

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados
de *Anthurium alcatrazense* e *Begonia* spp.**

Diana Fortkamp

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2018**

Diana Fortkamp
Licenciado em Ciências Biológicas

Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de
***Anthurium alcatrazense* e *Begonia* spp.**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **SIMONE POSSEDENTE DE LIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Fortkamp, Diana

Metabólitos secundários produzidos por fungos endófitos isolados de *Anthurium alcatrazense* e *Begonia* spp. / Diana Fortkamp. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

184 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Biofilme 2. Fungicida 3. Ilha de Alcatrazes 4. Mata Atlântica 5. Proteassoma I. Título

Dedico aos meus pais Altair e Rosemary Fortkamp, por todo incentivo que sempre recebi, pelo apoio nos momentos difíceis e pelo amor incondicional, por serem meu porto seguro e exemplos de vida para mim.

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por tudo que consegui até hoje. Com Ele tudo é possível.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) pela infraestrutura disponibilizada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade, suporte e conhecimento adquirido durante a realização deste doutorado.

A minha orientadora Profa. Dra. Simone Possedente de Lira por toda a ajuda e orientação recebida durante a realização deste trabalho, de modo especial pela correção atenciosa da tese. Agradeço também pela amizade e pela confiança recebida.

Ao meu co-orientador na Alemanha Dr. Wolf-Rainer Abraham pela boa vontade e disposição em me receber em Braunschweig, me ajudar e orientar nos 6 meses que passei em seu laboratório.

Agradeço também a toda a equipe de pesquisa do Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung que fizeram com que eu me sentisse em casa na Alemanha, e em particular a doutoranda e amiga querida Kamila Tomoko Yuyama pela amizade, paciência, e ajuda em todas as etapas da pesquisa. Agradeço a Esther Surges e Cornélia Senske pela ajuda e amizade, a Christel Kakosche pelas análises de RMN e aos estagiários Carolina Müller e Tim Neumann pela colaboração na realização dos experimentos. Agradeço a Clara Chepkirui pela ajuda recebida no laboratório e na consulta em banco de dados.

A CAPES e CNPq (processo nº 142079/2016-2) pela bolsa concedida, e aos projetos BIOprospeTA FAPESP (Projeto temático - 2013/50228-8) e FAPESP (Projeto regular - 2014/15760-3) pelo apoio financeiro.

A Marinha do Brasil por fornecer transporte à ilha de Alcatrazes.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio-MMA), a Estação Ecológica Tupinambás, aos funcionários da estação pelo transporte e auxílio durante a coleta na ilha de Alcatrazes.

Ao Centro de Biologia Marinha da USP (CEBIMAR - São Sebastião) e seus funcionários pelas acomodações e infraestrutura disponibilizada.

Ao Prof. Dr. Roberto de Souza Gomes Berlinck (IQSC-USP São Carlos) por disponibilizar materiais e os equipamentos HPLC-UV-MS-ELSD e UPLC-MS para as análises químicas, e às técnicas Fabiana T. Rodrigues e Karim F. B. de Camargo pela ajuda na utilização dos equipamentos.

Ao Prof. Dr. Márcio Weber Paixão por disponibilizar o equipamento para as análises de alfa D.

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira e a técnica Luciana Vizotto (Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear-UFSCAR) pelas análises de RMN.

Ao Prof. Dr. André Rodrigues (Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos – UNESP Rio Claro) e a aluna Ms. Ana Maria L. Correia pela identificação morfológica e molecular dos micro-organismos estudados.

Aos Professores Dr. Fernando Dini Andreote e Dr. Cláudio Aguiar pela coordenação do PPG em Microbiologia Agrícola.

Ao Dr. Pedro Andrade pela colaboração junto ao Projeto Temático.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio de Assis (Instituto de biociências – UNESP Rio Claro) e a aluna Ms. Letícia P. Poli pela ajuda na coleta e identificação das plantas.

Aos Professores Dr. João Lúcio Azevedo, Dra. Liliane D. Teixeira, Dra. Aline P. Kleiner (*in memoriam*) e Dr. Nelson Sidnei Massola Jr. (ESALQ-USP) por cederem as linhagens de fitopatógenos.

Ao Prof. Dr. André G. Tempone (Laboratório de Novos Fármacos e Doenças Negligenciadas - Instituto Adolfo Lutz-SP) pelos ensaios de atividade antileishmaniose.

A Dra. Daniela Trivella e ao Dr. Rafael de Felício, do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) pelos ensaios de PBP e de inibição do proteassoma.

Aos Professores do Departamento de Química Dr. Marcos Y. Kamogawa, Dra. Wanessa M. Mattos, Dr. Arquimedes Lavorenti e Dr. Marcelo E. Alves pela boa convivência e amizade, empréstimo de materiais e equipamentos e ajuda em diversos momentos.

Aos técnicos de laboratório Dr. Luiz Humberto Gomes, Ms. Felipe Gabriel Andrino, Lenita Maria. C. P. E. Oliveira, Janaína Truffi, Rita de Cássia L. de Castro, Gertrudes C. B. Fornazier e às secretárias Nádia Borges e Luciane Brajão por toda ajuda recebida nesses anos e pela boa convivência e companheirismo.

As secretárias do PPG em Microbiologia Agrícola Maria Fernanda Almeida Prado e Maria Solizete Granzioil Silva pela ajuda e boa vontade.

Aos colaboradores da Genética: Profa. Dra. Maria Carolina Quecine Verdi, Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, Dra. Joelma Marcon, José Antônio da Silva (Zezo) e Jéssica Campos por todo o suporte recebido.

Ao técnico João Luiz Bronzel Junior (UNESP, Araraquara) pelas análises de HR-EM.

Aos professores Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior e Dr. Francisco Tanaka pelo aprendizado adquirido enquanto monitora da disciplina de Microbiologia.

A toda equipe da biblioteca da ESALQ, em especial à bibliotecária Eliana M. Garcia pela ajuda na formatação correta da tese.

Aos amigos e colegas de laboratório Dra. Gislâine Vicente dos Reis, Dr. Richtier Gonçalves da Cruz, Dr. Sérgio Birello Sartori, Dr. Flávio Rocha, Dra. Luciana Mecatti Elias, Ms. Luciana Jankowsky, Ms. Débora Grandino, Dra. Jeane Maria Cunha Machado Andrino, Dra. Joze Aparecida Marciano Correa, Prof. Dr. Marcos Canto Machado (Pipoca), Dr. José Brites Neto, Ms. Isabela Maria Nascimento, Dra. Andrea Bogas, Dra. Marina Colzato, Ms. Amanda Ribeiro Martins da Silva, Ms. Marcos P. Monteiro de Oliveira, Ms. Natália Alexandrino, Ms. Cleiton dos Santos Mattos, Ms. Ana Paula Silva e Ms. Susilaine Savassa por toda a ajuda, pelo companheirismo, ensinamentos e momentos de descontração.

Aos alunos de iniciação científica Luís Claudio Martins, Fernanda Souza Krupek, Jessica Aparecida Ferrarezi, Higor Seraphim Pimpinato, Isabelli Casagrande, Marília C. Ferreira, Guilherme Novaes, Jonathas Oliveira, Eduardo Castro, André Patrício e Andressa Ducatti de Goes pela amizade e por toda ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

As amigas de Piracicaba (Dra. Juliana Tauffer de Paula, Dra. Ana Paula Preczenhak, Daniela Tornisielo, Ms. Rafaela Santos, Ms. Gabriela Salgado e Ms. Cláudia Alves) e aos amigos da Alemanha (Ms. Kamila Tomoko Yuyama, Ms. Abhishek Bakuli, Ms. Angélica Jaconi, Ms. Daniela Gornyk, Dra. Sophie Tiemann, Dra. Bahar Baser, Ms. Volker Berndt, Tim Neumann, Ms. Lamiaa, Dra. Hang, Ms. Zahra e Ms. Nassim) pela amizade, companheirismo e acolhimento.

Um agradecimento especial aos meus grandes amigos Dra. Gislâine Vicente dos Reis, que esteve comigo no laboratório durante a realização dos experimentos, e Dr. Richtier Gonçalves da Cruz, que me ajudou nas análises estatísticas.

Aos meus pais Altair J. Fortkamp e Rosemary Wrublack Fortkamp pelo amor, confiança e pela educação que me proporcionaram. Agradeço por serem exemplos de dedicação e perseverança.

Aos meus irmãos Anderson Felipe Fortkamp e Johann Fortkamp (*in memoriam*) pelo amor e incentivo que sempre recebi, e por acreditarem em mim.

A toda minha família pelo amor incondicional.

Enfim, agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho e da minha formação e que por ventura tiveram seus nomes esquecidos, meus sinceros agradecimentos.

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito.”

Martin Luther King

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE TABELAS.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	17
Referências.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. O bioma Mata Atlântica.....	19
2.2. O arquipélago de Alcatrazes.....	19
2.3. <i>Anthurium alcatrazense</i>	20
2.4. <i>Begonia</i> spp.....	21
2.5. Definição e caracterização de organismos endofíticos.....	22
2.6. Coevolução entre organismos endofíticos e plantas.....	24
2.7. Produtos naturais.....	24
2.8. Bioeconomia.....	27
2.9. Fungos endofíticos e a produção de metabólitos secundários.....	28
2.10. Metabólitos secundários produzidos por basidiomicetos endofíticos.....	36
2.11. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e a antracnose.....	37
2.12. <i>Phomopsis sojae</i> como importante fitopatógeno.....	40
2.13. Metabólitos fúngicos ativos contra <i>Colletotrichum</i> spp. e <i>P. sojae</i>	41
2.14. Lesihmaniose como doença negligenciada e metabólitos fúngicos ativos contra <i>Leishmania</i> spp.....	44
2.15. O proteassoma como alvo terapêutico e metabólitos fúngicos ativos contra o proteassoma.....	47
2.16. Biofilmes bacterianos e metabólitos secundários fúngicos ativos no combate aos biofilmes.....	48
REFERÊNCIAS.....	51
3. OBJETIVOS.....	67
3.1. Geral.....	67
3.2. Específicos.....	67
4. CAPÍTULO 1 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS TRILONGINS PRODUZIDAS POR <i>Trichoderma</i> sp.	69

RESUMO.....	69
ABSTRACT.....	69
4.1 Introdução	70
4.2 Materiais e métodos	71
4.2.1 Procedimentos gerais	71
4.2.2 Material biológico	72
4.2.3 Identificação botânica.....	72
4.2.4 Identificação fúngica	72
4.2.5 Isolamento dos compostos ativos	73
4.2.6 Protocolos dos ensaios.....	73
4.2.6.2 Ensaio de inibição do proteassoma.....	75
4.2.6.3 Ensaio <i>in vitro</i> contra <i>Leishmania (L.) infantum</i>	76
4.3 Resultados e discussão	77
4.3.1 Identificação botânica e fúngica	77
4.3.2 Isolamento e identificação dos compostos	79
4.3.3 Avaliação dos compostos ativos.....	82
4.4 Conclusão.....	90
Referências.....	91
Informações complementares	98
5 CAPÍTULO 2 - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS PELO	
BASIDIOMICETO <i>Hymenochaete</i>-LIKE, ENDÓFITO DA PLANTA <i>Anthurium</i>	
<i>alcatrazense</i>	107
RESUMO.....	107
ABSTRACT.....	107
5.1 Introdução	108
5.2 Materiais e Métodos.....	109
5.2.1 Procedimentos experimentais gerais	109
5.2.2 Material biológico	109
5.2.3 Identificação botânica e fúngica	110
5.2.4 Produção, extração e isolamento dos metabólitos secundários	110
5.2.5 Bioensaio de inibição do proteassoma	111
5.2.6 Bioensaio de eficiência <i>in vitro</i> contra <i>Leishmania (L.) infantum</i>	111
5.3 Resultados e Discussão	112

5.3.1	Identificação botânica e fúngica	112
5.3.2	Isolamento e identificação dos metabólitos secundários	112
5.4	Conclusões.....	114
	Referências	114
	Informações complementares.....	119
6	CAPÍTULO 3 - ISOLAMENTO DE COMPOSTO PRODUZIDO PELO FUNGO	
	ENDOFÍTICO <i>Neopestalotiopsis</i> sp. CONTRA <i>Phomopsis sojae</i>	123
	RESUMO	123
	ABSTRACT	123
6.1	Introdução.....	123
6.2	Material e Métodos.....	124
6.2.1	Procedimentos gerais	124
6.2.2	Material biológico	125
6.2.3	Identificação botânica e fúngica	125
6.2.4	Fermentação, extração e isolamento	126
6.2.5	Ensaio antifúngicos	126
6.3	Resultados e Discussão	128
6.3.1	Identificação botânica e fúngica	128
6.3.2	Isolamento e identificação do composto ativo	128
6.4	Conclusão	133
	Referências	133
	Informações complementares.....	138
7	CAPÍTULO 4 - SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS COM POTENCIAL	
	METABÓLICO CONTRA A FORMAÇÃO DE BIOFILME POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	e <i>Staphylococcus aureus</i>	141
	RESUMO	141
	ABSTRACT	141
7.1	Introdução.....	142
7.2	Material e Métodos.....	143
7.2.1	Procedimentos gerais	143
7.2.2	Micro-organismos	144
7.2.3	Identificação botânica e fúngica	144
7.2.4	Fermentação	144

7.2.5	Investigação da atividade antimicrobiana e antibiofilme dos extratos dos endófitos.....	145
7.2.6	Purificação e elucidação estrutural.....	145
7.3	Resultados e Discussão.....	146
7.4	Conclusão.....	171
	Referências.....	171
	Informações Complementares.....	178
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	183

RESUMO

Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de *Anthurium alcatrazense* e *Begonia* spp.

Os produtos do metabolismo secundário, também conhecidos por produtos naturais, representam uma fonte inexplorada de compostos com atividade biológica. Os microorganismos, entre eles os endófitos, são fontes promissoras de obtenção dessas substâncias. Assim sendo, essa pesquisa visou obter compostos de importância biotecnológica produzidos por fungos endofíticos isolados de folhas das plantas *Anthurium alcatrazense*, *Begonia venosa* e *B. fischeri*. Para isso, 5 linhagens de fungos endofíticos isolados dessas plantas (códigos P7BDA1F2, P8BDA1F1, AM29, D28 e D29) foram estudadas. A identificação desses microorganismos foi realizada por meio de análises morfológicas e moleculares, revelando serem estas linhagens *Hymenochaete*-like, *Trichoderma* sp., *Neopestalotiopsis* sp., *Aspergillus* sp. e *Diaporthe* sp., respectivamente. A partir do extrato bruto de *Hymenochaete*-like (código P7BDA1F2) foram isolados os compostos 5,7-dimetoxifitalida e metil orselinato, os quais foram testados contra *Leishmania* (L.) *infantum* e alvo do proteossoma e não apresentaram atividade. A partir do extrato bruto de *Trichoderma* sp. (código P8BDA1F1) foram isolados os compostos trilongins BI-BIV. Estes apresentaram atividade inibitória ao fitopatógeno *C. gloeosporioides*, com MIC de 40, 320, 160 e 310 μM , respectivamente. As trilongins BI-BIV foram testadas contra a subunidade ChTL do proteossoma e apresentaram os valores de IC_{50} de $6,5 \pm 2,7$; $4,7 \pm 1,8$; $6,3 \pm 2,2$; e $2,7 \pm 0,5$ μM . Os compostos também foram testados *ex vivo* contra os amastigotas intracelulares de *Leishmania* (L.) *infantum*, mas não apresentaram seletividade. A partir do extrato bruto de *Neopestalotiopsis* sp. (código AM29), foi isolado um composto de massa molecular 366,0570 Da (que pode ser inédito na literatura), o qual apresentou atividade inibitória ao fitopatógeno *P. sojae*, com MIC de 312 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A partir dos extratos brutos de *Aspergillus* sp. e *Diaporthe* sp. foram isolados 9 compostos, cujas frações precursoras apresentaram atividade contra as bactérias formadoras de biofilme *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Para a identificação desses compostos, análises adicionais precisam ser realizadas. Este é o primeiro relato do isolamento dos compostos 5,7-dimetoxifitalida e metil orselinato do basidiomiceto *Hymenochaete*-like. Também está sendo relatada pela primeira vez a atividade antifúngica das trilongins a *C. gloeosporioides* e contra o alvo do proteossoma, assim como o isolamento de um possível novo composto de *Neopestalotiopsis* sp. e sua atividade contra *P. sojae*.

Palavras-chave: Biofilme; Fungicida; Ilha de Alcatrazes; Mata Atlântica; Proteossoma

ABSTRACT

Secondary metabolites produced by endophytic fungi isolated from *Anthurium alcatrazense* and *Begonia* spp.

Secondary metabolism products, also known as natural products, represent an unexplored source of compounds with biological activity. Microorganisms, including endophytes, are promising sources of these substances. Thus, this research aimed to obtain compounds with biotechnological importance produced by endophytic fungi isolated from leaves of the plants *Anthurium alcatrazense*, *Begonia venosa* and *B. fischeri*. To this end, 5 endophytic fungal strains isolated from these plants (codes P7BDA1F2, P8BDA1F1, AM29, D28 and D29) were studied. The identification of these microorganisms was carried out by morphological and molecular analyzes, revealing that these strains are *Hymenochaete*-like, *Trichoderma* sp., *Neopestalotiopsis* sp., *Aspergillus* sp. and *Diaporthe* sp., respectively. From the crude extract of *Hymenochaete*-like (code P7BDA1F2) the compounds 5,7-dimethoxyphthalide and methyl orselinate were isolated, which were tested against *Leishmania* (L.) *infantum* and proteasome target and showed no activity. From the crude extract of *Trichoderma* sp. (code P8BDA1F1) the trilonins BI-BIV were isolated. These compounds presented inhibitory activity to the plant pathogen *C. gloeosporioides*, with MIC of 40, 320, 160 and 310 μM , respectively. The trilonins BI-BIV were tested against the ChTL subunit of the proteasome and showed IC_{50} values of 6.5 ± 2.7 , 4.7 ± 1.8 , 6.3 ± 2.2 , $2.7 \pm 0, 5 \mu\text{M}$. The compounds were also tested *ex vivo* against the intracellular amastigotes of *Leishmania* (L.) *infantum*, but did not show selectivity. From the crude extract of *Neopestalotiopsis* sp. (code AM29), a compound with molecular mass 366.0570 Da (which can be unpublished in the literature) was isolated, which presented inhibitory activity to the plant pathogen *P. sojae*, with MIC of 312 $\mu\text{g mL}^{-1}$. From the crude extracts of *Aspergillus* sp. and *Diaporthe* sp. 9 compounds were isolated, whose precursor fractions showed activity against the biofilm forming bacteria *S. aureus* and *P. aeruginosa*. For the identification of these compounds, additional analyzes need to be performed. This is the first report of the isolation of the compounds 5,7-dimethoxyphthalide and methyl orselinate from the basidiomycete *Hymenochaete*-like. The antifungal activity of trilonins to *C. gloeosporioides* and against the proteasome target is also being reported for the first time, as well as the isolation of a possible new compound from *Neopestalotiopsis* sp. and its activity against *P. sojae*.

Keywords: Biofilm; Fungicide; Island of Alcatrazes; Atlantic forest; Proteasome

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão parcial da Ilha de Alcatrazes.	20
Figura 2 – Estrutura química da penicilina (1) e da ciclosporina (2).	30
Figura 3 – Estrutura química do paclitaxel (3), da podofilotoxina (4), da vimblastina (5) e da camptotecina (6).	31
Figura 4 - Estrutura química da isopestacina (7).	32
Figura 5 - Estrutura química do ergosterol (8), do peróxido de ergosterol (9), do cerivisterol (10), da uracila (11), do dulcitol (12) e da lactona do ácido mevalônico (13).	33
Figura 6 – Estrutura química da dicetopiperazina do ciclo D-Pro-D-Leu (14), da 5-hidroximetilmeleína (15), do ácido suscínico (16), da nectriapirona (17), da 5-metilmeleína (18), do tirosol (19), do triptofol (20), da pirofena (21), da nigragilina (22), do ácido itacônico (23), do ácido salicílico (24) e do ácido kójico (25).	35
Figura 7 – Estrutura da hidroxicamptotecina (26), do topotecano (27) e do irinotecano (28).	36
Figura 8 - Antracnose em folhas de cajueiro.	38
Figura 9 – Plantas de soja infectadas por <i>P. sojae</i> . A) Sintomas na folha; B) Haste e semente infectadas.	40
Figura 10 – Estrutura química da fusapirona (29), da deoxifusapirona (30) e da citrinina (31).	42
Figura 11 – Estrutura química da fumitremorgina C (32), das ciclotriprostatinas A (33) e B (34), do verruculogen TR-2 (35), do 12 β -hidroxiverruculogen TR-2 (36), do 12- β -hidroxi-13 α -metoxiverruculogen TR-2 (37), da fumitremorgina B (38), do verruculogen (39), das fumiquinazolininas F (40), G (41), D (42) e A (43), da 3-hidroxifumiquinazolina A (44), da 4,8-dihidroxi-1-tetralona (45) e do ácido helvólico (46).	43
Figura 12 – Estrutura química da trichodermina (47), da (<i>S</i>)-5-hidroxi-2,6-dimetil-4 <i>H</i> -furo[3,4- <i>g</i>]benzopirano-4,8(6 <i>H</i>)-diona (48) e da 24-hidroxilergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (49).	44
Figura 13 – Estrutura da afidicolina (50), e das hipocrelinas A (51) e B (52).	46
Figura 14 – Estrutura da cochlioquinona A (53), da isocochlioquinona A (54) e da anidrocochlioquinona A (55).	46
Figura 15 – Estrutura química da 18-des-hidroxi-citocalasina H (56).	47
Figura 16 – Estrutura química do bortezomid (57).	48
Figura 17 – Estrutura química da gliotoxina (58) e da pirrolizilactona (59).	48
Figura 18 - Estrutura da ofiobolina K (60), da 6-epi-ofiobolina K (61) e da 6-epi-ofiobolina G (62).	50
Figura 19 – Estrutura química da sartoripirona A (63) e da aszonapirona A (64).	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Total de moléculas aprovadas de 1981-2014 para determinadas indicações médicas separadas por sua via de síntese.....	28
Tabela 2 - Metabólitos secundários e/ou extratos ativos produzidos por basidiomicetos endofíticos.....	37

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos biomas mais diversificados do mundo. São aproximadamente 116 mil espécies de animais, mais de 40 mil espécies de plantas e mais de 5 mil espécies de fungos. Isso representa, em termos mundiais, 9 % da fauna e 20 % da flora (BRASIL, 2015). Em relação aos fungos brasileiros, as 5.719 espécies já descritas estão distribuídas em 1.246 gêneros, 102 ordens e 13 divisões, com predomínio dos Basidiomycota (2.741 espécies) e Ascomycota (1.881 espécies). A Mata Atlântica possui a maior quantidade de registros de espécies fúngica até o momento, com 3.017 espécies, seguida pela Amazonia (1.050), sendo São Paulo o estado brasileiro com maior número de espécies registradas (1.846 espécies) (FORZZA et al., 2010; MAIA et al., 2015).

Desde a antiguidade, os fungos são utilizados pelos seres humanos como alimentos, remédios, na fabricação de bebidas e na panificação, além de desempenharem na natureza o papel de decompositores.

Atualmente, sabe-se que os fungos produzem inúmeros compostos via metabolismo secundário que podem ser utilizados nas indústrias médico-farmacêutica e na agricultura. Exemplos de classes químicas são os flavonóides, alcalóides, terpenos, isocumarinas, entre outros. Entre eles, há uma imensa gama de compostos ainda desconhecida, ou compostos que são conhecidos há décadas, dos quais pouco ou nada se sabe sobre sua atividade biológica.

Assim, o estudo dos metabólitos secundários fúngicos é uma área de grande interesse, visto que seus compostos podem ser usados benéficamente em diversas aplicações. Com a emergência de novas doenças e a resistência a medicamentos adquirida por espécies de micro-organismos já conhecidas, se faz necessária a pesquisa por compostos químicos capazes de funcionar como alternativa ao combate desses patógenos.

Os fungos endofíticos são considerados uma excelente alternativa para a bioprospecção de compostos. Eles vivem no interior de tecidos vegetais sem causar injúria aparente, produzindo compostos que auxiliam em sua adaptação a esse micro-ambiente e também conferindo vantagens à planta hospedeira.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi o isolamento e a caracterização de compostos produzidos por fungos endofíticos isolados de plantas da Ilha de Alcatrazes e da Mata Atlântica, e avaliar sua atividade contra a leishmaniose, como inibidores do proteossoma (alvo validado contra o câncer), bactérias formadoras de biofilme e contra fitopatógenos de relevância mundial como *Phomopsis sojae* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

Referências

BRASIL. 2015. Brasil tem 116 mil espécies de animais e 9% da fauna mundial. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2015/12/brasil-tem-116-mil-especies-de-animais-e-9-da-fauna-mundial>. Acesso 22 novembro 2017.

FORZZA, R.C.; BAUMGRATZ, J.F.A.; BICUDO, C.E.M.; CANHOS, D.A.L.; CARVALHO JR., A.A.; COSTA, A.F.; COSTA, D.P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P.M.; LOHMANN, L.G.; MAIA, L.C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M.P.; NADRUZ-COELHO, M.A.; PEIXOTO, A.L.; PIRANI, J.R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L.P.; SOUZA, V.C.; STEHMANN, J.R.; SYLVESTRE, L.; WALTER, B.M.T.; ZAPPI, D. (eds.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. 2 vols. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio / Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. 1699p.

MAIA, L.C.; CARVALHO JÚNIOR, A.A.; CAVALCANTI, L.H.; GUGLIOTTA, A.M.; DRECHSLER-SANTOS, E.R.; SANTIAGO, A.L.M.A.; CÁCERES, M.E.S.; GIBERTONI, T.B.; APTROOT, A.; GIACHINI, A.J.; SOARES, A.M.S.; SILVA, A.C.G.; MAGNAGO, A.C.; GOTO, B.T.; DE LIRA, C.R.S.; MONTOYA, C.A.S.; PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A.; DA SILVA, D.K.A.; SOARES, D.J.; REZENDE, D.H.C.; LUZ, E.D.M.N.; GUMBOSKI, E.L.; WARTCHOW, F.; KARSTEDT, F.; FREIRE, F.M.; COUTINHO, F.P.; DE MELO, G.S.N.; SOTÃO, H.M.P.; BASEIA, I.G.; PEREIRA, J.; DE OLIVEIRA, J.J.S.; SOUZA, J.F.; BEZERRA, J.L.; NETA, L.S.A.; PFENNING, L.H.; GUSMÃO, L.F.P.; NEVES, M.A.; CAPELARI, M.; JAEGER, M.C.W.; PULGARÍN, M.P.; MENOLLI JUNIOR, N.; DE MEDEIROS, P.S.; FRIEDRICH, R.C.S.; CHIKOWSKI, R.S.; PIRES, R.M.; MELO, R.F.; DA SILVEIRA, R.M.B.; URREA-VALENCIA, S.; CORTEZ, V.G.; DA SILVA, V.F. Diversity of brazilian fungi. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.66, n.4, p.1033-1045, 2015.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O bioma Mata Atlântica

A Mata Atlântica é um grande bioma brasileiro presente em 17 estados, sendo composta por cinco tipos principais de floresta: ombrófila densa, ombrófila aberta, ombrófila mista, floresta estacional decidual e estacional semidecidual. Além destas vegetações, os campos de altitude, mangues e restingas também integram a Mata Atlântica em menor proporção (JOLY et al., 2012; OLIVEIRA FILHO; FONTES, 2000). Ela foi decretada Reserva da Biosfera pela Unesco e Patrimônio Nacional, na Constituição Federal de 1988 (SOSMA, 2017).

A Mata Atlântica brasileira possui uma das mais diversas e ameaçadas biotas florestais tropicais, sendo que sua história de degradação descreve o destino experimentado pelas florestas tropicais em todo o mundo (JOLY; METZGER; TABARELLI, 2014). Esta vegetação possui níveis excepcionais de espécies endêmicas, sendo considerada um dos 25 hotspots mundiais de biodiversidade, com mais de 8.000 espécies endêmicas (MITTERMEIER et al., 2004).

Após cinco séculos de expansão humana, a maioria das paisagens da Mata Atlântica é composta de pequenos fragmentos florestais rodeados de matrizes de habitat aberto (JOLY; METZGER; TABARELLI, 2014), restando menos de 100.000 km² (4 %) da vegetação original (TABARELLI et al., 2005; IARBMA, 2014).

Das 633 espécies de animais ameaçadas de extinção no Brasil, 383 ocorrem na Mata Atlântica (SOSMA, 2017). Vivem na Mata Atlântica mais de 20 mil espécies de plantas, além de 298 espécies de mamíferos, 992 espécies de aves, 200 espécies de répteis, 370 espécies de anfíbios e 350 de peixes (PINTO et al., 2012).

2.2. O arquipélago de Alcatrazes

As ilhas são ambientes muito relevantes para estudos ecológicos, visto que são microambientes isolados (FRANCINI; RAMOS, 2014).

O arquipélago de Alcatrazes é composto por 13 ilhas, ilhotas e lajes. Está a sudeste do Brasil, distante 43 km da costa de São Sebastião-SP. Este arquipélago surgiu pelo aumento do

nível do mar cerca de 7.000 anos atrás, e hoje possui rochas expostas, gramíneas e ciperáceas. A Ilha de Alcatrazes (Figura 1) é a principal ilha, abrangendo 135 hectares e sendo a única com tamanho suficiente para possuir floresta (MUSCAT et al., 2014; ICMBIO, 2015).



Figura 1 - Visão parcial da Ilha de Alcatrazes.
Fonte: o autor (2016).

Desde 1980 e até o início de 2013, a Marinha praticava tiros no paredão de rochas da ilha principal. A prática não mais ocorre, visto que o arquipélago é considerado o maior berçário de aves marinhas do sudeste brasileiro e abriga espécies como a jararaca-de-alcatrazes e a perereca-de-alcatrazes, que só existem na região. As ilhas são protegidas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), por meio da Estação Ecológica Tupinambás e pela Marinha do Brasil (ICMBio, 2015). Atualmente, o Arquipélago de Alcatrazes é considerado refúgio da vida silvestre (PORTAL BRASIL, 2017).

2.3. *Anthurium alcatrazense*

O gênero *Anthurium* Schott (Araceae) pertence à subfamília Pothoideae, e abriga em torno de 1.100 espécies (COELHO, 2004). Dessas, 105 espécies ocorrem no Brasil, sendo 30

delas encontradas no estado de São Paulo (COELHO, 2007). O gênero é estritamente neotropical, podendo ser encontrado desde o sul do México até o norte da Argentina (CARLSEN; CROAT, 2013).

O gênero *Anthurium* é um dos mais morfológicamente diversos de Araceae. Ele exibe uma notável variação na morfologia da folha, incluindo folhas inteiras (lineares, lanceoladas, ovaladas, elípticas, arredondadas, peltadas, cordiformes, sagitadas e rastiformes), variadamente lobuladas (trilobadas e palmadas) e com folhas compostas (trifolhiadas e palmadas). Espécies de *Anthurium* epífitas têm vários hábitos de crescimento, como trepadeira, pendente, rastejando, escalando e "ninho de pássaro", normalmente fixando-se na terra durante os primeiros estágios de vida até encontrarem apoio nos galhos de árvores menores (BOWN, 2000). O gênero possui cerca de 600 espécies epífitas, estando figurado entre os cinco principais clados de epífitas vegetais (GENTRY; DODSON, 1987).

Espécies de *Anthurium* são semelhantes por terem flores bissexuais, a maioria cilíndrica, em espádices cônicas. No entanto, o comportamento de floração é bastante variável entre as espécies (CROAT, 1980). Grande diversidade é exibida na inflorescência, com cores que vão do verde discreto e branco, ao vermelho, amarelo, laranja, lavanda e roxo (CARLSEN; CROAT, 2013).

A Ilha de Alcatrazes (município de São Sebastião) possui uma espécie de antúrio endêmica: *Anthurium alcatrazense*, a qual pertence à seção *Urospadix* e à subseção *Obscurevi*. Morfológicamente, ela apresenta caule e entrenós curtos. Sua lâmina foliar é do tipo cartácea, lanceolada e com base aguda. Possui nervuras secundárias numerosas em ambas as faces (COELHO; CATHARINO, 2008).

2.4. *Begonia* spp.

O gênero *Begonia* pertence à família Begoniaceae, do grupo das angiospermas, englobando aproximadamente 1.600 espécies (THE PLANT LIST, 2013), com distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (GOODALL-COPESTAKE; HARRIS; HOLLINGSWORTH, 2009), ausente apenas na Austrália, Nova Zelândia, Nova Guiné e em algumas ilhas menores da parte oriental da Indonésia (HEYWOOD et al., 2007). Das 213 espécies que ocorrem no Brasil, 186 são encontradas apenas na Mata Atlântica (JACQUES; MAMEDE, 2005).

Morfológicamente, as begônias se apresentam sob a forma de ervas, arbustos e epífitas, com hastes aquosas, e podem ser caracterizadas pelas folhas assimétricas, flores estaminadas com quatro tépalas e pistiladas com cinco, ovário ínfero, placentação axilar, placenta inteira ou partida e cápsulas triloculares, muito diversas em formas, tamanhos e cores (JACQUES; MAMEDE, 2005; JACQUES, 2008).

A espécie *Begonia fischeri* Schrank é um subarbusto, sendo encontrada no sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, sudeste do México, Cuba, Jamaica, Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, Guiana, Venezuela, Argentina, Bolívia, Colômbia e Peru (JACQUES, 2014; WCSP, 2014). Ela ocorre principalmente em locais com incidência de luz e solos úmidos, comumente em áreas alteradas ou em regeneração (WANDERLEY, 2012).

A espécie *Begonia venosa* Skan ex Hook é nativa do Brasil e está criticamente ameaçada de extinção (JACQUES, 2014). Ela é considerada uma planta ornamental, possuindo folhas suculentas, grossas, redondas e coriáceas e com numerosos pelos em sua superfície (PIERIK; TETTEROO, 1987).

2.5. Definição e caracterização de organismos endofíticos

O termo ‘endofítico’ foi originalmente descrito por De Bary em 1866 (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Os organismos endofíticos são aqueles que vivem no interior de plantas hospedeiras sem causar injúria aparente, desde que estas se encontrem em condições ambientais harmônicas (HIGGINBOTHAM et al., 2013; SOLIMAN; RAIZADA, 2013). Sabe-se que os endófitos podem ocupar tanto os espaços intercelulares, bem como colonizar internamente as células vegetais (FAETH; HAMMON, 1997; KAUL et al., 2012). Normalmente, a relação estabelecida entre endófitos e plantas é de mutualismo. Eles recebem nutrientes e proteção, e em troca tornam a planta mais competitiva à ambientes de estresse. Porém, o endófito pode tornar-se patógeno ou sapróbio quando a planta se encontra em condições adversas, tais como desequilíbrio com outros endófitos (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

De acordo com a espécie da planta, idade, distribuição geográfica, clima, e outros fatores, diferentes endófitos são encontrados no interior das plantas. Eles pertencem mais comumente a diversos grupos de bactérias e fungos (ascomicetos em sua maioria) (BANDARA; SCNCVIRATNC; KULASVORIYA, 2006; ARNOLD, 2007), mas há também registros de protozoários e nematódeos vivendo como organismos endofíticos (GAMBOA; BAYMAN, 2001). Todas as angiospermas e gimnospermas já estudadas possuem endófitos

(STROBEL; DAISY, 2003), sendo que estes organismos também foram isolados de algas marinhas, briófitas e pteridófitas (TAN; ZOU, 2001). Sabe-se que a maior biodiversidade de endófitos está presente nas folhas das árvores tropicais, as quais podem conter espécies ainda não encontradas em outros biomas, como por exemplo, os de clima mais frio ou árido (ARNOLD; LUTZONI, 2007).

Há espécies de plantas que chegam a hospedar mais de 100 endófitos. Alguns são generalistas, sendo capazes de infectar uma ampla gama de hospedeiros, enquanto outros são especialistas, limitado a um ou poucos hospedeiros. Plantas associadas aos endófitos podem apresentar um aumento da resistência aos fitopatógenos, particularmente fungos e nematoides (ZABALGOGEAZCOA, 2008).

Os endófitos podem ser divididos em dois grupos: mutualistas constitutivos e mutualistas induzíveis. Os constitutivos são aqueles que infectam óvulos hospedeiros e se propagam em suas sementes, tendo uma biomassa substancial com alto custo metabólico, se desenvolvendo ao longo das partes aéreas da planta hospedeira. Já os induzíveis se disseminam independentemente das sementes, através do ar ou da água, permanecendo com pouca biomassa e inativos metabolicamente por longos períodos, crescendo rapidamente quando são fornecidos novos locais para infecção, quando estes produzem toxinas contra herbívoros (CARROLL, 1988). Há ainda outra divisão, na qual os endófitos são separados em quatro classes de acordo com sua gama de hospedeiros, os tipos de tecido colonizado e de colonização, sua diversidade na planta e os benefícios de sua transmissão (RODRIGUEZ et al., 2009).

Diversos autores definem que a infecção por endófitos pode ser ‘horizontal’ ou ‘vertical’. A infecção horizontal acontece por lesões naturais (crescimento das raízes, por exemplo) ou artificiais, como injúrias. Já na infecção do tipo ‘vertical’, os endófitos são transmitidos pelas sementes do hospedeiro, podendo manter-se por tempo indeterminado. Os modos de reprodução e de transmissão dos endófitos podem estar relacionados com sua virulência. Na transmissão vertical é predominante a interação mutualística, enquanto que na transmissão horizontal a antagonista (MELO; AZEVEDO, 1998; SAIKKONEN et al., 2006; ALY; DEBBAD; PROKSCH, 2011).

2.6. Coevolução entre organismos endofíticos e plantas

Durante a evolução, os organismos endofíticos desenvolveram uma série de características e funções para sobreviver em seus nichos ecológicos (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012). Por meio de tecidos fossilizados de caules e folhas de plantas, ficou evidenciado que as associações endófitos-plantas podem ter evoluído a partir do momento que as plantas superiores apareceram pela primeira vez na terra (REDECKER; KODNER; GRAHAM, 2000). Os endófitos têm sido associados com as plantas por mais de 400 milhões de anos (KRINGS et al., 2007). Algumas plantas produzem os mesmos produtos bioativos naturais que seus endófitos devido a coevolução hospedeiro-endófito (TAN; ZOU, 2001). Isso se deve ao fato dos endofíticos terem se adaptado aos seus microambientes pela variação genética gradual, absorvendo alguns segmentos de DNA de planta para o seu próprio genoma, bem como inserindo segmentos de seu DNA no genoma hospedeiro (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993; ZHANG; SONG; TAN, 2006). Essa troca de material genético é denominada “transferência genética horizontal” (BROWN, 2003), e a seleção natural pode ter favorecido a evolução de linhagens endofíticas benéficas (SAIKKONEN et al., 2004).

As características evolucionárias emergem como resultado da interação dos endófitos com os organismos associados (planta hospedeira, outros endófitos, fitopatógenos invasores e parasitas). Estas variam desde a produção de compostos antimicrobianos para a defesa até a ativação de caminhos biossintéticos, produção de precursores, moléculas envolvidas no *quorum sensing*, moduladores epigenéticos e até mesmo interações físicas diretas com os outros micro-organismos. Desse modo, a interação entre os organismos coexistentes determina a produção metabólica (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012; KUSARI; SINGH; JAYABASKARAN, 2014).

O fato dos endófitos serem conhecidos como uma rica fonte de biomoléculas com diversidade estrutural e aplicabilidade biotecnológica pode ser em parte atribuída à sua adaptação evolucionária para viverem no microambiente das plantas hospedeiras (FREY-KLETT et al., 2011).

2.7. Produtos naturais

Podemos definir produtos naturais como metabólitos secundários produzidos por organismos vivos (ROQUE, 2011). Eles são substâncias de limitado peso molecular, normalmente menores que 3000 Da. Até cerca de 1989, não se sabia ao certo a função dos

metabólitos secundários nos organismos produtores. No artigo de Williams e colaboradores (1989), eles reúnem uma série de hipóteses levantadas pelos pesquisadores da época para explicar a função dos metabólitos secundários: eles poderiam ser mutações neutras; um exemplo de progresso evolucionário (sendo que o metabolismo secundário seria fornecedor de um reservatório de variedade não-funcional, dos quais novos processos funcionais poderiam surgir em algum momento futuro, continuando a seleção natural); resíduos ou produtos de detoxificação celular; o metabolismo secundário (e não os metabólitos) teria uma função importante no auxílio do metabolismo primário até que as condições voltassem a ser propícias para a renovação da atividade metabólica e o crescimento; a algum momento evolucionário o metabolismo secundário teve (ou tem) um papel; os metabólitos secundários poderiam ser uma medida da adaptação do organismo, podendo atrair e repelir outros organismos, sendo usados como parte da estratégia de sobrevivência.

Sabe-se que os metabólitos secundários são importantes, desempenhando diversas funções nos organismos produtores, como defesa (contra predadores, micro-organismos e vírus), competição, atração, estimulação, como agentes de transporte de metais, como agentes de simbiose entre micro-organismos e plantas, nematóides, insetos e animais superiores, na forma de hormônios sexuais; como efetores de diferenciação e ainda agem contra estresses abióticos. Sabe-se ainda que alguns metabólitos secundários (incluindo antibióticos) podem estimular a formação de esporos e inibir ou estimular sua germinação. Isso acontece porque tanto a formação de metabólitos secundários como a formação de esporos são regulados por fatores semelhantes (DEMAIN; FANG, 2000; WINK, 2003; HARTMANN, 2007).

Os metabólitos secundários não estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento dos organismos produtores, mas frequentemente desempenham um importante papel como moléculas de defesa. Eles são moléculas orgânicas, e em sua maioria são classificados com base na sua origem biossintética. A maior produção dos metabólitos secundários ocorre entre a fase de crescimento e a fase estacionária, sendo que, mesmo na ausência dessa síntese, o organismo produtor continua seu desenvolvimento (AGOSTINI-COSTA et al., 2012). Existem três hipóteses sobre os metabólitos secundários. A primeira diz que sua produção não afeta o desenvolvimento e sobrevivência em curto prazo dos organismos produtores. A segunda hipótese afirma que os genes envolvidos no metabolismo secundário permitem que as mutações e a seleção natural fixem características benéficas por meio da evolução. A terceira trata os metabólitos secundários como parte integral do metabolismo celular, sendo que o metabolismo secundário se apoia no primário para conseguir as enzimas, energia,

substrato e maquinaria celular, de modo a contribuir para a sobrevivência do organismo produtor a longo prazo (ROZE; CHANDA; LINZ, 2011).

Resumindo, metabólitos secundários agem principalmente como moléculas de adaptação, auxiliando na sobrevivência dos organismos produtores. Além disso, eles são produzidos por espécies e linhagens específicas, estando, assim, intimamente ligados com a ecologia dos organismos produtores (O'BRIEN; WRIGHT, 2011).

O uso dos produtos naturais se aplica em diversas áreas. Quando o desenvolvimento de novas drogas farmacêuticas enfrenta um desafio considerável, os produtos naturais tornam-se fonte de inspiração, pois suas estruturas químicas complexas e diversificadas fornecem uma base para a construção de moléculas distintas. Estima-se que a variedade de produtos naturais é tanta que cerca de 40 % de arcabouços químicos que eles contêm ainda não são encontrados nos produtos sintéticos (LAGUNIN; FILIMONOV; POROIKOV, 2010; THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, 2015). Biólogos e fisiologistas usam alguns metabólitos secundários como ferramentas experimentais para modular funções celulares. Seu estudo também se faz no campo da microbiologia e da farmácia na forma de antibióticos e contra patógenos e parasitas. Já na ecologia, os produtos naturais desempenham papel fundamental na determinação de interações entre espécies (FIRN; JONES, 2003).

Os alcaloides (aminas cíclicas) são uma das principais classes de produtos naturais, tendo frequentemente ação neurotóxica e analgésica. Outros exemplos de produtos naturais são os terpenos (ROQUE, 2011), esteroides, quinonas e fenóis, entre outros (KAUL et al., 2012).

Um número significativo de medicamentos que são produtos naturais são atualmente produzidos por micro-organismos e/ou interações com o hospedeiro do qual o micro-organismo foi isolado, fato este que prediz a expansão dos estudos nessa área (NEWMAN; CRAGG, 2016).

A priorização dos produtos naturais a serem estudados e isolados deve ser feita de acordo com a necessidade da época em questão e também dos equipamentos, técnicas e recursos disponíveis. Por exemplo, em muitos casos as moléculas presentes em maior quantidade são precursoras na produção de moléculas mais raras e com maior potencial biológico, necessitando de enzimas para essa conversão. Sobre a atividade biológica, fica claro que a função que a molécula desempenha para seu produtor dificilmente é a mesma para qual o ser humano atribui um uso. Diversos produtos naturais podem ser produzidos pela mudança do meio de cultura. Assim, a variedade de moléculas disponíveis se estende consideravelmente (FIRN; JONES, 2003).

2.8. Bioeconomia

Bioeconomia, ou economia baseada em biologia, é um termo que começou a ser utilizado no início dos anos 2000. Ela pode ser definida como uma economia onde os blocos de construção básicos para materiais, produtos químicos e energia são derivados de recursos biológicos renováveis (MCCORMICK; KAUTTO, 2013).

Os fungos filamentosos têm grande destaque na bioeconomia, sendo utilizados por diversas empresas, se apresentando muitas vezes superiores aos sistemas de produção baseados em bactérias e leveduras, em termos de versatilidade metabólica, robustez e capacidade de secreção. Processos de fabricação em larga escala já foram desenvolvidos para a produção de ácidos orgânicos, proteínas, enzimas e antibióticos. A biotecnologia fúngica desempenha assim um papel central para muitas indústrias. Temos como exemplo a produção mundial de ácido cítrico pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger*. Já a produção de enzimas degradantes de biomassa vegetal por fungos filamentosos é um mercado estimado em 4,7 bilhões de euros, o que deverá duplicar nos próximos 10 anos. Em relação à procura global por fungicidas, o mercado foi de 10 mil milhões de euros em 2014 e deverá crescer continuamente na próxima década (MEYER et al., 2016).

O surgimento da bioeconomia é um processo de longo prazo que traz mudanças estruturais importantes, dependendo do progresso da ciência e da tecnologia, beneficiando os fornecedores de insumos biológicos (SAVIOTTI, 2017).

De 1940 até 2015, aproximadamente 75 % das moléculas de baixa massa molecular que atuam como drogas anticâncer foram baseadas em produtos naturais, de modo que metade das moléculas aprovadas pelas New Chemical Entities (NCEs) são derivadas de produtos naturais (SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, 2015, NEWMAN; CRAGG, 2016).

De um total de 1.328 drogas com indicação medicinal aprovadas de 1981-2014, 54 são produtos naturais inalterados, 268 são derivados de produtos naturais, 189 são macromoléculas biológicas (como grandes peptídeos e proteínas) e 156 são drogas sintéticas com o farmacóforo sendo produto natural e/ou droga mímica de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016). Alguns exemplos são mostrados na Tabela 1, a seguir:

Tabela 1 – Total de moléculas aprovadas de 1981-2014 para determinadas indicações médicas separadas por sua via de síntese

Indicação	Total de moléculas aprovadas	Macromolécula biológica	PN inalterado	Derivado de PN	Sintético	Vacina	Outros
Analgésico	17	0	1	0	11	0	5
Antialérgico	18	0	1	4	12	0	1
Antiartrítico	22	6	1	3	4	0	8
Antibacteriano	140	1	11	71	29	27	1
Anticâncer	174	33	17	38	23	5	58
Antidepressivo	27	0	0	0	8	0	19
Antidiabético	52	23	1	6	4	0	18
Antifúngico	32	1	0	3	25	0	3
Anti-hipertensivo	80	0	0	2	28	0	50
Anti-inflamatório	51	1	0	13	37	0	0
Antiobesidade	6	0	0	1	1	0	4
Antiparasítico	16	0	2	5	5	1	3
Antiúlceras	34	1	1	12	20	0	0
Antiviral	139	14	0	4	14	61	46
Metabolismo do Ca ²⁺	20	0	0	8	9	0	3
Imunossupressor	14	6	5	3	0	0	0
Relaxante muscular	10	0	0	4	2	0	4

Fonte: Newman e Cragg (2016, p.634-635).

Se tratando de pequenas moléculas que se tornaram fármacos antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antiparasíticos, 5,9 % são produtos naturais e 37,6 % são derivados de produtos naturais. Considerando também as macromoléculas, 4 % dos anti-infecciosos são produtos naturais e 25,5 % são derivados de produtos naturais, além dos 4,9 % que são macromoléculas biológicas (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Assim, nota-se que a descoberta desses compostos é uma área de grande interesse (SURYANARAYANAN et al., 2009), de modo que os fungos endofíticos são considerados promissores (KAUL et al., 2012).

2.9. Fungos endofíticos e a produção de metabólitos secundários

Uma ampla gama de moléculas, variando de estruturas simples a altamente complexas, têm sido isolada como produtos fúngicos (WARMINCK; NAZIR; VAN ELSAS, 2009). Os fungos endofíticos que já foram investigados química e biologicamente também demonstraram ser excelentes produtores de metabólitos secundários com significativa diversidade química e atividade biológica (TAN; ZOU, 2001). O fato de colonizarem múltiplos habitats e coexistirem há bilhões de anos junto com outros organismos, dividindo os mesmos nichos ecológicos e frequentemente dependendo um do outro, fez com que os fungos desenvolvessem mecanismos químicos de auto-defesa, os quais conferem proteção contra as

armadilhas ambientais (BOER et al., 2005; SPITELLER, 2008). Além das razões protetivas, os metabólitos são biossintetizados por razões fisiológicas, conferindo vantagens ambientais ao produtor (WARMINCK; NAZIR; VAN ELSAS, 2009).

Desde a descoberta da penicilina, a importância dos metabólitos fúngicos na procura por novas drogas se tornou evidente (WARMINCK; NAZIR; VAN ELSAS, 2009). A busca por micro-organismos que produzam determinados metabólitos secundários se faz necessária pelo fato de que muitas moléculas são inviáveis de serem produzidas por síntese química total, dado a inúmeras dificuldades e altos custos. Da mesma forma, sua obtenção de fontes naturais como plantas acarreta danos ao meio ambiente por conta da alta taxa de desmatamento (PURI et al., 2006). Os fungos filamentosos podem produzir até 73 % mais quantidade de metabólitos secundários quando comparados à outras classes de micro-organismos (DREYFUSS; CHAPELA, 1994). Entre os metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos podemos citar terpenos, alcaloides, fenóis, lactonas, isocumarinas, quinonas, citocalasinas, entre outros. A alta diversidade química dos produtos naturais é atribuída em parte à disponibilidade de precursores e reações biossintéticas (SPECIAN et al., 2014).

Os metabólitos secundários fúngicos incluem compostos com importância médico farmacológica, mas também micotoxinas (STERGIOPOULOS et al., 2013). Sua busca tem levado à descoberta de inúmeros compostos bioativos (BAKER; ALVI, 2004). Alguns eventos importantes no estudo de metabólitos secundários de fungos foram o desenvolvimento de antibióticos a partir da penicilina (**1**), mostrada na Figura 2, a qual foi descoberta em 1928 sendo sintetizada por uma espécie de *Penicillium* (na época identificada como *P. chrysogenum*, mas hoje, por meio de análises moleculares, sabe-se que é *P. rubens*) (HOUBRAKEN; FRISVAD; SAMSON, 2011) e da administração de ciclosporina (**2**) em pessoas transplantadas. A ciclosporina foi primeiramente isolada por volta de 1970 a partir dos fungos de solo *Tolypocladium inflatum* e *Cylindrocarpon lucidum* (SILVA; COELHO, 2006).

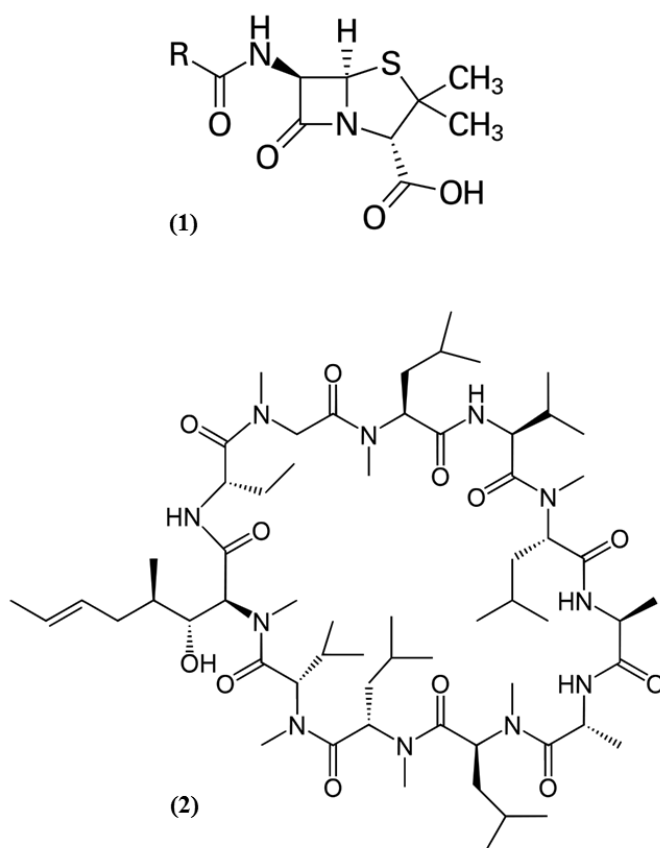


Figura 2 – Estrutura química da penicilina (1) e da ciclosporina (2).

Fonte: Adaptado de Silva e Coelho (2016).

Entre os 20 medicamentos mais prescritos na década de 1990, seis eram de origem fúngica (CZARNICK, 1996).

Os metabólitos secundários fúngicos são classificados em quatro grupos principais baseados no núcleo de enzimas e precursores envolvidos em sua biossíntese: policetídeos, peptídeos não-ribossomais, terpenos e alcaloides (KELLER; TURNER; BENNET, 2005).

Os fungos endofíticos também são capazes de sintetizar inúmeros compostos que são produzidos por vegetais, fato este que impulsiona os estudos nessa área, de modo que novos endofíticos são constantemente descobertos (KUSARI; PANDEY; SPITELLER, 2013). Entretanto, ao contrário das plantas, fungos produzem principalmente policetídeos e peptídeos não-ribossomais, e conseqüentemente contém um grande número de genes nucleares codificando policetídeo sintases (PKSs) e peptídeo não-ribossomal sintetases (NRPSs) em seus genomas (COLLEMARE et al., 2008). O trabalho de Zhao e colaboradores (2010) relata que diversos compostos são produzidos tanto pela planta hospedeira como seu endófito:

paclitaxel (3), podofilotoxina (4), vimblastina (5) e camptotecina (6), mostrados na Figura 3, entre outros.

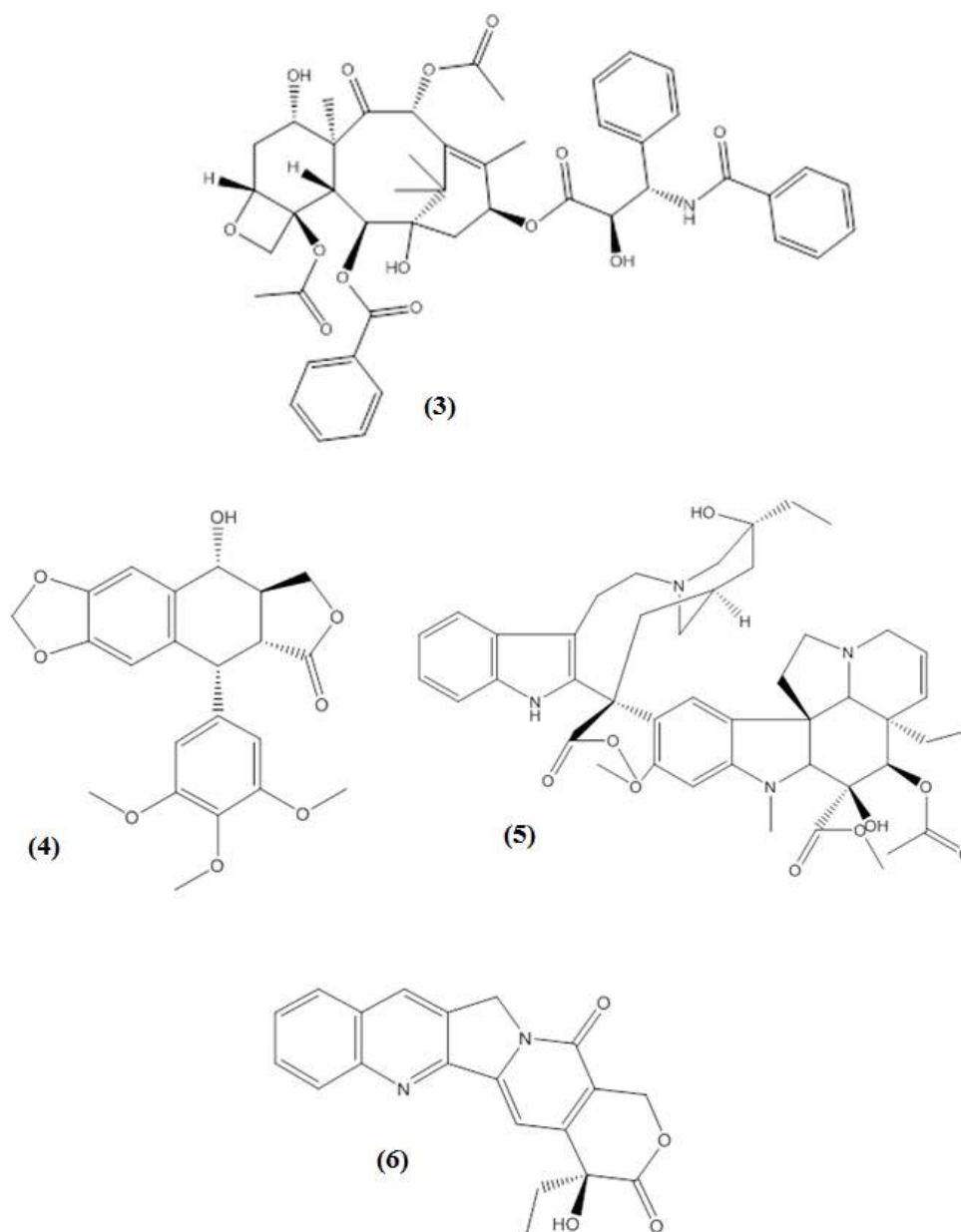


Figura 3 – Estrutura química do paclitaxel (3), da podofilotoxina (4), da vimblastina (5) e da camptotecina (6).

Fonte: Zhao e colaboradores (2010).

Os fungos endofíticos que habitam plantas tropicais têm recebido muita atenção por sua diversidade, pelos benefícios que podem proporcionar às plantas e pelo potencial como fonte de novos compostos biologicamente ativos (HIGGINBOTHAM et al., 2013). Esses compostos podem ser usados para satisfazer a demanda de produtos farmacêuticos, médicos,

industriais e de uso na agricultura (LIU et al., 2002; JALGAONWALA; MOHITE; MAHAJAN, 2011). Se seus extratos forem purificados e caracterizados há a possibilidade da descoberta de novas moléculas com atividade antimicrobiana, de modo a favorecer o desenvolvimento tecnológico e o meio ambiente (POWTHONG et al., 2012). Análises estatísticas mostram que 51 % dos metabólitos biologicamente ativos obtidos de fungos endofíticos eram anteriormente desconhecidos, comparados com 38 % de substâncias novas da microbiota do solo (SAIKKONEN et al., 2004; STROBEL et al., 2004).

Os fungos endofíticos podem realizar o controle dos fitopatógenos por meio de competição por nutrientes, indução da planta à resistência, parasitismo do fitopatógeno ou produção de substâncias antagonicas (ARAÚJO et al., 2010). Na agricultura, seus compostos podem ser utilizados em substituição aos defensivos agrícolas e agir no biocontrole, promovendo o crescimento de plantas (SANTOS; VARAVALLO, 2011; LAKRA et al., 2013). Os fungos endofíticos também produzem compostos com atividade antioxidante, como a isopestacina (7) (STROBEL et al., 2002), mostrada na Figura 4.

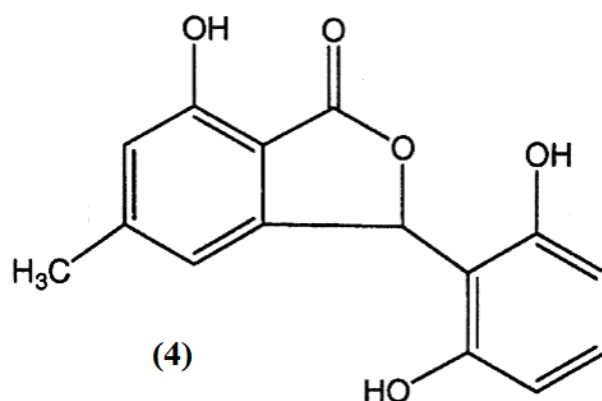


Figura 4 - Estrutura química da isopestacina (7).

Fonte: Strobel e colaboradores (2002).

Marinho, Marinho e Filho (2007) isolaram uma espécie de *Penicillium* a partir de *Murraya paniculata*, e recuperaram ergosterol (8), peróxido de ergosterol (9), cerivisterol (10), uracila (11), dulcitol (12) e lactona do ácido mevalônico (13), mostrados na Figura 5, como substâncias químicas produzidas pelo fungo.

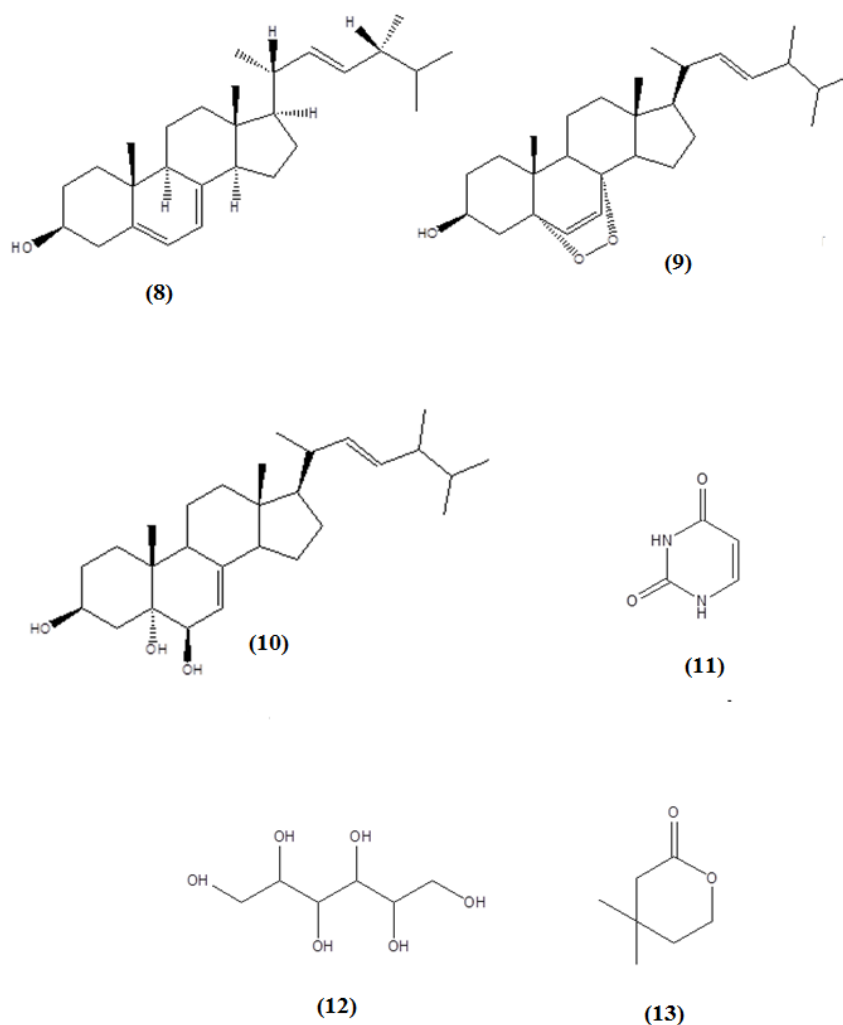


Figura 5 - Estrutura química do ergosterol (8), do peróxido de ergosterol (9), do cerivisterol (10), da uracila (11), do dulcitol (12) e da lactona do ácido mevalônico (13).

Fonte: Marinho, Marinho e Filho (2007).

Existe um grande interesse na descoberta de novos compostos produzidos por fungos endofíticos que apresentam atividade antimicrobiana. No trabalho de Powthong e colaboradores (2012) foram obtidos inúmeros compostos com atividade antimicrobiana e antifúngica de 28 fungos endofíticos isolados de caules e folhas de *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. Entre eles, foram identificados *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Phomosis* sp., *Paecilomyces* sp., *Phaeoacremonium* sp. e *Cladosporium* sp. Dos extratos fúngico obtidos, 92,86 % apresentaram atividade antimicrobiana significante contra *Bacillus subtilis*

(contaminante de alimentos), enquanto 82,14 % dos extratos foram ativos contra *Pseudomonas aeruginosa* (patógeno humano). Em relação à inibição de fungos, 75 % dos extratos foram ativos contra *Rhizopus* sp. (causador de mucormicose), 82,14 % contra *Mucor* sp. (causador de mucormicose), 42,86 % contra *Candida albicans* (patógeno humano) e 60,71 % contra *Cryptococcus neoformans* (fitopatógeno e agente causal de micose em animais e humanos).

Em relação a compostos com atividade contra fitopatógenos, Rocha (2007) isolou fungos endofíticos de três cultivares (FX3864, CDC312, MDF180) de *Hevea brasiliensis* contra *Microcyclus ulei*, agente causador da doença mal-das-folhas na seringueira. Os fungos *Fusarium* sp., *Glomerella cingulata*, *Phomopsis* sp., *Myrothecium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Microdiplodia* sp. apresentaram atividade inibitória significativa nas concentrações finais de 50 % e 12,5 % dos seus extratos brutos.

Potenciais substâncias inibidoras da replicação do HIV-1 podem ser descobertas estudando-se os metabólitos produzidos por fungos (WELLENSIEK et al., 2013).

Dependendo de certos fatores, como fonte de carbono e nitrogênio, temperatura, luz, pH, dentre outros, diferentes metabólitos secundários são produzidos (ALY et al., 2010). Santos (2011) corroborou essa teoria ao trabalhar com espécies isoladas de *Hancornia speciosa*. Ele verificou que o fungo *Phomopsis* sp., quando cultivado em meio líquido batata dextrose produziu cinco compostos: dicetopiperazina ciclo D-Pro-D-Leu (**14**), 5-hidroxi-metilmeleína (**15**), ácido succínico (**16**), nectriapirona (**17**) e 5-metilmeleína (**18**). Já o mesmo fungo quando cultivado em meio líquido malte produziu tirosol (**19**) e triptofol (**20**). Situação semelhante ocorreu com *Aspergillus niger*, que em meio batata dextrose produziu pirofena (**21**) e nigragilina (**22**) e em meio malte produziu ácido itacônico (**23**). *Guignardia* sp., em meio malte produziu ácido salicílico (**24**) e *Aspergillus* sp., em meio de batata e dextrose produziu ácido kójico (**25**), mostrados na Figura 6.

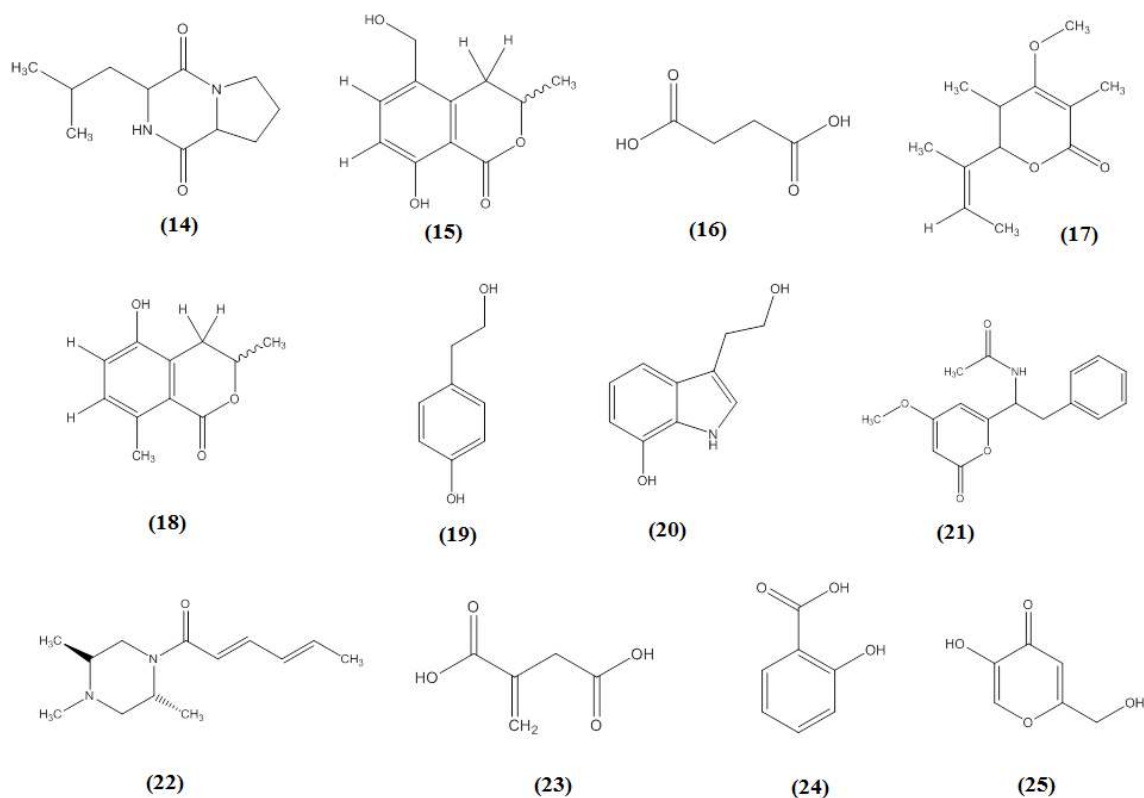


Figura 6 – Estrutura química da dicetopiperazina do ciclo D-Pro-D-Leu (14), da 5-hidroxi-metilmeleína (15), do ácido succínico (16), da nectriapirona (17), da 5-metilmeleína (18), do tirosol (19), do triptofol (20), da pirofena (21), da nigragilina (22), do ácido itacônico (23), do ácido salicílico (24) e do ácido kójico (25).

Fonte: arquivo pessoal.

O fungo *Fusarium solani*, endófito de *Apodytes dimidiata*, produz os compostos camptotecina e 10-hidroxycamptotecina (26), os quais são precursores na biossíntese de topotecano (27) e irinotecano (28), mostrados na Figura 7, drogas úteis no tratamento anticâncer (SHWETA et al., 2010).

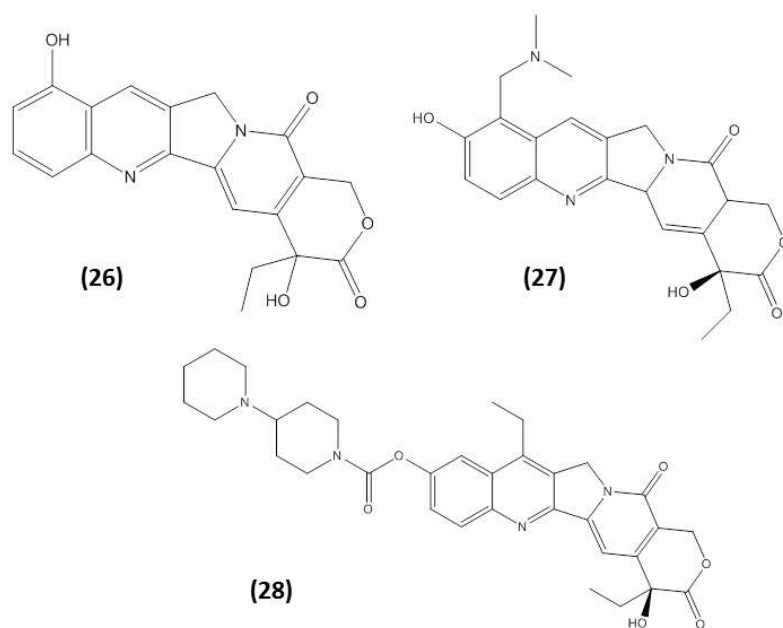


Figura 7 – Estrutura da hidroxycamptotecina (26), do topotecano (27) e do irinotecano (28).

Fonte: Shweta e colaboradores (2010).

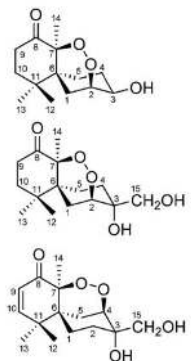
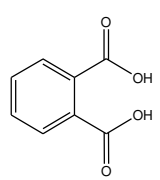
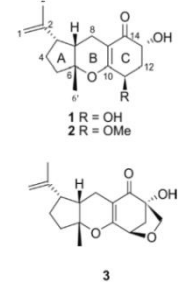
2.10. Metabólitos secundários produzidos por basidiomicetos endofíticos

Em geral, os basidiomicetos endofíticos são encontrados mais frequentemente nos tecidos lenhosos do que na folhagem. No entanto, avaliando-se a comunidade de basidiomicetos endofíticos por métodos independentes de cultivo, percebe-se que esse número pode quadruplicar (ARNOLD, 2007). Entre as classes mais comuns podemos citar Agaricomycotina, Pucciniomycotina e Ustilaginomycotina (RODRIGUEZ et al., 2009), sendo *Ustilago maydis* bem representado na comunidade endófito do milho (PAN; BAUMGARTEN; MAY, 2008). Os basidiomicetos têm sido relatados como endófitos de gramíneas, (SÁNCHEZ MÁRQUEZ; BILLS; ZABALGOGEAZCOAI, 2007), hepáticas (DUCKETT; LIGRONE, 2008) e da árvore de cacau (THOMAS et al., 2008).

Em relação a basidiomicetos isolados como endófitos, também podemos citar as espécies *Hymenochaete adusta*, *Phellinus noxius* e *Chromelosporium carneum*, ambas isoladas de *Huperzia serrata* (CHEN et al., 2011), *Sebacina vermifera* isolada de *Nicotiana attenuata* (BARAZANI; VON DAHL; BALDWIN, 2007), *Schizophyllum* sp. isolada de *Theobroma gileri* (THOMAS et al., 2008) e *Bjerkkandera* sp. isolada de *Drimys winteri* (OSES et al., 2006).

Os metabólitos secundários produzidos por basidiomicetos endofíticos apresentam diversas atividades biológicas, como podem ser verificados alguns exemplos na Tabela 2.

Tabela 2 - Metabólitos secundários e/ou extratos ativos produzidos por basidiomicetos endofíticos

Fungo basidiomiceto endofítico	Planta hospedeira	Metabólito (s) isolado(s)	Atividade biológica	Estrutura	Referência
XG8D, família Meruliaceae, classe Agaricomycetes	<i>Xylocarpus granatum</i>	Merulina A, merulina B e merulina C	Citotoxicidade contra linhagens celulares BT474 de câncer de mama e SW620 de adenocarcinoma de cólon		Chokpaiboon e colaboradores (2010)
<i>Schizophyllum commune</i>	<i>Avicennia officinalis</i>	Ácido ftálico	Contra <i>Micrococcus leuteus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>		Joel e Bhimba (2013)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	<i>Desmotes incomparabilis</i>	Coibanol A, coibanol B e coibanol C	-		Molinar e colaboradores (2012)
<i>Fomitopsis</i> sp.	<i>Bacopa monnieri</i>	Extrato orgânico	Propriedades antimicrobianas e citotóxicas	-	Katoch e colaboradores (2014)

2.11. *Colletotrichum gloeosporioides* e a antracnose

O termo *Colletotrichum* foi primeiramente introduzido por Corda em 1831 para designar a espécie *C. lineola* encontrada na República Tcheca (DAMM et al., 2009). O gênero *Colletotrichum* foi apontado como o oitavo mais importante fitopatógeno do mundo, com base em perspectivas científicas e importância econômica. Ele abriga inúmeros fitopatógenos

de grande importância, os quais são causadores de doenças em uma ampla variedade de plantas herbáceas e árvores, sendo a produção de frutas especialmente afetada. Como exemplos podemos citar manga, banana, citrus, abacate e morango, além de cereais como milho, cana e sorgo (DEAN et al, 2012), sendo que pelo menos 1000 espécies de plantas são infectadas por este fitopatógeno. A antracnose é frequentemente atribuída a *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. & Sacc) e, menos extensivamente, a *C. acutatum* (PHOULIVONG et al., 2010). Ela causa lesões necróticas limitadas e frequentemente profundas em folhas, caules, flores e frutos, assim como podridão no caule e murcha de plântulas, como é mostrado na Figura 8 (AGRIOS, 2005).



Figura 8 - Antracnose em folhas de cajueiro.

(Foto: J. E. Cardoso, fonte: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>).

A podridão das frutas causada por espécies de *Colletotrichum* é uma doença que afeta tanto a pré como a pós-colheita, diminuindo a produção e prejudicando o mercado de exportação de frutas tropicais (HYDE et al., 2009). Os danos variam de uma pequena queda na qualidade das frutas, resultando em redução de vendas, até perda total das frutas (HINDORF, 2000).

Em raras ocasiões o gênero *Colletotrichum* foi associado a doenças humanas, causando queratites e infecções subcutâneas (SHIRAISHI et al., 2011).

O gênero *Colletotrichum* pertence ao filo Ascomycota e é tradicionalmente reconhecido como um gênero assexual de fungos, sendo que muitas espécies de *Colletotrichum* tem como fase sexuada o gênero *Glomerella* (RÉBLOVÁ; GAMS; SEIFERT,

2011). O gênero *Colletotrichum* pode ser dividido em 9 clados principais por meio de análise filogenética, sendo eles: *acutatum*, *graminicola*, *spathianum*, *destructivum*, *dematium*, *gloeosporioides*, *boninense*, *truncatum* e *orbiculare*. O complexo de espécies *C. gloeosporioides* é um clado bem suportado com uma ramificação longa e mostra poucas diferenças nos loci gênicos estudados para a maioria das 22 espécies incluídas, as quais são morfologicamente indistinguíveis, mas genética e biologicamente isoladas (CAI et al., 2009). *G. cingulata* é amplamente reconhecida como sendo a fase sexuada de *C. gloeosporioides*, apesar dessa conexão não ter sido explicitamente provada (CANNON et al., 2012). As características da cultura, dos conídios e apressórios podem ser usados para diferenciar táxons dentro de complexos de espécies, mas não podem separar espécies dentro de um complexo (PHOULIVONG et al., 2010).

Por muitos anos, as espécies de *Colletotrichum* foram assumidas como sendo específicas às plantas que elas infectavam, conduzindo a um grande número de táxons descritos com pouca diferença entre eles que não fosse a identidade da planta infectada. Entretanto, entende-se que essa compreensão de especificidade do hospedeiro é imperfeita. Podemos citar fatores como amostragem incompleta, restrição de dados relativos a populações afetando plantações e plantas ornamentais e pouco conhecimento dos efeitos patogênicos. Muitas coleções de cultura indicam que há a associação com uma espécie de planta em particular, mas faltam detalhes a respeito da interação (CANNON et al., 2012). Além disso, uma planta pode frequentemente abrigar mais do que uma espécie patogênica de *Colletotrichum*, de modo que usar hospedeiros como um critério taxonômico pode resultar em erros e confusão na identificação (PHOULIVONG et al., 2010). Também há a habilidade de muitas espécies de *Colletotrichum* de existirem também como endófitos, a qual gera complicações extras no entendimento da especificidade do hospedeiro, sendo que o isolamento dessas espécies como endófitos não significa necessariamente que elas são patógenos latentes com uma fase hemibiotrófica (MÜNCH et al., 2008).

A lista com todos os nomes em uso de espécies de *Colletotrichum* aceita um total de 66 espécies, com um adicional de 20 nomes que ainda são considerados duvidosos (HYDE et al., 2009). Entretanto, no volume do “Studies in Micology” de 2012, mais 41 espécies foram introduzidas, elevando o número de espécies aceitas de *Colletotrichum* para mais de 100 (CANNON et al., 2012). Esse número deve ao uso de dados de sequências de DNA para distinguir as espécies de *Colletotrichum*. Pesquisadores identificaram a variação na região ITS1 do nrDNA entre seis espécies de *Colletotrichum*, bem como detectando polimorfismos

na mesma região entre linhagens de *C. gloeosporioides* de diferentes hospedeiros (SREENIVASAPRASAD; BROWN; MILLS, 1992; MILLS; RODSON; BROWN, 1992). Dados de sequência ITS que são geralmente adotados para o sequenciamento de fungos são inadequados para o gênero *Colletotrichum* (PHOULIVONG et al., 2010). O conceito de espécie dentro de *Colletotrichum* deveria se basear em filogenia de múltiplos genes e na correlação entre o genótipo e o fenótipo (SHARMA; SHENOY, 2016), pois a correta identificação de patógenos fúngicos é essencial para decisões de quarentena, melhoramento de plantas, e no controle e gerenciamento de patógenos (CAI et al., 2009; PHOULIVONG et al., 2010). Os dados moleculares usados para identificar linhagens dentro do complexo *C. gloeosporioides* também tem sido problemáticos, com >86 % das sequências ITS designadas como *C. gloeosporioides* no Genbank não sendo corretas para essa espécie (CAI et al., 2009).

2.12. *Phomopsis sojae* como importante fitopatógeno

O fungo *Phomopsis sojae* (Leh.) (Teleomorfo: *Diaporthe phaseolorum* var *sojae*) é responsável pela seca da haste e da vagem e pela infecção de sementes de soja, como pode ser visto na Figura 9 (EMBRAPA, 2004). Ele não é o único fungo que ataca esta cultura, mas é apontado como o principal responsável pela redução da qualidade das sementes (SANTOS, 2014).



Figura 9 – Plantas de soja infectadas por *P. sojae*. A) Sintomas na folha; B) Haste e semente infectadas.

Fonte: <https://www.agrolink.com.br>.

Entre 2016-2017, a produção mundial de soja foi de 351 milhões de toneladas métricas, sendo que os principais países produtores de soja foram os EUA (117 milhões de toneladas), o Brasil (96,5 milhões de toneladas), a Argentina (56,8 milhões de toneladas) e a China (11,7 milhões de t) (USDA, 2017). Entretanto, esses números poderiam ser ainda mais expressivos se não houvesse as reduções causadas por fitopatógenos, como fungos, bactérias, vírus e nematoides. Dependendo de certos fatores, como biótipo do patógeno, variedade da cultivar e condições ambientais, as perdas variam (MATSUO; FERREIRA; SEDIYAMA, 2017). O fungo *P. sojae* normalmente infecta a cultura da soja no final do ciclo, e pode ser introduzido na lavoura por meio de resíduos e sementes contaminadas (YORINORI, 2000). O controle da doença é feito por meio de agroquímicos, uso de cultivares resistentes, tratamento de sementes, rotação de culturas, entre outros. A maior parte dos agroquímicos disponíveis no mercado atualmente efetivos contra as doenças causados por *P. sojae* são a base de carbendazim, captana e difenoconazole (AGROLINK, 2017). Assim, percebe-se a necessidade de novos compostos que sejam eficazes e possam ser usados no manejo integrado desta doença.

2.13. Metabólitos fúngicos ativos contra *Colletotrichum* spp. e *P. sojae*

Os agroquímicos têm sido alvos de muitas críticas, principalmente devidos aos seus efeitos adversos ao meio ambiente, à saúde humana e a de outros organismos não alvos (RAJU; NIRANJANA; SHETTY, 2003). Além disso, há a incidência crescente de fitopatógenos com resistência aos agroquímicos disponíveis no mercado (WANG et al., 2013; ZABKA; PAVELA, 2013).

Juntamente com a preocupação crescente sobre o uso de agroquímicos, o reconhecimento do potencial dos compostos biológicos tem estimulado a pesquisa, o desenvolvimento e a implementação destes (EPSTEIN; BASSEIN, 2003).

Em relação a estudos realizados com isolamento de compostos contra fitopatógenos, podemos citar o trabalho de Altomare e colaboradores (2000), que por meio de ensaios com disco de papel com 15 µg de disco⁻¹, testaram os compostos fusapirona (**29**) e deoxifusapirona (**30**) (isolados de *Fusarium semitectum*), os quais se apresentaram ativos contra *C. gloeosporioides*, com um diâmetro da zona de inibição de 31,8 mm e 13,8 mm. Sartori (2016) isolou o composto citrinina (**31**) do fungo endofítico *Penicillium citrinum*, Figura 10, o qual

se mostrou ativo contra *P. sojae* e *C. gloeosporioides*, com uma MIC de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

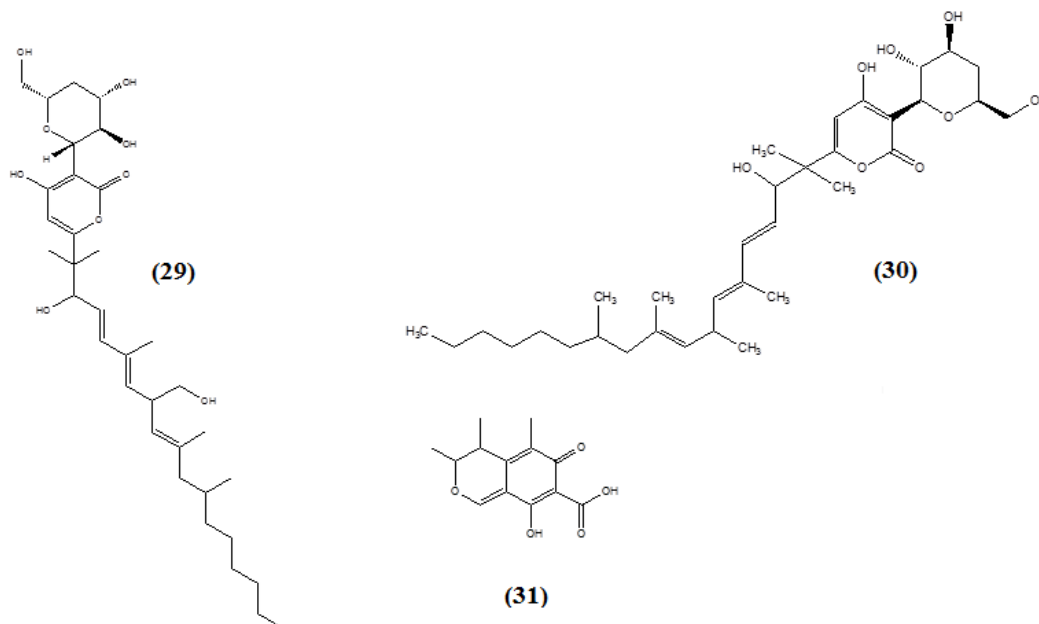


Figura 10 – Estrutura química da fusapirona (29), da deoxifusapirona (30) e da citrinina (31).

Fonte: arquivo pessoal.

Do fungo *Aspergillus fumigatus*, endófito da planta *Melia azedarach*, foram isolados os seguintes compostos: fumitremorgina C (32), ciclotriprostatinas A (33) e B (34), verruculogen TR-2 (35), 12 β -hidroxiverruculogen TR-2 (36), 12- β -hidroxi-13 α -metoxiverruculogen TR-2 (37), fumitremorgina B (38), verruculogen (39), fumiquinazolininas F (40), G (41), D (42) e A (43), 3-hidroxi-fumiquinazolina A (44), 4,8-dihidroxi-1-tetralona (45) e ácido helvólico (46), Figura 11, ambos ativos contra *C. gloeosporioides* em concentrações que variaram de $6,25$ a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LI et al., 2012b).

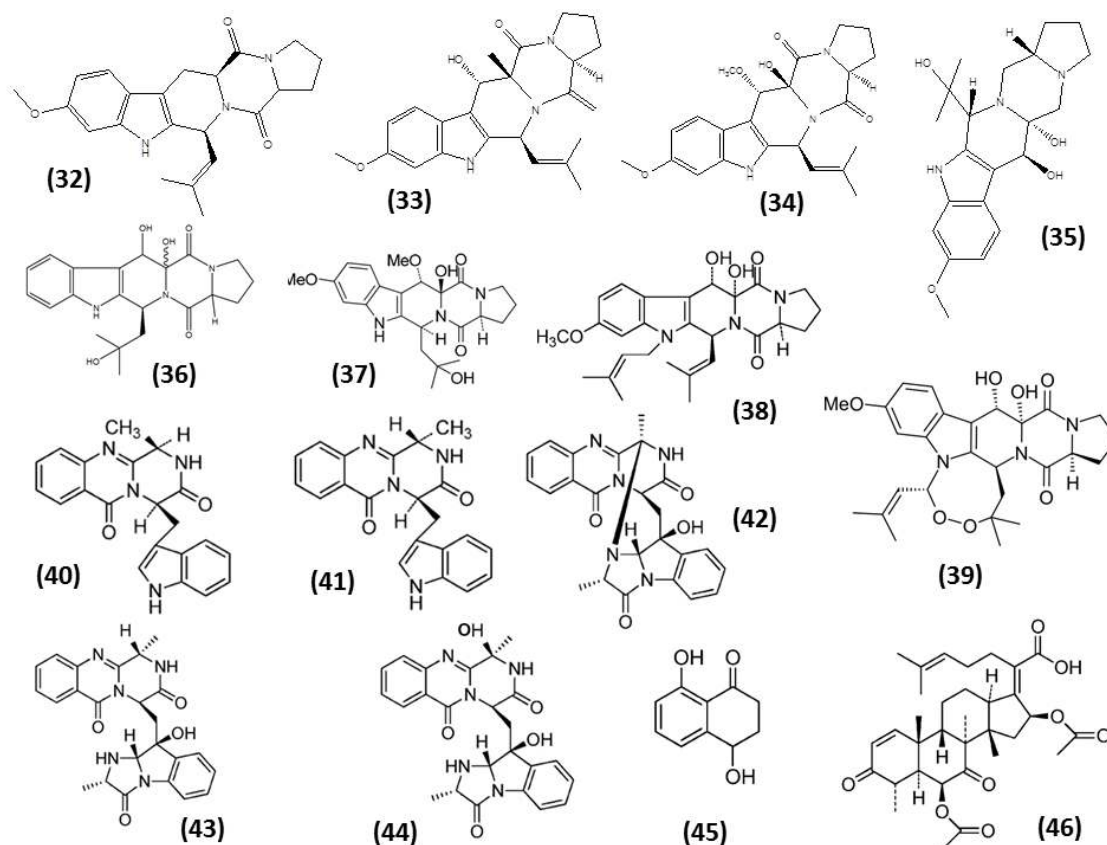


Figura 11 – Estrutura química da fumitremorgina C (32), das ciclotriprostatinas A (33) e B (34), do verrucologen TR-2 (35), do 12 β -hidroxiverrucologen TR-2 (36), do 12- β -hidroxi-13 α -metoxiverrucologen TR-2 (37), da fumitremorgina B (38), do verrucologen (39), das fumiquinazolinas F (40), G (41), D (42) e A (43), da 3-hidroxifumiquinazolina A (44), da 4,8-dihidroxi-1-tetralona (45) e do ácido helvólico (46).

Fonte: arquivo pessoal.

O composto trichodermina (47), isolado do fungo endofítico *Trichoderma brevicompactum*, apresentou atividade contra *C. lindemuthianum*, com um EC_{50} de 25,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SHENTU et al., 2014). Os compostos (*S*)-5-hidroxi-2,6-dimetil-4*H*-furo[3,4-*g*]benzopirano-4,8(6*H*)-diona (48) e 24-hidroxilergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (49), Figura 12, isolados do fungo endofítico *Aspergillus clavatus*, inibiram *C. musae* (LI et al., 2017).

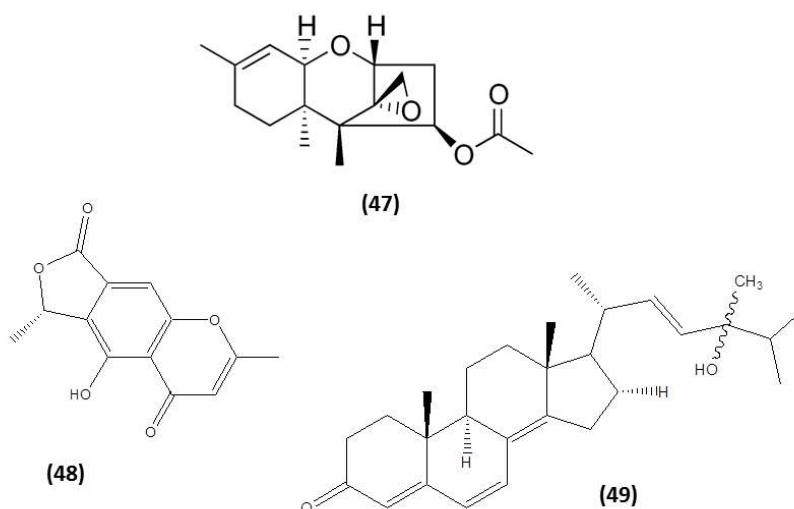


Figura 12 – Estrutura química da trichodermina (47), da (*S*)-5-hidroxi-2,6-dimetil-4*H*-furo[3,4-*g*]benzopirano-4,8(6*H*)-diona (48) e da 24-hidroxilergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (49).

Fonte: arquivo pessoal.

2.14. Leishmaniose como doença negligenciada e metabólitos fúngicos ativos contra *Leishmania* spp.

A leishmaniose é uma doença tropical causada por protozoários do gênero *Leishmania*, os quais são transmitidos pela picada de mosquitos hematófagos do gênero *Phlebotomus* (vetores), conhecidos popularmente como mosquitos-palha. As formas parasitas de *Leishmania* se multiplicam no trato digestivo dos vetores e são transmitidas aos mamíferos hospedeiros durante a alimentação dos vetores. Dentro dos vetores, os parasitas de *Leishmania* estão nas formas promastigotas (longas, flageladas e extracelulares) e, nos mamíferos hospedeiros, nas formas amastigotas (esféricas, intracelulares e sem flagelo) (GREEN et al., 1990; RITTING; BOGDAN, 2000).

Dentre as 20 espécies diferentes que pertencem ao gênero *Leishmania* e causam leishmaniose, podemos citar o complexo *L. donovani* com 2 espécies (*L. donovani*, *L. infantum*); complexo *L. mexicana* com 3 espécies principais (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*); *L. tropica*; *L. major*; *L. aethiopica*; e o subgênero *Viannia* (V) com 4 espécies principais *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana*. Morfologicamente, as diferentes espécies são indistinguíveis, mas podem ser diferenciadas por análise de isoenzimas, métodos moleculares ou anticorpos monoclonais (GRIMALDI; TESH, 1993).

A leishmaniose apresenta três principais formas clínicas: cutânea, muco-cutânea e visceral, conhecida também por calazar. A leishmaniose cutânea, que afeta a pele, costuma provocar úlceras na pele e é a forma mais comum da doença. A muco-cutânea é a forma mais rara de leishmaniose, afetando as membranas mucosas do nariz do palato, o que pode levar a destruição total ou parcial dessas membranas. A leishmaniose visceral afeta os órgãos internos como o baço e fígado, e pode ser fatal, pois também atinge o sistema imunológico através de danos a esses órgãos (CHAPPUIS et al., 2007; DARCIS et al., 2017; GUAMÁN; ARMIJOS; MANCHENO, 2017).

A leishmaniose ameaça 350 milhões de pessoas em 98 países ao redor do mundo (ALVAR et al., 2012; GUTIÉRREZ et al., 2016). Já existem 12 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo e dois milhões de novos casos ocorrem anualmente (GUTIÉRREZ et al., 2016), atingindo majoritariamente os segmentos mais pobres da população global (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006).

O diagnóstico e o tratamento com leishmaniose são caros (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006). O tratamento primário contra a leishmaniose inclui antimoniais pentavalentes, principalmente nas formas antimônicas de estibogluconato de sódio e N-metilglucamina, utilizadas desde a década de 1940. Mas sua toxicidade, que pode ser extremamente alta, leva a uma série de efeitos colaterais indesejáveis, o que causa a recusa de muitos pacientes a aderir ao tratamento (RAHT et al., 2003; SANTOS et al., 2008; GUTIÉRREZ et al., 2016). Em alguns casos, outras drogas, como pentamidina, anfotericina B e paromomicina são utilizadas como segunda opção em casos resistentes, possuindo também grande toxicidade para o hospedeiro (MOORE; LOCKWOOD, 2010). Além disso, a falta de acesso à saúde causa atrasos no diagnóstico e no tratamento, acentuando a mortalidade causada pela leishmaniose (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006).

Desde a descoberta dos primeiros medicamentos para o tratamento de leishmaniose, a busca de substâncias com atividade leishmanicida, sem efeitos tóxicos, e capaz de superar o surgimento de linhagens resistentes a drogas ainda permanece como meta (SANTOS et al., 2008).

Há relatos de compostos fúngicos com atividade contra *Leishmania* spp. Três derivados do composto afidicolina (**50**), isolado do fungo *Nigrospora sphaerica*, apresentaram-se ativos contra formas promastigotas e amastigotas de *L. donovani* (KAYSER et al., 2001), assim como as hipocrelinas A (**51**) e B (**52**), Figura 13, isolados do fungo *Hipocrella bambusae* (MA et al., 2004).

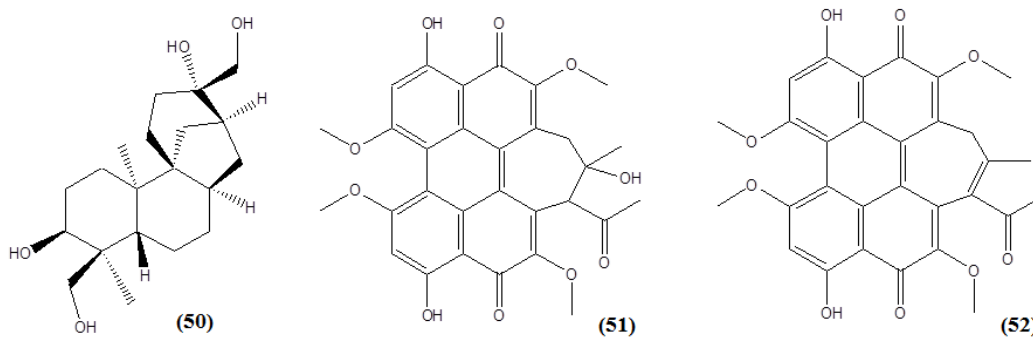


Figura 13 – Estrutura da afidicolina (50), e das hipocrelinas A (51) e B (52).

Fonte: Ma e colaboradores (2004).

Do fungo *Cochliobolus sativus*, endófito de *Vernonia polyanthes*, foram isolados os compostos cochlioquinona A (53), isocochlioquinona A (54) e anidrocochlioquinona A (55), Figura 14, que demonstraram inibir os parasitas de *L. amazonensis* (NASCIMENTO et al., 2015).

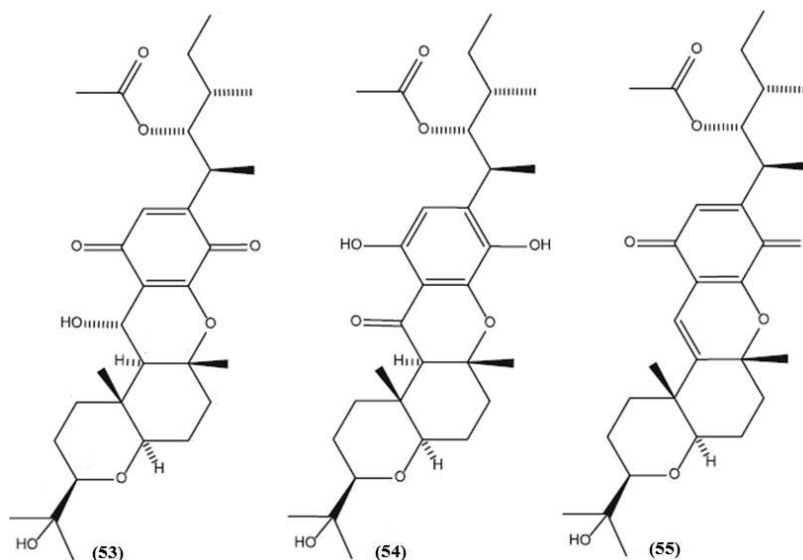


Figura 14 – Estrutura da cochlioquinona A (53), da isocochlioquinona A (54) e da anidrocochlioquinona A (55).

Fonte: Adaptado de Nascimento e colaboradores (2015).

Do fungo *Diaporthe phaseolorum*-92C, endófito de *Combretum lanceolatum*, foi isolado o composto 18-des-hidroxi-citocalasina H (56), Figura 15, o qual reduziu a viabilidade de *L. amazonensis* (BRISOW et al., 2017).

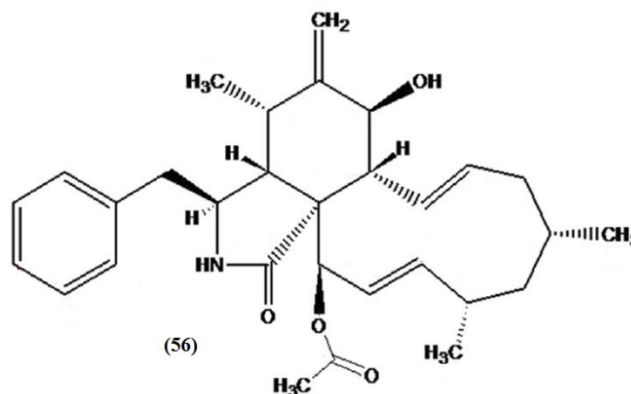


Figura 15 – Estrutura química da 18-des-hidroxi-citocalasina H (56).

Fonte: Brissow e colaboradores (2017).

2.15. O proteassoma como alvo terapêutico e metabólitos fúngicos ativos contra o proteassoma

O proteassoma é um complexo multienzimático responsável pela digestão de proteínas que estão prontas para serem eliminadas pelo organismo, destruindo também moléculas proteicas com defeitos e proteínas que já foram codificadas por vírus, sendo que sua função é crucial para a homeostase celular. Ele também intercede no controle do ciclo e diferenciação celular, resposta imune, reciclagem de aminoácidos e apoptose (MURATA; YASHIRODA; TANAKA, 2009). Estes processos biológicos podem ser manipulados através da adição de moléculas pequenas que seletivamente se dirigem às subunidades proteolíticas ativas do proteassoma (KISSELEV; VAN DER LINDEN; OVERKLEEF, 2012).

Os inibidores de proteassoma foram primeiramente sintetizados como sondas de processos proteolíticos. Depois da descoberta que estes induziam morte celular programada preferencialmente em células transformadas, eles começaram a ser investigados como possíveis fármacos. Seu primeiro teste como agentes terapêuticos ocorreu em 1998. Com a descoberta e a aprovação do bortezomid (57) - Figura 16 - para o tratamento do mieloma múltiplo recorrente e linfoma de células de crescimento, a via ubiquitina-proteassoma se tornou um alvo validado para o tratamento do câncer (ORLOWSKI; KUHN, 2008).

Nos biofilmes bacterianos, os agregados de bactérias são muito mais protegidos contra os agentes tóxicos, como antibióticos e desinfetantes, e resistentes até mesmo à ação do sistema imunológico (ABRAHAM, 2005; STEPANOVIC et al., 2007). Cerca de 80 % das infecções humanas estão associadas a biofilmes bacterianos, especialmente aquelas que envolvem implantes biomédicos, como próteses e cateteres. Os estudos de biofilmes começaram há cerca de 40 anos e geraram até 2013 mais de 24.000 artigos científicos publicados em bases de dados. No entanto, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na resistência de biofilmes aos agentes antimicrobianos (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

A densidade de células bacterianas de um biofilme é controlada por meio de comunicação entre as bactérias, chamada *quorum sensing* (QS). Essa comunicação é realizada com a ajuda de pequenas moléculas solúveis em água que atuam como auto-indutores, sendo as N-acil omo-serina-lactonas (AHL) um exemplo. Estes auto-indutores são detectados pelas células e quando um determinado limite é atingido uma cascata de sinalização se inicia e induz a transcrição de genes que levam à formação do biofilme. Além de regular a comunicação celular, o *quorum sensing* também é responsável pela motilidade, virulência e produção de matriz exopolissacarídica (ABRAHAM, 2005; RUTHERFORD; BASSLER, 2012).

O combate aos biofilmes bacterianos pode ser realizado pela inibição da formação de biofilmes (inibição do crescimento bacteriano ou bloqueio da adesão bacteriana) ou pelo tratamento de biofilmes já formados. O uso de moléculas inibidoras do sistema *quorum sensing* pode bloquear a comunicação celular bacteriana, pois as mesmas competem com o receptor das moléculas sinalizadoras (MARTIN; HOVEN; COOK, 2008). No entanto, alguns compostos parecem agir por meio de mecanismos ainda inexplorados. Compostos que fazem a dissolução de biofilmes podem ser combinados com antibióticos porque as células libertadas do biofilme retornam à sua sensibilidade normal contra antibióticos. Assim, interferir no QS poderia servir como uma alternativa aos tratamentos convencionais para combater infecções bacterianas (ESTRELA; HECK; ABRAHAM, 2009).

Devido ao fato de que as bactérias estão se tornando resistentes a alguns fármacos comumente utilizados, a busca por produtos naturais sintetizados por fungos endofíticos pode ser um caminho promissor para solucionar esse problema (HONGSHENG et al., 2010). Assim, existe um grande interesse na descoberta de novos compostos produzidos por endófitos que têm atividade antibacteriana e antibiofilme.

Em relação aos compostos fúngicos com atividade contra o biofilme, podemos citar o composto mevalonolactona, produzido por um fungo marinho não identificado isolado da esponja *Mycale magnirhaphidifera*, prevenindo a formação de biofilmes de *S. epidermidis* (SCOPEL et al., 2014).

Os sesterterpenos ofiobolina K (**60**), 6-epi-ofiobolina K (**61**) e 6-epi-ofiobolina G (**62**), Figura 18, foram isolados de *Emericella variecolor* e inibiram a formação de biofilme por *Mycobacterium smegmatis*, sendo que ofiobolina K também foi ativa contra *M. bovis* BCG (ARAI; NIIKAWA; KOBAYASHI, 2013).

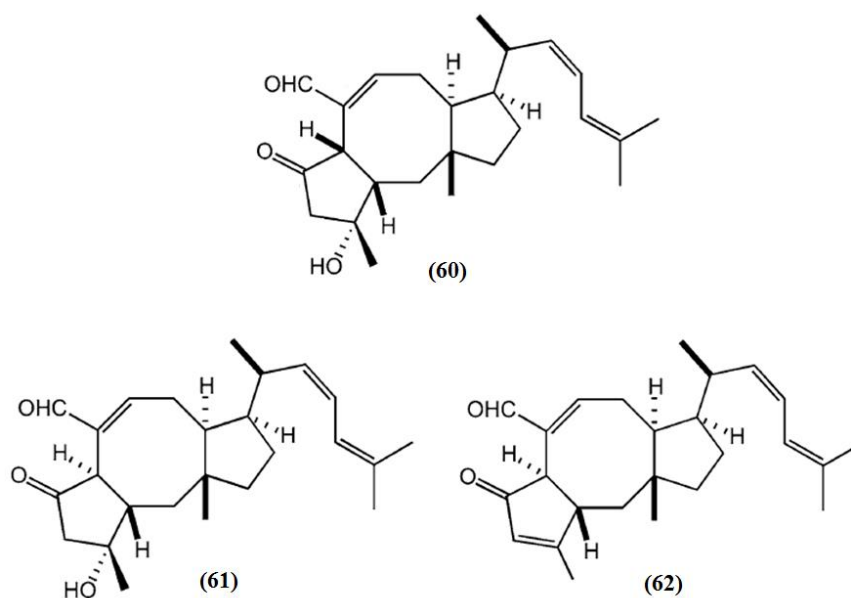


Figura 18 - Estrutura da ofiobolina K (60), da 6-epi-ofiobolina K (61) e da 6-epi-ofiobolina G (62).

Fonte: Adaptado de Arai, Niikawa e Kobayashi (2013).

Os compostos sartoripirona A (**63**) e aszonapirona A (**64**), Figura 19, foram isolados do fungo *Neosatorya fischeri* KUTC 6344 e impediram a formação de biofilme por *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*, não sendo tão ativos na dispersão de biofilmes já formados (EAMVIJARN et al., 2013; GOMES et al., 2014).

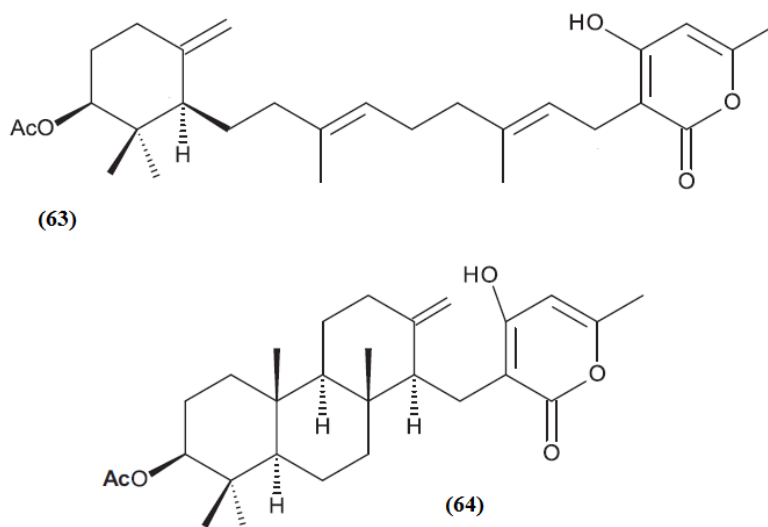


Figura 19 – Estrutura química da sartoripirona A (63) e da aszonapirona A (64).

Fonte: Adaptado de Eamvijarn e colaboradores (2013).

Assim, fica-se evidenciando o potencial dos fungos na produção de compostos com atividade antimicrobiana e contra a formação de biofilme.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, W-R. Controlling pathogenic gram-negative bacteria by interfering with their biofilm formation. **Drug Design Reviews - Online**, Sharjah , v.2, n.1, p.13-33, 2005.

AGOSTINI-COSTA, T.S.; VIEIRA, R.F.; BIZZO, H.R.; SILVEIRA, D.; GIMENES, M.A. Secondary Metabolites. In: Dhanarasu, S. (Ed.). **Chromatography and its Applications**. [s.l.]: InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0357-8.

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, 5.ed. New York: Academic Press, 2005. 952p.

AGROLINK. **Podridão seca**. 2017. Disponível em https://www.agrolink.com.br/culturas/problema/podridao-seca_1763.html. Acesso em: 13 outubro 2017.

ALTOMARE, C.; PERRONE, G.; ZONNO, M.S.; EVIDENTE, A.; PENGUE, R.; FANTI, F.; POLONELLI, L. Biological characterization of fusapyrone and deoxyfusapyrone, two bioactive secondary metabolites of *Fusarium semitectum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.63, p.1131-1135, 2000.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; THE WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis

worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, San Francisco, v.7, n.5, p.1-12, 2012.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, Oxford, v.12, p.552-557, 2006.

ALY, A.H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.41, p.1-16, 2010.

ALY, A.H.; DEBBAD, A.J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.90, p.1829-1845, 2011.

ARAI, M.; NIKAWA, H.; KOBAYASHI, M. Marine-derived fungal sesterterpenes, ophiobolins, inhibit biofilm formation of *Mycobacterium* species. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v.67, p.271–275, 2013.

ARAUJO, W.L.; LACAVA, P.T.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; SOBRAL, J.K.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**, CALO: Piracicaba, 2010.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v.21, p.51–66, 2007.

ARNOLD, E; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, Washington, v.88, n.3, p.541–549, 2007.

BAKER, D.D.; ALVI, K.A. Small-molecule natural products: New structures, new activities. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.15, p.576–583, 2004.

BANDARA, W.M.M.S., SCNCVIRATNC, G; KULASOORIYA, S.A. Interaction among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Biosciences**, New Delhi, v.31, n.5, p. 645-650, 2006.

BARAZANI, O., VON DAHL, C.C. AND BALDWIN, I.T. *Sebacina vermifera* promotes the growth and fitness of *Nicotiana attenuate* by inhibiting ethylene signaling. **Plant Physiology**, Rockville, v.144, p.1223-1232, 2007.

BOER, W.; FOLMAN, L.B.; SUMMERBELL, R.C.; BODDY, L. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.29, p.795-811, 2005.

BOWN, D. **Aroids: plants of the arum family**. Ed.2. Portland: Timber Press, 2000. 468p.

BRISSOW, E.R.; SILVA, I.P.; SIQUEIRA, K.A.; SENABIO, J.A.; PIMENTA, L.P.; JANUÁRIO, A.H.; MAGALHÃES, L.G.; FURTADO, R.A.; TAVARES, D.C.; JUNIOR, P.A.S.; SANTOS, J.L.; SOARES, M.A. 18-Des-hydroxy Cytochalasin: an antiparasitic compound of *Diaporthe phaseolorum*-92C, an endophytic fungus isolated from *Combretum lanceolatum* Pohl ex Eichler. **Parasitology Research**, Berlin, v.116, n.7, p.1823–1830, 2017.

BROWN, J.R. Ancient horizontal gene transfer. **Nature Reviews Genetics**, London, v.4, p.121-132, 2003.

CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; WALLER, J.; ABANG, M.M.; ZHANG, J.Z.; YANG, Y.L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z.Y.; PRIHASTUTI, H.; SHIVAS, R.G.; MCKENZIE, E.H.C.; JOHNSTON, P.R. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.39, p.183-204, 2009.

CANNON, P.F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P.R.; WEIR, B.S. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, Baarn, v.73, p.181-213, 2012.

CARDOSO, J.E. **Antracnose em folhas de cajueiro**. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 10 setembro 2017.

CARLSEN, M.M.; CROAT, T.B. A molecular phylogeny of the species-rich neotropical genus *Anthurium* (Araceae) based on combined chloroplast and nuclear DNA. **Systematic Botany**, Kent, v.38, n.3, p.576-588, 2013.

CARROL, G. Fungal endophytes in stems and leaves. From latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Washington, v.69, n.1, p.2-9, 1988.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews. Microbiology**, London, v.5, p.873–882, 2007.

CHEN, X.Y.; QI, Y.D.; WEI, J.H.; ZHANG, Z.; WANG, D.L.; FENG, J.D.; GAN, B.C. Molecular identification of endophytic fungi from medicinal plant *Huperzia serrata* based on rDNA ITS analysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.27, p.495–503, 2011.

CHOKPAIBOON, S.; SOMMIT, D.; TEERAWATANANOND, T.; MUANGSIN, N.; BUNYAPAIBOONSRI, T.; PUDHOM, K. Cytotoxic nor-chamigrane and chamigrane endoperoxides from a basidiomycetous fungus. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.73, p.1005–1007, 2010.

COELHO, N.A.M.; CATHARINO, M.L.E. Duas espécies novas de *Anthurium* (Araceae) endêmicas do litoral de São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.59, n.4, p.829-833, 2008.

COELHO, M.A.N. Araceae do estado de São Paulo. In: Mamede, M.C.H; Souza, V.C.; Prado, J.; Barros, F.; Wandereley, M.G.L.; Rando, J.G. **Livro vermelho das espécies vegetais ameaçadas do estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2007. p.53-56.

COELHO, M.A.N. **Taxonomia das espécies de *Anthurium* (Araceae) seção *Urospadix* subseção *Flavescentiviridia***. 2004. 329p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2004.

COLLEMARE, J.; BILLARD, A.; BÖHNERT, H.U.; LEBRUN, M.H. Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: the role of hybrid PKS-NRPS in pathogenicity. **Mycological Research**, Cambridge, v.112, p.207-215, 2008.

CROAT, T.B. Flowering behavior of the neotropical genus *Anthurium* (Araceae). **American Journal of Botany**, Baltimore, v.67, p.888-904, 1980.

CZARNIK, A. W. Guest editorial. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v.29, n.3, p.112-113, 1996.

DAMM, U.; WOUDEBERG, J.H.C.; CANNON, P.F.; CROUS, P.W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. **Fungal diversity**, Hong Kong, v.39, p.45-87, 2009.

DARCIS, G.; VAN DER AUWERA, G.; GIOT, J-B.; HAYETTE, M-P.; TASSIN, F.; ESTRADA, J.A.; CNOPS, L.; MOUTSCHEN, M.; DE LEVAL, L.; LEONARD, P. Recurrence of visceral and muco-cutaneous leishmaniasis in a patient under immunosuppressive therapy. **BMC Infectious Diseases**, London, v.17, p.478-482, 2017.

DEAN, R.; VAN KAN, J.A.L.; PRETORIUS, Z.A.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; DI PIETRO, A.; RUDD, J.J.; DICKMAN, M.; KAHMANN, R.; ELLIS, J. FOSTER, G.D. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, Oxford, v.13, p.414-430, 2012.

DEMAIN, L.A.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Heidelberg, v.69, p.1-39, 2000.

DREYFUSS, M.M.; CHAPELA, I.H. Potencial of fungi in the discovery of novel, lowmolecular weight pharmaceuticals. In: Gullo, V.P. (Ed.). **The discovery of natural products with therapeutic potential**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994. 544p.

DUCKETT, J.G.; LIGRONE, R.A. Cytological analysis of basidiomycetous endophytes in New Zealand Aneuraceae (simple thalloid liverworts, Metzgeriidae); confirmation of the derived status of *Verdoornia*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.86, p.346-358, 2008.

EAMVIJARN, A.; GOMES, N.M.; DETHOUP, T.; BUARUANG, J.; MANOCH, L.; SILVA, A.; PEDRO, M.; MARINI, I.; ROUSSIS, V.; KIJJOA, A. Bioactive meroditerpenes and indole alkaloids from the soil fungus *Neosartorya fischeri* (KUFC 6344), and the marine-derived fungi *Neosartorya laciniosa* (KUFC 7896) and *Neosartorya tsunodae* (KUFC 9213). **Tetrahedron**, Oxford, v.69, p.8583-8591, 2013.

EMBRAPA. **Longevidade de *Phomopsis sojae* Lehman durante o armazenamento de germoplasma de soja**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 63, 2004. 16p.

EPSTEIN, L.; BASSEIN, S. Patterns of pesticide use in California and the implications for strategies for reduction of pesticides. **Annual Reviews in Phytopathology**, Palo Alto, v.41, p.351-355, 2003.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: Uma Introdução a Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**, 2.ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010. 638p.

ESTRELA, A.B.; HECK, M.G.; ABRAHAM, W.-R. Novel approaches to control biofilm infections. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v.16, p.1512-1530, 2009.

FAETH, S.H.; HAMMON, K.E. Fungal endophytes in oak trees: experimental analyses of interactions with leafminers. **Ecology**, Washington, v.78, p.820-827, 1997.

FIRN, D.R.; JONES, G.C. Natural products – a simple model to explain chemical diversity. **Natural Product Reports**, London, v.20, p.382–391, 2003.

FRANCINI, B.R.; RAMOS, R.R. Butterflies of Alcatrazes Island, São Paulo State, Brazil (Lepidoptera: Papilionoidea and Hesperioidea). **Check List**, São Paulo, v.10, n.1, p.28–32, 2014.

FREY-KLETT, P.; BURLINSON, P.; DEVEAU, A.; BARRET, M.; TARKKA, M.; SARNIGUET, A. Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.75, n.4, p.583-609, 2011.

FUTAMURA, Y.; KAWATANI, M.; MUROI, M.; AONO, H.; NOGAWA, T.; OSADA, H. Identification of a molecular target of a novel fungal metabolite, pyrrolizilactone, by phenotypic profiling systems. **ChemBioChem**, Weinheim, v.14, n.18, p.2456–2463, 2013.

GAMBOA, M.A.; BAYMAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). **Biotropica**, Washington, v.33, n.2, p.352-360, 2001.

GENTRY, A.H.; DODSON, C.H. Diversity and distribution of Neotropical vascular epiphytes. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v.74, p.205–233, 1987.

GOMES, N.M.; BESSA, L.J.; BUTTACHON, S.; COSTA, P.M.; BUARUANG, J.D.; TIDA, S.A.M.S.; KIJJOA, A. Antibacterial and antibiofilm activities of tryptoquivalines and meroditerpenes isolated from the marine-derived fungi *Neosartorya paulistensis*, *N. laciniosa*, *N. tsunodae*, and the soil fungi *N. fischeri* and *N. siamensis*. **Marine Drugs**, Basel, v.12, p.822–839, 2014.

GOODALL-COPESTAKE, W.P.; HARRIS, D.J.; HOLLINGSWORTH, P.M. The origin of a mega-diverse genus: dating *Begonia* (Begoniaceae) using alternative datasets, calibrations and relaxed clock methods. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.159, n.3, p.363–380, 2009.

GREEN, S.J.; MELTZER, M.S.JR.; HIBBS, J.B.; NACY, C.A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **The journal of Immunology**, Baltimore, v.144, p.278–283, 1990.

GRIMALDI, G.JR.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v.6, n.3, p.230-250, 1993.

GUAMÁN, I.G.; ARMIJOS, M.A.; MANCHENO, J.S.; Leishmaniasis Cutánea. **Revista Médica HJCA**, Cuenca, v.5, n.2, p.181-186, 2013.

GUTIÉRREZ, V.; SEABRA, A.B.; REGUERA, R.M.; KHANDARE, J.; CALDERÓN, M. New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis. **Chemical Society Reviews**, Letchworth, v.45, p.152-168, 2016.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, New York, v.68, p.2831–2846, 2007.

HEYWOOD, V.H.; BRUMMITT, R.K.; CULHAM, A.; SEBERG, O. **Flowering plant families of the world**. Ontario: Firefly Books, 2007. 424p.

HIGGINBOTHAM, S.J.; ARNOLD, A.E.; IBÁÑEZ, A.; SPADAFORA, C.; COLEY, P.D.; THOMAS, A.; KURSAR. Bioactivity of fungal endophytes as a function of endophyte taxonomy and the taxonomy and distribution of their host plants. **Plos One**, San Francisco, v.8, n.9, 2013.

HINDORF, H. *Colletotrichum* species causing anthracnose of tropical crops. **Plant Pathology**, Oxford, v.39, p.343-366, 2000.

HONGSHENG, Y.; LEI, Z.; LIN, L.; CHENGJIAN, Z.; LEI G.; WENCHAO, L.; PEIXIN, S.; LUPING, Q. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, Pavia, v.165, n.6, p.437–449, 2010.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. **IMA Fungus: The Global Mycological Journal**, Berkeley, v.2, n.1, p.87-95, 2011.

HYDE, K.D.; CAI, L.; CANNON, P.F.; CROUCH, J.A.; CROUS, P.W.; DAMM, U.; GOODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.R.; JONES, E.B.G.; LIU, Z.Y.; MCKENZIE, E.H.C.; MORIWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.H.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; TAYLOR, P.W.J.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L.; ZHANG, J.Z. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal diversity**, Hong Kong, v.39, p.147-182, 2009.

ICMBIO, 2015. **MMA defende criação de parque em Alcatrazes**. Disponível em <http://www.icmbio.gov.br/portal/comunicacao/noticias/20-geral/4062-camara-debate-criacao-de-parque-em-alcatrazes.html>. Acesso em: 7 março 2015.

IARBMA. INSTITUTO AMIGOS DA RESERVA DA BIOSFERA DA MATA ATLÂNTICA (2014) Anuário Mata Atlântica 2014. LINO, F.C.; DIAS, H. (Orgs.). **A Mata Atlântica e as metas Nacionais da Biodiversidade para 2020**. São Paulo: IA-RBMA, 2014. 126p.

JACQUES, E.L. *Begoniaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5736>. Acesso em: 17 outubro 2014.

JACQUES, E.L. *Begonia lunaris* E. L. Jacques (Begoniaceae), uma nova espécie para o estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.59, n.1, p.259-263, 2008

JACQUES, E.L.; MAMEDE, M.C.H. Notas nomenclaturais em *Begonia* L. (Begoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.28, p.579-588, 2005.

JALGAONWALA, R.E; MOHITE, B.V.; MAHAJAN, R.T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, Udaipur, v.1, n.2, p.21-32, 2011.

JOEL, E.L.; BHIMBA, B.V. A secondary metabolite with antibacterial activity produced by mangrove foliar fungus *Schizophyllum commune*. **International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences**, Pattaya, v.1, n.1, p.165-168, 2013.

JOLY, C.A.; ASSIS, M.A.; BERNACCI, L.C.; TAMASHIRO, J.Y.; CAMPOS, M.C.R.; GOMES, J.A.M.A.; LACERDA, M.S.; SANTOS, F.A.M.; PEDRONI, F.; PEREIRA, L.S.; PADGURSCHI, M.C.G.; PRATA, E.M.B.; RAMOS, E.; TORRES, R.B.; ROCHELLE, A.; MARTINS, F.R.; ALVES, L.F.; VIEIRA, S.A.; MARTINELLI, L.A.; CAMARGO, P.B.; AIDAR, M.P.M.; EISENLOHR, P.V.; SIMÕES, E.; VILLANI, J.P.; BELINELLO, R. Floristic and phytosociology in permanent plots of the Atlantic Rainforest along an altitudinal gradient in southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, Campinas, vol. 12, n.1, p.123-145, 2012.

JOLY, C.A.; METZGER, J.P.; TABARELLI, M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: ecological findings and conservation initiatives. **The New Phytologist**, London, v.204, p.459–473, 2014.

KATOCH, M.; SINGH, G.; SHARMA, S.; GUPTA, N.; SANGWAN, P.L.; SAXENA, A.K. Cytotoxic and antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Bacopa monnieri* (L.) Pennell (Scrophulariaceae). **BMC Complementary & Alternative Medicine**, London, v.14, n.52, p.1-8, 2014.

KAUL, S.; GUPTA, S.; AHMED, M.; DHAR, K.M. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v.11, n.4, p.487-505, 2012.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; BERTELS, S.; SIEMS, K. Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Bethesda, v.45, n.1, p.288–292, 2001.

KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNET, J.W. Fungal secondary metabolism – from biotechnology to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.3, p.937-947, 2005.

KHARE, S.; NAGLE, A.S.; BIGGART, A.; LAI, Y.H.; LIANG, F.; DAVIS, L.C.; BARNES, S.W.; MATHISON, C.J.N.; MYBURGH, E.; GAO, M-Y.; GILLESPIE, J.R.; LIU, X.; TAN, J.L.; STINSON, M.; RIVERA, I.C.; BALLARD, J.; YEH, V.; GROESSL, T.; FEDERE, G.; KOH, H.X.Y.; VENABLE, J.D.; BURSULAYA, B.; SHAPIRO, M.; MISHRA, P.K.; SPRAGGON, G.; BROCK, A.; MOTTRAM, J.C.; BUCKNER, F.S.; RAO, S.P.S.; WEN, B.G.; WALKER, J.R.; TUNTLAND, T.; MOLTENI, V.; GLYNNE, R.J.; SUPEK, F.

Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. **Nature**, Basingstoke, v.537, p.229–233, 2016.

KISSELEV, A.F.; VAN DER LINDEN, W.A.; OVERKLEEF, H.S. Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. **Chemistry & Biology**, London, v.19, p.99-115, 2012.

KRINGS, M.; TAYLOR, N.T.; HASS, H.; KERP, H.; DOTZLER, N.; HERMSEN, J.E. Fungal endophytes in a 400-million-year-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. **The New Phytologist**, London, v.174, n.3, p.648-57, 2007.

KROLL, M.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; BACHELERIE, F.; THOMAS, D.; FRIGUET, D.; CONCONI, M. The secondary fungal metabolite gliotoxin targets proteolytic activities of the proteasome. **Chemistry & Biology**, London, v.6, n.10, p.689-698, 1999.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, London, v.19, n.7, p.792-798, 2012.

KUSARI, S.; PANDEY, P.S.; SPITELLER, M. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. **Phytochemistry**, New York, v.91, p.81–87, 2013.

KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.32, n.6, p.297-303, 2014.

LAGUNIN, A.; FILIMONOV, D.; POROIKOV, V. Multi-targeted natural products evaluation based on biological activity prediction with PASS. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v.16, n.15, p.1703-17, 2010.

LAKRA, S.N.; KOUL, M.; CHANDRA, R.; CHANDRA, S. Histological investigations of healthy tissues of *Catharanthus Roseus* to localize fungal endophytes. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, Bangalore, v.20, n.35, p.205-209, 2013.

LI, H.; PONDER, E.L.; VERDOES, M.; ASBJORNSDOTTIR, K.H.; DEU, E.; EDGINGTON, L.E.; LEE, J.T.; KIRK, C.J.; DEMO, S.D.; WILLIAMSON, K.C.; BOGYO, M. Validation of the proteasome as a therapeutic target in *Plasmodium* using an epoxyketone inhibitor with parasite-specific toxicity. **Chemistry & Biology**, London, v.19, p.1535–1545, 2012a.

LI, W.; XIONG, P.; ZHENG, W.; ZHU, X.; SHE, Z.; DING, W.; LI, C. Identification and antifungal activity of compounds from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus clavatus* R7. **Marine Drugs**, Basel, v.15, n.8, p.259-269, 2017.

LI, X.J.; ZHANG, Q.; ZHANG, A.L.; GAO, J.M. Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant, and toxic activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.60, n.13, p.3424-3431, 2012b.

LIU, J-Y.; LIU, C-H.; ZOU, W-X.; TIAN, X.; TAN, R-X. Leptosphaerone, a metabolite with a novel skeleton from *Leptosphaeria* sp. IV403, an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v.85, p.2664-2667, 2002.

MA, G.; KHAN, S.I.; JACOB, M.R.; TEKWANI, B.L.; LI, Z.; PASCO, D.S.; WALKER, L.A.; KHAN, I.A. Antimicrobial and antileishmanial activities of hipocrellins A and B. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Bethesda, v.8, p.11, p.4450–4452, 2004.

MARINHO, A.M.R.; MARINHO, P.S.B.; FILHO, E.R. Constituintes químicos de *Penicillium* sp., um fungo endofítico isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Guarapuava, v.9, n.2, 2007.

MARTIN, C.A.; HOVEN, A.D.; COOK, A.M. Therapeutic frontiers: preventing and treating infectious diseases by inhibiting bacterial quorum sensing. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v.27, p.635–642, 2008.

MATSUO, E.; FERREIRA, P.A.; SEDIYAMA, T. (2017) Resistance to Diseases. In: Lopes da Silva F.; Borém A.; Sedyama T.; Ludke W. (Orgs.). **Soybean Breeding**. Netherlands: Springer, Cham. p.329-350.

MCCORMICK, K.; KAUTTO, N. The Bioeconomy in Europe: An overview. **Sustainability**, Basel, v.5, n.6, p.2589-2608, 2013.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L.; **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488p.

MEYER, V.; ANDERSEN, M.R.; BRAKHAGE, A.A.; BRAUS, G.H.; CADDICK, M.X.; CAIRNS, T.C.; DE VRIES, R.P.; HAARMANN, T.; HANSEN, K.; HERTZ-FOWLER, C.; KRAPPMANN, S.; MORTENSEN, U.H.; PEÑALVA, M.A.; RAM, A.F.J.; HEAD, R.M. Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. **Fungal Biology and Biotechnology**, London, v.3, n.6, p.1-17, 2016.

MILLS, P.R.; HODSON, A.; BROWN, A.E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruits. In: Bailey, J.A.; Jeger, M.J.; (Orgs.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CABI, 1992. p.269-288.

MITTERMEIER, R.A.; GIL, P.R.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, J.; MITTERMEIER, C.G.; LAMOURUX, J.; FONSECA, G.A.B. **Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. Washington: Cermex, 2004. 392p.

MOLINAR, E.; RIOS, N.; SPADAFORA, C.A.; ARNOLD, E.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A.; GERWICK, W.H.; CUBILLA-RIOS, L. Coibanoles, a new class of meroterpenoids produced by *Pycnoporus sanguineus*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v.53, n.8, p.919–922, 2012.

MOORE, E.M.; LOCKWOOD, D.N. Treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, Mumbai, v.2, n.2, p.151-158, 2010.

MÜNCH, S.; LINGNE, U.; FLOSS, D.S.; LUDWIG, N.; SAUER, N.; DEISING, H.B. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v.165, p.41-51, 2008.

MURATA, S.; YASHIRODA, H.; TANAKA, K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v.10, p.104-115, 2009.

MUSCAT, E.; SAVIOLLI, Y.J.; COSTA, A.; CHAGAS, A.C.; EUGÊNIO, M.; ROTENBERG, L.E.; OLMOS, F. Birds of the Alcatrazes archipelago and surrounding waters, São Paulo, southeastern Brazil. **Check List**, São Paulo, v.10, n.4, p.729–738, 2014.

NASCIMENTO, A.M.; SOARES, M.G.; TORCHELSEN, F.K.V.S.; ARAUJO, J.A.V.; LAGE, P.S.; DUARTE, M.C.; ANDRADE, P.H.R.; RIBEIRO, T.G.; COELHO, E.A.F.; NASCIMENTO, A.M. Antileishmanial activity of compounds produced by endophytic fungi derived from medicinal plant *Vernonia polyanthes* and their potential as source of bioactive substances. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.31, n.11, p.1793–1800, 2015.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.79, p.629-661, 2016.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, D.G. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.22, n.4, p.552–558, 2011.

OLIVEIRA FILHO, A.T.; FONTES, M.A.L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in southeastern Brazil, and the influence of climate. **Biotropica**, Washington, v.32, p.793–810, 2000.

ORLOWSKI, R. Z.; KUHN, D. J. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. **Clinical Cancer Research**, Denville, v.14, n.1649-1657, 2008.

OSÉS, R.; VALENZUELA, S.; FREER, J.; BAESA, J.; RODRIGUEZ, J. Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme production and wood biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v.57, p.129-135, 2006.

PAN, J.J.; BAUMGARTEN, A.M.; MAY, G. Effects of host plant environment and *Ustilago maydis* infection on the fungal endophyte community of maize (*Zea mays*). **The New Phytologist**, London, v.178, p.147–156, 2008.

PEIXOTO-NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.29, p.62-77, 2002.

PHOULIVONG, S.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E.H.C.; ABDELSALAM, K.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K.D. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.44, p.33-43, 2010.

PIERIK, R.L.M.; TETTEROO, F.A.A. Vegetative propagation of *Begonia venosa* Skan in vitro from inflorescence explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.10, p.135-142, 1987.

PINTO, L.P.; BEDÊ, L.C.; FONSECA, M.T.; LAMAS, I.R.; MESQUITA, C.A.B.; PAGLIA, A.P., PINHEIRO, T.C.; SÁ, M.B. 2012. Mata Atlântica. In: Scarano, F.R.; Santos, I.L.; Martins, A.C.I.; Silva, J.M.C.; Guimarães, A.L.; Mittermeier, R.A. (Eds.). **Biomás brasileiros: retratos de um país plural**. Rio de Janeiro: Casa da Palavra. 304p.

PORTAL BRASIL. **Arquipélago de Alcatrazes passará a receber turistas no verão**. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/turismo/2017/09/arquipelago-de-alcatrazes-passara-a-receber-turistas-no-verao>. Acesso 08 novembro 2017.

POWTHONG, P.; JANTRAPANUKORN, B.; THONGMEE, A.; SUNTORNTHITICHAROEN, P. Evaluation of endophytic fungi extract for their antimicrobial activity from *Sesbania grandiflora* (L.) Pers. **Internacional Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research**, Cuddalore, v.3, n.2, p.132-136, 2012.

PURI, C. S.; NAZIR, A.; CHAWLA, R.; ARORA, R.; RIYAZ-ULHASAN, S.; AMNA, T.; AHMED, B.; VERMA, V.; SINGH, S.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; SHARMA, R.K.; QAZI, G.N. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.122, p.494–510, 2006.

RAJU, N.S.; NIRANJANA, S.R.; SHETTY, H. Effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* on head moulds and seed qualities of sorghum. **Crop Improvement**, Ludhiana, v.30, n.6, p.6-12, 2003.

RAHT, S.; TRIVELLIN, A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.; JUNIOR, H.F.A.; TEMPONE, A.G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado de arte. **Química Nova**, São Paulo, v.26, p.550-557, 2003.

RÉBLOVÁ, M.; GAMS, W.; SEIFERT, K.A. Monilochaetes and allied genera of the Glomerellales, and a reconsideration of families in the Microascales. **Studies in Mycology**, Baarn, v.68, p.163-191, 2011.

REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L.E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**, Washington, v.289, p.1920-1921, 2000.

RITTING, M.G.; BOGDAN, C. Leishmania host–cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, Amsterdam, v.16, p.292–297, 2000.

ROCHA, A.C.V. **Antagonismo in vitro de fungos endofíticos, isolados de *Hevea brasiliensis*, contra o *Microcyclus ulei* (Fungo causador do mal-das-folhas na seringueira)**. 2007. 141p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2007.

RODRIGUEZ, R.J.; WHITE, J.J.F.; ARNOLD, A.E.; REDMAN, R.S. Fungal endophytes diversity and functional roles. **The New Phytologist**, London, v.182, p.314-330, 2009.

ROQUE, F.N. **Substâncias orgânicas: estrutura e propriedades**. São Paulo: Edusp, 2011. 320p.

ROZE, L.V.; CHANDA, A.; LINZ, J.E. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v.48, p.35-48, 2011.

RUTHERFORD, S.T.; BASSLER, B.L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Woodbury, v.2, n.11, p.1-25, 2012.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, H. S. Evolution of endophyte-plant symbiosis. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.9, p.275-280, 2004.

SAIKKONEN, K.; LEHTONEN, P.; HELANDER, M.; KORICHEVA, J.; FAETH, S.H. Model systems in ecology: dissecting the endophyte-grass literature. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.11, p.428–433, 2006.

SÁNCHEZ MÁRQUEZ, S.; BILLS, G.F.; ZABALGOGEAZCOAI. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.27, p.171-195, 2007.

SANTOS, D.O.; COUTINHO, C.E.R.; MADEIRA, M.F.; BOTTINO, C.G.; VIEIRA, R.T.; NASCIMENTO, S.B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S.C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R.T.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, Berlin, v.103, n.1, p.1–10, 2008.

SANTOS, M.F.C. **Estudo Químico dos Fungos Endofíticos *Phomopsis* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger* e *Aspergillus* sp., associados à espécie vegetal *Hancornia speciosa* (Apocinaceae)**. 2011. 202p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2011.

SANTOS, P.L. **Efeito de óleos essenciais sobre o fungo *Phomopsis sojae* e a qualidade fisiológica de sementes de soja**. 2014. 59p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2014.

SANTOS, T.T.; VARAVALLO, M.A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.32, n.2, p.199-212, 2011.

SARTORI, S.B. **Potencial metabólico de fungos endofíticos de plantas do gênero *Anthurium* da Ilha de Alcatrazes**. 2016. 219p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2016.

SAVIOTTI, P.P. Structural Change, Knowledge and the Bioeconomy. In: Dabbert S., Lewandowski I., Weiss J., Pyka A. (eds) **Knowledge-driven developments in the bioeconomy. Economic complexity and evolution**. Basel: Springer, 2017. 341p.

SCOPEL, M.; ABRAHAM, W.-R.; ANTUNES, A.L.; BARTH, A.; RIBEIRO, V.B.; HENRIQUES, A.T.; MACEDO, A.J. Mevalonolactone: an inhibitor of *Staphylococcus*

epidermidis adherence and biofilm formation. **Medicinal Chemistry**, Los Angeles, v.10, p.246–251, 2014.

SHARMA, G.; SHENOY, B.D. *Colletotrichum* systematics: past, present and prospects. **Mycosphere**, Chiang Rai, v.7, p.1093–1102, 2016.

SHENTU, X.; ZHAN, X.; MA, Z.; YU, X.; ZHANG, C. Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.1, n.45, p.248-254, 2014.

SHIRAIISHI, A.; ARAKI-SASAKI, A.; MITANI, A.; MIYAMOTO, H.; SUNADA, A.; UEDA, A.; ASARI, S.; ZHENG, X.; YAMAMOTO, Y.; HARA, Y.; OHASHI, Y. Clinical characteristics of keratitis due to *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, New York, v.27, p.487-491, 2011.

SHWETA, S. ZÜHLKE, B.T. RAMESHA, V. PRITI, P.M. KUMAR, G. RAVIKANTH, M. SPITELLER, R. VASUDEVA, R.U. SHAANKER. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. **Phytochemistry**, New York, v.71, p.117–122, 2010.

SILVA, R.R.; COELHO, D.G. **Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006. 20p.

SOLIMAN, S.S.M.; RAIZADA, M.N. Interactions between co-habiting fungi elicit synthesis of taxol from an endophytic fungus in host taxus plants. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v.4, n.3, p.1-14, 2013.

SOSMA. SOS Mata Atlântica. **Florestas. A Mata Atlântica**. Disponível em <https://www.sosma.org.br/nossa-causa/a-mata-atlantica/>. Acesso em: 08 novembro 2017.

SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R.C.; FELBER, A.C.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.16, n.4, p.345-351, 2014.

SPITELLER, P. Chemical defense strategies of higher fungi. **Chemistry: A European Journal**, Weinheim, v.14, n.30, p.9100-9110, 2008.

SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. DNA sequence variation and interrelationship among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.41, p.265-281, 1992.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; CIRKOVIC, I.; RUZICKA, F.A. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v.115, p.891-899, 2007.

STERGIOPOULOS, I.; COLLEMARE, J.; MEHRABI, R.; DE WIT, P.J.E.M. Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic *Dothideomycete* fungi. **FEMS Microbiological Reviews**, Amsterdam, v.37, p.67-93, 2013.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, Washington, v.260, p.214-216, 1993.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.67, p.491-502, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.67, p.257-268, 2004.

STROBEL, G.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J.K.; ARIF, A.M.; GRANT, D.M.; FUNG, P.C.W.; CHAU, R.M.W. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, New York, v.60, n.2, p.179-183, 2002.

SURYANARAYANAN, T.S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M.B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T.S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v.23, p.9-19, 2009.

TABARELLI, M.; PINTO, L.P.; SILVA, J.M.C.; HIROTA, M.M.; BEDÊ, L.C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.1-7, 2005.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, London, v.18, p.448-459, 2001.

THE PLANT LIST (2013). Version 1.1. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/> Acesso 01 janeiro 2017.

THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE. Disponível em <http://www.scripps.edu/shen/NPLI/whynaturalproducts.html>. Acesso em: 13 janeiro 2015.

THOMAS, S.E.; CROZIER, J.; AIME, M.C.; EVANS, H.C.; HOLMES, K.A. Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies associated with the indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador. **Mycological Research**, Cambridge, v.112, p.852-860, 2008.

TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v.14, n.22, p.113-238, 2013.

USDA. United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. Circular Series WAP 09-17 September 2017. World Agricultural Production. Disponível em <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acesso em: 12 outubro 2017.

WANDERLEY, M.G.L. **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. São Paulo: Flora, 2012. 363p.

WANG, X.; RADWAN, M.M.; TARAWNEH, A.H.; GAO, J.; WEDGE, D.E.; ROSA, L.H.; CUTLER, H.G.; CUTLER, S.J. Antifungal activity against plant pathogens of metabolites from the endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.61, p.4551–4555, 2013.

WARMINK, J.A.; NAZIR, R.; VAN ELSAS, J.D. Universal and species-specific bacterial ‘fungiphiles’ in the mycospheres of different basidiomycetous fungi. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.11, p.300-312, 2009.

WCSP 2014. 'World Checklist of Selected Plant Families. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <http://wfo.kew.org/taxon/urn:kew.org:wcs:taxon:361594>. Acesso 19 novembro 2017.

WELLENSIEK, P.B.; RAMAKRISHNAN, R.; BASHYAL, P.B.; EASON, Y.; GUNATILAKA, L.A.A.; AHMAD, N. Inhibition of HIV-1 replication by secondary metabolites from endophytic fungi of desert plants. **The Open Virology Journal**, Hilversum, v.7, p.72-80, 2013.

WILLIAMS, H.D.; STONE, J.M.; HAUCK, R.P.; RAHMAN, K.S. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.52, n.6, p.1189-1208, 1989.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, New York, v.64, p.3–19, 2003.

YORINORI, J.T. Ameaças para a soja. **Cultivar Grandes Culturas**, n. 22, 2000. Disponível em <http://www.grupocultivar.com.br/artigos/ameacas-para-a-soja>. Acesso em: 12 outubro 2017.

ZABALGOGEAZCOA, I. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, n.6, p.138-146, 2008.

ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**, Oxford, v.93, n.6, p.1051-1056, 2013.

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, London, v.23, p.753-771, 2006.

ZHAO, J.; ZHOU, L.; WANG, J.; SHAN, T.; ZHONG, L.; LIU, X.; GAO, X. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. In: Méndez-Vilas, A. (Org.). **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. Badajoz: Formatex Research Center, 2010. p.567-576.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Realizar o estudo químico e biológico de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados das plantas *Anthurium alcatrazense*, *Begonia venosa* (provenientes da Ilha de Alcatrazes) e *B. fischeri* (da Mata Atlântica).

3.2. Específicos

- I. Selecionar cinco linhagens fúngicas;
- II. Isolar os metabólitos secundários por meio de técnicas cromatográficas e identificar os compostos por técnicas espectroscópicas;
- III. Avaliar frações e compostos puros em ensaios de atividade biológica contra fitopatógenos (*Colletotrichum gloeosporioides* e *Phomopsis sojae*), patógenos humanos (*Leishmania (L.) infantum*), como inibidores do proteassoma (alvo validado contra o câncer) e na inibição da formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

4 CAPÍTULO 1 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS TRILONGINS PRODUZIDAS POR *Trichoderma* sp.

RESUMO

Fungos do gênero *Trichoderma* são notórios produtores de metabólitos secundários com diversas aplicações, tais como antibióticos, promotores de crescimento de plantas e como fungicidas comerciais. Os peptaibols são uma classe de peptideos lineares sintetizados por estes fungos, com mais de 300 compostos já descritos, tais como “tricholonguins”, “longuibrachins”, “trichobrachins” e “trichovirins”. Os peptaibols são biossintetizados pela rota das peptideo sintetases não-ribossomais e apresentam diversas atividades biológicas. Através de isolamento bioguiado, foram isolados quatro compostos (6DP2, 6DP3, 6DP4 e 6DP5) produzidos pelo fungo *Trichoderma* sp., endófito de *Begonia venosa*, com atividade antifúngica a *Colletotrichum gloeosporioides* e ao alvo do proteassoma. O extrato acetato desse endófito apresentou 6,01 % e 75% de atividade contra *C. gloeosporioides* e o alvo do proteassoma, respectivamente. Os compostos isolados do extrato foram identificados por EM/EM, e a comparação com a literatura sugeriu as trilongins BI, BII, BIII e BIV, que são peptaibols de 20 resíduos de aminoácidos. A MIC contra *C. gloeosporioides* foi de 40 μ M para a trilongin BI, 320 μ M para a trilongin BII, 160 μ M para a trilongin BIII e 310 μ M para a trilongin BIV. As trilongins BI-BIV foram testadas contra a subunidade ChTL do proteassoma e apresentaram os valores de IC₅₀ de 6,5 \pm 2,7; 4,7 \pm 1,8; 6,3 \pm 2,2 e 2,7 \pm 0,5 μ M, respectivamente. Os compostos também foram testados *ex vivo* contra os amastigotas intracelulares de *Leishmania* (L.) *infantum*, mas não apresentaram seletividade.

Palavras-chave: *Begonia venosa*; *Colletotrichum gloeosporioides*; Ilha de Alcatrazes; peptaibióticos; peptaibols

ABSTRACT

Fungi of the genus *Trichoderma* are notorious producers of secondary metabolites with diverse applications, such as antibiotics, plant growth promoters and as commercial fungicides. Peptaibols are a class of linear peptides synthesized by these fungi, with more than 300 compounds already described, such as “tricholonguins”, “longuibrachins”, “trichobrachins” and “trichovirins”. The peptaibols are biosynthesized by the route of the non-ribosomal peptide synthetases and present several biological activities. Four compounds (6DP2, 6DP3, 6DP4 and 6DP5) with antifungal activity to *Colletotrichum gloeosporioides* and to the proteasome target were isolated from the fungus *Trichoderma* sp., endophytic from *Begonia venosa*. The ethyl acetate extract of this endophyte had 6.01% and 75% activity against *C. gloeosporioides* and the proteasome target, respectively. The compounds isolated from the extract were identified by MS/MS, and comparison with the literature suggested trilongins BI, BII, BIII and BIV, which are peptaibols of 20 amino acid residues. The MIC against *C. gloeosporioides* was 40 μ M for trilongin B1, 320 μ M for trilongin BII, 160 μ M for trilongin BIII and 310 μ M for trilongin BIV. BI-BIV trilongins were tested against the ChTL subunit of the proteasome and showed IC₅₀ values of 6.5 \pm 2.7; 4.7 \pm 1.8; 6.3 \pm 2.2 and 2.7 \pm

0.5 μM , respectively. The compounds were also tested *ex vivo* against the intracellular amastigotes of *Leishmania (L.) infantum*, but did not show selectivity.

Keywords: *Begonia venosa*; *Colletotrichum gloeosporioides*; Alcatrazes Island; peptaibiotics; peptaibols

4.1 Introdução

Os fungos do gênero *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea*) são amplamente usados na agricultura como biopesticidas (SRIVASTAVA et al., 2014) e conhecidos pela produção de peptaibióticos (DEGENKOLB et al., 2006; KRAUSE; KIRSCHBAUM; BRÜCKNER, 2007), com mais de 440 compostos já descritos (LA FUENTE-NÚÑEZ; WHITMORE; WALLACE, 2013). Os peptaibióticos são um grupo de antibióticos peptídicos que possuem conformações e bioatividades únicas (SZEKERES et al., 2005). Eles têm 4 a 21 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular que varia entre 500 e 2200 Da (DEGENKOLB; BRÜCKNER, 2008).

Os peptaibols são um subgrupo dos peptaibióticos, sendo uma classe de peptídeos lineares que contêm de 7 a 20 aminoácidos e caracteristicamente possuem um grupo N-terminal acilado, um aminoácido C-terminal e uma grande quantidade de ácido aminobutírico (Aib) - em torno de 40 % nos peptaibols longos, e de 14 % a 56 % nos peptaibols curtos (WHITMORE; WALLACE, 2004). Diversos peptaibols já foram isolados de espécies de *Trichoderma*, tais como tricholonguins (REBUFFAT et al., 1991), longuibrachins (LECLERC et al., 2001), trichobrachins (MOHAMED-BENKADA et al., 2006; RUIZ et al., 2007), trichokonins (SHI et al., 2012) e trichovirins (MOHAMED-BENKADA et al., 2006).

Entre os metabólitos secundários produzidos por *Trichoderma*, os peptaibols são a classe mais estudada em relação a atividades biológicas (DANIEL; RODRIGUES FILHO, 2007). Como exemplos, podemos citar a atividade antibacteriana contra *S. aureus* (AYERS et al., 2012; MOHAMED-BENKADA et al., 2016) e *Enterococcus faecalis* (MOHAMED-BENKADA et al., 2016), atividade anti-helmíntica contra *Haemonchus contortus* (AYERS et al., 2012) e antifúngica ao patógeno humano *Aspergillus fumigatus* (MOHAMED-BENKADA et al., 2016) e os fitopatógenos *Ascochyta citrullina*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica* e *Verticillium dahliae* (SHI et al., 2012), atividades citotóxicas contra células KB (sublinhagem da linhagem celular tumoral geral, que forma queratina), propriedades hemolíticas (BRÜCKNER; GRAF; BOKEL, 1984) e toxicidade aguda nas larvas de Diptera (MOHAMED-BENKADA et al., 2016), entre outras.

Dessa forma, o objetivo desta pesquisa foi isolar e caracterizar os metabólitos secundários bioativos produzidos pelo fungo endofítico *Trichoderma* sp. P8BDA1F2, por meio de isolamento bioguiado contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* e contra o alvo do proteassoma.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Procedimentos gerais

A espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-EM/EM) foi realizada em um espectrômetro Xevo G2-XS QToF Quadrupolo Tempo-de-voo (Waters) operando em modo eletrospray positivo nas seguintes condições: faixa de detecção: 100-2200 Da com aquisição total de íons; tensão capilar: +1,2 kV; energia de colisão: 60 V; temperatura capilar: 120 °C; gás do cone: 50 unidades, gás de desolvatação ($L h^{-1}$): 750; coluna: Acquity UPLC BEH C₁₈ (2,1 x 100 mm, 1,7 μm), e fase móvel em gradiente de H₂O ultrapura (A) e ACN (B), proporção inicial de 98A: 2B, chegando a 100 % B após 9 minutos e término após 10 minutos de análise. A vazão foi 0,5 mL min⁻¹ e a temperatura de 4 °C. Os valores *m/z* foram gravados no modo centroide. A aquisição de dados foi realizada usando o software MassLynx.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi conduzida no equipamento Agilent 1100 Series UV/Vis com uma bomba quaternária, acoplada a um detector UV MWD (Detector de múltiplos comprimentos de onda), utilizando uma coluna de fase reversa C₁₈ (250 x 4,60 mm, 5 μm ; Kinetex Phenomenex), com uma eluição em modo gradiente (H₂O ultrapura à 0,1 % ácido fórmico em ACN), vazão de 1 mL min⁻¹ e $\lambda = 220$ nm. Foram utilizados solventes de grau HPLC da marca J. T. Baker. A extração em fase sólida foi realizada com colunas Sep-pak de sílica gel e C₁₈ de diferentes dimensões (Phenomenex) e solventes de grau P.A. da marca Synth. Cromatofolhas de sílica gel com indicador de fluorescência (Macherey-Nagel) foram utilizadas para a cromatografia em camada delgada (CCD), sendo que os spots foram inspecionados sob luz UV (254 e 365 nm).

As leituras de absorvância óptica foram feitas em leitor TECAN, modelo SUNRISE, operado pelo software Magellan v.7.1, a 620 nm.

4.2.2 Material biológico

O endófito foi isolado de folhas de *Begonia* sp. (S24°06.027' W45°41.640'), a qual foi coletada na Ilha de Alcatrazes, São Paulo, Brasil, em setembro de 2013. As folhas passaram por um processo de desinfecção superficial segundo Petrini (1991). As folhas foram lavadas com água corrente e depois com água destilada. Após, as folhas foram esterilizadas por meio de lavagens consecutivas em água destilada (1 min), EtOH 70 % (1 min), NaOCl 2,5 % (2 min) e 2x em H₂O destilada estéril (1 min). Para confirmar a eficácia do método, uma alíquota de 100 µL da água da última lavagem foi inoculada sobre uma placa contendo meio sólido. O material esterilizado foi cortado em fragmentos (8 x 12 mm) e 3 foram depositados em placas de Petri contendo o meio batata dextrose agar (BDA), cloranfenicol e estreptomicina (100 µg mL⁻¹ de cada) para evitar o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a 28 °C em B.O.D. e observadas diariamente. As hifas das colônias emergentes foram re-inoculadas em placas novas de BDA até obtenção de culturas puras. A cultura pura da cepa endófito foi preservada pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1939).

4.2.3 Identificação botânica

O espécime botânico foi identificado com base nas características morfológicas pelos professores Dr. Marco Antônio de Assis (Departamento de Botânica, UNESP – Rio Claro) e Dra. Eliane Jacques (Departamento de Botânica, UFRJ- Rio de Janeiro), e um exemplar foi depositado no Herbário Rioclarense (HRCB).

4.2.4 Identificação fúngica

A cultura pura codificada P8BDA1F1 foi cultivada em meio sólido de malte (2 % extrato de malte e 1,5 % de ágar) a 25 °C, durante sete dias. O micélio fresco foi obtido e utilizado para extração de DNA com base no protocolo descrito em Montoya e colaboradores (2016). O gene *tef1* que codifica para o fator alfa de alongação foi amplificado usando primers descritos em Atanasova e colaboradores (2013). Os amplicons foram submetidos a reações de sequenciamento em ciclos usando o Kit BigDye Terminator v.3.1 (Thermo Fischer Scientific). As sequências bidirecionais foram geradas em ABI 3530 (Thermo Fischer Scientific) usando os mesmos primers. O contig resultante foi comparado com sequências

homólogas do NCBI-Genbank. A sequência de espécies relacionadas próximas foi reinserida no banco de dados e usada para realizar uma análise filogenética no MEGA v. 6.0 (TAMURA et al., 2013). As sequências foram alinhadas em MAFFT (KATO; STANDLEY, 2013) e, em seguida, a árvore filogenética foi inferida sob o algoritmo de *neighbor-joining*, usando o modelo Kimura 2-parâmetros como o modelo de substituição de nucleotídeos.

O suporte dos clados foi calculado com 1.000 pseudorepetições de bootstrap. Uma sequência de *Trichoderma deliquescens* (FJ860644) foi utilizada como o grupo externo. A árvore final foi editada no Adobe Illustrator CS6 (Adobe Systems).

4.2.5 Isolamento dos compostos ativos

O fungo endofítico P8BDA1F1 foi cultivado em meio líquido malte 2 % (9 L, 60 x 150 mL de meio de cultivo em cada frasco Erlenmeyer de 250 mL) a 28 °C e 150 rpm por cinco dias. O micélio foi separado do meio líquido utilizando filtração a vácuo, e o meio líquido foi extraído três vezes com AcOEt (150 mL de solvente para 150 mL de meio líquido). Após a partição, o solvente foi rotoevaporado gerando o extrato AcOEt (1.193 mg). Este foi submetido a uma cromatografia em coluna Sep-pak de sílica gel (10 g) eluída com um gradiente de hexano/ CH₂Cl₂/ MeOH. Esse procedimento foi repetido 2 vezes, e as frações reunidas segundo similaridade de perfil químico observado em CCD, obtendo-se seis frações finais (1-6). A fração 6 (344 mg) foi submetida a outro fracionamento, desta vez em coluna Sep-pak C₁₈ (10 g) eluída com um gradiente de H₂O em MeOH, resultando em cinco frações (6A-6E). A fração 6D (66 mg) foi purificada em HPLC (em coluna de fase reversa C₁₈) utilizando um gradiente de eluição de A (H₂O ultrapura + 0,1 % ácido fórmico) + B (ACN), iniciando com 60A: 40B até 100 % B em 15 min, resultando em sete frações, sendo que quatro se apresentaram puras: 6DP2 (7,2 mg), 6DP3 (6,1 mg), 6DP4 (7,1 mg) e 6DP5 (6,0 mg).

4.2.6 Protocolos dos ensaios

4.2.6.1 Ensaios antifúngicos

4.2.6.1.1 Ensaio do disco de papel

O ensaio do disco de papel (FOSTER; WOODRUFF, 1943) foi utilizado para determinar a atividade antifúngica durante os procedimentos de separação e purificação. Cada fração foi aplicada em discos de papel estéreis de 6 mm de diâmetro (2 mg para extrato AcOEt, 1 e 0,5 mg para frações e 0,2 mg para compostos puros) e colocada na borda da placa de Petri com meio malte 2 %. Um inóculo do patógeno (um disco de 7 mm de diâmetro removido de uma placa de 5 dias) foi adicionado a borda oposta da placa de Petri. As zonas de inibição de crescimento micelial em torno dos discos de papel foram medidas após incubação de 5 dias a 28 °C. As porcentagens de inibição foram calculadas em comparação com o controle que continha somente o patógeno usando o programa Image J (Processamento e Análise de Imagem em Java). Este experimento foi conduzido com uma repetição. Para inferir sobre a ação fungicida ou fungistática dos compostos, uma parte do micélio que sofreu inibição foi transferida para uma nova placa. A ação foi caracterizada como fungicida se o fungo não voltasse a crescer na nova placa, e fungistática caso houvesse crescimento. O fungo *C. gloeosporioides* utilizado neste estudo foi isolado de guaranazeiro e cedido pela UFAM, Amazonas-AM, Brasil, e está depositado na coleção de micro-organismos da Unesp, Rio Claro (WDCM 1043), sob o código CRM 1352.

4.2.6.1.2 Ensaios de microdiluição

O ensaio de microdiluição foi realizada em microplacas de 96 poços de acordo com as diretrizes do Comitê Nacional de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2008), com modificações. Para os ensaios, os compostos foram diluídos em DMSO e meio malte 2 % até concentrações finais de 2500; 1250; 625; 312,5; 156; 78,1; 39; 19,5; 7,7; 4,8 e 2,4 mg mL⁻¹ em cada poço. Uma suspensão de inóculo de *C. gloeosporioides* (10⁵ esporos mL⁻¹, 60 µL) foi adicionada a cada poço, totalizando um volume final no poço de 100 µL. Como controle negativo foram avaliados poços contendo meio, inóculo e DMSO, mas sem os compostos. Como controles positivos foram utilizados os fungicidas comerciais Captan (captana) e Score (difenoconazole). As microplacas foram incubadas em B.O.D. a 28 °C e foram analisadas em um leitor de microplacas a 620 nm, em intervalos de 12 h, durante 120 h.

As MICs foram determinadas espectrofotometricamente após os períodos de incubação acima mencionados, de acordo com as diretrizes do CLSI, com modificações. Para

fungicidas e compostos comerciais, as MICs foram determinadas como a menor concentração mostrando ausência de crescimento ou igual ao crescimento inicial em comparação com o crescimento (até 12 h) no poço livre de compostos.

4.2.6.2 Ensaio de inibição do proteassoma

4.2.6.2.1 Preparação do proteassoma 20S de levedura

O proteassoma 20S foi purificado de *S. cerevisiae* utilizando cromatografia de afinidade, permuta iônica e por exclusão de tamanho. A purificação de proteínas foi seguida pelo monitoramento da atividade de ChlI do proteassoma utilizando o substrato fluorogênico suc-LLVY-AMC (Bioquímica de R&D). As células de *S. cerevisiae* foram suspensas em tampão A (Tris 50 mM pH 7,5), congeladas rapidamente em gotas de nitrogênio líquido e lisadas. Após centrifugação (45k xg durante 1 h a 4 °C) e filtração, o lisado foi incubado com 50 mL de DEAE AffiGel® (BioRad) previamente equilibrado com tampão B (Tris 25 mM pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM). O proteassoma foi eluído num gradiente de tampão B suplementado com concentrações crescentes de NaCl. As frações ativas de ChTL foram dialisadas em tampão C (Tris 20 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM) e submetidas a cromatografia de permuta iônica, utilizando uma coluna HiTrap Q XL 5 mL (GE Life Sciences). O proteassoma foi eluído após a aplicação de um gradiente de tampão D (Tris 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM). As frações ativas foram concentradas para 1 mL e aplicadas a uma coluna de exclusão de tamanho HiPrep Sephacryl 400 (GE Life Sciences) equilibrada com tampão E (Tris 25 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, TDT 1 mM). As frações ativas foram concentradas para 1 mg mL⁻¹ e utilizadas nos ensaios de inibição. A concentração de proteína foi acessada por absorvância a 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção de $\epsilon = 707355 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e o leitor NanoDrop (Thermo Scientific). As amostras purificadas foram analisadas adicionalmente por meio de dispersão de luz dinâmica (Zetasizer Nano, Malvern), PAGE-SDS e eletroforese PAGE nativa (PhastGel® GE Life Sciences) para controle de qualidade.

4.2.6.2.2 Ensaios de inibição da partícula 20S do proteassoma

Os ensaios de inibição da partícula de núcleo do proteassoma 20S purificado de *S. cerevisiae* foram realizados segundo Trivella e colaboradores (2014), com modificações. Inicialmente, placas de 384 poços foram utilizadas para o screening de extratos e frações do fungo. Este ensaio foi realizado utilizando $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ do proteassoma de levedura preparado em Tris 25 mM pH 7,5, SDS 0,03 %. Foram adicionadas amostras ($1 \mu\text{l}$ a 1mg mL^{-1}) usando o manipulador líquido Janus MDT (Perkin Elmer) instalado na unidade de triagem Cell Explorer (Perkin Elmer) no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio, CNPEM). As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 h antes da adição de $5 \mu\text{l}$ do substrato fluorogênico suc-LLVY-AMC (R & D Biosciences) a $250 \mu\text{M}$. Cada placa foi imediatamente inserida no leitor de placas ClarioStar (BMG labtech) e a fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emissão}} = 460 \text{ nm}$) foi registrada no tempo zero (para calcular a inibição da fluorescência intrínseca) e após 1 h de reação enzimática. Os controles positivos ($n = 32$) e negativos ($n = 32$) foram realizados na mesma placa para acessar a atividade enzimática (controles de DMSO = atividade de 100 % de ChTL) e inibição (ensaio realizado na ausência da enzima = 0 % de atividade enzimática). Os controles foram usados para normalizar os dados e acessar a qualidade do ensaio (parâmetro Z') (ZHANG; CHUNG; OLDENBURG, 1999). As curvas de concentração-resposta foram avaliadas por incubação de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ do proteassoma com diferentes concentrações de inibidores em placas de 384 poços. A fluorescência foi normalizada para controles positivos e negativos e a porcentagem da atividade restante da enzima foi plotada. Os dados foram plotados em função da concentração de inibidores e ajustados usando a equação logística dos 4 parâmetros normalizada no software GraphPad versão 7 (GraphPad Prism, San Diego).

4.2.6.3 Ensaio *in vitro* contra *Leishmania (L.) infantum*

4.2.6.3.1 Obtenção de formas amastigotas *Leishmania (L.) infantum*

Os animais (hamsters dourados e camundongos BALB/c) foram obtidos no Instituto Adolfo Lutz-SP. Eles foram mantidos sob um ambiente controlado em gaiolas esterilizadas, e receberam alimentos e água *ad libitum*. A Comissão de Ética em Pesquisa animal aprovou o projeto (número CEUA IAL/Pasteur 02/2011), de acordo com o “Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório”, da Academia Nacional de Ciências. Os hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) serviram como hospedeiros de *Leishmania (L.) infantum*

(MHOM/BR/1972/LD) até aproximadamente 60-70 dias após a infecção. Os amastigotas foram obtidos a partir do baço de hamsters previamente infectados e purificados por centrifugação diferencial. Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c lavando-os com meio RPMI-1640 suplementado com 10 % de soro fetal de vitelo e foram mantidos a 37 °C em uma incubadora com 5 % de CO₂ humidificado (REIMÃO et al., 2008).

4.2.6.3.2 Determinação da concentração inibitória de 50 % (IC₅₀)

Os macrófagos peritoneais foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e os macrófagos foram semeados a 1×10^5 poço⁻¹, durante 24 h em lâminas de 16 poços (NUNC-Thermo, EUA). As formas amastigotas foram preparadas em uma proporção de 1:10 de macrófagos para amastigotas e incubadas em meio RPMI-1640 durante 24 h a 37 °C, em incubadora com 5 % de CO₂ humidificado. Os compostos foram incubados com macrófagos infectados durante 72 h. Miltefosina foi usada como medicamento padrão. Posteriormente, as células foram fixadas com MeOH, coradas com Giemsa e observadas usando um microscópio de luz. A carga parasitária foi determinada pelo número de macrófagos infectados fora de 400 células. Os compostos foram testados na concentração máxima de 50 µM e foram relatados como NA (não ativos) quando o valor IC₅₀ estava acima dessa concentração (MARTINS et al., 2016).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Identificação botânica e fúngica

A planta foi identificada por meio de características morfológicas e com a ajuda de chaves de identificação como sendo da espécie *Begonia venosa* Skan ex Hook. Um exemplar está depositado no Herbário de Rio Claro sob o n° de tombo HRCB 64227.

A espécie *B. venosa* é nativa do Brasil e está criticamente ameaçada de extinção, podendo ser encontrada nas ilhas do litoral norte de São Paulo (JACQUES, 2015). Morfologicamente, ela possui folhas suculentas, grossas, redondas e coriáceas e com numerosos pelos em sua superfície (PIERIK; TETTEROO, 1987). Seu hábit natural inclui

topos de morros e fendas de rochas, pois há maior acúmulo de matéria orgânica (WANDERLEY et al., 2012).

O isolado P8BDA1F1, endófito da planta *Begonia venosa*, foi identificado por características morfológicas da colônia como pertencente ao gênero *Trichoderma*. A análise filogenética mostrou que *T. andinense* é o clado relativo mais próximo, com alto suporte de bootstrap (96 %). No entanto, a linhagem P8BDA1F1 mostra divergência no gene *tef1* em comparação com estirpes do clado *T. andinense* (Figura 1). Assim, a linhagem P8BDA1F1 pode ser uma espécie ainda não descrita. No entanto, o sequenciamento de marcadores genéticos adicionais, como RPB2 (RNA polimerase 2), é necessário para apoiar esta hipótese.

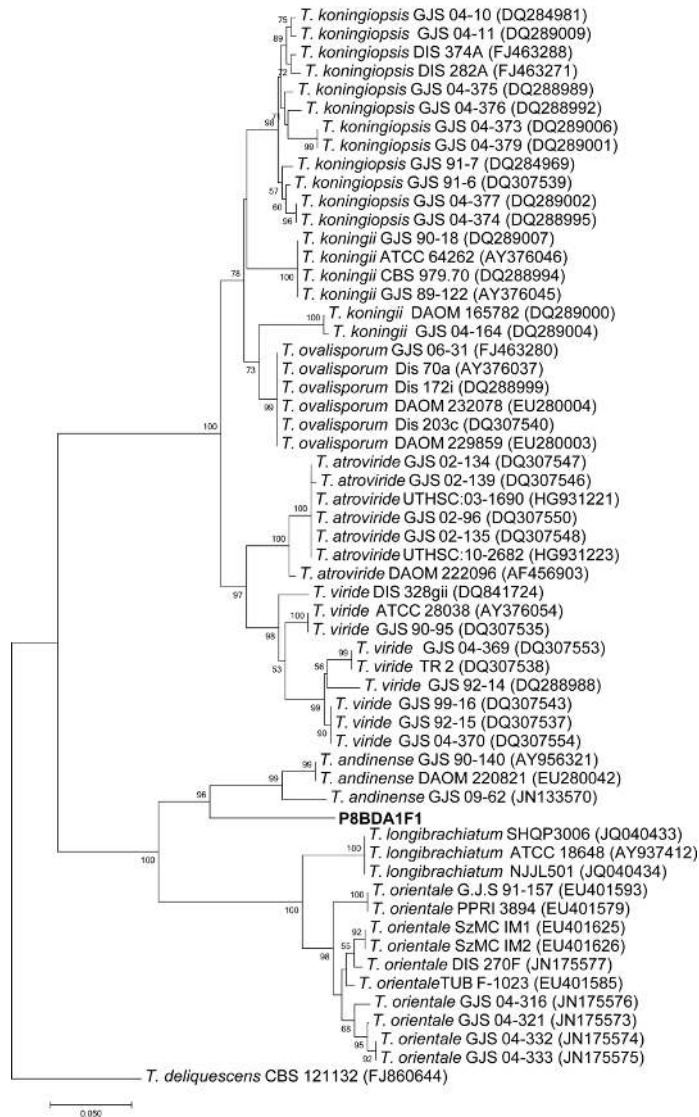


Figura 1 - Árvore filogenética do fungo P8BDA1F1 (*Trichoderma* sp.).

Até 2017, há 276 registros de nomes válidos de *Trichoderma* (ROBBERTSE et al., 2017). As espécies de *Trichoderma* são encontradas em solo, madeira em decomposição, vegetais, cogumelos infectados (HOSSEYNI-MOGHADDAM; SOLTANI, 2014), ambientes marinhos (GAL-HEMED et al., 2011) e também como endófitas, protegendo as plantas de doenças e estresses abióticos (BAILEY et al., 2006; BAE et al., 2009).

Os fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* são produtores bem conhecidos de metabolitos secundários com atividade contra fitopatógenos (VINALE et al., 2014).

4.3.2 Isolamento e identificação dos compostos

Após cultivo em meio líquido, filtração e partição com acetato de etila, foi obtido o extrato AcOEt (1193 mg). Esse extrato foi submetido aos ensaios biológicos de inibição a *C. gloeosporioides* e subunidade do tipo quimiotripsina (ChTL) do proteossoma, com 6,01 % e 75 % de atividade, respectivamente. Este foi fracionado por cromatografia em coluna Sep-pak de sílica gel gerando 6 frações. A sexta fração (344 mg) apresentou 30,66 % de atividade contra *C. gloeosporioides* e foi resubmetida a cromatografia em coluna Sep-pak C₁₈, obtendo-se 5 frações. A quarta fração (63 mg) apresentou 12,44 % de atividade contra *C. gloeosporioides* e foi purificada em HPLC utilizando uma coluna C₁₈, onde foram obtidas 4 frações: 6DP2, 6DP3, 6DP4 e 6DP5. Os compostos obtidos foram então fragmentados por EM/EM (Informações complementares, Figuras S1-S8) e comparados com compostos na literatura e também no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais (DPN, 2017).

Os quatro compostos isolados de *Trichoderma* sp. foram identificados por comparação dos dados de EM/EM (MIKKOLA et al., 2012). A Tabela 1 mostra os fragmentos de íons diagnóstico das séries b e y.

Tabela 1 - Valores dos íons $[M+Na]^+$ e íons diagnósticos das séries b13 e y7 obtidos por EM/EM das trilogins BI-BIV, (MIKKOLA et al., 2012)

Íons diagnósticos	Trilongin BI	Trilongin BII	Trilongin BIII	Trilongin BIV
$[M+Na]^+$	1958	1972	1972	1986
b13	1163	1163	1177	1177
b12	1078	1078	1092	1092
b11	965	965	979	979
b10	908	908	922	922
b9	823	823	837	837
b8	724	724	738	738
b7	639	639	653	653
b6	511	511	525	525
b5	440	440	440	440
b4	355	355	355	355
b3	284	284	284	284
b2	199	199	199*	199*
b1	128*	128*	128*	128*
y7	774	788	774	788
y6	623	637	623	637
y5	495	509	495	509
y4	367	381	367	381
y3	282	282	282	282
y2	197	197	197	197

* Estes fragmentos não foram observados para os compostos isolados.

Todos os íons obtidos por EM/EM dos compostos isolados 6DP2-6DP5 foram idênticos aos obtidos por Mikkola e colaboradores (2012). Somente os íons das séries b1 e b2 não foram observados nos espectros de fragmentação dos compostos isolados, provavelmente devido à intensidade de energia utilizada durante o processo de fragmentação.

Os fragmentos b e y se referem a um sistema de nomenclatura proposto por Roepstorff e Fohlman (1984), e elaborado por Johnson, Martin e Biemann (1988). Nessa nomenclatura, os fragmentos gerados são agrupados em duas séries (b e y), de acordo com a clivagem dos grupos N ou C-terminal, com retenção da carga em C ou N-terminal, respectivamente, como é mostrado na Figura 2. A formação dos íons N-terminal permitem a diferenciação de leucina e isoleucina.

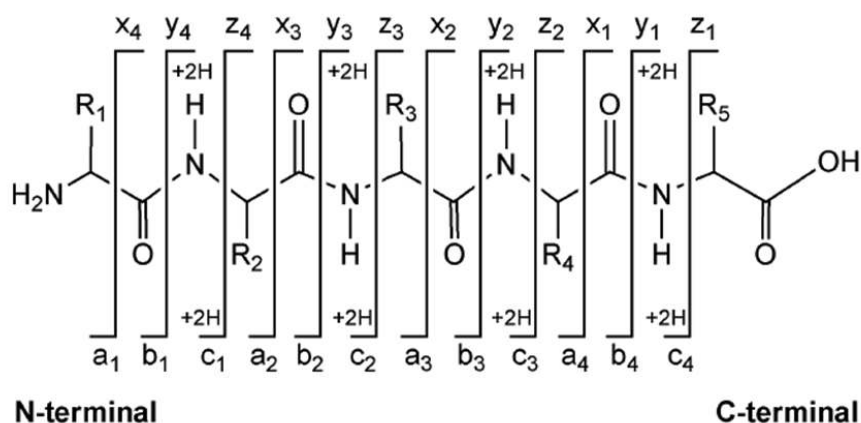


Figura 2 – Esquema geral da fragmentação de peptaibols.

Fonte: Daniel e Rodrigues Filho (2007).

Assim, por comparação dos íons diagnósticos obtidos, foi possível identificar os compostos como sendo as trilongins BI, BII, BIII e BIV, da classe dos peptaibols.

Os peptaibols podem ser classificados em grupos de acordo com o número de resíduos: peptídeos de cadeia longa (17 -21 resíduos), de cadeia média (11 a 16 resíduos), de cadeia curta (6-10 resíduos) e de cadeia muito curta, com cinco ou menos resíduos (DANIEL; RODRIGUES FILHO, 2007; KRAUSE; KIRSCHBAUM; BRÜCKNER, 2007).

Os compostos isolados trilongin BI (1936 Da, fragmentos m/z 1163 e m/z 774), trilongin BII (1950 Da, fragmentos m/z 1163 e m/z 788), trilongin BIII (1950 Da, fragmentos m/z 1177 e m/z 774) e trilongin BIV (1964 Da, fragmentos m/z 1177 e m/z 788) são peptaiboils de 20 resíduos com um ácido α -aminoisobutírico acetilado no terminal N e Pheol na porção C terminal.

Nesse grupo de peptídeos de cadeia longa, estão inclusos também a alameticina (KIRSCHBAUM et al., 2003), a suzukacilina (KRAUSE et al., 2006) e a paracelsina (PRZYBYLSKI et al., 1984), ambos com 20 resíduos.

A sequência completa de 20 aminoácidos das trilongins BI-BIV é: AcAib - Ala - Aib - Ala - Aib - Ala (BI-BII) /Aib (BIII-BIV) - Gln - Aib - Val/Iva - Aib - Gly - Leu/Ile - Aib - Pro - Val/Iva - Aib - Aib (BI-BIII)/ Val/Iva (BII-BIV) - Gln - Gln - Pheol.

A diferença entre esses compostos está nas sequências das posições 6 (Ala ou Aib) e 17 (Val/ Iva ou Aib): trilongin BI possui Ala (posição 6) e Aib (posição 17); trilongin BII possui Ala (posição 6) e Val (posição 17); trilongin BIII possui Aib (posição 6) e Aib (posição 17); trilongin BIV possui Aib (posição 6) e Iva (posição 17).

Os compostos trilongins BI-BIV são posicionalmente isoméricos, ou muito similares, a outros peptaibols já descritos na literatura (Tabela 2):

Tabela 2 – Compostos idênticos ou posicionalmente isoméricos às trilongins BI-BIV e suas fontes biológicas

Compostos idênticos ou posicionalmente isoméricos				Fonte biológica	Referência
Trilongin BI	Trilongin BII	Trilongin BIII	Trilongin BIV	<i>T. longibrachiatum</i>	Mikkola e colaboradores (2012)
Longibrachin AI (LGA I)	Longibrachin AII (LGA II)	Longibrachin AIII (LGA III)	Longibrachin AIV (LGA IV)	<i>T. longibrachiatum</i>	Leclerc e colaboradores (2001)
Trichobrachin II – 5/6	Trichobrachin II – 7/8/9	-	Trichobrachin II – 10	<i>T. parceramosum</i> BISSETT (<i>T. longibrachiatum</i> RIFAI)	Krause, Kirschbaum e Brückner (2007)
Trichokonin TK VI (TK VI)	Trichokonin TK VII (TK VII)	Trichokonin TK VIII (TK VIII)	-	<i>T. koningii</i>	Huang e colaboradores (1995); Song e colaboradores (2007)
-	-	Trichosporin TS-B-IVc (TS-B-IVc)	-		Iida e colaboradores (1990)
Gliodeliquescin A	-	-	-	<i>Gliocladium deliquescens</i>	Brückner e Przybylski (1984)
-	Suzukacillin 10a	-	-	<i>T. viride</i>	Krause e colaboradores (2006)

Trocas individuais e múltiplas de aminoácidos se acumulam em várias posições definidas e resultam em um padrão complexo de sequências análogas (BOHEIM et al., 1976). Um exemplo é a suzukacilina A, que representa uma mistura microheterogênea de pelo menos 15 peptaibols (KRAUSE; KIRSCHBAUM; BRÜCKNER, 2007) de modo que um deles corresponde a trilongin BII.

Os peptaibols são sintetizados por peptideos sintetases não ribossômicas (NRPSs). As NRPSs usam uma grande variedade de substratos, como substâncias polipeptídicas, aminoácidos não proteicos e hidroxíácidos (REBUFFAT; GOULARD; BODO, 1995; SZEKERES et al., 2005; MUKHERJEE et al., 2011).

4.3.3 Avaliação dos compostos ativos

As quatro trilongins isoladas apresentaram atividade fungistática a *C. gloeosporioides* (isolado do guaranzeiro) no ensaio de difusão em disco. As porcentagens de inibição do

crescimento micelial foram 41,43 % para a trilongin BI; 44,46 % para a trilongin BII; 44,97 % para a trilongin BIII e 39,07 % para a trilongin BIV ($200 \mu\text{g}$ de composto disco^{-1}).

Os compostos puros foram então testados contra esporos de *C. gloeosporioides* utilizando o ensaio de microdiluição. Este ensaio foi incubado por 120 h, com leituras a cada 12 horas. Os gráficos com os resultados são mostrados na Figura 3 (mistura dos 4 compostos) e na Figura 4 (compostos puros testados separadamente).

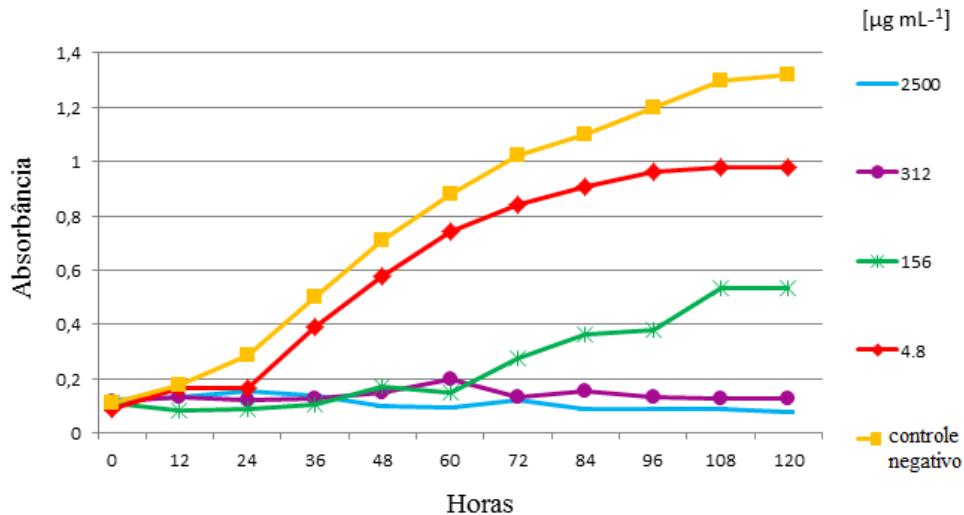


Figura 3 - Dados obtidos no ensaio de microdiluição com uma mistura das trilongins BI, BII, BIII e BIV contra esporos de *C. gloeosporioides*.

O gráfico acima mostra o crescimento fúngico em função do tempo. Pode-se observar que todas as concentrações usadas das trilongins foram capazes de inibir o crescimento de *C. gloeosporioides* até 24 horas de ensaio. Após esse período, a concentração de $4,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ não inibiu o fitopatógeno, assim como a concentração de $156 \mu\text{g mL}^{-1}$ após 60 horas. Sendo assim, determinou-se que a mínima concentração inibitória (MIC) da mistura das trilongins é $312 \mu\text{g mL}^{-1}$. O controle negativo apresentado no gráfico consistiu em meio malte 2 %, esporos de *C. gloeosporioides* e DMSO, na mesma concentração utilizada para diluir a mistura de compostos testada.

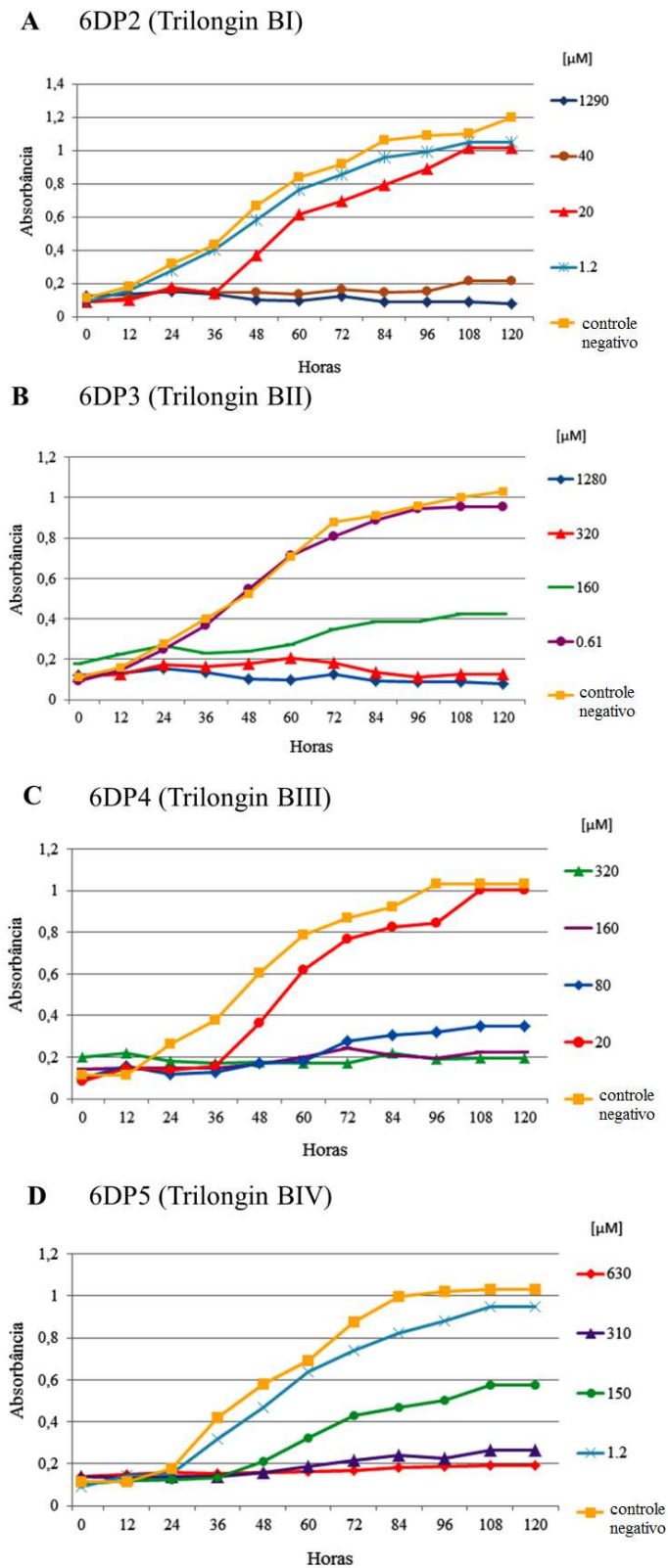


Figura 4 - Dados obtidos no ensaio de microdiluição com os compostos isolados trilongins BI (A), BII (B), BIII (C) e BIV (D) contra esporos de *C. gloeosporioides*.

Em relação aos gráficos acima, observa-se que há diferença de MIC entre as quatro trilongins isoladas. Para a trilongin BI (figura 4-A), a concentração de 1,2 μM não teve efeito inibitório sobre os esporos de *C. gloeosporioides*. Já concentração de 20 μM foi capaz de inibir o crescimento por 36 horas. Após esse período, somente as concentrações de 40 e 1290 μM inibiram o crescimento do fitopatógeno. Desta forma, para o composto trilongin BI a MIC a *C. gloeosporioides* foi de 40 μM .

Para a trilongin BII (figura 4-B), a concentração de 0,61 μM não teve efeito inibitório sobre os esporos de *C. gloeosporioides*. Já concentração de 160 μM foi capaz de inibir o crescimento por aproximadamente 48 horas. Após esse período, somente as concentrações de 320 e 1280 μM inibiram o crescimento do fitopatógeno. Desta forma, para o composto trilongin BII a MIC a *C. gloeosporioides* foi de 320 μM .

Para a trilongin BIII (figura 4-C), a concentração de 20 μM foi capaz de inibir o crescimento de *C. gloeosporioides* por 36 horas, e a concentração de 80 μM por 60 horas. Após esse período, somente as concentrações de 160 e 320 μM inibiram o crescimento do fitopatógeno. Desta forma, para o composto trilongin BIII a MIC a *C. gloeosporioides* foi de 160 μM .

Para a trilongin BIV (figura 4-D), 1,2 μM não teve efeito inibitório sobre os esporos de *C. gloeosporioides*. Já concentração de 150 μM foi capaz de inibir o crescimento por aproximadamente 36 horas. Após esse período, somente as concentrações de 310 e 630 μM inibiram o crescimento do fitopatógeno. Desta forma, para o composto trilongin BIV a MIC a *C. gloeosporioides* foi de 310 μM .

A avaliação da mistura das 4 trilongins em concentrações iguais (Figura 3) demonstrou que estas não possuem uma MIC menor contra *C. gloeosporioides* em comparação aos resultados obtidos com os compostos isolados, onde a trilongin BI apresentou a mais promissora atividade inibitória a *C. gloeosporioides* (MIC: 40 μM).

Esse resultado demonstra que, contra esporos de *C. gloeosporioides*, esses compostos não atuam de maneira sinérgica.

Os valores de MIC dos compostos podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima (MIC) dos compostos trilongin BI, BII, BIII e BIV contra esporos de *C. gloeosporioides*

Compostos isolados	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MIC (μM)
trilongin BI	78,1	40
trilongin BII	625	320
trilongin BIII	312	160
trilongin BIV	625	310
4 trilongins	312	-

O composto trilongin BI foi o que apresentou a menor MIC. Assim como a trilongin BII, ele possui Ala na posição 6; e igualmente a trilongin BIII (segunda melhor atividade), ele possui Aib (ácido aminobutírico) na posição 17. Já as trilongins BII e BIV possuem Val e Iva (isovalina) na posição 17, respectivamente. A trilongin BIII é o composto que contém maior quantidade de Aib, com 8 resíduos.

Como os compostos isolados pertencem à mesma classe (peptaibols), as diferenças de atividade observadas podem ser atribuídas a diferença de aminoácidos nas posições 6 e 17.

Os aminoácidos Aib e Iva (Figura 5) são exemplos de α,α -dialquilglicinas. Eles são tetrassubstituídos no átomo de carbono central e reduzem a rotação em torno das ligações peptídicas, de modo que os peptideos ficam com conformações mais definidas. Isso os torna mais resistentes à biodegradação, pois eles não são reconhecidos pelas enzimas (FERNANDES, 2011). Aib e Iva também promovem fortemente a formação de estruturas helicoidais (α - ou 3_{10} -helices, e mesmo formas misturadas) (TONIOLO; BENEDETTI, 1991).

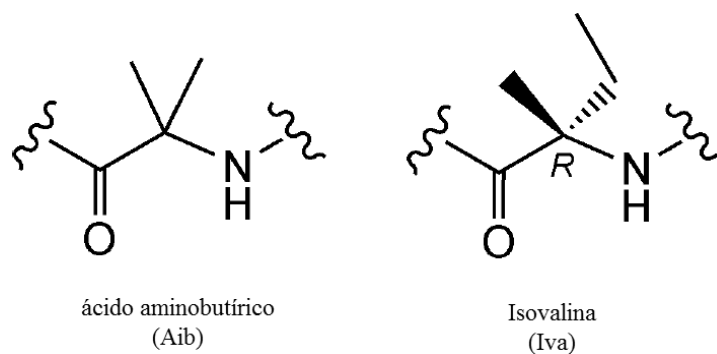


Figura 5 – Estruturas químicas do ácido aminobutírico e da isovalina.

As diferenças nas estruturas químicas e nas conformações dos peptaibols contribuem para uma variedade de atividades biológicas, a qual é atribuída também à formação de canais de íons dependentes da tensão nas membranas lipídicas, muito provavelmente devido à sua natureza anfipática (DANIEL; RODRIGUES FILHO, 2007).

As trilongins BI-BIV são compostos termoestáveis e mitocondriotóxicos para células de mamífero, capazes de formar canais permeáveis de Na^+/K^+ dependentes da tensão em biomembranas (MIKKOLA et al., 2012).

Algumas atividades biológicas já são descritas para as trilongins BI-BIV (com nomes sinônimos).

O composto longibrachin AI (trilongin BI) tem atividade contra larvas de Dipterae, com dose mínima efetiva de 250 mg k^{-1} (RUIZ et al., 2010). A longibrachin AIV (trilongin BIV) inibe o crescimento de seis espécies de micoplasma: *Acholeplasma laidlawii* (MIC: $0,78 \mu\text{M}$), *Mycoplasma gallisepticum* (MIC: $6,25 \mu\text{M}$), *M. mycoides* ssp *mycoides* (MIC: $6,25 \mu\text{M}$), *Spiroplasma apis* (MIC: $6,25 \mu\text{M}$), *S. citri* (MIC: $3,12 \mu\text{M}$) e *S. florícola* (MIC: $6,25 \mu\text{M}$). A longibrachin AIV (trilongin BIV) é ativa também na permeabilização do lipossomo, sugerindo que a atividade bactericida das longibrachins é relacionada à permeabilização da membrana plasmática (LECLERC et al., 2001).

As trichokonins VI, VII e VIII (trilongins BI, BII e BIV) possuem atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis*, *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, e contra os fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Valsa mali*, *Verticillium dahliae*, *Bipolaris sorokiniana* e *Colletotrichum lagenarium*, através do ensaio de difusão em disco (XIAO-YAN et al., 2006). A trichokonin VI (trilongin BI) é um agonista potente de canais de Ca^{2+} tipo L em membranas cardíacas (HUANG et al., 1994), induz apoptose em células de *F. oxysporum* (SHI et al., 2012) e inibe o crescimento da raiz primária em *Arabidopsis thaliana* (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2016). As trichokonins também possuem atividade inibitória contra o crescimento micelial de *Ganoderma lucidum* na concentração de $40 \mu\text{g disco}^{-1}$ (HUANG et al., 1995).

Uma mistura de peptídeos de 20-resíduos de aminoácidos possui atividade contra os fungos fitopatogênicos de carvalho *Apiognomonina quercina*, *Botryosphaeria cortícola*, *B. parva*, *B. obtusa*, *Biscognauxia mediterranea*, *Diplodia pinea* e *D. scrobiculata* (MADDAU et al., 2009).

As atividades antifúngicas são descritas também para outros peptaibols, como é caso das trichopolins I e II, ativas contra *Candida albicans*, *C. utilis*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* e *Penicillium chrysogenum* (FUJI et al., 1978).

Em relação aos fungos fitopatogênicos, as harzianinas, produzidas por *T. harzianum* e com 14 resíduos de aminoácidos, possuem atividade contra *Sclerotium rolfsii* (REBUFFAT; GOULARD; BODO, 1995). O peptaibol trichorzianin inibe a atividade das β -1,3-glucanas sintetases de *B. cinerea* (LORITO et al., 1996).

As trilingins isoladas BI-BIV foram testadas neste estudo contra amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum*, em diferentes concentrações. Os compostos não mostraram atividade contra os amastigotas em concentrações não tóxicas para os macrófagos, não mostrando seletividade (atividade contra o parasita em concentrações seguras para as células hospedeiras). Essa falta de eficácia contra os parasitas intracelulares pode ser atribuída à possível falta de receptores de macrófagos responsáveis pela internalização dos compostos, mas também a uma resistência bioquímica intrínseca do parasita contra os compostos.

O extrato AcOEt de *Trichoderma* sp. foi detectado neste estudo como sendo ativo contra o proteassoma em um rastreio de alto rendimento de inibidores de proteassoma usando uma biblioteca de extratos de fungos. Esta amostra foi detectada com 75 % de inibição da subunidade do tipo quimiotripsina (ChTL) do proteassoma, em uma placa com Z 'de 0,7. As trilingins BI-BIV foram confirmadas como inibidores do proteassoma em um ensaio inicial realizado a 100 μ M (Figura 6A). Em seguida, as trilingins foram submetidas a curvas de concentração-resposta (Figura 6B).

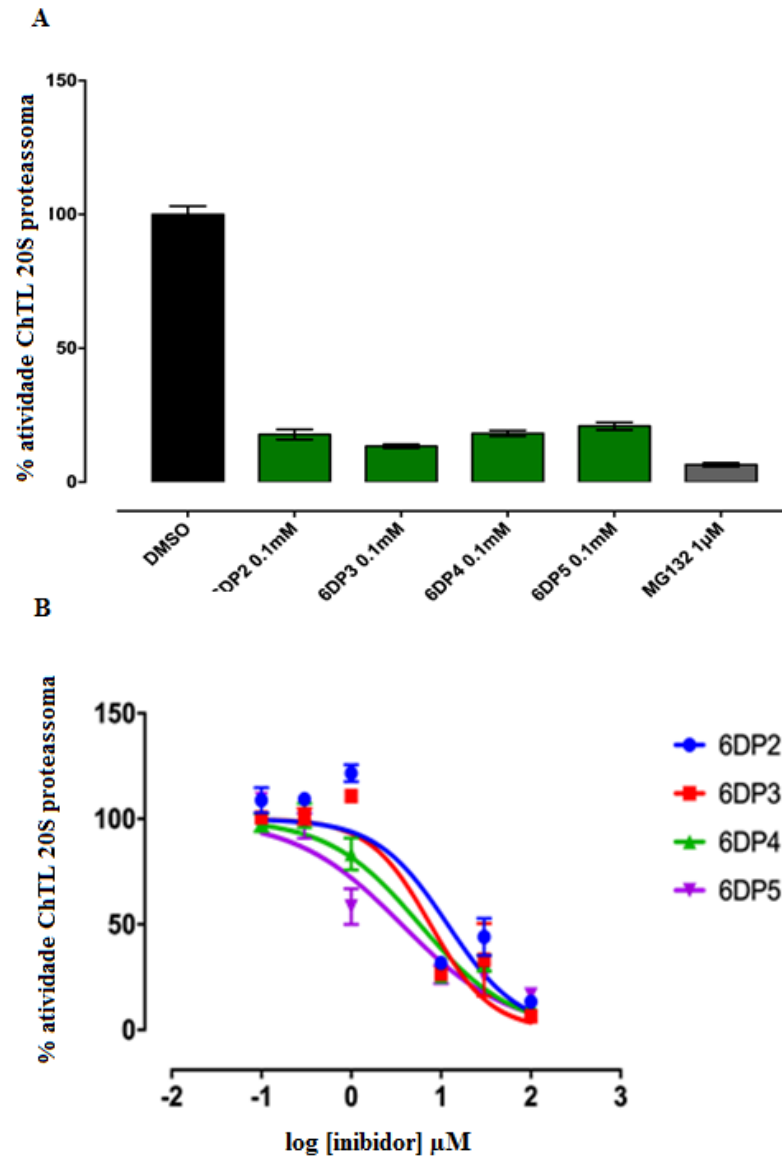


Figura 6 - Inibição da subunidade ChTL do proteassoma por trilingins isoladas de *Trichoderma* sp. **(A)** Compostos isolados testados na concentração única de 100 μM. Controles de atividade enzimática interna positiva (DMSO) e negativa (MG132 a 1 μM) são mostrados como referência. **(B)** Curvas de concentração-resposta das trilingins isoladas BI-BIV. Dados de atividade enzimática foram normalizados por controles DMSO (100 % atividade ChTL) e brancos da amostra (tempo zero da reação enzimática em cada poço). Curvas representativas de três experimentos independentes são mostradas. Os dados mostram a média ± SEM das triplicatas.

As trilingins isoladas foram avaliadas em curvas de concentração-resposta, gerando os seguintes valores de IC_{50} : trilingin BI: $6,5 \pm 2,7$; trilingin BII: $4,7 \pm 1,8$; trilingin BIII: $6,3 \pm 2,2$ e trilingin BIV: $2,7 \pm 0,5$ μM para a subunidade ChTL do proteassoma.

O proteassoma é responsável por 80 % da proteólise celular e intercede em uma série de processos celulares chave, como controle do ciclo, diferenciação, resposta imune, reciclagem de aminoácidos e apoptose (GOLDENBERG, 2007; CHANG, 2009; MURATA; YASHIRODA; TANAKA, 2009). Esses processos biológicos podem ser manipulados por moléculas pequenas que segmentam seletivamente as subunidades β proteolíticas do proteassoma (BORISSENKO; GROLL, 2007; MOORE; EUSTAQUIO; MCGLINCHEY, 2008; KISSELEV; VAN DER LINDEN; OVERKLEEF, 2012). Como consequência, o proteassoma é considerado um alvo biológico de maior interesse para o desenvolvimento farmacêutico. Três pequenas moléculas inibidoras do proteassoma, bortezomib, carfilzomib e ixazomib, estão atualmente aprovadas para o tratamento de mieloma múltiplo (MM) e essas e algumas outras estão sendo submetidas a ensaios clínicos para outros tipos de câncer. Mais recentemente, o proteassoma também foi apontado como um alvo estratégico para a malária (LI et al., 2012) e a tripanossomíase humana (KHARE et al., 2016).

Até onde se sabe, é a primeira vez que as trilogins BI-BIV são encontradas como inibidores do proteassoma. Apesar dos valores de IC_{50} serem elevados ($\sim 1 \mu M$) em comparação com inibidores de proteassoma disponíveis ($\sim 1 nM$), destaca-se uma nova classe de inibidores de proteassoma.

Dessa forma, os compostos isolados se mostraram eficientes tanto na inibição do proteassoma (IC_{50} entre 2,7 e 6,5 μM) quanto na inibição do fitopatógeno *C. gloeosporioides* (MIC entre 40 e 320 μM).

4.4 Conclusão

Do meio metabólito do fungo endofítico *Trichoderma* sp. P8BDA1F1 foram isolados 4 compostos da classe química dos peptaibols. Através de espectrometria de EM/EM, esses compostos foram identificados como trilogins BI, BII, BIII e BIV. Realizando um levantamento bibliográfico, pode-se dizer que é o primeiro relato das trilogins BI-BIV possuindo atividade antifúngica a *C. gloeosporioides* e contra o alvo do proteassoma, mostrando um grande potencial de estudos para uma nova classe de inibidores. Esse trabalho também reafirma o potencial de fungos do gênero *Trichoderma* como produtores de compostos ativos frente à fitopatógenos.

Referências

ATANASOVA, L.; DRUZHININA, I. S.; JAKLITSCH, W. M. Two hundred *Trichoderma* species recognized on the basis of molecular phylogeny. In: Mukherjee, P.K.; Horwitz, B.A.; Singh, U.S.; Mukherjee, M.; Schmoll, M. (eds) ***Trichoderma: biology and applications***. London: CAB International, 2013. p.10–42.

AYERS, S.; EHRMANN, B.M.; ADCOCK, A. F.; KROLL, D. J.; CARCACHE DE BLANCO, E.J.; SHEN, Q.; SWANSON, S.M.; FALKINHAM III, J.O.; WANI, M.C.; MITCHELL, S.M.; PEARCE, C.J.; OBERLIES, N.H.J. Peptaibols from two unidentified fungi of the order Hypocreales with cytotoxic, antibiotic, and anthelmintic activities. **Journal of Peptide Science**, Chichester, v.18, p.500-510, 2012.

BAE, H.; SICHER, R.C.; KIM, M.S.; KIM, S.H.; STREM, M.D.; MEINICE, R.L.; BAILEY, B.A. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. **Journal of experimental botany**, Oxford, v.60, p.3279–3295, 2009.

BAILEY, B.A.; BAE, H.; STREM, M.D.; ROBERTS, D.P.; THOMAS, S.E.; CROZIER, J.; SAMUELS, G.J.; CHOI, I.Y.; HOLMES, K.A. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* spp. **Planta**, Berlin, v.224, p.1449–1464, 2006.

BOHEIM, G.; JANKO, K.; LEIBFRITZ, D.; OOKA, T.; KÖNIG, W.A.; JUNG, G. Structural and membrane modifying properties of suzukacillin, a peptide antibiotic related to alamethicin. Part B. Pore formation in black lipid films. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v.433, n.1, p.182-199, 1976.

BORISSENKO, L.; GROLL, M. 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. **Chemical Reviews**, Washington, v.107, p.687-717, 2007.

BRÜCKNER, H.; GRAF, H.; BOKEL, M. Paracelsin; characterization by NMR spectroscopy and circular dichroism, and hemolytic properties of a peptaibol antibiotic from the cellulolytically active mold *Trichoderma reesei*. Part B. **Experientia**, Basel, v.40, n.11, p.1189-97, 1984.

BRÜCKNER, H.; PRZYBYLSKI, M. Methods for the rapid detection, isolation and sequence determination of "peptaibols" and other aib-containing peptides of fungal origin. I. Gliodeliquescin A from *Gliocladium deliquescens*. **Chromatographia**, Braunschweig, v.19, p.188-199, 1984.

CASTELLANI, S. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **The Journal of tropical medicine and hygiene**, Oxford, v.42, p.225-226, 1939.

CHANG, T-L. Inhibitory effect of flavonoids on 26s proteasome activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.57, p.9706–9715, 2009.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard - Second Edition. In: **CLSI document M38-A2**. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CONTRERAS-CORNEJO, H.A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; DEL-VAL, E.; LARSEN, J. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants, **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v.92, n.4, 2016.

DANIEL, J.F.S.; RODRIGUES FILHO, E. Peptaibols of *Trichoderma*. **Natural Product Reports**, London, v.24, p.1128–1141, 2007.

DEGENKOLB, T.; BRÜCKNER, H. Peptaibiotics: towards a myriad of bioactive peptides containing Ca-dialkylamino acids? **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, v.5, p.1817–1843, 2008.

DEGENKOLB, T.; GRÄFENHAN, T.; NIRENBERG, H.I.; GAMS, W.; BRÜCKNER, H. *Trichoderma brevicompactum* complex: rich source of novel and recurrent plant-protective polypeptide antibiotics (peptaibiotics). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.54, p.7047–7061, 2006.

DPN. Dictionary of Natural Products Database. Disponível em <http://dnp.chemnetbase.com>. Acesso em: 22 outubro 2016.

FERNANDES, R.D.V. **Péptidos com atividade antibiótica : síntese do Peptaibolin e de miméticos por substituição de resíduos de Aib**. 2011. Dissertação (Química medicinal). Universidade do Minho, Braga, 2011.

FOSTER, J.W.; WOODRUFF, H.B. Microbiological aspects of penicillin I. Methods of assay. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.46, n.2, p.187–202, 1943.

FUJI, K.; FUJITA, E.; TAKAISHI, Y.; FUJITA, T.; ARITA, I.; KOMATSU, M.; HIRATSUKA, N. New antibiotics, trichopolyns A and B: isolation and biological activity. **Experientia**, Basel, v.34, n.2, p.237-239, 1978.

GAL-HEMED, I.; ATANASOVA, L.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; DRUZHININA, I.S.; VITERBO, A.; YARDEN, O. Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.77, n.15, p.5100-5109, 2011.

GOLDBERG, A. L. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. **Biochemical Society transactions**, London, v.35, p.12-17, 2007.

HOSSEYNI-MOGHADDAM, M.S.; SOLTANI, J. Bioactivity of endophytic *Trichoderma* fungal species from the plant family Cupressaceae. **Annals of Microbiology**, Milano, v.64, n.2, p.753-761, 2014.

HUANG, Q.; TEZUKA, Y.; KIKUCHI, T.; MOMOSE, Y. Trichokonin VI, a new Ca²⁺ channel agonist in bullfrog cardiac myocytes. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v.271, R5–R6, 1994.

HUANG, Q.; TEZUKA, Y.; KIKUCHI, T.; NISHI, A.; TUBAKI, K.; TANAKA, K. Studies on metabolites of mycoparasitic fungi. II. Metabolites of *Trichoderma koningii*. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, Tokyo, v.43, p.223–229, 1995.

IIDA, A.; OKUDA, M.; UESATO, S.; TAKAISHI, Y.; SHINGU, T.; MORITA, M.; FUJITA, T. Fungal metabolites. Part 3. Structural elucidation of antibiotic peptides, trichosporin-B-IIIb, -IIIc, -IVb, IVc, -IVd, -VIa and -VIb from *Trichoderma polysporum*. Application of fast-atom bombardment mass spectrometry/mass spectrometry to peptides containing a unique aib-pro peptide bond. **Journal of the Chemical Society, Perkin transactions 1**, Cambridge, v.1, p.3249-3255, 1990.

JACQUES, E. L. *Begoniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5616>. Acesso 27 novembro 2015.

JOHNSON, R.S.; MARTIN, S.A.; BIEMANN, K. Collision-induced fragmentation of (M + H)⁺ ions of peptides. Side chain specific sequence ions. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, Amsterdam, v.86, p.137-154, 1988.

KATOH, K.; STANDLEY, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.30, p.772-780, 2013.

KHARE, S.; NAGLE, A.S.; BIGGART, A.; LAI, Y.H.; LIANG, F.; DAVIS, L.C.; BARNES, S.W.; MATHISON, C.J.N.; MYBURGH, E.; GAO, M-Y.; GILLESPIE, J.R.; LIU, X.; TAN, J.L.; STINSON, M.; RIVERA, I.C.; BALLARD, J.; YEH, V.; GROESSL, T.; FEDERE, G.; KOH, H. X.Y.; VENABLE, J.D.; BURSULAYA, B.; SHAPIRO, M.; MISHRA, P.K.; SPRAGGON, G.; BROCK, A.; MOTTRAM, J.C.; BUCKNER, F.S.; RAO, S.P.S.; WEN, B.G.; WALKER, J.R.; TUNTLAND, T.; MOLTENI, V.; GLYNNE, R. J.; SUPEK, F. Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. **Nature**, Basingstoke, v.537, p.229–233, 2016.

KIRSCHBAUM, J.; KRAUSE, C.; WINZHEIMER, R.K.; BRÜCKNER, H. Sequences of alamethicins F30 and F50 reconsidered and reconciled. **Journal of Peptide Science**, Chichester, v.9, p.799–809, 2003.

KISSELEV, A.F.; VAN DER LINDEN, W.A.; OVERKLEEF, H.S. Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. **Chemistry and Biology**, London, v.19, p.99-115, 2012.

KRAUSE, C.; KIRSCHBAUM, J.; BRÜCKNER, H. Peptaibiotics: microheterogeneity, dynamics, and sequences of Trichobrachins, peptaibiotics from *Trichoderma parceramosum* BISSET (*T. longibrachiatum* RIFAI). **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, v.4, p.1083-1102, 2007.

KRAUSE, C.; KIRSCHBAUM, J.; JUNG, G.; BRÜCKNER, H. Sequence diversity of the peptaibol antibiotic suzukacillin-A from the mold *Trichoderma viride*. **Journal of Peptide Science**, Chichester, v.12, n.5, p.321-327, 2006.

LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; WHITMORE, L.; WALLACE, B.A. Chapter 22 – Peptaibols. In: Kastin, A. (Ed.) **Handbook of Biologically Active Peptides**. London: Academic Press, 2013. p.150–156.

LECLERC, G.; GOULARD, C.; PRIGENT, Y.; BODO, B.; WRÓBLEWSKI, H.; REBUFFAT, S. Sequences and antimycoplasmic properties of longibrachins LGB II and LGB III, two novel 20-residue peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.64, p.164–170, 2001.

LI, H.; PONDER, E.L.; VERDOES, M.; ASBJORNSDOTTIR, K.H.; DEU, E.; EDGINGTON, L.E.; LEE, J.T.; KIRK, C.J.; DEMO, S.D.; WILLIAMSON, K.C.; BOGYO, M. Validation of the proteasome as a therapeutic target in *Plasmodium* using an epoxyketone inhibitor with parasite-specific toxicity. **Chemistry & Biology**, London, v.19, p.1535–1545, 2012.

LORITO, M.; FARKAS, V.; REBUFFAT, S.; BODO, B.; KUBICEK, C.P. Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, n.21, p.6382–6385, 1996.

MADDAU, L.; CABRAS, A.; FRANCESCHINI, A.; LINALDEDDU, B.T.; CROBU, S.; ROGGIO, T.; PAGNOZZI, D. Occurrence and characterization of peptaibols from *Trichoderma citrinoviride*, an endophytic fungus of cork oak, using electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Microbiology**, New York, v.155, p.3371–3381, 2009.

MARTINS, L.F.; MESQUITA, J.T.; PINTO, E.G.; COSTA-SILVA, T.A.; BORBOREMA, S.E.; GALISTEO JUNIOR, A.J.; NEVES, B.J.; ANDRADE, C.H.; SHUHAIB, Z.A.; BENNETT, E.L.; BLACK, G.P.; HARPER, P.M.; EVANS, D.M.; FITURI, H.S.; LEYLAND, J.P.; MARTIN, C.; ROBERTS, T.D.; THORNHILL, A.J.; VALE, S.A.; HOWARD-JONES, A.; THOMAS, D.A.; WILLIAMS, H.L.; OVERMAN, L.E.; BERLINCK, R.G.; MURPHY, P.J.; TEMPONE, A.G. Analogues of marine guanidine alkaloids are in vitro effective against *Trypanosoma cruzi* and selectively eliminate *Leishmania (L.) infantum* intracellular amastigotes. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.79, p.2202–2210, 2016.

MIKKOLA, R.; ANDERSSON, M.A.; KREDICS, L.; GRIGORIEV, P.A.; SUNDELL, N.; SALKINOJA-SALONEN, M.S. 20-residue and 11-residue peptaibols from the fungus *Trichoderma longibrachiatum* are synergistic in forming Na⁺/K⁺-permeable channels and adverse action towards mammalian cells. **The FEBS Journal**, Oxford, v.279, p.4172–4190, 2012.

MOHAMED-BENKADA, M.; MONTAGU, M.; BIARD, J.F.; MONDEGUER, F.; VERITE, P.; DALGALARRONDO, M.; BISSETT, J.; POUCHUS, Y.F. New short peptaibols from a marine *Trichoderma* strain. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, Chichester, v.20, p.1176–1180, 2006.

MOHAMED-BENKADA, M.; POUCHUS, Y.F.; VÉRITE, P.; PAGNIEZ, F.; CAROFF, N.; RUIZ, N. Identification and biological activities of long-chain peptaibols produced by a

marine-derived strain of *Trichoderma longibrachiatum*. **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, v.13, p.521-530, 2016.

MONTOYA, Q.V.; MEIRELLES, L.A.; CHAVERRI, P.; RODRIGUES, A. Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. **Antonie van Leeuwenhoek**, Berlin, v.109, p.633-651, 2016.

MOORE, B.S.; EUSTAQUIO, A.S.; MCGLINCHEY, R.P. Advances in and applications of proteasome inhibitors. **Current opinion in chemical biology**, London, v.12, p.434-440, 2008.

MUKHERJEE, P.K.; WIEST, A.; RUIZ, N.; KEIGHTLEY, A.; MORAN-DIEZ, M.E.; MCCLUSKEY, K.; POUCHUS, Y.F.; KENERLEY, C.M. Two classes of new peptaibols are synthesized by a single non-ribosomal peptide synthetase of *Trichoderma virens*. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.286, p.4544-4554, 2011.

MURATA, S.; YASHIRODA, H.; TANAKA, K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. **Nature reviews. Molecular cell biology**, London, v.10, p.104-115, 2009.

PETRINI, O. Fungal Endophytes in Tree Leaves. In: Andrews. J.H.; Hirano, S.S. (Eds.) **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer, 1991. p.179-197.

PIERIK, R.L.M.; TETTEROO, F.A.A. Vegetative propagation of *Begonia venosa* Skan in vitro from inflorescence explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.10, p.135-142, 1987.

PRZYBYLSKI, M.; DIETRICH, I.; MANZ, I.; BRÜCKNER, H. Elucidation of structure and microheterogeneity of the polypeptide antibiotics paracelsin and trichotoxin A-50 by fast atom bombardment mass spectrometry in combination with selective *in situ* hydrolysis. **Biological mass spectrometry**, Chichester, v.11, p.569-582, 1984.

REBUFFAT, S.; GOULARD, C.; BODO, B. Antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*: harzianins HC, proline-rich 14-residue peptaibols. **Journal of the Chemical Society, Perkin transactions 1**, Cambridge, v.14, p.1849-1855, 1995.

REBUFFAT, S.; PRIGENT, Y.; AUVIN-GUETTE, C.; BODO, B. Tricholongins BI and BII, 19-residue peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*. Solution structure from two-dimensional NMR spectroscopy. **European journal of biochemistry**, Berlin, v.201, p.661-674, 1991.

REIMÃO, J.Q.; MIGOTTO, A.E.; KOSSUGA, M.H.; BERLINCK, R.G.; TEMPONE, A.G. Antiprotozoan activity of Brazilian marine cnidarian extracts and of a modified steroid from the octocoral *Carijoa riisei*. **Parasitology research**, Berlin, v.103, p.1445-50, 2008.

ROBBERTSE, B.; STROPE, P.K.; CHAVERRI, P.; GAZIS, R.; CIUFO, S.; DOMRACHEV, M.; SCHOCH, C.L. Improving taxonomic accuracy for fungi in public sequence databases: applying 'one name one species' in well-defined genera with *Trichoderma/Hypocrea* as a test case. **Database : the journal of biological databases and curation**, Oxford, v.2017, p.1-14, 2017.

ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. **Biomedical Mass Spectrometry**, London, v.11, p.601, 1984.

RUIZ, N.; WIELGOSZ-COLLIN, G.; POIRIER, L.; GROVEL, O.; PETIT, K.E.; MOHAMED-BENKADA, M.; DU PONT, T.R.; BISSETT, J.; VÉRITÉ, P.; BARNATHAN, G.; POUCHUS, Y. F. New trichobrachins, 11-residue peptaibols from a marine strain of *Trichoderma longibrachiatum*. **Peptides**, New York, v.28, p.1351–1358, 2007.

RUIZ, N.; PETIT, K.; VANSTEELANDT, M.; KERZAON, I.; BAUDET, J.; AMZIL, Z.; BIARD, J-F.; GROVEL, O.; POUCHUS, Y.F. Enhancement of domoic acid neurotoxicity on Diptera larvae bioassay by marine fungal metabolites. **Toxicon**, Oxford, v.55, p.805–810, 2010.

SHI, M.; CHEN, L.; WANG, X.W.; ZHANG, T.; ZHAO, P.B.; SONG, X.Y.; SUN, C.Y.; CHEN, X.L.; ZHOU, B.C.; ZHANG, Y. Z. Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens. **Microbiology**, New York, v.158, n.1, p.166-175, 2012.

SONG, X-Y.; XIE, S-T.; CHEN, X-L.; SUN, C-Y.; SHI, M.; ZHANG, Y-Z. Solid-state fermentation for Trichokonins production from *Trichoderma koningii* SMF2 and preparative purification of Trichokonin VI by a simple protocol. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.131, p.209–215, 2007.

SRIVASTAVA, M.; SHAHID, M.; PANDEY, S.; SINGH, A.; KUMAR, V.; GUPTA, S.; MAURYA, M. *Trichoderma* genome to genomics: a review. **Journal of data mining in genomics and proteomics**, Sunnyvale, v.5, n.3, p.1-4, 2014.

SZEKERES, A.; LEITGEB, B.; KREDICS, L.; ANTAL, Z.; HATVANI, L.; MANCZINGER, L.; VÁGVÖLGYI, C. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*: a review. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, Budapest, v.52, p.137–168, 2005.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, New York, v.30, p.2725-2729, 2013.

TONIOLO, C.; BENEDETTI, E. The polypeptide 3_{10} -helix. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v.16, p.350–353, 1991.

TRIVELLA, D.B.B.; PEREIRA, A.R.; STEIN, M.L.; KASAI, Y.; BYRUM, T.; VALERIOTE, F.A.; TANTILLO, D.J.; GROLL, M.; GERWICK, W.H.; MOORE, B.S. Enzyme inhibition by hydroamination: design and mechanism of a hybrid carmaphycin-syringolin enone proteasome inhibitor. **Chemistry & Biology**, London, v.21, p.782–791, 2014.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; WOO, S.L.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; PASCALE, A.; RUOCCO, M.; LANZUISE, S.; MANGANIELLO, G.; LORITO, M. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. **The Open Mycology Journal**, Hilversum, v.8, p.127-139, 2014.

WANDERLEY, M.G.L. **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. São Paulo: Flora, 2012. p.363.

WHITMORE, L.; WALLACE, B.A. Analysis of peptaibol sequence composition: implications for in vivo synthesis and channel formation. **European biophysics journal: EBJ**, Berlin, v.33, n.3, p.233-237, 2004.

XIAO-YAN, S.; QING-TAO, S.; SHU-TAO, X.; XIU-LAN, C.; CAI-YUN, S.; YU-ZHONG, Z. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens, **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.260, n.1, p.119–125, 2006.

ZHANG, J.H.; CHUNG, T.D.Y.; OLDENBURG, K.R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. **Journal of Biomolecular Screening**, Larchmont, v.4, p.67–73, 1999.

Informações complementares

Figura S1. A) Espectro de massas de alta resolução do composto trilingin BI B) Espectro de massas de alta resolução do composto trilingin BI com ampliação na região de m/z 1958

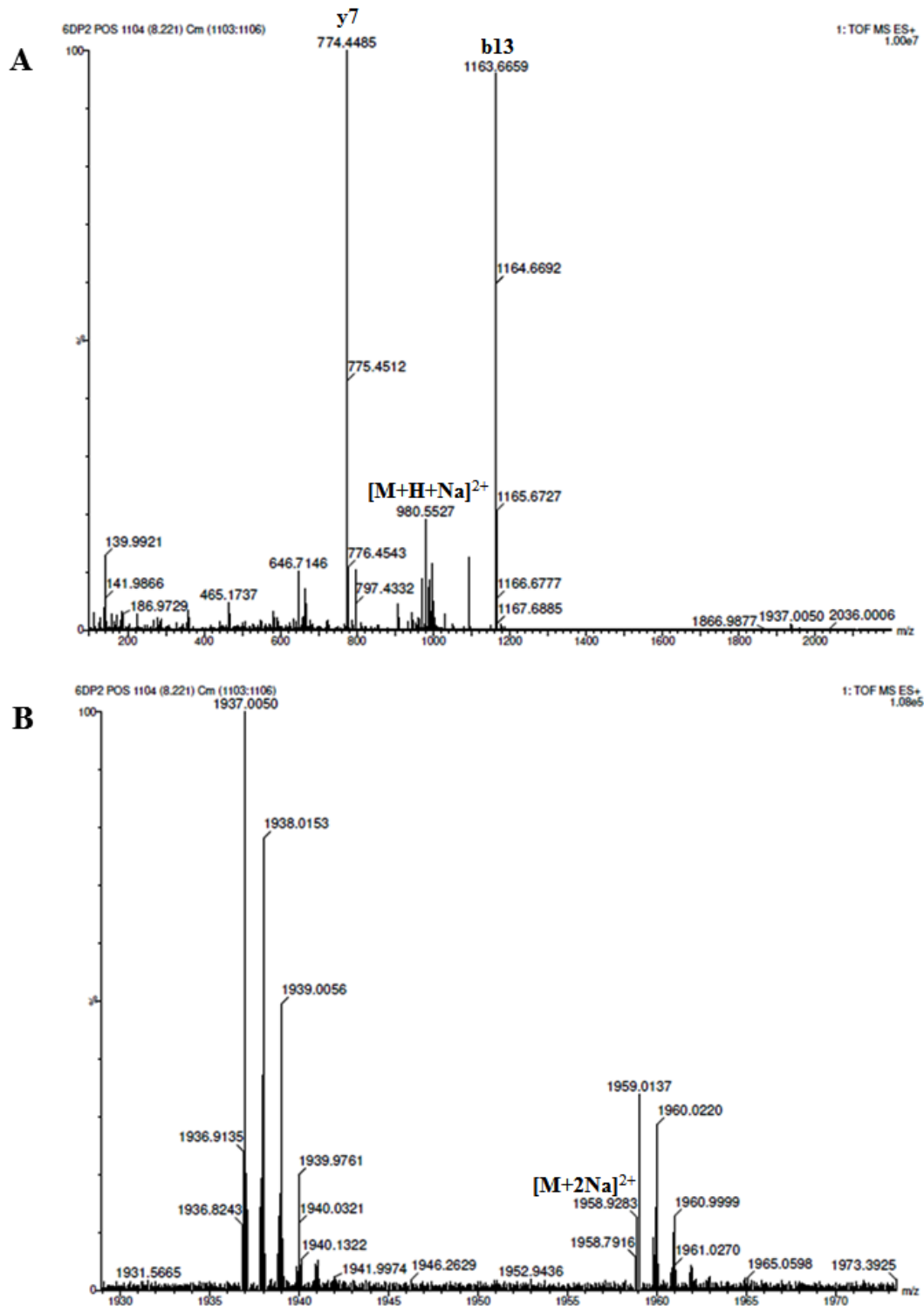


Figura S2. Espectros de fragmentação do composto trilonin BI **A)** EM/EM do m/z 1163 com indicação dos íons diagnósticos da série b e dos aminoácidos **B)** EM/EM do m/z 774 com indicação dos íons diagnósticos da série y

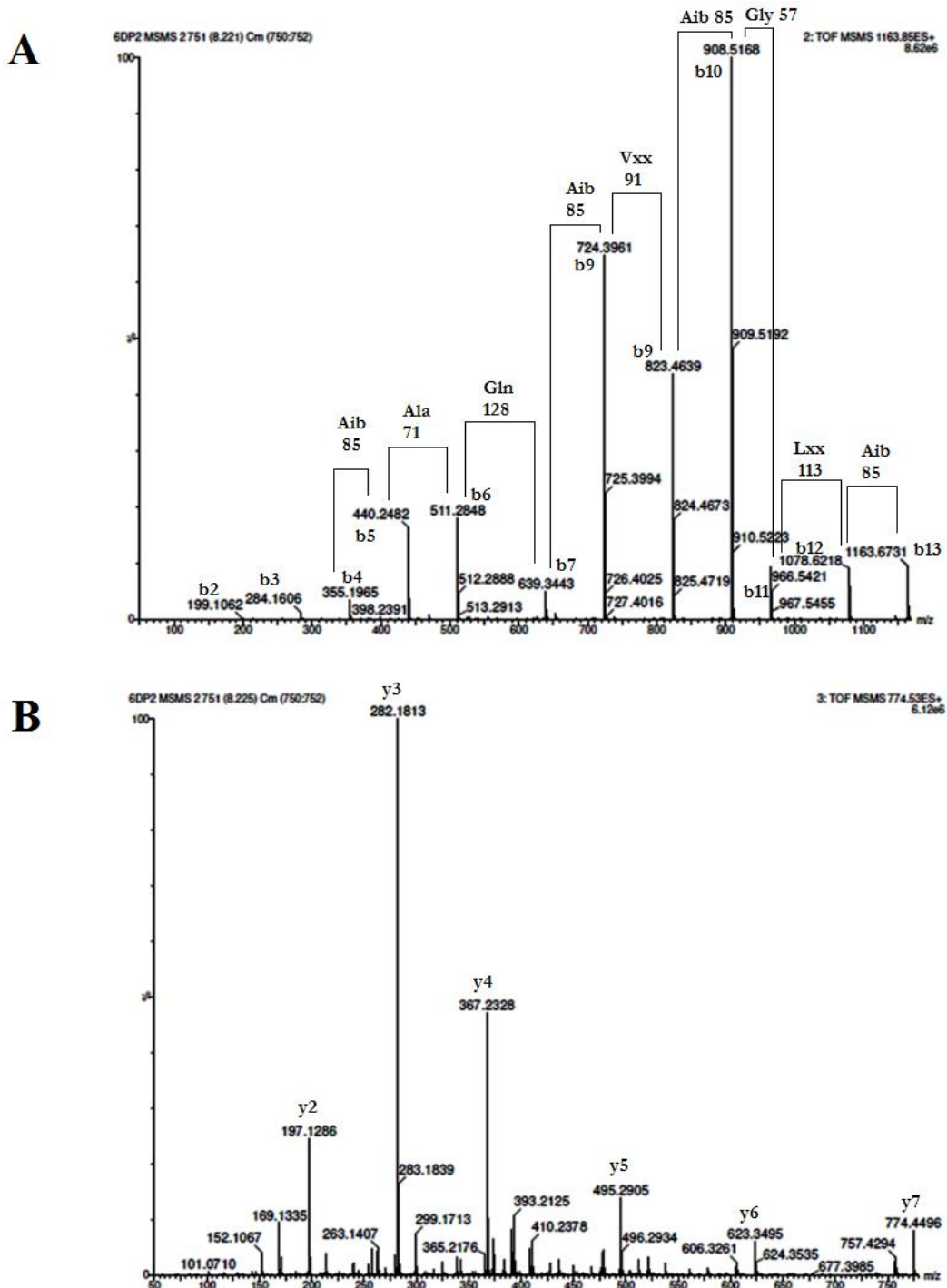


Figura S3. A) Espectro de massas de alta resolução do composto trilongin BII **B)** Espectro de massas de alta resolução do composto trilongin BII com ampliação na região de m/z 1972

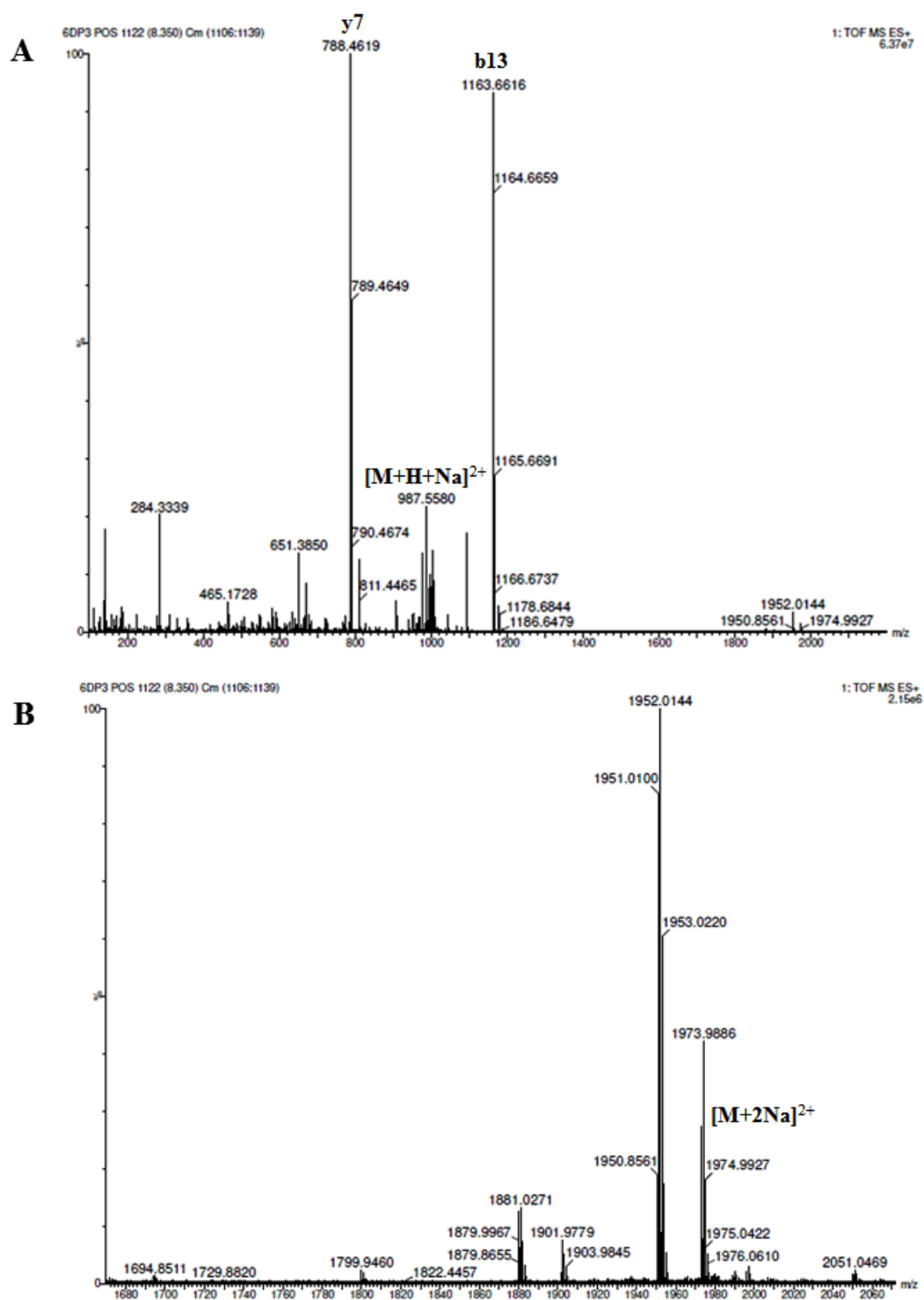


Figura S4. Espectros de fragmentação do composto trilonin BII **A)** EM/EM do m/z 1163 com indicação dos íons diagnóstico da série b e dos aminoácidos **B)** EM/EM do m/z 788 com indicação dos íons diagnóstico da série y

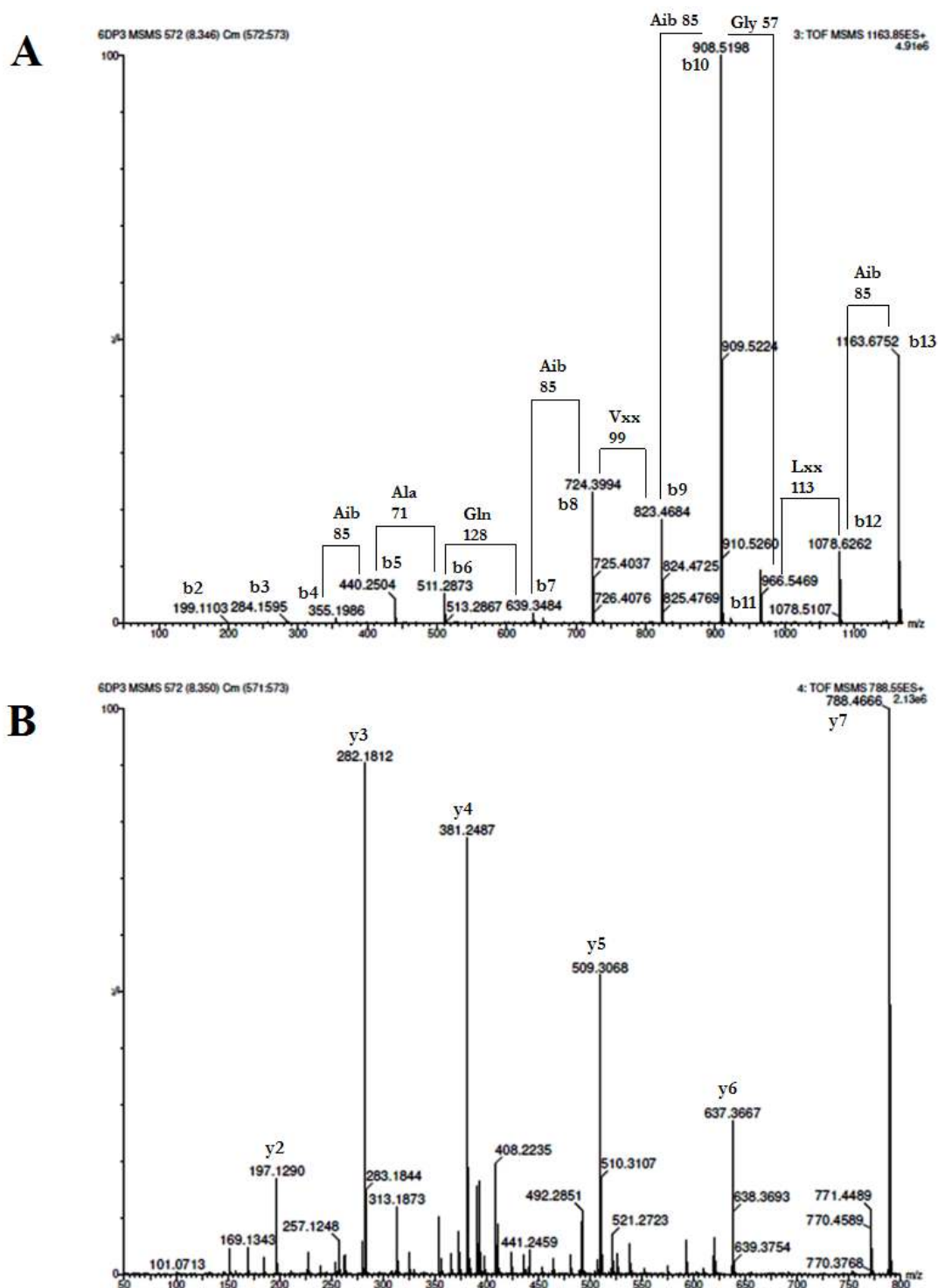


Figura S5. A) Espectro de massas de alta resolução do composto trilongin BIII B) Espectro de massas de alta resolução do composto trilongin BIII com ampliação na região de m/z 1972

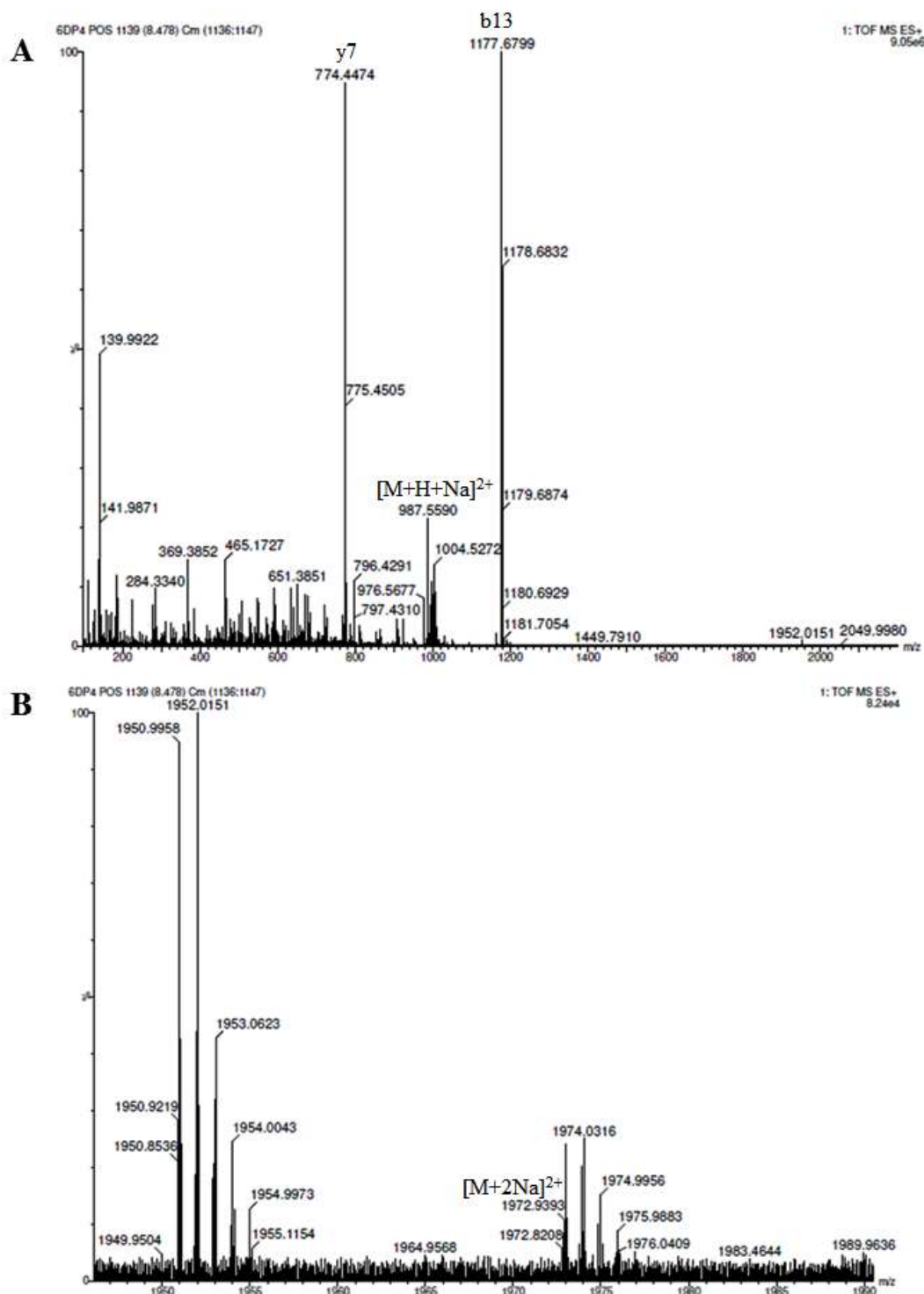


Figura S6. Espectros de fragmentação do composto trilingin BIII **A)** EM/EM do m/z 1177 com indicação de íons diagnóstico da série b **B)** EM/EM do m/z 774 com indicação de íons diagnóstico da série y e de aminoácidos

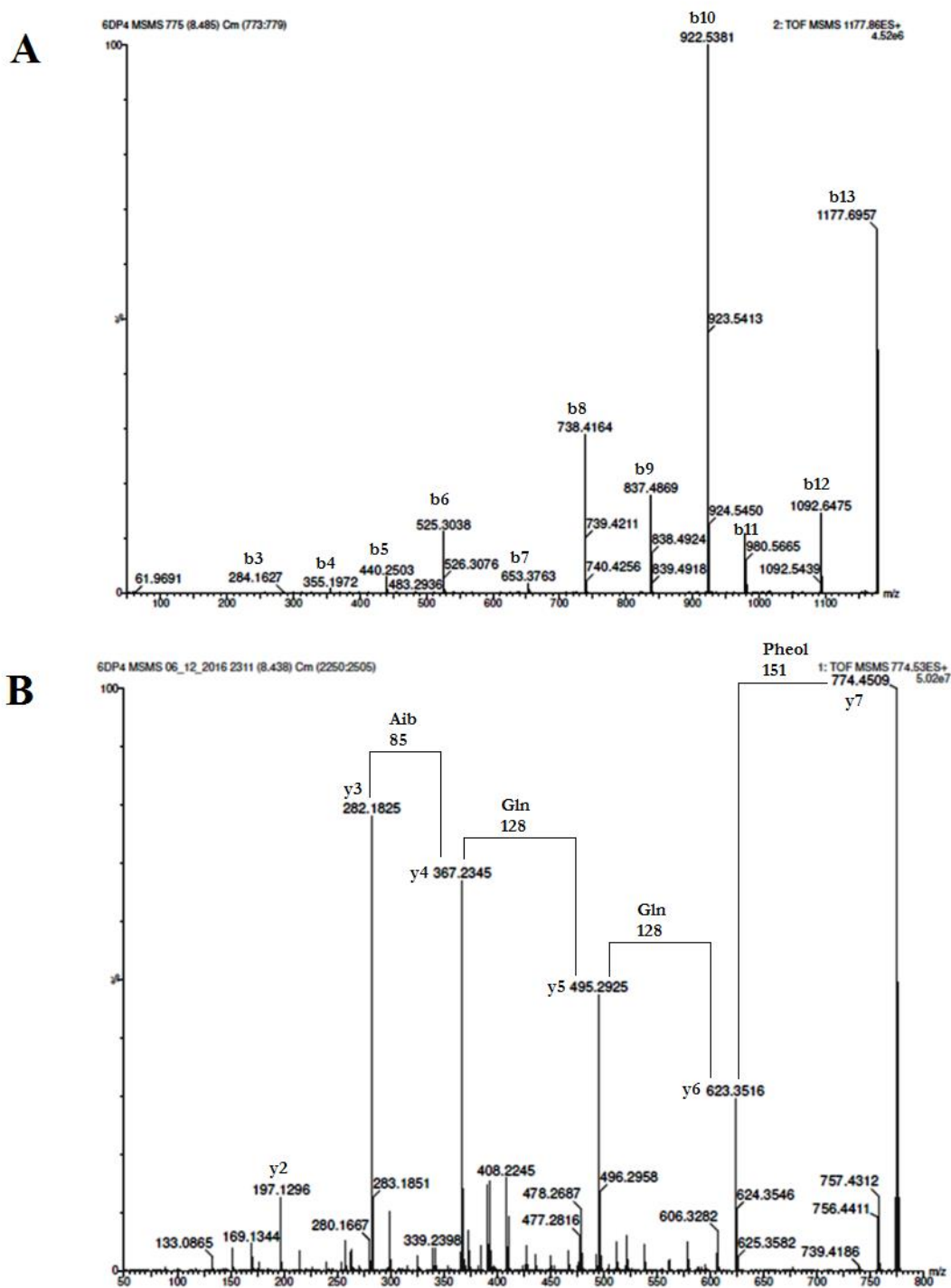


Figura S7. A) Espectro de massas de alta resolução do composto trilonin BIV B) Espectro de massas de alta resolução do composto trilonin BIV com ampliação na região de m/z 1986

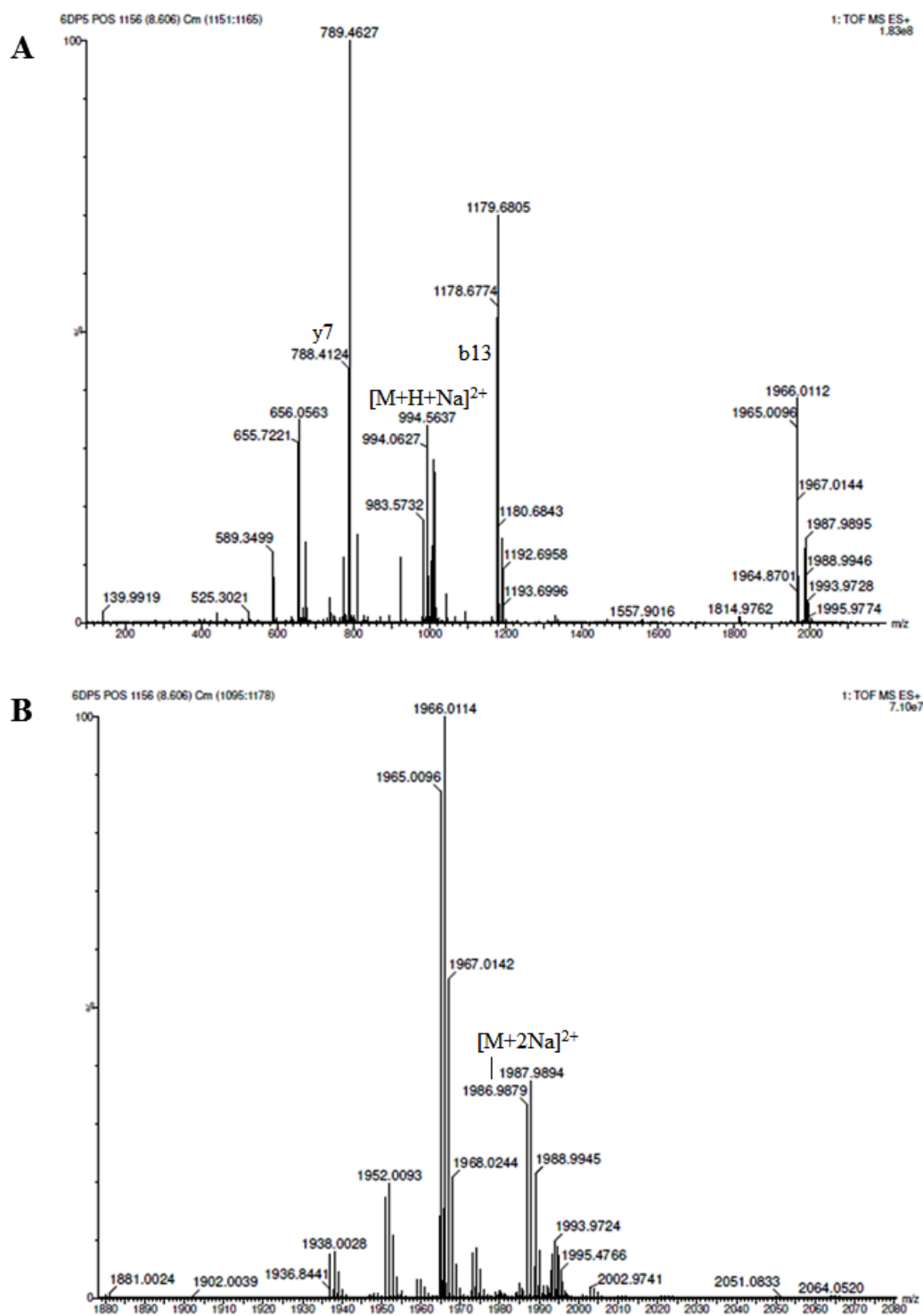
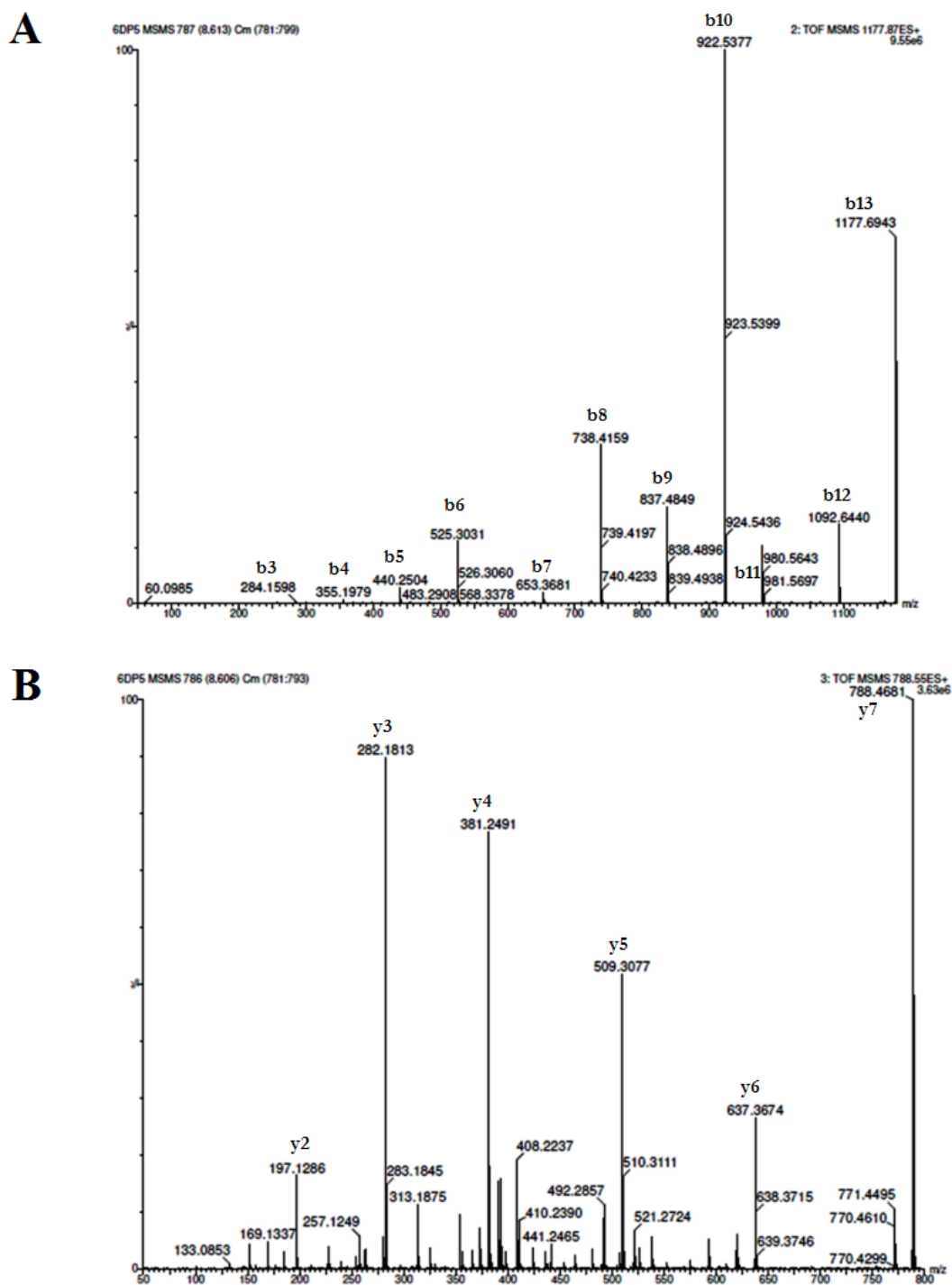


Figura S8. Espectros de fragmentação do composto trilongin BIV A) EM/EM do m/z 1177 com indicação de íons diagnósticos da série b B) EM/EM do m/z 788 com indicação de íons diagnósticos da série y



5 **CAPÍTULO 2 - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS PELO
BASIDIOMICETO *Hymenochaete*-LIKE, ENDÓFITO DA PLANTA
*Anthurium alcatrazense***

RESUMO

Os fungos endofíticos são uma das principais fontes para a bioprospecção de compostos naturais. Os endófitos podem auxiliar a defesa das plantas hospedeiras contra patógenos, produzindo compostos potencialmente úteis. Os basidiomicetos endofíticos desenvolveram um rico e diversificado metabolismo secundário devido à sua adaptação a diferentes climas, habitats e substratos. Seus metabólitos secundários são estruturalmente distintos dos obtidos a partir do metabolismo de ascomicetos. Diante dessa importância, foi selecionado um basidiomiceto endofítico da planta identificada como *Anthurium alcatrazense*, endêmica da Ilha de Alcatrazes, Brasil. Este isolado foi identificado por técnicas moleculares como *Hymenochaete*-like. A partir do seu meio metabólico, utilizando-se de diversas separações cromatográficas, foram isolados dois compostos, identificados por técnicas espectrométricas e espectroscópicas como 5,7-dimetoxiftalida e metil orselinato. Estes compostos apresentam diversas atividades biológicas e ambos foram avaliados contra *Leishmania* (L.) *infantum* e alvo do proteossoma, porém não apresentaram atividade. Este é o primeiro relato do isolamento desses compostos do basidiomiceto endofítico *Hymenochaete*-like.

Palavras-chave: 5,7-dimetoxiftalida; Ilha de Alcatrazes; mata Atlântica; metil orselinato; metil 2,4-dihidroxi-6-metilbenzoato.

ABSTRACT

Endophytic fungi are one of the main sources for the bioprospecting of natural compounds. Endophytes can assist host plants against pathogens by producing potentially useful compounds. Endophytic basidiomycetes developed a rich and diversified secondary metabolism due to their adaptation to different climates, habitats and substrates. Its secondary metabolites are structurally distinct from those obtained from the metabolism of ascomycetes. In view of this importance, an endophytic basidiomycete was selected from the plant identified as *Anthurium alcatrazense*, endemic from Alcatrazes Island, Brazil. This isolate was identified by molecular techniques such as *Hymenochaete*-like. From its metabolic medium, using several chromatographic separations, two compounds, identified by spectroscopic and spectroscopic techniques such as 5,7-dimethoxyphthalide and methyl orselinate, were isolated. These compounds present several biological activities and both were evaluated against *Leishmania* (L.) *infantum* and proteasome target, but did not present activity. This is the first report of the isolation of these compounds from the endophytic basidiomycete *Hymenochaete*-like.

Keywords: 5,7-dimethoxyphthalide; Alcatrazes Island; Atlantic forest; methyl orselinate; methyl 2,4-dihydroxy-6-methylbenzoate

5.1 Introdução

Atualmente, são aceitas cerca de 120.000 espécies fúngicas, sendo que apenas 3 a 8 % estão nomeadas até agora. No entanto, a faixa real de espécies fúngicas está estimada em 2,2 a 3,8 milhões. As estimativas melhoradas dependem particularmente de abordagens estatísticas e filogenéticas confiáveis para analisar a quantidade cada vez maior de dados (HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017).

Os fungos do filo Basidiomycota (basidiomicetos) compreendem aproximadamente 32 % dos fungos descritos (KIRK; MINTER; STALPERS, 2008). Eles desenvolveram um rico e diversificado metabolismo secundário devido à sua adaptação a diferentes climas, habitats e substratos. Seus metabólitos secundários são estruturalmente distintos dos obtidos a partir do metabolismo de ascomicetos, actinobactérias ou mixobactérias. Além disso, a origem biogenética de seus metabólitos também difere. Existem mais semelhanças com os produtos do metabolismo de plantas, especialmente em relação a alguns policetideos, acetilenos e sesquiterpenóides (SCHÜFFLER; ANKE, 2009). Os basidiomicetos são uma fonte de metabólitos ainda desconhecidos (HUANG et al., 2016) com as mais diversas atividades biológicas, tais como atividade antibacteriana a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pneumoniae* (WAITHAKA et al., 2017), contra o crescimento do fungo patógeno humano *Aspergillus fumigatus* e espécies patógenas de insetos, como *Beauveria bassiana* (STODŮLKOVÁ et al., 2015), atividade contra fungos fitopatogênicos, como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Physalospora piricola* (WANG; NG, 2006) e *Mycosphaerella arachidicola* (CHU; XIA; NG, 2005), atividade antioxidante, inibição da protease e integrase do HIV (LIU et al., 2017), atividade contra *Leishmania* spp. e formas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi* (INCHAUSTI et al., 1997), além de serem particularmente promissores na produção de terpenoides únicos (QUIN FLYNN; SCHIMIDT-DANNERT, 2014).

Devido ao grande número de espécies de plantas no mundo, se fazem necessárias estratégias para a procura de endófitos visando a produção de compostos, como as plantas endêmicas (TIWARI, 2015).

Dessa forma, objetivou-se o isolamento e a investigação química dos metabólitos secundários produzidos pelo basidiomiceto endofítico da planta *Anthurium alcatrazense*, endêmica da Ilha de Alcatrazes, Brasil.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Procedimentos experimentais gerais

As rotações ópticas foram medidas em polarímetro digital Polartronic H. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro modelo Bruker 14.1 Tesla, AVANCE III (operando a 600,13 MHz para a frequência de hidrogênio) com crioprobe™. Os espectros de RMN de ^1H foram medidos em DMSO deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) à temperatura ambiente. Os deslocamentos químicos são dados em valores δ (ppm), sendo o $\text{DMSO-}d_6$ (2,49 ppm) usado como padrão interno.

A espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (HR-ESI-MS) foi adquirida em um equipamento Maxis Impact Q-TOF nas seguintes condições: tensão capilar, 4,50 kV; operando em modo eletrospray positivo; faixa de detecção: 100-700 Da com extração total de íons. A aquisição de dados foi realizada usando o software Bruker Compass Data Analysis 4.2.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi conduzida em equipamento Agilent 1100 Series UV/Vis com uma bomba quaternária, acoplada a um detector UV MWD (Multiple Wavelength Detector), usando uma coluna de fase reversa C_{18} (250 x 4,60 mm, 5 μm ; Kinetex Phenomenex), com uma fase móvel em gradiente de H_2O ultrapura/ ACN/ MeOH (90: 5: 5, v/ v/ v), chegando a ACN/ MeOH (50: 50, v/ v), em 30 min, vazão de 1 mL min^{-1} e $\lambda = 254$ nm. Foram utilizados solventes de grau HPLC da marca J. T. Baker. A extração em fase sólida foi realizada utilizando colunas Sep-pak ciano e sílica gel de diferentes dimensões (Phenomenex) e solventes de grau P.A. da marca Synth. Cromatofolhas de sílica gel₂₅₄ (Macherey-Nagel) foram utilizadas para a cromatografia em camada delgada (CCD). Os spots foram inspecionados sob luz UV (254 e 365 nm).

A fermentação foi realizada em shaker Innova 40 (New Brunswick Scientific).

5.2.2 Material biológico

O endófito P7BDA1F2 foi isolado de folhas de *Anthurium* sp. (S24°06.027' W45°41.640') coletadas na Ilha de Alcatrazes, Brasil, em setembro de 2013. As folhas passaram por um processo de desinfecção superficial segundo Petrini (1991). Elas foram

lavadas com água corrente e água destilada. Após, foram esterilizadas por meio de lavagens consecutivas em água destilada (1 min), EtOH 70 % (1 min), NaOCl 2,5 % (2 min) e H₂O destilada estéril duas vezes durante 1 minuto. Para confirmar a eficácia do método, uma alíquota de 100 µL da água da última lavagem foi inoculada sobre uma placa contendo meio sólido. O material esterilizado foi cortado em fragmentos de aproximadamente 8 x 12 mm e 3 foram depositados em uma placa de Petri contendo meio batata dextrose agar (BDA), cloranfenicol e estreptomicina (100 µg ml⁻¹ de cada) para evitar o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a 28 °C e observadas diariamente até a visualização de colônias emergentes, as quais foram re-inoculadas em placas de BDA novas até serem obtidas culturas puras.

5.2.3 Identificação botânica e fúngica

O espécime botânico foi identificado com base nas características morfológicas pelo professor Dr. Marco Antônio de Assis (Departamento de Botânica, UNESP – Rio Claro), e um exemplar foi depositado no Herbário Rioclarense (HRCB).

O endófito foi identificado por análises moleculares. A extração de DNA seguiu o protocolo descrito por Schoch e colaboradores (2012), e as reações de sequenciamento foram feitas com o kit BigDye Terminator (Thermo Fischer Scientific), conforme descrito no capítulo 1.

5.2.4 Produção, extração e isolamento dos metabolitos secundários

O fungo foi primeiramente cultivado em placas de Petri contendo meio sólido malte 2 % a 28 °C durante 8 dias. Após este período, 3 plugues com meio e micélio foram transferidos para frascos Erlenmeyers de 250 mL (74 x 150 mL de meio líquido malte 2 %). O valor inicial de pH do meio foi ajustado para 7,0 e a fermentação foi realizada a 28 °C durante 12 dias a 150 rpm.

O meio de cultura foi triturado juntamente com o micélio, separado por filtração e submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila (150 mL de meio líquido para 150 mL de acetato de etila, repetido 3x). Os extratos foram concentrados utilizando-se um evaporador rotativo, onde se obteve a fração acetato de etila (729 mg). Esta foi submetida à cromatografia em coluna Sep-pak ciano eluído em um gradiente de hexano/ CH₂Cl₂/ AcOEt/

MeOH, resultando em sete frações: C1 (106,4 mg), C2 (354,9 mg), C3 (83,1 mg), C4 (53,7 mg), C5 (28,9 mg), C6 (56,2 mg) e C7 (27,3 mg). A fração C2 foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel com um gradiente de hexano/ CH₂Cl₂/ AcOEt/ MeOH, gerando 10 frações: C2A (18 mg), C2B (69 mg), C2C (5,2 mg), C2D (11,5 mg), C2E (30,5 mg), C2F (104 mg), C2G (14 mg), C2H (34 mg), C2I (16 mg), C2J (45 mg). A fração C2C foi purificada em HPLC (em coluna de fase reversa C₁₈) utilizando um gradiente de eluição de A (H₂O ultrapura) + B (MeOH) + C (ACN), iniciando com 90A: 5B: 5C até 50B: 50C em 30 minutos, de modo que foram obtidos os compostos puros C2CB (**1**) (0,5 mg) e C2CD (**2**) (3,1 mg).

5,7-Dimetoxiftalida (**1**) cristais esbranquiçados, $[\alpha]_D^{23} +0,0022$ (c 0,5 em MeOH). UV_{max} em 224 (log ε 2,50), 257 (log ε 3,10), 289 (log ε 1,30) nm. *m/z*: 195,0663 [M+H]⁺, 217,0478 [M+Na]⁺ e 233,0216 [M+K]⁺, calculado para C₁₀H₁₀O₄ (194,0584 Da). RMN de ¹H (DMSO-*d*₆, em ppm): 6,7 (s, 1 H, arom.), 6,5 (s, 1 H, arom.), 5,2 (s, H-7), 3,8 e 3,8 (s, 2 x O-CH₃).

Metil orselinato (**2**) prismas brancos, $[\alpha]_D^{23} +0,0008$ (c 5, MeOH). UV_{max} em 214 (log ε 3,50), 229 (log ε 2,80), 259 (log ε 3,50), 296 nm (log ε 2,10). *m/z*: 183,0657 [M+H]⁺, calculado para C₉H₁₀O₄ (182,0578 Da). RMN de ¹H (DMSO-*d*₆, em ppm): 6,16 (d, *J*= 1,73 Hz), 6,17 (d, *J*= 2,34 Hz), 2,28 (s, CH₃), 3,80 (s, CH₃).

5.2.5 Bioensaio de inibição do proteassoma

O bioensaio de inibição do proteassoma foi realizado conforme descrito no capítulo 1 e por Trivella et al. (2014), com modificações.

5.2.6 Bioensaio de eficiência *in vitro* contra *Leishmania* (L.) *infantum*

O bioensaio de eficiência *in vitro* contra *Leishmania* (L.) *infantum* foi realizado conforme descrito no capítulo 1 e por Martins et al. (2016).

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Identificação botânica e fúngica

O exemplar da planta *Anthurium* sp. foi identificado pelo Prof. Dr. Marco Antônio de Assis da UNESP/Rio Claro como sendo *Anthurium alcatrazense* Nadruz & Cath. A excicata foi depositada no Herbário Rioclarense (HRCB) do Instituto de Biociências (UNESP/Rio Claro) sob o número HRCB 64645. A planta possui folha cartácea, concolor, nervuras secundárias pouco visíveis, espata verde e espádice marrom.

O gênero *Anthurium* (família Araceae e subfamília Pothoideae) é tipicamente neotropical, com mais de 700 espécies descritas. Sua distribuição varia do norte do México e das grandes Antilhas até o sul do Brasil e norte da Argentina e do Paraguai (CROAT, 1983). Já a espécie *Anthurium alcatrazense* é endêmica da Ilha de Alcatrazes, com populações pequenas, menores do que de 1.000 indivíduos, estando em risco de extinção (COELHO; CATHARINO, 2008). Morfologicamente, possui lâmina foliar cartácea, elíptica a lanceolada e inflorescência diminuta (COELHO, 2012).

O endófito P7BDA1F2 foi identificado por meio do sequenciamento da região ITS como sendo próximo da espécie *Hymenochaete denticulata* (Basidiomycota), com 62 % de similaridade, e foi preservado pelo método Castellani (CASTELLANI, 1939).

Em geral, os basidiomicetos endófitos são mais comuns em tecidos lenhosos do que em folhas (ARNOLD, 2007). A pesquisa sobre basidiomicetos endófitos expandiu-se nos últimos anos, mas ainda pouco se sabe sobre a diversidade e seus papéis ecológicos (MARTIN et al., 2015).

5.3.2 Isolamento e identificação dos metabólitos secundários

Após cultivo do endófito em meio malte 2 % por 12 dias, extração com acetato de etila e 3 etapas cromatográficas, foram isolados dois compostos C2CB (**1**) e C2CD (**2**). Por meio de análises de EM de alta resolução e RMN de ¹H (Informações complementares, Figuras S1-S4), os compostos foram identificados como 5,7-dimetoxifitalida (CAS: 3465-69-8, TRAXLER et al., 1980) e metil orselinato (CAS: 3187-58-4, LI et al., 2006), respectivamente. As estruturas químicas dos compostos são mostradas na Figura 1.

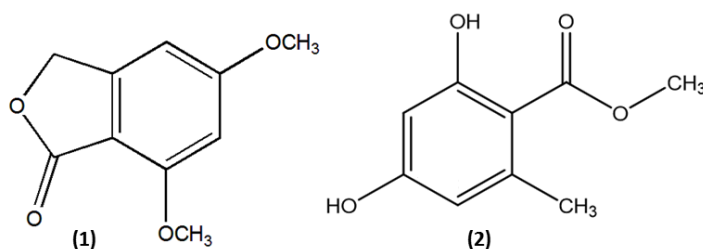


Figura 1 - Estrutura química dos compostos 5,7-dimetoxiftalida (1) e metil orselinato (2) produzidos pelo basidiomiceto *Hymenochete*-like P8BDA1F2, endófito da planta *A. alcatrazense*.

O composto 5,7-dimetoxiftalida (massa molecular 194,0584 Da) pertence à classe dos derivados das isobenzofuran-1(3H)-onas, também conhecidos por ftalidas. Essa classe se caracteriza por uma unidade de anel benzênico fundido a uma γ -lactona, e possui representantes com amplo espectro de atividades biológicas, como antibacteriana, antioxidante, anticonvulsivante, anti-HIV (PAIXÃO, 2013). Esses compostos são produzidos principalmente por plantas da família Apiaceae (RESENDE, 2016). O composto 5,7-dimetoxiftalida já foi isolado a partir de várias fontes biológicas, tais como das plantas *Helichrysum italicum* (OPITZ; HANSEL, 1971) e *Polygonum cuspidatum* (planta medicinal) e dos fungos ascomicetos *Papularia sphaerosperma* (TRAXLER et al, 1980) e *Scytalidium album* (EL-ELIMAT et al., 2015).

A 5,7-dimetoxiftalida foi testada por El-Elimat e colaboradores (2015), porém sem apresentar atividade, contra bactérias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis*), fungos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Micrococcus luteus* e *Aspergillus niger*) e em ensaios anticancerígenos, contra melanoma humano e adenocarcinoma colorretal humano. Por outro lado, nos ensaios realizados por Li e colaboradores (2010), a 5,7-dimetoxiftalida mostrou atividade antiviral contra o HIV-1 a uma concentração de 19,97 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

O composto metil 2,4-dihidroxi-6-metilbenzoato (massa molecular 182,0578 Da), também conhecido como metil orselinato, é um derivado do orcinol. Ele pertence à classe dos compostos fenólicos, que consistem em uma hidroxila ligada diretamente a um hidrocarboneto aromático, e são conhecidos pela sua atividade antioxidante (DE BEER et al., 2002). O composto metil orselinato é comum em espécies de líquens, como *Peltigera leucophlebia* (INGÓLFSDÓTTIR et al., 1985) e *P. aphthosa* (INGÓLFSDÓTTIR et al., 2002), *Pseudocyphellaria nudata* (CUELLAR et al., 2008), *Stereocaulon alpinum* (SEO et al., 2009), *Parmotrema tinctorum* (LOPES et al., 2008, BOGO et al., 2010) e *P. tsavoense*

(DUONG et al., 2015). Ele também já foi isolado de outras fontes biológicas, como dos fungos basidiomicetos *Trametes hirsuta* (ABRAHAM; BERGER, 1994), *Stereum* sp. (LI et al., 2006) e *Sparassis crispa* (WOODWARD et al., 1993), das plantas *Flourensia cernua* (MATA et al., 2003) e *Rhododendron primulaeflorum* (LI et al., 2008), do musgo *Plagiochila killarniensis* (RYCROFT et al., 1999) e, mais recentemente, do fungo ascomiceto *Aureobasidium melanogenum*, endófito de *A. alcatrazense* (SARTORI, 2016).

Foram relatadas para esse composto as atividades fitotóxica (ROJAS; LOTINAHENNSSEN; MATA, 2000; MATA et al., 2003), atividade inibitória à proteína tirosina fosfatase 1B (SEO et al., 2009), atividade antioxidante (LOPES et al., 2008) e contra células de carcinoma (BOGO et al., 2010).

No presente estudo, os compostos isolados 5,7-dimetoxifitalida e metil orselinato foram testados contra leishmaniose e alvo do proteassoma. Entretanto, ambos não se mostraram ativos.

5.4 Conclusões

A partir do meio metabólito do fungo endofítico *Hymenochaete*-like, foram isolados os compostos 5,7-dimetoxifitalida e metil-orselinato, os quais já possuem diversas atividades biológicas relatadas na literatura. No presente trabalho, ambos foram testados contra leishmaniose e alvo do proteassoma, mas não apresentaram atividade. Este é o primeiro relato da produção desses compostos pelo basidiomiceto *Hymenochaete*-like, endófito da planta *A. alcatrazense*. Isso demonstra o rico metabolismo secundário dos basidiomicetos endofíticos, ainda pouco explorado.

Referências

ABRAHAM, B.G.; BERGER, R.G. Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.42, p.2344-2348, 1994.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v.21, p.51–66, 2007.

BOGO, D.; MATOS, M.F.C.; HONDA, N.K.; PONTES, E.C.; OGUMA, P.M.; SANTOS, E.C.S.; CARVALHO, J.E.; NOMIZO, A. *In vitro* antitumour activity of orsellinates. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Tübingen, v.65, p.43-48, 2010.

CASTELLANI, S. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v.42, p.225-226, 1939.

CHU, K.; XIA, L.; NG, T. Pleurostrin, an antifungal peptide from the oyster mushroom. **Peptides**, New York, v.26, p.2098–2103, 2005.

COELHO, M.A.N. *Anthurium*. In: WANDERLEY et al. (Ed.). **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2012. 74 p.

COELHO, M.A.N.; CATHARINO, E.L.M. Duas espécies novas de *Anthurium* (araceae) endêmicas do litoral de São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.59, n.4, p.829-833, 2008.

CROAT, T.B. A revision of the genus *Anthurium* (Araceae) of Mexico and Central America. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v.70, n.2, p.211-416, 1983.

CUELLAR, M.; QUILHOT, W.; RUBIO, C.; SOTO, C.; ESPINOZA, L.; CARRASCO, H. Phenolics, depsides and triterpenes from the chilean lichen *Pseudocyphellaria nudata* (Zahlbr.) D.J. GALLOWAY. **Journal of the Chilean Chemical Society**, Misión, v.53, n.3, p.1624-1625, 2008.

DE BEER, D.; JOUBERT, E.; GELDERBLOM, W.C.A.; MANLEY, M. Phenolic compounds: a review of their possible role as in vivo antioxidants of wine. **South African Journal of Enology & Viticulture**, Stellenbosch, v.23, n.2, p.48-61, 2002.

DUONG, T.H.; CHAVASIRI, W.; BOUSTIE, J.; NGUYEN, K.P.P. New meta-depsidones and diphenyl ethers from the lichen *Parmotrema tsavoense* (Krog & Swinscow) Krog & Swinscow, Parmeliaceae. **Tetrahedron**, Oxford, v.71, n.52, p.9684-9691, 2015.

EL-ELIMAT, E.; RAJA, H.A.; FIGUEROA, M. SWANSON, S.M.; FALKINHAM, III, J. O.; LUCAS, D.M.; GREVER, M.R.; WANI, M.C.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. Sorbicillinoid analogues with cytotoxic and selective Anti-*Aspergillus* activities from *Scytalidium album*. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.68, n.3, p.191–196, 2015.

HAWKSWORTH, D.L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology Spectrum**, Washington, v.5, n.4, p.1-17, 2017.

HUANG, Y.; ZHANG, S-B.; CHEN, H-P.; ZHAO, Z-Z.; LI, Z-H.; FENG, T.; LIU, J-K. New acetylenic acids and derivatives from the Basidiomycete *Craterellus lutescens* (Cantharellaceae). **Fitoterapia**, Milano, v.115, p.177-181, 2016.

INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; ROJAS DE ARIAS, A.; TORRES, S.; FERREIRA, M.E.; NAKAYAMA, H.; SCHININI, A.; LORENZEN, K.; ANKE, T.; FOURNET, A. Leishmanicidal and trypanocidal activity of extracts and secondary metabolites from basidiomycetes. **Phytotherapy Research**, London, v.11, p.193–197, 1997.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; GUDMUNDSÓTTIR, G.F.; ÖGMUNDSÓTTIR, H.M.; PAULUS, L.; HARALDSDÓTTIR, S.; KRISTINSSON, H.; BAUER, R. Effects of tenuiorin

and methyl orsellinate from the lichen *Peltigera leucophlebia* on 5-/15-lipoxygenases and proliferation of malignant cell lines *in vitro*. **Phytomedicine**, Stuttgart, v.9, p.654-658, 2002.

INGÓLFSDÓTTIR, K.; SALLY, T.; BLOOMFIELD, F.; HYLANDS, P.J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of lichen metabolites as potential preservatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v.28, n.2, p.289-292, 1985.

KIRK, P.M.C.P.; MINTER, D.W.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the Fungi**. 10.ed. Wallingford: CAB International, 2008, 72p.

LI, G-H.; LI, L.; DUAN, M.; ZHANG, K-Q. The chemical constituents of the fungus *Stereum* sp. **Chemistry & Biodiversity**, Zurich, v.3, p.210-216, 2006.

LI, H.W.; SUN, M.X.; WANG, Y.H.; YANG, L.M.; YANG, Y.R.; HUANG, N.; XUAN, L.J.; XU, Y.M.; BAI, D.L.; ZHENG, Y.T.; XIAO, K. Anti-HIV activities of the compounds isolated from *Polygonum cuspidatum* and *Polygonum multiflorum*. **Planta Medica**, Stuttgart, v.76, p.889-892, 2010.

LI, X-F.; JIN, H-Z.; YANG, M.; CHEN, G.; ZHANG, W-D. A new methyl orsellinate glycoside from the aerial part of *Rhododendron primulaeflorum*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, Beijing, v.6, n.5, p.336-338, 2008.

LIU, F.; WANG, Y.; ZHANG, K.; WANG, Y.; ZHOU, R.; ZENG, Y.; HAN, Y.; NG, T.B. A novel polysaccharide with antioxidant, HIV protease inhibiting and HIV integrase inhibiting activities from *Fomitiporia punctata* (P. karst.) murrill (Basidiomycota, hymenochaetales). **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v.97, p.339-347, 2017.

LOPES, T.I.B.; COELHO, R.G.; YOSHIDA, N.C.; HONDA, N.K. Radical-scavenging activity of orsellinates. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.56, p.1551-1554, 2008.

MARTIN, R.; GAZIS, R.; SKALTSAS, D.; CHAVERRI, P.; HIBBETT, D. Unexpected diversity of basidiomycetous endophytes in sapwood and leaves of *Hevea*. **Mycologia**, Lancaster, v.107, n.2, p.284-97, 2015.

MARTINS, L.F.; MESQUITA, J.T.; PINTO, E.G.; COSTA-SILVA, T.A.; BORBOREMA, S.E.; GALISTEO JUNIOR, A.J.; NEVES, B.J.; ANDRADE, C.H.; SHUHAIB, Z.A.; BENNETT, E.L.; BLACK, G.P.; HARPER, P.M.; EVANS, D.M.; FITURI, H.S.; LEYLAND, J.P.; MARTIN, C.; ROBERTS, T.D.; THORNHILL, A.J.; VALE, S.A.; HOWARD-JONES, A.; THOMAS, D.A.; WILLIAMS, H.L.; OVERMAN, L.E.; BERLINCK, R.G.; MURPHY, P.J.; TEMPONE, A.G. Analogues of marine guanidine alkaloids are *in vitro* effective against *Trypanosoma cruzi* and selectively eliminate *Leishmania (L.) infantum* intracellular amastigotes. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.79, p.2202-2210, 2016.

MATA, R.; BYE, R.; LINARES, E.; MACÍAS, M.; RIVERO-CRUZ, I.; PÉREZ, O.; TIMMERMANN, B.N. Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. **Phytochemistry**, New York, v.64, p.285-291, 2003.

OPITZ, L.; HÄNSEL, R. Phthalide aus *Helichrysum italicum*. **Archiv der Pharmazie**, Weinheim, v.304, n.3, p.228-230, 1971.

PAIXÃO, D.A. **Estudo cristalográfico de compostos orgânicos com potencial atividade herbicida**. 2013. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

PETRINI, O. Fungal endophytes in tree leaves. In: Andrews, J.H.; Hirano, S.S. (Orgs.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer, 1991. p.179-197.

QUIN, M.B.; FLYNN, C.M.; SCHMIDT-DANNERT, C. Traversing the fungal terpenome. **Natural Product Reports**, London, v.31, n.10, p.1449-73, 2014.

RESENDE, G.C. **Síntese de derivados de isobenzofuran-1(3H)-onas: obtenção de compostos tipo gaiola e atividade inseticida**. 2016. 220p. Tese (Doutorado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

ROJAS, I.S.; LOTINA-HENNSEN, B.; MATA, R. Effect of lichen metabolites on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.63, p.1396-1399, 2000.

RYCROFT, D.S.; COLE, W.J.; ASLAM, N.; LAMONT, Y.M.; GABRIEL, R. Killarniensolide\ methyl orsellinates and 9-10 dihydrophenanthrenes from the liverwort *Plagiochila killarniensis* from Scotland and the Azores. **Phytochemistry**, New York, v.50, p.1167-1173, 1999.

SARTORI, S.B. **Potencial metabólico de fungos endofíticos de plantas do gênero *Anthurium* da Ilha de Alcatrazes**. 2016. 219p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2016.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUFNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.L.; LEVESQUE, A.; CHEN, W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.109, p.6241-6246, 2012.

SCHÜFFLER, A.; ANKE, T. Secondary metabolites of basidiomycetes. **Physiology and Genetics**, Berlin, v.15, p.209-231, 2009.

SEO, C.; SOHN, J.H.; AHN, J.S.; YIM, J.H.; LEE, H.K. OH, H. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory effects of depsidone and pseudodepsidone metabolites from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.19, p.2801-2803, 2009.

STODŮLKOVÁ, E.; CÍSAŘOVÁ, I.; KOLAŘÍK, M.; CHUDÍČKOVÁ, M.; NOVÁK, P.; MAN, P.; KUZMA, M.; PAVLŮ, B.; ČERNÝ, J.; FLIEGER, M. Biologically active metabolites produced by the basidiomycete *Quambalaria cyanescens*. **Plos One**, San Francisco, v.10, n.2, 2015.

TIWARI, K. The Future Products: Endophytic Fungal Metabolites. **Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development**, Foster City, v.2, n.1, p.1-7, 2015.

TRAXLER, P.; FRITZ, H.; FUHRER, H.; RICHTER, W.J. Papulacandins, a new family of antibiotics with antifungal activity. Structures of papulacandins A, B, C and D. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.33, n.9, p.967-978, 1980.

TRIVELLA, D.B.B.; PEREIRA, A.R.; STEIN, M.L.; KASAI, Y.; BYRUM, T.; VALERIOTE, F.A.; TANTILLO, D.J.; GROLL, M.; GERWICK, W.H.; MOORE, B.S. Enzyme Inhibition by hydroamination: design and mechanism of a hybrid carmaphycin-syringolin enone proteasome inhibitor. **Chemistry & Biology**, London, v.21, p.782–791, 2014.

WANG, H.; NG, T. Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Peptides**, New York, v.27, p.27–30, 2006.

WAITHAKA, P.N.; GATHURU, E.M.; GITHAIGA, B.M.; ONKOBA, K.M. Antimicrobial activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) and fungal (*Trametes gibbosa*) extracts from mushrooms and fungi of Egerton Main Campus, Njoro Kenya. **Journal of Biomedical Sciences**, Basel, v.6, p.1-6, 2017.

WOODWARD, S.; SULTAN, H.Y.; BARRET, D.K. PEAR, R.B. Two new antifungal metabolites produced by *Sparassis crispa* in culture and in decayed trees. **Journal of General Microbiology**, London, v.139, p.153-159, 1993.

Informações complementares

Figura S1. Espectro de massas de alta resolução do composto C2CB (modo positivo)

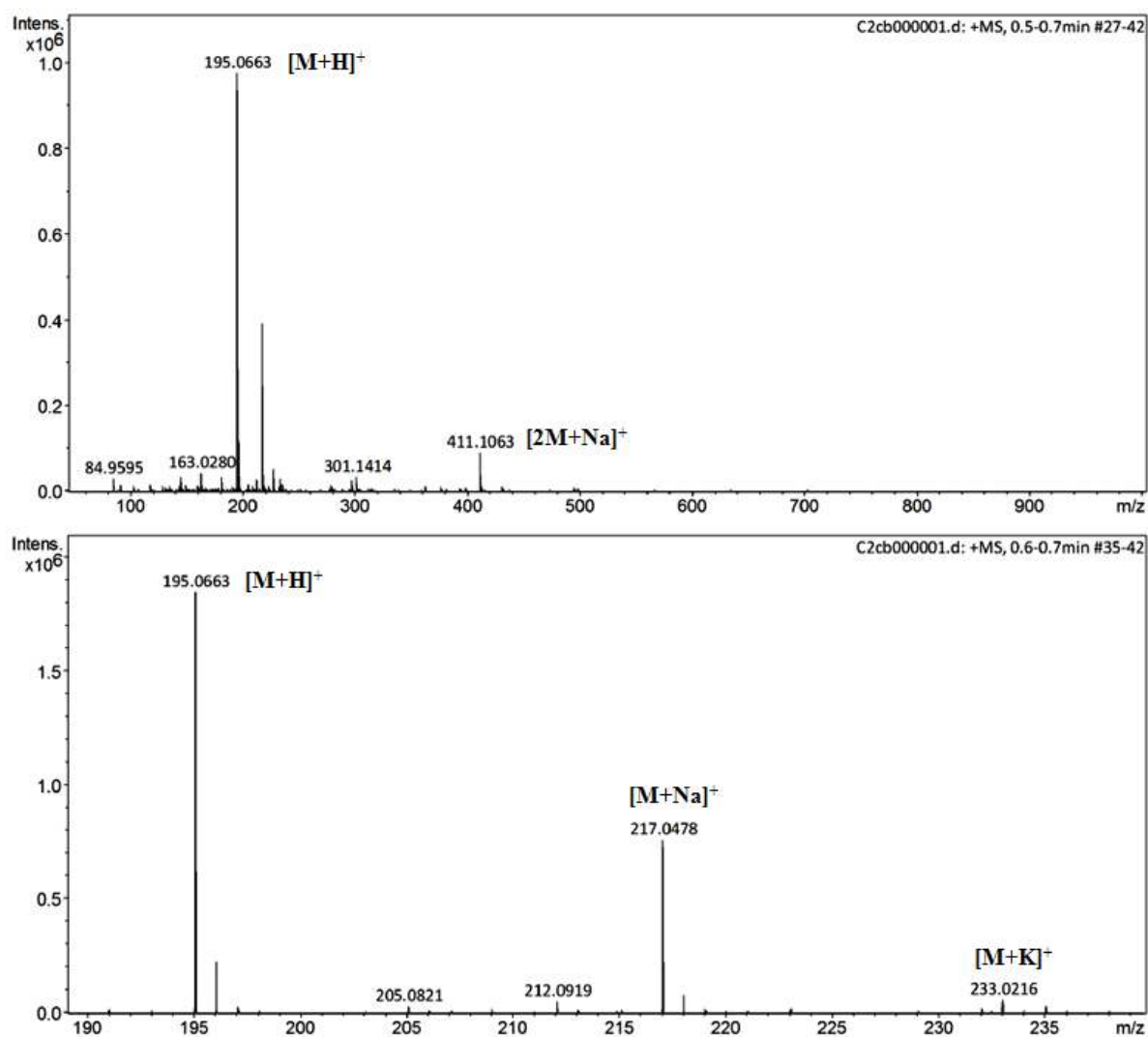


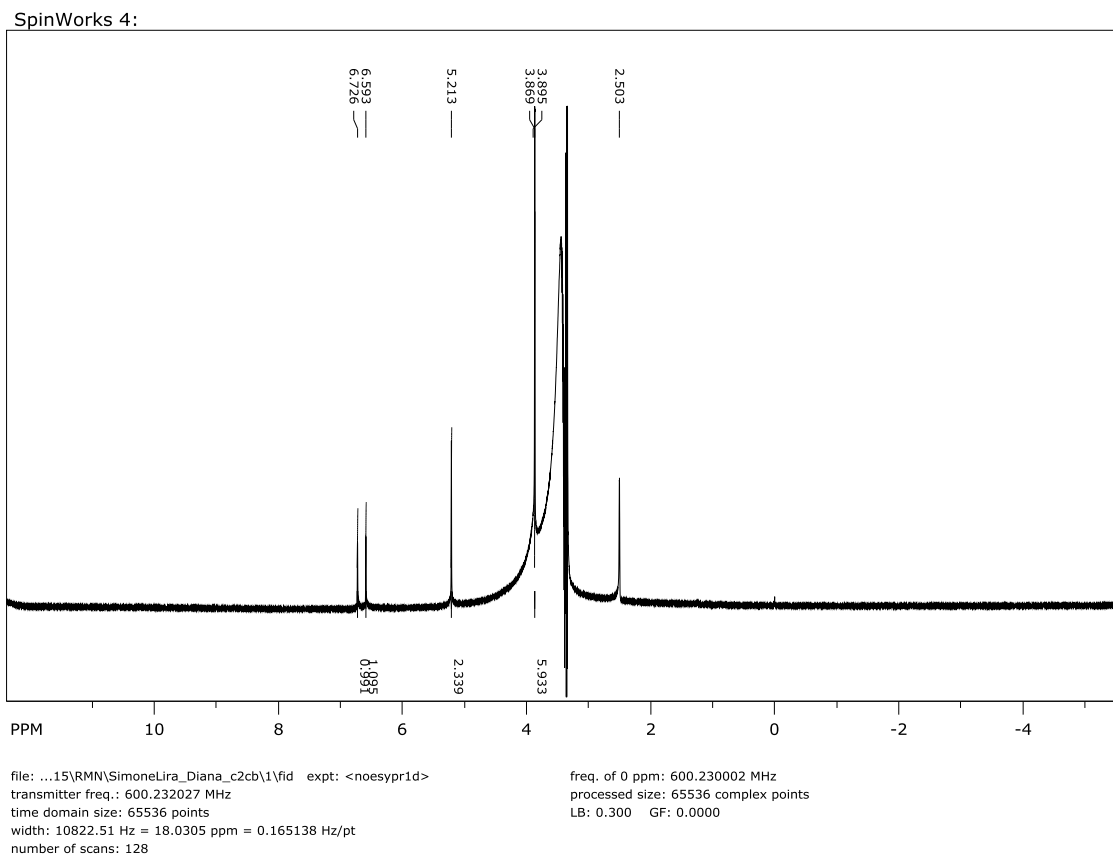
Figura S2. RMN de ^1H do composto C2CB em $\text{DMSO-}d_6$ 

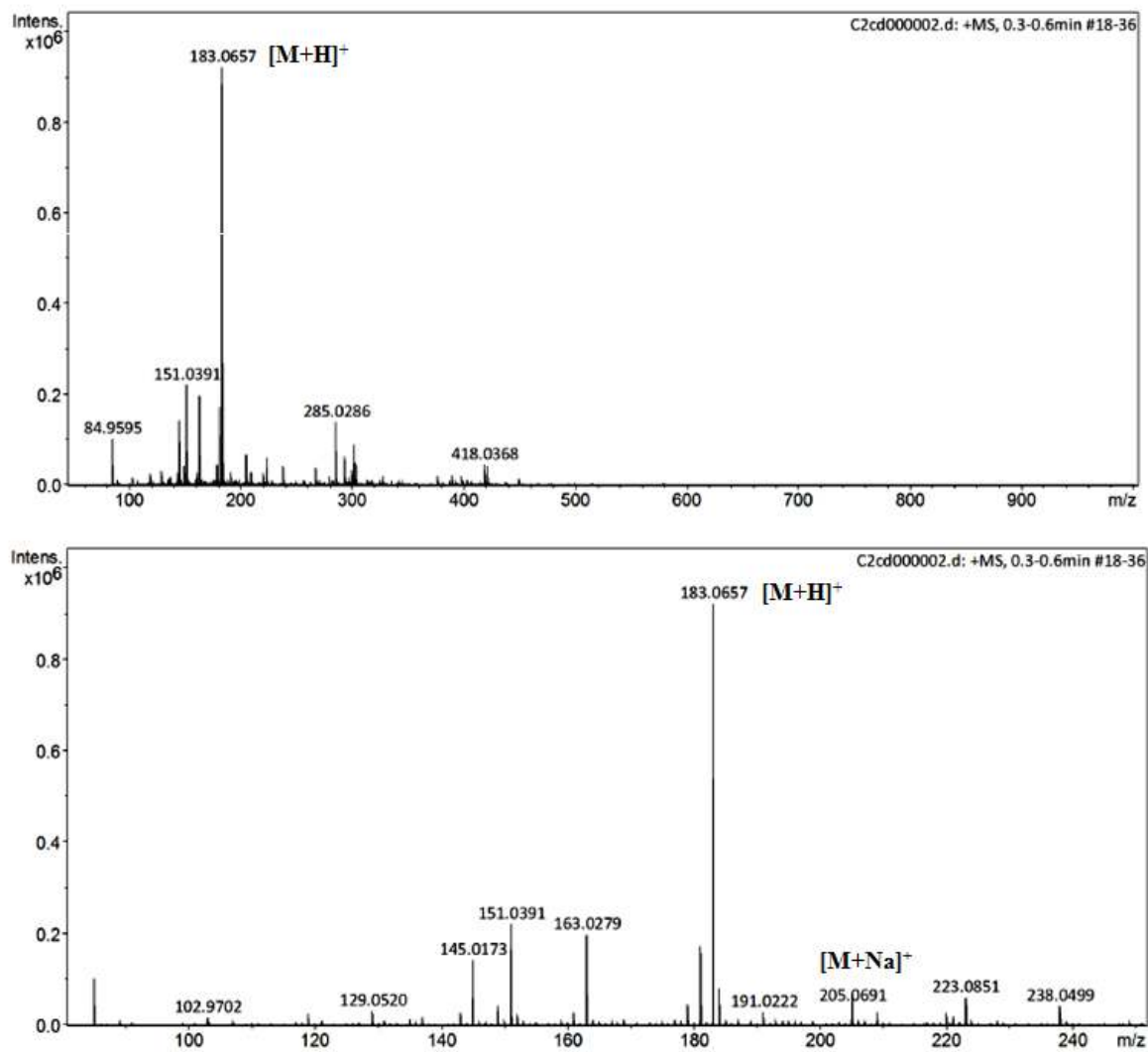
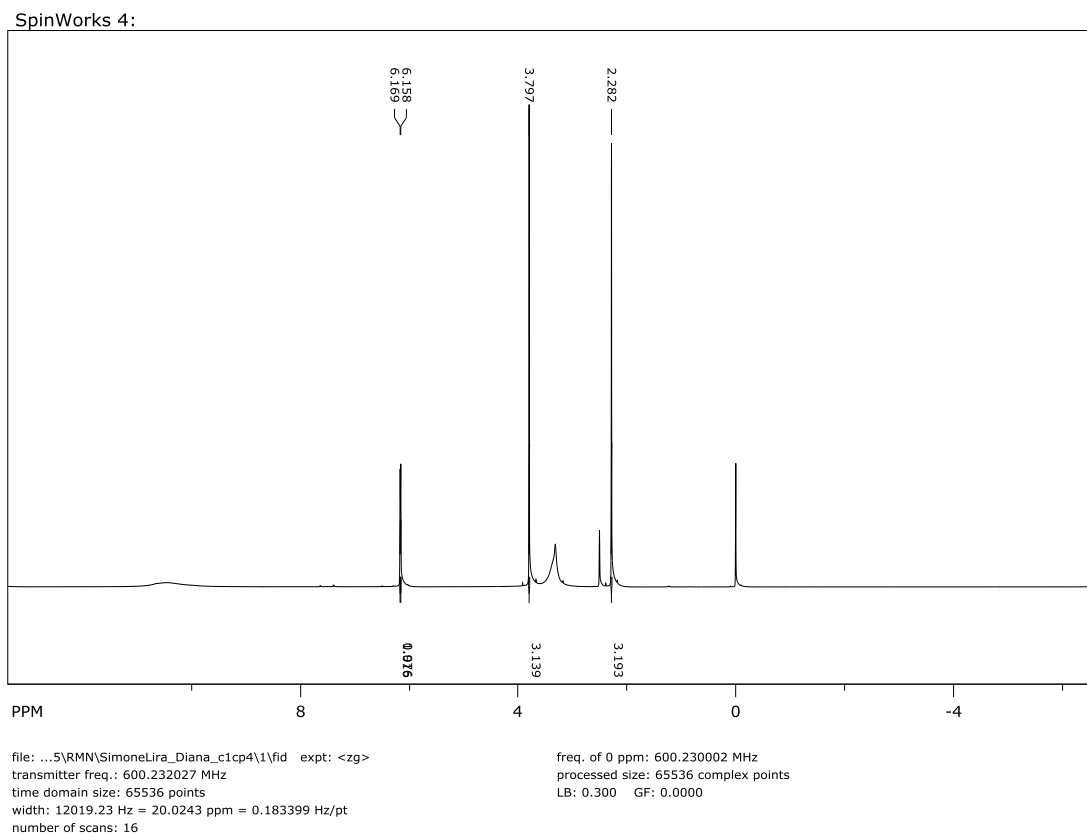
Figura S3. Espectro de massas de alta resolução do composto C2CD (modo positivo)

Figura S4. RMN de ^1H do composto C2CD em $\text{DMSO-}d_6$ 

6 CAPÍTULO 3 - ISOLAMENTO DE UM COMPOSTO PRODUZIDO PELO FUNGO ENDOFÍTICO *Neopestalotiopsis* sp. CONTRA *Phomopsis sojae*

RESUMO

Os fungos estão presentes nos mais diversos ambientes, inclusive no interior de tecidos vegetais, como endófitos, sem causar injúrias aparentes. Estes endófitos são produtores de metabolitos secundários com diversas atividades biológicas, dentre elas a fungicida. Neste contexto, um endófito foi isolado da planta *Begonia fischeri*, coletada na Mata Atlântica, em Ubatuba-SP, e identificado molecularmente como *Neopestalotiopsis* sp. A partir do seu meio metabólico foi obtida a fração acetato de etila, a qual apresentou 23 % de inibição micelial ao fitopatógeno *P. sojae*, causador da doença podridão seca nas culturas de soja. Assim, através de uma investigação química biomonitorada, isolou-se um composto de massa molecular 366,0570 Da, o qual apresentou 58 % de inibição micelial a *P. sojae* e uma MIC de 312 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no ensaio com esporos. Por meio de análises espectroscópicas (EM, RMN), sugere-se que pode se tratar de um novo composto, dímero da fumiquinona B, da classe das quinonas. Assim, relatamos o isolamento de um possível novo composto de *Neopestalotiopsis* sp., assim como sua atividade antifúngica a *P. sojae*.

Palavras-chave: fitopatógeno, fungicida, Mata Atlântica

ABSTRACT

Fungi are present in the most diverse environments, including inside vegetal tissues, as endophytes, without causing apparent damage. These endophytes are producers of secondary metabolites with several biological activities, among them the fungicide. In this context, an endophyte was isolated from the plant *Begonia fischeri*, collected in the Atlantic Forest, in Ubatuba-SP, and molecularly identified as *Neopestalotiopsis* sp. From the metabolic medium was obtained the ethyl acetate fraction, which showed 23% mycelial inhibition to the pathogen *P. sojae*, that causes dry rot disease in soybean. Thus, through a biomonitoring chemical investigation, a compound with molecular weight 366.0570 Da was isolated, which showed 58% mycelial inhibition to *P. sojae* and a MIC of 312 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in the spore assay. By means of spectroscopic analyzes (MS, NMR) it is suggested to be a new compound, dimer of fumiquinone B, from the quinone class. Thus, we report the isolation of a possible new compound from *Neopestalotiopsis* sp., as well as its antifungal activity to *P. sojae*.

Keywords: 2, 6- hydroxy- 5- methoxy- 3- methylcyclohexa- 2, 5- diene - 1, 4 -dione; phytopathogen, fungicide, Atlantic Forest

6.1 Introdução

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é o principal produto do agronegócio brasileiro, contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento do país (COLUSSI et al., 2016). Entretanto, as doenças que atingem essa cultura têm limitado sua produtividade, como é o

caso da seca da haste e da vagem, causada por *Phomopsis* spp. (TORMEN, 2014). Pelo menos quatro taxa de *Phomopsis* ocorrem na soja e são responsáveis por doenças graves e perdas de rendimento (PEREIRA; PEREIRA; FRAGA, 2000; SANTOS et al., 2011).

O fungo *Phomopsis sojae* (Leh.) (teleomorfo: *Diaporthe phaseolorum* var *sojae*) atinge a soja provocando podridão da semente (HEPPERLY; SINCLAIR, 1978; ZORRILLA; KNAPP; MCGEE, 1994; PEREIRA; PEREIRA; FRAGA, 2000), seca da vagem e da haste (PEDERSEN; GRAU, 2010) e cancro de haste (MORGAN-JONES, 1992), levando a perdas consideráveis mundialmente (UDAYANGA et al., 2015).

Diante da relevância da doença, é importante buscar novas alternativas que possam atuar no seu controle, como fungicidas (LEADBEATER, 2015).

O uso dos fungicidas sintéticos é progressivamente restrito devido aos seus efeitos nocivos sobre o meio ambiente e à saúde humana, e à emergência de cepas fúngicas altamente resistentes. Portanto, há uma grande demanda por novos fungicidas naturais (RIBERA; ZUÑIGA, 2012).

Devido ao potencial dos endófitos na proteção dos seus hospedeiros contra agentes patogênicos, o estudo nestes ambientes torna-se promissor.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi a investigação dos compostos produzidos pelo fungo endofítico AM29, quanto a atividade ao fitopatógeno *P. sojae*.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Procedimentos gerais

A ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN) foi registrada em um espectrômetro modelo Bruker 14.1 Tesla, AVANCE III (operando a 600.13 MHz na frequência do hidrogênio) com crioprobe™. Os deslocamentos químicos são dados em uma escala de δ (ppm).

A espectrometria de massa de alta resolução (UPLC-EM) foi adquirida em espectrômetro de massas Xevo G2-XS QToF Quadrupolo com detector tempo-de-vôo (Waters) operando em modo eletrospray positivo nas seguintes condições: faixa de detecção: 100-500 Da com extração total de íons; coluna: Acquity UPLC BEH C_{18} (2,1 x 100 mm, 1,7 μm). Os valores de m/z foram registrados no modo centróide. A aquisição de dados foi realizada usando o software MassLynx.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi conduzida no equipamento Agilent 1100 Series UV/Vis com uma bomba quaternária, acoplada a um detector UV MWD (Multiple Wavelength Detector), usando uma coluna de fase reversa C₁₈ (250 x 4,60 mm, 5 µm; Kinetex Phenomenex), com fase móvel em gradiente de H₂O ultrapura/ ACN (90:10, v/v), chegando a 100 % ACN em 30 min, vazão de 1 mL min⁻¹ e λ = 220 nm. Utilizaram-se solventes grau HPLC (LiChrosolv, Merck, Alemanha). A extração em fase sólida foi realizada utilizando colunas Sep-pak de sílica gel, ciano e C₁₈ de diferentes dimensões (Phenomenex, EUA e Sigma-Aldrich, Alemanha) e solventes de grau P.A da marca Synth. A cromatografia em camada delgada foi realizada com cromatofolhas de sílica gel com detector de UV (Macherey-Nagel). Os spots foram inspecionados sob luz UV (254 e 365 nm).

As leituras de absorvância óptica foram feitas em leitor TECAN, modelo SUNRISE, operando pelo software Magellan v.7.1, a 620 nm.

Os meios de cultura utilizados foram das marcas Kasvi (extrato de malte) e Acumedia (ágar). O fungicida comercial utilizado foi o Score (Syngenta).

6.2.2 Material biológico

O fungo endofítico AM29 foi isolado de folhas da planta *Begonia* sp. (S23°28'28.6" W45°10'22.6") coletada na Mata Atlântica, região de Ubatuba-SP, Brasil, em junho de 2014, sob o número de autorização 21774 (SISBio), cedida a André Rodrigues. A desinfecção das folhas foi feita com base no protocolo de Petrini (1991).

6.2.3 Identificação botânica e fúngica

A identificação da planta *Begonia* sp. foi feita a nível de espécie pelos Professores Dr. Marco Antônio de Assis (Departamento de Botânica, UNESP - Rio Claro) e pela Prof^a. Dra. Eliane Jacques (Departamento de Botânica, UFRJ – Rio de Janeiro).

O fungo endofítico foi identificado através de análises morfológicas e moleculares. A análise morfológica consistiu em observações macroscópicas (aspectos gerais da colônia) e microscópicas (estruturas reprodutivas). As estruturas observadas foram comparadas com as encontradas nas chaves taxonômicas (ELLIS, 1971, 1976; WATANABE, 2002). O DNA genômico foi extraído e submetido à sequência de ITS com iniciadores ITS4 e ITS5

(SCHOCH et al., 2012). As reações de amplificação consistiram em: 0,2 mM de cada dNTP, 5x tampão KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 μM de cada iniciador e 1 U da enzima Taq polimerase no volume final de 25 μl; As condições de amplificação foram as descritas em Montoya et al. (2016). Os produtos de amplificação foram visualizados no GelRed 1 % de gel de agarose (Biotium). A purificação dos amplicons foi realizada com o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) e quantificada em NanoDrop (Thermo Scientific). Uma quantidade de 20 ng de DNA foi utilizada na reação de sequenciamento empregando-se o Kit BigDye Terminator Cycle Sequencing v.3.1 (Life Technologies), seguindo o protocolo do fabricante e aplicado ao seqüenciador ABI 3500 (Life Technologies). Após a sequenciamento, os contigs foram montados usando o BioEdit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). Os contigs foram comparados com seqüências homólogas presentes no NCBI-GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) usando a ferramenta MEGA BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

6.2.4 Fermentação, extração e isolamento

O fungo endofítico AM29 foi primeiramente cultivado em placas de Petri contendo meio malte (2 % de extrato de malte, 1,5 % de ágar) a 28 °C durante 7 dias. Em seguida, foram transferidos 3 plugs (7 mm) de micélio para cada frasco Erlenmeyer de 250 mL (28 frascos contendo cada um 150 mL de meio líquido malte 2 %, pH 6,0). Os frascos foram incubados a 28 °C em agitador rotativo a 150 rpm durante 9 dias.

O meio de cultivo líquido foi filtrado e extraído com AcOEt três vezes (150 mL de solvente orgânico para 150 mL de meio líquido). O solvente orgânico foi evaporado sob vácuo gerando 1,0 g de extrato bruto. Este foi separado em coluna Sep-pak ciano (10 g) utilizando-se uma eluição em gradiente de CH₂Cl₂-MeOH (100: 0 a 0: 100), resultando em 5 frações (1-5). A fração 1 (877 mg) foi separada em coluna Sep-pak de sílica gel (10 g) com um gradiente de hexano-CH₂Cl₂-MeOH, gerando 5 frações (1A-1E). A fração 1B (60 mg) foi fracionada em coluna Sep-pak de fase reversa C₁₈ (1 g) utilizando-se um gradiente de H₂O-MeOH, gerando 3 frações (1B1-1B3). A fração 1B3 (8,3 mg) foi purificada por HPLC com um gradiente de H₂O ultrapura-ACN obtendo-se 1,2 mg do composto ativo 1B3P1 (**1**).

6.2.5 Ensaios antifúngicos

6.2.5.1 Ensaio do disco de papel

O ensaio do disco de papel (FOSTER; WOODRUFF, 1943) foi utilizado para determinar a atividade antifúngica durante os procedimentos de separação e purificação. As frações foram aplicadas em discos de papel estéreis de 6 mm de diâmetro (1 mg para extrato AcOEt, 0,5 mg para frações e 0,2 mg para compostos puros) e colocadas na borda de placas de Petri com meio malte 2 %. Um inóculo do patógeno (um disco de 7 mm de diâmetro removido de uma placa de 5 dias) foi adicionado a borda oposta da placa de Petri. As zonas de inibição de crescimento micelial em torno dos discos de papel foram medidas após incubação de 5 dias a 28 °C. As porcentagens de inibição foram calculadas em comparação com o controle que continha somente o patógeno usando o programa Image J (Processamento e Análise de Imagem em Java). Este experimento foi conduzido com uma repetição. O fungo *P. sojae* utilizado neste estudo foi isolado de soja e cedido pelo Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, do Laboratório de Genética de Microorganismos, Departamento de Genética, ESALQ-USP.

6.2.5.2 Ensaio de microdiluição

O ensaio de microdiluição foi realizado em uma microplaca de 96 poços de acordo com as diretrizes do Comitê Nacional de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2008) com modificações. Para o ensaio, o composto puro foi diluído em DMSO e meio malte 2 % até concentrações finais de 2500; 1250; 625; 312; 156; 78,1; 39; 19,5; 7,7; 4,8 e 2,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em cada poço. Uma suspensão de inóculo de *P. sojae* (10^5 esporos mL^{-1} , 60 μL) foi adicionada a cada poço, totalizando um volume final no poço de 100 μL . Como controle negativo, foram avaliados poços contendo meio, inóculo e DMSO, mas sem o composto. Como controle positivo foi utilizado o fungicida comercial Score, cujo princípio ativo é o difenoconazole. A microplaca foi incubada em B.O.D. a 28 °C e foi analisada em leitor de microplacas a 620 nm, em intervalos de 12 h, por 120 h.

A concentração mínima inibitória (MIC) do composto foi determinada espectrofotometricamente após os períodos de incubação acima mencionados, de acordo com as diretrizes da CLSI (2008), com modificações. Tanto para o composto isolado quanto para o fungicida comercial, a MIC foi determinada como a menor concentração mostrando ausência

de crescimento ou igual ao crescimento inicial em comparação com o crescimento (até 12 h) no poço livre de compostos.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Identificação botânica e fúngica

A planta foi identificada por meio de características morfológicas e com a ajuda de chaves de identificação como sendo da espécie *Begonia fischeri* Schrank. Um exemplar encontra-se depositado no Herbário Rioclarence (HRCB) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP, sob o número de tombo HRCB 64226.

O gênero *Begonia* pertence à família Begoniaceae, e é um dos mais abundantes em espécies no grupo das angiospermas, englobando aproximadamente 1.600 espécies (THE PLANT LIST, 2013). As begônias se apresentam sob a forma de ervas, arbustos e epífitas, com uma distribuição pantropical (GOODALL-COPESTAKE; HARRIS; HOLLINGSWORTH, 2009). *B. fischeri* é um subarbusto, sendo encontrada no sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, sudeste do México, Cuba, Jamaica, Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, Guiana, Venezuela, Argentina, Bolívia, Colômbia e Peru (WCSP, 2014).

O endófito AM29, isolado das folhas de *B. fischeri*, foi identificado por análises morfológicas e moleculares como *Neopestalotiopsis* sp., e está depositado sob o número CRM 1920 na Central de Recursos Microbianos da Unesp, Rio Claro-SP.

O gênero *Neopestalotiopsis* foi descrito recentemente por Maharachchikumbura e colaboradores (2014). Inicialmente, De Notaris, em 1839, descreveu o gênero *Pestalotia*, o qual foi dividido por Steyaert, em 1955 em *Pestalotia*, *Pestalotiopsis* e *Truncatella*. Até a década de 1990, a taxonomia de *Pestalotiopsis* e gêneros relacionados era baseada em características dos conídios, principalmente a pigmentação. Entretanto, esse método de identificação era controverso, devido à variação de outras características morfológicas, como cor da colônia, textura e forma (HU et al. 2007; SOLARTE et al., 2017). Então, por análises morfológicas e de DNA (ITS, β -tubulina e fator de alongação 1-alfa), o gênero *Pestalotiopsis* foi segregado em mais dois novos gêneros: *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*. Esses três gêneros são facilmente distinguíveis com base em suas células conidiogênicas e na cor de suas células conidiais. Assim, foram introduzidas 11 novas espécies em *Neopestalotiopsis*, 24

em *Pestalotiopsis* e duas em *Pseudopestalotiopsis* (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014).

Devido a esta recente revisão do gênero, a maioria das informações disponíveis é sobre o gênero *Pestalotiopsis*, o qual é comumente isolado como endófito (WEI et al., 2007; GOMES-FIGUEIREDO et al., 2007). Ele já foi isolado das famílias Podocarpaceae, Theaceae e Taxaceae (WEI et al., 2007), das espécies *Pinus armandii*, *Ribes* spp. (HU et al., 2007), *Rhizophora apiculata*, *Cocos nucifer*, *Taxus yunnanensis*, *Camellia sasanqua*, *Fragraea bodenii*, *Cordemoya integrifolia* (JIGUANG; TONG, 2003), *Maytenus ilicifolia* (GOMES-FIGUEIREDO et al., 2007), *R. mucronata* (ZHOU et al., 2017), entre outras. Esse gênero de fungo é conhecido pela produção de compostos com aplicações medicinais (TEJESVI et al., 2008), como antioxidante, anti-hipertensiva, antimicrobiana (TEJESVI et al., 2008; ZHAO et al., 2015) e antifúngica (STROBEL et al., 2002); aplicações agrícolas, como atividade anti-oomiceto (LI; STROBEL, 2001) e antifúngica a *Alternaria carthami*, *Fusarium oxysporum*, *F. verticilloides*, *Macrophomina phaseolina*, *Phoma sorghina* e *Sclerotinia sclerotiorum* (TEJESVI et al., 2007); além de produzir compostos com aplicações industriais (XU; EBADA; PROKSCH, 2010; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2011).

Com o gênero *Neopestalotiopsis* sp., há o trabalho recente de Costa e colaboradores (2017), relatando a biotransformação de 2-metil-6-alquilpiperidina em piperidina.

6.3.2 Isolamento e identificação do composto ativo

Após cultivo em meio líquido, filtração e partição com acetato de etila, foi obtido o extrato AcOEt (1,0 g). Este apresentou 23 % de atividade contra o crescimento micelial de *P. sojae* e foi fracionado de forma biomonitorada até a obtenção do composto puro ativo 1B3P1 (1,2 mg), com 58 % de atividade contra *P. sojae*. O composto puro foi analisado por técnicas espectroscópicas (EM e RMN) e comparado com os compostos disponíveis no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais (DPN) e do SciFinder.

Com os dados obtidos nos espectros de massas (Informações complementares, Figuras S1-S3), pode-se observar os valores de m/z 367,0649 $[M+H]^+$ e 389,0451 $[M+Na]^+$. Dessa forma, sugere-se a massa molecular de 366,0570 Da para o composto. Realizando-se buscas no SciFinder e no DPN por essa massa, foram encontrados 6 compostos. Entretanto, nenhum desses compostos condiz com o espectro de RMN de 1H obtido (Informações complementares, Figura S4). Observações adicionais nos permitiram correlacionar os

deslocamentos de hidrogênio (δ H) do composto isolado 1B3P1 (**1**) com o composto fumiquinona B (2,6-hidroxi-5-metoxi-3-metilciclohexa-2,5- dieno-1,4-diona, CAS 1011259-29-2), um derivado da quinona (grupo das benzoquinonas), Figura 1. A fumiquinona B possui uma massa molecular de 184 Da, a qual pode ser verificada nos espectros de massas nos modos positivo e negativo (m/z 185 $[M+H]^+$ e 183 $[M-H]^-$), respectivamente. Isso nos sugere que pode se tratar de uma molécula nova (estrutura proposta na Figura 2), cuja estrutura química provavelmente é dímera do composto fumiquinona B.

Fumiquinona B (1). Cristais roxos, UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ) 226 (2,400), 269 (3,700), 292 (3,200). m/z 185,0424 $[M+H]^+$ e 207 $[M+Na]^+$, fórmula molecular $C_8H_8O_5$ (184,0345 Da). RMN de 1H (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 1,74 (s, 3H), 3,72 (s, 3H).

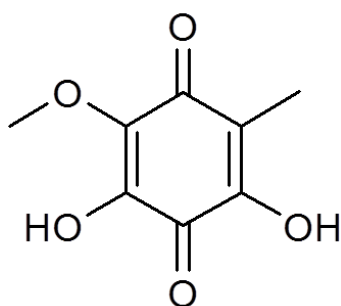


Figura 1 - Estrutura química da fumiquinona B ($C_8H_8O_5$).

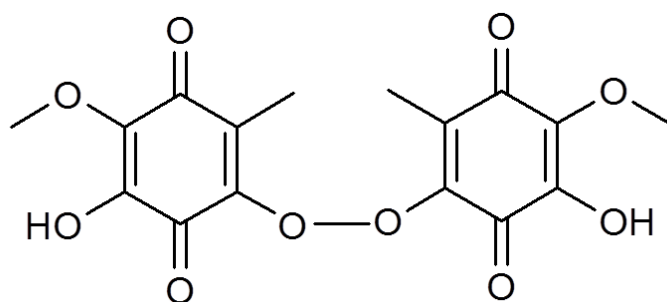


Figura 2 - Estrutura química proposta para um novo composto ($C_{16}H_{14}O_{10}$), dímero da fumiquinona B ($C_8H_8O_5$), produzido por *Neopetalotopsis* sp., endófito de *B. fischeri*.

As evidências que apontam que esse composto de massa molecular 366,0570 Da pode ser um dímero da fumiquinona B se devem ao fato de que tanto o RMN de 1H como as absorções máximas no UV são condizentes com o composto fumiquinona B. No espectro de massas de alta resolução podemos observar o valor protonado 367,0649 $[M+H]^+$ na

intensidade de 100 % e, numa intensidade menor, de 20 %, o valor protonado 185,0424 [M+H]⁺. Esse fato pode ocorrer se a ligação feita entre os oxigênios das duas partes da molécula for rompida, liberando as moléculas de fumiquinona B.

As quinonas são um grupo de compostos naturais encontrados em fungos, bactérias e plantas (MONKS; JONES, 2002). Elas geralmente são coloridas e semivoláteis, pertencentes à classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos oxigenados (HPAO). A estrutura das quinonas apresenta dois grupamentos carbonilas em um anel insaturado de seis átomos de carbono, e elas são classificadas como benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas ou fenantraquinonas, de acordo com o tipo de sistema aromático (SOUSA; LOPES; ANDRADE, 2016).

As quinonas são sintetizadas essencialmente através das via dos policetídeos ou da via do shikimato, vias biossintéticas ausentes em animais (THOMPSON, 1971). A reatividade biológica das quinonas nos sistemas biológicos pode ser atribuída ao fato de serem oxidantes e eletrófilos. Em relação à toxicidade, esta é influenciada pela estrutura química, principalmente por efeitos substituintes (MONKS; JONES, 2002). Eles têm um papel na fotossíntese, como transportadores de elétrons. Várias quinonas são vitaminas ou têm atividade antioxidante. Derivados de quinonas são comuns em moléculas biologicamente ativas. Muitas das drogas clinicamente aprovadas ou ainda em ensaios clínicos contra câncer são compostos relacionados a quinonas (EL-NAJJAR et al., 2011). As quinonas, como por exemplo, a 1,4-naftoquinona, a 1,2-naftoquinona, a 1,4-benzoquinona, e a antraquinona, apresentam atividade antifúngica moderada a *Colletotrichum* spp. (MEAZZA et al., 2003).

O composto fumiquinona B já foi isolado dos fungos *Aspergillus fumigatus* (HAYASHI et al., 2007) e *Xylaria feejeensis* (GARCÍA-MENDEZ et al., 2016).

O composto isolado apresentou 58 % de inibição do crescimento micelial de *P. sojae* pelo ensaio de difusão em disco (0,2 mg composto disco⁻¹) e foi então testado contra esporos de *P. sojae* pelo ensaio de microdiluição (Figura 3).

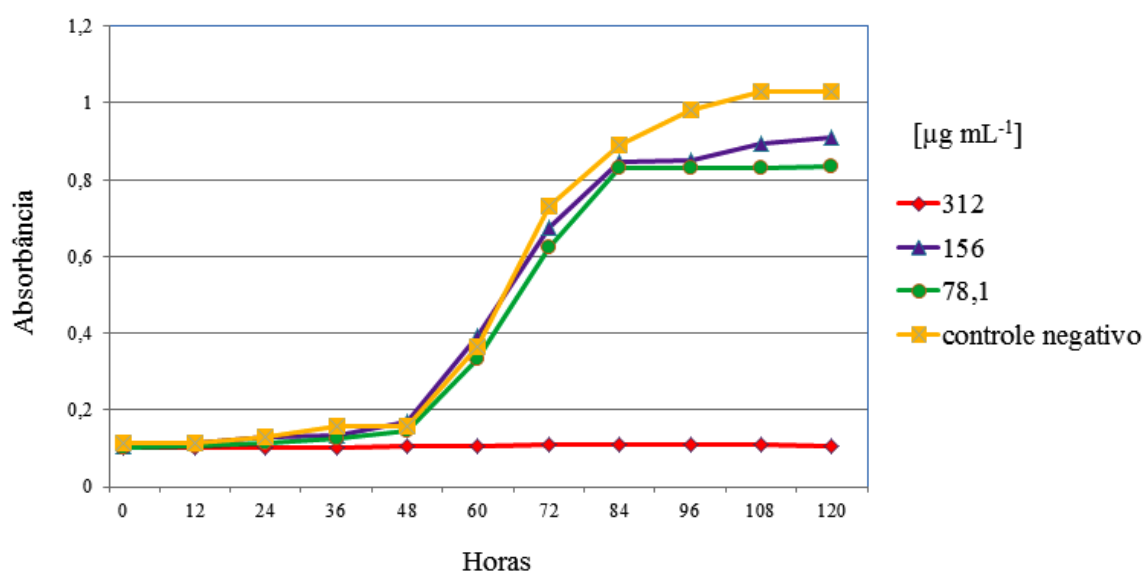


Figura 3 - Dados obtidos no ensaio de microdiluição do composto isolado contra esporos de *P. sojae*.

O ensaio foi finalizado após 120 h de incubação; o controle negativo mostrado no gráfico corresponde ao crescimento de *P. sojae* na presença de DMSO. Percebe-se que as concentrações de 156 e 78,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ só foram capazes de inibir o crescimento de *P. sojae* durante as primeiras 48 de ensaio. Entretanto, após esse período, houve o crescimento fúngico. Já a concentração de 312 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do composto manteve a inibição constante durante as 120 horas. Dessa forma, a concentração inibitória mínima (MIC) do composto isolado é 312 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A MIC do fungicida comercial difenoconazol (controle positivo, não mostrado no gráfico) foi de 2,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (5,9 μM). O difenoconazol pertence ao grupo dos triazoles que atuam sobre a membrana celular dos fungos (ODDS et al., 2003). Embora a MIC seja superior ao apresentado pelo fungicida comercial, o composto isolado pode apresentar um modo de ação diferente, já que pertence ao grupo das quinonas.

Devido à sugestão de o composto ser uma molécula nova, dímero da fumiquinona B, mas com pouca estabilidade entre as duas partes, não se pode afirmar se a atividade é devida à ação do composto de massa 366,0570 Da ou da fumiquinona B.

O composto fumiquinona B já é conhecido na literatura por sua atividade nematicida contra *Bursaphelenchus xylophilus* (HAYASHI et al., 2007) e por suas propriedades fitotóxicas (GARCÍA-MENDEZ et al., 2016).

Está sendo relatado aqui o isolamento de um composto de massa molecular 366,0570 Da do fungo endofítico *Neopestalotiopsis* sp., o qual possui atividade antifúngica ao fitopatógeno *P. sojae* e que pode se tratar de um composto inédito na literatura.

6.4 Conclusão

Do meio metabólico de *Neopestalotiopsis* sp. AM29, endófito da planta *B. fischeri*, isolou-se um composto de massa molecular 366,0570 Da, o qual pode ser inédito na literatura. Foi proposta aqui uma estrutura química para esse composto, na forma de um dímero do composto fumiquinona B, com base em dados de espectrometria de massas e RMN de ^1H . O composto isolado se mostrou ativo nos ensaios micelial e de esporos contra *P. sojae*, um fitopatógeno de relevância mundial na cultura da soja. Isso demonstra o potencial ainda pouco explorado do gênero *Neopestalotiopsis* como produtor de novos compostos com atividade biológica. Análises complementares precisam ser realizadas para a elucidação estrutural inequívoca do composto isolado neste estudo.

Referências

- CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard - Second Edition. In: **CLSI document M38-A2**. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- COLUSSI, L.; WEISS; C.R.; SOUZA; A.R.L.; OLIVEIRA, L. O agronegócio da soja: Uma análise da rentabilidade do cultivo da soja no Brasil. **Espacios**, Caracas, v.37, n.16, p. 23, 2016.
- COSTA, J.H.; DA COSTA, B.Z.; DE ANGELIS, D.A.; MARSAIOLI, A.J. Monoamine oxidase and transaminase screening: biotransformation of 2-methyl-6-alkylpiperidines by *Neopestalotiopsis* sp. CBMAI 2030. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.101, n.15, p.6061–6070, 2017.
- ELLIS, M.B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608p.
- ELLIS, M.B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1976. 507p.
- EL-NAJJAR, N.; GALI-MUHTASIB, H.; KETOLA, R.A.; VUORELA, P.; URTTI, A.; VUORELA, H. The chemical and biological activities of quinones: overview and implications in analytical detection. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v.10, p.353–370, 2011.
- FOSTER, J.W.; WOODRUFF, H.B. Microbiological aspects of penicillin I. Methods of assay. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.46, n.2, p.187–202, 1943.
- GARCÍA-MENDEZ, M.C.; MACÍAS-RUVALCABA, N.A.; LAPPE-OLIVERAS, P.; HERNANDEZ-ORTEGA, S.; MACÍAS-RUBALCAVA, M.L. Phytotoxic potential of

secondary metabolites and semisynthetic compounds from endophytic fungus *Xylaria feejeensis* strain SM3e- 1b isolated from *Sapium macrocarpum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.64, p.4255–4263, 2016.

GOMES-FIGUEIREDO, J.; PIMENTEL, I.C.; VICENTE, V.A.; PIE, M.R.; KAVACORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L.; PEREIRA, J.O.; DE SOUZA, A.Q.; GLIENKE, C. Bioprospecting highly diverse endophytic *Pestalotiopsis* spp. with antibacterial properties from *Maytenus ilicifolia*, a medicinal plant from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.53, n.10, p.1123-1132, 2007.

GOODALL-COPESTAKE, W.P.; HARRIS, D.J.; HOLLINGSWORTH, P.M. The origin of a mega-diverse genus: dating *Begonia* (Begoniaceae) using alternative datasets, calibrations and relaxed clock methods. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.159, n.3, p.363–380, 2009.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, London, v.41, n.48, p.95-98, 1999.

HAYASHI, A.; FUJIOKA, S.; NUKINA, M.; KAWANO, T.; SHIMADA, A.; KIMURA, Y. Fumiquinones A and B, nematocidal quinones produced by *Aspergillus fumigatus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.71, n.7, p.1697-1702, 2007.

HEPPERLY, P.R.; SINCLAIR, J.B. Quality losses in Phomopsis-infected soybean seeds. **Phytopathology**, St. Paul, v.68, p.1684-1687, 1978.

HU, H. L., JEEWON, R., ZHOU, D. Q., ZHOU, T. X., HYDE, K. D. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and β (tubulin gene phylogenies). **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.24, p.1–22, 2007.

JIGUANG, W.; TONG, X. Biodiversity of endophytic fungi *Pestalotiopsis*. **Chinese Biodiversity**, Beijing, v.11, n.2, p.162-168, 2003.

LEADBEATER, A. Recent developments and challenges in chemical disease control. **Plant Protection Science**, Prague, v.51, p.163–169, 2015.

LI, J.Y.; STROBEL, G.A. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jester*. **Phytochemistry**, New York, v.57, n.2, p.261-265, 2001.

MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N.; GUO, L-D.; CHUKEATIROTE, E.; BAHKALI, A.H.; HYDE, K.D. *Pestalotiopsis* - morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.50, p.167–187, 2011.

MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N.; HYDE, K.D.; GROENEWALD, J.Z.; XU, J.; CROUS, P.W. *Pestalotiopsis* revisited. **Studies in Mycology**, Baarn, v.79, p.121-186, 2014.

- MEAZZA, G.; DAYAN, F.E.; WEDGE, D.E. Activity of quinones on *Colletotrichum* species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.51, n.13, p.3824–3828, 2003.
- MONKS, T.T.J.; JONES, D.C. The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v.3, p.425-438, 2002.
- MONTOYA, Q.V.; MEIRELLES, L.A.; CHAVERRI, P.; RODRIGUES, A. Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v.109, n.5, p.633-651, 2016.
- MORGAN-JONES, G. The *Diaporthe Phaseolorum* complex of soybean. **Fitopatologia Brasileira**, Brasileira, v.17, p.359-367, 1992.
- ODDS, F.C.; BROWN, A.J.P.; GOW, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.11, n.6, p.272-279, 2003.
- PEREIRA, E.B.C.; PEREIRA, A.V.; FRAGA, A.C. Seed quality of early maturing soybean cultivars from different sowing dates. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Rio de Janeiro, v.35, n.8, p.1653-1662, 2000.
- PEDERSEN, P.; GRAU, C.R. Effect of agronomic practices and soybean growth stage on the colonization of basal stems and taproots by var. **Crop Science**, New York, v.50, p.718-722, 2010.
- PETRINI, O. Fungal Endophytes in Tree Leaves. In: Andrews, J.H.; Hirano, S.S. (Eds.) **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer, 1991. p.179-197.
- RIBERA, A.E.; ZUÑIGA, G. Induced plant secondary metabolites for phytopathogenic fungi control: a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Valdivia, v.12, n.4, p.893-911, 2012.
- SANTOS, J.M.; VRANDECIC, K.; COSIC, J.; DUVNJAK, T.; PHILLIPS, A.J.L. Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. **Persoonia**, Leiden, v.27, p.9-19, 2011.
- SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.A.; LEVESQUE, C.A.; CHEN, W.; FUNGAL BARCODING CONSORTIUM. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.109, n.16, p.6241-6246, 2012.
- SOLARTE, F.; MUÑOZ, C.G.; MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N.; ÁLVAREZ, E. Diversity of *Neopestalotiopsis* and *Pestalotiopsis* spp., Causal Agents of Guava Scab in Colombia. **Plant Disease**, St. Paul, p.1-32, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0068-RE>. Acesso 19 novembro 2017.

SOUSA, E.T.; LOPES, W.A.; ANDRADE, J.B. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, São Paulo, v.39, n.4, p.486-495, 2016.

STROBEL, G.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J.K.; ARIF, A.M.; GRANT, D.M.; FUNG, P.C.W.; CHAU, R.M.W. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, New York, v.60, n.2, p.179–183, 2002.

TEJESVI, M.V.; KINI, K.R.; PRAKASH, H.S.; SUBBIAH, V.; SHETTY, H.S. Antioxidant, antihypertensive, and antibacterial properties of endophytic *Pestalotiopsis* species from medicinal plants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.54, n.9, p.769-80, 2008.

TEJESVI, M.V.; KINI, K.R.; PRAKASH, H.S.; SUBBIAH, V.; SHETTY, H.S. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.1, p.1-18, 2007.

THE PLANT LIST (2013). Version 1.1. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/> Acesso 01 janeiro 2017.

THOMPSON, R.H. **Naturally occurring quinones**. London: Academic Press, 1971. 732p.

TORMEN, N.R. **Variação na incidência da seca da haste da soja (*Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*) devido ao espaçamento entre linhas, cultivar e aplicação de fungicida**. 2014. 70p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2014.

UDAYANGA, D.; CASTLEBURY, L.A.; ROSSMAN, A.Y.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K.D. The *Diaporthe sojae* species complex: Phylogenetic re-assessment of pathogens associated with soybean, cucurbits and other field crops. **Fungal Biology**, Amsterdam, v.119, n.5, p.383-407, 2015.

WATANABE, T. **Pictorial atlas of soil and seed fungi morphologies of cultured fungi and key to species**. 2 ed. London: CRC Press, 2002. 426p.

WCSP 2014. 'World Checklist of Selected Plant Families. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <http://wfo.kew.org/taxon/urn:kew.org:wcs:taxon:361594>. Acesso 19 novembro 2017.

WEI, J.G., XU, T., GUO, L.D., LIU, A.R. ZHANG, Y. AND PAN, X.H. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of Podocarpaceae, Theaceae and Taxaceae in southern China. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.24, p.55-74, 2007.

XU, J.; EBADA, S.S.; PROKSCH, P. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v.44, n.1, p.15–31, 2010.

ZHAO, S.; CHEN, S.; WANG, B.; NIU, S.; WU, W.; GUO, L.; CHE, Y. Four new tetramic acid and one new furanone derivatives from the plant endophytic fungus *Neopestalotiopsis* sp. **Fitoterapia**, Milano, v.103, p.106–112, 2015.

ZHOU, J.; LI, G.; DENG, Q.; ZHENG, D.; YANG, X.; XU, J. Cytotoxic constituents from the mangrove endophytic *Pestalotiopsis* sp. induce G₀/G₁ cell cycle arrest and apoptosis in human cancer cells. **Natural Product Research**, Milton Park, v.1, p.1-5, 2017.

ZORRILLA, G.; KNAPP, A.D.; MCGEE, D.C. Severity of *Phomopsis* seed decay, seed quality evaluation, and field performance of soybean. **Crop Science**, New York, v.34, p.172–177, 1994.

Informações complementares

Figura S1. Espectro de massas do composto 1B3P1 (modo positivo)

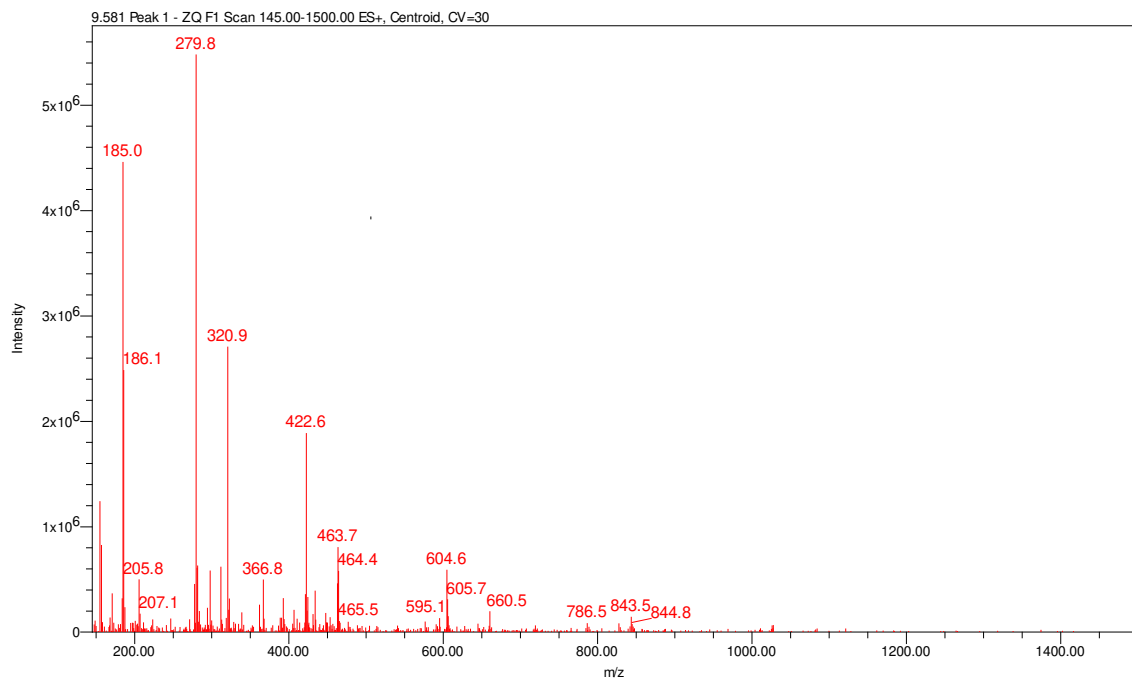


Figura S2. Espectro de massas do composto 1B3P1 (modo negativo)

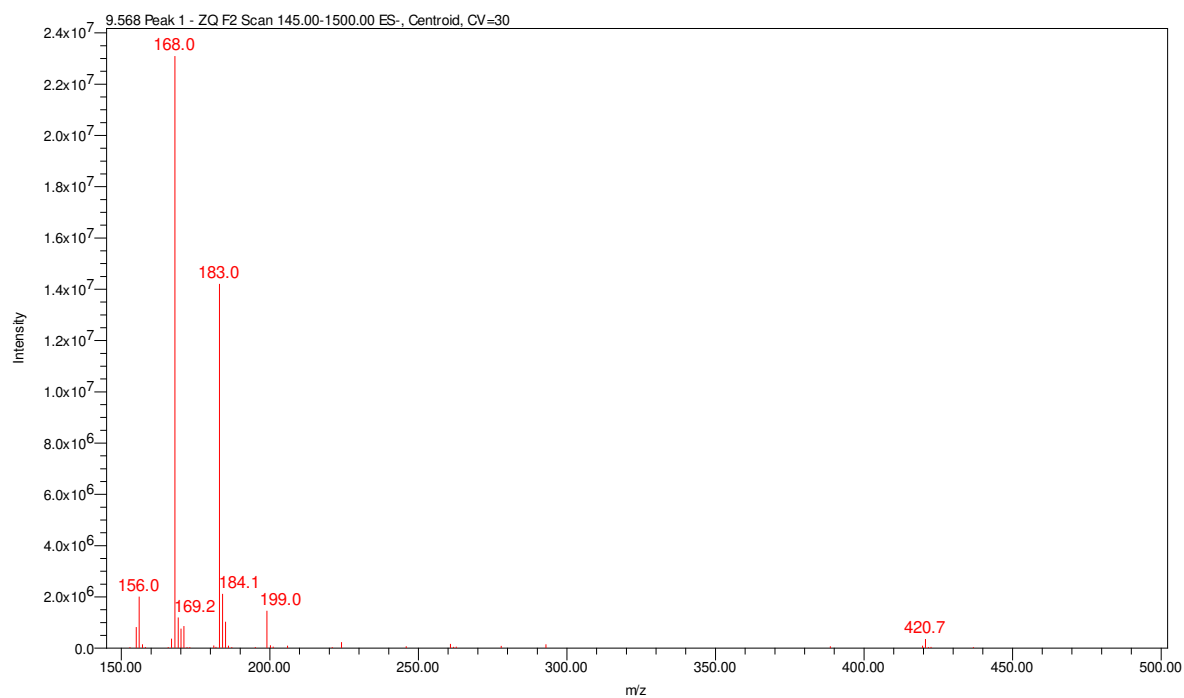


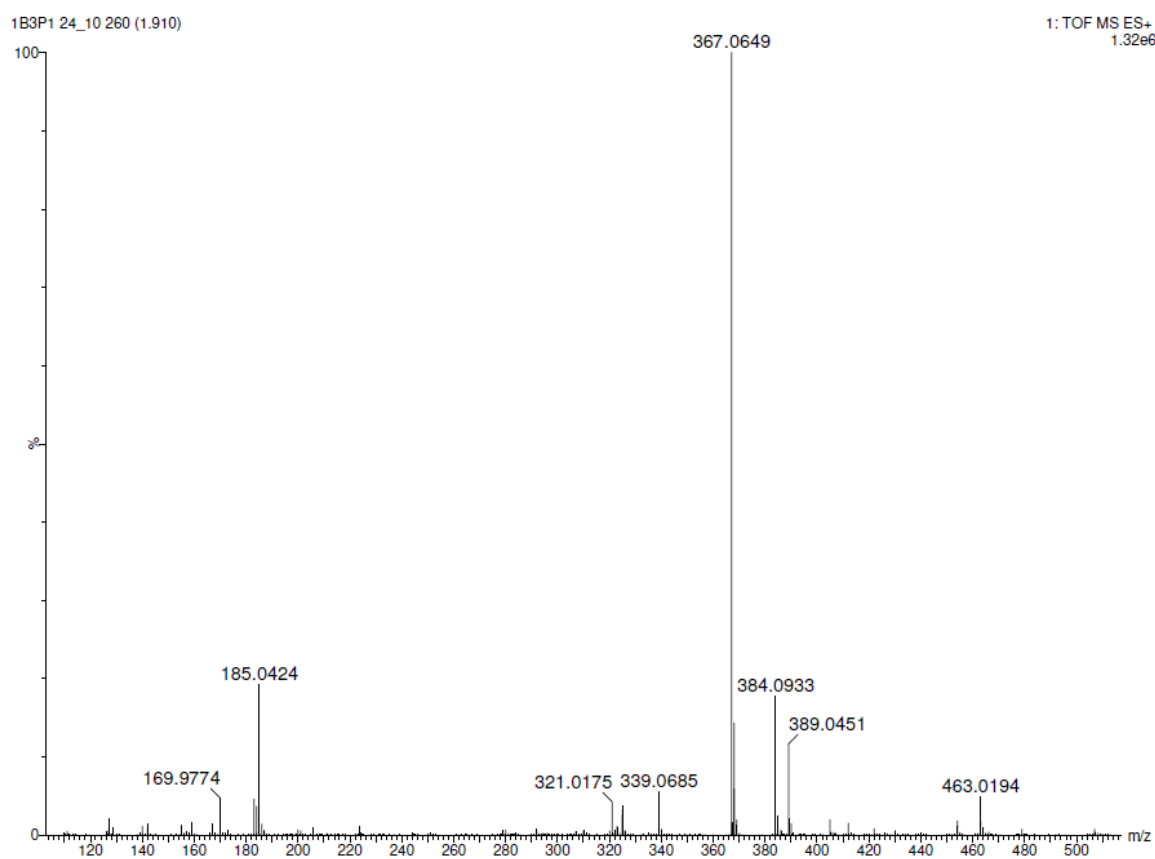
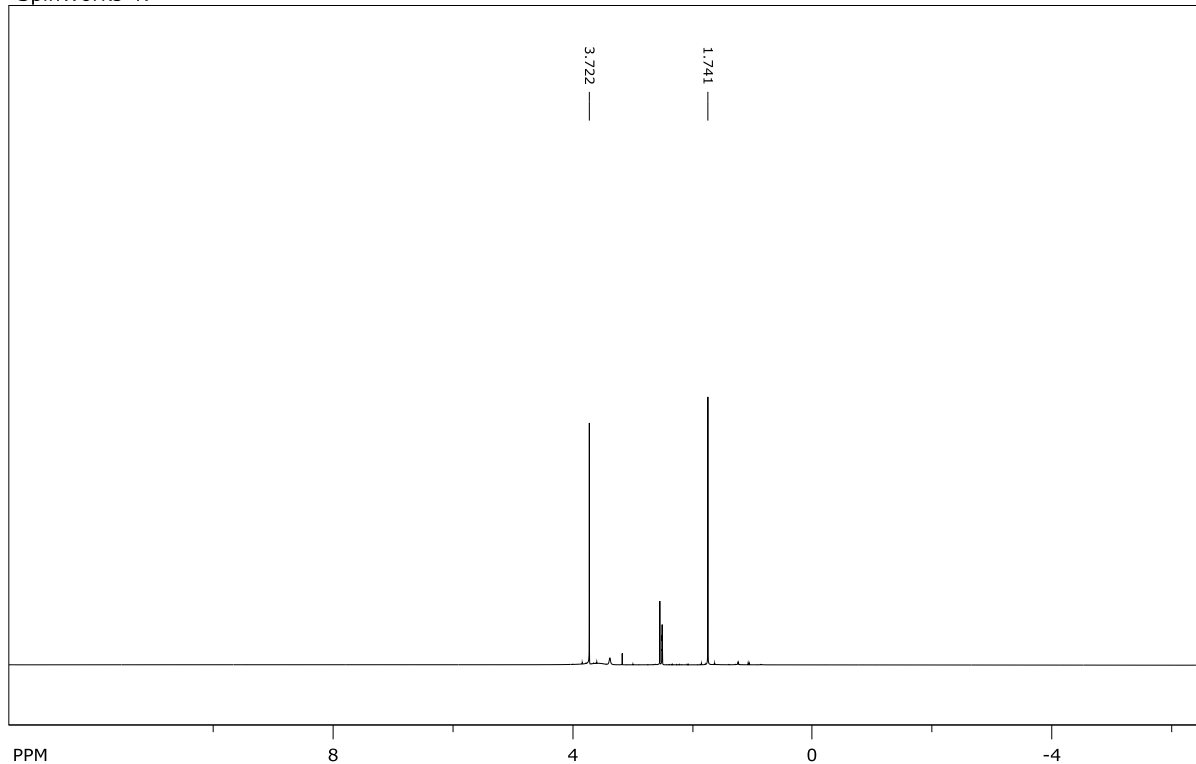
Figura S3. Espectro de massas de alta resolução do composto 1B3P1

Figura S4. RMN do composto 1B3P1 em DMSO_{d6}

SpinWorks 4:



file: ...sktop\SimoneLira_Diana_1B3P1\1\fid exp: <zgcpr>
transmitter freq.: 600.232049 MHz
time domain size: 65536 points
width: 12019.23 Hz = 20.0243 ppm = 0.183399 Hz/pt
number of scans: 32

freq. of 0 ppm: 600.230002 MHz
processed size: 65536 complex points
LB: 0.300 GF: 0.0000

7 **CAPÍTULO 4 - SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS COM POTENCIAL METABÓLICO CONTRA A FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus***

RESUMO

Os biofilmes são comunidades de bactérias aderentes à superfície, sendo formados por uma matriz extracelular hidratada de polissacarídeos complexos e proteínas, a qual confere resistência aos antibióticos. As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* são exemplos de patógenos oportunistas que persistem porque são formadores de biofilmes, nos quais estão protegidos. Visando novas opções de antibióticos a estas bactérias, 51 fungos endofíticos isolados da planta *B. venosa*, da Ilha de Alcatrazes, tiveram seus metabólitos secundários investigados. Através de um screening inicial, os fungos de código D28 e D29 foram selecionados por seus extratos se apresentarem simultaneamente ativos às duas bactérias. Os isolados foram identificados por análises moleculares como sendo *Aspergillus* sp. e *Diaporthe* sp., respectivamente. A partir do extrato de *Aspergillus* sp. foram isolados 4 compostos puros, e do extrato de *Diaporthe* sp. 5 compostos puros, cujas frações precursoras apresentaram-se ativas contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Este trabalho demonstra o potencial dos compostos produzidos por estes fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Diaporthe* na produção de antibióticos.

Palavras-chave: *Aspergillus* sp.; atividade antimicrobiana; *Begonia venosa*; *Diaporthe* sp.; Ilha de Alcatrazes

ABSTRACT

Biofilms are communities of bacteria adhering to the surface, being formed by a hydrated extracellular matrix of complex polysaccharides and proteins, which confers resistance to the antibiotics. The bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* are examples of opportunistic pathogens that persist because they are biofilm builders, in which they are protected. Aiming for new antibiotic options for these bacteria, 51 endophytic fungi isolated from the plant *B. venosa* from Alcatrazes Island had their secondary metabolites investigated. Through an initial screening, the fungi code D28 and D29 were selected because their extracts were simultaneously active to both bacteria. The isolates were identified by molecular analyzes as *Aspergillus* sp. and *Diaporthe* sp., respectively. From the extract of *Aspergillus* sp. were isolated 4 pure compounds, and from the extract of *Diaporthe* sp. 5 pure compounds, whose precursor fractions were active against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. This work demonstrates the potential of the compounds produced by these fungi of the genus *Aspergillus* and *Diaporthe* in the production of antibiotics.

Keywords: *Aspergillus* sp.; antimicrobial activity; *Begonia venosa*; *Diaporthe* sp.; Alcatrazes Island

7.1 Introdução

Os biofilmes são uma forma principal de crescimento microbiano e são fundamentais para o desenvolvimento de um amplo espectro de infecções no hospedeiro humano. Os biofilmes bacterianos são os mais comuns, mas muitos fungos medicamente importantes também produzem biofilmes, como *Candida* e *Pneumocystis* (FANNING; MITCHELL, 2012).

Se tratando de biofilmes bacterianos, eles podem ser definidos como comunidades multicelulares de bactérias aderentes a alguma superfície (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013), sendo formados por uma matriz extracelular hidratada de polissacarídeos complexos e proteínas, a qual confere resistência aos antibióticos (WATNICK; KOLTER, 2000). Os biofilmes podem ter evoluído como uma resposta adaptativa aos estresses ambientais, pois sua formação é um processo complexo que envolve redes reguladoras sofisticadas (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013).

Estima-se que os biofilmes estão presentes em 80 % das infecções microbianas em seres humanos (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). E, em ambientes naturais, 95 a 99 % dos micro-organismos existem sob a forma de biofilmes (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007).

Na natureza, o biofilme é quase sempre uma comunidade microbiana multiespecífica que abriga bactérias que ficam ou deixam o biofilme com alguma finalidade, compartilham seu material genético a altas taxas e preenchem nichos distintos no biofilme. Assim, o biofilme natural é menos como um organismo altamente desenvolvido e mais como uma comunidade multicultural complexa, altamente diferenciada (WATNICK; KOLTER, 2000). *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus* são exemplos de micro-organismos que persistem porque são adeptos da formação de biofilmes, nos quais estão protegidos (STEWART; COSTERTON, 2001; COLEMAN et al., 2009; GIL et al., 2014).

Os biofilmes são um problema em diversos setores. Na indústria de laticínios, os biofilmes podem ser uma fonte de contaminação recalcitrante, causando deterioração de alimentos e possíveis fontes de problemas de saúde pública, tais como surtos de patógenos transmitidos por alimentos (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010). Eles frequentemente contaminam o sistema de tubulação usado para resfriar instrumentos nos consultórios odontológicos (COLEMAN et al., 2009), e se formam também como placa dental, onde podem causar cárie e doença nas gengivas (CHANDKI; BANTHIA; BANTHIA, 2011; SAINI; SAINI; SHARMA, 2011; RYBTKE et al., 2015).

Infecções em próteses, implantes e dispositivos médicos mediados por biofilmes também são comuns (GBEJUADE; LOVERING; WEBB, 2015; GRIES; KIELIAN, 2017). Os biofilmes são a causa subjacente de uma variedade de outras infecções, tais como periodontite, otite média, pneumonia de fibrose cística, sinusite crônica, infecções crônicas da ferida, infecções musculoesqueléticas, fascite necrotizante, infecção do trato biliar, osteomielite, prostatite bacteriana, válvula nativa endocardite, melioidose, infecção do trato urinário, entre outras (RYBTKE et al., 2015).

As infecções crônicas provocadas por biofilmes bacterianos são muito difíceis de tratar devido à natureza recalcitrante dos biofilmes (GIL et al., 2014), e também porque sua matriz extracelular retarda a difusão de antibióticos (TSENG et al., 2013). Além disso, em muitos casos, o uso de compostos antimicrobianos convencionais não é capaz de erradicar infecções que tem a presença de biofilmes.

Os mecanismos de resistência nos biofilmes são diferentes dos plasmídeos, transposons e mutações que conferem resistência inata a células bacterianas individuais. Nos biofilmes, a resistência depende de estratégias multicelulares (STEWART; COSTERTON, 2001; GIL et al., 2014).

Assim sendo e diante da necessidade de desenvolver medidas alternativas para combater os biofilmes, o objetivo foi realizar um *screening* dos fungos endofíticos isolados da planta *B. venosa*, coletada na Ilha de Alcatrazes, em busca de compostos ativos que previnam a formação biofilme por *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

7.2 Material e Métodos

7.2.1 Procedimentos gerais

Os espectros de massas de alta resolução foram adquiridos em um Espectrômetro de Massas Q-TOF Maxis Impact (software Bruker Compass DataAnalysis 4.2) em modo positivo, com ionização eletrospray. As análises foram realizadas por injeção direta, com energia de ionização de 3000 V e faixa de detecção entre 100 e 2500 Da.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi conduzida em dois equipamentos: HPLC Gilson modelo GX-271 Liquid Handler, utilizando o programa Trilution LC, com coluna preparativa Kromasil C₁₈ (150 x 10 mm, 12,5 µm); e HPLC analítico com detector de massas da Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS 1200

Series operando com o programa Agilent Mass Hunter, com coluna analítica C₁₈ Nucleosil (125 mm x 20 mm, 5 µm). A extração em fase sólida foi realizada em colunas Sep-pak de sílica gel e C₁₈ de diferentes dimensões (Phenomenex). Cromatofolhas de sílica gel com detector de fluorescência (Macherey-Nagel) foram utilizadas para a cromatografia em camada delgada (CCD), sendo que os spots foram inspecionados sob luz UV (254 e 365 nm).

7.2.2 Micro-organismos

As linhagens de bactérias *Staphylococcus aureus* DSM 1104 e *Pseudomonas aeruginosa* PA14 usadas nos bioensaios foram compradas da DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Estas foram mantidas em ágar LB.

7.2.3 Identificação botânica e fúngica

As 51 linhagens de fungos endofíticos usadas no screening foram isoladas da planta *Begonia* sp., (S24°06.027' W45°41.640') coletada na Ilha de Alcatrazes, Brasil, em setembro de 2013. A planta foi identificada com base nas características morfológicas pelos professores Dr. Marco Antônio de Assis (Departamento de Botânica, UNESP – Rio Claro) e Dra. Eliane Jacques (Departamento de Botânica, UFRJ- Rio de Janeiro), e um exemplar foi depositado no Herbário Rioclarense (HRCB).

Para o isolamento dos endófitos, as folhas passaram por um processo de desinfecção superficial segundo Petrini (1991), conforme descrito no capítulo 1 deste trabalho.

A identificação de algumas linhagens em nível de gênero foi realizada por Correia (2016) e Correia e colaboradores (2017).

As linhagens selecionadas para o estudo químico foram identificadas molecularmente. Para a extração de DNA, foi usado o kit NucleoSpin Plant II (Macherey Nagel). A identificação dos isolados foi feita sequenciando as regiões espadoras transcritas internas (ITS), utilizando os primers ITS1F e ITS4. Os amplicons foram sequenciados pela Eurofins, e analisados usando o Sequencher 4.10.1.

7.2.4 Fermentação

Os isolados fúngicos foram primeiramente crescidos em placas de Petri contendo meio sólido malte 2 %. Em seguida, 3 plugs de cada linhagem foram transferidos para cada frasco

Erlenmeyer (contendo 50 mL de meio líquido malte 2 % ou meio PYE). O meio PYE consistiu em 1,25 g de extrato de levedura, 5 g de D-glicose e 1,25 g de peptona de soja para cada litro de água destilada. Estes foram incubados a 20 °C, no escuro, por 24 dias. Após esse período, foram filtrados, extraídos com acetato de etila e testados para atividade antimicrobiana e antibiofilme. Para o screening inicial foram cultivados 100 mL de cada tipo de meio para as 51 linhagens, totalizando 102 extratos, e para as linhagens selecionadas 5000 mL.

7.2.5 Investigação da atividade antimicrobiana e antibiofilme dos extratos dos endófitos

Os extratos fúngicos foram testados para verificação de atividade antibiofilme contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A formação de biofilme foi avaliada pelo método cristal violeta. 150 µl da suspensão bacteriana diluída em meio CASO (para *P. aeruginosa*) ou meio CASO + 4 % glicose (para *S. aureus*), padronizado de acordo com a escala 0,5 de McFarland, foram adicionados a microplacas de 96 poços. Os compostos foram diluídos em MeOH na concentração de 10 mg mL⁻¹ (para extratos acetato) e 5 mg mL⁻¹ (para frações), e um volume de 8 µL foi aplicado. Após o período de incubação (a 37 °C por 16 h), o conteúdo dos poços foi removido, e os poços foram lavados três vezes com solução salina estéril (PBS) a 0,9 %. As bactérias que permanecerem aderidas foram coradas com cristal violeta 0,1 % durante 15 minutos à temperatura ambiente. O cristal violeta residual foi retirado por meio de mais duas lavagens com solução salina. A mancha ligada às células foi solubilizada com ácido acético 30 % e a absorvância medida a 570 nm. MeOH foi usado como controle negativo à formação de biofilme.

7.2.6 Purificação e elucidação estrutural

A fração acetato de etila da linhagem D28 (3,7 g) foi separada em coluna Sep-pak C₁₈ com um gradiente de H₂O: MeOH (de 90 H₂O: 10 MeOH até 0 H₂O: 100 MeOH), onde foram coletadas 6 frações (1-6). As frações D28-1 (65 mg) e D28-5 (84 mg) apresentaram-se ativas e foram purificadas em HPLC semi-preparativo. O gradiente utilizado foi 20 % ACN + 0,05 % TFA: 80 % H₂O ultrapura + 0,05% TFA (0 - 3min), aumentando o gradiente de ACN até 100 % ACN em 33 minutos, com uma vazão de 15 mL min⁻¹. Os sinais de UV observados

foram 210 e 254 nm. Foram obtidas 4 frações com bom grau de pureza: D28-1-F6 (0,2 mg), D28-5-F3 (0,4 mg), D28-5-F6 (0,3 mg), D28-5-F7 (0,2 mg).

A fração acetato de etila do fungo D29 (1,78 g) foi separada em coluna Sep-pak de sílica, com um gradiente de CH₂Cl₂: MeOH (100 % CH₂Cl₂, 90 % CH₂Cl₂: 10 MeOH e 100 % MeOH) gerando 3 frações, sendo que a primeira fração foi ativa (203 mg). Esta foi aplicada em placas de sílica, e os pontos visíveis sob a luz UV foram raspados e solubilizados em acetona. As frações obtidas foram então purificadas em HPLC analítico, com gradiente inicial de 90 % H₂O ultrapura + 0,1 % ácido fórmico: 10 % ACN, aumentando a concentração de ACN gradualmente até 100 % em 12 min, com uma vazão de 0,4 mL min⁻¹. Foram obtidas 5 frações com bom grau de pureza: D29-2 (0,6 mg), D29-4.1 (0,8 mg), D29-5.2x (1 mg), D29-5.5 (0,1 mg) e D29-7.5 (0,2 mg).

7.3 Resultados e Discussão

7.3.1 Screening contra a formação de biofilme por *P. aeruginosa* e *S. aureus*

Um total de 51 linhagens de fungos endofíticos foram cultivadas em 2 meios (malte 2 % e PYE) e filtradas, resultado em 102 extratos. Após partição com acetato de etila, estes foram avaliados em ensaio biológico contra bactérias formadoras de biofilme. Os resultados obtidos com atividade mais promissora (> 64 % de inibição) são mostrados nas Tabelas 1 (meio malte 2 %) e 2 (meio PYE).

Tabela 1. Resultados obtidos em ensaio biológico na avaliação antimicrobiana dos extratos acetato de etila obtidos a partir do meio metabólito (em malte 2%)

Código da linhagem fúngica	% de inibição à formação de biofilme por <i>P. aeruginosa</i>	% de inibição à formação de biofilme por <i>S. aureus</i>
D28	86,33	70,40
D19	67,00	71,03
D20	65,33	63,40
D21	65,00	61,56
D22	64,00	32,56
D13	49,33	76,36
D34	29,66	73,33
D47	30,33	67,66
D35	21,33	65,60
D9	13,33	65,33
D18	5,33	64,00

Tabela 2. Resultados obtidos em ensaio biológico na avaliação antimicrobiana dos extratos acetato de etila obtidos a partir do meio metabólito (em meio PYE)

Código da linhagem fúngica	% de inibição à formação de biofilme por <i>P. aeruginosa</i>	% de inibição à formação de biofilme por <i>S. aureus</i>
D29	84,30	89,40
D31	83,93	85,60
D12	0	87,20
D22	6,60	86,46
D2	0	86,20
D28	0	85,76
D39	13,26	84,90
D48	0	84,83
D19	0	84,50
D16	0	81,76
D43	0	76,93
D47	0	76,20
D13	0	75,56
D40	0	72,96
D51	0	71,23
D38	7,00	69,56
D11	0	69,23
D41	0	66,83

Do total de 102 extratos acetato obtidos, 29 deles (28,43 %) apresentaram atividade inibitória maior que 64 % contra a formação de biofilme de pelo menos uma das bactérias avaliadas.

Quando utilizado o meio malte 2% (Tabelas S1 e S2, disponíveis nas informações complementares), 11 extratos (21,56 %) se mostraram promissores (com atividade superior a 64 %). Destes, somente 4 (D19, D20, D21 e D28) apresentaram atividade maior que 60 % simultaneamente para as 2 bactérias avaliadas. No geral, dos 51 extratos acetato, 26 apresentaram atividade a *P. aeruginosa* que variou entre 1 a 25 %; 14 extratos na faixa de 26 a 50 % de atividade; 1 extrato na faixa de 51 a 63 % de atividade, e 5 extratos sem atividade alguma à *P. aeruginosa*. Em relação à *S. aureus*, um extrato (D43) não possui atividade, enquanto os extratos acetato de 9 linhagens estão na faixa de 1 a 25 % de atividade; 17 extratos na faixa de 26 a 50 % de atividade, e 16 extratos na faixa de 51 a 63 % de atividade.

Já quando utilizado o meio PYE (Tabelas S2 e S3, disponíveis nas informações complementares), 18 extratos (35,29 %) se mostraram promissores (com atividade superior a 64 %), sendo que apenas 2 (D29 e D31) simultaneamente para as 2 bactérias (com inibição superior a 80 % em ambos os casos). Dos 51 extratos acetato, apenas 7 apresentaram atividade a *P. aeruginosa*, sendo que 2 deles superior a 80 % e os outros 5 na faixa de 6 a 14 %. Em relação à *S. aureus*, 5 extratos não possuem atividade, enquanto os extratos acetato de

12 linhagens estão na faixa de 1 a 25 % de atividade; 10 extratos na faixa de 26 a 50 % de atividade, e 6 extratos na faixa de 51 a 63 % de atividade.

Pode-se concluir que houve diferença na atividade apresentada pelas frações acetato dos mesmos endófitos quando cultivados em diferentes meios de cultivo. Isso comprova que metabólitos distintos são produzidos pelos fungos de acordo com os nutrientes disponíveis no meio de cultivo. O extrato de malte fornece carbono, proteínas e nutrientes para o crescimento fúngico, enquanto que a peptona de soja e a levedura são usadas como fontes de nitrogênio. O extrato de levedura também é rico em vitaminas hidrossolúveis, especialmente as do grupo B. Com o controle das fontes de carbono e nitrogênio, a produção de determinadas moléculas pode ser potencializada (HE et al., 2004). Isso afeta a quantidade e a diversidade dos metabólitos secundários fúngicos (ALDRED; MAGAN; LANE, 1999; XU et al., 2008; MOHANTY; PRAKASH, 2009; VANDERMOLEN et al., 2013), de modo que certos nutrientes são requeridos como precursores para a formação de determinados metabólitos secundários (IÓCA, 2015).

O screening foi realizado com duas bactérias, sendo uma Gram positiva (*S. aureus*) e a outra Gram negativa (*P. aeruginosa*).

A bactéria *P. aeruginosa* está envolvida em diferentes tipos de infecções associadas ao biofilme (RYBTKE et al., 2015), tais como feridas crônicas, otite média crônica, prostatite crônica e infecções pulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística. Cerca de 80% dos pacientes com fibrose cística apresentam infecção crônica do pulmão, causada principalmente por *P. aeruginosa* (CIOFU et al., 2015). A infecção permanece presente apesar da terapia antibiótica agressiva e é uma causa comum de morte em pacientes com fibrose cística devido a danos inflamatórios constantes nos pulmões (RYBTKE et al., 2015).

O ser humano é um dos reservatórios naturais de *S. aureus*, cujo principal nicho ecológico é a narina. Como comensal, *S. aureus* coloniza assintomaticamente cerca de 30 % da população (TONG et al., 2015). Entretanto, essa bactéria Gram positiva pode causar uma variedade muito ampla de infecções, desde infecções comuns de pele a infecções invasivas graves. Ela pode se disseminar do nariz para outras áreas do corpo. Uma vez transmitida para o sistema circulatório através de uma violação epitelial, cresce planctônicamente e regula fatores de adesão para a formação do biofilme. *S. aureus* continua a receber atenção considerável por se transformar de uma infecção aguda a uma infecção crônica e recorrente (FITZPATRICK; HUMPHREYS; O'GARA, 2005; BEENKEN et al., 2004).

Em infecções humanas onde há a presença de biofilme bacteriano, as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* podem ser encontradas juntamente (THOMSEN et al., 2015). Um bom

exemplo é nos pacientes com fibrose cística. No início da vida, eles adquirem infecções bacterianas agudas, muitas vezes causadas por *S. aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Burkholderia cepacia*, *P. aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia* (BAUERNFEIND et al., 1987; SAIMAN, 2004). Mais tarde, as infecções são dominadas por *S. aureus* e *P. aeruginosa* e, pela idade adulta, a maioria dos pacientes com fibrose cística sofre de infecções crônicas por *P. aeruginosa* (GILLIGAN, 1991; COLLIER et al., 2002; KOCH, 2002).

Entre as classes de antibióticos de amplo espectro no mercado, que combatem tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, podemos citar os β -lactâmicos (como a amoxicilina e a penicilina, que inibem a síntese da parede celular), os anfenicóis (como o cloranfenicol), as tetraciclina, os aminoglicosídeos (que inibem a síntese de proteínas), fluoroquinolonas e nitroimidazólicos (que inibem a síntese de DNA) (SINGH; YOUNG; SILVER, 2017).

Apesar da ampla gama de antibióticos disponíveis, as taxas de resistência a esses fármacos são muito elevadas (FIGUEIREDO et al., 2007; LAXMINARAYAN; CHAUDHURY, 2016; NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017).

Sendo assim, se faz interessante o isolamento de novos compostos com amplo espectro de atividade. Dessa forma, foram selecionadas as linhagens D28 (cultivo em meio malte 2 %) e D29 (meio PYE) para a bioprospecção de seus metabólitos secundários.

7.3.2 Identificação da planta e das linhagens fúngicas

A planta foi identificada por meio de características morfológicas e com a ajuda de chaves de identificação como sendo da espécie *Begonia venosa*. Um exemplar está depositado no Herbário de Rio Claro sob o n° de tombo HRCB 64227.

A espécie *B. venosa* é caracterizada por suas folhas suculentas, grossas, redondas e coriáceas, com numerosos pelos na superfície. Ela é nativa do Brasil e está criticamente ameaçada de extinção, podendo ser encontrada nas ilhas do litoral norte de São Paulo (PIERIK; TETTEROO, 1987; WANDERLEY, 2012; JACQUES, 2015).

A linhagem D28 (código original: P8M1F4, isolada em meio malte 2 %) foi identificada através de análises moleculares como sendo *Aspergillus* sp., e a linhagem D29 (código original: P8MF1F4, isolada em meio malte 2 % + folha estéril) como sendo *Diaporthe* sp. (anamorfo: *Phomopsis* sp.).

O gênero *Aspergillus* foi introduzido por Micheli (1729), sendo validado por von Haller (1768) e sancionado por Fries (1832). Ele compreende 344 espécies (FRISVAD, 2015) que compartilham uma estrutura comum de formação de esporos assexuados, o aspergillum. Aproximadamente um terço dessas espécies também produz um estágio sexual, sendo que todos menos cinco dos quais são homotáticas (GEISER, 2008). *Aspergillus* foi tradicionalmente associado a nove gêneros teleomorfos, mas dados filogenéticos sugerem que, juntamente com gêneros como *Polypaecilum*, *Phialosimplex*, *Dichotomomyces* e *Cristaspora*, *Aspergillus* forma um clado monofilético intimamente relacionado a *Penicillium* (SAMSON et al., 2014; FRISVAD; LARSEN, 2015).

O gênero *Aspergillus*, juntamente com *Penicillium* e *Talaromyces*, pertence ao grupo dos fungos mais quimicamente inventivos, produzindo uma ampla gama de metabólitos secundários (FRISVAD, 2015). Os projetos de sequenciamento do genoma mostraram que a diversidade de metabólitos secundários é muito maior em cada espécie que se pensava anteriormente, com enorme potencial para encontrar novos candidatos a medicamentos bioativos em *Aspergillus* (FRISVAD; LARSEN, 2015).

O gênero *Diaporthe* é composto por cerca de 800 espécies, com aproximadamente 2000 nomes atribuídos a ela e seus morfotipos assexuados previamente reconhecidos em *Phomopsis* (TANNEY et al., 2016). As espécies de *Diaporthe* são relatadas como fitopatógenos, endófitos ou saprófitas não-patogênicos, comumente isolados de uma ampla gama de hospedeiros (GOMES et al., 2013). Elas são conhecidas como boas produtoras de metabólitos secundários com diversas atividades biológicas, tais como atividade contra *Bacillus subtilis* (TANNEY et al., 2016), atividade antifúngica contra *C. albicans* (YEDUKONDALU et al., 2016), *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* (LIN et al., 2005), atividade citotóxica contra a linhagem celular de câncer de mama T47D (YEDUKONDALU et al., 2016) e contra contra linhagens celulares KB e Raji (LIN et al., 2005).

Assim, os fungos endofíticos *Aspergillus* sp. D28 e *Diaporthe* sp. D29 foram investigados química e biologicamente, e os compostos isolados são apresentados a seguir.

7.3.3 Investigação química do extrato de *Aspergillus* sp. D28

O endófito D28 teve seus metabólitos investigados quimicamente após o cultivo (5L em meio malte 2 %). Após partição, o extrato foi submetido à separação cromatográfica em coluna Sep-pak C₁₈ e foram obtidas 2 frações ativas: D28-1 (m= 65 mg, 44,97 % de inibição a *S. aureus*) e

D28-5 (m= 84 mg, 84,92 % de inibição a *S. aureus*).

7.3.3.1 Fração D28-1

7.3.3.1.1 Composto D28-1-F6

A fração D28-1 foi submetida a purificação final por HPLC preparativo, onde foi obtido um composto com bom grau de pureza (D28-1-F6, m= 0,2 mg). Este foi analisado por HPLC-UV-EM (Figura 1).

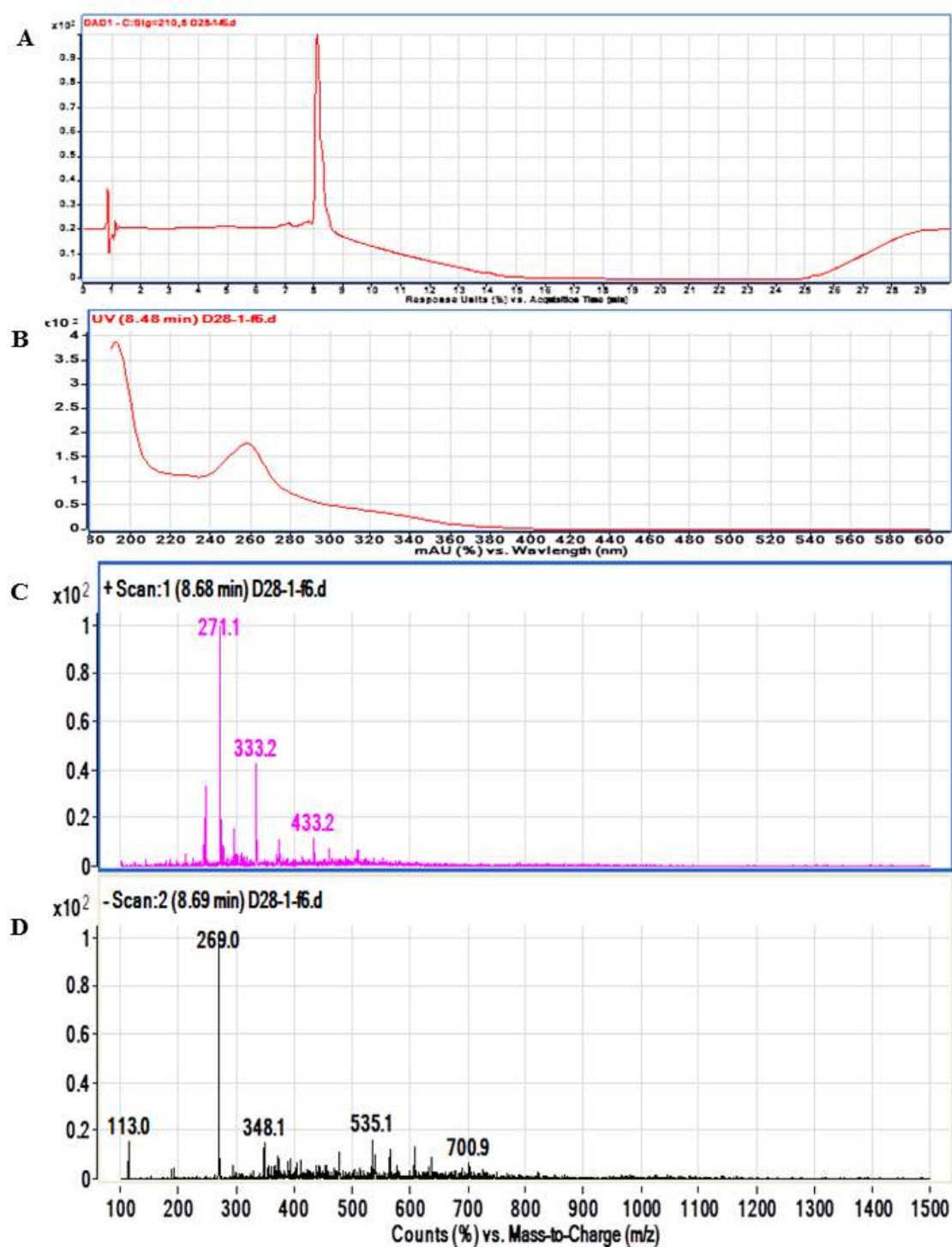


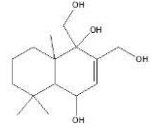
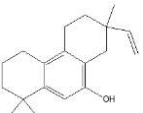
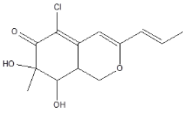
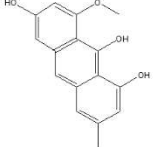
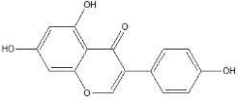
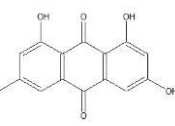
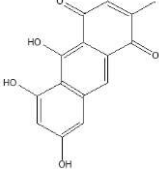
Figura 1 – cromatograma do composto D28-1-F6 monitorado no $\lambda=210$ nm (A), espectro de UV do composto D28-1-F6 (B) e espectros de massas em modo positivo (C) e em modo negativo (D) do composto D28-1-F6.

O composto D28-1-F6 apresenta tempo de retenção de 8,48 minutos. Em seu espectro de UV, foi possível observar os valores de absorção máxima em 200 e 260 nm. No espectro

de massas obtido no modo positivo, observou-se o pico de m/z 271 $[M+H]^+$. Em modo negativo, observou-se o pico de m/z 269 $[M-H]^-$ (Figura 1). Sendo assim, sugere-se uma massa molecular de 270 Da.

Realizando buscas no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais pela massa 270, foram encontrados 959 compostos, sendo que 7 deles são produzidos por *Aspergillus* sp. (Tabela 3).

Tabela 3 – Informações químicas dos compostos com massa 270 Da produzidos por *Aspergillus* spp. encontrados no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais

Nome do composto e referência na literatura	Número CAS ¹	Dados de UV _{max}	Fórmula molecular	Fórmula estrutural
6-epi-12-hidroialbrassitriol *	178330-78-4	-	C ₁₅ H ₂₆ O ₄	
Aspewentina A Miao e colaboradores (2014)	1558044-35-1	202 nm	C ₁₉ H ₂₆ O	
FK17-P3 Arai e Sano (1994)	162340-93-4	-	C ₁₃ H ₁₅ ClO ₄	
Anhidroasperflavina Grove (1972)	38371-02-7	-	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	
Diferenol A Asahi e colaboradores (1981)	9010-10-0	262, 337 nm	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	
Emodina Chukwujekwu e colaboradores (2006)	518-82-1	222, 252, 265, 289, 437 nm	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	
Hidroxiocristina Laatsch e Anke (1982)	61281-28-5	257, 282, 295, 307, 342, 515, 535, 572 nm	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	

¹Número de registro no banco de dados do Chemical Abstracts Service.

*Artigo em japonês.

Desses compostos relatados, alguns apresentam atividades biológicas descritas. O composto aspewentina A é ativo contra as espécies de fitoplâncton marinhos *Chattonella marina* e *Heterosigma akashiwo*, com valores CL_{50} de 0,81 e 2,88 μM , respectivamente (MIAO et al., 2014).

O composto diferanol A induz a diferenciação celular de células de eritroleucemia de camundongo (B8) em células positivas de benzidina a concentrações de 20~400 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Ele também induz a atividade da lisozima em células de leucemia mielóide de camundongo (M1) a 10~60 $\mu\text{g ml}^{-1}$, e mostra uma fraca atividade antimicrobiana a *Escherichia coli* BE1186 e *Xanthomonas oryzae*, sem toxicidade aguda (ASAHI et al., 1981).

O composto emodina tem os valores de concentração inibitória mínima (MIC) de $7,8 \times 10^{-3}$ e $3,9 \times 10^{-3}$ mg ml^{-1} contra *Bacillus subtilis* e *S. aureus*, respectivamente. Não foi ativo contra as bactérias Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* na maior concentração ($5,0 \times 10^{-1}$ mg ml^{-1}) testada (CHUKWUJEKWU et al., 2006). Possui efeito anti-neoplásico, anti-inflamatório, anti-angiogênese e potencial toxicológico para uso em farmacologia. A emodina demonstra efeitos citotóxicos (por exemplo, morte celular) através da prisão do ciclo celular e da indução da apoptose em células cancerosas (HSU; CHUNG, 2012). Ela inibe significativamente a formação de biofilme de *E. coli* a 20 μM , e aumenta a atividade da ampicilina contra *P. aeruginosa* (DING et al., 2011).

O composto hidroxiviocristina possui atividade contra as bactérias *B. brevis* e *Proteus vulgaris* pelo método de difusão em disco (LAATSCH; ANKE, 1982).

Para a identificação inequívoca do composto isolado, ainda são necessárias análises adicionais, como a aquisição de espectros de RMN e EM de alta resolução.

7.3.3.2 Fração D28-5

A fração D28-5 foi submetida a purificação final por HPLC preparativo, onde foram obtidos três compostos com bom grau de pureza: D28-5-F3 (m= 0,4 mg), D28-5-F6 (m=0,3 mg) e D28-5-F7 (m= 0,2 mg).

7.3.3.2.1 Composto D28-5-F3

O composto D28-5-F3 se apresentou puro e foi analisado por HPLC-UV-EM (Figura 2).

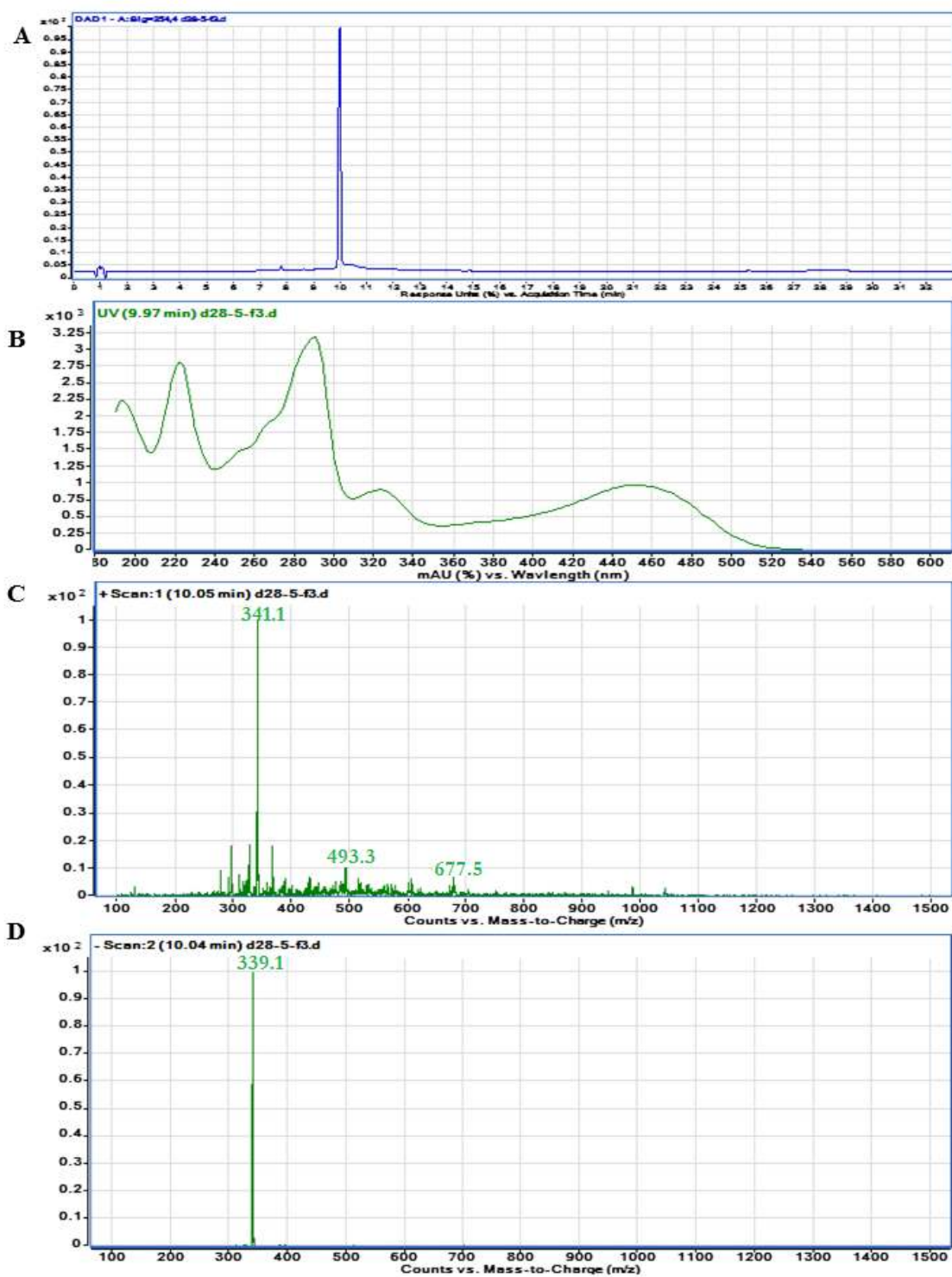
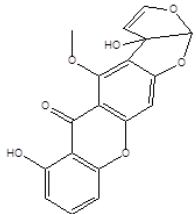
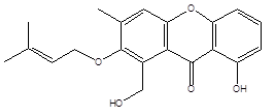
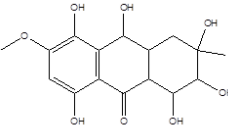
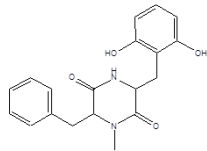
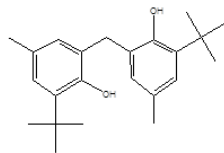
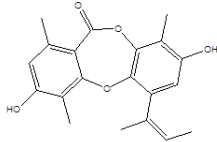
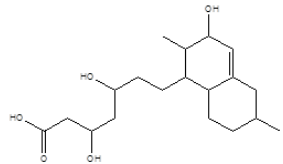


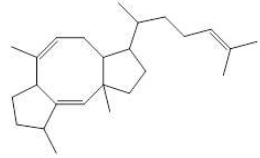
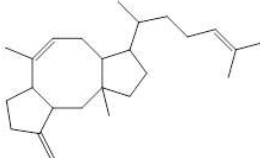
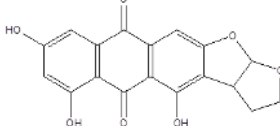
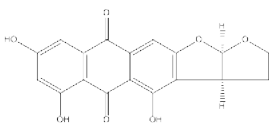
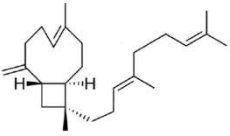
Figura 2 – Cromatograma do composto D28-5- F3 monitorado no $\lambda=254$ nm (A), espectro de UV do composto D28-5- F3 (B) e espectros de massas em modo positivo (C) e em modo negativo (D) do composto D28-5- F3.

O composto D28-1-F3 apresenta tempo de retenção de 9,97 minutos. Em seu espectro de UV, foi possível observar os valores de absorção máxima em 200, 220, 290, 320 e 450 nm. No espectro de massas obtido no modo positivo, observou-se o pico de m/z 341 $[M+H]^+$. Em modo negativo, observou-se o pico de m/z 339 $[M-H]^-$ (Figura 1). Sendo assim, sugere-se uma massa molecular de 340 Da.

Realizando buscas no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais pela massa 340, foram encontrados 942 compostos, sendo que 13 deles são produzidos por *Aspergillus* sp. (Tabela 4).

Tabela 4 -Informações químicas dos compostos com massa 340 Da produzidos por *Aspergillus* spp. encontrados no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais

Nome do composto e referência na literatura	Número CAS ¹	Dados de UV _{max}	Fórmula molecular	Fórmula estrutural
Austocistina I Steyn e Vleggaar (1975)	58775-51-2	-	C ₁₈ H ₁₂ O ₇	
Variecoxantona A Chexal e colaboradores (1975)	55812-94-7	252, 258, 274, 294, 376 nm	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	
Fusaquinona B Chen e colaboradores (2009)	1147549-78-7	286, 358 nm	C ₁₆ H ₂₀ O ₈	
Mactanamida Lorenz, Jensen e Fenical (1998)	278171-44-1	205, 272, 276 nm	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₄	
Antioxidante 2246 Shelton e Cox (1954)	119-47-1	212, 281 nm	C ₂₃ H ₃₂ O ₂	
4-metilunginol DPN (2017)	158964-23-9	-	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	
Ácido 3,5-dihidro-3- hidroximonacolínico L DPN (2017)	113855-37-1	-	C ₁₉ H ₃₂ O ₅	

1,7,18-ofiobolatriena Chiba e colaboradores (2013)	1417713-47-3	-	$C_{25}H_{40}$	
3(20),7,18- ofiobolatriena Chiba e colaboradores (2013)	1317713-48-4	-	$C_{25}H_{40}$	
Versicolorina B Hamasaki e colaboradores (1967)	4331-22-0	223,255, 266, 291, 324, 450 nm	$C_{18}H_{12}O_7$	
Versicolorina C Hamasaki e colaboradores (1967)	16049-49-3	223, 255, 267, 292, 326, 450 nm	$C_{18}H_{12}O_7$	
Dihidroxi-O- metilsterigmatocistina DPN (2017)	21793-91-9	238, 313 nm	$C_{19}H_{16}O_6$	-
Clavafileno Chiba e colaboradores (2013)	1418608-46-4	-	$C_{25}H_{40}$	

¹Número de registro no banco de dados do Chemical Abstracts Service.

Desses compostos sugeridos, alguns possuem atividade biológica já relatada na literatura. A fusaquinona B é ativa em ensaio citotóxico, com valores de IC_{50} contra linhagens celulares KB, KBv200 e MCF-7 acima de $50 \mu\text{mol ml}^{-1}$ (CHEN et al., 2009).

O composto mactanamida tem atividade fungistática (LORENZ; JENSEN; FENICAL, 1998).

O antioxidante 2246 é utilizado como conservante e estabilizador em plásticos e materiais elastoméricos, cosméticos, repelentes de insetos e composições antimicrobianas. Na indústria de polímeros, é utilizado como um estabilizador de temperatura, antioxidante e inibidor da polimerização de radicais livres (SHELTON; COX, 1954).

Entretanto, para a identificação inequívoca do composto isolado, ainda são necessárias análises adicionais.

7.3.3.2.2 Composto D28-5-F6

O composto D28-5-F6 apresentou bom grau de pureza e foi analisado por HPLC-UV-EM (Figura 3).

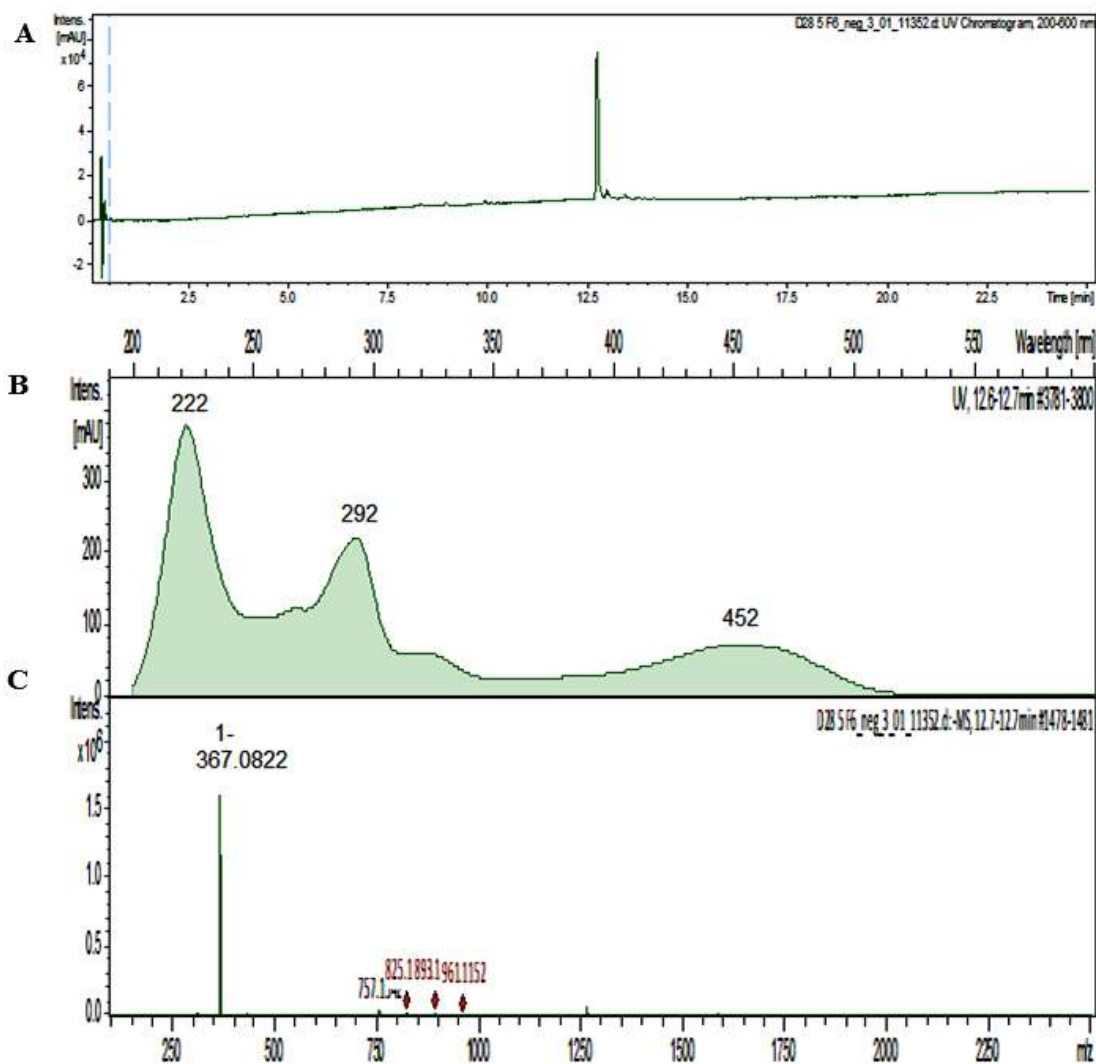


Figura 3 – cromatograma do composto D28-5-F6 monitorado na faixa de 200-600nm (A), espectro de UV do composto D28-5-F6 (B) e espectro de massas de alta resolução em modo negativo do composto D28-5-F6.

O composto D28-5-F6 apresenta tempo de retenção de 11,59 minutos. Em seu espectro de UV, foi possível observar os valores de absorção máxima em 200, 230, 270, 290, 320 e 450 nm. No espectro de massas de alta resolução obtido no modo negativo, observou-se o pico de 367,0822 [M-H]⁻. Sendo assim, sugere-se uma massa molecular de 368,0901 Da.

Realizando buscas no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais pela massa 368,09 Da, não foram encontrados compostos com essa massa molecular. Isso demonstra que o composto isolado pode ser inédito. Entretanto, análises adicionais são necessárias para a identificação inequívoca desse composto.

7.3.3.2.3 Composto D28-5-F7

O composto D28-5-F7 apresentou bom grau de pureza e foi analisado por HPLC-UV-EM (Figura 4).

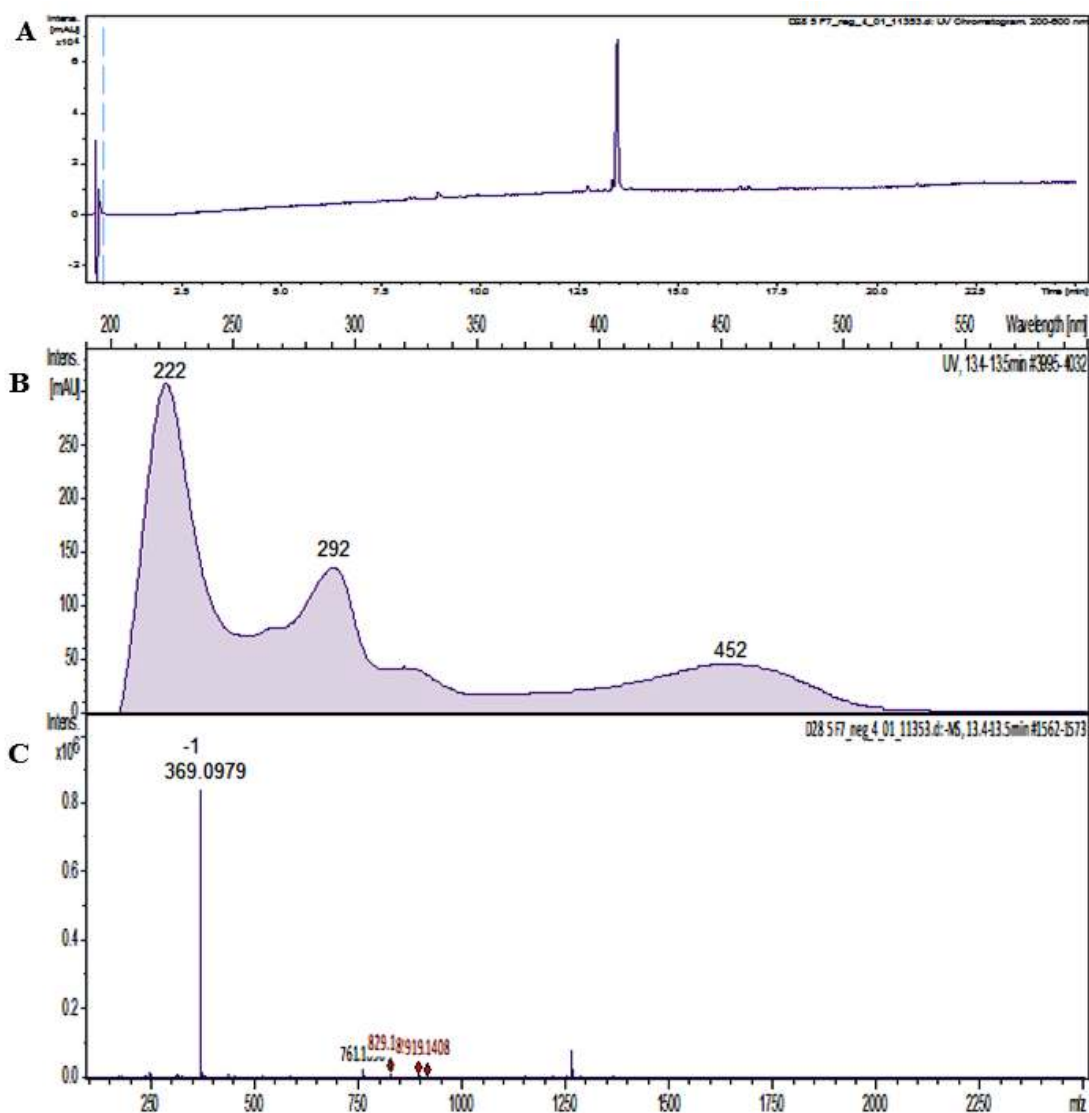
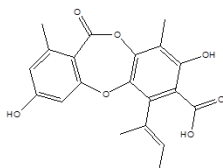
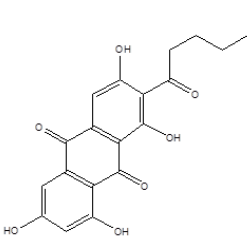
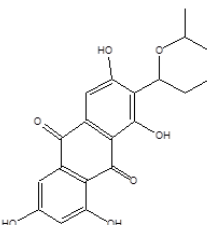
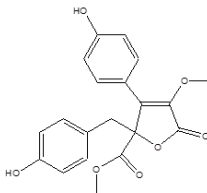
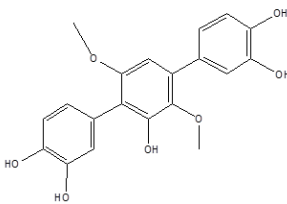


Figura 4 – cromatograma do composto D28-5-F7 monitorado na faixa de 200-600nm (A), espectro de UV do composto D28-5-F7 (B) e espectro de massas de alta resolução em modo negativo do composto D28-5-F7.

O composto D28-5-F7 apresenta tempo de retenção de 12,02 minutos. Em seu espectro de UV, foi possível observar os valores de absorção máxima em 200, 290, 320 e 460 nm. No espectro de massas de alta resolução obtido no modo negativo, observou-se o pico de m/z 369,0979 $[M-H]^-$. Sendo assim, sugere-se uma massa molecular de 370,1058 Da.

Realizando buscas no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais pela massa 370,10 foram encontrados 135 compostos, sendo que 5 deles são produzidos por *Aspergillus* sp. (Tabela 5).

Tabela 5 – Informações químicas dos compostos com massa 370,10 Da produzidos por *Aspergillus* spp. encontrados no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais.

Nome do composto e referência na literatura	Número CAS ¹	Dados de UV _{max}	Fórmula molecular	Fórmula estrutural
Aspergilusidona A Sureram e colaboradores (2012)	-	307, 362, 213 nm	C ₂₀ H ₁₈ O ₇	
Ácido norsolorínico Wang e colaboradores (2008)	10254-99-6	-	C ₂₀ H ₁₈ O ₇	
(+)-averufanina McCormick, Bhatnagar e Lee (1987)	28458-24-4	-	C ₂₀ H ₁₈ O ₇	
3-O-metilbutirolactona II DPN (2017)	-	-	C ₂₀ H ₁₈ O ₇	
3,3''dihidroxiterfenilina DPN (2017)	-	-	C ₂₀ H ₁₈ O ₇	

¹Número de registro no banco de dados do Chemical Abstracts Service.

Entre os compostos sugeridos, alguns já apresentam atividade biológica descrita na literatura.

O composto aspergilusidona A inibe a aromatase, e mostrou atividade de eliminação de radicais livres. Ele apresenta fraca (ou nenhuma) atividade citotóxica contra linhagens celulares HuC-CA-1, HepG2, A549, e de células de câncer MOLT-3 (SURERAM et al., 2012), e inibe o crescimento de células tumorais T47D (CYP19) (CHOTTANAPUND et al., 2017).

O ácido norsolorínico induz a apoptose de células MCF-7 sem mediação de p53 e p21/WAF1 (WANG et al., 2008).

Entretanto, análises adicionais são necessárias para a identificação inequívoca do composto isolado.

7.3.4 Investigação química do extrato de *Diaporthe* sp. D29

7.3.4.1 Composto D29-2

O composto D29-2 apresentou-se puro e foi analisado por HPLC-UV-EM (Figura 5).

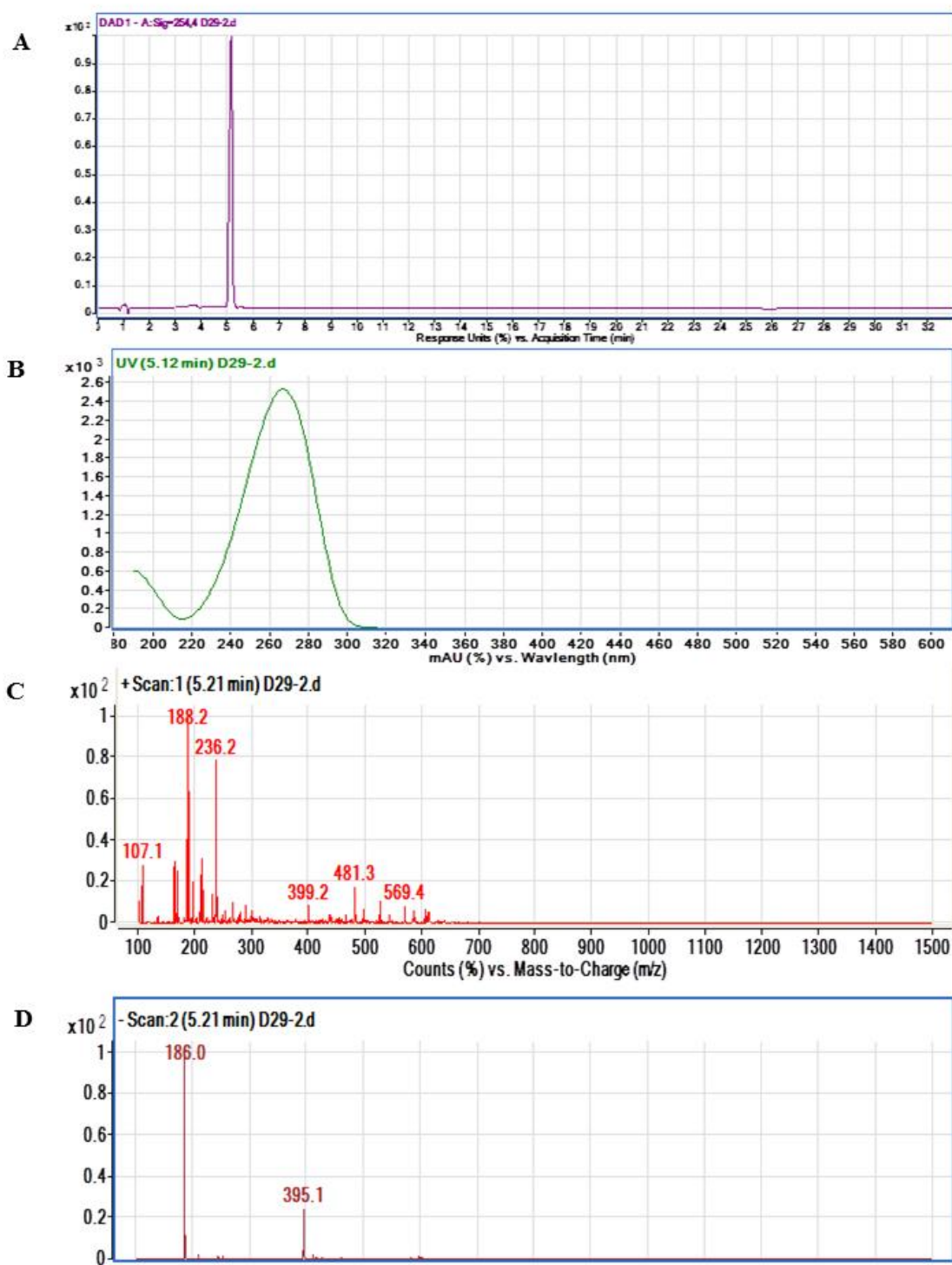


Figura 5 – Cromatograma do composto D29-2 monitorado no $\lambda=254$ nm (A), espectro de UV do composto D29-2 (B) e espectros de massas em modo positivo (C) e em modo negativo (D) do composto D29-2.

O composto D29-2 apresenta tempo de retenção de 5,12 minutos. Em seu espectro de UV, foi possível observar o valor de absorção máxima em 270 nm. No espectro de massas obtido no modo positivo, observou-se o pico de m/z 188 $[M+H]^+$. Em modo negativo,

observou-se o pico de m/z 186 $[M-H]^-$. Sendo assim, sugere-se uma massa molecular de 187 Da.

Realizando buscas no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais pela massa 187 foram encontrados 109 compostos, sendo que nenhum deles é produzido por *Diaporthe/Phomopsis sp.* Dessa forma, análises adicionais são necessárias para a identificação do composto.

7.3.4.2 Composto D29-4.1

O composto D29-4.1 apresentou-se puro e foi analisado por HPLC-UV-EM (Figura 6).

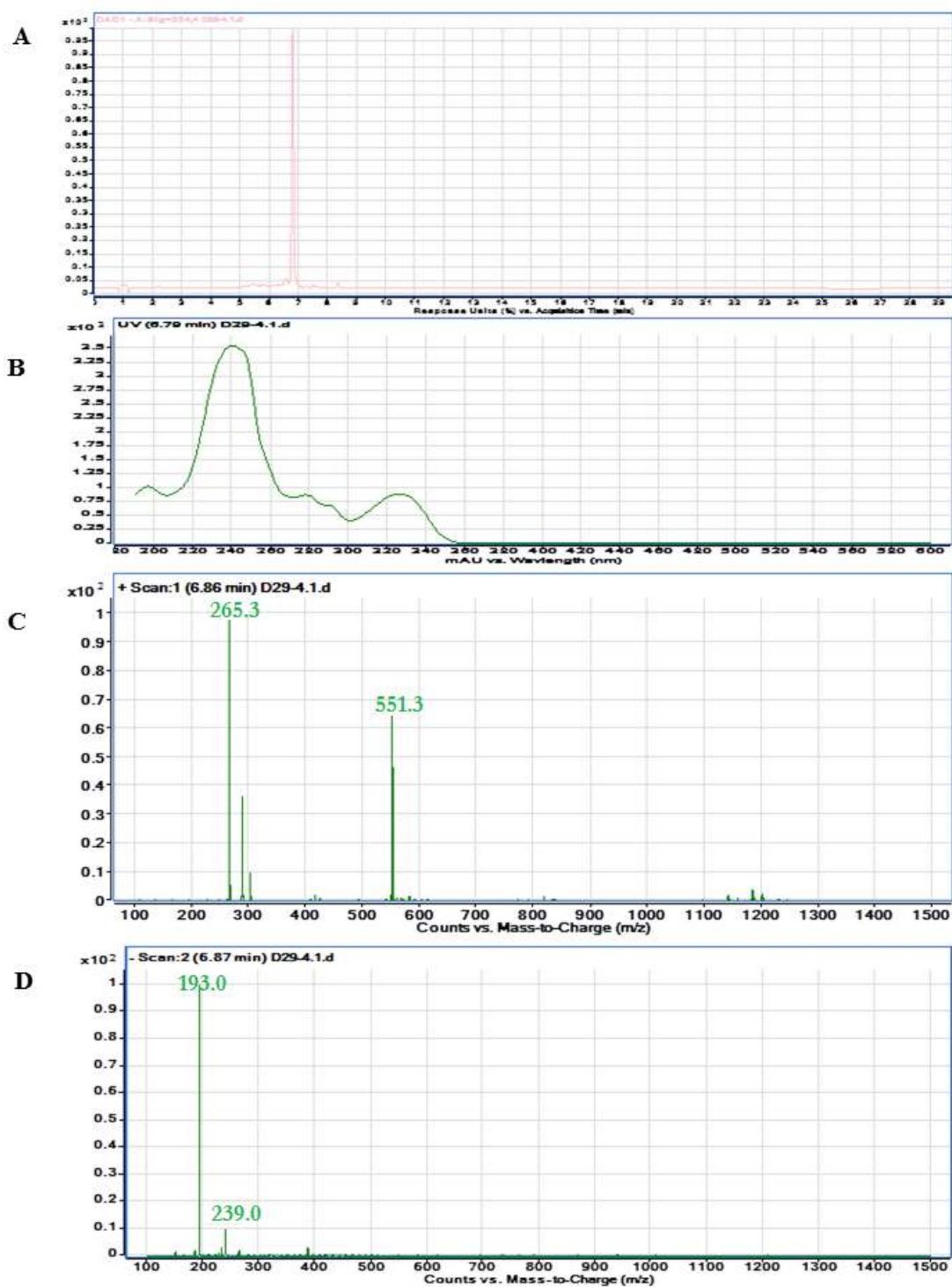
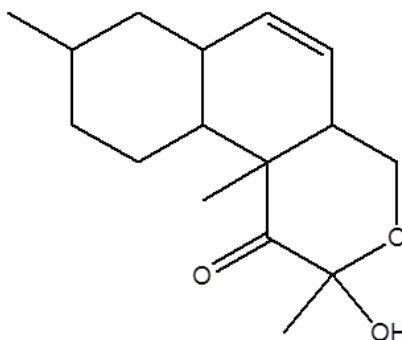


Figura 6 – Cromatograma do composto D29-4.1 monitorado no $\lambda=254$ nm (A), espectro de UV do composto D29-4.1 (B) e espectros de massas em modo positivo (C) e em modo negativo (D) do composto D29-4.1.

O composto D29-4.1 apresentou tempo de retenção de 6,86 minutos. Em seu espectro de UV, foi possível observar os valores de absorção máxima em 240 e 330 nm. No espectro

de massas obtido no modo positivo, observou-se o pico de m/z 265 $[M+H]^+$ e 551 $[2M+Na]^+$. Sendo assim, sugere-se uma massa molecular de 264 Da.

Realizando buscas no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais pela massa 264 foram encontrados 1597 compostos, sendo que somente um deles, a oblongolida T (Figura 7), é produzido por *Phomopsis* sp.



Oblongolida T

Figura 7 – composto produzido por *Phomopsis* sp. com massa molecular 264 Da e fórmula estrutural $C_{16}H_{24}O_3$.

O composto oblongolida T já foi isolado dos fungos endofíticos *Phomopsis* sp. XZ-26 (LIN et al., 2009) e *Phomopsis* sp. BCC 9789 (BUNYAPAIBOONSRI et al., 2010).

Entretanto, análises adicionais são necessárias para a identificação inequívoca do composto isolado.

7.3.4.3 Composto D29-5.2x

O composto D29-5.2x apresentou-se semi-puro e foi analisado por HPLC-UV-EM (Figura 8).

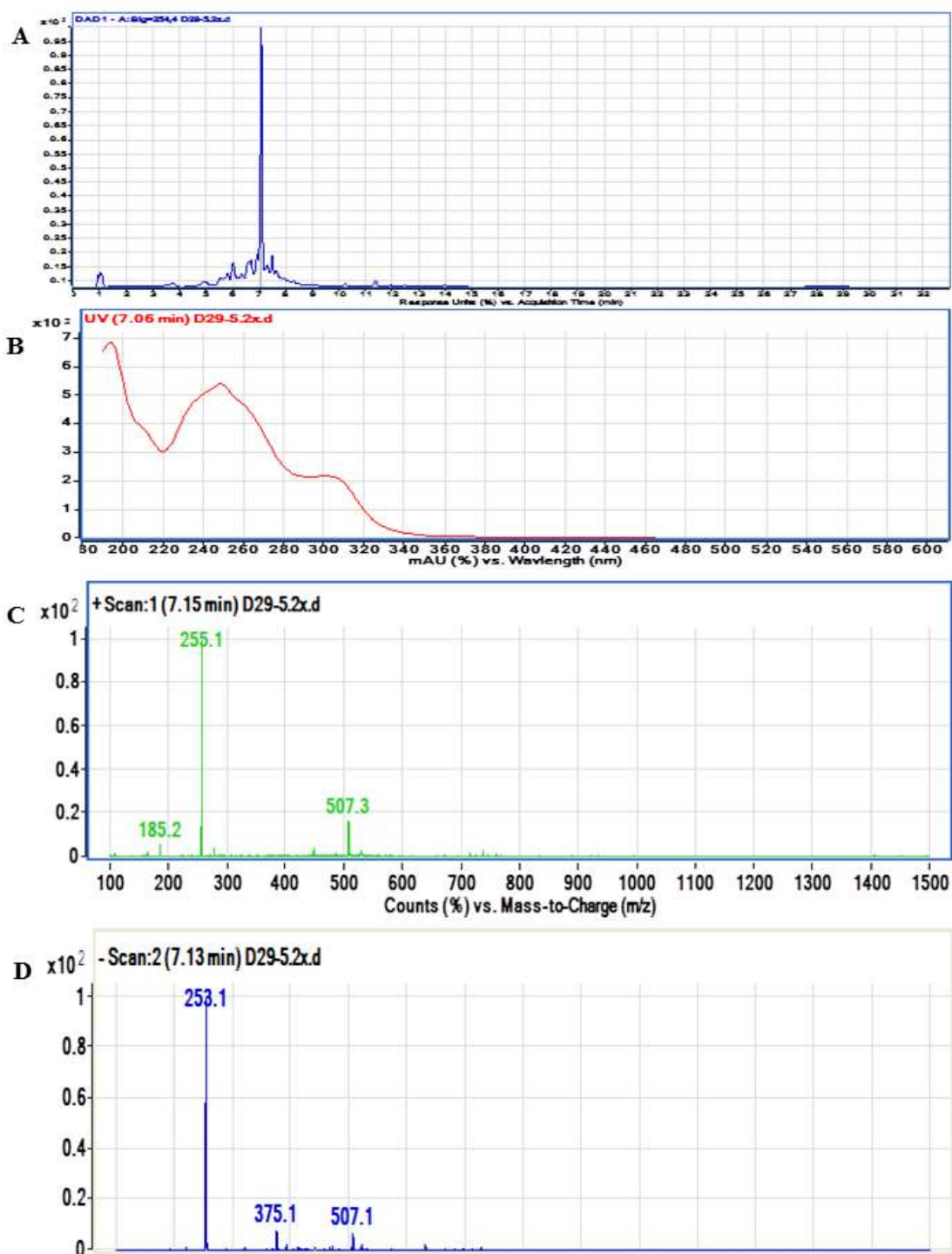
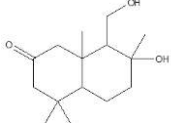
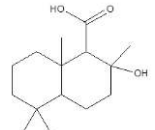
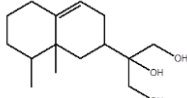
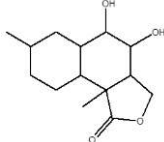
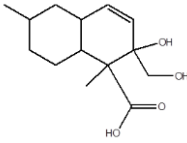
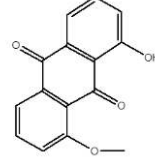
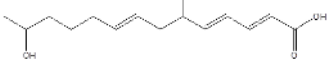


Figura 8 – Cromatograma do composto D29-5.2x monitorado no $\lambda=254$ nm (A), espectro de UV do composto D29-5.2x (B) e espectros de massas em modo positivo (C) e em modo negativo (D) do composto D29-5.2x.

O composto D29-5.2x apresenta tempo de retenção de 7,06 minutos. Em seu espectro de UV, foi possível observar os valores de absorção máxima em 200, 250 e 310 nm. No espectro de massas obtido no modo positivo, observou-se o pico de m/z 255 $[M+H]^+$. Em modo negativo, observaram-se os picos de m/z 253 $[M-H]^-$ e 507 $[2M-H]^-$. Sendo assim, sugere-se uma massa molecular de 254 Da.

Realizando buscas no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais pela massa 254 foram encontrados 1172 compostos, sendo que 7 deles são produzidos por *Diaporthe/Phomopsis* spp. (Tabela 6).

Tabela 6 -Informações químicas dos compostos com massa 254 Da produzidos por *Diaporthe/Phomopsis* spp. encontrados no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais

Nome do composto e referência na literatura	Dados de UV _{max}	Fórmula molecular	Fórmula estrutural
Diaporol D Zang e colaboradores (2012)	244 nm	C ₁₅ H ₂₆ O ₃	
Diaporol I Zang e colaboradores (2012)	200 nm	C ₁₅ H ₂₆ O ₃	
(4α,5α)-9-eremofilena-11,12,13-triol DPN (2017)	-	C ₁₅ H ₂₆ O ₃	
Oblongolida R Lin e colaboradores (2009)	-	C ₁₄ H ₂₂ O ₄	
Oblongolida S Lin e colaboradores (2009)	-	C ₁₄ H ₂₂ O ₄	
1-hidroxi-8-metoxiantraquinona DPN (2017)	-	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	
(2E, 4E, 6ξ, 8E, 13ξ)-ácido 6,13-dihidroxi-2,4,8-tetradecatrienóico DPN (2017)	-	C ₁₄ H ₂₂ O ₄	

Análises adicionais são necessárias para a identificação inequívoca desse composto.

7.3.4.4 Composto D29-5.5

O composto D29-5.5 apresentou bom grau de pureza e foi analisado por HPLC-UV-EM (Figura 9).

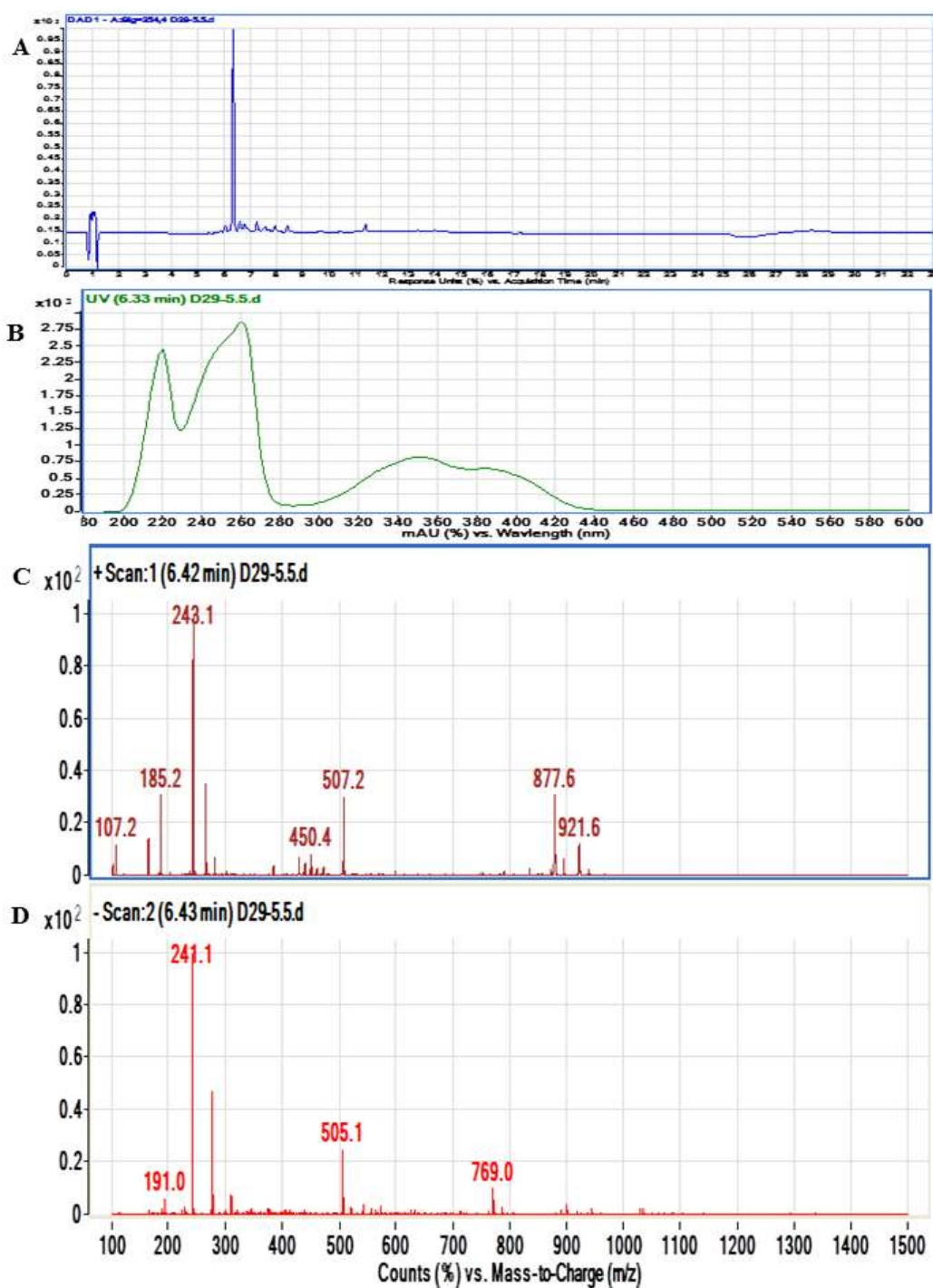
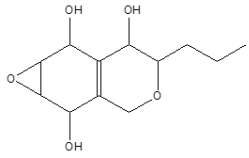
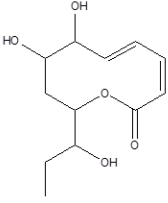
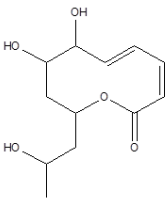
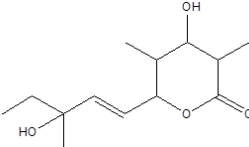


Figura 9 – Cromatograma do composto D29-5.5 monitorado no $\lambda=254$ nm (A), espectro de UV do composto D29-5.5 (B) e espectros de massas em modo positivo (C) e em modo negativo (D) do composto D29-5.5.

O composto D29-5.5 apresentou tempo de retenção de 6,33 minutos. Em seu espectro de UV, foi possível observar os valores de absorção máxima em 220, 260 e 350 nm. No espectro de massas obtido no modo positivo, observaram-se os picos de m/z 243 $[M+H]^+$ e 507 $[2M+Na]^+$. Em modo negativo, observou-se o pico de m/z 241 $[M-H]^-$. Sendo assim, sugere-se uma massa molecular de 242 Da.

Realizando buscas no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais pela massa 242 foram encontrados 611 compostos, sendo que 4 deles são produzidos por *Phomopsis* spp. (Tabela 7).

Tabela 7 - Informações químicas dos compostos com massa 242 Da produzidos por *Phomopsis* spp. encontrados no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais

Nome do composto e referência na literatura	Dados de UV_{max}	Fórmula molecular	Fórmula estrutural
Cicloepoxitriol A Hussain e colaboradores (2009)	-	$C_{12}H_{18}O_5$	
Fomolida E Li e colaboradores (2010)	206, 219, 236, 247 nm	$C_{12}H_{18}O_5$	
Fomolida F Li e colaboradores (2010)	208, 214, 239, 248, 251 nm	$C_{12}H_{18}O_5$	
Tetrahydro-4-hidroxi-6-(3-hidroxi-3-metil-1-pentenil)-3,5-dimetil-2H-piran-2-ona DPN (2017)	-	$C_{13}H_{22}O_4$	

Análises adicionais são necessárias para a identificação inequívoca desse composto.

7.3.4.5 Composto D29-7.5

O composto D29-7.5 apresentou-se com bom grau de pureza e foi analisado por HPLC-UV-EM (Figura 10).

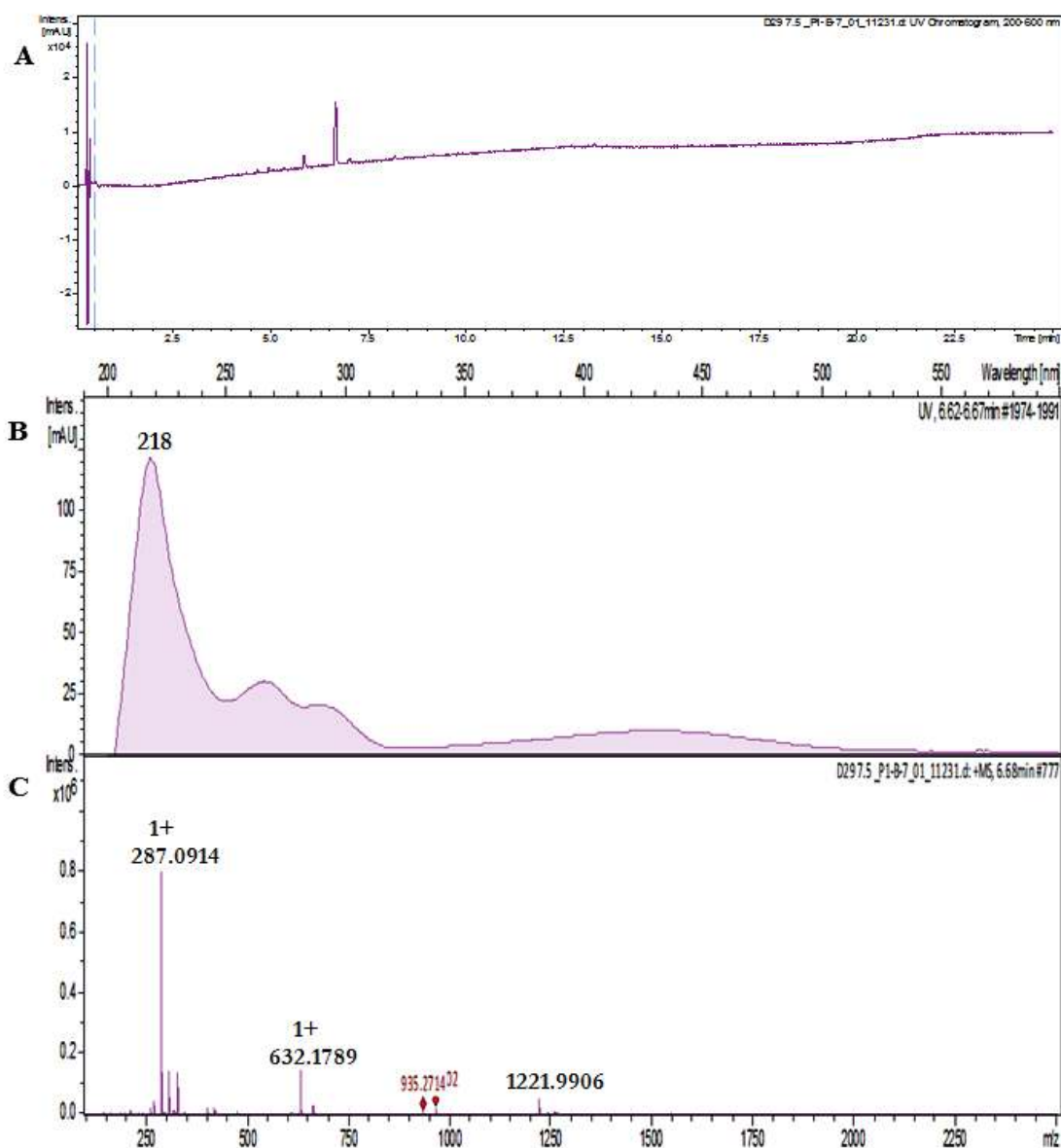


Figura 10 – Cromatograma do composto D29-7.5 monitorado na faixa de 200-600nm (A), espectro de UV do composto D29-7.5 (B) e espectro de massas de alta resolução em modo positivo do composto D29-7.5.

O composto D29-7.5 apresentou tempo de retenção de 7,5 minutos. Em seu espectro de UV, foi possível observar os valores de absorção máxima em 218, 270 e 290 nm. No espectro de massas de alta resolução obtido no modo positivo, observou-se o pico de m/z 631,1789 $[M+H]^+$. Sendo assim, sugere-se uma massa molecular de 631,1710 Da.

Realizando buscas no banco de dados do Dicionário de Produtos Naturais pela massa 631,17 Da não foi encontrado nenhum composto com essa massa molecular, o que sugere que possa se tratar de um composto inédito.

Entretanto, análises adicionais são necessárias para a identificação inequívoca do composto isolado.

7.4 Conclusão

Das linhagens endofíticas *Aspergillus* sp. e *Diaporthe* sp. foram isolados um total de 9 compostos, cujas frações precursoras apresentaram-se ativas contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Os compostos possuem as seguintes massas moleculares: 270 Da, 340 Da, 368 Da, 370,10 Da (isolados de *Aspergillus* sp. D28), 187 Da, 264 Da, 254 Da, 242 Da e 631,1710 Da (isolados de *Diaporthe* sp. D29). Estão sendo realizadas análises adicionais para a identificação desses compostos, sendo que existe a possibilidade de dois desses compostos serem inéditos na literatura. Este estudo confirma o potencial dos metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas e antibiofilme produzidos pelos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Diaporthe*, reafirmando esses gêneros como exímios produtores de compostos com inúmeras atividades biológicas.

Referências

- ALDRED, D.; MAGAN, N.; LANE, B.S. Influence of water activity and nutrients on growth and production of squalestatin S1 by a *Phoma* sp. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.87, p. 842–848, 1999.
- ARAI, T.; SANO, H. Novel UV-absorbing compounds FK17-P2a, FK17-P2b1, FK17-P2b2, and FK17-P3 and manufacture of the compounds with *Aspergillus* sp. **Japanese Kokai Tokkyo Koho**, Tokyo, JP 93–121677, 1994.
- ASAHI, K.; ONO, I.; KUSAKABE, H.; NAKAMURA, G.; ISONO, K. Studies on differentiation inducing substances of animal cells. I. Differenol A, a differentiation inducing substance against mouse leukemia cells. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.34, n.7, p.919-20, 1981.
- BAUERNFEIND, A.; BERTELE, R.M.; HARMS, K.; HORL, G.; JUNGWIRTH, R.; PETERMULLER, C.; PRZYKLENK, B.; WEISSLEIN-PFISTER, C.; BERTELE, R.M.; HARMS, K. Qualitative and quantitative microbiological analysis of sputa of 102 patients with cystic fibrosis. **Infection**, Munich, v.15, p.270-277, 1987.

BEENKEN, K.E.; DUNMAN, P.M.; MCALEESE, F.; MACAPAGAL, D.; MURPHY, E.; PROJAN, S.J.; BLEVINS, J.S.; SMELTZER, M.S. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.186, p.4665-4684, 2004.

BUNYAPAIBOONSRI, T.; YOIPROMMARAT, S.; SRIKITIKULCHAI, P.; SRICHOMTHONG, K.; LUMYONG, S. Oblongolides from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. BCC 9789. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.73, n.1, p.55-59, 2010.

CHANDKI, R.; BANTHIA, P.; BANTHIA, R. Biofilms: a microbial home. **Journal of Indian Society of Periodontology**, Mumbai, v.15, n.2, p.111-114, 2011.

CHEXAL, K.K.; HOLKER, J.S.E.; SIMPSON, T.J.; YOUNG, K.; ROBINSON, R. The biosynthesis of fungal metabolites. Part VI structure of variecoxanthenes A, B, and C, metabolites of *Aspergillus varicolor*; conversion of variecoxanthenone A into(±)-De-C prenylepishamixanthenone. **Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1**, Cambridge, v.16, p.543-548, 1975.

CHEN, Y.; CAI, X.; PAN, J.; GAO, J.; LI, J.; YUAN, J.; FU, L.; SHEA, Z.; LINA, Y. Structure elucidation and NMR assignments for three anthraquinone derivatives from the marine fungus *Fusarium* sp. (No. ZH-210). **Magnetic resonance in chemistry**, Chichester, v.47, p.362-365, 2009.

CHIBA, R.; MINAMI, A.; GOMI, K.; OIKAWA, H. Identification of ophiobolin F synthase by a genome mining approach: a sesterterpene synthase from *Aspergillus clavatus*. **Organic Letters**, Washington, v.15, n.3, p.594-597, 2013.

CHOTTANAPUND, S.; VAN DUURSEN, M.B.M.; ZWARTSEN, A.; TIMTAVORN, S.; NAVASUMRIT, P.; KITTA KOOP, P.; SURERAM, S.; RUCHIRAWAT, M.; VAN DEN BERG, M. Depsidones inhibit aromatase activity and tumor cell proliferation in a co-culture of human primary breast adipose fibroblasts and T47D breast tumor cells. **Toxicology Reports**, Ireland, v.4, p.165-171, 2017.

CHUKWUJEKWU, J.C.; COOMBES, P.H.; MULHOLLAND, D.A.; VAN STADEN, J. Emodin, an antibacterial anthraquinone from the roots of *Cassia occidentalis*. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v.72, n.2, p.295-297, 2006.

CIOFU, O.; TOLKER-NIELSEN, T.; JENSEN, P.Ø.; WANG, H.; HØIBY, N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v.85, p.7-23, 2015.

COLEMAN, D.C.; O'DONNELL, M.J.; SHORE, C.; RUSSELL, R.J. Biofilm problems in dental unit water systems and its practical control. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.106, p.1424-1437, 2009.

COLLIER, D.N.; ANDERSON, L.; MCKNIGHT, S.L.; NOAH, T.L.; KNOWLES, M.; BOUCHER, R.; SCHWAB, U.; GILLIGAN, P.; PESCI, E.C. A bacterial cell to cell signal in the lungs of cystic fibrosis patients. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v. 215, p.41-46, 2002.

CORREIA, A.M.L. **Diversidade e prospecção de fungos endofíticos de *Begonia* spp. encontradas na Mata Atlântica.** 2016. 61p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2016.

CORREIA, A.M.L.; LIRA, S.P.; ASSIS, M.A.; RODRIGUES, A. Fungal endophyte communities in *Begonia* species from the Brazilian Atlantic rainforest. **Current Microbiology**, New York, v.1, p.1-9, 2017.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v.284, p.1318–1322, 1999.

DING, X.; YIN, B.; QIAN, L.; ZENG, Z.; YANG, Z.; LI, H.; LU, Y.; ZHOU, S. Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v.60, p.1827-1834, 2011. DPN. Dictionary of Natural Products Database. Disponível em <http://dnp.chemnetbase.com>. Acesso em: 17 outubro 2017.

FANNING, S.; MITCHELL, A.P. Fungal Biofilms. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v.8, n.4, p.1-4, 2012.

FIGUEIREDO, E.A.P.; RAMOS, H.; MACIEL, M.A.V.; VILAR, M.C.M.; LOUREIRO, N.G.; PEREIRA, R.G. *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p.421-427, 2007.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O’GARA, J.P. The genetics of staphylococcal biofilm formation—will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? **Clinical microbiology and infection**, London, v.11, p.967-973, 2005.

FRIES, E.M. **Systema Mycologicum** E. Mauritius, Gryphiswald: ex officina Berlingiana, 1832. 592p.

FRISVAD, J.C. Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v.5, p.135-141, 2015.

FRISVAD, J.C.; LARSEN, T.O. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.99, p.7859–7877, 2015.

FUENTE-NÚÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R.E. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, London, v.16, n.5, p.580-589, 2013.

GBEJUADE, H.O.; LOVERING, A.M.; WEBB, J.C. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections: A review. **Acta Orthopaedica**, Basingstoke, v.86, n.2, p.147-158, 2015.

GEISER, D.M. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. **Medical Mycology**, Oxford, v.47, n.1, p.S21-S26, 2008.

GIL, C.; SOLANO, C.; BURGUI, S.; LATASA, C.; GARCÍA, B.; TOLEDO-ARANA, A.; LASA, I.; VALLE, J. Biofilm matrix exoproteins induce a protective immune response against *Staphylococcus aureus* biofilm infection. **Infection and Immunity**, Washington, v.82, n.3, p.1017-1029, 2014.

GILLIGAN, P.H. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.4, p.35-51, 1991.

GOMES, R.R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S.I.R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**, Leiden, v.3, p.1-41, 2013.

GRIES, C.M.; KIELIAN, T. Staphylococcal biofilms and immune polarization during prosthetic joint infection. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, Rosemont, v.25, p.S20-S24, 2017.

GROVE, J.F. New metabolic products of *Aspergillus flavus*. II. Asperflavin, anhydroasperflavin, and 5,7-dihydroxy-4-methylphthalide. **Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1**, Cambridge, v.19, p.2406-2411, 1972.

HAMASAKI, T.; HATSUDA, Y.; TERASHIMA, N.; RENBUTSU, M. Studies on the Metabolites of *Aspergillus versicolor* (Vuillemin) Tiraboschi. Part V. Isolation and structures of three new metabolites, versicolorins A, B and C. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.31, n.1, p.11-17, 1967.

HE, N.; LI, Y.; CHEN, J. Production of a novel polygalacturonic acid bioflocculant REA-11 by *Corynebacterium glutamicum*. **Bioresource Technology**, Essex, v.94, n.1, p.99-105, 2004.

HSU, S-C.; CHUNG, J-G. Anticancer potential of emodin. **Biomedicine**, Paris, v.2, n.3, p.108-116, 2012.

HUSSAIN, H.; AKHTAR, N.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; PESCIPELLI, G.; SALVADORI, P.; ANTUS, S.; KURTÁN, T.; KROHN, K. New bioactive 2,3-epoxycyclohexenes and isocoumarins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Laurus azorica*. **European journal of organic chemistry**, Weinheim, v.5, p.749-756, 2009.

IÓCA, L.P. **Estudo do metabolismo de fungos utilizando precursores isotopicamente marcados com ¹³C**. 2015. 87p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2015.

JACQUES, E. L. **Begoniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5616>. Acesso 27 novembro 2015.

KOCH, C. Early infection and progression of cystic fibrosis lung disease. **Pediatric Pulmonology**, New York, v.34, p.232-236, 2002.

LAATSCH, H.; ANKE, H. Stoffwechselprodukte von mikroorganismen, 214. Viocristin, isoviocristin und hydroxyviocristin. Struktur und synthese natürlich vorkommender 1,4-Anthrachinone. **Liebigs Annalen der Chemie**, Weinheim, v.1, p.2189-2215, 1982.

LAXMINARAYAN, R.; CHAUDHURY, R.R. Antibiotic resistance in India: drivers and opportunities for action. **Plos Medicine**, San Francisco, v.13, n.3, p.1-6, 2016.

LI, Y-Y.; WANG, M-Z.; HUANG, Y-J.; SHEN, Y-M. Secondary metabolites from *Phomopsis* sp. A123, **Mycology**, Cambridge, v.1, n.4, p.254-261, 2010.

LIN, T.; LIN, X.; LU, C.; HU, Z.; HUANG, W.; HUANG, Y.; SHEN, Y. Secondary metabolites of *Phomopsis* sp. XZ-26, an endophytic fungus from *Camptotheca acuminata*. **European Journal of Organic Chemistry**, Weinheim, v.18, p.2975–2982, 2009.

LIN, X.; HUANG, Y.; FANG, M.; WANG, J.; ZHENG, Z.; SU, W. Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi *Diaporthe* sp. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.251, n.1, p.53–58, 2005.

LORENZ, P.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Mactanamide, A new fungistatic diketopiperazine produced by a marine *Aspergillus* sp. **Natural Product Letters**, Chur, v.12, n.1, p.55-60, 1998.

MCCORMICK, S.P.; BHATNAGAR, D.; LEE, L.S. Averufanin is an aflatoxin B1 precursor between averantin and averufin in the biosynthetic pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, n.1, p.14-16, 1987.

MIAO, F.P.; LIANG, X.R.; LIU, X.H.; JI, N.Y. Aspewentins A-C, norditerpenes from a cryptic pathway in an algicolous strain of *Aspergillus wentii*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.77, n.2, p.429-32, 2014.

MICHELI, P.A. **Nova plantarvm genera ivxta Tovrnefortii methodvm disposita**. Florence: [s.n.], 1729. 234p.

MIZUBA, S.; HSU, C.; JIU, J. A third metabolite from *Spicaria divaricata* NRRL 5771 **The Journal of Antibiotics**, Toyo, v.30, n.8, p.670-672, 1977.

MOHANTY, S.S.; PRAKASH, S. Effects of culture media on larvicidal property of secondary metabolites of mosquito pathogenic fungus *Chrysosporium lobatum* (Moniliales: Moniliaceae). **Acta Tropica**, Amsterdam, v.109, p.50–54, 2009.

NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance, **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.41, n.3, p.252–275, 2017.

NIKOLAEV, Y.A.; PLAKUNOV, V.K. Biofilm—“City of microbes” or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, New York, v.76, n.2, p.125–138, 2007.

PETRINI, O. Fungal Endophytes in Tree Leaves. In: Andrews. J.H.; Hirano, S.S. (Eds.) **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer, 1991. p.179-197.

PIERIK, R.L.M.; TETTEROO, F.A.A. Vegetative propagation of *Begonia venosa* Skan in vitro from inflorescence explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.10, p.135-142, 1987.

RYBTKE, M.; HULTQVIST, L.D.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v.427, n.23, p.3628–3645, 2015.

SAIMAN, L. Microbiology of early CF lung disease. Paediatric respiratory reviews, London, v.5, p.S367-S369, 2004.

SAINI, R.; SAINI, S.; SHARMA, S. Biofilm: A dental microbial infection. **Journal of Natural Science, Biology, and Medicine**, Mumbai, v.2, n.1, p.71-75, 2011.

SAMSON, R.A.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; SUSCA, A.; TANNEY, J.B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J.C. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, Baarn, v.78, p.141-173, 2014.

SHELTON, J.R.; COX, W.L. Oxidation and antioxidant action in rubber vulcanizates. **Industrial and Engineering Chemistry**, Easton, v.46, n.4, p.816-823, 1964.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, London, v.43, n.4, p.573-583, 2010.

SINGH, S.B.; YOUNG, K.; SILVER, L.L. What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.133, p.63–73, 2017.

STEYN, P.S.; VLEGGAR, R. Dihydrofuro [3', 2'-4, 5] furo [3, 2-b] xanthenones-structures of austocystin-G, austocystin-H and austocystin-I. **Journal of the South African Chemical Institute**, Johannesburg, v.28, n.3, p.375-377, 1975.

STEWART, P.S.; COSTERTON, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, New York, v.358, n.9276, p.135-138, 2001.

SURERAM, S.; WIYAKRUTTA, S.; NGAMROJANAVANICH, N.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P. Depsidones, aromatase inhibitors and radical scavenging agents from the marine-derived fungus *Aspergillus unguis* CRI282-03. **Planta Medica**, Stuttgart, v.78, p.582–588, 2012.

TANNEY, J.B.; MCMULLIN, D.R.; GREEN, B.D.; MILLER, J.D.; SEIFERT, K.A. Production of antifungal and antiinsectan metabolites by the *Picea* endophyte *Diaporthe maritima* sp. nov. **Fungal Biology**, Amsterdam, v.120, n.11, p.1448-1457, 2016.

THOMSEN, T.; XU, Y.; LARSEN, L.; LORENZEN, J. Diagnosis of chronic infections: remember the biofilm. **Orthopaedic Proceedings**, Ribeirão Preto, v.97-B, sup.1684, 2015.

TONG, S.Y.; DAVIS, J.S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T.L.; FOWLER, V.G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.28, n.3, p.603–661, 2015.

TSENG, B.S.; ZHANG, W.; HARRISON, J.J.; QUACH, T.P.; SONG, J.L.; PENTERMAN, J.; SINGH, P.K.; CHOPP, D.L.; PACKMAN, A.I.; PARSEK, M.R. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.15, p.2865–2878, 2013.

VANDERMOLEN, K.M.; RAJA, H.A.; EL-ELIMAT, T.; OBERLIES, N.H. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB Express**, Heidelberg, v.3, n.71, p.1-7, 2013.

VON HALLER, A. **Historia stirpium indigenarum Helvetiae inchoata**. Bernae: Sumptibus Societatis typographicae (ex officina Dan. Brunneri & Alb. Halleri), 1968. 250p.

WANDERLEY, M.G.L. **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. São Paulo: Flora, 2012. 363p.

WANG, C.C.; CHIANG, Y.M.; KUO, P.L.; CHANG, J.K.; HSU, Y.L. Norsolorinic acid from *Aspergillus nidulans* inhibits the proliferation of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells via Fas-mediated pathway. **Basic and clinical pharmacology and toxicology**, Oxford, v.102, n.6, p.491-497, 2008.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.182, p.2675–2679, 2000.

YEDUKONDALU, N.; ARORA, P.; WADHWA, B.; MALIK, F.A.; VISHWAKARMA, R.A.; GUPTA, V.K.; RIYAZ-UL-HASSAN, S.; ALI, A. Diapolic acid A-B from an endophytic fungus, *Diaporthe terebinthifolii* depicting antimicrobial and cytotoxic activity. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.70, n.2, p.212-215, 2016.

XU, P.; DING, Z-Y.; QIAN, Z.; ZHAO, C-X.; ZHANG, K-C. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. **Enzyme and microbial technology**, New York, v.42, p.325–33, 2008.

ZANG, L.Y.; WEI, W.; GUO, Y.; WANG, T.; JIAO, R.H.; NG, S.W.; TAN, R.X.; GE, H.M. Sesquiterpenoids from the mangrove-derived endophytic fungus *Diaporthe* sp. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.75, p.1744–1749, 2012.

Informações Complementares

Tabela S1. Resultado do screening das frações acetato das linhagens fúngicas cultivadas em meio malte 2 % contra a formação de biofilme de *P. aeruginosa* (estatística R).

Grupo	Tratamento (código da linhagem fúngica)	Porcentagem de inibição a formação de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> (média)
a	D28	86,33
ab	D19	67,00
ab	D20	65,33
ab	D21	65,00
b	D22	64,00
bc	D2	55,33
bcd	D48	50,00
bcd	D13	49,33
bcd	D23	49,33
bcd	D25	48,66
cde	D31	42,00
cde	D24	41,66
cde	D33	41,00
cdef	D27	39,66
cdefg	D26	37,66
cdefgh	D29	35,66
defghi	D30	33,66
defghij	D16	30,66
defghijk	D47	30,33
defghijk	D34	29,66
efghijkl	D32	25,33
efghijklm	D36	21,66
efghijklmn	D35	21,33
fghijklmn	D12	19,33
fghijklmn	D46	19,00
fghijklmn	D51	18,66
ghijklmn	D50	18,00
ghijklmn	D39	16,33
hijklmn	D40	15,33
hijklmn	D45	15,33
hijklmn	D38	14,33
ijklmn	D41	13,33
ijklmn	D9	13,33
ijklmn	D1	12,66
ijklmn	D11	12,66
ijklmn	D3	12,66
ijklmn	D37	12,00
klmn	D7	9,00
lmn	D8	7,33
lmn	D5	6,33

lmn	D10	6,00
lmn	D18	5,33
lmn	D14	5,00
lmn	D42	4,00
mn	D4	1,33
mn	D15	1,00
n	D17	0
n	D43	0
n	D44	0
n	D49	0
n	D6	0

Tabela S2. Resultado do screening das frações acetato das linhagens fúngicas cultivadas em meio malte 2 % contra a formação de biofilme de *S. aureus* (estatística R).

Grupo	Tratamento (código da linhagem fúngica)	Porcentagem de inibição a formação de biofilme de <i>S. aureus</i> (média)
a	D13	76,36
ab	D34	73,33
abc	D19	71,03
abc	D28	70,40
abcd	D47	67,66
abcde	D35	65,60
abcde	D9	65,33
abcde	D18	64,00
abcdef	D20	63,40
abcdef	D12	62,83
abcdef	D14	62,16
abcdef	D21	61,56
abcdef	D33	61,20
abcdef	D50	60,46
abcdef	D30	60,33
abcdef	D48	59,33
abcdefg	D31	55,16
abcdefg	D51	54,90
abcdefg	D10	54,73
abcdefg	D23	54,50
abcdefg	D3	53,26
abcdefgh	D32	52,63
abcdefghi	D36	52,00
abcdefghij	D2	51,33
abcdefghij	D37	50,66
abcdefghij	D17	50,00
abcdefghij	D49	49,43
abcdefghijkl	D5	46,73

abcdefghijkl	D6	46,70
abcdefghijkl	D15	44,50
abcdefghijkl	D27	44,00
abcdefghijkl	D16	43,90
abcdefghijkl	D46	43,13
abcdefghijkl	D38	43,10
abcdefghijkl	D44	42,96
abcdefghijkl	D8	41,33
abcdefghijkl	D24	36,70
bcdefghijkl	D22	32,56
cdefghijkl	D26	31,13
defghijkl	D7	28,00
defghijkl	D29	27,63
efghijkl	D45	24,80
fghijkl	D25	22,83
ghijkl	D40	17,96
hijkl	D11	11,80
ijkl	D39	11,33
jkl	D42	10,56
kl	D41	8,00
kl	D4	7,00
kl	D1	5,83
l	D43	0

Tabela S3. Resultado do screening das frações acetato das linhagens fúngicas cultivadas em meio PYE contra a formação de biofilme de *P. aeruginosa* (estatística R).

Grupo	Tratamento (código da linhagem fúngica)	Porcentagem de inibição a formação de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> (média)
a	D29	84,30
a	D31	83,93
b	D20	13,83
b	D39	13,26
bc	D23	7,83
bc	D38	7,00
bc	D22	6,60
c	D1	0
c	D10	0
c	D11	0
c	D12	0
c	D13	0
c	D14	0
c	D15	0
c	D16	0
c	D17	0
c	D18	0
c	D19	0

c	D2	0
c	D21	0
c	D24	0
c	D25	0
c	D26	0
c	D27	0
c	D28	0
c	D3	0
c	D30	0
c	D32	0
c	D33	0
c	D34	0
c	D35	0
c	D36	0
c	D37	0
c	D4	0
c	D40	0
c	D41	0
c	D42	0
c	D43	0
c	D44	0
c	D45	0
c	D46	0
c	D47	0
c	D48	0
c	D49	0
c	D5	0
c	D50	0
c	D51	0
c	D6	0
c	D7	0
c	D8	0
c	D9	0

Tabela S4. Resultado do screening das frações acetato das linhagens fúngicas cultivadas em meio PYE contra a formação de biofilme de *S. aureus* (estatística R).

Grupo	Tratamento (código da linhagem fúngica)	Porcentagem de inibição a formação de biofilme de <i>S. aureus</i> (média)
a	D29	89,40
a	D12	87,20
a	D22	86,46
a	D2	86,20
ab	D28	85,76
ab	D31	85,60

ab	D39	84,90
ab	D48	84,83
ab	D19	84,50
abc	D16	81,76
abc	D43	76,93
abc	D47	76,20
abc	D13	75,56
abc	D40	72,96
abcd	D51	71,23
abcde	D38	69,56
abcde	D11	69,23
abcde	D41	66,83
abcdef	D6	62,33
abcdefg	D23	60,53
bcdefgh	D44	53,86
cdefghi	D18	51,76
cdefghi	D21	51,63
cdefghi	D45	51,46
defghij	D25	40,23
efghij	D26	39,00
efghijk	D36	38,66
efghijk	D3	37,60
fghijk	D15	34,46
fghijk	D50	33,90
fghijk	D49	32,90
ghijkl	D33	30,13
hijkl	D35	28,16
hijkl	D4	26,43
hijkl	D46	25,83
ijkl	D30	20,56
ijkl	D1	20,30
jkl	D9	18,66
jkl	D20	18,63
jkl	D24	17,50
jkl	D5	15,56
jkl	D8	15,40
jkl	D17	14,00
jkl	D37	11,73
jkl	D42	11,16
kl	D27	6,66
l	D10	0
l	D14	0
l	D32	0
l	D34	0
l	D7	0

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo reafirmou o potencial dos fungos endofíticos como fontes promissoras na produção de compostos bioativos, com atividade antifúngica, antimicrobiana e contra o proteassoma (alvo validado no combate ao câncer).

No estudo dos metabólitos secundários de *Trichoderma* sp. (P8BDA1F1), endófito de *B. venosa*, a fração acetato de etila inibiu 6 % o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* e apresentou 75 % de atividade contra o alvo do proteassoma. A partir de isolamento bioguiado, foram obtidos os compostos puros identificados por EM/EM como trilongins BI, BII, BIII e BIV, da classe dos peptaibols. Estes apresentaram atividade inibitória à *C. gloeosporioides*, com uma MIC que variou entre 40 a 320 μM . Para a subunidade ChTL do proteassoma, os valores de IC_{50} variaram entre 2,7 a 6,5 μM . Os compostos também foram testados *ex vivo* contra os amastigotas intracelulares de *Leishmania* (L.) *infantum*, mas não apresentaram seletividade. Este é o primeiro relato das trilongins BI-BIV possuindo atividade contra *C. gloeosporioides* e contra o alvo do proteassoma.

No estudo dos metabólitos secundários do basidiomiceto *Hymenochaete*-like (P7BDA1F2), endófito de *A. alcatrazense*, foram isolados os compostos puros 5,7-dimetoxifitalida e metil orselinato. Ambos foram testados contra *Leishmania* (L.) *infantum* e contra o alvo do proteassoma, mas não apresentaram atividade. Este é o primeiro relato do isolamento desses compostos do endófito *Hymenochaete*-like.

No estudo dos metabólitos secundários de *Neopestalotiopsis* sp. (AM29), endófito de *B. fischeri*, a fração acetato de etila inibiu 23 % o crescimento micelial de *P. sojae* em ensaio de difusão em disco. A partir de isolamento bioguiado, foi isolado um composto de massa molecular 366,0570 Da, o qual, muito provavelmente, é um composto inédito na literatura, cuja estrutura química pode ser dímera do composto já descrito fumiquinona B, do grupo das quinonas. O composto isolado apresentou 58 % de inibição micelial a *P. sojae* e uma MIC de 312 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no ensaio com esporos. Análises adicionais precisam ser realizadas para a elucidação estrutural inequívoca deste composto.

As linhagens *Aspergillus* sp. (D28/ P8M1F4) e *Diaporthe* sp. (D29/ P8MF1F4) foram selecionadas entre 51 endófitos isolados da planta *B. venosa*. As frações acetato de etila obtidas de seus meios metabólicos foram avaliadas em um *screening* contra a formação de biofilme pelas bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Do extrato de *Aspergillus* sp. foram isolados 4 compostos puros, e do extrato de *Diaporthe* sp. 5 compostos puros, cujas frações

precursoras apresentaram-se ativas contra as duas bactérias. Dois dos compostos isolados possuem um valor de massa molecular sem registros no DPN, sugerindo se tratar de compostos inéditos na literatura. Análises adicionais precisam ser realizadas para a elucidação estrutural desses compostos. Isso comprova o potencial dos gêneros *Aspergillus* e *Diaporthe* como produtores de metabólitos com atividade antimicrobiana e antibiofilme, muitos ainda desconhecidos pela ciência.

O presente trabalho apresenta significativa contribuição científica por ter relacionado novas atividades biológicas, como a antifúngica e contra o alvo do proteassoma, à compostos já conhecidos na literatura. Foi descrito o isolamento desses compostos de novas fontes biológicas, comprovando o potencial dos fungos endofíticos como produtores de compostos biologicamente ativos.

Além disso, há a possibilidade de terem sido isolados compostos inéditos. Para essa confirmação, análises complementares precisam ser realizadas, a fim de finalizar a elucidação estrutural dos compostos em questão.

Todos esses dados corroboram o potencial da Mata Atlântica como fonte promissora para a bioprospecção de fungos visando à descoberta de compostos com as mais diversas atividades biológicas.