

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Geane Pereira de Oliveira

**INDUÇÃO METABÓLICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS PELAS TÉCNICAS
DE CO-CULTIVO, OSMAC E MODULAÇÃO EPIGENÉTICA: PRODUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADE NEUROPROTETORA**

Belo Horizonte

2019

UFMG/ ICEx/DQ. 1365^a

T. 623^a

Geane Pereira de Oliveira

INDUÇÃO METABÓLICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS PELAS TÉCNICAS DE CO-CULTIVO, OSMAC E MODULAÇÃO EPIGENÉTICA: PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADE NEUROPROTETORA

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

Belo Horizonte

2019

Ficha Catalográfica

O46i
2019
T

Oliveira, Geane Pereira de
Indução metabólica de fungos filamentosos pelas técnicas de co-cultivo, osmac e modulação epigenética [manuscrito]: produção de metabólitos secundários com atividade neuroprotetora / Geane Pereira de Oliveira. 2019.
[xxii], 169 f. : il.

Orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Fungos - Teses 3. Espectrometria de massas - Teses 4. Inibidores da colinesterase - Teses 5. Ressonância magnética nuclear - Teses I. Takahashi, Jacqueline Aparecida, Orientadora II. Título.

**"Indução Metabólica de Fungos Filamentosos pelas Técnicas de Co-Cultivo,
OSMAC e Modulação Epigenética: Produção de Metabólitos Secundários com
Atividade Neuroprotetora."**

Geane Pereira de Oliveira

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

J. Takahashi

Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi - Orientadora
UFMG

M. A. F. Brandão

Prof. Marcos Antônio Fernandes Brandão
UFPE

P. G. Cardoso

Profa. Patrícia Gomes Cardoso
UFLA

Rosemeire Brondi Alves

Profa. Rosemeire Brondi Alves
UFMG

A. S. de Miranda

Profa. Amanda Silva de Miranda
UFMG

Belo Horizonte, 08 de agosto de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

À minha mãe Jucineide, ao meu pai Edomício, ao meu esposo Wagner Valença e aos meus irmãos queridos, pelo apoio em todos os momentos dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora *Jacqueline Aparecida Takahashi* pela oportunidade, confiança, orientação, incentivo e contribuição em minha formação acadêmica.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao programa de pós-graduação em química da UFMG, pela oportunidade.

Às alunas de iniciação científica *Debora* e *Barbara*, pela contribuição com os experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios *Laura*, *Bruna*, *Marília*, *Geisa*, *Diego*, *Thamires*, pelo apoio, amizade e carinho de todos.

Aos amigos *Gesiane*, *Gabriel* e *Denise*, pela contribuição com seus conhecimentos.

Aos professores do PPGQ-UFMG que contribuíram na minha formação acadêmica: *Rossimíriam Freitas*, *Rosemeire Brondi*, *Ana Luíza Quadros*, *Claudio Donnici*, *Adão Sabino* e *José Dias*.

Às químicas *Mirra Angelina*, Dra. *Vanny Ferraz* e Dra. *Ivana Silva*, pela ajuda com as análises por CLAE, realização dos espectros de massas e de ressonância magnética nuclear.

Às alunas *Dayana Gonzalez* e *Katherine García* e ao professor Dr. *Oscar Mosquera*, pelos ensinamentos para realização do ensaio de capacidade neuroprotetora. À aluna *Tainara Araújo*, pela ajuda com o ensaio de capacidade neuroprotetora. Ao Prof. Dr. João Trindade Marques, pela doação das moscas *Drosophila melanogaster*.

Ao Me. *Mauro Ramalho* e ao professor Dr. *Rodinei Augusti* pela análise por PS-MS.

Ao CNPq, pela bolsa concedida, PROEX, CAPES e FAPEMIG, pelo financiamento à pesquisa.

*“A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

INDUÇÃO METABÓLICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS PELAS TÉCNICAS DE CO-CULTIVO, OSMAC E MODULAÇÃO EPIGENÉTICA: PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADE NEUROPROTETORA

O reino *fungi* compreende uma grande variedade de espécies oferecendo fontes promissoras para a descoberta de novos compostos bioativos. Neste trabalho utilizaram-se as técnicas co-cultivo, OSMAC e modulação epigenética, visando a indução metabólica de cinco fungos filamentosos, *Aspergillus chevalieri*, *Clonostachys regersoniana*, *Talaromyces calidicanus*, *Fusarium nygamai* *Penicillium* sp., para a produção de metabólitos secundários com atividade biológica. Foram realizados quatro experimentos utilizando as diferentes abordagens em meios de cultura sólido e líquido. Os extratos obtidos foram submetidos à análise por CLAE e espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS), para avaliação da variação do perfil metabólico e identificação de compostos, e ao ensaio da atividade inibitória da acetilcolinesterase. As alterações dos perfis metabólicos e a atividade biológica conduziram à seleção de condições para a realização de cinco co-cultivos em escala ampliada. A partir dos extratos de co-cultivo foram isolados seis substâncias, cujas estruturas foram elucidadas utilizando espectroscopia de RMN 1D e 2D, infravermelho e espectrometria de massas de alta resolução, sendo identificadas como D-manitol (**GO-1**), echinulina (**GO-2**), fisciona (**GO-3**) flavoglaucina (**GO-4**), auroglaucina (**GO-5**) e tetra-hidroauroglaucina (**GO-6**). As substâncias **GO-2 - GO-6** foram submetidas ao ensaio da atividade inibitória da acetilcolinesterase e apresentaram IC₅₀ que variaram de 62,9 a 190,7 µM. O composto **GO-2** também apresentou atividade neuroprotetora preventiva (42,66 ± 1,34%) e terapêutica (27,93 ± 1,0%) sendo, portanto, uma substância promissora como modelo para o desenvolvimento de fármacos para doenças neurodegenerativas. Os metabólitos **GO-2- GO-6** foram quantificados nos extratos e **GO-5** e **GO-6** tiveram seus teores aumentados nos três cultivos do fungo *A. chevalieri* em relação ao controle. A análise por PS-MS dos extratos de co-cultura fúngica resultou na identificação de quatro compostos, ácido linoleico, ácido *p*-cumárico, 9-hidroxi-megastigma-3,5,8-trien-7-one-9-O-β-D-glucopiranosídeo e ácido 9-hidroxi-octadeca-dienoico.

Palavras-chave: Indução metabólica; Fungos filamentosos; Co-cultivo; OSMAC; Modulação epigenética; Atividade neuroprotetora.

ABSTRACT

METABOLIC INDUCTION OF FILAMENTOUS FUNGI BY CO-CULTIVATION, OSMAC, AND EPIGENETIC MODULATION TECHNIQUES: PRODUCTION OF SECONDARY METABOLITES WITH NEUROPROTECTIVE ACTIVITY

Fungi kingdom comprises a wide variety of species offering promising sources for the discovery of new bioactive compounds. In this work, co-cultivation, OSMAC and epigenetic modulation techniques were used aiming at inducing the metabolism of five filamentous fungi, *Aspergillus chevalieri*, *Clonostachys rogersoniana*, *Talaromyces calidicanus*, *Fusarium nygamai* and *Penicillium* sp., for production of secondary metabolites with biological activity. Four experiments were performed using the different approaches in solid and liquid culture media. The extracts were submitted to analysis by HPLC and mass spectrometry with paper spray ionization (PS-MS) to evaluate variation of the metabolic profiles and identification of compounds, as well as acetylcholinesterase inhibitory activity assay. Based on the variations of profiles and activity observed, five co-cultures were performed on larger scale. From the co-culture extracts were isolated six substances, and their structures were elucidated using 1D and 2D NMR techniques, infrared and high resolution mass spectrometry, being identified as D-mannitol (**GO-1**), echinilin (**GO-2**), physcion (**GO-3**), flavoglaucin (**GO-4**), auroglaucin (**GO-5**) and tetrahydroauroglaucin (**GO-6**). **GO-2-GO-6** were tested for acetylcholinesterase inhibitory activity and showed IC₅₀ ranging from 62.9 – 190.7 µM. Compound **GO-2** also presented preventive (42.66 ± 1.34%) and therapeutic (27.93 ± 1.0%) neuroprotective activities, being therefore a promising substance for the development of drugs to treat neurodegenerative diseases. Compounds **GO-2** to **GO-6** were quantified and **GO-5** and **GO-6** had their levels increased in the three cultures of the fungus *A. chevalieri* in relation to the control. PS-MS analysis of the fungal co-culture extracts resulted in the identification of four compounds, linoleic acid, *p*-coumaric acid, 9-hydroxy-megastigma-3,5,8-trien-7-one-9-O-β-D-glucopyranoside and 9-hydroxyoctadeca-dienoic acid.

Keywords: Metabolic induction; Filamentous fungi; Co-cultivation; OSMAC; Epigenetic modulation; Neuroprotective activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura microscópica (hifa) e macroscópica (micélio) de fungos.	3
Figura 2. Estruturas de fármacos isolados de micro-organismos.....	5
Figura 3. Estruturas de compostos 9-10, isolados de <i>A. arundinis</i> e 11-17, isolados de <i>S. chartarum</i>	7
Figura 4. Estruturas dos compostos 18, isolado de <i>A. versicolor</i> MF359, 19-20, isolados de <i>A. flavus</i> OUCMDZ-2205.....	8
Figura 5. Estrutura de PS-990, isolado de <i>B. ochroleuca</i>	8
Figura 6. Exemplos de co-cultivo de fungos em meio sólido.....	9
Figura 7. Metabólitos produzidos a partir do co-cultivo do fungo marinho <i>Emericella</i> sp. com a bactéria <i>S. arenicola</i>	10
Figura 8. Metabólitos produzidos a partir da fermentação de <i>A. fumigatus</i> com a bactéria <i>S. peuceitius</i>	10
Figura 9. Estrutura do composto isolado do extrato do co-cultivo de <i>B. ochroleuca</i> com <i>T. rubrum</i>	10
Figura 10. Metabólitos produzidos a partir da cultura mista de <i>P. fuscum</i> e <i>P. camembertii/clavigerum</i>	11
Figura 11. Estruturas dos compostos isolados do cultivo do fungo <i>Penicillium</i> sp. F23-2 utilizando OSMAC.....	13
Figura 12. Estrutura dos metabólitos isolados do cultivo do fungo <i>S. elegans</i> KLA03 utilizando OSMAC.	14
Figura 13. Estruturas dos compostos isolados do cultivo dos fungos <i>P. quadrisepata</i> via OSMAC.....	15
Figura 14. Estruturas dos compostos isolados do cultivo do fungo <i>P. adametzioides</i> AS-53 via OSMAC.....	15
Figura 15. Estrutura do DNA hipermetilado com gene inacessível.	16
Figura 16. Estruturas químicas de inibidores de DNA metiltransferases (DNAMT).	17
Figura 17. Estruturas químicas de metabólitos de <i>P. citreonigrum</i> induzidos por 5-AZA.	17

Figura 18. Estruturas químicas de metabólitos obtidos do cultivo de <i>P. crassiuscula</i> na presença de 5-AZA.....	18
Figura 19. Histonas acetiladas, expansão da cromatina e gene acessível.	19
Figura 20. Estruturas químicas de inibidores de histonas desacetilases (HDCAs).	19
Figura 21. Estruturas químicas dos chaetofenois D-F (70-72, respectivamente) e dos eupenicinicois C e D (73 e 74, respectivamente).	20
Figura 22. Representação do processo de transmissão de impulsos na fenda sináptica e a hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase.	21
Figura 23. Estruturas químicas de inibidores da acetilcolinesterase.	22
Figura 24. Estruturas químicas de dopamina (84) e levodopa (85).....	23
Figura 25. Sistema para microcultivo dos fungos filamentosos.....	29
Figura 26. Disposição: a) da bactéria ou levedura e do fungo; b) dos fungos em pares no meio de cultura para o Experimento 1.....	32
Figura 27. Esquema para procedimento da modulação do perfil metabólico de <i>A. chevalieri</i> com biomassa (cultivo 1), caldo (cultivo 2) e caldo e biomassa (cultivo 3) de <i>F. nygamai</i>	35
Figura 28. Avaliação da atividade locomotora da <i>D. Melanogaster</i> mediante geotaxis negativa.	40
Figura 29. Sequência de isolamento dos metabólitos do extrato do cultivo do fungo 584 com a biomassa do fungo 619 a partir das colunas cromatográficas I-V.	46
Figura 30. Sequência de isolamento dos metabólitos do extrato do cultivo do fungo 584 com a biomassa do fungo 619 a partir das colunas cromatográficas VI-VIII.....	48
Figura 31. Características macroscópicas e microscópicas das espécies fúngicas.	53
Figura 32. Co-cultura das espécies fúngicas <i>A. chevalieri</i> (584), <i>Penicillium</i> sp. (588), <i>T. calidicanus</i> (747), <i>C. rogersoniana</i> (529) e <i>F. nygamai</i> (619) em pares. a,b,c,e,g,j – inibição por contato; d – inibição à distância; f,j – supercrescimento.	56
Figura 33. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura de fungos <i>A. chevalieri</i> (584), <i>T. calidicanus</i> (747), <i>C. rogersoniana</i> (529), <i>Penicillium</i> (588) e <i>F. nygamai</i> (619) em pares em comparação com os perfis metabólicos controles. As	

setas indicam regiões dos cromatogramas onde o perfil encontra-se diferenciado.	58
Figura 34. Co-cultivo das espécies fúngicas <i>C. rogersoniana</i> (529), <i>A. chevalieri</i> (584), <i>Penicillium</i> (588), <i>F. nygamai</i> (619) e <i>T. calidicanus</i> (747) com <i>C. albicans</i> (CA) em meio sólido (frente e verso da placa de Petri).....	60
Figura 35. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura das espécies fúngicas <i>A. chevalieri</i> (584), <i>T. calidicanus</i> (747), <i>C. rogersoniana</i> (529), <i>Penicillium</i> (588) e <i>F. nygamai</i> (619) com <i>C. albicans</i> (CA) em comparação com os perfis metabólicos controles. As setas indicam regiões dos cromatogramas onde o perfil encontra-se diferenciado.	61
Figura 36. Co-cultivo dos fungos <i>C. rogersoniana</i> (529), <i>A. chevalieri</i> (584), <i>Penicillium</i> (588), <i>F. nygamai</i> (619) e <i>T. calidicanus</i> (747) com <i>S. aureus</i> em meio sólido (frente e verso da placa de Petri).....	63
Figura 37. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura das espécies fúngicas <i>A. chevalieri</i> (584), <i>T. calidicanus</i> (747), <i>C. rogersoniana</i> (529), <i>Penicillium</i> (588) e <i>F. nygamai</i> (619) com <i>S. aureus</i> (SA) em comparação com os perfis metabólicos controles. As setas indicam regiões dos cromatogramas onde o perfil encontra-se diferenciado.	64
Figura 38. Co-cultivo dos fungos <i>C. rogersoniana</i> (529), <i>A. chevalieri</i> (584), <i>Penicillium</i> (588), <i>F. nygamai</i> (619) e <i>T. calidicanus</i> (747) com <i>E. carotovora</i> em meio sólido (frente e verso da placa de Petri).	65
Figura 39. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura das espécies fúngicas <i>A. chevalieri</i> (584), <i>F. nygamai</i> (619), <i>C. rogersoniana</i> (529), <i>Penicillium</i> (588) e <i>T. calidicanus</i> (747) com <i>E. carotovora</i> (E) em comparação com os perfis metabólicos controles. As setas indicam regiões dos cromatogramas onde o perfil encontra-se diferenciado.....	66
Figura 40. Co-cultivo dos fungos <i>C. rogersoniana</i> (529), <i>Penicillium</i> (588), <i>T. calidicanus</i> (747), <i>F. nygamai</i> (619), <i>A. chevalieri</i> (584) com <i>E. coli</i> (EC) em meio sólido (frente e verso da placa de Petri).....	67
Figura 41. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura das espécies fúngicas <i>A. chevalieri</i> (584), <i>F. nygamai</i> (619), <i>C. rogersoniana</i> (529), <i>Penicillium</i> (588) e <i>T. calidicanus</i> (747) com <i>E. coli</i> (EC) em comparação com os perfis metabólicos controles. As setas indicam regiões do cromatograma onde o perfil encontra-se diferenciado.....	68
Figura 42. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura de <i>F. nygamai</i> (619) com <i>E. coli</i> (EC), <i>S. aureus</i> (SA) e <i>C. albicans</i> (CA) nos meios 1 e 2, em	

comparação com os extratos controles. As setas indicam regiões do cromatograma onde o perfil encontra-se diferenciado.	70
Figura 43. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura de <i>A. chevalieri</i> (584) com <i>E. coli</i> (EC), <i>S. aureus</i> (SA) e <i>C. albicans</i> (CA) nos meios 1 e 2, em comparação com os extratos controles. As setas indicam regiões do cromatograma onde o perfil encontra-se diferenciado.	71
Figura 44. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura de <i>T. calidicanus</i> (747) com <i>E. coli</i> (EC), <i>S. aureus</i> (SA) e <i>C. albicans</i> (CA) nos meios 1 e 2, em comparação com os extratos controles. As setas indicam regiões do cromatograma onde o perfil encontra-se diferenciado.	72
Figura 45. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura dos fungos com biomassa (B), caldo (C) e caldo/biomassa (CB) liofilizados de outras espécies fúngicas, em meio líquido.....	74
Figura 46. Cromatogramas (270 nm) dos extratos fúngicos de: A - <i>A. chevalieri</i> (584); B - <i>T. calidicanus</i> (747); C - <i>Penicillium</i> (588); D - <i>C. rogersoniana</i> (529); E - <i>F. nygamai</i> (619) obtidos antes e após produção induzida de metabólitos utilizando procainamida (PROCA) e hidralazina (HIDRA).....	76
Figura 47. Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos de co-cultivo de fungo com fungo do Experimento 1 (<i>Penicillium</i> (588), <i>A. chevalieri</i> (584), <i>T. calidicanus</i> (747), <i>F. nygamai</i> (619), <i>C. rogersoniana</i> (529)).....	79
Figura 48. Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos de co-cultivo dos fungos (F) <i>Penicillium</i> (588), <i>A. chevalieri</i> (584), <i>T. calidicanus</i> (747), <i>F. nygamai</i> (619) e <i>C. rogersoniana</i> (529) com <i>C. albicans</i> (CA), <i>S. aureus</i> (SA), <i>E.coli</i> (EC) e <i>E. carotovora</i> (E) do Experimento 1.	80
Figura 49. Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos de co-cultivo dos fungos (F) <i>Penicillium</i> (588), <i>A. chevalieri</i> (584), <i>T. calidicanus</i> (747), <i>F. nygamai</i> (619) e <i>C. rogersoniana</i> (529) com <i>C. albicans</i> (CA), <i>S. aureus</i> (SA) e <i>E.coli</i> (EC) no meio 1 do Experimento 2.....	81
Figura 50. Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos de co-cultivo dos fungos (F) <i>Penicillium</i> (588), <i>A. chevalieri</i> (584), <i>T. calidicanus</i> (747), <i>F. nygamai</i> (619) e <i>C. rogersoniana</i> (529) com <i>C. albicans</i> (CA), <i>S. aureus</i> (SA) e <i>E.coli</i> (EC) no meio 2 do Experimento 2.....	81
Figura 51. Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos de co-cultivo dos fungos (F) <i>Penicillium</i> (588), <i>A. chevalieri</i> (584), <i>T. calidicanus</i> (747), <i>F. nygamai</i> (619) e <i>C. rogersoniana</i> (529) com <i>C. albicans</i> (CA), <i>S. aureus</i> (SA) e <i>E.coli</i> (EC) no meio 3 do Experimento 2.....	82

Figura 52. Inibição da AChE dos extratos do cultivo dos fungos (F) com biomassa, caldo e com caldo/biomassa de outros fungos.....	83
Figura 53. Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos dos fungos (F) modulados com procainamida (F+PROCA) e hidralazina (F+HIDRA) e seus respectivos controles.....	84
Figura 54. Estruturas químicas dos compostos identificados por PS-MS.	88
Figura 55. Fragmentação proposta para o composto 9-hidroxi-megastigma-3,5,8-trien-7-ona-9-O- β -D-glucopiranosídeo detectado no extrato de co-cultura 584+588 (JIA et al., 2017).	89
Figura 56. Estruturas químicas dos compostos isolados.	90
Figura 57. Espectro no infravermelho (em pastilha de KBr) do composto GO-1..	91
Figura 58. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) do composto GO-1.....	91
Figura 59. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) do composto GO-1 (expansão).	92
Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (D_2O , 100 MHz) do composto GO-1.....	92
Figura 61. Mapa de contornos HSQC (D_2O , 400 MHz) do composto GO-1.....	93
Figura 62. Mapa de contornos HSQC (D_2O , 400 MHz) do composto GO-1 (expansão).	93
Figura 63. Espectro de massas (ESI modo negativo) do composto GO-1.....	94
Figura 64. Espectro no infravermelho (em pastilha de KBr) do composto GO-2..	95
Figura 65. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto GO-2.	96
Figura 66. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto GO-2 (expansão).	97
Figura 67. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto GO-2 (expansão).	97
Figura 68. Espectro de RMN de ^{13}C e expansões (CDCl_3 , 100 MHz) do composto GO-2.	98
Figura 69. Subespectro DEPT-135 e expansões (CDCl_3 , 100 MHz) do composto GO-2.	98
Figura 70. Mapa de contornos HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) do composto GO-2.....	99

Figura 71. Mapa de contornos HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-2 (expansão).	99
Figura 72. Mapa de contornos COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-2....	100
Figura 73. Mapa de contornos HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-2. ..	101
Figura 74. Mapas de contornos HMBC (CDCl ₃) do composto GO-2 (expansões).	102
Figura 75. Espectro de massas (ESI modo positivo) do composto GO-2.	103
Figura 76. Estrutura base de alcaloide indólico dicetopiperazina prenilado. A: núcleo indólico, B: anel dicetopiperazina, C: cadeia isoprênica.	103
Figura 77. Espectro de RMN de ¹ H e expansões (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-3.	105
Figura 78. Espectro de RMN de ¹³ C (A) e subespectro DEPT-135 (B) (CDCl ₃ , 100 MHz) do composto GO-3.	106
Figura 79. Mapa de contornos COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-3....	106
Figura 80. Mapa de contornos COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-3 (expansão).	107
Figura 81. Mapa de contornos HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-3....	107
Figura 82. Mapa de contornos HMBC (CDCl ₃) do composto GO-3.....	108
Figura 83. Mapa de contornos HMBC (CDCl ₃) do composto GO-3 (expansão). ..	108
Figura 84. Mapa de contornos HMBC (CDCl ₃) do composto GO-3 (expansão). ..	109
Figura 85. Mapa de contornos HMBC (CDCl ₃) do composto GO-3 (expansão). ..	109
Figura 86. Espectro de massas (ESI modo positivo) do composto GO-3.	110
Figura 87. Estrutura base das antraquinonas.....	110
Figura 88. Espectro no infravermelho (em pastilha de KBr) do composto GO-4. ..	112
Figura 89. Espectro de RMN de ¹ H e expansões (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-4.	113
Figura 90. Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) do composto GO-4.	114
Figura 91. Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) do composto GO-4 (expansão).	114

Figura 92. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto GO-4 (expansão).	115
Figura 93. Subespectro DEPT-135 e expansões (CDCl_3 , 100 MHz) do composto GO-4.	115
Figura 94. Mapa de contornos HSQC (CDCl_3) do composto GO-4.....	116
Figura 95. Mapa de contornos HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) do composto GO-4 (expansão).	116
Figura 96. Mapa de contornos HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) do composto GO-4 (expansão).	117
Figura 97. Mapa de contornos COSY ^1H - ^1H (CDCl_3 , 400MHz) do composto GO-4.	117
Figura 98. Mapa de contornos HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) do composto GO-4. ...	118
Figura 99. Mapa de contornos HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) do composto GO-4 (expansão).	119
Figura 100. Mapa de contornos HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) do composto GO-4 (expansão).	119
Figura 101. Mapa de contornos HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) do composto GO-4 (expansão).	120
Figura 102. Espectro de massas (ESI modo negativo) do composto GO-4.	120
Figura 103. Espectro no infravermelho (pastilha de Kbr) do composto GO-5. ...	122
Figura 104. Espectro de RMN de ^1H e expansões (CDCl_3 , 400 MHz) do composto GO-5.	123
Figura 105. Espectro de RMN de ^{13}C e expansões (CDCl_3 , 100 MHz) do composto GO-5.	123
Figura 106. Subespectro DEPT-135 e expansões (CDCl_3 , 100 MHz) de GO-5.	124
Figura 107. Mapa de contornos COSY (CDCl_3 , 400 MHz) do composto GO-5..	125
Figura 108. Mapa de contornos COSY (CDCl_3 , 400 MHz) do composto GO-5 (expansão).	125
Figura 109. Mapa de contornos HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) do composto GO-5..	126
Figura 110. Mapa de contornos HSQC (CDCl_3 , 400 MHz) do composto GO-5 (expansão).	126

Figura 111. Mapa de contornos HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-5.	127
Figura 112. Mapa de contornos HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-5 (expansão).	127
Figura 113. Mapa de contornos HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-5 (expansão).	128
Figura 114. Espectro de massas (ESI modo positivo) do composto GO-5.	128
Figura 115. Espectro no infravermelho (pastilha de Kbr) do composto GO-6.	130
Figura 116. Espectro de RMN de ¹ H e expansões (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-6.	131
Figura 117. Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 100 MHz) do composto GO-6.	132
Figura 118. Subespectro DEPT-135 (CDCl ₃ , 100 MHz) do composto GO-6.	132
Figura 119. Mapa de contornos COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-6.	133
Figura 120. Mapa de contornos COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-6 (expansão).	133
Figura 121. Mapa de contornos HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-6.	134
Figura 122. Mapa de contornos HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-6 (expansão).	134
Figura 123. Mapa de contornos HSQC (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-6 (expansão).	135
Figura 124. Mapa de contornos HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-6.	135
Figura 125. Mapa de contornos HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-6 (expansão).	136
Figura 126. Mapa de contornos HMBC (CDCl ₃ , 400 MHz) do composto GO-6 (expansão).	136
Figura 127. Espectro de massas (ESI modo positivo) do composto GO-6.	137
Figura 128. Estruturas químicas dos compostos GO-2 a GO-6 (A) e suas representações em 3D (B).	142
Figura 129. Cromatogramas (270 nm) dos extratos dos cultivos do fungo <i>A. chevalieri</i> com biomassa (584+B619), caldo (584+C619) e caldo/biomassa (584+C/B619), do controle (584) e dos compostos isolados (GO-2, GO-3, GO-4, GO-5 e GO-6).	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos meios de cultura preparados utilizando a abordagem OSMAC	33
Tabela 2. Planejamento do experimento de co-cultura em meio líquido	34
Tabela 3. Dados sobre a identificação molecular das espécies fúngicas.....	51
Tabela 4. Tempo de retenção dos metabólitos produzidos nos meios de cultura contendo os moduladores epigenéticos e ausentes no controle.....	77
Tabela 5. Compostos identificados em co-culturas de fungos por PS-MS.....	87
Tabela 6. Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, D ₂ O) do composto GO-1 comparado com dados da literatura (δ em ppm).....	95
Tabela 7. Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl ₃) do composto GO-2	104
Tabela 8. Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl ₃) do composto GO-3 comparado com dados da literatura (DANIELSEN et al., 1992).....	111
Tabela 9. Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl ₃) do composto GO-4 (δ em ppm) comparado com dados da literatura (KIM et al., 2014).	121
Tabela 10. Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl ₃) do composto GO-5 comparado a dados da literatura (MIYAKE et al., 2009).	129
Tabela 11. Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl ₃) do composto GO-6 comparado a dados da literatura (MIYAKE et al., 2009)	138
Tabela 12. Inibição da acetilcolinesterase dos compostos isolados.....	140
Tabela 13. Resultado da atividade neuroprotetora preventiva e terapêutica do extrato 584+B619 e do composto GO-2.....	144
Tabela 14. Teores dos metabólitos nos extratos dos três cultivos e no controle do fungo 584 do Experimento 3	146

ABREVIATURAS

ACHÉ	Acetilcolinesterase
BDA	Batata dextrose ágar
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	Espectroscopia de correlação bidimensional $^1\text{H} \times ^1\text{H}$
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
ESI	<i>Ionization by electrospray</i>
HIDRA	Cloridrato de hidralazina
HMBC	<i>Heteronuclear multiple-bond correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single-quantum correlation</i>
IC ₅₀	<i>Inhibitory concentration 50%</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Mutipleto
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
PDB	<i>Potato dextrose broth</i>
ppm	Partes por milhão
PROCA	Cloridrato de procainamida

PS-MS	<i>Paper spray mass spectrometry</i>
q	Quarteto
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1
s	Simpleto
t	Tripleto
td	Tripleto duplo
δ	Deslocamento químico em partes por milhão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Importância dos fungos	3
2.2 Diversidade de compostos bioativos isolados de micro-organismos	4
2.3 Co-cultivo e indução metabólica	9
2.4 Abordagem OSMAC no cultivo de fungos.....	11
2.5 Uso da modulação epigenética no cultivo de fungos	15
2.6 Doenças neurodegenerativas	20
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	26
4.1 Material	26
4.2 Equipamentos	27
4.3 Metodologia	28
4.3.1 Isolamento, reativação e armazenamento das espécies fúngicas estudadas	28
4.3.2 Identificação das espécies fúngicas.....	29
4.3.3 Cultivo dos fungos em pequena escala e obtenção dos extratos	30
4.3.3.1 Experimento 1: co-cultivo de fungos com fungos, bactérias e levedura em meio sólido.....	31
4.3.3.2 Experimento 2: co-cultivo de fungo com bactérias e levedura em meio sólido utilizando a abordagem OSMAC	32
4.3.3.3 Experimento 3: cultivo de fungo com biomassa e metabólitos de outros fungos em meio líquido.....	34
4.3.3.4 Experimento 4: cultivo de fungos em meio sólido na presença de moduladores epigenéticos.....	36
4.3.4 Análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	36
4.3.5 Bioensaios	38
4.3.5.1 Atividade inibitória da acetilcolinesterase	38

4.3.5.2 Atividade neuroprotetora: preventiva e terapêutica	39
4.3.6 Análise estatística	41
4.3.7 Cultivos em escala ampliada e obtenção dos extratos	41
4.3.7.1 Cultivo em escala ampliada do fungo <i>F. nygamai</i> em co-cultura com <i>Erwinia carotovora</i>	42
4.3.7.2 Cultivo em escala ampliada do fungo <i>T. calidicanus</i> em co-cultura com a bactéria <i>E. coli</i>	42
4.3.7.3 Cultivo em escala ampliada do fungo <i>T. calidicanus</i> em co-cultura com a levedura <i>C. albicans</i>	42
4.3.7.4 Cultivo em escala ampliada do fungo <i>F. nygamai</i> com a levedura <i>C. albicans</i>	43
4.3.7.5 Cultivo em escala ampliada do fungo <i>A. chevalieri</i> com a biomassa do fungo 619.....	43
4.3.8 Isolamento dos metabólitos secundários	43
4.3.8.1 Cromatografia em coluna do extrato obtido do cultivo do fungo <i>F. nygamai</i> em co-cultura com <i>E. carotovora</i> em escala ampliada.....	43
4.3.8.2 Cromatografia em coluna do extrato obtido do cultivo do fungo <i>T. calidicanus</i> em co-cultura <i>E. coli</i> em escala ampliada	44
4.3.8.3 Cromatografia em coluna do extrato obtido do cultivo do fungo <i>T. calidicanus</i> em co-cultura com <i>C. albicans</i> em escala ampliada	44
4.3.8.4 Cromatografia em coluna do extrato obtido do cultivo do fungo <i>F. nygamai</i> em co-cultura com <i>C. albicans</i> em escala ampliada	44
4.3.8.5 Cromatografia em coluna do extrato obtido do cultivo do fungo <i>A. chevalieri</i> com a biomassa do fungo <i>F. nygamai</i> em escala ampliada	45
4.3.9 Quantificação dos compostos por CLAE	48
4.3.10 Elucidação estrutural dos compostos	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 Identificação molecular e características morfológicas das espécies fúngicas	51
5.2 Co-cultivo dos fungos e análise por CLAE dos extratos do experimento 1 .	55
5.2.1 Co-cultura entre fungos	55
5.2.2 Análise por CLAE dos extratos do cultivo dos fungos isolados e em co-cultura fungo-fungo.....	57
5.2.3 Co-cultivo das espécies fúngicas com <i>C. albicans</i>	59

5.2.4	Análise por CLAE dos extratos de co-cultivo dos fungos com <i>C. albicans</i>	61
5.2.5	Co-cultivo das espécies fúngicas com bactérias.....	62
5.2.5.1	Co-cultivo das espécies fúngicas com <i>S. aureus</i>	63
5.2.5.2	Análise por CLAE dos extratos do co-cultivo dos fungos com <i>S. aureus</i>	63
5.2.5.3	Co-cultivo dos fungos com <i>E. carotovora</i>	65
5.2.5.4	Análise por CLAE dos extratos de co-cultivo dos fungos com <i>E. carotovora</i>	66
5.2.5.5	Co-cultivo dos fungos com <i>E. coli</i>	67
5.2.5.6	Análise por CLAE dos extratos de co-cultivo das espécies fúngicas com <i>E. coli</i>	68
5.3	Análise por CLAE dos extratos de co-cultivos do Experimento 2.....	69
5.3.1	Análise por CLAE dos co-cultivos do fungo <i>F. nygamai</i> com <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> nos meios 1 e 2.....	69
5.3.2	Análise por CLAE dos co-cultivos de <i>A. chevalieri</i> com <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> nos meios 1 e 2.....	71
5.3.3	Análise por CLAE dos co-cultivos de <i>T. calidicanus</i> com <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i> nos meios 1 e 2.....	72
5.4	Análise por CLAE dos extratos dos co-cultivos em meio líquido do Experimento 3.....	73
5.5	Análise por CLAE dos extratos do Experimento 4 (modulação epigenética)	76
5.6	Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos (AChE)	78
5.6.1	Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos do Experimento 1	78
5.6.2	Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos do Experimento 2	80
5.6.3	Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos do Experimento 3	82
5.6.4	Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos do Experimento 4	84
	Os resultados da atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos do Experimento 4 são apresentados na Figura 53.	84
5.7	Identificação por PS-MS de metabólitos elicitados por co-cultura	86
5.8	Caracterização estrutural dos compostos isolados	90

5.8.1 Caracterização estrutural do composto GO-1.....	90
5.8.2 Caracterização estrutural do composto GO-2.....	95
5.8.3 Caracterização estrutural do composto GO-3.....	105
5.8.4 Caracterização estrutural do composto GO-4.....	112
5.8.5 Caracterização estrutural do composto GO-5.....	121
Figura 114. Espectro de massas (ESI modo positivo) do composto GO-5.	128
5.8.6 Caracterização estrutural do composto GO-6.....	129
Figura 127. Espectro de massas (ESI modo positivo) do composto GO-6.	137
5.9 Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos compostos isolados.....	139
5.10 Atividade neuroprotetora preventiva e terapêutica.....	143
5.11 Quantificação dos compostos por CLAE.....	145
6 CONCLUSÕES	147
7 REFERÊNCIAS.....	148
APÊNDICE	165

1 INTRODUÇÃO

A grande diversidade de produtos naturais existente na natureza pode proporcionar a descoberta de fármacos para a cura ou tratamento de várias doenças mundialmente conhecidas (CLARDY et al., 2004).

O reino *Fungi*, que compreende uma grande variedade de espécies, destaca-se pela descoberta de novos compostos com potencial farmacológico. Pesquisas mostram que metabólitos secundários produzidos por fungos desempenham diversas atividades biológicas, tais como, antibiótica, antibacteriana, antitumoral, anti-inflamatória, imunossupressor, entre outras (NEWMAN & CRAGG, 2016; GUIMARÃES et al., 2010).

Metabólitos de diversas classes químicas, incluindo policetídeos, derivados do ácido chiquímico, terpenos, alcaloides e peptídeos, são sintetizados por fungos (ELIAS et al., 2006). Assim, a prospecção de fungos está sendo focada na química de produtos naturais e com boa perspectiva, pois a literatura relata que muitos genes responsáveis por rotas biossintéticas não são usualmente transcritos, permanecendo inativados quando fungos são cultivados em meios sintéticos (BODE et al., 2002; CICHEWICZ, 2010; RUTLEDGE & CHALLIS, 2015).

A adição de precursores biossintéticos e a mudança de componentes nutricionais no meio de cultura são estratégias interessantes para ativar genes silenciosos, visando ativar rotas biossintéticas que culminem na produção de novos metabólitos secundários (TAKAHASHI et al., 2013). Outra estratégia interessante é a co-cultura, que consiste no cultivo do fungo na presença de outro fungo ou de bactérias, uma vez que muitos dos metabólitos produzidos a partir da interação dos micro-organismos coexistentes possuem atividades biológicas promissoras (WANG et al., 2013; TELES et al., 2013). A utilização dessa metodologia, em conjunto com a abordagem OSMAC (*One Strain, Many Compounds*), que preconiza que grandes alterações no metabolismo fúngico podem ser obtidas a partir de variações mínimas no meio de cultura, pode aumentar a possibilidade de ativação de genes silenciosos, levando à produção de metabólitos secundários, os quais podem desempenhar importantes funções farmacológicas (BILLS et al., 2008).

A modulação epigenética, uma tecnologia inovadora que faz uso de substâncias químicas chamadas moduladores epigenéticos, é mais uma abordagem que têm dado resultados satisfatórios na transcrição gênica de fungos, levando à modulação do metabolismo dos mesmos (RUTLEDGE & CHALLIS, 2015).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo submeter cinco espécies de fungos filamentosos a cultivos em condições capazes de induzir a expressão de genes silenciosos, utilizando as abordagens de co-cultivo, OSMAC e modulação epigenética.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância dos fungos

Os fungos são organismos heterotróficos (não sintetizam seus alimentos) pertencentes ao Reino *Fungi* e são divididos em leveduriformes e filamentosos. Estes últimos são constituídos, em sua maioria, por um emaranhado de hifas (estruturas microscópicas), formando a estrutura macroscópica conhecida como micélio (Figura 1). Estes organismos encontram-se presentes nos mais diversos ambientes na natureza, como solo, ar, em matéria orgânica e ambientes aquáticos (GUNATILAKA, 2006).

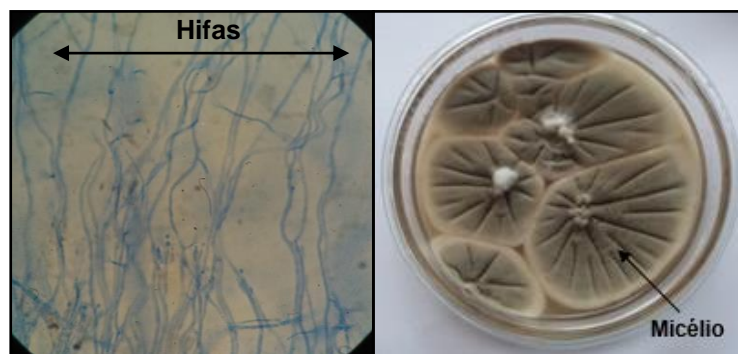


Figura 1. Estrutura microscópica (hifa) e macroscópica (micélio) de fungos.

Apesar de serem conhecidos principalmente por suas características não-benéficas, os fungos são organismos extremamente importantes, sendo fundamentais para a prosperidade dos ecossistemas terrestres. Desta forma, são essenciais para a sua sustentabilidade e biodiversidade (CLAY & HOLAH, 1999).

Além disso, estes micro-organismos realizam funções de grande importância em diversos setores, desempenhando um papel importante na economia, como na indústria alimentícia para produção de alimentos fermentados e bebidas alcoólicas (DAENEN et al., 2008). É o caso dos fungos *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti*, que são de grande importância no processo de fabricação de queijos (GIRAUD et al., 2010). Os fungos contribuem também na indústria farmacêutica, produzindo metabólitos biologicamente ativos com fins farmacológicos diversos, como antibióticos, imunossuppressores, antiparasitários e agentes anticancerígenos (TAKAHASHI & LUCAS, 2008), alguns dos quais

serviram como base para o desenvolvimento de muitos fármacos (RATEB & EBEL, 2011).

Os fungos são utilizados no processo de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, auxiliando na descontaminação de ambientes (SHIM & KAWAMOTO, 2005). São produtores de enzimas de interesse para indústria (WANG et al., 2005) e para a biotransformação (LOPES et al., 2016). Por exemplo, a enzima xilanase, produzida pela espécie *Penicillium oxalicum*, é usada no processo de fabricação de papel e na indústria alimentícia (LI et al., 2007). Também são de grande importância agrícola e ecológica, pois mantêm o equilíbrio do ambiente, decompondo restos vegetais, auxiliando no crescimento e proteção das plantas. Os fungos capazes de solubilizar fosfato, tais como os do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, desempenham papel importante no aumento da biodisponibilidade de fosfatos do solo para plantas. Estes fungos, associados às plantas, podem atuar como biofertilizantes (ELIAS et al., 2016). Com base no acervo de funções desempenhadas pelos fungos, pode se afirmar que estes micro-organismos são, sem dúvida, de grande interesse biotecnológico.

2.2 Diversidade de compostos bioativos isolados de micro-organismos

Uma vasta quantidade de compostos bioativos provenientes de produtos naturais já é conhecida. No entanto, os fungos continuam sendo fontes diretas para a descoberta de novos compostos, tendo em vista que apenas uma pequena fração (5%) das espécies fúngicas existentes foi estudada (MUELLER & SCHMIT, 2007). O número de espécies conhecidas é cerca de 69000, porém, no mundo, é estimada a existência de mais 2,2 milhões (HAWKSWORTH & LÜCKING, 2017).

A descoberta da penicilina (1) (Figura 2, pág. 6), um potente fármaco antibacteriano, por Fleming em 1928, produzida por *Penicillium crysogenum*, o isolamento e estudos clínicos posteriores realizados no início da década de 1940 e a comercialização de penicilinas sintéticas causaram uma revolução na pesquisa visando à descoberta de fármacos. Com o sucesso da penicilina, diversos pesquisadores iniciaram triagens com grandes coleções de culturas de micro-organismos na busca por novos antibióticos (BURGER, 1971).

A busca resultou em descobertas promissoras de antimicrobianos que estão presentes no mercado, como estreptomicina (**2**), cloranfenicol (**3**), clortetraciclina (**4**), cefalosporina C (**5**), entre outros (BUTLER, 2004). Posteriormente, novos fármacos foram identificados incluindo ácido clavulânico (**6**), inibidor de β -lactamase, isolado de *Streptomyces clavuligerus* (BROWN et al., 1976) e mevastatina (**7**), inibidor de HMG-CoA redutase, isolada de *Penicillium citrinum* (ENDO, 2004). Uma mistura de ácido clavulânico (**6**) e amoxicilina, uma penicilina sintética, é atualmente usada como um antibiótico de primeira linha. A mevastatina (**7**) e a lovastatina (**8**) foram a base para uma série de antilipidêmicos conhecidos como estatinas (Figura 2) (TOBERT, 2003). A busca por metabólitos secundários com potencial farmacológico a partir de espécies fúngicas de variados habitats continua até a atualidade (WANG et al., 2015; JIN et al., 2016; AKONE et al., 2016; CHOWDHURY et al., 2017; LIMA et al., 2018a).

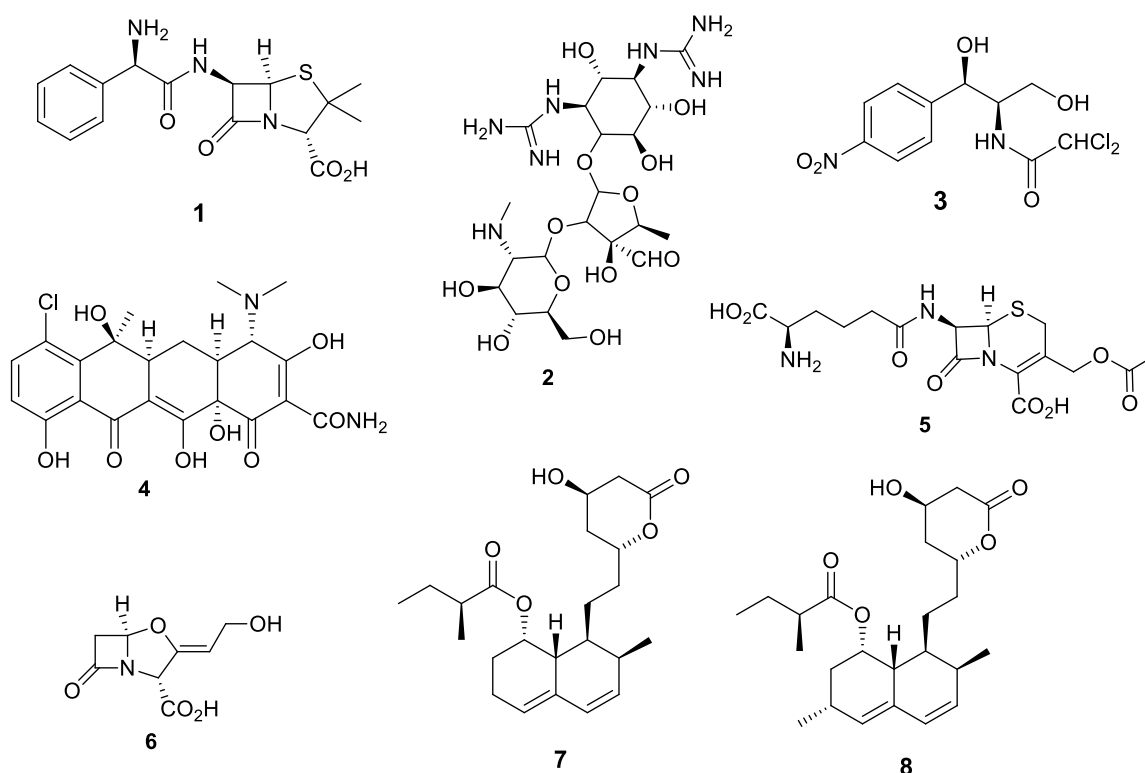


Figura 2. Estruturas de fármacos isolados de micro-organismos.

Metabólitos secundários com estruturas únicas foram relatados a partir de fungos provenientes de habitat marinho, incluindo policetídeos, alcaloides, peptídeos, lactonas, terpenos, esteroides, dentre outros, sendo os alcaloides os

mais abundantes. Alguns destes compostos apresentam propriedades anticancerígenas, antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anti-inflamatórias, antioxidantes, antibióticas e citotóxicas. Dentre os gêneros de fungos marinhos estudados encontram-se espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, considerados os mais ubíquos, sendo encontrados em sedimentos, algas, animais marinhos, mangue, dentre outros (JIN et al., 2016).

Novos compostos pertencentes à classe de alcaloides do tipo 4-hidroxi-2-piridona (**9-10**) (Figura 3, pág. 7) foram isolados a partir da espécie fúngica marinha *Arthrinium arundinis* ZSDS1-F3. Estes compostos apresentaram significativa citotoxicidade *in vitro* contra as linhagens de células tumorais K562, HL60, MCF-7 (células leucêmicas), A549, U937 (células epiteliais pulmonares), Hela (células do cancro cervical) e MOLT-4 (células mamárias), com valores de IC₅₀ que variaram de 0,24 a 45 mM. O metabólito **10** apresentou atividade inibitória significativa sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE) (IC₅₀ = 0,81 µM), enquanto que o composto **9** apresentou atividade moderada (IC₅₀ = 47,0 µM) (WANG et al., 2015).

O estudo químico do fungo endofítico *Stachybotrys chartarum* resultou no isolamento de novos fenilespirodrimanos, denominados chartarlactamas (**11-17**). Estes compostos exibiram potente efeito redutor de lipídios em células HepG2 na concentração de 10,0 µM (LI et al., 2014) (Figura 3, pág. 7).

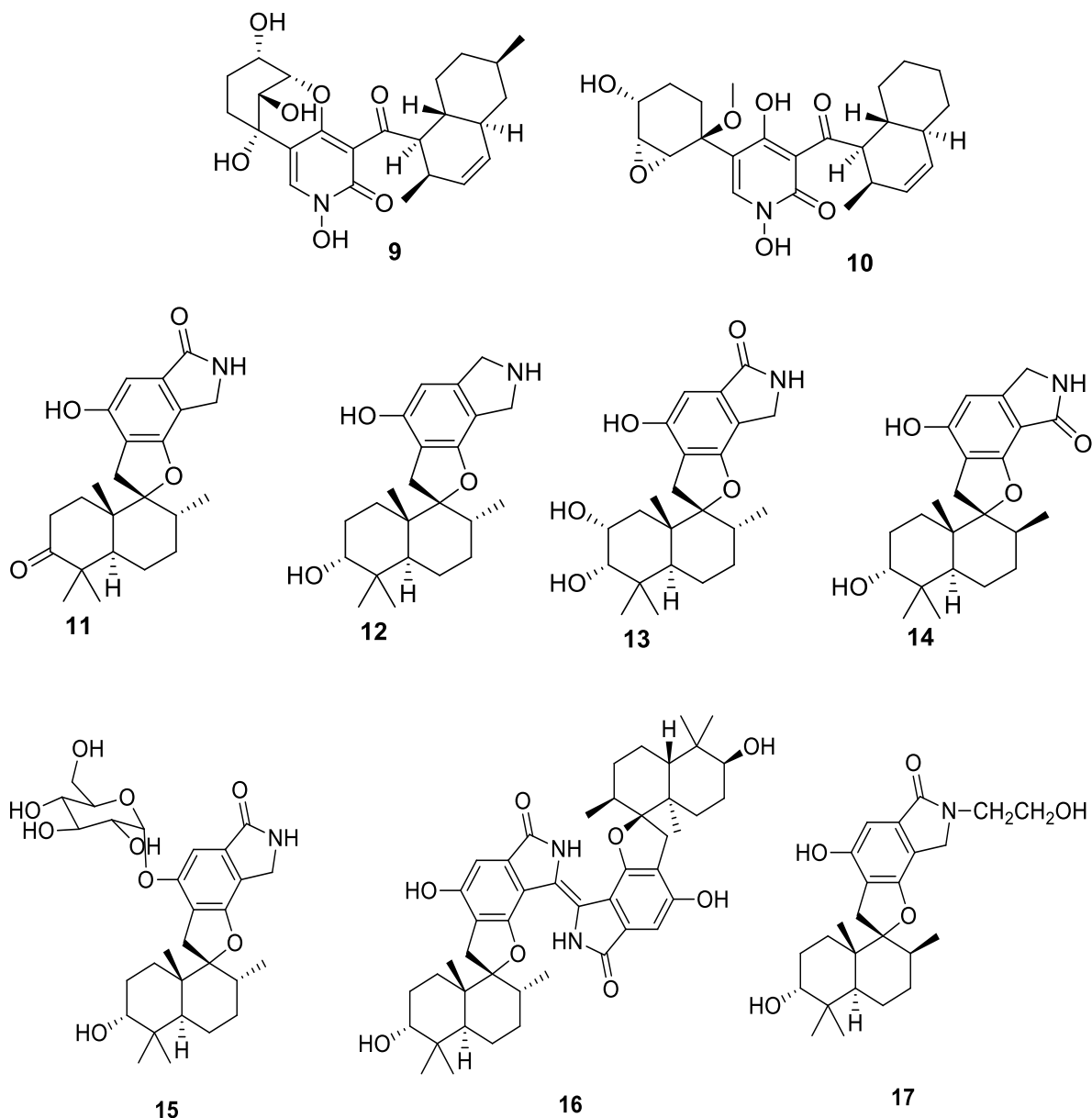


Figura 3. Estruturas de compostos **9-10**, isolados de *A. arundinis* e **11-17**, isolados de *S. chartarum*.

A partir da espécie fúngica *Aspergillus versicolor* MF359 foi isolado um novo composto denominado 5-metoxi-diidrosterigmatocistina (**18**) (Figura 4, pág. 8), que apresentou atividade potente contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* com valores de MIC de 12,5 e 3,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (SONG et al., 2014). Dois novos diterpenoides indólicos (**19** e **20**) (Figura 4, pág. 8) foram isolados a partir do caldo de fermentação do fungo *Aspergillus flavus* OUCMDZ-2205. O composto **19** exibiu atividade antibacteriana contra *S. aureus* com valor de MIC de 20,5 μM . Além disso, ambos

os compostos mostraram-se capazes de interromper o ciclo celular A549 na concentração de 10 μ M (SUN et al., 2014).

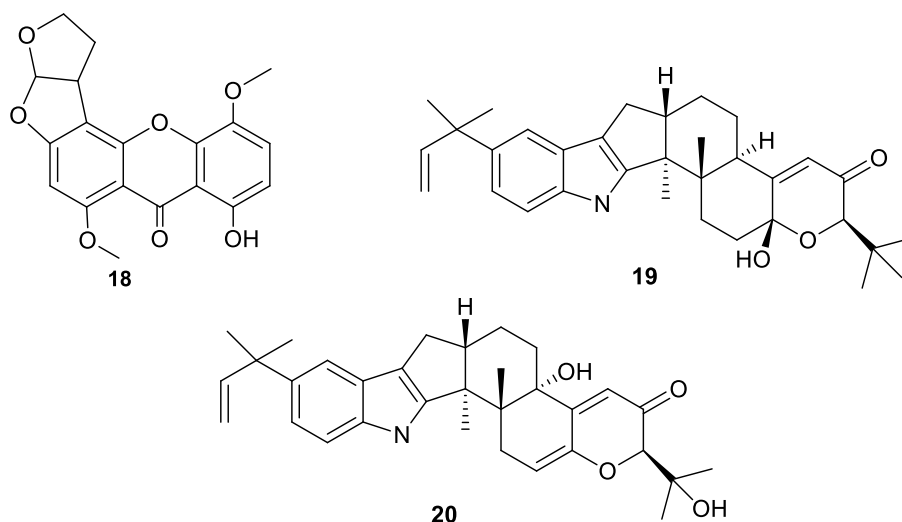


Figura 4. Estruturas dos compostos **18**, isolado de *A. versicolor* MF359, **19-20**, isolados de *A. flavus* OUCMDZ-2205.

O trímero substituído de ácido 3,5-dimetilorselínico, um ácido fenólico de grande relevância devido à sua propriedade neuritogênica, conhecido como PS-990 (**21**) (Figura 5), é produzido pela espécie fúngica *Bionectria ochroleuca* (BERTRAND et al., 2013a).

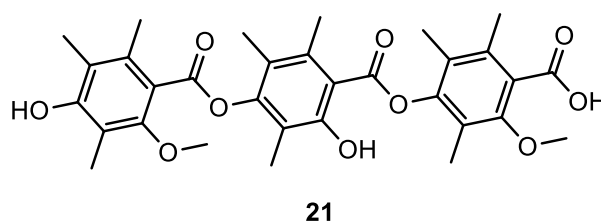


Figura 5. Estrutura de PS-990, isolado de *B. ochroleuca*

Estes trabalhos mostram a diversidade estrutural dos metabólitos secundários produzidos por esses micro-organismos a partir de diferentes precursores biossintéticos como ácido mevalônico (metabólitos **6** e **8**, Figura 2, pág. 5), triptofano (metabólitos **19** e **20**, Figura 4) e ácido orselínico (metabólito **21**, Figura 5).

2.3 Co-cultivo e indução metabólica

É relatado que fungos possuem um grande número de genes, que permanecem dormentes sob condições *ex-situ*, cujo verdadeiro potencial biossintético ainda está por ser descoberto (HERTWECK, 2009). Em virtude disso, diferentes formas de cultivos têm sido desenvolvidas, visando ativar a produção de metabólitos secundários estruturalmente diversificados e com potencial farmacológico (SCHERLACH et al., 2009). Dentre as abordagens utilizadas para o cultivo de fungos, a técnica de co-cultivo, também chamada de cultura mista ou fermentação mista, ganha destaque. Esta técnica trata do cultivo de duas ou mais espécies, em meio de cultura sólido ou líquido, para induzir a biossíntese de metabólitos secundários (Figura 6). A finalidade desta metodologia é imitar o ecossistema natural dos micro-organismos, isto é, um ambiente competitivo, onde metabólitos secundários bioativos são produzidos visando a sobrevivência (MARMANN et al., 2014).



Figura 6. Exemplos de co-cultivo de fungos em meio sólido.

Diversos estudos apontam resultados promissores quanto ao uso da técnica de co-cultura na exploração de genes fúngicos, bem como quanto ao potencial farmacológico dos metabólitos produzidos a partir dessa interação. Por exemplo, houve indução da produção de metabólitos secundários, até então desconhecidos, como as emericelamidas A (**22**) e B (**23**) (Figura 7, pág. 10), pelo fungo marinho *Emericella* sp., quando co-cultivado com a bactéria *Salinispora arenicola*. Estes compostos apresentaram moderada atividade antibacteriana contra *S. aureus* com valores de MIC de 3,8 e 6,0 μ M, respectivamente (OH et al., 2007).

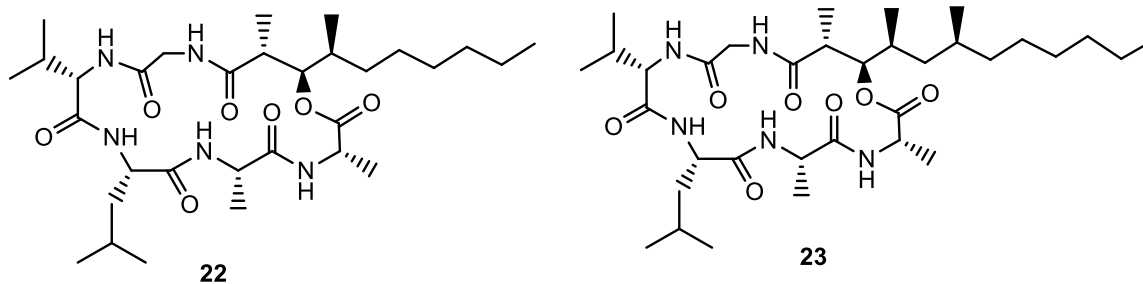


Figura 7. Metabólitos produzidos a partir do co-cultivo do fungo marinho *Emericella* sp. com a bactéria *S. arenicola*

A fermentação mista de *Aspergillus fumigatus* com a bactéria *Streptomyces peucetius* resultou no isolamento de dois novos produtos naturais (Figura 8), o composto sulfonado fumiformamida (**24**) e um derivado dimetoxilado (**25**) (ZUCK et al., 2011).

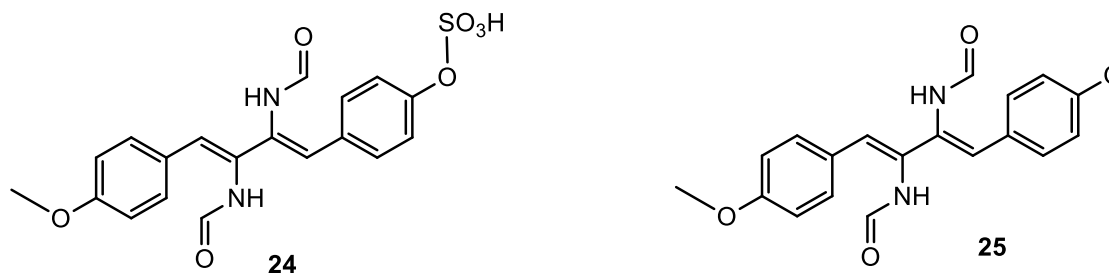


Figura 8. Metabólitos produzidos a partir da fermentação de *A. fumigatus* com a bactéria *S. peucetius*.

O co-cultivo dos fungos *Bionectria ochroleuca* e *Trichophyton rubrum* em meio sólido induziu a produção de um novo composto sulfonado (**26**), um trímero substituído de ácido 3,5-dimetilorselínico (Figura 9). A forma não sulfonada foi encontrada no extrato do cultivo de espécie fúngica *B. ochroleuca* isoladamente, não sendo detectada no extrato do cultivo isolado da espécie *T. rubrum*. Desta forma, sugere-se que a sulfonação ocorra devido à interação das duas espécies fúngicas ao competirem pelos mesmos nutrientes (BERTRAND et al., 2013a).

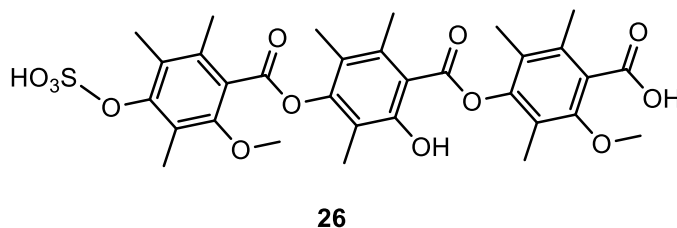


Figura 9. Estrutura do composto isolado do extrato do co-cultivo de *B. ochroleuca* com *T. rubrum*.

A interação das espécies *Penicillium fuscum* e *P. camembertii/clavigerum* induziu a produção de seis novos macrolídeos, berkeleylactonas A-F (**27**, **28**, **29**, **30**, **32**, **33**), além de um conhecido, A26771B (**31**) (Figura 10). Dentre os macrolídeos, metabólitos secundários formados a partir da via do acetato, a berkeleylactona A (**27**) apresentou a maior atividade antimicrobiana (MIC = 1-2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra quatro cepas de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA), assim como contra *Bacillus anthracis*, *S. pyogenes*, *Candida albicans* e *C. glabrata* (STIERLE et al., 2017).

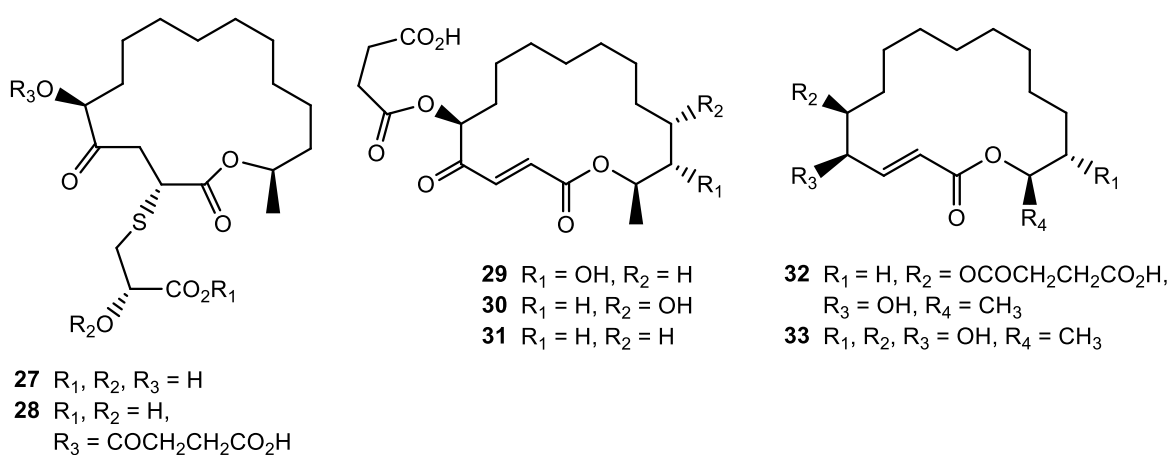


Figura 10. Metabólitos produzidos a partir da cultura mista de *P. fuscum* e *P. camembertii/clavigerum*.

A gama de metabólitos secundários isolados a partir da indução metabólica pela técnica de co-cultivo de fungos com outros micro-organismos, assim como as diversas atividades biológicas apresentadas por estes compostos mostram a relevância do uso dessa estratégia na busca por compostos com potencial farmacológico.

2.4 Abordagem OSMAC no cultivo de fungos

Como a biossíntese de metabólitos secundários é frequentemente alterada em diferentes condições de cultivo, a abordagem OSMAC (*One Strain, Many Compounds*) baseia-se em estratégias que levam em consideração a composição do meio de cultura, aeração, período de cultivo, pH, temperatura, entre outros,

visando maximizar a diversidade de metabólitos fúngicos (BODE et al., 2002; BILLS et al., 2008; GUO et al., 2015).

Para sobreviver, os fungos necessitam de diversas fontes de energia, sendo os carboidratos (fonte de carbono) a mais importante. A variação desse nutriente quali e quantitativamente no meio de cultura altera a expressão metabólica fúngica (TORTORA, 2012). Outra fonte necessária é o nitrogênio, elemento importante para a biossíntese de metabólitos nitrogenados, como os alcaloides. O nitrogênio pode ser adicionado ao meio de cultura em sua forma inorgânica como nitrito, nitrato e amônia ou em sua forma orgânica como peptona, aminoácidos, ureia, dentre outras (ARAI et al., 2013).

Guo e colaboradores (2015) relataram o isolamento de novos análogos do ácido ambuico (Figura 11, pág.13), os peniciclones A-C (**34-36**), a partir da fermentação do fungo *Penicillium* sp. F23-2 em meio de cultura composto por arroz e água do mar pH 6,0 a 15 °C, durante 60 dias. Estes metabólitos exibiram atividade antimicrobiana contra a bactéria *S. aureus* com valores de MIC variando de 0,3 a 1,0 µg mL⁻¹ (GUO et al., 2015). Ao ser cultivado em meio de cultura à base de batata, glucose, manitol, maltose, peptona, extrato de levedura e água do mar pH 6,0, temperatura (28 °C) e tempo de cultivo (45 dias) diferentes, sob condições estáticas, este fungo produziu os alcaloides meleagrinas D (**37**) e E (**38**) (Figura 11, pág. 13), que possuem cadeias laterais derivadas de acetato-mevalonato sem precedentes na porção imidazólica, e roquefortinas H (**39**) e I (**40**) (Figura 11, pág. 13). Estas novas meleagrinas apresentaram citotoxicidade contra a linhagem celular A-549 (DU et al., 2010).

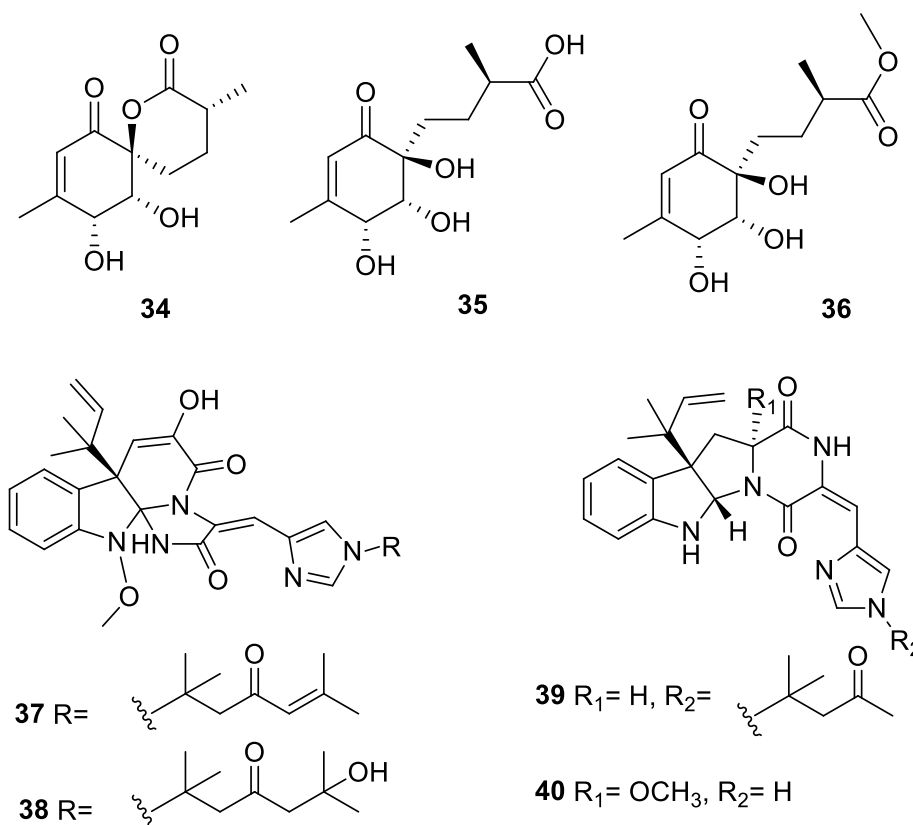


Figura 11. Estruturas dos compostos isolados do cultivo do fungo *Penicillium* sp. F23-2 utilizando OSMAC.

Condições de cultura dirigidas pela abordagem OSMAC modificaram drasticamente o metabolismo do fungo *Spicaria elegans* KLA03. De acordo com Lin e colaboradores (2009), quando cultivada em meio de cultura líquido, composto de amido solúvel, farinha de soja, extrato de levedura, peptona e água do mar pH 6,5 a 28 °C, sob agitação durante oito dias, esta espécie produziu policetídeos da família citocalasinas, incluindo espicalasina A (**41**) e aspocalhasas M-Q, (**42-46**) e dois aspochalasinas (**47-48**) (Figura 12, pág. 14). Por outro lado, quando *S. elegans* KLA03 foi cultivado em meio líquido composto por manitol, maltose, glucose, NH₄Cl, KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, extrato de levedura, licor de maceração de milho e água do mar pH 6,5 a 28 °C, de forma estática durante oito dias, *S. elegans* KLA03 produziu um policetídeo aromático altamente oxigenado, contendo um sistema de anel espiro raro, elegancetal A (**49**), tri-hidroxi-7-metil-1,3-di-hidroisobenzofurano (**50**) e flavimicina A (**51**) (Figura 12, pág. 14) (LUAN et al., 2014).

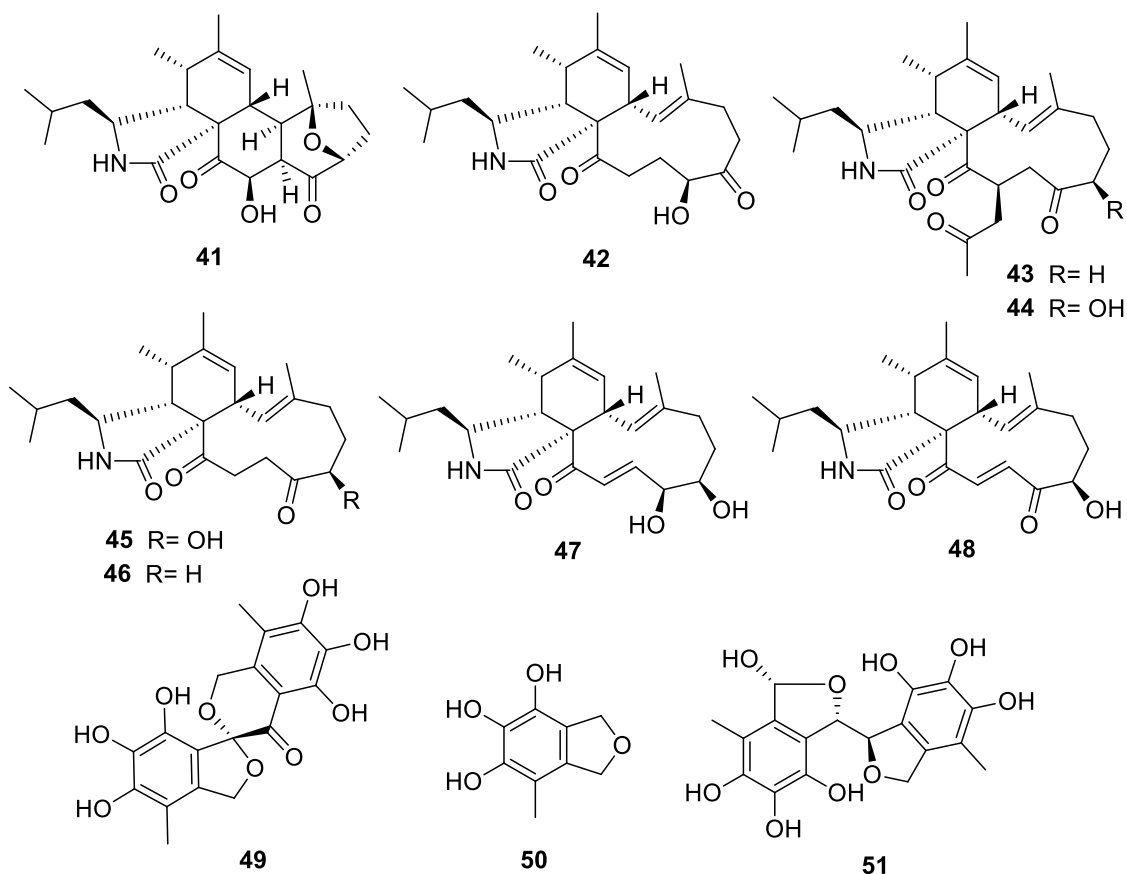


Figura 12. Estrutura dos metabólitos isolados do cultivo do fungo *S. elegans* KLA03 utilizando OSMAC.

Paranagama e colaboradores (2007) avaliaram o efeito das condições de cultura sobre a produção de metabólitos por *Paraphaeosphaeria quadriseptata*. Os resultados desses estudos indicaram que a produção dos principais metabólitos por *P. quadriseptata* diferem quando a água utilizada para fazer o meio de cultura líquido batata-dextrose (PDB) é destilada, ao invés de água de torneira. Por exemplo, monocillina I (**52**) é o composto majoritário deste fungo quando é utilizada água da torneira, enquanto quando se utiliza água destilada os majoritários são eugenetina (**53**), 6-metoximetil eugenina (**54**) e 6-hidroximetil eugenina (**55**) (Figura 13, pág. 15). Sugere-se que a presença de íons de metálicos, como Cu^{2+} , presentes na água de torneira influencia na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (PARANAGAMA et al., 2007).

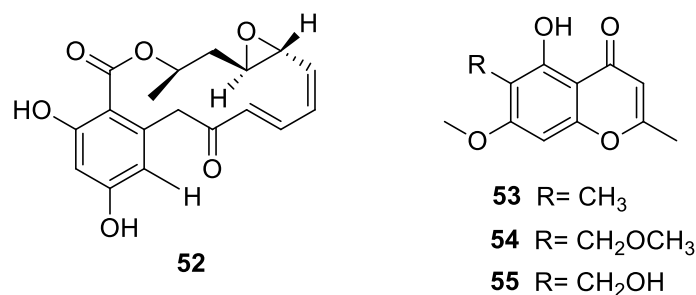


Figura 13. Estruturas dos compostos isolados do cultivo dos fungos *P. quadrisepitata* via OSMAC.

O estudo químico da espécie fúngica marinha *Penicillium adamezioides* AS-53 resultou na identificação de dois novos derivados de bistiodicetopiperazina, adamezinas A (**48**) e B (**49**), quando o fungo foi cultivado em meio de cultura líquido de PDB. Quando esta espécie foi cultivada em meio de cultura sólido de arroz, dois novos sesquiterpenos foram produzidos, adamezacorenois A (**50**) e B (**51**) (Figura 14). A adamezina A exibiu atividade inibitória contra *S. aureus*, *Aeromonas hydrophilia*, *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus* e *Gaeumannomyces graminis* com valores de concentração inibitória mínima de 8,0; 8,0; 32,0; 8,0 e 16,0 µg mL⁻¹, respectivamente (LIU et al., 2015).

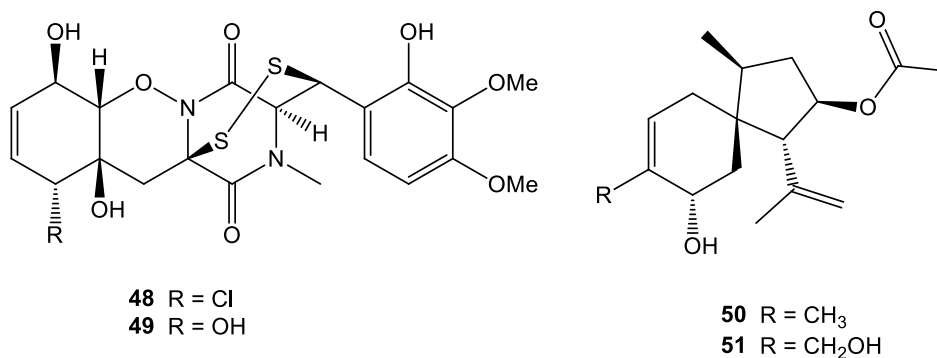


Figura 14. Estruturas dos compostos isolados do cultivo do fungo *P. adamezioides* AS-53 via OSMAC.

2.5 Uso da modulação epigenética no cultivo de fungos

A modulação epigenética consiste na interação de compostos químicos, chamados moduladores epigenéticos, com o DNA e moléculas associadas à sua estrutura, causando mudanças na expressão gênica devido à ativação ou ao silenciamento de genes (CHERBLANC et al., 2013; ZHANG, 2015) levando ao

aumento ou diminuição da biossíntese de metabólitos secundários comumente produzidos pelo fungo (RUTLEDGE & CHALLIS, 2015).

Os moduladores epigenéticos podem ser inibidores da DNA metiltransferase (DNAMT) ou de histona desacetilases (HDAC) que levam aos dois processos de regulação gênica mais conhecidos, metilação do DNA e modificação de histonas (CHERBLANC et al., 2013).

As enzimas DNA metiltransferases aceleram o processo de transferência de grupos metila do cofator S-adenosil metionina (SAM) para a posição C-5 dos resíduos de citosina de um dinucleotídeo citidina-guanina (CpG, onde p representa um grupo fosfato entre os dois nucleotídeos) (CICHEWICZ, 2010). A hipermetilação de DNA nas regiões ricas em CpG próximas do promotor estão associadas ao silenciamento de genes, levando à repressão transcricional (Figura 15).

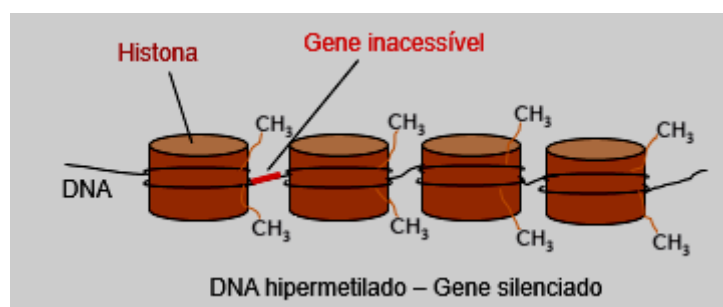


Figura 15. Estrutura do DNA hipermetilado com gene inacessível.

Embora os mecanismos moleculares para a repressão transcricional não sejam totalmente elucidados, acredita-se que as proteínas reconheçam o DNA metilado e, assim, reprimam a expressão de genes. Além disso, acredita-se que a metilação do DNA diminui a afinidade de ligação dos fatores de transcrição permissivos (CHERBLANC et al., 2013).

Entre os inibidores da DNA metiltransferase, os mais utilizados são cloridrato de procainamida (PROCA) (**52**), cloridrato de hidralazina (HIDRA) (**53**) e 5-aza-2'-deoxicitidina (5-AZA) (**54**) (Figura 16, pág. 17).

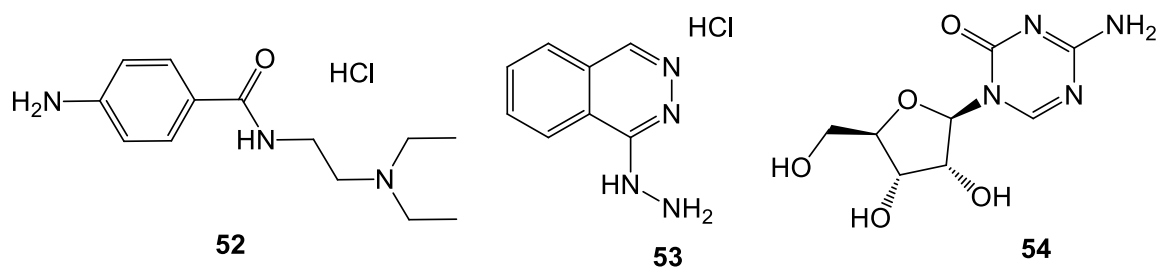


Figura 16. Estruturas químicas de inibidores de DNA metiltransferases (DNAMT).

De acordo com Wang e colaboradores (2010), o 5-AZA induziu o fungo *Penicillium citreonigrum* a produzir dois novos meroterpenos, atlantinonas A e B (**55** e **56**, respectivamente) e seis azafilonas, esclerotiorina (**57**), esclerotioramina (**58**), ocrefilona (**59**), decloroisocromofilona III (**60**), decloroisocromofilona IV (**61**) e 6-((3*E*,5*E*)-5,7-dimetil-2-metilenona-3,5-dienil)-2,4-dihidroxi-3-etilbenzaldeído (**62**) (Figura 17). Esses compostos não foram identificados quando o fungo foi cultivado sem o modulador, o que indica a ativação de rotas biossintéticas pelo 5-AZA.

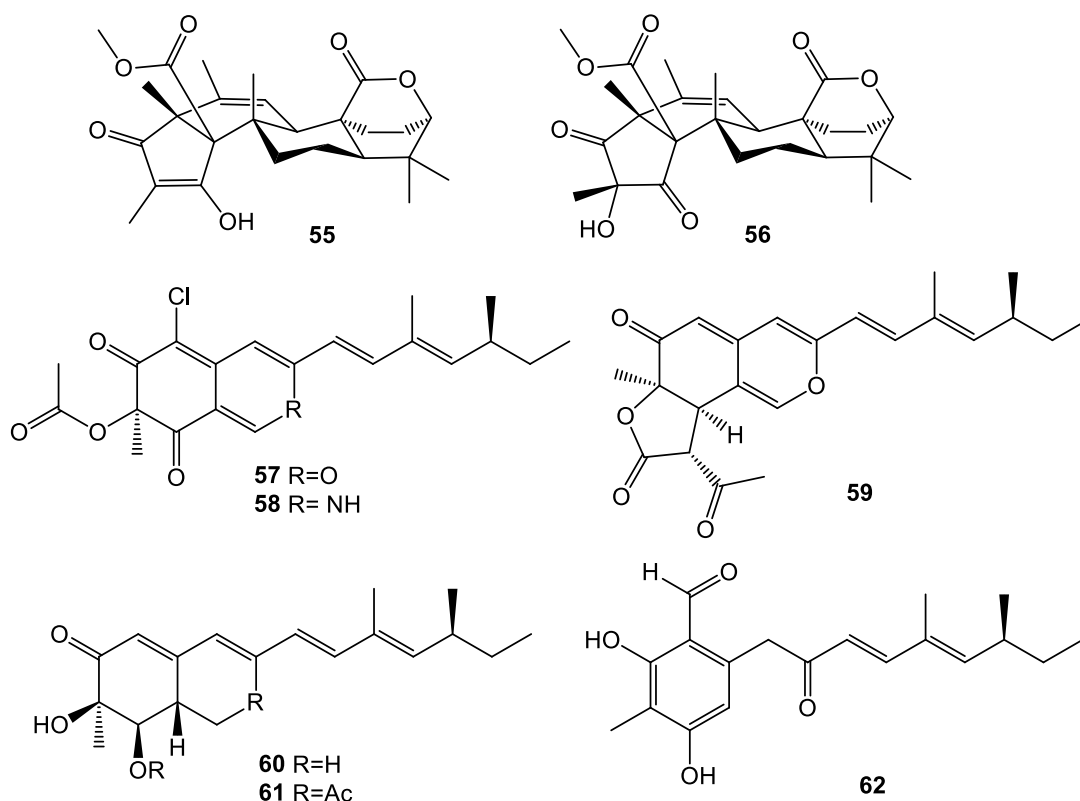


Figura 17. Estruturas químicas de metabólitos de *P. citreonigrum* induzidos por 5-AZA.

Yang e colaboradores (2014) relatam que o 5-AZA induziu o fungo endofítico *Pestalotiopsis crassiuscula* a produzir três metabólitos crípticos (**63**, **64** e **65**) (Figura 18). Já o tratamento da espécie fúngica *Chaetomium* sp. com o mesmo modificador epigenético resultou no aumento da biossíntese do metabólito isosulocrina (**66**) (Figura 18) (AKONE et al., 2016).

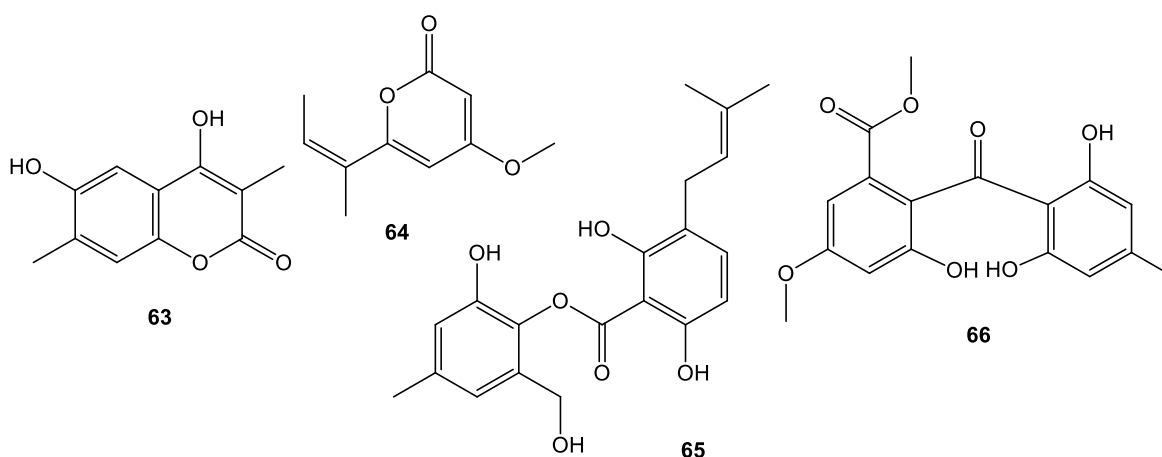


Figura 18. Estruturas químicas de metabólitos obtidos do cultivo de *P. crassiuscula* na presença de 5-AZA.

Para compreender o processo de modificação de histonas é necessário entender o papel das histonas. As histonas são proteínas encontradas no núcleo da célula, associadas à cromatina e são responsáveis pelo envelopamento do DNA, formando a estrutura do nucleossoma. Essas proteínas estão diretamente envolvidas no processo de regulação da expressão gênica por meio de reações químicas, como acetilação, metilação, fosforilação, glicosilação, carbonilação (TAKAHASHI et al., 2016), que ocorrem nos resíduos N-terminais das histonas presentes na superfície dos nucleossomos, alterando assim, a cromatina (CICHEWICZ, 2010; GONZALO, 2010). Como consequência das modificações químicas ocorridas nas histonas N-terminais altera-se o nível de enrolamento da cromatina, conseqüentemente, pode ocorrer ativação e/ou silenciamento de genes responsáveis por rotas biossintéticas (CICHEWICZ, 2010).

A alteração no nível de enrolamento da cromatina ocorre devido à mudança no nível eletrostático, mecanismo que auxilia na união de DNA e histona. Grupos amino presentes no resíduo de lisina, por exemplo, tornam as histonas carregadas positivamente, o que permite a interação com as cargas

negativas presentes nos grupos fosfato do DNA. Uma vez que ocorre uma reação de acetilação, por exemplo, há a conversão de aminas em amidas, suprimindo a carga positiva existente e, conseqüentemente, reduzindo a atração eletrostática DNA e histona. O enfraquecimento da união entre DNA e histona resulta na expansão da cromatina, com conseqüente transcrição genética da região cromossômica exposta (Figura 19) (CICHEWICZ, 2010).

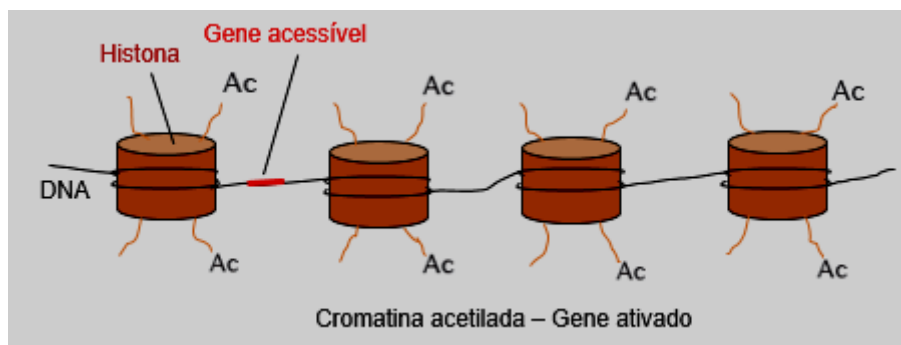


Figura 19. Histonas acetiladas, expansão da cromatina e gene acessível.

A carga positiva das histonas pode ser reativada por enzimas chamadas histonas desacetilases (HDCAs). Estas atuam na eliminação dos grupos acetila das histonas, restaurando a atração eletrostática e, conseqüentemente, a união entre DNA e histona (CHERBLANC et al., 2013).

Desta forma, a utilização de substâncias capazes de inibir a função das HDCAs têm sido utilizadas para regulação da expressão gênica por estas enzimas. Entre os moduladores epigenéticos inibidores de histonas desacetilases utilizados em estudos epigenéticos tem-se o ácido hidroxâmico suberoilânilida (SAHA) (**67**), o bis-suberoil-ácido hidroxâmico SBHA (**68**) e a trocrostatina A (**69**) (Figura 20).

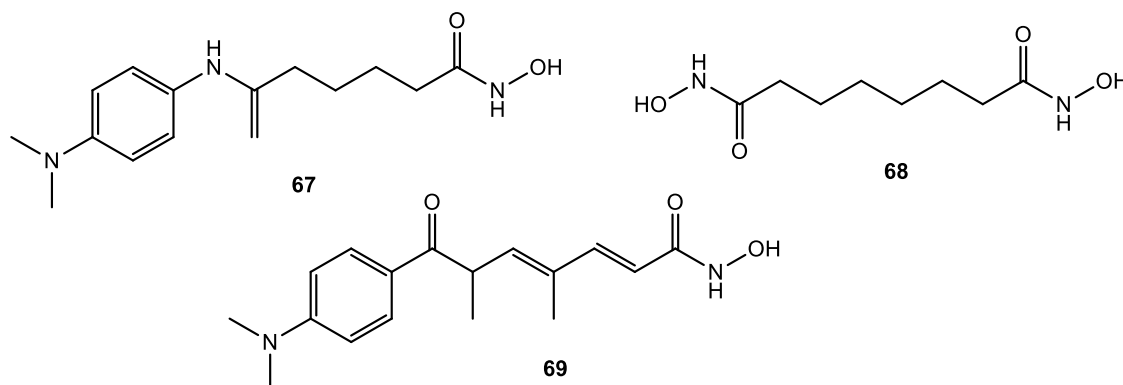


Figura 20. Estruturas químicas de inibidores de histonas desacetilases (HDCAs).

Os inibidores de histonas desacetilases tem mostrado resultados promissores em relação à modulação do metabolismo fúngico. Por exemplo, Asai e colaboradores (2013) mostraram que a adição de SAHA ao cultivo de *Chaetomium indicum* resultou no aumento da produção dos chaetofenóis D-F (**70-72**, respectivamente) (Figura 21). De acordo com os autores, a produção desses policetídeos tem associação direta com a regulação epigenética da cromatina em virtude da acetilação da histona (ASAI et al., 2013). O fungo *Eupenicillium sp.*, na presença do inibidor de histona desacetilase, nicotinamida, levou à produção de dois compostos inéditos, eupenicinicol C e D (**73** e **74**, respectivamente) (Figura 21). Eupenicinicol D apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (MIC de $0,1\mu\text{g mL}^{-1}$) e citotóxica contra células leucêmicas (THP-1) (LI et al., 2017a).

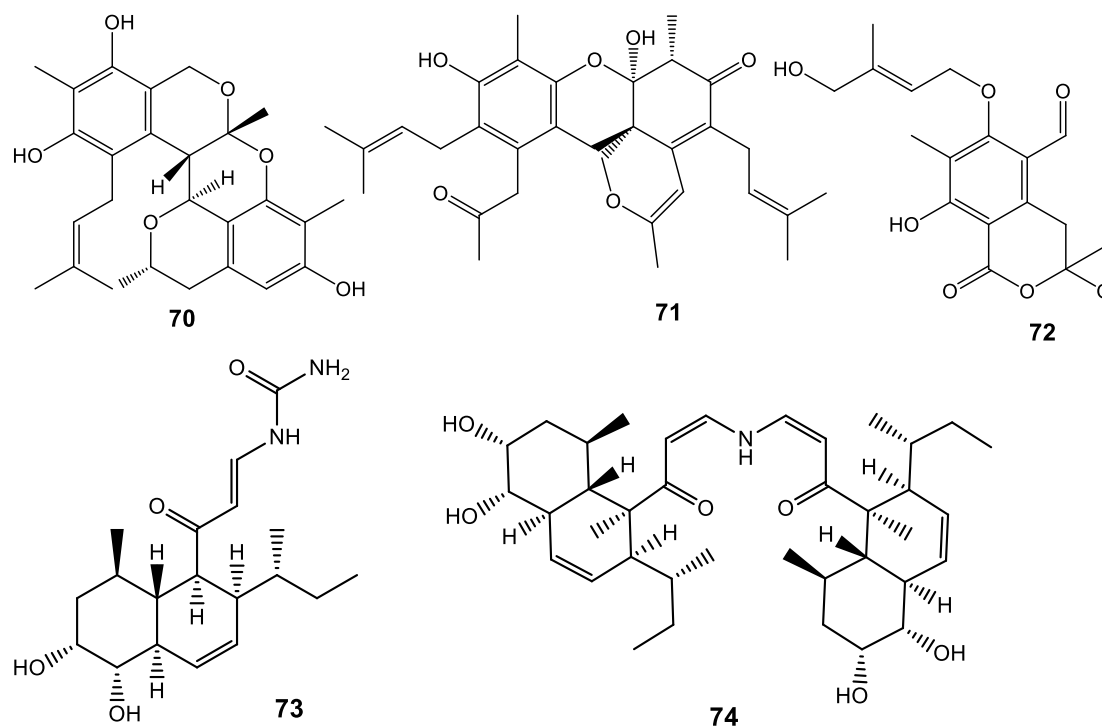


Figura 21. Estruturas químicas dos chaetofenóis D-F (**70-72**, respectivamente) e dos eupenicinicol C e D (**73** e **74**, respectivamente).

2.6 Doenças neurodegenerativas

Doenças neurodegenerativas causam danos irreversíveis no sistema nervoso dos indivíduos e são extremamente preocupantes devido ao elevado número de pessoas atingidas mundialmente. A doença de Alzheimer, descrita pela primeira vez por Alois Alzheimer em 1906, é uma desordem

neurodegenerativa grave, crônica, progressiva e de grande impacto social, que está relacionada ao aumento da idade, atingindo, portanto, principalmente, a população idosa (DEY et al., 2017). Acredita-se que em 2010, cerca de 35,6 milhões de pessoas sofreram com a doença e estima-se que o número de pacientes dobrará a cada 20 anos. Em 2030 o número de idosos no mundo deverá chegar a quase 1 bilhão e, de acordo com as estatísticas, 65,7 milhões terão esta doença. Os sintomas da doença envolvem perda progressiva da memória e das funções cognitivas, causando declínio na capacidade de socialização do indivíduo (MAO et al., 2014).

A doença de Alzheimer engloba múltiplos fatores, tais como baixos níveis de acetilcolina (neurotransmissor) devido à atividade da enzima acetilcolinesterase, depósitos de β -amiloide, agregação de τ -proteína, estresse oxidativo e disomeostase de biometálicos (OLIVEIRA et al., 2019). A maioria dos tratamentos para a doença de Alzheimer é baseada em inibidores da acetilcolinesterase (AChE), enzima que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica (OLIVEIRA et al., 2019). Acetilcolina é um neurotransmissor muito importante pois, além de atuar na junção neuromuscular, controla a atividade de áreas cerebrais que envolvem as ações de atenção, aprendizagem e memória (HOUGHTON et al., 2006). A Figura 22 representa o processo de transmissão de impulsos na fenda sináptica e a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase.

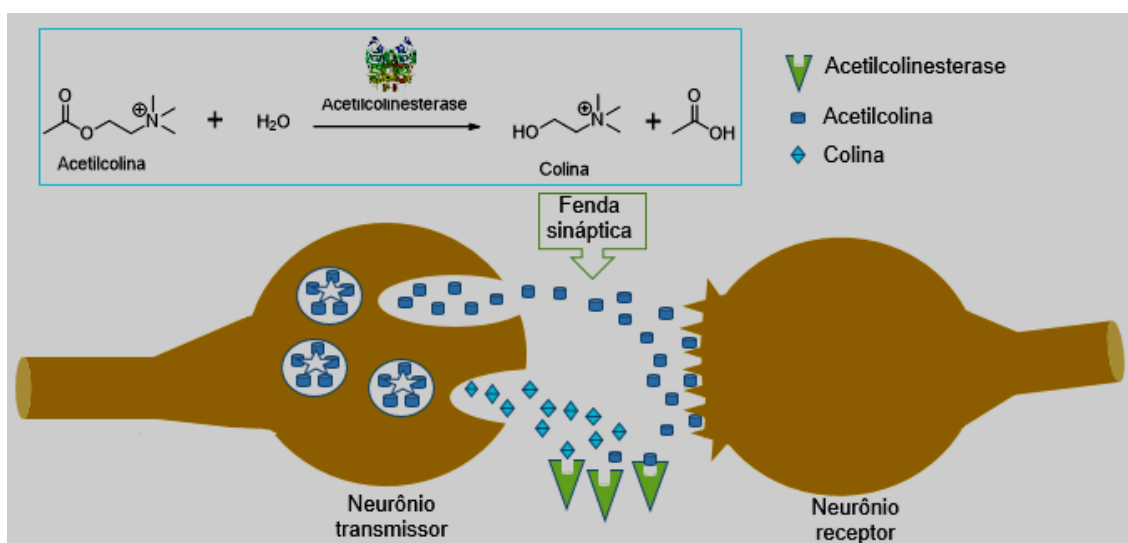


Figura 22. Representação do processo de transmissão de impulsos na fenda sináptica e a hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase.

Inibidores da acetilcolinesterase, tais como donepezil (**75**), rivastigmina (**76**), galantamina (**77**) e fisostigmina, também conhecida como eserina (**78**) (Figura 23), foram desenvolvidos como as principais opções terapêuticas para o tratamento da doença de Alzheimer (HOUGHTON et al., 2006). No entanto, esses fármacos, atualmente em uso clínico, causam vários efeitos adversos, sendo necessário buscar estratégias terapêuticas eficazes e menos agressivas, capazes de minimizar ou retardar os principais sintomas da doença de Alzheimer (DEY et al., 2017).

A huperzina A (**79**) (Figura 23) é um importante inibidor da acetilcolinesterase de origem fúngica, isolada de *Cladosporium cladosporioides* (WANG et al., 2011). Outros inibidores são as dicetopiperazinas isoladas de *Aspergillus sydowii* (**80**, **81** e **82**) (Figura 23), cujos valores de IC₅₀ variaram de 0,36-1,24 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ (LIMA et al., 2018a) e o ácido kojico (**83**) (Figura 23), isolado do fungo *Aspergillus parasiticus* (80,38 \pm 1,31% de inibição da enzima) (LIMA et al., 2018b).

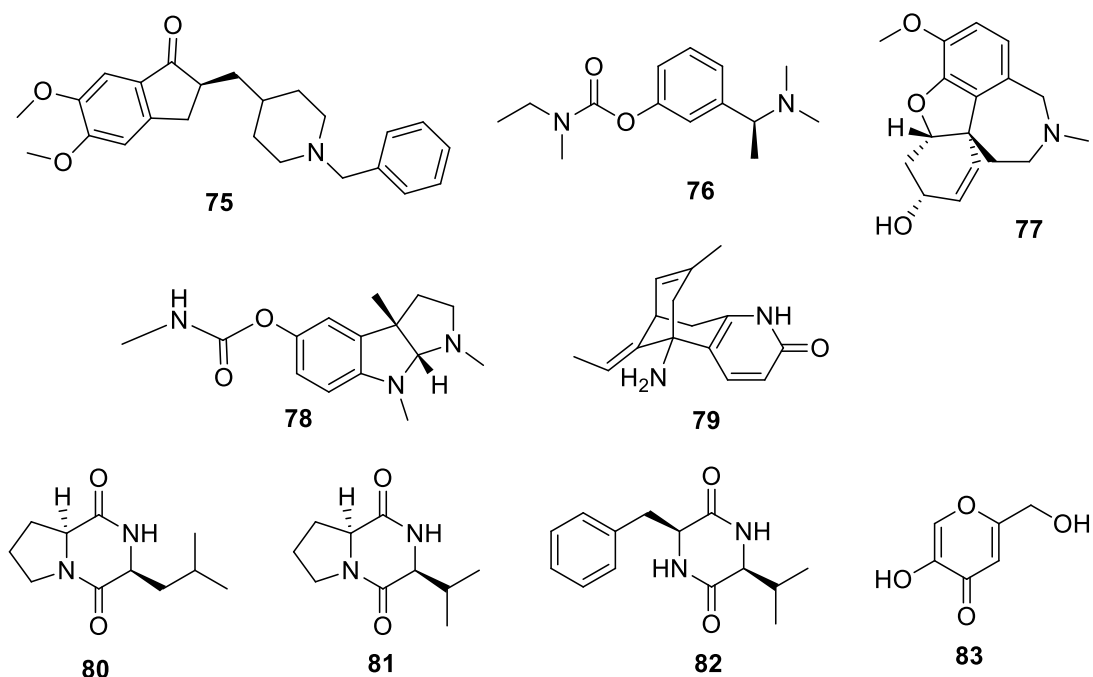


Figura 23. Estruturas químicas de inibidores da acetilcolinesterase.

A segunda enfermidade neurodegenerativa mais comum que vem causando preocupação mundial por atingir um grande número de indivíduos é a doença de Parkinson que, assim como a doença de Alzheimer, está relacionada à idade, atingindo principalmente os idosos, e ainda não possui cura. Essa doença

é caracterizada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos, resultando na redução dos conteúdos de dopamina (**84**), neurotransmissor que atua na transmissão de mensagens entre as células nervosas (Figura 24). As principais características clínicas dessa doença incluem tremor, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural (DAWSON et al, 2010).

Estudos sugerem que a atuação combinada de toxinas ambientais, como as inibidoras do complexo I mitocondrial, e de genes de suscetibilidade, é relevante para o desenvolvimento da doença (COULOM & BIRMAN, 2004). A incidência da doença de Parkinson é maior em indivíduos do sexo masculino, possivelmente devido às propriedades neuroprotetoras dos hormônios esteroidais femininos (YOKOYAMA et al., 2008).

Por se tratar de uma doença de cura desconhecida, apenas estratégias terapêuticas são utilizadas apenas para minimizar os sintomas da doença, como o uso de levodopa (**85**) (Figura 24). No entanto, o uso desse fármaco a longo prazo apresenta complicações devido ao desenvolvimento de efeitos adversos (YOKOYAMA et al., 2008).

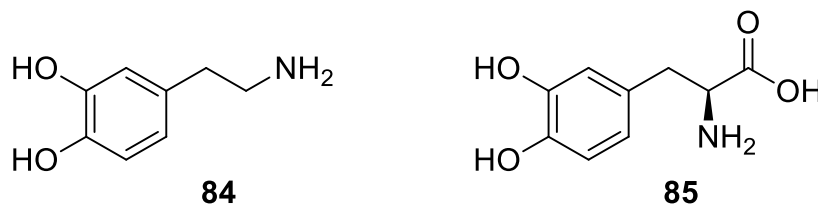


Figura 24. Estruturas químicas de dopamina (**84**) e levodopa (**85**).

Com o aumento do número de idosos nas próximas décadas, a prevalência da doença de Parkinson provavelmente aumentará. Portanto, é de extrema importância a busca de substâncias bioativas como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos que diminuam ou interrompam a progressão da doença. Desta forma, tem-se realizado estudos com animais (ensaios *in vivo*), como a mosca *Drosophila melanogaster* visando avaliar os efeitos neurodegenerativos e comportamentais da exposição crônica à toxina rotenona. Moscas tratadas com rotenona apresentaram perda seletiva de neurônios dopaminérgicos no cérebro e deficiências locomotoras severas (COULOM & BIRMAN, 2004). Algumas substâncias podem atuar restaurando apenas os

defeitos de comportamento induzidos por rotenona, ou ambos, comportamento e perda neuronal (COULOM & BIRMAN, 2004).

Tendo em vista a maior incidência da doença de Parkinson em homens e o fato de *Drosophila* macho exibir sintomas mais precoces quando exposta a toxinas neurodegenerativas (CHAUDHURI et al., 2007), as moscas machos são preferencialmente utilizadas nos ensaios do modelo RING (*Rapid Iterative Negative Geotaxis*). Neste ensaio, avalia-se, por meio da geotaxis negativa (resposta de direção das moscas contra a gravidade), a capacidade locomotora das moscas tratadas com drogas antes e após dano neurodegenerativo induzido (JIMÉNEZ et al., 2017). Desta forma, esse ensaio permite avaliar a atividade neuroprotetora preventiva e terapêutica das amostras investigadas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Ativar o metabolismo de fungos filamentosos por meio de técnicas de co-cultivo, OSMAC e modulação epigenética, de modo a se obter metabólitos secundários que apresentem atividade biológica.

3.2 Objetivos específicos

- Cultivar cinco fungos filamentosos isoladamente, em co-cultura, em condições OSMAC e sob modulação epigenética.
- Avaliar a diversidade metabólica, por meio de CLAE ou espectrometria de massas, dos extratos obtidos a partir de co-cultivo, OSMAC e modulação epigenética em comparação aos extratos obtidos a partir das espécies fúngicas cultivadas isoladamente;
- Avaliar a atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos obtidos;
- Selecionar cinco condições propícias para fermentação em escala ampliada;
- Extrair, isolar, identificar, quantificar e avaliar a atividade inibitória da acetilcolinesterase dos metabólitos secundários.
- Avaliar a capacidade neuroprotetora de extratos e metabólitos isolados.

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Material

I – Solventes

- Solventes grau HPLC: metanol (Vetec), acetonitrila (J.T. Baker), clorofórmio (Vetec);
- Solventes PA: metanol (Synth), acetato de etila (Synth), clorofórmio (Nox), hexano (Nox), diclorometano (Nox), acetona (Neon);
- Solventes deuterados: clorofórmio – CDCl_3 (Aldrich®) e água – D_2O (Aldrich®) (98,0 – 99,9%);
- Água destilada;
- Água ultrapura Milli-Q (Direct-Q Millipore).

II – Meios de cultura para os experimentos em meio sólido

- Batata dextrose ágar – BDA (HIMEDIA);
- Ágar bacteriológico (bioBRÁS);
- Extrato de carne bovina (bioBRÁS);
- Glicerol (Synth).

III – Meio de cultura para o experimento em meio líquido

- Caldo batata dextrose – PDB (KASVI).

IV – Reagentes utilizados para o ensaio de inibição da acetilcolinesterase (AChE)

- Acetilcolinesterase (Sigma Aldrich);
- Eserina (Sigma Aldrich);
- Tampão tris/HCl (Invitrogen);
- Iodeto de acetiltiocolina (ATCI) (Sigma Aldrich);
- Dimetilsulfóxido (Synth)

V – Moduladores epigenéticos

- Cloridrato de procainamida (Sigma Aldrich);
- Cloridrato de hidralazina (Sigma Aldrich).

VI – Suportes para cromatografia em coluna e em camada delgada

- Sephadex LH-20 (Sigma Aldrich);
- Sílica gel 70-230 Mesh (Merck, Vetec);
- Sílica gel 230-400 Mesh (Merck, Vetec);
- Placas prontas TLC Sílica gel F₂₅₄ (Merck).

4.2 Equipamentos

- Espectrômetros de ressonância magnética nuclear, Bruker *AVANCE III* 400;
- Espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR de feixe duplo, para obtenção dos espectros no infravermelho em pastilha de KBr anidro;
- Cromatógrafo líquido Shimadzu LCMS-IT-TOF (225-07100-34), equipado com degaseificador in line modelo DGU- 20A3, duas bombas modelo LC-20AD, autoinjeter modelo SIL-20A e módulo comunicador CBM-20A. Fonte de ionização eletrospray (ESI), com acumulador Íon Trap (IT) e analisador de massas *Time of Flight* (TOF);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu série 20A, composto por duas bombas LC-20AT, um detector UV-visível SPD-20A e software de aquisição de dados LC solution. Colunas analíticas utilizadas: Nucleosil C18 250 mm x 3,0 mm, 5 µm (Supelco) e Kromasil C18 250 mm x 4,6 mm, 5µm;
- Espectrômetro de massas MICROTOF – Bruker Daltonics, equipado com fonte de ionização eletrospray;
- Espectrômetro de massa LCQ Fleet (Thermo Scientific, São José, CA, EUA) equipado com uma fonte de ionização *paper spray*.
- Fusômetro Fisher-Johns;
- Microscópio ótico Olympus CX40;
- Evaporador rotatório IKA RV10 e BuchiR-114;
- Balança analítica Shimadzu AUW220D;
- Balança semi analítica Shimadzu BL320H;
- Câmaras de fluxo laminar Veco e Biohazard;

- Autoclaves verticais Phoenix e Fanem 415;
- Estufas de secagem Quimis e Fanem 002 CB;
- Leitor de microplacas de Elx800 (BioTek);
- Estufa de cultura bacteriológica 0316M4 (Quimis);
- Espectrofotômetro SP-22 (Bioespectro);
- Shaker IKA KS 4000 I control;
- Liofilizador (Liobras).

4.3 Metodologia

4.3.1 Isolamento, reativação e armazenamento das espécies fúngicas estudadas

Neste trabalho foram estudadas cinco espécies fúngicas obtidas a partir de amostras de solo identificadas pelos códigos: CMSV 584, CMSV 588, CMSV 529, CMSV 747 e CMSV 619 cedidas pelo Dr. Ivanildo Evodio Marriel, em uma parceria da Embrapa de Milho e Sorgo (Minas Gerais).

Para o crescimento dos cinco fungos e com intuito de avaliá-los morfológicamente, as espécies foram reativadas em placa de Petri em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) por sete dias à temperatura ambiente. Para preservação das espécies foi adotado o método de repicagens periódicas, que consistiu em transferir, periodicamente, colônias do fungo para meio de cultura recentemente preparado (DHINGRA, 1995). Assim, os fungos foram inoculados em tubos de ensaio contendo o meio BDA e, após sete dias, foram armazenados em geladeira para utilização durante a pesquisa. Neste trabalho, 'fungo (s)' refere-se a fungos filamentosos e 'levedura' refere-se a fungos leveduriformes.

As cinco espécies fúngicas também foram preservadas de acordo com o método Castellani. Para isso, discos de colônias puras de fungo crescido em meio BDA foram colocados em frascos de vidro pequenos contendo água destilada estéril. Em seguida, os frascos foram selados e armazenados à temperatura ambiente (DHINGRA, 1995). Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar, na zona de esterilização da chama do bico de Bunsen.

4.3.2 Identificação das espécies fúngicas

Os fungos foram identificados morfológicamente e geneticamente. A identificação morfológica foi realizada utilizando-se as técnicas de macro e microcultivo. A partir do macrocultivo foram observadas características macroscópicas dos fungos incubados por sete dias a 25 ± 3 °C, tais como diâmetro, pigmentação, textura, forma e margem.

A técnica de microcultivo em lâmina consistiu em colocar um cubo de meio de cultura BDA, com aproximadamente $1,0 \text{ cm}^2$, na superfície de uma lâmina histológica sobre um suporte, contido em placa de Petri (Figura 25). Posteriormente, o fungo foi semeado nas extremidades do cubo e recobriu-se com uma lamínula esterilizada. Em seguida, foi colocado um pequeno chumaço de algodão estéril embebido com água estéril no fundo da placa, para evitar desidratação do meio de cultura durante o tempo de crescimento fúngico. A placa foi vedada e armazenada a 25 ± 3 °C por 3 dias. Após esse período, a lamínula e o meio de cultura foram retirados e corou-se a lâmina com lactofenol, para visualização das colônias e hifas em microscópio óptico (RIDDELL, 1950).

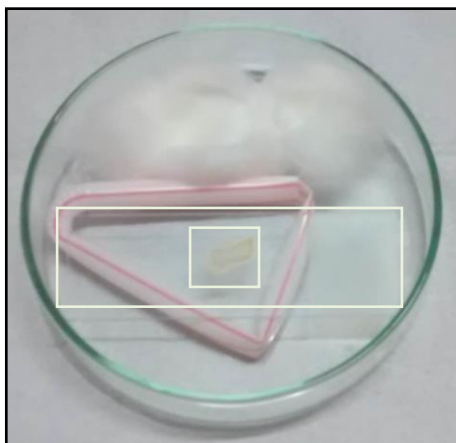


Figura 25. Sistema para microcultivo dos fungos filamentosos.

A identificação molecular dos fungos foi realizada pelo Dr. Ubiraci Gomes Paula Lana, na Embrapa de Milho e Sorgo. Para isso, o DNA foi extraído de 0,5 g de micélios frescos (SAGHAI-MAROOF et al., 1984) e as regiões do espaçador interno transcrito (ITS) foram amplificadas com primers universais ITS5 (5'-

GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990), realizada em um volume total de 20 µL contendo 20 ng de DNA molde, 0,125 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer, 1X PCR buffer (Kapa Biosystems, EUA), MgCl₂ 2,5 mM, 1 U de DNA polimerase Taq (Kapa Biosystems, EUA). As amplificações por PCR foram realizadas com um passo inicial de desnaturação (95 °C por 2 min), seguido por 35 ciclos de amplificação de 94 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 1 min e etapa final de extensão de 72 °C por 10 min. Os fragmentos amplificados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 1% (p / v) e purificados com o kit Exosap-IT (GE Healthcare, EUA). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados em ambas as direções usando Big Dye v.3.1 Kit (Applied Biosystems, EUA) e detectados em um sequenciador ABI PRISM 3500XL (Applied Biosystems, EUA). Os eletroferogramas foram analisados utilizando o programa Sequencher, versão 4.1 (Gene Codes Corp., EUA) e sequências de DNA em comparação com a base de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pelo programa BLAST N (ALTSCHUL et al., 1997). O material genético das espécies encontra-se depositado no banco de Fiel depositária na Embrapa de Milho e Sorgo.

4.3.3 Cultivo dos fungos em pequena escala e obtenção dos extratos

Para identificar as melhores condições de cultivo capazes de variar o perfil metabólico das espécies fúngicas em co-cultura foram realizados experimentos variados. O Experimento 1 consistiu na utilização de um único meio de cultura sólido, o BDA, onde cada uma das cinco espécies de fungos foi inoculada com outro micro-organismo (fungo filamentoso, bactéria ou levedura) (co-cultura em pares). O Experimento 2, também realizado em meio sólido, consistiu em cultivar os fungos alterando a composição do meio de cultura (abordagem OSMAC). O Experimento 3 foi realizado utilizando-se meio de cultura líquido (PDB), sem variar a composição do mesmo. O Experimento 4 foi realizado adicionando-se moduladores epigenéticos a um meio de cultura sólido definido, sem variação de sua composição. Como o objetivo seria comparar os perfis metabólicos para avaliar a ocorrência de variações, as cinco espécies fúngicas, as bactérias e a

levedura foram cultivadas isoladamente, nas mesmas condições (controles), para determinar os perfis metabólicos controles.

4.3.3.1 Experimento 1: co-cultivo de fungos com fungos, bactérias e levedura em meio sólido

Para o preparo do meio de cultura BDA, o meio foi dissolvido em água destilada, sob agitação, até atingir aspecto translúcido. Em seguida, o meio de cultura foi distribuído em 58 tubos de ensaio (40 mL em cada tubo) e todos foram devidamente tampados e autoclavados durante 20 minutos a 120 °C. Logo após, em capela de fluxo laminar, previamente esterilizada com álcool 70° GL, o conteúdo de cada tubo foi vertido em placa de Petri estéril para solidificação.

Foram preparadas suspensões das bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29212 (Gram-positiva), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negativa) e *Erwinia carotovora* CCT 0101 e da levedura *Candida albicans* ATCC 18804 em solução salina estéril de NaCl 0,85%. As suspensões foram padronizadas para uma turbidez correspondente a 0,5 da escala McFarland, medindo-se a absorbância entre 0,08 e 0,1 a 600 nm para as bactérias e a 530 nm para a levedura.

Após solidificação do meio de cultura, com o auxílio de um pipetador automático, foram adicionadas alíquotas de 10,0 µL da suspensão do micro-organismo (bactéria ou levedura), formando um círculo na superfície do meio de cultura. Em seguida, foi adicionado o fungo no centro do círculo (Figura 26a, pág. 32), as placas foram seladas e armazenadas à temperatura ambiente. Cada espécie fúngica foi cultivada com cada um dos quatro micro-organismos.

As cinco espécies também foram cultivadas na presença de cada uma das outras quatro espécies, em pares. Para a cultura de fungos em pares foram semeados esporos de uma espécie no lado direito e de outra no lado esquerdo da placa (Figura 26b, pág. 32). Os experimentos foram feitos em duplicatas e foi feito o controle do meio de cultura. O tempo de duração do experimento foi 30 dias.

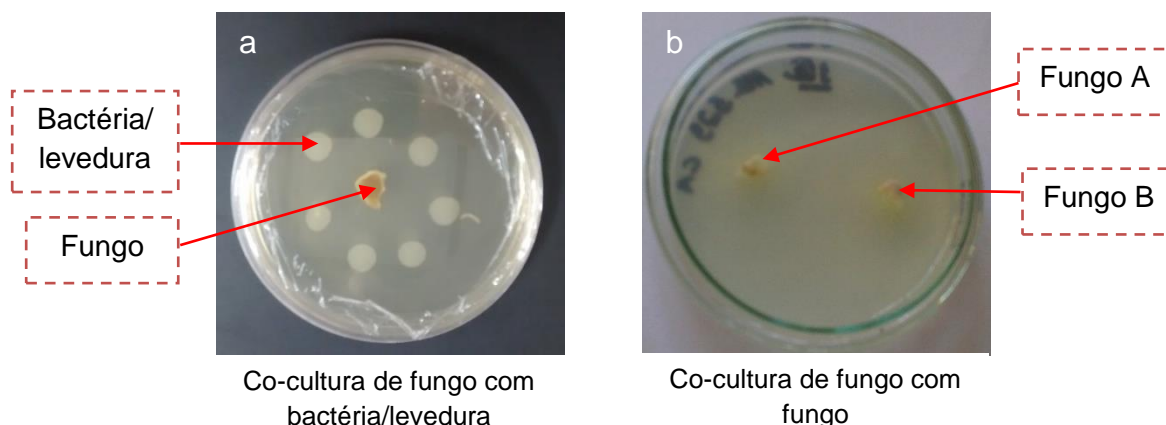


Figura 26. Disposição: a) da bactéria ou levedura e do fungo; b) dos fungos em pares no meio de cultura para o Experimento 1.

Ao término do período de cultivo, o meio de cultura de cada placa de Petri, contendo os micro-organismos crescidos em co-cultura foi recortado com o auxílio de uma espátula e extraído com MeOH durante 72 horas. Em seguida, foi realizada filtração a vácuo para separar a parte sólida (meio de cultura e micélio) da parte orgânica. O solvente foi eliminado, com o auxílio do evaporador rotatório, obtendo-se o extrato metanólico. Os extratos foram submetidos à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para verificação da variação do perfil metabólico, bem como a bioensaio.

Os extratos de co-cultura de fungo com fungo também foram submetidos à análise por PS-MS (*Paper Spray Mass Spectrometry*), para verificar a variação do perfil metabólito e para identificação de compostos elicitados em co-cultura.

4.3.3.2 Experimento 2: co-cultivo de fungo com bactérias e levedura em meio sólido utilizando a abordagem OSMAC

Para a realização deste experimento, primeiramente, foi feito um planejamento (Tabela 1) para variação dos meios de cultura quanto aos seus nutrientes. No geral, foram preparados três meios de cultura, aos quais foram adicionadas as suspensões de micro-organismos vivos, antes da solidificação, garantindo a presença do micro-organismo em todo o meio sólido.

As suspensões das bactérias *S. aureus* e *E. coli* e da levedura *C. albicans* foram preparadas com água destilada estéril e padronizadas na turbidez 0,5 da

escala McFarland, medindo-se a transmitância entre 74 e 75 % a 600 nm, para bactéria e entre 75 e 76 % a 530 nm, para levedura.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura preparados utilizando a abordagem OSMAC

Constituintes	Meios de cultura											
	1				2				3			
	1*	2	3	4	5*	6	7	8	9*	10	11	12
Solidificante	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB
Fonte de carbono	G	G	G	G	-	-	-	-	G	G	G	G
Fonte de nitrogênio	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	-	-	-	-
Micro-organismo	N	G-	G+	CA	N	G-	G+	CA	N	G-	G+	CA

(*) = fungo cultivado isolado (controle); AB: ágar bacteriológico; G: Glicerina; EC: extrato de carne bovina; N: nenhum; G+: bactéria Gram-positiva; G-: bactéria Gram-negativa; CA: *C. albicans*.

A composição nutricional dos meios de cultura foi a seguinte:

- **Meio 1: Placas 1 a 4** – Ágar bacteriológico (39 g L⁻¹), glicerina (10 g L⁻¹) e extrato de carne bovina (10 g L⁻¹);
- **Meio 2: Placas 5 a 8** – Ágar bacteriológico (39 g L⁻¹) e extrato de carne bovina (10 g L⁻¹);
- **Meio 3: Placas 9 a 12** – Ágar bacteriológico (39 g L⁻¹) e glicerina (10 g L⁻¹).

Os meios foram distribuídos em frascos Erlenmeyer de 125 mL (50 mL em cada) e autoclavados por 20 minutos a 120 °C. Ao resfriar, até 40 - 45 °C, adicionou-se, com o auxílio de um pipetador automático, 1 mL da suspensão de micro-organismo (bactéria ou levedura) e agitou-se manualmente. Em seguida, o meio foi vertido em placa de Petri estéril. Após uma hora foram adicionados dois cubos recortados do meio BDA onde o fungo foi crescido previamente, um em cada extremidade da placa. As placas foram seladas e observou-se o crescimento por 30 dias à temperatura ambiente. Ao término desse período o meio de cultura de cada placa, contendo os micro-organismos crescidos em co-cultura, foi recortado e submetido à extração com metanol durante 72 horas. Após esse tempo foi feita filtração a vácuo, para separação do meio e do micélio da fase

orgânica e, em seguida, o solvente foi destilado em evaporador rotatório, obtendo-se os extratos metanólicos. Os extratos foram submetidos à análise por CLAE e a ensaio biológico.

4.3.3.3 Experimento 3: cultivo de fungo com biomassa e metabólitos de outros fungos em meio líquido

Para a realização deste experimento foi feito um planejamento (Tabela 2), de modo que cada uma das cinco espécies fúngicas foram cultivadas isoladamente (controle) e em três formas distintas: (i) na presença da biomassa inativa e liofilizada de outra espécie fúngica, (ii) na presença de caldo liofilizado contendo os metabólitos de outra espécie e (iii) na presença de biomassa/caldo liofilizados de outra espécie.

Tabela 2. Planejamento do experimento de co-cultura em meio líquido

Fungo	Biomassa, caldo e caldo/biomassa				
	584	588	529	747	619
584	-	X	X	X	X
588	X	-	X	X	X
529	X	X	-	X	X
747	X	X	X	-	X
619	X	X	X	X	-

(-): ausência de material de outra espécie (controle); (X): presença de material de outra espécie.

Este experimento foi realizado em duas etapas, utilizando-se o meio de cultura *Potato Dextrose Broth* (PDB).

- Etapa 1: Preparo da biomassa e caldo liofilizados

Para obtenção da biomassa de cada espécie fúngica e do caldo liofilizados foram preparados 2 L de uma solução de PDB na concentração de 27 g L⁻¹ e distribuídos 200 mL em frascos Erlenmeyer de 500 mL. Os frascos foram autoclavados à temperatura de 120 °C por 20 minutos. Em seguida, preparou-se a suspensão de esporos de cada espécie fúngica, adicionando-se 5 mL de água destilada estéril a tubos de ensaio contendo os fungos crescidos em meio BDA. O

micélio foi friccionado com uma alça de platina, formando uma suspensão de esporos. Após resfriamento, esta suspensão foi adicionada ao meio de cultura, sendo cada espécie cultivada em Erlenmeyer separadamente, por 14 dias, de forma estática. Após o período de incubação, todos foram autoclavados e filtrados a vácuo. O micélio e o caldo foram submetidos à liofilização e, após liofilizados, ambos foram pesados e foram separadas alíquotas de 50 e 120 mg, respectivamente, e esterilizados para a próxima etapa.

- Etapa 2: Cultivo das espécies fúngicas com biomassa, caldo e caldo/biomassa de cada fungo separadamente

Nesta etapa foram feitos três cultivos diferentes para cada espécie fúngica em PDB (200 mL), como exemplificado para o cultivo do fungo 584 com a biomassa (cultivo 1), caldo (cultivo 2) e biomassa/caldo (cultivo 3) liofilizados do fungo 619 (Figura 27). Para cada cultivo foram adicionadas as seguintes quantidades ao meio de cultura PDB:

- **Cultivo 1:** 5 mL da suspensão de esporos do fungo 584 e 50 mg da biomassa liofilizada do fungo 619.
- **Cultivo 2:** 5 mL da suspensão de esporos do fungo 584 e 120 mg do caldo liofilizado do fungo 619.
- **Cultivo 3:** 5 mL de suspensão de esporos do fungo 584, 50 mg da biomassa liofilizada do fungo 619 e 120 mg do caldo liofilizado do fungo 619.

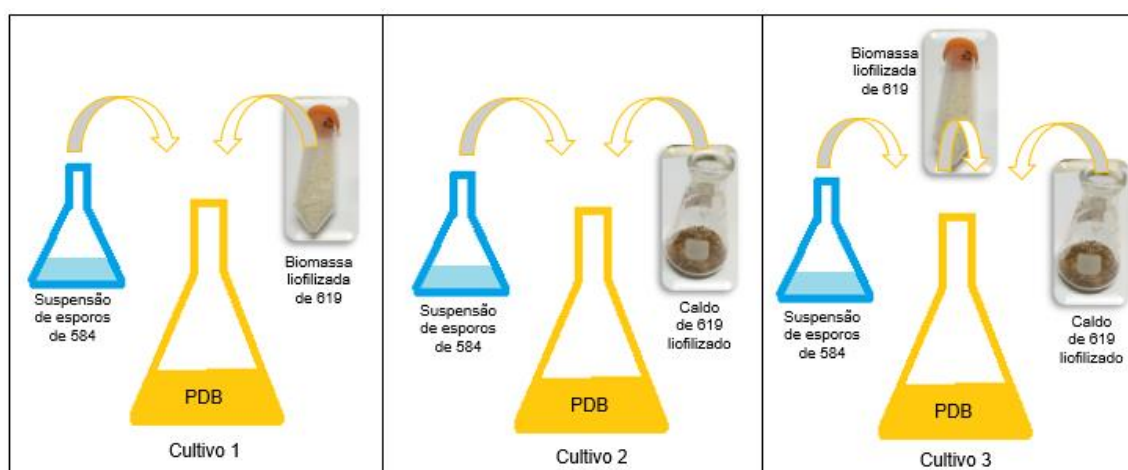


Figura 27. Esquema para procedimento da modulação do perfil metabólico de *A. chevalieri* com biomassa (cultivo 1), caldo (cultivo 2) e caldo e biomassa (cultivo 3) de *F. nygamai*.

As cinco espécies, preparadas como descrito, foram cultivadas de forma estática durante 30 dias. Ao término desse período foram adicionados 30 mL de acetato de etila a cada Erlenmeyer, o material foi filtrado a vácuo, para separar o micélio da fase líquida e o filtrado foi submetido à extração líquido/líquido até exaustão, em funil de separação, utilizando acetato de etila. O solvente extrator foi retirado em evaporador rotatório, sendo obtidos os extratos secos, os quais foram pesados e armazenados para análise posterior por CLAE e bioensaio.

4.3.3.4 Experimento 4: cultivo de fungos em meio sólido na presença de moduladores epigenéticos

Neste experimento, cada espécie fúngica foi cultivada em placas de Petri contendo meio de cultura sólido composto por ágar bacteriológico (39 g L^{-1}), extrato de carne bovina (10 g L^{-1}) e glicerina (10 g L^{-1}), esterilizado a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min (controle). Foram preparadas placas de Petri contendo os moduladores adicionados ao mesmo meio de cultura (36 placas por modulador). Este meio foi esterilizado em frascos Erlenmeyer e, após resfriamento a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, os moduladores epigenéticos procainamida (PROCA) e hidralazina (HIDRA) foram adicionados, separadamente, aos frascos, em capela de fluxo laminar, para atingir uma concentração final de $500 \text{ } \mu\text{M}$. Em seguida, o meio foi vertido em placas de Petri (30 mL por placa) e, após solidificação, cada fungo foi inoculado. Os controles foram realizados contendo meio de cultura e moduladores (sem inoculação de fungos), para verificar a possível degradação espontânea de moduladores no meio de cultura. O crescimento dos fungos foi observado por 28 dias a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, os metabólitos fúngicos foram extraídos usando metanol e o solvente foi retirado em evaporador rotatório. Em sequência, os extratos obtidos foram avaliados por CLAE e submetidos ao ensaio de atividade inibitória da acetilcolinesterase.

4.3.4 Análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise por CLAE dos extratos brutos foi realizada utilizando, como fase móvel, acetonitrila grau HPLC e água Milli-Q acidificada (0,1% ácido fórmico). Para a análise dos extratos dos Experimentos 1 e 2 (em meio sólido) foi utilizada

coluna analítica C18 250 x 3,0 mm, 5 µm, assim como para a análise de alguns extratos do Experimento 3 (em meio líquido). Porém, devido à primeira coluna apresentar problemas, como pouca resolução dos picos, os demais extratos deste último experimento foram analisados utilizando-se coluna analítica C18 250 mm x 4,6 mm, 5 µm.

Para o preparo das amostras 1 mg de extrato foi solubilizado em 1 mL de metanol grau HPLC, obtendo-se a concentração de 1,0 mg mL⁻¹. As amostras foram injetadas utilizando-se as seguintes condições cromatográficas: fase móvel – acetonitrila (A) e água acidificada 0,1 % ácido fórmico (B); fluxo - 0,6 mL min; volume de injeção - 20,0 µL; comprimentos de onda 240 e 270 nm (escolhidos baseado em análise prévia em espectrofotômetro UV-Vis). O sistema de eluição foi gradiente linear e variou dependendo da amostra.

Todos os extratos dos Experimentos 1 e 2 foram analisados utilizando-se o seguinte gradiente linear: 1-5 min, 5% A; 5-30 min, 5-50% A; 30-45 min, 50-100% A; 45-50 min, 100% A.

Para os extratos do Experimento 3 foram utilizados gradientes lineares distintos. No entanto, os extratos obtidos dos três cultivos de um mesmo fungo foram injetados utilizando-se o mesmo gradiente, como descrito a seguir.

Para a análise dos extratos dos três cultivos do fungo 584: 1-7 min, 15-40% A; 7-40 min, 40-50% A; 40-50 min, 50-90% A; 50-60 min, 90-95% A; 60-70 min, 95-100% A; 70-80 min, 100% A.

Para a análise dos extratos dos três cultivos do fungo 529: 1-20 min, 15-50% A; 20-25 min, 50% A; 25-35 min, 50-55% A; 35-50 min, 55-100% A; 50-70 min, 100% A.

Para a análise dos extratos dos três cultivos do fungo 747 utilizou-se mesmo gradiente usado para os extratos do fungo 529, mudando apenas o tempo final da corrida para 55 minutos.

Para a análise dos extratos dos três cultivos do fungo 588: 1-20 min, 15-35% A; 20-25 min, 35-40% A; 25-35 min, 40-50% A; 35-50 min, 50-100% A; 50-65 min, 100% A.

Para a análise dos extratos dos três cultivos do fungo 619: 1-30 min, 20% A; 30-35 min, 20-50 % A; 35-45 min, 50-100% A; 45-50 min, 100% A.

Para a análise dos extratos do Experimento 4 utilizaram-se os métodos do Experimento 2, respectivos para cada fungo.

4.3.5 Bioensaios

Os ensaios biológicos, atividade inibitória da acetilcolinesterase e atividade neuroprotetora, foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios (LaBB), no Departamento de Química da UFMG.

4.3.5.1 Atividade inibitória da acetilcolinesterase

O ensaio de inibição da acetilcolinesterase trata-se de um método espectrofotométrico que avalia a capacidade da amostra de inibir a enzima acetilcolinesterase (ELLMAN et al., 1961). Este teste foi realizado em microplacas de 96 poços, nos quais foram adicionados 50 µL de tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8,0), 125 µL de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (3 mM), contendo NaCl 0,1 M e MgCl₂.6H₂O 0,02 M, 25 µL dos extratos fúngicos (10mg mL⁻¹ em dimetilsulfóxido (DMSO)) e 25 µL de iodeto de acetilcolina (15 mM). O DMSO foi utilizado como controle negativo e a eserina (10 mg mL⁻¹ em DMSO) como inibidor padrão. A absorbância foi medida em 405 nm utilizando leitor de microplacas, com intervalos de 1 minuto por oito vezes. Após essas leituras foram adicionados nos poços 25 µL de solução da enzima acetilcolinesterase (0,22 U mL⁻¹ em tampão), contendo 0,1% de albumina de soro bovino. As absorbâncias foram medidas novamente com intervalos de 1 minuto por dez vezes a 405 nm. Calculou-se a porcentagem de inibição por comparação das absorbâncias das amostras com as absorbâncias do branco utilizando a fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 100 - (AACE - AASE / ACNCE - ACNSE) \times 100$$

Onde AACE é a absorbância da amostra com enzima; AASE é a absorbância da amostra sem enzima; ACNCE é a absorbância do controle negativo com enzima e ACNSE é a absorbância do controle negativo sem enzima.

Todos os ensaios foram realizados em quintuplicata. O percentual de inibição da acetilcolinesterase foi calculado utilizando o programa Microsoft® Excel.

Para os compostos isolados determinou-se a IC₅₀ (concentração de cada composto necessária para a inibição de 50% da atividade da enzima) em um ensaio de microdiluição (1,0 - 0,0078 mg mL⁻¹). Os valores de IC₅₀ foram determinados por análise de dados e software gráfico Origin® 8.6, 64-bit (OriginLab Corporation, Northampton, MA).

4.3.5.2 Atividade neuroprotetora: preventiva e terapêutica

O efeito neuroprotetor do extrato do fungo 584 com a biomassa do fungo 619 e do composto **GO-2** foi avaliado em modelo experimental *in vivo*, em lesões neurológicas induzidas por rotenona em moscas *Drosophila melanogaster*, seguindo a metodologia descrita por Jiménez e colaboradores (2017), com modificações. A espécie de mosca utilizada foi cedida pelo Dr. João Trindade Marques, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. A partir das cepas cedidas, as moscas procriaram em temperatura ambiente, dando origem às moscas novas que foram usadas para o ensaio, como descrito a seguir.

Criação das moscas novas

Quinze moscas de cada sexo, machos e fêmeas, foram transferidas para frascos contendo 20,0 mL de alimento, composto por mistura de banana prata (*Musa paradisíaca*), levedura *Saccharomyces cerevisiae*, ágar bacteriológico, nistatina, ácido propiônico e água destilada. As moscas foram mantidas à temperatura ambiente por oito dias, em seguida foram removidas dos frascos, deixando apenas as larvas. Após eclosão (48 h), as novas moscas foram imobilizadas temporariamente com éter etílico e as moscas macho foram transferidas para outros frascos (dez por frasco) contendo 20,0 mL de alimento, estando prontas para o ensaio.

Determinação da concentração da amostra para o ensaio

Frascos contendo as moscas machos em alimento acrescentado de 0,6 mL de solução do extrato nas concentrações de 5,0, 10,0 e 20,0 mg mL⁻¹, dissolvido em água destilada com gotas de DMSO foram utilizados em triplicata. Após sete dias, foi realizado o teste de geotaxis negativa (tendência das moscas de se direcionarem contra a gravidade). Para isso, as moscas foram transferidas para tubos Falcon de 50,0 mL, os quais foram acoplados em um suporte de madeira

(Figura 28, pág. 40). Em seguida, bateu-se o suporte três vezes contra uma superfície sólida, por cinco vezes. A cada sequência de golpes foram tiradas 10 fotos sequenciais e a sexta foto de cada sequência foi utilizada para observação do número de moscas que atingiu metade da altura do recipiente. O valor médio do número de moscas que subiram mais da metade da altura na sexta foto foi utilizado como parâmetro de comparação entre os ensaios nas diferentes concentrações. Com base nos resultados escolheu-se a concentração da amostra para se prosseguir com o ensaio.

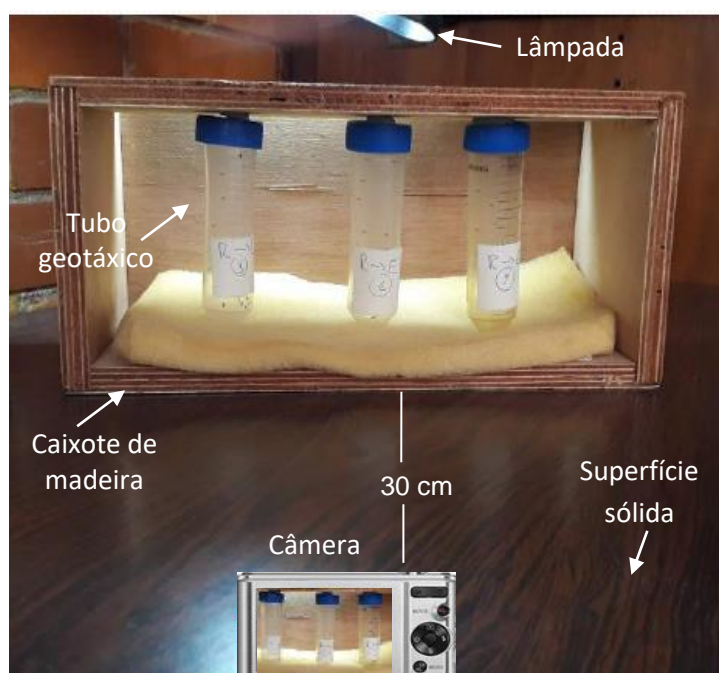


Figura 28. Avaliação da atividade locomotora da *D. Melanogaster* mediante geotaxis negativa.

- Avaliação da atividade preventiva e terapêutica

Para a próxima etapa, 135 moscas machos foram separadas e transferidas para nove frascos (15 por frasco) nos quais: três continham apenas o alimento (controle), três continham alimento acrescentado da solução do extrato (600,0 μL) na concentração escolhida e três continham alimento acrescentado de 100,0 μL de solução de rotenona (100,0 mg mL^{-1}). Após sete dias, as moscas que estavam no frasco contendo alimento suplementado com extrato foram transferidas para outro frasco contendo alimento suplementado com rotenona, para avaliar

atividade preventiva, e as moscas que estavam no frasco contendo alimento suplementado com rotenona foram transferidas para outro frasco contendo alimento suplementado com extrato, para avaliar a atividade terapêutica. As moscas foram mantidas por mais sete dias neste alimento. Após esse período realizou-se o teste geotaxis negativa, registrando os resultados observados. A partir das médias dos números de moscas que atingiram metade da altura dos tubos após os golpes foram determinadas as capacidades neuroprotetora preventiva e terapêutica do extrato. A capacidade neuroprotetora preventiva e terapêutica de substância pura foi determinada utilizando-se o mesmo procedimento e a mesma concentração definida para o extrato.

4.3.6 Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios de inibição da acetilcolinesterase e de avaliação da capacidade neuroprotetora foram submetidos à análise de variância ANOVA (one-way) e teste Tukey de comparação múltipla com $P < 0,05$ (intervalo de confiança de 95%). As análises foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 5.02.

4.3.7 Cultivos em escala ampliada e obtenção dos extratos

Baseado na avaliação do perfil metabólico por CLAE, bem como nos resultados do bioensaio dos extratos brutos e com o intuito de isolar metabólitos secundários bioativos, algumas condições de cultivos foram escolhidas para serem recultivados em quantidade maior e nas mesmas condições da escala pequena. Desta forma, foram selecionados os cultivos: fungo 619 (*F. nygamai*) com a bactéria *E. carotovora* (Experimento 1); fungo 747 (*T. talidicanus*) com a bactéria *E. coli* no meio 1 (Experimento 2); fungo 747 com a levedura *C. albicans* no meio 2 (Experimento 2); fungo 619 (*F. nygamai*) com a levedura *C. albicans* no meio 2 (Experimento 2) e fungo 584 (*A. chevalieri*) com a biomassa inativa e liofilizada do fungo 619 (*A. chevalieri*) (Experimento 3).

4.3.7.1 Cultivo em escala ampliada do fungo *F. nygamai* em co-cultura com *Erwinia carotovora*

Para o cultivo em escala ampliada do fungo *F. nygamai* (619) em co-cultura com *E. carotovora* (Experimento 1) seguiu-se a metodologia descrita no item 4.3.3.1, pág.31. Foram preparados 1,6 L de meio de cultura BDA e distribuídos em 40 placas de Petri (40 mL por placa). Preparou-se a suspensão da bactéria *E. carotovora* na turbidez correspondente a 0,5 da escala McFarland. Após incubação dos micro-organismos, esperou-se o período de crescimento, extrairam-se os metabólitos e obteve-se o extrato bruto (1,6 g). Posteriormente, o extrato foi submetido à cromatografia em coluna utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária, visando o isolamento dos metabólitos secundários.

4.3.7.2 Cultivo em escala ampliada do fungo *T. calidicanus* em co-cultura com a bactéria *E. coli*

Para o cultivo em escala ampliada do fungo *T. calidicanus* (747) com a bactéria *E. coli* preparou-se 1,8 L do meio de cultura 1 (Experimento 2), composto por ágar bacteriológico (39 g L⁻¹), extrato de carne bovina (10 g L⁻¹) e glicerina (10 g L⁻¹) e distribuiu-se em 45 frascos Erlenmeyer (40 mL por frasco). Seguiu-se a metodologia descrita no item 4.3.3.2, pág. 32. Utilizou-se a suspensão da bactéria *E. coli* na turbidez correspondente a 0,5 da escala McFarland. O extrato bruto obtido (5,7 g) foi submetido à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20.

4.3.7.3 Cultivo em escala ampliada do fungo *T. calidicanus* em co-cultura com a levedura *C. albicans*

Para o cultivo em escala ampliada do fungo *T. calidicanus* (747) com a levedura *C. albicans* preparou-se 1,2 L do meio de cultura 2 (Experimento 2), composto por ágar bacteriológico (39 g L⁻¹) e extrato de carne bovina (10 g L⁻¹) e distribuiu-se em 30 frascos Erlenmeyer (40 mL por frasco). Neste caso, utilizou-se a suspensão da levedura *C. albicans*, na turbidez correspondendo a 0,5 da escala McFarland. Seguiu-se a metodologia descrita no item 4.3.3.2, pág. 32. O extrato obtido (4,3 g) foi submetido à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20.

4.3.7.4 Cultivo em escala ampliada do fungo *F. nygamai* com a levedura *C. albicans*

Para o cultivo em escala ampliada do fungo *F. nygamai* (619) com a levedura *C. albicans* prepararam-se 875 mL do meio de cultura 2 (Experimento 2), composto por ágar bacteriológico (39 g L⁻¹) e extrato de carne bovina (10 g L⁻¹) e distribuiu-se em 25 frascos Erlenmeyer (35 mL por frasco). Seguiu-se a metodologia descrita no item 4.3.3.2, pág. 32. Foi utilizada a suspensão da levedura *C. albicans* na turbidez correspondente a 0,5 da escala McFarland. Após os procedimentos finais obteve-se o extrato bruto (1,1 g), o qual foi submetido à cromatografia em coluna utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária.

4.3.7.5 Cultivo em escala ampliada do fungo *A. chevalieri* com a biomassa do fungo 619

O cultivo do fungo *A. chevalieri* (584) com a biomassa de *F. nygamai* (619) (cultivo 1 do Experimento 3) em escala ampliada foi realizado utilizando as mesmas condições descritas anteriormente (item 4.3.3.3, pág. 34). Para este cultivo foram utilizados 10 L do meio PDB, distribuídos em garrafas Roux (200 mL em cada) e em frascos Erlenmeyer (1 L em cada). A partir desse cultivo obtiveram-se 13,9 g de extrato.

4.3.8 Isolamento dos metabólitos secundários

Os extratos obtidos a partir dos cultivos em escala ampliada foram submetidos à cromatografia em coluna, visando o isolamento dos constituintes químicos.

4.3.8.1 Cromatografia em coluna do extrato obtido do cultivo do fungo *F. nygamai* em co-cultura com *E. carotovora* em escala ampliada

Para cromatografia em coluna do extrato bruto obtido a partir desse co-cultivo em escala ampliada submeteram-se 1,6 g deste extrato a fracionamento cromatográfico em coluna aberta empacotada com Sephadex LH-20 (33,0 g), utilizando-se metanol como fase móvel. Recolheram-se 12 frações de 80 mL, as quais foram combinadas após análise por CCD. As frações combinadas 9-13

(407,9 mg) foram novamente cromatografadas em Sephadex, rendendo 34 frações de 10 mL. Após análise por CCD, as frações foram combinadas. As frações 11-17 resultaram em um precipitado branco (17,7 mg) nomeado **GO-1**, que foi submetido à análise espectroscópica, visando sua elucidação estrutural.

4.3.8.2 Cromatografia em coluna do extrato obtido do cultivo do fungo *T. calidicanius* em co-cultura *E. coli* em escala ampliada

A cromatografia em coluna do extrato bruto (2,0 g) obtido a partir desse co-cultivo em escala ampliada foi realizada em coluna aberta empacotada com Sephadex LH-20 (33,0 g), utilizando-se metanol como eluente. A partir deste fracionamento foram obtidas 89 frações de 20 mL, as mesmas foram submetidas à análise por CCD para agrupamento de acordo com a semelhança do perfil. Após serem combinadas, as frações 15-32 (256,2 mg) foram recromatografadas utilizando-se as mesmas condições cromatográficas e obtiveram-se 26 frações, as quais foram combinadas após análise por CCD. Nenhum metabólito pôde ser isolado a partir desse extrato.

4.3.8.3 Cromatografia em coluna do extrato obtido do cultivo do fungo *T. calidicanius* em co-cultura com *C. albicans* em escala ampliada

Para a cromatografia do extrato desse cultivo foram submetidos 2,0 g a cromatografia em coluna aberta empacotada com Sephadex LH-20 (33,0 g), utilizando-se metanol como eluente. Foram obtidas 91 frações, as quais foram combinadas após análise por CCD. As frações combinadas 18-28 (102,2 mg) e 36-49 (157,3 mg) foram recromatografadas novamente em coluna Sephadex LH-20, obtendo-se 22 e 38 frações, respectivamente. As frações obtidas foram analisadas por CCD e combinadas. A partir desse extrato não se isolou nenhum metabólito puro.

4.3.8.4 Cromatografia em coluna do extrato obtido do cultivo do fungo *F. nygamai* em co-cultura com *C. albicans* em escala ampliada

Para cromatografia em coluna do extrato bruto desse co-cultivo em escala ampliada submeteu-se 1,1 g deste extrato ao fracionamento cromatográfico em coluna aberta empacotada com Sephadex LH-20 (33,0 g), utilizando-se metanol

como fase móvel. Foram coletadas 47 frações de 20 mL, as quais foram combinadas após análise por CCD. As frações 7-8 (66,2 mg) e 9-13 (337,3 mg) foram cromatografadas, utilizando-se a mesma coluna, fase fixa e mesmo eluente, obtendo-se 14 e 20 frações, respectivamente. As frações foram agrupadas após análise por CCD. Nenhum metabólito pôde ser isolado.

4.3.8.5 Cromatografia em coluna do extrato obtido do cultivo do fungo *A. chevalieri* com a biomassa do fungo *F. nygamai* em escala ampliada

A partir desse extrato foram feitas várias colunas cromatográficas, as quais foram enumeradas de I-VIII para melhor compreensão. Para as colunas com Sephadex LH-20, utilizou-se metanol como eluente e, para as colunas com sílica gel, usou-se hexano/acetato de etila/metanol em proporção crescente de polaridade. O extrato bruto (1,0 g) foi submetido à cromatografia em coluna aberta empacotada com Sephadex LH-20 (coluna I) utilizando metanol como eluente. Obtiveram-se 59 frações; nas frações 4-8 observou-se a formação de precipitado, o qual foi separado e lavado com metanol obtendo-se um composto branco nomeado **GO-2** (10,2 mg). As frações, incluindo aquelas de onde foi retirado o precipitado, foram submetidas à análise por CCD e posteriormente combinadas de acordo com a similaridade do perfil. As frações 15-21 (53,9 mg) foram recromatografadas em coluna de sephadex (coluna II) obtendo-se 31 frações, que foram combinadas após análise por CCD. Em seguida, as frações 18-23 (50,9 mg) foram recromatografadas em coluna de sílica gel (coluna III) e obtiveram-se 94 frações. Após análise por CCD, as frações 1-5 foram combinadas, obtendo-se um sólido laranja nomeado **GO-3** (4,1 mg).

As frações 5-9 (195,0 mg) da coluna I foram cromatografadas em coluna Sephadex LH-20 (coluna IV), obtendo-se 18 frações. Após análise por CCD, as frações foram combinadas. As frações 8-9 (56,3 mg) foram submetidas a cromatografia em coluna de sílica gel (coluna V), obtendo-se 67 frações, as quais foram combinadas após análise por CCD. Das frações 6-8 obteve-se um sólido amarelo nomeado **GO-4** (6,3 mg). Um esquema para o isolamento dos compostos nesta primeira parte é mostrado na figura a seguir (Figura 29, pág. 46).

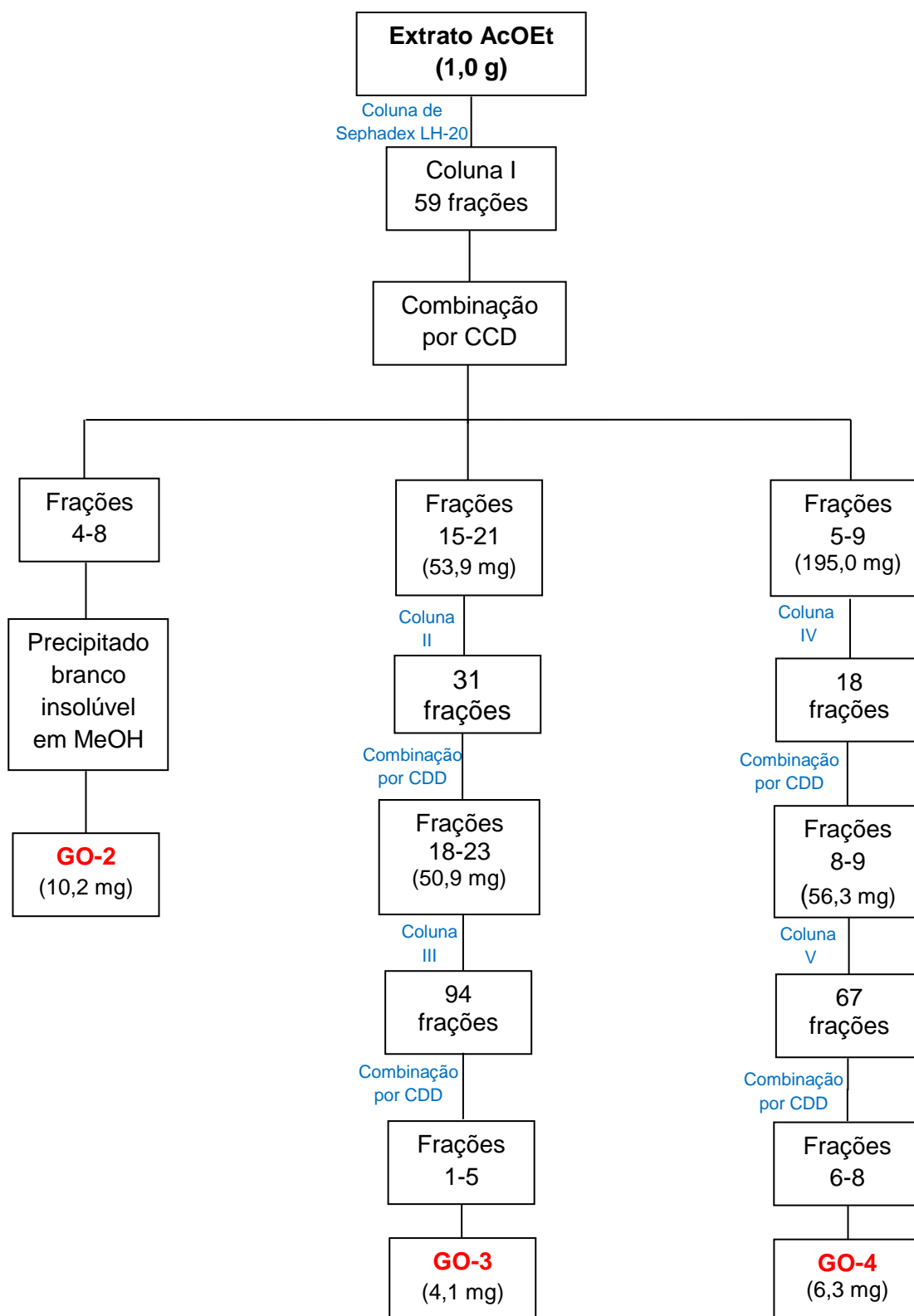


Figura 29. Sequência de isolamento dos metabólitos do extrato do cultivo do fungo 584 com a biomassa do fungo 619 a partir das colunas cromatográficas I-V.

Visando o isolamento de outros compostos e de maior quantidade dos compostos já isolados, foi feita outra cromatografia em coluna partindo de uma quantidade maior de massa do mesmo extrato bruto. Dessa forma, foram submetidos 3,0 g do extrato à cromatografia em coluna Sephadex LH-20 (coluna VI) utilizando metanol como eluente. Obtiveram-se 92 frações; nas frações 10-16 observou-se novamente a formação do precipitado branco **GO-2**, o qual foi separado e lavado com metanol obtendo-se mais 25,4 mg. Nas frações 15-18 também observou-se um material sólido, que foi separado e lavado com metanol, obtendo-se um composto laranja nomeado **GO-5** (5,2 mg). As 92 frações, incluindo aquelas de onde foi retirado o precipitado, foram submetidas à análise por CCD e, após combinadas, algumas foram recromatografadas em coluna aberta empacotada com sílica-gel.

A coluna cromatográfica de sílica das frações 8-18 (411,0 mg, coluna VII) da coluna VI deu origem a 64 frações, as quais foram combinadas após monitoramento por CCD. Das frações 8-15 obteve-se um sólido amarelo nomeado **GO-6** (16,9 mg).

A coluna cromatográfica das frações 16-18 (33,9 mg, coluna VIII) da coluna VII deu origem a 13 frações, que foram combinadas após análise por CCD. Das frações 1-5 foram obtidos 11,3 mg do composto **GO-4** e das frações 6-7 obteve-se novamente o composto **GO-6** (9,4 mg).

A seguir é mostrado um esquema de isolamento dos compostos nessa etapa (Figura 30, pág. 48).

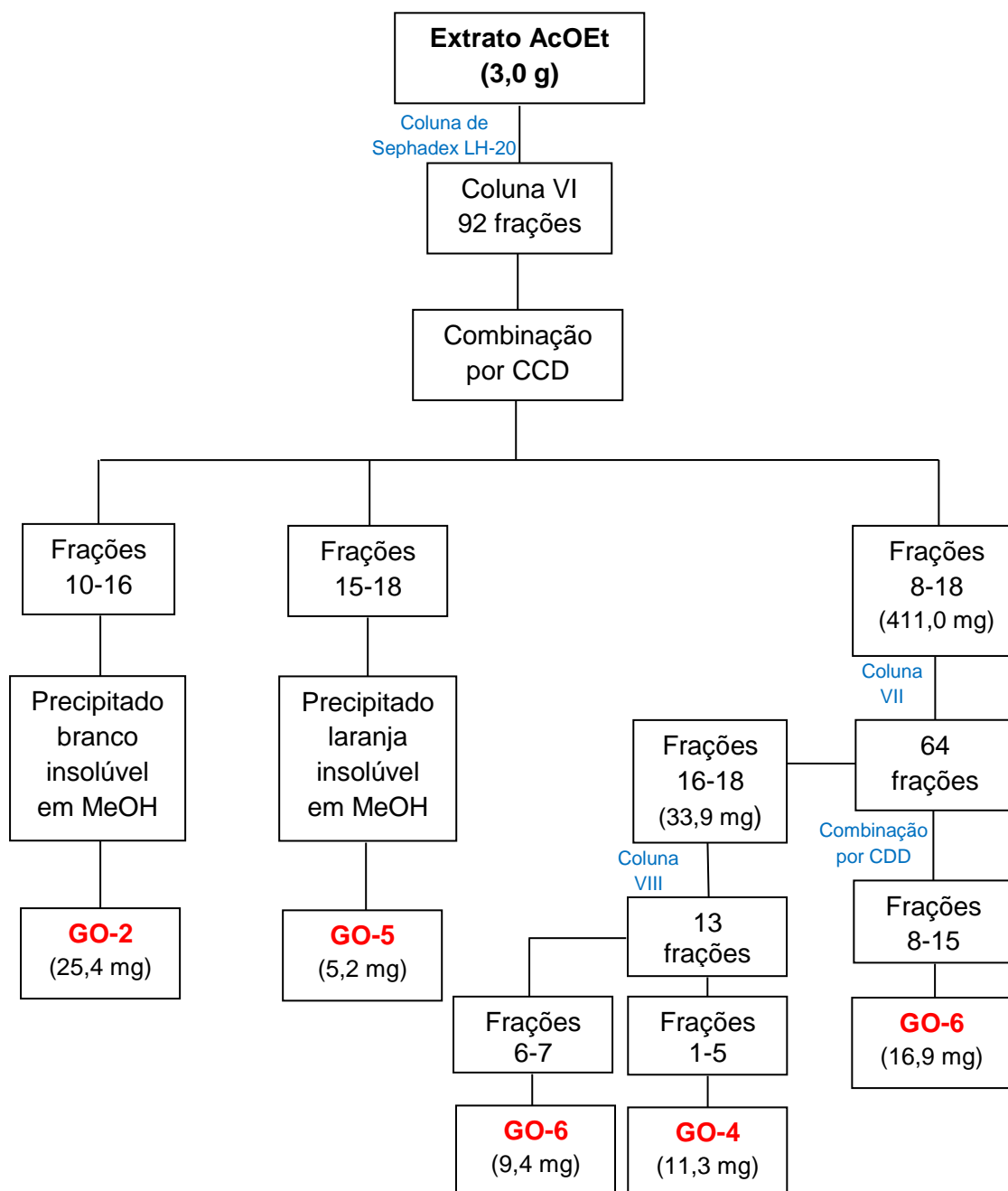


Figura 30. Sequência de isolamento dos metabólitos do extrato do cultivo do fungo 584 com a biomassa do fungo 619 a partir das colunas cromatográficas VI-VIII.

4.3.9 Quantificação dos compostos por CLAE

Os cinco compostos isolados a partir do extrato do cultivo do fungo 584 com a biomassa do fungo 619 (**GO-2**, **GO-3**, **GO-4**, **GO-5** e **GO-6**) foram quantificados nos extratos dos três cultivos do fungo 584 (Experimento 3) e no

extrato controle. A quantificação foi realizada por CLAE a 270 nm, utilizando as mesmas condições cromatográficas descritas para os extratos do fungo 584 do Experimento 3, item 4.3.3.3, pag. 34, mudando o gradiente que foi aprimorado para o seguinte: 1-7 min, 15-40% A; 7-30 min, 40-70% A; 30-35 min, 70-95% A; 35-60 min, 95% A; 60-65 min, 95-100% A; 70 min, 100% A. Os cromatogramas e os registros das áreas dos picos foram obtidos a partir de processamento dos dados no *software* LCsolution.

Foram preparadas soluções dos extratos na concentração de 1,0 mg mL⁻¹ em metanol UV/HPLC e dos padrões (compostos) em concentrações que variaram entre 0,01 mg mL⁻¹ e 3,0 mg mL⁻¹ em acetonitrila/clorofórmio UV/HPLC. Uma curva de calibração foi traçada para cada composto, utilizando-se as respectivas soluções dos mesmos. A partir da equação da reta obtida pela curva concentração *versus* área obtiveram-se as concentrações dos padrões nos extratos, substituindo na variável “y” o valor da média das áreas dos picos de cada amostra padrão em cada extrato. A partir das massas iniciais dos extratos obtiveram-se os valores referentes às massas dos padrões em cada extrato e, conseqüentemente, o teor (% m/m) dos mesmos. Os calculos foram realizados utilizando o *software* Microsoft Excel®.

4.3.10 Elucidação estrutural dos compostos

Para a elucidação estrutural dos compostos isolados realizou-se a análise espectroscópica por ressonância magnética nuclear (RMN), que consistiram em experimentos unidimensionais (RMN de ¹H e de ¹³C e DEPT-135) e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC), na frequência de 400 e 100 MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente. Análises por espectrometria de massas e determinação de pontos de fusão também foram realizadas.

Os experimentos de RMN foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) do DQ-UFMG e os espectros foram processados no *software* MestReNova.

Os experimentos de espectrometria de massas foram realizados em espectrômetro de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS) para os extratos no DQ-UFMG e com ionização por *electrospray* (ESI-MS) para os

compostos puros no DQ-UFMG (compostos: **GO-1**, **GO-2** e **GO-4**) e na Central Analítica IQ-USP (Compostos: **GO-3**, **GO-5** e **GO-6**).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação molecular e características morfológicas das espécies fúngicas

As cinco espécies selecionadas para este trabalho foram identificadas molecularmente, o que permitiu a identificação de quatro cepas em nível de espécie baseado na similaridade (98 a 100%) das sequências de ITS (*Internal Transcribed Spacer*) com sequências de isolados depositados em coleções de culturas internacionais (Tabela 3). A espécie 529 foi identificada como *Clonostachys rogersoniana*, a 584 como *Aspergillus chevalieri*, a 588 foi identificada apenas em nível de gênero com *Penicillium* sp., as espécies 619 e 747 foram identificadas como *Fusarium nygamai* e *Talaromyces calidicanus*, respectivamente. Todas as cepas identificadas estão depositados na Embrapa Milho e Sorgo (MG) sob os códigos BRM047708 (529), BRM047709 (584), BRM047710 (588), BRM047711 (619) e BRM047712 (747), respectivamente.

Tabela 3. Dados sobre a identificação molecular das espécies fúngicas

Código de depósito	Código da coleção	Fragmento ITS (pb)	Descrição	Cobertura (%)	Identidade (%)	Acesso ao GenBank
BRM 047708	529	533	<i>C. rogersoniana</i>	99	100	MH143243
BRM 047709	584	566	<i>A. chevalieri</i>	95	100	MH143244
BRM 047710	588	603	<i>Penicillium</i> sp.	95	98	MH143245
BRM 047711	619	562	<i>F. nygamai</i>	94	99	MH143246
BRM 047712	747	584	<i>T. calidicanus</i>	97	99	MH143247

pb: Pares de base

Para contribuir com a identificação molecular foram observadas as características morfológicas das cinco espécies de fungos filamentosos (Figura 31, pág. 53), conforme descrito a seguir.

As cinco espécies formaram colônias que se espalharam pelo meio de cultura. O fungo 584 revelou coloração amarela-dourada, com textura rugosa e margem inteira. A partir da observação microscópica foi possível evidenciar microestruturas como hifas não septadas, esporângio e esporos no micélio desta espécie (KRIMITZAS et al., 2013).

Quanto à espécie 588, esta apresentou coloração verde, com textura rugosa, aveludada e margem inteira. Microscopicamente observaram-se hifas septadas, fialides e conídios no micélio desta espécie (LAMSAF et al., 2013; VISAGIE et al., 2014).

A espécie 619 apresentou coloração esbranquiçada com tons roxos, textura algodonosa e margem filamentosa. Por meio da observação microscópica foi possível identificar hifas septadas e esporos com formato de grãos de arroz (WOO et al., 2010).

O fungo 529 apresentou coloração bege, textura rugosa e margem filamentosa. Foram observados, microscopicamente, hifas não septadas e esporos no micélio desta espécie (KOTWAL et al., 2016).

A espécie 747 apresentou pigmentação rosada, textura radiada, com margem inteira. Em seu micélio foram observadas as estruturas microscópicas hifa e esporo (YILMAZ et al., 2014).

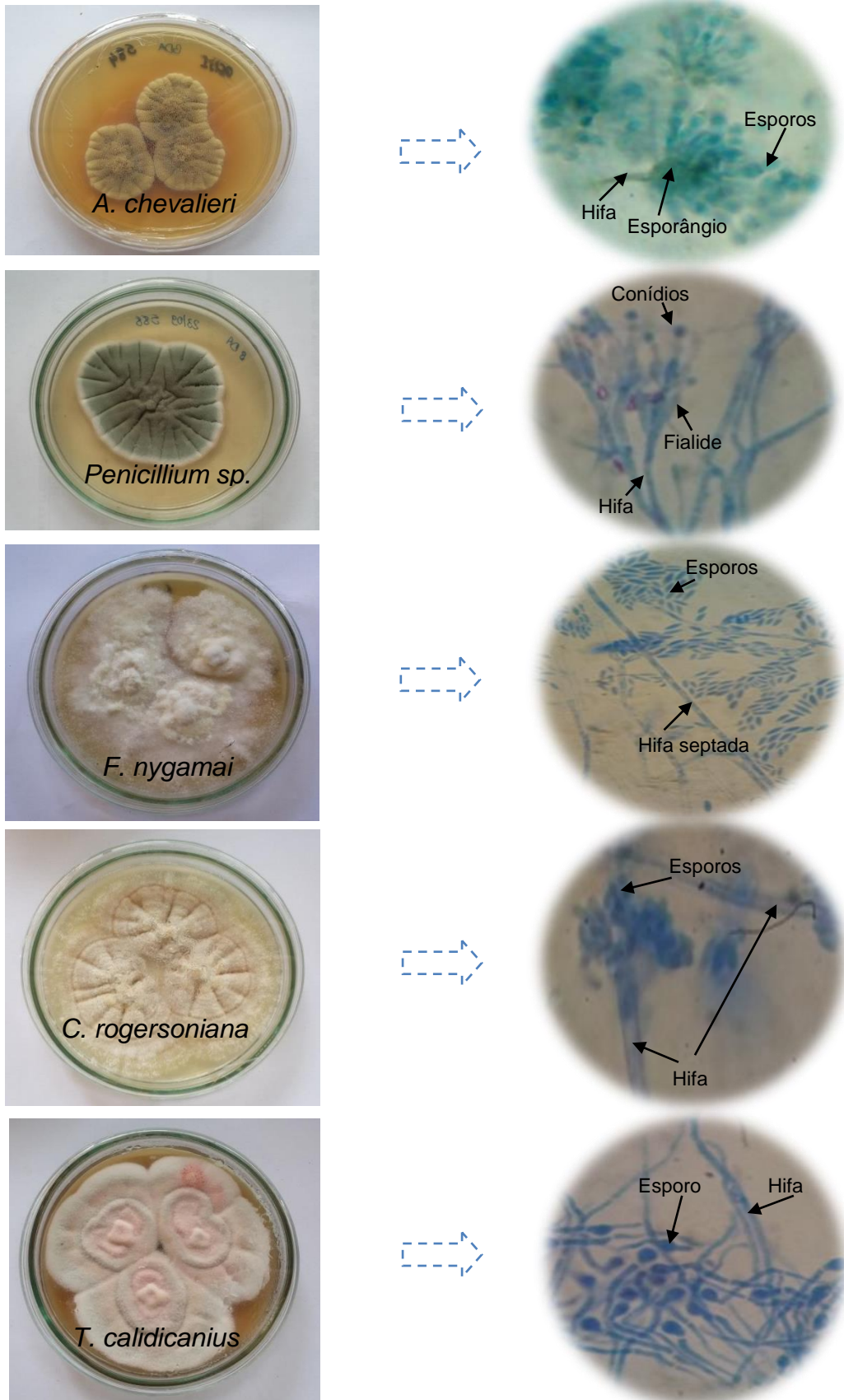


Figura 31. Características macroscópicas e microscópicas das espécies fúngicas.

Fungos do gênero *Aspergillus* são bem conhecidos por produzirem vários metabólitos biologicamente ativos (LUBERTOZZI & KEASLING, 2009), incluindo inibidores da AChE (LIMA et al., 2018a). A espécie *A. chevalieri* já foi estudada isoladamente, a partir da qual vários metabólitos secundários foram isolados. Dentre os principais metabólitos desta espécie destacam-se alcaloides derivados do triptofano, como isoechinulina e análogos (ALI et al., 1988), policetídeos, como antraquinonas (BACHMANN et al., 1979) e derivados benzaldeídicos, como auroglaucina e seus análogos (HAMASAK et al., 1981).

Espécies do gênero *Penicillium* e *Clonostachys* também foram relatadas como fontes de inibidores da AChE (KONG et al., 2016; LI et al., 2017b). Espécies do gênero *Penicillium* são muito estudadas e demonstram ter um metabolismo secundário bem diversificado em termos de estruturas químicas. Foram relatados derivados de bistiodicetopiperazina e sesquiterpenos com atividade antibacteriana da espécie *P. adametzioides* (LIU et al., 2015), análogos do ácido ambuico de *Penicillium* sp. (GUO et al., 2015), macrolídeos formados a partir da via do acetato da espécie de *penicillium* em co-cultura, meroterpenos por *P. citreonigrum* na presença de modulador epigenético (WANG et al., 2010), dentre outras classes de compostos.

Dentre os metabólitos isolados de *C. rogersoniana* destacam-se os compostos da classe das verticillinas, caracterizadas por uma ponte dissulfeto através de um anel de dicetopiperazina, como a 11'-deoxiverticillin A, substância que atraiu interesse biológico devido à sua potente indução na formação de autofagossomos (WANG et al., 2017a), além de induzir autofagia e apoptose de células tumorais humanas (ZHANG et al., 2011).

Uma espécie do gênero *Talaromyces* foi indentificada neste trabalho e tem o papel antagonista reconhecido para espécies desse gênero, como relatado para *Talaromyces flavus*, um fungo muito usado como agente biocontrole (YILMAZ et al., 2014) que se encaixa no modelo de estresse biótico. Substâncias com atividade antibacteriana, como norlichexantona, antifúngica, como os compostos fenólicos stemfiperilenol e ácido secalônico A, neuroprotetora, como (2R,3S)-pinobanksin-3-cinamato, foram produzidas a partir de espécies do gênero *Talaromyces* (NICOLETTI et al., 2018).

Uma espécie de *Fusarium* também foi identificada neste trabalho e fungos deste gênero são reconhecidos por biossintetizar metabólitos relacionados ao estresse biótico, como ácido fusárico (BOHNI et al., 2016) e seus análogos (AMALFITANO et al., 2002).

5.2 Co-cultivo dos fungos e análise por CLAE dos extratos do experimento 1

Como descrito no item 4.3.3.1 (pág. 31), as cinco espécies de fungos foram cultivadas em co-cultura (em pares) com outros fungos, bactérias e levedura durante 30 dias em meio de cultura sólido. A seguir são apresentados os resultados destes cultivos.

5.2.1 Co-cultura entre fungos

Em co-cultura de fungos podem ser observados padrões morfológicos de interação que incluem: inibição à distância – os fungos não entram em contato físico devido à presença de substâncias tóxicas no meio, produzidas por uma ou por ambas as espécies; linha de zona – linha formada entre as duas espécies pelo depósito de substâncias produzidas por ambas; inibição por contato – as espécies entram em contato físico, mas não avançam sobre a outra; supercrescimento – uma espécie cresce excessivamente, inclusive sobre a outra (BERTRAND et al., 2013b). Alguns desses padrões foram observados nos co-cultivos das cinco espécies estudadas nesse trabalho.

Nos cultivos em pares (Figura 32, pág, 56) das espécies *A. chevalieri* (584), *T. calidicanus* (747) e *C. rogersoniana* (529) com a espécie *Penicillium* sp. (588) foi possível observar a inibição por contato, onde ambas as espécies em co-cultivo cresceram de modo que seus micélios entraram em contato físico, mas não avançaram sobre o território da outra. Espécies de *Penicillium* são conhecidas por produzirem, em co-cultura, substâncias com atividade antibacteriana, antifúngica, como a Berkeleylactona A e o antibiótico A26771B (STIERLE et al., 2017). O mesmo tipo de inibição foi observado para o cultivo de *C. rogersoniana* (529) com *F. nygamai* (619) e para os cultivos em pares da

espécie *T. calidicanus* (747) com *A. chevalieri* (584), *C. rogersoniana* (529) e *F. nygamai* (619).

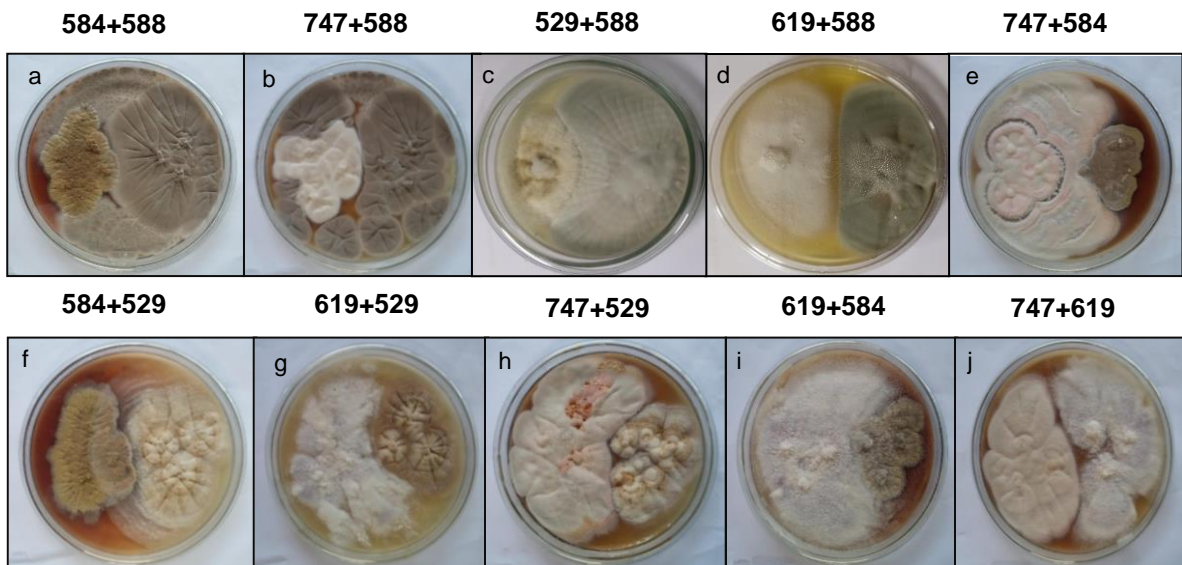


Figura 32. Co-cultura das espécies fúngicas *A. chevalieri* (584), *Penicillium* sp. (588), *T. calidicanus* (747), *C. rogersoniana* (529) e *F. nygamai* (619) em pares. a,b,c,e,g,j – inibição por contato; d – inibição à distância; f,j – supercrescimento.

Foi possível observar a inibição à distância entre *F. nygamai* (619) e *Penicillium* sp. (588), não havendo contato físico entre os micélios das duas espécies. A inibição por espécie do gênero *Fusarium* em co-cultura com outro fungo já foi relatada, *Fusarium* *sf.* *Oxysporum*, por exemplo, inibiu o fungo *Sarocladium* *sf.* *strictum* devido ao aumento da produção da toxina ácido fusárico (BOHNI et al., 2016). O supercrescimento de *C. rogersoniana* (529) e *F. nygamai* (619) foi observado no co-cultivo com *A. chevalieri* (584), onde as duas espécies cresceram excessivamente, inclusive por cima de *A. chevalieri*.

Ao coexistirem em um mesmo ambiente, os fungos competem pelos nutrientes limitados e pelo espaço. Ambas as espécies necessitam se defender contra o opositor e se adaptar ao ambiente que promove estresse (MARMANN et al., 2014). Apesar da competição, algumas espécies fúngicas conseguem se disseminar mais intensamente pelo meio de cultura, inibindo assim, o crescimento do seu opositor, como ocorreu no caso das espécies *Penicillium* sp., *T. calidicanus* e *F. nygamai* quando cultivadas com *A. chvalieri*. Em virtude desse estresse biótico pode ocorrer variação dos metabólicos produzidos por estas

espécies, o que pode ser evidenciado por análise dos perfis metabólicos por cromatografia líquida de alta eficiência.

5.2.2 Análise por CLAE dos extratos do cultivo dos fungos isolados e em co-cultura fungo-fungo

As análises por CLAE foram realizadas comparando-se os perfis dos extratos resultantes dos diferentes co-cultivos com o perfil por CLAE dos fungos cultivados isoladamente. A análise dos cromatogramas obtidos dos extratos metanólicos das espécies fúngicas cultivadas em co-cultura e isoladamente evidenciou que houve variação no perfil metabólico dos fungos (Figura 33, pág. 58). Foi possível observar que ocorreu tanto inibição da produção de compostos que foram produzidos quando o fungo foi cultivado isoladamente, quanto elicitação de metabólitos que não foram observados no extrato do cultivo isolado. Isso pode ser visualizado na Figura 33D, onde notou-se a presença de um pico com tempo de retenção (TR) em torno de treze minutos no extrato de co-cultivo das espécies fúngicas *A. chevalieri* e *F. nygamai*, o qual não foi detectado nos cromatogramas dos extratos do cultivo das espécies isoladas. Também não são observados nas Figuras 33A, B, C e D o pico referente ao composto com TR 45 min e nas Figuras 33D e I, o pico com TR 15 min, quando comparado ao perfil do extrato de co-cultivo.

Os extratos dos co-cultivos de *A. chevalieri* com *T. calidicanus* (584+747) e *A. chevalieri* com *F. nygamai* (584+619), (Figuras 33 A e D, respectivamente), *T. calidicanus* com *Penicillium* (747+588) e *T. calidicanus* com *C. rogersoniana* (747+529) (Figuras 33E e G, respectivamente) foram os que apresentaram maior variação nos perfis cromatográficos. Os extratos dos co-cultivos *T. calidicanus* com *F. nygamai* (747+619), *T. calidicanus* com *C. rogersoniana* (747+529), *Penicillium* com *C. rogersoniana* (588+529) e *F. nygamai* com *C. rogersoniana* (619+529) (Figuras 33F, G, H e J) não apresentaram variações significativas no perfil, quando comparados aos perfis metabólicos controles.

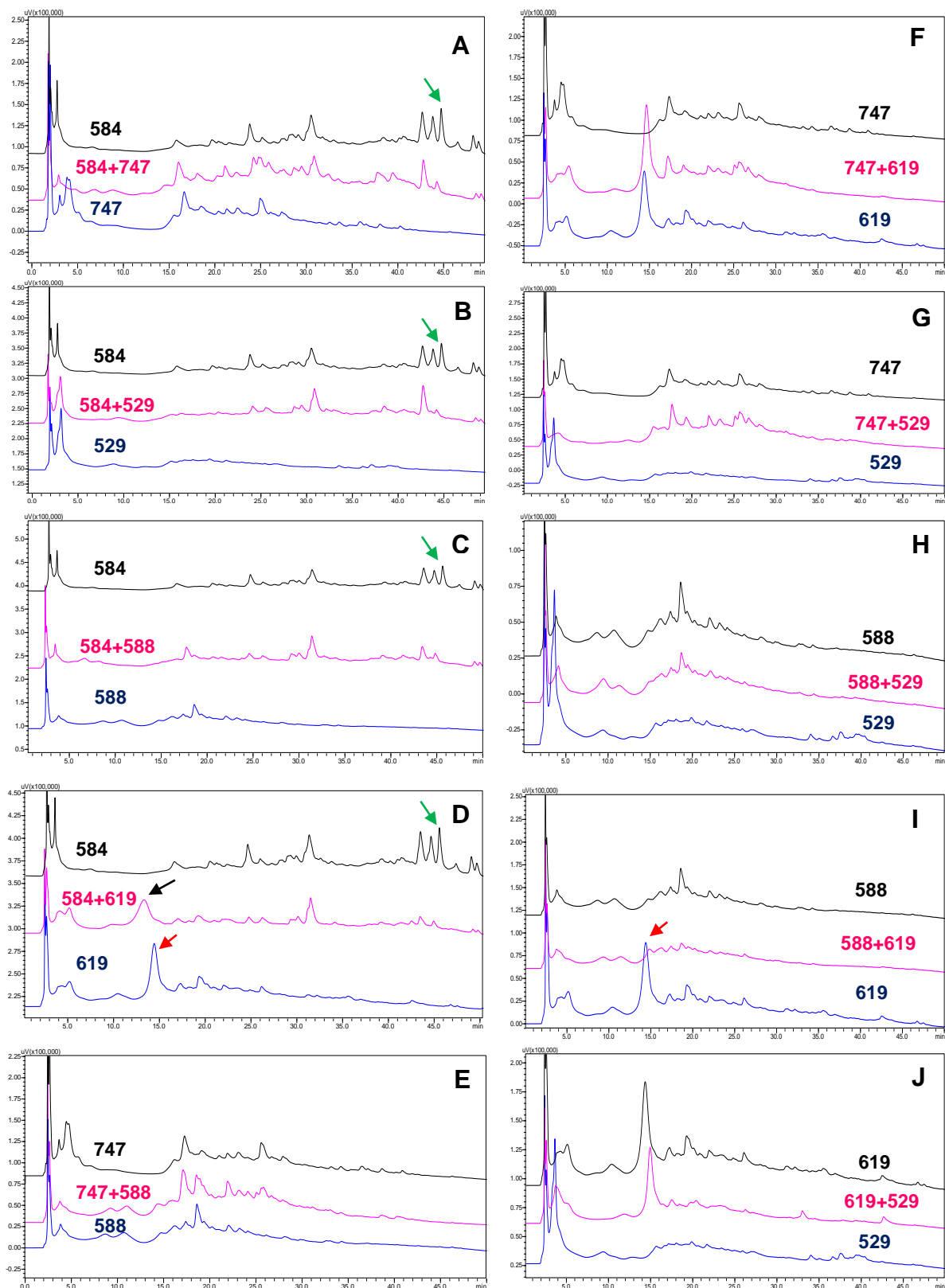


Figura 33. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura de fungos *A. chevalieri* (584), *T. calidicanus* (747), *C. rogersoniana* (529), *Penicillium* (588) e *F. nygamai* (619) em pares em comparação com os perfis metabólicos controles. As setas indicam regiões dos cromatogramas onde o perfil encontra-se diferenciado.

A elicitação de novos metabólitos pode ocorrer devido à ativação de genes silenciosos que não são transcritos em condições de cultivo (MOUSSA et al., 2019). Isto ocorre porque a ausência de estímulos e a abundância de nutrientes presentes nos meios de cultura tornam desnecessárias várias rotas biossintéticas relacionadas à defesa ou à sobrevivência (MOUSSA et al., 2019).

No entanto, em um ambiente competitivo, esses genes podem ser expressos em resposta ao estresse biótico, levando assim, à produção de compostos que até então não eram produzidos, como uma forma de defesa e/ou adaptação ao meio (SHANG et al., 2017; STIERLE et al., 2017). Assim como algumas rotas biossintéticas podem ser ativadas, outras podem ser inativadas, podendo ocorrer inibição da biossíntese de compostos que são produzidos quando a espécie é cultivada isoladamente. Por exemplo, o cultivo de *Aspergillus niger* com *Fusarium verticillioides* levou à redução de metabólitos produzidos em cultura simples (CHATTERJEE et al., 2016). O aumento da produção de metabólitos também é resultado da modificação do metaboloma fúngico a partir da co-cultura com outros micro-organismos, como é o caso da toxina ácido fusárico, que teve sua produção aumentada na co-cultura de *F. oxysporum* com *S. strictum* (BOHNI et., 2016).

5.2.3 Co-cultivo das espécies fúngicas com *C. albicans*

De acordo com Ho e colaboradores (2003), a utilização da levedura *C. albicans* (CA) no cultivo de fungos levou à produção de metabólitos fúngicos com atividade antifúngica contra diferentes cepas de *C. albicans*. Sendo assim, este organismo é eficaz para promover estresse biótico.

Como pode ser visualizado na Figura 34, pág. 60, a levedura *C. albicans* (CA) inibiu o crescimento do fungo *A. chevalieri* (584), tendo em vista que o fungo não se disseminou pelo meio de cultura, ficando totalmente contido no centro da placa em resposta à presença da levedura. Isso significa que, possivelmente, a levedura produziu alguma substância capaz de inibir o desenvolvimento deste fungo. Embora, em meio sólido, o fungo *A. chevalieri* não tenha inibido a levedura, existem relatos de que, em meio líquido e na presença da levedura, esse fungo

produziu extrato com atividade antifúngica (HO et al., 2003), o que se justifica pelo diferente comportamento de fungos de acordo com o ambiente de crescimento.

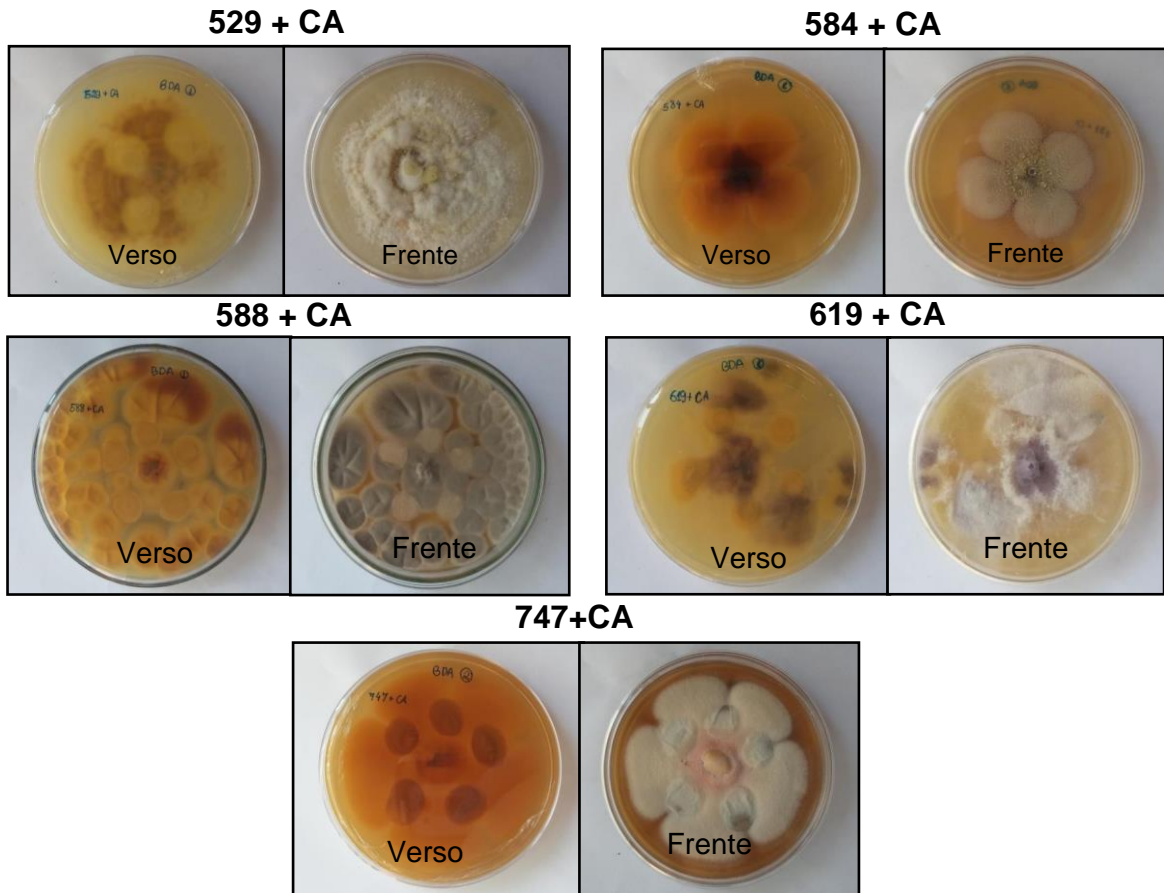


Figura 34. Co-cultivo das espécies fúngicas *C. rogersoniana* (529), *A. chevalieri* (584), *Penicillium* (588), *F. nygamai* (619) e *T. calidicanus* (747) com *C. albicans* (CA) em meio sólido (frente e verso da placa de Petri).

Também ocorreu inibição dos fungos *Penicillium* (588) e *T. calidicanus* (747), que não conseguiram se disseminar no local onde cresceu a *C. albicans*. A levedura *C. albicans* além de produzir metabólitos antimicrobianos (KADHIM et al., 2016) é capaz de aumentar o pH do ambiente (VYLKOVA et al., 2011), o que pode ter afetado o desenvolvimento das duas espécies fúngicas.

Em relação às espécies *C. rogersoniana* (529) e *F. nygamai* (619), estas cresceram por todo o meio de cultura, inclusive sobre a levedura, logo, não ocorreu inibição do crescimento desses fungos. Espécies do gênero *Fusarium* são relatadas como antifúngica contra *C. albicans* (TAYUNG et al., 2011).

5.2.4 Análise por CLAE dos extratos de co-cultivo dos fungos com *C. albicans*

A análise dos cromatogramas obtidos por CLAE (Figura 35) evidenciou que, ao serem cultivados em co-cultura, tanto a levedura *C. albicans* (CA) quanto o fungo *A. Chevalieri* (584) tiveram inibição da produção de seus metabólitos secundários (Figura 35A). Esse resultado corrobora com o fato do fungo ter sido totalmente contido pela levedura e não ter conseguido se desenvolver normalmente (Figura 34, pág. 60).

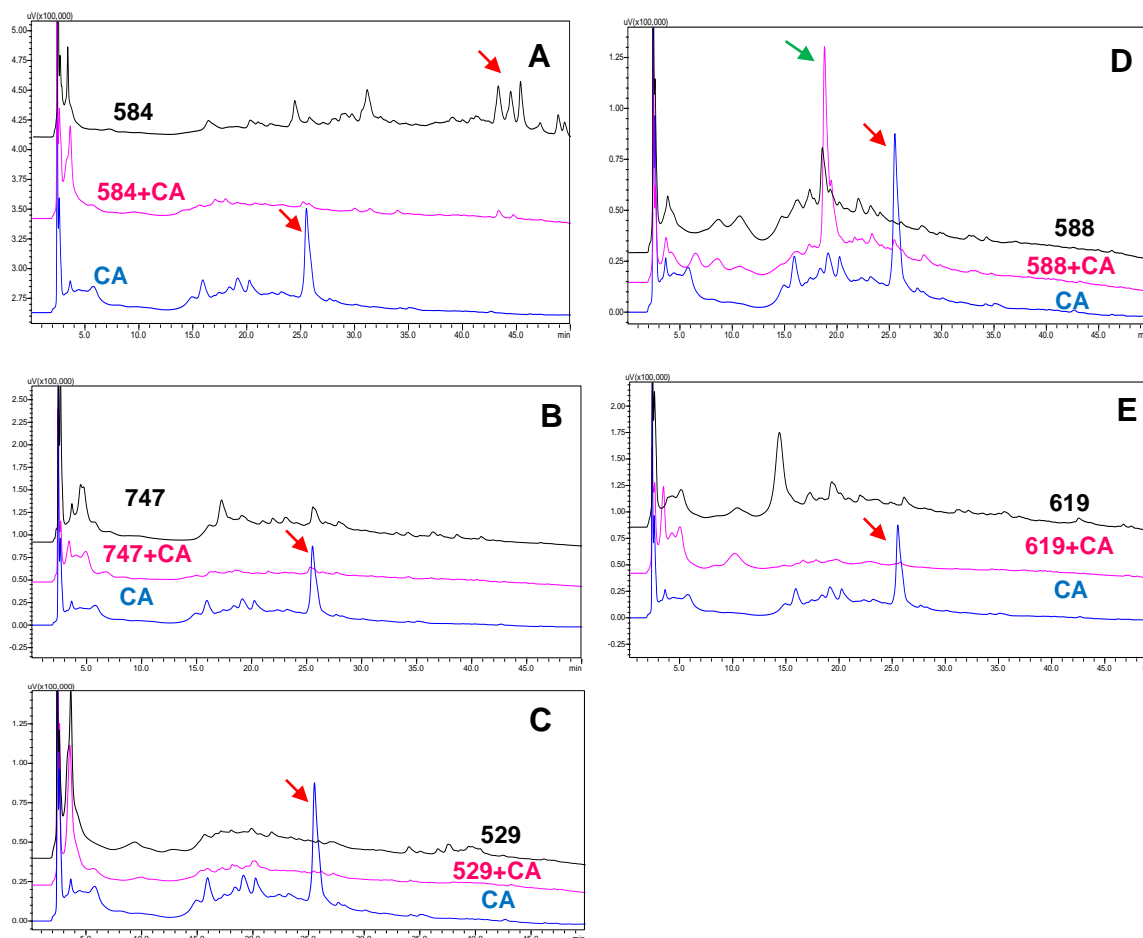


Figura 35. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura das espécies fúngicas *A. chevalieri* (584), *T. calidicanus* (747), *C. rogersoniana* (529), *Penicillium* (588) e *F. nygamai* (619) com *C. albicans* (CA) em comparação com os perfis metabólicos controles. As setas indicam regiões dos cromatogramas onde o perfil encontra-se diferenciado.

Em relação à inibição da produção dos metabólitos da levedura, apesar de *A. chevalieri* não ter crescido, possivelmente este produziu alguma substância que causou inibição de rotas biossintéticas na levedura.

Também foi observada inibição da produção metabólica no co-cultivo dos fungos *T. calidicanus* (747), *C. rogersoniana* (529) e *F. nygamai* (619) com *C. albicans* (Figuras 35B, C e E, respectivamente). Embora estes fungos tenham crescido bem na presença da levedura, não significa que produziram os mesmos metabólitos do controle. Quanto ao co-cultivo do fungo *Penicillium* (588) com a levedura (Figura 35D), este resultou no aumento da produção de metabólitos, como por exemplo o composto com TR 19,0 min, além de inibição de compostos produzidos pela levedura, como é o caso do metabólito com TR 26 min. De acordo com essa análise foi possível observar que, de modo geral, a levedura *C. albicans* não se mostrou efetiva para produzir estresse biótico capaz de influenciar de forma expressiva o metabolismo secundário dos fungos.

5.2.5 Co-cultivo das espécies fúngicas com bactérias

Experiências anteriores indicaram que fungos, quando cultivados com diferentes bactérias, Gram-positivas ou Gram-negativas, respondem por meio da biossíntese de diferentes metabólitos crípticos. Por exemplo, o cultivo do fungo *Chaetomium* sp. com culturas vivas da bactéria Gram-positiva *B. subtilis* produziram novos derivados do ácido chiquímico (AKONE et al., 2016), enquanto a co-cultura do mesmo fungo com culturas autoclavadas da bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* produziram novos derivados de butenolida (ANCHEEVA et al., 2017). O cultivo do fungo *Fusarium tricinctum* com a bactéria *Streptomyces lividans* (Gram-positiva) também resultou na indução de novos metabólitos secundários, dímeros de naftoquinona (MOUSSA et al., 2019).

A bactéria *E. coli* (Gram-negativa) em co-cultura com fungo foi capaz de induzir a produção de compostos de interesse para tratamento de doenças neurodegenerativas, como por exemplo a narigenina (ZHANG et al., 2017), um flavanoide que apresenta atividade protetora contra espécies reativas de oxigênio (WANG et al., 2017b). A bactéria *Salmonella typhimurium* (Gram-negativa) em co-cultura com o fungo *Paecilomyces lilacinus* induziu à produção do composto paecilomida, um inibidor da acetilcolinesterase (TELES et al., 2013).

Com base nas pesquisas, observa-se que o uso de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em co-cultura com fungos são relevantes para a indução de metabólitos crípticos com potencial biológico.

5.2.5.1 Co-cultivo das espécies fúngicas com *S. aureus*

Como pode ser observado na Figura 36, a bactéria *S. aureus* (SA) inibiu o crescimento do fungo *Penicillium* sp. (588), uma vez que, quando cultivado isoladamente (Figura 31, pág. 53), o fungo se espalhou por todo o meio de cultura.

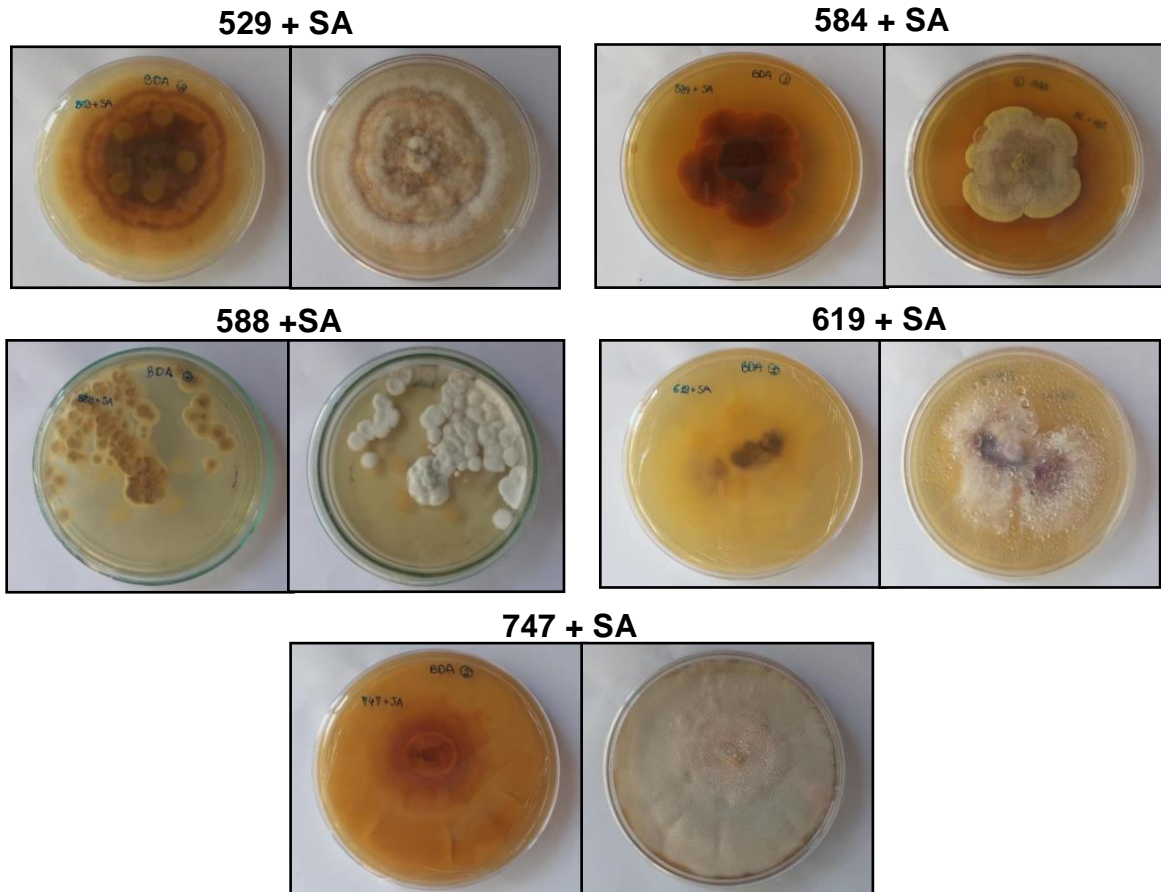


Figura 36. Co-cultivo dos fungos *C. rogersoniana* (529), *A. chevalieri* (584), *Penicillium* (588), *F. nygamai* (619) e *T. calidicanus* (747) com *S. aureus* em meio sólido (frente e verso da placa de Petri).

A bactéria também inibiu o crescimento do fungo *A. chevalieri* (584). As demais espécies fúngicas, *C. rogersoniana* (529), *F. nygamai* (619) e *T. calidicanus* (747), cresceram espalhando suas colônias sobre a bactéria.

5.2.5.2 Análise por CLAE dos extratos do co-cultivo dos fungos com *S. aureus*

A seguir são apresentados os cromatogramas, obtidos por CLAE, dos extratos do co-cultivo das espécies de fungos com *S. aureus* (Figura 37).

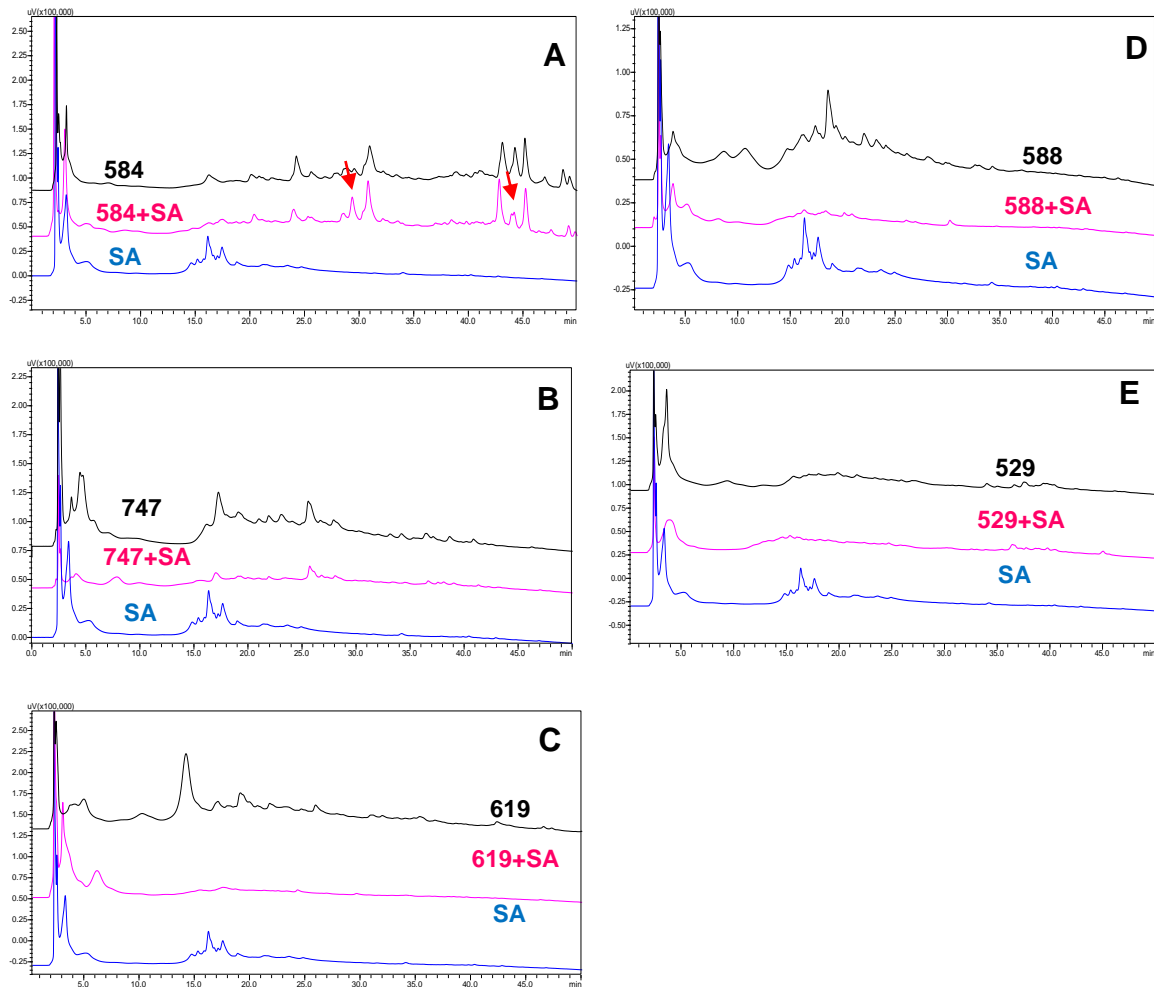


Figura 37. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura das espécies fúngicas *A. chevalieri* (584), *T. calidicanus* (747), *C. rogersoniana* (529), *Penicillium* (588) e *F. nygamai* (619) com *S. aureus* (SA) em comparação com os perfis metabólicos controles. As setas indicam regiões dos cromatogramas onde o perfil encontra-se diferenciado.

Observa-se que, para o fungo *A. chevalieri* (584) houve diminuição da produção metabólica, bem como aumento da produção do composto com TR 29 min (Figura 37A). Espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. fumigatus*, são receptivas a estímulos causados por bactéria Gram-positiva como *Streptomyces bullii*, produzindo metabólitos crípticos (RATEB et al., 2013).

Para os demais co-cultivos houve inibição da produção de metabólitos. Como observado na Figura 36 (pág. 63) o crescimento do fungo *Penicillium* sp.

(588) foi inibido pela bactéria, a ponto de não produzir nenhum dos metabólitos detectados no seu extrato controle. Portanto, no geral, nestas condições o estresse biótico causado pela bactéria *S. aureus* não foi efetivo para influenciar significativamente o metabolismo secundário dos fungos.

5.2.5.3 Co-cultivo dos fungos com *E. carotovora*

Na Figura 38 são mostrados os cultivos das espécies fúngicas com *E. carotovora* (E).

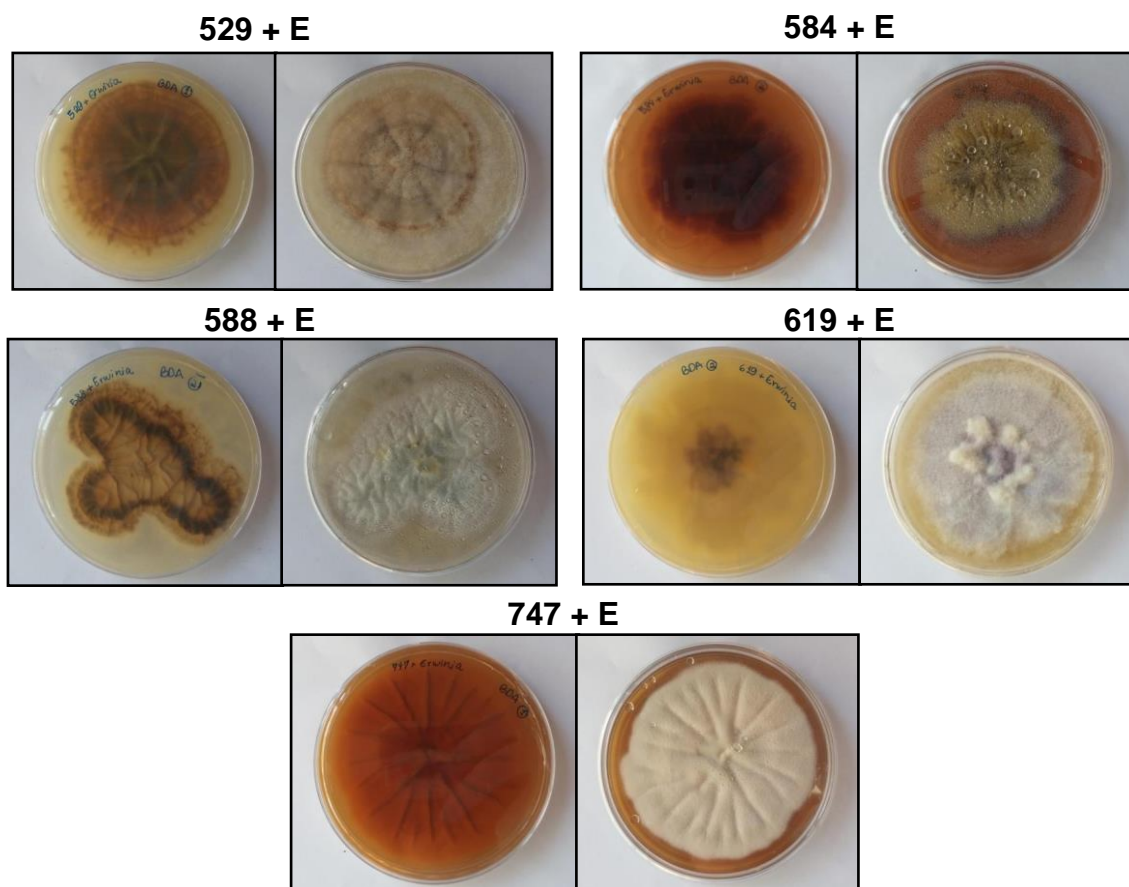


Figura 38. Co-cultivo dos fungos *C. rogersoniana* (529), *A. chevalieri* (584), *Penicillium* (588), *F. nygamai* (619) e *T. calidicanus* (747) com *E. carotovora* em meio sólido (frente e verso da placa de Petri).

Como pode ser observado, a bactéria *E. carotovora* não inibiu o crescimento de nenhuma das espécies fúngicas, tendo em vista que todas cresceram por todo o meio de cultura, inclusive recobrendo a bactéria.

5.2.5.4 Análise por CLAE dos extratos de co-cultivo dos fungos com *E. carotovora*

A análise dos cromatogramas obtidos, por CLAE, dos extratos destes co-cultivos (Figura 39) mostrou que ocorreu variação no perfil cromatográfico do fungo *A. chevalieri* (584), para o qual foi possível observar tanto minimização e inibição de metabólitos normalmente produzidos pelo fungo quanto a produção de um novo metabólito com TR 33 min (Figura 39A).

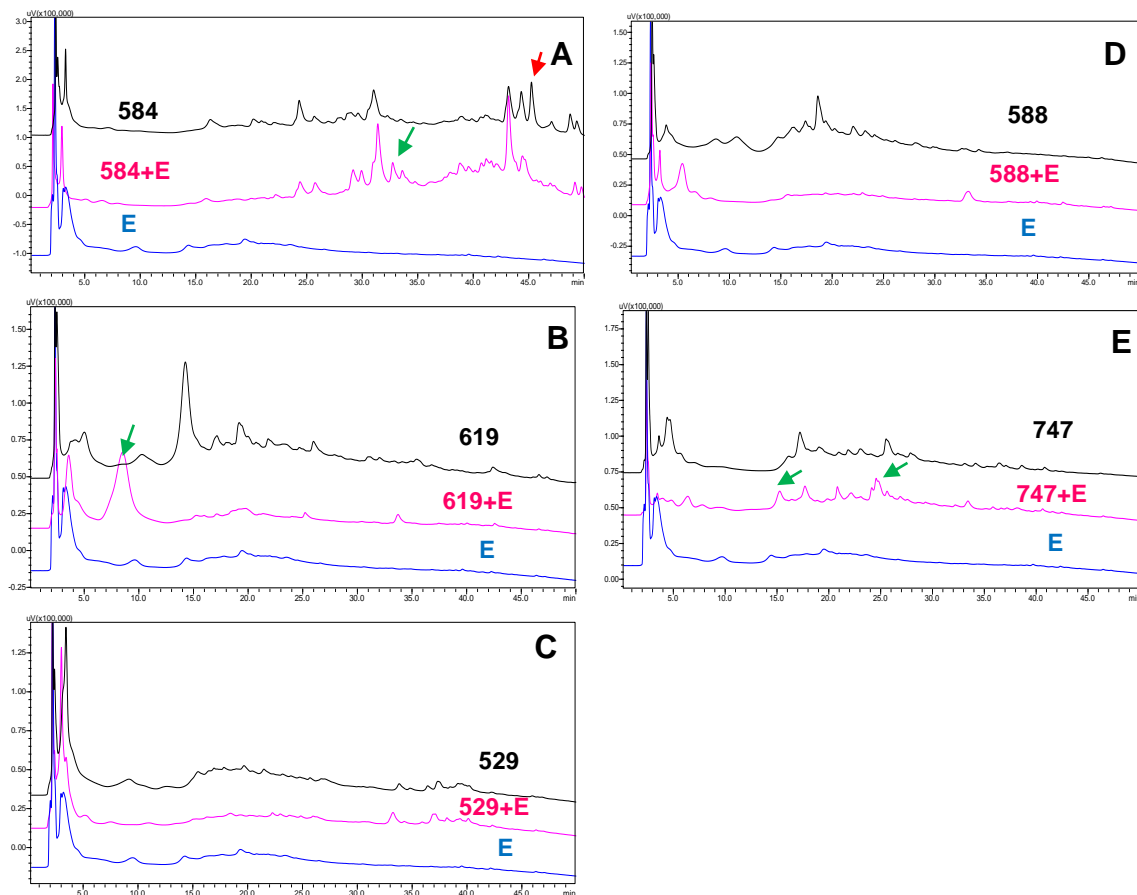


Figura 39. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura das espécies fúngicas *A. chevalieri* (584), *F. nygamai* (619), *C. rogersoniana* (529), *Penicillium* (588) e *T. calidicanus* (747) com *E. carotovora* (E) em comparação com os perfis metabólicos controles. As setas indicam regiões dos cromatogramas onde o perfil encontra-se diferenciado.

O perfil cromatográfico do extrato de co-cultivo do fungo *F. nygamai* (619) (Figura 39B) evidenciou a produção de um composto majoritário (TR 8 min) que não foi detectado nos extratos dos cultivos do fungo ou da bactéria isolados. Em virtude disso, este co-cultivo foi escolhido para ser realizado em escala ampliada.

Também foi observado variação no perfil metabólico da espécie fúngica *T. calidicanus* (747) (Figura 39E), sendo possível detectar no extrato de co-cultivo metabólitos que não foram observados nos extratos do cultivo do fungo e da bactéria isolados. De modo geral, a bactéria *E. carotovora* mostrou-se eficiente para produzir estresse biótico, sendo capaz de influenciar efetivamente o metabolismo secundário das espécies fúngicas.

5.2.5.5 Co-cultivo dos fungos com *E. coli*

Na Figura 40 são apresentados os co-cultivos das espécies fúngicas com *E. coli* (EC).

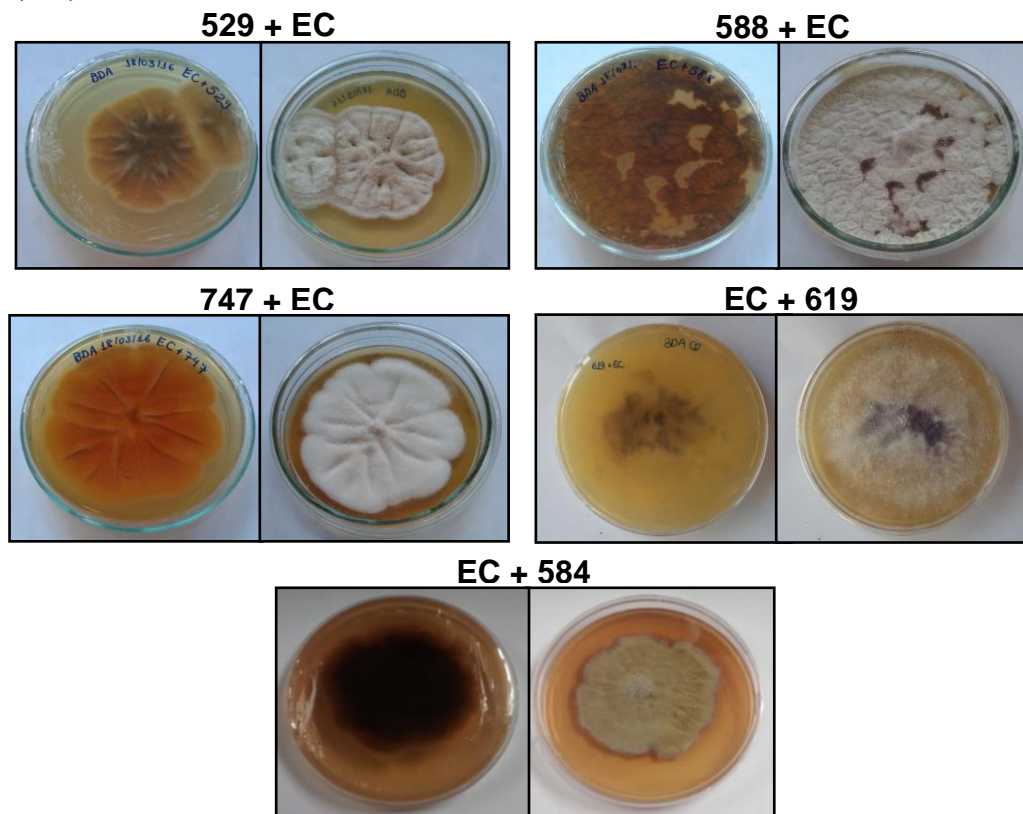


Figura 40. Co-cultivo dos fungos *C. rogersoniana* (529), *Penicillium* (588), *T. calidicanus* (747), *F. nygamai* (619), *A. chevalieri* (584) com *E. coli* (EC) em meio sólido (frente e verso da placa de Petri).

A alteração mais relevante observada nestes co-cultivos foi uma pequena inibição no crescimento da espécie *Penicillium* (588) que, apesar de se espalhar por todo o meio de cultura, não cresceu totalmente sobre a bactéria.

5.2.5.6 Análise por CLAE dos extratos de co-cultivo das espécies fúngicas com *E. coli*

A análise dos cromatogramas dos extratos deste experimento revelou variação do perfil metabólico (Figura 41), principalmente das espécies *A. chevalieri* (584) e *T. calidicanus* (747) (Figuras 41A e E, respectivamente).

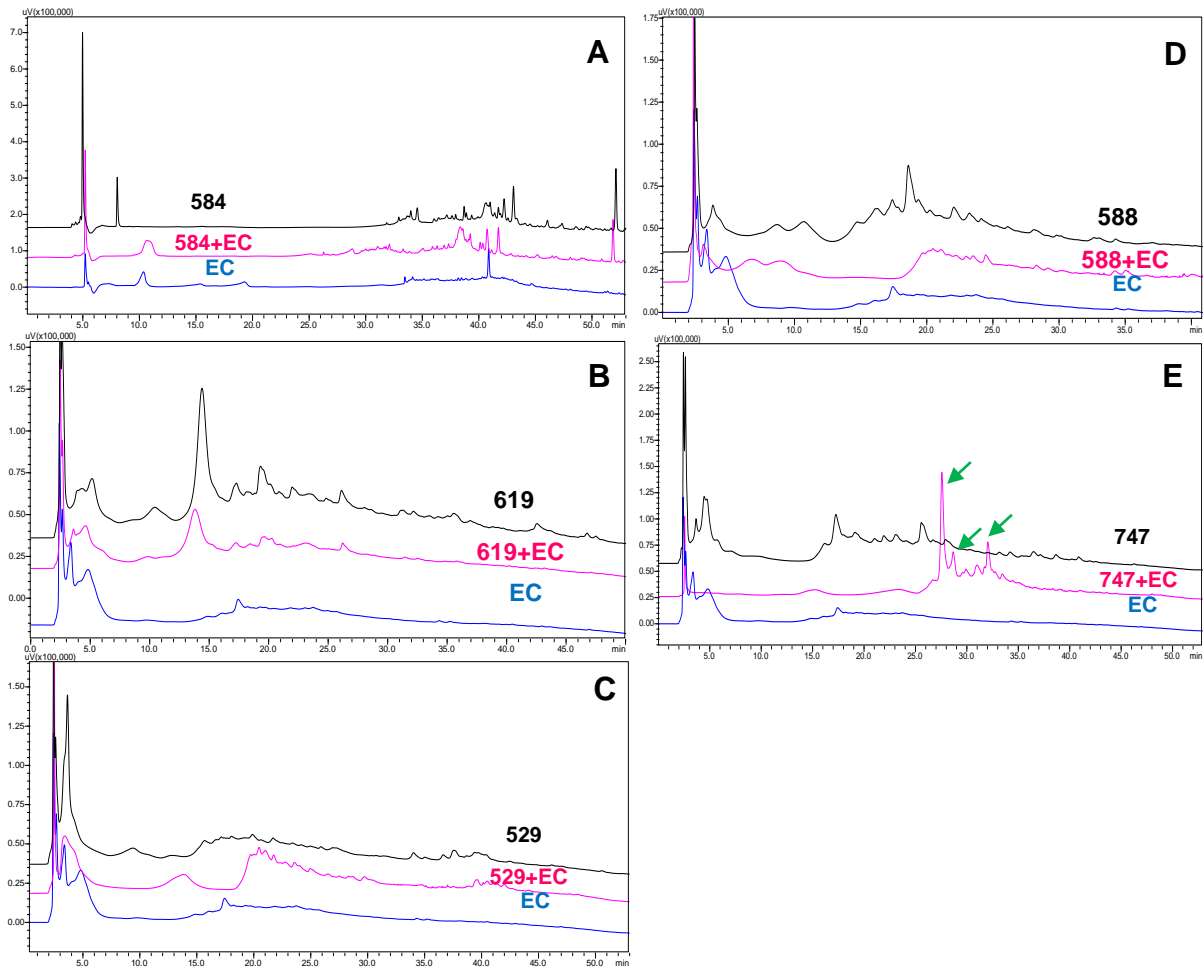


Figura 41. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura das espécies fúngicas *A. chevalieri* (584), *F. nygamai* (619), *C. rogersoniana* (529), *Penicillium* (588) e *T. calidicanus* (747) com *E. coli* (EC) em comparação com os perfis metabólicos controles. As setas indicam regiões do cromatograma onde o perfil encontra-se diferenciado.

O maior destaque foi a espécie *T. calidicanus* (747), uma vez que, em co-cultura, produziu compostos diferentes daqueles produzidos quando cultivado isolado (TR 27-34 min). No geral, nestas condições de cultivo, a bactéria *E. coli*

não promoveu estresse biótico efetivo para influenciar efetivamente o metabolismo secundário de todas as espécies fúngicas.

5.3 Análise por CLAE dos extratos de co-cultivos do Experimento 2

O Experimento 2 (item 4.3.3.2, pág. 32) constou do co-cultivo das cinco espécies de fungos com *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*, separadamente, durante 30 dias, em três meios de cultura distintos (meios 1, 2 e 3). A seguir, serão apresentados algumas análises por CLAE mais significativas dos extratos dos co-cultivos nos meios 1 e 2. A análise por CLAE dos extratos do meio 3 não será apresentada pois os cromatogramas não ficaram bem resolvidos.

5.3.1 Análise por CLAE dos co-cultivos do fungo *F. nygamai* com *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* nos meios 1 e 2

Com base na análise dos cromatogramas obtidos por CLAE (Figura 42, pág. 70) observou-se que, nos meios 1 (composto ágar bacteriológico, extrato de carne e glicerina) e 2 (composto ágar bacteriológico e extrato de carne), o co-cultivo levou a variações no perfil metabólico de *F. nygamai* (619), com produção de metabólitos que não foram observados no extrato do fungo cultivado isolado. Um metabólito com TR 15 min foi produzido quando o fungo foi cultivado com *S. aureus* no meio 1 (Figura 42B) e, em menor quantidade quando cultivado com *C. albicans* no mesmo meio (Figura 42C). Quando cultivado com *E. coli* no meio 1, este fungo produziu um metabólito com TR 43 min (Figura 42A) em quantidade maior do que nos co-cultivos com *S. aureus* e com *C. albicans* no mesmo meio (Figuras 42B e C). No meio 2, este composto foi produzido em maior quantidade quando *F. nygamai* foi cultivado com *C. albicans* (Figura 42F) do que quando cultivado com *S. aureus* (cromatogramas E). Este composto não foi observado no cultivo do fungo com *E. coli* no meio 2 (Figura 42 D). Um composto com TR 24 min foi observado apenas quando *F. nygamai* sofreu sob estresse biótico produzido pela presença de *S. aureus* e *C. albicans* no meio 2 (Figura 42E e F).

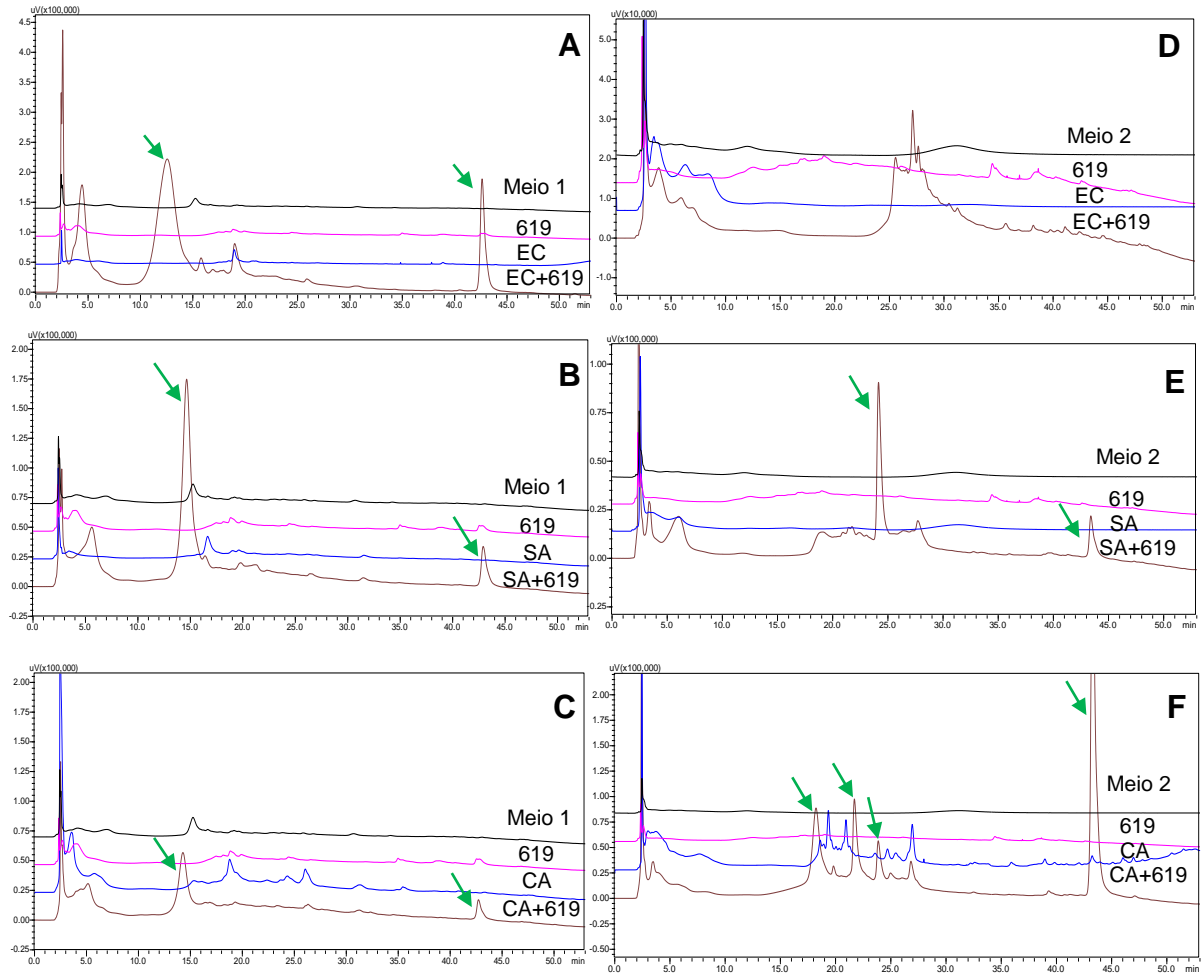


Figura 42. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura de *F. nygamai* (619) com *E. coli* (EC), *S. aureus* (SA) e *C. albicans* (CA) nos meios 1 e 2, em comparação com os extratos controles. As setas indicam regiões do cromatograma onde o perfil encontra-se diferenciado.

Em virtude da variação do perfil cromatográfico no co-cultivo de *F. nygamai* com *E. coli* no meio 1 e com *C. albicans* no meio 2 (Figuras 42A e F, respectivamente), realizou-se o cultivo em escala ampliada nestas duas condições, visando isolamento de metabólitos secundários. Com base nestes resultados, pode-se inferir que, nestas condições, *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* são efetivas para produzirem estresse biótico capaz de influenciar significativamente o metabolismo secundário de *F. nygamai*.

5.3.2 Análise por CLAE dos co-cultivos de *A. chevalieri* com *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* nos meios 1 e 2

A análise dos cromatogramas dos extratos do co-cultivo de *A. chevalieri* (584) com *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* nos meios 1 e 2 (Figura 43) evidenciou a presença de compostos que não foram observados nos extratos dos controles (Figuras 43A, B e C), assim como ocorreu inibição da produção de outros metabólitos (Figuras 43D, E e F).

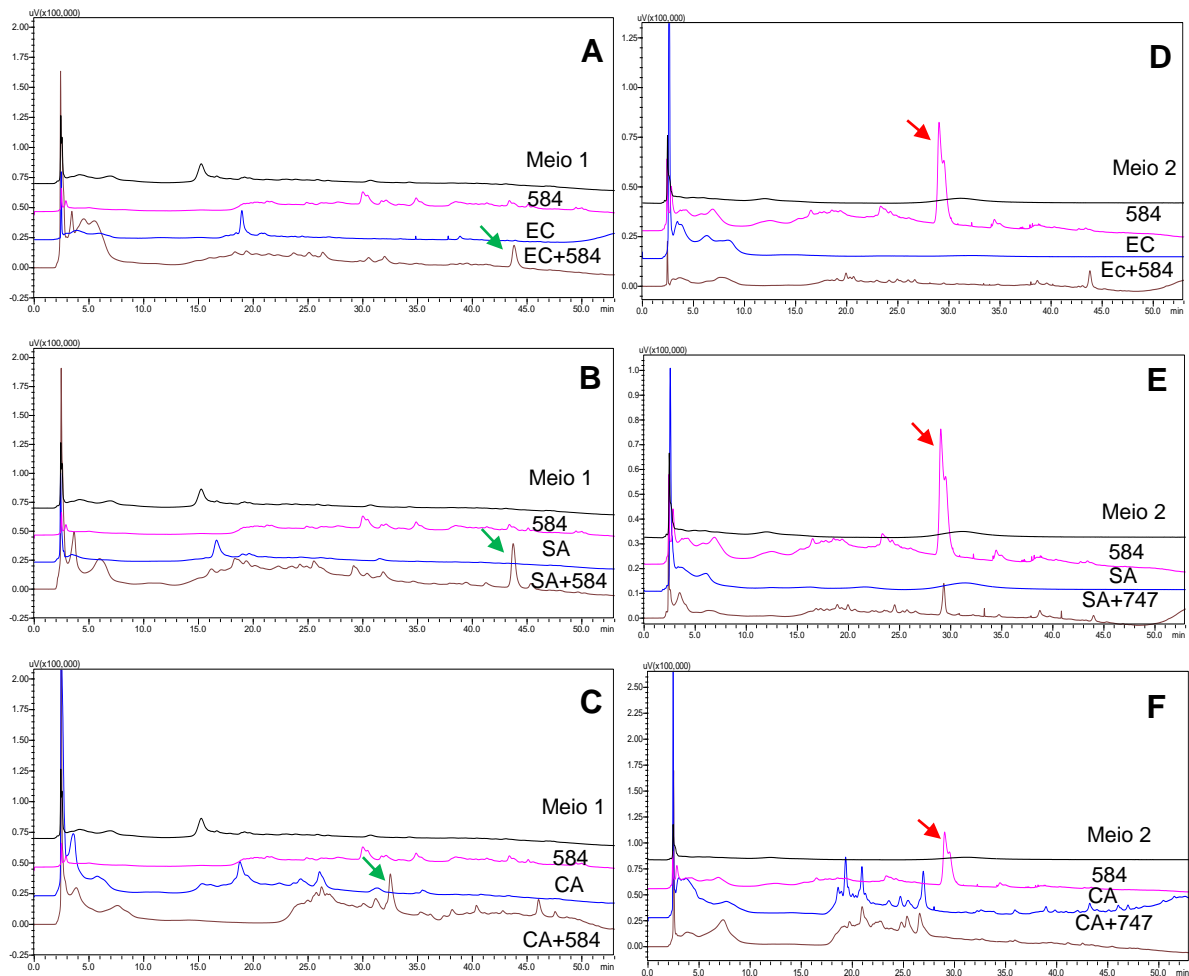


Figura 43. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura de *A. chevalieri* (584) com *E. coli* (EC), *S. aureus* (SA) e *C. albicans* (CA) nos meios 1 e 2, em comparação com os extratos controles. As setas indicam regiões do cromatograma onde o perfil encontra-se diferenciado.

De modo geral, os meios 1 e 2 (cuja diferença era a presença da fonte de carbono, glicerina, no meio 1) foram eficazes para promover mudança no metabolismo de *A. chevalieri*.

5.3.3 Análise por CLAE dos co-cultivos de *T. calidicanus* com *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* nos meios 1 e 2

A análise dos cromatogramas dos extratos dos co-cultivos de *T. calidicanus* (747) com *E. coli* (EC), *S. aureus* (SA) e *C. albicans* (CA) nos meios 1 e 2 (Figura 44) evidenciou mudanças no perfil metabólico do fungo 747, principalmente quando cultivado com *C. albicans* nos meios 1 e 2 (Figura 44C e F), nos quais foi possível observar a produção de novos metabólitos. Em virtude disso, o co-cultivo do fungo 747 com *C. albicans* no meio 2 foi escolhido para ser repetido em escala ampliada, com a finalidade de isolar metabólitos secundários.

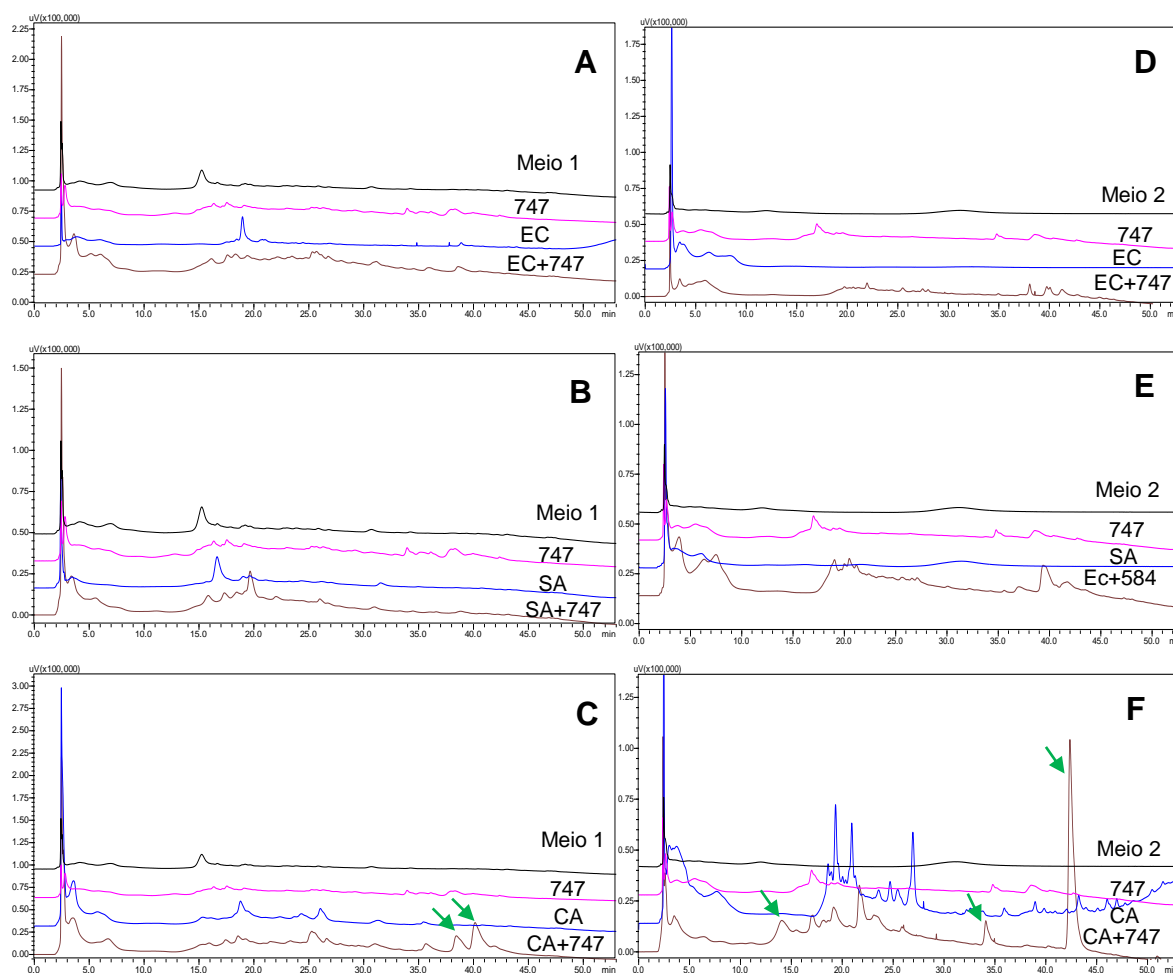


Figura 44. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura de *T. calidicanus* (747) com *E. coli* (EC), *S. aureus* (SA) e *C. albicans* (CA) nos meios 1 e 2, em comparação com os extratos controles. As setas indicam regiões do cromatograma onde o perfil encontra-se diferenciado.

Com base nos resultados observados para estas condições de cultivos (meios 1 e 2), *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* mostraram maior efetividade para produzirem estresse biótico capaz de influenciar significativamente o metabolismo secundário dos fungos do que nas condições utilizadas no Experimento 1 (meio de cultura BDA). Isso demonstra a eficiência da abordagem OSMAC aliada ao co-cultivo na modulação do metabolismo secundário fúngico.

5.4 Análise por CLAE dos extratos dos co-cultivos em meio líquido do Experimento 3

Neste experimento (item 4.3.3.3, pág. 34), as cinco espécies de fungos foram cultivadas em meio líquido, no qual foi adicionada a biomassa, o caldo e o caldo e a biomassa liofilizados de outra espécie fúngica. Como pode ser observada na análise dos cromatogramas obtidos (Figura 45, pág. 74-75), a espécie fúngica *A. chevalieri* (584) apresentou maior variação do seu perfil metabólico quando cultivado em meio de cultura suplementado com o caldo liofilizado (Figura 45B) do que quando cultivado com biomassa ou na presença de ambos, caldo/biomassa liofilizados (Figuras 45A e C, respectivamente) das outras quatro espécies. *F. nygami* (619) não apresentou variações significativas no seu perfil metabólico nas condições experimentais (Figuras 45D, E e F). A espécie *T. calidicanus* (747) apresentou maiores variações no seu perfil quando cultivada com caldo/ biomassa das espécies *F. nygami* (619) e *A. chevalieri* (584) (Figura 45I). Já a espécie *C. rogersoniana* (529) apresentou variação do perfil metabólico ao ser cultivada com caldo e com caldo/biomassa das demais espécies (Figuras 45K e L, respectivamente). A espécie *Penicillium* sp. (588) apresentou maior variação metabólica quando cultivada com a biomassa do fungo 584 (Figura 45M).

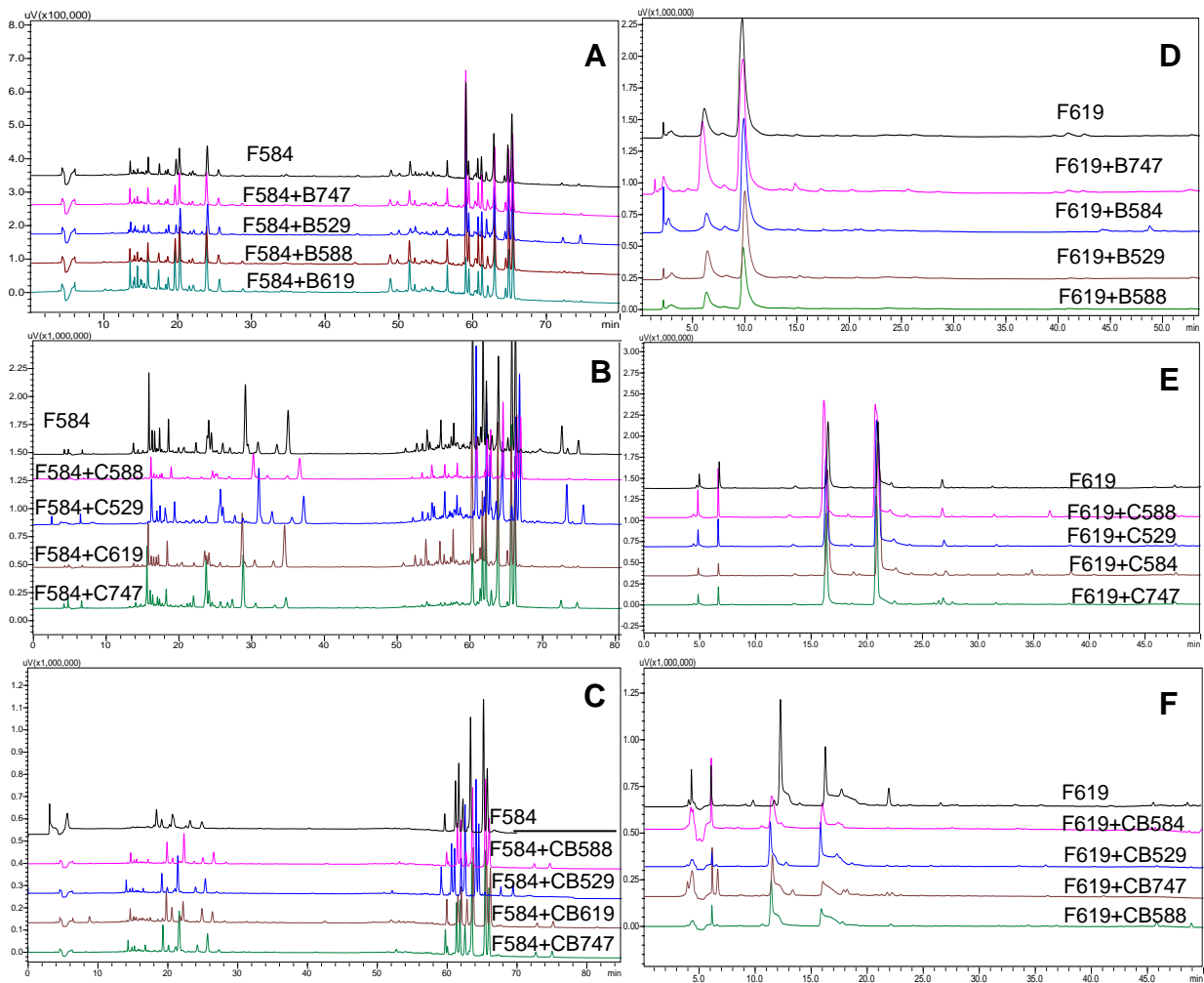


Figura 45. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura dos fungos com biomassa (B), caldo (C) e caldo/biomassa (CB) liofilizados de outras espécies fúngicas, em meio líquido.

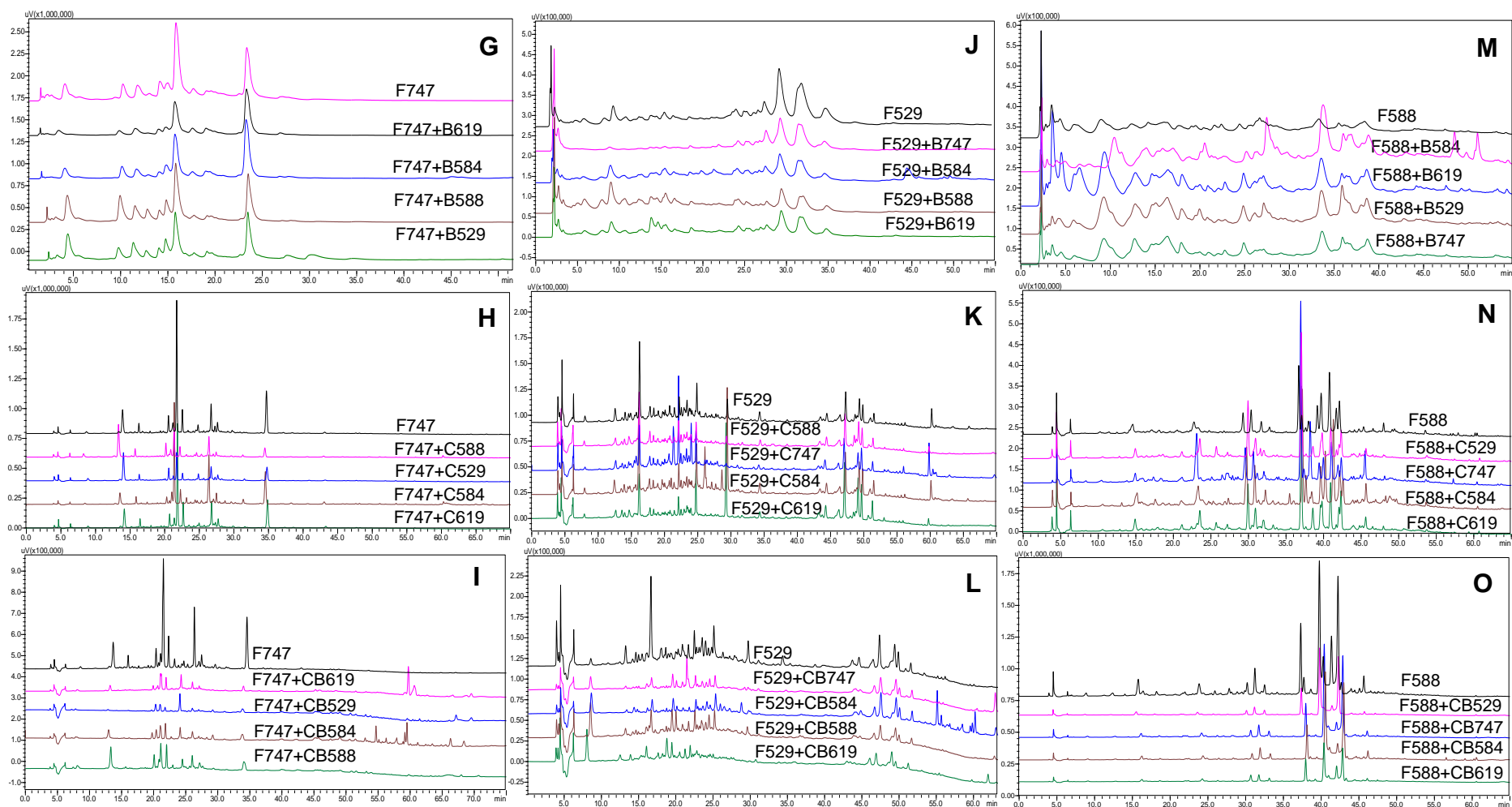


Figura 45. Cromatogramas (270 nm) dos extratos de co-cultura de fungos com biomassa (B), caldo (C) e caldo/biomassa (CB) liofilizados de outras espécies fúngicas, em meio líquido (continuação).

5.5 Análise por CLAE dos extratos do Experimento 4 (modulação epigenética)

Os resultados da análise dos cromatogramas obtidos por CLAE mostraram que a presença dos moduladores epigenéticos PROCA e HIDRA ao meio de cultura foi efetiva para promover a expressão de novos metabólitos secundários (Figura 46).

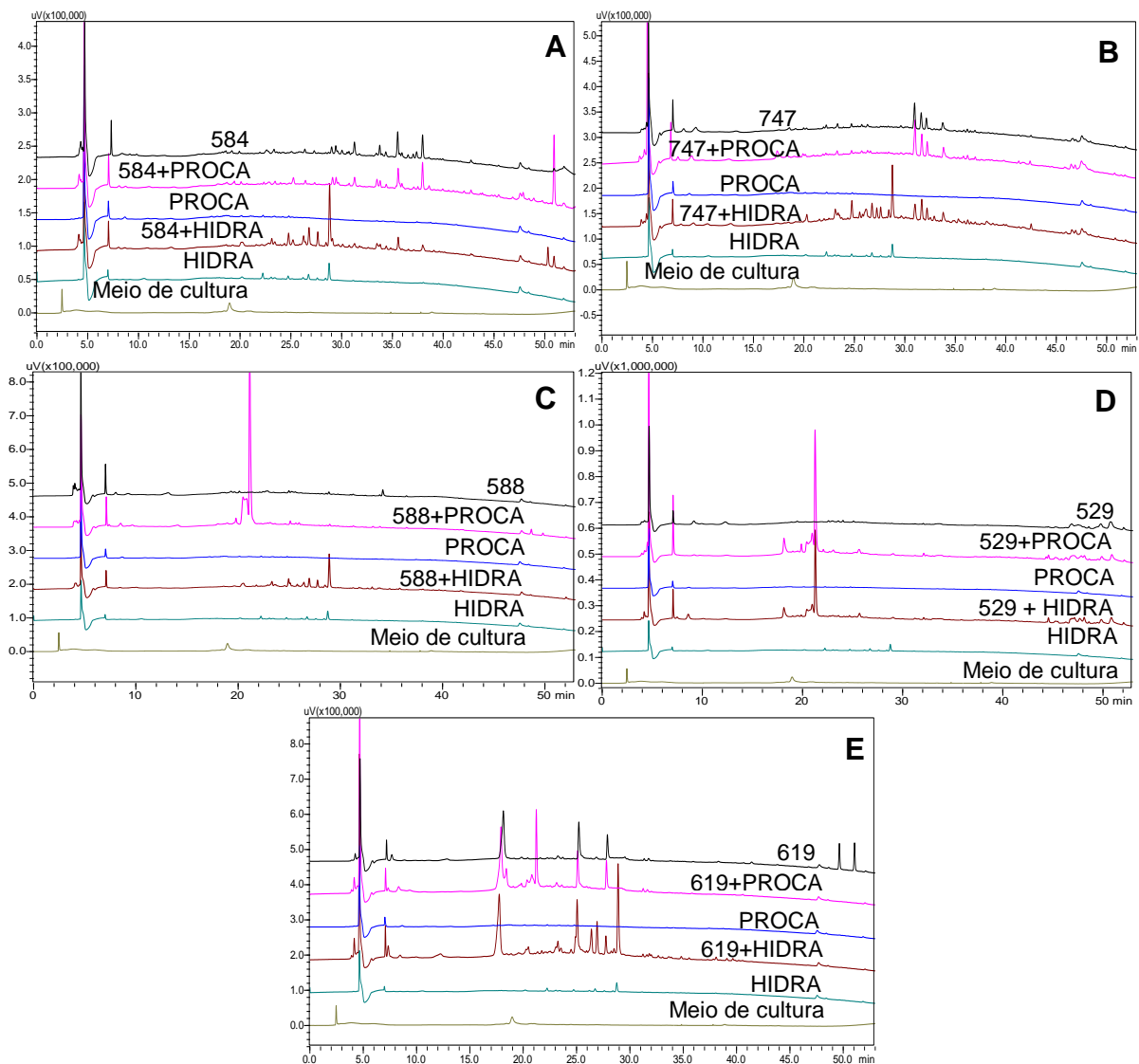


Figura 46. Cromatogramas (270 nm) dos extratos fúngicos de: A - *A. chevalieri* (584); B - *T. calidicanus* (747); C - *Penicillium* (588); D - *C. rogersoniana* (529); E - *F. nygamai* (619) obtidos antes e após produção induzida de metabólitos utilizando procainamida (PROCA) e hidralazina (HIDRA).

Na Tabela 4 são apresentados os tempos de retenção dos metabólitos secundários produzidos nos meios de cultura contendo os moduladores epigenéticos e ausentes nos cromatogramas dos extratos provenientes do cultivo dos fungos isolados (controle).

Tabela 4. Tempo de retenção dos metabólitos produzidos nos meios de cultura contendo os moduladores epigenéticos e ausentes no controle

Fungos	TR (min)		
	Procainamida (PROCA)	Hidralazina (HIDRA)	Controle
<i>A. chevalieri</i>	51,0 (Cromatograma A, 584 + PROCA)	25,0; 26,5; 28,5 (Cromatograma A, 584 + HIDRA)	(Cromatograma A, 584)
<i>T. calidicanus</i>	Não houve modulação	24,5; 26,5; 27,0; 27,5; 29,0 (Cromatograma B, 747 + HIDRA)	(Cromatograma B, 747)
<i>Penicillium</i>	21,0 (Cromatograma C, 588 + PROCA)	25,0; 27,0; 27,8; 29,0 (Cromatograma C, 588 + HIDRA)	(Cromatograma C, 588)
<i>C. rogersoniana</i>	18,0; 21,5 (Cromatograma D, 529 + PROCA)	18,0; 21,5 (Cromatograma D, 529 + HIDRA)	Cromatograma D, 529)
<i>F. nygamai</i>	21,5 (Cromatograma E, 619 + PROCA)	26,5; 27,0; 29,0 (Cromatograma E, 619 + HIDRA)	Cromatograma E, 619)

A adição de procainamida ativou a produção de novos metabólitos secundários por *A. chevalieri* (584), *Penicillium* (588), *C. rogersoniana* (529) e *F. nygamai* (619). Este modulador não alterou o perfil metabólico da espécie *T. calidicanus* (747). Enquanto que, a adição de hidralazina ativou o metabolismo secundário de todas as espécies fúngicas, levando à produção de vários metabólitos diferentes dos encontrados no extrato do controle, em especial *T. calidicanus* (747) e *Penicillium* (588).

Desta forma, considerando todo o experimento, independente da espécie fúngica utilizada, a hidralazina provocou maior elicitación de compostos e maior modulação do metabolismo. Embora ambos os moduladores, PROCA e HIDRA,

ajam pelo mesmo mecanismo, isto é, inibindo as DNA metiltransferases, eles ativaram diferentes rotas biossintéticas, levando à expressão de metabólitos secundários diferentes pela maioria das espécies de fungos.

5.6 Atividade inibitória da acetilcolinesterase do extratos (AChE)

Os extratos obtidos a partir dos cultivos dos Experimentos 1, 2, 3 e 4 foram submetidos ao bioensaio de inibição da acetilcolinesterase, visando determinar quais possuem potencial atividade anti-Alzheimer.

5.6.1 Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos do Experimento 1

Como pode ser observado na Figura 47 (pág. 79), os extratos dos co-cultivos de *Penicillium* com *T. calidicanus* (588+747), *Penicillium* com *A. chevalieri* (588+584), *T. calidicanus* com *A. chevalieri* (747+584), *T. calidicanus* com *C. rogersoniana* (747+529), *C. rogersoniana* com *A. chevalieri* (529+584) e *F. nygamai* com *T. calidicanus* (619+747) apresentaram valores de inibição da enzima acetilcolinesterase maiores do que os valores apresentados pelos extratos do cultivo dos respectivos fungos isolados. O co-cultivo de *F. nygamai* com *A. chevalieri* (619+584) produziu um extrato com valor de inibição da AChE maior do que o valor apresentado pelo extrato do cultivo do fungo *A. chevalieri* (584) isoladamente. O extrato do co-cultivo de *T. calidicanus* com *A. chevalieri* (747+584) apresentou porcentagem de inibição da AChE ($99,6 \pm 0,2\%$) maior que o apresentado pela eserina ($99,1 \pm 0,1\%$), composto utilizado como inibidor padrão da AChE. Como observado na análise por CLAE, o co-cultivo destas espécies foi um dos que resultou em maior variação do perfil metabólico dos fungos (Figura 33A, pág. 58).

Os resultados evidenciam que o co-cultivo de fungos filamentosos foi efetivo para a produção de compostos com potencial atividade anti-acetilcolinesterase.

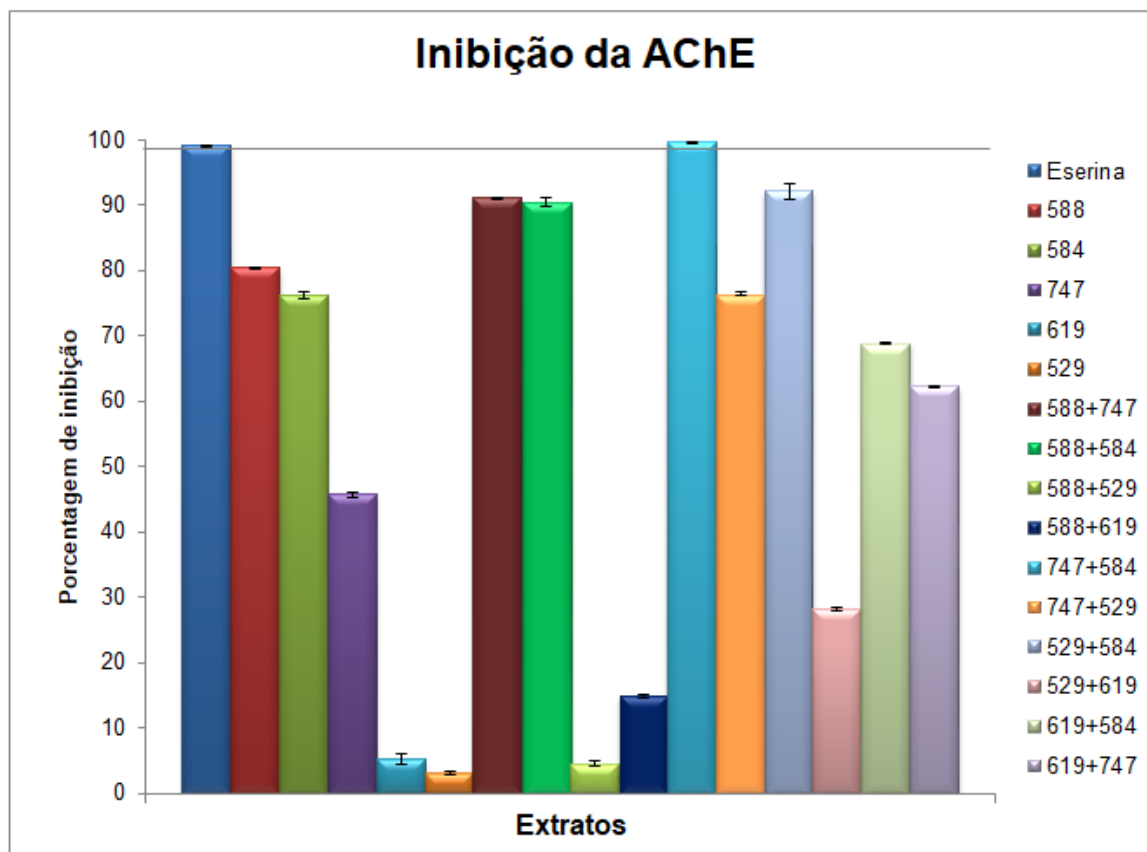


Figura 47. Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos de co-cultivo de fungo com fungo do Experimento 1 (*Penicillium* (588), *A. chevalieri* (584), *T. calidicanus* (747), *F. nygamai* (619), *C. rogersoniana* (529)).

Quanto aos extratos do co-cultivo das cinco espécies fúngicas (representadas por F na legenda do gráfico) com a levedura *C. albicans* (CA) e as bactérias *S. aureus* (SA), *E. coli* (EC) e *E. carotovora* (E) em meio BDA, os resultados do bioensaio mostraram-se promissores para alguns extratos (Figura 48, pág. 80). Os extratos dos co-cultivos de *A. chevalieri* (584) com *S. aureus* (SA), *T. calidicanus* (747) com *S. aureus*, *T. calidicanus* com *E. coli* (EC), *T. calidicanus* com *E. carotovora* (E) apresentaram valores de inibição maiores do que o valor apresentado pelas respectivas espécies fúngicas quando cultivadas isoladamente. O extrato do co-cultivo de *A. chevalieri* com *S. aureus* apresentou inibição da AChE ($99,1 \pm 0,1\%$) tão potente quanto a eserina ($99,1 \pm 0,1\%$), inibidor padrão da AChE. Desta forma, *A. chevalieri* e *T. calidicanus* em co-cultura com bactérias foram capazes de produzir metabólitos secundários com atividade anti-acetilcolinesterase tão promissora quanto a eserina.

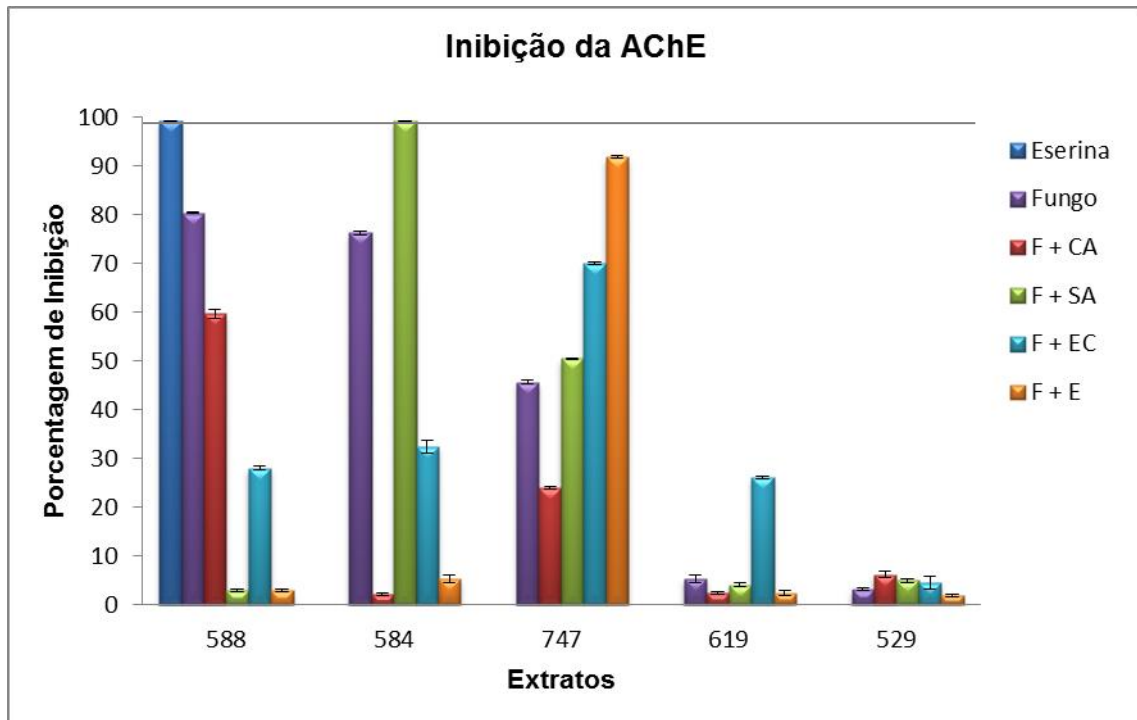


Figura 48. Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos de co-cultivo dos fungos (F) *Penicillium* (588), *A. chevalieri* (584), *T. calidicanus* (747), *F. nygamai* (619) e *C. rogersoniana* (529) com *C. albicans* (CA), *S. aureus* (SA), *E.coli* (EC) e *E. carotovora* (E) do Experimento 1.

5.6.2 Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos do Experimento 2

No Experimento 2 diversas condições propiciaram a produção de extratos capazes de inibir a acetilcolinesterase (Figuras 49, 50 e 51, pág. 81-82). Considerando todos os cultivos, os melhores resultados foram obtidos quando *T. calidicanus* (747) foi cultivado com *C. albicans* (CA) no meio 1, *A. chevalieri* (584) com *C. albicans* (CA) no meio 2 e *T. calidicanus* (747) com *C. albicans* (CA) e com *E. coli* (EC) no mesmo meio.

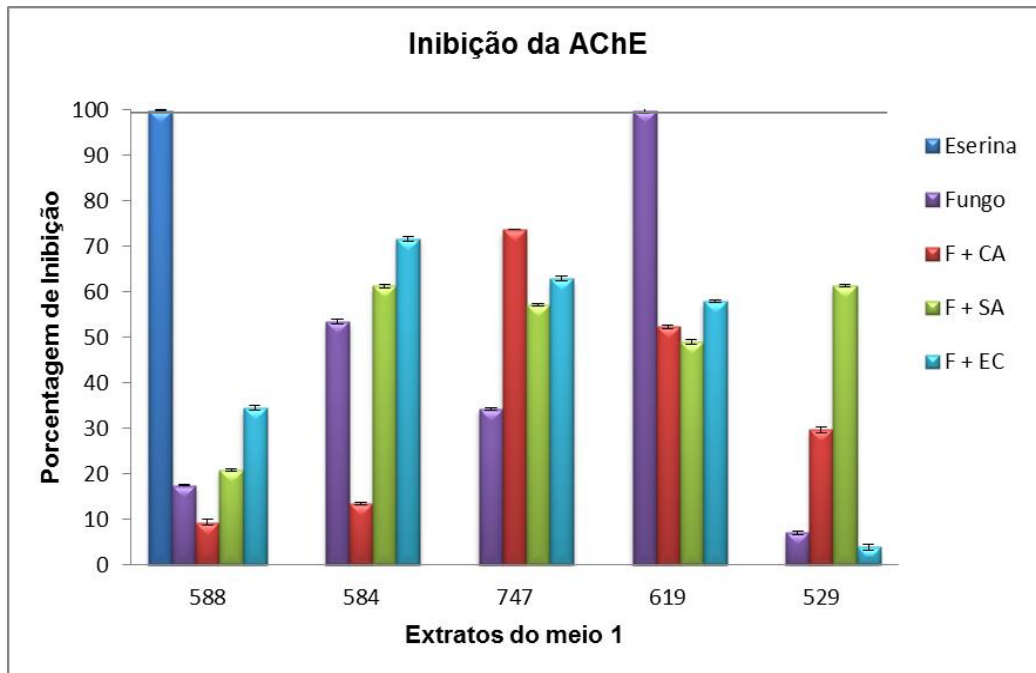


Figura 49. Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos de co-cultivo dos fungos (F) *Penicillium* (588), *A. chevalieri* (584), *T. calidicanus* (747), *F. nygamai* (619) e *C. rogersoniana* (529) com *C. albicans* (CA), *S. aureus* (SA) e *E.coli* (EC) no meio 1 do Experimento 2.

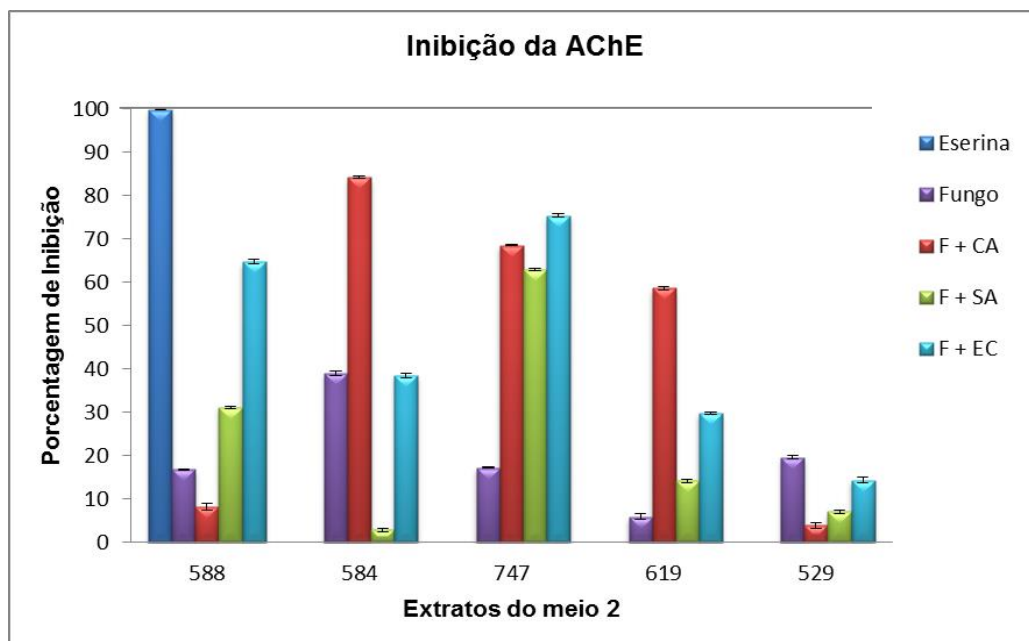


Figura 50. Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos de co-cultivo dos fungos (F) *Penicillium* (588), *A. chevalieri* (584), *T. calidicanus* (747), *F. nygamai* (619) e *C. rogersoniana* (529) com *C. albicans* (CA), *S. aureus* (SA) e *E.coli* (EC) no meio 2 do Experimento 2.



Figura 51. Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos de co-cultivo dos fungos (F) *Penicillium* (588), *A. chevalieri* (584), *T. calidicanius* (747), *F. nygamai* (619) e *C. rogersoniana* (529) com *C. albicans* (CA), *S. aureus* (SA) e *E.coli* (EC) no meio 3 do Experimento 2.

5.6.3 Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos do Experimento 3

Os extratos obtidos no Experimento 3, a partir do cultivo das cinco espécies de fungos com a biomassa, o caldo e com caldo/biomassa liofilizados das demais espécies, separadamente, foram submetidos ao ensaio de atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase. Os resultados são apresentados na Figura 52 (pág, 83), em cada gráfico são mostrados os resultados para os extratos de um fungo cultivado com a biomassa, com o caldo e com caldo/biomassa dos demais.

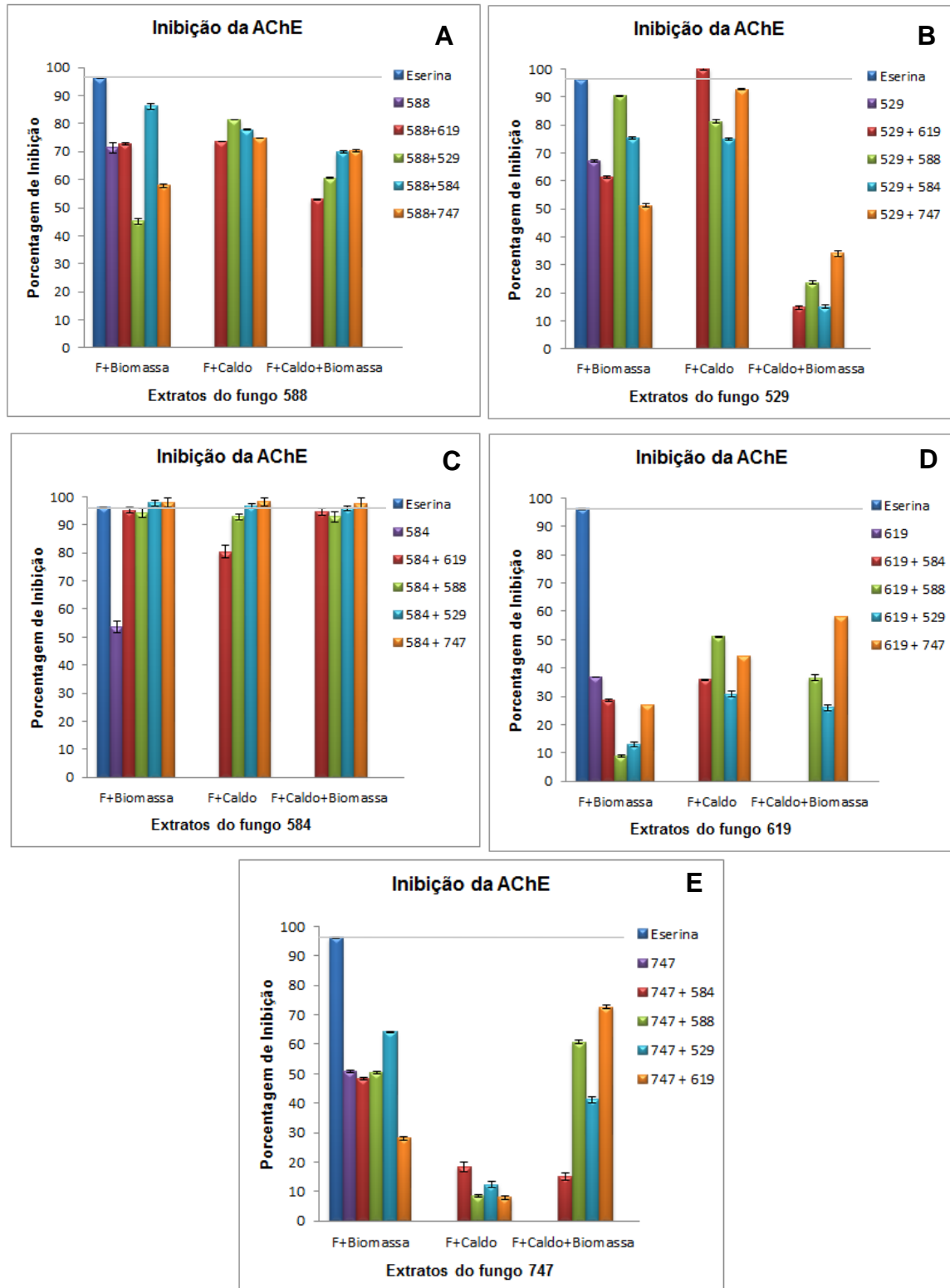


Figura 52. Inibição da AChE dos extratos do cultivo dos fungos (F) com biomassa, caldo e com caldo/biomassa de outros fungos.

O extrato do fungo *Penicillium* (588) cultivado com a biomassa do fungo *A. chevalieri* (584) apresentou alta porcentagem de inibição ($86,2 \pm 0,4\%$) (Figura 52A). Dentre os extratos da espécie fúngica *C. rogersoniana* (529) (Figura 52B), destaca-se o cultivo com o caldo do fungo *F. nygamai* (619), cuja porcentagem de inibição ($99,9 \pm 0,6\%$) foi maior que a da eserina ($96,2 \pm 0,1\%$), inibidor padrão da AChE. Os extratos do fungo 584 (Figura 52C) se destacaram pelos altos valores de porcentagem de inibição da AChE, a maioria acima de 90% e quatro com inibição maior que o inibidor padrão, a eserina. Em relação aos extratos das espécies *C. rogersoniana* (619) (Figura 52D), e *T. calidicanus* (747) (Figura 52E), poucas condições levaram à alta inibição da AChE. Os resultados evidenciaram que os extratos do fungo *A. chevalieri* (584) obtidos nas três formas de cultivos foram os mais promissores inibidores de acetilcolinesterase.

5.6.4 Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos do Experimento 4

Os resultados da atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos do Experimento 4 são apresentados na Figura 53.

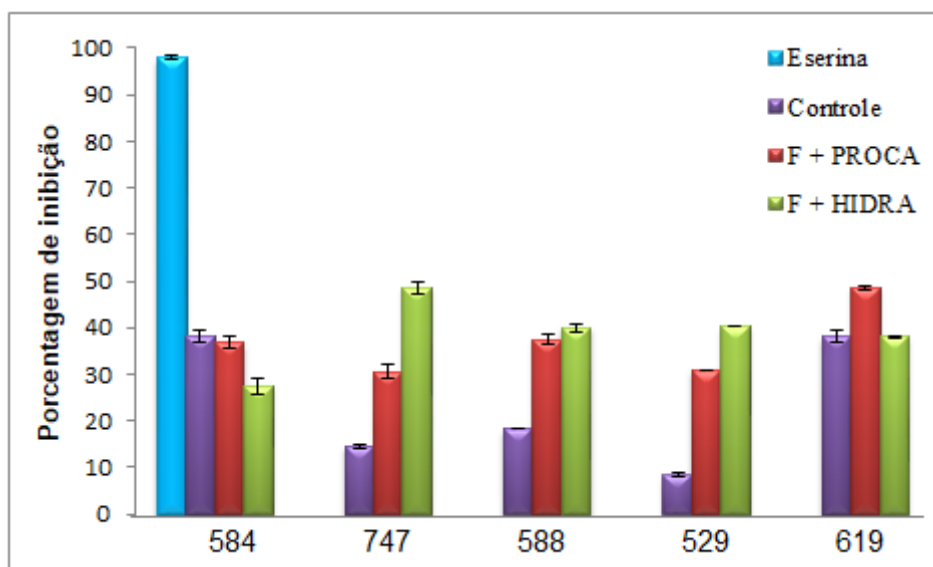


Figura 53. Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos dos fungos (F) modulados com procainamida (F+PROCA) e hidralazina (F+HIDRA) e seus respectivos controles.

Os extratos obtidos na presença de PROCA e HIDRA foram, em geral, mais ativos que seus respectivos controles (crescimento dos fungos sem os

moduladores), com exceção de *A. Chevalieri* (584), o único que não apresentou aumento da atividade, embora tenha apresentado variação em seu perfil metabólico, com produção de novos compostos, conforme evidenciado pela análise por CLAE (Figura 46A, pág. 76). Os extratos das espécies *T. calidicanus* (747) e *Penicillium* (588) sob modulação com PROCA foram cerca de duas vezes mais ativos ($30,53 \pm 1,44\%$ e $37,54 \pm 0,92\%$, respectivamente) que seus respectivos controles ($14,64 \pm 0,51\%$ e $18,32 \pm 0,15\%$, respectivamente). Sob modulação com HIDRA, o aumento na atividade também foi observado para *T. calidicanus*, que produziu um conjunto de metabólitos cerca de três vezes mais ativo ($48,54 \pm 1,34\%$) e para *Penicillium* cerca de duas vezes mais ativo ($40,13 \pm 0,86\%$) em relação aos respectivos controles. Os metabólitos produzidos por *C. rogersoniana* (529) na presença de PROCA apresentaram aumento significativo na atividade ($30,88 \pm 0,12\%$) em relação ao controle ($8,46 \pm 0,53$), enquanto o extrato do fungo modulado por HIDRA foi ainda mais ativo ($40,34 \pm 0,15\%$). Embora extratos de *C. rogersoniana* obtidos na presença de PROCA e HIDRA apresentassem perfis metabólicos muito semelhantes, seu efeito na inibição da acetilcolinesterase variou, pois o extrato modulado por HIDRA foi significativamente mais ativo ($P < 0,05$, no intervalo de confiança de 95%). *C. rogersoniana* produz terpenos (DONG et al., 2017) e compostos desta classe foram previamente relatados como inibidores da acetilcolinesterase (DOS SANTOS et al., 2017). Portanto, uma hipótese, é que a modulação epigenética por HIDRA tenha aumentado a biossíntese de terpenoides, justificando, assim, o aumento da atividade em comparação ao controle. Em relação à espécie *F. nygamai* (619), a modulação com PROCA durante o seu desenvolvimento levou a um aumento significativo da atividade ($48,64 \pm 0,48\%$) em relação ao controle ($38,16 \pm 1,45\%$), enquanto que, com HIDRA, não apresentou diferença significativa ($P < 0,05$, no intervalo de confiança de 95%). Embora se espere aumento na biossíntese de compostos bioativos, modificações metabólicas causadas por agentes epigenéticos podem ser sinérgicas ou antagônicas (KONDO et al., 2003).

Com base nesses resultados, a expressão de novos metabólitos secundários pela adição de inibidores de DNA metiltransferases foi efetiva para as espécies estudadas, com aumento da atividade inibitória da acetilcolinesterase.

5.7 Identificação por PS-MS de metabólitos elicitados por co-cultura

Como relatado anteriormente, os extratos dos co-cultivos em pares de fungo com fungo do Experimento 1 foram submetidos a análise por PS-MS com a finalidade de identificar compostos produzidos pelos fungos durante a co-cultura, como resultado direto do estresse biótico. Esta é uma metodologia eficiente para a identificação de metabólitos secundários em matrizes complexas, evitando desperdício desnecessário de tempo e despesas com isolamento de compostos conhecidos (GUO et al., 2017).

Em geral, a variação metabólica evidenciada por CLAE nos extratos de co-cultura foi corroborada pela detecção de vários íons nos espectros de massa que não foram observados nos extratos dos fungos cultivados individualmente. Alguns metabólitos presentes nos extratos que apresentaram maior variação no perfil metabólico com base na análise por CLAE (619+584, 747+584, 747+529, 588+747, 584+588 e 529+584) (Figura 33, pág. 58) e ausentes nos controles foram identificados por padrão de fragmentação (PS-MS/MS), nos modos negativo ou positivo. Os íons selecionados foram submetidos à fragmentação, visando a identificação dos respectivos compostos, combinando resultados experimentais com dados relatados na literatura.

Quatro compostos foram previamente identificados, um do extrato de 619+584, um do extrato 588+747, um do extrato 584+588 e um do extrato 529+584 (Tabela 5, pág. 87).

O composto detectado no espectro de massas do extrato 619+584 exibiu íon em m/z 279, $[M-H]^-$ e um íon produto em m/z 261, formado pela perda de água, $[M-H_2O-H]^-$. Com base nos dados do espectro de massas combinados com a literatura, este composto foi identificado como ácido linoleico (YANG et al., 2015). Existem relatos da produção de ácido linoleico, assim como de vários outros ácidos graxos, por *A. chevalieri* (MOKHTAR et al., 2009). Um estudo publicado por Zugno e colaboradores (2015) enfatizou que ácidos graxos ômega-3 reduziram efetivamente a atividade da acetilcolinesterase em animais. Desta forma, a presença deste metabólito no extrato de co-cultura pode ter contribuído para a boa atividade anti-acetilcolinesterase apresentada pelo extrato 619+584 (Figura 47, pág. 79).

Tabela 5. Compostos identificados em co-culturas de fungos por PS-MS

Extrato	<i>m/z</i>	Íon	MS/MS	Estrutura sugerida	Referência
619+584	279	[M-H] ⁻	261	Ácido linoleico	YANG et al. (2015)
588+747	163	[M-H] ⁻	119	Ácido <i>p</i> -cumárico	KARAR & KUHNERT (2015)
584+588	391	[M+Na] ⁺	373, 359, 229	9-hidroxi-megastigma-3,5,8-trien-7-ona-9-O-β-D-glucopiranosídeo	JIA et al. (2017)
529+584	295	[M-H] ⁻	277, 171	Ácido 9-hidroxi-octadeca-dienoico	WANG et al. (2017c)

O metabólito identificado no espectro de massas do extrato de 588+747 exibiu um íon em *m/z* 163, [M-H]⁻ e um íon fragmento em *m/z* 119, formado pela perda de CO₂, [M-CO₂-H]⁻. O padrão de fragmentação e os dados da literatura permitiram a identificação do ácido *p*-cumárico (KARAR & KUHNERT, 2015). Embora este metabólito possa ser produzido por algumas espécies de *Penicillium* (DONAGHY & MCKAY, 1995), não foi detectado no experimento controle e não foram encontrados relatos de sua produção por *T. calidicanus*, sendo, portanto, uma possível resposta de *Penicillium* sp. ao estresse biótico.

No extrato 584+588 foi detectado o íon em *m/z* 391, este exibiu fragmentos em *m/z* 373, 359 e 229, formados pela perda de H₂O, CH₃OH e perda de um resíduo neutro de glucosilo (162 Da), respectivamente. Com base no padrão de fragmentação, este composto foi identificado como 9-hidroxi-megastigma-3,5,8-trien-7-ona-9-O-β-D-glucopiranosídeo, previamente detectado em tabaco (JIA et

al., 2017). Aparentemente, este é o primeiro relato sobre a produção deste composto por fungos, no entanto, seu precursor megastigma-4,6(e),8(Z)-trieno é produzido pelo fungo *Paecilomyces variotii* (EFFMERT et al., 2012).

O composto identificado no extrato 529+584 exibiu íon em m/z 295, [M-H]⁻. Este íon exibiu fragmentos em m/z 277 e 171 (perda de 18 e 24 Da, respectivamente), que permitiram identificá-lo como o ácido 9-hidroxi-octadecadienoico, um ácido graxo hidroxilado, cujo precursor foi relatado em espécies de fungo, como *A. chevalieri* (MOKHTAR et al., 2009).

As estruturas químicas dos compostos identificados preliminarmente são mostrados na Figura 54 e os espectros MS/MS dos mesmos encontram-se no Apêndice (Figuras A1-A4, pág. 164-167). As vias de fragmentação propostas para o composto 9-hidroxi-megastigma-3,5,8-trien-7-ona-9-O- β -D-glucopiranosídeo são mostradas na Figura 55, pág. 89.

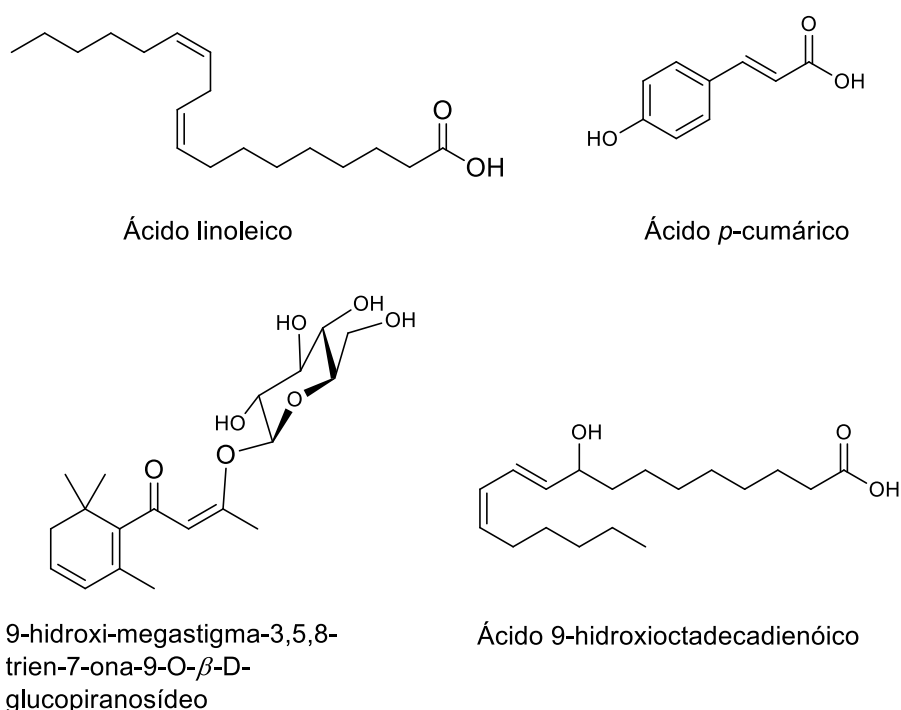


Figura 54. Estruturas químicas dos compostos identificados por PS-MS.

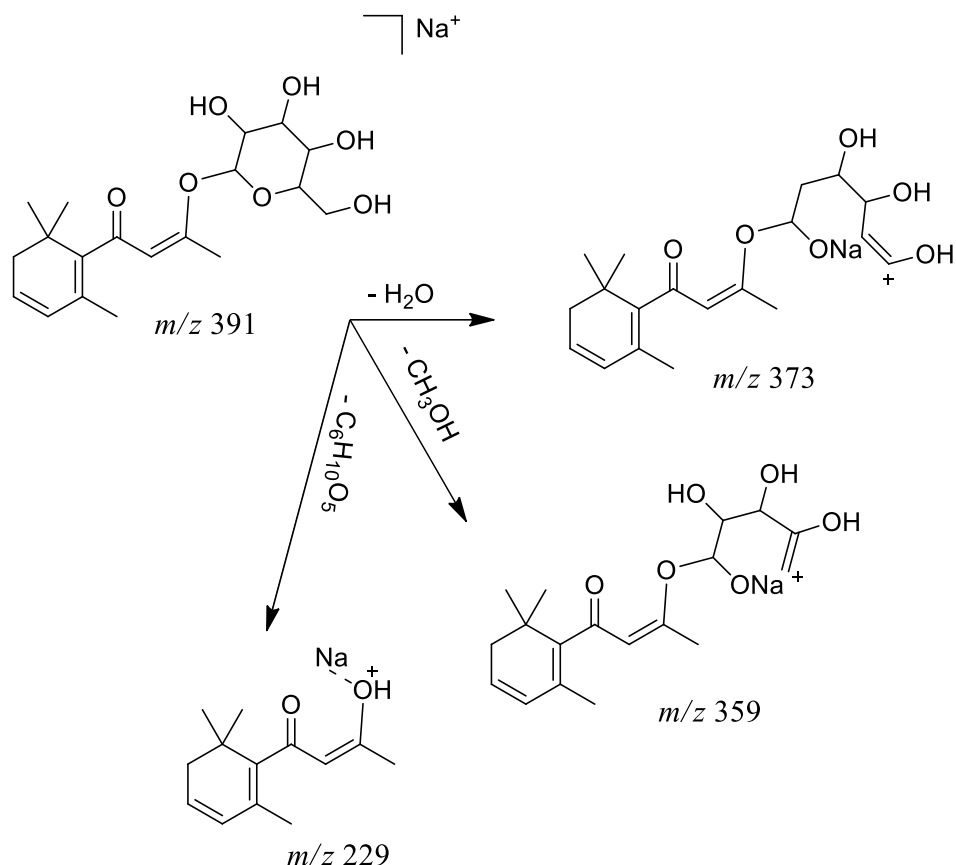


Figura 55. Fragmentação proposta para o composto 9-hidroxi-megastigma-3,5,8-trien-7-ona-9-O- β -D-glucopiranosídeo detectado no extrato de co-cultura 584+588 (JIA et al., 2017).

A técnica PS-MS tem sido muito utilizada para discriminação rápida de perfis de matrizes complexas, principalmente extratos de plantas (TAVERNA et al., 2016; GUO et al., 2017). No entanto, seu potencial tem sido pouco explorado para os estudos de perfis de extratos fúngicos. O uso da técnica PS-MS é de grande relevância, pois, como mostrado neste trabalho, o perfil metabólico fúngico varia muito com pequenas variações nas condições de cultivo e esta técnica, além de possibilitar a identificação de metabólitos presentes nos extratos fúngicos, permite identificar de forma rápida e simples a ocorrência dessas variações, agilizando os resultados obtidos a partir de um determinado experimento.

5.8 Caracterização estrutural dos compostos isolados

A identificação estrutural dos compostos isolados neste trabalho, **GO-1**, **GO-2**, **GO-3**, **GO-4**, **GO-5** e **GO-6** (Figura 56), foi realizada com base nos dados obtidos por técnicas espectroscópicas de infravermelho, RMN de ^1H e de ^{13}C , incluindo técnicas bidimensionais (mapas de contornos COSY, HSQC e HMBC) e espectrometria de massas, além de comparação com dados da literatura. Para facilitar a visualização, as estruturas dos compostos identificados e da cristatamina F, utilizada para comparação com **GO-2**, encontram-se em apêndice, pág. 169.

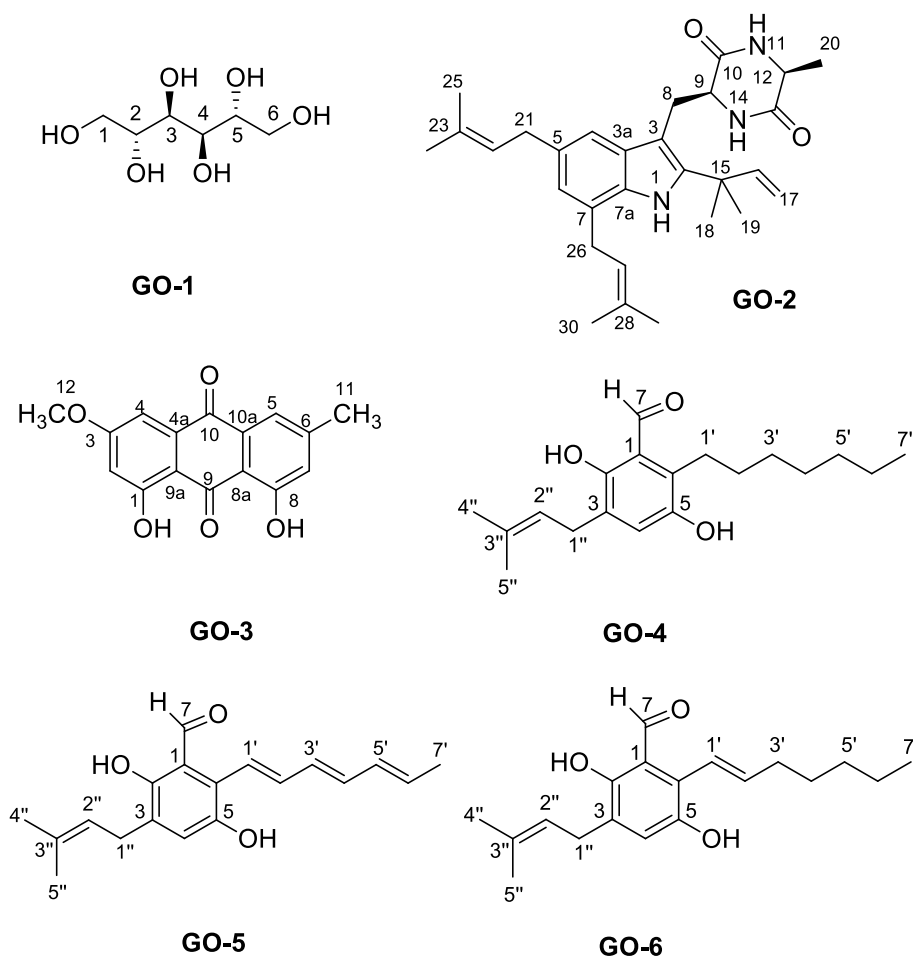


Figura 56. Estruturas químicas dos compostos isolados.

5.8.1 Caracterização estrutural do composto GO-1

O composto **GO-1** (Figura 56), isolado a partir do extrato de co-cultivo do fungo *F. nygamai* (619) com *E. carotovora*, apresentou faixa de fusão 172-174 °C

(Lit. 165-168 °C; OLIVEIRA et al., 2009) e foi solúvel em água. O espectro no infravermelho (Figura 57) deste composto apresentou banda de absorção larga e intensa em torno de 3261 cm^{-1} , referente a estiramento de ligação O–H. Observou-se ainda banda de absorção em 2943 cm^{-1} , referente a estiramento de ligação C–H sp^3 (PAVIA et al., 2010).

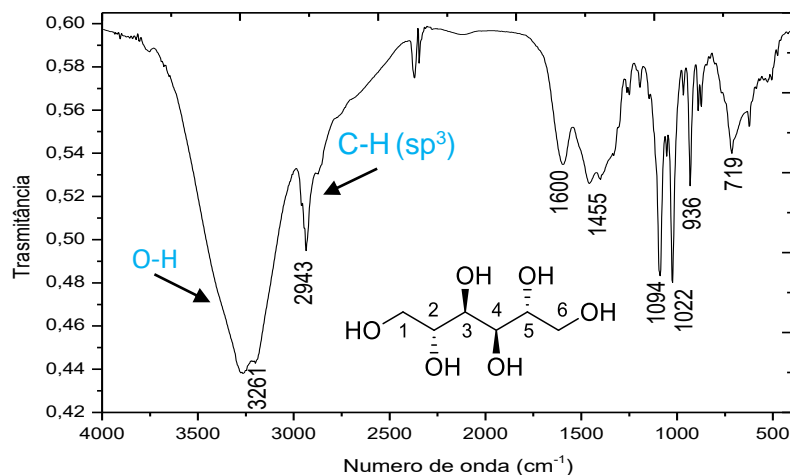


Figura 57. Espectro no infravermelho (em pastilha de KBr) do composto **GO-1**.

O espectro de RMN de ^1H (D_2O , 400 Hz) apresentou um conjunto de sinais na região de 3,89-3,66 ppm (Figuras 58-59), sendo um duplete duplo (dd, $J = 2,2$; 11,6 Hz) em δ_{H} 3,87 ppm, um duplete em δ_{H} 3,81 ppm (d, $J = 8,4$ Hz), um multiplete entre δ_{H} 3,78-3,74 ppm e um duplete duplo em δ_{H} 3,68 ppm (dd, $J = 6,0$; 11,6 Hz). Todos os sinais possuem integração para o mesmo número de átomos de hidrogênio. Os átomos de hidrogênios foram atribuídos conforme a multiplicidade dos sinais, como se observa na Figura 59, pág. 92.

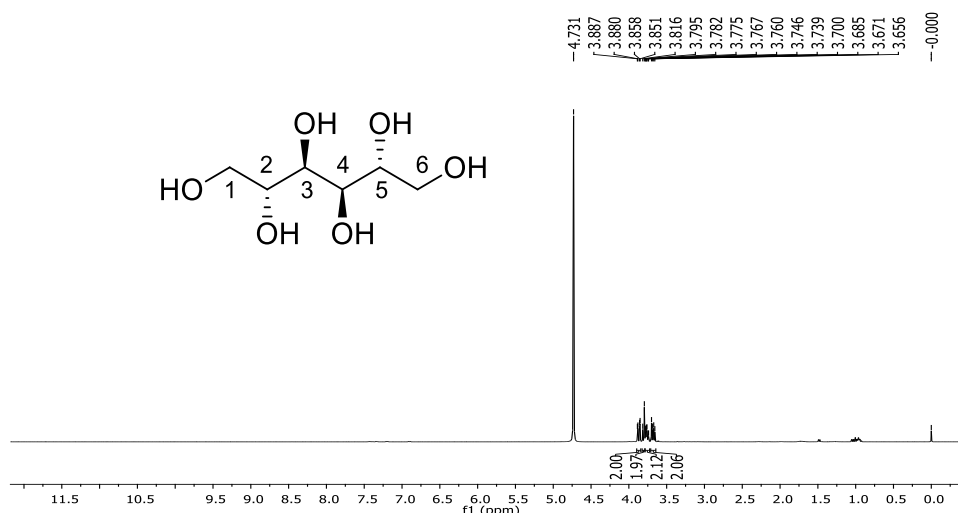


Figura 58. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) do composto **GO-1**.

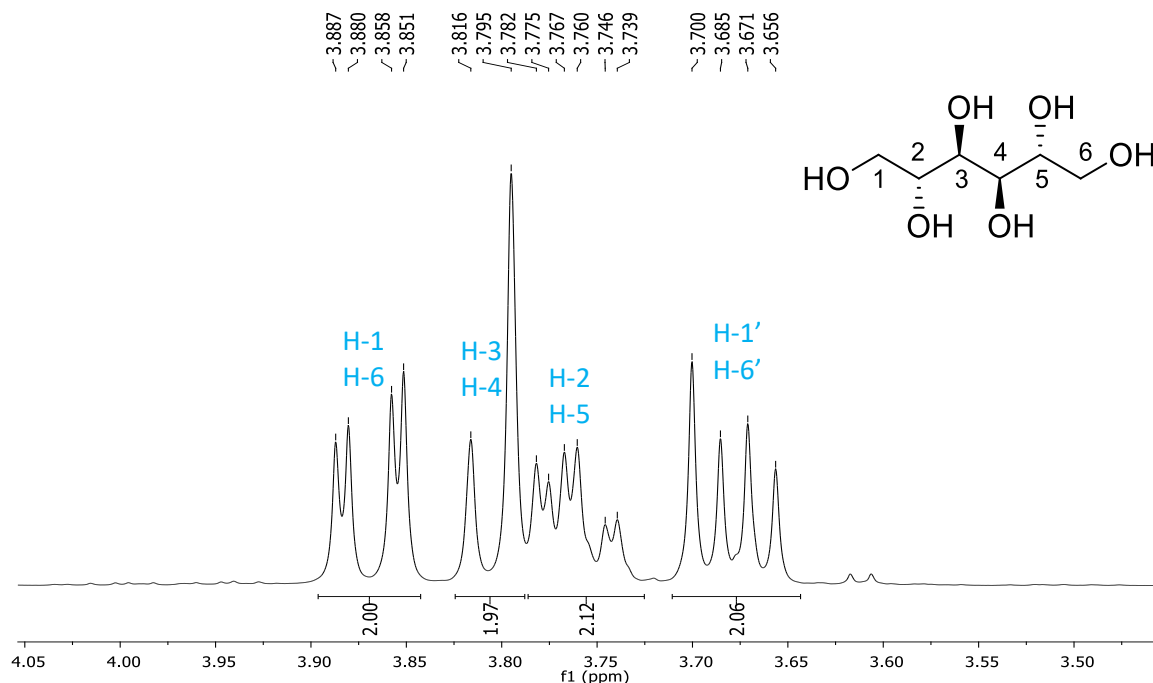


Figura 59. Espectro de RMN de ^1H (D_2O , 400 MHz) do composto **GO-1** (expansão).

O espectro de RMN de ^{13}C e o subespectro DEPT-135 (Figura 60) apresentaram três sinais apenas, em δ_{C} 70,9; 69,4 e 63,3 ppm, referentes a dois átomos de carbono metínicos e um metilênico. O número de sinais nestes espectros, aliado aos sinais do espectro de RMN de ^1H levou à suposição de que tratava-se de um composto simétrico.

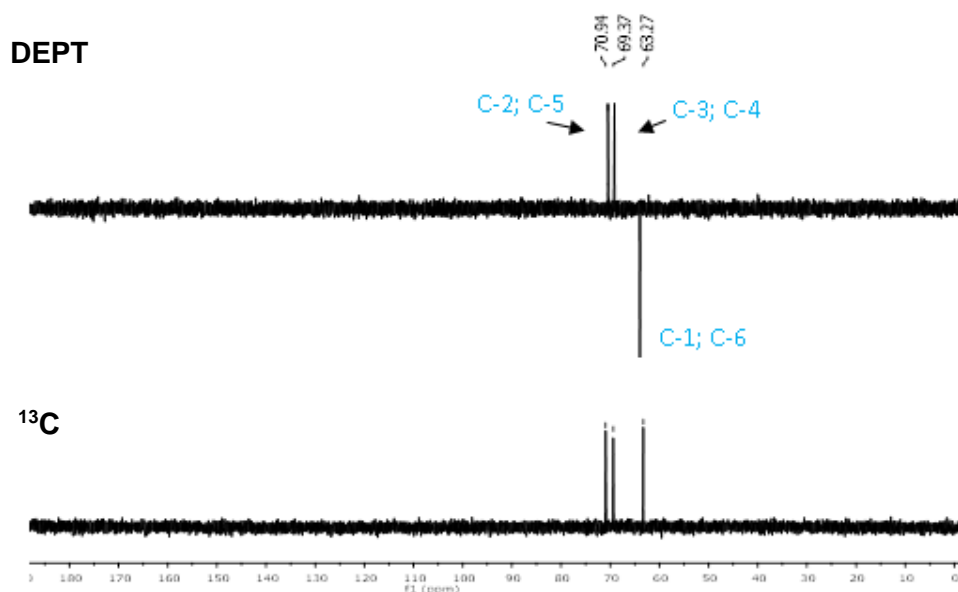


Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT-135 (D_2O , 100 MHz) do composto **GO-1**.

Com base nas correlações diretas ($^1J_{CH}$) observadas no mapa de contornos HSQC (Figuras 61-62) foi possível atribuir os sinais em δ_c 70,9; 69,4 e 63,3 ppm aos átomos de carbono C-2 e C-5, C-3 e C-4, C-1 e C-6, respectivamente.

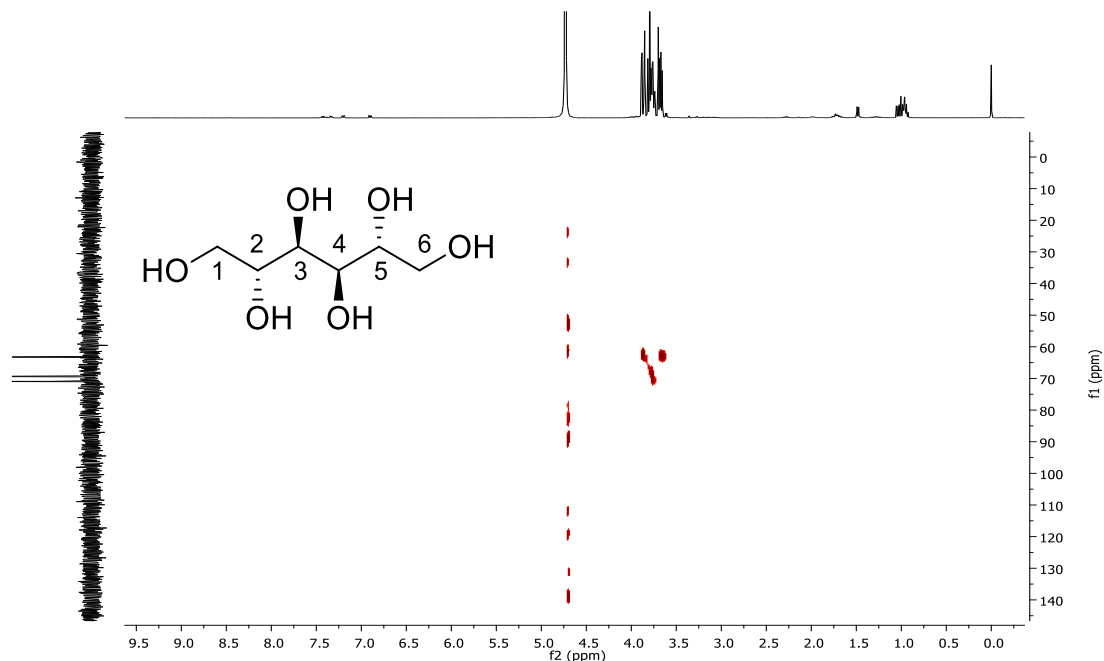


Figura 61. Mapa de contornos HSQC (D₂O, 400 MHz) do composto **GO-1**.

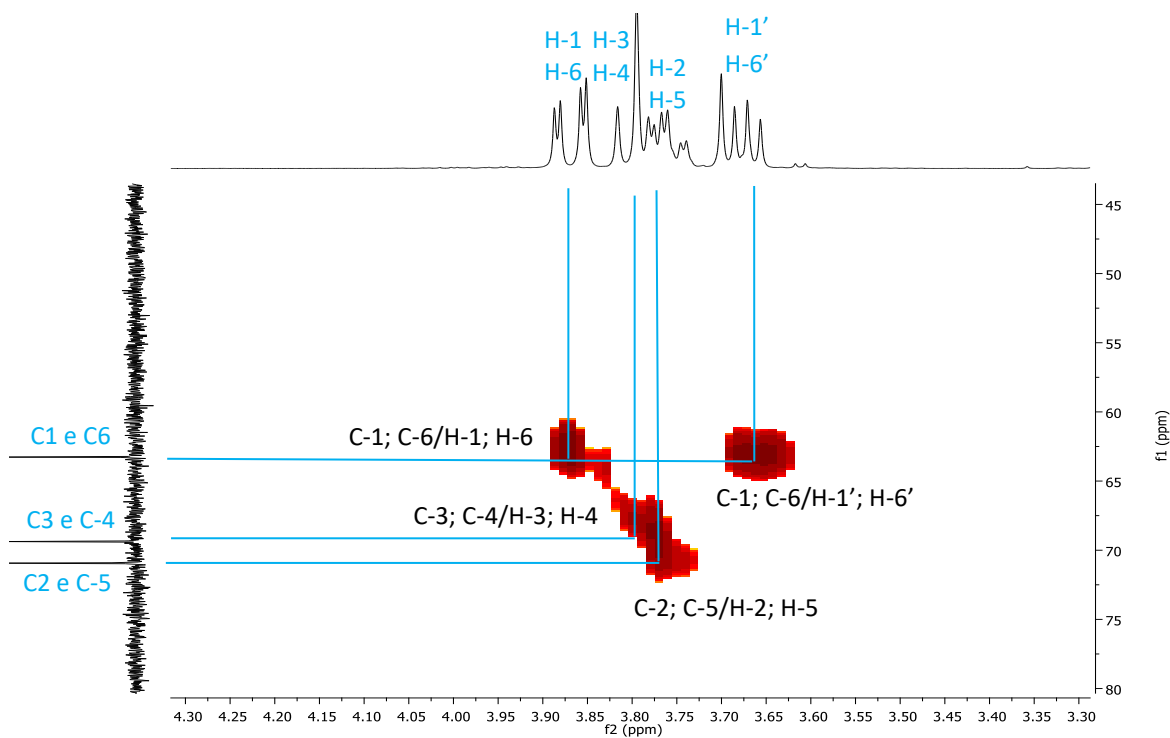


Figura 62. Mapa de contornos HSQC (D₂O, 400 MHz) do composto **GO-1** (expansão).

No espectro de massas de alta resolução (ESI modo positivo) do composto (Figura 63) observou-se o pico do íon molecular em m/z 205,0679 para a fórmula molecular $C_6H_{14}NaO_6 [M+Na]^+$ (calculado: 205,0683).

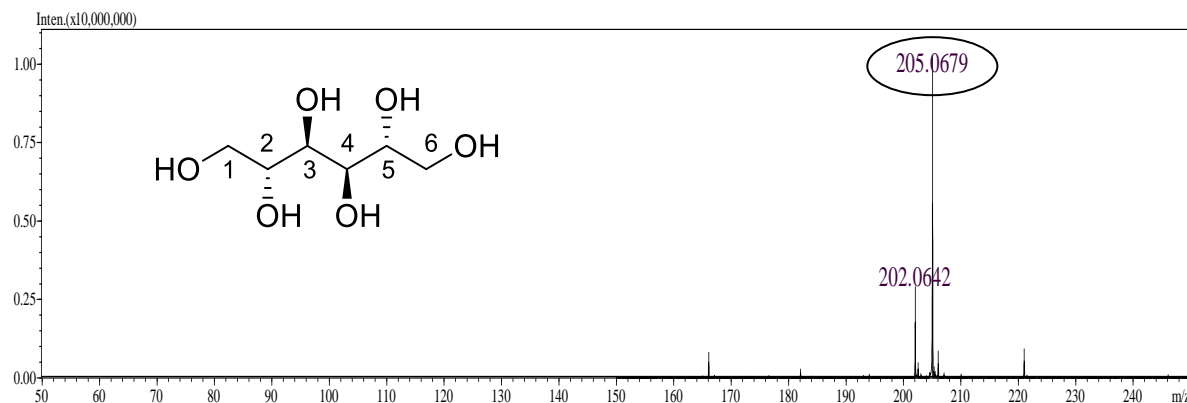


Figura 63. Espectro de massas (ESI modo positivo) do composto **GO-1**.

Com base nos dados obtidos, juntamente com os dados da literatura (SCHÜRMAN et al., 2010), foi possível identificar o composto **GO-1** como sendo o açúcar D-manitol (apêndice, pág 170). A estereoquímica do composto foi determinada com base na literatura. Os dados de RMN estão apresentados na Tabela 6, pág. 95.

O D-manitol foi identificado pela primeira vez no micélio de fungos em 1811 por Henri Braconnot, sendo este, geralmente, o mais abundante de todos os carboidratos solúveis dentro do micélio (SOLOMON et al., 2007). Trata-se de um poliálcool acíclico de seis carbonos, comumente produzido por fungos dos filos Basidiomicota e Ascomycota (RAMSTEDT et al., 1987). Existe relato de que esse carboidrato natural possua atividade anti-hipertensiva (FEOFILOVA, 2001). Este poliol ainda é apontado como fonte de carbono e energia (SOLOMON et al., 2007). Apresenta grande versatilidade como material de partida na síntese de ligantes e de diversas sínteses totais de produtos naturais complexos (OLIVEIRA et al., 2009).

Tabela 6. Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, D₂O) do composto **GO-1** comparado com dados da literatura (δ em ppm)

C	¹ H x ¹³ C – HSQC (GO-1)		* $\delta^{13}\text{C}$ (125 MHz, D ₂ O,)
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m, J (Hz))	
1 e 6	63,3	3,87 (dd, J= 2,2; 11,6 Hz; H-1 e H-6) 3,68 (dd, J= 6,0; 11,6 Hz, H-1' e H-6')	63,6
2 e 5	70,9	3,78-3,74 (m, H-2 e H-5)	71,2
3 e 4	69,4	3,81 (d, J= 8,4 Hz; H-3 e H-4)	69,6

*HAGIWARA et al., 2005

5.8.2 Caracterização estrutural do composto GO-2

O composto **GO-2** (Figura 55, pág. 90) foi obtido como um sólido de coloração branca, solúvel em clorofórmio e com faixa de fusão 230-232 °C (Lit. 242-244 °C; ALI et al., 1988). O espectro no infravermelho (Figura 64) deste composto apresentou bandas de absorção em 1654 cm⁻¹, referente a estiramento de ligação C=O de grupo carbonila de amida, além de banda em torno de 3477 cm⁻¹, referente a estiramento de ligação N-H (PAVIA et al., 2010).

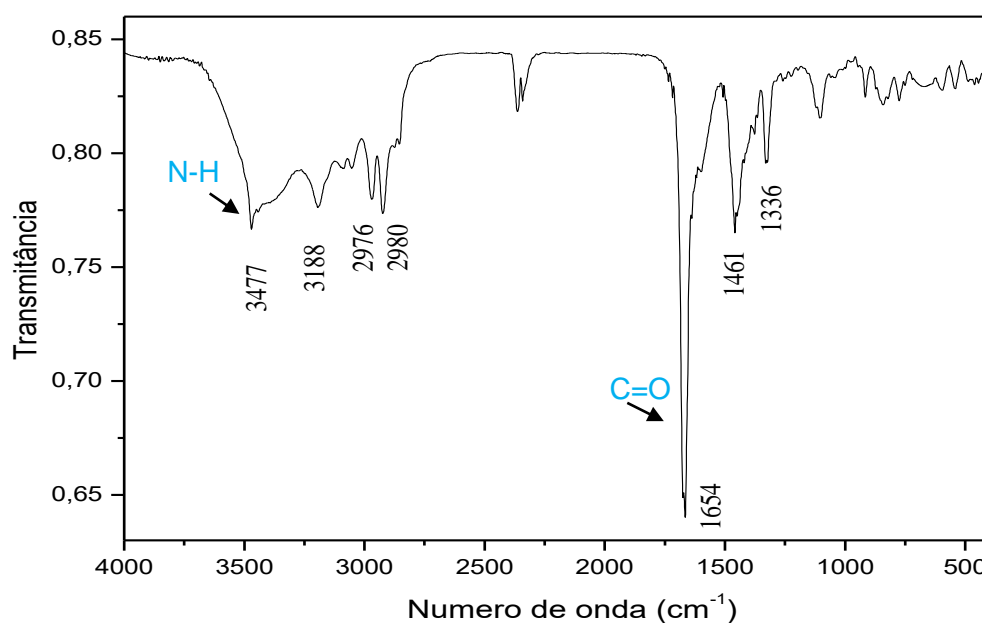


Figura 64. Espectro no infravermelho (em pastilha de KBr) do composto **GO-2**.

As análise dos dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Figuras 65, 66 e 67, pág. 96-97), RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Figura 68, pág. 98), subespectro DEPT-135 (Figura 69, pág. 98) e HSQC (Figuras 70-71, pág. 99) indicaram a presença de sete grupos metila, quatro metilênicos, sete metínicos, onze átomos de carbono quaternários, quatorze olefínicos/aromáticos (sendo seis hidrogenados) e dois átomos de carbono de grupos carboxila de amida (ZOU et al., 2014). Estes dados, juntamente com sinais de três átomos de hidrogênio ligados a nitrogênio, representaram todos os sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C para **GO-2** e são consistentes com a fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_2$. No espectro de RMN de ^1H foi observado um conjunto de sinais integrando para trinta e nove átomos de hidrogênio. Destes, nove são simpletos: um em δ_{H} 8,04 ppm, referente a hidrogênio de amina; dois em δ_{H} 6,47 e δ_{H} 5,68 ppm, referentes a hidrogênio de amida; dois na região de hidrogênio aromático, em δ_{H} 7,14 e 6,80 ppm, indicando a presença de um anel aromático tetrassubstituído na estrutura; quatro na região de hidrogênio alifático, em δ_{H} 1,86 (integral para 6H), em 1,81 (integral para 3H), em δ_{H} 1,74 (integral para 3H) e em δ_{H} 1,51 (integral para 6H), referentes aos grupos metílicos. Foram observados cinco dupletos: em δ_{H} 5,19 ($J=17,5$ Hz); em δ_{H} 5,18 ($J=10,7$ Hz); em δ_{H} 3,39 ($J=7,2$ Hz); em δ_{H} 3,53 ($J=7,5$ Hz) e em δ_{H} 1,54 ($J=7,0$ Hz). Dois tripletos, em δ_{H} 5,42 ($J=7,5$ Hz) e em δ_{H} 5,36 ($J=7,2$ Hz). Um quarteto em δ_{H} 4,09 ($J=7,0$ Hz). Por fim, quatro dupletos duplos, em δ_{H} 3,66 ($J=3,4; 14,6$ Hz), em δ_{H} 3,18 ($J=11,5; 14,6$ Hz), em δ_{H} 4,40 ($J=3,4; 11,5$ Hz) e em δ_{H} 6,10 ($J=10,7; 17,5$ Hz).

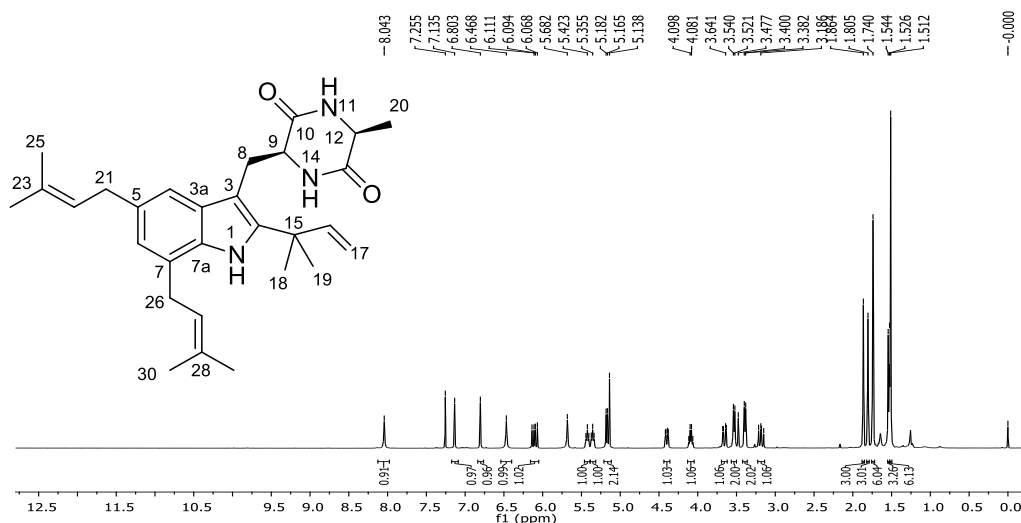


Figura 65. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **GO-2**.

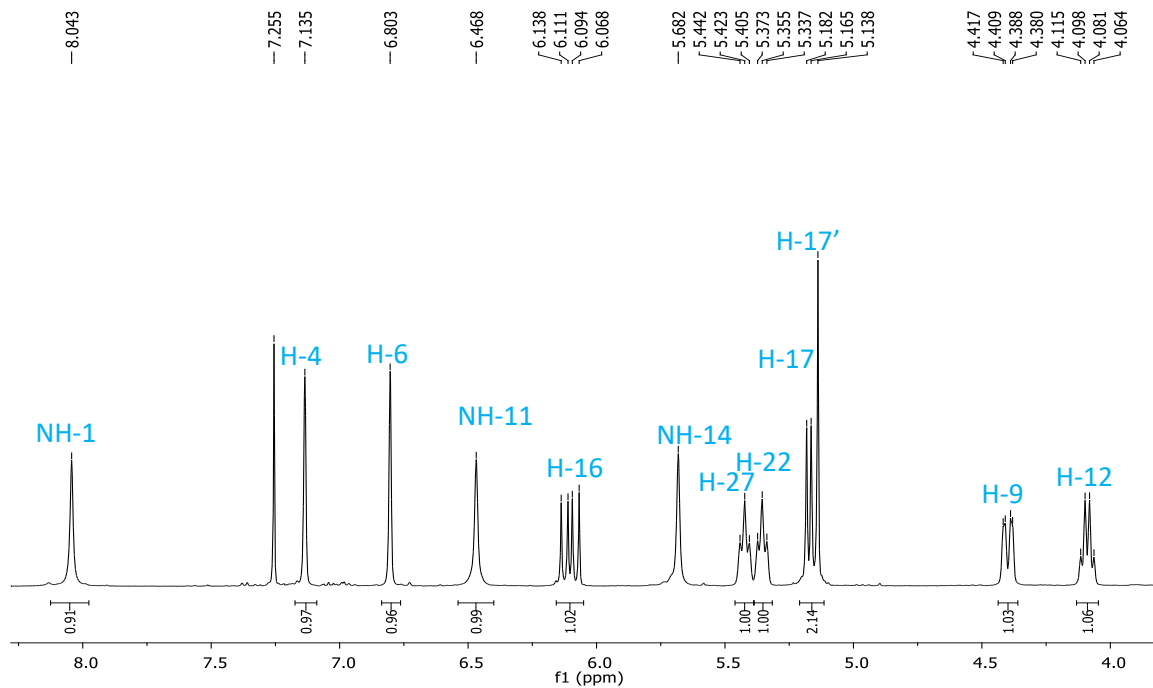


Figura 66. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **GO-2** (expansão).

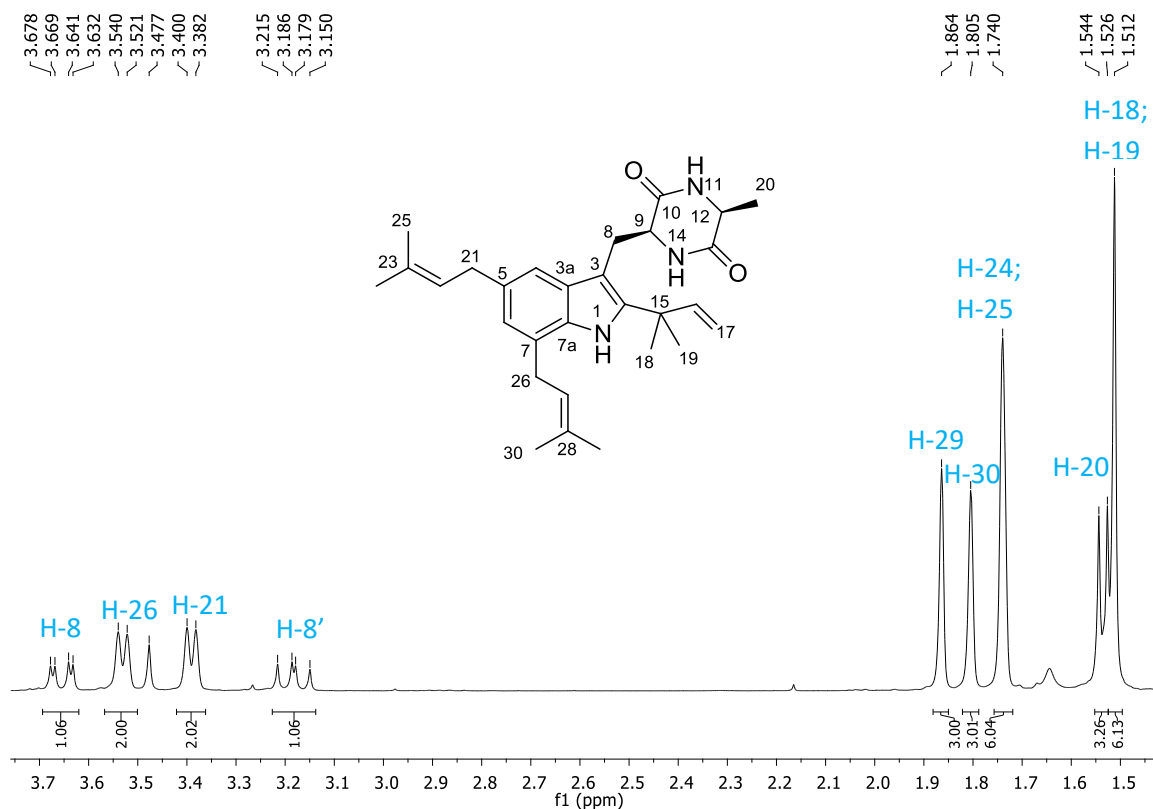


Figura 67. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **GO-2** (expansão).

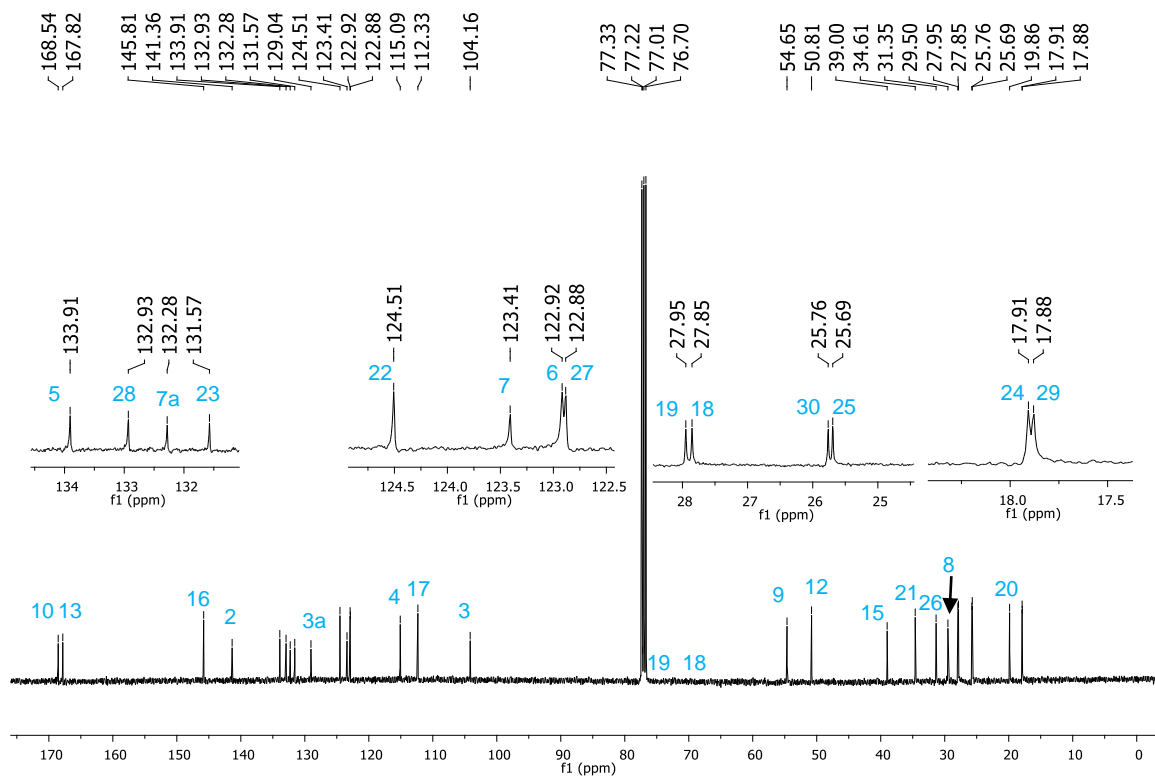


Figura 68. Espectro de RMN de ^{13}C e expansões (CDCl_3 , 100 MHz) do composto GO-2.

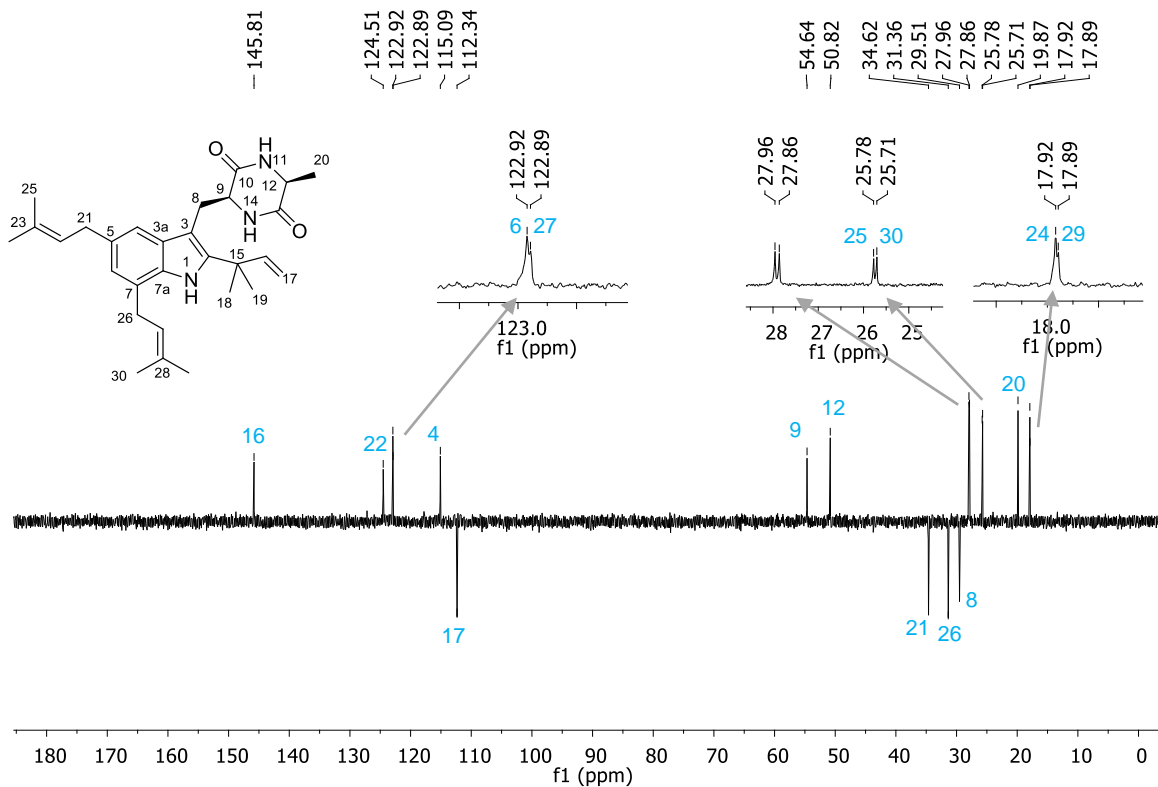


Figura 69. Subespectro DEPT-135 e expansões (CDCl_3 , 100 MHz) do composto GO-2.

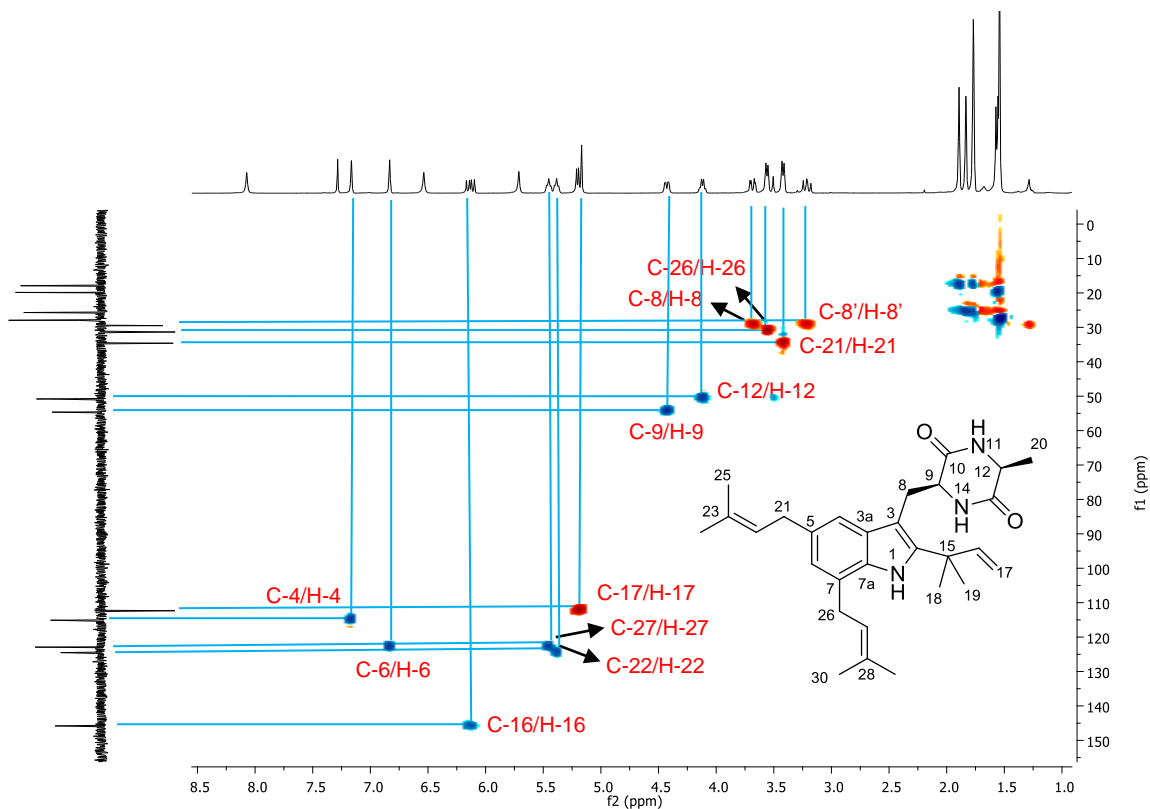


Figura 70. Mapa de contornos HSQC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-2**.

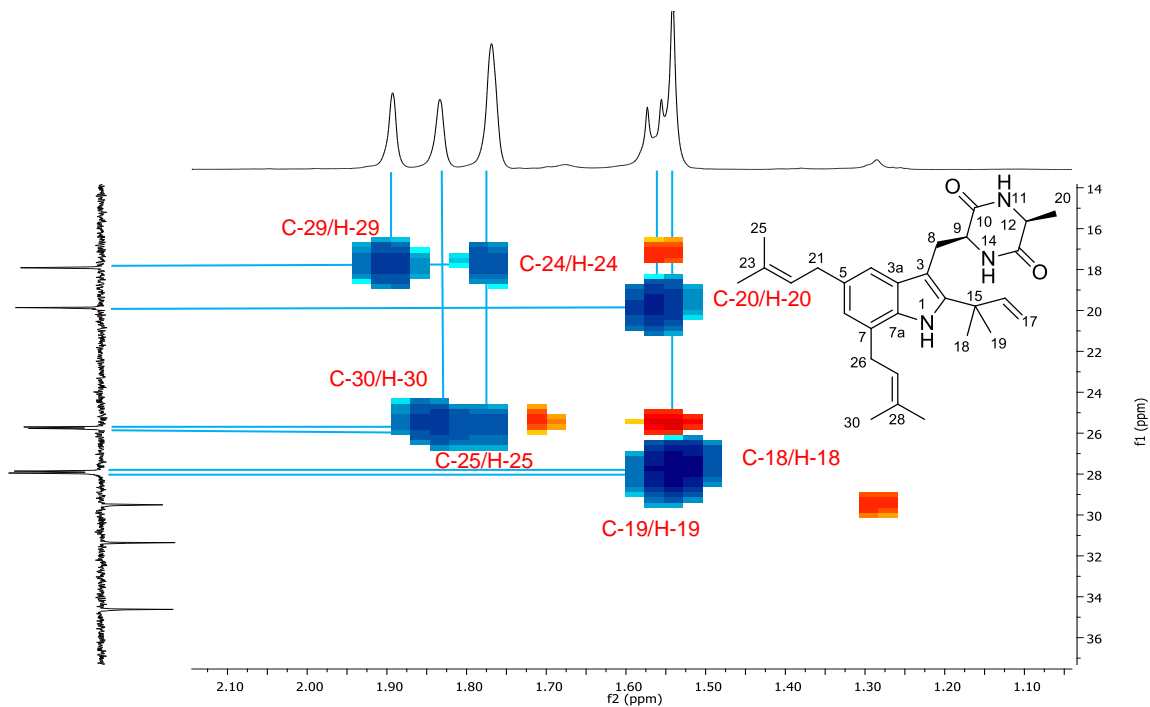


Figura 71. Mapa de contornos HSQC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-2** (expansão).

As interpretações do mapa de contornos COSY ^1H - ^1H (Figura 72) permitiram identificar os átomos de hidrogênio que acoplam entre si e, conseqüentemente, fragmentos da estrutura de **GO-2**.

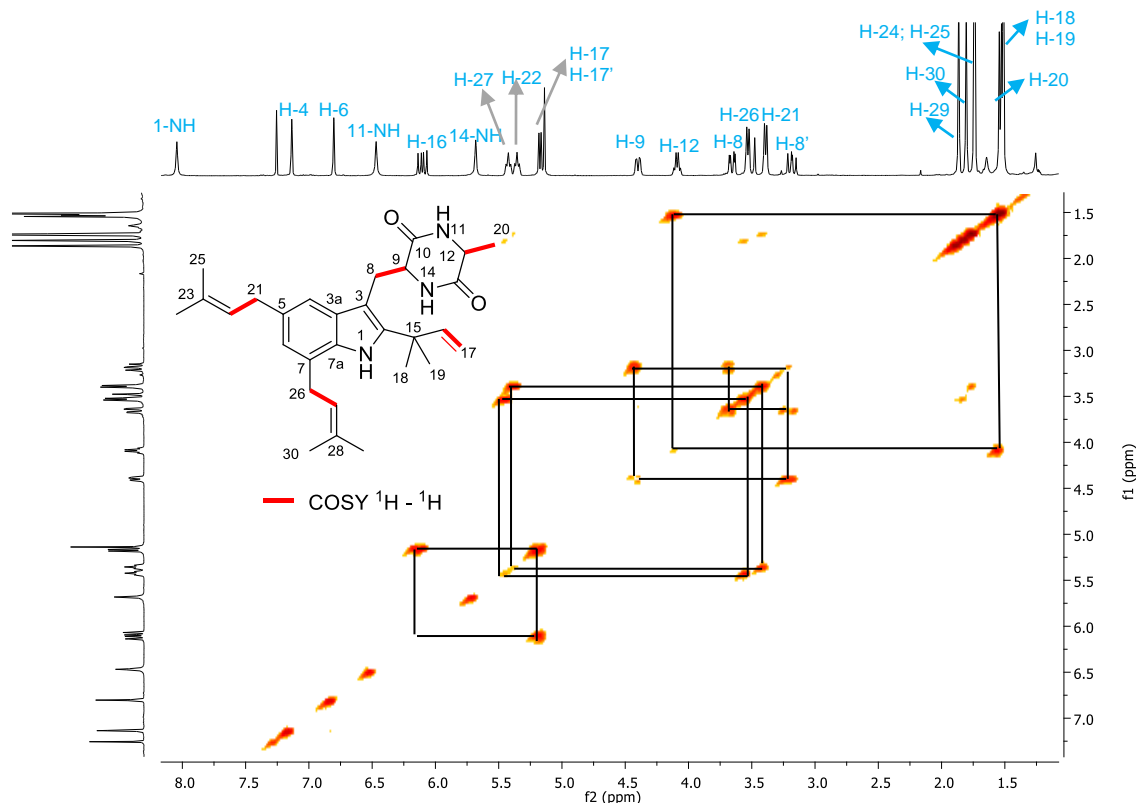


Figura 72. Mapa de contornos COSY (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **GO-2**.

As correlações estabelecidas no mapa de contornos HMBC (Figuras 73-74, pág. 101-102), em destaque na estrutura, de H-24 e H-25 com C-22 e C-23, H-29 e H-30 com C-27 e C-28, estabeleceram as duas subunidades prenila do composto (ZOU et al., 2014). A porção indol tetrassubstituída de **GO-2** foi deduzida pelas correlações estabelecidas no HMBC de H-4 com C-3, C-6, C-7a e C-21; de H-6 com C-4, C-7a, C-21 e C-26 e de NH-1 com C-2, C-3 e C-3a. As correlações de H-18 e H-19 com C-15 e C-16, H-17 com C-15 e C-16 e de H-16 com C-15, C-18 e C-19 completaram o fragmento composto pelos carbonos C-15 a C-19 da estrutura. As correlações de H-18 e H-19 com C-2 indicaram que este fragmento está ligado a C-2 através de C-15. As correlações de H-21 com C-4, C-5 e C-6, de H-26 com C-6 e C-7a indicaram que C-21 e C-26 estão ligados a C-5 e C-7, respectivamente. Com base na análise descrita acima e nas

correspondentes correlações COSY ^1H - ^1H foi estabelecida a subestrutura de indol prenilado. Os dados de RMN característico de dois grupos carboxila de amida (δ_c 168,5 e δ_c 167,8) e dois metínicos (δ_c 54,6 e δ_c 50,8) sugeriram a presença de um anel dicetopiperazina (ZOU et al., 2014) na estrutura de **GO-2**. A existência desse sistema foi corroborada pelas correlações de H-9 com C-10, NH-11 com C-9 e C-13, H-12 com C-13 e C-20 e de NH-14 com C-10 e C-12 estabelecidas no HMBC. As correlações de H-8 e H-8' com C-3 e C-9 no HMBC revelaram a ligação do núcleo indol prenilado com a parte de dicetopiperazina através da ponte metilênica. No espectro de massas de alta resolução (ESI modo positivo) (Figura 75, pág. 103) observou-se pico do íon molecular em m/z 462,3039 para a fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculado: 462,3121). Com base nos dados obtidos, bem como nos dados da literatura (ZOU et al., 2014), o composto **GO-2** foi identificado como sendo um alcaloide indólico dicetopiperazina prenilado conhecido como echinulina (apêndice, pág 170). Os dados espectroscópicos encontram-se listados na Tabela 7, pág. 104, comparando-se com os dados do composto cristatumina F (apêndice, pág. 170).

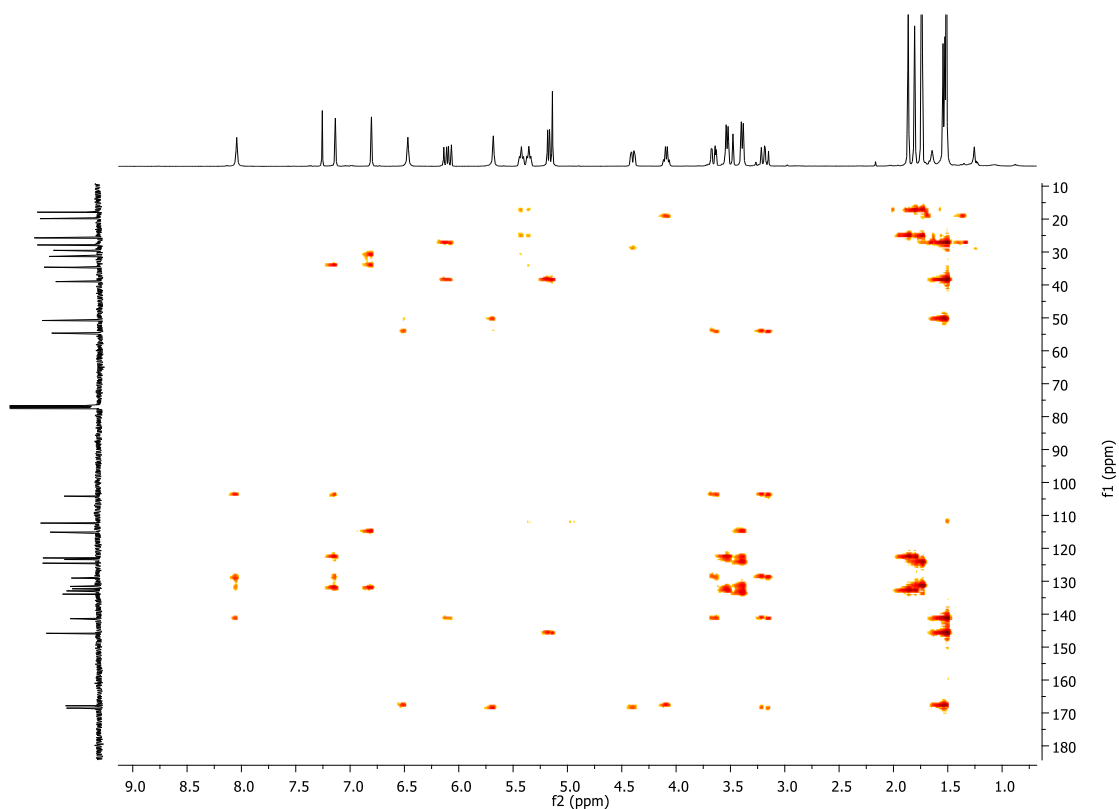


Figura 73. Mapa de contornos HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **GO-2**.

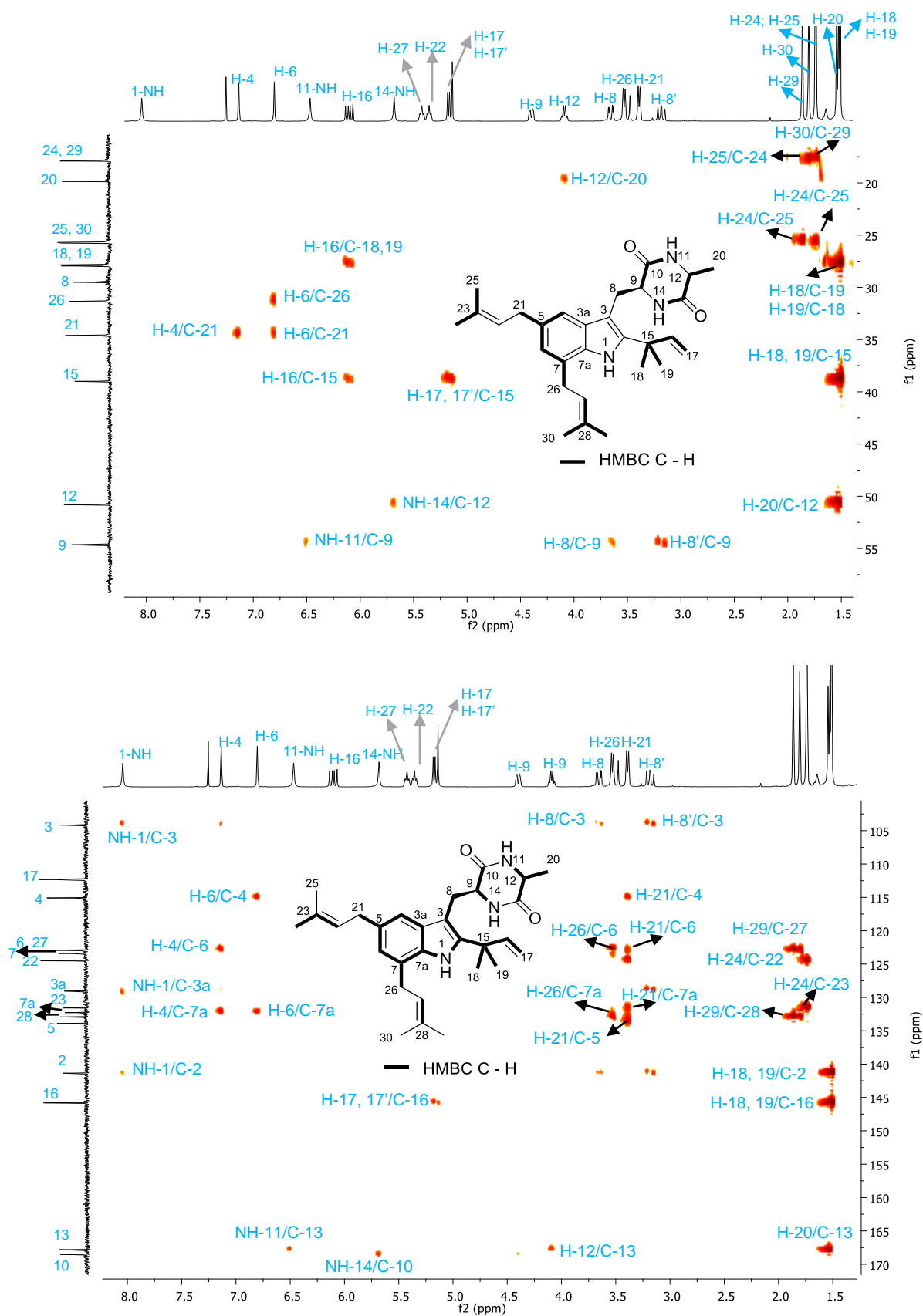


Figura 74. Mapas de contornos HMBC (CDCl₃) do composto GO-2 (expansões).

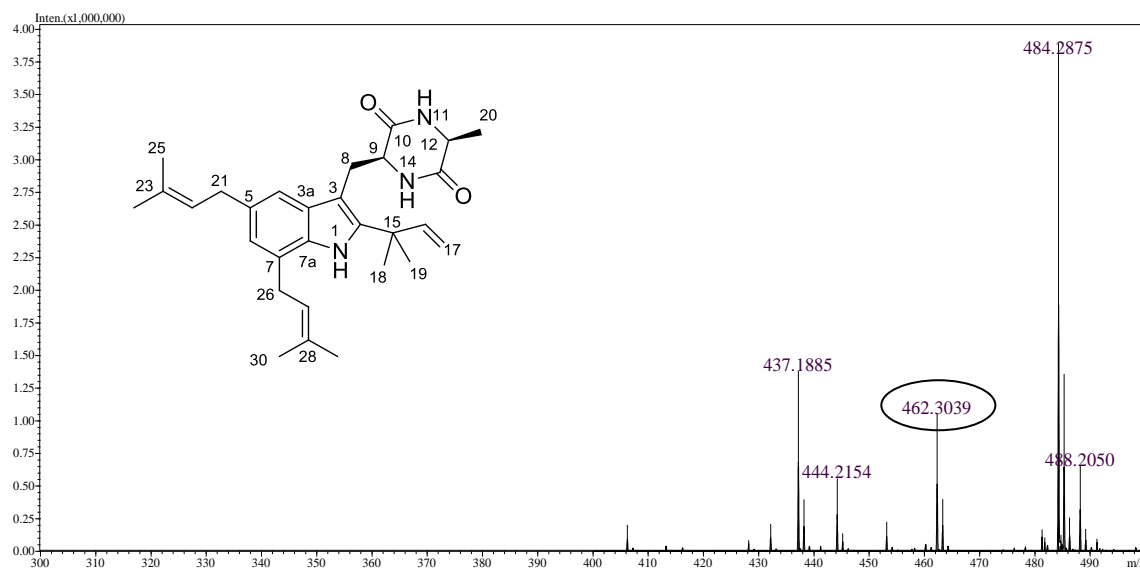


Figura 75. Espectro de massas (ESI modo positivo) do composto **GO-2**.

Alcaloides do tipo indólico dicetopiperazina prenilados são uma classe importante de compostos comumente produzidos por espécies fúngicas dos gêneros *Eurotium* e *Aspergillus*, tais como *Eurotium cristatum* (GOMES et al., 2012; ZOU et al., 2014), *Aspergillus varicolor* (WANG et al., 2007), *Aspergillus chevalieri* (ALI et al., 1989). Estes compostos contêm três tipos de unidades estruturais: indol (A), dicetopiperazina (B) e isoprenila (C), e geralmente são caracterizados pela cadeia isoprênica na posição C-2 do núcleo indol (Figura 76).

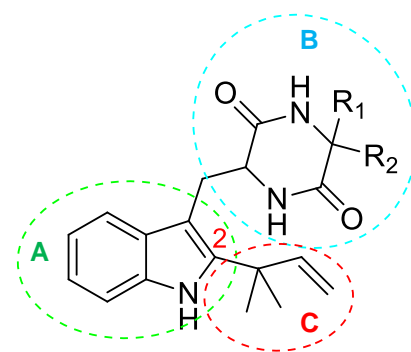


Figura 76. Estrutura base de alcaloide indólico dicetopiperazina prenilado. A: núcleo indólico, B: anel dicetopiperazina, C: cadeia isoprênica.

Este grupo de alcaloides é conhecido por apresentar uma variedade de atividades biológicas, incluindo imunossupressora (FUJIMOTO et al., 1999), antibacteriana (DU et al., 2012), antirradicalar (LI et al., 2004a), proteção UV-A (LI et al., 2004b) e citotóxica (ALI et al., 1989; YAN et al., 2012).

Tabela 7. Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl₃) do composto **GO-2**

¹ H - ¹³ C HSQC			¹ H - ¹³ C HMBC		* δ C Cristalina F (125 MHz, CDCl ₃)
C	δ C (ppm)	δ H (ppm) [m, J (Hz)]	² j	³ j	
1-NH		8,04 (s)			
2	141,4			H-18; H-19	141,5
3	104,2		H-8; H-8'	NH-1; H-4	103,8
3a	129,0				128,9
4	115,1	7,14 (s)		H-6; H-21	115,1
5	133,9		H-21		133,9
6	122,9	6,80 (s)		H-4; H-26; H-21	122,9
7	123,4				123,4
7a	132,3			H-4; H-6; H-26	132,2
8	29,5	3,66 (dd, J=3,4; 14,6) 3,18 (dd, J=11,5; 14,6)			29,7
9	54,7	4,40 (dd, J=3,4; 11,5)	H-8; H-8'	NH-11	53,6
10	168,5			NH-14	168,6
11-NH		6,47 (s)			
12	50,81	4,09 (q, J=7,0)	H-20	NH-14	-
13	167,8		H-12	NH-11; H-20	166,5
14-NH		5,68 (s)			
15	39,0		H-16	H-17; H-17'	39,0
16	145,8	6,10 (dd, J=10,7; 17,5)	H-18; H-19		145,8
17	112,3	5,18 (d, J=10,7) 5,19 (d, J=17,5)			112,2
18	27,9	1,51 (s)		H-16	27,8
19	27,9	1,51 (s)		H-16	27,7
20	19,9	1,54 (d, J=7,0)	H-12		-
21	34,6	3,39 (d, J=7,2)		H-6; H-4	34,6
22	124,5	5,36 (t, J=7,2)		H-24; H-25	124,5
23	131,6		H-24	H-25	131,6
24	17,9	1,74 (s)	H-25		17,9
25	25,8	1,74 (s)	H-24		25,8
26	31,4	3,53 (d, J=7,5)		H-6	31,4
27	122,9	5,42 (t, J=7,5)		H-29; H-30	122,9
28	132,9		H-29; H-30		132,9
29	17,9	1,86 (s)	H-30		17,9
30	25,7	1,81 (s)	H-29		25,7

* ZOU et al., 2014.

5.8.3 Caracterização estrutural do composto GO-3

O composto **GO-3** foi obtido como sólido amorfo de cor laranja solúvel em clorofórmio. O espectro de RMN de ^1H (Figura 77) apresentou oito sinais: dois dupletos em δ_{H} 6,69 ($J= 2,4$ Hz) e δ_{H} 7,38 ($J= 2,4$ Hz), ambos com integração para um átomo de hidrogênio; seis simpletos em δ_{H} 2,46 (integral para 3H), δ_{H} 3,94 (integral para 3H), δ_{H} 7,09 (integral para 1H), δ_{H} 7,63 (integral para 1H), δ_{H} 12,13 (integral para 1H) e δ_{H} 12,33 (integral para 1H), sendo os dois últimos característicos de hidrogênio de hidroxila quelado à carbonila.

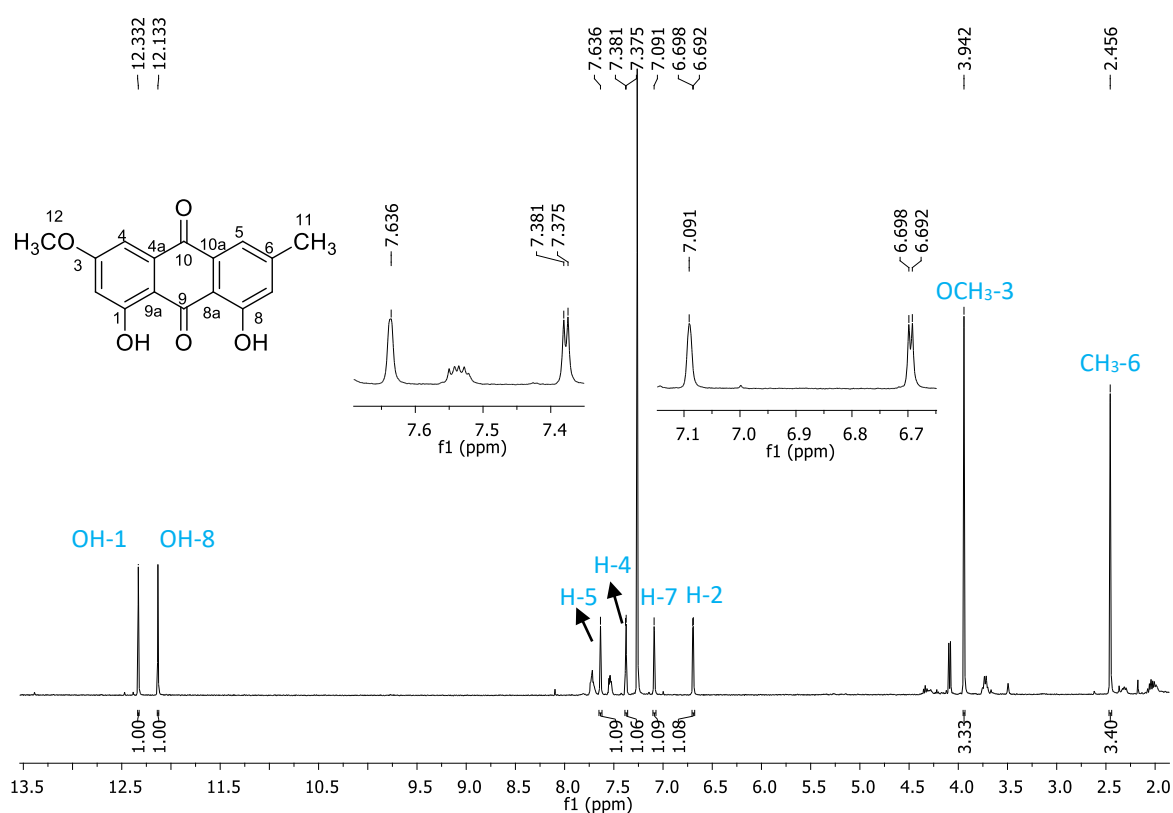


Figura 77. Espectro de RMN de ^1H e expansões (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **GO-3**.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais para dezesseis átomos de carbono e, em conjunto com o subespectro DEPT-135 (Figura 78, pág. 106), indicou sinais para dois átomos de carbono metílicos, quatro metínicos e dez para átomos de carbono não hidrogenados. Os sinais mais afastados do TMS no espectro, δ_{C} 190,9 e δ_{C} 182,1, foram atribuídos aos átomos de carbono carbonílicos. Os sinais em δ_{C} 106,8, δ_{C} 108,3, δ_{C} 121,3 e δ_{C} 124,5 foram atribuídos aos átomos de carbono metínicos dos anéis aromáticos. Os átomos de carbono

metílicos foram atribuídos aos sinais em δ_c 22,2, característico de metila ligada a anel aromático e δ_c 56,1, característico de metoxila ligada ao anel aromático.

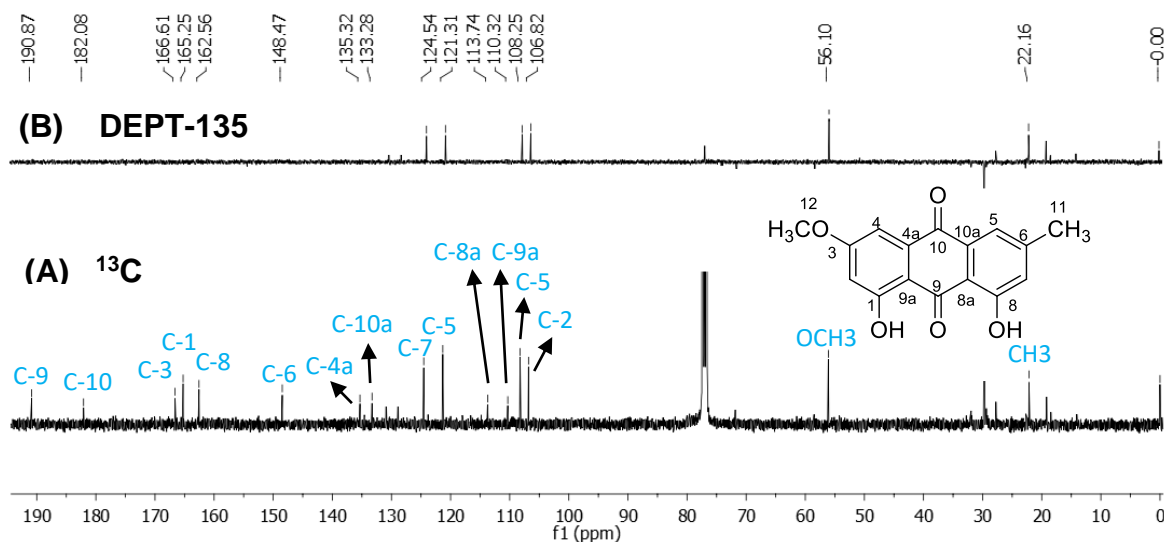


Figura 78. Espectro de RMN de ^{13}C (A) e subspectro DEPT-135 (B) (CDCl_3 , 100 MHz) do composto **GO-3**.

As correlações no mapa de contornos COSY (Figuras 79-80, pág. 106-107) possibilitou identificar acoplamentos *meta*.

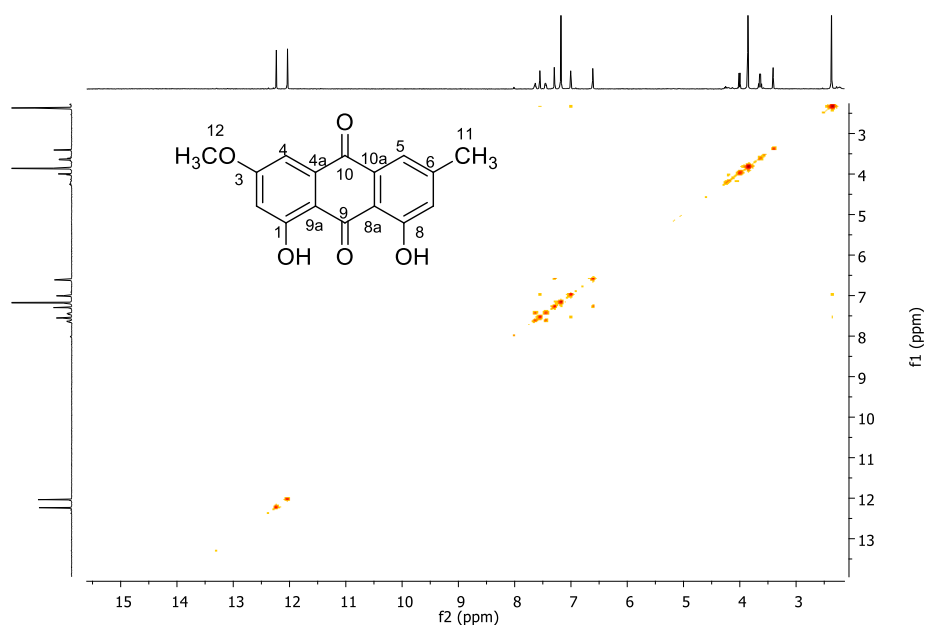


Figura 79. Mapa de contornos COSY (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **GO-3**.

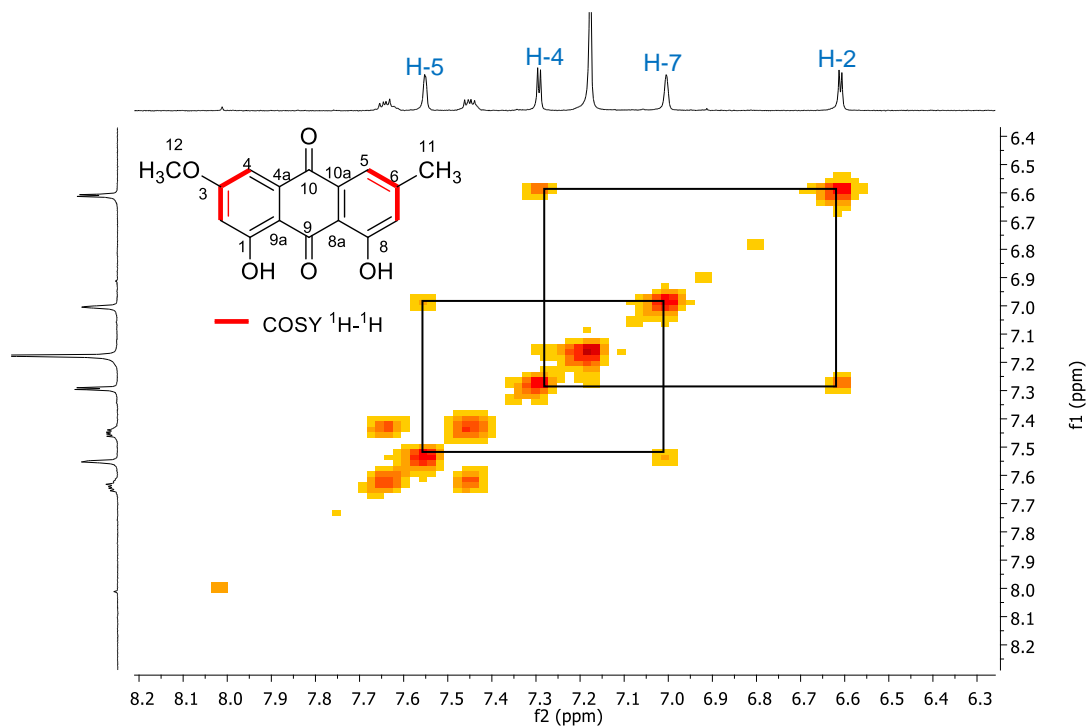


Figura 80. Mapa de contornos COSY (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-3** (expansão).

O mapa de contornos HSQC (Figuras 81) permitiu identificar as correlações diretas dos átomos de hidrogênio com os respectivos átomos de carbonos.

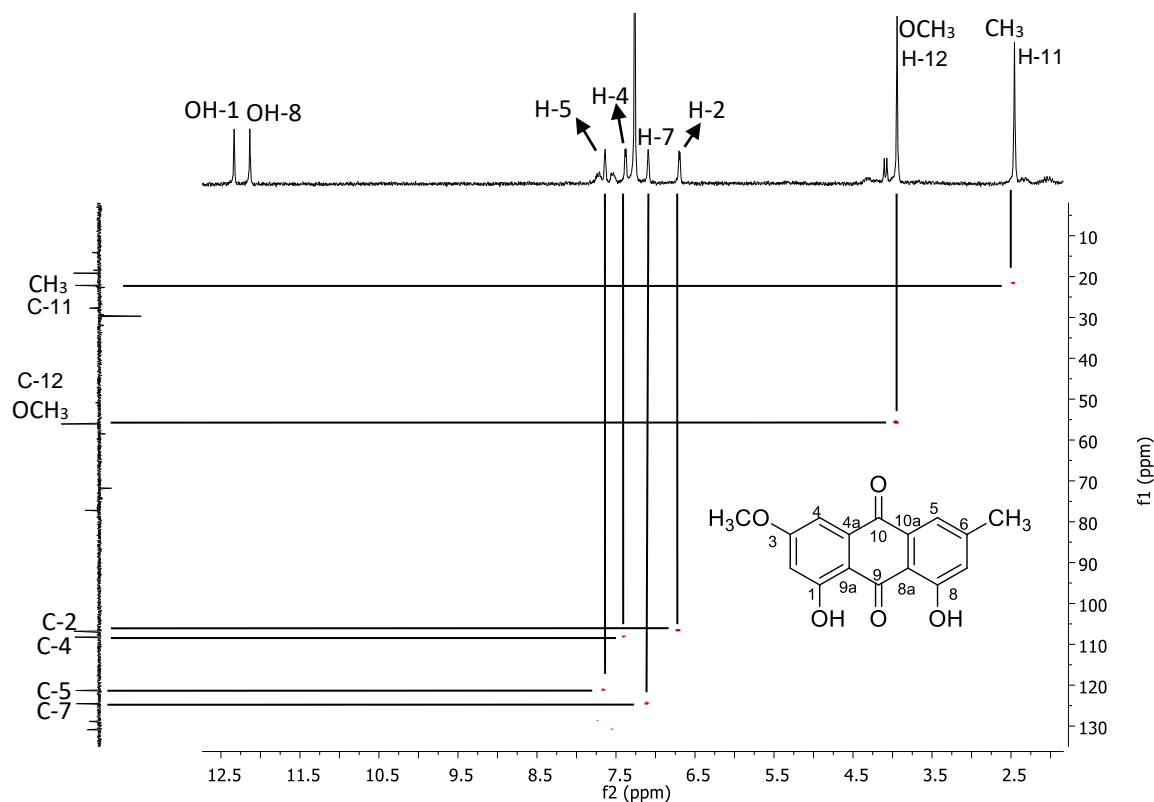


Figura 81. Mapa de contornos HSQC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-3**.

As correlações no mapa de contornos HMBC (Figura 82-85, pág. 108-109) de H-11 com C-5, C-6 e C-7 indicaram que a metila está ligada a C-6, enquanto que a correlação entre H-12 e C-2 indicou que o grupo metoxila está ligado a C-3.

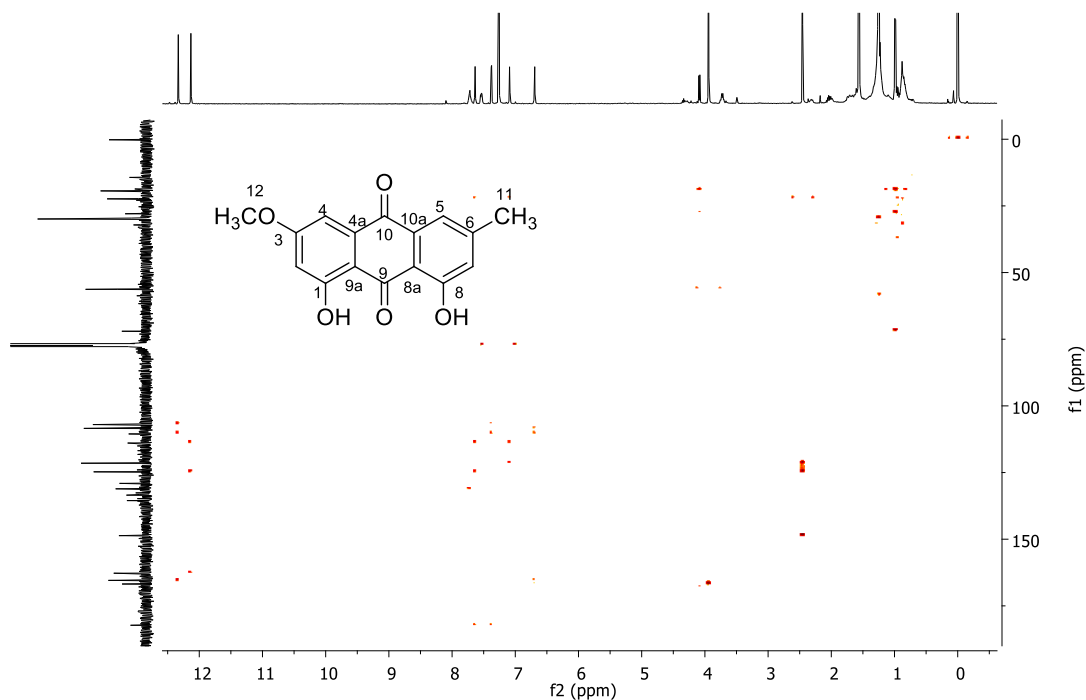


Figura 82. Mapa de contornos HMBC (CDCl_3) do composto **GO-3**.

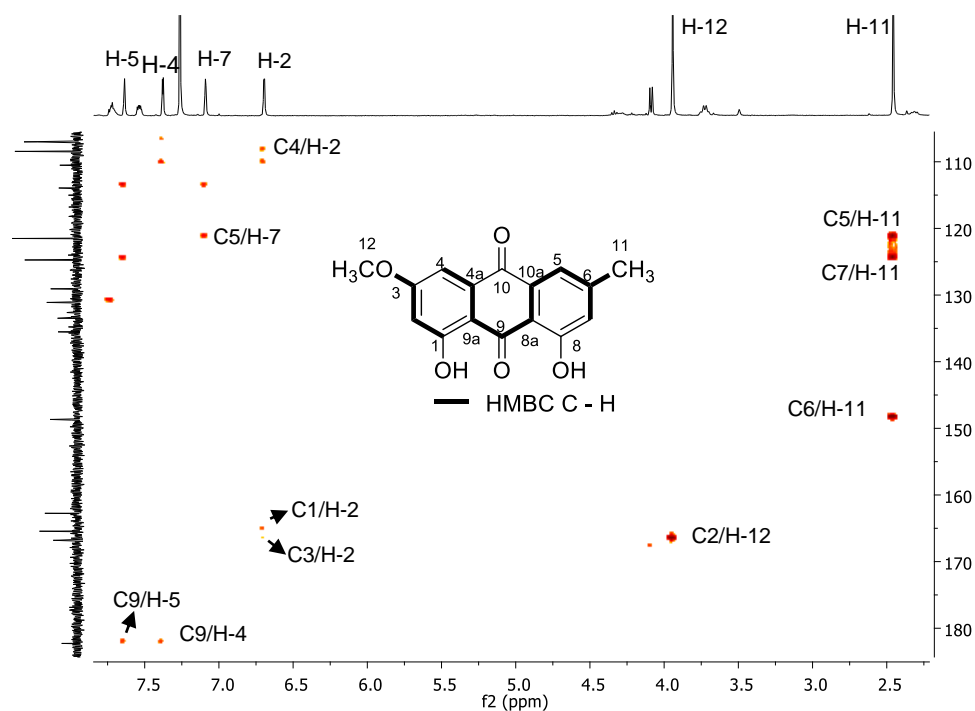


Figura 83. Mapa de contornos HMBC (CDCl_3) do composto **GO-3** (expansão).

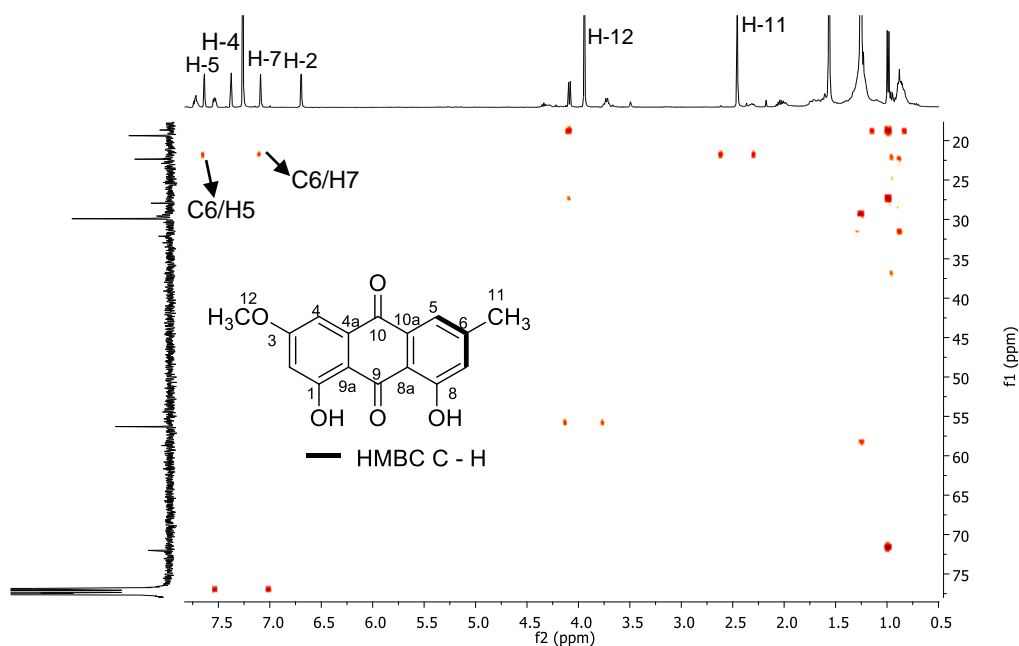


Figura 84. Mapa de contornos HMBC (CDCl_3) do composto **GO-3** (expansão).

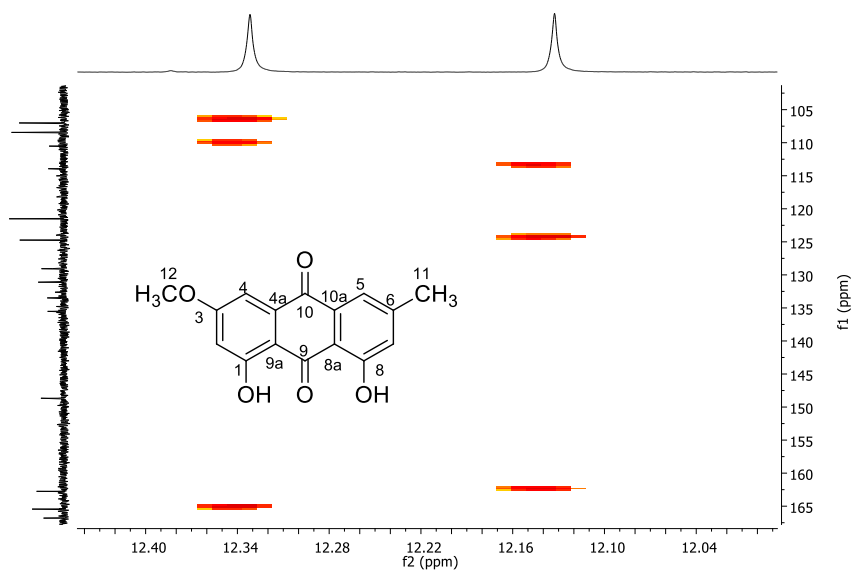


Figura 85. Mapa de contornos HMBC (CDCl_3) do composto **GO-3** (expansão).

Os dados de RMN aliados à espectrometria de massas, cujo espectro de massas de alta resolução (ESI modo positivo) (Figura 86, pág. 110) apresentou pico do íon molecular em m/z 285,0761, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculado: 285,0718) e, em conjunto com os dados da literatura, permitiram identificar o composto **GO-3** como sendo a antraquinona 9,10-antracenediona, 1,8-di-hidroxi-3-metoxi-6-metil, conhecida como fisciona

(apêndice, pág 170) (DANIELSEN et al., 1992). Os dados de RMN do composto estão apresentados na Tabela 8 (pág. 111).

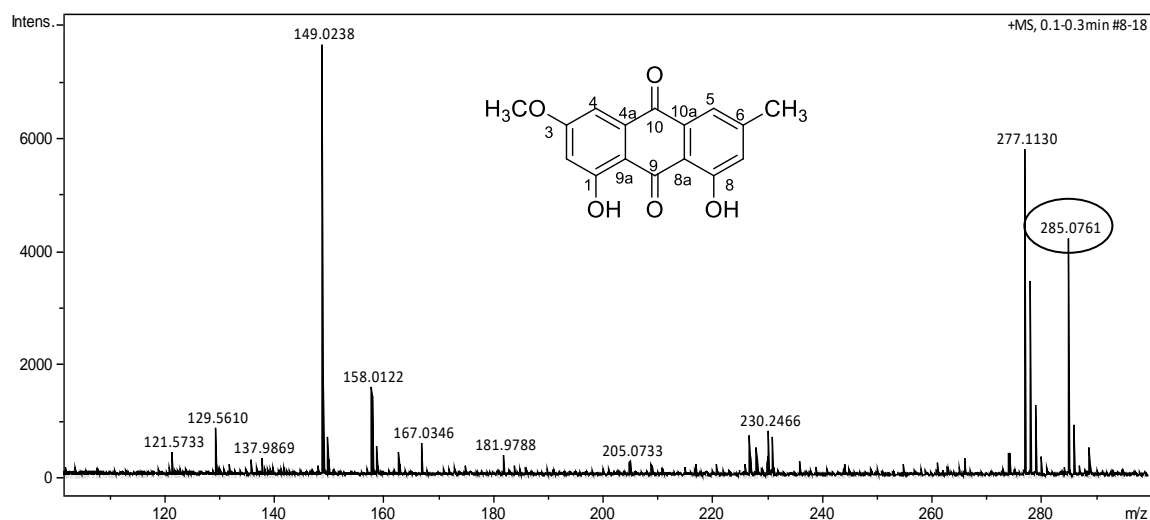


Figura 86. Espectro de massas (ESI modo positivo) do composto **GO-3**.

Fisciona é um derivado de antraquinona que ocorre naturalmente em muitos fungos e plantas. Antraquinonas apresentam propriedades biológicas úteis, incluindo atividades antineoplásica, anti-inflamatória, antiparasitária (GRIFFITHS et al., 2016). As estruturas químicas básicas das antraquinonas possuem dois grupos cetona adicionados às posições C9 e C10 (Figura 87).

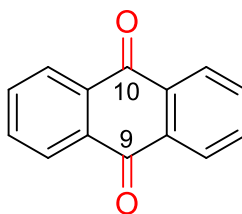


Figura 87. Estrutura base das antraquinonas.

A adição de um grupo funcional no anel aromático torna as antraquinonas eficazes contra certas doenças (YEN et al., 2000). A fisciona já foi isolada de espécies de planta como *Cassia tora* (ROHIT et al., 2016) e *Senna reticulata* (SANTOS et al., 2008) e de espécies fúngicas tais como *Microsporium sp.* (WIJESEKARA et al., 2014), *Eurotium chevalieri* (DUFOSSÉ et al., 2014) e *A. chevalieri* (BACHMANN et al., 1979). Foi relatado que esse composto apresenta uma série de atividades biológicas, incluindo hepatoprotetora (ZHAO et al., 2009), anti-inflamatória (GHOSH et al., 2010), antimicrobiana (TAMOKOU et al., 2009), além de induzir apoptose em células HeLa de carcinoma cervical humano

(WIJESEKARA et al., 2014). Fisciona, assim como outras antraquinonas, tem sido alvo de interesse industrial como pigmentos, produzidos a partir de algumas cepas de *Aspergillus* sp. (*A. glaucus*, *A. cristatus* e *A. repens*) (DUFOSSÉ et al., 2014).

Tabela 8. Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl₃) do composto **GO-3** comparado com dados da literatura (DANIELSEN et al., 1992)

C	¹ H - ¹³ C HSQC		¹ H - ¹³ C HMBC		* ^δ ¹³ C (400 MHz, CDCl ₃)
	^δ ¹³ C	^δ ¹ H (m, J em Hz)	² J	³ J	
1	165,3	-	OH-1; H-2		165,2
2	106,8	6,69 (d, J= 2,4)		OH-1	106,8
3	166,6	-	H-2	OCH ₃	166,6
4	108,3	7,38 (d, J= 2,4)		H-2	108,2
4a	135,3	-			135,3
5	121,3	7,63 (s)		H-7; H-11	121,3
6	148,5	-	H-11	CH ₃ -6	148,4
7	124,5	7,09 (s)		OH-8; H-5; CH ₃ -6	124,5
8	162,6	-	OH-8		162,5
8a	113,7	-		OH-8	113,7
9	190,9	-			190,8
9a	110,3	-		OH-1	110,3
10	182,1	-			182,05
10a	133,3	-			133,2
11	22,2	2,46 (s)		H-5; H-7	22,2
12	56,1	3,49 (s)			56,1
OH-1		12,33 (s)			
OH-8		12,13 (s)			

*DANIELSEN et al., 1992.

5.8.4 Caracterização estrutural do composto GO-4

O composto **GO-4** foi isolado como um sólido amarelo, solúvel em clorofórmio. O espectro no infravermelho (Figura 88) desse composto apresentou banda de absorção em 1629 cm^{-1} , típica de estiramento de ligação C=O de carbonila de aldeído conjugado. Observaram-se bandas em 3290 cm^{-1} , típica de estiramento de ligação O–H, em 2922 , referente a estiramento de ligação C–H e 2850 cm^{-1} , típica de estiramento C-H de aldeído. Em 1268 cm^{-1} foi possível observar banda intensa, referente ao estiramento de ligação C–O e em 1586 cm^{-1} , observou-se banda típica de estiramento de ligação C=C de anel aromático. Ainda foi possível identificar uma banda em 713 cm^{-1} , que indica a presença de uma cadeia de CH₂ na estrutura do composto (PAVIA et al., 2010).

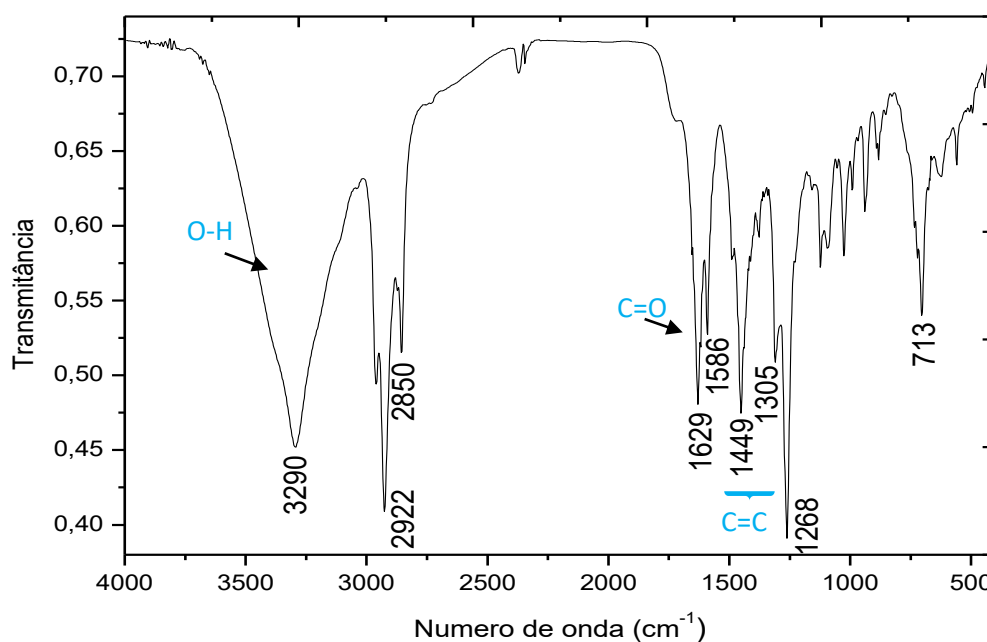


Figura 88. Espectro no infravermelho (em pastilha de KBr) do composto **GO-4**.

O espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) apresentou um conjunto de sinais referente a vinte e oito átomos de hidrogênio (Figura 89, pág. 113). Dentre estes, foi possível observar seis simpletos: em δ_{H} 10,27, indicando a presença de um hidrogênio de aldeído; em δ_{H} 6,91, indicando a presença de hidrogênio

aromático; em δ_H 11,94 e em δ_H 4,41, indicando a presença de hidroxila de fenol; em δ_H 1,78 e δ_H 1,72 ppm, referentes a dois grupos metila. Além desses sinais, observou-se a presença de um duplete em δ_H 3,33 ppm, com integração para dois átomos de hidrogênio, indicando a presença de átomos de hidrogênio metilênicos. Observou-se ainda um triplo em δ_H 2,91 ppm, com integração para dois átomos de hidrogênio, além de cinco multipletos, entre δ_H 0,89-0,92 ppm, com integração para três átomos de hidrogênio, indicando a presença de mais um grupo metila no composto, entre δ_H 1,28-1,33 ppm, com integral para oito átomos de hidrogênio, indicando a presença de quatro grupos metilênicos, e por fim, entre δ_H 1,59-1,62 ppm, com integral para dois átomos hidrogênio, referente a mais um grupo metilênico na estrutura do composto.

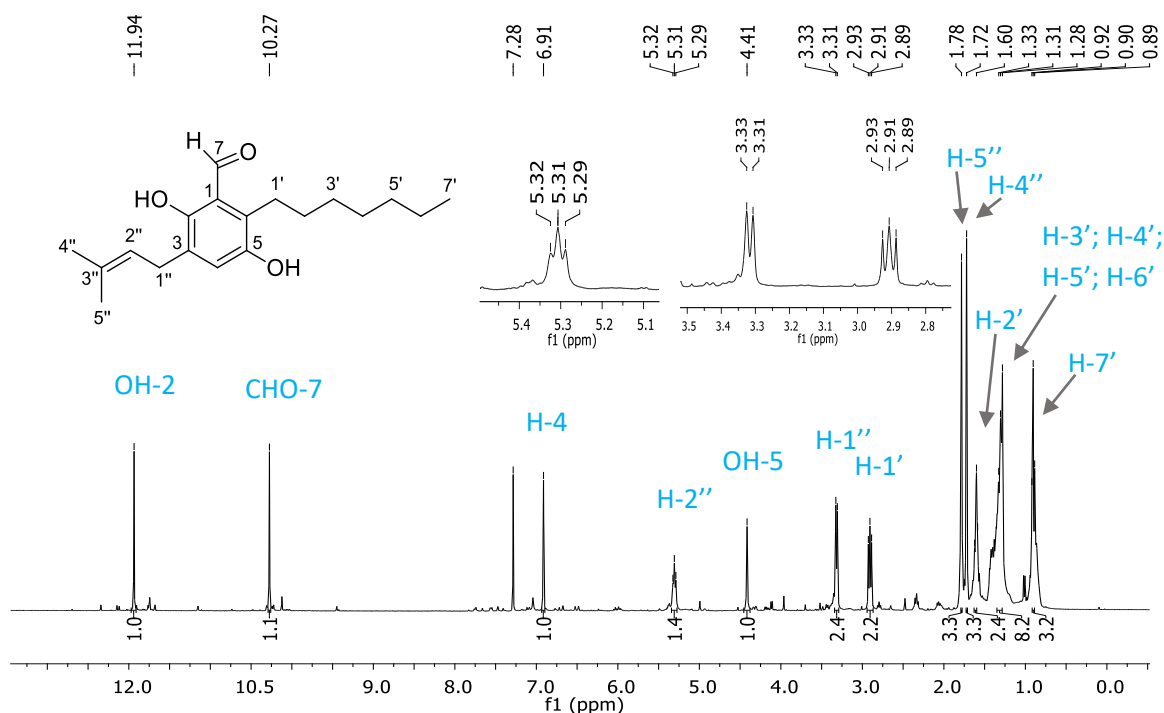


Figura 89. Espectro de RMN de ^1H e expansões (CDCl_3 , 400 MHz) do composto GO-4.

O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto apresentou sinais para dezenove átomos de carbono (Figuras 90-92, pág. 114), dentre os quais, um carbonílico, dois metínicos, sete metilênicos e três metílicos. O subspectro DEPT-135 (Figura 93, pág. 115) apresentou sinais para átomos de carbono metílicos, metilênicos e metínicos. Os seis sinais não observados no subspectro DEPT-135 evidenciou a presença de seis átomos de carbono não hidrogenados no composto.

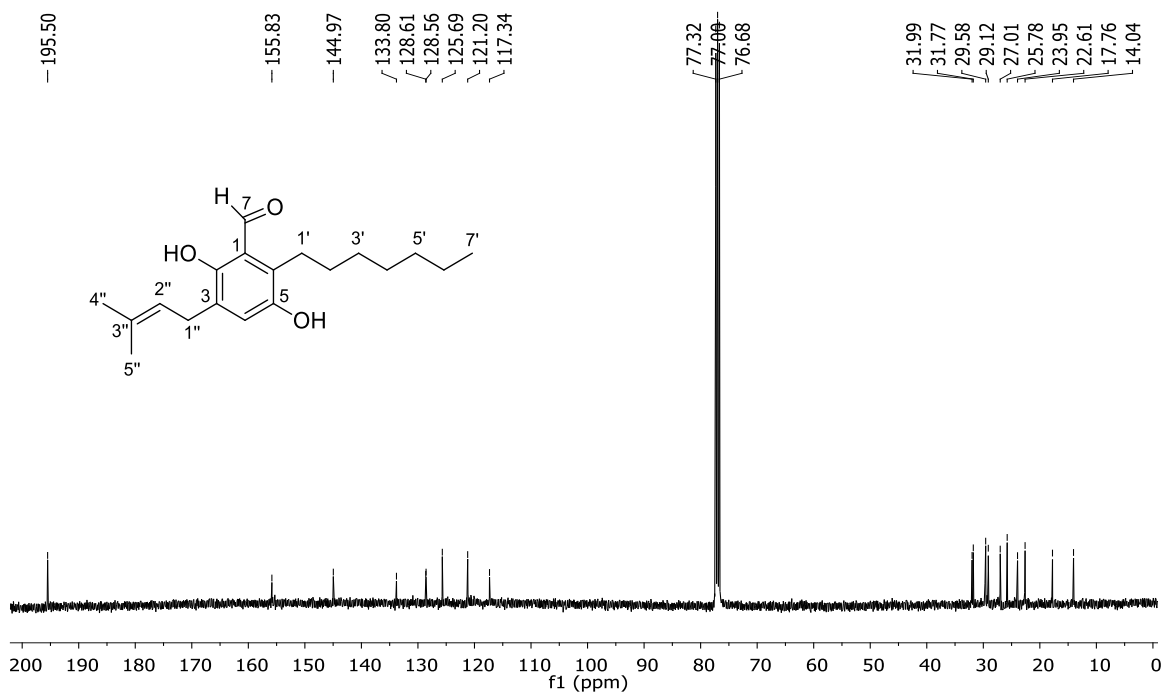


Figura 90. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto **GO-4**.

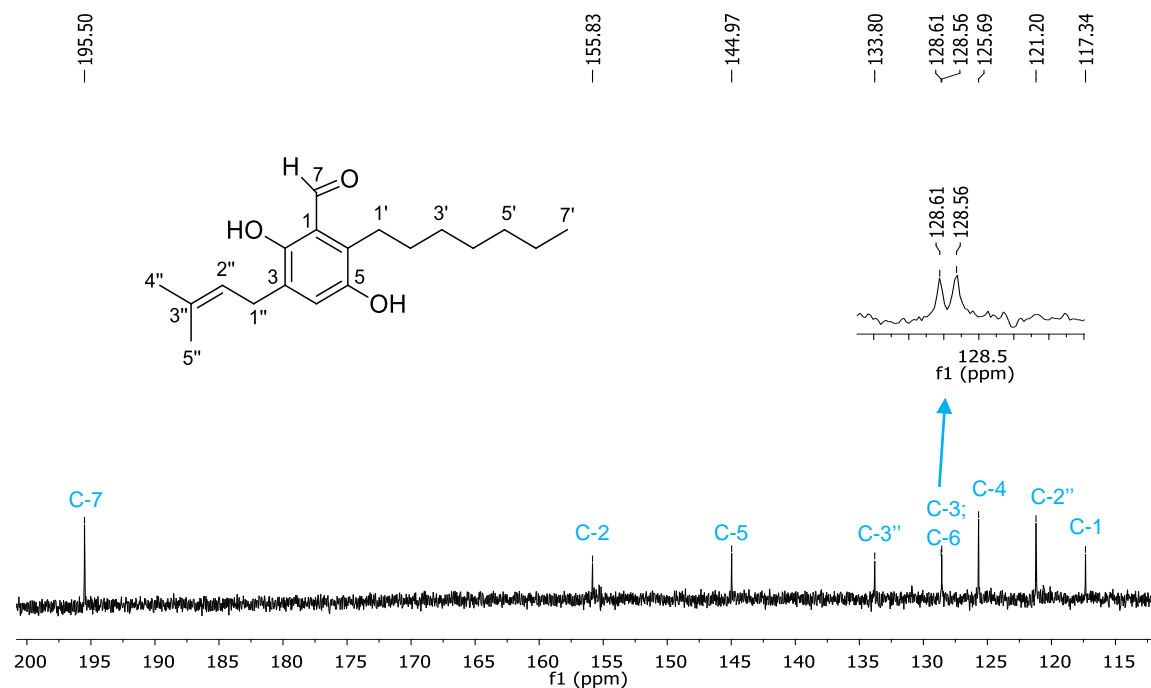


Figura 91. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto **GO-4** (expansão).

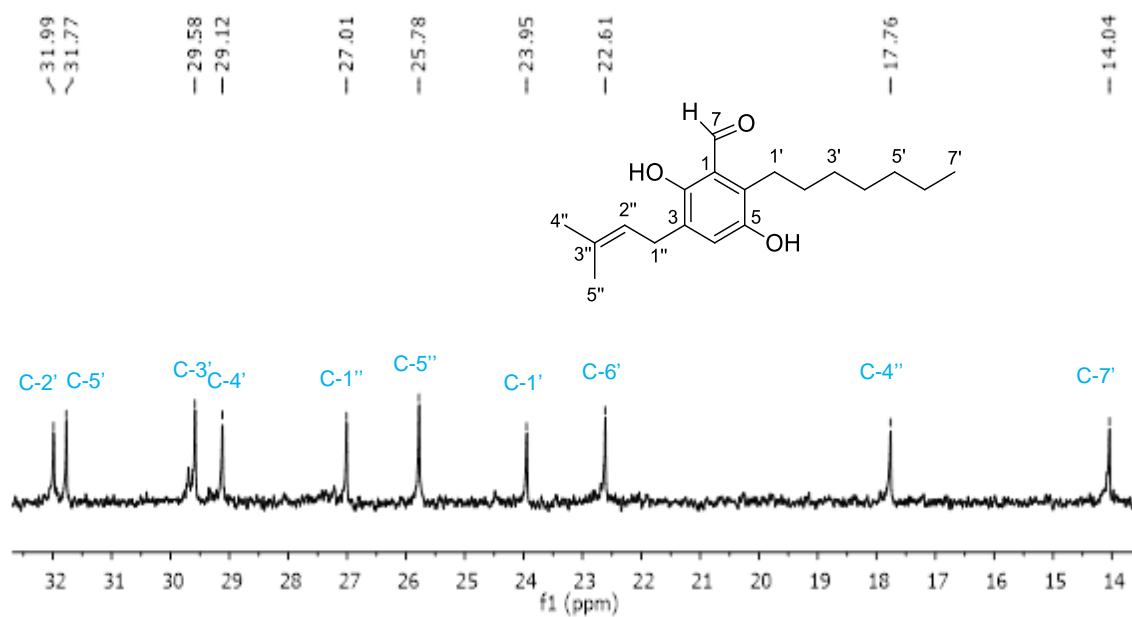


Figura 92. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto **GO-4** (expansão).

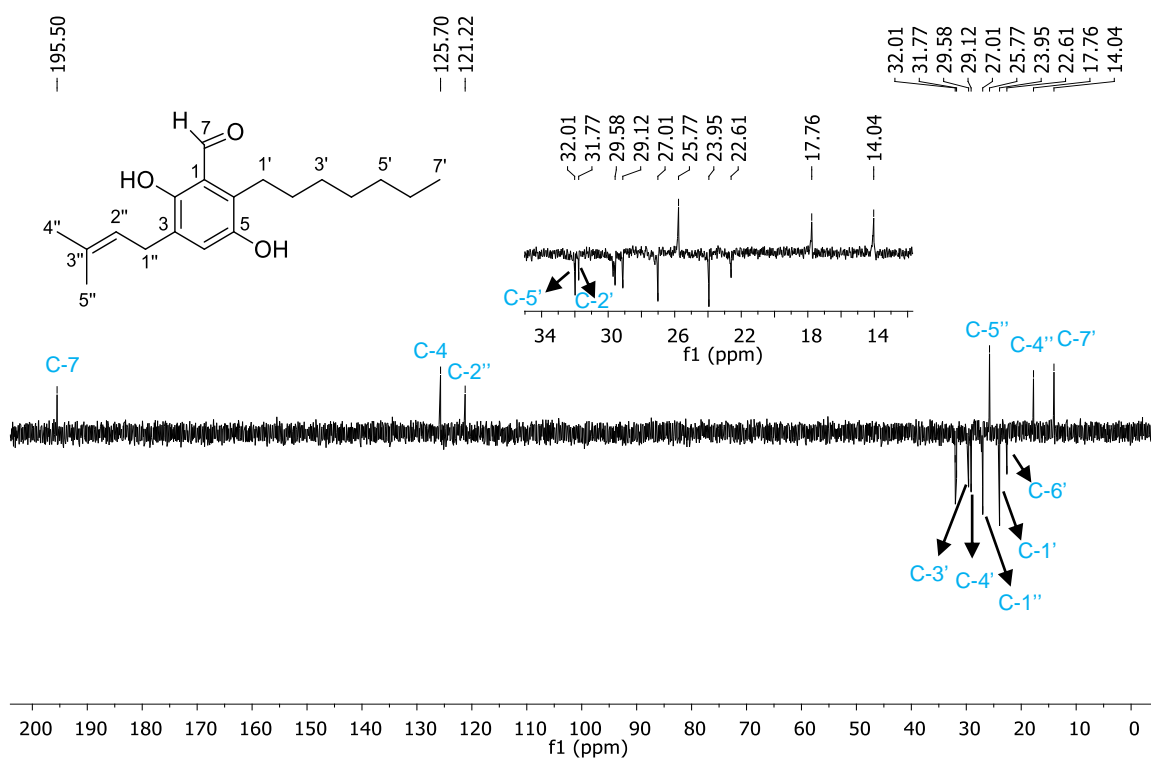


Figura 93. Subespectro DEPT-135 e expansões (CDCl_3 , 100 MHz) do composto **GO-4**.

Por meio do mapa de contornos HSQC (Figura 94-96) foi possível atribuir as correlações diretas ($^1J_{CH}$) e identificar os tipos de átomos de hidrogênio. A análise do mapa de contornos COSY 1H - 1H (Figura 97, pág. 117) permitiu identificar quais átomos de hidrogênio acoplam entre si e, conseqüentemente, alguns fragmentos da estrutura do composto.

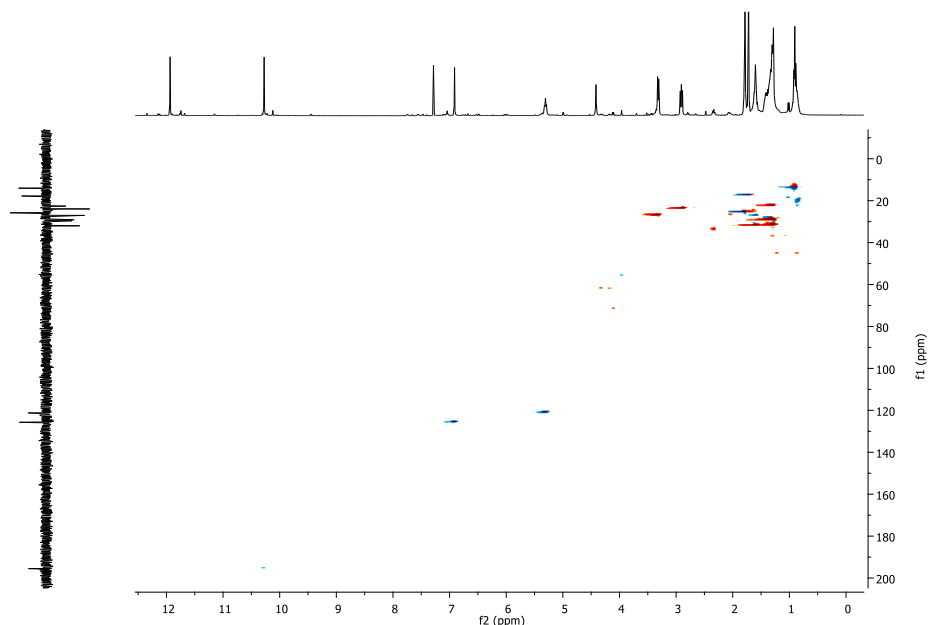


Figura 94. Mapa de contornos HSQC ($CDCl_3$) do composto **GO-4**.

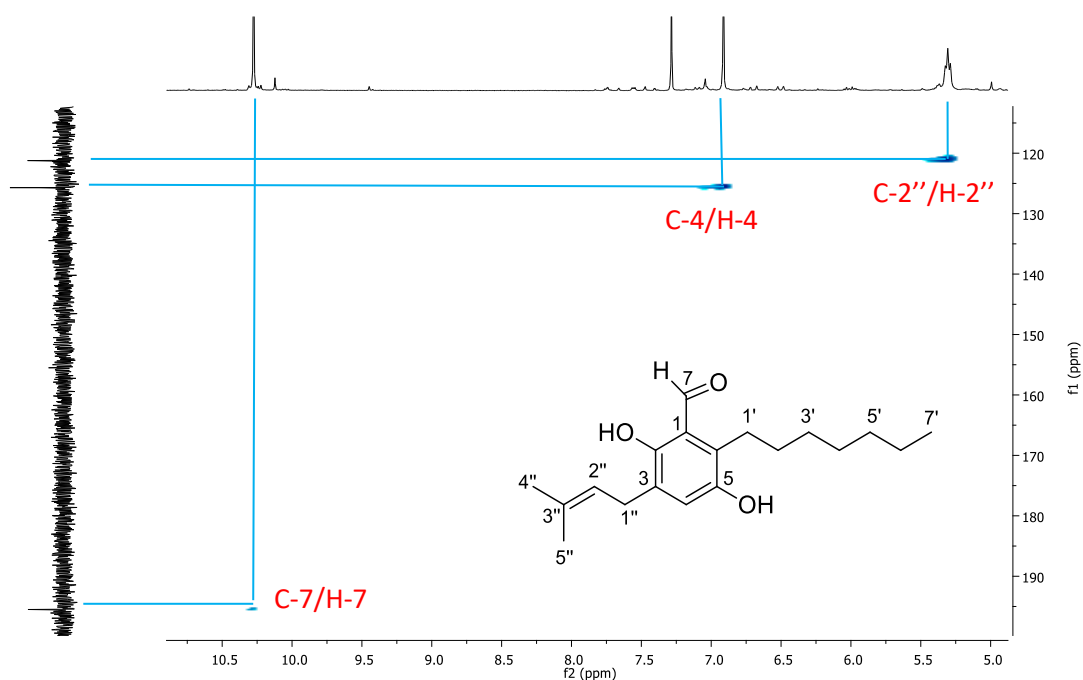


Figura 95. Mapa de contornos HSQC ($CDCl_3$, 400 MHz) do composto **GO-4** (expansão).

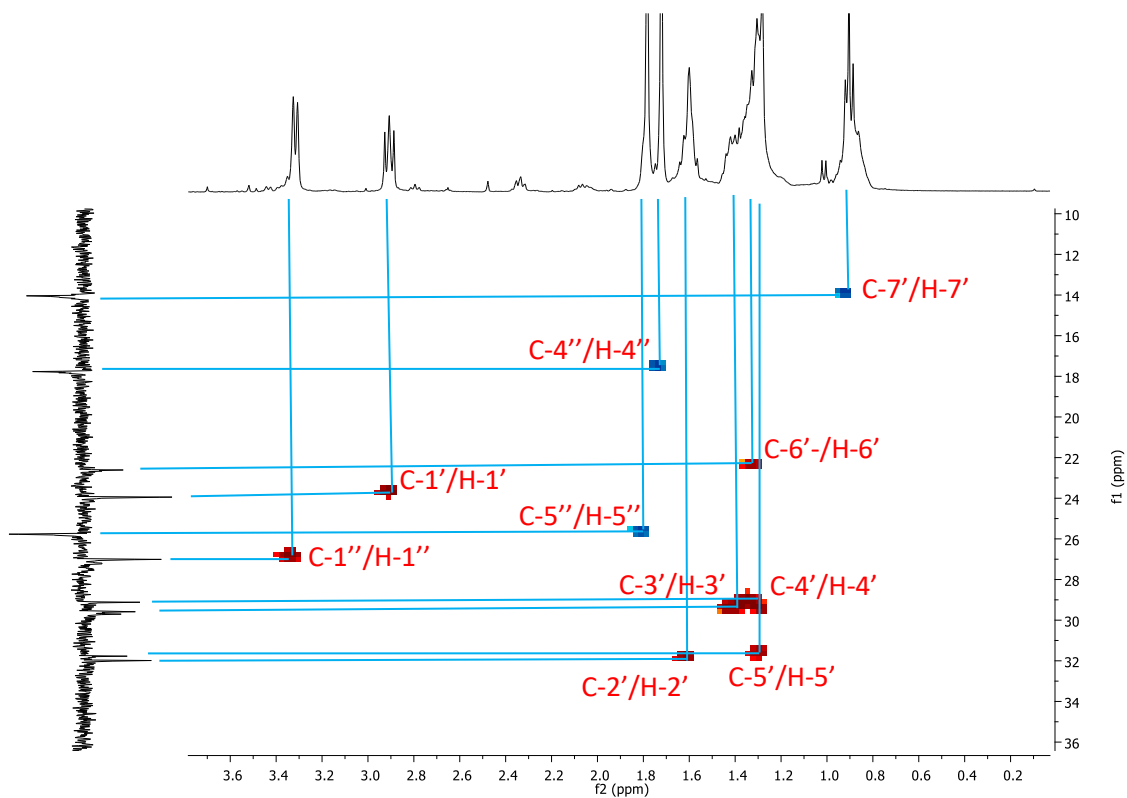


Figura 96. Mapa de contornos HSQC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-4** (expansão).

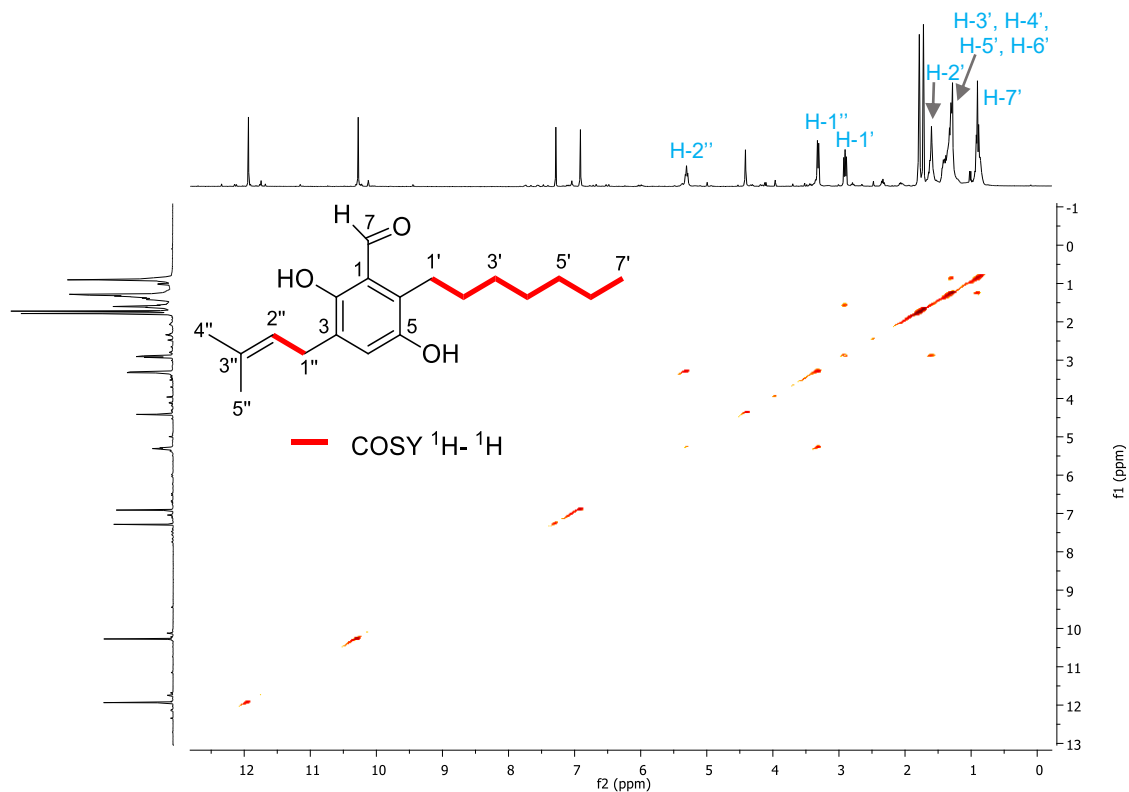


Figura 97. Mapa de contornos COSY ¹H-¹H (CDCl₃, 400MHz) do composto **GO-4**.

As correlações ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$) estabelecidas no mapa de contornos HMBC (Figuras 98-101) de H-1' com C-6, C-5 e C-1, indicaram que a cadeia metilênica está ligada a C-6 do anel aromático. As correlações de H-4 com C-1'', H-1'' com C-2, C-4, C-3 indicaram que a unidade prenila está ligada a C-3. As posições das hidroxilas foram identificadas pelas correlações no HMBC de OH-2 com C-1, C-3 e C-2 e de OH-5 com C-6, indicando a ligação destes grupos aos C-2 e C-5 do anel, respectivamente. As correlações de H-7 com C-1, C-2 e C-6 no HMBC, comprovaram que o grupo aldeído está ligado ao C-1 do anel.

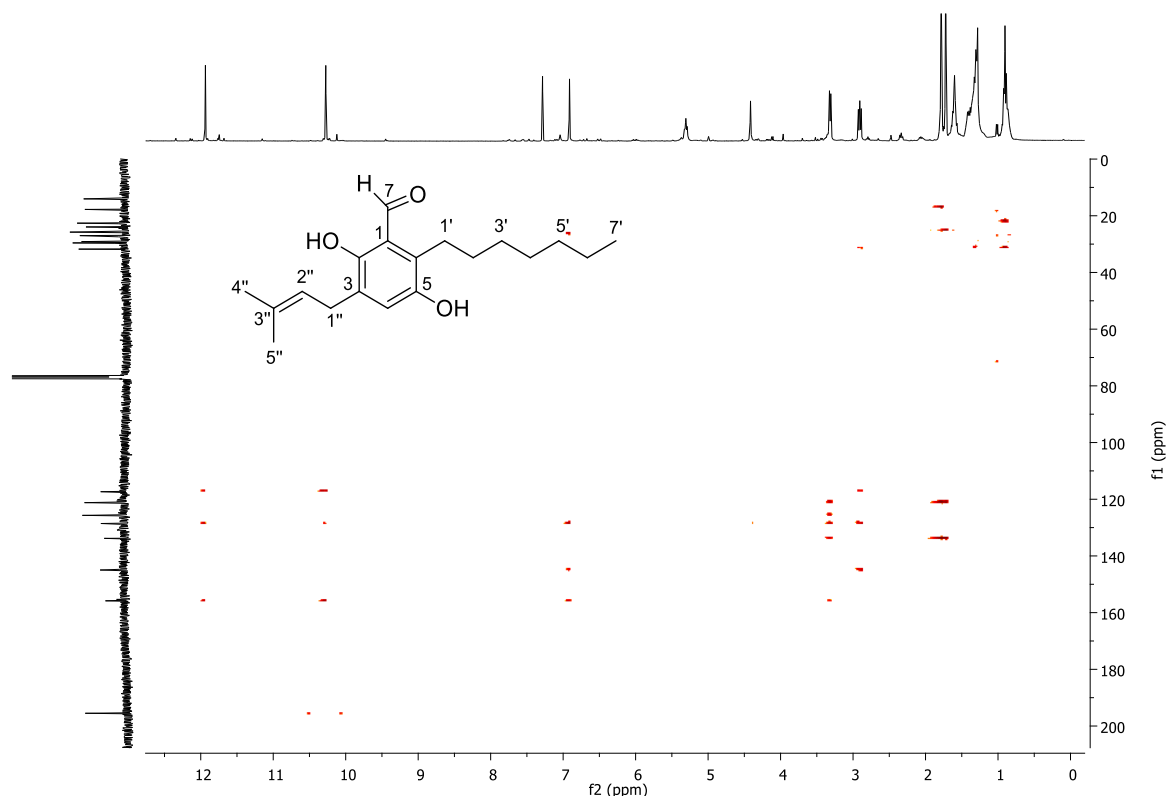


Figura 98. Mapa de contornos HMBC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-4**.

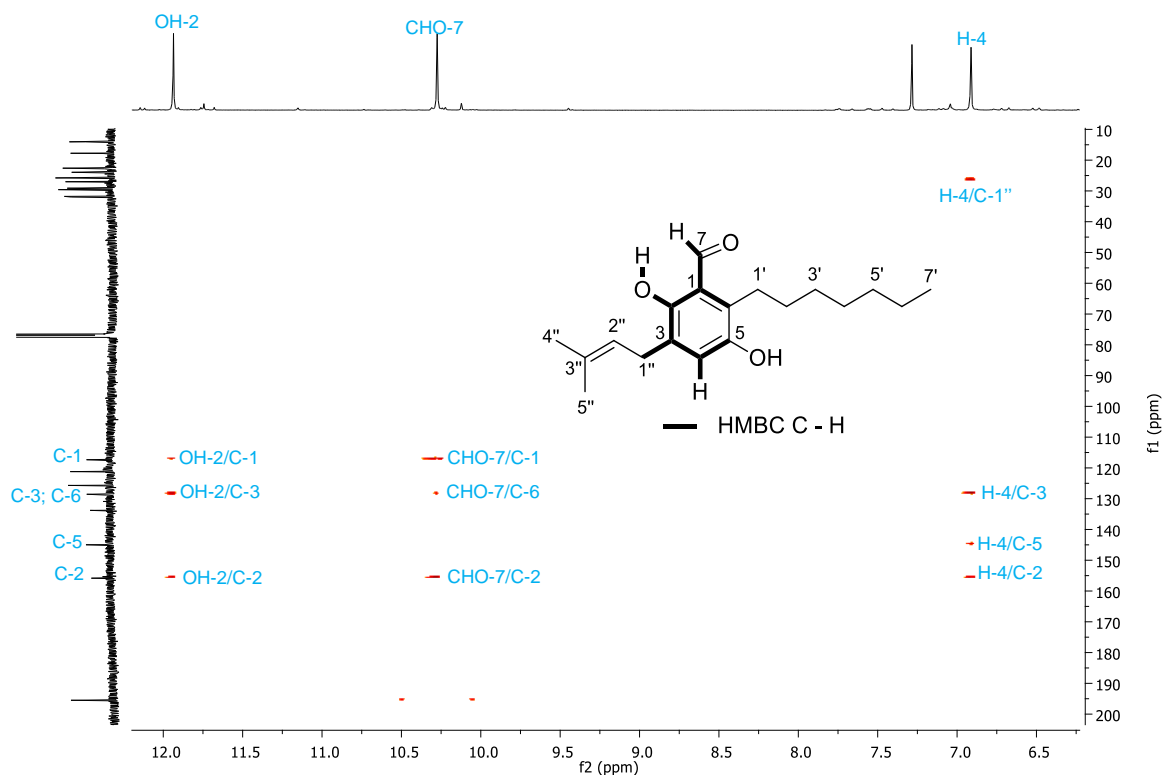


Figura 99. Mapa de contornos HMBC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-4** (expansão).

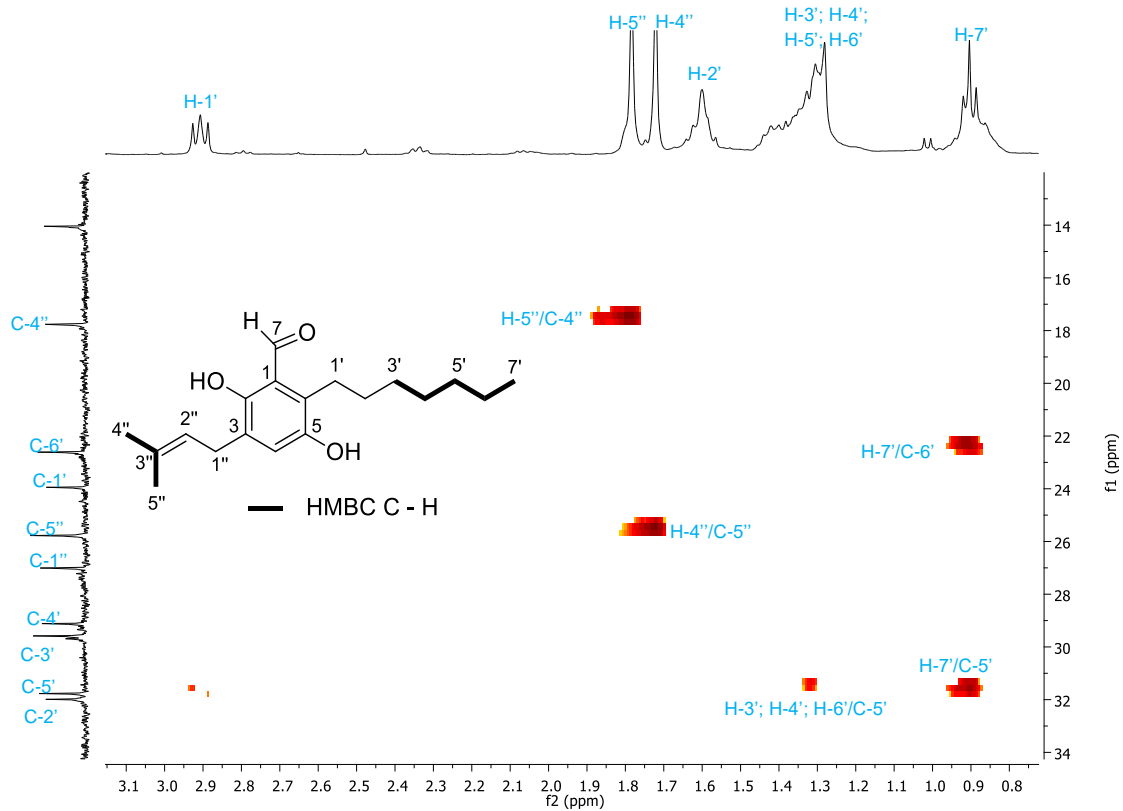


Figura 100. Mapa de contornos HMBC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-4** (expansão).

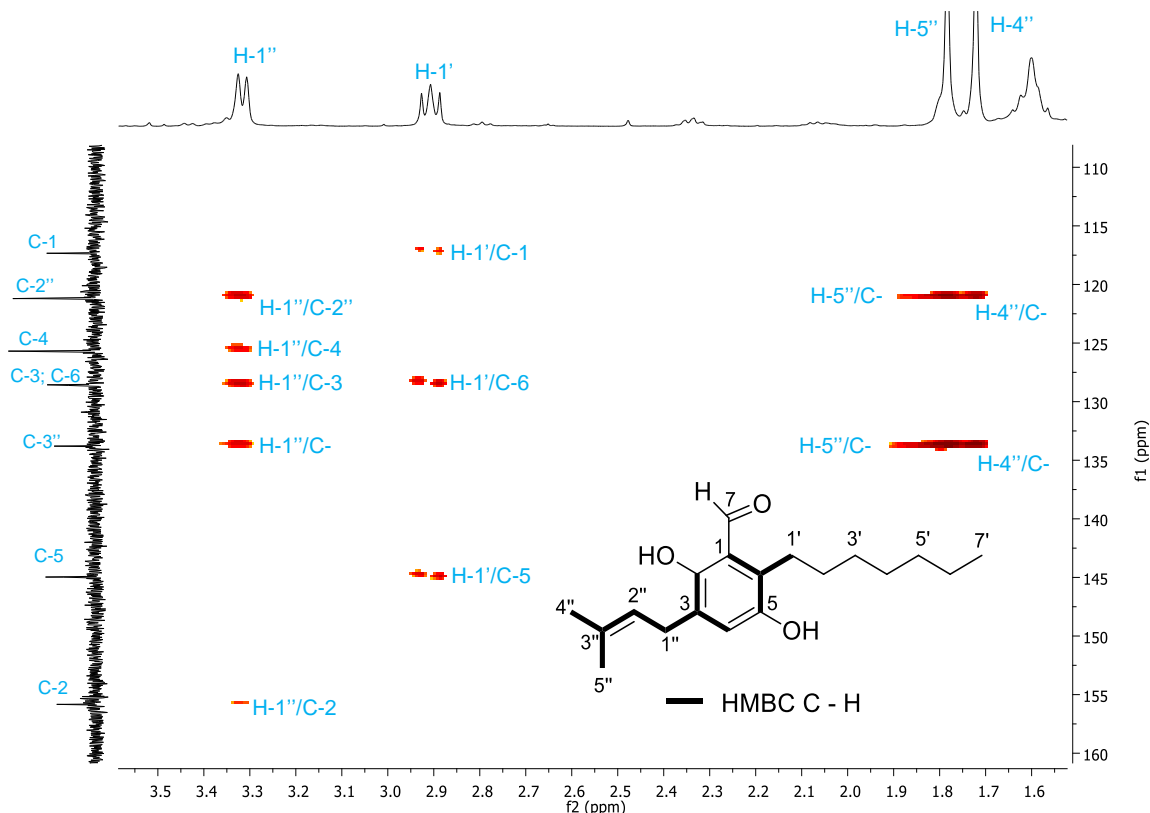


Figura 101. Mapa de contornos HMBC (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **GO-4** (expansão).

No espectro de massas de alta resolução (ESI modo negativo) de **GO-4** observou-se o pico do íon molecular em m/z 303,1916 (Figura 102) para a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{O}_3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculado: 303,1960). Com base nos dados obtidos e em conjunto com os dados da literatura (KIM et al., 2014), foi possível identificar **GO-4** como sendo o composto conhecido como flavoglaucina (apêndice, pág 170). Os dados de RMN do composto estão apresentados na Tabela 9, pág. 121.

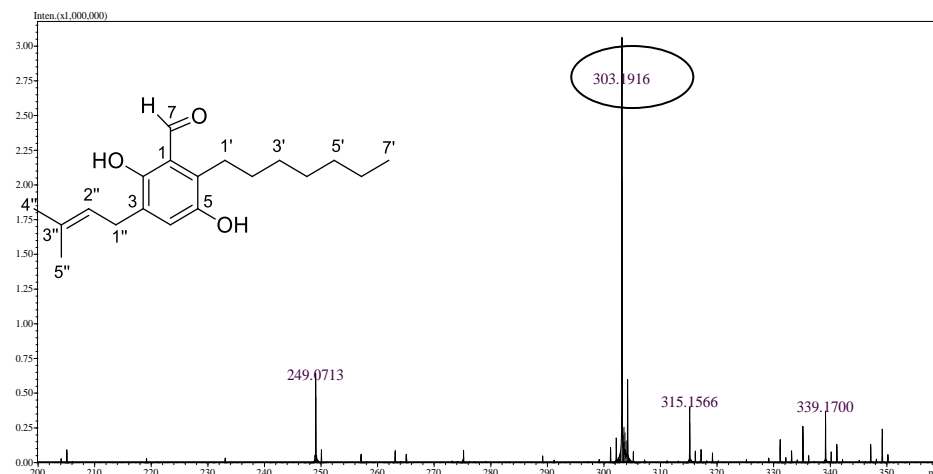


Figura 102. Espectro de massas (ESI modo negativo) do composto **GO-4**.

Tabela 9. Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl₃) do composto **GO-4** (δ em ppm) comparado com dados da literatura (KIM et al., 2014).

C	¹ H - ¹³ C HSQC		¹ H - ¹³ C HMBC		* $\delta^{13}\text{C}$ (400 MHz, CDCl ₃)
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	² J _{CH}	³ J _{CH}	
1	117,3	-		H-1'; OH-2	117,4
2	155,8	-	OH-2	H-7; H-4; H-1''	156,0
3	128,6	-	H-4; H-1''	OH-2	128,7
4	125,7	6,91 (s)		H-1''	125,8
5	145,0	-	H-4	H-1'	145,1
6	128,6	-	H-1'	H-7	128,6
7	195,5	10,27 (s)			195,7
1'	23,9	2,91 (t, J= 8,0 Hz)			24,1
2'	31,9	1,59-1,62 (m)			32,1
3'	29,6	1,28-1,33 (m)			29,7
4'	29,1	1,28-1,33 (m)			-
5'	31,8	1,28-1,33 (m)	H-4'; H-6'	H-3'; H-7'	31,9
6'	22,6	1,28-1,33 (m)	H-7'		22,8
7'	14,0	0,89-0,92 (m)			14,2
1''	27,0	3,33 (d, J= 8,0 Hz)		H-4	27,1
2''	121,2	5,29-5,32 (m)		H-5''; H-4''	121,3
3''	133,8	-	H-5''; H-4''	H-1''	134,0
4''	17,8	1,72 (s)		H-5''	18,0
5''	25,8	1,78 (s)		H-4''	26,0
OH-2		11,94 (s)			
OH-5		4,41 (s)			

*KIM et al., 2014.

5.8.5 Caracterização estrutural do composto GO-5

O composto **GO-5** foi obtido como sólido amorfo de cor laranja solúvel em clorofórmio. O espectro no infravermelho (Figura 103, pág. 122) de **GO-5** apresentou bandas de absorção semelhantes às do composto **GO-4**. Foi observada uma banda larga em 3313 cm⁻¹, referente ao estiramento de ligação O-

H, uma banda intensa em 2926 cm^{-1} , referente a estiramento de ligação C-H, uma banda 2854 cm^{-1} , referente a estiramento C-H de aldeído, uma banda intensa em 1725 cm^{-1} , característica de estiramento C=O (PAVIA et al., 2010).

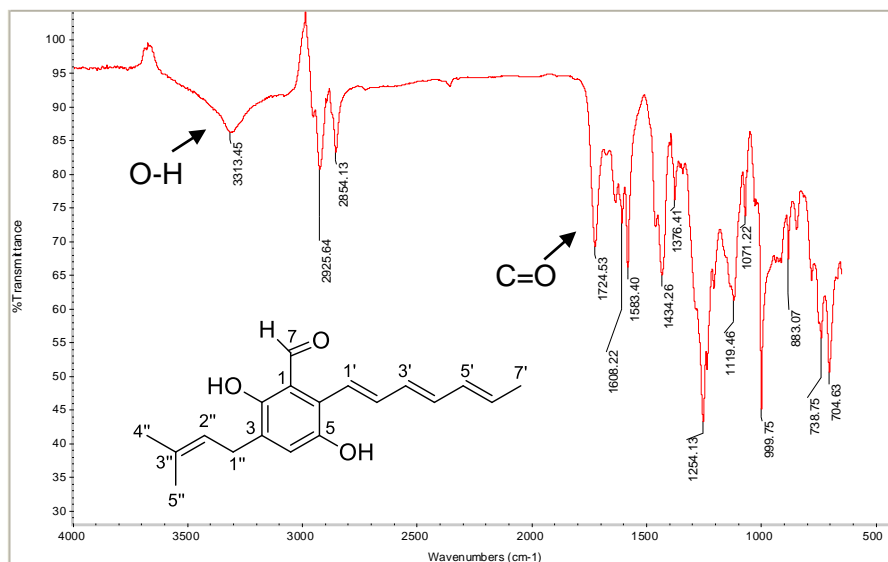


Figura 103. Espectro no infravermelho (pastilha de Kbr) do composto **GO-5**.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 104, pág. 123) apresentou sinais similares aos observados para o composto **GO-4**, o que indicou se tratar de um composto com o mesmo esqueleto. Os sinais diferentes no espectro foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H-1' (δ_{H} 6,65), H-2' (δ_{H} 6,46-6,52), H-3' e H-4' (δ_{H} 6,31-6,35), H-5' (δ_{H} 6,13-6,19), H-6' (δ_{H} 6,16) e H-7' (δ_{H} 1,83).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 105, pág. 123) também apresentou sinais para 19 átomos de carbono, variando o número de átomos de carbono metilênicos e metínicos. De acordo com o subspectro DEPT-135 (Figura 106, pág. 124), três átomos de carbono são metílicos, um metilênico e nove metínicos. Os sinais presentes no espectro de RMN de ^{13}C e não observados no subspectro DEPT-135 são referentes aos seis átomos de carbono não hidrogenados do composto. Os sinais em δ_{C} 120,9, δ_{C} 139,8, δ_{C} 129,2, δ_{C} 136,5, δ_{C} 132,9, δ_{C} 131,5 e δ_{C} 18,7 foram atribuídos aos átomos de carbono C-1', C-2', C-3', C-4', C-5', C-6' e C-7', respectivamente. Os dados de RMN indicaram que a diferença entre os compostos **GO-4** e **GO-5** está apenas na cadeia alifática de sete carbonos, que ao contrário de **GO-4**, em **GO-5** está totalmente conjugada com o anel aromático.

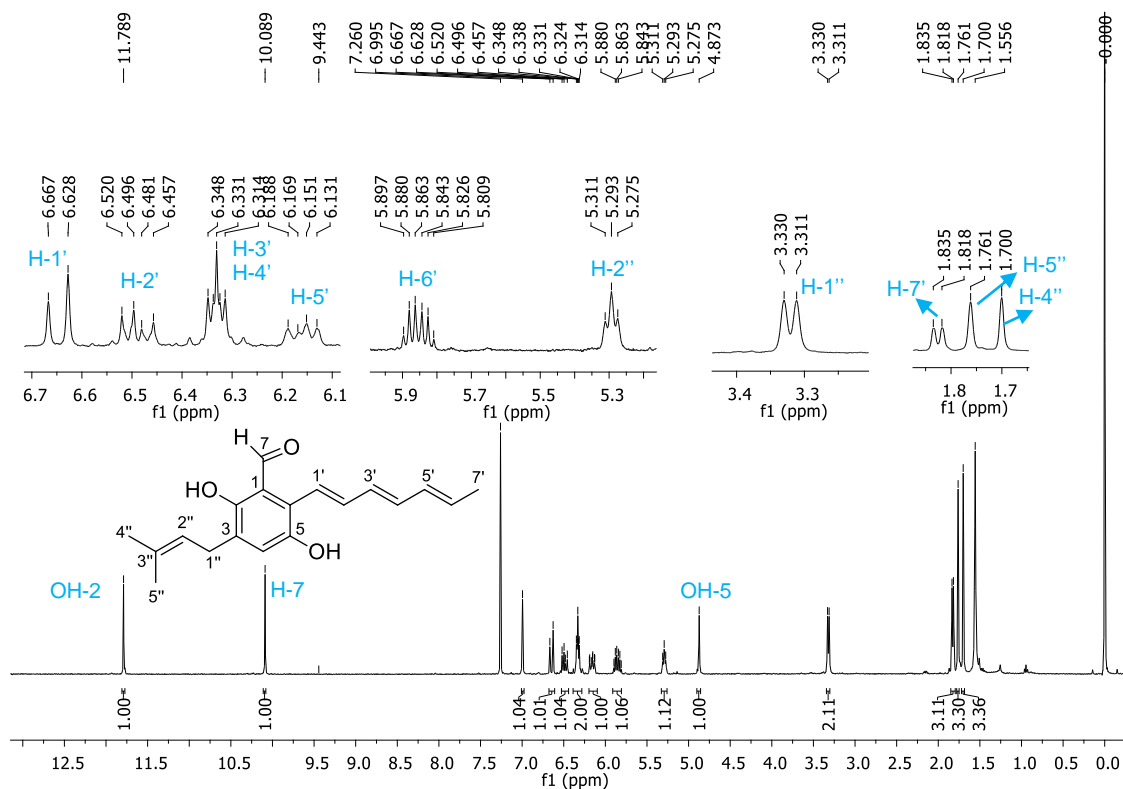


Figura 104. Espectro de RMN de ^1H e expansões (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **GO-5**.

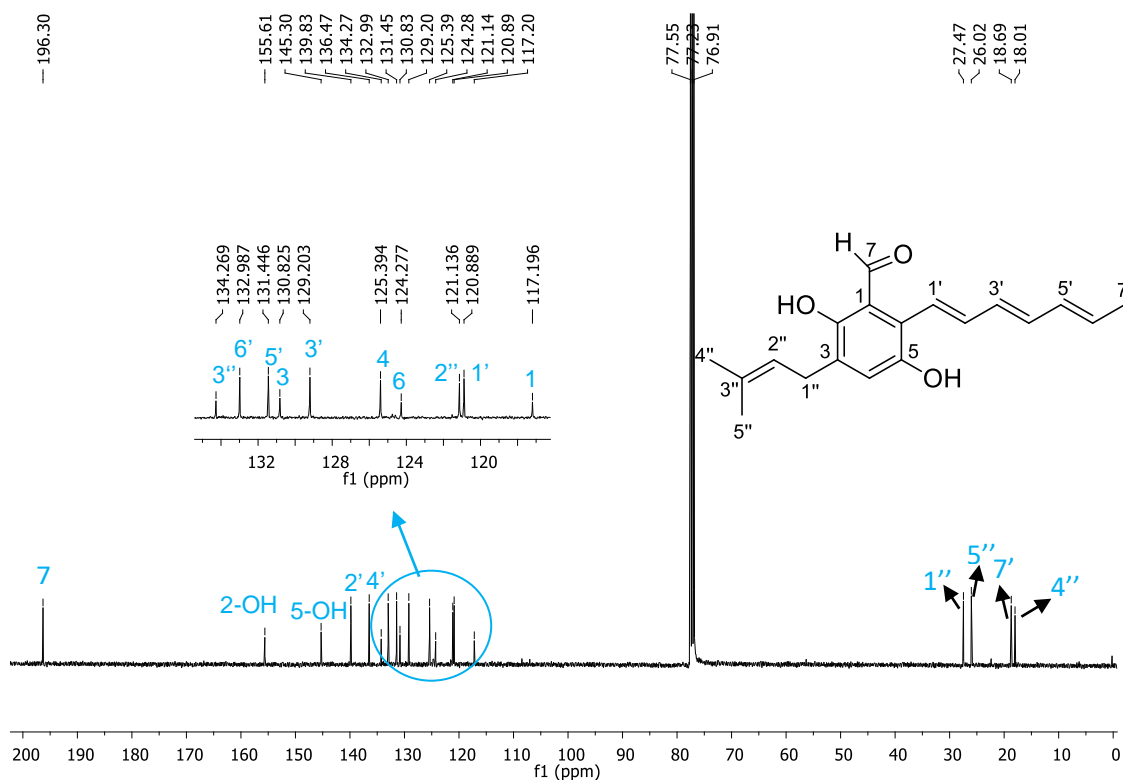


Figura 105. Espectro de RMN de ^{13}C e expansões (CDCl_3 , 100 MHz) do composto **GO-5**.

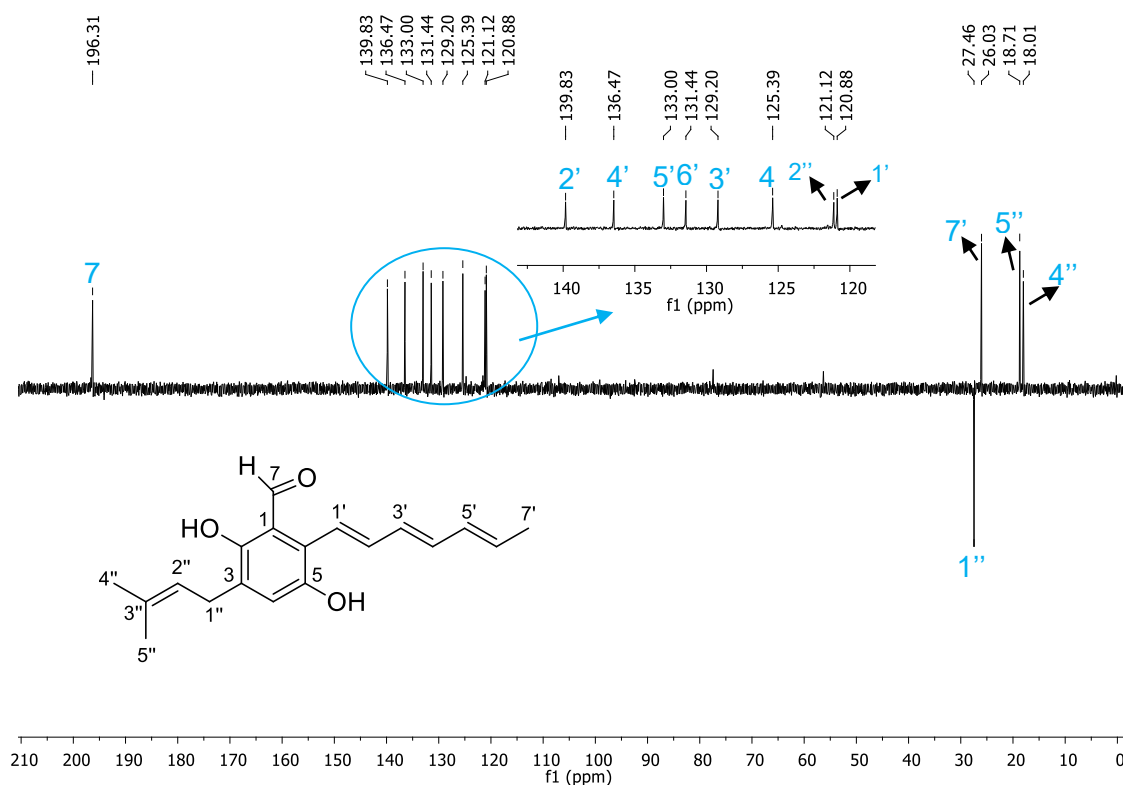


Figura 106. Subespectro DEPT-135 e expansões (CDCl₃, 100 MHz) de **GO-5**.

Os dados de RMN de ¹H 1D e 2D (COSY (Figuras 107-108, pág. 125), HSQC (Figuras 109-110, pág. 126) e HMBC (Figura 111-113, pág. 127-128) em conjunto com a espectrometria de massas de alta resolução (ESI modo positivo), cujo espectro (Figura 114, pág. 128-129) apresentou o pico íon molecular do composto em *m/z* 299,1586 para a fórmula molecular C₁₉H₂₃O₃ [M+H]⁺ (calculado: 299,1602) levaram à identificação do composto **GO-5** como sendo o derivado benzaldeídico auroglaucina (apêndice, pág 170) (MIYAKE et al., 2009). Os dados de RMN do composto estão apresentados na Tabela 10, pág. 129.

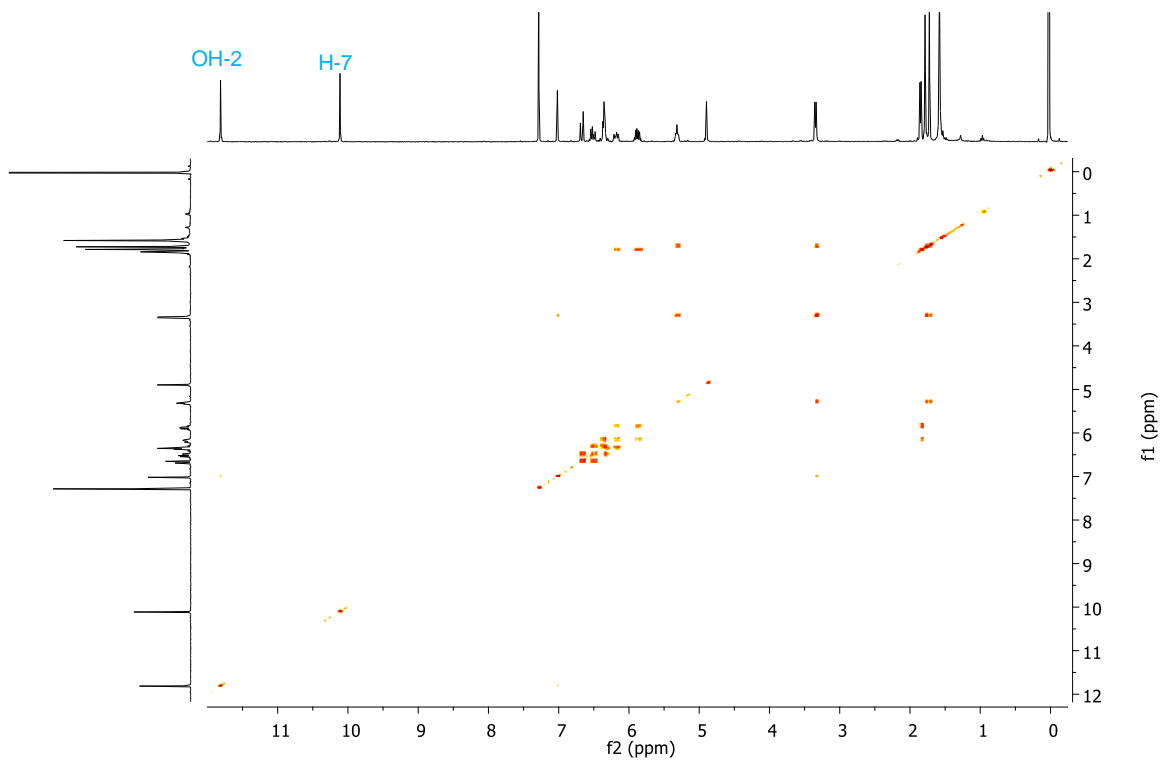


Figura 107. Mapa de contornos COSY (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-5**.

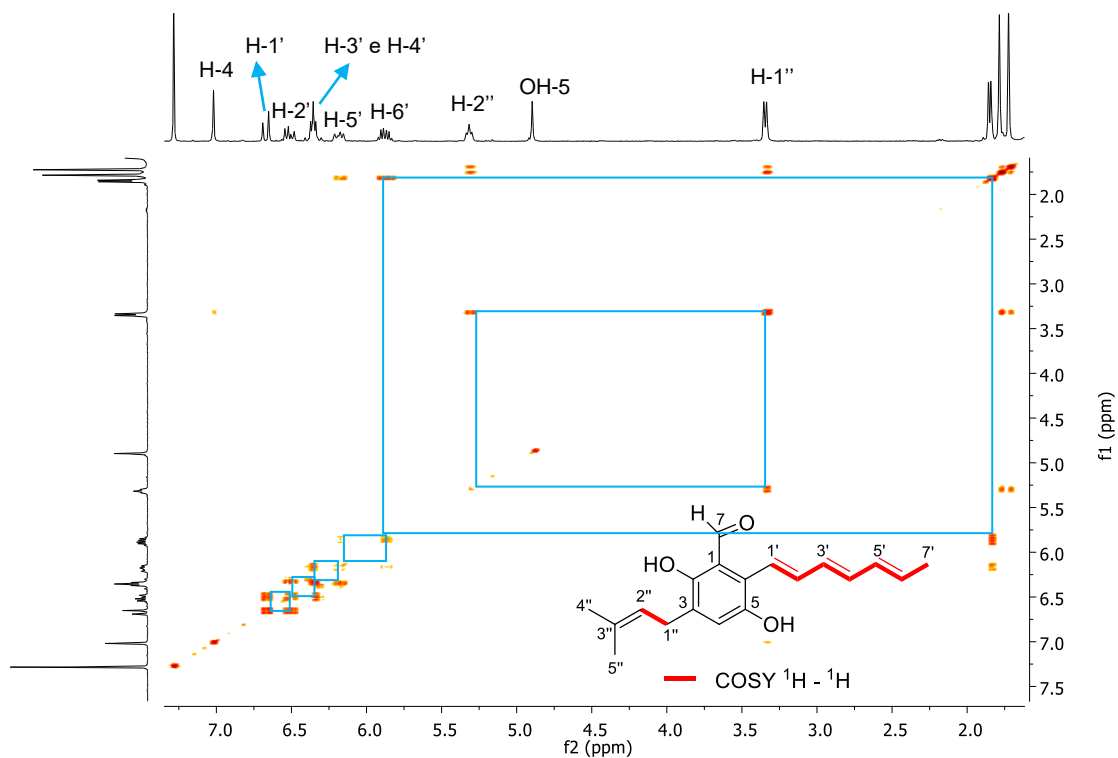


Figura 108. Mapa de contornos COSY (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-5** (expansão).

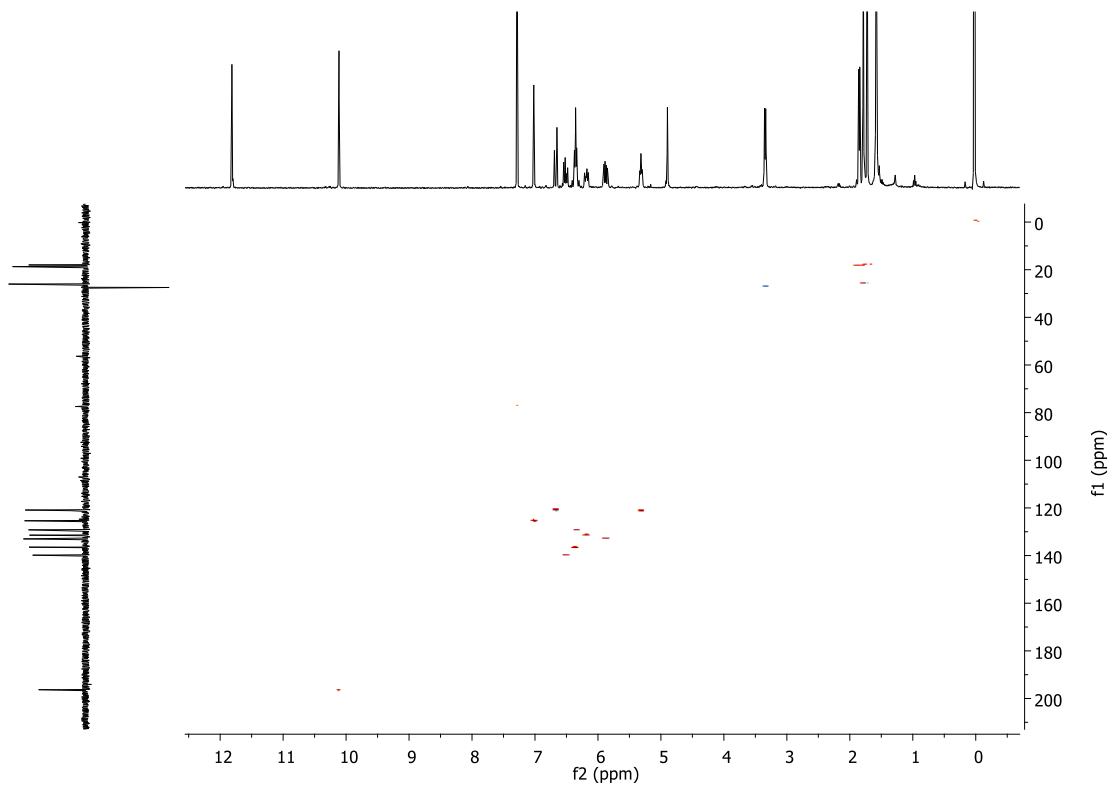


Figura 109. Mapa de contornos HSQC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-5**.

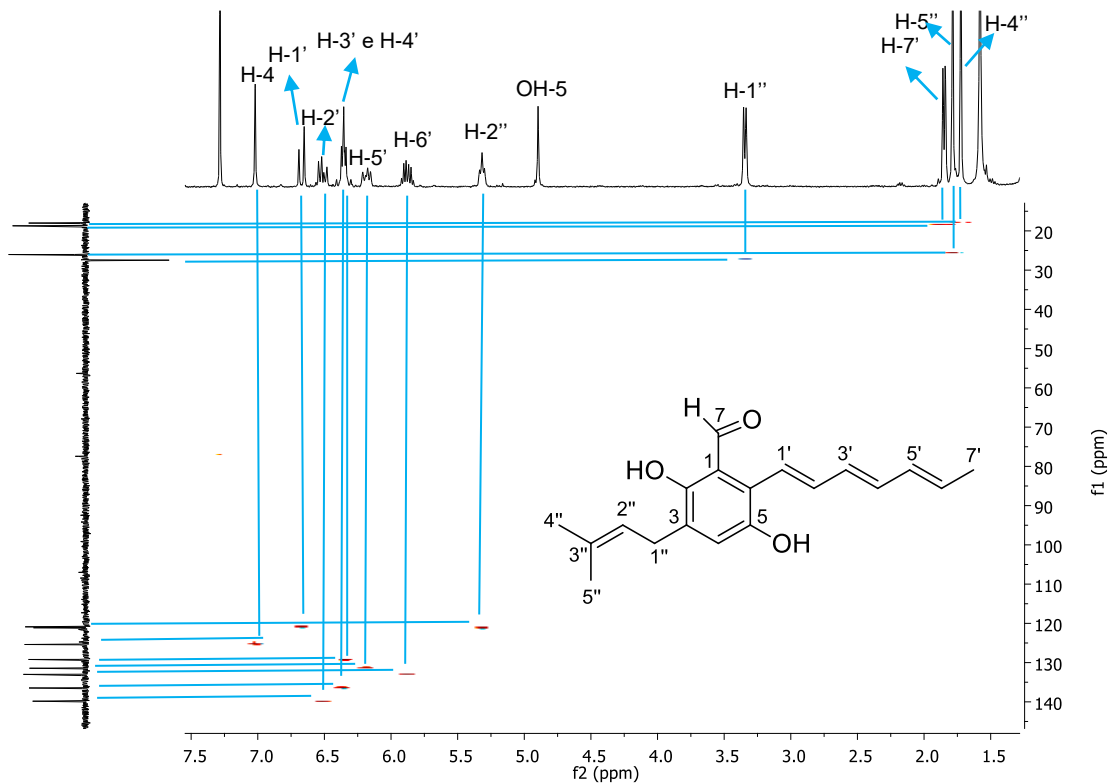


Figura 110. Mapa de contornos HSQC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-5** (expansão).

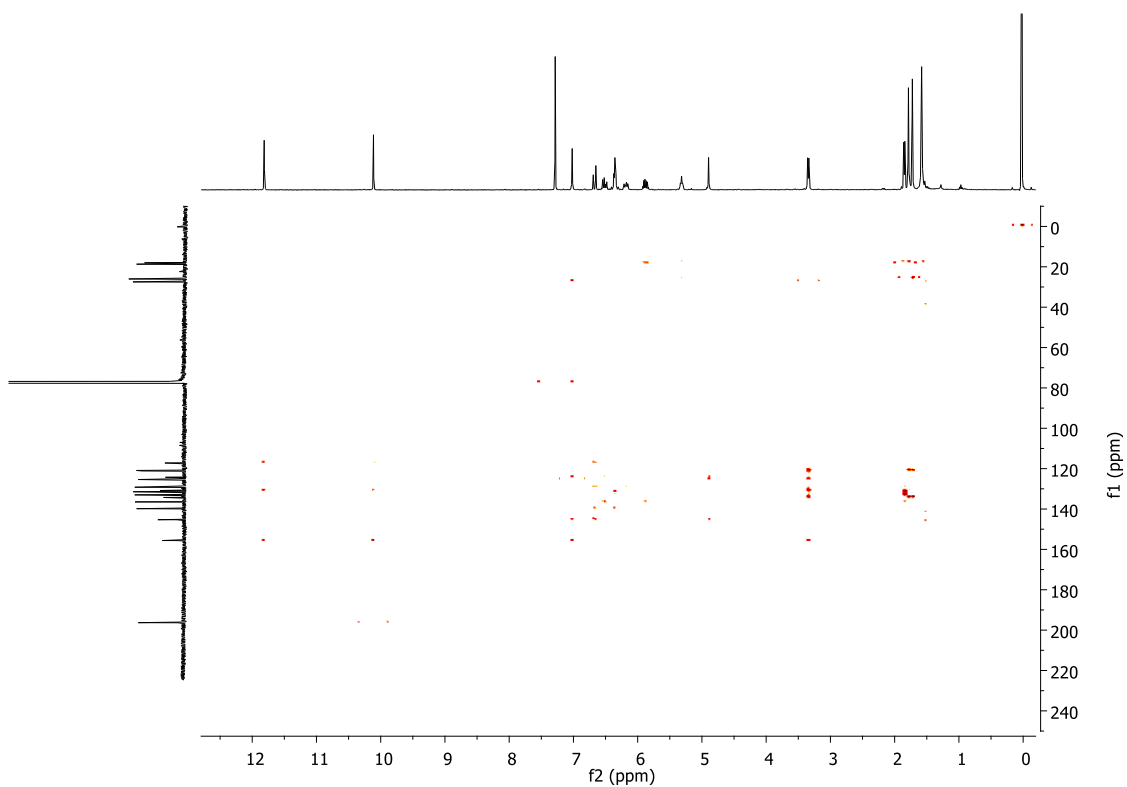


Figura 111. Mapa de contornos HMBC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-5**.

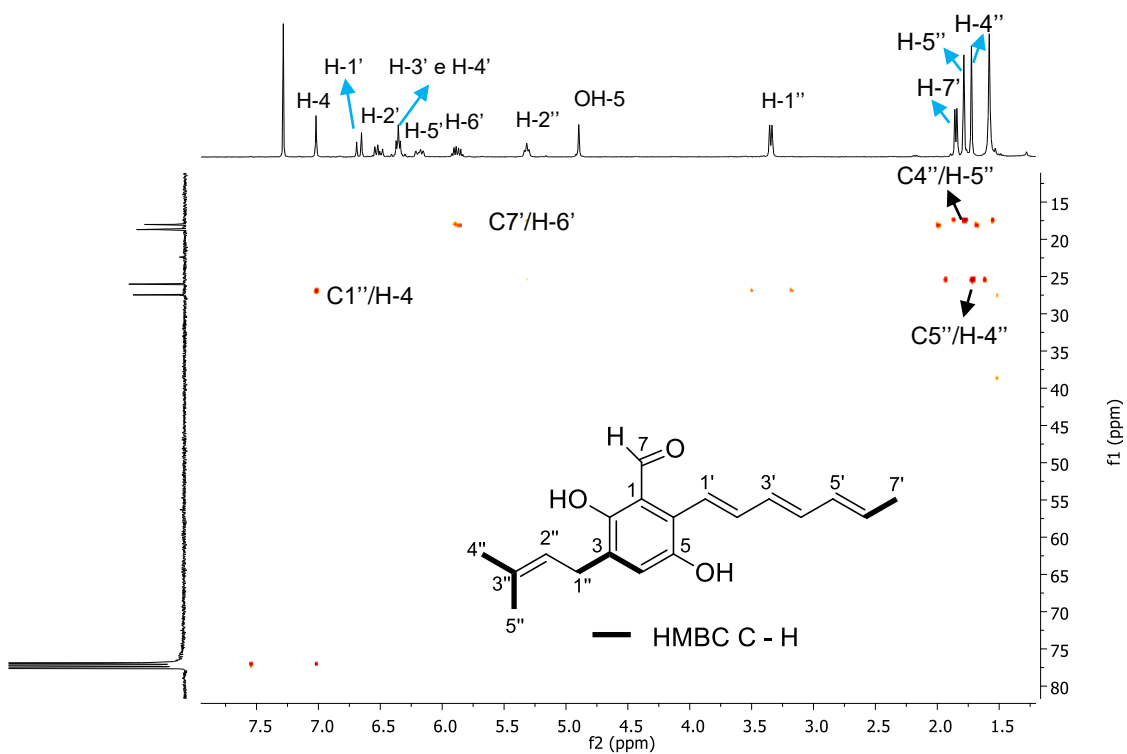


Figura 112. Mapa de contornos HMBC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-5** (expansão).

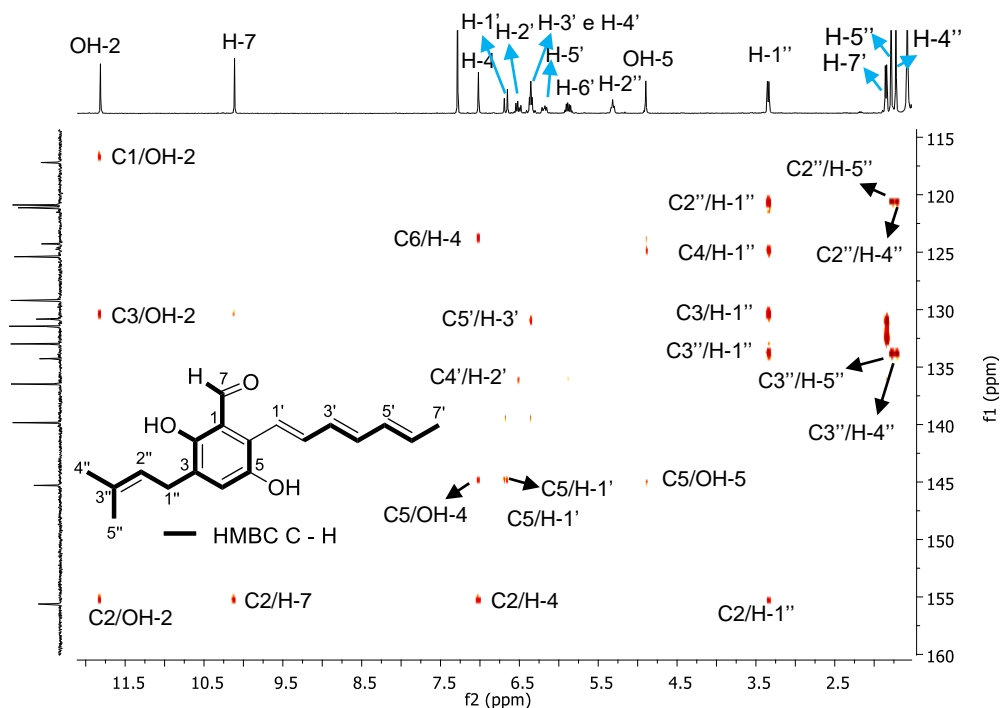


Figura 113. Mapa de contornos HMBC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-5** (expansão).

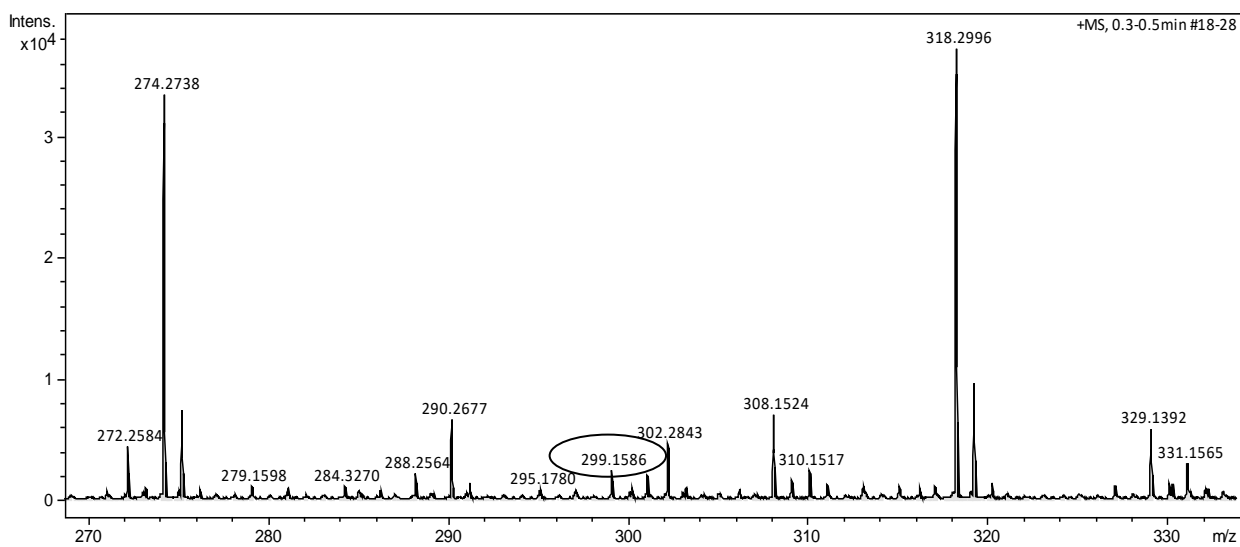


Figura 114. Espectro de massas (ESI modo positivo) do composto **GO-5**.

Tabela 10. Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl₃) do composto **GO-5** comparado a dados da literatura (MIYAKE et al., 2009).

C	¹ H - ¹³ C HSQC		¹ H - ¹³ C HMBC		* $\delta^{13}\text{C}$ (500 MHz, (CD ₃) ₂ O)
	$\delta^{13}\text{C}$	δ ¹ H [m, J (Hz)]	² J _{CH}	³ J _{CH}	
1	117,2	-		OH-2	118,1
2	155,6	-	OH-2	H-4, H-7, H-1''	155,3
3	130,8	-	H-1''	OH-2	130,0
4	125,4	6,99 (s)		OH-5, H-1''	125,8
5	145,3	-	H-4, OH-5	H-1'	148,1
6	124,3	-		H-4	126,1
7	196,3	10,09 (s)			197,6
1'	120,9	6,65 (d, J= 15,6 Hz)			123,4
2'	139,8	6,46-6,52 (m)			139,4
3'	129,2	6,31-6,35 (m)			131,6
4'	136,5	6,31-6,35 (m)		H-2'	135,6
5'	131,5	6,13-6,19 (m)		H-3', H-7'	132,7
6'	133,0	5,85 (qd, J= 6,8 e 14,8 Hz)	H-7		131,6
7'	18,7	1,83 (d, J= 6,8 Hz)	H-6		18,4
1''	27,5	3,32 (d, J= 7,4 Hz)		H-4	27,8
2''	121,1	5,29 (t, J= 7,4 Hz)	H-1''	H-4''	122,3
3''	134,3	-	H-4'', H-5''	H-1''	133,8
4''	18,0	1,70 (s)		H-5''	17,8
5''	26,0	1,76 (s)		H-4''	25,8
OH-2		11,79 (s)			
OH-5		4,87(s)			

*MIYAKE et al., 2009

5.8.6 Caracterização estrutural do composto GO-6

O composto **GO-6** foi obtido como um sólido de cor amarela, solúvel em clorofórmio com faixa de fusão 78-79 °C (Lit. 60-61 °C; YOSHIHIRA et al., 1972). O espectro no infravermelho de **GO-6** (Figura 115, pág. 130) apresentou bandas

de absorção semelhantes às dos compostos **GO-4** e **GO-5**. Foi observada uma banda em 3259 cm^{-1} , característica de estiramento de ligação O-H, em 2924 , típica de estiramento de ligação C-H, em 2855 cm^{-1} típica de estiramento de ligação C-H de aldeído. Além de bandas em 1724 cm^{-1} , referente ao estiramento de ligação C=O (PAVIA et al., 2010).

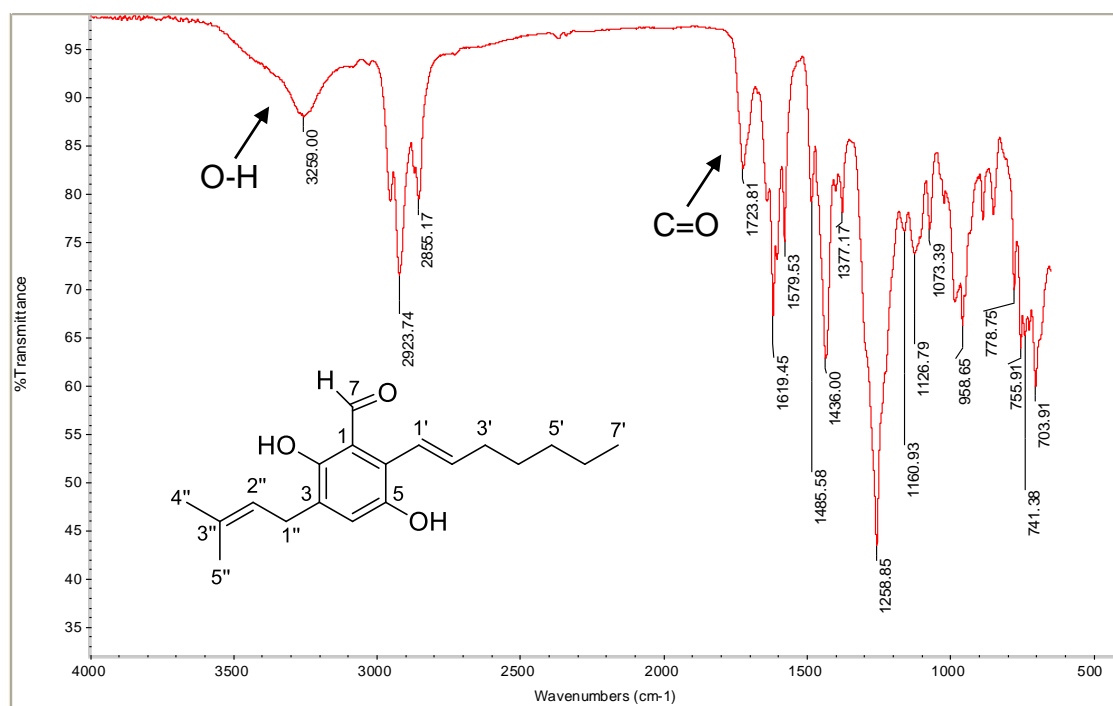


Figura 115. Espectro no infravermelho (pastilha de Kbr) do composto **GO-6**.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 116, pág. 131) apresentou sinais similares aos observados para os compostos **GO-4** e **GO-5**, o que indicou que **GO-6** possui uma estrutura semelhante. Neste espectro observaram-se quatorze sinais, sendo seis simpletos, dois dupletos, um tripleto, um quinteto, tripleto duplo e três multipletos. A partir das observações feitas no espectro de RMN de ^1H foi possível inferir que se trata de um composto com estrutura semelhante aos compostos **GO-4** e **GO-5**, com diferença apenas na cadeia de sete átomos de carbono. Os sinais diferentes foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H-1' (δ_{H} 6,48), H-2' (δ_{H} 5,99), H-3' (2,29-2,35) e H-4' (δ_{H} 1,52), H-5' e H-6' (δ_{H} 1,37-1,33) e H-7' (δ_{H} 0,92).

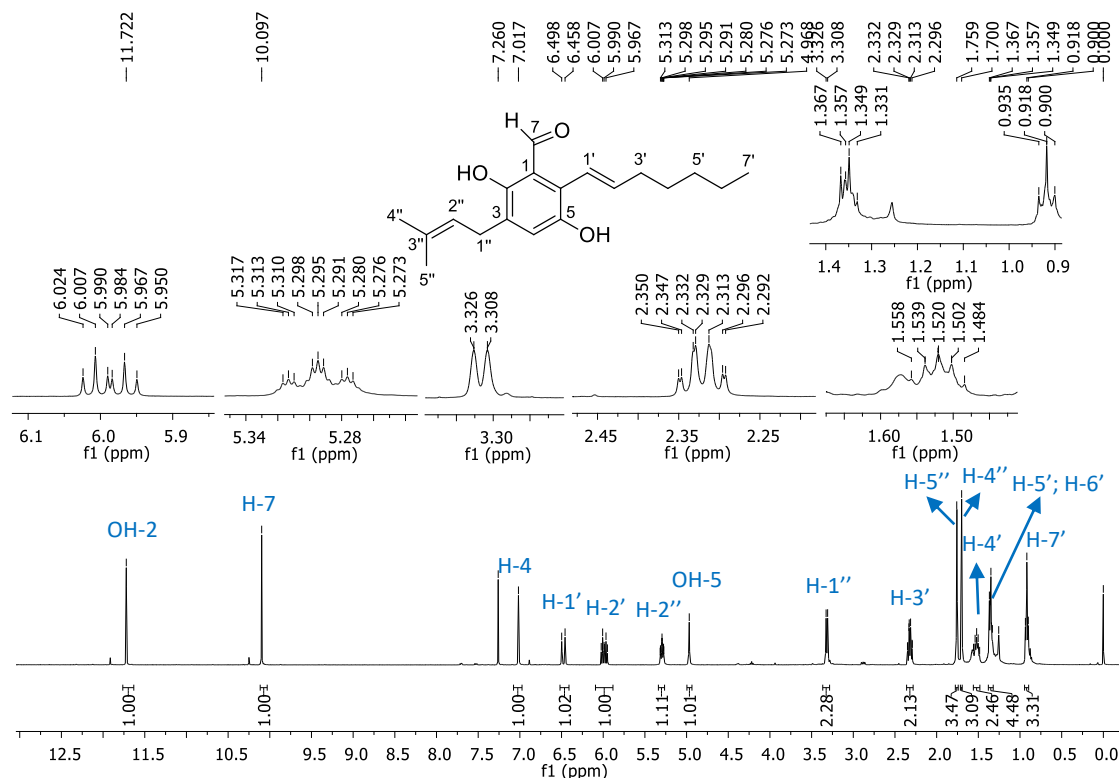


Figura 116. Espectro de RMN de ^1H e expansões (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **GO-6**.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 117, pág. 132) também apresentou sinais para 19 átomos de carbono, variando apenas o número de átomos de carbono metilênicos e metínicos da cadeia alifática de sete átomos de carbono: C-1' (δ_{C} 120,1), C-2' (δ_{C} 142,7), C-3' (δ_{C} 33,5), C-4' (δ_{C} 28,7), C-5' (δ_{C} 22,5), C-6' (δ_{C} 31,5) e C-7' (δ_{C} 14,0). De acordo com o subspectro DEPT-135 (Figura 118, pág. 132), o composto possui três átomos de carbono metílicos, cinco metilênicos e cinco metínicos. Os dados de RMN de ^1H 1D e 2D [COSY (Figura 119-120, pág. 133), HSQC (Figura 121-123, pág. 134-135) e HMBC (Figura 124-126, pág. 135-136)] em conjunto com a espectrometria de massas de alta resolução (ESI modo positivo), que apresentou o íon molecular do composto em m/z 303,1956 (calculado: 303,1915) para a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Figura 127, pág. 137) e, baseado nos dados da literatura levaram à identificação do composto **GO-6** como tetraidroauroglaucina (apêndice, pág 170) (MIYAKE et al., 2009). Os dados de RMN deste composto estão apresentados na Tabela 11, pág. 138.

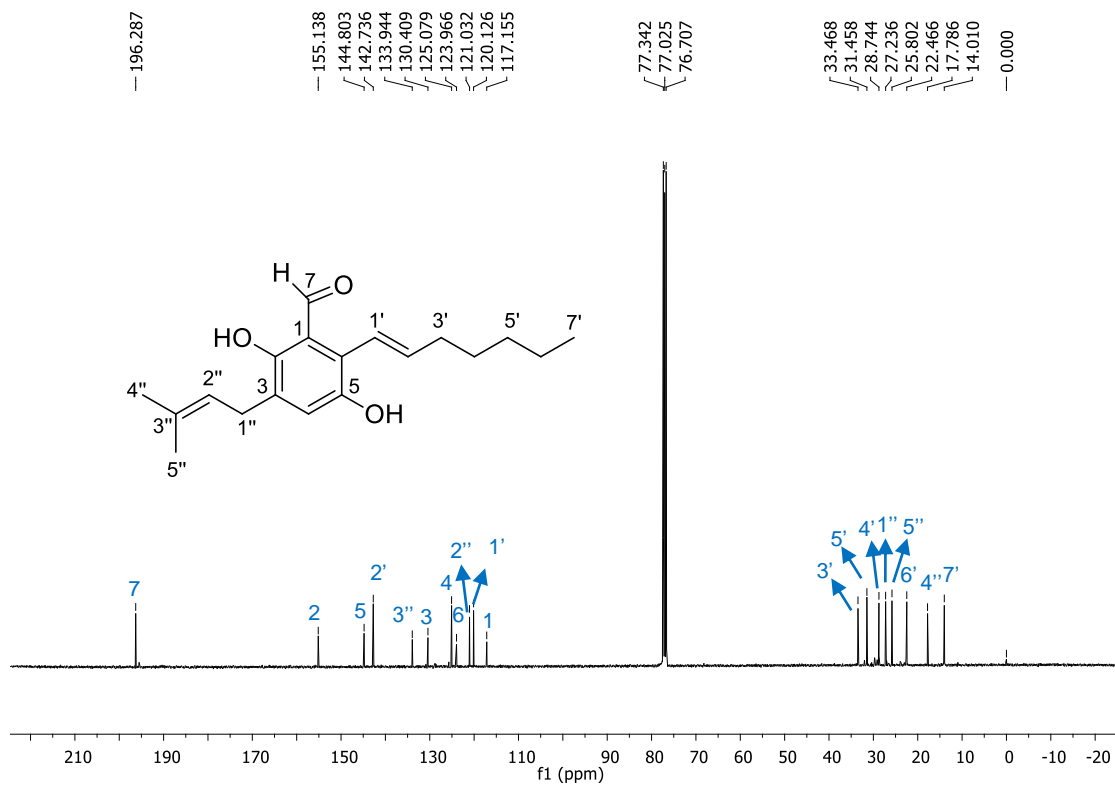


Figura 117. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do composto **GO-6**.

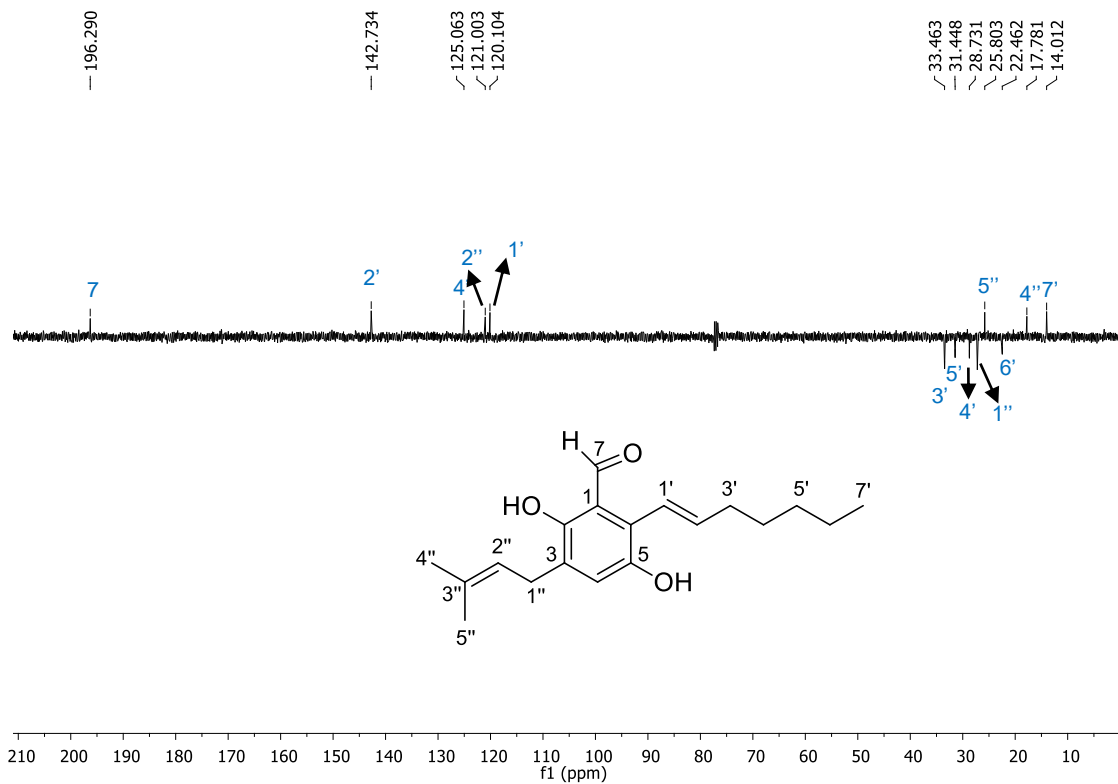


Figura 118. Subespectro DEPT-135 (CDCl_3 , 100 MHz) do composto **GO-6**.

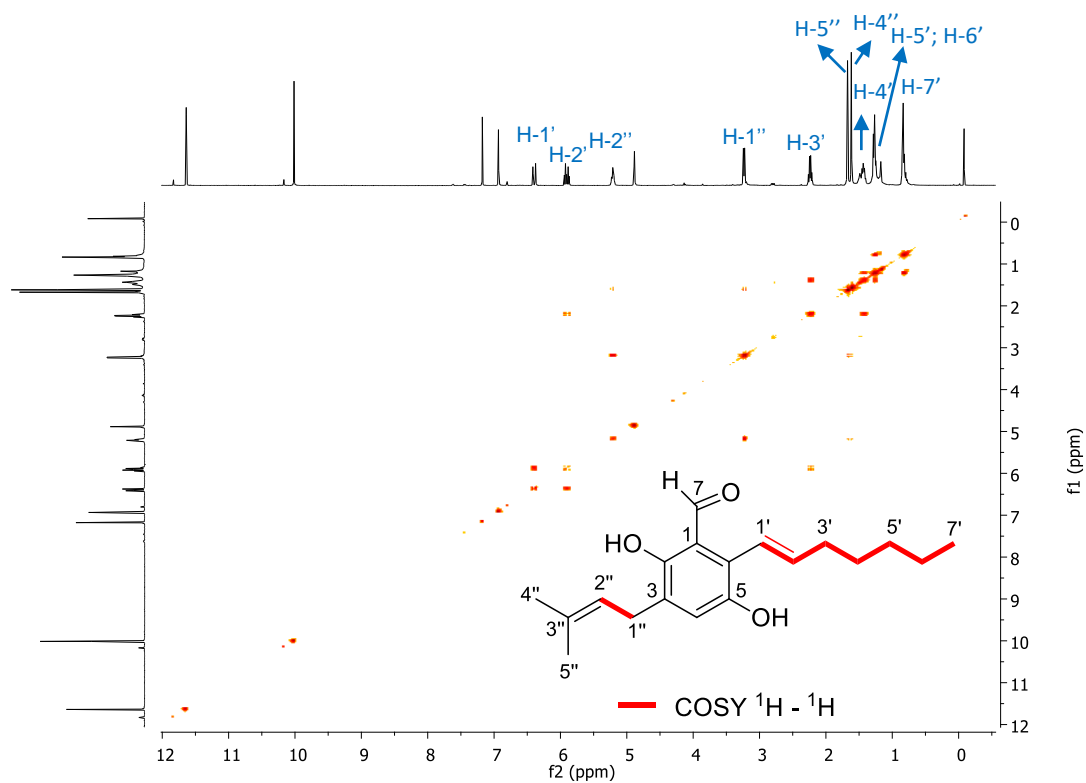


Figura 119. Mapa de contornos COSY (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **GO-6**.

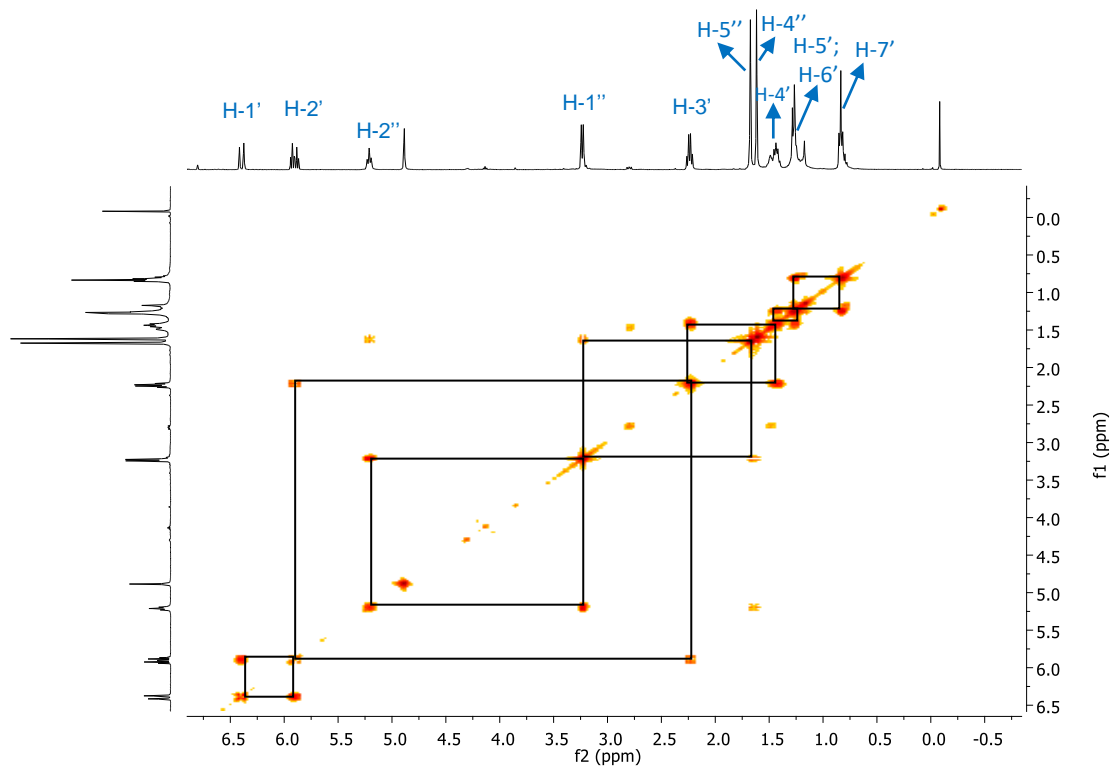


Figura 120. Mapa de contornos COSY (CDCl_3 , 400 MHz) do composto **GO-6** (expansão).

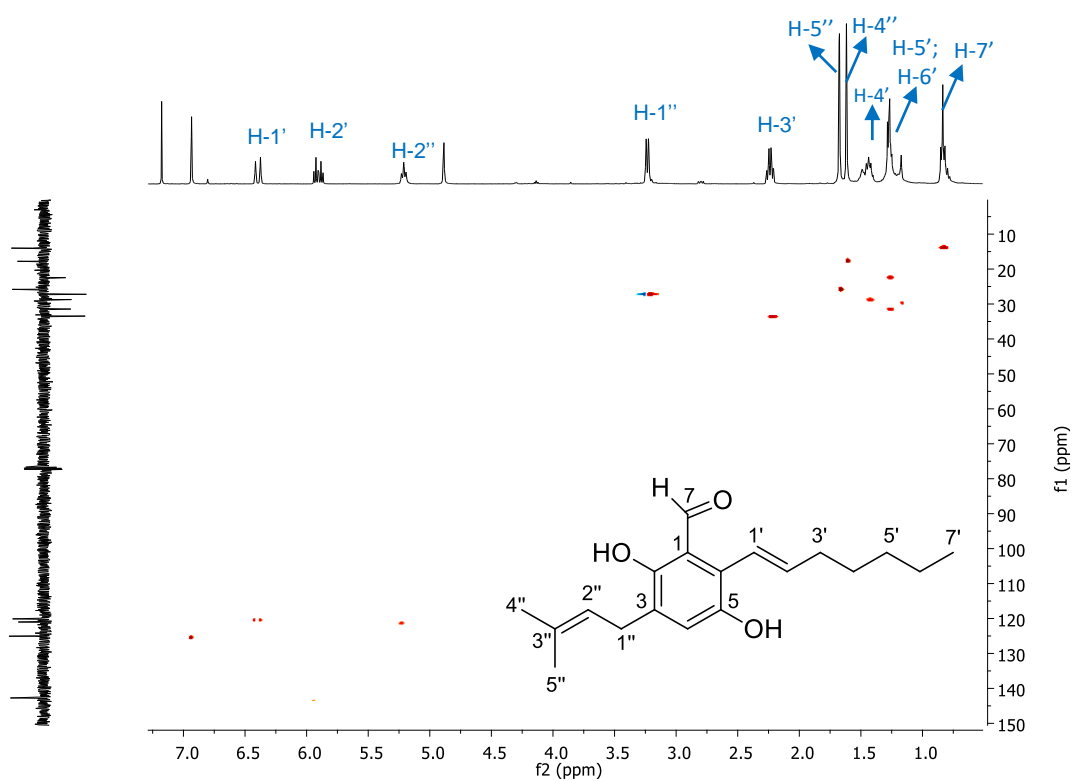


Figura 121. Mapa de contornos HSQC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-6**.

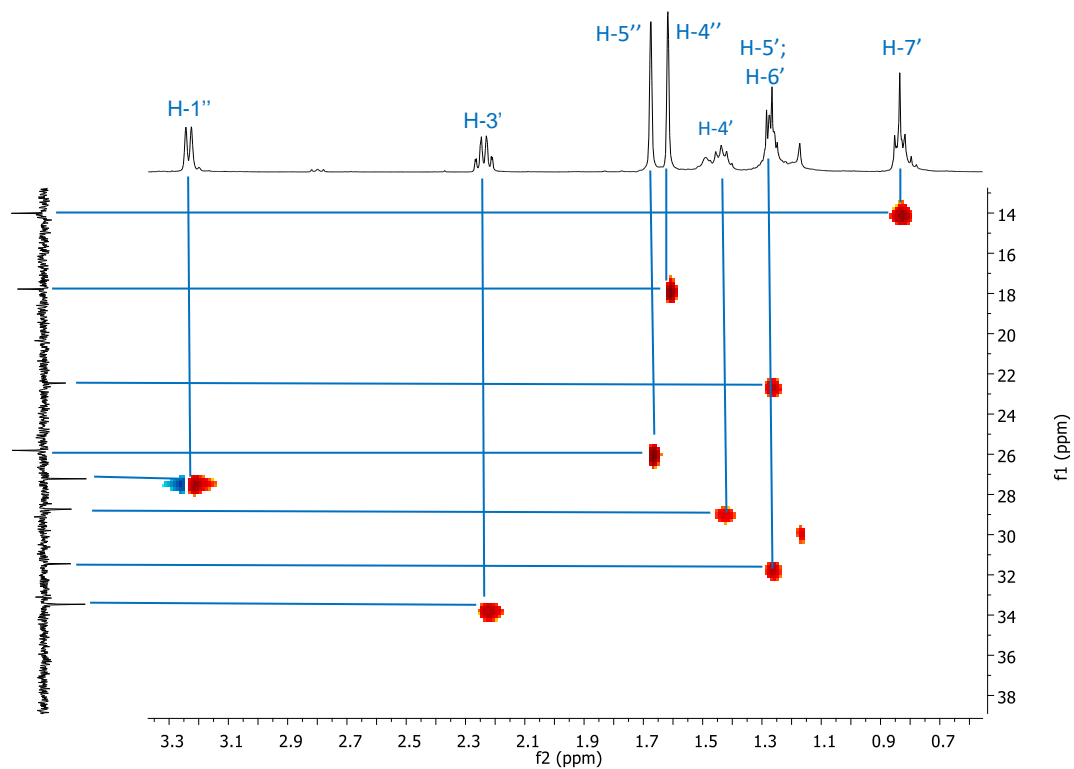


Figura 122. Mapa de contornos HSQC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-6** (expansão).

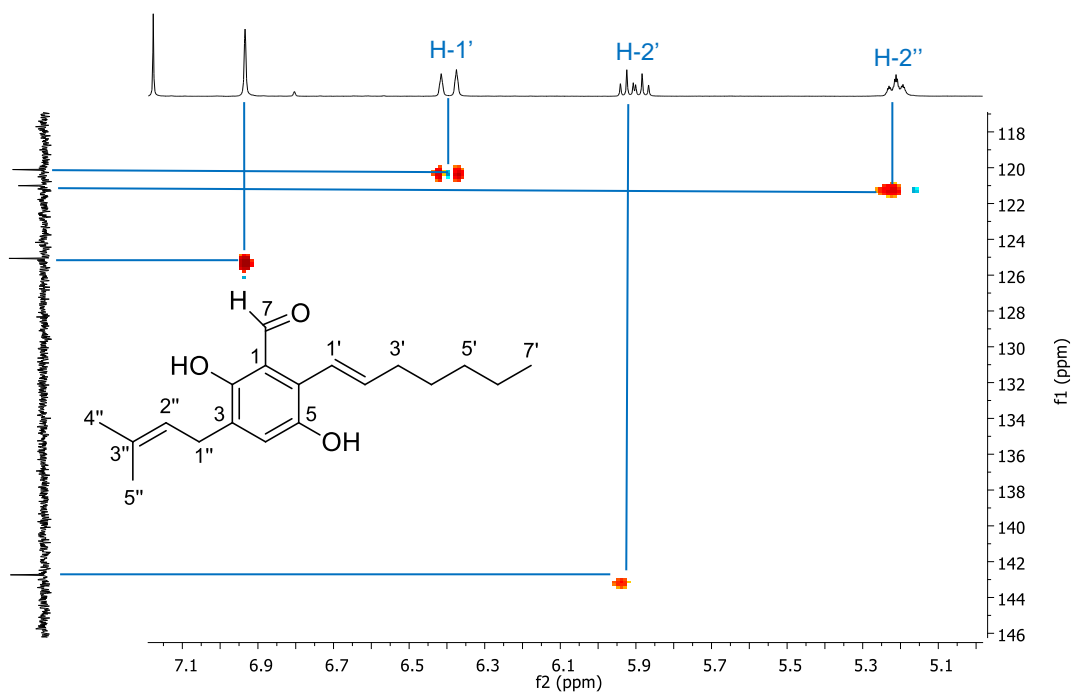


Figura 123. Mapa de contornos HSQC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-6** (expansão).

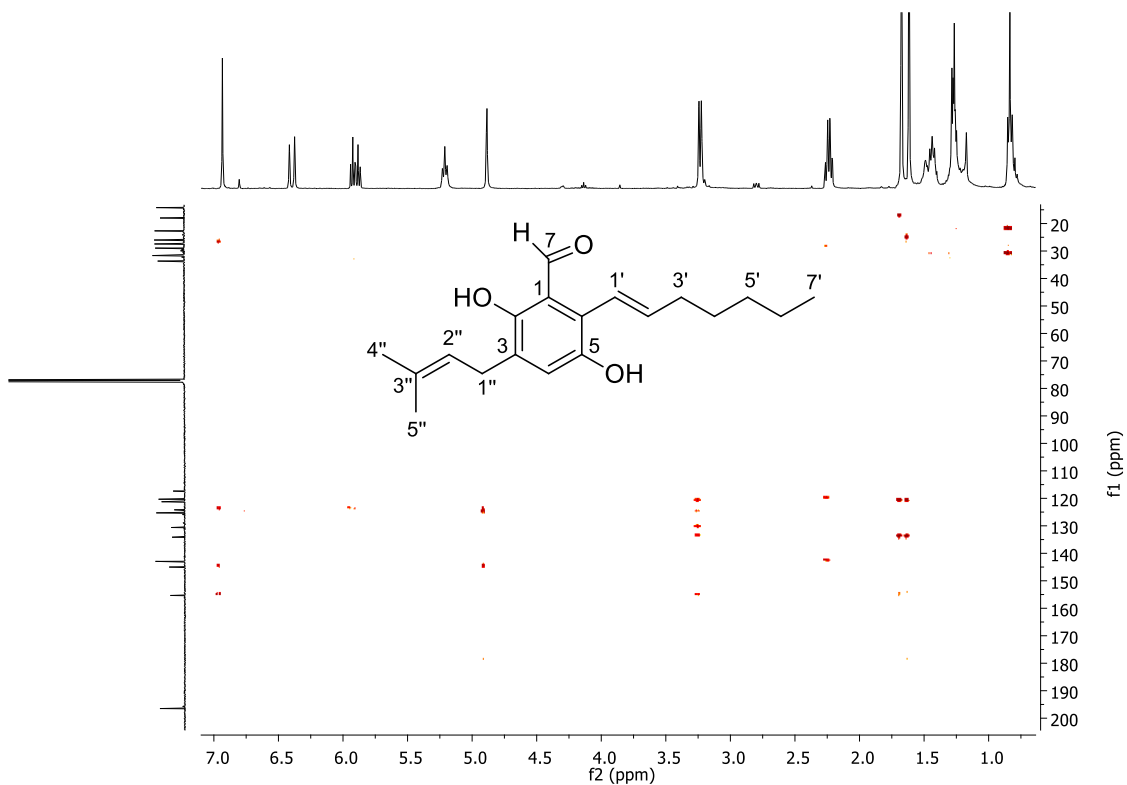


Figura 124. Mapa de contornos HMBC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-6**.

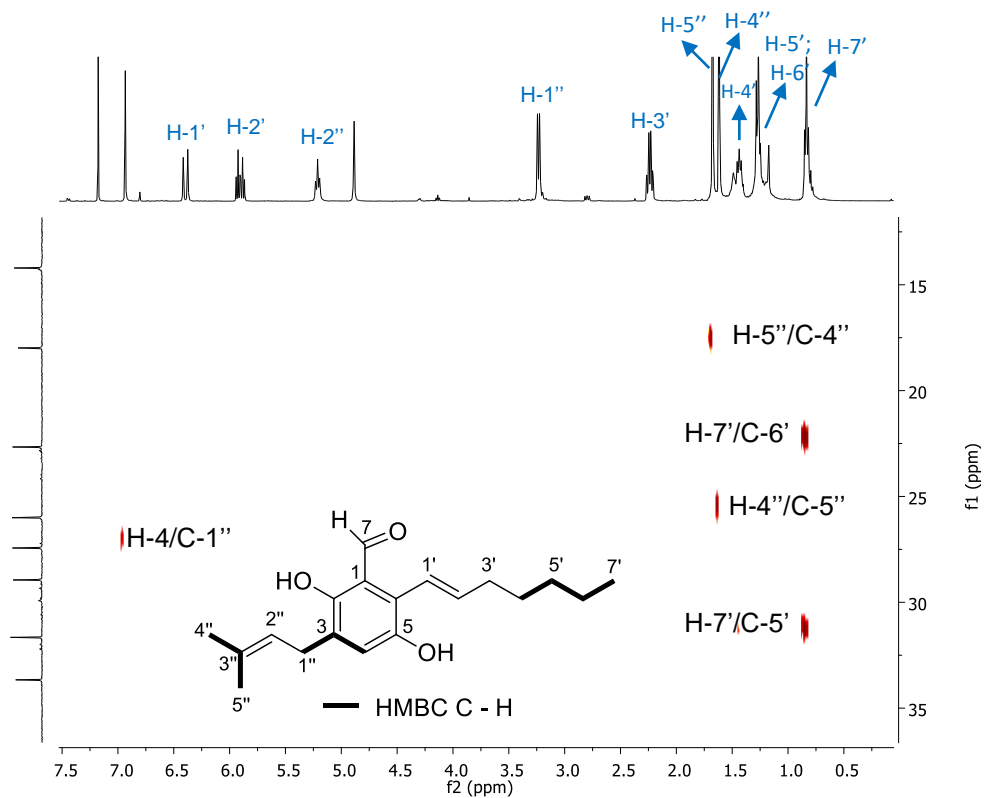


Figura 125. Mapa de contornos HMBC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-6** (expansão).

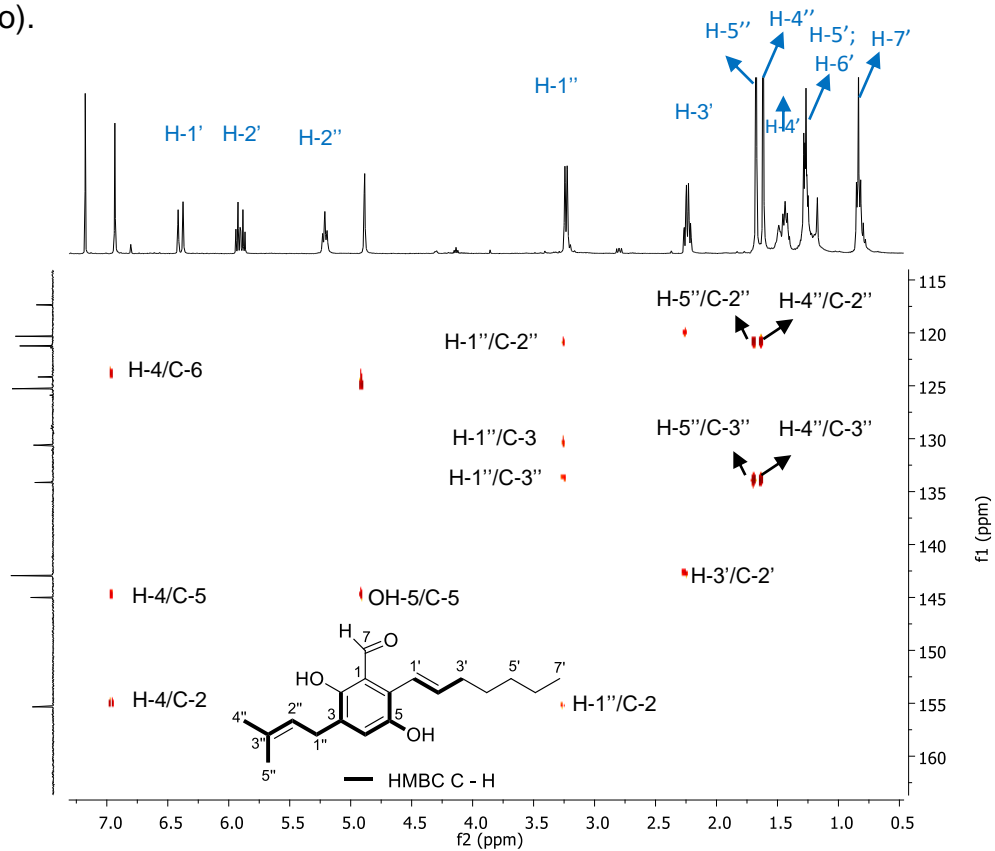


Figura 126. Mapa de contornos HMBC (CDCl₃, 400 MHz) do composto **GO-6** (expansão).

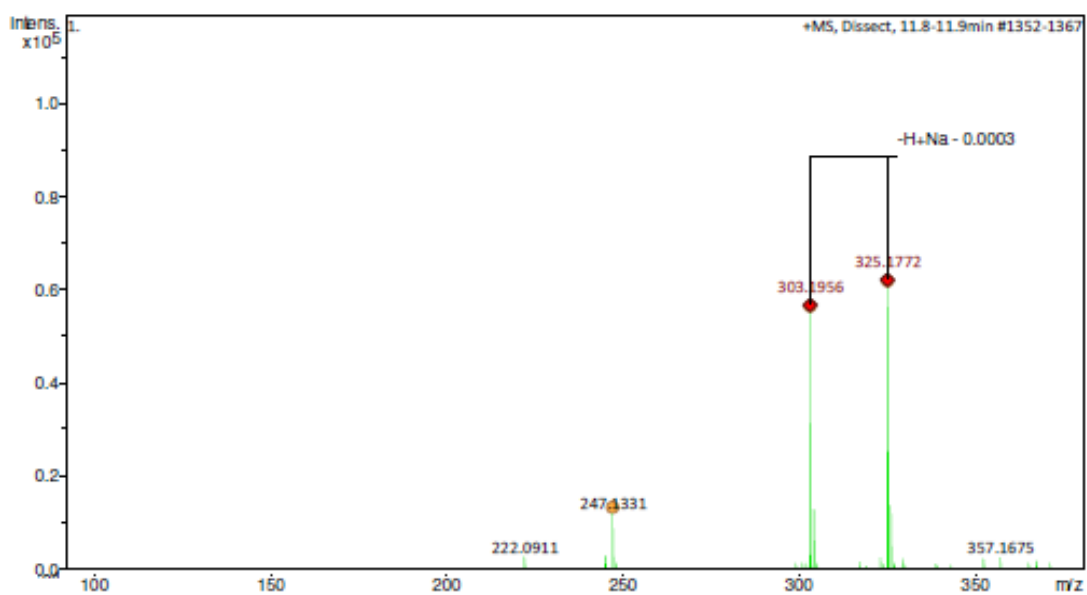
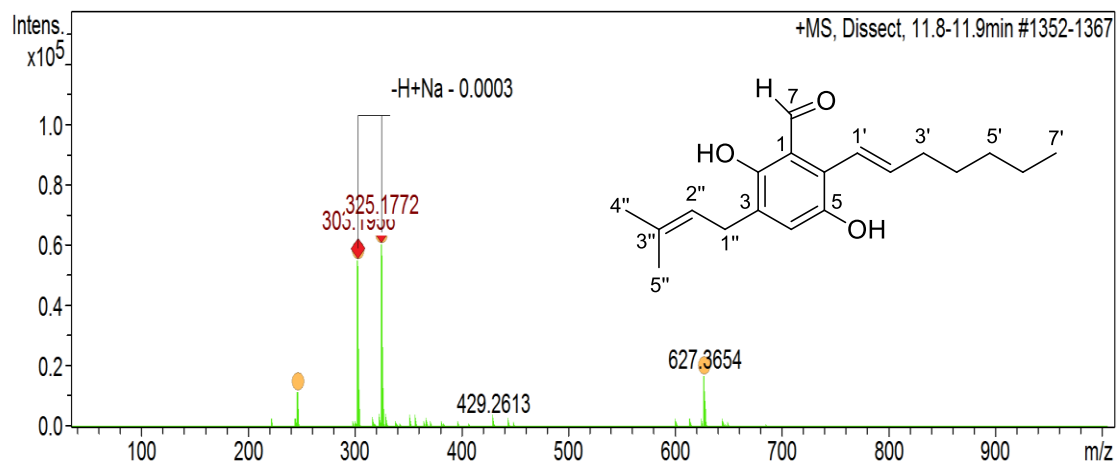


Figura 127. Espectro de massas (ESI modo positivo) do composto **GO-6**.

Tabela 11. Dados espectroscópicos de RMN (400 MHz, CDCl₃) do composto **GO-6** comparado a dados da literatura (MIYAKE et al., 2009)

C	¹ H - ¹³ C HSQC		¹ H - ¹³ C HMBC		* $\delta^{13}\text{C}$ (500 MHz, CDCl ₃)
	$\delta^{13}\text{C}$	δ ¹ H [m, J (Hz)]	² J _{CH}	³ J _{CH}	
1	117,2	-			117,1
2	155,1	-		H-4, H-1''	155,1
3	130,4	-	H-1''		130,4
4	125,1	7,02 (s)			125,0
5	144,8	-	OH-5		144,8
6	123,9	-		H-4	123,9
7	196,3	10,09 (s)			196,3
1'	120,1	6,48 (d, J= 16,0 Hz)		H-3'	120,1
2'	142,7	5,99 (td, J= 6,8 e 16,0 Hz)	H-3'		142,7
3'	33,5	2,29-2,35 (m)			33,4
4'	28,7	1,52 (quinteto J= 7,2 Hz)			28,7
5'	31,5	1,37-1,33 (m)	H-4'	H-7'	31,4
6'	22,5	1,37-1,33 (m)	H-7'		22,4
7'	14,0	0,92 (t, J= 7,0 Hz)			14,0
1''	27,2	3,32 (d, J= 7,2 Hz)		H-4	27,2
2''	121,0	5,32-5,27 (m)	H-1''	H-4'', H-5''	121,0
3''	133,9	-	H-4'', H-5''	H-1''	133,9
4''	17,8	1,70 (s)	H-5''		17,8
5''	25,8	1,76 (s)	H-4''		25,8
OH-2		11,72 (s)			
OH-5		4,97 (s)			

*MIYAKE et al., 2009.

Flavoglaucina, auroglaucina, tetraidroauroglaucina e análogos são derivados benzaldeídicos produzidos por diferentes espécies fúngicas, tais como *Eurotium rubrum* (LI et al., 2008), *Eurotium repens* (SMETANINA et al., 2007;

GAO et al., 2012), *Aspergillus amstelodami* (ALLEN et al., 1978), *A. chevalieri* (HAMASAKI et al., 1981) e *Penicillium charlesii* (YOSHIHIRA et al., 1972).

A maioria desse grupo de compostos é um benzaldeído com grupo prenila em C-3 e cadeia lateral de sete membros em C-6. Em alguns casos, a cadeia lateral e o grupo hidróxi em C-5 formam o anel furano ou pirano (LI et al., 2008).

Auroglaucina é o precursor que sofre redução formando flavoglaucina, tetraidroauroglaucina, dentre outros. Estudos mostram que estes três metabólitos secundários possuem diversas atividades, dentre as quais incluem-se antirradicalar contra 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) e superóxido (MIYAKE et al., 2009), sendo interessantes para o estudo nos modelos da doença de Parkinson, pois a patogênese desta doença inclui a morte neuronal como resultado do estresse oxidativo (WANG et al., 2018). Apresentam também atividade antagonista contra promastigotas de *Leishmania donovani* antipalúdicas contra estirpes sensíveis à cloroquina e resistentes à cloroquina de *Plasmodium falciparum* (GAO et al., 2012). Foi relatada atividade antifúngica e antibacteriana para flavoglaucina e tetraidroauroglaucina, enquanto auroglaucina apresentou atividade antifúngica (GAO et al., 2012). Além disso, estudos do efeito inibitório sobre mediadores inflamatórios caracterizaram derivados benzaldeídicos provenientes de fungos como potenciais candidatos ao tratamento de doenças inflamatórias (KIM et al., 2014).

5.9 Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos compostos isolados

Após identificados, os compostos **GO-2**, **GO-3**, **GO-4**, **GO-5** e **GO-6** foram submetidos ao ensaio de inibição da acetilcolinesterase e apresentaram alta porcentagem de inibição (superior a 50%) na maior concentração testada, sendo posteriormente submetidos ao ensaio de microdiluição para determinação da IC₅₀. Os valores de IC₅₀ encontrados para os compostos variaram de 62,9 - 120,7 µM (Tabela 12, pág. 140). **GO-6** apresentou maior atividade frente à acetilcolinesterase (IC₅₀ = 62,9 µM), sendo cerca de três vezes mais ativo que **GO-4** (IC₅₀ = 190,7 µM). **GO-5** foi o segundo metabólito mais ativo (IC₅₀ = 83,8 µM), e **GO-2** o terceiro mais ativo (IC₅₀ = 108,2 µM). Estatisticamente, todos os

valores de IC₅₀ diferem significativamente entre si ($P < 0,05$, intervalo de confiança de 95%).

Tabela 12. Inibição da acetilcolinesterase dos compostos isolados

Compostos	IC ₅₀ (μM)	R ²
GO-2	108,2	0,93
GO-3	143,3	0,98
GO-4	190,7	0,96
GO-5	83,8	0,99
GO-6	62,9	0,97
Eserina	3,6	0,99

De acordo com os resultados obtidos pode-se inferir que os compostos **GO-2** a **GO-6** contribuem para a alta porcentagem de inibição da enzima apresentada pelo extrato ($95,3 \pm 1,1\%$) do qual esses metabólitos foram isolados.

Inibidores da acetilcolinesterase interagem com a enzima inibindo a degradação do neurotransmissor acetilcolina. A substância inibidora pode agir retardando o ataque direto da enzima ao neurotransmissor, deixando o sítio ativo da enzima temporariamente inativo. Com o sítio ativo impedido, a enzima não realiza a função catalítica na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, retardando, assim, sua degradação (HOUGHTON et al., 2006).

Tendo em vista que a estratégia mais usada para o tratamento da doença de Alzheimer é a terapia com substâncias anticolinesterásicas (OLIVEIRA et al., 2019), os compostos investigados podem ajudar como novos modelos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de pacientes com a doença de Alzheimer. De acordo com a literatura, dicetopiperazinas (LIMA et al., 2018a) bem como derivados de pirrol (ALMASI et al., 2018) são relatadas como potencial inibidores da acetilcolinesterase e o composto **GO-2** contém ambas as unidades em sua estrutura, o que pode ter corroborado para a sua alta atividade. Derivados de compostos quinonoídicos têm sido relatados como inibidores da acetilcolinesterase (WU et al., 2018) e benzoquinonas têm sido utilizadas como

ligantes para potencializar tal atividade (PRATI et al., 2013). O composto **GO-3** possui a porção benzoquinona em sua estrutura, o que pode ter colaborado para a atividade apresentada por este metabólito. Compostos fenólicos também tem apresentado bons resultados como inibidores da acetilcolinesterase (NUGROHO et al., 2016). Tendo em vista que os metabólitos **GO-3**, **GO-4**, **GO-5** e **GO-6** possuem um grupamento fenol em sua estrutura, o que pode justificar a alta inibição apresentada por esses compostos.

Recentemente, dienos funcionalizados foram relatados como agentes potencias para o tratamento da doença de Alzheimer (OLIVEIRA et al., 2019). De acordo com estudos de docking molecular, quanto maior o número de interações π - π entre os dienos e os resíduos no local catalítico da enzima, maior a capacidade inibitória do composto. É interessante notar que os compostos **GO-2** a **GO-6** possuem ligações duplas em suas estruturas, seja no anel benzeno ou numa cadeia alifática, o que pode ser mais um fato que ajuda a explicar a alta atividade apresentada por estes metabólitos secundários (OLIVEIRA et al., 2019).

Portanto, sugere-se que a diferença na atividade apresentada pelos compostos **GO-2** a **GO-6** pode estar relacionada ao arranjo espacial dos compostos, o que permite aumentar ou diminuir o número de interações com a enzima. É interessante notar que, em **GO-2**, o núcleo indólico, região de maior número de ligações π , encontra-se estericamente impedido devido ao arranjo da porção dicetopiperazina e das unidades isoprenilas no espaço (Figura 128, pág. 142). Enquanto o composto **GO-4**, diferente de **GO-5**, possui uma cadeia alifática saturada que pode girar em torno de uma ligação simples causando impedimento estérico, essa diferença pode ser responsável pelo fato de **GO-4** ter sido o composto menos ativo. Porém, estudos mais aprofundados serão necessários para comprovar tais suposições.

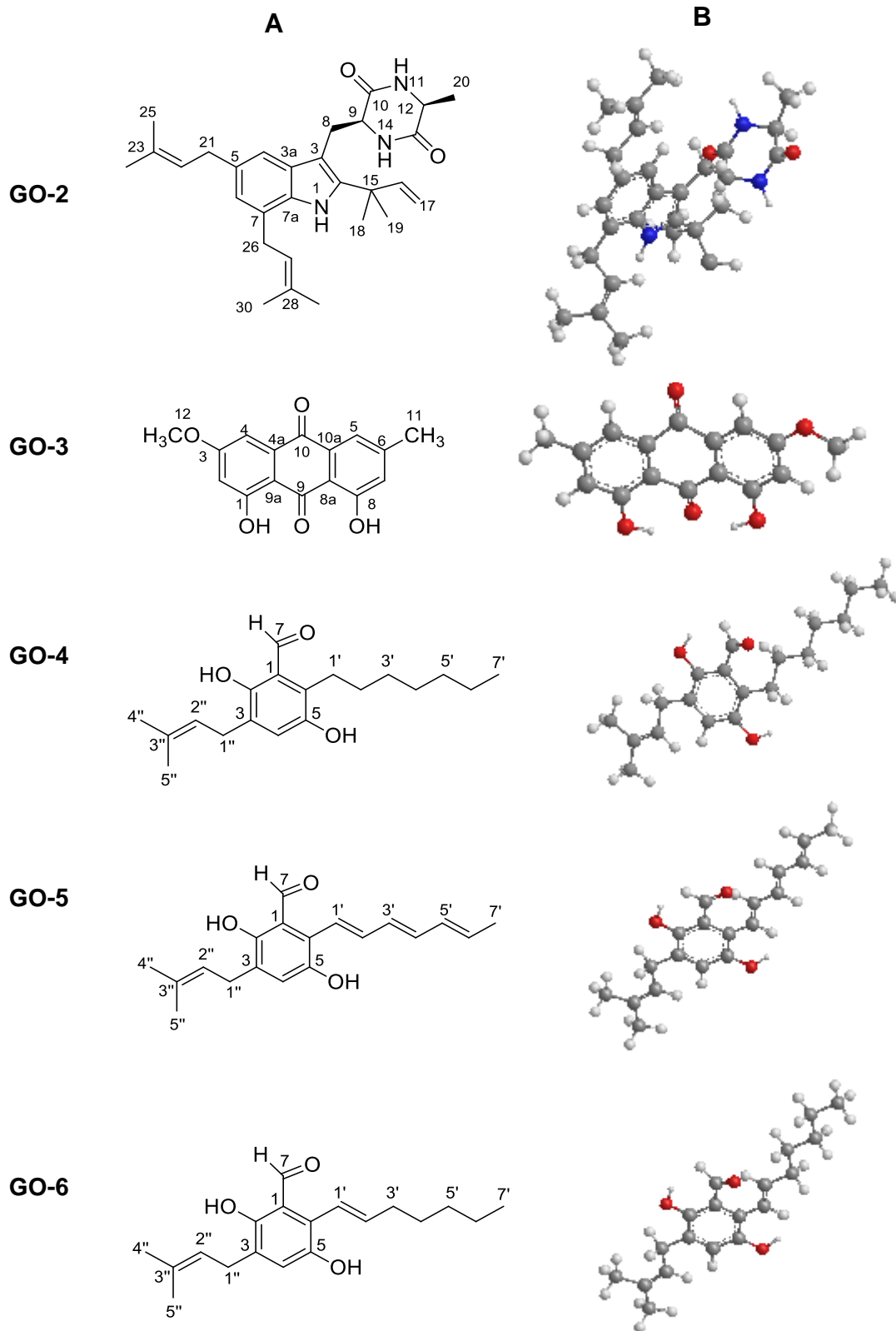


Figura 128. Estruturas químicas dos compostos **GO-2** a **GO-6** (A) e suas representações em 3D (B).

5.10 Atividade neuroprotetora preventiva e terapêutica

O composto **GO-2** e o extrato do qual foi isolado (584+B619, cultivo 1 do Experimento 3) foram submetidos ao ensaio de atividade neuroprotetora preventiva e terapêutica *in vivo*, como descrito no item 4.3.5.2, pag. 39.

Inicialmente, testaram-se três concentrações do extrato (5, 10 e 20 mg mL⁻¹) para determinar qual seria ideal, ou seja, a concentração não tóxica para as moscas e que apresente o maior efeito neuroprotetor. Para isso, as moscas foram expostas ao alimento contendo o extrato, nas respectivas concentrações e, em seguida, ao alimento contendo a rotenona. Dentre as concentrações testadas, a de 20 mg mL⁻¹ apresentou o melhor resultado, sendo escolhida para a realização do ensaio. Os resultados foram calculados baseados na média do número de moscas que subiram acima da metade do volume do tubo geotáxico durante a determinação da geotaxis negativa.

Desta forma, a concentração de 20 mg mL⁻¹ foi utilizada para os ensaios da avaliação da atividade neuroprotetora preventiva, na qual as moscas foram submetidas primeiro à presença da amostra (extrato ou substância pura) e depois à rotenona (amostra-rotenona) e da avaliação da capacidade terapêutica, na qual as moscas foram submetidas primeiro à rotenona e depois à amostra (rotenona-amostra). Essa concentração foi utilizada para os ensaios com o extrato e com o composto **GO-2**. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 13, pág. 144. Estatisticamente, para cada atividade, em particular, os resultados são significativamente diferentes ($P < 0,05$, no intervalo de confiança de 95%). A atividade preventiva do extrato mostrou-se significativamente igual à atividade terapêutica do composto **GO-2**.

Tabela 13. Resultado da atividade neuroprotetora preventiva e terapêutica do extrato 584+B619 e do composto **GO-2**

Amostra	Atividade preventiva (%) (Amostra-Rotenona)	Atividade terapêutica (%) (Rotenona-amostra)
Extrato 584+B619	27,33 ± 0,67 ^a	24,47 ± 0,2 ^c
GO-2	42,66 ± 1,34 ^b	27,93 ± 1,0 ^{d,a}

As letras sobrescritas se referem à análise estatística (teste Tukey: $P < 0,05$, intervalo de confiança de 95%), onde valores com a mesma letra sobrescrita significam que são significativamente iguais entre si e com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si.

Os resultados mostraram que o extrato 584+B619 e o composto **GO-2** apresentaram atividade neuroprotetora preventiva e terapêutica contra o efeito neurodegenerativo induzido por rotenona em *D. melanogaster*. Em média, a cada 15 moscas submetidas ao efeito neurodegenerativo induzido, $4,1 \pm 0,6$ não foram afetadas quando submetidas à presença do extrato anteriormente (27,3% de proteção), enquanto $6,4 \pm 0,5$ não foram afetadas quando submetidas à presença do composto **GO-2** anteriormente (42,6% de proteção).

Quanto à avaliação do efeito terapêutico, embora ambas as amostras tenham apresentado atividade baixa (extrato: $24,47 \pm 0,2\%$ e **GO-2**: $27,93 \pm 1,0\%$), esse resultado já é muito interessante, uma vez que tanto o extrato como a substância pura possivelmente auxiliaram, ainda que pouco, na regeneração de neurônios danificados pelo efeito neurodegenerativo da rotenona, permitindo que as moscas desempenhassem sua função locomotora normalmente, como ocorre no controle, em que as moscas não são submetidas a nenhum tratamento.

Portanto, esses resultados, aliados aos resultados de inibição da acetilcolinesterase, indicam que o fungo *A. chevalieri* é uma fonte de metabólitos promissores para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como o composto **GO-2**, que apresentou atividade neuroprotetora preventiva, terapêutica e anti-acetilcolinesterásica.

5.11 Quantificação dos compostos por CLAE

Para a quantificação dos compostos **GO-2**, **GO-3**, **GO-4**, **GO-5** e **GO-6**, estes foram submetidos à análise por CLAE, por meio da qual foi possível identificá-los nos extratos obtidos a partir dos três cultivos (584+B619, cultivo 1; 584+C619, cultivo 2 e 584+C/B619, cultivo 3) do Experimento 3, bem como no extrato controle (584) (Figura 130). A presença dos mesmos nos extratos significa que foram produzidos pelo fungo em todos os cultivos, inclusive no controle, restando avaliar a quantidade produzida para verificar se ocorreu aumento ou minimização de sua produção nos diferentes cultivos.

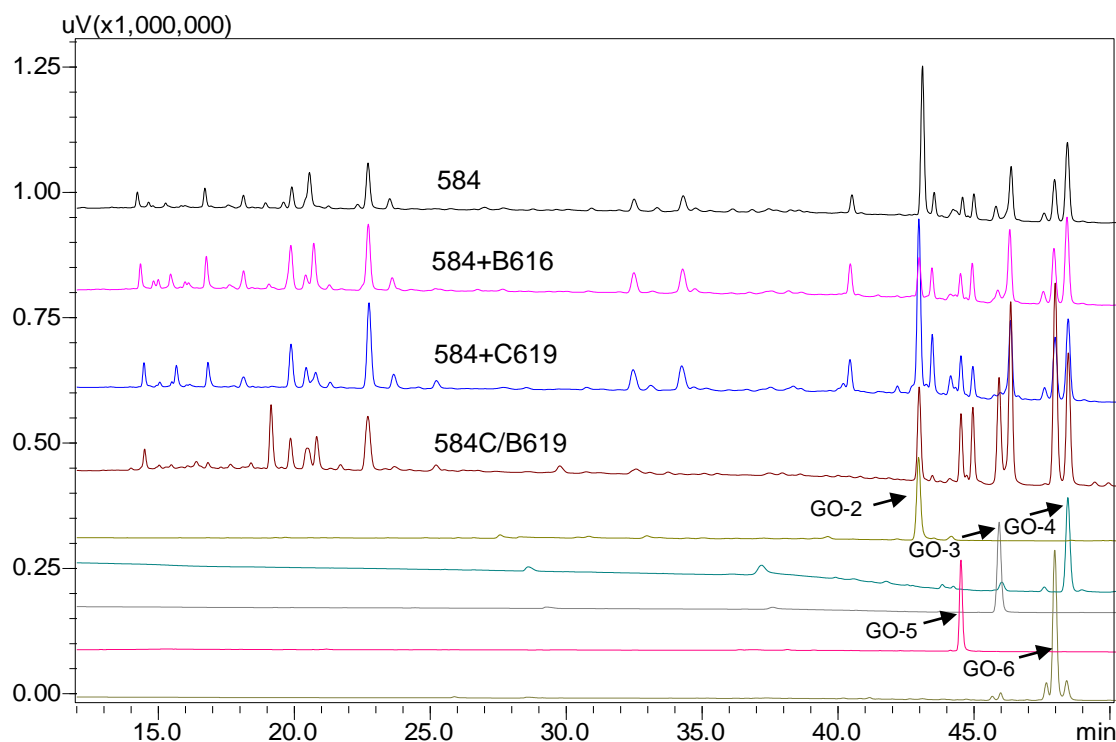


Figura 129. Cromatogramas (270 nm) dos extratos dos cultivos do fungo *A. chevalieri* com biomassa (584+B619), caldo (584+C619) e caldo/biomassa (584+C/B619), do controle (584) e dos compostos isolados (**GO-2**, **GO-3**, **GO-4**, **GO-5** e **GO-6**).

A equação da reta determinada para cada composto, o coeficiente de correlação (R^2) e os valores dos teores dos compostos (expressos em porcentagem) estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Teores dos metabólitos nos extratos dos três cultivos e no controle do fungo 584 do Experimento 3

Metabólito	TR (min)	Teor nos extratos (%)				Equação da reta e R ²
		584+B616 (Cultivo 1)	584+C619 (Cultivo 2)	584+C/B619 (Cultivo 3)	584 (Controle)	
GO-2	43,0	15,2 ^a	25,3 ^b	6,0 ^c	26,8 ^d	Y= 1,0 x 10 ⁶ x + 18785 (R ² = 0,99)
GO-3	46,0	1,3 ^{a,e}	0,8 ^f	9,9 ^g	1,5 ^{e,h}	Y= 2,0 x 10 ⁶ x - 1547 (R ² = 0,99)
GO-4	48,5	15,5 ^{a,i}	15,1 ^{a,j}	15,1 ^{a,k}	27,7 ^l	Y= 1,0 x 10 ⁶ x - 5537,7 (R ² = 0,99)
GO-5	44,5	8,3 ^m	6,7 ⁿ	16,2 ^o	5,6 ^p	Y= 8,8 x 10 ⁵ x - 5643,4 (R ² = 0,99)
GO-6	48,0	2,7 ^q	3,2 ^r	10,4 ^s	2,1 ^t	Y= 4,0 x 10 ⁷ x + 81536 (R ² = 0,99)

As letras sobrescritas se referem à análise estatística (teste Tukey: P < 0,05, intervalo de confiança de 95%), onde valores com a mesma letra significa que são significativamente iguais entre si e com letras diferentes, são significativamente diferentes entre si.

De acordo com os resultados obtidos a partir da quantificação, os cinco compostos juntos constituem 43,0% do extrato do cultivo 1 (584+B619), 51,1% do extrato do cultivo 2 (584+C619), 57,6% do extrato do cultivo 3 (584+CB619) e 63,7% do extrato controle (cultivo do fungo 584 isolado).

Dos cinco compostos quantificados, os compostos **GO-5** e **GO-6** tiveram seus teores aumentados nos três cultivos do fungo 584 em relação ao controle, enquanto **GO-2** e **GO-4** tiveram seus teores reduzidos. No extrato a partir do qual os compostos foram isolados (584+B619), **GO-2** e **GO-4** são majoritários em relação aos outros três, com teores significativamente iguais entre si (P < 0,05, intervalo de confiança de 95%), enquanto os compostos **GO-3** e **GO-6** são minoritários.

Tendo em vista que os extratos dos cultivos 1, 2 e 3 apresentaram atividade anti-acetilcolinesterase acima de 80% e que os compostos **GO-2** a **GO-6** estão presentes nos mesmos, pode se inferir que estes contribuem significativamente para a atividade destes extratos.

6 CONCLUSÕES

No geral, co-cultura, OSMAC e modulação epigenética mostraram-se abordagens eficientes para obter modificações no metabolismo das espécies fúngicas estudadas e, conseqüentemente, para modular a atividade inibitória da acetilcolinesterase. Por meio de cromatografia líquida de alta eficiência e de espectrometria de massas foi possível constatar a variação do perfil metabólico dos fungos nos diferentes experimentos realizados.

Dos cento e trinta e cinco extratos obtidos nos Experimentos 1, 2, 3 e 4, sessenta e dois apresentaram valor de porcentagem de inibição acima de 50%. Os extratos da espécie *A. chevalieri* (584) cultivada em meio líquido nos cultivos 1, 2 e 3 (Experimento 3) apresentaram altos valores de inibição da acetilcolinesterase, sendo em sua maioria acima de 80%. A partir da cromatografia dos extratos dos cinco cultivos realizados em escala ampliada foi possível o isolamento de seis produtos naturais, D-manitol (**GO-1**), obtido a partir da co-cultura de *F. nygamai* com a bactéria *E. carotovora* (Experimento 1), echinulina (**GO-2**), fisciona (**GO-3**), flavoglaucina (**GO-4**), auroglaucina (**GO-5**) e tetraidroauroglucina (**GO-6**), obtidos a partir da co-cultura da espécie *A. chevalieri* com a biomassa da espécie *F. nygamai* (Experimento 3).

As substâncias isoladas (**GO-2** a **GO-6**) apresentaram atividade inibitória da acetilcolinesterase (IC_{50} variando de 62,9 a 190,7 μ M), mostrando-se promissoras para futuras investigações, visando obter novos fármacos para o tratamento de pacientes com doença de Alzheimer. O metabólito **GO-2** mostrou-se como uma substância promissora para a pesquisa de fármacos para o tratamento de pacientes com doenças neurodegenerativas, pois também apresentou atividade neuroprotetora.

A co-cultura de *A. chevalieri* com *F. nygamai* em meio líquido resultou no aumento da produção de **GO-5** e **GO-6** nos três cultivos do fungo *A. chevalieri*.

A análise por PS-MS dos extratos de co-cultura de fungos foi eficiente para identificação dos metabólitos ácido linoleico, ácido *p*-cumárico, 9-hidroxi-megastigma-3,5,8-trien-7-ona-9-O- β -D-glucopiranosídeo e ácido 9-hidroxi-octadeca-dienoico.

7 REFERÊNCIAS

- AKONE, S. H.; MÁNDI, A.; KURTÁN, T.; HARTMANN, R.; LIN, W.; DALETOS, G.; PROKSCH, P. Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Chaetomium* sp. through fungalebacterial co-culture and epigenetic Modification. **Tetrahedron**, 72, 6340-6347, 2016.
- ALLEN, J. K.; BARROW, K. D.; JONES, A. J.; HANISCH, P. Biosynthesis of Flavoglucin. Stereochemistry of Aromatic Isoprenylation. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, 152-154, 1978.
- ALI, M.; MOHAMMED, N.; ALNAQEEB, M. A.; HASSAN, R. A. H.; AHMAD, H. S. A. S. A. Toxicity of Echinulin from *Aspergillus chevalieri* in Rabbits. **Toxicology Letters**, 48, 235-241, 1989.
- ALI, M.; NAZAR, M.; ALNAQEED, M. A.; HASSAN, R. A. H.; AHMAD, H. S. A. Toxicity of Echinulin from *Aspergillus chevalieri* in Rabbits. **Mycotoxins**, 121-122, 1988.
- ALMASI, F.; MOHAMMADIPANAH, F.; ADHAMI, H. R.; HAMEDI, J. Introduction of marine-derived *Streptomyces* sp. UTMC 1334 as a source of pyrrole derivatives with anti-acetylcholinesterase activity. **Journal of Applied Microbiology**, 125, 1370-1382, 2018.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A.; A. ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of proteínas database search programs. **Nucleic Acids Reseach**, 25, 3389-3402, 1997.
- AMALFITANO, C.; PENGUE, R.; ANDOLFI, A.; VURRO, M.; ZONNO, M. C.; EVIDENTE, A. HPLC analysis of fusaric acid, 9,10-dehydrofusaric acid and their methyl esters, toxic metabolites from weed pathogenic *Fusarium* species. **Phytochemical Analysis**, 13, 277-282, 2002.
- ANCHEEVA, E.; KUPPERS, L.; AKONE, S. H.; EBRAHIM, W.; LIU, Z.; MANDI, A.; KURTAN, T.; LIN, W.; ORFALI, R.; REHBERG, N.; KALSCHUEUR, R.; DALETOS, G.; PROKSCH, P. Expanding the Metabolic Profile of the Fungus *Chaetomium* sp. through Co-culture with Autoclaved *Pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Organic Chemistry**, 22, 3256-3264, 2017.

- ARAI, T.; KOGANEI, K.; UMEMURA, S.; KOJIMA, R.; KATO, J.; KASUMI, T.; OGIHARA, J. Importance of the ammonia assimilation by *Penicillium purpurogenum* in amino derivative Monascus pigment, PP-V, production. **AMB Express**, 3, 19, 2013.
- ASAI, T.; CHUNG, Y.; SAKURAI, H.; OZEKI, T.; CHANG, F.; WU, Y.; YAMASHITA, K.; OSHIMA, Y. Highly oxidized ergosterols and isariotin analogs from an entomopathogenic fungus, *Gibellula formosana*, cultivated in the presence of epigenetic modifying agents. **Tetrahedron**, 68, 5817–5823, 2012.
- BACHMANN, M.; LUTHY, J.; SCHLATTER, C. Toxicity and Mutagenicity of Molds of the *Aspergillus glaucus* Group, Identification of Physcion and Three Related Anthraquinones as Main Toxic Constituents from *Aspergillus chevalieri*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 27, 1342-1347, 1979.
- BERTRAND, S.; SCHUMPP, O.; BOHNI, N.; MONOD, M.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J. -L. De Novo Production of Metabolites by Fungal Co-Culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. **Journal of Natural Products**, 76, 1157, 2013a.
- BERTRAND, S.; SCHUMPP, O.; BOHNI, N.; BUJARD, A.; AZZOLLINI, A.; MONOD, M.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J. Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. **Journal of Chromatography A**, 1292, 219-228, 2013b.
- BILLS, G. F.; PLATAS, G.; FILLOLA, A.; JIMÉNEZ, M. R.; COLLADO, J.; VICENTE, F.; MARTÍN, J.; GONZÁLEZ, A.; BUR-ZIMMERMANN, J.; TORMO, J. R.; PELÁEZ, F. Enhancement of Antibiotic and Secondary Metabolite Detection from Filamentous Fungi by Growth on Nutritional Arrays. **Journal of Applied Microbiology**, 104, 1644-1658, 2008.
- BODE, H. B.; BETHE, B.; HÖFS, R.; ZEECK, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBioChem**, 3, 619-627, 2002.
- BOHNI, N.; HOFSTETTER, V.; GINDRO, K.; BUYCK, B.; SCHUMPP, O.; BERTRAND, S.; MONOD, M.; WOLFENDER, J. L. Production of Fusaric

- Acid by *Fusarium* spp. in Pure Culture and in Solid Medium Co-Cultures. **Molecules**, 21, 370, 2016.
- BROWN, A. G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J. D.; READING, C.; ROLINSON, G. N. Naturally-Occurring β -Lactamase Inhibitors With Antibacterial Activity. **The Journal of Antibiotics**, 29, 668-669, 1976.
- BURGER, A. The History of Penicillin Production. **Journal of Medicinal Chemistry**, 14, 86-86, 1971.
- BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products**, 67, 2141-2153, 2004.
- CHATTERJEE, S.; KUANG, Y.; SPLIVALLO, R.; CHATTERJEE, P.; KARLOVSKY, P. Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. **BMC Microbiology**, 83, 1-13, 2016.
- CHAUDHURI, A.; BOWLING, K.; FUNDERBURK, C.; LAWAL, H.; INAMDAR, A.; WANG, Z.; O'DONNELL, J. M. Interaction of genetic and environmental factors in a *Drosophila* Parkinsonism model. **The Journal of Neuroscience**, 27, 2457-2467, 2007.
- CHERBLANC, F. L.; DAVIDSON, R. W. M.; DI FRUSCIA, P.; SRIMONGKOLPITHAK, N.; FUCHTER, M. J. Perspectives on natural product epigenetic modulators in chemical biology and medicine. **Natural Product Reports**, 30, 24-605, 2013.
- CHOWDHURY, N. S.; SOHRAB, M. D. H.; RANA, M. D. S.; HASAN, C. M.; SHIDI, S. J.; RAHMAN, K. M. Cytotoxic Naphthoquinone and Azaanthraquinone Derivatives from an Endophytic *Fusarium solani*. **Journal Natural Products**, 80, 1173-1177, 2017.
- CICHEWICZ, R. H. Epigenome Manipulation as a Pathway to New Natural Product Scaffolds and their Congeners. **Natural Product Reports**, 27, 11-22, 2010.
- CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from Natural Molecules. **Nature**, 432, 829-37, 2004.
- CLAY, K.; HOLAH, T. Fungal Endophyte Symbiosis and Plant Diversity in Successional Fields. **Science**, 285, 1742-1744, 1999.

- COULOM, H.; BIRMAN, S. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's Disease in *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Neuroscience**, 24, 10993-10998, 2004.
- DAENEN, L.; SAISON, D.; STERCKX, F.; DELVAUX, F. R.; VERACHTERT, H. DERDELINCKX, G. Screening and Evaluation of the Glucoside Hydrolase Activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* Brewing Yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, 104, 478-488, 2008.
- DANIELSEN, K.; AKSNES, D. W.; FRANCIS, G. W. NMR Study of Some Anthraquinones from *Rhubarb*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 30, 359-363, 1992.
- DAWSON, T. M.; KO, H. S.; DAWSON, V. L. Genetic Animal Models of Parkinson's Disease. **Neuron**, 66, 646-661, 2010.
- DEY, A.; BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, A.; PANDEY, D. K. Natural Products against Alzheimer's Disease: Pharmaco-Therapeutics and Biotechnological Interventions. **Biotechnology Advances**, 35, 178-216, 2017.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Basic plant pathology methods. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, p. 434, 1995.
- DONG, J.-W.; CAI, L.; LI, X.-J.; MEI, R.-F.; WANG, J.-P.; LUO, P.; SHU, Y.; DING, Z.-T. Fermentation of *Illigera aromatica* with *Clonostachys rogersoniana* producing novel cytotoxic menthane-type monoterpenoid dimers. **RSC Advances**, 7, 38956–38964, 2017.
- DOS SANTOS, G. F.; PEREIRA, R. G.; BOAVENTURA, M. A. D.; MACIAS, F. A.; LIMA, G. S.; COELHO, A. C. S.; MOLINILLO, J. M. G.; CALA, A.; TAKAHASHI, J. A. Structure-Activity Relationship Study of Diterpenes for Treatment of Alzheimer's Disease. **Química Nova**, 40, 1045-1050, 2017.
- DU, L.; FENG, T.; ZHAO, B.; LI, D.; CAI, S.; ZHU, T.; WANG, F.; XIAO, X.; GU, Q. Alkaloids from a deep ocean sediment-derived fungus *Penicillium* sp. and their antitumor activities. **The Journal of Antibiotics**, 63, 165–170, 2010.
- DU, F. Y.; LI, X. M.; LI, C. S.; SHANG, Z.; WANG, B. G. Cristatumins A-D, New Indole Alkaloids From the Marine-Derived Endophytic Fungus *Eurotium cristatum* EN-220. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, 22, 4650-4653, 2012.

- DUFOSSÉ, L., FOUILLAUD, M., CARO, Y., MAPARI, S. A., & SUTTHIWONG, N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, 26, 56–61, 2014.
- EFFMERT, U.; KALDERÁS, J.; WARNKE, R.; PIECHULLA, B. Volatile Mediated Interactions Between Bacteria and Fungi in the Soil. **Journal of Chemical Ecology**, 38, 665-703, 2012.
- ELIAS, B. C.; SAID, S.; ALBUQUERQUE, S.; PUPO, M. T. Microbiol. The Influence of Culture Conditions on the Biosynthesis of Secondary Metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck. **Microbiological Research**, 161, 273-280, 2006.
- ELIAS, F.; WOYESSA, D.; MULETA, D. Phosphate Solubilization Potential of Rhizosphere Fungi Isolated from Plants in Jimma Zone, Southwest Ethiopia. **International Journal of Microbiology**, 1-11, 2016.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRESS JR., V.; FEATHERSTONE, R. M. A New Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. **Biochemical Pharmacology**, 7, 88-90, 1961.
- ENDO, A. The Discovery and Development of HMG-CoA Reductase Inhibitors. **The Journal of Lipid Research**, 33, 1569-1582, 2004.
- FEOFILOVA, E. P. The Kingdom Fungi: Heterogeneity of Physiological and Biochemical Properties and Relationships with Plants, Animals, and Prokaryotes (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, 37, 124-137, 2001.
- FUJIMOTO, H.; FUJIMAKI, T. OKUYAMA, E.; YAMAZAKI, M. Immunomodulatory Constituents from an Ascomycete, *Microascus tardifaciens*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 47, 1426-1432, 1999.
- GAO, J.; RADWAN, M. M.; LEÓN, F.; WANG, X.; JACOB, M.R.; TEKWANI, B. L.; KHAN, S. I.; LUPIEN, S.; HILL, R. A.; DUGAN, F. M.; CUTLER, H. G.; CUTLER, S. J. Antimicrobial and Antiprotozoal Activities of Secondary Metabolites from the Fungus *Eurotium repens*. **Medicinal Chemistry Research**, 21, 3080-3086, 2012.
- GHOSH, S.; SARMA, M. D.; PATRA, A.; HAZRA, B. Anti-inflammatory and anticancer compounds isolated from *Ventilago madraspatana* Gaertn., *Rubia*

- cordifolia* Linn. and *Lantana camara* Linn. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 62, 1158–66, 2010.
- GIRAUD, F.; GIRAUD, T.; AGUILETA, G.; FOURNIER, E.; SAMSON, R.; CRUAUD, C.; LACOSTE, S.; ROPARS, J.; TELLIER, A.; DUPONT, J. Microsatellite loci o Recognize Species for the Cheese Starter and Contaminating Strains Associated with Cheese Manufacturing. **International Journal of Food Microbiology**, 137, 204-213, 2010.
- GOMES, N. G.; DETHOUP, T.; SINGBURAUDOM, N.; GALES, L.; SILVA, A. M. S.; KIJJOA, A. Eurocristatine, a New Diketopiperazine Dimer from the Marine Sponge-Associated Fungus *Eurotium cristatum*. **Phytochemistry Letters**, 5, 717-720, 2012.
- GONZALO, S. Epigenetic alterations in aging. **Journal of Applied Physiology**, 109, 586-597, 2010.
- GRIFFITHS, S.; MESARICH, C. H.; SACCOMANNO, B.; VAISBERG, A.; DE WIT, P. J.; COX, R.; COLLEMARE, J. Elucidation of cladofulvin biosynthesis reveals a cytochrome P450 monooxygenase required for anthraquinone dimerization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 113, 6851-6856, 2016.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, 33, 667-679, 2010.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. **Journal of Natural Products**, 69, 509-26, 2006.
- GUO, W.; ZHANG, Z.; ZHU, T.; GU, Q.; LI, D. Penicyclones A–E, Antibacterial Polyketides from the Deep-Sea-Derived Fungus *Penicillium* sp. F23-2. **Journal of Natural Products**, 78, 2699-2703, 2015.
- GUO, Y.; GU, Z.; LIU, X.; LIU, J.; MA, M.; CHEN, B.; WANG, L. Rapid Analysis of Corni fructus Using Paper Spray-Mass Spectrometry. **Phytochemical Analysis**, 28, 344–350, 2017.
- HAGIWARA, S.; TAKAHASHI, M.; SHEN, Y.; KAIHOU, S.; TOMIYAMA, T.; YAZAWA, M.; TAMAI, Y.; SIN, Y.; KAZUSAKA, A.; TERAZAWA, M. A Phytochemical in the Edible Tamogi-take Mushroom (*Pleurotus*

- cornucopiae*), D-Mannitol, Inhibits ACE Activity and Lowers the Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 69, 1603-1605, 2005.
- HAWKSWORTH, D. L., & LÜCKING R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology Spectrum**, 5, 2017.
- HERTWECK, C. Hidden Biosynthetic Treasures Brought to Light. **Nature Chemical Biology**, 5, 450-452, 2009.
- HO, E. H.; TO, P. C.; HYDE, K. D. Induction of antibiotic production of freshwater fungi using mix-culture fermentation. **Fungal Diversity**, 12, 45-51, 2003.
- HAMASAKI, T.; KIMURA, Y.; HATSUDA, Y.; NEGAO, M. Structure of a New Metabolite, Dihydroauroglaucin, Produced by *Aspergillus chevalieri*. **Agricultural Biologic Chemistry**, 45, 313-314, 1981.
- HOUGHTON, P. J.; RENA, Y.; HOWES, M. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Product Reports**, 23, 181–199, 2006.
- JIA, C.; ZHU, Y.; ZHANG, J.; YANG, J.; CHUNPING XU, C.; MAO, D. Identification of Glycoside Compounds from Tobacco by High Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Linear Ion-Trap Tandem Mass Spectrometry Coupled with Electrospray Ionization Orbitrap Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 28, 4, 629-640, 2017.
- JIMÉNEZ, E. V.; TOVAR, J.; MOSQUERA, O. M.; CARDOZO, F. Actividad neuroprotectora de *Solanum ovalifolium* (Solanaceae) contra la toxicidad inducida por rotenona en *Drosophila melanogaster*. **Revista Facultad de Ciencias Básicas**, 13, 26-34, 2017.
- JIN, L.; QUAN, C.; HOU, X.; FAN, S. Potential Pharmacological Resources: Natural Bioactive Compounds from Marine-Derived Fungi. **Marine Drugs**, 76, 1-25, 2016.
- KARAR, M. G. E.; KUHNERT, N. UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS Characterization of Phenolics from *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* (Hawthorn) Leaves, Fruits and their Herbal Derived Drops (Crataegutt Tropfen). **Journal of Chemical Biology & Therapeutics**, 1, 2015.
- KADHIM, M. J.; MOHAMMED, G. J.; HUSSEIN, H. Analysis of Bioactive Metabolites from *Candida albicans* Using (GC-MS) and Evaluation of

- Antibacterial Activity. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, 8, 655-670, 2016.
- KIM, K. S.; CUI, X.; LEE, D. S.; KO, W.; SOHN J. H.; YIM, J. H.; AN, R. B.; KIM, Y. C.; OH, H. Inhibitory Effects of Benzaldehyde Derivatives from the Marine Fungus *Eurotium* sp. SF-5989 on Inflammatory Mediators via the Induction of Heme Oxygenase-1 in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW264.7 Macrophages. **International Journal of Molecular Sciences**, 15, 23749-23765, 2014.
- KONDO, Y.; SHEN, L.; ISSA, J.-P. J. Critical Role of Histone Methylation in Tumor Suppressor Gene Silencing in Colorectal Cancer. **Molecular and Cellular Biology**, 23, 206-215, 2003.
- KONG, F. D.; ZHOU, L. M.; MA, Q. Y.; HUANG, S. Z.; WANG, P.; DAI, H. F.; ZHAO, Y. X.; Penicillars A–E from the marine animal endogenic fungus *Penicillium* sp. SCS-KFD08. **Phytochemistry Letters**, 17, 59-63, 2016.
- KOTWAL, S.; SUMBALI, G. Preferential Utilization and Colonization of Keratin Baits by Different Myco-keratinophiles. **SpringerPlus**, 5, 1204, 2016.
- KRIMITZAS, A.; PYRRI, I.; KOUVELIS, V. N.; KAPSANAKI-GOTSI, E.; TYPAS, M. A. A Phylogenetic Analysis of Greek Isolates of *Aspergillus* Species Based on Morphology and Nuclear and Mitochondrial Gene Sequences. **BioMed Research International**, 1-18, 2013.
- LAMSAF, K.; KIM, S. W.; NAEIMF, S.; ADHIKARI, M.; YADAV, D. R.; KIM, C.; LEE, H. B.; LEE, Y. S. Three New Records of *Penicillium* Species Isolated from Insect Specimens in Korea. **Mycobiology**, 41, 116-119, 2013.
- LI, D. L.; LI, X. M.; LI, T. G.; DANG, H. Y.; PROKSCH, P.; WANG, B. G. Benzaldehyde Derivatives from *Eurotium rubrum*, an Endophytic Fungus Derived from the Mangrove Plant *Hibiscus tiliaceus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 56, 1282-1285, 2008.
- LI, G.; KUSARI, S.; GOLZ, C.; LAATSCH, H.; STROHMANN, C.; SPITELLER, M. Epigenetic Modulation of Endophytic *Eupenicillium* sp. LG41 by a Histone Deacetylase Inhibitor for Production of Decalin-Containing Compounds. **Journal of Natural Products**, 80, 983–988, 2017a.
- LI, X. J.; DONG, J. W.; CAI, L.; MEI, R. F.; DING, Z. T. Improving the acetylcholinesterase inhibitory effect of *Illigera henryi* by solid-state

- fermentation with *Clonostachys rogersoniana*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 124, 493-497, 2017b.
- LI, Y.; WU, C.; LIU, D.; PROKSCH, P.; GUO, P.; LIN, W.H. Chartarlactams A–P, Fhenylspirodrimanes from the Sponge-associated Fungus *Stachybotrys chartarum* with Antihyperlipidemic Activities. **Journal of natural Products**, 77, 138-147, 2014.
- LI, Y.; LI, X. F.; KANG, J. S.; CHOI, H. D.; SON, B. W. New Radical Scavenging and Ultraviolet-A Protecting Prenylated Dioxopiperazine Alkaloid Related to Isoechinulin a From a Marine Isolate of the Fungus *Aspergillus*. **The Journal of Antibiotics**, 57, 337-340, 2004a.
- Li, Y.; Li, X. F.; Kim, S.K.; Kang, J.S.; Choi, H.D.; Rho, J.R.; Son, B.W. Golmaenone, a New Diketopiperazine Alkaloid from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus* sp. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin.**, 52, 375-376, 2004b.
- LI, Y.; CUI, F.; ZHIQIANG LIU, Z.; XU, Y.; ZHAO, H. Improvement of Xylanase Production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 Using Response Surface Methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, 40, 1381-1388, 2007.
- LIMA, G. S.; ANDRADE, G. F.; SILVA, M. A. N.; SOUSA, E. M. B.; TAKAHASHI, J. A. Novel Kojic Acid-Based Functionalized Silica Nanoparticles for Tyrosinase and Ache Inhibition and Antimicrobial Applications. **Chemical Engineering Transactions**, 64, 2018b.
- LIMA, G. S.; ROCHA, A. M.; SANTOS, G. F.; D'SILVA, A. F.; MARRIEL, I. E.; TAKAHASHI, J. A. Metabolic response of *Aspergillus sydowii* to OSMAC modulation produces acetylcholinesterase inhibitors. **Phytochemistry Letters**, 24, 39-45, 2018a.
- LIN, Z.; ZHU, T.; WEI, H.; GUOJIAN ZHANG, G.; HUI WANG, H.; GU, Q. Spicochalasin A and New Aspochalasin from the Marine-Derived Fungus *Spicaria elegans*. **European Journal of Organic Chemistry**, 3045-3051, 2009.
- LIU, Y.; LI, X. M.; MENG, L. H.; JIANG, W. L.; XU, G. M.; HUANG, C. G.; WANG, B. G. Bisthiodiketopiperazines and Acorane Sesquiterpenes Produced by the Marine-Derived Fungus *Penicillium adametzioides* AS-53 on Different Culture Media. **Journal of Natural Products**. 78, 1294-9, 2015.

- LOPES, B. P.; EGEEA, T. C.; MONTEIRO, D. A.; VICI, A. C.; DA SILVA, D. G. H.; LISBOA, D. C. O.; ALMEIDA, E. A.; PARSONS, J. R.; SILVA, R.; GOMES, E. Evaluation of Diuron Tolerance and Biotransformation by Fungi from a *Sugarcane Plantation* Sandy-loam Soil. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 64, 9268–9275, 2016.
- LUAN, Y.; WEI, H.; ZHANG, Z.; CHE, Q.; ZHU, T.; GU, Q.; LI, D. Eleganketal A, a Highly Oxygenated Dibenzospiroketal from the Marine-Derived Fungus *Spicaria elegans* KLA03. **Journal of Natural Products**, 77, 1718-1723, 2014.
- LUBERTOZZI, D.; KEASLING, J. D. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. **Biotechnology Advances**. 27, 53-75, 2009.
- MAO, F.; YAN, J.; LI, J.; JIA, X.; MIAO, H.; SUN, Y.; HUANG, L.; LI, X. New multi-target-directed small molecules against Alzheimer's disease: a combination of resveratrol and clioquinol. **Organic & Biomolecular Chemistry**, 12, 5936-5944, 2014.
- MARMANN, A.; ALY, A. H.; LIN, W.; WANG, B. Co-Cultivation—A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms. **Marine Drugs**, 12, 1043-1065, 2014.
- MIYAKE, Y.; ITO, C.; ITOIGAWA, M.; OSAWA, T. Antioxidants Produced by Eurotium Herbariorum of Filamentous Fungi Used for the Manufacture of Karebushi, Dried Bonito (Katsuobushi). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 73, 1323-1327, 2009.
- MOKHTAR, M. M.; FARRAG, RASHA, M.; MEKAWY, AMAL, A. Parameters Governing Sexuality in Two *Aspergillus* Species. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, 5, 709-718, 2009.
- MOUSSA, M.; EBRAHIM, W.; BONUS, M.; GOHLKE, H.; MÁNDI, A.; KURTÁN, T.; HARTMANN, R.; KELSCHUEER, R.; LIN, W.; LIU, Z.; PROKSCH, P. Co-culture of the fungus *Fusarium tricinctum* with *Streptomyces lividans* induces production of cryptic naphthoquinone dimers. **RSC Advances**, 9, 1491-1500, 2019.
- MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal Biodiversity: What do We Know? What Can We Predict? **Biodiversity and Conservation**, 16, 1-5, 2007.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, 79, 629-661, 2016.

- NICOLETTI, R.; SALVATORE, M.; ANDOLFI, A. Secondary Metabolites of Mangrove-Associated Strains of *Talaromyces*. **Marine Drugs**, 16, 1-15, 2018.
- NUGROHO, A.; SONG, B. M.; SEONG, S. H.; CHOI, J. S.; CHOI, J.; CHOI, J. Y.; PARK, H. J. HPLC analysis of Phenolic Substances and Anti-Alzheimer's Activity of Korean Quercus Species. **Natural Product Sciences**, 22, 299-306, 2016.
- OH, D.-C.; Kauffman, C. A.; Jensen, P. R.; Fenical. W. Induced Production of Emericellamides A and B from the Marine-Derived Fungus *Emericella* sp. in Competing Co-culture. **Journal of Natural Products**, 70, 515-520, 2007.
- OLIVEIRA, P. S. M.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. V. N. Utilização do D-Manitol em Síntese Orgânica. **Química Nova**, 32, 441-452, 2009.
- OLIVEIRA, A. S.; MEIER, L.; ZAPP, E.; BRONDANI, D.; BRIGHENTE, I. M. C.; SÁ, M. M. Functionalized Dienes: A New Series of Potential Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 30, 1045-1054, 2019.
- PARANAGAMA, P. A.; WIJERATNE, E. M. K.; GUNATILAKA, A. A. L. Uncovering Biosynthetic Potential of Plant-Associated Fungi: Effect of Culture Conditions on Metabolite Production by *Paraphaeosphaeria quadriseptata* and *Chaetomium chiwersii*. **Journal of Natural Products**, 70, 1939-1945, 2007.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia, Tradução Pedro Barros, 4º Ed., norte-americana, Cengage Learning, 2010. Título Original: Introduction to spectroscopy.
- PRATI, F.; BARTOLINI, M.; SIMONI, E.; SIMONE A.; PINTO, A.; ANDRISANO V.; BOLOGNESI, M. L. Quinones bearing non-steroidal anti-inflammatory fragments as multitarget ligands for Alzheimer's disease. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**. 23, 6254-8, 2013.
- RAMSTEDT, M.; JIRJIS, R.; SODERHALL, K. Metabolism of Mannitol in Mycorrhizaland Non-Mycorrhizal Fungi. **New Phytologist**, 105, 281-287, 1987.
- RATEB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Product Reports**, 28, 290, 2011.

- RATEB, M. E.; HALLYBURTON, I.; HOUSSEN, W. E.; BULL, A. T.; GOODFELLOW, M.; SANTHANAM, R., JASPARS, M.; EBEL, R. Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. **RSC Advances**, 3, 14444 -14450, 2013.
- RIDDELL, R. W. Permanent Stained Mycology Preparations Obtained by Slide Culture. **Mycologia**, 42, 265-270, 1950.
- ROHIT, M.; ASHOK, T.; VIJAYKUMAR, R.; KASHNIYAL, K. Molecular Docking Study of *Cassia tora*, *Brassica campestris* and *Calotropis procera* as Acetylcholinesterase Inhibitor. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, 50, 122-116, 2016.
- RUTLEDGE, P. J.; CHALLIS, G. L. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. **Nature reviews**, 13, 209-523, 2015.
- SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JOGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 81, 8014-8018, 1984.
- SANTOS, R. N.; SILVA, M. G. V.; FILHO, R. B. Constituintes químicos do caule de *Senna reticulata* Willd. (Leguminosae). **Quimica Nova**, 31, 1979-1981, 2008.
- SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering Cryptic Natural Product Biosynthesis in Microorganisms. **Organic Biomolecular Chemistry**, 7, 1753-1760, 2009.
- SCHÜRMAN, B. T. M.; SALLUM, W. S. T.; TAKAHASHI, J. A. Austin, Dehydroaustin and Other Metabolites from *Penicillium brasilianum*. **Química Nova**, 33, 1044-1046, 2010.
- SHANG, Z.; SALIM, A. A.; CAPON, R. J.; CHAUNOPYRAN, A. Co-Cultivation of Marine Mollusk-Derived Fungi Activates a Rare Class of 2-Alkenyl-Tetrahydropyran. **Journal of Natural Products**, 80, 1167-1172, 2017.
- SHIM, S. S.; KAWAMOTO, K. Enzyme Production Activity of *Phanerochaete chrysosporium* and Degradation of Pentachlorophenol in a Bioreactor. **Water Research**, 36, 4445-4454, 2005.

- SMETANINA, O. F.; KALINOVSKII, A. I.; KHUDYAKOVA, Y. V.; SLINKINA, N. N.; PIVKIN, M.V.; KUZNETSOVA, T.A. Metabolites from the Marine Fungus *Eurotium repens*. **Chemistry of Natural Compounds**, 43, 395-398, 2007.
- SOLOMON, P. S.; WATERS, O. D. C.; OLIVER, R. P. Decoding the Mannitol Enigma in Filamentous Fungi. **Trends in Microbiology**, 15, 258-262, 2007.
- SONG, F.; REN, B.; CHEN, C.; YU, K.; LIU, X.; ZHANG, Y.; YANG, N.; HE, H.; LIU, X.; DAI, H.; ZHANG, L. Three New Sterigmatocystin Analogues From Marine-Derived Fungus *Aspergillus versicolor* MF359. **Applied Microbiology Biotechnology**, 98, 3753-3758, 2014.
- STIERLE, A. A.; STIERLE, D. B.; DECATO, D.; PRIESTLEY, N. D.; ALVERSON, J. B.; HOODY, J.; MCGRATH, K.; KLEPACKI, D. The Berkeleylactones, Antibiotic Macrolides from Fungal Coculture. **Journal of Natural Products**, 80, 1150-1160, 2017.
- SUN, K.; LI, Y.; GUO, L.; WANG, Y.; LIU, P.; ZHU, W. Indole Diterpenoids and Isocoumarin From the Fungus, *Aspergillus flavus*, Isolated From the Prawn, *Penaeus Vannamei*. **Marine Drugs**, 12, 3970-3981, 2014.
- TAKAHASHI, J.A., GOMES, D.C., LYRA, F.H., DOS SANTOS, G.F. Modulation of Fungal Secondary Metabolites Biosynthesis by Chemical Epigenetics. 117–133. In: *Fungi: Applications and Management Strategies*, Deshmukh, S.K., Misra, J.K., Tewari, J.P. Papp, T. CRC Press, 496p, 2016.
- TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e Diversidade Estrutural de Metabólitos Fúngicos com Atividade Antibiótica. **Química Nova**, 31, 1807-1813, 2008.
- TAKAHASHI, J. A.; TELES, A. P. C.; BRACARENSE, A. A. P.; GOMES, D. C. Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungi. **Phytochemistry Reviews**, 12, 773–789, 2013.
- TAMOKOU, J. D. D.; TALA, M. F.; WABO, H. K.; KUIATE, J. R.; TANE, P. Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. **Journal Ethnopharmacol**, 124, 571-575, 2009.
- TAVERNA, D.; DONNA, L.; MAZZOTTI, F.; TAGARELLI, A.; NAPOLI, A.; FURIA, E.; SINDONA, G. Rapid discrimination of bergamot essential oil by paper

- spray mass spectrometry and chemometric analysis. **Journal of Mass Spectrometry**, 51, 761–767, 2016.
- TAYUNG, K.; BARIK, B. P.; JHA, D. K.; DEKA, D. C. Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Fusarium solani* isolated from bark of Himalayan yew. **Mycosphere**, 2, 203–213, 2011.
- TELES, A. P.; ATALIBA, G. S.; TAKAHASHI, J. A. Modulation of *Paecilomyces lilacinus* Antimicrobial Metabolite Production by Co-culturing with *Salmonella typhimurium*. **Natural Product Research**, 27, 1598-1601, 2013.
- TOBERT, J. A. Lovastatin and Beyond: The History of the HMG-CoA Reductase Inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2, 517-526, 2003.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L.; Microbiologia. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 964, 2012.
- VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; HONG, S.-B.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R.A. Identification and Nomenclature of the Genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, 78, 343-371, 2014.
- VYLKOVA, S.; CARMAN, A. J.; DANHOF, H. A.; COLLETTE, J. R.; ZHOU, H.; LORENZ, M. C. The Fungal Pathogen *Candida albicans* Autoinduces Hyphal Morphogenesis by Raising Extracellular pH. **MBio**, 2, 2011.
- WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; YOUNG, M. M. Bioprocessing Strategies to Improve Heterologous Protein Production in Filamentous Fungal Fermentations. **Biotechnology Advances**, 23, 115-129, 2005.
- WANG, J.; WEI, X.; QIN, X.; LIN, X.; ZHOU, X.; LIAO, S.; YANG, B.; LIU, J.; TU, Z.; LIU, Y. Arthpyrones A–C, Pyridone Alkaloids from a Sponge-Derived Fungus *Arthrimum arundinis* ZSDS1-F3. **Organic Letters**, 17, 656-659, 2015.
- WANG, J. P.; LIN, W.; WRAY, V.; LAI, D. Induced Production of Depsipeptides by Co-culturing *Fusarium tricinctum* and *Fusarium begoniae*, **Tetrahedron Letters**, 54, 2492, 2013.
- WANG, J.; JIA, Z.; ZHANG, Z.; WANG, Y.; LIU, X.; WANG, L.; LIN, R. Analysis of Chemical Constituents of *Melastoma dodecandrum* Lour. By UPLC-ESI-Q-Exactive Focus-MS/MS. **Molecules**, 22, 476, 2017c.

- WANG, K.; CHEN, Z.; HUANG, L.; MENG B.; ZHOU, X.; WEN, X.; REN, D. Naringenin reduces oxidative stress and improves mitochondrial dysfunction via activation of the Nrf2/ARE signaling pathway in neurons. **Internacioal Journal Molecular Medicine**. 40, 1582-1590, 2017b.
- WANG, Q. L.; GUO, C.; QI, J.; MA, J. H.; LIU, F. Y.; LIN, S. Q.; ZHANG, C. Y.; XIE, W. D.; ZHUANG, J. J.; LI, X. Protective effects of 3beta-angeloyloxy-8beta, 10beta dihydroxyeremophila-7(11)-en-12,8alpha-lactone on paraquat-induced oxidative injury in SH-SY5Y cells. **Journal Asian Natural Product Research**. 1-13, 2018.
- WANG, X.; SENA FILHO, J. G.; HOOVER, A. R.; KING, J. B.; ELLIS, T. K.; POWELL, D. R.; CICHEWICZ, R. H. Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum*. **Journal of Natural Products**, 73, 942–948, 2010.
- WANG, Y.; HU, P.; PAN, Y.; ZHU, Y.; LIU, X.; CHE, Y.; LIU, G. Identification and characterization of the verticillin biosynthetic gene cluster in *Clonostachys rogersoniana*. **Fungal Genetics and Biology**, 103, 25–33, 2017a.
- WANG, Y.; ZENG, Q. G.; ZHANG, Z.; BIN, Y.; WANG, L.Y., ZHU, D. Isolation and characterization of endophytic huperzine A-producing fungi from *Huperzia serrata*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 38, 1267–1278, 2011.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J.; editor. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press Inc, 315-322, 1990.
- WIJESEKARA, I.; ZHANG, C.; TA, Q. V.; VO, T. S.; LI, Y. X.; KIM, S. K. Physcion from marine-derived fungus *Microsporium* sp. induces apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells. **Microbiological Research**, 169, 255–261, 2014.
- WOO, P. C. Y.; NGAN, A. Y.; CHUI, H. K.; LAU, S. K. P.; YUEN, K. Y. Agar Block Smear Preparation: a Novel Method of Slide Preparation for Preservation of

- Native Fungal Structures for Microscopic Examination and Long-Term Storage. **Journal of Clinical Microbiology**, 48, 3053-3061, 2010.
- WU, Z.; LIAO, W.; CHEN K.; QIN, J.; TANG, H. Synthesis of derivatives of cleistopholine and their anti-acetylcholinesterase and anti- β -amyloid aggregation activity. **Bioorganic Chemistry**, 76, 228-236, 2018.
- YAN, H.J.; LI, X.M.; LI, C.S.; WANG, B.G. Alkaloid and Anthraquinone Derivatives Produced by the Marine-Derived Endophytic Fungus *Eurotium rubrum*. **Helvetica Chimica Acta**, 95, 163-168, 2012.
- YANG, X. L.; HUANG, L.; RUAN, X. L. Epigenetic modifiers alter the secondary metabolite composition of a plant endophytic fungus, *Pestalotiopsis crassiuscula* obtained from the leaves of *Fragaria chiloensis*. **Journal of Asian Natural Products Research**, 16, 412–417, 2014.
- YANG, S. T.; WU, X.; RUI, W., GUO, J.; FENG, Y. F. UPLC/Q-TOF-MS Analysis for Identification of Hydrophilic Phenolics and Lipophilic Diterpenoids from Radix Salviae Miltiorrhizae. **Acta Chromatographica**, 27, 711-728, 2015.
- YEN, G. C.; DUH, P. D.; CHUANG, D. Y. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. **Food Chemistry**, 70, 437–441, 2000.
- YILMAZ, N.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic Taxonomy of the Genus *Talaromyces*. **Studies in Mycology**, 78, 175-341, 2014.
- YOKOYAMA, H.; HAYATO KUROIWA, H.; YANO, R.; ARAKI, T. Targeting reactive oxygen species, reactive nitrogen species and inflammation in MPTP neurotoxicity and Parkinson's disease. **Neurological Sciences**, 29:293–301, 2008.
- YOSHIHIRA, K.; TAKAHASHI, C.; SEKITA, S.; NATORI, S. Tetrahydroauroglaucin from *Penicillium charlesii*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 20, 2727–2728, 1972.
- ZHANG, N.; CHEN, Y.; JIANG, R.; LI, E.; CHENG, X.; XI, Z.; GUO, Y.; LIU, X.; ZHOU, Y.; CHE, Y.; JIANG, X. PARP and RIP 1 are required for autophagy induced by 11'-deoxyverticillin A, which precedes caspase-dependent apoptosis. **Autophagy**, 7, 598-612, 2011.

- ZHANG, N. Epigenetic modulation of DNA methylation by nutrition and its mechanisms in animals. **Animal Nutrition**, 1, 144–151, 2015.
- ZHANG, W.; LIU, H.; LI, X.; LIU, D.; DONG, X. T.; Li, F. F.; WANG, E.X.; LI, B.-Z.; Yuan, Y. J. Production of naringenin from D-xylose with co-culture of *E. coli* and *S. cerevisiae*. **Engineering in Life Sciences**, 17, 1021–1029, 2017.
- ZHAO, Y. L.; WANG, J. B.; ZHOU, G. D.; SHAN, L. M.; XIAO, X. H. Investigations of free anthraquinones from rhubarb against α -naphthylisothiocyanate-induced cholestatic liver injury in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 104, 9-463, 2009.
- ZOU, X.; LI, Y.; ZHANG, X.; LI, Q.; LIU, X.; HUANG, Y.; TANG, T.; ZHENG, S.; WANG, W.; TANG, J. A New Prenylated Indole Diketopiperazine Alkaloid from *Eurotium cristatum*. **Molecules**, 19, 17839-17847, 2014.
- ZUCK, K. M.; SHIPLEY, S.; NEWMAN, D. J. Induced Production of N-Formyl Alkaloids from *Aspergillus fumigatus* by Co-culture with *Streptomyces peucetius*. **Journal of Natural Products**, 74, 1653-1657, 2011.
- ZUGNO, A.; CHIPINDO, H.; CANEVER, L.; BUDNI, J.; CASTRO, A. A. C.; OLIVEIRA, M. B.; HEYMANN, A. S.; WESSLER, P. G.; SILVEIRA, F. R.; DAMÁZIO, L. S.; MASTELLA, G. A.; KIST, L. W.; BOGO, M. R.; QUEVEDO, J.; GAMA, C. S. Omega-3 fatty acids prevent the ketamine-induced increase in acetylcholinesterase activity in an animal model of schizophrenia. **Life Sciences**, 121 65–69, 2015.

APÊNDICE

Fus_Asp_fragmentacao_279_negativo_180824124704 #1-6 RT: 0.00-0.07 AV: 6 NL: 3.04E2
T: ITMS - c ESI Full ms2 279.00@cid30.00 [75.00-1000.00]

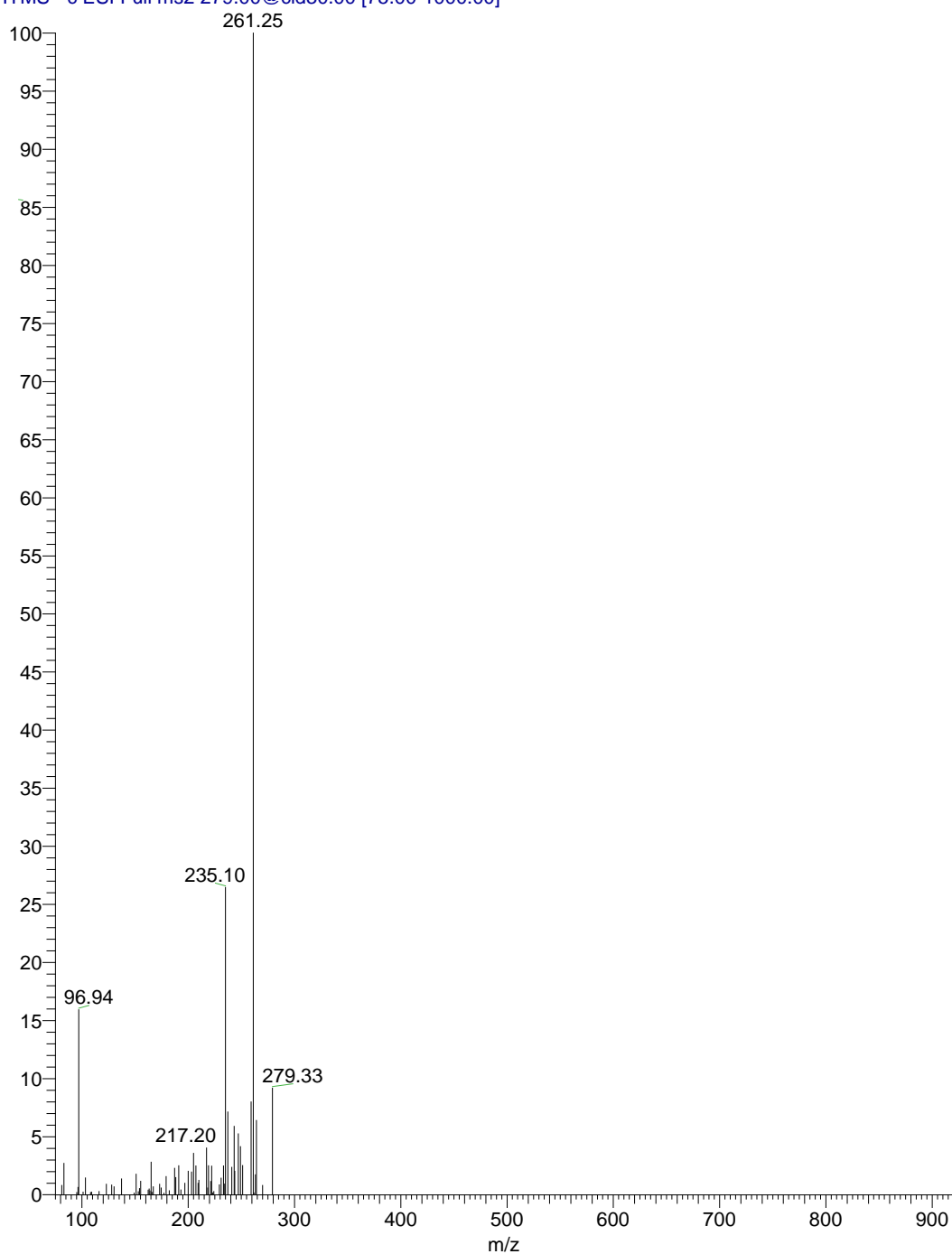


Figura A1. Espectro MS/MS do íon m/z 279 do extrato de co-cultura de *F. nygamai* com *A. chevalieri*.

Pen_Tal_fragmentacao_163_negativo_180824132520 #1-25 RT: 0.00-0.34 AV: 25 NL: 5.88E2
T: ITMS - c ESI Full ms2 163.00@cid20.00 [50.00-1000.00]

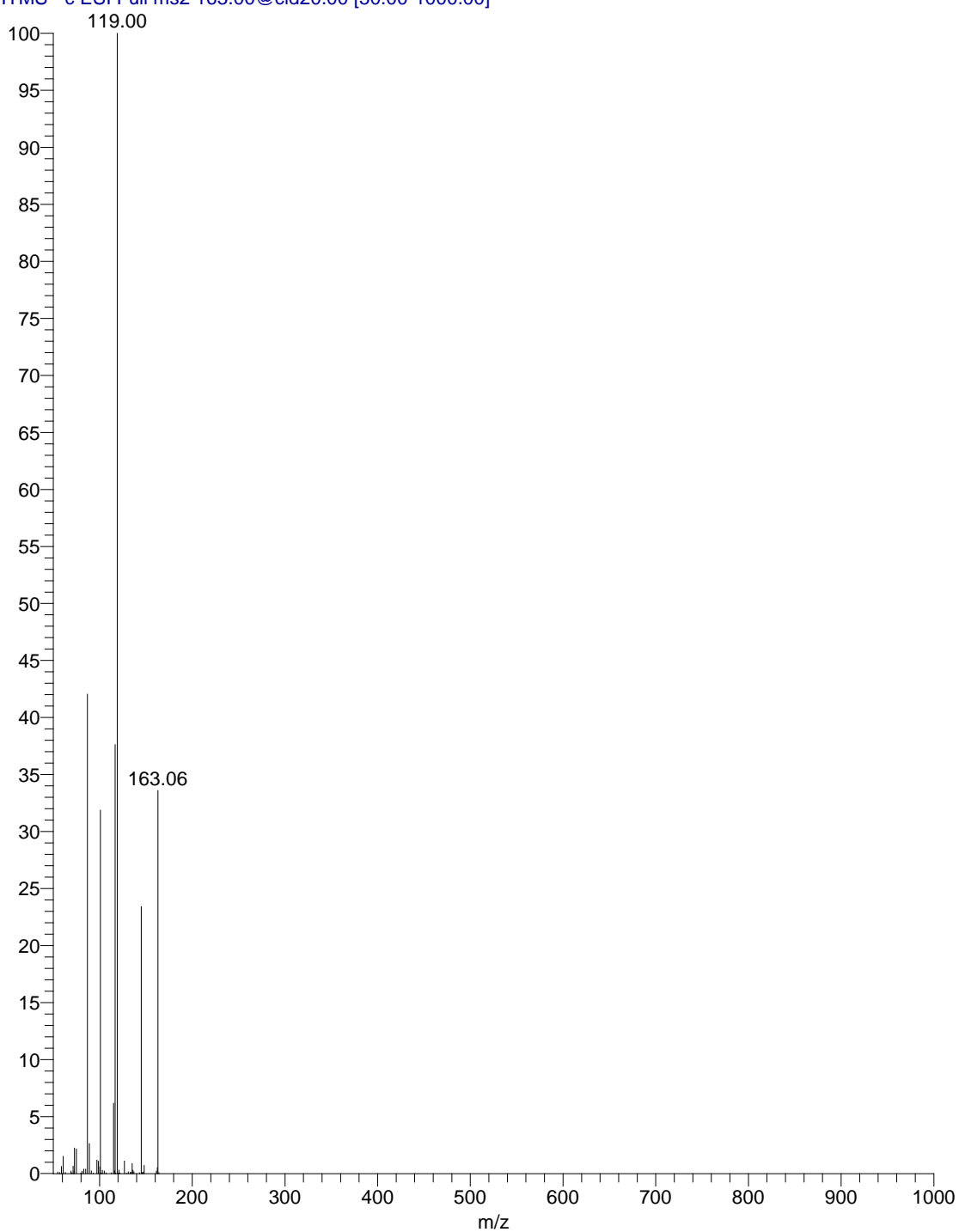


Figura A2. Espectro MS/MS do íon m/z 163 do extrato de co-cultura de *Penicillium* com *T. calidicanus*.

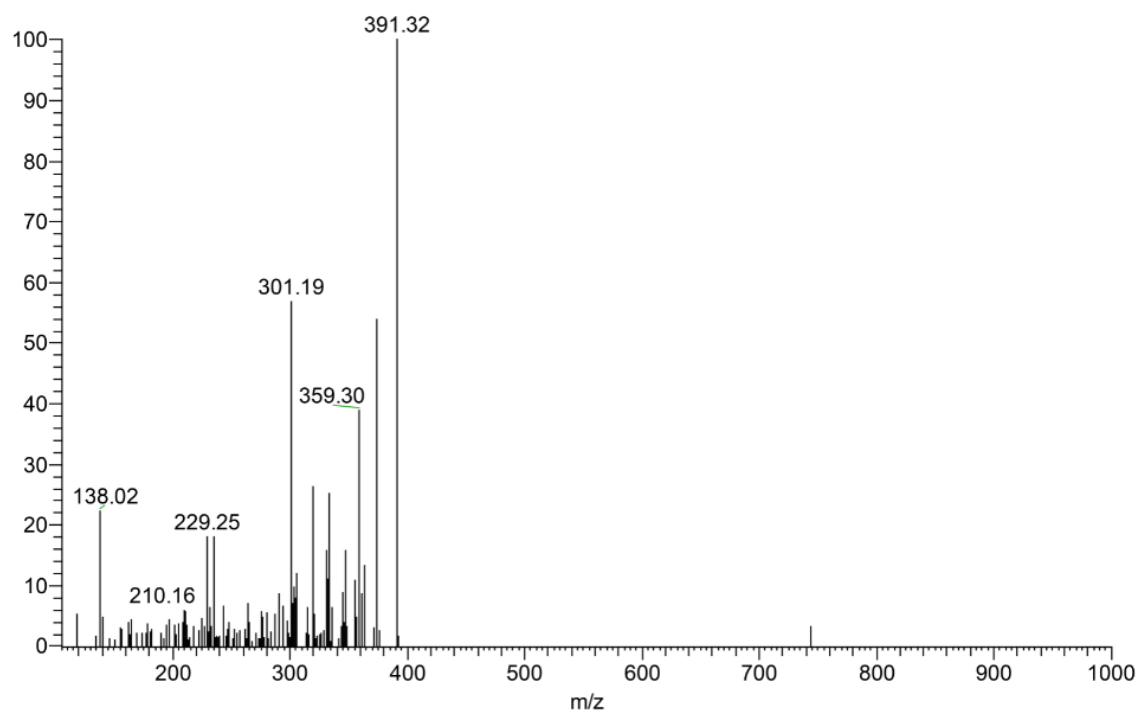


Figura A3. Espectro MS/MS do íon m/z 391 do extrato de co-cultura de *A. chevalieri* com *Penicillium*.

Clo_Asp_fragmentacao_295_negativo_180824134444 #1-25 RT: 0.00-0.34 AV: 25 NL: 2.64E1
T: ITMS - c ESI Full ms2 295.00@cid25.00 [80.00-1000.00]

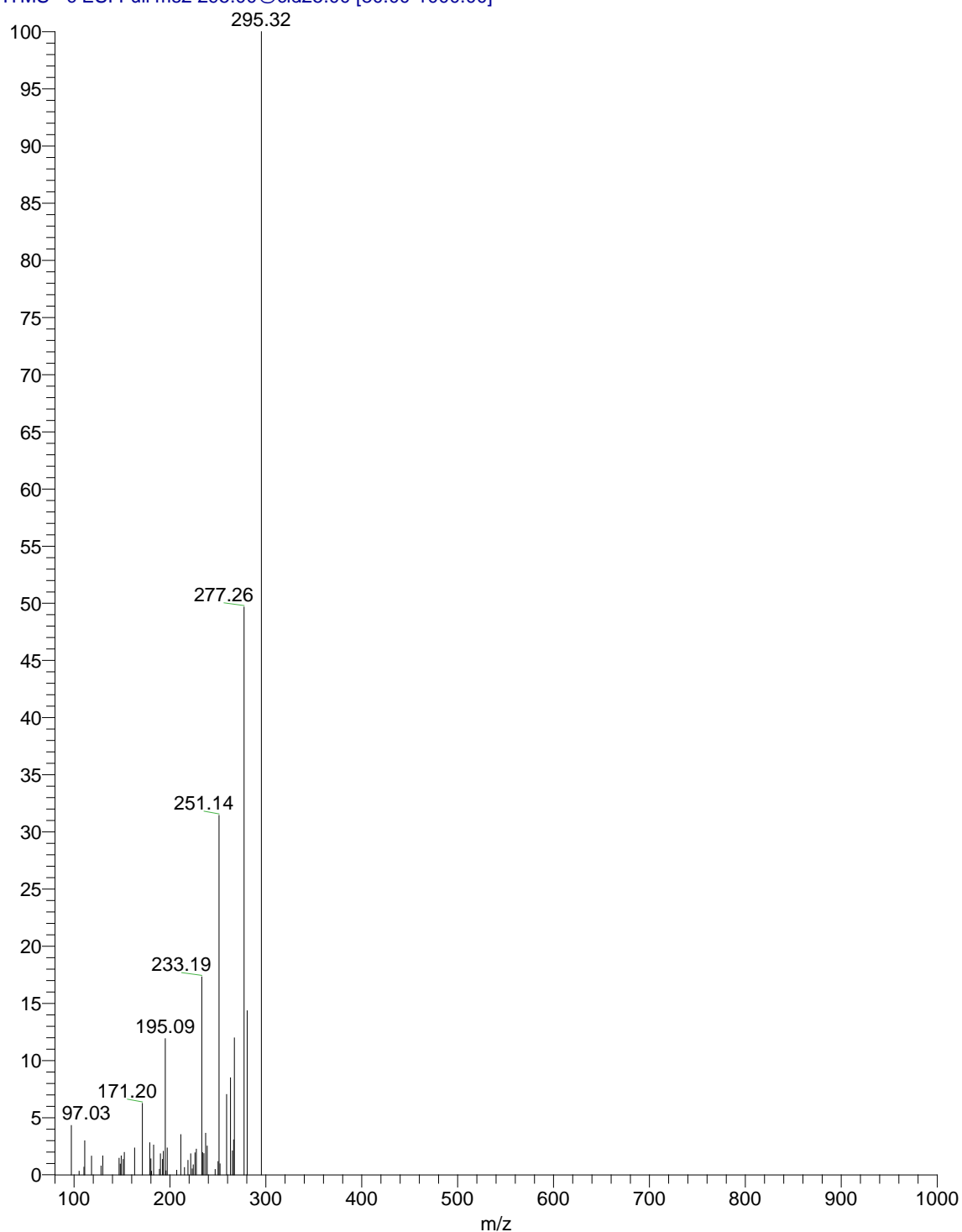
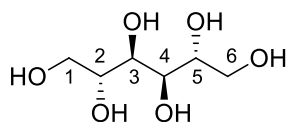
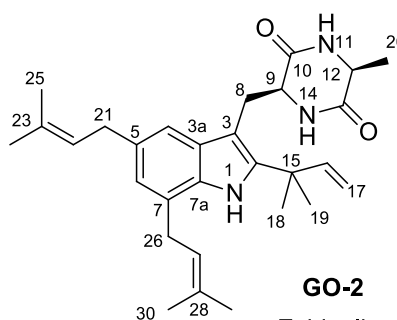


Figura A4. Espectro MS/MS do íon m/z 295 do extrato de co-cultura de *C. rogersoniana* com *A. chevalieri*.

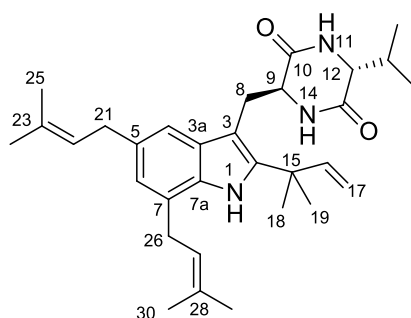
Estruturas químicas dos compostos isolados e da cristatamina F



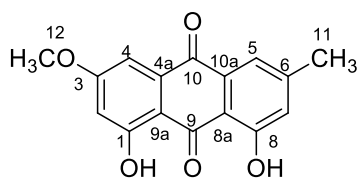
GO-1
D-manitol



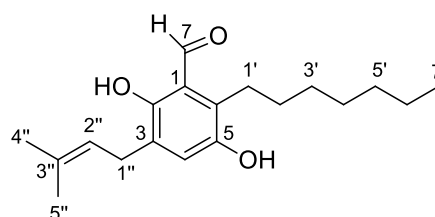
GO-2
Echinulina



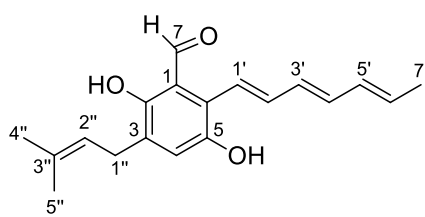
Cristatamina F



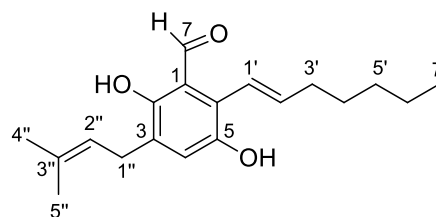
GO-3
Fisciona



GO-4
Flavoglaucina



GO-5
Auroglaucina



GO-6
Tetraidroauroglaucina

