



UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E BIOTECNOLOGIA



IQB

ANDRESSA SOARES SANTOS

**ESTUDO QUÍMICO E DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA MACAÚBA
[(*Acrocomia aculeata* (JACQ.) LODD.EX MART. 1763)] E DOS SEUS ENDOFÍTICOS**

MACEIÓ

2015

ANDRESSA SOARES SANTOS

**ESTUDO QUÍMICO E DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA MACAÚBA
[(*Acrocomia aculeata* (JACQ.) LODD.EX MART. 1763)] E DOS SEUS ENDOFÍTICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia – PPGQB da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson de Souza Bento

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Cristina
Caño de Andrade

MACEIÓ

2015

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S237e Santos, Andressa Soares.
Estudo químico e da atividade antimicrobiana da macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. 1763] e dos seus endofíticos / Andressa Soares Santos. - 2015.
74 f. : il. tabs., graf.

Orientador: Edson de Souza Bento.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2015.

Bibliografia: f. 68-74.

1. Produtos naturais. 2. Macaúba. 3. Fungos. 4. Endofíticos. 5. Atividade antimicrobiana. I. Título.

CDU: 547.9



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

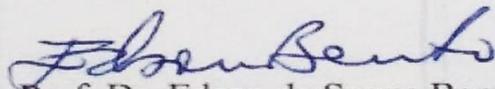


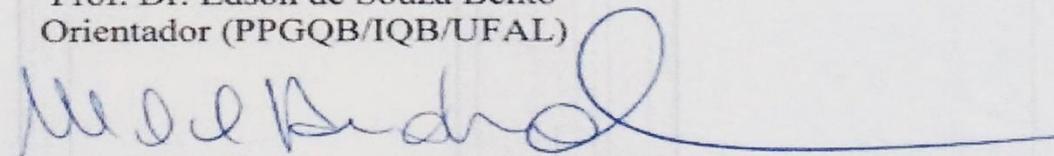
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

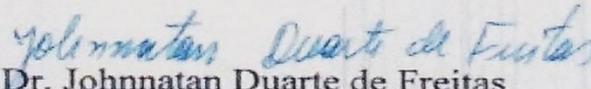
FOLHA DE APROVAÇÃO

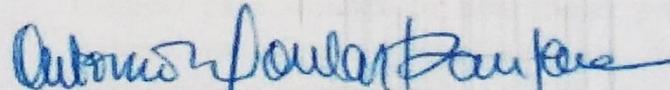
Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação da Mestranda **ANDRESSA SOARES SANTOS**, intitulada: **“ESTUDO QUÍMICO E DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA MACAÚBA [(Acrocomia aculeata (JACQ.) LODD.EX MART. 1763)] E DOS SEUS ENDOFÍTICOS”** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 18 de dezembro de 2015, às 09h30, na Sala de Aulas da Pós-Graduação do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

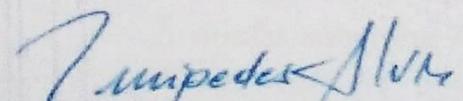
COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Edson de Souza Bento
Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)


Prof.^a. Dr.^a. Maria Cristina Caño de Andrade
(Coorientadora - IQB/UFAL)


Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas
(IFAL)


Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho
(ICBS/UFAL)

Dedico essa conquista aos meus pais Anna Cleide e Ailton, principais incentivadores dessa jornada, por todo amor e ensinamentos e por compreenderem minha ausência.

À minha sobrinha Anna Sofia que alegra todos os meus dias.

Aos meus tios Esperidião e Luiza pelo acolhimento e incentivo em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, pelo dom da vida, por todas as oportunidades de crescimento e amadurecimento e principalmente por mais essa benção em minha vida;

Ao Prof. Dr. Edson de Sousa Bento pelo acolhimento em seu laboratório, orientação, dedicação e paciência que foram essenciais para a realização desse trabalho;

À Prof.^a. Dr.^a Maria Cristina Caño de Andrade pela orientação e por todos os ensinamentos nesses anos de pesquisa;

À Prof.^a. Dr.^a Maria Helena Caño de Andrade, da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, por ceder tão gentilmente todo material da Macaúba.

À Prof.^a. Dr.^a Adriana Reis Todaro por sua generosidade, disponibilidade, amizade, dedicação, conselhos e incentivos na minha vida acadêmica, por sua orientação ímpar nesse trabalho, o qual não seria realizado sem sua colaboração, à minha imensa e eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano pelas orientações e ensinamentos, por toda disponibilidade, que foram indispensáveis para a concretização desse nosso trabalho.

A Prof.^a. Dr.^a Maria Lysete de Assis Bastos por ceder o Laboratório de Tratamento de Feridas – UFAL para os testes desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Eusébio Goulart Sant`Anna, por me acolher em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Henrique Fonseca Goulart pela orientação e disponibilidade.

À Prof.^a. Dr.^a Margarida dos Santos Humberto minha eterna professora, inspiração para minha vida acadêmica e profissional.

Ao meu grande amigo Doutorando Alexandre Carmo Crispim por sua amizade, dedicação em ajudar, por iluminar meu caminho, esse trabalho só foi realizado por sua incansável ajuda em todos os momentos, jamais terei como retribuir tudo o que você fez por mim. Você é um anjo que Deus enviou. Muito obrigada meu amigo.

À Nathaly Costa de Aquino pela amizade e conselhos preciosos.

Aos meus amigos Gregório, Márcio, Andressa Santos, Aglaupe Meira e Aniéli pela amizade, carinho e pelos momentos maravilhosos. Amo vocês.

Aos meus amigos do início do curso Claudinete, Luana, Evelyn, Marcela, Thaysa e Rossiel pela amizade.

Aos meus amigos dos laboratórios de RMN e Biotecnologia que me ajudaram tantas vezes, Alexandre, Raquel, Prazeres, Adilson, Shirley, Mariel, Michele, Jéssica Rocha, Jéssica

Guerra, Sandreane, Juliana Tavares, Gabi, Carol, Carla, Stephanie Cordova, Lucas Henrique, Lucas Lima, Kerly, Regina Couto.

A Vanderley, Gabi e Jefferson do Laboratório de Tratamento de Feridas – UFAL, pela disponibilidade e contribuição nesse trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, diretores e coordenadores da Escola Estadual Irene Garrido, por compreenderem as dificuldades da vida acadêmica e compreenderem as ausências necessárias.

Aos meus professores do ensino fundamental e médio que contribuíram para que eu subisse mais esse degrau, Tia Rosa, Tia da Luz, Tia Pretinha, Ana Luzia, Amilton Ramos, Edson, Amanda, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus tios Luiza e Esperidião que me acolheram tão generosamente em seu lar, por todo incentivo e ajuda em toda minha vida, meus eternos agradecimentos.

Aos meus pais Ailton e Anna Cleide por todo amor, dedicação, paciência e incentivo na vida, por disponibilizar tantas oportunidades de crescimento e estudo, pela compreensão da minha ausência em casa.

À minha irmã Laryssa por ser a primeira amiga e por trazer ao mundo minha sobrinha Anna Sofia que faz transbordar o amor na nossa família.

Aos meus primos Rhoan Henry e Romilson Júnior por trazerem alegria para minha vida, vocês são os irmãos que não tive.

À Nayara Condja pela amizade, dedicação e por tantas vezes me ensinar a ser uma pessoa melhor, por segurar minha mão em todos os momentos e não me deixar desistir.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho, meu muito obrigado!

“Missão dada é missão cumprida. Vá e vença, que por vencido não o conheça.”

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o potencial biotecnológico da palmeira macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Martius.1763)]. O material vegetal foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Processos da Macaúba da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As amostras de folhas foram colhidas em períodos de alta e baixa pluviosidade, nos meses de outubro a abril e junho a agosto, respectivamente. Com o objetivo de investigar a diversidade de fungos endofíticos nas folhas foram realizadas 04 (quatro) coletas e o material foi esterilizado conforme a literatura. O procedimento para a identificação dos endofíticos ocorreu conforme observação das características macroscópicas (DOMSCH et al., 1980), e microcultivo em lâminas (RIDELL, 1950). Como resultado, obtivemos 04 (quatro) fungos isolados: *Acremonium* sp, *Brachysporiella* sp, *Papulospora* sp e *Trichothecium* sp. Em seguida foi realizado o estudo para identificar os metabólitos presentes no filtrado da cultura do fungo endofítico *Acremonium* sp, utilizando a técnica espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear – RMN. Os metabólitos identificados foram etanol, alanina, acetato, acetona succinato, metanol e oxaloacetato. Adicionalmente foi realizada a extração, com acetato de etila, dos metabólitos secundários presentes no filtrado da cultura. A avaliação antimicrobiana do extrato bruto (ACM) foi determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para bactérias Gram positivas o extrato EtOAc apresentou atividade inibitória moderada para *Staphylococcus aureus* com CIM de 500 µg/mL, e boa atividade inibitória para *Staphylococcus epidermidis* com CIM de 250 µg/mL. Para as bactérias Gram-negativas apresentou atividade inibitória muito alta para *Salmonella entérica* com CIM de 125 µg/mL e atividade fraca para *Pseudomonas aeruginosa* com CIM de 1000 µg/mL. Igualmente foi realizada a avaliação antimicrobiana para o extrato etanólico das folhas da macaúba, este apresentou atividade fracamente inibitória para Gram-positiva *Staphylococcus aureus* com CIM de 1000 µg/mL e Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* com CIM de 1000 µg/mL, para as demais não houve inibição. Esses resultados destacam relevância e a necessidade de mais pesquisas com a macaúba, principalmente dos fungos endofíticos, visto que o presente estudo é inédito.

Palavras-chaves: Macaúba. Fungos endofíticos. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The present work was performed with the objective to study the biotechnological potential of the palm tree macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Martius.1763)]. The plant material was gently given by the Laboratory of Macaúba Processes from Federal University of Minas Gerais (UFMG). The samples of leaves were collected during periods of high and low rainfall, in the months from October to april and june to august, respectively. With the aim to investigate the diversity of endophytic fungi in macaúba leaves, 04 (four) collects were executed and the material was sterilized according procedure reported in the literature (DOBRANIC et al., 1995). The process of identification of the endophytic organisms was performed in accordance with the observation of the macroscopic characteristics (DOMSCH et al.1980), and microcultivation in blades (RIDELL, 1950). As a result, were obtained 04 (four) isolate fungi: *Acremonium* sp., *Brachysporiella* sp, *Papulospora* sp e *Trichothecium* sp. After this stage it was executed the study to identify the metabolites presents in the culture filtrate of the endophytic fungi *Acremonium* sp, using the spectroscopic technique of Nuclear Magnetic Ressonance - NMR. The metabolites identified were ethanol, alanine, acetone succinate, methanol and oxaloacetate. Additionally was carried out the extraction with ethyl acetate of the secondary metabolites presents in the filtrate, and the antimicrobial evaluation of the crude extract was determinated by the Minimal Inhibitory Concentration (MIC). The Gram positives bacteria the EtOAc extract showed moderate inhibitory activity for *Staplylococcus aureus* with MIC of 500 µg/mL and for *Staphylococcus epidermides* with MIC of 250 µg/mL. The Gram negative bacteria were presented a very high inhibitory activity for *Salmonela entérica* with MIC of 125 µg/mL and weak inhibitory acitivity for *Pseudomonas aeruginosa* with MIC of 1000 µg/mL. Equally was carried out antimicrobial evaluation for the ethanol extract of the leaves of macauba, showing weak inhibitory activity for Gram-positive *Staphylococcus aureus* with MIC of 1000 µg/mL and Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* with MIC of 1000 µg/mL, with the rest there was no inhibition. These results highlight the relevance and the necessity of more researches with macauba, specially with endophytic fungi, considering that the present work is inedit.

Keywords: Macaúba. Endophytic fungi. Antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Distribuição geográfica da espécie <i>Acrocomia aculeata</i> pelos estados brasileiros.	19
Figura 2- A Macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i>).....	20
Figura 3- Tronco da Macaúba (<i>Acrocomia aculeata</i>).	20
Figura 4- Cacho com frutos de macaúba.....	21
Figura 5- Frutos de macaúba.....	21
Figura 6- Tipos de hifa dos fungos: a - apocíticas (com septo) e b - cenocíticas (sem septo)	23
Figura 7- Ciclo de vida assexual de fungos.....	23
Figura 8- <i>Acremonium</i> sp.....	25
Figura 9- <i>Brachysporiella</i> sp.	26
Figura 10- <i>Papulospora</i> sp.....	26
Figura 11- <i>Trichothecium</i> sp.....	27
Figura 12- Compostos produzidos por <i>Trichothecium</i> sp: a – Taxol, b- Tricotecina.....	27
Figura 13- Metabólitos secundários de <i>Acremonium</i> sp: a-acremonol, b- acremodiol e c - Citocalasina D.....	29
Figura 14- Spins nucleares desorientados na ausência de um campo magnético e orientados quando expostos a um campo magnético externo B_0	30
Figura 15- Movimento de precessão do spin comparado ao movimento de um pião.....	31
Figura 16- Obtenção dos espectros de RMN.....	33
Figura 17- Tetrametil-silano (TMS).....	34
Figura 18- Deslocamento químico dos tipos de hidrogênios mais conhecidos.....	34
Figura 19- Desdobramentos de spin-spin observado em grupos alquilas comuns.....	35
Figura 20- Espectro de RMN do etanol.....	36
Figura 21- Triângulo de Pascal.....	36
Figura 22- Microplaca (contendo 96 micropoços) para técnica da Microdiluição em Caldo.	44
Figura 23- Plaqueamentos: a- setembro/2014 b - dezembro/2014 e c- março/2015 d - abril/2015.....	46
Figura 24- <i>Acremonium</i> sp : a – Coloração laranja e b – coloração roxa.....	47
Figura 25- <i>Acremonium</i> sp em placa de microcultivo com sete dias.....	47
Figura 26- <i>Acremonium</i> sp: a – chave da literatura, b – lâmina com 7 dias. Observado com objetiva de 40x.....	48
Figura 27- Colônia de <i>Brachysporiella</i> sp com diferentes dias de cultivo.....	48

Figura 28- <i>Brachysporiella</i> sp: a – hifa com septos curtos cinco dias, b- conídios imaturos com 18 dias, c- conídios com 30 dias, d – chave da literatura. Observado com objetiva de 40x.....	49
Figura 29: Colônia de <i>Papulospora</i> sp com diferentes dias de cultivo.....	50
Figura 30- Colônia de <i>Papulospora</i> sp: a – hifa com septos curtos 10 dias, b- conídios imaturos com 15 dias, c – chave da literatura. Observado com objetiva de 40x...	50
Figura 31- <i>Trichothecium</i> sp com diferentes dias de cultivo.	51
Figura 32- <i>Trichothecium</i> sp: a –conídios em forma de bastão com 3 dias, b- conídios maduros e septados com 25 dias, c – chave da literatura. Observado com objetiva de 40x.....	52
Figura 33- Crescimento do <i>Acremonium</i> sp em meio líquido Difco ® com diferentes dias de cultivo.....	53
Figura 34- Crescimento do <i>Acremonium</i> sp em meio líquido (BD) com diferentes dias de cultivo.....	53
Figura 35- Crescimento do <i>Acremonium</i> sp em meio líquido (BD) apresentando diferentes colorações, com 14 dias.....	53
Figura 36- Crescimento do <i>Acremonium</i> sp em meio líquido (BD): a – com 30 (trinta) dias, b – cultivo utilizado para retirar as alíquotas, com 30 (trinta) dias.....	54
Figura 37- a – Partição líquido-líquido com acetato de etila, b- extrato bruto.....	54
Figura 38 - a –Extração com etanol, b- extrato bruto xaroposo, c – extrato bruto seco.....	55
Figura 39- Placas CIM – a: Gram-positivas; b - Gram-negativas.	57
Figura 40- Espectro de RMN- ¹ H do meio de cultivo estéril: a – sem supressão do sinal da água e b- com a supressão.....	59
Figura 41- Sinais característicos ao hidrogênio ligado ao carbono 1 da α e β-dextrose - estereoquímica não definida- presentes no espectro de RMN- ¹ H no meio de cultura estéril, ampliado a região de 2 a 5.5 ppm.	60
Figura 42- Sinais característicos aos metabólitos identificados no espectro de RMN- ¹ H presentes no meio de cultura estéril, ampliado a região de 1 a 3 ppm.....	60
Figura 43- Espectro de RMN- ¹ H da oitava semana de cultura do fungo <i>Acremonium</i> sp.....	61
Figura 44- Espectro de RMN- ¹ H da oitava semana de cultura do fungo <i>Acremonium</i> sp, ampliado na região de 0.5 a 4.0 ppm.	61
Figura 45- Espectro de RMN- ¹ H da oitava semana de cultura do fungo <i>Acremonium</i> sp, ampliado na região de 1.2 a 2.4 ppm.....	61

Figura 46- Espectro de RMN- ¹ H da oitava semana de cultura do fungo <i>Acremonium</i> sp, ampliado na região de 3.1 a 3.8 ppm.....	62
Figura 47- Sobreposição dos espectros de RMN- ¹ H do meio estéril e da primeira a oitava semana, colocados de baixo para cima e ampliado na região de 0 a 6 ppm.....	62
Figura 48- Curva de variação dos metabólitos primarios, majoritários, encontrados no caldo de cultivo fermentado da primeira a oitava semana de cultivo. A intensidade relativa é dada em log ₂ (abs +1000), logo a variação de uma unidade corresponde a uma variação de 2 ^(abs +1000)	63
Figura 49-Curva de variação da intensidade do tripleto encontrado em 1.188 ppm, referente ao etanol.....	64
Figura 50- Curva de variação da intensidade de um singleto encontrado em 1.9223 ppm, referente ao acetato.....	64
Figura 51- Reação de formação de etanol a partir de piruvato.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variados usos da Macaúba.....	22
Tabela 2 - Atividade antimicrobiana do extrato do caldo fermentado de <i>Acremonium</i> sp...	56
Tabela 3 - Atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas da macaúba.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACM – Extrato bruto
ATM- Atmosfera
BD - Batata e Dextrose
BDA - Batata, dextrose e ágar
BHI – Brain Heart Infusion
B₀– Campo magnético gerado pelo equipamento
B₁ – Pulso de rádio frequência
CIM - Concentração Inibitória Mínima
DMSO - Dimetilsulfóxido
D1- tempo de espera entre pulsos
D₂O – Água Deuterada
FID – Free Induction Decay
FM – Folha da macaúba
FT – Transformada de Fourier
g – Gramas
h – Constante de Plank
I – Número quântico de Spin
J – Constante de acoplamento
L – Litros
M – mol/Litro
MHz – Megahertz
mL – Mililitros
mM- Milimolar (10⁻³)
NS- Número de pulsos
pH – Potencial hidrogeniônico
ppm – Parte por milhão
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
SW – Largura da janela do espectro de RMN
T₁ - Tempo de relaxação spin/rede
T – Temperatura
TD – Número de pontos que geram o espectro

TMS - Trimetilsilano

TSP – Timetilsilipropionato de sódio

UFC – Unidade de Formação de Colônias

ν_1 - Núcleo distinto através de um pulso

ν_2 - Frequência de ressonância

α - Orientação do spin paralela ao campo aplicado

β - Orientação do spin antiparalela ao campo aplicado

ω - Nomenclatura utilizada para designar os ácidos graxos

δ - Deslocamento Químico

μ - Momento magnético

ρ – Momento angular

σ – Constante de blindagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Macaúba [(<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. ex Mart. 1763)]: Aspectos Gerais	19
3.1.1 Aplicações e usos da Macaúba.....	21
3.2 Fungos: aspectos gerais	22
3.2.1 Fungos filamentosos.....	23
3.2.2 Fungos endofíticos	24
3.2.3 Ocorrência de fungos endofíticos na família Palmae	25
3.2.4 Fungo endofítico do gênero <i>Acremonium</i>	25
3.2.5 Fungo endofítico do gênero <i>Brachysporiella</i> sp.....	26
3.2.6 Fungo endofítico do gênero <i>Papulospora</i> sp.....	26
3.2.7 Fungo endofítico do gênero <i>Trichothecium</i> sp.....	27
3.3 Metabólitos dos fungos	28
3.3.1 Metabólitos secundários de fungos endofíticos do gênero <i>Acremonium</i> sp.....	29
3.4 Ressonância Magnética Nuclear – RMN aplicada à identificação de compostos orgânicos	30
3.4.1 Absorção de energia e ressonância.....	31
3.4.2 O espectro de Ressonância Magnética Nuclear.....	32
3.4.3 Blindagem e Deslocamento químico.....	33
3.4.4 Acoplamento Spin-Spin.....	35
3.4.5 Efeito Nuclear Overhauser (NOE)	37
3.4.6 Experimento NOESY-1D (Nuclear Overhauser effect spectroscopy One-dimensional).....	37
3.4.7 Metabolômica.....	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Material biológico	40
4.2 Meios de cultura	40
4.2.1 Meio Líquido de Batata e Dextrose (BD)	40
4.2.2 Meio Líquido preparado com Batata e Dextrose -Difco ®.....	40

4.2.3 Meio sólido preparado com Batata e Dextrose -Difco ® e ágar.....	40
4.3 Isolamento	41
4.4 Identificação	41
4.5 Suspensão micelial e extração de metabólitos com acetato de etila (EtOAc).	42
4.5.1 Preparação do extrato etanólico das folhas da macaúba.....	42
4.6 Preparação dos inóculos bacterianos	42
4.7 Avaliação da atividade inibitória	43
4.8 Metabolômica do Filtrado da Cultura	44
4.8.1 Tampão fosfato de Sódio 0,1M (pH = 7,4) com 1 mM de TSP.....	44
4.8.2 Experimento de RMN- ¹ H.....	44
4.8.3 Análise.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Isolamento dos fungos endofíticos	46
5.1.1 Isolamento e identificação do fungo endofítico <i>Acremonium</i> sp.....	46
5.1.2 Isolamento e identificação do fungo endofítico <i>Brachysporiella</i> sp.....	48
5.1.3 Isolamento e identificação do fungo endofítico <i>Papulospora</i> sp.....	49
5.1.4 Isolamento e identificação do fungo endofítico do gênero <i>Trichothecium</i> sp...	51
5.2 Extração de metabólitos	52
5.2.1 Extrato etanólico da folha da macaúba.....	54
5.3 Avaliação da atividade inibitória	55
5.4 Análise Metabolômica	59
6 CONCLUSÃO	66
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	67
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos são caracterizados por viverem no interior de tecidos vegetais, principalmente em caules e folhas, e não causam dano aos seus hospedeiros (AZEVEDO, 1999). As interações entre endofíticos e planta, ainda não são claramente compreendidas, entretanto podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas.

Os fungos endofíticos constituem um vasto e inexplorado recurso de compostos farmacologicamente ativos. Em sua associação mutualística, o vegetal fornece proteção e nutrientes para o endofítico, o qual produz metabólitos bioativos que beneficiam o hospedeiro no crescimento, proteção, permanência no habitat (ARACHEVALETA et al., 1989).

A busca por metabólitos produzidos por micro-organismos é recente. A descoberta da penicilina por Fleming, em 1928, levou a revolução no tratamento de infecções bacterianas (BASHYAL et al., 2007), e impulsionou pesquisadores da academia e de indústrias farmacêuticas a procurar intensivamente produtos bioativos provenientes de micro-organismos (GALLO et al., 2008). Por suas propriedades bioativas, vários metabólitos são utilizados como antibióticos, hipocolesterolemiantes e imunossuppressores, além disso, pouquíssimos metabólitos secundários não apresentam atividade antibiótica (DEMAIN, 1999; SHWAB; KELLER, 2008).

Bashyal et al. (2007) afirmam que existem variedades de micro-organismos endofíticos seja influenciada pela variedade de espécies vegetais, bem como de fatores ambientais, sugerindo vasto potencial para descoberta de metabólitos secundários a partir de endofíticos encontrados em associação espécies vegetais até então não estudadas como fonte de micro-organismos associados. Partindo desse pressuposto, a palmeira macaúba [(*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Martius. 1763)] é excelente fonte de pesquisa, sendo comumente encontrada no território brasileiro e pouco estudada em relação aos micro-organismos endofíticos.

Dessa forma, pretende-se contribuir para o conhecimento da diversidade e do potencial biotecnológico da palmeira macaúba [(*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. 1763)], através do isolamento e identificação dos fungos endofíticos provenientes da folha da planta. E adicionalmente o presente trabalho apresenta o estudo do metabóloma do filtrado da cultura do endofítico *Acremonium sp* , isolado das folhas e o estudo da atividade antimicrobiana do extrato do filtrado. Esse trabalho tem contribuição científica impar, pois não há relatos na literatura sobre estudos referentes aos fungos endofíticos provenientes da macaúba.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais:

- Investigar a ocorrência de fungos endofíticos nas folhas da macaúba [(*A. aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. 1763)] e avaliar seu potencial biotecnológico.
- Identificar os metabólitos presentes no filtrado da cultura do fungo endofítico *Acremonium* sp, aplicando a técnica espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear – RMN e análises das atividades antimicrobiana por Concentração Inibitória Mínima - CIM.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar fungos endofíticos das folhas da macaúba [(*A. aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. 1763)];
- Identificar o gênero dos fungos através de características macroscópicas e microscópicas;
- Cultivar o fungo endofítico *Acremonium* sp durante 08 (oito) semanas;
- Realizar coletas semanais da fase líquida da cultura;
- Analisar a fase líquida da cultura através de experimentos de RMN – ^1H , através da técnica NOESY 1D;
- Identificar os metabólitos presentes na fase líquida da cultura ao longo de 08 (oito) semanas;
- Obter extratos do filtrado da cultura em acetato de etila;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima do extrato etanólico da folha e do extrato EtOAc do filtrado da cultura do fungo *Acremonium* sp contra bactérias patogênicas humanas, tais como bactéria Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* e *Enterobacter aerogenes*, utilizando o método de Microdiluição em Caldo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. 1763]: Aspectos Gerais.

A palmeira macaúba *Acrocomia aculeata* é pertencente à família Arecaceae, distribuída geograficamente pelas Américas. (MORCOTE-RIOS; BERNAL, 2001). O gênero *Acrocomia* é composto por duas espécies – *A. aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. e *A. hassleri* (B. Rodr.) W. J. Hahn. Estas espécies se diferem pelo tamanho dos indivíduos e por sua localização geográfica. A espécie *A. aculeata* possui porte maior e é distribuída nas regiões secas da América Tropical. (HENDERSON et al.,1995). É considerada a palmeira com maior dispersão pelo Brasil, é encontrada nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, integralmente na região centro-oeste, e parcialmente nas regiões norte e nordeste (Figura 1) (AMARAL, 2007). Devido a sua dispersão recebe vários nomes regionais, por exemplo, macaúba, macaíba, macaiúva, bacaiúva, bocaiúva, imbocaiá ou coco-de-espinhos.

Figura 1- Distribuição geográfica da espécie *Acrocomia aculeata* pelos estados brasileiros.



Fonte: Disponível em: <http://www.umpedeque.com.br/site_umpedeque/arvore.php?id=710>

A macaúba (Figura 2) é uma palmeira perene, frutífera e nativa de florestas tropicais, o tronco atinge de 10 a 15 m de altura e 20 a 30 cm de diâmetro. Na região dos nós, são encontrados espinhos escuros, pontiagudos com cerca de 10 cm de comprimento (Figura 3).

Suas folhas verdes, ordenadas em diferentes planos apresentam um aspecto de pluma à copa (Figura 2). A espata, folha modificada que serve de proteção para as flores, pode chegar até 2,0 m de comprimento e suas inflorescências são de coloração amarelada e espádice com 50 a 80 cm de comprimento. As flores são amarelas e unissexuais onde ambos os sexos aparecem numa mesa inflorescência (LORENZI, 2006; NUCCI, 2007).

Figura 2- A Macaúba (*Acrocomia aculeata*)



Fonte: Disponível em :<<http://economia.uol.com.br/agronegocio/album/2013/10/29/fruta-do-cerrado-macauba-se-transforma-em-pratos-salgados-no-recife.htm>>

Figura 3- Tronco da Macaúba (*Acrocomia aculeata*).



Fonte: Disponível em: <<http://www.altiplano.com.br/1105macauba.html> >

A frutificação ocorre por todo ano, com o amadurecimento dos frutos somente no período entre os meses de setembro a janeiro. No ambiente natural as sementes podem levar de um a dois anos para germinar. Os frutos são esféricos ou achatados com diâmetro variando de 2,5 a 5,0 cm, a produção pode variar de 0 à 271 frutos, conforme a região (Figura 4).

Estudos da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC mostraram que macaubais nativos em solos de média fertilidade, tem produção aproximada de 100 kg por árvore por ano, dessa forma em plantios racionais com espaçamento de 7 m x 7 m pode se esperar uma produtividade mínima de 20.000 kg/ha/ano de frutos. O mesocarpo possui coloração amarelo ou esbranquiçado, tem aspecto fibroso, sabor adocicado, rico em glicerídeos, e é comestível. O endocarpo é aderido ao mesocarpo, ou seja, à polpa, com parede dura e escura e por fim a amêndoa comestível (Figura 5) (GRAY, 2005; HENDERSON et al., 1995; SILVA, 1994; BONDAR, 1964; SCARIOT et al., 1995).

Figura 4- Cacho com frutos de macaúba



Fonte: Disponível em: <<http://www.terrastock.com.br/default.asp?i=br&p=detalhes&cod=c4711>>

Figura 5- Frutos de macaúba



Fonte: Disponível em: <<http://www.macaubabrasil.com.br/o-fruto.php>>

3.1.1 Aplicações e usos da Macaúba

As palmeiras destacam-se pela importância natural, econômica e ecológica. São amplamente utilizadas como alimento pelo homem na forma de palmito, frutos e derivados, tais como doces, óleos, bebidas, além de ser fonte de alimento para várias espécies da fauna silvestre. A estipe é empregada em construções rurais, na confecção de ripas e calhas para

água (LIMA et al., 2003). O fruto é a parte mais importante da planta, cuja polpa pode ser consumida *in natura*, ou utilizada para extração de óleo comestível; a amêndoa fornece óleo claro com qualidades semelhantes ao da oliveira (LORENZI, 1992).

Todas as partes da palmeira *Acrocomia aculeata* podem ser utilizadas para os mais variados fins, que variam com cada região, sendo os principais usos medicinal e alimentício.

Tabela 1- Variados usos da Macaúba.

Parte da planta	Uso	Finalidade
Raízes	Medicinal	Diurético
Estipe (parede)	Vários	Caibro, ripas, estacas.
Estipe (medula)	Alimentar	Palmito
Estipe (seiva)	Alimentar / medicinal	Vinho/ febrífuga
Folha	Vários	Forragem gado, chapéu, balaio, cobertura de casas
Fruto (mesocarpo)	Medicinal / Alimentar	Fortificante, fruta, goma de mascar, doces.
Fruto (óleo do mesocarpo)	Medicinal / Alimentar / Cosmética	Analgésico, licor, sorvete, hidratante capilar.
Semente (amêndoa)	Alimentar	Coco, paçoca.
Semente (óleo da amêndoa)	Medicinal / Alimentar / Cosmética	Laxante, óleo de cozinha, hidratante capilar.

Fonte: Autora (2015). Adaptado de LORENZI (2006)

Mesmo com esse vasto potencial biotecnológico, a palmeira macaúba [(*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Martius. 1763)] pouco estudada em relação aos micro-organismos endofíticos.

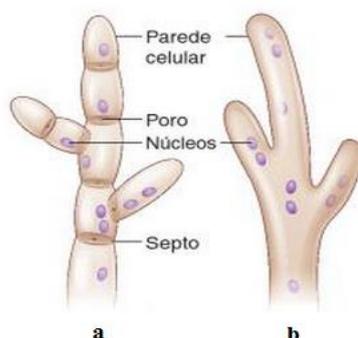
3.2 Fungos: aspectos gerais

A generalização das características dos fungos é complexa devido à diversidade ecológica, fisiológica e morfológica presente no Reino Fungi, o qual é grande e heterogêneo, entretanto são reconhecidos três grupos: fungos filamentosos, leveduras e cogumelos. Estudos apresentam que existem cerca de 1,5 milhões de espécies fúngicas. Excluindo os insetos, fungos são os mais numerosos seres vivos (JIANG; NA, 2000; ESPOSITO; AZEVEDO; ARCHER et al., 2008).

3.2.1 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são abundantes e amplamente encontrados na natureza, apresentam hifas, septadas ou não, são formadas por filamentos delgados, de aparência aveludada, ou algodonosa, possuindo vários pigmentos. O conjunto de hifas é chamado de micélio, importantes para a taxonomia (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; LOPES, 1999; ALEXOPOULOS et al., 1996; TORTORA et al., 2000; LACAZ et al., 2002) (Figura 6).

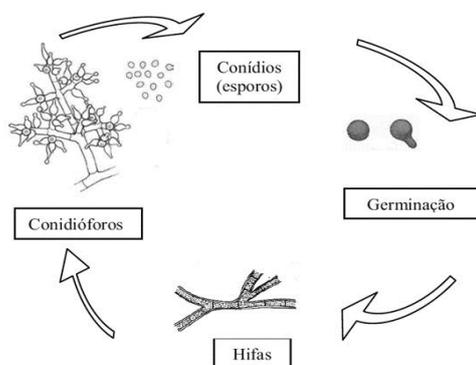
Figura 6- Tipos de hifa dos fungos: a - apocíticas (com septo) e b - cenocíticas (sem septo).



Fonte: TORTORA et. al (2012)

No ciclo de vida dos fungos existe a formação de esporos, ocorrendo de forma sexuada ou assexuada, que dão origem aos novos indivíduos, são responsáveis pela dispersão em um novo local e sobrevivência do fungo em condições adversas até o surgimento de condições favoráveis (CARLILE; WATKINSON, 1994; LOPES, 1999). Na reprodução assexuada são formados os esporos imóveis denominados conídios, o compartimento hifal onde são formados os conídios é a célula conidiogênica, também chamada de conidióforo (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; LOPES, 1999) (Figura 7).

Figura 7- Ciclo de vida assexual de fungos



Fonte: Autor (2015) - Adaptado de KRUGER; BACCHI (1995)

Os fungos, em sua maioria, são benéficos e vivem em harmonia com outras espécies. São de grande valor para os mais variados tipos de indústrias tais como a alimentícia, com a produção de vinhos, bebidas fermentadas, queijos, e a indústria farmacêutica com a produção de ácidos orgânicos, antibióticos como a penicilina descoberta em 1928 por Alexander Fleming. Os fungos também são utilizados para o controle de pragas na agricultura (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004; NICOLAOU et al., 2008).

3.2.2 Fungos endofíticos

Os microrganismos denominados endofíticos, fungos e bactérias, são caracterizados por viverem no interior de tecidos vegetais, principalmente em caules e folhas, e não causam dano aos seus hospedeiros (AZEVEDO, 1999).

A interação entre planta e fungo ainda é obscura (LODGE et al., 1996; SOUTHCOTT; JOHNSON, 1997). Alguns são encontrados também no interior de tecidos vegetais saudáveis, sendo um leque de possibilidades para o estudo da interação entre planta e microrganismo (EMBRAPA, 2011). Pesquisas realizadas por Arachevaleta et al (1989), mostraram que os fungos endofíticos aumentaram a resistência da planta, quando esta se encontrava sob estresse por falta de água, nitrogênio. Esses fungos também protegem a planta contra ataques de insetos, fungos, bactérias e mamíferos (FISHER et al., 1984; STROBEL; LONG, 1998; LATCH, 1998). Fungo e planta convivem pacificamente, uma associação mutualística, uma vez que os endofíticos produzem compostos que ajudam no crescimento, proteção e permanência do hospedeiro no ambiente em que se encontram (LODGE et al., 1996).

Os microrganismos endofíticos mais encontrados são os fungos filamentosos e podem ser transmitido por gerações, podem ser transmitidos horizontalmente por esporos, mais comumente entre os endofíticos, ou verticalmente por sementes infectadas (ARNOLD et al. 2007; CLAY 1988).

Os estudos com microrganismos endofíticos se iniciaram no século XIX, sendo que, somente com Barry (1866) houve distinção entre patógeno e endofítico. Muito tempo depois, no final dos anos 70 os estudos foram retomados e despertaram interesse por sua importância econômica, uma vez que produzem diferentes substâncias bioativas denominadas metabólitos secundários (AZEVEDO et al., 2000).

3.2.3 Ocorrência de fungos endofíticos na família Arecaceae.

As pesquisas sobre fungos associados à família Arecaceae cresceram na década de 90, e desde então, apresenta uma grande diversidade de fungos incluindo espécies novas, entretanto esses estudos ainda são considerados escassos (HYDE et al., 2007).

No Brasil há poucos registros de fungos endofíticos em Arecaceae. O pesquisador Freire (2005) relata a ocorrência de várias espécies em *Copernicia prunifera* (Miller) H. E. Moore, conhecida popularmente no Ceará como carnaúba. O autor Rodrigues (1990), isolou fungos endofíticos da palmeira amazônica conhecida popularmente como açai (*Euterpe oleracea* Mart.). Mariano et al.,(1997) realizaram uma pesquisa comparativa entre a população endofítica e epifítica de *Cocos nucifera* L. em Pernambuco, Sergipe e Alagoas.

3.2.4 Fungo endofítico do gênero *Acremonium*

O gênero *Acremonium* é formado por 100 espécies distribuídas mundialmente em diversos nichos (KIRK et al., 2001; DOMSCH, 2007) (Figura 8). Fungos desse gênero são utilizados nos mais variados segmentos industriais. O *Acremonium zeae* é encontrado nos grãos de milho (*Zea mays*) e produz os antibióticos pirrocidina e cefalosporina C, combatendo o fungo *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*, que causam o apodrecimento dos grãos. (WICKLOW et al 2005; WEIL et al 1995). Já o *Acremonium tubakii* DSM12774 produz o antibiotico Peptaibol, conhecido como Chephaibol, que possui propriedades anti-helmíntica (SCHIELL et al., 2001).

Estudos recentes mostram que os fungos endofíticos do gênero *Acremonium* sp possuem ação antibacteriana frente patógenos humanos como *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, além de atividade antifúngica sobre *Trichophyton*. Produzem compostos como terpenóides, alcaloides, e ainda Leucinostatina A, que possui atividade antitumoral, incluindo células de melanoma e leucemia e antifúngica (STROBEL, 2006; TODARO, 2011).

Figura 8- *Acremonium* sp.

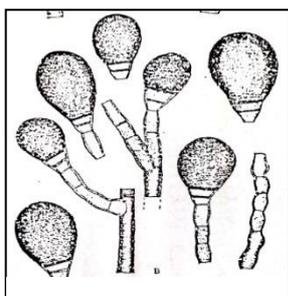


Fonte: LACAZ et al. (1998)

3.2.5 Fungo endofítico do gênero *Brachysporiella* sp

É um fungo pouco estudado, não há registros na literatura sobre seus metabólitos secundários bioativos (Figura 9).

Figura 9- *Brachysporiella* sp.

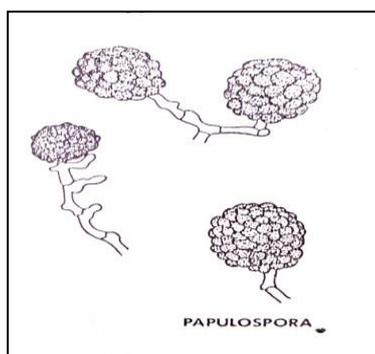


Fonte: LACAZ et al. (1998)

3.2.6 Fungo endofítico do gênero *Papulospora* sp

Fungos desse gênero apresentam a produção de moléculas bioativas. O fungo *Papulospora imersa*, isolado de *Smallanthus sonchifolius*, apresenta atividades antibacteriana, inibitória de enzimas dos parasitas *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania tarentolae*. Além de apresentar 90% de ação antitumoral frente a três linhagens tumorais humanas HCT-8 (côlon), MDA-MB435 (melanoma) e SF295 (glioblastoma) (BRAUN, 2008). Possui também ação antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rhizophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (RAMOS, 2010) (Figura 10).

Figura 10- *Papulospora* sp

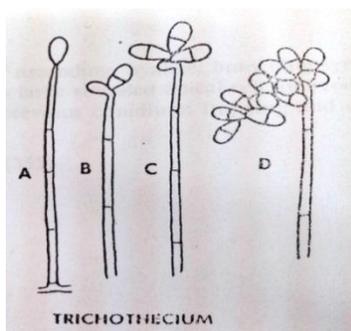


Fonte: LACAZ et al. (1998)

3.2.7 Fungo endofítico do gênero *Trichothecium* sp

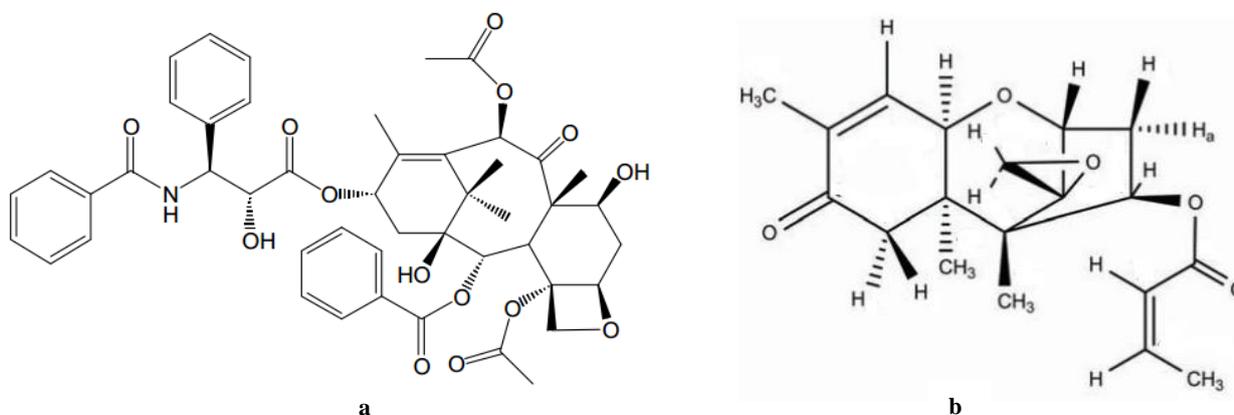
Estudos realizados por Shrestha et al. (2001) mostraram que fungos desse gênero (Figura 11), isolados da planta medicinal *Taxus wallichiana*, da região do Nepal, Índia, produzem paclitaxel (nome comercial do taxol, uma droga anticancerígena), dessa forma é uma alternativa de produção de taxol a partir de fungos. Outro composto produzido por esse fungo é a tricotecina uma micotoxina do tipo sesquiterpeno, que pertence ao grupo Trichothecene, e é um potente inibidor da síntese de proteínas, agente antifúngico e antimetastático contra carcinoma cervical humano (HeLa) e melanoma (B16-F10) (TAWARE et al., 2015) (Figura 12).

Figura 11- *Trichothecium* sp



Fonte: LACAZ et al. (1998)

Figura 12- Compostos produzidos por *Trichothecium* sp: a – Taxol, b- Tricotecina



Fonte: a- GUIMARÃES(2006); b- TAWARE et al. (2015)

3.3 Metabólitos dos fungos

Os fungos são utilizados em várias áreas industriais, pois produzem substâncias de uso comercial e biotecnológico, como a produção de álcoois, enzimas, vitaminas, polissacarídeos, lipídeos, polióis e ácidos orgânicos (DEMAIN, 1999).

Os metabólitos primários são moléculas produzidas ao longo do crescimento vegetativo, geralmente são álcoois (etanol), aminoácidos (glutamato monossódico, lisina, treonina, fenilalanina, triptofano), nucleotídeos flavorizantes (ácido 5-guanílico, ácido 5-inosínico), ácidos orgânicos (acético, propiônico, fumárico, láctico), polióis (glicerol, manitol, xilitol), polissacarídeos (xantana), açúcares (frutose, ribose) e vitaminas (riboflavina, cianocobalamina, biotina) muito utilizados industrialmente para os mais variados usos (DEMAIN, 2000; RAJASEKARAN et al., 2008).

Metabólitos secundários são substâncias frequentemente bioativas, são produzidas em resposta as condições ambientais, envolvidos na comunicação entre fungo e planta hospedeira (BÉRDY, 2005).

Os fungos endofíticos são metabolicamente mais ativos por causa de funções específicas na natureza na ativação de vias metabólicas necessárias a sobrevivência no tecido do hospedeiro. (STROBEL; DAISY, 2003; STROBEL, 2006; RIYAZ-UL-HASSAN et al., 2012; PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011). Essa síntese metabólitos secundários garantem ao fungo vantagens em *habitats* no qual este é ameaçado ou precisa competir com outros microrganismos, produzindo efeitos tóxicos ou inibitórios em outros organismos (KHALDI et al., 2010).

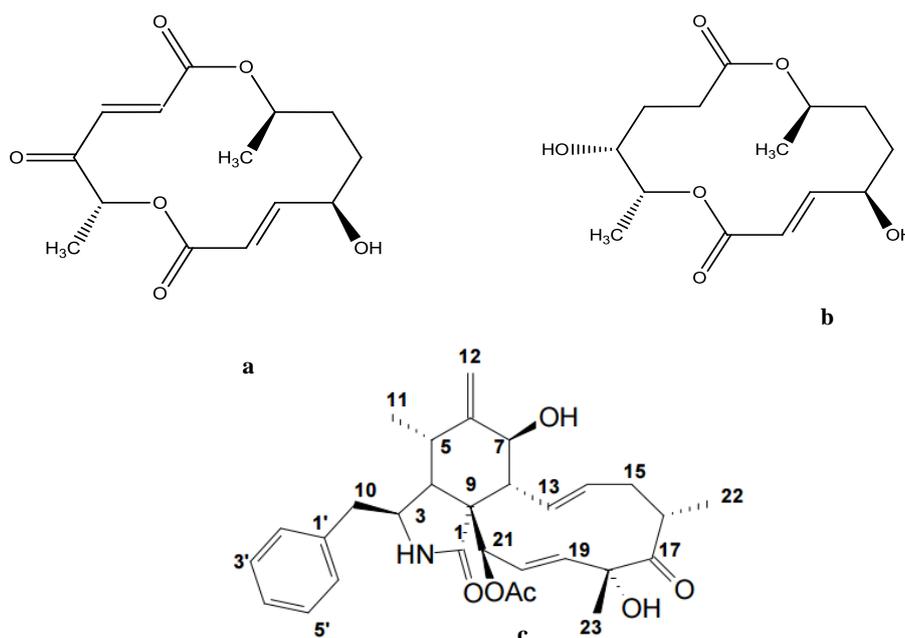
Por suas propriedades bioativas, vários metabólitos são utilizados como antibióticos, hipocolesterolemiantes, imunossupressores, além disso, pouquíssimos metabólitos secundários não apresentam atividade antibiótica (DEMAIN, 1999; SHWAB; KELLER, 2008). Os metabólitos secundários têm enorme potencial para serem usados na medicina, na agricultura e na indústria (STROBEL; DAISY, 2003; GUO et al., 2008). O fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, encontrado no interior da planta *Taxus brevifolia*, é capaz de produzir o taxol um agente antitumoral (STIERLE, STROBEL; STIERLE, 1993).

Os extratos isolados de metabólitos secundários de fungos endofíticos apresentam diversos grupos estruturais, os principais são: isocumarinas, xantonas, fenóis, furandionas, terpenóides, depsipeptídeos e citocalasinas (NEWMAN; CRAGG, 2012).

3.3.1 Metabólitos secundários de fungos endofíticos do gênero *Acremonium* sp

O gênero *Acremonium* sp é bastante conhecido pois são relatados cerca de 90 metabólitos secundários produzidos a partir de fungos desse gênero (ABDEL-LATEFF et al., 2002). Estudos de Nakai et al (2000) descobriu que o composto, UCS1025A, isolado de *Acremonium* sp KY4917, possui atividade antimicrobiana e antiproliferativa contra células tumorais humanas. A Citocalasina D, produzida por *Acremonium* sp isolado de *Senna spectabilis*, apresenta atividade anticolinesterásica (ZANARDI et al, 2006). Berg et al (2002) isolaram de *Acremonium* sp dois metabolitos: o acremonol e acremodiol, que possuem atividades antibacterianas. Outros metabolitos importantes são os antibióticos cefalosporina C (*Acremonium chrysogenum*) e ácido fusídico (*Acremonium fusidioides*). (MADIGAN et al., 2004).

Figura 13- Metabólitos secundários de *Acremonium* sp: a – acremonol, b- acremodiol e c - Citocalasina D



Fonte: a e b: BERG et al.(2002); c – AMARAL (2009)

Os metabolitos secundários do gênero *Acremonium* sp também são observados em lavouras como controle de pragas, o fungo endofítico *Acremonium zeae* encontrado nos grãos de milho (*Zea mays*) apresenta atividade antifúngica ao crescimento dos fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*, que causam o apodrecimento ambos causadores do apodrecimento dos grãos, essa atividade antifúngica ocorre pela produção de dois antibióticos

derivados de policetídeo, pirrocidinas A e B, e que também são ativos contra *Candida albicans* (WICKLOW et al., 2005; WICKLOW; POLING, 2009).

3.4 Ressonância Magnética Nuclear – RMN aplicada à identificação de compostos orgânicos.

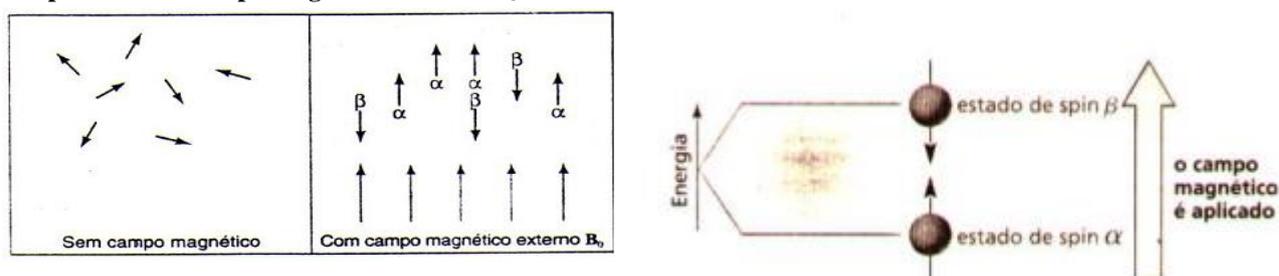
A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é um método espectroscópico muito utilizado para a identificação da estrutura química dos compostos orgânicos, que associada a outras técnicas de identificação, tais como Infravermelho e Ultravioleta, geralmente são suficientes para determinar a estrutura química de moléculas desconhecidas.

O spin é uma propriedade característica de alguns núcleos atômicos que possuem massa ímpar ou número atômico ímpar, ou ambos. Esses núcleos atômicos se encontram em rotação, gerando o momento angular de spin e o momento magnético. Nos núcleos atômicos que possuem massas atômicas e números atômicos pares, o número de spin é igual à zero, assim não apresentam propriedades magnéticas, dessa forma não são detectáveis por RMN como é o caso dos isótopos mais comuns, a exemplo do ^{16}O .

Os núcleos que tem essa característica tem comportamento específico de momento angular, que é capaz de gerar um momento magnético nuclear (μ), devido ao fato de que uma carga em movimento é capaz de gerar um campo magnético. Assim o momento magnético nuclear pode ser descrito em termos de número quântico de spin (I), que pode assumir valores inteiros ou semi-inteiros ($1/2, 1, 3/2, \dots$). O I determina o número de estados de spin permitidos, e dessa forma designa a quantidade de orientações que o núcleo assume diante da aplicação de um campo magnético externo, de acordo com a equação: $n = 2I + 1$, onde n = número de orientações possíveis e I = número quântico de spin (SILVERSTEIN, 2006; HARRIS, 1986; STRAUSS, 1968; MATTHEWS, 1986).

Na ausência de um campo nuclear magnético, os spins nucleares se orientam ao acaso. Quando um campo magnético externo B_0 é aplicado, os spins nucleares se dispõem em diferentes orientações, paralela (α) ou antiparalela (β) ao campo (Figura 14) (PAIVA, 2012).

Figura 14- Spins nucleares desorientados na ausência de um campo magnético e orientados quando expostos a um campo magnético externo B_0 .



Fonte: MARTINS (2004); BRUCE (2006)

A diferença de energia (ΔE) entre os estados de spin α e β é dependente a intensidade do campo aplicado, e pode ser calculado pela equação 1:

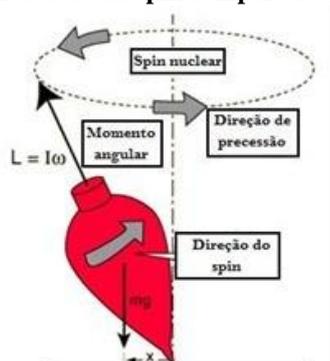
$$\text{Equação 1: } \Delta E = h\nu = -\left(\frac{h\gamma}{2\pi}\right) B_0.$$

Onde h corresponde a constante de Planck, que relaciona a diferença de energia à frequência ν , e γ é a razão giromagnética, uma constante que depende do momento magnético de cada núcleo (CLARIDGE, 2009; KEELER, 2002; SILVERSTEIN, 2005; BRUICE, 2006).

3.4.1 Absorção de energia e ressonância

Considere um núcleo com número de spin $I = 1/2$, quando o campo magnético é aplicado, somente duas orientações são possíveis, uma alinhada ao campo e outra contra campo. Essas orientações têm diferentes estados energéticos, que somente surgem quando o campo magnético é aplicado, dessa forma os hidrogênios absorvem energia e começam a mudar de direção. Esse fenômeno de precessão é semelhante ao pião que girando tende a cambalear ou mudar de direção por causa do campo gravitacional da terra (Figura 15). Com influência do campo magnético aplicado, o núcleo muda de direção sobre seu próprio eixo de rotação com frequência denominada de frequência de Larmor. (SILVERSTEIN, 2005, PAIVA, 2012).

Figura 15- Movimento de precessão do spin comparado ao movimento de um pião.



Fonte: Disponível em: <<http://pharmacyebooks.com/2010/09/relationship-spinning-top-nuclear-magnetic-resonance.html>>

Quando o núcleo está em precessão é gerado um campo oscilatório na mesma frequência, isso significa que, se ondas de radiofrequência forem aplicadas perpendicularmente, na mesma frequência do campo elétrico oscilatório gerado, dois campos podem se acoplar transferindo energia para o núcleo e gerando a mudança de spin, esse fenômeno é chamado de ressonância. Isto é, quando não existe um campo magnético externo

aplicado os estados de spins tem a mesma energia, são degenerados, quando aplica-se o campo magnético externo há energia e mudança de rotação para um estado mais estável que o outro, pois existe a interação entre o campo e o momento magnético do spin nuclear, dessa forma quando se aplica, perpendicularmente, um segundo campo magnético na região da radiofrequência, ocorrem às transições entre os níveis energéticos gerando assim a chamada ressonância magnética nuclear. (PAIVA, 2012).

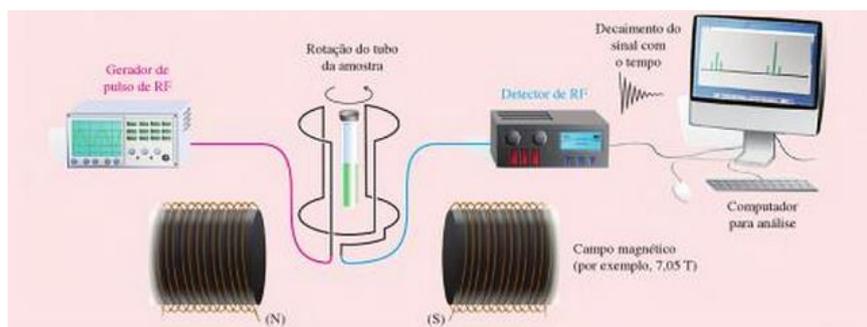
3.4.2 O espectro de Ressonância Magnética Nuclear

Para se obter o espectro de Ressonância Magnética Nuclear, um tubo contendo a amostra é inserido no equipamento, onde a mesma será exposta a um campo magnético, B_0 , para alinhar todos os núcleos das moléculas. Em seguida, são aplicados pulsos de radiofrequência (B_1) perpendiculares ao plano do campo B_0 , com duração na ordem de microssegundos (μ s) a milissegundos (ms). Supondo que B_1 seja aplicado na direção x, o campo oscilante nessa direção é equivalente à soma vetorial de dois vetores de igual amplitude, movendo-se em direções opostas no plano xy.

Por esse método pulsado, os núcleos são excitados em uma região de frequências por um ou mais pulsos. Assim, o campo B_1 , aplicado na forma de um pulso, ocasiona uma perturbação do sistema, mudando a direção de precessão da magnetização, pois núcleos em equilíbrio com a magnetização líquida em z, estão sob influência do campo B_0 , e quando esses núcleos absorvem energia, seus momentos magnéticos nucleares passam a precessar no plano xy.

Quando o pulso é cessado, o sistema tende a retornar à situação original de equilíbrio. Este retorno é denominado processo de relaxação, assim os núcleos perdem o excesso de energia e retornam às suas posições originais de equilíbrio. Esse decaimento da magnetização no plano xy que produz o sinal de RMN para retornar à sua posição de equilíbrio é exponencial e dá origem ao chamado sinal FID (Free Induction Decay). Os sinais do FID, que são detectados como uma função do tempo, contém as informações sobre acoplamento e deslocamento químico existentes em um espectro de RMN. Devido à existência de vários núcleos em uma amostra, são originados vários sinais de FID que se superpõem. Para facilitar o entendimento dessas informações e facilitar a interpretação do espectro, os sinais do FID são convertidos matematicamente para um domínio de frequências de ressonância, características de cada núcleo, pela transformada de Fourier. Assim a transformada de Fourier dos diferentes sinais de FID dá origem ao espectro de RMN (Figura 16) (CLARIDGE, 2009; NASCIMENTO JR., 2001; PAIVA, 2012; SILVERSTEIN, 2005).

Figura 16- Obtenção dos espectros de RMN



Fonte: VOLLHARD; SCHORE (2013)

3.4.3 Blindagem e Deslocamento químico

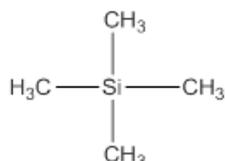
As absorções de um mesmo tipo de núcleo em uma molécula, em um espectro de RMN, nem sempre são iguais. Essa variação deve-se à vizinhança a qual o núcleo em questão está ligado, essa diferença de frequências é chamada de blindagem.

Quando um hidrogênio é submetido ao campo magnético aplicado os seus elétrons de valência começam a circular, gerando uma corrente diamagnética local, e um campo magnético chamado de campo induzido, que se opõe ao campo magnético aplicado B_0 . Com isso, o efeito de B_0 que o núcleo sente é minimizado, sendo este fenômeno denominado blindagem diamagnética ou anisotropia. O grau de blindagem depende do ambiente químico, a densidade eletrônica, ao qual o núcleo se encontra. Quanto maior for a densidade que rodeia o núcleo, maior será o efeito da blindagem. Quando se tem átomos muito eletronegativos na vizinhança esse efeito é diminuído e chamado de desblindagem. Por exemplo, na molécula do cloreto de etano, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Cl}$, os átomos de hidrogênios do grupo $-\text{CH}_3$ encontram-se mais distantes do átomo de cloro, devido a isso a densidade eletrônica perto do grupo é maior e por tanto estão mais blindados em relação aos átomos de hidrogênio do grupo $-\text{CH}_2$ que estão diretamente ligados ao átomo de cloro, que é um elemento eletronegativo que desloca a nuvem eletrônica para si, dessa forma os átomos de hidrogênio do grupo $-\text{CH}_2$ são chamados de desblindados. Quando um hidrogênio é blindado, requer uma indução magnética mais forte, deslocando a absorção para campos altos, enquanto os hidrogênios que são desblindados, requerem indução magnética mais baixa e deslocam a absorção para campos mais baixos.

Devido aos graus de blindagem ou desblindagem, os núcleos que estão em ambientes químicos diferentes apresentam diferentes frequências de absorção em relação ao núcleo-padrão de referência, geralmente o tetrametilsilano (TMS) (Figura 17), utilizado por ter

hidrogênios intensamente blindados, com deslocamento químico em 0 ppm. Essa diferença é denominada de deslocamento químico (δ). A ressonância dos hidrogênios é indicada em termo de deslocamento químico em Hertz, em relação aos hidrogênios do TMS.

Figura 17- Tetrametil-silano (TMS)



Fonte: Autora (2015)

Os valores do deslocamento químico (δ) são calculados em escala delta δ , conforme a equação 2 :

$$\text{Equação 2: } \delta = \frac{\text{Deslocamento em Hz}}{\text{Frequência do espectrometro em MHz}}$$

Quando os núcleos são mais blindados apresentam valores de δ menores, e encontram-se em campo alto, enquanto os mais desblindados apresentam valores de δ maiores.

Os hidrogênios que apresentam o mesmo deslocamento químico, dentro da mesma molécula, são quimicamente equivalentes, pois geram um único pico dentro do espectro de RMN. No TMS, todos os hidrogênios são iguais por simetria e dessa forma tem ressonância em um único valor de δ . Quando não ocorre essa equivalência os hidrogênios apresentam picos diferentes dependendo em qual ambiente químico se encontram (Figura 18).

Figura 18- Deslocamento químico dos tipos de hidrogênios mais conhecidos

Tipo de hidrogênio	Deslocamento químico aproximado (ppm)	Tipo de hidrogênio	Deslocamento químico aproximado (ppm)
$(\text{CH}_3)_4\text{Si}$	0		6.5-8
—CH_3	0.9		9.0-10
$\text{—CH}_2\text{—}$	1.3	I—CH—	2.5-4
—CH—	1.4	Br—CH—	2.5-4
—C=C—CH_3	1.7	RNH_2	Variável, 1.5-4
	2.1	ROH	Variável, 2-5
	2.3	ArOH	Variável, 4-7
$\text{—C}\equiv\text{C—H}$	2.4		Variável, 10-12
R—O—CH_3	3.3		Variável, 5-8
R—C=CH_2	4.7		
R—C=C—H	5.3		

Fonte: Autora (2015) - Adaptado de BRUICE (2006)

3.4.4 Acoplamento Spin-Spin

No espectro de RMN aparecem vários sinais que são originados das absorções, esses sinais se desdobram como pico único ou singlete (s), dubletos (d) e assim por diante (Figura 19). Isso ocorre pelo fenômeno de acoplamento spin-spin, que é gerado quando núcleos em diferentes ambientes eletrônicos estão próximos entre si, esse fenômeno pode ser descrito pela regra do $n + 1$, onde cada hidrogênio enxerga o número de hidrogênios (n) que são equivalentes no (s) átomo (s) de carbono (s) vizinho (s) gerando a multiplicidade em $(n+1)$ componentes.

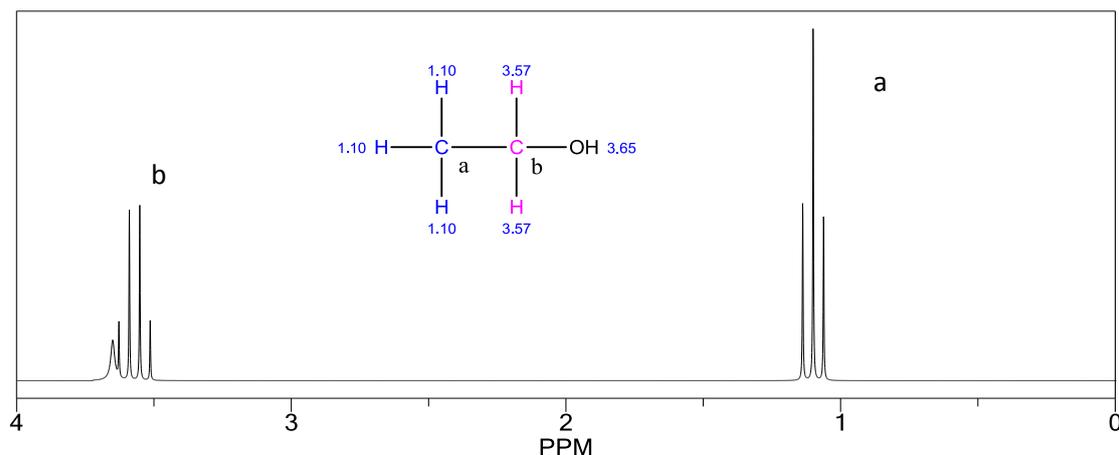
Figura 19 - Desdobramentos de spin-spin observado em grupos alquilas comuns

Desdobramento padrão de H_a	Estrutura	Desdobramento padrão de H_b
H_a tem um vizinho H_b : 2 picos ou dubleto		
H_a tem um vizinho H_b : 2 picos ou dubleto		
H_a tem dois vizinhos H_b : 3 picos ou tripleto		
H_a tem um vizinho H_b : 2 picos ou dubleto		
H_a tem dois vizinhos H_b : 3 picos ou tripleto		
H_a tem um vizinho H_b : 2 picos ou dubleto		
H_a tem seis vizinhos H_b : 7 picos ou septeto		

Nota: H_a e H_b não são equivalentes e não têm outros núcleos acoplados na sua vizinhança.

Fonte: VOLLHARD; SCHORE (2013)

Por exemplo, em um espectro de RMN do etanol é possível observar a presença de um tripleto (t) em 1,10 ppm, o que indica que os hidrogênios do carbono a, se acoplam com dois hidrogênios do carbono b, ou seja os hidrogênios do carbono a se “enxergam” como um só mas “enxergam” os hidrogênios do carbono b como dois diferentes, por isso é gerado o tripleto. De modo análogo os hidrogênios do carbono b “enxergam” três hidrogênios no carbono a gerando assim um quarteto (Figura 20).

Figura 20 - Espectro de RMN do etanol

Fonte: Autora (2015). Simulado no Programa ChemBioDraw Ultra 12.0.

A intensidade dos picos de um multipletto é variável, estando associada ao número de transições naquela determinada frequência de cada um dos picos observados. Por exemplo, os núcleos com $I = \frac{1}{2}$, tem a intensidade dos picos do multipletto obtida a partir do triângulo de Pascal (Figura 21), dispensando o cálculo dos números de transições associadas a cada um dos picos. Dessa forma, para um dupletto, por exemplo, a intensidade dos sinais será de 1:1; para um tripleto, de 1:2:1; para um quarteto, de 1:3:3:1; e assim por diante, segundo os valores expressos no triângulo de Pascal (NASCIMENTO JR., 2001).

Figura 21 - Triângulo de Pascal

Hidrogênios vizinhos equivalentes (N)	Número de picos ($N + 1$)	Nome para o padrão de picos (abreviação)	Razão de integração dos picos individuais
0	1	Singleto (s)	1
1	2	Dubleto (d)	1 : 1
2	3	Tripleto (t)	1 : 2 : 1
3	4	Quarteto (q)	1 : 3 : 3 : 1
4	5	Quinteto (quin)	1 : 4 : 6 : 4 : 1
5	6	Sexteto (sex)	1 : 5 : 10 : 10 : 5 : 1
6	7	Septeto (sep)	1 : 6 : 15 : 20 : 15 : 6 : 1

Fonte: VOLLHARD; SCHORE (2013)

A constante de acoplamento J , dada em unidades de frequência (Hz), é a medida da distancia entre os picos em um multipletto, e é uma medida da intensidade de como o núcleo é afetado pelos estados de spin do (s) seu (s) vizinho (s), assim quanto mais efetivo é o acoplamento maior é a constante de acoplamento.

A constante de acoplamento também serve para identificar os tipos de acoplamento no espectro, assim se um núcleo A faz acoplamento com o núcleo B e possui uma constante de acoplamento J_{AB} , a constante de acoplamento de B com A (J_{BA}) será igual a J_{AB} ($J_{AB} = J_{BA}$) (MORRISON, 1996).

3.4.5 Efeito Nuclear Overhauser (NOE)

Em experimentos de RMN é possível irradiar um núcleo de hidrogênio e assim observar sua interação com outros núcleos, com os quais estava acoplado. O NOE é um fenômeno de suma importância na espectroscopia por RMN, que utiliza dupla irradiação causando mudança na intensidade do sinal.

Esse efeito usa fonte adicional para irradiação de um núcleo em sua frequência de ressonância (ν_2) e adicionalmente, detecta o efeito dessa irradiação em um núcleo distinto através de um pulso (ν_1) (SILVERSTEIN, 2005).

Dessa forma, ocorre uma polarização provocada pela irradiação ν_2 , através do espaço, que leva ao aumento da população do nível mais alto de energia no hidrogênio vizinho não irradiado. O excesso de população passa por um processo de relaxação (T_1) a um nível de energia mais baixo, levando ao aumento da intensidade do(s) sinal(is) do(s) hidrogênio(s) próximos(s) (SILVERSTEIN, 2005).

3.4.6 Experimento NOESY-1D (Nuclear Overhauser effect spectroscopy One-dimensional)

Em experimentos de RMN- ^1H , os solventes normalmente têm concentrações mais elevadas (por exemplo, 55 M para água) do que os solutos (por exemplo, alguns mM para proteínas), dessa forma uma simples analogia pode ser utilizada para compreender essa diferença de concentrações: seria como uma tentativa de ver a luz de uma lanterna quando esta fosse ligada na frente do sol. Portanto, sem supressão do sinal do solvente, os intensos sinais referentes a átomos de ^1H do solvente, de outros compostos presentes, e de agentes tamponantes, frequentemente sobrecarregam a faixa dinâmica disponível do espectro, além de saturar o receptor de RMN. Enquanto os sinais adicionais são certamente indesejáveis, eles não podem ser considerados simplesmente como sendo "ruído", uma vez que não são aleatórios e podem até mesmo produzir informações biologicamente relevantes por meio de técnicas, tais como medidas de velocidade de trocas. Durante muito tempo a procura de um método eficiente, simples e fortemente capaz de levar a supressão do sinal do solvente impulsionou várias pesquisas e diferentes experimentos

foram propostos. O método mais adequado para a supressão do sinal da água, depende do tipo de amostra, do pH e do tamanho da molécula observada.

Estes processos podem variar a partir de um método que simplesmente produz a supressão adequada do sinal, para experimentos capazes de efetuar simultaneamente a supressão de sinais múltiplos, com sequências de pulsos complexos e com muitos parâmetros de RMN que necessitam de otimização detalhada. Um dos métodos de supressão de sinal é denominado NOESY-1D. Este experimento é amplamente utilizado para métodos baseados em estudos de metabolômica com utilização da RMN. A seleção desta sequência de pulsos é baseada em vários fatores. O primeiro fator é a capacidade de facilmente se obter a supressão do sinal da água. O segundo fator é a crescente utilização dessa sequência por grupos de pesquisa bem estabelecidos. O experimento NOESY - 1D frequentemente produz adequada supressão do sinal do solvente com pouca necessidade de otimização. Outro motivo para a seleção dessa técnica é a de que os requisitos físicos para a sequência de pulsos estão presentes nos modernos espectrômetros de RMN.

Existem três aspectos para o experimento NOESY-1D que se imagina poderem contribuir para a supressão do sinal do solvente. O primeiro é a discriminação/seleção do T_1 do soluto a partir do T_1 do solvente. O segundo aspecto é a seleção de sinais oriundos de uma região desejável da amostra. O terceiro mecanismo é a subtração de sinais indesejados através da ciclagem de fase, este último é complexo e envolve os métodos anteriores (ZHENG, 2010; CUPERLOVIC-CULF, 2012).

No primeiro aspecto do experimento NOESY-1D pode-se esperar que este siga a lógica da sequência WEFT - Water Eliminated Fourier Transform, onde se espera que o solvente e o soluto sejam invertidos por os dois primeiros pulsos de 90° de uma forma consistente. O equilíbrio ao longo de vários transientes (scans) pode ser alcançado e, dependendo do tempo de mistura e de características de relaxação, uma porção do solvente não seria observada, pois, aproximou-se do ponto zero do eixo Z, assim o sinal do solvente residual seria pequeno. Entretanto, não é isso que se observa no 1D-NOESY os sinais são devolvidos ao eixo +Z sobre execuções supletas da sequência de pulsos antes da leitura final, assim o T_1 é a discriminação ativa somente em metade dos transientes (scans) adquiridos.

O segundo aspecto é a seleção de sinais oriundos de uma região desejável da amostra, para qualquer método de seleção, o melhor seria ter intensidade de sinal completo em um lado do limite hipotético, e não na excitação o lado oposto. Entretanto isso não é possível, e um espaço de transição deve existir onde a excitação começaria a degradar e eventualmente, reduzir a zero. O conceito por trás de seleção de volume é que apenas sinais originários a

partir de porções desejadas da amostra (presumivelmente esses átomos ressonantes na área central das bobinas receptoras) sofrem os campos mais homogêneos e são gravadas (McKAY, 2011).

3.4.7 Metabolômica

Dentre as diversas estratégias para análise de misturas complexas que contém elevado número de metabólitos, destaca-se a metabolômica, que tem como objetivo a identificação e quantificação do metaboloma, que é o conjunto dos metabólitos primários e secundários, encontrados em células que participam de transformações químicas enzimaticamente controladas. Além disso, a análise do metaboloma pode fornecer informações relevantes para a compreensão das respostas bioquímicas a fatores externos, tais como estresse, nutrição e ataque por patógenos (LAST et al., 2007).

Para o estudo do metaboloma pode-se utilizar várias técnicas espectroscópicas, tais como espectroscopia no infravermelho, ultravioleta-visível ou ainda ressonância magnética nuclear (RMN), dentre outras. Entretanto há limitação desses métodos analíticos para obter o perfil do metaboloma, pois há elevado número de substâncias químicas diferentes, podem apresentar instabilidade, além de diferentes concentrações, assim a escolha do método analítico é extremamente relevante na metabolômica (MACHADO, 2014). A principal técnica utilizada para as análises metabolômicas é a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), pois esta se destaca por sua reprodutibilidade, curto tempo de análise e por sua excelente capacidade de identificação estrutural (NASCIMENTO, 2011).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material biológico

As folhas da macaúba [(*A. aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. 1763)] foram gentilmente cedidas pela professora Dra. Maria Helena Caño de Andrade coordenadora do Laboratório de Processos da Macaúba da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As coletas do material vegetal foram realizadas nos meses setembro e novembro de 2014 e março e abril de 2015.

O material microbiológico foi isolado das folhas da macaúba em meio sólido no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas – UFAL.

4.2 Meios de cultura

4.2.1 Meio Líquido preparado com Batata e Dextrose (BD)

Inicialmente 200g de batata inglesa, já descascadas e fatiadas, foram cozidas em 500mL de água destilada por 15 minutos em autoclave a 0,5 atm. Após a filtração, por duas vezes em coador de café comercial, foi adicionado 20g de dextrose (VERTEC, QUÍMICA FINA) ao caldo filtrado, completando-se com água destilada para o volume total de 1000 mL. Após a preparação do caldo, o mesmo foi distribuído em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL cada, em seguida foram vedados com papel alumínio e papel de filme e autoclavados por 15 minutos a 1 atm, para a esterilização do meio.

4.2.2 Meio líquido preparado com Batata e Dextrose - Difco®

Foram pesados 24g de do meio Batata e Dextrose - Difco®, que contém proteína de batata e dextrose, em seguida foi adicionada água destilada completando-se para o volume total de 1000 mL. Após a preparação do meio, o mesmo foi distribuído em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL cada, em seguida foram vedados com papel alumínio e papel de filme e autoclavados por 15 minutos a 1 atm, para a esterilização do meio.

4.2.3 Meio sólido preparado com Batata e Dextrose - Difco® e ágar

Foram pesados 24 g de do meio Difco®, que contém proteína de batata e dextrose, e 18g de ágar (VERTEC, QUÍMICA FINA), em seguida foi adicionada água destilada até o volume de 1000 mL, o caldo foi homogeneizado e autoclavado por 15 minutos a 1 atm Após a

preparação do caldo, o mesmo foi distribuído em placas de Petri 50 mL cada, em um total de 20 placas, após o resfriamento estas foram lacradas com papel filme e expostas a luz ultravioleta por 15 minutos, para esterilização.

4.3 Isolamento

Foram realizados quatro coletas das folhas de macaúba em diferentes épocas do ano, nos meses de setembro e novembro de 2014 e março e abril de 2015. As folhas foram lavadas com água corrente, esterilizadas em etanol a 70%, seguido de tratamento com solução de hipoclorito de sódio NaOCl a 4% e novamente lavadas em água destilada (DOBRANIC et al., 1995). Em seguida, com o auxílio de uma tesoura esterilizada, foram cortados quatro segmentos de 01 cm das folhas e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA - Difco.

O material biológico foi incubado a temperatura ambiente ($28^{\circ}\pm 1$) e observadas diariamente por quatro semanas. Conforme ocorria a formação dos micélios ao redor dos segmentos das folhas, estes eram transferidos para outras placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura. Em alguns cultivos ocorreu o aparecimento de uma bactéria, esta provavelmente endofítica, então procedeu-se a purificação dos isolados fúngicos, que foram transferidos para outras placas de Petri, contendo o meio sólido Difco[®], suplementado com o antibiótico amoxicilina (1g L^{-1}). Para o isolamento total do fungo de interesse, foram feitos vários repiques até a purificação total.

4.4 Identificação

O procedimento de identificação foi realizado em duas etapas, na primeira foram observadas características macroscópicas como coloração, diâmetro da colônia, textura e comparadas com a literatura (DOMSCH et al., 1980). A etapa seguinte foi realizar o microcultivo em lâminas (RIDELL, 1950), onde foram transferidos três segmentos do fungo a ser identificado e cobertos com lamínulas, sendo retiradas após o tempo de crescimento de cada fungo e posterior análise em microscópio óptico Nikon Eclipse E200, com auxílio de chaves taxonômicas padrão, que descrevem as características morfológicas microscópicas e macroscópicas pertencentes aos fungos.

4.5 Suspensão micelial e extração de metabolitos com acetato de etila (EtOAc)

O *Acremonium* sp foi cultivado em 20 (vinte) erlenmeyers contendo 100 mL de meio líquido de batata e dextrose (BD), dos quais 6 (seis) erlenmeyers foram separados para retiradas de alíquotas de 1 mL durante 08 (oito) semanas, afim de realizar o estudo de metabolômica do fungo. Os demais foram incubados a temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C}\pm 1$), na ausência de luz e em repouso. O cultivo foi conduzido até que a dextrose fosse consumida, totalizando 30 (trinta) dias. Em seguida, a massa micelial foi separada por filtração, passando-se duas vezes consecutivas em papel de filtro comercial, com o auxílio de uma bomba de vácuo. A massa micelial foi reservada e seca em estufa por 48 horas.

A fase líquida da cultura, agora denominada caldo de cultivo fermentado, foi submetida ao processo de extração líquido-líquido (método de fracionamento) na presença do solvente orgânico acetato de etila, na proporção 2:1, entre caldo da cultura e acetato de etila, respectivamente, durante 04 (quatro) semanas. Após a separação das fases, a fase orgânica foi posteriormente concentrada em evaporador rotatório a 50°C , até eliminação do solvente. O solvente utilizado nessa extração foi escolhido por sua polaridade e eficiência na extração de metabolitos secundários, tais como flavonoides, cumarinas, dentre outros.

O extrato bruto obtido (ACM) foi dissolvido em solução dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% para análises de atividade antibacteriana.

4.5.1 Preparação do extrato etanólico das folhas da macaúba

As folhas de macaúba utilizadas foram do plaqueamento de março de 2015, período de alta pluviosidade. As folhas foram secas a temperatura ambiente por duas semanas, trituradas e mantidas ao abrigo da luz (MATOS, 1988). Em seguida foram submetidas à extração com etanol P.A. utilizando-se a proporção de 700 mL /86 g entre solvente/soluto, à temperatura ambiente, por três semanas. A solução resultante após a filtração foi concentrada em evaporador rotatório a 40°C , até a consistência xaroposa e deixada em repouso até a secagem total do solvente. O extrato foi armazenado em frasco e conservado ao abrigo da luz, até a realização dos testes de Concentração Inibitória Mínima.

4.6 Preparação dos inóculos bacterianos

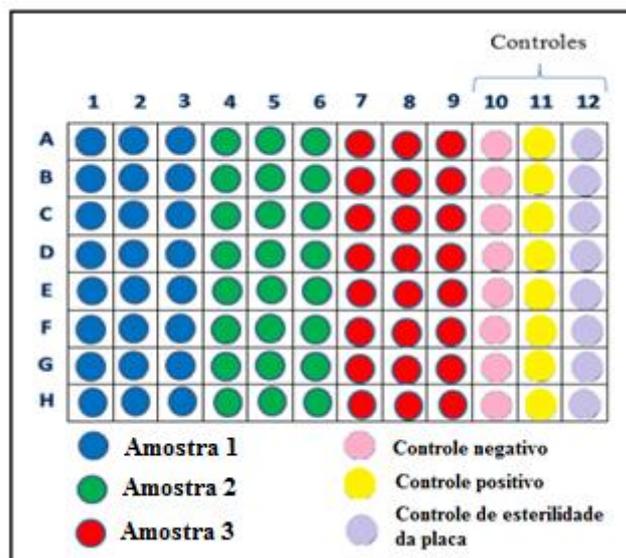
Os inóculos foram preparados utilizando as cepas de *Staphylococcus Aureus* (ATCC25923), *S. epidermidis* (ATCC14990), *Escherichia coli* (ATCC14942), *Salmonella*

entérica (ATCC14028), *Enterococcus faecalis* (ATTC29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATTC31488), *Pseudomonas aeruginosa* (ATTC27853), *Shigella flexneri* (ATTC12022) e *Enterobacter aerogenes* (ATTC13048), em Solução Salina Tamponada estéril e a suspensão bacteriana foi determinada a partir da turvação do tubo 0,5 da escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), diluída numa proporção de 1:10 obtendo assim uma diluição 10^7 UFC/mL, com concentração final de bactérias entre 5×10^5 UFC/mL e 5×10^4 UFC/poço.

4.7 Avaliação da atividade inibitória

Cerca de 2 mg da amostra foi solubilizado em 1 mL água estéril com DMSO a 10% onde obteve-se uma concentração estoque de 2000 $\mu\text{g/mL}$. Para os testes foram utilizadas microplacas de poliestireno estéreis com 8 linhas e 12 colunas, num total de 96 orifícios de fundo chato e com tampa (Figura 22). Da solução estoque, 200 μL de cada amostra foi colocado nos poços da primeira linha e nos demais orifícios foi colocado 100 μL de meio de infusão de cérebro e coração - BHI (duas vezes). Para se obter a concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foi transferido para a segunda linha 100 μL de cada amostra em 100 μL de BHI (duas vezes) e assim por diante até se obter a concentração final de $15,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada amostra. Feita a diluição seriada em triplicata, foi adicionado 20 μL do inóculo ($1,5 \times 10^6$ UFC) de cada bactéria utilizada nos ensaios. Como controle positivo, foram adicionados 20 μL de cada inóculo em 100 μL de BHI (2x) para controles de crescimento, para controle negativo 20 μL de DMSO a 10% e 20 μL de cada inóculo em 100 μL de BHI (2x) e para controle de esterilidade 100 μL de meio BHI (duas vezes). As placas foram incubadas, em estufa bacteriológica, por 24 horas a 35°C . Para leitura das placas foi adicionado em cada poço 20 μL (0,5%) de revelador cloreto de 2, 3, 5 trifeniltetrazolium (Sigma) em seguida as placas foram reincubadas por três horas. A coloração vermelha foi interpretada como ausência de inibição. Os testes foram realizados em triplicata para garantir a eficiência das análises e permitir que os dados fossem reprodutíveis. O objetivo desse teste é de definir a Concentração Inibitória Mínima, dos extratos que possuem atividade antimicrobiana. A metodologia seguida foi a descrita por Ayres e colaboradores (2008), com modificações. O teste de avaliação da atividade antimicrobiana foi gentilmente realizado no Laboratório de Tratamento de Feridas da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, sob orientação da Professora Dra. Lysete de Assis Bastos.

Figura 22 - Microplaca (contendo 96 micropoços) para técnica da Microdiluição em Caldo.



Fonte: Autora (2015) - Adaptado de GUIMARÃES (2013)

4.8 Metabolômica do Filtrado da Cultura

4.8.1 Tampão fosfato de Sódio 0,1M (pH = 7,4) com 1 mM de TSP

Adicionou-se 0,31 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 1,09 g de Na_2HPO_4 (anidro) em 100 mL de água destilada. O pH da solução final foi de 7,4. Ao tampão foi adicionado 1 mM (0,0172 g) de TSP. O tampão foi conservado em geladeira 4 °C.

4.8.2 Experimento de RMN-¹H

Para preparação das amostras e posterior análise espectroscópica, alíquotas de 1mL do caldo de cultivo fermentado foram centrifugadas a 7000 rpm, a 20°C, por 15 minutos. Posteriormente 350µL do mesmo foram transferidos para tubos específicos para RMN, com de 5 mm de diâmetro, adicionados 350µL de solução tampão fosfato de sódio (pH = 7,4, com TSP) juntamente com 50 D₂O µL. Para a realização da análise de RMN¹H foi utilizado o experimento NOESY-1D (sequência de pulsos noesypr1d) para supressão do sinal referente à água. A análise foi realizada em espectrômetro BRUKER UltraShield 400 MHz para núcleo de hidrogênio, a temperatura de 25 °C (CRISPIM, 2015). O Equipamento de RMN é pertencente ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, sob orientação do Professor Dr. Edson de Souza Bento.

Para todos os experimentos foram utilizados os seguintes parâmetros:

TD: 64K (número de pontos do espectro)

NS: 64 (número de pulsos)

SW: 13,0143 ppm (largura da janela)

RG: 256

O1P: 4,692 ppm (posição de irradiação para a supressão do sinal da água)

D1: 12,00 s (tempo de espera entre pulsos).

4.8.3 Análise

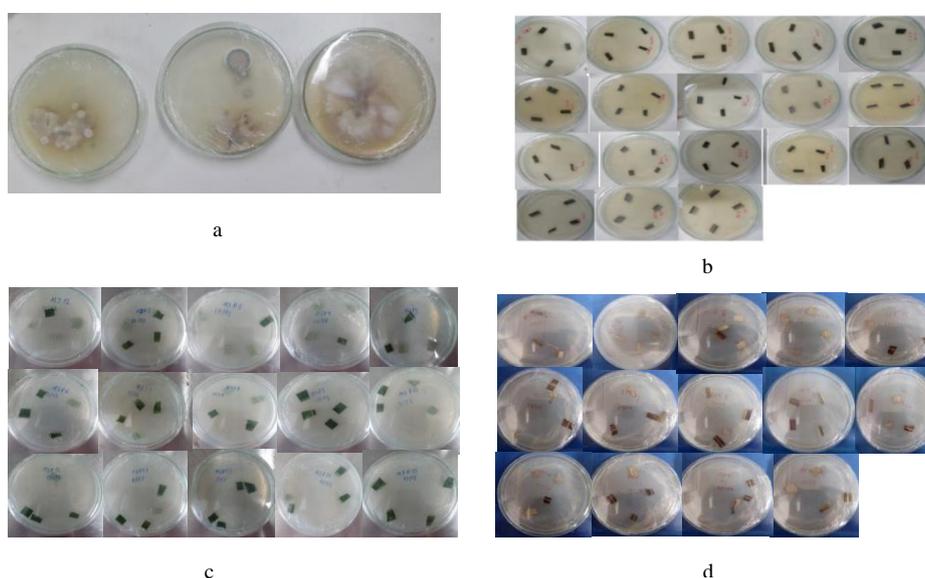
Os espectros obtidos foram inicialmente processados no software TopSpin[®], em seguida para identificação dos metabólitos utilizou-se o software Chenomx[®] e adicionalmente o banco de dados disponível em www.hmdb.ca.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento dos fungos endofíticos

Após o crescimento micelial em meio sólido, procedeu-se o isolamento do material microbiológico por vários repiques até o isolamento de um único microrganismo fúngico. Como resultado, obtivemos 04 (quatro) fungos isolados: *Acremonium* sp, *Brachysporiella* sp, *Papulospora* sp e *Trichothecium* sp (Figura 23).

Figura 23 - Plaqueamentos: a- setembro/2014, b - dezembro/2014 e c- março/2015 d - abril/2015.



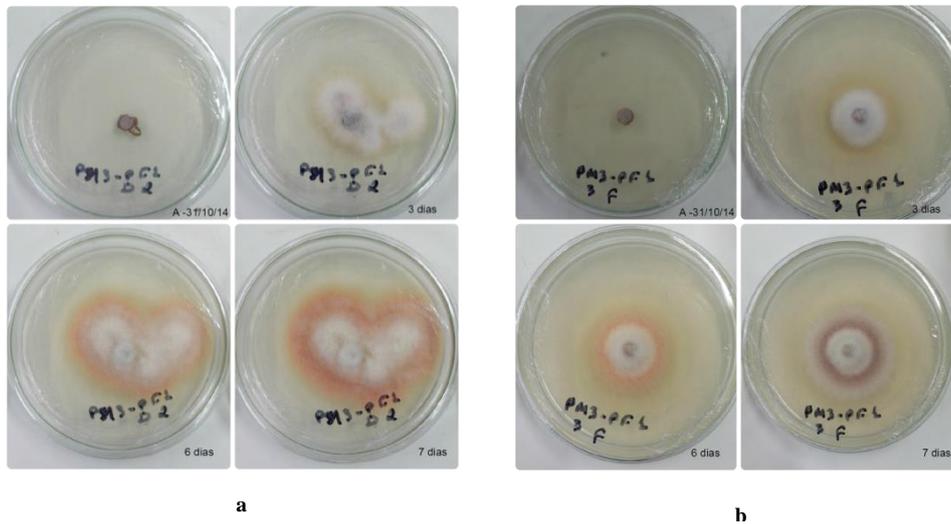
Fonte: Autora (2015)

5.1.1 Isolamento e identificação do fungo endofítico *Acremonium* sp

Dos quatro plaqueamentos realizados, o *Acremonium* sp foi encontrado em três, sendo o primeiro (setembro/2014) das folhas já infectadas com o patógeno, e nos demais (dezembro/2014 e abril/2015) com as folhas jovens e vistosas e devidamente esterilizadas. Foi observado que este fungo apresenta 75% de ocorrência, estando presente durante o tempo chuvoso e seco. O fungo isolado foi incubado a 28°C por 07 (sete) dias para o isolamento de colônias monospóricas e posterior identificação a nível molecular, e para a produção de metabolitos secundários com o objetivo de avaliar o potencial biotecnológico do endofítico. Observou-se que o crescimento micelial é rápido e homogêneo, com 03 (três) dias o fungo

começa a apresentar a coloração laranja ou roxa nas bordas e branco no centro, com 07 (sete) dias a coloração é mais intensa (Figura 24).

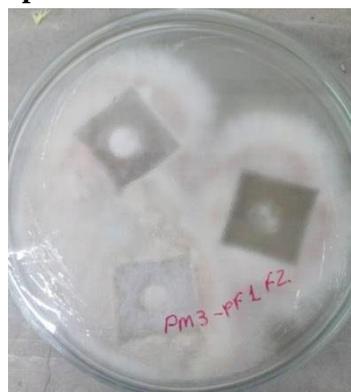
Figura 24 - *Acremonium* sp : a – Coloração laranja e b – coloração roxa.



Fonte: Autora (2015)

Para a identificação procedeu-se o cultivo do *Acremonium* sp conforme recomendado na literatura (RIDELL, 1950), e as lamínulas foram retiradas em um esquema de 48 h, 96 h e 144h, respectivamente. Através das chaves taxonômicas da literatura especializada foi possível a identificação genérica do fungo, como pertencendo ao gênero *Acremonium* (Figuras 25 e 26) (MULLER; ARX, 1962).

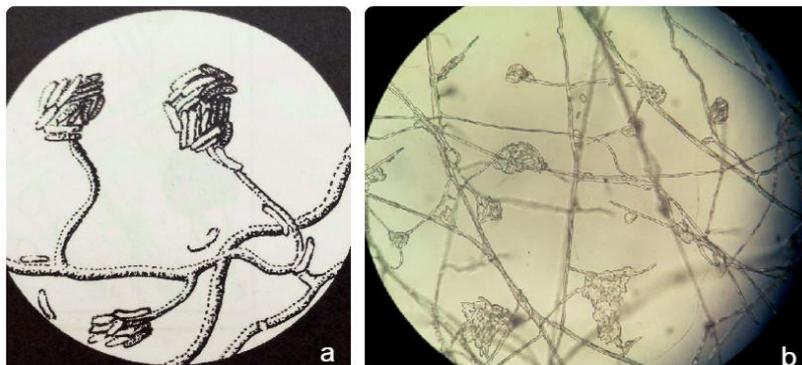
Figura 25 - *Acremonium* sp em placa de microcultivo com sete dias.



Fonte: Autora (2015)

Analisando as características morfológicas microscópicas, o fungo apresenta hifas longas e com septos longos e lisos, conídios em forma de cabeça, características presentes em fungos do tipo *Acremonium* sp (Figura 26).

Figura 26 - *Acremonium* sp: a – chave da literatura, b – lâmina com 7 dias. Observado com objetiva de 40x

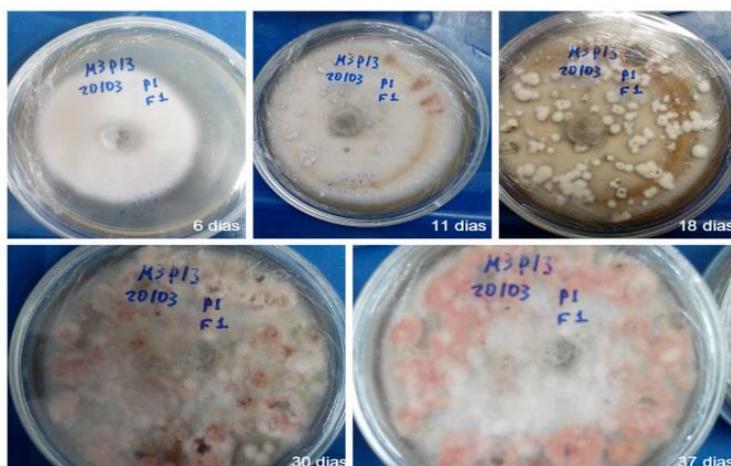


Fonte: a – LACAZ et al (1998); b Autora (2015)

5.1.2 Isolamento e identificação do fungo endofítico *Brachysporiella* sp

Dentre os quatro plaqueamentos realizados, o *Brachysporiella* sp foi encontrado somente no plaqueamento de março de 2015, ocorrendo em menor abundância, somente na época chuvosa. O fungo isolado foi incubado a 28° C por 34 (trinta e quatro) dias para o isolamento de colônias monospóricas e posterior identificação a nível molecular. O crescimento é rápido, inicialmente apresenta coloração branca, após 11 (onze) dias é possível observar um círculo rosa e a formação de pequenas esferas brancas de textura algodonosa, após 18 dias as esferas são maiores e começam a apresentar a coloração rosa claro, após 30 (trinta) dias as esferas estão mais rosadas e surgem outras menores e brancas. Com 37 (trinta e sete) dias a placa está totalmente rosa escuro. (Figura 27).

Figura 27- Colônia de *Brachysporiella* sp com diferentes dias de cultivo

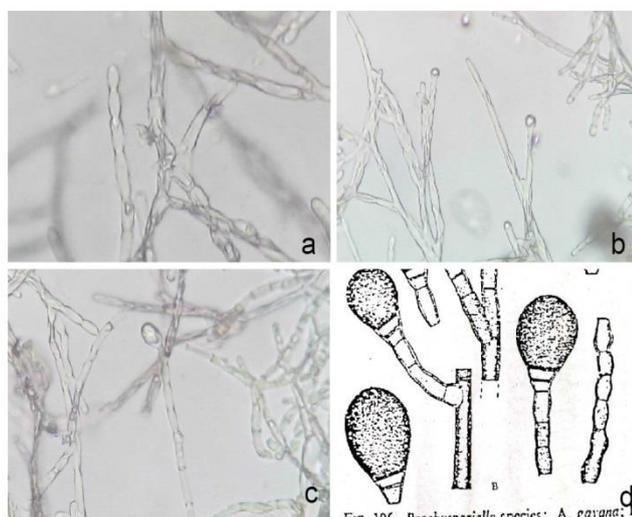


Fonte: Autora (2015)

Para a identificação procedeu-se o cultivo do *Brachysporiella* sp conforme recomendado na literatura (RIDELL, 1950) e as lamínulas foram retiradas em períodos distintos, após uma, duas e três semanas, respectivamente. Através das chaves taxonômicas da literatura especializada foi possível a identificação genérica do fungo, como pertencendo ao gênero *Brachysporiella* (Figura 28) (MULLER; ARX, 1962).

Analisando das características morfológicas microscópicas, o fungo apresenta hifas curtas e septadas, conídios em forma de cabeça, com aspecto maciço, características presentes em fungos do tipo *Brachysporiella* sp (Figura 28).

Figura 28 - *Brachysporiella* sp: a – hifa com septos curtos cinco dias, b- conídios imaturos com 18 dias, c- conídios com 30 dias, d – chave da literatura. Observado com objetiva de 40x

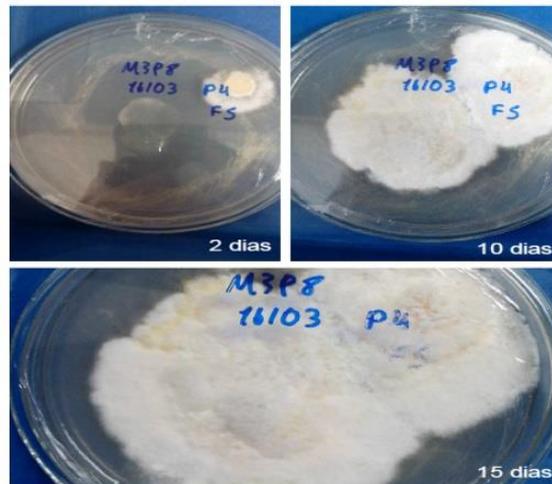


Fonte: a,b,c Fonte: Autora (2015); d: LACAZ et al (1998)

5.1.3 Isolamento e identificação do fungo endofítico *Papulospora* sp

Dos quatro plaqueamentos realizados, *Papulospora* sp foi encontrado somente no plaqueamento de março de 2015, ocorrendo em menor abundância, somente na época chuvosa. O fungo isolado foi incubado a 28°C por 30 (trinta) dias para o isolamento de colônias monospóricas e posterior identificação a nível molecular. O crescimento micelial é rápido, após 02 (dois) dias apresenta coloração branca, após 10 (dez) dias a coloração é branca amarelada, com 15 (quinze) dias é possível observar que a coloração amarela é mais intensa (Figura 29).

Figura 29 - Colônia de *Papulospora* sp com diferentes dias de cultivo

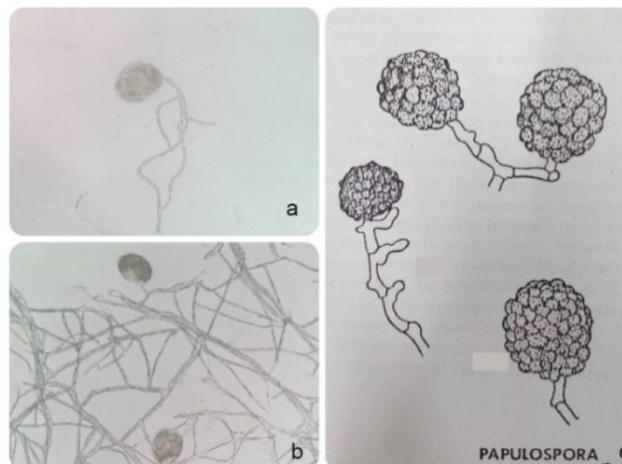


Fonte: Autora (2015)

Para a identificação procedeu-se o cultivo do *Papulospora* sp, conforme recomendado na literatura (RIDELL, 1950) e as lamínulas foram retiradas em períodos distintos, após uma, duas e três semanas, respectivamente. Através das chaves taxonômicas da literatura especializada foi possível a identificação genérica do fungo, como pertencendo ao gênero *Papulospora* (Figura 30) (MULLER; ARX, 1962).

Analisando das características morfológicas microscópicas, o fungo apresenta hifas com septos curtos, conídios em forma de círculos de aspecto maciço, características presentes em fungos do tipo *Papulospora*. (Figura 30).

Figura 30- Colônia de *Papulospora* sp: a – hifa com septos curtos 10 dias, b- conídios imaturos com 15 dias, c – chave da literatura. Observado com objetiva de 40x

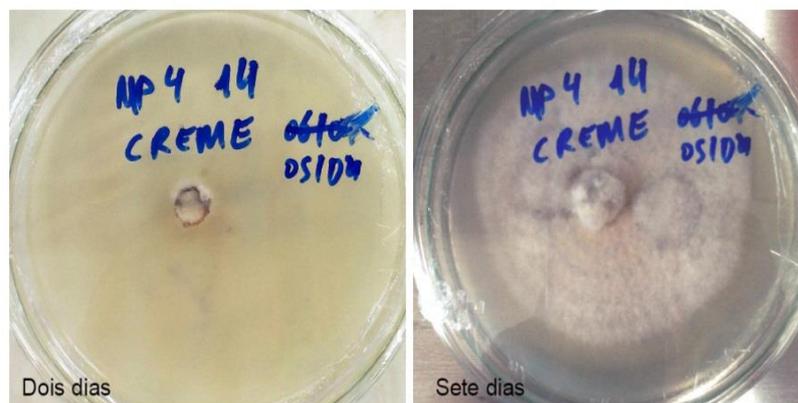


Fonte: a,b - Autora (2015); c- LACAZ et al (1998)

5.1.4 Isolamento e identificação do fungo endofítico do gênero *Trichothecium* sp

Dos quatro plaqueamentos realizados, o *Trichothecium* sp foi encontrado somente no plaqueamento de abril de 2015, ocorrendo em menor abundância, somente na época chuvosa. O fungo isolado foi incubado a 28°C por 30 (trinta) dias, para o isolamento de colônias monospóricas e posterior identificação a nível molecular, e para a produção de metabólitos secundários com o objetivo de avaliar o potencial biotecnológico do endofítico. Observou-se que o crescimento micelial é rápido e homogêneo, após 02 (dois) dias o fungo começa a apresentar a coloração branca de aspecto ondulado e após 07 (sete) dias apresenta coloração creme, levemente rosa (Figura 31).

Figura 31- *Trichothecium* sp com diferentes dias de cultivo

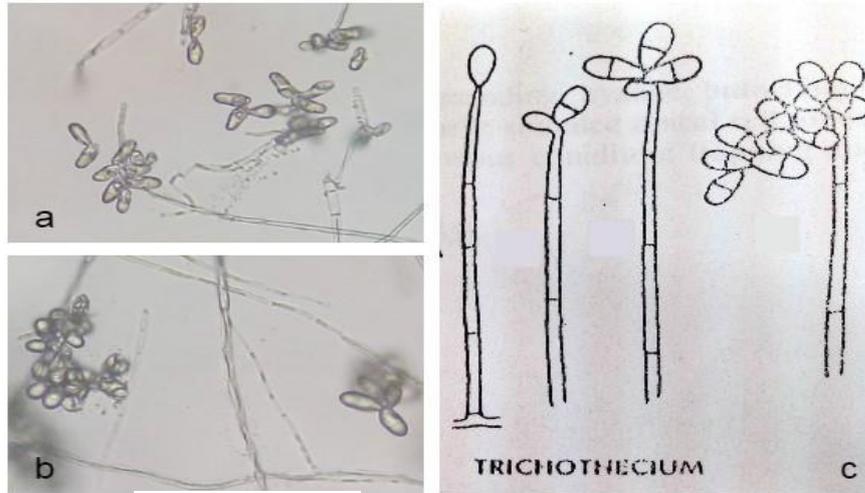


Fonte: Autora (2015)

Para a identificação procedeu-se o cultivo do *Trichothecium* sp conforme recomendado na literatura (RIDEIL, 1950), as lamínulas foram retiradas em períodos distintos, após de uma, duas e três semanas, respectivamente. Através das chaves taxonômicas da literatura especializada foi possível a identificação genérica do fungo, como pertencendo ao gênero *Trichothecium* (Figura 32) (MULLER; ARX, 1962).

Através da análise microscópica e comparação com a chave da literatura, foi possível confirmar que o fungo era o *Trichothecium* sp, por apresentar características tais como: hifas com septos curtos, conídios em forma de bastão com um septo (Figura 32).

Figura 32 - *Trichothecium* sp: a –conídios em forma de bastão com 3 dias, b- conídios maduros e septados com 25 dias, c – chave da literatura. Observado com objetiva de 40x.



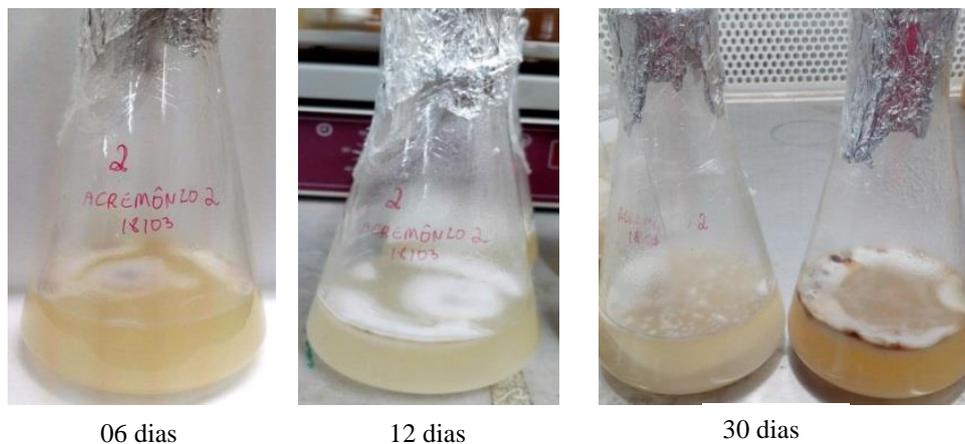
Fonte: a,b - Autora (2015); c- LACAZ et al (1998)

5.2 Extração de metabólitos

Em meio líquido, *Acremonium* sp apresentou crescimento rápido e homogêneo, principalmente em meio de cultura Batata-Dextrose (BD), em comparação ao meio comercial Batata-Dextrose Difco®, pois este pode oxidar com o tempo, inviabilizando seu uso (Figura 33). Em meio BD, o fungo produziu grande quantidade de pigmento laranja durante seu crescimento, permanecendo intenso após 30 (trinta) dias de cultivo. Após 05 (cinco) dias de incubação, foi possível observar o crescimento dos micélios, de coloração branca. Com 07 (sete) dias, a coloração dos micélios começa a ficar alaranjada, formando pequenos círculos de coloração vermelha no centro e com bordas brancas. Também surgem gotículas de coloração vermelho intenso, que pode ser algum metabólito volátil. Estes círculos em seguida passam a ter a coloração verde e as gotículas evaporam. (Figuras 34 e 35). O caldo de cultivo fermentado tem odor semelhante ao solvente acetato de etila.

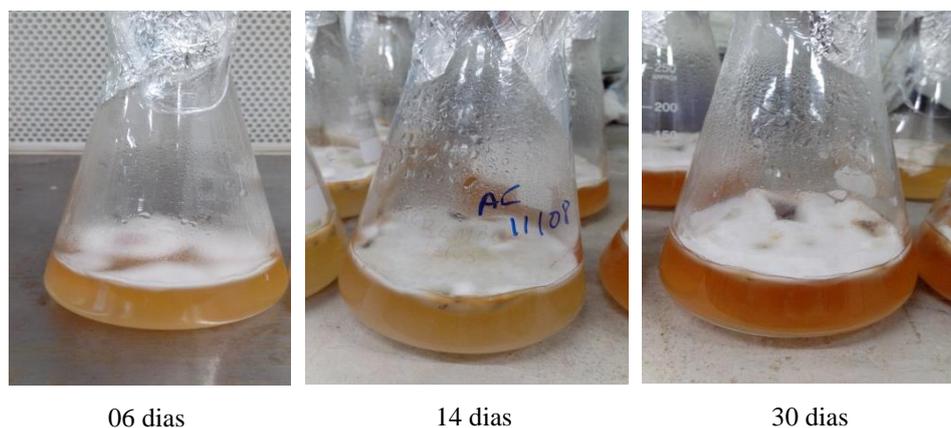
Com a retirada das alíquotas, os micélios crescem mais rapidamente, enquanto que o fechado não apresenta essa evolução. Percebe-se assim que oxigenação é de fundamental importância, pois proporciona maior produtividade de biomassa (Figura 36).

Figura 33 - Crescimento do *Acremonium sp* em meio líquido Batata-Dextrose (BD) Difco ® com diferentes dias de cultivo



Fonte: Autora (2015)

Figura 34 - Crescimento do *Acremonium sp* em meio líquido (BD) com diferentes dias de cultivo



Fonte: Autora (2015)

Figura 35 - Crescimento do *Acremonium sp* em meio líquido (BD) apresentando diferentes colorações, com 14 dias



Fonte: Autora (2015)

Figura 36 - Crescimento do *Acremonium sp* em meio líquido (BD): a – com 30 (trinta) dias, b – cultivo utilizado para retirar as alíquotas, com 30 (trinta) dias



Fonte: Autora (2015)

a

b

Completado o período de incubação em meio BD, o caldo foi desagregado do micélio através de filtração e submetido à partição líquido-líquido com solvente orgânico acetato de etila em uma proporção 2:1 por três vezes. Logo após o solvente orgânico foi evaporado e forneceu 0,280 g de extrato bruto (ACF) (Figura 37). Adicionalmente o processo foi realizado com o meio Difco, que apenas forneceu 0,065 g de extrato. Assim, com excelente rendimento em meio BD, seu extrato foi utilizado para os testes de atividade inibitória.

Figura 37- a – Partição líquido-líquido com acetato de etila, b- extrato bruto



a



b

Fonte: Autora (2015)

5.2.1 Extrato etanólico da folha da macaúba

Após a extração com etanol P. A. a solução resultante foi filtrada e concentrada em até a consistência xaroposa, após a evaporação solvente foram obtidos 5,2 gramas (Figura 38). O

extrato foi armazenado em frasco e conservado ao abrigo da luz, até a realização dos testes de Concentração Inibitória Mínima.

Figura 38 - a –Extração com etanol, b- extrato bruto xaroposo, c – extrato bruto seco.



a

b

c

Fonte: Autora (2015)

5.3 Avaliação da atividade inibitória

O critério para classificação da atividade antimicrobiana foi determinado, segundo metodologia proposta por AYRES (2008) onde: Concentração Inibitória Mínima (CIM) com bom potencial inibitório atividade em concentrações de até 100 $\mu\text{g/mL}$, atividade inibitória moderada de 100-500 $\mu\text{g/mL}$, atividade fraca de 500-1000 $\mu\text{g/mL}$ e inativos maiores que 1000 $\mu\text{g/mL}$. Para leitura das placas foi adicionado em cada poço 20 μL (0,5%) de revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolium (Sigma). A coloração vermelha foi interpretada como ausência de inibição. (Figura 39).

Os ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro* (Figura 37), mostraram que o extrato do caldo de cultivo fermentado (ACF) do *Acremonium* sp, apresenta atividade moderada contra bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (500 $\mu\text{g/mL}$) e *Staphylococcus epidermides* (250 $\mu\text{g/mL}$) e Gram-negativa *Salmonela enterica* (125 $\mu\text{g/mL}$) e atividade fraca para a Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (1000 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 2).

Tabela 2- Atividade antimicrobiana do extrato do caldo fermentado de *Acremonium* sp.

Concentração Inibitória Mínima - CIM	
Bactérias patogênicas	Concentração
Gram-positivas	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)	500 µg/mL
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC14990)	250 µg/mL
Gram-negativas	
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATTC29212)	NI
<i>Escherichia coli</i> (ATCC14942)	NI
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATTC31488)	NI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATTC27853)	1000 µg/mL
<i>Salmonela enterica</i> (ATCC14028)	125 µg/mL
<i>Shigella flexneri</i> (ATTC12022)	NI
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATTC13048)	NI

*NI – Não Inibiu

Fonte: Autora (2015)

As atividades inibitórias moderadas sobre as cepas de *Staphylococcus aureus* e *epidermidis*, importantes patógenos relacionados com a ocorrência de endocardites, bacteremias, sepse, bem como outras graves infecções envolvidas com dispositivos médicos implantados tais como cateteres e próteses (KONEMAN et al., 1999; MARANGONI, 1997), e também contra *Salmonela enterica*, que causa enterites, são estimulantes para a continuação do estudo das frações deste extrato, na perspectiva de que se possa revelar uma possível ação antimicrobiana para outros tipos de bactérias.

Estudos adicionais foram realizados com o extrato etanólico bruto das folhas da macaúba (FM), entretanto atividades foram fracamente inibitórias para a Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (1000 µg/mL) e Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (1000 µg/mL) (Tabela 3).

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas da macaúba

Concentração Inibitória Mínima - CIM	
Bactérias patogênicas	Concentração
Gram-positivas	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)	1000 µg/mL
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC14990)	NI
Gram-negativas	
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATTC29212)	NI
<i>Escherichia coli</i> (ATCC14942)	NI
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATTC31488)	NI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATTC27853)	1000 µg/mL
<i>Salmonela enterica</i> (ATCC14028)	NI
<i>Shigella flexneri</i> (ATTC12022)	NC
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATTC13048)	NC

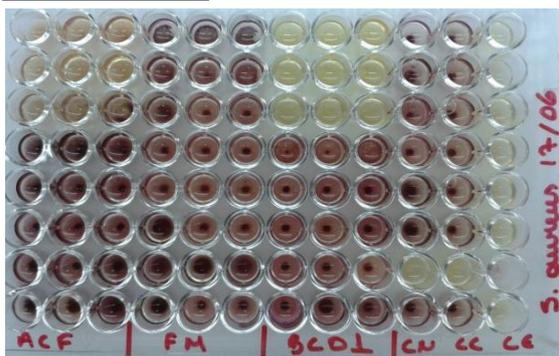
*NI- Não inibiu; NC – Não cresceu.

Fonte: Autora (2015)

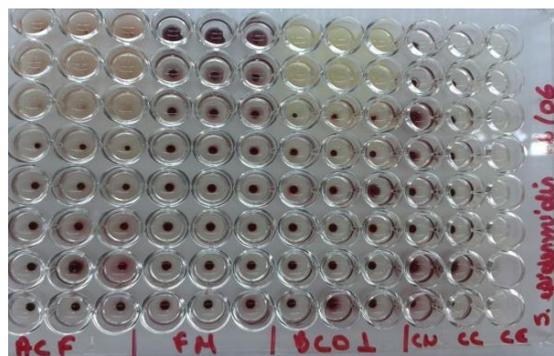
A baixa ou mesmo ausente atividade inibitória do extrato etanólico das folhas da macaúba sobre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, talvez esteja relacionada com a elevada concentração de clorofila no extrato, que pode ter mascarado a atividade antibacteriana, pois as substâncias potencialmente ativas podem estar em concentrações muito baixas.

Figura 39 - Placas CIM – a: Gram-positivas; b - Gram-negativas.

a: Gram-positivas

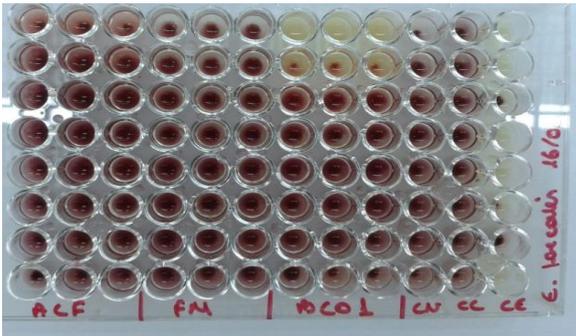


Staphylococcus aureus (ATCC25923)

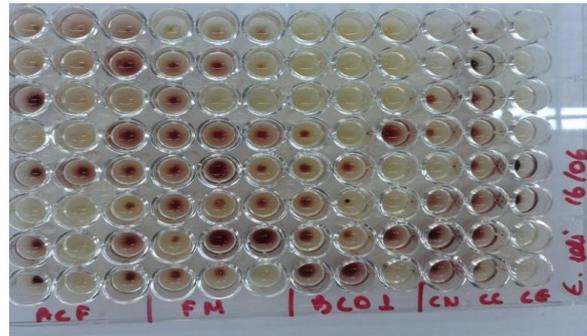


Staphylococcus epidermidis (ATCC14990)

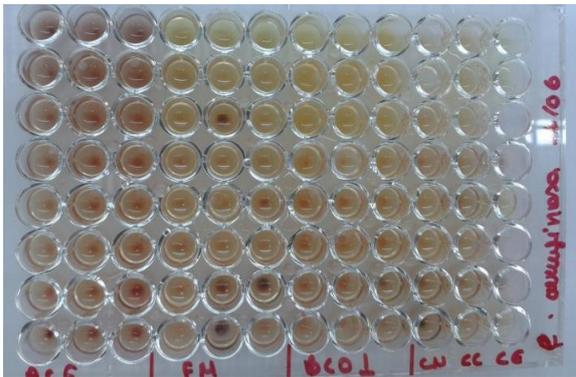
b- Gram-negativas



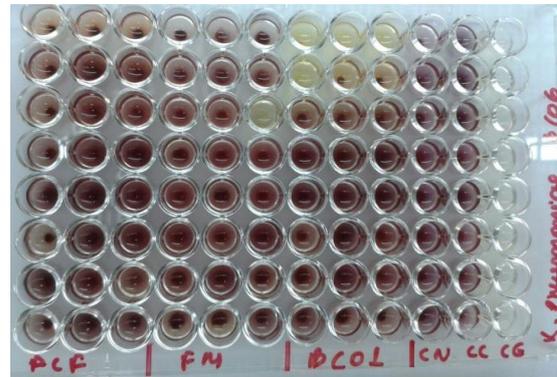
Enterococcus faecalis (ATTC29212)



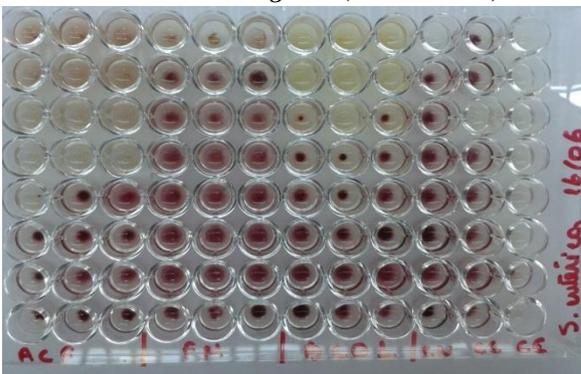
Escherichia coli (ATCC14942)



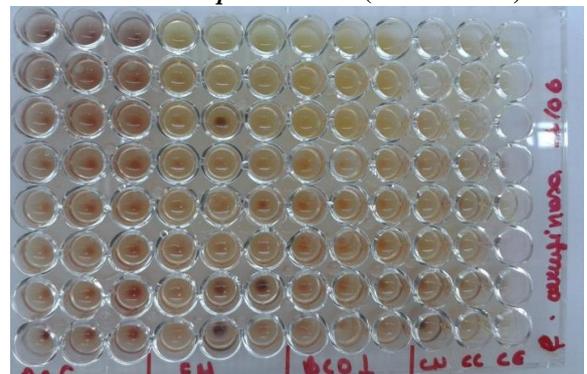
Enterobacter aerogenes (ATTC13048)



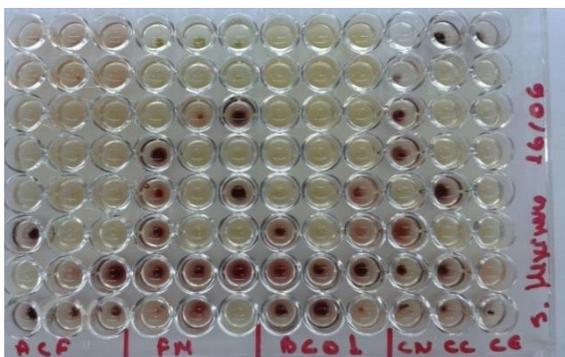
Klebsiella pneumoniae (ATTC31488)



Salmonella enterica (ATCC14028)



Pseudomonas aeruginosa (ATTC27853)



Shigella flexneri (ATTC12022)

Esses resultados mostram a importância dos fungos endofíticos da macaúba, por produzirem substâncias mais eficazes contra patógenos humanos do que o extrato etanólico bruto da própria folha. Adicionalmente, o extrato do caldo de cultivo fermentado (ACF) do *Acremonium* sp, tem potencial para ser utilizado como alternativa para o combate das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e Gram-negativa *Salmonella enterica* e a Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*.

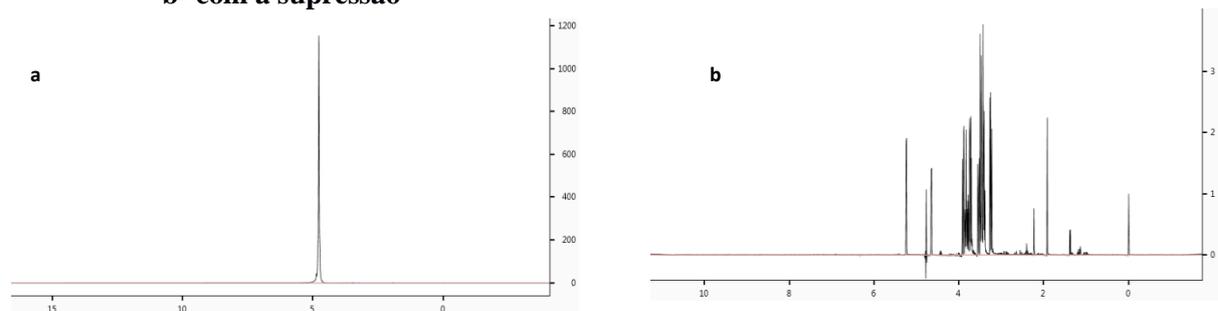
A descoberta de plantas endêmicas e de fungos endofíticos com reconhecido potencial terapêutico tem sido aplicada pelas comunidades tradicionais com resultados satisfatórios, entretanto é necessário estudo em busca do isolamento, da purificação e da identificação de novos compostos químicos (HOSTETTMANN et al., 2003). A automedicação e o uso excessivo de antibióticos acarretam a seleção de cepas de bactérias resistentes, assim existe a constante busca de novos medicamentos. Pesquisas têm demonstrado que fungos endofíticos podem sintetizar produtos bioativos potencialmente úteis para a medicina (STROBEL, 2003).

5.4 Análise Metabolômica

Ao longo de oito semanas, as alíquotas retiradas foram preparadas e analisadas por RMN¹H (Bruker 400MHz para núcleo de hidrogênio, NOESY). O procedimento foi realizado com o meio de cultura estéril, que não apresenta as estruturas encontradas, confirmando assim que são provenientes do metabolismo fúngico.

Os espectros obtidos foram processados com o emprego do programa TopSpin®, em seguida analisados com o uso do programa Chenomx® e comparados com banco de dados da literatura. Para visualização do espectro, foi necessário fazer a supressão do sinal da água, através do experimento *noesypr1d*, pois os sinais referentes à amostra apresentaram intensidades inferiores em comparação com o sinal da água, tornando-se impossível visualizá-los sem a supressão (Figura 40).

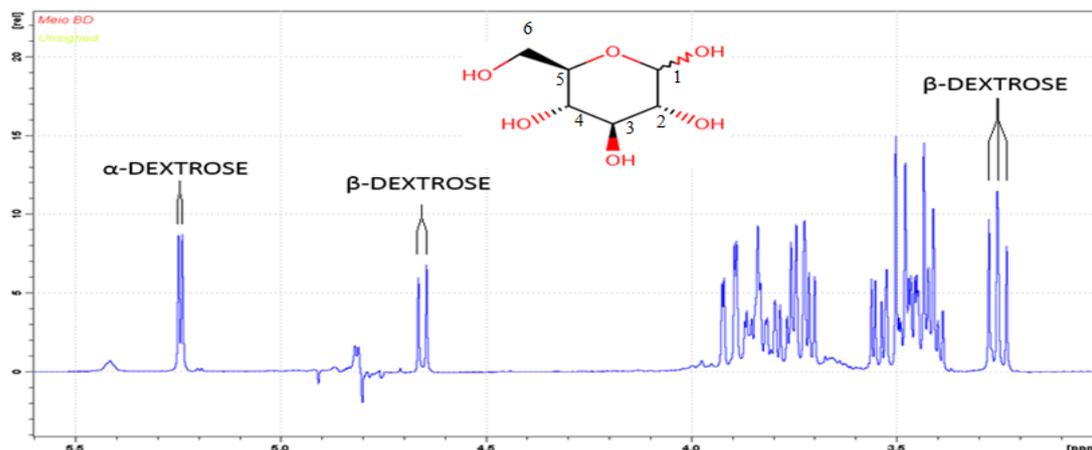
Figura 40 - Espectro de RMN-¹H do meio de cultivo estéril: a – sem supressão do sinal da água e b- com a supressão



Fonte: Autora (2015)

Com a análise do meio de cultura estéril, sem a presença do fungo, foram identificados os sinais característicos dos hidrogênios anoméricos da α -dextrose em 5,24 ppm e da β -dextrose em 4,65 ppm, como descrito na figura 41.

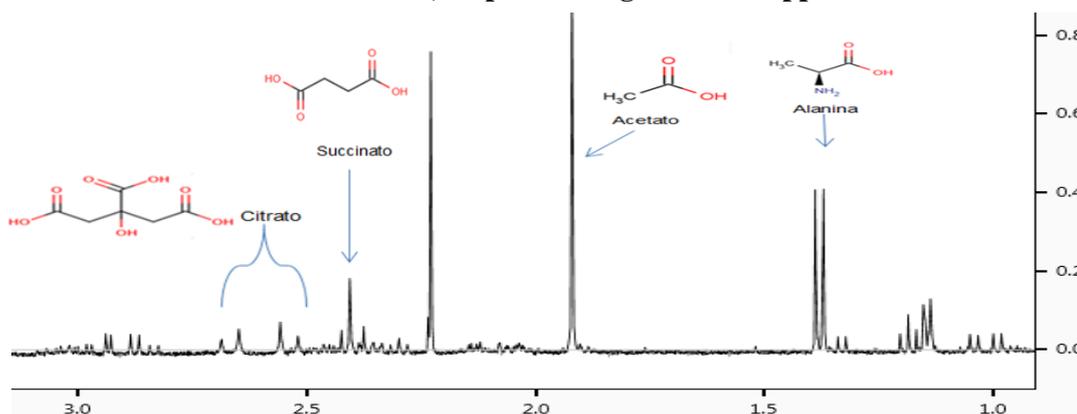
Figura 41 - Sinais característicos ao hidrogênio ligado ao carbono 1 da α e β -dextrose - estereoquímica não definida- presentes no espectro de RMN- ^1H no meio de cultura estéril, ampliado a região de 2 a 5,5 ppm.



Fonte: CRISPIM, 2015

Em pequena quantidade foi observada a ocorrência de alanina (1.48 ppm, d, $J = 7.25$ Hz, CH_3), acetato (1.92 ppm, s, CH_3), succinato (2.40 ppm, s, CH_2) e citrato (2.535 ppm, d, $J = 15.88$ Hz, H; 2.66 ppm, d, $J = 15.88$ Hz, H) (Figura 42).

Figura 42 - Sinais característicos aos metabólitos identificados no espectro de RMN- ^1H presentes no meio de cultura estéril, ampliado a região de 1 a 3 ppm.

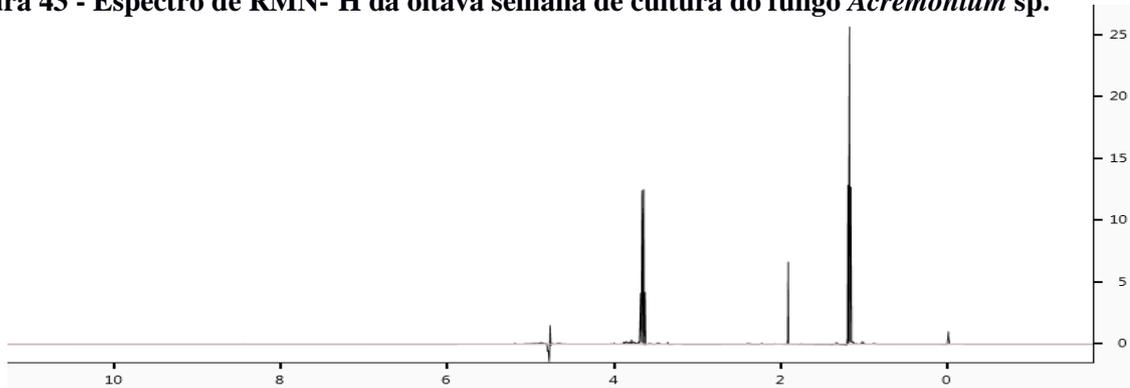


Fonte: Autora (2015)

Para a análise dos metabólitos no caldo de cultivo fermentado, foi escolhida uma amostra da oitava semana cultivo (Figura 43). Com base no banco de dados disponibilizado pelo *Chenomx*, foi possível identificar os metabólitos os seguintes metabólitos: etanol (1.18 ppm, t, 3H, $J = 7.00$ Hz; 3.66 ppm, q, 2H, $J = 7.00$ Hz), acetato (1.92 ppm, s, CH_3), acetona (2.239 ppm, s, CH_3), succinato (2.40 ppm, s, CH_2), oxaloacetato (2,383 ppm, s) e metanol (3.36 ppm, s, CH_3). (Figuras 43,44, e 45).

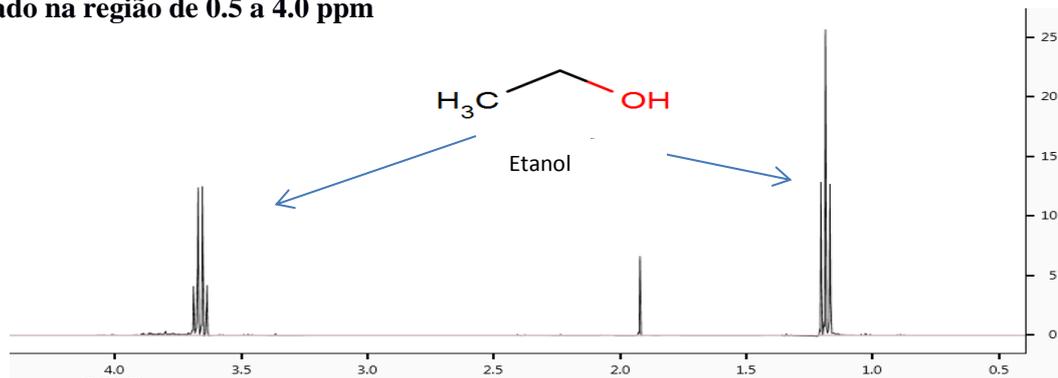
Como os hidrogênios ácidos das hidroxilas e aminas fazem ligações de hidrogênio com a água, no espectro de RMN-¹H seus sinais aparecem somados ao da água, dessa forma uma vez que o sinal da água foi supresso, os sinais dos hidrogênios ácidos também foram supressos. (CRISPIM, 2015).

Figura 43 - Espectro de RMN-¹H da oitava semana de cultura do fungo *Acremonium* sp.



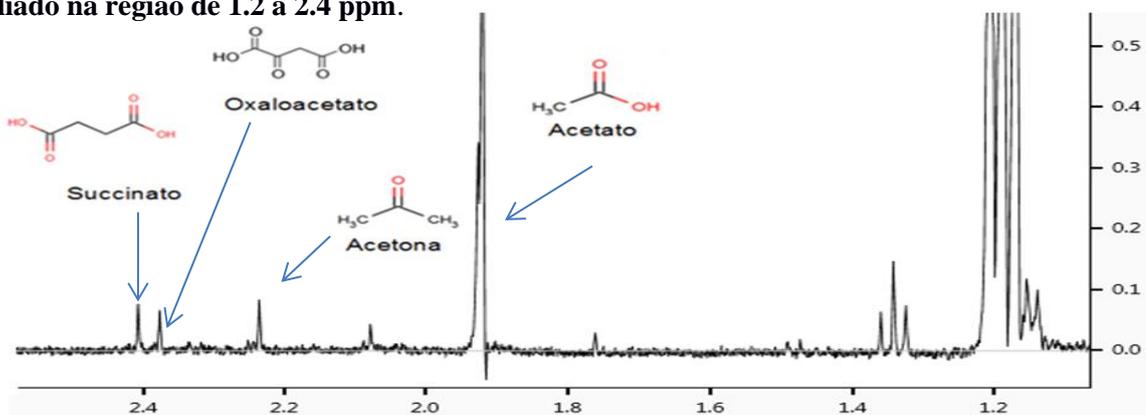
Fonte: Autora (2015)

Figura 44 - Espectro de RMN-¹H da oitava semana de cultura do fungo *Acremonium* sp, ampliado na região de 0.5 a 4.0 ppm



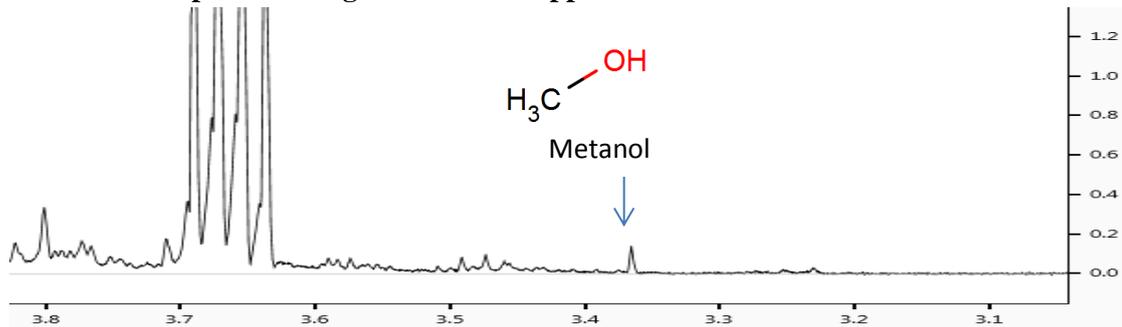
Fonte: Autora (2015).

Figura 45 - Espectro de RMN-¹H da oitava semana de cultura do fungo *Acremonium* sp, ampliado na região de 1.2 a 2.4 ppm.



Fonte: Autora (2015)

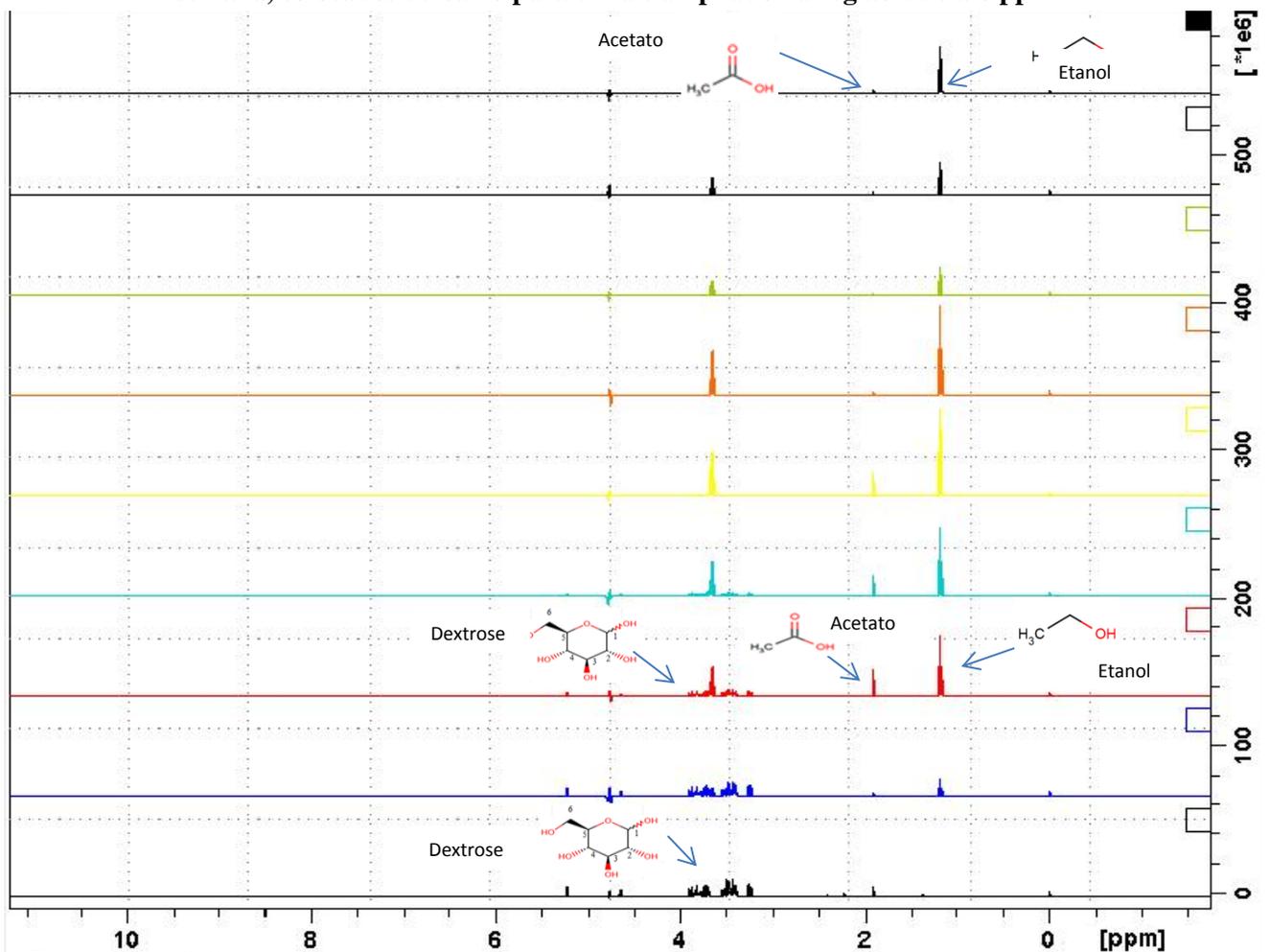
Figura 46 - Espectro de RMN-¹H da oitava semana de cultura do fungo *Acremonium* sp, ampliado na região de 3.1 a 3.8 ppm.



Fonte: Autora (2015)

Através da investigação dos metabólitos do caldo de cultivo fermentado, foi possível observar que praticamente todo o consumo de dextrose ocorre entre a quinta e sexta semanas, sendo constante até o fim da análise (Figuras 47 e 48). A dextrose ou glicose é a principal fonte energia e de carbono, sendo também intermediário metabólico, indispensável para o crescimento do fungo.

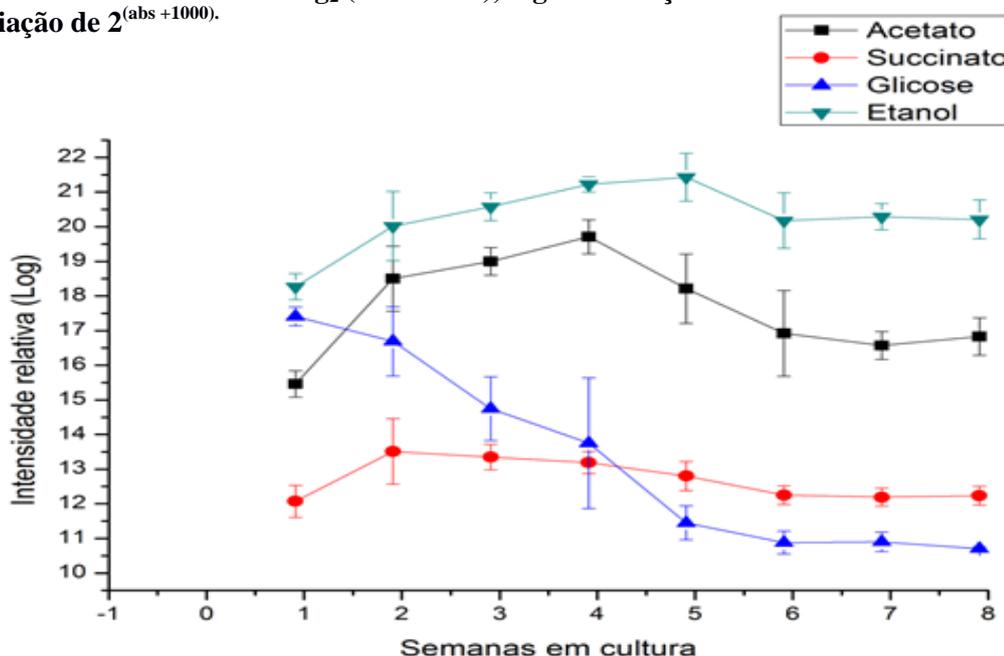
Figura 47- Sobreposição dos espectros de RMN-¹H do meio estéril e da primeira a oitava semana, colocados de baixo para cima e ampliado na região de 0 a 6 ppm.



Fonte: Autora (2015)

No período entre a quarta e quinta semanas ocorre a produção máxima de etanol, em seguida há decaimento e se mantém estável até o fim da oitava semana. É possível observar que o crescimento do fungo é praticamente interrompido, fato justificado pela pouca disponibilidade de glicose no meio. Adicionalmente na quarta semana, ocorre a produção máxima de acetato, a partir da quinta semana ocorre um decaimento, pois com a diminuição da concentração de glicose no meio, o fungo tende a consumir o acetato para produzir etanol. (Figura 48). Nas semanas seguintes há a diminuição de produção dos metabólitos produzidos, fato explicado pela pouca disponibilidade de glicose no meio.

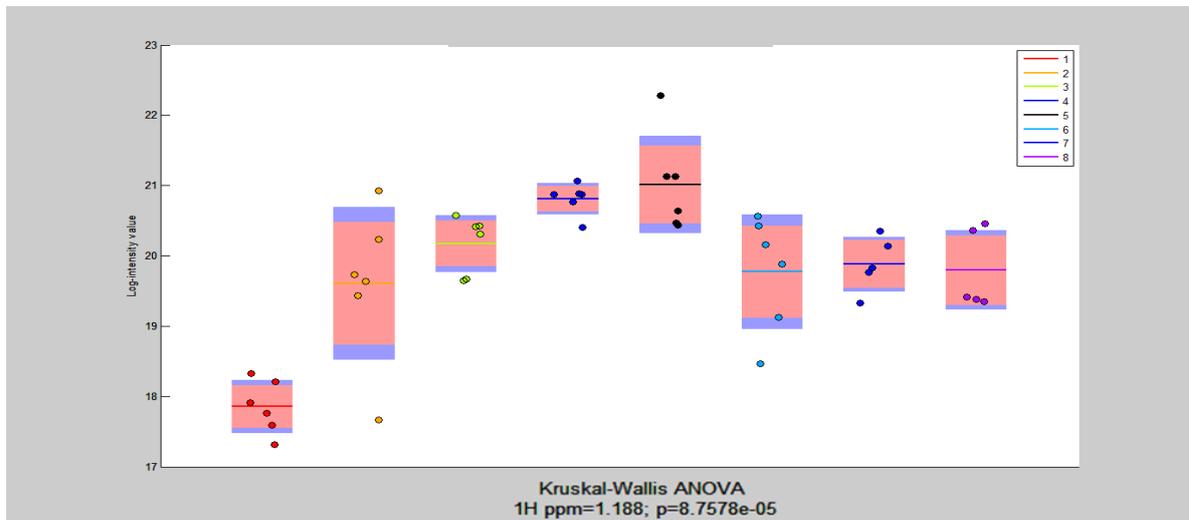
Figura 48- Curva de variação da concentração dos metabólitos primários, majoritários, encontrados no caldo de cultivo fermentado da primeira a oitava semana de cultivo. A intensidade relativa é dada em $\log_2(\text{abs} + 1000)$, logo a variação de uma unidade corresponde a uma variação de $2^{(\text{abs} + 1000)}$.



Fonte: Autora (2015)

O acompanhamento em relação produção de etanol pode ser observada isoladamente por meio da figura 49, que mostra a variação da intensidade do tripleto em 1.188 ppm, um dos sinais característicos do etanol, no meio de cultura. Os círculos representam as amostras e cada coloração uma semana de cultivo. É possível notar que a produção máxima de etanol ocorre na quinta semana, sofrendo um declínio na sexta semana e se mantém estável até o fim da análise.

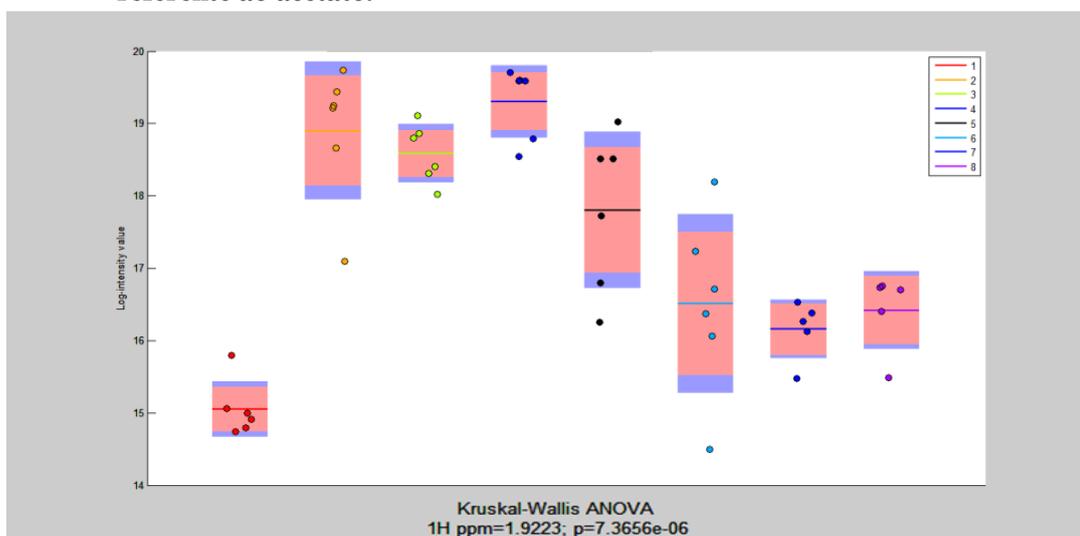
Figura 49 - Curva de variação da intensidade do tripleto encontrado em 1.188 ppm, referente ao etanol



Fonte: Autora (2015)

Adicionalmente, o acompanhamento individual em relação a produção de acetato pode ser observada através da figura 50, que mostra a variação da intensidade do singlete em 1.92 ppm, sinal característico do acetato, no meio de cultura. Os círculos representam as amostras e cada coloração uma semana de cultivo. É possível notar que a produção máxima de acetato ocorre na quarta semana, sofrendo um declínio na quinta e sexta semanas e se mantém estável até o fim da análise.

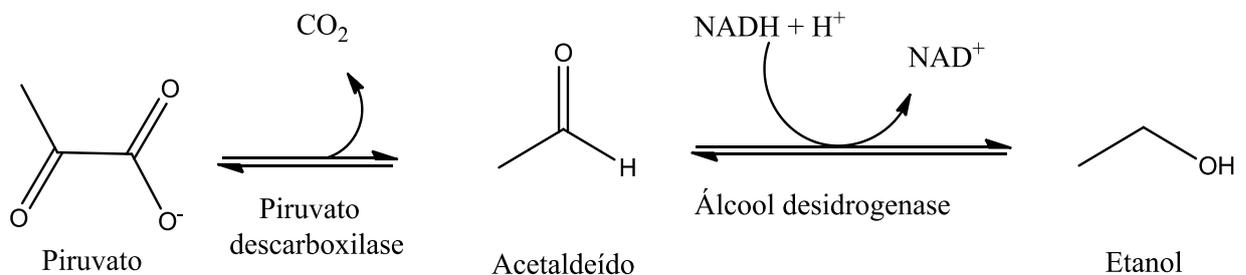
Figura 50 - Curva de variação da intensidade de um singlete encontrado em 1,9223 ppm, referente ao acetato.



Fonte: Autora (2015)

Por ter o etanol como produto majoritário e ser cultivado em condições anaeróbicas, o metabolismo fúngico segue, provavelmente, a via da glicólise, onde para uma molécula de glicose são produzidas duas moléculas de piruvato, que são reduzidas e formam etanol liberando CO_2 . (Figura 51). Somente uma parte do Ciclo de Krebs funciona sobre condições anaeróbicas, assim o fungo tende a crescer mais lentamente do que em condições aeróbicas. É provável que ocorra o Ciclo de Krebs reutivo, pois no meio de cultivo fermentado são encontrados Succinato e Oxaloacetato, que participam de etapas reversíveis do Ciclo. Adicionalmente podem ser sintetizados outros subprodutos por vias alternativas (BAI et al., 2008).

Figura 51- Reação de formação de etanol a partir de piruvato



Fonte: Autora (2015)

6 CONCLUSÃO

O fungo *Acremonium* sp, foi o de maior ocorrência, encontrado em épocas de seca (junho, julho, agosto) ou chuvoso (outubro a abril). Enquanto que os outros fungos, *Brachysporiella* sp *Papulospora* sp, *Trichothecium* sp, foram isolados somente no período chuvoso.

Os testes de Concentração Inibitória Mínima – CIM mostraram que o fungo *Acremonium* sp possui atividade moderada contra microrganismos importantes tais como bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermides* e Gram-negativa *Salmonela entérica*, além de atividade fraca para a Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*.

Os metabólitos encontrados no caldo de cultivo fermentado são do metabolismo primário do fungo, o etanol é produzido majoritariamente.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente projeto está em andamento e estamos obtendo mais extratos do *Acremonium sp* e de outros fungos endofíticos isolados da folha e do espinho da macaúba para realizar o estudo do metabolôma e posteriores testes antifúngicos, antitumorais, cicatrizantes e anestésicos, além da realização sequenciamento genético.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-LATEFF, A., et al.. New antioxidant hydroquinone derivatives from the algicolous marine fungus *Acremonium* sp. **Nat. Prod.** n. 65, p.1605-1611. 2002
- AMARAL, F. P. **Estudo das características físico-químicas dos óleos da amêndoa e polpa da macaúba (*Acrocomia Aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart).** 2007. 52f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, 2007.
- AMARAL, L. S. **Análise de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos associados à *Cupressus lusitânica*.** 2009. 184f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, São Carlos, 2009.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M.. **Introductory Mycology.** 4.ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 896p.
- ARACHEVALETA, M. et al.. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. **Agronomy Journal**, n. 81, p. 83-90, 1989.
- ARCHER, V.B; CONNERTON, I . F; MACKEZIE, D. A. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology.** N. 111, pag. 99-147, 2008.
- ARNOLD, A. E.; et al. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, v. 3, p. 267-274, 2007.
- AYRES M.C.C, et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Ver. Bras. Farmacogn.** v.18, p. 90-97, 2008.
- AZEVEDO J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 225-229, 1999
- AZEVEDO, J. L.; et al. Endophytic microorganism: a review on insect control and recente advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3 , p. 40-65, 2000
- BAI, F.W; ANDERSON W. A; MOO-YOUNG, M.. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances** v. 26, p. 89-105, 2008
- BASHYAL, P. B.; et al. Discovery of small molecule bioactive agents fro, endophytic fungi of the Sonoran Desert. **Grassland Research and Practice series.** Nova Zelândia, v. 13, p. 211-214, 2007.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **J. Antibiot.**, v. 58, p.1-26, 2005
- BERG, A.; et al. Acremonol and acremodiol, new fungal bislactones. **Journal Of Antibiotics.** Tokyo, v. 55, n.7, p. 660-662, 2002.
- BONDAR, G. **Palmeiras do Brasil.** São Paulo: Instituto de Botânica, n. 2, p. 500-554. 1964.

BRAUN, G. H. **Otimização das condições de cultivo do fungo *Papulaspora imersa* para produção de substâncias bioativas**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

BRUCE, P. Y., Química Orgânica, 4. ed. São Paulo: Perarson Pretice Hall, 2006.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The Fungi**. London: Academic Press, 1994.

CLARIDGE, T. D. W. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**, 2. ed. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2009.

CLAY, K. Fungal endophytes of grasses a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, v. 1, n. 69, p. 10-16, 1988.

CUPERLOVIC-CULF M., **NMR Metabolomics in Cancer Research**. Canadá : Woodhead, 2012.

DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 455-463, 1999.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004.

DOBRANIC, J. K.; JOHNSON, J. A.; ALIKHAN, Q. R. Isolation of endophytic fungi from eastern larch (*Larix laricina*) leaves fom New Brunswick, Canada. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 41, p. 194-198, 1995.

DOMSCH, K. H; GAMS, W.; TRAUTE-HEIDI, A. Compendium of soil fungi. New York: **APS Press**, 1980. v.1.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Caju, Fortaleza. Programa Nacional de Pesquisa de Caju, Fortaleza. EMBRAPA-CNPCA, 1991. 59 p. (EMBRAPA. CNPCA. Documentos, 05).

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Jornal do Endofítico**, Embrapa meio ambiente. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/introducao.html>>. Acesso em: 11 mar. 2015.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul. Rio Grande do Sul. 2004. 510p.

FISHER, P. J.; et al. O. A study of fungal endophytes in leaves, stems and roots of *Gynoxis oleifolia* Muchler (Compositae) from Ecuador. **Nova Hedwigia**, v. 3-4, n. 60, p. 589-594, 1995.

FREIRE, F. C. O. An updated list of plant fungi from Ceará State (Brazil) - I Hyphomycetes. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, p. 364-370, 2005.

GALLO, M. B.C.; et al. Natural Products from endophytic fungi. In: Ratul Saikai; Rajib L. Bezbaruah; Tarun Ch. Bora. (Org.). **Microbial Biotechnology**. New Delhi: Publishing Agency, 2007. p. 139-168.

GRAY, M. **Palm and Cycad Societies of Australia**. Disponível em: <<http://www.pacsoa.org.au/palms/Acrocomia/aculeata.html>>. Acesso em: 8 jun. 2015

GUIMARÃES, D. O. *Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a *Viguiera arenaria* (Asteraceae)*. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006l.

GUO B, WANG Y, SUN X, TANG K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Appl Biochem Microbiol**. v. 44, n , p.136–142. 2008.

JIANG, Z. D.; AN, Z. Bioactive fungal natural products through classic and biocombinatorial approaches, **Studies in Natural Products Chemistry**, n. 22, p. 245-72, 2000.

KHALDI, N.; et. al: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, p. 736-741, 2010.

HALLMANN, J.; SIKORA, R.A.. Toxicity of Fungal Endophyte Secondary Metabolites to Plant Parasitic Nematodes and SoilBorne Plant Pathogenic Fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v.102, pag. 155-162. 1996.

HARRIS, R. K. Nuclear magnetic resonance a physicochemical **View**. **Longman Scientific & Technical**, England, 1986.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field guide to the palms of the americas**. New Jersey: Princeton University, 1995. p.166-167.

HYDE, K. D. et al. Diversity of saprobic microfungi. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n.1, p. 7-35, 2007.

KEELER, J. **Understanding NMR spectroscopy**, 2002. 209 p.

KONEMAN, E. W.,et. al. **Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas Color**. 5. ed. Buenos Ayres: Panamericana. 1999.

KIRK, P. M. et al. **Dictionary of the Fungi**. 9. ed. England: Ainsworth & Bisby's CABI Publishing, Surrey, 2001.

KRUGER, T.L., BACCHI, L.M.A. - Fungos. In: FILHO, A.B.; KIMATI, H.;

LACAZ C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier; 1998.

_____ et. al., **Tratado de micologia médica**. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p

LAST, R. L.; JONES, A. D.; SHACHAR-HILL, Y. Towards the plant metabolome and beyond. **Nature Reviews**, v. 8, p. 167-174, 2007.

LATCH, G. C. M., CHRISTENSEN, M. J.; SAMUELS, G. J. Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. **Mycotaxon**, v. 20, n. 2, p. 535-550, 1984.

LIMA, E. S. et al. Diversidade, estrutura e distribuição espacial de palmeiras em um cerrado *sensu stricto* no Brasil Central. **Rev. Bra. de Botânica**, São Paulo, v. 26, n.3, p. 361-370, 2003.

LODGE, D. J.; FISHER, P. J.; SUTTON, B. C. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. **Mycologia**, v. 5, n. 88, p. 733-738, 1996.

LOPES, S. **Biologia**. São Paulo: Saraiva, 1999.

LORENZI, G. M. A. C., **Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. – Arecaceae**: bases para o extrativismo sustentável. 2006, f.156. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LORENZI, H. **Palmeiras do Brasil**: exóticas e nativas. Nova Odessa: Plantarum, 1996. p.1-20.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

MACHADO, A. R. T., Metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear de *Annona* spp para o Controle de Nematoides. 2014. f.174. Tese (Doutorado em Ciências-Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

MADIGAN, T. M.; MARTINKO, M. J.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Pretince Hall, 2004. cap. 17, p. 531.

MARANGONI, D. V. *Staphylococcus aureus*. In: Rodrigues E.A.C. et al. (Ed.). **Infecções hospitalares prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, 1997. p.573-591.

MARIANO, R. L. R. et. al. Levantamento de fungos endofíticos e epifíticos em folhas de coqueiro no Nordeste do Brasil. I. Frequência da população fúngica e efeito da hospedeira. **Agrotópica**, v. 9, p. 127–134, 1997.

MATOS F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: EUFC. 1988

MATTHEWS, P. S. C. Quantum chemistry of atoms and molecules. Cambridge: Cambridge University Press, 1986.

McKAY, R. T. How the 1D-NOESY Suppresses Solvent Signal in Metabonomics NMR Spectroscopy: an examination of the pulse sequence components and evolution. **Concepts in Magnetic Resonance Part A**, v. 38A, n. 5, p.197-220, 2011.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**, 13. ed., Lisboa, 1996.

MORCOTE-RIOS, G.; BERNAL, R. Remains of palms (Palmae) at archaeological sites in the New World: a review. **The Botanical Review**, New York, v. 67, n. 3, p. 309-350, 2001.

MULLER, E.; ARX, J. A. V. Die Gattungen der didymosporen pyrenomyceten. **Beitr. Kryptogammenfl. Schweiz**, Wabern- Bern, v. 11 n. 2, p. 1-922, 1962.

NASCIMENTO JÚNIOR, C. J. do. Ressonância magnética nuclear: gradus primus. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 21, 2001.

NASCIMENTO, E. S. P. **Análise metabolômica via RMN**: amostras de urina e látex. 2011. f.172. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2011.

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, p. 311-335, 2012.

NICOLAOU, K. C.; MONTAGNON, T. **Molecules that changed the world**, wiley. Weinheim: VCH, 2008. cap. 13.

NUCCI, S. M. **Desenvolvimento, caracterização e análise da utilidade de marcadores microssatélites em genética de população de macaúba**. 2007. f. 87. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) - Instituto Agronômico, Campinas, 2007.

PAIVA, D. L. et. al. **Introdução a espectroscopia**. Tradução de Pedro Barros, Paulo Sergio Santos, Carlos Alberto Villarruel Moreira e Adriane Peçanha Sueli Bossi. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

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

RAJASEKARAN, R., CHANDRASEKARAN, R., MUTHUSELVAM, M. Microbial Biotechnology: Rapid Advances in an area of massive impact. **Advanced Biotech**, 2008. p.19-25.

RAMOS, P. H. et. al., Antimicrobial activity from endophytic fungi *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. and *Papulaspora immerse*. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, Curitiba, v.53, n. 3, 2010.

RIDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 1, n. 42, p. 265, 1950.

RIYAZ-UL-HASSAN, S.; et. al., Modulation of volatile organic compound formation in the Mycodiesel producing endophyte- *Hypoxylon* sp. C1-4. **Microbiology**, v. 58, p. 464-473, 2012.

RODRIGUES, K. F., SAMUELS, G.J.. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. **Mycol. Res.** n. 94, p. 827-830. 1990

RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm. *Euterpe oleracea*. **Mycologia**, v. 86, n. 3, p. 376-385, 1994.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**, 7.ed. 2005. 502 p.

SOUTHCOTT, K. A.; JHOANSON, J. A. Isolation of endophytes from two species of palm, from Bermuda. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 43, p. 789-792, 1997.

SCARIOT, A.; LLERAS, E.; HAY, J. D. Flowering and fruiting phenologies of the palm *Acrocomia aculeata*: patterns and consequences. **Biotropica**, Washington, v. 27, n. 2, p. 168-173, 1995.

SCHIELL, M., et. al. Chephaibols, novos antibióticos peptaibol com propriedades anti-helmínticos de *Acremonium tubaki* DSM 12774. **J. Antibiot.**, n. 53, p. 220-233. 2001

SCHWAB, E. K.; KELLER, N. P. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. **Mycol. Res.** v.112, p. 225-230, 2008.

SILVA, J. C. **Macaúba**: fonte de matéria-prima para os setores alimentício, energético e industrial. 1994. Trabalho de Conclusão da Disciplina Cultivo de Essências Exóticas e Nativas. 41 f. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia Florestal, Viçosa, MG, 1994.

SHRESTHA, K. et. al., Evidence for paclitaxel, from three new endophytic fungi of Himalay yew of Nepal. **Planta Medica.**, v. 4., n. 64, p 374-376. 2011.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.18, n. 4, p. 382-385, 1998.

STRAUSS, H. L. **Quantum mechanics**: an introduction. New Jersey: Prentice-Hall, 1968.

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

STROBEL, G.A. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current Opin Microbiology**, v. 9, p. 240- 244, 2006.

_____; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

_____; HESS, W. M. Glucosylation of the peptide leucinostatin A, produced by an endophytic fungus of European yew, may protect the host from leucinostatin toxicity. **Chemical Biology**, 4: 529-536, 1999.

_____; LONG, D. M. Endophytic microbes embody pharmaceutical potencial. **ASM News**, v. 5, n. 64, p. 263-268, 1998.

TAWARE R. et. al. Trichothecin from Endophytic Fungus *Trichothecium* sp. and its Anticancer Effect on Murine Melanoma and Breast Cancer Cell Lines. **Current Biochemical Engineering**, v. 2, n. 1, 2015.

TODARO, A. R., Atividades antifúngica e antimicrobiana e análise genômica em populações de *Acremonium cavaraeanum*. 2011. Tese de (Doutorado em Biotecnologia – RENORBIO) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827 p.

_____; _____. **Microbiologia**, 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VOLLHARD K. P., SCHORE N. E. **Química orgânica: estrutura e função**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2013.

VOLKSCH, B.; ULLRICH, M.; FRITSCH, W. Identification and population dynamics of bacteria in leaf spots of soybean. **Mic. Eco.**, n. 24, p. 305-311, 1992.

WANG, J. et. al. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. **FEMS - Microbiology Letters**, v. 193, p. 249-253, 2000.

WICKLOW, D. T.; POLING, S. M. Antimicrobial activity of pyrrocidines from *Acremonium zeae* against endophytes and pathogens of maize. **Biological Control**, v. 99, p. 109 - 115, 2009.

_____. et. al. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Mycological Research**, v. 109, p. 610-618. 2005

ZANARDI, L. M. et. al. Citocalasina D produzida por *Acremonium* sp. isolado como fungo endofítico de *Senna spectabilis* (DC) Irwin et Barn. **Sociedade Brasileira de Química**, 2006.

ZHENG G.; PRICE W. S. Solvent signal suppression in NMR. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 56, n. 3, p. 267-288, 2010.