

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

JÉSSICA RAIMUNDO DA ROCHA

**Estudo da Evolução Metabólica do Filtrado da Cultura e 5-metilmeleina em micélio do  
Fungo Endofítico *Phomopsis* sp**

Maceió

2017

JÉSSICA RAIMUNDO DA ROCHA

**Estudo da Evolução Metabólica do Filtrado da Cultura e 5-metilmeleina em micélio do Fungo Endofítico *Phomopsis* sp.**

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano

Maceió

2017

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- R672e Rocha, Jéssica Raimundo Rocha.  
Estudo da evolução metabólica do filtrado da cultura e 5-metilmeleina em micélio do fungo endofítico *Phomopsis* sp. / Jéssica Raimundo Rocha. – 2017. 69 f.: il.
- Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant’Ana.  
Coorientador: Luiz Carlos Caetano.  
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2017.
- Bibliografia: f. 65-69.
1. *Phomopsis* – Estudo metabólico. 2. Ciclo dos ácidos tricarboxílicos. 3. Endofíticos. 4. Fermentação alcoólica. I. Título.

CDU: 547.9:579.22



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

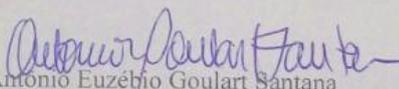


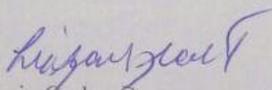
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone/Fax: (82) 3214-1144  
email: ppgqb.ufal@gmail.com

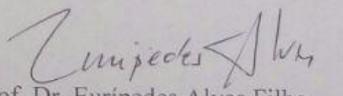
### FOLHA DE APROVAÇÃO

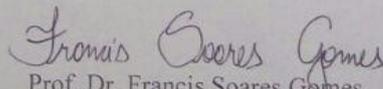
Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de **JESSICA RAIMUNDO DA ROCHA**, intitulada: “**Estudo da Evolução metabólica do Filtrado da Cultura e 5-metilmeleina em micélio do Fungo Endofítico *Phomopsis* sp**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 20 de fevereiro de 2017, às 9h, no Auditório do Núcleo de Pesquisa Multidisciplinar (NPM) da Universidade Federal de Alagoas.

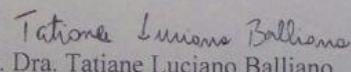
### COMISSÃO JULGADORA

  
Prof. Dr. Antonio Euzébio Goulart Santana  
Orientador (PPGQB/UFAL)

  
Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano  
Coorientador (IQB/UFAL)

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

  
Prof. Dr. Francis Soares Gomes  
(PPGQB/IQB/UFAL)

  
Profa. Dra. Tatiane Luciano Balliano  
(PPGQB/IQB/UFAL)

A Deus, a minha família e aos amigos...  
companheiros de todas as horas...

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Senhor Deus, pelo dom da vida, por todas as bênçãos, lições e livramentos no caminho até aqui.

Aos meus pais Arnaldo e Josefa e irmãos Agnes e Matheus por todo apoio nas horas mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos por todos os ensinamentos, amizade e ajuda desde a graduação.

Aos Profs. Drs. Euzébio e Edson pelos ensinamentos e suporte fundamentais na realização desta pesquisa.

Ao pesquisador visitante Dr. Geoffrey Hawkes por toda paciência, ajuda e esclarecimentos na área de RMN

Aos colegas Alessandre e Thyago pela amizade, ajuda na realização dos experimentos, apoio nos momentos difíceis e todos os ensinamentos durante o curso.

Aos meus colegas de laboratório: Andressa, Habibu, Maiara, Nanda, Mariana, Jeferson, Regina e Silvana pela amizade e suporte no desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus colegas de curso Lourdinha, Maryana, Thatiane, Sheila e John por tornarem as aulas e o entendimento dos conteúdos mais descontraídos.

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

## RESUMO

Microrganismos endofíticos, que são importantes fontes de compostos bioativos, vêm sendo amplamente estudados devido às propriedades que seus metabólitos apresentam e, em comparação com as plantas hospedeiras, são de mais fácil manipulação em laboratório. Visto que do gênero de fungo endofítico *Phomopsis* já foram isolados compostos com diferentes atividades biológicas, a investigação dos metabólitos, sejam eles primários ou secundários, presentes no filtrado de sua cultura é de extrema importância. O estudo metabolômico de *Phomopsis* sp. pode levar ao entendimento das vias de produção dos metabólitos de interesse. O presente trabalho teve como objetivo traçar o perfil metabólico do filtrado da cultura do fungo endofítico *Phomopsis* sp., um isolado de *Syzygium jambolanum* DC, através do consumo da dextrose como fonte de carbono e energia durante 6 semanas de cultivo utilizando a técnica de RMN <sup>1</sup>H com supressão do sinal da água por NOESY 1D. O enfoque do estudo é. Além disso, foram realizadas cromatografia líquida em coluna e cromatografia em camada delgada com o intuito de isolar compostos a partir de extrato orgânico do micélio. As análises estatísticas tiveram o auxílio dos softwares MatLab<sup>®</sup> para normalização e quantificação relativa dos dados. Assim, foi possível traçar o perfil metabólico de *Phomopsis* sp, cultivado em condições de hipóxia, e constatar a ocorrência de rotas redutivas, tais como fermentação alcoólica e Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos redutivo. Também foi possível observar a intensificação da pigmentação amarela, característica desse gênero de fungo, a partir da quarta semana de cultivo, período este que a maioria dos metabólitos primários já não se fazem mais presentes. Através de experimentos de RMN foi possível elucidar a estrutura de uma substância isolada do extrato em clorofórmio do micélio seco do fungo, a 5-metilmeleina. Com base nesses resultados, pode-se inferir que, sob estas condições, o microrganismo estudado realiza fermentação alcoólica durante todo o cultivo. Também foi verificada a ocorrência do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos redutivo no citosol até a terceira semana de cultivo e, após esse período, a partir da quarta semana o metabolismo secundário é intensificado. É a primeira vez que o metabólito secundário 5-metilmeleina é isolado desse gênero de endofítico.

**Palavras-chave:** Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos; endofíticos; fermentação alcoólica; *Phomopsis*; estudo metabolômico.

## ABSTRACT

Endophytic microorganisms are important sources of bioactive compounds and have been widely studied due to the properties that their metabolites have. Compared to the host plants are easier handling in the laboratory. From the *Phomopsis* sp fungus genus have been isolated compounds with different biological activities. The investigation of the metabolites, whether primary or secondary, present in the filtrate of culture is of utmost importance. The metabolomic study of *Phomopsis* sp can lead to understanding of the production pathways of the metabolites of interest. The objective of the present work was to trace the metabolic profile of the filtrate from the endophytic fungus *Phomopsis* sp., An isolate of *Syzygium jambolanum* DC, through the consumption of dextrose as a source of carbon and energy for 6 weeks of culture using the <sup>1</sup>H NMR With water signal suppression by NOESY 1D. In addition, liquid column chromatography and thin layer chromatography were performed in order to isolate compounds from organic mycelium extract. The analyzes had the help of MatLab® software for data normalization. Thus, it was possible to trace the metabolic profile of *Phomopsis* sp., cultivated under conditions of hypoxia, and verify the occurrence of reductive routes such as alcoholic fermentation and reductive Tricarboxylic Acid Cycle. It was also possible to observe the intensification of yellow pigmentation, characteristic of this genus of fungus, from the fourth week of cultivation, which is the period most of the primary metabolites are no longer present. By means of NMR experiments it was possible to elucidate a structure of a substance isolated from the chloroform extract of the fungus dry mycelium, 5-methylmethane. Based on these results, it can be inferred that, under these conditions, the microorganism studied performs alcoholic fermentation throughout the culture. It was also verified the occurrence of the reductive Tricarboxylic Acid Cycle in the cytosol until the third week of culture and, after this period, from the fourth week the secondary metabolism is intensified. It is the first time that the secondary metabolite 5-methylmeleina is isolated from this genus of endophytic.

**keywords:** The citric acid cycle; endophytic; *Phomopsis*; alcoholic fermentation; metabolomic study.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação de diferentes hifas.....	15
Figura 2 - Etapas da glicólise .....	21
Figura 3 - Destino do piruvato em sistemas aeróbio e anaeróbio.....	22
Figura 4 - Cultivo de 7 dias de <i>Phomopsis</i> sp. em meio BDA .....	35
Figura 5 - Evolução do cultivo de <i>Phomopsis</i> sp em meio BD durante 8 semanas .....	35
Figura 6 - Curva de crescimento micelial de <i>Phomopsis</i> sp durante 8 semanas de cultivo .....	36
Figura 7 - Espectros do meio de cultura puro (sem inóculo) sem supressão (à esquerda) e com supressão (à direita) do sinal da água .....	36
Figura 8 - Sinais referentes a $\alpha$ - e $\beta$ -dextrose no espectro de RMN 1H do meio BD puro .....	37
Figura 9 - Metabólitos identificados no espectro de RMN 1H do meio BD puro na região de 2,20-2,99 ppm, ampliado 8x.....	38
Figura 10 - Metabólitos identificados no espectro de RMN 1H do meio BD puro na região de 1,16-1,94 ppm, ampliado 4x.....	38
Figura 11 - Metabólitos identificados no espectro de RMN 1H do meio BD puro na região de 3,96-4,48 ppm, ampliado 16x.....	39
Figura 12 - Metabólitos identificados no espectro de RMN 1H do meio BD puro na região de 6,35-7,28 ppm, ampliado 64x.....	39
Figura 13 - Sobreposição dos espectros das seis semanas.....	40
Figura 14 - Sobreposição dos espectros de RMN 1H do meio sem inóculo e da primeira semana de cultivo (a) e da quinta e sexta semana (b1) e (b2), para observação do aumento da intensidade do sinal do etanol.....	41
Figura 15 - Duplete referente a alanina identificado no espectro de RMN 1H da cultura da primeira semana de cultivo na região de 1,39-1,87 ppm ampliado 32x.....	41
Figura 16 - Duplo duplete referente ao malato identificado no espectro de RMN 1H da cultura da primeira semana de cultivo na região de 4,21-4,52 ppm ampliado 64x .....	42
Figura 17 - Simpleto referente ao formato identificado no espectro de RMN 1H da cultura da segunda semana de cultivo na região de 8,20-8,71 ppm ampliado 128x .....	42
Figura 18 - Simpleto referente ao formaldeído identificado no espectro de RMN 1H da cultura da primeira semana de cultivo na região de 8,11-10,80 ppm ampliado 128x .....	43
Figura 19 - Sobreposição dos espectros de RMN 1H do meio sem inóculo e da primeira semana de cultivo: sinais referentes a asparagina .....	43
Figura 20 - Sobreposição dos espectros de RMN 1H do meio sem inóculo e da primeira semana de cultivo: sinais referentes a alanina e acetoína.....	44
Figura 21 - Sobreposição dos espectros de RMN 1H do meio sem inóculo e da primeira semana de cultivo: sinais referentes ao malato e acetoína.....	44
Figura 22 - Sobreposição dos espectros de RMN 1H do meio sem inóculo e da primeira semana de cultivo: sinal referente ao formato. ....	45
Figura 23 - Sobreposição dos espectros de RMN 1H do meio sem inóculo e da primeira semana de cultivo: sinal referente ao formaldeído. ....	45
Figura 24 - Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos redutivo que acontece no citosol.....	47
Figura 25 - Representação da quantificação relativa dos metabólitos do TCA redutivo presentes no caldo da cultura até a segunda semana de cultivo. ....	49
Figura 26 - Representação da quantificação relativa dos metabólitos do TCA redutivo presentes no caldo da cultura da segunda a quarta semana de cultivo .....	50

Figura 27 - Representação da quantificação relativa dos metabólitos do TCA redutivo presentes no caldo da cultura da quarta a sexta semana de cultivo .....	51
Figura 28 - Esquema de oxidação do metanol à CO <sub>2</sub> e redução do CO <sub>2</sub> à metanol.....	52
Figura 29 - Formato e formaldeído mostrando forte correlação positiva e covariância positiva com metanol (Semana 1-2).....	52
Figura 30 - espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto isolado.....	53
Figura 31 - Espectro de RMN J-resolvido do composto isolado.....	54
Figura 32 - Parte da estrutura onde o anel aromático possui hidrogênios em orto.....	54
Figura 33 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto isolado .....	55
Figura 34 - Espectro de RMN DEPT 90 do composto isolado .....	55
Figura 35 - Espectro de RMN DEPT 135 do composto isolado .....	56
Figura 36 - Espectro de RMN COSY do composto isolado.....	57
Figura 37 - Espectro de RMN COSY do composto isolado destacando o acoplamento dos hidrogênios em δH 1,4870 ppm, em δH 2,6556 ppm e δH 2,8796 ppm .....	57
Figura 38 - Espectro de RMN HSQC do composto isolado.....	58
Figura 39 - Parte não aromática da molécula .....	58
Figura 40 - Espectro de RMN NOESY do composto isolado .....	59
Figura 41 - Grupo metil ligado ao anel aromático da molécula .....	59
Figura 42 - Espectro RMN HMBC do composto isolado .....	60
Figura 43 - 5-metilmeleina .....	61

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Elementos requeridos pelas células fúngicas .....	16
Tabela 1 - Metabolismo de fungos e leveduras baseados em suas respostas a disponibilidade de oxigênio .....	23
Quadro 2 – Metabólitos com atividade biológica isolados de <i>Phomopsis</i> sp .....	27
Tabela 2 - Variação dos metabólitos no decorrer de 6 semanas de cultivo do fungo.....	48
Tabela 3 - Dados referentes ao experimento de RMN 1H e HMBC da estrutura elucidada.....	60
Tabela 4 - Dados referentes ao experimento de RMN 13C e HSQC da estrutura elucidada...	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Metabolismo de fungos e leveduras baseados em suas respostas a disponibilidade de oxigênio .....	23
Tabela 2 - Variação dos metabólitos no decorrer de 6 semanas de cultivo do fungo.....	48
Tabela 3 - Dados referentes ao experimento de RMN 1H e HMBC da estrutura elucidada.....	60
Tabela 4 - Dados referentes ao experimento de RMN 13C e HSQC da estrutura elucidada...	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\delta$	Deslocamento químico
$\int$	Integral
BD	Batata-Dextrose
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
COSY	Correlated Spectroscopy
d	Dupleto
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
dd	Duplo dupleto
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
$J$	Constante de acoplamento
m	Multipleto
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto
TCA	Tricarboxylic Acid Cycle
TSP	Trimetilsililpropanoato
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ABTS	2,2'-azino-bis (ácido 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfônico)
TD	Time-Domain (domínio de tempo)
NS	Number of scans (número de varreduras)
SW	Spectral width (largura espectral)
RG	Receiver gain (ganho do receptor)
O1P	Transmitter frequency offset (desvio de frequência do transmissor)
D1	First delay (primeiro retardamento)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	144
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	14
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
<b>3.1</b>	<b>Fungos</b> .....	15
3.1.1	Metabolismo dos Fungos .....	18
3.1.2	Fungos Endofíticos .....	24
<b>3.2</b>	<i>Phomopsis</i> sp. ....	25
<b>3.3</b>	<b>RMN e Metabolômica</b> .....	29
<b>3.4</b>	<b>Compostos Orgânicos Voláteis e Microrganismos Associados a Plantas</b> .....	29
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	31
<b>4.1</b>	<b>Preparação de Meios de Cultura</b> .....	31
4.1.1	Meio batata-dextrose-ágar (BDA) .....	31
4.1.2	Meio batata-dextrose (BD) .....	31
<b>4.2</b>	<b>Avaliação da Evolução Metabólica no Caldo da Cultura</b> .....	31
4.2.1	Cultivo .....	31
4.2.2	Coleta .....	32
4.2.3	Crescimento do Micélio .....	32
4.2.4	Experimentos de RMN .....	32
<b>4.3</b>	<b>Extração e Identificação de Compostos a Partir do Micélio</b> .....	33
4.3.1	Extrato em clorofórmio .....	33
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	35
<b>5.1</b>	<b>Cultivo e Avaliação do Crescimento Micelial</b> .....	35
<b>5.2</b>	<b>Evolução Metabólica no Caldo da Cultura</b> .....	36
<b>5.3</b>	<b>Elucidação do Composto Isolado</b> .....	533
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	63
	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	64
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65

## 1. INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos habitam os órgãos internos e tecidos de plantas, tais como folhas, caules, sementes e raízes, durante pelo menos um período de seus ciclos de vida, sem causar doenças ou produzir manifestação externa visível (AZEVEDO et al., 2000).

Comunidades endofíticas são formadas principalmente por fungos e bactérias. Estima-se que cada espécie de planta, possivelmente hospeda microrganismos endofíticos, que, na grande maioria e apesar do seu grande potencial biotecnológico (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013), não são identificados. Embora a interação entre esses microrganismos e as suas plantas hospedeiras não seja, por enquanto, totalmente compreendida, nos últimos anos eles têm sido cada vez mais amplamente utilizados, tanto na agricultura, promovendo crescimento e/ou controlando patogenicias em plantas (SANTOS; VARAVALLLO, 2011), ou na produção de compostos com aplicação terapêutica, tais como o Taxol<sup>®</sup>, um agente antitumoral contra cânceres de mama e de ovário (STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D., 1993), e leucinostatin, que possui propriedades citotóxicas, anticâncerígenas e antifúngicas (STROBEL; HESS, 1999).

A descoberta de que os microrganismos endofíticos também podem produzir os compostos sintetizados pelas plantas hospedeiras, sendo muitas destas medicinais (MUSSIDIAS et al., 2012), fez com que eles se tornassem a principal fonte dos produtos bioativos, uma vez que é muito mais fácil obtê-los e mantê-los em laboratório, ao contrário das plantas, onde é necessário manter uma área de plantação e ainda há gastos com controle de pragas e fertilização do solo. Além disso, muitas vezes o rendimento do metabólito bioativo via produção através do endofítico é maior que na planta. A vincristina é um exemplo disso, pois para obter três gramas desse composto são necessárias três toneladas de folhas dessecadas de *Catharanthus roseus* G. Don (BRUNETON, 2001).

O entendimento global em torno das vias metabólicas, sua conectividade e variação de concentrações dos metabólitos envolvidos se faz de extrema importância no estudo investigativo dos metabólitos de interesse produzidos por endofíticos. A técnica de RMN <sup>1</sup>H, inicialmente utilizada na metabonômica, acaba se tornando uma importante aliada também na metabolômica, que, usualmente era associada ao uso de técnicas cromatográficas e espectrometria de massas. Metabolômica é definida como o estudo do conteúdo metabólico englobando sua identificação e quantificação, já a metabonômica trata-se da análise quantitativa das alterações dinâmicas nos níveis dos metabólitos como resultado de um estímulo (BAYNES;

DOMINICZAK, 2015), no entanto os métodos e abordagens utilizadas nos dois estudos são, atualmente, altamente convergentes (LINDON; NICHOLSON; HOLMES, 2007).

Com base nesses fatos, o fungo endofítico *Phomopsis* sp., isolado de *Syzygium jambolanum* DC em trabalho anterior (LIMA, 2010), foi escolhido como a base de estudo tendo em vista que desse gênero já foram isolados compostos, com atividade antimicrobiana (RUKACHAISIRIKUL et al., 2008), antimalárica (KORNSAKULKARN et al., 2015) e anticâncer (ADELIN et al., 2011). O enfoque do estudo foi, através de experimentos de RMN, identificar os metabólitos presentes no filtrado da cultura de *Phomopsis* sp. e avaliar sua evolução durante seis semanas de cultivo, além de isolar e identificar compostos a partir do micélio.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a evolução metabólica no filtrado da cultura do fungo endofítico *Phomopsis* sp. utilizando RMN  $^1\text{H}$ .

### 2.2 Objetivos Específicos

- Identificar os metabólitos presentes no filtrado da cultura do fungo *Phomopsis* sp durante o período de cultivo de seis semanas tendo a identificação dos metabólitos presentes no meio de cultura líquido de Batata Dextrose como controle;
- Construir a curva de crescimento do micélio fúngico;
- Obter o perfil metabólico do filtrado da cultura utilizando RMN  $^1\text{H}$  com supressão do sinal da água, construindo o mapa metabólico dos processos que estão ocorrendo durante o cultivo do fungo;
- Obter quantificação relativa dos metabólitos identificados no filtrado da cultura de *Phomopsis* sp.;
- Realizar extração e identificação de compostos a partir do micélio.



Em geral, as necessidades nutricionais dos fungos são relativamente simples, são capazes de sobreviver em condições anaeróbicas se supridos com glicose, sais de amônio, íons inorgânicos e alguns fatores de crescimento. O quadro 1 detalha as funções celulares de cada elemento (KAVANAGH, 2005).

Quadro 1 - Elementos requeridos pelas células fúngicas

<b>Elemento</b>	<b>Fontes comuns</b>	<b>Funções celulares</b>
<b>Carbono</b>	Açúcares	Estrutura elementar de células fúngicas em combinação com hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Fonte de energia
<b>Hidrogênio</b>	Prótons de meio ácido	pH intracelular ácido (cerca de 5-6) necessário para o metabolismo fúngico.
<b>Oxigênio</b>	Ar, O <sub>2</sub>	Substrato para enzimas oxidativas de função respiratória e outras funções mistas. Essencial para a síntese de ergosterol e ácidos graxos insaturados.
<b>Nitrogênio</b>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , sais, ureia, aminoácidos	Estruturalmente e funcionalmente como nitrogênio amínico orgânico em proteínas e enzimas
<b>Fósforo</b>	Fosfatos	Transdução de energia, estrutura da membrana e ácido nucleico

Continua na próxima página

Continuação

<b>Potássio</b>	Sais $K^+$	Equilíbrio iônico, atividade enzimática
<b>Magnésio</b>	Sais $Mg^{2+}$	Atividade enzimática, estrutura celular e organela
<b>Enxofre</b>	Sulfatos, metionina	Vitaminas e aminoácidos sulfidrílicos
<b>Cálcio</b>	Sais $Ca^{2+}$	Possível mensageiro secundário em transdução de sinal
<b>Cobre</b>	Sais cúpricos	Pigmentos redox
<b>Ferro</b>	Sais férricos: $Fe^{3+}$ é quelatado por sideróforos e lançado como $Fe^{2+}$ dentro da célula	Hemeproteínas, citocromos
<b>Manganês</b>	Sais $Mn^{2+}$	Atividade enzimática
<b>Zinco</b>	Sais $Zn^{2+}$	Atividade enzimática
<b>Níquel</b>	Sais $Ni^{2+}$	Atividade da urease
<b>Molibdênio</b>	$Na_2MoO_4$	Metabolismo do nitrato, vitamina $B_{12}$

Fonte: KAVANAGH, 2005

Os meios de cultivo podem ser líquidos ou sólidos e são classificados como naturais, sintéticos e semissintéticos. No primeiro caso a composição quantitativa é desconhecida, são os produtos naturais ou seus derivados de origem animal ou vegetal; no segundo, a composição

quantitativa e qualitativa é conhecida; e no terceiro, pelo menos um dos componentes é um produto natural (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Independentemente do modo de nutrição, os fungos absorvem os nutrientes necessários para seu crescimento em um substrato disponível, geralmente presentes em uma solução que rodeia a célula. Esses nutrientes, de tamanho adequado, atravessam as camadas celulares para chegarem ao citoplasma onde serão metabolizados. A parede celular é de consistência porosa e permite apenas que pequenas moléculas sejam absorvidas, porém, é a membrana celular que exerce maior barreira à entrada de substratos, pois sua permeabilidade é seletiva. Dessa maneira, a concentração de solutos dentro e fora da célula é diferenciada, bem como a composição de solutos (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; WEBSTER; WEBER, 2007).

O ambiente físico-químico onde o fungo está presente influencia seu crescimento e suas atividades metabólicas. Alguns compostos entram na célula sem ser necessárias modificações enquanto outros precisam ser hidrolisados, neste caso a atividade enzimática é fundamental, pois a ausência de enzimas específicas pode prejudicar o crescimento do fungo em determinado substrato. Porém, fungos são capazes de produzir enzimas adaptativas na presença de um substrato que, normalmente, não utiliza, ao selecionar um núcleo mutante capaz de sintetizar a(s) enzima(s) de interesse (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; KAVANAGH, 2005).

### **3.1.1 Metabolismo dos fungos**

Metabolismo é o “conjunto de reações nas quais a célula utiliza os recursos disponíveis para obter: energia utilizável, seus ‘tijolos’ químicos constituintes e para prover-se dos bens e serviços requeridos para sua sobrevivência, crescimento e reprodução.” (HAROLD apud ESPOSITO, 2010). Em outras palavras, metabolismo é uma atividade celular onde as vias metabólicas cooperam para: obter energia química capturando energia solar ou degradando nutrientes energeticamente ricos obtidos do meio ambiente; converter as moléculas dos nutrientes em moléculas com características próprias de cada célula, incluindo precursores de macromoléculas; polimerizar precursores monoméricos em macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos); e sintetizar e degradar as biomoléculas necessárias para as funções celulares especializadas, como lipídeos de membrana, mensageiros intracelulares e pigmentos (NELSON; COX, 2014).

Os fungos dependem de reações redox para a obtenção de energia utilizando compostos ricos em energia sintetizados pelos fototróficos e utilizam matéria orgânica como fonte de carbono e hidrogênio. Seu metabolismo consiste em catabolismo ou componente gerador de

energia sob a forma de ATP e em um componente biossintético consumidor dessa energia ou anabolismo. Durante o catabolismo são gerados  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  para prover de poder redutor (como NADPH, NADH e FADH), além de nitrogênio, enxofre, fósforo e carbono sob a forma de pequenos precursores. Logo, a energia conservada no ATP e os produtos metabólicos do catabolismo são usados para as atividades celulares, inclusive o próprio anabolismo, a mobilidade e o transporte (ESPOSITO, 2010; KAVANAGH, 2005).

Segundo Putzke e Putzke (2002), os fungos, bem como outros organismos, geralmente têm seu metabolismo dividido em dois grupos principais:

- 1- **Metabolismo primário:** o que envolve as reações metabólicas necessárias para sustentar o indivíduo;
- 2- **Metabolismo secundário:** o que envolve a produção de numerosos compostos que, pelo menos aparentemente, não são essenciais à sustentabilidade do fungo.

Nos fungos, o armazenamento de energia para manutenção celular, crescimento, reprodução e derivação de constituintes celulares de uma variedade de fontes de elementos químicos é compreendido por diversas vias metabólicas (ESPOSITO, 2010; PUTZKE, J; PUTZKE, M. T. L., 2002)

Os fungos obtêm energia através da oxidação de açúcares simples presentes em seu suco celular, além disso a energia pode ser armazenada com a formação da trealose e de álcoois-glicídios. Polissacarídeos também são produzidos por fungos, o glicogênio, por exemplo, trata-se da reserva de energia mais importante desses microrganismos. Os processos básicos para a obtenção dessa energia são a respiração e fermentação, logo, se não estiverem em forma de glicose, os açúcares são convertidos nesse monossacarídeo ou entram no ciclo respiratório na altura onde se encaixam. Nesse processo de geração de energia, em fungos ditos aeróbicos o aceptor final de elétrons é o oxigênio enquanto em fungos anaeróbicos é um composto orgânico, geralmente derivado da glicose. Há também os que executam os dois processos, são capazes de realizar respiração aeróbica e fermentação (PUTZKE, J; PUTZKE, M. T. L., 2002).

No que se trata de catabolismo do carbono no metabolismo fúngico, estes microrganismos obtêm sua energia a partir da decomposição de compostos orgânicos e, tanto estes quando algumas espécies de leveduras, quebram compostos poliméricos extracelularmente através de enzimas que são secretadas. Devido ao seu tamanho relativamente grande (20-60 kDa), enzimas agregadas ao complexo de Golgi são transportados em vesículas para serem secretadas de locais de crescimento celular, essencialmente das pontas das hifas. Essas enzimas podem ligar-se a parede celular ou difundir-se externamente de maneira que decaiam substratos no ambiente. Alguns exemplos de enzimas hidrolíticas, oxidativas,

peroxidativas e geradoras de radicais livres, produzidas por fungos para a degradação de compostos poliméricos são dispostos a seguir (KAVANAGH, 2005):

pectina  $\xrightarrow{\text{pectina liase, poligalacturonase}}$  ácido galacturônico

amido  $\xrightarrow{\text{amilases, glucoamilase}}$  glicose

inulina  $\xrightarrow{\text{inulinase}}$  frutose

celulose  $\xrightarrow{\text{celulases}}$  glicose

hemicelulose  $\xrightarrow{\text{hemicelulases, xilanase}}$  xilose, glicose

triglicerídeos  $\xrightarrow{\text{lipases}}$  ácidos graxos

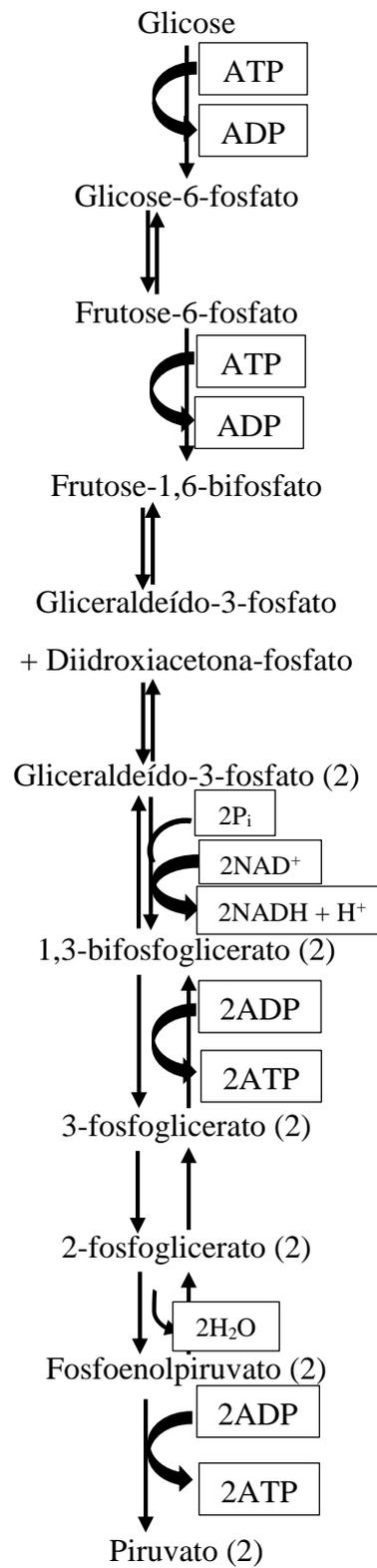
proteínas  $\xrightarrow{\text{proteinasas}}$  aminoácidos

quitina  $\xrightarrow{\text{quitinase}}$  N – acetilglucosamina

lignina  $\xrightarrow{\text{ligninase, manganês peroxidase, lacase, glicose oxidase}}$  variedade de compostos  
fenólicos

A sequência de reações catalisadas por enzimas que convertem a glicose em ácido pirúvico é conhecido como glicólise, onde uma molécula de glicose é degradada em uma série de reações catalisadas por enzimas gerando duas moléculas de piruvato (figura 2), e esta via proporciona energia às células fúngicas, em conjunto com moléculas precursoras e poder de redução (na forma de NADH) para vias biossintéticas. Ao servir ambas as funções, catabólica e anabólica, a glicólise é por vezes referida como sendo uma via anfibólica (KAVANAGH, 2005; NELSON; COX, 2014).

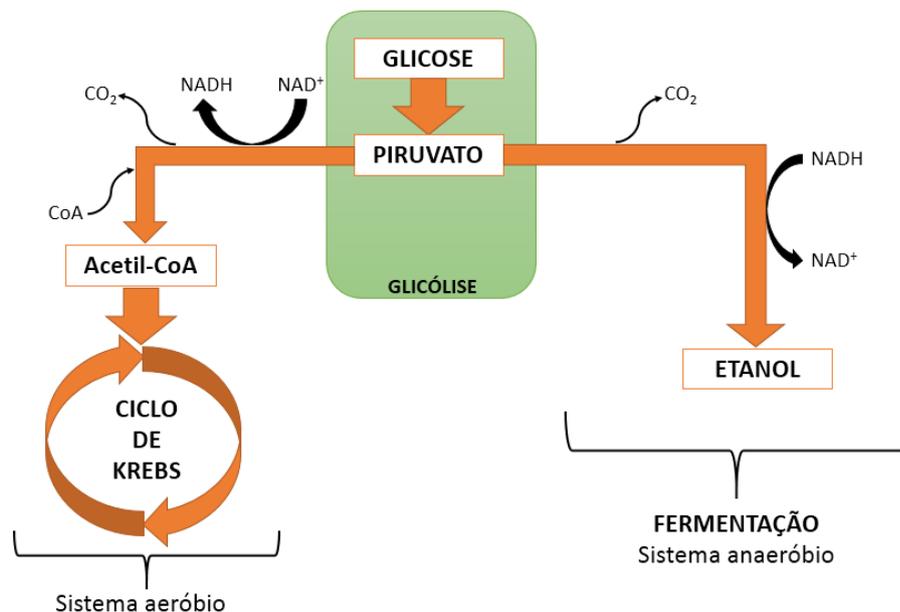
Figura 2 - Etapas da glicólise



Fonte: adaptado de NELSON; COX, 2014

De maneira geral, em condições aeróbias, o piruvato formado na etapa final da glicólise é oxidado a acetil-CoA, que entra no Ciclo do Ácido Cítrico e é oxidado a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . No entanto, em condições de hipoxia (pouco oxigênio), o NADH gerado pela glicólise não pode ser reoxidado pelo  $\text{O}_2$ , portanto,  $\text{NAD}^+$  deve ser regenerado de outra forma. As células primitivas que viviam em uma atmosfera praticamente desprovida de oxigênio tiveram que se adaptar e encontrar uma maneira de extrair energia de moléculas combustíveis em condições anaeróbias. A maioria dos organismos modernos reteve a capacidade de regenerar  $\text{NAD}^+$  continuamente durante a glicólise anaeróbia pela transferência de elétrons do NADH para formar um produto final reduzido, como lactato ou etanol (NELSON; COX, 2014).

Figura 3 - Destino do piruvato em sistemas aeróbio e anaeróbio



Fonte: adaptado de NELSON; COX, 2014

Em termos de necessidade de oxigênio, a maioria dos fungos são aeróbios, no entanto, alguns são referidos como anaeróbios facultativos. Nessa classe também se encaixam as leveduras, que só conseguem crescer em condições estritamente anaeróbicas se supridas com certos ácidos graxos e esteróis (os quais não são sintetizados sem oxigênio molecular). Para fungos e leveduras de respiração aeróbica, oxigênio é requerido como aceptor terminal de elétrons. Diferentes espécies de fungos respondem de diversas maneiras a disponibilidade de oxigênio, baseando-se nisso a Tabela 1 categoriza fungos e leveduras em diferentes grupos (KAVANAGH, 2005).

Tabela 1 - Metabolismo de fungos e leveduras baseados em suas respostas a disponibilidade de oxigênio

<b>Forma do metabolismo energético</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Comentários</b>
<b>Fermentativo obrigatório</b>	Leveduras: <i>Candida pintoypesii</i> ( <i>Saccharomyces telluris</i> )	Ocorre naturalmente em leveduras de respiração deficiente. Apenas fermenta, mesmo na presença de oxigênio.
	Fungos: anaeróbios obrigatórios e facultativos	Não requer oxigênio.
<b>Fermentativo facultativo</b>		
<b>Crabtree positivo</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermentam meios com elevado teor de açúcar na presença de oxigênio
<b>Crabtree negativo</b>	<i>Candida utilis</i>	Não formam etanol sob condições aeróbicas e não podem crescer anaerobicamente
<b>Não fermentativo</b>	Leveduras: <i>Rhodotorula rubra</i> Fungos: <i>Phycomyces</i>	Não produzem etanol, nem na presença ou ausência de oxigênio Oxigênio essencial (oxidativo obrigatório)
<b>Aeróbio obrigatório</b>	<i>Gaemannomyces graminis</i>	Crescimento reduzido se a pressão parcial do oxigênio cai abaixo da atmosférica normal

Fonte: Adaptado de WALKER, 1998; DEACON, 2000; CARLILE, WATKINSON E GOODAY, 2001 apud KAVANAGH, 2005

### 3.1.2 Fungos endofíticos

Microrganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que habitam os órgãos internos e tecidos de plantas, tais como folhas, caules, sementes e raízes, durante pelo menos um período de seus ciclos de vida, sem causar doenças ou produzir manifestação externa visível, dessa maneira diferenciam-se dos microrganismos fitopatogênicos, que são prejudiciais a planta e dos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais (AZEVEDO et al., 2000). Evidências sugerem que microrganismos endofíticos exercem efeito sobre fatores externos que possam agredir de alguma forma seu hospedeiro, como por exemplo conferir proteção contra pragas de insetos, outros microrganismos patogênicos e herbívoros. Dessa maneira, tornam-se objeto de estudo com o intuito de investigar os metabólitos produzidos por eles que, por exemplo, possam diminuir o ataque de insetos ou patógenos em plantas (YAN et al., 2015). Dentro deste contexto pode ser inserido o estudo de interações entre fungos a fim de verificar se o endofítico em questão inibe um patógeno que possa atacar seu hospedeiro.

Fungos endofíticos também podem comportar-se como patógenos prejudicando a produção de metabólitos de interesse em seus hospedeiros, essa condição irá depender das condições ambientais e fisiológicas que o hospedeiro se encontra. A atividade antioxidante de sementes de soja, por exemplo, está relacionada com a presença de isoflavonas em sua composição. Sementes saudáveis demonstraram uma maior capacidade antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS além de uma maior quantidade de isoflavonas em comparação com sementes infectadas com *Phomopsis longicolla* e *Cercospora kikuchii* (LEE et al., 2015).

Por outro lado, plantas medicinais se tornam uma fonte de interesse especial para o isolamento de microrganismos endofíticos pelo fato da possível interação que estes apresentam com seus hospedeiros. Yadav et al (2014) relataram atividade antioxidante em extratos de fungos endofíticos isolados de *Eugenia jambolana* Lam., popularmente conhecida como jamelão, esta atividade, provavelmente, está relacionada a quantidade de compostos fenólicos presentes nesses extratos. Compostos voláteis com atividade antibacteriana foram detectados em endofítico associado a *Costus spiralis* (Jacq) Roscoe (Costaceae), popularmente conhecida por cana-de-macaco ou cana-do-brejo, planta medicinal tradicionalmente utilizada para tratar afecções renais (SOARES et al., 2015).

Taxol®, um famoso agente antitumoral que atua sobre cânceres de mama e de ovário, inicialmente isolado de *Taxus brevifolia*, teixo do pacífico, também foi isolado do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, sendo relatadas as mesmas atividades imunológica e citotóxica do isolado da planta hospedeira (STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D., 1993).

Além deste, Leucinostatin A, composto que apresenta propriedades citotóxicas, anticâncer e antifúngicas foi isolado do fungo endofítico *Acremonium* (STROBEL; HESS, 1999). Em alguns casos o rendimento do composto de interesse é maior via produção através do endofítico em comparação a planta hospedeira. Para a obtenção de três gramas de vincristina que é um medicamento utilizado em quimioterapia, por exemplo, são necessárias três toneladas de folhas dessecadas de *Catharanthus roseus* G. Don (BRUNETON, 2001). Dessa maneira, compostos isolados de microrganismos endofíticos tornam-se de grande interesse biotecnológico.

### 3.2 *Phomopsis* sp.

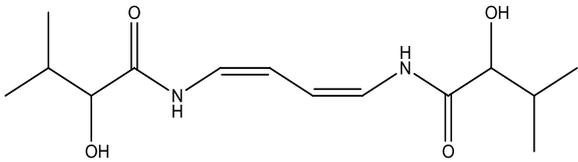
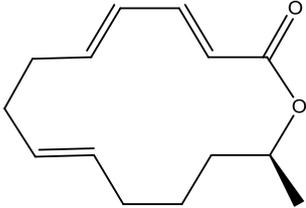
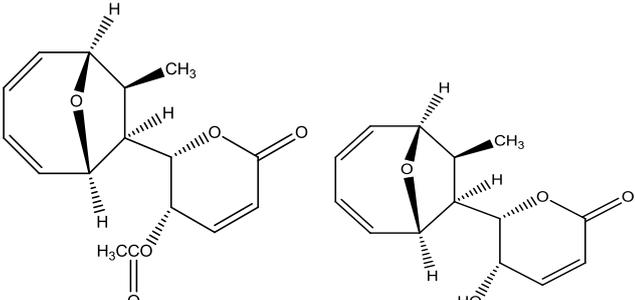
*Phomopsis* é um gênero de fungo endofítico que habita os tecidos vegetais de uma variedade de plantas hospedeiras em diversas regiões do mundo (UDAYANGA et al., 2011). Deste gênero já foram identificados compostos biologicamente ativos, tanto de extratos do caldo quanto do micélio, alguns até então desconhecidos como a phomoenamida, produzida por *Phomopsis* sp. PSU-D15 isolado de *Garcinia dulcis* (Roxb.) Kurz, que apresentou moderada atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, esse composto foi isolado através de cromatografia em coluna e teve sua estrutura elucidada através das técnicas de espectrometria de massas, ultravioleta (UV), infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) (RUKACHAISIRIKUL et al., 2008). A benquoina também foi isolada pela primeira vez deste mesmo gênero, produzida por *Phomopsis* sp. CMU-LMA isolado de *Alpinia malaccensis* (Burm.f.) Roscoe, apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e citotoxicidade contra a linhagem de câncer HCT-116, esse composto foi isolado através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e elucidado através de espectrometria de massas e RMN (ADELIN et al., 2011). Outros compostos produzidos por *Phomopsis* sp. BCC 45011, isolado de *Xylocarpus granatum* (Koen), apresentaram, além de atividade citotóxica contra células Vero, KB, MCF-7 e NCI-H187 e atividade antimicrobiana contra *B. cereus*, também apresentou atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum* K1 (KORNSAKULKARN et al., 2015).

Yenn et al (2012) testaram a atividade anti-cândida de *Phomopsis* sp. associando o extrato aquoso de sua planta hospedeira *Orthosiphon stamineus* Benth ao meio de cultura e verificaram um aumento significativo na atividade frente a *C. albicans*.

A produção de metabólitos secundários pertencentes a várias classes de interesse como flavonoides (ZHANG et al., 2016), alcaloides (SHWETA et al., 2013), entre outras, já foi

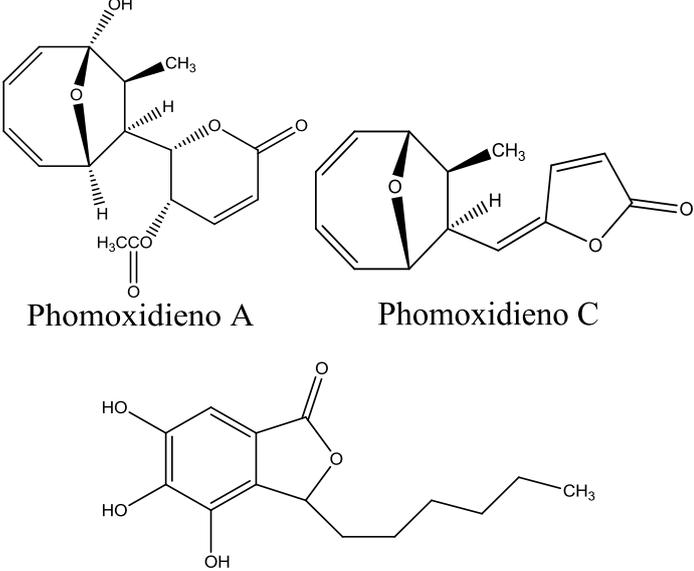
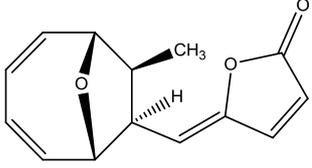
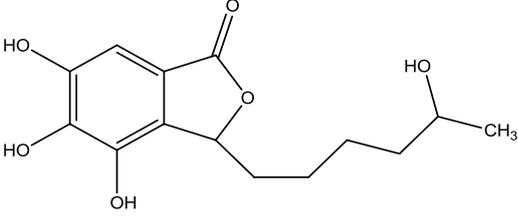
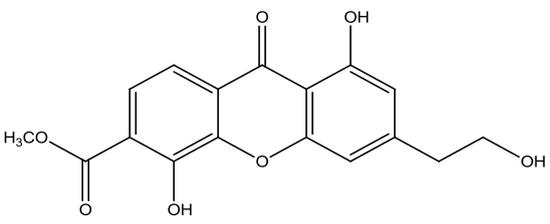
verificada estando de alguma maneira associada a presença de *Phomopsis* sp. na planta hospedeira. Xantonas, inéditas e conhecidas, produzidas por *Phomopsis* sp. isolado de *Paris polyphylla* Var. *Yunnanensis*, foram isoladas através de CLAE, tiveram suas estruturas elucidadas através de UV, espectrometria de massas e RMN e apresentaram citotoxicidade contra algumas linhagens de células tumorais (YANG et al., 2013).

Quadro 2 – Metabólitos com atividade biológica isolados de *Phomopsis* sp

Estrutura	Atividade	Origem
 <p style="text-align: center;">Phomoenamida</p>	<p>Moderada atividade contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra</p>	<p><i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>Garcinia dulcis</i> (Roxb.) Kurz</p>
 <p style="text-align: center;">Benquoína</p>	<p>Atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e citotoxicidade e contra a linhagem de câncer HCT-116</p>	<p><i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>Alpinia malaccensis</i> (Burm. F.) Roscoe</p>
 <p style="text-align: center;">Micoepoxidieno      Deacetilmicoepoxidieno</p>	<p>Atividade antimalárica contra <i>Plasmodium falciparum</i></p>	<p><i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>Xylocarpus granatum</i> (Koen)</p>

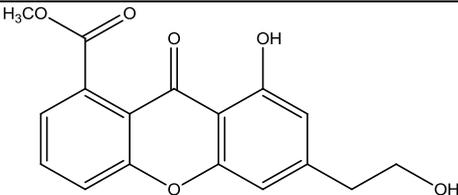
Continua na próxima página

## Continuação

 <p>Phomoxidieno A      Phomoxidieno C</p> <p>Citosporona E</p>	<p>K1 e</p> <p>atividade citotóxica contra células Vero, KB, MCF-7 e NCI-H187.</p>	
 <p>1893 A</p>	<p>Atividade citotóxica contra células Vero e NCI-H187.</p>	<p><i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>Xylocarpus granatum</i> (Koen)</p>
 <p>Citosporona P</p>	<p>Atividade antimalárica contra <i>Plasmodium falciparum</i></p> <p>K1</p>	<p><i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>Xylocarpus granatum</i> (Koen)</p>
 <p>1,5-dihidroxi-3-hidroxi-etil-6-metoxicarbonilxantona</p>	<p>Atividade citotóxica contra as linhagens de células tumorais A549 e MCF7</p>	<p><i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>Paris polyphylla</i> Var. <i>Yunnanensis</i></p>

Continua na próxima página

## Continuação

 <p>1-hidroxi-3-hidroxi-etil-8-etoxicarbonilxantona</p>	<p>Atividade citotóxica contra a linhagem de célula tumoral A549</p>	<p><i>Phomopsis</i> sp. isolado de <i>Paris</i> <i>polyphylla</i> Var. Yunnanensis</p>
--	--	--

Fonte: RUKACHAISIRIKUL et al., 2008; ADELIN et al., 2011; KORNSAKULKARN et al., 2015; YANG et al., 2013

### 3.3 RMN e Metabolômica

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica com aplicação nas mais diferentes áreas sendo utilizada por exemplo na determinação da estrutura tridimensional de compostos em solução ou no estado sólido; em estudos sobre a dinâmica molecular, a complexação e os processos de reconhecimento molecular; na confirmação de estruturas de substâncias obtidas através de síntese e na elucidação de novas estruturas obtidas de produtos naturais (NASCIMENTO, 2016).

O uso da RMN bidimensional é uma ferramenta importante no que diz respeito a elucidação estrutural, pois, a dispersão dos sinais em duas dimensões facilita a análise de espectros para compostos complexos estruturalmente. As técnicas bidimensionais subdividem-se em homonucleares e heteronucleares, dentre as homonucleares tem-se o COSY (Correlated Spectroscopy) no qual as duas dimensões do espectro gerado correspondem às frequências de hidrogênio, suas correlações são por meio de ligações químicas, tem-se ainda o NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) onde as correlações são feitas espacialmente (NASCIMENTO, 2016). Dentre as técnicas heteronucleares tem-se HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) na qual detecta-se acoplamentos escalares a uma ligação. Contudo, para observar correlações a longa distância utiliza-se a técnica HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) (NASCIMENTO, 2016).

O estudo em metabolômica exige o uso de instrumentos e técnicas aprimoradas, em especial, pelo fato de que em uma única amostra de origem biológica possam estar presentes milhares de compostos. Partindo desse fato, técnicas de cromatografia são muito utilizadas na separação desses compostos e posterior detecção utilizando-se técnicas espectrométricas. Porém, como todas as técnicas, a cromatografia apresenta suas limitações. Tratando-se da cromatografia gasosa de alta resolução, esta só pode ser aplicada a compostos volatilizáveis e termoestáveis a 350 °C enquanto na cromatografia líquida de alta eficiência pode ocorrer co-

eluição de substâncias a depender da complexidade da amostra (FUNARI et al., 2013). Neste sentido, a ressonância magnética nuclear (RMN) ganha espaço tornando a obtenção de perfis metabólicos mais eficiente para uma maior variedade de amostras.

Wishart (2008) destaca que apesar de técnicas de cromatografia acopladas a espectrômetro de massas terem ganhado espaço em experimentos relacionados a metabolômica, RMN ainda apresenta vantagens como, por exemplo, não destruir a amostra, permitir uma fácil quantificação, requerer pouca ou nenhuma separação, permitir a identificação de novos compostos e não necessitar de derivatização química.

Tendo sido aplicada nas mais diversas áreas, a RMN tem ganhado destaque no que diz respeito a determinação de perfis metabólicos. Nas ciências médicas por exemplo, a metabolômica por RMN  $^1\text{H}$  mostrou-se uma técnica relativamente menos invasiva e mais rápida para rastrear e identificar isquemia do miocárdio em pacientes com angina instável (AMETA et al., 2016). No âmbito fitoquímico, variações metabólicas em *Neptunia oleracea* foram avaliadas também através de RMN  $^1\text{H}$  obtendo-se, com o auxílio de análise multivariada, forte correlação entre estes metabólitos e as atividades antioxidantes e inibitórias de  $\alpha$ -glucosidase das folhas desta planta (LEE et al., 2016). Nota-se que em estudos recentes que abordam perfilhamento metabólico a técnica tem sido preferencialmente escolhida.

Técnicas quimiométricas são importantes aliadas nos mais diferentes estudos em torno de metabolômica. Dentre as diversas aplicações, ferramentas quimiométricas, já foram utilizadas para realizar uma triagem da composição química e enzimática em raízes de mandioca durante o período de deterioração fisiológica pós-colheita (UARROTA et al., 2014). Análises multivariadas utilizando respostas a partir de espectros de RMN também tem sido amplamente utilizadas em estudos de metabolômica (SAVORANI et al., 2013). O perfil metabolômico do fungo *Piromyces* sp. F1 foi analisado por RMN, nesse estudo o citrato revelou-se como um dos principais metabólitos do fungo anaeróbico associado a um metanogênico, sugerindo uma rota metabólica ainda não identificada nessa co-cultura (CHENG et al., 2013). Sendo assim, o uso de RMN atrelada a quimiometria torna-se uma alternativa interessante para a realização desse tipo de estudo.

### **3.4 Compostos Orgânicos Voláteis e Microrganismos Associados a Plantas**

Microrganismos endofíticos, apesar de sua relação simbiote com o hospedeiro ainda não ser muito bem compreendida (MOLLER; LERM; BOTHA, 2016), têm mostrado diferentes interações com insetos que podem atacar a planta que os hospeda. A partir disso inicia-se um

amplo estudo em torno de endofíticos atuando no controle de insetos-praga. Nesse âmbito, de uma maneira geral, no que se avalia a presença de endofíticos e o ataque de insetos, tem-se uma situação em que a planta hospedeira e, conseqüentemente, as colônias endofíticas são as favorecidas (MELO; AZEVEDO, 2000). Esse comportamento, dentre outros fatores, é atribuído a produção de compostos orgânicos voláteis emitidos por esses endofíticos.

É importante mencionar que nem sempre o microrganismo associado a planta se mostrará relacionado ao afastamento de insetos, em alguns casos as substâncias produzidas por eles podem atuar como atraentes (MORATH; HUNG; BENNETT, 2012), o que não significa necessariamente que será prejudicial a planta. Contudo, nem sempre esse comportamento resultará na proteção do hospedeiro. Já foi relatado que um mesmo volátil, isolado de grãos de trigo infectados por fungos, atua tanto como atraente quanto repelente frente a *Plodia interpunctella*, uma mariposa conhecida como traça-indiana-da-farinha, a depender da concentração, dessa forma um mesmo composto pode influenciar tanto na proteção quanto na susceptibilidade ao ataque de insetos (BUDA et al., 2016).

De maneira similar, fungos epifíticos também são capazes de emitir compostos voláteis que atuam como atrativos (DAVIS; MILLS; LANDOLT, 2012). Nota-se que o campo de estudo envolvendo a produção e emissão de semioquímicos por microrganismos associados a plantas é promissor e ainda não é tão bem aprofundado. A descoberta de compostos orgânicos voláteis de fungos atuando como feromônios, alomônios, cairomônios, etc (MORATH; HUNG; BENNETT, 2012) pode trazer uma alternativa interessante para o controle de ataque de insetos-praga em determinadas plantações.

## **4.METODOLOGIA**

*Phomopsis* sp. foi isolado de *S. jambolanum*, popularmente conhecida como jambolão e brinco de viúva, em trabalho anterior realizado por Lima (2010). Este isolamento foi feito do sétimo explante do caule da planta localizada no campus A.C. Simões da Universidade Federal de Alagoas, neste explante foram obtidos dois fungos endofíticos. Para dar prosseguimento a este estudo foi escolhido o endofítico que obteve melhor desempenho quando testado antagonicamente frente aos fungos fitopatogênicos conhecidos *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora*.

### **4.1 Preparação de Meios de Cultura**

#### **4.1.1 Meio batata-dextrose-ágar (BDA)**

Para cada 1L de meio foram utilizados 200 g de batata inglesa previamente descascadas e cortadas em discos. Estas foram cozidas em 500 mL de água destilada durante 30 minutos, em seguida a mistura foi filtrada com papel de filtro. Ao filtrado foram adicionados 20 g de D-(+)-Glicose anidra P.A., 20 g de Ágar-Ágar tipo I e mais 500 mL de água destilada e, após total dissolução, a mistura foi esterilizada em autoclave por 17 minutos a 1 atm.

#### **4.1.2 Meio batata-dextrose (BD)**

Para o preparo do meio BD foi realizado o mesmo procedimento do meio BDA, excluindo-se o ágar. O meio foi distribuído em frascos erlenmeyer 250 mL cada um comportando 100 mL do material. A mistura foi esterilizada em autoclave por 20 minutos a 1 atm.

### **4.2 Avaliação da Evolução Metabólica no Caldo da Cultura**

#### **4.2.1 Cultivo**

O microrganismo inicialmente foi cultivado em meio BDA durante 7 dias. Após esse período, realizou-se o repique e inoculação em 40 frascos contendo meio BD, onde o fungo foi cultivado durante 8 semanas em frascos vedados, sem agitação e na ausência de luz, pois foi observado que nessas condições a pigmentação liberada ao meio pelo fungo é mais intensa.

#### 4.2.2 Coleta

A cada semana, 5 frascos foram retirados para a coleta do caldo da cultura. Alíquotas de 1,5 mL foram retiradas de cada frasco e transferidas para tubos eppendorf onde foram conservadas em refrigerador, essa etapa foi realizada em câmara de fluxo laminar horizontal devidamente esterilizada. Dos frascos recolhidos, micélio e caldo foram separados por filtração simples utilizando filtro de papel, o restante do material foi descartado, o micélio foi desidratado em estufa (UNITERM® Serie 1500) a 50 °C durante 7 dias. Após a secagem do micélio, este foi pesado para determinação da biomassa produzida.

#### 4.2.3 Crescimento do Micélio

A taxa de crescimento do micélio foi determinada pela média de 5 amostras coletadas separadamente à cada semana, tendo um total de 40 amostras. A partir do micélio previamente seco e pesado construiu-se a curva de crescimento.

#### 4.2.4 Experimentos de RMN

##### 4.2.4.1 Preparo da Solução Padrão Tampão Fosfato de Sódio 0,1m (Ph = 7,4) com 1 mM de TSP

A solução foi preparada adicionando 0,31 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e 1,09 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (anidro) em 100 mL de água destilada. O pH da solução final foi de 7,4. Adicionaram-se 0,0172 g de TSP 0,1 mM, para ser utilizado como padrão de deslocamento nos experimentos de RMN.

##### 4.2.4.2 Análises de RMN $^1\text{H}$

Para cada análise utilizaram-se 350  $\mu\text{L}$  do caldo da cultura, adicionados a 350  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato de sódio (pH = 7,4, com TSP) e 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  em tubos próprios de 5 mm de diâmetro. O experimento foi realizado a 25 °C utilizando-se do experimento NOESY1D (sequência de pulsos Noesygppr1d), para supressão do sinal referente a água, em um espectrômetro BRUKER UltraShield 400 MHz.

Para todos os experimentos foram utilizados os seguintes parâmetros:

TD: 64K (número de pontos do espectro)

NS: 64 (número de experimentos)

SW: 13,0143 ppm (largura da janela)

RG: 256

O1P: 4,692 ppm (posição onde aparece o sinal referente a água e, portanto, é irradiada)

D1: 6,00 s (tempo de relaxação)

#### **4.2.4.3 Análise dos espectros**

Os espectros foram pré-processados no software TopSpin<sup>®</sup> 3.5. Para identificação dos metabólitos utilizou-se uma licença gratuita do software Chenomx<sup>®</sup> e banco de dados disponível em [www.hmdb.ca](http://www.hmdb.ca). A análise estatística multivariada foi realizada utilizando-se o software MatLab<sup>®</sup> 2013a através de ferramenta desenvolvida pelo Dr. K. Veselkov (Imperial College, London, UK).

### **4.3 Extração e Identificação de Compostos a Partir do Micélio**

#### **4.3.1 Extrato em clorofórmio**

*Phomopsis* sp. foi cultivado em 3000 mL de meio BD distribuídos igualmente em 30 frascos erlenmeyer de 250 mL. Após o período de 8 semanas, o material foi filtrado através de filtração simples em filtro de papel. O micélio foi posto em estufa (UNITERM<sup>®</sup> Serie 1500) a 50 °C durante 7 dias e, após desidratado, foi extraído com os solventes orgânicos (3x100mL), em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Em seguida, fez-se a filtração em papel de filtro comum e concentrou-se as soluções em evaporador rotatório a 40 °C.

Em trabalho anterior realizado por Rocha (2013) foram realizados testes qualitativos frente a cloreto férrico e Dragendorff e foi constatada a presença de compostos fenólicos e alcaloídicos no extrato em clorofórmio, sendo assim esse extrato foi escolhido para dar continuidade ao trabalho. Esse extrato foi separado utilizando a técnica de cromatografia líquida clássica. Os eluentes usados como fase móvel foram respectivamente: hexano, hexano:diclorometano (2:1, 1:1, 1:2), diclorometano, diclorometano:clorofórmio (2:1, 1:1, 1:2), clorofórmio, clorofórmio:metanol (2:1, 1:1, 1:2) e metanol, 40 mL de cada. Como fase estacionária foi utilizada sílica em coluna de 20cm de altura e 1cm de diâmetro. A cromatografia em camada delgada de sílica também foi utilizada para verificar se a fração coletada se tratava de uma mistura, o eluente utilizado foi CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (98:2).

#### 4.3.1.1 Experimento de RMN

O sólido obtido após secagem foi dissolvido em  $\text{CDCl}_3$ . Para obtenção dos espectros e posterior identificação do composto isolado, a amostra foi submetida aos experimentos de RMN unidimensionais  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135, DEPT 90 e bidimensionais COSY, NOESY, HMBC, HSQC e J-resolvido. O deslocamento químico dos sinais foi ajustado utilizando como referência o sinal do tetrametilsilano (TMS).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Cultivo e Avaliação do Crescimento Micelial

Em 7 dias de cultivo em BDA, *Phomopsis* sp apresentou pigmentação levemente amarelada.

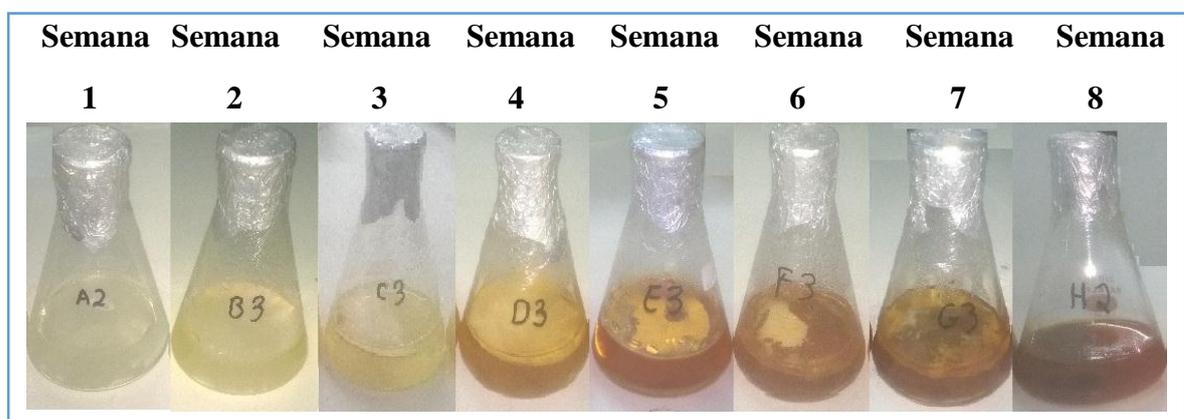
Figura 4 - Cultivo de 7 dias de *Phomopsis* sp. em meio BDA



Fonte: autora

Durante o cultivo em BD, verificou-se a intensificação da pigmentação amarela no decorrer das semanas até atingir o castanho na oitava semana. Essa pigmentação, que foi consideravelmente elevada a partir da quarta semana, é atribuída a metabólitos secundários (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2006). Essa observação indica que esse metabolismo é melhor estabelecido nesse período.

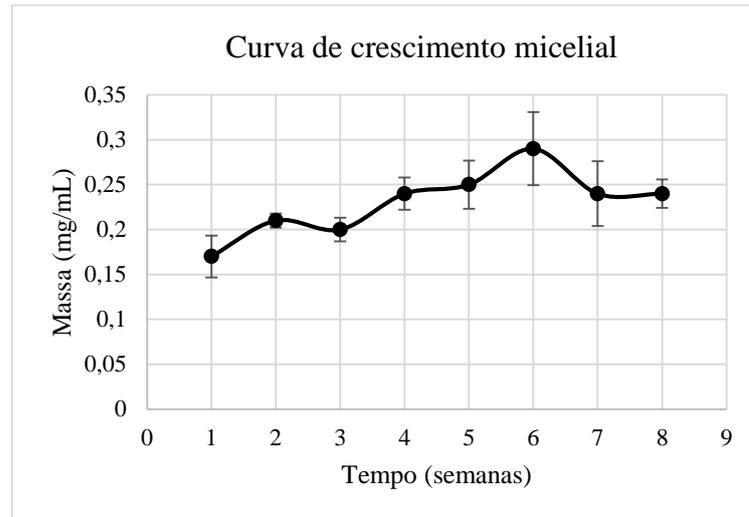
Figura 5 - Evolução do cultivo de *Phomopsis* sp em meio BD durante 8 semanas



Fonte: autora

Analisando a curva de crescimento micelial, observa-se que o endofítico apresentou um crescimento acentuado da primeira para segunda semana e segue em ascensão até a quarta semana. A partir da quarta semana não há variação significativa em quantidade de massa micelial.

Figura 6 - Curva de crescimento micelial de *Phomopsis* sp durante 8 semanas de cultivo

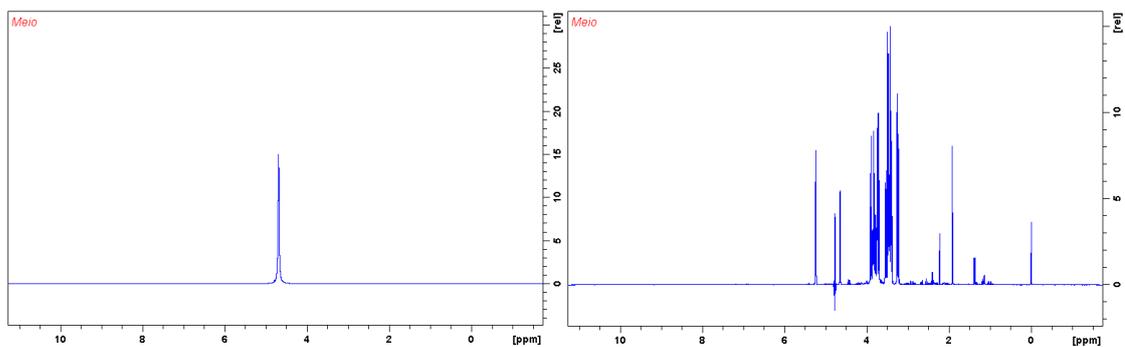


Fonte: autora

## 5.2 Evolução Metabólica no Caldo da Cultura

Para identificação de metabólitos no caldo da cultura (CC) de *Phomopsis* sp por RMN  $^1\text{H}$  foi necessária a supressão do sinal da água através da técnica NOESY1D, por tratar-se de amostras aquosas, sem essa técnica a análise dos espectros para a metabolômica seria impossibilitada.

Figura 7 - Espectros do meio de cultura puro (MC) sem supressão (à esquerda) e com supressão (à direita) do sinal da água



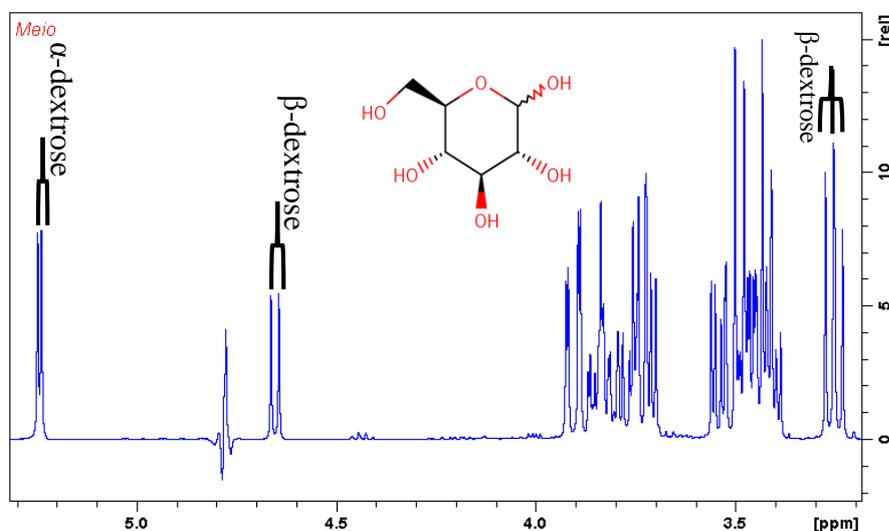
Fonte: autora

Analisando os espectros do MC foram detectados sinais referentes a  $\alpha$ - e  $\beta$ -dextrose (figura 8), 5,24 e 4,65 ppm, respectivamente, além de acetoína (1,37 ppm, d; J = 7,15 Hz, CH<sub>3</sub>; 2,21 ppm, s, CH<sub>3</sub>; 4,42 ppm, q, CH), asparagina (2,84 ppm, m, CH'; 2,94 ppm, m, CH''; 4,00 ppm, dd, J = 7,69 e 4,26 Hz, CH), citrato (2,53 ppm, d, J = 15,88, Ha; 2,66 ppm, d, J = 15,88, Hb), succinato (2,40 ppm, s, CH<sub>2</sub>), piruvato (2,46 ppm, s, CH<sub>3</sub>) (figura 9), acetato (1,92 ppm, s, CH<sub>3</sub>), etanol (1,18 ppm, t, J = 7,00, CH<sub>3</sub>; 3,66 ppm, q, J = 7,00, CH<sub>2</sub>), oxaloacetato (2,38 ppm, s, CH<sub>2</sub>) (figura 10), piroglutamato (2,02 ppm, m, CH'; 2,39 ppm, m, CH<sub>2</sub>; 2,50 ppm, m, CH''; 4,17 ppm, dd, J = 9,02 e 5,83 Hz, CH) (figura 11), tirosina (3,02 ppm, dd, CH'; 3,17 ppm, dd, CH''; 3,92 ppm, dd, CH; 6,90 ppm, m, CH; 7,20 ppm, m, CH), fumarato (6,53 ppm, s, CH) (figura 12) e metanol (3,36 ppm, s, CH<sub>3</sub>). Nota-se que os sinais detectados não incluem os sinais dos hidrogênios ácidos de hidroxilas e aminas presentes nas estruturas desses metabólitos, fato esperado, pois, tratando-se de uma amostra aquosa, há a formação de ligações de hidrogênio e a aplicação da técnica NOESY1D, ao suprimir o sinal da água, também elimina os sinais desses hidrogênios.

Todos os deslocamentos e constantes de acoplamento foram verificados através de consulta aos bancos de dados The Human Metabolome Database – HMDB (<http://www.hmdb.ca/>), da biblioteca de sinais do software Chenomx<sup>®</sup> e dados da literatura.

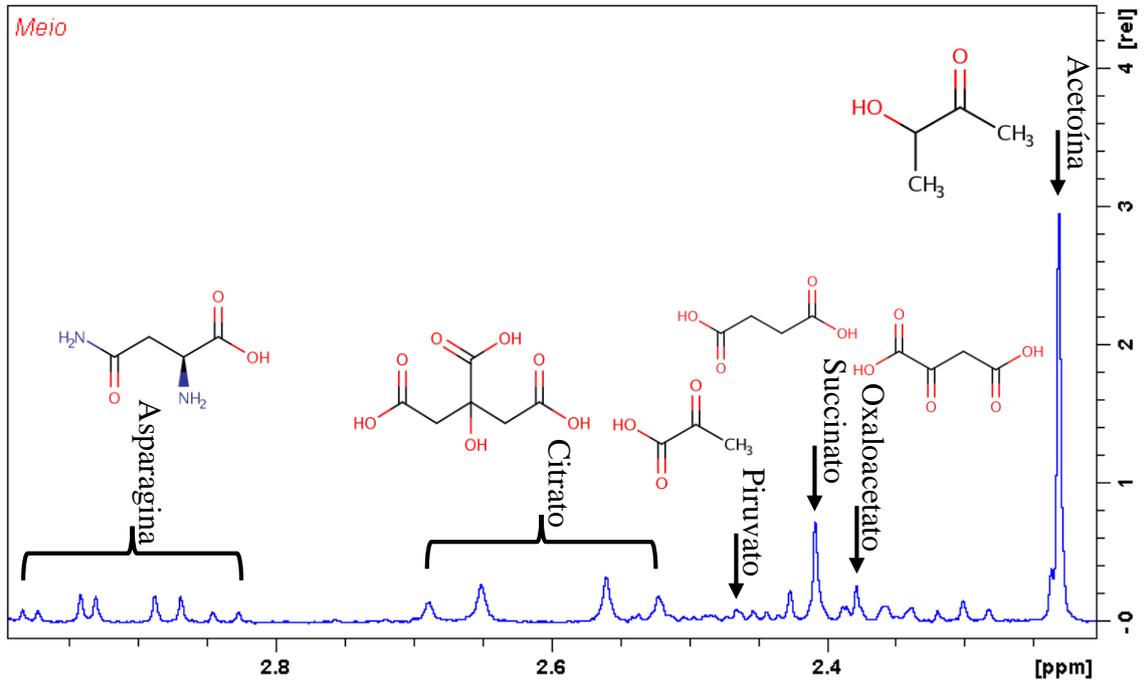
A dextrose foi adicionada no preparo do meio de cultura e os metabólitos hidrossolúveis pertencentes a batata passam para a água durante o cozimento, logo fazem parte do meio e são detectados durante a análise. ROESSNER et al. (2000) e PARR et al. (2005) citaram a presença de diversos metabólitos na batata através do uso das técnicas de espectrometria de massas e cromatografia líquida e gasosa.

Figura 8 - Sinais referentes a  $\alpha$ - e  $\beta$ -dextrose no espectro de RMN <sup>1</sup>H do MC



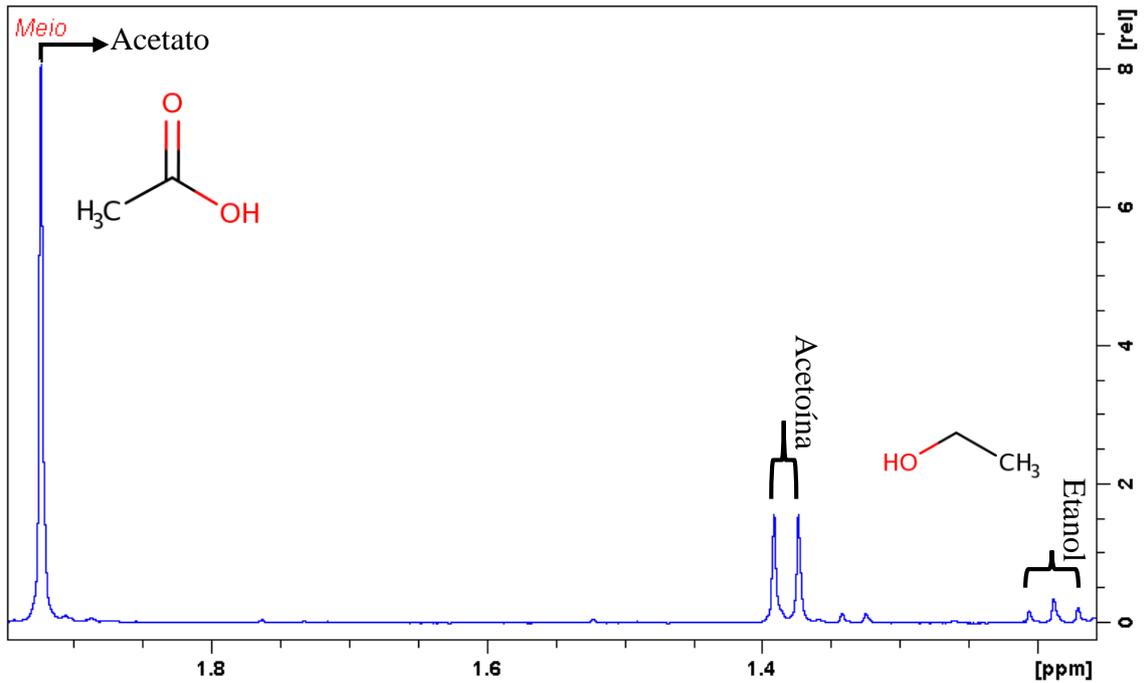
Fonte: autora

Figura 9 - Metabólitos identificados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do MC na região de 2,20-2,99 ppm, ampliado 8x



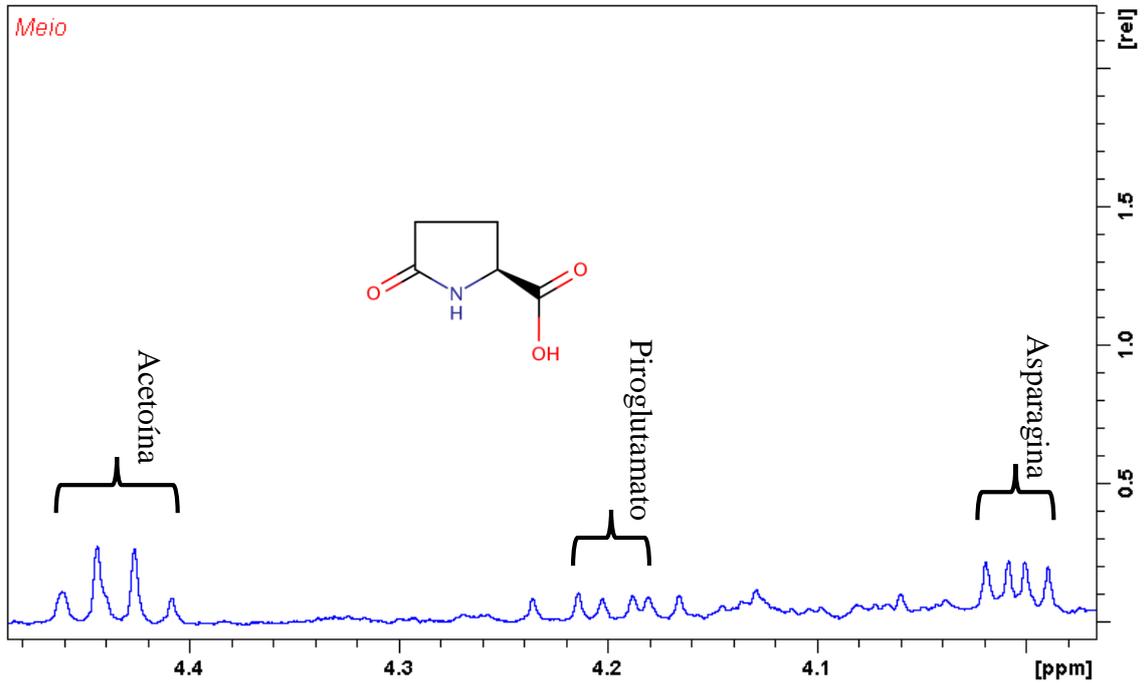
Fonte: autora

Figura 10 - Metabólitos identificados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do MC na região de 1,16-1,94 ppm, ampliado 4x



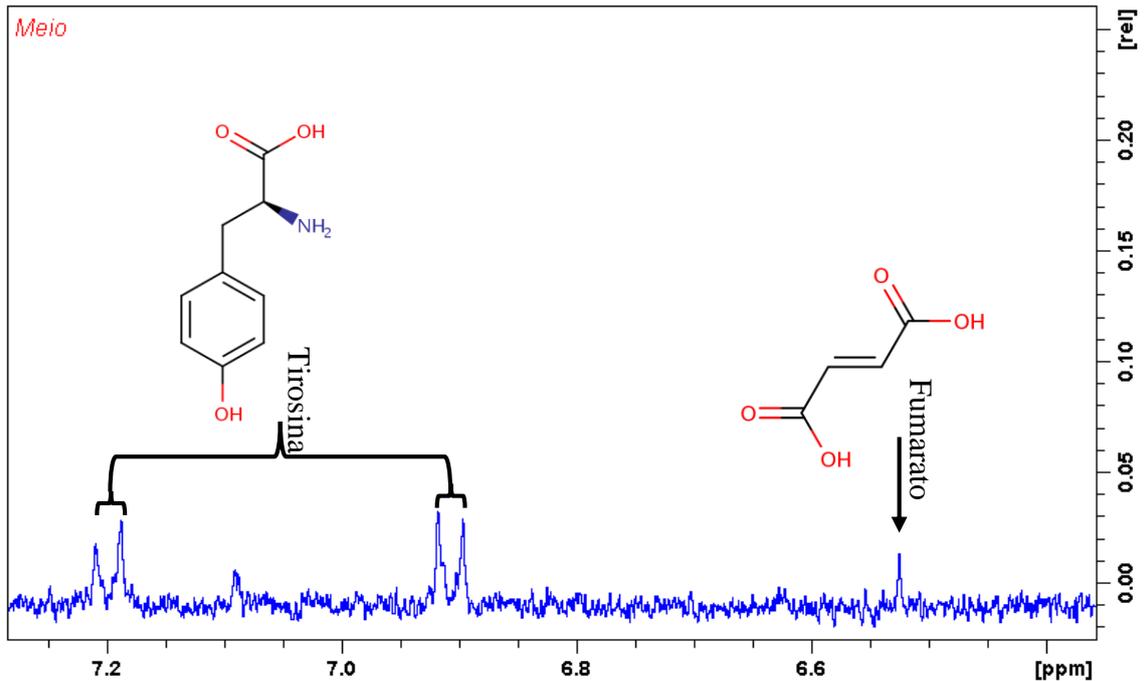
Fonte: autora

Figura 11 - Metabólitos identificados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do MC na região de 3,96-4,48 ppm, ampliado 16x



Fonte: autora

Figura 12 - Metabólitos identificados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  do MC na região de 6,35-7,28 ppm, ampliado 64x

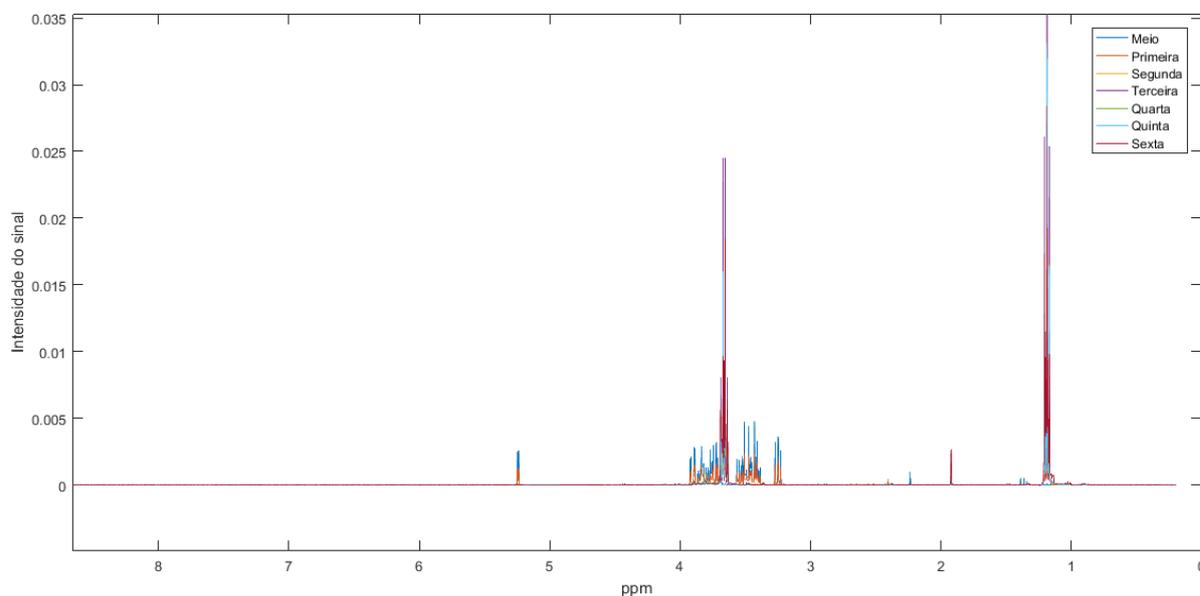


Fonte: autora

Analisando os espectros do CC a partir da primeira até a sexta semana de cultivo é possível observar variações nas intensidades dos sinais dos metabólitos (figura 13), ou seja, há uma variação quantitativa desses compostos. É possível observar ainda um aumento significativo na intensidade dos sinais do etanol, que se elevam até a última semana (figura 14), indicando a ocorrência de fermentação, este fato é atribuído às condições de cultivo, onde os frascos foram mantidos vedados, sem agitação e na ausência de luz. Além disso, a presença de alguns metabólitos que não foram detectados no MC foi observada a partir da primeira semana de cultivo (CC1), são eles: alanina (1,48 ppm, d,  $J = 7,14$  Hz, CH; 3,76 ppm, q,  $J = 7,20$  Hz, CH) (figura 15), malato (2,36 ppm, dd,  $J = 15,38$  e  $10,10$  Hz, CH'; 2,66 ppm, dd,  $J = 15,36$  e  $2,90$  Hz, CH"); 4,29 ppm, dd,  $J = 10,12$  e  $2,80$  Hz, CH) (figura 16), formato (8,46 ppm, s, CH) (figura 17) e formaldeído (9,68 ppm, s, CH<sub>2</sub>) (figura 18).

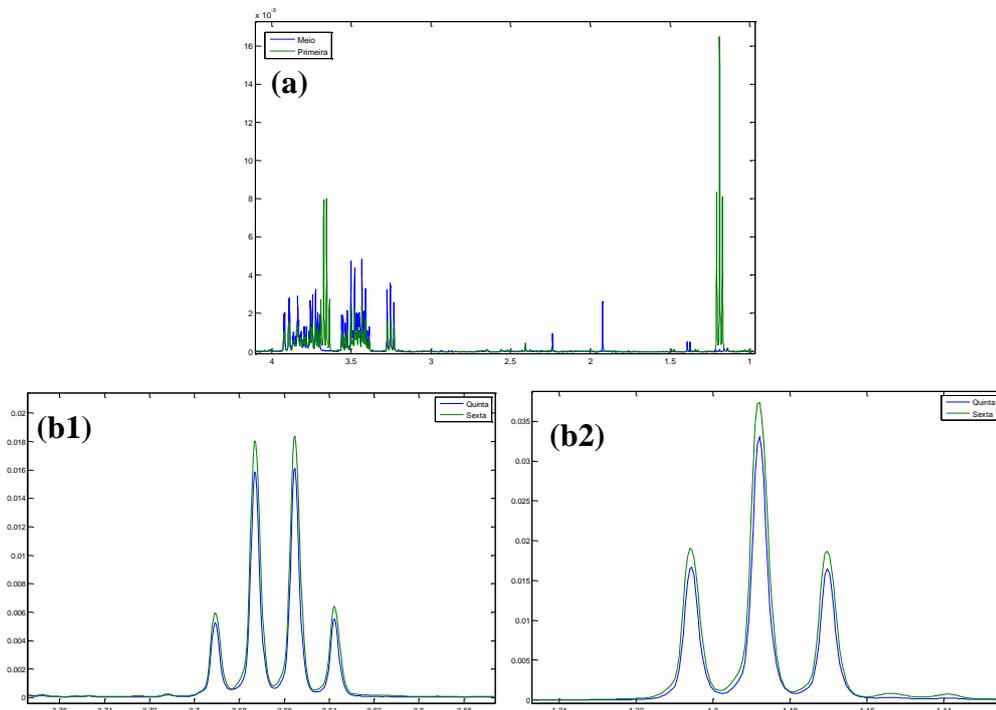
Por outro lado, asparagina, detectada no MC, já não foi observada na CC1 indicando que o microrganismo a metabolizou (figura 19). É possível observar essas variações de intensidade entre o MC e a CC1 nas figuras 19-23 geradas utilizando o software MatLab<sup>®</sup>.

Figura 13 - Sobreposição dos espectros das seis semanas



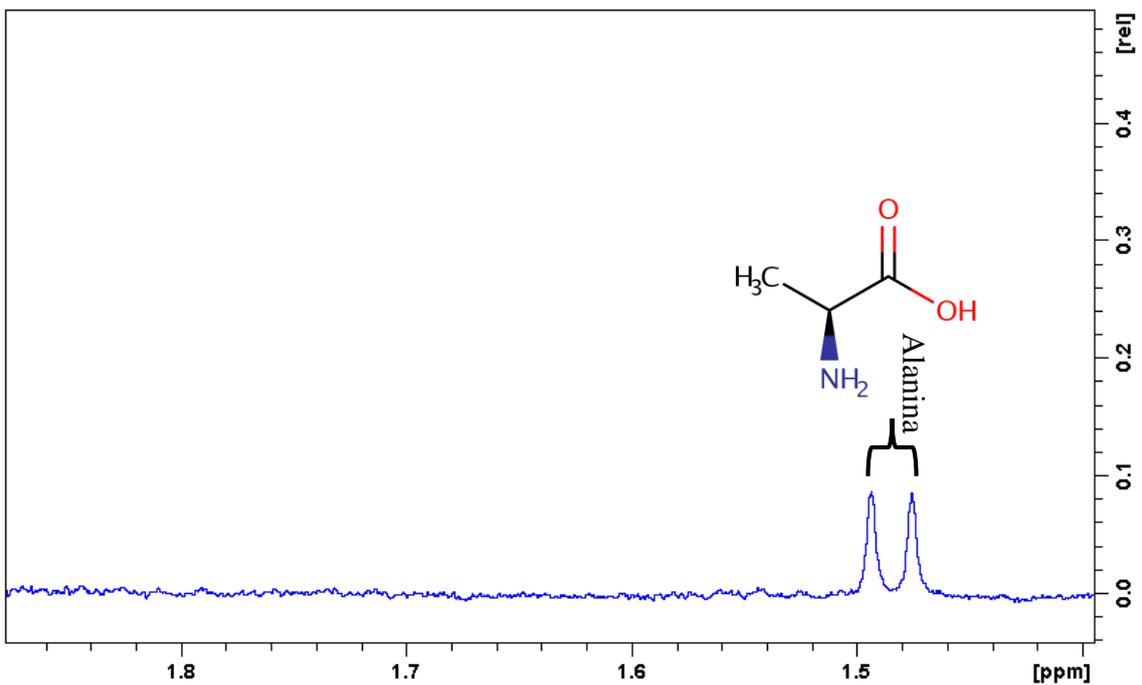
Fonte: autora

Figura 14 - Sobreposição dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  do MC e da CC1 (a) e da quinta e sexta semana (b1) e (b2), para observação do aumento da intensidade do sinal do etanol



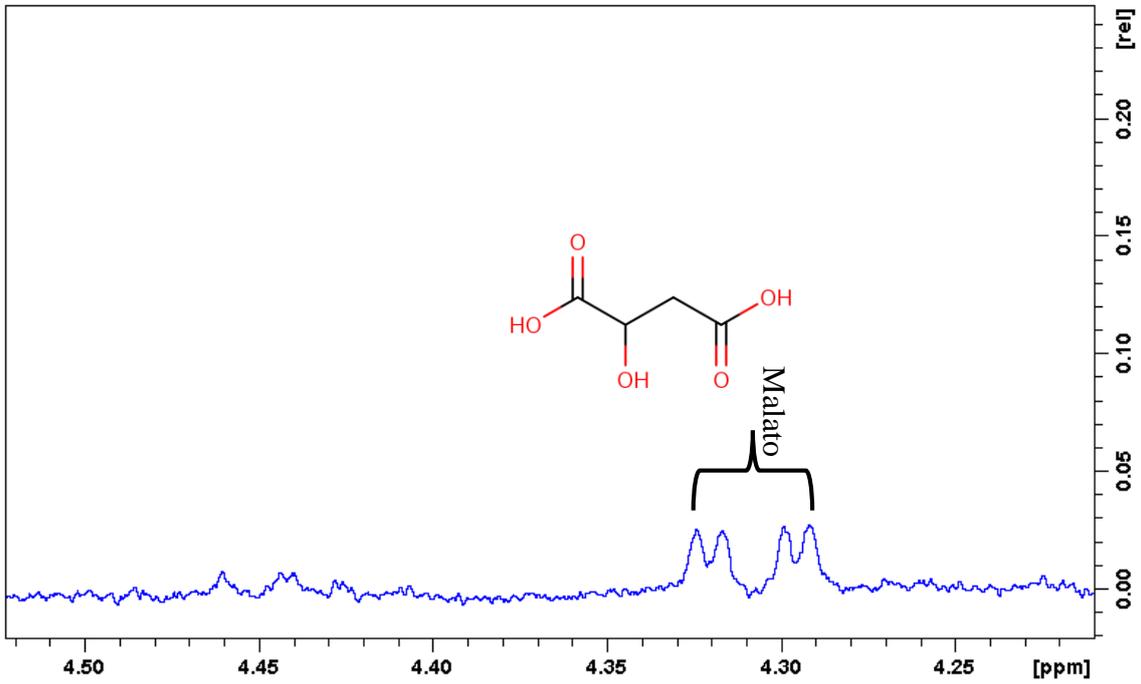
Fonte: autora

Figura 15 - Duplete referente a alanina identificado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  da CC1 na região de 1,39-1,87 ppm ampliado 32x



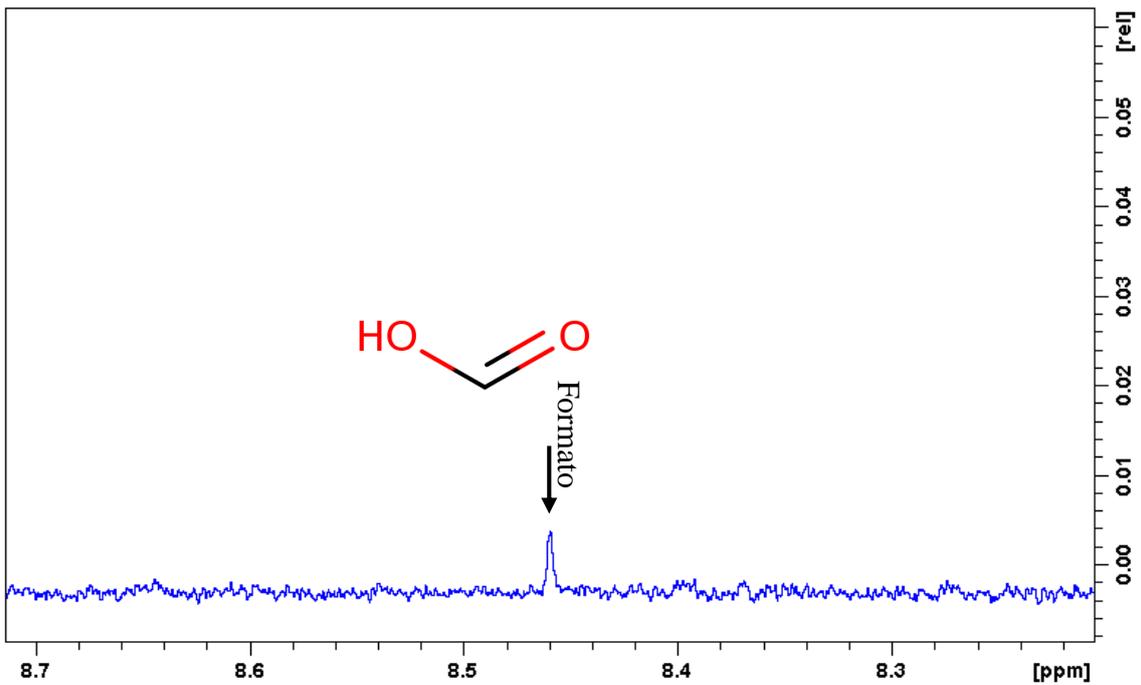
Fonte: autora

Figura 16 - Duplo duplete referente ao malato identificado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  da CC1 na região de 4,21-4,52 ppm ampliado 64x



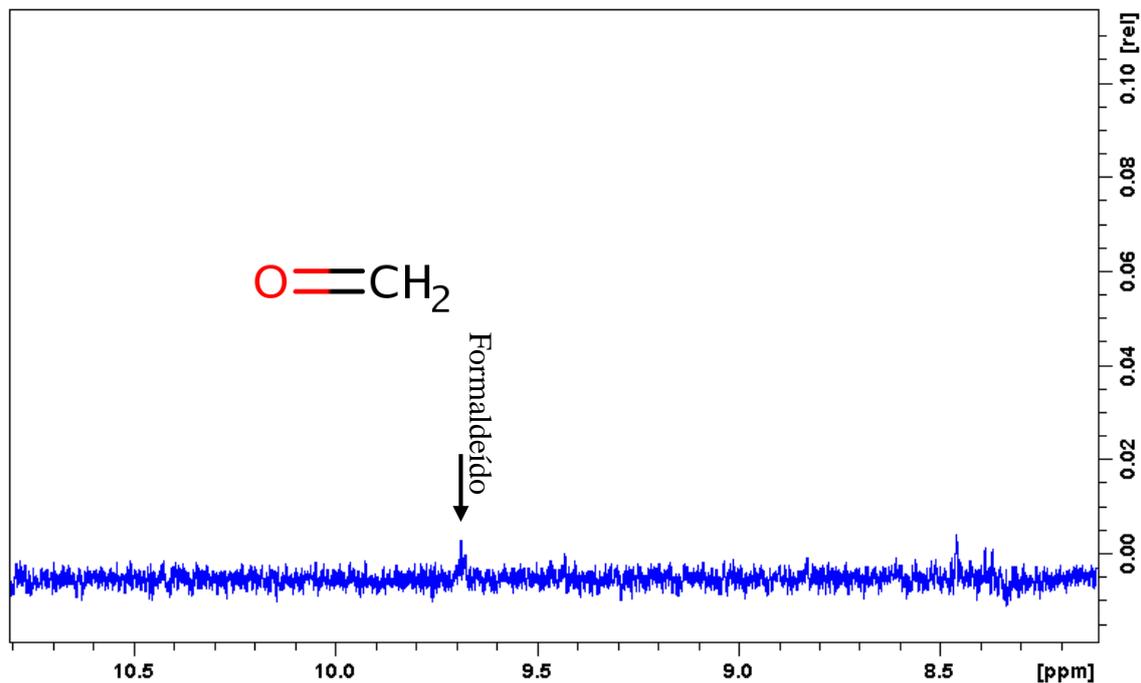
Fonte: autora

Figura 17 - Simpleto referente ao formato identificado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  da cultura da segunda semana de cultivo (CC2) na região de 8,20-8,71 ppm ampliado 128x



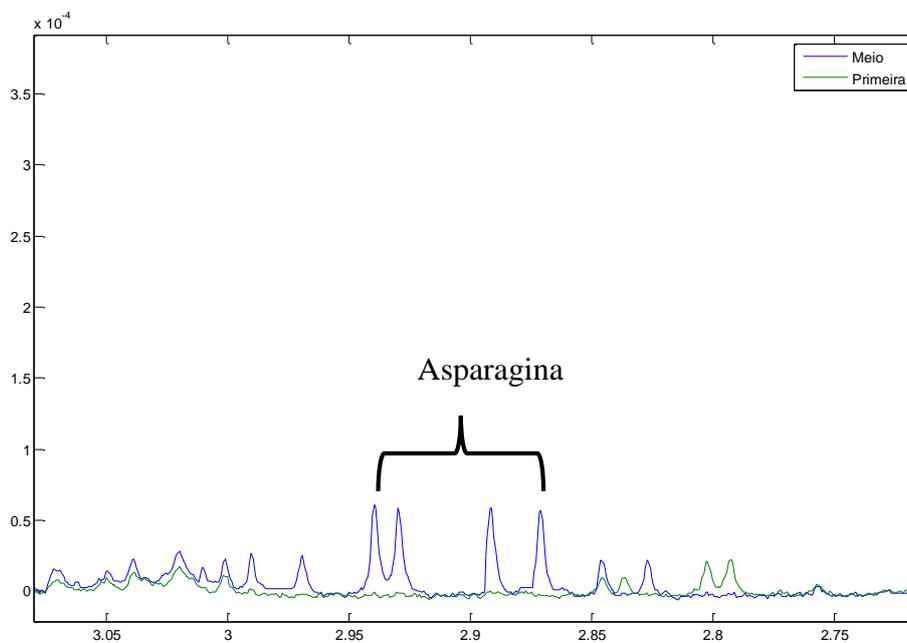
Fonte: autora

Figura 18 - Simpleto referente ao formaldeído identificado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  da CC1 na região de 8,11-10,80 ppm ampliado 128x



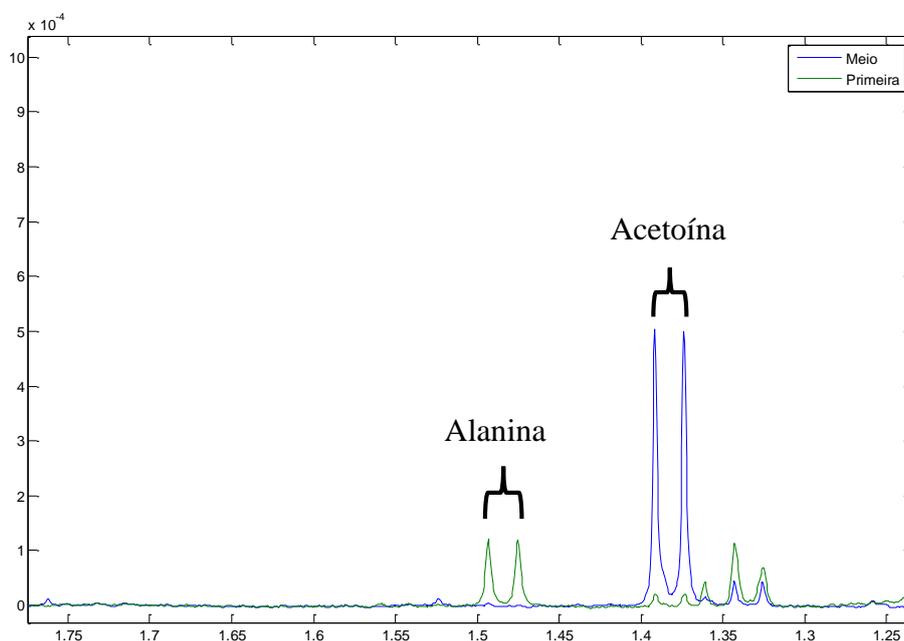
Fonte: autora

Figura 19 - Sobreposição dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  do MC e da CC1 de cultivo: sinais referentes a asparagina



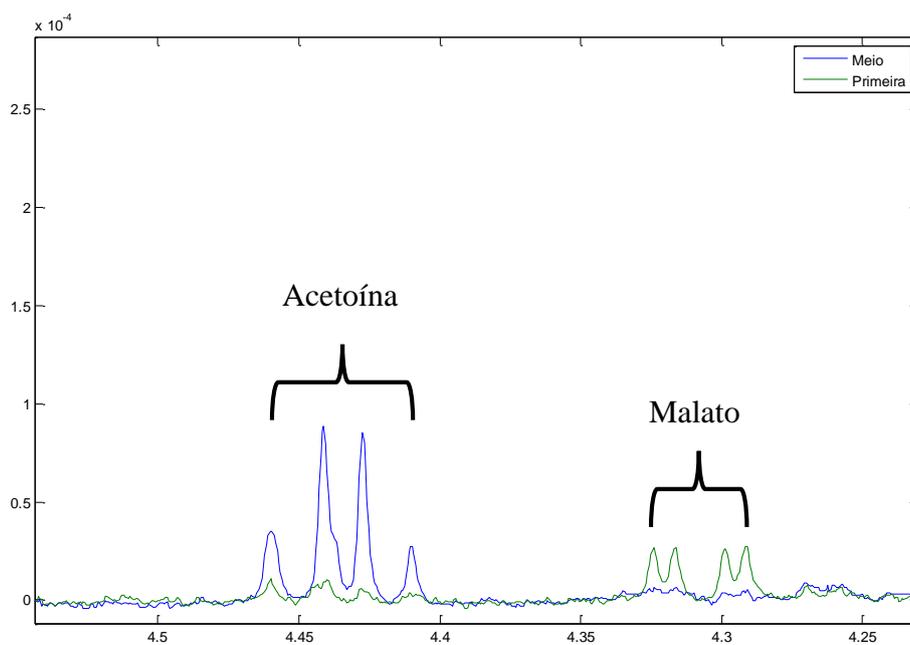
Fonte: autora

Figura 20 - Sobreposição dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  do MC e da CC1: sinais referentes a alanina e acetóina

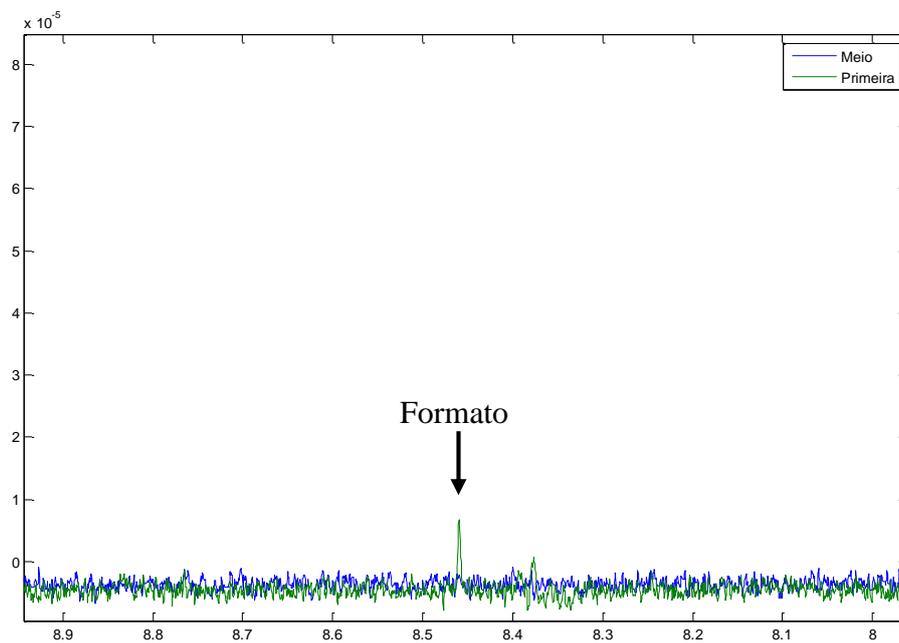


Fonte: autora

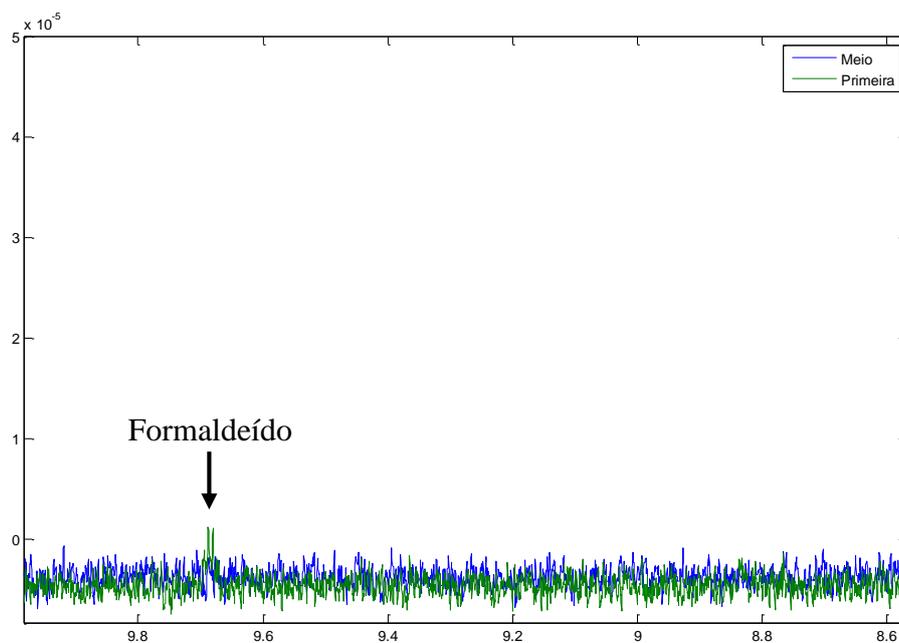
Figura 21 - Sobreposição dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  do MC e da CC1: sinais referentes ao malato e acetóina



Fonte: autora

Figura 22 - Sobreposição dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  do MC e da CC1: sinal referente ao formato.

Fonte: autora

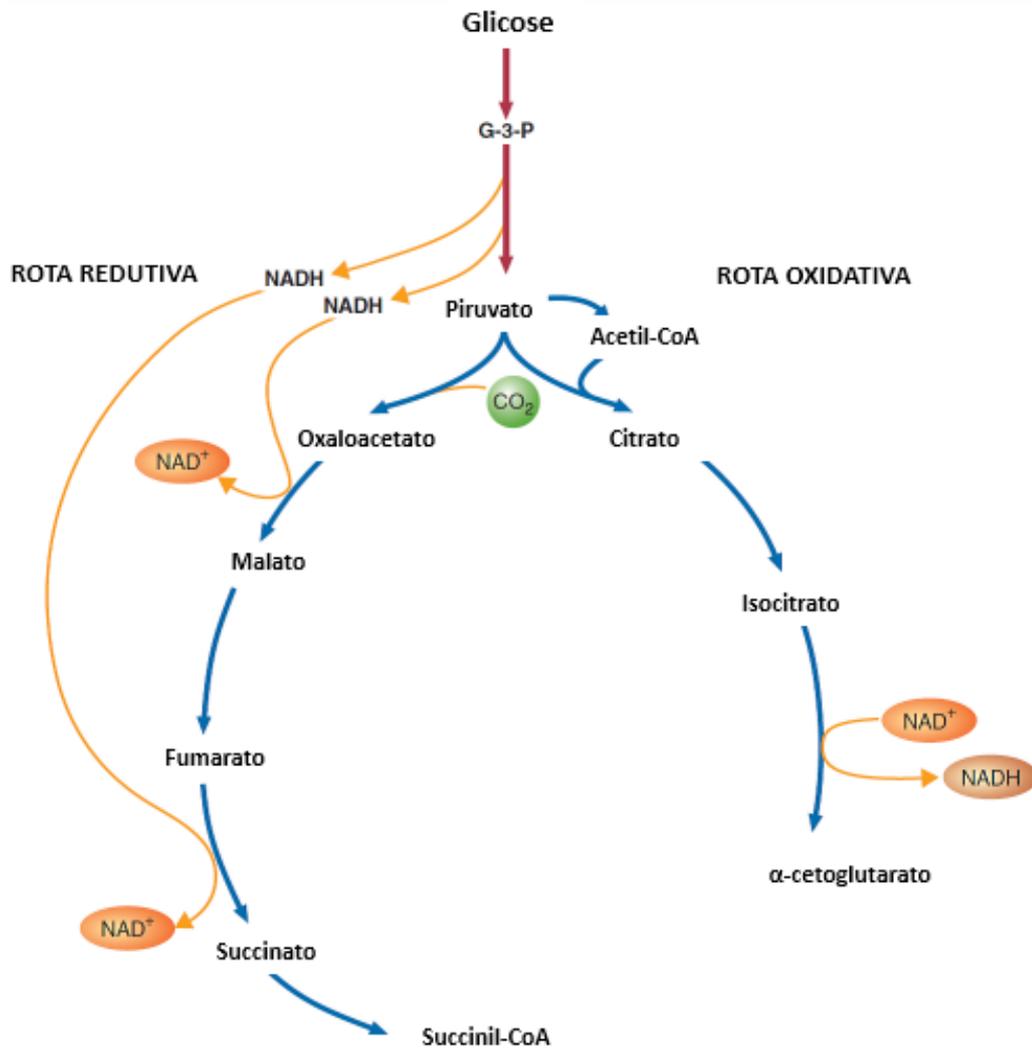
Figura 23 - Sobreposição dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  do MC e da CC1: sinal referente ao formaldeído.

Fonte: autora

Como é visto na figura 5, a pigmentação amarela é consideravelmente elevada da terceira para a quarta semana de cultivo intensificando-se até o final do período cultivado. É a partir da quarta semana que o quantitativo de massa micelial não apresenta desenvolvimento significativo (vide figura 6). Atentando-se aos espectros das amostras durante seis semanas de cultivo foi observado que, para a maioria dos metabólitos, não foi possível observar variação da quarta semana em diante ou ainda, alguns deles, não foram detectados nesse período, pois já haviam sido metabolizados. Uma minoria conseguiu ser visivelmente acompanhada até a quinta e sexta semana. Sendo todos os metabólitos identificados no CC apenas do tipo primário, é inferido que a partir desse período (quarta semana) inicia-se o metabolismo secundário utilizando dos primários presentes para a sua produção. Sendo a amostra bastante diluída, a intensidade dos sinais de metabólitos secundários que estão iniciando sua produção é baixa dificultando sua detecção. A tabela 3 indica essas variações metabólicas no decorrer de todo o cultivo. A classificação dos metabólitos disposta na tabela foi feita baseando-se no banco de dados KEGG PATHWAY (<http://www.genome.jp/>).

É possível observar as variações, dispostas na tabela, dos metabólitos pertencentes ao Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos, do inglês Tricarboxylic Acid Cycle (TCA), através da análise de variância (ANOVA) realizada através de ferramenta no software MatLab® (Figuras 25-27). É evidente a ocorrência do TCA redutivo (figura 24) até a terceira semana de cultivo. Evans, Buchanan e Arnon descreveram pela primeira vez esta rota através da assimilação redutiva de CO<sub>2</sub> por uma bactéria fotossintética. No caso presente, a não detecção de metabólitos como  $\alpha$ -cetoglutarato e isocitrato também confirma a rota redutiva ocorrendo. A partir da semana 0, MC, até a primeira semana vê-se o oxaloacetato diminuindo em quantidade enquanto o malato, fumarato e succinato aumentam, vê-se ainda na semana seguinte, além da diminuição do oxaloacetato, a diminuição do malato e fumarato e conseqüente aumento do succinato. Da segunda para a terceira semana o oxaloacetato começa a diminuir, o malato também segue essa tendência e decresce, porém, apesar do fumarato ter um pequeno aumento, não apresenta variações tão significativas, como conseqüência tem-se a diminuição do succinato indicando que os metabólitos que levariam a sua produção começaram a ser mais participantes em outras rotas. A partir da terceira até a quarta semana o oxaloacetato começa a se elevar, porém desta vez não segue a malato, tão logo, este não consegue mais ser visualizado a partir deste ponto, e, como esperado, também não se observa o fumarato que proveria dele. Desta maneira o succinato continua a decair, pois esta rota foi interrompida. Baseando-se nisso é inferido que a partir da interrupção do TCA redutivo as rotas para produção de metabólitos secundários começam a ser estabelecidas.

Figura 24 - Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos redutivo que acontece no citosol



Fonte: Adaptado de EVANS; BUCHANAN; ARNON, 1966 apud CANDELA, 2013

Num sistema anaeróbio pode ser esperado a produção de compostos orgânicos a partir de  $\text{CO}_2$ , logo, esse tipo de sistema favorece rotas redutivas (NELSON, D. L.; COX, M. M., 2014). Dentro desse contexto, observando o comportamento metabólico de *Phomopsis* sp. é possível observar a evolução da produção de etanol até a sexta semana de cultivo. A quantidade de etanol tem um aumento significativo já na primeira semana (vide figura 14) e, apesar de haver um pequeno decréscimo da terceira para a quarta semana, o etanol continua se elevando em quantidade até a última semana analisada. Dessa maneira, pode-se verificar a fermentação alcoólica ocorrendo no cultivo.

Tabela 2 - Variação dos metabólitos no decorrer de 6 semanas de cultivo do fungo.

Metabólitos	Variação a cada semana					
	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6
<b>Metabolismo de aminoácidos e proteínas</b>						
<b>Acetoína</b>	↓	↓	↓	*	*	*
<b>Alanina</b>	↑	↓	↓	*	*	*
<b>Asparagina</b>	↓					
<b>Pirotglutamato</b>	~	↑	↑	↓	↓	*
<b>Tirosina</b>	~	↑	↑	*	*	↑
<b>Metabolismo de carboidratos</b>						
<b>Acetato</b>	↓	↑	↑	↑	↑	↑
<b>Etanol</b>	↑	↑	↑	↓	↑	↑
<b>Citrato</b>	↑	↑	↓	↓	↓	*
<b>Fumarato</b>	↑	↓	↑	*	*	*
<b>Glicose</b>	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<b>Malato</b>	↑	↓	↓	*	*	*
<b>Oxaloacetato</b>	↓	↓	↓	↑	~	~
<b>Succinato</b>	↑	↑	↓	↓	↓	~
<b>Metabolismo do metano</b>						
<b>Metanol</b>	↑	↑	↑	~	↓	~
<b>Formaldeído</b>	↑	↑	~	~	~	↓
<b>Formato</b>	↑	↑	~	*	*	*
<b>Vários</b>						
<b>Piruvato</b>	↓	↑	↑	↓	↓	*

~ = sem variações; ↑ = aumento; ↓ = diminuição; \* = não foi possível determinar presença ou variações.

Fonte: autora

Figura 25 - Representação da quantificação relativa dos metabólitos do TCA redutivo presentes no caldo da cultura até a segunda semana de cultivo.

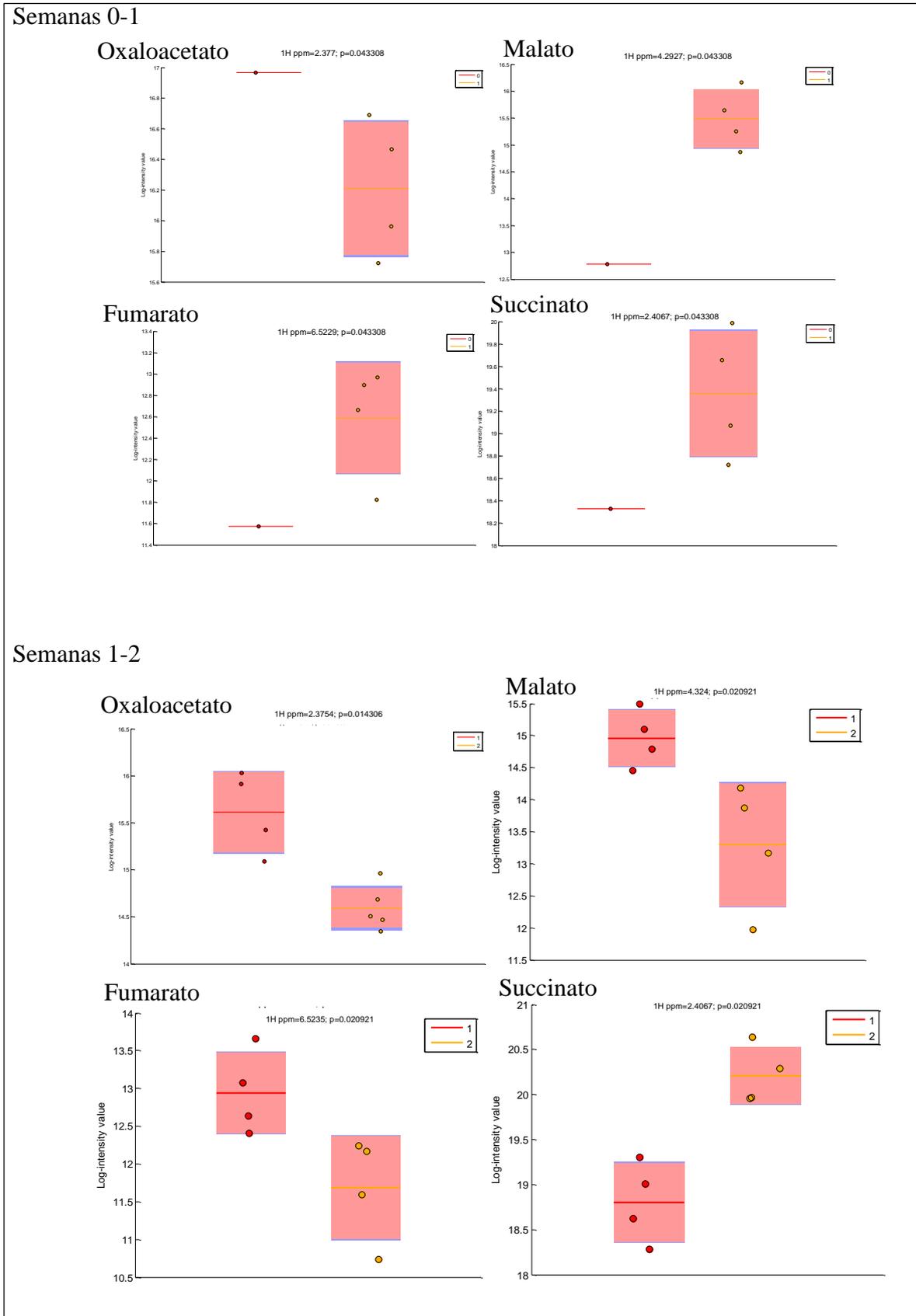


Figura 26 - Representação da quantificação relativa dos metabólitos do TCA redutivo presentes no caldo da cultura da segunda a quarta semana de cultivo

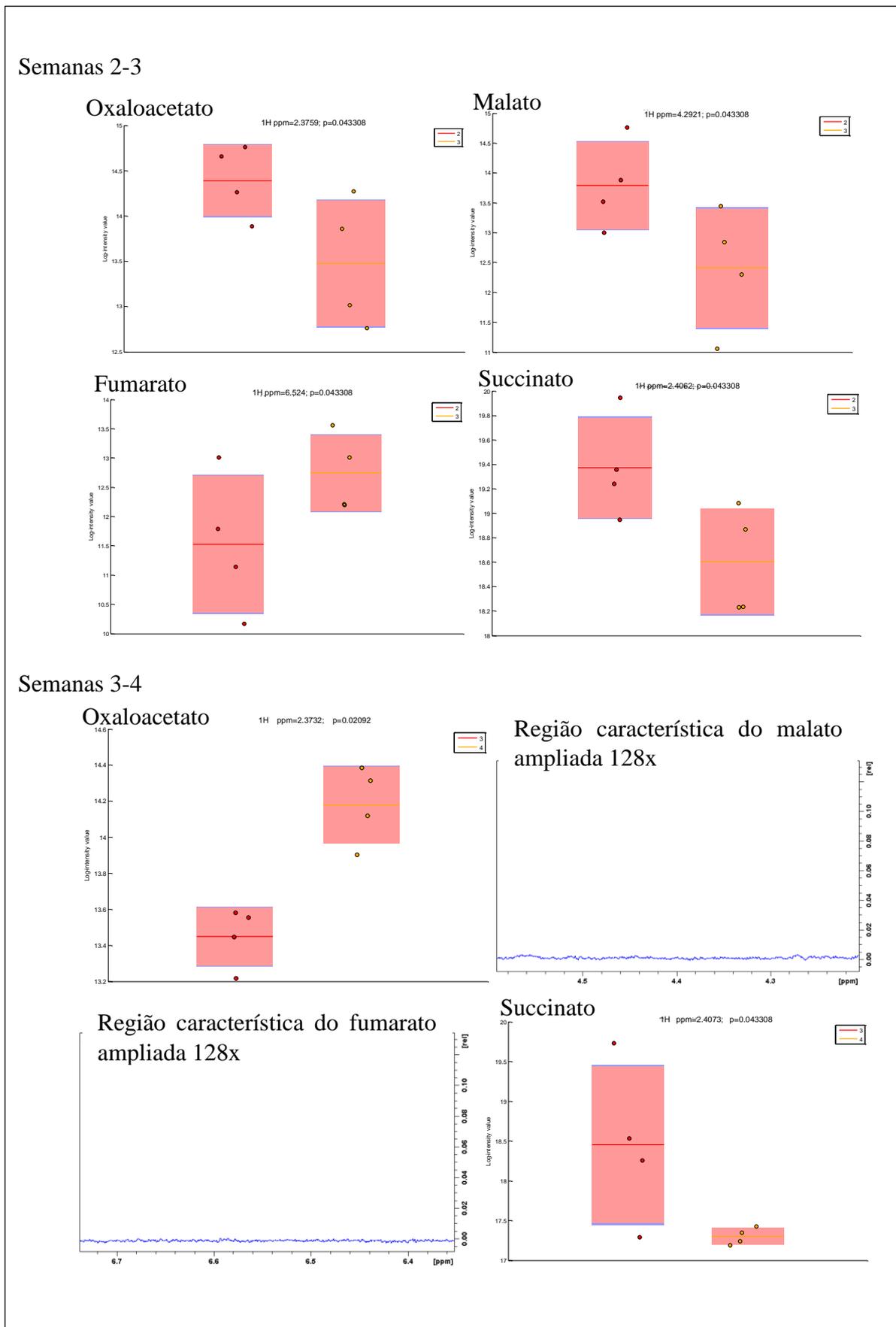
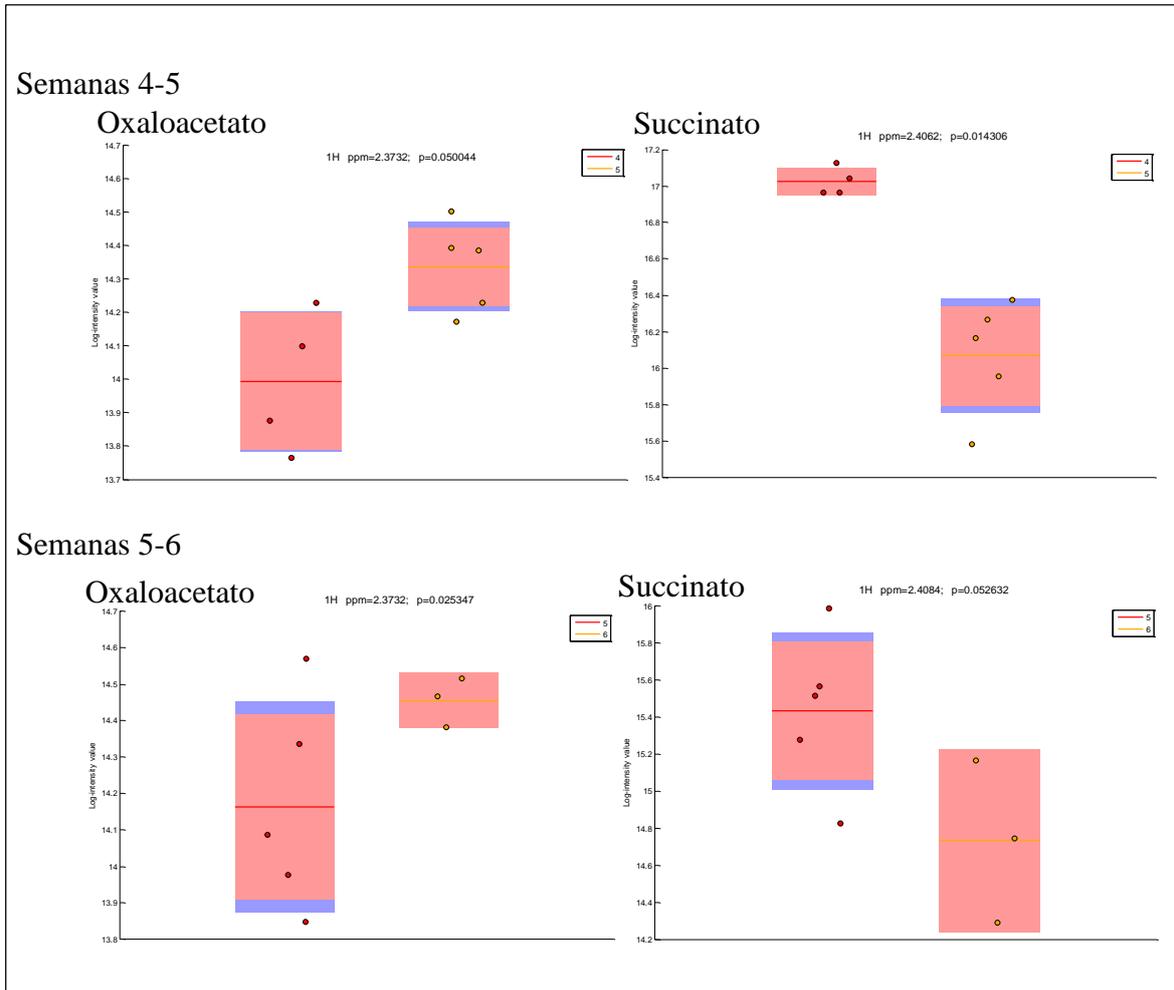


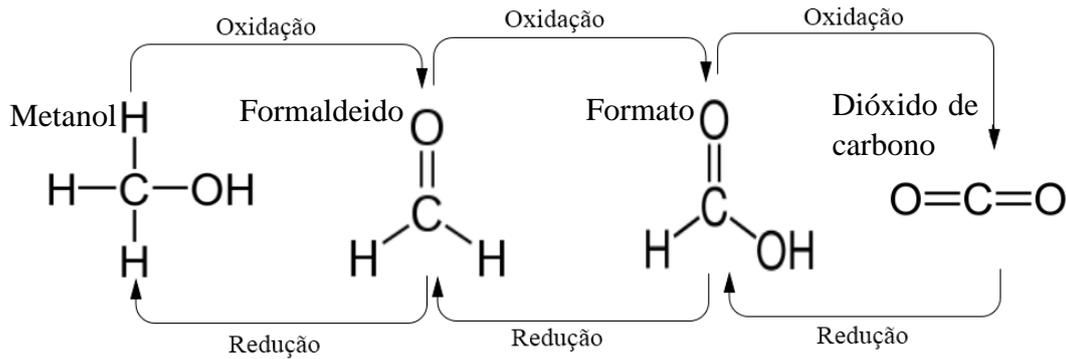
Figura 27 - Representação da quantificação relativa dos metabólitos do TCA redutivo presentes no caldo da cultura da quarta a sexta semana de cultivo



Nota-se ainda que o metanol consegue ser acompanhado até a sexta semana de análise. Sua quantidade se eleva até a terceira semana, onde se mantém até a quarta seguida de um decréscimo na quinta que se mantém até a última semana de cultivo. Tanto o formaldeído e o formato apresentam aumento até a segunda semana, este último se mantém na terceira e não consegue mais ser visualizado a partir desse ponto. Por outro lado, o formaldeído, que consegue ser acompanhado até o final, também não varia a partir da segunda semana, porém ao chegar na quinta semana sofre decréscimo. Sabe-se que esses três metabólitos pertencem a uma mesma rota (figura 29), a oxidação do metanol o leva a formaldeído, em seguida a formato, podendo ir até a formação de  $\text{CO}_2$  (figura 28). Contudo, tem-se um ambiente de oxigenação limitada (hipoxia), tem-se ainda  $\text{CO}_2$  proveniente da fermentação (vide figura 3) que está ocorrendo durante todo o período de cultivo. E, de fato, de forma geral observa-se uma tendência do

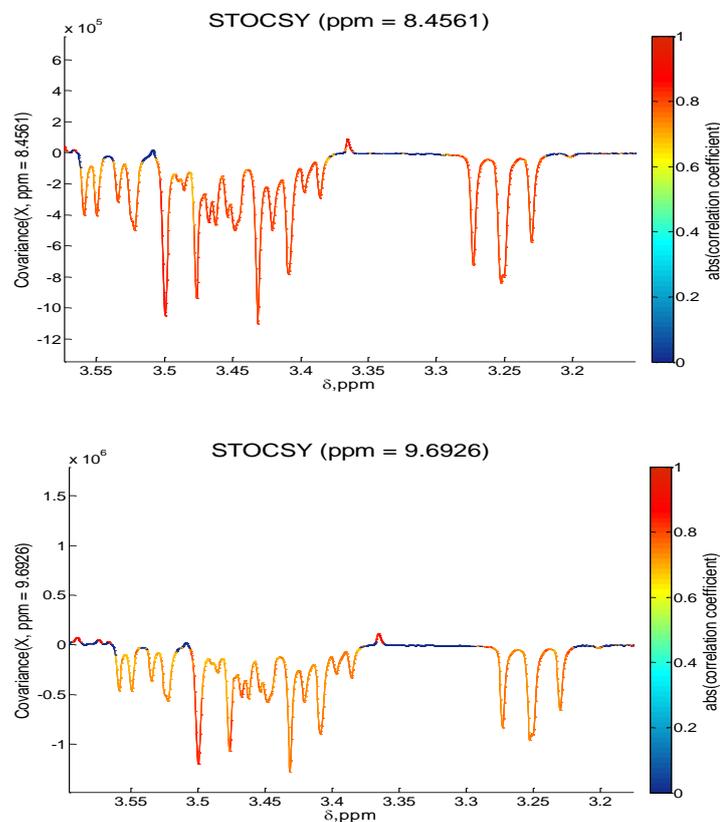
metanol em se manter presente enquanto formato não consegue mais ser visualizado, além do formaldeído sofrer decréscimo na última semana, logo após o metanol também diminuir uma semana antes, contudo ele se mantém na última semana indicando que sua produção pode estar ocorrendo através da redução do  $\text{CO}_2$  presente (figura 28).

Figura 28 - Esquema de oxidação do metanol à  $\text{CO}_2$  e redução do  $\text{CO}_2$  à metanol



Fonte: Adaptado de <<http://www.genome.jp/>>

Figura 29 - Formato e formaldeído mostrando forte correlação positiva e covariância positiva com metanol (Semana 1-2)



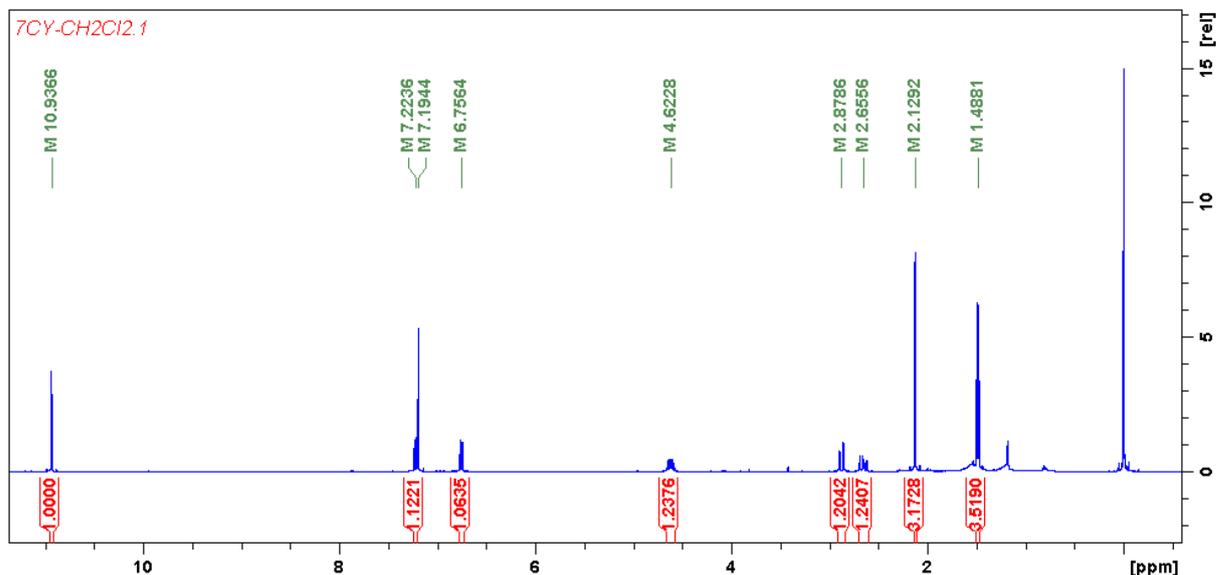
Fonte: autora

### 5.3 Elucidação do Composto

O sólido obtido do extrato em clorofórmio, após separação em coluna cromatográfica de sílica, mostrou-se puro ao possuir um ponto de fusão 126-128 °C e ser analisado por RMN  $^1\text{H}$ . Esse espectro apresentou sinais com deslocamentos químicos que sugerem a presença de hidrogênios aromáticos, metílicos e hidrogênio ácido. A integração dos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  indicou a presença de 12 átomos de hidrogênio (figura 30).

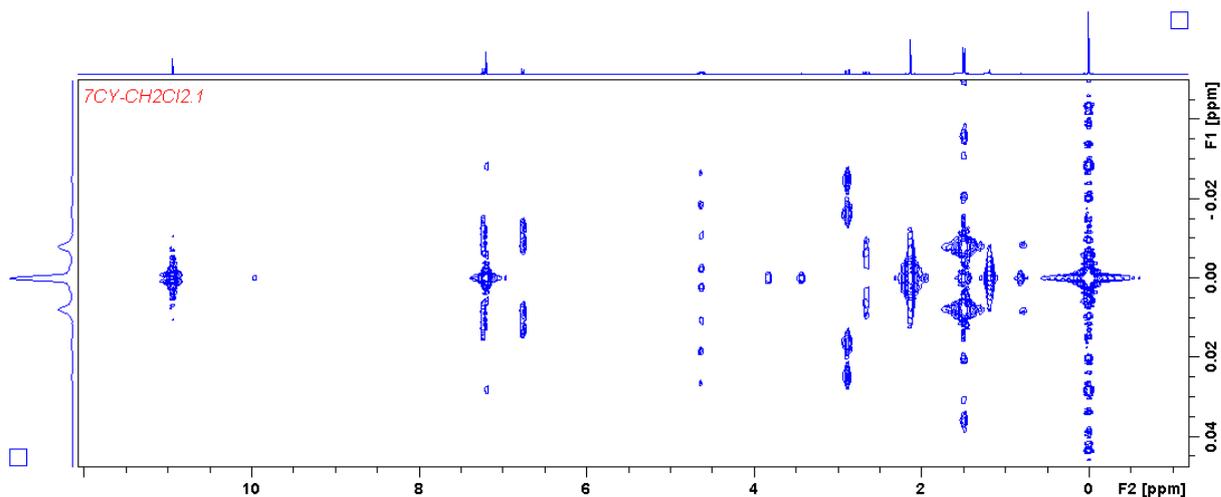
O padrão dos sinais, dois dupletos ( $\delta_{\text{H}}$  6,7564 ppm e  $\delta_{\text{H}}$  7,2236 ppm) e  $J = 8,49$  Hz para ambos, na região de aromáticos sugere que os hidrogênios estejam em posição orto (PAVIA, D. *et al*, 2010), isso também pode ser observado através do experimento COSY (figura 36), dessa forma é inferido que o anel aromático é tetrasubstituído. A figura 37 representa como, possivelmente, é essa parte da estrutura. Através da integração dos sinais foi possível observar a presença de 2 grupos metila, o deslocamento químico de um deles, um simpleto em  $\delta_{\text{H}}$  2,1291 ppm, sugere que esteja ligado ao anel aromático (SILVERSTEIN, R. M. *et al*, 2007).

Figura 30 - espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto isolado



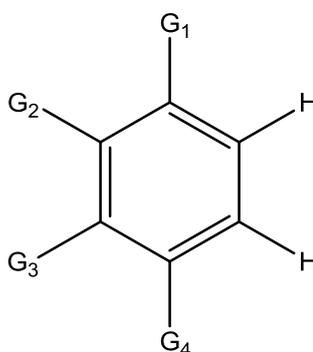
Fonte: autora

Figura 31 - Espectro de RMN J-resolvido do composto isolado



Fonte: autora

Figura 32 - Parte da estrutura onde o anel aromático possui hidrogênios em orto

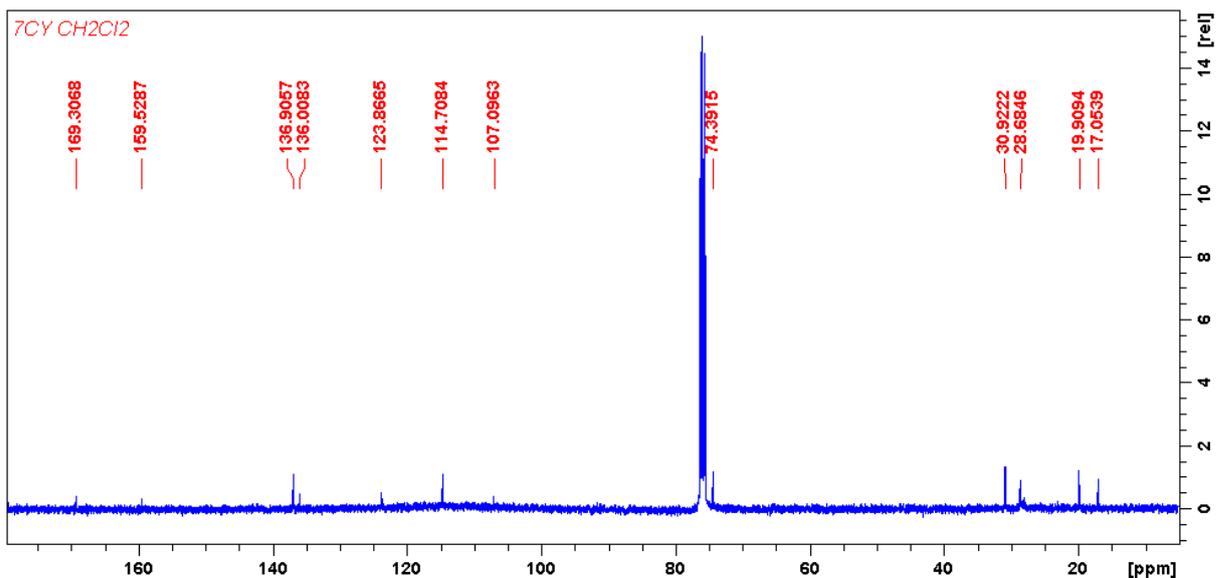


Fonte: autora

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (figura 33) apresentou um total de 12 carbonos. A análise desse espectro juntamente ao DEPT 90 (figura 34) permitiu a identificação de três grupos CH com sinais em  $\delta_{\text{C}}$  74,3915 ppm,  $\delta_{\text{C}}$  114,7084 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  136,9057 ppm. A análise do DEPT 135 (figura 35) permitiu detectar a presença de um grupo  $\text{CH}_2$  com sinal em  $\delta_{\text{C}}$  30,9222 ppm e dois  $\text{CH}_3$  com sinais em  $\delta_{\text{C}}$  17,0539 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  19,9094 ppm. Os 6 sinais restantes detectados no RMN  $^{13}\text{C}$  e que não aparecem no DEPT 90 e DEPT 135 referem-se a carbonos que não estão ligados a hidrogênios.

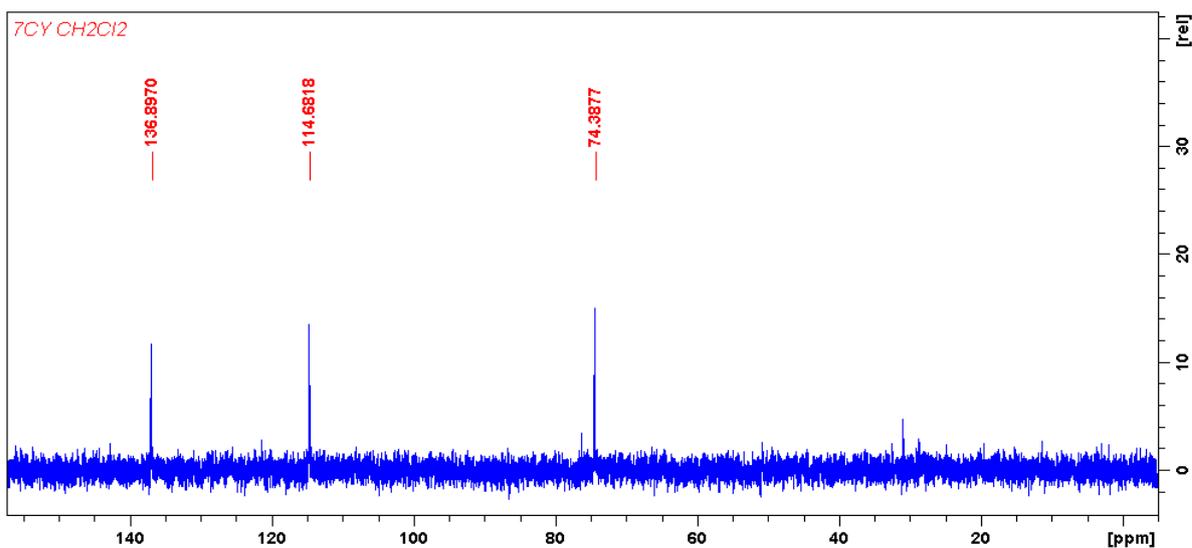
Nenhum carbono foi detectado na região de ácidos carboxílicos, assim o hidrogênio detectado em  $\delta_H$  10,9364 ppm não é pertencente a um grupo desse tipo, logo pode se tratar de um hidrogênio com ligação intramolecular (SILVERSTEIN, R. M. *et al*, 2007).

Figura 33 - Espectro de RMN  $^{13}C$  do composto isolado



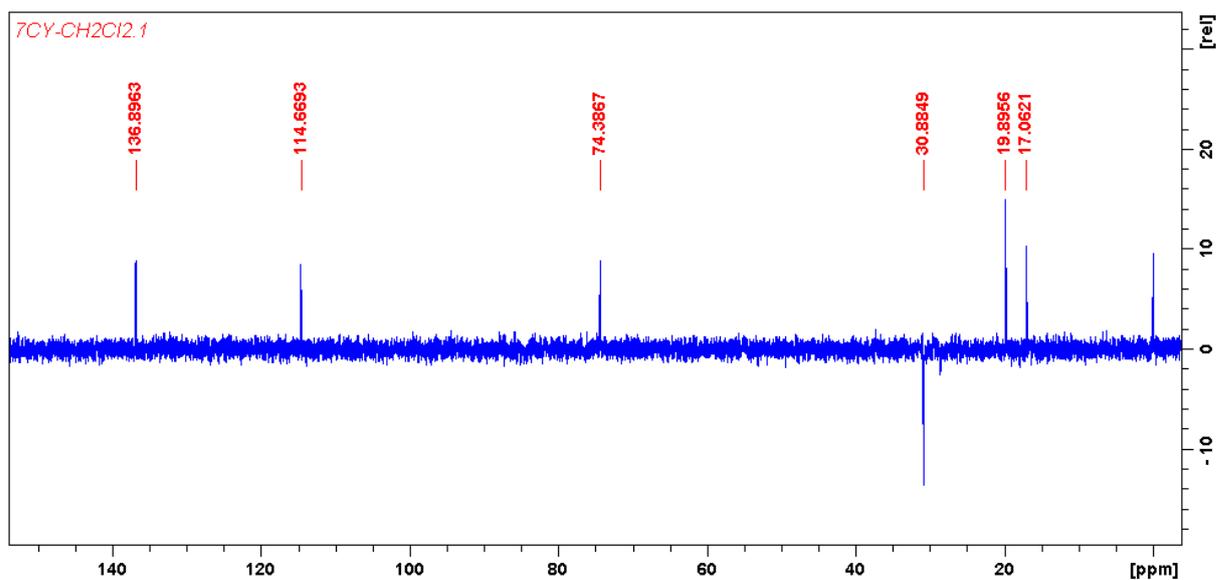
Fonte: autora

Figura 34 - Espectro de RMN DEPT 90 do composto isolado



Fonte: autora

Figura 35 - Espectro de RMN DEPT 135 do composto isolado

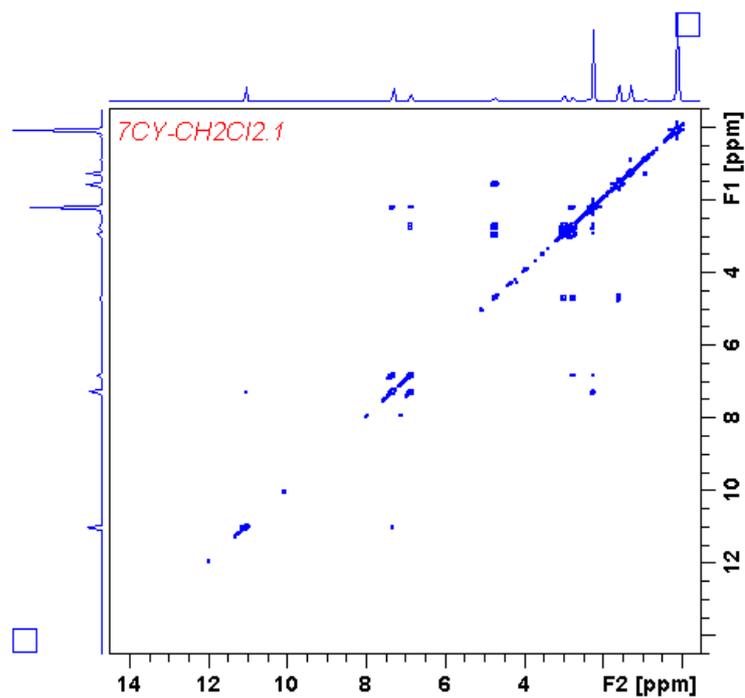


Fonte: autora

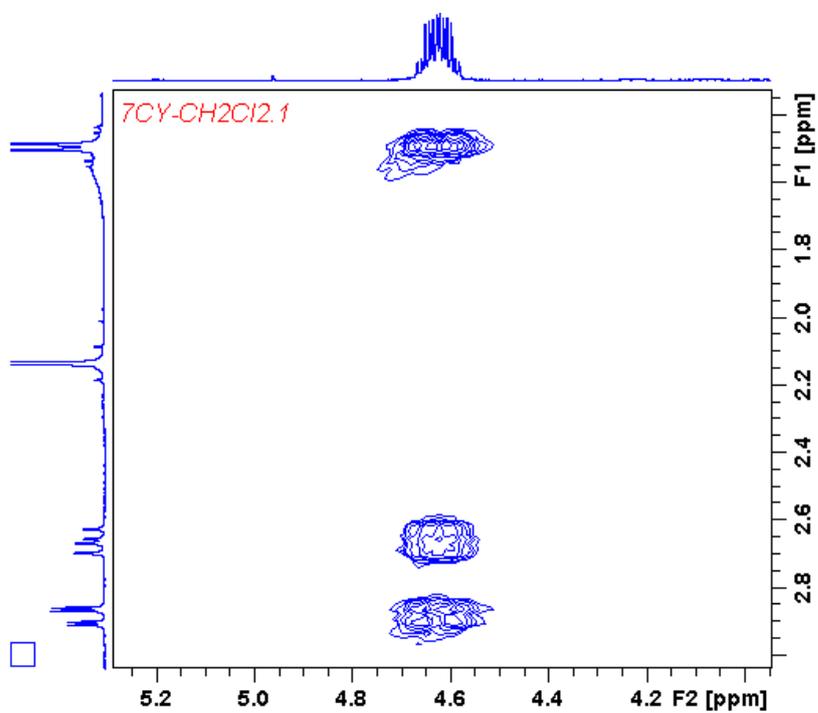
Através do experimento COSY (figura 36) é possível observar que o multipletto em  $\delta_H$  4,6224 ppm é resultado do acoplamento com os hidrogênios da metila em  $\delta_H$  1,4870 ppm com  $J = 6,32$  Hz e com os hidrogênios em  $\delta_H$  2,6556 ppm com  $J = 11,61$  e  $\delta_H$  2,8796 ppm com  $J = 3,42$  (figura 37).

Através do experimento HSQC (figura 38) determinou-se qual sinal de hidrogênio está diretamente ligados a qual carbono e observou-se que os hidrogênios em  $\delta_H$  2,6556 ppm e  $\delta_H$  2,8796 ppm estão ligados ao mesmo carbono, em  $\delta_H$  30,9222 ppm, a diferença no deslocamento químico mesmo estando ligados ao mesmo carbono pode ser atribuída ao efeito anisotrópico (PAVIA, D. *et al*, 2010) ou ainda por serem diastereotópicos (NASCIMENTO, C., 2016)

Figura 36 - Espectro de RMN COSY do composto isolado

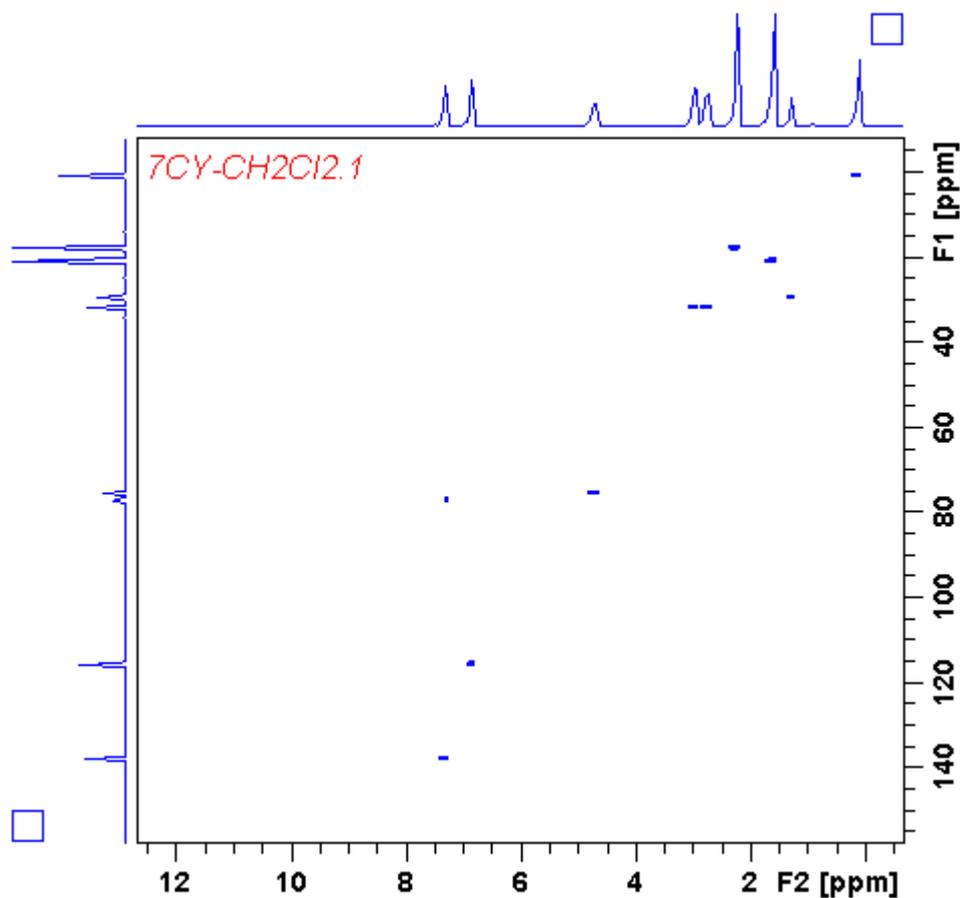


Fonte: autora

Figura 37 - Espectro de RMN COSY do composto isolado destacando o acoplamento dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  1,4870 ppm, em  $\delta_{\text{H}}$  2,6556 ppm e  $\delta_{\text{H}}$  2,8796 ppm

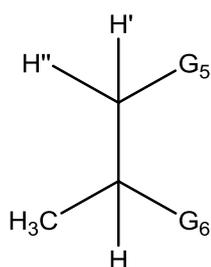
Fonte: autora

Figura 38 - Espectro de RMN HSQC do composto isolado



Fonte: autora

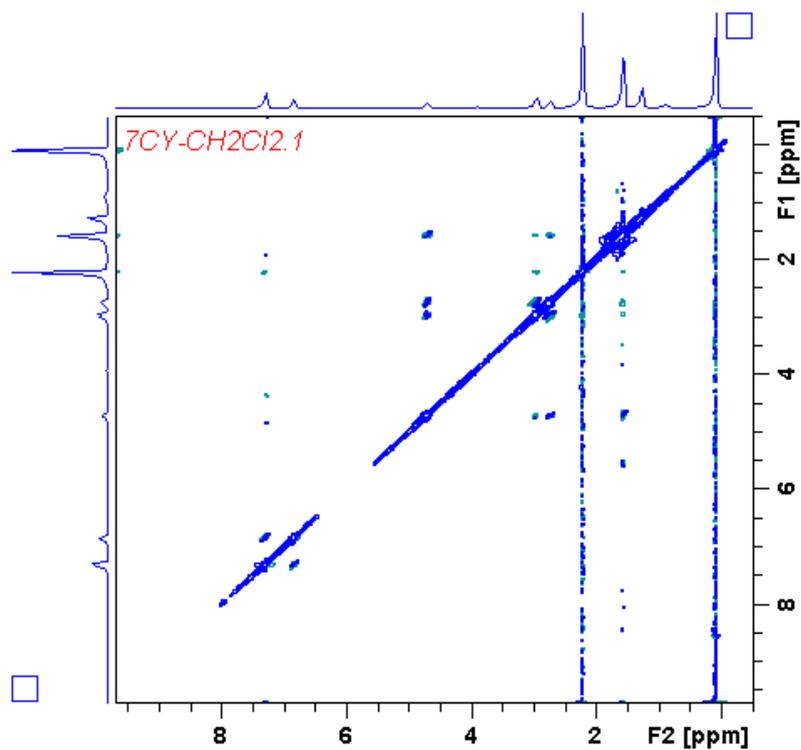
Figura 39 - Parte não aromática da molécula



Fonte: autora

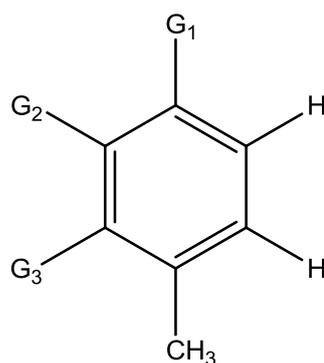
Através do experimento NOESY é possível observar que a metila ligada ao anel aromático, em  $\delta_H$  2,1291 ppm, é espacialmente vizinha somente ao hidrogênio aromático  $\delta_H$  7,2234 ppm.

Figura 40 - Espectro de RMN NOESY do composto isolado



Fonte: autora

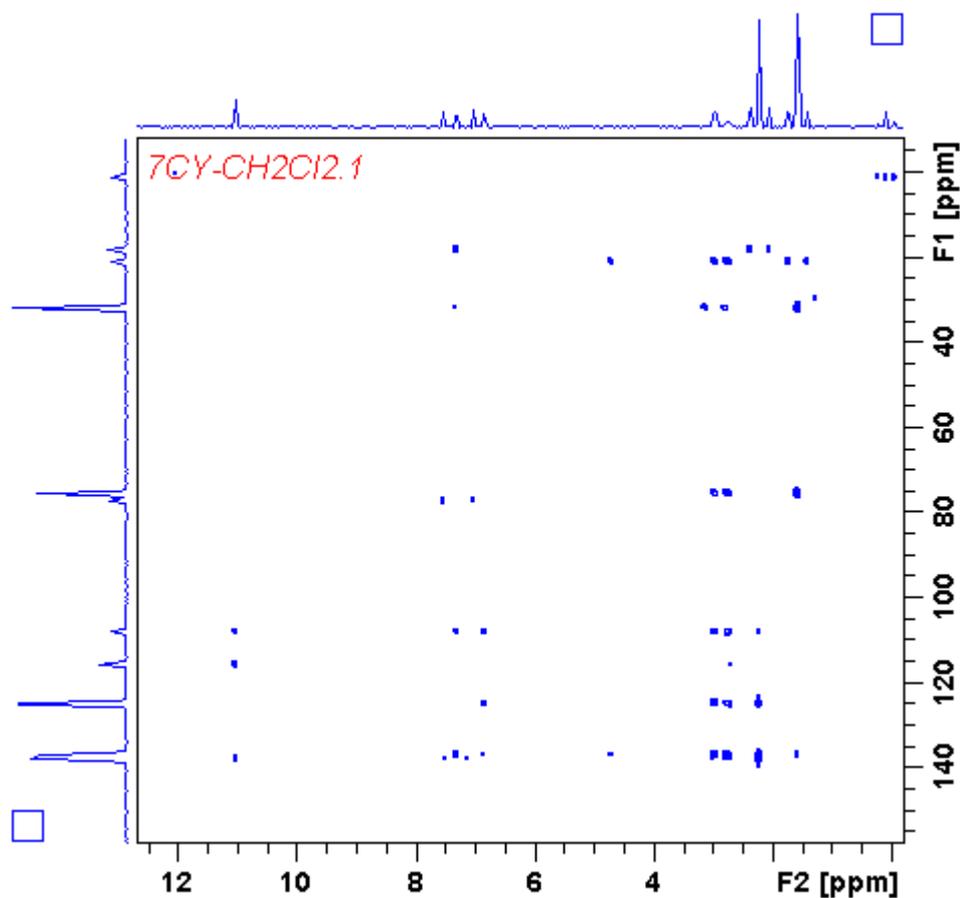
Figura 41 - Grupo metil ligado ao anel aromático da molécula



Fonte: autora

Através do experimento HMBC não foi observada correlação entre o carbono  $\delta_C$  28,6846 ppm e os hidrogênios presentes, sugerindo assim que esse sinal é referente a possíveis impurezas presentes na coluna. Com base no HMBC (figura 42) foi feita todas as correlação hidrogênio-carbono a longa distância (Tabela 3), permitindo assim conectar as duas partes.

Figura 42 - Espectro RMN HMBC do composto isolado



Fonte: autora

Tabela 3 - Dados referentes ao experimento de RMN  $^1\text{H}$  e HMBC da estrutura elucidada

H	$\delta$	Multiplicidade	$J$ (Hz)	$J$	HMBC
1	1.4870	d	6.32	3	30.9222; 74.3915; 136.9057; 159.5287; 136.0083
2	2.1291	s	---	3	107.0963; 123.8665; 136.0083; 159.5287
3'	2.6556	dd	11.61; 16.68	1	19.9094; 74.3915; 107.0963; 123.8665; 136.9057
3''	2.8796	dd	3.42; 16.68	1	
4	4.6224	m	---	1	19.9094
5	7.1944	d	8.52	1	107.0963; 123.8665; 159.5287; 169.3068
6	7.2234	d	8.52	1	17.0539; 107.0963; 136.9057; 159.5287
7	10.9364	s	---	1	107.0963; 114.7084; 136.9057; 159.5287

Fonte: autora

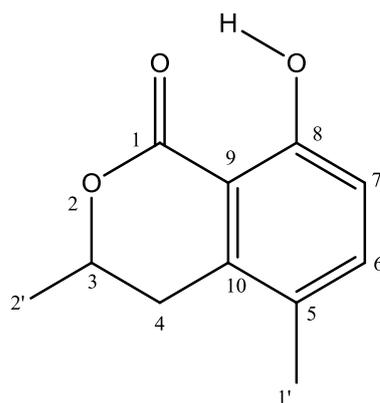
Tabela 4 - Dados referentes ao experimento de RMN <sup>13</sup>C e HSQC da estrutura elucidada

C	δ		HSQC (δ H)
1	169.3068	C	
1'	17.0539	CH <sub>3</sub>	2.1291
2'	19.9094	CH <sub>3</sub>	1.4870
3	74.3915	CH	4.6224
4	30.9222	CH <sub>2</sub>	2.6556; 2.8796
5	159.5287	C	
6	136.9057	CH	7.2234
7	114.7084	CH	7.1944
8	107.0963	C	
9	123.8665	C	
10	136.0083	C	

Fonte: autora

Baseando-se nos espectros obtidos e dados da literatura, o composto isolado na extração do micélio seco foi então elucidado e identificado como sendo 5-metilmeleina (3,4-dihidro-8-hidroxi-3,5-dimetilisocumarina), esse composto foi isolado pela primeira vez do fungo *Fusicoccum amygdali* (BALLIO; BARCELLONA; SANTURBANO, 1966), sua estrutura está representada na figura 43.

Figura 43 - 5-metilmeleina



Fonte: autora

Esse composto trata-se de uma dihidroisocumarina e está relacionado a classe das isocumarinas, uma classe muito conhecida no campo de estudo de produtos naturais e que tem

uma ampla aplicação farmacológica apresentando atividades antioxidante, anti-inflamatória, etc (SAEED, A., 2016). A produção desse composto já foi relatada em uma variedade de gêneros de fungos pertencentes a família Xylariaceae, como *Biscogniauxia*, *Entonaema*, *Hypoxylon*, *Resillinia*, *Poronia*, *Podosodaria*, *Hycocopra*, *Daldinia*, *Nummularia*, *Kretzschmaria*, *Camillea*, *Penzigia* (EVIDENTE et al., 2004), no entanto é a primeira vez que sua produção é relatada no gênero *Phomopsis*, que pertence à família Diaporthaceae.

Rukachaisirikul et al (2012) identificaram a 5-metilmeleina também sendo produzida pelo fungo endofítico *Xylaria* sp. isolado de *Garcinia hombroniana*. O extrato do caldo, do qual o composto foi isolado, apresentou atividade antioxidante quando testado frente ao radical DPPH, porém os compostos desse extrato quando analisados individualmente não apresentaram essa atividade, concluindo que a atividade antioxidante do extrato é atribuída ao efeito sinérgico dos compostos presentes.

Num estudo investigativo de feromônios de trilha no qual verificaram-se as possíveis respostas que a formiga *Lasius filiginosus* Latr. poderia mostrar frente a algumas dihidroisocumarinas, a meleína obteve melhor resposta eletrofisiológica, os análogos estruturais 5-metilmeleina e 5,7-dimetilmeleina induziram algumas respostas eletrofisiológicas, porém as formigas apenas seguiram a trilha com meleína, logo, é razoável supor que os substituintes metila no anel aromático podem influenciar na atividade apresentada por essas substâncias (KERN et al., 1996).

Levando-se em conta as atividades biológicas já relatadas em *Phomopsis* sp., e sendo esse composto identificado pela primeira vez como sendo produzido por esse gênero, a investigação dessas atividades a partir da 5-metilmeleina se mostra de suma importância

## 6. CONCLUSÃO

Os metabólitos identificados do filtrado da cultura de *Phomopsis* sp foram todos primários. Não sendo possível observar presença e/ou variação desses metabólitos a partir da quarta semana de cultivo, semana esta onde a pigmentação amarela intensa do microrganismo é intensificada, é inferido que a partir desse período intensifica-se o metabolismo secundário.

O estudo metabolômico, através da técnica de RMN, de *Phomopsis* sp realizado nas condições trabalhadas mostrou a ocorrência do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos reutivo e fermentação alcoólica.

Através da técnicas de cromatografia líquida clássica o composto foi isolado do micélio seco do microrganismo e através de RMN teve sua estrutura elucidada e identificada como sendo 5-metilmeleina. É a primeira vez que esse composto aparece como isolado do gênero *Phomopsis* sp.

## **PERSPECTIVAS**

- Identificar metabólitos secundários no filtrado da cultura;
- Realizar extração do micélio para identificação de compostos orgânicos voláteis;
- Propor uma rota metabólica para a produção de 5-metilmeleina.

## REFERÊNCIAS

- ADELIN, E. et al. Isolation, structure elucidation and biological activity of metabolites from Sch-642305-producing endophytic fungus *Phomopsis* sp. CMU-LMA. **Phytochemistry**, London, v. 72, n. 18, p. 2406–2412, 2011. ISSN 0031-9422.
- AMETA, K. et al. <sup>1</sup>H NMR-derived metabolomics of filtered serum of myocardial ischemia in unstable angina patients. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 456, p. 56–62, 2016. ISSN 0009-8981.
- AZEVEDO, J. L. et al. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, p.1-4, 2000. ISSN 0717-3458.
- BALLIO, A.; BARCELLONA, S.; SANTURBANO, B. 5-methylmellein, a new natural dihydroisocoumarin. **Tetrahedron Letters**, Amsterdam, v.7, n. 31, p. 3723-3726, 1966. ISSN 0040-4039.
- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- BRUNETON, J. **Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales**. 2. ed. Zaragoza: Acribia S.A., 2001
- BUDA, V. et al. Response of moth *Plodia interpunctella* to volatiles of fungus-infected and uninfected wheat grain. **Journal of Stored Products Research**, Amsterdam, v. 69, p. 152-158, 2016. ISSN 0022-474X.
- CANDELA, J. L. E. G. Perspectiva evolutiva del ciclo de Krebs “introducción”. Disponível em: < <http://cienciasdejoseleg.blogspot.com.br/2013/05/perspectiva-evolutiva-del-ciclo-de.html>>. Acesso em 04 de mar. de 2017.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**. Rio de Janeiro, v.5, n. 3, p. 421-437, 2013. ISSN 1984-6835.
- CHENG, Y. F. et al. Production of citrate by anaerobic fungi in the presence of co-culture methanogens as revealed by <sup>1</sup>H NMR spectrometry. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 26, n. 10, p. 1416-1423, 2013. ISSN 1011-2367.
- CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet**. New Jersey: Blackwell Publishing, 2006.
- EDILBERTO R. S. Fundamentos básicos da RMN e sequências de pulsos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 28., 2005, Poços de Caldas. **Curso**. Poços de Caldas, MG: SBQ, 2005. Disponível em: < [http://www.s bq.org.br/28ra/curso\\_5.php](http://www.s bq.org.br/28ra/curso_5.php)>. Acesso em: 03 ago. 2016.

ESPOSITO, O. E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. d. Caxias do Sul: Educs, 2010.

EVANS, M. C.; BUCHANAN, B. B.; ARNON, D. I. A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. **Proceedings of the national academy of sciences of USA**, Washington, v. 55, n. 4, p. 928–934, 1966. ISSN 1091-6490.

EVIDENTE, A. et al. Biscopyran, a phytotoxic hexasubstituted pyranopyran produced by *biscogniauxia mediterranea*, a fungus pathogen of cork oak. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 68, p. 568-571, 2005. ISSN 0163-3864.

FUNARI, C. S. et al. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013. ISSN 1678-7064.

HOLZGRABE, U.; WAWER, I.; DIEHL, B. **NMR Spectroscopy in pharmaceutical analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2008.

JEENER, J. et al. Investigation of exchange process by two-dimensional NMR spectroscopy **Journal of Chemical Physics**, Melville, v. 71, p. 4546-4553, 1979. ISSN 0021-9606.

KAVANAGH, K. **Fungi: biology and applications**. County Kildare: Wiley, 2005.

KERN, F. et al. SCHÄFER, D.; MASCHWITZ, U. Mellein, a trail pheromone component of the ant *Lasius fuliginosus*. **Journal of Chemical Ecology**, Berlin, v. 23, n. 3, 1997. ISSN 0098-0331.

KORNSAKULKARN, J. et al. Bioactive oxygen-bridged cyclooctadienes from endophytic fungus *Phomopsis* sp. BCC 45011. **Tetrahedron**, Amsterdam, v. 71, p. 9112-9116, 2015. ISSN 0040-4020.

LEE, J. H. et al. Changes occurring in compositions and antioxidant properties of healthy soybean seeds [*Glycine max*(L.) Merr.] and soybean seeds diseased by *Phomopsis longicolla* and *Cercospora kikuchii* fungal pathogens. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 185, p. 205–211, 2015. ISSN 0308-8146.

LEE, S. Y. et al. Metabolite profiling of *Neptunia oleracea* and correlation with antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities using  $^1\text{H}$  NMR-based metabolomics. **Phytochemistry Letters**. London, v. 16, p. 23–33, 2016. ISSN 1874-3900.

LEITE, R. F. S. **Elucidação estrutural por RMN de alcaloides indólicos dos extratos de *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Müll. Arg. e *Aspidosperma pyriforme* Mart. (Apocynaceae) com atividade antimalárica**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.

LIMA, S. M. S. **Isolamento de fungos endofíticos de folhas e ramos *Syzygium jambolanum* (lam.) Dg. Teste de antagonismo frente a fitopatógenos**. TCC (Graduação em Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E. The handbook of metabonomics and metabolomics. Amsterdam: Elsevier, 2007

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 3

MOLLER, L.; LERM, B.; BOTHA, A. Interactions of arboreal yeast endophytes: an unexplored discipline. **Fungal ecology**, Amsterdam, v. 22, p. 73-82, 2016. ISSN 1754-5048.

MORATH, S. U.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal biology reviews**, Amsterdam, v. 26, p. 73-83, 2012. ISSN 1749-4613.

MUSSI-DIAS, V. et al. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 261-266, 2012. ISSN 1516-0572.

NASCIMENTO, C. **Ressonância magnética nuclear**. São Paulo: Blucher, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014

PARR, A. J. et al. Dihydrocaffeoyl polyamines (kukoamine and allies) in potato (*Solanum tuberosum*) tubers detected during metabolite profiling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Munchen, v. 53, p. 5461-5466, 2005. ISSN 0021-8561

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**, 4.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010

PUTZKE, J; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. 2. d. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2004. v. 1.

\_\_\_\_\_. **Os Reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2002. v. 2.

ROCHA, J. R. **Investigação química preliminar em *Phomopsis* sp.** TCC (Graduação em Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.

ROESSNER, U. et al. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. **The Plant Journal**, Malden, v. 23, n. 1, p. 131-142, 2000. ISSN 1365-313X.

RUKACHAISIRIKUL, V. et al. Indanone and mellein derivatives from the Garcinia-derived fungus *Xylaria* sp. PSU-G12. **Phytochemistry Letters**, London, v. 6, p. 135–138, 2013. ISSN 1874-3900.

RUKACHAISIRIKUL, V. et al. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. **Phytochemistry Letters**, London, v. 69, p. 783–787, 2008. ISSN 1874-3900.

SAEED, A. Isocoumarins, miraculous natural products blessed with diverse pharmacological activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 116, p. 290–317, 2016. ISSN 0223-5234.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, 2011. ISSN 2237-9150.

SAVORANI, F. et al. A primer to nutritional metabolomics by NMR spectroscopy and chemometrics. **Food Research International**, Amsterdam, v. 54, p. 1131–1145, 2013. ISSN 0963-9969.

SHWETA, S. et al. Endophytic fungi from *Miquelia dentata* Bedd., produce the anti-cancer alkaloid, camptothecine. **Phytomedicine**, Amsterdam, v. 20, n. 3-4, p. 337–342, 2013. ISSN 0944-7113.

SILVERSTEIN, R. M.; FRANCIS, X. W.; DAVID, J. K.; **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOARES, D. A. et al. Detecção de compostos voláteis com atividade antibacteriana por fungos endofíticos associados à *Costus spiralis*. **Journal of bioenergy and food Science**. Amapá, v. 2, n. 4, p. 156-159, 2015. ISSN 2359-2710.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. **Química orgânica**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. v. 1.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, New York, NY, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993. ISSN 1095-9203.

STROBEL, G.; HESS, W. M. Glucosylation of the peptide leucinostatina A, produced by an endophytic fungus of European yew, may protect the host from leucinostatin toxicity. **Chemistry and Biology**, Amsterdam, v. 4, p. 529-536, 1999. ISSN 1074-5521.

UARROTA, V. G. et al. Metabolomics combined with chemometric tools (PCA, HCA, PLS-DA and SVM) for screening cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots during postharvest physiological deterioration. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 161, p. 67–78, 2014. ISSN 0308-8146.

UDAYANGA, D. et al. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. **Fungal Diversity**, Berlin, v. 50, p. 189-225, 2011. ISSN 1878-9129.

WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. **Introduction to fungi**. 3. d. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

WISHART, D. S. Quantitative metabolomics using NMR. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 228-237, 2008. ISSN 0165-9936.

YADAV, M.; YADAV, A.; YADAV, J. P. *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Amsterdam, v. 7, suppl. 1, p. S256-S261, 2014. ISSN 1995-7645.

YAN, J. F. et al. Do endophytic fungi grow through their hosts systemically? **Fungal Ecology**, Amsterdam, v. 13, p. 53-59, 2015. ISSN 1754-5048.

YANG, H. Y. et al. Xanthone derivatives from the fermentation products of an endophytic fungus *Phomopsis* sp. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 91, p. 189–193, 2013. ISSN 0367-326X.

YENN, T. W. et al. Enhancement of anti-candidal activity of endophytic fungus *Phomopsis* sp. ED2, isolated from *Orthosiphon stamineus* Benth, by incorporation of host plant extract in culture medium. **The Journal of Microbiology**, Berlin, v. 50, n. 4, p. 581–585, 2012. ISSN 1225-8873.

ZHANG, W. et al. Enhanced nodulation of peanut when co-inoculated with fungal endophyte *Phomopsis liquidambari* and bradyrhizobium. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v.. 98, p. 1–11, 2016. ISSN 0981-9428.