

THIAGO MEIRELLES CASELLA

**SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS OU CITOTÓXICAS
EM MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS FOLIARES**

BRASÍLIA, 2014

CO-TUTELA INTERNACIONAL DE TESE DE DOUTORADO

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

UNIVERSITÉ DES ANTILLES ET DE LA GUYANE

ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉS DANS LES
AMÉRIQUES

THIAGO MEIRELLES CASELLA

**SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS OU CITOTÓXICAS
EM MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS FOLIARES**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Laila Salmen Espindola

Co-orientadora: Dr^a. Mariana Laundry de Mesquita

Orientador em co-tutela: Dr. Didier Stien

BRASÍLIA, 2014

THIAGO MEIRELLES CASELLA

**SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS OU CITOTÓXICAS
EM MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS FOLIARES**

Relatório apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas
para obtenção do grau de Doutor em co-tutela entre a
Universidade de Brasília, sob a orientação da
Prof^ª Dr^ª Laila Salmen Espindola
e a Universidade das Antilhas e da Guiana, sob orientação do
Prof. Dr. Didier Stien

BRASÍLIA, 2014

UNIVERSITÉ DES ANTILLES ET DE LA GUYANE

ÉCOLE DOCTORALE SANTÉ, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉS DANS LES
AMÉRIQUES

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

THIAGO MEIRELLES CASELLA

**COMPOSÉS ANTIMICROBIENS OU CYTOTOXIQUES
À PARTIR DE MICRO-ORGANISMES ENDOPHYTES FOLIAIRES**

Soutenue le 31 juillet à Brasília, Brésil

Sous la direction de:

Didier Stien, Centre National de la Recherche Scientifique, France

Laila Salmen Espindola, Universidade de Brasília, Brésil

N° attribué par la bibliothèque

| | | | | | | | | | | | | | | |

JURY

Didier Stien, Centre National de la Recherche Scientifique, France - Directeur de thèse

Jacqueline ABAUL, Université des Antilles et de la Guyane, France - Examinatrice

Christophe DUPLAIS, Centre National de la Recherche Scientifique, France - Examineur

Laila SALMEN ESPINDOLA, Université de Brasília, Brésil - Directrice de thèse en cotutelle

Maria Fatima GROSSI DE SA, *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brésil - Rapporteuse

Ian CASTRO-GAMBOA, Université de l'état de São Paulo, Brésil - Rapporteur

Se não sabes, aprende. Se já sabes, ensina.

Confúcio

Agradecimentos

Em primeiro lugar, eu agradeço Jacqueline ABAUL, Christophe DUPLAIS, Maria Fatima GROSSI DE SA e Ian CASTRO-GAMBOA por terem aceitado participar do júri desta tese.

Eu desejo agradecer calorosamente meus diretores de tese, Didier STIEN e Laila S. ESPINDOLA, que souberam me orientar perfeitamente ao longo deste trabalho, compartilhando seus conhecimentos científicos, sabedoria, paciência e compreensão. Os preciosos conselhos e ajudas recebidas de ambos não serão jamais esquecidos, sentirei muita falta.

Eu agradeço à toda equipe e aos estudantes do Laboratório de Farmacognosia da UnB, lugar que me despertou para o mundo científico. Meus agradecimentos vão especialmente para Mariana LAUNDRY DE MESQUITA, Phellipe THEODORO e Lorena ALBERNAZ.

Um agradecimento muito especial vai para o melhor botânico que pude conhecer e ver atuando em campo, José Elias DE PAULA. Agradeço também Guillaume ODONNE, amigo para toda vida, sem ele não poderia ter coletado e identificado as espécies vegetais na Guiana Francesa.

Eu agradeço Véronique EPARVIER, do *Institut de Chimie de Substances Naturelles*, França. Minha lista de agradecimentos para com sua pessoa não caberia nesta tese, então listo apenas alguns dos favores aos quais sou muito grato: agradeço o bom humor e companhia na cantina em Gif-sur-Yvette, conselhos químicos preciosos, correios enviados e recebidos, as inúmeras ajudas para resolver problemas com a burocracia francesa, telefonemas para banqueiros, *Sécurité Sociale*, locadores, etc. Merci Véro!! Agradeço ainda outros colegas de trabalho da equipe de *Substances Naturelles et Biodiversité*: agradecimento especial para Charlotte NIRMA, Hughes, Jonathan, Caroline, Mayka, Clémence, Milena e outros amigos do instituto.

Na Guiana Francesa, agradeço a receptividade e acolhimento dos colegas de laboratório Charlie BASSET, Nadine AMUSANT, Pierre-Alain BLANDINIERES, Xavier CUNIBERTI, Christophe ROOS, Laura DAYAN e especialmente Alice RODRIGUES.

Agradeço ainda os inúmeros amigos que pude fazer ao longo desta tese. Um grande agradecimento e saudades de Hugo Roger, Jonathan Benabou, Martin Zarka, Gabriel Gaga, Lucas, Tommy Aerien, Keleva, Luciole, Karine, Tyshor, Yasmin, e tantos outros.

Agradeço a minha família. Obrigado pai e mãe! Vocês me ensinaram o que é amor incondicional. Agradeço também meus irmãos queridos, Felipe e Maysa. Por fim, agradeço minha amada Dani, paciência infinita com seu doutorando sempre ocupado.

Abreviações

[α] _D	Poder rotatório
ABD	Agar batata dextrose
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AF	Ácido fórmico
ATCC	“American Type Culture Collection”
C ₁₈	Sílica gel com grupamentos octadecilas, fase reversa
CBD	Caldo batata dextrose
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Espectroscopia de RMN bidimensional de correlação, do inglês Correlation Spectroscopy
DAD	Detector com Arranjo de Diodos
DCM	Diclorometano
DMF	<i>N-N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Et	Etila
éq	Equivalente
ESI ⁺ , ESI ⁻	Ionização electrospray, modo positivo e modo negativo
Fig	Figura
Hex	Hexano
HMBC	Espectroscopia de RMN bidimensional de correlação heteronuclear, do inglês Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Espectroscopia de RMN bidimensional de correlação heteronuclear, do inglês Heteronuclear Single Quantum Coherence
HR	Alta resolução, do inglês High Resolution
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular

IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Me	Metila
MeOH	Metanol
Min	Minuto
mm	Massa molecular
MS	Espectrometria de massa, do inglês Mass Spectrometry
Noe	Do inglês Nuclear Overhauser effect
NOESY	Espectroscopia de RMN bidimensional, do inglês Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
Rf	Fator de retenção
RMN (1D, 2D)	Ressonância Magnética Nuclear (unidimensional e bidimensional)
rpm	Rotações por minuto
RPMI	“Rosewell Park Memorial Institute”, meio de cultura
TMS	Tetrametilsilano
Tr	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
YMG	Meio de cultura com extrato de levedura, extrato de malte e glicose, do inglês “Yeast-Malt-glucose”

Sumário

1. Introdução.....	26
1.2 Origem, evolução e biologia dos fungos endofíticos	26
1.3 Principais grupos e classificação dos fungos endofíticos.....	30
2 Metabolismo secundário dos fungos endofíticos.....	34
2.1 Metabólitos endofíticos antimicrobianos.....	37
2.2 Metabólitos endofíticos citotóxicos	41
4 Objetivo Geral	46
4.1 Objetivos específicos.....	46
5 Parte experimental – Materiais e Métodos	47
5.1 Coleta do Material Vegetal.....	47
5.2 Isolamento dos micro-organismos endofíticos	48
5.3 Identificação dos micro-organismos endofíticos	49
5.4 Produção dos extratos brutos endofíticos	49
5.5 Avaliação da atividade antimicrobiana	52
5.5.1 Bactérias e fungos patogênicos humanos	52
5.5.2 Teste da microdiluição (CIM).....	52
5.6 Estudos de citotoxicidade	53
5.7 Estudos químicos e generalidades.....	54
5.7.1 Solventes	54
5.7.2 Cromatografias	55
5.7.3 Métodos físicos de análise	57
5.8 Isolamento dos constituintes dos extratos fúngicos	59
5.8.1 Estudo do extrato AcOEt de <i>Xylaria cubensis</i> (SNB-GCI02)	59
5.8.2 Estudo do extrato AcOEt de <i>Lewia infectoria</i> (SNB-GTC2402).....	64
5.8.3 Estudo do extrato AcOEt de <i>Xylaria</i> sp. (SNB-GTC2501)	74
5.8.4 Estudo do extrato AcOEt de <i>Mycoleptodiscus</i> sp. (SNB-GTC2304).....	79
5.8.5 Estudo do extrato AcOEt de <i>Diaporthe pseudomangiferae</i> (SNB-GSS10) ..	85
5.8.6 Estudo do extrato AcOEt de <i>Chaetomium globosum</i> (SNB-GTC2114)	88
5.8.7 Estudo do extrato AcOEt de <i>Colletotrichum</i> sp. (SNB-GTC0201)	93
5.8.8 Estudo do extrato AcOEt de <i>Eurotium rubrum</i> (BBS 01).....	96
6 Resultados e discussões.....	100
6.1 Plantas coletadas, endófitos isolados e extratos brutos endofíticos produzidos .	100

6.2 Atividade antimicrobiana.....	112
6.3-Atividade citotóxica	113
6.4 Isolamento, caracterização e avaliação biológica das substâncias isoladas dos fungos endofíticos	124
6.4.1 Estudo do extrato AcOEt de <i>Xylaria cubensis</i> (SNB-GCI02)	124
6.4.2 Estudo do extrato AcOEt de <i>Lewia infectoria</i> (SNB-GTC2402).....	127
6.4.3 Estudo do extrato AcOEt de <i>Xylaria</i> sp. (SNB-GTC2501)	133
6.4.4 Estudo do extrato AcOEt de <i>Mycoleptodiscus</i> sp. (SNB-GTC2304).....	136
6.4.5 Estudo do extrato AcOEt de <i>Diaporthe pseudomangiferae</i> (SNB-GSS10)	139
6.4.6 Estudo do extrato AcOEt de <i>Chaetomium globosum</i> (SNB-GTC2114)	142
6.4.7 Estudo do extrato AcOEt de <i>Colletotrichum</i> sp. (SNB-GTC0201)	145
6.4.8 Estudo do extrato AcOEt de <i>Eurotium rubrum</i> (BBS01).....	148
7 Conclusão e perspectivas.....	151
8 Bibliografia	154

Lista de figuras

Figura 1. Filogenia e classificação dos fungos Ascomycetos	31
Figura 2. Metabólitos secundários endofíticos com atividade antimicrobiana	38
Figura 3. Metabólitos secundários endofíticos com atividade antimicrobiana	40
Figura 4. Metabólitos secundários endofíticos com atividade citotóxica <i>in vitro</i>	42
Figura 5. Coleta de material botânico e exemplo de exsicata.....	47
Figura 6. Fragmentos foliares em cultura para posterior isolamento de endófitos.....	49
Figura 7. Culturas líquidas de fungos endofíticos após 15 dias de incubação.....	50
Figura 8. Culturas sólidas de fungos endofíticos após 15 dias de incubação.....	51
Figura 9. Extratos brutos obtidos a partir da maceração das culturas endofíticas em AcOEt	51
Figura 10. Esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de <i>Xylaria cubensis</i> (SNB-GCI02).....	59
Figura 11. Cromatograma por CLAE da fração F6 do extrato em AcOEt de <i>Xylaria cubensis</i> (SNB-GCI02).....	60
Figura 12. Espectro de RMN ¹ H do Ácido pilifórmico (24) em acetona- <i>d</i> ₆	61
Figura 13. Espectro de RMN ¹³ C do Ácido pilifórmico (24) em acetona- <i>d</i> ₆	61
Figura 14. Espectro de massa HR-ESI-MS (negativo) do Ácido pilifórmico (24).....	62
Figura 15. Espectro de RMN ¹ H da Griseofulvina (25) em acetona- <i>d</i> ₆	62
Figura 16. Espectro de RMN ¹³ C da Griseofulvina (25) em acetona- <i>d</i> ₆	63
Figura 17. Espectro de massa HR-ESI-MS (positivo) da Griseofulvina (25).....	63
Figura 18. Esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de <i>Lewia infectoria</i> (SNB-GTC2402).....	64
Figura 19. Cromatograma por CLAE da fração F6 do extrato em AcOEt de <i>Lewia infectoria</i> (SNB-GTC2402).....	65
Figura 20. Espectro de RMN ¹ H da Phomopirona A (26) em CD ₃ OD.....	66
Figura 21. Espectro de massa HR-ESI-MS (positivo) da Phomopirona A (26).....	66
Figura 22. Espectro de RMN ¹ H da Pyrenocina A (27) em CD ₃ OD ₃	67
Figura 23. Espectro de RMN ¹³ C da Pyrenocina A (27) em CD ₃ OD ₃	67
Figura 24. Espectro de massa HR-ESI-MS (positivo) da Pyrenocina A (27).....	68
Figura 25. Espectro de RMN ¹ H do Alterperilenol (28) em DMSO- <i>d</i> ₆	69
Figura 26. Espectro de RMN ¹³ C do Alterperilenol (28) em DMSO- <i>d</i> ₆	69
Figura 27. Espectro de RMN ¹ H da Novae-zelandina A (29) em CD ₃ OD.....	70
Figura 28. Espectro de RMN ¹ H da Pyrrocidina C (30) em CDCl ₃	71
Figura 29. Espectro de RMN ¹³ C da Pyrrocidina C (30) em CDCl ₃	72
Figura 30. Espectro COSY da Pyrrocidina C (30) em CDCl ₃	72
Figura 31. Espectro HSQC da Pyrrocidina C (30) em CDCl ₃	73

Figura 32. Espectro HMBC da Pyrrocidina C (30) em CDCl ₃	73
Figura 33. Espectro NOESY da Pyrrocidina C (30) em CDCl ₃	74
Figura 34. Espectro de massa HR-ESI-MS (negativo) da Pyrrocidina C (30).....	74
Figura 35. Esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de <i>Xylaria</i> sp. (SNB-GTC2501).....	75
Figura 36. Cromatograma por CLAE da fração F5 do extrato em AcOEt de <i>Xylaria</i> sp. (SNB-GTC2501).....	76
Figura 37. Espectro de RMN ¹ H da 5-metilmelleina (31) em CDCl ₃	77
Figura 38. Espectro de RMN ¹³ C da 5-metilmelleina (31) em CDCl ₃	77
Figura 39. Espectro de massa HR-ESI-MS (negativo) da 5-metilmelleina (31).....	78
Figura 40. Espectro RMN ¹ H da Dihidrosporothriolida (32) em CDCl ₃	78
Figura 41. Espectro RMN ¹³ C da Dihidrosporothriolida (32) em CDCl ₃	79
Figura 42. Esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de <i>Mycoleptodiscus</i> sp. (SNB-GTC2304).....	80
Figura 43. Cromatograma por CLAE da fração F4 do extrato em AcOEt de <i>Mycoleptodiscus</i> sp. (SNB-GTC2304).....	80
Figura 44. Cromatograma por CLAE da fração F4 do extrato em AcOEt de <i>Mycoleptodiscus</i> sp. (SNB-GTC2304).....	81
Figura 45. Espectro de RMN ¹ H da Mycoleptodiscina A (34) em CDCl ₃	82
Figura 46. Espectro de RMN ¹³ C da Mycoleptodiscina A (34) em CDCl ₃	83
Figura 47. Espectro de massa HR-ESI-MS (negativo) da Mycoleptodiscina A (34).....	83
Figura 48. Espectro de RMN ¹ H da Mycoleptodiscina B (35) em DMSO- <i>d</i> ₆	84
Figura 49. Espectro de massa HR-ESI-MS (negativo) da Mycoleptodiscina B (35).....	84
Figura 50. Esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de <i>Diaporthe pseudomangiferae</i> (SNB-GSS10).....	85
Figura 51. Cromatograma por CLAE da fração F5 do extrato em AcOEt de <i>Diaporthe pseudomangiferae</i> (SNB-GSS10).....	86
Figura 52. Espectro de RMN ¹ H do Mycoepoxidieno (36) em DMSO- <i>d</i> ₆	87
Figura 53. Espectro de RMN ¹³ C do Mycoepoxidieno (36) em DMSO- <i>d</i> ₆	87
Figura 54. Espectro de RMN ¹ H da Altioxina A (37) em CDCl ₃	88
Figura 55. Esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de <i>Chaetomium globosum</i> (SNB-GTC2114).....	89
Figura 56. Cromatograma por CLAE da fração F7 do extrato em AcOEt de <i>Chaetomium globosum</i> (SNB-GTC2114).....	89
Figura 57. Espectro de RMN ¹ H do Acremonisol A (40) em CD ₃ OD.....	90
Figura 58. Espectro de RMN ¹³ C do Acremonisol A (40) em CD ₃ OD.....	91
Figura 59. Espectro de RMN ¹ H do Semicochliodinol A (41) em CDCl ₃	92
Figura 60. Espectro de RMN ¹ H do Cochliodinol A (42) em DMSO- <i>d</i> ₆	93
Figura 61. Esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de <i>Colletotrichum</i> sp. (SNB-GTC0201).....	94

Figura 62. Cromatograma por CLAE da fração F8 do extrato em AcOEt de <i>Colletotrichum</i> sp. (SNB-GTC0201).....	94
Figura 63. Espectro de RMN ¹ H da colletotragarona A2 (43) em DMSO- <i>d</i> ₆	96
Figura 64. Esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de <i>Eurotium rubrum</i> (BBS01).....	97
Figura 65. Cromatograma por CLAE da fração F3 do extrato em AcOEt de <i>Eurotium rubrum</i> (BBS01).....	97
Figura 66. Espectro de RMN ¹ H da Flavoglaucina (44) em CD ₃ OD ₃	98
Figura 67. Espectro de RMN ¹³ C da Flavoglaucina (44) em CD ₃ OD ₃	99
Figura 68. Espectro de massa HR-ESI-MS (negativo) da Flavoglaucina (44).....	99
Figura 69. Número de micro-organismos endofíticos isolados por espécie vegetal coletada.....	101
Figura 70. Número de micro-organismos endofíticos isolados por ordem filogenética.....	102
Figura 71. <i>Xylaria cubensis</i> (SNB-GCI02) e seu vegetal hospedeiro <i>Chrysobalanus icaco</i> (Chrysobalanaceae).....	124
Figura 72. Substâncias isoladas de SNB-GCI02 <i>Xylaria cubensis</i>	125
Figura 73. <i>Lewia infectoria</i> (SNB-GTC2402) e seu vegetal hospedeiro <i>Besleria insolita</i> (Gesneriaceae).....	127
Figura 74. Substâncias isoladas de <i>Lewia infectoria</i> (SNB-GTC2402).....	128
Figura 75. NOESY selecionada da pyrrocidina C (30).....	132
Figura 76. <i>Xylaria</i> sp. (SNB-GTC2501) e seu vegetal hospedeiro <i>Bisboeckelera microcephala</i> (Cyperaceae).....	133
Figura 77. Compostos isolados de <i>Xylaria</i> sp. (SNB-GTC2501).....	134
Figura 78. <i>Mycoleptodiscus</i> sp. (SNB-GTC2304) e seu vegetal hospedeiro <i>Psychotria poepiggiana</i> (Rubiaceae).....	136
Figura 79. Substâncias isoladas de <i>Mycoleptodiscus</i> sp. (SNB-GTC2304).....	137
Figura 80. <i>Diaporthe pseudomangiferae</i> (SNB-GSS10) e seu vegetal hospedeiro <i>Sabicea cinerea</i> (Rubiaceae).....	139
Figura 81. Substâncias isoladas de <i>Diaporthe pseudomangiferae</i> (SNB-GSS10).....	140
Figura 82. <i>Chaetomium globosum</i> (SNB-GTC2114) e seu vegetal hospedeiro <i>Paspalum virgatum</i> (Poaceae).....	142
Figura 83. Substâncias isoladas de <i>Chaetomium globosum</i> (SNB-GTC2114).....	144
Figura 84. <i>Colletotrichum</i> sp. (SNB-GTC0201) e seu vegetal hospedeiro <i>Banara guianensis</i> (Flacourtiaceae).....	145
Figura 85. Substância isolada de <i>Colletotrichum</i> sp. (SNB-GTC0201).....	147
Figura 86. <i>Eurotium rubrum</i> (BBS01) após 15 dias em cultura líquida e seu hospedeiro vegetal <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Myrtaceae).....	148
Figura 87. Substância isolada de <i>Eurotium rubrum</i> (BBS01).....	150

Lista de tabelas

Tabela 1. Critérios de simbiose utilizados na classificação de fungos endofíticos	33
Tabela 2. Plantas coletadas, identificação dos micro-organismos endofíticos e rendimento dos respectivos extratos brutos em AcOEt.....	104
Tabela 3. Atividade antimicrobiana (CIM - $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e citotóxica (porcentagem de inibição do crescimento celular) dos extratos em AcOEt de cada micro-organismo endofítico isolado.....	114
Tabela 4. Atividade antimicrobiana (CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$) e citotóxica (IC_{50} μM) das substâncias isoladas de SNB-GCI02, comparadas às substâncias controles.....	126
Tabela 5. Dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C para pyrrocidina C (30) em CDCl_3	130
Tabela 6. Atividade antimicrobiana (CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$) e citotóxica (IC_{50} μM) das substâncias isoladas de SNB-GTC2402, comparadas às substâncias controles.....	132
Tabela 7. Atividade antimicrobiana (CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$) e citotóxica (IC_{50} μM) das substâncias isoladas de SNB-GTC2501, comparadas às substâncias controles.....	135
Tabela 8. Atividade antimicrobiana (CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$) e citotóxica (IC_{50} μM) das substâncias isoladas de SNB SNB-GTC2304, comparadas às substâncias controles...	138
Tabela 9. Atividade antimicrobiana (CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$) e citotóxica (IC_{50} μM) das substâncias isoladas de SNB-GSS10, comparadas às substâncias controles.....	141
Tabela 10. Atividade antimicrobiana (CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$) e citotóxica (IC_{50} μM) das substâncias isoladas de SNB-GTC2114, comparadas às substâncias controles.....	145
Tabela 11. Atividade antimicrobiana (CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$) e citotóxica (IC_{50} μM) da substância isolada de SNB-GTC0201, comparadas às substâncias controles.....	148
Tabela 12. Atividade antimicrobiana (CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$) e citotóxica (IC_{50} μM) da substância isolada de BBS01, comparadas às substâncias controles.....	150

Resumo

Devido à natureza simbiótica dos micro-organismos endofíticos, este estudo teve como objetivo investigar a atividade antibacteriana, antifúngica e citotóxica em metabólitos secundários de extratos de fungos endofíticos foliares de plantas do bioma Amazônia e Cerrado. Neste trabalho de tese foram isolados 147 micro-organismos cultiváveis (130 fungos, 3 bactérias e 14 fungos não-identificados ou desconhecidos) a partir de 28 plantas (4 espécies coletadas no Brasil e 24 na Guiana Francesa). Todos os micro-organismos foram identificados por análise molecular de regiões específicas de DNAr, com uso de técnicas de sequenciamento genômico. Fungos endofíticos da ordem Xylariales foram os de maior frequência de isolamento neste estudo, representados por 25 isolados. Extratos brutos em AcOEt foram produzidos a partir de culturas de cada micro-organismo isolado. Uma proporção relativa significativa (23,1%) dos extratos demonstrou atividade em *Candida albicans* ATCC 10213, enquanto 4% foram ativos em *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. O potencial citotóxico dos extratos foi avaliado para as linhagens celulares humanas KB (carcinoma cervical uterino), MDA-MB-435 (melanoma), e MRC-5 (fibroblastos de pulmão normal), resultando em proporção significativa com atividade de inibição da proliferação celular (24,4%, 23,1% e 16,3%, respectivamente).

Dezoito metabólitos secundários foram isolados a partir do fracionamento de oito extratos brutos endofíticos. Dezessete destas substâncias já tinham sido descritas anteriormente na literatura: ácido pilifórmico (24) e griseofulvina (25) isoladas de *Xylaria cubensis* SNB-GCI02; phomopirona A (26), pyrenocina A (27), alterperilenol (28) e novae-zelandina A (29) isoladas de *Lewia infectoria* SNB-GTC2402; 5-metilmelleina (31) e Dihidrosporothriolida (32) isoladas de *Xylaria* sp. SNB-GTC2501; mycoleptodiscina A (34) e mycoleptodiscina B (35) isoladas de *Mycoleptodiscus* sp. SNB-GTC2304; mycoepoxidieno (36) e altioxina A (37) isoladas de *Diaporthe pseudomangiferae* SNB-GSS10; acremonisol A (40), semicochliodinol A (41) e cochliodinol (42) isoladas de *Chaetomium globosum* SNB-GTC2114; colletotragarona A2 (43) isolada de *Colletotrichum* sp. SNB-GTC0201; flavoglaucina (44) isolada de *Eurotium rubrum* BBS01. Dentre estas substâncias, a flavoglaucina (44) isolada de *E. rubrum* BBS01, demonstrou atividade comparável ao controle fluconazol em *C. albicans* (CIM de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Esta substância (44) apresentou $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$ em células normais MRC-5, tornando-se candidata para estudos posteriores. Neste trabalho foi

identificado pela primeira vez a atividade citotóxica da colletotragarona A2 (**43**), isolada de *Colletotrichum* sp. SNB-GTC0201. A substância inédita nomeada pyrrocidina C (**30**) foi isolada a partir de *L. infectoria* SNB-GTC2402 e identificada através de análises espectroscópicas (Casella *et al.*, 2013). A pyrrocidina C (**30**) foi ativa em *S. aureus* ATCC 10213 (CIM de 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), e não foi considerada citotóxica para as células normais MRC-5 ($\text{IC}_{50} >10 \mu\text{M}$), demonstrando seletividade na ação antimicrobiana.

Estes resultados demonstram a grande diversidade fúngica endofítica em plantas do bioma Amazônia e Cerrado, e a quimiodiversidade associada aos metabólitos secundários destes micro-organismos. Fungos endofíticos tropicais, como os vistos neste trabalho, podem emergir como uma nova fonte de substâncias antimicrobianas e citotóxicas.

Palavras-chave:

Endófitos tropicais
Fungos endofíticos foliares
Quimiodiversidade funcional
Antimicrobianos
Metabólitos citotóxicos
Pyrrocidina C

Résumé

En raison de la nature symbiotique des micro-organismes endophytes, cette étude visait à étudier l'activité antibactérienne, antifongique et cytotoxique chez les métabolites secondaires des extraits endophytes foliaires de plantes de l'Amazonie brésilienne et du Cerrado. Dans ce travail de thèse 147 micro-organismes cultivables ont été isolés (130 champignons, 3 bactéries e 14 champignons non-identifiés ou inconnus) à partir de 28 plantes (4 espèces collectées au Brésil et 24 en Guyane Française). Tous les micro-organismes furent identifiés par analyse moléculaire des régions spécifiques de l'ADNr en utilisant des techniques de séquençage génomique. Des champignons endophytes de l'ordre des Xylariales furent ceux de plus importante fréquence d'isolation dans cette étude, représentés par 25 isolats. Des extraits bruts à l'AcOEt furent produits à partir de cultures de chaque micro-organisme isolé. Une proportion relative signifiante (23,1%) des extraits démontra une activité sur *Candida albicans* ATCC 10213, pendant que 4% furent actifs sur *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Le potentiel cytotoxique des extraits fut évalué pour des lignées cellulaires humaines KB (carcinome cervical utérin), MDA-MB-435 (mélanome), et MRC-5 (fibroblastes de poumon normal), résultant en proportion signifiante avec activité d'inhibition de la prolifération cellulaire (24,4%, 23,1% e 16,3%, respectivement).

Dix-huit métabolites secondaires furent isolés et identifiés à partir du fractionnement des extraits bruts de huit endophytes. Dix-sept de ces substances furent déjà décrites précédemment dans la littérature: l'acide piliformique (**24**) et la griséofulvine (**25**) isolés à partir de *Xylaria cubensis* SNB-GCI02; La phomopirone (**26**), la pyrenocine (**27**), l'alterpérilenol (**28**) et la novae-zelandine (**29**), isolés de *Lewia infectoria* SNB-GTC2402; 5-méthylmelleina (**31**) et la dihydrosporothriolide (**32**) isolées à partir de *Xylaria* sp. SNB-GTC2501; La mycoleptodiscine (**34**) et la mycoleptodiscine B (**35**) isolées à partir de *Mycoleptodiscus* sp. SNB-GTC2304; le mycoepoxidiène (**36**) et la altioxina A (**37**) isolés à partir de *Diaporthe pseudomangiferae* SNB-GSS10; L'acremonisol (**40**), le semicochliodinol (**41**) et le cochliodinol (**42**) isolés à partir de *Chaetomium globosum* SNB-GTC2114; la colletofragarone A2 (**43**) isolée à partir de *Colletotrichum* sp. SNB-GTC0201; la flavoglaucine (**44**) isolée à partir de *Eurotium rubrum* BBS01. Parmi ces substances, la flavoglaucine (**44**) isolée à partir de *E. rubrum* BBS01 démontra une activité comparable au contrôle fluconazol en *C. albicans* (CIM de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). La substance (**44**) présenta $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$ sur cellules normales MRC-5,

ce qui en fait un candidat pour des études ultérieures. Dans ce travail, fut identifié pour la première fois l'activité de la colletofragarone A2 (**43**) isolée à partir de *Colletotrichum* sp. SNB-GTC0201. La substance inédite nommée pyrrocidine C (**30**) fut isolée à partir de *L. infectoria* SNB-GTC2402 et identifiée par des analyses spectroscopiques (Casella *et al.*, 2013). La pyrrocidine C (**30**) fut active en *S. aureus* ATCC 10213 (CIM de 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) et ne fut pas considérée cytotoxique pour les cellules normales MRC-5 ($\text{IC}_{50} >10 \mu\text{M}$), démontrant une sélectivité dans l'action antimicrobienne.

Ces résultats démontrent la grande diversité des endophytes fongiques chez les plantes de l'Amazonie brésilienne et du Cerrado et la grande chimiodiversité associée aux métabolites secondaires de ces micro-organismes. Des champignons endophytes tropicaux, comme ceux présentés dans cette étude, peuvent apparaître comme une nouvelle source de substances antimicrobiennes et cytotoxiques.

Mots-clés:

Endophytes tropicaux
Champignons endophytes foliaires
Chimiodiversité fonctionnelle
Antimicrobiens
Métabolites cytotoxiques
Pyrrocidine C.

Summary

Because of the symbiotic nature of endophytes, this survey aims to investigate the probability of discovering antibacterial, antifungal and cytotoxic activities in secondary metabolites of leaf endophytes isolated from plants of Amazon and Cerrado biomes. In this study, 147 cultivable microorganisms were isolated (130 fungi, 3 bacteria and 14 unidentified or unknown microbes) from 28 plant species (4 species collected in Brazil and 24 in French Guyana). All endophytes were identified by molecular analyses of specific rDNA regions, with genomic sequencing techniques. Fungal endophytes belonging to Xylariales order were the most frequently isolated in this study, represented by 25 isolates. Crude AcOEt extracts were produced from cultures of each isolated endophyte. A significant relative proportion (23,1%) of extracts showed activity in *Candida albicans* ATCC 10213, while 4% were active in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. The cytotoxic potential of the extracts was evaluated for human cell lines KB (uterin cervical carcinome), MDA-MB-435 (melanoma) and MRC-5 (normal lung fibroblasts), and a significant proportion of them showed cellular proliferation inhibition (24,4%, 23,1% e 16,3%, respectively).

Eighteen secondary metabolites were isolated by the fractionation of eight endophytic extracts. Seventeen of these substances had already been previously described in the literature: piliformic acid (**24**) and griseofulvin (**25**) isolated from *Xylaria cubensis* SNB-GCI02; phomopiron A (**26**), pyrenocin A (**27**), alterperilenol (**28**) and novae-zelandin A (**29**) isolated from *Lewia infectoria* SNB-GTC2402; 5-metilmellein (**31**) and dihidrosporothrioid (**32**) isolated from *Xylaria* sp. SNB-GTC2501; mycoleptodiscin A (**34**) and mycoleptodiscin B (**35**) isolated from *Mycoleptodiscus* sp. SNB-GTC2304; mycoepoxidien (**36**) and altiloxin A (**37**) isolated from *Diaporthe pseudomangiferae* SNB-GSS10; acremonisol A (**40**), semicochliodinol A (**41**) and cochliodinol (**42**) isolated from *Chaetomium globosum* SNB-GTC2114; colletofragaron A2 (**43**) isolated from *Colletotrichum* sp. SNB-GTC0201; flavoglaucin (**44**) isolated from *Eurotium rubrum* BBS01. Among these substances, flavoglaucin (**44**), isolated from *E. rubrum* BBS01, showed comparable antifungal activity with the positive control fluconazol in *C. albicans* (MIC of 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Flavoglaucin (**44**) also showed $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$ in normal MRC-5 cells, becoming a good candidate for further studies. In this work, the cytotoxic activity of colletofragaron A2 (**43**), isolated from *Colletotrichum* sp. SNB-GTC0201 was described for the first time. The unpublished

substance named pyrrocidin C (**30**) isolated from *L. infectoria* SNB-GTC2402 was identified by spectroscopic analyses (Casella *et al.*, 2013). The pyrrocidin C (**30**) was active in *S. aureus* ATCC 10213 (MIC of 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), and was not considered cytotoxic for normal MRC-5 cells ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$), showing selectivity in antimicrobial activity.

These results demonstrate the great endophytic fungal diversity in plants of Amazon and Cerrado biomes, along with the chemodiversity associated to the secondary metabolites of these endophytes. Tropical fungal endophytes, like those seen in this work, may emerge as a new source of antimicrobial and cytotoxic substances.

Keywords:

Tropical endophytes
Leaf endophytes fungi
Functional chemodiversity
Antimicrobials
Cytotoxic metabolites
Pyrrocidine C

Résumé étendu

Grâce à la nature symbiotique des micro-organismes endophytes, ce travail de thèse a eu pour objectif de découvrir de nouvelles substances avec activités antibactériens, antifongiques et d'inhibition de prolifération cellulaire appartenant aux endophytes foliaires de plantes du biome Amazonien et du biome Cerrado.

Un total de 28 espèces de plantes, appartenant à 16 familles d'angiospermes ont été récoltées en Guyane française, dans le biome Amazonien et au Brésil, dans le biome Cerrado, à la recherche de champignons endophytes. A partir des feuilles de ces espèces, 147 micro-organismes endophytes ont été isolés, la grande majorité des souches obtenues sont des champignons de la classe Ascomycota (143 champignons isolés). Il a été possible d'isoler au moins un champignon cultivable dans toutes les espèces récoltées. L'espèce végétale ayant permis d'isoler le plus grand nombre de souches endophytes (22) est l'espèce *Vismia latifolia* (Clusiaceae), un arbre invasif trouvé abondamment sur presque toute la forêt amazonienne (Nebel *et al.*, 2001). La variété et la grande distribution géographique de cette plante en Amazonie peut avoir comme origine son association avec des endophytes bioactifs (Clay et Holah, 1999) ou due à sa tolérance à la colonisation endophytique. Une distribution hétérogène quantitative et qualitative des isolats obtenus à partir des plantes collectées dans ce travail a été observée. Le travail de révision de Sanchez Marquez (2012) a conclu que ce type de résultat est communément observé dans la majorité des études qui traitent de l'isolement endophytique en régions tropicales et tempérées de la planète.

A travers l'identification génétique moléculaire des isolats, 13 différents ordres fongiques ont été identifiés, incluent 12 différents ordres d'ascomycètes, un ordre de levure inséré dans l'ordre de basidiomycètes, 3 bactéries endophytes et aussi 14 souches non identifiées. L'identification génétique de certaines souches isolées n'a pas été possible due aux difficultés qui ont surgit pendant l'extraction ou le séquençage de l'ADN génomique, ou due à l'absence de séquence comparative dans la banque de données GenBank. Dans certains cas (SNB-GTC2901, SNB-GTC2905, SNB-GTC2906), les séquences obtenues correspondent de manière homologue à la séquence des champignons pas encore identifiés dans la banque de données GenBank. Les plantes qui résident dans les surfaces à grande biodiversité peuvent loger des endophytes uniques et extrêmement biodiversifiés (Strobel *et al.*, 2003). L'ordre des Xylariales a été observé comme le plus fréquemment isolé dans cette étude, représenté par 25 isolats,

certaines de ces isolats ont été identifiées comme appartenant à la même espèce fongique, en revanche ces souches ont été maintenues séparées dû aux différences morphologiques significatives et aux résultats biologiques hétérogènes obtenus après le criblage biologique des extraits bruts obtenus. Les champignons de l'ordre des Xylariales sont généralement des parasites d'arbres, et sont rencontrés généralement sur les bois, les feuilles, des excréments d'animaux ou encore sur le sol (Lee *et al.*, 2000). Les espèces de champignons endophytes récoltées par Schultz et Boyle (2005) en région tropicale sont *Xylaria* spp., *Colletotrichum* spp., *Guignardia* spp., *Phyllostica* spp., *Pestalotopsis* spp., *Phomopsis* spp. Dans cette étude, tous les genres ont été obtenus avec une grande fréquence relative d'isolats, à l'exception du genre *Phyllostica* qui n'a pas été retrouvé. La biodiversité inexplorée du biome amazonien et du biome cerrado justifient la création de programmes de conservation et de programmes de recherche visant l'augmentation de connaissances sur ces biomes menacés, et assurant la préservation de ceux-ci (Klink et Machado, 2005).

Une levure appartenant au phylum Basidiomycota identifiée comme *Rhodotorula minuta* a été isolée de la plante médicinale *Phyllodendrum insignum* (Araceae). Il est intéressant de souligner que les basidiomycètes levuriformes ont été identifiés comme de rares champignons endophytiques de palmiers (Frolich *et al.*, 2000). Trois bactéries endophytes ont été isolées sans l'usage d'un milieu de culture sélectif ou d'antibiotique durant le processus d'isolement. Rosenblueth & Martinez-Romero (2006) ont établi certains critères de reconnaissance de bactéries endophytes véritables, dans lesquels il est demandé non seulement l'isolement à partir de tissus superficiellement désinfectés mais aussi des preuves microscopiques de bactéries préalablement marquées à l'intérieur du tissu végétal. Comme ce dernier critère n'a pas été atteint, le terme endophyte putatif a été utilisé pour les isolats bactériens trouvés dans cette étude.

Tous les extraits bruts à l'AcOEt des microorganismes endophytes isolés ont été criblés sur deux pathogènes humains: la bactérie Gram-positif *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et la levure *Candida albicans* ATCC 10213. La cytotoxicité des extraits a été évaluée sur des lignes cellulaires tumorales KB (Carcinome cervical de l'utérus) et MDA-MB-435 (Mélanome), et aussi dans la lignée cellulaire saine MRC-5 (fibroblastes pulmonaires humains). L'extrait obtenu à partir du milieu de culture seul (blanc) a été testé sur tous les modèles biologiques analysés et n'a pas présenté d'activité biologique significative, ce qui démontre que le résultat positif du criblage est bien dû à la présence de métabolites secondaires produits par les endophytes. L'identification de tous les

microorganismes endophytes et de leurs hôtes respectifs, ainsi que les activités antimicrobiennes et cytotoxiques de tout les extraits produit ont été présenté sur les tableaux 2 et 3.

Six extraits bruts fongiques (4,1%) présentent une activité antimicrobienne significative sur *S. aureus*, et trente-quatre (représentant 21,3%) ont été actifs sur la levure pathogène *C. albicans*. Les extraits des champignons endophytes codifiés par SNB-GTC2114 (*Chaetomium globosum*), SNB-GTC2304 (*Mycocleptodiscus* sp.), SNB-GTC2402 (*Lewia infectoria*) et SNB-GTC2501 (*Xylaria* sp.) ont été actifs avec une valeur de CIM entre 8 et 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sur *S. aureus*. Les extraits de champignons endophytes codifiés par SNB-GTC2003 (*Glomerella cingulata*), SNB-GTC2101 (inconnue), SNB-GTC2102 (*Pestalotiopsis* sp.), SNB-GTC2114 (*Chaetomium globosum*), SNB-GTC2201 (*Diaphorthe phaseolorum*), SNB-GTC2503 (*Phomopsis* sp.), SNB-GTC2605 (*Colletotrichum boninense*), SNB-GTC2706 (*Colletotrichum* sp.), SNB-GTC2710 (*Hypoxyllum investiens*), SNB-GTC2711 (*Hypoxyllum investiens*), SNB-GVL02 (*Penicillium* sp.), SNB-GTC2814 (*Phomopsis* sp.), SNB-GCI02 (*Xylaria cubensis*), SNB-GTC0201 (*Colletotrichum* sp.), BBS01 (*Eurotium rubrum*) ont obtenu une valeur de CIM entre 8 et 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sur *C. albicans*. Les extraits codifiés par SNB-GTC2003, SNB-GTC2101, SNB-GTC2102, SNB-GTC2501, SNB-GTC2605, SNB-GTC2706, SNB-GTC2710 et BBS01 ont démontré une activité antimicrobienne importante, et n'ont pas présenté de cytotoxicité sur les cellules MRC-5 à 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, démontrant une certaine sélectivité sur les modèles biologiques sélectionnés. Dans cette étude, des différences ont été observées entre les endophytes appartenant au même genre, quant à la capacité de production de métabolites antimicrobiens. Une grande proportion d'extraits antifongiques a été observée par rapport aux extraits antibactériens.

Les activités cytotoxiques des extraits bruts obtenus sont présentées sur le tableau 3. À la concentration de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ trente-six (24,4%), trente-quatre (23,2%), vingt-quatre (16,3%) des extraits ont inhibé plus de 50% de la prolifération cellulaire de lignées cellulaire KB, MDA-MB-435 et MRC-5 respectivement. Les extraits démontrant une inhibition de la croissance cellulaire supérieure à 80% à une concentration de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ont aussi été testé à une concentration de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, et un nombre important de ceux-ci ont maintenu leur activité. Dans cette concentration inférieure, dix-neuf extraits (12,9%) ont continué a démontrer une inhibition de la croissance cellulaire supérieure à 50% sur la lignée de cellules KB, cinq extraits (3,4%)

sur la lignée de cellules tumorales MDA-MB-435 et sept extraits (4,7%) sur la lignée de cellules saines MRC-5. Ces résultats démontrent une fois de plus que la grande proportion d'extraits avec une activité cytotoxique peut avoir comme origine la nature symbiotique de ces endophytes, pouvant contribuer à la défense des feuilles végétales contre l'attaque des pathogènes et des herbivores.

Les extraits bruts fongiques des endophytes codifiés par SNB-GTC2114 (*Chaetomium globosum*), SNB-GTC2304 (*Mycoleptodiscus* sp.), SNB-GTC2804 (*Diaphorte* sp.) et SNB-GSS10 (*Diaphorte pseudomangiferae*) démontrent une forte inhibition de la prolifération cellulaire à une concentration de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, avec des valeurs d'inhibition de la croissance cellulaire supérieure à 80% sur les trois lignées cellulaires. Ces extraits ont été sélectionnés pour une investigation chimique visant l'isolement et l'identification des métabolites responsables des activités cytotoxiques des extraits. De plus, il a été observé que quatre vingt quatre extraits (57,1%) ne démontrent pas d'activité cytotoxique contre les cellules saines MRC-5, ce qui inclut ces extraits comme de bons candidats à être testés sur d'autres modèles biologiques, étant donné l'absence de cytotoxicité sur ce modèle cellulaire indique une bonne spécificité d'action biologique (Cos *et al.*, 2006).

Vingt-huit métabolites secondaires ont été isolés à travers les fractionnements bioguidés de huit extraits bruts appartenant aux huit différents champignons. Ceux métabolites et leurs respectifs champignons producteurs sont décrit en suite. Dix-sept composés isolés ont déjà été décrit auparavant dans la littérature: l'acide piliformique (24), la griséofulvine (25), isolés de *X. cubensis* SNB-GCI02; la phomopirone A (26), la pyrenocine A (27), l'alterperilenol (28) et la novae zelandin A (29) isolés de *L. infectoria* SNB-GTC2402; la 5-metilmeloin (31) et la dihydrosporothriolide (32) isolés de *Xylaria* sp. SNB-GTC2501; la mycoleptodiscine A (34) et la mycoleptodiscine B (35) isolés de *Mycoleptodiscus* sp. SNB-GTC2304; le mycoepoxidien (36) et l'altioxine A (37) isolés de *D. pseudomangiferae* SNB-GSS10; l'acrémonisol A (40), le semicochliodinol A (41) et le cochliodinol (42) isolés de *C. Globosum* SNB-GTC2114; la colletofragarone A2 (43) isolé de *Colletotrichum* sp. SNB-GTC0201; la flavoglaucine (44) isolé de *E. rubrum* BBS01. Le composé inédit nommé pyrrocidine C (30) a été isolé à partir de *L. infectoria* SNB-GTC2402 et identifié grâce à des analyses spectroscopiques (Casella *et al.*, 2013). L'activité sur *S. aureus* de la pyrrocidine C (30) a eu une valeur de CIM de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, cette activité a été sélective vue que la pyrrocidine C n'a pas été considérée cytotoxique sur les cellules saines MRC-5.

En somme, les résultats présentés dans ce travail de thèse sont le fruit de petites recherches bien établies sur des plantes amazoniennes ou du biome Cerrado. Une grande biodiversité de champignons endophytes ainsi qu'une grande chimiodiversité des métabolites secondaires ont été obtenues. Les micro-organismes endophytes tropicaux comme ceux présentés dans ce travail de thèse, peuvent représenter une nouvelle source d'agents antimicrobiens et cytotoxiques.

1. Introdução

O termo genérico “endofítico” representa todos os micro-organismos que durante algum período de suas vidas, colonizam algum tecido interno vivo, sem causar danos aparentes aos seus hospedeiros do reino vegetal (Strobel e Daisy, 2003). Micro-organismos endofíticos que habitam as folhas de vegetais terrestres superiores são extremamente diversos, representados em grande parte por fungos, além da existência de bactérias (incluindo estreptomicetos), nematoides e vírus (Strobel *et al.*, 2004).

Os principais micro-organismos endofíticos encontrados em tecidos aéreos e subterrâneos de plantas examinadas são fungos endofíticos. Estes representam uma classe ainda pouco conhecida e extremamente importante do ponto de vista ecológico às comunidades de plantas terrestres (Arnold *et al.*, 2003).

Esta microbiota pode contribuir para a proteção e sobrevivência de seus hospedeiros através da produção de substâncias pertencentes a diferentes classes químicas (Zhang *et al.*, 2009). Esta peculiar microbiota vem sendo considerada como uma promissora fonte de metabólitos estruturalmente ricos e inéditos (Strobel, 2003), com atividade antibiótica, imunossupressora, anticancerígena dentre outras. Nos últimos anos, diferentes moléculas têm sido isoladas com o propósito de utilização agrícola e por indústrias farmacêuticas (Arnold 2007) justificando a importância em se investigar e a conservar estes organismos. Apesar do conhecimento adquirido nos últimos anos, existem muitas perguntas relacionadas à origem evolucionária, aos variados papéis ecológicos ainda não respondidos e ao real potencial de utilização biotecnológica dos fungos endofíticos (Leeder *et al.*, 2011).

1.2 Origem, evolução e biologia dos fungos endofíticos

Os simbioses fúngicos podem mediar alterações profundas no que concerne à ecologia, evolução e capacidade de adaptação de vegetais em relação ao ambiente circundante (Schulz e Boyle, 2005). Comunidades inteiras de plantas são atingidas (Clay e Holah, 1999), manifestando os fortes efeitos na diversidade e na estrutura dos outros organismos associados aos hospedeiros vegetais, como bactérias, nematódeos e

insetos (Omacini *et al.*, 2001). Segundo Rodriguez *et al.* (2009), pode-se esperar ainda que existam micro-organismos endofíticos que sejam específicos a determinados hospedes, havendo assim uma relação simbiótica exclusiva entre hospede e hospedeiro.

A antiga associação entre fungos e plantas é revelada pela presença de endófitos em tecidos de plantas fossilizadas (Strobel, 2003; Krings *et al.*, 2007). Por meio de análises de sequenciamento gênico de enzimas, como celulases e pectinases que são ubíquas aos fungos, e relativamente bem conservadas através da evolução destes organismos, Carrol (1988) sugeriu que alguns fitopatógenos que existem no ambiente atual têm origem ancestral endofítica. A análise de enzimas como as feniltransferases, responsáveis pela biossíntese de derivados indólicos (Li, 2009), e de enzimas da família das hidrolases glicosídicas sugere grande semelhança genética entre fungos endofíticos e fungos fitopatogênicos (Parrent *et al.*, 2009). A transição entre um modo de vida mutualístico e patogênico dos fungos endofíticos provavelmente permitiu a diversificação das espécies e a especificidade existente entre algumas delas e seus respectivos hospedeiros (Eaton *et al.*, 2011). A transição entre os estados de patogênese, comensalismo, simbiose e/ou mutualismo e parasitismo ocorre geralmente como resposta às mudanças das condições ambientais nas quais o fungo se encontra (Newton *et al.*, 2010). Comensalismo e mutualismo representam um estado de equilíbrio entre a planta hospedeira e o micro-organismo hospede. O desequilíbrio causado por fatores bióticos ou abióticos pode transformar uma relação previamente simbiótica em uma relação de parasitismo (Kogel *et al.*, 2006). A regulação destas mudanças é realizada por diferentes cascatas de sinalização, onde diferentes receptores e transportadores são ativados ou bloqueados através de diferentes moléculas sinalizadoras, como açúcares, por exemplo (Doidy *et al.*, 2012). A transição de fungos patogênicos entre diferentes reinos, como fungos que atacam insetos e plantas, também pode ser considerada como uma possível origem e diversificação dos fungos endofíticos (Baarlen *et al.*, 2007). Foi demonstrado, que fungos associados a algumas espécies de formigas podem habitar tecidos internos de raízes de plantas sem causar danos a seu hospedeiro vegetal (Voglymar *et al.*, 2011). Uma revisão sobre os aspectos co-evolucionários entre fungos e artrópodes é descrita por Rohlfs e Churchill (2011) onde os autores concluem que provavelmente uma pressão seletiva estabelecida por relações de antagonismo/simbiose entre os mesmos contribuiu para a diversificação ecológica dos micro-organismos endofíticos.

Estudos demonstram que endófitos fúngicos sistêmicos, os Clavicipitaceus, transmitidos verticalmente são detectados quase que exclusivamente em gramíneas (Petrini, 1991). Esses endófitos contribuem à defesa do hospedeiro contra a herbivoria, através da produção de alcaloides com atividade inseticida, reduzindo assim a abundância e a diversidade de herbívoros que atacam gramíneas de interesse agrônomico (Faeth e Saari, 2012). AnZhi *et al.* (2009) comprovaram que os efeitos destas associações simbióticas em gramíneas deve ser analisado apenas em nível da espécie do endófito e do morfotipo da cepa, pois diferentes morfotipos podem conferir ou não adaptações entre hóspede/hospedeiro. Já os endófitos não sistêmicos, os Não-Clavicipitaceus, transmitidos horizontalmente planta a planta através de esporos, representam a maior parte dos fungos endofíticos em Gimnospermas e Angiospermas (Saikkonen, 2007).

Dentro das zonas intertropicais, Arnold (2007) demonstrou que todas as folhas amostradas de vegetais superiores estão colonizadas por micro-organismos endofíticos, e que uma espécie vegetal é capaz de abrigar facilmente entre 30 a 40 fungos endofíticos cultiváveis, além dos não cultiváveis. Nas zonas temperadas, Sieber (2007) concluiu que todas as árvores amostradas possuíam endófitos, apresentando muitas vezes uma alta diversidade inter-espécie, sendo que certos hospedeiros continham mais de cem espécies diferentes de micro-organismos por tipo de tecido vegetal. Em regiões árticas, Higgins *et al.* (2007) observaram uma diminuição nas frequências de endófitos de acordo com o aumento da latitude para a espécie *Dryas intergrifolia* (Rosaceae), sendo a presença de micro-organismos endofíticos ainda observada em todas as espécies amostradas. Gore e Bucak (2007) demonstraram em espécimens de *Laurus nobilis* (Lauraceae), oriundos de diferentes locais mediterrâneos, que os fatores geográficos influenciaram fortemente a comunidade de endófitos coletada, enquanto as diferenças sazonais não interferiram na diversidade dos micro-organismos.

Alterações no clima e nos níveis de gás carbônico influenciam o padrão de colonização dos fungos endofíticos, levando-os a se adaptarem em função destas variações e conseqüentemente alterando também a adaptação e fisiologia de seus hospedeiros vegetais (Compant *et al.*, 2010). A simbiose estabelecida entre vegetais e fungos os adaptam a diferentes estresses bióticos e abióticos e muitas vezes são responsáveis pela sobrevivência de ambos quando estes são expostos à habitat de risco ou a condições de vida consideradas desfavoráveis (Rodriguez *et al.*, 2004). Esta

simbiose é estabelecida através de uma fina regulação entre ambas as partes e este equilíbrio pode ser desbalanceado tanto por moléculas advindas do hospedeiro vegetal (Saunders e Kohn, 2009) quanto por moléculas produzidas pelo endófito hóspede (Torres *et al.*, 2012).

Em folhas de *Theobroma cacao* (Sterculiaceae) foi demonstrado que a presença de fungos endofíticos aumentou a capacidade fotossintética da planta e reduziu sensivelmente o ataque de patógenos superficiais, contribuindo assim à defesa e à sobrevivência de seus hospedeiros vegetais (Arnold *et al.*, 2003). Outro caso de resistência ao ataque de patógenos mediado pela presença de endófitos foi demonstrado por Brunsfeld e Newcombe (2004), onde foi evidenciado que em pinheiros da espécie *Cronartium ribicola* (Cronartiaceae) a presença destes micro-organismos reduziu em onze vezes a mortalidade dos pinheiros que receberam a inoculação de diferentes espécies de fitopatógenos em seus tecidos aéreos.

O trabalho de Bailey *et al.* (2006) indica que a presença de endófitos altera a expressão gênica de suas plantas hospedeiras. Alguns benefícios fisiológicos e adaptativos advindos das interações simbióticas entre vegetais e seus respectivos endófitos já foram demonstradas. Plantas submetidas à restrição luminosa responderam positivamente à associação com fungos endofíticos, diminuindo efeitos negativos advindos da falta de luz (Davitt *et al.*, 2010). Em *Mentha piperita* (Lamiaceae), a presença de fungos endofíticos radiculares influenciou a produção de terpenos voláteis pelos seus tricomas foliares (Mucciarelli *et al.*, 2007). Jaber e Vidal (2010) demonstraram que em *Vicia alba* (Fabaceae), conhecida popularmente como feijão, a presença do fungo endofítico *Acremonium strictum* diminuiu significativamente os efeitos de herbivoria causados pela larva da mariposa *Helicoverpa armigera*.

Mesmo com o enorme avanço dos conhecimentos quanto à importância destes seres em diferentes áreas e aplicações humanas, a diversidade microbiana até os dias atuais ainda é muitas vezes ignorada e muitas questões quanto à origem, evolução e à biologia dos fungos endofíticos ainda continuam inexplicadas (Rodriguez *et al.*, 2009). A conservação e a exploração desta grande biodiversidade, de certa forma ainda desconhecida, deve ser priorizada, pois novos produtos de grande interesse humano podem ser descobertos a partir dos fungos endofíticos (Smith *et al.*, 2008).

1.3 Principais grupos e classificação dos fungos endofíticos

A grande maioria dos fungos endofíticos conhecidos pertencem ao filo Ascomycota, com alguns poucos representantes do filo Basidiomycota (Carroll, 1988), Mais de 75% dos fungos endofíticos foliares conhecidos pertencem ao filo Ascomycota (Arnold, 2007). A filogenia atual dos fungos ascomicetos, estabelecida por Hibbett *et al.* (2007) é apresentada na figura 1.

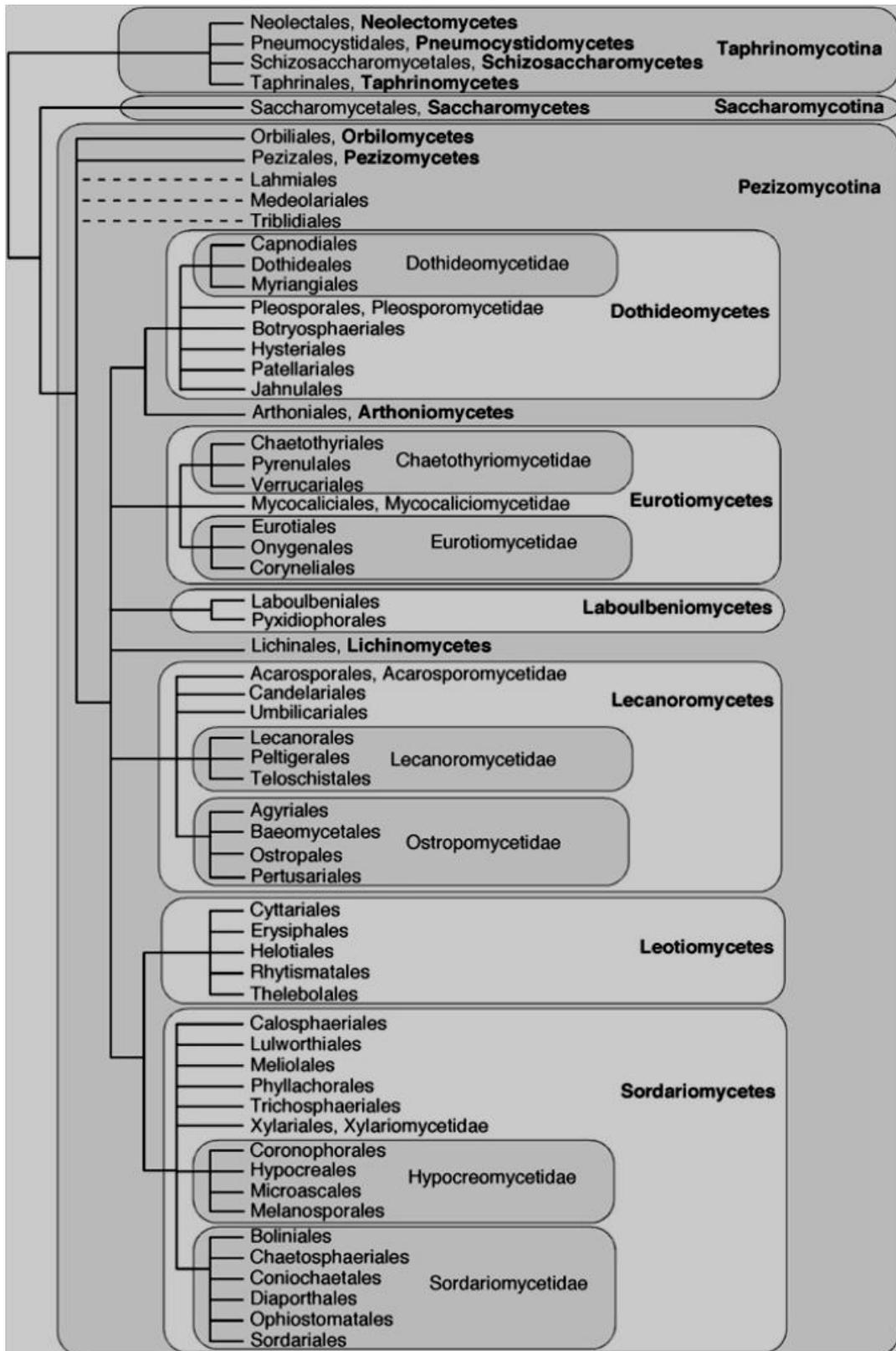


Figura 1. Filogenia e classificação dos fungos Ascomicetos, adaptada de Hibbett *et al.*, 2007.

*As linhas não representam a real distância filogenética.

Fungos endofíticos são divididos em classes que muitas vezes fazem menções às suas respectivas origens vegetais, ou também a localização *in situ* na planta, ou considerando critérios como a relação simbiótica estabelecida entre hospede e hospedeiro (Stone *et al.*, 2000). Ao contrário das micorrizas que colonizam tanto as raízes vegetais quanto a rizosfera circundante, micro-organismos endofíticos residem somente na parte interna dos tecidos vegetais e podem crescer em raízes, folhas, caule, flores e frutos, esporulando sempre que a planta ou o tecido habitado entra em senescência (Stone *et al.*, 2004). A colonização pode ocorrer nos espaços inter- ou intracelular de forma localizada ou sistêmica (Schulz e Boyle, 2005), sendo que a invasão da célula vegetal envolve a quebra dos biopolímeros da parede celular hospedeira através de enzimas como celulasas e pectinases (Aro *et al.*, 2005).

Dois grandes grupos principais de ascomicetos endofíticos foram reconhecidos - clavicipitaceus e não- clavicipitaceus (Carroll, 1988), refletindo diferenças quanto ao parentesco evolucionário, taxonomia, tipo de hospedeiro vegetal e funções ecológicas (Tabela 1).

O grupo dos endófitos clavicipitaceus infectam apenas gramíneas; e o dos não-clavicipitaceus, podem ser coletados a partir de tecidos assintomáticos de plantas não vascularizadas, briófitas, pteridófitas, algas, gimnospermas e angiospermas (Clay e Schardl, 2002). A grande maioria das publicações científicas relacionadas aos fungos endofíticos é sobre endófitos clavicipitaceus devido aos impactos significativos ocasionados por esses fungos em gramíneas de interesse econômico (Torres *et al.*, 2012). No entanto, os endófitos não-clavicipitaceus são mais biodiversos, mais numerosos e são representados por pelo menos três grupos funcionais distintos (Tabela 1) baseados em características biológicas e significância ecológica.

Tabela 1. Critérios de simbiose utilizados na classificação de fungos endofíticos

Critério	Clavicipitaceous	Não-clavicipitaceous		
	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4
Hospedeiros colonizados	Limitado	Variados	Variados	Variados
Tecidos colonizados	Rizoma e partes aéreas	Raízes, rizomas e partes aéreas	Partes aéreas	Raízes
Colonização <i>in planta</i>	Sistêmica	Sistêmica	Não sistêmica	Sistêmica
Biodiversidade <i>in planta</i>	Baixa	Baixa	Alta	Baixa
Transmissão	Vertical e horizontal	Vertical e horizontal	Horizontal	Horizontal

Tabela adaptada de Rodriguez *et al.*, 2009.

2 Metabolismo secundário dos fungos endofíticos

Desde o isolamento da penicilina encontrada no fungo *Penicillium notatum* (Fleming, 1945), pesquisadores vêm tentando descobrir novos metabólitos bioativos advindos de diferentes micro-organismos. Entre 1981-2002, cerca de 60% dos novos fármacos registrados no FDA (Federal Drug Administration) para o tratamento do câncer, hipertensão e doenças infecciosas foram originários de micro-organismos (Newman *et al.*, 2003).

A grande maioria das substâncias isoladas de fungos endofíticos corresponde a pequenas moléculas derivadas do metabolismo secundário fúngico (Arnold 2007). O perfil dos metabólitos secundários fúngicos consiste em diferentes compostos que um fungo pode produzir em um determinado substrato, incluindo toxinas, antibióticos e outros compostos com funções ecológicas distintas (Frisvad *et al.*, 2008).

A produção dos metabólitos secundários é coordenada e alterada ao longo do desenvolvimento fúngico, logo o aparecimento de cada metabólito ocorre somente durante estágios apropriados nos quais haja geralmente uma vantagem ao micro-organismo produtor do metabólito (Shwab e Keller, 2008). Os metabólitos biologicamente ativos isolados de micro-organismos endofíticos, certamente são os que possibilitaram sua adaptação ao ambiente circundante (Hurek e Hurek, 2011), e que são capazes de interferir em cascatas de sinalização, ou que conferem proteção contra outros micro-organismos que habitam o mesmo nicho ecológico. Muitos metabólitos secundários podem servir como um escudo químico contra seus predadores ou animais saprófagos competidores (Kempken e Rohlfs, 2010). Por isso, moléculas citotóxicas ou antibióticas com aplicações clínicas são encontradas nestes micro-organismos ou podem servir de modelo para moléculas de síntese (Sanchez Marquez *et al.*, 2011).

A origem bioquímica da maioria dos metabólitos secundários fúngicos começa a partir de metabólitos primários comuns, onde algumas vias biossintéticas já foram decifradas. Dentre as principais classes de metabólitos secundários produzidos podemos citar: os policetídeos, que são derivados da condensação de ácidos carboxílicos simples, de uma maneira semelhante à formação de ácidos graxos (Hutchinson e Fujii, 1995); os ácidos graxos complexos e oxilipinas são formados a partir de ramificações e

complexações de ácidos graxos de baixa massa molecular (Tsitsigiannis *et al.*, 2004); terpenos e esteróides derivam de unidades isoprênicas advindas do ácido mevalônico (Cerdá-Olmedo, 1994); alcalóides e peptídeos nitrogenados são formados por peptídeo-sintases não ribossomais que ligam simples unidades peptídicas para formar os produtos finais, como no caso das das cefalosporinas (Keller, 2011).

Uma única espécie de fungo endofítico pode produzir uma variada quantidade de metabólitos secundários, advindos de diferentes vias metabólicas, possuindo atividades biológicas distintas (Strobel *et al.*, 1993). A literatura demonstra que a diversidade genética e metabólica dos fungos endofíticos é uma importante fonte de metabólitos secundários bioativos (Bacon e White, 2000) podendo interagir com diferentes alvos e estruturas celulares (Strobel, 2003).

Ao contrário do que ocorre no reino vegetal, ainda não é possível utilizar os perfis dos metabólitos secundários fúngicos como critério de filogenia, isto devido à distribuição heterogênea e inconsistente destes metabólitos através do reino fúngico (Frisvad *et al.*, 2008).

A disponibilidade de sequências genômicas fúngicas tem aumentado o conhecimento quanto às vias biossintéticas dos metabólitos secundários fúngicos. Diferentes genes reguladores já foram identificados, sendo que a maioria se encontra agrupada em enormes “clusters” genéticos (Fox e Howlett, 2008). “Clusters” genéticos co-regulados são a marca registrada da regulação do metabolismo secundário fúngico, e um grande número de evidências sugere que a regulação destes genes é em parte epigenética, como visto em outros eucariotos (Palmer e Keller, 2010). Fungos do gênero *Aspergillus* podem mudar completamente o perfil metabólico, com apenas poucas modificações de condições de cultivo (Bok *et al.*, 2006), ou simples mutações genômicas pontuais são suficientes para alterar completamente a estrutura química das substâncias produzidas (Nielsen *et al.*, 2009). No trabalho de Wang *et al.* (2010), foi demonstrado que manipulações epigenéticas através do uso de agentes químicos podem causar profundas alterações no perfil químico dos metabólitos secundários excretados em seu exsudado (gutato) pelo fungo *Penicillium citreonigrum*. Enquanto o gutato de culturas controle exibiu um perfil metabólico relativamente simples, o gutato coletado de culturas tratadas com 50 μ M de 5-azacytidina (inibidor da DNA metiltransferase) foi

fortemente enriquecido quanto ao número de compostos presentes no extrato bruto fúngico, representando ao menos três famílias biossintéticas distintas.

Muitos fungos endofíticos desenvolveram mecanismos de autodefesa contra seus próprios metabólitos tóxicos. Esta proteção pode ser feita de diferentes maneiras, como através da modificação de receptores celulares ou estratégias de efluxo do composto tóxico através de proteínas especializadas (Cundliffe e Demain, 2010). Os mesmos mecanismos podem ser utilizados para a defesa do endófito contra toxinas vegetais também, ou ainda o fungo passa a mimetizar o mesmo composto tóxico vegetal, como no caso do fungo endofítico *Xylaria* sp., que se mostrou capaz de metabolizar saponinas antifúngicas de *Sapindus saponaria* (Sapindaceae), tornando possível sua presença nos frutos desta planta, que apresenta elevados teores de saponinas antibióticas em seu pericarpo (Amaral *et al.*, 2008).

Considerando que os fungos endofíticos se adaptaram às substâncias tóxicas de seu hospedeiro vegetal, e ainda, por mimetismo, podem produzir a mesma substância citotóxica, pode-se pensar que o hospedeiro vegetal possa utilizar estes compostos mimetizados como estratégia de autodefesa. O vegetal hospedeiro se beneficia de uma maior concentração de seu próprio metabólito de defesa, como por exemplo, no caso da produção do anticancerígeno camptotecina pelo fungo *Fusarium solani*, isolado de *Camptotheca acuminata* (Kusari *et al.*, 2011). A capacidade de alguns fungos endofíticos mimetizarem substâncias vegetais possibilita, por exemplo, a produção de vincamina pelo fungo Vm-J2, isolado de *Vinca minor* (Apocynaceae) (Yin e Yuhongsun, 2011). Outro exemplo de mimetismo de uma substância bioativa vegetal isolada a partir de um fungo endofítico é a produção de hipericina pelo ascomiceto *Chaetomium globosum*, isolado de *Hypericum perforatum* (Hypericaceae) (Kusari *et al.*, 2008).

A produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos, antes considerados como produtos exclusivos de plantas, levanta questionamentos intrigantes quanto ao organismo biossintetizador original. Na realidade, é possível que vários metabólitos antes considerados como fitocompostos sejam na realidade produtos biossintetizados por micro-organismos endofíticos (Kusari *et al.*, 2012).

2.1 Metabólitos endofíticos antimicrobianos

Os metabólitos secundários antimicrobianos isolados de fungos endofíticos pertencem a diferentes classes, como diterpenos (Imlach *et al.*, 2011), policetídeos (Sumarah *et al.*, 2011; Wicklow *et al.*, 2009), naftoquinonas (Kharwar *et al.*, 2009), cumarinas (Liu *et al.*, 2008), flavonoides e esteroides (You *et al.*, 2009), alcaloides (Ge *et al.*, 2009) e taninos mistos (Abdou *et al.*, 2010).

O isolado *Pestalotiopsis adusta* (L416), obtido dos galhos de uma planta não identificada na China, foi cultivado em meio sólido. Seu extrato bruto produzido em *n*-butanol demonstrou atividade em fungos fitopatogênicos: *Fusarium culmorum*, *Gibberella zeae* e *Verticillium albo-atrum*. O fracionamento bioguiado do extrato permitiu o isolamento dos pestacloretos A (1), B (2) e C (3) (Figura 2) que demonstraram potente atividade antifúngica sobre os três fitopatógenos, com valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) entre 0,5 e 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Zhang *et al.*, 2007).

O fungo identificado como *Talaromyces* sp., isolado da casca de *Kandelia candel* (Rhizophoraceae) demonstrou produzir metabólitos com atividade antimicrobiana em *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Sarcina ventriculi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*. Investigações químicas no extrato do isolado permitiu o isolamento dos compostos identificados como 7-epiaustidiol (4), 8-O-methilepiaustidiol (5), stemphyperilenol (6), skyrina (7), ácido secalônico A (8), emodina (9) e norlichexantona (10) (Figura 2). A substância 7-epiaustidiol demonstrou atividade para a bactéria multi-resistente *Pseudomonas aeruginosa*, com valor de CIM de 6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Já o composto stemphyperilenol foi ativo para a bactéria Gram-positiva *Sarcina ventriculi* com CIM de 3,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, valor menor que para o controle utilizado, ampicilina (12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Yang *et al.*, 2012).

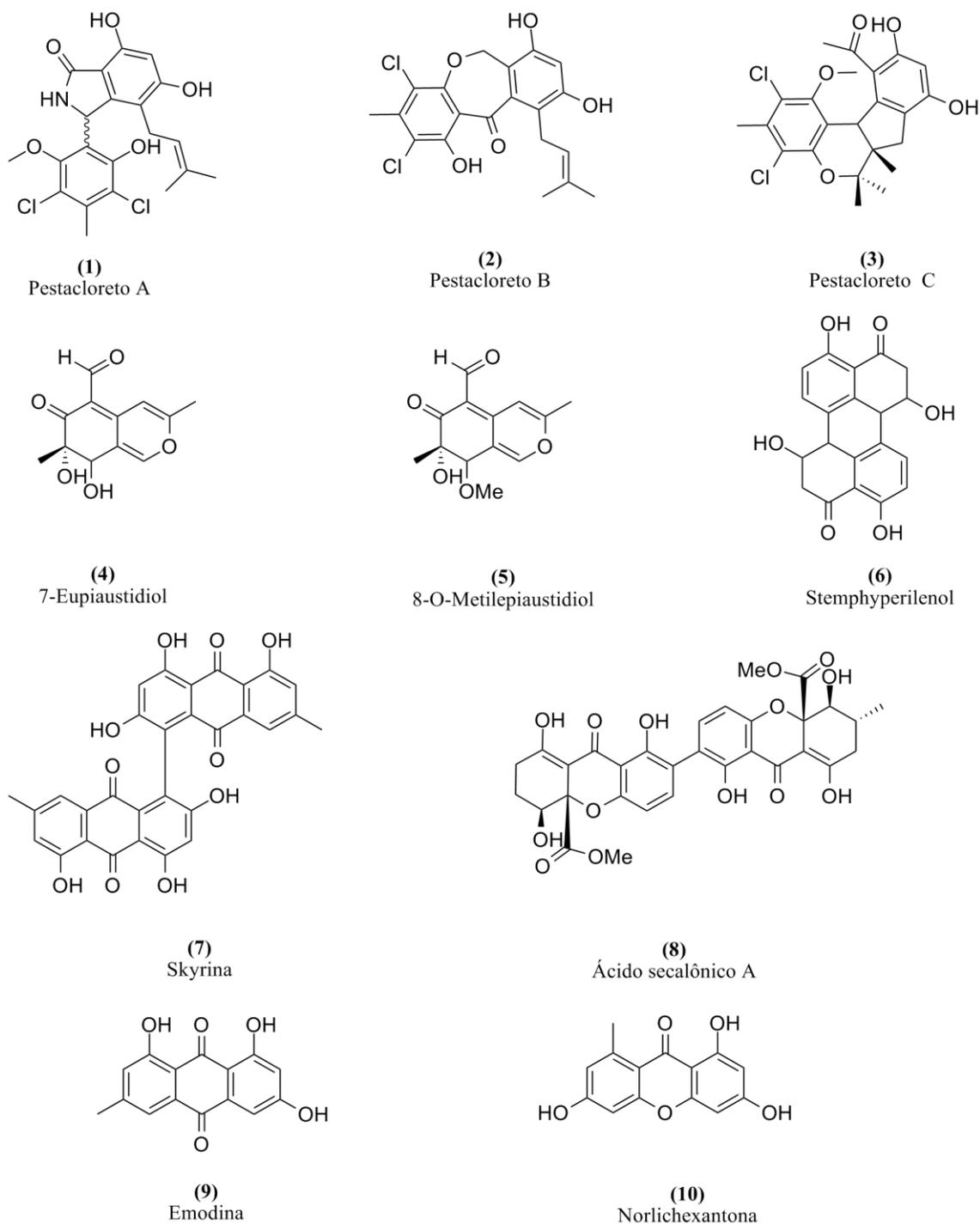


Figura 2. Metabólitos secundários endofíticos com atividade antimicrobiana.

O extrato bruto AcOEt de *Phomopsis cassiae*, fungo endofítico isolado de *Cassia spectabilis* (Fabaceae), demonstrou atividade antifúngica em *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides*. O fracionamento bioguiado do extrato resultou no isolamento de diferentes sesquiterpenos como o 3,9 α ,12-

trihidroxicadaleno (**11**), 3,9 β ,12-trihidroxicadaleno (**12**), 3,12-dihidroxicadaleno (**13**), e 3,11,12-trihidroxicadaleno (**14**) (Figura 3). Entre os compostos isolados, o 3,12-dihidroxicadaleno demonstrou atividade para os dois fungos fitopatogênicos (Krohn *et al.*, 2004).

O estudo químico do fungo endofítico *Edenia gomezpompae*, isolado a partir de *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae) resultou no isolamento de quatro naftoquinonas: preussomerina EG1 (**15**), preussomerina EG2 (**16**), preussomerina EG3 (**17**) e palmarumicina CP2 (**18**) (Figura 3). A preussomerina EG1 e EG3 inibiram o crescimento dos fitopatógenos *Colletotrichum* sp., *Phomopsis* sp., *Guignardia mangifera*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus solani* com valores de CIM entre 10 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Yang *et al.*, 2008).

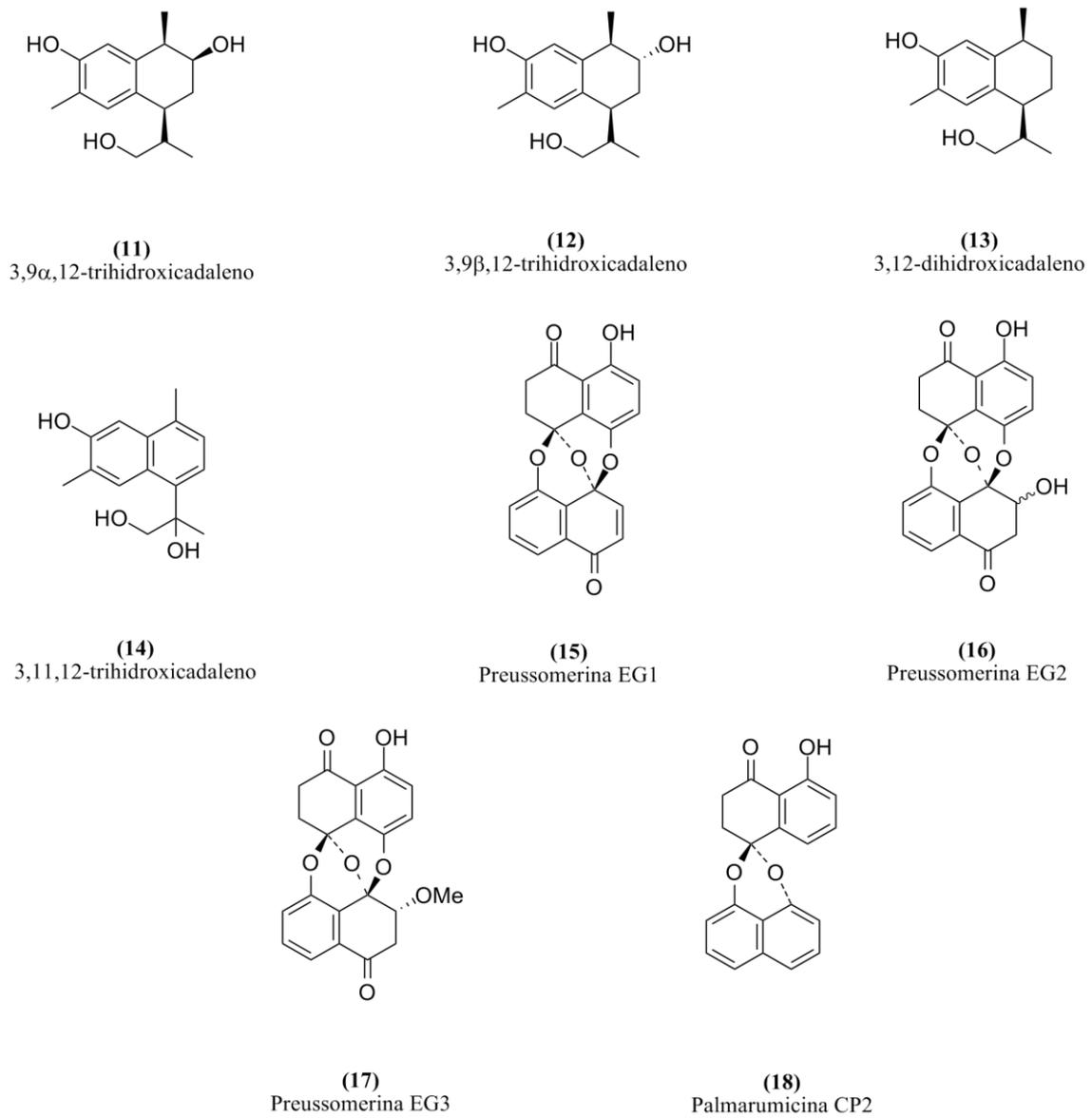


Figura 3. Metabólitos secundários endofíticos com atividade antimicrobiana.

2.2 Metabólitos endofíticos citotóxicos

Produtos naturais ou seus derivados semissintéticos e sintéticos são importantes fontes de fármacos antitumorais, dentre os 175 compostos aprovados como agentes anti-câncer entre 1940 e 2006, 42% eram produtos naturais ou compostos semissintéticos (Olano *et al.*, 2009). A procura por novos compostos é um objetivo prioritário na quimioterapia do câncer, devido ao rápido desenvolvimento de resistência múltipla aos fármacos disponíveis no mercado, à alta toxicidade e efeitos colaterais advindos dos mesmos (Cragg e Newman, 2000). A atividade biológica mais investigada dentre os metabólitos isolados de fungos endofíticos foi a atividade citotóxica *in vitro* (Kharwar *et al.*, 2011).

Um exemplo é o alcalóide 9-deacetoxifumigaclavina C (**19**) (Figura 4), isolado de *Aspergillus fumigatus*, fungo endofítico oriundo da gramínea *Cynodon dactylon* (Poaceae). A substância exibiu potente atividade citotóxica em células de leucemia humana (K562) com IC₅₀ de 3,1 µM, valor próximo ao do controle positivo hidrocloreto de doxorubicina, 1,2 µM, composto comumente utilizado para o tratamento da leucemia (Ge *et al.*, 2009).

O policetídeo nomeado 2-(7'-hidroxioxiocila)-3-hidroxi-5-metoxibenzeno acetato de etila (**20**) (Figura 4) foi isolado de culturas em meio sólido de *Phomopsis* sp. ZSU-H76, fungo endofítico encontrado em *Excoecaria agallocha* (Euphorbiaceae). Este composto exibiu atividade citotóxica em células Hep-2 (câncer de laringe) e HepG2 (carcinoma hepatocelular do fígado) com valores de IC₅₀ de 25 e 30 µg.mL⁻¹ respectivamente (Huang *et al.*, 2009).

Chaetomium sp. IFB-E015, fungo endofítico isolado das folhas de *Adenophora axilliflora* (Campanulaceae), produziu o alcaloide chaetominina (**21**) (Figura 4). Este alcaloide foi citotóxico para as células humanas de leucemia (K562) e células de câncer do cólon (SW1116) com valores de IC₅₀ de 33 e 76 µM, respectivamente (Jiao *et al.*, 2006).

A brefeldina A (**22**) (Figura 4) foi isolada do fungo endofítico *Acremonium* sp., o qual foi obtido a partir da planta medicinal tailandesa *Knema laurina* (Myristicaceae). Neste estudo, o composto demonstrou potente atividade citotóxica *in vitro* em células

KB (carcinoma uterino cervical humano), células BC-1 (câncer de mama) e células NCI-HI187 (câncer de pulmão), com valores de IC_{50} de $0,18 \mu\text{M}$, $0,04 \mu\text{M}$ e $0,11 \mu\text{M}$, respectivamente (Chinworrungsee *et al.*, 2008).

O composto nomeado como radicicol (**23**) (Figura 4) foi isolado a partir do fungo *Chaetomium chiversii*, obtido previamente de *Ephedra fasciculata* (Ephedraceae). O metabólito exibiu efeito antiproliferativo em linhagens de células de câncer de mama (MCF-7), com valor de IC_{50} de $0,03 \mu\text{M}$ (Turbyville *et al.*, 2006).

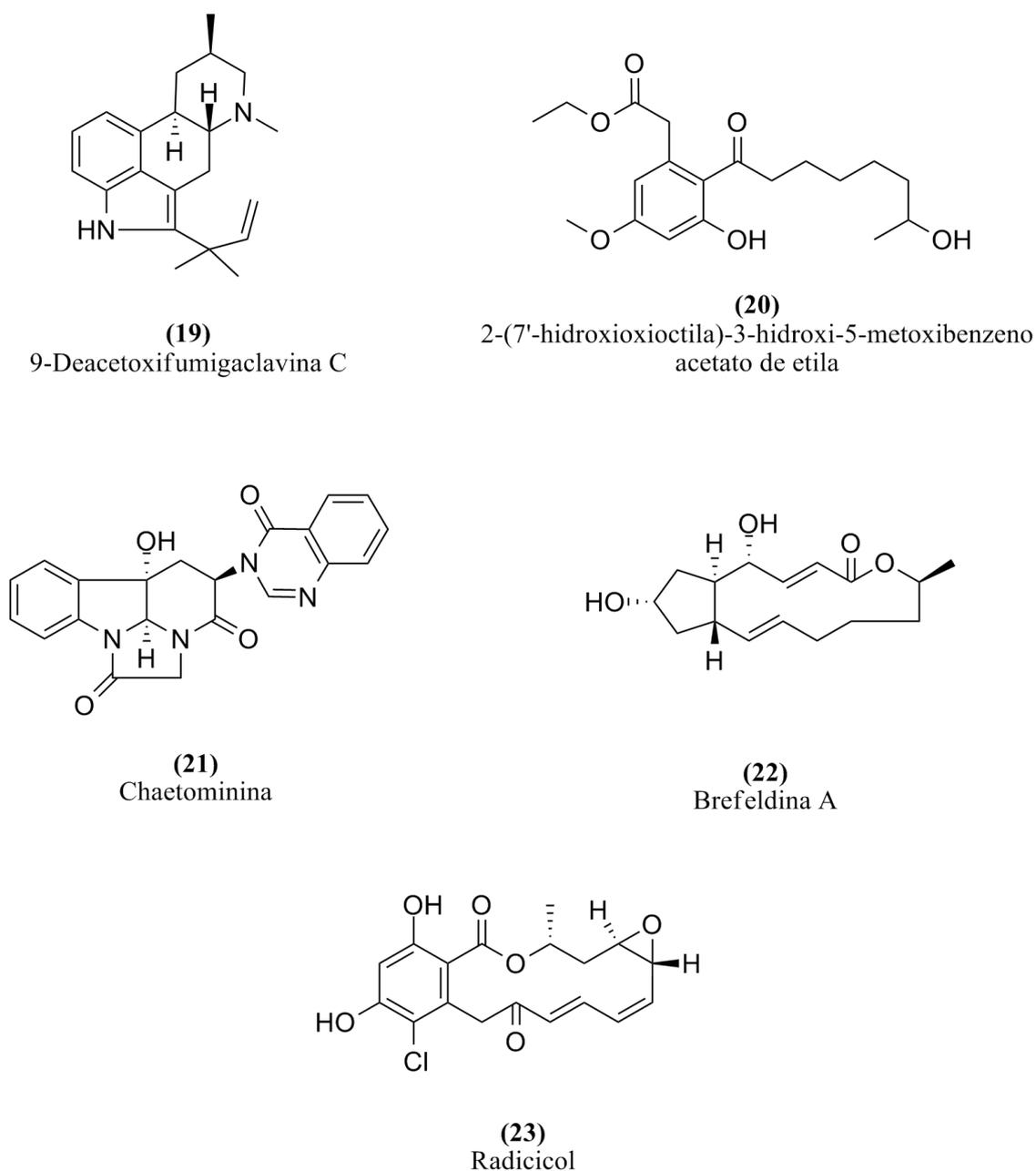


Figura 4. Metabólitos secundários endofílicos com atividade citotóxica *in vitro*.

3 Potencial de aplicabilidade

Dentre os benefícios promovidos pelos fungos endofíticos às plantas, podemos citar a proteção contra influências bióticas e abióticas, regulação de diferentes cascatas de sinalização celular de crescimento, desenvolvimento e defesa vegetal (Berg, 2009).

Os metabólitos fúngicos que conferem benefícios ao hospedeiro vegetal podem permitir o desenvolvimento de bioprotetores, promotores do crescimento vegetal, ou mesmo agentes fertilizantes a partir da utilização *in vivo* de micro-organismos endofíticos nos campos agrícolas (Davitt *et al.*, 2011). Endófitos poderiam ser utilizados diretamente no tratamento de sementes ou aplicados diretamente em plantas recém-plantadas através da aplicação de quantidades precisas de inóculo. Estas iniciativas podem ser consideradas atrativas do ponto de vista industrial e biotecnológico, pois representam alternativas ecológicas aos defensores agrícolas tradicionais que vêm se mostrando cada vez mais ineficazes no combate às pragas (Backman e Sikora, 2008). No entanto, Rosenblueth e Martínez-Romero (2006) ressaltam que o uso de endófitos em campos de agricultura ou a simples inserção de novos micro-organismos no meio ambiente devem ser avaliados cuidadosamente para evitar a introdução de novos patógenos ou causar um desequilíbrio ambiental ainda maior que aquele ocasionado pelos agentes químicos.

Estudos recentes tentam validar e reforçar a utilização de fungos endofíticos para o controle biológico de pragas agrícolas como insetos (Gurulingappa *et al.*, 2010), bactérias (Pavlo *et al.*, 2011) e fungos (Mejía *et al.*, 2008). Pesquisas na área de fitorremediação vêm também utilizando estes micro-organismos como agentes de degradação de compostos nocivos ao meio ambiente, como metais pesados e poluentes petroquímicos (Li *et al.*, 2011). Plantas associadas a certos fungos endofíticos que possuem vias apropriadas de degradação e capacidades metabólicas particulares se beneficiam de uma descontaminação mais eficiente de agentes tóxicos. Geralmente há redução da toxicidade ocasionada pelos contaminantes ambientais, devido à facilitação da evaporação de contaminantes que são voláteis e à capacidade endofítica de sequestrar metais pesados (Weyens *et al.*, 2009). Métodos de controle ecológico de pragas agrícolas estão sendo cada vez mais utilizados. Yang *et al.* (2007) demonstraram que extratos brutos, obtidos a partir de culturas do endófito *Phaeothea dimorphospora*

impregnados em painéis de madeira de construção civil, protegeu os mesmos contra o ataque de diferentes fungos lignívoros. Certas bactérias endofíticas, por exemplo, foram introduzidas experimentalmente em culturas de arroz e milho e colonizaram efetivamente seus hospedeiros aumentando a fixação de nitrogênio pela planta, conferindo assim uma maior produção agrícola (Stoltzfus *et al.*, 1997). Stadler e Schulz (2009) e Tomscheck *et al.* (2010) verificaram a utilização de fungos endofíticos para a produção de biocarburantes, devido à produção de elevados níveis de hidrocarbonetos voláteis em cultura, principalmente metabólitos terpênicos.

Diferentes utilizações dos fungos endofíticos são almeçadas, mas talvez a mais promissora, e aquela que apresenta maiores investimentos é a pesquisa de desenvolvimento de novos fármacos oriundos de seus metabólitos secundários (Zhang *et al.*, 2009). Sabe-se que entre 1981 e 2002, 52% dos medicamentos introduzidos no mercado eram produtos naturais ou derivados destes (Chin *et al.*, 2006) e que em 1993, cerca de 1500 metabólitos fúngicos eram conhecidos por suas atividades antibióticas ou citotóxicas (Pelaéz, 2005). Atualmente, a maioria dos compostos antibióticos utilizados na clínica são moléculas análogas ou derivadas de micro-organismos (Newman e Cragg, 2007; Butler e Buss, 2006), além disso, mais de dois terços dos medicamentos aprovados entre 2005 e 2007 eram policetídeos de origem microbiana, movimentando em torno de US\$ 20 bilhões de dólares anuais em vendas (Butler, 2008).

As doenças infecciosas causaram 14,7 milhões de mortes em 2001, o que representa 26% da mortalidade global (Becker *et al.*, 2006). Nos últimos 10 anos, esta situação vem se agravando, com o aumento do número de mortes e dos gastos com o tratamento, que cresceram em torno de cinco vezes, atingindo cerca de US\$27 bilhões de dólares em 2010 (Dye *et al.*, 2013). Em países desenvolvidos, o câncer é a segunda maior causa de mortalidade, apenas na Europa no ano de 2008, 3,2 milhões de novos casos foram registrados e 1,7 milhões de mortes foram registradas (Ferlay *et al.*, 2010). Esta situação representa um desafio à saúde pública global, e está atrelada aos fenômenos de quimiorresistência, ao crescente número de pacientes imunodeprimidos, transplantados ou com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). O desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (Borysowski e Górski, 2008; Samra *et al.*, 2007) e anti-câncer (Ferlay *et al.*, 2010) deve ser aumentado. Fontes de moléculas farmacologicamente ativas devem ser pesquisadas para suprir as demandas de saúde atuais (Clardy e Walsh, 2004), logo a pesquisa de moléculas promissoras advindas de

micro-organismos endofíticos deve ser incluída nos programas de desenvolvimento de novos fármacos (Kharwar *et al.*, 2011).

Dentro deste contexto, este trabalho de tese teve como objetivo principal cultivar, isolar e identificar fungos endofíticos provenientes de plantas tropicais do bioma Amazônia, Guiana Francesa, e do bioma Cerrado, Brasil. Em paralelo, foi avaliado a atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos em AcOEt de culturas dos micro-organismos isolados. Alguns extratos considerados promissores nesta triagem foram cultivados em grande escala e fracionados por métodos cromatográficos em busca das substâncias responsáveis pelas atividades biológicas. As substâncias isoladas foram identificadas por técnicas espectrométricas de massa e de ressonância magnética nuclear em uma e duas dimensões. Os resultados obtidos ao longo deste trabalho de tese, são apresentados a seguir.

4 Objetivo Geral

Isolar e identificar fungos endofíticos foliares provenientes de plantas do Bioma Amazônia e do Bioma Cerrado e avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica dos extratos brutos produzidos a partir de culturas de cada micro-organismo isolado e de suas respectivas substâncias.

4.1 Objetivos específicos

-Selecionar, coletar, identificar e depositar exsicata em herbário das plantas candidatas ao isolamento de micro-organismos endofíticos foliares;

-Isolar micro-organismos endofíticos a partir de fragmentos foliares superficialmente estéreis colocados em cultura por um período de até seis meses;

-Identificar cada micro-organismo endofítico obtido utilizando técnicas de caracterização molecular e análise filogenética de cada isolado;

-Produzir extratos brutos em AcOEt a partir de culturas de cada endófito isolado;

-Avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica dos extratos brutos produzidos;

-Fracionar os extratos selecionados ativos e elucidar as substâncias isoladas;

-Avaliar a atividade antimicrobiana e citotóxica das substâncias.

5 Parte experimental – Materiais e Métodos

5.1 Coleta do Material Vegetal

A coleta das folhas para posterior isolamento dos micro-organismos endofíticos e para a confecção das exsicatas foi realizada no entorno de Brasília, DF, Brasil e na Floresta Nacional de Tibourou, da Guiana Francesa, França. Com auxílio de um GPS, todos os locais de coleta foram marcados quanto às coordenadas geográficas para cada espécie vegetal. As exsicatas (Figura 5) foram depositadas no Herbário da Universidade de Brasília (UB/UnB), e no Herbário da Guiana, “Herbier de Guyane” (CAY), em Cayenne, Guiana Francesa.

As folhas selecionadas foram cuidadosamente escolhidas, de forma que estas não podiam apresentar nenhum sinal visível de infecção latente. O isolamento dos micro-organismos endofíticos foi realizado em até 24 horas após as coletas, para evitar o desenvolvimento de micro-organismos saprófitos nas amostras vegetais, pois estes podem interferir no isolamento dos micro-organismos endofíticos.



Figura 5. Coleta de material botânico e exemplo de exsicata.

5.2 Isolamento dos micro-organismos endofíticos

Para o isolamento de fungos endofíticos foi utilizado o meio de cultura agar-batata-dextrose (ABD) (4 g.L^{-1} de extrato concentrado de batata, 20 g.L^{-1} de dextrose e 18 g.L^{-1} de agar; Fluka Analytical, Alemanha), diluído a 50%, autoclavado à $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min. Tubos tipo Eppendorf transparentes (2 mL) contendo 1 mL do meio de cultura foram também autoclavados nas mesmas condições. Quatro folhas de cada planta coletada foram selecionadas, dezesseis pequenos fragmentos de cada folha foram utilizados, somando então um total de 64 amostras por espécie vegetal. Cada fragmento selecionado foi esterilizado superficialmente por imersão sequencial em solução hidroalcolica a 70% (3 min), seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio e água a 5% (5 min) e por último, imersão final em solução hidroalcolica a 70% (1 min) para eliminar o hipoclorito de sódio remanescente. Após estes procedimentos, cada fragmento foi lavado com água destilada estéril. A água esterilizada residual foi incubada em placas de Petri contendo meio ABD para certificar a eliminação de todos os micro-organismos saprofíticos. Não deve haver crescimento de nenhum micro-organismo nas placas controle. Cada fragmento estéril foi colocado em tubos tipo Eppendorf contendo meio ABD e incubado a $26 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 6). Cada fungo emergente foi repicado em novas placas de Petri (10 cm) com meio de cultura ABD 50% estéril, sendo que sucessivos repiques foram feitos até se atingir o isolamento de cada micro-organismo endofítico. Em alguns casos um microscópio ótico foi utilizado para confirmação da pureza das cepas isoladas. Em todas as etapas utilizou-se uma pinça esterilizada em bico de Bunsen. Os fragmentos foliares foram deixados em cultura durante um máximo de cinco meses. Os micro-organismos isolados na Guiana Francesa foram codificados com “G” ou “LD” como letras iniciais e aqueles coletados no Brasil foram codificados com “B” como letra inicial. Todas as cepas foram conservadas em triplicata em tubos tipo Eppendorf (2 mL) contendo 1 mL de solução de glicerol e caldo batata-dextrose (mesma composição do meio ABD sem a presença de agar) (1:1) a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.



Figura 6. Fragmentos foliares em cultura para posterior isolamento de endófitos.

5.3 Identificação dos micro-organismos endofíticos

As análises moleculares foram realizadas em parte por BACTUP, França, para os endófitos isolados na Guiana Francesa e por Genotyping Biotecnologia, Brasil, no caso dos endófitos isolados no Brasil. A identificação dos fungos foi conduzida pela amplificação das regiões de DNA ribossomal ITS4 e/ou ITS1 de acordo com o protocolo descrito por White *et al.* (1990). As três espécies bacterianas foram identificadas de acordo com a análise das sequências 16S de DNA ribossomal (Priest, 1993). As sequências foram alinhadas utilizando o programa BLASTN 2.2.28 (Zhang *et al.*, 2000; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com sequências de DNA da base de dados GenBank, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências obtidas para os isolados endofíticos foram depositadas no GenBank para obtenção dos números de acesso.

5.4 Produção dos extratos brutos endofíticos

A partir dos fungos isolados no Brasil foi utilizado um protocolo de fermentação em meio de cultura líquido. Para isso foram utilizados erlenmeyers transparentes de 1 L

contendo 500 mL de caldo YMG, do inglês “Yeast-Malt-glucose” (extrato de levedura 4 g.L⁻¹, extrato de malte 10 g.L⁻¹, glicose 4 g.L⁻¹). Em cada erlenmeyer foi introduzido um pedaço do ágar de 1 cm² contendo o fungo proveniente de uma cultura estoque de 10 dias. Nesta etapa o bico de Bunsen garantiu a esterilidade do processo. Depois de inoculado, os erlenmeyers foram colocados em cultura dentro de um agitador orbital a 150 rpm por 15 dias a 26 °C (Figura 7).



Figura 7. Culturas líquidas de fungos endofíticos após 15 dias de incubação.

A produção dos extratos brutos dos micro-organismos isolados na Guiana Francesa foi realizada em culturas com meio ágar ABD (meio sólido) em placas de Petri de 14 cm de diâmetro. Cada endófito isolado foi individualmente inoculado nas placas de Petri por meio de palitos de dente autoclavados, de modo que pequenos fragmentos de hifa de culturas estoque de 10 dias eram repicados para as novas placas de Petri. As culturas foram mantidas por 15 dias a 26 °C (Figura 8).

Ambos os tipos de cultura (em meio sólido ou líquido) foram submetidos ao processo de extração por maceração em AcOEt (150 mL para cada placa de Petri ou erlenmeyer), por 24 h. O solvente orgânico em contato com as culturas foi filtrado à vácuo, lavado com água destilada em um funil de separação dando origem à solução

extrativa que foi em seguida evaporada sob pressão reduzida em rota evaporador rotativo e dessecada em câmara à vácuo até a obtenção do extrato bruto final (Figura 9). A atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* dos extratos foi verificada por meio dos ensaios biológicos. Para o estudo químico dos extratos fúngicos ativos foram realizadas culturas em grande escala através da mesma metodologia, utilizando-se 150 vezes mais Placas de Petri de 14 cm para os micro-organismos isolados na Guiana Francesa e 50 vezes mais erlenmeyers para os fungos endofíticos do Brasil. As culturas em grande escala foram realizadas para a obtenção de uma maior quantidade de extrato bruto, permitindo assim a realização dos estudos químicos posteriores.



Figura 8. Culturas sólidas de fungos endofíticos após 15 dias de incubação.



Figura 9. Extratos brutos obtidos a partir da maceração das culturas endofíticas em AcOEt.

5.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

5.5.1 Bactérias e fungos patogênicos humanos

A triagem inicial de todos os extratos brutos endofíticos foi avaliada em dois patógenos humanos: a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 10213, e a levedura *Candida albicans* ATCC 29213. Algumas substâncias isoladas foram testadas na bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 25922.

5.5.2 Teste da microdiluição (CIM)

O teste de microdiluição foi utilizado a fim de determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos sobre o crescimento da levedura *C. albicans* e de bactérias patogênicas humanas. O método utilizado foi adaptado segundo as normas NCCLS M27-A2 (levedura) e M7-A6 (bactérias aeróbicas) (NCCLS 2002; NCCLS 2003). A solução do meio de cultura RPMI foi tamponada com ácido 3-(*N*-morfolino)-propano-sulfônico (MOPS), na concentração de 0,165 mol.L⁻¹ para atingir pH = 7,0. O meio tamponado foi então filtrado em uma unidade de filtração estéril equipada com um filtro de porosidade de 0,22 μm. Para as bactérias o meio de cultura utilizado foi o TSB (peptona de caseína 17 g.L⁻¹, peptona de soja 3 g.L⁻¹, d(+)glucose 2,5 g.L⁻¹, cloreto de sódio 5 g.L⁻¹, di-potássio hidrogeno fosfato 2 g.L⁻¹). Os controles positivos utilizados nos testes foram os fármacos: oxacilina (64 a 0,125 μg.mL⁻¹) para *Staphylococcus aureus*, itraconazol (16 a 0,03 μg.mL⁻¹) e fluconazol (64 a 0,125 μg.mL⁻¹) para *Candida albicans*, adquiridos em pó diretamente do fabricante (Sigma, Alemanha). O itraconazol foi diluído em água destilada estéril para a obtenção de uma solução estoque de 320 μg.mL⁻¹ (20 vezes mais concentrada que a solução de teste inicial); e o fluconazol em DMSO, para a obtenção de uma solução estoque a 1280 μg.mL⁻¹. As soluções estoque foram diluídas a 5% (v/v) em RPMI em uma placa de microdiluição, para obtenção das concentrações teste. Os extratos foram diluídos em DMSO para a obtenção de uma solução a 10 mg.mL⁻¹. Na placa de microdiluição, essa solução foi diluída em RPMI estéril para a obtenção de uma gama de concentrações entre 256 e 0,5 μg.mL⁻¹. Todos os

testes da triagem inicial foram feitos em duplicata e as substâncias isoladas foram testadas em triplicata. As soluções estoque dos inóculos foram preparadas por meio da suspensão das partes visíveis dos micélios em água estéril. Todas as soluções estoque foram ajustadas para o padrão de turbidez McFarland 0,5 e, em seguida, diluídas na proporção de 1:10 (v/v, bactérias) ou 1:1000 (v/v, levedura) em RPMI estéril. Os microorganismos foram então adicionados às placas de microdiluição, contendo os extratos/substâncias e os controles positivos e o meio de cultura RPMI (100 μL), em seguida as placas foram incubadas a 36 °C. Os resultados foram observados após 5 dias para dermatófitos e após 2 dias para a levedura. O CIM foi determinado como a concentração correspondente ao último poço, onde o crescimento do patógeno foi visivelmente nulo.

5.6 Estudos de citotoxicidade

Os estudos de citotoxicidade foram realizados no Instituto de Química de Substâncias Naturais (ICSN, França) como parte de um serviço comum da plataforma de pesquisa do Centro Nacional de Pesquisa Científica francês (CNRS). Cada extrato foi testado em triplicata em três linhagens celulares diferentes: carcinoma uterino cervical humano KB (ATCC CCL-17) (O'Neil, 2009), melanoma humano MDA-MB-435 (ATCC HTB-129) e fibroblastos de pulmão saudáveis MRC-5 (ATCC CCL-171). Todas as células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma, Alemanha), suplementadas com 10% de soro fetal bovino ativado (PAA, Áustria) e 1% de penicilina/estreptomicina. As culturas foram mantidas em um incubador umidificado a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO_2 . Os extratos endofíticos foram testados em triplicata, em placas de 96 poços utilizando-se uma concentração inicial de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada extrato bruto diluído previamente em DMSO. Os resultados da triagem citotóxica são expressos pela porcentagem (%) de inibição da proliferação celular ocasionada por cada extrato em cada modelo celular. Os extratos brutos que apresentaram uma inibição celular superior a 80% a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram também testados a uma concentração de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A leitura dos testes foi feita após 72 h de incubação através do teste com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo) (Sigma, Alemanha), como descrito previamente por Tempete *et al.* (1995). A leitura dos

resultados foi feita em espectrofotômetro a 490 nm. Foram determinados os valores de IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento celular). A mesma metodologia foi utilizada para avaliar a atividade das substâncias isoladas. Os controles positivos utilizados foram docetaxel e doxorubicina (Carlo Erba, França). A atividade de inibição da proliferação celular das substâncias isoladas foi também avaliada pelo mesmo protocolo, no entanto utilizando a concentração inicial de 1 µg.mL⁻¹ com diluições seriadas atingindo a concentração de 0,0001 µg.mL⁻¹ para o cálculo do IC₅₀.

5.7 Estudos químicos e generalidades

5.7.1 Solventes

Os solventes (Acros Organics, França) utilizados na produção e fracionamento dos extratos brutos foram:

- Acetonitrila (ACN);
- Acetato de etila (AcOEt);
- Diclorometano (CH₂Cl₂);
- Hexano (Hex);
- Metanol (MeOH);
- Água deionizada (Milli-Q) (H₂O).

5.7.2 Cromatografias

Cromatografia líquida flash:

As cromatografias flash foram realizadas em um sistema Grace Reveleries® equipado de detecção dual a UV e ELSD com colunas Grace®:

- Sílica (50 μm), solventes utilizados foram Hex, AcOEt e MeOH;
- RP C18 (50 μm), solventes utilizados foram H₂O e ACN.

Cromatografia em camada delgada analítica:

As cromatografias em camada delgada analítica (CCD) foram realizadas em placas Merck:

- Gel de sílica 60 F₂₅₄ (fase normal);
- RP-18 F₂₅₄ (fase inversa).

As revelações foram efetuadas através da exposição da placa à irradiação ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm, e pela borrifação do revelador ácido fosfomolibdênico (5 g em 95 mL de EtOH), seguido de aquecimento da placa em capacitor térmico.

Cromatografia líquida de alta eficiência analítica:

As cromatografias líquidas de alta eficiência (CLAE, em inglês HPLC) analíticas foram realizadas com:

- Modulo de separação Waters 2695 Alliance®;
- Espectrômetro de massa Waters Micromass ZQ 2000;
- Detector UV de diodo Waters 2996 PDA (DAD em português);
- Detector evaporativo à difusão da luz (DEDL).

O controle do sistema foi realizado com o programa Empower™ 2. As colunas utilizadas foram:

- Waters Sunfire® Shield RP 18 (5 µm), 4,6 x 150 mm;
- Phenomenex Luna® C18 (5 µm), 4,6 x 250 mm.

Os solventes utilizados foram H₂O, ACN ou MeOH grau HPLC. Os modos de eluição e o fluxo utilizados são descritos no capítulo 5.8. Os cromatogramas apresentados são todos feitos a partir da detecção em UV (PDA), estes foram gerados pelo programa Empower™ 2 (Waters).

Cromatografia líquida de ultra eficiência:

As cromatografias líquidas ultra eficiência (CLUE, em inglês UPLC) acopladas ao Espectrômetro de Massa foram feitas através de um sistema Waters ACQUITY UPLC®, com detector UV Waters ACQUITY UPLC® PDA, detector DEDL ACQUITY UPLC® e um espectrômetro de massa triplo quadripolar Waters ACQUITY UPLC TDQ®. As colunas utilizadas foram:

- Waters High Strength Silica Atlantis® T3 (1,8 µm), 2,1 x 50 mm;
- Waters HSS C18 (1,8 µm), 2,1 x 50 mm.

Os solventes utilizados foram H₂O e ACN grau HPLC.

Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa:

As CLAE preparativas foram realizadas com:

- O sistema Autoprep (Waters 600 System Controller, bomba Waters 600, detector UV DAD Waters 2996, detector DEDL Waters 2424) acoplado a um injetor automático de amostras (Sample Manager Waters 2700) e controlado pelo programa MassLynx (Waters).

As colunas utilizadas nas CLAE preparativas foram:

- Waters Sunfire® OBD RP 18 (5 µm), 19 x 150 mm;
- Phenomenex Luna® (5 µm), 21,2 x 250 mm.

Os solventes utilizados foram H₂O, ACN e MeOH grau HPLC.

5.7.3 Métodos físicos de análise

Poder rotatório:

As massas moleculares são expressas em g.mol⁻¹. Os espectros de dicroísmo circular foram realizados em polarímetro Jasco[®] P-1010 nas temperaturas, concentrações e solventes indicados. O poder rotatório de cada substância foi verificado em polarímetro Anton Paar[®] MCP 300, a um comprimento de onda de 589 nm. As amostras foram diluídas em células de quartzo de 300 µL com 100 mm de largura.

Espectrometria de massa:

Os espectros de massa foram realizados em ionização electrospray (modo positivo ou negativo) em um aparelho Navigator LC/MS Thermo Finnigan. Os espectros de massa a alta resolução foram obtidos com uma fonte electrospray Lockspray (modo positivo ou negativo) acoplado a um analisador a tempo de voo LCT Micromass. As amostras foram solubilizadas em MeOH e injetadas manualmente no aparelho de massa que era equipado com uma bomba de sistema Waters 2795. As amostras foram analisadas a um fluxo de 0,2 mL.min⁻¹, com fase móvel (MeOH / H₂O, 50/50) durante 15 minutos.

Espectrometria de ressonância magnética nuclear:

Os espectros RMN foram realizados em aparelhos Avance 300 MHz Bruker Ultrashield, Avance 500 MHz Bruker e DRX 600 MHz Bruker. O tratamento dos espectros foi feito com o software ACD/NMR[®] e são apresentados em seu formato original (inglês) por uma questão de melhor resolução; o eixo X representa o deslocamento químico (Chemical shift) e o eixo Y a intensidade (intensity). O TMS foi usado como referência (padrão) interno com deslocamento químico (δ_H) de 0,0 ppm.

Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm, os seguintes valores de pico de solvente foram utilizados:

- δ_{H} 7,24 e δ_{C} 77,00 para o CDCl_3 ;
- δ_{H} 3,31 e δ_{C} 49,15 para o CD_3OD_3 ;
- δ_{H} 2,50 e δ_{C} 39,52 para o $\text{DMSO}-d_6$;
- δ_{H} 2,04 e δ_{C} 29,8 para a acetona- d_6 ;
- δ_{H} 2,73; 2,91; 8,01 e δ_{C} 162,7 para o $\text{DMF}-d_7$.

As constantes de acoplamento (J) são indicadas em Hertz. As seguintes abreviações foram empregadas: s (singleto), d (dubleto), dd (duplo dubleto), dq (duplo quadripleto), t (triplete), m (multiplete), a letra “b” indica uma multiplicidade larga do sinal, ex. bs (singleto largo), bt (triplete largo).

A nomenclatura das moléculas seguiu a nomenclatura IUPAC. No entanto em alguns casos, por questões de homogeneidade e devido às referências encontradas na literatura, a numeração dos átomos não foi sempre seguida.

5.8 Isolamento dos constituintes dos extratos fúngicos

5.8.1 Estudo do extrato AcOEt de *Xylaria cubensis* (SNB-GCI02)

I - Fracionamento e isolamento

Uma porção do extrato bruto em AcOEt (200 mg) de *Xylaria cubensis* (SNB-GCI02) foi fracionada por cromatografia flash utilizando-se gradientes lineares crescentes dos solventes Hex/AcOEt/MeOH. Oito frações foram reunidas com base nos seus perfis cromatográficos analisados em CCD e em seguida testados quanto à atividade citotóxica, o esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de *X. cubensis* (SNB-GCI02) é apresentado na Figura 10.

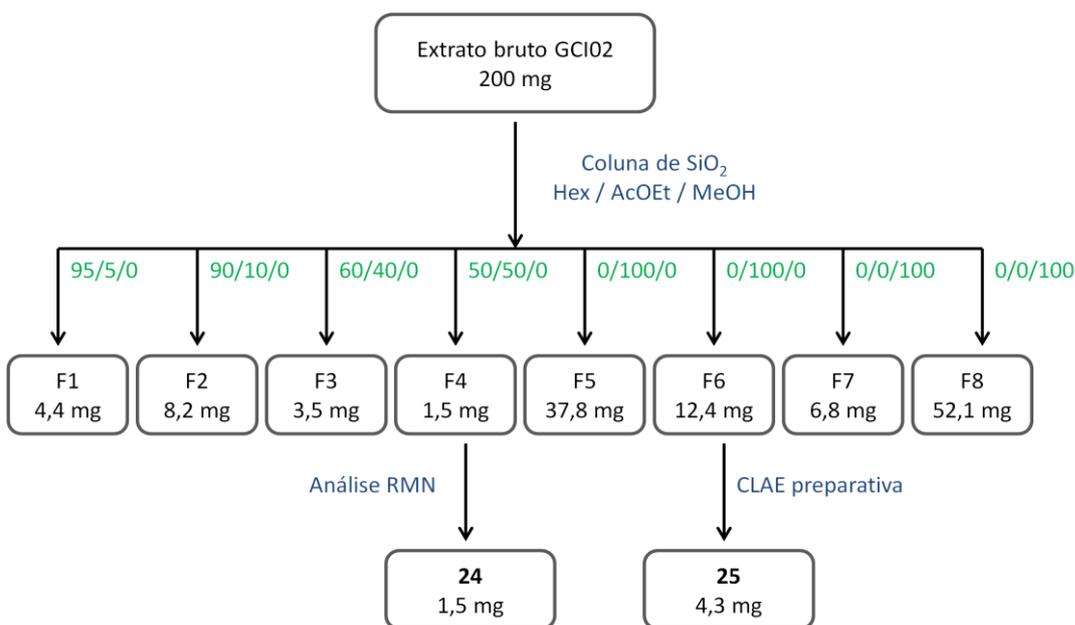


Figura 10. Esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de *Xylaria cubensis* (SNB-GCI02).

A fração F4, eluída em cromatografia flash com Hex/AcOEt 50/50, permitiu o isolamento direto da substância pura identificada como ácido pilifórmico (**24**) (1,5 mg). A fração ativa F6 (12,4 mg), eluída com 100% AcOEt, foi purificada por CLAE em fase

reversa. A griseofulvina (**25**) ($T_r=7,0$ min, 4,3 mg) foi isolada a partir desta fração, o isolamento por CLAE (Figura 11) foi realizado de acordo com as seguintes condições:

Coluna: Waters Sunfire OBD RP 18 ($5 \mu\text{m}$) 19 x 150 mm; **eluentes:** $\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{AF} / \text{ACN} + 0,1\% \text{AF}$; **gradiente:** 60/40 \rightarrow 0/100 (20 min), 0/100 (15 min), 0/100 (5 min), $17 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; **detecção:** UV 290 nm.

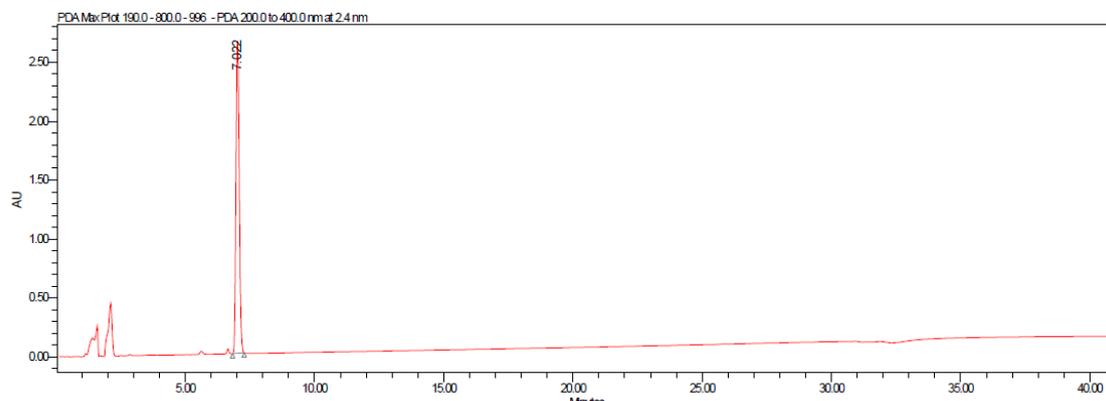
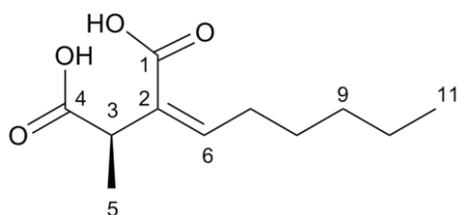


Figura 11. Cromatograma por CLAE da fração F6 do extrato em AcOEt de *Xylaria cubensis* (SNB-GCI02).

II – Dados espectroscópicos das substâncias isoladas

Ácido pilifórmico (**24**):



^1H RMN (500 MHz, acetona- d_6) (Figura 12) δ 0,90 (3H, t, $J = 6,9$ Hz), 1,30 (3H, d, $J = 6,9$ Hz), 1,36 (2H, m), 1,50 (2H, dt, $J = 7,3$ e 3,7 Hz), 2,06 (2H, m), 2,27 (2H, dq, $J = 7,3$ e 1,8 Hz), 3,68 (1H, q, $J = 7,1$ Hz), 6,85 (1H, t, $J = 7,7$ Hz); ^{13}C RMN (125 MHz, acetona- d_6) (Figura 13) δ 14,5 ; 16,6 ; 23,4 ; 29,4 ; 32,5 ; 41,1 ; 95,5 ; 134,0 ; 160,2 ; 168,3 ; 175,2.

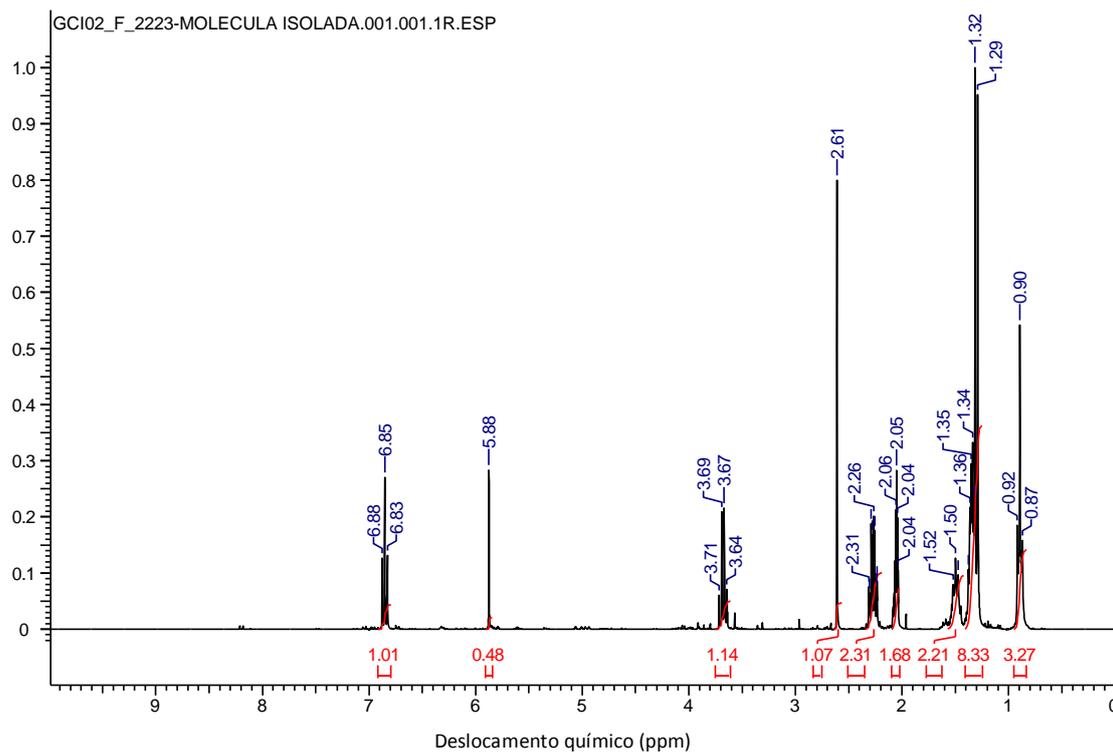


Figura 12. Espectro de RMN ^1H do Ácido pilifórmico (**24**) em acetona- d_6 .

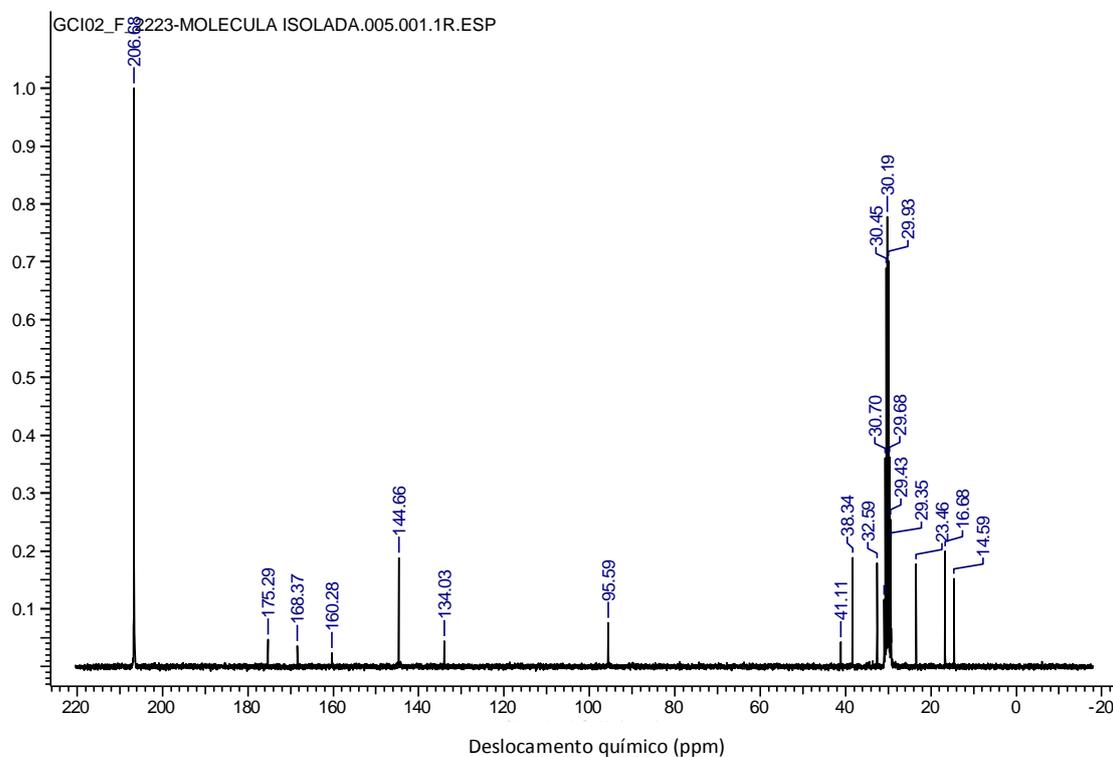


Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C do Ácido pilifórmico (**24**) em acetona- d_6 .

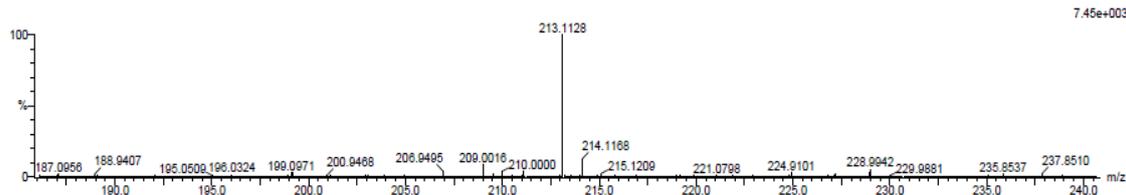
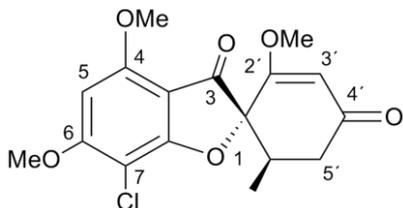


Figura 14. Espectro de massa HR-ESI-MS (negativo) do Ácido pilifórmico (**24**).

Griseofulvina (**25**):



^1H RMN (500 MHz, acetona- d_6) (Figura 15) δ 0,91 (3H, d, $J = 6,1$ Hz), 2,36 (1H, m), 2,82 (2H, m), 3,68 (3H, m), 3,98 (3H, s), 4,10 (3H, s), 5,54 (1H, s), 6,54 (1H, s); ^{13}C RMN (125 MHz, acetona- d_6) (Figura 16) δ 14,1 ; 37,2 ; 40,3 ; 56,6 ; 57,0 ; 57,5 ; 90,9 ; 91,2 ; 96,6 ; 105,1 ; 105,4 ; 158,5 ; 165,3 ; 171,0 ; 191,9 ; 195,5.

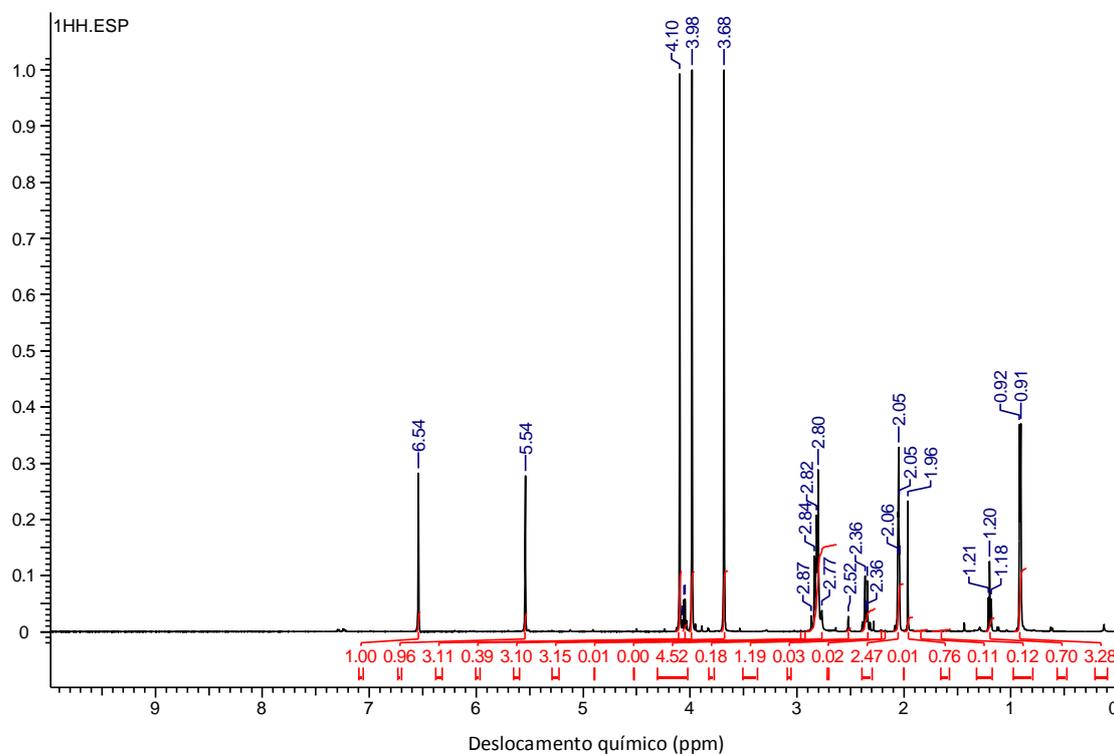


Figura 15. Espectro de RMN ^1H da Griseofulvina (**25**) em acetona- d_6 .

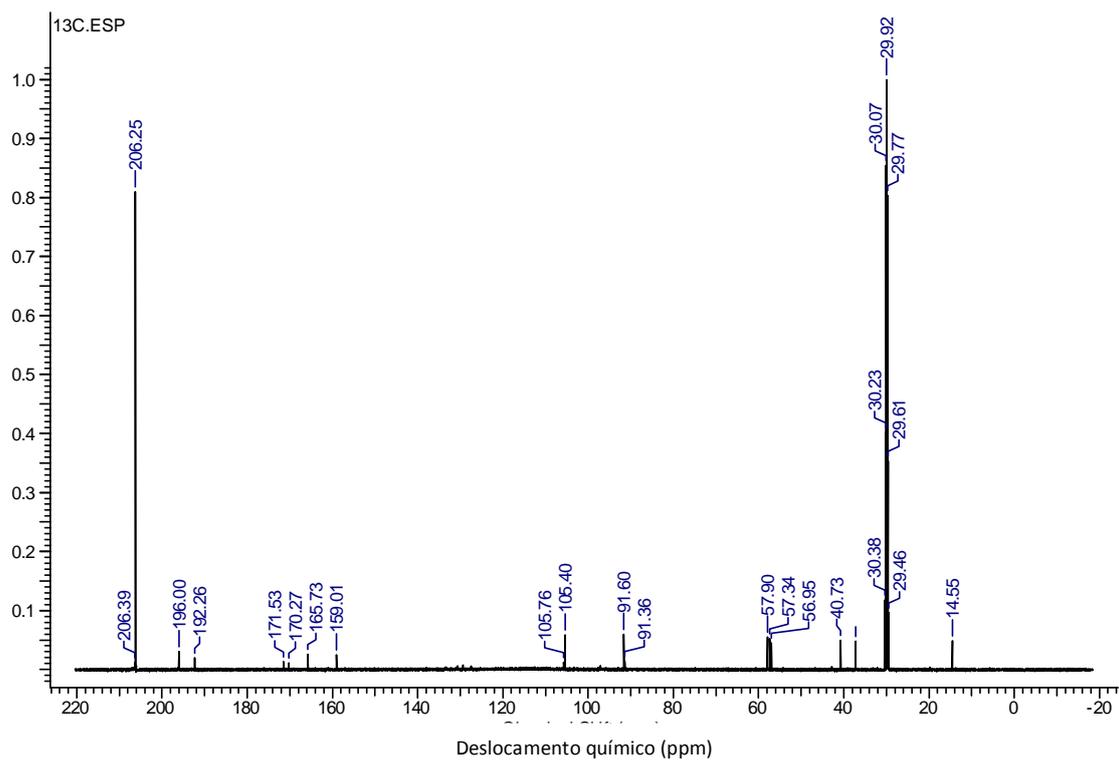


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C da Griseofulvina (**25**) em acetona- d_6 .

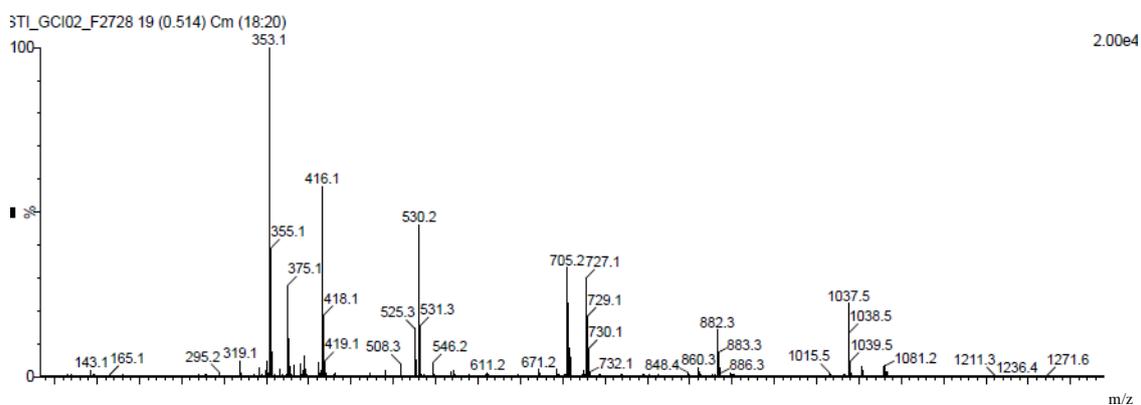


Figura 17. Espectro de massa HR-ESI-MS (positivo) da Griseofulvina (**25**).

5.8.2 Estudo do extrato AcOEt de *Lewia infectoria* (SNB-GTC2402)

I - Fracionamento e isolamento

Uma porção do extrato bruto em AcOEt (1000 mg) de *Lewia infectoria* (SNB-GTC2402) foi fracionada por cromatografia flash utilizando-se gradientes lineares crescentes dos solventes Hex/AcOEt/MeOH. Sete frações foram reunidas com base nos seus perfis cromatográficos analisados em CCD e em seguida testados quanto à atividade antibacteriana em *S. aureus*. O esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de *L. infectoria* (SNB-GTC2402) é apresentado na Figura 18.

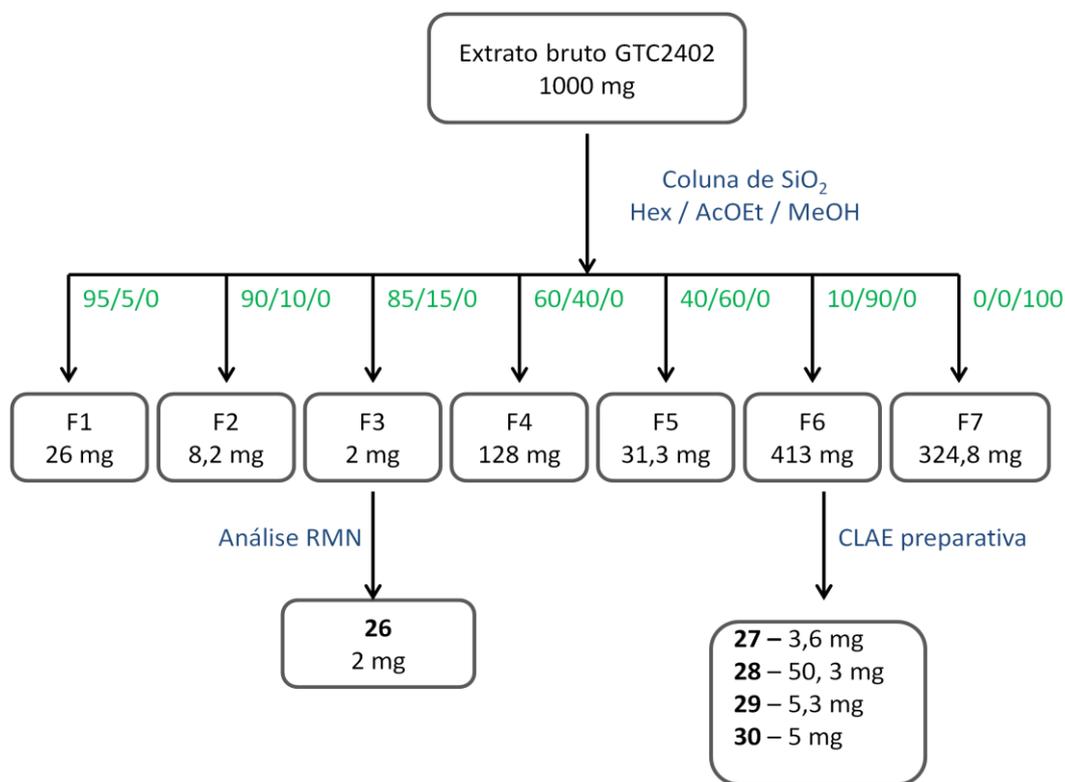


Figura 18. Esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de *Lewia infectoria* (SNB-GTC2402).

A fração F3, eluída em cromatografia flash com Hex/AcOEt 85/15, permitiu o isolamento direto da substância identificada como phomopirona A (**26**) (2,0 mg). A fração F6 (412 mg), eluída em cromatografia flash com Hex/AcOEt 10/90, foi purificada por CLAE (Figura 19) em fase reversa permitindo o isolamento da pyrenocina A (**27**) (Tr= 5,0 min, 3,6 mg), do alterperilenol (**28**) (Tr= 9,6 min, 50,3 mg),

da novae-zelandina A (**29**) (Tr= 13,4 min, 5,3 mg) e da substância nova nomeada pyrrocidina C (**30**) (Tr= 32,2 min, 5,0 mg). O isolamento por CLAE da fração F6 foi realizado nas seguintes condições:

Coluna: Waters Sunfire OBD RP 18 (5 μ m) 19 x 150 mm; **eluentes:** H₂O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF; **gradiente:** 65/35 isocrático (5 min), 65/35 \rightarrow 30/70 (5 min), 30/70 isocrático (10 min), 30/70 \rightarrow 0/100 (5 min), 0/100 (10 min), 17 mL.min⁻¹; **deteção:** UV 290 nm.

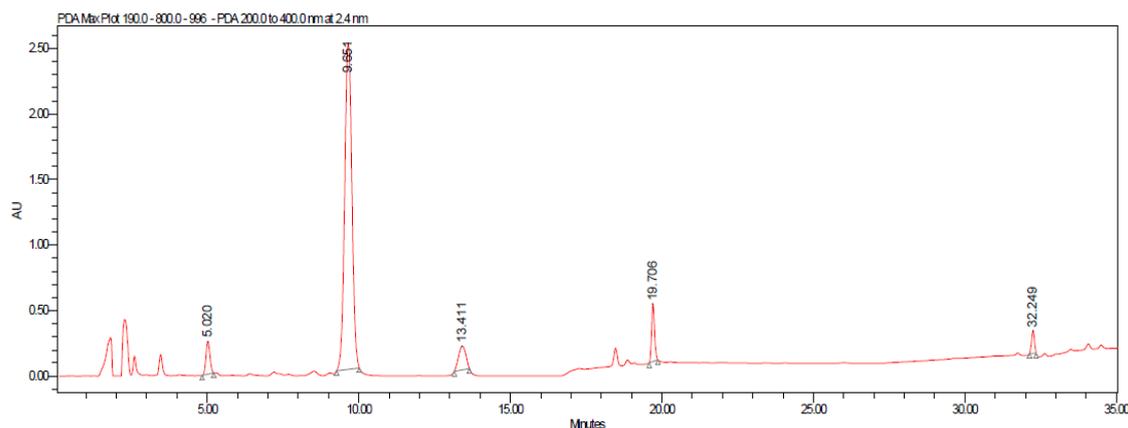
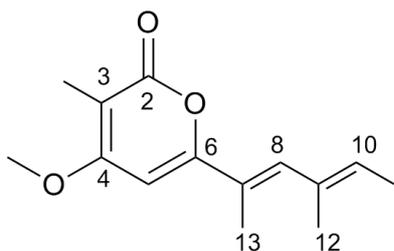


Figura 19. Cromatograma por CLAE da fração F6 do extrato em AcOEt de *Lewia infectoria* (SNB-GTC2402).

II – Dados espectroscópicos das substâncias isoladas

Phomopirona A (**26**):



¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) (Figura 20) δ 0,25 (3H, d, $J = 7,0$ Hz), 0,34 (3H, br. d, $J = 12,8$ Hz), 0,55 (3H, s), 1,78 (3H, s), 2,46 (3H, s), 4,15 (1H, d, $J = 7,0$ Hz), 4,97 (1H, s), 5,42 (1H, s).

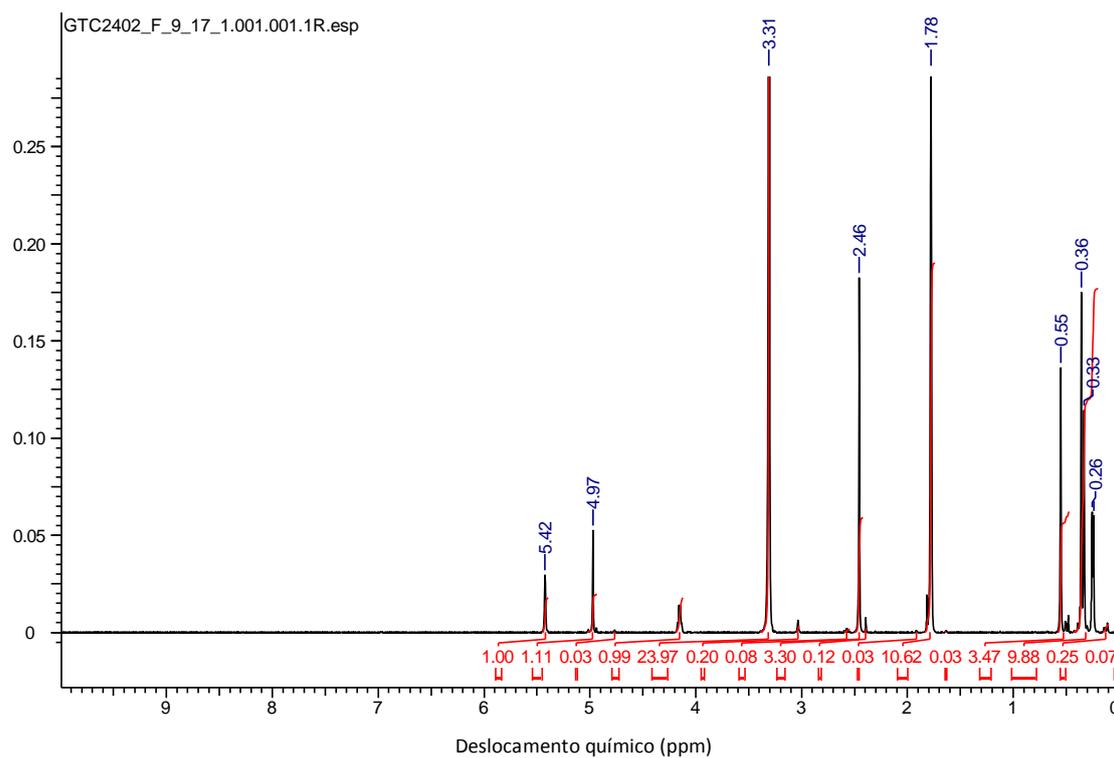


Figura 20. Espectro de RMN ^1H da Phomopirona A (**26**) em CD_3OD .

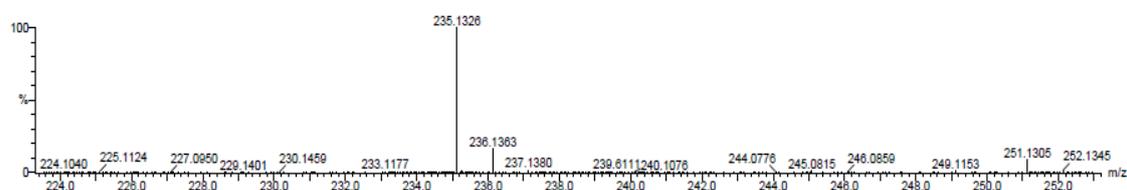
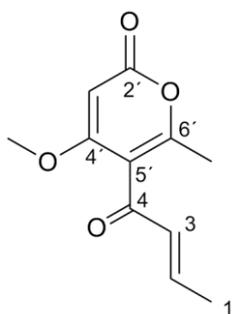


Figura 21. Espectro de massa HR-ESI-MS (positivo) da Phomopirona A (**26**).

Pyrenocina A (**27**):



^1H RMN (300 MHz, CD_3OD) (Figura 22) δ 1,63 (3H, m), 2,22 (3H, s), 3,06 (2H, m), 3,87 (3H, s), 5,44 (2H, m), 5,57 (1H, s); ^{13}C RMN (75,5 MHz, CD_3OD) (Figura 23) δ 17,3 ; 18,0 ; 27,7 ; 57,3 ; 88,4 ; 112,1 ; 127,3 ; 128,4 ; 160,5 ; 167,5 ; 173,2.

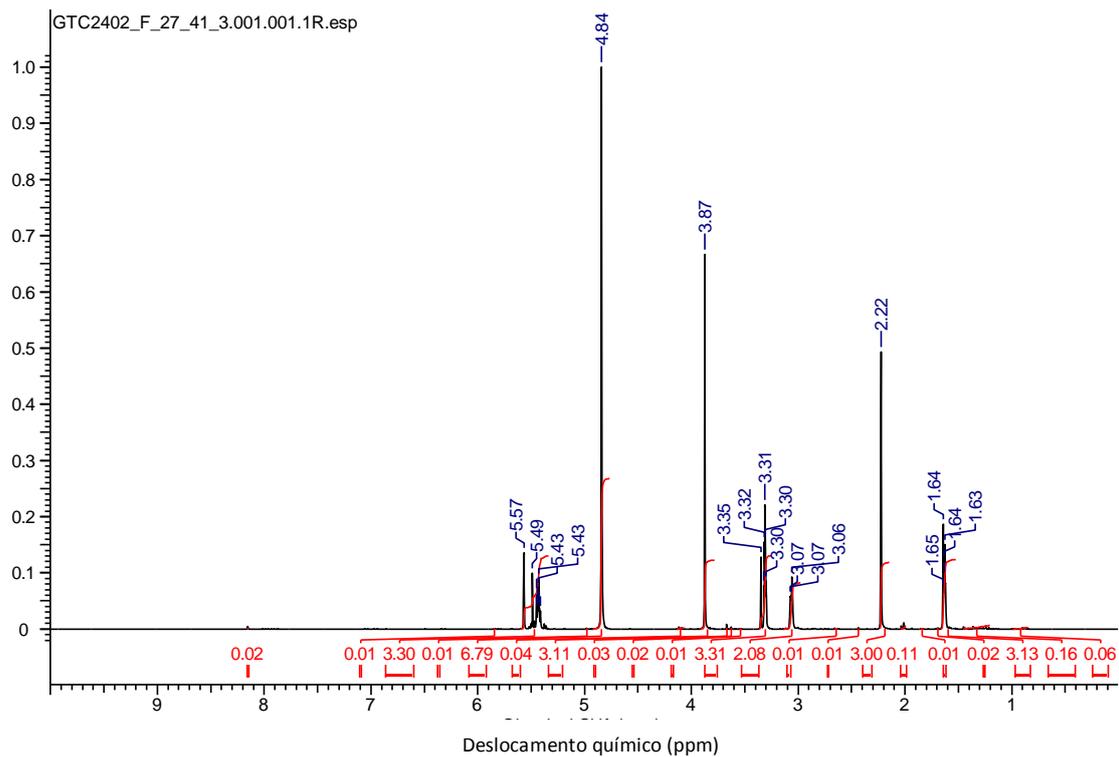


Figura 22. Espectro de RMN ^1H da Pyrenocina A (27) em CD_3OD_3 .

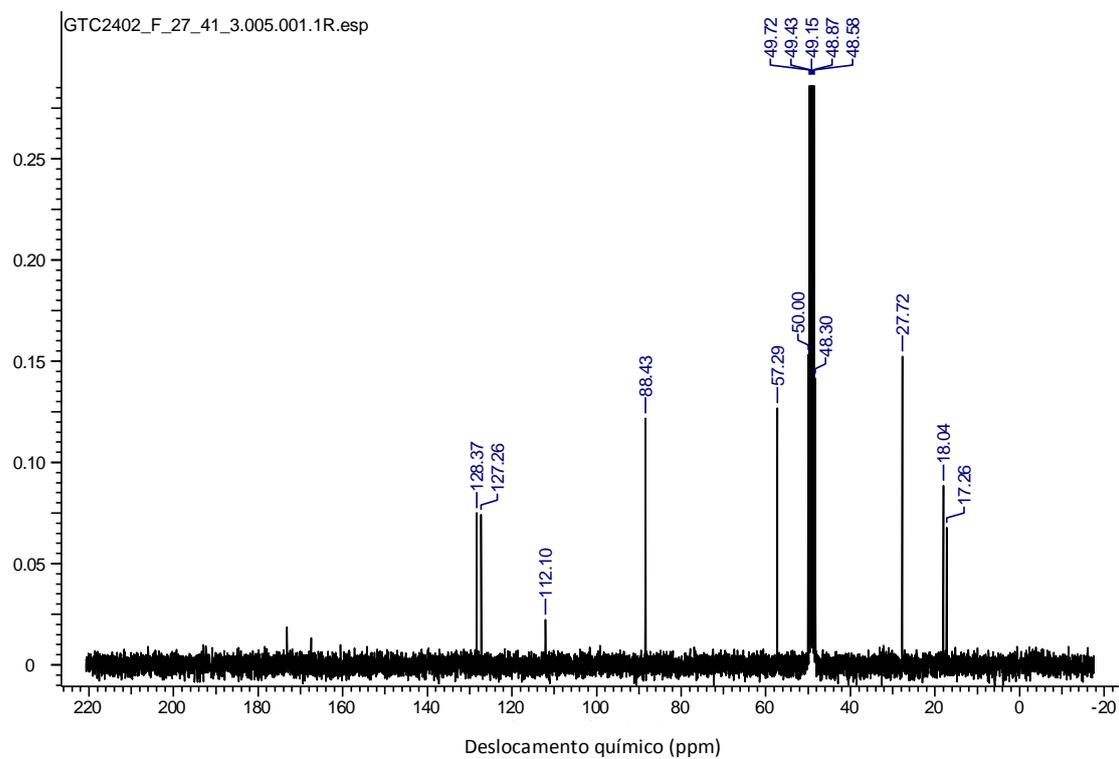


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C da Pyrenocina A (27) em CD_3OD_3 .

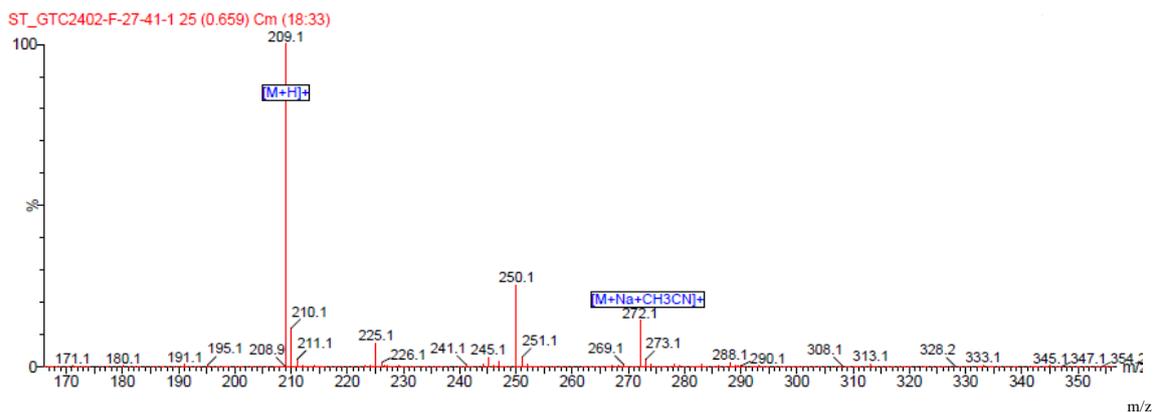
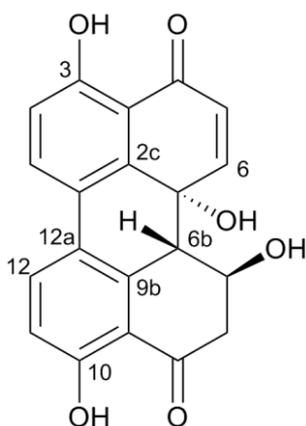


Figura 24. Espectro de massa HR-ESI-MS (positivo) da Pyrenocina A (**27**).

Alterperilenol (**28**):



¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) (Figura 25) δ 2,93 (2H, m), 3,09 (1H, d, $J = 9,6$ Hz), 4,41 (1H, m), 5,72 (1H, d, $J = 6,2$ Hz), 5,75 (1H, d, $J = 1,5$ Hz), 6,35 (1H, d, $J = 10,4$ Hz), 6,96 (1H, bd, $J = 8,7$ Hz), 7,05 (1H, d, $J = 8,7$ Hz), 7,89 (1H, d, $J = 10,4$ Hz), 8,01 (1H, d, $J = 8,7$ Hz), 8,07 (1H, d, $J = 8,7$ Hz), 12,39 (1H, s), 12,47 (1H, s); ¹³C RMN (75,5 MHz, DMSO-*d*₆) (Figura 26) δ 47,2 ; 50,6 ; 64,4 ; 65,6 ; 112,5 ; 115,7 ; 116,5 ; 117,3 ; 124,0 ; 124,4 ; 125,2 ; 131,7 ; 131,9 ; 137,6 ; 140,2 ; 153,4 ; 160,0 ; 160,8 ; 190,4 ; 203,8.

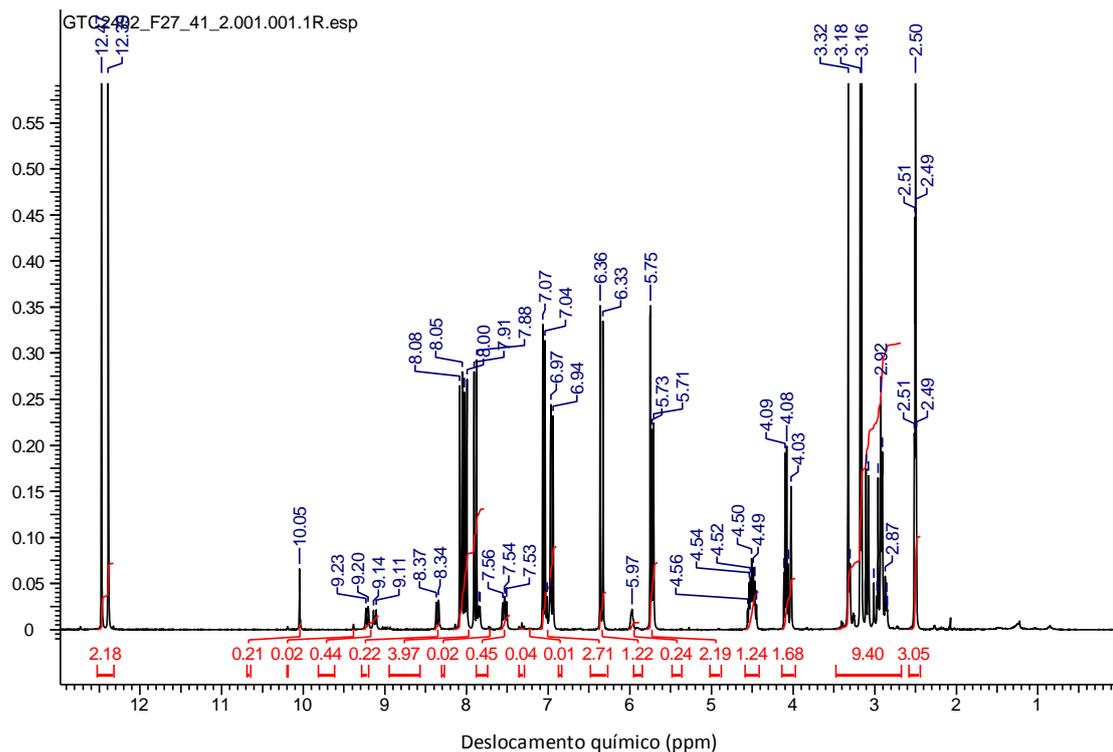


Figura 25. Espectro de RMN ^1H do Alterperilenol (**28**) em $\text{DMSO-}d_6$.

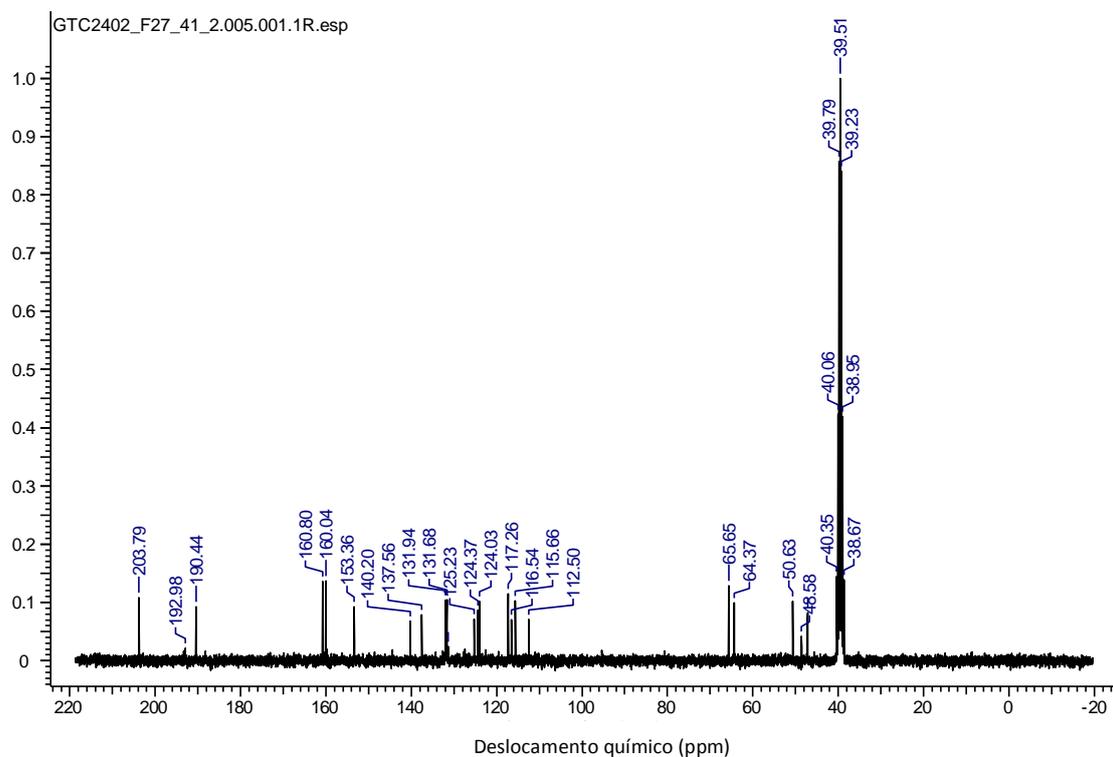
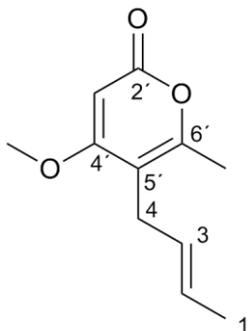


Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C do Alterperilenol (**28**) em $\text{DMSO-}d_6$.

Novae-zelandina A (29):



^1H RMN (500 MHz, CD_3OD) (Figura 27) δ 1,96 (3H, d, $J = 7,0$ Hz), 2,15 (3H, s), 3,84 (3H, s), 5,64 (1H, s), 6,32 (1H, bd, $J = 15,6$ Hz), 6,88 (1H, dq, $J = 15,6$ e $7,0$ Hz);

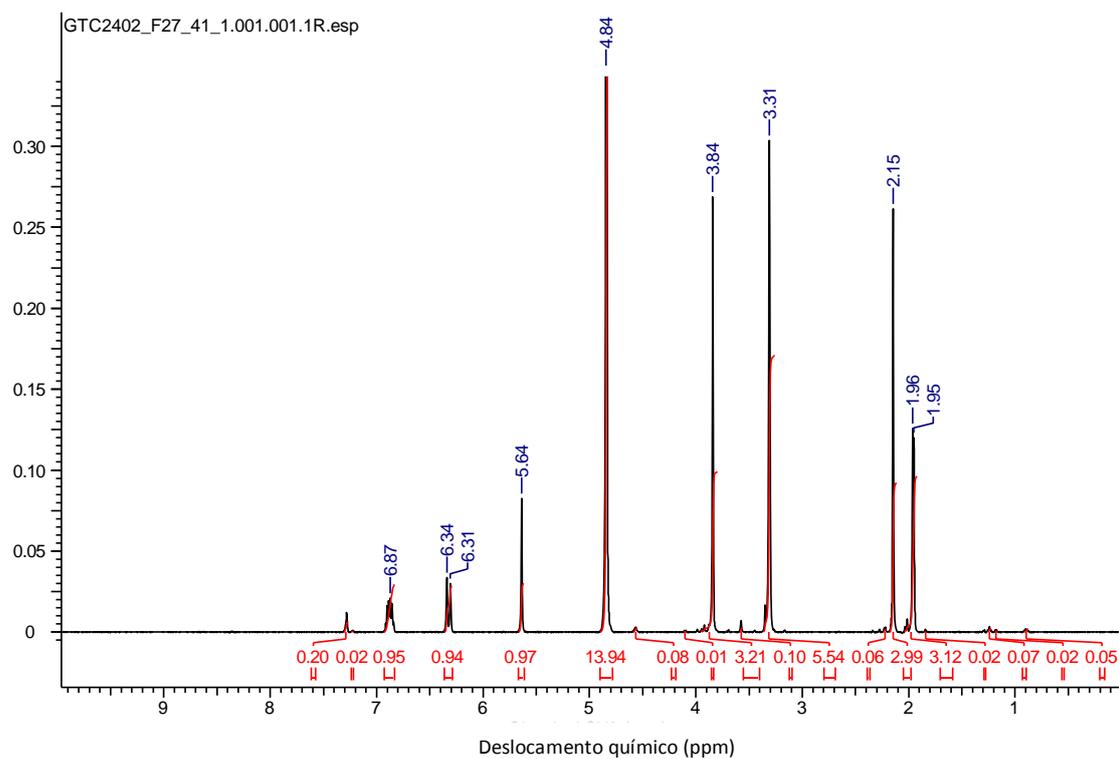
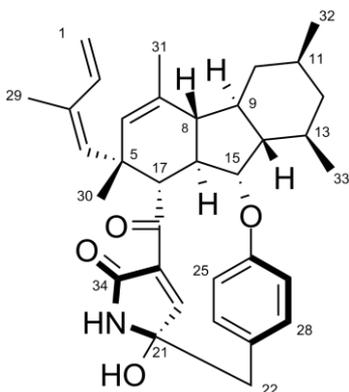


Figura 27. Espectro de RMN ^1H da Novae-zelandina A (29) em CD_3OD .

Pyrrucidina C (30)



Sólido amarelo. $[\alpha]_D^{25} + 93$ (MeOH, c 0.05); UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 203 (4.80), 228 (4.48); ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) (Figura 28), deslocamentos químicos (δ) na tabela 5; ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) (Figura 29), deslocamentos químicos (δ) na tabela 5; HR-ESI-MS (negativo) m/z : 526,2971 $[\text{M}-\text{H}]^-$; calculado para $[\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{NO}_4]^-$: 526,2957 (Figura 34).

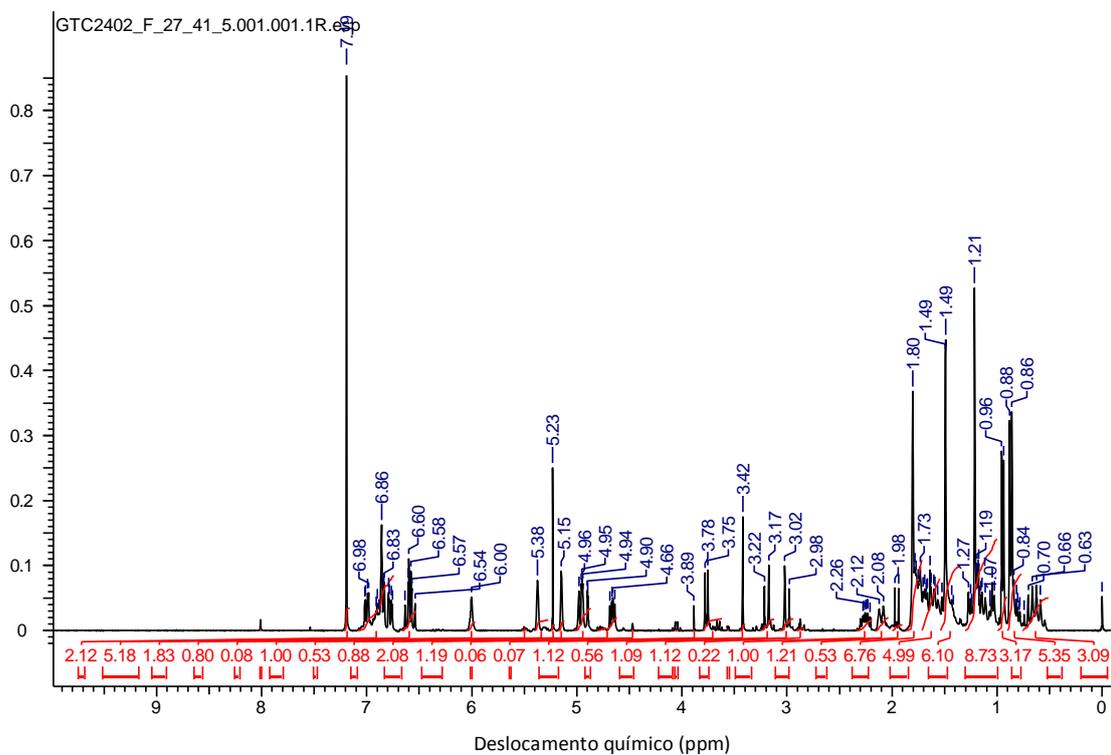


Figura 28. Espectro de RMN ^1H da Pyrrucidina C (30) em CDCl_3 .

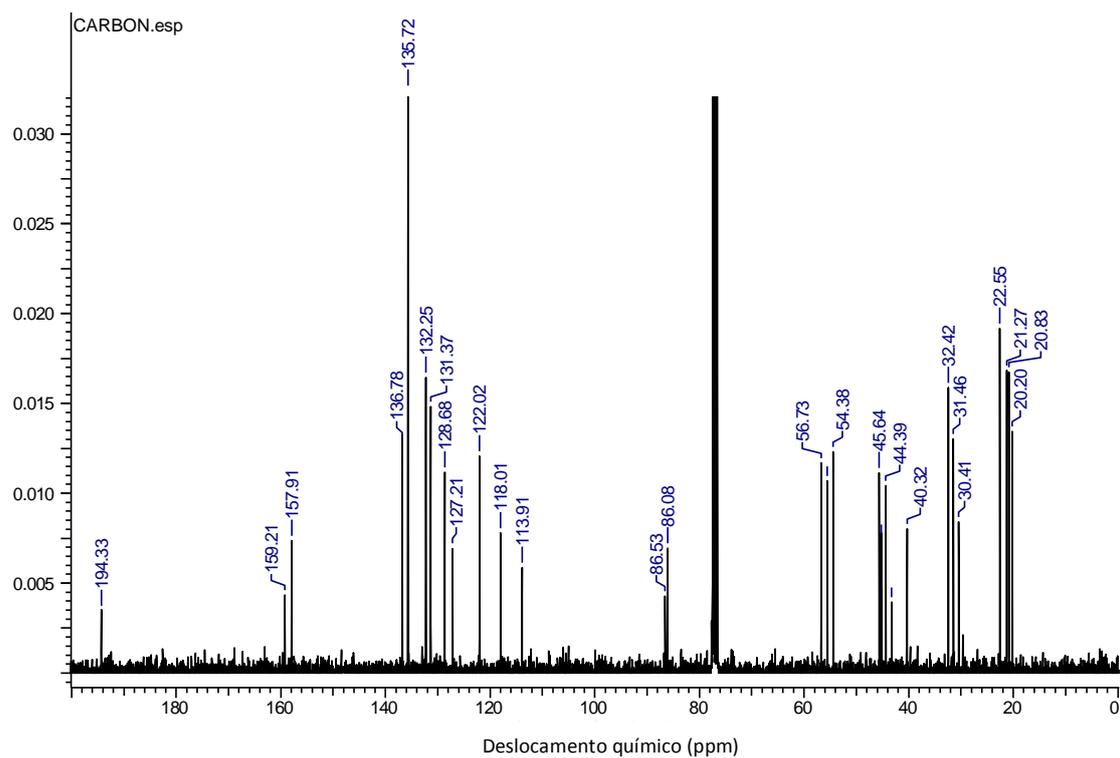


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C da Pyrrocidina C (**30**) em CDCl_3 .

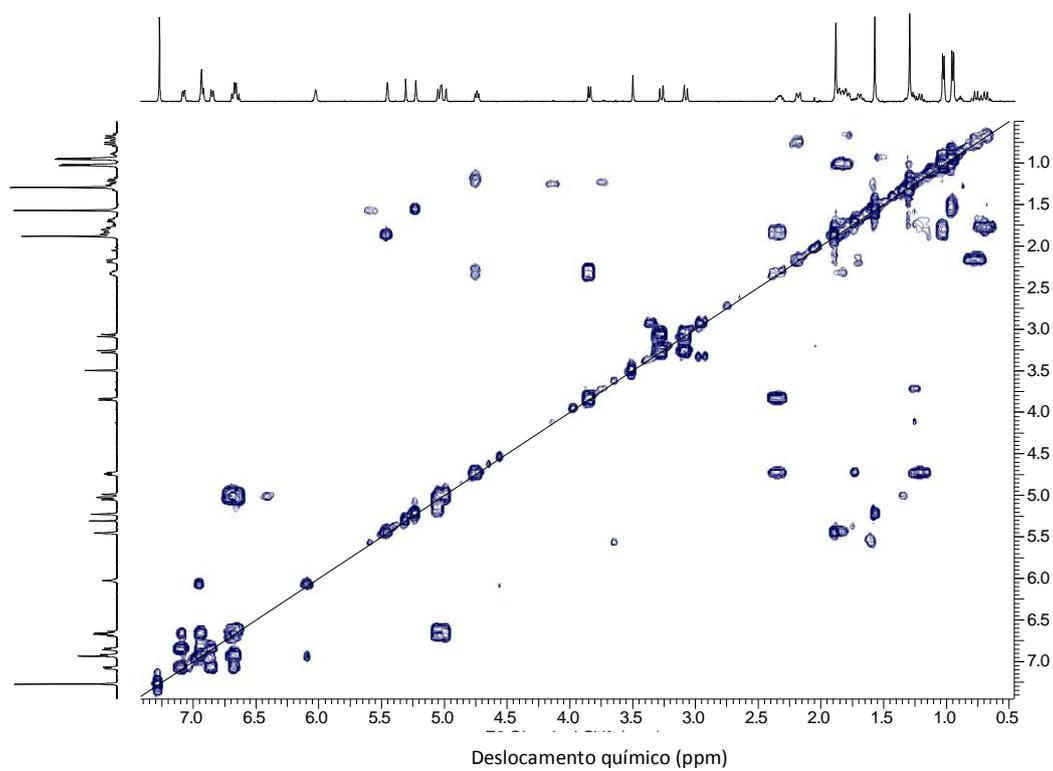


Figura 30. Espectro COSY da Pyrrocidina C (**30**) em CDCl_3 .

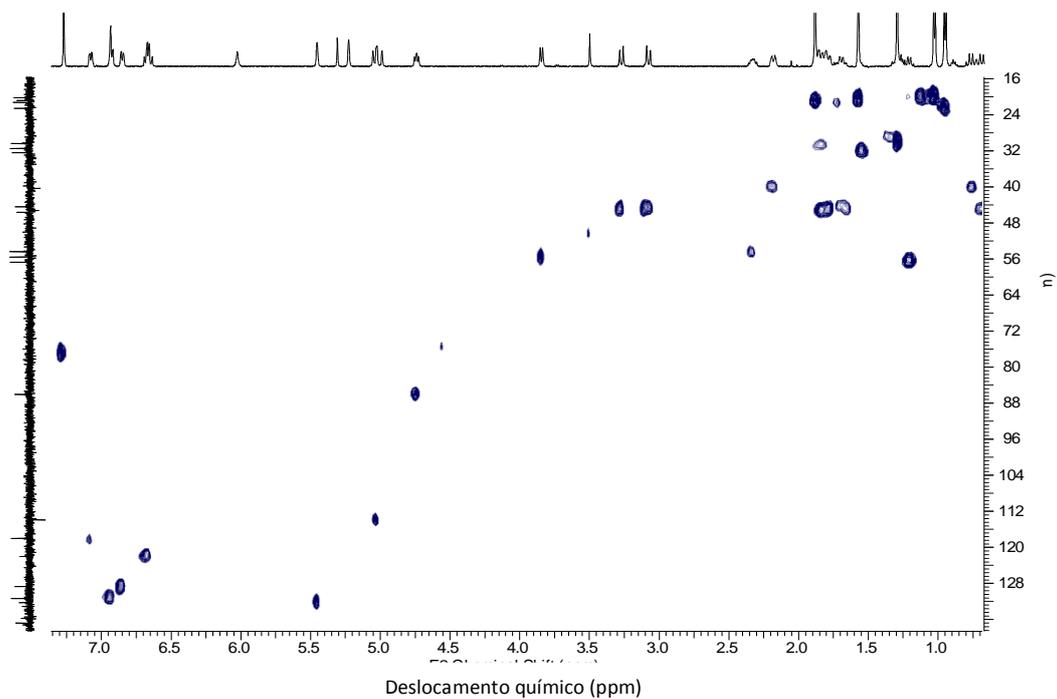


Figura 31. Espectro HSQC da Pyrrocidina C (**30**) em CDCl_3 .

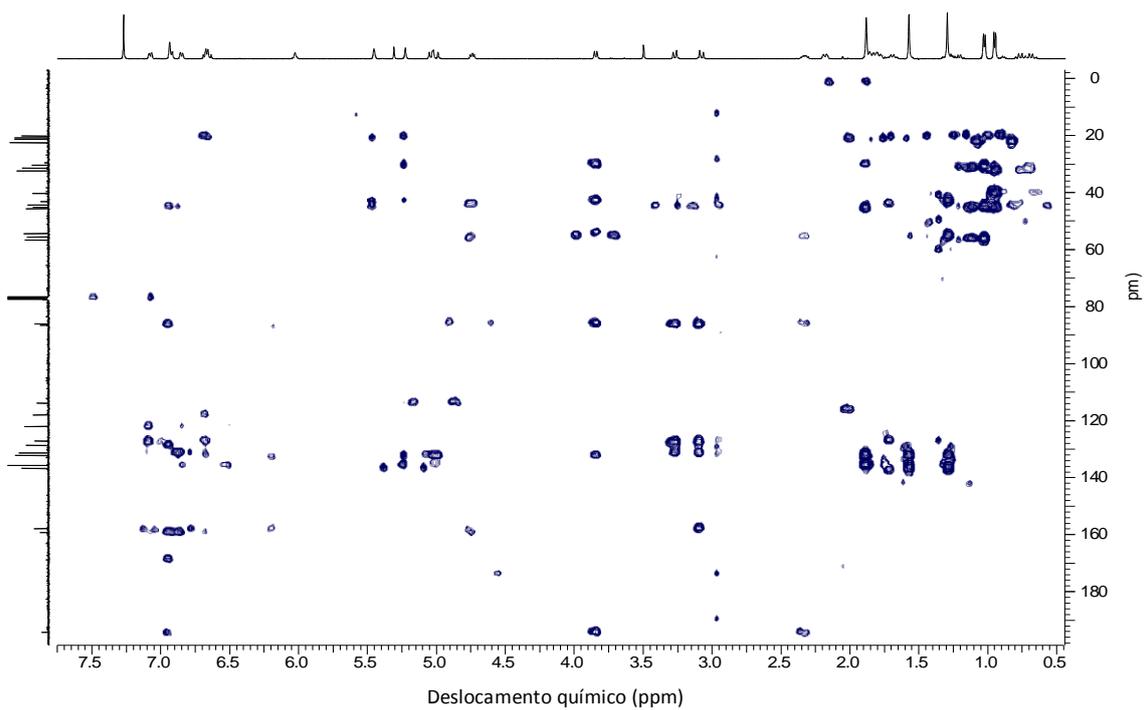


Figura 32. Espectro HMBC da Pyrrocidina C (**30**) em CDCl_3 .

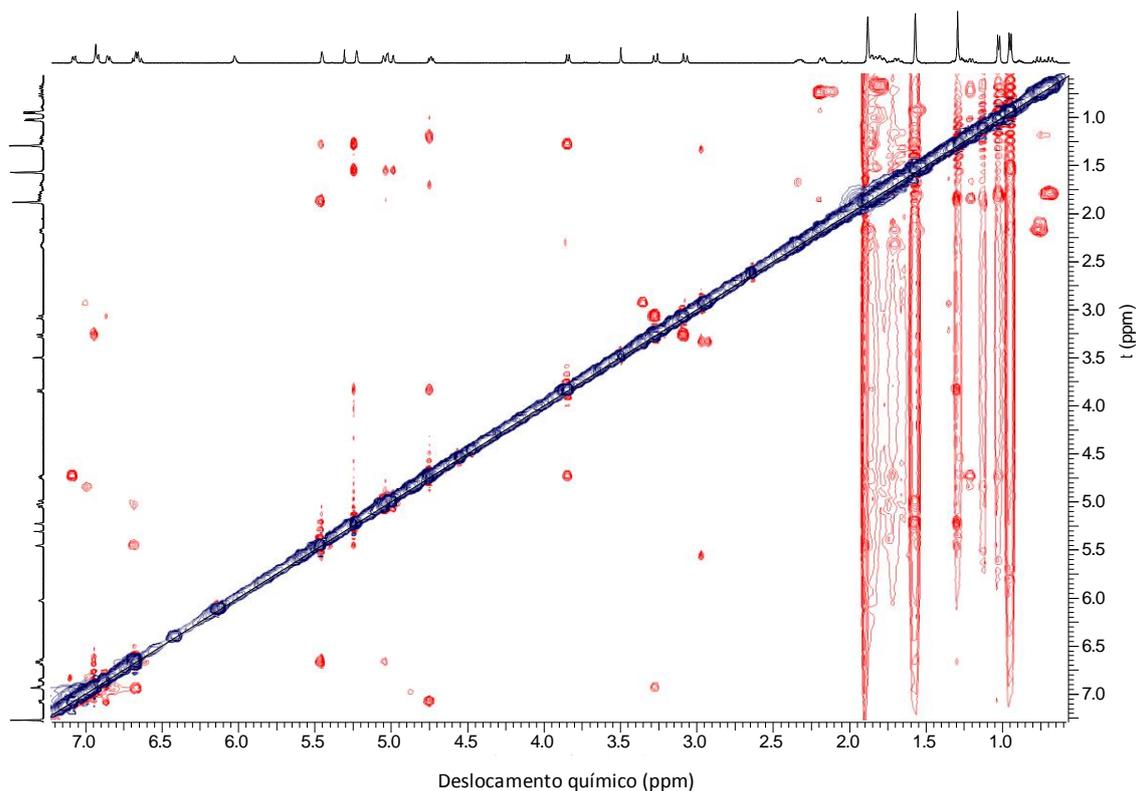


Figura 33. Espectro NOESY da Pyrrocidina C (**30**) em CDCl_3 .

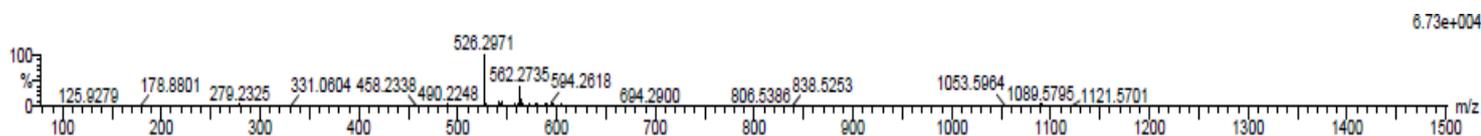


Figura 34. Espectro de massa HR-ESI-MS (negativo) da Pyrrocidina C (**30**).

5.8.3 Estudo do extrato AcOEt de *Xylaria* sp. (SNB-GTC2501)

I – Fracionamento e isolamento

Uma porção do extrato bruto em AcOEt (644 mg) de *Xylaria* sp. (SNB-GTC2501) foi fracionada por cromatografia flash utilizando-se gradientes lineares crescentes dos solventes Hex/AcOEt/MeOH. Sete frações foram reunidas com base nos seus perfis cromatográficos analisados em CCD e em seguida testados quanto à

atividade antibacteriana em *S. aureus*, o esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de *Xylaria* sp. (SNB-GTC2501) é apresentado na Figura 35.

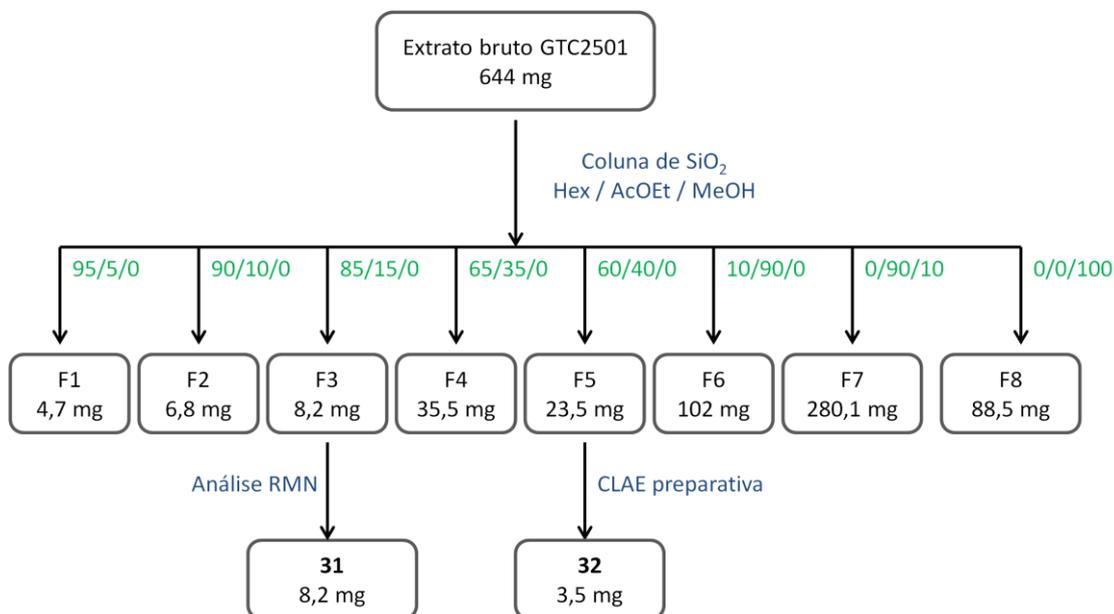


Figura 35. Esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de *Xylaria* sp. (SNB-GTC2501).

A fração F3, eluída em cromatografia flash com Hex/AcOEt 85/15, permitiu o isolamento direto da substância identificada como 5-metilmelleina (**31**) (8,2 mg). A fração F5 (23,5 mg), eluída em cromatografia flash com Hex/AcOEt 60/40, foi purificada por CLAE (Figura 36) em fase reversa permitindo o isolamento da Dihidrosporothriolida (**32**) (Tr= 5,7 min, 3,5 mg). O isolamento das substância **32** por CLAE foi realizado nas seguintes condições:

Coluna: Waters Sunfire OBD RP 18 (5 μ m) 19 x 150 mm; **eluentes:** H₂O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF; **gradiente:** 40/60 → 0/100 (25 min), 0/100 (10 min), 17 mL.min⁻¹; **deteção:** UV 220 nm.

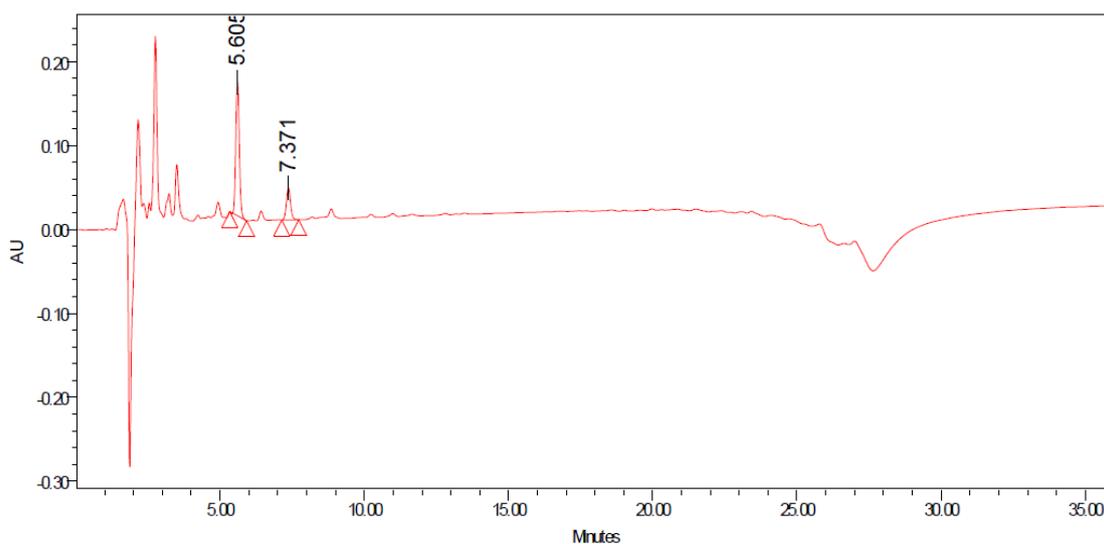
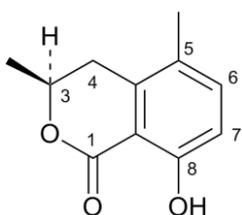


Figura 36. Cromatograma por CLAE da fração F5 do extrato em AcOEt de *Xylaria* sp. (SNB-GTC2501).

III – Dados espectroscópicos das substâncias isoladas

5-metilmelleina (31):



^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) (Figura 37) δ 1,52 (3H, d, $J = 6,8$ Hz), 2,16 (3H, s), 2,73 (1H, dd, 11,5 e $J = 3,4$ Hz), 2,95 (1H, q, $J = 6,8$ Hz), 4,70 (1H, ddq, $J = 11,5$ e 3,4 Hz), 6,79 (1H, d, $J = 6,8$ Hz), 7,24 (1H, d, $J = 3,4$ Hz), 10,97 (1H, s); ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) (Figura 38) δ .18,0 ; 20,9 ; 29,6 ; 31,9 ; 75,4 ; 115,6 ; 124,8 ; 137,0 ; 137,9 ; 160,5.

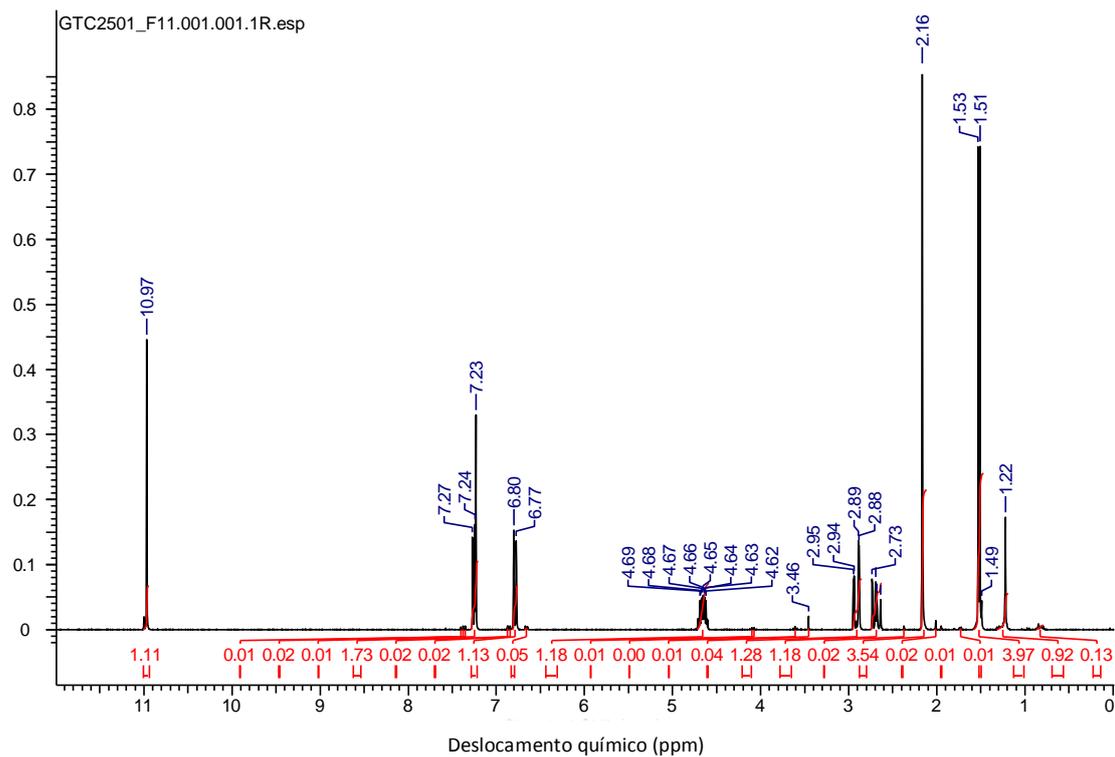


Figura 37. Espectro de RMN ^1H da 5-metilmelleina (**31**) em CDCl_3 .

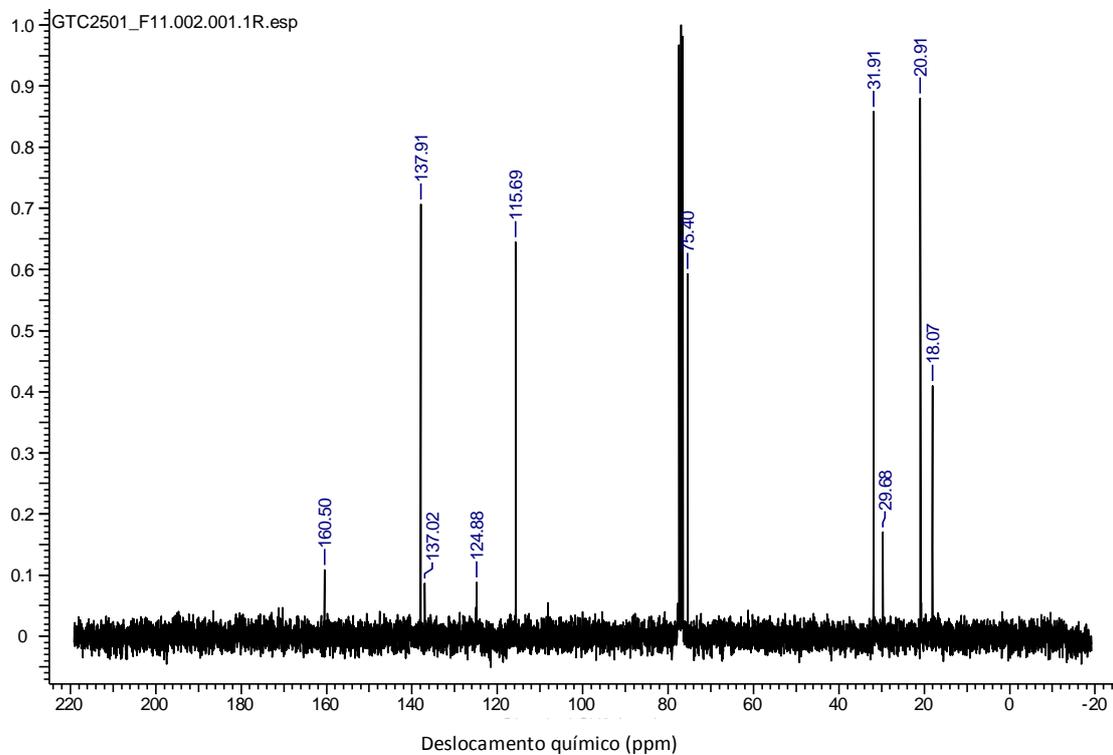


Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C da 5-metilmelleina (**31**) em CDCl_3 .

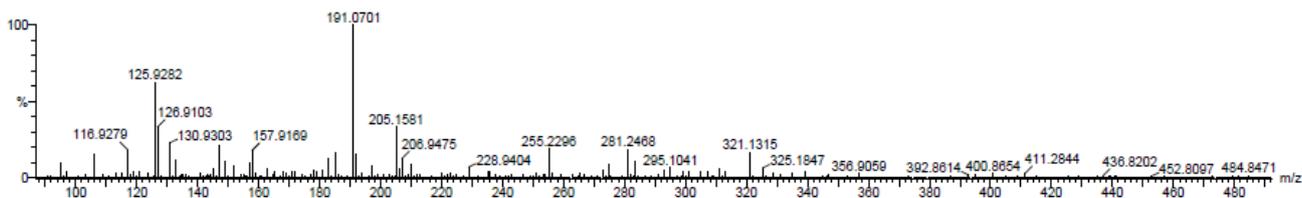
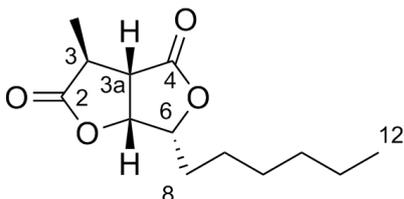


Figura 39. Espectro de massa HR-ESI-MS (negativo) da 5-metilmelleina (31).

Dihidrosprothriolida (32):



^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) (Figura 40) δ 0,90 (3H, t, $J = 7,7$ Hz), 1,31 (1H, m), 1,32 (1H, m), 1,36 (1H, m), 1,46 (3H, d, $J = 7,7$ Hz), 1,48 (2H, m), 1,87 (2H, m), 3,08 (1H, q, $J = 7,7$ e 1,4 Hz), 3,15 (1H, dd, $J = 6,0$ e 1,4 Hz), 4,56 (1H, ddd, $J = 7,7$; 6,0 e 4,0 Hz), 5,12 (1H, dd, $J = 6,0$ e 4,0 Hz); ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) (Figura 41) δ .14,0 ; 22,5 ; 25,3 ; 28,8 ; 28,9 ; 31,5 ; 38,3 ; 49,0 ; 78,3 ; 82,4 ; 174,7 ; 175,7.

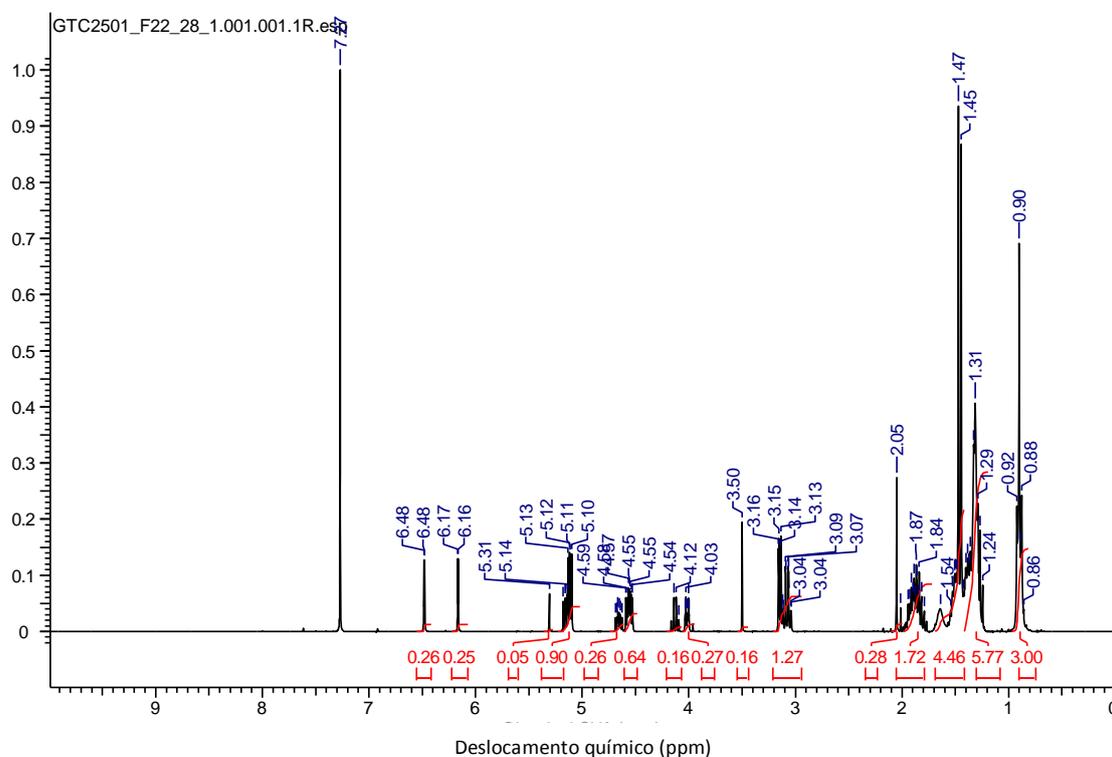


Figura 40. Espectro RMN ^1H da Dihidrosprothriolida (32) em CDCl_3 .

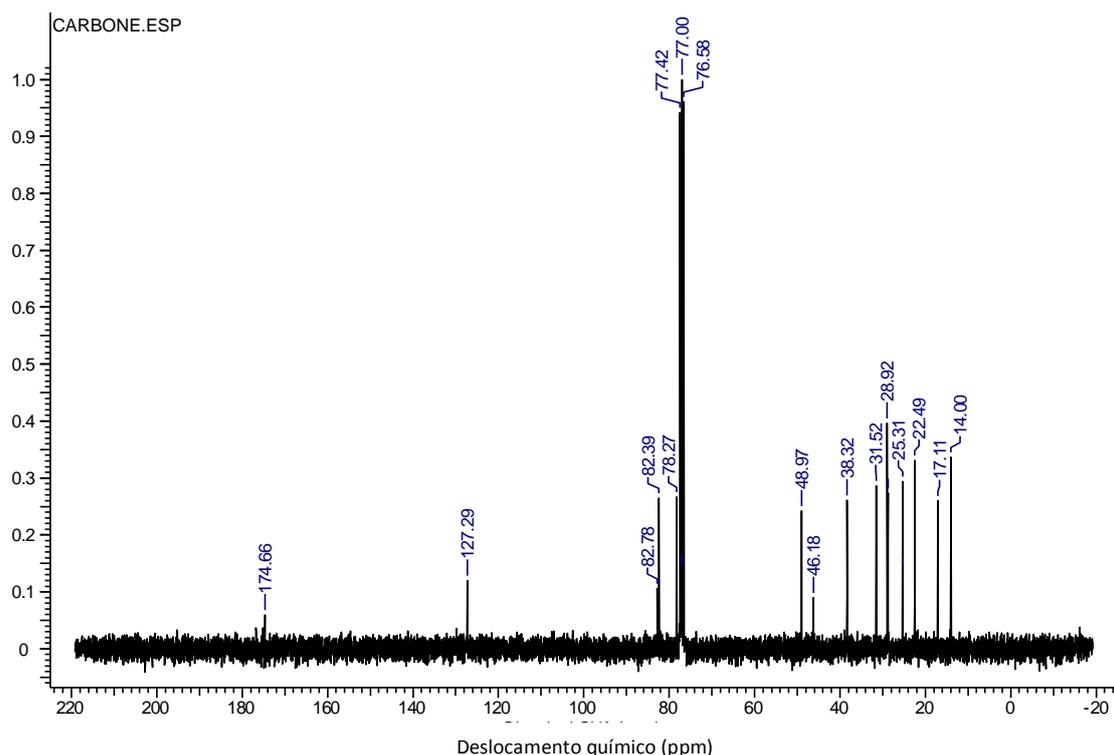


Figura 41. Espectro RMN ^{13}C da Dihidrosporothriolida (**32**) em CDCl_3 .

5.8.4 Estudo do extrato AcOEt de *Mycoleptodiscus* sp. (SNB-GTC2304)

I - Extração e isolamento

Uma porção do extrato bruto em AcOEt (1000 mg) de *Mycoleptodiscus* sp. (SNB-GTC2304) foi fracionada por cromatografia flash utilizando-se gradientes lineares crescentes dos solventes Hex/AcOEt/MeOH. Oito frações foram reunidas com base nos seus perfis cromatográficos analisados em CCD. A fração F4 e a fração F8 mantiveram a atividade de inibição da proliferação celular e foram selecionadas para uma investigação química mais profunda. O esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de *Mycoleptodiscus* sp. (SNB-GTC2304) é apresentado na Figura 42.

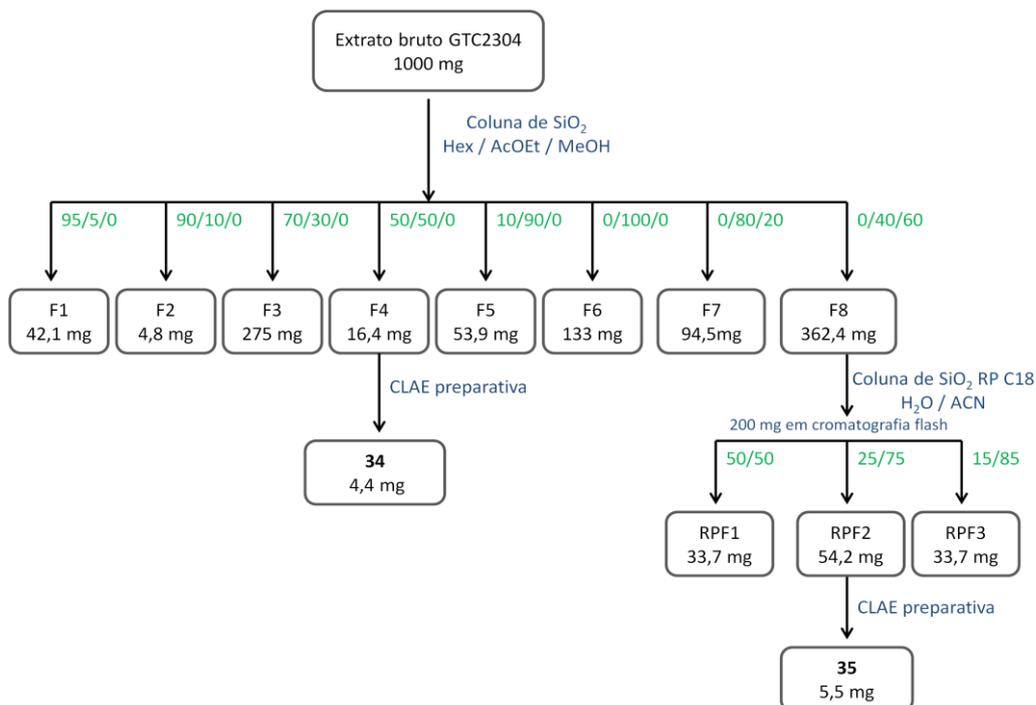


Figura 42. Esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de *Mycoleptodiscus* sp. (SNB-GTC2304).

A fração F4 (16,4 mg), eluída em cromatografia flash fase normal com Hex/AcOEt 50/50, foi purificada por CLAE (Figura 43) em fase reversa permitindo o isolamento da mycoleptodiscina A (**34**) (Tr= 33,5 min, 4,4 mg), o isolamento em CLAE foi realizado nas seguintes condições:

Coluna: Waters Sunfire OBD RP 18 (5 μ m) 19 x 150 mm; **eluentes:** H₂O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF; **gradiente:** 85/15 \rightarrow 20/80 (30 min), 20/80 \rightarrow 0/100 (5 min), 0/100 (10 min), 17 mL.min⁻¹; **deteção:** UV 290 nm.

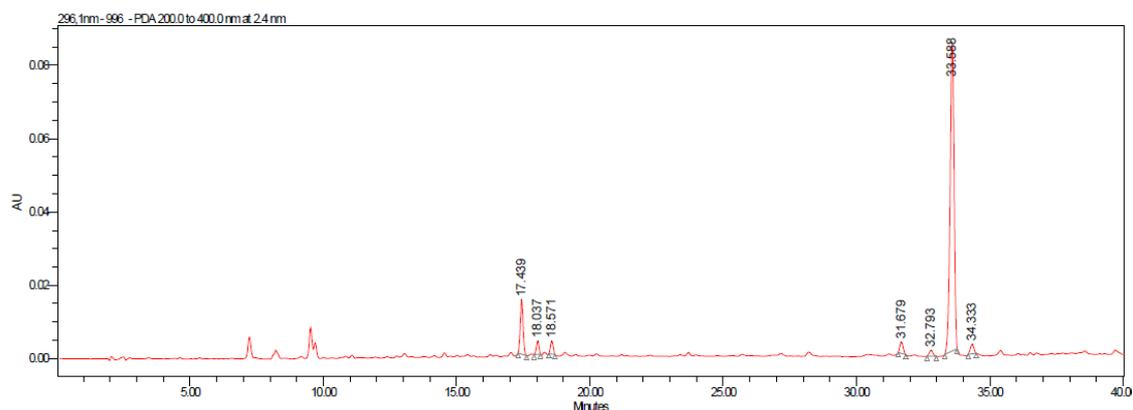


Figura 43. Cromatograma por CLAE da fração F4 do extrato em AcOEt de *Mycoleptodiscus* sp. (SNB-GTC2304).

Uma porção da fração F8 (200 mg), foi fracionada em cromatografia flash de fase reversa utilizando-se gradientes lineares crescentes dos solventes H₂O e ACN, três subfrações foram obtidas. A subfração RPF2 (54,2 mg), eluída com H₂O/ACN 25/75, foi purificada por CLAE (Figura 44) em fase reversa permitindo o isolamento da mycoleptodiscina B (**35**) (Tr= 16,0 min, 5,5 mg), o isolamento em CLAE foi realizado nas seguintes condições:

Coluna: Waters Sunfire OBD RP 18 (5 μm) 19 x 150 mm; **eluentes:** H₂O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF; **gradiente:** 50/50 → 30/70 (30 min), 30/70 → 0/100 (5 min), 0/100 (10 min), 17 mL.min⁻¹; **deteção:** UV 295 nm.

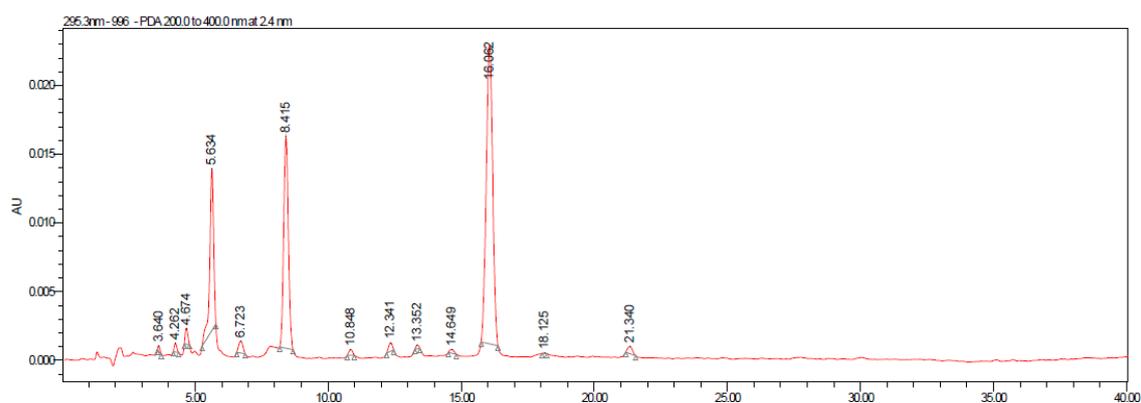
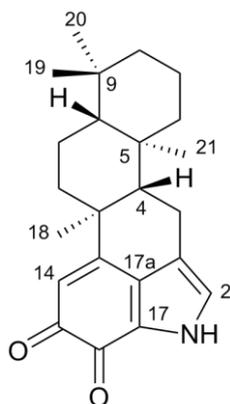


Figura 44. Cromatograma por CLAE da fração F4 do extrato em AcOEt de *Mycoleptodiscus* sp. (SNB-GTC2304).

II – Dados espectroscópicos das substâncias isoladas

Mycoleptodiscina A (**34**):



¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) (Figura 45) δ 0,87 (3H, s), 0,87 (3H, s), 0,90 (3H, s), 1,04 (3H, s), 1,15 (1H, dt, *J* = 9,4 e 3,6 Hz), 1,23 (3H, s), 1,41 (1H, bd, *J* = 13,1 Hz), 1,49 (2H, dd, *J* = 12,5 e 3,6 Hz), 1,54 (2H, dd, *J* = 11,5 e 3,6 Hz), 1,63 (2H, bdt, *J* = 13,1 e

3,05 Hz), 1,73 (2H, bdt, $J = 12,5$ e $1,8$ Hz), 1,78 (2H, bdt, $J = 12,5$ e $1,8$ Hz), 2,09 (1H, bdt, $J = 12,5$ e $1,8$ Hz), 2,46 (1H, bdt, $J = 12,5$ e $3,6$ Hz), 2,69 (1H, bdt, $J = 16,1$ e $3,6$ Hz), 5,75 (1H, s), 7,01 (1H, s); ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) (Figura 46) δ .16,4 ; 17,8 ; 18,3 ; 21,5 ; 21,7 ; 33,1 ; 33,3 ; 36,9 ; 38,2 ; 38,3 ; 40,0 ; 41,5 ; 55,9 ; 56,0 ; 115,1 ; 123,7 ; 127,5 ; 127,7 ; 131,0 ; 163,2 ; 166,4 ; 185,5.

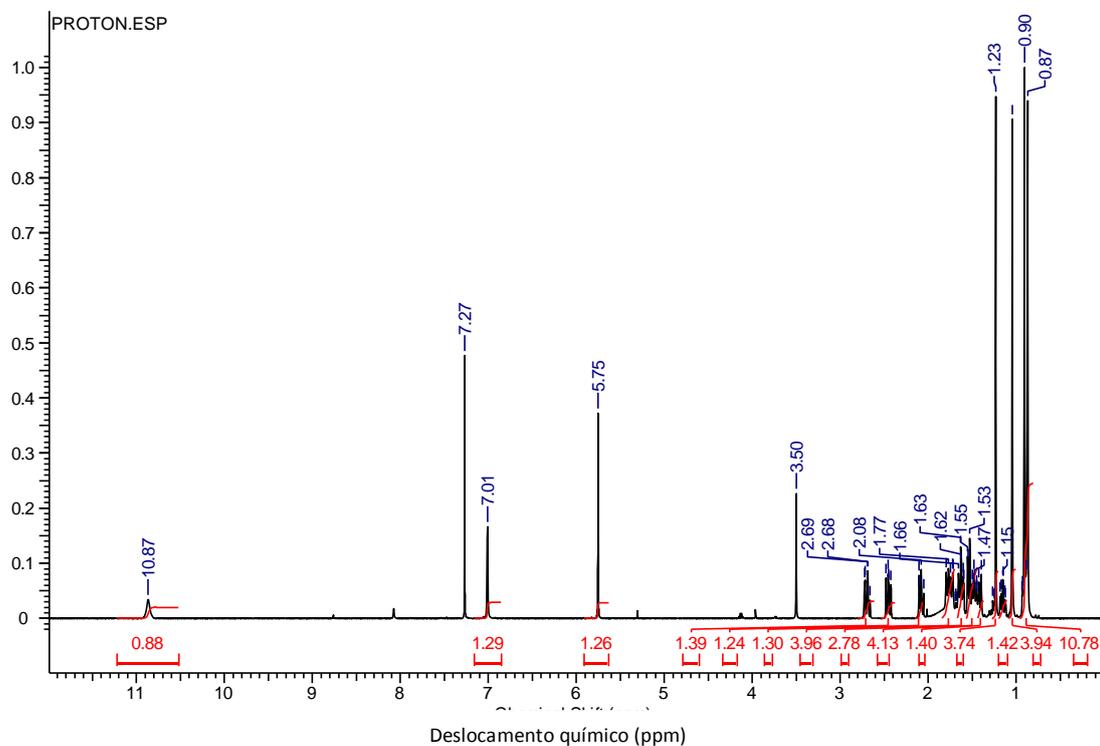


Figura 45. Espectro de RMN ^1H da Mycoleptodiscina A (**34**) em CDCl_3 .

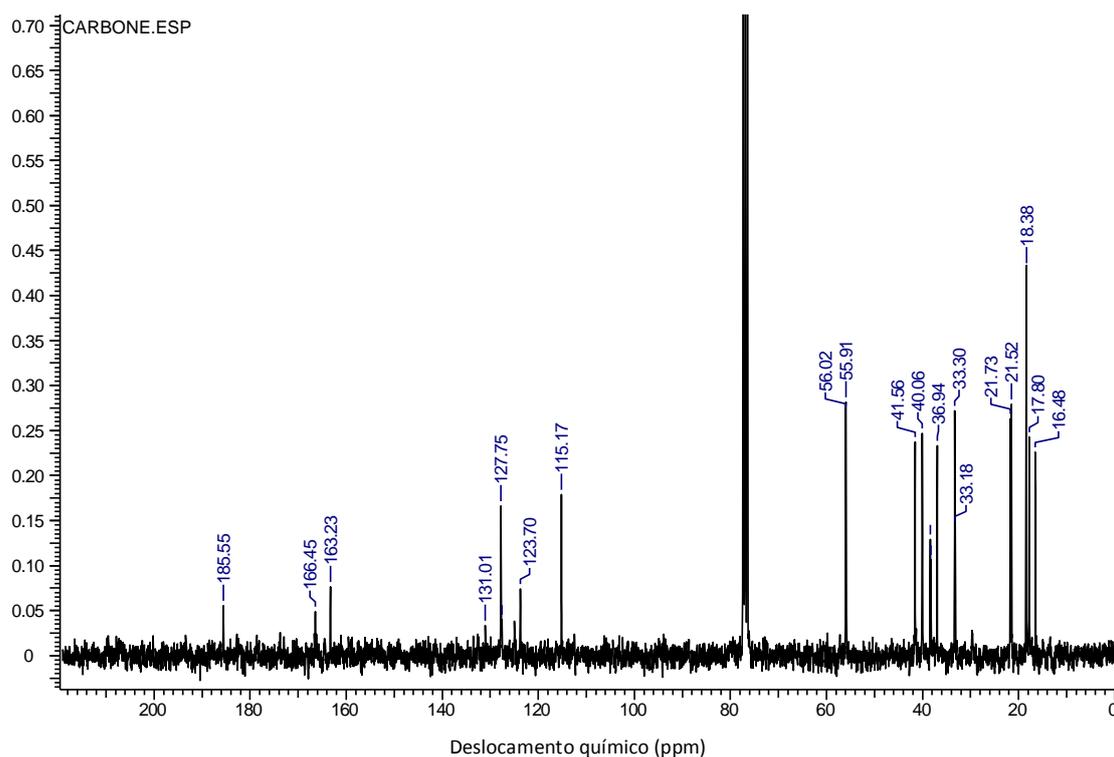


Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C da Mycoleptodiscina A (**34**) em CDCl_3 .

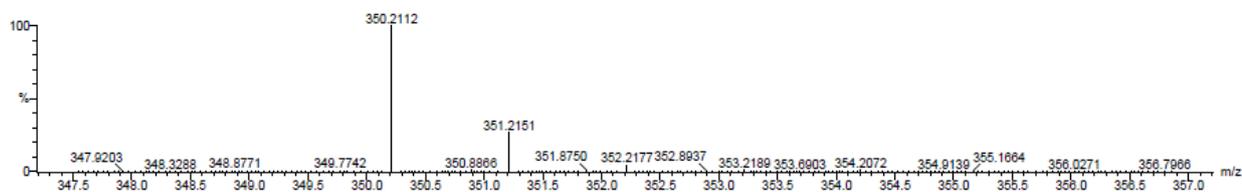
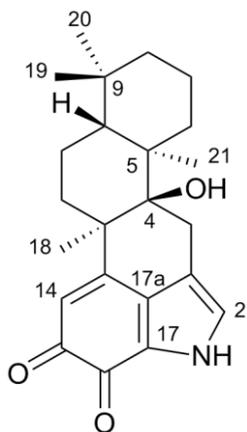


Figura 47. Espectro de massa HR-ESI-MS (negativo) da Mycoleptodiscina A (**34**).

Mycoleptodiscina B (35):



^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (Figura 48) δ 0,85 (3H, s), 0,85 (3H, s), 0,88 (3H, s), 1,08 (1H, bdt, $J = 13,2$ e $3,4$ Hz), 1,10 (3H, s), 1,24 (3H, s), 1,29 (2H, q, $J = 11,0$ Hz), 1,44 (2H, bdt, $J = 13,2$ e $2,52$ Hz), 1,53 (2H, t, $J = 13,2$ Hz), 1,60 (2H, bdt, $J = 13,4$ e $3,15$ Hz), 1,72 (2H, bt, $J = 15,4$ Hz), 1,85 (1H, bdt, $J = 13,2$ e $3,4$ Hz), 2,54 (1H, bd, $J = 16,71$ Hz), 2,88 (1H, bd, $J = 16,7$ Hz), 4,13 (1H, s), 5,58 (1H, s), 7,13 (1H, d, $J = 2,8$ Hz).

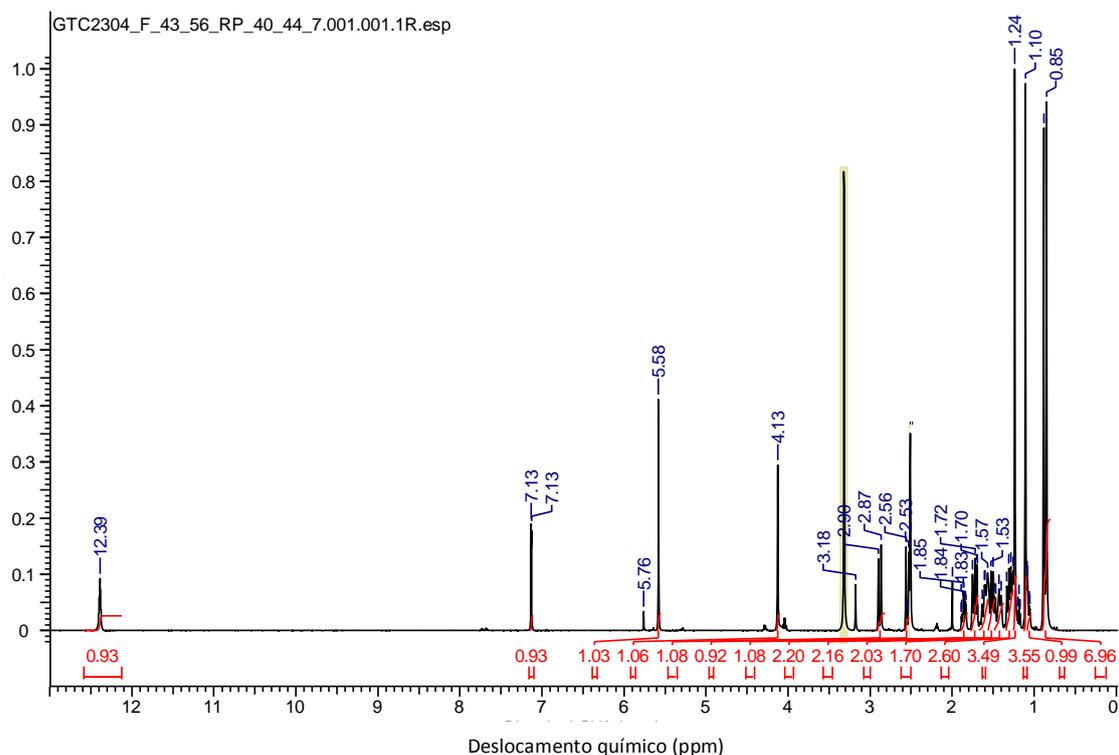


Figura 48. Espectro de RMN ^1H da Mycolectodiscina B (35) em $\text{DMSO-}d_6$.

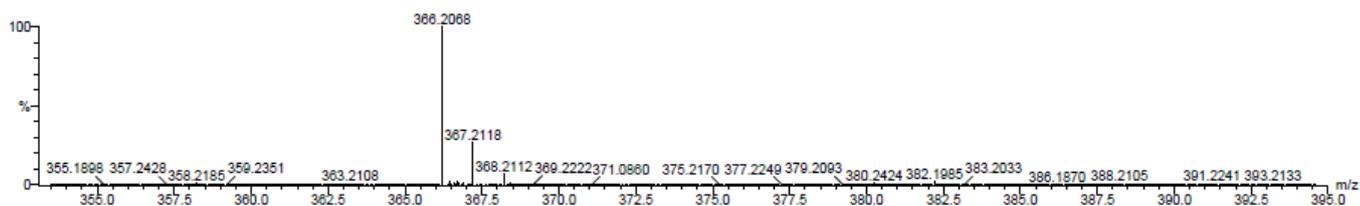


Figura 49. Espectro de massa HR-ESI-MS (negativo) da Mycolectodiscina B (35).

5.8.5 Estudo do extrato AcOEt de *Diaporthe pseudomangiferae* (SNB-GSS10)

I - Extração e isolamento

Uma porção do extrato bruto em AcOEt (720 mg) de *Diaporthe phaseolorum* (SNB-GSS10) foi fracionada por cromatografia flash utilizando-se gradientes lineares crescentes dos solventes Hex/AcOEt/MeOH. Sete frações foram reunidas com base nos seus perfis cromatográficos analisados em CCD. Através de ensaios de citotoxicidade, a fração F5 foi selecionada para uma investigação química de seus metabólitos. O esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de *D. phaseolorum* (SNB-GSS10) é apresentado na Figura 50.

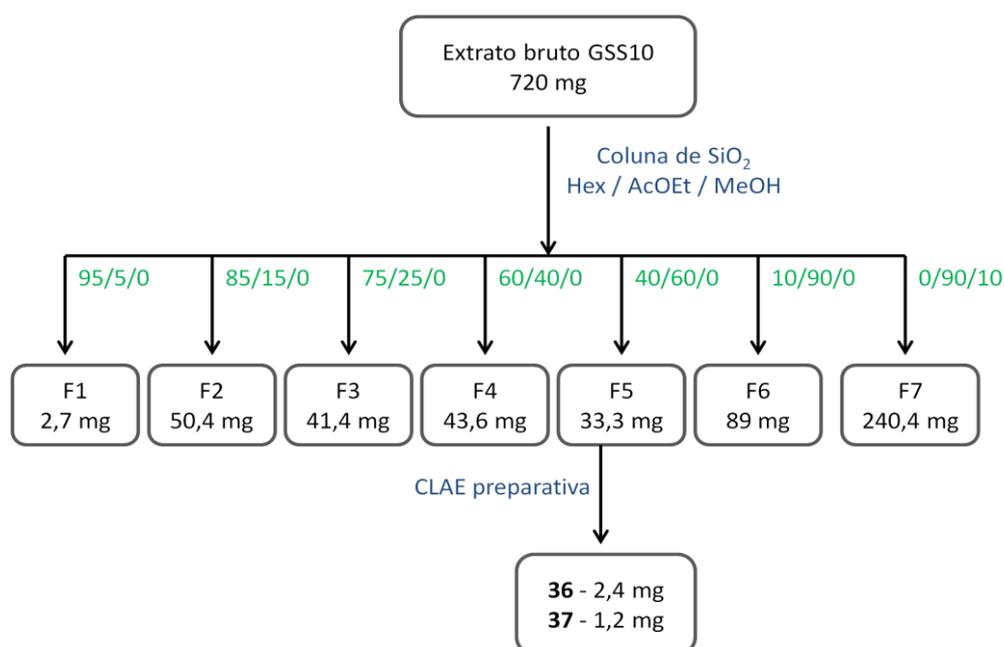


Figura 50. Esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de *Diaporthe pseudomangiferae* (SNB-GSS10).

A fração F5 (33,3 mg), eluída em cromatografia flash fase normal com Hex/AcOEt 40/60, foi purificada por CLAE (Figura 51) em fase reversa permitindo o isolamento do mycoepoxidieno (**36**) (Tr= 12,6 min, 2,4 mg) e da altioxina A (**37**) (Tr= 6,1 min, 1,2 mg). O isolamento por CLAE foi realizado nas seguintes condições:

Coluna: Waters Sunfire OBD RP 18 (5 μm) 19 x 150 mm; **eluentes:** H₂O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF; **gradiente:** 80/20 \rightarrow 40/60 (10 min), 40/60 isocrático (20 min), 40/60 \rightarrow 0/100 (5 min), 0/100 (5 min), 17 mL.min⁻¹; **deteção:** UV 260 nm.

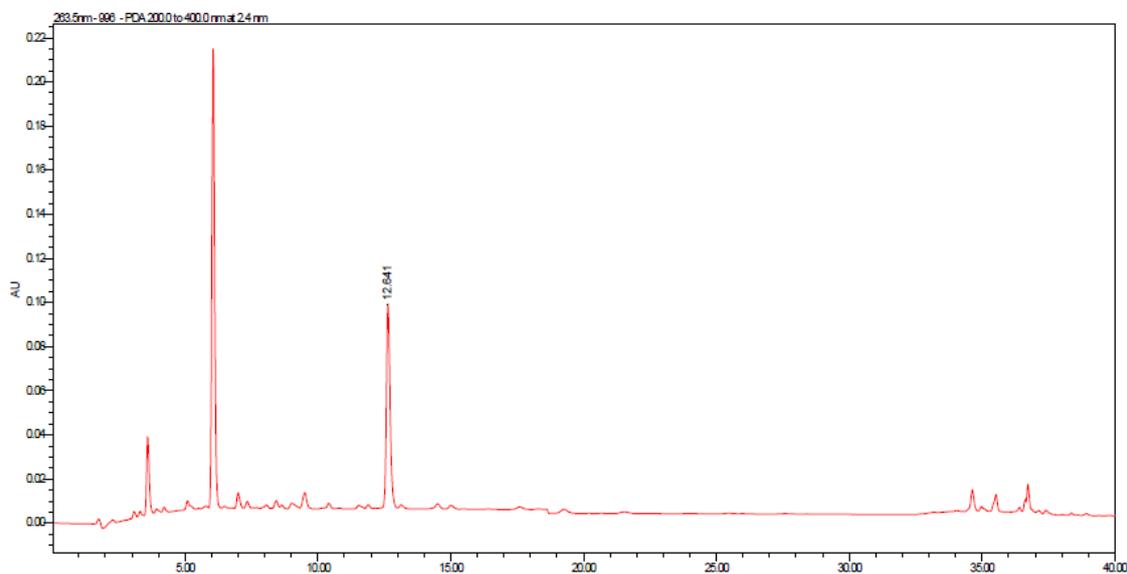
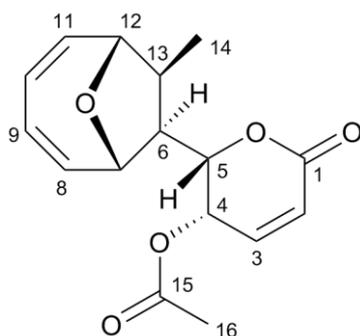


Figura 51. Cromatograma por CLAE da fração F5 do extrato em AcOEt de *Diaporthe pseudomangiferae* (SNB-GSS10).

II – Dados espectroscópicos das substâncias isoladas

Mycoepoxidieno (36):



¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) (Figura 52) δ 1,00 (3H, d, $J = 6,1$ Hz), 1,97 (3H, s), 2,78 (1H, m), 2,78 (1H, m), 4,23 (1H, d, $J = 4,3$ Hz), 4,43 (1H, bt, $J = 5,2$ Hz), 4,64 (1H, d, $J = 9,8$ Hz), 5,20 (1H, bd, $J = 6,1$ Hz), 5,86 (1H, m), 5,87 (1H, m), 5,95 (1H, bdd, $J = 9,8$ e $6,1$ Hz), 6,10 (1H, dd, $J = 9,8$ e $6,1$ Hz), 6,22 (1H, d, $J = 9,8$ Hz), 7,07 (1H, dd, $J = 9,8$ e $6,1$ Hz), ¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆) (Figura 53) δ .13,8 ; 20,4 ; 49,7 ; 52,3 ; 63,0 ; 74,6 ; 76,9 ; 85,4 ; 124,1 ; 124,2 ; 125,5 ; 137,7 ; 141,0 ; 162,1 ; 169,5.

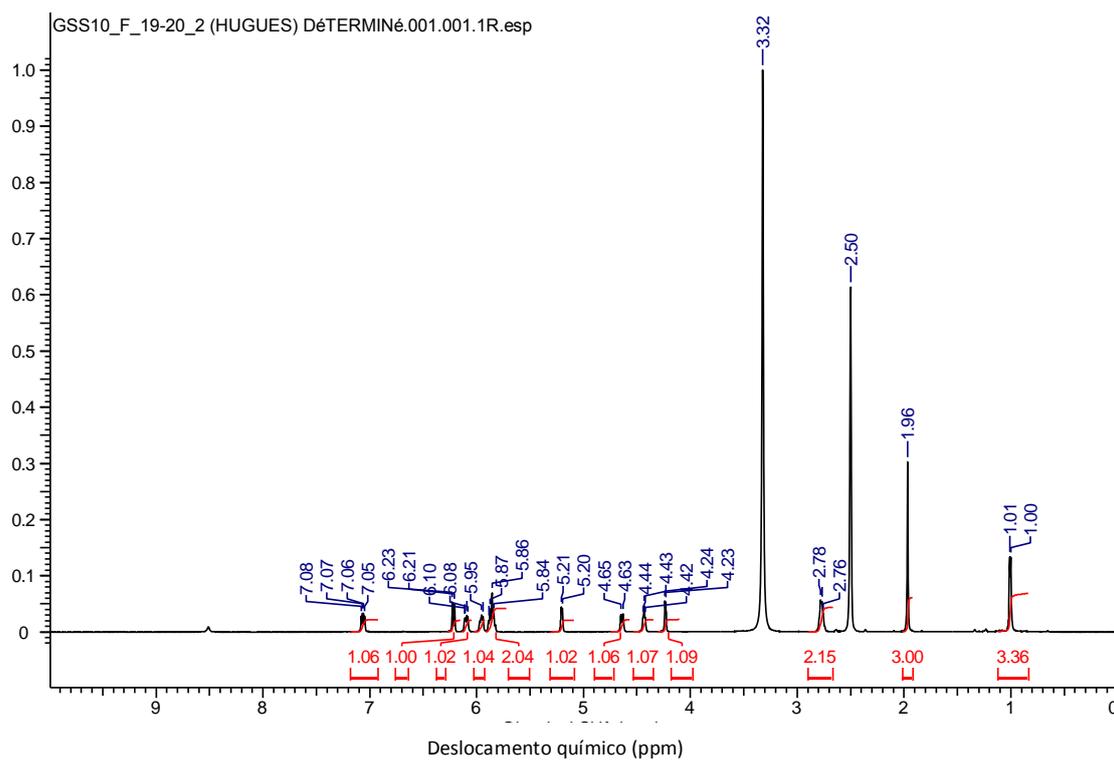


Figura 52. Espectro de RMN ^1H do Mycoepoxidieno (**36**) em $\text{DMSO-}d_6$.

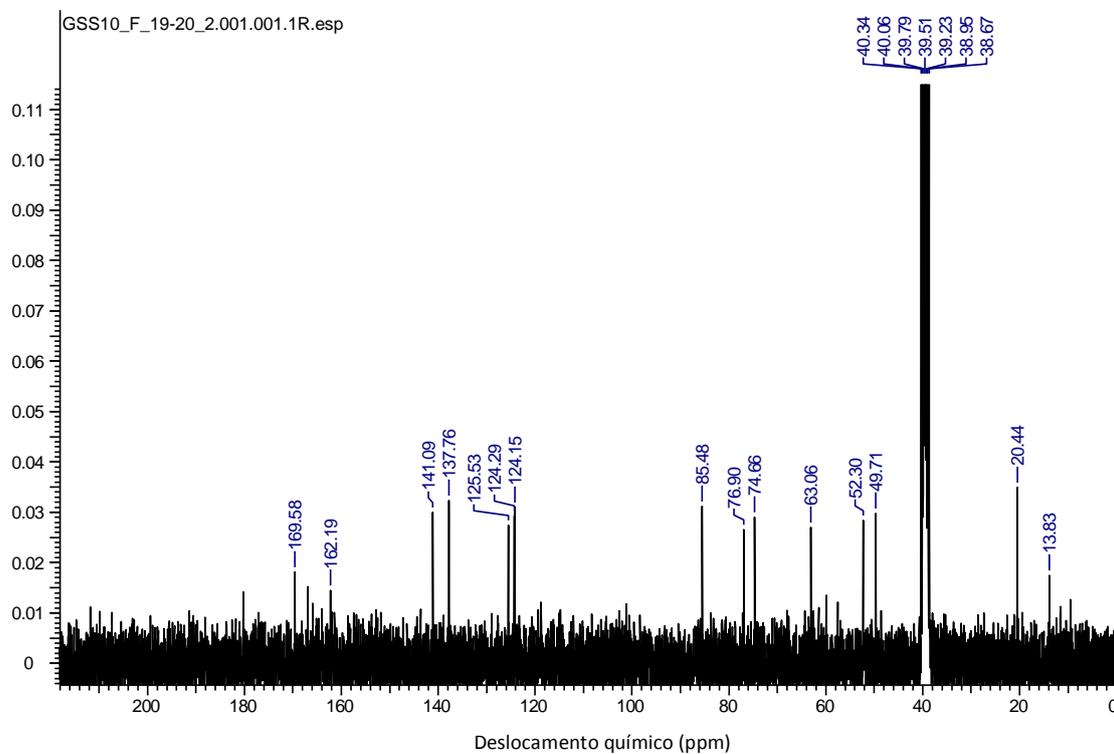
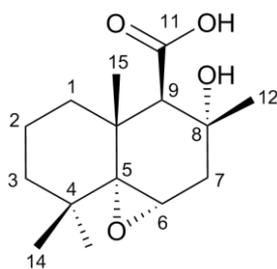


Figura 53. Espectro de RMN ^{13}C do Mycoepoxidieno (**36**) em $\text{DMSO-}d_6$.

Altioxina A (37):



^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) (Figura 54) δ 0,76 (3H, s), 1,15 (3H, s), 1,29 (3H, s), 1,32 (1H, dd, $J = 13,0$ e $0,9$ Hz), 1,41 (3H, s), 1,44 (1H, m), 1,48 (1H, dd, $J = 3,7$ e $9,3$ Hz), 1,55 (1H, m), 1,76 (1H, dq, $J = 3,7$ e $13,0$ Hz), 1,92 (1H, bd, $J = 3,7$ e $13,0$ Hz), 2,19 (1H, bd, $J = 16,1$ Hz), 2,41 (1H, dd, $J = 3,7$ e $16,1$ Hz), 3,16 (1H, s), 3,17 (1H, d, $J = 3,7$ Hz).

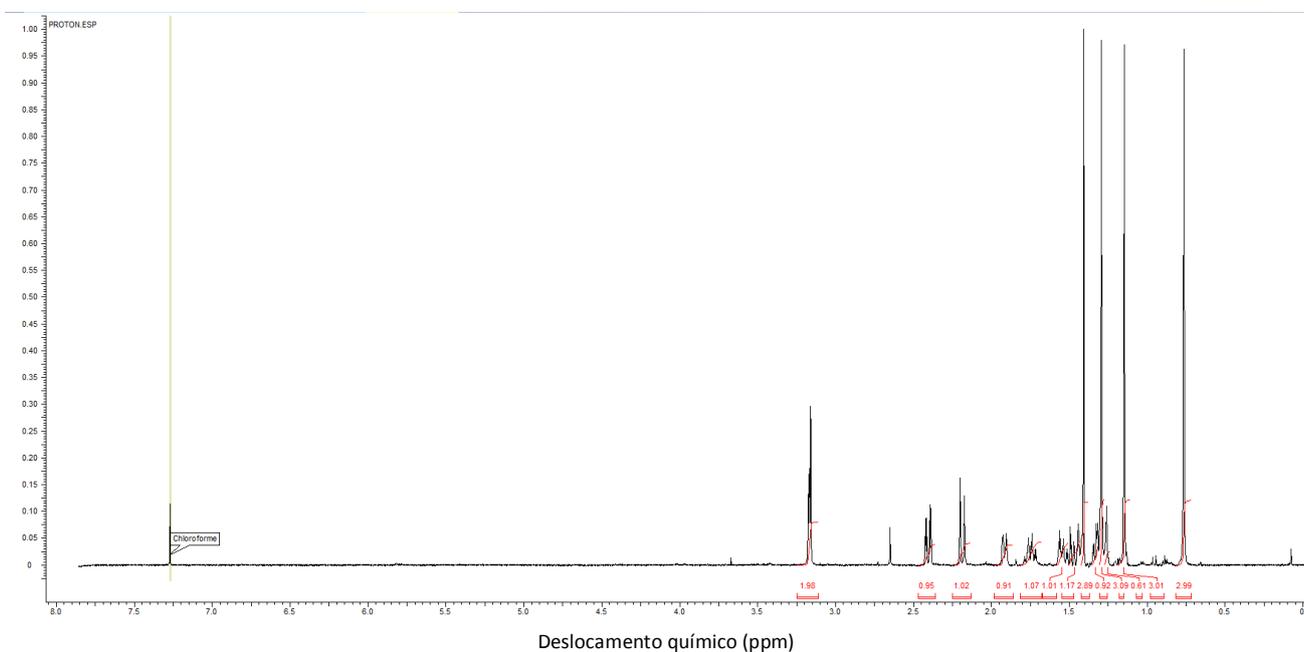


Figura 54. Espectro de RMN ^1H da Altioxina A (37) em CDCl_3 .

5.8.6 Estudo do extrato AcOEt de *Chaetomium globosum* (SNB-GTC2114)

I - Extração e isolamento

Uma porção do extrato bruto em AcOEt (554 mg) de *Chaetomium globosum* (SNB-GTC2114) foi fracionada por cromatografia flash utilizando-se gradientes lineares crescentes dos solventes Hex/AcOEt/MeOH. Oito frações foram reunidas com

base nos seus perfis cromatográficos analisados em CCD e em seguida avaliadas quanto à atividade antibacteriana em *S. aureus* e *C. albicans*. O esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de *C. globosum* (SNB-GTC2114) é apresentado na Figura 55.

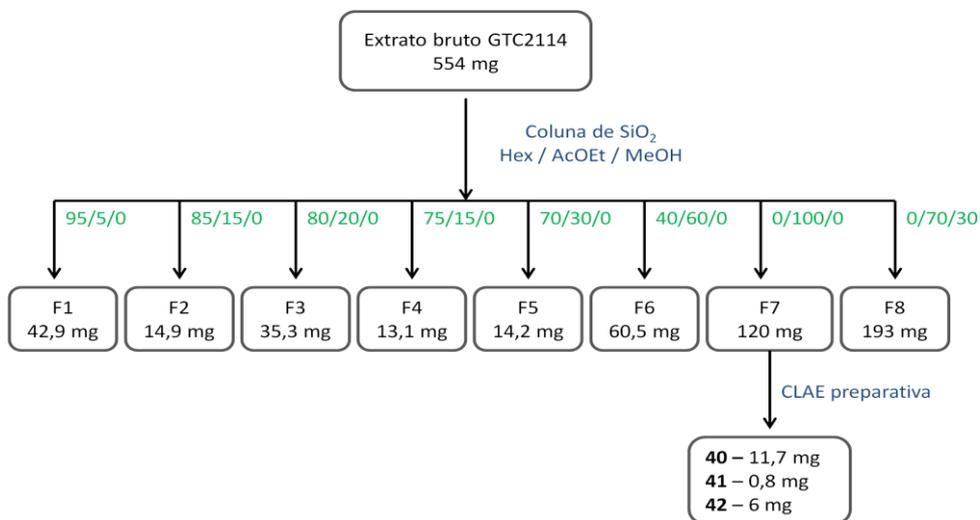


Figura 55. Esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de *Chaetomium globosum* (SNB-GTC2114).

A fração F7 (16,4 mg), eluída em cromatografia flash fase normal com 100% AcOEt, foi purificada por CLAE (Figura 56) em fase reversa permitindo o isolamento do acremonisol A (**40**) (Tr= 18,3 min, 11,7 mg), semicochliodinol A (**41**) (Tr= 20,6 min, 0,8 mg), cochliodinol (**42**) (Tr= 27,1 min, 6 mg), o isolamento em CLAE foi realizado nas seguintes condições:

Coluna: Waters Sunfire OBD RP 18 (5 μ m) 19 x 150 mm; **eluentes:** H₂O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF; **gradiente:** 55/45 isocrático (20 min), 55/45 \rightarrow 0/100 (5 min), 0/100 (10 min), 17 mL.min⁻¹; **detecção:** UV 260 nm.

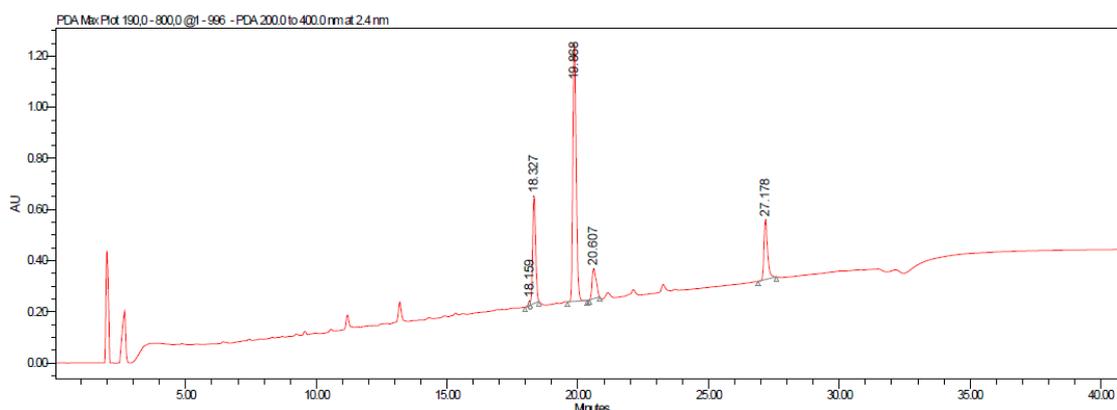
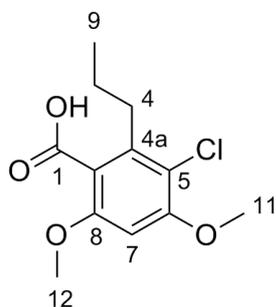


Figura 56. Cromatograma por CLAE da fração F7 do extrato em AcOEt de *Chaetomium globosum* (SNB-GTC2114).

II – Dados espectroscópicos das substâncias isoladas

Acremonisol A (40):



^1H RMN (300 MHz, CD_3OD) (Figura 57) δ 0,97 (3H, t, $J = 7,4$ Hz), 1,61 (2H, m), 2,69 (2H, m), 3,86 (3H, s), 3,91 (3H, s), 6,63 (1H, s); ^{13}C RMN (75,5 MHz, CD_3OD) (Figura 58) δ 14,7 ; 24,2 ; 34,7 ; 56,8 ; 57,0 ; 96,0 ; 115,3 ; 119,9 ; 140,1 ; 157,1 ; 158,1 ; 171,8.

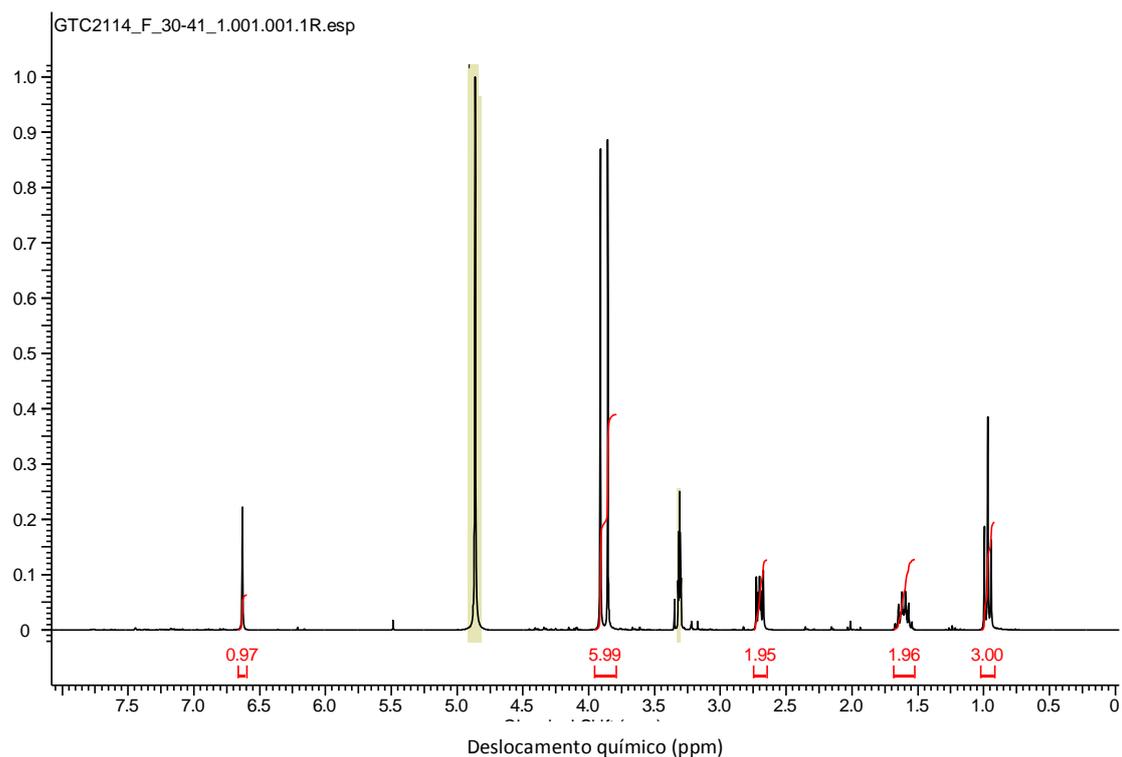


Figura 57. Espectro de RMN ^1H do Acremonisol A (40) em CD_3OD .

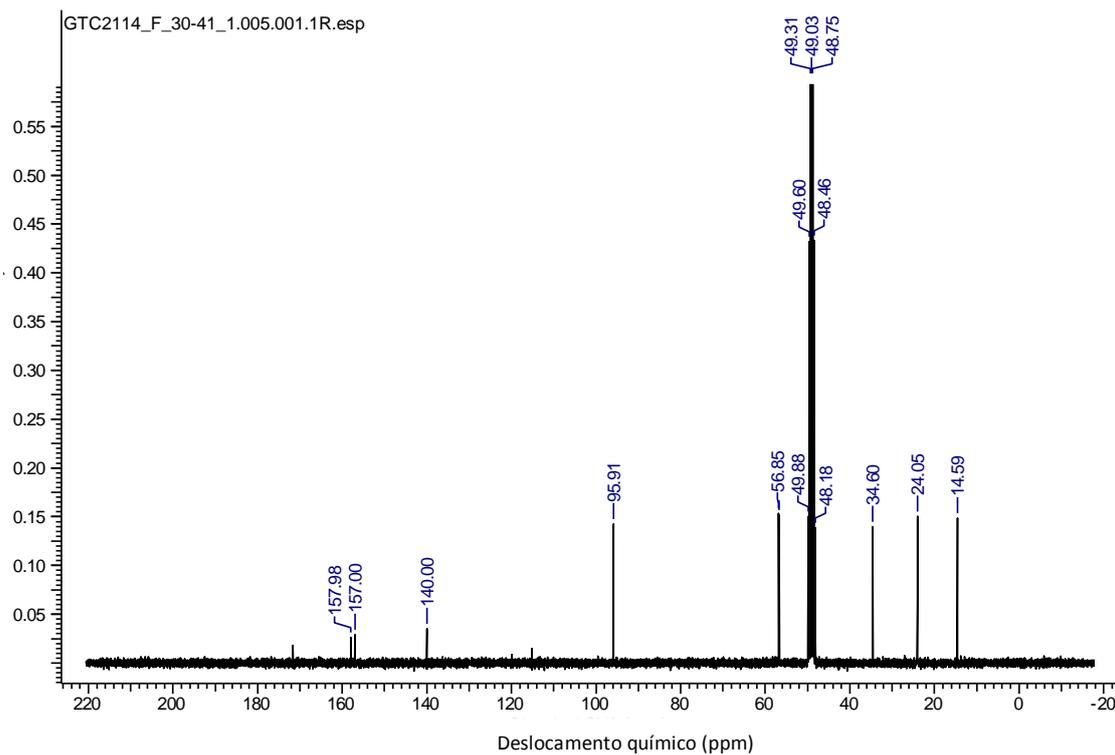
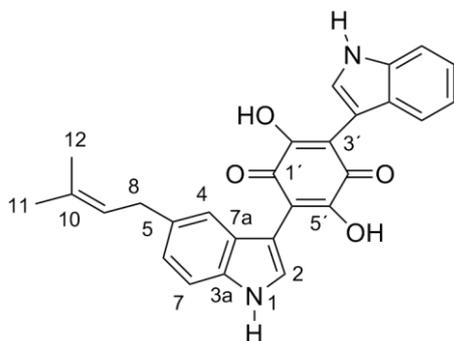


Figura 58. Espectro de RMN ^{13}C do Acremonisol A (**40**) em CD_3OD .

Semicochliodinol A (41**):**



^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) (Figura 59) δ 1,75 (3H, s), 1,77 (3H, s), 3,48 (2H, d), 5,41 (1H, t, $J = 7,2$ Hz), 7,11 (1H, d, $J = 8,4$ Hz), 7,21 (1H, t, $J = 7,6$ Hz), 7,24 (1H, t, $J = 6,3$ Hz), 7,35 (1H, d, $J = 8,2$ Hz), 7,43 (1H, s), 7,45 (1H, d, $J = 7,6$ Hz), 7,59 (1H, d, $J = 2,5$ Hz), 7,64 (1H, d, $J = 2,3$ Hz), 7,68 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 8,48 (1H, bs), 8,57 (1H, bs);

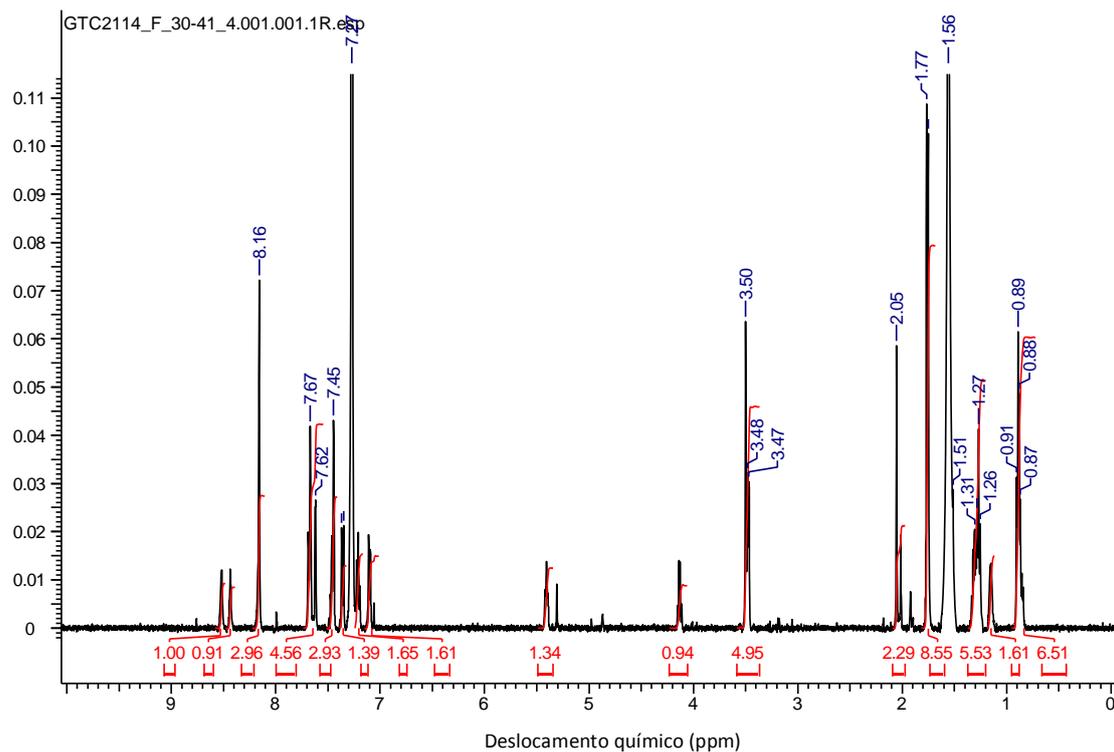
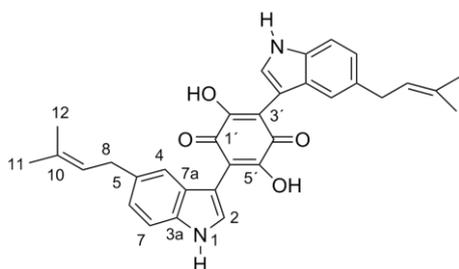


Figura 59. Espectro de RMN ^1H do Semicochliodinol A (41) em CDCl_3 .

Cochliodinol (42):



^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) (Figura 60) δ 1,69 (6H, s), 1,71 (6H, s), 3,34 (4H, d, $J = 7,3$ Hz), 5,32 (2H, t, $J = 7,3$ Hz), 6,91 (2H, bd, $J = 8,2$ Hz), 7,22 (2H, s), 7,31 (2H, d, $J = 8,2$ Hz), 7,44 (2H, d, $J = 2,4$ Hz), 10,66 (2H, bs), 11,23 (2H, bs);

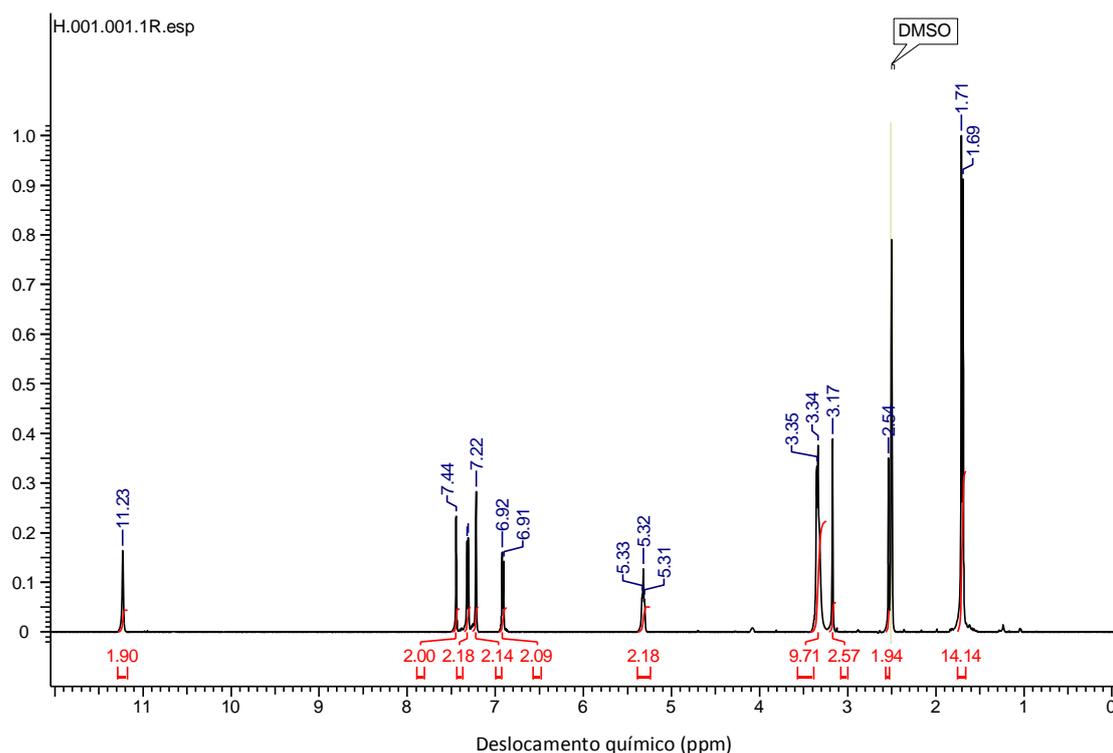


Figura 60. Espectro de RMN ^1H do Cochliodinol A (**42**) em $\text{DMSO-}d_6$.

5.8.7 Estudo do extrato AcOEt de *Colletotrichum* sp. (SNB-GTC0201)

I - Extração e isolamento

Uma porção do extrato bruto em AcOEt (732 mg) de *Colletotrichum* sp. (SNB-GTC0201) foi fracionada por cromatografia flash utilizando-se gradientes lineares crescentes dos solventes Hex/AcOEt/MeOH. Oito frações foram reunidas com base nos seus perfis cromatográficos analisados em CCD e em seguida avaliadas quanto à atividade antiproliferativa celular e em *C. albicans*. O esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de *Colletotrichum* sp. (SNB-GTC0201) é apresentado na Figura 61.

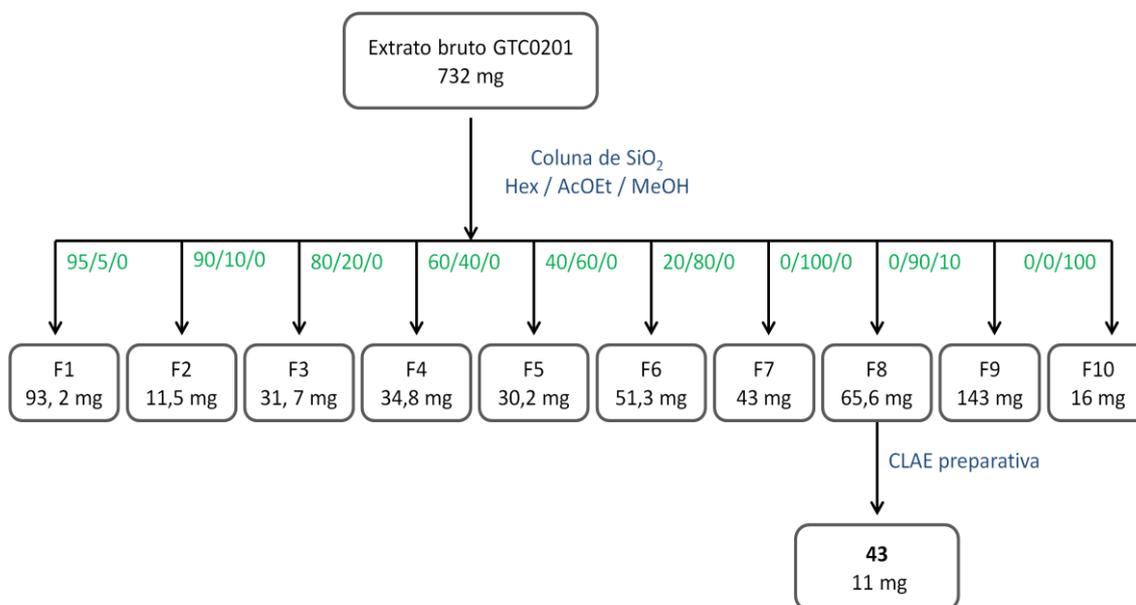


Figura 61. Esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de *Colletotrichum* sp. (SNB-GTC0201).

A fração F8 (65,6 mg), eluída em cromatografia flash fase normal com AcOEt/MeOH, 90/10 foi purificada por CLAE (Figura 62) em fase reversa permitindo o isolamento da colletotragarone A2 (**43**) (Tr= 24,4 min, 11 mg), o isolamento em CLAE foi realizado nas seguintes condições:

Coluna: Waters Sunfire OBD RP 18 (5 μ m) 19 x 150 mm; **eluentes:** H₂O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF; **gradiente:** 40/60 isocrático (30 min), 40/60→ 0/100 (5 min), 0/100 (10 min), 17 mL.min⁻¹; **deteção:** UV 260 nm.

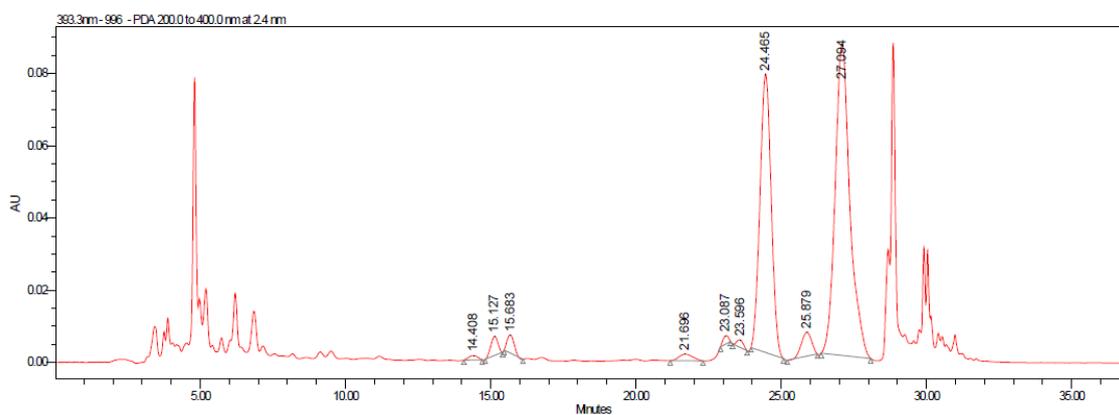
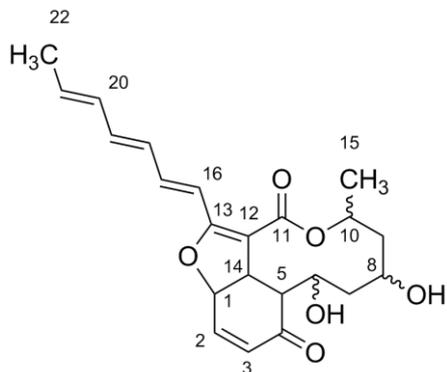


Figura 62. Cromatograma por CLAE da fração F8 do extrato em AcOEt de *Colletotrichum* sp. (SNB-GTC0201).

II – Dados espectroscópicos da substância isolada

Colletofragarona A2 (43):



^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (Figura 63) δ 1,31 (1H, d, $J = 6,1$ Hz), 1,33 (1H, m), 1,61 (1H, dt, $J = 13,7$ e $10,5$ Hz), 1,78 (3H, d, $J = 6,7$ Hz), 1,92 (1H, bd, $J = 13,7$ Hz), 2,19 (1H, bt, $J = 10,5$ Hz), 2,88 (1H, dd, $J = 9,9$ e $5,0$ Hz), 3,46 (1H, m), 3,76 (1H, m), 4,28 (1H, dd, $J = 8,9$ e $5,2$ Hz), 4,34 (1H, d, $J = 2,8$ Hz), 4,58 (1H, dq, $J = 12,2$, $6,1$ e $1,6$ Hz), 4,62 (1H, d, $J = 4,0$ Hz), 5,65 (1H, dd, $J = 8,9$ e $3,4$ Hz), 5,91 (1H, dq, $J = 14,6$ e $7,2$ Hz), 6,16 (1H, dd, $J = 14,6$ e $11,0$ Hz), 6,20 (1H, d, $J = 10,1$ Hz), 6,30 (1H, dd, $J = 14,7$ e $11,6$ Hz), 6,34 (1H, d, $J = 15,0$ Hz), 6,52 (1H, dd, $J = 14,7$ e $11,0$ Hz), 6,60 (1H, dd, $J = 10,1$ e $3,4$ Hz), 6,74 (1H, dd, $J = 15,3$ e $11,3$ Hz);

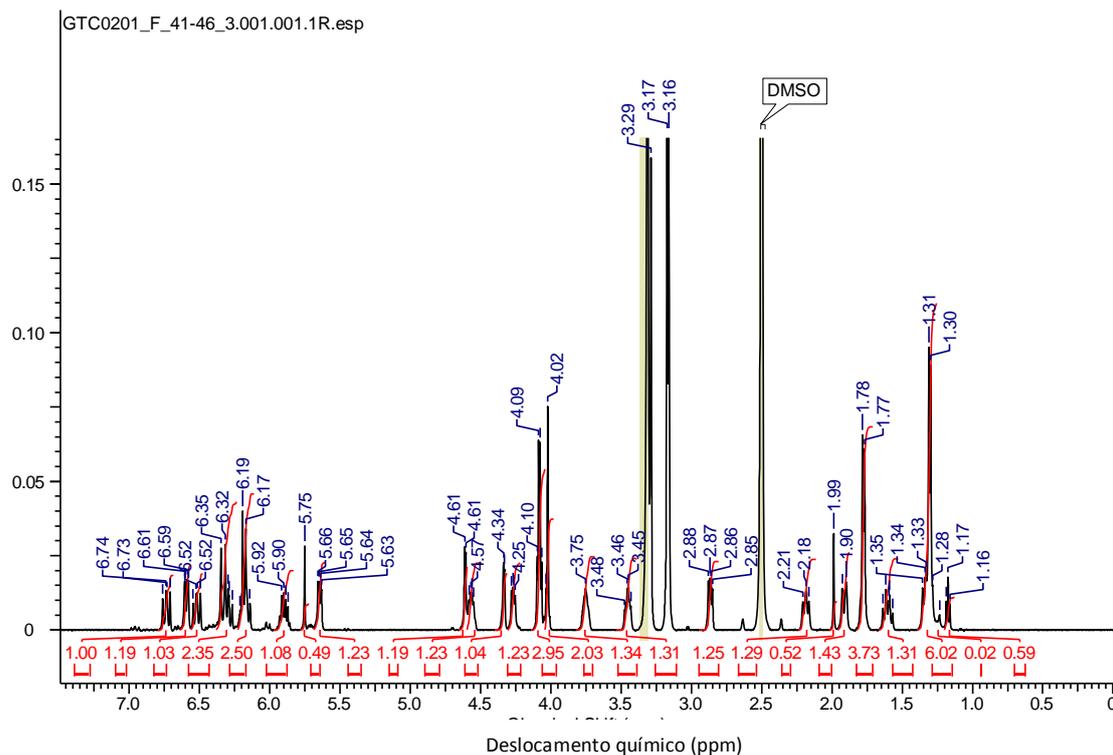


Figura 63. Espectro de RMN ^1H da coletofragarona A2 (**43**) em $\text{DMSO-}d_6$.

5.8.8 Estudo do extrato AcOEt de *Eurotium rubrum* (BBS 01)

I - Extração e isolamento

Uma porção do extrato bruto em AcOEt (1200 mg) de *Eurotium rubrum* (BBS01) foi fracionada por cromatografia flash utilizando-se gradientes lineares crescentes dos solventes Hex/AcOEt/MeOH. Oito frações foram reunidas com base nos seus perfis cromatográficos analisados em CCD e em seguida testados quanto à atividade antifúngica em *C. albicans*. O esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de *E. rubrum* (BBS01) é apresentado na Figura 64.

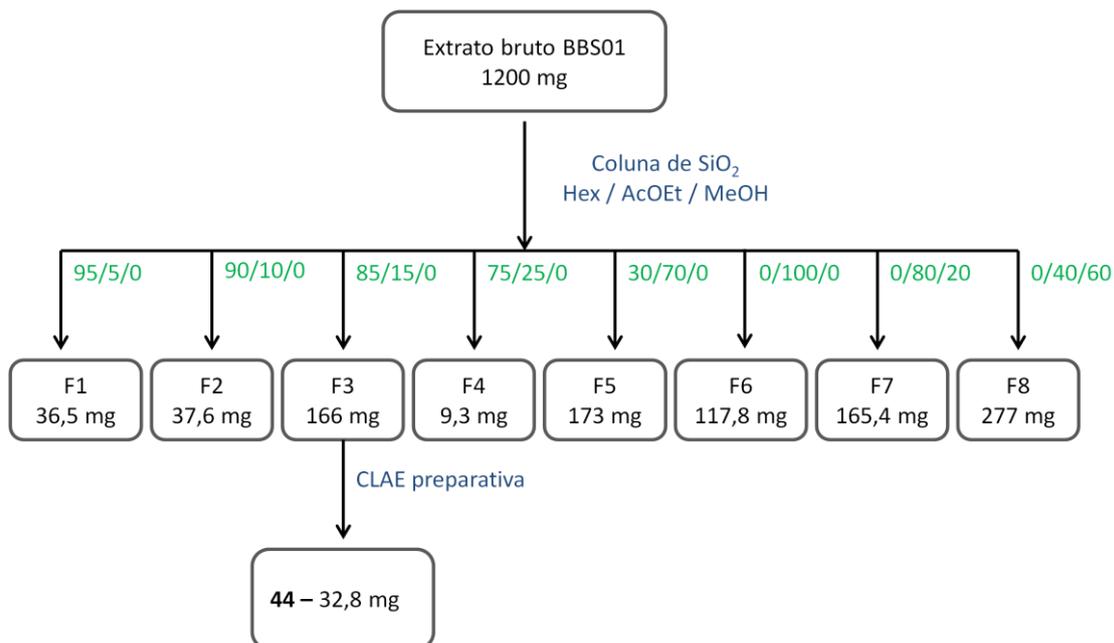


Figura 64. Esquema geral do fracionamento do extrato em AcOEt de *Eurotium rubrum* (BBS01).

A fração F3 (166 mg), eluída em cromatografia flash com Hex/AcOEt 85/15, foi purificada por CLAE (Figura 65) em fase reversa permitindo o isolamento da flavoglaucina (**44**) ($T_r = 38,5$ min, 32,8 mg). O isolamento em CLAE foi realizado nas seguintes condições:

Coluna: Waters Sunfire OBD RP 18 (5 μ m) 19 x 150 mm; **eluentes:** H₂O + 0,1% AF / ACN + 0,1% AF; **gradiente:** 37/63 isocrático (35 min), 37/63 \rightarrow 5/95 (5 min), 5/95 \rightarrow 0/100 (5 min), 0/100 (5 min), 17 mL.min⁻¹; **deteção:** UV 270 nm.

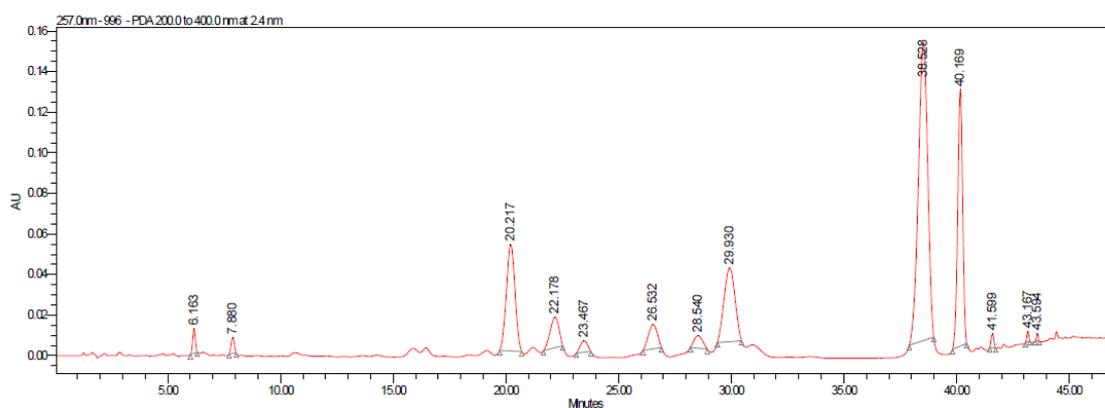
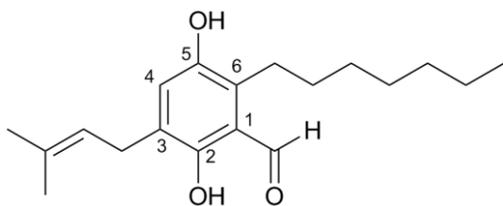


Figura 65. Cromatograma por CLAE da fração F3 do extrato em AcOEt de *Eurotium rubrum* (BBS01).

II – Dados espectroscópicos da substância isolada

Flavoglaucina (44):



^1H RMN (500 MHz, CD_3OD_3) (Figura 66) δ 0,89 (3H, t, $J = 6,9$ Hz), 1,30 (2H, m), 1,30 (2H, m), 1,30 (2H, m), 1,35 (2H, m), 1,55 (2H, q, $J = 7,3$ Hz), 1,70 (3H, s), 1,74 (3H, s), 2,91 (2H, t, $J = 7,3$ Hz), 3,24 (2H, d, $J = 7,3$ Hz), 5,28 (1H, tq, $J = 7,3$ e $1,3$ Hz), 6,93 (1H, s), 10,26 (1H, s); ^{13}C RMN (125 MHz, CD_3OD_3) (Figura 67) δ 14,5 ; 17,9 ; 23,8 ; 24,6 ; 26,0 ; 28,0 ; 30,4 ; 30,7 ; 33,1 ; 33,2 ; 40,5 ; 118,9 ; 123,1 ; 126,6 ; 128,9 ; 130,5 ; 134,2 ; 148,2 ; 155,6 ; 197,7.

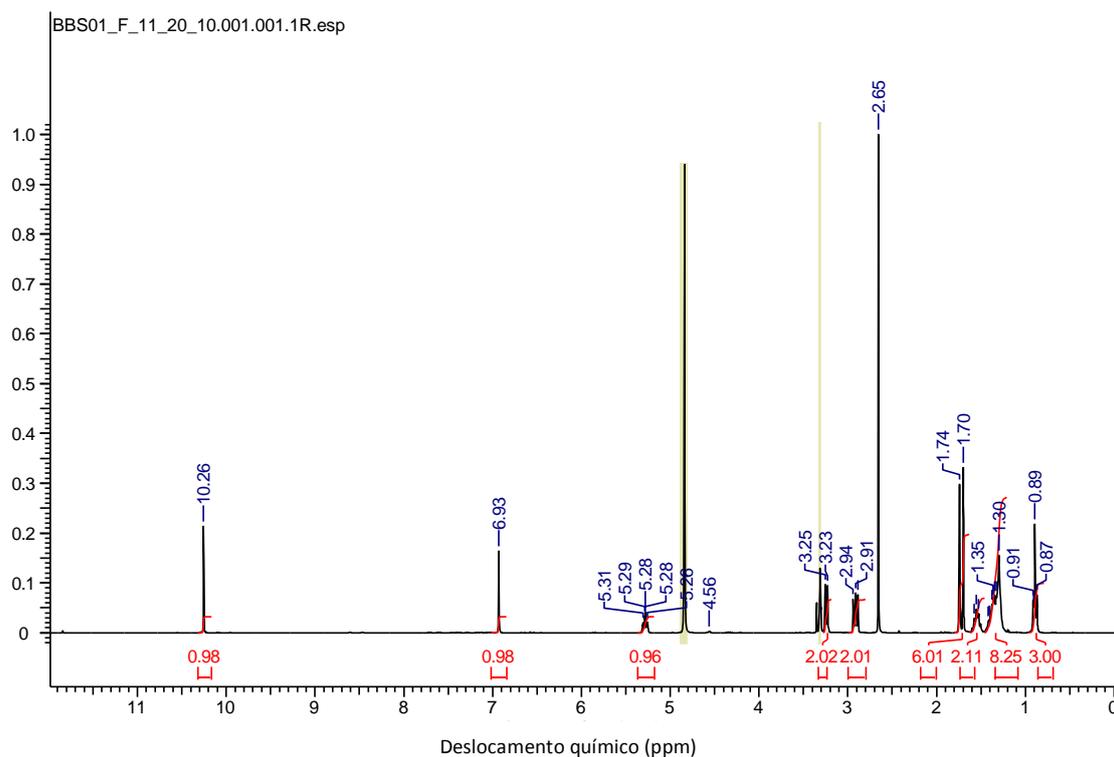


Figura 66. Espectro de RMN ^1H da Flavoglaucina (44) em CD_3OD_3 .

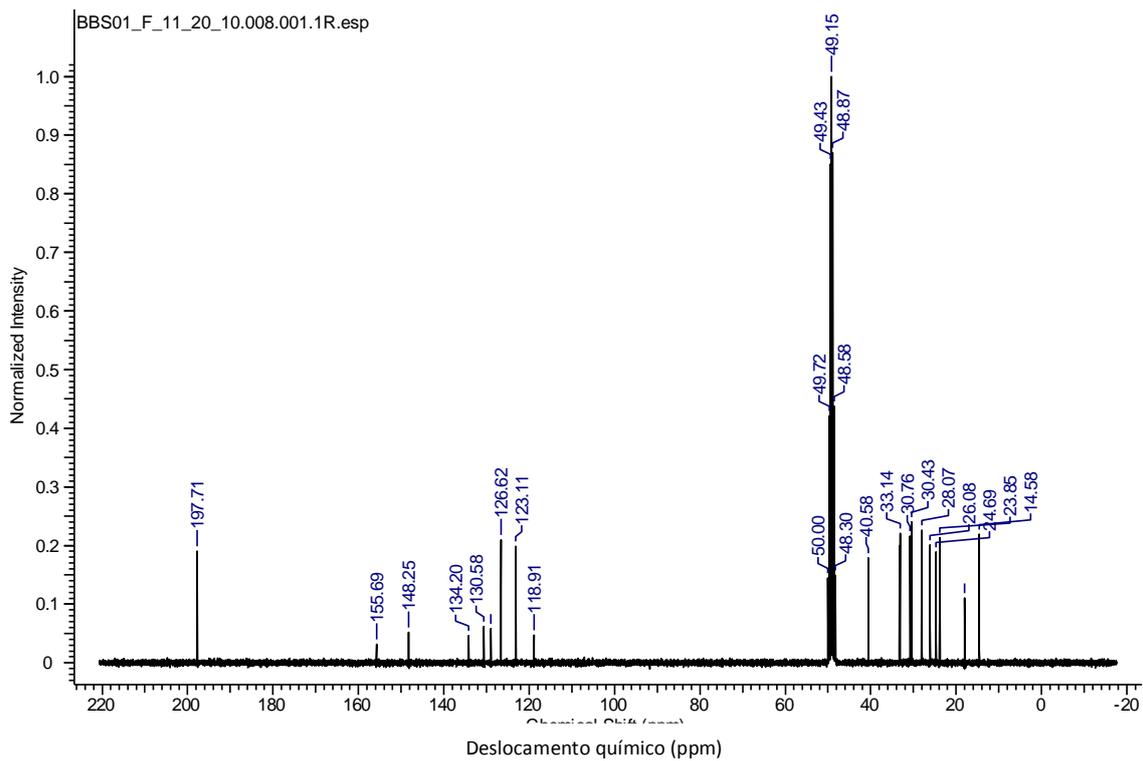


Figura 67. Espectro de RMN ^{13}C da Flavoglucina (**44**) em CD_3OD_3 .

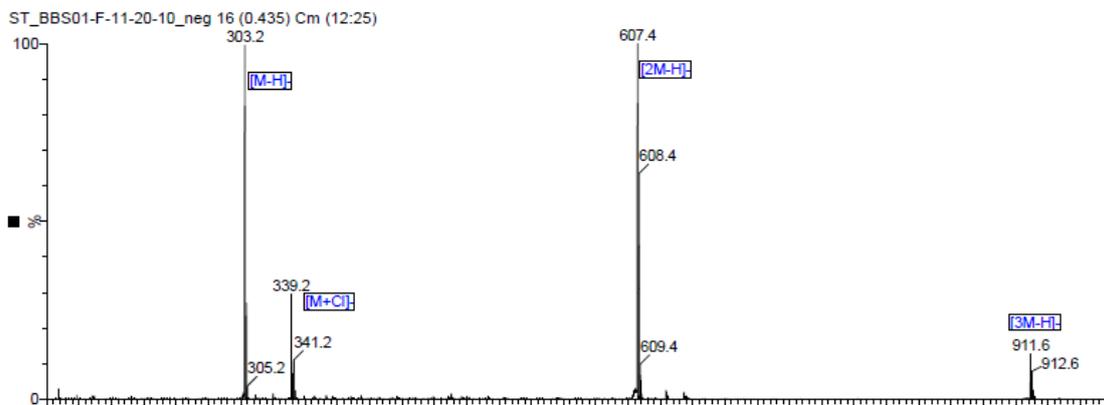


Figura 68. Espectro de massa HR-ESI-MS (negativo) da Flavoglucina (**44**).

6 Resultados e discussões

6.1 Plantas coletadas, endófitos isolados e extratos brutos endofíticos produzidos

Um total de 28 espécies de plantas (Figura 69), pertencentes a 16 famílias de angiospermas foram coletadas na Guiana Francesa, em bioma Amazônia, e no Brasil, no bioma Cerrado em busca de fungos endofíticos. As espécies vegetais coletadas foram selecionadas por dois fatores, todas são espécies com utilização etnofarmacológica e ainda devem habitar ambientes úmidos e sombreados, pois esta condição propicia o desenvolvimento de micro-organismos. A ausência de infecções foliares visíveis nas amostras coletadas serviu como um primeiro indicador da presença de micro-organismos benéficos associados à planta, pois no ambiente de coleta as outras espécies circundantes apresentavam geralmente sinais de parasitismo. A partir das folhas das 28 espécies, 147 micro-organismos endofíticos foram isolados, sendo a maioria identificada como fungos do filo Ascomycota (143 isolados).

Foi possível isolar ao menos um fungo cultivável nas folhas de todas as espécies amostradas, sendo que as amostras foliares permaneceram em cultura por até 6 meses. A espécie vegetal encontrada com o maior número de isolados endofíticos, 22 fungos (Figura 69), foi a árvore pioneira *Vismia latifolia* (Hypericaceae), encontrada abundantemente por quase toda Floresta Amazônica (Nebel *et al.*, 2001). A variada e grande distribuição geográfica desta planta na Amazônia pode ser originária de sua associação com endófitos bioativos (Clay e Holah, 1999) ou pela sua tolerância à colonização endofítica, o que a tornaria mais adaptada à diversidades climáticas, geográficas e edáficas. Foi observada uma distribuição heterogênea quantitativa e qualitativa dos isolados obtidos a partir das plantas coletadas neste trabalho. Sánchez Márquez *et al.* (2012) concluíram em trabalho de revisão da literatura, que este padrão é comumente observado em grande parte dos estudos envolvendo o isolamento de fungos endofíticos de regiões tropicais e temperadas.

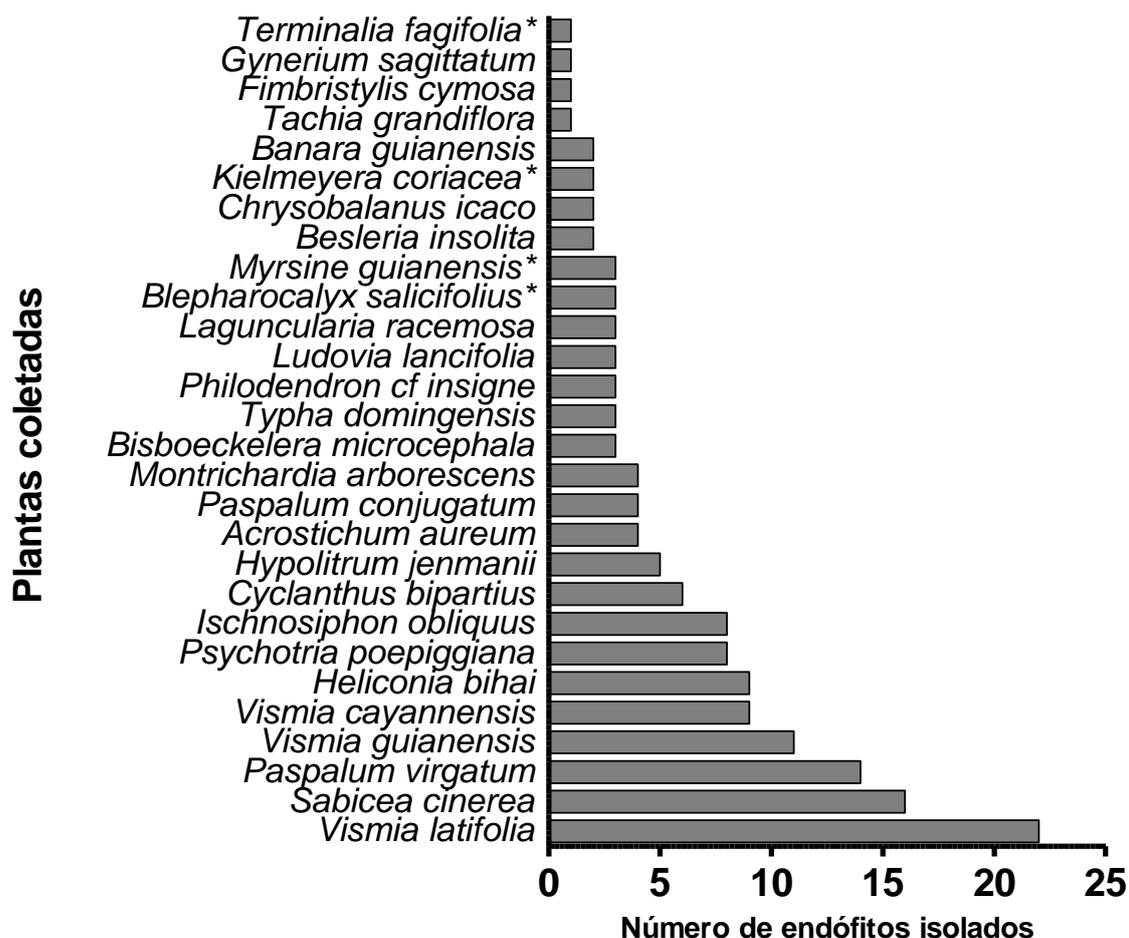


Figura 69. Número de micro-organismos endofíticos isolados por espécie vegetal coletada.

* Plantas coletadas no Brasil

Através da identificação molecular dos isolados foram identificadas 12 diferentes ordens fúngicas, incluindo 11 diferentes ordens de Ascomycetos, uma ordem de levedura inserida no filo Basidiomycota, 3 bactérias endofíticas e também 14 cepas não identificadas (Figura 70). A identificação molecular de algumas cepas isoladas não foi possível devido à dificuldades surgidas durante a extração e/ou o sequenciamento do DNAr genômico, ou ainda devido a falta de uma sequência comparativa no banco de dados GEnBank. Em alguns casos (SNB-GTC 2901, SNB-GTC2905, SNB-GTC2906, tabela 2), as sequências obtidas corresponderam à sequências de fungos ainda não identificados na base de dados GenBank, sugerindo que estes isolados sejam novas espécies fúngicas. Plantas residentes de áreas de grande biodiversidade podem hospedar

endófitos únicos e extremamente biodiversos (Strobel *et al.*, 2003). Estes isolados, que podem representar espécies ainda não descritas na literatura, são interessantes para estudos de investigação química de seus metabólitos e vias biossintéticas e serão testados sobre outros modelos biológicos. A ordem Xylariales foi observada como a mais frequentemente isolada neste estudo, representada por 35 isolados (Figura 70), sendo alguns destes identificados como pertencentes à mesma espécie fúngica (*Xylaria cubensis*). No entanto, estas cepas foram mantidas separadas devido às diferenças morfológicas substanciais encontradas e devido aos resultados biológicos heterogêneos obtidos através da triagem biológica dos diferentes extratos brutos produzidos. Os fungos da ordem Xylariales parasitam geralmente plantas lenhosas, sendo encontrados geralmente em madeiras ou folhas, além de colonizarem excrementos de animais e a cobertura vegetal do solo de florestas (Lee *et al.*, 2000). As espécies de fungos endofíticos mais amostradas em regiões tropicais são *Xylaria* spp., *Colletotrichum* spp., *Guignardia* spp., *Phyllosticta* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phomopsis* spp. (Schulz e Boyle, 2005). Dentre os endófitos coletados neste trabalho, apenas o gênero *Phyllosticta* não foi amostrado, já os demais gêneros obtiveram uma alta frequência relativa de isolados (Tabela 2). A biodiversidade do bioma Amazônico e do bioma Cerrado justificam a criação de programas de conservação e pesquisas racionais visando o conhecimento destes biomas ameaçados (Klink e Machado, 2005).

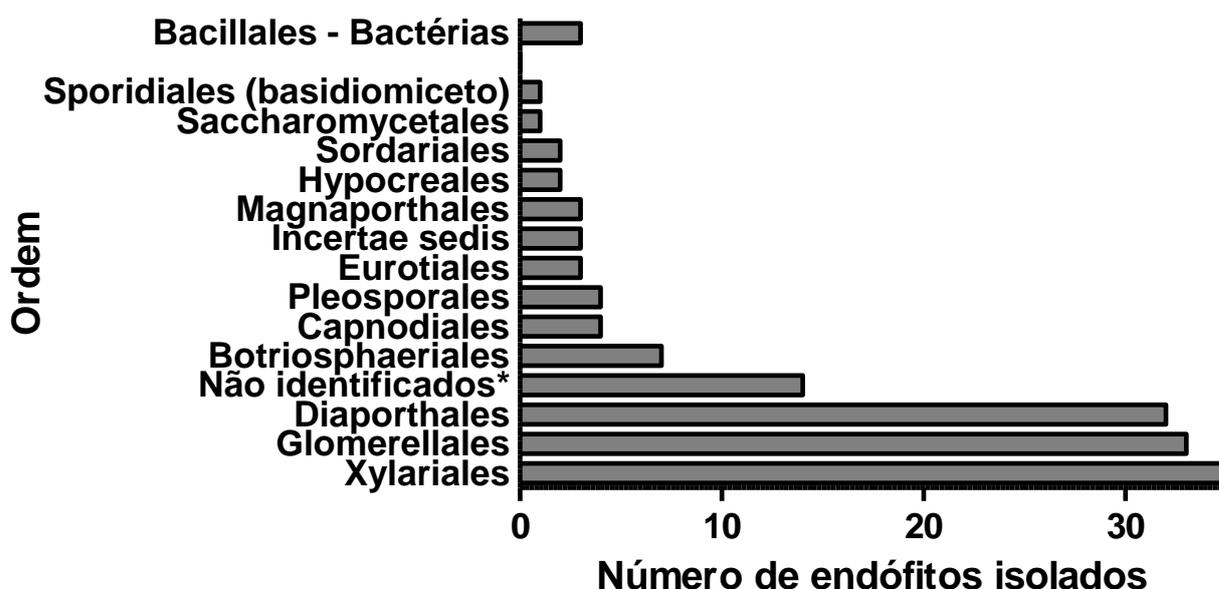


Figura 70. Número de micro-organismos endofíticos isolados por ordem filogenética.

* A sequência completa ITS1 não foi obtida para estes isolados devido a dificuldades em extrair ou sequenciar o DNAr genômico

Uma levedura do filo Basidiomycota identificada como *Rhodotorula minuta* (Tabela 2) foi isolada de *Philodendron insigne* (Araceae). Basidiomicetos leveduriformes foram reportados como raros fungos endofíticos de palmeiras e de outras angiospermas (Fröhlich *et al.*, 2000). Curiosamente, foram isoladas 3 bactérias endofíticas sem o uso de meio de cultura seletivo ou de antibióticos durante o processo de isolamento. Rosenblueth e Martínez-Romero (2006) estabeleceram alguns critérios para o reconhecimento de bactérias endofíticas “verdadeiras”, nos quais é requerido não somente o isolamento a partir de tecidos superficialmente desinfetados, mas também evidências microscópicas para visualizar bactérias previamente “marcadas” no interior do tecido vegetal. Quando este último critério não é atingido, estes autores utilizam o termo “endófito putativo” para os isolados bacterianos encontrados. Assim os endófitos bacterianos encontrados neste estudo podem então ser considerados como putativos.

Todos os extratos brutos em AcOEt dos micro-organismos endofíticos isolados foram avaliados em dois patógenos humanos: a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e a levedura *Candida albicans*. A citotoxicidade dos extratos foi avaliada em células de linhagens tumorais KB (carcinoma uterino cervical) e MDA-MB-435 (melanoma), e também na linhagem celular normal MRC-5 (fibroblastos humanos de pulmão). O meio de cultura sem qualquer endófito (“branco”) foi testado em todos os modelos biológicos analisados e não apresentou atividade, confirmando que o resultado positivo das triagens foi devido à presença de metabólitos secundários produzidos pelos endófitos. A identificação dos micro-organismos endofíticos e seus respectivos hospedeiros vegetais, assim como o rendimento de produção de cada extrato bruto endofítico são apresentados na tabela 2. As atividades antimicrobianas e citotóxicas *in vitro* dos extratos brutos provenientes de cada micro-organismo endofítico isolado são apresentadas na tabela 3.

Tabela 2.

Plantas coletadas, identificação dos micro-organismos endofíticos e rendimento dos respectivos extratos brutos em AcOEt

Espécie hospede - Família - Coordenada geográfica	Número de acesso NCBI	Tamanho da sequência obtida em pares de base	Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleotídeos NCBI ^a	Número de acesso do isolado mais próximo	Semelhança à espécie conhecida (%)	Rendimento de extração (g.m ⁻²)
<i>Tachia grandiflora</i> Maguire e Weaver - Gentianaceae - N 05°12'796'' W 052°98'078''	KF164294	483	GTG01	<i>Epicoccum nigrum</i>	EU821486.1	99	4,44
<i>Laguncularia racemosa</i> (L.) C.F. Gaertn. - Combretaceae - N 04°90'104'' W 052°36'314''	KF164295	502	GTC2001	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	GQ407097.1	99	2,87
	KF164296	503	GTC2002	<i>Glomerella</i> sp.	GQ352476.1	98	3,48
	KF164297	502	GTC2003	<i>Glomerella</i> sp.	GQ352476.1	99	1,85
<i>Paspalum virgatum</i> L. - Poaceae - N 04°90'104'' W 052°36'314''	KF164298	557	GTC2101	Desconhecido (Fungal sp. F504) ^b	JQ747726.1	99	2,90
	KF164299	506	GTC2102	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	JF304629.1	98	0,80
	KF164300	512	GTC2103	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	JF304629.1	99	0,97
	KF164301	523	GTC2104	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	JF304629.1	98	1,44
	KF164302	323	GTC2105	<i>Glomerella</i> sp.	JQ809667.1	99	0,97
	-	-	GTC2106	Não-identificado ^c	-	-	2,17
	KF164303	515	GTC2107	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	JF304630.1	99	0,90
	KF164304	368	GTC2108	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	JF304630.1	99	1,86
	-	-	GTC2109	Não-identificado ^c	-	-	2,34
	KF164306	391	GTC2110	<i>Phomopsis</i> sp.	EF564153.1	99	2,11
	KF164307	363	GTC2111	<i>Sarocladium</i> sp.	KC311484.1	98	0,96
	KF164427	427	GTC2112	<i>Bacillus cereus</i> ^d	KC166867.1	100	3,18

Espécie hospede - Família - Coordenada geográfica	Número de acesso NCBI	Tamanho da sequência obtida em pares de base	Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleotídeos NCBI ^a	Número de acesso do isolado mais próximo	Semelhança à espécie conhecida (%)	Rendimento de extração (g.m ⁻²)
	-	-	GTC2113	Não-identificado ^c	-	-	2,31
	KF164309	375	GTC2114	<i>Chaetomium globosum</i>	AY429056.1	99	2,23
	KF164428	454	GTC21B2	<i>Bacillus anthracis</i> ^d	HQ683778.1	99	1,84
<i>Fimbristylis cymosa</i> R. Br. - Cyperaceae - N 04°30'104'' W 052°36'314''	KF164310	508	GTC2201	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	JF896458.1	99	6,25
<i>Psychotria poepiggiana</i> Müll. Arg. - Rubiaceae - N 04°30'209'' W 052°18'065''	KF164311	473	GPP01	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	JX464074.1	99	3,06
	KF164312	469	GPP02	<i>Xylaria cubensis</i>	GU373810.1	97	1,62
	KF164313	480	GTC2301	<i>Mycoleptodiscus</i> sp.	FJ478407.1	98	0,97
	KF164314	300	GTC2302	<i>Mycoleptodiscus</i> sp.	HM211288.1	99	1,20
	KF164315	502	GTC2303	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	GQ424105.1	99	2,10
	KF164316	300	GTC2304	<i>Mycoleptodiscus</i> sp.	FJ478407.1	98	1,58
	KF164317	530	GTC2307	<i>Colletotrichum</i> sp.	DQ780412.1	98	4,57
	KF164318	377	GTC2308	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	GU066701.1	99	1,78
<i>Besleria insolita</i> C.V. Morton - Gesneriaceae - N 04°30'100'' W 052°18'265''	KF164319	506	GTC2401	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM013821.1	99	2,23
	KF164320	468	GTC2402	<i>Lewia infectoria</i>	GU584989.1	100	3,19
<i>Bisboeckelera</i> <i>microcephala</i> (Boeckeler) T. Koyama - Cyperaceae - N 04°30'288'' W 052°18'467''	KF164321	468	GTC2501	<i>Xylaria</i> sp.	FJ175171.1	99	0,90
	KF164322	359	GTC2502	<i>Colletotrichum boninense</i>	JQ926743.1	99	0,76
	KF164323	392	GTC2503	<i>Phomopsis</i> sp.	JN153053.1	99	5,83
	KF164429	436	GCYPB01	<i>Brevibacillus reuszeri</i> ^d	AB680946.1	100	2,62
<i>Hypolytrum jenmanii</i> subs. <i>jenmanii</i> C. B. Clarke -	KF164324	339	GTC2601	<i>Colletotrichum boninense</i>	JN222969.1	99	2,29
	KF164325	467	GTC2602	<i>Colletotrichum</i> sp.	EF672323.1	98	1,91
	KF164326	396	GTC2603	<i>Xylaria cubensis</i>	GU373810.1	99	2,81

Espécie hóspede - Família - Coordenada geográfica	Número de acesso NCBI	Tamanho da sequência obtida em pares de base	Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleotídeos NCBI ^a	Número de acesso do isolado mais próximo	Semelhança à espécie conhecida (%)	Rendimento de extração (g.m ⁻²)
Cyperaceae - N 04°30'222'' W 052°18'069''	KF164327	474	GTC2604	<i>Xylaria cubensis</i>	GU373810.1	88	1,90
	KF164328	388	GTC2605	<i>Colletotrichum boninense</i>	JQ926743.1	100	3,81
<i>Vismia guianensis</i> (Aubl.)	KF164329	420	GTC2701	<i>Colletotrichum</i> sp.	EF672323.1	100	1,26
Choisy - Hypericaceae - N 04°52'709'' W 052°17'780''	KF164330	436	GTC2702	<i>Hypoxylon investiens</i>	KC771458.1	97	0,63
	KF164331	581	GTC2703	<i>Guignardia vaccinii</i>	JQ936158.1	99	0,77
	KF164332	519	GTC2704	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	JF304629.1	98	0,72
	KF164333	440	GTC2705	<i>Diaporthe</i> sp.	EF423524.2	98	1,69
	KF164334	440	GTC2706	<i>Colletotrichum</i> sp.	EF672323.1	99	0,84
	KF164335	379	GTC2707	<i>Hypoxylon investiens</i>	KC771458.1	97	1,60
	KF164336	467	GTC2708	<i>Diaporthe</i> sp.	EF423524.2	98	1,0
	KF164337	515	GTC2709	<i>Hypoxylon investiens</i>	KC771458.1	97	2,73
	KF164338	320	GTC2710	<i>Hypoxylon investiens</i>	KC771458.1	100	2,13
	KF164339	554	GTC2711	<i>Hypoxylon investiens</i>	KC771458.1	97	2,51
<i>Vismia latifolia</i> (Aubl.)	KF164340	558	GVL02	<i>Penicillium</i> sp.	AB588822.1	97	1,81
Choisy - Hypericaceae - N 04°52'708'' W 052°17'781''	KF164341	519	GTC2801	<i>Phomopsis bougainvilleicola</i>	JX847139.1	99	1,39
	-	-	GTC2802	Não-identificado ^c	-	-	0,89
	KF164342	556	GTC2803	<i>Guignardia</i> sp.	GU066723.1	99	1,03
	KF164343	523	GTC2804	<i>Diaporthe</i> sp.	KC343211.1	99	1,33
	KF164344	437	GTC2805	<i>Xylaria cubensis</i>	GU373810.1	99	1,87
	KF164345	534	GTC2806	<i>Phomopsis</i> sp.	EF564153.1	98	1,92
	KF164346	513	GTC2807	<i>Phomopsis</i> sp.	EF564153.1	99	2,99
	KF164347	535	GTC2808	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	AF001025.2	99	1,78
	KF164348	505	GTC2809	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	AF001025.2	99	2,23
	KF164349	504	GTC2810	<i>Phomopsis</i> sp.	EF564153.1	99	1,66

Espécie hospede - Família - Coordenada geográfica	Número de acesso NCBI	Tamanho da sequência obtida em pares de base	Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleotídeos NCBI ^a	Número de acesso do isolado mais próximo	Semelhança à espécie conhecida (%)	Rendimento de extração (g.m ⁻²)
	KF164350	504	GTC2811	<i>Phomopsis</i> sp.	EF564153.1	99	1,88
	KF164351	510	GTC2812	<i>Phomopsis</i> sp.	EF564153.1	99	2,53
	KF164352	501	GTC2813	<i>Phomopsis</i> sp.	EF564153.1	99	1,91
	KF164353	388	GTC2814	<i>Phomopsis</i> sp.	EF564153.1	98	0,96
	KF164354	343	GTC2815	<i>Phomopsis</i> sp.	EF564153.1	98	2,95
	KF164355	343	GTC2816	<i>Phomopsis</i> sp.	EF564153.1	98	3,35
	KF164356	338	GTC2817	<i>Phomopsis</i> sp.	EF564153.1	98	4,66
	KF164357	343	GTC2818	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	AY745987.1	100	5,46
	KF164358	316	GTC2819	<i>Phomopsis</i> sp.	HM595507.1	100	2,84
	KF164359	316	GTC2820	<i>Phomopsis</i> sp.	HM595507.1	100	3,07
	KF164360	397	GTC2821	<i>Phomopsis</i> sp.	EF564153.1	99	2,48
	KF164361	306	GTC2822	<i>Phomopsis</i> sp.	HM595507.1	100	2,72
<i>Vismia cayennensis</i> (Jacq.) Pers. - Hypericaceae - N 04°52'709'' W 052°17'780''	KF164362	529	GTC2901	Desconhecido (Fungal sp. A223) ^b	HM222954.1	99	0,53
	KF164363	438	GTC2902	<i>Xylaria</i> sp.	AB073533.1	99	3,10
	KF164364	481	GTC2903	<i>Sarocladium strictum</i> .	KC254091.1	99	1,27
	KF164365	480	GTC2904	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	HM190153.1	99	1,33
	KF164366	483	GTC2905	Desconhecido (Fungal sp. A223) ^b	HM222954.1	99	1,34
	KF164367	444	GTC2906	Desconhecido (Fungal endophyte 2157) ^b	EU687033.1	99	1,13
	KF164368	539	GTC2907	<i>Xylaria</i> sp.	AB073533.1	93	2,90
	KF164369	538	GTC2908	<i>Xylaria</i> sp.	AB073533.1	93	1,98
	KF164370	394	GTC2909	<i>Colletotrichum boninense</i>	JQ926743.1	99	2,78
<i>Paspalum conjugatum</i> P.J. Bergius - Poaceae -	KF164371	461	GTC3001	<i>Xylaria cubensis</i>	GU373810.1	99	2,90
	KF164372	443	GTC3002	<i>Glomerella</i> sp.	JQ809667.1	99	2,04
	KF164373	501	GTC3003	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	HM013821.1	100	1,61

Espécie hóspede - Família - Coordenada geográfica	Número de acesso NCBI	Tamanho da sequência obtida em pares de base	Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleotídeos NCBI ^a	Número de acesso do isolado mais próximo	Semelhança à espécie conhecida (%)	Rendimento de extração (g.m ⁻²)
N 04°30'209'' W 052°18'065''	KF164374	425	GTC3004	<i>Xylaria cubensis</i>	GU373810.1	99	1,43
<i>Sabicea cinerea</i> Aubl. - Rubiaceae - N 04°52'731'' W 052°17'768''	KF164375	563	GSS 01	<i>Guignardia</i> sp.	GQ352495.1	99	1,83
	KF164376	490	GSS02	<i>Xylaria cubensis</i>	GU373810.1	99	1,82
	KF164377	489	GSS04	<i>Xylaria cubensis</i>	GU373810.1	98	1,70
	KF164378	461	GSS05	<i>Xylaria cubensis</i>	GU373810.1	98	1,28
	KF164379	430	GSS06	<i>Xylaria cubensis</i>	GU373810.1	98	0,88
	KF164380	509	GSS07	<i>Colletotrichum</i> sp.	JF730186.1	99	2,33
	KF164381	406	GSS08	<i>Glomerella</i> sp.	JQ809667.1	99	1,22
	KF164382	503	GSS09	<i>Diaporthe pseudomangiferae</i>	KC343181.1	99	3,36
	KF164383	451	GSS10	<i>Diaporthe pseudomangiferae</i>	KC343181.1	100	2,60
	KF164384	434	GSS11	<i>Diaporthe</i> sp.	FJ799941.1	98	2,19
	KF164385	470	GSS12	<i>Diaporthe</i> sp.	FJ799941.1	98	3,58
	KF164386	466	GSS13	<i>Glomerella</i> sp.	JQ809667.1	99	1,88
	KF164387	437	GSS14	<i>Diaporthe</i> sp.	FJ799941.1	98	2,89
	KF164388	443	GSS15	<i>Diaporthe</i> sp.	FJ799941.1	98	2,55
	KF164389	343	GSS16	<i>Diaporthe pseudomangiferae</i>	KC343181.1	99	3,69
<i>Chrysobalanus icaco</i> L. - Chrysobalanaceae - N 04°52'731'' W 052°17'768''	KF164390	472	GCI01	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	JF304630.1	97	1,27
	KF164391	425	GCI02	<i>Xylaria cubensis</i>	GU373810.1	99	1,02
<i>Banara guianensis</i> Aubl. - Flacourtiaceae - N 04°30'209'' W 052°18'065''	KF164392	387	GTC0201	<i>Colletotrichum</i> sp.	GU935885.1	99	3,36
	KF164393	326	GTC0202	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KC010542.1	99	6,80
<i>Heliconia bihai</i> (L.) L. - Heliconiaceae -	KF164394	542	LD1.6	Desconhecido (Fungal endophyte UFMGCB_899) ^b	FJ466726.1	86	3,45

Espécie hospede - Família - Coordenada geográfica	Número de acesso NCBI	Tamanho da sequência obtida em pares de base	Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleotídeos NCBI ^a	Número de acesso do isolado mais próximo	Semelhança à espécie conhecida (%)	Rendimento de extração (g.m ⁻²)
N 04°45'908'' W 052°25'683''	KF164395	328	LD1.5	<i>Muscodor vitigenus</i>	AY100022.1	99	2,58
	KF164396	500	LD1.8.2	<i>Xylaria</i> sp.	JN418792.1	99	2,89
	KF164397	434	LD1.12	<i>Xylaria cubensis</i>	GU373810.1	99	4,51
	KF164398	659	LD1.32.2	Desconhecido (<i>Scolecobasidium</i> sp. HLS212) ^b	FJ770070.1	97	2,61
	KF164399	488	LD1.9	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	GQ120496.1	100	3,84
<i>Cyclanthus bipartitus</i> Poit. ex A. Rich. - Cyclanthaceae -	KF164400	500	LD2.10.2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	JX258733.1	99	3,03
N 04°44'790''	KF164401	338	LD2.6	<i>Xylaria cubensis</i>	GU373810.1	96	3,79
W 052°25'114''	KF164402	557	LD2.2	Desconhecido (<i>Hypocreales</i> sp.) ^b	GU595044.1	86	0,86
<i>Ischnosiphon obliquus</i> (Rudge) Körn - Marantaceae -	KF164403	406	LD2.13	<i>Guignardia vaccinii</i>	GU066692.1	100	3,25
N 04°45'700''	KF164404	314	LD3.12.2	<i>Epicoccum nigrum</i>	JN545798.1	100	4,05
W 052°25'543''	KF164405	431	LD3.11	<i>Xylaria cubensis</i>	GU373810.1	96	3,84
	KF164406	382	LD3.4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	GU066701.1	100	3,28
	KF164407	524	LD3.7	<i>Diaporthe</i> sp.	FJ799941.1	98	3,33
	KF164408	348	LD3.14	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	JF304630.1	99	2,79
	KF164409	403	LD3.6.2	<i>Xylaria cubensis</i>	GU373810.1	99	4,26
<i>Philodendron insigne</i> Schott - Araceae -	KF164410	328	LR01	<i>Rhodotorula minuta</i>	HQ326999.1	99	2,70
N 05°01'459''	-	-	LD4.11	Não-identificado ^c	GU373810.1	79	4,41
W 052°45'079''	KF164412	376	LD4.3.2	<i>Colletotrichum fragariae</i>	JX258785.1	99	4,28
<i>Ludovia lancifolia</i> Brongn. - Cyclanthaceae -	KF164413	372	LD5.7	<i>Candida</i> sp.	FJ755821.1	100	2,75
N 05°01'459''	KF164414	403	LD5.9.2	<i>Xylaria cubensis</i>	GU373810.1	96	1,76
W 052°45'079''							
<i>Montrichardia</i>	KF164415	485	LD6.15	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	GU066701.1	100	3,25

Espécie hospede - Família - Coordenada geográfica	Número de acesso NCBI	Tamanho da sequência obtida em pares de base	Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleotídeos NCBI ^a	Número de acesso do isolado mais próximo	Semelhança à espécie conhecida (%)	Rendimento de extração (g.m ⁻²)
<i>arborescens</i> (L.) Schott - Araceae - N 05°01'389" W 052°44'345"	KF164416	499	LD6.5.2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	GQ120496.1	100	3,79
<i>Typha domingensis</i> Pers. - Typhaceae - N 04°54'048" W 052°21'266"	KF164417	444	LD6.11	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	GU066653.1	99	3,63
<i>Acrostichum aureum</i> L. - Pteridaceae - N 04°54'048" W 052°21'266"	KF164418	447	LD7.2	<i>Leptosphaeria typharum</i>	AF439465.1	99	2,11
	KF164419	352	LD7.1	<i>Cochliobolus</i> sp.	JX868657.1	100	2,63
	KF164420	499	LD8.10	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	GU066671.1	99	2,32
	KF164421	419	LD8.6	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	GU066671.1	99	2,45
	KF164422	382	LD8.2	<i>Colletotrichum boninense</i>	JQ926743.1	100	2,21
	KF164423	514	LD8.9	<i>Guignardia vaccinii</i>	GU066692.1	99	3,11
	KF164424	406	LD8.7	<i>Guignardia vaccinii</i>	GU066692.1	99	3,50
<i>Gynerium sagittatum</i> (Aubl.) P.Beauv. - Poaceae - N 04°55'052" W 052°22'485"	KF164425	548	LD9.2	Desconhecido (<i>Cosmospora consors</i> isolate H76861I) ^b	EF121861.1	90	2,71
	-	-	LD9.8	Não-identificado ^c	-	-	3,41
<i>Terminalia fagifolia</i> Mart. e Zucc. - Combretaceae - S 15°52'267" W 047°49'391"		456	BTF01	<i>Aspergillus sydowii</i>	FR733840.1	99	1,8
<i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. - Clusiaceae - S 15°52'054" W 047°50'844"		469	BKC02	<i>Mycosphaerella stramenti</i>	DQ303042	99	2,11
		467	BKC03	<i>Preussia</i> sp.	FJ037749.1	100	1,87

Espécie hospede - Família - Coordenada geográfica	Número de acesso NCBI	Tamanho da sequência obtida em pares de base	Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleotídeos NCBI ^a	Número de acesso do isolado mais próximo	Semelhança à espécie conhecida (%)	Rendimento de extração (g.m ⁻²)
<i>Blepharocalyx salicifolius</i> Kunth O. Berg - Myrtaceae - N 15°52'003'' W 047°49'038''		470	BBS01	<i>Eurotium rubrum</i>	FR727115.1	100	3,23
		471	BBS02	<i>Mycosphaerella</i> sp.	HM595521.1	97	1,64
		457	BBS03	<i>Stagonosporopsis caricae</i>	GU237912.1	100	2,45
<i>Myrsine guianensis</i> (Aublet) O. Kuntze - Myrsinaceae - N 15°45'051'' W 048°03'031''		467	BMG02	<i>Mycosphaerella scytalidii</i>	EU851927.1	99	3,02
		458	BMG03	<i>Cladosporium</i> sp.	HQ717404.1	100	1,45
	-	-	BMG04	Não-identificado ^c	-	-	2,31

^a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 3 de junho, 2013, algoritmo BLASTn, excluindo sequências de amostras não cultiváveis ou ambientais.

^b Isolados desconhecidos são aqueles cuja sequência nucleotídica obtida não corresponde à nenhuma sequência descrita ou corresponde à uma sequência de um micro-organismo sem taxonomia conhecida.

^c Isolados não-identificados são aqueles cuja extração do DNA genômico não pode ser obtida devido à dificuldades de sua extração ou sequenciamento.

^d Espécies bacterianas mais próximas por homologia à sequência da região de DNAr 16S obtida em relação às da base de dados NCBI.

6.2 Atividade antimicrobiana

As atividades antimicrobianas são apresentadas na tabela 3. Seis extratos brutos endofíticos (4,0%) apresentaram atividade ($CIM \leq 256 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em *S. aureus* e trinta e quatro (23,1%) em *C. albicans*. Os extratos dos fungos endofíticos codificados por SNB-GTC2114 (*Chaetomium globosum*), SNB-GTC2304 (*Mycocleptodiscus* sp.), SNB-GTC2402 (*Lewia infectoria*) e SNB-GTC2501 (*Xylaria* sp.) foram ativos em *S. aureus* com valores de CIM entre 8 e $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$. E os codificados por GTC2003 (*Glomerella cingulata*), SNB-GTC2101 (desconhecido), SNB-GTC2102 (*Pestalotiopsis* sp.), SNB-GTC2114 (*Chaetomium globosum*), SNB-GTC2201 (*Diaporthe phaseolorum*), SNB-GTC2503 (*Phomopsis* sp.), SNB-GTC2605 (*Colletotrichum boninense*), SNB-GTC2706 (*Colletotrichum* sp.), SNB-GTC2710 (*Hypoxylon investiens*), SNB-GTC2711 (*Hypoxylon investiens*), SNB-GVL02 (*Penicillium* sp.), SNB-GTC2814 (*Phomopsis* sp.), SNB-GCI02 (*Xylaria cubensis*), SNB-GTC0201 (*Colletotrichum* sp.), SNB-BBS01 (*Eurotium rubrum*) obtiveram valores de CIM entre 8 e $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em *C. albicans*. Os extratos codificados por SNB-GTC2003, SNB-GTC2101, SNB-GTC2102, SNB-GTC2501, SNB-GTC2605, SNB-GTC2706, SNB-GTC2710 e BBS01 além de demonstrarem uma atividade antimicrobiana relevante não apresentaram citotoxicidade em células MRC-5 a $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando uma certa seletividade aos modelos biológicos selecionados. Cos *et al.*, (2006) utiliza este modelo celular como prova para atestar a ausência de toxicidade *in vitro* de extratos e substâncias naturais.

Os controles positivos, oxacilina em *S. aureus* e fluconazol em *C. albicans*, apresentaram valores de CIM de $0,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ e $4 \mu\text{g.ml}^{-1}$ respectivamente. Foi observado uma alta proporção relativa de extratos endofíticos com atividade antifúngica em comparação à atividade antibacteriana. Guimarães *et al.* (2008) isolaram 39 fungos endofíticos em duas plantas da família Asteraceae e também observaram uma proporção maior de endófitos ativos em *C. albicans* (64,1%), do que em *S. aureus* (5,1%). Já Hormazabal e Piontelli (2009) observaram maior porcentagem de atividade em bactérias para 38 extratos de fungos endofíticos isolados de gimnospermas chilenas, sendo 57,8% ativos em *S. aureus* e somente 0,07% ativos em *C. albicans*. Fungos endofíticos, como os isolados neste trabalho, certamente podem ser fonte de extratos e substâncias que podem emergir como candidatos a novos agentes anti-*Candida*.

6.3-Atividade citotóxica

As atividades citotóxicas dos extratos brutos são apresentadas na tabela 3. Na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, trinta e seis (24,4%), trinta e quatro (23,1%), vinte e quatro (16,3%) extratos inibiram mais de 50% da proliferação celular das linhagens celulares KB, MDA-MB-435 e MRC-5 respectivamente. Os extratos que demonstra uma inibição celular superior a 80% à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram também testados à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e um número importante destes mantiveram suas atividades. Nesta concentração inferior, dezenove extratos (12,9%) continuaram a demonstrar inibição celular superior a 50% para a linhagem de células KB, cinco extratos (3,4%) para a linhagem tumoral MDA-MB-435 e sete extratos (4,7%) para a linhagem de células sãs MRC-5. Os controles positivos utilizados nos testes de inibição da proliferação celular foi o docetaxel, IC_{50} de 2.10^{-10} M para células KB e IC_{50} de 5.10^{-10} M para células normais MRC-5, e a doxorubicina para células MDA-MB-435, IC_{50} de 2.10^{-8} M. Estes resultados sugerem que a alta proporção de extratos com atividade citotóxica pode ser originária da natureza simbiótica destes endófitos, que contribuem provavelmente à defesa das folhas vegetais contra o ataque de patógenos e herbívoros.

Os extratos brutos fúngicos dos endófitos codificados por SNB-GTC2114 (*Chaetomium globosum*), SNB-GTC 2304 (*Mycoleptodiscus* sp.), SNB-GTC2804 (*Diaporthe* sp.) e SNB-GSS10 (*Diaporthe pseudomangiferae*) demonstram forte inibição da proliferação celular à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com valores de inibição celular superiores a 80% para as três linhagens celulares utilizadas neste estudo. Estes extratos foram selecionados para uma investigação química, a fim de isolar os metabólitos responsáveis pelas atividades citotóxicas encontradas. Foi observado também, que oitenta e quatro extratos (57,1%) não demonstram atividade citotóxica para as células normais MRC-5, o que inclui estes extratos como bons candidatos a serem testados em outros modelos biológicos, visto que a ausência de citotoxicidade sobre este modelo celular indica uma boa especificidade de ação biológica.

A literatura reporta a presença de agentes anti-câncer isolados a partir de fungos endofíticos como o paclitaxel (Stierle *et al.*, 1993), radicicol (Turbyville *et al.*, 2006), sequoiatonas A e B (Stierle *et al.*, 1999) e camptotecina (Amna *et al.*, 2006). Os

resultados obtidos nesta triagem corroboram com achados anteriores que indicam os fungos endofíticos como fonte de metabólitos citotóxicos.

Tabela 3.

Atividade antimicrobiana (CIM - $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e citotóxica (porcentagem de inibição do crescimento celular) dos extratos em AcOEt de cada micro-organismo endofítico isolado

Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleotídeos NCBI ^a	<i>C. a.</i> ^e $\mu\text{g.mL}^{-1}$	<i>S. a.</i> ^e $\mu\text{g.mL}^{-1}$	KB ^f , 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	KB ^f , 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	MDA-MB-435 ^f , 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	MDA-MB-435 ^f , 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	MRC-5 ^f , 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	MRC-5 ^f , 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
GTG01	<i>Epicoccum nigrum</i>	128	> 256	0 ± 5	-	14 ± 13	-	2 ± 6	-
GTC2001	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	> 256	> 256	7 ± 9	-	0 ± 14	-	0 ± 17	-
GTC2002	<i>Glomerella</i> sp.	256	> 256	1 ± 18	-	0 ± 22	-	0 ± 5	-
GTC2003	<i>Glomerella</i> sp.	16	> 256	99 ± 0	2 ± 21	82 ± 3	18 ± 14	97 ± 1	0 ± 7
GTC2101	Desconhecido (Fungal sp. F504) ^b	8	> 256	47 ± 9	-	41 ± 4	-	1 ± 8	-
GTC2102	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	64	> 256	2 ± 5	-	15 ± 10	-	0 ± 32	-
GTC2103	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 5	-	30 ± 5	-	0 ± 5	-
GTC2104	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	> 256	> 256	4 ± 14	-	0 ± 17	-	0 ± 23	-
GTC2105	<i>Glomerella</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 19	-	5 ± 9	-	0 ± 4	-
GTC2106	Não-identificado ^c	> 256	> 256	40 ± 4	-	18 ± 6	-	24 ± 10	-
GTC2107	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	> 256	> 256	2 ± 23	-	16 ± 18	-	0 ± 10	-
GTC2108	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	> 256	> 256	2 ± 5	-	1 ± 13	-	0 ± 20	-
GTC2109	Não-identificado ^c	> 256	> 256	78 ± 1	-	67 ± 3	-	34 ± 12	-
GTC2110	<i>Phomopsis</i> sp.	256	> 256	12 ± 4	-	0 ± 24	-	0 ± 3	-
GTC2111	<i>Sarocladium</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 5	-	14 ± 13	-	2 ± 6	-

Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleotídeos NCBI ^a	<i>C. a.</i> ^e μg.ml ⁻¹	<i>S. a.</i> ^e μg.ml ⁻¹	KB ^f , 10 μg.ml ⁻¹	KB ^f , 1 μg.ml ⁻¹	MDA-MB-435 ^f , 10 μg.ml ⁻¹	MDA-MB-435 ^f , 1 μg.ml ⁻¹	MRC-5 ^f , 10 μg.ml ⁻¹	MRC-5 ^f , 1 μg.ml ⁻¹
GTC2112	<i>Bacillus cereus</i> ^d	> 256	> 256	8 ± 14	-	31 ± 14	-	0 ± 18	-
GTC2113	Não-identificado ^c	> 256	> 256	0 ± 13	-	7 ± 14	-	0 ± 5	-
GTC2114	<i>Chaetomium globosum</i>	32	16	94 ± 1	97 ± 1	97 ± 1	47 ± 2	97 ± 1	95 ± 3
GTC21B2	<i>Bacillus anthracis</i> ^d	> 256	> 256	0 ± 4	-	17 ± 5	-	3 ± 6	-
GTC2201	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	32	> 256	92 ± 1	72 ± 3	80 ± 5	51 ± 2	47 ± 5	-
GPP01	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	> 256	> 256	78 ± 21	0 ± 5	51 ± 9	-	35 ± 7	-
GPP02	<i>Xylaria cubensis</i>	> 256	> 256	77 ± 3	0 ± 7	51 ± 5	-	49 ± 7	-
GTC2301	<i>Mycoleptodiscus</i> sp.	> 256	> 256	36 ± 15	-	0 ± 11	-	30 ± 14	-
GTC2302	<i>Mycoleptodiscus</i> sp.	128	> 256	48 ± 25	-	0 ± 6	-	25 ± 31	-
GTC2303	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	> 256	> 256	0 ± 22	-	0 ± 9	-	0 ± 14	-
GTC2304	<i>Mycoleptodiscus</i> sp.	> 256	64	100 ± 1	95 ± 1	100 ± 1	97 ± 1	100 ± 1	100 ± 1
GTC2307	<i>Colletotrichum</i> sp.	> 256	> 256	24 ± 11	-	0 ± 24	-	0 ± 20	-
GTC2308	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	128	> 256	57 ± 1	-	64 ± 28	-	27 ± 5	-
GTC2401	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	> 256	> 256	0 ± 12	-	0 ± 17	-	0 ± 22	-
GTC2402	<i>Lewia infectoria</i>	> 256	64	100 ± 1	55 ± 2	96 ± 2	18 ± 5	99 ± 1	8 ± 19
GTC2501	<i>Xylaria</i> sp.	> 256	8	98 ± 1	8 ± 10	71 ± 3	25 ± 5	85 ± 1	0 ± 9
GTC2502	<i>Colletotrichum boninense</i>	> 256	> 256	0 ± 21	-	0 ± 5	-	0 ± 13	-
GTC2503	<i>Phomopsis</i> sp.	32	> 256	79 ± 2	-	76 ± 3	-	52 ± 1	-

Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleotídeos NCBI ^a	<i>C. a.</i> ^e $\mu\text{g.ml}^{-1}$	<i>S. a.</i> ^e $\mu\text{g.ml}^{-1}$	KB ^f , $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$	KB ^f , $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$	MDA-MB-435 ^f , $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$	MDA-MB-435 ^f , $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$	MRC-5 ^f , $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$	MRC-5 ^f , $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$
GCYPB01	<i>Brevibacillus reuszeri</i> ^d	> 256	> 256	0 ± 3	-	13 ± 4	-	4 ± 1	-
GTC2601	<i>Colletotrichum boninense</i>	> 256	> 256	7 ± 22	-	0 ± 7	-	0 ± 15	-
GTC2602	<i>Colletotrichum</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 32	-	6 ± 32	-	0 ± 6	-
GTC2603	<i>Xylaria cubensis</i>	> 256	> 256	77 ± 2	-	69 ± 3	-	43 ± 3	-
GTC2604	<i>Xylaria cubensis</i>	> 256	> 256	79 ± 2	-	67 ± 7	-	42 ± 13	-
GTC2605	<i>Colletotrichum boninense</i>	16	> 256	3 ± 5	-	7 ± 23	-	0 ± 9	-
GTC2701	<i>Colletotrichum</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 12	-	0 ± 17	-	0 ± 22	-
GTC2702	<i>Hypoxyylon investiens</i>	> 256	> 256	0 ± 7	-	19 ± 5	-	0 ± 4	-
GTC2703	<i>Guignardia vaccinii</i>	> 256	> 256	0 ± 21	-	0 ± 6	-	0 ± 11	-
GTC2704	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 23	-	2 ± 1	-	0 ± 12	-
GTC2705	<i>Diaporthe</i> sp.	> 256	> 256	3 ± 21	-	10 ± 18	-	0 ± 9	-
GTC2706	<i>Colletotrichum</i> sp.	16	> 256	10 ± 5	-	5 ± 10	-	27 ± 3	-
GTC2707	<i>Hypoxyylon investiens</i>	> 256	> 256	63 ± 6	-	54 ± 2	-	74 ± 16	-
GTC2708	<i>Diaporthe</i> sp.	> 256	> 256	4 ± 17	-	0 ± 23	-	0 ± 10	-
GTC2709	<i>Hypoxyylon investiens</i>	> 256	> 256	12 ± 13	-	64 ± 8	-	13 ± 5	-
GTC2710	<i>Hypoxyylon investiens</i>	16	> 256	86 ± 1	0 ± 18	71 ± 5	14 ± 6	84 ± 2	0 ± 12
GTC2711	<i>Hypoxyylon investiens</i>	64	> 256	77 ± 2	-	14 ± 12	-	60 ± 14	-
GVL02	<i>Penicillium</i> sp.	64	> 256	22 ± 6	-	28 ± 20	-	0 ± 15	-

Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleotídeos NCBI ^a	<i>C. a.</i> ^e µg.ml ⁻¹	<i>S. a.</i> ^e µg.ml ⁻¹	KB ^f , 10 µg.ml ⁻¹	KB ^f , 1 µg.ml ⁻¹	MDA-MB-435 ^f , 10 µg.ml ⁻¹	MDA-MB-435 ^f , 1 µg.ml ⁻¹	MRC-5 ^f , 10 µg.ml ⁻¹	MRC-5 ^f , 1 µg.ml ⁻¹
GTC2801	<i>Phomopsis bougainvilleicola</i>	> 256	> 256	2 ± 10	-	22 ± 9	-	0 ± 5	-
GTC2802	Não-identificado ^c	> 256	> 256	0 ± 21	-	0 ± 6	-	0 ± 11	-
GTC2803	<i>Guignardia</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 6	-	0 ± 4	-	0 ± 12	-
GTC2804	<i>Diaporthe</i> sp.	> 256	> 256	100 ± 1	97 ± 1	98 ± 1	94 ± 1	100 ± 1	100 ± 1
GTC2805	<i>Xylaria cubensis</i>	> 256	> 256	90 ± 0	74 ± 2	59 ± 1		37 ± 11	
GTC2806	<i>Phomopsis</i> sp.	> 256	> 256	1 ± 18	-	0 ± 42	-	0 ± 14	-
GTC2807	<i>Phomopsis</i> sp.	> 256	> 256	95 ± 2	9 ± 7	62 ± 10	-	94 ± 2	0 ± 5
GTC2808	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	> 256	> 256	0 ± 25	-	0 ± 5	-	0 ± 24	-
GTC2809	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	> 256	> 256	0 ± 7	-	0 ± 17	-	0 ± 5	-
GTC2810	<i>Phomopsis</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 11	-	0 ± 29	-	0 ± 7	-
GTC2811	<i>Phomopsis</i> sp.	> 256	> 256	3 ± 15	-	0 ± 21	-	0 ± 1	-
GTC2812	<i>Phomopsis</i> sp.	> 256	> 256	49 ± 17	-	54 ± 17	-	0 ± 32	-
GTC2813	<i>Phomopsis</i> sp.	> 256	> 256	9 ± 18	-	19 ± 7	-	0 ± 21	-
GTC2814	<i>Phomopsis</i> sp.	64	256	100 ± 1	66 ± 10	100 ± 0	43 ± 13	100 ± 0	76 ± 10
GTC2815	<i>Phomopsis</i> sp.	> 256	> 256	12 ± 17	-	0 ± 4	-	0 ± 5	-
GTC2816	<i>Phomopsis</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 3	-	13 ± 15	-	0 ± 9	-
GTC2817	<i>Phomopsis</i> sp.	> 256	> 256	99 ± 1	60 ± 10	96 ± 1	11 ± 7	98 ± 1	5 ± 19
GTC2818	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	256	> 256	92 ± 2	0 ± 10	82 ± 4	0 ± 5	93 ± 1	0 ± 8

Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleotídeos NCBI ^a	<i>C. a.</i> ^e $\mu\text{g.ml}^{-1}$	<i>S. a.</i> ^e $\mu\text{g.ml}^{-1}$	KB ^f , $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$	KB ^f , $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$	MDA-MB-435 ^f , $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$	MDA-MB-435 ^f , $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$	MRC-5 ^f , $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$	MRC-5 ^f , $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$
GTC2819	<i>Phomopsis</i> sp.	> 256	> 256	3 ± 17	-	0 ± 64	-	0 ± 3	-
GTC2820	<i>Phomopsis</i> sp.	> 256	> 256	3 ± 13	-	0 ± 25	-	0 ± 3	-
GTC2821	<i>Phomopsis</i> sp.	> 256	> 256	6 ± 13	-	2 ± 5	-	0 ± 9	-
GTC2822	<i>Phomopsis</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 20	-	0 ± 10	-	0 ± 12	-
GTC2901	Desconhecido (Fungal sp. A223) ^b	> 256	> 256	11 ± 4	-	21 ± 7	-	0 ± 6	-
GTC2902	<i>Xylaria</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 1	-	32 ± 4	-	0 ± 7	-
GTC2903	<i>Sarocladium strictum</i>	256	> 256	3 ± 3	-	32 ± 13	-	0 ± 4	-
GTC2904	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	> 256	> 256	0 ± 15	-	12 ± 14	-	0 ± 12	-
GTC2905	Desconhecido (Fungal sp. A223) ^b	> 256	> 256	7 ± 4	-	38 ± 9	-	0 ± 9	-
GTC2906	Desconhecido (Fungal endophyte 2157) ^b	> 256	> 256	0 ± 15	-	0 ± 10	-	0 ± 12	-
GTC2907	<i>Xylaria</i> sp.	> 256	> 256	5 ± 9	-	38 ± 21	-	68 ± 22	-
GTC2908	<i>Xylaria</i> sp.	> 256	> 256	28 ± 8	-	29 ± 31	-	3 ± 3	-
GTC2909	<i>Colletotrichum boninense</i>	256	> 256	3 ± 32	-	5 ± 3	-	0 ± 4	-
GTC3001	<i>Xylaria cubensis</i>	> 256	> 256	90 ± 1	70 ± 3	68 ± 4	-	36 ± 15	-
GTC3002	<i>Glomerella</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 1	-	0 ± 19	-	0 ± 3	-
GTC3003	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	> 256	> 256	0 ± 1	-	0 ± 9	-	0 ± 8	-
GTC3004	<i>Xylaria cubensis</i>	> 256	> 256	90 ± 4	82 ± 2	71 ± 2	-	35 ± 1	-
GSS 01	<i>Guignardia</i> sp.	128	> 256	0 ± 10	-	12 ± 6	-	0 ± 10	-

Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleotídeos NCBI ^a	<i>C. a.</i> ^e $\mu\text{g.ml}^{-1}$	<i>S. a.</i> ^e $\mu\text{g.ml}^{-1}$	KB ^f , $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$	KB ^f , $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$	MDA-MB-435 ^f , $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$	MDA-MB-435 ^f , $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$	MRC-5 ^f , $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$	MRC-5 ^f , $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$
GSS02	<i>Xylaria cubensis</i>	> 256	> 256	0 ± 6	-	0 ± 19	-	0 ± 8	-
GSS04	<i>Xylaria cubensis</i>	> 256	> 256	2 ± 8	-	2 ± 5	-	0 ± 4	-
GSS05	<i>Xylaria cubensis</i>	> 256	> 256	76 ± 2	22 ± 12	48 ± 2	-	51 ± 9	-
GSS06	<i>Xylaria cubensis</i>	128	> 256	0 ± 6	-	0 ± 19	-	0 ± 8	-
GSS07	<i>Colletotrichum</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 10	-	0 ± 12	-	0 ± 3	-
GSS08	<i>Glomerella</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 15	-	0 ± 8	-	2 ± 16	-
GSS09	<i>Diaporthe pseudomangiferae</i>	256	> 256	5 ± 5	-	0 ± 7	-	3 ± 7	-
GSS10	<i>Diaporthe pseudomangiferae</i>	256	> 256	98 ± 1	100 ± 1	97 ± 1	97 ± 1	97 ± 1	100 ± 1
GSS11	<i>Diaporthe</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 5	-	0 ± 20	-	0 ± 10	-
GSS12	<i>Diaporthe</i> sp.	> 256	> 256	27 ± 3	-	0 ± 39	-	0 ± 7	-
GSS13	<i>Glomerella</i> sp.	> 256	> 256	9 ± 5	-	15 ± 4	-	9 ± 8	-
GSS14	<i>Diaporthe</i> sp.	> 256	> 256	31 ± 19	-	24 ± 8	-	21 ± 19	-
GSS15	<i>Diaporthe</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 6	-	0 ± 19	-	0 ± 8	-
GSS16	<i>Diaporthe pseudomangiferae</i>	> 256	> 256	42 ± 20	-	25 ± 11	-	94 ± 0	-
GCI01	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	128	> 256	0 ± 5	-	22 ± 12	-	0 ± 9	-
GCI02	<i>Xylaria cubensis</i>	32	> 256	78 ± 3	-	69 ± 2	-	63 ± 1	-
GTC0201	<i>Colletotrichum</i> sp.	64	> 256	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 0	88 ± 3	98 ± 0	100 ± 1
GTC0202	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	> 256	> 256	0 ± 7	-	0 ± 6	-	0 ± 4	-

Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleotídeos NCBI ^a	<i>C. a.</i> ^e μg.ml ⁻¹	<i>S. a.</i> ^e μg.ml ⁻¹	KB ^f , 10 μg.ml ⁻¹	KB ^f , 1 μg.ml ⁻¹	MDA-MB-435 ^f , 10 μg.ml ⁻¹	MDA-MB-435 ^f , 1 μg.ml ⁻¹	MRC-5 ^f , 10 μg.ml ⁻¹	MRC-5 ^f , 1 μg.ml ⁻¹
LD1.6	Desconhecido (Fungal endophyte UFMGCB_899) ^b	> 256	> 256	88 ± 2	71 ± 5	70 ± 4	-	52 ± 7	-
LD1.5	<i>Muscodor vitigenus</i>	> 256	> 256	2 ± 2		6 ± 5	-	0 ± 1	-
LD1.8.2	<i>Xylaria</i> sp.	> 256	> 256	74 ± 1		55 ± 4	-	58 ± 8	-
LD1.12	<i>Xylaria cubensis</i>	> 256	> 256	87 ± 2	82 ± 3	67 ± 2	-	44 ± 3	-
LD1.32.2	Desconhecido (<i>Scolecobasidium</i> sp. HLS212) ^b	> 256	> 256	0 ± 7	-	11 ± 13	-	0 ± 5	-
LD1.9	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	> 256	> 256	0 ± 14	-	8 ± 15	-	0 ± 17	-
LD2.10.2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	> 256	> 256	0 ± 5	-	0 ± 29	-	0 ± 1	-
LD2.6	<i>Xylaria cubensis</i>	> 256	> 256	79 ± 5	-	63 ± 5	-	35 ± 2	-
LD2.2	Desconhecido ^b	> 256	> 256	0 ± 20	-	8 ± 19	-	0 ± 8	-
LD2.13	<i>Guignardia vaccinii</i>	> 256	> 256	0 ± 7	-	0 ± 20	-	0 ± 9	-
LD3.12.2	<i>Epicoccum nigrum</i>	128	256	85 ± 1	62 ± 10	88 ± 3	35 ± 3	91 ± 1	84 ± 3
LD3.11	<i>Xylaria cubensis</i>	> 256	> 256	85 ± 1	83 ± 2	68 ± 9	-	42 ± 15	-
LD3.4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	> 256	> 256	0 ± 10	-	0 ± 14	-	0 ± 25	-
LD3.7	<i>Diaporthe</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 7	-	11 ± 6	-	0 ± 2	-
LD3.14	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 7	-	7 ± 13	-	0 ± 7	-
LD3.6.2	<i>Xylaria cubensis</i>	> 256	> 256	87 ± 1	83 ± 4	69 ± 8	-	62 ± 2	-
LR01	<i>Rhodotorula minuta</i>	> 256	> 256	0 ± 27	-	0 ± 35	-	0 ± 12	-
LD4.11	Não-identificado ^c	> 256	> 256	80 ± 3	72 ± 5	66 ± 1	-	44 ± 3	-

Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleótídeos NCBI ^a	<i>C. a.</i> ^e $\mu\text{g.ml}^{-1}$	<i>S. a.</i> ^e $\mu\text{g.ml}^{-1}$	KB ^f , $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$	KB ^f , $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$	MDA-MB-435 ^f , $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$	MDA-MB-435 ^f , $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$	MRC-5 ^f , $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$	MRC-5 ^f , $1 \mu\text{g.ml}^{-1}$
LD4.3.2	<i>Colletotrichum fragariae</i>	> 256	> 256	9 ± 7	-	13 ± 4	-	0 ± 1	-
LD5.7	<i>Candida</i> sp.	> 256	> 256	0 ± 11	-	9 ± 5	-	0 ± 5	-
LD5.9.2	<i>Xylaria cubensis</i>	> 256	> 256	0 ± 11	-	9 ± 5	-	0 ± 5	-
LD6.15	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	> 256	> 256	0 ± 4	-	5 ± 4	-	1 ± 12	-
LD6.5.2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	> 256	> 256	1 ± 5	-	2 ± 7	-	0 ± 8	-
LD6.11	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	> 256	> 256	0 ± 7	-	6 ± 32	-	0 ± 13	-
LD7.2	<i>Leptosphaeria typharum</i>	> 256	> 256	0 ± 3	-	2 ± 17	-	0 ± 10	-
LD7.1	<i>Cochliobolus</i> sp.	256	> 256	0 ± 5	-	0 ± 6	-	0 ± 4	-
LD8.10	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	256	> 256	11 ± 4	-	2 ± 32	-	0 ± 5	-
LD8.6	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	> 256	> 256	0 ± 4	-	0 ± 19	-	0 ± 1	-
LD8.2	<i>Colletotrichum boninense</i>	> 256	> 256	17 ± 21	-	10 ± 14	-	0 ± 3	-
LD8.9	<i>Guignardia vaccinii</i>	128	> 256	0 ± 11	-	0 ± 17	-	0 ± 11	-
LD8.7	<i>Guignardia vaccinii</i>	> 256	> 256	0 ± 13	-	10 ± 8	-	0 ± 6	-
LD9.2	Desconhecido (<i>Cosmospora consors</i> isolate H76861I) ^b	> 256	> 256	0 ± 14	-	0 ± 23	-	0 ± 2	-
LD9.8	Não-identificado ^c	> 256	> 256	80 ± 3	76 ± 5	66 ± 2	-	43 ± 2	-
BTF01	<i>Aspergillus sydowii</i>	128	-	-	-	-	-	-	-
BKC02	<i>Mycosphaerella stramentii</i>	> 256	-	-	-	-	-	-	-
BKC03	<i>Preussia</i> sp.	> 256	-	-	-	-	-	-	-

Códigos de identificação (SNB-...)	Isolado mais próximo na base de dados de nucleotídeos NCBI ^a	<i>C. a.</i> ^e μg.ml ⁻¹	<i>S. a.</i> ^e μg.ml ⁻¹	KB ^f , 10 μg.ml ⁻¹	KB ^f , 1 μg.ml ⁻¹	MDA-MB-435 ^f , 10 μg.ml ⁻¹	MDA-MB-435 ^f , 1 μg.ml ⁻¹	MRC-5 ^f , 10 μg.ml ⁻¹	MRC-5 ^f , 1 μg.ml ⁻¹
BBS01	<i>Eurotium rubrum</i>	8	> 256	26 ± 8	-	10 ± 10	-	29 ± 15	-
BBS02	<i>Mycosphaerella</i> sp.	> 256	-	-	-	-	-	-	-
BBS03	<i>Stagonosporopsis caricae</i>	> 256	-	-	-	-	-	-	-
BMG02	<i>Mycosphaerella scytalidii</i>	64	-	-	-	-	-	-	-
BMG03	<i>Cladosporium</i> sp.	> 256	-	-	-	-	-	-	-
BMG04	Não-identificado ^c	> 256	-	-	-	-	-	-	-

^a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 3 de junho, 2013, algoritmo BLASTn, excluindo sequências de amostras não cultiváveis ou ambientais.

^b Isolados desconhecidos são aqueles cuja sequência nucleotídica obtida não corresponde à nenhuma sequência descrita ou corresponde à uma sequência de um micro-organismo sem taxonomia conhecida.

^c Isolados não-identificados são aqueles cuja extração do DNA genômico não pode ser obtida devido à dificuldades de sua extração ou sequenciamento.

^d Espécies bacterianas mais próximas por homologia à sequência da região de DNAr 16S obtida em relação às da base de dados NCBI.

^e CIM, Concentração Inibitória Mínima, definida como a menor concentração de extrato que inibe a visualização do crescimento microbiano após o período de incubação. *C. a.* = *Candida albicans* ATCC 10213; *S. a.* = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; -, não avaliado.

^f As atividades citotóxicas são representadas como a porcentagem (%) de inibição celular em cada alvo: KB (câncer uterino cervical), MRC-5 (fibroblastos humanos de pulmão), MDA-MB-435 (Melanoma metastático). Controles positivos: Oxacilina: 0,5 μg.ml⁻¹ em *S. aureus* ATCC 29213; fluconazol: 4 μg.ml⁻¹ em *C. albicans* ATCC 10213; docetaxel: 2.10⁻¹⁰ M para células KB e 5.10⁻¹⁰ M para células MRC5; doxorubicina: 2.10⁻⁸ M para células MDA-MB-435.

6.4 Isolamento, caracterização e avaliação biológica das substâncias isoladas dos fungos endofíticos

6.4.1 Estudo do extrato AcOEt de *Xylaria cubensis* (SNB-GCI02)



Figura 71. *Xylaria cubensis* (SNB-GCI02) e seu vegetal hospedeiro *Chrysobalanus icaco* (Chrysobalanaceae).

I - Extração e isolamento

O fungo endofítico codificado como SNB-GCI02 (Figura 71) foi identificado como *Xylaria cubensis* através de análise molecular da região de DNAr ITS1. O fungo foi isolado a partir de folhas da árvore *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae) (Figura 71). A cultura em grande escala da cepa foi realizada em 150 placas de Petri de 14 cm. A extração em acetato de etila, a filtração e a lavagem das culturas obtidas após 15 dias de crescimento permitiram a obtenção de 2,02 g de extrato bruto (1,02 g.m⁻²).

Os resultados da atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* do extrato bruto AcOEt de SNB-GCI02 são apresentados na tabela 3. A partir da triagem preliminar do extrato, foi observada uma atividade à 32 µg.mL⁻¹ em *C. albicans*. O extrato ainda

inibiu o crescimento celular à $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da linhagem celular KB em 78%, da linhagem celular MRC-5 em 63% e da linhagem celular MDA-MB-435 em 69%.

O fracionamento do extrato em AcOEt (200 mg) de *Xylaria cubensis* SNB-GCI02 permitiu o isolamento do ácido pilifórmico (**24**) (1,5 mg) e da griseofulvina (**25**) (4,3 mg), (Figura 72).

II – Elucidação estrutural das substâncias isoladas

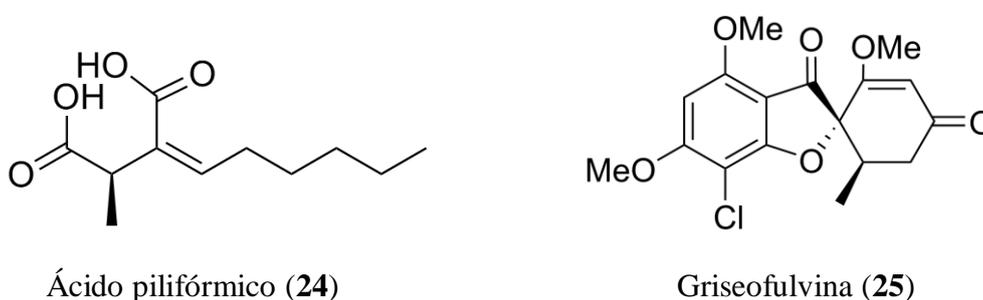


Figura 72. Substâncias isoladas de SNB-GCI02 *Xylaria cubensis*.

A substância obtida na fração F4 foi identificado como ácido pilifórmico (**24**) através de análises espectrométricas de ressonância magnética nuclear, estes dados analíticos foram comparados com dados da literatura (Matsumoto *et al.*, 1973). O $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ de -86 foi obtido em metanol, a uma concentração de $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, na literatura o poder rotatório de sinal negativo foi igualmente descrito. O ácido pilifórmico se apresenta como um sólido branco. A massa do composto foi analisada por HR-ESI-MS (negativo) m/z : 213,1128 $[\text{M}-\text{H}]^-$; calculado para $[\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{O}_4]^-$: 213,1127.

Os dados analíticos espectrométricos da griseofulvina (**25**) foram comparados com dados obtidos através de uma amostra comercial (Sigma-Aldrich) para a confirmação da identificação da molécula isolada de SNB-GCI02 *X. cubensis*. O $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ de +310 foi obtido em clorofórmio a uma concentração de $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A griseofulvina se apresenta como um sólido branco. Esta substância foi isolada a partir de diferentes espécies fúngicas da ordem Sordariales, principalmente fungos do gênero *Penicillium* (Chooi *et al.*, 2010). A substância foi isolada apenas uma vez de uma espécie de *Xylaria* sp., o qual era um endófito encontrado na América do Sul (Cafêu *et al.*, 2005). Neste estudo a griseofulvina foi o metabólito majoritário de *X. cubensis* SNB-GCI02 dentro

das condições de cultivo mencionadas anteriormente. Uma dosagem por CLAE revelou que **25** representa 7,4% m/m do extrato bruto total nas condições de cultivo utilizadas.

III – Atividade biológica das substâncias isoladas

O ácido pilifórmico (**24**) não foi considerado ativo em nenhum dos modelos biológicos testados (Tabela 4). A griseofulvina (**25**) apresentou atividade de 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em *C. albicans*, e IC_{50} de 5,9 μM em células KB (Tabela 4). A griseofulvina é um agente antifúngico utilizado na clínica para o tratamento de dermatofitoses. A literatura descreve também sua atividade antagonista da formação dos microtúbulos celulares (Asahina *et al.*, 2001), mecanismo provavelmente responsável pela citotoxicidade encontrada no extrato bruto de *X. cubensis* SNB-GCI02, que tem a griseofulvina como metabólito secundário majoritário.

Tabela 4.

Atividade antimicrobiana (CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$) e citotóxica (IC_{50} μM) das substâncias isoladas de SNB-GCI02, comparadas às substâncias controles

Substâncias	<i>C. a.</i> $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (μM)	<i>S. a.</i> $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (μM)	KB IC_{50} μM	MDA-MB-435 IC_{50} μM	MRC-5 IC_{50} μM
Ácido pilifórmico (24)	> 128	> 128	> 10	> 10	> 10
Griseofulvina (25)	128 (363,6)	> 128	5,9	> 10	> 10
Fluconazol	4 (13,0)	-	-	-	-
Oxacilina	-	0,5 (1,24)	-	-	-
Docetaxel	-	-	0,0002	-	0,0005
Doxorubicina	-	-	-	0,02	-

C. a. = *Candida albicans* ATCC 10213; *S. a.* = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. KB (câncer uterino cervical), MDA-MB-435 (melanoma metastático), MRC-5 (fibroblastos humanos de pulmão); - não avaliado.

6.4.2 Estudo do extrato AcOEt de *Lewia infectoria* (SNB-GTC2402)



Figura 73. *Lewia infectoria* (SNB-GTC2402) e seu vegetal hospedeiro *Besleria insolita* (Gesneriaceae).

I - Extração e isolamento

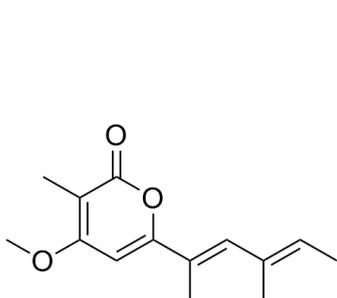
O fungo endofítico codificado como SNB-GTC2402 (Figura 73) foi identificado como *Lewia infectoria* através de uma análise molecular da região de DNAr ITS1. O fungo foi isolado a partir de folhas do arbusto *Besleria insolita* C.V. Morton (Gesneriaceae) (Figura 73). A cultura em grande escala da cepa foi realizada em 150 placas de Petri de 14 cm. A extração em acetato de etila, a filtração e a lavagem das culturas obtidas após 15 dias de crescimento permitiram a obtenção de 1,92 g de extrato bruto (0,96 g.m⁻²).

Os resultados da atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* do extrato bruto em AcOEt de SNB-GTC2402 são apresentados na tabela 3. A partir da triagem biológica preliminar do extrato, foi observada atividade antimicrobiana em *S aureus* de 64 µg.mL⁻¹. O mesmo extrato inibiu o crescimento celular da linhagem celular KB em 55% a 1 µg.mL⁻¹.

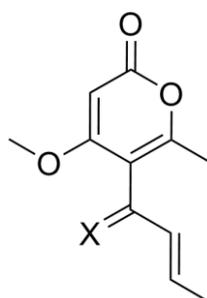
O fracionamento do extrato em AcOEt (1000 mg) de *Lewia infectoria* SNB-GTC2402 permitiu a seleção de duas frações: F3 e F6. A fração 3 continha o sólido

branco identificado como phomopirona A (**26**) (2 mg) (Figura 74). A fração 6 obteve CIM de $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em *S. aureus* e seu fracionamento em CLAE permitiu o isolamento da pyrenocina A (**27**) (3,6 mg), alterperilenol (**28**) (50,3 mg), novae-zelandina A (**29**) (5,3 mg) e de uma substância ainda não descrita na literatura, nomeada pyrrocidina C (**30**) (5,0 mg) (Figura 74).

II – Elucidação estrutural das substâncias isoladas

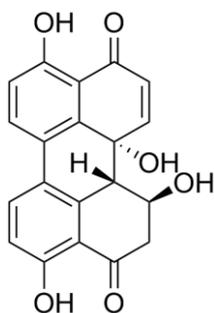


Phomopirona A (**26**)

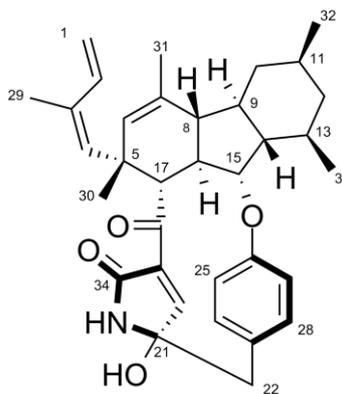


X = O; Pyrenocina A (**27**)

X = H,H; Novae-zelandina A (**29**)



Alterperilenol (**28**)



Pyrrocidina C (**30**)

Figura 74. Substâncias isoladas de *Lewia infectoria* (SNB-GTC2402).

A substância obtida na fração 3 foi identificada como phomopirona A (**26**), após comparação dos dados espectrométricos de ressonância magnética nuclear com a literatura (Pedras *et al.*, 1994). A massa da substância foi analisada por HR-ESI-MS (positivo) m/z : 235,1326 $[\text{M}-\text{H}]^+$; calculado para $[\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_3]^+$: 235,1334.

As substâncias **27-29** foram identificadas através de análises espectroscópicas e seus dados analíticos correspondiam com aqueles reportados anteriormente para

pyrenocina A (**27**, Ichihara *et al.*, 1987), alterperilenol (**28**, Okuno *et al.*, 1983), novaezelandina A (**29**, Christensen *et al.*, 2005). Para a substância **30**, a fórmula molecular foi determinada por espectrometria de massa de alta resolução como sendo C₃₄H₄₁NO₄. A estrutura planar de **30** foi deduzida através da análise de dados espectrais de ¹H e ¹³C RMN, DEPT, COSY, HMQC e HMBC, estes dados espectroscópicos se encontram na tabela 5. A unidade decahidrofluoreno entre C-5 e C-17 foi construída seguindo a sequência de hidrogênios e de átomos de carbono começando da ligação dupla trissubstituída entre C-6 e C-7 a δ 132,3 e 135,7, respectivamente, com H-6 a δ 5,45. A unidade decahidrofluoreno possui quatro substituintes metílicos em C-5, C-7, C-11 e C-13, um átomo de oxigênio em C-15, como demonstrado pelo deslocamento químico de H-15 a δ 4,74, e pelo grupamento carbonila conjugado ligado a C-17 (C-18, δ 194,3, seguido por um átomo de carbono quaternário olefínico C-19 a δ 132,2), como visto nas correlações HMBC de H-17-C-18 e H-17-C-19. C-5 foi identificado como um carbono quaternário, também ligado ao grupamento 2-metilbutadienil (C-1-C-4). A correlação encontrada entre C-15 e o átomo de carbono quaternário aromático C-16 a δ 159,2 demonstrou que o átomo de oxigênio em C-15 fazia parte de uma ariloxila. Os dados espectrais deste grupo arila indicavam um grupo fenila 1,4-dissubstituído, apesar dos deslocamentos químicos em ¹H e ¹³C dos átomos 2,6- e 3,5 não terem sido equivalentes, indicando uma rotação lenta ou bloqueada da unidade fenila. No átomo de carbono C-23, a unidade fenílica estava ligada a um grupamento metilênico com dois hidrogênios não equivalentes a δ 3,08 e 3,27, o qual estava ligado a um átomo de carbono quaternário C-21 a δ 86,5. O hidrogênio olefínico H-20 estava correlacionado a C-18, C-21 e C-34, demonstrando a presença de uma unidade γ -lactâmica incluindo C-34, C-19, C-20 e C-21 e ligada à unidade decahidrofluorenil via um grupo carbonila em C-18. Esta substância parecia em grande parte às pyrrocidinas e hirsutelonas, e foi nomeado como pyrrocidina C (**30**) (He *et al.*, 2002; Isaka *et al.*, 2005). Pyrrocidinas e hirsutelonas pertencem a uma classe crescente de alcaloides possuindo um sistema único de ligação com um sistema de anel espirocetálico (Shiono *et al.*, 2012), as substâncias conhecidas desta classe apresentam propriedades antifúngicas e antibióticas marcantes (Nicolaou *et al.*, 2009). Alcaloides apresentando este tipo de estrutura molecular são relativamente raros na natureza, sendo que os possíveis intermediários postulados para as pyrrocidinas não foram ainda encontrados na natureza (Isaka *et al.*, 2005).

Tabela 5.Dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C para pyrrocidina C (**30**) em CDCl_3 .

N ^o	^1H	^{13}C	COSY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$)	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	NOESY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$)
1	a: 5.00 (d, 1H, $J = 17.5$) b: 5.04 (d, 1H, $J = 11.3$)	113.9 (CH ₂)	H-2 H-2	C-2, C-3 C-2, C-3	H-29 H-2
2	6.66 (dd, 1H, $J = 17.5, 11.3$)	135.7 (CH)	H-1 _a , H1 _b	C-29	H-1 _b
3		132.2 (C)			
4	5.22 (br s, 1H)	136.8 (CH)	H-29	C-2, C-3, C-5, C-29, C-30	H-29, H-30
5		43.2 (C)			
6	5.45 (br s, 1H)	132.3 (CH)	H-31	C-4, C-5, C-8, C-17, C-31	H-2, H-30, H-31
7		135.7 (C)			
8	1.84 (m, 1H)	45.6 (CH)		-	H-14, H-30
9	1.69 (br q, 1H, $J = 10.1$)	44.4 (CH)	H-10 _{ax} , H-10 _{eq} , H-14		H-10 _{eq} , H-16
10	ax: 0.76 (br q, 1H, $J = 11.9$) eq: 2.18 (br d, 1H, $J = 11.9$)	40.3 (CH ₂)	H-9, H-10 _{eq} , H-14 H-9, H-10 _{ax}	C-9, C-11 -	H-10 _{eq} , H-14, H-32 H-9, H-10 _{ax} , H-11, H-31, H-32
11	1.54 (m, 1H)	32.4 (CH)	H-12 _{ax} , H-32		H-10 _{eq} , H-32
12	ax: 0.68 (br q, 1H, $J = 12.0$) eq: 1.81 (m, 1H)	45.3 (CH ₂)	H-12 _{eq} , H-11 H-12 _{ax}	C-11, C-32, C-33 C-11, C-32, C-33	H-12 _{eq} , H-14 H-12 _{ax}
13	1.85 (m, 1H)	31.5 (CH)	H-14, H-33	-	
14	1.20 (br q, 1H, $J = 10.8$)	56.7 (CH)	H-9, H-13, H-15	C-12, C-13	H-8, H-10 _{ax} , H-12 _{ax} , H-15
15	4.74 (dd, 1H, $J = 8.8, 6.4$)	86.1 (CH)	H-14, H-16	C-9, C-14, C-26	H-14, H-17, H-27
16	2.33 (m, 1H)	54.4 (CH)	H-15, H-17	C-7, C-8, C-15, C-17, C-18	H-9
17	3.84 (d, 1H, $J = 8.8$)	55.6 (CH)	H-16	C-5, C-15, C-16, C-18, C-19, C-30	H-15, H-30
18		194.3 (C)			
19		132.2 (C)			
20	6.93 (s, 1H)	157.9 (CH)	OH, NH	C-18, C-21, C-34	H-22 _b
21		86.5 (C)			
22	a: 3.08 (d, 1H, $J = 12.8$) b: 3.27 (d, 1H, $J = 12.8$)	45.2 (CH ₂)	H-22 _b H-22 _a	C-20, C-21, C-23, C-24 C-21, C-23, C-24	H-22 _b , H-28 H-20, H-22 _a , H-24
23		127.2 (C)			
24	6.93 (br d, 1H, $J = 7.8$)	131.4 (CH)	H-25, H-28	C-26, C-28	H-22 _b , H-25
25	6.67 (br d, 1H, $J = 7.8$)	122.0 (CH)	H-24, H-27	C-23, C-26, C-27	H-16, H-24
26		159.2 (C)			
27	7.08 (dd, 1H, $J = 8.2, 1.8$)	118.0 (CH)	H-28, H-25	C-23, C-25, C-26	H-15, H-28, H-33
28	6.85 (br d, 1H, $J = 8.2$)	128.7 (CH)	H-24, H-27	C-22, C-24, C-26	H-22 _a , H-27
29	1.57 (s, 3H)	20.8 (CH ₃)	H-4	C-3, C-4	H-1 _a , H-4
30	1.29 (s, 3H)	30.4 (CH ₃)		C-4, C-5, C-6, C-17	H-4, H-8, H-17
31	1.88 (s, 3H)	21.3 (CH ₃)	H-6	C-6, C-7, C-8	H-6, H-10 _{eq}
32	0.95 (d, 3H, $J = 6.4$)	22.5 (CH ₃)	H-11	C-10, C-11, C-12	H-10 _{eq} , H-11, H-12 _{eq}
33	1.03 (d, 3H, $J = 5.8$)	20.2 (CH ₃)	H-13	C-12, C-13, C-14	H-12 _{eq} , H-15, H-27
34		198.8 (C)			
OH	6.03 (br s, 1H)		H-20		
NH	3.50 (s, 1H)		H-20		H-22 _a

A estereoquímica relativa da pyrrocidina C (**30**) foi elucidada pela análise de dados espectrais NOESY e valores-J vicinais (tabela 5). Correlações NOESY selecionadas são descritas na figura 75, na qual existe uma representação da conformação estrutural minimizada da pyrrocidina C (**30**), esta feita com o programa Chem3D Pro, além da incorporação de informações estruturais/conformacionais dos experimentos em RMN. O sinal RMN de H-9 continha 3 largas constantes de acoplamento 3J axial-axial em torno de 10 Hz, demonstrando uma orientação antiperiplanar de H-9 com H-8, H-10_{ax} e H-14. H-9 estava então de um lado da unidade decafluorenil enquanto H-8, H-10_{ax} e H-14 estavam do outro lado. Importante também observar a forte correlação NOESY entre H-15 e H-17. Na literatura, essa correlação NOESY aparece nas pyrrocidinas e não nas hirsutellonas, indicando que estes dois hidrogênios estavam do mesmo lado do sistema tricíclico na substância **30**. A sequência circular das correlações NOESY H-30 - H-8 - H-14 - H-15 - H-17 - H-30 indicavam que todos estes hidrogênios estavam do mesmo lado do grupo decafluorenil, juntamente com H-10_{ax} e H-12_{ax}. Importante foi a forte correlação NOESY entre H-30 e H-8, indicando que o anel ciclohexano que possuía estes prótons estava em conformação de barco. Ao contrário, o outro anel ciclohexano estava em conformação cadeira, com dois substituintes metílicos equatoriais. Interessante notar que tanto H-33 como H-15 correlacionavam-se com H-27, demonstrando assim a orientação da unidade fenílica. As correlações H-28 – H22_a – NH e H-20 – H22_b – H-24 confirmaram a conformação da γ -lactama em relação ao grupo fenil. Com base nestes dados espectrais, a estereoquímica relativa da pyrrocidina C (**30**) foi proposta nas figuras 74 e 75.

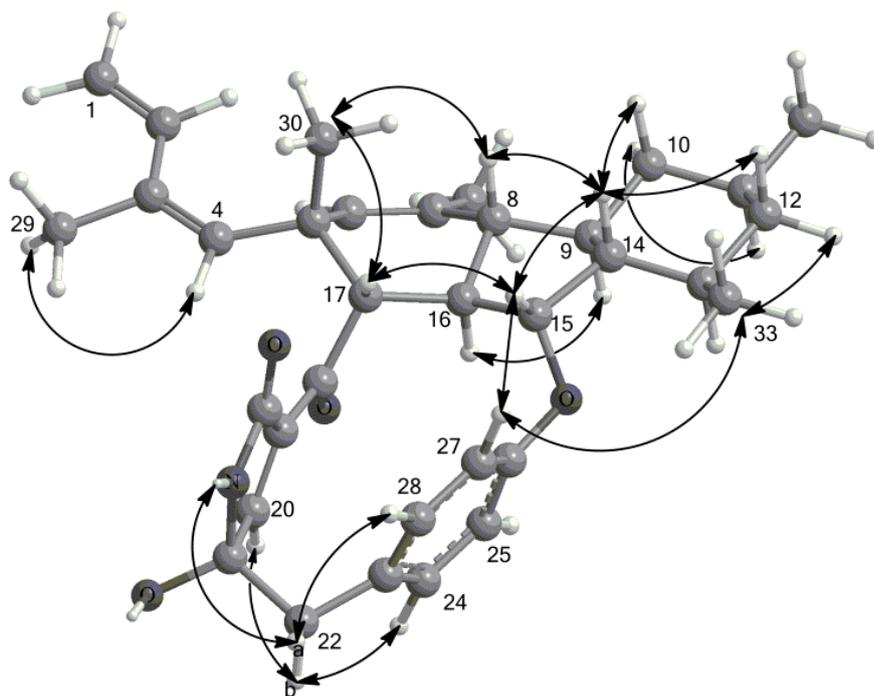


Figura 75. NOESY selecionada da pyrrocidina C (30).

III – Atividade biológica das substâncias isoladas

A phomopirona A (26), a pyrenocina A (27) e a novae-zelandina A (29) não foram ativas em nenhum dos modelos biológicos testados (Tabela 6). O alterperilenol (28), substância majoritária da fração 6 foi moderadamente ativa em *S. aureus* ATCC 29213 (CIM = 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Tabela 6.

Atividade antimicrobiana (CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$) e citotóxica (IC_{50} μM) das substâncias isoladas de SNB-GTC2402, comparadas às substâncias controles

Substâncias	<i>C. a.</i>	<i>S. a.</i>	KB	MDA-MB-435	MRC-5
	$\mu\text{g.mL}^{-1}$ (μM)	$\mu\text{g.mL}^{-1}$ (μM)	IC_{50} μM	IC_{50} μM	IC_{50} μM
Phomopirona A (26)	> 128	> 128	> 10	> 10	> 10
Pyrenocina A (27)	> 128	> 128	> 10	> 10	> 10
Alterperilenol (28)	> 128	32 (91,4)	> 10	> 10	> 10
Novae-zelandina A (29)	> 128	> 128	> 10	> 10	> 10
Pyrrocidina C (30)	> 128	2 (3,7)	10	> 10	> 10
Fluconazol	4 (13,0)	-	-	-	-
Oxacilina	-	0,5 (1,24)	-	-	-
Docetaxel	-	-	0,0002	-	0,0005
Doxorubicina	-	-	-	0,02	-

C. a. = *Candida albicans* ATCC 10213; *S. a.* = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. KB (câncer uterino cervical), MDA-MB-435 (melanoma metatástico), MRC-5 (fibroblastos humanos de pulmão); - não avaliado.

A Pyrrocidina C (**30**) foi ativa para a mesma linhagem bacteriana com um valor CIM de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 6) e inativa para a bactéria Gram-negativa *E. coli* (dado não mostrado). Ambas as substâncias (**28** e **30**) são presumidamente responsáveis pela atividade antibacteriana encontrada no extrato bruto (CIM = $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Tabela 3). Pyrrocidinas A e B e hirsutellonas são também metabólitos com atividade antimicrobiana, com valores de CIM comparáveis ao da pyrrocidina C (**30**) em bactérias Gram-positivas (He *et al.*, 2002). Estes compostos, assim como **30**, possuem uma citotoxicidade moderada (Isaka *et al.*, 2005), e contribuem ao arsenal de defesas químicas de diferentes classes de fungos endofíticos.

6.4.3 Estudo do extrato AcOEt de *Xylaria* sp. (SNB-GTC2501)



Figura 76. *Xylaria* sp. (SNB-GTC2501) e seu vegetal hospedeiro *Bisboeckelera microcephala* (Cyperaceae).

I - Seleção do extrato, extração e isolamento

O fungo endofítico codificado como SNB-GTC2501 (Figura 76) foi identificado como *Xylaria* sp. através de análise molecular da região de DNAr ITS1. Este gênero de fungos representa grande parte da microbiota presente em florestas tropicais, podendo

ser decompositores, endófitos, patógenos ou simbioses de ninhos de cupim (Osono *et al.*, 2011). O fungo foi isolado a partir de folhas de *Bisboeckelera microcephala* (Boeckeler) T. Koyama (Cyperaceae) (Figura 76). A cultura em grande escala da cepa foi realizada em 150 placas de Petri de 14 cm e a extração em acetato de etila. A filtração e a lavagem das culturas obtidas após 15 dias de crescimento permitiram a obtenção de 1,8 g de extrato bruto (0,9 g.m⁻²).

Os resultados da atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* do extrato bruto AcOEt de SNB-GTC2501 são apresentados na tabela 3. A partir da triagem preliminar do extrato, foi observada atividade em *S. aureus* à 8 µg.mL⁻¹. O extrato não inibiu significativamente o crescimento celular das duas linhagens celulares cancerígenas (KB e MDA-MB-435), nem o da linhagem celular normal MRC-5, demonstrando seletividade na atividade antimicrobiana detectada. O fracionamento do extrato em AcOEt (644 mg) de *Xylaria* sp. SNB-GTC2501 permitiu a seleção de duas frações: F3 e F5. A fração 3 continha o sólido amarelado identificado como 5-metilmelleina (**31**) (8,2 mg), (Figura 77). A fração 5 obteve valor de atividade CIM de 8 µg.mL⁻¹ em *S aureus* e seu fracionamento em CLAE permitiu o isolamento da Dihidrosporo-thriolida (**32**) (3,5 mg) (Figura 77).

II – Elucidação estrutural das substâncias isoladas

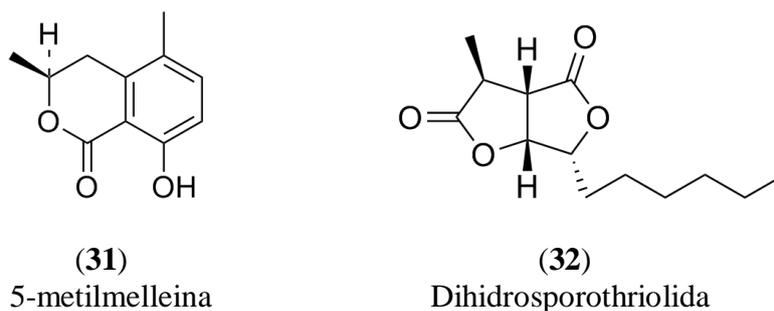


Figura 77. Compostos isolados de *Xylaria* sp. (SNB-GTC2501).

A substância obtida na fração 3 foi identificado como 5-metilmelleina (**31**) após comparação das análises espectrométricas de ressonância magnética nuclear com a literatura (Okuno *et al.*, 1986). A 5-metilmelleina (**31**) se apresenta como um sólido amarelado de $[\alpha]_D^{25}$ igual a -90 em CHCl₃ (*c* = 0,3). A massa da substância foi analisada

por HR-ESI-MS (negativo) m/z : 191,0701 $[M-H]^-$; calculado para $[C_{11}H_{13}O_3]^-$: 191,0708. A substância **32** já tinha sido reportada previamente na literatura, e foi identificada através de análises espectroscópicas e seus dados analíticos correspondiam à dihidrosporothriolida (**32**, Isaka *et al.*, 2010). O $[\alpha]_D^{25}$ obtido para a Dihidrosporothriolida foi de -65 em MeOH ($c = 0,1$).

III – Atividade biológica das substâncias isoladas

O gênero *Xylaria* é fonte de metabólitos secundários biologicamente ativos como a griseofulvina (**25**), citochalasinias, sesquiterpenos eremofilanos, xantonas, furanopiranoles ou ainda xyrlaramidas (Silva *et al.*, 2010). Neste estudo, três substâncias foram isoladas de *Xylaria* sp. SNB-GTC2501, destas a 5-metilmelleina (**31**) não foi considerada ativa em nenhum dos modelos biológicos testados (Tabela 7).

A substância Dihidrosporothriolida (**32**) foi moderadamente ativa em *S. aureus* ATCC 29213 com valor de CIM de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 7). A atividade antimicrobiana encontrada na substância **32** foi menos expressiva que aquela encontrada no extrato bruto de SNB-GTC2501 (CIM = $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Tabela 3) e menor que aquele da fração 5 (CIM = $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Este resultado demonstrou que alguma substância da fração 5 poderia ter sido degradada ou não isolada durante seu fracionamento. Análises em CLAE e RMN da fração 5 (dado não mostrado) não puderam confirmar a presença de outras substâncias na mesma fração. Novos estudos devem ser efetuados (refracionamento do extrato bruto), afim de que a/as substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana encontrada previamente possam ser identificadas.

Tabela 7.

Atividade antimicrobiana (CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$) e citotóxica ($\text{IC}_{50} \mu\text{M}$) das substâncias isoladas de SNB-GTC2501, comparadas às substâncias controles

Substâncias	<i>C. a.</i> $\mu\text{g.mL}^{-1} (\mu\text{M})$	<i>S. a.</i> $\mu\text{g.mL}^{-1} (\mu\text{M})$	KB $\text{IC}_{50} \mu\text{M}$	MDA-MB-435 $\text{IC}_{50} \mu\text{M}$	MRC-5 $\text{IC}_{50} \mu\text{M}$
5-metilmelleina (31)	> 128	> 128	> 10	> 10	> 10
Dihidrosporothriolida (32)	> 128	64 (201,7)	> 10	> 10	> 10
Fluconazol	4 (13,0)	-	-	-	-
Oxacilina	-	0,5 (1,24)	-	-	-
Docetaxel	-	-	0,0002	-	0,0005
Doxorubicina	-	-	-	0,02	-

C. a. = *Candida albicans* ATCC 10213; *S. a.* = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. KB (câncer uterino cervical), MDA-MB-435 (melanoma metastático), MRC-5 (fibroblastos humanos de pulmão); - não avaliado.

6.4.4 Estudo do extrato AcOEt de *Mycoleptodiscus* sp. (SNB-GTC2304)



Figura 78. *Mycoleptodiscus* sp. (SNB-GTC2304) e seu vegetal hospedeiro *Psychotria poepiggiana* (Rubiaceae).

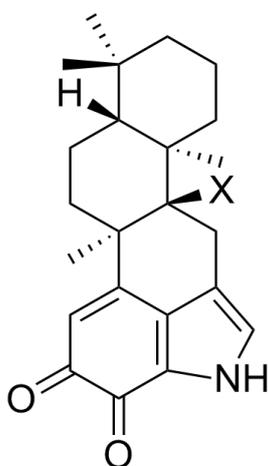
I - Extração e isolamento

O fungo endofítico codificado como SNB-GTC2304 (Figura 78) foi identificado como *Mycoleptodiscus* sp. através de uma análise molecular da região de DNAr ITS1. O fungo foi isolado a partir de folhas do arbusto *Psychotria poepiggiana* Müll. Arg. (Rubiaceae) (Figura 78). A cultura em grande escala da cepa foi realizada em 150 placas de Petri de 14 cm. A extração em acetato de etila, a filtração e a lavagem das culturas obtidas após 15 dias de crescimento permitiram a obtenção de 3,1 g de extrato bruto (1,58 g.m⁻²).

Os resultados da atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* do extrato bruto AcOEt de SNB-GTC2304 são apresentados na tabela 3. A partir da triagem preliminar do extrato, foi observada atividade em *S. aureus* à 64 µg.mL⁻¹. O extrato inibiu o crescimento celular à 1 µg.mL⁻¹ da linhagem KB em 95%, de MDA-MB-435 em 97% e de MRC-5 em 100%. Na concentração de 1 µg.mL⁻¹ os controles positivos docetaxel, em células KB e MRC-5; e doxorubicina em MDA-MB-435, inibem em 100% as linhagens celulares.

O fracionamento do extrato em AcOEt (1000 mg) de *Mycoleptodiscus* sp. SNB-GTC2304 permitiu a seleção de duas frações que mantiveram a mesma atividade citotóxica do extrato bruto: F4 e F8. O fracionamento da fração 4 permitiu o isolamento da mycoleptodiscina A (**34**) (4,4 mg) (Figura 79). E o da fração 8 gerou 3 sub-frações, sendo que a RPF2 permitiu o isolamento da mycoleptodiscina B (**35**) (5,5 mg) (Figura 79).

II – Elucidação estrutural das substâncias isoladas



X = H; Mycoleptodiscina A (**34**)
X = OH; Mycoleptodiscina B (**35**)

Figura 79. Substâncias isoladas de *Mycoleptodiscus* sp. (SNB-GTC2304).

As estruturas das substâncias isoladas de SNB-GTC2304 foram determinadas a partir de análises espectroscópicas e estão de acordo com estruturas isoladas de um outro fungo endofítico do mesmo gênero, substâncias índole-terpenos provenientes de um esqueleto raro na natureza previamente identificadas como mycoleptodiscina A e B (**34** e **35**, Ortega *et al.*, 2013) (Figura 79). A massa da mycoleptodiscina A (**34**) foi analisada por HR-ESI-MS (negativo) m/z : 350,2112 [M-H]⁻; calculado para [C₂₃H₂₈NO₂]⁻: 350,2120. O [α]_D²⁵ de -130 foi obtido em metanol, a uma concentração de 0,01 g.L⁻¹, poder rotatório igualmente descrito na literatura. A massa da mycoleptodiscina B (**35**) foi analisada por HR-ESI-MS (negativo) m/z : 366,2068 [M-H]⁻; calculado para [C₂₃H₂₈NO₃]⁻: 366,2069. O [α]_D²⁵ de -160 foi obtido em metanol, a uma

concentração de 0,5 g.L⁻¹, o poder rotatório de sinal negativo foi igualmente descrito na literatura.

III – Atividade biológica das substâncias isoladas

Neste trabalho a mycoleptodiscina A (**34**) demonstrou atividade citotóxica *in vitro* com valores de IC₅₀ = 0,11; 0,18; 0,07 μM (Tabela 8) para as linhagens celulares KB, MDA-MB-435 e MRC-5, respectivamente. A mycoleptodiscina B (**35**) demonstrou atividade citotóxica *in vitro* com valores de IC₅₀ = 0,10; 0,12; 0,11 μM (Tabela 8) para KB, MDA-MB-435 e MRC-5, respectivamente.

Tabela 8.

Atividade antimicrobiana (CIM, μg.mL⁻¹/μM) e citotóxica (IC₅₀ μM) das substâncias isoladas de SNB SNB-GTC2304, comparadas às substâncias controles

Substâncias	<i>C. a.</i>	<i>S. a.</i>	KB	MDA-MB-435	MRC-5
	μg.ml ⁻¹ (μM)	μg.ml ⁻¹ (μM)	IC ₅₀ μM	IC ₅₀ μM	IC ₅₀ μM
Mycoleptodiscina A (34)	> 128	> 128	0,11	0,18	0,07
Mycoleptodiscina B (35)	> 128	> 128	0,10	0,12	0,11
Fluconazol	4 (13,0)	-	-	-	-
Oxacilina	-	0,5 (1,24)	-	-	-
Docetaxel	-	-	0,0002	-	0,0005
Doxorubicina	-	-	-	0,02	-

C. a. = *Candida albicans* ATCC 10213; *S. a.* = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. KB (câncer uterino cervical), MDA-MB-435 (melanoma metastático), MRC-5 (fibroblastos humanos de pulmão); - não avaliado.

Os valores de IC₅₀ para as três linhagens celulares foram expressivos, no entanto a falta de seletividade da atividade citotóxica para células cancerígenas, a elevada toxicidade para as células normais MRC-5 e a existência de fármacos mais ativos (controles positivos) demonstram que estas substâncias precisam ter suas atividades melhoradas e o mecanismo de ação elucidado.

Na literatura, ambas as substâncias foram isoladas anteriormente do fungo endofítico identificado como *Mycoleptodiscus* sp. (Ortega *et al.*, 2013). Este mesmo estudo demonstrou que a Mycoleptodiscina B (**35**) apresentava atividades citotóxicas com IC₅₀ de 0,6 μM para as linhagens celulares cancerígenas H460, A2058, H522-T1 e PC-3. Foi concluído que a citotoxicidade das mycoleptodiscinas A e B para células cancerosas humanas não resulta da inibição do processo proliferativo celular, indicando

uma falta de seletividade na atividade citotóxica. Ambas as substâncias provavelmente contribuem com o mecanismo de defesa química do fungo endofítico em seu habitat natural.

6.4.5 Estudo do extrato AcOEt de *Diaporthe pseudomangiferae* (SNB-GSS10)



Figura 80. *Diaporthe pseudomangiferae* (SNB-GSS10) e seu vegetal hospedeiro *Sabicea cinerea* (Rubiaceae).

I - Seleção do extrato, extração e isolamento

O fungo endofítico codificado como SNB-GSS10 (Figura 80) foi identificado como *Diaporthe pseudomangiferae*, através de análise molecular da região de DNAr ITS1. O gênero *Diaporthe* é a forma sexuada (teleomorfo) do fungo, a forma assexuada (anamorfo) é denominada *Phomopsis* (Abreu *et al.*, 2012). O fungo foi isolado a partir de folhas de uma trepadeira comumente encontrada em bordas de estradas, a planta *Sabicea cinerea* Aubl. (Rubiaceae) (Figura 80). A cultura em grande escala da cepa foi realizada em 150 placas de Petri de 14 cm. A extração em acetato de etila, a filtração e a lavagem das culturas obtidas após 15 dias de crescimento permitiram a obtenção de 3,9 g de extrato bruto (1,95 g.m⁻²).

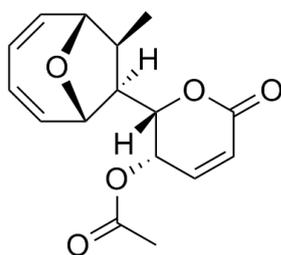
Os resultados da atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* do extrato bruto AcOEt de SNB-GSS10 são apresentados na tabela 3. A partir da triagem preliminar do extrato, foi observada atividade de inibição do crescimento celular à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da linhagem celular KB em 100%, de MDA-MB-435 em 97% e de MRC-5 em 100%.

O fracionamento do extrato em AcOEt (720 mg) de *Diaporthe pseudomangiferae* SNB-GSS10 permitiu a seleção de duas frações: F5 e F6, que mantiveram a atividade citotóxica com inibição do crescimento celular de 100% nas três linhagens celulares. O fracionamento da fração 5 permitiu o isolamento do mycoepoxidieno **36** (2,4 mg) e da altiloxina A **37** (1,2 mg) (Figura 81). A fração 6 ainda não foi completamente analisada.

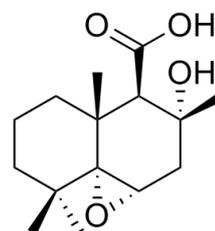
II – Elucidação estrutural das substâncias isoladas

As estruturas das substâncias isoladas de SNB-GSS10 foram determinadas a partir de análises espectroscópicas de massa e de ressonância magnética nuclear em uma e duas dimensões. A fórmula bruta da substância **36** foi determinada como sendo $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_5$, analisada por HR-ESI-MS, negativo m/z : foi achado 290,3088 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Os dados espectroscópicos obtidos em RMN 500 MHz da substância **36** solubilizada em $\text{DMSO}-d_6$ permitiram a identificação do mycoepoxidieno (**36**, figura 53), em acordo com a estrutura descrita previamente por Cai *et al.* (1999). O $[\alpha]_D^{25}$ de +140 foi obtido em metanol, a uma concentração de $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, na literatura o poder rotatório de sinal positivo foi igualmente descrito. Estes dados permitiram a identificação do mycoepoxidieno (**36**, figura 81).



Mycoepoxidieno (**36**)



Altioxina A (**37**)

Figura 81. Substâncias isoladas de *Diaporthe pseudomangiferae* (SNB-GSS10).

Os dados espectroscópicos obtidos em RMN 600 MHz da substância **37** solubilizada em CDCl_3 permitiram a identificação da altioxina A (**37**, figura 81), em

acordo com a estrutura descrita previamente por Ichihara *et al.* (1984). Apesar da altiloxina A ser conhecida na literatura, é a primeira vez que dados relativos ao espectro de RMN ^{13}C da substância são descritos. A massa da altiloxina A (**37**) foi analisada por HR-ESI-MS (negativo) m/z : 267,1596 $[\text{M-H}]^-$; calculado para $[\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{O}_3]^-$: 267,1906. O $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ de -20 foi obtido em clorofórmio, a uma concentração de $0,7 \text{ g.L}^{-1}$, na literatura o poder rotatório de sinal negativo foi igualmente descrito.

III – Atividade biológica das substâncias isoladas

Todas as substâncias isoladas de *Diaporthe pseudomangiferae* (SNB-GSS10) foram avaliadas quanto à atividade em *C. albicans* e *S. aureus*, e quanto à atividade citotóxica em células KB, MDA-MB-435 e MRC-5.

A substância identificada como mycoepoxidieno (**36**), isolada previamente do fungo endofítico identificado como *Diaporthe* sp. HLY-1, é um policetídeo com propriedades citotóxicas em células HeLa que interrompeu o ciclo celular em fase G2/M (Wang *et al.*, 2010). No presente estudo, a substância demonstrou uma baixa atividade citotóxica *in vitro* com valor de IC_{50} de $8,6 \mu\text{M}$ (Tabela 9) para as células KB, e $\text{IC}_{50} > 10$ para as células MDA-MB-435 e MRC-5. A atividade citotóxica do mycoepoxidieno (**36**) foi significativa apenas em células KB, o que demonstra certa seletividade na ação de inibição da proliferação celular, no entanto o valor da atividade é muito elevado quando comparado aos controles positivos (Tabela 9). A literatura reporta metabólitos citotóxicos e antifúngicos isolados de fungos do gênero *Diaporthe* (Lin *et al.*, 2005), como a diaportachalasin, substância inibidora da enzima CYP3A4 com IC_{50} de $0,626 \mu\text{M}$ (Pompakakul *et al.*, 2007).

Tabela 9.

Atividade antimicrobiana (CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$) e citotóxica ($\text{IC}_{50} \mu\text{M}$) das substâncias isoladas de SNB-GSS10, comparadas às substâncias controles

	<i>C. a.</i>	<i>S. a.</i>	KB	MDA-MB-435	MRC-5
Substâncias	$\mu\text{g.mL}^{-1} (\mu\text{M})$	$\mu\text{g.mL}^{-1} (\mu\text{M})$	$\text{IC}_{50} \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} \mu\text{M}$	$\text{IC}_{50} \mu\text{M}$
Mycoepoxidieno (36)	> 128	> 128	8,6	> 10	> 10
Altiloxina A (37)	> 128	> 128	> 10	> 10	> 10
Fluconazol	4 (13,0)	-	-	-	-
Oxacilina	-	0,5 (1,24)	-	-	-
Docetaxel	-	-	0,0002	-	0,0005
Doxorubicina	-	-	-	0,02	-

C. a. = *Candida albicans* ATCC 10213; *S. a.* = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. KB (câncer uterino cervical), MDA-MB-435 (melanoma metastático), MRC-5 (fibroblastos humanos de pulmão); - não avaliado.

A altiloxina A (**37**) foi isolada previamente do fungo endofítico *Phoma asparagi* por Ichihara *et al.* (1984), que demonstram a atividade fitotóxica sobre o crescimento radicular das plantas hospedes. A altiloxina A (**37**) não apresentou atividade antimicrobiana ou citotóxica para os modelos testados neste trabalho (Tabela 9).

A fração 6 apresentou forte atividade citotóxica *in vitro* sobre os três modelos celulares testados (KB, MDA-MB-435 e MRC-5), com valores de inibição de 100% quando testada a $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. O fracionamento da fração 6 e a identificação de suas respectivas substâncias poderá explicar melhor a atividade citotóxica encontrada no extrato em AcOEt de *Diaporthe pseudomangiferae* SNB-GSS10.

6.4.6 Estudo do extrato AcOEt de *Chaetomium globosum* (SNB-GTC2114)

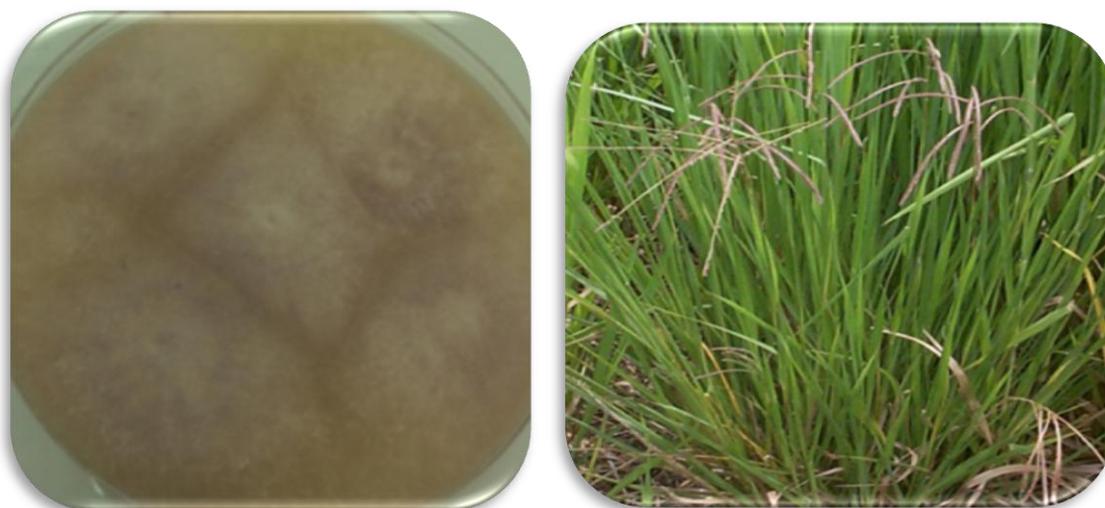


Figura 82. *Chaetomium globosum* (SNB-GTC2114) e seu vegetal hospedeiro *Paspalum virgatum* (Poaceae).

I - Extração e isolamento

O fungo endofítico codificado como SNB-GTC2114 (Figura 82) foi identificado como *Chaetomium globosum* através de análise molecular da região de DNAr ITS1. O fungo foi isolado a partir da gramínea *Paspalum virgatum* L. (Poaceae) (Figura 82). *Chaetomium* é um dos gêneros mais diversos e representativos da ordem Sordariales, filo Ascomycota, com mais de cem espécies marinhas e terrestres conhecidas (Li *et al.*, 2011). A cultura em grande escala da cepa foi realizada em 150 placas de Petri de 14 cm. A extração em AcOEt, a filtração e a lavagem das culturas obtidas após 15 dias de crescimento permitiram a obtenção de 0,614 g de extrato bruto (0.31 g.m⁻²).

Os resultados da atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* do extrato bruto AcOEt de SNB-GTC2114 são apresentados na tabela 3. A partir da triagem preliminar do extrato, foi observada atividade antifúngica à 32 µg.mL⁻¹ em *C. albicans*, e à 16 µg.mL⁻¹ em *S. aureus*. O extrato inibiu o crescimento celular à 1 µg.mL⁻¹ da linhagem celular KB em 97%, de MDA-MB-435 em 47% e de MRC-5 em 95%.

O fracionamento do extrato em AcOEt (554 mg) de *C. globosum* SNB-GTC2114 permitiu a seleção da fração ativa: F7. A partir do fracionamento da fração 7 foram isolados o acremonisol A (**40**) (11,7 mg), do semicochliodinol A (**41**) (0,8 mg) e do cochliodinol (**42**) (6 mg) (Figura 83).

II – Elucidação estrutural das substâncias isoladas

As estruturas das substâncias isoladas de SNB-GTC2114 foram determinadas a partir de análises espectroscópicas de massa e de ressonância magnética nuclear em uma e duas dimensões e estão de acordo com as seguintes estruturas previamente descritas, acremonisol A (**40**, Pontius *et al.*, 2008), semicochliodinol A (**41**, Fredenhagen *et al.*, 1997) e cochliodinol (**42**, Kingsland e Barrow, 2009) (Figura 83).

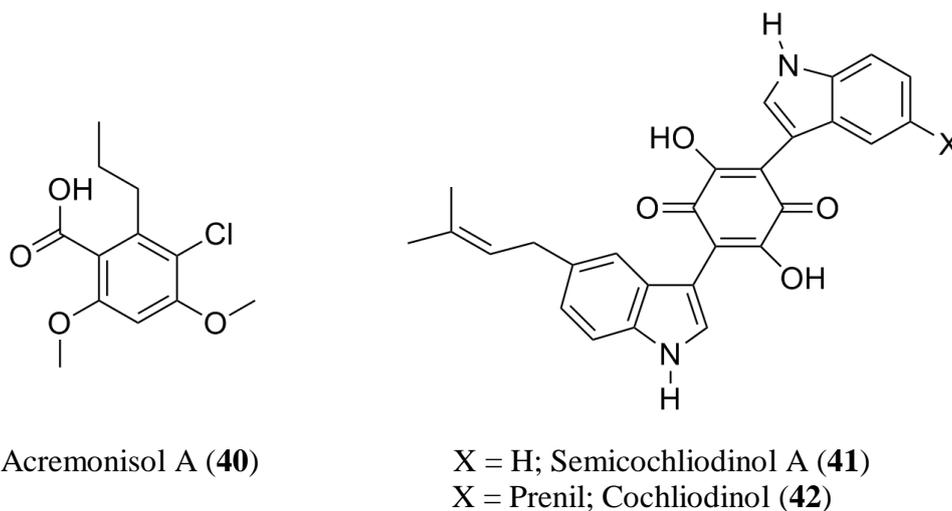


Figura 83. Substâncias isoladas de *Chaetomium globosum* (SNB-GTC2114).

III – Atividade biológica das substâncias isoladas

A substância identificada como acremonisol A (**40**) foi isolada previamente do fungo endofítico identificado como *Acremonium* sp. (Pontius *et al.*, 2008). No presente estudo, acremonisol A (**40**) demonstrou baixa atividade em *S. aureus* ($64 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Tabela 10), não sendo portanto, a substância responsável pela atividade anti-bacteriana encontrada na fração ativa 7 ($8 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Semicochliodinol A (**41**) demonstrou atividade citotóxica *in vitro* com valores de IC_{50} de 0,31; 0,84; $0,31 \mu\text{M}$ (Tabela 10) para as linhagens celulares KB, MDA-MB-435 e MRC-5, respectivamente. Esta mesma substância inibiu o crescimento de *S. aureus* com valor CIM de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Na literatura, a substância foi isolada anteriormente do fungo *Chrysosporium merdarium*, e foi capaz de inibir a protease viral 1'-HIV-1 do vírus HIV-1 ($\text{IC}_{50} = 0,37 \mu\text{M}$), a proteína tirosina kinase (EGF-R PTK) do receptor de crescimento ecodermal ($\text{IC}_{50} = 20 \mu\text{M}$), e a catepsina D humana ($\text{IC}_{50} = 2,5 \mu\text{M}$) (Fredenhagen *et al.*, 1997). Cochliodinol (**42**) é um metabólito fúngico citotóxico e antimicrobiano já isolado de algumas espécies do gênero *Chaetomium* (Brewer *et al.*, 1970; Debbab *et al.*, 2009). Neste estudo, o cochliodinol (**42**) foi ativo para todos os alvos biológicos testados, demonstrando atividade antimicrobiana com valores de CIM de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em *C. albicans* (atividade maior que à do controle fluconazol) e de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em *S. aureus* (Tabela 10). Os valores da atividade citotóxica desta mesma substância para as linhagens celulares KB ($\text{IC}_{50} = 0,53 \mu\text{M}$), MDA-MB-435 ($\text{IC}_{50} = 2,2 \mu\text{M}$) e MRC-5 ($\text{IC}_{50} = 0,76 \mu\text{M}$), demonstrou baixa seletividade na

atividade antimicrobiana do cochliodinol (42), com significante toxicidade para as células normais MRC-5.

Tabela 10.

Atividade antimicrobiana (CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$) e citotóxica (IC_{50} μM) das substâncias isoladas de SNB-GTC2114, comparadas às substâncias controles

Substâncias	<i>C. a.</i> $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (μM)	<i>S. a.</i> $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (μM)	KB IC_{50} μM	MDA-MB-435 IC_{50} μM	MRC-5 IC_{50} μM
Acremonisol A (40)	> 128	64 (247,3)	> 10	> 10	> 10
Semicochliodinol A (41)	> 128	2 (4,5)	0,31	0,84	0,31
Cochliodinol (42)	2 (3,9)	4 (9,0)	0,53	2,2	0,76
Fluconazol	4 (13,0)	-	-	-	-
Oxacilina	-	0,5 (1,24)	-	-	-
Docetaxel	-	-	0,0002	-	0,0005
Doxorubicina	-	-	-	0,02	-

C. a. = *Candida albicans* ATCC 10213; *S. a.* = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. KB (câncer uterino cervical), MDA-MB-435 (melanoma metastático), MRC-5 (fibroblastos humanos de pulmão); - não avaliado.

6.4.7 Estudo do extrato AcOEt de *Colletotrichum* sp. (SNB-GTC0201)



Figura 84. *Colletotrichum* sp. (SNB-GTC0201) e seu vegetal hospedeiro *Banara guianensis* (Flacourtiaceae).

I - Extração e isolamento

O fungo endofítico codificado como SNB-GTC0201 (Figura 84) foi identificado como *Colletotrichum* sp. através de análise molecular da região de DNAr ITS1. O fungo foi isolado a partir da árvore *Banara guianensis* Aublet (Flacourtiaceae) (Figura 84). O gênero *Colletotrichum* é o anamorfo do gênero *Glomerella* teleomorfo. Teleomorfo é a designação dada à forma de um fungo capaz de se reproduzir sexuadamente, ao contrário do anamorfo que se reproduz assexuadamente (García-Pajón e Collado, 2003). O gênero está incluído na ordem Glomerellales e representam muitas vezes os fitopatógenos causadores da antracnose em diferentes espécies vegetais (García-Pajón e Collado, 2003). A cultura em grande escala da cepa foi realizada em 150 placas de Petri de 14 cm. A extração em acetato de etila, a filtração e a lavagem das culturas obtidas após 15 dias de crescimento permitiram a obtenção de 3,835 g de extrato bruto (1,91 g.m⁻²).

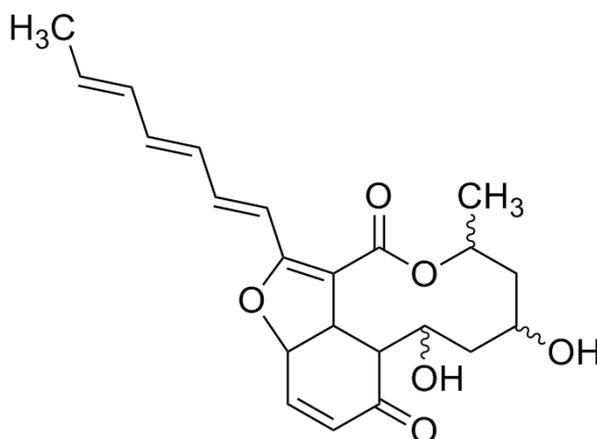
Os resultados da atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* do extrato bruto AcOEt de SNB-GTC0201 são apresentados na tabela 3. A partir da triagem preliminar do extrato, foi observada atividade com valor de CIM de 64 µg.mL⁻¹ em *C. albicans*. O mesmo extrato inibiu o crescimento celular à 1 µg.mL⁻¹ da linhagem KB em 100%, e de MDA-MB-435 em 88% e de MRC-5 em 100%.

O fracionamento do extrato em AcOEt (554 mg) de *Colletotrichum* sp. SNB-GTC0201 permitiu a seleção da fração ativa F8. O fracionamento da fração 8 permitiu o isolamento da substância colletofragarona A2 (**43**) (Figura 85).

II – Elucidação estrutural da substância isolada

Os dados espectroscópicos obtidos em RMN 500 MHz da substância isolada e solubilizada em DMSO-*d*₆ permitiram a identificação da colletofragarona A2 (**43**) (Figura 85), que correspondia à estrutura previamente descrita por Inoue *et al.*, 1996. Apesar da configuração relativa ter sido elucidada, a configuração absoluta da substância não pode ser elucidada. Isto devido a uma degradação da substância durante experimentos posteriores, logo a configuração absoluta das hidroxilas e da metila não foram elucidados assim como não foram pelo grupo de Inoue *et al.*, 1996. A massa da colletofragarona A2 (**43**) foi analisada por HR-ESI-MS (negativo) *m/z*: 387,1804 [M-

H]; calculado para $[C_{22}H_{25}O_6]$: 387,1784. O $[\alpha]_D^{25}$ de + 42 foi obtido em clorofórmio/metanol (9:1), a uma concentração de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, na literatura o poder rotatório de sinal positivo foi igualmente descrito.



Colletofragarona A2 (43)

Figura 85. Substância isolada de *Colletotrichum* sp. (SNB-GTC0201).

III – Atividade biológica da substância isolada

A substância identificada como colletofragarona A2 (43) demonstrou atividade em *C. albicans* (CIM de $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Tabela 11). A mesma substância demonstrou atividade citotóxica para as linhagens celulares KB, MDA-MB-435 e MRC-5 com valores de IC_{50} de 1,11; 1,44; $0,93 \mu\text{M}$ respectivamente. Esta substância foi identificada anteriormente no fungo *Colletotrichum fragariae*, e observada a atividade fitotóxica, com inibição de germinação de diferentes vegetais (Inoue *et al.*, 1996).

As estruturas moleculares dos metabólitos encontrados no gênero *Colletotrichum* são variadas: alcaloides, como dicetopiperazinas (Guimarães *et al.*, 2010), macrolídeos como a gloeosporona (García-Pajón e Collado, 2003), além de fazer parte do grupo de fungos produtores do paclitaxel (Rukachaisirikul *et al.*, 2008). Com este trabalho de tese, é a segunda vez que a colletofragarona A2 (43) é isolada de uma fonte natural e é a primeira vez que sua atividade antifúngica e citotóxica é descrita. A colletofragarona A2 (43) é certamente a substância responsável pelas atividades biológicas encontradas no extrato bruto de SNB-GTC0201 durante a triagem preliminar

e provavelmente contribui nos mecanismos de auto-defesa química do fungo endofítico *Colletotrichum* sp. SNB-GTC0201.

Tabela 11.

Atividade antimicrobiana (CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}/\mu\text{M}$) e citotóxica (IC_{50} μM) da substâncias isolada de SNB-GTC0201, comparadas às substâncias controles

Substâncias	<i>C. a.</i> $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (μM)	<i>S. a.</i> $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (μM)	KB IC_{50} μM	MDA-MB-435 IC_{50} μM	MRC-5 IC_{50} μM
Colletofragarona A2 (43)	16 (44,8)	> 128	1,11	1,44	0,93
Fluconazol	4 (13,0)	-	-	-	-
Oxacilina	-	0,5 (1,24)	-	-	-
Docetaxel	-	-	0,0002	-	0,0005
Doxorubicina	-	-	-	0,02	-

C. a. = *Candida albicans* ATCC 10213; *S. a.* = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. KB (câncer uterino cervical), MDA-MB-435 (melanoma metastático), MRC-5 (fibroblastos humanos de pulmão); - não avaliado.

6.4.8 Estudo do extrato AcOEt de *Eurotium rubrum* (BBS01)



Figura 86. *Eurotium rubrum* (BBS01) após 15 dias em cultura líquida e seu hospedeiro vegetal *Blepharocalyx salicifolius* (Myrtaceae).

I - Extração e isolamento

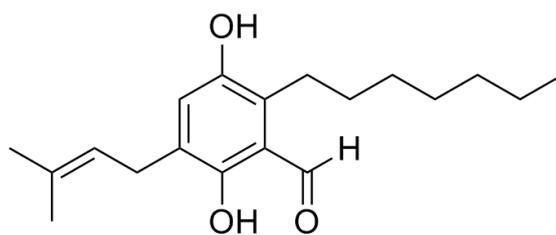
O fungo endofítico codificado como BBS01 (Figura 86) foi identificado como *Eurotium rubrum* através de análise molecular da região de DNAr ITS1. O fungo foi isolado a partir da árvore pertencente ao bioma Cerrado *Blepharocalyx salicifolius* Kunth O. Berg (Myrtaceae) (Figura 86), popularmente chamada de Maria-preta. Espécies do gênero *Eurotium* representam o estado sexuado (teleomorfo) de espécies de fungos do gênero *Aspergillus* (Geiser, 2009). Contrariamente ao gênero *Aspergillus*, apenas algumas espécies do gênero *Eurotium* tiveram seus metabólitos secundários investigados (Smetanina *et al.*, 2007). A cultura em grande escala da cepa foi realizada em 50 erlenmeyers de 1 L contendo 500 mL de caldo estéril de extrato de levedura, extrato de malte e glicose, (YMG). A extração em AcOEt, a filtração e a lavagem das culturas obtidas após 15 dias de crescimento permitiram a obtenção de 3,23 g de extrato bruto (1,61 g.m⁻²).

Os resultados da atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* do extrato bruto AcOEt de BBS01 são apresentados na tabela 3. A partir da triagem preliminar do extrato, foi observada atividade antifúngica com valor CIM de 8 µg.mL⁻¹ em *C. albicans*. O mesmo extrato não demonstrou toxicidade significativa a 10 µg.mL⁻¹ para as linhagens celulares KB, MDA-MB-435 e MRC-5.

O fracionamento do extrato em AcOEt (1200 mg) de *Eurotium rubrum* BBS01 permitiu a seleção da fração ativa F3. O fracionamento em CLAE da fração 3 (Figura 65) permitiu o isolamento da flavoglaucina (**44**) (32,8 mg) (Figura 87).

II – Elucidação estrutural da substância isolada

Os dados espectroscópicos obtidos em RMN 500 MHz para a substância isolada solubilizada em CD₃OD₃ permitiram a identificação da flavoglaucina (**44**) (Figura 87), que se apresentava na forma de um sólido amarelado, e sua estrutura molecular correspondia com a descrita previamente por Li *et al.* (2008). A massa da flavoglaucina (**44**) foi analisada por HR-ESI-MS (negativo) *m/z*: 303.1967 [M-H]⁻; calculado para [C₁₉H₂₇O₃]⁻: 303,1992.



Flavoglaucina (**44**)

Figura 87. Substância isolada de *Eurotium rubrum* (BBS01).

III – Atividade biológica da substância isolada

A substância identificada como flavoglaucina (**44**) demonstrou atividade em *C. albicans* ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$, tabela 12), valor similar ao do controle positivo Fluconazol (CIM de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$) e não demonstrou citotoxicidade para as linhagens celulares KB, MDA-MB-435 e MRC-5.

Tabela 12.

Atividade antimicrobiana (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}/\mu\text{M}$) e citotóxica ($\text{IC}_{50} \mu\text{M}$) da substâncias isolada de BBS01, comparadas às substâncias controles

Substâncias	<i>C. a.</i> $\mu\text{g mL}^{-1}$ (μM)	<i>S. a.</i> $\mu\text{g mL}^{-1}$ (μM)	KB $\text{IC}_{50} \mu\text{M}$	MDA-MB-435 $\text{IC}_{50} \mu\text{M}$	MRC-5 $\text{IC}_{50} \mu\text{M}$
Flavoglaucina (44)	4 (13,1)	> 128	>10	>10	>10
Fluconazol	4 (13,0)	-	-	-	-
Oxacilina	-	0,5 (1,24)	-	-	-
Docetaxel	-	-	0,0002	-	0,0005
Doxorubicina	-	-	-	0,02	-

C. a. = *Candida albicans* ATCC 10213; *S. a.* = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. KB (câncer uterino cervical), MDA-MB-435 (melanoma metatástico), MRC-5 (fibroblastos humanos de pulmão); - não avaliado.

A flavoglaucina (**44**) é uma substância identificadas regularmente em culturas de fungos do gênero *Eurotium* ou *Aspergillus* (Gomes *et al.*, 2012). Uma atividade de inibição da promoção de tumores de pele de camundongos foi demonstrada para a flavoglaucina (Miyake *et al.*, 2010), no entanto, a atividade antifúngica ainda não havia sido descrita. Li *et al.* (2008) isolaram uma série de alcaloides dioxopiperazínicos e derivados prenílicos do benzaldeído (como a flavoglaucina) de culturas sólidas de *E. rubrum*, isolado de uma planta de mangue *Hibiscus tiliaceus* (Malvaceae). Kanokmedhakul *et al.* (2011) isolaram os monoterpênicos citotóxicos chevalonas A–D, aszonapirona A, aszonapirona B e o alcaloide terpênico eurochevalierina a partir de culturas de *Eurotium chevalieri*.

7 Conclusão e perspectivas

Este trabalho de tese teve como objetivo a descoberta de substâncias antimicrobianas e citotóxicas provenientes de fungos endofíticos foliares associados a plantas do bioma Cerrado e Amazônia. Para a realização deste estudo foi proposto a coleta, cultivo e identificação de micro-organismos endofíticos provenientes de plantas de nichos ecológicos húmidos e sombreados para a posterior produção de extratos brutos endofíticos de cada isolado obtido. Os extratos brutos produzidos foram testados em micróbios patogênicos humanos e também em linhagens celulares cancerígenas. Os extratos considerados mais ativos sobre algum dos modelos testados foram fracionados e as substâncias obtidas identificadas através de técnicas espectrométricas.

Foram isolados 147 micro-organismos cultiváveis (130 fungos, 3 bactérias e 14 fungos não-identificados ou desconhecidos) a partir de 28 plantas (4 espécies coletadas no Brasil e 24 na Guiana Francesa). Foi possível isolar ao menos um fungo cultivável nas folhas de todas as espécies amostradas, sendo que a espécie vegetal encontrada com o maior número de isolados, 22 fungos endofíticos, foi a árvore invasiva *Vismia latifolia* (Hypericaceae). Todos os micro-organismos foram identificados através de análise molecular de regiões específicas de DNAr através de técnicas de sequenciamento genômico. Fungos endofíticos da ordem Xylariales foram os de maior frequência de isolamento neste estudo, representados por 25 isolados.

A partir da triagem dos extratos brutos em AcOEt produzidos observou-se que uma proporção relativa significativa (23,1%) dos extratos demonstrou atividade em *C. albicans* ATCC 10213, enquanto 4% foram ativos em *S. aureus* ATCC 29213. O potencial citotóxico *in vitro* dos extratos foi também avaliado para as linhagens celulares humanas KB (carcinoma cervical uterino), MDA-MB-435 (melanoma), e MRC-5 (fibroblastos de pulmão normal) e uma proporção significativa destes demonstraram atividade de inibição da proliferação celular (24,4%, 23,1% e 16,3%, respectivamente). Alguns dos extratos endofíticos considerados ativos em *C. albicans* (*Glomerella cingulata* GTC2003, SNB-GTC2101 (desconhecido), *Pestalotiopsis* sp. SNB-GTC2102, *Chaetomium globosum* SNB-GTC2114, *Diaporthe phaseolorum* SNB-GTC2201, *Phomopsis* sp. SNB-GTC2503, *Colletotrichum boninense* SNB-GTC2605, *Colletotrichum* sp. SNB-GTC2706, *Hypoxylon investiens* SNB-GTC2710, *Penicillium* sp. SNB-GVL02) não apresentaram citotoxicidade em MRC-5, demonstrando

seletividade na atividade antimicrobiana. Estes extratos são considerados promissores para investigações de substâncias ativas.

Oito extratos brutos endofíticos foram selecionados para o fracionamento químico devido às atividades encontradas durante a triagem biológica preliminar. Dezoito metabólitos secundários foram isolados. Dezesete destas substâncias já tinham sido descritas anteriormente na literatura: ácido pilifórmico (24) e griseofulvina (25) isoladas de *X. cubensis* SNB-GCI02; phomopirona A (26), pyrenocina A (27), alterperilenol (28) e novae-zelandina A (29) isoladas de *L. infectoria* SNB-GTC2402; 5-metilmelleina (31) e Dihidrosporothriolida (32) isoladas de *Xylaria* sp. SNB-GTC2501; mycoleptodiscina A (34) e mycoleptodiscina B (35) isoladas de *Mycoleptodiscus* sp. SNB-GTC2304; mycoepoxidieno (36) e altiloxina A (37) isoladas de *D. pseudomangiferae* SNB-GSS10; acremonisol A (40), semicochliodinol A (41) e cochliodinol (42) isoladas de *C. globosum* SNB-GTC2114; colletofragarona A2 (43) isolada de *Colletotrichum* sp. SNB-GTC0201; flavoglaucina (44) isolada de *E. rubrum* BBS01. Dentre estas substâncias, cochliodinol (42) isolado de *C. globosum* SNB-GTC2114 demonstrou atividade em *S. aureus* (CIM de 4 µg mL⁻¹); e em *C. albicans* (CIM de 2 µg mL⁻¹) esta foi maior que para o controle Fluconazol (CIM de 4 µg.mL⁻¹); no entanto sua alta toxicidade em células normais MRC-5 (IC₅₀ de 0,76 µM) demonstra a não seletividade na ação antimicrobiana da substância. A flavoglaucina (44) isolada de *E. rubrum* BBS01, demonstrou atividade comparável ao controle fluconazol em *C. albicans* (CIM de 4 µg mL⁻¹). Esta substância (44) apresentou IC₅₀ >10 µM em células normais MRC-5, tornando-se candidata para estudos posteriores. Neste trabalho foi identificado pela primeira vez a atividade citotóxica da colletofragarona A2 (43), isolada de *Colletotrichum* sp. SNB-GTC0201, substância que provavelmente contribui no arsenal de defesas químicas do mesmo endófito.

A substância inédita nomeada pyrrocidina C (30) foi isolada a partir de *L. infectoria* SNB-GTC2402 e identificada através de análises espectroscópicas (Casella *et al.*, 2013). A pyrrocidina C (30) foi ativa em *S. aureus* ATCC 10213 (CIM de 2 µg.mL⁻¹), e não foi considerada citotóxica para as células normais MRC-5 (IC₅₀ >10 µM), demonstrando seletividade na ação antimicrobiana. A pyrrocidina C (30) pertence a uma classe de alcaloides, como as hirsutelonas e as pyrrocidinas A e B, que apresentam propriedades antibióticas marcantes apenas sobre bactérias Gram-positivas. Estudos posteriores para investigação do mecanismo de ação desta substância, assim como uma investigação aprofundada do espectro de ação da mesma devem ser realizados.

É sugerido a partir deste trabalho que micro-organismos endofíticos foliares de plantas amazônicas sintetizam substâncias antimicrobianas e/ou citotóxicas. A investigação completa do potencial farmacológico e/ou biotecnológico dos extratos obtidos neste trabalho é promissora visto que muitos destes não demonstraram citotoxicidade *in vitro*. A possibilidade de novas espécies de fungos terem sido isoladas neste estudo evidencia a biodiversidade única associada à algumas das plantas selecionadas, a possibilidade da descoberta de novas substâncias e/ou rotas biossintéticas nestes endófitos deve ser investigada.

Em conclusão, o conjunto de resultados reunidos nesta tese evidencia a grande diversidade endofítica que pode ser obtida a partir de plantas do bioma Amazônia e Cerrado utilizando uma metodologia de seleção das espécies vegetais a partir do nicho ecológico da planta. A quimiodiversidade observada nos metabólitos secundários provenientes dos endófitos deste trabalho representa um estímulo ao estudo de substâncias naturais bioativas visto o caráter de complexidade e de novidade de algumas das substâncias identificadas, como a Pyrrocidina C e/ou as mycoleptodiscinas A e B. Fungos endofíticos tropicais, como os vistos neste trabalho, podem emergir como uma nova fonte de substâncias antimicrobianas e citotóxicas.

8 Bibliografia

- ABDOU R, SCHERLACH K, DAHSE H, SATTLER I, HERTWECK C (2010) Botryorhodines A–D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*. *Phytochemistry*, v.71, p. 110-116.
- ABREU LM, COSTA SS, PFENNING LH, TAKAHASHI JA, LARSEN TO, ANDERSEN B (2012) Chemical and molecular characterization of *Phomopsis* and Cytospora-like endophytes from different host plants in Brazil. *Fungal Biology*, v. 116: 2, p. 249-260.
- AMARAL LS, RODRIGUES MM, DE SOUZA AQL, SARQUIS MIM (2008) A saponin tolerant and glycoside producer xylariaceous fungus isolated from fruits of *Sapindus saponaria*. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, v. 24, p. 1341-1348.
- AMNA T, PURI SC, VERMA V, SHARMA JP, KHAJURIA RK, MUSARRAT J, SPITELLER M, QAZI GN (2006) Bioreactor studies on the endophytic fungus *Entrophospora infrequens* for the production of an anticancer alkaloid camptothecin. *Canadian Journal of Microbiology* v. 52, p. 189-196.
- ARNOLD AE, MEJÍA LC, KYLLO D, ROJAS EI, MAYNARD Z, ROBBINS N, HERRE EA (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100: 26, p. 15649-15654.
- ARNOLD AE (2007) Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* v. 21, p. 51-66.
- ARO N, PAKULA T, PENTTILA M (2005) Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* v. 29, p. 719-739.
- ASAHINA A, TADA Y, NAKAMURA K, TAMAKI K (2001) Colchicine and griseofulvin inhibit VCAM-1 expression on human vascular endothelial cells-evidence for the association of VCAM-1 expression with microtubules. *Journal of Dermatology Science* v. 26, p. 1-9.
- BAARLEN PV, BELKUM AV, SUMMERBELL RC, CROUS PW, THOMMA BP (2007) Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiology Reviews*, v. 31, p. 239-277.
- BAILEY BA, BAE H, STREM MD, ROBERTS DP, THOMAS SE, CROZIER J, SAMUELS GJ, CHOI I-Y, HOLMES KA (2006) Fungal and plant gene expression

during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* v. 224, p. 1449-1464.

BACKMAN PA, SIKORA RA (2008) Endophytes: An emerging tool for biological control *Biological Control* v. 46, p. 1-3.

BACON CW, WHITE JF (2000) Microbial endophytes. *Marcel Dekker Inc.*, New York, N.Y.

BECKER K, HUA Y, BILLER-ANDORNO N (2006) Infectious diseases – A global challenge. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 296, p. 179-85.

BERG G (2009) Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 84, p. 11-18.

BOK JW, HOFFMEISTER D, MAGGIO-HALL LA, MURILLO R, GLASNER JD, KELLER NP (2006) Genomic Mining for *Aspergillus* Natural Products. *Chemistry e Biology*, v. 13, p. 31-37.

BORYSOWSKI J, GÓRSKI G (2008) Is phage therapy acceptable in the immunocompromised host? *International Journal of Infection Diseases*, v. 12, p. 466-471.

BREWER D, JERRAM WA, MEILER D, TAYLOR A (1970) The toxicity of cochliodinol, an antibiotic metabolite of *Chaetomium* spp. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 16, p. 433-440.

BRUNSFELD GRJ, NEWCOMBE SJ (2004) A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. *Proceedures of National Academy os Sciences USA*, v. 6 :101, p. 10107-10112.

BUTLER MS (2008) Natural products to drugs: Natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural Products Reports* v. 25, p. 475-516.

BUTLER MS, BUSS AD (2006) Natural products – the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemistry Pharmacology*, v. 71, p. 919-929.

CAFÊU M C, SILVA GH, TELES HL, BOLZANI VS, ARAÚJO AR, YOUNG MCM, PFENNING LH (2005) Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Química Nova*, v. 28, p. 991-995.

CAI P, MCPHAIL AT, KRAINER E, KATZ B, PEARCE C, BOROS C, CACERES B, SMITH D, HOUCK DR (1999) Mycoepoxydiene represents a novel class of fungal metabolites. *Tetrahedron Letters*, v. 40: 8, p. 1479-1482.

- CARROL G (1988) Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology*, v. 69, p. 2-9.
- CASELLA TM, EPARVIER V, MANDAVID H, BENDELAC A, ODONNE G, DAYAN L, DUPLAIS C, ESPINDOLA LS, STIEN D (2013) Antimicrobial and cytotoxic secondary metabolites from tropical leaf endophytes: Isolation of antibacterial agent pyrrocidine C from *Lewia infectoria* SNB-GTC2402. *Phytochemistry*, v. 96, p. 370-377.
- CASSADY JM, CHAN KK, FLOSS HG, LEISTNER E (2004). Recent developments in the maytansinoid antitumor agents. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo) v. 52, p. 1-26.
- CERDA-OLMEDO, E (1994) The genetics of chemical diversity. *Critical Reviews in Microbiology* v. 20, p. 151-160.
- CHIN Y-W, BALUNAS MJ, CHAI HB, KINGHORN AD (2006) Drug discovery from natural sources. *The AAPS Journal* v. 8, p. 239-253.
- CHINWORRUNGSEE M, WIYAKRUTTA S, SRIUBOLMAS N, CHUAILUA P, SUKSAMRARN A (2008) Cytotoxic activities of trichothecenes isolated from an endophytic fungus belonging to order hypocreales. *Archives in Pharmacology Research*, v. 31, p. 611-616.
- CHOOI YH, CACHO R, TANG Y (2010) Identification of the viridicatumtoxin and Griseofulvin gene clusters from *Penicillium aethiopicum*. *Chemistry and Biology*, v. 17, p. 483-494.
- CHRISTENSEN KB, VAN KLINK JW, WEAVERS RT, LARSEN TO, ANDERSEN B, PHIPPS RK (2005) Novel chemotaxonomic markers of the *Alternaria infectoria* species-group. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* v.53, p. 9431-9435.
- CLARDY J, WALSH C. Lessons from natural molecules. *Nature*, v. 432, p. 829-837, 2004.
- CLAY K, HOLAH J (1999) Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science* v. 285, p. 1742-1745.
- CLAY K, SCHARDL CL (2002) Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist* v. 160, p. 99-127.
- COMPANT S, VAN DER HEIJDEN MGA, SESSITSCH A (2010) Climate change effects on beneficial plant microorganism Interactions. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 73, p. 197-214.

- COS P, VLIETINCK AJ, BERGHE DV, MAES L (2006) Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology* v. 106, p. 290-302.
- CRAGG GM, NEWMAN DJ (2000) Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Expert Opinion on Investigational Drugs* v. 9, p. 1-15.
- CUNDLIFFE E, DEMAIN AL (2010) Avoidance of suicide in antibiotic-producing microbes. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* v. 37, p. 643-672.
- DAVITT AJ, STANSBERRY M, RUDGERS JA (2010) Do the costs and benefits of fungal endophyte symbiosis vary with light availability? *New Phytologist* 188: 824–834
- DAVITT AJ, CHEN C, RUDGERS JA (2011) Understanding context-dependency in plant–microbe symbiosis: The influence of abiotic and biotic contexts on host fitness and the rate of symbiont transmission. *Environmental and Experimental Botany*, v. 71, p. 137-145.
- DEBBAB A, HASSAN AA, EDRADA-EBEL RA, MÜLLER WEG, MOSADDAK M, HAKIKI A, EBEL R, PROKSCH P (2009) Bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus *Chaetomium* sp. isolated from *Salvia officinalis* growing in Morocco. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environmental*, v. 13, p. 229-234.
- DENG BW, LIU KH, CHENG WQ (2009) *Fusarium solani*, Tax-3, a new endophytic taxol-producing fungus from *Taxus chinensis*. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, v. 25, p. 139-143.
- DOIDY J, GRACE E, KUHN C, SIMON-PLAS F, CASIERI L, WIPF D (2012) Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends in Plant Science* v. 381: 9864, p. 413-418.
- DYE C, MERTENS T, HIRNSCHALL G, MPANJU-SHUMBUSHO W, NEWMAN RD, RAVIGLIONE MC, SAVIOLI L, NAKATANI H (2013) WHO and the future of disease control programmes. *The Lancet* v. 1381, p. 413-418.
- EATON CJ, COXA MP, SCOTTA B (2011) What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? *Plant Science*, v. 180, p. 190-195.
- ESCALANTE A, GATTUSO M, PÉREZ P, ZACCHINO S (2008) Evidence for the Mechanism of Action of the Antifungal Phytolaccoside B Isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *Journal of Natural Products*, v. 71 p. 1720-1725.

- FAETH SH, SAARI S (2012) Fungal grass endophytes and arthropod communities: lessons from plant defence theory and multitrophic interactions. *Fungal ecology*, v. 5, p. 364-371.
- FERLAY J, PARKIN DM, STELIAROVA-FOUCHER E (2010) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European Journal of Cancer*, v. 46: 4, p. 765-781.
- FLEMING A (1945) Penicillin. *Nobel Lecture*, December 11.
- FOX EM, HOWLETT BJ (2008) Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology* v. 11, p. 481-487.
- FREDENHAGEN A, PETERSEN F, TINTELNOT-BLOMLEY M, RÖSEL J, METT H, HUG P, (1997) Semicochliodinol A and B: inhibitors of HIV-1 protease and EGF-R protein tyrosine kinase related to asterriquinones produced by the fungus *Chrysosporium merdarium*. *Journal of Antibiotics*, v. 50: 5, p. 395-401.
- FRISVAD JC, ANDERSEN B, THRANE U (2008) The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological Research*, v. 112, p. 231-240.
- FRÖHLICH J, HYDE KD, PETRINI O (2000) Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* v. 104, p. 1202-1212.
- GARCÍA-PAJÓN CM, COLLADO IG (2003) Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. *Natural Product Reports* v. 20:4, p. 426-431.
- GE HM, YU ZG, ZHANG J, WU JH, TAN RX (2009) Bioactive Alkaloids from endophytic *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Natural Products*, v. 72, p. 753-755.
- GEISER DM (2009) Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Medical Mycology*, v. 47: 1, p. 21-26.
- GOMES NM, SINGBURAUDOM N, GALES L, SILVA AMS, KIJOA A (2012) Eurocristatine, a new diketopiperazine dimer from the marine sponge-associated fungus *Eurotium cristatum*. *Phytochemistry Letters*, v. 5: 4, p. 71.
- GÖRE ME, BUCAK C (2007) Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Laurus nobilis*. *Forest Pathology*, v. 37, p. 281-288.
- GUIMARÃES DO, BORGES WS, KAWANO CY, RIBEIRO PH, GOLDMAN GH, NOMIZO A, THIEMANN OH, OLIVA G, LOPES NP, PUPO MT (2008) Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *FEMS Immunology e Medical Microbiology*, v. 52, p. 134-144.

GUIMARÃES DO, BORGES WS, VIEIRA NJ, DE OLIVEIRA LF, DA SILVA CHTP, LOPES NP, DIAS LG, DURÁN-PATRÓN R, COLLADO IG, PUPO MT (2010) Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species. *Phytochemistry*, v. 71:12, p. 1423-1429.

GURULINGAPPA P, SWORD GA, MURDOCH G, MCGEE PA (2010) Colonization of crop plants by fungal entomopathogens and their effects on two insect pests when in planta. *Biological Control*, v. 55, p. 34-41.

HARRER G, SOMMER H (1994) Treatment of mild/moderate depressions with *Hypericum*. *Phytomedicine*, v. 1: 1, p. 3-8.

HASA D, PERISSUTTI B, DALL'ACQUA S, CHIEROTTI MR, GOBETTO R, GRABNAR I, CEPEK C, VOINOVICH D(2013) Rationale of using *Vinca minor* Linne dry extract phytocomplex as a vincamine's oral bioavailability enhancer. *European Journal of Pharmacology and Biopharmaceuticals* v.84:1, p. 138-44.

HORMAZABAL E, PIONTELLI E (2009) Endophytic fungi from Chilean native gymnosperms: antimicrobial activity against human and phytopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology Biotechnology* v. 25, p. 813-819.

HOSOE T, ITABASHI T, KOBAYASHI N, UDAGAWA S, KAWAI K (2006) Three new types of indoloditerpenes, emindole PA-PC, from *Emericella purpurea*. Revision of the structure of emindole PA. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo), v. 54, p. 185-187.

HUANG Z, GUO Z, YANG R, YIN X, LI X, LUO W, SHE Z, LIN Y (2009) Chemistry and cytotoxic activities of polyketides produced by the mangrove endophytic fungus *Phomopsis* SP. ZSU-H76. *Chemistry in Natural Compounds*, v. 45, p. 625-628.

HAWKSWORTH DL, KIRK PM, SUTTON BC, PEGLER DN (1995) Ainsworth e Bisby's Dictionary of the Fungi, eighth ed. CAB International, Wallingford, USA.

HAWKSWORTH DC, ROSSMAN AY (1987) Where are the undescribed fungi? *Phytopathology*, v. 87, p. 888-891.

HE H, YANG HY, BIGELIS R, ERIC H, GREENSTEIN SM, CARTER GT (2002) Pyrrocidines A and B, new antibiotics produced by a filamentous fungus. *Tetrahedron Letters* v. 43, p. 1633-1636.

HERRMANN KM (1995) The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiology*, v. 107, p. 7-12.

HIBBETT DS, BINDERA M, BISCHOFFB JF, *et al.* (2007) A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*. *Mycological Research*, v. 111, p. 509-547.

HIGGINS KL, ARNOLD AE, MIADLIKOWSKA J, SARVATE SD, LUTZONI F (2007) Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 42: 2, p. 543-555.

HUANG H, SHE Z, LIN Y, VRIJMOED LLP, LIN W (2007) Cyclic Peptides from an Endophytic Fungus Obtained from a Mangrove Leaf (*Kandelia candel*). *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 1696-1699.

HUTCHINSON CR, FUJII I (1995) Polyketide synthase gene manipulation: a structurefunction approach in engineering novel antibiotics. *Annual Reviews Microbiology*, v. 49, p. 201-238.

ICHIHARA A, MURAKAMI K, SAKAMURA S (1987) Synthesis of pyrenocines A, B and pyrenochaetic acid A. *Tetrahedron* v. 43, p. 5245-5250.

ICHIHARA A, SAWAMURA S, SAKAMURA S (1984) Structures of Altiloxins A and B, phytotoxins from *Phoma asparagi* Sacc. *Tetrahedron Letters* v. 25: 30, p. 3209-3212.

IMLACH WL , FINCH SC , ZHANG Y , DUNLOP J, DALZIEL JE (2011) Mechanism of action of lolitrem B, a fungal endophyte derived toxin that inhibits BK large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Toxicon*, v. 57, p. 686-694.

INOUE M; TAKENAKA H; TSURUSHIMA T; MIYAGAWA H; UENO T (1996) Colletofragarones A1 and A2, novel germination self-inhibitors from the fungus *Colletotrichum fragariae*. *Tetrahedron Letters* v. 37:32, p. 5731-5734.

ISAKA M, CHINTHANOM P, BOONRUANGPRAPA T, RUNGJINDAMAI N, PINRUAN U (2010) Eremophilane-Type Sesquiterpenes from the Fungus *Xylaria* sp. BCC 21097. *Journal of Natural Products* v. 73, p. 683-687.

ISAKA M, RUGSEREE N, MAITHIP P, KONGSAEREE P, PRABPAI S, THEBTARANONTH Y (2005) Hirsutellones A–E, antimycobacterial alkaloids from the insect pathogenic fungus *Hirsutella nivea* BCC 2594. *Tetrahedron* v. 61, p. 5577–5583.

ITO T, ODAKE T, KATOH H, YAMAGUCHI Y, AOKI M (2011) High-Throughput Profiling of Microbial Extracts. *Journal of Natural Products*, v. 74, p. 983-988.

IVANOV S, FEDOROVA E, BISSELING T (2010) Intracellular plant microbe associations: secretory pathways and the formation of perimicrobial compartments *Current Opinion in Plant Biology*, v. 13, p. 372-377.

JABER L, VIDAL S (2010) Fungal endophyte negative effects on herbivory are enhanced on intact plants and maintained in a subsequent generation. *Ecological Entomology*, v. 35, p. 25-36.

JIAO RH, XU S, LIU JY, GE HM, DING H, XU C, ZHU HL, TAN RX (2006) Chaetominine, a cytotoxic alkaloid produced by endophytic *Chaetomium* sp. IFB-E015. *Organic Letters*, v. 8, p. 5709-5712.

JONES KE, PATEL NG, LEVY MA, STOREYGARD A, BALK D, GITTLEMAN JL, DASZAK P (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* v. 451, p. 990-993.

KANOKMEDHAKUL K, KANOKMEDHAKUL S, SUWANNATRAI R, SOYTONG K, PRABPAI S, KONGSAEREE P (2011). Bioactive meroterpenoids and alkaloids from the fungus *Eurotium chevalieri*. *Tetrahedron*, v. 67, p. 5461-5468.

KELLER N (2011) The fungal treasure chest: Spore origins? *Fungal Biology Reviews* v. 25, p. 73-77.

KEMPKEN F, ROHLFS M (2010) Fungal secondary metabolite biosynthesis—achemical defence strategy against antagonistic animals? *Fungal ecology*, v. 3, p. 107-114.

KHARWAR RN, MISHRA A, GOND SK, STIERLE A, STIERLE D (2011) Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Natural Products Reports*, v. 28:7, p. 1208-1228.

KHARWAR RN, VERMA VC, KUMAR A (2009) Javanicin, an antibacterial naphthoquinone from an endophytic fungus of neem, *Chloridium* sp. *Current Microbiology*, v. 58, p. 233-238.

KINGSLAND SR, BARROW RA (2009) Identification of chaetoviridin E from a cultured microfungus, *Chaetomium* sp. and structural reassignment of chaetoviridins B and D. *Australian Journal of Chemistry*, v. 62, p. 269-274.

KOGEL K, FRANKEN P, CKELHOVEN RH (2006) Endophyte or parasite ? what decides. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 9, p. 358-363.

KRINGS M, TAYLOR TN, HASS H, KERP H, DOTZLER N, HERMSEN EJ (2007) Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytologist*, v. 174, p. 648-657.

KROHN K, SOHRAB H, AUST H, DRAEGER S, SCHULZ B (2004) Biologically active metabolites from Fungi, 19: New isocoumarins and highly substituted benzoic acids from the endophytic fungus, *Scytalidium* SP. *Natural Products Research*, v. 18, p. 277-285.

Perspective

- KUSARI S, HERTWECK C, SPITELLER M (2012) Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry e Biology*, v. 19, p.798-792.
- KUSARI S, KOSUTH J, CELLAROVA E, SPITELLER M (2011) Survival-strategies of endophytic *Fusarium solani* against indigenous camptothecin biosynthesis. *Fungal ecology*, v. 4, p. 219- 223.
- KUSARI S, LAMSHÖFT M, ZÜHLKE S, SPITELLER M (2008) An Endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that Produces Hypericin. *Journal of natural products*, v. 71:2, p. 275-280.
- LARSEN TO, SMEDSGAARD J, NIELSEN KF, HANSEN ME, FRISVAD JC (2005) Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural Products Reports*, v. 22, p. 672-695.
- LEE JS, KO KS, JUNG HS (2000) Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 sequences. *FEMS Microbiology Letters* v. 187, p. 89-93.
- LEEDER AC, PALMA-GUERRERO J, GLASS NL (2001) The social network: deciphering fungal language. *Nature Reviews*, v. 9, p. 440-451.
- LI DL, LI XM, LI TG, DANG HY, PROKSCH P, WANG BG (2008) Benzaldehyde derivatives from *Eurotium. rubrum*, an endophytic fungus derived from the mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 56, p. 1282-1285.
- LI HQ, LI XJ, WANG YL, ZHANG Q, ZHANG AL, GAO JM, ZHANG XC (2011) Antifungal metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus in *Ginkgo biloba*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 39: 4, p. 876-879.
- LI S (2009) Evolution of aromatic prenyltransferases in the biosynthesis of indole derivatives. *Phytochemistry*, v. 70, p. 1746-1757.
- LI T, LIU M J, ZHANG X T, ZHANG H B, SHA T, ZHAO ZW (2011) Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. *Science of the Total Environment*, v. 409, p. 1069-1074.
- LIN X, HUANG Y, FANG M, WANG J, ZHENG Z, SU W (2005) Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe* sp. *FEMS Microbiology Letters*, v. 251: 1, p. 53-58.
- LIU X, DONG M, CHEN X, JIANG M, XIN L V, ZHOU J (2008) Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp.YX-28 and identification of its antimicrobial

compound 7-amino-4-methylcoumarin. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 78, p. 241-247.

LIU X, SCHWAN RW, VOLK TJ, *et al.* (2012) Antibacterial Spirobisnaphthalenes from the North American Cup Fungus *Urnula craterium*. *Journal of Natural Products*, v. 75: 9, p. 1534-1538.

MARTINEZ-LUIS M, DELLA-TOGNA G, COLEY PD, KURSAR TA, GERWICK WH, CUBILLA-RIOS L (2008) Antileishmanial Constituents of the Panamanian Endophytic Fungus *Edenia* sp. *Journal of Natural Products* v. 71, p. 2011-2014.

MASHEGO MR, RUMBOLD K, DE MEY M, VANDAMME E, SOETAERT W, HEIJNEN JJ (2007) Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnology Letters* v. 29, p. 1-16.

MATSUMOTO T, OKABE T, FUKUI K (1973) Pyrrolizidine alkaloids. The absolute configurations of latifolic acid and its stereoisomers. *Chemical Letters*, v. 8, p. 773-776

MEJIA L C, ROJAS E I, MAYNARD Z, VAN BAELE S, ARNOLD AE, HEBBAR P, SAMUELS GJ, ROBBINS N, HERRE EA (2008) Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, v. 46, p. 4-14.

MIYAKE Y, ITO C, TOKUDA H, OSAWA T, ITOIGAWA M (2010) Evaluation of flavoglucan, its derivatives and pyranonigrins produced by molds used in fermented foods for inhibiting tumor promotion. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 74: 5, p. 1120-1122.

MOLINA R, HORTON TR, TRAPPE JM, MARCOT BG (2011) Addressing uncertainty: How to conserve and manage rare or little-known fungi. *Fungal ecology*, v. 4, p. 134-146.

MONROE EW, MANSUKH CW (1996) Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, p. 239-254.

NEWMAN D J, CRAGG G M (2007) Natural products as source of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 461-77.

MUCCIARELLI M, CAMUSSO W, MAFFEI M, PANICCO P, BICCHI C (2007) Volatile terpenoids of endophyte-free and infected peppermint (*Mentha piperita* L.): chemical partitioning of a symbiosis. *Microbial Ecology*, v. 54, p. 685–696.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEBEL G, DRAGSTED J, VANCLAY JK (2001) Structure and floristic composition of flood plain forests in the Peruvian Amazon: II. The understory of restinga forests. *Forest Ecology Management* v. 150: 1-2, p. 59-77.

NEWMAN DJ, CRAGG GM, SNADER KM (2003) Natural Products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 1022-1037.

NEWTON AC, FITT BDL, ATKINS SD, WALTERS DR, DANIELL TJ (2010) Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends in Microbiology*, v. 18, p. 365-373.

NICOLAOU KC, SARLAH D, WU TR, ZHAN W (2009) Total Synthesis of Hirsutellone B. *Angew Chem Int Ed Engl.*, v. 48: 37, p. 6870-6874.

NIELSEN KF, MOGENSEN JM, JOHANSEN M, LARSEN TO, FRISVAD JC (2009) Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Anal of Bioanalytical Chemistry*, v. 395, p. 1225-1242.

OKUNO T, NATSUME I, SAWAI K, SAWAMURA K, FURUSAKI A, MATSUMOTO T (1983) Structure of antifungal and phytotoxic pigments produced by *Alternaria* sps. *Tetrahedron Letters* v. 24, p. 5653-5656.

OKUNO T, OIKAWA S, GOTO T, SAWAI K, SHIRAHAMA H, MATSUMOTO T (1986) Structures and Phytotoxicity of Metabolites from *Valsa ceratosperma*. *Agriculture, Biology and Chemistry* v. 50: 4, p. 997-1001.

OLANO C, MENDEZ C, SALAS JA (2009) Antitumor compounds from actinomycetes: from gene clusters to new derivatives by combinatorial biosynthesis. *Natural Products Reports*, v. 26, p. 628-660.

OMACINI M, CHANETON EJ, GHERSA CM, MÜLLER CB (2001) Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature* v. 409, p. 78-81.

O'NEILL LD (2009) Continued misrepresentation of KB cells as being of oral cancer phenotype requires action. *Oral oncology*, v. 45:10, p. 117-118.

ORTEGA HE, GRAUPNER PR, ASAI Y, DYKE KT, QIU D, SHEN YY, RIOS N, ARNOLD EA, COLEY PD, KURSAR TA, GERWICK WH, CUBILLA-RIOS L

- (2013) Mycoleptodiscins A and B, cytotoxic alkaloids from the endophytic fungus *Mycoleptodiscus* sp. F0194 *Journal of Natural Products* v. 76:4, p. 741-744.
- OSONO T, TO-ANUN C, HAGIWARA Y, HIROSE D (2011) Decomposition of wood, petiole and leaf litter by *Xylaria* species from northern Thailand. *Fungal ecology* v. 4: 3, p. 210-218.
- PALMER JM, KELLER NP (2010) Current Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Opinion in Microbiology*, v. 13, p. 431-436.
- PARRENT JL, JAMES TY, VASAITIS R, TAYLOR AFS (2009) Friend or foe? Evolutionary history of glycoside hydrolase family 32 genes encoding for sucrolytic activity in fungi and its implications for plant-fungal symbioses. *BMC Evolutionary Biology*, v. 9, p. 148-153.
- PAVLO A, LEONID O, IRYNA Z, NATALIA K, MARIA PA (2011) Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biological Control*, v. 56, p. 43-49.
- PEDRAS MSC, MORALES VM, TAYLOR JN (1994) Phomopyrones: three metabolites from the blackleg fungus. *Phytochemistry* v. 36: 5, p. 1315-1318.
- PELAÉZ F (2005) Biological activities of fungal metabolites. In: An Z (ed), Handbook of Industrial Mycology. Marcel Dekker, New York, p. 49-92.
- PETRINI O (1991) Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews JH, Hirano SS (eds), Microbial Ecology of Leaves. Springer-Verlag, New York, p. 179-197.
- PORNPAAKAKUL S, ROENGSUMRAN S, DEECHANGVIPART S, PETSOM A, MUANGSIN N, NGAMROJNAVANICH N, SRIUBOLMAS N, CHAICHIT N, OHTA T (2007) Diaporthichalasin, a novel CYP3A4 inhibitor from an endophytic *Diaporthe* sp. *Tetrahedron Letters*, v. 48: 4, p. 651-655.
- PONTIUS A, MOHAMED I, KRICK A, KEHRAUS S, KÖNIG GM (2008) Aromatic polyketides from marine algicolous fungi. *Journal of Natural Products*, v. 71, p.272-274.
- PRIEST F (1993) Systematics and ecology of *Bacillus*, p. 3-16. In: *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria, biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society of Microbiology Press, Washington, DC, USA.
- REINHOLD-HUREK B, HUREK M T (2011) Living insideplants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, v.14, p. 1-9.

- RODRIGUEZ RJ, REDMAN RS, HENSON JM (2004) The role of fungal symbioses in the adaptation of high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, v. 9, p. 261-272.
- RODRIGUEZ RJ, WHITE JR JF, ARNOLD AE, REDMAN RS (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, v. 182, p. 314-330.
- ROHLFS M, CHURCHIL ACL (2011) Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genetics and Biology*, v.48, p. 23-34.
- ROSENBLUETH M, MARTÍNEZ-ROMERO E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts molecular. *Plant-microbe Interactions*, v. 19: 8, p. 827-837.
- RUKACHAISIRIKUL V, SOMMART U, PHONGPAICHIT S, SAKAYAROJ J, KIRTIKARA K (2008) Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry*, v. 69: 3, p. 783-787.
- SAIKKONEN K (2007) Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biology Reviews*, v.21, p. 67-74.
- SAMRA Z, OFIRA O, LISHTZINSKY Y, MADAR-SHAPIRO L, BISHARA J (2007) Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 30, p. 525-529.
- SANCHEZ-MARQUEZ S, BILLS GF, HERRERO NI, ZABALGOGEAZCOA (2012) Non-systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal ecology*, v. 5, p. 289-287.
- SAUNDERS M, KOHN LM (2009) Evidence for alteration of fungal endophyte community assembly by host defense compounds. *New Phytologist*, v. 182, p. 229-238.
- SCHULZ B, BOYLE C (2005) The endophytic continuum. *Mycological Research*, v.109, p. 661-686.
- SHIONO Y, KOSUKEGAWA A, KOSEKI T, MURAYAMA T, KWON E, UESUGI S, KIMURA K (2012) A dimeric pyrrolicidone from *Neonectria ramulariae* is an inhibitor of prolyl oligopeptidase. *Phytochemistry Letters*, v. 5, p. 91-95.
- SHWAB EK, KELLER NP (2008) Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological Research*, v. 112, p. 225-230.
- SIEBER TN (2007) Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal biology reviews*, v. 21, p. 75-89.

SILVA FM; DE PAULA JE, ESPINDOLA LS (2009) Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Mycoses* v. 52, p. 511-517.

SILVA GH, DE OLIVEIRA CM, TELES HL, PAULETTI PM, CASTRO-GAMBOA I, SILVA DHS, BOLZANI VS, YOUNG MCM, COSTA-NETO CM, PFENNING L, BERLINCK RGS, ARAUJO AR (2010) Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). *Phytochemistry Letters*, v. 3: 3, p. 164-167.

SMETANINA OF, KALINOVSKII AI, KHUDYAKOVA YV, SLINKINA NN, PIVKIN MV, KUZNETSOVA TA (2007) Metabolites from the marine fungus *Eurotium repens*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 43, p. 395-398.

SMITH S A, TANK DC, BOULANGER L, BASCOM-SLACK CA, EISENMAN K, KINGERY D, BABBS B, FENN K, GREENE JS, HANN BD, KEEHNER J, KELLEY-SWIFT E G, KEMBAIYAN V, LEE S J, LI P, LIGHT DY, CONGMA EH L, MOORE E, SCHORN MA, VEKHTER D, NUNEZ PV, STROBEL GA, DONOGHUE MJ, STROBEL SA (2008) Bioactive Endophytes Warrant Intensified Exploration and Conservation. *Plos one*, v. 3: 8, p. 3052-3055.

STADLER M, SCHULZ B (2009) High energy biofuel from endophytic fungi? *Trends in Plant Science*, v.14: 7, p. 353-355.

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

STIERLE AA, STIERLE DB, BUGNI T (1999) Sequoiatones A and B: novel antitumour metabolites isolated from a redwood endophyte. *Journal of Organic Chemistry* v. 64, p 5479-5484.

STONE JK, BACON CW, WHITE JF (2000) An overview of endophytic microbes: endophytism defined. Ed. CW Bacon and J White Jr, M Dekker, Inc, New York, p. 3-5.

STONE JK, POLISHOOK JD, WHITE JRJ (2004) Endophytic fungi. In: Mueller G Bills GF, Foster MS, eds. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Burlington, MA, USA: Elsevier, p. 241-270.

STOLTZFUS JR RSO, MALARVITHI PP, LADHA JK, DE BRUIJN FJ (1997) Nodulation and nitrogen fixation in rice: potential and prospects. *Plant and Soil*, v. 194, p. 25-33.

STROBEL GA (2003) Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes infections*, v. 5, p. 535- 544.

STROBEL GA, DAISY B (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67: 4, p. 491-502.

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

STROBEL GA, STIERLE A, STIERLE DE, HESS WM (1993) Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Mycotaxon*, v. 47, p. 71-76.

SUMARAH MW, PUNIANI E, SORENSEN D, BLACKWELL BA, MILLER JD (2010) Secondary metabolites from anti-insect extracts of endophytic fungi isolated from *Picea rubens*. *Phytochemistry*, v. 71: 29, p. 760–765.

TEMPETE C, WERNER GH, FAVRE F, ROJAS A, LANGLOIS N (1995) *In vitro* cytostatic activity of 9-demethoxyporothramycin B. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 30, p. 647-650.

TOMSHECK AR, STROBEL GA, BOOTH E, GEARY B, SPAKOWICZ D, KNIGHTON B, FLOERCHINGER C, SEARS J, LIARZI O, EZRA D (2010) *Hypoxylon* sp., an Endophyte of *Persea indica*, Producing 1,8-Cineole and Other Bioactive Volatiles with Fuel Potential. *Microbiology Ecology*, v. 60, p. 903-914.

TORRESA MS, WHITE JR JF, ZHANG X, HINTON DM, BACON CH (2012) Endophyte-mediated adjustments in host morphology and physiology and effects on host fitness traits in grasses. *Fungal Ecology*, v. 5, p. 322-330.

TSITSIGIANNIS DI, KOWIESKI TM, ZARNOWSKI R, KELLER NP (2004) Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryote Cell*, v. 3, p. 1398-1411.

TURBYVILLE TJ, WIJERATNE EM, LIU MX, BURNS AM, SELIGA CJ, LUEVANO LA, DAVID CL, FAETH SH, WHITESELL L, GUNATILAKA AA (2006) Search for Hsp90 inhibitors with potential anticancer activity: isolation and SAR studies of radicicol and monocillin I from two plant-associated fungi of the Sonoran desert. *Journal of Natural Products*, v. 69, p. 178-184.

VOGLMAYR H, MAYER V, MASCHWITZ U, MOOG J, DJIETO-LORDON C, BLATRIXE R (2011) The diversity of ant-associated black yeasts: insights into a newly discovered world of symbiotic interactions. *Fungal Biology* v. 115: 10, p. 1077-91.

WEYENS N, VAN DER LELIE D, TAGHAVI S, VANGRONSVELD J (2009) Phytoremediation: plant–endophyte partnerships take the Challenge. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, p. 248-254.

- WANG X, SENA FILHO JG, HOOVER AR, KING JB, ELLIS TK, POWELL DR, CICHEWICZ RH (2010) Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum*. *Journal of Natural Products*, v. 73: 5, p. 942-948.
- WANG J, ZHAO B, ZHANG W, WU X, WANG R, HUANG Y, CHHEN D, PARK K, WEIMER BC, SHEN Y (2010) Mycoepoxydiene, a fungal polyketide, induces cell cycle arrest at the G2/M phase and apoptosis in HeLa cells. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, v. 20: 23, p. 7054-7058.
- WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds), *Protocols: A Guide to Methods and Applications. PCR Academic Press*, New York, p. 315-322.
- WICKLOW DT, JORDAN AM, GLOER JB (2009) Antifungal metabolites (monorden, monocillins I, II, III) from *Colletotrichum graminicola*, a systemic vascular pathogen of maize. *Mycological Research*, v. 113, p. 1433-1442.
- XIAOLI L, MINGSHENG D, XIAOHONG C, MEI J, XIN L, JIANZHONG Z (2008) Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 78, p. 241-247.
- YANG D, WAN H, WANG X, LIU Z (2007) Use of fungal metabolites to protect wood-based panels against mould infection. *Biological Control*, v. 52, p. 427-436.
- YANG X, KHONG TT, CHEN L, CHOI HD, KANG JS, SON BW (2008) 8'-Hydroxyzearalanone and 2'-hydroxyzearalanol: resorcylic acid lactone derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo), v. 56, p. 1355-1356.
- YANG YE, LI X, TANG C, YAO S (2012) Natural products chemistry research 2010's progress in China. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 10, p. 1-12.
- YIN H, YU-HONGSUN (2011) Vincamine producing endophytic fungus isolated from *Vinca minor*. *Phytomedicine* v. 18: 8-9, p. 802-5.
- YOU F, HAN T, WU J, HUANG B, QIN L (2009) Antifungal secondary metabolites from endophytic *Verticillium* sp. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 37, p. 162-165.
- YU TW, BAI L, CLADE D, HOFFMANN D, TOELZER S, TRINH KQ, XU J, MOSS SJ, LEISTNER E, FLOSS HG (2002) The biosynthetic gene cluster of the

maytansinoid antitumor agent ansamitocin from *Actinosynnema pretiosum*. *Proceedings in National Academic Science, USA* v. 99, p. 7968–7973.

YU H, LI L, ZHENG C J, GUO L, LI W, SUN P, QIN L (2010) Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*, v. 165, p. 437-449.

ZHANG Z, SCHWARTZ S, WAGNER L, MILLER W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computer Biology* v. 7, p. 203-214.

ZHANG Y, LI X, PROKSCH P, WANG B (2007) Ergosterimide, a new natural Diels–Alder adduct of a steroid and maleimide in the fungus *Aspergillus niger*. *Steroids*, v. 72, p. 723-727.

ZHANG D, NAGABHYRU P, SCHARDL CL (2009) Regulation of a chemical defense against herbivory produced by symbiotic fungi in grass plants. *Plant Physiology*, v. 150, p. 1072-1082.

ZHAO Z, WANG Q, WANG K, BRIAN K, LIU CG, GU Y (2010) Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 292-297.