

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

PATRÍCIA LUNARDELLI NEGREIROS DE CARVALHO

**ESTUDO QUÍMICO E DO POTENCIAL BIOLÓGICO
DO PRODUTO DA FERMENTAÇÃO DO FUNGO
ENDOFÍTICO *Gibberella moniliformis***

Alfenas/MG
2016

PATRÍCIA LUNARDELLI NEGREIROS DE CARVALHO

**ESTUDO QUÍMICO E DO POTENCIAL BIOLÓGICO
DO PRODUTO DA FERMENTAÇÃO DO FUNGO
ENDOFÍTICO *Gibberella moniliformis***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal de Alfenas, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Ciências Farmacêuticas.
Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki
Co-orientadora: Profa. Dra. Jaine H.H. Luiz

Alfenas/MG
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Carvalho, Patrícia Lunardelli Negreiros de.
Estudo químico e do potencial biológico do produto da
fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis* / Patrícia
Lunardelli Negreiros de Carvalho. – Alfenas/MG, 2016.
136 f.

Orientador: Masaharu Ikegaki.
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade
Federal de Alfenas, 2016.
Bibliografia.

1. *Gibberella*. 2. Anti-Infeciosos. 3. Sinergismo Farmacológico.
4. Viabilidade Celular. 5. Espectroscopia de Ressonância Magnética.
6. Ácido fusárico. I. Ikegaki, Masaharu. II. Título.

CDD-615.32

PATRÍCIA LUNARDELLI NEGREIROS DE CARVALHO

“Estudo químico e do potencial biológico do produto da fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis*”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovado em: 05/07/16

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Masaharu Ikegaki

Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Instituição: UNICAMP

Assinatura: Pedro Luiz Rosalen

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar
Instituição: USP/ESALQ

Assinatura: Severino Matias de Alencar

Prof. Dr. Profa. Dra. Daniela Aparecida
Chagas de Paula
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Daniela Aparecida Chagas de Paula

Profa. Dra. Marisa Ionta
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Marisa Ionta

Dedico este trabalho com gratidão:

*Aos meus pais, Cláudia e Paulo,
às minhas irmãs, Sarah e Flávia,
ao meu noivo Andre.*

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Masahau Ikegaki, por toda paciência, confiança e apoio, tornando possível o desenvolvimento deste trabalho que me trouxe enorme crescimento científico e pessoal.
- À Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz, que me permitiu enfrentar tantos desafios, e, sem dúvida, me mostrou um mundo da química mais doce. Obrigada pela amizade, oportunidade de amadurecimento e pela sensação de dever cumprido e de conhecimento adquirido.
- Ao Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava e a Dra. Fernanda L. S. Sebastianes por cederem gentilmente o fungo endofítico estudado neste projeto.
- À doutoranda Kris Simone Tranches Dias pelas colaborações com as valiosas análises de RMN na Unifal-MG e ao Prof. Dr. Cláudio Viegas Júnior pela disponibilização de MeOD para uma análise importante;
- Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira e a Luciana Vizotto pelas análises de RMN na UFSCar;
- Ao doutorando Fábio A. Belinelli Silva, pela colaboração na análise de IV no LACFar/Unifal-MG;
- À funcionária Daniela Aparecida de Paulo Pinto, pelos auxílios com vidrarias do Laboratório de Bioprocessos da Unifal-MG;
- A profa. Dra. Marisa Ionta, ao mestrando Guilherme Álvaro F. da Silva e à acadêmica Graciana Yokota Garavelli pelo aprendizado proporcionado durante os ensaios de viabilidade celular realizados no LABInt/Unifal-MG;
- À Dra. Olimpia M.M.S. Viana, pelos ensinamentos e ajuda no monitoramento com o HPLC;
- Ao Prof. Dr. Eduardo Alves, às técnicas Aline norfe e Elisa de Melo Castro e ao pós doc Silvino Intra do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) da UFLA-MG pelos ensinamentos sobre o MEV e colaborações na aquisição das imagens;
- As professoras Dra. Daniela A. Chagas-Paula, Marisa Ionta e Eliane O. Silva pelas importantes contribuições no exame de qualificação geral e específico;
- Ao técnico Gabriel Issac, ao amigo farmacêutico Dr. André Ruela e Dr. Marcelo José, ao pós doc Thiago Belarmino e aos professores da Unifal-MG, Prof. Adriano Mendes, Prof. Mateus F. Leite, Profa. Cássia Avelino, Profa. Dra. Amanda L.T. Dias, Prof. Dr. Marcelo A. da Silva e Prof. Antonio Luengo, por todas as contribuições diretas e indiretas a este trabalho;
- Ao prof. Dr. Fernando R. Pavan do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP, Araraquara-SP, pela colaboração com os ensaios antituberculose;
- Ao Prof. Msc. Juliano G. Amaral do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) da FCFRP/USP por toda ajuda e dedicação nas análises de Massas;
- Às funcionárias e professores do Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Maria Vita dos Reis, Maria Cristina, Profa. Dra. Sandra M.O.M. Veiga, Prof. Mateus Freire Leite, Prof. Dr. Luiz Carlos do Nascimento e Prof. Dr. Sinézio Inácio da Silva Júnior e do Laboratório de Tecnologia de Cosméticos: Odete, Profa. Dra. Helenice A. de Carvalho e Profa. Dra. Flávia Chiva que colaboraram durante esses anos de jornada intensa entre estudo e trabalho;
- À Universidade Federal de Alfenas, por toda estrutura disponibilizada nos laboratórios;
- À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo apoio necessário para a realização desta pesquisa;
- Ao PROQUALITAE, pelo auxílio institucional no ano de 2014.

- À Deus e Nossa Senhora por todas as bênçãos.
- À minha mãe, por sua presença infinita e incondicional durante todas as etapas de minha vida. Ao meu pai por me apresentar ao mundo da ciência.
- Às minhas irmãs Sarah e Flávia, orgulhos de minha vida! Pelo apoio, incentivo e momentos de amizade e descontração que permitem a união de nossa família, mesmo à distância!
- Ao meu noivo Andre, por seu carinho, apoio e compreensão durante a concretização de cada pedacinho deste trabalho.
- A minha querida dona Déa, pelas orações, apoio e amizade.
- Ao casal amigo Olimpia M.M.S. Viana e André Viana, por todas as contribuições, boas conversas e sinceridade.
- Aos amigos Taciane M.M. Hipólito e Rodrigo T. Monteiro com quem sempre posso contar.
- Aos amigos e colegas da pós-graduação (Jenniffer, Renan, Milena, André Viana, André Ruela, Gérsika, Aline e Naiara Chaves) que possibilitaram trocas de experiências durante as disciplinas cursadas.
- À profa. Dra. Eliane Silva, pela amizade, conversas, apresentação de novas técnicas e metodologias que viabilizaram a realização de ensaios. Um exemplo a ser seguido de inspiração e amor à ciência;
- Ao técnico, amigo e doutorando Gustavo Silveira, pelas conversas, boas ideias e caráter exemplar;
- Às companheiras diárias de trabalho (Maria Vita, Odete e Cristina) que com certeza deram todo suporte necessário para que eu me ausentasse esporadicamente sem comprometimento das minhas obrigações como servidora. Obrigada pela amizade, apoio e compreensão!
- Às alunas fofas de IC e TCC que tive a sorte de co-orientar e/ou colaborar nessa jornada de quase quatro anos. Sem dúvida foram fundamentais para meu amadurecimento e aprendizado: Natália Quintiliano, Juliana Grell, Isabela Amatto, Mariana Risola, Bárbara Akemi, Vânia Camargo, Anelique Pinto e Mariane Silva;
- À profa. Dra. Daniela Vieira e pós doc Fábio Colombo pelos papos informais e relaxantes no frio congelante polar do ar condicionado da biomol;
- Aos amigos e colegas de trabalho, pelos 5 minutos de prosa com palavras incentivadoras: Marlene Santos, Nilda, Vanderlei Flausino, Taciane Hipólito, Ana Flávia Silva, Marcela Lima, Adriana, prof. Adriano Mendes;
- A todos que direta ou indiretamente participaram na realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*“Tudo o que se faz com amor e dedicação, chega ao momento da colheita,
e, inegavelmente, ela é perfeita”.*
(M.C.L.N. Carvalho)

*“Não pode existir conhecimento sem emoção. Podemos estar cientes da
verdade, mas até que tenhamos sentido sua força, ela não é nossa. A
cognição do cérebro deve ser acrescentada a experiência da alma”.*
Arnold Bennett

RESUMO

Os fungos endofíticos tornam-se valiosa fonte para descoberta de novas moléculas de interesse terapêutico e biotecnológico. O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o potencial bioativo do produto da fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis* 99(3) e identificar as moléculas responsáveis por essa bioatividade. Inicialmente, o endófito isolado das folhas de *Laguncularia racemosa* foi submetido ao processo de fermentação em caldo Czapeck por 20 dias/ 28°C em condições estáticas. Após, o caldo fermentado foi particionado com diferentes solventes, gerando os extratos acetato de etila (JAc: 238 mg) e n-butanólico (JBU: 27,2 mg). Estes foram biomonitorados pelo ensaio de difusão em ágar frente diferentes patógenos (*S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922 e *C. albicans* ATCC 10231) e, diante do potencial antimicrobiano observado, foi determinada também a concentração inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM). É pertinente destacar os resultados para JAc (CIM: 125-250 µg/mL) e para JBU (CIM: 25-50 µg/mL; CMM: 100-200 µg/mL) contra *C. albicans* ATCC 10231. Procedeu-se estudo de fracionamento bioguiado com o extrato JAc, obtendo 27 frações. Estas foram reagrupadas em quatro (J₁, J₂, J₃ e J₄), às quais foram biomonitoradas quanto ao potencial antimicrobiano, sendo o maior destaque evidenciado pela fração J₃. No estudo cromatográfico, J₃ revelou-se positivo com reagente de Dragendorff e luz UV 254 nm. Os estudos espectroscópicos com esta fração (¹H RMN, ¹³C RMN, COSY, HSQC, HMBC, EM e IV), permitiram a caracterização de um alcaloide piridínico denominado Ácido 5-butilpiridina-2-carboxílico, também conhecido como Ácido fusárico. Investigou-se o potencial biológico deste composto por meio de seis ensaios biológicos *in vitro*. No estudo de viabilidade celular, pelo ensaio do MTS frente quatro linhagens humanas tumorais (A549, Hep G2, HT 144 e MCF 7), observou-se seletividade moderada para duas linhagens (MCF 7 e HT 144) e baixa seletividade para a linhagem normal (CCD-1059Sk). A redução da viabilidade celular de 60 % (MCF 7) e 50 % (HT 144), ocorreu por efeito antiproliferativo (IC₅₀: 60 µg/mL), conforme constatado no ensaio por exclusão com o azul de tripano. Nos estudos antimicrobianos, o alcaloide piridínico evidenciou forte potencial antifúngico frente *C. albicans* ATCC 10231 (CIM: 25-50 µg/mL; CFM: 200-400 µg/mL). Neste sentido, o conjunto dos dados permitiu sugerir tratamento tópico seguro para o paciente com candidíase, uma vez que a CIM esteve bem abaixo de uma possível concentração tóxica para os fibroblastos de pele (CCD-1059Sk). Ainda, diante do perfil antifúngico observado contra linhagens provenientes de ambiente hospitalar, este composto poderia ser indicado como higienizador em fontes secundárias de contaminação (CIM contra *C. albicans* isoladas de lençol e jaleco: 50-100 µg/mL). Também foi constatado forte potencial bacteriostático contra *E. coli* (CIM: 50-100 µg/mL) e moderado contra *S. aureus* (CIM: 200-400 µg/mL). Por meio das imagens de MEV foi possível observar que a bactéria *S. aureus* sofreu evidentes alterações morfológicas quando tratada com 200 e 400 µg/mL de Ácido fusárico. Ao investigar o efeito sinérgico da associação do composto com antimicrobianos de uso comercial, verificou-se frente a *E. coli* efeito parcialmente sinérgico (ICIF = 0,625), com potencialização em oito vezes da atividade antimicrobiana da estreptomicina. Frente *S. aureus* foi verificado efeito aditivo na associação do alcaloide e amoxicilina (ICIF = 1). Em estudo da ação antituberculose, observou-se CIM₉₀ > 25 µg/mL. Conclui-se que o fungo endofítico *G. moniliformis* é promissor na produção de compostos de interesse e os estudos realizados no presente trabalho abrem novas perspectivas de conhecimento para o Ácido fusárico que até então não haviam sido explorados na literatura.

Palavras-chave: *Gibberella moniliformis*. Potencial antimicrobiano. Sinergismo. Viabilidade Celular. Atividade antiproliferativa. Ácido fusárico.

ABSTRACT

The endophytic fungi become valuable sources for discovering new molecules with therapeutic and biotechnological interest. The present study aimed to evaluate the bioactive potential of the products obtained in the fermentation of *Gibberella moniliformis* 99(3) endophytic fungus and to identify the molecules responsible for this bioactivity. Initially, the endophyte isolated from leaves of *Laguncularia racemosa* (Brazilian mangrove) was submitted to the fermentation in Czapek broth for 20 days / 28°C, under static conditions. Then, the fermented broth was partitioned with different solvents resulting in the ethyl acetate (JAc: 238 mg) and n-BuOH (JBU: 27.2 mg) extracts. These extracts were biologically monitored by agar diffusion assay against different pathogens (*S. aureus* ATCC® 6538™, *E. coli* ATCC® 25922™ and *C. albicans* ATCC® 10231™). Since an antimicrobial potential was observed, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal microbicidal concentration (MMC) were also determined. It is pertinent to highlight the results of JAc (CIM: 125-250 µg/mL) and to JBU (CIM: 50-100 µg/mL; CMM: 100-200 µg/mL) against *C. albicans* ATCC 10231. A bioguided fractionation study was realized with JAc extract obtaining 27 fractions, which were grouped into four fractions (J₁, J₂, J₃ e J₄). The antimicrobial potential was biomonitoring, with more emphasis to J₃. In chromatographic study, the J₃ fraction was positive to Dragendorff reagent and UV 254 nm. In the spectroscopic studies with J₃ (¹H NMR, ¹³C NMR, COSY, HSQC, HMBC, MS and IR) was possible the characterization of a pyridine alkaloid called 5-butylpyridine-2-carboxylic acid also known as fusaric acid. The bioactive potential of this compound was investigated applying six biological assays *in vitro*. The cell viability study was realized by colorimetric assay MTS, using four human tumor lines (A549, Hep G2, HT 144 and MCF 7), was observed a moderate selectivity for the lines MCF 7 and HT 144 and low selectivity was assessed on normal fibroblast strains (CCD-1059Sk). The reduction of cellular viability of 60 % (MCF 7) and 50 % (HT 144) occurs by antiproliferative effect (IC₅₀: 60 µg/mL), according to test by exclusion with trypan blue. In antimicrobials studies, the pyridine alkaloid showed strong antifungal potential against *C. albicans* ATCC 10231 (MIC: 25-50 µg/mL; MFC: 200-400 µg/mL). In this sense, a safe and topical treatment for patients with candidiasis could be suggested based on data set, once the MIC was well below toxic concentration for a possible skin fibroblasts (CCD-1059Sk). Besides that, this compound could be suitable for use as a sanitizer on secondary sources of hospital infection due to the fungistatic profile observed in *C. albicans* isolated from lab coat and sheet (MIC : 50-100 µg/mL). It was also observed strong bacteriostatic potential against *E. coli* (MIC: 50-100 µg/mL) and moderate against *S. aureus* (MIC: 200-400 µg/mL). With the SEM images was noted that *S. aureus* suffered obvious morphological changes when treated with 200 and 400 µg/mL of fusaric acid. Investigating the synergistic potential of the combination between fusaric acid and commercially used antimicrobials, it was observed partially synergistic effect (ICIF = 0,625) for *E. coli*, with eight times potentiation of the streptomycin antimicrobial activity. It was checked for *S. aureus* an additive effect in the combination of alkaloid and amoxicillin (ICIF = 1). Studying antimycobacterial activity, the compound was tested against *Mycobacterium tuberculosis*, with MIC₉₀ > 25 µg/mL. The present work consistently demonstrated that the fungus endophyte *G. moniliformis* is promising in the production of compounds of interest and the data presented in this study open up new avenues of knowledge for fusaric acid which until then had not been explored in the literature.

Palavras-chave: *Gibberella moniliformis*. Antimicrobial potential. Sinergism. Cell viability. Antiproliferative activity. Fusaric acid.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\delta^{13}\text{C}$	– Deslocamento químico do carbono 13
$\delta^1\text{H}$	– Deslocamento químico do hidrogênio 1
A549	– Linhagem celular tumoral de carcinoma de pulmão
ABD	– Agar Batata Dextrose
AcOEt	– Acetato de etila
ATCC	– <i>American Type Culture Collection</i>
BBD	– <i>Broad Band Decoupling</i>
BGC823	– Linhagem celular tumoral de câncer gástrico
BT474	– Linhagem celular tumoral de mama
CBM	– Concentração Bactericida Mínima
CCD	– Cromatografia em Camada Delgada
CCD-1059Sk	– Células derivadas de pele normal (fibroblastos)
CDCl_3	– Clorofórmio deuterado
CLAE-DAD	– Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo
CG/MS	– Cromatografia gasosa e espectrometria de massas
CIF	– Concentração inibitória fracionária
CIF_a	– Concentração inibitória fracionada do antimicrobiano
CIF_e	– Concentração inibitória fracionada do extrato
CLSI	– <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COSY	– <i>Homonuclear COrrrelation Spectroscopy</i>
<i>d</i>	– Dupleto
DEPT	– <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMEM	– <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DU145	– Linhagem celular tumoral de próstata
EM	– Espectrometria de massas
EM/EM	– Espectrometria de massas sequencial
ESI-MS	– Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>
FT-IR	– Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
H1975	– Linhagem celular tumoral de pulmão
HeLa	– Linhagem celular derivada de adenocarcinoma cervical
HepG2	– Linhagem celular tumoral de carcinoma hepatocelular
HIV-1	– Vírus da Imunodeficiência Humana subtipo 1
HL-60	– Linhagem celular de leucemia promielocítica
HMBC	– <i>Heteronuclear MultipleBond Coherence</i>
HPLC	– <i>High Performance Liquid Chromatograph</i>
HSQC	– <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HT 144	– Linhagem celular derivada de melanoma humano
Hz	– <i>Hertz</i>
IC_{50}	– Concentração necessária para 50% de inibição <i>in vitro</i>
IFIC	– Índice da concentração inibitória fracionária
ISN	– Isonicotinamida
<i>J</i>	– Constante de acoplamento
K562	– Linhagem celular leucêmica
KB	– Linhagem celular tumoral da nasofaringe epidermoide
LC/MS	– Cromatografia líquida e espectrometria de massas
LOVO	– Linhagem celular de adenocarcinoma de cólon

<i>m</i>	– Multiplicidade
<i>m/z</i>	– Razão massa-carga
MCF-7	– Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano
MDA-MB-435	– Linhagem celular de adenocarcinoma mamário
MDA-MB-468	– Linhagem celular de adenocarcinoma mamário
MEV	– Microscopia eletrônica de varredura
MIA PaCa-2	– Linhagem celular tumoral de pâncreas
MKN45	– Linhagem celular de carcinoma gástrico
MOLT-4	– Linhagem celular leucêmica
MTB	– Anti <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTS	– Modified tetrazolium salt
MS ²	– Espectro de massas de 2 ^a ordem
NCI-H460	– Linhagem celular tumoral de pulmão
OADC	– Ácido oleico, albumina, dextrose e catalase
ODS	– Octadecilsilano
OMS	– Organização Mundial de Saúde
PBS	– Tampão fosfato salina
ppm	– Partes por milhão
SF-268	– Linhagem celular tumoral do SNC (glioblastoma)
SGC-7901	– Linhagem celular tumoral câncer gástrico
Sinan	– Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SK-BR-3	– Linhagem celular tumoral de mama
<i>sl</i>	– Sinal largo
SNC	– Sistema Nervoso Central
SW1116	– Linhagem celular tumoral de carcinoma colorrectal
SW48	– Linhagem celular tumoral de carcinoma colorrectal
SW480	– Linhagem celular tumoral de carcinoma colorrectal
SW742	– Linhagem celular tumoral de carcinoma colorrectal
<i>t</i>	– Tripleto
TMS	– Tetrametilsilano
U937	– Linhagem celular leucêmica
WHO	– <i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos.....	31
Figura 2 -	Compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos.....	32
Figura 3 -	Metabólitos bioativos de <i>Penicillium</i> SP. 091402, um fungo endofítico isolado das raízes de <i>Bruguiera sexangula</i>	33
Figura 4 -	Metabólicos secundários fenólicos produzidos por <i>Pestalotiopsis</i> sp. AcBC2, isolados do mangue chinês.....	34
Figura 5 -	Moléculas produzidas por fungos endofíticos isolados do mangue na China.....	38
Figura 6 -	Estruturas de compostos fenólicos produzidos por fungos endofíticos <i>Phomopsis</i> sp. ZSU-H76 isolado do mangue chinês.....	40
Figura 7 -	Principais núcleos fundamentais dos alcaloides heterocíclicos e sua origem biossintética de aminoácidos.....	45
Figura 8 -	Principais vias do metabolismo secundário de vegetais e suas interligações.....	45
Figura 9 -	Alcaloides produzidos por diferentes espécies do fungo endofítico <i>Aspergillus</i>	47
Figura 10 -	Alcaloides piridínicos.....	48
Figura 11 -	Compostos bioativos oriundos de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais.....	49
Figura 12 -	Vitamina B3.....	49
Figura 13 -	Alcaloides citotóxicos de <i>Fusarium incarnatum</i> (HKI0504) proveniente do mangue.....	51
Figura 14 -	Micotoxinas produzidas pelos fungos endofíticos do gênero <i>Fusarium</i>	52
Figura 15 -	Esquema metodológico para fermentação e obtenção do extrato fúngico.....	56
Figura 16 -	Estudo das frações de <i>Gibberella moniliformis</i> 99(3).....	57
Figura 17 -	Esquema metodológico desenvolvido para o ensaio sinérgico com o composto majoritário presente na fração J ₃ associado com antimicrobianos comerciais e respectivos patógenos (<i>S. aureus</i> /amoxicilina; <i>E. coli</i> /estreptomicina e <i>C. albicans</i> /nistatina).....	65

Figura 18 -	Preparo de amostras e análise em MEV.....	67
Figura 19 -	Representação esquemática para avaliação do potencial anti MTB da fração J ₃	68
Figura 20 -	Espectro de absorção no infravermelho da fração J ₃	72
Figura 21 -	(A) Espectro de ¹ H RMN do composto Ácido fusárico (300 MHz, MeOD).....	75
Figura 22 -	Ampliação dos picos do espectro de ¹ H RMN de Ácido fusárico (400MHz, MeOD).....	76
Figura 23 -	Espectro de ¹³ C RMN DEPT 135, do composto Ácido fusárico (75 MHz, MeOD).....	77
Figura 24 -	Espectro de ¹³ C RMN BBD, do composto Ácido fusárico (100 MHz, MeOD).....	78
Figura 25 -	Espectro bidimensional HSQC (¹ H: 400 MHz e ¹³ C: 100 MHz) do composto Ácido fusárico em MeOD.....	79
Figura 26 -	Espectro bidimensional COSY (¹ H: 400 MHz) do composto Ácido fusárico em MeOD.....	80
Figura 27 -	Espectro bidimensional HMBC (¹ H: 400 MHz e ¹³ C: 100 MHz) do composto Ácido fusárico em MeOD.....	81
Figura 28 -	Posições possíveis da substituição da cadeia alquila no anel piridínicos...	82
Figura 29 -	(A) Moléculas piridínicas substituídas na posição <i>orto</i> em relação ao nitrogênio. (B) Molécula piridínica substituída na posição <i>meta</i> em relação ao nitrogênio.....	83
Figura 30 -	Correlações observadas para o composto presente na fração J ₃ , sendo evidenciado em (A) correlações ¹ H- ¹ H do espectro COSY e em (B) correlações ¹ H- ¹³ C a longa distância do espectro HMBC.....	85
Figura 31 -	Cromatograma da fração J ₃	86
Figura 32 -	Espectro de Massas de alta resolução, <i>full scan</i> , no modo positivo da fração J ₃	87
Figura 33 -	Fragmentação proposta para o íon molecular <i>m/z</i> 180.....	88
Figura 34 -	Molécula presente na fração J3 identificada como Ácido fusárico.....	88

Figura 35 - Viabilidade celular de linhagens celulares tumorais humanas determinada pelo ensaio MTS, após exposição por 48 horas ao composto Ácido fusárico.....	91
Figura 36 - Gráfico da curva de crescimento da linhagem HT 144 e MCF 7, determinada pelo ensaio do azul de tripano, após exposição por 24, 48 e 72 horas ao composto Ácido fusárico. (A)-Células viáveis. (B)-Células inviáveis.....	93
Figura 37 - Compostos produzidos por <i>Penicillium melinii</i> Yuan-25 isolado de <i>Panax ginseng</i>	94
Figura 38 - Imagens da redução microbiana após 24 horas de tratamento da <i>E. coli</i> com Ácido fusárico em relação ao controle.....	99
Figura 39 - Imagens da redução microbiana após 24 horas de tratamento do <i>S. aureus</i> com Ácido fusárico em diferentes concentrações, comparado com o controle.....	100
Figura 40 - (A) Imagem controle da bactéria <i>S. aureus</i> (Aumento 10.000 vezes. (B) Imagem das alterações morfológicas observadas em <i>S. aureus</i> tratada com 200 µg/mL de ácido fusárico (Aumento 15.000 vezes). (C) Imagem das alterações morfológicas observadas em <i>S. aureus</i> tratada com 400 µg/mL de ácido fusárico (Aumento 15.000 vezes).....	101
Figura 41 - Ácido fusárico complexado com cobre.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Densidade celular para cada linhagem avaliada.....	60
Tabela 2 -	Medida do halo de inibição (mm) e rendimento (mg) para os extratos oriundos da fermentação fúngica.....	69
Tabela 3 -	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) observada para extratos AcOEt e n-BuOH do fungo <i>G. moniliformis</i> frente a patógenos.....	69
Tabela 4 -	Rendimento das frações AcEtO do fungo <i>G. moniliformis</i> 99(3).....	71
Tabela 5 -	Resultados de CIM ($\mu\text{g/mL}$) observados para as frações acetato de etila provenientes do endófito <i>G. moniliformis</i>	71
Tabela 6 -	Dados de RMN (H^1 : 300 MHz e C^{13} : 75 MHz) em MeOD para a substância presente na fração J ₃	82
Tabela 7 -	Dados comparativos de RMN para a molécula presente na fração J ₃ (H^1 : 400 MHz e C^{13} : 100 MHz; MeOD), para o Ácido fusárico (H^1 : 300 MHz e C^{13} : 75 MHz; MeOD), Metil fusarato (H^1 : 500 MHz e C^{13} : 125 MHz; CDCl_3) e Ácido 10-hidroxi-11-clorofusárico (H^1 : 600 MHz e C^{13} : 150 MHz; MeOD).....	84
Tabela 8 -	Inibição parcial do crescimento celular (IC_{50}), expressos pela média \pm desvio padrão, em $\mu\text{g/mL}$, de linhagens tumoral/normal frente ao composto Ácido fusárico pelo ensaio do MTS.....	90
Tabela 9 -	Resultados de CIM/CFM ($\mu\text{g/mL}$) contra cepas de <i>C. albicans</i> de diferentes origens.....	95
Tabela 10 -	Resultados de CIM e CBM ($\mu\text{g/mL}$) do extrato acetato de etila, frações e para o composto isolado provenientes do endófito <i>G. moniliformis</i> observados contra patógenos ATCC.....	97
Tabela 11 -	Escala de interpretação do ensaio sinérgico.....	103
Tabela 12 -	Resultados apresentados para o teste de <i>Checkerboard</i>	103
Tabela 13 -	Valor da concentração inibitória mínima de 90% (CIM_{90}) de 4-BP frente à cepa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	105

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	BIOPROSPECÇÃO EM MANGUEZAIS	25
2.2	FUNGOS ENDOFÍTICOS: IMPORTÂNCIA, POTENCIALIDADE E MOLÉCULAS.....	26
2.2.1	Fungo endofítico <i>Gibberella moniliformis</i>.....	35
2.3	COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	36
2.3.1	Compostos anticâncer	36
2.3.2	Compostos antimicrobianos	38
2.3.2.1	Compostos antimicobacterianos.....	42
2.4	ALCALOIDES	43
2.4.1	Alcaloide Piridínico	47
2.4.2	Papel ecológico dos alcaloides	50
2.5	MODELOS DE ESTUDO PARA O ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS DE PRODUTOS NATURAIS.....	52
3	OBJETIVOS	54
3.1	OBJETIVO GERAL.....	54
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	55
4.1	FUNGO ENDOFÍTICO ESTUDADO.....	55
4.2	OBTENÇÃO DE METABÓLITOS FÚNGICOS BIOATIVOS	55
4.3	TÉCNICAS ANALÍTICAS	56
4.3.1	Técnicas cromatográficas	56
4.3.1.1	Cromatografia em camada delgada (CCD)	56
4.3.1.2	Cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak	57

4.3.1.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	57
4.3.2	Técnicas espectroscópicas	58
4.3.2.1	Infravermelho	58
4.3.2.2	Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	58
4.3.2.3	Análise no Espectrômetro de Massas (EM/EM- ESI-TOF e CLAE-DAD-ESI-TOF).....	59
4.4	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	59
4.4.1	Viabilidade celular determinada por MTS	59
4.4.2	Viabilidade celular por exclusão com azul de tripano	61
4.5	TRIAGEM ANTIMICROBIANA: MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR	61
4.6	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E MICROBICIDA MÍNIMA (CMM).....	61
4.7	TESTE DE CHECKERBOARD	64
4.8	ESTUDO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	65
4.9	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI Mycobacterium tuberculosis (MTB).....	67
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1	TRIAGEM ANTIMICROBIANA COM OS EXTRATOS	69
5.2	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO JAc.....	70
5.2.1	Purificação do extrato JAc	70
5.2.2	Análises espectroscópicas da fração J3	71
5.2.2.1	Infravermelho	71
5.2.2.2	Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas de alta resolução.....	72
5.3	ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR	89
5.4	RESULTADO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (CIM E CMM) E IMAGENS DE MEV.....	94

5.5	RESULTADO DO ENSAIO SINÉRGICO	102
5.6	RESULTADO DO POTENCIAL ANTI <i>M. tuberculosis</i>	104
6	CONCLUSÕES	107
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	108
	REFERÊNCIAS	109

1 INTRODUÇÃO

Plantas de habitat único ou com histórico etnobotânico devem ser consideradas fontes potenciais para a busca de novos compostos, pois, frequentemente, estão associadas a uma substância química inovadora (NEWMAN; CRAGG, 2016; ARNOLD et al., 2003; TAN; ZOU, 2001). A literatura sugere que ao buscar novas moléculas, estas sejam provenientes de micro-organismos oriundos de nichos que requeiram alta atividade metabólica, pois as condições ambientais extremas tendem a induzir a produção de compostos diversos (LACAVA; ANDREOTE; AZEVEDO, 2008). Neste sentido, ambientes como mangues, tornam-se atrativos para a descoberta de novas moléculas com potencial farmacológico, além de compostos para uso agrícola e/ou biotecnológico.

O manguezal é uma região de alta biodiversidade que compreende uma área de transição entre o ambiente terrestre e marinho, sendo característico de regiões tropicais e subtropicais. Trata-se de um ambiente ecológico único, que abriga árvores com raízes aéreas, galhos, troncos e sedimentos, formando um habitat atrativo a uma comunidade compreendida por fungos, bactérias, macro-algas e invertebrados (WALTERS et al.; 2008). Este habitat se torna um ambiente favorável para investigação do potencial bioativo das plantas, bem como dos micro-organismos associados simbioticamente a elas, denominados de endofíticos.

Fungos de um modo geral são conhecidos como fontes ricas de metabólitos secundários (GLOER, 2007), sendo que, de 22.500 compostos biologicamente ativos obtidos de micro-organismos até 2009, 38% foram produzidos por fungos (DEMAIN; SANCHES, 2009), os quais têm se mostrado indispensáveis para aplicações farmacêuticas e agrícolas. No entanto, a atenção de pesquisadores de produtos naturais tem se direcionado para fungos de fontes menos comuns (CARVALHO et al., 2012; SEBASTIANES et al, 2012; KJER et al., 2009; FERNANDES et al., 2009), devido à grande diversidade química e ineditismo de moléculas, com potencial de sintetizarem compostos iguais aos de seus hospedeiros (taxol, camptotecina, vincristina) e também outras moléculas de grande importância, como os compostos fenólicos provenientes do metabolismo de endófitos (CARVALHO et al., 2016). Existem também moléculas provenientes de micro-organismos isolados do mangue (CHEN et al., 2011).

Conceitualmente, micro-organismos endofíticos habitam o interior das plantas durante algum período de seu ciclo de vida e podem ser encontrados em órgãos e

tecidos vegetais, não causando prejuízo visível a seus hospedeiros e estabelecendo relação mutualística com eles (MENDES; AZEVEDO, 2007), sendo os custos e benefícios dessa associação dependentes da interação entre ambos (KUSARI; SINGH; JAYABASKARAN, 2014). A importância dos fungos endofíticos se reforça ainda mais pela inexistência de estudos na literatura que descrevam ausência de espécies de endófitos em associação com o hospedeiro (NISA et al., 2015).

Há evidências da influência de micro-organismos endofíticos em diversas características expressas pela planta devido à produção ou indução de metabólitos primários e secundários que podem conferir vantagens à mesma, tais como promoção do crescimento, defesa pela síntese de fito-hormônios, produção de biosurfactantes que evitam doenças de plantas, compostos que auxiliam na tolerância das plantas à seca e à salinidade bem como a outros fatores abióticos (PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011; KUSARI; SPITELLER, 2011).

Considerando que, embora estratégias modernas como química combinatória e modelagem molecular de fármacos exerçam um papel importante no desenvolvimento de medicamentos, Ling et al. (2015) recentemente obtiveram um potente antibiótico denominado teixobactina proveniente de estudos com bactérias não cultiváveis de solo. Os autores afirmaram que abordagens sintéticas para a produção de antibióticos ainda têm sido incapazes de mudar a realidade de resistência antimicrobiana, tema este abordado no último relatório da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014), uma vez que a resistência aos antibióticos está acontecendo de forma mais rápida que a introdução de novos compostos na clínica médica.

Somado a isso, levantamentos realizados de 1997 até 2014 (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; NEWMAN; CRAGG, 2007; NEWMAN; CRAGG, 2012; NEWMAN; CRAGG, 2016) demonstraram que a influência dos produtos naturais na área de síntese é bastante marcante e seguem desempenhando papel importante no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, constituindo-se como estratégia clássica de sucesso para a busca de novos produtos e moléculas com aplicações diversas, incluindo farmacêutica, agrícola e industrial. Adicionalmente, Newman; Cragg (2016) chamam a atenção da comunidade científica para o reconhecimento da rápida e significativa evolução de fármacos produzidos por micro-organismos ou pela interação microbiana com seu hospedeiro, e deixam claro que esta área deve ser mais investigada e estudada pois pode

proporcionar ampla oportunidade para a descoberta de novas moléculas, dada a diversidade química que apresentam.

Este cenário pode ser associado aos avanços técnicos em métodos e procedimentos analíticos, tais como cromatografia, líquida ou gasosa, acoplada à espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, bem como técnicas avançadas em biologia molecular, bioinformática e robótica, ferramentas estas que tornam possível minimizar parte das dificuldades encontradas com as fontes naturais de estudo (MCCHESEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007).

Assim, diante deste contexto, a busca por novos compostos com aplicação terapêutica bem como de substâncias com outras finalidades (agrícola, biotecnológica), tornam-se relevantes e justificam o investimento nas pesquisas atuais, sendo que o produto de fermentação de fungos endofíticos obtidos do mangue deve ser considerado como fonte promissora para novas moléculas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOPROSPECÇÃO EM MANGUEZAIS

O manguezal é um rico ecossistema protetor de toda a zona costeira que serve como abrigo para várias espécies de animais, vegetais e micro-organismos. Trata-se de um ambiente altamente produtivo, constituído pela associação de materiais sedimentares provenientes do mar e continente (SEBASTIANES et al., 2013).

Estima-se que 25% do litoral do mundo seja coberto por manguezais, distribuídos em 112 países, com um território de aproximadamente 18,1 milhões de hectares de manguezal (GOPAL; CHAUHAN, 2006). Dentro deste levantamento, o Brasil compreende a segunda maior extensão de manguezais do mundo e a primeira das Américas; sendo que sua localização no Brasil se estende desde o Cabo Orange, no Amapá, até a foz do rio Araranguá, em Santa Catarina (SOUSA et al., 2006).

As plantas dos manguezais estão entre as mais produtivas do oceano. A principal representante nas regiões tropicais do continente americano é o mangue vermelho (*Rhizophora mangle*, família Rhizophoraceae), enquanto que o mangue preto (*Avicennia germinans*, família Acanthaceae) e o mangue branco (*Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. F; família Combretaceae) são os mais abundantes nos estuários do México, oeste da Índia, Barramas e Flórida (MILES et al., 1999). Estas plantas sintetizam compostos bioativos utilizados na área médica, agrônômica e farmacêutica como benzoquinonas, sesquiterpenos, alcaloides, flavonóides e taninos (LI et al., 2009; WU et al., 2008).

Situados na interface entre terra e mar, os manguezais são ambientes bem adaptados às condições de estresses naturais como alta temperatura, salinidade, anóxia e radiação ultravioleta. Devido à necessidade de adaptação e aos desafios para sobrevivência neste ecossistema complexo, muitos micro-organismos, especialmente os fungos, tornam-se uma valiosa fonte para descoberta de novas moléculas com potencial terapêutico (SEBASTIANES et al., 2012; DING; DAHSE; HERTWECK, 2012).

Plantas do mangue têm provado ser uma fonte bem estabelecida para busca de metabólitos secundários estruturalmente diversos e bioativos (LI et al., 2009), principalmente porque o próprio ambiente de estresse tende a estabelecer a ativação de genes silenciosos que induzem as vias biossintéticas para a produção de metabólitos ativos (TAMBURINI; MASTROMEI, 2000). A diversidade fúngica nos manguezais é

influenciada pela idade do mangue e características do habitat, incluindo temperatura, salinidade, marés, entre outras (THATOI; BEHERA; MISHRA, 2013).

Kumaresan; Suryanarayanan (2001) descreveram que a associação de fungos endofíticos com raízes do mangue confere proteção contra condições ambientais adversas e permite a competição de sucesso com fungos saprófitas, os quais se decompõem nas raízes senescentes. De acordo com Liu; Wu; Tong (2007), mais de 200 espécies de fungos endofíticos foram isolados e identificados a partir de manguezais, sendo o destaque dado para os gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Phyllosticta* e *Trichoderma*.

Apesar de ainda pouco estudados, os fungos do manguezal apresentam importante papel ecológico e relevante potencial biotecnológico (THATOI; BEHERA; MISHRA, 2013). Na literatura é relatado que os metabólitos provenientes de fungos endofíticos do mangue são utilizados em indústrias farmacêuticas na produção de antibióticos, antidiabéticos, antiviral, anti-inflamatório, antioxidantes e imunossuppressores (BALAGURUNATHA; RADHAKRISHNAN, 2007). Além disso, os fungos endofíticos do mangue também tem ampla aplicação no campo de biorremediação e na produção de biodiesel, podendo ser usado como um agente de biopesticida para controle de pragas (THATOI; BEHERA; MISHRA, 2013).

2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS: IMPORTÂNCIA, POTENCIALIDADE E MOLÉCULAS

Fungos associados às plantas são geralmente divididos em cinco principais grupos: micorrízicos, patogênicos, epifíticos, endofíticos e saprofíticos (PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011). Estima-se que existam no mundo cerca de 1,5 milhão de espécies fúngicas, das quais, somente 70 mil já foram descritas, restando expressivos 1,43 milhão de fungos a serem investigados sob o ponto de vista do metabolismo secundário (HAWKSWORTH; ROSSMAN, 1997).

De acordo com Dreyfuss; Chapela (1994), dentre os fungos filamentosos, os fungos endofíticos constituem o grupo com maior produção de metabólitos secundários, sendo esta produção superior a 73% em relação aos demais fungos. Esta alta produtividade pode ser explicada pela teoria ecológica que prediz que existem dois fatores chaves para a diversidade metabólica em organismos: alto nível de estresse

ambiental e intensas interações com outros organismos, que quando submetidos a um ou ambos os fatores, se tornam mais prováveis de produzirem metabólitos secundários biologicamente ativos.

A interação endófito-planta pode ser classificada como mutualística, uma vez que o micro-organismo recebe nutriente e proteção da planta e, em contrapartida, produz compostos químicos que, em condições de estresse do hospedeiro, aumentam sua capacidade competitiva e sua resistência contra diversos fatores bióticos e abióticos (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Strobel; Daisy (2003) descreveram a relação entre endófitos e o hospedeiro, onde os primeiros evitam, com sucesso, o ataque de pragas às plantas por meio da produção de substâncias especiais (metabólitos secundários). Em troca, recebem alimentos e proteção. Esses micro-organismos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, sendo Bary, em 1866, quem primeiro delineou a diferença entre eles e os patógenos de plantas (WILSON, 1995).

Em 1993, estudos de Stierle; Strobel; Stierle (1993) impulsionaram pesquisadores da área de produtos naturais a trabalharem com fungos endofíticos na busca por moléculas bioativas. O principal incentivo foi a descoberta de *Taxomyces andreanae*, um fungo endofítico isolado da casca de *Taxus brevifolia*, o qual se mostrou capaz de produzir o antitumoral Taxol[®], ~~composto~~ molécula que já movimentou mais de 9 bilhões de dólares (BORGES et al., 2009). Strobel et al. (1996a) descreveram que, após a descoberta do paclitaxel (Taxol[®]) sendo produzido por um fungo endofítico (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993), foi verificado que outros fungos endofíticos (*Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Pithomyces*, *Monochaetia* e outros) também eram capazes de sintetizar este composto, cujo alvo terapêutico é principalmente o câncer ovariano e de mama.

Assim, cada vez mais fica evidente que fungos endofíticos compreendem um campo de grande importância a ser estudado para a descoberta de novas moléculas de interesse (NISA et al., 2015; STANIEK; WOERDENBAG; KAYSER, 2008). Isto se reflete também pelo número crescente de patentes que se apresentam utilizando endófitos para a produção de metabólitos secundários com importantes atividades biológicas (PRITI et al., 2009). Além disso, na literatura também é cada vez mais expressiva a quantidade de trabalhos que identificam e/ou compilam diversas classes químicas de compostos provenientes do metabolismo fúngico, os quais incluem alcaloides (DING; DAHSE; HERTWECK, 2012), terpenos (DESHMUKH; VEREKAR; BHAVE, 2015; LI et al., 2014) e compostos fenólicos (CARVALHO et al.,

2016). Estes diversos compostos podem atuar sobre alvos biológicos, os quais incluem bactérias (SEBATHIANES et al., 2012; ARIVUDAINAMBI et al., 2011), fungos, célula cancerígena (SANTIAGO et al., 2012; PANDI; MANIKANDAN; MUTHUMARY, 2010; STROBEL; DAISY, 2003; STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993), leishmania (SANTIAGO et al., 2012) e malária (CALCUL et al., 2013; WIYAKRUTTA et al., 2004). Ainda, alguns compostos foram investigados quanto ao mecanismo de ação sobre alvos celulares específicos que atuam no processo de divisão celular, transporte de glicose, HIV-1 protease e citoesqueleto (PORRAS-ALFARO; BAYMAN; 2011).

Tentativas para desvendar o caminho biossintético da produção de metabólitos secundários vêm sendo realizadas, incluindo estudos de transferência horizontal de genes (HEINING; SCHOLZ; JENNEWEIN, 2013), de *quorum sensing* (GUIMARÃES et al., 2009) e vias bioquímicas (KUMARA et al., 2014; SOLIMAN; TSAO; RAIZADA, 2011) apesar de, até o momento, nenhum estudo tenha levado a conclusões satisfatórias sobre a real origem desses compostos produzidos por endófitos (PRITI et al., 2009).

Durante a associação mutualística, o vegetal se torna mais tolerante aos fatores bióticos e abióticos, estando mais protegido com a produção de classes de compostos sintetizados pelo endófito, pelo próprio hospedeiro ou ainda, produzido em decorrência do estímulo dessa associação. A presença do endófito também incita a produção de hormônios de crescimento, que favorecem o desenvolvimento e a germinação da espécie hospedeira, a produção de substâncias antioxidantes para combater radicais livres e quelantes para eliminação de compostos tóxicos. Em troca, a planta oferece proteção física e fornece nutrientes fundamentais ao micro-organismo em associação (WHITE Jr.; TORRES, 2010; WEYENS et al., 2009).

Muitos estudos corroboram que os fungos endofíticos representam fontes quantitativas e qualitativas de moléculas bioativas e vêm se tornando uma opção promissora e indiscutível para estudos científicos. E, embora ainda existam afirmações de que ainda não há condições satisfatórias para a produção industrial de metabólitos provenientes de fungos endofíticos (KUSARI; SPITELLER, 2011; ALY; DEBBAD; PROKSCH, 2011), há reconhecimento da importância de incentivar trabalhos de bioprospecção, principalmente por sua característica sustentável e não predatória (CARVALHO et al., 2012; KUSARI; SPITELLER, 2011; ELAVARASI; RATHNA; KALAISELVAM, 2012), que possibilitaram traçar uma trajetória diferente para a *Taxus brevifolia*, de onde originalmente foi obtido o taxol, se tornando uma alternativa

positiva em prol da preservação ambiental e contribuindo com esperança dentro de cenários de explorações desastrosas.

Elavarasi; Rathna; Kalaiselvam (2012) sugeriram que o fungo endofítico *Fusarium oxysporum*, proveniente do mangue (*Rhizophora annamalayana*), e outros endófitos capazes de produzir taxol (STIERLE; STROBEL; STROBEL, 1993; STROBEL et al., 1996b; LI et al., 1996; WANG et al., 2000; GUO et al., 2006; XU et al., 2006; JI et al., 2006; CHAKRAVARTHI et al., 2008; GARYALI; KUMAR; REDDY, 2013), sejam uma alternativa à extração predatória da casca de *T. brevifolia*, bem como de outras plantas (VENUGOPALAN; SRIVASTAVA, 2015). Isto se reforça, uma vez que os métodos tradicionais de extração de taxol a partir da casca da espécie de *Taxus* são inviáveis, visto que o taxol constitui de 0,01 a 0,03 % do peso seco do floema desta planta, sendo necessárias 10 toneladas de casca (3000 árvores) para obtenção de 1 Kg de taxol (suficiente apenas para o tratamento de 500 pacientes) (ELAVARASI; RATHNA; KALAISELVAM, 2012; MALIK et al., 2011; CRAGG; NEWMAN, 2005). Por esta razão, se torna imprescindível que a busca e otimização de novas alternativas de obtenção do taxol, bem como de outros compostos bioativos, seja a partir de fungos endofíticos, cujo estudo também representa uma forma de proteção do hospedeiro e ainda, da redução do custo do tratamento.

Muitas vezes a busca por novas fontes de obtenção de moléculas bioativas se faz necessária diante do baixo rendimento oferecido pelas plantas e frente às sínteses químicas economicamente inviáveis. É o caso da podofilotoxina, um metabólito que ocorre naturalmente em algumas espécies de plantas, compreendendo uma lignana precursora para a síntese de fármacos anticancerígenos (etoposídeo, teniposídeo e fosfato de etoposídeo) (MEDRADO et al., 2015), mas que também pode ser produzida pelo fungo endofítico *Fusarium oxysporum* (KOUR et al., 2008), sendo este sugerido como um candidato promissor para a produção, em larga escala, de podofilotoxina, cuja fonte atual de obtenção provém de plantas ameaçadas de extinção (*Podophyllum hexandrum* e *Podophyllum peltatum*), que não conseguem suprir a demanda anual de mais de 100 toneladas, fornecendo apenas 50-80 toneladas/ano (ALAM; NAIK; MISHRA, 2009).

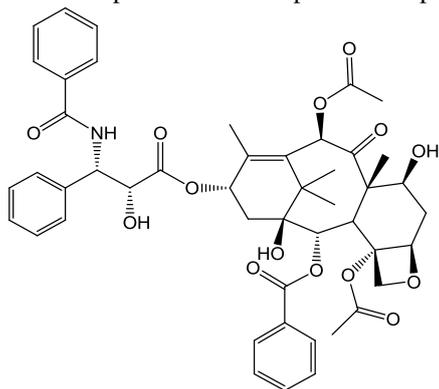
Considerando a contribuição e o impacto de cerca de 40% de fármacos prescritos até hoje, oriundos de estudos com fungos endofíticos, Nisa et al. (2015) reforçam aos pesquisadores da área, a necessidade de priorizarem esta exploração do ponto de vista biotecnológico e farmacêutico, na intenção de aumentar qualitativamente

esse número, fornecendo perspectivas para o tratamento de diversas doenças, inclusive, das negligenciadas.

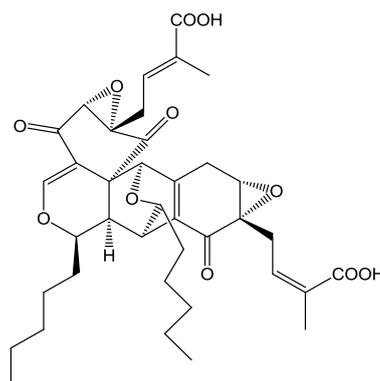
Sem dúvida, explorar uma variedade de novos produtos naturais produzidos por fungos endofíticos vem se tornando um novo caminho para a descoberta de novas moléculas e novos medicamentos (NEWMAN; CRAGG, 2016; CUI; GUO; XIAO, 2011; GUO et al., 2008). Embora ainda não esteja claro o mecanismo de ação, nem o rendimento dos compostos sejam satisfatórios, os endófitos vêm contribuindo para a biossíntese de metabólitos dentro das plantas hospedeiras (DEBBAB et al., 2009). Além disso, viabilizam estudos para busca de candidatos a medicamentos, se tornando recursos alternativos para produção de moléculas ou protótipos de interesse biológico (ZHAO et al., 2011).

O potencial dos endófitos na produção de compostos ativos pode ser exemplificado pelas Figura 1 e 2. Farmacologicamente, pode-se começar pelo antitumoral Paclitaxel (1) (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993), o Ácido Torreiano (2) (LEE et al., 1996); Vimblastina (3) (GUO; LI; ZHANG, 1998) e Vincristina (4) (ZHANG et al., 2000); os antivirais denominados Ácidos citônicos A (5) e B (6) (GUO et al., 2000); o antimicótico Criptocina (7) (LI et al., 2000) e o Ácido ambrico (8) (LI et al., 2001); antioxidantes como Pestacin (9) (HARPER et al., 2003) e Isopestacin (10) (STROBEL et al., 2002); os antitumorais Podofilotoxina (11) (YANG et al., 2003) e Camptotecina (12) (PURI et al., 2005); os antidepressivos Hipericina (13) e Emodina (14) (KUSARI et al., 2008) e o anti-inflamatório Ergoflavina (15) (DESHMUKH et al., 2009). Há outros registros na literatura com importância para o meio ambiente, tais como o “myco-diesel”, produzido pelo endófito *Gliocladium roseum*, como uma possível alternativa aos combustíveis (STROBEL et al., 2008). Para a agricultura, Kusari et al. (2012) descrevem dois inseticidas naturais Azadiractina A (16) e B (17) e Lacey; Neven (2006) descrevem o bioinseticida de *Muscodora albus* para combater adultos e larvas de mariposas contra batatas.

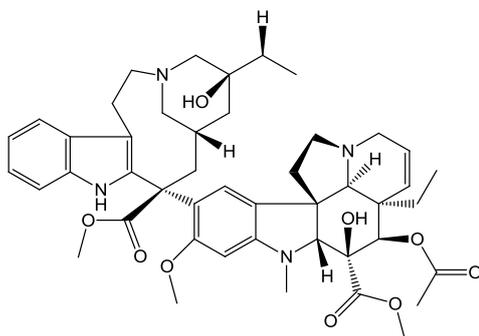
Figura 1 - Compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos.



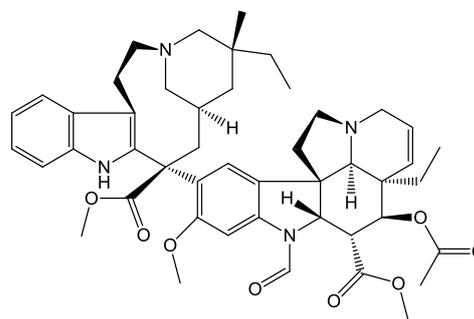
(1) Taxol



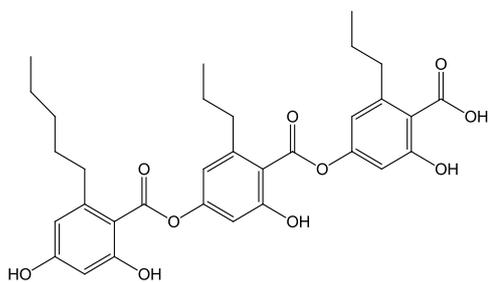
(2) Ácido Torreiano



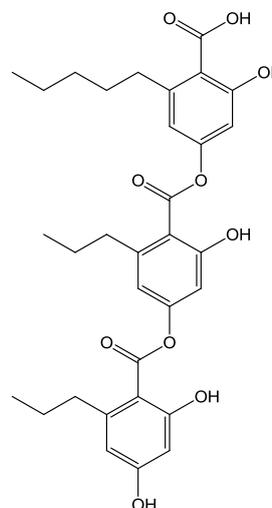
(3) Vimblastina



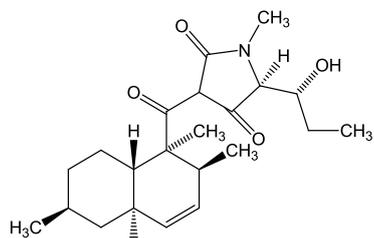
(4) Vincristina



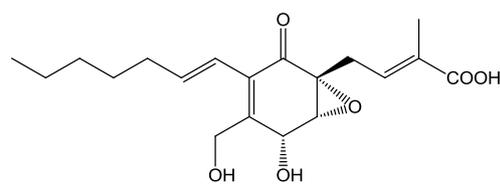
(5) Ácido Citônico A



(6) Ácido Citônico B



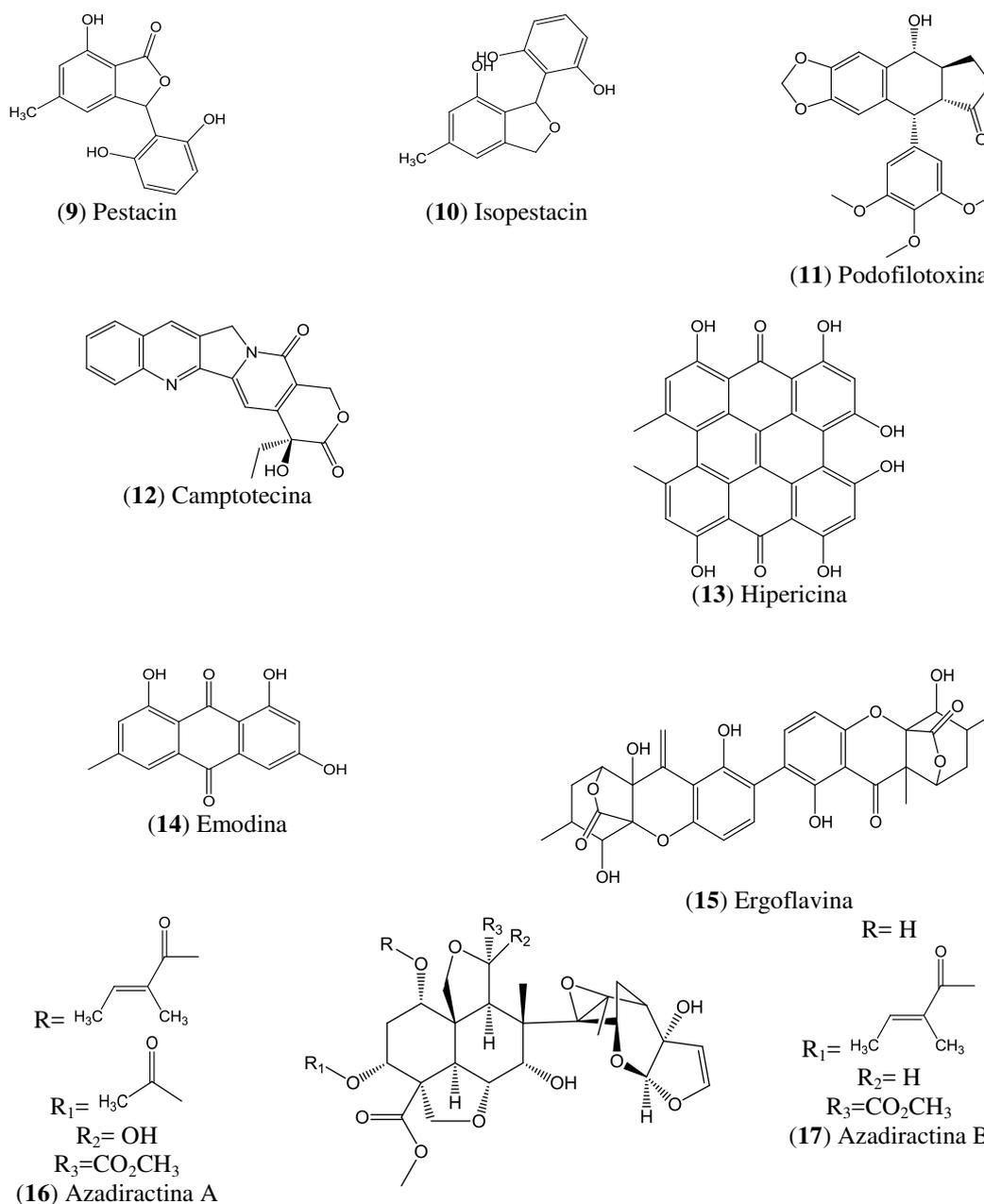
(7) Criptocina



(8) Ácido Ambuico

Fonte: Imagens redesenhadas pelo Autor no *ChemDraw* Ultra 12.0.

Figura 2- Compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos.

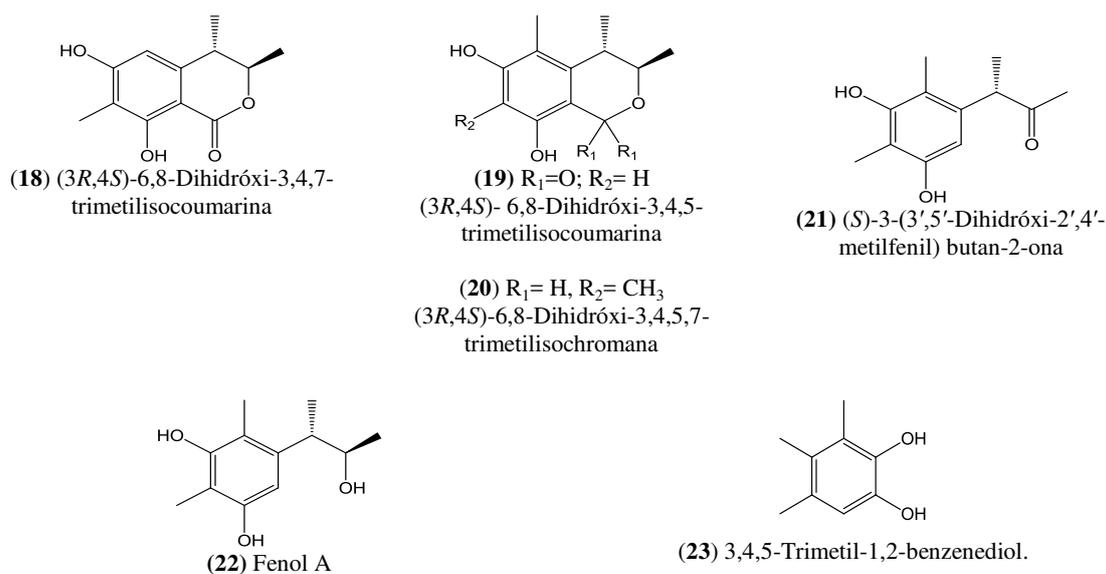


Fonte: Imagens redesenhadas pelo Autor no *ChemDraw* Ultra 12.0.

Existem apontamentos de outros compostos fúngicos com importância terapêutica, tais como artemisinina e canabinóides, dentre muitos outros para serem descobertos (KUSARI; SPITELLER, 2011; ZHAO et al., 2011). Por exemplo, Han et al. (2009) isolaram o fungo endofítico *Penicillium* sp. 091402 das raízes de *Bruguiera sexangula*, uma planta do mangue. Os autores caracterizaram seis compostos a partir dos metabólitos secundários deste endófito, sendo um deles inédito (18) e outros cinco já conhecidos (19-23) (Figura 3). Destaca-se o composto 18, cujo IC₅₀ contra a

linhagem tumoral leucêmica (K562) foi de 18,9 $\mu\text{g/mL}$ e o composto **22** com atividade citotóxica contra a linhagem do câncer gástrico humano (SGC-7901, IC_{50} : 36 $\mu\text{g/mL}$). Há que se considerar que, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (NCI), os critérios de atividade citotóxica considerados coerentes é $\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990).

Figura 3 - Metabólitos bioativos de *Penicillium* SP. 091402, um fungo endofítico isolado das raízes de *Bruguiera sexangula*.

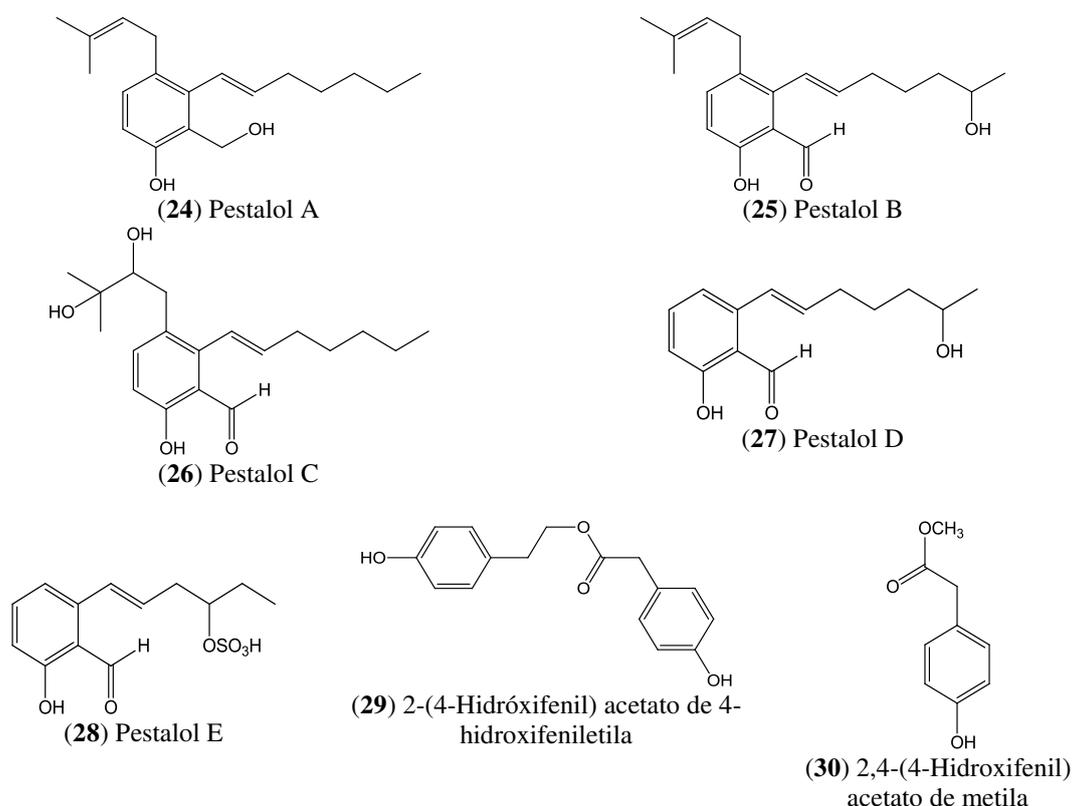


Fonte: Adaptado de Han et al. (2009).

Nota: Imagens redesenhadas pelo Autor no *ChemDraw* Ultra 12.0.

Sun et al. (2014) pesquisaram fungos endofíticos do mangue chinês (*Aegiceras corniculatum*) e isolaram o gênero *Pestalotiopsis* sp. AcBC2, capaz de produzir compostos fenólicos até então não descritos (**24**) a (**28**) e outros já mencionados (**29**) e (**30**), cujas estruturas químicas são ilustrados na Figura 4. Foi verificada a atividade antiproliferativa frente linhagens celulares humanas (cólon, pulmão, próstata, ovário, mama, colo do útero, pâncreas e tumores malignos de melanoma), sendo os compostos Pestalol B (**25**) e C (**26**) eficazes contra dez linhagens. Os compostos (**24**) a (**28**) também exibiram atividade contra o vírus Influenza A subtipo H3N2 e gripe suína (H1N1). Além disso, Pestalol B (**25**) apresentou atividade inibitória contra tuberculose.

Figura 4 - Metabólicos secundários fenólicos produzidos por *Pestalotiopsis* sp. AcBC2, isolados do mangue chinês.



Fonte: Adaptado de Sun et al. (2014).

Nota: Imagens redesenhadas pelo Autor no *ChemDraw* Ultra 12.0.

Considerando toda biodiversidade disponível mundialmente, é notório que a atividade biológica da maioria dos compostos naturais ainda não tenha sido testada, existindo várias fontes inovadoras disponíveis a serem exploradas (STROBEL et al., 2004; HARVEY, 2007), preferencialmente de forma sustentável, como é o caso do estudo com micro-organismos endofíticos. Há que se analisar também que as exclusivas relações simbióticas entre plantas hospedeiras e seus associados endofíticos, tendem a levar os micro-organismos a apresentarem caminhos metabólicos especiais em relação a outros não endofíticos (STROBEL; DAISY, 2003).

Diante da expansão do conhecimento sobre as interações endófito-planta hospedeira, tem sido possível compreender melhor os processos ecológicos envolvidos nessa relação mutualística, e ainda, descobrir nessa relação, uma fonte alternativa de substâncias de interesse para a humanidade (SANTOS, 2003), das quais, 51% de compostos isolados de fungos endofíticos já se apresentaram como novos compostos bioativos (SANTOS et al., 2013). Mas ainda, tornam-se imprescindíveis estudos para possibilitar a compreensão mais profunda da relação hospedeiro-endófito em níveis

moleculares e genéticos, na esperança deste conhecimento minimizar problemas laboratoriais como a baixa capacidade produtiva de metabólitos pelos micro-organismos (ALY; DEBBAD; PROKSCH, 2011) favorecendo sua obtenção em escala industrial (KUSARI; SPITELLER, 2011).

2.2.1 Fungo endofítico *Gibberella moniliformis*

A denominação *G. moniliformis* é atribuída à fase sexuada ou teleomorfa do fungo, sendo a fase anamorfa ou assexuada atribuída à *Fusarium verticillioides* (JURGENSON; ZELLER; LESLIE, 2001).

Fungos endofíticos, incluindo o gênero *Fusarium*, ainda são relativamente pouco explorados e raramente conhecidos em comparação com os fungos isolados do solo e os fitopatogênicos (TAN; ZOU, 2001). Embora menos frequente, existem na literatura relatos da associação mutualística entre o gênero *Fusarium* e seus hospedeiros, com resultados favoráveis decorrentes dessa interação. Lee; Pan e May (2009) inocularam o fungo endofítico do milho *Fusarium verticillioides* em culturas de milhos considerando três momentos: antes, simultaneamente e após a inoculação do patógeno *Ustilago maydis* DC (Corda), o qual é responsável por provocar ferrugem no milho e comprometer o crescimento da planta. Os resultados indicaram que o fungo endofítico de ocorrência comum no milho, *F. verticillioides*, melhorou os efeitos provocados pelo patógeno *U. maydis*, interferindo no processo de infecção e desenvolvimento da doença, contribuindo positivamente com o crescimento da planta estudada.

Apesar de muitos metabólitos e compostos produzidos por endófitos ainda representarem uma incógnita sob vários aspectos (origem, função, rota metabólica), certamente contribuem com papel ecológico vasto frente às diversas interações realizadas com seus hospedeiros (TAN; ZOU, 2001; SCHULZ et al., 2002; TEJESVI et al., 2007). São conhecidas na literatura algumas micotoxinas provenientes deste gênero: ácido fusárico (BACON et al., 1996); fumonisinas (MUNHOZ et al., 2015) e a moniliformina (ISMAIEL; PAPENBROCK, 2015). Este gênero também compreende espécies que são empregadas como agentes no controle biológico (BENHAMOU; GARAND; GOULET, 2002) e produtores de hormônios de plantas, como giberelinas (TSAVKELOVA et al., 2008) e compostos antitumorais (SHWETA et al., 2010). Segundo Ismaiel; Papenbrock (2015), durante a simbiose, a presença de micotoxinas pode exercer efeitos biológicos sutis sobre a fisiologia das plantas, mas, não

necessariamente a micotoxina produzida pelo fungo endofítico irá exercer ação patológica sobre o hospedeiro.

Sebastianes et al. (2013) descreveram que o terceiro gênero de fungos endofíticos mais frequente no mangue brasileiro compreende o gênero *Fusarium*, o qual também foi reportado como frequente em outros mangues (CHENG et al., 2009). Zaher et al. (2015) identificaram um novo antibiótico, a enniatina, a partir do endófito *Fusarium tricinctum* Corda. Os autores destacaram que as enniatinas são antibióticos produzidos também por outros gêneros (*Halosarpheia*, *Verticillium* e *Alternaria*).

Diante da importância que os fungos endofíticos apresentam, em especial o gênero *Fusarium*, associado à carência de moléculas para driblarem a resistência antimicrobiana e outras patologias como tuberculose e câncer, os estudos com fontes naturais protagonizados pelo fungo endofítico *G. moniliformis* proveniente do mangue brasileiro, tendem a contribuir grandemente com a ciência na busca de novos compostos de interesse farmacológico.

2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS

Muitas são as narrativas na literatura sobre a capacidade de fungos endofíticos produzirem metabólitos com distintas atividades biológicas (CAO et al., 2012; CARVALHO et al., 2012; SPECIAN et al., 2012; CUI; GUO; XIAO, 2011; SONG et al., 2005).

Os autores descrevem para os endófitos potencial antimicrobiano e anticâncer (PENG et al., 2013; KORNSAKULKARN et al., 2011), somente anticâncer (SUN et al., 2014; COSTA-LOTUFO et al., 2010; STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993), somente antimicrobiano (SEBASTIANES et al., 2012; FERNANDES et al., 2009; GONG; GUO, 2009; PHONGPAICHIT et al., 2006), com destaque também contra micobactérias (ALVIN; MILLER; NEILAN, 2014).

2.3.1 Compostos anticâncer

O interesse no meio científico por compostos de origem natural para tratar diversos tipos de câncer foi iniciado principalmente após 1954, com relatos de Sidney Farber empregando o antibiótico actinomicina D (extraído do cultivo de *Streptomyces*)

para tratar um paciente com tumor de Wilms metastático (COSTA-LOTUFO et al., 2010; FARBER, 1955).

Considerando a literatura, pode-se dizer que os fungos endofíticos estão também associados à descoberta de compostos anticancerígenos de origem natural. Isso devido a descoberta por pesquisadores na década de 90 (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993) que o fungo endofítico *Taxomyces andreanae* era capaz de produzir o antitumoral taxol, que até então era extraído da casca de *T. brevifolia* (WANI et al., 1971) em uma prática que quase provocou a extinção da planta.

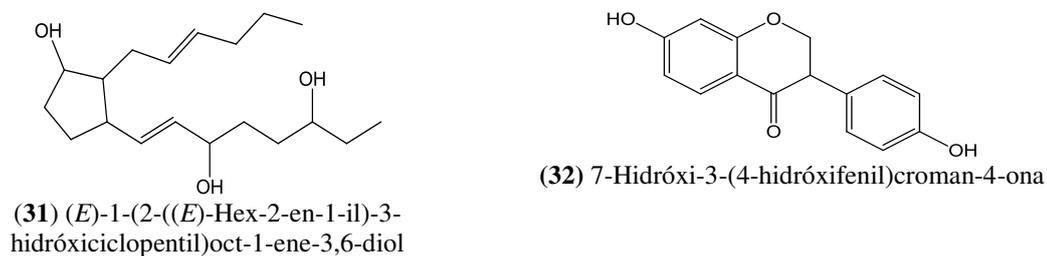
Embora o taxol venha salvando muitas vidas de pacientes com câncer de mama, carcinoma de ovário, sarcoma de Kaposi e neoplasia maligna dos brônquios e dos pulmões, ainda não é o fármaco ideal devido ao grau de toxicidade e efeitos colaterais provocados nos pacientes em tratamento (PACLITAXEL, 2016). Diante disso, além do taxol, outras moléculas continuam sendo pesquisadas e aprimoradas, mas também descobertas, advindas de produtos naturais ou de semissínteses, no intuito de ampliar o arsenal terapêutico no combate ao câncer, buscando tratamento contra novos alvos tumorais, contra a resistência das células tumorais aos agentes quimioterápicos disponíveis, bem como, minimizando os efeitos colaterais ocasionados durante o tratamento. Estes e outros fatores motivam a busca por novas agentes anticâncer, além de incentivar estudos para aperfeiçoar os fármacos já existentes (NCI, 2016).

Na literatura, é possível encontrar relatos promissores de trabalhos com metabólitos secundários de fungos endofíticos, sendo evidenciado pelo levantamento realizado por Kharwar et al. (2011), entre 1990 e 2010, os quais descreveram o potencial de mais de 50 fungos endofíticos responsáveis pela produção de 100 compostos, pertencentes a 19 classes químicas diferentes, os quais exibiram atividade contra 45 linhagens celulares distintas.

De forma mais detalhada, pode-se observar o trabalho de Zhang et al. (2005), os quais obtiveram, a partir da cultura do fungo endofítico *Cephalosporium acremonium* IFB-E007 isolado das raízes de *Trachelospermum jasminoides* (LINDL.), quatro metabólitos (grafislactona G, grafislactona H, grafislactona A e alternariol monometil éter). Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que os quatro compostos apresentaram pronunciada atividade contra células derivadas do câncer de colon humano (SW1116) sendo o IC₅₀ (µg/mL) para os compostos, respectivamente: 21; 12; 8,5 e 14. Como controle positivo do teste, empregou-se 5-fluorouracil, cujo IC₅₀ foi 6,0 µg/mL.

Outro exemplo foi descrito por Puri et al. (2005), os quais relataram a obtenção de camptotecina a partir da fermentação de um fungo endofítico isolado do interior da casca de *Nothapodytes foetida* na Índia. Ainda, Tao et al. (2010) descreveram duas moléculas (**31** e **32**, Figura 5) produzidas por fungos endofítico provenientes do manguê da China, as quais foram apresentadas como promissoras no tratamento de pacientes com câncer, incentivando mais esforços para obtenção de candidatos favoráveis para o desenvolvimento de quimioterápicos provenientes do manguê.

Figura 5 - Moléculas produzidas por fungos endofíticos isolados do manguê na China.



Fonte: Adaptado de Tao et al. (2010).

Nota: Imagens redesenhadas pelo Autor no *ChemDraw* Ultra 12.0

2.3.2 Compostos antimicrobianos

A busca de compostos metabolizados por micro-organismo é mais recente que a história dos produtos provenientes de plantas (GALLO et al., 2008), sendo o maior impulso ocorrido em 1928, quando Alexander Fleming descobriu um composto antibacteriano a partir de uma substância secretada por *Penicillium notatum* em uma placa de cultura contaminada. Este fato revolucionou a pesquisa e o tratamento de infecções bacterianas (BUSH, 2010).

Em 1940 foi relatado o primeiro caso de resistência bacteriana (BUSH, 2004; ABRAHAM; CHAIN, 1940). Na década de 1970, o principal problema era a resistência aos fármacos contra bactérias Gram-negativas. Na década de 1980, bactérias Gram-positivas também se tornaram preocupantes, incluindo Estafilococos resistentes à meticilina, Pneumococos resistentes à penicilina e Enterococos resistentes à vancomicina (MOELLERING, 1998).

Desde então, muitas estratégias vem sendo empregadas por indústrias farmacêuticas e pesquisadores no desenvolvimento de novos antimicrobianos, como exemplo, pode-se citar a prospecção de substâncias de origem natural a partir de plantas

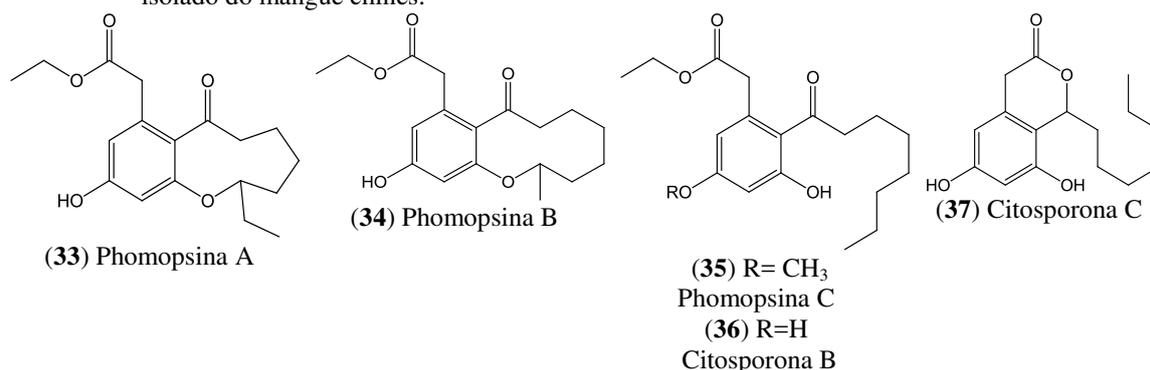
e micro-organismos (ROCHA et al., 2011; WRIGHT; SUTHERLAND, 2007). Com isso, se torna crescente o número de estudos e a caracterização de compostos provenientes de produtos naturais com propriedade antimicrobiana (NEWMAN; CRAGG, 2016). De acordo com Guimarães et al. (2008), os fungos endofíticos vem emergindo como fonte alternativa para a produção de novos agentes com esse propósito. Estes autores isolaram 39 fungos endofíticos da *Viguiera arenaria* e *Tithonia diversifolia*, e verificaram que 64,1% dos extratos acetato de etila obtidos com a fermentação fúngica em caldo Czapek, exibiram atividade contra *C. albicans* ATCC 10231, evidenciando que estes endófitos podem produzir compostos antifúngicos.

Sebastianes et al. (2012) descreveram que, necessariamente, na busca por novos antimicrobianos, estes devem apresentar-se eficazes, com baixa toxicidade e serem provenientes de um processo de descoberta que implique em um impacto ambiental mínimo. Desta forma, obtiveram um composto antimicrobiano, ácido 3-hidroxiopropiônico, a partir do metabolismo do fungo endofítico *Diaporthe phaseolorum* proveniente do mangue brasileiro. Os pesquisadores observaram valores de CIM de 64 µg/mL contra *S. aureus* e *Salmonella typhi*.

Shaala; Youssef (2015) estudaram compostos bioativos de um fungo marinho denominado *Penicillium* sp. CYE-87, e identificaram que os compostos terretrione C e terretrione D (inérito) apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans* (CIM: 32 µg/mL).

Em estudos de Huang et al. (2008) foram caracterizados cinco compostos (**33-37**, Figura 6) obtidos do fungo endofítico ZSU-H76, isolado de uma árvore do mangue chinês (*E. agallocha*). Dentre estes compostos, dois (**35** e **37**) apresentaram satisfatória atividade antifúngica contra *C. albicans* e *Fusarium oxysporum*, cujas concentrações inibitórias mínimas foram, respectivamente, 32 e 64 µg/mL.

Figura 6 - Estruturas de compostos fenólicos produzidos por fungos endofíticos *Phomopsis* sp. ZSU-H76 isolado do mangue chinês.



Fonte: Adaptado de Huang et al. (2008).

Nota: Imagens redesenhadas pelo Autor no *ChemDraw* Ultra 12.0.

Munumbicinas A-D foram produzidos em caldo fermentativo por *Streptomyces* sp., isolado de *Kennedia nigriscans* e apresentaram atividade antimicrobiana contra patógenos humanos (*Bacillus anthracis* e *M. tuberculosis* resistente) e patógenos de plantas (*Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cinnamomi*, *Geotrichum candidum* e *Sclerotinia sclerotiorum*) (CASTILLO et al., 2002).

O composto inédito 4-(2,4,7-Trioxa-biciclo [4.1.0] heptan-3-il) fenol, proveniente do metabolismo do fungo endofítico *Pestalotiopsis mangiferae*, associado com folhas de *Mangifera indica* Linn foi testado por Subban; Subramani; Johnpaul (2012) frente diversos patógenos, sendo ativo contra bactérias Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* (CIM: 0,039 µg/mL), *E. coli* (CIM: 1,25 µg/mL) e *P. aeruginosa* (CIM: 5,0 µg/mL). Por meio de estudos de microscopia eletrônica de transmissão, foi observado ainda que este composto revelou ação bactericida ao destruir as células de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* por meio de aglutinação de citoplasma e formação de poros nas membranas da parede celular, contribuindo assim, com dados sobre o modo de ação do composto isolado.

Hoffman et al. (2008) identificaram um novo composto fenólico, a partir das culturas do fungo endofítico *Phoma pinodella*, denominado Phomodiona, o qual exibiu ação antimicrobiana contra *S. aureus* mas não foi ativo contra *E. coli*.

Outros relatos na literatura mostram esforços de pesquisadores na busca por sucesso com substâncias oriundas do metabolismo de fungos endofíticos. É o caso de Kjer et al. (2009) que descreveram a altenusina e o ácido xanaltérico I e II (inéditos), os quais foram isolados do fungo endofítico *Alternaria* sp. a partir de uma planta do mangue denominada *Sonneratia alba*. Embora os compostos inéditos tenham exibido

fraca atividade antimicrobiana contra *S. aureus* resistente a multi-drogas (CIM: 125-250 µg/mL), a molécula de altenusina evidenciou ampla atividade antimicrobiana contra várias cepas multirresistentes de bactérias (*Streptococcus pneumoniae*; *S. aureus* meticilina resistente, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus cloacae*) e fungos (*Aspergillus fumigatus* e *C. albicans*), com valores de CIM entre 31,25 e 125 µg/mL.

Casella et al. (2013) também obtiveram sucesso ao estudarem o fungo endofítico *Chaetomium globosum* SNB-GTC2114 na floresta tropical da Guiana Francesa, obtendo dois compostos. Semicochliodinol A foi ativo contra *S. aureus* ATCC 29213 (CIM: 2 µg/mL) e cochliodinol apresentou atividade antimicrobiana contra *C. albicans* ATCC 10213 (CIM: 2 µg/mL) e *S. aureus* ATCC 29213 (CIM: 4 µg/mL). Ainda, os autores obtiveram o composto alterperileno que classificaram como ativo contra *S. aureus* ATCC 29213 (CIM: 32 µg/mL).

No ano de 2015 foi destacada por agências regulatórias (OMS) a importância da regulação e promoção do uso racional de medicamentos com o propósito de prevenir e controlar as infecções, bem como impedir a resistência microbiana (LETRA, 2015). Fato este que vem crescendo e se tornando ainda mais relevante ao considerarmos que doenças infecciosas já lideram, em mortes, o primeiro lugar nos países subdesenvolvidos e o terceiro lugar no mundo (WHO, 2011).

Dentro deste contexto, autores afirmam que as abordagens sintéticas para a produção de antibióticos ainda têm sido incapazes de mudar a realidade de resistência antimicrobiana, pois a mesma vem ocorrendo mais rapidamente do que a capacidade de introdução de novos compostos na clínica médica (LING et al., 2015). Neste sentido, estudos vêm ressaltando que o uso de extratos ou compostos de origem natural em combinação com antimicrobianos tem promovido significativa redução das concentrações inibitórias mínimas sobre isolados resistentes de diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SOUZA et al., 2010; VINOD et al., 2010). E esta terapia de combinação se faz uma abordagem importante, pois pode ser usado para expandir o espectro antimicrobiano, prevenir a resistência dos micro-organismos emergentes, minimizar a toxicidade e obter atividade sinérgica (KUMAR et al., 2012).

Na literatura, embora ainda escassos, é possível encontrar relatos de estudos com metabólitos de endófitos em combinação com antimicrobianos de uso comercial. No trabalho de Arivudainambi et al. (2011), os autores avaliaram os efeitos sinérgicos do extrato metanólico da fermentação do fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides* com penicilina, meticilina e vancomicina, frente a várias cepas de *Staphylococcus*

aureus resistentes a esses medicamentos. Foi observada uma ação sinérgica do extrato testado juntamente com os antibióticos contra a cepa 6 de *S. aureus* resistente, sendo o resultado significativo para a redução dos valores da concentração inibitória mínima. Semelhantemente, Ramesh; Karunakaran; Rajendran (2012) verificaram que o extrato acetato de etila obtido de *Xylaria curta*, quando em associação com vancomicina e ciprofloxacina, possuiu ação sinérgica contra cepas multi-resistentes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Os valores de ICIF observados foram 0,22 para vancomicina frente à cepa 8 de *S. aureus* e 0,46 para ciprofloxacina frente à cepa 1 de *P. aeruginosa*.

Diante do exposto, fica evidenciada a importância de incentivos às pesquisas que possibilitem descobrir novas moléculas com propriedades antimicrobianas ou que atuem eficazmente de modo sinérgico.

2.3.2.1 Compostos antimicobacterianos

A descoberta de novos fármacos contra micobactérias representa um grande desafio. Isto se deve às características morfológicas e estruturais do agente etiológico da tuberculose em humanos, *Mycobacterium tuberculosis*, o qual se apresenta com a forma de bacilo reto e fino, medindo de 1 a 5 μm de comprimento por 0,45 μm de largura. Trata-se de um patógeno aeróbio obrigatório com crescimento muito lento. Possui grande quantidade de lipídios presentes em sua parede celular, o que representa uma significativa proteção contra agentes agressores e parece determinar o longo e desgastante tratamento ao indivíduo acometido pela doença. Os ácidos micólicos (ácidos graxos de cadeia longa de C78-C90), ceras e fosfatídios são os principais representantes dos lipídios. Devido à natureza hidrofóbica da superfície celular e ao crescimento em agregados, mostra-se altamente resistente à desidratação e aos agentes químicos como álcalis, ácidos, antibióticos e quimioterápicos (BRASIL, 2005; KONEMAN et al., 2001).

Trata-se da segunda doença infecciosa com mais mortes no mundo, ficando atrás somente do HIV. No Brasil, em 2013, foram registrados 73.692 casos novos de tuberculose no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan). A taxa de incidência foi de 36,6/100 mil habitantes para todas as formas de tuberculose. Do total de casos novos, 10,1% eram coinfectados TB-HIV. Ainda em 2013, foram diagnosticados 503 casos novos de tuberculose multidroga-resistente (BRASIL, 2015).

Fármacos como o alcaloide piridínico isoniazida (INH) e o análogo pirazínico da nicotinamida, a pirazinamida (PZA) têm historicamente sido bem sucedidos no tratamento de infecções de tuberculose. Entretanto, pelo fato do tratamento envolver a administração de muitos fármacos durante um longo período de tempo, provoca a não adesão do paciente, que resulta com o surgimento de cepas resistentes (AZIZ et al., 2006). Por isso, há necessidade urgente de novos fármacos potentes para serem empregados na terapia da tuberculose (SOUZA et al., 2010). A atividade antituberculose tem sido demonstrada para diversas estruturas químicas provenientes de plantas, mas também de outras fontes como fungos e organismos marinhos (PAULI et al., 2005).

Na literatura, embora ainda sejam poucos os relatos de moléculas com potencial antimicobacteriano provenientes do produto da fermentação de fungos endofíticos, observa-se que se trata de uma linha de pesquisa em crescimento devido ao retorno positivo proporcionado por esses estudos. Pode-se exemplificar o trabalho de Chomcheon et al. (2005), o qual identificaram o metabólito Ácido nitropropanóico, isolado de fungo endofítico *Phomopsis* sp., que apresentou alta atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* (CIM: 3,3 µM). Prince (2008) identificou uma substância pura, denominado Ácido pirenochaético A, a partir da fermentação de um fungo endofítico não identificado, isolado das raízes de *Michelia champaca*, presente no cerrado brasileiro. Tal composto apresentou excelente atividade antimicobacteriana, com valor de CIM de 3,9 µg/mL. Cheng et al. (2012) identificaram duas moléculas, Biscogniazafilona A e B, a partir da fermentação do endófito *Biscogniauxia formosana* encontrado na casca da planta medicinal *Cinnamomum* sp. Os autores observaram forte atividade antimicobacteriana contra *M. tuberculosis* cepa H₃₇Rv, sendo os valores de CIM 5,12 e 2,52 µg/mL, respectivamente. Mais recentemente, Prabpai et al. (2015) relataram a elucidação estrutural de (-)-cis-(7R*,8S*)-4,7,8-Trihidroxi-3,6,7,8-tetrahidronafto-[2,3-c]furan-5(1H)-ona, metabólito que evidenciou importante atividade antimicobactéria contra a cepa *M. tuberculosis* H₃₇Ra (IC₅₀ 3,125 µg/mL) e também antimalárica contra *Plasmodium falciparum* K1 (IC₅₀ 11,3 µg/mL). Ele foi produzido pelo fungo endofítico *Nodulisporium* sp. proveniente de *Antidesma ghaesembilla*.

2.4 ALCALOIDES

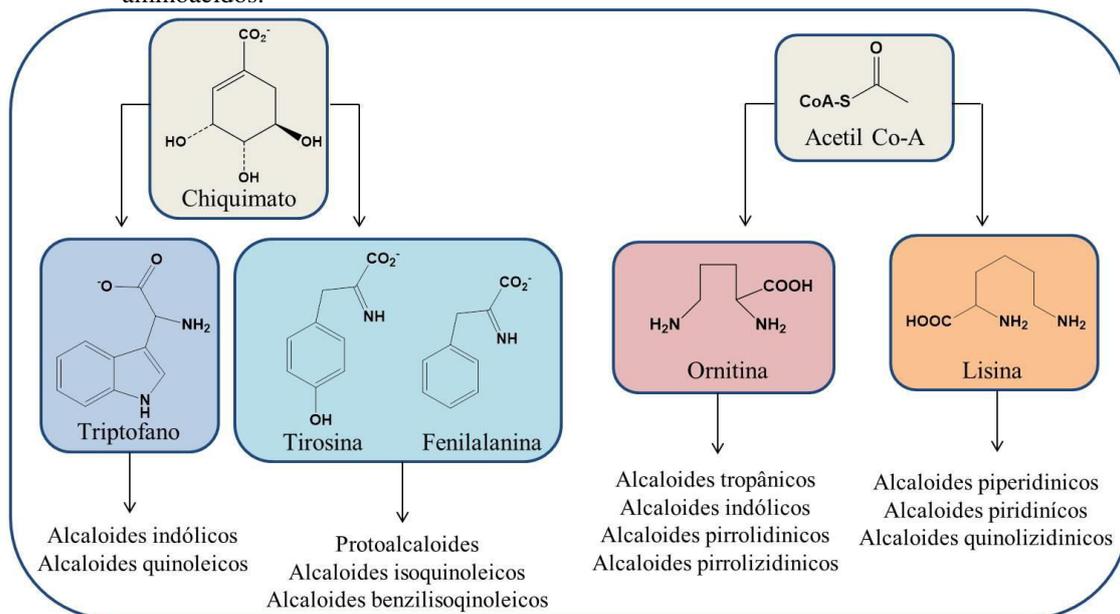
Várias são as classes químicas capazes de serem metabolizadas por fungos endofíticos, as quais atuam em diversos alvos biológicos (PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011).

Os alcaloides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas comumente em plantas superiores e, em menor escala, em plantas inferiores, animais, micro-organismos e organismos marinhos (BHAT; NAGASAMPAGI; MEENAKSHI, 2009), podendo ser originados a partir dos aminoácidos (Figura 7). Esta classe de compostos, de forma geral, se sobressai pelas diversas substâncias de acentuado efeito no sistema nervoso e que, largamente, são utilizadas como venenos ou alucinógenos. Destaca-se a morfina, administrada para pacientes com câncer em fase terminal; a colchicina, utilizada no tratamento da gota; a quinina, empregada como antimalárico; a teofilina e teobromina, como diuréticos (HENRIQUES et al., 2004). Além disso, Ishihara et al. (1992) descreveram presença de alcaloides no óleo essencial de hortelã, atribuindo a eles a responsabilidade pelo aroma pungente do óleo.

Os alcaloides possuem, comprovadamente, valioso papel por sua propriedade inseticida, citotóxica, anticancerígena e antimicrobiana (ZHANG et al., 2012), que permitem seu uso pela indústria farmacêutica ou na agricultura. Fungos endofíticos também são descritos na literatura como produtores de alcaloides, cujo papel no hospedeiro, especialmente gramíneas forrageiras, é de proteção contra fatores bióticos (ação contra insetos herbívoros e parasitas, herbivoria de aves e mamíferos) e abióticos (LUO et al., 2015; AZEVEDO, 1999). Em contrapartida, os fungos se beneficiam pelo abrigo, proteção e acesso aos nutrientes fornecidos pela planta (VERMA; KHARWAR; STROBEL, 2009; ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005).

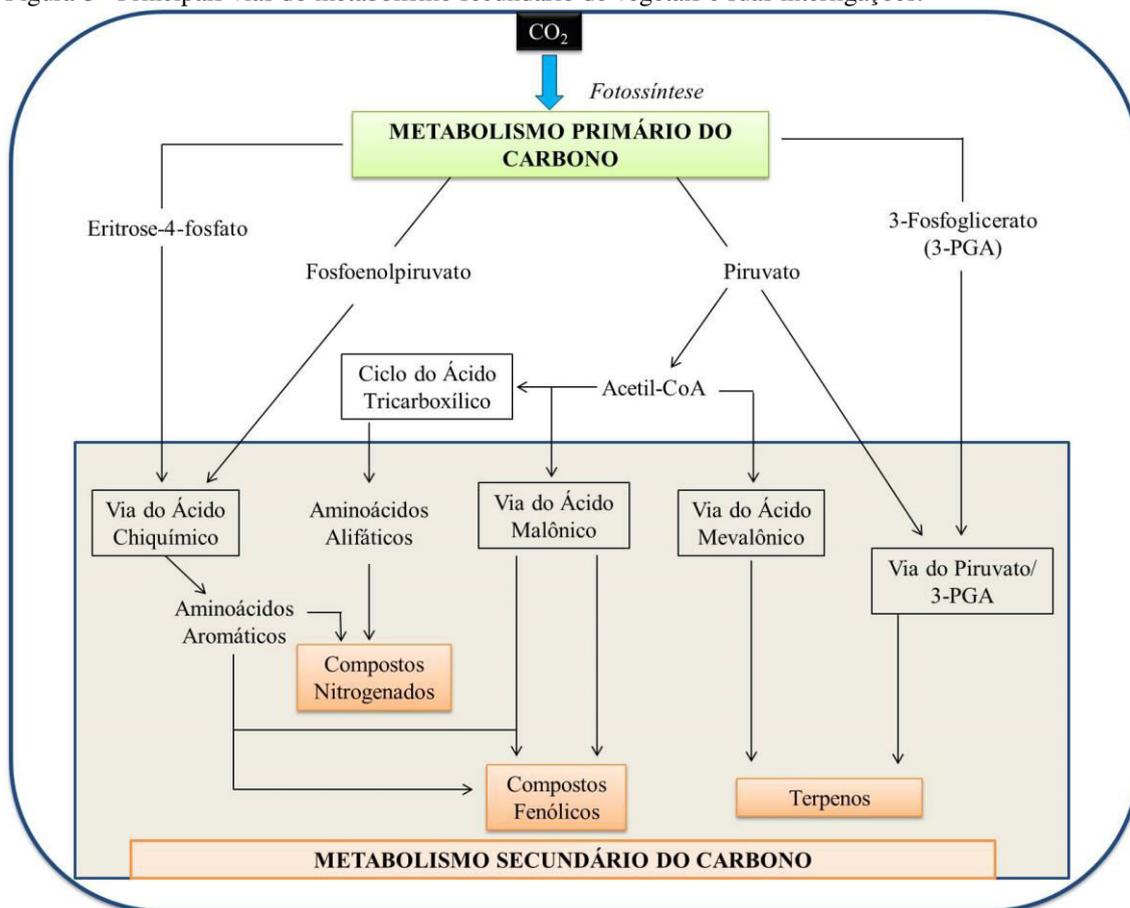
Embora a maioria dos fungos apresentem rotas bioquímicas peculiares, de acordo com Canuto et al. (2012), pode-se assemelhar o metabolismo do reino Fungi com o das plantas (Figura 8), pois diversos compostos fitoquímicos (vincristina, taxol, etc.) já foram encontrados neles. A diversidade química e a complexidade estrutural dos compostos produzidos por plantas ou micro-organismos serão decorrentes da via biossintética adotada: via do ácido chiquímico (precursor de compostos aromáticos), do acetato (precursor de ácidos graxos, polifenóis, isoprenos, prostaglandinas) e dos aminoácidos (precursores de alcaloides) (CANUTO et al., 2012).

Figura 7 - Principais núcleos fundamentais dos alcaloides heterocíclicos e sua origem biossintética de aminoácidos.



Fonte: Adaptado de Bhat; Nagasampagi; Meenakshi (2009).

Figura 8 - Principais vias do metabolismo secundário de vegetais e suas interligações.



Fonte: Adaptado de Taiz; Zeiger (2013).

Produzidos por fungos endofíticos, os alcaloides também podem desempenhar diversos papéis biológicos. Criptocina, um potente alcaloide com ação antifúngica, foi produzido pelo fungo endofítico *Cryptosporiopsis quercina*, presente na casca do caule de *Tripterygium wilfordii* (STROBEL; DAISY, 2003).

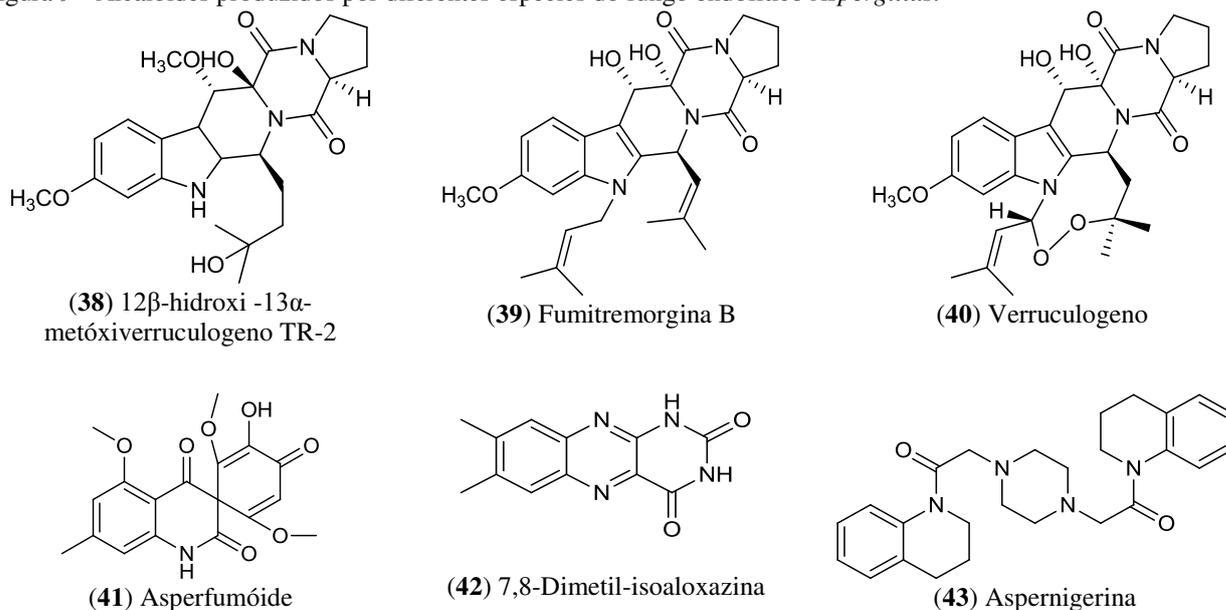
Li et al. (2012) caracterizaram treze alcaloides indólicos originários de *Aspergillus fumigatus*, fungo endofítico isolado de *Melia azedarach*. Os autores destacaram 12- β -Hidroxi-13- α -metóxiverruculogeno TR-2 (**38**) e Fumitremorgina B (**39**) como promissoras fungicidas. Os compostos (**39**) e Verruculogeno (**40**) se destacaram por considerável ação inibitória contra larvas da lagarta *Mythimna separata* Walker (Figura 9). Neste estudo os autores destacaram que o fungo *A. fumigatus* poderia estar envolvido diretamente na proteção da planta hospedeira *M. azedarach* contra a invasão por parasitas, insetos e patógenos.

Vincristina (**4**) (utilizada no tratamento de leucemia) e vimblastina (**3**) (terapia de cório-carcinomas e na doença de Hodgkin's) são alcaloides indólicos terpenoídicos, e também foram descritos como metabólitos de fungos endofíticos, tais como *Alternaria* sp. (GUO; LI; ZHANG, 1998), *Fusarium oxysporum* (ZHANG et al., 2000) e *Mycellia sterilia* (YANG et al., 2004).

O alcaloide Asperfumoide (**41**, Figura 9) foi isolado a partir do fungo endofítico *Aspergillus fumigatus* CY018, proveniente da planta *Cynodon dactylon*. O composto exibiu ação antifúngica contra *Candida albicans* com CIM de 75 $\mu\text{g/mL}$ (LIU et al., 2004). Wang et al. (2008) também isolaram este composto do produto de fermentação do fungo endofítico *Penicillium* sp., isolado a partir da folha de *Hopea hainanensis*. Além de (**41**), Wang et al. (2008) descreveram o composto 7,8-dimetil-isoaloxazina (**42**). Ambas as moléculas inibiram o crescimento de *C. albicans* com IC_{50} de 20 e 25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Além disso, o composto Asperfumoide (**41**) exibiu atividade citotóxica contra KB e Hep G2, com valores de IC_{50} de 20 $\mu\text{g/mL}$ e 15 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Aspernigerina (**43**, Figura 9), metabolizada pelo endófito *Aspergillus niger* IFB-E003, manifestou potencial citotóxico frente linhagens celulares de tumores da nasofaringe epidermóide, carcinoma cervical e carcinoma colorrectal, com correspondentes valores de IC_{50} de 22, 46 e 35 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (SHEN et al., 2006).

Figura 9 - Alcaloides produzidos por diferentes espécies do fungo endofítico *Aspergillus*.



Fonte: Adaptado de Li et al. (2012); Liu e al. (2004); Wang et al. (2008) e Shen et al. (2006).

Nota: Imagens desenhadas pelo autor no *ChemDrawUltra* 12.0.

2.4.1 Alcaloide Piridínico

Em relatos sobre alcaloides piridínicos, foi verificado que estes também se mostraram importantes nas atividades biológicas, tais como inseticidas (44-46) (VIEGAS Jr, 2003), atividade anti-HIV (47-48) (CHENG; MENG; CHEN, 1998) e citotóxica (49-50) (SRIPHONG et al., 2003), sendo as moléculas mostradas na Figura 10.

O'Hagan (2001) relatou isolamento de cerca de 100 alcaloides piridínicos a partir do ambiente marinho, destacando o composto 51 (Figura 11) constituído por unidades repetidas de *N*-Butil-(3-butilpiridina), o qual existe como uma mistura de 29 e 99 repetições. Estes polímeros se mostraram inibidores potentes da acetilcolinesterase. Ecologicamente, foi verificado que seu papel consistia na defesa das esponjas, ficando sua superfície inatingível para outros micro-organismos.

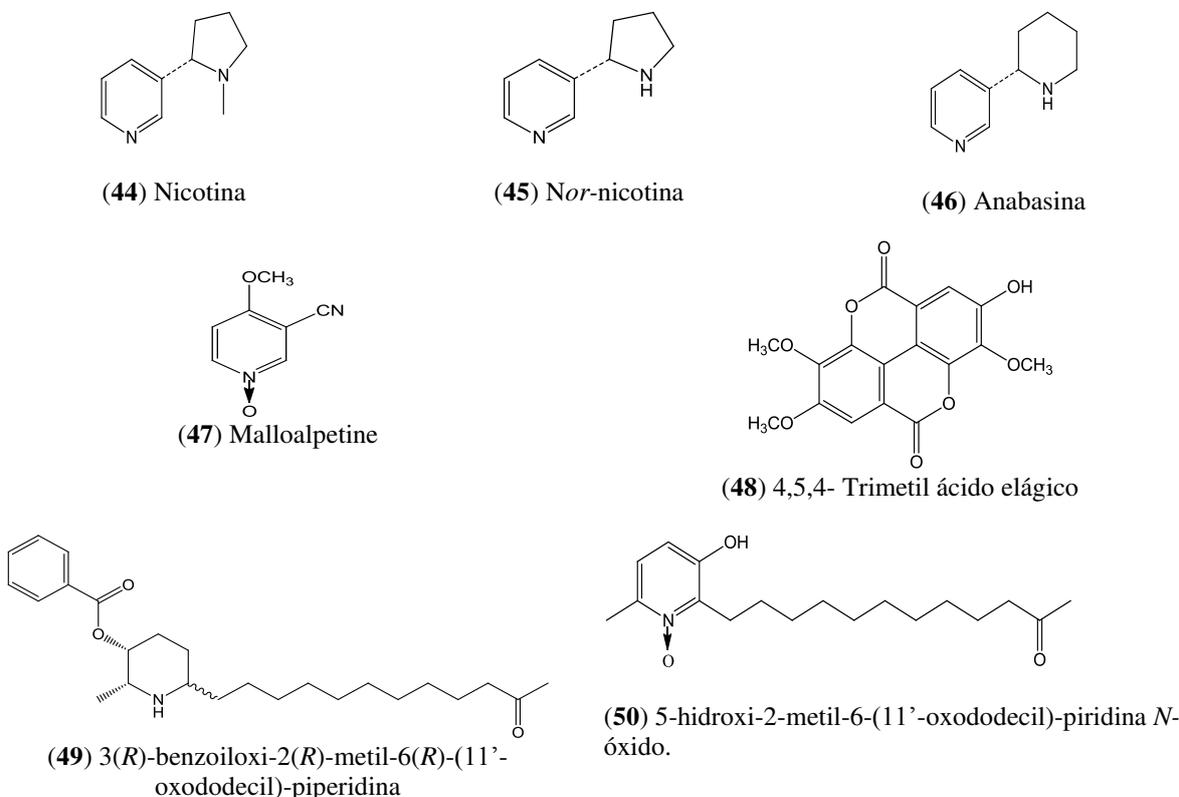
Dois novos compostos, (-)-4,6'-anhidrooxisporidinona (52) e (-)-6-deoxioxisporidinona (53), foram isolados a partir do caldo do fungo endofítico *Cladosporium herbarum* de *Efedrina fasciculata*, juntamente com um composto conhecido (-)-oxisporidinona (54) (ZHAN et al., 2007), ilustrados na Figura 11. Tais compostos não exibiram ação significativa contra as linhagens celulares humanas

tumorais avaliadas: NCI-H460 (células pequenas do pulmão), MIA PaCa-2 (pâncreas), MCF-7 (mama) e SF-268 (sistema nervoso central).

Ge et al. (2008) caracterizaram três alcaloides piridínicos (**55-57**, Figura 11) a partir da cultura de *Penicillium* sp., um endófito residente no tronco de *Quercus variabilis*, e os autores destacaram que tais moléculas apresentaram estruturas únicas pela presença de um núcleo γ -piridona idêntico, não descrito anteriormente para qualquer outro produto natural. Em ensaio de citotoxicidade *in vitro* contra quatro linhagens derivadas de câncer humano (SW1116, K562, KB e HeLa), os compostos apresentaram-se moderadamente citotóxicos, com valores de IC_{50} entre 21,1 e 90,8 μ M, intermediários aos valores de IC_{50} (entre 17 e 122 μ M) da 5-fluorouracilo empregada como controle positivo.

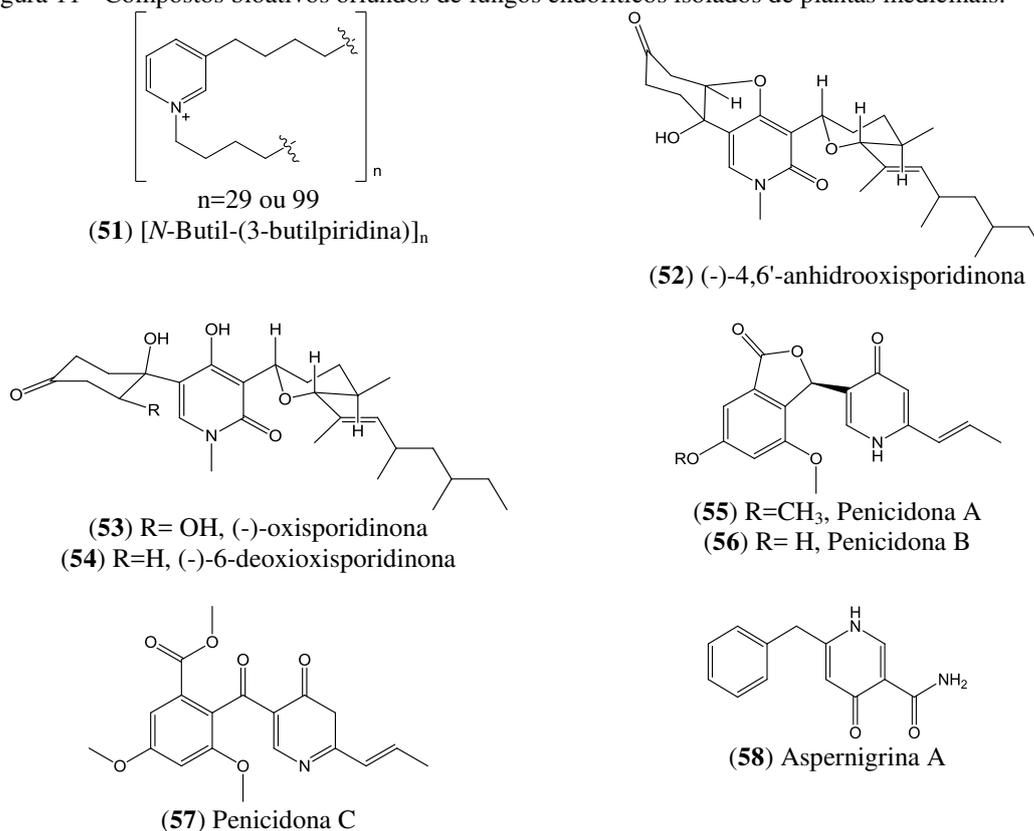
Aspernigrina A (**58**, Figura 11) também compreende um alcaloide piridínico proveniente do metabolismo secundário de *Cynodon dactylon* presente em *Cladosporium herbarum* (YE et al., 2005). Tal composto revelou potencial bioativo frente *C. albicans* (IC_{50} de 75,5 μ g/mL).

Figura 10 - Alcaloides piridínicos.



Fonte: Imagens redesenhadas pelo Autor no ChemDraw Ultra 12.0.

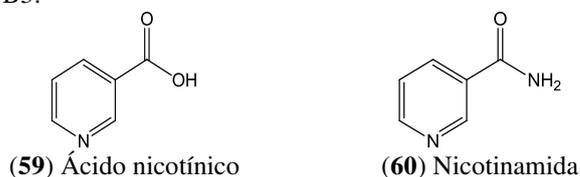
Figura 11 - Compostos bioativos oriundos de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais.



Fonte: Imagens redesenhadas pela Autor no *ChemDraw* Ultra 12.0.

Várias piridinas representam um papel importante no sistema biológico. Embora sua biosíntese não esteja completamente esclarecida, a vitamina B3 (**59-60**, Figura 12) ocorre em algumas bactérias, fungos e mamíferos, os quais sintetizam este composto através da oxidação de triptofano. Por outro lado, *M. tuberculosis* e *E. coli* produzem Ácido nicotínico (**59**) pela condensação de gliceraldeído-3-fosfato e ácido aspártico (TARR; ARDITTI, 1982).

Figura 12 – Vitamina B3.



Fonte: Imagens redesenhadas pela Autora no *ChemDraw* Ultra 12.0

Por este potencial, e outros já explorados no presente estudo, é que os fungos endofíticos se destacam, chamando a atenção de pesquisadores, os quais ainda precisam esclarecer dúvidas preciosas. Entre elas, como ocorre a produção de alcaloides durante a

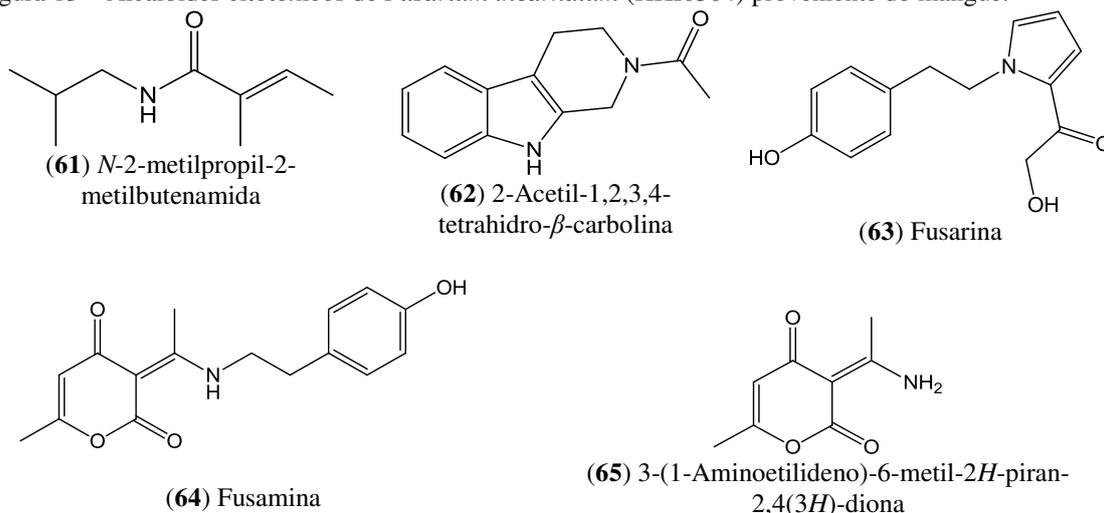
interação entre hospedeiros e endófitos. Além disso, faz-se necessário solucionar os problemas de baixo rendimento dos alcaloides produzidos por fungos endofíticos, de modo que seja possível contribuir para uma produção em larga escala a um custo mais baixo (ZHANG et al., 2012).

2.4.2 Papel ecológico dos alcaloides

Pouco se sabe sobre as funções que os metabólitos podem desempenhar nos organismos que os produziram (GLOER, 2007), entretanto, para algumas classes de compostos, algumas funções já são conhecidas. Por exemplo, Hoffman et al. (2008) encontraram na cultura de *Phoma pinodella*, um fungo endofítico isolado de *Saurauia scaberrinae*, o Ácido úsnico (derivado dibenzofurano) e a Cercosporamida (alcaloide) que são conhecidos por atuarem como regulador do crescimento de plantas e como fitopatógeno, respectivamente. White Jr.; Torres (2010) relataram que os alcaloides produzidos por endófitos, são capazes de oferecer proteção à planta contra herbivoria. Goyal (2013) descreveu que muita atenção tem sido dada para os alcaloides oriundos de micro-organismos endofíticos durante os últimos 25 anos, pois estes podem desempenhar um papel direto ou indireto na ecologia do habitat em que estão inseridos.

Ding; Dahse; Hertweck (2012) relataram a caracterização de cinco alcaloides (61-65) a partir da fermentação do endófito *Fusarium incarnatum* (HKI0504), proveniente do mangue (*Aegiceras corniculatum*) (Figura 13). Os autores comentaram que, do ponto de vista ecológico, é compreensível que manguezais abriguem uma flora microbiana rica, capaz de sintetizar metabólitos que protejam as plantas de agentes patogênicos.

Figura 13 – Alcaloides citotóxicos de *Fusarium incarnatum* (HKI0504) proveniente do manguê.



Fonte: Adaptado de Ding; Dahse; Hertweck (2012).

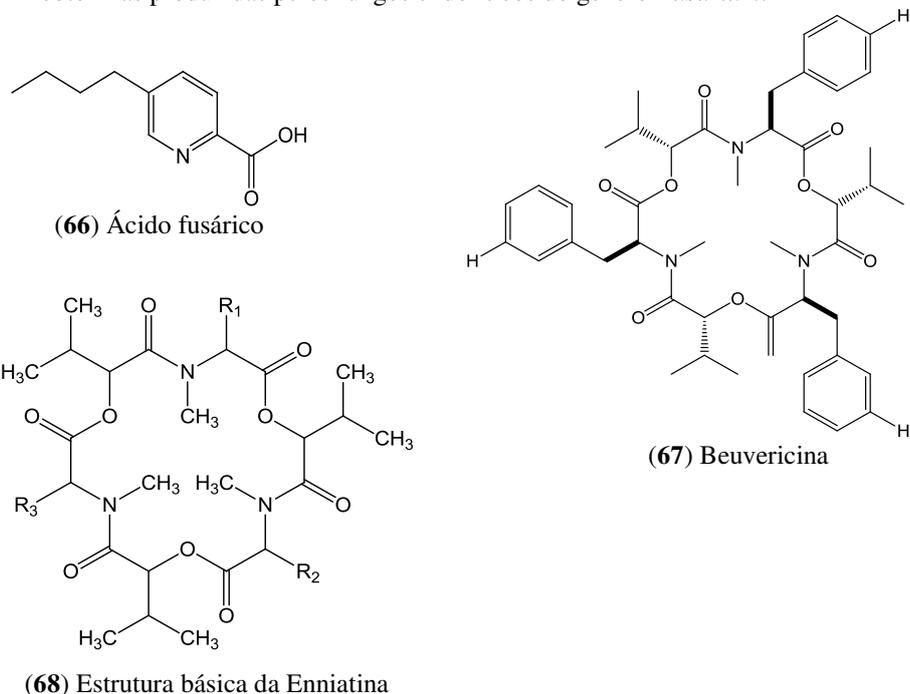
Nota: Imagens redesenhadas pela Autora no *ChemDraw* Ultra 12.0.

Kharwar et al. (2009) caracterizaram o composto javanicina a partir da cultura fúngica do fungo endofítico *Chloridium* sp., isolado das raízes da planta hospedeira *Azadirachta indica*, conhecida na medicina popular por seu poder cicatrizante e por sua ação inseticida. O composto evidenciou seletiva ação contra a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas fluorescens* (MIC: 2 $\mu\text{g/mL}$), cujo gênero está associado a doenças em animais, plantas e seres humanos. Além disso, houve eficácia de javanicina contra fitopatógenos (*Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae* e *Cercospora arachidicola*), sugerindo ao composto um papel protetor. Adicionalmente, os autores realizaram um interessante estudo, inoculando culturas puras deste fungo em raízes marcadas de *A. indica*, com incubação por um ano. Após o período, não foram observadas evidências de qualquer desenvolvimento de doenças, confirmando a relação simbiótica entre o referido micro-organismo e seu hospedeiro.

O gênero *Fusarium* é bastante conhecido por produzir diferentes classes de metabólitos secundários (ZAHER et al., 2015; SCOGNAMIGLIO et al., 2014; SONG et al., 2012; ELAVASARI; RATHNA; KALAISELVAM, 2012; STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993) como as micotoxinas. Estas podem ser exemplificadas pelo Ácido fusárico (66) (BACON et al., 1996), Beauvericina (67) e Ennitianinas (68) (ISMAIEL; PAPENBROCK, 2015) (Figura 14), as quais asseguram proteção à planta hospedeira pela toxicidade aos animais, mas, por outro lado, podem exercer ação fitotóxica em algumas culturas, como as de milho. Vale destacar que o ácido fusárico também apresenta potencial antimicobacteriano (PAN et al., 2011), farmacológico (HIDAKA et

al., 1969), inseticida e propriedades fitotóxicas (LIU et al., 2016), dentre outras (WANG; NG, 1999).

Figura 14 – Micotoxinas produzidas pelos fungos endofíticos do gênero *Fusarium*.



Fonte: Adaptado de Bacon et al. (1996) e Ismaiel; Papenbrock (2015)

Nota: Imagens redesenhadas pela Autora no *ChemDraw* Ultra 12.0.

2.5 MODELOS DE ESTUDO PARA O ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS DE PRODUTOS NATURAIS

Um extrato bruto constitui-se de uma matriz bem complexa contendo diversos metabólitos, os quais diferem consideravelmente em seus parâmetros físico-químicos e espectroscópicos (RODRIGUES et al., 2006). Para o estudo de novas moléculas bioativas, o extrato deve ser submetido a triagens química e biológica.

Na triagem química, inicialmente o extrato é fracionado visando o isolamento de substâncias puras. Os métodos cromatográficos são os mais utilizados atualmente nos processos de separação de compostos ativos presentes na mistura. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998), sendo comum o emprego da cromatografia em camada delgada (CCD) e da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no estudo com produtos naturais.

A CCD é um método de monitoramento que possui a vantagem de ser executada em poucos minutos sem a necessidade de utilização de aparelhos. Esta avaliação pode ser feita utilizando-se diferentes misturas de eluentes para que ocorra eluição dos compostos presentes no extrato e também utilizando diferentes reveladores (físicos e químicos) para a detecção dos tipos de substâncias presentes na amostra em estudo (PERES, 2002).

Adicionalmente, pode ser utilizada a CLAE cuja separação se deve à diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

O emprego dos métodos espectroscópicos se destina à elucidação estrutural, à análise de misturas e à orientação de trabalhos de separação e purificação de compostos. Compreende especialmente as técnicas de infravermelho (IV), ultravioleta (UV), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998).

A técnica de IV permitirá observar bandas relacionadas com os estados vibracionais e rotacionais das ligações presentes nas moléculas, de forma a oferecer informações sobre os diversos grupos funcionais existentes na molécula (ligação dupla ou tripla de carbono-carbono, funções nitrogenadas como amina, amida, nitrila, etc., ou oxigenadas, como álcool, cetonas, ácido carboxílico, aldeídos e a presença de enxofre, halogênios, entre outros) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998). A técnica de UV analisará as transições eletrônicas de um elétron no estado fundamental a um estado excitado e fornecerá dados sobre grupos cromóforos (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 1996; SILVERSTEIN et al., 1994).

A EM fornecerá dados sobre o peso molecular e padrões de fragmentação dos analitos. A técnica de RMN será importante para a obtenção de elementos estruturais detalhados sobre compostos orgânicos em solução e no estado sólido, incluindo informações sobre a disposição dos grupos funcionais na molécula, a estereoquímica, entre outras. (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 1996).

O uso em conjunto de técnicas espectrais, como UV, IV, RMN ^1H e ^{13}C e Massas, aliado ao uso de técnicas bidimensionais de RMN (COSY, HSQC, HMBC) tem permitido propôr com segurança a estrutura molecular de substâncias advindas de produtos naturais (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil químico e o potencial bioativo do produto da fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis* 99(3).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter extratos fúngicos com solvente acetato de etila e n-butanol a partir da fermentação de *G. moniliformis* 99(3);

Realizar o isolamento de compostos ou enriquecimento de frações por meio de técnicas cromatográficas e a identificação molecular através de técnicas espectroscópicas (RMN, EM e IV);

Realizar triagem antimicrobiana com os extratos por meio do ensaio de difusão em ágar;

Avaliar os efeitos do composto isolado sobre a viabilidade celular de linhagens humanas tumorais e normais por diferentes técnicas;

Determinar o potencial antimicrobiano dos extratos, frações e compostos frente a cepas ATCC de bactérias e leveduras;

Determinar o potencial antifúngico de frações e do composto contra cepas de *C. albicans* oriundas de fontes de infecção hospitalar;

Avaliar o efeito sinérgico da associação entre a molécula isolada com antimicrobianos comercialmente utilizados;

Avaliar o potencial antituberculósico do composto isolado frente ao *Mycobacterium tuberculosis*.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 FUNGO ENDOFÍTICO ESTUDADO

Para os ensaios utilizou-se o fungo endofítico: *Gibberella moniliformis* 99(3) isolado da folha de *Laguncularia racemosa* coletado em Bertioga/SP, Brasil (SEBASTIANES, 2010). O isolado foi gentilmente cedido pelo Professor Dr. Paulo Teixeira Lacava e encontra-se armazenado na coleção do Setor de Genética de Microorganismos do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Brasil. O isolado também se encontra estocado no Laboratório de Bioprocessos da Unifal-MG em água estéril (Metodologia de Castelani) e em 90% de glicerol.

4.2 OBTENÇÃO DE METABÓLITOS FÚNGICOS BIOATIVOS

Este estudo foi conduzido nos Laboratórios de Bioprocessos e Multidisciplinar I da Unifal-MG. Para a obtenção dos metabólitos secundários do fungo endofítico *G. moniliformis* 99(3), utilizou-se as orientações metodológicas descritas por Carvalho et al. (2012), ilustrado na Figura 15.

O isolado foi repicado, primeiramente, em meio de cultura ABD (ágar batata-dextrose) por sete dias a temperatura de 28°C. Em seguida, oito discos (5 mm) de micélio das culturas recentes em ABD foram cortados e inoculados em dez Erlenmeyers de 1000 mL, contendo 250 mL de caldo Czapek [Glicose: 30,0 g; NaNO₃: 2,0 g; K₂HPO₄: 1,0 g; MgSO₄.7H₂O: 0,5 g; KCl: 0,5 g; FeSO₄.7H₂O: 0,01 g; extrato de levedura: 1,0 g; água destilada: qsp 1000 mL] (RAPER; FENNELL, 1965), totalizando 2,5 L de caldo fermentado que foi incubado a 28 °C por 20 dias em condições estáticas e na ausência de luz.

Após o período de fermentação, procedeu-se com a filtração do caldo fermentado para retirada do micélio fúngico. Em seguida, realizou-se sistema de partição líquido-líquido com hexano, acetato de etila (AcOEt) e n-butanol (n-BuOH). O solvente hexano foi empregado apenas com o intuito de eliminar impurezas apolares que estivessem presentes no caldo de fermentação, não sendo objeto de estudo do presente trabalho. O solvente AcOEt, comumente relatado na literatura, apresenta-se com polaridade intermediária, sendo capaz de solubilizar compostos bioativos de

interesse e que, normalmente, são os mais frequentemente descritos na literatura. Enquanto o n-BuOH, por solubilizar compostos mais polares, não é comumente estudado, podendo conter substâncias do metabolismo primário, o que não implica que não apresente compostos bioativos. Foi determinado o rendimento observado para cada extrato e estes foram avaliados.

Figura 15 - Esquema metodológico para fermentação e obtenção do extrato fúngico.



Fonte: Da Autora.

4.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS

4.3.1 Técnicas cromatográficas

O extrato AcOEt do fungo endofítico *G. moniliformis* foi analisado por cromatografia em camada delgada utilizando diferentes reveladores. Esta técnica foi realizada para monitoramento dos compostos presentes no extrato em estudo.

4.3.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para as análises qualitativas em CCD, foram usadas cromatofolhas de Sílica-gel 60 sobre alumínio com indicador de ultravioleta F₂₅₄ 20 X 20 cm. As cromatofolhas foram reveladas por inspeção sob a luz ultravioleta (UV) em 254 nm, além de serem usados os seguintes reagentes como reveladores químicos:

- Solução de 0,2 g de ninhidrina em 100 mL de etanol P.A., aquecendo-se em seguida por 5 minutos em estufa a 120°C, para a identificação qualitativa de aminas primárias/secundárias.

- Solução de 20% de ácido fosfomolibdico em etanol P.A. aquecendo-se em seguida por 5 minutos em estufa a 120°C, para a identificação qualitativa de substâncias redutoras.

- Solução do reagente de Dragendorff preparada segundo o procedimento descrito na literatura (MERCK, 1972) para identificação qualitativa de aminas terciárias/quaternárias.

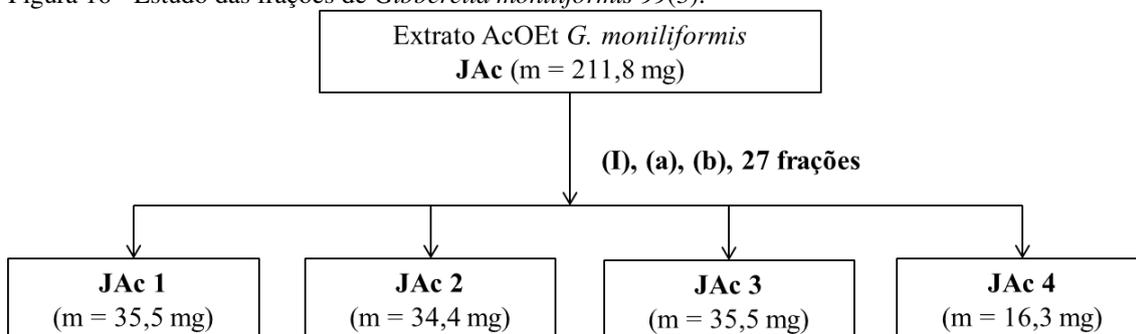
Este estudo foi realizado para verificar o comportamento do extrato em diferentes misturas de eluentes, com a finalidade de se escolher o melhor eluente para a separação dos compostos presentes nos extratos, e também, o revelador apropriado para a detecção dos mesmos.

4.3.1.2 Cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak

Para estudo do extrato AcOEt, empregou-se cromatografia em coluna pré-empacotada da Waters Sep-Pak^R vac 35 cc de sílica (10 g).

No fluxograma apresentado na Figura 16 é possível observar o fracionamento do extrato acetato de etila do endófito *G. moniliformis* 99(3). Empregou-se gradiente de metanol em acetato de etila (100% AcOEt; AcOEt:MeOH (v/v): 9:1; 8:2; 6:4; 4:6 e 2:8; 100% MeOH), sendo 50 mL o volume de cada fase móvel empregada.

Figura 16 - Estudo das frações de *Gibberella moniliformis* 99(3).



Fonte: Da Autora.

Nota: (I) Sílica Gel Sep-Pak vac 35 cc (10 g) com gradiente de MeOH em AcOEt: 100% AcOEt; AcOEt:MeOH (v/v): 9:1; 8:2; 6:4; 4:6 e 2:8; 100% MeOH. (a) Monitoramento por CCD: luz UV 254 nm; Reagente Dragendorff; Ácido Fosfomolibdico; Ninhidrina. (b) Monitoramento por CLAE (Consultar item 4.3.1.3).

4.3.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As frações provenientes do estudo com o fungo endofítico *G. moniliformes*, obtidas por cromatografia (seção 4.3.1.1), foram também avaliadas no equipamento PROMINENCE UFLC de cromatografia líquida ultra rápida (Shimadzu) com detector

espectrofotométrico UV-Visível. A análise foi monitorada no comprimento de onda de 254 nm. Foram avaliadas separações utilizando colunas de fase reversa C18, Shim-pack XR-ODS, com tamanho de partículas de 5 μm , com comprimento de 150 mm x 46 mm, operando-se no modo isocrático de eluição, com fluxo de 1 mL/min, sendo a temperatura do forno de 40°C. As fases móveis testadas foram MeOH:H₂O (9:1) e (5:5). Também foi avaliada a separação em coluna C8 (Macherey Nagel), de tamanho 250 mm x 46 mm, temperatura do forno 40°C, operando-se no modo isocrático de eluição, com fluxo de 1 mL/min, sendo a fase móvel avaliada MeOH:H₂O (1:9) e (5:5).

4.3.2 Técnicas espectroscópicas

Este estudo foi conduzido apenas com a fração J₃ do fungo endofítico *G. moniliformis*.

4.3.2.1 Infravermelho

Os espectros de absorção foram obtidos no equipamento Thermo Nicolet iS50 FT-IR espectrofotômetro (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), equipado com acessório de reflexão horizontal ATR- MIRacle single (Pike Technologies, Madison, WI, USA). As bandas de absorção características foram obtidas por FT-IR na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , 30 scans e resolução de 4 cm^{-1} . Os dados foram adquiridos usando o software OMNIC 9 Thermo Scientific e tratados utilizando o software ORIGIN PRO 9.0.

4.3.2.2 Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram adquiridos em Alfenas-MG, no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Alfenas (LRMN-Unifal-MG), utilizando o Espectrômetro Bruker AC-300, operando a 300 MHz para RMN ¹H e 75 MHz para RMN ¹³C e também em São Carlos-SP, no Departamento de Química-UFSCar, utilizando o seguinte equipamento: Bruker DRX (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (¹H) e 100,10 MHz na frequência do carbono (¹³C).

Em todas as análises, as amostras foram preparadas utilizando solvente metanol deuterado (MeOD). Como padrão de referência interna empregou-se o tetrametilsilano (TMS).

4.3.2.3 Análise no Espectrômetro de Massas (EM/EM- ESI-TOF e CLAE-DAD-ESI-TOF)

A análise por espectrometria de massas foi realizada em colaboração com Prof. MsC. Juliano Geraldo Amaral, no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-SP.

Para os experimentos de EM/EM em alta resolução utilizou-se espectrômetro de massas microTOF II-ESI-ToF Bruker Daltonics® (Billerica, Massachusetts, EUA). Os espectros foram adquiridos em modo positivo e negativo, empregando ionização por eletrospray via bomba de infusão 300 µL/h (Kd Scientific, USA) e analisador de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF). As condições da análise foram: capilar 3500; placa final -500 v; transferido 100 µs; temperatura do gás de secagem (N₂) 180 °C, vazão 4 L/min e pressão 2 bar. As amostras foram previamente diluídas na fase móvel MeOH:H₂O (1:1). Para calibração interna utilizou-se solução de Na-TFA a 10 mg/mL. O programa empregado na aquisição dos dados foi o software Bruker Compass DataAnalysis 4.1 (Bremen, Germany).

4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Este ensaio foi conduzido apenas com a fração J₃ de *G. moniliformis*.

Realizou-se a avaliação da viabilidade celular *in vitro* no Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt), Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG) em colaboração com a Profa. Dra. Marisa Ionta e o mestrando Guilherme Álvaro Ferreira da Silva.

Empregaram-se as metodologias do MTS e por exclusão pelo Azul de tripano, as quais serão descritas a seguir.

4.4.1 Viabilidade celular determinada por MTS

Os testes foram realizados nas linhagens celulares derivadas de tumores humanos: adenocarcinoma de mama (MCF 7), carcinoma hepatocelular (Hep G2), carcinoma de pulmão (A549), melanona (HT 144) e em células normais humanas de fibroblastos de pele (CCD-1059Sk). As linhagens A549, Hep G2 e CCD-1059Sk foram adquiridas no Banco de células do Rio de Janeiro e as linhagens MCF 7 e HT 144 foram doadas pela Profa. Dra. Glaucia Maria Machado-Santelli. As células foram mantidas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, Brasil). As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera controlada (95% de ar e 5% de CO₂). Cisplatina foi utilizada como controle positivo.

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade (células/poço) estabelecida na Tabela 1. Após aderência (24 h), as células foram tratadas por 48 h com o composto isolado do fungo endofítico *G. moniliformis* 99(3) nas concentrações de 10, 20, 40 e 80 µg/mL. O composto foi solubilizado em DMSO e a partir da solução-estoque (20 mg/mL) as novas diluições foram realizadas em meio de cultura (DMEM). A concentração final de DMSO não ultrapassou 1% (v/v).

Tabela 1 - Densidade celular para cada linhagem avaliada.

Linhagem celular	Densidade (células/poço)
MCF-7	1,0 x 10 ⁴
HepG2	2,0 x 10 ⁴
HT 144	2,0 x 10 ⁴
A549	5,0 x 10 ³
CCD-1059Sk	5,0 x 10 ³

Fonte: Da Autora.

Após o tempo de tratamento, 15 µL de MTS foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas em 37 °C por 4 horas. As absorvâncias foram registradas em espectrofotômetro (ELISA) em 490 nm.

Vale destacar que este ensaio colorimétrico detecta a quantidade de formazan produzido a partir da redução do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazólio) por ação de desidrogenases mitocondriais presentes em células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983; CORY et al., 1991).

Os valores de absorvância são diretamente proporcionais ao número de células vivas nas amostras e, portanto, a viabilidade foi determinada comparando-se os valores de absorvância entre culturas tratadas e não tratadas. Os experimentos foram realizados

em triplicata, sendo determinados os valores de IC₅₀ (concentração capaz de inibir o crescimento celular em 50%). Os dados quantitativos foram apresentados na forma média ± erro padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Tukey usando o software GraphPad Prism®.

4.4.2 Viabilidade celular por exclusão com azul de tripano

As células foram semeadas em placa de 24 poços com densidade de 8x10⁴ células/poço. Após adesão (24 horas), as células HT 144 foram tratadas com Ácido fusárico na concentração de 60 µg/mL durante 24, 48 e 72 horas. Nos dias de interesse, as células foram contadas em hemocitômetro na presença do corante azul de tripano (0,4%) utilizando microscópio de contraste de fase. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados apresentados correspondem à média ± DP.

O azul de tripano é um corante de vitalidade capaz de corar apenas células inviáveis, pois células viáveis apresentam membrana íntegra capaz de impedir a entrada do corante no interior dela. Ao observar no microscópio, é possível então diferenciar as células vivas das mortas (FRESHNEY, 2010).

4.5 TRIAGEM ANTIMICROBIANA: MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

Cada extrato fúngico (JAc e JBu) de ambos isolados fúngicos, assim como o caldo Czapek, foram avaliados quanto à susceptibilidade microbiana, utilizando metodologia descrita por Lorian (1991). Empregou-se ágar Mueller Hinton (AMH) acrescido de 1% de inóculo padronizado a 75% transmitância/ 660 nm dos microorganismos *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538™, *Escherichia coli* ATCC® 25922™ e *Candida albicans* ATCC® 10231™). A partir de uma concentração de 25 mg/mL do extrato suspenso em etanol, foi adicionado ao poço teste do ensaio de difusão em ágar, um volume de 50 µL. Os demais poços continham 50 µL de solvente e do antimicrobiano controle. Após incubação em estufa a 37 °C/ 24 horas, fez-se a leitura com medição do halo formado ao redor dos pocinhos.

4.6 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E MICROBICIDA MÍNIMA (CMM)

Para a realização destes ensaios foi adotado o procedimento descrito por CLSI (2006) para bactérias e CLSI (2008) para levedura, com algumas modificações. Este estudo foi conduzido nos Laboratórios de Bioprocessos e Multidisciplinar I da Unifal-MG.

Também foi realizado ensaio de CIM para os extratos (faixa avaliada 7,8-1000 µg/mL) conforme descrito por Carvalho (2011).

a) Preparo das amostras

Em *ependorf*, a solução do extrato teste foi preparada com 1 mg do extrato dissolvido em 125 µL de álcool etílico absoluto, sendo a concentração final de 8 mg/mL.

b) Preparo do inóculo

Com o auxílio de alça de platina esterilizada, culturas de 24 horas dos microorganismos indicadores, que se encontravam em caldo Mueller Hinton (CMH) (bactérias) ou Caldo Sabouraud (CSab) (leveduras), foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina 0,9% esterilizada, gerando uma suspensão que foi padronizada em espectrofotômetro, 660 nm e 75% transmitância, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Transferiu-se 1 mL de cada suspensão para 9 mL de solução salina 0,9 %, da qual foram retirados 2 mL, transferidos para 10 mL de CMH (*S. aureus* ATCC 6538; *E. coli* ATCC 25922) ou CSab (*C. albicans* ATCC 10231; *C. albicans* n° 31 isolada de ponta de cateter; *C. albicans* n° 500 isolada de lençol de leito hospitalar e *C. albicans* n° 521 isolada de jaleco de profissionais da saúde de hospital). Desta última suspensão foram retiradas alíquotas de 20 µL de inóculo e adicionadas após diluição seriada do extrato teste e antimicrobiano padrão.

c) Determinação da atividade antimicrobiana

Em uma microplaca de 96 poços adicionou-se 100 µL de meio CMH ou CSab em cada poço de amostra. A seguir, 20 µL da amostra solubilizada em etanol e 80 µL de meio foi adicionado ao primeiro poço de cada fileira da placa, sendo que cada fileira correspondia a uma amostra diferente. A diluição da amostra na microplaca começou a

partir da transferência de 100 µL do primeiro poço para os poços consecutivos, até o último poço, onde 100 µL foram desprezados, para que todos os poços contivessem 100 µL. Após a diluição, 80 µL de meio CMH ou CSab e 20µL do inóculo previamente preparado, foram transferidos para todos os poços, exceto para os controles. O volume final em cada poço foi de 200 µL.

O extrato foi testado nas seguintes concentrações 400 µg/mL; 200 µg/mL; 100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,25 µg/mL; 3,125 µg/mL; 1,562 µg/mL; 0,781 µg/mL e 0,390 µg/mL.

Alguns orifícios da placa foram utilizados para controle de crescimento do inóculo, de esterilidade do meio de cultura, do solvente utilizado na solubilização do extrato (álcool etílico absoluto) e de esterilidade do extrato avaliado.

Nos poços de controle de esterilidade, foi adicionado apenas 200µL de meio CMH ou CSab.

Nos poços para controle de crescimento dos micro-organismos avaliados, foi adicionado 180 µL de meio CMH ou CSab e 20µL do inóculo previamente preparado. Nos poços referentes ao controle de sensibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos, foram adicionados ao 1º poço 200 µL da solução antimicrobiana e nos demais poços, 100 µL de meio CMH ou CSab para diluição seriada, como realizado com as amostras.

O ensaio foi conduzido em triplicata com três repetições. As microplacas foram seladas com plástico filme e incubadas a 37 °C. Na avaliação com *S. aureus* e *C. albicans*, *C. albicans* n° 31, *C. albicans* n° 500 e *C. albicans* n° 521, incubou-se cada microplaca por 22 h para posterior adição do revelador e leitura após 2 h, confirmada novamente em 48h. No ensaio contra *E. coli*, incubou-se cada microplaca por 20 h para posterior adição do revelador, e leitura após 2 horas. O revelador utilizado foi solução aquosa de resazurina 0,2% (adição de 40 µL por poço), o qual consiste de um corante indicador de viabilidade celular de cor inicialmente azul. Após a incubação das microplacas, a presença de coloração azul é indicativa de amostra com ação bacteriostática/fungistática frente ao micro-organismo testado. Coloração púrpura, rosa ou incolor, evidenciam resistência do micro-organismo ao extrato/fração/composto em estudo (SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007).

d) Determinação da CMM (Concentração Microbicida Mínima)

Retirou-se uma alíquota de 25 µL dos poços que apresentaram coloração azul e do primeiro poço que apresentou coloração rosa/púrpura e aplicou-se sobre a superfície de uma placa contendo ágar Mueller Hinton. Incubou-se a 37 °C/ 24 h e procedeu-se com a leitura.

O crescimento sobre a placa indica que o extrato não exerceu ação bactericida (CBM)/fungicida (CFM). Caso contrário (ausência de crescimento) é indicativo da ação bactericida/fungicida sobre o micro-organismo testado, sendo avaliada a faixa de concentração testada.

4.7 TESTE DE *CHECKERBOARD*

Este ensaio foi conduzido apenas com a fração J₃ de *G. moniliformis*.

Para avaliar se a combinação de um composto proveniente do metabolismo fúngico com outro agente antimicrobiano produz ação sinérgica foi utilizado o método de microdiluição *checkerboard*, conforme a técnica descrita por White et al. (1996).

Após a determinação do CIM do composto e o CIM do antimicrobiano para cada micro-organismo teste, realizaram-se diluições em série associando a substância teste com o agente antimicrobiano e a suspensão microbiana. O ensaio foi realizado em duplicata com três repetições, sendo o esquema metodológico apresentado na Figura 17.

O efeito das combinações foi obtido a partir do cálculo da concentração inibitória fracionária (CIF) para cada agente nas concentrações utilizadas de acordo com as Equações 1, 2 e 3 abaixo:

$$ICIF = CIF_c + CIF_a \quad (\text{Equação 1})$$

$$CIF_c \text{ (concentração inibitória fracionária do composto fúngico)} = \frac{\text{CIM do composto com o antimicrobiano}}{\text{CIM do composto sozinho}} \quad (\text{Equação 2})$$

$$CIF_a \text{ (concentração inibitória fracionária do antimicrobiano)} = \frac{\text{CIM do antimicrobiano com o extrato}}{\text{CIM do antimicrobiano sozinho}} \quad (\text{Equação 3})$$

Os índices obtidos foram interpretados como sinérgico ($ICIF \leq 0,5$); parcialmente sinérgico ($1,0 \leq ICIF < 0,5$), aditivo ($ICIF = 1,0$) e indiferente ($4,0 \geq ICIF > 1,0$), de acordo com Timurkaynak et al. (2006).

Figura 17 - Esquema metodológico desenvolvido para o ensaio sinérgico com o composto majoritário presente na fração J₃ associado com antimicrobianos comerciais e respectivos patógenos (*S. aureus*/amoxicilina; *E. coli*/estreptomicina e *C. albicans*/nistatina).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cpt 100 Ant 4	Cpt 100 Ant 4	Cpt 100 Ant 2	Cpt 100 Ant 2	Cpt 100 Ant 1	Cpt 100 Ant 1	Cpt 100 Ant 0,5	Cpt 100 Ant 0,5	CIM _{composto} 400	CIM _{nistatina} 16	mcg	meio
B	Cpt 50 Ant 4	Cpt 50 Ant 4	Cpt 50 Ant 2	Cpt 50 Ant 2	Cpt 50 Ant 1	Cpt 50 Ant 1	Cpt 50 Ant 0,5	Cpt 50 Ant 0,5	200	8	mcg	meio
C	Cpt 25 Ant 4	Cpt 25 Ant 4	Cpt 25 Ant 2	Cpt 25 Ant 2	Cpt 25 Ant 1	Cpt 25 Ant 1	Cpt 25 Ant 0,5	Cpt 25 Ant 0,5	100	4	mcg	meio
D	Cpt 12,5 Ant 4	Cpt 12,5 Ant 4	Cpt 12,5 Ant 2	Cpt 12,5 Ant 2	Cpt 12,5 Ant 1	Cpt 12,5 Ant 1	Cpt 12,5 Ant 0,5	Cpt 12,5 Ant 0,5	50	2	mcg	meio
E	Cpt 6,25 Ant 4	Cpt 6,25 Ant 4	Cpt 6,25 Ant 2	Cpt 6,25 Ant 2	Cpt 6,25 Ant 1	Cpt 6,25 Ant 1	Cpt 6,25 Ant 0,5	Cpt 6,25 Ant 0,5	25	1	mcg	meio
F	Cpt 3,12 Ant 4	Cpt 3,12 Ant 4	Cpt 3,12 Ant 2	Cpt 3,12 Ant 2	Cpt 3,12 Ant 1	Cpt 3,12 Ant 1	Cpt 3,12 Ant 0,5	Cpt 3,12 Ant 0,5	12,5	0,5	mcg	meio
G	Cpt 1,56 Ant 4	Cpt 1,56 Ant 4	Cpt 1,56 Ant 2	Cpt 1,56 Ant 2	Cpt 1,56 Ant 1	Cpt 1,56 Ant 1	Cpt 1,56 Ant 0,5	Cpt 1,56 Ant 0,5	6,25	0,25	mcg	meio
H	Cpt 0,78 Ant 4	Cpt 0,78 Ant 4	Cpt 0,78 Ant 2	Cpt 0,78 Ant 2	Cpt 0,78 Ant 1	Cpt 0,78 Ant 1	Cpt 0,78 Ant 0,5	Cpt 0,78 Ant 0,5	3,12	0,12	mcg	meio
ENSAIO SINÉRGICO em <i>C. albicans</i>												

Fonte: Da Autora.

Nota: Cpt: composto; Ant: antimicrobiano; CIM: concentração inibitória mínima; mcg: controle de crescimento do micro-organismo teste; meio: controle de esterilidade do meio de cultura.

4.8 ESTUDO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram adquiridas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) da UFLA-MG. Todo preparo de amostras para análise por MEV foi realizado dentro de capela química e os reagentes descartados adequadamente. O protocolo encontra-se esquematizado na Figura 18.

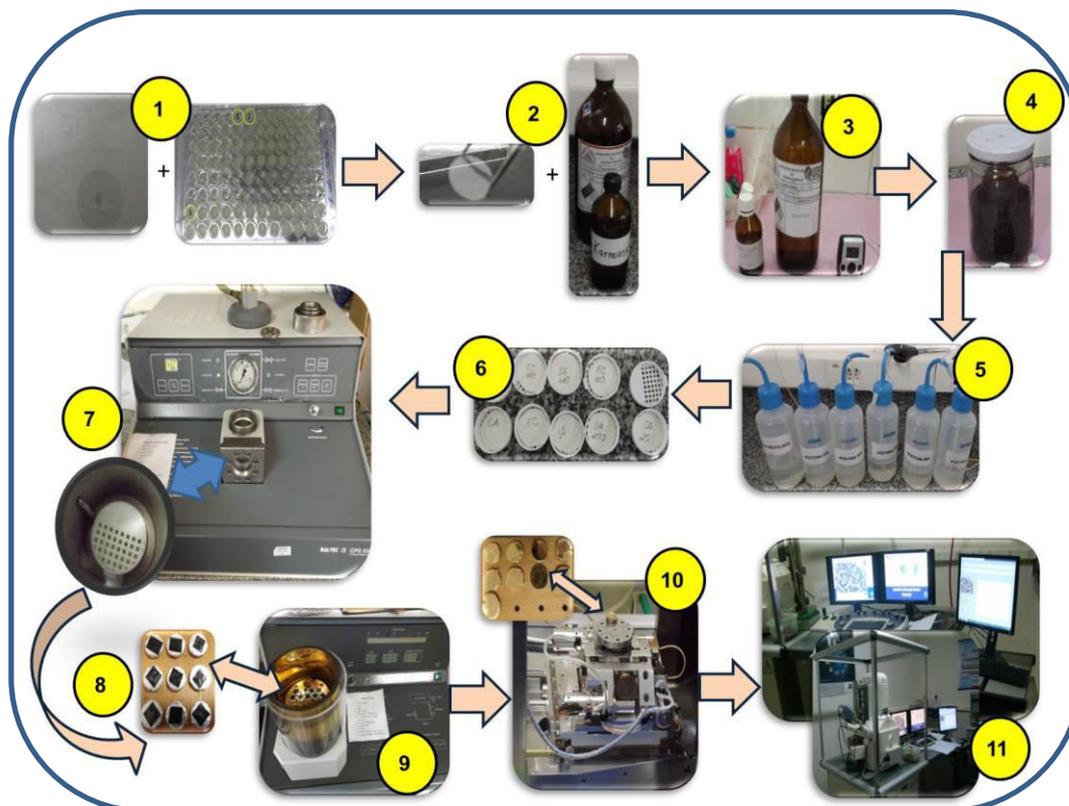
O preparo de amostras para análise em MEV foi realizado utilizando-se lamínulas de vidro em formato circular (13 mm de diâmetro). Com auxílio de micropipetador, adicionou-se sobre a superfície da lamínula 10 µL de Poli-L-Lisina (cedente de carga positiva), espalhando sobre toda a superfície da lamínula com auxílio da própria ponteira. Após aguardar pelo menos 30 minutos para completa secagem, adicionou-se alíquota de 10 µL de suspensão microbiana selecionada para análise em MEV (sem adição de resazurina). Esta suspensão foi proveniente da microplaca de 96 poços utilizada para fazer os ensaios de CIM.

Aguardou-se cerca de 10 minutos e, na sequência, retirou-se excesso do inóculo microbiano com imediata adição do reagente de Karnovitsky em quantidade suficiente para cobrir a lamínula. Após 24 horas, fez-se retirada deste reagente com pipeta de Pasteur. Procedeu-se a lavagem com tampão Cacodilado (pH 7,2) por três vezes:

adicionou-se quantidade suficiente de tampão para cobrir a lamínula, o qual foi descartado após 10 minutos. Na última vez, deixou-se uma pequena quantidade de tampão cobrindo a lamínula e adicionou-se três gotas de tetróxido de ósmio (OsO_4) para fixação secundária, deixando o reagente por 1 hora. Após, retirou-se o excesso de reagente e com auxílio de pisseta contendo água destilada, lavou-se três vezes para retirada do reagente. Posteriormente, realizou-se a desidratação do material em acetona, usando séries de 25%, 50%, 75% e 90% por 10 minutos. Por fim, na série 100%, foram realizadas três lavagens de 10 minutos cada.

Após, as lamínulas foram acondicionadas em porta-amostras, levadas para secagem em secador de ponto crítico e, posteriormente montadas em *stubs* com fita dupla face de carbono, sendo levadas assim ao *sputtering* para metalização com ouro. Realizada a metalização, as lamínulas foram visualizadas e imagens digitais foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura MEV LEO Evo 40.

Figura 18 - Preparo de amostras e análise em MEV.



Fonte: Do autor.

Nota: Etapas: ① Incorporar reagente poli-L-Lisina em lâmina circular. Aguardar secagem. Adicionar 50µL suspensão microbiana (microplaca) e aguardar 10 minutos para adesão do micro-organismo à lâmina. ② Retirar o excesso (não deixar secar) e logo em seguida adicionar Reagente de Karnovisks (mínimo de 24 horas). ③ Adição de tampão Cacodilato 3x. ④ Adição de OsO₄ por 1 hora, lavagem com 3x H₂O. ⑤ Etapa de desidratação em concentrações crescentes de Acetona (25, 50, 75 e 90%) por 10 minutos cada. Acetona 100% 10 min/3 vezes. ⑥ Transferir lâminas para porta amostra. ⑦ Colocar porta amostra no aparelho de Ponto Crítico. ⑧ Preparar os *stubs* para fixar lâminas. ⑨ Dar banho de ouro nas amostras fixadas nos *stubs*. ⑩ Posicionar os *stubs* no suporte para leitura no MEV. ⁽¹¹⁾ Leitura e captura de imagens no microscópio eletrônico de varredura (MEV LEO Evo 40).

4.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)

O experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Fernando Pavan, no Departamento de Ciências Biológicas da UNESP, Araraquara-SP.

Na Figura 19 é esquematizada a metodologia empregada para determinação da CIM (PALOMINO et al., 2002) da fração J₃ de *G. moniliformis* frente MTB.

Em uma microplaca estéril de 96 orifícios foram depositados 200 µL de água estéril na coluna de hidratação (coluna 12) e os seguintes volumes de meio Middlebrook 7H9 enriquecido com OADC: 150 µL no poço controle da fração J₃ analisada (coluna 1); 100 µL nos poços controle positivo contendo o micro-organismo (poços A, B, C e D da coluna 11); 200 µL nos poços controle negativo contendo apenas meio de cultivo (poços E, F, G e H da coluna 11) e 100 µL demais orifícios da placa (colunas 2 à 10).

Em seguida foi realizada diluição seriada de maneira a se obter concentrações variáveis de isoniazida (de 1 a 0,01 µg/mL, linha H) e da fração J₃ (de 25 µg/mL a 0,09 µg/mL, linha A) – na própria placa. A cepa de MTB H₃₇R_V – ATCC 27294 congelada foi diluída até atingir a concentração de 10⁵ UFC/mL. Na sequência, 100 µL desta suspensão foi inoculada em cada um dos orifícios contendo as soluções de isoniazida, da fração J₃ e no controle positivo. A microplaca foi selada com parafilme e papel alumínio, sendo incubada à 37°C / 7 dias.

Figura 19 – Representação esquemática para avaliação do potencial anti MTB da fração J₃.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(J3)	J3 25	J3 12,5	J3 6,25	J3 3,12	J3 1,56	J3 0,78	J3 0,39	J3 0,19	J3 0,09	MTB	H ₂ O
B											MTB	H ₂ O
C											MTB	H ₂ O
D											MTB	H ₂ O
E											MEIO	H ₂ O
F											MEIO	H ₂ O
G											MEIO	H ₂ O
H	ISH	ISH 1	ISH 0,5	ISH 0,25	ISH 0,12	ISH 0,06	ISH 0,03	ISH 0,01			MEIO	H ₂ O

Fonte: Da Autora.

Nota: [amarelo]: controle das amostras analisadas; [amarelo claro]: diluição seriada das amostras testadas; [verde escuro]: controle Isoniazida (INH); [verde claro]: diluição seriada da INH; [rosa]: controle positivo (MTB); [azul]: controle negativo (meio); [azul claro]: coluna de hidratação com H₂O.

Após esse período de incubação, foi adicionado o volume de 30 µL da resazurina diluída em água estéril (0,01%) por toda placa, sendo esta reincubada a 37 °C por 24 horas. A seguir, foi realizada a leitura visual e a interpretação da fluorescência no SpectraFluor Plus (TECAN®; filtros: 530 nm de excitação e 590 nm de emissão). A análise foi realizada utilizando uma planilha do Excel que permitiram realizar os cálculos e gerar gráfico.

A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir a multiplicação de 90% da cepa de MTB, ou seja, a menor concentração dos compostos capaz de impedir a mudança da cor azul para rosa. O revelador empregado (resazurina) age como indicador da multiplicação celular e/ou viabilidade; sendo a cor azul representativa da ausência de multiplicação/viabilidade celular e a rosa, presença de multiplicação ou presença de viabilidade (PALOMINO et al., 2002).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TRIAGEM ANTIMICROBIANA COM OS EXTRATOS

A partir da fermentação fúngica, foram obtidos os extratos JAc (m = 238 mg) e JBu (m = 27,2 mg). Estes foram submetidos à triagem pelo ensaio de difusão em ágar para avaliação do potencial antimicrobiano frente aos diferentes patógenos estudados (Tabela 2).

Tabela 2 - Medida do halo de inibição (mm) e rendimento (mg) para os extratos oriundos da fermentação fúngica.

Extrato	Rendimento (mg)	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)
JAc	238	20	25	20
JBu	27,2	20	28	40

Fonte: Da Autora.

Nota: JAc: extrato acetato de etila do fungo *G. moniliformis*; JBu: extrato n-butanólico do fungo *G. moniliformis*.

Diante da existência de halos de inibição frente aos micro-organismos avaliados, foi realizado o ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) para os extratos em estudo, observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) observada para extratos AcOEt e n-BuOH do fungo *G. moniliformis* frente a patógenos.

Extrato	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)		<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	
	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
JAc	250-500	>1000	250-500	>1000	125-250	>1000
JBu	200-400	>400	50-100	>400	25-50	100-200

Fonte: Da Autora.

Nota: JAc: extrato acetato de etila do fungo *G. moniliformis*; JBu: extrato n-butanólico do fungo *G. moniliformis*.

Considerando o critério de Holetz et al. (2002), é possível classificar a ação antimicrobiana como forte ($< 100 \mu\text{g/mL}$), moderada (entre 100 e $500 \mu\text{g/mL}$), fraca (entre 500 e $1000 \mu\text{g/mL}$) e inativa ($\geq 1000 \mu\text{g/mL}$). Observa-se que o extrato JAc apresentou atividade moderada frente à *S. aureus* e *E. coli* ($250-500 \mu\text{g/mL}$) e ação também moderada, porém mais pronunciada sobre *C. albicans* ($125-250 \mu\text{g/mL}$). Nas concentrações testadas, não foi observada ação bactericida/fungicida frente a estes

patógenos (CMM > 1000 µg/mL). Diante do rendimento satisfatório (238 mg) e da atividade antimicrobiana este extrato foi selecionado para prosseguir com os estudos químicos e de bioatividade que serão expostos no presente trabalho. O extrato JBu também apresentou potencial antimicrobiano de amplo espectro, com destaque para a ação observada frente *C. albicans*, cujo CIM foi de 25-50 µg/mL e o CMM de 100-200 µg/mL. Os demais patógenos apresentaram atividade microbicida > 400 µg/mL.

5.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO JAc

A partir do extrato JAc (m = 238 mg), iniciou-se o estudo químico por meio da cromatografia em camada delgada (CCD) para verificar o comportamento em diferentes misturas de eluentes, sendo um passo importante para definir as etapas seguintes de trabalho referentes às separações dos compostos presentes nos extratos.

Como eluentes foram testadas as seguintes misturas: Hex:AcOEt (1:1); AcOEt:MeOH (9:1); AcOEt:MeOH (1:1), sendo o melhor eluente a mistura de AcOEt:MeOH (1:1). Dentre os reveladores empregados, apenas dois apresentaram-se mais apropriados para a detecção dos compostos presentes nos extratos em estudo: a luz UV-254 nm que revelou grupos cromóforos e o reagente de Dragendorff que revelou aminas terciárias/quaternárias, característicos de alcaloides. A análise por CCD forneceu informações sobre a classe de compostos presentes no extrato, além de possibilitar uma escolha apropriada da técnica cromatográfica em coluna que foi utilizada, posteriormente, para a separação e purificação de compostos.

5.2.1 Purificação do extrato JAc

Com a finalidade de separar os compostos e realizar possível isolamento de substâncias, 211,8 mg do extrato AcOEt foram submetidos a cromatografia em coluna pré-empacotada, empregando o cartucho da Waters Sep-pak^R vac 35 cc de sílica (10 g).

O cartucho foi condicionado com AcOEt e para o eluente foi realizado um gradiente de metanol em acetato de etila, utilizando-se 50 mL de cada eluente nas proporções acetato de etila/metanol (v:v) (9:1); (8:2); (6:4); (4:6) e (2:8), realizando-se a lavagem da coluna com 100% de metanol (50 mL).

Vinte e sete frações foram coletadas e analisadas por CCD (fase móvel empregada: tubos 1-7 AcOEt: MeOH (9:1); tubos 8-17 AcOEt: MeOH (64:36); tubos

18-27 AcOEt: MeOH (4:6)), sendo as frações mais semelhantes reunidas, de acordo com padrão de corrida e resultados observados com os reveladores químicos e físico, em J₁, J₂, J₃ e J₄, cujos rendimentos seguem apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Rendimento das frações AcEtO do fungo *G. moniliformis* 99(3).

Frações reunidas	Rendimento (mg)	Tubos correspondentes
J ₁	35,5	1-5
J ₂	34,4	6-10
J ₃	35,5	11-14
J ₄	26,3	15-27

Fonte: Da Autora.

Todas as 27 frações revelaram sob luz UV 254 nm, mas apenas J₁, J₂ e J₃ foram positivas frente ao revelador químico Dragendorff. No estudo bioguiado com as quatro frações, observou-se que a fração J₃ apresentou maior potencial antimicrobiano (Tabela 5), sendo selecionada para estudos espectroscópicos de IV, RMN e Massas que serão apresentados a seguir.

Tabela 5 - Resultados de CIM ($\mu\text{g/mL}$) observados para as frações acetato de etila provenientes do endófito *G. moniliformis*.

	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	Concentração testada
J ₁	200-400	100-200	100-200	
J ₂	200-400	50-100	50-100	
J ₃	200-400	50-100	25-50	0,39-400
J ₄	>400	100-200	50-100	
Amoxicilina	2,5 – 5	-	-	0,078-10
Estreptomicina	-	5,0 – 10	-	0,078-10
Nistatina	-	-	1 – 2	0,016-64

-: não realizado

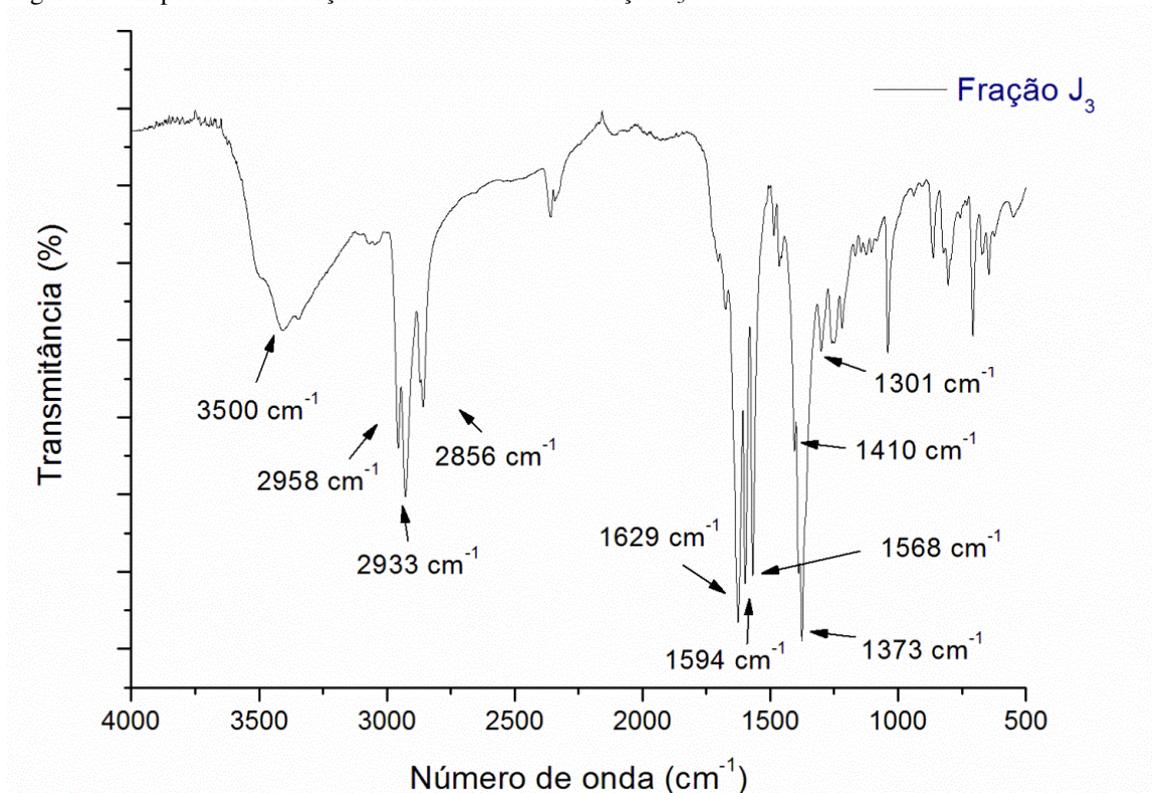
5.2.2 Análises espectroscópicas da fração J₃

5.2.2.1 Infravermelho

A espectroscopia na região do Infravermelho (IV) é uma técnica bastante empregada em química orgânica, que juntamente com outros métodos espectroscópicos modernos (RMN e espectrometria de massas) ajudam a identificar e elucidar estruturas de substâncias orgânicas (LOPES; FASCIO, 2004).

A fração J₃ foi obtida como um sólido castanho (m= 35,5 mg) e é possível observar na Figura 20 as bandas apresentadas em seu espectro de absorção no infravermelho.

Figura 20 - Espectro de absorção no infravermelho da fração J₃



Fonte: Da Autora.

Atribui-se o sinal forte na região de 3500 cm^{-1} ao estiramento de O-H. As bandas de absorção em 2856, 2933, 2958 cm^{-1} são referentes aos estiramentos C-H simétrico e assimétrico de CH₂ e CH₃. Deformações angulares de C-H e de estiramento de C-O são observadas na região entre 1373 e 1410 cm^{-1} . Na região entre 1590-1620 cm^{-1} nota-se um sinal de C=O de carbonila, bem como bandas relacionadas ao estiramento C=C de menor intensidade. Observou-se também os estiramentos C-N (1301 cm^{-1}) e C=N (1594 cm^{-1}) pertencentes ao anel piridínico.

5.2.2.2 Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas de alta resolução

A fração J₃ também foi identificada por métodos de ressonância magnética nuclear mono (RMN ¹H (400 MHz), ¹³C DEPT 135 (75 MHz), ¹³C BBD (100 MHz)) e bidimensional (COSY, HSQC e HMBC (400 MHz e 100 MHz)).

Nas Figuras 21 e 22 é possível ressaltar que o espectro de ^1H RMN da referida fração exibiu três átomos de hidrogênios típicos de anel aromático em δ_{H} 8,26 (H6; singlete alargado), δ_{H} 8,07 (H3) e δ_{H} 7,85 (H4; dubleto; $J = 7,6 \text{ Hz}$). Foram observados hidrogênios mais blindados em 2,68 ppm referente a dois hidrogênios metilênicos característicos de carbono ligado a anel aromático; dois multipletos referentes a hidrogênios metilênicos em δ_{H} 1,58 (H9) e 1,30 (H10) e um tripleto em δ_{H} 0,91 (H11; $J = 7,1 \text{ Hz}$) característico de grupo metila de cadeia alquila, indicando a presença de uma cadeia alquila n-butyl (Tabela 6).

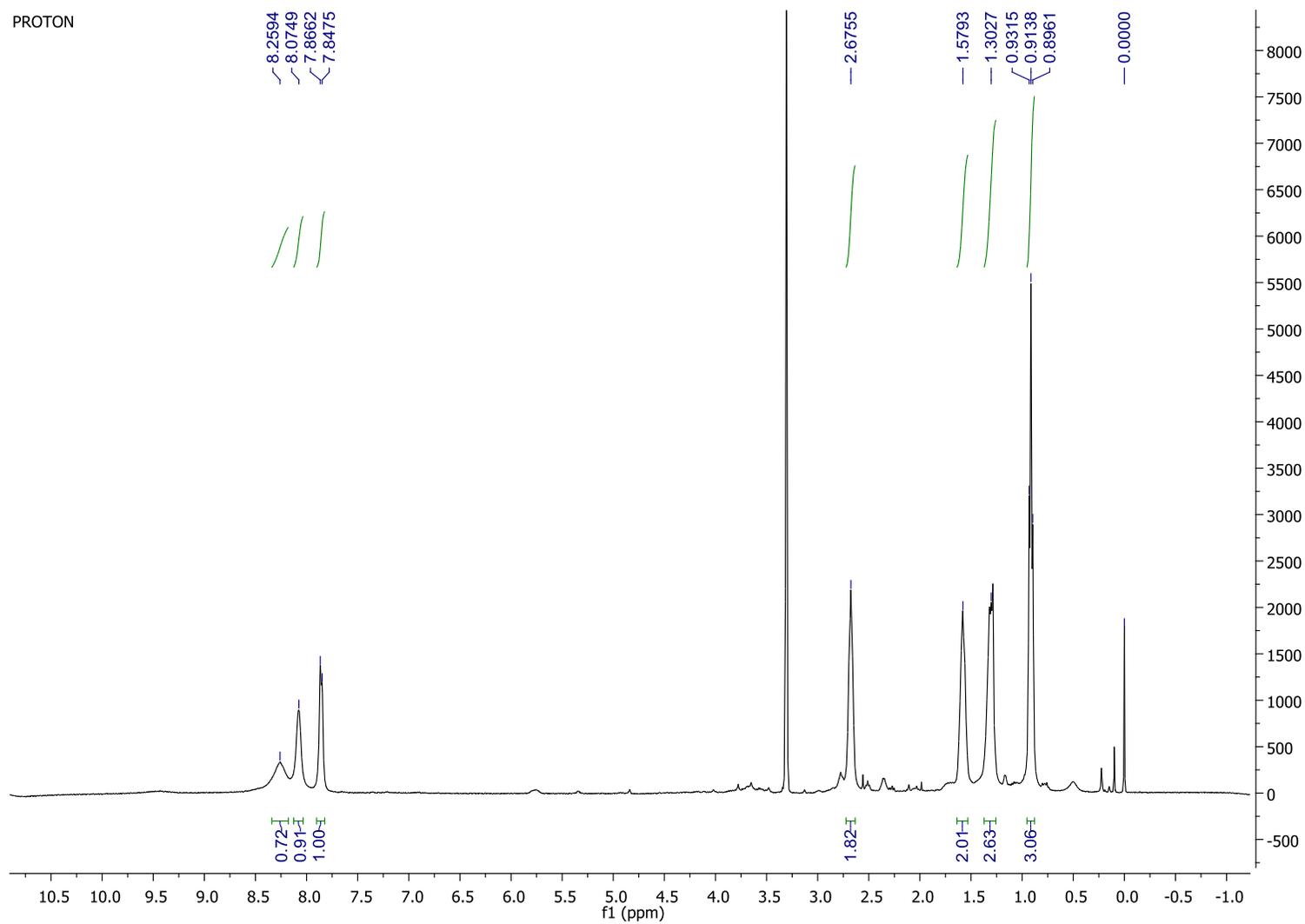
Os espectros de RMN- ^{13}C DEPT 135 (75 MHz) e BBD (100 MHz) exibidos nas Figuras 23 e 24 respectivamente, evidenciaram sinais de átomos de carbono do tipo sp^2 (δ_{C} : 125,3 (C3); 140,3 (C4); 143,4 (C5); 148,6 (C6); 150,2 (C2) e 170,4 (C7)) e sp^3 (δ_{C} : 34,1 (C9); 33,4 (C8); 23,2 (C10) e 14,1 (C11)), sendo este último sinal (14,1 ppm) referente a uma metila (Tabela 6). É importante destacar que no espectro de DEPT 135 não é possível visualizar os sinais de carbono quaternário, os quais foram observados no BBD (143,4 e 150,2 ppm).

A presença de um nitrogênio na estrutura foi comprovada pela revelação com o reagente de Dragendorff, pelas bandas observadas no espectro de IV e pelo número de sinais de carbonos observados nos espectros de RMN mono e bidimensionais analisados. Ainda, a presença do nitrogênio no anel piridínico também está relacionada aos deslocamentos químicos mais desblindados evidenciados pelos carbonos e hidrogênios vizinhos ao átomo de nitrogênio, os quais se encontrariam menos desblindados no caso de um anel aromático homonuclear (δ_{H} : 7-8 ; δ_{C} : 120-130).

Por meio da análise do espectro HSQC (^1H - ^{13}C) na Figura 25, foi possível constatar a ligação do hidrogênio em δ_{H} 8,07 (H3) ao carbono em δ_{C} 125,3 (C3); assim como do hidrogênio em δ_{H} 7,85 (H4) ao carbono em δ_{C} 140,3 (C4) e do hidrogênio em δ_{H} 8,26 (H6) ao carbono em δ_{C} 148,6 (C6), sugerindo a presença de um anel piridínico dissustituído. Também foi possível atribuir os sinais de hidrogênios aos carbonos da cadeia alquila, conforme apresentado na Tabela 6.

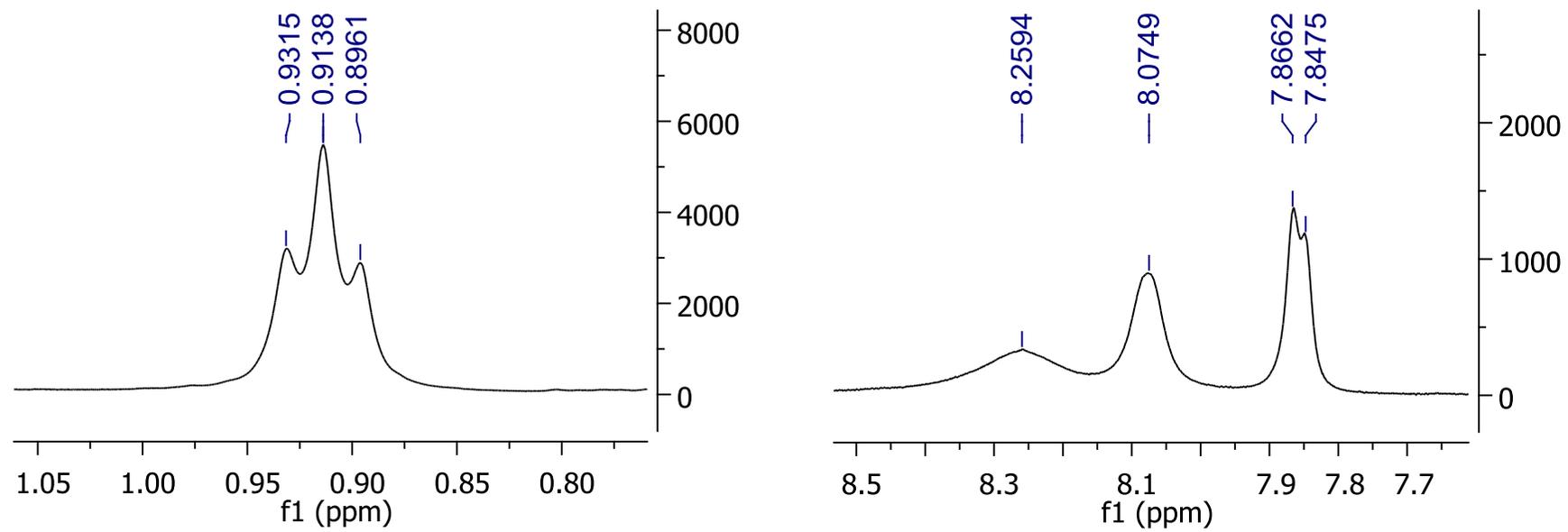
Analisando o espectro COSY (^1H - ^1H) na Figura 26, foi possível observar as correlações entre os hidrogênios aromáticos H3-H4, confirmando serem hidrogênios vizinhos. Foram evidenciadas outras correlações existentes entre átomos de hidrogênios metilênicos da cadeia alquila: H8-H9, H9-H10 e H10-H11 (Tabela 6).

O espectro de HMBC (Figura 27) destaca os acoplamentos à longa distância dos átomos de hidrogênio com os de carbono, sendo relevante considerar δ_H 7,85 (H4) com δ_C 150,2 (C2); 125,3 (C3) e 33,4 (C8); δ_H 2,68 (H8) com δ_C 140,3 (C4); 143,4 (C5); 148,6 (C6); 34,1 (C9) e 23,2 (C10); δ_H 1,58 (H9) com δ_C 143,4 (C5); 33,4 (C8); 23,2 (C10) e 14,1 (C11); δ_H 1,31 (H10) com 33,4 (C8); 34,1 (C9) e 14,1 (C11) além de δ_H 14,1 (H11) com os carbonos 33,4 (C8); 34,1 (C9) e 23,2 (C10). As correlações entre os átomos H4 – C8, H8 – C4/C5/C6 e H9 – C5 comprovam a junção da cadeia alquila ao anel piridínico. Além disso, foi observado no espectro de HMBC correlações de hidrogênios com carbonos quaternários (H8/H9-C5 e H4-C2), as quais também podem ser consultadas na Tabela 6.

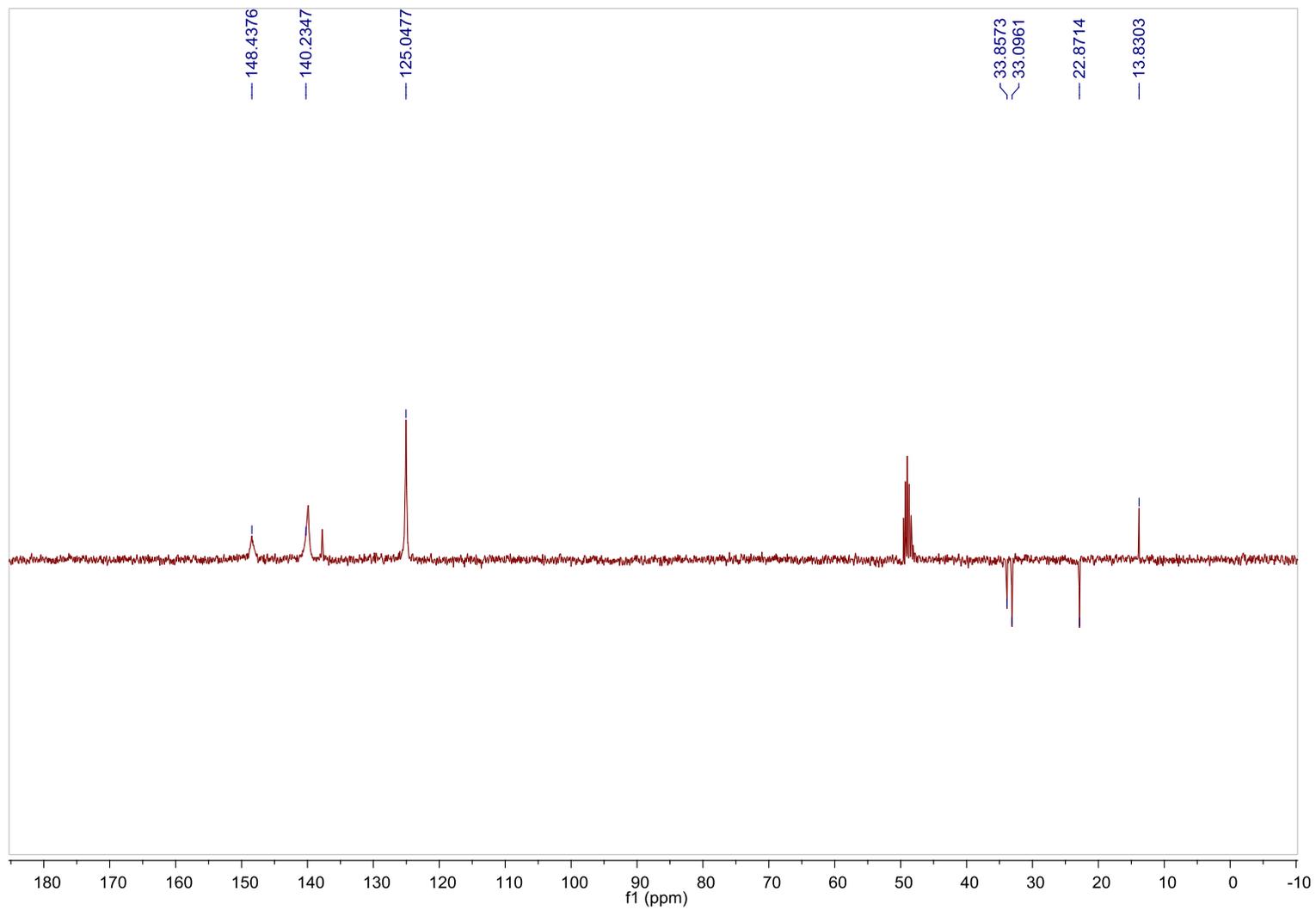
Figura 21 - (A) Espectro de ^1H RMN do composto Ácido fusárico (300 MHz, MeOD).

Fonte: Da Autora.

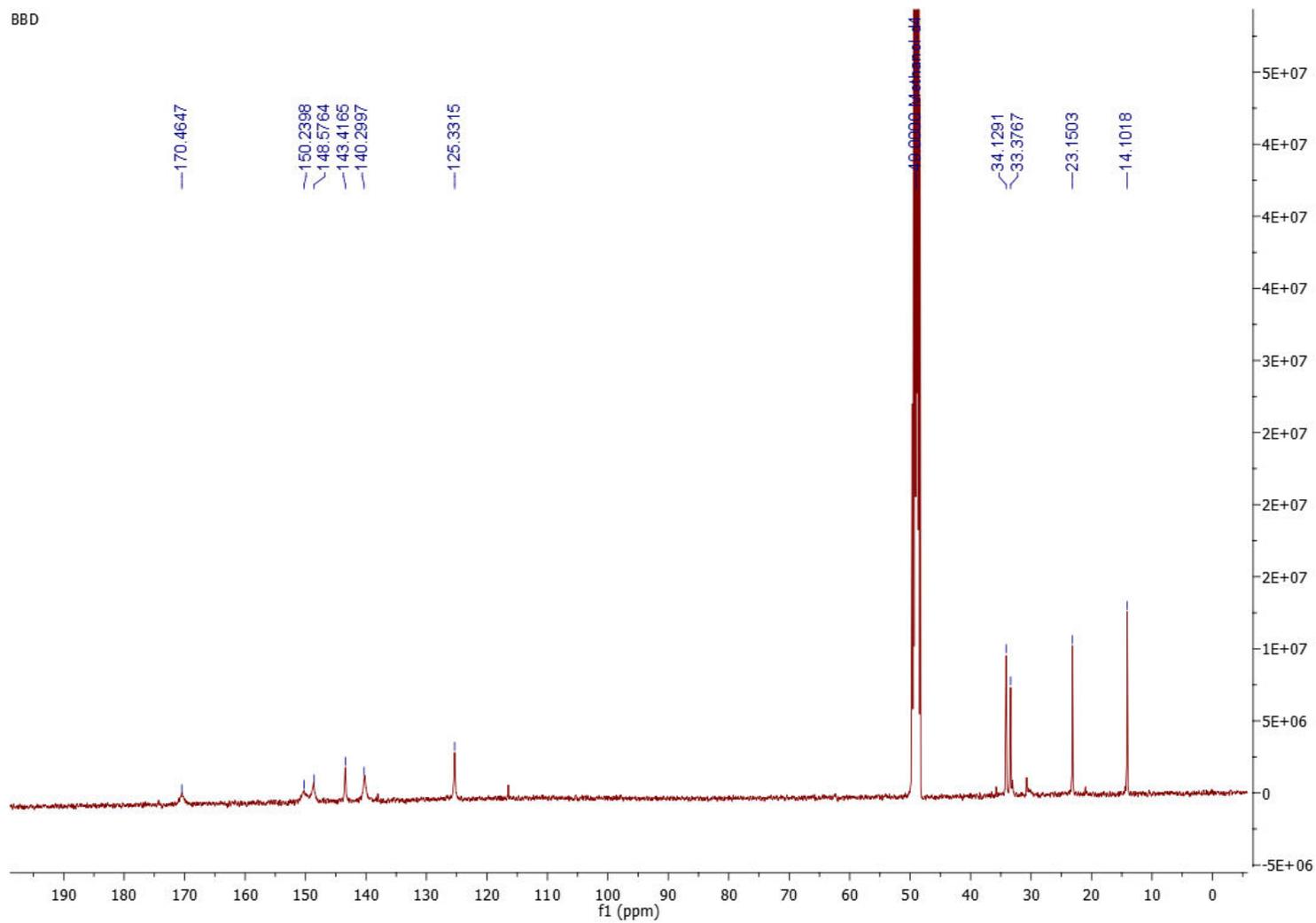
Figura 22 - Ampliação dos picos do espectro de ^1H RMN de Ácido fusárico (400MHz, MeOD).



Fonte: Da Autora.

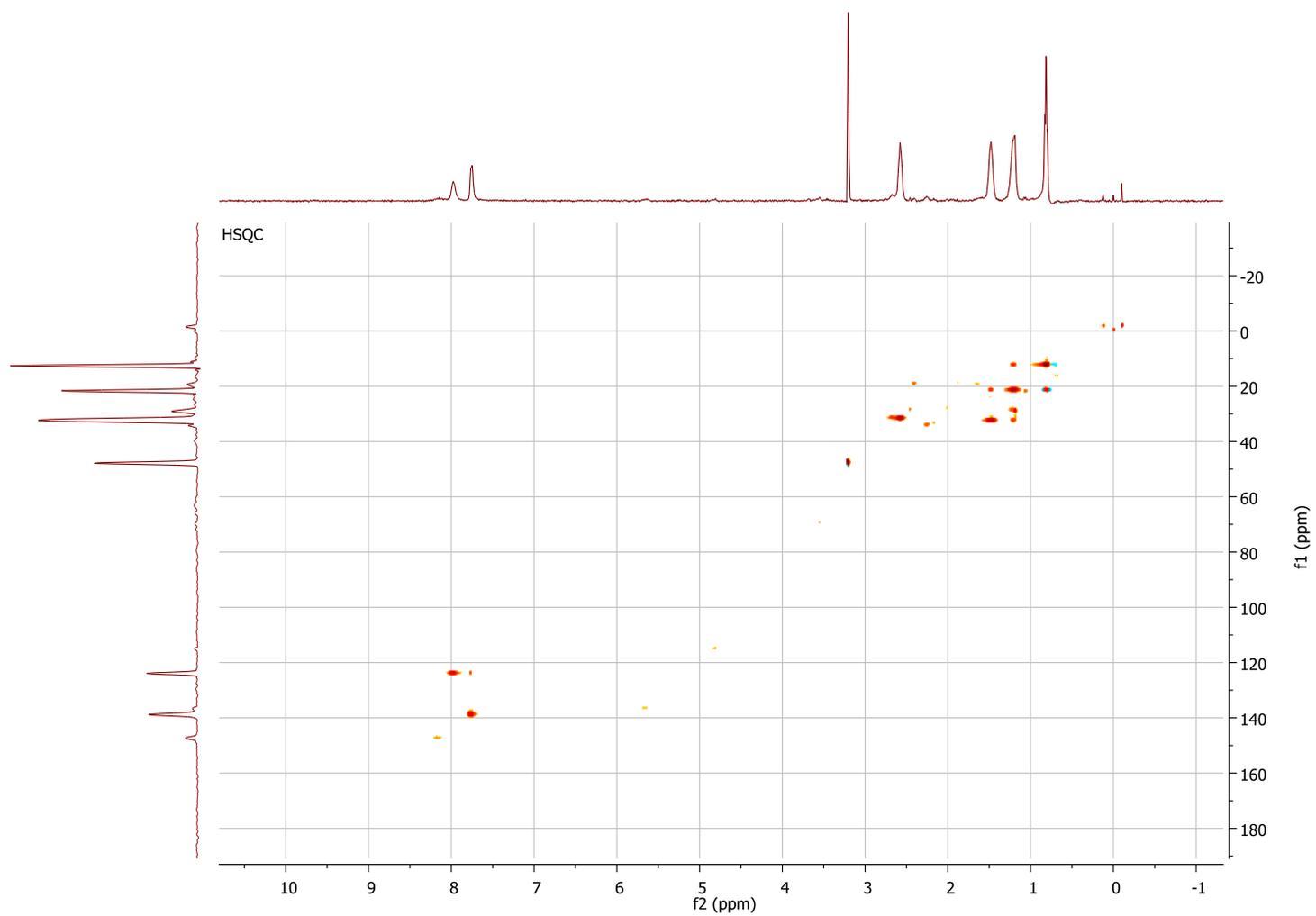
Figura 23 - Espectro de ^{13}C RMN DEPT 135, do composto Ácido fusárico (75 MHz, MeOD).

Fonte: Da Autora.

Figura 24 - Espectro de ^{13}C RMN BBD, do composto Ácido fusário (100 MHz, MeOD).

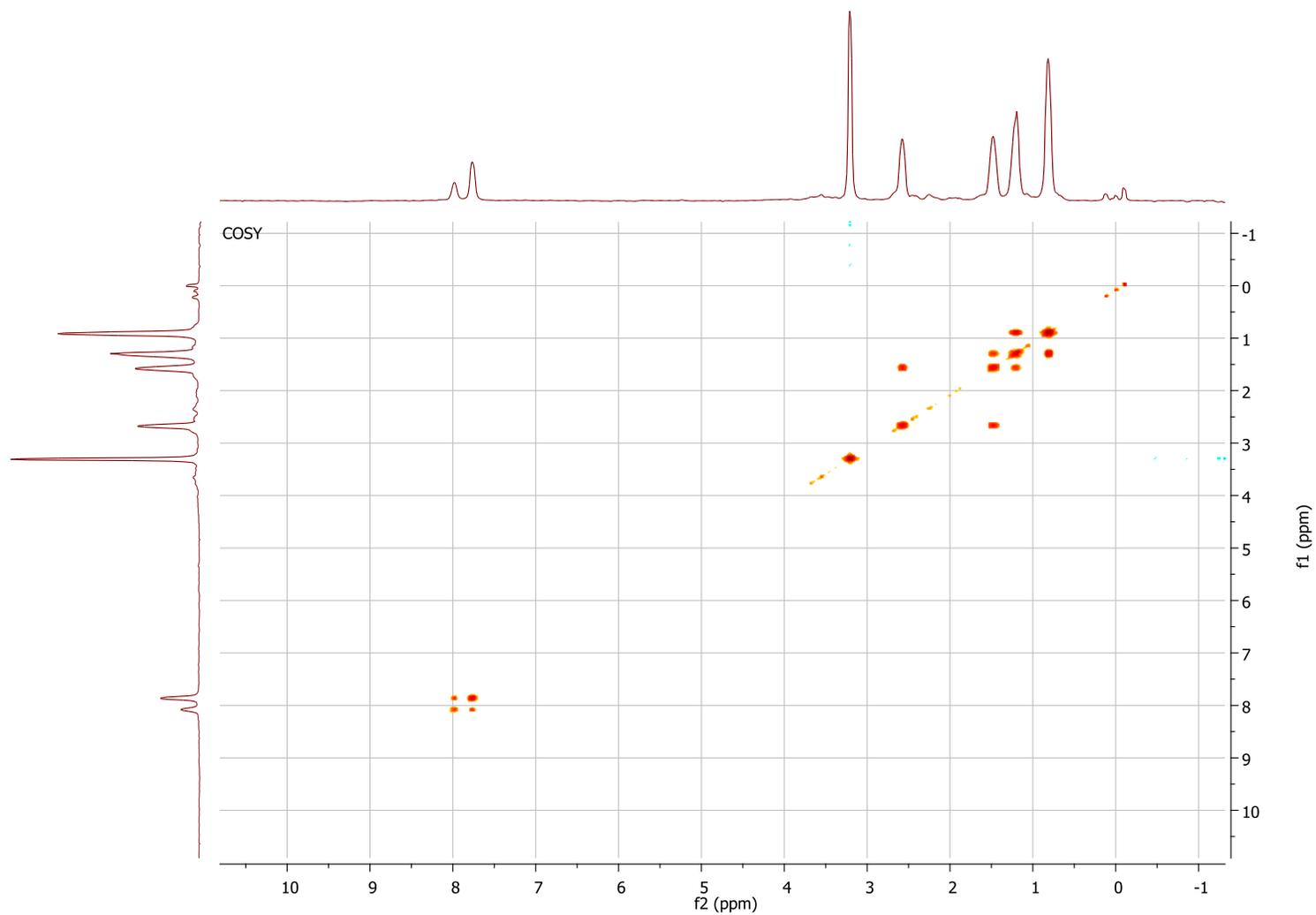
Fonte: Da Autora.

Figura 25 – Espectro bidimensional HSQC (^1H : 400 MHz e ^{13}C : 100 MHz) do composto Ácido fusário em MeOD.



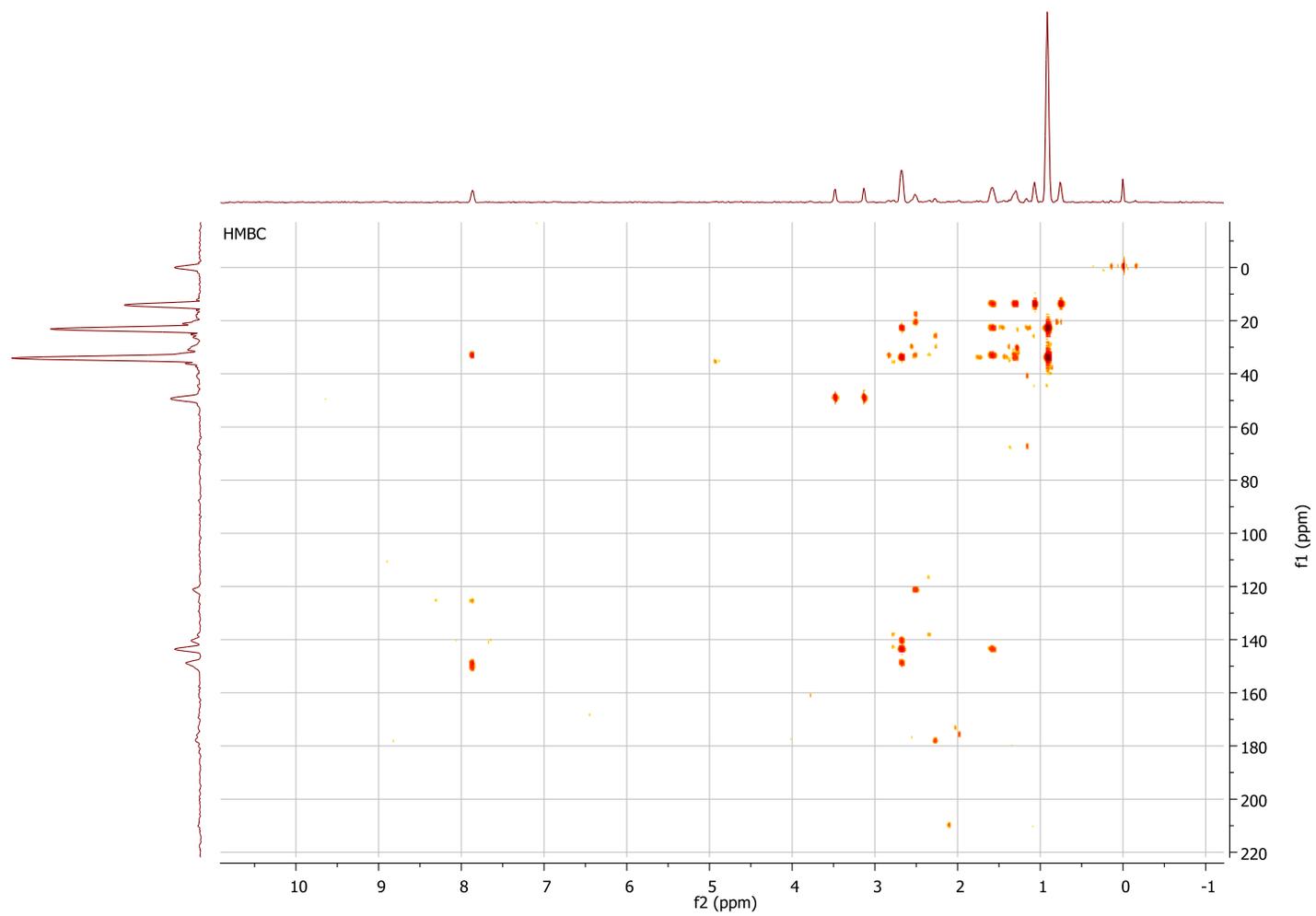
Fonte: Da Autora.

Figura 26 - Espectro bidimensional COSY (^1H : 400 MHz) do composto Ácido fusário em MeOD.



Fonte: Da Autora.

Figura 27 - Espectro bidimensional HMBC (^1H : 400 MHz e ^{13}C : 100 MHz) do composto Ácido fusário em MeOD.



Fonte: Da Autora.

Tabela 6 – Dados de RMN (H^1 : 300 MHz e C^{13} : 75 MHz) em MeOD para a substância presente na fração J_3 .

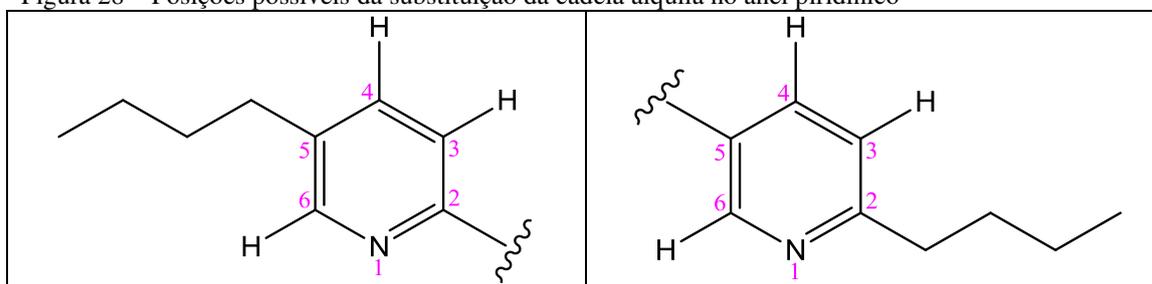
Posição	δ^1H (ppm); J (m; Hz)	Integral 1H	$\delta^{13}C$ (ppm)	HMBC	COSY
1 (N)	-	-	-	-	-
2	-	-	150,2	-	-
3	8,07	1H	125,3	-	H4
4	7,85 (<i>d</i> ; 7,5 Hz)	1H	140,3	C2, C3, C8	H3
5	-	-	143,4	-	-
6	8,26 (<i>sl</i>)	1H	148,6	-	-
7	-	-	170,4	-	-
8	2,68 (<i>m</i>)	-	33,4	C4, C5, C6, C9, C10	H9
9	1,58 (<i>m</i>)	2H	34,1	C5, C8, C10, C11	H10 e H8
10	1,30 (<i>m</i>)	2H	23,2	C8, C9, C11	H11 e H9
11	0,91 (<i>t</i> ; 7,1 Hz)	3H	14,1	C8, C9, C10	H10

Fonte: Da Autora.

Nota: *sl*: sinal largo; *d*: dupletto; *t*: tripleto; *J*: constante de acoplamento.

É oportuno salientar que se encontram descritos na literatura (BREITMAIER, 2003; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 1996) que as constantes de acoplamento entre átomos de hidrogênio do anel piridínico refletem a posição dos prótons relativos ao anel, sendo clara a diferença existente entre os prótons na posição 2 e 3 ($^3J_{HH} = 5,5 \text{ Hz}$) e os prótons da posição 3 e 4 ($^3J_{HH} = 7,6 \text{ Hz}$). Na presente molécula em estudo, os sinais apresentados pelos hidrogênios aromáticos vicinais indicaram $^3J = 7,5 \text{ Hz}$, o que permitiu a atribuição das posições 3 e 4 aos hidrogênios δ_H 8,07 e 7,85. Tal atribuição implica diretamente sobre as posições da dissstituição do anel piridínico, resultando em duas possibilidades para a cadeia alquila: posição 2 ou 5 (Figura 28).

Figura 28 – Posições possíveis da substituição da cadeia alquila no anel piridínico



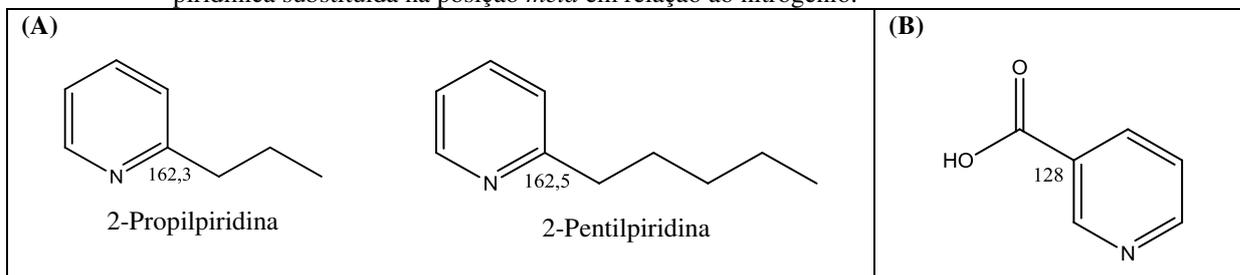
Fonte: Da Autora.

A presença de um sinal em 170,2 ppm observado no espectro ^{13}C RMN BBD, sugestivo de um grupo ácido carboxílico, foi confirmada por meio dos dados de espectrometria de massas (discutidos adiante). É oportuno ressaltar que na literatura, Liu et al. (2016) elucidaram a molécula do Ácido 10-hidroxi-11-clorofusárico e informaram um sinal não detectado para o carbono da carbonila (Tabela 7). No presente estudo este sinal de

carbono foi detectado, entretanto não foram observadas correlações no espectro bidimensional de RMN HMBC. Assim, diante deste outro substituinte e de duas posições para as substituições, estudou-se na literatura informações que justificassem a atribuição dos deslocamentos para duas estruturas possíveis de serem formadas com o ácido carboxílico e o grupo n-butil no anel piridínico, na tentativa de esclarecer a estrutura presente na fração J₃.

Trabalhando com a hipótese da substituição do grupo ácido carboxílico na posição *meta* em relação ao nitrogênio, a cadeia alquila automaticamente ocuparia a posição *para* em relação ao grupo carboxílico, sendo a estrutura denominada Ácido 2-butilpiridina-5-carboxílico, inédita na literatura. Ao atribuir os deslocamentos químicos observados nos espectros, diversas incompatibilidades foram observadas, sendo pertinente destacar duas. A primeira é relativa ao deslocamento químico apresentado pelo carbono substituído com a cadeia alquila, cujo valor para a molécula em estudo foi 143,4 ppm, mas o valor apresentado pela literatura esteve próximo de 162 ppm (GROENHAGEN et al., 2014) como pode ser observado na Figura 29-A. A outra incompatibilidade foi evidenciada para o deslocamento do carbono ligado ao grupo ácido carboxila, cujo valor observado no presente estudo foi 150,2 ppm. Mas na posição *meta* em relação ao nitrogênio, os valores descritos na literatura (VENKATESWARLU et al., 2015) são próximos de 128 ppm (Figura 29-B), o que descartou a possibilidade de ser a molécula do Ácido 2-butilpiridina-5-carboxílico.

Figura 29 – (A) Moléculas piridínicas substituídas na posição *orto* em relação ao nitrogênio. (B) Molécula piridínica substituída na posição *meta* em relação ao nitrogênio.



Fonte: Adaptado de Groenhagen et al. (2014) e Venkateswarlu et al. (2015).

Nota: Imagens redesenhadas pelo Autor no ChemDraw Ultra 12.0.

A outra hipótese seria a substituição do grupo ácido carboxílico ocorrer em posição *orto* em relação ao nitrogênio, de forma que a cadeia alquila ocuparia a posição *para* em relação ao ácido carboxílico e a molécula seria denominada de Ácido 5-butilpiridina-2-carboxílico, cujos relatos na literatura remetem ao Ácido fusárico (**66**). Os dados de RMN (H^1 e C^{13}) para este composto, bem como para o Metil fusarato e ácido 10-hidróxi-11-clorofusárico são expostos comparativamente na Tabela 7.

Tabela 7 – Dados comparativos de RMN para a molécula presente na fração J₃ (H¹: 400 MHz e C¹³: 100 MHz; MeOD), para o Ácido fusárico (H¹: 300 MHz e C¹³: 75 MHz; MeOD), Metil fusarato (H¹: 500 MHz e C¹³: 125 MHz; CDCl₃) e Ácido 10-hidroxi-11-clorofusárico (H¹: 600 MHz e C¹³: 150 MHz; MeOD).

Posição	Molécula em estudo presente na fração J ₃		Ácido fusárico (BURMEISTER et al., 1985)		Metil fusarato (STIPANOVIC et al., 2011a)		Ácido 10-hidroxi-11-clorofusárico (LIU et al., 2016)	
	δ ¹ H (ppm); <i>J</i> (m; Hz)	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm); <i>J</i> (m; Hz)	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm); <i>J</i> (m; Hz)	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm); <i>J</i> (m; Hz)	δ ¹³ C (ppm)
2	-	150,2	-	148,8	-	144,9	-	145,8
3	8,07	125,3	8,26 (<i>d</i> ; 8,2 Hz)	128,8	8,17	124,5	8,03 (<i>d</i> ; 7,7 Hz)	125,7
4	7,85 (<i>d</i> ; 7,5 Hz)	140,3	8,47 (<i>dd</i> ; 8,2 Hz)	143,1	7,75	138,5	7,84 (<i>d</i> ; 7,7 Hz)	139,6
5	-	143,4	-	146,1	-	143,1	-	142,7
6	8,26 (<i>sl</i>)	148,6	8,57 (<i>sl</i>)	149,7	8,70	147,6	8,59 (<i>sl</i>)	149,9
7	-	170,4	-	166,6	2,71	32,7	-	Não detectado
8	2,68 (<i>m</i>)	33,4	2,87 (<i>t</i> ; 7,6 Hz)	34,4	1,62	32,9	2,88 (<i>m</i>)	29,7
9	1,58 (<i>m</i>)	34,1	1,66 <i>m</i>	34,3	1,34	22,2	2,77 (<i>m</i>)	36,2
10	1,30 (<i>m</i>)	23,2	1,32 <i>m</i>	24,1	0,90	13,7	3,68 (<i>m</i>)	71,3
11	0,91 (<i>t</i> ; 7,1 Hz)	14,1	0,89 <i>t</i>	15,7	-	165,2	3,55 (<i>dd</i>); 3,50 (<i>dd</i>)	50

Fonte: Da Autora.

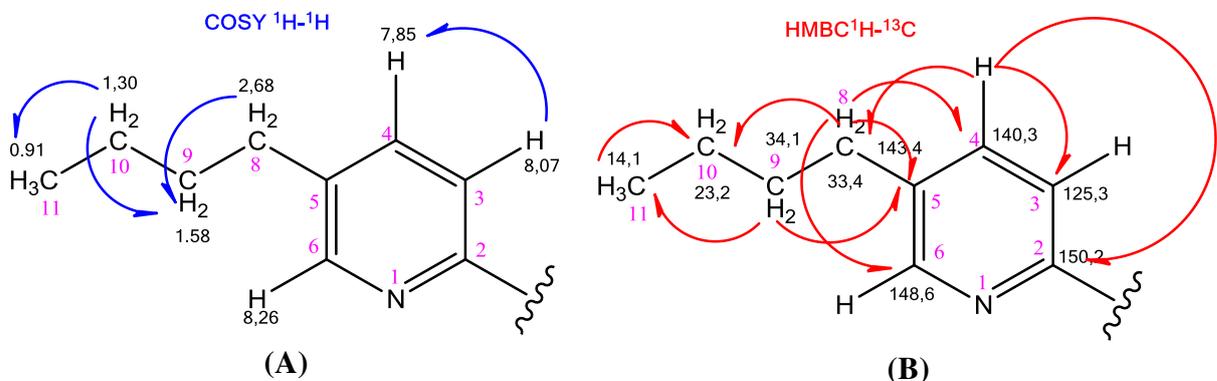
Nota: *sl*: singleto largo; *m*: multipleteo; *d*: dubleteo; *t*: tripleto; *J*: constante de acoplamento.

Analisando os dados exibidos na Tabela 7, se tornam pertinentes algumas ressalvas. A primeira refere-se aos deslocamentos químicos atribuídos por Burmeister et al. (1985) para carbonos e hidrogênios, os quais deixaram dúvidas para a confirmação da molécula em estudo. Isto pode ser examinado com os deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos (H3, H4 e H6) descritos por Burmeister et al. (1985) que apresentaram-se mais desblindados. Ainda, o átomo de hidrogênio H4 encontra-se mais desblindado (8,47 ppm) do que o observado para a molécula em estudo (7,85 ppm). Adicionalmente, os deslocamentos químicos do carbono C8 (δ_C 33,4) do composto em estudo encontra-se mais blindado do que C9 (δ_C 34,1), ao contrário do observado para os dados descritos por Burmeister et al. (1985) (C8: 34,4 ppm e C9: 34,3 ppm).

Em intenso estudo na literatura, foi verificado que Stipanovic et al. (2011a) realizaram a biossíntese do ácido fusárico empregando substratos marcados com ^{13}C (acetato [$1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$] e aspartato) e ^{15}N (glutamina e aspartato), sendo possível confirmarem, com segurança, os deslocamentos químicos à molécula em questão. Os autores recorreram inclusive aos dados da constante de acoplamento entre C-C. Diante dessas atribuições apresentadas pela literatura, os dados descritos para a molécula proveniente da fração J₃ se encontram totalmente compatíveis aos apresentados por Stipanovic et al. (2011a) (Tabela 7).

Na Figura 30 é possível conferir algumas das correlações evidenciadas nos espectros de RMN mono e bidimensionais observadas para a fração J₃.

Figura 30 – Correlações observadas para o composto presente na fração J₃, sendo evidenciado em (A) correlações $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ do espectro COSY e em (B) correlações $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ a longa distância do espectro HMBC.

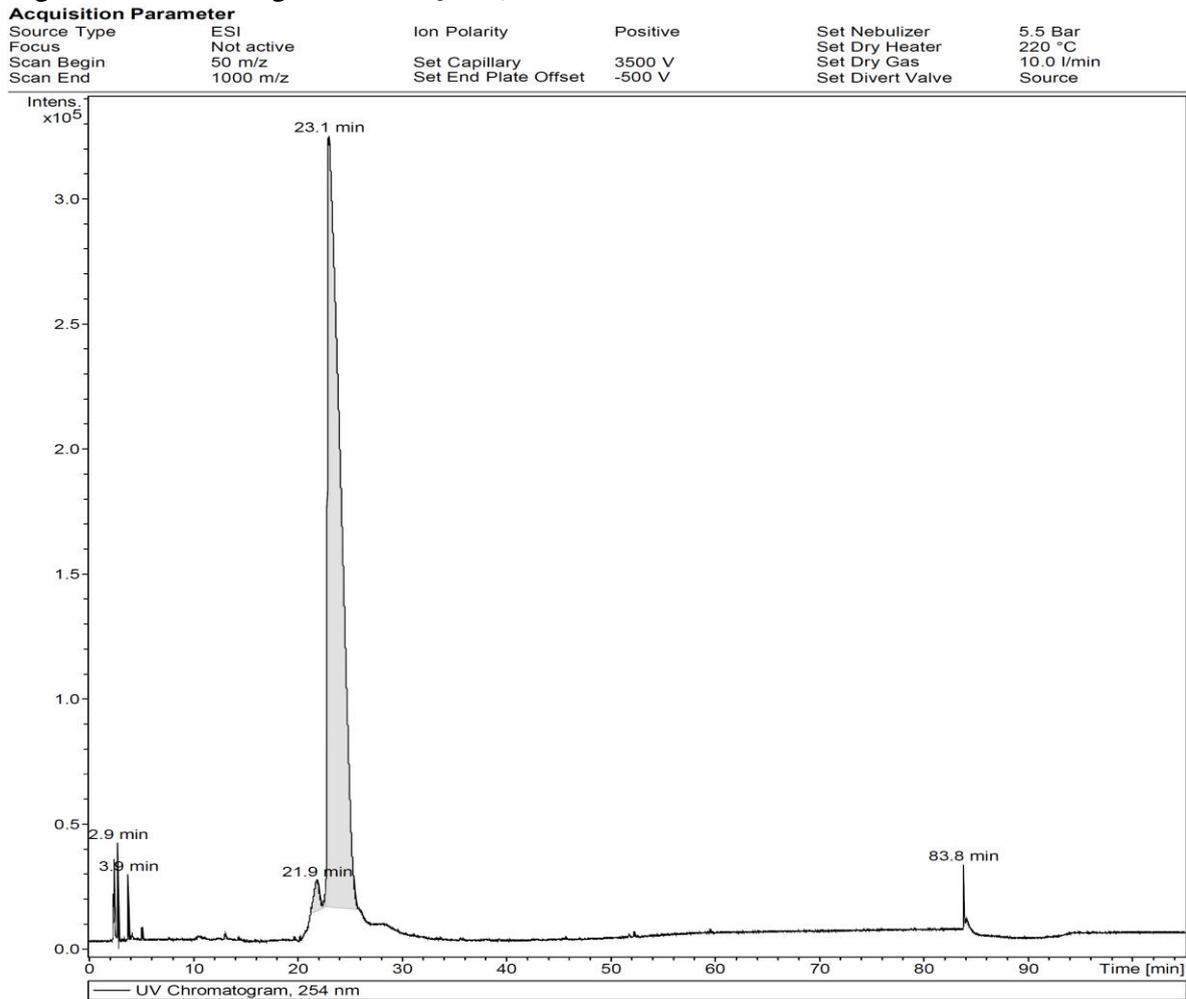


Fonte: Da Autora.

Conforme comentado anteriormente, a avaliação dos espectros de massas de alta resolução permitiu confirmar a presença do grupo ácido carboxílico ligado ao anel piridínico. Assim, ao monitorar o pico 23,1 minuto à 254 nm (Figura 31), obteve-se um espectro *full scan*,

no modo positivo, com o perfil evidenciado na Figura 32. Na literatura é descrito por Han et al. (2014) e Vieira (2016) que o íon molecular $[M+H]^+$ de m/z 180, fragmenta na fonte e origina o fragmento de m/z 162, pertencente a uma desidratação, e m/z 134, devido a perda de uma molécula de monóxido de carbono.

Figura 31 - Cromatograma da fração J₃.



Fonte: Da Autora.

Figura 32 – Espectro de Massas de alta resolução, *full scan*, no modo positivo da fração J₃.

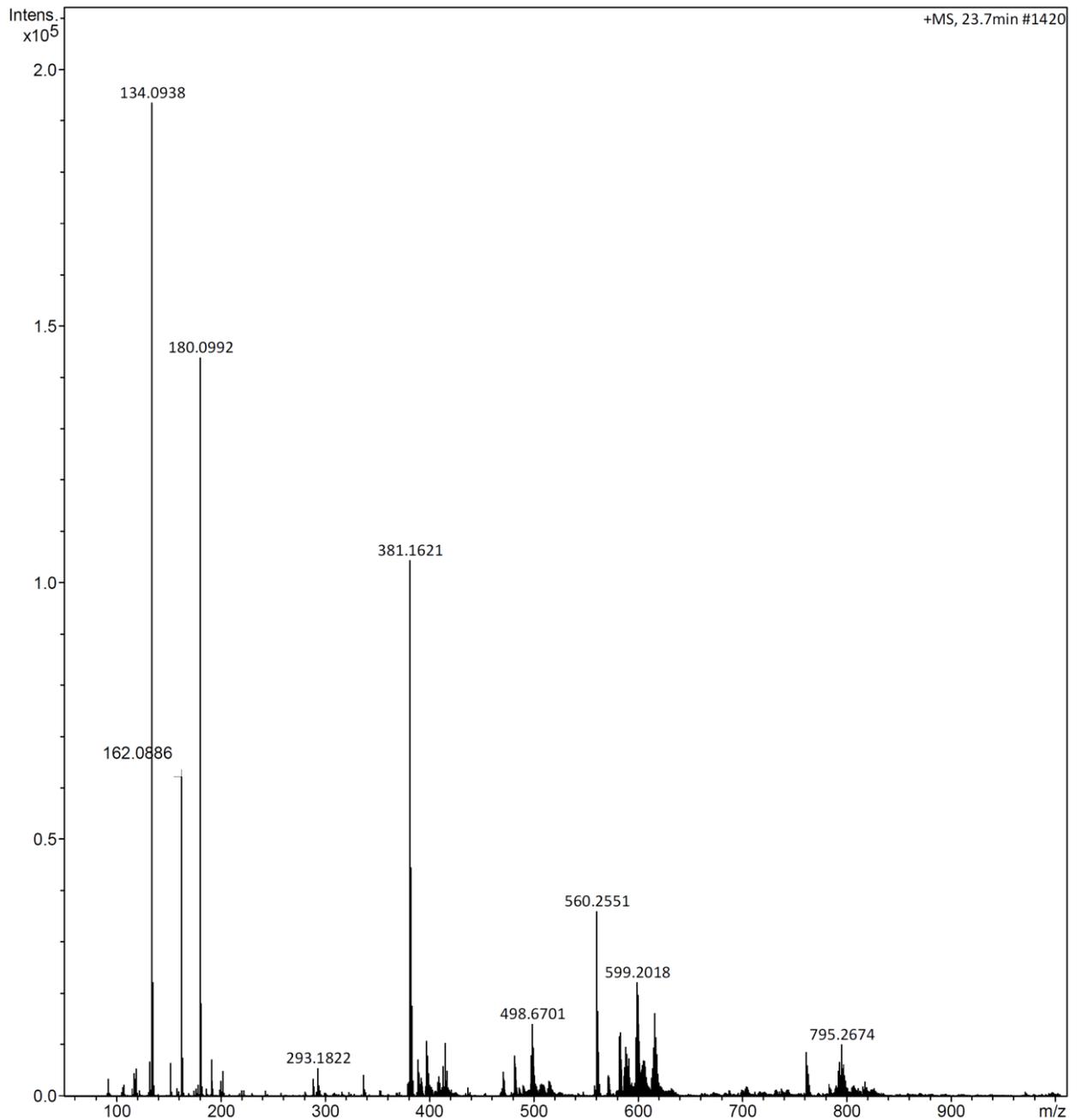
Display Report

Analysis Info

Analysis Name	C:\Users\Juliano Amaral\Documents\Doutorado\MASSAS\QTOF II\Ju_POS_alc patri	Acquisition Date	07/05/2016 20:58:12
	07-05-16_1-3_01_258.d		
Method	Juliano_07-05-16.m	Operator	BD@AL
Sample Name	Ju_POS_alc patri 07-05-16	Instrument	micrOTOF 213750.10361
Comment			

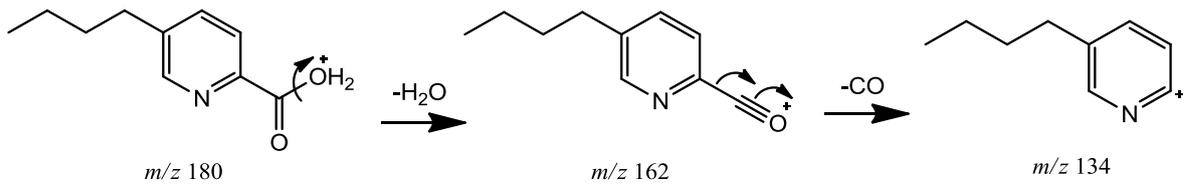
Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	5.5 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	220 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	3500 V	Set Dry Gas	10.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source



Fonte: Da Autora.

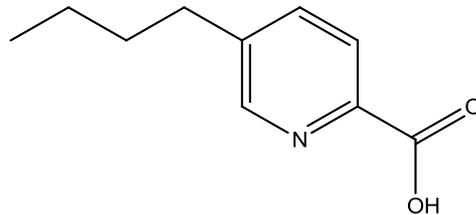
Figura 33 – Fragmentação proposta para o íon molecular m/z 180.



Fonte: Adaptado de Han et al. (2014) e Vieira (2016).

O conjunto de resultados obtidos com as análises de IV, RMN e EM tornou possível caracterizar a molécula do Ácido 5-butilpiridina-2-carboxílico (Ácido fusárico), presente majoritariamente na fração J_3 (Figura 34).

Figura 34 – Molécula presente na fração J_3 identificada como Ácido fusárico.



Fonte: Da Autora.

Em vasta pesquisa pela literatura, foram observados relatos da produção do Ácido fusárico por diversas espécies de fungos endofíticos pertencentes ao gênero *Fusarium* (BOHNI et al., 2016; ISMAIEL; PAPENBROCK, 2015; BACON et al., 1996). Mas o presente trabalho descreve pela primeira vez a produção deste composto como oriundo do metabolismo do fungo endofítico *G. moniliformis* proveniente do manguê brasileiro.

Sinônimos são atribuídos a esta molécula, incluindo ácido 5-butilpicolínico e ácido fusarínico.

Um fator importante a se considerar é o alto valor agregado atribuído a este composto, que se encontra sendo comercializado pela empresa Santa Cruz Biotechnology por US\$ 30,00 cada 50 mg. Já a empresa Sigma-Aldrich apresenta orçamento para 1 g do composto por R\$ 1.878,00. Estes valores evidenciam o valor agregado da molécula que foi produzida pelo endófito *G. moniliformis* nas condições fermentativas empregadas no presente trabalho.

Na literatura são descritas algumas das potencialidades evidenciadas com este alcaloide piridínico, tais como atividade hipotensiva pela ação inibitória sobre a dopamina β -hidroxilase (HIDAKA et al., 1969), atividade cardiovascular e neurológica (WANG; NG, 1999), estudos de biocontrole (HU et al., 2012) e potencial agrícola por suas propriedades inseticidas e fitotóxicas (LIU et al., 2016).

Cabe ainda destacar que, considerando a estrutura química, os grupos piridínico e ácido carboxílico podem ser responsáveis pela atividade farmacológica da molécula em estudo. O anel piridínico, como visto no item 1.4.1, é importante nos processos biológicos, sendo descrito na literatura moléculas piridínicas de interesse, tais como nicotina e isoniazida (TARR; ARDITTI, 1982; VIEGAS Jr, 2003; CHENG; MENG; CHEN, 1998; SRIPHONG et al., 2003). Sebastianes et al. (2012) avaliaram o ácido 3-hidroxi propiônico, assim como seu éster (éster 3-hidroxi propanóico), frente a patógenos humanos. Os autores observaram atividade apenas para o ácido 3-hidroxi propiônico e atribuíram a presença do efeito bioativo ao grupo ácido carboxílico (R-CO-OH). De forma semelhante, Stipanovic et al. (2011b) atribuíram ao grupo ácido carboxílico o potencial fitotóxico do ácido fusárico (66) em folhas de algodoeiro, uma vez que os compostos 3-butilpiridina e seus análogos (3-etilpiridina, picolinaldeído) apresentaram ação atóxica nos ensaios realizados.

Neste sentido, existem muitas outras expectativas de estudo com a molécula do Ácido fusárico que a colocam em destaque na comunidade científica, sendo no presente estudo evidenciadas algumas das potencialidades que até então não foram relatadas na literatura.

5.3 ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR

O século XX apresentou um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais dentro do campo da oncologia, especialmente oriundos de plantas e micro-organismos, propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica (COSTA-LOTUFO et al., 2010). De todos os 174 fármacos inseridos na clínica médica entre 1981 até 2014, 54% são advindos de produtos naturais derivados de plantas, micro-organismos ou animais, sendo que mais de 30% dos medicamentos utilizados tem, em alguma instância, origem relacionada a uma fonte natural (NEWMAN; CRAGG, 2016).

É importante destacar que, antes da aplicação de novas moléculas em animais, devem ser realizados estudos *in vitro* com a finalidade de identificar potencialidades terapêuticas de uma determinada substância. Sendo assim, modelos de triagem *in vitro* como ensaios de viabilidade e crescimento celular são de grande importância na determinação da atividade citotóxica de novas substâncias, de modo a fornecerem dados que possam direcionar para estudos mais detalhados (FRICKER, 1999).

Na Tabela 8 são expressos os valores de IC₅₀, em µg/mL, para o Ácido fusárico frente a diferentes células humanas tumorais e normais (ensaio de viabilidade realizado pelo MTS).

Tabela 8 - Inibição parcial do crescimento celular (IC_{50}), expressos pela média±desvio padrão, em $\mu\text{g/mL}$, de linhagens tumoral/normal frente ao composto Ácido fusárico pelo ensaio do MTS.

	MCF 7	HT 144	Hep G2	A549	CCD-1059Sk
Ácido fusárico	59,55±0,91	63,85 ± 5,24	n/d	n/d	n/d
Cisplatina	21,12±1,56	9,91±0,66	27,15±1,73	24,70±4,78	77,41±8,22

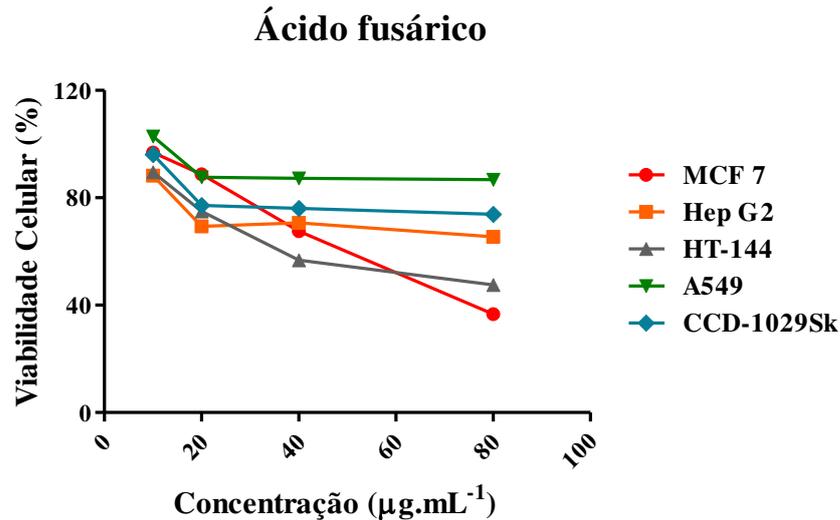
Fonte: Da Autora.

Nota: n/d: corresponde a valores $> 80 \mu\text{g/mL}$.

A partir da análise da Tabela 8, é possível verificar seletividade ~~especificidade~~ nos ensaios preliminares contra quatro linhagens tumorais humanas. Isto porque o composto Ácido fusárico apresentou IC_{50} com valores indicativos de ação moderadamente seletiva frente a MCF 7 (IC_{50} : 59,55 $\mu\text{g/mL}$) e HT 144 (IC_{50} : 63,85 $\mu\text{g/mL}$) e baixa seletividade frente às linhagens A549 e Hep G2 ($IC_{50} > 80 \mu\text{g/mL}$). Tal ação é considerada satisfatória, pois fármacos que atuam de modo não seletivo se tornam tóxicos para os tecidos saudáveis, acarretando efeitos colaterais indesejáveis e dificuldades com o tratamento (SILVEIRA-LACERDA et al., 2010).

Na Figura 35 pode-se verificar que diferentes concentrações do composto teste foram utilizadas no tratamento das linhagens tumorais avaliadas pelo ensaio do MTS. Para as linhagens MCF 7 (adenocarcinoma de mama) e HT 144 (melanoma) observou-se redução da viabilidade celular em 60 e 50 %, respectivamente, com efeito dependente da concentração, após 48 horas de tratamento com 80 $\mu\text{g/mL}$ do composto.

Figura 35 - Viabilidade celular de linhagens celulares tumorais humanas determinada pelo ensaio MTS, após exposição por 48 horas ao composto Ácido fusárico.



Fonte: Da Autora.

Nota: Adenocarcinoma de mama (MCF 7); Carcinoma hepatocelular (Hep G2); Carcinoma de pulmão (A549); Melanona (HT 144) e Células de fibroblastos de pele (CCD-1029Sk). Os valores de viabilidade representados no gráfico referem-se à média dos experimentos realizados em triplicata.

Embora o valor de IC₅₀ para ambas as linhagens tenha sido superior a 30 µg/mL (Tabela 7) e, considerando que valores inferiores a esse é que são os aceitáveis pelo NCI (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990), ainda podemos considerar estes dados relevantes, uma vez que houve acentuada redução da viabilidade celular observada para ambas as linhagens.

Em pesquisa pela literatura, não foi observado relatos associando o estudo do ácido fusárico com a linhagem tumoral HT 144. Considerando que o melanoma é uma das neoplasias malignas de pele mais agressivas, os dados observados no presente estudo (redução de 50 % da viabilidade celular de HT 144) se destacam. Principalmente porque se trata de um câncer que, apesar de apresentar-se com baixa incidência (cerca de 5% dos tumores cutâneos diagnosticados no Brasil), encontra dificuldade no diagnóstico precoce e tratamento eficaz, o que torna o tempo médio de sobrevivência de apenas 6 a 10 meses (SOENGAS; LOWE, 2003), sendo, portanto, responsável por uma alta taxa de mortalidade (80 a 85% dos casos chegam a óbito) (BRASIL, 2016a; MILLER; MIHM JR, 2006). A cirurgia é uma opção, mas quando em estágio avançado a estratégia deve ser medicamentosa para aliviar os sintomas (dor e efeitos secundários do tratamento como fadiga, náuseas, vômitos) e melhorar a qualidade de vida do paciente (BRASIL, 2016b).

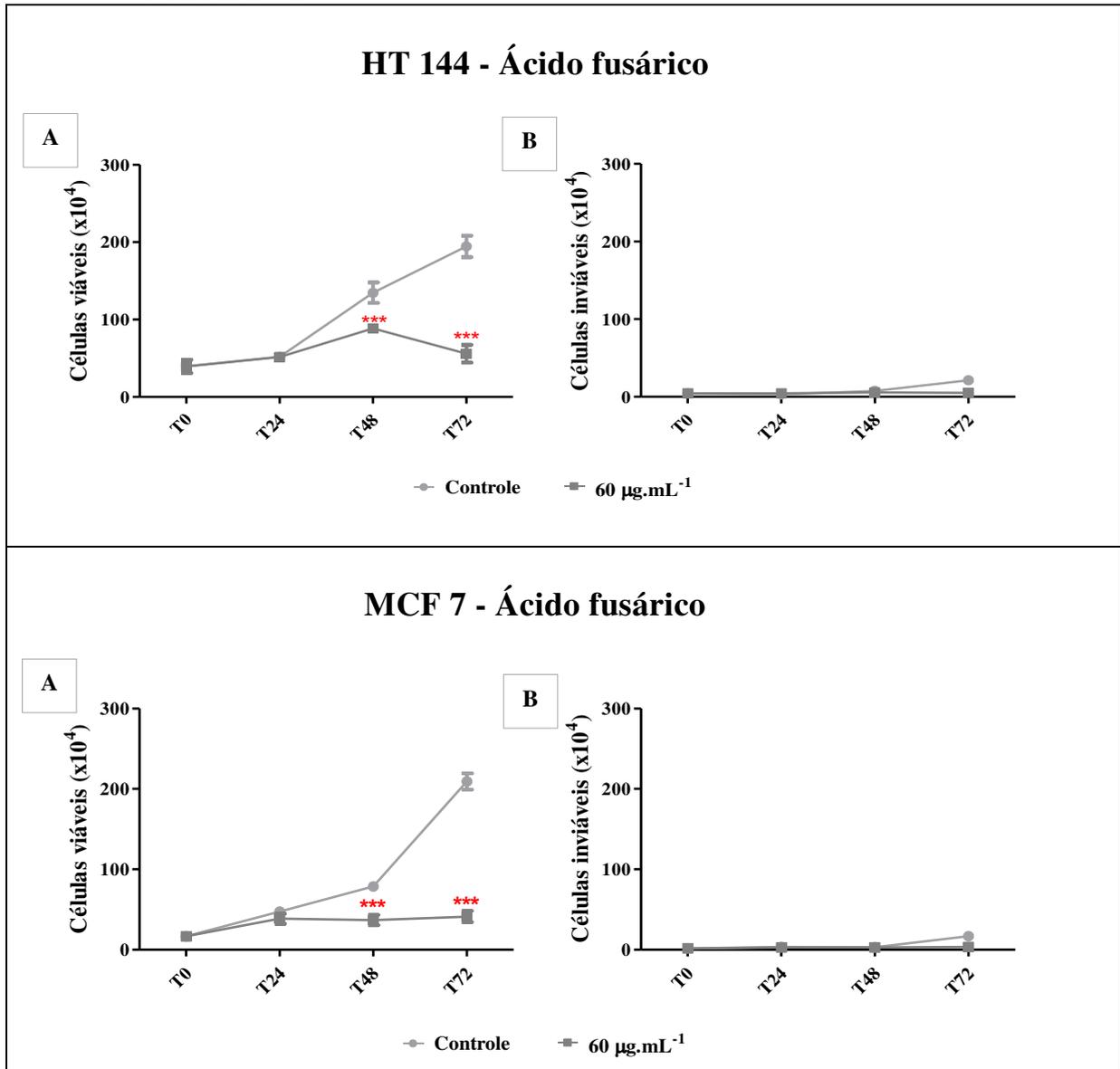
O câncer de mama é o tipo mais comum de câncer entre as mulheres no Brasil e no mundo, respondendo por 25 % dos casos novos a cada ano, cujo tratamento consiste em radio e quimioterapia (BRASIL, 2016c). A redução da viabilidade celular observada para a

linhagem tumoral MCF 7 sob a ação do Ácido fusárico é um dado relevante que deve ser investigado quanto ao modo de ação pelo qual essa redução significativa ocorreu. Na literatura, Fernandez-Pol; Klos; Hamilton (1993) destacaram os efeitos citotóxicos do ácido fusárico sobre a linhagem tumoral humana MDA-MB-468 (adenocarcinoma de mama), bem como contra linhagens humanas de carcinoma de colon retal (SW48, SW480 e SW742).

No ensaio de viabilidade celular (MTS) frente à linhagem humana normal CCD-1059Sk, foi observada baixa toxicidade do Ácido fusárico em 48 horas ($IC_{50} > 80 \mu\text{g/mL}$, Tabela 8, Figura 34). Estes dados podem ser interessantes por minimizarem eventuais efeitos tóxicos existentes sobre a pele. É oportuno destacar que na literatura o ácido fusárico foi avaliado sobre linhagens humanas normais de fibroblastos (WI-38) e, de acordo com Fernandez-Pol; Klos; Hamilton (1993) foi observado comportamento quiescente (ação citostática) sobre estas células durante um período de 30 a 48 horas. Entretanto, a remoção do ácido fusárico do meio de cultura reverteu este efeito.

A partir da coloração das células HT 144 com azul de tripano, pode-se realizar a contagem do número de células viáveis e inviáveis após 24, 48 e 72 horas de tratamento com Ácido fusárico. A concentração empregada no ensaio foi de $60 \mu\text{g/mL}$, próxima ao IC_{50} obtido no ensaio do MTS para a linhagem em questão (Tabela 8). Observando a Figura 35 é possível comparar a proliferação celular de HT 144 e MCF 7 tratadas com DMSO (controle) e com $60 \mu\text{g/mL}$ do ÁCIDO FUSÁRICO nos diferentes tempos. É importante ressaltar que o composto em questão reduziu significativamente ($p < 0,001$) as células HT 144 e MCF 7 entre os tempos 48 h e 72 h, contudo não houve aumento significativo do número de células inviáveis e, desta forma, a redução da viabilidade celular em ambas as linhagens, ocorreu por efeito citostático e não citotóxico (Figura 36).

Figura 36– Gráfico da curva de crescimento da linhagem HT 144 e MCF 7, determinada pelo ensaio do azul de tripano, após exposição por 24, 48 e 72 horas ao composto Ácido fusárico. (A)-Células viáveis. (B)-Células inviáveis.



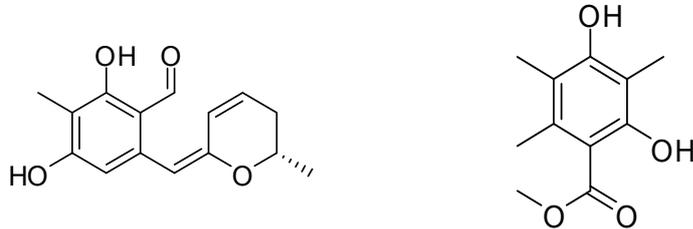
Fonte: Da Autora.

Nota: Os valores de viabilidade representados no gráfico referem-se à média dos experimentos realizados em triplicata e a barra de erros representa o erro padrão em relação à média. T0: tempo inicial; T24, T48 e T72: tempos de tratamento. Controle: DMSO. ***p<0,001 de acordo com análise de variância ANOVA e pós teste Tukey.

Na literatura, encontra-se com frequência relatos do potencial de fungos endofíticos frente a linhagens tumorais humanas. Zheng et al. (2013), ao estudarem o fungo endofítico *Penicillium melinii* Yuan-25 isolado de *Panax ginseng*, descreveram a obtenção de Ginsenocina (72) e Metil 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato (73). O composto (72) foi indicado pelos autores como candidato inibidor de tumor devido ao seu comportamento citotóxico frente a seis linhagens cancerígenas testadas (MKN45, LOVO, A549, MDA-MB-435, Hep G2 e HL-60), com IC₅₀ entre 0,49 e 5,03 µg/mL. Os autores sugeriram que a

atividade citotóxica se deve à presença do grupo aldeído ou do anel pirano, visto que o composto (73) se apresentou com anel benzênico semelhante ao Ginsenosina (72), mas evidenciou baixa toxicidade para as linhagens testadas (Figura 37).

Figura 37 - Compostos produzidos por *Penicillium melinii* Yuan-25 isolado de *Panax ginseng*.



(72) Ginsenosina

(73) Metil 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato

Fonte: Adaptado de Zheng et al. (2013).

Nota: Imagens redesenhadas pelo Autor no *ChemDraw* Ultra 12.0.

Devari et al. (2014) isolaram do fungo endofítico *Alternaria alternata* proveniente de *Capsicum annum*, o composto capsaicina (conhecido por sua propriedade anticancerígena), além de alternariol-10-metil éter. Este último se destacou pela citotoxicidade contra uma variedade de células cancerosas humanas, além da indução de apoptose nas células HL-60 (IC₅₀: 85 µM). Os autores sugeriram otimizar as condições em larga escala para produção de capsaicina e realizar modificações estruturais em alternariol-10-metil éter, visando melhorar as atividades biológicas por ele evidenciadas, estabelecendo também seu modo de ação.

De acordo com Costa-Lotufo et al. (2010), apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico do câncer, vários tumores ainda não dispõem de tratamento adequado. Assim, o incentivo de pesquisadores na busca por novas moléculas com este potencial bioativo é muito importante.

5.4 RESULTADO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (CIM E CMM) E IMAGENS DE MEV

A Tabela 9 apresenta os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) das frações J₁, J₂ e J₄ e do composto Ácido fusárico frente a cepas de *C. albicans* de diferentes origens (ATCC e de fontes de infecção de ambiente hospitalar). Há que se destacar que na literatura consultada não foram encontrados estudos para a molécula do ácido fusárico, como os apresentados a seguir.

Tabela 9- Resultados de CIM/CFM ($\mu\text{g/mL}$) contra cepas de *C. albicans* de diferentes origens.

	<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)		<i>C. albicans</i> n° 31 (ponta de cateter)		<i>C. albicans</i> n° 521 (jaleco)		<i>C. albicans</i> n° 500 (lençol)	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
JAc	125-250	>1000	-	-	-	-	-	-
J₁	100-200	>400	>400	>400	50-100	100-200	-	-
J₂	50-100	200-400	200-400	>400	200-400	200-400	-	-
Ácido fusárico	25-50	200-400	200-400	200-400	50-100	50-100	50-100	>400
J₄	50-100	200-400	>400	>400	50-100	50-100	-	-
Nistatina	1-2	1-2	4-8	32-64	4-8	8-16	2-4	16-32

Fonte: Da Autora.

Nota: -: não realizado.

É possível destacar na Tabela 9 o potencial antimicrobiano observado para o alcaloide piridínico que se apresentou mais ativo frente a cepa ATCC 10231 do que o extrato que o originou. Na literatura, Goyal (2013) retratou que as informações sobre o papel dos alcaloides contra micro-organismos, bem como os mecanismos de ação envolvidos são escassos. No entanto, o autor ressalta que já existem muitas classes de alcaloides conhecidos que apresentam atividades antifúngicas, tal como foi evidenciado no presente estudo.

Neste trabalho, além de forte ação fungistática para Ácido fusárico (CIM: 25-50 $\mu\text{g/mL}$) contra a levedura *C. albicans* ATCC 10231, também foi observada moderada ação fungicida (CFM: 200-400 $\mu\text{g/mL}$). Ainda, foi constatada atividade fungistática e fungicida forte contra isolados de *C. albicans* provenientes de ambiente hospitalar (lençol e jaleco) cuja CIM/CFM foi 50-100 $\mu\text{g/mL}$, além de potencial moderado contra a cepa proveniente da ponta de cateter (CIM: 200-400 $\mu\text{g/mL}$).

Cabe aqui destacar a forte ação fungistática das frações J₂ e J₄ contra a cepa de *C. albicans* ATCC 10231 e J₁ e J₄ contra *C. albicans* n° 521. Ainda, J₄ também apresentou ação fungicida contra *C. albicans* isolada de jaleco (n° 521), evidenciando ser uma fração constituída por uma ou mais estruturas químicas promissoras.

Ao comparar o comportamento do antifúngico controle (nistatina) com o alcaloide piridínico frente as cepas de *C. albicans* ATCC e n° 521 (jaleco), pode-se notar que enquanto ocorreu aumento de apenas duas vezes na CIM do composto frente a cepa ATCC em comparação com a n° 521 (CIM de 25-50 passou para 50-100 $\mu\text{g/mL}$), foi necessário aumentar a CIM da nistatina quatro vezes para observar o mesmo efeito fungistático (CIM de 1-2 passou para 4-8 $\mu\text{g/mL}$). Para a atividade fungicida, o efeito de Ácido fusárico frente a cepa n° 521 foi pelo menos oito vezes menor que a CFM observada para a cepa ATCC (CFM de >400 passou para 50-100 $\mu\text{g/mL}$), ao contrário da nistatina que necessitou de aumentar

oito vezes a CFM observada frente a cepa ATCC para tratar a linhagem proveniente do ambiente hospitalar (CFM de 1-2 passou para 8-16 µg/mL).

O estudo contra isolados de *C. albicans* provenientes de fontes de infecção de ambiente hospitalar é relevante, considerando que esse patógeno é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas nosocomiais, podendo ser brandas ou mortais (HINRICHSEN et al., 2009). Muitas dessas infecções podem ser adquiridas por via endógena ou exógena, e esta última pode ser proveniente de mãos de trabalhadores da área da saúde, jaleco, lençóis, instrumentos terapêuticos, biomateriais (cateter), entre outras fontes ambientais direta e indiretamente associadas ao profissional de saúde e ao paciente (NAKAMURA; CALDEIRA; AVILA, 2013). Assim, além destes profissionais incluírem em sua rotina as boas práticas de higiene, devem utilizar equipamentos de proteção individual, preferencialmente descartáveis, ou que sejam submetidos à desinfecção adequada, de forma a inviabilizarem a transmissão exógena de patógenos para os pacientes. Ainda, é imprescindível que o ambiente seja adequadamente higienizado, de forma a diminuir o risco secundário na cadeia de infecções (FERNANDO et al., 2013). Neste sentido, o Ácido fusárico se mostrou bastante efetivo (Tabela 8), sugerindo uma potencial ação no processo de desinfecção dos fomites (jaleco e lençol), os quais podem ser a via de contágio em indivíduos debilitados e, conforme o local atingido, podem ocasionar desde uma simples infecção superficial até uma infecção invasiva (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

De acordo com Berman; Sudbery (2002) a maioria dos antifúngicos são, em sua maioria, fungistáticos em vez de fungicidas. No presente estudo foi observado potencial fungicida para o Ácido fusárico e para a fração J₄, o que reforça o potencial bioativo dos produtos de fermentação do fungo endofítico *G. moniliformis*.

Leveduras do gênero *Candida* são patógenos oportunistas que se desenvolvem quando ocorrem alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou comprometimento de barreiras anatômicas (queimaduras ou procedimentos médicos invasivos), que podem levar ao desenvolvimento de infecções denominadas candidíases, as quais variam desde lesões superficiais até infecções disseminadas (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007). Vale destacar que espécies de *Candida* são encontradas no tubo gastrointestinal em 20 a 80% da população adulta saudável. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização por *Candida* na vagina (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Antifúngicos podem ser empregados no tratamento da candidíase vaginal, de pele, unhas e oral. A nistatina tem seu uso limitado ao tratamento de infecções fúngicas da pele (creme de uso tópico) e do trato gastrointestinal (suspensão oral), visto ser altamente tóxica

por via sistêmica ou intra-vítrea (SERRACARBASSA; DOTTO, 2003). Este medicamento se liga com os esteroides existentes na membrana celular dos fungos susceptíveis, resultando em alteração na permeabilidade da membrana celular e, em consequente extravasamento do conteúdo citoplasmático (NISTATINA, 2016). Pelo fato das leveduras serem organismos eucarióticos, compartilham de alguns processos biológicos de origem humana, o que conduz maiores efeitos secundários prejudiciais no uso de antifúngicos (BERMAN; SUDBERY, 2002).

O resultado observado contra *C. albicans* ATCC 10231 no presente estudo (CIM: 25-50 µg/mL), esteve bem abaixo de uma possível concentração tóxica para os fibroblastos de pele (linhagem CCD-1059Sk, IC₅₀ > 80 µg/mL, ver seção 5.4). Estas informações sugerem a possibilidade deste compost ser um tratamento seguro devido à baixa seletividade evidenciada contra esta linhagem normal derivada de pele. Adicionalmente, este da do pode ser considerado ainda mais promissor uma vez que, em 34 anos (entre 1981 e 2014), apenas 32 fármacos antifúngicos foram introduzidos na clínica médica, dos quais mais de 78% eram de natureza sintética (NEWMAN; CRAGG, 2016). Isto mostra que o desenvolvimento de um agente antifúngico constitui-se um desafio, pois existem poucos alvos de ação que não sejam compartilhados pelo fungo e a espécie humana (ROCHA, 2002).

A Tabela 10 exhibe os resultados obtidos para o ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) do extrato AcOEt (JAc), suas frações J₁, J₂ e J₄ e do Ácido fusárico frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Tabela 10 - Resultados de CIM e CBM (µg/mL) do extrato acetato de etila, frações e para o composto isolado provenientes do endófito *G. moniliformis* observados contra patógenos ATCC.

	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)		<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	
	CIM	CBM	CIM	CBM
JAc	250-500	> 1000	250-500	> 1000
J₁	200-400	> 400	100-200	> 400
J₂	200-400	> 400	50-100	> 400
Ácido fusárico	200-400	200-400	50-100	200-400
J₄	>400	> 400	100-200	> 400
Amoxicilina	2,5 - 5	5 - 10	-	-
Estreptomicina	-	-	5 - 10	> 10

Fonte: Da Autora.

Nota: -: não realizado.

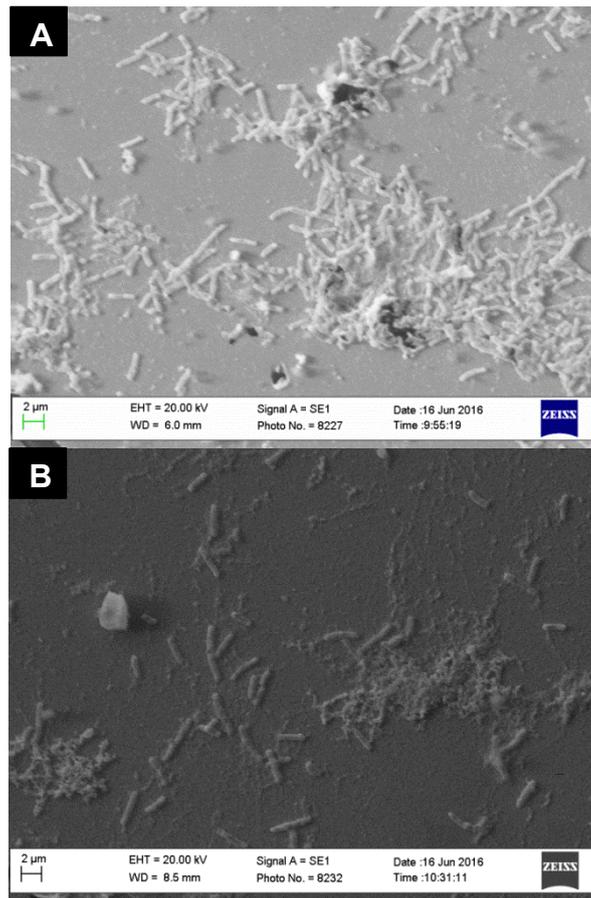
Analisando a Tabela 10, a molécula apresentou forte ação bacteriostática e moderada ação bactericida contra *E. coli* (CIM: 50-100 µg/mL; CBM: 200-400 µg/mL). Ainda, observa-se ação bacteriostática para J₂ contra *E. coli* (CIM: 50-100 µg/mL), evidenciando potencial

promissor das frações advindas do metabolismo secundário do fungo endofítico *G. moniliformis*, os quais se destacam devido a raridade de trabalhos relatados na literatura com ação contra bactérias Gram-negativas. Por meio do estudo de imagens de microscopia eletrônica de varredura, comparado com o controle (Figura 38-A) foi possível observar a redução do número de bastonetes após 24 horas de tratamento com 50 µg/mL (Figura 38-B). Embora Giamarellou (2010) tenha descrito poucos esforços no desenvolvimento de estratégias para o combate do aumento da prevalência de bactérias Gram-negativas resistentes a múltiplas drogas, há que se destacar ainda que esta dificuldade reside na própria característica mais complexa da parede celular dessas bactérias, que são envolvidas por uma membrana externa composta por lipoproteínas, polissacarídeos e fosfolipídios. Por isso, raros são os compostos que conseguem cruzar efetivamente esta barreira lipídica, pois estes necessitam apresentar grupos ionizáveis em suas estruturas químicas, que os possibilitem atravessar os canais protéicos de porina presentes na estrutura lipídica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Por esta razão, poucos estudos apresentam sucesso na obtenção de compostos com esse propósito (LEE; JANG; CHA, 2012).

Embora a literatura descreva com frequência relatos de compostos com ação mais pronunciada contra bactérias Gram-positivas (EPSTEIN; GOLAN, 2012; WORTHINGTON et al., 2012), no presente estudo, o composto Ácido fusárico apresentou valores moderados contra *S. aureus* (CIM/CBM: 200-400 µg/mL, conforme critério de Holetz et al. (2002). Essa inibição pode ser confirmada por meio das imagens de MEV (Figura 39) que evidenciaram a redução do número de cocos após 24h de tratamento nas concentrações 200 e 400 µg/mL.

No tratamento com 200 µg/mL de Ácido fusárico, foi possível observar que, comparado com o controle (Figura 40-A), os cocos se apresentaram com alterações no formato arredondado (Figura 40-B). Essa deformação celular também foi descrita na literatura para *Staphylococcus epidermidis* quando em contato com o extrato de um fruto proveniente da caatinga (SILVA et al., 2015). Da mesma forma, Wang et al. (2015) descreveram esse efeito quando *S. aureus* foi tratada com um composto sintético 2-(N-alkil-pirrolidina) tanshinone I. Para o tratamento com 400 µg/mL de Ácido fusárico, além da deformação celular foi possível verificar que alguns cocos sofreram alterações morfológicas mais drásticas (Figura 40-C) quando comparados com o controle (Figura 40-A). Na literatura foi descrito para *S. aureus* o aparecimento de grandes alterações morfológicas quando a bactéria sofreu ação da proteína de uma larva, responsável por provocar destruição da célula pelo rompimento da parede celular do coco (ZHANG et al., 2013).

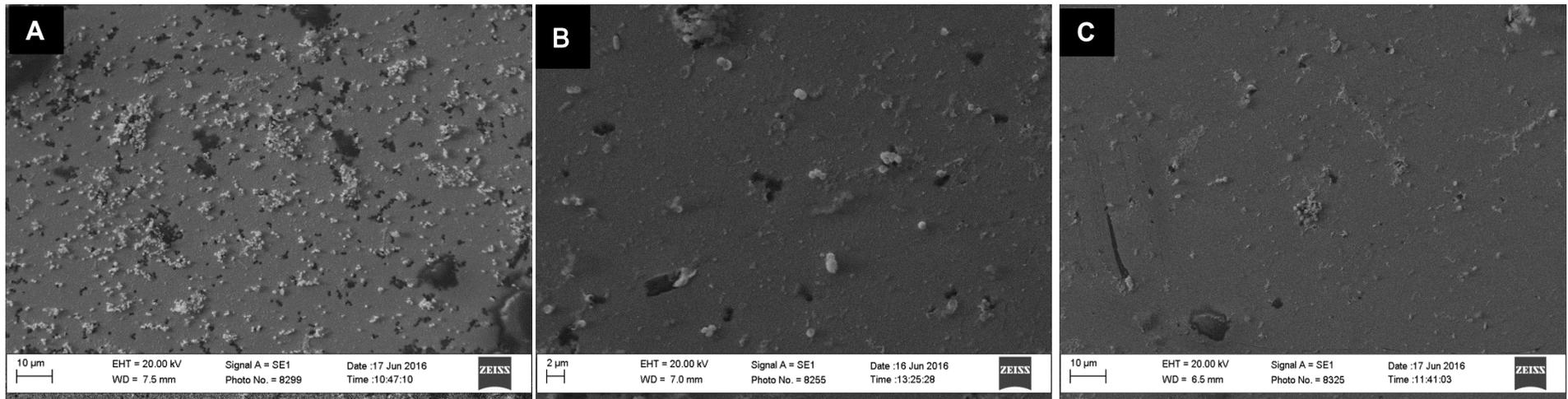
Figura 38 - Imagens da redução microbiana após 24 horas de tratamento da *E. coli* com Ácido fusárico em relação ao controle.



Fonte: Da Autora.

Nota: A- *E. coli* imagem controle (Aumento 5.000 vezes). B- *E. coli* após 24 h tratamento com 50 µg/mL de ácido fusárico (Aumento 5.000 vezes).

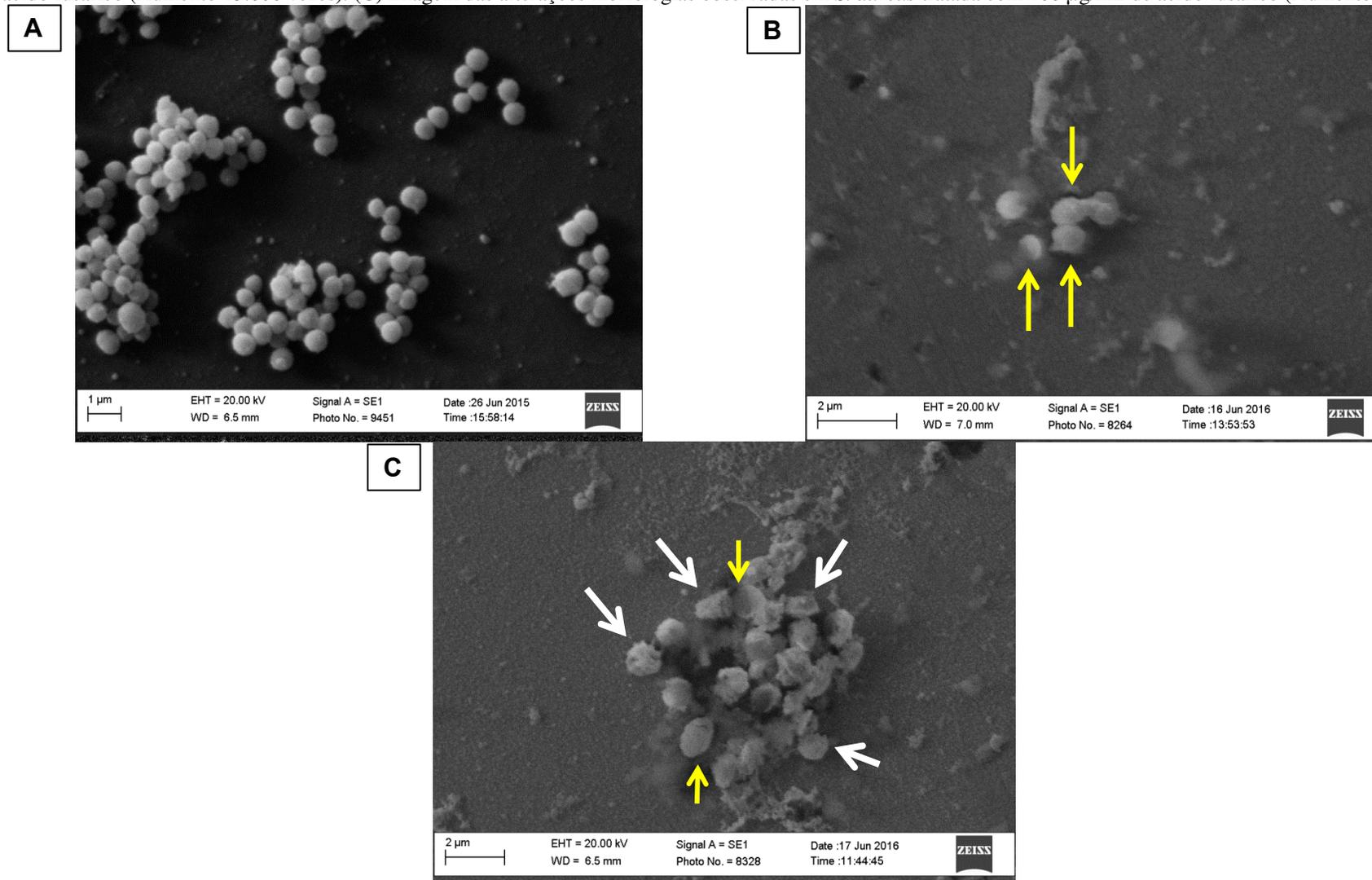
Figura 39 - Imagens da redução microbiana após 24 horas de tratamento do *S. aureus* com Ácido fusárico em diferentes concentrações, comparado com o controle.



Fonte: Da Autora.

Nota: A- *S. aureus* imagem controle (Aumento 2.000 vezes). B- *S. aureus* após 24 h tratamento com 200 µg/mL de ácido fusárico (Aumento 5.000 vezes). C- *S. aureus* após 24 h tratamento com 400 µg/mL de ácido fusárico (Aumento 2.000 vezes).

Figura 40 – (A) Imagem controle da bactéria *S. aureus* (Aumento 10.000 vezes). (B) Imagem das alterações morfológicas observadas em *S. aureus* tratada com 200 $\mu\text{g/mL}$ de ácido fusárico (Aumento 15.000 vezes). (C) Imagem das alterações morfológicas observadas em *S. aureus* tratada com 400 $\mu\text{g/mL}$ de ácido fusárico (Aumento 15.000 vezes).



Fonte: Da Autora.

Nota: Setas amarelas: alteração morfológica (deformação celular). Setas brancas: alteração morfológica mais drástica (possível rompimento da parede celular).

Há que se destacar na literatura que o Ácido fusárico ainda não foi descrito como agente antimicrobiano de uso clínico, pois os mecanismos de toxicidade não estão esclarecidos (RUIZ; BERNAR; JUNG, 2015) e pouco se conhece sobre sua resistência em micro-organismos (HU et al., 2012). Neste sentido, o conjunto dos resultados observados no presente estudo contribuirá positivamente para a ciência com novos dados antimicrobianos alcançados para o ácido fusárico.

Cabe ainda discutir que, de acordo com Petersen et al. (2004), o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos continua sendo importante para superar as dificuldades encontradas no tratamento de infecções causadas por patógenos resistentes. Neste contexto, os fungos endofíticos surgiram como uma fonte alternativa e promissora para a produção de novos compostos antimicrobianos (GUIMARÃES et al., 2008), como pode ser observado com os resultados do presente estudo e outros descritos na literatura, por exemplo, no trabalho de Erbert et al. (2012). Estes autores descreveram dois metabólitos secundários fenólicos oriundos de fungos endofíticos isolados de algas vermelhas *Bostrychia radicans*. A cepa *Phomopsis longicolla* produziu dicerandrol C e ácido micofenólico. O primeiro composto revelou significativa ação antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC 6538) e *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305), com CIM de 1 e 2 µg/mL, respectivamente. Outro exemplo é o trabalho de Kornsakulkarn et al. (2011), no qual foi observado para o composto Javanicina (naftoquinona), proveniente da fermentação do fungo endofítico *Fusarium* sp. BCC14842, ação antifúngica contra *C. albicans* com valor de 6,16 µg/mL (IC₅₀).

5.5 RESULTADO DO ENSAIO SINÉRGICO

Considerando a importância que a ação sinérgica apresenta como opção promissora dentro do panorama de multirresistência aos antimicrobianos (SILVEIRA et al., 2006; BOLLENBACH, 2015), o ensaio sinérgico foi realizado entre o alcaloide piridínico e antimicrobianos de uso comercial. Para a interpretação do ensaio, adotou-se as orientações descritas por Timurkaynak et al. (2006), expressas na Tabela 11. Os resultados deste estudo seguem expressos na Tabela 12 a seguir.

Tabela 11 - Escala de interpretação do ensaio sinérgico.

Nível de interação	Valores
Sinérgica	ICIF \leq 0,5
Parcialmente sinérgica	0,5 < ICIF < 1,0
Aditiva	ICIF = 1,0
Indiferente	1,0 < ICIF < 4,0
Antagônica	ICIF \geq 4,0

Fonte: Adaptado de Timurkaynak et al. (2006).

Nota: ICIF: Índice de concentração inibitória fracionada

Tabela 12 - Resultados apresentados para o teste de *Checkerboard*.

Patógenos	Substâncias testadas	CIM _s	CIM _A	CIF	ICIF*
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Ácido fusárico (µg/mL)	100	50	0,5	0,625 parcialmente sinérgico
	Estreptomicina (µg/mL)	10,0	1,25	0,125	
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Ácido fusárico (µg/mL)	400	200	0,50	1,00 Aditivo
	Amoxicilina (µg/mL)	5,0	2,5	0,50	
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Ácido fusárico (µg/mL)	50	50	1,0	1,25 indiferente
	Nistatina (µg/mL)	2	1	0,25	

Fonte: Da Autora.

CIM_s: valor para substância sozinha; CIM_A: valor para associação mais efetiva; CIF: Combinação inibitória fracionada; ICIF: Índice da concentração inibitória fracionada. *Classificação de Timurkaynak et al. (2006).

Analisando as Tabelas 11 e 12, para *E. coli*, constatou-se efeito parcialmente sinérgico entre o alcaloide piridínico em associação com estreptomicina, cuja ação foi potencializada em 8 vezes, sendo a CIM do antimicrobiano reduzida de 10 µg/mL para 1,25 µg/mL. Este resultado pode se tornar uma opção promissora dentro do panorama de multirresistência aos antimicrobianos ao evitar ou retardar a resistência microbiana e ainda, contribuir com maior efeito terapêutico, minimizando os efeitos colaterais através da possibilidade da administração de doses menores com obtenção de um efeito maior (SILVEIRA et al., 2006).

Na literatura é possível observar relatos semelhantes, como os descritos por Madmanang et al. (2016). Estes autores verificaram os efeitos da combinação de 10 µg/mL de eritromicina com 25 µg/mL dos compostos 5-formilisocromen-1-ona, (-)-melleina e swermacrolactona C, isolados da casca do caule de *Fagraea fragrans* e testaram contra *Mycobacterium smegmatis*. Foi observada potencialização da ação do antibiótico em oito vezes na associação com 5-formilisocromen-1-ona e swermacrolactona C e, 16 vezes, na combinação com (-)-melleina. Desta forma, os autores sugeriram que estes compostos provenientes da planta *F. fragrans* poderiam ser utilizados como potencializadores de

eritromicina para tratar infecções de *Mycobacterium* spp. O estudo de Li et al. (2015) também corrobora aos achados do presente trabalho. Estes pesquisadores estudaram o potencial sinérgico de 17 compostos oriundos do metabolismo fúngico do endófito *Guignardia* sp. (obtido de *Euphorbia sieboldiana*) contra *C. albicans* e seu biofilme. Os autores observaram efeito sinérgico na associação de fluconazol com os compostos 13-Hidroxiado guignardona A, Guignardona N, Guignardona O, Guignardona B e Ácido guignárdico ($0,19 < ICIF < 0,38$). Também foi constatada ação sinérgica contra o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* ($0,16 < ICIF < 0,46$).

Considerando a classificação de Timurkaynak et al. (2006), no estudo frente a *S. aureus*, observou-se efeito aditivo para a associação do Ácido fusárico com amoxicilina (ICFI = 1,0), ou seja, o resultado obtido na associação das substâncias correspondeu à soma dos resultados obtidos isoladamente. Clinicamente esta ação aditiva se torna um dado importante para a terapia de combinação diante de a atividade bacteriostática observada ser, possivelmente, mais extensa (prolongada). Ainda, devido aos relatos de hipersensibilidade a este antibiótico, metade da dose em associação com o composto em estudo conferiria o mesmo efeito bacteriostático sem gerar grande desconforto ao paciente em tratamento. Também, esta combinação poderia ser utilizada para minimizar eventual toxicidade do β -lactâmico ao paciente (KUMAR et al., 2012; BOLLENBACH, 2015).

No ensaio contra *C. albicans* o efeito foi classificado como indiferente, pois a CIM obtida na associação foi muito próxima ou igual ao valor da CIM encontrada para as substâncias isoladas. Apesar da associação não ser conveniente, somente o alcaloide piridínico na concentração de 25-50 $\mu\text{g/mL}$ já seria capaz de exercer uma forte atividade inibitória contra *C. albicans* ATCC 10231, como foi apresentado na seção 5.5.

Estes dados se tornam promissores e colaborativos com a literatura uma vez que não foram descritos, ainda, estudos sinérgicos entre o ácido fusárico e antimicrobianos.

5.6 RESULTADO DO POTENCIAL ANTI *M. tuberculosis*

Mediante a importância dos alcaloides piridínicos no tratamento da tuberculose, fez-se pertinente investigar o potencial antituberculose do Ácido fusárico, o qual pode ser observado na Tabela 13.

Tabela 13 – Valor da concentração inibitória mínima de 90% (CIM₉₀) do Ácido fusárico frente a cepa de *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

	CIM ₉₀ (µg/mL)
Ácido fusárico	> 25
Isoniazida	0,03

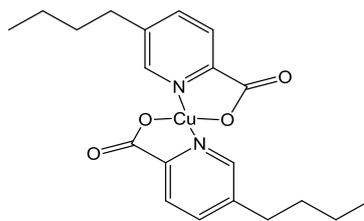
Fonte: Da Autora.

Nota-se que não foi observado potencial antituberculose promissor para o composto Ácido-5-butilpiridina-2-carboxílico, uma vez que, de acordo com Pavan; Sato; Leite (2012), amostras com CIM > 10 µg/mL são consideradas inativas. Cantrell et al. (1998) afirmam que a elevada concentração de lipídios de alto peso molecular presentes na parede de micobactérias provavelmente funcione como uma barreira para os compostos polares, tornando por isso, os compostos apolares mais promissores.

Contudo, considerando o perfil do alcaloide metabolizado pelo endófito do mangue (Ácidofusárico), é possível continuar o estudo investigando a complexação desta substância com metais. Souza et al. (2010) estudaram compostos de paládio (II) contendo ligantes piridínicos (4-Cianopiridina, Ácido isonicotínico, 4-Aminopiridina e Tioisonicotinamida), visando estabelecer uma relação estrutura atividade em função do substituinte. Os autores destacaram o emprego desses ligantes para potencializar a atividade antituberculose, como foi exemplificado com *trans*-[Pd(N₃)₂(isn)₂] {isn= isonicotinamida}, o qual se mostrou mais potente que a pirazinamida, fármaco de escolha no tratamento da tuberculose (SOUZA et al., 2010).

De acordo com Pan et al. (2011), o ácido fusárico possui átomos de nitrogênio e oxigênio em dois locais de coordenação, os quais permitem a formação de complexos de metal estáveis. Estes autores reportaram pela primeira vez a atividade antimicobacteriana do ácido fusárico coordenado com metais (cobre, manganês, ferro II, ferro III, zinco, cádmio), avaliando os complexos formados contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv, isolados clínicos resistentes e *M. bovis*. De modo geral foram observados destaques para os complexos com cobre (Figura 41) e cádmio, sendo oportuno destacar uma expressiva CIM para o complexo com cobre frente *M. tuberculosis* H₃₇Rv (10 µg/mL). Ainda, a complexação com cádmio evidenciou atividade mais fraca (CIM: 60 µg/mL) do que o valor observado para o composto sozinho (40 µg/mL) frente este patógeno.

Figura 41 – Ácido fusárico complexado com cobre.



Fonte: Adaptado de Pan et al. (2011).

Nota: Imagem redesenhadas pela Autora no *ChemDraw* Ultra 12.0.

6 CONCLUSÕES

Foi possível caracterizar na fração J₃ o alcaloide piridínico Ácido 5-butilpiridina-2-carboxílico também conhecido como Ácido fusárico, além de ser possível sugerir a presença de outras estruturas químicas de interesse nas demais frações estudadas (J₁, J₂ e J₄).

Constatou-se seletividade moderada sobre MCF 7 e HT 144, com expressiva redução da viabilidade celular por ação antiproliferativa.

Diante dos resultados de CIM (25-50 µg/mL) contra *C. albicans* e da baixa seletividade contra CCD-1059Sk, foi possível sugerir uso tópico do Ácido fusárico contra candidíase.

O Ácido fusárico se mostrou eficaz contra cepas de *C. albicans* provenientes de jaleco e lençol (CIM: 50-100 µg/mL) sendo possível sugerir se tratar de um composto importante no processo de desinfecção de fômites hospitalares.

O presente estudo evidenciou forte ação bacteriostática contra *E. coli* (CIM: 50-100 µg/mL), sendo possível comprovar pelas imagens de MEV redução do número de patógenos.

Observou-se nas imagens de MEV a redução do número de bactérias *S. aureus*, além de alterações morfológicas possivelmente relacionadas ao mecanismo de ação do alcaloide.

A associação do Ácido fusárico com Estreptomicina potencializou em 8x a ação deste antimicrobiano contra *E. coli* (ICIF = 0,625). Contra *S. aureus*, observou-se efeito aditivo quando associado com amoxicilina (ICIF = 1,0).

Não foi observado potencial antituberculose relevante (CIM₉₀ > 25 µg/mL), instigando a complexação do composto com metais ainda não estudados.

O conjunto dos resultados permitem afirmar que o fungo endofítico *G. moniliformis*, proveniente do mangue brasileiro, se mostrou promissor para a produção de compostos bioativos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho abrem novas perspectivas de conhecimento para a molécula do Ácido fusárico, que até então não haviam sido exploradas na literatura, estimulando a sequência do presente estudo por meio de outras pesquisas que viabilizem:

Estabelecer o perfil de sensibilidade e resistência do Ácido fusárico frente outros patógenos;

Propor estudos com formulações tópicas na pele de humanos e como agentes de desinfecção de superfícies hospitalares, empregando o Ácido fusárico como ativo contra cepas de *Candida spp.*;

Aprofundar estudos sobre o mecanismo de ação do Ácido fusárico sobre as linhagens tumorais ainda não avaliadas.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v. 146, p. 837, 1940.
- ALAM, A., NAIK, P.K., MISHRA, G.P. Congruence of RAPD and ISSR markers for evaluation of genomic relationship among 28 populations of *Podophyllum hexandrum* Royle from Himachal Pradesh, India. **Turkish Journal of Botany**, v. 33, p. 1-12, 2009.
- ALMEIDA, C. V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 5, p. 467-470, 2005.
- ÁLVARES, C.A.; SVIDZINSKI, T.I.E.; CONSOLARO, M.E.L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.
- ALVIN, A.; MILLER, K.I.; NEILAN, B.A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiological Research**, v. 169, p. 483–495, 2014.
- ALY, A. H.; DEBBAD, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.90, p.1829-1845. 2011.
- ARIVUDAINAMBI, U.S.E.; ANAND, T.D.; SHANMUGAIAH, V.; KARUNAKARAN, C.; RAJENDRAN, A. Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 340-345, 2011.
- ARNOLD, A.E.; MEJIA, L.C.; KYLLO, D.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E.A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 15649-15654, 2003.
- AZEVEDO, J.L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada?. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.22, p.225-9, 1999.
- AZIZ, M.A.; WRIGHT, A.; LASZLO, A.; DE MUYNCK, A.; PORTAELS, F.; VAN DEUN, A.; WELLS, C.; NUNN, P.; BLANC, L.; RAVIGLIONE, M. Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance): an updated analysis. **The Lancet**, v. 368, p. 2142–2154, 2006.

BACON, C.W.; HINTON, D.M.; HINTON, A.Jr. Growth-inhibiting effects of concentrations of fusaric acid on the growth of *Bacillus mojavensis* and other biocontrol *Bacillus* species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 1, p. 185-194, 2006.

BACON, C.W.; PORTER, J.K.; NORRED, W.P.; LESLIE, J.F. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4039-4043, 1996.

BALAGURUNATHAN R, RADHAKRISHNAN M. Exploiting the less explored-microbial endophytes. **Advanced Biotech**, v. 6, p. 20–23. 2007.

BECKER, Z.E.; PUSHKAREVA, I.D.; POLETAEVA, V.F.; SHILINA, S.G.; YASAKOVA, E.I. Nature and biosynthesis of Fusariumwilt toxin, its mechanism of action, and its transformation in the cotton plant. **Bodenkultur**, v. 23, p. 256–271, 1972.

BEKKER, E.E.; DOVLETMURADOV, K.D.; PUSHKAREVA, I.D.; POLETAEVA, V.F.; SHILINA, S.G.; YASAKOVA, E.I. Nature and biosynthesis of the toxin of the causative agents of fusariosis wilt, the mechanism of its actions, and its possible transformation within the cotton plant. **Izvestiia Akademii Nauk SSSR. Serii Biologicheskaja**, v. 5, p. 749–754, 1971.

BENHAMOU, N.; GARAND, C.; GOUET, A. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4044-4060, 2002.

BERMAN, J.; SUDBERY, P.E. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 918–930, 2002.

BHAT, S.V.; NAGASAMPAGI, B.A.; MEENAKSHI, S. Natural products: chemistry and applications. In: **Alkaloids**. Oxford: Alpha Science International, 2009. Cap. 4. p. 41-466.

BOLLENBACH, T. Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v. 27, p. 1-9, 2015.

BORGES, W.S.; BORGES, K.B.; BONATO, P.S.; SAID, S.; PUPO, M.T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137-1163, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação Epidemiológica da Tuberculose nos Estados partes e associados do Mercosul 2009 a 2013**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 56p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Tipos de câncer: pele melanoma**. Rio de Janeiro: INCA, 2016a. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/>. Acesso em: <03 de abril de 2016>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Tipos de câncer: pele melanoma. Tratamento**. Rio de Janeiro: INCA, 2016b. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/tratamento. Acesso em: <30 de abril de 2016>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Tipos de câncer: mama**. Rio de Janeiro: INCA, 2016c. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>. Acesso em: <30 de abril de 2016>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**. 3. ed. Rio de Janeiro, 2005.

BREITMAIER, E. **Structure elucidation by NMR in organic chemistry: a practical guide**. 3ed. Alemanha: John Wiley & Sons, LTD, 2003. Cap. 2.

BURMEISTER, H. R.; GROVE, M.D.; PETERSON, R.E.; WEISLEDER, D.; PLATTNER, R D. Isolation and characterization of two new fusaric acid analogs from *Fusarium moniliforme* NRRL 13,163. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 311–314, 1985.

BUSH, K. The coming of age of antibiotics: discovery and therapeutic value. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1213, p. 1-44, 2010.

BUSH, K. Why it is important continue antibacterial drug discovery. **ASM News**, v 70, p. 282-288, 2004.

CALCUL, L.; WATERMAN, C.; MA, W.S.; LEBAR, M.D.; HARTER, C.; MUTKA, T.; MORTON, L.; MAIGNAN, P.; OLPHEN, A.V.; KYLE, D.E.; VRIJMOED, L.; PANG, K-L.; PEARCE, C.; BAKER, B.J. Screening mangrove endophytic fungi for antimalarial natural products. **Marine Drugs**, v. 11, n. 12, p. 5036–505, 2013.

CANTRELL, C.L.; NUÑEZ, I.S.; CASTAÑEDA-ACOSTA, J.; FOROOZESH, M.; FRONCZEK, F.R.; FISCHER, N.H.; FRANZBLAU, S.G. Antimycobacterial activities of

dehydrocostus lactone and its oxidation product. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 10, p. 1181-1186, 1998.

CANUTO, K.M.; RODRIGUES, T.H.S.; OLIVEIRA, F.S.A. de; GONÇALVES, F. J.T. **Fungos endofíticos: perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012. 34 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documento 154).

CAO, S.; CRYAN, L.; HABESHIAN, K.A.; MURILLO, C.; TAMAYO-CASTILLO, G.; ROGERS, M.S.; CLARDY, J. Phenolic compounds as antiangiogenic CMG2 inhibitors from Costa Rica endophytic fungi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 18, p. 5885-5888, 2012.

CARVALHO, P.L.N. **Isolamento e seleção de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos associados às plantas do gênero *Rheedia***. 2011. 84f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2011.

CARVALHO, P.L.N.; SILVA, E.O.; CHAGAS-PAULA, D.A.; LUIZ, J.H.H.; IKEGAKI, M. Importance and Implications of the production of phenolic secondary metabolites by endophytic fungi: a mini-review. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 4, p 259-271, 2016.

CARVALHO, P.L.N.; AMARAL, P.O.; RUIZ, A.L.T.G.; DE ALENCAR, S.M.; PFENNING, L.H.; DE CARVALHO, J.E.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1: antioxidant and antiproliferative activities an endophytic fungus associated with *Rheedia brasiliensis* plant. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 1, p. 172-176, 2012.

CASELLA, T.M.; EPARVIER, V.; MANDAVID, H.; BENDELAC, A.; ODONNE, G.; DAYAN, L.; DUPLAIS, C.; ESPINDOLA, L.S.; STIEN, D. 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, 2013.

CASTILLO, U.F.; STROBEL, G.A.; FORD, E.J.; HESS, W.M.; PORTER, H.; JENSEN, J.B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M.A.M.; TELOW, D.B.; STEVENS, D.; YAVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**, v. 148, 2675–2685, 2002.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação

estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHAKRAVARTHI, B.V.; DAS, P.; SURENDRANATH, K.; KARANDE, A.A.; JAYABASKARAN, C. Production of paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. **Journal of Bioscience**, v. 33, n. 2, p. 259-267, 2008.

CHEN, Y.; MAO, W.; TAO, H.; ZHU, W.; QI, X.; CHEN, Y.; LI, H.; ZHAO, C.; YANG, Y.; HOU, Y.; WANG, C.; LI, N. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8179–8184, 2011.

CHENG, M-J.; WU, M-D.; YANAI, H.; SU, Y-S.; CHEN, I-S.; YUAN, G-F.; HSIEH, S-Y.; CHEN, J-J. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Biscogniauxia formosana* and their antimycobacterial activity. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 3, p. 467–472, 2012.

CHENG, X. F.; MENG, Z.; CHEN, Z. A pyridine-type alkaloid from *mallotus apelta*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 7, p. 2193-2194, 1998.

CHENG, Z.; PAN, J.; TANG, W.; CHEN, Q.; LIN, Y. Biodiversity and biotechnological potential of mangrove associated fungi. **Journal of Forest Research**, v. 20, p. 63–72, 2009.

CHOMCHEON, P.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; NGAMROJANAVANICH, N.; ISARANGKUL, D.; KITTAKOOP, P. 3-Nitropropionic Acid (3-NPA), a potente antimycobacterial agent from endophytic fungi: Is 3-NPA in some plants produced by endophytes? **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1103-1105, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Aerobic Bacteria**. In *Approved Standard*, 7th ed. M7-A7. CLSI: Wayne, PA, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved Standard-Third Edition. M27-A3. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S.V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agentes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72-79, 2005.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal Natural Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

CRUTCHER, F.K.; LIU, J.; PUCKHABER, L.S.; STIPANOVIC, R.D.; DUKE, S.E.; BELL, A.A.; WILLIAMS, H.J.; NICHOLS, R.L. Conversion of fusaric acid to fusarinol by *Aspergillus tubingensis*: a detoxification reaction. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, p. 84-89, 2014.

CUI, J.L.; GUO, S.X.; XIAO, P.G. Antitumor and antimicrobial activities of endophytic fungi from medicinal parts of *Aquilaria sinensis*. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 5, n. 12, p. 385-392, 2011.

DEBBAB, A.; ALY, A.H.; EDRADA-EBER, R.; WRAY, V.; MÜLLER, W.E.; TOTZKE, F.; ZIRRGIEBEL, U.; SCHÄCHTELE, C.; KUBBUTAT, M.H.; LIN, W.H.; MOSADDAK, M.; HAKIKI, A.; PROKSCH, P.; EBERL, R. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum* isolated from *Mentha pulegium*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 4, p. 626-631, 2009.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 2-25, 1998.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, p. 5-16, 2009.

DESHMUKH, S.K.; MISHRA, P.D.; KULKARNI-ALMEIDA, A.; VEREKAR, S.; SAHOO, M.R.; PERIYASAMY, G.; GOSWAMI, H.; KHANNA, A.; BALAKRISHNAN, A.; VISHWAKARMA, R. Anti-inflammatory and anticancer activity of ergoflavin isolated from an endophytic fungus. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 5, p. 784-789, 2009.

DESHMUKH, S.K.; VEREKAR, S.A.; BHAVE, S.V. Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 715, p. 1-43, 2015.

DEVARI, S.; JAGLAN, S.; KUMAR, M.; DESHIDI, R.; GURU, S.; BHUSHAN, S.; KUSHWAHA, M.; GUPTA, A.P.; GANDHI, S.G.; SHARMA, J.P.; TANEJA, S.C.; VISHWAKARMA, R.A.; SHAH, B.A. Capsaicin production by *Alternaria alternata*, an endophytic fungus from *Capsicum annum*; LC-ESI-MS/MS analysis. **Phytochemistry**, v. 98, p. 183-189, 2014.

DING, L.; DAHSE, H-M.; HERTWECK, C. Cytotoxic alkaloids from *Fusarium incarnatum* associated with the mangrove tree *Aegiceras corniculatum*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 617–621, 2012.

DREYFUSS, M. M; CHAPELA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel low-molecular weight pharmaceuticals. In: GULLO, V. P. **The discovery of natural products with therapeutic potential**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994. Cap. 3, p. 49-80.

ELAVARASI, A.; RATHNA, G.S.; KALAISELVAM, M. Taxol producing mangrove endophytic fungi *Fusarium oxysporum* from *Rhizophora annamalayana*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. S1081-S1085, 2012.

EPSTEIN, L.; GOLAN, Y. Fidaxomicin, a new treatment for *Clostridium difficile* infections. **Drugs Today**, v. 48, n. 2, p. 101-108, 2012.

ERBERT, C.; LOPES, A.A.; YOKOYA, N.S.; FURTADO, N.A.J.C.; CONTI, R.; PUPO, M.T.; LOPES, J.L.C.; DEBONSI, H.M. Antibacterial compound from the endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from the tropical red seaweed *Bostrychia radicans*. **Botanica Marina**, v. 55, p. 435-440, 2012.

FARBER, S. Carcinolytic action of antibiotics: puromycin and actinomycin D. **American Journal of Pathology**, v. 31, p. 582, 1955.

FERNANDES, M.R.V.; SILVA, T.A.C.; PFENNING, L.H.; COSTA NETO, C.M.; HEINRICH, T.A.; ALENCAR, S.M.; LIMA, M.A.; IKEGAKI, M. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, 2009.

FERNANDEZ-POL, J.A.; KLOS, D.J.; HAMILTON, P.D. Cytotoxic activity of fusaric acid on human adenocarcinoma cells in tissue culture. **Anticancer research**, v. 13, n. 1, p. 57-64, 1993.

FERNANDO, F.S.L. DE; FERREIRA, A.M.; COLOMBO, T.E.; RUBIO, F.G.; ALMEIDA, M.T.G. Contaminação por fungos antes e após limpeza e desinfecção de colchões hospitalares. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 26, n. 5, p. 485-491, 2013.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, p. 226–236, 1929.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 6. ed. Estados Unidos: Wiley-Blackell, 2010. 676 p. Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/hugolival90/culture-of-animal-cells-6th-freshney>>. Acesso em: 15 de maio de 2016.

FRICKER, S.P.A. Screening strategy for meta antitumor agentes as exemplified by gold (III) complexes. **Metal-Based Drugs**, v. 6, n. 4-5, p. 291-300, 1999.

GALLO, M.B.C.; GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Natural products from endophytic fungi. p. 139-168. In: SAIKIA, R.; BEZBARUAH, R.L.; BORA, T.C. **Microbial Biotechnology**, India: New India Publishing Agency, 2008.

GARYALI, S.; KUMAR, A.; REDDY, M.S. Taxol production by an endophytic fungus, *Fusarium redolens*, isolated from *Himalayan yew*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 10, p. 1372-1380, 2013.

GE, H.M.; SHEN, Y.; ZHU, C.H.; TAN, S.H.; DING, H.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Penicidones A-C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 571-576, 2008.

GIAMARELLOU, H. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: How to treat and for how long. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2010, v. 36, p. S50–S54.

GLOER, J.B. Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products. In: WICKLOW, D.T.; SODERSTROM, B.E. (Eds.). **Environmental and microbial relationships**. The Mycota (Vol IV, 2. Ed., pp. 249-268). New York: Spriger-Verlag, 2007.

GONG, L-J.; GUO, S-X. Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 5, p. 731-736, 2009.

GOPAL, B.; CHAUHAN, M. Biodiversity and its conservation in the Sudarban Mangrove Ecosystem. **Aquatic Sciences**, v. 68, p. 338- 354, 2006.

GOYAL, S. Ecological role of alkaloids. In: RAMAWAT, K.G.; MÉRILLON, J. M. **Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes**.

Berlin Heidelberg: Springer-verlag, 2013. Cap. 6. p. 149-171. Disponível em:
<http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-22144-6_98>. Acesso em:
01 fev. 2016.

GROENHAGEN, U.; MACZKA, M.; DICKSCHAT, J.S.; SCHULZ, S. Streptopyridines, volatile pyridine alkaloids produced by *Streptomyces* sp. FORM5. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 1421–1432, 2014.

GUIMARAES, D.O.; BORGES, K.B.; BONATO, P.S.; PUPO, M.T. A simple method for the quantitative analysis of tyrosol by hplc in liquid Czapek Cultures from endophytic fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society** [online], v. 20, n. 1, p. 188-194, 2009.

GUIMARÃES, D.O.; BORGES, W.S.; KAWANO, C.; RIBEIRO, P.H. ; GOLDMAN, G.H.; NOMIZO, A.; THIEMAN, O.H.; OLIVA, G.; LOPES, N.P.; PUPO, M.T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** (Print), v. 52, p. 134-144, 2008.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, 667-679, 2010.

GUO, B.; DAI, J-R.; NG, S.; HUANG, Y.; LEONG, C.; ONG, W.; CARTE, B.K. Cytotoxic acids A & B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora* species. **Journal of Natural Product**, v. 63, p. 602–604, 2000.

GUO, B.; LI, H.; ZHANG, L. Isolation of the fungus producing vinblastine. **Journal of Yunnan University (Natural Science Edition)**, v. 20, p. 214-215, 1998.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136–142, 2008.

GUO, B.H.; WANG, Y.C.; ZHOU, X.W.; HU, K.; TAN, F.; MIAO, Z.Q.; TANG, K.X. An endophytic taxol producing fungus BT2 isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 875-877, 2006.

HAN, Z.; MEI, W.; ZHAO, Y.; DENG, Y.; DAI, H. A new cytotoxic isocoumarin from endophytic fungus *Penicillium* sp. 091402 of the mangrove plant *Bruguiera sexangula*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 6, p. 805-807, 2009.

HARPER, J.K.; FORD, E.J.; STROBEL, G.A.; ARIF, A.M.; GRANT, D.M.; PORCO, J.A.Jr.; TOMER, D.P.; ONEILL, K.L.; HEIDER, E.M.; GRANT, D.M. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. **Tetrahedron**, v. 59, p. 2471–2476, 2003.

HARVEY, A.L. Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 5, p. 480-484, 2007.

HAWKSWORTH, D.L.; ROSSMAN, A.Y. Where are all the undescribed fungi? **Phytopathology**, v. 87, p. 888–89, 1997.

HEINING, U.; SCHOLZ, S.; JENNEWEIN, S. Getting to the bottom of Taxol biosynthesis by fungi. **Fungal diversity**, v. 60, p. 161-170, 2013.

HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER, R.P.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: UFRGS editora, 2004.

HIDAKA, H.; NAGATSU, T.; TAKEYA, K.; TAKEUCHI, T.; SUDA, H.; KOJIRI, K.; MATSUZAKI, M.; UMEZAWA, H. Fusaric acid, a hypotensive agent produced by fungi. *The Journal of Antibiotics*, v. 22, n. 5, p. 228-230, 1969.

HINRICHSEN, S.L. et al. *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 325-328, 2009.

HOFFMAN, A.M.; MAYER, S.G.; STROBEL, G.A.; HESS, W.M.; SOVOCOL, G.W.; GRANGE, A.H.; HARPER, J.K.; ARIF, A.M.; GRANT, D.M.; KELLEY-SWIFT, E.G. Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic *Phoma* species. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p.1049-1056, 2008.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HU, R-M.; LIAO, S-T.; HUANG, C-C.; HUANG, Y-W.; YANG, T-C. An inducible fusaric acid tripartite efflux pump contributes to the fusaric acid resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51053, 2012.

HUANG, Z.; CAI, X.; SHAO, C.; SHE, Z.; XIA, X.; CHEN, Y.; YANG, J.; ZHOU, S.; LIN, Y. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1604–1608, 2008.

ISHIHARA, M.; TSUNEYA, T.; SHIGA, M.; KAWASHIMA, S.; YAMAGISHI, K.; YOSHIDA, F.; SATO, H.; UNEYAMA, K. New pyridine derivatives and basic components in spearmint oil (*Mentha gentilis f. cardiaca*) and peppermint oil (*Mentha piperita*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1647-1655, 1992.

ISMAIEL, A.A.; PAPENBROCK, J. Mycotoxins: producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. **Agriculture**, v. 5, p. 492-537, 2015.

JI, Y.; BI, J-N.; YAN, B.; ZHU, X-D. Taxol-producing fungi: a new approach to industrial production of taxol. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 1–6, 2006.

JURGENSON, J.E.; ZELLER, K.A.; LESLIE, J.F. Expanded Genetic Map of *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). **Applied and Environmental Microbiology**, n. 4, v. 68, p. 1972–1979, 2002.

KHARWAR, R.N.; MISHRA, A.; GOND, S.K.; STIERLE A.; STIERLE, D. Anticancer compounds, derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1208-1228, 2011.

KHARWAR, R.N.; VERMA, V.V.; KUMAR, A.; GOND, S.K.; HARPER, J.K.; HESS, W.M.; LOBKOVOSKY, E.; MA, C.; REN, Y.; STROBEL, G.A. Javanicin, an antibacterial naphthaquinone from an endophytic fungus of neem, *Chloridium* sp. **Current Microbiology**, v. 58, p. 233-238, 2009.

KJER, J.; WRAY, V.; EDRADA-EBEL, R.; EBEL, R.; PRETSCH, A.; LIN, W.; PROKSCH, P. Xanalteric acids I and II and related phenolic compounds from an endophytic *Alternaria* sp. isolated from the mangrove plant *Sonneratia alba*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 11, p. 2053-2057, 2009.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W. C. **Diagnóstico laboratorial de microbiologia: texto e atlas colorido**. 5. ed. São Paulo: Medsi, 2001. p. 941 – 947.

KORNSAKULKARN, J.; DOLSOPHONB, K.; BOONYUENA, N.; BOONRUANGPRAPAA, T.; RACHTAWEEA, P.; PRABPAIB, S.; KONGSAEREEB, P.; THONGPANCHANGA, C. Dihydronaphthalenones from endophytic fungus *Fusarium* sp. BCC14842. **Tetrahedron**, v. 67, n. 39, p. 7540-7547, 2011.

KOUR, A.; SHAWL, A.S.; REHMAN, S.; SULTAN, P.; QAZI P.H.; SUDEN, P.; KHAJURIA, R.; VERMA, V. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1115-1121, 2008.

KUMAR, S.N.; SIJI, J.V.; NAMBISAN, B.; MOHANDAS, C. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria *in vitro*. **World Journal of microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 3143-3150, 2012.

KUMARA, P.M.; SHWETA, S.; VASANTHAKUMARI, M.M.; SACHIN, N.; MANJUNATHA, B.L.; SAGAR JADHAV, S.; RAVIKANTH, G.; GANESHAIAH, K.N.; SHAANKER, R.U. **Endophytes and plant secondary metabolite synthesis: molecular and evolutionary perspective**. In: VERMA, V.C.; GANGE, A.C. (Eds). Advances in endophytic research, Cap. 9, p. 177-190, 2014.

KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T.S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. **Mycological Research**, v. 105, p. 1388–1391, 2001.

KUSARI, S.; LAMSHÖFT, M.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 2, p. 159-162, 2008.

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

KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1203-1207, 2011.

KUSARI, S.; VERMA, V.C.; LAMSHÖFT, M.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 1287-1294, 2012.

LACAVA, P.T.; ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L. Metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMTFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R. (Eds). **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. p. 209-228.

LACEY, L.A.; NEVEN, L.G. The potential of the fungus, *Muscodor albus*, as a microbial control agent of potato tuber moth (Lepidoptera: Gelechiidae) in stored potatoes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 91, p. 195–198, 2006.

LEE, J.C.; STROBEL, G.A.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J.C. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p. 3232–3233, 1996.

LEE, K.; PAN, J.J.; MAY, G. Endophytic *Fusarium verticillioides* reduces disease severity caused by *Ustilago maydis* on maize. **FEMS Microbiol Lett**, v. 299, n. 1, p. 31-37, 2009.

LEE, Y-S.; JANG, K-A.; CHA, J-D. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

LETRA, L. **OMS: resistência a antibióticos é o maior desafio contra doenças infecciosas.** 2015. Rádio das Nações Unidas (ONU), Nova York. Disponível em: <<http://www.unmultimedia.org/radio/portuguese/2015/04/oms-resistencia-a-antibioticos-e-o-maior-desafio-contra-doencas-infecciosas/#.Vouu9VIuTJm>>. Acesso em: 04 jan. 2016.

LI, J.; YANG, X.; LIN, Y.; YUAN, J.; LU, Y.; ZHU, X.; LI, J.; LI, M.; LIN, Y.; HE, J.; LIU, L. Meroterpenes and azaphilones from marine mangrove endophytic fungus *Penicillium* 303#. **Fitoterapia**, v. 97, p. 241-246, 2014.

LI, J.Y.; HARPER, J.K.; GRANT, D.M.; TOMBE, B.O.; BASHYAL, B.; HESS, W.M.; STROBEL, G.A. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. **Phytochemistry**, v. 56, p. 463–468, 2001.

LI, J.Y.; STROBEL, G.; SIDHU, R.; HESS, W.M.; FORD, E.J. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. **Microbiology**, v. 142, (Pt 8), p. 2223-2236, 1996.

LI, J.Y.; STROBEL, G.A.; HARPER, J.K.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Organic Letters**, v. 2, p. 767–770, 2000.

LI, M.Y.; XIAO, Q.; PAN, J.Y.; WU, J. Natural products from semi-mangrove flora: source, chemistry and bioactivities. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 2, p. 281–298, 2009.

LI, T-X.; YANG, M-H.; WANG, X-B.; WANG, Y.; KONG, L-Y. Synergistic antifungal meroterpenes and dioxolanone derivatives from the endophytic fungus *Guignardia* sp. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 2511–2520, 2015.

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

LIMA, A.P. **Estudo do potencial genotóxico, citotóxico e antitumoral do composto Cloreto de cis-tetraaminodichlororutênio(III) sobre diferentes células tumorais**. 2010. 148 f. Dissertação (Mestre em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

LING, L.L.; SCHNEIDER, T.; PEOPLES, A.J.; SPOERING, A.L.; ENGELS, I.; CONLON, E.P.; MUELLER, A.; SCHÄBERLE, T.F.; HUGHES, D.E.; EPSTEIN, S.; JONES, M.; LAZARIDES, L.; STEADMAN, V.A.; COHEN, D.R.; FELIX, C.R.; FETTERMAN, K.A.; MILLETT, W.P.; NITTI, A.G.; ZULLO, A.M.; CHEN, C.; LEWIS, K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, p. 455-459, 2015.

LIU, A.R.; WU, X.P.; TONG, X.U. Research advances in endophytic fungi of mangrove. **Chinese Journal of Applied Ecology**, v. 18, p. 912-918, 2007.

LIU, J.Y.; SONG, Y.C.; ZHANG, Z.; WANG, L.; GUO, Z.J.; ZOU, W.X.; TAN, R.X. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v. 114, p. 279-287, 2004.

LIU, S.; DAI, H.; ORFALI, R.S.; LIN, W.; LIU, Z.; PROKSCH, P. New fusaric acid derivatives from the endophytic fungus *Fusarium oxysporum* and their phytotoxicity to barley leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 16, p. 3127-3132, 2016.

LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 7, n. 4, p. 670-673, 2004.

LUO, H.; XIE, L.; ZENG, J.; XIE, J. Biosynthesis and regulation of bioprotective alkaloids in the gramineae endophytic fungi with implications for herbivores deterrents. **Current Microbiology**, v. 71, p. 719-724, 2015.

MADMANANG, S.; CHEYENG, N.; HEEMBENMAD, S.; MAHABUSARAKAM, W.; SAISING, J.; SEEGER, M.; CHUSRI, S.; CHAKTHONG, S. Constituents of *Fagraea fragrans* with antimycobacterial activity in combination with erythromycin. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 4, p. 767-774, 2016.

LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 3.ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991. 330 p.

MALIK, S., CUSIDÓ, R.M., MIRJALILI, M.H., MOYANO, E., PALAZÓN, J., BONFILL, M. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 23–34, 2011.

McCHESNEY, J.D.; VENKATARAMAN, S.K.; HENRI, S.T. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-2022, 2007.

MEDRADO, H.H.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BRANDÃO, H.N. Distribuição, atividade biológica, síntese e métodos de purificação de podofilotoxina e seus derivados. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 243-258, 2015.

MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIS, L.; MALOSSO, E.; YANOMELO, A.M. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: UFPE, 2007. p. 129-140.

MERCK, E. **Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y papel**. Darmstadt: Merck, 1972. p. 130.

MILES, D.H.; KOKPOL, U.; CHITTAWONG, V.; TIP-PYANG, S.; TUNSUWAN, K.; NGUYEN, C. Mangrove Forests – The importance of conservation as a bioresource for ecosystem diversity and utilization as a source of chemical constituents with potential medicinal and agricultural value. **Pure Applied Chemical**, Berlim, v. 70, p. 23-27, 1999.

MILLER, A.J.; MIHM JUNIOR, M.C. Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 355, p. 51-65, 2006.

MOELLERING, R.C.Jr. Problems with antimicrobial resistance in Gram-positive cocci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, p. 1177-1178, 1998.

MUNHOZ, A.T.; CARVALHO, R.V. de; QUERALES, P.J., GONÇALVES, F.P.; CAMARGO, L. E.A. Relação entre resistência de linhagens tropicais de milho à podridão de espiga e ao acúmulo de fumonisinas provocados por *Fusarium verticillioides*. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 2, p. 144-148, 2015.

NAKAMURA, H.M.; CALDEIRA, S.M.; AVILA, M.A.G. de. Incidência de infecções fúngicas em pacientes cirúrgicos: uma abordagem retrospectiva. **Revista SOBECC**, v. 18, n. 3, p. 38-48, 2013.

NCI. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. A story of discovery: natural compound helps treat breast and ovarian cancers. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/research/progress/discovery/taxol>>. Acesso em: <11 de abril de 2016>.

NETO, P.A.S.P.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-76, 2002.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 2461-477, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-666, 2016.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NISA, H.; KAMILI, A.N.; NAWCHOO, I.A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, S.A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p. 50-59, 2015.

NISTATINA. Ana Paula C. Neumann. Barueri: Nova Química Farmacêutica Ltda, 2016. Bula de remédio.

O'HAGAN, D. Pyrrole, pyrrolidine, pyridine, piperidine and tropane alkaloids. **Natural Product Reports**, v. 17, p. 435-446, 2000.

PACLITAXEL: solução injetável. São Paulo: GLENMARK Farmacêutica LTDA, 2016. Bula de remédio.

PAN, J-H.; CHEN, Y.; HUANG, Y-H.; TAO, Y-W.; WANG, J.; LI, Y.; PENG, Y.; DONG, T.; LAI, X-M.; LIN, Y-C. Antimycobacterial activity of fusaric acid from a mangrove endophyte and its metal complexes. **Research Articles Drug Actions**, v. 34, p. 1177-1181, 2011.

PANDI, M.; MANIKANDAN, R.; MUTHUMARY, J. Anticancer activity of fungal taxol derived from *Botryodiplodia theobromae* Pat., an endophytic fungus, against 7, 12 dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary gland carcinogenesis in Sprague dawley rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 48–53, 2010.

PAULI, G.F.; CASE, R.J.; INUI, T.; WANG, Y.; CHO, S.; FISCHER, N.H.; FRANZBLAU, S.G. New perspectives on natural products in TB drug research. **Life Sciences**, v. 78, p. 485-494, 2005.

PAVAN, F. R.; SATO, D. N.; LEITE, C. Q. F. An approach to the search for new drugs against tuberculosis. In: CARDONA, P-J. (Ed.). **Understanding tuberculosis: new approaches to fighting against drug resistance**. Rijeka: Intech, 2012. Cap. 5, p. 137-145.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy**. 2. ed. Saunders College Publishing. 511p., 1996.

PENG, W.; YOU, F.; LI, X.-L.; JIA, M.; ZHENG, C.-J.; HAN, T.; QIN, L-P. A new diphenyl ether from the endophytic fungus *Verticillium sp.* isolated from *Rehmannia glutinosa*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 6, p. 673–675, 2013.

PETERSEN, P.J.; WANG, T.Z.; DUSHIN, R.G.; BRADFORD, P.A. Comparative in vitro activities of AC98-6446, a novel semisynthetic glycopeptide derivative of the natural product mannopeptimycin α , and other antimicrobial agents against gram-positive clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 739 – 746, 2004.

PHONGPAICHIT, S.; RUNGJINDAMAI, N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SAKAYAROJ, J. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**., v.48, p.367-372, 2006.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 49, p. 291–315, 2011.

PRABPAI, S.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; KONGSAEREE, P. Antimycobacterial dihydronaphthalenone from the endophytic fungus *Nodulisporium sp.* of *Antidesma ghaesembilla*. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 375-378, 2015.

PRINCE, K.A. de. **Derminação da atividade anti – *Mycobacterium tuberculosis* de metabólitos bioativos de fungos endofíticos empregando a técnica do MABA**. 2008. 71f. Dissertação (Mestre em Análises Clínicas), Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.

PRITI, V.; RAMESHA, B.T.; SINGH, S.; RAVIKANTH, G.; GANESHIAIAH, K.; SURYANARAYANAN, T.S.; UMA SHAANKER, R. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites? **Current Science**, v. 97, p. 477–478, 2009.

PURI, S.C.; VERMA, V.; AMNA, T.; QAZI, G.N.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1717-1719, 2005.

RAMESH; V.; KARUNAKARAN, C.; RAJENDRAN, A. Evaluation of synergistic and antibacterial activity of *Xylaria curta* against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Mycology**, v. 3, n. 4, p. 252–257, 2012.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus Aspergillus**. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1965, p. 56-57.

ROCHA, D.P.; PINTO, G.F.; RUGGIERO, R.; OLIVEIRA, C.A. DE; GUERRA, W.; FONTES, A.P.S.; AVARES, T.T.; MARZANO, I.M.; PEREIRA-MAIA, E.C. (2011). Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 111-118, 2011.

ROCHA, E.M.F. **Mecanismo molecular envolvido na resistência aos derivados de acridina e ao antimicótico tioconazol em *Aspergillus nidulans***. 2002. 108 P. Tese (Doutorado em Genética). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2002.

RODRIGUES, M.V.N.; REHDER, V.L.G.; SARTORATTO, A.; BOAVENTURA JÚNIOR, S.; SANTOS, A.S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **MultiCiência**, v. 7, p. 1-14, 2006

RUIZ, J.A.; BERNAR, E.M.; JUNG, K. Production of siderophores increases resistance to fusaric acid in *Pseudomonas protegens* Pf-5. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. e0117040, 2015.

SANTIAGO, I.F.; ALVES, T.M.; RABELLO, A.; SALES JUNIOR, P.A.; ROMANHA, A.J.; ZANI, C.L.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. **Extremophiles**, v. 96, p. 95-103, 2012.

SANTOS, L.S.; RHODEN, S.A.; BARROS, I.T.; TONINI, R.C.G.; MARQUES, R.M.; SOUZA, V.H.E.; PAMPHILE, J.A. A interação harmônica entre fungos e plantas: aspectos da

relação endófito/hospedeiro. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 8, n. 1, p. 92-101, 2013.

SANTOS, R.M.G. dos. **Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae)**. 2003. 432p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, 2003.

SARKER, S.D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, p. 321-324, 2007.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A-K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SCOGNAMIGLIO, M.; NICOLETTI, R.; PACIFICO, S.; D'ABROSCA, B.; FIORENTINO, A. Spectroscopic characterization of a pyridine alkaloid from an endophytic strain of the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex. **Current Bioactive Compounds**, v. 10, p. 196-200, 2014.

SEBASTIANES, F.L.S. **Diversidade genética e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de manguezais do estado de São Paulo**. 2010. 150f. Tese (Doutora em Ciências), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2010.

SEBASTIANES, F. L. S.; CABEDO, N.; AOUAD, N.E.; VALENTE, A.M.M.P.; LACAVA, P.T.; AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; CORTES, D. 3-Hydroxypropionic Acid as an Antibacterial agente from Endophytic Fungi *Diaporthe phaseolorum*. **Current Microbiology**, v. 65, p. 622-632, 2012.

SEBASTIANES, F.L.S.; ROMÃO-DUMARESQ, A.S.; LACAVA, P.T.; HARAKAVA, R.; AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. **Current Genetics**, v. 59, p.153-166, 2013.

SERRACARBASSA, P. D.; DOTTO, P. Endoftalmite por *Candida albicans*. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, n. 5, 2003.

SHAALA, L. A.; YOUSSEF, D. T.A. Identification and bioactivity of compounds from the fungus *Penicillium* sp. CYE-87 isolated from a marine Tunicate. **Marine Drugs**, v. 13, p. 1698-1709, 2015.

SHEN, L.; YE, Y.H.; WANG, X.T.; ZHU, H.L.; XU, C.; SONG, Y.C.; LI, H.; TAN, R.X. Structure and total synthesis of aspernigerin: a novel cytotoxic endophyte metabolite. **Chemistry**, v. 12, p. 4393-4396, 2006.

SHILINA, S.G.; BEKKER, Z.E.; GOSHAEV, M.G. Isolation and comparative characterization of vivotoxin from wilt-infected cotton plants and of fusaric acid. **Ekologo-Fiziologicheske Metody Bor'be Fuzarioznm Viltom Khlop**, v. 2, p. 219-230, 1973.

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

SILVA, L.N.; TRENTIN, D. DA S.; ZIMMER, K.R.; TRETER, J.; BRANDELLI, C.L.; FRASSON, A.P.; TASCA, T.; DA SILVA, A.G.; DA SILVA, M.V.; MACEDO, A.J. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 3, p. 464-468, 2015.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M.; TEREZI, H. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SILVEIRA-LACERDA, E. P, VILANOVA-COSTA C.A.S.T.; HAMAGUCHI, A.; PAVANIN, L.A.; GOULART, L.R.; HOMSI-BRANDENBURGO, M. I.; SANTOS, W.B.; SOARES, A. M.; NOMIZO, A. The ruthenium complex cis- (Dichloro) tetraammineruthenium (III) chloride presents selective cytotoxicity against murine B cell lymphoma (A-20), murine ascitic sarcoma 180 (S-180), human breast adenocarcinoma (SK-BR-3), and human T cell leukemia (Jurkat) tumor cell lines. **Biological Trace Element Research**, v. 135, n. 1-3, p. 98-111, 2010.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5a.ed. Guanabara Koogan S.A. 387p., 1994.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Spectrometric identification of organic compounds**. 6.ed. Nova Iorque: John Wiley Publisher, 1998. 482p.

SOENGAS, M.S.; LOWE, S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3138-3151, 2003.

SOLIMAN, S.S.; TSAO, R.; RAIZADA, M.N. Chemical inhibitors suggest endophytic fungal paclitaxel is derived from both mevalonate and non-mevalonate-like pathways. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 12, p. 2497-504, 2011.

SONG, Y.C.; HUANG, W.Y.; SUN, C.; WANG, E.W.; TAN, R.X. Characterization of Graphislactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosparium* sp 1FBE001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 506-509, 2005.

SONG, Y.X.; WANG, J.; HUANG, H.; MA, L.; WANG, J.; GU, Y.; LIU, L.; LIN, Y. Four eremophilane sesquiterpenes from the mangrove endophytic fungus *Xylaria* sp. BL321. **Marine Drugs**, v. 10, p. 340-34, 2012.

SOUSA, O.V.; MACRAE, A.; MENEZES, F.G.; GOMES, N.C.; VIEIRA, R.H.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 1725–1734, 2006.

SOUZA, R.A.; STEVANATO, A.; TREU-FILHO, O.; NETTO, A.V.G.; MAURO, A.E.; CASTELLANO, E.E.; CARLOS, I.Z.; PAVAN, F.R.; LEITE, C.Q.F. Antimycobacterial and antitumor activities of Palladium(II) complexes containing isonicotinamide (isn): X-ray structure of trans-[Pd(N3)2(isn)2]. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 4863-4868, 2010.

SPECIAN, V.; SARRAGIOTTO, M.H.; PAMPHILE, J.L.; CLEMENTE, E. Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* isolated from *Luehea divaricata*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1174-1182, 2012.

SRIPHONG, L.; SOTANAPHUN, U.; LIMSIRICHAIKUL, S.; WETWITAYAKLUNG, P.; PUMMANGURA, S. Cytotoxic alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. **Planta medica**, v. 69, p. 1051-1054, 2003.

STANIEK, A.; WOERDENBAG, H.J.; KAYSER, O. Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. **Journal of Plant Interactions**, v. 3, p. 75–93, 2008.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

STIPANOVIC, R.D.; PUCKHABER, L.S.; LIU, J.; BELL, A.A. Phytotoxicity of fusaric acid and analogs to cotton. **Toxicon**, v. 57, p. 176–178, 2011b.

STIPANOVIC, R.D.; WHEELER, M.H.; PUCKHABER, L.S.; LIU, J.; BELL, A.A.; WILLIAMS, H.J. Nuclear magnetic resonance (NMR) studies on the biosynthesis of fusaric acid from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5351-5356, 2011a.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.

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

STROBEL, G.A. ; HESS, W.M. ; FORD, E.; SIDHU, R.S.; YANG, X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 417-423, 1996a.

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

STROBEL, G.A.; KNIGHTON, B.; KLUCK, K.; REN, Y.; LIVINGHOUSE, T.; GRIFFIN, M.; SPAKOWICZ, D.; SEARS, J. The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). **Microbiology**, v. 154, p. 3319–3328, 2008.

STROBEL, G.A.; YANG X.S.; SEARS, J.; ROBERT, K.; SIDHU, R.S.; HESS, W.H. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology**, v. 142, p. 435-440, 1996b.

SUBBAN, K.; SUBRAMANI, R.; JOHNPAUL, M. A novel antibacterial and antifungal phenolic compound from the endophytic fungus *Pestalotiopsis mangiferae*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 16, p. 1445-1449, 2012.

SUFFNESS, S.M.; PEZZUTO, J.M. Assays for cytotoxicity and antitumor activity. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.). **Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity**. vol. 6. London: Academic Press, 1990. Cap. 4, p. 71-133.

SUN, J-F.; LIN, X.; ZHOU, X-F.; WAN, J.; ZHANG, T.; YANG, B.; YANG, X-W.; TU, Z.; LIU, Y. Pestalols A–E, new alkenyl phenol and benzaldehyde derivatives from endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. AcBC2 isolated from the Chinese mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, p. 451-457, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954p.
TAMBURINI, E.; MASTROMEI, G. Do bacterial cryptic genes really exist? **Research in Microbiology**, v. 151, p. 179–182, 2000.

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

TAO, L.; ZHANG, J.Y.; LIANG, Y.J.; CHEN, L.M.; ZHEN, L.C.; WANG, F.; MI, Y.; SHE, Z.G.; TO, K.K.W.; LIN, Y.C.; FU, L.W. Anticancer effect and structure-activity analysis of marine products isolated from metabolites of mangrove fungi in the South China Sea. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1094–1105, 2010. [Mar Drugs]

TARR, J.B.; ARDITTI, J. Niacin biosynthesis in seedlings of *Zea mays*. **Plant Physiology**, v. 69, n. 3, p. 553-556, 1982.

TEJESVI, M. V.; NALINI, M. S.; MAHESH, B.; PRAKASH, H. S.; KINI, K. R.; SHETTY, H. S.; SUBBIAH, V. New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. **Boletín de la Sociedad Química de México**, v. 1, n. 1, p. 19-26, 2007.

THATOI, H.; BEHERA, B.C.; MISHRA, R.R. Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: a review. **Mycology**, v. 4, n. 1, p. 54–71, 2013.

TIMURKAYNAK, F.; CAN, F.; AZAP, Ö.K.; DEMIRBILEK, M.; ARSLAN, H.; KARAMAN, S.Ö. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 3, 224 – 228, 2006.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

TSAVKELOVA, E.A.; BÖMKE, C.; NETRUSOV, A.I.; WEINER, J.; TUDZYNSKI, B. Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, p. 1393-1403, 2008.

VENKATESWARLU, V.; KUMAR, K.A.A.; GUPTA, S.; SINGH, D.; VISHWAKARMA, R.A.; SAWANT, S.D. DMSO/I₂ mediated C–C bond cleavage of α -ketoaldehydes followed by C–O bond formation: a metal-free approach for one-pot esterification. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, p. 7973-7978, 2015.

VENUGOPALAN, A.; SRIVASTAVA, S. Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 873-87, 2015.

VERMA, V.C.; KHARWAR, R.N.; STROBEL, G.A. Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. **Natural Product Communications**, v. 4, p. 1511-1532, 2009.

VIEGAS Jr, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

VINOD, N.V.; SHIJINA, R.; DILEEP, K.V.; SADASIVAN, V. Inhibition of beta-lactamase by 1,4-naphthalenedione from the plant *Holoptelea integrifolia*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1752-1759, 2010.

WALTERS, B.B.; RÖNNBÄCK, P.; KOVACS, J.M.; CRONA, B.; HUSSAIN, S.A.; BADOLA, R.; PRIMAVERA, J.H.; BARBIER, E.; DAHDOUN-GUEBAS, F. Ethnobiology, sócio-economics and management of mangrove forests: a review. **Aquatic Botany**, New York, v. 89, p. 220-236, 2008.

WANG, D.; ZHANG, W.; WANG, T.; LI, N.; MU, H.; ZHANG, J.; DUAN, J. Unveiling the mode of action of two antibacterial tanshinone derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p.17668-17681, 2015.

WANG, F.W.; HOU, Z.M.; WANG, C.R.; LI, P.; SHI, D.H. Bioactive metabolites from *Penicillium* sp., an endophytic fungus residing in *Hopea hainanensis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 2143-2147, 2008.

WANG, H.; NG, T.B. Pharmacological activities of fusaric acid (5-butylpicolinic acid). **Life Sciences**, v. 65, n. 9, p. 849-856, 1999.

WANG, J.F.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SU, W. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 193, n. 2, p. 249-253, 2000.

WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A.T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 9, p. 2325-2327, 1971.

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

WHITE, F.J.Jr.; TORRES, M.S. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? **Physiologia Plantarum**, v. 138, p. 440-446, 2010.

WHITE, R.L.; BURGESS, D.; MANDURU, M.; BOSSO, J.A. comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914-1918, 1996.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death**. 2011.

WHO. World Health Organization. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. França: WHO Press, 2014. 257p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: <09/01/2015>.

WILSON, D. Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, v. 73, n. 2, p. 274-276, 1995.

WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; DANWISSETKANJANA, K.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 265–272, 2004.

WORTHINGTON, R.J.; BUNDERS, C.A.; REED, C.S.; MELANDER, C. Small molecule suppression of carbapenem resistance in NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae*. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, n. 5, p. 357–361, 2012.

WRIGHT, G.D.; SUTHERLAND, A.D. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. **Trends in Molecular Medicine**, v. 13, n. 6, p. 260-267, 2007

WU, J.; XIAO, Q.; XU, J.; LI, M.Y.; PAN, J.Y.; YANG, M.H. Natural products from true mangrove flora: source chemistry and bioactivities. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 25, p. 955-981, 2008.

XU, F.; TAO, W.; CHENG, L.; GU, L. Strain improvement and optimization of the media of taxol-producing fungus *Fusarium maire*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 31, n. 1, p. 67-73, 2006.

YANG, X.; GUO, S.; ZHANG, L.; SHAO, H. Selection of producing podophyllotoxin endophytic fungi from podophyllin plant. **Natural Product Research and Development**, v. 15, p. 419-422, 2003.

YANG, X.; ZHANG, L.; GUO, B.; GUO, S. Preliminary study of vincristine-producing endophytic fungus from eaves of *Catharanthus roseus*. **Zhongcaoyo**, v. 35, n. 1, p. 79-81, 2004.

YE, Y.H.; ZHU, H.L.; SONG, Y.C.; LIU, J.Y.; TAN, R.X. Structural revision of aspernigrin A, reisolated from *Cladosporium herbarum* IFB-E002. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1106-1108, 2005.

ZAHER, A.M.; MAKBOUL, M.A.; MOHARRAM, A.M.; TEKWANI, B.L.; CALDERÓN, A.I. A new enniatin antibiotic from the endophyte *Fusarium tricinctum* Corda. **The Journal of Antibiotics**, v. 68, p. 197-200, 2015.

ZHAN, J.X.; BURNS, A.M.; LIU, M.P.X.; FAETH, S.H.; GUNATILAKA, A.A.L. Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: Beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 227-232, 2007.

ZHANG, H-W.; HUANG, W-Y.; SONG, Y-C.; CHEN, J-R.; TAN, R-X. Four 6H-Dibenzo[b,d]pyran-6-one derivatives produced by the Endophyte *Cephalosporium acremonium* IFB-E007. **Helvetica Chimica Acta**, v. 88, n. 11, p 2861-2864, 2005.

ZHANG, L.; GUO, B.; LI, H.; ZENG, S.; SHAO, H.; GU, S.; WEI, R. Preliminary study on the isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic value. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, v. 31, p. 805-807, 2000.

ZHANG, Y.; HAN, T.; MING, Q.; WU, L.; RAHMAN, K.; QIN, L. Alkaloids produced by endophytic fungi: a review. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 7, p. 963-968, 2012.

HANG, Z.; WANG, J.; ZHANG, B.; LIU, H.; SONG, W.; HE, J.; LV, D.; WANG, S.; XU, X. Activity of antibacterial protein from maggots against *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 31, p. 1159-1165, 2013.

ZHAO, J.; SHAN, T.; MOU, Y.; ZHOU, L. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 159-168, 2011.

ZHENG, C.J.; XU, L.L.; LI, Y.Y.; HAN, T.; ZHANG, Q.Y.; MING, Q.L.; RAHMAN, K.; QIN, L.P. Cytotoxic metabolites from the cultures of endophytic fungi from *Panax ginseng*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 17, p. 7617-7625, 2013.