de $2,14 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$, inferior em relação à frutose, glicose, ramnose, celobiose, sacarose e rafinose, porém superior aos carboidratos maltose e amido.

Observando o gráfico representado na FIGURA 4.58 verifica-se a produção de citocalasina D em todos os meios de cultura, independente da origem da fonte de nitrogênio. Este resultado mostra o potencial do fungo NICL5 em reconhecer nitrogênio, seja ela de origem orgânica ou inorgânica e, utilizá-lo na biossíntese de citocalasinas.

Os aminoácidos glicina, prolina e serina são as fontes de nitrogênio que exercem uma maior influência frente à produção de citocalasina D, ($261,2 \pm 13,0$; $241,4 \pm 29,8$ e $255,2 \pm 1,46 \mu\text{g/mL}$ respectivamente). Curiosamente a tirosina leva a uma produção de citocalasina D ($105,0 \pm 15,5 \mu\text{g/mL}$) maior que o aminoácido a fenilalanina ($41,00 \pm 22,9 \mu\text{g/mL}$). Este fato é intrigante, pois a fenilalanina, precursor direto das citocalasinas, ocasiona, dentre os aminoácidos, uma produção menor do composto em estudo. Além disso, o nitrato de sódio também atua de uma forma mais acentuada quando comparado a fenilalanina, refletindo em maior produção da citocalasina D ($117,9 \pm 9,7 \mu\text{g/mL}$). Estes resultados sugerem fortemente que o micro-organismo deve produzir este aminoácido de uma maneira particular, fornecendo indícios de uma possível biossíntese *de novo*.

Dentre as fontes nitrogenadas inorgânicas o nitrato de sódio influenciou a produção de citocalasina D mais eficientemente que os sais de amônio bromado ($6,30 \mu\text{g/mL}$) e clorado ($8,86 \pm 5,15 \mu\text{g/mL}$).

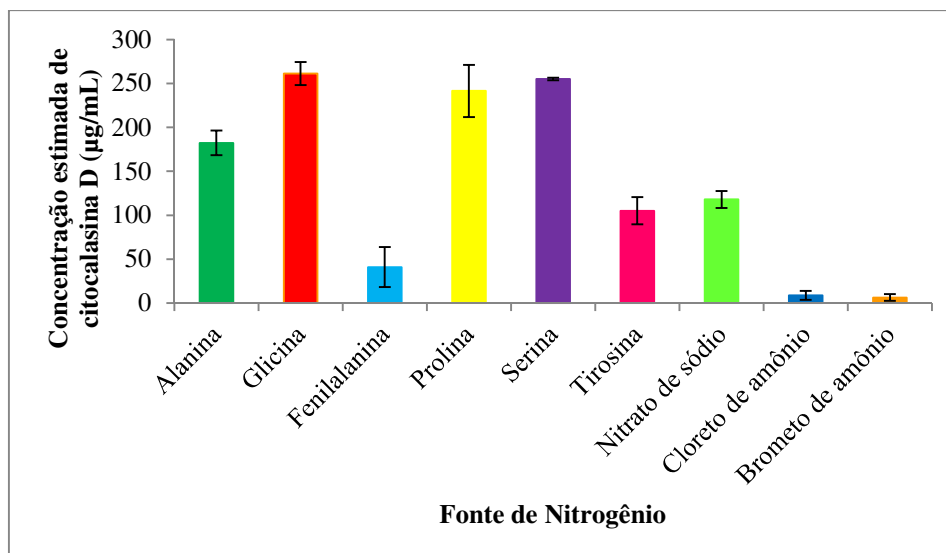


FIGURA 4.58 - Influência das fontes de N frente a produção de citocalasina D

Para buscar maior informação sobre a possibilidade de uma biossíntese *de novo* do aminoácido fenilalanina e conseqüentemente da citocalasina D, foram administrados precursores marcados isotopicamente ao meio de cultivo de N1CL5, sendo os resultados discutidos na próxima sessão.

A TABELA 4.6 sumariza os valores estimados da produção de citocalasina D mediante as diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

TABELA 4.6 - Influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de citocalasina D

Fonte de C	Concentração estimada (µg/mL)	Fonte de N	Concentração estimada (µg/mL)
Amido	0,93 ± 0,81	Alanina	182,3 ± 13,9
Celobiose	640,9 ± 29,9	Brometo de amônio	6,30 ± 3,81
Frutose	554,5 ± 16,9	Cloreto de amônio	8,86 ± 5,15
Glicerol	2,14 ± 0,12	Glicina	261,2 ± 13,0
Glicose	472,7 ± 29,7	Fenilalanina	41,00 ± 22,9
Maltose	0,47 ± 0,50	Prolina	241,4 ± 29,8
Rafnose	154,1 ± 20,5	Serina	255,2 ± 1,46
Ramnose	293,4 ± 9,44	Tirosina	105,0 ± 15,5
Sacarose	599,8 ± 5,61	Nitrato de sódio	117,9 ± 9,7
		Prolina	241,4 ± 29,8

4.3 Administração de precursores marcados isotopicamente frente ao fungo NICL5

As citocalasinas são compostos de origem biossintética mista, consistindo do acoplamento de um aminoácido intacto (fenilalanina, triptofano, alanina, tirosina) e uma cadeia policetídica (TAMM 1974, 1975, 1976). O fungo NICL5, pertencente à família *Xylariaceae*, mostrou-se ser um hábil produtor de citocalasinas, principalmente a citocalasina D.

Os estudos de fragmentação por ESI+, através de experimentos de íons produtos de m/z 508, íon molecular protonado da citocalasina D, mostraram perdas de 18 e 60 Da, as quais são referentes a perdas de água e ácido acético, como mostrado no espectro de íons produtos representado na FIGURA 4.13. No entanto, este estudo mostrou-se ainda mais relevante, pois, evidenciou que íon de m/z 120, pode ser considerado íon diagnóstico para as citocalasinas oriundas do aminoácido fenilalanina, o que vem de encontro com o publicado por PRASAIN e colaboradores (2002).

Para buscar informações a respeito de uma possível biossíntese *de novo* da fenilalanina e conseqüentemente das citocalasinas, foram realizados experimentos com marcação isotópica, nos quais foram administrados fontes de nitrogênio e carbono marcadas, através da suplementação do meio de cultura com $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$, $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, ^{15}N -glicina, 1- ^{13}C , 2- ^{13}C fenilalanina, 3- ^{13}C alanina e 2- ^{13}C glicina.

Os estudos por espectrometria de massas mostraram que a adição dos sais marcados nitrato de sódio e cloreto de amônio e do aminoácido ^{15}N -glicina refletiram em uma incorporação do ^{15}N em quase 100%, uma vez que, observou-se majoritariamente o íon de m/z 509, uma unidade de massa a mais em relação experimento controle, conforme mostra a FIGURA 4.59.

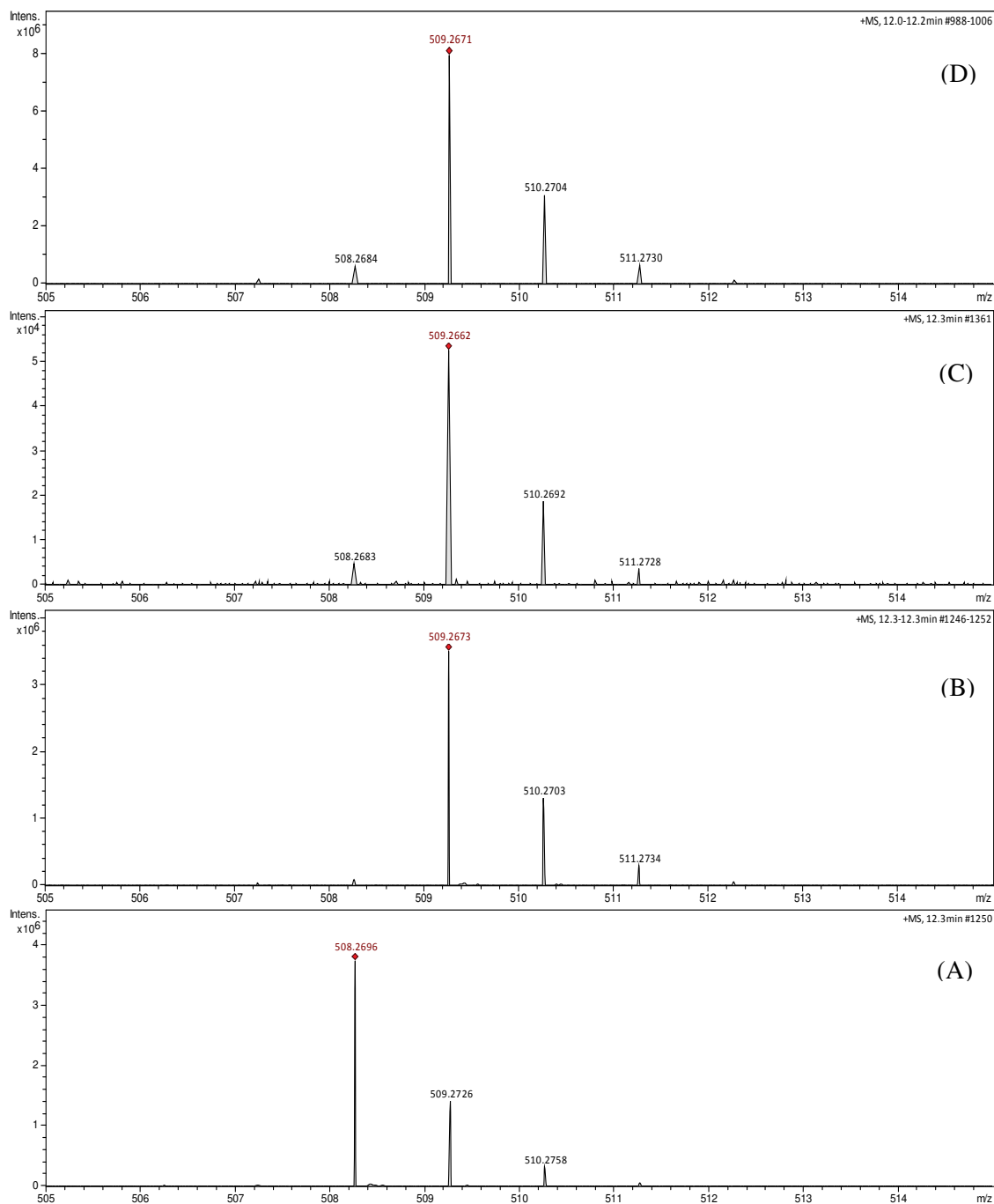


FIGURA 4.59 - Espectro de massas *full scan* referente à citocalasina D nos meios de cultura Czapek suplementado com (A) NaNO_3 - controle, (B) $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$, (C) $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e (D) ^{15}N -glicina

Experimentos de íons produtos de m/z 509, empregando energia de colisão de 32,2 eV, evidenciaram a produção do íon de m/z 121, o qual confirma a proposta inicial, de que este seja proveniente da fenilalanina e, conseqüentemente, íon diagnóstico das citocalasinas biossintetizadas a partir deste aminoácido, conforme mostra a FIGURA 4.60.

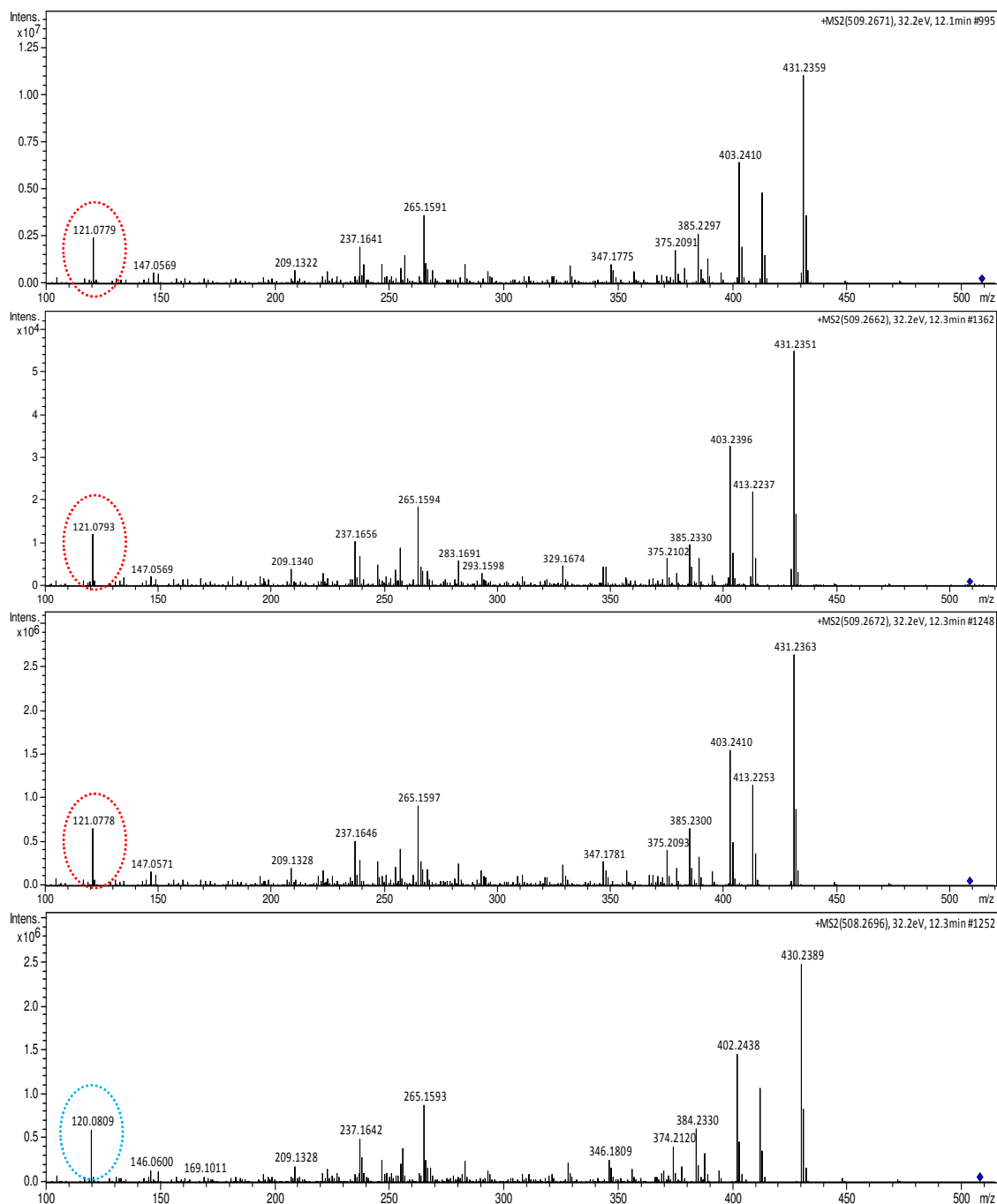


FIGURA 4.60 - Espectro de íons produzidos de m/z 508 (A) e de m/z 509 - meio de cultura suplementado com (B) $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$, (C) $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e (D) $^{15}\text{-N}$ glicina

Como ainda não existe estudo genético em relação a NICKL5, não se conhecem as enzimas que são responsáveis pela assimilação de nitrogênio por este micro-organismo. No entanto, sabe-se que a principal fonte de nitrogênio para a formação de aminoácidos e outras biomoléculas nitrogenadas é o íon amônio. A porta de entrada do nitrogênio deve-se a ação da enzima glutamato

desidrogenase, a qual catalisa a reação entre o íon amônio e o α -cetoglutarato, produzindo glutamato e, este por sua vez realiza a introdução do grupo amino nos demais aminoácidos. Desta forma, acredita-se que o micro-organismo deve possuir um sistema enzimático específico que seja capaz de reconhecer o nitrogênio independente da fonte administrada e direcioná-lo à produção do metabolismo primário e secundário.

As análises dos extratos fúngicos suplementados com a fenilalanina marcada isotopicamente no 1- ^{13}C e 2- ^{13}C , mostraram uma taxa de incorporação menor em relação ao experimento com as fontes de ^{15}N , como mostra a FIGURA 4.61.

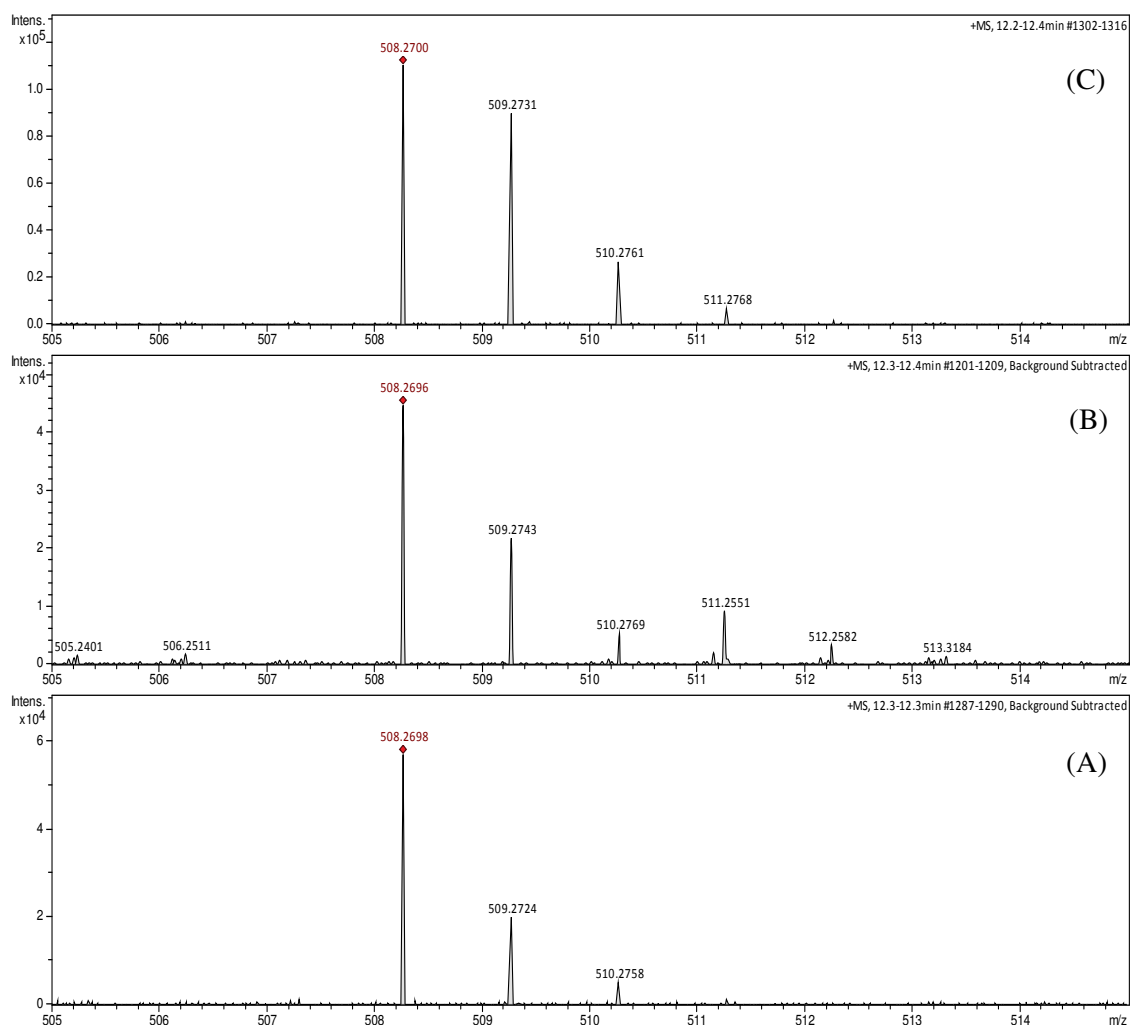


FIGURA 4.61 - Espectro de massas *full scan* referente à citocalasina D em extrato oriundo do meio de cultura Czapek suplementado com: (A) fenilalanina, (B) 1- ^{13}C fenilalanina e (C) 2- ^{13}C fenilalanina

Acredita-se que ocorreu a incorporação da 1-¹³C fenilalanina em virtude do perfil isotópico apresentado na FIGURA 4.61, pois se nota a presença de m/z 511 e 512. Embora tenha ocorrido à incorporação da fenilalanina marcada 1-C¹³, não foi verificado o íon de m/z 121 no espectro de íons produtos de m/z 509, mostrado na FIGURA 4.62A, o que está de acordo com o fato da fenilalanina ser incorporada de forma intacta, sendo o carbono marcado perdido na cadeia policetídica, como mostra na FIGURA 4.63.

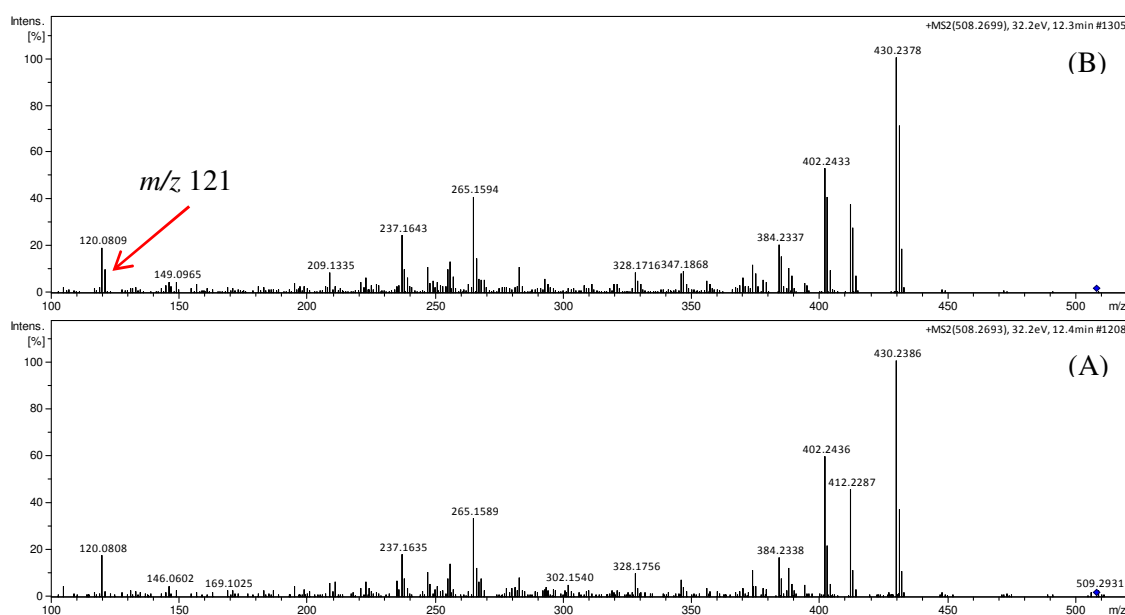


FIGURA 4.62 - Espectro de íons produtos de m/z 509 - meio de cultura suplementado com (A) 1-¹³C fenilalanina e (B) 2-¹³C fenilalanina

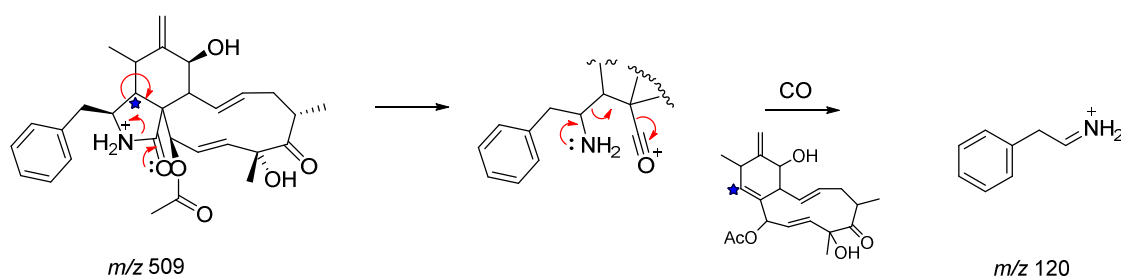


FIGURA 4.63 - Mecanismo de fragmentação de m/z 509 evidenciando a perda do carbono marcado proveniente da 1-¹³C fenilalanina

Ao observar a FIGURA 4.61C nota-se claramente a incorporação do carbono marcado ao se administrar o precursor 2-¹³C fenilalanina, contudo

esta incorporação é inferior quando comparada às fontes nitrogenadas $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$, $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e ^{15}N -glicina. A FIGURA 4.62B corrobora com os dados de *full scan*, pois destaca a existência do íon de m/z 121, o qual corresponde ao íon diagnóstico da fenilalanina com incremento de 1 Da devido a incorporação do carbono marcado do precursor.

O resultado do experimento da influência da fonte nitrogenada frente à produção de citocalasina D, mostrou que os aminoácidos glicina, prolina, serina e alanina atuam significativamente na biossíntese deste composto. Logo, se o micro-organismo realiza a biossíntese *de novo* da fenilalanina a partir destes aminoácidos, a suplementação do meio de cultura fúngico com estas substâncias marcadas com ^{13}C deve ser uma excelente estratégia para avaliar este mecanismo. Deste modo, o fungo N1CL5 foi cultivado, separadamente, em meio Czapek enriquecido com os aminoácidos marcados 2- ^{13}C glicina e 3- ^{13}C alanina como fonte exclusiva de nitrogênio. Após a obtenção dos extratos, análises por LC-MS foram implementadas. Porém, como artifício para antever os resultados, buscou-se na literatura o catabolismo dos aminoácidos glicina e alanina e a possibilidade destes serem direcionados para a biossíntese da fenilalanina.

A glicina é convertida em serina pela adição enzimática de um grupo hidroximetila catalisada pela serina hidroximetil transferase, a qual requer as coenzimas tetraidrofolato e piridoxal fosfato. Em seguida, a serina formada é convertida em piruvato pela ação da enzima serina desidratase. Nesta conversão os grupos β -hidroxila e α -amino são removidos em uma única reação, a qual é dependente de piridoxal fosfato. Por fim, o piruvato sofre uma descarboxilação e a introdução da coenzima A leva a formação da acetil Co-A. A alanina libera piruvato diretamente por transaminação com o α -cetoglutarato, sendo que o piruvato formado tem a mesma via descrita para a glicina. A FIGURA 4.64 ilustra o processo catabólico da glicina e da alanina.

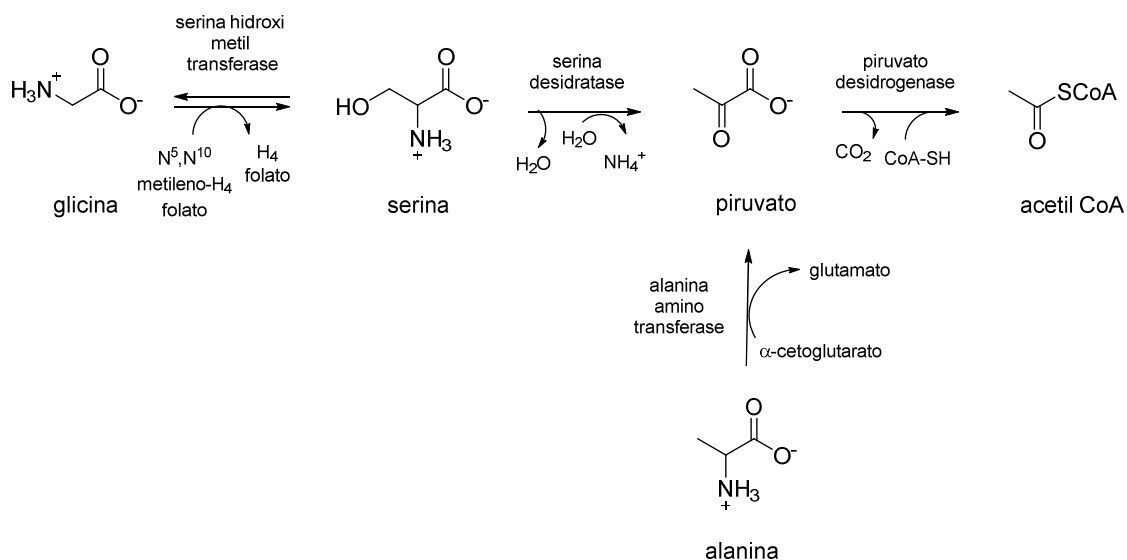


FIGURA 4. 64 - Representação da via catabólica dos aminoácidos glicina e alanina (Adaptado de NELSON & COX, 5ª ed)

A biossíntese da fenilalanina inicia-se com os precursores fosfoenolpiruvato e eritrose 4-fosfato, sendo que as primeiras quatro reações irão produzir o chiquimato. O chiquimato, por sua vez, é convertido em corismato em três outras etapas subsequentes, que incluem a adição de mais três carbonos de outra molécula de fosfoenolpiruvato. Na etapa seguinte, devido à ação da enzima corismato mutase, ocorre um rearranjo que transfere o fosfoenolpiruvato para junto do grupo COO^- , produzindo desta forma, o prefenato. Em seguida, o prefenato sofre descarboxilação a qual leva a aromatização e, por fim, o fenilpiruvato sofre uma trans-aminação, produzindo desta forma, a fenilalanina. De acordo com o descrito e levando em consideração que o micro-organismo desvie o piruvato, produzido no catabolismo da glicina e da alanina, para a biossíntese da fenilalanina, tem-se o aminoácido marcado em duas posições distintas, ou seja, se piruvato, proveniente do catabolismo da glicina marcada no $2\text{-}^{13}\text{C}$, formar o fosfoenolpiruvato têm-se a fenilalanina marcada nas posições destacadas em vermelho na FIGURA 4.65. Já se o processo ocorrer com o piruvato proveniente da $3\text{-}^{13}\text{C}$ alanina, têm-se a fenilalanina marcada nas posições evidenciadas em rosa.

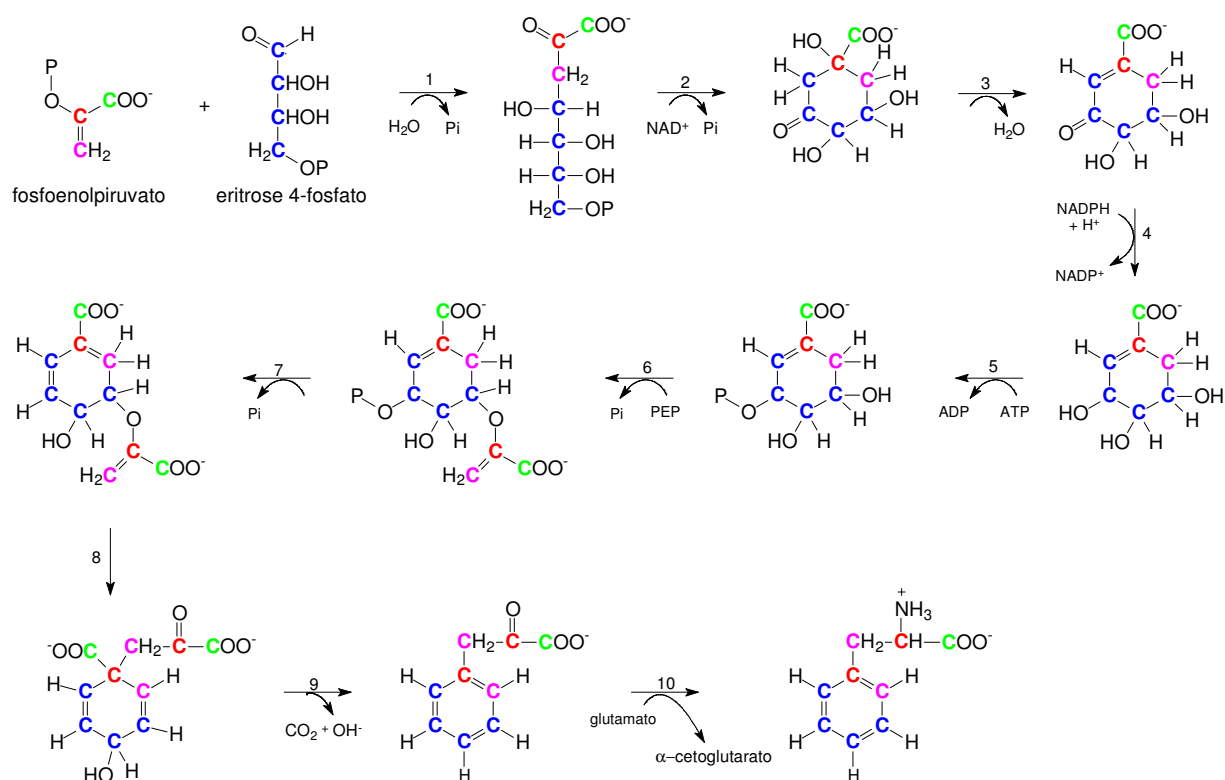


FIGURA 4.65 - Proposta hipotética da biossíntese da fenilalanina a partir do fosfoenolpiruvato (oriundo da 2-¹³C glicina e 3-¹³C alanina) e eritrose 4-fosfato. (*) Processo biossintético dependente das enzimas: (1) 2-ceto-3-dexosi D-arabinoeptuloseonato 7-fosfato sintase, (2) desidroquinato sintase, (3) 3-desidroquinato desidratase, (4) chiquimato desidrogenase, (5) chiquimato quinase, (6) 5-enolpiruvil chiquimato 3-fosfato sintase, (7) corismato sintase, (8) corismato mutase, (9) prefenato desidrogenase (10) prefenato desidratase (Adaptado de NELSON & COX, 5ª ed)

Diante da produção hipotética da fenilalanina marcada nas posições mencionadas, a citocalasina D deverá também apresentar ambas as marcações e, desta forma, na análise por espectrometria de massas o íon referente à substância deverá corresponder a m/z 510 e, por conseguinte, o íon diagnóstico da porção do aminoácido deverá apresentar m/z 122, conforme mostra a FIGURA 4.66.

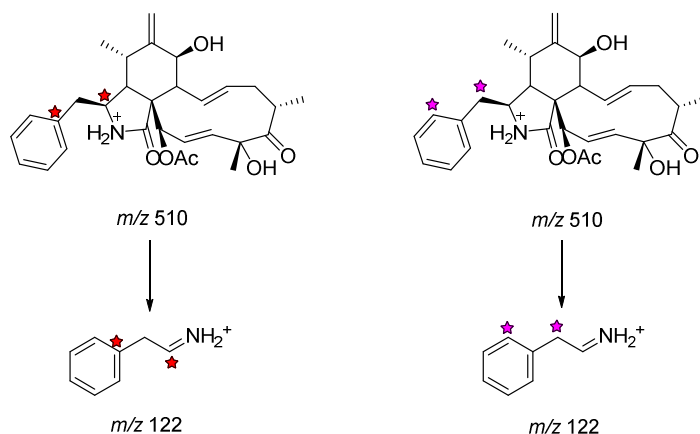


FIGURA 4.66 - Proposta hipotética da incorporação de carbono marcado na biossíntese da citocalasina D a partir da 2-¹³C glicina (vermelho) e 3-¹³C alanina (rosa). Detecção por MS de m/z 510 e MS/MS m/z 122

Diante disso, as análises por LC-MS mostraram que quando é administrado o aminoácido 3-¹³C alanina, verifica-se um perfil isotópico discretamente diferente daquele observado ao se comparar o espectro de *full scan* do experimento controle, pois se verifica um pequeno aumento na intensidade de m/z 510 e 511, evidenciando uma modesta incorporação do ¹³C, como pode ser visto na FIGURA 4.67.

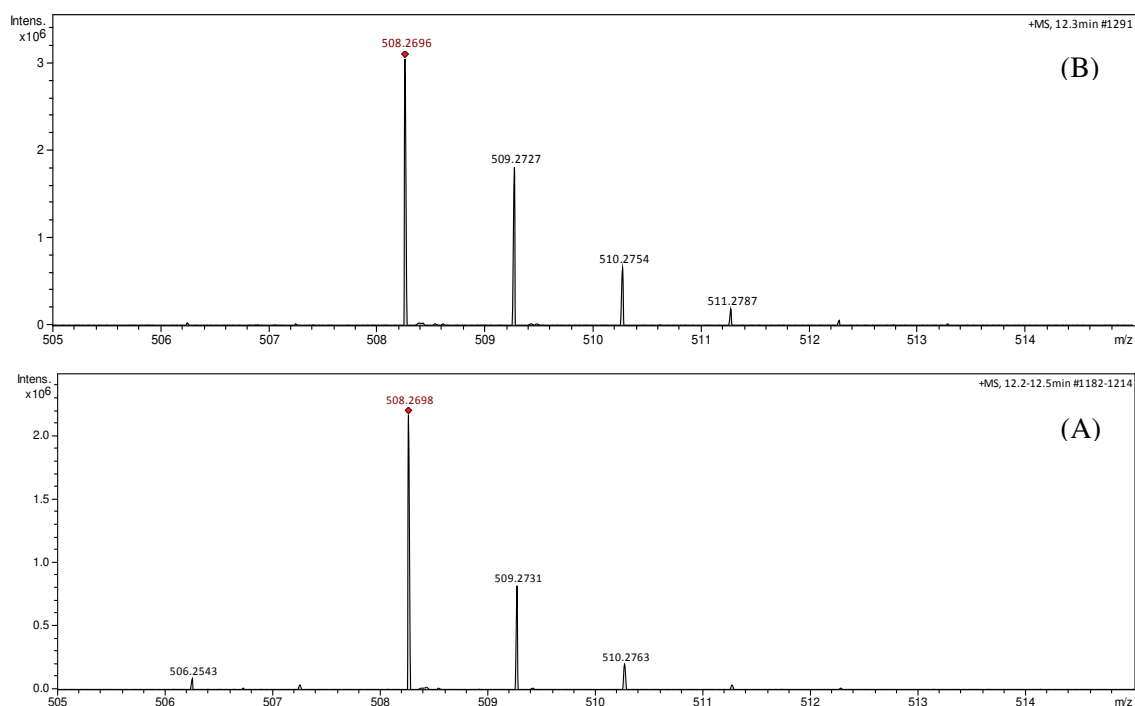


FIGURA 4.67 - Espectro de massas *full scan* - (A) alanina e (B) extrato suplementado com 3-¹³C alanina

De acordo com a FIGURA 4.68 o experimento de íons produtos mostrou que a incorporação não deve ter ocorrido na porção referente à fenilalanina, uma vez que, m/z 122 não foi observado.

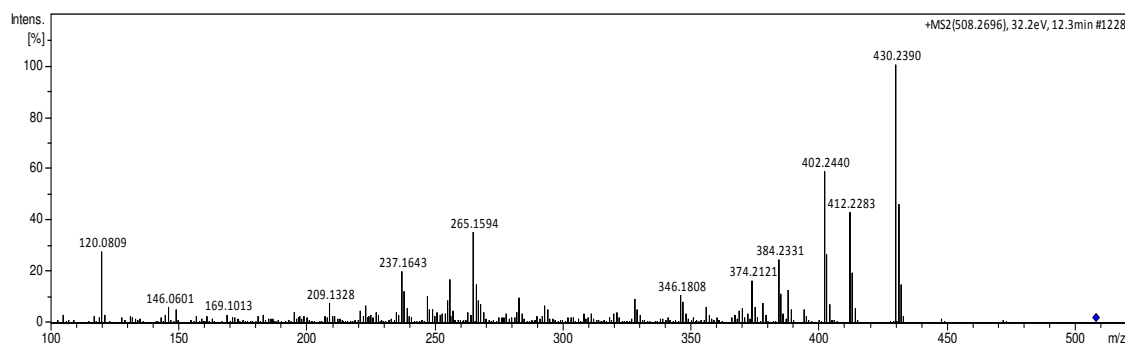


FIGURA 4.68 - Espectro de íons produtos de m/z 510 quando o micro-organismo é cultivado em meio suplementado com 3- ^{13}C alanina

Os dados de espectrometria de massas no modo *full scan* do experimento suplementado com 2- ^{13}C glicina mostrou um perfil isotópico muito diferente daquele observado no experimento controle, desta forma, evidenciando duas ou mais incorporações de ^{13}C , como pode ser visto na FIGURA 4.69.

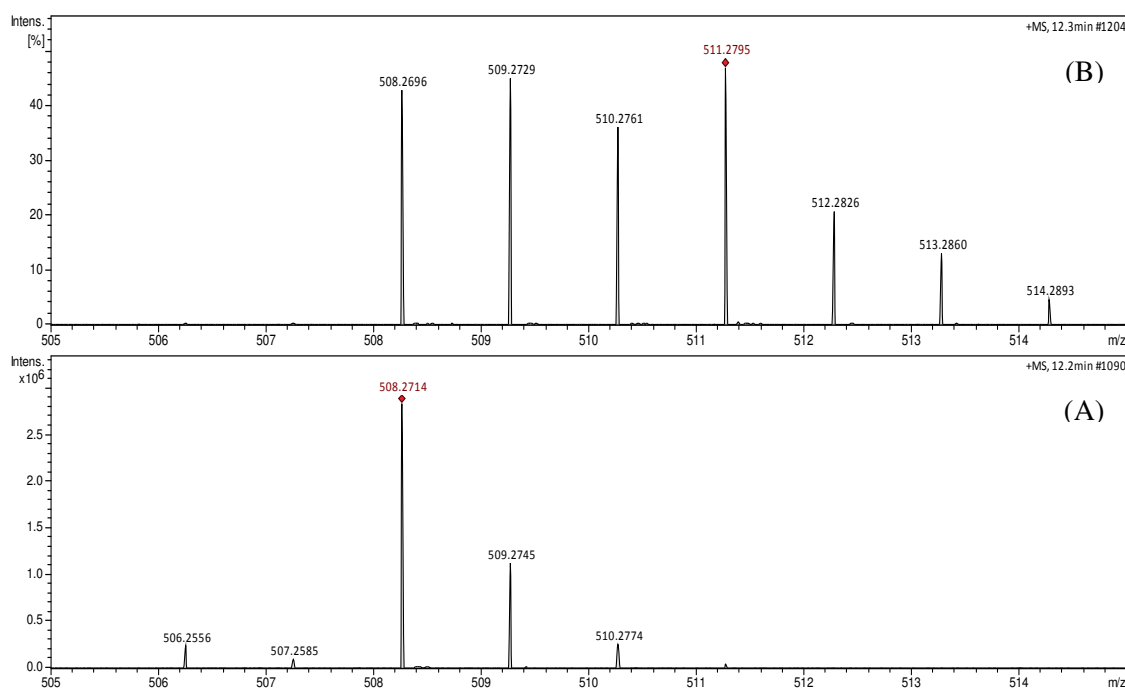


FIGURA 4.69 - Espectro de massas *full scan* - (A) glicina e (B) extrato suplementado com 2- ^{13}C glicina

O experimento de íons produtos de m/z 510 mostrou que os íons pertencentes à cadeia policetílica apresentam perfil isotópico diferente daquele observado no experimento controle, no entanto, o íon diagnóstico da fenilalanina, não apresenta marcação, visto que, observa-se o íon de m/z 120 e não m/z 122 como o esperado (FIGURA 4.70). Desta forma, verifica-se que o fungo é capaz de degradar o aminoácido precursor e utilizar o nitrogênio para produzir a fenilalanina, porém o carbono marcado é, possivelmente, orientado para produção da cadeia policetílica. Este fato justifica a não observação do aumento da diversidade metabólica quando aplicada a abordagem OSMAC frente ao metabolismo de N1CL5, uma vez que, o micro-organismo deve ter degradado os aminoácidos, utilizando o nitrogênio para produzir fenilalanina e os carbonos para produzir a cadeia policetílica.

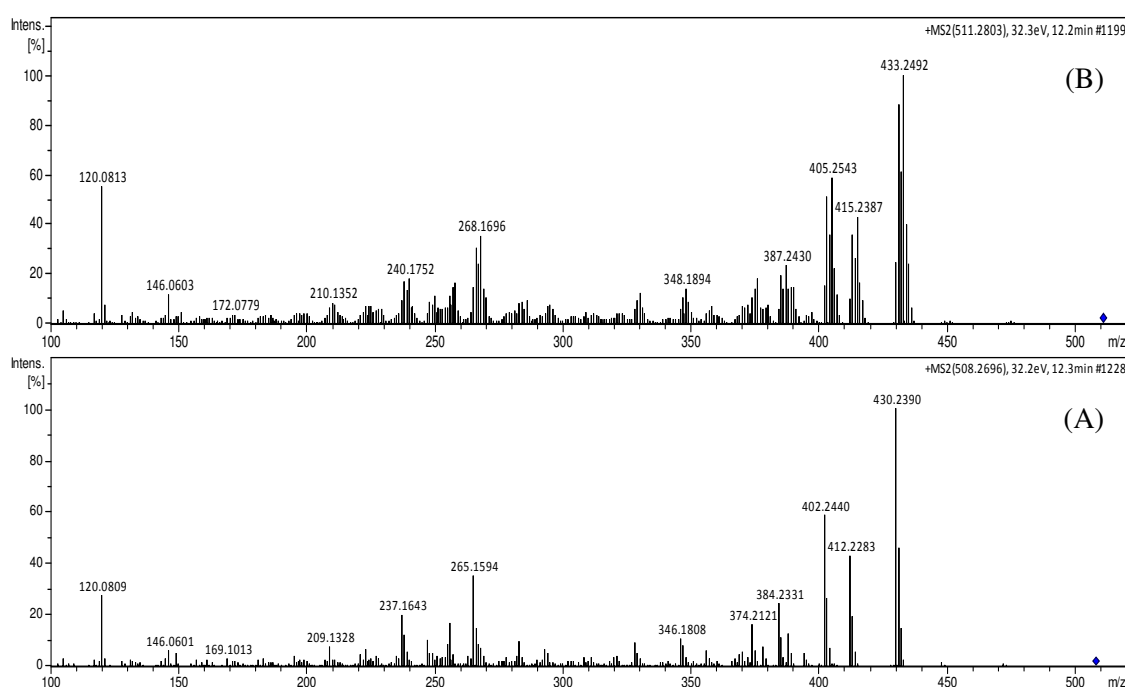


FIGURA 4.70 - Espectro de íons produtos de m/z 511 quando o micro-organismo é cultivado em meio suplementado com (A) glicina e (B) $2\text{-}^{13}\text{C}$ glicina

Para se confirmar a produção da cadeia policetílica a partir da $2\text{-}^{13}\text{C}$ glicina, cultivou-se o micro-organismo em 36 frascos de Erlenmeyer de 25 mL,

contendo 5 mL de meio de cultivo enriquecido com a 2-¹³C glicina. Após o desenvolvimento fúngico, o extrato de AcOEt foi obtido e, curiosamente, era possível visualizar os cristais referentes às citocalasinas C, D e Q, os quais foram removidos com auxílio de uma espátula e solubilizados em metanol e a solução injetada no HPLC analítico para separação de uma pequena quantidade da citocalasina D marcada. A FIGURA 4.71 ilustra a separação cromatográfica da substância em estudo.

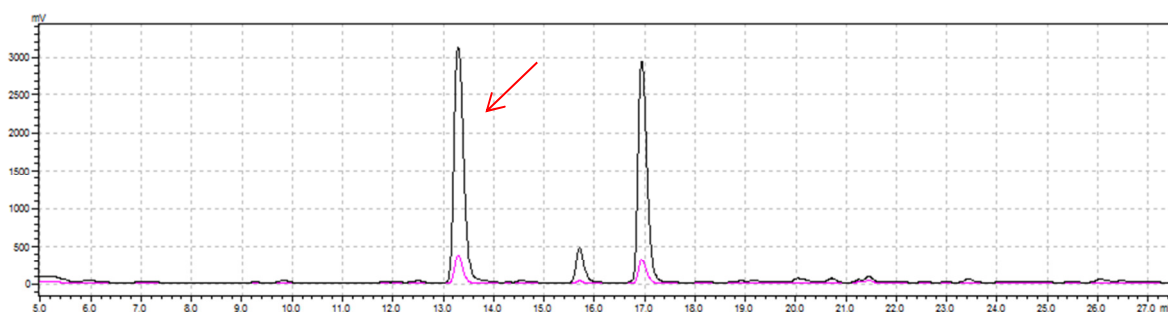


FIGURA 4. 71 - Cromatograma a 220 e 240 nm obtido na separação da citocalasina D oriunda do extrato Czapek enriquecido com 2-¹³C glicina

Após a obtenção do composto, experimento de ¹³C RMN foi realizado, visando estabelecer as posições nas quais os carbonos marcados foram introduzidos. Ao observar a FIGURA 4.72 referente ao espectro de ¹³C RMN citocalasina D produzida em meio suplementado com 2-¹³C glicina, nota-se um incremento na intensidade dos sinais referentes a três carbonos, sendo dois deles sp³ em δ 19,38 e δ 24,32 e um sp² em δ 114,45. A comparação do espectro de ¹³C RMN com os dados obtidos por AMARAL (2009), evidenciou a incorporação nas posições C-22, C-23 e C-12, as quais são correspondentes a duas metilas e um metileno, respectivamente. De acordo com estudos biossintéticos realizados por GRAF (1974), estes grupos são originados devido à atividade da enzima S-adenosil metionina (SAM) e, por tanto, não estão relacionados aos policetídeos como era esperado.

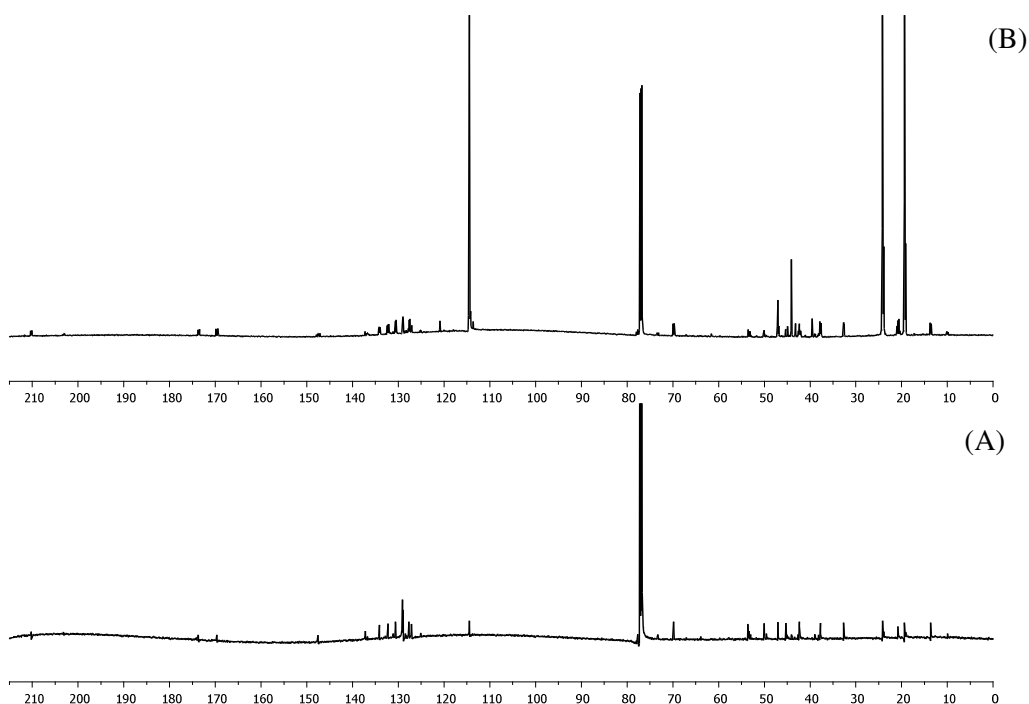


FIGURA 4.72 - Espectro de RMN ^{13}C da citocalasina D: (A) sem marcação isotópica (B) produzida em meio de cultura suplementado com 2- ^{13}C glicina (CDCl_3 , 150 MHz)

A enzima SAM é composta por uma metionina e uma unidade de ATP. No entanto, para entender a origem da metila se faz necessário voltar alguns passos atrás. A metionina é biossintetizada a partir da introdução de um grupo metila proveniente do 5-N metil tetraidrofolato a homocisteína. A fonte de grupos metilas que compõe o tetraidrofolato é proveniente da conversão reversível da serina a glicina. Porém existe uma via catabólica da glicina na qual o aminoácido é convertido a CO_2 , NH_4^+ e um grupo metileno $-\text{CH}_2$. Essa reação requer um tetraidrofolato, formando, deste modo, o 5-N,10-N metilenotetraidrofolato, o qual é reduzido a 5-N metil tetraidrofolato. Este por sua vez, pode entrar na via biossintética da metionina, a qual provavelmente terá um carbono marcado. A FIGURA 4.73, ilustra o processo descrito acima.

É importante mencionar que a via catabólica que produz o grupo CH_2 , o qual é incorporado na tetraidrofolato e conseqüentemente será introduzido na metionina, é uma rota, segundo NELSON & COX (2011), de predominância animal. No entanto, há relatos da existência desta rota em plantas

(COSSINS e CHEN, 1998) e em fungos (PIPER et al., 2000 e SCHÜPEN et al., 2003).

Como provavelmente o micro-organismo deve ter executado a rota representada na FIGURA 4.73, justifica-se o fato de encontrar a incorporação dos carbonos marcados nas posições em que a SAM é responsável pela metilação da citocalasina D. No entanto, o processo biossintético das citocalasinas deve envolver um sistema enzimático de maior complexidade, logo não se exclui a possibilidade de uma biossíntese *de novo*, uma vez que não existem estudos genômicos, proteômicos do fungo em questão.

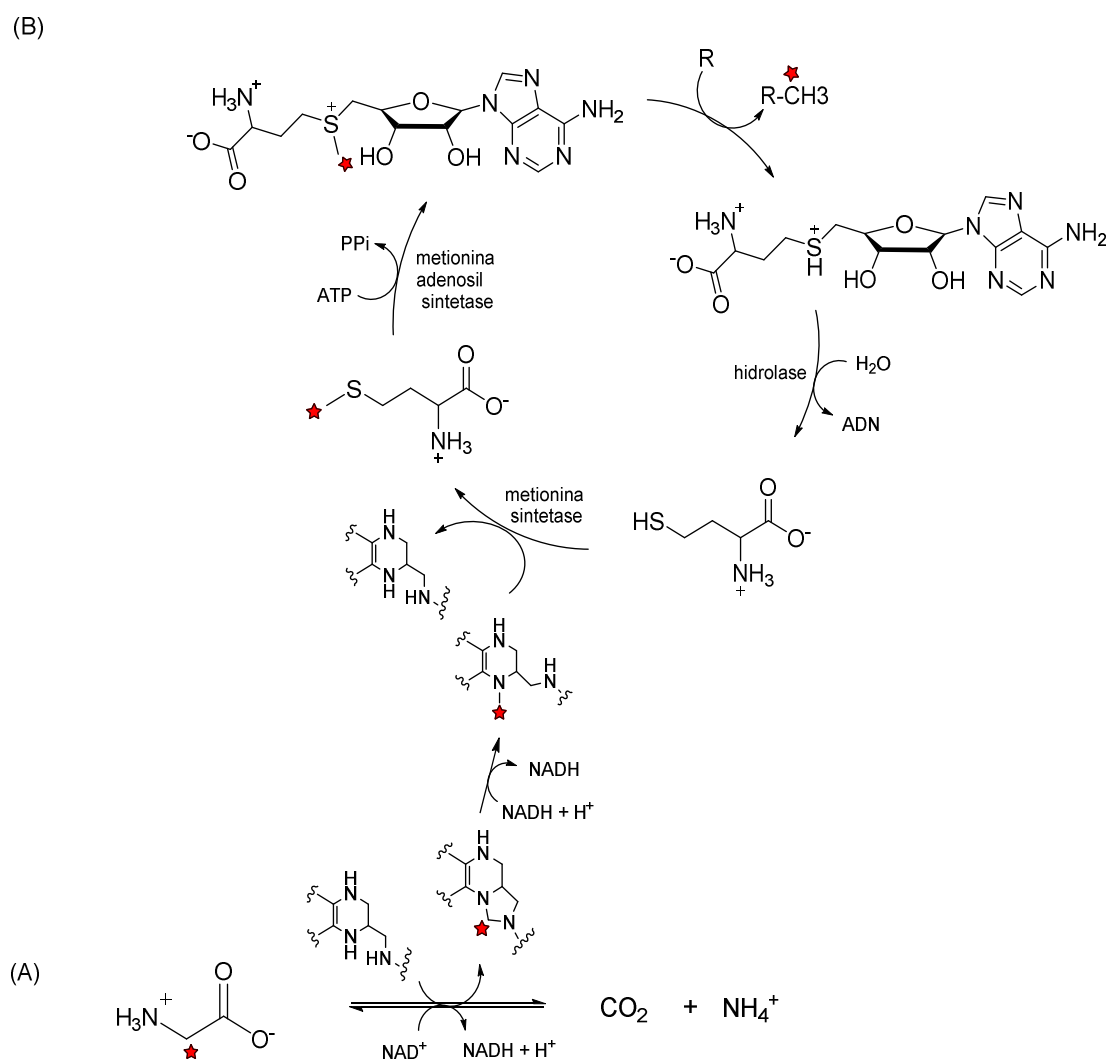


FIGURA 4.73 - (A) Catabolismo da glicina. (B) Ciclo biossintético da metionina e da S-adenosil metionina e consequente mecanismo de metilação (adaptado de NELSON & COX, 5ª ed)

4.4 Estudo do metabolismo de NICL5 e NICL3 em meio Czapek enriquecido com extrato de levedura

4.4.1 Metabolismo secundário de NICL5

Como já mencionado o metabolismo de NICL5 mostrou-se bastante direcionado para a produção de citocalasinas, principalmente as citocalasinas C, D e Q. No entanto, após etapas de purificação em HPLC preparativo empregando-se as frações provenientes dos extratos miceliais, MCL5-pAfDA e MCL5_pAfA, foi possível isolar quatro outros compostos, os quais foram codificados como MCL5_pAfDA_13, MCL5_pAfDA_15 e MCL5_pAfDA_19 e MCL5_pAfA_9.

A fração intitulada MCL5_pAfDA_13, com massa de 1,0 mg, foi identificada com base em experimentos de espectrometria de massas (FIGURA 4.94) e RMN de uma e duas dimensões (FIGURAS 4.75 - 4.78). De acordo com o espectro de *full scan*, mostrado na FIGURA 4.74A observa-se $[M+H]^+$ com m/z 492, o qual ao ser fragmentado evidenciou a produção de uma citocalasina, pois, notam-se as perdas características de 18, 60 e 78 Da, além da presença de m/z 120 (FIGURA 4.74B).

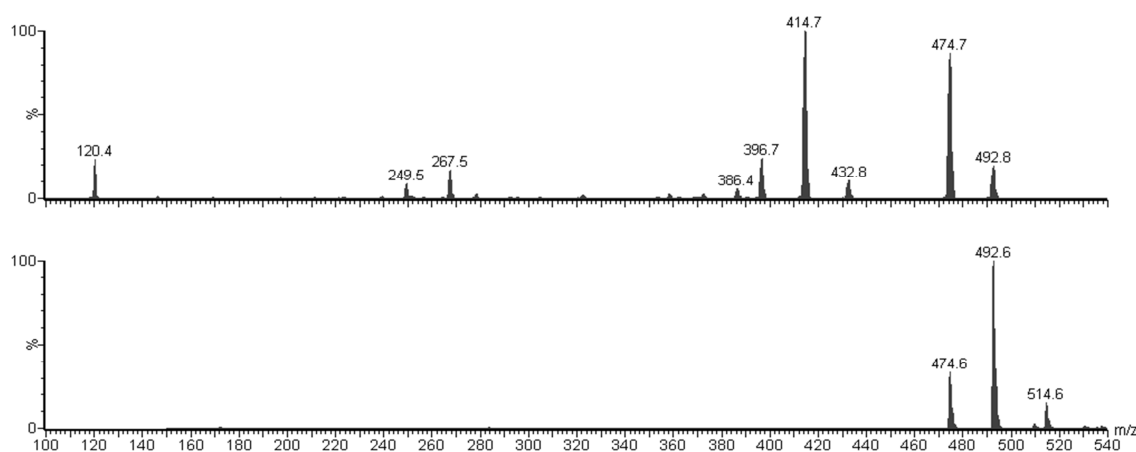


FIGURA 4.74 - Espectros de massas de MCL5_pAfDA_13: (A) *Full scan* e (B) íons produtos de m/z 492

A FIGURA 4.75 representa o espectro ^1H RMN de MCL5_pAfDA_13, na qual nota-se cinco hidrogênios aromáticos H-4' em δ 7,27 (m; 1H), H-3' em δ 7,33 (t; 7,5 Hz; 2H), e H-2' em δ 7,16 (d; 7,5 Hz; 2H), os quais foram atribuídos a uma unidade de fenilalanina, devido ao acoplamento de H-2', no espectro de HMBC (FIGURA 4.78), com o carbono C-10 em δ 45,9. Além disso, os hidrogênios H-10 δ 2,72 (dd; 7,2; 4,2 Hz, 2H) acoplam, no COSY (FIGURA 4.77), com H-3 em δ 3,55 (t, 7,4). Observa-se, também no espectro de ^1H RMN, cinco metilas em δ 2,19 (s, 3H), δ 1,22 (d; 7,1 Hz, 3H), δ 1,16 (s, 3H) e δ 0,86 (s; 3H), além da existência de quatro hidrogênios olefínicos, δ 5,83 (dd; 15,9; 10,2 Hz, 1H), δ 5,20 (ddd; 15,9; 10,8; 4,9 Hz; 1H), δ 5,92 (ddd; 15,9; 2,2; 1,2 Hz, 1H) e δ 4,74 (ddd; 15,9; 7,7; 2,4 Hz; 1H).

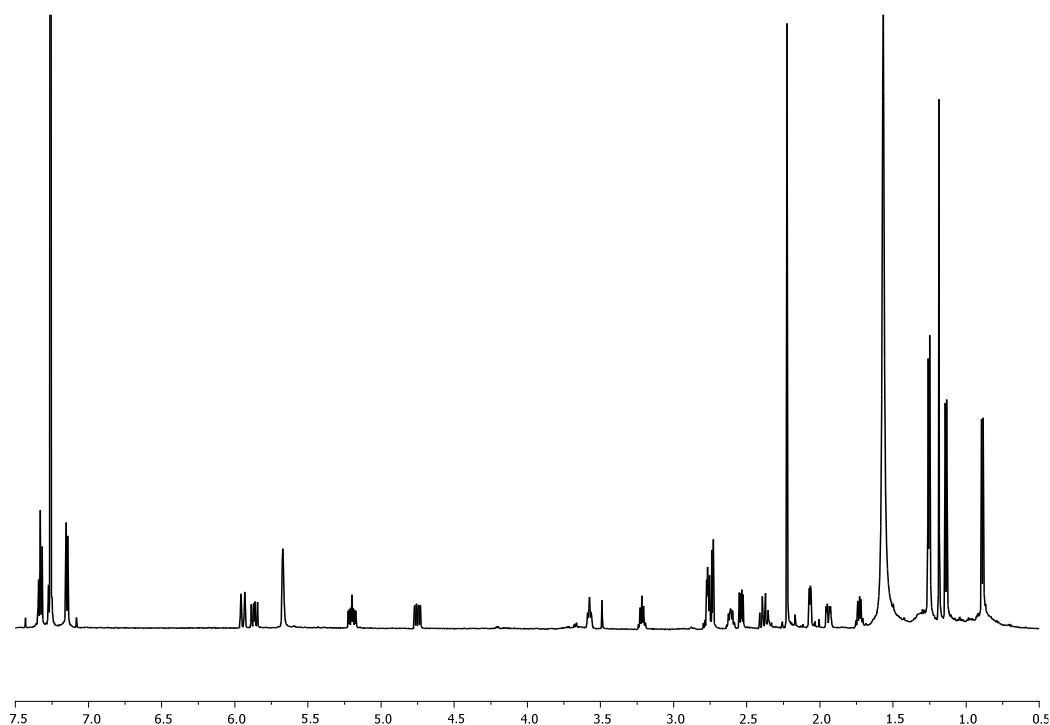


FIGURA 4. 75 - Espectro de RMN de hidrogênio de MCL5_pAfDA_13

Ademais, verificou-se o acoplamento de três sinais em δ 1,12 (s; 3H); δ 2,52 (dd; 9,9; 5,7 Hz; 1H) e 5,83 (dd; 15,9; 10,2 Hz, 1H) com um carbono com deslocamento químico característico de epóxido em δ 62,5. Estas informações mostram que a estrutura do composto da fração MCL5_pAfDA_13

é análoga a citocalasina Q, no entanto, com massa molecular 16 Da inferior em relação a citocalasina mencionada. Desta forma, sugeriu-se que o novo composto deve possuir uma hidroxila a menos que a citocalasina Q. Fato este comprovado, pois se constatou, no HSQC, a correlação do hidrogênio metínico H-18 em δ 3,18 (dt; 14,2; 7,1 Hz; 1H) com o carbono em δ 50,9. Assim, o composto presente na fração MCL5_pAfDA_13 foi identificado como a 18-desoxi citocalasina Q, em concordância com o trabalho publicado por CHEN e colaboradores (2011).

A FIGURA 4.79 representa a estrutura da 18-desoxi citocalasina Q.

Os dados espectroscópicos referentes à fração MCL5_pAfDA_13 que permitiram identificar o composto como 18-desoxi citocalasina Q estão agrupados na TABELA 4.7.

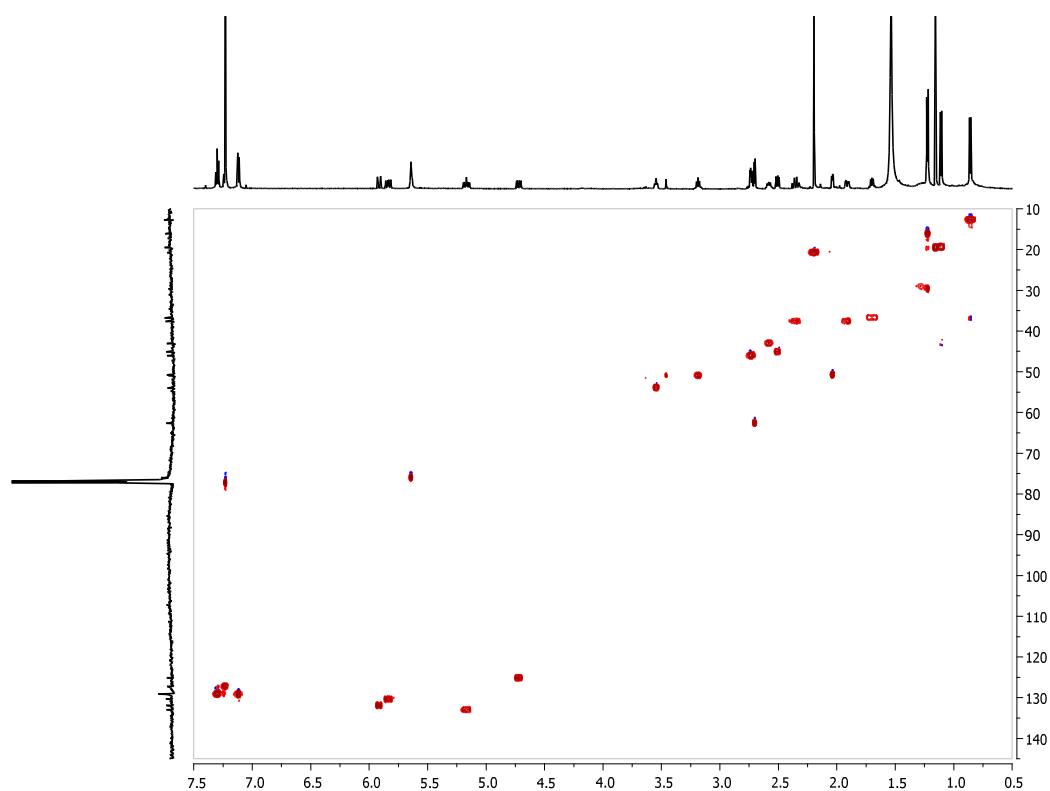


FIGURA 4.76 - Espectro de HSQC de MCL5_pAfDA_13

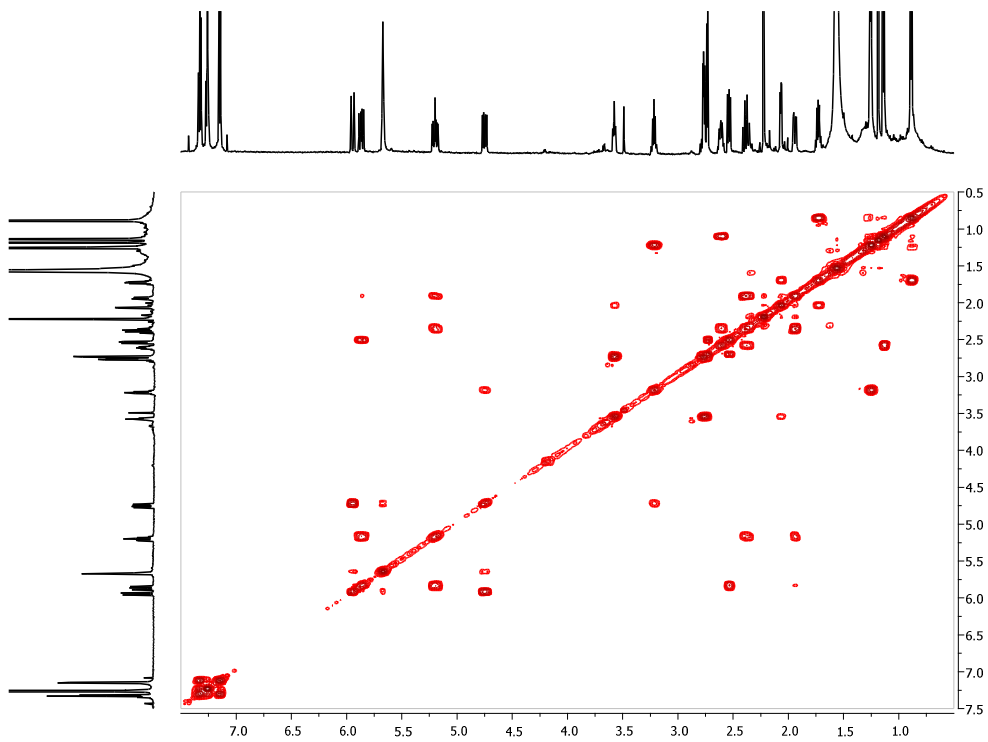


FIGURA 4.77 - Espectro de COSY de MCL5_pAfDA_13

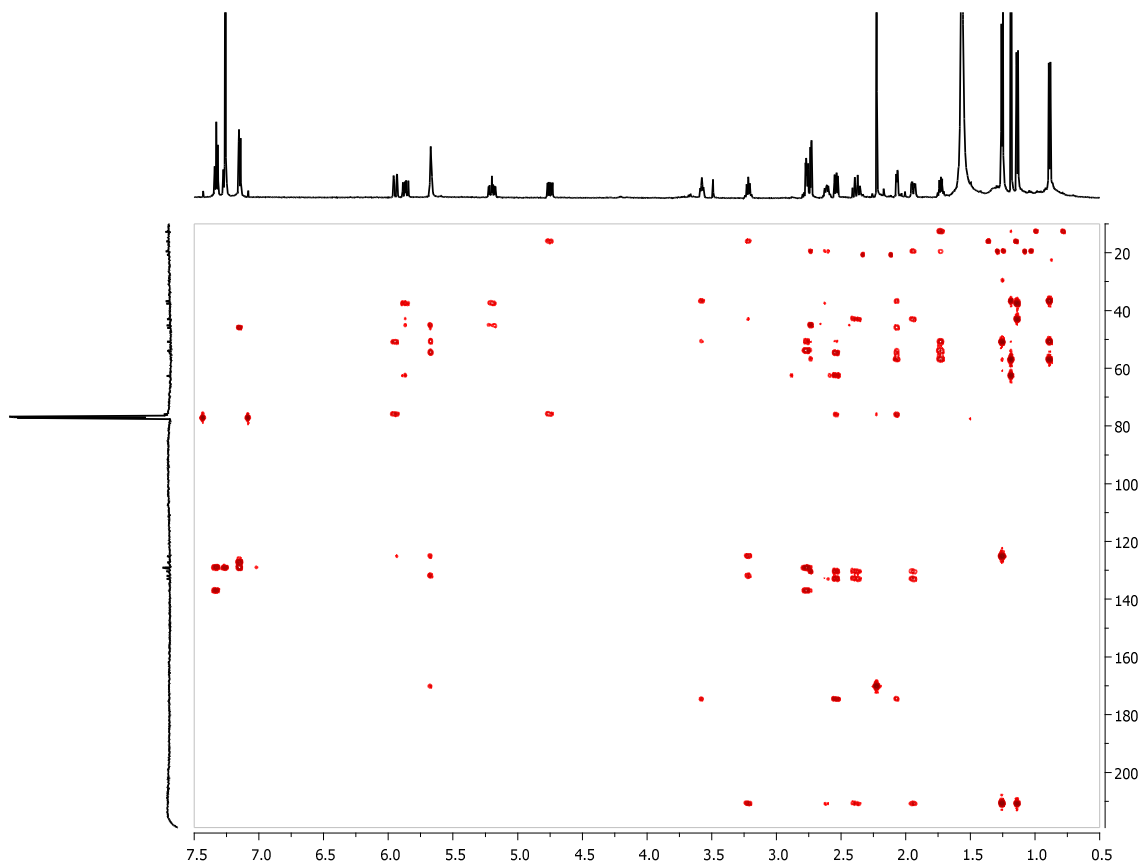


FIGURA 4.78 - Espectro de HMBC de MCL5_pAfDA_13

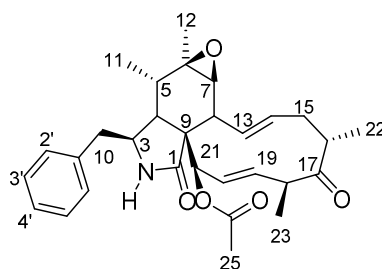


FIGURA 4.79 - Estrutura química da 18-desoxi citocalasina Q

TABELA 4.7 - Dados de RMN obtidos para a fração MCL5_pAfDA_13

	$^1\text{H}^*$	HSQC	COSY	HMBC
1	-		-	
2				
3	3,55 (t; 7,4)	53,91	4, 10	1, 4, 5
4	2,04 (dd; 5,5; 2,5)	50,75	3, 5	3, 5, 6, 10, 21
5	1,70 (dt; 13; 7,3)	36,68	4, 11	3, 4, 6, 11, 12
6	-	56,7	-	
7	2,70 (d; 5,7)	62,5	8	6, 8, 12
8	2,52 (dd; 9,9; 5,7)	44,9	7, 13	1, 4, 7, 9, 13, 14, 21
9	-	54,4	-	
10	2,74 (dd; 7,2; 4,2)	45,9	3	1', 2', 3, 4
11	0,86 (s)	12,63	5, 12	4, 5, 6
12	1,16 (s)	19,46	-	5, 6, 7
13	5,83 (dd; 15,7; 10,2)	130,3	8, 14, 15a	7, 8, 15
14	5,20 (ddd; 15,9; 10,8; 4,9)	132,9	15a, 15b, 13	8, 15
15a	1,91 (dd; 13,1; 4,9)	37,4	14, 15b	14, 16, 17, 22
15b	2,37 (q; 10,6)	37,4	14, 15a, 16	13, 14, 16, 17
16	2,58 (m)	42,9	15b, 22	14, 15, 17, 22
17	-			
18	3,18 (dt; 14,2; 7,1)	50,9	20, 23	17, 19, 20, 23
19	5,92 (ddd; 15,8; 2,2; 1,2)	131,8	20	18, 20, 21
20	4,74 (ddd; 15,9; 7,7; 2,4)	125,1	18, 19, 21	21, 23
21	5,64 (sl)	75,9	20	8, 9, 19, 20, 24
22	1,10 (d; 6,9)	19,3	16	15, 16, 17
23	1,22 (d; 7,1)	16,1	18	17, 18, 22
24	-	-	-	-
25	2,19 (s)	20,7	-	24
1'	-	136,9	-	
2'	7,12 (d; 8,1)	129,1	3'	3', 4', 10
3'	7,30 (t; 7,5)	128,9	2'	1'
4'	7,23	127,2	-	2'

(*) entre parênteses estão representados a multiplicidade e a constante de acoplamento, respectivamente.

A análise por espectrometria de massas revelou que o composto presente na fração MCL5_pAfDA_15 possui espectro de *full scan* e de íons produtos idênticos ao da 18-desoxi citocalasina Q, como pode ser visto na FIGURA 4.80. Contudo, a massa obtida não foi suficiente para realizar experimentos de RMN. Logo, o micro-organismo deve ter produzido um análogo da citocalasina C ou D sem a hidroxila na posição 18.

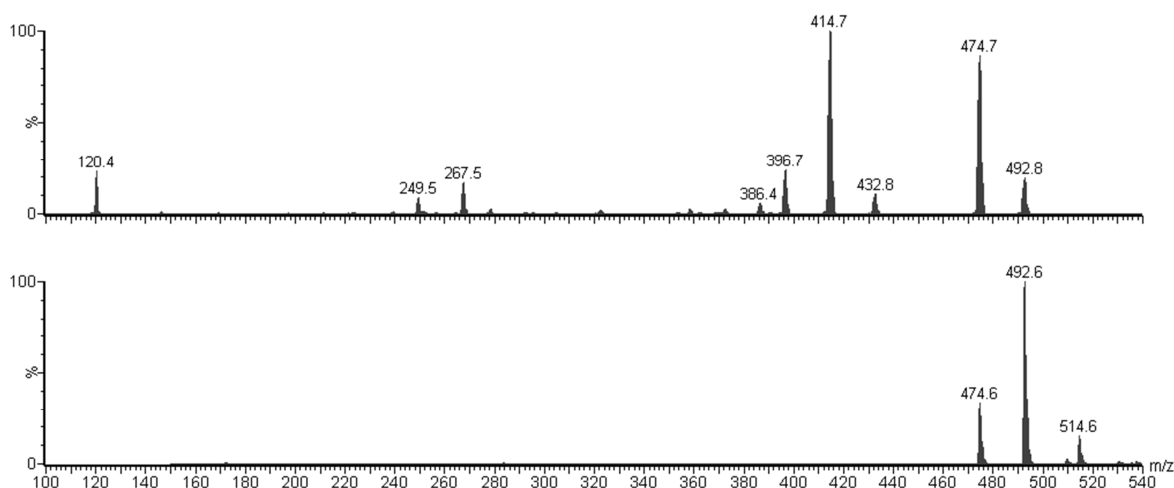


FIGURA 4.80 - Espectros de massas de MCL5_pAfDA_15: (A) *Full scan* e (B) íons produtos de m/z 492

Análises de espectrometria de massas da fração MCL5_pAfDA_19, mostraram a produção de um metabólito com íon molecular protonado de m/z 689, conforme mostra o espectro de massas representado na FIGURA 4.81A. Para obtenção de informação estrutural foi realizado experimento de íons produtos de m/z 689, empregando energia de colisão de 45 eV (FIGURA 4.81B), o qual permitiu observar um perfil espectral bastante diferente das citocalasinas, pois constatou-se perdas de 113, 87, 147 e 113 Da, as quais podem estar relacionadas a perdas dos resíduos dos aminoácidos leucina ou isoleucina, serina, fenilalanina e leucina ou isoleucina, respectivamente, fornecendo indícios da produção de um peptídeo ou um depsipeptídeo.

Como mostrado na introdução deste trabalho, há poucos relatos da produção de peptídeos por fungos do gênero *Xylaria*, no entanto, nenhum dos

peptídeos já conhecidos possuem massa similar ao observado na fração MCL5_pAfDA_19.

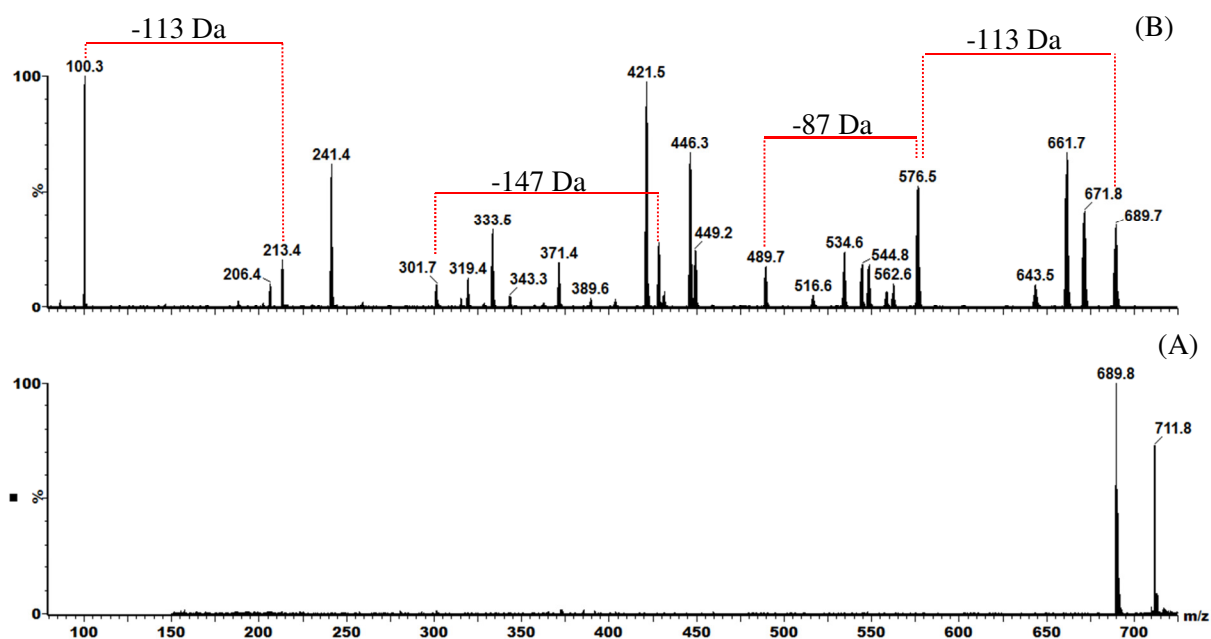


FIGURA 4.81 - Espectros de massas de MCL5_pAfDA_19: (A) *Full scan* e (B) íons produtos de m/z 689

Desta forma, experimentos de RMN de uma e duas dimensões foram realizados, visando identificar o composto. No espectro de ^1H RMN, FIGURA 4.82, verificam-se a presença de cinco hidrogênios aromáticos, nove metilas, sendo oito delas na região entre δ 1,10 e 0,70; e uma em δ 3,07, a qual deve estar ligada a um nitrogênio. Observou-se também seis hidrogênios metínicos com deslocamento químico característico de hidrogênio em posição alfa carbonila em δ 5,45; 5,29; 4,73; 4,65; 4,52 e 3,45. Além disso, três hidrogênios de grupo N-H em δ 7,93; 7,46; e 5,92. Verificou-se a presença de dois hidrogênios ligados a carbono carbinólico em δ 4,21 e 4,05. A presença de hidrogênios alfa carbonílicos e hidrogênios ligados a nitrogênio corroboram com os dados de espectrometria de massas, evidenciando resíduos de aminoácidos.

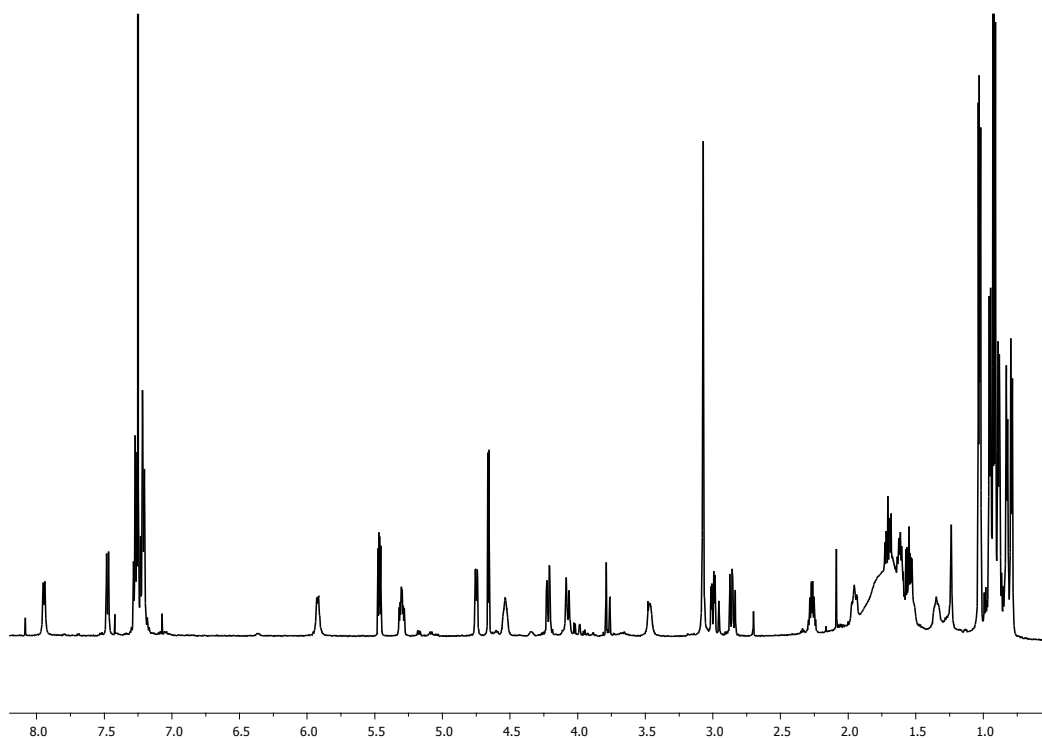


FIGURA 4.82 - Espectro de RMN de hidrogênio da fração MCL5_pAfDA_19

O resíduo de aminoácido fenilalanina foi prontamente identificado, pois o espectro de COSY (FIGURA 4.83) permitiu identificar a correlação entre o hidrogênio α -carbonila em δ 5,30 (ddd; 4,7; 8,7 e 10,0 Hz, 1H) com os hidrogênios metilênicos em δ 2,86 (dd; 13; 10 Hz; 1H) e δ 3,00 (dd; 13; 4,7 Hz; 1H) e também com o hidrogênio de $-\text{NH}$ em δ 7,45 (d; 8,7 Hz; 1H). Já no HMBC, mostrado na FIGURA 4.83, observou-se o acoplamento do duplo dubleto em δ 5,30 com o carbono aromático em δ 129,1. Além disso, os hidrogênios metilênicos apresentaram correlação com o carbono carboxílico em δ 172,4. Desta forma, através da junção dos dados mencionados caracterizou-se o resíduo de fenilalanina, o qual é corroborado pela perda do fragmento de 147 Da no espectro de íon produtos. A estrutura parcial desta porção da molécula está representada na FIGURA 4.86, as setas azuis indicam os acoplamentos observados no HMBC e a ligação destacada em negrito os acoplamentos verificados no COSY.

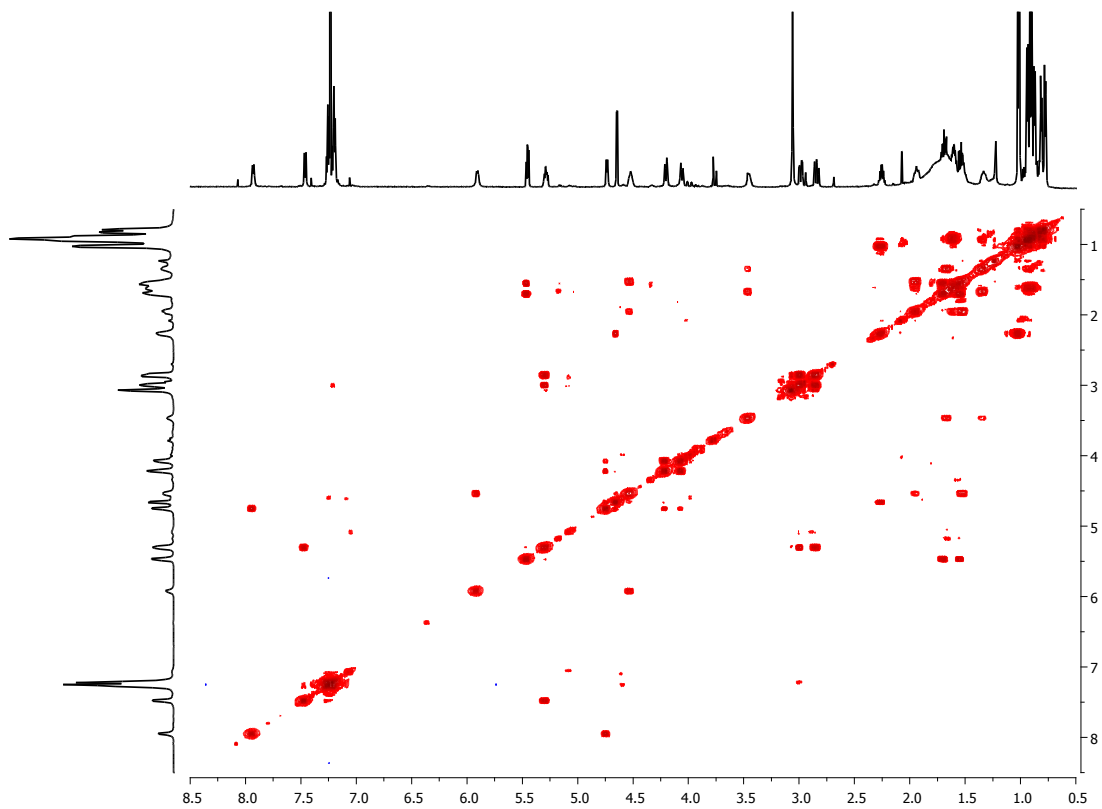


FIGURA 4.83 - Espectro de COSY da fração LSA_MCL5_pAFA_19

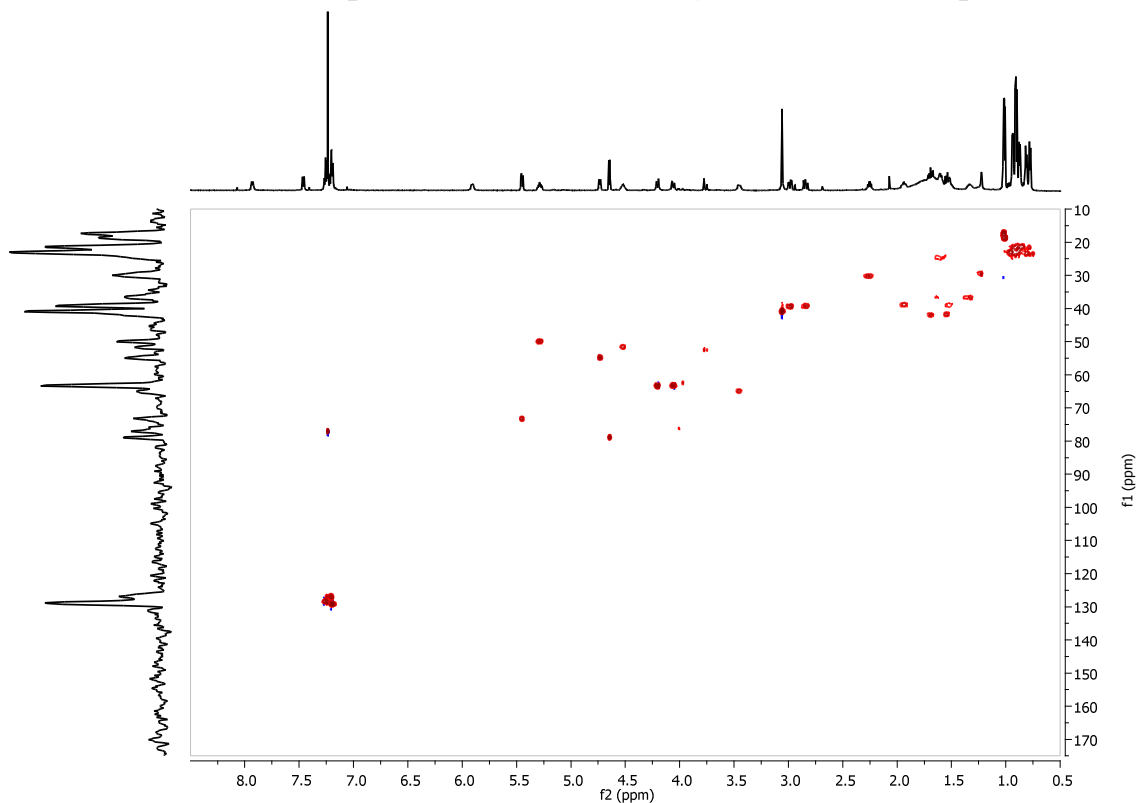


FIGURA 4.84 - Espectro de HSQC da fração LSA_MCL5_pAFA_19

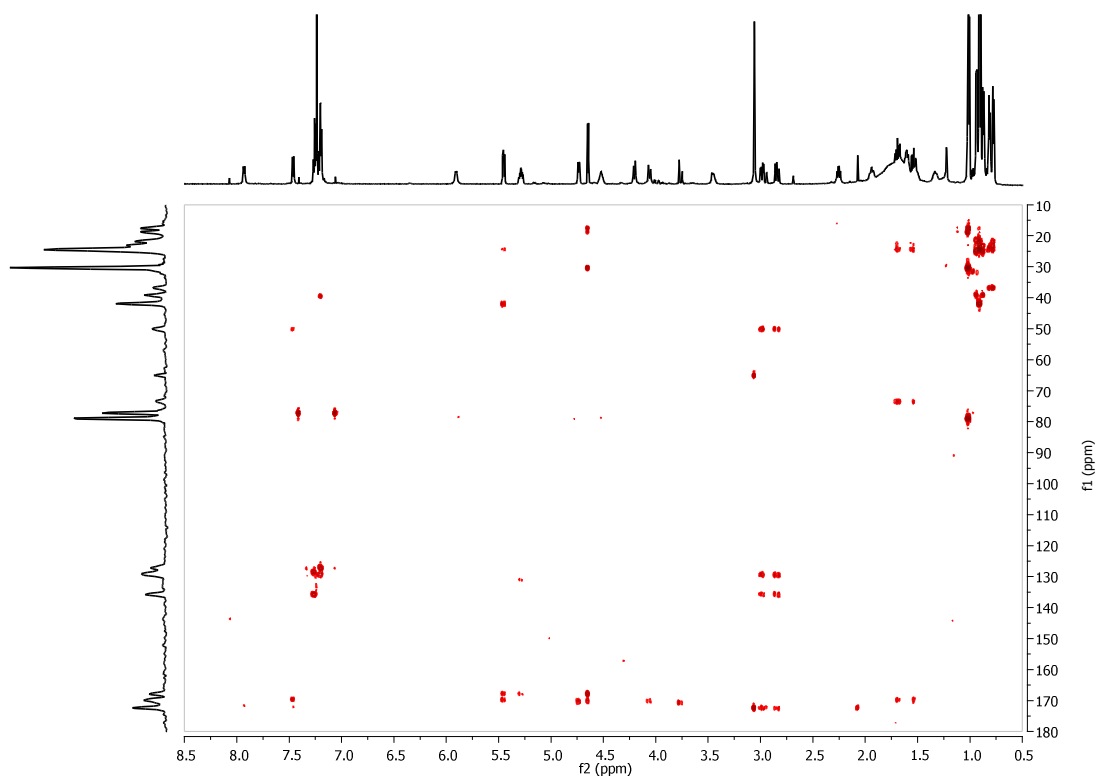


FIGURA 4.85 - Espectro de HMBC da fração LSA_MCL5_pAFA_19

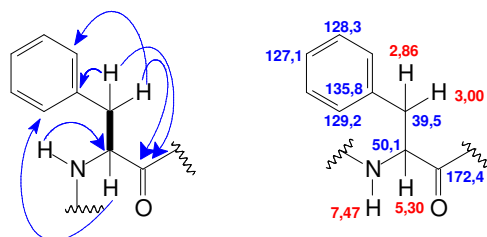


FIGURA 4.86 - Principais correlações que permitiram identificar o resíduo de fenilalanina

De acordo com os dados RMN o segundo resíduo de aminoácido deve conter um grupo isopentila, haja vista a presença do acoplamento, no espectro de HMBC, de duas metilas em δ 0,78 (d; 6,2 Hz) e δ 0,86 (d; 6,2 Hz) com os carbonos metínico em δ 23,5 e metilênico em δ 36,8; os quais correlacionam no HSQC com o multipletto entre 1,53-1,77 e com os multipletos em δ 1,30-1,39 e δ 1,53-1,77, respectivamente. Pelo COSY verifica-se a correlação dos hidrogênios metilênicos com o hidrogênio que deve estar em posição α carbonila em δ 3,50-3,42 (m; 1H). O singletto referente a uma metila em δ 3,06 (s) deve estar ligado ao átomo de nitrogênio, justificando, desta forma, o deslocamento químico observado. Este singletto acopla com o carbono

metínico em δ 65,1; caracterizando, deste modo, o resíduo do aminoácido leucina N metilado. As estruturas parciais são mostradas na FIGURA 4.87, na qual as setas verdes e azuis indicam os acoplamentos observados no HSQC e HMBC, respectivamente, e a ligação destacada em negrito os acoplamentos verificados no COSY.

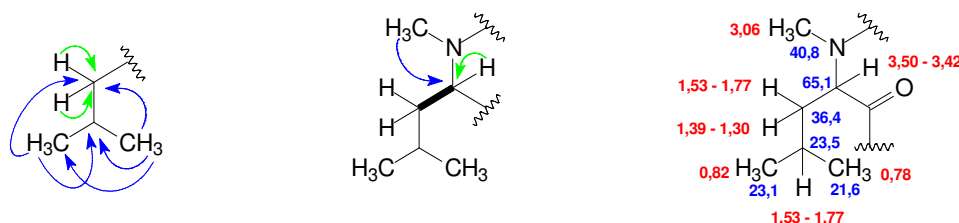


FIGURA 4.87 - Principais correlações que permitiram identificar o resíduo de leucina N-metilada

O COSY mostrou a presença de outro grupo isopentila, uma vez que, as metilas em δ 0,93 (d; 6,2 Hz) e 0,87 (d; 6,2 Hz) acoplam com o multiplete em δ 1,53-1,77 e este por sua vez com os hidrogênios metilênicos em δ 1,95 (ddd; 3,2; 8,9; 12,9 Hz) e δ 1,51-1,60 (m). Ainda pelo COSY, observou-se o acoplamento dos hidrogênios metilênicos com o hidrogênio que deve estar em posição α carbonila em δ 4,52 (m) e, este correlaciona com o dubleto em δ 5,92 (d; 7,6 Hz, 1H). Através das demais correlações observadas no espectro de HMBC, aliados aos dados de espectrometria de massas foi possível chegar a estrutura do aminoácido leucina, mostrada na FIGURA 4.88, na qual as ligações destacadas em negrito representam as correlações observadas no COSY

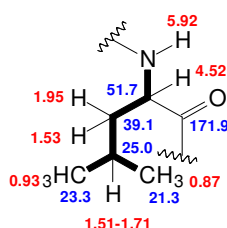


FIGURA 4.88 - Principais correlações que permitiram identificar o resíduo de leucina

Os hidrogênios em δ 4,21 (dd; 12; 2 Hz; 1H) e δ 4,05 (dl; 12 Hz; 1H) são referentes a um metileno, haja vista o acoplamento de ambos no espectro de HSQC com o carbono em δ 63,4. Devido ao deslocamento químico

dos hidrogênios e do carbono, estes devem estar adjacentes a um grupo retirador de elétrons como uma hidroxila. Observa-se no espectro de COSY a correlação de ambos os hidrogênios do metileno com o duplete largo em δ 4,73 (d; 7,7 Hz, 1H) e, este por sua vez acopla com o hidrogênio de -NH em δ 7,93 (d, 7,7 Hz; 1H). Pelo HMBC, verifica-se a correlação dos hidrogênio em δ 4,05 e δ 4,73 com o carbono carboxílico em δ 170,2; caracterizando o resíduo de serina e, confirmando a perda de 87 Da observada no espectro de íons produtos de m/z 689. A FIGURA 4.89 ilustra as principais correlações que permitiram a identificação deste aminoácido, na qual as setas verdes e azuis representam os acoplamentos observados no HSQC e HMBC respectivamente, e as ligações em negrito representam o COSY.

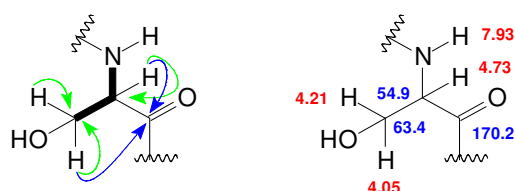


FIGURA 4.89 - Principais correlações que permitiram identificar o resíduo de serina

Observando os dados de COSY e HMBC verificou-se a presença de um grupo isopropil, devido ao acoplamento dos dupletos referentes a duas metilas em δ 1,01 (d; 6,7 Hz, 3H) e δ 1,02 (d; 6,7 Hz, 3H) com o hidrogênio metínico em δ 2,26 (m), que por sua vez correlaciona com o duplete em δ 4,66 (d; 5 Hz, 1H). Nota-se no espectro de HMBC a correlação do hidrogênio metínico em δ 4,66 com os carbonos metílicos em δ 17,5 e 18,5 e com o sinal em 167,9; sugerindo a presença de um grupo carbonila em sua vizinhança. Entretanto, o carbono em que este hidrogênio está ligado possui deslocamento químico de δ 78,9; indicando a presença de um grupo retirador de elétrons como o oxigênio. A partir destes dados tem-se a estrutura de um derivado oxigenado do aminoácido valina, conforme mostra a FIGURA 4.90, na qual se observam as principais correlações. As setas verdes e azuis representam os acoplamentos

observados no HSQC e HMBC respectivamente, e as ligações em negrito representam o COSY.

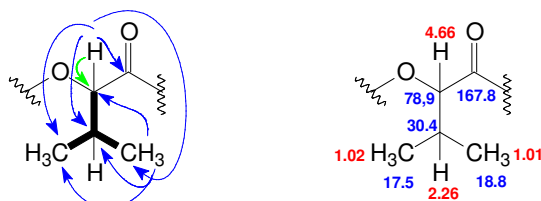


FIGURA 4.90 - Principais correlações que permitiram identificar o resíduo de O-valina

A identificação da última porção da molécula baseou-se principalmente nos dados de HMBC, devido à sobreposição de sinais. Sendo assim, notou-se a correlação dos dubletos referentes a duas metilas em δ 0,92 (d; 6,7 Hz; 3H) e δ 0,91 (d; 6,7 Hz) com o carbono metínico em δ 24,4 e com o carbono metilênio em δ 42,06. Pelo COSY verificou-se a correlação dos hidrogênios metilênicos δ 1,53-1,71 (m) com o duplo dubleto em δ 5,47 (dd; 8,2 e 4,6 Hz; 1H). O duplo dubleto δ 5,47 está ligado ao carbono em δ 73,3 e, assim como a O-valina, este deve estar vizinho a um oxigênio e a carboxila em 168,7. A junção destes dados permitiu identificar uma O-leucina. A FIGURA 4.91 mostra as principais as correlações observadas no COSY (ligação destacada em negrito), HSQC e HMBC (setas verdes e azuis, respectivamente).

A identificação dos resíduos de fenilalanina, leucina, serina e N-metil leucina justificam a presença de três grupo $-NH$ e um grupo $-NCH_3$, respectivamente, o que é coerente com o dado de espectrometria de massas, no qual o íon molecular protonado de m/z 689, por ser ímpar, indica número par de átomos de nitrogênio. Já a presença dos derivados O-valina e O-leucina completam a quantidade hidrogênios metínicos na posição α carbonila.

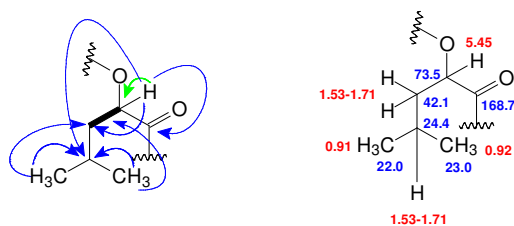


FIGURA 4.91 - Principais correlações que permitiram identificar o resíduo de O-leucina

Os dados de HMBC permitiram identificar a forma com que os resíduos estão ligados entre si. Deste modo, observou-se a correlação da metila em 3,06 da N-metil leucina com o carbono carboxílico da fenilalanina em δ 172,4. Verificou-se também o acoplamento do hidrogênio de –NH da fenilalanina em δ 7,45 com o carbono carboxílico da O-leucina em δ 168,7. O hidrogênio em posição α carbonila da O-leucina δ 5,45 correlaciona-se com a carboxila da O-valina em δ 167,8. Já o hidrogênio em δ 4,66 (α carbonila) da O-valina acopla com o carbono carboxílico da serina em δ 170,2. E por fim, verifica-se a correlação do hidrogênio de –NH da serina com o carbono carboxílico da leucina em 171,9, como pode ser visto na FIGURA 4.92.

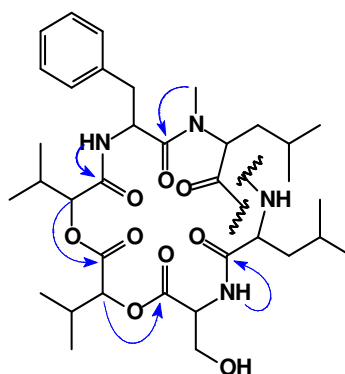


FIGURA 4.92 - Correlações observadas no espectro de HMBC para a substância da fração MCL5_pafDA_19

O experimento de espectrometria de massas de alta resolução indicou $[M+H]^+$ com m/z 689,4122 o qual permitiu estabelecer a fórmula molecular $C_{36}H_{56}N_4O_9$, correspondente a onze graus de insaturação, logo para satisfazer o número de insaturações, o composto deve ser cíclico, conforme mostra a FIGURA 4.93.

Através dos dados de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear foi possível chegar a estrutura final do composto presente na fração MCL5_pAfDA_19. Entretanto, SY-CORDEIRO (2011) e colaboradores, reportaram a produção desta substância pelo fungo *Trichothecium* sp. e, a denominaram como tricodepsipeptídeo.

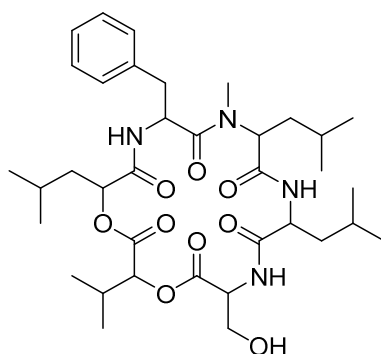


FIGURA 4.93 - Estrutura química proposta para o composto presente na fração MCL5_pAfDA_19

A produção do tricodepsipeptídeo por N1CL5 é algo significativo, pois existem somente dois trabalhos na literatura que correlacionam depsipeptídeos e fungos do gênero *Xylaria*. PAUNGMOND e colaboradores (2007) relataram a detecção da enzima NRPS, responsável pela biossíntese desta classe de compostos e JIRAKKAKUL et al. (2009) isolaram o ciclodepsipeptídeo bassianolideo produzido por *Xylaria* sp. BCC1067.

Depsipeptídeos são metabólitos secundários compostos por aminoácidos e por pelo menos um hidroxí ácido. Estes produtos naturais são biossintetizados pela enzima peptídeo não ribossomal sintetase (NRPS). As NRPS são enzimas multimodulares em que cada módulo é responsável pela adição de um aminoácido. As NRPSs podem incorporar aminoácidos proteínogênicos e não proteínogênicos, bem como carboxi e hidroxí ácidos. Além disso, realizam modificações como N-metilação, epimerização, ciclização (SÜSSMUTH et al., 2011).

O estudo de fragmentação de ciclodepsipeptídeos é algo bastante desafiador, pois no caso do tricodepsipeptídeo, existem seis possibilidades de abertura do ciclo, logo a população de íons produtos observada pode ser fruto de todas estas possibilidades, conforme mostra a FIGURA 4.94.

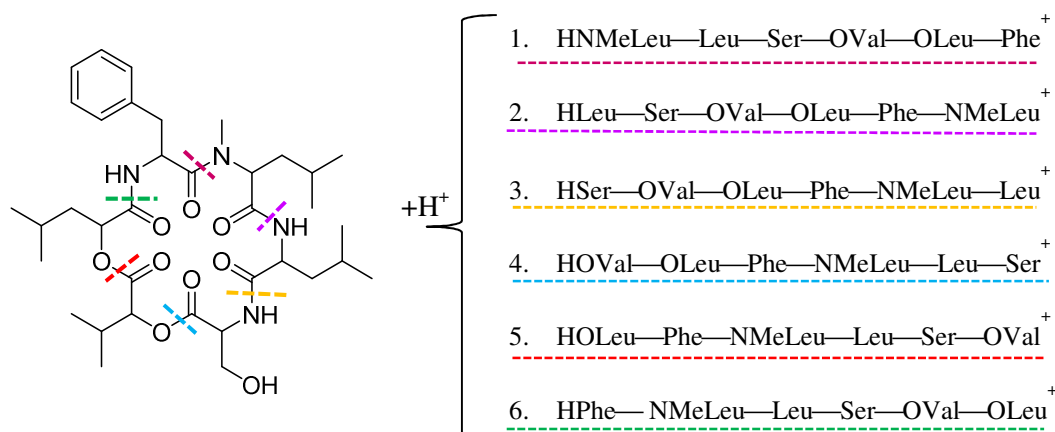


FIGURA 4.94 - Possibilidades de abertura do tricodepsipeptídeo

Para justificar os íons observados no espectro de íons produtos de m/z 689, foi realizado uma proposta de fragmentação como ilustra a FIGURA 4.95. A protonação do nitrogênio da N-metil leucina e consequente abertura do ciclo devido à assistência do par de elétrons não ligantes do oxigênio da carboxila, leva a sequencia 1 mostrada na FIGURA 4.94. O ataque do par de elétrons do nitrogênio ao carbono carboxílico mostrado no caminho (a) leva a perda de 127 Da, equivalente ao derivado da N-metil leucina e resultando na formação do íon de m/z 562, o qual ao perder CO gera o íon de m/z 534. Já o ataque do par de elétrons no carbono carboxílico, evidenciado no caminho (b), conduz a formação de m/z 449 e, a perda de CO produz o íon de m/z 421.

A protonação do nitrogênio da leucina e consequente abertura do ciclo leva a espécie mostrada na FIGURA 4.95B. O ataque do par de elétrons do nitrogênio da porção N terminal no carbono carboxílico evidenciado no caminho (a) leva a perda de 113 Da, referente ao aminoácido leucina, gerando m/z 576. No entanto, se o ataque ocorrer como mostra o caminho (b) observa-se o íon de m/z 489. A abertura do anel entre o nitrogênio da serina e o carbono carboxílico da leucina, leva a espécie representada na FIGURA 4.95C. A clivagem mostrada pela linha tracejada, gera m/z 241 e este ao perder CO gera m/z 213. A perda de 85 Da assistida pelo par de elétrons não ligantes da carboxilia produz m/z 128, o qual ao perder CO, leva ao íon imônio da N-metil leucina corresponde a m/z 100.

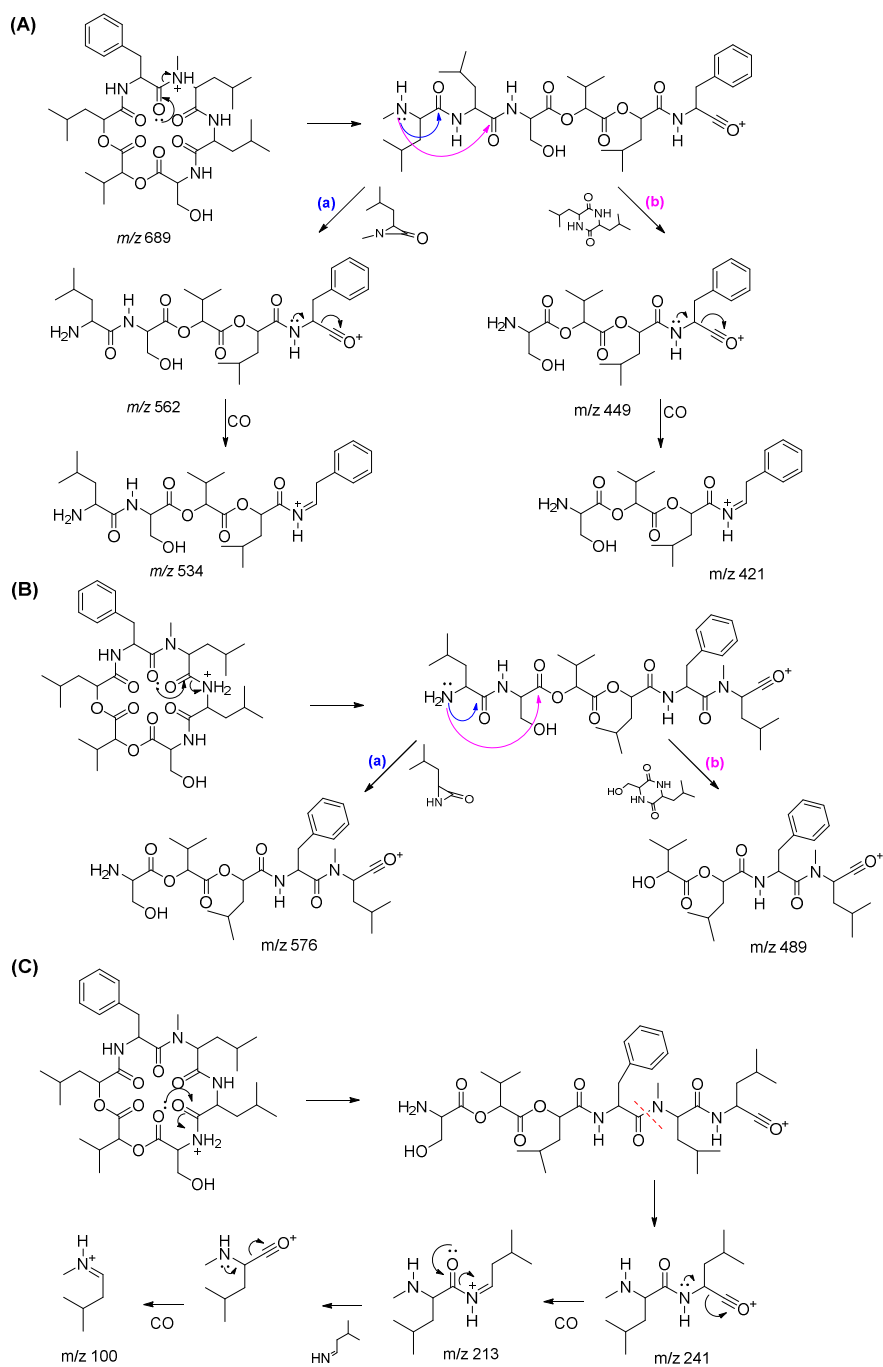


FIGURA 4.95 - Proposta de fragmentação de m/z 689

Aberturas nas outras posições do ciclo não levam aos íons observados no espectro de íon produtos, logo as demais espécies que não foram justificadas devem corresponder a fragmentação da cadeia lateral dos aminoácidos.

Vale mencionar a produção do tricodipeptídeo quando o micro-organismo foi cultivado em meio de cultura suplementado com $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$, ^{15}N

glicina e 2-¹³C glicina, evidenciando mais uma vez a versatilidade do micro-organismo em utilizar as diferentes fontes de nitrogênio para produção de seu metabolismo secundário.

Dando continuidade ao estudo do metabolismo de N1CL5, isolou-se a fração MCL5_pAfA_19, uma mistura de dois compostos com [M+H]⁺ de *m/z* 621,3850 e 721,4357; os quais correspondem a fórmula molecular C₃₂H₅₂N₄O₈ e C₃₇H₆₀N₄O₁₀, relacionadas a 9 e 10 graus de instauração, respectivamente. A análise de íons produtos de ambas as substâncias (FIGURA 4.96), evidenciou uma grande similaridade destes compostos com o tricodepsipeptídeo pois, observam-se perdas de 113, 127 e 147 Da, as quais sugerem a presença de leucina/isoleucina, N-metil leucina e fenilalanina. Além disso, observa-se a presença de *m/z* 100, íon imônio da N-metil leucina.

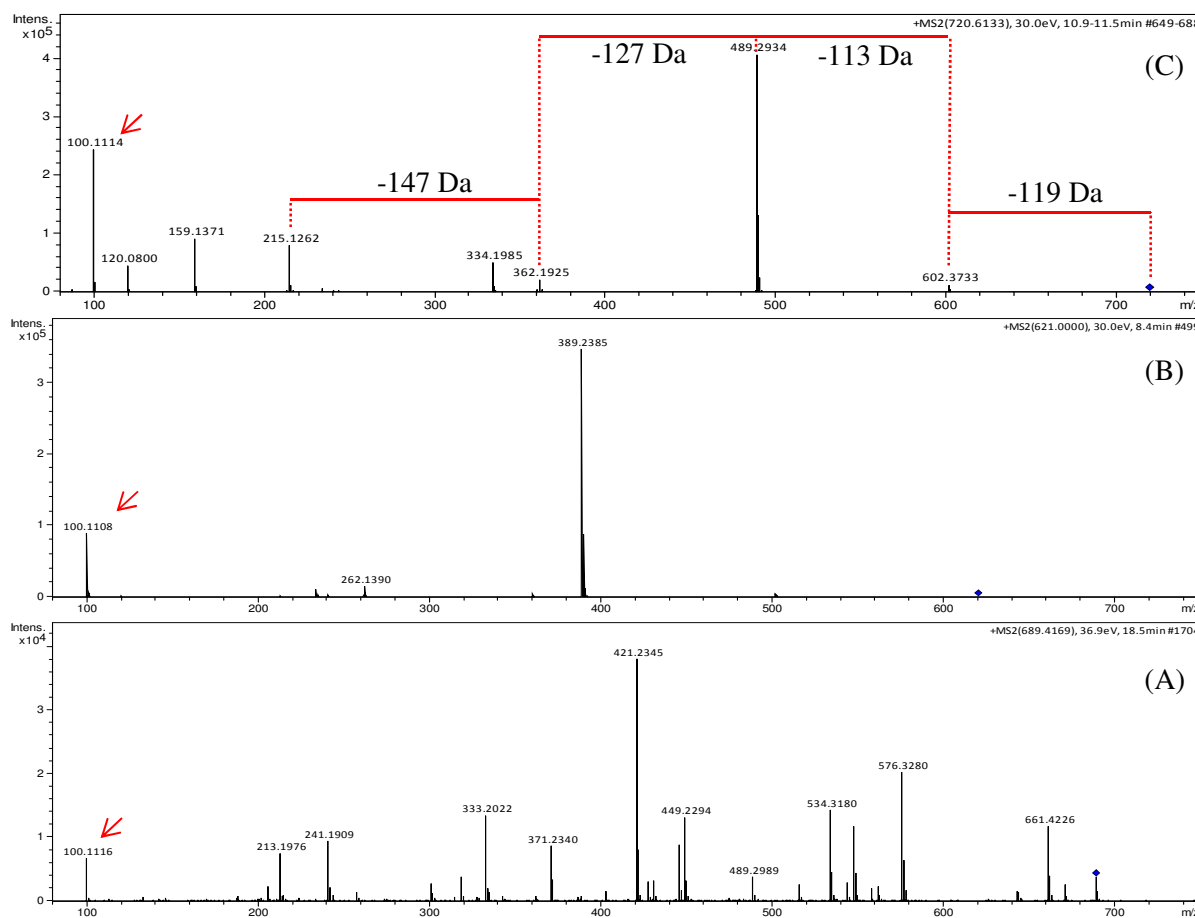


FIGURA 4.96 - Espectro de íons produtos de *m/z* (A) 689,4122 (B) 621,3850 e (C) 721,4357

Verifica-se ainda no espectro de íons produtos, mostrado na FIGURA 4.113, a perda de 119 Da, a qual poderia ser correlacionada com o aminoácido treonina se os compostos fossem lineares. No entanto, ao observar os espectros de RMN de uma e duas dimensões da mistura, não foi possível constatar a presença deste aminoácido. Ademais a grande complexidade espectral, devido à mistura, dificulta a elucidação estrutural, porém acredita-se que ambas as substâncias sejam inéditas, pois ao inserir as fórmulas moleculares na base de dados Science Finder, não foi possível encontrar candidatos que corroborem com os dados de espectrometria de massas.

Após a finalização da elucidação estrutural destes compostos, deve-se avaliar a configuração absoluta dos aminoácidos que os compõem.

Nenhum dos metabólitos produzidos por NICL5 inibiram a atividade da enzima acetilcolinaesterase.

4.4.2 Metabolismo secundário de NICL3

Em trabalho anterior, verificou-se que o fungo NICL3 é produtor dos sesquiterpenos eremofilanos maiterolídeo A, cupressolídeo A e cupressolídeo B (AMARAL E RODRIGUES FILHO, 2010), além das isocumarinas, meleína, meleína metil éter e 5-formil meleína (AMARAL, 2009), como pode ser visto na FIGURA 4.97.

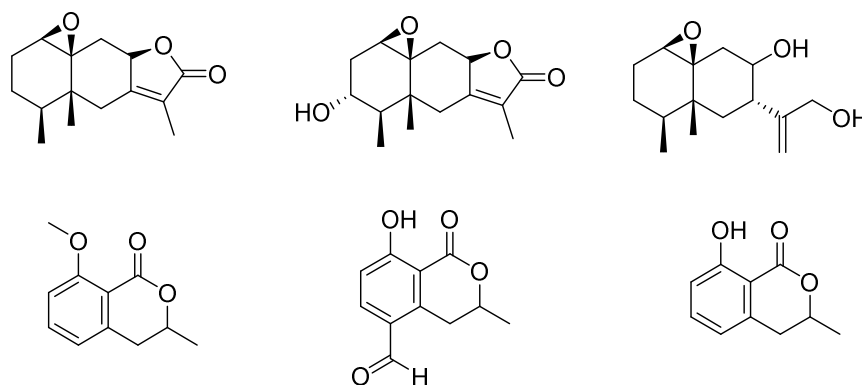


FIGURA 4.97 - Metabólitos secundários produzidos por NICL3 em meio Czapek enriquecido com extrato de levedura

Dando continuidade ao estudo do metabolismo deste micro-organismo, foi possível isolar do extrato micelial a fração MCL3_pAfD_13, a qual apresentou características espectrais semelhantes aos sesquiterpenos eremofilanos isolados anteriormente. A análise por espectrometria de massas de alta resolução, cujo espectro é mostrado na FIGURA 4.98, permitiu estabelecer a fórmula molecular $C_{15}H_{18}O_3$, de acordo com o valor de $[M+H]^+$ m/z 247,1337 (calc. 247,1329), correspondente a sete graus de insaturação.

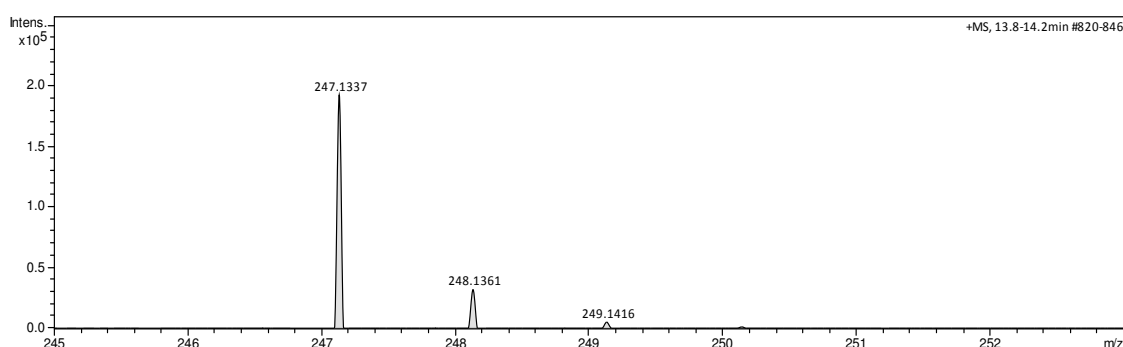


FIGURA 4.98 - Espectro de massas *full scan* de MCL3_pAfD_13

A integração do espectro de 1H RMN, mostrado na FIGURA 4.99 apresentou 18 hidrogênios, enquanto que no espectro de DEPT 135 (FIGURA 4.100), notou-se a presença de três metilas, três metilenos e dois grupos metínicos, um dos quais possui deslocamento químico característico de carbono sp^2 .

Inicialmente, acreditava-se que N1CL3 tivesse produzido um análogo desidratado de cupressolideo A, pois, nota-se o aparecimento de um dubleto em δ 5,95 (d; 1,4 Hz; 1H) e a ausência de um segundo hidrogênio carbinólico. Além disso, o grau de insaturação é satisfeito, pois o cupressolideo é composto por quatro anéis e duas insaturações, logo a sétima seria correspondente à dupla ligação formada pela desidratação. No entanto, ao analisar os espectros de HSQC e HMBC (FIGURAS 4.101 e 4.102), respectivamente, verificou-se a inexistência de um carbono de epóxido, porem notou-se a correlação dos hidrogênios δ 1,10 (d; 6,7 Hz; 3H), δ 2,21 (m, 1H) e

2,37 (m, 1H) com carbono carbonílico com deslocamento químico típico de carbonila α,β insaturada em δ 197,9; contradizendo a proposta inicial. Desta maneira, buscou-se determinar a posição da cetona α,β insaturada.

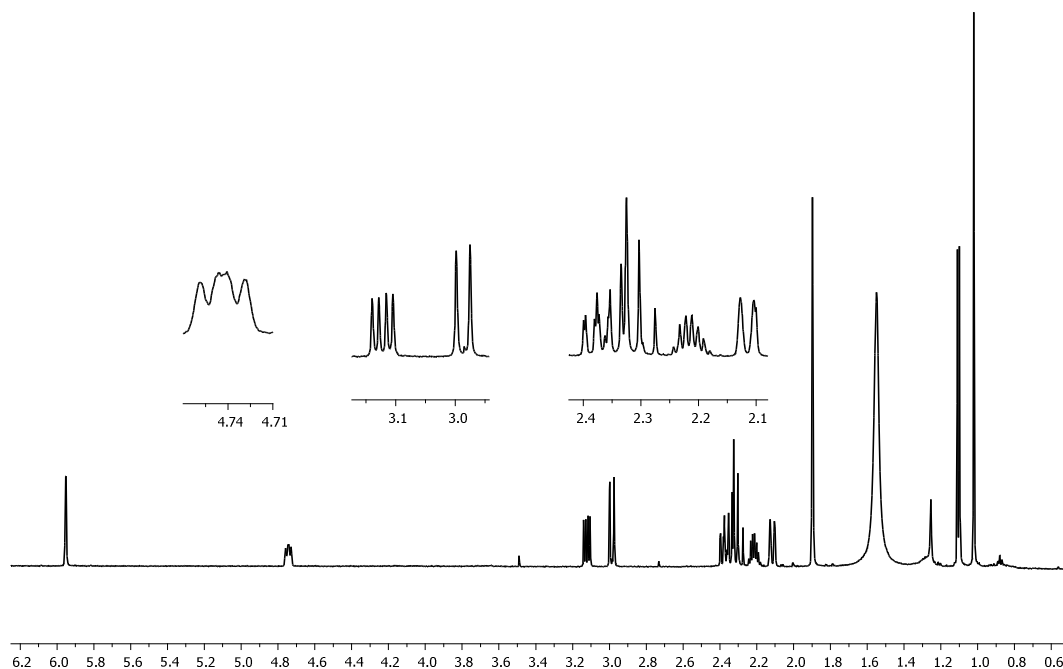


FIGURA 4.99 - Espectro de RMN de hidrogênio da fração MNICL3_pAfD_4 (CDCl₃, 600 MHz)

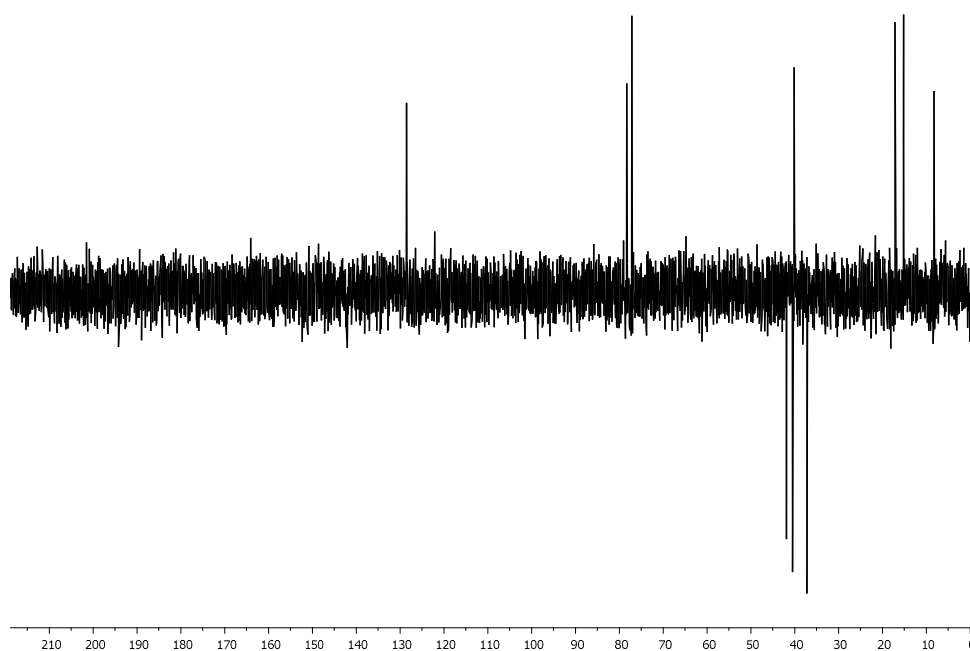


FIGURA 4.100 - Espectro de DEPT 135 de MNICL3_pAfD_4 (CDCl₃, 150 MHz)

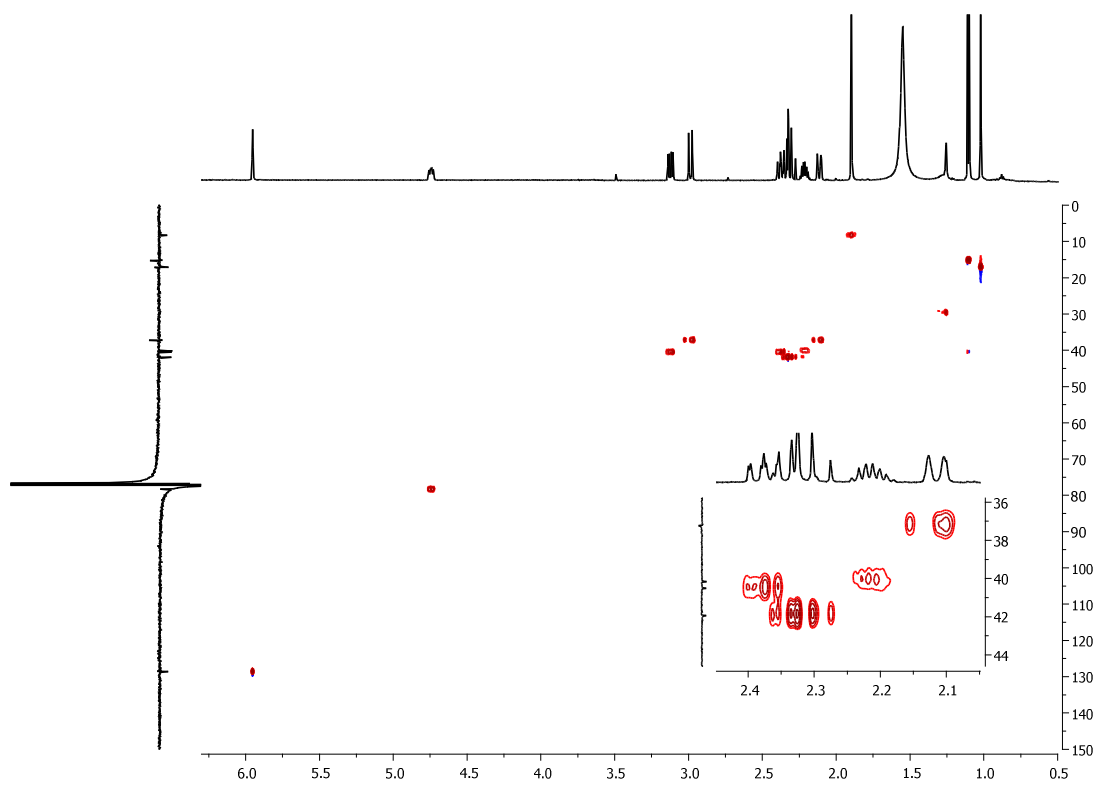


FIGURA 4.101 - Espectro de HSQC da fração MCL3_pAfD_13 (CDCl₃)

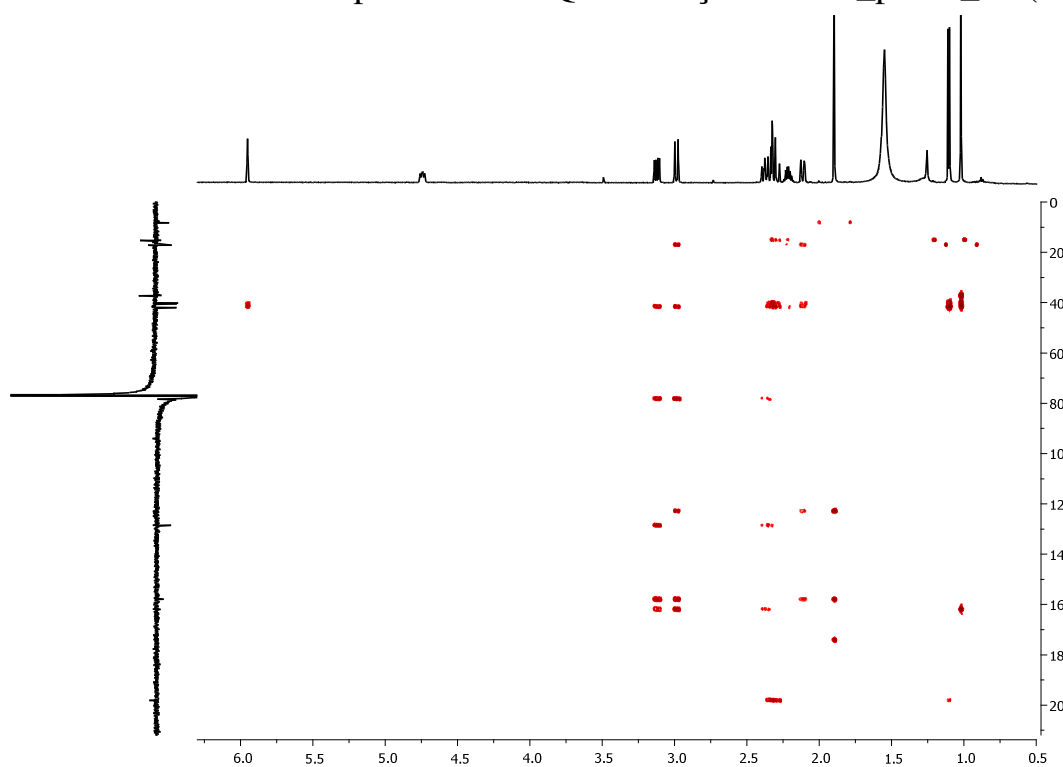


FIGURA 4.102 - Espectro de HMBC da fração MCL3_pAfD_13

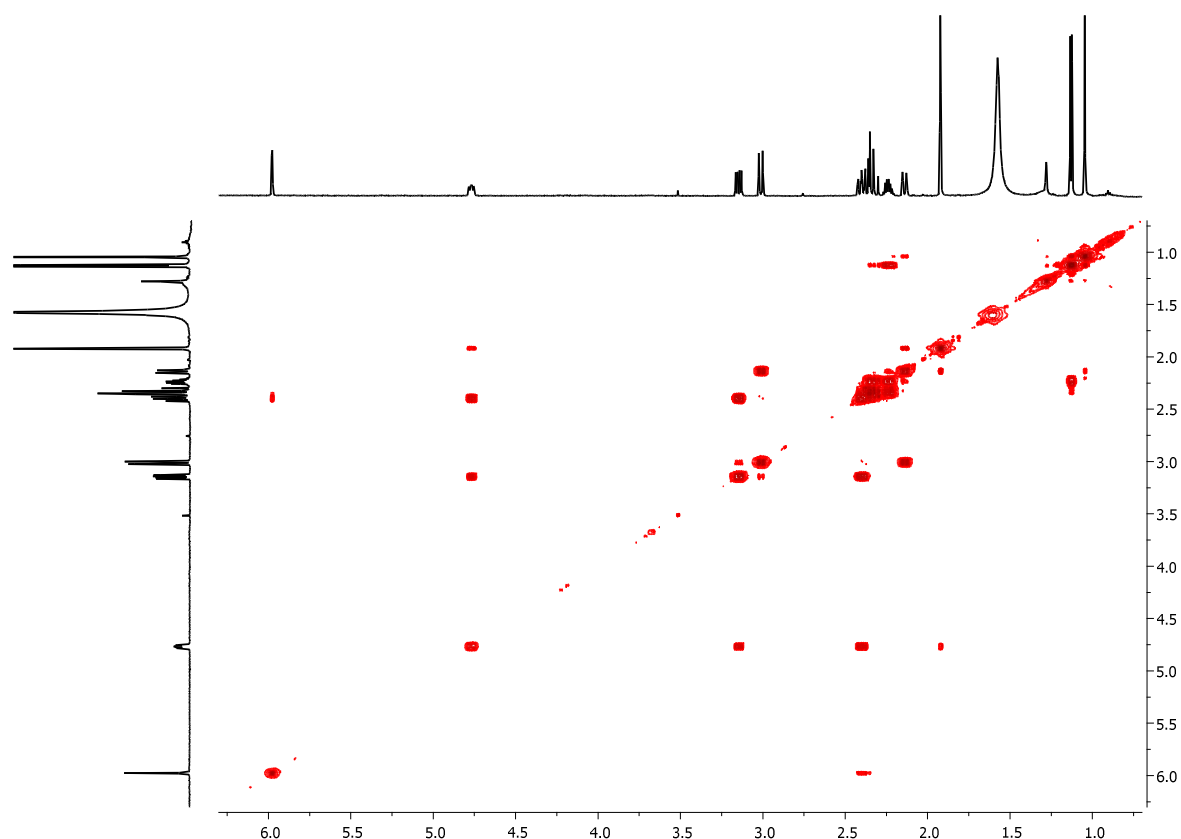


FIGURA 4.103 - Espectro de COSY da fração MCL3_pAfD_13

A FIGURA 4.103 representa o espectro de COSY no qual se observam as correlações entre os hidrogênios metilênicos H-3 em δ 2,33 (m; 2H) com o hidrogênio metínico H-4 em δ 2,21 (m; 1H) e com a metila H-15 em δ 1,10 (d; 6,7 Hz). Nota-se, no espectro de HMBC, o acoplamento dos hidrogênios do multiplete H-3 com o carbono olefínico em δ 128,5. Ademais, verificam-se também, no mapa de correlações HMBC, os acoplamentos entre os hidrogênios H-4 e H-15 com a carbonila em δ 197,9. Constatou-se também o acoplamento da metila H-14 δ 1,02 (s) com os carbonos quaternários C-5 em δ 41,3 e C-10 em δ 161,8. Ainda analisando o espectro de HMBC, notou-se a correlação entre os hidrogênios metilênicos H-9 δ 2,37 (m) e δ 3,12 (dd; 14,2 e 6,7 Hz) com o carbono olefínico δ 128,5. Logo, têm-se a estrutura parcial da substância presente na fração MCL3_pAfD_13, como ilustra a FIGURA 4.104.

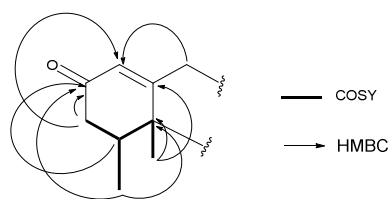


FIGURA 4.104 - Estrutura química parcial da substância presente na fração LSA_MCL3_pAfD_13

Determinada posição da cetona α,β insaturada, prosseguiu-se com a elucidação estrutural. Observou-se a correlação da metila H-14 em δ 1,02 com um dos hidrogênios metilênicos H-6a δ 2,12 (dl; 14 Hz). Pelo espectro de HMBC nota-se a correlação de H-6a com os carbonos olefínicos C-7 em δ 157,9 e C-11 em δ 122,7, além do acoplamento com a carboxila C-12 em δ 174,0. O deslocamento químico da metila H-13 δ 1,90 implica que esta deve estar na vizinhança de uma dupla ligação, o que é confirmado no espectro de HMBC, pois esta acopla com os carbonos quaternários C-7 δ em 157,9; C-11 em δ 122,7 e C-12 em δ 174,0 e também com o carbono de um grupo oximetínico em δ 78,3. Verificou-se pelo COSY que a metila H-13 δ 1,90 (t; 1,7 Hz) apresenta acoplamento homoalílico com os hidrogênios H-6a (δ 2,12) e H-8 (δ 4,74), justificando a multiplicidade da metila ser um tripleto. Por fim, constata-se o acoplamento de H-8 com os hidrogênios H-9a e b. Assim pelos dados de HSQC, COSY e HMBC pode-se propor a estrutura da substância pertencente à fração MCL3_pAfD_13, como pode ser visto na FIGURA 4.105, a qual é semelhante ao sesquiterpeno eremofilano cupressolídeo A.

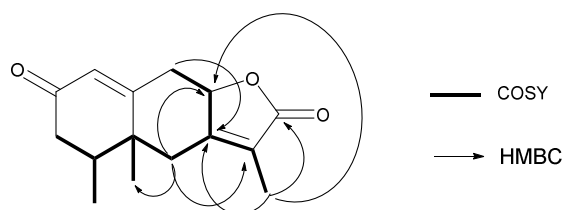


FIGURA 4.105 - Estrutura química proposta para a substância pertencente a fração LSA_MCL3_pAfD_13 e as principais correlações observadas nos experimento de COSY e HMBC

Determinou-se a estereoquímica relativa através do NOE, mostrado na FIGURA 4.106; e do COSY. A irradiação da metila H-15 causou efeito NOE nos hidrogênios da metila H-14 em δ 1,02; no hidrogênio H6b em δ 2,99 e no hidrogênio H-9a, logo estes devem possuir orientação β . Como já mencionado anteriormente, verificou-se o acoplamento homoalílico entre os hidrogênios da metila H-14 com os hidrogênios H-6a em δ 2,12 e H-8 em δ 4,75, o que leva a sugerir um ângulo diedro de 90° para H-6 e H-8 em relação ao carbono olefínico C-7, indicando uma orientação α para H-6a e H-8. A Figura 4.107 apresenta a estrutura de MCL3_pAfD_13 com a estereoquímica relativa.

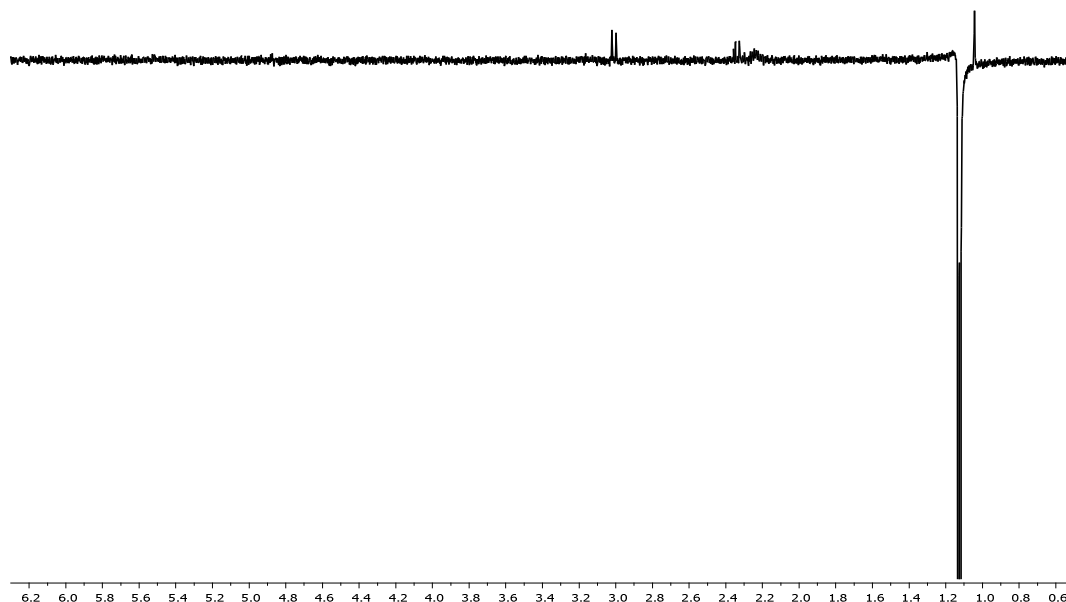


FIGURA 4.106 - Espectro de NOE de LSA_MCL3_pAfD_13; irradiação da metila H-15 em δ 1,10

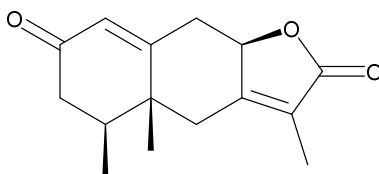


FIGURA 4.107- Estrutura química proposta para a substância da fração MCL3_pAfD_13

A Tabela 4.8 exhibe todas as informações de RMN que permitiram identificar o composto presente na fração MCL3_pAfD_13.

TABELA 4.8 - Dados espectroscópicos de MCL3_pAfD_13

Posição	¹ H (*)	HSQC	COSY	HMBC
1	5,95 (d; 1,4; 1H)	128,5	6, 14	10, 3, 6
2	-	-	-	-
3	2,33 (m)	41,8	14	5, 13
4	2,21 (m)	40,0	3, 15, 6a, 9a,	2, 3, 6, 11, 15
5	-			
6a	2,12 (dl; 14; 1H)	35,1	6b, 8, 13, 14	7, 11, 9, 14
6b	2,99 (d; 14; 1H)		1, 6b, 8, 9b,	3, 7, 8,10, 11, 14
7	-			
8	4,74 (dd; 10,7 e 7,4; 1H)	78,3	6, 9, 13	-
9a	2,37 (m)	40,4	1, 6a, 8, 9b	1, 8, 10
9b	3,12 (dd; 14,2 e 6,7; 1H)		1, 6b, 8, 9a	1, 3, 7, 8, 10
10	-			
11	-			
12	-			
13	1,90 (t; 1,7; 3H)	8,21	6a, 8	7, 8, 11, 14
14	1,02 (s; 3H)	17,0	6a, 10, 15	5, 6, 10
15	1,10 (d; 6,7; 3H)	15,1	4, 14	2, 3

Vale mencionar que, de acordo com pesquisa bibliográfica na base de dados Science Finder a estrutura proposta para MCL3_pAfD_13 é inédita.

Análise por LC-HRMS, ilustrada na FIGURA 4.108, mostrou que NICL3 além de produzir sesquiterpenos eremofilanos e isocumarinas, produz uma mistura de dois compostos isoméricos de íon molecular protonado de m/z 524,3741 e m/z 524,3747.

Para obtenção de informação estrutural promoveu-se o experimento de íons produtos de ambos os compostos, como pode ser observado na FIGURA 4.109. No espectro de íon produtos observam-se perdas de 17 e 28 Da, correspondente a perdas de amônia e monóxido de carbono. Ademais, notam-se perdas de 113, 71 e 99 Da, as quais são características dos aminoácidos leucina/isoleucina, alanina e valina, respectivamente. Além disso, verificou-se a presença do íon de m/z 86,0970 referente ao íon imônio da leucina/isoleucina.

De acordo com os dados de espectrometria de massas, inferiu-se que NICL3, também é produtor de peptídeos, os quais devem possuir a fórmula molecular $C_{27}H_{49}N_5O_5$, correspondente a seis graus de insaturação. Logo, como os compostos devem possuir cinco ligações peptídicas, para satisfazer o grau de insaturação indicado, o composto deve ser cíclico.

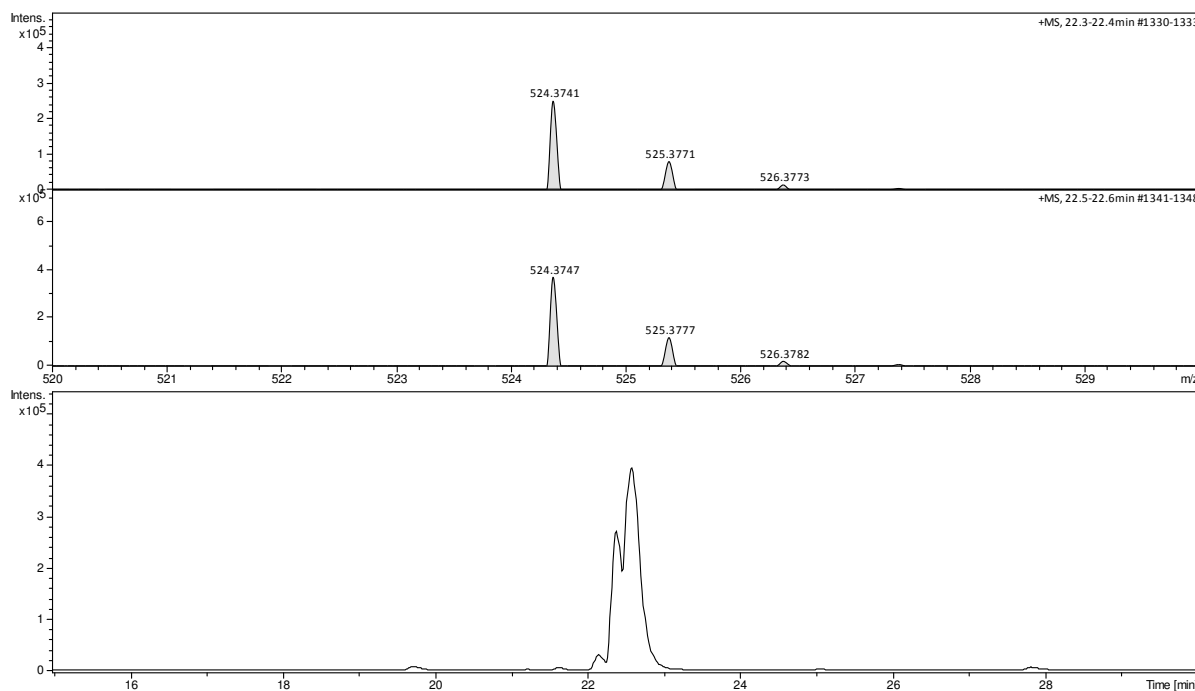


FIGURA 4.108 - (A) Cromatograma de íons totais da fração MCL3_pAfDA_22. Espectros de massas *full scan* referente ao pico: (B) em 22,4 e (C) 22,5 min

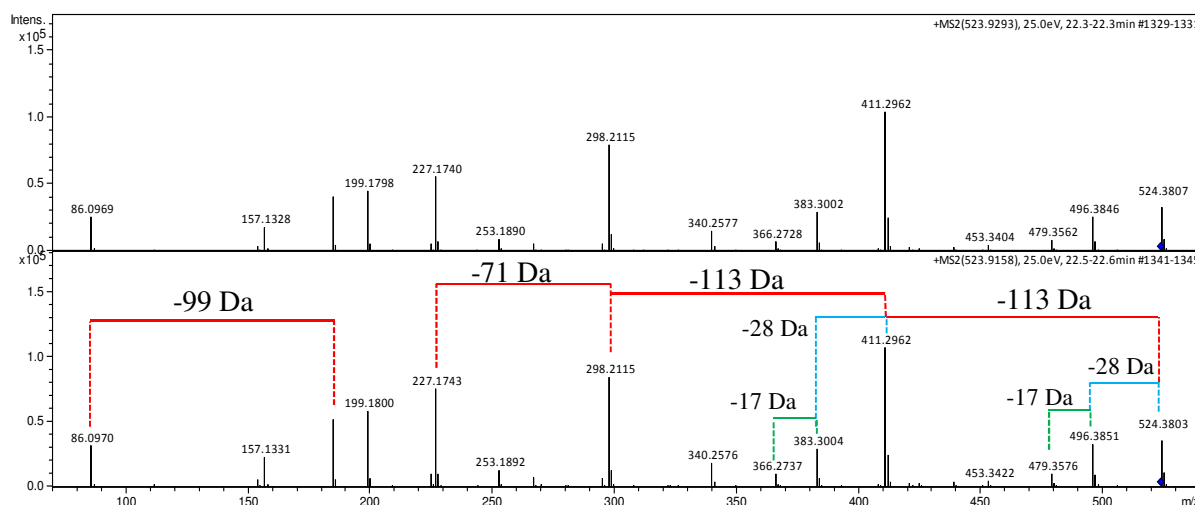


FIGURA 4.109 - Espectro de íons produtos de m/z 534

Diante das informações obtidas por espectrometria de massas tem-se que o fungo N1CL3 produziu um peptídeo cíclico. Para identificar o composto produzido, foram realizados experimentos de RMN de uma e duas dimensões, no entanto, houve a necessidade de solubilizar a amostra em uma mistura de MeOH e ácido trifluoroacético, pois se observou a adsorção desta com a superfície do frasco de vidro, evidenciando uma interação forte com o sódio.

Observou-se no espectro de ^1H RMN, mostrado na FIGURA 4.110, a presença de quatro hidrogênios com deslocamento químico característico de H em posição α carbonila em δ 4,50; 4,49; 4,30; 3,99. Pelo COSY (FIGURA 4.111) observou-se o acoplamento de um sinal encoberto em 3,95 com um hidrogênio em δ 1,83 e, este por sua vez acopla com duas metilas, desta forma, o sinal encoberto deve ser o quinto hidrogênio α carbonila. Notou-se ainda no espectro de ^1H RMN a presença de uma metila desblindada em δ 2,03, a qual deve estar ligada a um grupo retirador de elétrons como o nitrogênio.

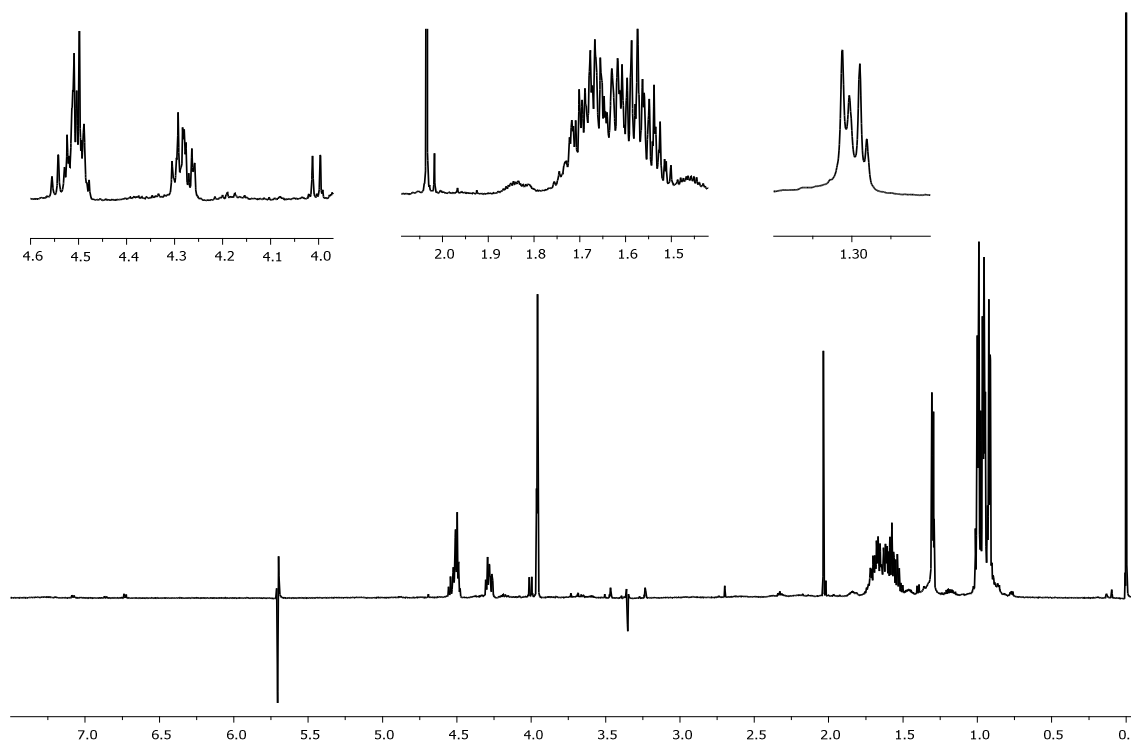


FIGURA 4.110 – Espectro de RMN de hidrogênio da fração MCL3_pAfDA_22

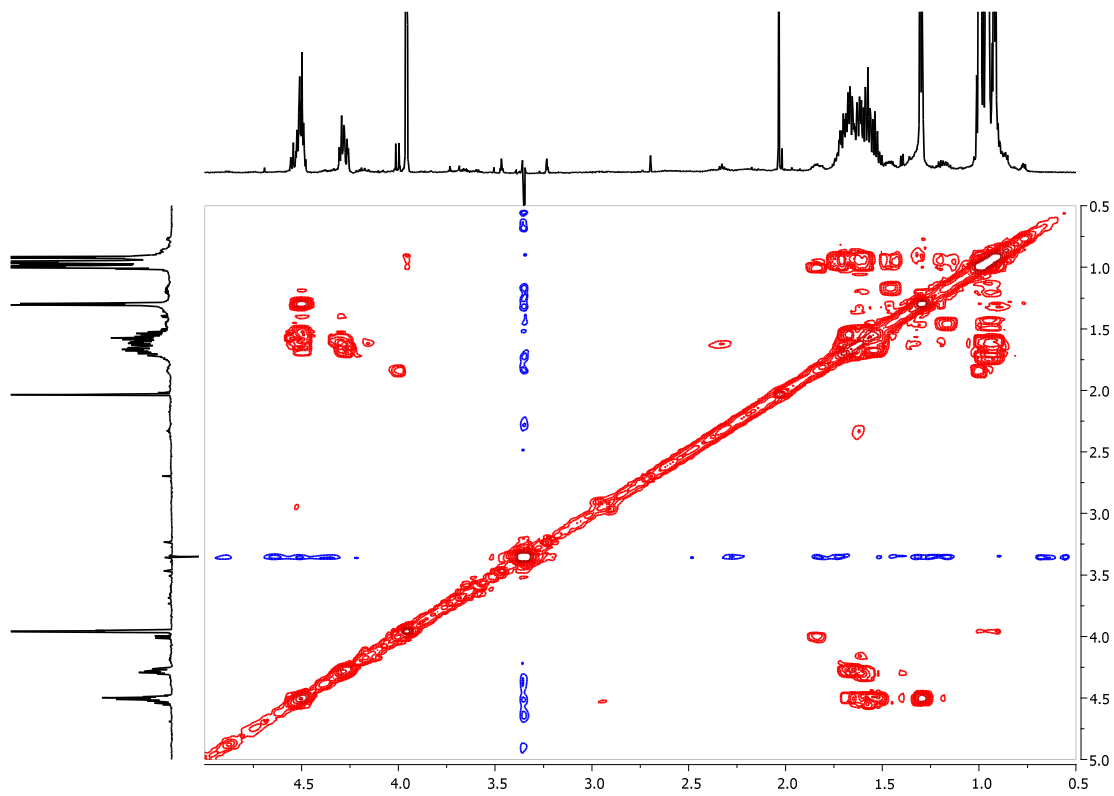


FIGURA 4.111 - Espectro de COSY da fração MCL3_pAfDA_22

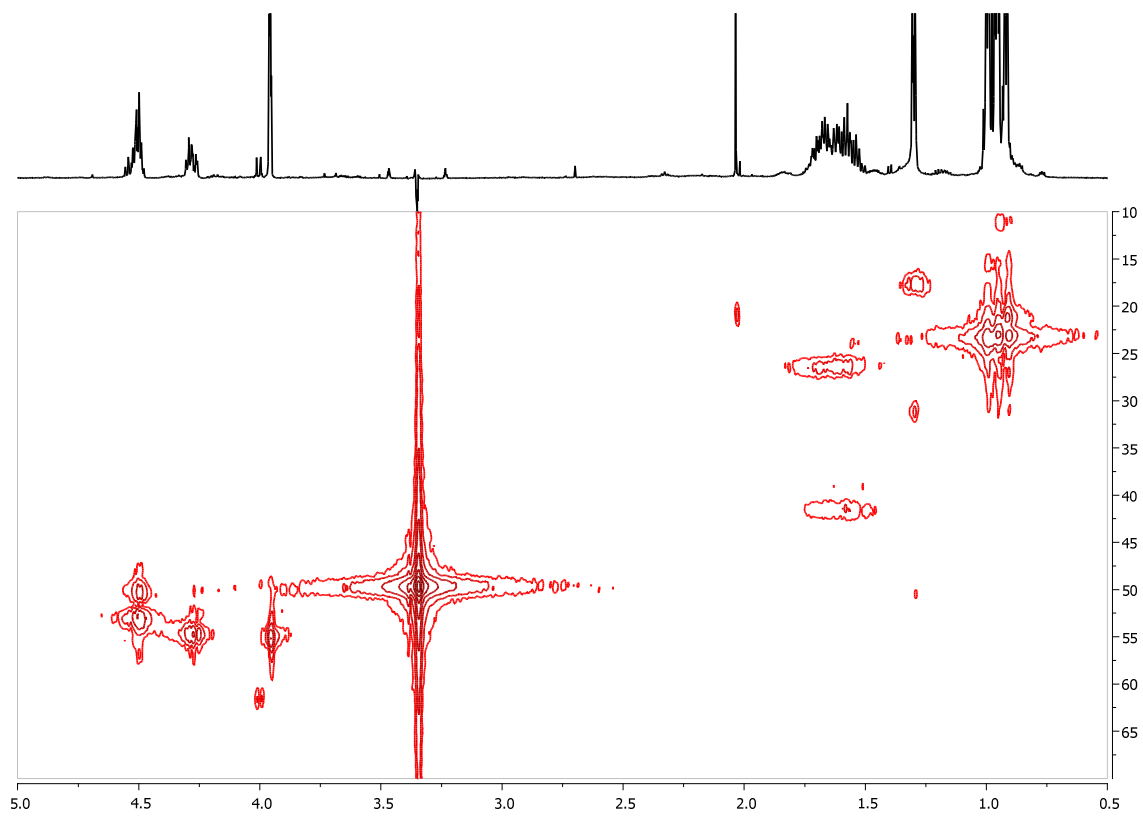


FIGURA 4.112 - Espectro de HSQC da fração MCL3_pAfDA_22

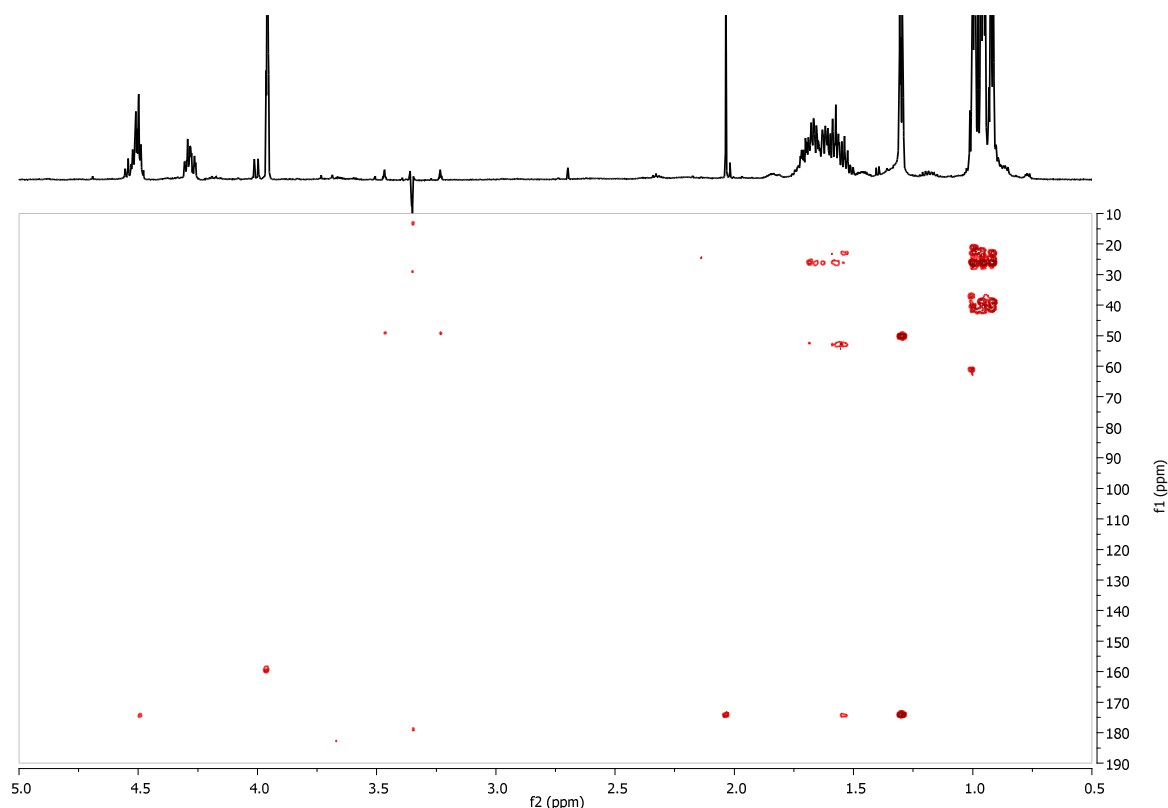


FIGURA 4.113 Espectro de HMBC da fração MCL3_pAfDA_22

O hidrogênio em posição α carbonila, com deslocamento químico δ 4,50 (m) apresenta correlação no COSY com o dubleto referente a uma metila em δ 1,30 (d; 6,7 Hz). A metila por sua vez acopla no espectro de HMBC, ilustrado na FIGURA 4.113, com o carbono em δ 50,13 característico de carbono α carbonila e com o carbono carboxílico em δ 170,0. Deste modo, caracterizou-se o resíduo do aminoácido alanina. A FIGURA 4.114A representa as principais correlações que permitiram identificar a porção da alanina.

Pelo espectro de COSY verificou-se o acoplamento do hidrogênio em δ 3,95 com o hidrogênio de um grupo metínico em δ 1,83 e, este correlacionou-se com dois hidrogênios metílicos em δ 1,00 e 0,94, caracterizando a presença de um grupo isopropil. Verificou-se também no espectro de HMBC a correlação da metila em δ 1,00 com o carbono em δ 61,2 e, assim, caracterizando a presença do resíduo do aminoácido valina, como indica a FIGURA 4.114B.

A análise do COSY, HSQC e HMBC referentes aos três resíduos de aminoácidos remanescentes revelou estruturas muito semelhantes, indicando a

possibilidade da presença dos aminoácidos isoméricos leucina/isoleucina. No entanto, a presença do sinal em δ 2,03 indica um aminoácido N-metilado. Através das correlações no HMBC, observou-se a correlação dos hidrogênios metilênicos do multipletto em δ 1,78-1,48 com o carbono da metila em δ 30,0, o que permitiu constatar a presença da N-metil leucina. As correlações a longa distância entre os hidrogênios das metilas com os carbonos $C\beta$ e $C\gamma$ caracterizaram o grupo isobutil, indicando, desta forma a presença de duas unidades de leucina. A FIGURA 4.114C, D e E, representam as correlações observadas que permitiram identificar os resíduos de N-metil leucina, e duas leucinas.

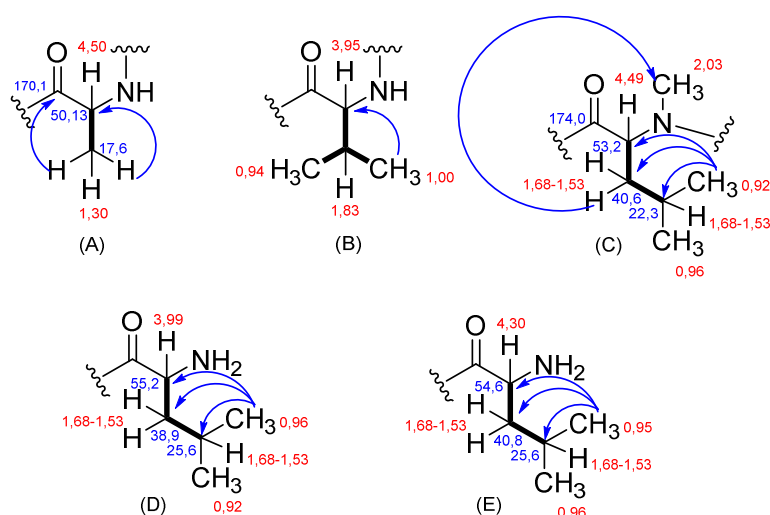


FIGURA 4.114 - Correlações observadas nos experimentos de RMN de duas dimensões (setas azuis HMBC/ ligação em negrito COSY)

Como no espectro de HMBC as informações a respeito das correlações dos hidrogênios em posição α carbonila são extremamente pobres em relação aos carbonos carboxílicos, determinou-se a sequencia de aminoácidos com base no espectro de íons produtos, de acordo com as perdas dos resíduos de aminoácidos. Logo, propôs-se que o peptídeo cíclico é formado por Leu-Leu-Ala-NMetil Leu-Val, como pode ser visto na FIGURA 4.115.

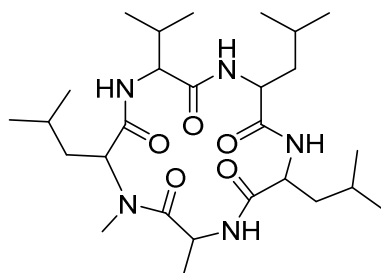


FIGURA 4.115 - Estrutura química proposta para o composto presente na fração MCL3_pAfDA_22

Estabeleceu-se uma proposta de fragmentação para justificar os íons observados no espectro de íons produtos do composto MCL3_pAfDA_22. De acordo com a FIGURA 4.116, tem-se a protonação do nitrogênio da leucina vizinho ao resíduo da valina, produzindo o íon de m/z 524. A abertura do ciclo decorre da conjugação do par de elétrons não ligantes do oxigênio carboxílico da leucina e, conseqüentemente estabilização da carga positiva do nitrogênio. O ataque do par de elétrons do nitrogênio ao carbono carboxílico mostrado no caminho (a) leva a perda de 113 Da, equivalente a leucina, e resultando na formação do íon de m/z 411,2962; o qual ao perder CO gera o íon de m/z 383,3004. Já o ataque do par de elétrons no carbono carboxílico, evidenciado no caminho (b), produz m/z 298,2115; sendo que o ataque do par de elétrons do nitrogênio da alanina ao carbono carboxílico mais próximo leva a formação de m/z 227,1740; a qual perdendo uma molécula de CO, gera o íon de m/z 199,1798. Por fim a perda sequencial dos aminoácidos a partir da porção C-terminal até o resíduo final de leucina leva a formação do íon imônio do referido aminoácido de m/z 89,0969.

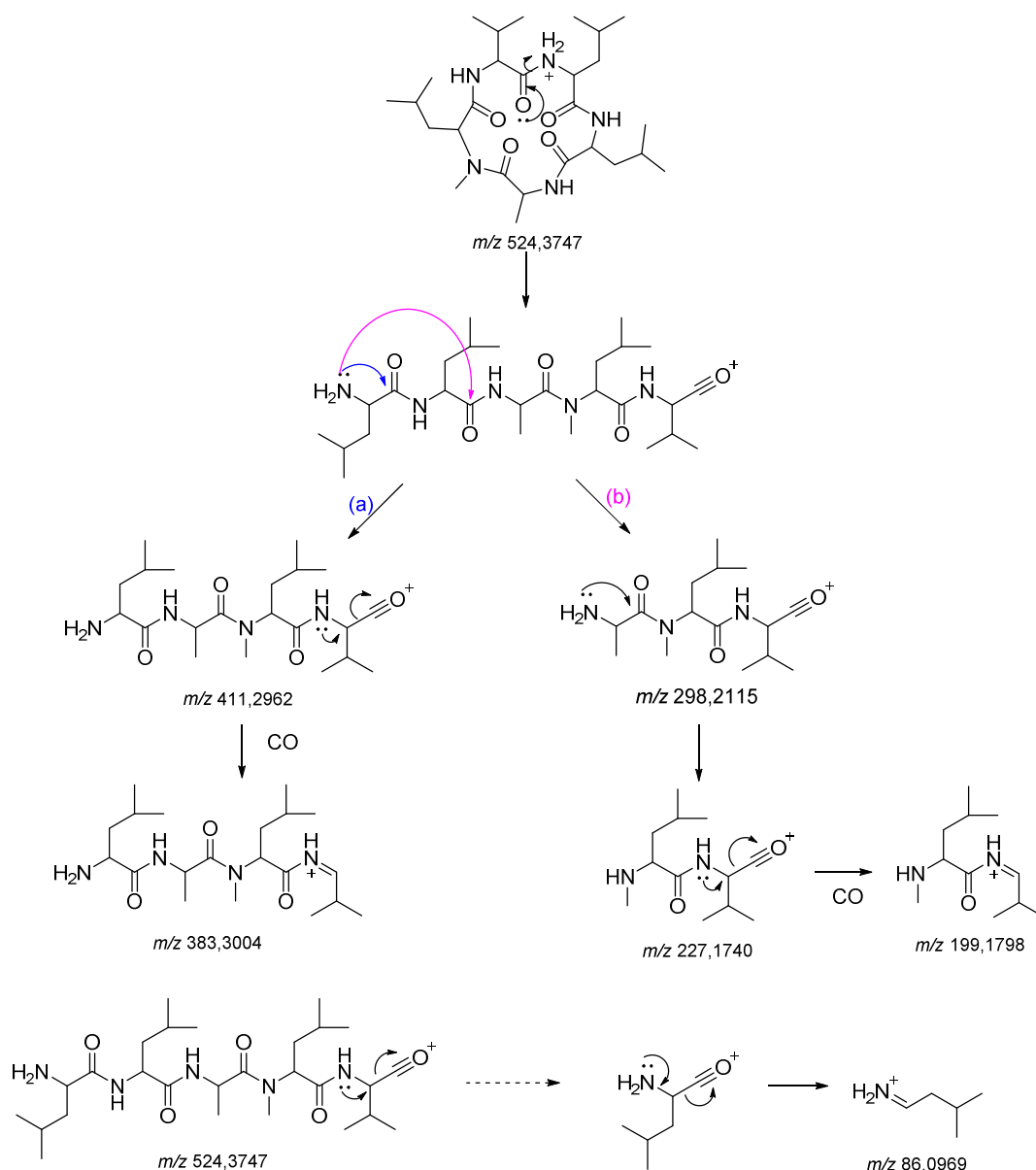


FIGURA 4.116 - Proposta de fragmentação para os compostos presentes na fração MCL3_pAfDA_22

Nenhum dos metabólitos produzidos por NICL3 inibiram a atividade da enzima acetilcolinaesterase.

4.5 Estudo do perfil das biomoléculas dos fungos do gênero *Xylaria* por MALDI-TOF

Estudos prévios de identificação de micro-organismos por espectrometria de massas, especialmente no caso de células fúngicas, mostram

que, a obtenção da informação e reprodutibilidade por MALDI TOF são pré-requisitos essenciais para o sucesso da classificação e identificação das espécies estudadas. Vários parâmetros influenciam na aquisição dos dados, sejam eles característicos da técnica, como a escolha da matriz, solvente, co-cristalização do sistema matriz/amostra, ou relacionados ao pré-tratamento da amostra fúngica, como meio de cultura, idade do cultivo, dentre outros. Dessa forma, nas sessões seguintes são mostrados os fatores dependentes da técnica e do pré-tratamento da amostra que foram avaliados na tentativa de se traçar um perfil das biomoléculas que pudesse diferenciar as espécies de fungos do gênero *Xylaria*.

4.5.1 Escolha da matriz, técnica de co-cristalização e amostragem fúngica

A espectrometria de massas por MALDI-TOF consiste em submeter uma amostra coberta com uma matriz absorvente de radiação UV. A matriz transfere a energia proveniente de uma fonte de laser de N₂ pulsada para as moléculas da amostra, promovendo uma ionização branda. Existe uma grande diversidade de matrizes e a escolha da matriz adequada é um fator crucial para a identificação de micro-organismos por MALDI-TOF. Dessa forma, a matriz deve fornecer uma boa razão sinal/ruído, picos finos e pouca supressão de sinal.

As escolhas da matriz, da forma de co-cristalização da amostra/matriz e amostragem fúngica foram baseadas no procedimento de extração de biomoléculas de acordo com o protocolo A, uma vez que, o uso do micro-organismo intacto se mostrou limitado, pois observou-se a deformação ou duplicação dos picos, a qual pode estar diretamente relacionada com a superfície da amostra/matriz devido, a dificuldade de depositar o micélio fúngico de forma uniforme sobre o *target*, como pode ser visto na FIGURA 4.117.

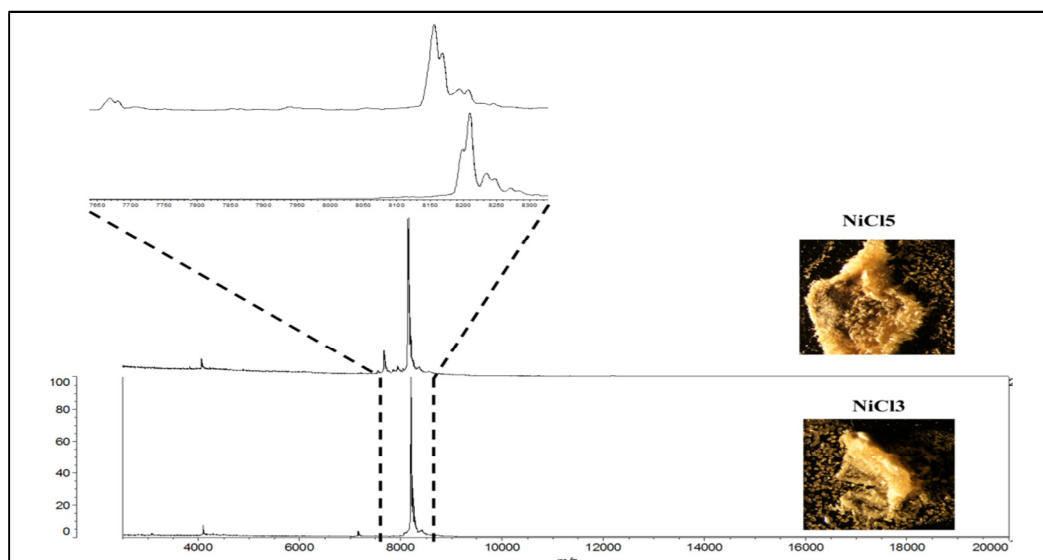


FIGURA 4.117 - Imagem microscópica do *spot* micélio/matriz e espectro de massa de NiCl₃ e NiCl₅ respectivamente. As linhas tracejadas evidenciam a deformidade dos picos quando o espectro de massas é gerado utilizando o micro-organismo intacto. Solução de matriz 30 mg SA dissolvidos em 1 mL ACN:0.1% TFA (7:3)

Independente da técnica de co-cristalização do sistema amostra/matriz e do procedimento de extração biomoléculas, a matriz DHB não forneceu bons resultados, uma vez que, o espectro de massa gerado foi extremamente ruidoso e pobre em informação, além da cristalização ocorrer de forma dispersa, impedindo, dessa forma, a aquisição automática dos dados (FIG. 4.118).

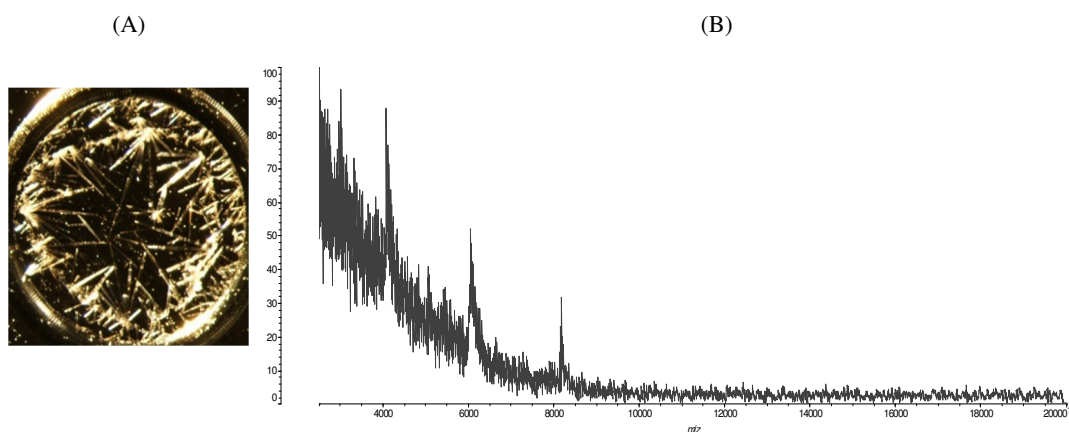


FIGURA 4.118 - (A) imagem microscópica do *spot* da matriz/amostra usando 10 mg DHB dissolvido em 1 mL ACN:0.1%TFA (7:3), (B) espectro de massas de NiCl₅

Avaliou-se, tomando-se como base os espectros de massas obtidos para o fungo N1CL5, a matriz e sua concentração, bem como a técnica de co-cristalização (*dried droplet*, *thin layer*, *sandwich* e *volume technique*), conforme pode ser visto nas FIGURAS 4.119-121.

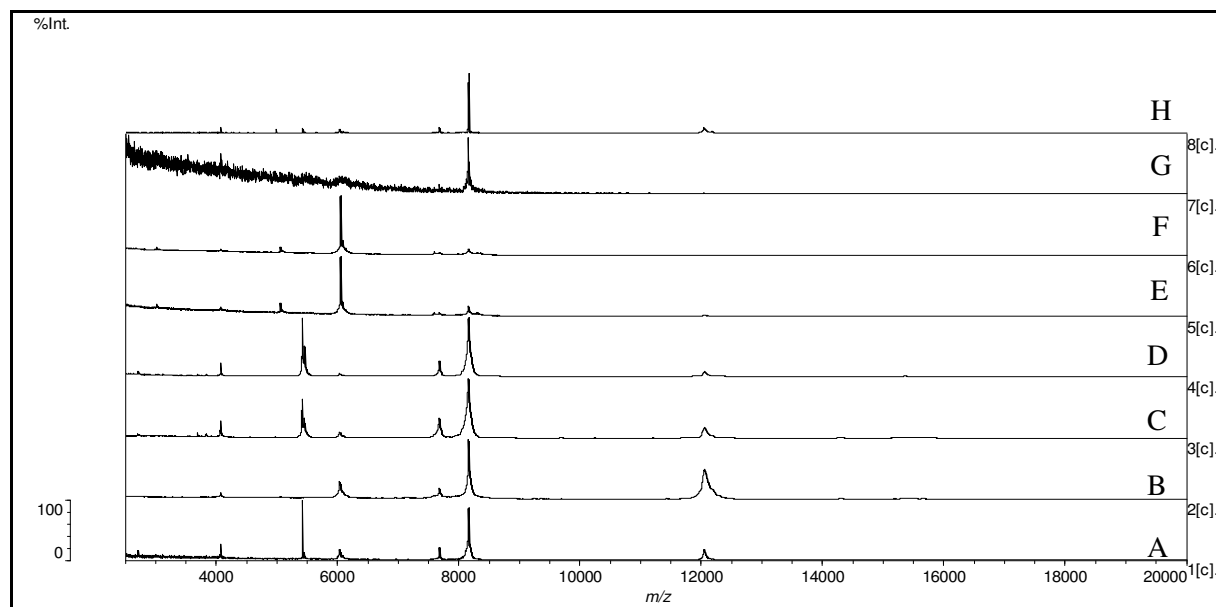


FIGURA 4.119 - Espectro de massas de N1CL5 gerado utilizando a matriz CHCA nas concentrações de 6 e 10 mg/mL, respectivamente, e a técnica de co-cristalização da matriz/amostra: (A) e (B) *dried droplet*, (C) e (D) *sandwich*, (E) e (F) *thin layer*, (G) e (H) *volume technique*

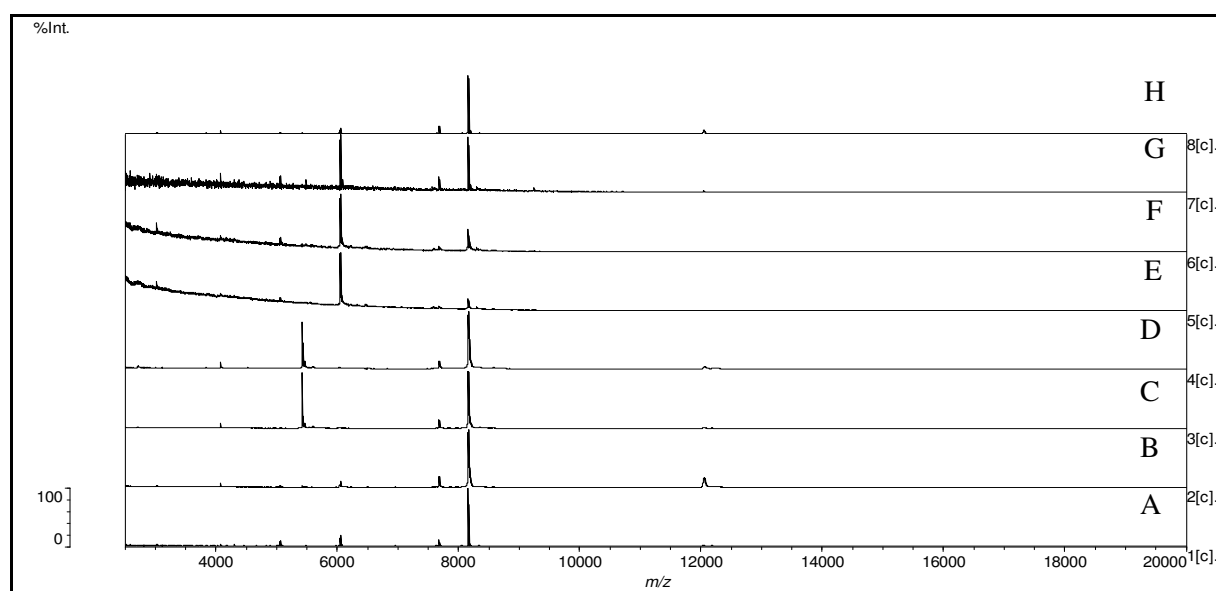


FIGURA 4.120 - Espectro de massas de N1CL5 adquirido utilizando a matriz FA nas concentrações de 10 e 30 mg/mL, respectivamente, e a técnica de co-cristalização da matriz/amostra: (A) e (B) *dried droplet*, (C) e (D) *sandwich*, (E) e (F) *thin layer*, (G) e (H) *volume technique*

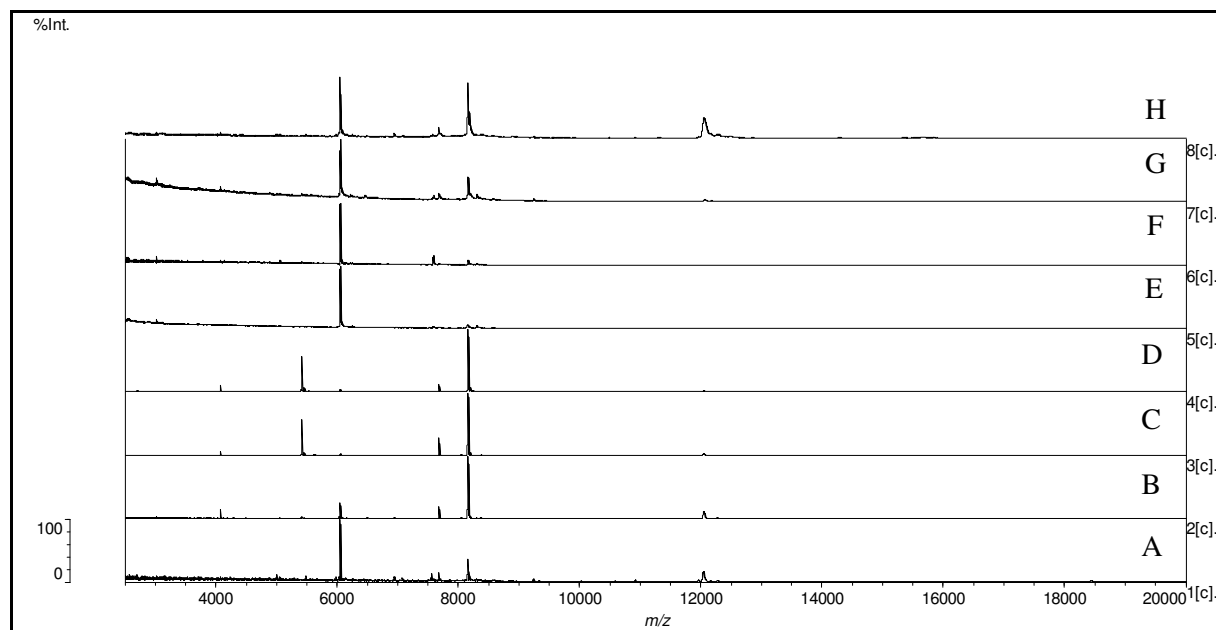


FIGURA 4.121 - Espectro de massas de NICL5 produzido a partir a matriz SA nas concentrações de 10 e 30 mg/mL, respectivamente, e a técnica de co-cristalização da matriz/amostra: (A) e (B) *dried droplet*, (C) e (D) *sandwich*, (E) e (F) *thin layer*, (G) e (H) *volume technique*

Os espectros de massas produzidos para NICL5 utilizando-se a matriz CHCA apresentaram, independente da técnica de co-cristalização, picos largos, no entanto, as técnicas de deposição da amostra *dried droplet* e *sandwich* levaram a espectros mais informativos, uma vez que, foi possível observar maior número de picos. Já as técnicas *thin layer* e *volume technique* produziram espectros muito ruidosos.

Com a matriz FA espectros de melhor qualidade foram produzidos empregando-se a técnica de co-cristalização *sandwich* independentemente da concentração da matriz. Novamente as técnicas *thin layer* e *volume technique* geraram espectros de massas de baixa qualidade.

Verificou-se a existência de uma tendência, dado que novamente, os espectros de massas originados através da co-cristalização *sandwich* também foram os mais informativos quando se empregou a matriz SA. Porém com a matriz na concentração de 30 mg/mL os picos ficaram mais finos, logo a qualidade da informação produzida foi melhor. Desta forma, escolheu-se a

matriz SA na concentração de 30 mg/mL como a matriz para o desenvolvimento deste trabalho. Alguns estudos de identificação de micro-organismos por MALDI-TOF apontam a matriz SA como preferida, devido a melhor capacidade de ionização de compostos de maior faixa de massa, produzir espectros com picos mais intensos e com melhor razão sinal-ruído, além de gerar picos finos (MOURA et al., 2008, OCHOA e HARRINGTON, 2005 e RAMIREZ e FENSELAU, 2001).

Outro fator bastante interessante e que deve ser levado em consideração, é a região do cultivo, da qual o micélio fúngico deve ser retirado quando este é cultivado em meio sólido, pois o crescimento micelial apresenta diferentes zonas que correspondem a diferentes idades ou estágios de desenvolvimento. Para verificar a ocorrência de alguma modificação no perfil das biomoléculas dos micro-organismos estudados, avaliou-se três regiões distintas que correspondem a diferentes estágios de crescimento, como pode ser visto na FIGURA 4.122.

Pode-se constatar que o íon de m/z 8164 é comum a todas as regiões da placa, no entanto, a parte correspondente ao centro da massa micelial forneceu maior número de íons em comparação aos demais, ou seja, a região central, parte em que o fungo apresenta um desenvolvimento mais avançado, forneceu os íons de m/z 5420; 6027; 8269 e 12059.

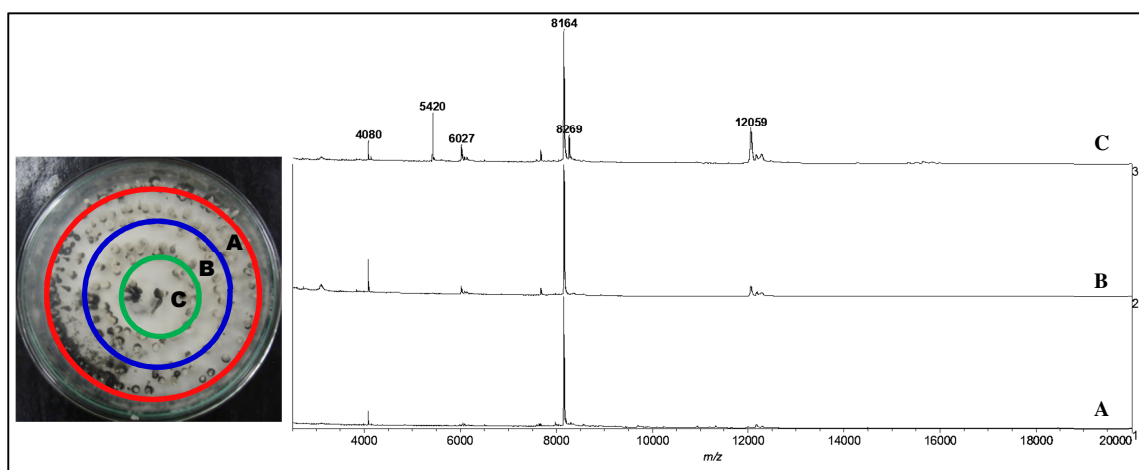


FIGURA 4.122 - Placa de Petri com o fungo endofítico NICL5 dividido em três diferentes regiões e respectivos espectros de massas

Para que a amostragem fosse o mais homogênea possível, estabeleceu-se que os três estágios de desenvolvimento fúngico seriam adotados, sendo o micélio retirado do meio de cultura conforme mostra a FIGURA 4.123.

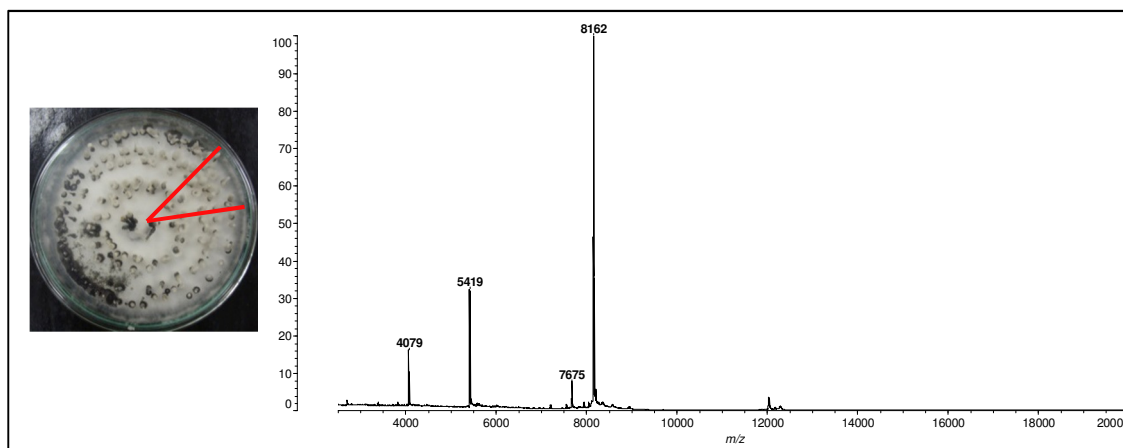


FIGURA 4.123 - Representação da região micelial estabelecida para todas as análises seguintes e espectro de massas de N1CL5 corresponde a esta região

4.5.2 Análise por MALDI-TOF dos fungos do gênero *Xylaria*, isolados como endofíticos de *Cupressus lusitanica*

O estudo da diferenciação do perfil de biomoléculas de fungos endofíticos da família Xylariaceae, isolados de *Cupressus lusitanica*, por MALDI-TOF, foi realizado durante o estágio sanduíche no exterior, junto ao grupo do Prof. Dr. Günter Allmaier na Universidade de Tecnologia de Viena (Áustria).

A diferenciação e identificação de bactérias por espectrometria de massas de células intactas empregando MALDI-TOF já é algo bem estabelecido, no entanto, ainda existem inúmeros desafios para a consolidação desta técnica visando à identificação de fungos filamentosos, uma vez que, a composição química da parede celular fúngica dificulta a aquisição e análise dos dados gerados. A constituição da parede celular dos ascomicetos e basidiomicetos é de cerca de 90% de polissacarídeos, lipídeos, polifosfatos, sais inorgânicos e proteínas, e, devido a complexidade desta, acredita-se que a porcentagem de

biomoléculas ionizadas compreende em sua grande maioria de polissacarídeos e proteínas de superfície. O estudo proteômico tem se mostrado um aliado da técnica de identificação de micro-organismos por espectrometria de massas, pois este vem a confirmar que, majoritariamente, os íons observados são referentes a proteínas.

É importante relatar que ainda não foi reportado nenhum estudo proteômico de fungos do gênero *Xylaria* e, conseqüentemente, não se pode afirmar que os íons observados nos espectros de massas compreendem peptídeos e/ou proteínas, sendo assim, o presente trabalho consiste em traçar um perfil de biomoléculas espécie-específica que seja capaz de diferenciar um micro-organismo do outro.

Uma vez decidido a matriz, a concentração desta, bem como, a forma de deposição da amostra-matriz, foi dado seqüência aos experimentos avaliando-se diferentes protocolos de extração das biomoléculas fúngicas a fim de verificar quais deles produziria o maior número de íons biomarcadores.

O protocolo de extração A consistiu em expor as células do micro-organismo a uma solução de ácido fórmico 70%, a qual deve causar algum dano na parede celular fúngica e, conseqüentemente, auxiliar na extração dos biomarcadores. O protocolo A originalmente foi reportado para análise da bactéria *Staphylococcus aureus*, sendo o micro-organismo exposto ao extrator pelo período de 6 minutos (SZABADOS et al., 2010). Diferentemente das bactérias, os fungos apresentam parede celular rígida, o que dificulta a obtenção de íons biomarcadores, sendo assim, foram avaliados o tempo de exposição do micro-organismo a solução extratora das biomoléculas, bem como o efeito do uso do banho de ultrassom.

Ao avaliar N1CL3 verificou-se que, independente do tempo de exposição ao extrator e do efeito da sonicação, os espectros de massas da FIGURA 4.124 apresentaram o mesmo perfil, ou seja, a parede celular fúngica

não deve ter sido afetada e, somente as biomoléculas extra celulares foram ionizadas.

Ao se observar os espectros verificam-se a presença majoritária de apenas dois íons, m/z 8210 e m/z 4104, sendo o de maior relação massa carga a espécie monocarregada. No entanto, se os espectros forem divididos em três partes, pôde-se verificar a ocorrência de outros íons com menor intensidade, como pode ser visto na FIGURA 4.125. Mais uma vez constata-se que a exposição do micro-organismo ao extrator em diferentes tempos não intensificou a extração das biomoléculas. A FIGURA 4.125A mostra uma região no espectro de massa bastante ruidosa, no entanto, verificou-se, na área pontilhada das FIGURAS 4.125A e B, a presença de espécies duplamente carregadas, os quais correspondem aos íons de m/z 8080; 7873; 7629. Na região compreendida entre m/z 12000 e 16500 constatou-se a presença de íons de m/z 12119; 12197; 12324; 15420; 15581 e 16412.

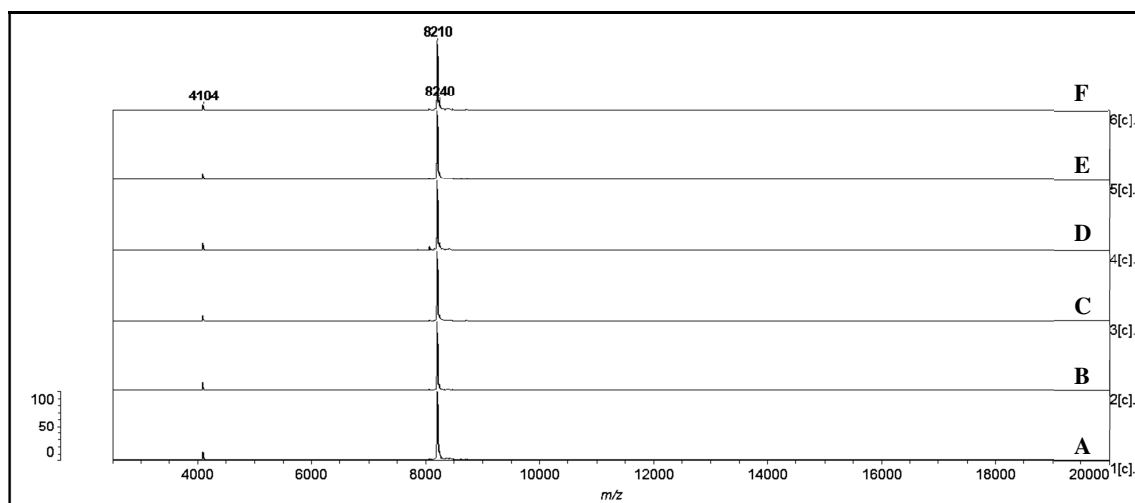


FIGURA 4.124 - Espectros de massas de N1CL5 quando exposto ao protocolo A empregando diferentes tempos de extração com e sem sonicação: (A) extração por 10 min, (B) extração por 10 min com sonicação, (C) extração por 20 min, (D) extração por 20 min com sonicação, (E) extração por 30 min, (F) extração por 30 min com sonicação

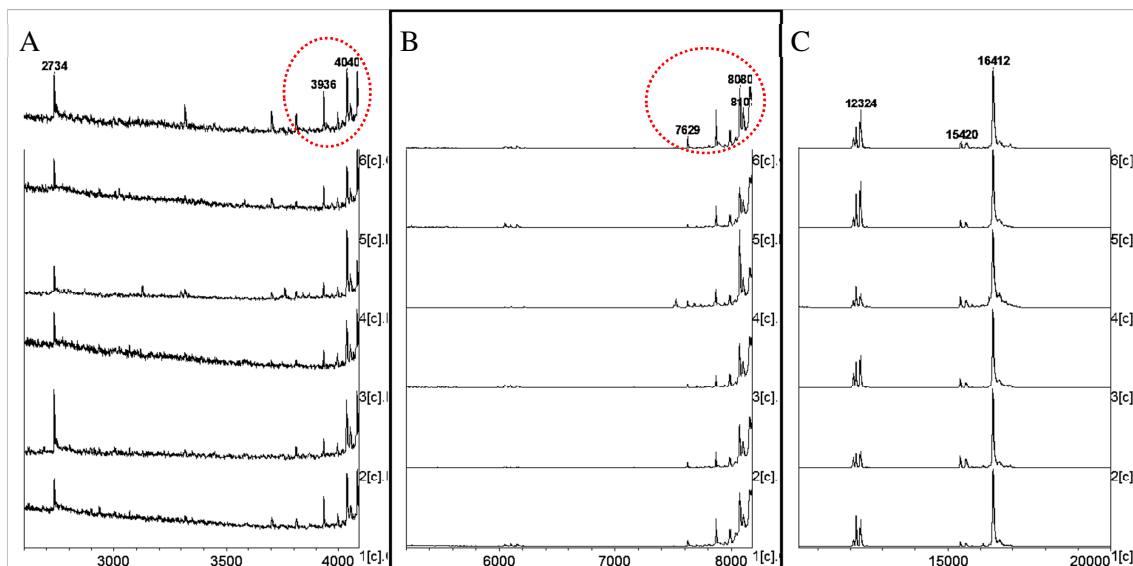


FIGURA 4.125 - Ampliação dos espectros de massas de NICL3 obtidos através do protocolo A: (A) região de m/z 2600-4100; (B) região de m/z 5200-8100; (C) região de m/z 10400-20000

Nos espectros de massas de NICL5 (Fig. 4.126), também obtidos através do protocolo A, observou-se uma maior quantidade de picos em relação ao fungo NICL3. A utilização de sonicação, bem como, diferentes tempos de extração não influenciaram no aumento da quantidade de sinais, dessa forma, estes íons devem ser referentes a biomoléculas superficiais do micro-organismo. Apesar da presença dos íons de m/z 7679 e 5422, verificou-se um perfil espectral semelhante ao observado para NICL3 devido a presença do íon de m/z 8166 e de sua correspondente espécie duplamente carregada (m/z 4082), podendo este íon ser um biomarcador espécie-específico. Ao se dividir os espectros de massas em três regiões, como pode ser visto na FIG. 4.127, verificam-se outros íons com menor intensidade. A região de massa compreendida entre m/z 2600 a 4063, Fig. 4.127A, apresenta-se muito ruidosa e pouco informativa. Quando se analisa a região entre m/z 5200 a 8148, verificam-se, além de m/z 5422 e 7679, os íons de m/z 7950; 8065. Na região de massa mais elevada observa-se a presença dos íons de m/z 12055; 12187; 12291; 15660; 15827 e 16328, os quais parecem ser influenciados pelo tempo de extração e pela sonicação, pois verificou-se a

diminuição da intensidade destes quando o micro-organismo foi exposto ao agente extrator por 30 minutos com sonicação.

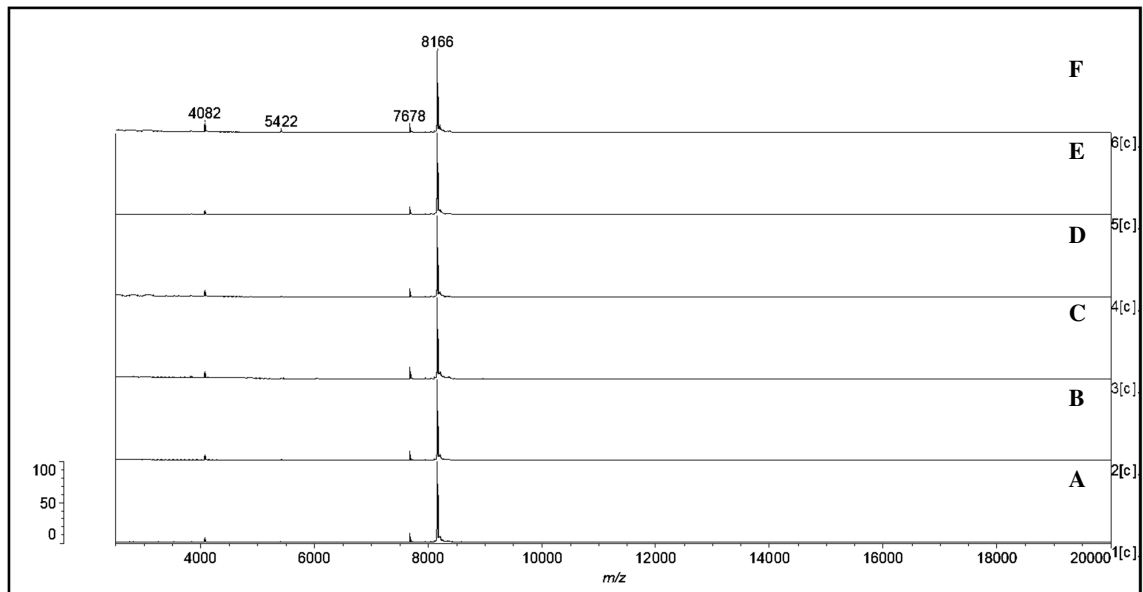


FIGURA 4.126 - Espectros de massas de NICL5 quando exposto ao protocolo A empregando diferentes tempos de extração com e sem sonicação: (A) extração por 10 min, (B) extração por 10 min com sonicação, (C) extração por 20 min, (D) extração por 20 min com sonicação, (E) extração por 30 min, (F) extração por 30 min com sonicação

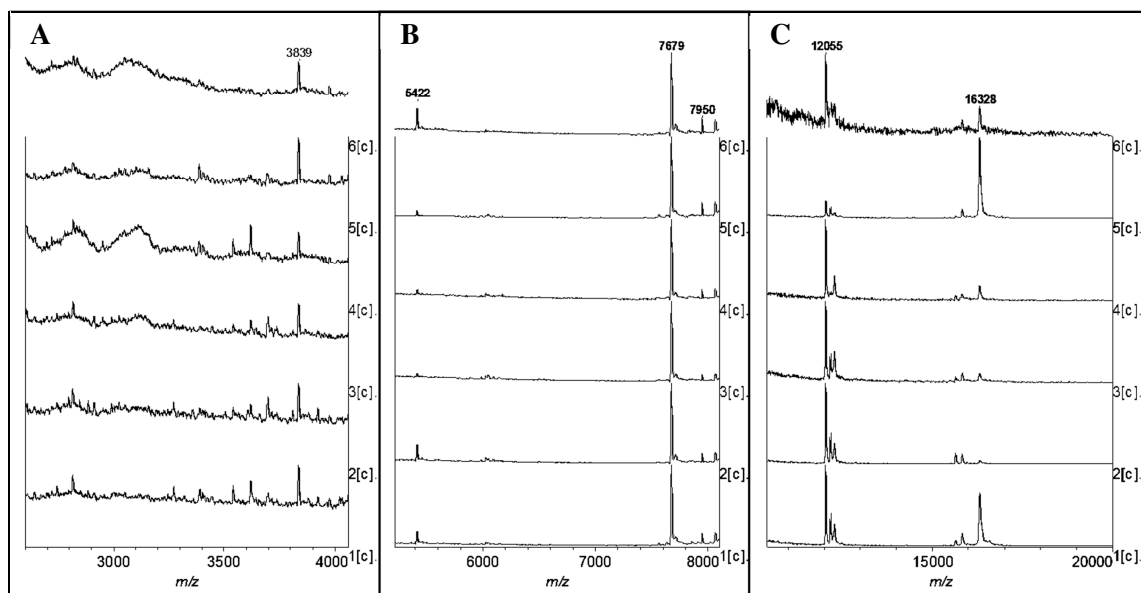


FIGURA 4.127 - Ampliação dos espectros de massas de NICL5 obtidos através do protocolo A de extração: (A) região de m/z 2600-4059; (B) região de m/z 5200-8099; (C) região de m/z 10400-20000

Os micro-organismos também foram cultivados nos demais meios de cultivo e avaliados de acordo com o protocolo A, no entanto, os melhores resultados foram obtidos usando o meio de cultura BDA.

Outro protocolo de extração avaliado consistiu em submeter às células fúngicas a um ambiente básico através do uso de uma solução aquosa de bicarbonato de amônio (protocolo B), em três diferentes valores de pH, 7,5; 8,0 e 8,5 com tempo de exposição do micro-organismo de 10 minutos. A FIGURA 4.128 mostra os espectros de massas de NICK3 e NICK5 obtidos através deste protocolo.

A extração das biomoléculas a pH 8 mostrou-se mais informativa, uma vez que, pode-se observar o aumento na quantidade de íons nos espectros de massas tanto de NICK3 como de NICK5, como pode ser visto na FIGURA 4.128. A FIGURA 4.129 mostra uma aproximação em três distintas regiões dos espectros de massas e, nestas aproximações pode-se constatar que para ambos os fungos a extração a pH 8 fornece espectros de massas com maior informação, visto que para NICK3 observa-se os íons de m/z 3749; 3712; 3589; 3515. No caso de NICK5 a principal diferença ocorre na região de massa mais elevada, devido a presença do íon de m/z 12901.

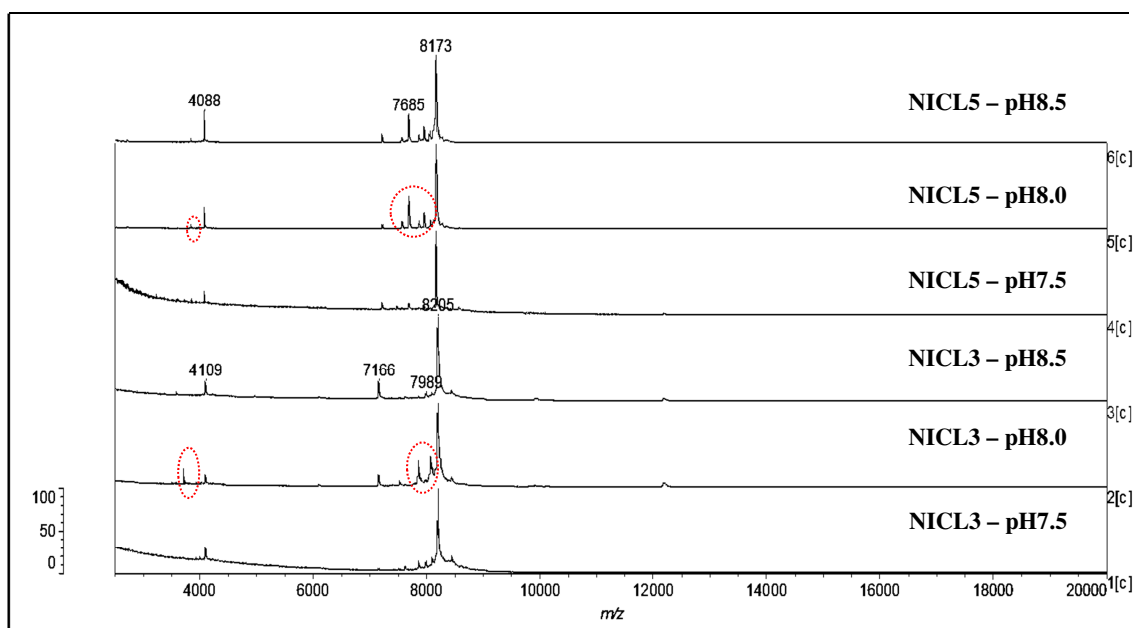


FIGURA 4.128 - Espectros de massas de NICK3 e NICK5 obtidos através do protocolo B em pH 7,5; 8,0 e 8,5

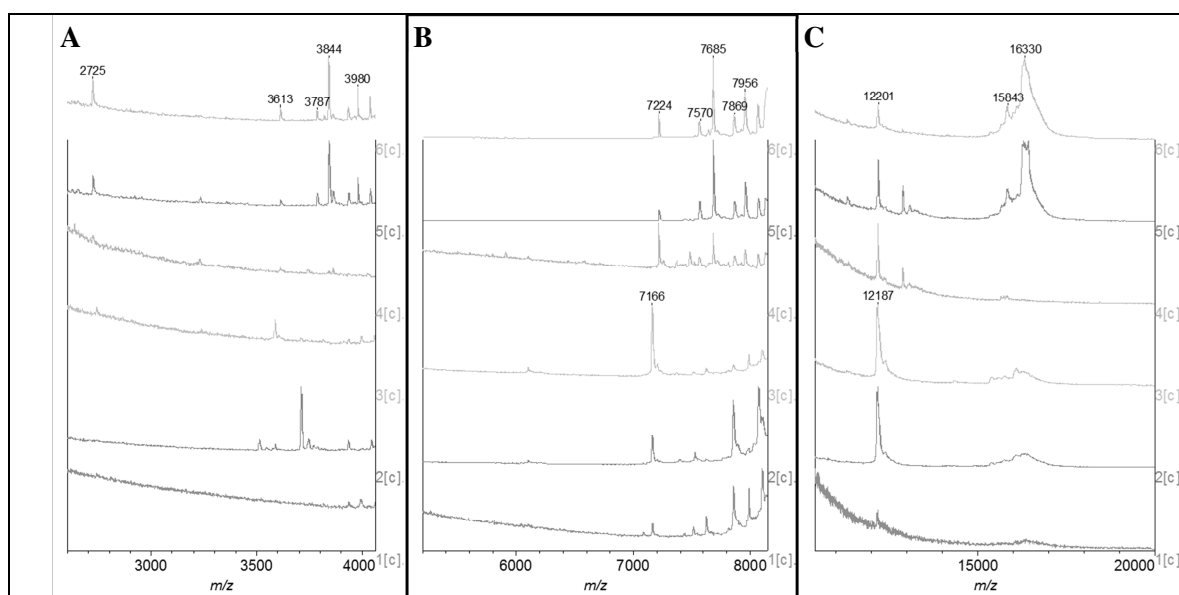


FIGURA 4.129 - Ampliação dos espectros de massas de NICL3 e NICL5 obtidos através do protocolo B de extração: (A) região de m/z 2600-4059; (B) região de m/z 5200-8099; (C) região de m/z 10400-20000

Assim como no caso do protocolo A, o protocolo B foi reportado para análise das bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus thuringiensis* (WANG et al., 1998). A fim de verificar a influência do tempo e da sonicação na extração das biomoléculas, os fungos foram submetidos à extração básica empregando pH 8 em três tempos diferentes; 10, 20 e 30 minutos com e sem sonicação.

Aparentemente não houve influência do tempo de extração e da sonicação para a geração de informação das biomoléculas de NICL3 cultivado em meio BDA, como pode ser observado na FIGURA 4.130A. No entanto, ao limitar os espectros em uma faixa de massa menor, como mostrado na ampliação da FIGURA 4.130B, pode-se observar a influência das variáveis analisadas, pois se verifica a maior intensidade do íon de m/z 7170 quando se emprega 20 minutos de extração, no entanto, a intensidade deste mesmo íon diminui consideravelmente ao empregar sonicação independente do tempo de extração. Além disso, pode-se averiguar que, independente do tempo de extração, a intensidade dos íons de m/z 7515 e 7630 também diminui ao aplicar sonicação. O contrário é observado em relação ao íon de m/z 7872, sendo a maior intensidade observada quando a sonicação é aplicada por 20 minutos. Na

faixa de maior massa, pode-se verificar que também com 20 minutos de extração sem sonicação o íon de m/z 12199 é mais intenso. Através destes dados acredita-se que um bom tempo de trabalho para a extração das biomoléculas de NICL3 é de 20 minutos sem a necessidade de sonicação.

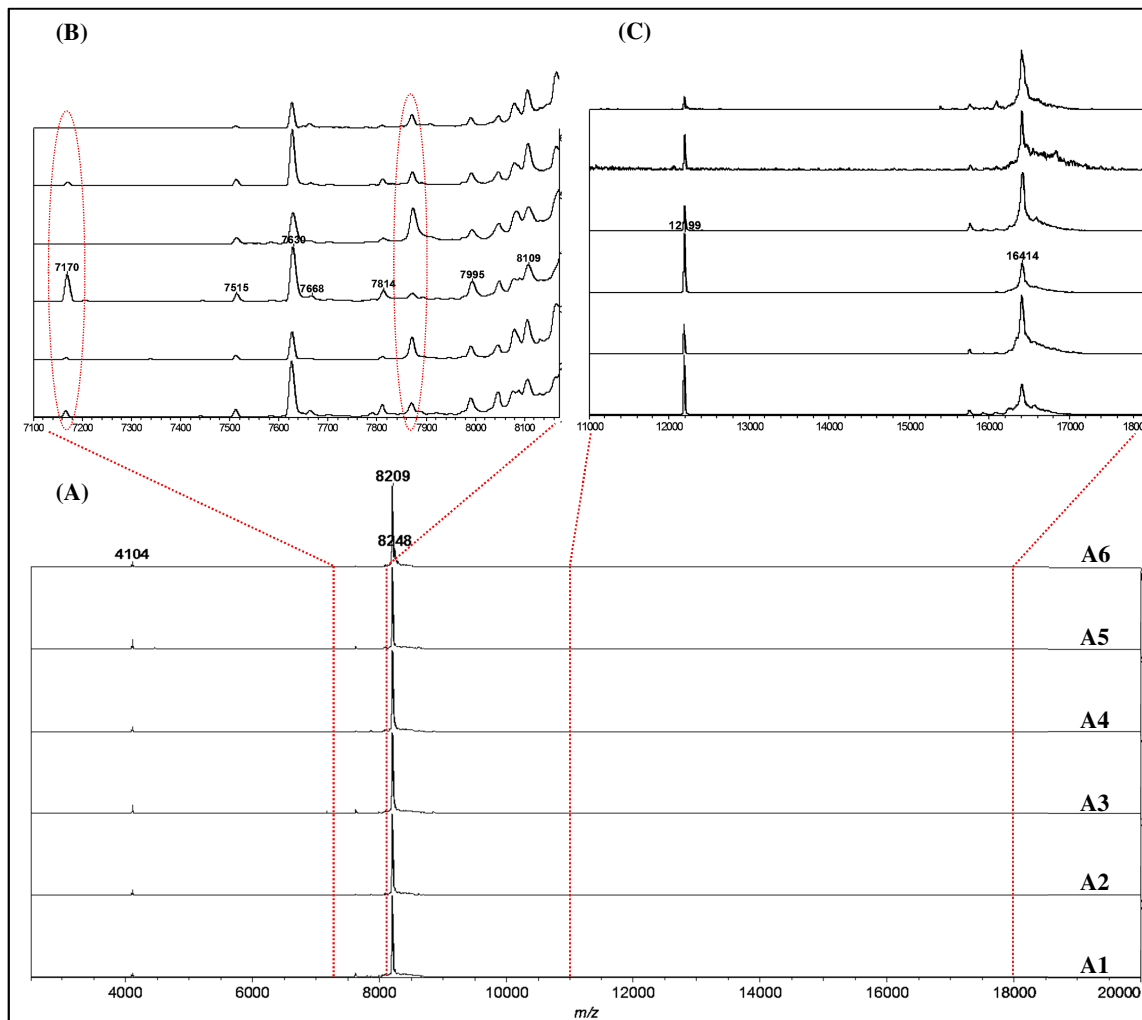


FIGURA 4.130 - (A) Espectros de massas de NICL3 em BDA obtido através do protocolo B pH 8.0 com diferentes tempos de extração: (A1) 10 min, (A2) 10 minutos com sonicação, (A3) 20 min, (A4) 20 minutos com sonicação, (A5) 30 min, (A6) 30 minutos com sonicação. (B) Ampliação dos espectros massas entre m/z 7100 a 8170. (C) Ampliação dos espectros de massas entre m/z 1100 a 18000

Para verificar se a composição do meio de cultivo influencia na análise das biomoléculas, N1CL3 foi cultivado em meio MEA e, após o crescimento do micro-organismo, aplicou-se o protocolo C a pH 8.0. A FIGURA 4.131 mostra os espectros de massas de N1CL3 obtido em diferentes tempos de extração com e sem sonicação.

Comparando as FIGURAS 4.130A e 4.131A verifica-se diferenças muito sutis em relação a intensidade dos íons entre 7100 e 8170, entretanto, as ampliações mostradas nas FIGURAS 4.130B e 4.131B mostram que a diferença não é somente em relação a intensidade, mas também devido o aparecimento de novos picos como os de m/z 6974 e 7087 quando o micro-organismo é cultivado em meio MEA. Estes íons possuem maior intensidade quando o micro-organismo é extraído por 20 minutos sem o uso de sonicação. Observa-se também que o íon de m/z 7170 aparece em MEA quando o fungo é submetido a extração por 10 minutos e após este período independe do uso ou não de sonicação este não mais é observado. Na FIGURA 4.131C pode-se observar que em 20 minutos sem sonicação os íons de m/z 12198 e 15756 são mais intensos. Comparando as FIGURAS 4.130C e 4.131C observa-se uma diferença nos íons compreendidos entre m/z 15200 e 17000, ou seja, em meio BDA a intensidade do íon de m/z 16414 é maior, enquanto que em meio MEA o íon de m/z 15756 é maior.

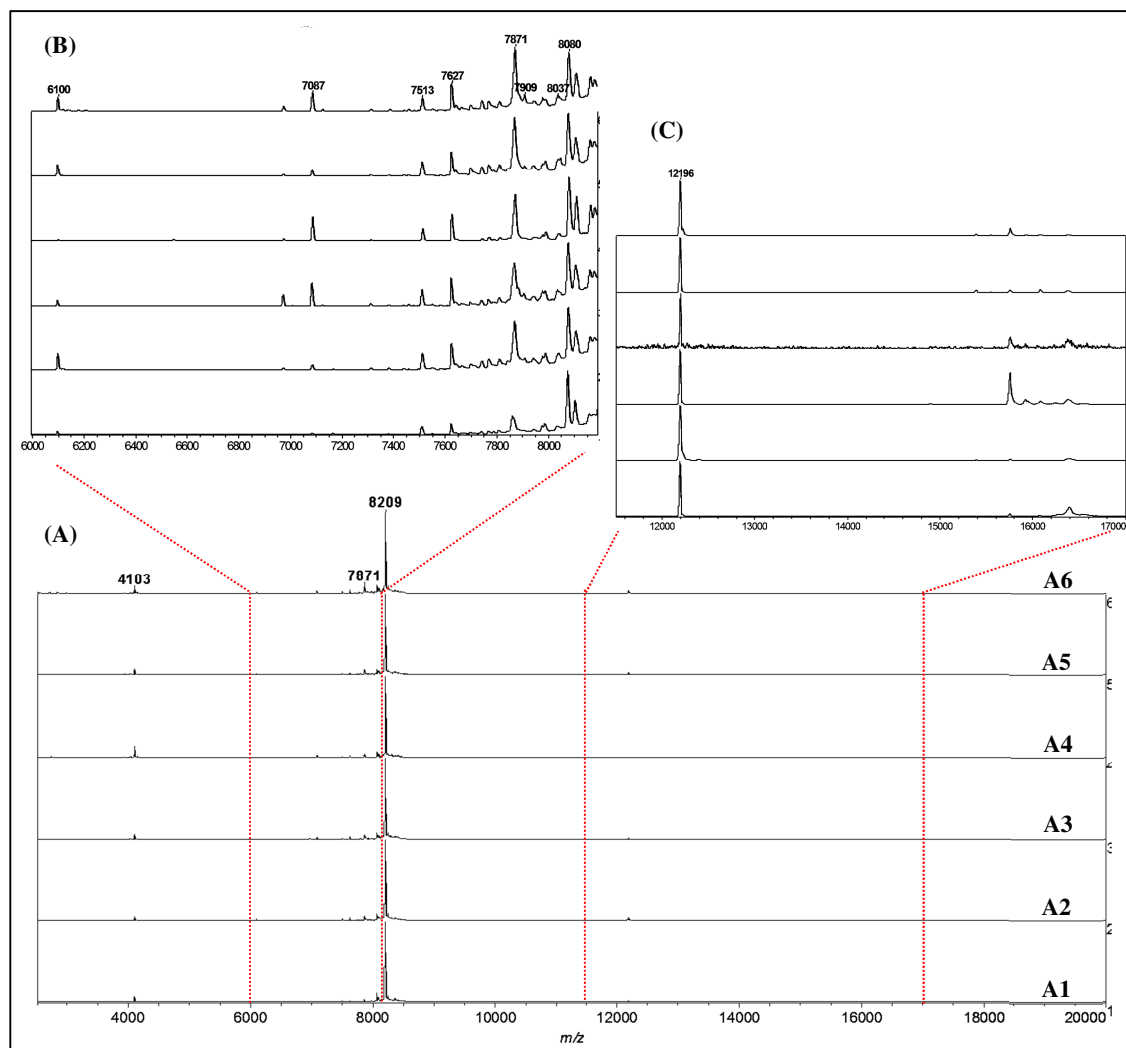


FIGURA 4.131 - A) Espectros de massas de NICL3 em MEA obtido através do protocolo B pH 8.0 com diferentes tempos de extração: (A1) 10 min, (A2) 10 minutos com sonicação, (A3) 20 min, (A4) 20 minutos com sonicação, (A5) 30 min, (A6) 30 minutos com sonicação. (B) Ampliação dos espectros de massas entre m/z 6000 a 8200. (C) Ampliação dos espectros de massas entre m/z 1150 a 17500

Através destas análises pode-se constatar que o meio de cultura é um fator importante na obtenção das biomoléculas, no entanto, como o íon de m/z 8209 é o pico mais intenso e este pode estar suprimindo os demais picos, fica difícil inferir até que ponto a diferença na composição do meio de cultivo é significativa na obtenção das biomoléculas microbianas por MALDI-TOF.

O protocolo B foi efetuado para NICL5 cultivado tanto em meio BDA e MEA como pode ser visto nas FIGURAS 4.132A e 4.133A respectivamente. Nos espectros mostrados na FIGURA 4.132 verifica-se que o

protocolo B não promoveu a extração do íon de m/z 5420 o qual foi observado quando o micro-organismo foi extraído pelo protocolo A. Entretanto, este protocolo permitiu a detecção o íon de m/z 7220, como pode ser visto na ampliação da região entre m/z 7200 e 8120 a qual está representada na FIGURA 4.132B. Analisando a região de maior massa, pode-se constatar que a intensidade do íon m/z 12191 não foi influenciada pelas variáveis analisadas.

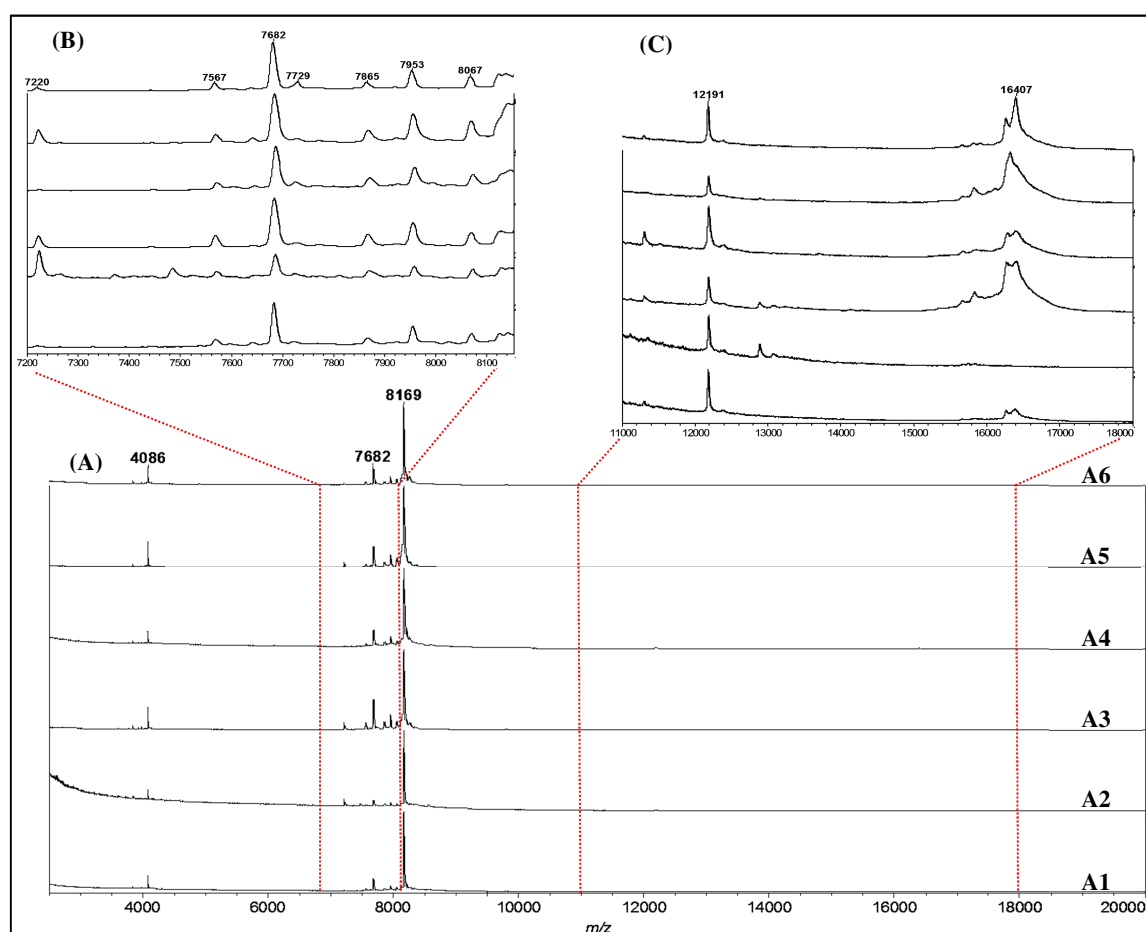


FIGURA 4.132 - (A) Espectros de massas de N1CL5 em BDA obtido através do protocolo B pH 8.0 com diferentes tempos de extração: (A1) 10 min, (A2) 10 minutos com sonicação, (A3) 20 min, (A4) 20 minutos com sonicação, (A5) 30 min, (A6) 30 minutos com sonicação. (B) Ampliação dos espectros de massas entre m/z 7200 a 8140. (C) Ampliação dos espectros de massas entre m/z 11000 a 18000

Os espectros adquiridos a partir do cultivo de N1CL5 em meio MEA, FIGURA 4.133A, apresentaram os íons de m/z 7219 e 7680 mais intensos em relação aos espectros obtidos através da extração do micro-organismo em

meio BDA. No entanto, nos demais íons a intensidade foi consideravelmente diminuída.

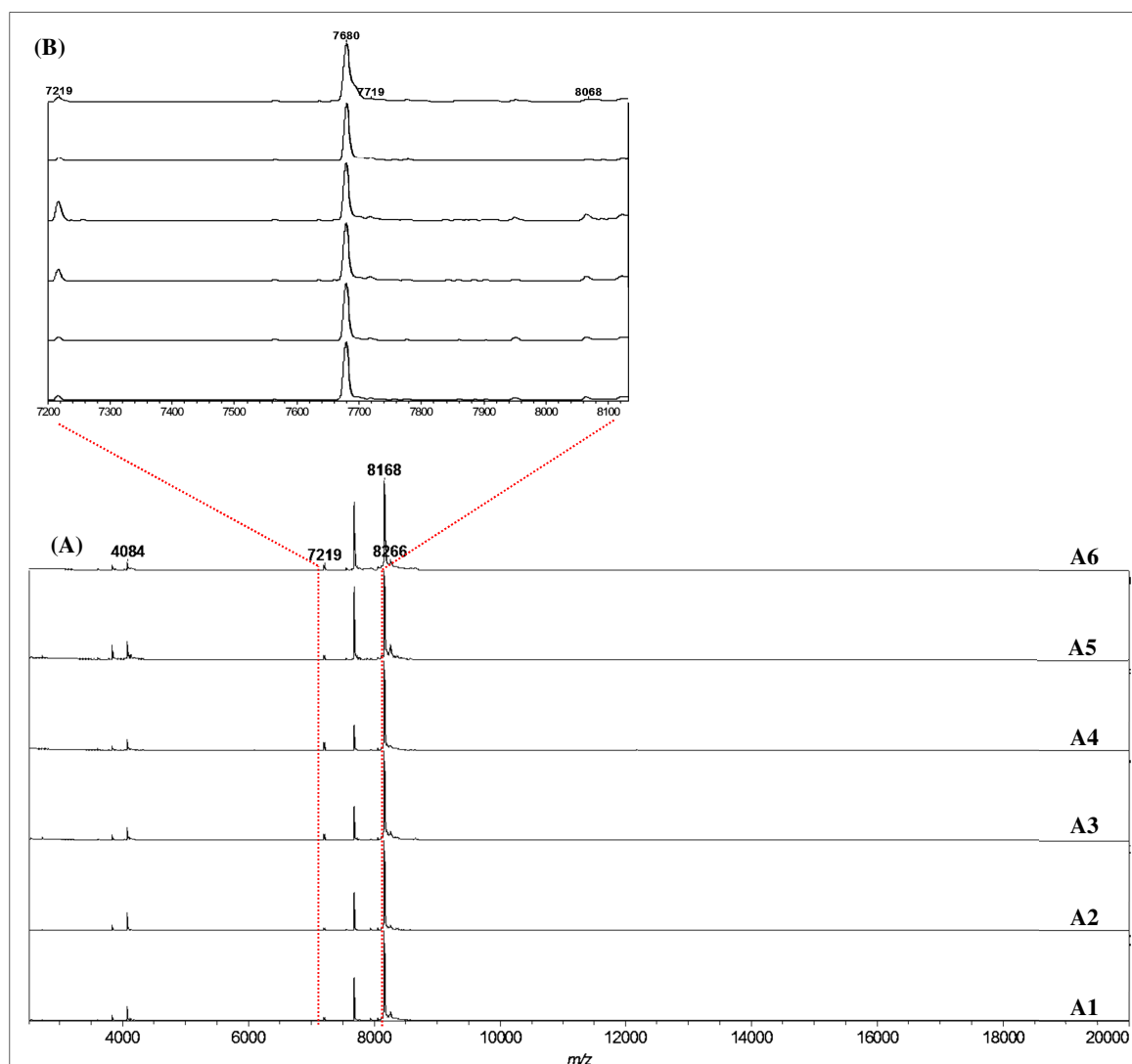


FIGURA 4.133 - (A) Espectros de massas de NICL5 em MEA obtido através do protocolo B pH 8.0 com diferentes tempos de extração: (A1) 10 min, (A2) 10 minutos com sonicação, (A3) 20 min, (A4) 20 minutos com sonicação, (A5) 30 min, (A6) 30 minutos com sonicação. (B) Ampliação dos espectros de massas entre m/z 7200 a 8140

Outra abordagem utilizada no intuito de aumentar a quantidade de íons biomarcadores dos micro-organismos estudados foi a utilização do produto natural timol. Este metabólito secundário de plantas possui atividade antimicrobiana, promovendo danos na parede celular de bactérias e fungos

(BENNIS et al., 2004) e, dessa forma, poderia auxiliar na extração das biomoléculas, gerando espectros de massa mais informativos.

Embora os espectros de NICL3 e NICL5 apresentem um perfil espectral bastante característico, com a predominância do íon m/z 8210 para NICL3 e m/z 8164 para NICL5, o tempo de extração de 20 minutos mostrou ser mais adequado para a extração das biomoléculas de menor intensidade. Dessa forma, os dados seguintes foram obtidos através da exposição do micro-organismo ao extrator durante este período de tempo.

Como visto nos dados anteriores tanto as soluções ácida como a básica foram capazes de promover a extração das biomoléculas dos micro-organismos, deste modo, a solução 12 mM de timol foi preparada empregando os solventes orgânicos; etanol, acetonitrila, etanol e acetonitrila (1:1 v/v) e isopropanol com 0,1% de TFA ou 0,1% de solução de bicarbonato de amônio a pH 8. Este protocolo de extração foi denominado C.

A FIGURA 4.134A mostra os espectros de massas gerados a partir do protocolo C, e constatou-se que todas as soluções de timol produziram espectros muito semelhantes, porém, pode-se inferir que a utilização do timol não promoveu danos na parede celular de NICL3, uma vez que, os íons detectados são correspondentes a aqueles já observados nos protocolos de extração anteriores.

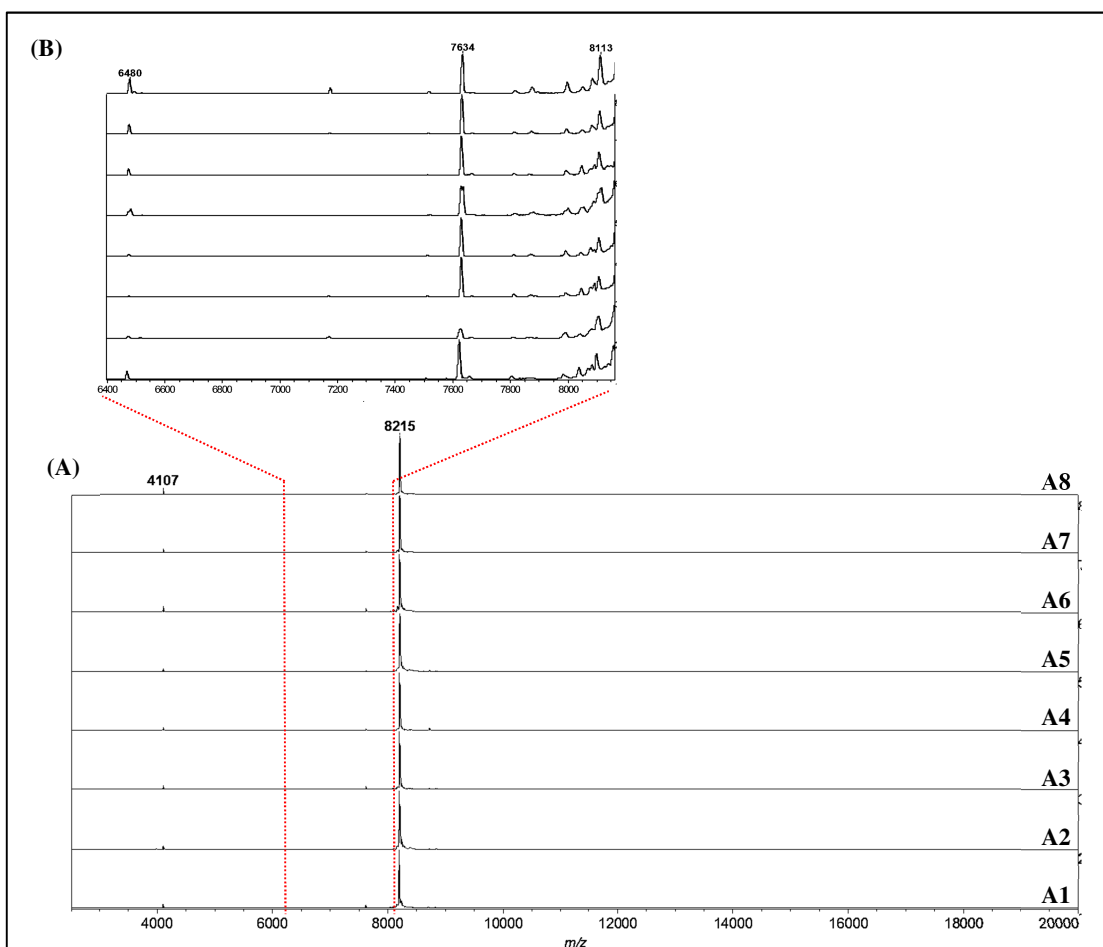


FIGURA 4.134 - (A) Protocolo D - espectros de massas de NICL3 em BDA - 12 mM timol em: (A1) EtOH:0.1%TFA, (A2) ACN:0.1%TFA, (A3) EtOH:ACN (1:1): 0.1%TFA, (A4) PrOH:0.1%TFA, (A5) EtOH:0.1%BCA, (A6) ACN:0.1%BCA, (A7) EtOH:ACN (1:1):0.1%BCA, iPrOH:0.1%BCA. (B) Ampliação dos espectros de massas na faixa de m/z 6400 a 8170

A análise de NICL5 mostrada na FIGURA 4.135 se mostrou bastante diferente, uma vez que, foi possível observar um aumento no número de picos nos espectros de massas, indicando que o timol pode ter causado algum dano na parede celular do fungo, resultando, desse modo, em espectros de massas mais informativos. A solução etanólica ácida de timol propiciou a extração do íon de m/z 9653, o qual foi observado pela primeira vez. Ampliando os espectros de massas entre m/z 3500 a 6200, pode-se verificar um maior número de íons e a variação observada entre os espectros esta relacionada à intensidade destes íons. O íon de m/z 5015 está presente em todos os espectros,

entretanto, sua intensidade é maior no espectro produzido a partir da extração com solução de básica de timol em acetonitrila. Já o íon de m/z 6050 está presente somente nos espectros produzidos a partir da extração com timol em solução ácida, sendo a maior intensidade observada em solução de isopropanol. Diferentemente dos outros protocolos de análise, o protocolo C não foi capaz de extrair as biomoléculas compreendidas na faixa de m/z 11000 - 18000, como mostra a FIGURA 4.135C.

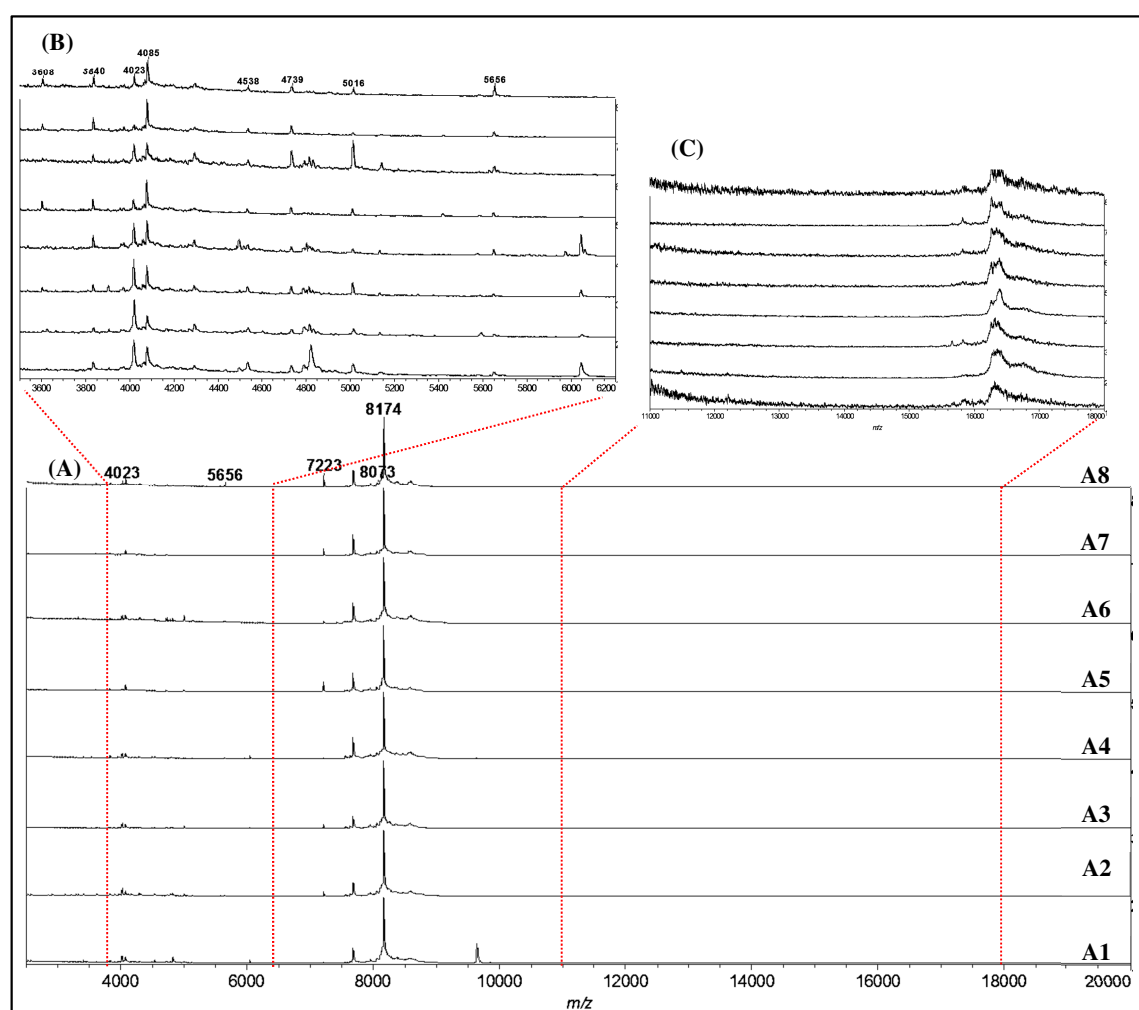


FIGURA 4.135 -(A) Espectros de massas de NICL5 em BDA obtido através do protocolo C, solução 12 mM timol em: (A1) EtOH:0.1%TFA, (A2) ACN:0.1%TFA, (A3) EtOH:ACN (1:1): 0.1%TFA, (A4) PrOH:0.1%TFA, (A5) EtOH:0.1%BCA, (A6) ACN:0.1%BCA, (A7) EtOH:ACN (1:1):0.1%BCA, iPrOH:0.1%BCA. (B) Ampliação dos espectros de massas na faixa de m/z 3500 a 6200. (C) Ampliação dos espectros de massas na faixa de m/z 11000 a 18000

Poucos são os estudos de identificação de fungos por MALDI-TOF e a maioria dos estudos descritos na literatura trabalha com células intactas destes micro-organismos. Recentemente CHALUPOVÁ et al. (2012) publicaram um trabalho no qual empregava a própria solução de matriz como extrator das biomoléculas presentes nos esporos do fungo fitopatogênico *Bremia lactucae*. Os autores perceberam que soluções mais concentradas de TFA aumentava a intensidade dos sinais entre as regiões de m/z 6000-8000 e 11000-14000. Deste modo, avaliou-se o efeito da concentração deste ácido orgânico (0,1; 0,3; 0,5; 1,0 e 2,5% v/v) na extração das biomoléculas presente no micélio de NICL3 e NICL5, sendo a matriz SA solubilizada em acetonitrila e solução aquosa de TFA na proporção de 7:3, sendo este procedimento denominado de protocolo D.

A FIGURA 4.136A mostra os espectros de NICL3 (cultivado tanto em meio BDA e MEA) produzidos a partir do protocolo D. Analisando os espectros na região de m/z 2500 a 20000 nota-se a predominância do íon m/z 8209, o qual indica que a variação na concentração de TFA não deve ter afetado a estrutura celular como era esperado. No entanto, quando estes espectros são ampliados nas faixas de m/z 2700-4100 e 11000-18000 (Fig. 4.136B e C), nota-se uma diferença em relação aos íons de menor intensidade.

A análise da FIGURA 4.136 permite verificar que o íon de m/z 3707 é observado em meio BDA a partir da concentração de 0,5% de TFA, no entanto, em meio MEA este é observado em todas as concentrações do ácido. Os íons de m/z 2805 e 2846 são observados em meio MEA quando a concentração do ácido é de apenas 0,1%.

Já quando se observa a FIGURA 1.136C, verificou-se que o meio BDA deve promover a formação de uma parede celular mais rígida, uma vez que, somente a partir da concentração máxima de TFA é que os picos parecem estar mais bem definidos, sendo possível observar somente nesta concentração a presença do íon de m/z 12319. Por outro lado em meio MEA pode-se observar

um aumento na intensidade dos íons de m/z 12195, 15386, 15549 e 16398 à medida que a concentração de TFA aumenta até 1,0%. No entanto, para afirmar a ocorrência de danos na parede celular do micro-organismo se faz necessário introduzir análises da superfície micelial fúngica, pois somente desta forma pode-se realmente afirmar que a maior quantidade de íons observados é decorrente do prejuízo estrutural celular.

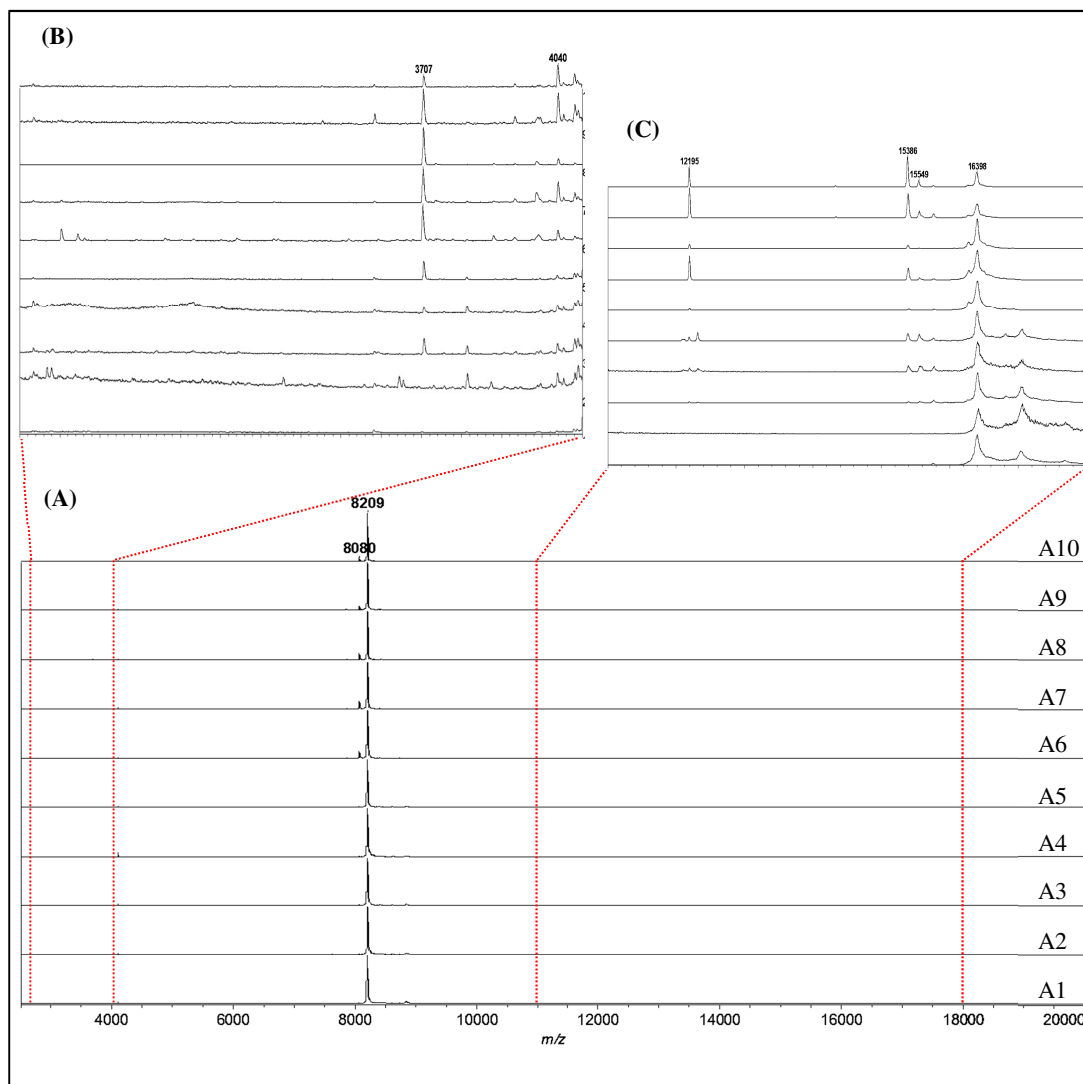


FIGURA 4.136 - Espectros de massas de NICK3 obtidos a partir do protocolo D, sendo o fungo cultivado em: (A1-A5) BDA e (A6-A10) MEA. (B) ampliação dos espectros de massas na faixa de m/z 2700-4100. (C) ampliação dos espectros de massas na faixa de m/z 11000-18000.

Quando NICK5 é submetido ao mesmo protocolo verifica-se um perfil espectral completamente diferente não só relacionado a variação da

concentração do ácido, mas também a composição do meio de cultura, como pode ser visto na FIGURA 4.137A. Nota-se que em meio BDA (FIG. 4.137 A1-5) ao aumentar a concentração do ácido o íon de m/z 8169 diminui de intensidade e, em contrapartida, o inverso é observado para o íon de m/z 5423. No entanto, é difícil afirmar que a maior concentração do ácido promoveu a degradação da biomolécula correspondente ao íon de m/z 8169, ou se a ionização desta foi suprimida pela alta intensidade do íon de m/z 5423. No entanto, a concentração de 0,5% de TFA é a mais informativa quando o micro-organismo é cultivado em meio BDA, como pode ser visto na ampliação na região de m/z 5200 a 8110, mostrada na FIGURA 4.137B.

Curiosamente em meio MEA não ocorre o detrimento do íon de m/z 8169 em virtude do aumento da concentração do ácido, porém verifica-se que a concentração é um fator importante na extração do íon de m/z 5423, pois este é detectado somente quando utilizada as concentrações de 1,0 e 2,5% de TFA. Outro fato bastante interessante é que os íons de m/z 7219, 7680, 7955 e 8067 são mais intensos em meio MEA do que em meio BDA, evidenciando, que neste protocolo, MEA é o melhor meio para gerar informações a respeito das biomoléculas de NICL5.

Através dos dados aqui mostrados, infere-se que padronizar um protocolo de extração que seja ótimo para produzir espectros de massas por MALDI-TOF para os micro-organismos estudados, não é uma tarefa simples, no entanto, os protocolos A e D produziram bons resultados.

Somente por uma questão de evidenciar a eficiência dos protocolos de extração, um pequeno espaço amostral de fungos pertencentes à família Xylariaceae foram submetidos aos protocolos A e B, conforme pode ser visto nas FIGURAS 4.138 e 4.139, respectivamente. Os espectros de massas adquiridos através de ambos os protocolos mostram claramente um perfil muito semelhante para todos os micro-organismos, com o íon em torno de m/z 8000 como a principal forma de discriminação entre um fungo e outro.

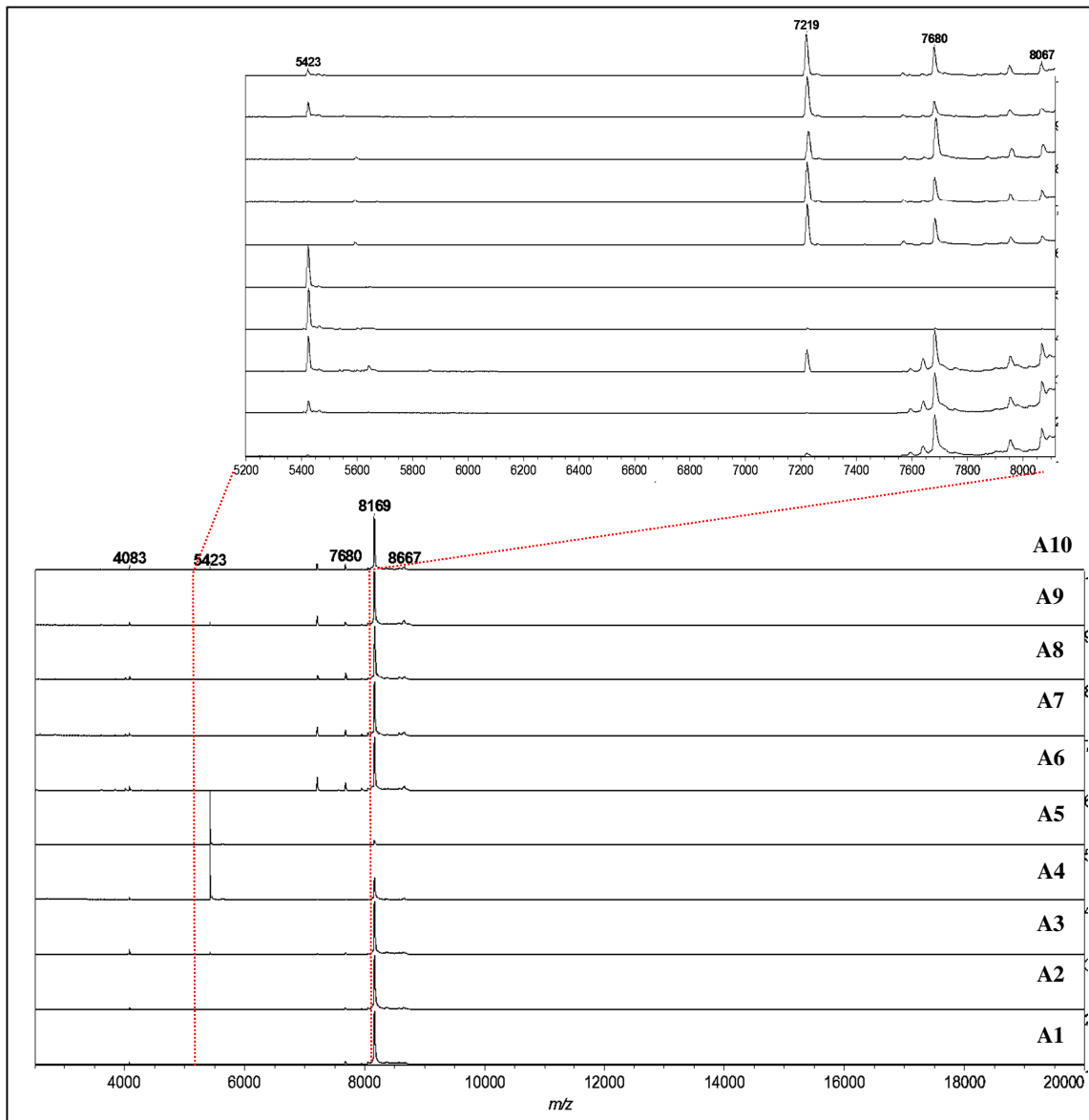


FIGURA 4.137 - (A) Espectros de massas de NiCl₅ obtidos a partir do protocolo D, sendo o fungo cultivado em: (A1-A5) BDA e (A6-A10) MEA. (B) ampliação dos espectros de massas na faixa de m/z 5200-8100

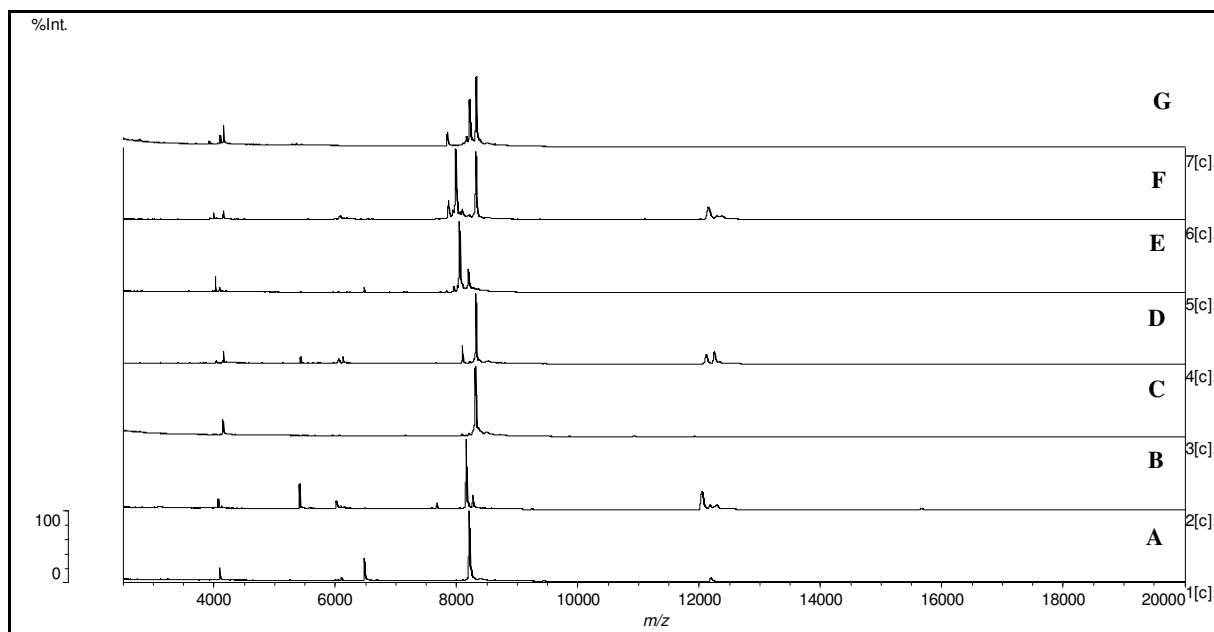


FIGURA 4.138 - Obtenção do perfil de biomoléculas de fungos pertencentes a família Xylariaceae através do protocolo A: (A) NICL3, (B) NICL5, (C) fungo endofítico F26 isolado de *Alternantera brasiliana*, (D) fungo endofítico CJ isolado de *Taxus*, (E) fungo endofítico Pinus p1A isolado de *Pinus taeda*, (F) fungo endofítico Ara_fv3A isolado de *Araucaria angustifolia*, (G) fungo endofítico Ara_fj3A Pinus p-1a isolado de *Araucaria angustifolia*

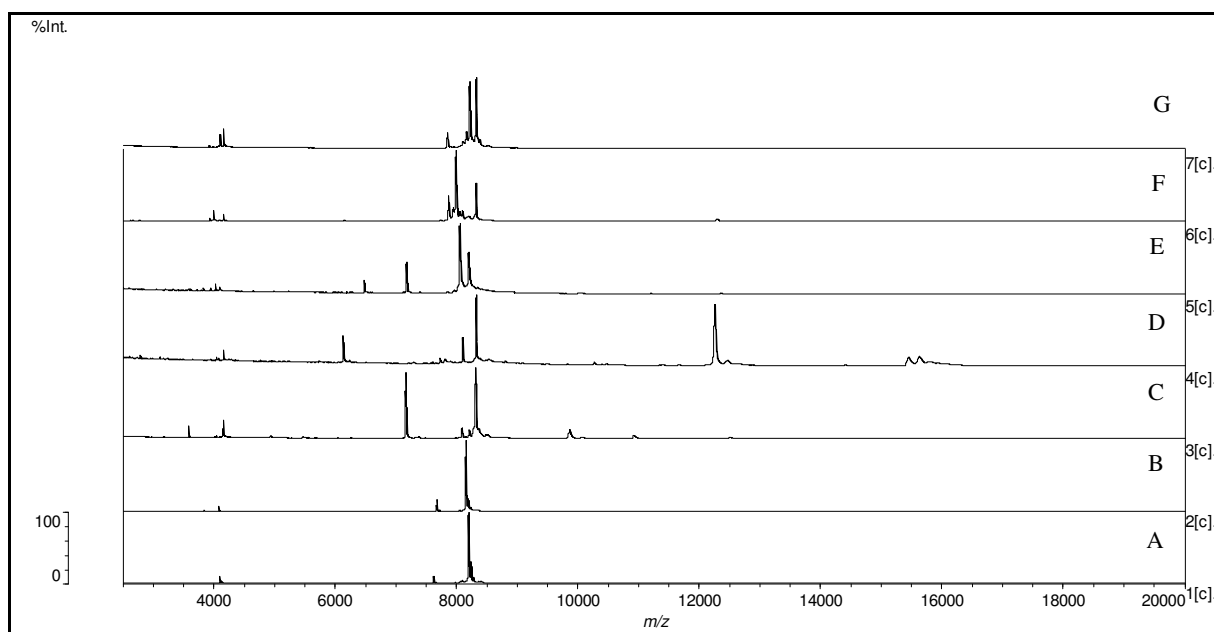


FIGURA 4.139 - Obtenção do perfil de biomoléculas de fungos pertencentes a família Xylariaceae através do protocolo B: (A) NICL3, (B) NICL5, (C) fungo endofítico F26 isolado de *Alternantera brasiliana*, (D) fungo endofítico CJ isolado de *Taxus*, (E) fungo endofítico Pinus p1A isolado de *Pinus taeda*, (F) fungo endofítico Ara_fv3A isolado de *Araucaria angustifolia*, (G) fungo endofítico Ara_fj3A Pinus p-1a isolado de *Araucaria angustifolia*

4.6 Coleção de fungos pertencentes a família Xylariaceae

4.6.1 Construção da coleção de fungos da família Xylariaceae

Foram isolados 10 fungos pertencentes à família Xylariaceae, sendo as cepas Pinus P1A, Pinus P2A, Pinus B1A, Pinus B2B isoladas das folhas de *Pinus taeda*. As 5 cepas AraFJ1A, AraFJ2A, AraFM3B, AraFV3A e AraFJB foram isoladas das folhas de *Araucaria angustifolia*. A cepa codificada como CJ foi isolada das folhas de *Taxus*. Outras 6 cepas foram previamente isoladas por membros do laboratório sendo estas incluídas na coleção. As cepas F9, F11, F26 e FEndBDS foram isoladas das folhas de *Alternanthera brasiliana*, uma cepa codificada como NISS foi isolada dos frutos de *Sapindus saponaria* e uma cepa denominada GUATA isolada das folhas de *Aspidosperma subincanum*. A FIGURA 4.140 ilustra os primeiros representantes da coleção de micro-organismos da família Xylariaceae.

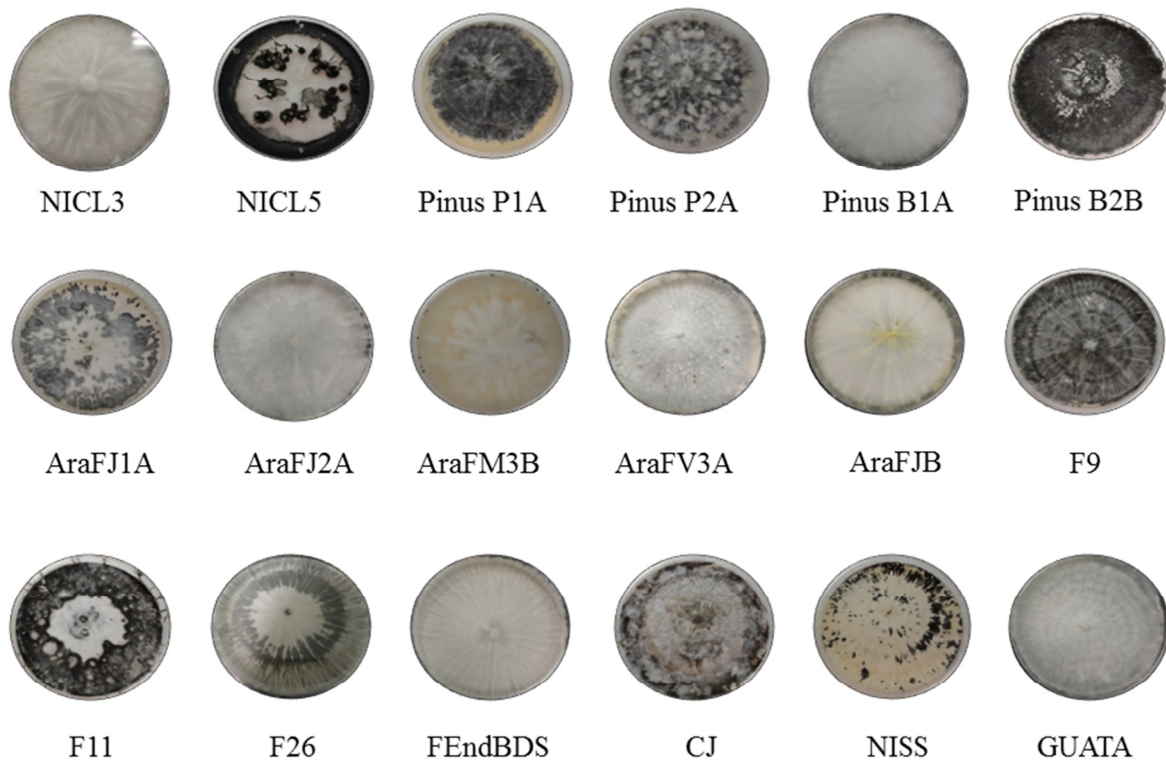


FIGURA 4.140 - Representantes da coleção de fungos da família Xylariaceae

Através de uma parceria estabelecida com o grupo do professor Dr. Ludwig Heinrich Pfenning e o Dr. Lucas M. Abreu, ambos do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, foi possível identificar os micro-organismos com base em métodos de biologia molecular através de sequenciamento da região da proteína nuclear actina. Os resultados obtidos são mostrados na TABELA 4.9. Pela tabela verifica-se que os isolados podem ser divididos em dois grupos, um formado pelos indivíduos do gênero *Xylaria* e o outro por membros do gênero *Nemania*.

TABELA 4.9 - Identificação dos micro-organismos pertencentes a coleção de fungos da família Xylariaceae

Código Luciana	Endofítico de	Identificação
NICL3	<i>C. lusitanica</i>	<i>Nemania</i> aff. <i>primolutea</i>
NICL5	<i>C. lusitanica</i>	<i>Xylaria arbuscula</i>
NISS	<i>S. saponaria</i>	<i>Xylaria multiplex</i>
LSA_CJ	<i>Taxus</i>	<i>Xylaria</i> sp.
PINUS_P1A	<i>P. taeda</i>	<i>Xylaria</i> aff. <i>grammica</i>
PINUS_P2A	<i>P. taeda</i>	<i>Nemania diffusa</i>
PINUS_B1B	<i>P. taeda</i>	<i>Nemania</i> aff. <i>primolutea</i>
PINUS B2B	<i>P. taeda</i>	<i>Xylaria arbuscula</i>
ARA_FJ1A	<i>A. angustifolia</i>	<i>Xylaria multiplex</i>
ARA_FJ2A	<i>A. angustifolia</i>	<i>Nemania diffusa</i>
ARA_FJB	<i>A. angustifolia</i>	<i>Nemania</i> aff. <i>primolutea</i>
ARA_FM3B	<i>A. angustifolia</i>	<i>Nemania</i> aff. <i>primolutea</i>
ARA_FV3A	<i>A. angustifolia</i>	<i>Xylaria cubensis</i>
F_END_BDS	<i>A. brasiliana</i>	-
F9a	<i>A. brasiliana</i>	<i>Xylaria</i> aff. <i>grammica</i>
F11	<i>A. brasiliana</i>	<i>Xylaria arbuscula</i>
F26	<i>A. brasiliana</i>	<i>Xylaria curta</i>
GUATA	<i>A. subincanum</i>	<i>Nemania</i> aff. <i>bipapillata</i>

De acordo com o mostrado na TABELA 4.9, surpreendentemente NICL3 não foi identificado como pertencente ao gênero *Xylaria* e sim como *Nemania* aff. *primolutea*. Este resultado não inviabiliza o trabalho desenvolvido até aqui, pois este gênero pertence à família Xylariaceae. Além disso, acredita-se que inúmeros outros fungos identificados como *Xylaria* sp. foram erroneamente

classificados e as bases de dados não sofreram atualização. Ademais, não existe relato algum do estudo do metabolismo fúngico de representantes do gênero *Nemania*.

A parceria estabelecida com o professor Dr. Ludwig permitiu o aumento da coleção, uma vez que, foram incorporados mais 26 isolados pertencentes à família Xylariaceae. Todos os micro-organismos da coleção de Xylariaceae foram depositados e catalogados na micoteca do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos (LaBioMMi).

4.6.2 Comparação entre os dados filogenéticos, MALDI-TOF e metabólico da coleção fúngica pertencente à família Xylariaceae

Muitos estudos envolvendo identificação de fungos do gênero *Xylaria* por técnicas moleculares baseadas na região ITS apresentaram inconsistências, uma vez que, vários destes fungos foram erroneamente classificados. Desta forma, estudos filogenéticos recentes abordam a utilização três outras sequências que codificam proteínas nucleares como β -tubulina, actina e RPB2 para análise filogenética de micro-organismos deste gênero (HSIEH, et al., 2010).

Os micro-organismos da coleção LaBioMMi de Xylariaceae foram identificados utilizando-se somente a sequência que codifica a proteína nuclear actina (TABELA 4.10) e para auxiliar a identificação molecular, realizou-se também análises por MALDI-TOF visando uma distinção no perfil das biomoléculas fúngicas, bem como análises metabolômicas empregando espectrometria de massas de alta resolução (Q-TOF, Waters).

TABELA 4.10 - Coleção de Xylariaceae e respectiva identificação

Código LaBioMMi	Código precedente	Identificação
LaBioMMi 426	CML 0450	Xylariaceae?
LaBioMMi 427	CML 0664	Xylariaceae
LaBioMMi 428	CML 0673	<i>Xylaria curta</i>
LaBioMMi 429	CML 0761	Xylariaceae
LaBioMMi 430	CML 0822	<i>Hypoxylon</i> sp.
LaBioMMi 431	CML 0823	<i>Xylaria</i> sp.1
LaBioMMi 432	CML 0836	Xylariaceae
LaBioMMi 433	CML 0838	Xylariaceae
LaBioMMi 434	CML 0840	<i>Xylaria</i> aff. <i>cubensis</i>
LaBioMMi 435	CML 0841	Xylariaceae
LaBioMMi 436	CML 0843	<i>Xylaria</i> aff. <i>arbuscula</i>
LaBioMMi 437	CML 0845	<i>Xylaria cubensis</i>
LaBioMMi 438	CML 1674	<i>Xylaria cubensis</i>
LaBioMMi 439	CML 1675	<i>Xylaria</i> aff. <i>berteri</i>
LaBioMMi 440	CML 1677	Xylariaceae
LaBioMMi 441	CML 1678	Xylariaceae
LaBioMMi 442	CML 1679	<i>Xylaria cubensis</i>
LaBioMMi 443	CML 1680	<i>Xylaria cubensis</i>
LaBioMMi 444	CML 1707	<i>Daldinia eschscholzii</i>
LaBioMMi 445	NICL5	<i>Xylaria</i> aff. <i>arbuscula</i>
LaBioMMi 446	CML 2833	<i>Xylaria cubensis</i>
LaBioMMi 447	CML 2834	Xylariaceae?
LaBioMMi 448	CML 2835	<i>Xylaria</i> sp.1
LaBioMMi 449	CML 2836	Xylariaceae
LaBioMMi 450	CML 2837	Xylariaceae
LaBioMMi 451	CML 2838	<i>Xylaria</i> aff. <i>grammica</i>
LaBioMMi 452	CML 2839	<i>Xylaria multiplex</i>
LaBioMMi 453	CML 2840	Xylariaceae
LaBioMMi 454	CML 2841	<i>Xylaria multiplex</i>
LaBioMMi 455	NICL3	<i>Nemania</i> aff. <i>primolutea</i>
LaBioMMi 456	NISS	<i>Xylaria multiplex</i>
LaBioMMi 457	LSA_CJ	<i>Xylaria</i> aff. <i>cubensis</i>
LaBioMMi 458	PINUS_P1A	<i>Xylaria</i> aff. <i>grammica</i>
LaBioMMi 459	PINUS_P2A	<i>Nemania diffusa</i>
LaBioMMi 460	PINUS_B1B	<i>Nemania</i> aff. <i>primolutea</i>
LaBioMMi 461	PINUS_B2B	<i>Xylaria</i> aff. <i>arbuscula</i>
LaBioMMi 462	ARA_FJ1A	<i>Xylaria multiplex</i>
LaBioMMi 463	ARA_FJ2A	<i>Nemania diffusa</i>
LaBioMMi 464	ARA_FJB	<i>Nemania</i> aff. <i>primolutea</i>

TABELA 4.10 - continuação

Código LaBioMMi	Código precedente	Identificação
LaBioMMi 465	ARA_FM3B	<i>Nemania</i> aff. <i>primolutea</i>
LaBioMMi 466	ARA_FV3A	<i>Xylaria cubensis</i>
LaBioMMi 467	ARA_FV3A	<i>Xylaria cubensis</i>
LaBioMMi 468	F_END_BDS	Xylariaceae
LaBioMMi 469	F9	<i>Xylaria</i> aff. <i>grammica</i>
LaBioMMi 470	F11	<i>Xylaria</i> aff. <i>arbuscula</i>
LaBioMMi 471	F26	<i>Xylaria curta</i>
LaBioMMi 472	GUATA	<i>Nemania</i> aff. <i>bipapillata</i>

As análises por MALDI-TOF foram realizadas de acordo com a metodologia implementada no LaBioMMi, a qual consistiu em empregar o método de esfregação do material fúngico sobre o *spot* da placa de MALDI, sendo posteriormente aplicada 1µL da solução de matriz CHCA na concentração de 20 mg/mL. Cada micro-organismo foi analisado em dezoito réplicas, no entanto, a aquisição dos dados foi em duplicada, logo foram adquiridos 36 espectros de massas para cada isolado do universo de estudo. Destes trinta e seis espectros foi gerado um espectro principal, denominado MSP (*main spectra*) com base na discriminação de sinais de maior e menor intensidade segundo algoritmo interno do software MALDI Biotyper 3.1. Estes espectros “MSPs” formam a base de dados do software que permite a criação de uma biblioteca de espectros microbianos. A FIGURA 4.141 representa o MSP Dendograma que permitiu agrupar os fungos da coleção LaBioMMi de Xylariaceae em cinco grupos principais, de acordo com a similitude dos dados espectrais adquiridos para cada isolado do grupo de estudo.

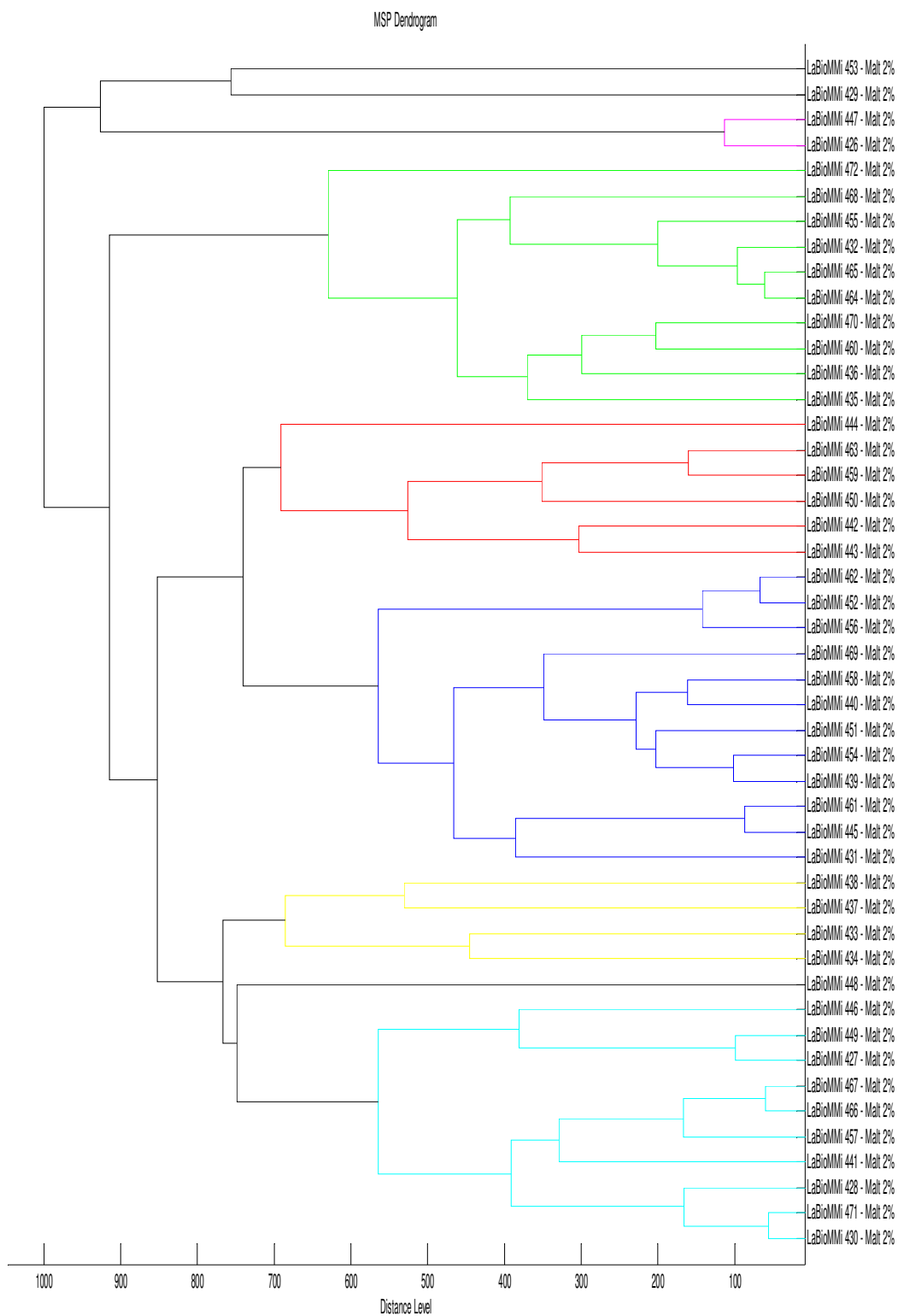


FIGURA 4.141 MSP Dendrograma obtido com espectros principais (*MSPs*) de 46 fungos pertencentes à família Xylariaceae analisados via MALDI-TOF

A comparação entre a identificação molecular e a análise por MALDI-TOF permitiu verificar que há uma divergência entre algumas

linhagens fúngicas. Os micro-organismos identificados como *Xylaria cubensis* ou *Xylaria* aff. *cubensis* foram reunidos em três grupos distintos. Os fungos codificados como 457, 466 e 467 estão agrupados entre si, já 434, 437 e 438 estão reunidos em outro grupo sendo que o nível de distância evidencia a diferença do perfil espectral encontrado para os isolados, enquanto 442 e 443 estão juntos em outra série. Para buscar uma explicação para esta distinção, verificou-se o perfil metabólico destes micro-organismos adquiridos via espectrometria de massas de alta resolução. Verificou-se que 457, 466 e 467 possuem como semelhança principal a presença dos íons de m/z 319,1173; 353,0795 e 508,2784 (FIGURA 4.142); os quais puderam ser correlacionados as substâncias declorogriseofulvina, griseofulvina e citocalasina D com base nos trabalhos de NIELSEN e SMEDSGAARD (2003) e AMARAL (2009). Vale mencionar a ocorrência de fragmentação de m/z 508,2784 na fonte de ionização, podendo-se observar na FIGURA 4.142F os íons de m/z 490,2591 e 430,2373. Interessantemente existe apenas uma publicação referente à produção de griseofulvina pelo fungo *Xylaria cubensis* (CASELA et al., 2013), os demais trabalhos mostram a produção destes metabólitos por *Xylaria* sp. (JOONG-HYEOP et al., 2005). Já a produção de citocalasina D foi reportada por KLAIKLAY e colaboradores (2012). Ao considerar os isolados 434, 437 e 438 observa-se um perfil metabólico diferente entre eles (FIGURA 4.143) e um tanto quanto complexo de se fazer alguma analogia que permita justificar a discrepância entre os dados filogenéticos e de MALDI-TOF, porém, estes micro-organismos apresentam em comum o pico em 4,50 min, o qual refere-se ao íon molecular protonado de m/z 461,2544. Vale mencionar que o isolado 437 é produtor de citocalasina D, enquanto que 438, além de citocalasina D, produz também a griseofulvina e a declorogriseofulvina. A análise dos perfis metabólicos de 442 e 443 demonstram a produção da griseofulvina, citocalasina D e também da substância de $[M+H]^+$ de m/z 461,2544; no entanto, somente estes dados não permitem justificar a separação destes micro-organismos.

Vale ressaltar que o perfil metabolômico dos fungos da família Xylariaceae também seria tratado estatisticamente empregando-se o software *MarkerLynx* (Waters), no entanto, inúmeros problemas com a instalação deste aplicativo impossibilitaram a realização do agrupamento dos micro-organismos e, conseqüentemente, impediu o confronto entre os dados gerados por MALDI-TOF e filogenia.

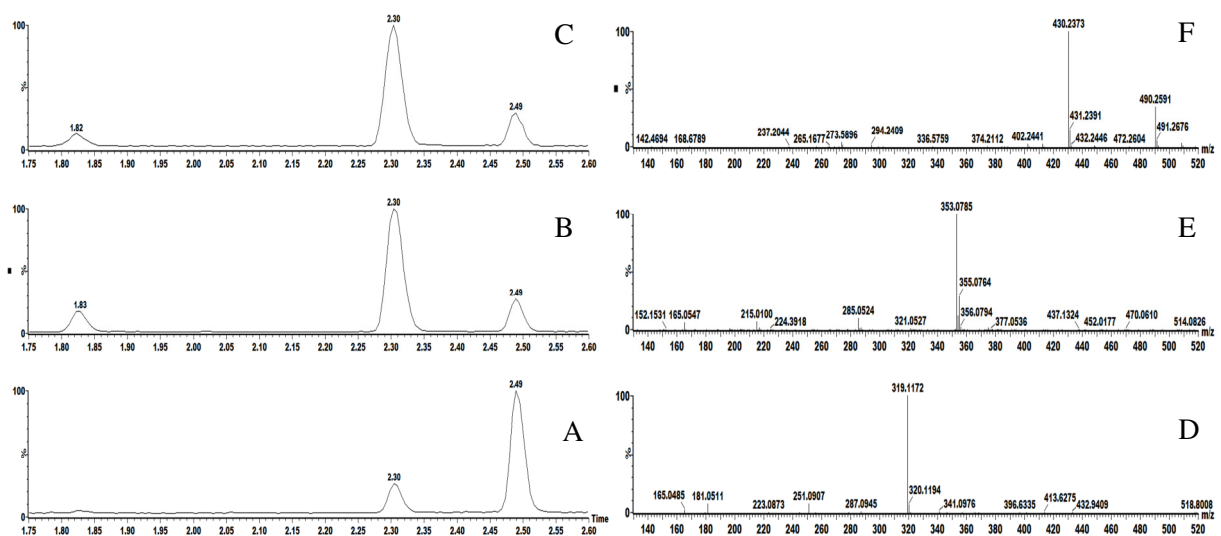


FIGURA 4.142 - Cromatograma de íons totais de: (A) LaBioMMi 445, (B) LaBioMMi 466 e (C) LaBioMMi 467. Espectros de massas associados aos picos em: (D) 1,83 min, (E) 2,30 min, (F) 2,49 min

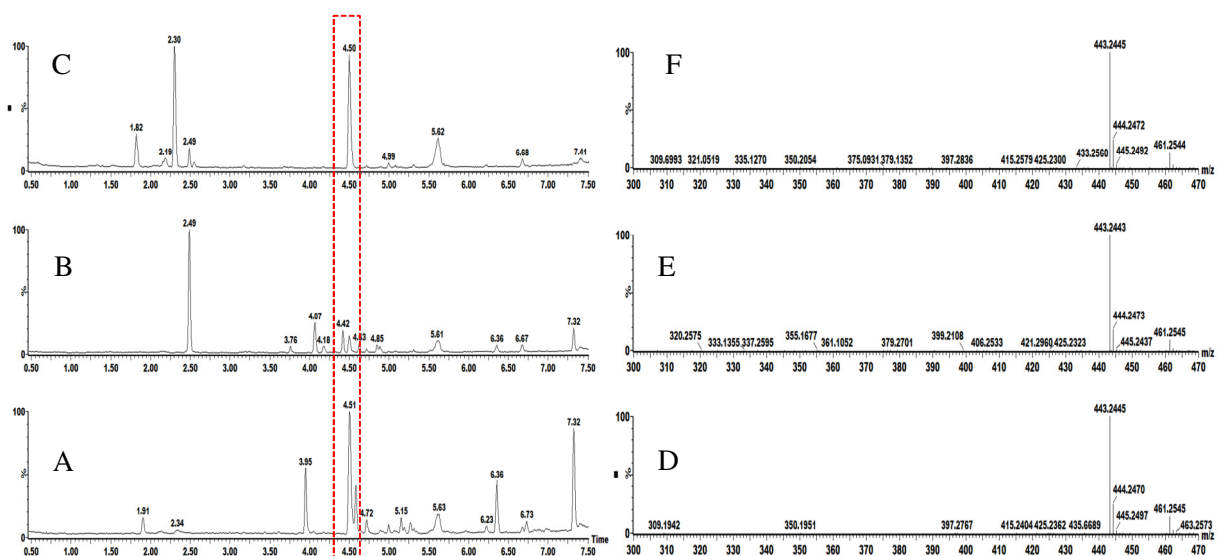


FIGURA 4.143 - Cromatograma de íons totais de: (A) LaBioMMi 434, (B) LaBioMMi 436 e (C) LaBioMMi 437. (D)-(F): Espectros de massas associados aos picos em 4,50 min.

Outra inconsistência entre a identificação molecular e por MALDI-TOF refere-se à separação dos isolados 436, 445 (NICL5), 461 e 470, correlacionados a *Xylaria arbuscula*, os quais foram segregados em dois grupos. A análise do perfil metabolômico isoladamente não permitiu identificar diferenças relevantes entre 445, 461 e 470, contudo 436 apresenta um número maior de bandas cromatográficas quando comparado aos demais, conforme pode ser visto na FIGURA 4.144. Vale destacar que através da técnica de micro-extração foi possível identificar a produção das citocalasinas C e D por todos estes fungos, no entanto a produção do depsipeptídeo cíclico tricodepsipeptídeo foi observada em 455 (NICL5), como esperado, e por 470.

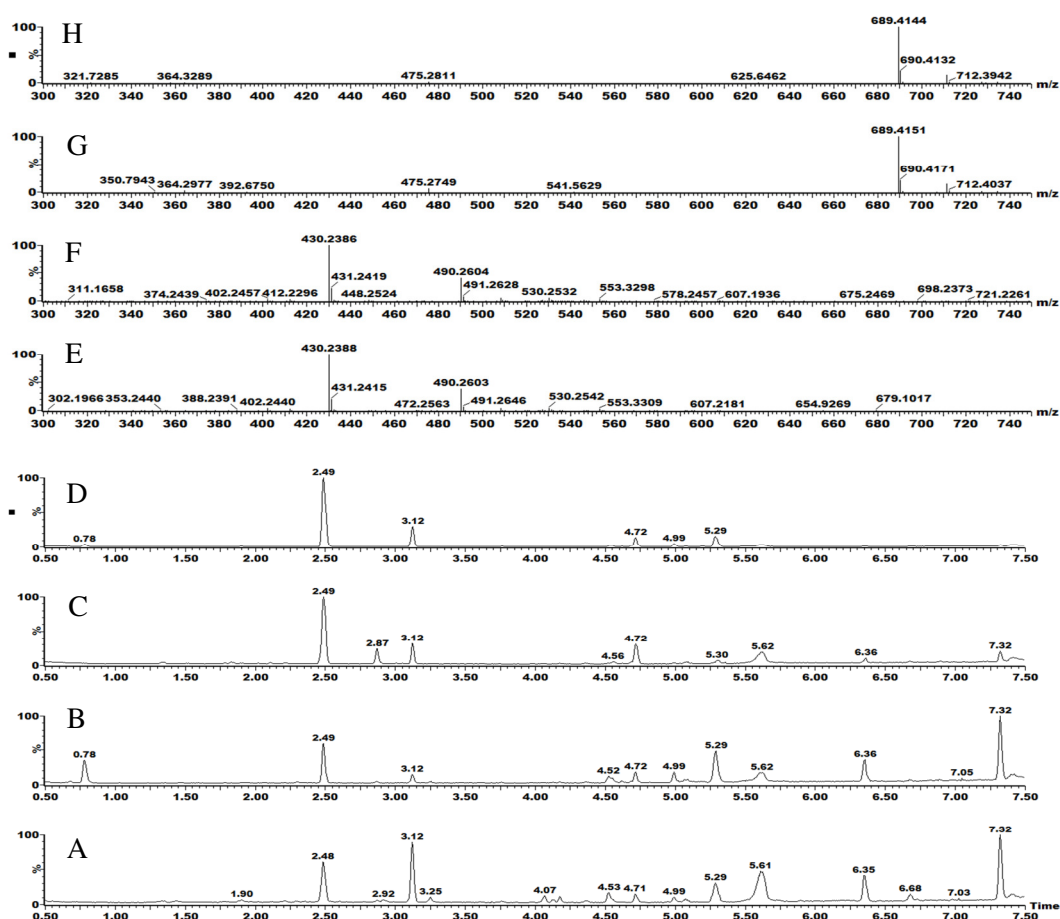


FIGURA 4.144 - Cromatograma de íons totais de: (A) LaBioMMi 436, (B) LaBioMMi 445, (C) LaBioMMi 461 e (D) LaBioMMi 470. Espectros de massas associados aos picos: (E) 2,49 referente a citocalasina D, (F) 3,12 referente a citocalasina C, espectro de massa do tricodepsipeptídeo produzido por (G) LaBioMMi 445 e (H) LaBioMMi 470

Dentre aos micro-organismos classificados como pertencentes ao gênero *Nemania*, notou-se um comportamento interessante na análise do perfil das biomoléculas dos isolados 459 e 463, correspondente a *Nemania difusa* em relação a 455 (NICL3), 464, 465 e 460 referentes *Nemania aff. primolutea* e o isolado 472 denominado *Nemania aff. bipapillata*, uma vez que, somente os micro-organismos 459 e 463 não foram agregados juntamente com os outros fungos do mesmo gênero. O perfil metabômico de 459 e 463 mostrou-se muito pobre em informações (FIGURA 4.145), no entanto, ambos apresentam os picos em 2,66; 4,56; 4,72; 5,07 e 5,31 min referentes aos íons de m/z 177,9554; 520,3414; 520,3408; 247,1455 e 478,3228, corroborando, desta forma, com o agrupamento por MALDI-TOF. Verifica-se a presença de uma banda comum em 5,63min, no entanto, esta é equivalente a alguma contaminação com PEG, pois a diferença entre um íon e outro é de 44 Da.

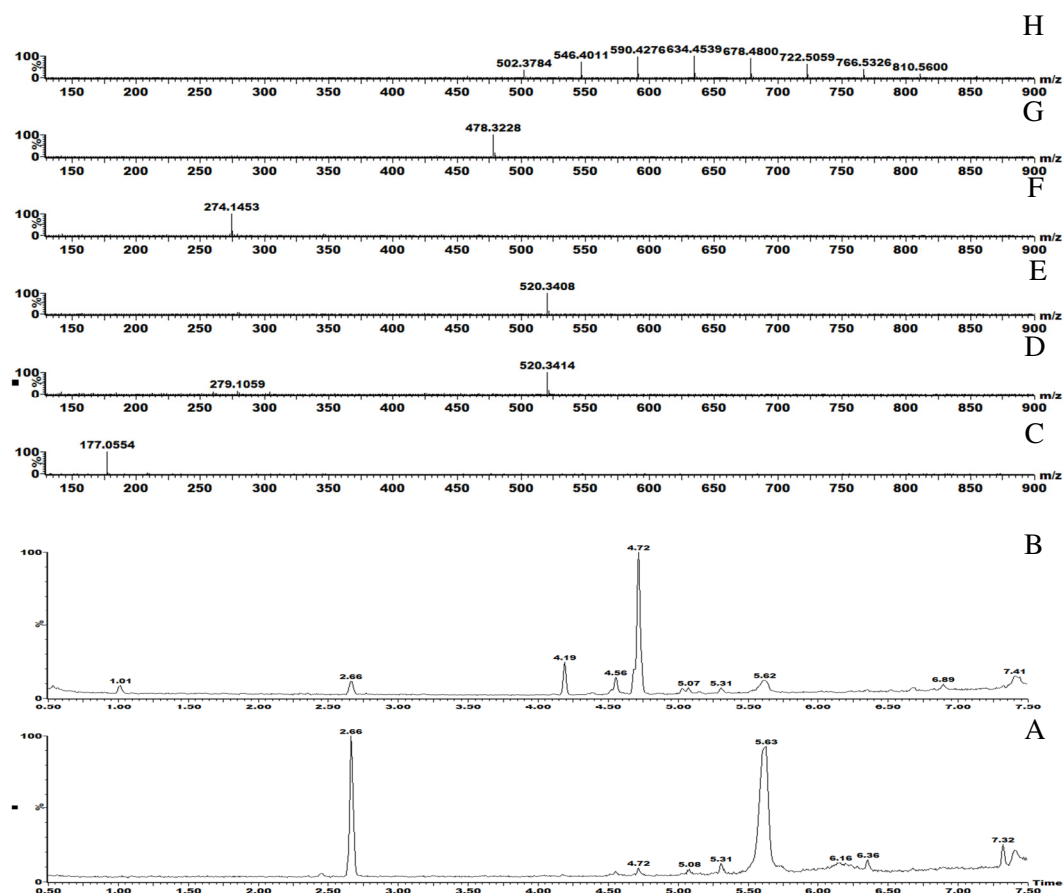


FIGURA 4.145 - Cromatograma de íons totais de: (A) LaBioMMi 459, (B) LaBioMMi 463. Espectros de massas associados aos picos: (C) 2,66 min (D) 4,56 min; (E) 4,72 min; (F) 5,07min; (G) 5,31 min e (H) 5,63 min

A observação dos metabólitos produzidos pelos fungos relacionados com *Nemania* aff. *primolutea*, converge com a classificação taxonômica e com os dados de MALDI-TOF, pois verifica-se que os quatros isolados produzem majoritariamente os peptídeos cíclicos de m/z 524,3849 que foram identificados neste trabalho, conforme pode ser visto na FIGURA 4.146. Curiosamente, não foi observada a produção dos sesquiterpenos eremofilanos produzidos por 455 (N1CL3). Já em relação a 472 (*Nemania* aff. *bipapillata*) a simples inspeção do perfil metabólico não ratifica com o agrumento deste micro-organismo juntamente com aqueles designados como *Nemania* aff. *primolutea*.

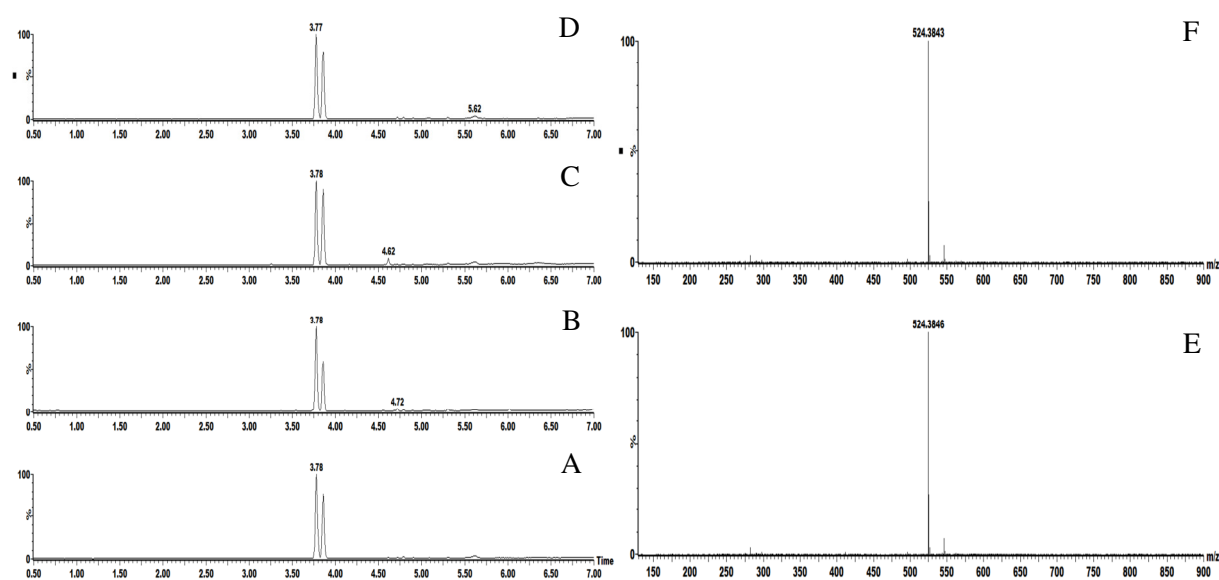


FIGURA 4.146 - Cromatograma de íons totais de (A) LaBioMMi 455, (B) LaBioMMi 464, (C) LaBioMMi 465 e (D) LaBioMMi 460. Espectros de massas associados as bandas: (E) 3,78 e (F) 3,86 min

A comparação entre a identificação filogenética, o perfil de biomoléculas por MALDI-TOF e o perfil metabólico convergem para os mesmos resultados em relação aos micro-organismos 428 e 471, identificados como *Xylaria curta*, conforme mostra a FIGURA 4.147. Os compostos presentes nos picos delimitados pelos retângulos vermelhos apresentam espectros de íons produtos característicos das citocalasinas biossintetizadas a partir do aminoácido fenilalanina devido à presença de m/z 120, além de

apresentarem perdas de 60 Da, correspondente ao acetato na posição 21. Os metabólitos com m/z 542 não apresentaram correlação com nenhuma citocalasina descrita, no entanto, os espectros C e E podem ser referentes as citocalasinas isoméricas 19,20 epoxicitocalasinas C (**48**), D (**50**), Q (**55**) ou R (**61**), enquanto os espectros D e F correspondem as citocalasinas D e C, respectivamente.

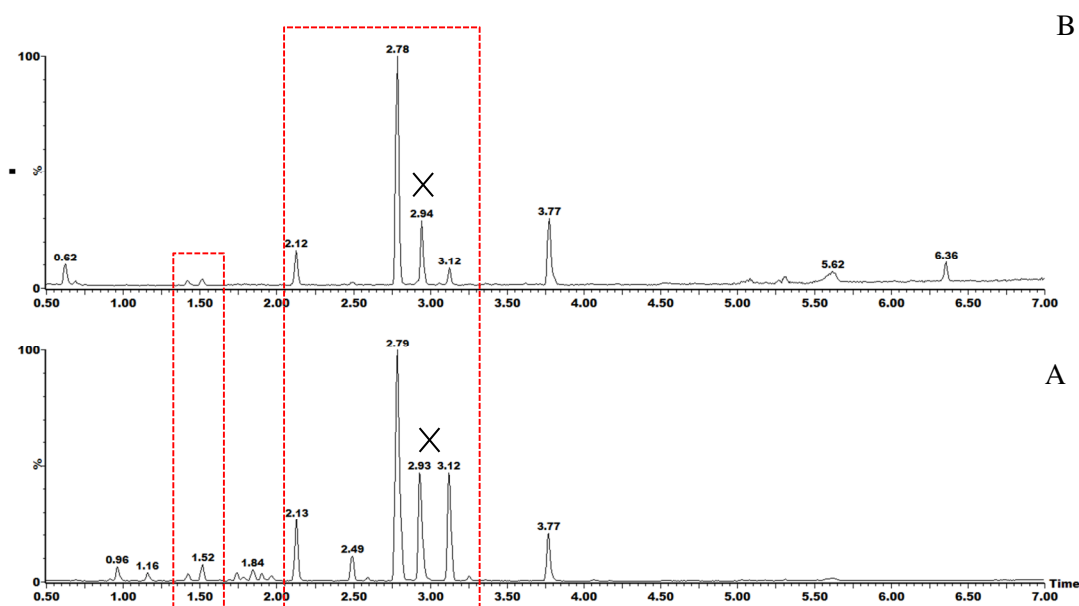


FIGURA 4.147 – Perfil metabolômico de (A) LaBioMMi 428 e (B) LaBioMMi 471

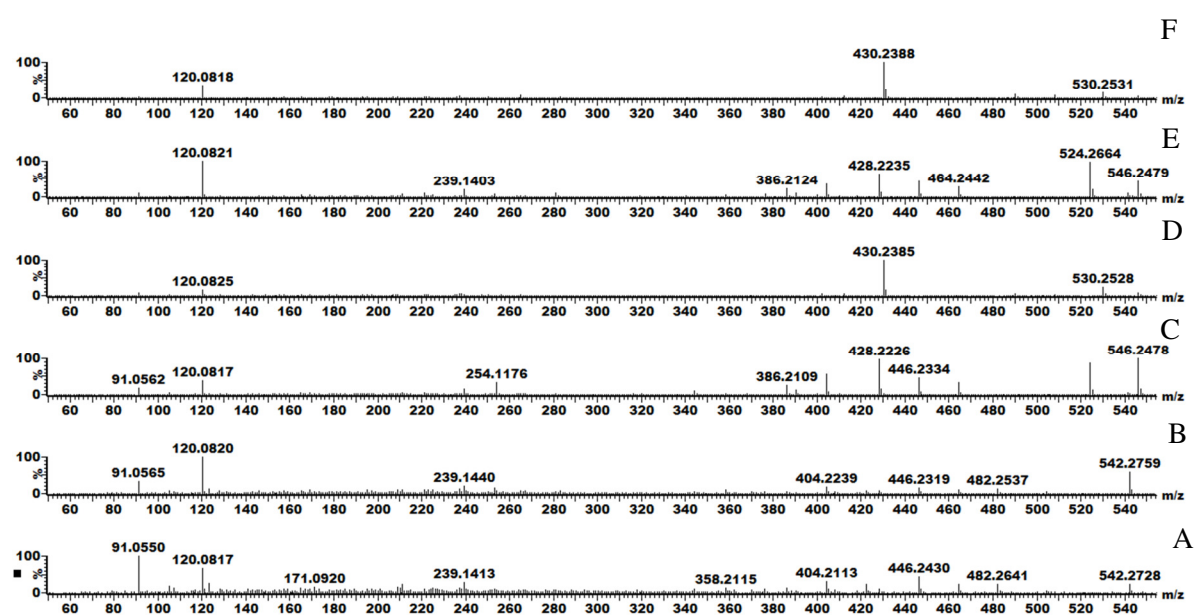


FIGURA 4.148 - Espectro de íons produtos dos compostos presentes nos picos: (A) 1,42 min; (B) 1,52 min; (C) 2,13 min; (D) 2,49; (E) 2,79 e (F) 3,12 min

Em relação aos isolados 451, 458 e 469, identificados como *Xylaria* aff. *grammica* verifica-se também uma boa convergência entre as três metodologias de identificação abordadas, pois estes foram reunidos no mesmo grupo pela análise por MALDI-TOF e apresentam um perfil metabólico muito semelhante entre si, conforme pode ser visto na FIGURA 4.149. As substâncias presentes no cromatograma de íons totais referentes aos picos em 4,11 e 4,19 minutos apresentam grande similaridade espectral com os peptídeos cíclicos **34** e **35**, os quais foram isolados de um fungo identificado como *Xylaria* sp. isolado como endofítico do líquen *Leptogium saturninum* (WU et al., 2011).

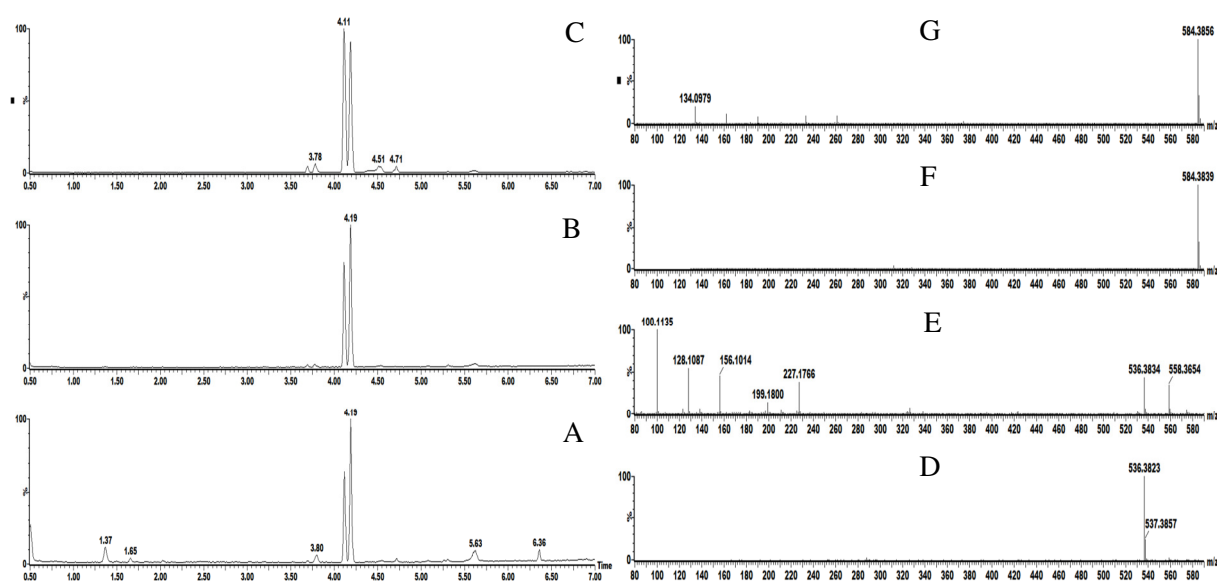


FIGURA 4.149 - Cromatograma de íons totais de: (A) LaBioMMi 451, (B) LaBioMMi 458 e (C) LaBioMMi 469. Espectro de massas *full scan* de: (D) pico em 4,11 min e (F) pico em 4,19 min. Espectro de íons produtos: (E) m/z 536,3823 e (G) m/z 584,3839

Há apenas um relato na literatura a respeito do metabolismo de *Xylaria grammica*. A esta espécie associa-se a produção da gramicina (**45**), no entanto, esta substância não foi detectada em nenhum dos três micro-organismos em questão.

Através de pesquisas na base de dados Science Finder, pôde-se contatar a existência de somente um trabalho visando o metabolismo secundário de *Xylaria multiplex*, o qual destaca a produção dos multiplolídeos A e B (43 e 44), no entanto, estes não foram detectados no presente trabalho.

De forma geral, os resultados apontam uma boa concordância entre as três técnicas avaliadas, desta forma, a espectrometria de massas tanto pelo perfil das biomoléculas como pelo perfil metabômico é uma ferramenta eficaz e ágil para a distinção de micro-organismos. As divergências observadas podem ser decorrentes de “falhas” nas três técnicas empregadas, pois para uma identificação molecular mais precisa os últimos trabalhos sugerem o emprego de mais de uma sequencia codificadora de proteínas nucleares. A obtenção de resultados por MALDI-TOF é fortemente dependente do preparo de amostra e das inúmeras variáveis pertinentes à técnica. Uma das vantagens que merece destaque em relação ao uso do perfil espectral obtido via MALDI-TOF, é o curto intervalo de tempo necessário para obtenção dos resultados quando comparados com o intervalo necessário para o sequenciamento genético. Por fim, o estudo metabômico empregando a técnica de micro-extração está sujeito à produção dos metabólitos em determinado meio de cultivo, o que irá implicar de forma direta na presença e/ou ausência de analitos e na intensidade dos sinais gerados.

5. Conclusão

Concluiu-se que a aplicação da abordagem OSMAC, mediante a administração de diferentes aminoácidos ao meio de cultivo de fungo N1CL5, *Xylaria* aff. *arbuscula*, não levou a um incremento da diversidade metabólica. Porém a suplementação do meio de cultura com NH₄Br levou a produção de citocalasinas bromadas, além de permitir o isolamento da 4-hidroximetil citocalasina C, um metabólito inédito.

Concluiu-se que o fungo N1CL5 pode realizar biossíntese *de novo* das citocalasinas, uma vez que, os experimentos de espectrometria de massas dos extratos enriquecidos com precursores marcados isotopicamente, mostraram a incorporação do nitrogênio marcado quando Na¹⁵NO₃, ¹⁵NH₄Cl, 2-¹⁵N glicina foram adicionados ao meio de cultura. Verificou-se uma discreta incorporação do carbono marcado quando o meio de cultura foi suplementado com 1-¹³C fenilalanina e 2-¹³C fenilalanina. Já a suplementação com 2-¹³C glicina levou a incorporação de três carbonos marcados, no entanto, a marcação ocorreu nas posições 12, 17 e 23 da molécula, evidenciando a atividade da enzima S-adenosil metionina.

Concluiu-se que o fungo N1CL5 possui um potencial enzimático a ser explorado, uma vez que, foram isolados quatro diferentes produtos de biotransformação do ácido *p*-bromo benzoico. Verificou-se a redução do ácido *p*-bromo benzoico ao seu correspondente álcool, a incorporação do ácido γ -aminobutírico ao núcleo do ácido aromático, além da incorporação de uma unidade de glicose ao álcool. Estes resultados sugerem que o micro-organismo possui as enzimas Ácido Carboxílico Redutase (CAR) e N-aciltransferase (NAT), sendo ambas dependentes de NADPH e ATP. No entanto, a capacidade catalítica ocorre quando o sistema aromático é substituído com grupos retiradores de elétrons, pois se detectou a produtos de biotransformação clorados análogos aos bromados e a redução do ácido *p*-nitro benzoico ao seu

corresponde álcool. Já os substratos ácidos *p*-hidroxi e amino benzoicos não foram biotransformados.

Conclui-se que o fungo N1CL5 além de ser um excelente produtor de citocalasinas C, D e Q, produz a 18 desoxicitocalasina Q, e também produz ciclodepsipeptídeos, como o tricodepsipeptídeo e outros dois depsipeptídeos que aparentemente são inéditos. A produção destes compostos por N1CL5 é um resultado bastante expressivo, pois somente dois relatos na literatura correlacionam à produção de depsipeptídeos e fungos do gênero *Xylaria*.

Conclui-se que o fungo N1CL3, *Nemania* aff. *primolutea*, produziu um novo sesquiterpeno eremofilano e também uma mistura de dois peptídeos cíclicos inéditos na literatura.

A técnica de MALDI-TOF foi capaz de diferenciar os micro-organismos estudados, sendo que os protocolos de extração ácido com 70% de ácido fórmico, extração básica e solução de matriz apresentaram os resultados mais promissores.

O confronto das técnicas de identificação de micro-organismo baseada em biologia molecular, perfil de biomarcadores por MALDI-TOF e perfil metabolômico, de forma geral, apontaram uma boa concordância. Logo, a espectrometria de massas é uma ferramenta eficaz e ágil para a distinção de micro-organismos.

6. Referências bibliográficas

ABATE, D.; ABRAHAM, W.-R.; MEYER, H. “Cytochalasins and phytotoxins from the fungus *Xylaria obovata*”. *Phytochemistry*, **44**: 1443, 1997.

ADEBOYA, M. O.; EDWARDS, R. L.; LASSØE, T.; DAITLAND, J.; SHIELDS, L. & WHALLEY, A. J. S. “Metabolites of the higher fungi. Part 29. Maldoxin, maldoxone, dihydromaldoxin, isodihydromaldoxin and dechlorodihydromaldoxin. A spirocyclohexadienone, a depsidone and three diphenyl ethers: keys in the depsidone biosynthetic pathway from a member of the fungus genus *Xylaria*”. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **12**: 1419, 1996.

ALDRIDGE, D. C.; ARMSTRONG, J. J.; SPEAKE, R. N. & TURNER, W. B. “The cytochalasins, a new class of biologically active mould metabolites”. *Chem. Commun.*, **1**: 26, 1967.

ALVI, K. A.; NAIR, B.; PU, H.; URSINO, R.; GALLO C & MOCEK, U. “Phomacins: three novel antitumor cytochalasan constituents produced by a *Phoma* sp.”. *J. Org. Chem.*, **62**: 2148, 1997.

AMARAL, L. S. “Análise de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos associados à *Cupressus lusitanica*”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2009. Dissertação de mestrado.

AMARAL, L. S. & RODRIGUES FILHO, E. “Two novel eremophilane sesquiterpenes from an endophytic Xylariaceous fungus isolated from leaves of *Cupressus lusitanica*” *J. Braz. Chem. Soc.*, **21**: 1446, 2010.

AMARAL, L. S.; MURGU, M.; RODRIGUES-FO, E.; DE SOUZA, A. Q. L. & SARQUIS, M. I. M. “A saponin tolerant and glycoside producer xylariaceous fungus isolated from fruits of *Sapindus saponaria*”. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**: 1341, 2008.

AMARAL, L. S.; RODRIGUES-FO, E.; SANTOS, C. A. A.; ABREU, L. M. & PFENNING, L. H. “An HPLC evaluation of cytochalasin D biosynthesis by *Xylaria arbuscula* cultivated in different media”. *Nat. Prod. Com.*, **9**: 1279, 2014.

ANDERSEN, B.; SMEDSGAARD, J. & FRISVAD, J. C. “*Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products”. *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 2421, 2004.

ANDERSON, J. R.; EDWARDS, R. L. & WHALLEY, A. J. S. "Metabolites of the higher fungi. Part 21. 3-methyl-3,4-dihydroisocoumarins and related compounds from the ascomycete family Xylariaceae", J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 2185, 1983.

ARAI, T.; UMEMURA, S.; OTA, T.; OGIHARA, J.; KATO, J. & KASUMI, T. "Effects of inorganic nitrogen source on the production of PP-V [(10Z)-12-carboxyl-monascorubramine] and the expression of the nitrate assimilation gene cluster by *Penicillium* sp. AZ". Biosci. Biotechnol. Biochem., 76 (1): 120, 2012.

BARABAN, E. G.; MORIN, J. B.; PHILLIPS, G. M.; PHILLIPS, A. J.; STROBEL, S. A. & HANDELSMAN, J. "Xyolide, a bioactive nonenolide from an Amazonian endophytic fungus, *Xylaria feejeensis*". Tetrahedron Lett., 54: 4058, 2013.

BETINA, V.; MICEKOVA, D. & NEMEC, P. "Antimicrobial properties of cytochalasins and their alteration of fungal morphology". J. Gen. Microbiol., 71: 343, 1972.

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

BODE, H. B.; BETHE B.; HOF, R. & ZEECK, A. "Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity". ChemBioChem, 3: 619, 2002.

BOONPHONG, S.; KITTAKOOP, P.; ISAKA, M.; PITTAYAKHAJONWUT, D.; TANTICHAROEN, M. & THEBTARANONTH. "Multiplolides A and B, new antifungal 10-membered lactones from *Xylaria multiplex*". J. Nat. Prod., 64: 965, 2001.

BRUNNER, F. & PETRINI, O. "Taxonomy of some *Xylaria* species and xylariaceous endophytes by isozyme electrophoresis". Mycol. Res., 96: 723, 1992.

CAI, M.; FANG, Z.; NIU, C.; ZHOU, X. & ZHANG, Y. "Light regulation on growth, development, and secondary metabolism of marine-derived filamentous fungi". Folia Microbiol., 58: 537, 2013.

CASELLA, T. M.; EPARVIER, V.; MANDAVID, H.; BENDELAC, A.; ODONNE, G.; DAYAN, L.; DUPLAIS, C.; ESPINDOLA, L. & STIEN, D.

“Antimicrobial and cytotoxic secondary metabolites from tropical leaf endophytes: Isolations of antibacterial agent pyrrocidine C from *Lewia infectoria* SNB-GTC2402”. *Phytochemistry*, **96**: 370, 2013.

CHALUPOVÁ, J.; SEDLÁROVÁ, M.; HELMEL, M.; REHULKA, P.; MARCHETTI-DESCHMANN, M.; ALLMAIER, G. & ŠEBELA, M. “MALDI-based intact spore mass spectrometry of downy and powdery mildews”. *J. Mass Spec.* **47**: 978, 2012.

CHEN J.; ZHANG, L. C.; XING, Y. M.; WANG, Y. Q.; XING, X. Q.; ZHANG, D. W.; LIANG, H. W. & GUO, S. X. “Diversity and taxonomy of endophytic Xylariaceae fungi from medicinal plants of *Dendrobium* (Orchidaceae). *PLoS ONE*, (8): 3, 1, 2013.

CHEN, H. Y.; CHEN, Y. C.; “Characterization of intact *Penicillium* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry”. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**: 3564, 2005.

CHRISTIAN, O. E.; COMPTON, J.; CHRISTIAN, K. R.; MOOBERRY, S. L.; VALERIOTE, F. A. & CREWS, P. “Using jasplakinolide to turn on pathways that enable the isolation of new chaetoglobosins from *Phomopsis asparagi*” *J. Nat. Prod.*, **68**: 1592, 2005.

CLARK, A. E. KALETA, E.J.; ARORA, A. & WOLK, D. M. “Matrix-Assisted Laser Desorption – Time of Flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology”. *Clin. Microbiol. Rev.*, 26 (3): 547, 2013.

COOPER, J. A. “Effects of cytochalasin and phalloidin on actin”. *J. Cell. Biol.* **105**: 1473, 1987.

COSSINS, E. A. & CHEN, L. “Folates and one-carbon metabolism in plants and fungi”. *Phytochemistry*, **45**: 437, 1997.

DAVIS, D. A. & KOTIV, M. “Synthesis of the fungal natural product (-)-xylariamide A”. *Tetrahedron Lett.*, 46 (31): 5199, 2005.

DAVIS, R. A. “Isolation and structure elucidation of the new fungal metabolite (-)-xylariamide A. *J. Nat. Prod.* **68**: 769, 2005.

DEYRUP, S. T.; GLOER, J. B.; O'DONNELL, K. & WICKLOW, D. T. “Kolokosides A-D: triterpenoid glycosides from a Hawaiian isolate of *Xylaria* sp.”. *J. Nat. Prod.*, **70**: 378, 2007.

DI SANTOS, R. “Natural products as antifungal agents against clinically relevant pathogens”. *Nat. Prod. Rep.*, **27**: 1084, 2010.

DOMBROWSKI, A. W.; BILLS, G. F.; SABNIS, G.; KOUPAL, L. R.; MEYER, R.; ONDEYKA, J. G.; GIACOBBE, R. A.; MONAGHAN, R. L. & LINGHAM, R. B. “L-696,474, a novel cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease. I. “The producing organism and its fermentation”. *J. Antibiot.*, **45**: 671 1992.

DONG, C.; FLECKS, S.; UNVERSUCHT, S.; HAUPT, C.; VAN PÉE, K. H. & NAISMITH, J. H. “Tryptophan 7-halogenase (PrnA) structure suggests a mechanism for regioselective chlorination”. *Science*, **309**: 2216, 2005.

EDWARDS, R. L. MAITLAND, D. J. & WHALLEY, J. S. “Metabolites of the Higher Fungi. Part 26. Cubenic Acid, 3,7,11,15-Tetrahydroxy-18-(hydroxymethyl)-2,4,6,10,14,16,20-heptamethyldocosa-4E,8E,12E-tetraenoic acid, a novel polysubstituted C₂₂ fatty acid from the fungus *Xylaria cubensis* (Mont.) Fr. with substituents and substitution pattern similar to the macrolide antibiotics”. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1411, 1991.

EDWARDS, R. L. MAITLAND, D. J.; PITTAYAKHAJONWUT, P. & WHALLEY, J. S. “Metabolites of the higher fungi. Part 33. Grammicin, a novel bicyclic C₇H₆O₄ furanopyranol from the fungus *Xylaria grammica* (Mont.) Fr.”. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **11**: 1296, 2001.

EDWARDS, R. L.; MAITLAND, D. J. & WHALLEY, A. J. S. “Metabolites of the higher fungi. Part 26. Cubenic acid, 3,7,11,15-tetrahydroxy-18-(hydroxymethyl)-2,4,6,10,14,16,20-heptamethyldocosa-4E,8E,12E,16E-tetraenoic acid, a novel polysubstituted C₂₂ fatty acid from the fungus *Xylaria cubensis* (Mont.) Fr. With substituents and substitution pattern similar to the macrolide antibiotics”. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1411, 1991.

FENSELAU, C.; DEMIREV, P. A. “Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry”. *Mass Spectrometry Reviews*, **20**: 157, 2001.

FILL, T. P. “Estudos metabólicos, enzimáticos e genéticos do fungo endofítico *Penicillium brasilianum*”. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCAR, 2014. Tese de doutorado, 127 p.

FOURNIER, J.; FLESSA, F.; PERŠOH, D. & STADLER, M. “Three new *Xylaria* species from southwestern Europe”. *Mycol Progress*, **10**: 33, 2011.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN B. & THRANE U. "The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi". *Mycological Research*, **112**: 231, 2008.

FUJII, Y.; TANI, H.; ICHINOE, M. & NAKAJIMA, H. "Zygosporin D and two new cytochalasin produced by the fungus *Metarrhizium anisopliae*". *J. nat. Prod.*, **63**: 132, 2000.

GAN, Y.; AU, J. L.; LU J. & WIENTJES, M. G. "Antiproliferative and cytotoxic effects of geldanamycin, cytochalasin E, suramin and thiacetazone in human prostate xenograft tumor histocultures". *Pharm. Res.*, **15**: 1760, 1998.

GE, H. M.; YAN, W.; GUO, Z. K.; LUO, Q.; FENG, R.; ZANG, L. Y.; SHEN, Y.; JIAO, R. H.; XUA, Q. & TAN, R. X. "Precursor-directed fungal generation of novel halogenated chaetoglobosins with more preferable immunosuppressive action". *ChemComm*, **47**: 2321, 2011.

GEBHARDT, K.; SCHIMANA, J.; HOLTZEL, A.; DETTNER, K.; DRAEGER, S.; BEIL, W.; RHEINHEIMER J. & FIEDLER, H. P. "Aspochalamins A-D and aspochalasin Z produced by the endosymbiotic fungus *Aspergillus niveus* LU 9575". *J. Antibiot.*, **57**: 707, 2004.

GOGOI, D. K.; MAZUMDER, S.; SAIKIA, R. & BORA, T. C. "Impact of submerged culture conditions on growth and bioactive metabolite produced by endophyte *Hypocrea* spp. NSF-08 isolated from *Dillenia indica* Linn. in North-East India". *Journal de Mycologie Médicale*, **18**: 1, 2008.

GOSS, R.; O'HAGAN, D. & COURTIEU, J. "Assay for the enantiomeric analysis of fluoroacetic acid: Insight into the stereochemical course of fluorination during fluorometabolite biosynthesis in *Streptomyces cattleya*". *J. Am. Chem. Soc.*, **125**: 379, 2003.

GRAF, W.; ROBERT, J.; VEDERAS, J. C.; TAMM, C.; SOLOMON, P. H.; MIURA, I. & NAKANISHI, K. "Biosynthesis of the Cytochalasins. Part III. ¹³C NMR of cytochalasin B (Phomin) and cytochalasin D. Incorporation of [1-¹³C] and [2-¹³C] sodium acetate". *Helv. Chim. Acta*, **57**: 1801, 1974.

GRIFFIN, J. F.; RAMPAL, A. L. & JUNG, C. Y. "Inhibition of glucose transport in human erythrocytes by cytochalasins: A model based on diffraction studies". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**: 3759, 1982.

GU, W. & DING, H. "Two new tetralone derivatives from the culture of *Xylaria hypoxylon* AT-028". *Chin. Chem. Lett.*, **18**: 1323, 2008.

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

HÄDENER, A.; ROTH, P. & TAMM, C. “Biosynthesis of cytochalasin. XI. “New results on the incorporation of phenylalanine into cytochalasin D, by *Zigospodium masonii*”. *Z. Naturforsch. C*, **44**: 19, 1989.

HE, A.; LI, T.; DANIELS, L.; FOTHERINGHAM, I. & ROSAZZA, J. P. N. “*Nocardia* sp. carboxylic acid reductase: cloning, expression, and characterization of a new aldehyde oxidoreductase family”. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1874, (2004).

HEALY, P. C.; HOCKING, A.; TRAN-DINH, N.; PITT, J. I.; SHIVAS, R. G.; MITCHELL, J. K.; KOTIW, M. & DAVIS, R. A. “Xanthones from a microfungus of the genus *Xylaria*”. *Phytochemistry*, **65**: 2373, 2004.

HEYNEKAMP, J. J.; HUNSAKER, L. A.; JAGT, T. A. V.; DECK, L. M. & JAGT, D. L. V. “Uncharged isocoumarin-based inhibitors of urokinase-type plasminogen activator”. *BMC Chem. Biol.*, **6**: 1, 2006.

HORN, W. S.; SIMMONDS, M. S. J. SCHWARTZ, R. E. & BLANEY, W. N. “Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp.”. *Tetrahedron*, **51**: 3969, 1995.

HSIEH, H. M.; LIN, C. R.; FANG, M. J.; ROGERS, J. D.; FOURNIER, J.; LECHAT, C. & JU, Y.M. “Phylogenetic status of *Xylaria* subgenus *Pseudoxylaria* among taxa of the subfamily Xylarioideae (Xylariaceae) and phylogeny of the taxa involved in the subfamily”. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **54**: 957, 2010.

HU, Z. Y.; LI, Y. Y.; HUANG, Y. J.; SU, W.-J. & SHEN, Y. M. “Three new sesquiterpenoids from *Xylaria* sp. NCY2”. *Helv. Chim. Acta*, **91**: 46, 2008.

HUANG, H. B.; FENG, X. J.; LIU, L.; CHEN, B.; LU, Y. J.; MA, L.; SHE, Z. G. & LIN, Y. C. “Three dimeric naphtha- γ -pyrones from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from *Pongamia pinnata*. *Planta Med.*, **76** (16): 1888, 2010.

HUANG, H. B.; XIAO, Z. E.; FENG, X. J.; HUANG, C. H.; ZHU, X.; JU, J. H.; LI, M. F.; LIN, Y. C.; LIU, L. & SHE, Z. G. “Cytotoxic naphtha- γ -pyrones from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus tubingensis*. *Helv. Chim. Acta*, **94**: 1733, 2011.

HUANG, Y., WANG J., LI G., ZHENG Z., SU W. “Anti tumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*”. FEMS Immunol. Med. Microbiol., **31**: 163, 2001.

ISAKA, M.; CHINTHANOM, P.; BOONRUANGPRAPA, T.; RUNGJINDAMAI, N. & PINRUAN, U. “Eremophilane-type sesquiterpenes from the fungus *Xylaria* sp. BCC 21097”. J. Nat. Prod., **73**: 683, 2010.

ISAKA, M.; SRISANOH, U.; SAPPAN, M.; KONGTHONG, S. & SRIKITIKULCHAI, P. “Eremophilane and eudesmane sesquiterpenoids and a pimarane diterpenoid from the wood-decay fungus *Xylaria* sp. BCC 5484”. Phytochem Lett., **5**: 78, 2012.

ISAKA, M.; YANGCHUM, A.; AUNCHAROEN, P.; SRICHOMTHONG, K. & SRIKITIKULCHAI, P. “Ring B aromatic norpimarane glucoside from a *Xylaria* sp.”. J. Nat. Prod., **74**: 300. 2011.

ISAKA, M.; YANGCHUM, A.; SUPOTHINA, S.; CHANTHAKET, R. & SRIKITIKULCHAI, P. “Isopimaranes and eremophilanes from the wood-decay fungus *Xylaria allantoides* BCC 23163”. Phytochem Lett., **8**: 59, 2014.

JIRAKKAKUL, J.; PUNYA, J.; PONGPATTANAKITSHOTE, S.; PAUNGMOUNG, P.; VORAPREEDA, N.; TACHALEAT, A.; KLOMNARA, C.; TANTICHAROEN, M. & CHEEVADHANARAK, S. “Identification of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for bassianolide synthesis in wood-decaying fungus *Xylaria* sp. BCC1067”. Microbiology, **154**: 995, 2008.

JOONG-HYEOP, P.; CHOI, G. J.; LEE, H. B.; KIM, K. M.; JUNG, H. S.; LEE, S. O., JANG, K. S.; CHO, K. Y. & KIM, J. C. “Griseofulvin from *Xylaria* sp. strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi”. J. Microbiol. Biotechnol., **15**: 112, 2005.

JU, Y.M. & HSIEH, H. M. “*Xylaria* species associated with nests of *Odontotermes formosanus* in Taiwan”. Mycologia. 99(6): 936, 2007.

KEMPTNER, J.; MARCHETTI-DESCHMANN, M.; KUBICEK, C. P. & ALLMAIER, G. “Mixed volume sample preparation method for intact cell mass spectrometry of *Fusarium* spores”. J. Mass. Spectrom., **44**: 1622, 2009.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; DAVID, J.C. & STALPERS, J.A. “Ainsworth & Bisby’s Dictionary of the Fungi”, tenth ed. CABI International University Press, Wallingford, UK., 2008.

KLAIKLAY, S.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SUKPONDMA, Y.; PHONGPAICHIT, S.; BUATONG, J. & BUSSABAN, B. "Metabolites from the mangrove-derived fungus *Xylaria cubensis* PSU-MA34". Arch. Pharm. Res., **35**: 1127, 2012.

KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; U.; AUST, H. J.; DRAEGER, S. & SCHULZ, B. "Geniculol, a new biologically active diterpene from the endophytic fungus *Geniculosporium* sp.". J. Nat. Prod., **62**: 155, 1999.

KUMAR, C.P.; YADAV, R. S. S. & SUDHA, Y. "Purification, characterization and steady state enzyme kinetics of laccase from *Xylaria polymorpha* MTCC-1100". Int. J. Res. Chem. Environ. 3 (2): 93, 2013.

LAATSCH, H. "Die Struktur von Imacidin". Liebigs Ann. Chem., 28, 1982.

LEE, J. S.; KO, K. S. & JUNG, H. S. "Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 sequences". FEMS Microbiology Letters, **187**: 89, 2000.

LI, T. & ROSAZZA, J. P. N. "NMR identification of an acyl-adenylate intermediate in the aryl-aldehyde oxidoreductase catalyzed reaction". J. Biol. Chem. **273**: 34230, 1998.

LI, T. & ROSAZZA, J. P. N. "Purification, characterization, and properties of an aryl aldehyde oxidoreductase from *Nocardia* sp. strain NRRL 5646". J. Bacteriol. **179**: 3482, 1997.

LI, T. Y.; LIU, B. H.; CHEN, Y. C., "Characterization of *Aspergillus* spores by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry", Rapid Commun. Mass Spectrom., **14**, 2393, 2000.

LI, Y. Y.; HU, Z. H.; LU, C. H. & SHEN, Y. M. "Four new terpenoids from *Xylaria* sp. 101". Helv. Chim. Acta, **93**: 796, 2010.

LI, Y.; HUANG, Y.; LI, H. & SHEN, Y. "Cytochalasin H2, a new cytochalasin, isolated from the endophytic fungus *Xylaria* sp. A23". Rec. Nat. Prod., **6**: 121, 2012.

LI, Z. H.; CHEN, J. W.; YUAN, F.; HUANG, Y. Y.; ZHAO, L. Z.; LI, J.; SU, H. X.; LIU, J.; PANG, J. Y.; LIN, Y. C.; LU, X. L.; PEI, Z.; WANG, G. H. & GUAN, Y. Y. "Xyloketal B exhibits its antioxidant activity through induction of HO-1 in vascular endothelial cells and zebrafish". Mar. Drugs, **11**: 504, 2013.

LIERS, C.; ULLRICH, R.; PECYNA, M.; SCHLOSSER, D. & HOFRICHTER, M. "Production, purification and partial enzymatic and molecular

characterization of a laccase from the wood-rotting ascomycete *Xylaria polymorpha*". Enzyme Microb. Technol., **41**: 785, 2007.

LIN, Y.; WU, X.; FENG, S.; JIANG, G.; LUO, J.; ZHOU, S.; VRIJMOED, L. L. P.; JONES, E. B. G.; KROHN, K.; STEINGRÖVER, K. & ZSILA, F. "Five unique compounds: xyloketal from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea Coast". J. Org. Chem., **66**: 6252, 2001.

LIN, Y.; WU, X.; FENG, S.; JIANG, G.; ZHOU, S.; VRIJMOED, L. L. P. & JONES, E. B. G. "A novel N-cinnamoylcyclopeptide an allenic ether from the fungus *Xylaria* sp. (strain # 2508) from the South China Sea". Tetrahedron Lett., **42**: 449, 2001.

LIN, Z.; ZHU, T.; WEI, H.; ZHANG, G.; WANG, H. & GU, Q. "Spicochalsin A and new aspochalsins from the marine-derived fungus *Spicaria elegans*. Eur. J. Org. Chem., **18**: 3045, 2009.

LINGHAM, R. B.; HSU, A.; SILVERMAN, K. C.; BILLS, G. F.; DOMBROWSKI, A.; GOLDMAN, M. E.; DARKE, P. L.; HUANG, L.; KOCH, G.; ONDEYKA, J. G. & GOETZ, M. A. "L-696,474, a novel cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease. III. Biological activity". J. Antibiot., **45**: 686, 1992.

LIU, K.; DING, X.; DENG, B. & CHEN, W. "10-Hydroxycamptothecin produced by a new endophytic *Xylaria* sp., M20, from *Camptotheca acuminata*". Biotechnol. Lett., **32**, 689, 2010.

LIU, K.; DING, X.; DENG, B. & CHEN, W. "Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*". J. Ind. Microbiol. Biotechnol., **36**: 1171, 2009.

LIU, R.; LIN, Z.; ZHU, T.; FANG, YUCHUM, GU, Q. & ZHU, W. "Novel open-chain cytochalsins from the marine-derived fungus *Spicaria elegans*". J. Nat. Prod., **71**: 1127, 2008.

LIU, X.; DONG, M.; CHEN, X.; JIANG, M.; & LV, X. & ZHOU, J. "Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin". Appl. Microbiol. Biotechnol., **78**: 241, 2008.

LU, X. L.; XU, Z. L.; YAO, X. L.; SU, F. J.; YE, C. H.; LI, J.; LIN, Y. C.; WANG, G. L.; ZENG, J. S.; HUANG, R. X.; OU, J. S.; SUN, H. S.; WANG, L. P.; PANG, J. Y. & PEI, Z. "Marine cyclotriptide X-13 promotes angiogenesis

in zebrafish and human endothelial cells via PI3K/Akt/eNOS signaling pathways”. *Mar. Drugs*, **10**: 1307, 2012.

MALMSTRØM, J. “Unguisins A and B: new cyclic peptides from the marine-derived fungus *Emericella unguis*”. *J. Nat. Prod.* **62**: 787, 1999.

MALMSTRØM, J.; RYAGER, A.; ANTHONI, U. & NIELSEN, P. H. “Unguisin C, a GABA-containing cyclic peptide from the fungus *Emericella unguis*”. *Phytochemistry* **60**: 869, 2002.

MARTIN, P. “Studies in the Xylariaceae VIII: *Xylaria* and its allies. South African Journal of Botany, **36**: 73, 1970.

MATHIEU, Y.; GELHAYE, E.; DUMARÇAY, E.; GÉRARDIN, P.; HARVENGT, L. & BUÉE, M. “Selection and validation of enzymatic activities as functional markers in wood biotechnology and fungal ecology”. *J. Microbiol. Methods*, **92**: 157, 2013.

MIAO, L.; KWONG T.F.N. & QIAN. P.y. “Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium c.f. saccharicola*”. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **72**: 1063, 2006.

MITCHELL, J. K.; KOTIW, M. & DAVIS, R. A. “Xanthones from a microfungus of the genus *Xylaria*”. *Phytochemistry*, **65**: 2373, 2004.

MURGU, M.; SANTOS, L. F. A.; DE SOUZA, G. D.; DAOLIO, C.; SCHNEIDER, B.; FERREIRA, A. G. & RODRIGUES-FO, E. “Hydroxylation of a hederagenin derived saponin by a Xylareaceous fungus found in fruits of *Sapindus saponaria*”. *J. Braz. Chem. Soc.* **19**, 831, 2008.

NGHI, D. H.; BITTNER, B.; KELLNER, H.; JEHMLICH, N.; ULLRICH, R.; PECYNA, M.J.; NOUSIAINEN, P.; SIPILÄ, D. J.; HUONG, L. M.; HOFRICHTER, M & LIERS, C. “The wood rot ascomycete *Xylaria polymorpha* produces a novel GH78 glycoside hydrolase that exhibits -L-rhamnosidase and feruloyl esterase activities and releases hydroxycinnamic acids from lignocelluloses”. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78 (14): 4893, 2012.

NELSON D. L. & COX, M. M. “Princípios de Bioquímica de Lehninger”. 5^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

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". J. Chromatogr. A, **1002**: 111, 2003.

NUKINA, M. "Pyrichalasin H, a new phytotoxic metabolite belonging to the cytochalasans from *Pyricularia grisea* (Cooke) Saccardo". Agric. Biol. Chem., **51**: 2625, 1987.

NUMATA, A.; TAKAHASHI, C.; ITO, Y.; MINOURA, K.; YAMADA, T.; MATSUDA, C. & NOMOTO, K. "Penochalasin, a novel class of cytotoxic cytochalasans from a *Penicillium* species separated from a marine alga: structure determination and solution conformation". J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 239, 1996.

OKANE, I. & NAKAGIRI, A. "Taxonomy of an anamorphic xylariaceous fungus from a termite nest found together with *Xylaria angulosa*. Mycoscience, **48**: 240, 2007.

OKANE, I.; SRIKITIKULCHAI, P.; TOYAMA, K.; LÆSSØE, T.; SIVICHAI, S.; HYWEL-JONES, N.; NAKAGIRI, A.; POTACHAROEN, W. & SUZUKI, K. "Study of endophytic Xylariaceae in Thailand: diversity and taxonomy inferred from rDNA sequence analyses with saprobes forming fruit bodies in the field. Mycoscience, **49**: 359, 2008.

OLA, A. R. B.; THOMY, D.; LAI, D.; BRÖTZ-OESTERHELT, H. & PROKSCH, P. "Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. J. Nat. Prod., **76**: 2094, 2013.

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

ONDEYKA, J.; HENSENS, O. D.; ZINK, D.; BALL, R.; LINGHAM, R. B.; BILLS, G.; DOMBROWSKI, A. & GOETZ, M. "L-696,474, a novel cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease. II. Isolation and structure". J. Antibiot., **45**: 679, 1992.

OXFORD, A.E., RAISTRICK, H., SIMONART, P. "Studies in the biochemistry of micro-organisms: griseofulvin, C₁₇H₁₇O₆Cl, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum*. Biochem. J. **33**: 240, 1939.

PERŠOH, D.; MELCHER, M. & GRAF, K. Molecular and morphological evidence for the delimitation of *Xylaria hypoxylon*. *Mycologia*, 101 (2): 256, 2009.

PETERSON, J. R. & MITCHISON, T. J. "Small molecules, big impact: A history of chemical inhibitors and the cytoskeleton". *Chem. Biol.*, **9**: 1275, 2002.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; E VIRET, O. "Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi". *Natural Toxins*, **1**: 185, 1992.

PINEDO-RIVILLA, C.; CAFÊU, M. C.; CASATEJADA, J. A.; ARAUJO, A. R. & COLLADO, I.G. "Asymmetric microbial reduction of ketones: absolute configuration of trans-4-ethyl-1-(1S-hydroxyethyl)cyclohexanol". *Tetrahedron: Asymmetry*, **20**: 2666, 2009.

PIPER, M. D.; HONG, S. P.; BALL, G. E.; DAWES, I. W. "Regulation of the Balance of One-carbon Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Biol. Chem.*, **275**: 30987, 2000.

PITTAYAKHAJONWUT P.; USUWAN A.; INTARAUDOM, C.; VEERANONDHA, S.; SRIKITIKULCHAI, P. "Sesquiterpene lactone 12,8-eudesmanolides from the fungus *Xylaria ianthinovelutina*". *Planta Med.*, **75**: 1431, 2009.

PITTAYAKHAJONWUT, P.; SUVANNAKAD, R.; THIENHIRUN, S.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P. & TANTICHAROENA, M. "An anti-herpes simplex virus-type 1 agent from *Xylaria mellisii* (BCC 1005)". *Tetrahedron Lett.*, **46**: 1341, 2005.

POINTING, S. B.; PARUNGAO, M. M. & HYDE, K. D. "Production of wood-decay enzymes, mass loss and lignin solubilization in wood by tropical Xylariaceae". *Mycol. Res.* 107 (2): 231, 2003.

PONGCHAROEN, W.; RUKACHAISIRIKUL, V.; ISAKA, M. & SRIKLUNG, K. "Cytotoxic metabolites from the wood-decayed fungus *Xylaria sp.* BCC 9653". *Chem. Pharm. Bull.*, 55 (11) 1647, 2007.

PRASAIN, J. K.; UEKI, M.; STEFANOWICZ, P. & OSADA, H. "Rapid screening and identification of cytochalasins by electrospray tandem mass spectrometry". *J. Mass Spectrom.*, **37**: 283, 2002.

QIAO, K.; CHOOI, Y. H. & TANG, Y. "Identification and engineering of the cytochalasin gene cluster from *Aspergillus clavatus* NRRL1". *Metab. Eng.*, **13**: 723, 2011.

RAMPAL, A. L.; PINKOFSKY, H. B. & JUNG, C. Y. "Structure of cytochalasins and cytochalasin B binding sites in human erythrocyte membranes". *Biochemistry*, **19**: 679, 1980.

RARIG, R. A. F.; TRAN, M. N. & CHENOWETH, M. "Synthesis and conformational dynamics of the reported structure of xylopyridine A". *J. Am. Chem. Soc.*, **135**: 9213, 2013.

RICHARDSON, S. N.; WALKER, A. K.; NSIAMA, T. K.; MCFARLANE, J.; SUMARAH, M. W.; IBRAHIM, A. & MILLER, J. D. "Griseofulvin-producing *Xylaria* endophytes of *Pinus strobus* and *Vaccinium angustifolium*: evidence for a conifer-understory species endophyte ecology". *Fungal Ecol.*, **11**: 107, 2014.

ROCHFORT, S.; FORD, J.; OVENDEN, S.; WAN, S. S.; GEORGE, S.; WILDMAN, H.; TAIT, R. M.; MEURER-GRIMES, B.; COX, S.; COATES, J. & RHODES, D. "A novel aspochalasin with HIV-1 integrase inhibitory activity from *Aspergillus flavipes*". *J. Antibiot.*, **58**: 279, 2005.

ROGERS, J. D. "Anamorphs of *Xylaria*: Taxonomic considerations". *Sydowia*, **38**: 255, 1985.

ROGERS, J. D. "Thoughts and musings on tropical Xylariaceae". *Mycol. Res.*, **104**: 1412, 2000.

ROTHWEILER, W. & TAMM, C. "Isolation and structure of phomin". *Experientia*, **22**: 750, 1966.

RUKACHAISIRIKUL, V.; BUADAM, S.; PHONGPAICHIT, S. & SAKAYAROJ, J. "Amide, cyclohexenone, and cyclohexenonesordaricin derivatives from the endophytic fungus *Xylaria plebeja* PSU-G30". *Tetrahedron*, **69**: 10711, 2013.

RUKACHAISIRIKUL, V.; BUADAM, S.; SUKPONDMA, Y.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J. & HUTADILOK-TOWATANA, N. "Indanone and mellein derivatives from the *Garcinia*-derived fungus *Xylaria* sp. PSU-G12. *Phytochemistru Lett.* **6**: 135, 2013.

RUKACHAISIRIKUL, V.; KHAMTHONG, N.; SUKPONDMA, Y.; PAKAWATCHAI, C.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J. & KIRTIKARA, K. "An [11]cytochalasin derivative from the marine-derived fungus *Xylaria* sp. PSU-F100". *Chem. Pharm. Bull.*, **57** (12): 1409, 2009.

RUKACHAISIRIKUL, V.; SOMMART, U.; PHONGPAICHIT, S.; HUTADILOK-TOWATANA, N.; UNGJINDAMAI, N. & SAKAYAROJ, J.

“Metabolites from the Xylariaceous Fungus PSU-A80”. Chem. Pharm. Bull., 55 (9): 1316, 2009.

SCHERLACH, K. & HERTWECK, C. “Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms”. Org. Biomol. Chem., 7: 1753, 2009.

SCHERLACH, K.; BOETTGER, D.; REMME, N. & HERTWECK, C. “The chemistry and biology of cytochalasans”. Nat. Prod. Rep., 27: 869, 2010.

SCHNEIDER, G.; ANKE, H. & STERNER, O. “Xylarin, an antifungal *Xylaria* metabolite with an unusual tricyclic uronic acid moiety”. Nat. Prod. Lett. 7: 309, 1995.

SCHOFIELD, J. G. “Cytochalasin B and release of growth hormone”. Nature New Biol., 234, 215, 1971.

SCHULZ, B.; BOYLE C.; DRAEGER, S.; ROMMERT A.& KROHN, K. “Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites”. Mycol. Res., 106 (9): 996, 2002.

SCHÜMANN, J. & HERTWECK, C. “Molecular basis of cytochalasin biosynthesis in fungi: gene cluster analysis and evidence for the involvement of a PKS-NRPS hybrid synthase by RNA silencing”. J. Am. Chem. Soc., 129: 9564, 2007.

SCHÜPEN, C.; SANTOS, M. A.; WEBER, U., DE GRAAF, A.; REVUELTA J. L. & STAHMANN, P. “Disruption of the SHM2 gene, encoding one of two serine hydroxymethyltransferase isoenzymes, reduces the flux from glycine to serine in *Ashbya gossypii*. Biochem. J., 369: 263, 2003.

SEKITA, S.; YOSHIHIRA, K.; NATORI, S. & KUWANO, H. “Chaetoglobosins, cytotoxic 10-(indo-3-yl)-[13] cytochalasans from *Chaetomium spp.* II. Structures of chaetoglobosins A, B and D”. Chem. Pharm. Bull., 30: 1618, 1982.

SEKITA, S.; YOSHIHIRA, K.; NATORI, S. & KUWANO, H. “Chaetoglobosins, cytotoxic 10-(indol-3-yl)-[13] cytochalasans from *Chaetomium spp.* III. Structures of chaetoglobosins C, E, F, G and J”. Chem. Pharm. Bull., 30: 1629, 1982.

SHIONO, Y.; MATSUI, N.; IMAIZUMI, T.; KOSEKI, T.; MURAYAMA, T.; KWON, E.; ABE, T. & KIMURA, K. I. “An unusual spirocyclic isopimarane diterpenoid and other isopimarane diterpenoids from fruiting bodies of *Xylaria polymorpha*”. Phytochem. Lett., 6: 439, 2013.

SHWAB, E. K. & KELLER, N. P. "Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes". *Mycol. Res.*, **112**: 225, 2008.

SILVA, G. H.; OLIVEIRA, C. M.; TELES, H. L.; PAULETTI, P.M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; COSTA-NETO, C. M.; PFENNING, L. H.; BERLINCK, R. G. S.; ARAUJO, A. S. "Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae)". *Phytochem. Lett.*, **3**: 164, 2010.

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

SONG, Y.; WANG, J.; HUANG, H.; MA, L.; WANG, J.; GU, Y.; LIU, L. & LIN, Y. "Four eremophilane sesquiterpenes from the mangrove endophytic fungus *Xylaria* sp. BL321". *Mar. Drugs* **10**: 340, 2012.

STADLER, M.; FOURNIER, J.; LÆSSØE T.; LECHAT, C.; TICHY, H-V. & PIEPENBRING, M. "Recognition of hypoxyloid and xylarioid *Entonaema* species and allied *Xylaria* species from a comparison of holomorphic morphology, HPLC profiles, and ribosomal DNA sequences". *Mycol. Prog.*, **7**: 53, 2008.

STADLER, M.; KUHNERT, E.; PERŠOH, D. & FOURNIER, J. "The Xylariaceae as model example for a unified nomenclature following the "One Fungus-One Name" (1F1N) concept". *Mycology*, (4): 1, 5, 2013.

STEHN, J. R.; SCHEVZOV, G.; O'NEIL, G. M. & GUNNING, P. W. "Specialisation of the tropomyosin composition of actin filaments provides new potential targets for chemotherapy". *Curr. Cancer Drug. Targets*, **6**: 245, 2006.

SUN, Z.; ZHANG, M.; ZHANG, J.; FENG, J. "Antifungal and cytotoxic activities of the secondary metabolites from endophytic fungus *Massrisson* sp. *Phytomedicine*, **18**:859, 2011.

SY-CORDEIRO, A.; GRAF, T. N.; ADCOCK, A. F.; KROLL, D. J.; SHEN, Q.; SWANSON, S. M.; WANI, M. C.; PEARCE, C. J. & OBERLIES, N. H. "Cyclodepsipeptides, sesquiterpenoids, and other cytotoxic metabolites from the filamentous fungus *Trichothecium* sp. (MSX 51320)". *J. Nat. Prod.* **74**: 2137, 2011.

TAKENAKA, S. T.; TANAKA, K. & YOSHIDA, K. “Molecular characterization of a novel N-acetyltransferase form *Chryseobacterium* sp. ”. Appl. Environ. Microbiol., **80**: 1770, 2013.

TAN, R. X. & ZOU, W. X. “Endophytes: a rich source of functional metabolites. Nat. Prod. Rep., **18**: 448, 2001.

TANG, A.M.C.; JEEWON, R. & HYDE, K.D. “Phylogenetic relationships of *Nemania plumbea* sp. nov. and related taxa based on ribosomal ITS and RPB2 sequences”. Mycol. Res., **111**: 392, 2007.

TANSUWAN, S.; PORNPAAKAKUL, S.; ROENGSUMRAN, S.; PETSOM, A.; MUANGSIN, N.; SIHANONTA, P. & CHAICHIT, N. “Antimalarial benzoquinones from an endophytic fungus, *Xylaria* sp.”. J. Nat. Prod., **70**: 1620, 2007.

UGADAWA, T.; YUAN, J. PANIGRAHY, D.; CHANG, Y. H.; SHAH, J. & D’AMATO, R. J. “Cytochalasin E, an epoxide containing *Aspergillus*-derived fungal metabolite, inhibits angiogenesis and tumor growth”. J. Pharmacol. Exp. Ther., **294**: 421, 2000.

VALENTINE, N. B.; WAHL, J. H.; KINGSLEY, M. T.; WAHL, K. L. “Direct analysis of fungal species matrix laser desorption/ionization mass spectrometry”. Rapid Commun. Mass Spectrom. **16**: 1352, 2002.

VAN DEN BAN, E. C. D.; WILLEMEN, H. M.; WASSINK, H.; LAANE, C. & HAAKER, H. “Bioreduction of carboxylic acids by *Pyrococcus furiosus* in batch cultures”. Enzyme Microb. Technol. **25**: 251, 1999.

VANZOLINI, K. L.; VIEIRA, L. C. C.; CORRÊA, A. G.; CARDOSO, C. L. & CASS, Q. B. “Acetylcholinesterase immobilized capillary reactors–Tandem mass spectrometry: An on-flow tool for ligand screening”. J. Med. Chem., **56**: 2038, 2013.

VEDERAS, J. C. & TAMM, C. “Biosynthesis of cytochalasans. Part 6. The mode of incorporation of phenylalanine into cytochalasin D”. Helv. Chim. Acta, **59**: 558, 1976.

VEDERAS, J. C.; GRAF, W.; DAVID, L. & TANN, C. “Biosynthesis of cytochalasans. Part 4. The mode of incorporation of common naturally occurring carboxylic acids into cytochalasin D”. Helv. Chim. Acta, **58**: 1887, 1975.

VENKITASUBRAMANIAN, P.; DANIELS, L. & ROSAZZA, J. P. N. “Reduction of carboxylic acids by *Nocardia* aldehyde oxidoreductase requires a phosphopantetheinylated enzyme”. J. Biol. Chem. **282**: 478, 2007.

VENKITASUBRAMANIAN, P.; DANIELS, L. & ROSAZZA, J.P.N. “Reduction of Carboxylic Acids by *Nocardia* Aldehyde Oxidoreductase Requires a Phosphopantetheinylated Enzyme”. J. Biol. Chem. **282**, 478, 2007.

VENKITASUBRAMANIAN, P.; DANIELS, L.; DASA, S.; LAMMA, A. S. & ROSAZZA, J. P. N. “Aldehyde oxidoreductase as a biocatalyst: reductions of vanillic acid”. Enzyme Microb. Technol. **42**: 130, 2008.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAVI, B. “Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity”. Biomed. Res. Int., **2013**: 1, 2013.

VISSER, A.A.; ROS, V.I.D.; DE BEER, Z.W.; DEBETS, A.J.M.; HARTOG, E.; KUYPER, T.W.; LÆSSØE, T.; SLIPPERS, B. & AANEN, D.K. “Levels of specificity of *Xylaria* species associated with fungus-growing termites: a phylogenetic approach”. Mol. Ecol., **18**: 553, 2009.

WANG, F.; HAN, S.; HU, S.; XUE, Y.; WANG, J.; XU, H.; CHEN, L.; ZHANG, G. & ZHANG, Y. “Two new secondary metabolites from *Xylaria* sp. cfcc 874668. Molecules, **19**: 1250, 2014.

WANG, W. J.; LI, D. Y.; LI, Y. C.; HUA, H. M.; MA, E. L. & LI, Z. L. “Caryophyllene sesquiterpenes from the marine-derived fungus *Ascotricha* sp. ZJ-M-5 by the One-Strain-Many-Compounds strategy”. J. Nat. Prod., **77**: 1367, 2014.

WANG, X. N.; TAN, R. X. & LIU, J. K. “Xylactam, a new nitrogen-containing compound from the fruiting body of ascomycete *Xylaria euglossa*”. J. Antibiot., **58** (4): 268, 2005.

WANG, X. N.; TAN, R. X.; WANG, F.; STEGLICH, W. & LIU, J. K. “The first isolation of a phlegmacin type pigment from the ascomycete *Xylaria euglossa*”. Z. Naturforsch. B, **60**: 333, 2005.

WELHAM, K. J.; DOMIN, M. A.; JOHNSON, K.; JONES, L.; ASHTON, D. S. “Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry”. Rapid Commun. Mass Spectrom., **14**, 307, 2000.

WHALLEY, A. J. S. “The Xylariaceous way of life”. Mycol. Res. **100** (8): 897 1996.

WHITE, H.; FEICHT, R.; HUBER, C.; LOTTSPEICH, F. & SIMON, H. "The tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from *Clostridium thermoaceticum* and its complex with a viologen-accepting NADPH oxidoreductase". Biol. Chem. Hoppe-Seyler **372**: 999, 1991.

WHITE, H.; HUBER, C.; FEICHT, R. & SIMON, H. "On a reversible molybdenum-containing aldehyde oxidoreductase from *Clostridium formicoaceticum*". Arch. Microbiol. **159**: 244, 1993.

WHITE, H.; STROBL, G.; FEICHT, R. & SIMON, H. "Carboxylic acid reductase: a new tungsten enzyme catalyses the reduction of non-activated carboxylic acids to aldehydes". Eur. J. Biochem. **184**: 89, 1989.

WU, W.; DAI, H.; BAO, L.; REN, B.; LU, J.; LUO, Y.; GUO, L.; ZHANG, L. & LIU, H. "Isolation and structural elucidation of proline-containing cyclopentapeptides from an endolichenic *Xylaria* sp.". J. Nat. Prod. **74**: 1303, 2011.

WU, X.; LIU, X. H.; LIN, Y. C.; LUO, J. H.; SHE, Z. G.; HOUJIN, LI.; CHAN, W. L.; ANTUS, S.; KURTAN, T; ELSÄSSER, B. & KROHN, K. "Xyloketal F: a strong L-calcium channel blocker from the mangrove fungus *Xylaria* sp. (#2508) from the South China Sea Coast". Eur. J. Org. Chem., **19**: 4061, 2008.

WU, X.; LIU, X.; JIANG, G.; LIN Y.; CHAN, W. & VRIJMOED, L. L. P. "Xyloketal G, a novel metabolite from the mangrove fungus *Xylaria* sp. 2508". Chem. Nat. Compd., **41**: 27, 2005.

XIAOBO, Z.; HAIYING, W.; LINYU H.; YONGCHENG, L.& ZHONGTAO, L. "Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of eucalyptene A and xyloketal A from *Xylaria* sp. 2508 using response surface methodology". Process Biochem., **41**: 293, 2006.

XU, F.; ZHANG, Y.; WANG, J.; PANG, J.; HUANG, C.; WU, X.; SHE, Z.; VRIJMOED, L. L. P.; JONES, E. B. G. & LIN, Y. "Benzofuran derivatives from the mangrove endophytic fungus *Xylaria* sp. (#2508)". J. Nat. Prod. **71**: 1251, 2008.

XU, F.; ZHANG, Y.; WANG J.; PANG, J.; HUANG, C.; WU, X.; SHE, Z.; VRIJMOED, L. L. P.; JONES E. B. G. & LIN, Y. "Benzofuran derivatives from the mangrove endophytic fungus *Xylaria* sp. J. Nat. Prod., **71**: 1251, 2008.

XU. F.; PANG, J.; LU, B.; WANG, J.; ZHANG, Y.; SHE, Z.; VRIJMOED, L. L. P.; GARETH JONES, E. B. & LIN, Y. "two new metabolites with DNA-

binding affinity from the mangrove fungus *Xylaria* sp. (#2508) from the South China Sea Coast". *Chin. J. Chem.*, **27**: 365, 2009.

YAN, S.; LI, S.; WU, W.; ZHAO, F.; BAO, L.; DING, R.; GAO, H.; WEN, H. A.; SONG, F. & LIU, H. W. "Terpenoid and phenolic metabolites from the fungus *Xylaria* sp. associated with termite nests". *Chem. Biodivers.*, **8**: 1689, 2011.

YAN, W.; LIN, Y.; SHE, Z.; VRIJMOED, L. L. P. & JONES, G. "A new compound: xyloketal H from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea Coast". *Chem. Nat. Compd.*, **44**: 3, 2008.

YEH, E.; BLASIAK, L. C.; KOGLIN, A.; DRENNAN, C. L. & WALSH, T. "Chlorination by a long-lived intermediate in the mechanism of flavin-dependent halogenases". *Biochemistry*, **47**: 1248, 2007.

YIN, X.; FENG, T.; LI, Z. H.; SU, J.; LI, Y.; TAN, N.H. & LIU, J. K. "Chemical investigation on the cultures of the fungus *Xylaria carpophila*". *Nat. Prod. Bioprospect.* **1**: 75, 2011.

ZHANG, Y.; TIAN, R.; LIU, S.; CHEN, X.; LIU, X. & CHE, Y. "Alachalasin A-G, new cytochalasins from the fungus *Stachybotrys charatum*". *Bioorg. Med. Chem.*, **16**: 2627, 2008.

ZHANG, Y.; TIAN, R.; LIU, S.; CHEN, X.; LIU, X. & CHE, Y. "Corrigendum to Alachalasin A-G, new cytochalasins from the fungus *Stachybotrys charatum*". *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 428, 2009.

ZHOU, G. X.; WIJERATNE, E. M.; BIGELOW, D. & PIERSON 3RD L. S.; VANETTEN, H. D. & GUNATILAKA, A. A. L. "Aspochalasin I, J, and K: three new cytotoxic cytochalasins of *Aspergillus flavipes* from the rhizosphere of *Ericameria laricifolia* of the Sonoran Desert". *J. Nat. Prod.*, **67**: 328, 2004.