

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

**ESTUDO QUÍMICO DO FUNGO *Colletotrichum acutatum* E
SUA INTERAÇÃO COM *Citrus sinensis***

Wesley Faria Gomes*

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

* bolsista Capes

São Carlos - SP

2014

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar

G633eq Gomes, Wesley Faria.
Estudo químico do fungo *Colletotrichum acutatum* e sua interação com *Citrus sinensis* / Wesley Faria Gomes. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
190 f.

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

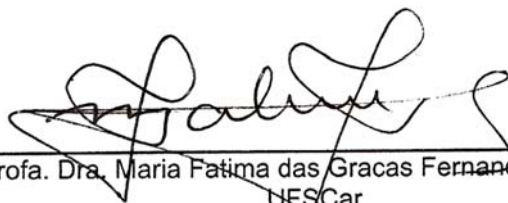
1. Química orgânica. 2. *Colletotrichum acutatum*. 3. Cítricos. 4. Moduladores epigenéticos. 5. Cultivo pareado. 6. Componentes voláteis. I. Título.

CDD: 547 (20^a)

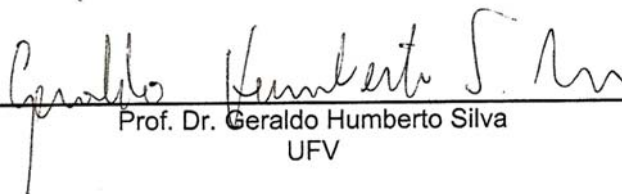


Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de Doutor em Ciências do candidato Wesley Faria Gomes, realizada em 06/11/2014:



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



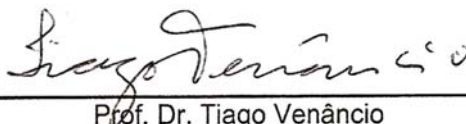
Prof. Dr. Geraldo Humberto Silva
UFV



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
UFSCar



Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati
ESALQ/USP



Prof. Dr. Tiago Venâncio
UFSCar

**Ao Senhor meu Deus por me conceder o dom da vida e ter
dado a oportunidade de completar mais uma
etapa da minha vida profissional.**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, Leonildo Pereira Gomes e Elza Faria Gomes, pelo incentivo, amor, carinho, repreensão. Saibam que vocês são responsáveis por grande parte dessa vitória.

Ao meu irmão Kley, pelo companheirismo, palavras de incentivo, e por sempre fazer acreditar que eu poderia chegar mais além do que imaginava.

A toda minha família que, sempre com palavras motivadoras, me ajudou a superar todos os obstáculos dessa etapa. Sem contar a compreensão por algumas ausências em reuniões familiares.

A todos os meus amigos por sempre estarem torcendo e orando por minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de São Carlos, através do Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ) e à Universidade de Cádiz, pela oportunidade de execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof^a. Dr^a. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva pela orientação. Sempre com palavras sábias e motivadoras fez com que o meu estímulo e apreço pela pesquisa se renovasse a cada dia.

Ao Prof. Dr. Isidro Gonzalez Collado, pela orientação na Universidade de Cádiz.

Aos professores do grupo de Produtos Naturais da UFSCar (PN-UFSCar), Prof. Dr. João Batista Fernandes, Prof. Dr. Paulo César Vieira, Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, pelos conselhos e palavras de conforto.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, pelos conselhos e direcionamento no nosso trabalho.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), ao Rodrigo Facchini Magnani, ao Dr. Geraldo José Silva e seus alunos Gleisson e Rosana, pelo auxílio no experimento com as flores.

Ao Dr. Leonardo Toffano pelo auxílio nos ensaios biológicos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati da Universidade de São Paulo-ESALQ (Campus Piracicaba) junto ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia por ter cedido o fungo *Colletotrichum acutatum*.

Ao meu amigo Dr. Murilo Marinho pelos conselhos, amizade e companheirismo.

Aos meus amigos conterrâneos Moacir Andrade e Edenilson Niculau, por me apoiarem e fazerem com que acreditasse em mim mesmo. Valeu Sergipanidade!!!

À minha amiga Danielle Santos que vem acompanhando essa luta desde a graduação.

Aos meus amigos Barbara, Israel, Tati, Sâmya e Keylla pela amizade e auxílio em algumas etapas do meu trabalho.

A todos meus amigos do PN-UFSCar, foi uma enorme satisfação compartilhar quatro anos da minha vida profissional com vocês.

A todos os meus amigos que deixei na Espanha, em especial, Bauer, Euge, Ana, Alej, Francys, Inma, Moraga, Blanker, Oly, EPT, Helena, Chiki, Cies, Juanjo, Migue, Carmén, e ao meu irmão A. Ruano. Obrigado por fazerem com que 2013 fosse o melhor ano da minha vida. Viva a Família Meandro!!!

ABREVIATURA E SÍMBOLOS

BD – batata-dextrose

BDLEv – batata-dextrose suplementado com 1% de levedura

CDCl₃ - Clorofórmio Deuterado

CG-EM - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COSY - *Correlation Spectroscopy*

d - Dubleto

dd - duplo dubleto

ddd - duplo duplo dubleto

DKPs - dicetopiperazinas

EM - Espectrometria de massas

eV - eletro volts

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

Hz – Hertz

IR - Índice de Retenção de Kovats

J - Constante de Acoplamento

m - multiplete

m/z - relação massa sobre carga

MeOH - Metanol

min - minutos

PDMS – Polimetilsiloxano

ppm - partes por milhão

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s - Singleto

sl - Singleto largo

SPE - *Solid-Phase Extraction* (Extração em Fase Sólida)

SPME - *Solid Phase Micro-Extraction* (Microextração em Fase Sólida)

t - Tripleto

t.r. – Tempo de Retenção

TIC - *Total Ion Chromatogram*

UV - *Ultraviolet Detector*

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 400 e 100 MHz) da substância 01 em comparação com os dados da literatura.	34
TABELA 2.2 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 400 e 100 MHz) da substância 03 em comparação com os dados da literatura.	39
TABELA 2.3 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 400 e 100 MHz) da substância 04 em comparação com os dados da literatura.	44
TABELA 2.4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD , 400 e 100 MHz) da substância 07 em comparação com os dados da literatura.	54
TABELA 2.5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO-d_6 , 400 e 100 MHz) da substância 08 em comparação com os dados da literatura.	57
TABELA 2.6 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD , 400 e 100 MHz) da substância 09 em comparação com os dados da literatura.	60
TABELA 2.7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD , 400 e 100 MHz) da substância 10 em comparação com os dados da literatura.	66
TABELA 2.8 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD , 400 e 100 MHz) da substância 11 em comparação com os dados da literatura.	74
TABELA 2.9 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD , 400 e 100 MHz) da substância 12 em comparação com os dados da literatura.	77
TABELA 2.10 - Dados de RMN de ^1H (MeOD , 400 MHz) da substância 13 em comparação com os dados da literatura.	79
TABELA 2.11 - Constituintes químicos voláteis de <i>C. acutatum</i> em BDLev.	81
TABELA 3.1 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD , 400 e 100 MHz) da substância 15 em comparação com os dados da literatura.	102
TABELA 3.2 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD , 400 e 100 MHz) da substância 16 em comparação com os dados da literatura.	107
TABELA 3.3 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD , 400 e 100 MHz) da substância 17 em comparação com os dados da literatura.	110
TABELA 3.4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD , 400 e 100 MHz) da substância 18 em comparação com os dados da literatura.	112
TABELA 3.5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD , 400 e 100 MHz) da substância 19 em comparação com os dados da literatura.	115
TABELA 3.6 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD , 400 e 100 MHz) da substância 20 em comparação com os dados da literatura.	118
TABELA 3.7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 400 e 100 MHz) da substância 21 em comparação com os dados da literatura.	121
TABELA 3.8 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD , 400 e 100 MHz) da substância 22 em comparação com os dados da literatura.	126
TABELA 3.9 - Dados de RMN de ^1H ($\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$, 400 MHz) da substância 23 em comparação com os dados da literatura.	131
TABELA 3.10 - Dados de RMN de ^1H ($\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$, 400 MHz) da substância 24.	133
TABELA 3.11 - Dados de RMN de ^1H (MeOD , 400 MHz) da substância 25 em comparação com os dados da literatura.	135

TABELA 3.12 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD, 400 e 100 MHz) da substância 26	141
TABELA 4.1 - Constituintes químicos voláteis das flores de <i>C. sinensis</i> sadias (FS) e infectadas com 2, 4 e 7 dias (FD01, FD02 e FD03)	163
TABELA 4.2 - Porcentagem de inibição das substâncias testadas frente <i>C. acutatum</i>	172
TABELA 4.3 - Porcentagem de inibição das substâncias testadas frente <i>A. alternata</i>	174

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Sintomas da Podridão Floral dos Citros em pétalas de <i>Citrus sinensis</i> (CINTRA, 2009)	2
FIGURA 1.2 - Aspecto morfológico do fungo <i>Colletotrichum acutatum</i> cultivado em meio batata-dextrose-ágar	3
FIGURA 2.1 - Metabolitos isolados do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	8
FIGURA 2.2 - Metabolitos isolados de espécies de <i>Colletotrichum</i>	10
FIGURA 2.3 - Metabolitos isolados do fungo <i>Colletotrichum nicotianae</i>	11
FIGURA 2.4 - Metabolitos isolados do fungo <i>Colletotrichum capsici</i>	12
FIGURA 2.5 - Metabolitos isolados do fungo <i>Colletotrichum dematium</i>	12
FIGURA 2.6 - Metabolitos isolados do fungo <i>Colletotrichum acutatum</i>	13
FIGURA 2.7 - Compostos indólicos identificados em <i>Colletotrichum acutatum</i>	14
FIGURA 2.8 - Metabolitos isolados do fungo <i>Colletotrichum fragariae</i> e <i>Colletotrichum lagenarium</i>	15
FIGURA 2.9 - Metabolito isolado de <i>Colletotrichum sp.</i>	15
FIGURA 2.10 - Metabolitos isolados de <i>Colletotrichum sp.</i>	16
FIGURA 2.11 - Metabolitos isolados de <i>Colletotrichum sp.</i>	18
FIGURA 2.12 - Metabolitos isolados de <i>Colletotrichum sp.</i>	19
FIGURA 2.13 - Metabolitos isolados de <i>Colletotrichum graminicola</i>	19
FIGURA 2.14 - Esteroides isolados de <i>Colletotrichum sp.</i>	20
FIGURA 2.15 - Derivados dicetopiperazínicos isolados de <i>C. gloeosporioides</i>	21
FIGURA 2.16 - Aspecto do fungo <i>Colletotrichum acutatum</i> cultivado em diferentes meios de cultivo após 20 dias de crescimento	28
FIGURA 2.17 - Cromatogramas CLAE-UV dos extratos metanólicos de <i>Colletotrichum acutatum</i> cultivado em BD, CZAPECK e BDLev	29
FIGURA 2.18 - Espectro de RMN ¹ H da substância 01 (CDCl ₃ , 400 MHz)	35
FIGURA 2.19 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 01 (CDCl ₃ , 400 MHz)	37
FIGURA 2.20 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 01 (CDCl ₃ , 100 MHz)	37
FIGURA 2.21 - Espectro de RMN ¹ H da substância 02 (CDCl ₃ , 400 MHz)	39
FIGURA 2.22 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 02 (CDCl ₃ , 400 MHz)	39
FIGURA 2.23 - Espectro de RMN ¹ H da substância 03 (CDCl ₃ , 400 MHz)	42
FIGURA 2.24 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 03 (CDCl ₃ , 400 MHz)	42
FIGURA 2.25 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 03 (CDCl ₃ , 100 MHz)	43
FIGURA 2.26 - Espectro de RMN ¹ H da substância 04 (CDCl ₃ , 400 MHz)	45
FIGURA 2.27 - Espectro de (a) COSY e (b) HSQC da substância 04	47
FIGURA 2.28 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 04 (CDCl ₃ , 100 MHz)	48
FIGURA 2.29 - Cromatograma de íons monitorados do oleato de metila após a reação de transesterificação	49
FIGURA 2.30 - Espectro de massas do éster da substância 04	49
FIGURA 2.31 - Espectro de RMN ¹ H da substância 05 (CDCl ₃ , 400 MHz)	51

FIGURA 2.32 - Cromatograma de íons totais dos ésteres dos ácidos que esterificam o glicerol, após a reação de transesterificação	51
FIGURA 2.33 - Espectro de massas do éster do ácido palmítico	52
FIGURA 2.34 - Espectro de massas do éster do ácido linoleico	52
FIGURA 2.35 - Espectro de massas do éster do ácido oleico	52
FIGURA 2.36 - Espectro de RMN ¹ H da substância 06 (MeOD, 400 MHz)	53
FIGURA 2.37 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 06	54
FIGURA 2.38 - Espectro de RMN ¹ H da substância 07 (MeOD, 400 MHz)	56
FIGURA 2.39 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 07	57
FIGURA 2.40 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 07 (MeOD, 100 MHz)	57
FIGURA 2.41 - Espectro de RMN ¹ H da substância 08 (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	60
FIGURA 2.42 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 08 (DMSO-d ₆ , 100 MHz)	60
FIGURA 2.43 - Espectro de RMN ¹ H da substância 09 (MeOD, 400 MHz)	63
FIGURA 2.44 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 09	63
FIGURA 2.45 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 09 (MeOD, 100 MHz)	64
FIGURA 2.46 - Espectro de massas da substância 09	64
FIGURA 2.47 - Espectro de RMN ¹ H da substância 10 (MeOD, 400 MHz)	66
FIGURA 2.48 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 10	68
FIGURA 2.49 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 10 (MeOD, 100 MHz)	68
FIGURA 2.50 - Espectro de HSQC da substância 10 (MeOD, 400 MHz)	69
FIGURA 2.51 - Espectro de massas da substância 10	69
FIGURA 2.52 - Espectro de RMN ¹ H da substância 11 (MeOD, 400 MHz)	71
FIGURA 2.53 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 11	73
FIGURA 2.54 - Espectro de massas da substância 11	73
FIGURA 2.55 - Espectros de RMN (a) HSQC e (b) COSY da substância 11	74
FIGURA 2.56 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 11 (MeOD, 100 MHz)	75
FIGURA 2.57 - Formação do tirosol a partir da tirosina	76
FIGURA 2.58 - Espectro de RMN ¹ H da substância 12 (MeOD, 400 MHz)	77
FIGURA 2.59 - Ampliação de espectro de RMN ¹ H da substância 12	78
FIGURA 2.60 - Espectro de massas da substância 12	78
FIGURA 2.61 - Espectro de massas da substância 13	80
FIGURA 2.62 - Espectro de RMN ¹ H da substância 13 (MeOD, 400 MHz)	80
FIGURA 2.63 - Cromatograma de íons totais do meio de cultivo BDLev sem a presença do fungo <i>Colletotrichum acutatum</i>	82
FIGURA 2.64 - Cromatograma de íons totais do meio de cultivo BDLev com a presença do fungo <i>Colletotrichum acutatum</i>	82
FIGURA 2.65 - Espectro de massas do álcool feniletílico	82
FIGURA 3.1 - Esquema de reações que ocorrem com as histonas na célula (CHERBLANC et al., 2012).	88
FIGURA 3.2 - Moduladores epigenéticos inibidores da DNA metiltransferase e Histona deacetilase utilizados em cultivos de microrganismos	89
FIGURA 3.3 - Cultivo do fungo <i>Colletotrichum acutatum</i> sob agitação	94
FIGURA 3.4 - Esquema de zonas de enfrentamento foram extraídas AcOEt	96

FIGURA 3.5 - Espectro de RMN ¹ H da substância 14 (CDCl ₃ , 400 MHz)	101
FIGURA 3.6 - Espectro de RMN ¹ H da substância 15 (MeOD, 400 MHz)	103
FIGURA 3.7 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 15	104
FIGURA 3.8 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 15 (MeOD, 100 MHz)	104
FIGURA 3.9 - Espectro de (a) COSY e (b) HSQC da substância 15	105
FIGURA 3.10 - Espectro de massas da substância 15	106
FIGURA 3.11 - Espectro de RMN ¹ H da substância 16 (MeOD, 400 MHz)	107
FIGURA 3.12 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 16 (MeOD, 100 MHz)	108
FIGURA 3.13 - Espectro de massas da substância 16	108
FIGURA 3.14 - Espectro de massas da substância 17	109
FIGURA 3.15 - Espectro de RMN ¹ H da substância 17 (MeOD, 400 MHz)	110
FIGURA 3.16 - Espectro de RMN ¹ H da substância 18 (MeOD, 400 MHz)	112
FIGURA 3.17 - Espectro de COSY da substância 18	113
FIGURA 3.18 - Espectro de massas da substância 18	113
FIGURA 3.19 - Espectro de RMN ¹ H da substância 19 (MeOD, 400 MHz)	115
FIGURA 3.20 - Espectro de massas da substância 19	116
FIGURA 3.21 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 19 (MeOD, 100 MHz)	116
FIGURA 3.22 - CCD do Ext. AcOEt do meio de cultura com butirato de sódio	117
FIGURA 3.23 - Espectro de RMN ¹ H da substância 20 (MeOD, 400 MHz)	119
FIGURA 3.24 - Espectro de massas da substância 20	119
FIGURA 3.25 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 20 (MeOD, 100 MHz)	119
FIGURA 3.26 - Espectro de RMN ¹ H da substância 21 (CDCl ₃ , 400 MHz)	122
FIGURA 3.27 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 21	122
FIGURA 3.28 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 21	123
FIGURA 3.29 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 21 (CDCl ₃ , 100 MHz)	123
FIGURA 3.30 - Provável caminho biossintético da substância 22	125
FIGURA 3.31 - Espectro de RMN ¹ H da substância 22 (MeOD, 400 MHz)	126
FIGURA 3.32 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 22	127
FIGURA 3.33 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 22 (MeOD, 100 MHz)	127
FIGURA 3.34 - Espectro de COSY da substância 22 (MeOD, 400 MHz)	128
FIGURA 3.35 - Espectro de RMN ¹ H da substância 23 (C ₂ D ₆ CO, 400 MHz)	130
FIGURA 3.36 - Espectro de massas da substância 23	130
FIGURA 3.37 - Espectro de massas da substância 24	132
FIGURA 3.38 - Espectro de RMN ¹ H da substância 24 (C ₂ D ₆ CO, 400 MHz)	133
FIGURA 3.39 - Espectro de massas da substância 25	134
FIGURA 3.40 - Espectro de RMN ¹ H da substância 25 (MeOD, 400 MHz)	135
FIGURA 3.41 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 25	136
FIGURA 3.42 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD) CD das zonas de contato de <i>C. acutatum</i> com (a) <i>TaΔTri5</i> e (b) <i>Memmoniella levispora</i>	138

FIGURA 3.43 - Aspecto do crescimento dos fungos em cultivo pareado com <i>Colletotrichum acutatum</i>	138
FIGURA 3.44 - Aspecto das hifas nas áreas de contato de <i>Colletotrichum acutatum</i> com (a) <i>Memmoniella levispora</i> , (b) <i>Phytophthora nicotianae</i> e (c) <i>Alternaria alternata</i> . Foto tirada após 7 dias de cultivo. Aumento de 100x	139
FIGURA 3.45 - Espectro de RMN ¹ H da substância 26 (MeOD, 400 MHz)	141
FIGURA 3.46 - Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 26	142
FIGURA 3.47 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 26 (MeOD, 100 MHz)	142
FIGURA 3.48 - Biossíntese do triptofano pelo caminho do chiquimato	144
FIGURA 3.49 - Biossíntese de alcaloides indólicos derivados do triptofano (BARTEL, 1997)	145
FIGURA 4.1 - (a) botões de <i>Citrus sinensis</i> ; (b) flores da laranja sadias e (c) flores da laranja com 7 dias de infectadas	153
FIGURA 4.2 - Procedimento experimental para avaliação do ensaio antifúngico de crescimento micelial de <i>Colletotrichum acutatum</i> e <i>Alternaria alternata</i>	155
FIGURA 4.3 - Procedimento experimental para ensaio antifúngico de germinação de esporos e formação de apressórios de <i>Colletotrichum acutatum</i> e <i>A. alternata</i>	156
FIGURA 4.4 - Compostos voláteis identificados nas flores de <i>Citrus sinensis</i> sadias e infectadas	159
FIGURA 4.5 - Comparação dos cromatogramas dos voláteis das flores sadias e infectadas	160
FIGURA 4.6 - Espectro de massas do linalol	160
FIGURA 4.7 - Cromatograma de íons totais dos voláteis das flores infectadas com (a) 2 dias, (b) 4 dias e (c) 7 dias	161
FIGURA 4.8 - Cromatograma de íons totais do fungo <i>C. acutatum</i> na presença de linalol	162
FIGURA 4.9 - Gráfico ilustrativo das áreas percentuais dos componentes voláteis identificados nas flores de <i>Citrus sinensis</i> sadias (FS) e infectadas com 2, 4 e 7 dias (FD02, FD04 e FD07)	164

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 1: Esquema de fracionamento do extrato metanólico do micélio do fungo <i>Colletotrichum acutatum</i>	26
FLUXOGRAMA 2: Esquema do fracionamento do Ext. AcOEt do meio de cultivo de <i>C. acutatum</i> incorporado com moduladores químicos (fenilalanina e jasmonato de metila) após 20 dias	93
FLUXOGRAMA 3: Esquema de fracionamento do extrato acetato de etila do meio de cultivo de <i>Colletotrichum acutatum</i> incorporado com o modulador epigenético butirato de sódio após 20 dias	95

RESUMO

ESTUDO QUÍMICO DO FUNGO *Colletotrichum acutatum* E SUA INTERAÇÃO COM *Citrus sinensis*: O Brasil mantém-se como maior produtor mundial de laranja, sendo responsável por 32% da produção total de laranja e 50% de suco de laranja. O Estado de São Paulo detém 97% das exportações brasileiras de suco de laranja, possuindo uma das maiores áreas citrícolas do mundo. As plantas cítricas podem ser afetadas por vários agentes fitopatogênicos onde se destaca o fungo *Colletotrichum acutatum*, agente causal da Podridão Floral dos Citros (PFC), que sob determinadas condições ambientais, constitui-se em um fator limitante à produção em várias áreas citrícolas. Diante do exposto e visto a importância da PFC no cultivo de citros, percebe-se a necessidade de informações relacionadas ao estudo químico de *C. acutatum*. Assim, o presente trabalho apresenta o estudo químico do fungo *C. acutatum*, além disso, aborda o estudo da interação planta-microrganismo, identificando compostos voláteis por HS-SPME-GC-MS, bem como sinais característicos de compostos produzidos pela planta quando infectada. O estudo químico de *C. acutatum*, proporcionou o isolamento de algumas dicetopiperazinas, compostos fenólicos, esteroides, nucleosídeos e glicérides. Com a finalidade de incentivar a produção de metabolitos pelo fungo e entender mais o seu metabolismo, foram utilizados alguns moduladores (químicos e epigenéticos), além do crescimento do microrganismo em culturas mistas, onde foi possível isolar alguns metabolitos como o 2,5-dihidroximetilfurano e o IAA. Visando observar o comportamento das flores quanto a produção de metabolitos quando infectadas, foi realizado o estudo de interação fungo-planta, onde o patógeno foi inoculado em flores de *Citrus sinensis*, e estas foram coletadas com 2, 4 e 7 dias. Os componentes voláteis das flores infectadas foram identificados por HS-SPME-GC-MS e comparados com as flores sadias. Uma metodologia para ensaios biológicos como crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios foi implantada.

ABSTRACT

CHEMICAL STUDY OF FUNGUS *Colletotrichum acutatum* AND ITS INTERACTION WITH *Citrus sinensis*: Brazil remains the world's largest orange producer, accounting for 32% of the total production of oranges and 50% orange juice. The State of São Paulo holds 97% of Brazilian exports of orange juice, possessing one of the largest citrus producing areas of the world. Citrus plants can be affected by various pathogenic agents which highlights the fungus *Colletotrichum acutatum*, causal agent of citrus post-bloom fruit drop which under certain environmental conditions, is in a limiting factor in many citrus production areas. Given the above and seen the importance of disease in the cultivation of citrus, realizes the need for information related to the chemical study of *C. acutatum*. Thus, this study presents the chemical study of fungal plant pathogen, in addition, discusses the study of plant-microbe interactions, identifying volatiles by HS-SPME-GC-MS as well as characteristic signals compounds produced by plants when infected. Chemical studies of *C. acutatum* to the isolation of certain diketopiperazines, phenolic compounds, steroids, nucleosides and glycerides. In order to encourage the production of metabolites by the fungus and understand more your metabolism, some modulators (chemical and epigenetic) were used, in addition to the growth of microorganisms in mixed cultures, where it was possible to isolate some metabolites such as 2,5-dihydroximetilfurano and IAA. Aiming to observe the behavior of the flowers as the production of metabolites when infected, the study of plant-fungus interaction, where the pathogen was inoculated in flowers of *Citrus sinensis*, and these were collected at 2, 4 and 7 days. The volatile components of infected flowers were identified by HS-SPME-GC-MS and compared with the healthy flowers. A methodology for biological assays as mycelial growth, spore germination and appressorium formation was implemented.

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2-CAPÍTULO 01 - Isolamento de metabolitos secundários e estudo do óleo essencial do fungo <i>C. acutatum</i>.....	5
2.1-Considerações Gerais.....	5
2.1.1-Metabolitos secundários.....	5
2.1.2-A Química do gênero <i>Colletotrichum</i>	6
2.1.3-Compostos voláteis.....	22
2.2-Objetivos.....	23
2.3-Metodologia.....	24
2.3.1-Isolamento de metabólitos do fungo <i>C. acutatum</i>	24
2.3.2-Reação de transesterificação e identificação por CG/EM.....	27
2.3.3-Identificação de compostos voláteis de <i>C. acutatum</i>	27
2.4-Resultados e discussões.....	28
2.4.1-Substâncias isoladas de <i>C. acutatum</i> cultivadas em meio BDLev.....	30
2.4.2-Identificação estrutural das substâncias isoladas.....	34
2.4.2.1-Substância 01 - Ergosterol.....	34
2.4.2.2-Substância 02 - Ergosterol e epi-ergosterol.....	38
2.4.2.3-Substância 03 - Endo/Exo-peróxido de ergosterol.....	40
2.4.2.4-Substância 04 - Mistura de monoglicerídeos.....	44
2.4.2.5-Substância 05 – Mistura de triglicerídeos.....	50
2.4.2.6-Substância 06 – Uracila.....	53
2.4.2.7-Substância 07 – Uridina.....	55
2.4.2.8-Substância 08 – Inosina.....	58
2.4.2.9-Substância 09 – <i>Ciclo</i> (Pro-Leu).....	61
2.4.2.10-Substância 10 – <i>Ciclo</i> (Pro-Phe).....	65
2.4.2.11-Substância 11 – <i>Ciclo</i> (Pro-Tyr).....	70
2.4.2.12-Substância 12 – Tirosol.....	76
2.4.2.13-Substância 13 – Álcool 4-hidroxibenzílico.....	79
2.4.3-Identificação dos componentes químicos do óleo essencial de <i>C. acutatum</i>	81
2.5-Conclusões.....	83
3-CAPÍTULO 02 - Novas estratégias na obtenção de metabolitos secundários.....	85
3.1-Considerações Gerais.....	85
3.1.1-Moduladores químicos.....	85
3.1.2-Remodelagem epigenética.....	86
3.1.3-Cultivo pareado de microrganismos.....	89
3.2-Objetivos.....	91
3.3-Metodologia.....	92
3.3.1-Moduladores químicos.....	92
3.3.2-Moduladores epigenéticos.....	94
3.3.3-Cultivo pareado de microrganismos.....	95

3.4-Resultados e discussões	97
3.4.1-Substância isoladas dos estudos com moduladores e cultivo pareado.....	97
3.4.2-Resultados obtidos após o uso de moduladores químicos.....	100
3.4.2.1-Substância 14 – Ácido benzoico.....	101
3.4.2.2-Substância 15 – 3-fenil-1,2-propanodiol.....	102
3.4.2.3-Substância 16 – Ácido 4-hidroxibenzoico.....	106
3.4.2.4-Substância 17 – Ácido 4-hidroxibenzenoacético.....	109
3.4.2.5-Substância 18 – 11-hidroxijasmonato de metila.....	111
3.4.2.6-Substância 19 – Ácido 11-hidroxijasmônico.....	114
3.4.3-Resultados obtidos após o uso de moduladores epigenéticos.....	117
3.4.3.1-Substância 20 – 2,5-dihidroximetilfurano.....	118
3.4.3.2-Substância 21 – isosclerona.....	120
3.4.3.3-Substância 22 – 6-hidroximeleina.....	124
3.4.3.4-Substância 23 – triptofol.....	129
3.4.3.5-Substância 24 – indol-3-aldeído.....	131
3.4.3.6-Substância 25 – indol.....	134
3.4.4-Resultados obtidos no estudo de cultivo pareado de microrganismos.....	137
3.4.4.1-Substância 26 – Ácido indol-3-acético.....	140
3.5-Conclusões.....	146
4-CAPÍTULO 03 - Estudo da interação planta-patógeno e ensaios biológicos.....	149
4.1-Considerações Gerais.....	149
4.1.1-Interação planta-patógeno.....	149
4.1.2-Extração de componentes voláteis.....	150
4.1.3-Ensaio biológicos.....	151
4.2-Objetivos.....	152
4.3-Metodologia.....	153
4.3.1-Inoculação do fungo nas flores.....	153
4.3.2-Análise dos componentes voláteis por HS-SPME-GC-MS.....	154
4.3.3-Protocolo para ensaio de inibição de <i>C. acutatum</i> e <i>A. alternata</i> <i>in vitro</i> frente ao crescimento micelial.....	154
4.3.4-Protocolo para o ensaio de inibição de <i>C. acutatum</i> e <i>A. alternata</i> , <i>in vitro</i> , frente à germinação de esporos e formação de apressórios.....	155
4.4-Resultados e discussões.....	157
4.4.1-Análise dos voláteis das flores de <i>C. sinensis</i> por HS-SPME-GC-MS.....	157
4.4.2-Ensaio de atividade biológica.....	171
4.4.2.1-Substâncias isoladas de espécies da família Rutaceae e Malvaceae.....	171
4.4.2.2 - Substâncias isoladas do fungo <i>Colletotrichum acutatum</i>	174
4.4.2.3 - Substâncias derivadas do jasmonato de metila isoladas do fungo <i>Colletotrichum acutatum</i>	176
4.5-Conclusões.....	177
5-Considerações finais.....	180
6-Referências bibliográficas.....	182

Introdução Geral

1 - INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil mantém-se como maior produtor mundial de laranja, sendo responsável por 51,4% da produção total do fruto *in natura* e 60% do suco (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014). O Estado de São Paulo detém 97% das exportações brasileiras de suco de laranja, possuindo uma das maiores áreas citrícolas do mundo, com cerca de 200 milhões de pés do fruto em 13.000 propriedades. Tal área compreende cerca de 465 mil hectares distribuídos ao longo de quase todo o Estado de São Paulo (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2014). No entanto, as plantas cítricas podem ser afetadas por vários agentes fitopatogênicos onde se destacam os fungos *Colletotrichum acutatum*, agente causal da Podridão Floral dos Citros (PFC), *Guignardia citricarpa*, causadora da Mancha Preta nos Citros (MPC) e *Alternaria alternata* responsável pela Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA). Tais doenças, sob determinadas condições ambientais, constituem-se em fator limitante à produção em várias áreas citrícolas.

A PFC foi verificada pela primeira vez em 1956, em Belize, infectando principalmente laranjeiras 'Valência' (*Citrus sinensis*) (FAGAN, 1979). No Brasil, a doença foi descrita primeiramente no Rio Grande do Sul por DORNELLES (1977) e constatada por PORTO et al. (1979) e, atualmente ocorre em todos os estados produtores como São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Bahia, Minas Gerais e Goiás, causando prejuízos variáveis dependendo da ocorrência de chuvas na época do florescimento das plantas (KIMATI et al., 2005).

Os sintomas da PFC (FIGURA 1.1) caracterizam-se pela presença de lesões de coloração laranja-amarronzada nas pétalas das flores abertas. Após a infecção das flores, os frutos recém formados caem e os cálices ficam aderidos ao disco floral e, comumente, são chamados de "estrelinhas". Quando em ataques severos, essas lesões podem ocorrer antes mesmo da abertura dos botões florais. As pétalas afetadas permanecem aderidas ao disco, adquirem consistência seca e rígida e apresentam coloração rosa pardo (TIMMER et al., 1994; TIMMER e BROWN, 2000).



FIGURA 1.1 - Sintomas da Podridão Floral dos Citros em pétalas de *Citrus sinensis* (CINTRA, 2009).

Tradicionalmente, características morfológicas como tamanho, forma de conídios e formato de apressórios são utilizados para a taxonomia de *Colletotrichum*. (TOZZE JUNIOR et al., 2006). No Brasil, estudos referentes à identificação, caracterização e patogenicidade de *C. acutatum* (FIGURA 1.2) em citros foram apresentados por GOES e KIMATI (1997) e KURAMAEIZIOKA et al. (1997). Entretanto, estudos no contexto da variabilidade dessas formas mostram-se ausentes ou escassos. *C. acutatum* produz conídios que apresentam, em sua maioria, uma das extremidades fusiforme e a outra arredondada e são menores do que os conídios de *C. gloeosporioides* (AGOSTINI et al., 1992). Além disso, isolados de *C. acutatum* mostraram-se insensíveis ao benomyl *in vitro*, constituindo-se um meio para diferenciar *C. acutatum* de *Colletotrichum gloeosporioides* (SONODA e PELOSI, 1988; GOES e KIMATI, 1998; PERES et al., 2002).

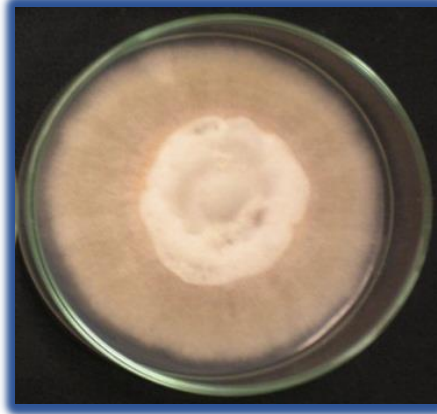


FIGURA 1.2 - Aspecto morfológico do fungo *Colletotrichum acutatum* cultivado em meio batata-dextrose-ágar.

A sobrevivência do fungo *C. acutatum* dá-se por meio de apressórios formados na superfície de folhas, ramos e cálices retidos. Em condições de molhamento prolongado e presença de nutrientes encontrados em pétalas, o conídio germina e emite uma hifa sobre a cutícula da folha, dando origem aos primeiros apressórios, sem a formação de acérvulo. Com o surgimento de novas flores, os conídios livres na superfície das folhas e cálices retidos são dispersos por respingos de água e atingem as pétalas onde penetram diretamente, sem a formação de apressório. Os conídios de *C. acutatum* são produzidos em abundância nos acérvulos em flores infectadas e disseminados pelos respingos de água para flores saudáveis durante o período de floração. Quando na ausência de flores, o ciclo de sobrevivência se reinicia nas folhas, cálices retidos e ramos (ZULFIQAR, 1996). Sendo assim, *C. acutaum* comporta-se em citros como necrotrófico durante o curto período de florescimento, no entanto, por muitos anos, o fungo pode viver biotroficamente na forma de apressórios, como infecções quiescentes em tecidos vegetais (AGOSTINI e TIMMER, 1994; PERES et al., 2002; GUAN et al.; 2008).

Isolamento de metabolitos secundários e estudo do óleo essencial do fungo *C. acutatum*

Capítulo 01

2 - Capítulo 01 - Isolamento de metabolitos secundários e estudo do óleo essencial do fungo *C. acutatum*

2.1 - Considerações Gerais

2.1.1 - Metabolitos Secundários

A grande capacidade de fungos filamentosos produzir metabolitos secundários tem atraído o interesse de pesquisadores de produtos naturais há algum tempo. Fungos produzem uma variedade de metabolitos secundários, com algumas funções importantes e esses organismos são codificados por quatro grupos principais de metabolitos, que são importantes para a identificação de genes envolvidos na patogenicidade (BOETTGER e HERTWECK, 2013), tais como os policetídeos produzidos por policetídeo sintase (PKS), peptídeos produzidos por nonribossomal peptídeo sintase (NRPS), alcaloides produzidos por dimetilalil triptofano sintase (DMATS) e terpenos produzidos por terpeno sintase (TS). Alguns genes podem também incluir tanto PKS quanto NRPS, e são descritos como híbridos PKS-NRPS (KELLER E HOHN, 1997; COLLEMARE et al., 2008; BERGMANN et al., 2007). Fungos patógenos adquirem nutrientes de suas plantas hospedeiras e alguns podem até enfraquecer as respostas de defesa da planta pela produção de toxinas, fornecendo tal nutrição para o seu crescimento e colonização.

Metabolitos secundários desempenham papéis importantes nos diversos estilos de vida de espécies de *Colletotrichum*, funcionando na aquisição de nutrientes, virulência e defesa contra os concorrentes e predadores confrontados em habitats naturais (ARIVUDAINAMBI et al., 2011). Além disso, as propriedades bioativas de metabolitos fúngicos têm estimulado o interesse de pesquisadores no sentido de identificar os genes envolvidos na sua biossíntese (HOFFMEISTER e KELLERB, 2007).

As espécies do gênero *Colletotrichum* estão implicadas em doenças de plantas, geralmente conhecidas como antracnose. As várias espécies desse gênero compreendem os mais destrutivos patógenos pós-colheita de uma grande variedade de plantas, incluindo cereais, leguminosas, frutas e legumes (GARCÍA-PAJÓN e COLLADO, 2003). Assim, a caracterização química de metabolitos secundários isolados de espécies diferentes pode ajudar a identificar o gênero e a esclarecer o papel patogênico que os metabolitos secundários desempenham no mecanismo de infecção.

2.1.2 - A química do gênero *Colletotrichum*

Espécies do gênero *Colletotrichum* produzem metabolitos fitotóxicos, os quais induzem similares sintomas aos de outros agentes fitopatogênicos. Alguns desses metabolitos têm sido usados para testes de resistência frente a outros patógenos, mostrando assim um papel importante na patogênese. As espécies de fungos desse gênero mais estudadas no que se diz respeito a sua produção de metabolitos tóxicos são: *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. nicotianae*, *C. lagenarium*; *C. capsici*, *C. truncatum*; *C. fragaria* e *C. dematium* (GARCIA-PAJON e COLLADO, 2003).

O metabolismo de *C. gloeosporioides* tem sido alvo de muitos trabalhos devido ao fato que afeta diversas plantas economicamente importantes, como morangos e uvas. Os primeiros trabalhos descreveram o isolamento dos metabolitos aspergillomasmina A e B (**1** e **2**), que tinham sido previamente isolados a partir de uma espécie de *Aspergillus*. Posteriormente, estudos mostraram que *C. gloeosporioides* produziam gloesporona (**3**). A estrutura deste metabolito foi revista para o composto **4** utilizando dados espectroscópicos e análises por difração de raio-x. As estruturas dos principais metabolitos desse fungo são mostradas na FIGURA 2.1 (GARCIA-PAJON e COLLADO, 2003; INACIO et al., 2006).

Estudos relataram o isolamento de alguns compostos indólicos a partir dessa mesma espécie como sendo três auto-inibidores de germinação de esporos (**5**, **6** e **7**). Estes inibidores reduziram a germinação de conídios nos próprios fungos que os produziram (TSURUSHIMA et al., 1995).

Compostos conhecidos como micosporina possuem em suas estruturas uma ciclohexenona substituída ligada a um grupo aminoácido e estudos relatam que estes compostos estão envolvidos no processo de produção de conídios. Os compostos glutamina micosporina (**8**) e o ácido glutâmico micosporina (**9**) foram isolados de *Omphalodes pylonema* e *Glomerella cingulata*, a forma sexuada de *C. gloesporioides*. Já a alanina micosporina (**10**) apresentou atividade fitotóxica e foi isolada a partir de *C. graminicola*. Por outro lado, cinco dicetopiperazinas (**11-15**) foram isoladas de *C. gloesporioides* e apresentaram atividade fitotóxica (YOUNG e PATTERSON, 1982; HIROTA, HORIKAWA e FUJIWARA, 1993).

Em um estudo sobre *C. gloesporioides*, um fungo endofítico de *Artemisia annua*, foi isolado e identificado um alcaloide indólico (**16**). Alguns metabolitos conhecidos, incluindo ácido indolacético e alguns derivados de ergosterol (**18** e **19**) também foram relatados nestes estudos (LU et al., 2000).

Um novo metabolito antimicrobiano denominado ácido colletotrico (**17**) foi isolado a partir de uma cultura líquida de *C. gloeosporioides*, um fungo endofítico de *Artemisia mongolica*. Resultados mostraram que o ácido colletotrico inibiu o crescimento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Sarcina lutea* com uma concentração mínima inibitória (CMI) de 25 µg/mL (ZOU et al., 2000).

A produção de firilina (**20**) por *C. gloesporioides* foi analisada por CLAE e CLAE-EM, e comparando a um padrão, obteve-se o mesmo tempo de retenção e similares fragmentos no espectro de massas, confirmando a sua presença (ZHANG, WEI e WANG, 2012).

Além disso, FEMENÍA-RIOS et al. (2006) descreveram o isolamento de (-) gloesporiol (**21**), bem como do seu derivado paracetilado (**22**), isolados a partir do extrato acetato de etila da cultura líquida de *C. gloesporioides*, e estabeleceu a sua constituição e estereoquímica relativa através de estudos de espectroscopia.

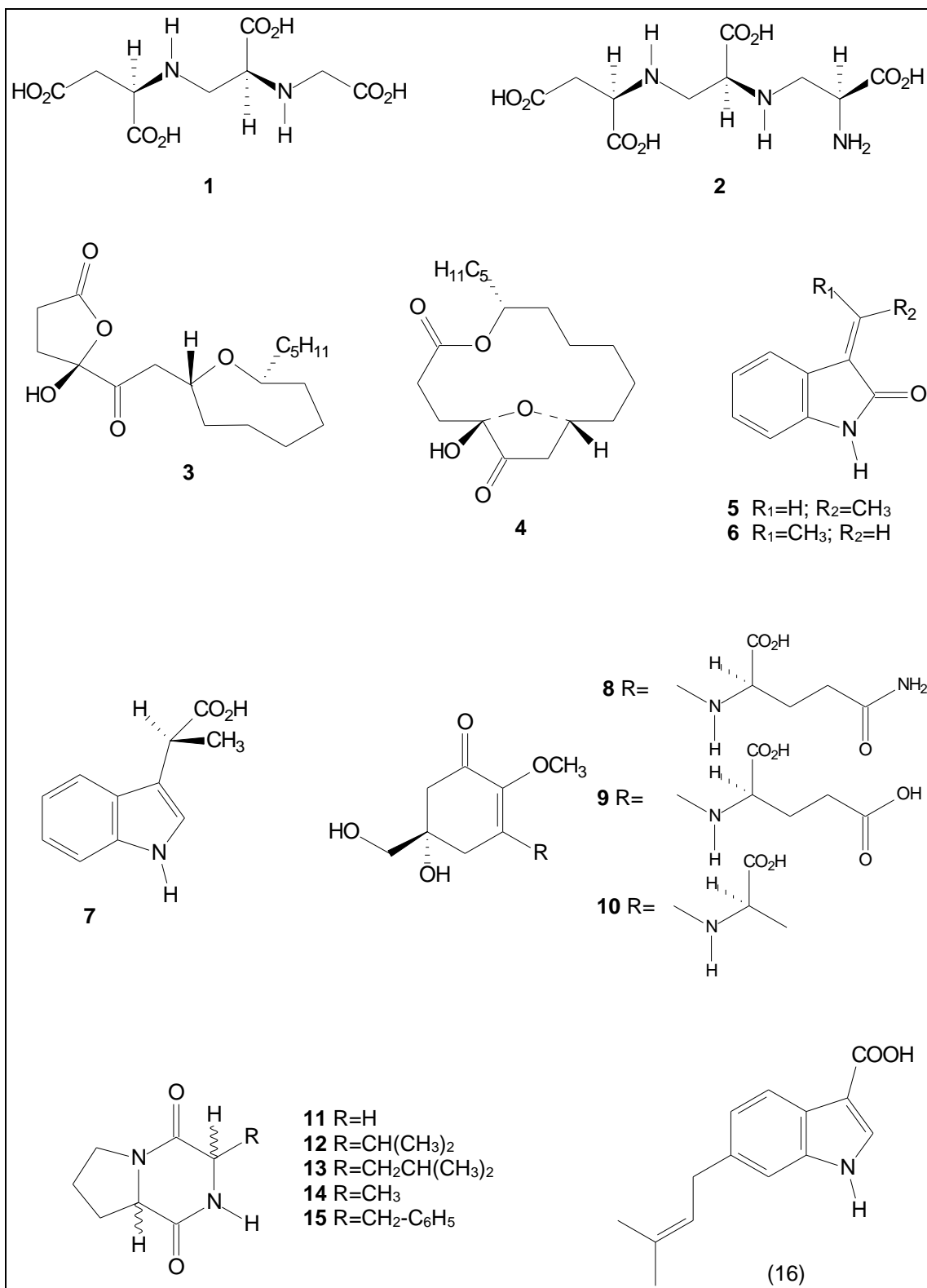


FIGURA 2.1 - Metabolitos isolados do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*.

Em outros estudos, os policetídeos aromáticos **23** e **24** foram produzidos por *C. acutatum* isolado do morango (MANCILLA et al., 2009; JIMENEZ-TEJA et al., 2009). Esses compostos também foram produzidos pelo fungo endofítico de *Cryptocarya mandioccana*, *C. gloeosporioides*, e mostrou uma notável atividade antifúngica contra os fungos fitopatógenos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (INACIO et al., 2006).

O ácido colletoico (**25**) foi isolado a partir do meio de cultura líquido de *C. gloeosporioides*. A sua estrutura foi determinada pela análise de vários métodos espectroscópicos usuais como sendo um novo tipo de sesquiterpeno. A síntese total enantiosseletiva de (+)-ácido colletoico, foi descrita por SAWADA e NAKADA (2013). A produção de policetídeos lineares também é comum em microrganismos. A mupirocina é um antibiótico utilizado clinicamente para o tratamento de infecções bacterianas da pele e para controlar o *Staphylococcus aureus* e é produzida por *Pseudomonas fluorescens* (GROSS e LOPER, 2009). Em alguns casos relatados, espécies de *Colletotrichum* também produzem policetídeos de cadeias lineares, tais como a produção de glucosilceramidas (**26** e **27**) (SILVA et al., 2004) (FIGURA 2.2).

Vários metabolitos biologicamente ativos têm sido isolados a partir do fitopatógeno *C. nicotianae*, causador da antracnose em fumo. Existem numerosos estudos sobre os metabolitos desse fungo e, em alguns deles, é observado o isolamento de colletoclorinas A-D (**28**, **29**, **32** e **33**), além das coletorinas A e C (**30** e **31**) (GOHBARA et al., 1978). Também foram isolados os metabolitos fitotóxicos colletotrichinas A, B, C (**34-36**). Quando estes compostos foram aplicados a folhas de tabaco induziram sintomas semelhantes aos da antracnose causadas pelo fungo (KOSUGE, SUZUKI e TAMURA, 1974). Já em outros estudos, foi isolada a colletochina (**37**), um metabolito com uma estrutura semelhante à das colletotrichinas, podendo ser um precursor destes compostos em *C. nicotianae*. Já o composto colletopirona (**38**) foi isolado de *C. nicotianae* e é considerado um dos metabolitos fúngicos que funcionam como agente tóxico. Assim, quando soluções desse composto foram colocadas em folhas de tabaco jovens, manchas necróticas castanhas semelhantes às causadas pelo patógeno apareceram nas folhas (GARCIA-PAJON e COLLADO, 2003) (FIGURA 2.3).

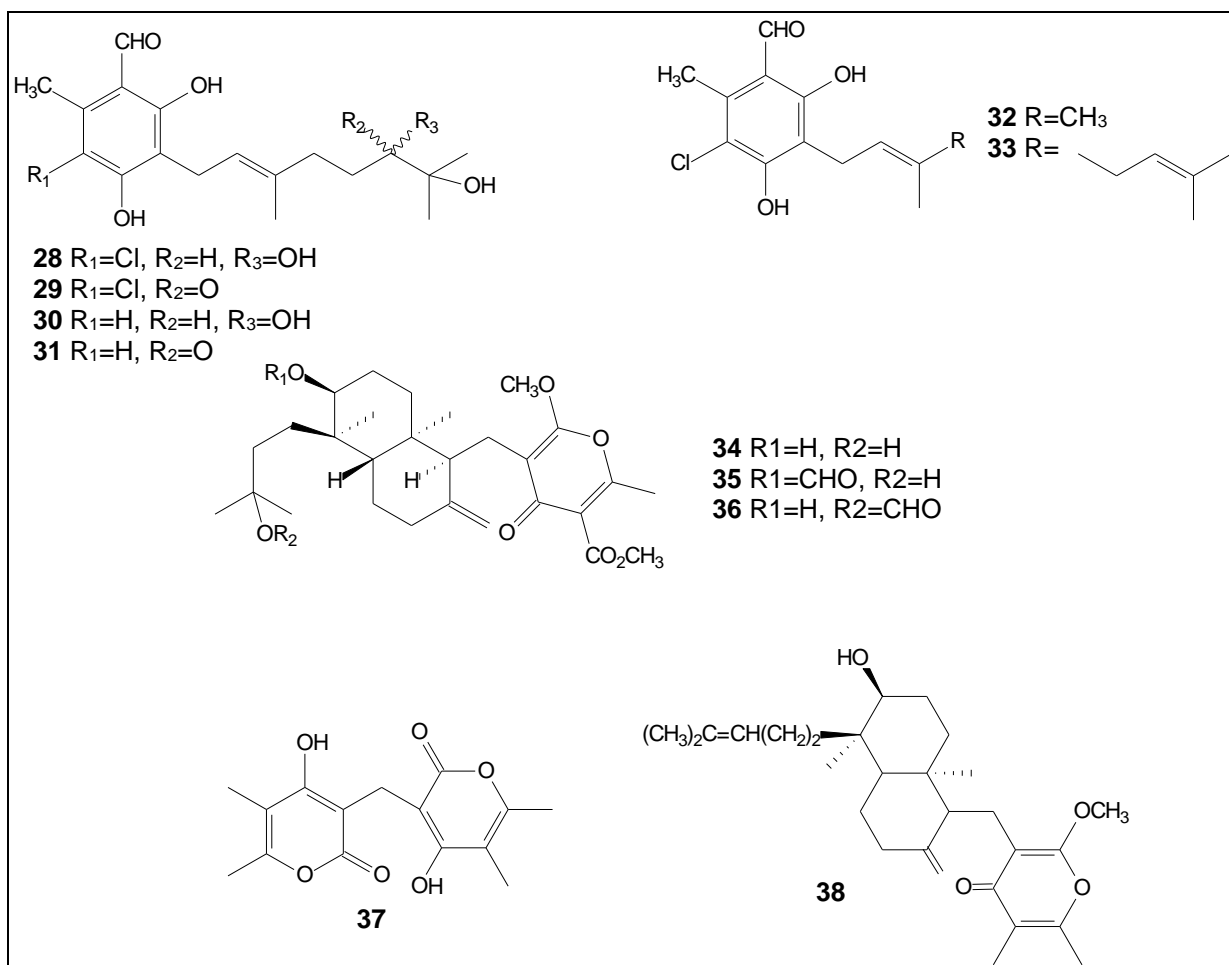


FIGURA 2.3 - Metabolitos isolados do fungo *Colletotrichum nicotianae*.

Diversos trabalhos têm lidado com as toxinas excretadas pelo fungo *C. capsici*, embora muitas estruturas não tenham sido identificadas. Além da colletotrichina A, novos metabolitos como o colletodiol (**39**), colletocetol (**40**), colletol (**41**) e colletalol (**42**), foram isolados a partir de *C. capsici* (FIGURA 2.4) (MACMILLAN e SIMPSON, 1968).

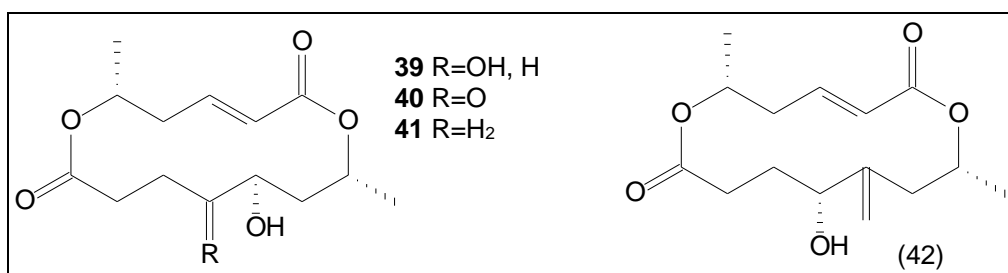


FIGURA 2.4 - Metabolitos isolados do fungo *Colletotrichum capsici*.

Por outro lado, *Colletotrichum dematium*, um patógeno de *Epilobium angustifolium* (Onagraceae) tem sido investigado como um agente para controle de plantas daninhas. Este patógeno provoca grandes lesões necróticas nas folhas e caule da planta infectada. Dois metilflavonóis (**43** e **44**) foram isolados a partir dos extratos acetato de etila da cultura líquida deste fungo (FIGURA 2.5) (ABOU-ZAID et al., 1997).

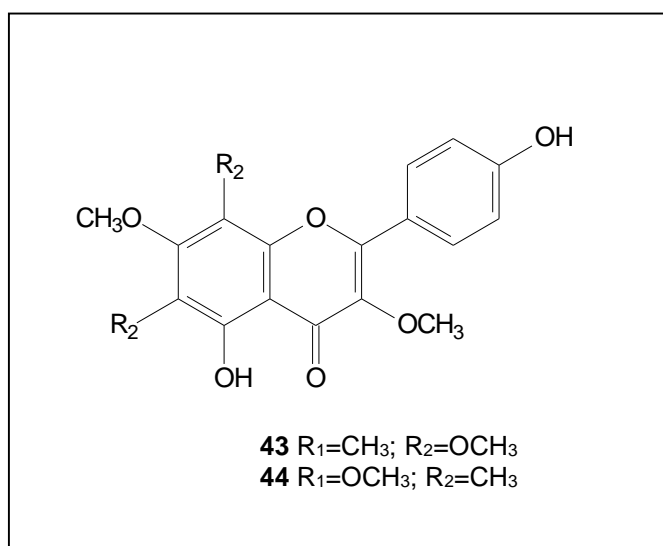


FIGURA 2.5 - Metabolitos isolados do fungo *Colletotrichum dematium*.

Alguns compostos são comumente encontrados em fungos, como é o caso do tirosol, que é um antioxidante fenólico que ocorre naturalmente em várias fontes naturais. Tirosol (**45**), álcool 4-hidroxibenzílico (**46**), 2,5-dihidroximetilfurano (**47**) e um novo macrolídeo 4,7-dihidroxi-13-tetradeca-2,5,8-trienolídeo (**48**) (FIGURA 2.6), foram isolados a partir da cultura líquida de *C. acutatum*. Esse macrolídeo foi isolado em quantidade insuficiente para determinação da configuração absoluta dos três centros quirais (MANCILLA et al., 2009).

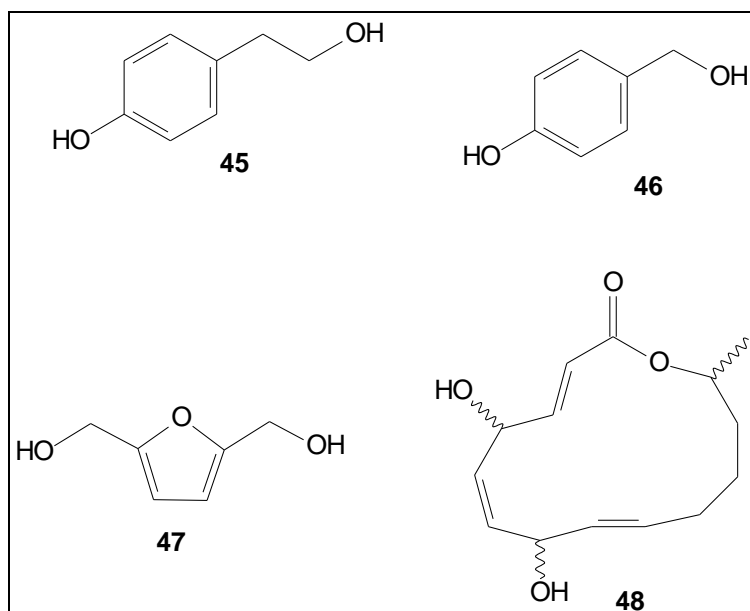


FIGURA 2.6 - Metabolitos isolados do fungo *Colletotrichum acutatum*.

Estudos realizados por CHUNG et al. (2003) revelaram a produção de alcaloides por *C. acutatum* na presença de triptofano (FIGURA 2.7). Análises por CLAE, por CCD e utilização de padrões, foram suficientes para identificar os alcaloides indólicos ácido indolacético (**49**), triptofol (**50**), indolacetaldéido (**51**), indoleacetamida (**52**), ácido indolpirúvico (**53**) e ácido indolático (**54**) a partir de culturas suplementadas com triptofano.

A germinação de conídios por *C. fragariae* é inibida em grandes concentrações de conídios em água. Este fenômeno acontece devido a auto-inibidores químicos secretados a partir dos esporos do fungo. As colletotragaronas A1 e A2 (**56** e **57**) foram isoladas de *C. fragariae* e a mistura desses dois compostos reduziu a germinação de conídios de *C. fragariae*. Estes compostos foram também detectados na suspensão de conídios em grandes concentrações, sugerindo que as colletotragaronas atuam como auto-inibidores de germinação (INOUE et al., 1996). Por outro lado, estudos realizados mostraram o isolamento do colletruncoato de metila (**55**) a partir do fungo *C. truncatum*, um patógeno da soja (FIGURA 2.8) (STOESSL e STOTHERS, 1986). Em outros estudos, um inibidor das catepsinas B e L, WF14861 (**58**) foi obtido a partir do micélio de *Colletotrichum* sp. (FIGURA 2.9) (DETTERBECK e HESSE, 2003).

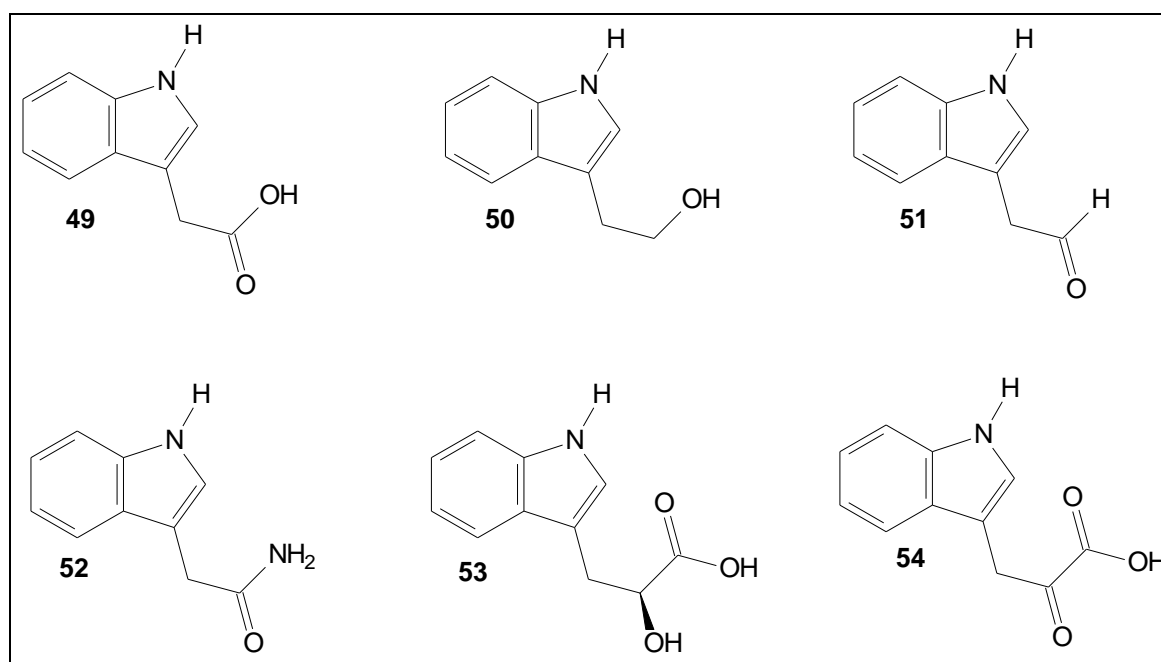


FIGURA 2.7 - Compostos indólicos identificados em *Colletotrichum acutatum*.

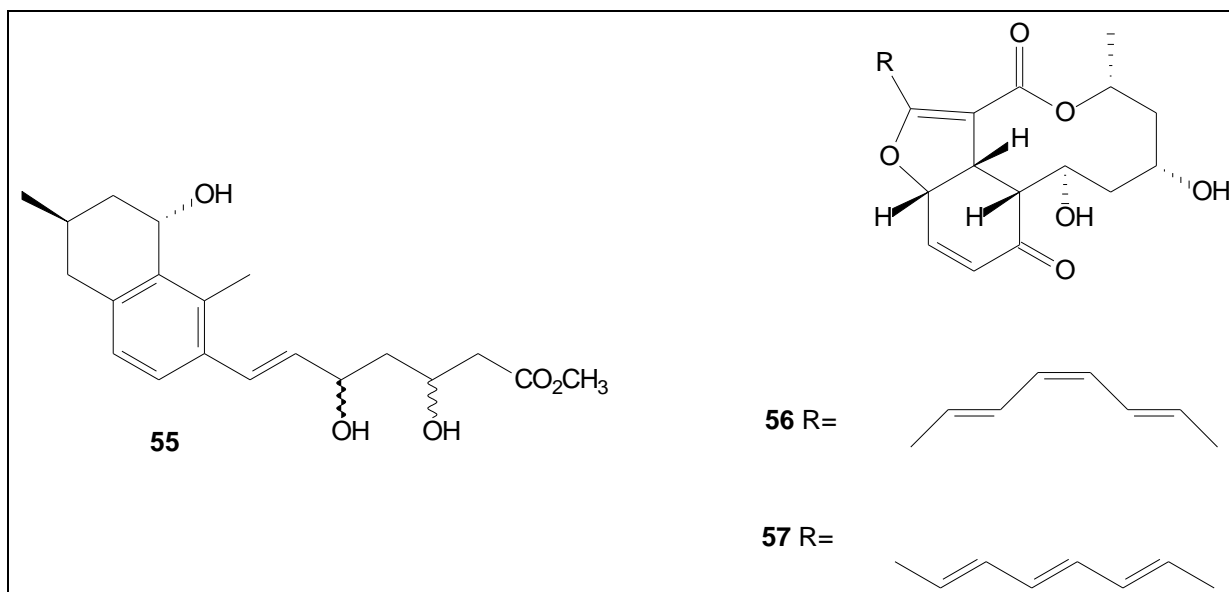


FIGURA 2.8 - Metabolitos isolados do fungo *Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum lagenarium*.

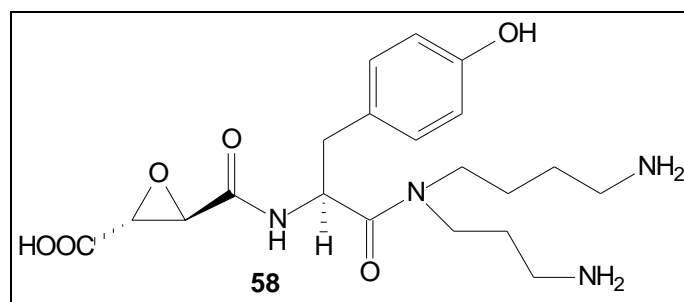


FIGURA 2.9 - Metabolito isolado de *Colletotrichum sp.*

Em estudos relatados por Lu et al. (2012) foram encontrados seis policetídeos aromáticos (**59-64**) em *Colletotrichum sp.* isolado a partir de *Cephalotaxus hainanensis* (FIGURA 2.10). As estruturas dos compostos foram determinadas com base em métodos espectroscópicos. Estes compostos foram avaliados quanto à atividade citostática contra as células HL-60 e PC-3, mas não apresentaram uma atividade citotóxica.

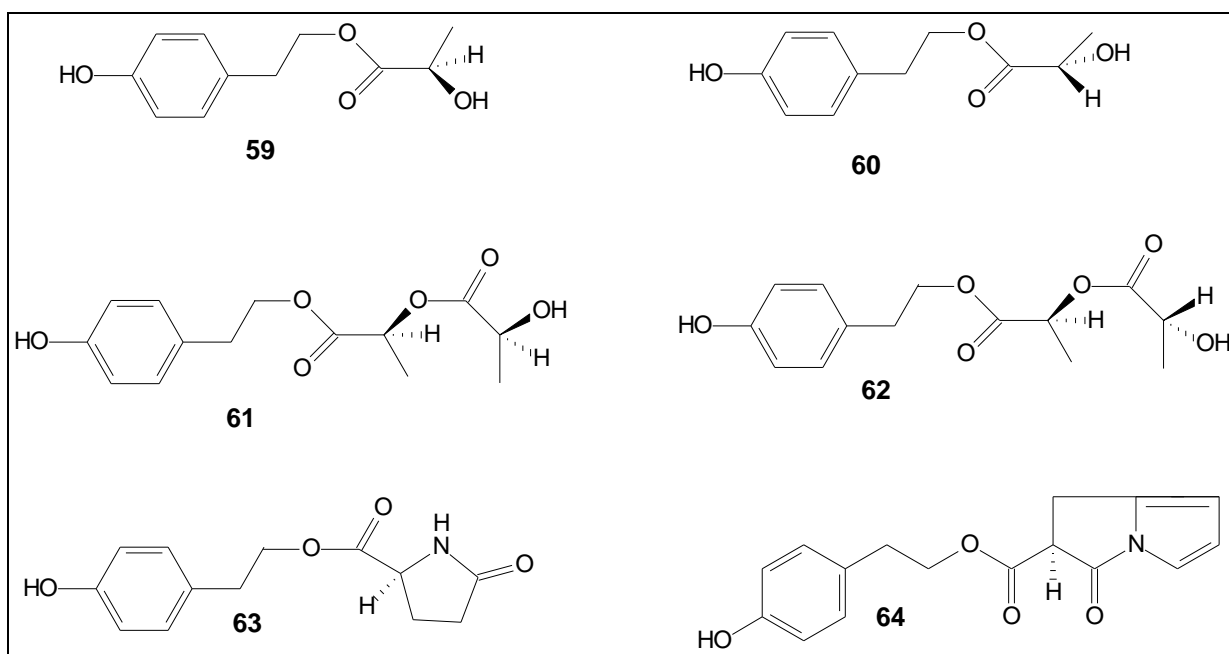


FIGURA 2.10 - Metabolitos isolados de *Colletotrichum sp.*

Outro terpenoide encontrado em *Colletotrichum sp.* é o metileugenol (**66**), identificado na cultura líquida por CG/EM. O extrato acetato de etila de culturas líquidas contendo metileugenol como principal metabolito exibiu atividade antifúngica contra *Saccharomyces Cerevisi*. Além disso, estudos realizados por YANG et al. (2013) revelaram a produção de um policetideo de cadeia linear (**65**) por *Colletotrichum sp.*

Além disso, algumas acetogeninas também foram encontradas em *Colletotrichum sp.*, onde cinco isocumarinas conhecidas, monocerina (**67**) e seu derivado (**68**), fusarentina (**69**), fusarentina 6,7-dimetil éter (**70**), fusarentina 6-metil éter (**71**) e uma nova ftalida, a colletotrialida (**72**), foram isoladas a partir do endofítico *Colletotrichum sp.* Os compostos piroglutamato de (4-metoxi-3-metil-2-oxo-2*H*-piran-6-il) butila (**73**) e apigenina-8-C- β -D-glucopiranosídeo (**75**) também foram isoladas a partir de *Colletotrichum sp.* (CHEN et al., 2011; ZHOU et al, 2011).

Estudos realizados por CHEN et al. (2011) mostraram a presença de um dímero de alcaloide indólico (**74**) encontrado na cultura líquida de *Colletotrichum sp.* isolado a partir de *C. hainanensis*. Por outro lado, o composto 2-hidroxiacetil etanol (**76**) foi isolado do meio líquido do fungo endófito *Colletotrichum sp.* isolado a partir de *Ginkgo biloba* (FIGURA 2.11) (ZHOU et al., 2011).

Por outro lado, estudos realizados por YANG et al. (1996) relataram a presença de compostos como alternariol (**78**) e alguns de seus derivados (**77** e **79**) em *Colletotrichum sp.* e mostraram uma atividade contra o câncer do pulmão e de mama (FIGURA 2.12). No entanto, o composto altertoxina (**81**), também isolado de *Colletotrichum sp.*, não revelou nenhuma atividade citotóxica contra estas células. Ainda nesses estudos, foi relatada a presença de dois peptídeos em *Colletotrichum sp.* isolados a partir de *Aristolochia sp.* Os compostos tentoxina (**80**) e dihidrotentoxina (**83**) foram isolados e identificados com base nos seus dados espectroscópicos, e o primeiro composto demonstrou atividade citotóxica contra o câncer do pulmão.

C. graminicola é um patógeno que causa antracnose no milho. Alguns estudos relataram a presença de metabolitos conhecidos como o radicicol (**83**) e as monocilinas I-III (**84-86**) nesse fungo, onde o composto majoritário (**83**) apresentou atividade antifúngica contra *A. alternata*, *Bipolaris zeicola*, e *Curvularia lunata* (FIGURA 2.13) (WICKLOW, JORDAN e GLOER, 2009).

O ergosterol e mais oito esteroides (**87-95**) foram isolados a partir de *Colletotrichum sp.*, um fungo endófito isolado a partir de *Ilex canariensis*. Estudos preliminares mostraram uma atividade microbiana desses esteroides frente ao fungo *Microbotryum violaceum*, à alga *Chlorella fusca*, e às bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus megaterium* (FIGURA 2.14) (ZHANG et al., 2009).

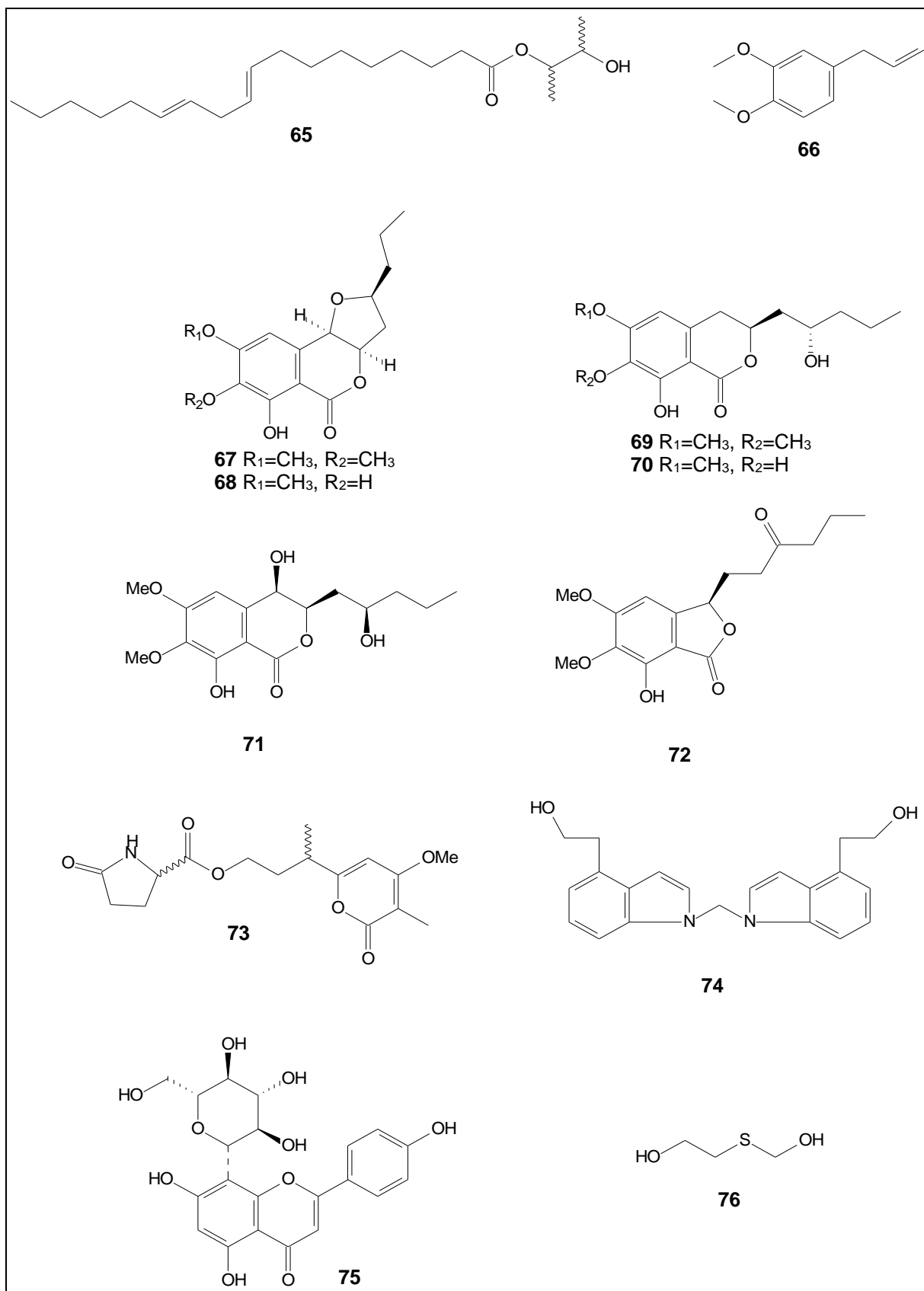


FIGURA 2.11 - Metabolitos isolados de *Colletotrichum* sp.

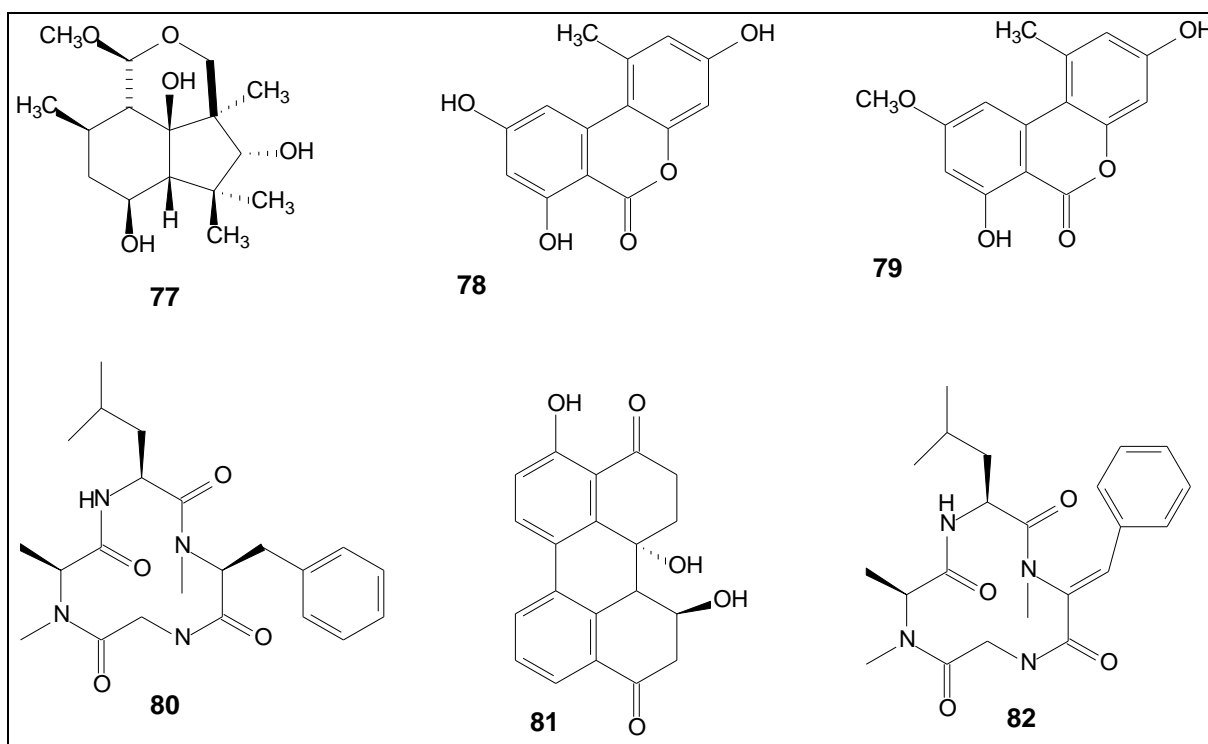


FIGURA 2.12 - Metabolitos aislados de *Colletotrichum sp.*

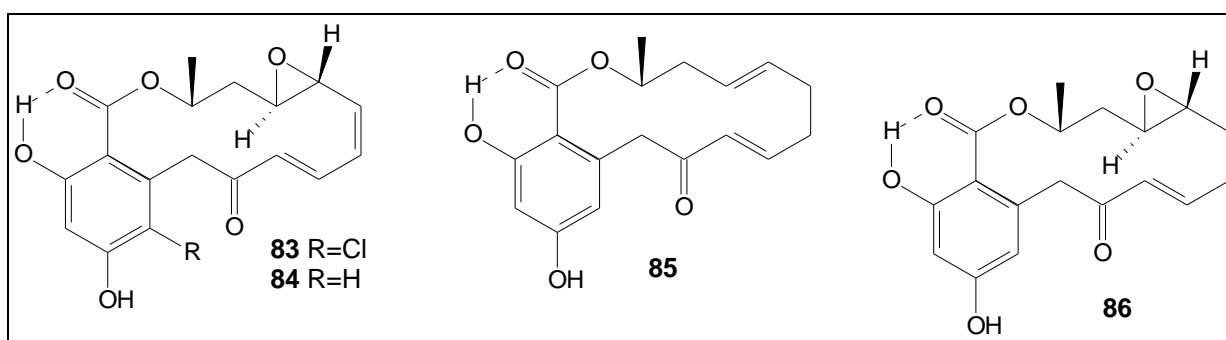


FIGURA 2.13 - Metabolitos aislados de *Colletotrichum graminicola*.

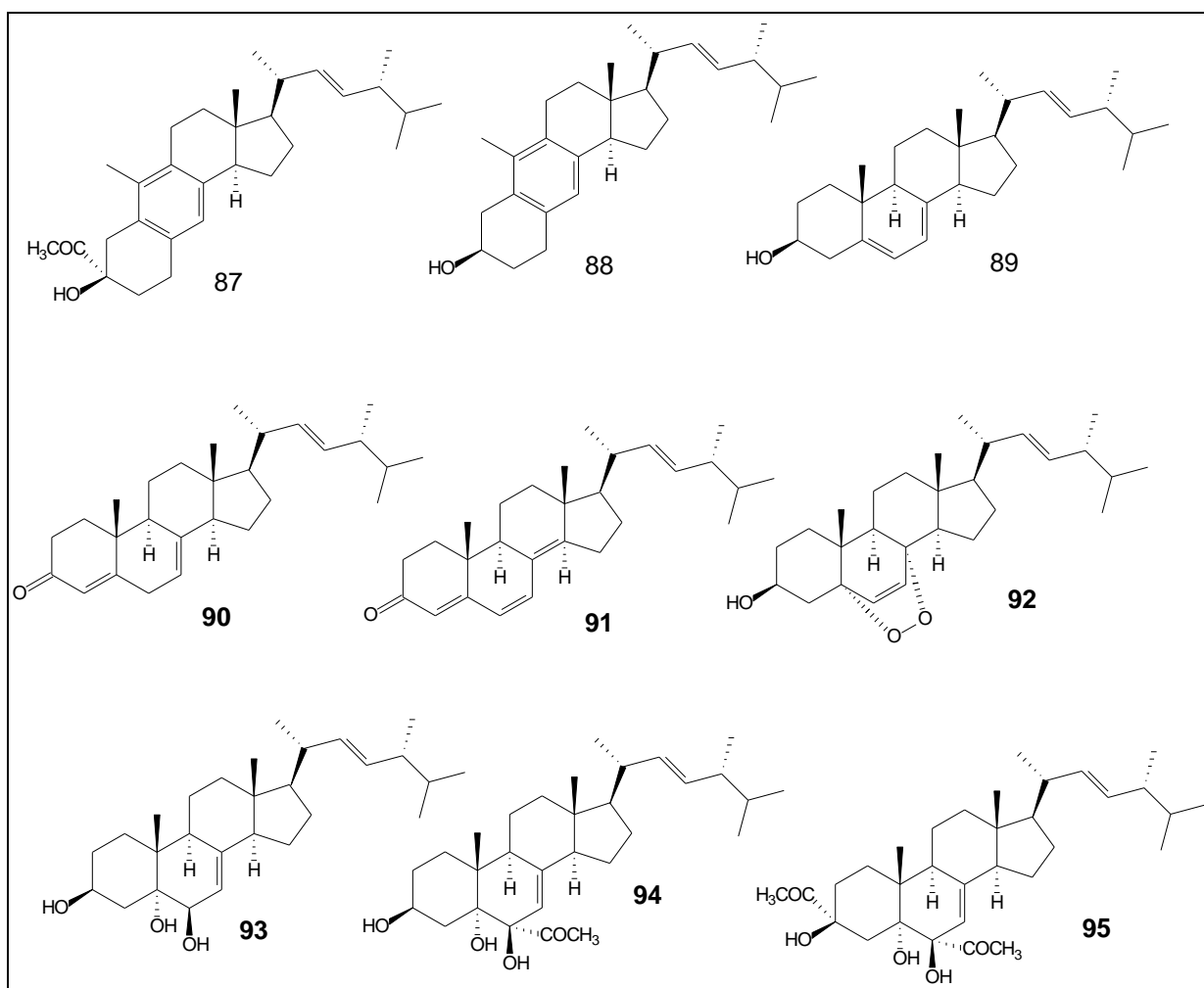


FIGURA 2.14 - Esteroides isolados de *Colletotrichum* sp.

Em outros estudos, alguns derivados dicetopiperazínicos foram encontrados em culturas de *C. gloeosporioides*. Os compostos colletopiperazina (**97**) e seu derivado (**96**) foram identificados e isolados com base em seus dados espectroscópicos. Esses compostos apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus* (FIGURA 2.15) (GUIMARAES et al., 2010).

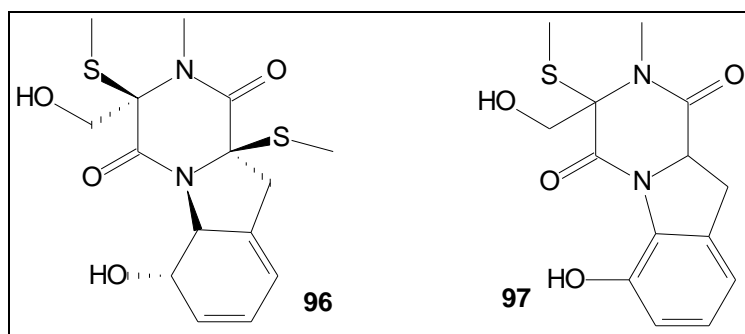


FIGURA 2.15 - Derivados dicetopiperazínicos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Os dados apresentados acima sobre a química do gênero *Colletotrichum* revelaram a variedade de classes de substâncias produzidas por esse gênero, além do potencial deste em produzir substâncias bioativas. Sendo estes, pontos importantes na escolha do microrganismo estudado no presente trabalho.

2.1.3 - Compostos voláteis

Os óleos essenciais (OE) são produtos voláteis obtidos por processos físicos e podem ser encontrados nos vegetais e em microrganismos, sendo mais frequente em folhas, flores, frutos e raízes (YUNES et al., 2009). Cada componente de um OE tem um perfil característico e cada aroma e sabor é uma combinação dos perfis de seus constituintes (GARLET, 2007). Sendo assim, a utilização de OE requer minuciosa caracterização química e avaliação de possíveis modificações na sua composição, devido a diferentes origens geográficas e condições climáticas (SPEZIALI, 2008). Estes óleos são constituídos por substâncias de baixo peso molecular, principalmente misturas de fenilpropanoides e terpenoides, embora diterpenos também possam estar presentes. Além destes, uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos, ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres acíclicos, lactonas e compostos com nitrogênio e enxofre também foram identificados em OE (SIANI et al., 2000).

Apesar dos metabolitos voláteis de microrganismos não tenham sido amplamente explorados, existem alguns trabalhos que relatam a identificação destes compostos voláteis microbianos. As técnicas usuais para identificação de voláteis contribuíram para a caracterização estrutural de compostos aromatizantes, como ésteres produzidos por *Pseudomonas fragi*, o aroma de coco detectado em cultivos de *Trichoderma viride*, o aroma de maçã em *Kluyveromyces marxianus*, e o odor de pêssigo produzido pela levedura *Sporobolomyces odorus* (MEDEIROS et al., 2000; JANSSENS et al., 1996; ZOHRE e ERTEN, 2002).

2.2 - Objetivos

- Avaliar um meio de cultivo adequado para o crescimento de *C. acutatum* em larga escala;
- Isolar os metabolitos do fungo *C. acutatum* provenientes do micélio e os excretados no meio de cultivo com base em métodos cromatográficos usuais (CC, CLAE-UV);
- Identificar os metabolitos do fungo utilizando técnicas espectroscópicas como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^1H e ^{13}C (1D e 2D), além de Espectroscopia de Massas (EM);
- Identificar os componentes químicos do OE de *C. acutatum* utilizando a técnica da hidrodestilação;

2.3 - Metodologia

2.3.1 - Isolamento de metabolitos secundários do fungo *C. acutatum*

O fungo *C. acutatum* isolado de *C. sinensis* (Laranja Valência) foi cedido pelo Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati da Universidade de São Paulo (Campus Piracicaba - ESALQ) junto ao Departamento de Fitopatologia e Nematologia, onde foi cultivado em Placa de Petri contendo o meio de cultura sólido BDA – “batata-dextrose-ágar”, para o crescimento do fungo e posterior crescimento em larga escala.

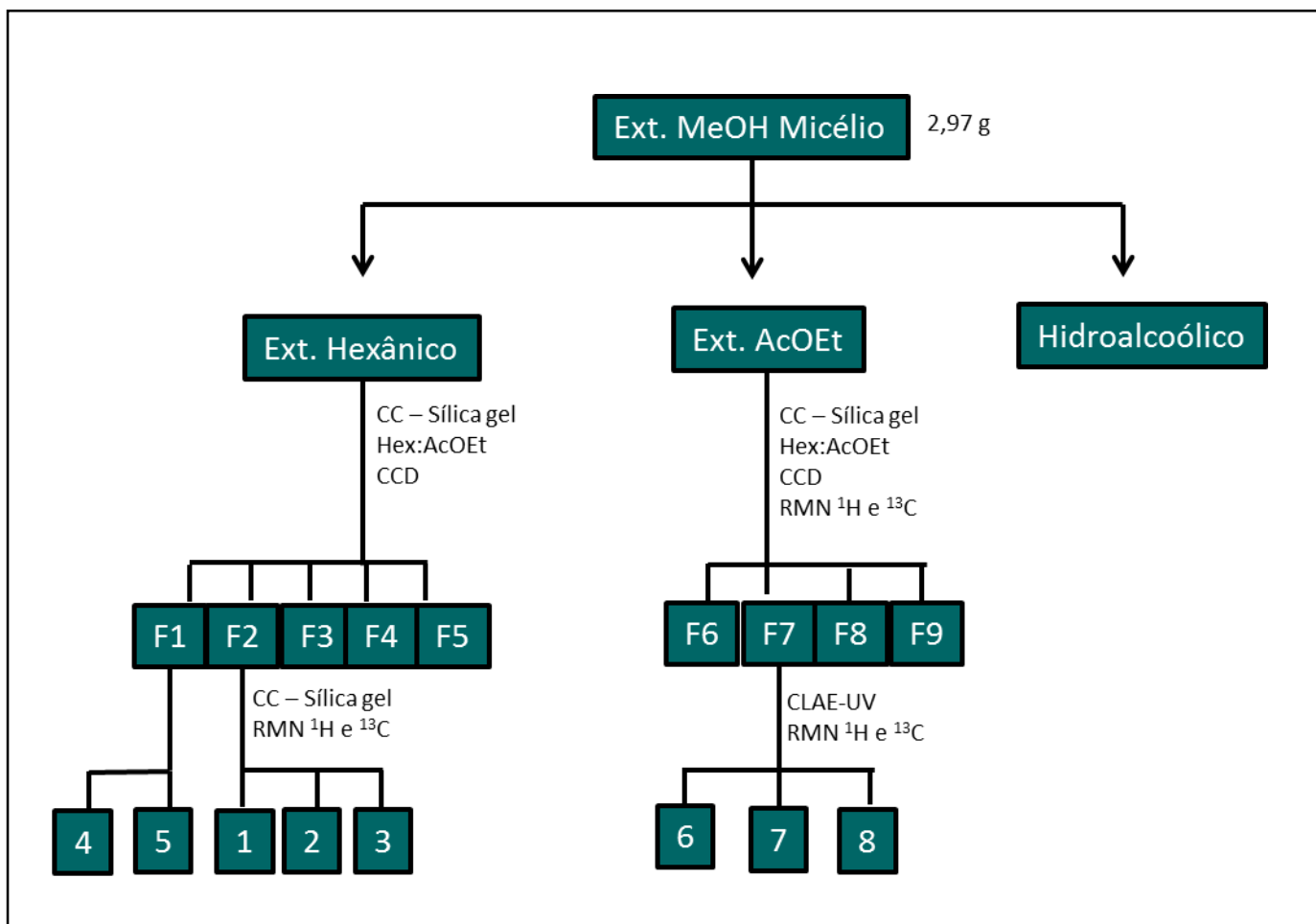
Para avaliação do melhor meio de cultivo para *C. acutatum*, em larga escala, foram utilizados os meios CZAPECK (3,0 g de NaNO_3 , 1,0 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 de KCl, 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 30g de glicose em 1L de água), BD (batata-dextrose) e BD suplementado com 1% de levedura (BDLev).

A partir de culturas puras dos isolados, dois discos de 5 mm de diâmetro das extremidades da colônia, foram transferidos assepticamente para erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL do meio de cultura. Após 20 dias de incubação, realizou-se a coleta da massa micelial através da filtração a vácuo da cultura. A massa seca ao ar foi transferida para um erlenmeyer contendo metanol onde foi triturada em um triturador elétrico, permanecendo em repouso durante 48 horas. Após sedimentação e filtração a vácuo, o extrato metanólico (Ext. MeOH) foi concentrado à pressão reduzida obtendo-se o extrato metanólico do micélio. Os metabolitos contidos no meio líquido fermentado e separado do micélio por filtração foram extraídos com acetato de etila (Ext. AcOEt), obtendo-se o extrato do meio de cultivo.

Os parâmetros utilizados para avaliação do meio mais viável para cultivo do fungo foram a massa micelial e o perfil químico do extrato metanólico do micélio avaliado por CLAE-UV, utilizando um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent Technologies modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329A e detector ultravioleta G1314B. Para escolha de um comprimento de onda adequado para as análises, foi utilizado um CLAE-DAD. O equipamento está acoplado a uma interface G1369A e os cromatogramas foram registrados através do *software* EZCrom Elite. A partir dos resultados foi escolhido o melhor meio e repetido o mesmo procedimento de cultivo numa escala ampliada.

O Ext. MeOH (2,97 g) do micélio foi particionado com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade, obtendo-se as partições hexânica e acetato de etila. Onde estas, bem como o extrato acetato de etila do meio de cultivo, foram submetidas a cromatografia em coluna (CC), utilizando-se sílica gel como fase estacionária e hexano:acetato de etila como fase móvel em uma eluição gradiente. Após comparação por cromatografia de camada delgada (CCD), as frações obtidas foram reunidas e purificadas por CC e/ou CLAE-UV preparativo, utilizando um CLAE Shimadzu modelo LC-10AD, detector espectrofotômetro UV-VIS, Modelo SPD-GAV, Shimadzu. Foram reunidas cinco frações da partição hexânica do Ext. MeOH do micélio: F1 (100% Hex); F2 (10% AcOEt); F3 (50% AcOEt); F4 (80% AcOEt) e F5 (100% AcOEt). Por outro lado, foram reunidas quatro frações da partição AcOEt do Ext. MeOH do micélio: F6 (20% AcOEt), F7 (50% AcOEt), F8 (80% AcOEt) e F9 (100% AcOEt). As frações F1 e F2 foram purificadas por CC e analisadas por RMN ^1H e ^{13}C obtendo-se as substâncias 1-5. A fração F7 foi purificada por CLAE-UV (254 nm) utilizando-se uma coluna de fase reversa C-18 semi-preparativa e eluição em modo isocrático (50% MeOH:H₂O).

As substâncias puras foram submetidas a análises espectroscópicas como RMN ^1H e ^{13}C (1D e 2D) 400 MHz utilizando o equipamento DRX 400 Bruker (9,4 Tesla) e EM, utilizando um cromatógrafo de fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução Shimadzu GC-MS QP5000, equipado com coluna AT-5ms, L= 30 m, DI= 0,25 mm e filme = 0,25 μm .



FLUXOGRAMA 1: Esquema de fracionamento do extrato metanólico do micélio do fungo *Colletotrichum acutatum*.

2.3.2 - Reação de transterificação e identificação por CG/EM

Parte da mistura de triglicerídeos (20,0 mg) e monoglicerídeos (20,0 mg) foi aquecida à 60 °C sob agitação em 10% HCl/MeOH (3mL) por 8h. Após resfriamento, a solução foi extraída com CH₂Cl₂ (3x10 mL). A fase orgânica foi lavada inicialmente com solução NaHCO₃ 10% e depois com H₂O, seca com Na₂SO₄ anidro e concentrada em evaporador rotatório fornecendo os respectivos ácidos graxos como ésteres metílicos, os quais foram analisados por CG/EM.

2.3.3 - Identificação de compostos voláteis de *C. acutatum*

O fungo *C. acutatum* cultivado em BDA (2 discos de 5 mm) foi incorporado ao meio de cultivo BDLev em um balão de fundo redondo (2L). O fungo foi cultivado durante 20 dias e submetido a técnica da hidrodestilação utilizando o aparato de Clevenger, sendo que as substâncias voláteis foram extraídas utilizando éter etílico e após concentração com gás N₂, foram analisadas por CG/EM utilizando um cromatógrafo de fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução Shimadzu GC-MS QP5000, equipado com coluna AT-5ms, L=30 m, DI=0,25 mm e filme=0,25 µm.

Os índices de retenção foram obtidos injetando uma mistura de C8-C20 de hidrocarbonetos lineares (*n*-alcanos). A identificação dos compostos foi feita com base nos índices de retenção (VAN DEN DOOL e KRATZ, 1963) e na comparação computadorizada dos espectros de massas adquiridos com aqueles armazenados no banco de dados do sistema CG/EM (NIST107, NIST21, WILEY8) e com outros da literatura. A percentagem de cada componente foi determinada pela área do componente dividida pela área total de todos os componentes presentes na mistura (ADAMS, 2007).

2.4 - Resultados e discussões

Os parâmetros observados para avaliação do meio mais viável para o cultivo de *C. acutatum* em larga escala foram a massa micelial e o perfil químico do Ext. MeOH do micélio avaliado por CLAE-UV (254 nm). Após 20 dias de cultivo, observou-se uma enorme diferença na quantidade de massa micelial seca do fungo cultivado em CZAPECK (160 mg) com os cultivados em BD (797 mg) e BDLev (1151 mg) (FIGURA 2.16). A análise por CLAE-UV mostrou que o cromatograma do Ext. MeOH do micélio do fungo cultivado no meio BDLev possuía mais bandas cromatográficas (FIGURA 2.17). Assim, com base nos parâmetros utilizados, o meio utilizado para o cultivo de *C. acutatum* em larga escala foi o BDLev.

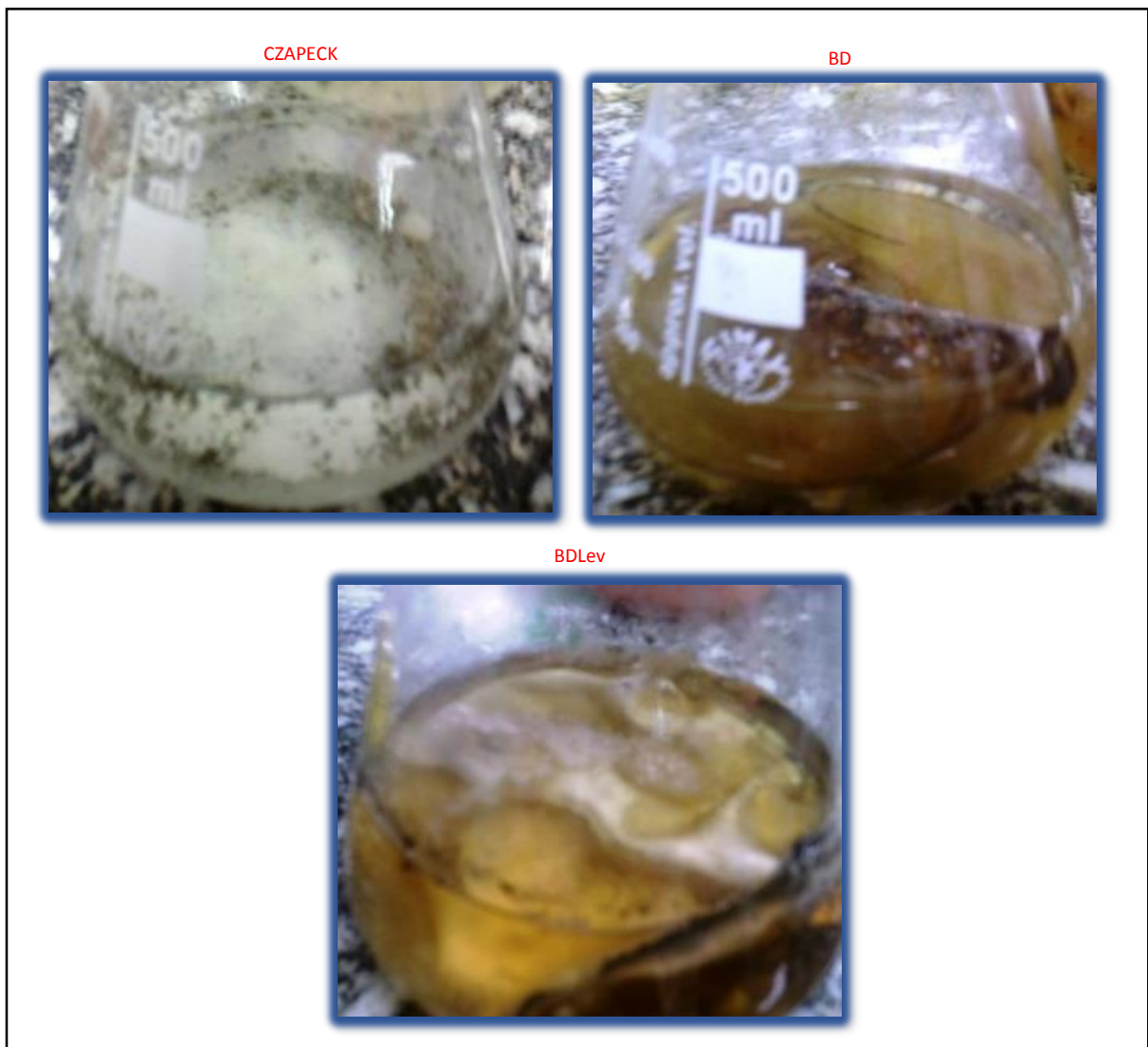


FIGURA 2.16 - Aspecto do fungo *Colletotrichum acutatum* cultivado em diferentes meios de cultivo após 20 dias de crescimento.

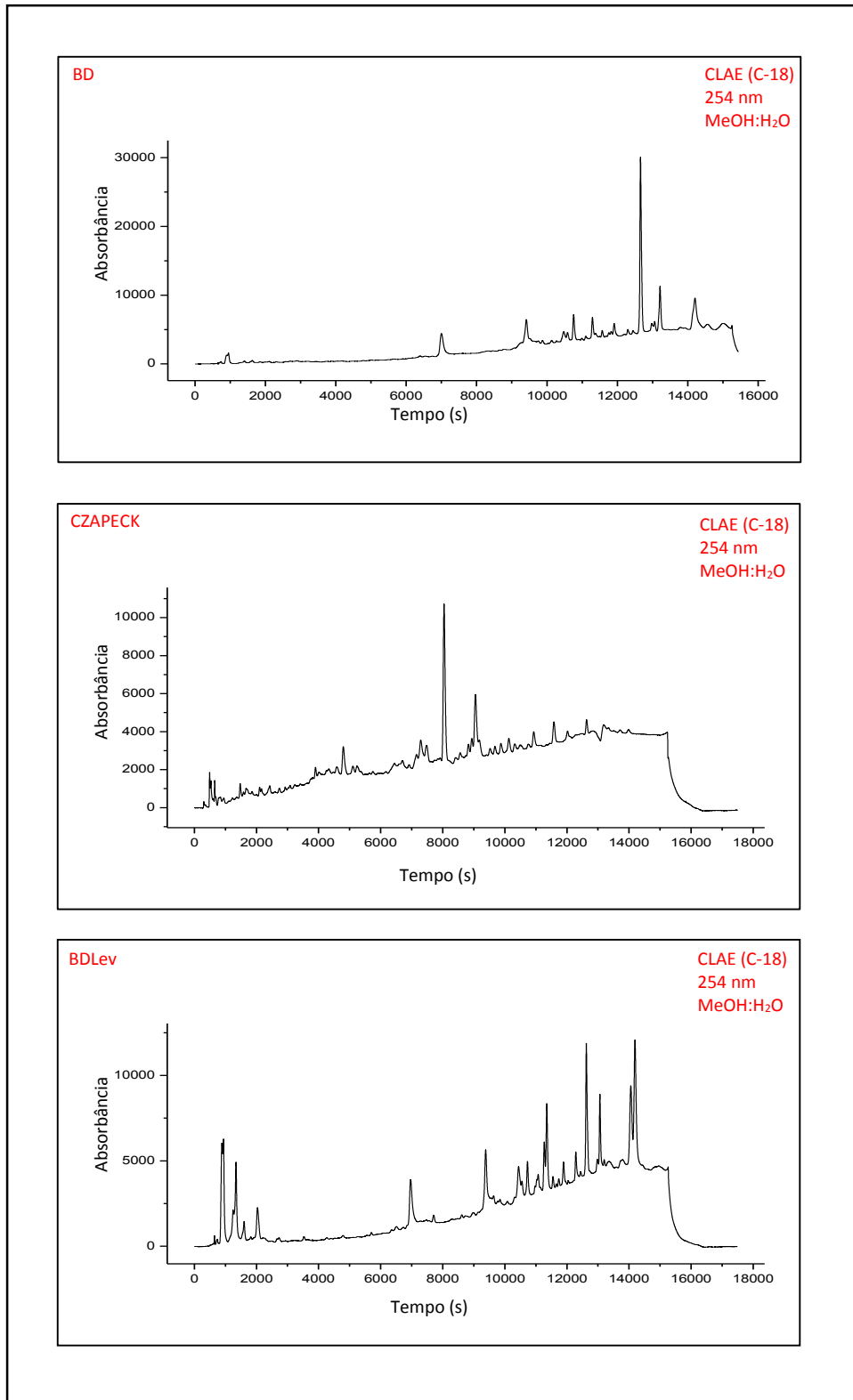
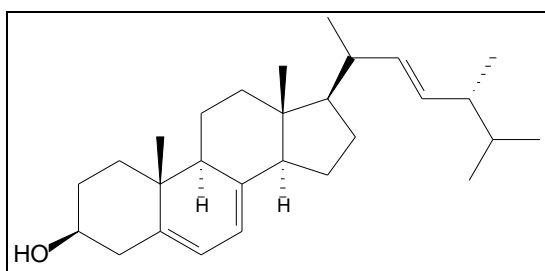


FIGURA 2.17 - Cromatogramas CLAE-UV dos extratos metanólicos de *Colletotrichum acutatum* cultivado em BD, CZAPECK e BDLev.

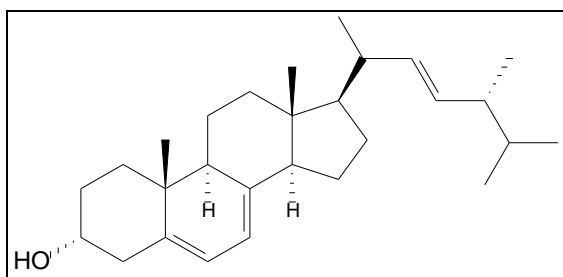
2.4.1 - Substâncias isoladas de *C. acutatum* cultivadas em meio BDLev

O estudo químico do fungo *C. acutatum* proporcionou o isolamento e identificação de 13 substâncias. Da partição hexânica do Ext. MeOH do micélio foram isolados esteroides típicos de fungo, como o ergosterol, além de metabolitos primários como glicerídeos. Já na partição AcOEt do Ext. MeOH do micélio também foram isolados metabolitos primários como alguns nucleosídeos bem comuns em fungos, como a uracila, uridina e a inosina.

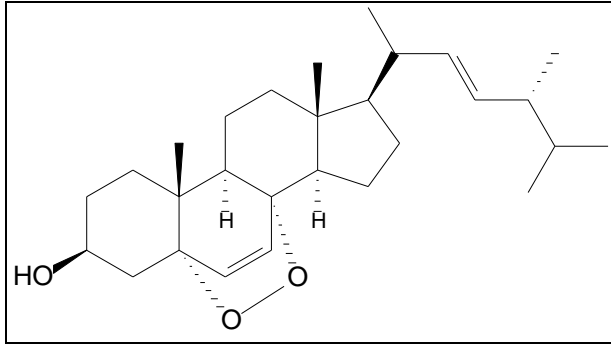
O fracionamento por CC e purificação por CLAE-UV do Ext. AcOEt do meio de cultura líquido proporcionou o isolamento e identificação de algumas dicetopiperazinas, além de compostos fenólicos como o tirosol e o álcool 4-hidroxibenzílico.



Ergosterol (S01)
Part. Hex. Ext. MeOH micélio
Massa: 26,3 mg

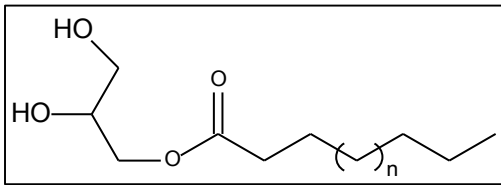


Epi-ergosterol (S02)
Part. Hex. Ext. MeOH micélio
Massa: 45,6 mg



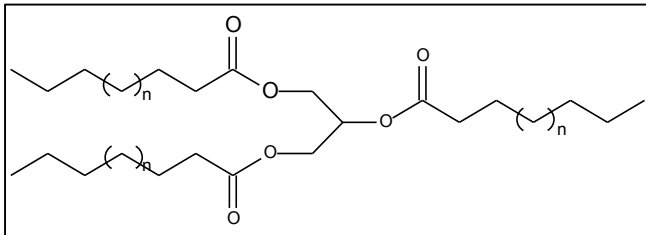
Exo/endo peróxido de ergosterol (S03)

Part. Hex. Ext. MeOH micélio
 Massa: 14,8 mg



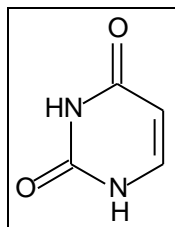
Monoglicerídeo (S04)

Part. Hex. Ext. MeOH micélio
 Massa: 23,4 mg



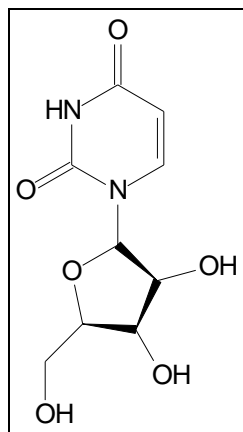
Triglicerídeo (S05)

Part. Hex. Ext. MeOH micélio
 Massa: 30,5 mg

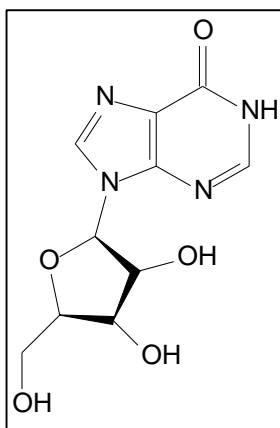


Uracila (S06)

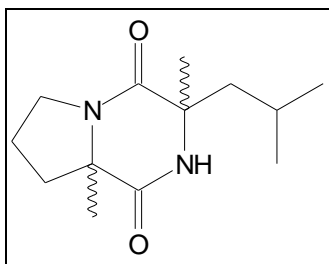
Part. AcOEt Ext. MeOH micélio
 Massa: 0,4 mg



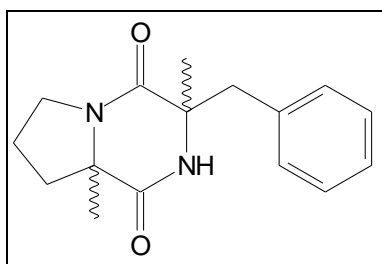
Uridina (S07)
Part. AcOEt Ext. MeOH micélio
Massa: 5,6 mg



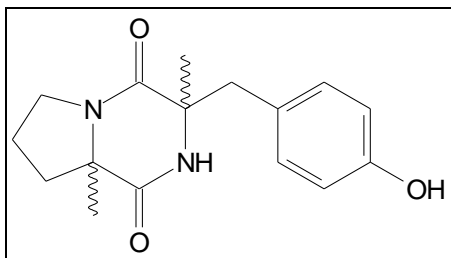
Inosina (S08)
Part. AcOEt Ext. MeOH micélio
Massa: 0,9 mg



Ciclo (Pro-Leu) (S09)
Part. AcOEt Ext. MeOH micélio
Massa: 5,8 mg



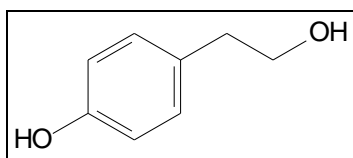
Ciclo (Pro-Phe) (S10)
Part. AcOEt Ext. MeOH micélio
Massa: 5,0 mg



Ciclo (Pro-Tyr) (S11)

Part. AcOEt Ext. MeOH micélio

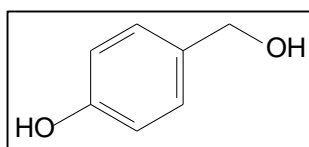
Massa: 4,0 mg



Tirosol (S12)

Part. AcOEt Ext. MeOH micélio

Massa: 6,5 mg



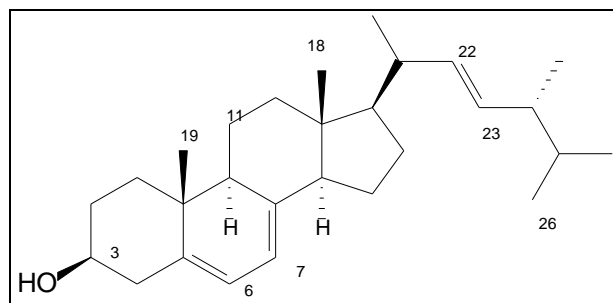
Álcool 4-hidroxibenzílico (S13)

Part. AcOEt Ext. MeOH micélio

Massa: 0,5 mg

2.4.2 - Identificação estrutural das substâncias isoladas

2.4.2.1 - Substância 01 - Ergosterol



A substância 01 foi isolada da partição hexânica do Ext. MeOH do micélio como um sólido branco. Observou-se no espectro de RMN ^1H (FIGURA 2.18) dois duplos dubletos na região de hidrogênios olefínicos em δ 5,38 e 5,57 (FIGURA 2.19). Foi também possível observar um multiplete em δ 5,19 proveniente dos hidrogênios da ligação dupla da cadeia lateral. Foram observados sinais característicos de hidrogênio carbinólico em δ 3,63 (*m*, 1H). Os sinais de hidrogênio em δ 0,84; 0,82; 1,04; 0,92; 0,93; 0,61 observados no espectro de RMN ^1H caracterizam-se por esqueleto de estrutura esteroidal.

Com o espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 2.20) foi possível observar sinais de carbono com hibridização sp^2 em δ 141,3; 139,8; 135,6; 132,0; 119,6; 116,3, além de apresentar sinais de carbonos metílicos (δ 12,0; 16,3; 17,6; 19,6; 21,1 e 33,1). Observou-se também um sinal em δ 70,5 referente ao carbono carbinólico (C-3).

Com a análise dos dados espectroscópicos e comparação com os dados da literatura (PRIETO, 2012), conclui-se que a substância 01 é o ergosterol, um esteroide presente na membrana celular dos fungos (TABELA 2.1).

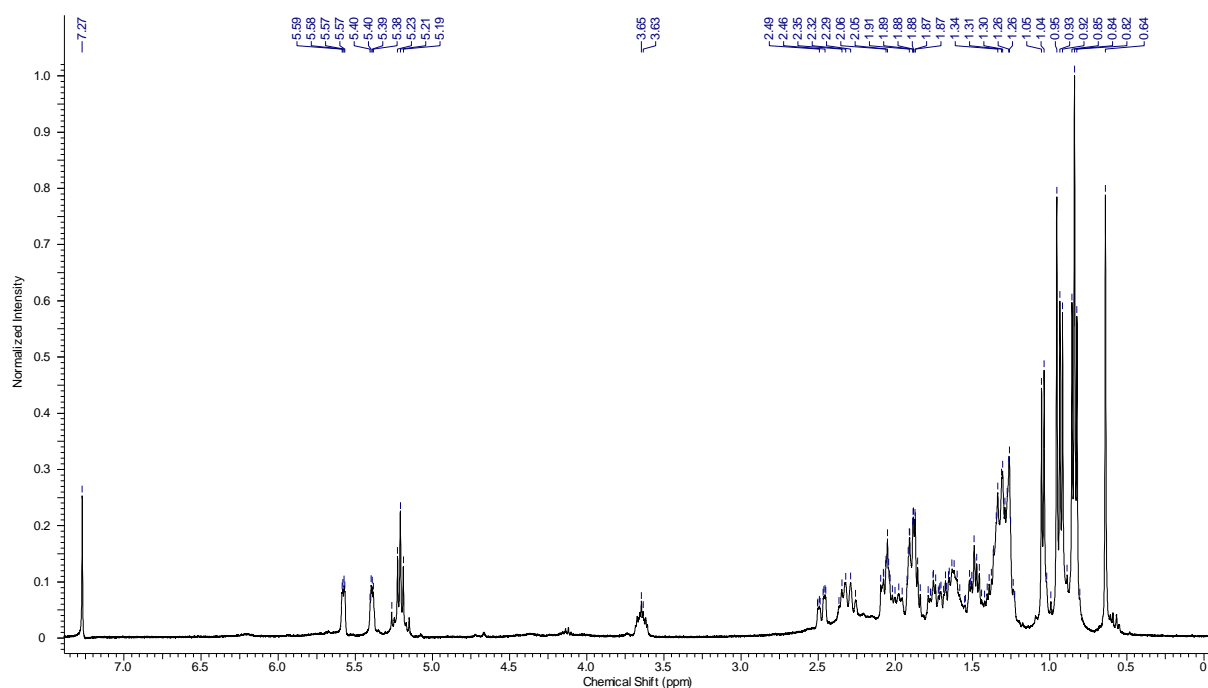


FIGURA 2.18 - Espectro de RMN ¹H da substância 01 (CDCl₃, 400 MHz).

TABELA 2.1 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 400 e 100 MHz) da substância 01 em comparação com os dados da literatura (PRIETO, 2012; CDCl_3).

C	δ_{H}	δ_{H} Lit.	δ_{C}	δ_{C} Lit.
1	-	-	38,4	38,4
2	-	-	32,0	32,0
3	3,63 (<i>m</i> , 1H)	3,62 (<i>m</i> , 1H)	70,5	70,5
4	-	-	40,4	40,4
5	-	-	141,3	141,3
6	5,57 (<i>dd</i> , $J=5,4$ e $2,2$ Hz, 1H)	5,56 (<i>dd</i> , $J=5,4$ e $2,2$ Hz, 1H)	119,6	119,6
7	5,38 (<i>dd</i> , $J=5,4$ e $2,5$ Hz, 1H)	5,37 (<i>dd</i> , $J=5,4$ e $2,5$ Hz, 1H)	116,3	116,3
8	-	-	139,8	139,8
9	-	-	46,3	46,2
10	-	-	37,0	37,0
11	-	-	21,1	21,1
12	-	-	28,3	28,3
13	-	-	42,8	42,8
14	-	-	54,6	54,5
15	-	-	23,0	23,0
16	-	-	39,1	39,1
17	-	-	55,7	55,7
18	0,93 (<i>s</i> , 3H)	0,93 (<i>s</i> , 3H)	12,0	12,1
19	0,64 (<i>s</i> , 3H)	0,62 (<i>s</i> , 3H)	16,3	16,3
20	-	-	40,4	40,4
21	1,04 (<i>d</i> , $J=6,5$ Hz, 3H)	1,02 (<i>d</i> , $J=6,6$ Hz, 3H)	19,6	19,6
22	5,19 (<i>m</i> , 1H)	5,18 (<i>m</i> , 1H)	132,0	132,0
23	5,19 (<i>m</i> , 1H)	5,18 (<i>m</i> , 1H)	135,6	135,5
24	-	-	42,8	42,9
25	-	-	19,9	19,9
26	0,82 (<i>d</i> , $J=6,5$ Hz, 3H)	0,82 (<i>d</i> , $J=6,7$ Hz, 3H)	33,1	33,1
27	-	-	20,0	21,1
28	0,93 (<i>s</i> , 3H)	0,93 (<i>s</i> , 3H)	17,6	17,6

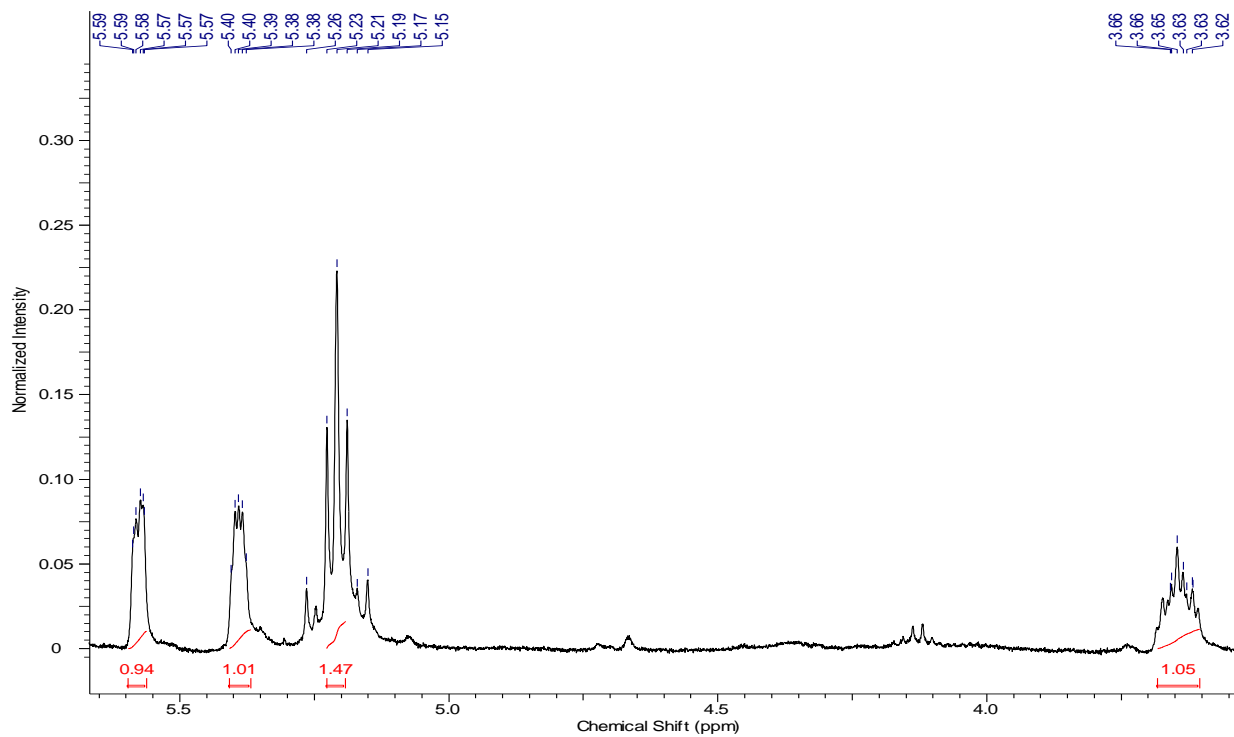


FIGURA 2.19 - Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 01 (CDCl_3 , 400 MHz).

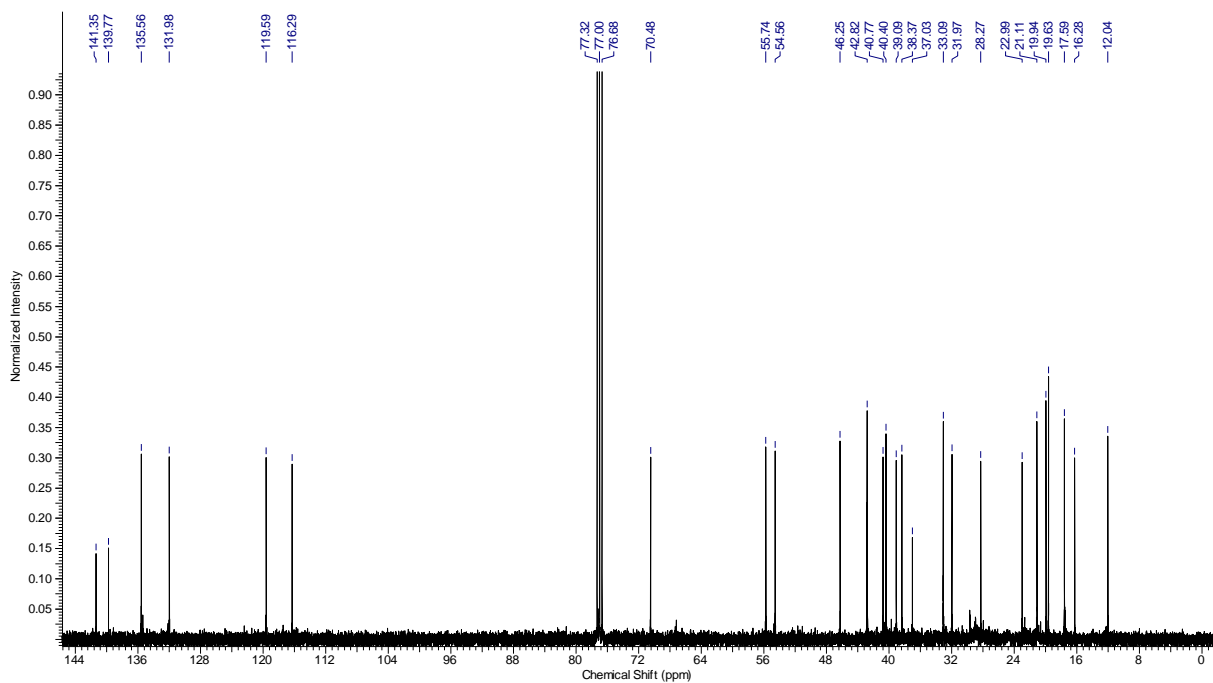
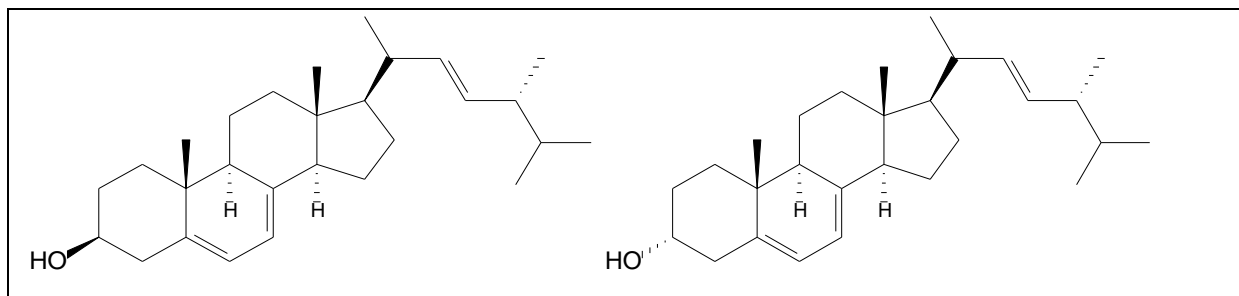


FIGURA 2.20 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 01 (CDCl_3 , 100 MHz).

2.4.2.2 - Substância 02 - Mistura de ergosterol e epi-ergosterol



A substância 02, um precipitado branco isolado da partição hexânica do extrato MeOH do micélio, foi solubilizado em CDCl_3 e analisado por RMN ^1H (FIGURA 2.21). Pela análise do espectro de RMN ^1H foi possível observar a presença de dois sinais multipletos em δ 3,61 e 3,67, característicos de hidrogênio ligado a carbono carbinólico, indicando uma possível duplicação de sinais. Olhando na região de δ 0,64 a 1,05 ppm observou-se também duplicação em vários sinais de metila, como principalmente aqueles em δ 0,64 e 0,82, que indicam corresponder a metilas bem blindadas de esteroides, levando a acreditar numa possível existência de uma mistura de diastereoisômeros (FIGURA 2.22). Comparando os sinais do ergosterol com o da substância 02 foi possível observar uma imensa similaridade entre os espectros com a diferença de sinais duplicados na amostra isolada. Interpretando os sinais e comparando-os com a literatura, vemos que a substância isolada é uma mistura do ergosterol com o epi-ergosterol (GRIFFITHS, 2003).

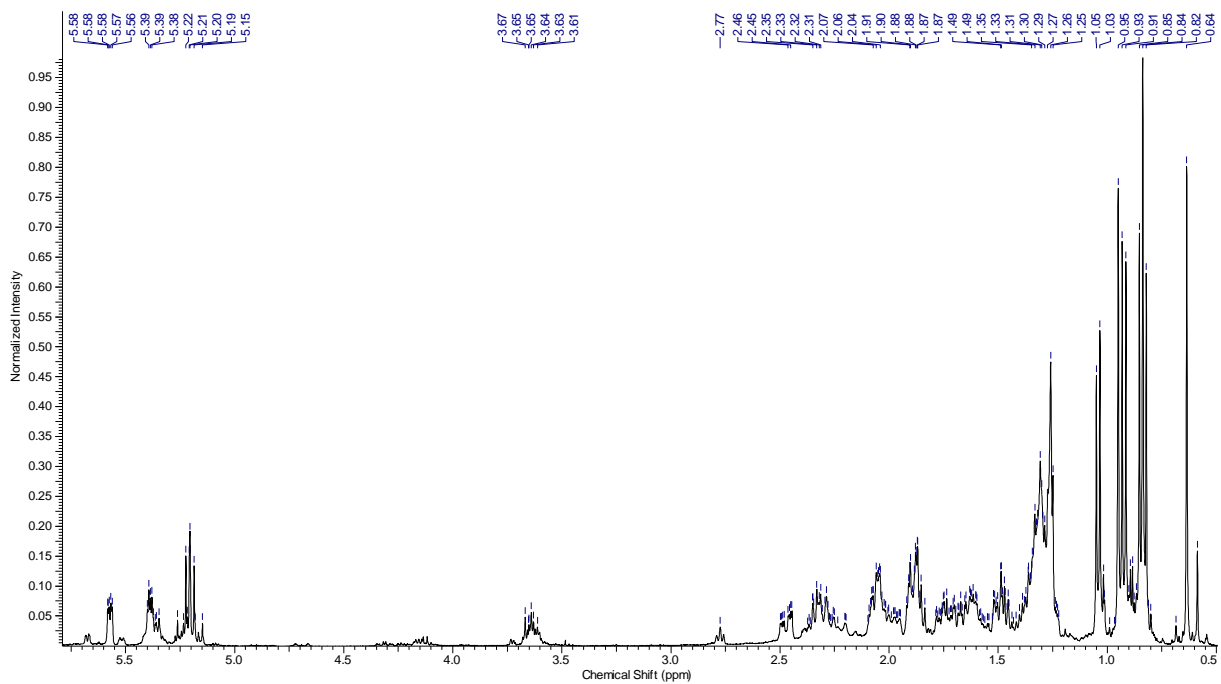


FIGURA 2.21 - Espectro de RMN ^1H da substância 02 (CDCl_3 , 400 MHz).

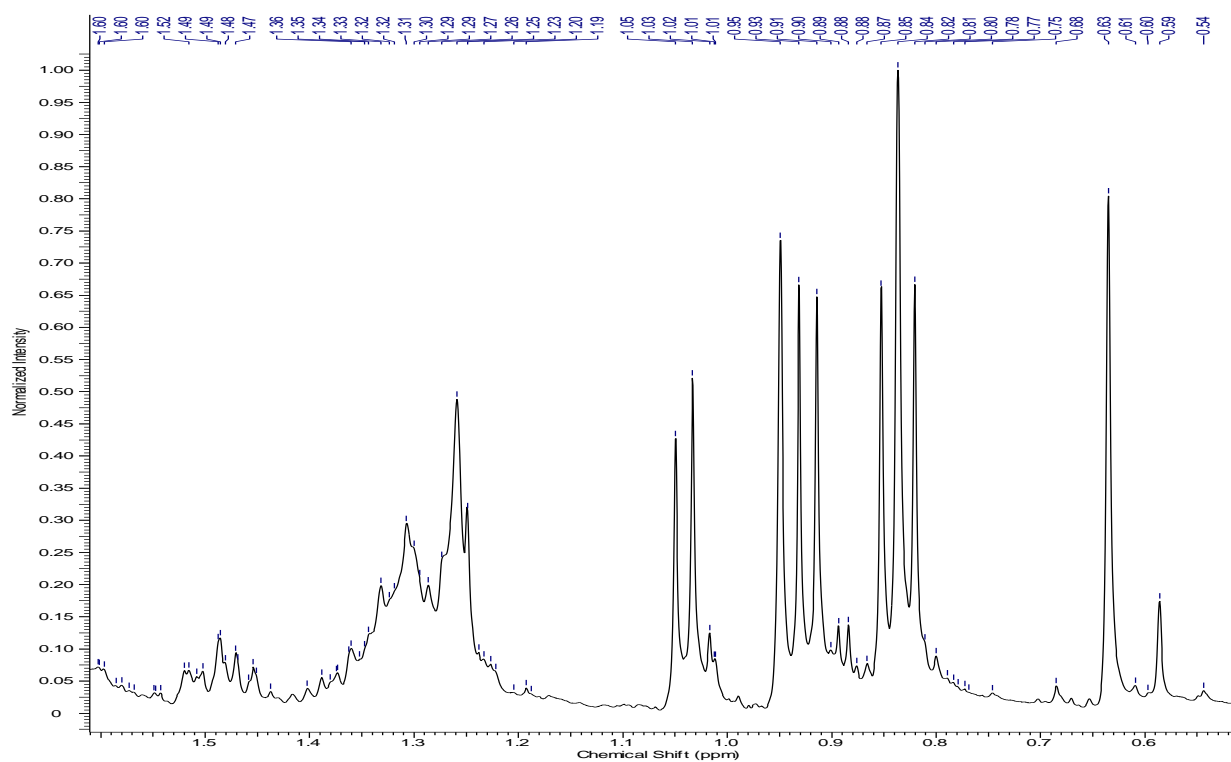
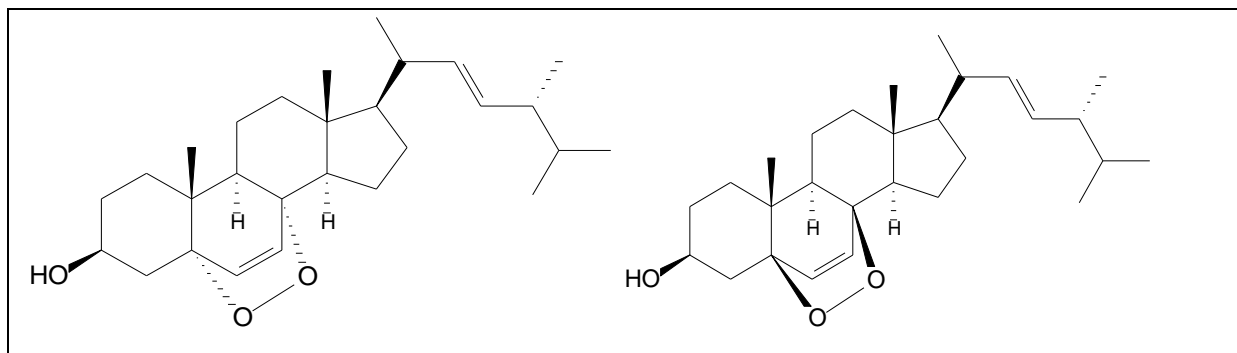


FIGURA 2.22 - Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 02 (CDCl_3 , 400 MHz).

2.4.2.3 - Substância 03 - Mistura de endo/exo-peróxido de ergosterol



A substância 03 foi isolada como um sólido branco da partição hexânica do Ext. MeOH do micélio e analisada por RMN ^1H e ^{13}C . O espectro de RMN ^1H (FIGURA 2.23) apresenta dois dubletos de hidrogênios olefínicos acoplando-se entre si em δ 6,48 ($J=8,5$ Hz) e 6,26 ($J=8,5$ Hz), indicando a estereoquímica *cis* para os hidrogênios (FIGURA 2.24). O sinal do hidrogênio carbinólico foi observado como um multiplete em δ 3,95. Os sinais em δ 5,19 são comumente atribuídos a existência de ligações duplas na cadeia lateral de um esteroide.

Pelo espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 2.25) pôde-se observar sinais característicos de carbono com hibridização sp^2 em δ 135,4; 135,1; 132,3; 130,6.

Comparando com os dados da literatura (PRIETO, 2012), pôde-se concluir que a substância 03 trata-se do peróxido de ergosterol. Em todos os espectros mostrados notou-se a duplicação dos sinais, podendo levar a conclusão que existe uma mistura de endo e exo peróxido de ergosterol (TABELA 2.2).

TABELA 2.2 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 400 e 100 MHz) da substância 03 em comparação com os dados da literatura (PRIETO, 2012; CDCl_3).

C	δ_{H}	$\delta_{\text{H Lit}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{C Lit}}$
1	-		30,4	30,4
2	-		34,7	34,6
3	3,95 (<i>m</i> , 1H)	3,93 (<i>m</i> , 1H)	66,3	66,3
4			39,3	39,3
5			82,1	82,1
6	6,26 (<i>d</i> , $J=8,5$ Hz, 1H)	6,25 (<i>d</i> , $J=8,4$ Hz, 1H)	135,1	135,2
7	6,48 (<i>d</i> , $J=8,5$ Hz, 1H)	6,47 (<i>d</i> , $J=8,4$ Hz, 1H)	130,6	130,7
8			79,4	79,3
9			51,0	51,0
10			36,8	36,8
11			20,6	20,6
12			36,0	36,9
13			44,5	44,5
14			51,6	51,6
15			23,3	23,3
16			28,6	28,6
17			56,1	56,1
18	1,25 (<i>s</i> , 3H)	1,23 (<i>s</i> , 3H)	12,9	12,9
19	0,87 (<i>s</i> , 3H)	0,87 (<i>s</i> , 3H)	18,1	18,1
20			39,7	39,7
21	0,91 (<i>d</i> , $J=6,5$ Hz, 3H)	0,91 (<i>d</i> , $J=6,6$ Hz, 3H)	20,8	20,8
22	5,19 (<i>m</i> , 1H)	5,17 (<i>m</i> , 1H)	135,4	135,4
23	5,19 (<i>m</i> , 1H)	5,17 (<i>m</i> , 1H)	132,3	132,2
24			42,7	42,8
25			33,0	33,0
26	0,82 (<i>d</i> , $J=6,5$ Hz, 3H)	0,82 (<i>d</i> , $J=6,7$ Hz, 3H)	19,6	19,6
27	0,80 (<i>d</i> , $J=6,5$ Hz, 3H)	0,79 (<i>d</i> , $J=6,4$ Hz, 3H)	19,9	19,9
28	1,00 (<i>s</i> , 3H)	0,96 (<i>s</i> , 3H)	17,49	17,49

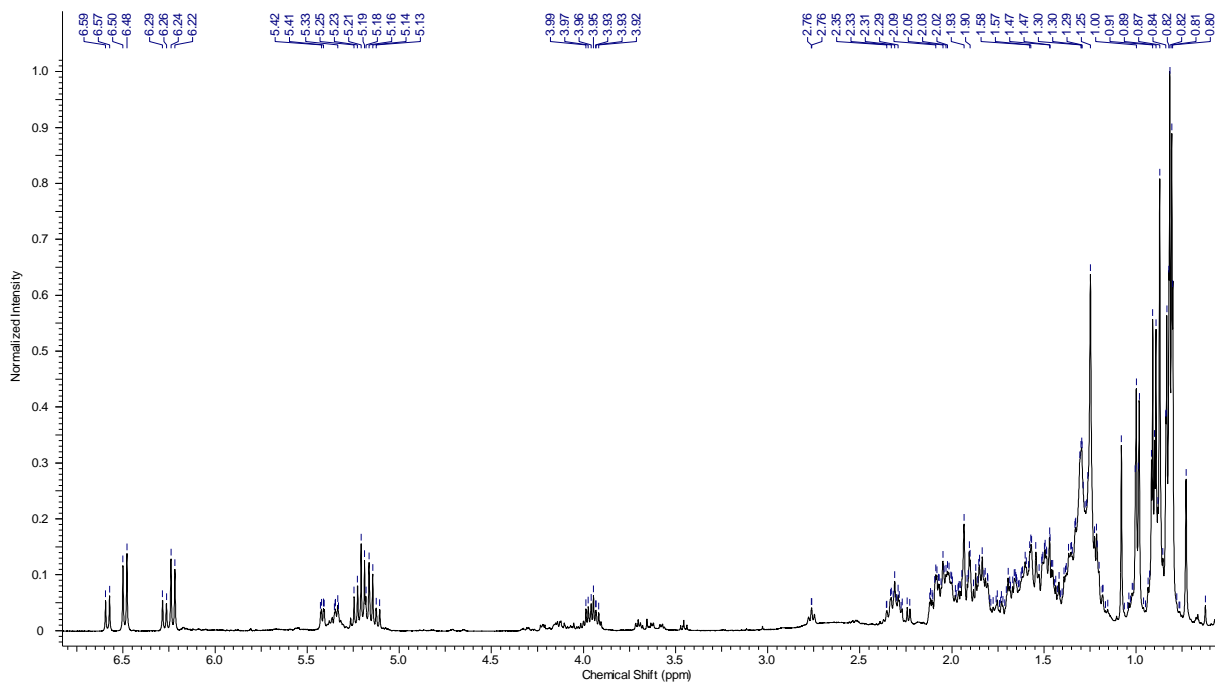


FIGURA 2.23 - Espectro de RMN ^1H da substância 03 (CDCl_3 , 400 MHz).

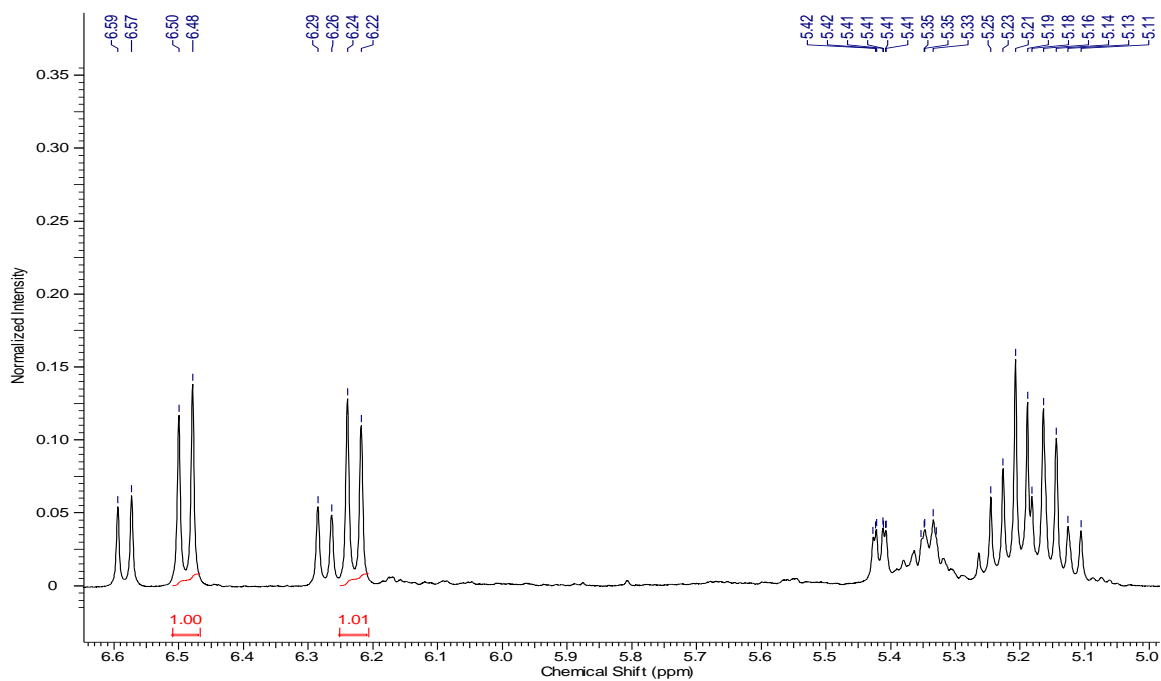


FIGURA 2.24 - Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 03 (CDCl_3 , 400 MHz).

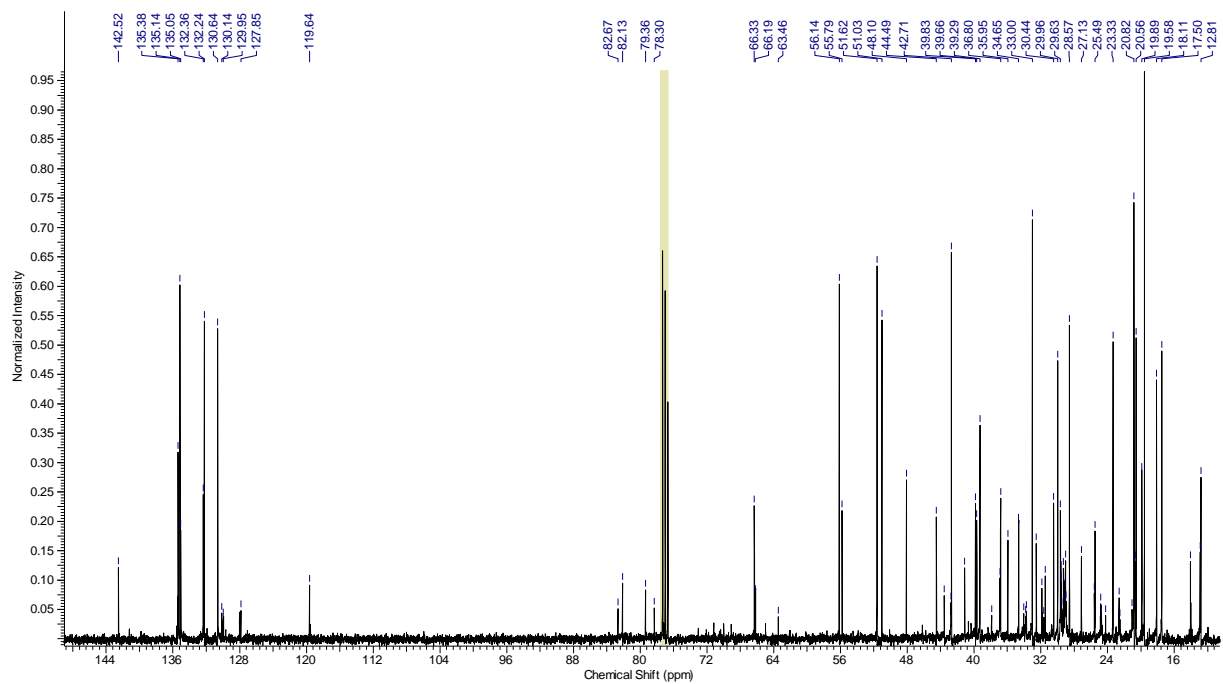
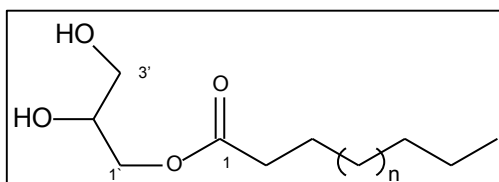


FIGURA 2.25 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 03 (CDCl_3 , 100 MHz).

2.4.2.4 - Substância 04 - Mistura de monoglicerídeos



A substância 04 foi isolada da partição hexânica do Ext. MeOH do micélio como um óleo esverdeado. Com o espectro de RMN ^1H (FIGURA 2.26) pôde-se observar sinais característicos de glicerídeos, diferenciando-se dos triglicerídeos pelos sinais de hidrogênio presentes na região dos hidrogênios carbinólicos do glicerol, onde esses sinais apareceram um pouco mais blindados. O espectro apresenta também alguns sinais adicionais em δ 3,63 (*m*), além de um sinal em δ 3,84 (*q*, $J=5,5$ Hz) e um dubleto em δ 4,06 (*m*).

No espectro de COSY o sinal em δ 0,84 correlacionou-se com sinal em δ 1,29 referente aos hidrogênios metilênicos da cadeia. Além disso, foi observado que o sinal em δ 2,01 correlaciona-se com os hidrogênios em δ 5,33 e 1,29 dando indícios de estar próximo a ligação dupla (FIGURA 2.27).

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 2.28) apresentou 21 sinais comuns de glicerídeos com um sinal em δ 174,3 referente a uma carboxila de éster, dois sinais de carbonos olefínicos δ 129,7 e 130,0 que indicam a existência de uma ligação dupla na estrutura. Observou-se também 3 sinais típicos de carbonos carbinólicos em δ 63,3; 65,0 e 70,1. Foram observados também no espectro de RMN ^{13}C sinais de carbonos metilênicos e ainda um outro referente a metila terminal em δ 14,1.

No espectro de HSQC observou-se a correlação do sinal em δ 0,84 com o carbono em δ 14,0; além do sinal em δ 2,01 ligado ao carbono em δ 27,2.

Com a reação de transesterificação e análise por CG/EM pôde-se notar a presença de um éster de cadeia insaturada (FIGURA 2.29). O espectro de massas apresentou o pico do íon molecular em m/z 296, além de fragmentos típicos de ésteres (FIGURA 2.30).

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C foram comparados com aqueles da literatura para um monoglicerídeo de cadeia insaturada (MARINHO, 2005) e com o auxílio dos espectros de 2D e EM pôde-se concluir que o único ácido que esterificava o glicerol era o ácido oleico (TABELA 2.3).

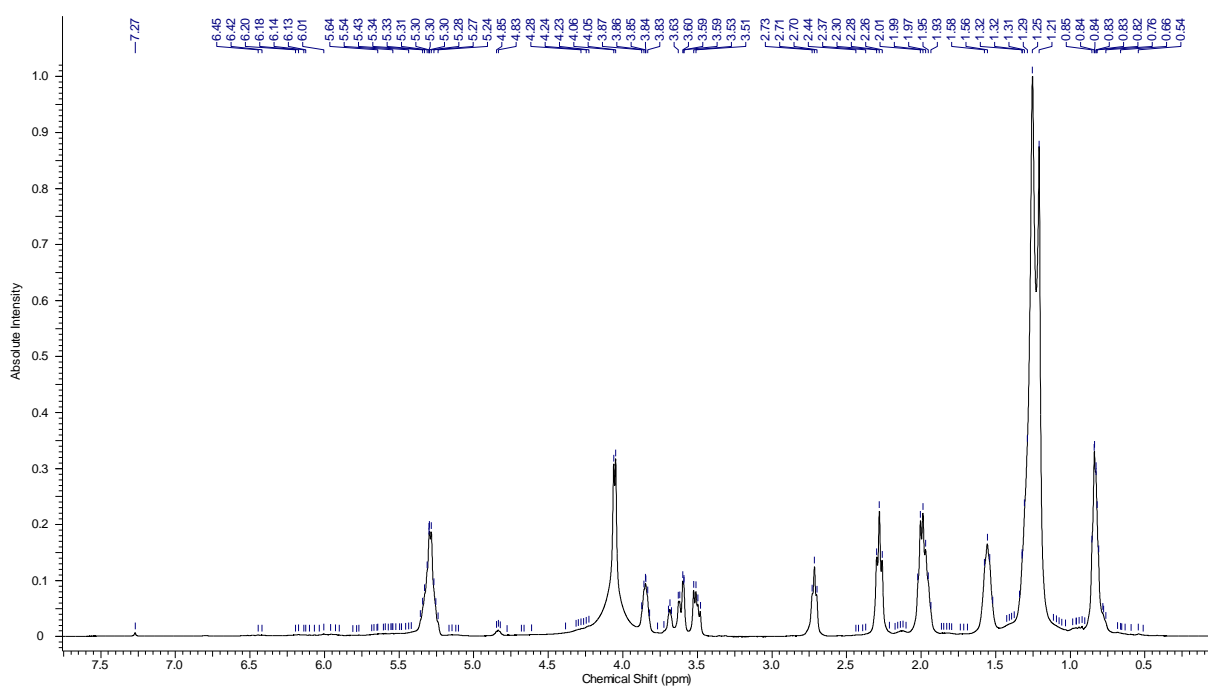


FIGURA 2.26 - Espectro de RMN ^1H da substância 04 (CDCl_3 , 400 MHz).

TABELA 2.3 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 400 e 100 MHz) da substância 04 em comparação com os dados da literatura (MARINHO, 2005; CDCl_3).

No.	δ_{H}	$\delta_{\text{H Lit}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{C Lit}}$
1	-		174,3	174,2
2	2,28 (<i>t</i> , $J=7,5$ Hz)	2,31 (<i>t</i> , $J=7,6$ Hz)	34,1	34,0
3	1,59 (<i>q</i> , $J=7,0$ H)	1,59 (<i>q</i> , $J=7,3$ H)	24,8	24,8
4	1,29 (<i>s</i>)	1,28 (<i>s</i>)	29,5	29,5
5	1,29 (<i>s</i>)	1,28 (<i>s</i>)	29,3	29,2
6	1,29 (<i>s</i>)	1,28 (<i>s</i>)	29,1	29,1
7	1,29 (<i>s</i>)	1,28 (<i>s</i>)	28,9	29,0
8	2,01 (<i>q</i> , $J=6,5$ e $13,5$ Hz)	2,02 (<i>q</i> , $J=6,8$ e $13,6$ Hz)	27,2	27,1
9	5,33 (<i>m</i>)	5,33 (<i>m</i>)	129,7	128,0
10	5,33 (<i>m</i>)	5,33 (<i>m</i>)	130,0	130,1
11	2,71 (<i>t</i> , $J=6,0$ Hz)	2,74 (<i>t</i> , $J=6,3$ Hz)	34,1	25,5
12	1,29 (<i>s</i>)	-	29,2	-
13	1,29 (<i>s</i>)	-	27,2	-
14	1,29 (<i>s</i>)	-	29,7	-
15	1,29 (<i>s</i>)	1,29 (<i>s</i>)	29,7	29,0
16	1,29 (<i>s</i>)	1,29 (<i>s</i>)	31,9	31,4
17	1,29 (<i>s</i>)	1,29 (<i>s</i>)	22,6	22,5
18	0,84 (<i>t</i> , $J=6,5$ Hz)	0,86 (<i>t</i> , $J=6,8$ Hz)	14,1	13,9
1'	4,06 (<i>d</i> , $J=5,5$ Hz)	4,10 (<i>d</i> , $J=5,5$ Hz)	65,0	65,0
2'	3,84 (<i>m</i>)	3,89 (<i>m</i>)	70,1	70,1
3'	3,63 (<i>m</i>)	3,65 (<i>m</i>)	63,3	63,3

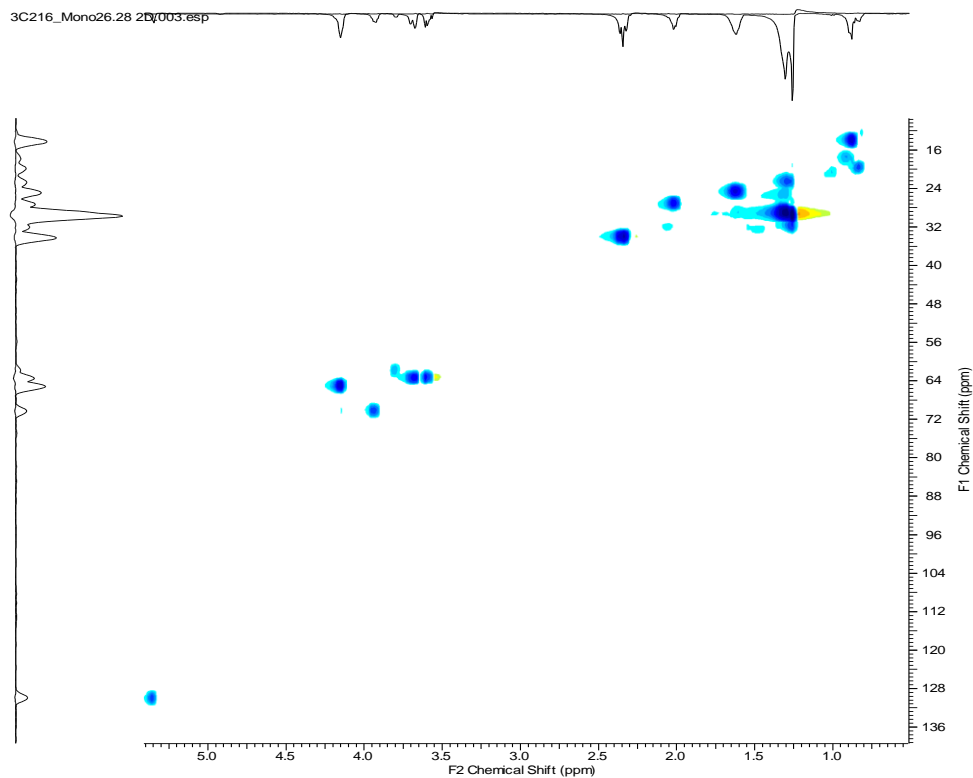
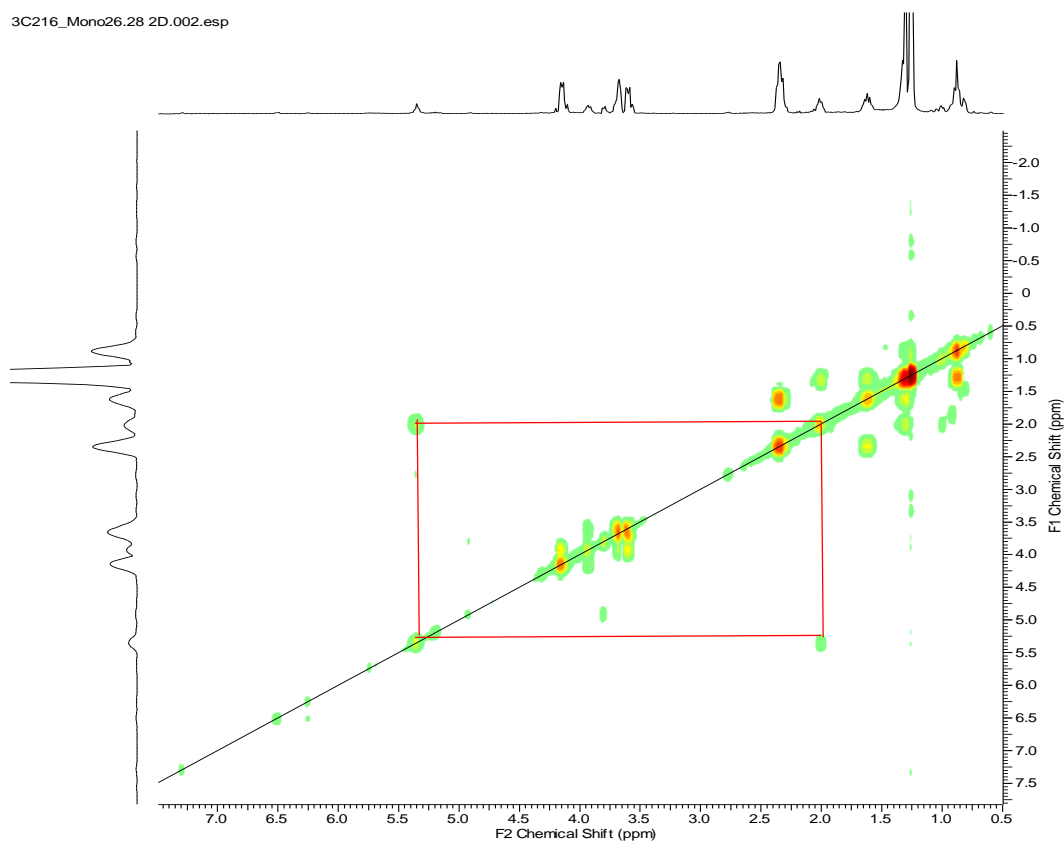


FIGURA 2.27 - Espectro de (a) COSY e (b) HSQC da substância 04.

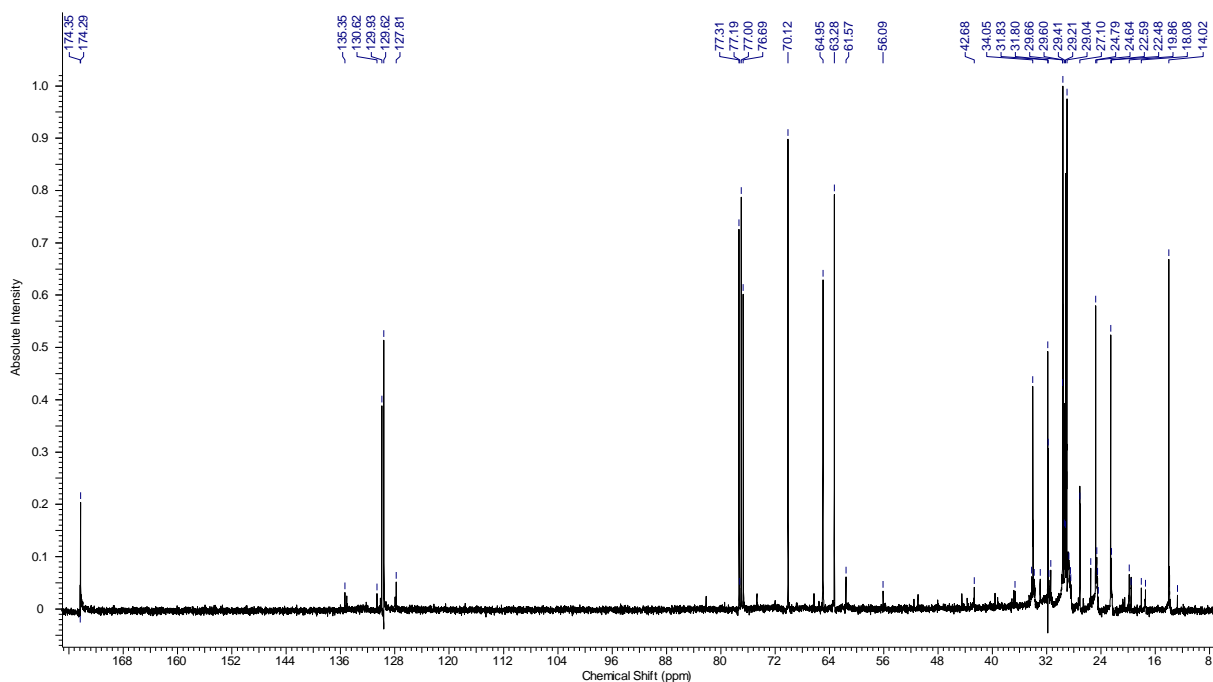
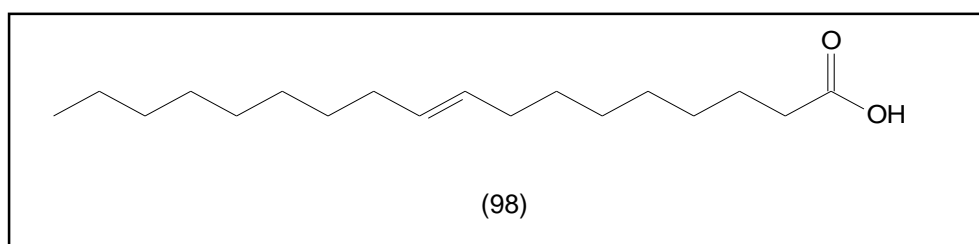


FIGURA 2.28 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 04 (CDCl_3 , 100 MHz).

A substância 04 foi submetida a reação de transesterificação e com isso pôde-se observar no espectro de massas o ácido de cadeia insaturada que esterificava o glicerol (FIGURA 2.29; FIGURA 2.30). O EM mostrou o pico do íon molecular em m/z 296, além de fragmentações características de cadeia de ácidos graxos. O banco de dados (NIST21, WILEY8) mostrou a presença do oleato de metila, evidenciando que o ácido oleico é o ácido que esterifica o glicerol (**98**).



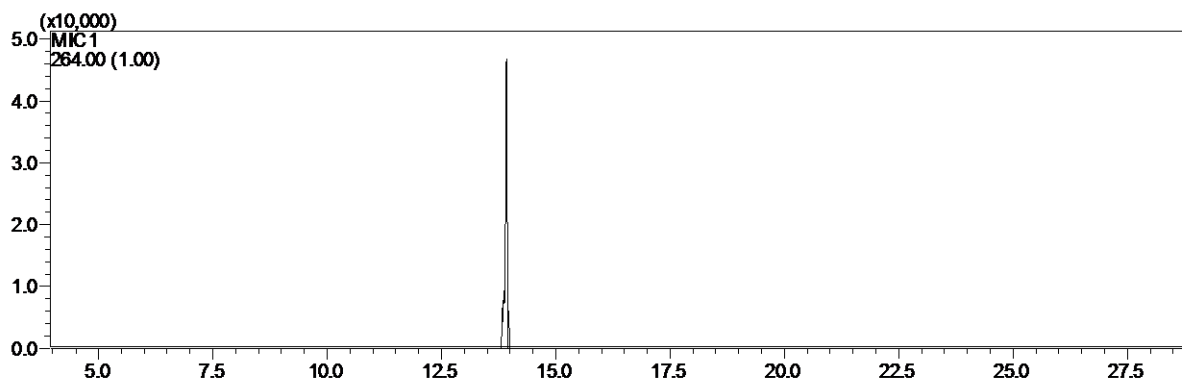


FIGURA 2.29 - Cromatograma de íons monitorados do oleato de metila após a reação de transesterificação.

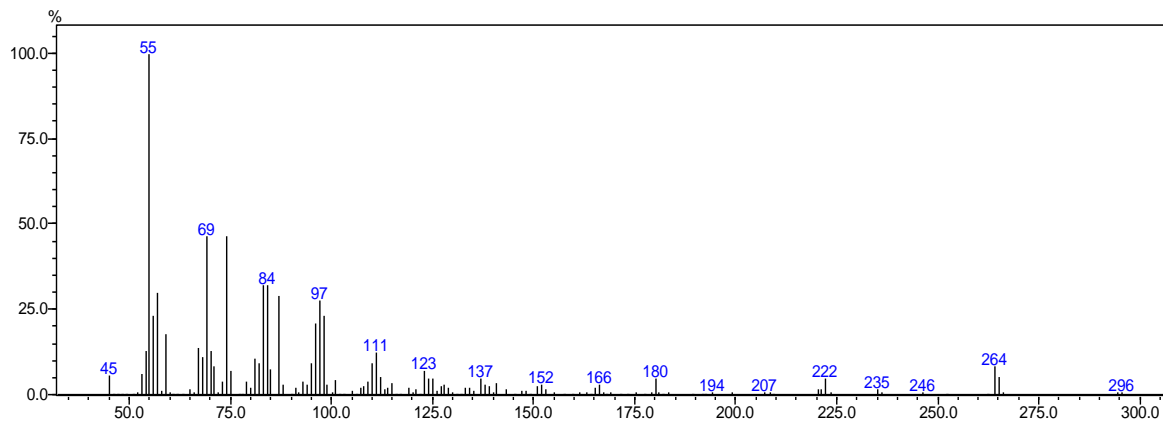
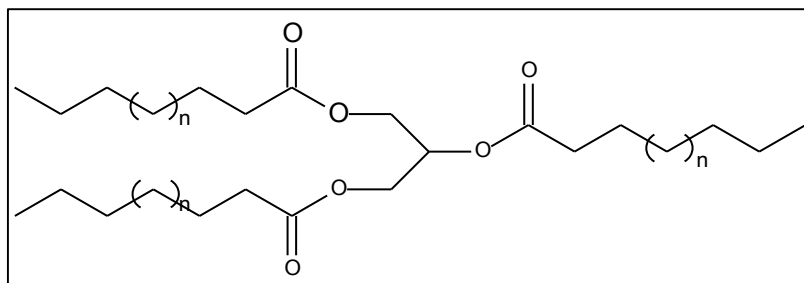


FIGURA 2.30 - Espectro de massas do éster da substância 04.

2.4.2.5 - Substância 05 - Mistura de triglicerídeos



A substância 05, um óleo de cor laranja-avermelhada, foi isolada da partição hexânica do Ext. MeOH da massa micelial. Os dados de RMN ^1H (FIGURA 2.31) apresentaram sinais característicos de triglicerídeos, como um multipletto em δ 0,79 (sinais típicos de metila terminal), além de sinais intensos característicos de metilenos de cadeia alquílica. Ainda observou-se um tripleto em δ 2,76 do metileno α a carboxila dois sinais em δ 4,10 e 4,30 referentes aos hidrogênios do glicerol e um multipletto em δ 5,32 referente aos hidrogênios olefínicos.

Para identificação dos ácidos graxos que esterificavam o glicerol, a mistura foi submetida a uma reação de transesterificação e o produto obtido foi analisado por CG/EM (FIGURA 2.32). Pôde-se observar no cromatograma a presença de 3 picos referentes aos ésteres metílicos dos respectivos ácidos graxos: ácido palmítico (33,57%), ácido linoleico (47,50%) e ácido oleico (18,93%) (FIGURA 2.33, 2.34 e 2.35).

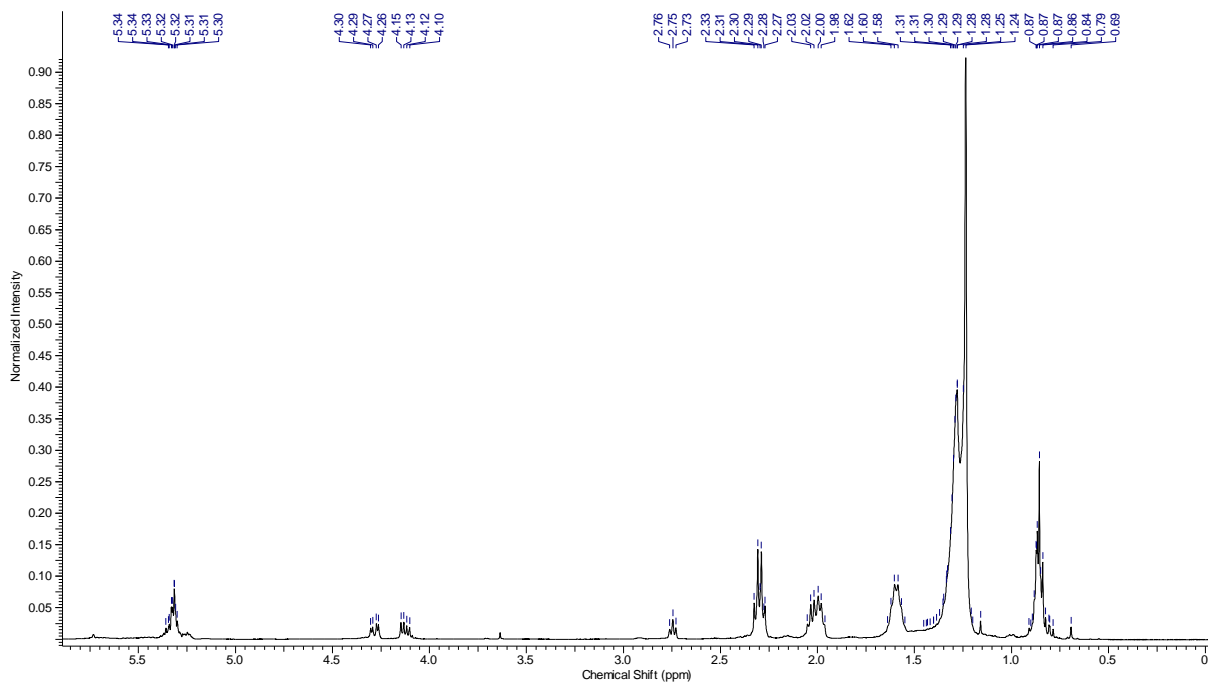


FIGURA 2.31 - Espectro de RMN ^1H da substância 05 (CDCl_3 , 400 MHz).

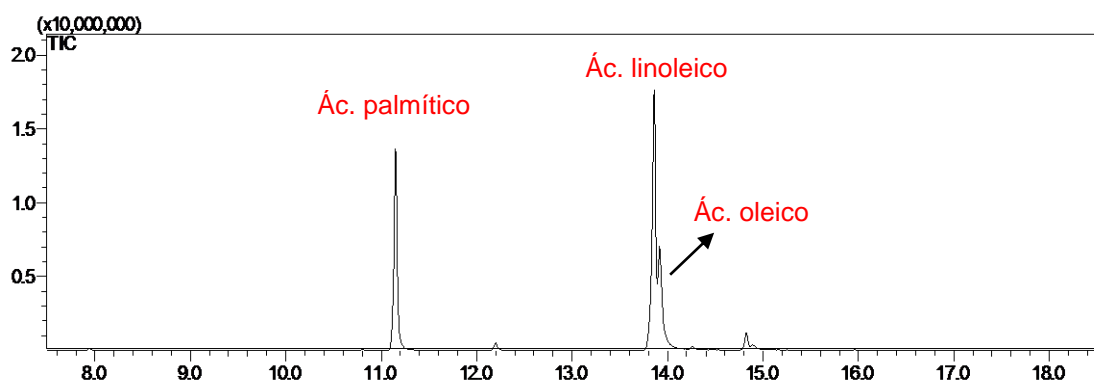


FIGURA 2.32 - Cromatograma de íons totais dos ésteres dos ácidos que esterificam o glicerol, após a reação de transesterificação.

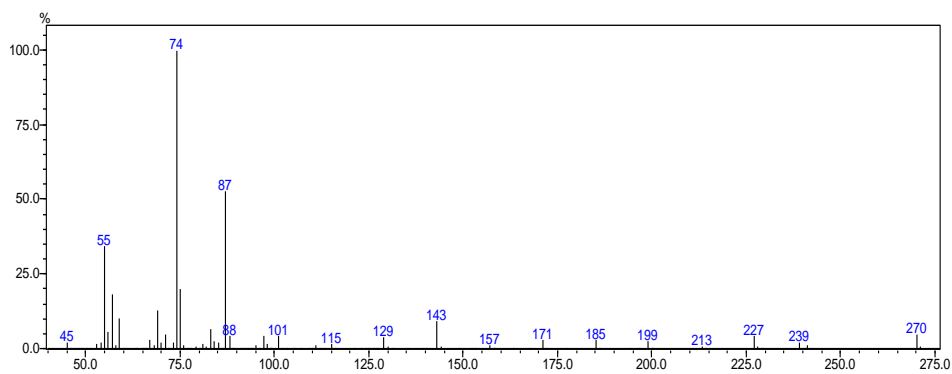


FIGURA 2.33 - Espectro de massas do éster do ácido palmítico.

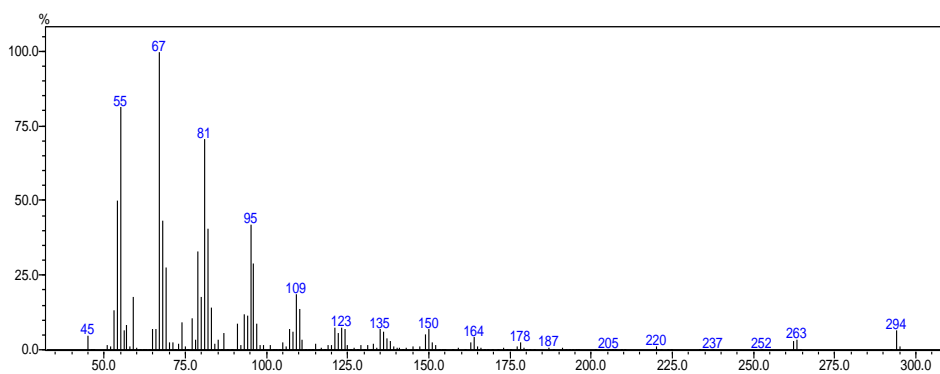


FIGURA 2.34 - Espectro de massas do éster do ácido linoleico.

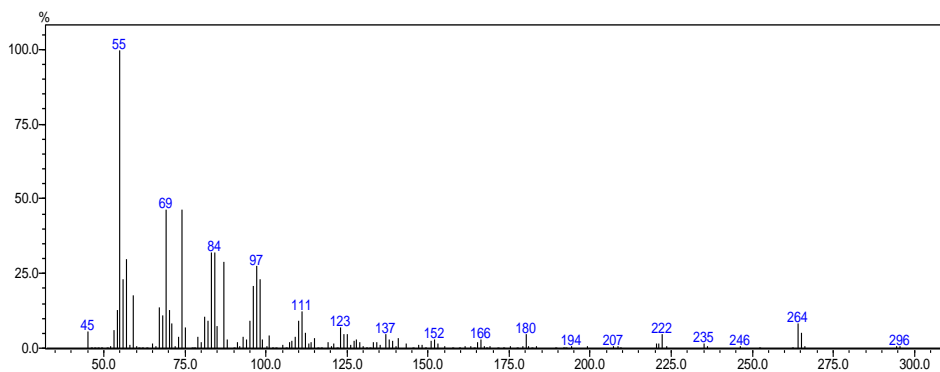
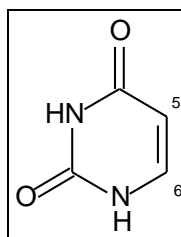


FIGURA 2.35 - Espectro de massas do éster do ácido oleico.

2.4.2.6 - Substância 06 - Uracila



A substância 06 foi isolada em forma de um cristal branco da partição AcOEt do Ext. MeOH do micélio após fracionamento por CC e purificação por CLAE-UV. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 2.36) apresentou dois sinais em δ 5,56 (*d*, $J=7,5$ Hz, 1H) e 7,40 (*d*, $J=7,5$ Hz, 1H) (FIGURA 2.37).

Com os dados de RMN ^1H apresentados, pôde-se observar que se tratava de uma molécula simples comum em fungos, o nucleosídeo uracila.

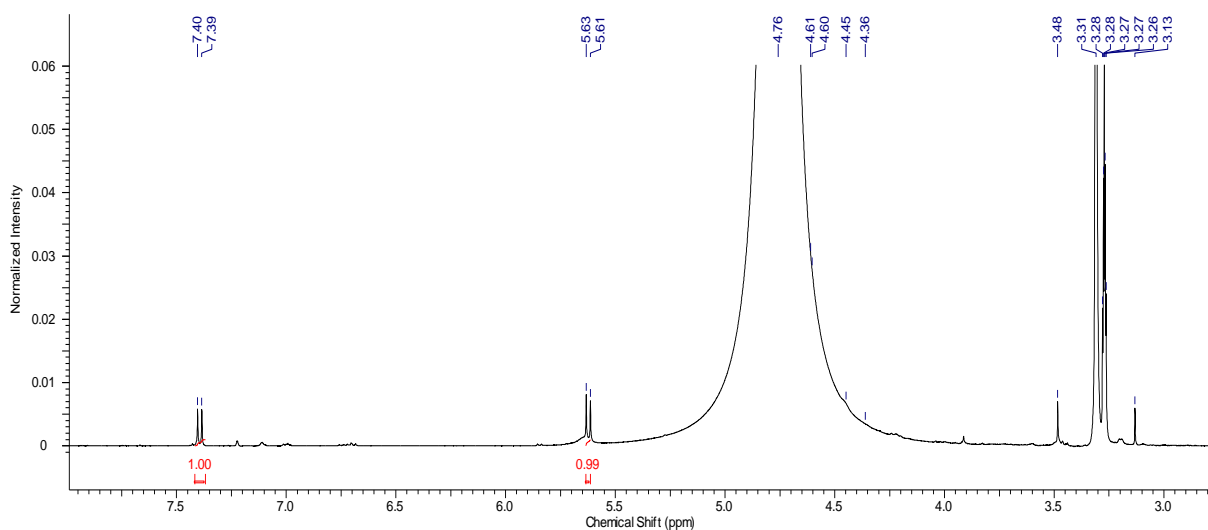


FIGURA 2.36 - Espectro de RMN ^1H da substância 06 (MeOD, 400 MHz).

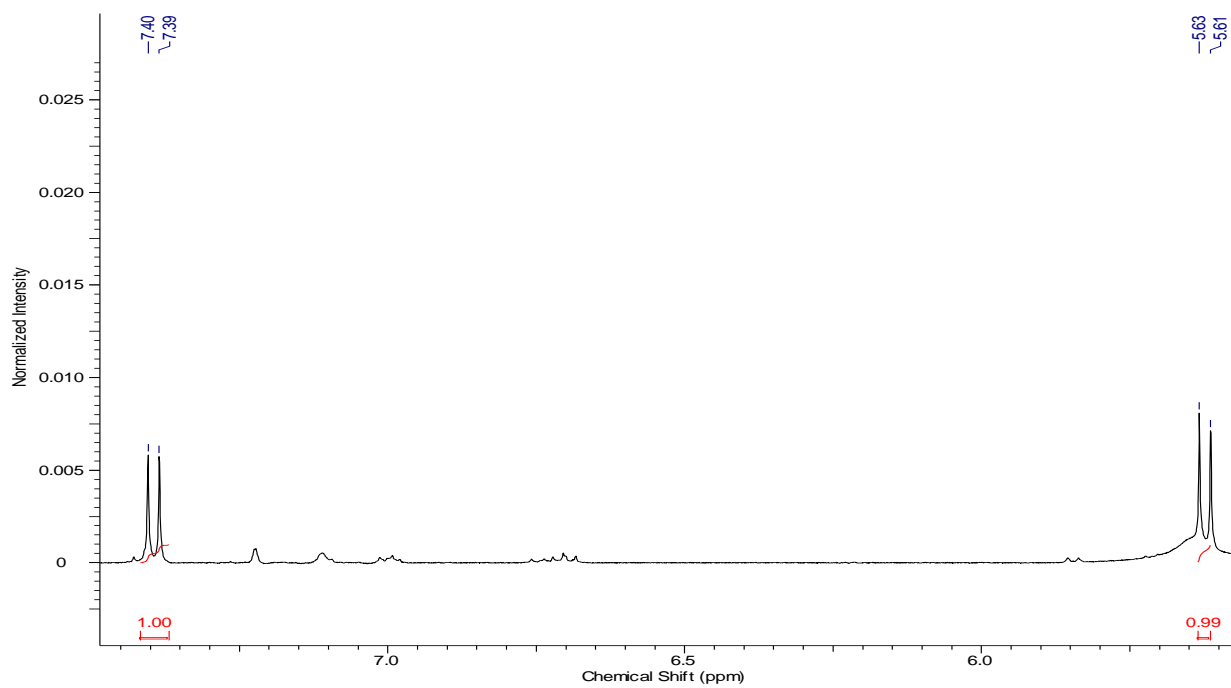
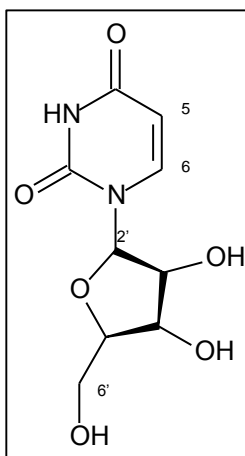


FIGURA 2.37 - Ampliação do espectro de RMN ¹H da substância 06 (MeOD, 400 MHz).

2.4.2.7 - Substância 07 - Mistura de Uridina e Uracila



A substância 07 foi isolada como uma mistura de nucleosídeos da partição AcOEt do Ext. MeOH do micélio. No espectro de RMN ^1H (FIGURA 2.38) observou-se dois dubletos acoplado entre si em δ 8,00 (*d*, $J=8,0$ Hz, 1H) e 5,70 (*d*, $J=8,0$ Hz, 1H) os quais foram atribuídos aos hidrogênios olefínicos e um sinal em δ 5,90 (*d*, $J=5,0$ Hz, 1H) o qual foi atribuído ao H-2'. Também foram observados sinais em δ 4,17 (*t*, $J=5,0$ Hz, 1H) e 4,13 (*t*, $J=5,0$ Hz, 1H) referentes aos hidrogênios H-3' e H-4'. O espectro de RMN ^1H também apresentou um multipletto em δ 4,00 referente ao H-5' (FIGURA 2.39).

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 2.40) apresentou um sinal característico de carbamida em δ 166,2 o qual foi atribuído ao carbono C-4. Observou-se também sinais de carbonos olefínicos em δ 102,6 e 142,7; além de sinais de carbonos carbinólicos em δ 90,7; 75,7; 71,3; 86,4 e 62,3.

Os dados apresentados de RMN ^1H e ^{13}C e sua comparação com os dados da literatura (PRIETO, 2012) levaram a estrutura do nucleosídeo uridina. Dois dubletos em δ 5,56 (*d*, $J=7,5$ Hz, 1H) e 7,40 (*d*, $J=7,5$ Hz, 1H) mostraram que a uridina estava em mistura com outro nucleosídeo conhecido, a uracila (TABELA 2.4).

TABELA 2.4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD, 400 e 100 MHz) da substância 07 em comparação com os dados da literatura (PRIETO, 2012; MeOD).

C	δ_{H}	$\delta_{\text{H Lit}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{C Lit}}$
2	-	-	-	152,8
4	-	-	166,2	166,3
5	5,70 (<i>d</i> , $J=8,0$ Hz, 1H)	5,68 (<i>d</i> , $J=8,0$ Hz)	102,6	102,8
6	8,00 (<i>d</i> , $J=8,0$ Hz, 1H)	7,99 (<i>d</i> , $J=8,0$ Hz)	142,7	142,8
2'	5,90 (<i>d</i> , $J=5,0$ Hz)	5,88 (<i>d</i> , $J=5,0$ Hz)	90,7	90,8
3'	4,17 (<i>t</i> , $J=5,0$ Hz)	4,17 (<i>t</i> , $J=5,0$ Hz)	75,7	75,9
4'	4,13 (<i>t</i> , $J=5,0$ Hz)	4,13 (<i>t</i> , $J=5,0$ Hz)	71,3	71,4
5'	4,00 (<i>m</i>)	3,99 (<i>m</i>)	86,4	86,6
6'a	3,82 (<i>dd</i> , $J=12; 3$ Hz)	3,82 (<i>dd</i> , $J=12; 3$ Hz)	62,3	62,3
6'b	3,74 (<i>dd</i> , $J=12; 3$ Hz)	3,72 (<i>dd</i> , $J=12; 3$ Hz)	62,3	62,3

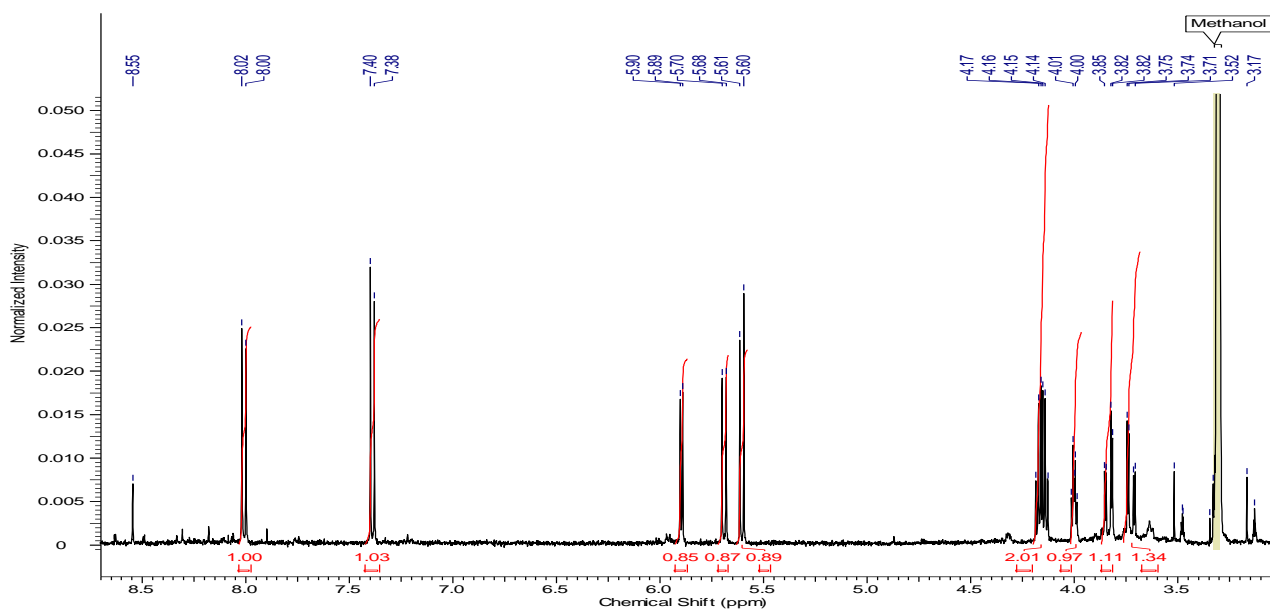


FIGURA 2.38 - Espectro de RMN ^1H da substância 07 (MeOD, 400 MHz).

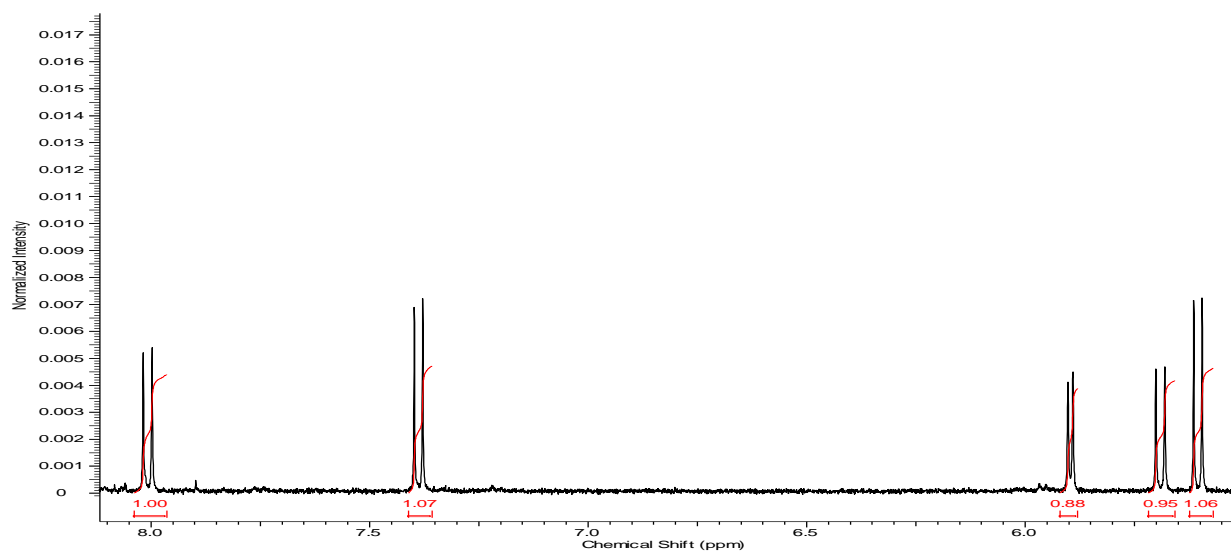


FIGURA 2.39 - Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 07 (MeOD, 400 MHz).

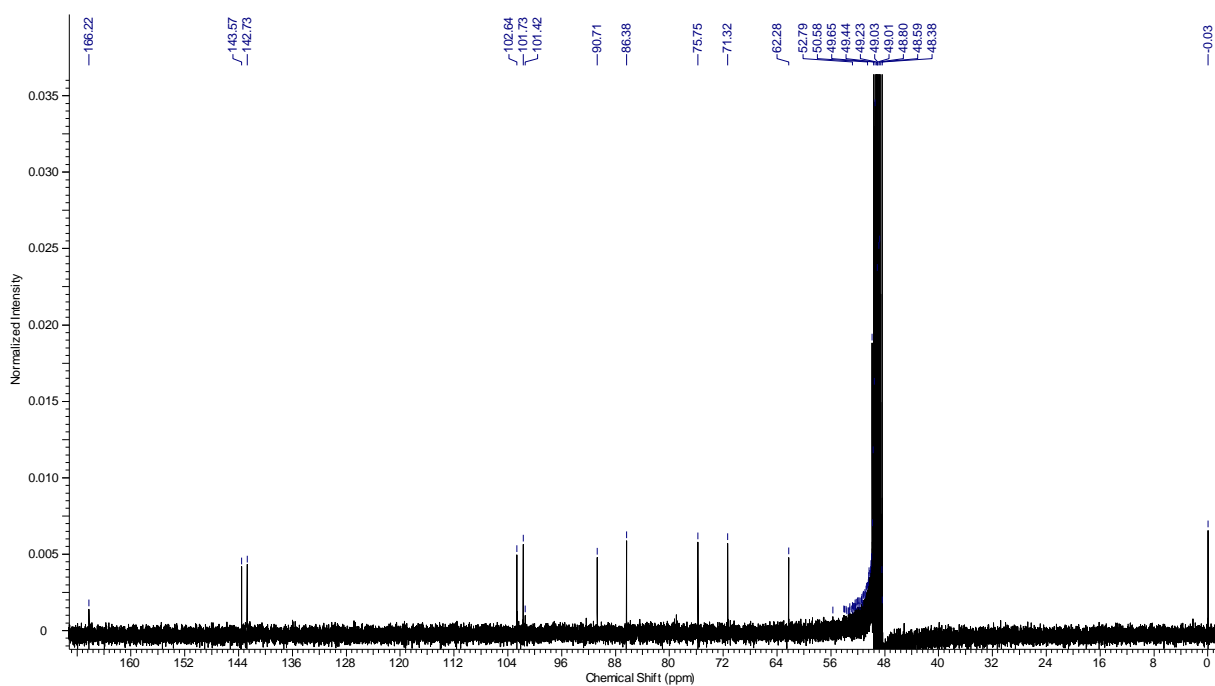
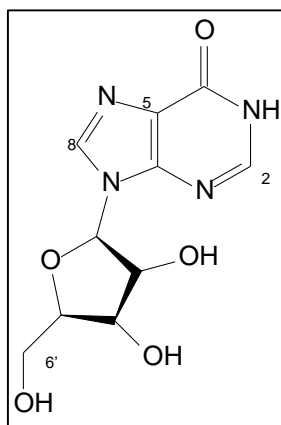


FIGURA 2.40 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 07 (MeOD, 100 MHz).

2.4.2.8 - Substância 08 - Inosina



A substância 08 foi isolada da partição AcOEt do Ext. MeOH do micélio. Com os dados apresentados pelo espectro de RMN ^1H (FIGURA 2.41), pôde-se observar sinais em δ 8,34 e 8,13 referentes aos hidrogênios olefínicos H-8 e H-2 respectivamente. Foi observado também um dubleto, integrando para um hidrogênio, em δ 5,87 ($J = 6,5$ Hz) referente ao hidrogênio H-2'. Ainda analisando o espectro de RMN de ^1H , observou-se um duplo dubleto em δ 3,96 ($J = 3,0$ e 6,5 Hz) referente ao hidrogênio H-5' (FIGURA 2.41).

No espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 2.42) observou-se um sinal de carbono característico de lactama com um deslocamento químico de δ 156,1; o qual foi atribuído ao carbono C-4. Foram observados também sinais de carbonos olefínicos referentes ao C-2 e C-8 em δ 149,0 e 139,9; respectivamente. Foram atribuídos aos carbonos C-5 e C-6 sinais de carbonos olefínicos totalmente substituídos com os respectivos deslocamentos de δ 119,3 e 152,3. Outros cinco sinais de carbonos carbinólicos, sendo quatro metínicos (δ 87,9; 73,4; 70,6 e 87,9) e um metilênico com deslocamento de δ 61,6 foram observados, indicando, portanto a presença de uma unidade de ribose ligada à estrutura.

Com base nos dados apresentados de RMN ^1H e ^{13}C e a devida comparação com os dados da literatura (SILVA, 2007) pôde-se concluir que a substância 08 é o nucleosídeo inosina (TABELA 2.5).

TABELA 2.5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 400 e 100 MHz) da substância 08 em comparação com os dados da literatura (SILVA, 2007; DMSO- d_6).

C	δ_{H}	$\delta_{\text{H Lit}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{C Lit}}$
2	8,34 (s, 1H)	8,34 (s, 1H)	149,0	149,1
4	-		156,1	156,2
5			119,3	119,4
6			152,3	152,4
8	8,13 (s, 1H)	8,13 (s, 1H)	139,9	140,0
2'	5,87 (d, $J=6,5$ Hz, 1H)	5,86 (d, $J=6,4$ Hz, 1H)	87,9	87,9
3'	4,59 (t, $J=5,5$ Hz, 1H)	4,59 (t, $J=5,5$ Hz, 1H)	73,9	73,9
4'	4,12 (t, $J=4,5$ Hz, 1H)	4,12 (t, $J=4,4$ Hz, 1H)	70,7	70,7
5'	3,96 (dd, $J=3,0$; 6,5 Hz, 1H)	3,95 (dd, $J=3,2$; 6,4 Hz, 1H)	86,0	86,0
6'	3,65 (dd, $J=12,0$ e 4,0 Hz, 1H)	3,65 (dd, $J=12,1$ e 4,0 Hz, 1H)	61,6	61,7

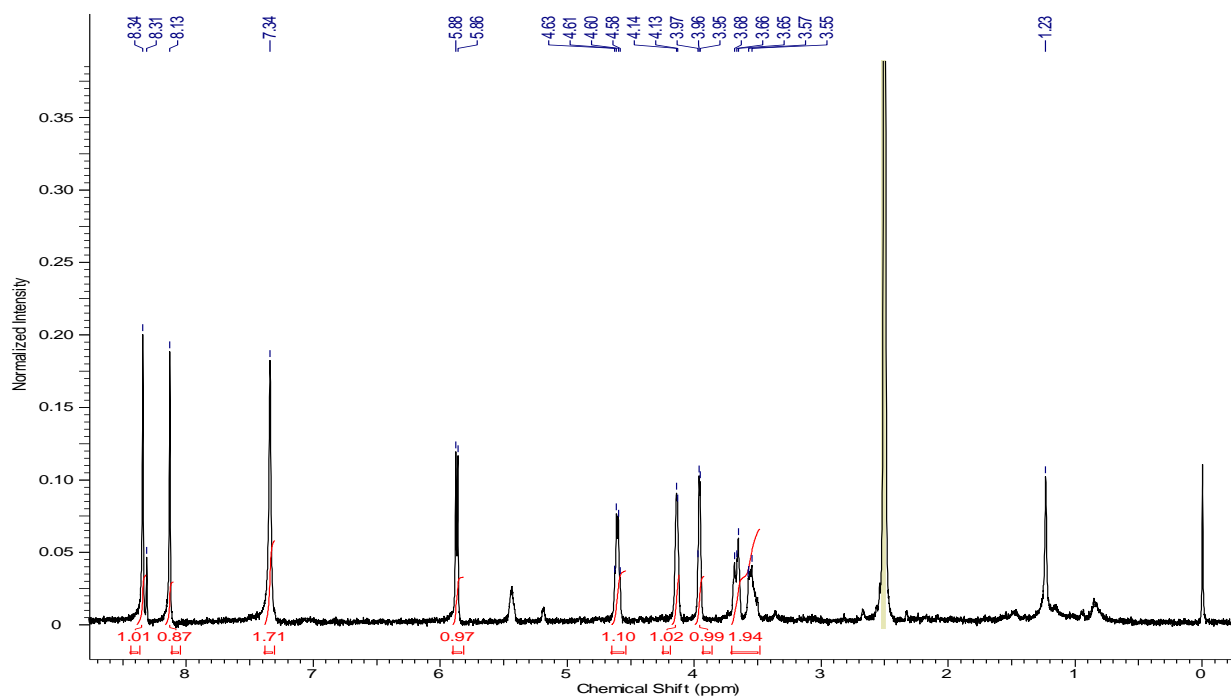


FIGURA 2.41 - Espectro de RMN ^1H da substância 08 (DMSO-d₆, 400 MHz).

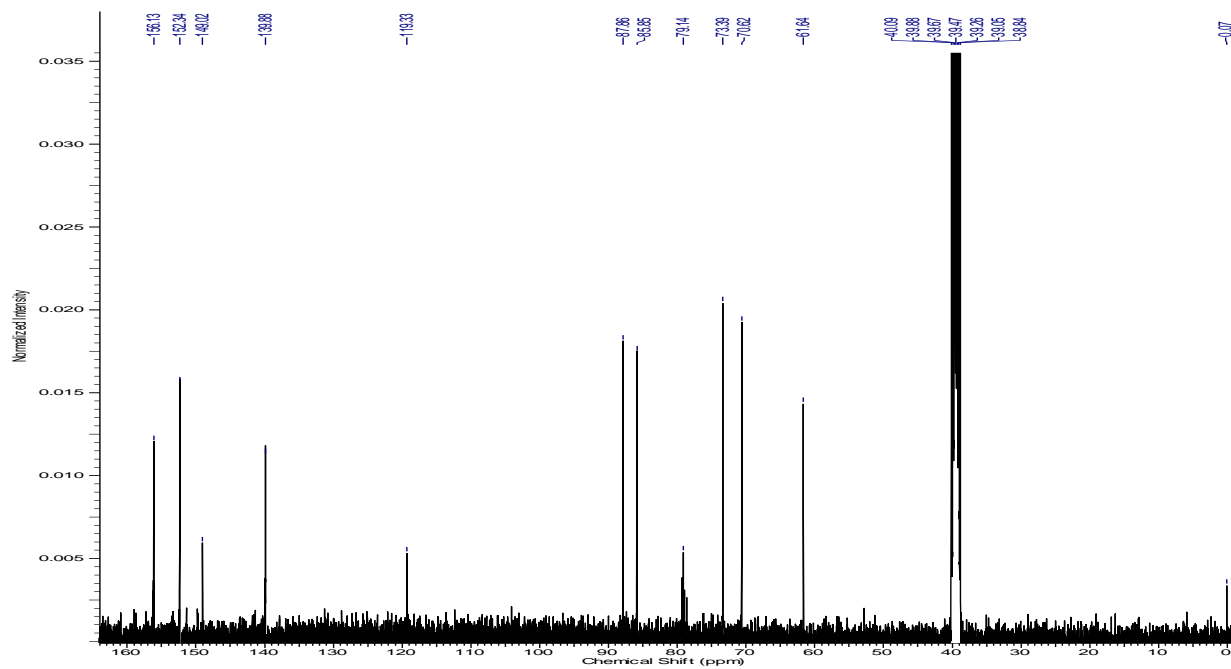
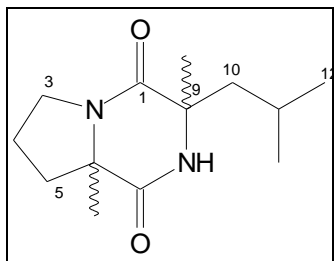


FIGURA 2.42 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 08 (DMSO-d₆, 100 MHz).

2.4.2.9 - Substância 09 - *Ciclo* (Pro-Leu)



A substância 9 foi isolada do Ext. AcOEt do meio líquido como um sólido branco. Pela análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 2.45) foi possível observar a presença de dois dubletos integrando para 3H em δ 0,97 (*d*, $J=6,5$ Hz, 3H) e 0,99 (*d*, $J=6,5$ Hz, 3H), indicando a presença de duas metilas. A presença de três sinais na forma de multipletos em δ 1,90-3,55; referentes aos hidrogênios metilênicos, indicam a presença de resíduo do aminoácido prolina na estrutura (FIGURA 2.46).

Também foi possível atribuir os sinais mais desblindados aos hidrogênios H-6 em δ 4,28 (1H, *t*, $J= 8,0$ Hz) e H-9 em 4,16 (*m*) os quais estão ligados aos carbonos vizinhos ao átomo de nitrogênio (TABELA 2.6).

No espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 2.47) observaram-se sinais de carbonos metilênicos em δ 46,4; 23,3; 29,1; 39,4. Os sinais em δ 22,2 e 23,3 referem-se aos carbonos das metilas da isopropila. Também observaram-se sinais em δ 168,9 e 172,8 referentes aos carbonos das carboxilas típicas de dicetopiperazinas.

O espectro de massas obtido por impacto eletrônico (IE) (70 eV) (FIGURA 2.48) mostrou o pico do íon molecular em m/z 210 e picos intensos em m/z 70 e 154, característicos de dicetopiperazinas formadas pelo aminoácido prolina. O pico em m/z 86 evidenciou a presença do resíduo leucina na molécula.

TABELA 2.6 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD, 400 e 100 MHz) da substância 09 em comparação com os dados da literatura (FURTADO et al., 2005; MEOD).

C	δ_{H}	$\delta_{\text{H Lit}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{C Lit}}$
1	-	-	168,9	168,5
3	3,51-3,55 (<i>m</i> , 2H)	3,47-3,51 (<i>m</i> , 2H)	46,4	46,0
4a	1,96-2,03 (<i>m</i> , 1H)	1,96-2,03 (<i>m</i> , 1H)	23,3	23,2
4b	1,90-1,94 (<i>m</i> , 1H)	1,81-1,94 (<i>m</i> , 1H)		
5a	2,31-2,33 (<i>m</i> , 1H)	2,24-2,34 (<i>m</i> , 1H)	29,1	28,8
5b	1,96-2,03 (<i>m</i> , 1H)	1,96-2,05 (<i>m</i> , 1H)		
6	4,28 (<i>ddd</i> , $J=11,0$; 6,0; 1,5 Hz)	4,75 (<i>ddd</i> , $J=11,1$; 6,3; 1,7 Hz)	60,3	60,1
7	-	-	172,8	172,6
9	4,09-4,16 (<i>m</i> , 1H)	4,09-4,13 (<i>m</i> , 1H)	60,0	54,0
10a	1,90-1,94 (<i>m</i> , 1H)	1,81-1,94 (<i>m</i> , 1H)	39,4	38,2
10b	1,52-1,56 (<i>m</i> , 1H)	1,47-1,56 (<i>m</i> , 1H)		
11	1,90-1,94 (<i>m</i> , 1H)	1,81-1,94 (<i>m</i> , 1H)	25,4	25,0
12	0,97 (<i>d</i> , $J=6,5$ Hz, 3H)	0,94 (<i>d</i> , $J=6,5$ Hz, 3H)	22,2	21,4
13	0,99 (<i>d</i> , $J=6,5$ Hz, 3H)	0,95 (<i>d</i> , $J=6,5$ Hz, 3H)	23,3	22,8

Com base nos dados apresentados de RMN ^1H e ^{13}C e EM, e comparação com a literatura (FURTADO et al., 2005) concluiu-se que a substância 9 tratava-se da dicetopiperazina *Ciclo* (Prolina-Leucina). As DKPS são comumente encontradas em espécies do gênero *Colletotrichum* (GARCIA-PAJON e COLLADO, 2003). Elas são formadas a partir da ciclização de aminoácidos.

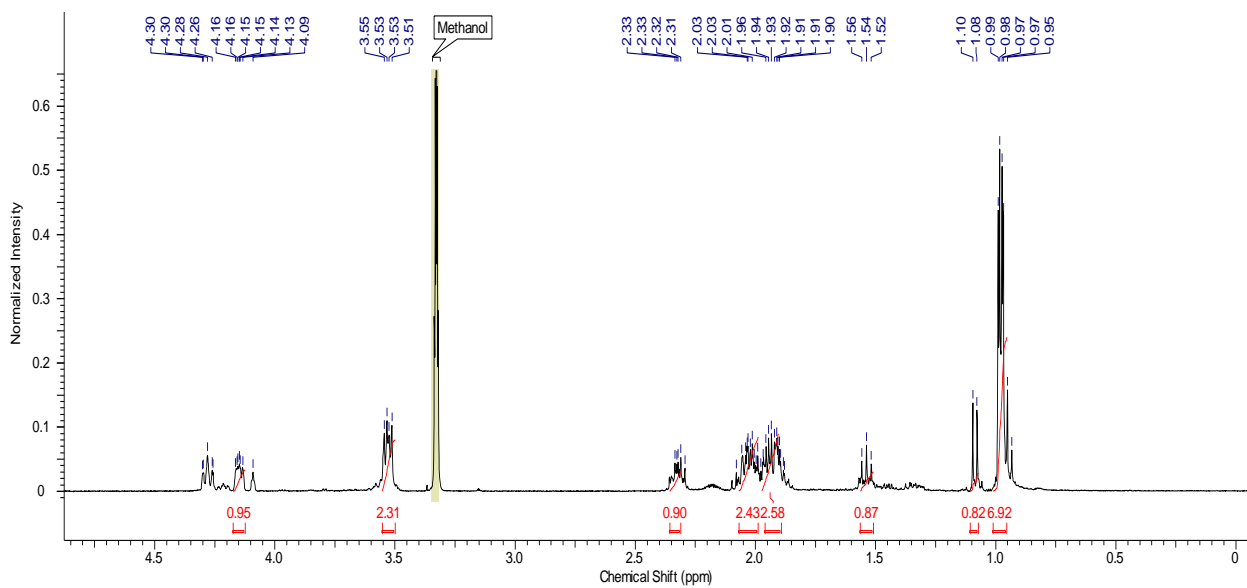


FIGURA 2.43 - Espectro de RMN ^1H da substância 09 (MeOD, 400 MHz).

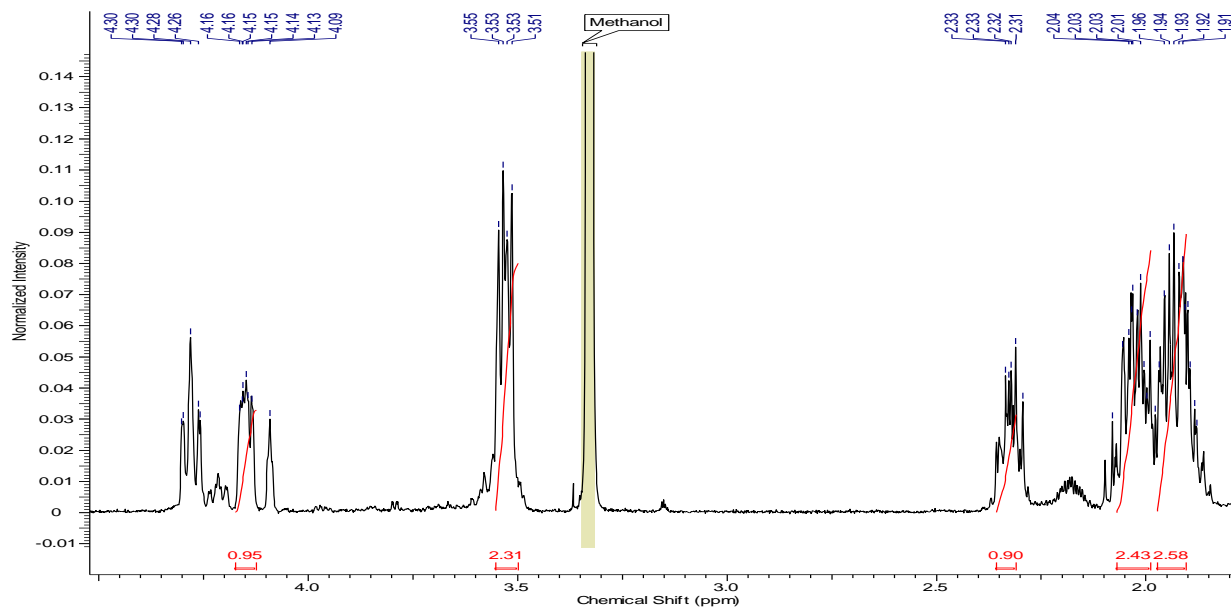


FIGURA 2.44 - Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 09 (MeOD, 400 MHz).

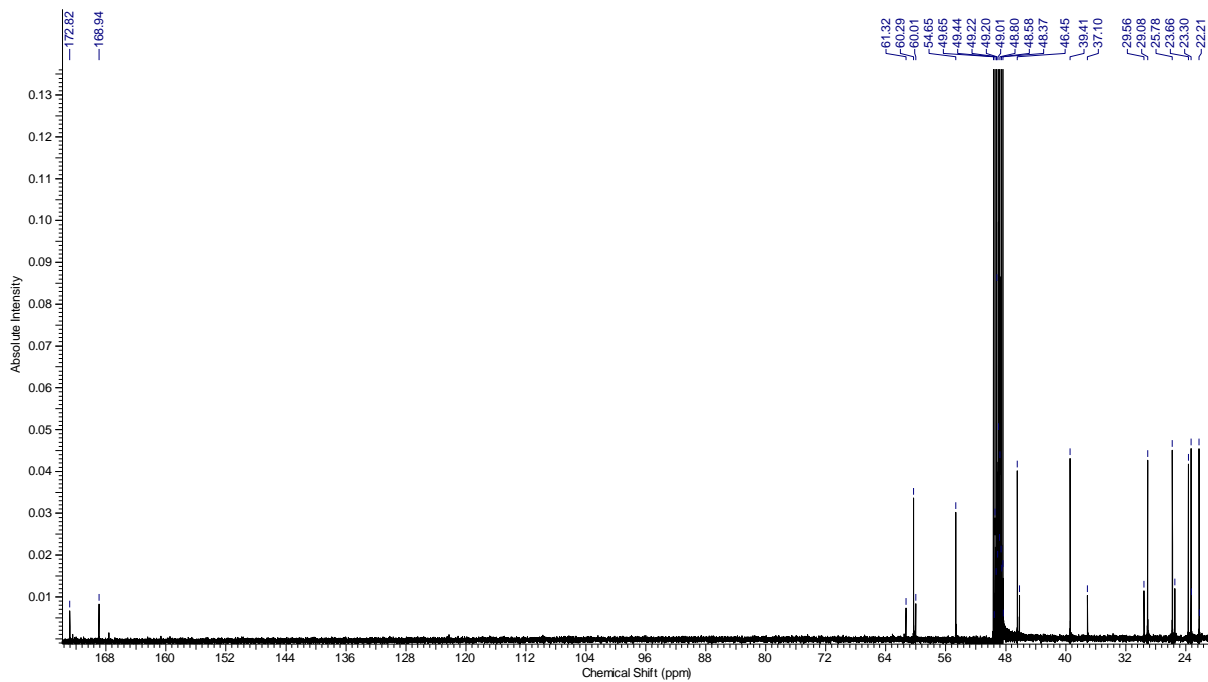


FIGURA 2.45 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 09 (MeOD, 100 MHz).

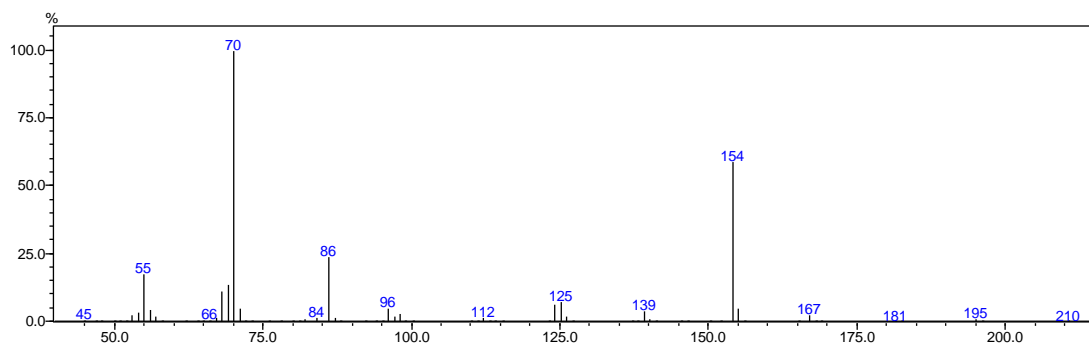
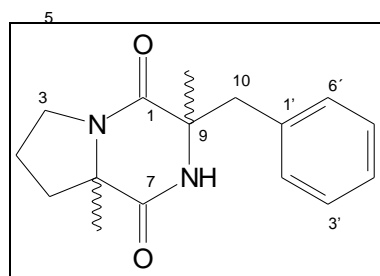


FIGURA 2.46 - Espectro de massas da substância 09.

2.4.2.10 - Substância 10 - *Ciclo* (Pro-Phe)



A substância 10 foi isolada do Ext. AcOEt do meio de cultura líquido como um sólido branco e submetida à análise por RMN de ^1H e ^{13}C , e espectrometria de massas. O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 2.49) apresentou na região de alifáticos, três multipletos em δ 3,35; 1,77 e 1,16 integrando para dois hidrogênios cada. Na região de aromáticos, foram visualizados sinais em δ 7,22 (*m*), além de dois duplos dubletos em δ 3,13 (*dd*, $J=14,0$; 5,0 Hz, 1H) e 3,17 (*dd*, $J=14,0$; 5,0 Hz, 1H), evidenciando um sistema benzílico com o anel aromático monossustituído. Foram observados ainda, dois sinais em δ 4,07 (*ddd*, $J=10,8$; 6,3; 1,7 Hz, 1H) e 4,45 (*ddd*, $J=5,0$; 4,8; 1,0 Hz, 1H) referente aos hidrogênios dos carbonos ligados ao átomo de nitrogênio (FIGURA 2.50).

Nos espectros de RMN ^{13}C (FIGURA 2.51) e HSQC (FIGURA 2.52) foram observados quatro carbonos metilênicos, sendo que um deles está em δ 46,0 e ligado ao átomo de nitrogênio. Além desses sinais pôde-se observar um sinal de carbono de carboxila em δ 167,8. Sinais em δ 137,3; 131,1; 129,5; 128,1; 129,5 e 131,1 evidenciaram a presença de carbonos aromáticos.

No espectro de HSQC observou-se a correlação dos hidrogênios em δ 1,77 (*m*) com o carbono em δ 22,8. Também foi observada a correlação dos hidrogênios na região de aromáticos em δ 7,22 - 7,29 (*m*) com carbonos na região de δ 128,1 - 137,3. Ainda no espectro de HSQC foram observadas correlações dos hidrogênios em δ 4,07 e 4,45 com os carbonos em δ 60,1 e 57,7; respectivamente, evidenciando que estes carbonos estavam ligados ao átomo de nitrogênio.

O EM obtido por IE (70 eV) (FIGURA 2.53) mostrou o pico do íon molecular em *m/z* 244, além de sinais característicos de fragmentos benzílicos em *m/z* 91 e de resíduos de prolina em *m/z* 70.

Desta forma, os dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C e EM foram comparados com a literatura (FURTADO et al., 2005) permitindo a identificação da substância 10 como *Ciclo* (Pro-Phe) (TABELA 2.7).

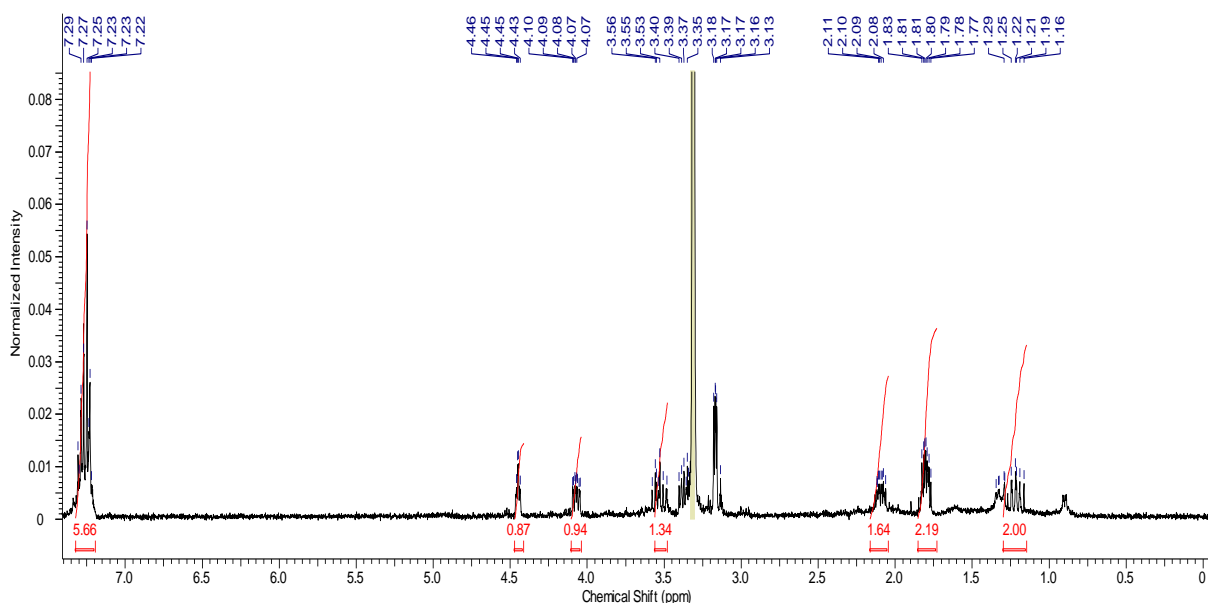


FIGURA 2.47 - Espectro de RMN ^1H da substância 10 (MeOD, 400 MHz).

TABELA 2.7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD, 400 e 100 MHz) da substância 10 em comparação com os dados da literatura (FURTADO et al., 2005; MeOD).

C	δ_{H}	$\delta_{\text{H Lit}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{C Lit}}$
1	-	-	167,8	167,3
2	-	-	-	-
3a	3,53-3,56 (<i>m</i> , 1H)	3,48-3,56 (<i>m</i> , 1H)	46,0	45,9
3b	3,35-3,39 (<i>m</i> , 1H)	3,33-3,39 (<i>m</i> , 1H)		
4	1,77-1,83 (<i>m</i> , 2H)	1,75-1,83 (<i>m</i> , 2H)	22,8	23,1
5a	2,08-2,11 (<i>m</i> , 1H)	2,04-2,12 (<i>m</i> , 1H)	29,4	29,7
5b	1,16-1,29 (<i>m</i> , 1H)	1,15-1,24 (<i>m</i> , 1H)		
6	4,07 (<i>ddd</i> , $J=10,8$; 6,3; 1,7 Hz)	4,06 (<i>ddd</i> , $J=10,8$; 6,3; 1,7 Hz)	60,1	60,4
7	-	-	171,3	171,3
8	-	4,56 (<i>s</i> , 1H)	-	-
9	4,45 (<i>ddd</i> , $J=5,0$; 4,8; 1,0 Hz; 1H)	4,44 (<i>ddd</i> , $J=5,0$; 4,8; 1,0 Hz; 1H)	57,7	58,0
10a	3,17 (<i>dd</i> , $J=14,4$; 4,8, 1H)	3,18 (<i>dd</i> , $J=14,4$; 4,8, 1H)	38,2	38,6
10b	3,13 (<i>dd</i> , $J=14,4$; 5,0, 1H)	3,14 (<i>dd</i> , $J=14,4$; 5,0, 1H)		
1'	-	-	137,3	137,6
2'	7,22-7,29 (<i>m</i> , 1H)	7,20-7,29 (<i>m</i> , 1H)	131,1	131,4
3'	7,22-7,29 (<i>m</i> , 1H)	7,20-7,29 (<i>m</i> , 1H)	129,5	130,1
4'	7,22-7,29 (<i>m</i> , 1H)	7,20-7,29 (<i>m</i> , 1H)	128,1	128,5
5'	7,22-7,29 (<i>m</i> , 1H)	7,20-7,29 (<i>m</i> , 1H)	129,5	130,1
6'	7,22-7,29 (<i>m</i> , 1H)	7,20-7,29 (<i>m</i> , 1H)	131,1	131,4

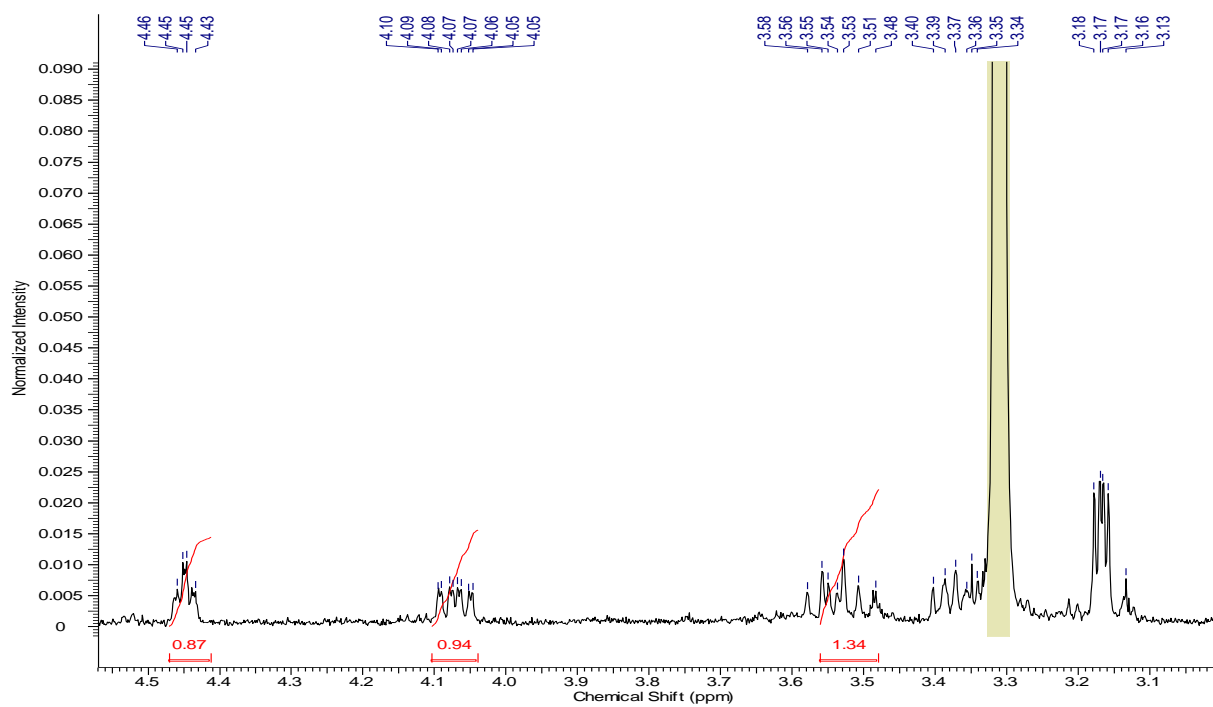


FIGURA 2.48 - Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 10 (MeOD, 400 MHz).

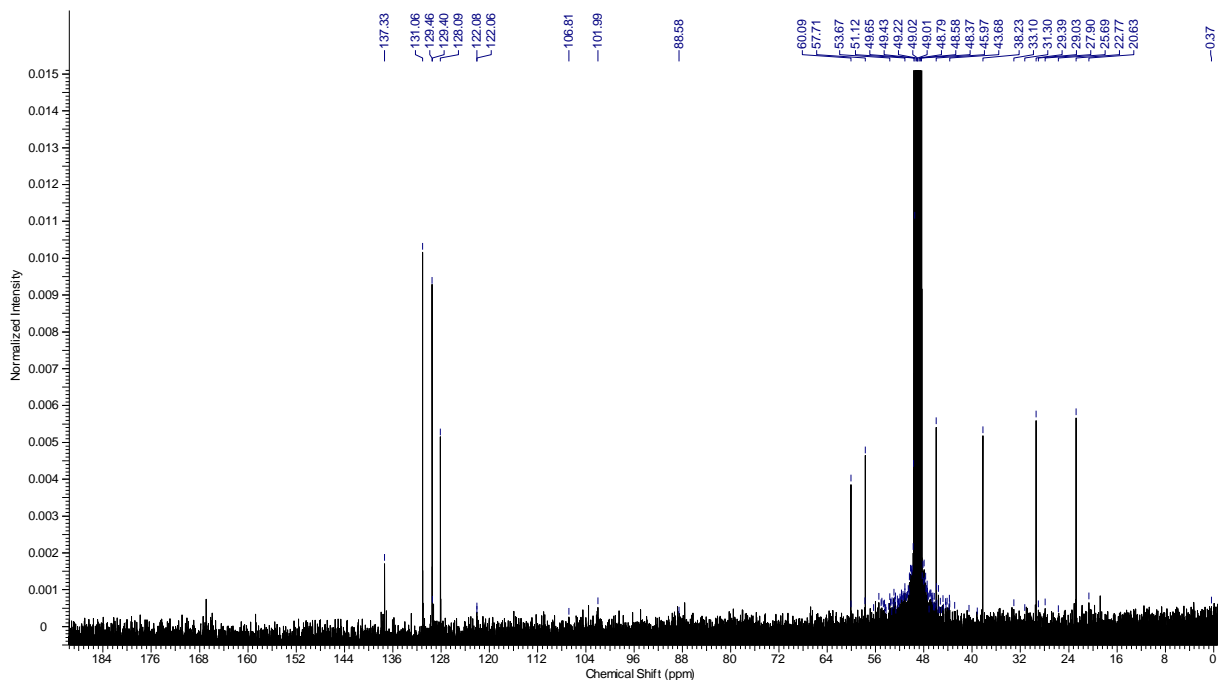


FIGURA 2.49 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 10 (MeOD, 100 MHz).

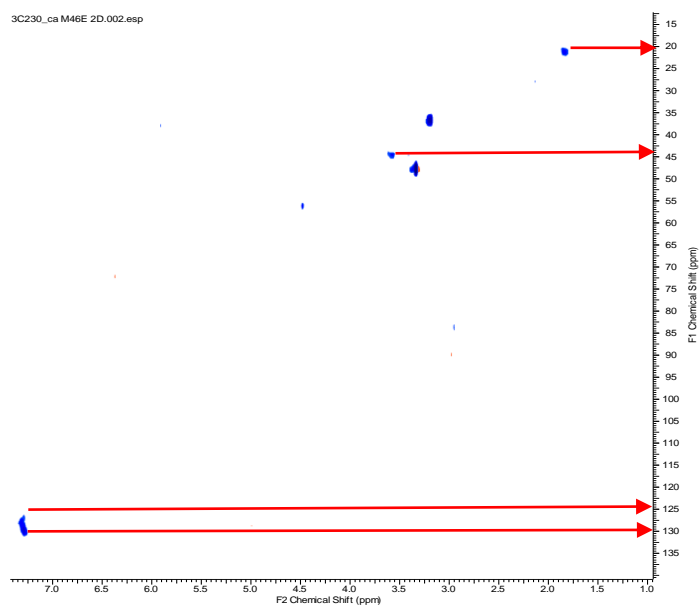


FIGURA 2.50 - Espectro de HSQC da substância 10 (MeOD, 400 MHz).

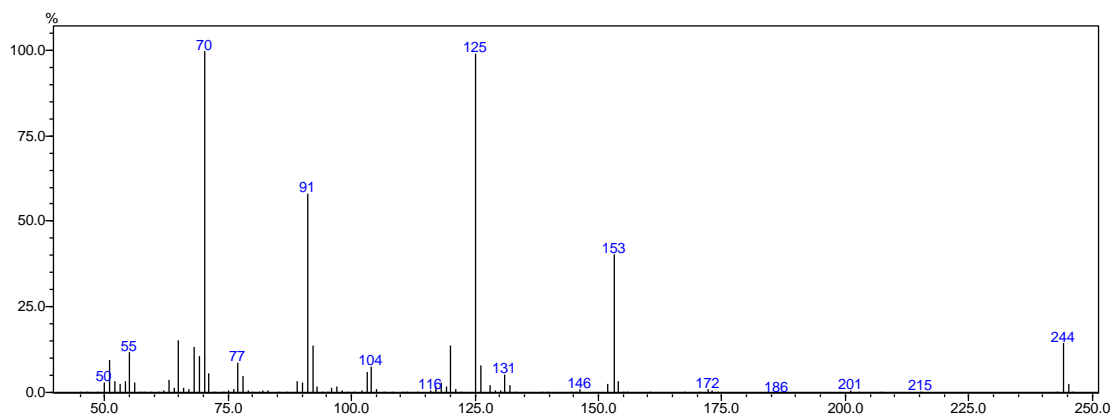
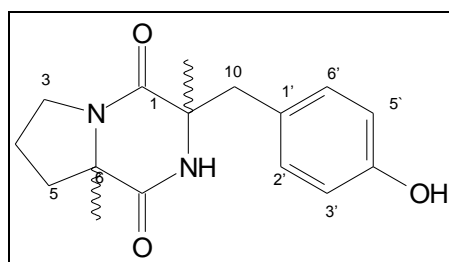


FIGURA 2.51 - Espectro de massas da substância 10.

2.4.2.11 - Substância 11 - *Ciclo* (Pro-Tyr)



A substância 11 foi isolada do Ext. AcOEt do meio de cultura líquido como um sólido branco. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 2.54) apresentou dois dubletos em δ 7,05 (*d*, $J=8,5$ Hz) e 6,71 (*d*, $J=8,5$ Hz) indicando um sistema típico de anel aromático *para*-dissubstituído. A presença do deslocamento químico em δ 155,4 indicou a presença de um grupo $-\text{OH}$ ligado ao anel aromático evidenciando a presença de resíduo do aminoácido tirosina (Tyr) (FIGURA 2.55).

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 2.57) e HSQC (FIGURA 2.57) apresentou sinais em δ 164,9 e 170,1; indicando grupos CONH, o que aliado aos deslocamentos químicos de RMN ^1H em δ 4,05 (*ddd*, $J=10,9$; 6,2; 1,8 Hz, 1H) e 4,34 (*t*, $J=5,0$ Hz, 1H) conduziram a presença de um anel dicetopiperazínico (JAYATILAKE et al., 1996). Com base nos espectros de COSY (FIGURA 2.57) foi possível observar correlações entre os hidrogênios benzílicos H-10 e H-9 (δ 3,03 e 4,05 ppm), corroborando para a presença da unidade tirosina. O espectro de massas mostrou o pico do íon molecular em m/z 260, além de sinais de fragmentações de anel benzílico em m/z 91 (FIGURA 2.56)

Os dados dos experimentos de RMN ^1H , ^{13}C e COSY evidenciaram a presença de resíduo do aminoácido prolina (Pro) nesta molécula. Com bases nos dados apresentados de RMN ^1H e ^{13}C e EM e devida comparação com a literatura (FURTADO et al., 2005), conclui-se que a substância 11 é a dicetopiperazina *Ciclo* (Pro-Tyr) (TABELA 2.9). A produção de DKPS é comum em espécies do gênero *Colletotrichum*, como em *C. gloesporioides* (GARCIA-PAJON e COLLADO, 2003). Existem relatos na literatura de diversas atividades biológicas para esta classe de substâncias, onde as propriedades antifúngicas e citotóxicas levam um certo destaque (GUIMARÃES, 2006).

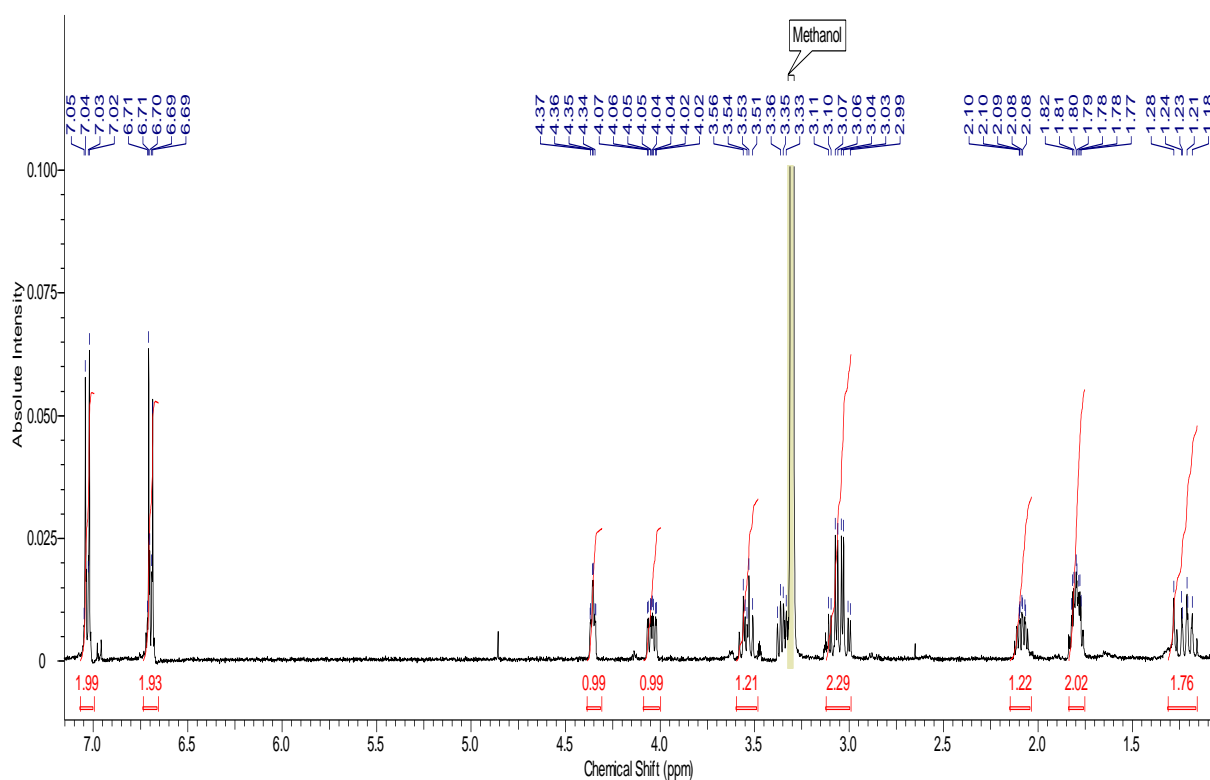


FIGURA 2.52 - Espectro de RMN ^1H da substância 11 (MeOD, 400 MHz).

TABELA 2.8 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD, 400 e 100 MHz) da substância 11 em comparação com os dados da literatura (FURTADO et al., 2005; MeOD).

C	δ_{H}	$\delta_{\text{H Lit}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{C Lit}}$
1	-	-	-	185,0
2	-	-	-	-
3	3,51-3,56 (<i>m</i>)	3,50-3,75 (<i>m</i>)	46,1	44,5
4	1,80 (<i>m</i>)	1,81 (<i>m</i>)	22,7	21,8
5	2,08 (<i>m</i>)	2,16 (<i>m</i>)	29,3	27,8
6	4,34 (<i>dt</i> , 5,0; 2,1 Hz)	4,09 (<i>dt</i> , 1,0 e 8,5 Hz)	57,8	58,3
7	-	-	175,5	168,8
8	-	5,62 (<i>sl</i>)	-	-
9	4,05 (<i>ddd</i> , 10,9; 6,2 e 1,8 Hz)	4,22 (<i>m</i> , 10,6; 3,7 e 1,0 Hz)	60,1	56,0
10	3,06 (<i>dd</i> , 5,5 e 14,3 Hz, 1H) 3,03 (<i>dd</i> , 4,4 e 14,3 Hz, 1H)	2,75 (<i>dd</i> , 10,6 e 14,8 Hz); 3,60 (<i>dd</i> , 14,6 e 3,7 Hz)	37,7	34,7
1'	-	-	120,0	127,0
2' e 6'	7,05 (<i>d</i> , 8,5 Hz)	7,10 (<i>d</i> , 8,5 Hz)	132,1	130,7
3' e 5'	6,71 (<i>d</i> , 8,5 Hz)	6,82 (<i>d</i> , 8,5 Hz)	116,2	114,7
4'-	-	5,15 (<i>sl</i>)	155,4	155,8

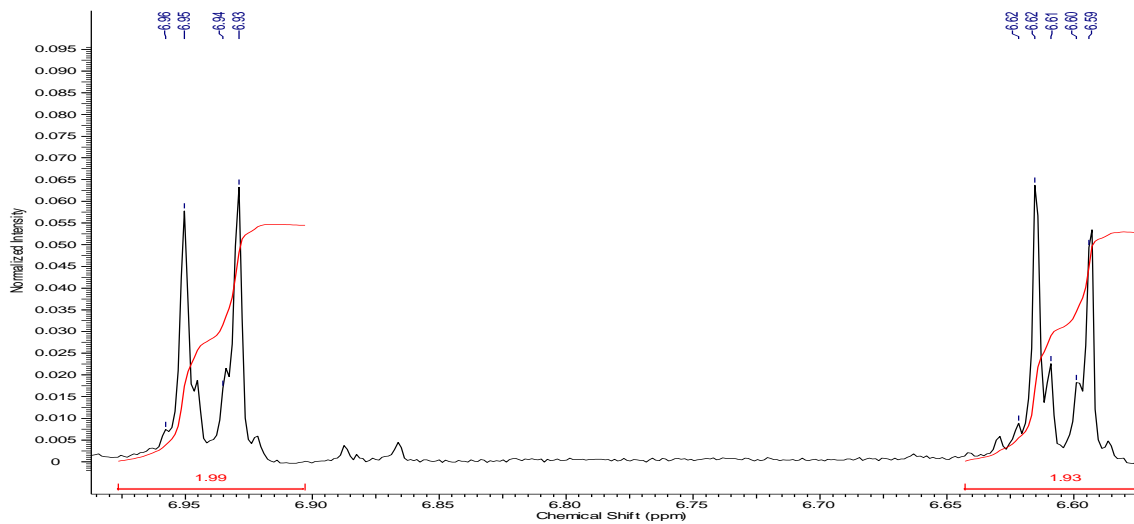


FIGURA 2.53 - Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 11.

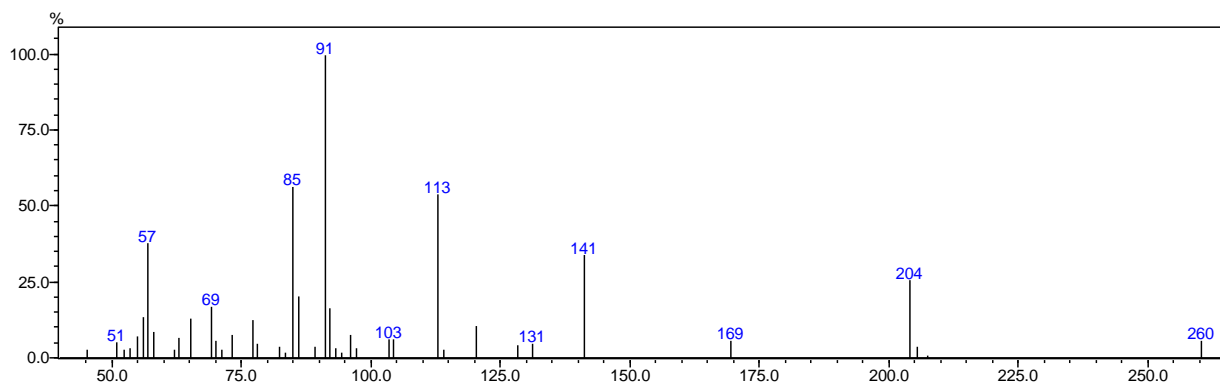


FIGURA 2.54 - Espectro de massas da substância 11.

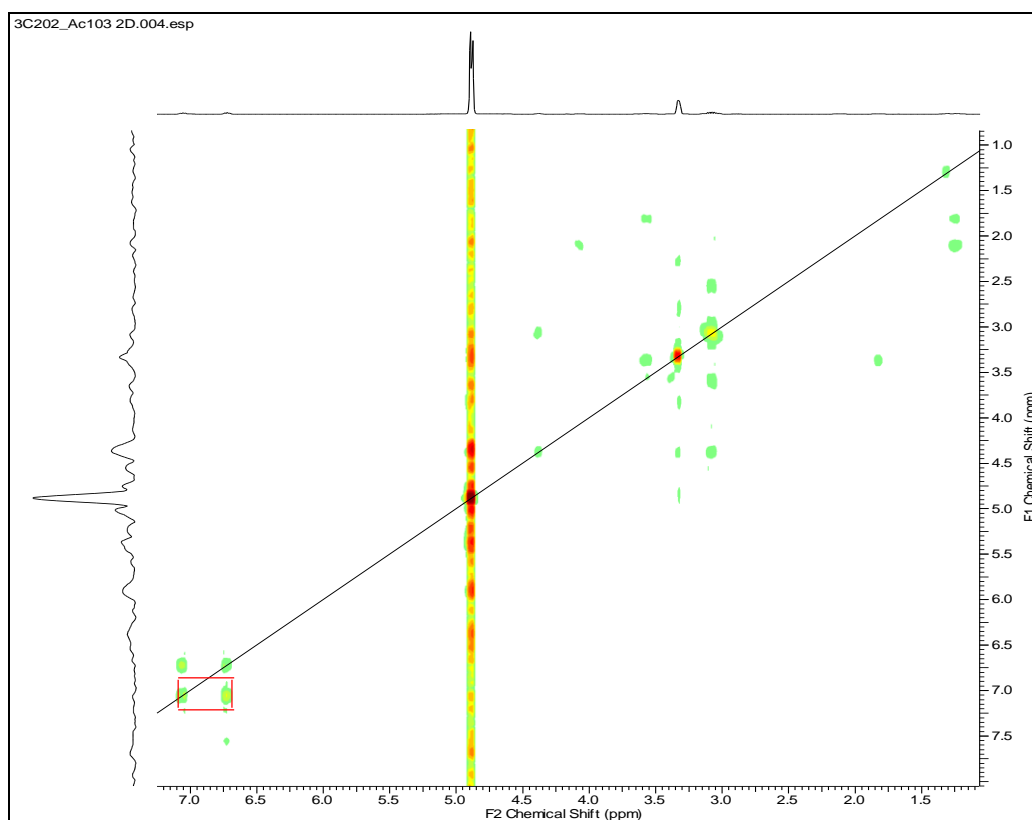
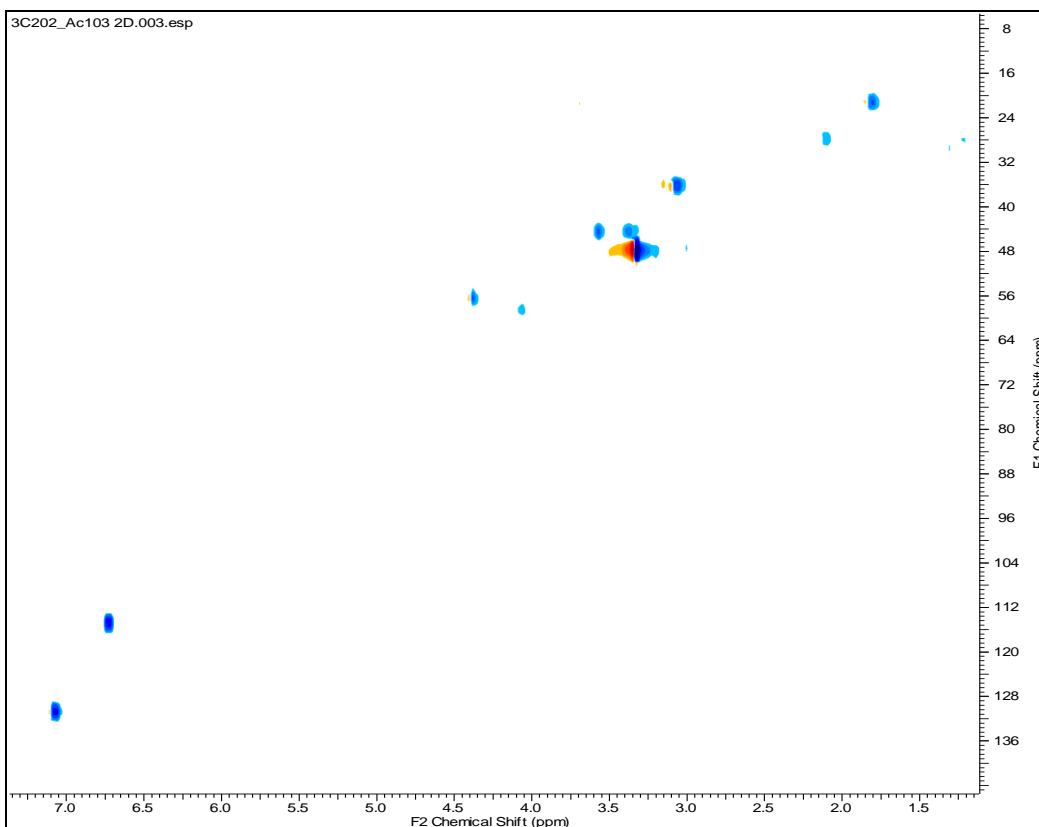


FIGURA 2.55 - Espectros de RMN (a) HSQC e (b) COSY da substância 11.

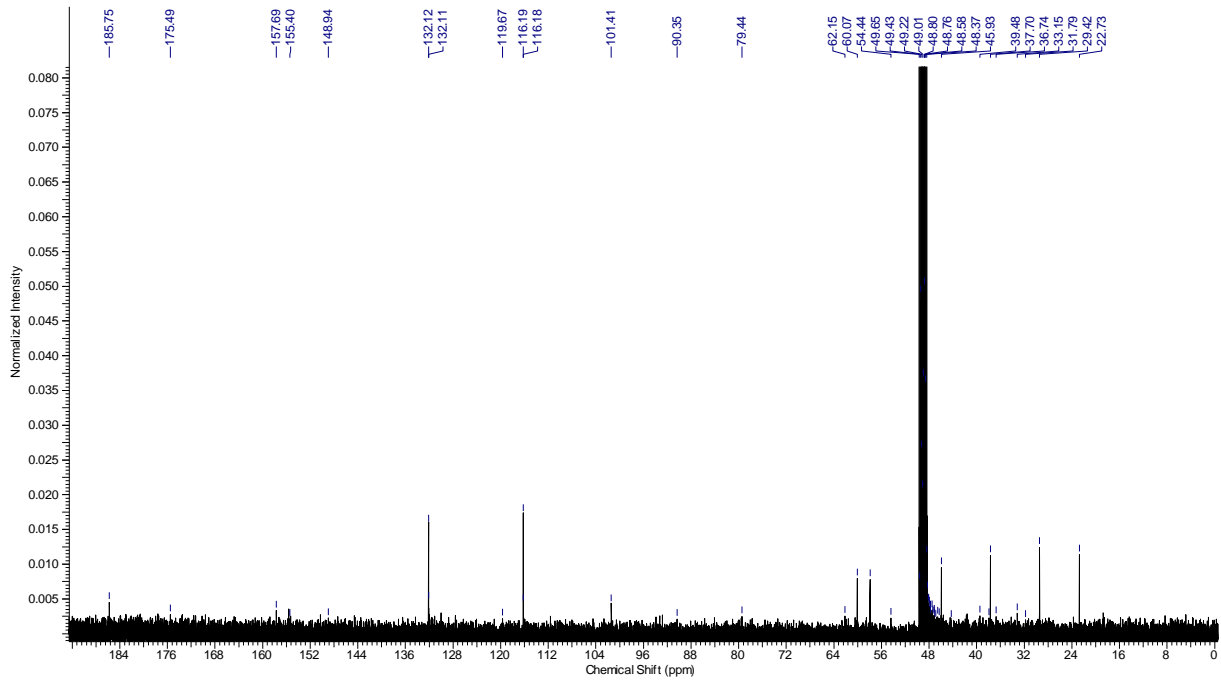
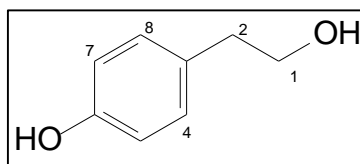


FIGURA 2.56 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 11 (MeOD, 100 MHz).

2.4.2.12 - Substância 12 - Tirosol



A substância 12 foi isolada do extrato AcOEt do meio líquido como um sólido branco. Pela análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 2.60) foi possível observar a presença de dois tripletos em δ 3,69 (*t*, $J=6,5$ Hz, 2H) e 2,73 (*t*, $J=6,5$ Hz, 2H), integrando para dois hidrogênios cada, e a presença de dois dubletos em δ 7,03 (*d*, $J=8,5$ Hz, 2H) e 6,70 (*d*, $J=8,5$ Hz, 2H) integrando para dois hidrogênios cada (FIGURA 2.61). O EM (FIGURA 2.62) mostrou o pico do íon molecular em m/z 130 e um pico intenso em m/z 107.

Os dados de RMN ^1H e EM foram comparados a literatura (MANCILLA et al., 2009) evidenciando a estrutura do tirosol (TABELA 2.10). O tirosol pode ser produzido a partir da tirosina (**99**), onde a rota biossintética mostra que há uma reação de desaminação oxidativa inicial pela enzima aminotransferase, seguido por uma descarboxilação e redução do aldeído. A reação de desaminação oxidativa resulta no produto *p*-hidroxifenilpiruvato (**100**) e a descarboxilação produzida pela enzima descarboxilase resulta na produção do *p*-hidroxifenilacetaldeído (**101**). A redução do aldeído pela enzima álcool desidrogenase produz o tirosol (**102**) (FIGURA 2.59) (GUZMAN-LOPES et al., 2007).

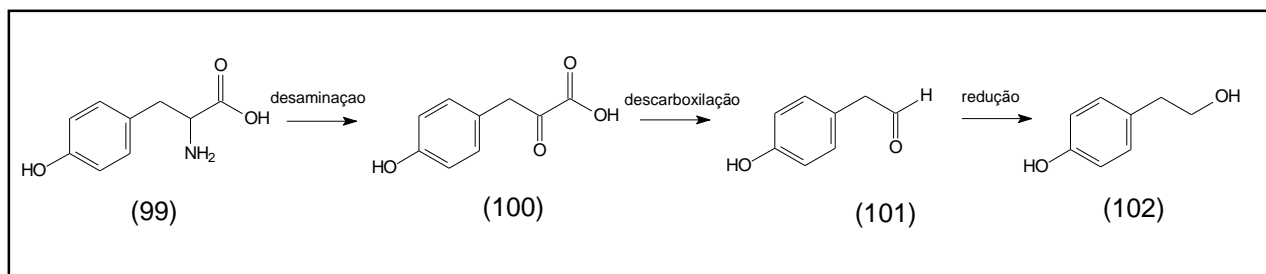


FIGURA 2.57 - Formação do tirosol a partir da tirosina.

O tirosol já foi relatado como metabolito secundário produzido por alguns fungos endofíticos e por espécies de *Colletotrichum* (CAFEU, 2007). Existem relatos na literatura do tirosol como sendo uma molécula “quorum-sensing” (sinalizadora) com importantes implicações na dinâmica do crescimento e morfologia de *Candida albicans*, além de ser um agente antifúngico em potencial (GUIMARÃES, 2006). Além disso, alguns trabalhos demonstram o potencial fitotóxico desse metabolito em folhas de alface (GUZMAN-LOPES et al., 2007).

TABELA 2.9 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD, 400 e 100 MHz) da substância 12 em comparação com os dados da literatura (MANCILLA et al., 2009; CDCl_3).

C	δ_{H}	δ_{H} Lit
1	3,69 (t, $J=6,5$ Hz, 2H)	3,83 (t, $J=6,6$ Hz, 2H)
2	2,73 (t, $J=6,5$ Hz, 2H)	2,91 (t, $J=6,6$ Hz, 2H)
4 e 8	7,03 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)	6,94 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)
5 e 7	6,70 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)	6,58 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)

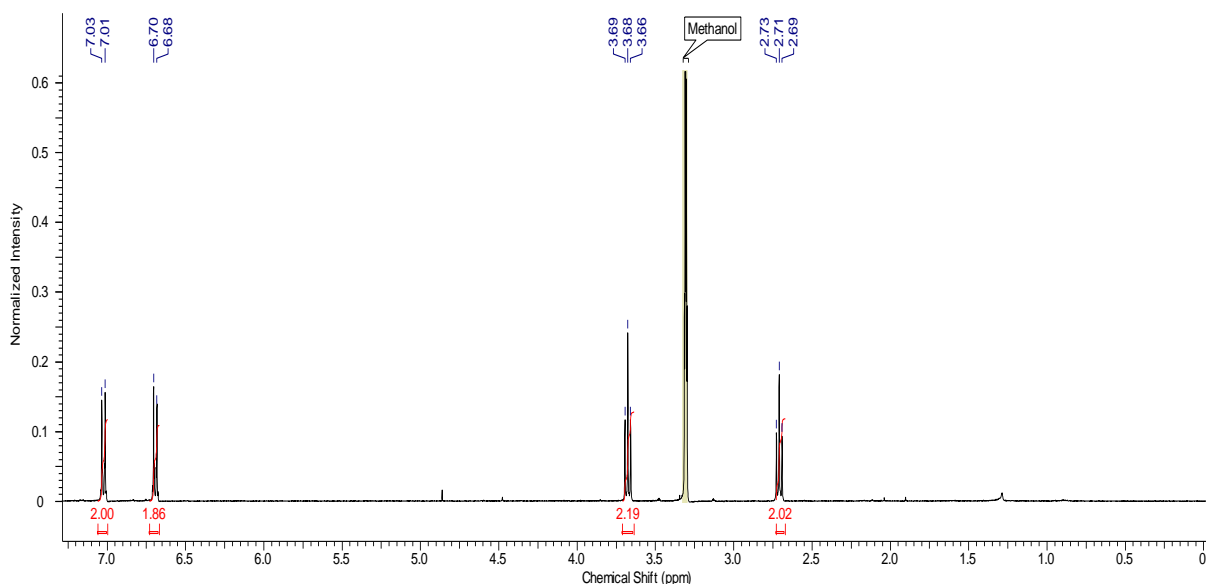


FIGURA 2.58 - Espectro de RMN ^1H da substância 12 (MeOD, 400 MHz).

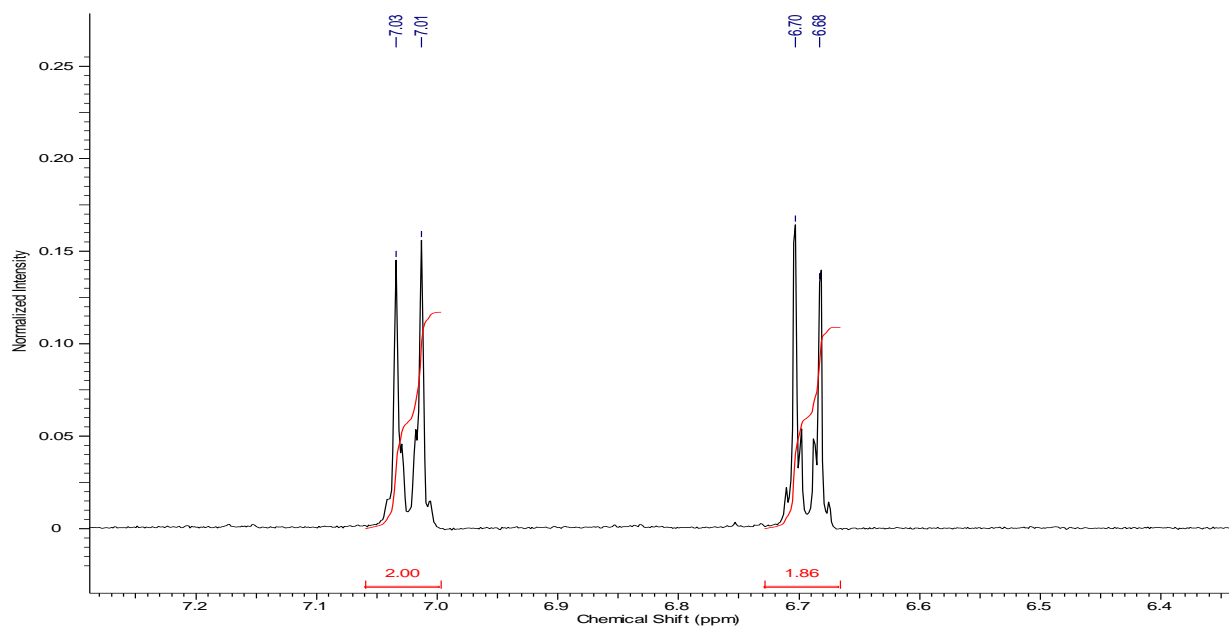


FIGURA 2.59 - Ampliação de espectro de RMN ^1H da substância 12 (MeOD, 400 MHz).

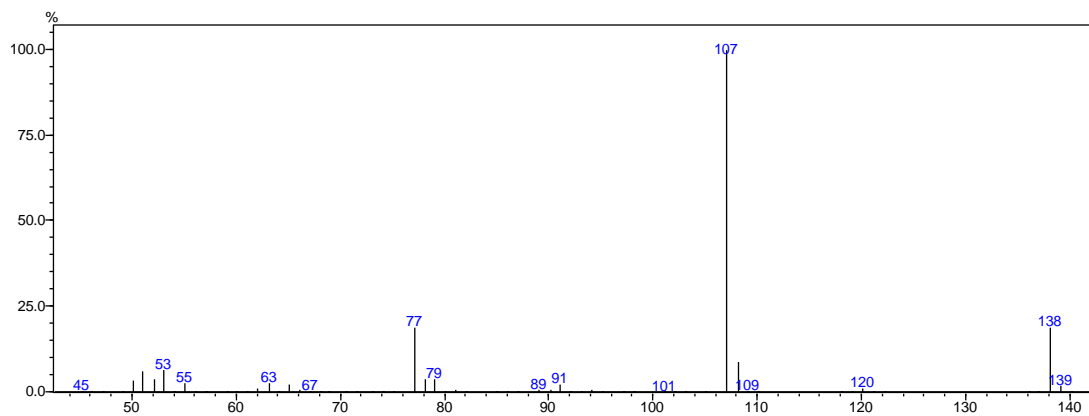
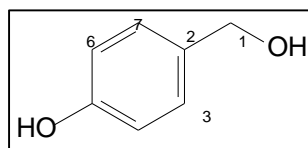


FIGURA 2.60 - Espectro de massas da substância 12.

2.4.2.13 - Substância 13 - Álcool 4-hidroxibenzílico



A substância 13 foi isolada do Ext. AcOEt do meio líquido como um sólido branco. No espectro de RMN ^1H (FIGURA 2.64) observou-se a presença de 2 dubletos integrando para 2 hidrogênios cada em δ 6,76 e 7,18; onde as constantes de acoplamento indicaram a substituição *para* no anel aromático. A presença de um sinal em δ 4,60 integrando para 2 hidrogênios indicaram a presença da unidade $\text{CH}_2\text{-OH}$ na molécula.

O EM, obtido por impacto eletrônico (70 eV) (FIGURA 2.63) mostrou o pico do íon molecular em m/z 124 e um pico intenso em m/z 77 referente a fragmentação de aromáticos. Com base nos dados de RMN ^1H e espectroscopia de massas, e devida comparação com aqueles obtidos na literatura (MANCILLA et al., 2009) foi possível identificar a substância 13 como sendo o álcool 4-hidroxibenzílico (TABELA 2.10).

TABELA 2.10 - Dados de RMN de ^1H (MeOD, 400 MHz) da substância 13 em comparação com os dados da literatura (MANCILLA et al.; 2009; CDCl_3).

C	δ_{H}	$\delta_{\text{H Lit}}$
1	4,60 (s, 2H)	3,89 (s, 2H)
3 e 7	7,18 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)	7,16 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)
4 e 6	6,76 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)	6,77 (d, $J=8,5$ Hz, 2H)

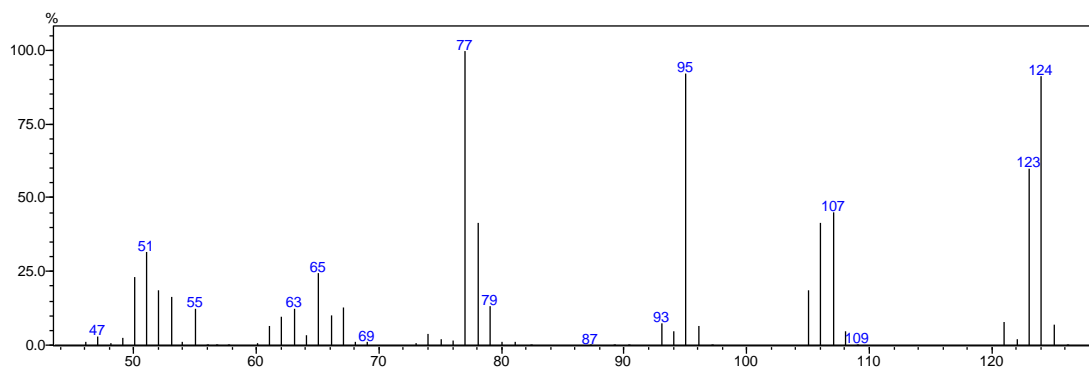


FIGURA 2.61 - Espectro de massas da substância 13.

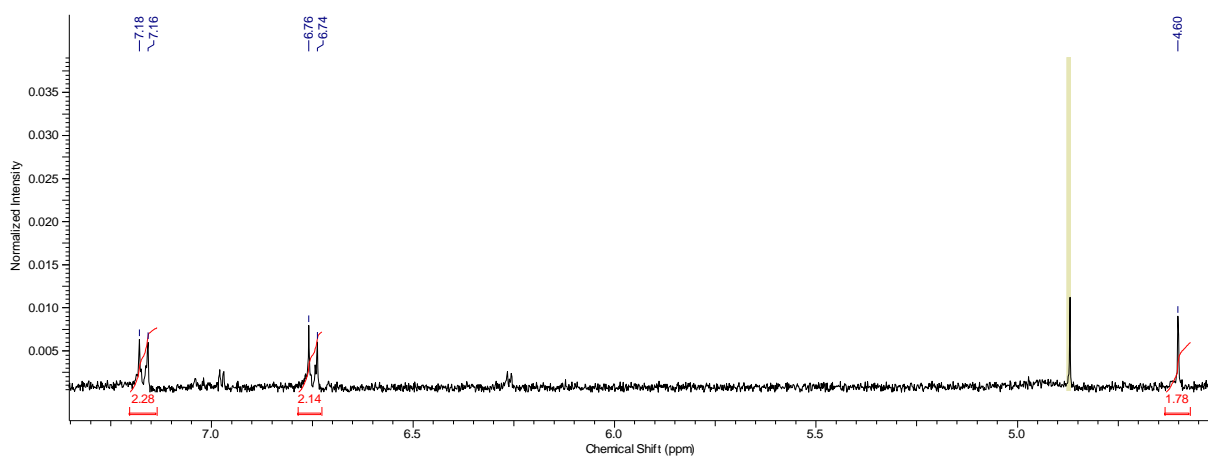


FIGURA 2.62 - Espectro de RMN ^1H da substância 13 (MeOD, 400 MHz).

2.4.3 - Identificação dos componentes químicos do óleo essencial de *C. acutatum*

O estudo da composição química do óleo essencial de *C. acutatum* proporcionou a identificação de 15 metabolitos voláteis, feitas as devidas subtrações com o controle (meio BDLev sem o fungo) (FIGURA 2.65 e 2.66, TABELA 2.11).

Os compostos do óleo essencial de *C. acutatum* são, em sua maioria, ésteres metílicos e etílicos que são comumente encontrados em microrganismos como é o caso do hexadecanoato de metila, derivado do ácido palmítico.

Além disso, com a análise dos componentes do óleo essencial de *C. acutatum* observou-se a presença do álcool feniletílico, onde em seu espectro de massas foi observado o pico do íon molecular em m/z 122, além de um pico intenso em m/z 91 característico de fragmentação de anel benzílico (FIGURA 2.67).

TABELA 2.11 - Constituintes químicos voláteis de *C. acutatum* em BDLev.

Pico	TR (min)	Composto	%	IR exp.*	IR lit.**
1	8,442	3-metiltio propanol	0,3±0,1	976	969
2	12,250	Álcool feniletílico	27,89±1,4	1116	1107
3	19,217	Undecanoato de metila	2,34±0,9	1435	1424
4	29,850	(9Z,12Z)-octadecadienato de metila	1,66±0,4	2091	2095
5	29,925	10-octadecenoato de metila	0,88±0,3	2097	#
6	30,258	Octadecanoato de metila	0,81±0,2	2110	2124
7	16,258	Ácido nonanóico	4,85±1,4	1277	1267
8	17,200	(2E,4E)-decadienal	1,56±0,5	1325	1315
9	18,255	Ácido decanóico	1,98±0,3	1377	1364
10	19,600	9-oxo-nonanoato de metila	0,39±0,2	1446	#
11	20,933	9-oxo-nonanoato de etila	1,78±0,9	1518	#
12	22,417	Nonanodioato de dimetila	2,33±0,5	1602	#
13	27,842	Hexadecanoato de metila	30,41±0,3	1921	1921
14	28,825	Hexadecanoato de etila	4,55±0,7	1980	1992
15	30,267	(9Z,12Z)-octadecadienato de metila	0,3±0,1	2107	2095

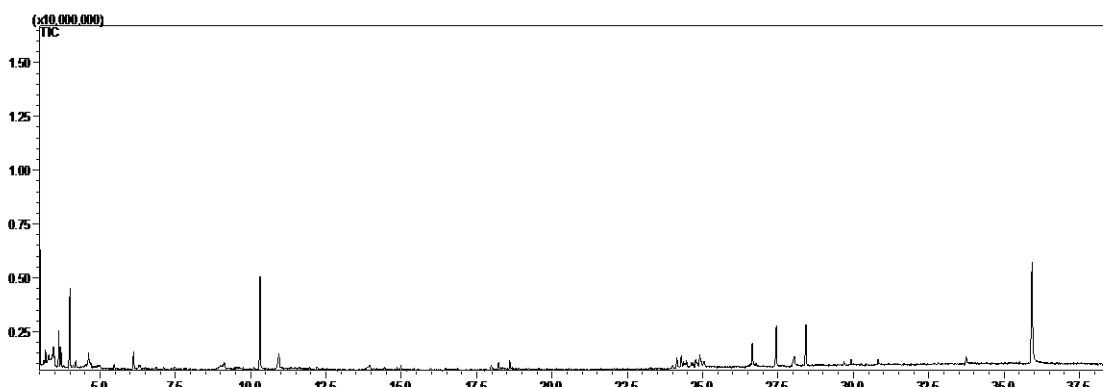


FIGURA 2.63 - Cromatograma de íons totais do meio de cultivo BDLev sem a presença do fungo *C. acutatum*.

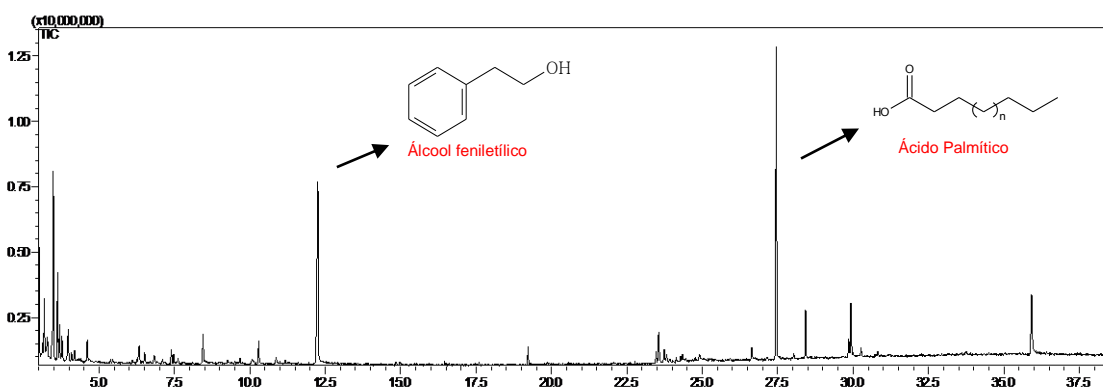


FIGURA 2.64 - Cromatograma de íons totais do meio de cultivo BDLev com a presença do fungo *C. acutatum*.

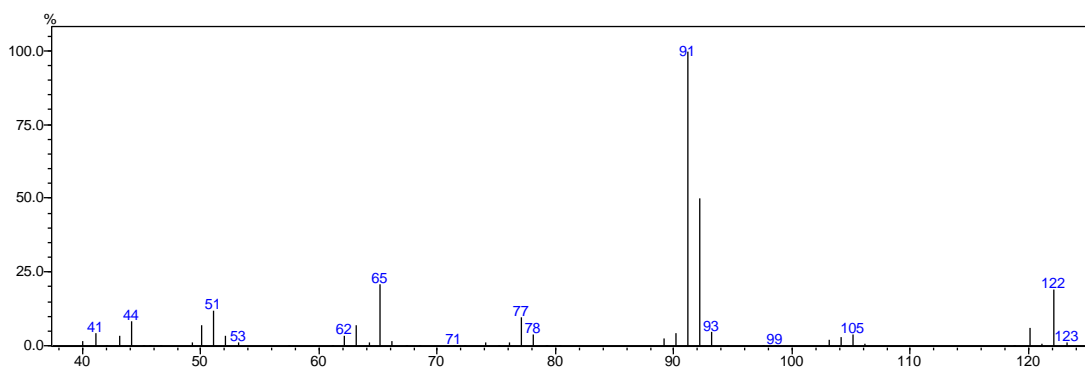


FIGURA 2.65 - Espectro de massas do álcool feniletílico.

2.5 - Conclusões

Os dados apresentados neste capítulo mostraram uma certa progressão no que diz respeito à química de *C. acutatum*, já que haviam poucos relatos na literatura sobre a química deste fitopatógeno.

Nestes estudos pôde-se observar a diferença no cultivo deste fungo em diferentes meios, sendo que este não apresenta um bom rendimento concernente à massa micelial quando cultivado em um meio pobre em nutrientes (CZAPECK).

O estudo químico proporcionou o isolamento e identificação de 13 substâncias, onde com o estudo químico do micélio pôde-se isolar e identificar alguns metabolitos comuns em fungos como esteroides, glicerídeos e alguns nucleosídeos. Já o estudo químico do extrato do meio de cultivo apresentou o isolamento de algumas dicetopiperazinas já conhecidas no gênero *Colletotrichum*, além de outros metabolitos como o tirosol e o álcool 4-hidroxibenzílico.

Utilizando a técnica da hidrodestilação pôde-se extrair o OE do fungo *C. acutatum* cultivado em meio BDLev e através das análises por CG/EM foram identificados os componentes químicos presentes no óleo. Realizando a devida subtração com o branco (meio de cultura sem o fungo) pôde-se identificar 15 componentes químicos, onde o álcool feniletílico e o hexadecanoato de metila foram os componentes majoritários.

Com o isolamento de compostos já conhecidos e com a limitação de situações de cultivo no laboratório, fez-se necessário o estudo de novas estratégias na obtenção de metabolitos secundários que serão expostas nos próximos capítulos.

**Novas estratégias na obtenção de
metabolitos secundários**

Capítulo 02

3 - Capítulo 02 - Novas estratégias na obtenção de metabólitos secundários

3.1 - Considerações Gerais

3.1.1 - Moduladores químicos

As rotas biossintéticas presentes em microrganismos são responsáveis pela produção de uma ampla diversidade estrutural de compostos químicos. No entanto, a biossíntese de metabólitos secundários em microrganismos é controlada por mecanismos regulatórios limitando a descoberta de novos compostos bioativos (MIAO et al., 2006). Assim, uma possível forma de induzir a produção dessas substâncias poderia ser suplementar os meios de cultivo com eliciadores químicos ou com precursores de rotas biossintéticas. Inibidores específicos de vias biossintéticas são comumente utilizados para analisar a biossíntese de um metabólito secundário, evidenciando a rota envolvida (HAN, HEIJDEN e VERPOORTE, 2002), além de auxiliar na compreensão de sua regulação. Isso possibilita uma manipulação adequada das rotas para aumentar a produção de determinados metabólitos secundários (SUN et al., 2009). Entretanto, a maioria desses estudos biossintéticos tem sido realizada em plantas (SIRCAR e MITRA, 2009).

O ácido jasmônico, um hormônio produzido por plantas, também tem sido amplamente utilizado como eliciador do metabolismo secundário, sendo capaz de estimular a biossíntese de terpenos, alcaloides, flavonoides, e outros compostos fenólicos em plantas (ZHAO, DAVIS e VERPOORT, 2005). Geralmente, jasmonatos são compostos produzidos por plantas que atuam como reguladores de respostas de defesa (VERGOPOULOU, GALANOPOULOU e MARKAKI, 2001), no entanto, há relatos de que o jasmonato de metila também pode ser produzido por patógenos de plantas (ABDOU et al., 2010). Em culturas de *Aspergillus parasiticus* e *A. flavus*, jasmonato de metila afetou a produção de aflatoxinas, podendo atuar, contraditoriamente, como promotor ou inibidor da biossíntese (GOODRICH-TANRIKULU, MAHONEY e RODRIGUEZ, 1995).

3.1.2 - Remodelagem epigenética

A epigenética consiste no estudo das interações das histonas com o DNA, produzindo fenótipos sem causar alterações na sequência primária do DNA (CHERBLANC et al., 2013). Essas interações podem ser introduzidas por metilação do nucleotídeo citosina ou por reações que ocorrem nas proteínas nucleossomais denominadas histonas. Há ainda evidências de que há uma inter-relação entre a metilação do DNA e as modificações nas histonas (DOBOSY e SELKER, 2001).

A metilação do DNA é um processo realizado pela enzima DNA metiltransferase, pelo qual catalisa a transferência de grupos metila desde S-adenosil metionina (SAM) à posição C-5 do nucleotídeo citosina. Já as histonas, que são proteínas nucleares associadas a cromatina, cumprem a função de servir de suporte para a compactação da molécula de DNA, diminuindo o seu tamanho e permitindo o maior controle dos genes por parte da célula (HARP, HANSON e BUNICK, 2004; BRADBURY e VAN HOLDE, 2004; BIEL, WASCHOLOWSKI e GIANNIS, 2005). Assim, algumas reações que ocorrem nas histonas como a acetilação e deacetilação alteram o empacotamento da molécula de DNA com a cromatina (CICHEWICZ, 2010).

As modificações sobre as histonas acontecem sobre os resíduos N-terminal das proteínas. Há uma interação eletrostática entre as histonas (carregadas positivamente devido aos grupos amino existente na lisina e arginina) e o grupo fosfato do DNA (carregado negativamente) (FIGURA 3.1) (CHERBLANC et al., 2013).

A acetilação, realizada pelas enzimas histona acetiltransferases (HATs) neutraliza a carga positiva das histonas convertendo as aminas em amidas (reduzindo a capacidade de interação das histonas com o DNA). Esta redução da interação permite a expansão da cromatina e conseqüentemente a diminuição da transcrição genética. Por outro lado, a deacetilação de histonas é realizada pelas enzimas histonadeacetilases (HDACs) e são responsáveis por retirar esse grupo acetila. Essas enzimas HDAC tem um papel muito importante da remodelagem da cromatina (GRAESSLE, LOIDL e BROSCH, 2001). O descobrimento de moléculas que atuam como inibidores de HDACs e seus derivados sintéticos tem permitido aprofundar o conhecimento das funções dessas enzimas (CHERBLANC et al., 2012).

No geral, a hipoacetilação de histonas está associada com silenciamento de genes, enquanto que hiperacetilação é mais comumente associada com ativação gênica (TRIBUS et al., 2010; SHWAB et al., 2007), podendo haver exceções (DE NADAL et al., 2004; ROBYR, KURDISTANI e GRUNSTEIN, 2004; HANSEN et al., 2005). A metilação de histonas também é um processo que comumente ocorre e seu efeito na cromatina depende da quantidade de metilação e de qual aminoácido sofreu a modificação, podendo resultar em ativação ou silenciamento gênico (LAWRENCE et al., 2004).

O tratamento de diferentes fungos com inibidores da enzima HDAC resultou na produção de vários metabólitos que não haviam sido identificados nas espécies não tratadas (SHWAB et al., 2007; FISH et al., 2009). O fungo *Chaetomium indicum*, após tratamento com ácido suberoidroxâmico, teve a produção de alguns policetídeos induzidos, e acabou levando ao isolamento seis novos compostos, chaetofenol A-F (ASAI et al., 2013). A produção desses compostos também foi detectada no controle sem tratamento, mas foi estimulada em diferentes graus após o tratamento com o inibidor de HDAC, sendo que apenas chaetofenol A, B, C e E parecem realmente ter sido induzidos devido ao tratamento. Os autores ainda verificaram um maior grau de acetilação em genes possivelmente envolvidos na biossíntese desses compostos.

O motivo pelo qual apenas alguns *clusters* de genes são afetados pelas enzimas HDACs e DNA-metiltransferases é algo que ainda não foi descoberto (KOSALKOVA et al., 2009; LEE et al., 2009). A regulação da produção de metabólitos mediada por essas enzimas poderia ser um fenômeno disseminado em fungos filamentosos, que evoluiu como uma ferramenta para permitir a produção de metabólitos secundários sob algumas condições específicas. Conseqüentemente, a regulação epigenética do metabolismo secundário é uma eficiente forma dos fungos assegurarem que a produção energeticamente desfavorável de determinadas moléculas só ocorrerá quando for vantajosa (SHWAB et al., 2007). Assim, o tratamento de fungos com inibidores químicos das enzimas HDAC e DNA-metiltransferases pode promover o aumento da produção de metabólitos de interesse,

além de auxiliar na identificação de novos produtos naturais que provavelmente não são detectados sob condições normais de cultivo.

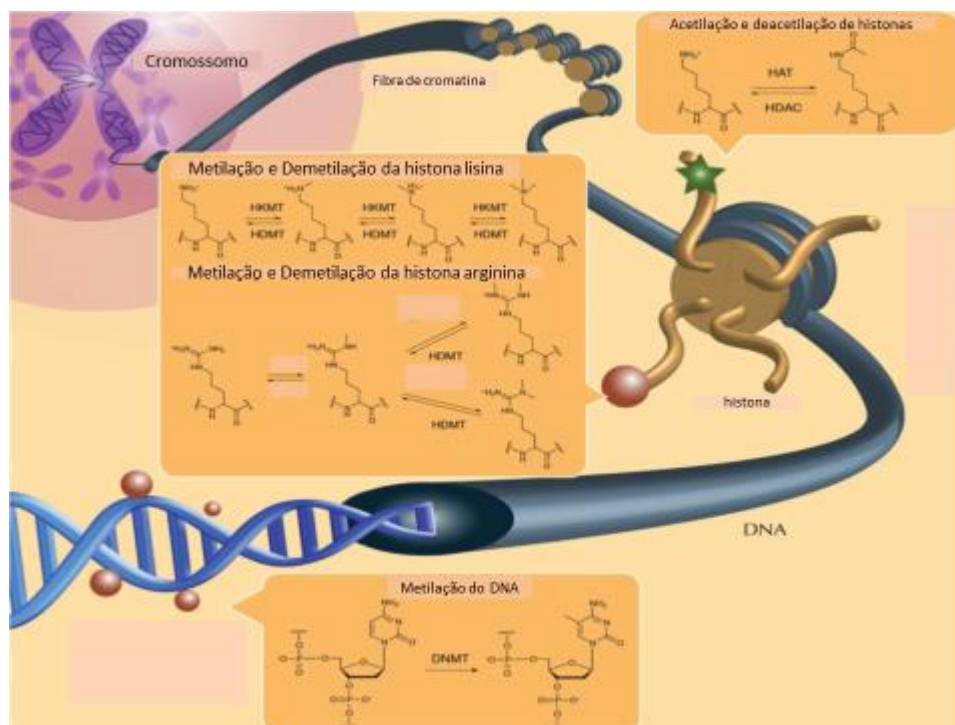


FIGURA 3.1 - Esquema adaptado de reações que ocorrem com as histonas na célula (CHERBLANC et al., 2012).

Os dois principais tipos de moduladores epigenéticos utilizados em microrganismos são os inibidores de DNA metiltransferase (DNMT) e de histona deacetilase (HDAC). Esta técnica tem a vantagem que não há modificação na sequência gênica e pode ser aplicada de maneira simples a muitos microrganismos (CICHEWICZ, 2010).

O uso de moduladores epigenéticos tem permitido a descoberta de novos metabolitos críticos em diversas espécies de fungos (WILLIAMS et al., 2008) (HENRIKSON et al., 2009). Os inibidores de DNMT mais comumente utilizados são a 5-azacitidina (**1**), 5-aza-2-deoxicitidina (**2**) e a metiltioadenosina (**3**). Por outro lado, os moduladores epigenéticos ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA) (**4**), butirato de

sódio (5), ácido valproico (6) e a tricostatina (7) são utilizados como inibidores de HDAC (FIGURA 3.2).

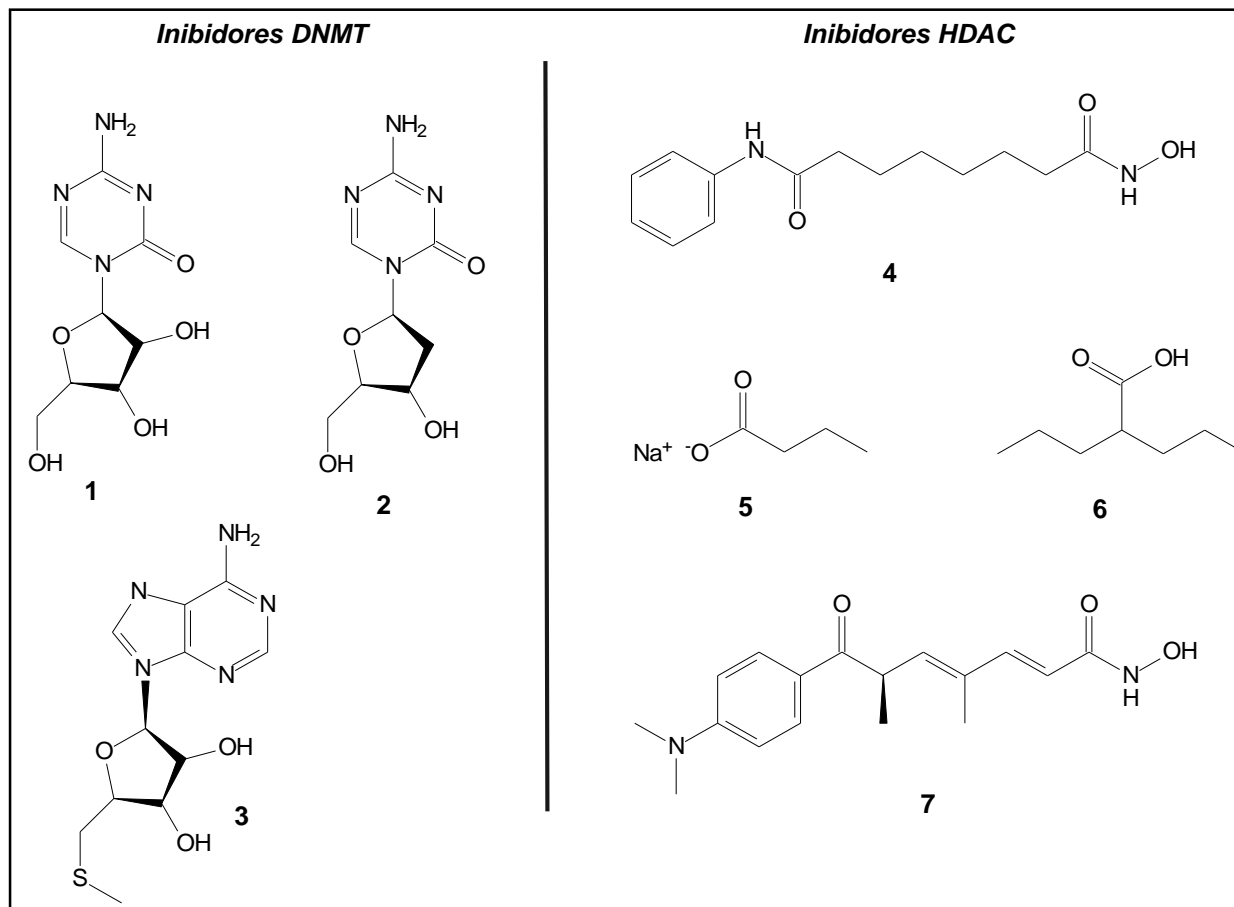


FIGURA 3.2 - Moduladores epigenéticos inibidores da DNA metiltransferase e Histona deacetilase utilizados em cultivos de microrganismos (CICHEWICZ, 2010).

3.1.3 - Cultivo pareado de microrganismos

Os microrganismos, em geral, estão em constante interação na natureza, principalmente em áreas amplamente colonizadas. A competição neste ambiente, faz com que haja uma prioridade em sobreviver fazendo com que os microrganismos produzam metabolitos bioativos (KNIGHT et al., 2003; SLATTERY, RAJBHANDARI e WESSON, 2001). Assim, nas condições não naturais de cultivo, grupos de genes potencialmente interessantes, responsáveis pela expressão de metabolitos que aumentam a competitividade no meio ambiente, podem não estar sendo expressados (PETTIT, 2009). Uma estratégia utilizada para adquirir uma

proximidade com o ambiente microbiológico natural é cultivar um microrganismo em presença de outro. Em estudos prévios, a utilização de co-cultivos estimulou a produção de metabolitos secundários e/ou aumentou a atividade biológica de extratos microbianos.

Estudos relatam que culturas mistas entre fungos e bactérias podem produzir novas moléculas bioativas, onde foi observada a produção de glionitrina pelo fungo *Aspergillus fumigatus* quando cultivado na presença da bactéria *Sphingomonas* sp. A glionitrina é uma dicetopiperazina bissulfeto com atividade antibiótica e citotóxica (PARK et al., 2009).

Em outros estudos envolvendo culturas mistas entre microrganismos, também foi observado o aumento da produção de toxinas e uma certa inibição no desenvolvimento de microrganismos, quando *Fusarium proliferatum* foi cultivado em presença de *Trichoderma* sp. Na interação entre os dois microrganismos, ocorreu a inibição do crescimento de *F. proliferatum* e acentuada diminuição da produção da toxina fumonisina B1 por este fungo (ROJO et al., 2007). Os mecanismos específicos pelos quais as interações entre várias espécies induzem a produção de metabolitos secundários ainda não são bem definidos, entretanto, o isolamento de várias substâncias inéditas com atividade biológica evidenciam que o co-cultivo representa uma estratégia promissora na indução da expressão do potencial metabólico microbiano.

O cultivo de um fungo na presença de outro microrganismo pode representar uma ferramenta útil no estudo das interações que ocorrem em um dado ecossistema, como por exemplo, os microrganismos endofíticos que habitam numa mesma planta hospedeira, ou até mesmo entre fitopatógenos e endofíticos. Assim, o estudo de culturas mistas de microrganismos poderá possibilitar a descoberta de novas moléculas biologicamente ativas e ainda fornecer dados para aprofundar o entendimento das interações entre vários fungos e sua relação com a planta hospedeira.

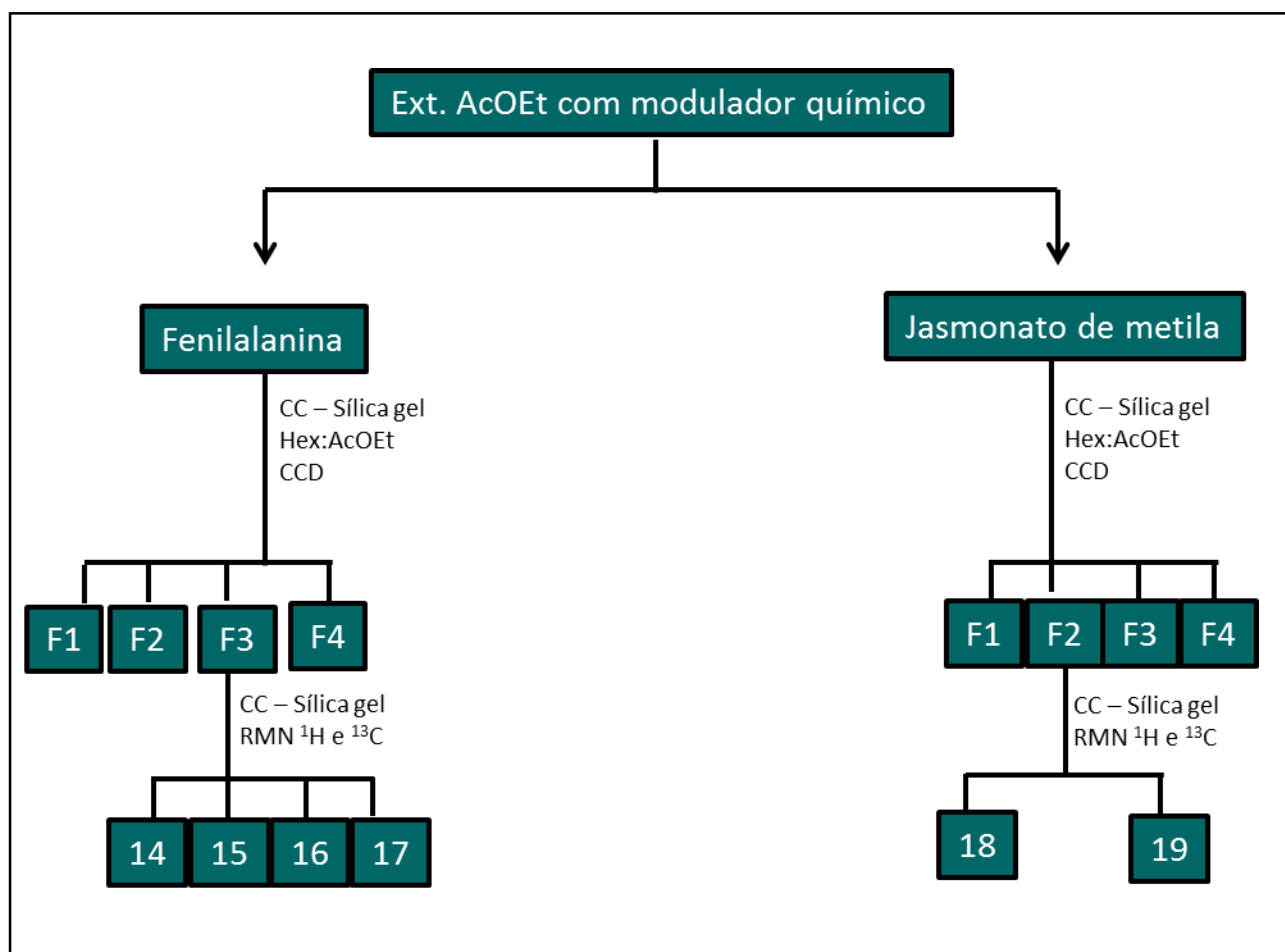
3.2 - Objetivos

- Isolar e identificar os metabolitos produzidos por *C. acutatum* quando cultivado na presença de moduladores químicos;
- Analisar a variação do perfil químico do fungo *C. acutatum* quando cultivado com moduladores epigenéticos incorporados ao meio de cultura;
- Isolar e identificar os principais metabolitos produzidos pelo fungo quando cultivado com moduladores epigenéticos;
- Verificar a variação do metabolismo do fungo *C. acutatum* quando cultivado na presença de outros microrganismos.

3.3 - Metodologia

3.3.1 - Moduladores químicos

A fenilalanina (precursor de rota biossintética) e o jasmonato de metila (eliciador químico) foram utilizados como moduladores químicos. Uma suspensão de esporos (10^5 esporos.mL⁻¹) foi incorporada ao meio de cultura líquido BD contendo os moduladores químicos (50, 100 e 200 μ M). Após 14 dias de incubação (sob agitação), realizou-se a extração com AcOEt (5x100 mL). O extrato foi concentrado à pressão reduzida (rotaevaporador). Após comparação dos extratos obtidos por CCD e CLAE-UV, realizou-se o mesmo procedimento experimental em uma escala ampliada utilizando os modificadores numa concentração de 200 μ M. Após 20 dias de incubação (sob agitação) e extração com AcOEt (5x100 mL), o extrato foi concentrado à pressão reduzida (rotaevaporador) e fracionado em uma coluna de sílica gel em modo gradiente de eluição utilizando-se hexano e AcOEt como fase móvel. As respectivas frações F1 (20% AcOEt), F2 (50% AcOEt), F3 (80% AcOEt) e F4 (100% AcOEt) foram submetidas às análises cromatográficas usuais (CCD e CLAE-UV) e análises espectroscópicas (RMN e EM).



FLUXOGRAMA 2: Esquema do fracionamento do Ext. AcOEt do meio de cultivo de *C. acutatum* incorporado com moduladores químicos (fenilalanina e jasmonato de metila) após 20 dias.

3.3.2 - Moduladores epigenéticos

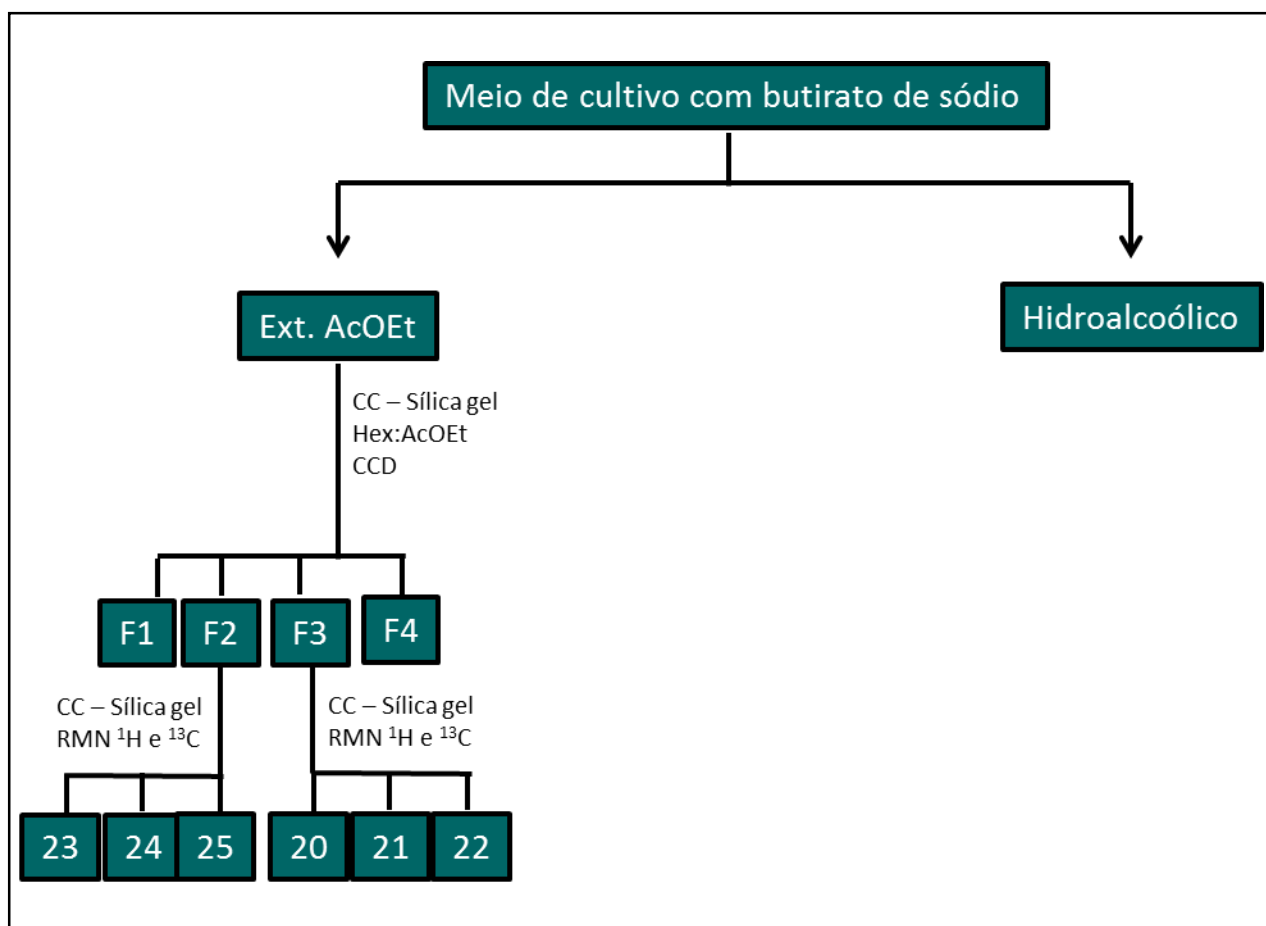
Foram testados alguns moduladores epigenéticos como 5-azacitidina (1), SAHA (4), butirato de sódio (5), ácido valproico (6), e incorporados ao cultivo de *C. acutatum* em BD. Os moduladores foram incorporados ao meio de cultivo nas concentrações (50 μ M, 100 μ M e 200 μ M) e após 20 dias de cultivo sob agitação (FIGURA 3.3) foram extraídos com AcOEt, e o extrato foi concentrado em um evaporador rotatório à pressão reduzida. Os extratos obtidos foram analisados por CCD e CLAE-UV onde foi escolhido um modulador e a concentração mais viável para se trabalhar em uma escala ampliada.

Após os testes iniciais para avaliação das condições de cultivo, o fungo *C. acutatum* foi cultivado em larga escala, onde após 20 dias o meio de cultivo líquido foi extraído com AcOEt obtendo-se o Ext. AcOEt do meio líquido.

O extrato obtido foi fracionado por CC utilizando-se sílica gel como fase estacionária e Hex:AcOEt como eluentes. Após as devidas comparações por CCD foram reunidas as frações F1 (20% AcOEt), F2 (50% AcOEt), F3 (80% AcOEt) e F4 (100% AcOEt). As frações F2 e F3 foram purificadas por CC e após análises por RMN ^1H e ^{13}C e EM foram obtidas as substâncias 20-25.



FIGURA 3.3 - Cultivo do fungo *Colletotrichum acutatum* sob agitação.



FLUXOGRAMA 3: Esquema de fracionamento do extrato acetato de etila do meio de cultivo de *Colletotrichum acutatum* incorporado com o modulador epigenético butirato de sódio após 20 dias.

3.3.3 - Cultivo pareado de microrganismos

Os microrganismos foram cultivados em placas de Petri (15,0x15,0 cm) contendo o meio BDA. *C. acutatum* foi cultivado na presença de outros microrganismos, onde 1 disco de 5mm de cada fungo foi incorporado ao meio de cultivo de maneira que os discos ficassem equidistantes. Após o contato das hifas, a partes de interesse foram cortadas e extraídas com AcOEt (FIGURA 3.4). Foi realizada a comparação por CCD das zonas A, B, C e D. Os fungos utilizados para o co-cultivo com *C. acutatum* foram: *Alternaria alternata*, *Guignardia citricarpa*, *Phytophthora nicotianae*, *Memmoniola levispora*, *Botrytis cinerea*, *Trichoderma aundinaceum* e o seu mutante *Ta Δ Tri5*.

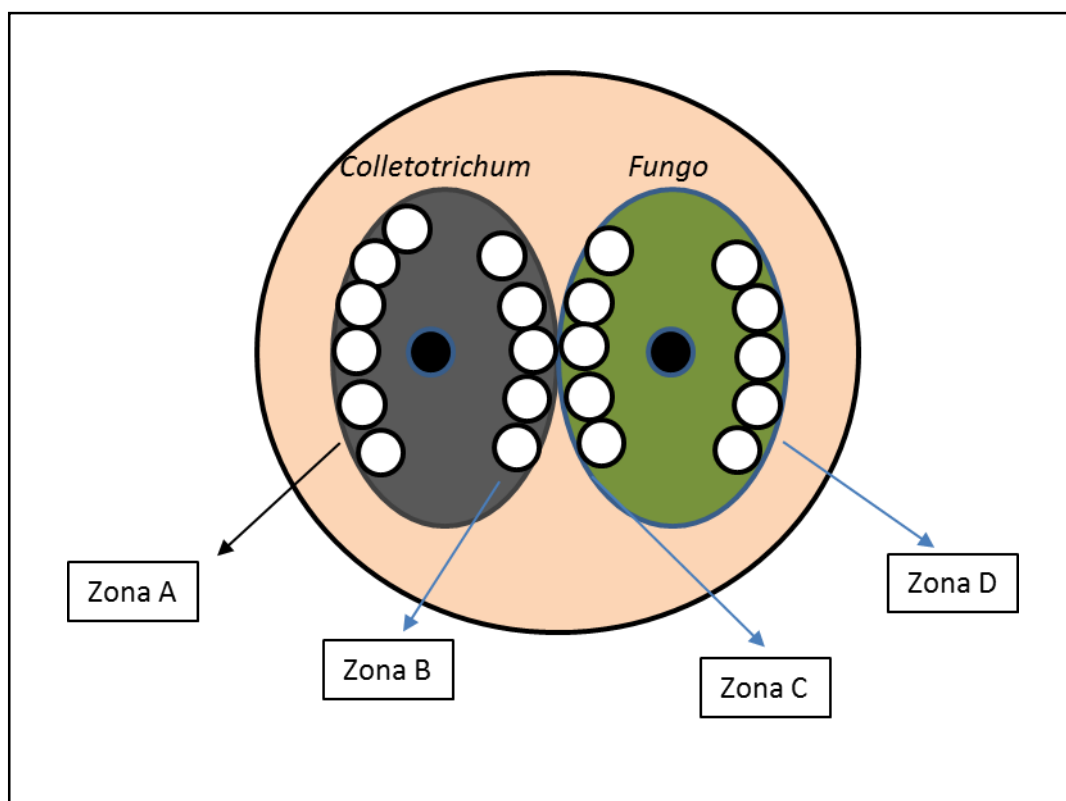
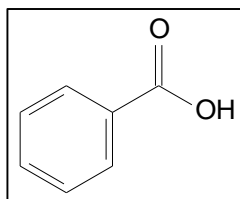


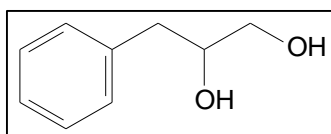
FIGURA 3.4 - Esquema ilustrativo do crescimento de *Colletotrichum acutatum* em cultivo pareado com os microrganismos utilizados no experimento.

3.4 - Resultados e discussões

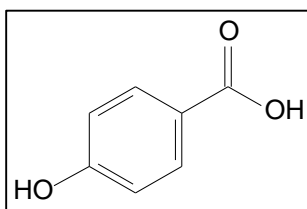
3.4.1 - Substâncias isoladas dos estudos com moduladores e cultivo pareado



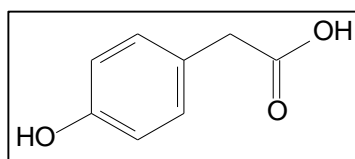
Ác. benzoico (S14)
Ext. Moduladores químicos
Massa: 0,5 mg



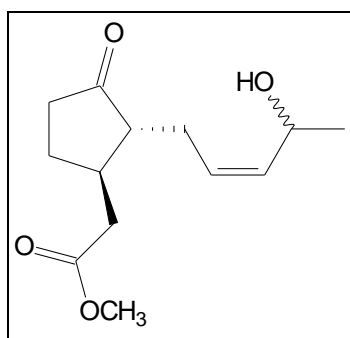
3-fenil-1,2-propanodiol (S15)
Ext. Moduladores químicos
Massa: 0,8 mg



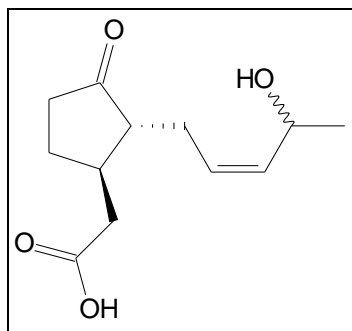
Ácido 4-hidroxibenzoico (S16)
Ext. Moduladores químicos
Massa: 1,0 mg



Ácido 4-hidroxibenzoacético (S17)
Ext. Moduladores químicos
Massa: 5,6 mg



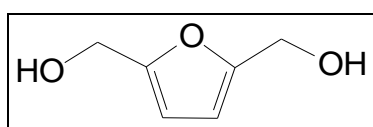
11-hidroxijasmonato de metila (S18)
Ext. Moduladores químicos
Massa: 1,8 mg



Ácido 11-hidroxijsmônico (S19)

Ext. Moduladores químicos

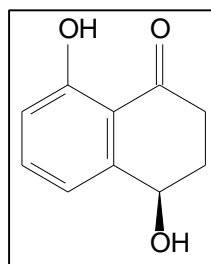
Massa: 2,5 mg



2,5-dihidroximetilfurano (S20)

Ext. Moduladores epigenéticos

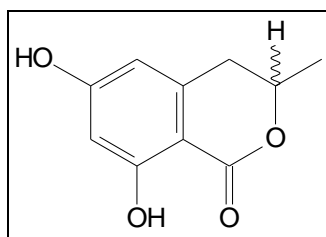
Massa: 5,8 mg



(-)-isosclerona (S21)

Ext. Moduladores epigenéticos

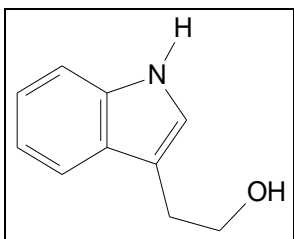
Massa: 0,6 mg



6-hidroximeleina (S22)

Ext. Moduladores epigenéticos

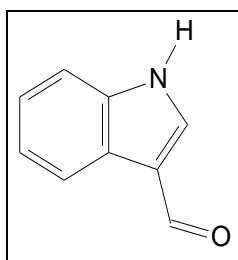
Massa: 0,9 mg



Triptofol (S23)

Ext. Moduladores epigenéticos

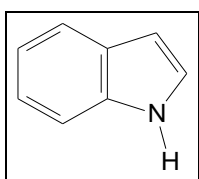
Massa: 0,1 mg



Indol-3-aldeído (S24)

Ext. Moduladores epigenéticos

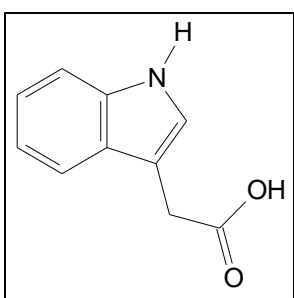
Massa: 0,1 mg



Indol (S25)

Ext. Moduladores epigenéticos

Massa: 0,4 mg



Ácido indol-3-acético (S26)

Ext. Culturas mistas

Massa: 7,4 mg

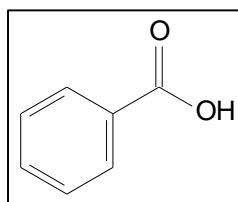
3.4.2 - Resultados obtidos após o uso de moduladores químicos

Apesar da utilização de moduladores químicos na busca de moléculas novas ter apresentado algumas moléculas não isoladas em estudos anteriores, pôde-se observar que estes compostos provavelmente são produtos de biotransformação a partir do modulador incorporado. Apesar do estudo com a fenilalanina ter apresentado novos compostos, a utilização de um precursor pode ter feito com que o fungo degradasse este a moléculas menores.

Os estudos com a incorporação do jasmonato de metila mostraram o comportamento de um fungo patogênico a uma molécula de defesa de vegetais. Existem vários relatos na literatura em que espécies do gênero *Colletotrichum* hidroxilam fitoalexinas, transformando-as em moléculas mais polares e menos tóxicas a eles (GARCIA-PAJON, HERNANDEZ-GALAN e COLLADO, 2003).

A seguir serão discutidas as substâncias isoladas usando essa metodologia.

3.4.2.1 - Substância 14 - Ácido benzoico



A substância 14 foi isolada do Ext. AcOEt do meio líquido incorporado com fenilalanina. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 3.5) apresentou sinais na região de hidrogênios aromáticos. Observou-se um dubleto em δ 8,16; um tripleto em δ 7,66 e outro tripleto em δ 7,52 integrando cada sinal respectivamente a 2, 1 e 2 hidrogênios. Com base nos dados de RMN ^1H e comparado com a literatura, notou-se que a substância 14 tratava-se de uma molécula simples, e que os sinais desblindados dos hidrogênios do anel aromático evidenciavam a presença de um grupo retirador de elétrons como substituinte do anel. Sendo assim, a substância 14 foi identificada como sendo o ácido benzoico.

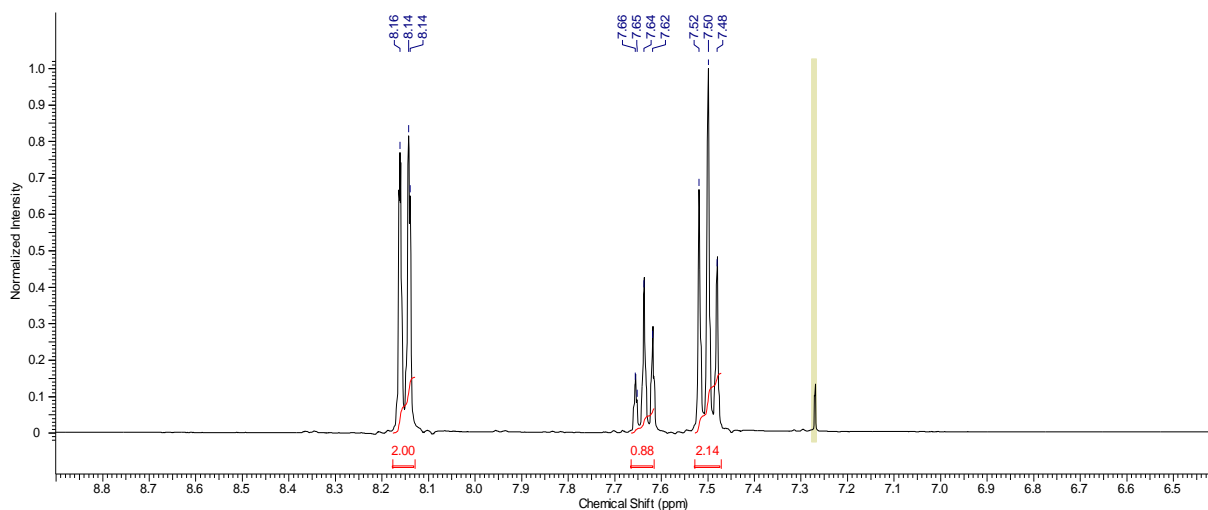
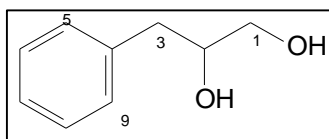


FIGURA 3.5 - Espectro de RMN ^1H da substância 14 (CDCl_3 , 400 MHz).

3.4.2.2 - Substância 15 - 3-fenil-1,2-propanodiol



A substância 15 foi isolada como um sólido amorfo branco do Ext. AcOEt do meio líquido incorporado com fenilalanina. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 3.6 e 3.7) mostrou sinais típicos de anel aromático monossustituído em δ 7,28 (*m*, 5H), além de sinais de hidrogênios de carbonos ligados a oxigênio em δ 3,82 (*q*, 1H) e 3,50 (*dd*, 2H).

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 3.8) mostrou sinais de carbonos aromáticos em δ 140,7; 130,5; 130,4 e 127,1. Também observou-se sinais de carbonos ligados a oxigênio em δ 74,5 e 66,6. Os dados de COSY mostraram a correlação entre os hidrogênios em δ 3,81 do carbono ligado ao oxigênio com os hidrogênios em δ 3,51 e 2,84. Os dados de HSQC mostraram a correlação do hidrogênio em δ 3,81 com o carbono em δ 74,5 (FIGURA 3.9).

O espectro de massas apresentou o pico do íon molecular em *m/z* 152 e alguns picos característicos de anel benzílico em *m/z* 91 e 92 (FIGURA 3.10).

Com base nos dados observados nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e EM, e comparando-se com a literatura (AYER et al., 1985) pôde-se identificar a substância 15 como 3-fenil-1,2-propanodiol e a configuração em um polarímetro foi $\{[\alpha]_{\text{D}}^{25} (c=1.5 \text{ mg/mL CHCl}_3): -14,5^\circ\}$ obteve a configuração R, identificando a substância como (-)-3-fenil-1,2-propanodiol (TABELA 3.1).

TABELA 3.1 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD, 400 e 100 MHz) da substância 15 em comparação com os dados da literatura (AYER et al., 1985; CDCl_3).

C	δ_{H}	δ_{H} Lit	δ_{C}	δ_{C} Lit
1	3,82 (<i>q</i> , 1H)	3,80 (<i>q</i> , 1H)	74,5	74,9
2	3,50 (<i>dd</i> , 2H)	3,52 (<i>dd</i> , 2H)	66,6	66,8
3a	2,67(<i>dd</i> , $J=8,5$ Hz, 1H)	2,65(<i>dd</i> , $J=8,5$ Hz, 1H)	41,0	41,3
3b	2,82 (<i>dd</i> , $J= 8,5$ Hz, 1H)	2,81 (<i>dd</i> , $J= 8,5$ Hz, 1H)		
4	-	-	140,1	-
5	7,28 (<i>m</i> , 5H)	7,29 (<i>m</i> , 5H)	101,4	101,5
6	7,28 (<i>m</i> , 5H)	7,29 (<i>m</i> , 5H)	115,4	115,4
7	7,28 (<i>m</i> , 5H)	7,29 (<i>m</i> , 5H)	127,1	127,0
8	7,28 (<i>m</i> , 5H)	7,29 (<i>m</i> , 5H)	129,2	-
9	7,28 (<i>m</i> , 5H)	7,29 (<i>m</i> , 5H)	130,4	-

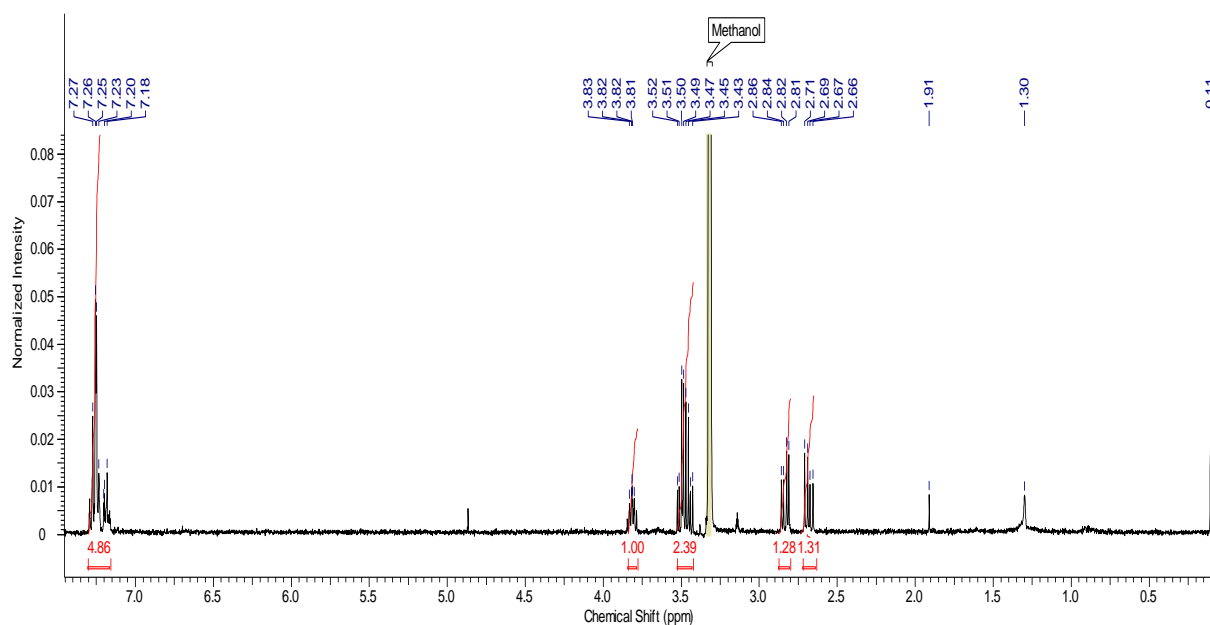


FIGURA 3.6 - Espectro de RMN ^1H da substância 15 (MeOD, 400 MHz).

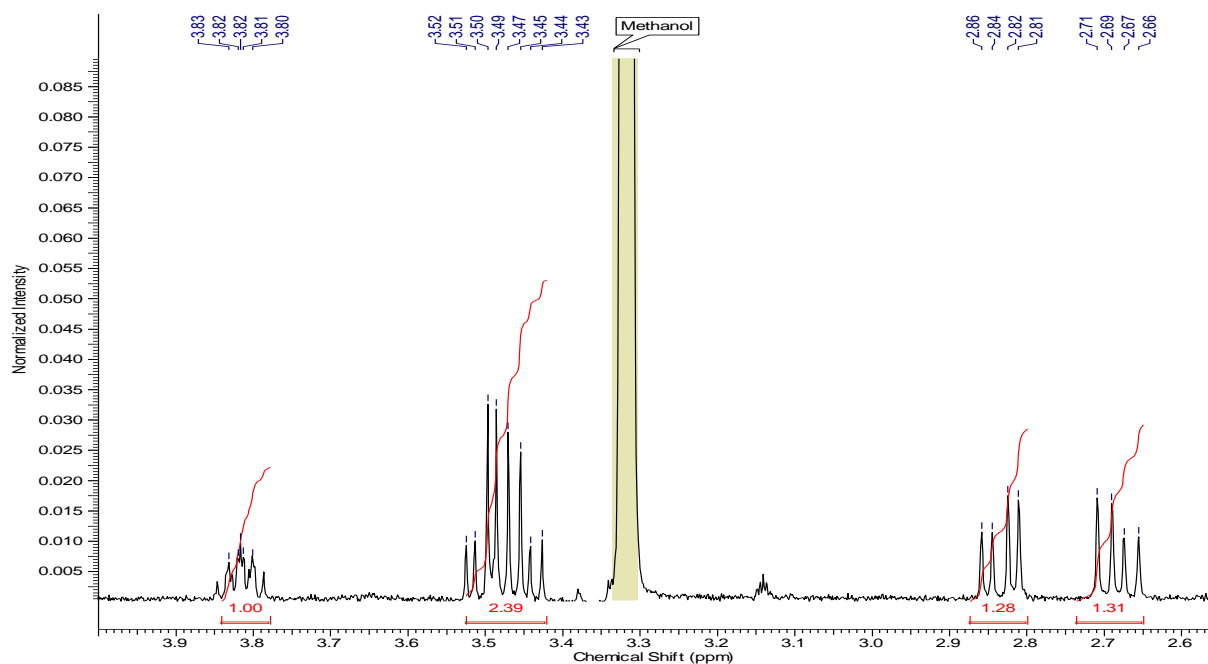


FIGURA 3.7 - Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 15 (MeOD, 400 MHz).

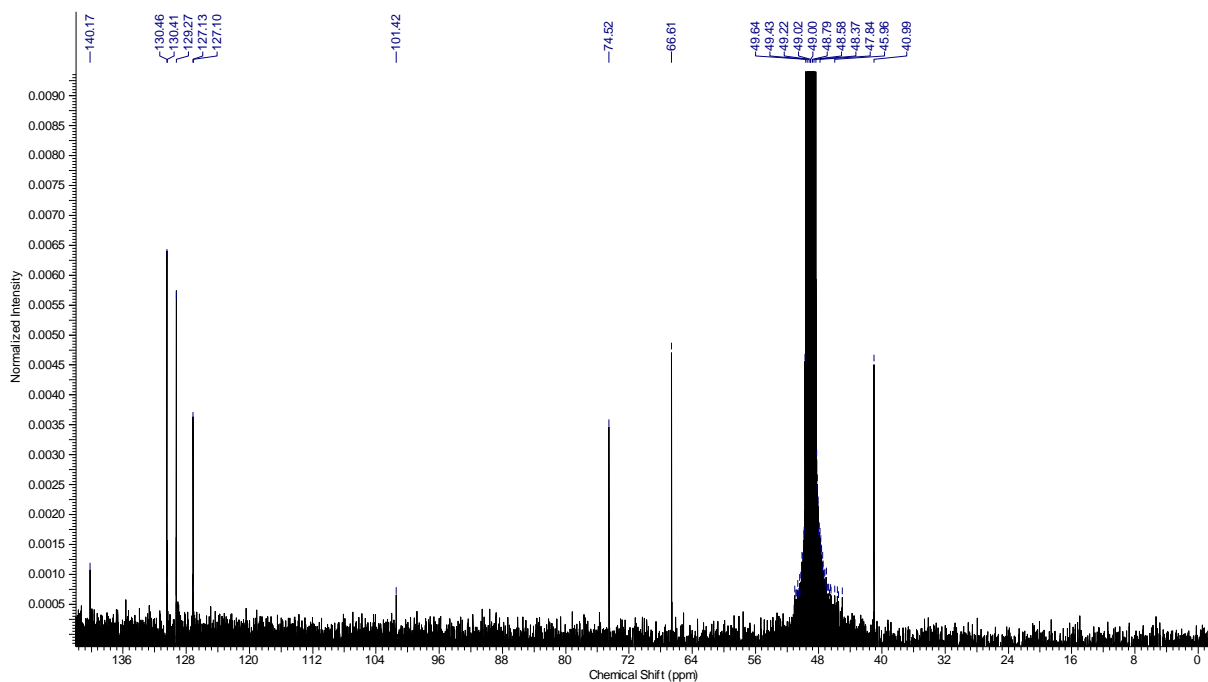


FIGURA 3.8 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 15 (MeOD, 100 MHz).

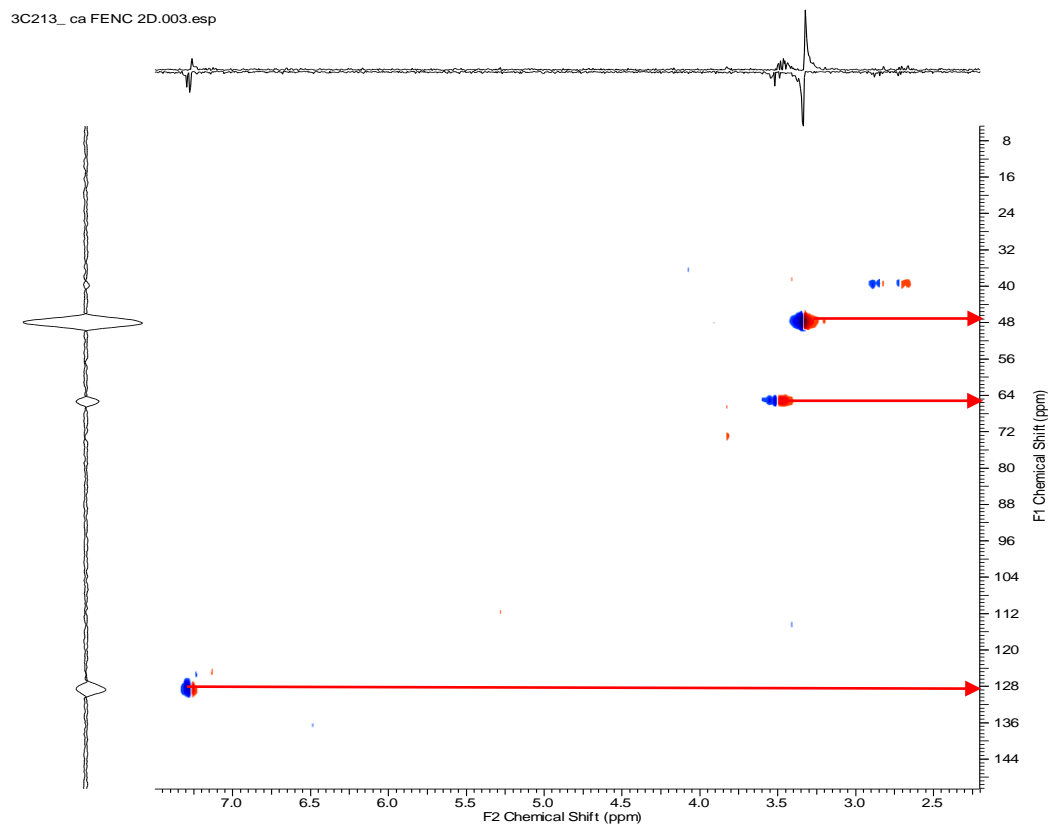
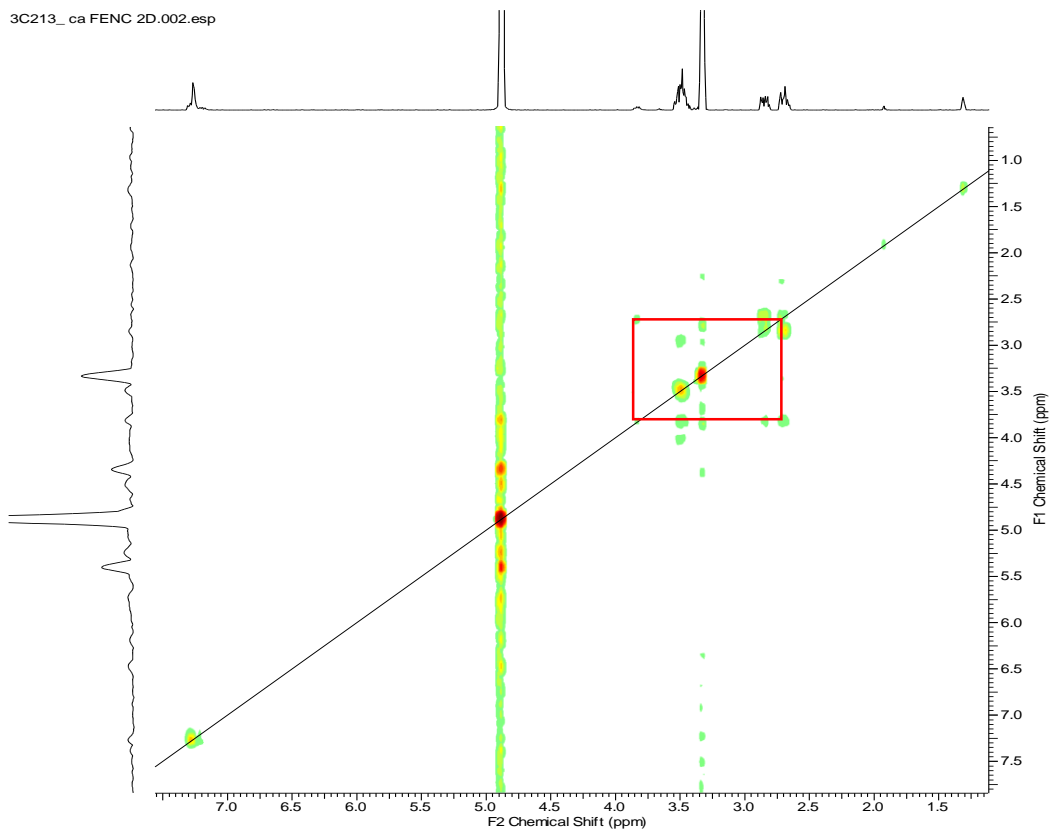


FIGURA 3.9 - Espectro de (a) COSY e (b) HSQC da substância 15.

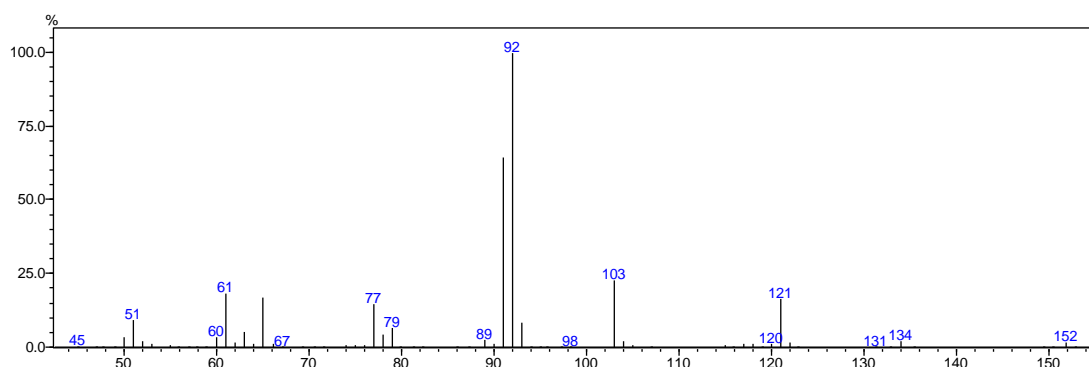
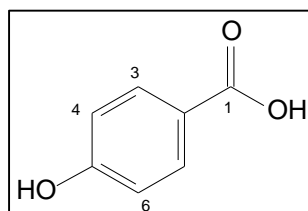


FIGURA 3.10 - Espectro de massas da substância 15.

3.4.2.3 - Substância 16 - Ácido hidroxibenzoico



A substância 16 foi isolada como um sólido branco do Ext. AcOEt do meio líquido incorporado com fenilalanina. Com o espectro de RMN ^1H (FIGURA 3.11) observou-se a presença de dois dubletos, com constante de acoplamento 8,8 Hz e 9,1 Hz, um centrado em δ 7,14 e o outro em 6,71; integrando para dois hidrogênios cada um, indicando um sistema de anel aromático *para*-dissubstituído. O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 3.12) revelou sinais de carbonos aromáticos em δ 131,4; 116,3 e 156,9. O espectro de massas (FIGURA 3.13) revelou a presença do íon molecular em m/z 138.

Com base nos dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , EM e comparados com a literatura (ANDRADE, 2011), a substância 16 foi definida como o ácido 4-hidroxibenzoico (TABELA 3.2).

TABELA 3.2 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD, 400 e 100 MHz) da substância 16 em comparação com os dados da literatura (ANDRADE, 2011; CD_3CN).

C	δ_{H}	$\delta_{\text{H Lit}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{C Lit}}$
1		-	167,0	169,0
2		-	-	121,9
3 e 7	6,71 (<i>d</i> , $J=9,0$ Hz, 2H)	6,70 (<i>d</i> , $J=9,0$ Hz)	131,4	132,7
4 e 6	7,14 (<i>d</i> , $J=9,0$ Hz)	7,80 (<i>d</i> , $J=9,0$ Hz)	116,3	115,8
5		-	156,9	162,5

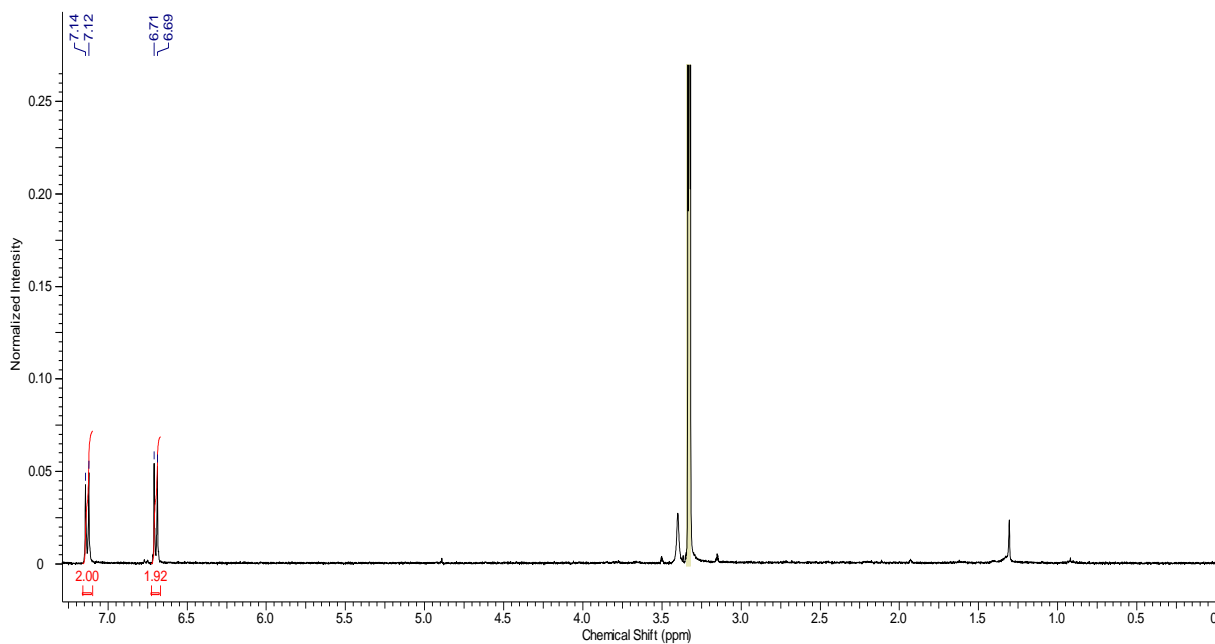


FIGURA 3.11 - Espectro de RMN ^1H da substância 16 (MeOD, 400 MHz).

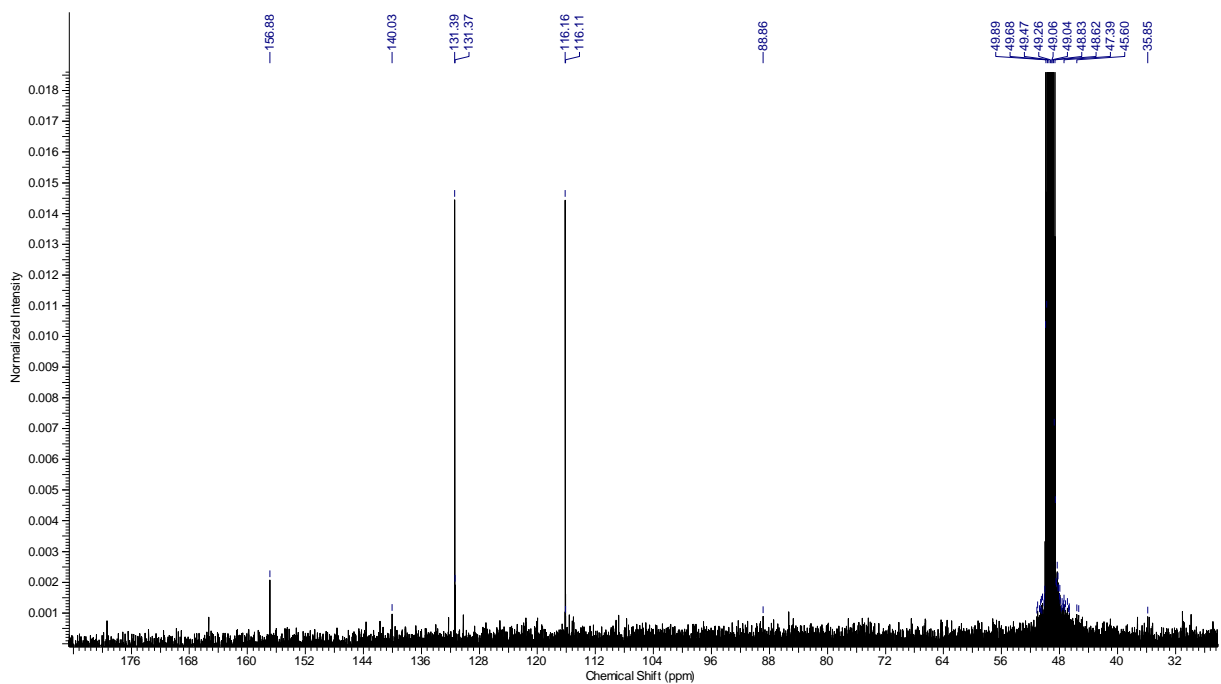


FIGURA 3.12 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 16 (MeOD, 100 MHz).

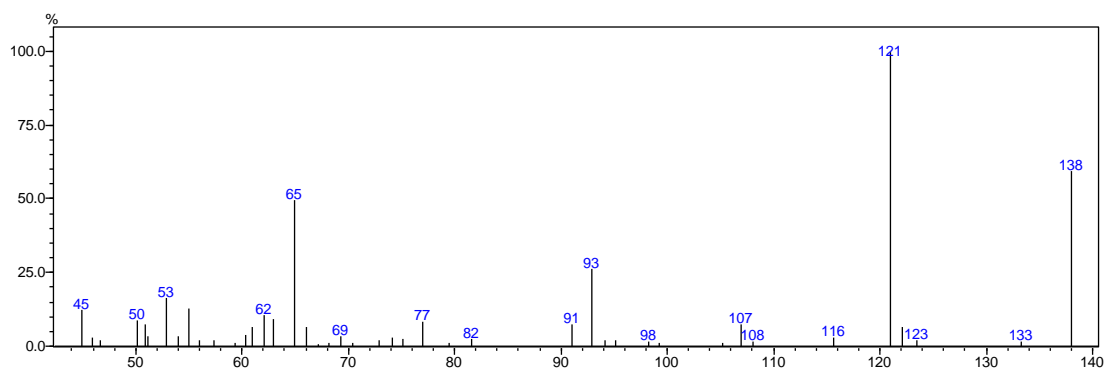
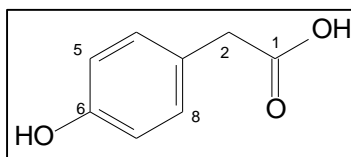


FIGURA 3.13 - Espectro de massas da substância 16.

3.4.2.4 - Substância 17 - Ácido 4-hidroxibenzenoacético



A substância 17 foi isolada do Ext. AcOEt do meio de cultura líquido incorporado com fenilalanina. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 3.15) apresentou sinais referentes a hidrogênios aromáticos em δ 6,72 (*d*, $J=9,0$ Hz, 2H) e 7,11 (*d*, $J=9,0$ Hz, 2H) sendo dois dubletos acomplando entre si com constante de $J=9,0$ Hz evidenciando a substituição *para* no anel aromático. Um sinal em δ 3,88 integrando para 2H refere-se ao hidrogênio do carbono alfa a carboxila.

O espectro de massas (FIGURA 3.14) mostrou o pico do íon molecular em m/z 152, além de um pico intenso em m/z 107 referente ao fragmento do anel *para*-substituído.

Com as análises dos espectros de RMN ^1H e EM e comprados com a literatura (ANDRADE, 2011) pôde-se identificar a substância 17 como o ácido 4-hidroxibenzenoacético (TABELA 3.3).

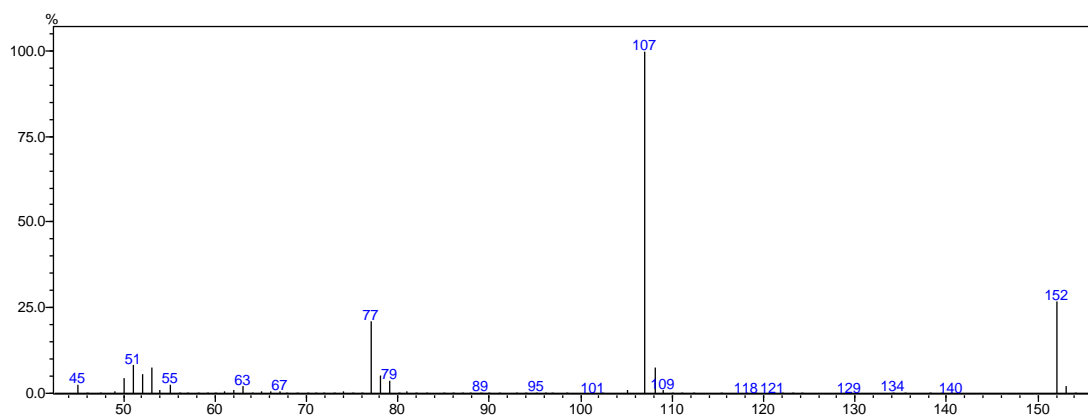


FIGURA 3.14 - Espectro de massas da substância 17.

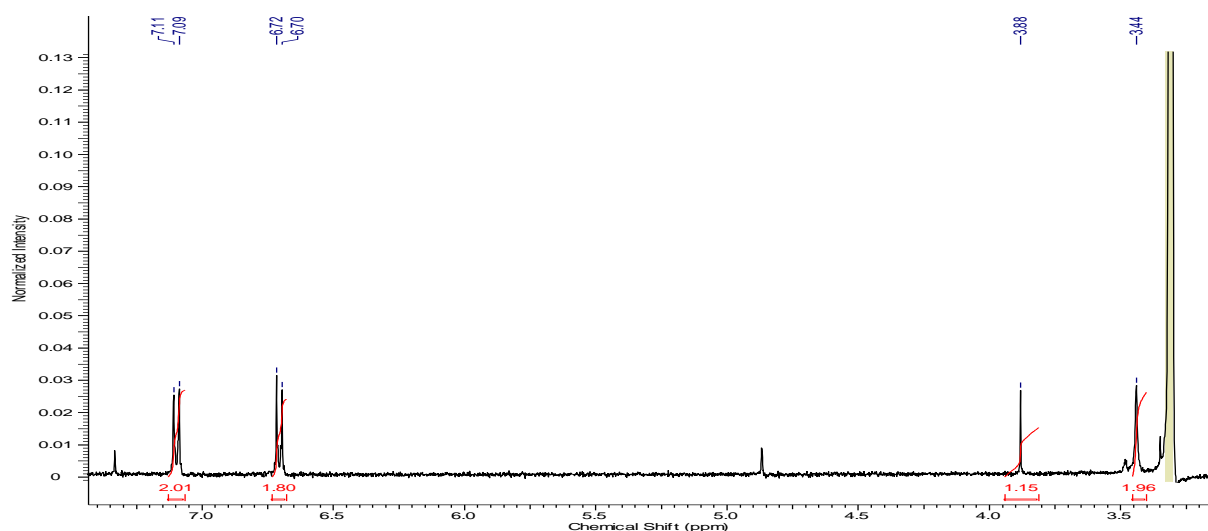
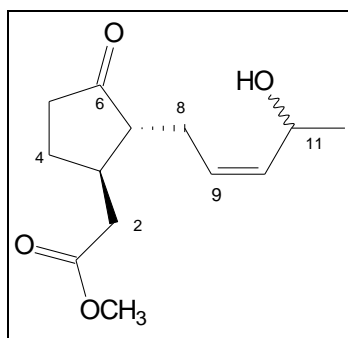


FIGURA 3.15 - Espectro de RMN ^1H da substância 17 (MeOD, 400 MHz).

TABELA 3.3 - Dados de RMN de ^1H (MeOD, 400 MHz) da substância 17 em comparação com os dados da literatura (ANDRADE, 2011; CD_3CN).

C	δ_{H}	δ_{H} Lit
2	3,88 (s; 2H)	3,90 (s; 2H)
4 e 8	6,72 (d, $J=9,0$ Hz, 2H)	6,70 (d, $J=9,0$ Hz)
5 e 7	7,11 (d, $J=9,0$ Hz, 2H)	7,80 (d, $J=9,0$ Hz)

3.4.2.5 - Substância 18 - 11-hidroxijasmonato de metila



A substância 18 foi isolada como um óleo esverdeado do Ext. AcOEt do meio de cultura líquido incorporado com jasmonato de metila. Com as análises dos espectros de RMN ¹H pôde-se observar sinais na região característica dos metilênicos. O sinal em δ 3,68 (s, 3H) como um singlete largo integrando para 3H evidenciou a presença da metoxila na estrutura (FIGURA 3.16). O espectro de COSY (FIGURA 3.17) apresentou a correlação do hidrogênio da metila terminal com o hidrogênio do carbono ligado a hidroxila, evidenciando que esta está ligada ao carbono vizinho a metila terminal.

O espectro de massas revelou o pico do íon molecular em m/z 240, além de um pico em m/z 222 evidenciando a perda de água (FIGURA 3.18).

Os dados espectroscópicos apresentados de COSY, e EM e a devida comparação com a literatura (SILVA, 2007), evidenciaram a substância 18 como sendo o 11-hidroxijasmonato de metila (TABELA 3.4).

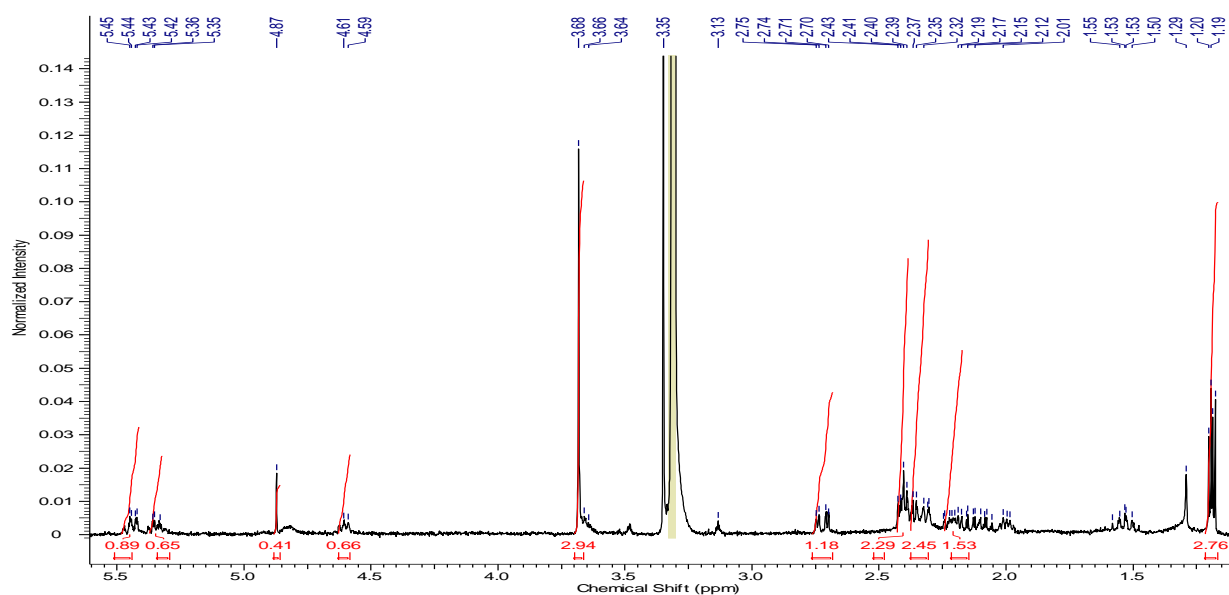


FIGURA 3.16 - Espectro de RMN ^1H da substância 18 (MeOD, 400 MHz).

TABELA 3.4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD, 400 e 100 MHz) da substância 18 em comparação com os dados da literatura (SILVA, 2007; CDCl_3).

C	δ_{H}	δ_{H} Lit
1'	3,68 (s, 3H)	3,70 (s, 3H)
2	2,64 (dd, $J=5,6$ e $15,6$ Hz, 1H)	2,65 (dd, $J=5,6$ e $15,6$ Hz, 1H)
	2,40 (m, 1H)	2,44 (m, 1H)
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	1,93 (m, 1H)	1,93 (m, 1H)
8	1,53/2,25 (m, 1H)	1,53/2,25 (m, 1H)
9	5,38 (ddd, $J=10,4$; $10,4$; $5,2$ Hz, 1H)	5,38 (ddd, $J=10,4$; $10,4$; $5,2$ Hz, 1H)
	5,20 (ddd, $J=10,4$; $10,4$; $5,4$ Hz, 1H)	5,20 (ddd, $J=10,4$; $10,4$; $5,4$ Hz, 1H)
10	5,54 (m, 2H)	5,50 (m, 2H)
11	4,59 (m, 2H)	4,67 (m, 2H)
12	1,23 (d, $J=6,4$ Hz, 3H)	1,23 (d, $J=6,4$ Hz, 3H)

3C228_ca jasm 2D.001.esp

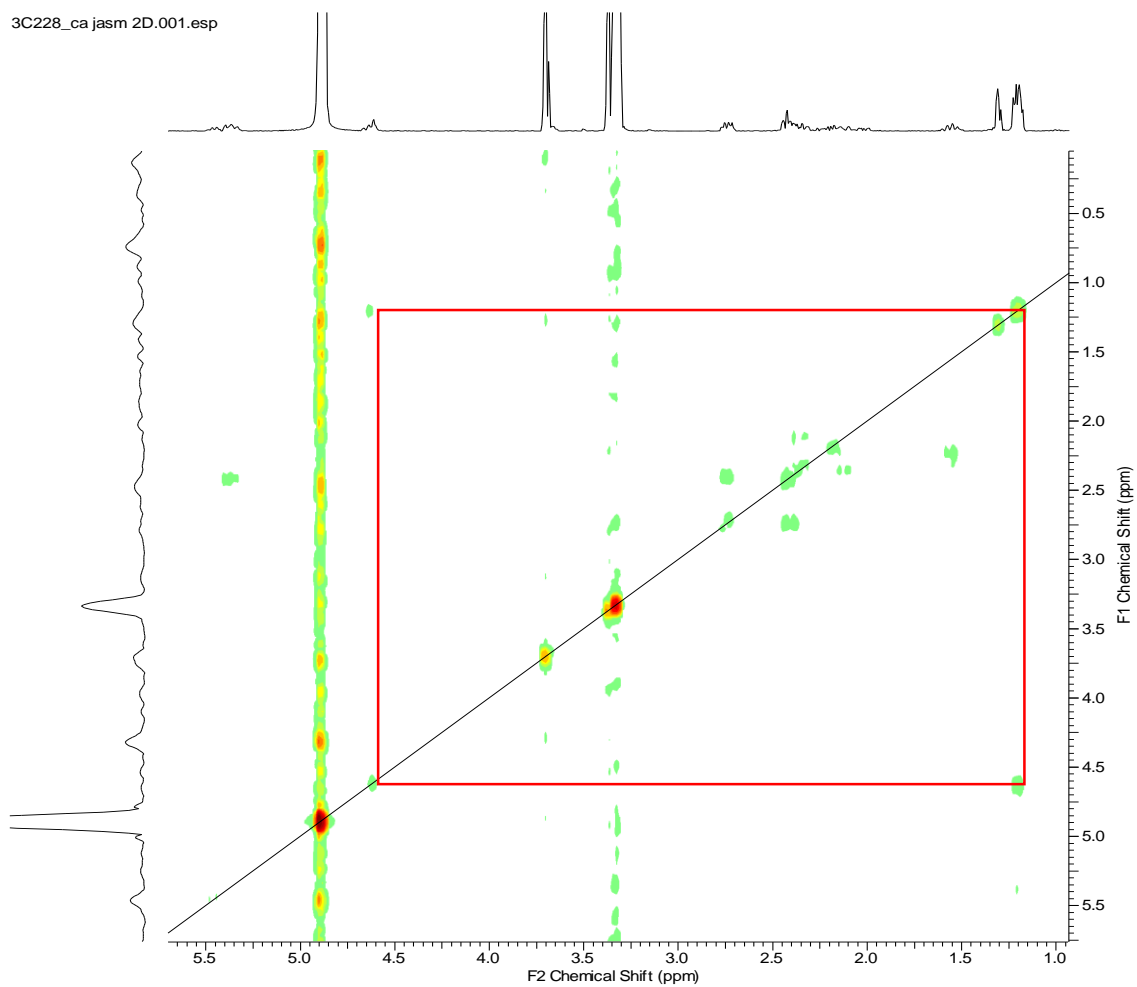


FIGURA 3.17 - Espectro de COSY da substância 18.

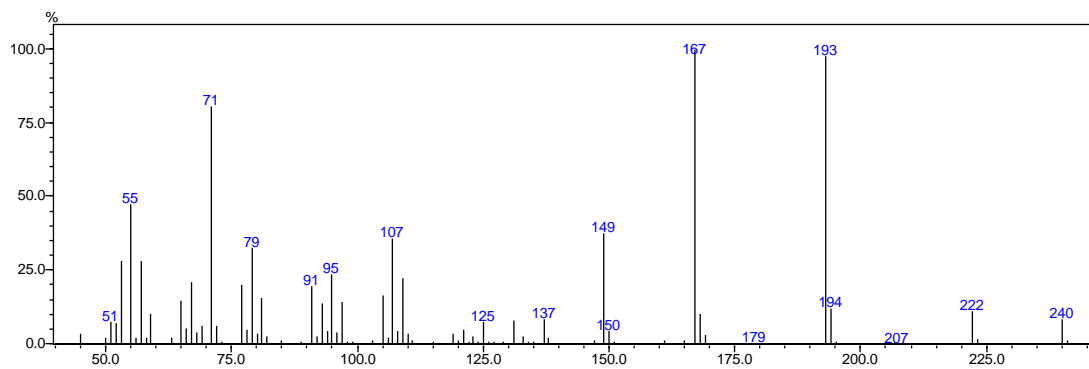
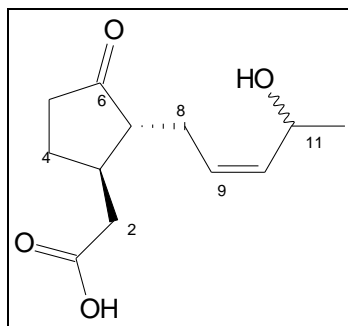


FIGURA 3.18 - Espectro de massas da substância 18.

3.4.2.6 - Substância 19 - Ácido 11-hidroxijasmônico



A substância 19 foi isolada como um óleo do Ext. AcOEt do meio de cultura líquido incorporado com jasmonato de metila. Com as análises dos espectros de RMN ^1H (FIGURA 3.19) pôde-se observar sinais característicos do esqueleto jasmônico. Observou-se um duplete típico de metila em δ 1,23 ($J=6,4$ Hz).

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 3.21) apresentou sinais de carbonos olefínicos além de um sinal de carbono ligado a oxigênio em δ 84,8. O EM não apresentou o pico do íon molecular, mas apresentou o pico [M-18] indicando a perda de água (FIGURA 3.20).

Os dados espectroscópicos apresentados de RMN ^1H e ^{13}C , EM e a devida comparação com a literatura (SILVA, 2007), evidenciaram a substância 19 como sendo o ácido 11-hidroxijasmônico (TABELA 3.5).

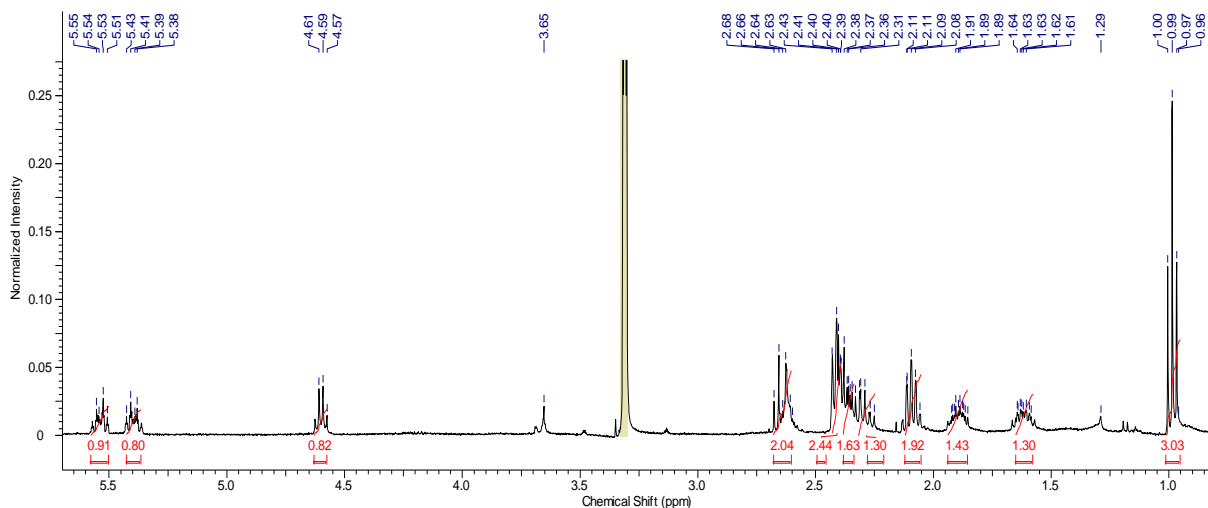


FIGURA 3.19 - Espectro de RMN ^1H da substância 19 (MeOD, 400 MHz).

TABELA 3.5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD, 400 e 100 MHz) da substância 19 em comparação com os dados da literatura (SILVA, 2007; CDCl_3).

C	δ_{H}	δ_{H} Lit	δ_{C}	δ_{C} Lit
1			179,4	176,9
2a	2,64 (<i>dd</i> , $J=5,6$ e $15,6$ Hz,	2,65 (<i>dd</i> , $J=5,6$ e $15,6$	39,6	39,2
2b	1H) 2,40 (<i>m</i> , 1H)	Hz, 1H) 2,44 (<i>m</i> , 1H)		
3	-	-	34,9	38,2
4	-	-	25,1	27,5
5	-	-	29,0	37,9
6	-	-	219,1	219,1
7	1,93 (<i>m</i> , 1H)	1,93 (<i>m</i> , 1H)	54,7	54,7
8	1,53/2,25 (<i>m</i> , 1H)	1,53/2,25 (<i>m</i> , 1H)	21,8	26,0
9	5,38 (<i>ddd</i> , $J=10,4$; $10,4$; 5,2 Hz, 1H)	5,38 (<i>ddd</i> , $J=10,4$; $10,4$; 5,2 Hz, 1H)	124,4	127,3
	5,20 (<i>ddd</i> , $J=10,4$; $10,4$; 5,4 Hz, 1H)	5,20 (<i>ddd</i> , $J=10,4$; $10,4$; 5,4 Hz, 1H)		
10	5,54 (<i>m</i> , 2H)	5,50 (<i>m</i> , 2H)	135,6	135,7
11	4,59 (<i>m</i> , 2H)	4,67 (<i>m</i> , 2H)	84,8	63,4
12	1,23 (<i>d</i> , $J=6,4$ Hz, 3H)	1,23 (<i>d</i> , $J=6,4$ Hz, 3H)	14,5	22,7

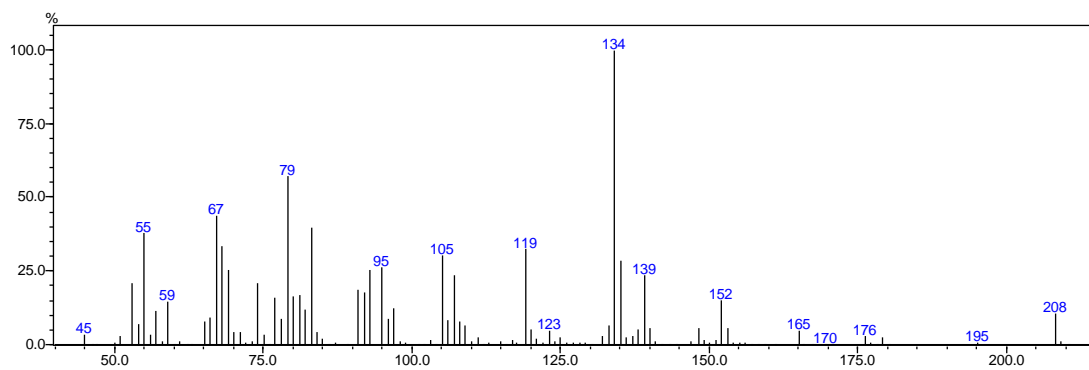


FIGURA 3.20 - Espectro de massas da substância 19.

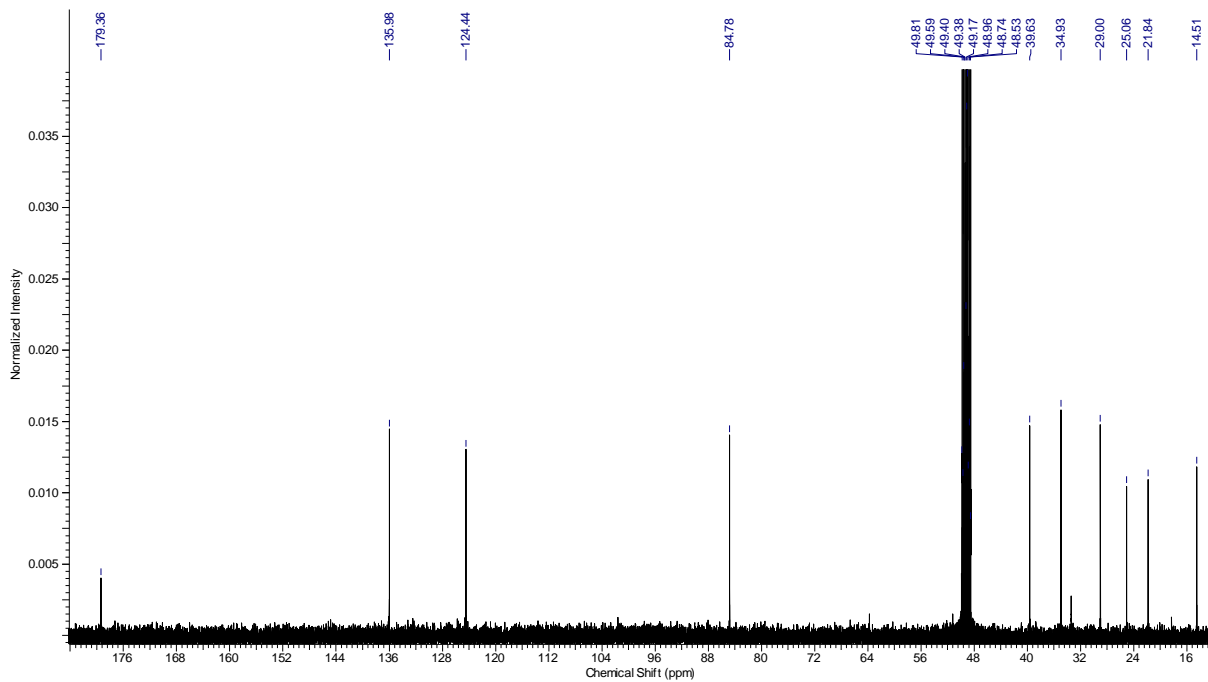


FIGURA 3.21 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 19 (MeOD, 100 MHz).

3.4.3 - Resultados obtidos após o uso de moduladores epigenéticos

Dos moduladores epigenéticos utilizados, o butirato de sódio teve uma melhor resposta com relação a todos os outros utilizados, sendo escolhido para cultivo do fungo em larga escala. Os genes que codificam para o DMAT em espécies do gênero *Colletotrichum* evidenciam a produção de alcaloides indólicos derivados do triptofano. Em estudos químicos realizados anteriormente com o fungo *C. acutatum*, não foi observada a produção destes compostos.

Com a utilização de um modulador epigenético que inibe a deacetilação nas histonas, pôde-se observar a produção destes alcaloides. O fato do modulador inibir a reação de deacetilação nas histonas provavelmente faz com que ocorra uma hiperacetilação, transformando a histona em uma amida, neutralizando a carga carregada positivamente.

Com isso, não haverá uma atração eletrostática por parte da histona com os grupos fosfato do DNA carregados positivamente acarretando na desmodelagem na cromatina. Assim, alguns genes ficam inativos já que não participam da divisão celular. Acredita-se que o silenciamento de alguns genes fez com que houvesse uma produção demasiada do furanoide 2,5-dihidroximetilfurano além da produção de alguns compostos indólicos. A diferença na produção destes compostos foi visualizada por CCD em fase normal (sílica gel) com hexano e acetato de etila como eluentes (80% AceOEt) (FIGURA 3.22).

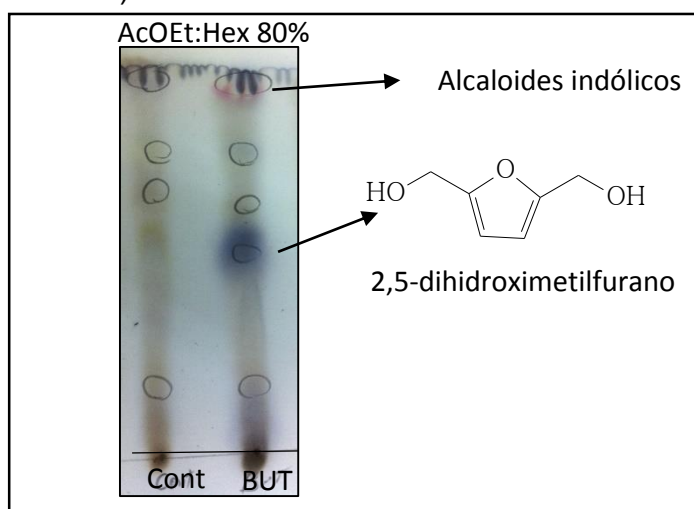
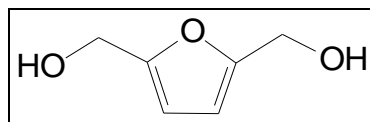


FIGURA 3.22 - CCD do Ext. AcOEt do meio de cultura com butirato de sódio.

3.4.3.1 - Substância 20 - 2,5-dihidroximetilfurano



A substância 20 foi isolada como um óleo esverdeado do Ext. AcOEt do meio de cultivo líquido incorporado com butirato de sódio. No espectro de RMN ^1H (FIGURA 3.23) pôde-se observar apenas dois singletos em δ 4,49 (s, 4H) e 6,24 (s, 2H), evidenciando ser uma molécula com estrutura simples e podendo ter simetria.

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 3.25) apresentou sinais em δ 56,0 de carbono ligado a oxigênio, além de sinais de carbonos com hibridização sp^2 em δ 154,3 e 107,7.

O espectro de massas (FIGURA 3.24) apresentou o pico do íon molecular em m/z 128, além de um pico intenso em m/z 97.

A análise dos dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C e EM, além da comparação com os dados obtidos na literatura (MANCILLA et al., 2009) evidenciaram que a substância 20 tratava-se de um composto simples, simétrico e com um anel furânico. O furanoide em questão foi identificado como o 2,5-dihidroximetilfurano (TABELA 3.6).

TABELA 3.6 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD, 400 e 100 MHz) da substância 20 em comparação com os dados da literatura (MANCILLA et al., 2009; CDCl_3).

C	δ_{H}	$\delta_{\text{H Lit}}$	δ_{C}	$\delta_{\text{C Lit}}$
1	4,49 (s, 4H)	4,58 (s, 4H)	56,0	57,4
2	-	-	154,3	152,0
3	6,24 (s, 2H)	6,23 (s, 2H)	107,7	109,7

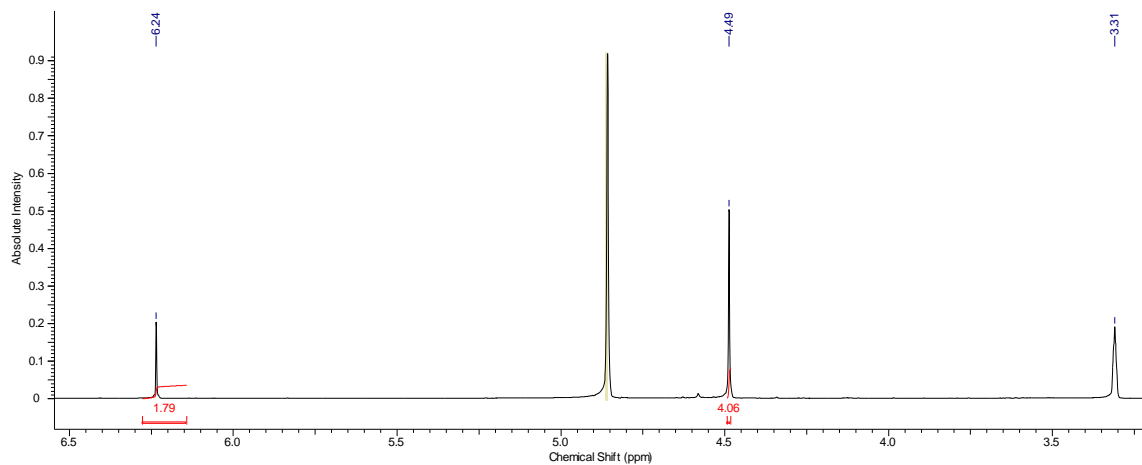


FIGURA 3.23 - Espectro de RMN ^1H da substância 20 (MeOD, 400 MHz).

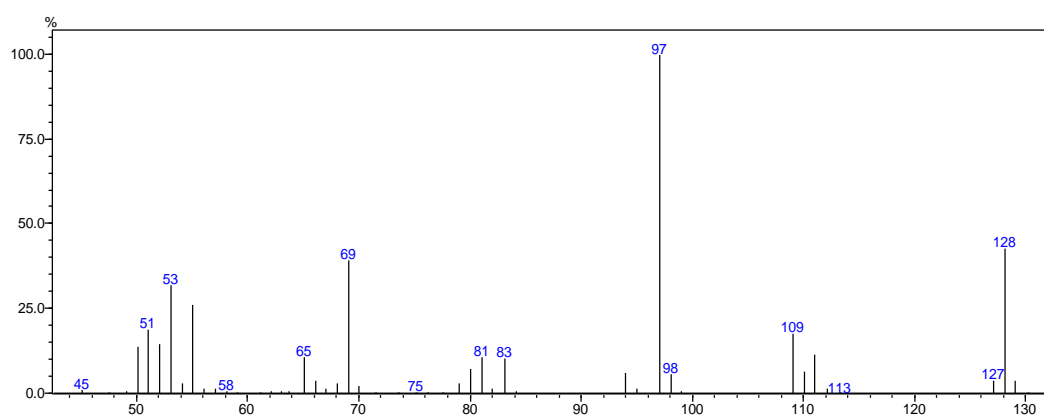


FIGURA 3.24 - Espectro de massas da substância 20.

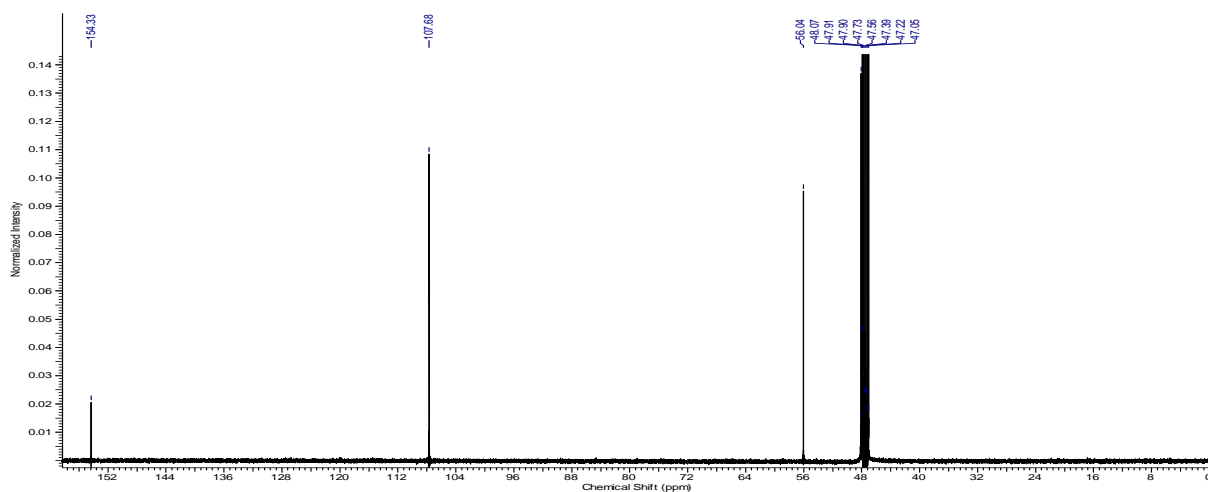
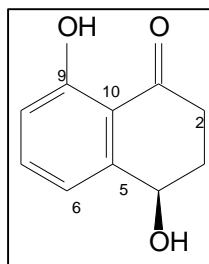


FIGURA 3.25 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 20 (MeOD, 100 MHz).

3.4.3.2 - Substância 21 - (-)-isosclerona



A substância 21 foi isolada como um óleo amarelo do ext. AcOEt do meio cultivo líquido do fungo na presença de butirato de sódio. Nos espectros de RMN ^1H (FIGURA 3.26; 3.27; 3.28) observaram-se sinais em δ 6,93; 7,04 e 7,51, cujas constantes de acoplamento evidenciaram 3 substituições no anel aromático nas posições C-8, C-9 e C-10. Ainda observou-se um singlete em δ 12,40 de um hidrogênio fenólico. Observou-se também um sinal em δ 4,94 o que indicou a presença de outra hidroxila na molécula. O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 3.29) apresentou um sinal em δ 204,2 referente a presença da carbonila. Além disso, há um sinal em δ 67,6 referente a carbono ligado a oxigênio confirmando a presença de uma hidroxila.

Os dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C e comparação com os dados obtidos na literatura (MANCILLA et al., 2009) auxiliaram na identificação da substância 21. A partir destes dados pôde-se concluir que se tratava de um metabolito secundário já isolado em espécies do gênero *Colletotrichum*, a (-)-isosclerona (TABELA 3.7).

TABELA 3.7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 400 e 100 MHz) da substância 21 em comparação com os dados da literatura (MANCILLA et al., 2009; CDCl_3).

C	δ_{H}	δ_{H} (Lit)	δ_{C}	δ_{C} (Lit)
1	-	-	204,2	204,2
2a	2,65 (<i>ddd</i> , $J=4,7$; 8,3; 17,9 Hz; 1H)	2,64 (<i>ddd</i> , $J=4,7$; 8,3; 17,9 Hz; 1H)	34,6	34,5
2b	3,00 (<i>ddd</i> , $J=4,7$; 8,3; 17,9 Hz; 1H)	3,00 (<i>ddd</i> , $J=4,7$; 8,3; 17,9 Hz; 1H)		
3a	2,05 (<i>dddd</i> , $J=4,7$; 8,3; 12,8; 18,0 Hz, 1H)	2,18 (<i>dddd</i> , $J=4,7$; 8,3; 12,8; 18,0 Hz, 1H)	31,2	31,2
3b	2,37 (<i>dddd</i> , $J=4,7$; 8,3; 13,6; 18,0, 1H)	2,34 (<i>dddd</i> , $J=4,7$; 8,3; 13,6; 18,0, 1H)		
4	4,94 (<i>m</i> , 1H)	4,91 (<i>m</i> , 1H)	67,7	67,7
5	-	-	117,3	117,3
6	6,93 (<i>d</i> , 1H)	6,92 (<i>d</i> , 1H)	137,0	137,0
7	7,51 (<i>t</i> , 1H)	7,49 (<i>t</i> , 1H)	117,8	117,8
8	7,04 (<i>d</i> , 1H)	7,01 (<i>d</i> , 1H)	-	115,2
9	-	-	162,7	162,8
10	-	-	149,6	145,8

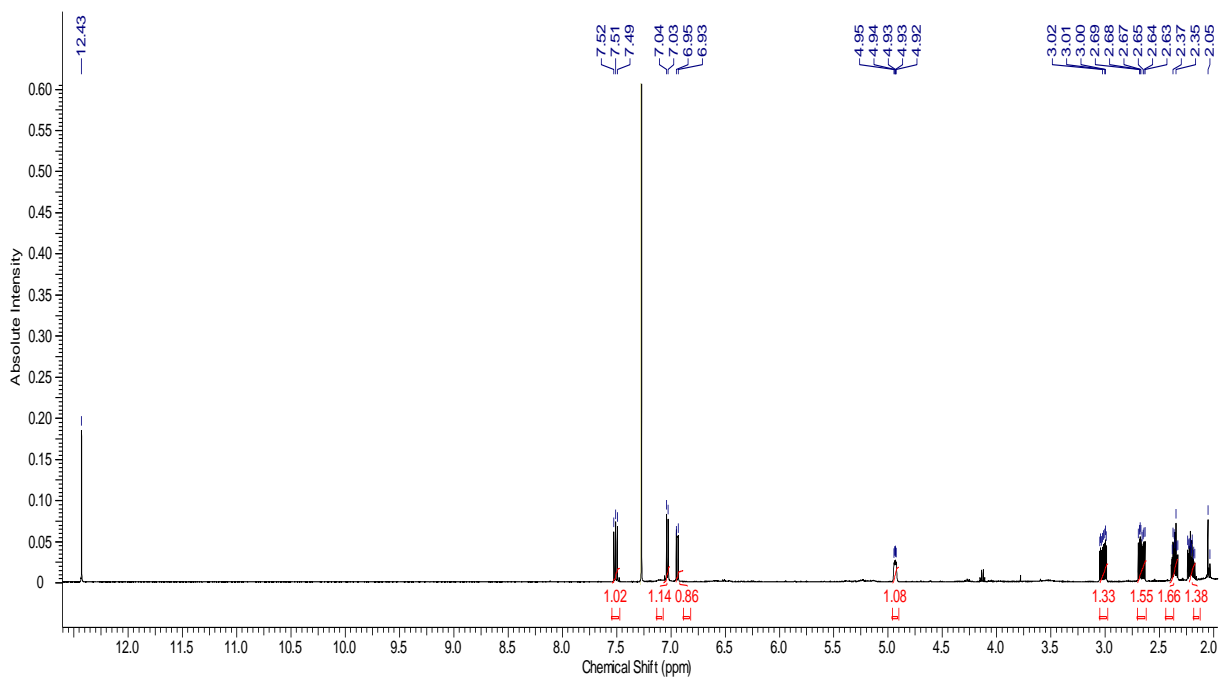


FIGURA 3.26 - Espectro de RMN ^1H da substância 21 (CDCl_3 , 400 MHz).

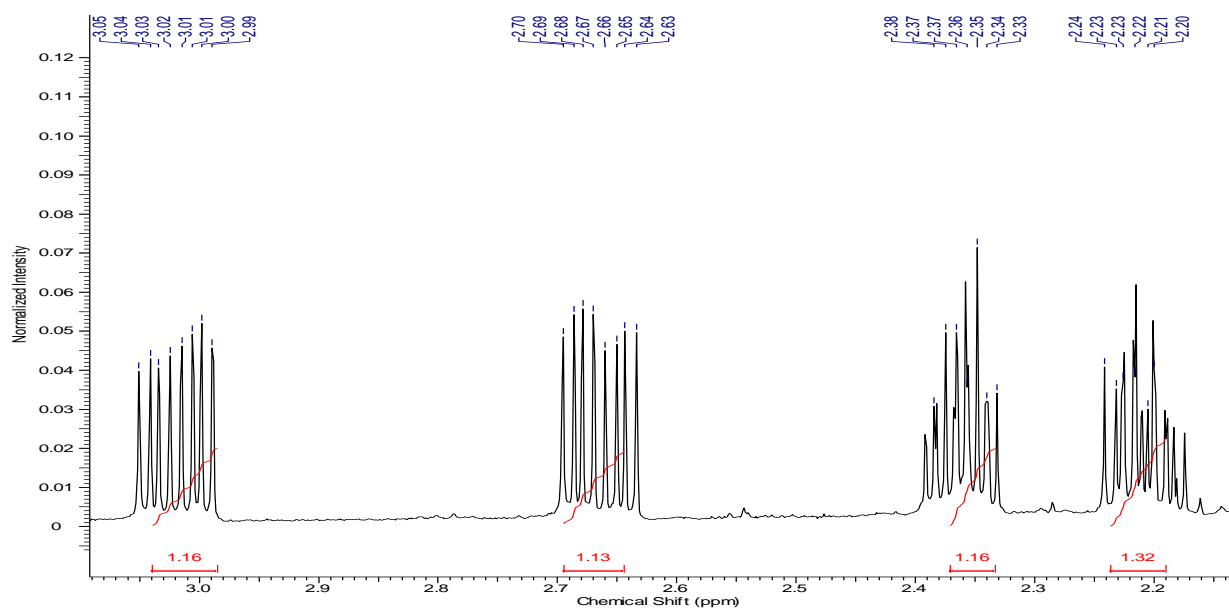


FIGURA 3.27 - Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 21 (CDCl_3 , 400 MHz).

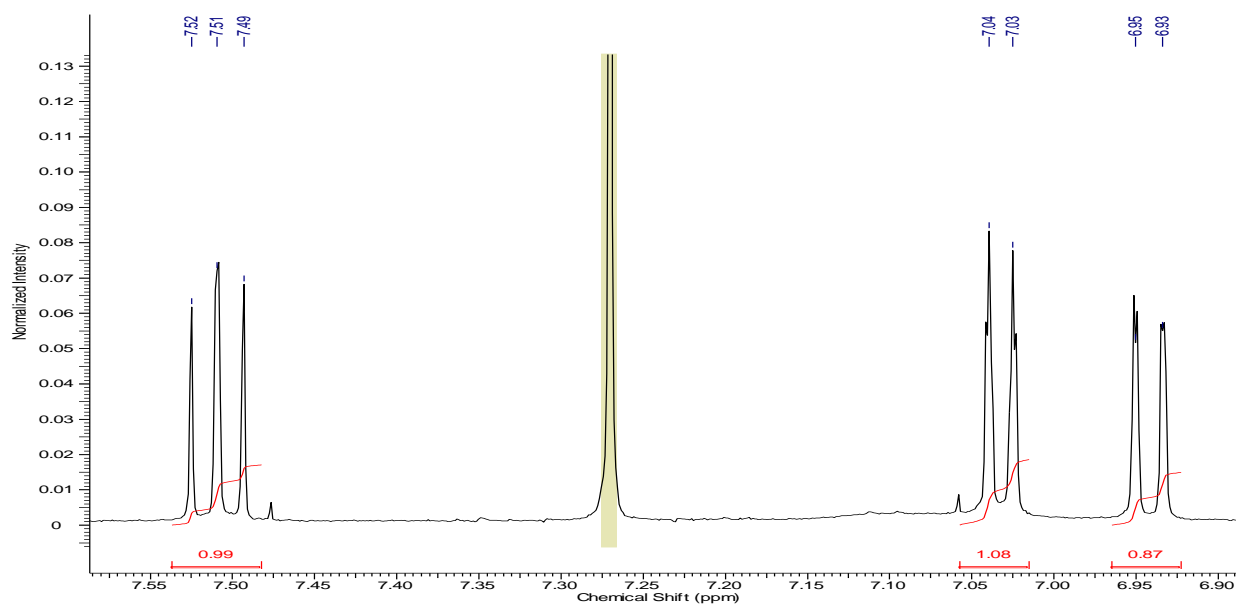


FIGURA 3.28 - Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 21 (CDCl_3 , 400 MHz).

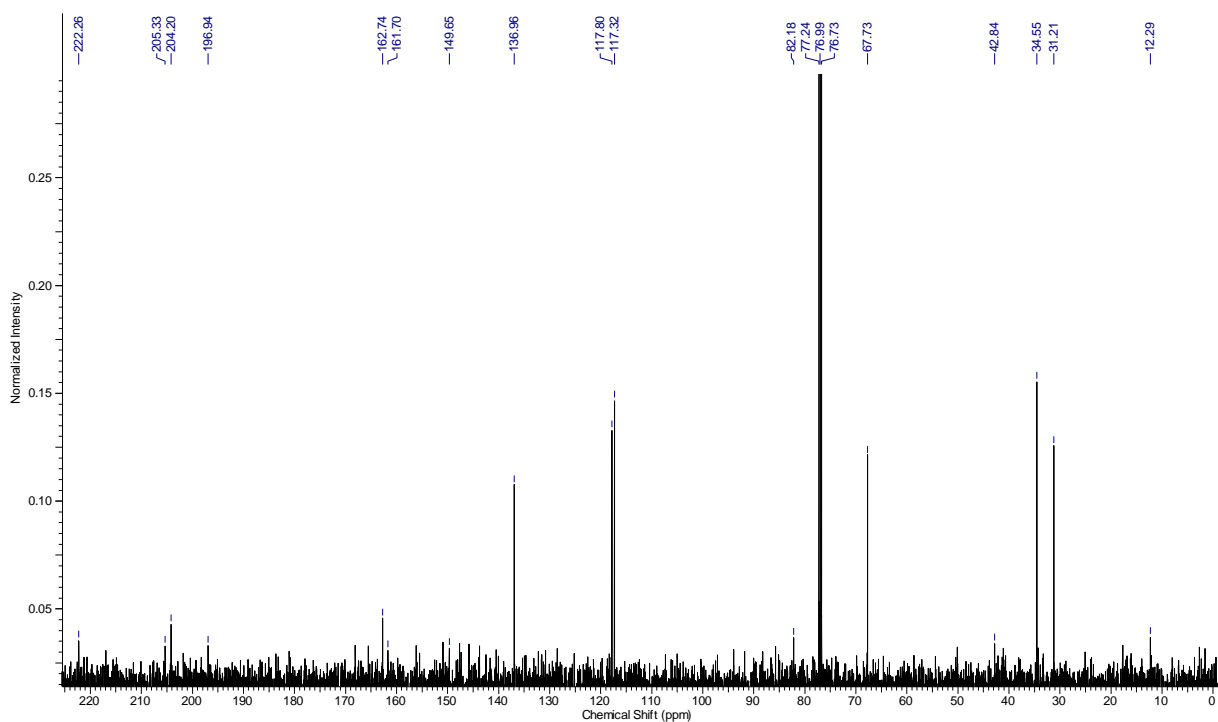
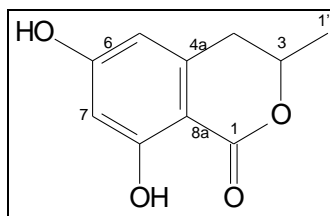


FIGURA 3.29 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 21 (CDCl_3 , 100 MHz).

3.4.3.3 - Substância 22 - 6-hidroximeleina



A substância 22 foi isolada como um sólido branco do Ext. AcOEt do meio de cultura líquido incorporado com o modulador epigenético butirato de sódio. A substância 22 foi purificada por CC e CLAE-UV preparativo e identificada por espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C . O espectro de RMN ^1H (FIGURA 3.31; 3.32) apresentou sinais em δ 4,15 (*m*, 1H) característicos de hidrogênios de carbono ligado ao oxigênio. O sinal em δ 1,26 (*d*, $J=6,0$ Hz, 3H) como um dubleto, refere-se a hidrogênios de metila ligada a um grupo metínico.

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 3.33) apresentou um sinal de carbono com deslocamento químico típico de carbono carbinólico em δ 67,9 sugerindo constituir uma lactona.

Os dados obtidos no espectro de COSY (FIGURA 3.34) apresentaram correlação dos sinais da metila em δ 1,26 ppm com o hidrogênio do carbono ligado ao oxigênio em δ 4,15. Esse hidrogênio em δ 4,15 também apresentou correlação com os hidrogênios em δ 2,59.

Com os dados obtidos de RMN 1D e 2D e devida comparação com aqueles obtidos na literatura (SHIMADA et al., 2002) pôde-se observar a presença de um esqueleto isocumarínico na molécula. Estes tipos de moléculas comumente aparecem em fungos (EDWARDS et al., 1983) (SILVA, 2007), mas a substância 22 não havia sido isolada até o momento em espécies do gênero *Colletotrichum*. A substância acima refere-se a 6-hidroximeleina (TABELA 3.8). Estudos comprovam que algumas isocumarinas, como a meleina, além de serem precursoras para

formação de diversos metabolitos secundários, apresentam atividades antifúngicas, antimicrobiana e inseticida (KOKUBUN et al., 2003) (RUANGRUNGSI et al., 1995).

Essas isocumarinas são policetídeos formados pela PKS sintase que obedecem a rota biossintética do acetato. Estudos realizados por KUROSAKI, KISAWA e NISHI (1989) demonstraram a biossíntese destes compostos utilizando átomos marcados. Nestes estudos foi possível observar o caminho que leva a formação da 6-hidroximeleina, pelo qual envolve uma unidade de acetil CoA e quatro unidades de malonil CoA. Após as primeiras etapas da biossíntese, há a formação de uma molécula com 10 átomos de carbono e a partir dela pode-se chegar ao produto final por dois mecanismos, onde no primeiro ocorrem condensações até a formação do composto contendo uma ligação dupla entre C-3 e C-4, seguidas de uma redução levando ao produto final. Por outro lado, no segundo mecanismo observa-se uma redução da carbonila à hidroxila no C-3 seguido de um ataque desta hidroxila à carbonila do C-1, levando a formação da 6-hidroximeleina (FIGURA 3.30).

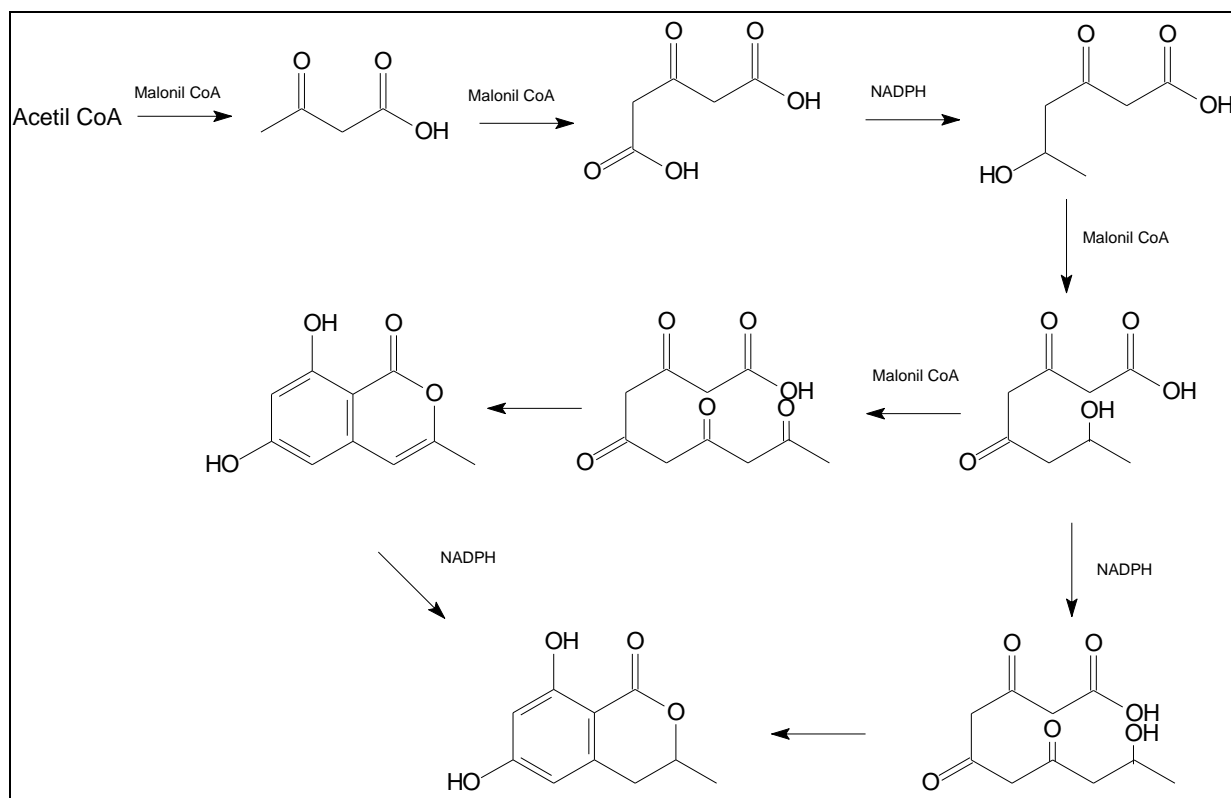


FIGURA 3.30 - Provável caminho biossintético da substância 22.

TABELA 3.8 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (MeOD, 400 e 100 MHz) da substância 22 em comparação com os dados da literatura (SHIMADA et al., 2002; acetona- d_6).

C	δ_{H}	δ_{H} Lit	δ_{C}	δ_{C} Lit
1'	1,26 (<i>d</i> , $J=6,0$ Hz, 3H)	1,51 (<i>d</i> , $J=6,2$ Hz, 3H)	23,5	20,6
1	4,15 (<i>m</i> , 1H)	4,66 (<i>dq</i> , $J=5,5$; 6,2 Hz, 1H)	-	170,5
3	-	-	67,9	76,2
4	2,59 (<i>m</i> , 2H)	2,84 (<i>m</i> , 2H)	43,9	34,9
4a	-	-	137,6	143,0
5	6,37 (<i>s</i> , 1H)	6,31 (<i>s</i> , 1H)	111,6	107,3
6	-	-	156,2	165,1
7	6,31 (<i>s</i> , 1H)	6,20 (<i>s</i> , 1H)	104,0	101,8
8	-	-	149,6	165,0
8a	-	-	103,5	101,5

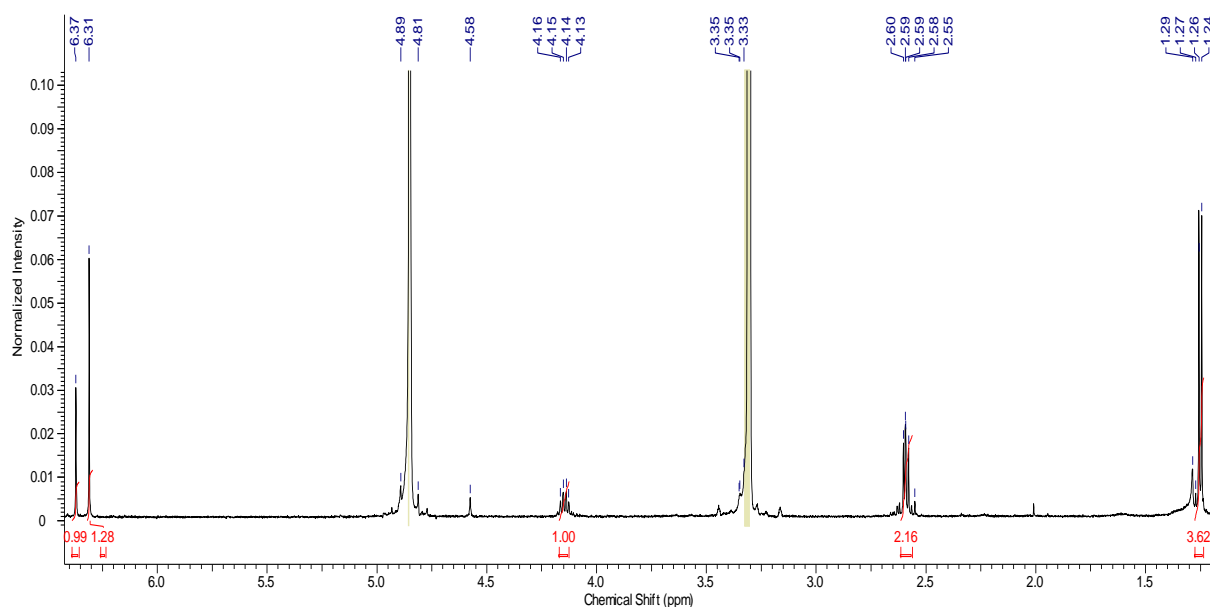


FIGURA 3.31 - Espectro de RMN ^1H da substância 22 (MeOD, 400 MHz).

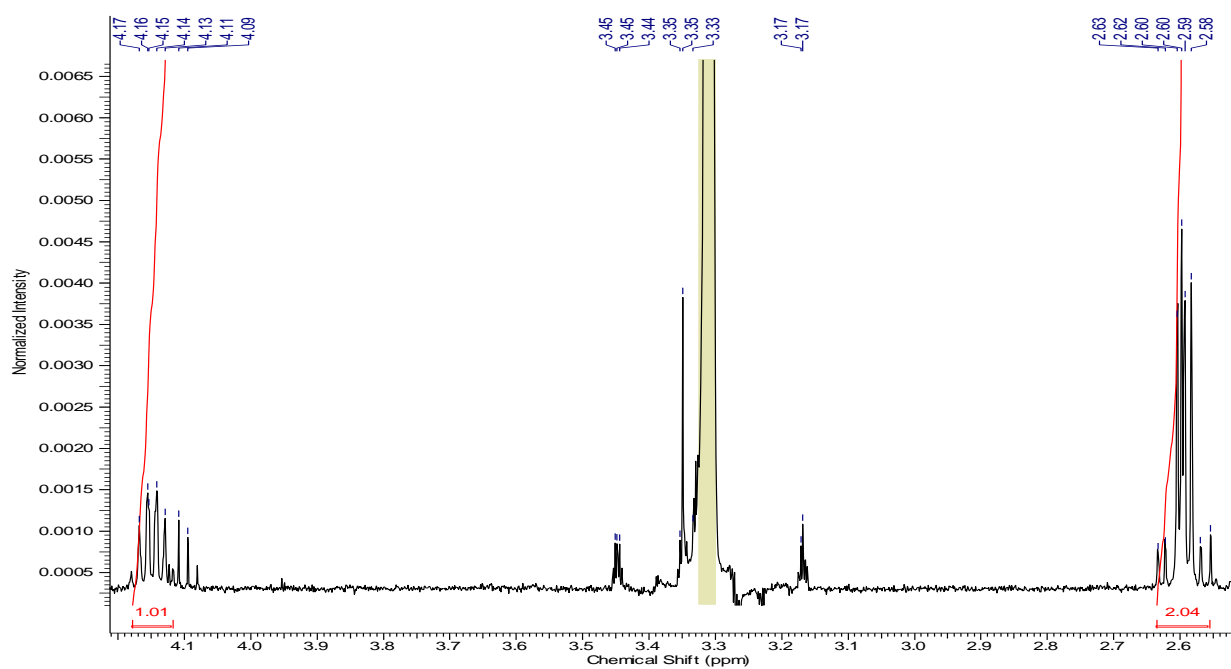


FIGURA 3.32 - Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 22 (MeOD, 400 MHz).

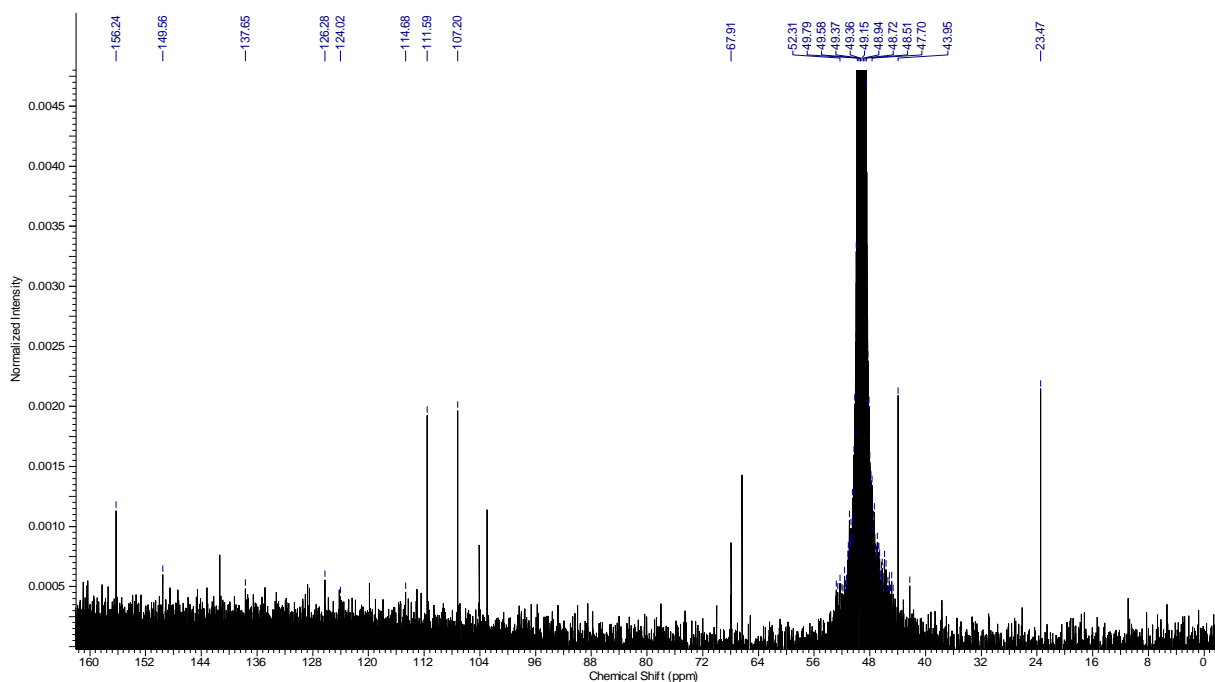


FIGURA 3.33 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 22 (MeOD, 100 MHz).

gCOSY_01.fid.esp

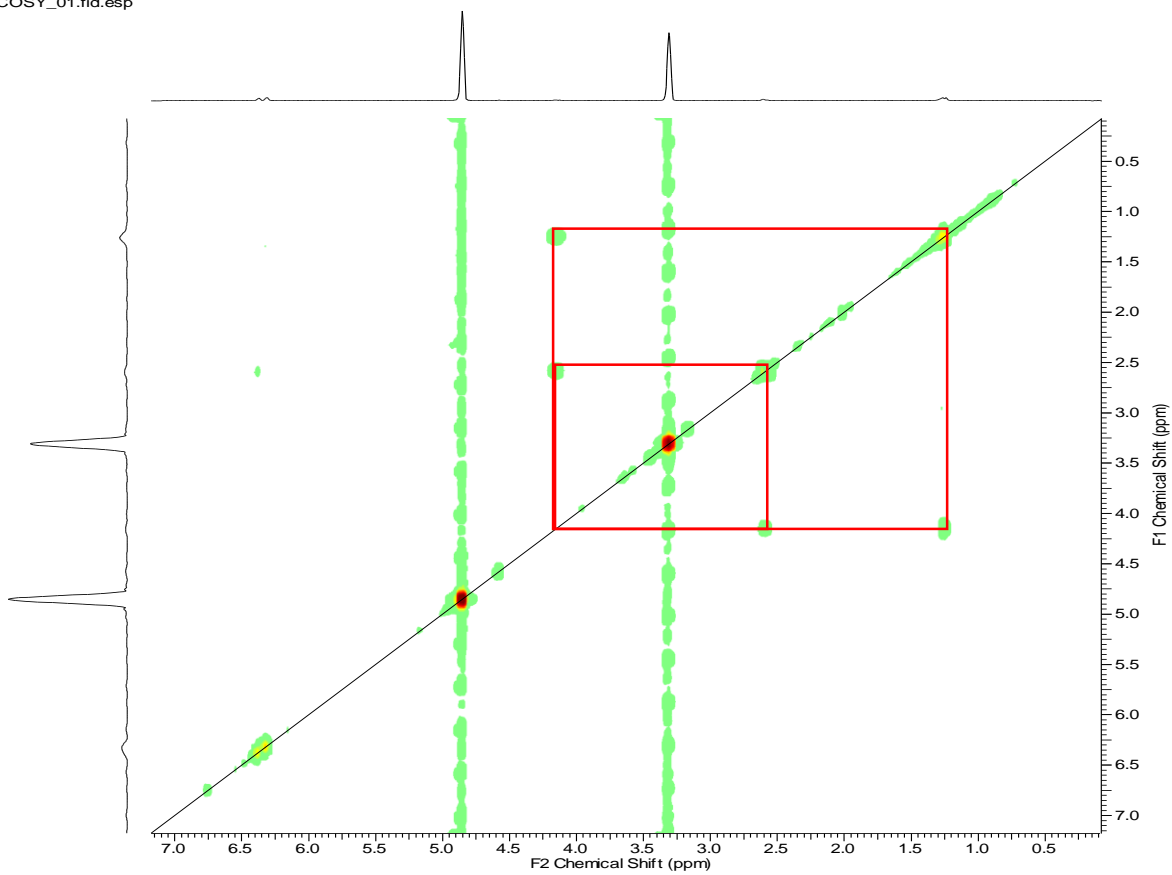
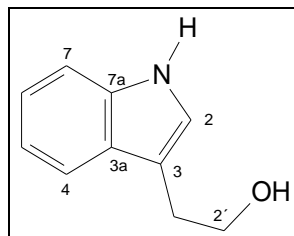


FIGURA 3.34 - Espectro de COSY da substância 22 (MeOD, 400 MHz).

3.4.3.4 - Substância 23 - triptofol



A substância 23 foi isolada como um sólido branco amorfo do Ext. AcOEt do meio de cultura líquido incorporado com o modulador epigenético butirato de sódio. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 3.35) mostrou alguns sinais com deslocamento químico referente a hidrogênios aromático em δ 8,23 (*d*, $J=7,4$ Hz, 1H), 8,16 (*d*, $J=8,1$ Hz, 1H), 7,55 (*t*, $J=8,1$ Hz, 1H), 7,25 (*t*, $J=7,4$ Hz, 1H) e 7,27 (*s*, 1H). O espectro de RMN ^1H também mostrou a presença de um sinal em δ 3,80 (*t*, $J=7,5$ Hz, 2H) referente a hidrogênio metilênico ligado a oxigênio. A presença desses dois tripletos, dois dubletos e um singleto na região de hidrogênios aromáticos, além do sinal referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio, evidencia a presença de um anel indólico monossustituído.

Pelo espectro de massas (FIGURA 3.36) pôde-se observar a presença do íon molecular em m/z 161, um pico em m/z 77 referente a fragmentação de anel aromático, além de um pico intenso em m/z 130 referente a perda de $[-\text{CH}_2\text{OH}]$.

Com base nos dados obtidos pelos espectros de RMN ^1H e espectro de massas e comparação com os dados da literatura (LIU et al., 2006), pôde-se identificar a substância 23 como o alcaloide indólico triptofol (TABELA 3.9).

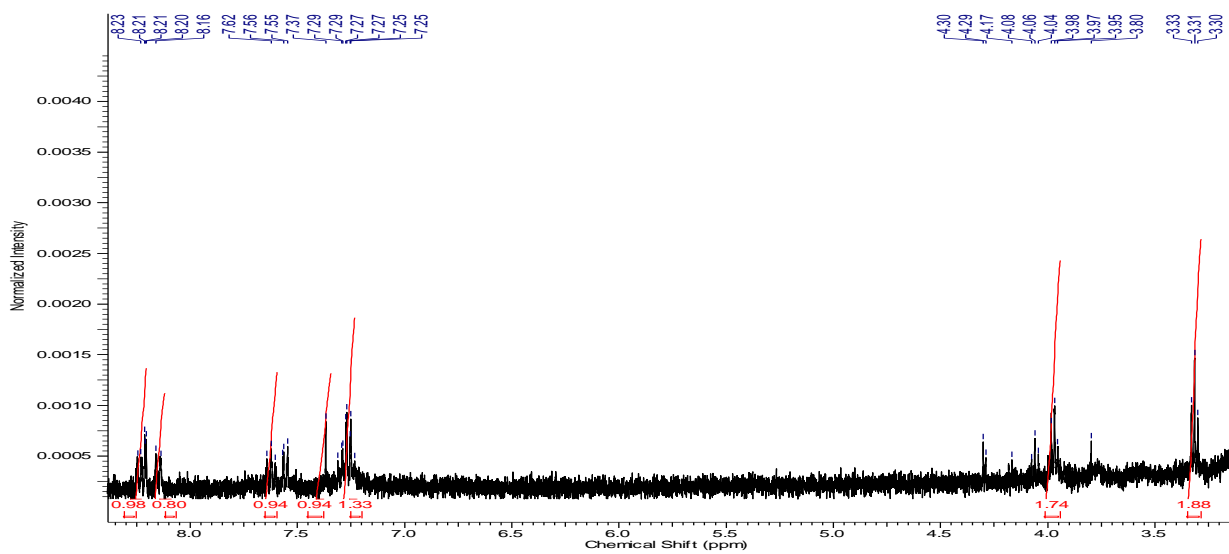


FIGURA 3.35 - Espectro de RMN ^1H da substância 23 ($\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$, 400 MHz).

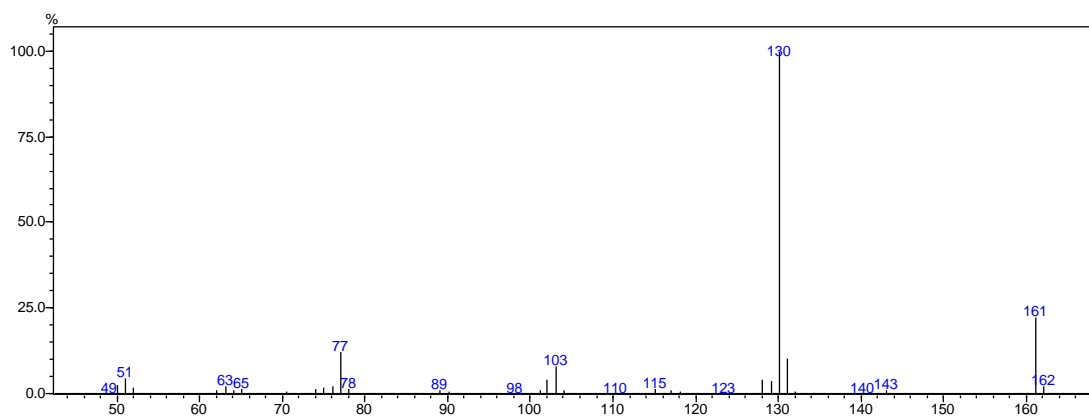
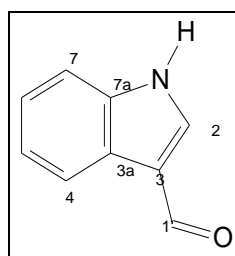


FIGURA 3.36 - Espectro de massas da substância 23.

TABELA 3.9 - Dados de RMN de ^1H ($\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$, 400 MHz) da substância 23 em comparação com os dados da literatura (LIU et al.; 2006; MeOD).

C	δ_{H}	$\delta_{\text{H Lit}}$
1'	3,30 (<i>t</i> , $J=7,3$ Hz, 2H)	2,96 (<i>t</i> , $J=7,5$ Hz, 2H)
2'	3,80 (<i>t</i> , $J=7,3$ Hz, 2H)	3,80 (<i>t</i> , $J=7,5$ Hz, 2H)
2	7,27 (<i>s</i> , 1H)	7,06 (<i>s</i> , 1H)
4	8,23 (<i>d</i> , $J=7,4$ Hz, 1H)	7,54 (<i>d</i> , $J=7,5$ Hz, 1H)
5	7,25 (<i>t</i> , $J=7,4$ Hz, 1H)	7,06 (<i>t</i> , $J=7,5$ Hz, 1H)
6	7,55 (<i>t</i> , $J=8,1$ Hz, 1H)	7,14 (<i>t</i> , $J=8,0$ Hz, 1H)
7	8,16 (<i>d</i> , $J=8,1$ Hz, 1H)	7,29 (<i>d</i> , $J=8,0$ Hz, 1H)

3.4.3.6 - Substância 24 - Indol-3-aldeído



A substância 24 foi isolada como um sólido branco do Ext. AcOEt do meio de cultura líquido na presença de butirato de sódio. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 3.38) mostra sinais característicos de anel indólico monossustituído em δ 8,20 (*d*, $J=8,1$ Hz, 1H), 8,15 (*d*, $J=8,1$ Hz, 1H), 7,54 (*t*, $J=8,1$ Hz, 1H), 7,25 (*t*, $J=7,4$ Hz, 1H) e 7,27 (*s*, 1H). Um sinal em δ 10,0 referente a hidrogênio de aldeído evidencia a presença dessa função no composto.

O EM (FIGURA 3.37) mostrou o pico do íon molecular em m/z 145, além do sinal em m/z 116 referente a perda do carbaldeído.

Os dados apresentados de RMN ^1H e EM e comparados com a literatura (ASHOUR et al., 2007) mostraram que a substância 24 é o alcaloide indol-3-aldeído (TABELA 3.9).

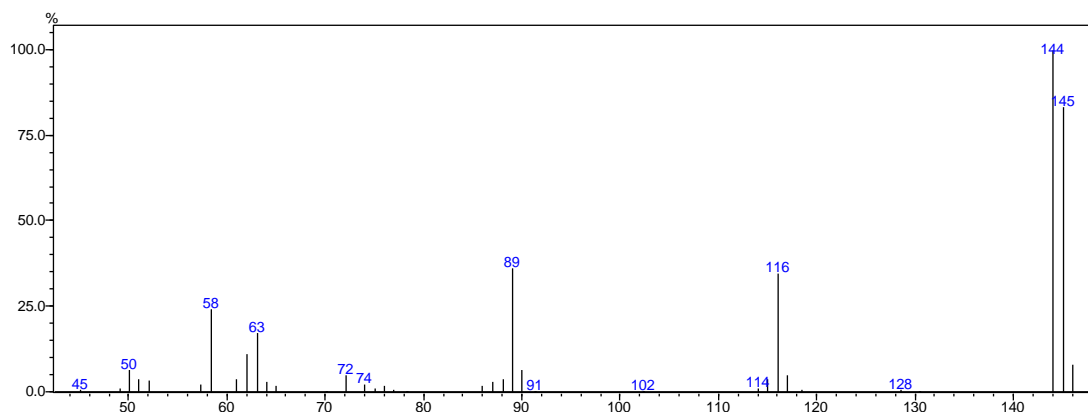


FIGURA 3.37 - Espectro de massas da substância 24.

TABELA 3.11 - Dados de RMN de ^1H ($\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$, 400 MHz) da substância 24 em comparação com os dados da literatura (ASHOUR et al., 2007; MeOD)

C	δ_{H}	δ_{H} Lit
1'	10,0 (s, 1H)	9,95 (s, 1H)
2	7,27 (s, 1H)	7,06 (s, 1H)
4	8,20 (d, $J=7,4$ Hz, 1H)	8,07 (d, $J=7,4$ Hz, 1H)
5	7,25 (t, $J=7,4$ Hz, 1H)	7,10 (t, $J=7,4$ Hz, 1H)
6	7,54 (t, $J=8,1$ Hz, 1H)	7,30 (t, $J=8,0$ Hz, 1H)
7	8,15 (d, $J=8,1$ Hz, 1H)	7,90 (d, $J=8,0$ Hz, 1H)

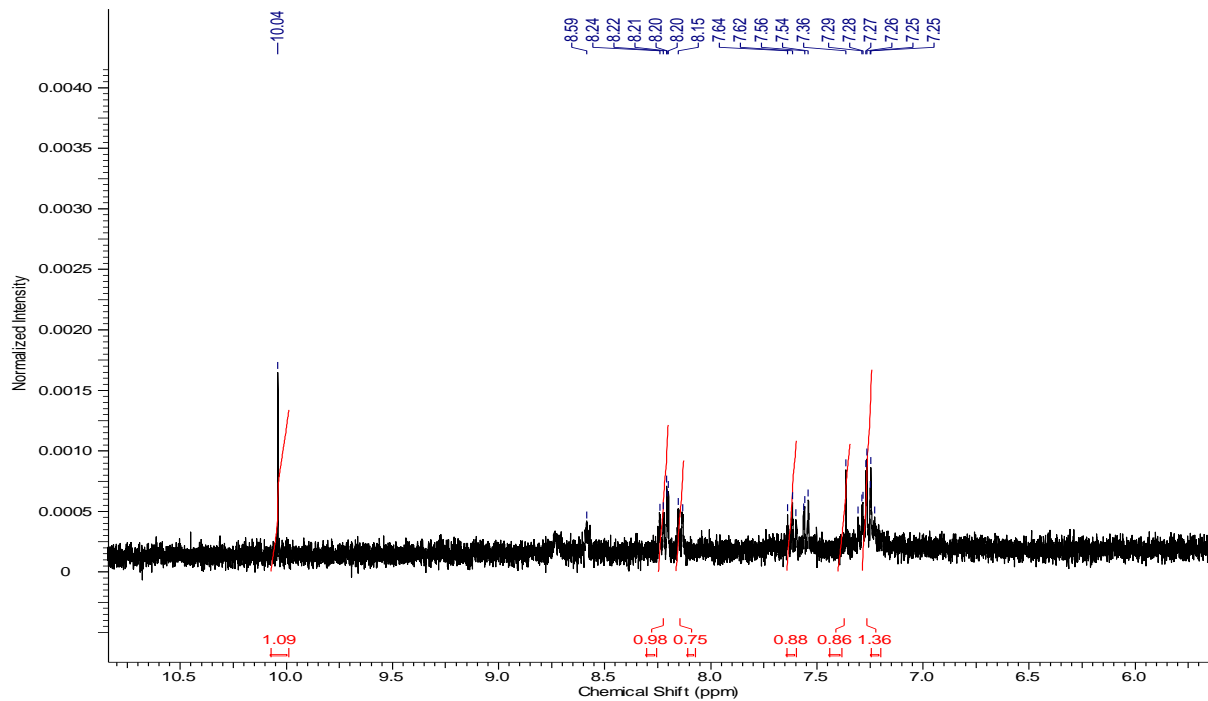
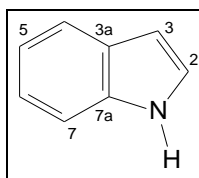


FIGURA 3.38 - Espectro de RMN ^1H da substância 24 ($\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$, 400 MHz).

3.4.3.6 - Substância 25 - Indol



A substância 25 foi isolada como um sólido branco do Ext. AcOEt do meio de cultura líquido incorporado com o modulador epigenético butirato de sódio. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 3.40 e 3.41) apresentou sinais característicos de anel indólico em δ 7,53 (*d*, $J=7,5$ Hz, 1H), 7,21 (*d*, $J=8,1$ Hz, 1H), 7,09 (*t*, $J=7,0$ Hz, 1H), 7,09 ppm (*t*, $J=7,0$ Hz, 1H). Os sinais em δ 6,38 evidenciaram que o anel indólico não possuía substituições. O espectro de massas apresentou o pico do íon molecular em m/z 117 (FIGURA 3.39). Com base nos dados de RMN ^1H e EM e devida comparação com a literatura (QUINTANILLA-LICEA et al., 2006), pôde-se concluir que a substância 25 tratava-se do alcaloide indol.

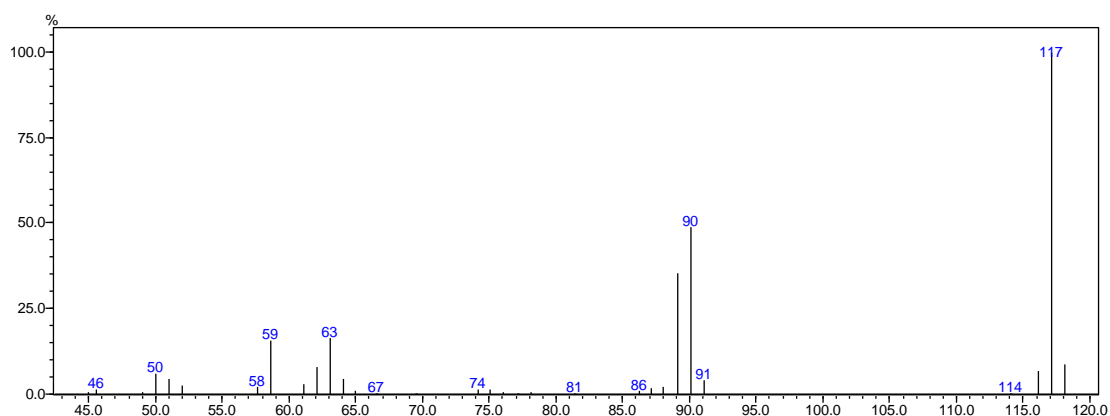


FIGURA 3.39 - Espectro de massas da substância 25.

TABELA 3.11 - Dados de RMN de ^1H (MeOD, 400 MHz) da substância 25 em comparação com os dados da literatura (QUINTANILLA-LICEA et al., 2006; DMSO- d_6).

C	δ_{H}	$\delta_{\text{H Lit}}$
2	7,35 (d, $J=7,5$ Hz, 1H)	7,33 (d, $J=7,4$ Hz, 1H)
3	6,38 (d, $J=3,4$ Hz, 1H)	6,42 (d, $J=2,6$ Hz, 1H)
4	7,53 (d, $J=7,5$ Hz, 1H)	7,53 (d, $J=7,8$ Hz, 1H)
5	6,98 (t, $J=7,0$ Hz, 1H)	6,98 (t, $J=7,4$ Hz, 1H)
6	7,09 (t, $J=7,0$ Hz, 1H)	7,07 (t, $J=7,5$ Hz, 1H)
7	7,21 (d, $J=8,1$ Hz, 1H)	7,39 (d, $J=8,0$ Hz, 1H)

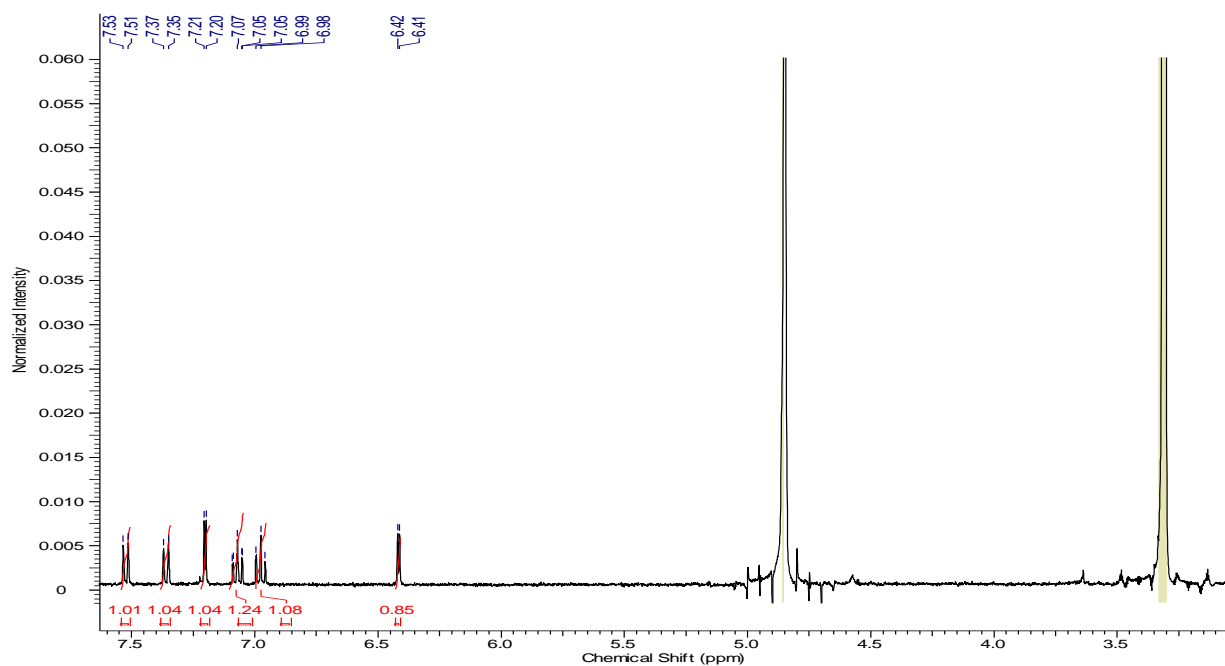


FIGURA 3.40 - Espectro de RMN ^1H da substância 25 (MeOD, 400 MHz).

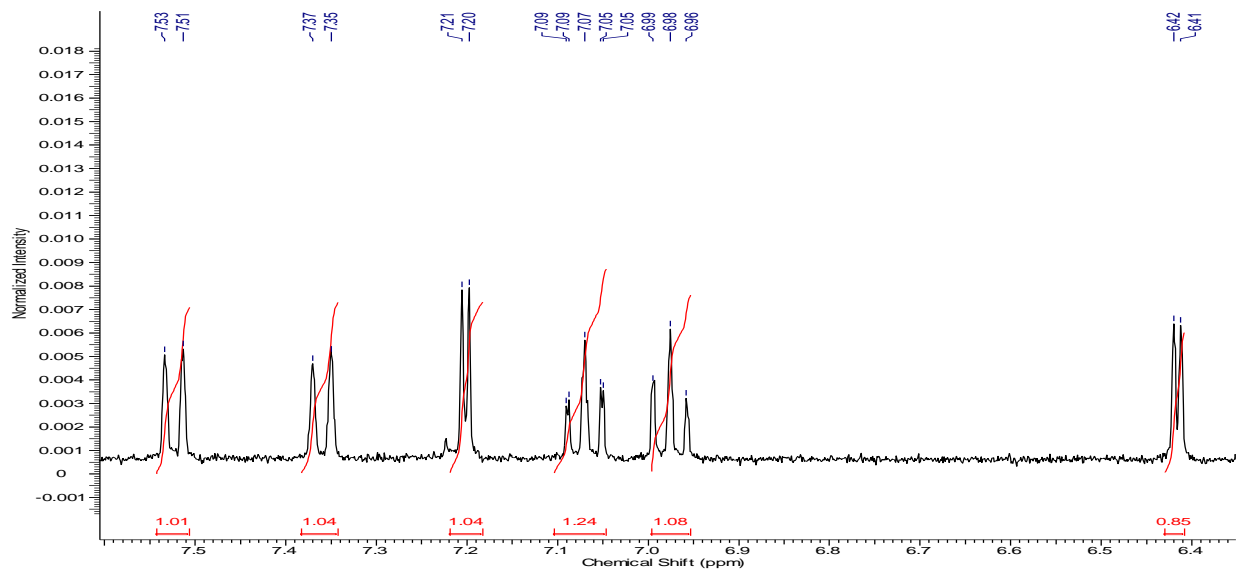


FIGURA 3.41 - Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 25 (MeOD, 400 MHz).

3.4.4 - Resultados obtidos no estudo de cultivos pareados de microrganismos

O fungo *C. acutatum* foi cultivado na presença de outros sete microrganismos, onde o cultivo desses microrganismos e uma ampliação da zona de enfrentamento destes podem ser visualizados nas figuras 3.43 e 3.44. Na FIGURA 3.44 pode-se observar um emaranhado de hifas tocando-se na zona de enfrentamento. As análises por CCD da região de enfrentamento e do controle (FIGURA 3.42) foram avaliadas e pôde-se verificar uma diferença nos cromatogramas para o fungo *C. acutatum* com *Memoniela levispora* e com *Ta Δ Tri5*.

Com o fracionamento do Ext. AcOEt da região de enfrentamento por CC (Hex:AcOEt 80%) pôde-se isolar um metabolito secundário que revelava uma mancha vermelha na placa. Nos dois casos, comparando a região de enfrentamento com o controle, observou-se um aumento na produção desse metabolito, o qual com base em análises espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C e EM, foi identificado como sendo o alcaloide indólico ácido indol-3-acético (IAA).

O IAA é conhecido por ser um hormônio de crescimento produzido por plantas. Essa auxina é responsável pelo alongamento do tecido vegetal, ajudando na divisão celular. Existem alguns relatos de que microrganismos produzem metabolitos comuns em plantas, como o ácido jasmônico e ácido salicílico (KIMATI et al.; 2005). Alguns trabalhos dão ênfase também à produção do IAA por microrganismos no momento da infecção, já que a produção dessa auxina pelo fungo, faz com que a planta acelere seu metabolismo de divisão celular ficando mais susceptível ao ataque. Outra vertente desse caso é que o fungo pode produzir esse hormônio acelerando o crescimento do vegetal, lhe oferecendo mais nutrientes para que ele se desenvolva e colonize o tecido vegetal.

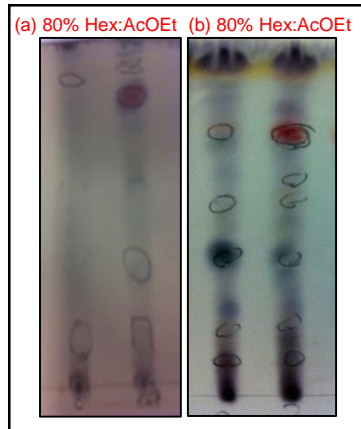


FIGURA 3.42 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD) CD das zonas de contato de *C. acutatum* com (a) *TaΔTri5* e (b) *Memmoniella levispora*

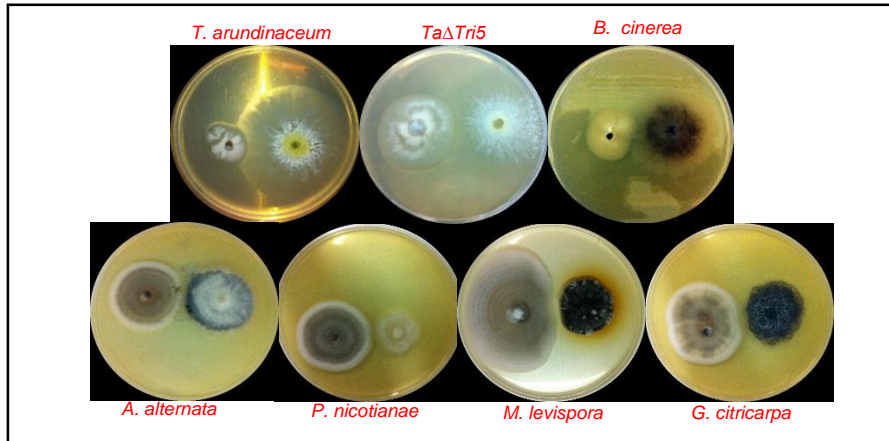
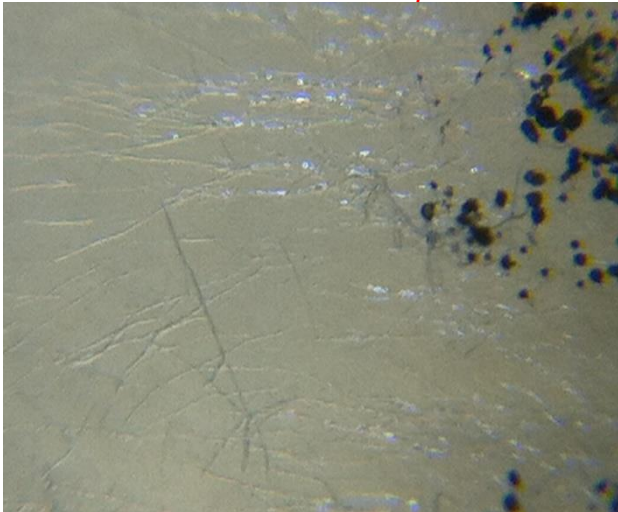


FIGURA 3.43 - Aspecto do crescimento dos fungos em cultivo pareado com *Colletotrichum acutatum*.

C. acutatum x *M. levispora*



C. acutatum x *P. nicotianae*

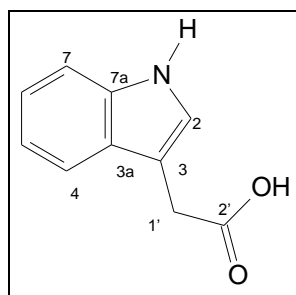


C. acutatum x *A. alternata*



FIGURA 3.44 - Aspecto das hifas nas áreas de contato de *Colletotrichum acutatum* com (a) *Memmonniella levispora*, (b) *Phytophthora nicotianae* e (c) *Alternata alternata*. Foto tirada após 7 dias de cultivo. Aumento de 100x.

3.4.4.1 - Substância 26 - Ácido indol-3-acético



A substância 26 foi isolada como um sólido branco do Ext. AcOEt da região de enfrentamento de *C. acutatum* com *Memoniela levispora* e com *Trichoderma arundinacium*. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 3.45; 3.46) apresentou sinais característicos de hidrogênios de anel aromático em δ 7,54 (*d*, $J=7,5$ Hz, 1H), 7,03 (*t*, $J=7,5$ Hz, 1H), 7,17 (*t*, $J=8,0$ Hz, 1H) e 7,36 (*d*, $J=8,0$ Hz, 1H). As multiplicidades e constantes de acoplamento evidenciaram a presença de um anel indólico monossustituído na molécula. Também foi observado um sinal com deslocamento químico em δ 3,73 (*s*, 2H) integrando para dois hidrogênios, referente aos hidrogênios metilênicos vizinhos a carboxila.

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 3.47) apresentou sinais de carbonos na região de aromáticos em δ 128,7; 119,5; 124,6; 112,2 e 138,0. Além de um sinal em δ 32,0 referente ao carbono metilênico alfa a carboxila. O sinal do carbono da carboxila foi observado em δ 176,6.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos possuíam sinais característicos de um alcaloide indólico, dando evidências de que a substância 26 seria o IAA (TABELA 3.10).

TABELA 3.12 - Dados de RMN de ^1H (MeOD, 400 e 100 MHz) da substância 26.

C	δ_{H}	δ_{C}
1'	3,73 (s, 2H)	32,0
2'	-	176,5
2	7,17 (s, 1H)	124,8
3	-	108,9
3a	-	128,7
4	7,54 (d, $J=7,5$ Hz, 1H)	119,5
5	7,03 (t, $J=7,5$ Hz, 1H)	119,8
6	7,17 (t, $J=8,0$ Hz, 1H)	124,6
7	7,36 (d, $J=8,0$ Hz, 1H)	112,2
7a	-	138,0

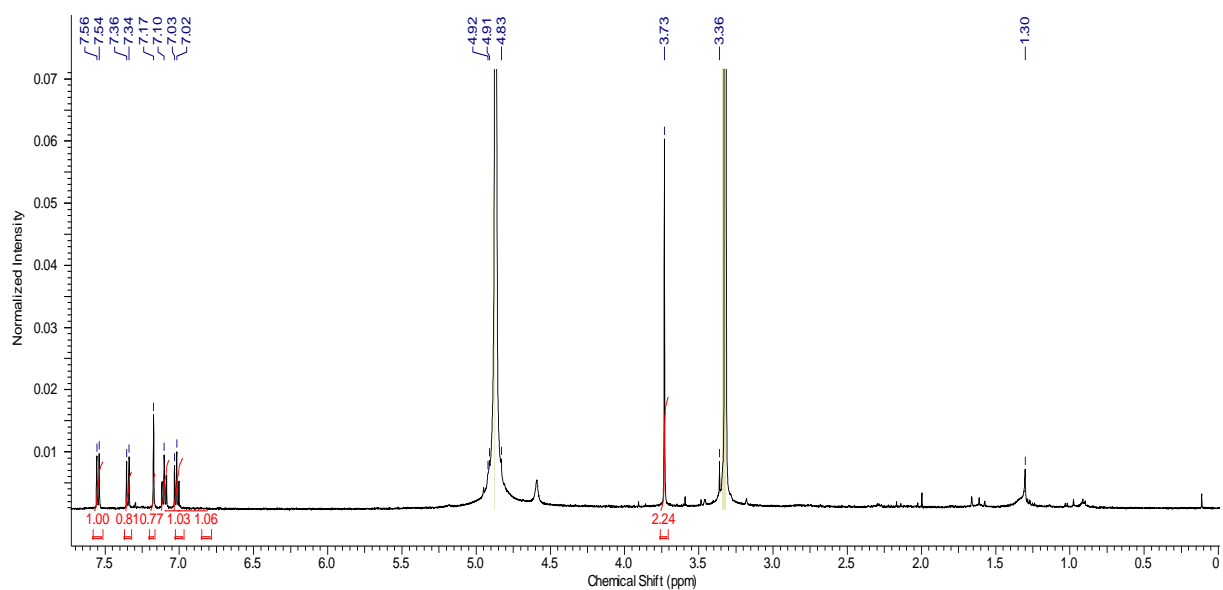


FIGURA 3.45 - Espectro de RMN ^1H da substância 26 (MeOD, 400 MHz).

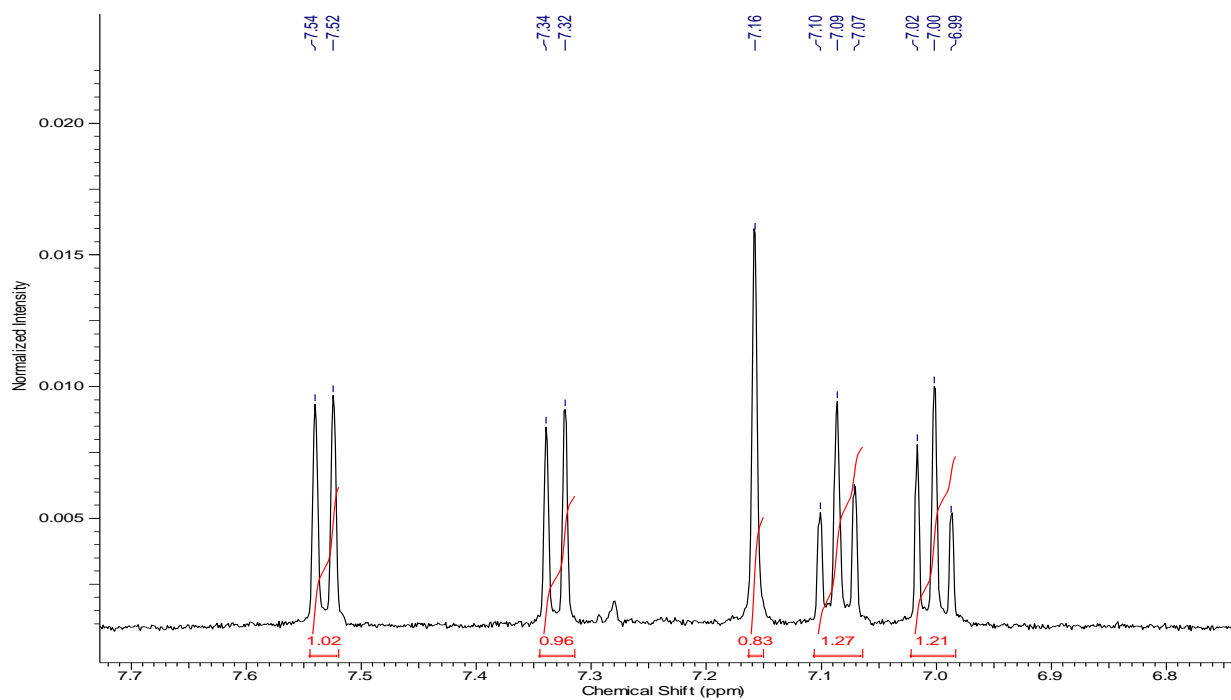


FIGURA 3.46 - Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 26 (MeOD, 400 MHz).

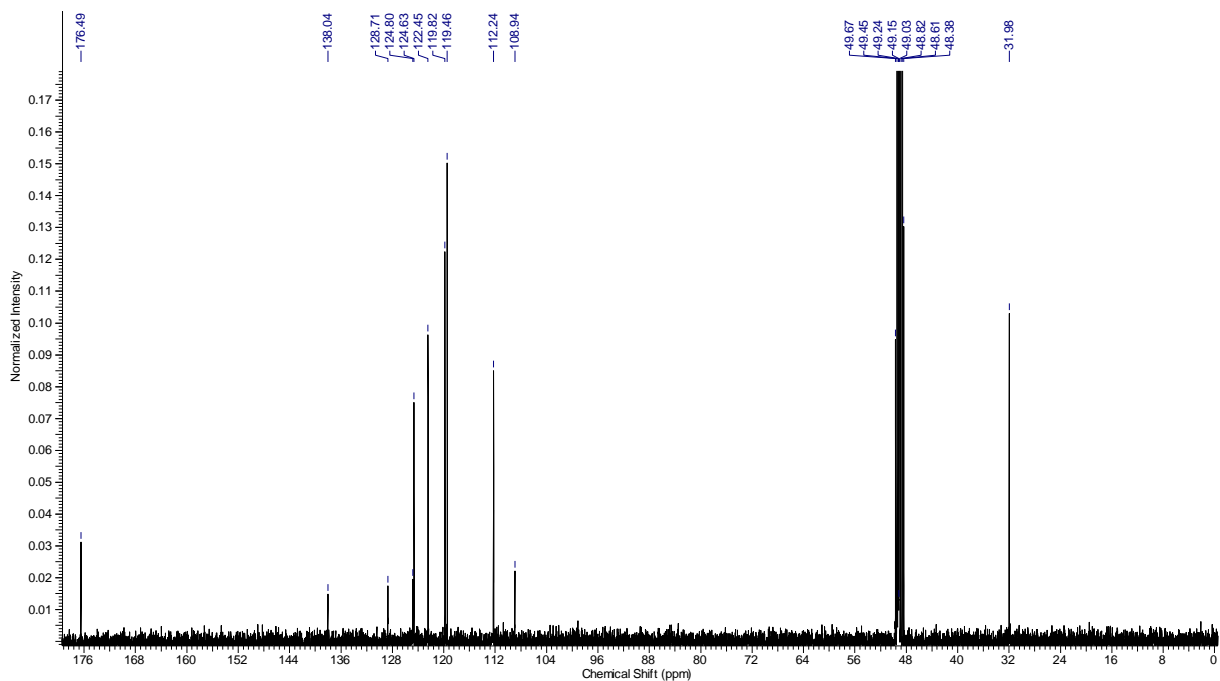


FIGURA 3.47 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 26 (MeOD, 100 MHz).

Outras espécies do gênero *Colletotrichum* também possuem esses alcaloides indólicos provenientes do triptofano. Estudos realizados por LU et al. (2000) mostraram a produção de IAA por *Colletotrichum* sp., um fungo endofítico isolado de *Artemisia annua*. A produção deste metabolito pelo fungo pode ter relação de que esteja, de certa forma, colaborando com a planta para acelerar o seu metabolismo. Já que o IAA é uma auxina produzida por plantas, estes endofíticos produzem este metabolito para que tenham mais nutrientes para sobreviver.

Existem alguns relatos na literatura que espécies de *Colletotrichum* possuem genes que codificam a enzima dimetilalil triptofano sintase (DMATS), responsáveis pela produção destes compostos (GAN et al., 2013).

O triptofano utiliza-se do caminho do chiquimato para realizar sua biossíntese, onde o ácido chiquímico, na forma de ânion chiquimato, é o precursor do triptofano. Sua biossíntese ainda passa por etapas importantes mediadas por enzimas, chegando no ácido antranílico e depois ao indol (FIGURA 3.48).

Uma das rotas metabólicas do triptofano é a sua conversão em compostos indólicos. O ácido indol-3-acético é um produto do metabolismo realizado por microrganismos e por vegetais. Esta conversão ocorre principalmente pela transaminação do triptofano a ácido indol-pirúvico, com subsequente descarboxilação. A desidrogenação do ácido indol-3-acetaldeído formado resulta na produção do ácido indol-3-acético. A rota da triptamina seria outra rota dependente do triptofano para formação do ácido indol-3-acético (FIGURA 3.49) (BARTEL, 1997).

Alguns microrganismos sintetizam reguladores de crescimento de plantas tais como ácido indol-3-acético (AIA) e outros compostos indólicos relacionados. Por outro lado, existem microrganismos capazes de catabolizar o triptofano originando o indol. Como é o caso de bactérias do gênero *Citrobacter*, que degradam o triptofano com a enzima triptofanase, formando o indol (STANIER et al., 1951).

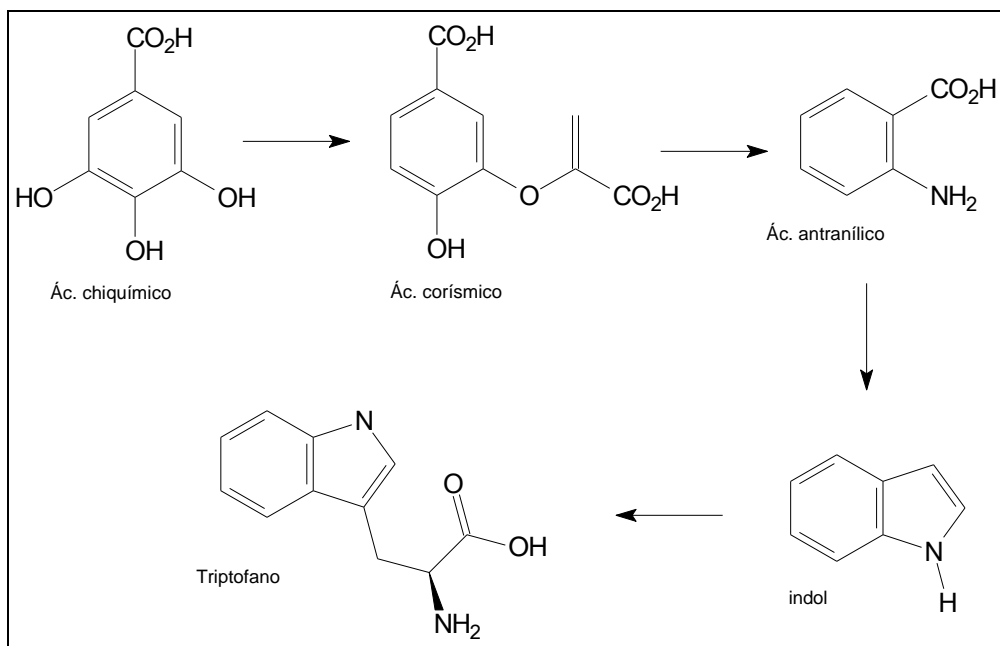


FIGURA 3.48 - Biosíntese do triptofano pelo caminho do chiquimato.

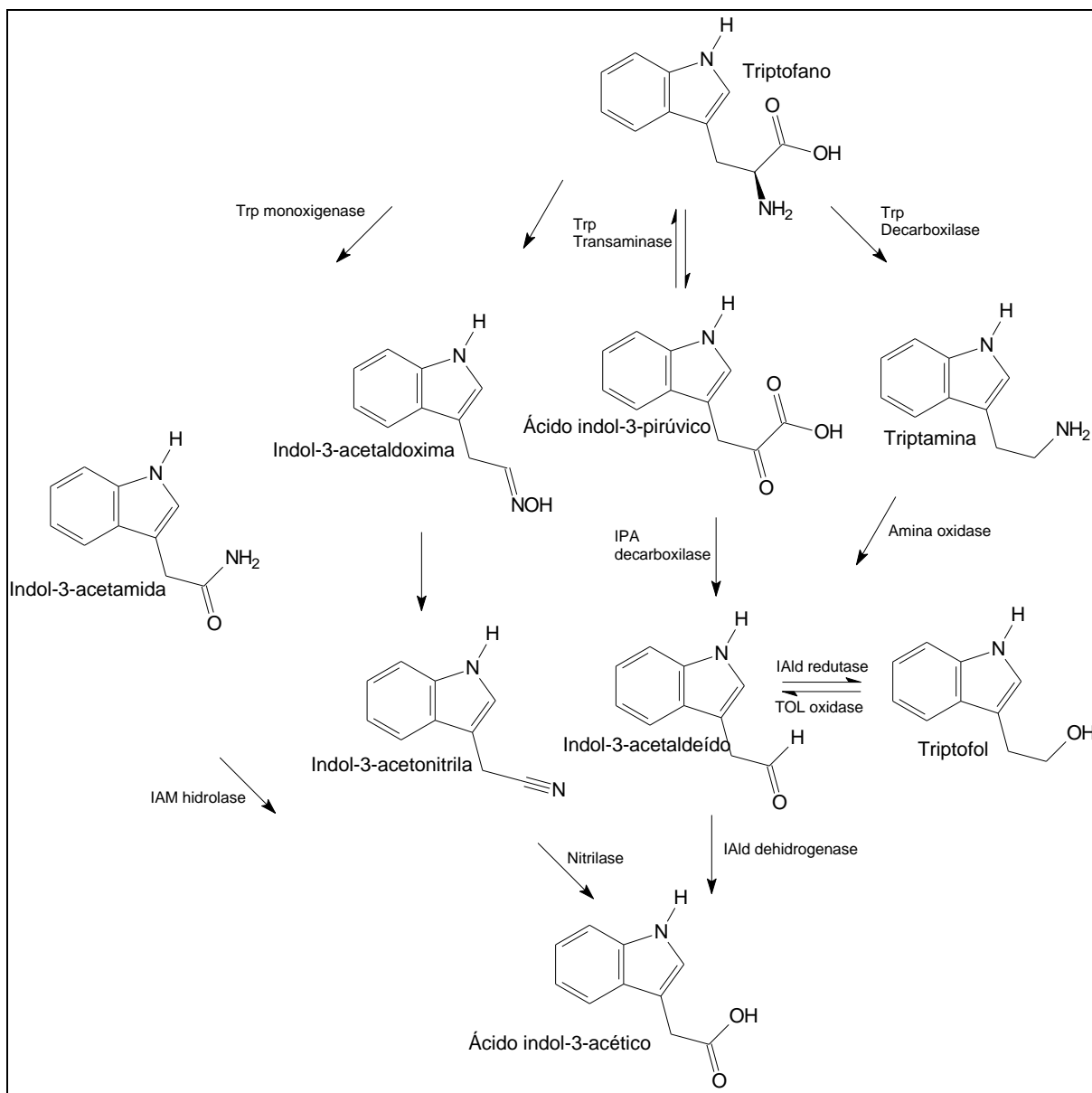


FIGURA 3.49 - Biosíntese de alcaloides indólicos derivados do triptofano (BARTEL, 1997).

3.5 - Conclusões

Os estudos realizados neste capítulo revelaram um grande avanço na química de produtos naturais, valendo-se da utilização de novas estratégias na obtenção de metabolitos secundários do fungo *C. acutatum*, abrindo possibilidades para uma série de diferentes estudos na tentativa de conhecer e explorar o metabolismo deste microrganismo.

As estratégias estabelecidas na busca de novos metabolitos secundários como a utilização de moduladores (epigenéticos e químicos), bem como do cultivo de culturas mistas de microrganismos, mostraram-se eficientes já que foram isolados metabolitos não observados em estudos anteriores, além de metabolitos inéditos no gênero *Colletotrichum*.

Com a utilização da fenilalanina como um precursor biossintético pôde-se observar um comportamento típico de fungos fitopatógenos que degradam moléculas maiores na tentativa de produção de suas toxinas. Neste estudo pôde-se isolar e identificar quatro metabolitos, os quais são provavelmente produtos de degradação deste precursor.

Com o estudo do fungo *C. acutatum* cultivado na presença de jasmonato de metila, pôde-se isolar duas substâncias como produtos de biotransformação provenientes deste substrato, o ácido 11-hidroxijsmônico e o 11-hidroxijsmonato de metila. Nestes estudos observa-se um comportamento típico de fungos fitopatogênicos que hidroxilam moléculas de defesa das plantas (fitoalexinas e fitoanticipinas) transformando-as em moléculas menos tóxicas para eles.

Na tentativa de explorar o metabolismo de *C. acutatum* foram incorporados alguns moduladores epigenéticos no cultivo deste fungo podendo ser uma estratégia para este produzir metabolitos diferentes daqueles observados em condições normais de cultivo. Este capítulo mostra o primeiro relato de estudos epigenéticos com espécies do gênero *Colletotrichum*.

Estes estudos mostraram que há uma modificação epigenética nas histonas quando utiliza-se o modulador inibidor da deacetilase, o butirato de sódio, onde foi possível observar uma maior produção do furanoide 2,5-dihidroximetilfurano.

Com o cultivo em larga escala na presença deste modulador pôde-se isolar e identificar uma nova isocumarina no gênero *Colletotrichum*, a 6-hidroximeleina. Estes estudos também mostraram a capacidade de espécies deste gênero em produzir alcaloides indólicos produzidos por DMATS. Os compostos indólicos triptofol, indol-3-aldeído e indol foram isolados e identificados.

A utilização de culturas mistas de microrganismos mostrou-se eficiente para o entendimento do comportamento de *C. acutatum* na presença de outros microrganismos, podendo ser este, um parâmetro para se avaliar este patógeno em seu habitat natural.

Foram testados sete fungos diferentes cultivados na presença de *C. acutatum*, onde após comparações cromatográficas das regiões de enfrentamento, pôde-se observar o aumento na produção de um composto quando este fungo foi cultivado na presença de *M. levispora* e *TaΔTri5*. Após o cultivo em larga escala destes dois tratamentos pôde-se isolar e identificar este composto que revelava como uma mancha vermelha nas análises por CCD. O composto foi isolado como sendo o alcaloide indolico IAA.

Estudo da interação planta-patógeno e ensaios biológicos

Capítulo 03

4 - Capítulo 03 - Estudo da interação planta-patógeno e ensaios biológicos

4.1 - Considerações Gerais

4.1.1 - Interação planta-patógeno

O ciclo das relações planta-patógeno é constituído por cinco fases: sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução. O desenvolvimento de doenças infecciosas em vegetais é resultado desse conjunto de processos.

Nas flores de citros, a germinação de conídios de *C. acutatum* se inicia após um período de molhamento de 12 a 24 h. A germinação dos conídios e a infecção das pétalas podem ocorrer em 24 a 48 h, havendo a formação de apressórios. Após 4 a 5 dias aparecem as lesões, quando novos conídios são produzidos. O fungo pode colonizar as flores necrotroficamente, enquanto que em folhas, ele pode sobreviver entre várias estações, atuando biotroficamente (FEICHTENBERGER et al., 2005; PERES et al., 2005).

O processo de infecção ou presença de um patógeno ou praga pode induzir a produção de algumas moléculas sinalizadoras pelas plantas que são responsáveis pela ativação do seu sistema de defesa. As fitoalexinas são compostos químicos com propriedades antimicrobianas produzidas pelas plantas após sua infecção por microrganismos para dificultar o crescimento e propagação do patógeno. Por outro lado, as fitoanticipinas são compostos de defesa constitutivos da planta que ocorre sem a ação de agentes agressores. Uma das formas de entender esse mecanismo de defesa em citros seria a inoculação do microrganismo na planta.

Existem alguns trabalhos sobre os componentes voláteis envolvendo as flores de citros, onde os compostos majoritários identificados foram sabineno, linalol e limoneno (JABALPURWALA, SMOOT e ROUSEFF, 2009; VILELA, 2012).

4.1.2 - Extração de componentes voláteis

Existem algumas técnicas para extração de componentes voláteis as quais merecem destaque a hidrodestilação e o *Headspace* (HS). Dentre as técnicas de extração normalmente utilizadas para concentração de analitos, destacam-se a extração líquido-líquido (LLE), a extração em fase sólida (SPE) e a micro extração em fase sólida (SPME). As técnicas que utilizam solventes na extração produzem um elevado volume de resíduos de solvente ao final da extração. Uma das técnicas mais eficientes e viáveis é a SPME já que os riscos ocupacionais são sensivelmente reduzidos e o impacto ambiental minimizado, além da redução dos custos, uma vez que na técnica de SPME não se utiliza solvente e a fibra pode ser reutilizada várias vezes.

Os compostos voláteis são geralmente analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), com uma etapa prévia envolvendo a extração e pré-concentração das frações. A SPME exige apenas uma pequena quantidade de amostra e permite a extração dos voláteis em diferentes matrizes (estado sólido ou líquido) em um curto tempo, de uma forma simples. Por esta razão, a técnica por SPME é comumente utilizada para a extração de compostos voláteis (DELGADO et al., 2010).

A técnica de SPME tem sido usada na extração de componentes voláteis em culturas microbianas, uma vez que, em um curto espaço de tempo, normalmente menos de 30 min, pode-se realizar a extração. Apesar dessas vantagens da SPME, os revestimentos da fibra podem limitar a sensibilidade, preferencialmente absorvendo ou excluindo analitos especiais com base na polaridade ou tamanho. Por exemplo, a fibra de PDMS (polidimetilsiloxano) adsorve preferencialmente metabólitos apolares, enquanto CAR/DVB (Carboxeno/divinilbenzeno) favorece compostos polares de cadeia curta, assim como, a área da superfície da fibra também pode limitar a capacidade de absorção do analito (FARAG et al., 2006).

4.1.3 - Ensaios biológicos

A preocupação dos agricultores tem aumentado cada vez mais com relação ao controle de doenças, já que há uma demanda na produção de resíduos químicos com a utilização de agrotóxicos, além da conscientização sobre o impacto que estes produtos podem causar no meio ambiente. Assim, os produtores têm considerado o uso de métodos alternativos no combate a essas doenças (PUNJA e UTKHEDE, 2003).

No campo da citricultura, a utilização de fungicidas sintéticos não tem apresentado um controle satisfatório de doenças como a Podridão Floral dos Citros (PFC) e a Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA), onde poucos são os produtos registrados para a cultura e seu uso constante resulta no surgimento de formas resistentes do fungo (ALMEIDA, CARMARGO e PANIZZI, 2009).

A dificuldade no controle dessas doenças durante o período de comercialização, a segurança alimentar e o alto custo são fatores limitantes no controle desses fitopatógenos. A literatura tem registrado a eficiência de extratos, obtidos de uma gama enorme de espécies botânicas, em promover a inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos de natureza fúngica (CINTRA, 2009; WILSON et al., 1997; KURITA et al., 1981; ALMEIDA, CAMARGO e PANIZZI, 2009). Esta informação estimula implantar ensaios de avaliação da atividade antifúngica de metabolitos secundários frente à *C. acutatum*, podendo assim colaborar na busca de compostos antifúngicos naturais.

Considerando que muitos dos compostos de fungos são biossintetizados para agirem como antibióticos de defesa, o presente trabalho visa também a busca de potenciais inibidores do desenvolvimento de outros fitopatógenos de citros. Assim, uma alternativa na busca de compostos fungicidas naturais contra a MMA seria realizar testes de atividade antifúngica de compostos isolados de *C. acutatum* contra *A. alternata*.

4.2 - Objetivos

- Analisar a diferença no perfil químico dos componentes voláteis das flores de *C. sinensis* quando infectada com *C. acutatum*;
- Avaliar a concentração relativa de alguns metabolitos voláteis das flores de *C. sinensis* em diferentes estágios de infecção;
- Observar a presença de compostos voláteis do fungo *C. acutatum* nas flores infectadas;
- Avaliar o potencial fungitóxico de compostos isolados de *C. acutatum* frente ao fitopatógeno *A. alternata*;
- Verificar a atividade antifúngica de compostos isolados de vegetais da família Rutaceae e Malvaceae contra o fungo *C. acutatum*;

4.3 - Metodologia

4.3.1 - Inoculação do fungo nas flores

As flores foram obtidas de *C. sinensis* localizadas no Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS (Araraquara-SP), onde em um ramo contendo botões fechados de flores de 5 plantas diferentes foi borrifada uma suspensão de esporos de *C. acutatum* (2×10^5 esporos/mL). As coletas foram realizadas com 2, 4 e 7 dias. Uma planta sem a inoculação do fungo foi utilizada para o controle (FIGURA 4.1). Cinco pétalas de cada planta analisada foram trituradas com N₂ líquido e colocadas em um frasco pequeno de vidro fechado com tampa de plástico até a marca de 0,5 mL.



FIGURA 4.1 - (a) botões de *Citrus sinensis*; (b) flores da laranja sadias e (c) flores da laranja com 7 dias de infectadas.

4.3.2 - Análise dos componentes voláteis por HS-SPME-GC-MS

Para a extração dos voláteis das flores de *C. sinensis* foi utilizada a técnica de microextração em fase sólida (SPME) com a fibra PDMS 65 µm e análise por CG/EM utilizando um cromatógrafo de fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas de baixa resolução Shimadzu GC-MS QP5000, equipado com coluna AT-5ms, L = 30 m, DI = 0,25 mm e filme = 0,25 µm. A fibra foi inserida no *vial* contendo as flores sadias de *C. sinensis* (controle) deixando-a exposta por 30, 45 e 60 min. Após esse período, injetou-se a fibra diretamente no CG/EM. Os índices de retenção foram obtidos injetando uma mistura de C8-C20 de hidrocarbonetos lineares (n-alcenos). A identificação dos compostos foi feita com base nos índices de retenção (VAN DEN DOOL e KRATZ, 1963) e na comparação dos espectros de massas adquiridos com aqueles armazenados no banco de dados do sistema CG/EM (NIST107, NIST21, WILEY8) e com outros da literatura (ADAMS, 2007). A percentagem de cada componente foi determinada pela área do componente dividida pela área total de todos os componentes presentes na mistura.

4.3.3 - Protocolo para ensaio *in vitro* de inibição do crescimento micelial de *C. acutatum* e *A. alternata*

Para avaliação da inibição do crescimento micelial de *C. acutatum* e *A. alternata* frente aos compostos isolados, foi utilizado o método de incorporação em meio de cultivo. O meio sólido de cultivo utilizado foi o BDA e para cada tratamento foi preparada uma solução da substância a ser testada utilizando-se 4 mg desta dissolvida em 300 µL de DMSO para um total de quatro repetições. A incorporação foi realizada diretamente ao meio fundente (± 50 °C), após a autoclavagem. O experimento foi mantido em fluxo laminar, onde a solução da amostra foi incorporada em 40 mL de meio BDA. Para cada tratamento foi realizado um controle positivo, que consistiu em 300 µL de DMSO em 40 mL de meio BDA fundente, para quatro

repetições. Os sistemas foram vertidos em placas de Petri e após a solidificação dos meios, discos de micélio de 5 mm de diâmetro dos fungos (cultivados em BDA) foram transferidos para o centro das placas contendo BDA mais substância incorporada, e BDA acrescido de 300 μL de DMSO, no caso da testemunha. As placas foram mantidas a 25 $^{\circ}\text{C}$, sob luz fluorescente com fotoperíodo de 12 h. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas quando o fungo cultivado como controle tomou toda a placa. Os cálculos foram feitos dividindo a média do diâmetro da colônia do tratamento pela do controle (FIGURA 4.2).

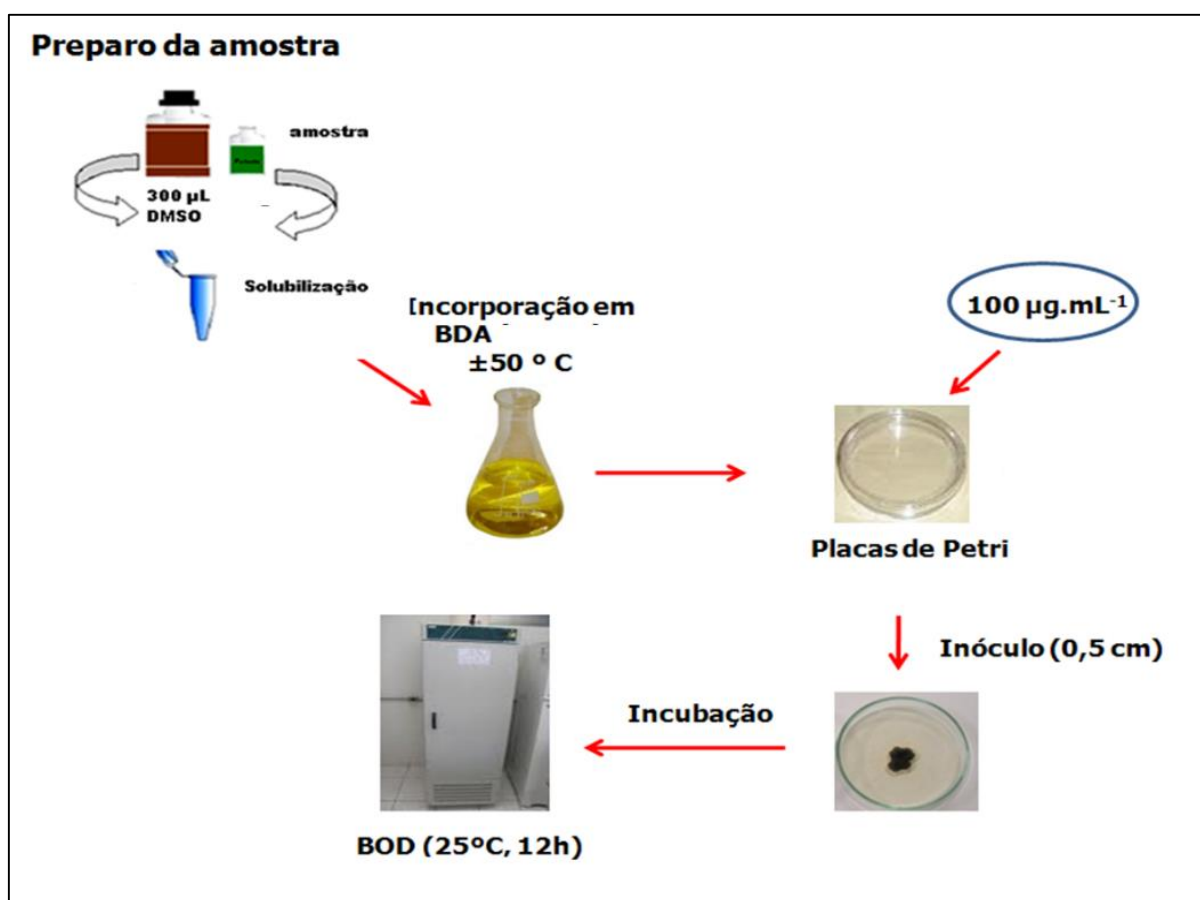


FIGURA 4.2 - Procedimento experimental para avaliação do ensaio antifúngico de crescimento micelial de *Colletotrichum acutatum* e *Alternaria alternata*.

4.3.4 - Protocolo para ensaio *in vitro* de inibição da germinação de esporos e formação de apressórios de *C. acutatum* e *A. alternata*,

Para a obtenção de uma suspensão de esporos foi utilizado um cultivo desses fungos em meio BDA. Em seguida foram preparadas soluções dos compostos naturais isolados de *C. acutatum*, o qual foi utilizado 1 mg da substância, solubilizada em 50 μL de DMSO, em 10 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, foram vertidos 30 μL da solução de cada substância e 30 μL da suspensão de esporos (10^5 esporos.mL⁻¹) do fungo nas placas de Petri. Como testemunha foi preparada uma solução de 10 mL de água destilada esterilizada, contendo 50 μL de DMSO. As placas foram vedadas com filme PVC transparente a fim de manter a umidade, e conservada a 25 °C, sob luz fluorescente com fotoperíodo de 12 h, por 24 h. Após este período a porcentagem de germinação e formação de apressórios foi avaliada através da observação em microscópio óptico (aumento de 100 x). Foram considerados como germinados os esporos com tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao comprimento dos esporos não germinados (FIGURA 4.3).

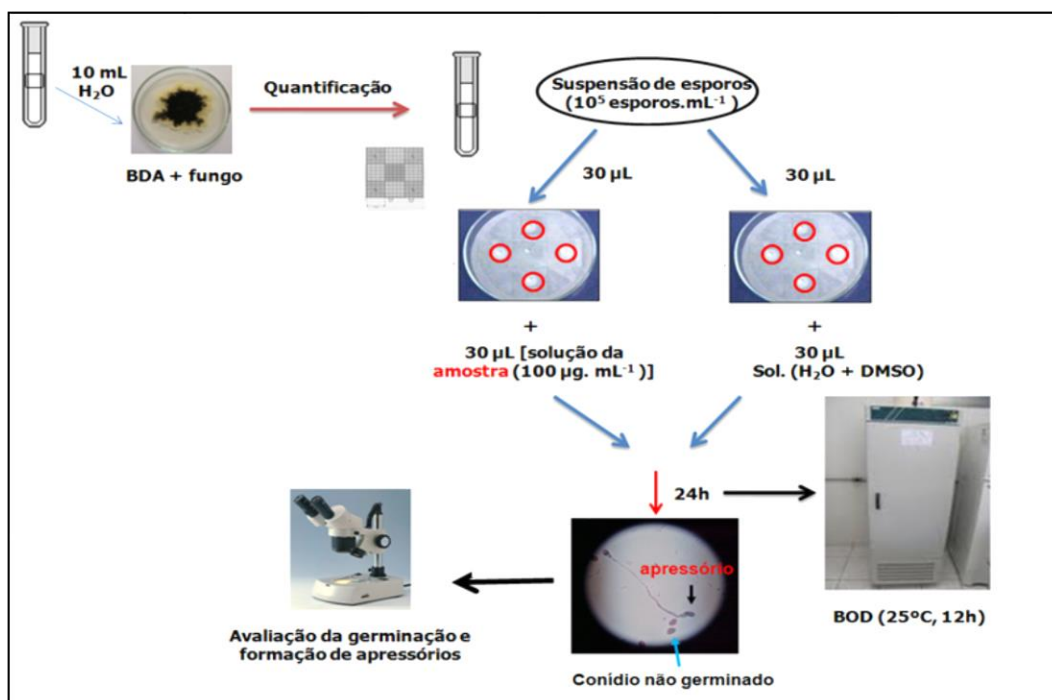


FIGURA 4.3 - Procedimento experimental para ensaio antifúngico de germinação de esporos e formação de apressórios de *Colletotrichum acutatum* e *Alternaria alternata*.

4.4 - Resultados e discussões

4.4.1 - Análise dos voláteis das flores de *C. sinensis* por HS-SPME-GC-MS

A análise dos componentes voláteis das flores de *C. sinensis* levou a identificação de 23 compostos para as flores sadias e infectadas com 2 e 4 dias e 27 compostos para as flores infectadas com 7 dias (TABELA 4.1). Com a injeção de um padrão de *n*-alcanos pôde-se calcular o índice de retenção (IR) e comparar com os dados da literatura (ADAMS, 2007).

O tempo de exposição da fibra para extração dos voláteis foi analisado em 30, 45 e 60 min. As análises mostraram que 30 min de exposição da fibra foram suficientes para analisar os componentes voláteis das flores sadias e infectadas.

Os experimentos foram realizados em 5 plantas de *C. sinensis* diferentes, sendo que cada espécime teve 3 tratamentos por dias de coleta (2, 4 e 7 dias). Utilizou-se um sexto espécime sem inoculação do fungo para controle, totalizando 18 tratamentos. Os componentes voláteis destes 18 tratamentos foram extraídos por HS-SPME-GC-MS fornecendo 18 cromatogramas (FIGURA 4.9 - 4.26) das flores sadias (FS) e flores doentes (FD).

Os compostos majoritários das flores sadias de *C. sinensis* analisados foram o sabineno (**7**) (38,06%±1,8), o linalol (**2**) (10,44%±0,8), o limoneno (**1**) (9,51±1,1) e o β-ocimeno (**3**) (11,29%±0,6) (FIGURA 4.4 e 4.6). O padrão de fragmentação do linalol mostrou a presença do pico do íon molecular em *m/z* 154, além de picos em *m/z* 55, 91 e 73, típicos de terpenos de cadeia aberta (FIGURA 4.8).

Com a análise dos voláteis observou-se um aumento na concentração do linalol (10,44% - 19,20%) comparando as flores sadias com as flores infectadas com 2 dias. Segundo relatos na literatura o processo de infecção de *C. acutatum*, nas flores da laranja ocorre em 48h (BRAND, 2012). Provavelmente foram nestes dois dias de infecção que a planta sentiu a presença do fungo produzindo mais linalol que é considerado um metabolito de defesa da planta. Com o passar dos dias de infecção,

a concentração de linalol diminuiu, e surgiram novos compostos como os óxidos de linalol nas suas formas piranoide (**17**) e furanoide (**18**), além do óxido de limoneno (**11**) (FIGURA 4.4). Existem alguns relatos de fungos que biotransformam o linalol nos seus respectivos óxidos, como é o caso de *Botrytis cinerea* e *Aspergillus niger* (ALEU e COLLADO, 2001; BOCK, BENDA e SCHREIER, 1986). No caso presente, *C. acutatum* pode estar biotransformando o linalol para que perca a sua toxicidade.

O limoneno também é considerado um metabolito produzido como defesa pela planta (BRAND, 2012), e pôde-se observar também um aumento na área percentual relativa do limoneno, comparando os cromatogramas das flores sadias com as infectadas com 2 dias.

Vale ressaltar também que somente nas flores infectadas com 7 dias foram observadas as lesões necróticas. E foi somente nesse tratamento que foi possível identificar um possível composto do fungo presente nas flores (álcool feniletílico $1,05\% \pm 0,2$), levantando a hipótese de que o álcool feniletílico (**16**) seria uma possível toxina do fungo, responsável pela necrose nos tecidos vegetais das flores (FIGURA 4.6).

Com a presença do óxido de linalol piranoide ($1,32 \pm 0,4$) e óxido de linalol na sua forma furânica ($1,45\% \pm 1,1$), surgiu a ideia de realizar uma biotransformação do linalol pelo fungo *C. acutatum*. Onde foram feitas extrações dos voláteis por HS-SPME-GC-MS por 7 dias de cultivo em meio de cultura líquido (BD) incorporado com linalol ($0,10 \mu\text{M}$).

Os resultados mostraram a formação dos óxidos de linalol (piranoide e furanoide), além de outros compostos como o linalol dihidratado, confirmando a potencialidade de fungos do gênero *Colletotrichum* em realizar biotransformações (FIGURA 4.7).

A diminuição das concentrações relativas do limoneno de FD02 a FD07 ($14,40 - 7,55$) pode ser atribuída ao fato da formação do óxido de limoneno (**4**), que só foi observado nas análises das flores infectadas com 7 dias.

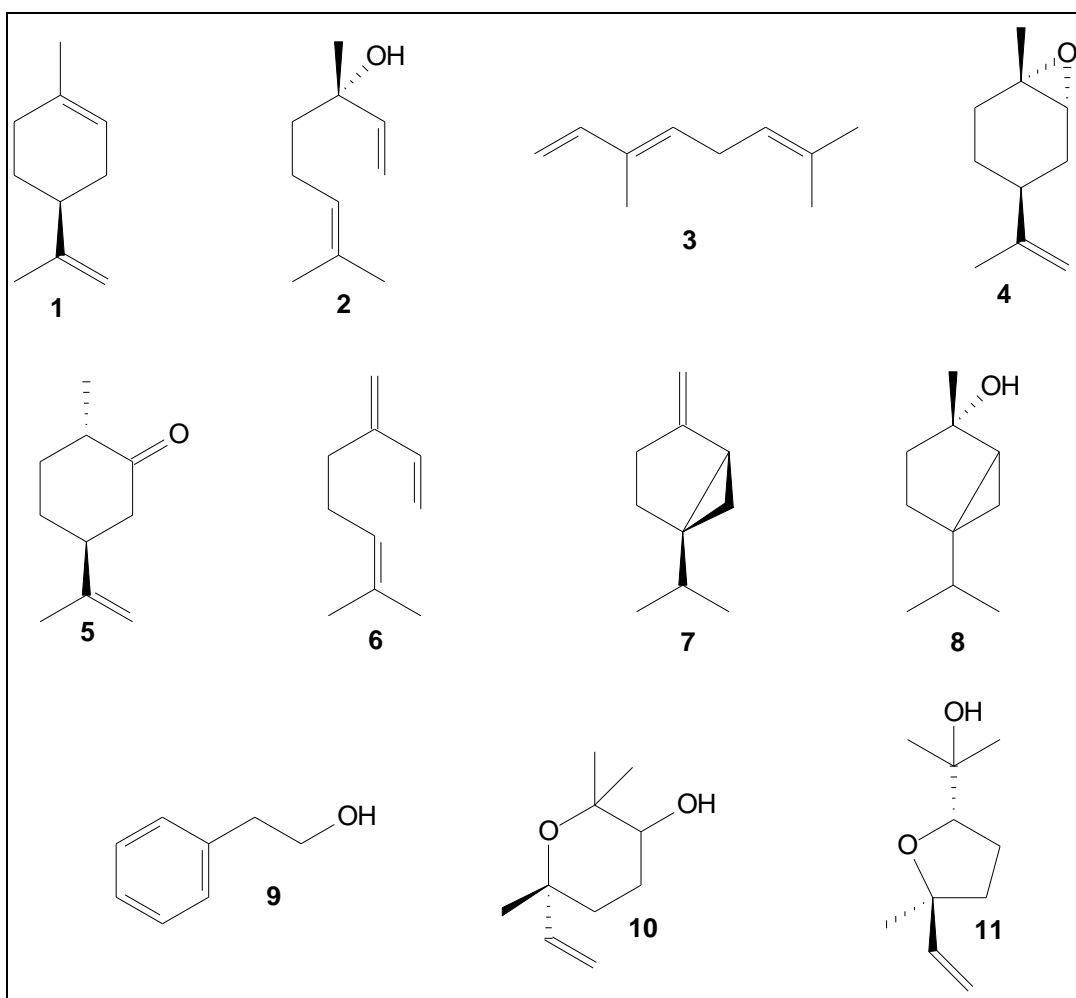


FIGURA 4.4 - Compostos voláteis identificados nas flores de *Citrus sinensis* sadias e infectadas.

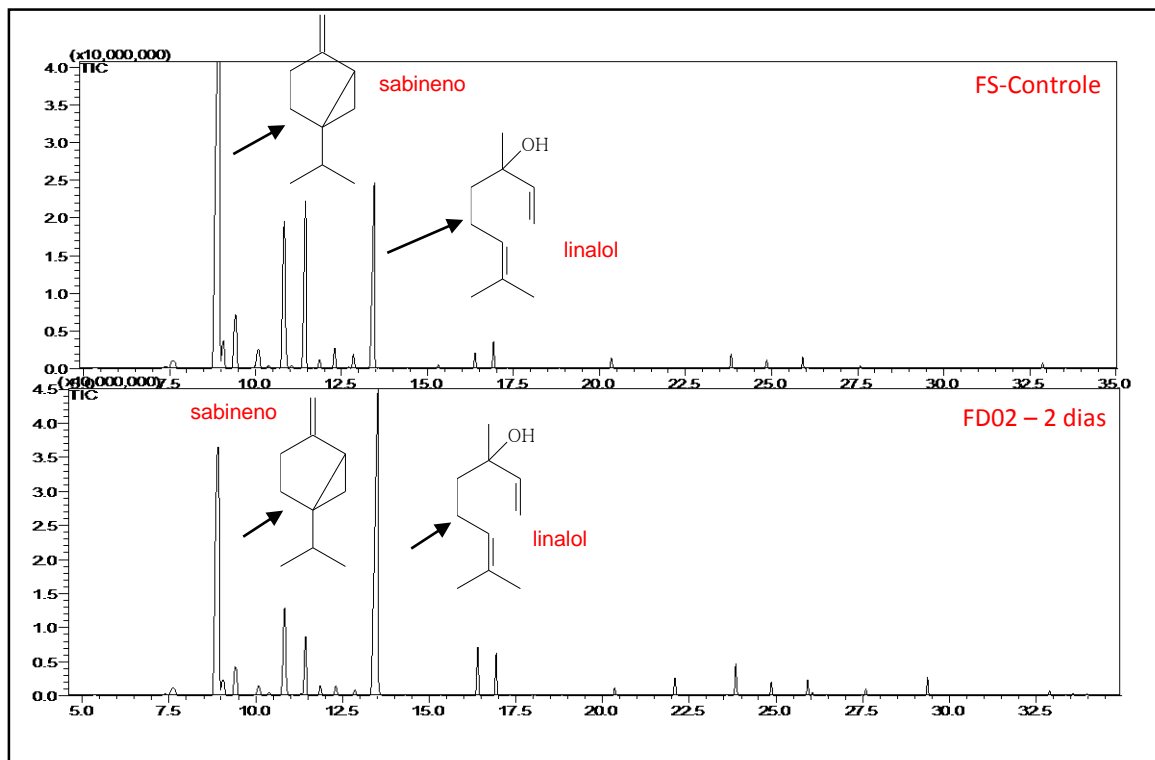


FIGURA 4.5 - Comparação dos cromatogramas dos voláteis das flores saudáveis e infectadas.

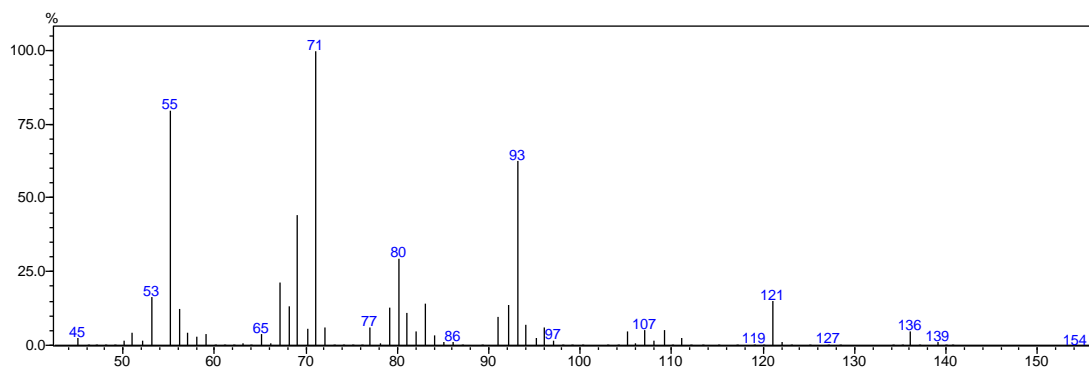


FIGURA 4.6 - Espectro de massas do linalol.

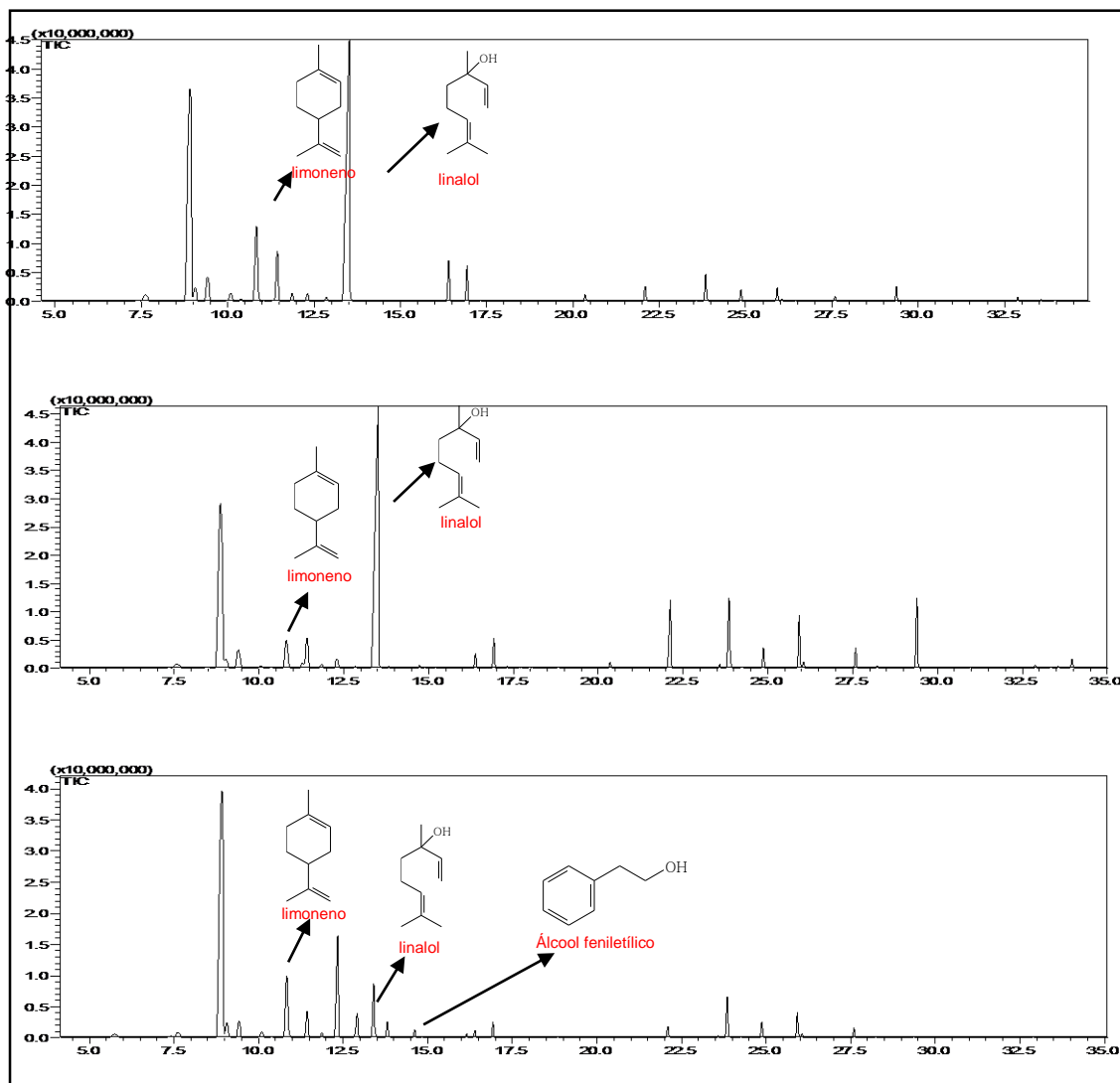


FIGURA 4.7 - Cromatograma de íons totais dos voláteis das flores infectadas com (a) 2 dias, (b) 4 dias e (c) 7 dias.

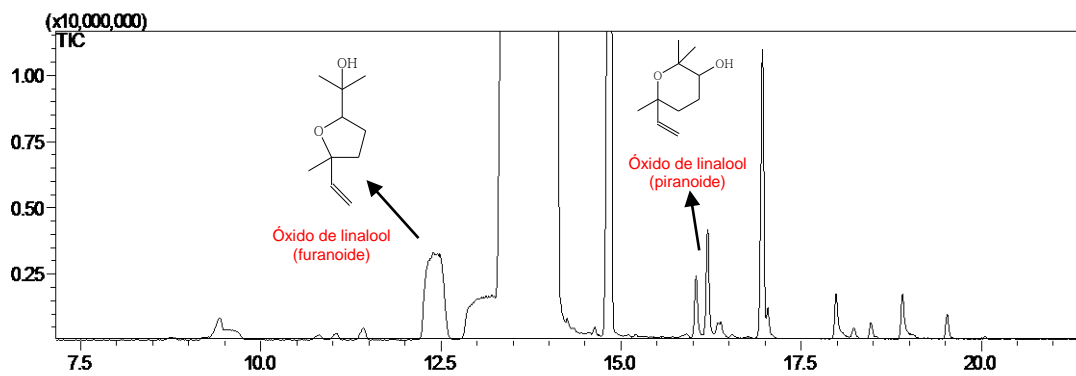


FIGURA 4.8 - Cromatograma de íons totais do fungo *C. acutatum* na presença de linalol.

TABELA 1 - Constituintes químicos voláteis das flores de *Citrus sinensis* sadias (FS) e infectadas com 2, 4 e 7 dias (FD02, FD04 e FD07).

Nº	Componentes	IR*	IR _{Lit} *	% área do pico			
				FS	FD02	FD04	FD07
1	Hexanol	871	863	0,19±0,1	0,27±0,4	0,15±0,1	0,95±0,2
2	α-pineno	938	932	0,59±0,1	0,48±0,1	1,67±0,2	0,59±0,6
3	sabineno	975	969	38,06±1,8	37,20±6,4	39,04±7,1	35,21±3,2
4	β-mirceno	990	988	2,92±1,8	4,14±0,2	3,15±1,0	6,79±1,9
5	3-careno	1008	1008	2,34±0,9	4,21±0,8	2,78±0,5	1,23±1,0
6	α-terpineno	1015	1014	0,60±0,4	0,30±0,1	0,14±0,1	1,89±1,0
7	limoneno	1027	1024	9,51±1,1	14,40±1,8	15,98±0,6	7,55±1,5
8	(E)-β-ocimeno	1049	1044	11,29±0,6	6,89±1,0	9,06±1,4	0,67±0,8
9	γ-terpineno	1054	1054	0,54±0,2	1,04±0,1	0,80±0,1	0,05±0,2
10	cis-sabineno hidratado	1067	1065	0,95±0,2	0,38±0,1	0,45±0,1	5,89±1,3
11	óxido de trans-linalol (furanoide)	1084	1084	-	-	-	1,45±1,1
12	linalol	1096	1095	10,44±0,8	19,2±4,2	10,22±1,1	6,24±4,2
13	álcool feniletílico	1109	1106	-	-	-	1,05±0,2
14	óxido de cis-limoneno	1132	1132	-	-	-	1,61±0,2
15	óxido de trans-linalol (piranoide)	1173	1173	-	-	-	1,32±0,4
16	terpine-4-ol	1177	1174	1,75±0,1	0,08±1,0	1,50±0,1	2,22±0,1
17	α-terpineol	1189	1186	1,87±0,1	1,60±0,4	2,56±0,5	2,88±0,5
18	indol	1289	1290	1,75±0,2	0,66±0,2	1,40±0,1	1,11±0,1
19	antranilato de metila	1335	1334	1,42±0,1	0,68±0,2	1,99±0,1	2,46±0,3
20	β-elemeno	1389	1389	1,62±0,2	0,64±0,3	1,87±0,2	1,91±0,4
21	β-cariofileno	1417	1417	1,33±0,1	0,52±0,3	1,81±0,1	1,33±0,2
22	α-cariofileno	1451	1452	1,36±0,1	0,88±0,6	1,00±0,6	1,67±0,4
23	β-farneseno	1453	1454	0,33±0,1	0,60±0,2	0,95±0,1	1,44±0,1
24	α-farneseno	1504	1505	1,17±0,1	0,31±0,2	1,41±0,1	1,66±0,7
25	β-sesquifelandreno	1521	1521	1,18±0,1	0,62±0,2	1,55±0,4	1,09±0,1
26	nerolidol	1561	1561	1,16±0,1	0,15±0,1	1,17±0,8	1,23±0,1
27	heptadeceno	1676	1676	1,36±0,1	0,56±0,3	2,60±0,1	1,09±0,1
Total				93,55	95,75	93,95	91,21

* = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

** = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) baseada na equação de Van den Dool e Kratz.

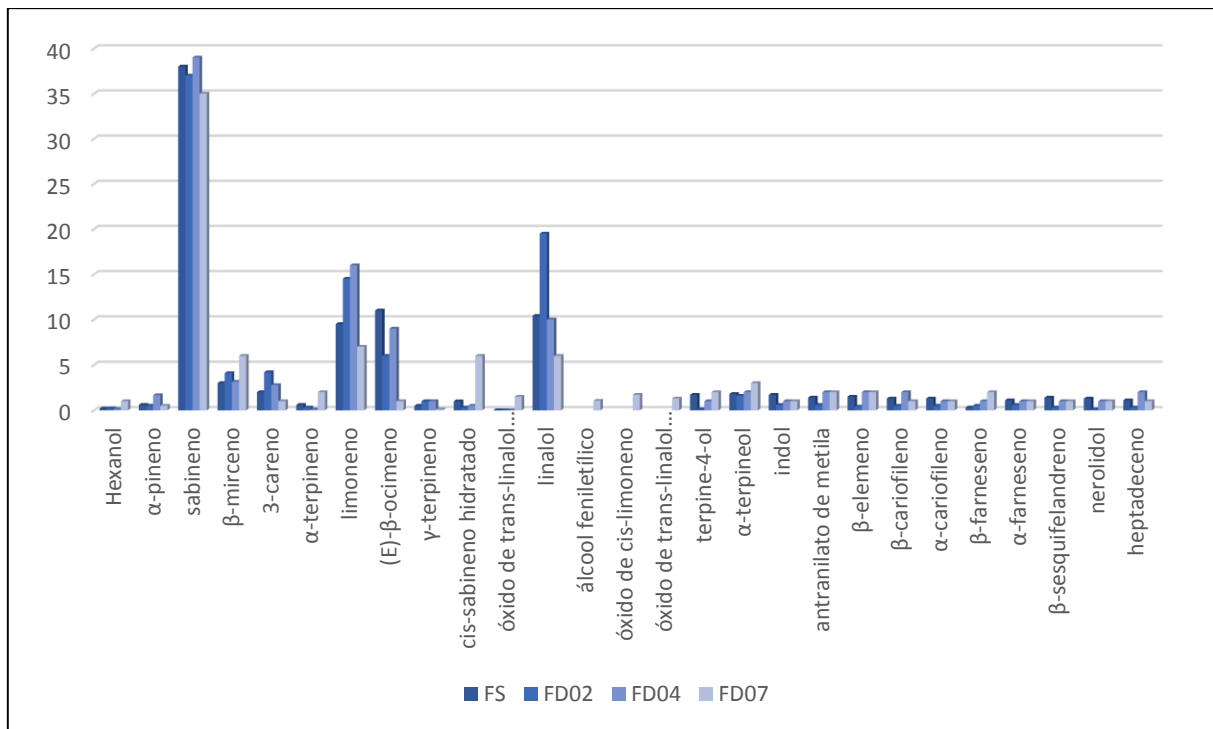


FIGURA 4.9 - Gráfico ilustrativo das áreas percentuais dos componentes voláteis identificados nas flores de *Citrus sinensis* sadias (FS) e infectadas com 2, 4 e 7 dias (FD02, FD04 e FD07).

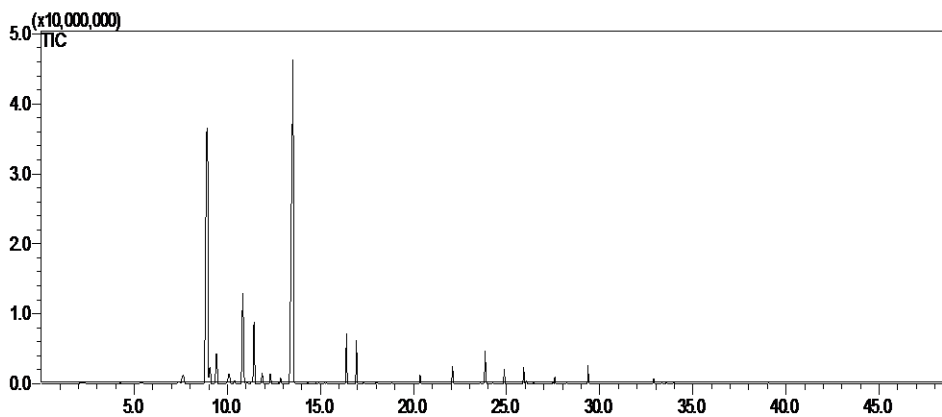


FIGURA 4.10 - Cromatograma de íons totais dos voláteis do tratamento 01 das flores infectadas com 2 dias.

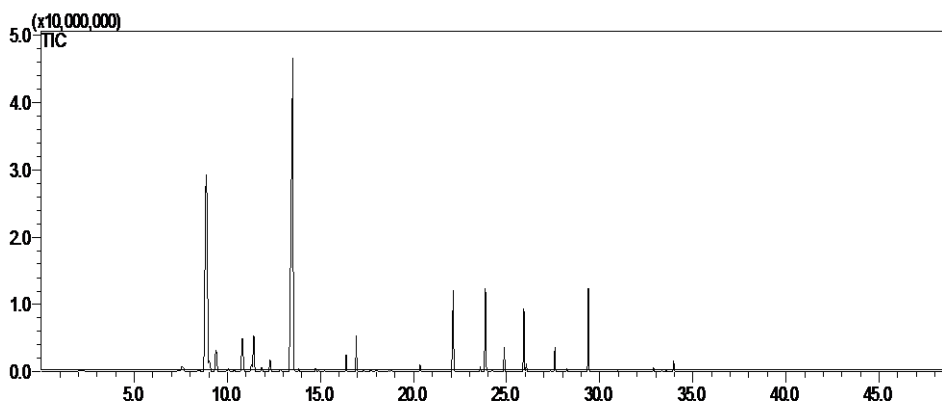


FIGURA 4.11 Cromatograma de íons totais dos voláteis do tratamento 01 das flores infectadas com 4 dias.

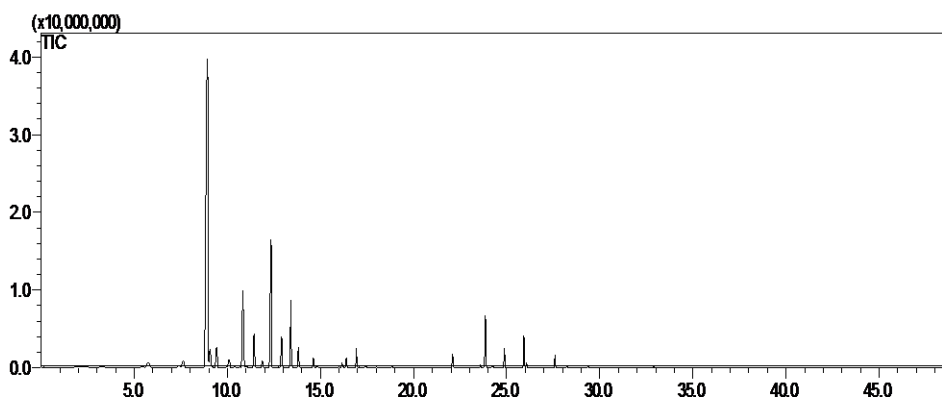


FIGURA 4.12 - Cromatograma de íons totais dos voláteis do tratamento 01 das flores infectadas com 7 dias.

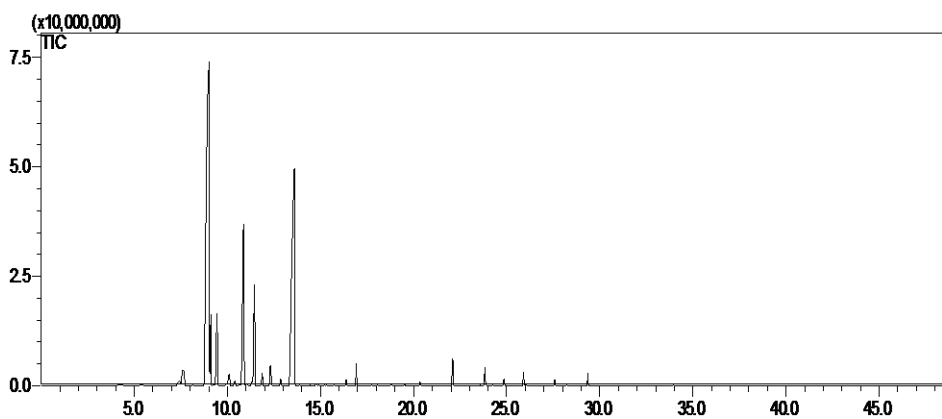


FIGURA 4.13 - Cromatograma de íons totais dos voláteis do tratamento 02 das flores infectadas com 2 dias.

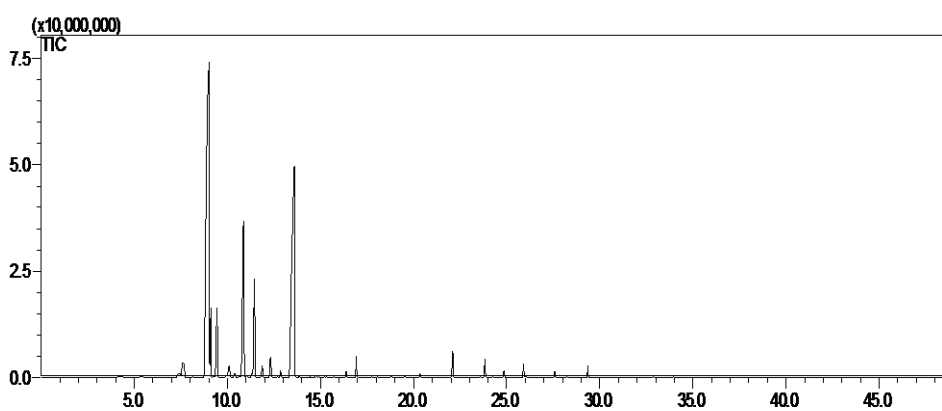


FIGURA 4.14 - Cromatograma de íons totais dos voláteis do tratamento 02 das flores infectadas com 4 dias.

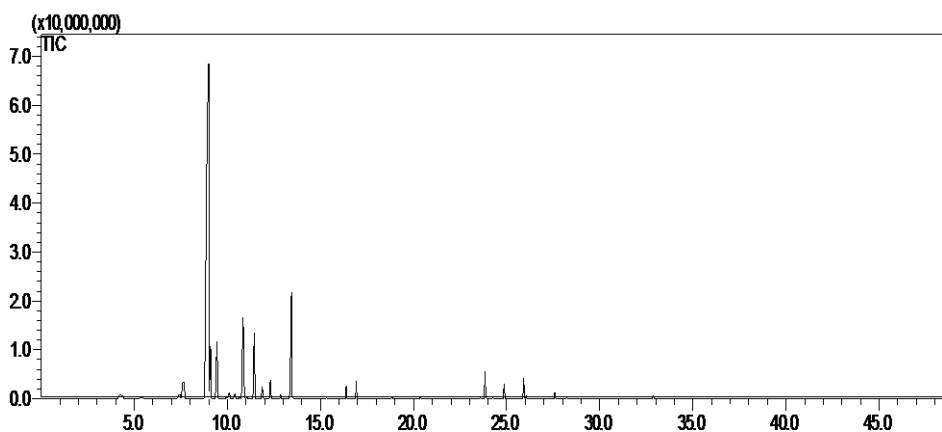


FIGURA 4.15 - Cromatograma de íons totais dos voláteis do tratamento 02 das flores infectadas com 7 dias.

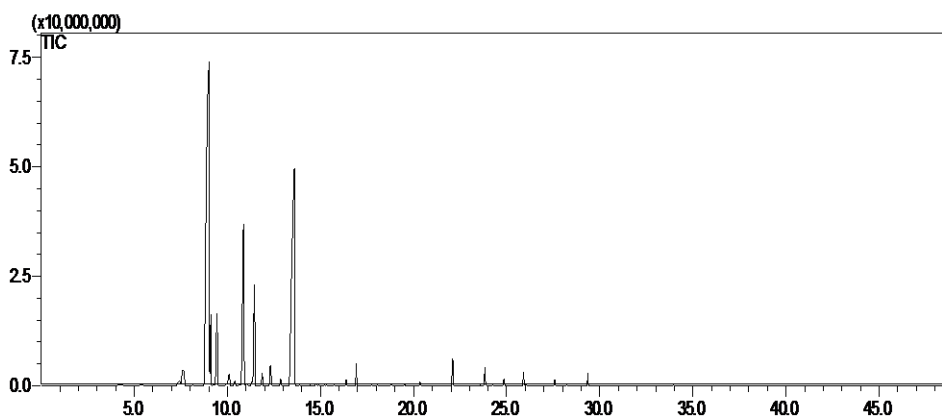


FIGURA 4.16 - Cromatograma de íons totais dos voláteis do tratamento 03 das flores infectadas com 2 dias.

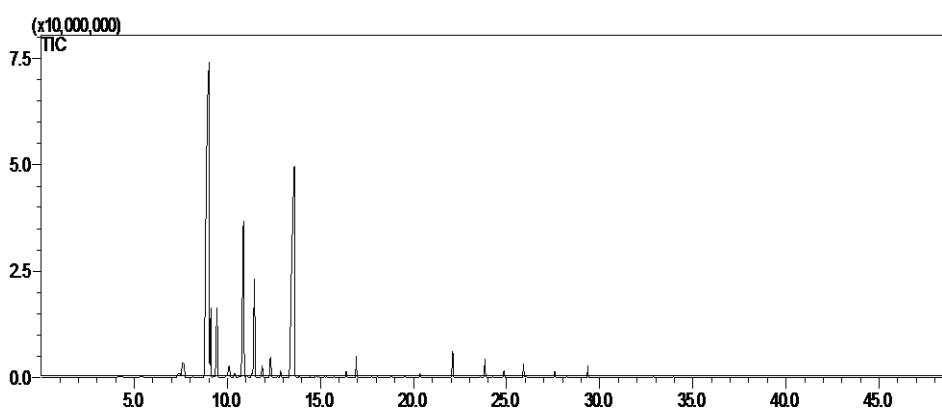


FIGURA 4.17 - Cromatograma de íons totais dos voláteis do tratamento 03 das flores infectadas com 4 dias.

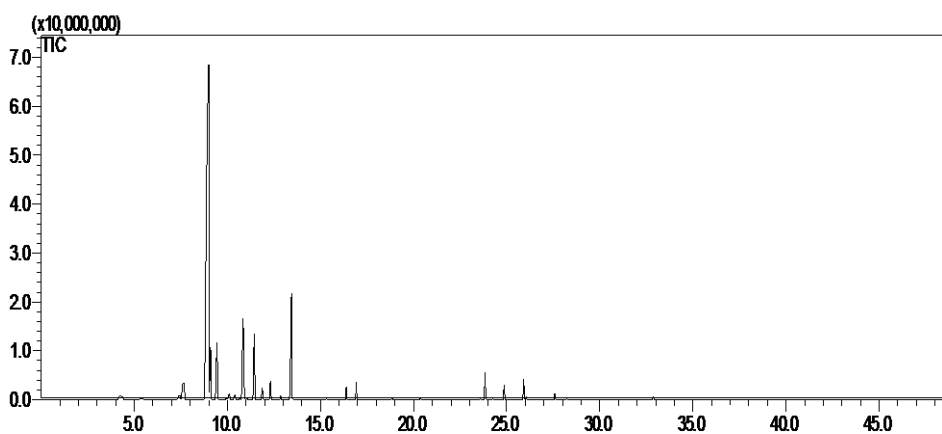


FIGURA 4.18 - Cromatograma de íons totais dos voláteis do tratamento 03 das flores infectadas com 7 dias.

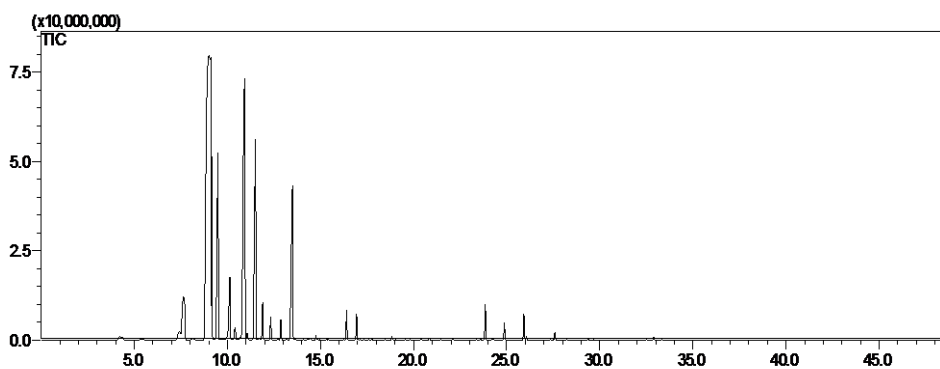


FIGURA 4.19 - Cromatograma de íons totais dos voláteis do tratamento 04 das flores infectadas com 2 dias.

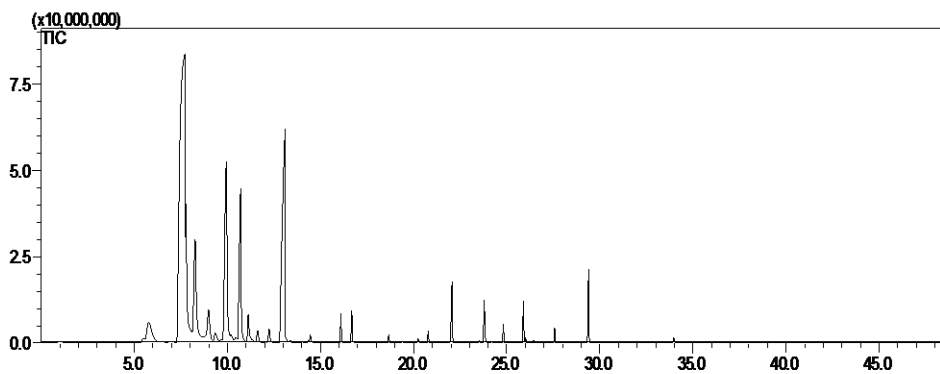


FIGURA 4.20 - Cromatograma de íons totais dos voláteis do tratamento 04 das flores infectadas com 4 dias.

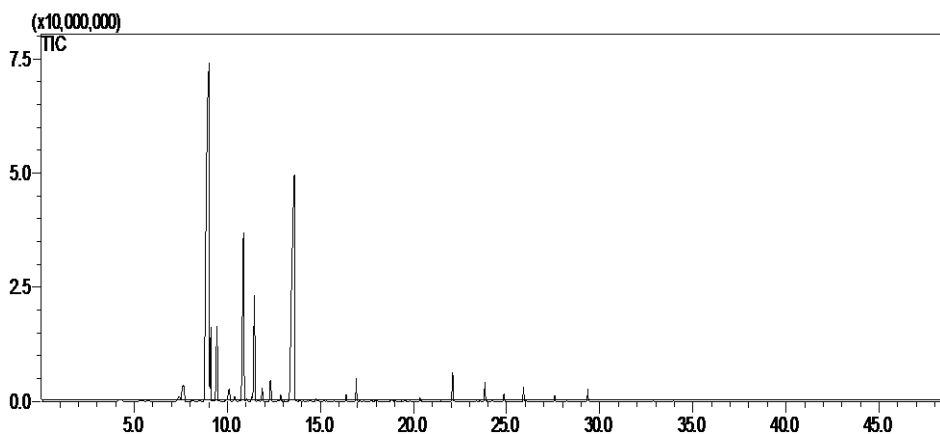


FIGURA 4.21 - Cromatograma de íons totais dos voláteis do tratamento 04 das flores infectadas com 7 dias.

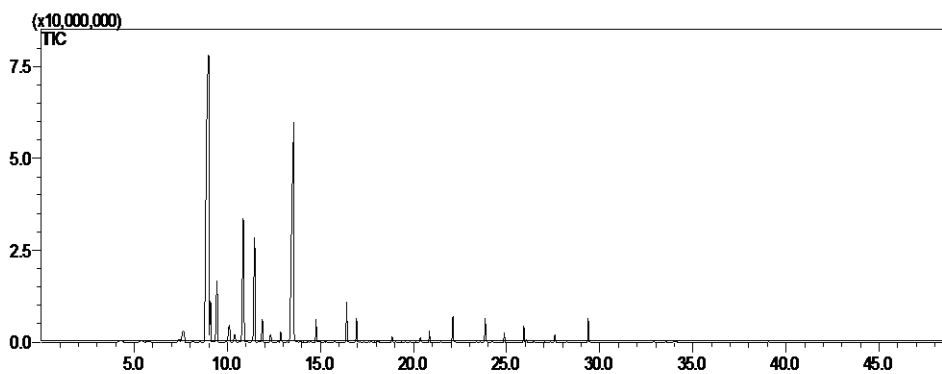


FIGURA 4.22 - Cromatograma de íons totais dos voláteis do tratamento 05 das flores infectadas com 2 dias.

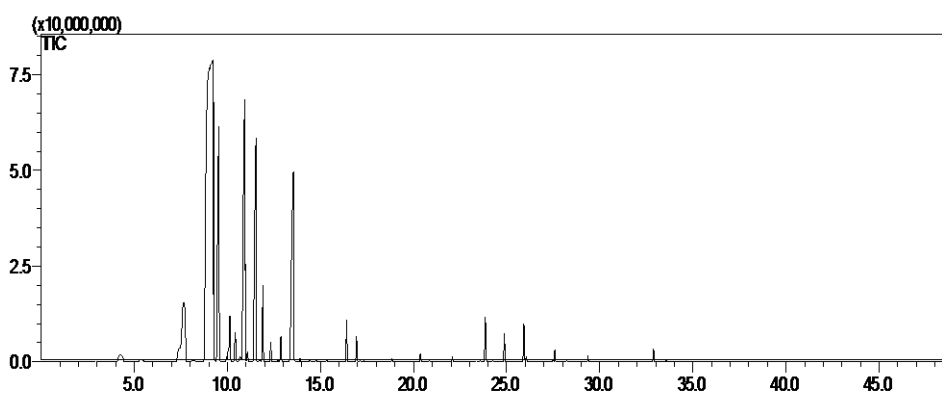


FIGURA 4.23 - Cromatograma de íons totais dos voláteis do tratamento 05 das flores infectadas com 4 dias.

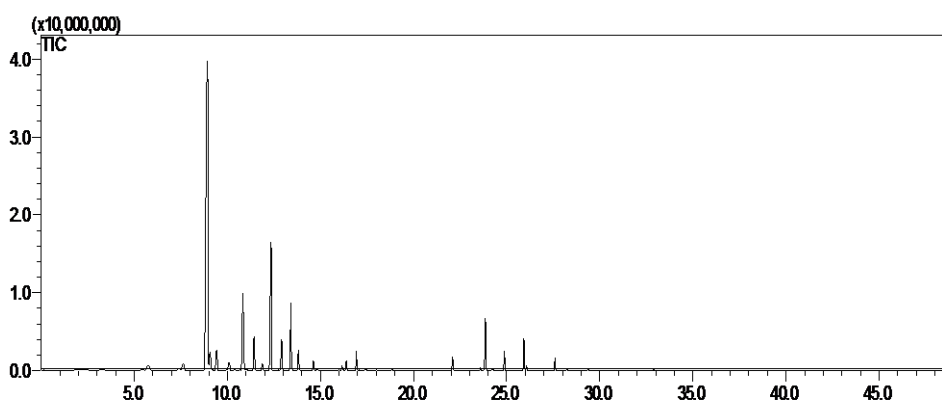


FIGURA 4.24- Cromatograma de íons totais dos voláteis do tratamento 05 das flores infectadas com 5 dias.

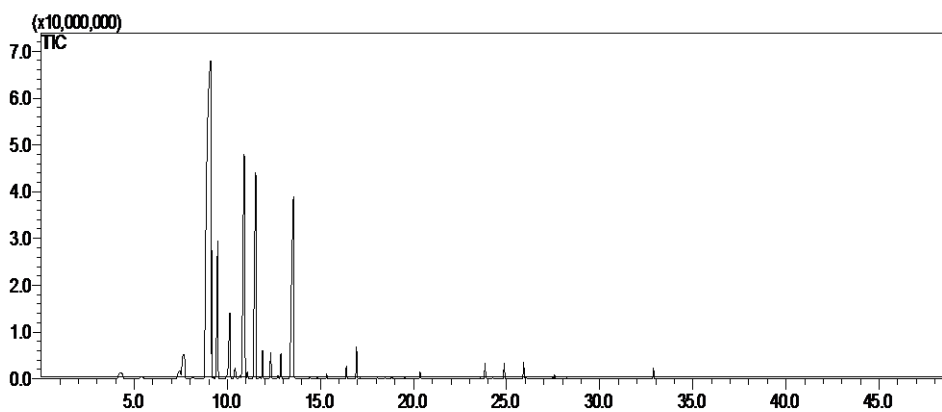


FIGURA 4.25 - Cromatograma de íons totais dos voláteis das flores sadias com 2 dias.

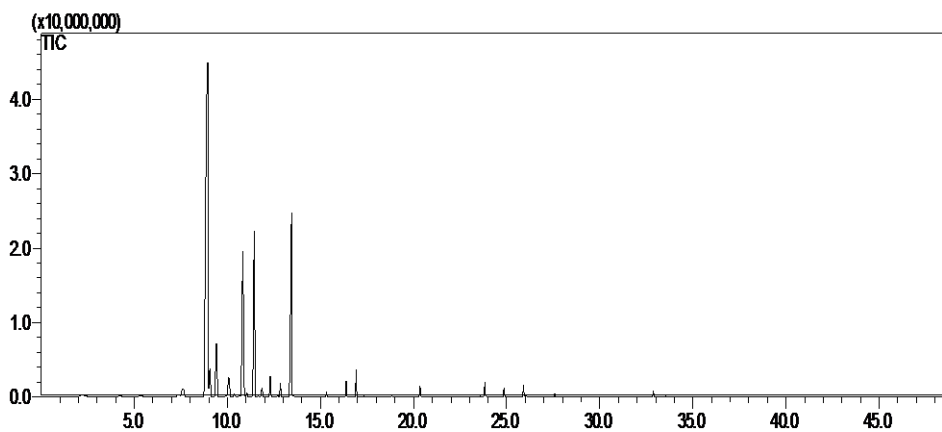


FIGURA 4.26 - Cromatograma de íons totais dos voláteis das flores sadias com 4 dias.

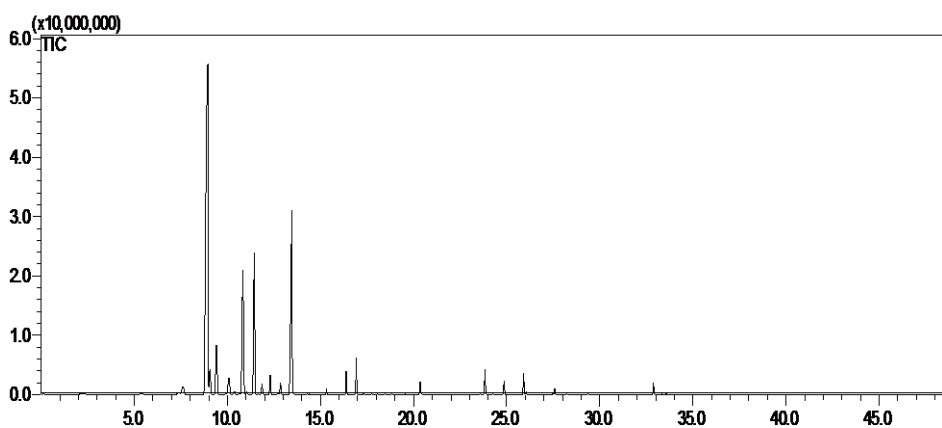


FIGURA 4.27 - Cromatograma de íons totais dos voláteis das flores sadias com 7 dias.

4.4.2 - Ensaios de atividade biológica

4.4.2.1 - Substâncias isoladas de espécies da família Rutaceae e Malvaceae

Foram ensaiadas 15 substâncias isoladas de plantas das famílias Rutaceae e Malvaceae de espécies trabalhadas no grupo de pesquisa PN-UFSCar. Foram realizados 3 tipos de ensaios antifúngicos diferentes: inibição do crescimento micelial, da germinação de esporos e da formação de apressórios. As substâncias puras, dentre elas cumarinas, alcaloides, flavonoides, foram testadas a uma concentração de 100 µg/mL contra o crescimento do fungo *C. acutatum*.

As substâncias isoladas de vegetais não tiveram efeito significativo frente ao crescimento do fungo nas concentrações testadas, onde apenas a cumarina chalepensina (**20**) e o alcaloide tangeritina (**19**) (FIGURA 4.28) exibiram uma porcentagem de inibição um pouco maior do que 50%, apenas nos ensaios de germinação de esporos e formação de apressórios (FIGURA 4.27). Apesar dos flavonoides glicosilados hesperidina (**21**) e rutina (**22**) (FIGURA 4.28) apresentarem atividade antifúngica em alguns casos relatados pela literatura (BRAND, 2012), eles não apresentaram uma atividade considerável nas concentrações testadas contra *C. acutatum* (FIGURA 4.29; TABELA 4.2).

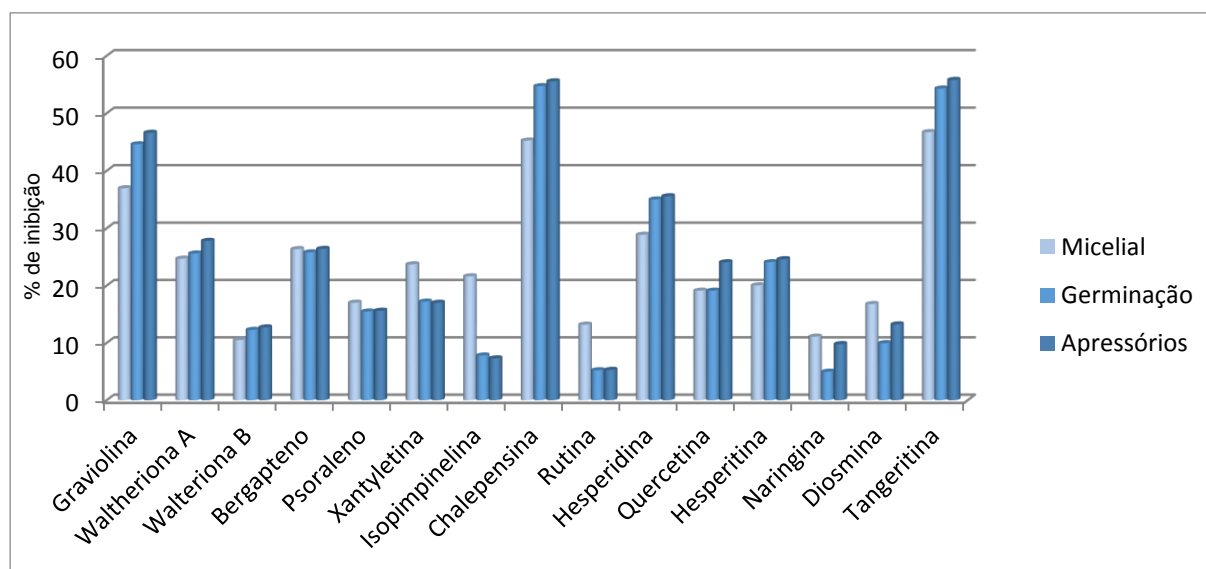


FIGURA 4.28 - Gráfico de porcentagem de inibição de compostos isolados de vegetais da família Rutaceae e Malvaceae no crescimento de *Colletotrichum acutatum*.

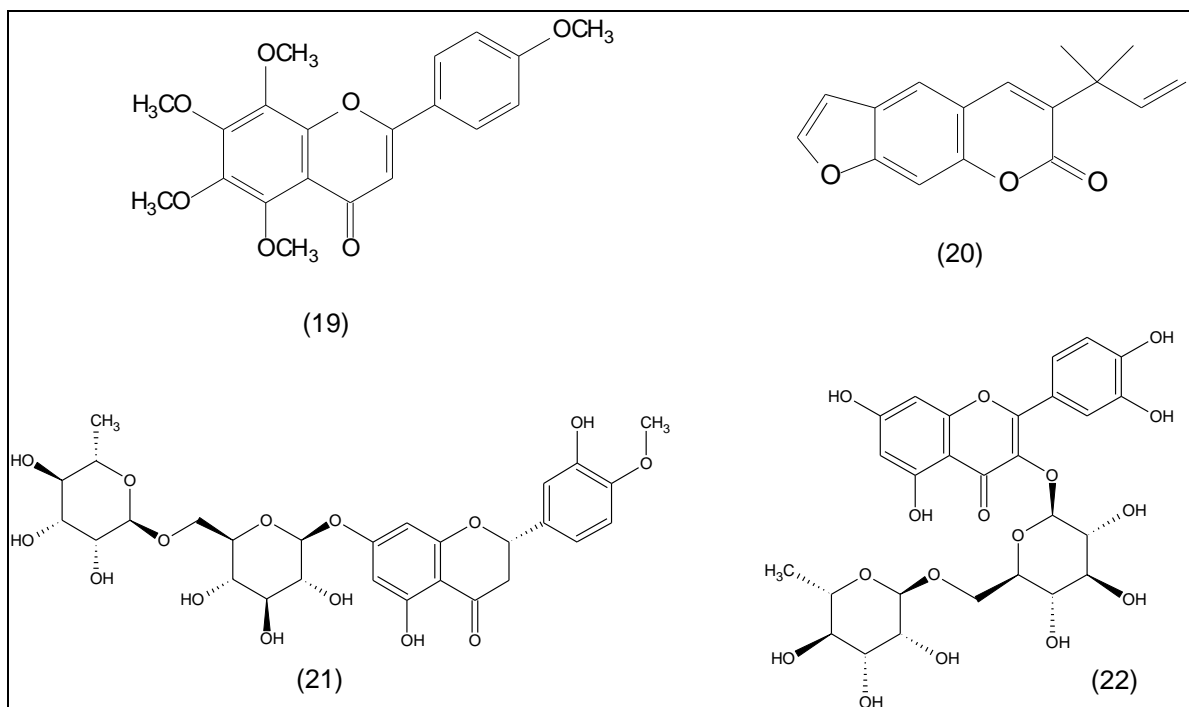


FIGURA 4.29 - Substâncias isoladas da família Rutaceae utilizadas nos ensaios de inibição de *Colletotrichum acutatum*.



FIGURA 4.30 - Aspectos dos conídios de *Colletotrichum acutatum* após o ensaio de inibição com a tangeritina. Foto tirada em um microscópio óptico (100x).

TABELA 4.2 - Porcentagem de inibição de *Colletotrichum acutatum* frente às substâncias isoladas da família Rutaceae e Malvaceae.

Substâncias	Crescimento Micelial (%)	Germinação de Esporos (%)	Formação de apressórios (%)
Waltheriona A	24,70±0,2	25,60±2,6	27,71±2,9
Waltheriona B	10,50±0,3	12,27±2,1	12,70±2,7
Bergapteno	26,36±0,3	25,80±2,9	26,40±4,9
Graviolina	36,96±0,2	44,67±3,1	46,61±2,0
Xantyletina	23,71±0,5	17,20±5,1	17,90±3,5
Tangeritina	46,72±0,2	54,30±3,7	55,87±3,7
Isopimpineline	21,62±0,3	7,29±1,5	7,90±2,9
Hesperidina	28,87±3,6	35,01±2,7	35,57±2,3
Hesperitina	20,04±2,5	24,08±2,2	24,60±4,1
Rutina	13,18±1,2	5,23±3,1	5,29±1,5
Quercetina	19,11±0,6	19,11±3,8	24,07±1,2
Psoraleno	17,01±0,8	15,47±3,5	15,61±1,4
Chalepensina	45,25±0,3	54,71±5,6	55,55±4,3
Naringinina	11,09±0,7	4,97±2,9	9,79±2,5
Diosmina	16,78±1,1	9,95±2,6	13,23±2,5

4.4.2.2 - Substâncias isoladas do fungo *Colletotrichum acutatum*

Algumas substâncias isoladas de *C. acutatum* foram ensaiadas contra o fitopatógeno de citros *A. alternata*. Foram ensaiadas 13 substâncias (100 µg/mL). O alcaloide IAA apresentou uma atividade antifúngica considerável nos ensaios de inibição de crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios. Esses resultados corroboram com aqueles obtidos nos experimentos de co-cultivo, onde foi observado um aumento na produção de IAA quando *C. acutatum* foi cultivado na presença de outros microrganismos (FIGURA 4.30, TABELA 4.3). O efeito antagônico do tirosol e do 2,5-dihidroximetilfurano pode ser explicado pelo fato destes compostos serem possíveis antibióticos produzidos por *C. acutatum*, ou como em alguns casos relatados na literatura (CHEN et al., 2004), o tirosol funciona como uma molécula sinalizadora para a produção de esporos.

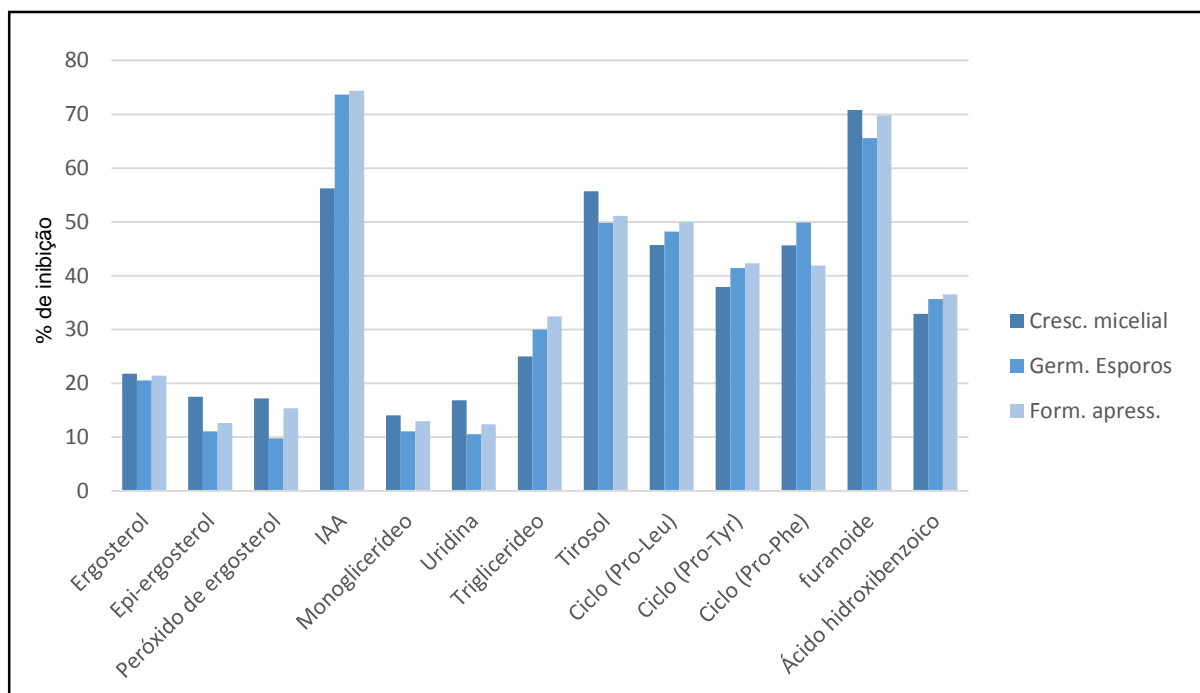


FIGURA 4.31 - Gráfico de porcentagem de inibição de compostos isolados de *Colletotrichum acutatum* contra *Alternaria alternata*.

TABELA 4.3 - Porcentagem de inibição de *Alternaria alternata* frente às substâncias isoladas do fungo *Colletotrichum acutatum*.

Substâncias	Crescimento Micelial (%)	Germinação Esporos (%)	Formação de apressórios (%)
Ergosterol	21,78±0,7	20,53±2,6	21,43±1,2
Epi-ergosterol	17,50±0,2	11,05±3,6	12,64±2,6
Peróxido de ergosterol	17,19±0,6	9,74±2,2	15,38±4,2
IAA	56,25±0,1	73,68±4,2	74,35±4,0
Monoglicerídeo	14,06±0,5	11,05±2,6	12,99±6,3
Uridina	16,87±0,1	10,52±2,3	12,36±3,9
Triglicerídeo	25,00±1,0	30,00±4,0	32,42±3,8
Tirosol	55,67±0,1	49,78±0,8	51,12±4,1
<i>Ciclo</i> (Pro-Leu)	45,71±0,5	48,19±1,1	49,90±1,9
<i>Ciclo</i> (Pro-Tyr)	37,89±1,0	41,43±3,1	42,33±2,3
<i>Ciclo</i> (Pro-Phe)	45,67±0,6	49,89±1,1	71,92±3,3
furanoide	70,81±0,2	65,55±1,5	69,78±1,1
Ácido hidroxibenzoico	32,89±0,2	35,66±1,5	36,56±2,0

4.4.2.3 - Substâncias derivadas do jasmonato de metila isoladas do fungo *Colletotrichum acutatum*

Afim de se constatar a habilidade de *C. acutatum* em fazer com que algumas moléculas percam o seu efeito fungitóxico, foram realizados ensaios de atividade antifúngica com os derivados de ácido jasmônico no desenvolvimento desse fungo. Os derivados 11-hidroxi-jasmonato de metila e o ácido 11-hidroxi-jasmônico foram ensaiados a uma concentração de 100 µg/mL e seus efeitos inibitórios foram comparados com os efeitos de um padrão de ácido jasmônico.

Com os testes de crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios, pôde-se constatar uma queda no efeito inibitório desses derivados com relação ao ácido jasmônico, corroborando com alguns trabalhos na literatura que relataram a capacidade de espécies de *Colletotrichum* em detoxificar algumas fitoanticipinas e fitoalexinas, transformando-as em moléculas mais polares (FIGURA 4.31) (GARCIA-PAJON, HERNANDEZ-GALAN e COLLADO, 2003).

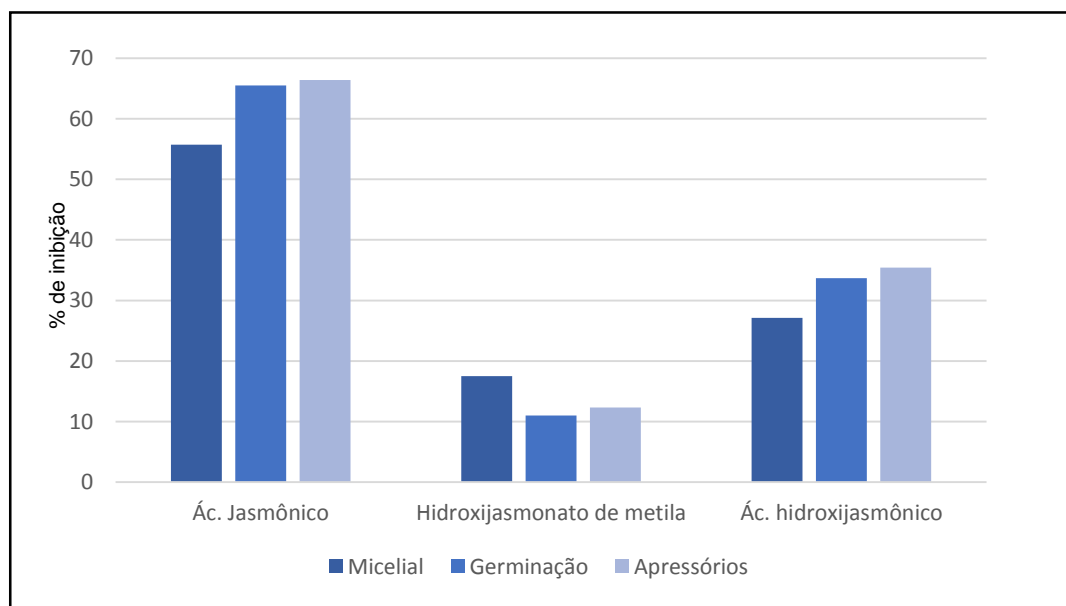


FIGURA 4.32 - Gráfico de porcentagem de inibição de compostos derivados do ácido jasmônico contra *Colletotrichum acutatum*

4.5 - Conclusões

Os estudos realizados no presente capítulo revelaram o comportamento das flores de *C. sinensis* infectadas com *C. acutatum* quanto à produção de componentes voláteis, bem como o potencial antifúngico de algumas substâncias puras.

A metodologia desenvolvida por HS-SPME-GC-MS mostrou-se eficiente na extração dos componentes voláteis das flores de *C. sinensis*, onde foram identificados 23 compostos para as plantas sadias e infectadas com 2 e 4 dias, além de 27 compostos identificados nas flores infectadas com 7 dias.

A partir dessa metodologia pôde-se avaliar a diferença na produção de metabolitos voláteis pela planta quando infectada com o fungo. Nas flores infectadas e coletadas após 2 dias observou-se um aumento na produção do linalol, que é considerado um metabolito produzido como defesa da planta. Já nas flores infectadas e coletadas após 7 dias observou-se uma diminuição na concentração do linalol e a produção de outros compostos como os óxidos de linalol (piranoide e furanoide). As reações de biotransformação do linalol por *C. acutatum* comprovaram que esse microrganismo, assim como *Aspergillus niger* e *Botrytis cinerea*, também biotransforma o linalol em seus respectivos óxidos.

Nestes estudos também foi possível observar que somente as flores infectadas e coletadas após 7 dias apresentaram lesões laranja-amarronzada, e somente nesses tratamentos pôde-se identificar um metabolito do fungo, o álcool feniletílico, dando indícios desse metabolito ser uma toxina do patógeno.

As metodologias de ensaios biológicos mostraram ser adequadas para a avaliação inicial do potencial antifúngico de um determinado composto natural.

As substâncias isoladas de plantas da família Rutaceae e Malvaceae testadas contra *C. acutatum* não apresentaram atividade antifúngica considerável nos ensaios realizados. Apesar de alguns estudos na literatura relatarem que alguns flavonoides glicosilados apresentam efeito antagônico, nos estudos realizados neste capítulo estes metabolitos não apresentaram atividade significativa.

Alguns metabolitos isolados de *C. acutatum* foram testados na inibição do desenvolvimento de *A. alternata*, onde observou-se atividade considerável do composto IAA, corroborando com os resultados obtidos nos ensaios de pareamento. Outros compostos, como o tirosol e o 2,5-dihidroximetilfurano, também apresentaram atividade contra esse patógeno de citros, revelando que esses compostos podem ser antibióticos produzidos por *C. acutatum*.

Com os ensaios de atividade antifúngica, pôde-se também constatar a detoxificação do ácido jasmônico, uma fitoanticipina, por *C. acutatum*. Como abordado no capítulo 2 foi verificado que *C. acutatum* biotransformou o jasmonato de metila, sendo que os produtos de biotransformação exibiram uma atividade antifúngica menor do que a do ácido jasmônico.

Considerações Finais

5 - Considerações Finais

O estudo químico do fungo *Colletotrichum acutatum* proporcionou o isolamento e identificação de 13 metabolitos, sendo que alguns destes eram esteroides, derivados de ácidos graxos e nucleosídeos provenientes do micélio. Já o estudo químico do extrato do meio de cultivo proporcionou o isolamento de algumas dicetopiperazinas já conhecidas no gênero *Colletotrichum*, além de outros metabolitos como o tirosol e o álcool 4-hidroxibenzílico.

A técnica da hidrodestilação mostrou-se importante para a extração do óleo essencial do fungo *C. acutatum*. Através das análises por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas, foram identificados 15 componentes químicos presentes neste óleo, onde o álcool fenilético e o hexadecanoato de metila foram os componentes majoritários.

Com a utilização de moduladores químicos foram isolados de *Colletotrichum acutatum* alguns compostos como sendo prováveis produtos de biotransformação como o 3-fenil-1,2-propanodiol, o ácido 11-hidroxijasmônico e o 11-hidroxijasmonato de metila. Esses estudos confirmaram a potencialidade deste patógeno em realizar biotransformações.

As estratégias estabelecidas na busca de novos metabolitos secundários, como a utilização de moduladores epigenéticos, permitiu o isolamento de compostos como o 2,5-dihidroximetilfurano, a (-)-isosclerona e um composto inédito no gênero *Colletotrichum*, a 6-hidroximeleina. Nestes estudos também foi possível observar a produção de alguns compostos indólicos como o triptofol, o indol e o indol-3-aldeído.

A utilização de cultivos pareados de microrganismos foi adequada para o entendimento do comportamento de *C. acutatum* na presença de outros fungos, já que foi possível observar o aumento na produção de IAA, quando este fungo foi cultivado na presença de *Memmoniola levispora* e o mutante de *Trichoderma aundinaceum*, *TaΔTri5*.

A metodologia desenvolvida por HS-SPME-GC-MS mostrou-se eficiente na comparação dos componentes voláteis das flores sadias e infectadas de *C. sinensis*, onde foram observadas diferenças nas concentrações relativas do linalol. Nessas análises pôde-se observar também a formação de produtos de biotransformação do linalol pelo fungo *C. acutatum*, além de um metabolito deste fungo nas flores infectadas com 7 dias.

As metodologias desenvolvidas para ensaios de avaliação da atividade biológica como crescimento micelial, germinação de esporos e formação de apressórios, revelaram ser adequadas para avaliação do potencial antifúngico de compostos naturais.

6 - Referências Bibliográficas

ABDOU, R.; SCHERLACH, K.; DAHSE, H.M., SATTler, I., HERTWECK, C. "Botryorhodines A-D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*". *Phytochemistry*, **71**: 110, 2010.

ABOU-ZAID, M.; DUMAS, M.; CHAURET, D.; WATSON, A.; THOMPSON, D. C. "Methyl-flavonols from the fungus *Colletotrichum dematium* f.sp.*epilobii*". *Phytochemistry*, **45** (5): 957, 1997.

ADAMS, R. P. "Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry". 4a ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 804 p., 2007.

AGOSTINI, J. P.; TIMMER, L.W.; MITCHELL, D.J. "Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus". *Phytopathology*, **82** (11): 1377, 1992.

AGOSTINI, J. P.; TIMMER, L.W. "Population dynamics and survival of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* on citrus in Florida". *Phytopathology*, **84** (4): 420, 1994.

AGOSTINI, J. P.; TIMMER, L.W. "Selective isolation procedures for differentiation of two strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus". *Plant Disease*, **76** (11): 1176, 1992.

AGRIBUS 2009. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP, Consultoria & Comércio, 2009. p. 267-300.

ALMEIDA, T. F., CAMARGO, M., PANIZZI, R. C. "Efeito de extratos de plantas medicinais no controle de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da flor preta do morangueiro". *Summa Phytopathology*, **35** (3): 196, 2009.

ANDRADE, M. S. Estudo Químico em Patógenos e Vetores de Doenças de Citros. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2011. Tese de doutorado, 260 p.

ARIVUDAINAMBI, U. S. E., T. D. ANAND, V. SHANMUGAIAH, C. KARUNAKARAN, E. A. RAJENDRAN. "Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*". *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **61**: 340, 2011.

ASAI, T.; YAMAMOTO, T.; SHIRATA, N.; TANIGUCHI, T.; MONDE, K.; FUJII, I.; GOMI, K.; OSHIMA, Y. "Structurally diverse chaetophenol productions induced by chemically mediated epigenetic manipulation of fungal gene expression". *Organic Letters*, **15**: 3346, 2013.

ASHOUR, M. A.; ELKHAYAT, E. S.; EBEL, R.; EDRADA, R.; PROCKSH, P. "Indole alkaloid from the Red Sea sponge *Hyrtios erectus*". *Arkivoc*, **3**: 225, 2007.

AYER, W. A.; BROWNE, L. M.; FENG, M.; ORSZANSKA, H.; SAEEDI-GHOMI, H. "The chemistry of the blue stain fungi". *Canadian Journal of Chemistry*, **64**: 904, 1985.

BARTEL, B. "Auxin Biosynthesis". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**: 51, 1997.

BERGMANN, S., J. SCHUMANN, K. SCHERLACH, C. LANGE, E. C. HERTWECK A. A. BRAKHAGE. "Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*." *Natural Chemical Biology*, **3**: 213, 2007.

BIEL, M., WASCHOLOWSKI, V. & GIANNIS, A. "Epigenetics - An epicenter of gene regulation: Histones and histone-modifying enzymes". *Angewandte Chemie*, **44**: 3186, 2005.

BOETTGER, D., E. C. HERTWECK. "Molecular diversity sculpted by fungal PKS-NRPS hybrids." *ChemBioChem*, **14**: 28, 2013.

BRADBURY, E. M.; VAN HOLDE, K. E. "Chromatin structure and dynamics: a historical perspective". *New Comprehensive Biochemistry*, **39**: 1, 2004.

BRAND, S. C. Isolamento e Identificação de Substâncias Provenientes da Laranja Valência (*Citrus sinensis*) Envolvidas no Estímulo e/ou Quebra da Dormência de Estruturas Quiescentes de *Colletotrichum acutatum*, Agente Causal da Podridão Floral dos Citros. Piracicaba, Programa de Pós-Graduação – USP-ESALQ, 2012. Dissertação de mestrado, 104 p.

CAFEU, M. C. Estudo Químico e Avaliação Biológica dos Fungos Endofíticos *Xylaria sp.* e *Colletotrichum crassipes* Isolados de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). Araraquara, Programa de Pós-Graduação em Química – UNESP, 2007. Tese de doutorado, p. 255.

CHEN, G., H. F. DAI, Y. SHA, E. Y. H. PEI. "Two new compounds from the endophytic fungus *Colletotrichum sp.* L10 of *Cephalotaxus hainanensis*". *Journal of Asian Natural Products Research*, **13**: 1042, 2011.

CHEN, H.; FUJITA, M.; FENG, Q.; CLARDY, J.; FINK, G. R. "Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (14): 5048, 2004.

CHERBLANC, F. L., DAVIDSON, R. W., DI FRUSCIA, P., SRIMONGKOLPITHAK, N.; FUCHTER, M. J. "Perspectives on natural product epigenetic modulators in chemical biology and medicine". *Natural Product Reports*, **30**: 605, 2013.

CHUNG, K.; SHILTS, T.; ERTÜRK, U.; TIMMER, L. W.; UENG, P. P. "Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus". *Microbiology Letters*, **226**: 23, 2003.

CICHEWICZ, R. H. "Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners". *Natural Product Reports*, **27**: 11, 2010.

CINTRA, G. S. Podridão Floral dos Citros: Variabilidade, Sobrevivência e Controle do Agente Causal, *Colletotrichum acutatum*. Piracicaba, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, USP-ESALQ, 2009. Tese de Doutorado, p. 205.

COLLEMARE, J., A. BILLARD, H. U. BOHNERT, E. M. LEBRUN. "Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: the role of hybrid PKS-NRPS in pathogenicity." *Mycological Research*, **12**: 207, 2008.

DE NADAL, E.; ZAPATER, M.; ALEPUZ, P. M.; SUMOY, L.; MAS, G.; POSAS, F. "The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes". *Nature*, **427**: 370, 2004.

DELGADO, F. J.; GONZÁLEZ-CRESPO, J.; CAVA, R.; GARCÍA-PARRA, J.; RAMÍREZ, R. "Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening". *Food Chemistry*, **118**: 182, 2010.

DETTERBECK, R.; M. HESSE. "Configuration and enantioselective synthesis of the fungal metabolite WF14861". *Helvetica Chimica Acta*, **86**: 222, 2003.

DOBOSY, J. R.; SELKER, E. U. "Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation". *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**: 721, 2001.

DORNELLES, C.M.M. O problema da queda prematura de frutos jovens de citros no Rio Grande do Sul. In: *MESA REDONDA PARA ESTUDO DA QUEDA DE FRUTOS JOVENS EM CITROS*. Taquari, 1977. p. 3-6.

FAGAN, H.J. "Postbloom fruit drop: a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*". *Annals of Applied Biology*, 91 (1): 13, 1979.

FARAG, M. A.; RYU, C.; SUMNER, L. W.; PARE, P. W. "GC–MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants". *Phytochemistry*, **67**: 2262, 2006.

FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M B.; PIO, R. M; CASTRO, J.L. "Seleção de tangerinas e híbridos de citros para a tolerância à Mancha Marrom de *Alternaria* (*Alternaria alternata* Keissler)". *Citricultura atual*, 45 (8): 8, 2005.

FEMENÍA-RÍOS, M., C. M. GARCÍA-PAJÓN, R. HERNÁNDEZ-GALÁN, A. J. MACÍAS-SÁNCHEZ, E I. G. COLLADO. "Synthesis and free radical scavenging activity of a novel metabolite from the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **16**: 5836, 2006.

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

FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; CARVALHO, I.; CAMPO, V. L.; DUARTE, M. C. T.; BASTOS, J. K. "Diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus* brazilian strain". *Jornal of the Brazilian Chemical Society*, 16 (6B): 1448, 2005.

GAN, P., "Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi". *New Phytologist*, **197**: 1236, 2013.

GARCÍA-PAJÓN, C. M., E I. G. COLLADO. "Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species." *Natural Products Report*, **20**: 426, 2003.

GARCIA-PAJON, C. M.; HERNANDEZ-GALAN, R.; COLLADO, I. G. "Biotransformation by *Colletotrichum* species". *Tetrahedron*, **14**: 1229, 2003.

GARLET, T. M. B. Produtividade, Teor e Composição do Óleo Essencial de Espécies de *Mentha l.* (Lamiaceae) Cultivadas em Hidroponia com Variação de Potássio. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 2007. Tese de doutorado, 112 p.

GOES, A.; KIMATI, H. "Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* associados à Queda Prematura dos Frutos Cítricos". *Summa Phytopathologica*, 23 (1): 4, 1997.

GOES, A.; KIMATI, H. "*Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos: resistente ou insensível ao benomyl?". *Summa Phytopathologica*, 24 (3): 246, 1998.

GOHBARA, M.; KOSUGE, Y.; YAMASAKI, S.; KIMURA, Y.; SUZUKI, A.; TAMURA, S. "Isolation, structures and biological activities of colletotrichins, phytotoxic substances from *Colletotrichum nicotianae*". *Agricultural and Biological Chemistry*, **42**: 1037, 1978.

GOODRICH-TANRIKULU, M.; MAHONEY, N.; RODRIGUEZ, S. B. "The plant growth regulator methyl jasmonate inhibits aflatoxin production by *Aspergillus flavus*". *Microbiology*, **141**: 2831, 1995.

GRAESSLE, S.; LOIDL, P.; BROSCH, G. "Histone acetylation: plants and fungi as model systems for the investigation of histone deacetylases". *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**: 704, 2001.

GRIFFITHS, K. M.; BACIC, A.; HOWLETT, B. J. "Sterol composition of mycelia of the plant pathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*". *Phytochemistry*, **62**: 147, 2003.

GROSS, H., E J. E. LOPER. "Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas spp.*". *Natural Product Reports*, **26**: 1408, 2009.

GUAN, Y., RAMALINGAM, S., NAGEGOWDA, D., TAYLOR, P. W. J., CHYE, M. "Brassica juncea chitinase BjCHI1 inhibits growth of fungal phytopathogens and

agglutinates Gram-negative bacteria". *Journal of Experimental Botany*, **59** (12): 3475, 2008.

GUIMARÃES, D. O. Prospecção Química e Biológica em Fungos Endofíticos Associados à *Viguiera arenaria* (Asteraceae). Ribeirão Preto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, 2006. Dissertação de Mestrado, 208 p.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; VIEIRA, N. J.; OLIVEIRA, L. F.; SILVA, C. H.; LOPES, N. P.; DIAS, L. G.; DURAN-PATRON, R.; COLLADO, I. G.; PUPO, M. T. "Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species." *Phytochemistry*, **71**: 1423, 2010.

GUZMAN-LOPES, O.; TRIGOS, A.; FERNANDEZ, F. J.; YANNEZ-MORALES, M. J.; SAUCEDO-CASTANEDA, G. "Tyrosol and tryptofol produced by *Ceratocystis adipose*". *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **23**: 1473, 2007.

HAN, Y. S.; HEIJDEN, R.; VERPOORTE, R. "Improved anthraquinone accumulation in cell cultures of *Cinchona Robusta* by feeding of biosynthetic precursors and inhibitors". *Biotechnology Letters*, **24**: 705, 2002.

HANSEN, K. R.; BURNS, G.; MATA, J.; VOLPE, T. A.; MARTIENSSEN, R. A.; BAHLER, J.; THON, G. "Global effects on gene expression in fission yeast by silencing and RNA interference machineries". *Molecular and Cellular Biology*, **25**: 590, 2005.

HARP, J. M., HANSON, B. L. & BUNICK, G. J. "The core particle of the nucleosome". *New Comprehensive Biochemistry*, **39**: 13, 2004.

HENRIKSON, J. C., HOOVER, A. R., JOYNER, P. M.; CICHEWICZ, R. H. "A chemical epigenetics approach for engineering the in situ biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*". *Organic and Biomolecular Chemistry*, **7**: 435, 2009.

HIROTA, A.; HORIKAWA, T.; FUJIWARA, A. "Isolation of phenylacetic acid and indoleacetic acid from a phytopathogenic fungus, *Glomerella cingulata*". *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **57**: 492, 1993.

HOFFMEISTER, D., E N. P. KELLERB. "Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation." *Natural Product Reports*, **24**: 393, 2007.

INACIO, M. L.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; ARAUJO, A. R. "Antifungal metabolites from *Colletotrichum gloesporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocaria mandiocanna* Nees (Lauraceae)". *Biochemical Systematics and Ecology*, **34** (11): 822, 2006.

INOUE, M.; TAMEOKA, H.; TSURUSHIMA, T.; MIYAGAWAAND, H.; UENO, T. "Colletofragarones A1 and A2, novel germination self-inhibitors from the fungus *Colletotrichum fragariae*". *Tetrahedron Letters*, **37**: 5731, 1996.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Estimativa da safra de laranja do Estado de São Paulo, ano safra 2013/2014. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=12856>>. Acesso em 10 nov. 2014.

JABALPURWALA, F. A.; SMOOT, J. M.; ROUSSEF, R. L. "A comparison of citrus blossom volatiles". *Phytochemistry*, **70** (11): 1428, 2009.

JANSSENS, L.; DEPOOTER, H. L.; SCHAMP, N. M.; VANDAMME, E. J. "Production of flavours by microorganisms". *Process in Biochemistry*, **27**: 195, 1992.

JIMÉNEZ-TEJA, D., M. DAOUBI, I. G. COLLADO, E R. HERNÁNDEZ-GALÁN. "Lipase-catalyzed resolution of 5-acetoxy-1,2-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene application to the synthesis of (3R,4S)-cis-4-hydroxy-6-deoxyscytalone, a metabolite isolated from *Colletotrichum acutatum*". *Tetrahedron*, **65**: 3392, 2009.

KELLER, N. P., E T. M. HOHN. "Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi." *Fungal Genetics and Biology*, **21**: 17, 1997.

KNIGHT, V.; SANGLIER, J. J.; DITULIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. "Diversifying microbial natural products for drug Discovery". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **62**: 446, 2003.

KOKUBUN, C. VEITCH, N. C.; BRIDGE, P. D.; SIMMONDS, M. S. J. "Dihydrocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola*". *Phytochemistry*, **62**: 779, 2003.

KOSALKOVA, K.; GARCÍA-ESTRADA, C.; ULLÁN, R.V.; GODIO, R.P.; FELTRER, R.; TEJEIRA, F.; MAURIZ, E.; MARTÍN, J.F. "The global regulator LaeA controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine C synthesis in *Penicillium chrysogenum*". *Biochimie*, **91**: 214, 2009.

KOSUGE, Y.; SUZUKI, A.; TAMURA, S. "Structure of Colletochlorin D from *Colletotrichum nicotianae*". *Agricultural and Biological Chemistry*, **38**: 1553, 1974.

KURAMAEIZIOKA, E.E.; LOPES, C.R.; SOUZA, N.L.; MACHADO, M.A. "Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. from citrus orchards affected by postbloom fruit drop in Brazil". *European Journal of Plant Pathology*, **103**: 323, 1997

KURITA, N.; MAKOTO, M.; KURANE, R.; TAKAHARA, Y. "Antifungal activity of components of essential oils". *Agricultural and Biological Chemistry*, **45**: 945, 1981.

KUROSAKI, F. KISAEA, Y.; NISHI, A. "Derailment product in NADPH-dependent synthesis of dihydroisocoumarin 6-hydroxymellein by elicitor-treated carrot cell extracts". *European Journal of Biochemical*, **185**: 85, 1989.

LAWRENCE, R. J.; EARLEY, K.; PONTES, O.; SILVA, M.; CHEN, Z. J.; NEVES, N.; VIEGAS, W.; PIKAARD, C. S. "A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance". *Molecular Cell*, **13**: 599, 2004.

LEE, I.; OHA, J. H.; SHWAB, E. K.; DAGENAIS, T. R. T; ANDES, D.; KELLER, N. P. "HdaA, a class 2 histone deacetylase of *Aspergillus fumigatus*, affects germination and secondary metabolite production". *Fungal Genetics and Biology*, **46**: 782, 2009.

LIU, Y.; JUNG, J. H; ZHANG, S. "Indole alkaloids from *Sarcotragus* species". *Biochemical Systematics and Ecology*, **34**: 453, 2006.

LU, X. "Aromatic compounds from endophytic fungus *Colletotrichum* sp. L10 of *Cephalotaxus hainanensis* Li". *Fitoterapia*, **83**: 737, 2012.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. "New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*". *Plant Science*, **151**: 67, 2000.

MACMILLAN, J.; SIMPSON, T. J. "The absolute stereochemistry of colletodiol and the structures of related metabolites of *Colletotrichum capsici*". *Tetrahedron Letters*, **1**: 16, 1968.

MANCILLA, G., D. JIMÉNEZ-TEJA, M. FEMENÍA-RÍOS, A. J. MACÍAS-SÁNCHEZ, I. G. COLLADO, E R. HERNÁNDEZ-GALÁN. "Novel macrolide from wild strains of the phytopathogen fungus *Colletotrichum acutatum*". *Natural Product Communications*, **4**: 307, 2009.

MARINHO, A. M. MARINHO, P. S. B., RODRIGUES FILHO, E. "Constituintes químicos de *Penicillium* sp, um fungo endofítico isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae)". *Revista Ciências Exatas e Naturais*, **9** (2): 189, 2007.

MARINHO, A. M. *Metabolismo Secundário de Fungos Endofíticos do Gênero Penicillium Associados às Plantas Murraya paniculata (Rutaceae) e Melia azederach (Meliaceae)*. São Carlos. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2005. Tese de doutorado, 316 p.

MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; FREITAS, R. J. S.; CHRISTEN, P.; SOCCOL, C. R. "Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology". *Biochemical Engineering Journal*, **6**: 33, 2000.

MIAO, L.; KWONG, T.F.N.; QIAN, P.Q. "Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium c.f. saccharicola*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **72**: 1063, 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Citrus. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus>>. Acesso em 10 nov. 2014.

PARK, H. B.; KWON, H. C.; LEE, C. H.; YANG, H. O. "Glionitrin A, an antibioticantitumor metabolite derived from competitive interaction between abandoned mine microbes". *Journal of Natural Products*, **72**: 248, 2009.

PETTIT, R. K. "Mixed fermentation for natural product drug Discovery". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **83**: 19, 2009.

PERES, N.A.; TIMMER, L.W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. "Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*". *Plant Disease*, 89 (8): 784, 2005.

PORTO, O. M.; ROSSETTI, V.; DORNELLES, C. M. M. Queda de frutos jovens de citrus, causada por *Colletotrichum* sp. no Rio Grande do Sul. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA*, 5, 1979, Pelotas. Anais... Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. p.681-692.

PRIETO, K. R. Estudo Químico de *Alternaria alternata* Patótipo de Tangerina em Meio Artificial e na Interação com *Guignardia citricarpa*. São Carlos. Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2012. Tese de doutorado, 295 p.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. "Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases". *Trends in Biotechnology*, **21**: 400, 2003.

QUINTANILLA-LICEA, R.; COLUNGA-VALLADARES, J. F.; CABALLERO-QUINTERO, A.; WAKSMAN, N.; GOMEZ-FLORES, R.; RODRIGUEZ-PADILLA, C.; TAMEZ-GUERRA, R. "5,5'-Biindole". *Molbank*, **10**: 474, 2006.

ROBYR, D.; KURDISTANI, S. K.; GRUNSTEIN, M. "Analysis of genome-wide histone acetylation state and enzyme binding using DNA microarrays". *Methods in Enzymology*, **376**: 289, 2004.

ROJO, F.; FERREZ, M.; REYNOSO, M.; TORRES, A.; CHULZE, S. "Effect of *Tricoderma* species on growth of *Fusarium proliferatum* and production of fumonisins, fusaproliferin and beauvericin". *Mycotoxin Research*, **23**: 173, 2007.

RUANGRUNGSI, N.; SEKINI, T.; PHADUNGSHAROEN, T.; SURYIAGAN, S.; MURAKOSHI, I. "Isocoumarins from *Xyris indica*". *Phytochemistry*, 38 (2): 481, 1995.

SAWADA, T., NAKADA, E. M. "Enantioselective total synthesis of (+)-colletoic acid via catalytic asymmetric intramolecular cyclopropanation of an α diazo- β -keto diphenylphosphine oxide". *Organic Letters*, **15**: 1004, 2013.

SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO DE SÃO PAULO. Previsão da safra agrícola de laranja do Estado de São Paulo, ano agrícola 2007/2008: 1º levantamento, maio de 2008. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/mercado/laranja0508.pdf>. Acesso em: 11 out. 2010.

SILVA, A. F.C., M. L. RODRIGUES, S. E. FARIAS, I. C. ALMEIDA, M. R. PINTO, E. E. BARRETO-BERGTER. "Glucosylceramides in *Colletotrichum gloeosporioides* are

involved in the differentiation of conidia into mycelial cells.” FEBS Letters, **561**: 173, 2004.

SILVA, S. C. Estudo Químico de Microrganismos Associados a *Khaya ivorensis* (Meliaceae). São Carlos. Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2007. Tese de doutorado, 242 p.

SIRCAR, D.; MITRA, A. “Accumulation of *p*-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota* 2: Confirming biosynthetic steps through feeding of inhibitors and precursors”. Journal of Plant Physiology, **166**: 1370, 2009.

SHIMADA, A.; MIYAKO, K.; TACKEUCHI, S.; FUJIOKA, S.; INOKUSHI, T.; KIMURA, Y. “Aspterric acid and 6-hydroxymellein, inhibitors of pollen development in *Arabidopsis thaliana*, produced by *Aspergillus terreus*. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, **1**: 459, 2002.

SHWAB, E. K.; KELLER, N. P. “Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes”. Mycological Research, **112**: 225, 2008.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; De SOUZA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M.; RAMOS, M. F. S. “Óleos essenciais”. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, **1**: 38, 2000.

SLATTERY, M.; RAJBHANDARI, I.; WESSON, K. “Competition-mediated antibiotic induction in the marine bacterium *Streptomyces tenjimariensis*”. Microbial Ecology, **41**: 90, 2001.

SONODA, R.M.; PELOSI, R.R. “Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* from lesions on citrus blossoms in the Indian River of Florida”. Proceedings of the Florida State Horticulture Society, **101**: 36, 1988.

SPEZIALI, M. G. Síntese de Produtos Fragrantes Através da Oxidação Catalítica de Olefinas de Origem Natural. Minas Gerais, Instituto de Química – UFMG, 2008. Dissertação de mestrado, 198 p.

STANIER, R. Y.; HAYAISHI, O.; TSUCHIDA, M. “The bacterial oxidation of tryptophan”. A general survey of the pathways, **62**, 1951.

STOESSL, A.; STOTHERS, J. B. “Colletruncoic acid methyl ester, a unique meroterpenoid from *Colletotrichum truncatum*”, Bioscience, **41**: 677, 1986.

SUN, X.; ZHOU, X.; CAI, M.; TAO, K.; ZHANG, Y. “Identified biosynthetic pathway of aspergiolide A and a novel strategy to increase its production in a marine derived fungus *Aspergillus glaucus* by feeding of biosynthetic precursors and inhibitors simultaneously”. Bioresource Technology, **100**: 4244, 2009.

TIMMER, L.W.; AGOSTINI, J.P.; ZITKO, S.E.; ZULFIQAR, M. “Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas”. Plant Disease, **78** (4): 329, 1994.

TIMMER, L.W.; BROWN, G.E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Eds). *Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interactions*. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. p. 300-316.

TOZZE JÚNIOR, H. J. MELLO, M. B. A., MASSOLA JÚNIOR, N. S. "Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum sp.* causadores de antracnose em solanáceas". *Summa Phytopathology*, 32 (1): 77, 2006.

TRIBUS, M.; BAUER, I., GALEHR, J.; RIESER, G.; TROJER, P.; BROSCHE, G.; LOIDL, P.; HAAS, H.; GRAESSLE, S. "A novel motif in fungal class 1 histone deacetylases is essential for growth and development of *Aspergillus*". *Molecular Biology of the Cell*, 21: 345, 2010.

TSURUSHIMA, T.; UENO, T.; FUKAMI, H.; IRIE, H.; INOUE, M. "Germination of selfinhibitors from *Colletotrichum gloeosporioides f. sp. Jussiaea*". *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8: 652, 1995.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D.J. "A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography". *Journal of Chromatography*, 11: 463, 1963.

VERGOPOULOU, S.; GALANOPOULOU, D.; MARKAKI, P. "Methyl jasmonate stimulates aflatoxin B1 biosynthesis by *Aspergillus parasiticus*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3494, 2001.

VILELA, A. E. Identificação de substâncias biologicamente ativas, produzidas por laranja Valência (*Citrus sinensis*), envolvidas na ativação de estruturas de infecção de *Colletotrichum acutatum*. Piracicaba, Departamento de Fitopatologia - USP, 2012. Dissertação de Mestrado, 83 p.

WICKLOW, D. T., A. M. JORDAN, e J. B. GLOER. "Antifungal metabolites (monorden, monocillins I, II, III) from *Colletotrichum graminicola*, a systemic vascular pathogen of maize". *Mycological Research*, 113: 1433, 2009.

WILLIAMS, R. B., HENRIKSON, J. C., HOOVER, A. R., Lee, A. E.; CICHEWICZ, R. H. "Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome". *Organic and Biomolecular Chemistry*, 6: 1895, 2008.

WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; GHAOUTH, A. E.; WINIEWSKI, M. E. "Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*". *Plant Disease*, 81: 204, 1997.

YANG, Z., Y. YIN, Z. WANG, T. YANG, E D. CHEN. "Cytotoxic metabolites of endophytic fungus *Colletotrichum sp.* from *Aristolochia spp.*" *Molecular & General Genetics*, 251: 565, 1996.

YANG, Z.; YIN, Y.; YANG, T.; JIN, W.; KANG, H.; WEN, L.; XIA, X.; RUAN, L.; LUO, M.; GE, M. "3-Hydroxybutan-2-yl octadeca-9,12-dienoate, its preparation method and application in preparing antibacterial drugs". *Faming Zhuanli Shenqing*, 2013.

YOUNG, H.; PATTERSON, V. J. "A UV protective compound from *Glomerella cingulata*-a mycosporine". *Phytochemistry*, **21**: 1075, 1982.

YUNES, R. A., FILHO, V. C. *Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia*. 2a ed., p.221-276. 319p., 2009.

ZHANG, W.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; KROHN, K. "Ring B aromatic steroids from an endophytic fungus, *Colletotrichum sp.*". *Natural Product Communications*, **4**: 1449, 2009.

ZHANG, Q.; WEI, X.; WANG, J. "Phillyrin produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus isolated from *Forsythia suspensa*". *Fitoterapia*, **83**: 1500, 2012.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORT, R. "Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites". *Biotechnology Advances*, **23**: 283, 2005.

ZHOU, S.; ZHOU, M.; WANG, S.; CHEN, S. "Two compounds from the endophytic *Colletotrichum sp.* of *Ginkgo biloba*". *Natural Product Communications*, **6**: 1131, 2011.

ZOHRE, D. E.; ERTEN, H. "The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation". *Process Biochemistry*, **38**: 319, 2002.

ZOU, W. X.; MENG, J. C.; Lu, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y.; TAN, R. X. "Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an Endophytic Fungus in *Artemisia mongolica*". *Jornal of the Natural Products*, **63**: 1529, 2000.

ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W. "Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*". *Mycologia*, **88** (1): 121, 1996.