



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
FEIRA DE SANTANA**



**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

FERNANDA PINHEIRO DE CARVALHO RIBEIRO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
DE *Mikania laevigata* (ASTERACEAE) E ANÁLISE QUÍMICA
DOS EXTRATOS POR CLAE-DAD**

FEIRA DE SANTANA - BA

2011

FERNANDA PINHEIRO DE CARVALHO RIBEIRO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DE *Mikania laevigata* (ASTERACEAE) E
ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS POR CLAE-DAD**

FEIRA DE SANTANA - BA

2011

Ficha Catalográfica Biblioteca Central Julieta Carteado

Ribeiro, Fernanda Pinheiro Carvalho

R367i Isolamento e identificação de fungos endofíticos de *Mikania laevigata* (asteroaceae) e análise química dos extratos por clae-dad. / Fernanda Pinheiro Carvalho Ribeiro . – Feira de Santana, 2011.

139f.: il.

Orientador: Alexsandro Branco
Co-orientadora: Helio M. Kamida

Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)–
Universidade Estadual de Feira de Santana, 2011.

1. *Mikania laevigata*. 2. Planta medicinal. 3. Metabólitos secundários. I. Branco, Alexsandro. II. Kamida, Helio M. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 633.88

FERNANDA PINHEIRO DE CARVALHO RIBEIRO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DE *Mikania laevigata* (ASTERACEAE)
E ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS POR CLAE-DAD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Alexsandro Branco

Co-orientador: Prof. Dr. Hélio M. Kamida

FEIRA DE SANTANA-BAHIA

2011

À Jamerson, meu esposo, amigo,
companheiro e minha fonte de inspiração.
Amor, te amo muito!

À minha pequena Júlia, luz da minha vida,
meu sol, meu céu, meu mar...meu amor!

À minha mãe, minha fortaleza, meu exemplo
de mulher, te amo!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela bondade, misericórdia e por me levar sempre adiante;

A meus pais, Maria do Carmo, Luiz Antonio e Luiz Alberto e meus amados irmãos, Camila e Neto por todo amor, carinho e incentivo;

Ao meu querido esposo Jamerson pelo amor, compreensão e por ter permitido que este sonho fosse realizado;

A minha amada Júlia por alegrar a minha vida;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aleksandro Branco pelos preciosos ensinamentos e pela paciência. Foi um privilégio desenvolver este trabalho sob sua orientação;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Hélio M. Kamida pela contribuição na realização deste trabalho;

À Professora Dr^a Ana Paula Trovatti Uetanabaro pelos auxílios prestados na execução dos experimentos;

À Professora Dr^a Larissa Corrêa pela colaboração na coleta da planta;

À Professora Dr^a Carla Branco que sempre com muita atenção e carinho me ajudou na manipulação da CLAE;

Ao Prof. Dr. Cássio Vandenberg (LAMOL) por disponibilizar o laboratório para as análises moleculares dos fungos;

Ao amigo Paulo (LAMOL) pela imensa colaboração e por não medir esforços em me ajudar na realização da parte molecular deste trabalho;

Aos amigos do laboratório de Fitoquímica (especialmente Fernanda Fonseca e Isabela), do LAPEM (especialmente João, Gorete e Cissa) e do LAMOL pelos inúmeros auxílios prestados;

À Louise (LAMIC) pela ajuda nas análises morfológicas dos fungos;

À amiga Tarcisa pelas palavras de incentivo que sempre me deram ânimo e pelas preciosas correções;

À Zezé pelo imenso carinho e paciência;

A Rita e Mary por cuidarem do meu bem maior;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPGRGV) pelos ensinamentos e pela oportunidade;

Ao secretário do programa, Alberto, pelas informações e inúmeros auxílios prestados;

A todos os amigos que fiz durante o mestrado.

“Os conhecimentos nos dão meios para viver. A sabedoria nos dá razões para viver”.

(Rubem Alves)

RESUMO

As interações entre fungos e plantas, especialmente fungos endofíticos, são consideradas importantes fontes geradoras de metabólitos secundários. A detecção destes microrganismos no interior de plantas sadias abriu novas perspectivas para o estudo das interações fungos-planta. O presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar por análise molecular os fungos endofíticos de *Mikania laevigata* (Asteraceae) e realizar a análise química por CLAE-DAD dos extratos obtidos destes fungos. As folhas de *Mikania laevigata*, cultivadas em horto florestal, foram submetidas a procedimento de isolamento dos fungos endofíticos que resultou em 40 isolados. Destes, 15 foram selecionados e caracterizados pelos aspectos morfológicos como ascomicetos da família Xylariaceae. A investigação molecular através do sequenciamento da região ITS rDNA resultou na identificação de 3 cepas de *Nodulisporium* sp., 3 cepas de *Hypoxylon* sp., 1 cepa de *Daldinia* sp. e 1 espécie identificada como *Xylaria luteostromata*. Não foi possível identificar em nível molecular as demais amostras submetidas ao seqüenciamento. A análise por CLAE-DAD revelou grande diversidade química entre os extratos analisados. Notou-se a presença de uma maior quantidade de metabólitos nos extratos externos em comparação com os extratos micelares. Os extratos metanólicos mostraram a presença de um maior número de metabólitos quando comparados aos extratos em acetato de etila.

Palavras-chaves: Planta medicinal. *Mikania laevigata*. Metabólitos secundários

ABSTRACT

The interactions between fungi and plants, especially endophytic fungi, are considered important sources of secondary metabolites. The detection of these microorganisms inside healthy plants has opened new perspectives for the study of fungus-plant interactions. This study aimed to isolate and identify the molecular analysis of endophytic fungi of *Mikania laevigata* (Asteraceae) and perform chemical analysis by HPLC-DAD extracts of these fungi. The leaves of *Mikania laevigata* grown in tree farm were subjected to the isolation procedure that resulted in endophytic fungi isolated 40. Of these, 15 were selected and characterized by morphological features as Xylariaceae ascomycetes family. Molecular investigation by sequencing the rDNA ITS region resulted in the identification of three strains of *Nodulisporium* sp., 3 strains of *Hypoxylon* sp. *Daldinia* sp 1 strain. and a species identified as *Xylaria luteostromata*. Could not be identified at the molecular level the other samples subjected to sequencing. The analysis by HPLC-DAD showed a large chemical diversity among the analyzed extracts. It was noted the presence of a greater amount of metabolites in the extracts compared to the external micellar extracts. The methanol extracts showed the presence of a greater number of metabolites when compared to extracts in ethyl acetate.

Keywords: Medicinal plants. *Mikania laevigata*. Secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Compostos 1, 2 e3 isolados do fungo endofítico <i>Colletotrichum</i> sp. de <i>A. Annua</i>	09
Figura 2	Compostos 4 a 11 isolados do fungo endofítico <i>Ampelomyces</i> sp. da <i>Urospermum picroides</i> .	10
Figura 3	Antraquinonas produzidas pelo fungo endofítico <i>Phoma sorghina</i> isolado da planta medicinal <i>Tithonia diversifolia</i> (Asteracea)	11
Figura 4	Sesquiterpenos produzidos pelo fungo endofítico <i>Phomopsis cassiae</i> isolado da planta <i>Cassia spectabilis</i> (Leguminosae).	13
Figura 5	Compostos produzidos pelo fungo endofítico <i>Eupenicillium</i> sp. isolado da planta <i>Murraya paniculata</i> (Rutaceae).	14
Figura 6	Compostos 28-31 (12,8-eudesmanolideos) isolados do fungo <i>Xylaria ianthinovelutina</i> .	16
Figura 7	Alguns compostos isolados do fungo <i>Xylaria</i> PSU-A80.	17
Figura 8	Xyloketal J (35) e Xyloester A (36) isolados do fungo endofítico <i>Xylaria</i> sp.(#2508).	18
Figura 9	7-amino-4-methylcoumarin extraído do fungo endofítico <i>Xylaria</i> sp YX-28.	18
Figura 10	<i>Mikania laevigata</i>	23
Figura 11	Isolamento dos fungos endofíticos de <i>Mikania laevigata</i> . A- Desinfestação superficial; B- Obtenção do extrato foliar após maceração das folhas; C- Transferência do extrato para as placas; D- Extrato foliar espalhado.	25
Figura 12	Obtenção dos extratos dos fungos endofíticos isolados. A- Crescimento de um dos fungos isolados neste trabalho em frascos Erlenmeyer; B- Equipamento de extração por refluxo do micélio do fungo.	29
Figura 13	Árvore Filogenética dos fungos endofíticos isolados de <i>Mikania laevigata</i> .	33
Figura 14	Algumas amostras cultivadas em placas contendo o meio EM, utilizadas para a identificação molecular. A- <i>Nodulisporium</i> sp (FEX9), B- <i>Daldinia</i> sp. (FEX7), C- <i>Hypoxylon</i> sp. (FEX11) e D- <i>Xylaria luteostromata</i> (FEX13).	34

Figura 15	Alguns Compostos isolados do fungo endofítico <i>Xylaria</i> sp.	36
Figura 16	Fluxograma demonstrando a obtenção dos extratos de fungos endofíticos de <i>Mikania laevigata</i> .	37
Figura 17	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol da parte externa dos fungos endofíticos <i>Nodulisporium</i> sp. (espécies 1-3).	40
Figura 18	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol da parte externa dos fungos endofíticos <i>Hypoxylon</i> sp. (espécies 1 e2).	41
Figura 19	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol da parte externa dos fungos endofíticos <i>Daldinia</i> sp.	42
Figura 20	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol da parte externa dos fungos endofíticos <i>Xylaria luteostromata</i>	42
Figura 21	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol dos extratos externos dos fungos endofíticos classificados como FEX3, FEX4 e FEX6	43
Figura 22	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol dos extratos externos dos fungos endofíticos classificados como FEX10, FEX12 e FEX14	44
Figura 23	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol dos extratos externos dos fungos endofíticos classificados como FEX15	45
Figura 24	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol do micélio dos fungos endofíticos <i>Nodulisporium</i> sp. (espécies 1-3).	52
Figura 25	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol da parte externa dos fungos endofíticos <i>Hypoxylon</i> sp. (espécie 1-3).	53
Figura 26	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol do micélio dos fungos endofíticos <i>Daldinia</i> sp.	54
Figura 27	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol do micélio dos fungos endofíticos <i>Xylaria luteostromata</i>	54

Figura 28	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol do micélio dos fungos endofíticos classificados como FEX3, FEX4 e FEX6	55
Figura 29	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol do micélio dos fungos endofíticos classificados como FEX10, FEX12 e FEX14	56
Figura 30	Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol do micélio dos fungos endofíticos classificados como FEX15	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fungos isolados e seqüenciados no estudo.	35
Tabela 2	Análise por CLAE-DAD dos picos eluídos nos cromatogramas dos extratos externos dos fungos isolados.	39
Tabela 3	Análise por CLAE-DAD dos picos eluídos nos cromatogramas dos extratos micelares dos fungos isolados.	51

LISTA DE ANEXOS

Anexo A	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A dos extratos em acetato de etila da parte externa dos fungos endofíticos <i>Nodulisporium sp.</i> (Espécie 1)	72
Anexo B	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B dos extratos em metanol da parte externa dos fungos endofíticos <i>Nodulisporium sp.</i> (Espécie 1)	74
Anexo C	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma C dos extratos em acetato de etila da parte externa dos fungos endofíticos <i>Nodulisporium sp.</i> (Espécie 2)	77
Anexo D	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma D dos extratos em metanol da parte externa dos fungos endofíticos <i>Nodulisporium sp.</i> (Espécie 2)	80
Anexo E	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma E dos extratos em acetato de etila da parte externa dos fungos endofíticos <i>Nodulisporium sp.</i> (Espécie 3)	83
Anexo F	Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas A dos extratos em acetato de etila da parte externa dos fungos endofíticos <i>Hypoxylon sp.</i> (Espécie 1)	84
Anexo G	Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas B dos extratos em metanol da parte externa dos fungos endofíticos <i>Hypoxylon sp.</i> (Espécie 1)	85
Anexo H	Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas A dos extratos em acetato de etila da parte externa dos fungos endofíticos <i>Hypoxylon sp.</i> (Espécie 2)	86

Anexo I	Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas A dos extratos em acetato de etila da parte externa dos fungos endofíticos <i>Daldinia sp.</i>	87
Anexo J	Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas B dos extratos em metanol da parte externa dos fungos endofíticos <i>Daldinia sp.</i>	88
Anexo K	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A do extrato em acetato de etila da parte externa dos fungos endofíticos <i>Xylaria luteostromata</i>	91
Anexo L	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B do extrato em metanol da parte externa dos fungos endofíticos <i>Xylaria luteostromata</i>	92
Anexo M	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A do extrato em acetato de etila da parte externa do fungo endofítico FEX3.	94
Anexo N	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B do extrato em metanol da parte externa do fungo endofítico FEX3	95
Anexo O	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma D do extrato em metanol da parte externa do fungo endofítico FEX4	97
Anexo P	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma E do extrato em acetato de etila da parte externa do fungo endofítico FEX6	98
Anexo Q	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A do extrato em acetato de etila da parte externa do fungo endofítico FEX10	99
Anexo R	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B do extrato em metanol da parte externa do fungo endofítico FEX10	100

Anexo S	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma C do extrato em acetato de etila da parte externa do fungo endofítico FEX12	102
Anexo T	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma D do extrato em metanol da parte externa do fungo endofítico FEX12	103
Anexo U	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma E do extrato em acetato de etila da parte externa do fungo endofítico FEX14	105
Anexo V	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A do extrato em acetato de etila da parte externa do fungo endofítico FEX15	106
Anexo X	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B do extrato em metanol da parte externa do fungo endofítico FEX15	108
Anexo Z	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A dos extratos em acetato de etila do micélio dos fungos endofíticos <i>Nodulisporium</i> sp. (Espécie 1)	110
Anexo Aa	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B dos extratos em metanol do micélio dos fungos endofíticos <i>Nodulisporium</i> sp. (Espécie 1)	111
Anexo Ab	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma C dos extratos em acetato de etila do micélio dos fungos endofíticos <i>Nodulisporium</i> sp. (Espécie 2)	112
Anexo Ac	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma D dos extratos em metanol do micélio dos fungos endofíticos <i>Nodulisporium</i> sp. (Espécie 2)	115

Anexo Ad	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma E dos extratos em acetato de etila do micélio dos fungos endofíticos <i>Nodulisporium</i> sp. (Espécie 3)	116
Anexo Ae	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma F dos extratos em metanol do micélio dos fungos endofíticos <i>Nodulisporium</i> sp. (Espécie 3)	117
Anexo Af	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A dos extratos em acetato de etila do micélio dos fungos endofíticos <i>Hypoxylon</i> sp. (Espécie 1)	118
Anexo Ag	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B dos extratos em metanol do micélio dos fungos endofíticos <i>Hypoxylon</i> sp. (Espécie 1)	119
Anexo Ah	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma C dos extratos em acetato de etila do micélio dos fungos endofíticos <i>Hypoxylon</i> sp. (Espécie 2)	120
Anexo Ai	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma D dos extratos em metanol do micélio dos fungos endofíticos <i>Hypoxylon</i> sp. (Espécie 2)	121
Anexo Aj	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma E dos extratos em acetato de etila do micélio dos fungos endofíticos <i>Hypoxylon</i> sp. (Espécie 3)	122
Anexo Ak	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma F dos extratos em metanol do micélio dos fungos endofíticos <i>Hypoxylon</i> sp. (Espécie 3)	123
Anexo Al	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A dos extratos em acetato de etila do micélio dos fungos endofíticos <i>Daldinia</i> sp.	124

Anexo Am	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A dos extratos em acetato de etila do micélio dos fungos endofíticos <i>Xylaria luteostromata</i>	125
Anexo An	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B dos extratos em metanol do micélio dos fungos endofíticos <i>Xylaria luteostromata</i>	126
Anexo Ao	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A dos extratos em acetato de etila do micélio do fungo FEX3	127
Anexo Ap	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B dos extratos em metanol do micélio do fungo FEX3	128
Anexo Aq	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma E dos extratos em acetato de etila do micélio do fungo FEX6	129
Anexo Ar	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma F dos extratos em metanol do micélio do fungo FEX6	130
Anexo As	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A dos extratos em acetato de etila do micélio do fungo FEX10	132
Anexo At	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B dos extratos em metanol do micélio do fungo FEX10	133
Anexo Au	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma C dos extratos em acetato de etila do micélio do fungo FEX12	134
Anexo Av	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma D dos extratos em metanol do micélio do fungo FEX12	136
Anexo Ax	Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma F dos extratos em metanol do micélio do fungo FEX14.	139

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1	FUNGOS ENDOFÍTICOS	5
2.2	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS MEDICINAIS	7
2.3	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA FAMÍLIA XYLARIACEAE	15
2.4	CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD)	19
3	OBJETIVOS	21
3.1	GERAL	21
3.2	ESPECÍFICOS	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1	OBTENÇÃO DE <i>MIKANIA LAEVIGATA</i>	22
4.2	DESINFECÇÃO DE <i>MIKANIA LAEVIGATA</i> E ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	24
4.3	PRESERVAÇÃO E ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	26
4.4	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	27
4.4.1	Extração de DNA e Amplificação por PCR	27
4.4.2	Alinhamento, Sequenciamento do DNA e Análise Filogenética	28
4.5	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	28
4.6	ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CLAE-DAD	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	31
5.2	ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS POR CLAE-DAD	36
5.2.1	Obtenção dos Extratos	36
5.2.2	Análise dos Extratos Brutos dos Caldos das Culturas (Metabólitos externos)	38
5.2.3	Análise dos Extratos Brutos dos Micélios	50
6	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são consideradas importantes fontes de compostos bioativos e assim se destacam como precursores de novos fármacos. Entre os compostos utilizados como medicamentos podemos citar os terpenos, carotenos e esteróides que são metabólitos secundários extraídos de plantas medicinais. Muitas ações terapêuticas destas plantas devem-se ao seu metabolismo secundário, cuja função está ligada principalmente à sobrevivência do vegetal.

Os processos biossintéticos utilizados pelas plantas para a formação de metabólitos envolvem sequências de reações que levam a diferentes tipos de componentes secundários. (ROBBERS, et al., 1997). Estas reações, também chamadas rotas biossintéticas, compreendem um número limitado de vias metabólicas chamadas de vias do ácido acético, ácido chiquímico, ácido mevalônico e suas inter-relações. Estas vias levam a formação de uma grande diversidade de compostos químicos, com diferentes propriedades farmacológicas. (SERAFINI et al., 2001).

Outra importante fonte de produção de metabólitos secundários são os fungos. As rotas biossintéticas utilizadas por estes micro-organismos para a construção dos seus metabólitos apresentam as mesmas características gerais daquelas encontradas em plantas diferindo apenas em pequenos detalhes. (HANSON, 2008).

Diversas substâncias com atividade farmacológica foram isoladas a partir destes microrganismos como, por exemplo, a descoberta da penicilina por Alexandre Fleming em 1928 (BERDY, 2005; KELLER et al., 2005) que representa, ainda hoje, uma importante ferramenta no tratamento de diversas infecções bacterianas.

As interações existentes entre fungos e plantas destacam-se também como fontes geradoras de metabólitos secundários. Esta simbiose inclui os fungos endofíticos que podem fornecer substâncias úteis, com propriedades farmacológicas consideráveis.

Os fungos endofíticos compreendem uma classe de micro-organismos que vivem no interior de tecidos vegetais em pelo menos um período de seus ciclos de vida sem lhes causar sintomas evidentes de doenças. (PETRINI, 1992). A detecção destes microrganismos no interior de plantas saudáveis e a relação que estes fungos estabelecem com seus hospedeiros abriram novas perspectivas para o estudo das interações fungos-planta.

Além da produção de substâncias oriundas do metabolismo secundário como a maioria dos antimicrobianos, a simbiose entre plantas e fungos endofíticos pode fornecer outros benefícios para as plantas hospedeiras como substâncias que melhoram o crescimento e a competitividade dos hospedeiros na natureza. Além do potencial farmacológico, estes microrganismos podem destacar-se também pela capacidade de produção de substâncias de interesse para a agricultura, como reguladores de crescimento de plantas, inseticidas, etc, desempenhando desta forma importante papel do ponto de vista ecológico e contribuindo de maneira significativa para a preservação da diversidade biológica. (SOUZA, 2004).

Dentre os fungos endofíticos, a família Xylariaceae destaca-se como uma fonte de metabólitos secundários, apresentando uma grande variedade de estruturas químicas e atividades biológicas. Como exemplo, podemos destacar o taxol, um derivado diterpenóide que tem se mostrado efetivo como agente anticancerígeno. (STIERLE et al., 1993).

A investigação química de fungos da família Xylariaceae aponta-os como fontes potenciais de produtos biotecnológicos, principalmente com propriedades farmacológicas.

Na tentativa de descobrir novas fontes de obtenção de princípios bioativos, há atualmente, uma preocupação mundial em ampliar as pesquisas fitoterápicas. Apesar das constantes descobertas de novos produtos naturais com potencial terapêutico, a investigação científica a respeito dos metabólitos gerados das interações fungos-plantas ainda constitui um vasto campo de pesquisa, já que somente um pequeno percentual de plantas medicinais e de fungos endofíticos já foram investigados do ponto de vista fitoquímico. (RATES, 2001).

Devido às propriedades terapêuticas apresentadas, algumas plantas adquiriram fundamental importância na medicina popular e representam fontes

tradicionais de metabólitos secundários bioativos. O interesse no estudo de plantas medicinais e a extração de compostos farmacologicamente ativos cresce a cada dia no intuito de encontrar novas alternativas terapêuticas. (BÉRDY, 2005; GURIB-FAKIM, 2006).

O Brasil apresenta grande tradição no uso da matéria prima vegetal como forma de tratamento alternativo, não somente pela abundância e diversidade da flora, como também por questões culturais. Entre as plantas da flora brasileira utilizadas destaca-se a *Mikania laevigata* (Asterceae), conhecida popularmente como cipó-catinga, coração-de-jesus, erva-de-cobra, guaco, guaco-trepador. (GUPTA, 1995). A planta é utilizada principalmente pelas suas propriedades sobre as vias respiratórias (TESKE; TRENTINI, 1997), propriedades antimicrobianas (AMARAL et al., 2003) e antiinflamatórias (FALCÃO et al., 2005), também são atribuídas à espécie os efeitos broncodilatadores, antiespasmódicos, antiulcerosos e antireumáticos. (GUPTA, 1994; PEREIRA et al., 1994, MOSADDIK; ALAM, 2000).

A análise fitoquímica desta espécie revelou a presença de vários constituintes, principalmente a cumarina e seus derivados. (OLIVEIRA et al., 1984). As informações etnofarmacológicas citam o seu cozimento (decocto) em gararejo e bochecho nos casos de inflamações na boca e na garganta e a aplicação local da tintura, em fricções ou em compressas nas partes afetadas por traumatismos, nevralgias, pruridos e dores reumáticas. (LORENZI; MATOS, 2002). Destas propriedades somente suas ações sobre as vias respiratórias, justificadas pelo seu efeito broncodilatador, antitussígeno, expectorante e antiedematogênico, foi confirmada em estudos científicos. (LOPES, 1997; LEAL et al., 2000).

A atividade da *Mikania* sobre os inibidores da MAO (monoaminoxidase) também foi comprovada. (AMARAL et al., 2003). As folhas de *Mikania* vêm sendo empregadas exaustivamente em programas de fitoterapia na rede pública de saúde e na medicina popular. A literatura também cita que doses altas podem provocar vômitos e diarreia, que desaparecem com a suspensão do uso.

A *Mikania laevigata* (Asteraceae) é uma trepadeira sublenhosa, de grande porte, perene, com folhas obtusas na base, de forma quase deltóide, de cor verde escura e semitorcida, com três nervuras destacadas, carnosas-

coriacea, presas duas a duas ao longo de ramos volúveis. Flores reunidas em capítulos congestos, resultado em fruto tipo aquênio. É nativa do Sul do Brasil, contudo, pela popularidade do seu uso medicinal, vem sendo cultivada em vários outros estados. (SIMÕES et al., 2003). Apesar de ser utilizada amplamente com finalidade terapêutica na medicina popular, nenhum estudo sobre os microrganismos endofíticos de *Mikania laevigata* e a análise de seus metabólitos secundários gerados desta interação foram descritos na literatura. Isto se torna relevante no sentido que estes microrganismos podem modificar compostos bioproduzidos pela planta gerando compostos bioativos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS

O termo endofítico foi utilizado inicialmente para denominar os micro-organismos que vivem no interior de tecidos de plantas hospedeiras, habitando em geral, raízes, caules e folhas, em situações de infecções sintomáticas ou não. (PETRINI; MULLER, 1986). Estudos posteriores restringiram o termo endófito a organismos que causam infecções assintomáticas nos tecidos internos de plantas. (CARROL, 1986). Esta definição abrange qualquer tipo de interação simbiótica em que fungos e plantas participam tais como mutualismo e comensalismo.

Alguns endofíticos não provocam efeitos perceptíveis em seus hospedeiros, entretanto, outros estão intimamente relacionados com o funcionamento e a sobrevivência dos vegetais. A descoberta que tais micro-organismos têm a capacidade de proteger as plantas contra patógenos e predadores motivaram as pesquisas a cerca da biologia dos endófitos, sugerindo que a interação entre estes microrganismos e plantas acarreta em importantes implicações para a ecologia e a biodiversidade. (JACOBS et al, 1985; HALLMAN et al, 1997; AZEVEDO et al, 2000).

Segundo Wilson (1995), o termo endofítico pode ser geralmente aplicado para fungos, bactérias e leveduras que ao invadir os tecidos de plantas vivas fossem capazes de colonizá-las, em algum tempo de seu ciclo de vida, sem causar sintomas de doenças.

Os fungos, ao contrário das plantas, são incapazes de sintetizar moléculas orgânicas a partir de moléculas inorgânicas. Eles se associam de maneira simbiótica às raízes das plantas que cedem ao fungo parte das substâncias orgânicas produzidas através da fotossíntese, fornecendo-lhe desta forma, parte do alimento. Micorrizas são associações mutualísticas entre fungos e raízes vegetais, onde os denominados fungos micorrízicos facilitam a absorção de água e nutrientes do solo pelas plantas hospedeiras. Em troca os

fungos recebem os nutrientes necessários à sua sobrevivência. (RODRIGUEZ et al., 2009). As plantas que apresentam estas associações prestam funções adaptativas essenciais ao hospedeiro tornando-se mais resistentes a micro-organismos patogênicos e a condições de estresse. Portanto, de certa forma os fungos micorrízicos podem ser considerados endofíticos, exceto os ectomicorrízicos, pois colonizam raízes externas. (SERAFINI et al., 2001).

A divisão entre fungos endofíticos, patogênicos e oportunistas é apenas didática e varia conforme as condições ambientais as quais estes micro-organismos são expostos. Um endofítico pode se comportar como um patógeno quando os mecanismos de defesa da planta são reduzidos. (ARAÚJO et al., 2002).

Os métodos usados nos estudos de penetração e colonização endofítica são os mesmos utilizados nos estudos de infecções por fungos fitopatógenos. No entanto, a investigação endofítica enfatiza, sobretudo, a biodiversidade dos fungos ao infectar hospedeiros em seus ambientes naturais. (CARROLL, 1995).

A transmissão dos endófitos de uma geração para outra pode ocorrer verticalmente, através de sementes, por meio da reprodução de plantas, ou horizontalmente onde os esporos fúngicos são transmitidos por via aérea, pela água ou por insetos. (CARROLL, 1988). Os endofíticos podem habitar principalmente as partes aéreas das plantas especialmente nas folhas, entretanto podem também ser encontrados vivendo nos espaços intracelulares de raízes as quais constituem uma das principais portas de entrada para estes micro-organismos. (KOBAYASHI; PALUMBO, 2000).

Os fungos endofíticos podem estar presentes em todos os tecidos de uma planta. (PETRINI et al., 1992). Entretanto, eles são encontrados em maior abundância em tecidos velhos quando comparados às folhas jovens que são geralmente menos colonizadas. As condições ambientais são também relevantes no que diz respeito à colonização endofítica. O regime de chuvas pode ser citado como exemplo, quanto maior for o regime de chuvas, maior é a taxa de endofíticos presentes no hospedeiro. (CARROLL; CARROLL, 1978).

Os fungos endofíticos são amplamente distribuídos entre as espécies vegetais. É provável que todas as plantas sejam colonizadas por vários endófitos, a presença e a diversidade de endófitos na microbiota vegetal variam

de acordo com o hospedeiro ou tecido específico. (SHULZ; BOYLE, 2005). Um fungo endofítico é capaz de colonizar mais de um hospedeiro, no entanto não interage com estes hospedeiros da mesma maneira, a interação com o hospedeiro pode demonstrar especificidade ecológica e funcional.

Os fungos endofíticos têm despertado interesse especialmente por prestar a seus hospedeiros importantes benefícios como agentes de controle biológico de inúmeras doenças, como promotores de crescimento vegetal e no controle de patógenos e de pragas, desempenhando também um importante papel na sobrevivência dos vegetais em seus ecossistemas. Do ponto de vista agrícola, traz importantes implicações para comunidades, para a agricultura e biodiversidade. Além disso, certos endófitos são considerados excelentes modelos de sistemas para o estudo das interações entre organismos. (STROBEL, 2002).

2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS MEDICINAIS

A busca de substâncias com utilidade farmacêutica foi um dos fatores que impulsionou as pesquisas a cerca dos fungos endofíticos. Além dos estudos a respeito da colonização endofítica, a caracterização de novos metabólitos produzidos a partir da associação simbiótica entre fungos e plantas hospedeiras levou ao isolamento de vários compostos de importância comercial. Diversos metabólitos de classes biossintéticas distintas foram isolados de fungos endofíticos e muitos deles apresentaram efeitos farmacológicos de interesse. (TAN; ZOU, 2001).

Diversos trabalhos têm sido realizados neste sentido e muitos compostos biologicamente ativos já foram identificados e quimicamente caracterizados. Contudo, devido a diversidade taxonômica e a ocorrência destes microrganismos em um grande número de hospedeiros, os endofíticos constituem ainda um grupo de fungos que precisam ser melhor explorados do ponto de vista químico e funcional, representando um campo fértil de pesquisa para a ciência. (ARNOLD et al., 2000; ARNOLD, 2007).

As pesquisas relacionadas à estrutura e a atividade biológica dos metabólitos dos fungos têm dado também importantes contribuições para o desenvolvimento da química. Até final do século XIX e início do século XX, a quantidade de metabólitos extraídos de fungos era insuficiente para permitir a caracterização dos compostos isolados devido à degradação dos mesmos. A inexistência de métodos espectroscópicos impedia a elucidação estrutural dos metabólitos. Uma das exceções foi um alcalóide isolado do fungo *Claviceps purpurea*, cujos estudos foram estimulados pelas propriedades terapêuticas e tóxicas apresentadas. A partir de então, várias pesquisas foram realizadas neste sentido, e diversas substâncias foram isoladas e caracterizadas quimicamente, como os ácidos oxálico e cítrico extraídos do fungo *Aspergillus niger*. (HANSON et al., 2008).

O desenvolvimento de modernos métodos espectroscópicos a partir de 1950 representou um importante avanço na determinação estrutural dos metabólitos de fungos. Com estes métodos, os compostos produzidos em escalas de miligramas e que podiam ser separados por métodos espectroscópicos puderam ser estudados. O desenvolvimento de novos agentes com propriedades farmacológicas constitui-se ainda em um grande desafio para a ciência e representa uma área contínua de pesquisa. Nos últimos 40 anos, muitos metabólitos com diferentes esqueletos de carbono foram isolados de fungos. O isolamento da ciclosporina em 1970, como metabólitos dos fungos *Cylindrocarpon lucidum* e *Tolyposcladium inflation* representou um importante avanço no tratamento com imunossuppressores. (HANSON, 2008). Seguem-se então vários trabalhos neste sentido que resultaram no isolamento de diversas substâncias de interesse científico.

Lu et al (2000) em um estudo realizado em Nanjing, China verificaram a presença de 11 metabólitos bioativos produzidos por *Colletotrichum sp.*, um fungo endofítico isolado da *Artemisia annua* (Asteracea), planta tradicional da medicina chinesa. Os seguintes metabólitos foram isolados: ergosterol (**1**), 3 β ,5 α ,6 β -trihidroxi-ergosta-7,22-dieno (**2**), 3 β -hidroxi-ergosta-5-eno (**3**) (Figura 1), 3-oxo-ergosta-4,6,8(14),22-tetraeno, 3 β -hidroxi-5 α ,8 α -epidioxi-ergosta-6,22-dieno, 3 β -hidroxi-5 α ,8 α -epidioxi-ergosta-6,9(11),-22-trieno, 3-oxo-ergosta-4-eno, além de um hormônio vegetal, o ácido indol-3-acético (IAA) e 3 novos

metabólitos antimicrobianos. Todos os 11 metabólitos foram submetidos a ensaios microbiológicos.

Segundo os autores supracitados os compostos **1-3** e os compostos derivados do ergosterol apresentaram atividade inibitória contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, como *Pseudomonas sp.* e *Bacillus subtilis*. Os esteróis **2 e 3**, apresentaram também, atividade antifúngica e os compostos **1 e 3**, foram fungistáticos para os fungos patogênicos *Candida albicans* e *Aspergillus niger* na concentração de 200 µg/ml.

Estes mesmos autores sugerem ainda que o endofítico *Colletotrichum sp.* isolado da *A. annua*. pode proteger a planta hospedeira através da produção de metabólitos que podem ser tóxicos ou letais para fitopatógenos. O trabalho afirma que o IAA isolado pode, em baixas concentrações, regular processos fisiológicos no hospedeiro, como o crescimento da planta. Os metabólitos isolados da cultura do *Colletotrichum sp.* mostraram que o endofítico está envolvido na adaptabilidade e competitividade da *A. annua* na natureza.

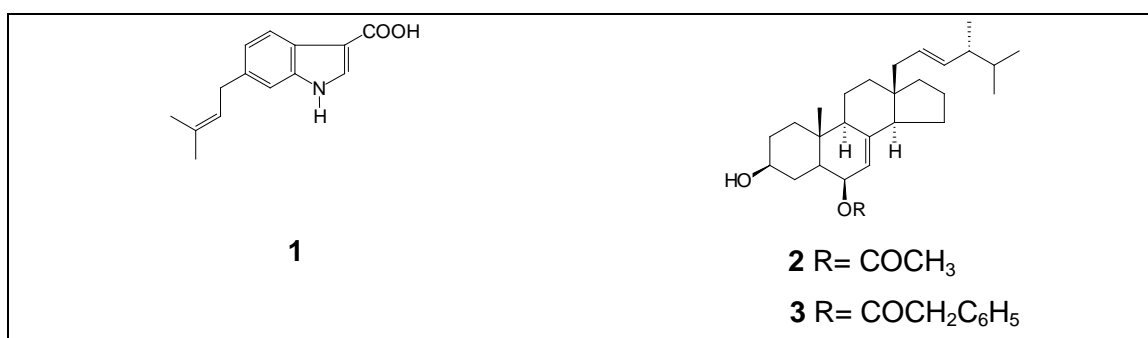


Figura 1. Compostos **1, 2 e 3** isolados do fungo endofítico *Colletotrichum sp.* da *A. annua*.

Um trabalho semelhante foi desenvolvido por Aly et al. (2008) que investigou o fungo endofítico *Ampelomyces sp.* isolado de flores de *Urospermum picroides*. Típica da dieta mediterrânea tradicional, a planta é encontrada no deserto do Egito e seus extratos mostram atividade antiinflamatória. (STRZELECKA et al., 2005; EBEL, 2006). Segundo dados dos autores, os extratos da cultura do fungo isolado da planta medicinal exibiram considerável atividade citotóxica quando testadas *in vitro* contra células L5178Y (células de linfoma de camundongos). Neste estudo, foram isolados os seguintes metabólitos: Ampelopirano (**4**), desmetildiaportinol (**5**), desmetildiclo-

rodiaportin (**6**), macrosporin-7-O- sulfato (**7**), 3-O-metilalaternin-7-O-sulfato (**8**), 3-O-metilalaternin (**9**) e ampelanol (**10**) e altersolanol A (**11**) (Figura 2). Os extratos fúngicos obtidos no estudo diferiram em relação aos metabólitos secundários, quando cultivados em meio líquido ou sólido. Os extratos obtidos da cultura em meio líquido forneceram um pirano (**4**) e antraquinonas sulfatadas (**7** e **8**) enquanto em meio sólido, os fungos forneceram os compostos (**5**, **6**, **9**, **10** e **11**). Os compostos **5** apresentou a maior atividade citotóxica contra células L5178Y. Os compostos (**9** e **11**) exibiram atividade antimicrobiana contra patógenos gram-positivos, como o *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Enterococcus faecalis*, na concentração inibitória mínima de 12,5 µg/ml, 12,5 e 25µg/ml, respectivamente.

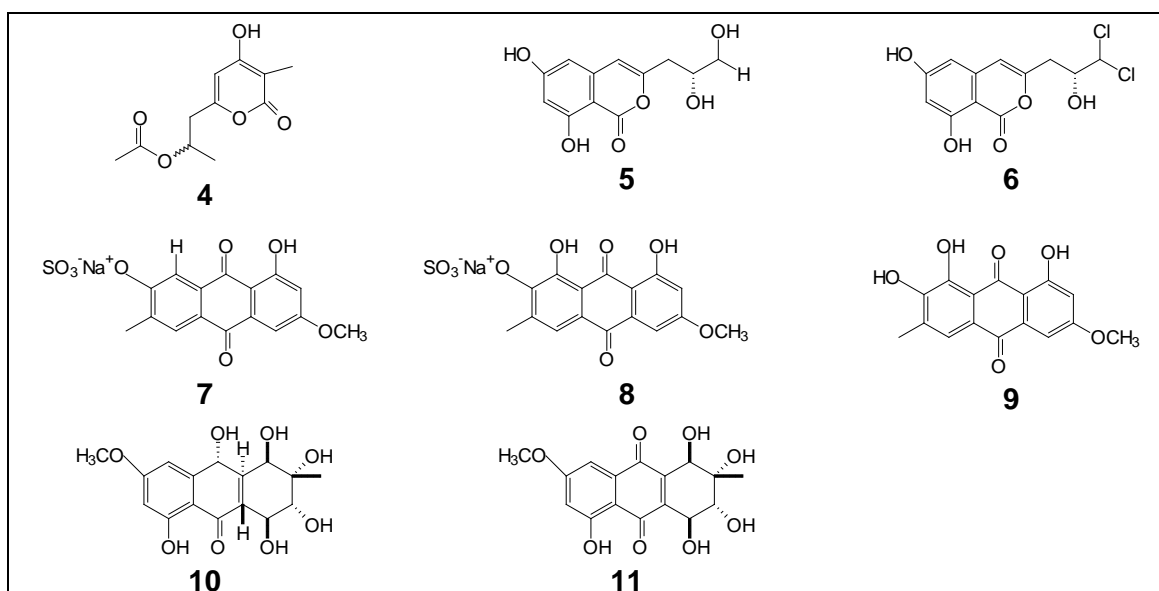


Figura 2. Compostos **4** a **11** isolados do fungo endofítico *Ampelomyces* sp. da *Urospermum picroides*.

Os fungos endofíticos isolados nos dois trabalhos citados anteriormente apresentaram atividade antimicrobiana contra os patógenos testados, o que reforça a teoria descrita na literatura a respeito do potencial de produção de metabólitos bioativos por microrganismos endofíticos.

Borges et al (2006), descreveram a presença de antraquinonas derivativas produzidas por *Phoma sorghina*, um fungo endofítico associado a planta medicinal *Tithonia diversifolia* (Asteracea). Os extratos desta planta são usados no tratamento de malária, diarreia, febre, hepatite e feridas. (COS et al., 2002; GU et al., 2002). São atribuídas também atividades anti-inflamatórias,

amebicida, atiespasmódica, antifúngica, antibacteriana e antiviral (GOFFIN et al., 2002, CÓS et al., 2002). Os autores caracterizaram as seguintes estruturas extraídas deste fungo endofítico: 1,7-diidroxi-3-metil-9,10-antraquinona (**12**), 1,6-diidroxi-3-metil-9,10-antraquinona (**13**), 1-hidroxi-3-metil-9,10-antraquinona (**14**), 1,7-diidroxi-3-hidroximetil-9,10-antraquinona (**15**) e dois novos derivados hexahidroantraquinônicos, dendryol E (**16**) e dendryol F (**17**) (Figura 3). As estruturas foram identificadas com base em dados espectroscópicos, principalmente RMN 1D e 2D.

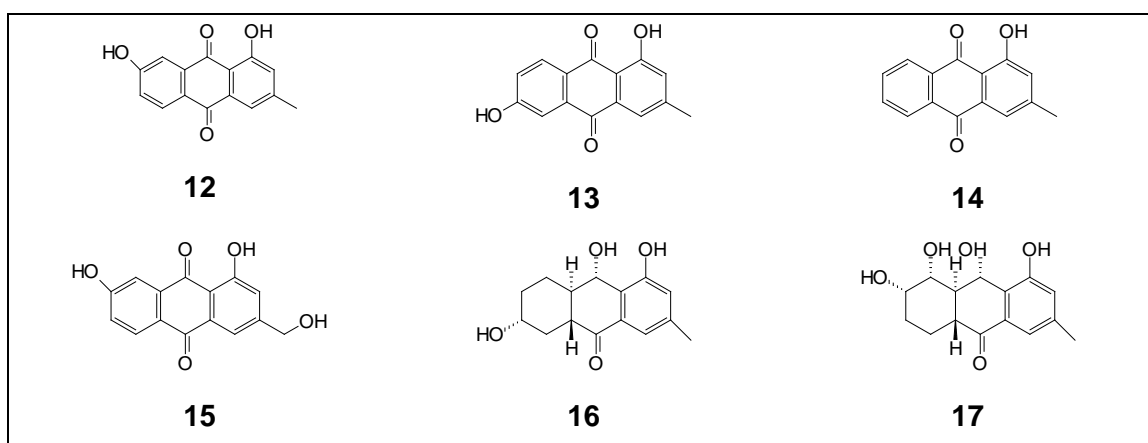


Figura. 3. Antraquinonas produzidas pelo fungo endofítico *Phoma sorghina* isolado da planta medicinal *Tithonia diversifolia* (Asteracea).

Taechowisan et al (2008), descreveram a atividade biológica de constituintes químicos de *Streptomyces sp.*, um fungo endofítico isolado das raízes de *Alpinia galanga* (Zingiberaceae), planta medicinal coletada nos arredores de Nakom Pathom, Tailândia. De acordo com os autores, as substâncias isoladas apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC25932, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli* ATCC10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Candida albicans* ATCC90028 e *Colletotrichum musae*. Os compostos foram caracterizados como campferol (MARKHAM et al.,1978), isoscutelarina (JAY; GONNET, 1973), umbeliferona (YAMOGUCHI, 1970) e cichoriina (ABDEL-SALAM et al., 1986), baseado em dados espectrofotométricos.

Sobre a análise antimicrobiana, os autores verificaram que o campferol e a isoscutelarina apresentaram grande atividade contra bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) enquanto a umbeliferona e

cichoriina apresentaram moderada atividade em relação a estes microrganismos. O Campferol e a isoscutelarina exibiram moderada atividade contra bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), enquanto umbeliferona e cichoriina apresentaram fraca atividade. Campferol, isoscutelarina e umbeliferona mostraram grande atividade contra *Candida albicans* e moderada atividade contra *Colletotrichum musae*. A cichoriina não apresentou atividade em relação a estes microrganismos. Estudos apontam ainda que os metabólitos produzidos por *Streptomyces* sp. além da atividade protetora contra patógenos, também influenciam no crescimento e na fisiologia da planta. (KATZNELSON; COLE, 1965).

Davis et al. (2005), também testaram a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos. Após análises químicas de culturas de fungos endofíticos *Eupenicillium* sp. isolados de uma planta endêmica na Austrália, *Glochidium ferdinandi* (Euphorbiaceae), os autores verificaram a presença dos seguintes compostos: os policetídeos phomoxina B e C, eupenoxide e phomoxin. Os compostos isolados foram testados contra diversos microrganismos associados a infecções nosocomiais, incluindo *Staphylococcus aureus* multi-resistente a drogas (MRSA), *Staphylococcus aureus* (NCCLS 29523), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (NCCLS 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Acinetobacter anitratus* e *Candida albicans* (ATCC 60193). A atividade antimicrobiana foi determinada através da microdiluição em caldo (JORGENSEN et al., 2000; LISTER, 2002), onde cada composto foi testado nas concentrações de 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4 e 0.2 µg/ml. Segundo dados do trabalho, nenhuma atividade inibitória do crescimento microbiano foi verificada na phomoxina B e C, e no eupenoxide.

Silva et al. (2006) desenvolveram um trabalho semelhante, isolando cinco sesquiterpenos candinanos de *Phomopsis cassiae*, um fungo endofítico associado com *Cassia spectabilis* (Leguminosae), planta nativa do cerrado brasileiro. A estrutura dos compostos 3,9,12-trihidroxicalamenenos (**18**); 3,12-trihidroxicalamenenos (**19**); 3,12-trihidroxicaladeno (**20**); e 3,11,12-trihidroxicaladeno (**21**) (Figura 4) foi estabelecida com base na análise de dados espectrofotométricos. A atividade antifúngica dos isolados foi avaliada contra os microrganismos *Cladasporium sphaerospermum* e *Cladasporium*

cladosporioides, onde o composto **21**, isolado no trabalho, demonstrou a maior atividade.

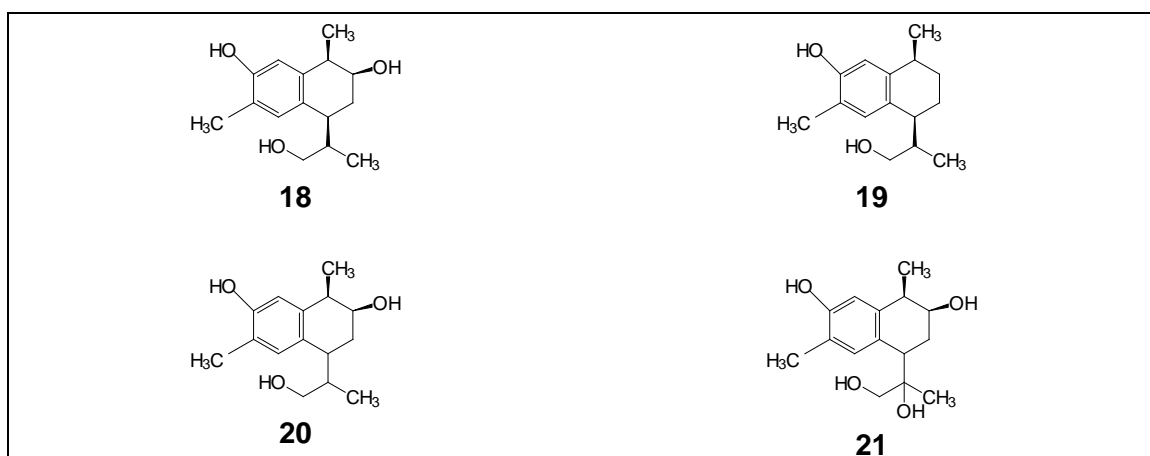


Figura. 4. Sesquiterpenos produzidos pelo fungo endofítico *Phomopsis cassiae* isolado da planta *Cassia spectabilis* (Leguminosae).

Assim, de um modo geral, entre as atividades apresentadas pelos endofíticos, a ação antimicrobiana é a que mais se destaca de acordo com os trabalhos relacionados anteriormente.

No trabalho desenvolvido por Barros et al. (2004) foram apresentados quatro alcalóides espiroquinazolina de *Eupenicillium sp.*, um fungo endofítico isolado de folhas sadias de *Murraya paniculata* (Rutaceae), planta nativa do sudoeste da Ásia que foi introduzida no Brasil com propósito ornamental. Os autores investigaram o quanto os microrganismos associados com esta espécie influenciavam no metabolismo secundário da planta. Foram isolados os compostos espiroquinazolina (**22**), alantripinona (**23**), e quatro alcalóides: alanditripinona (**24**), alantrifenona (**25**), alantripinona B (**26**) e alantrilenona (**27**) (Figura 5). Estes metabólitos foram comparados aos produzidos pela planta hospedeira.

Neste estudo, os autores verificaram que os alcalóides produzidos pela planta (ácido antranílico e triptofano) parecem ser os mesmos citados anteriormente, os alcalóides produzidos pelo fungo parecem ser sintetizados por uma via diferente. Segundo os autores, uma explicação para o fato é que, provavelmente, o fungo quando habita dentro da planta, aprisiona aminoácidos precursores do alcalóide da planta para produzir seus próprios metabólitos. No entanto, de acordo com os autores, o estudo falhou em detectar compostos

antranílicos livres e aminoácidos triptofano na folhas da planta. Outra possibilidade, é que os alcalóides do fungo são produzidos diretamente de proteínas através de atividade de proteases fúngicas.

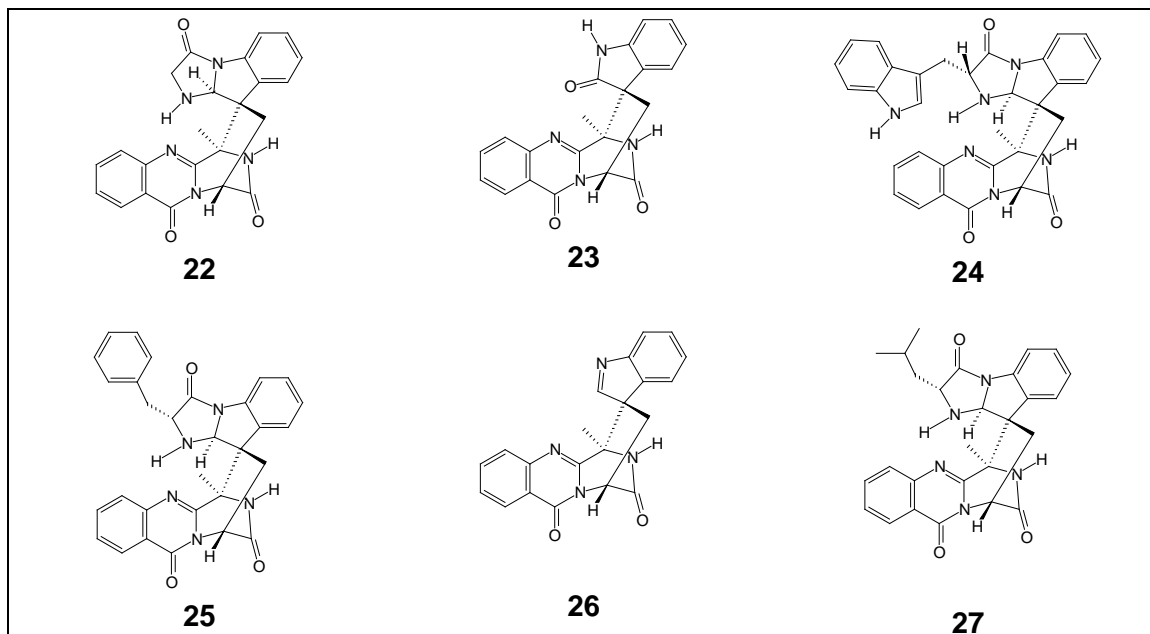


Figura. 5. Compostos produzidos pelo fungo endofítico *Eupenicillium* sp. isolado da planta *Murraya paniculata* (Rutaceae).

Através da investigação fitoquímica, os autores demonstraram que os principais metabólitos secundários acumulados na *M. paniculata* são cumarinas alquiladas e flavonóides (FERRACINI, 1996). O acúmulo destes compostos pode estar relacionado à infestação pelo fungo, o que pode causar uma elevada expressão da atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL), enzima chave da via fenilpropanóide.

Naik et al. (2008) estudaram a diversidade de fungos endofíticos em plantas medicinais arbustivas, da região de Malnad, Sul da Índia. Durante o estudo, foram isolados 6125 fungos endofíticos de 9000 segmentos foliares, num total de 15 plantas medicinais. Os fungos detectados pertenciam ao filo Ascomycota (8.6 %), classe dos Coelomycetos (26.0 %), Hyphomycetos (28.0 %), e subfilo Mucoromycotina (0.3 %) e formas estéreis (4.9 %). *Alternaria*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Phyllosticta* e *Xylaria* foram os fungos mais frequentemente isolados. Notou-se que durante o inverno, os fungos eram mais freqüentes quando comparados às demais estações, o que sugere que a colonização endofítica é correlacionada

com fatores climáticos. (WILSON; CARROLL, 1994). Os autores descrevem que a alta umidade do inverno e a temperatura moderada podem permitir que os propágulos fúngicos germinem com sucesso. Os autores acrescentam que a alta incidência de espécies do gênero *Cladosporium* e *Penicillium* isolados durante o verão pode estar relacionada à habilidade que os esporos destes fungos apresentam em crescer mesmo em baixos potenciais de água.

2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ISOLADOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA FAMÍLIA XYLARIACEAE

A família Xylariaceae é considerada fonte de uma grande variedade de compostos bioativos. Entre os metabólitos isolados, destacam-se mellein, 5-metilmellein, 8-metoxi-1-naftol, ácido orselinico, daldinal A, daldinona B, macrocarpon A, hipomiltin, cochiliodinol, entre outros. (BITZER et al., 2008).

Entre os fungos pertencentes à Xylariaceae, o gênero *Xylaria* destaca-se como fonte de novos metabólitos secundários, com estruturas químicas diversas e atividades biológicas distintas.

O trabalho conduzido por Healy et al. (2004) resultou no isolamento de xantonas, compostos isolados de fungos endofíticos identificados como *Xylaria* sp. O fungo foi isolado da planta *Glochidion ferdinandi*, e os metabólitos extraídos apresentaram importantes atividades farmacológicas (PERES and NAGEM, 1996; PERES et al., 2000) como por exemplo: propriedades antiinflamatórias (LIN et al., 1996), propriedades antimicrobianas (MALET-CASCON et al., 2003), antioxidantes (MINAMI et al., 1994), antifúngicas (ROCHA et al., 1994) e anticancerígenas. (HO et al., 2002).

Krohn et al. (2004), desenvolveram um trabalho semelhante, descreveram a síntese de xyloketal D, produto natural pertencente a um grupo de metabólitos secundários isolados de *Xylaria* sp. O interesse biotecnológico por este grupo deve-se a atividade inibitória sobre a enzima acetil colinesterase.

Entre os metabólitos extraídos de fungos endofíticos destacam-se o Xylarenal A, um sesquiterpenóide isolado da fermentação de *Xylaria persicaria*

(SMITH et al., 2002) e xylactam, um composto nitrogenado obtido de corpos de frutificação do ascomyceto *Xylaria euglossa*. (WANG et al., 2005).

Estudos químicos realizados por Deyrup et al. (2007) em extratos do fungo *Xylaria* sp. levaram ao isolamento de quatro glicosídeos triterpenóides, nomeados kolosídes A-D, juntamente com o metabólito já conhecido: 19,20-epoxycitochalsin N. (ESPADA et al., 1997). As estruturas e as configurações relativas destes compostos foram determinadas por RMN. O composto identificado como Kolosíde A exibiu atividade contra as bactérias gram-positivas *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

No trabalho desenvolvido por Pittayakhajonwut et al. (2009), foram isolados quatro novos compostos (12,8-eudesmanolídeos) do fungo *Xylaria ianthinovelutina*, cujas estruturas foram determinadas por espectroscopia. Estes compostos exibiram atividade biológica contra cepas de *Plasmodium falciparum* K-1, NCI-H187, KB, MCF-7. Os compostos isolados de *Xylaria ianthinovelutina* foram: 3 α ,4 α ,7 β -Trihidroxi-11(13)-eudesmen-12,8-olídeo (**28**), 4 α ,7 β -Dihidroxi-3 α -metoxi-11(13)-eudesmen-12,8-olídeo (**29**), 7 β -Hidroxi-3,11(13)-eudesma-di-eno-12,8-olídeo (**30**), 13-Hidroxi-3,7(11)-eudesma-dieno-12,8-olídeo (**31**) (Figura 6).

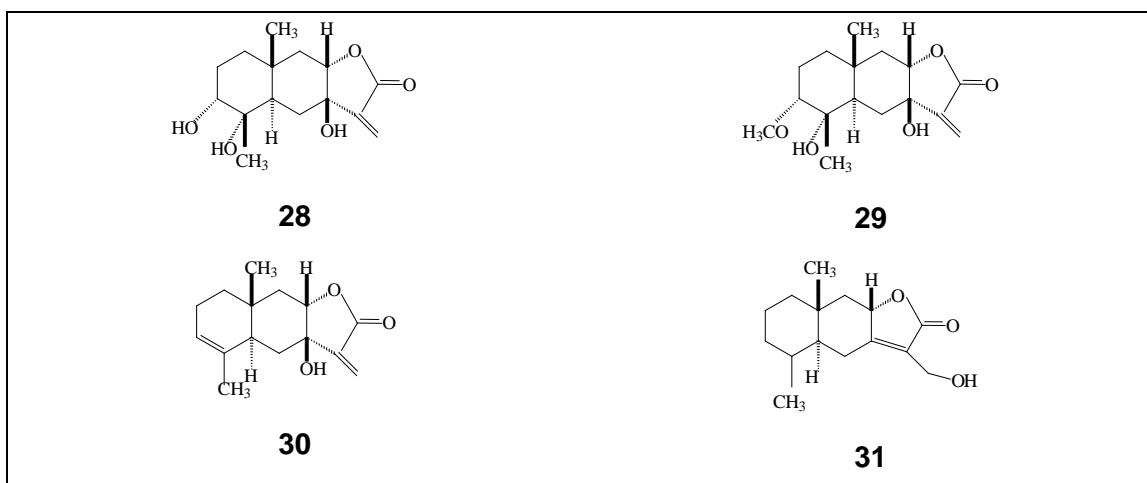


Figura 6. Compostos 28-31 (12,8-eudesmanolídeos) isolados do fungo *Xylaria ianthinovelutina*.

Rukachaisirikul et al. (2007) isolaram as seguintes substâncias de *Xylaria* identificada como PSU-A80: Xylarenol (**32**), um derivado do ácido hexadienoico (**33**) e xylarenona (**34**) (figura 7) juntamente com dez compostos conhecidos de fungos do gênero *Xylaria*.

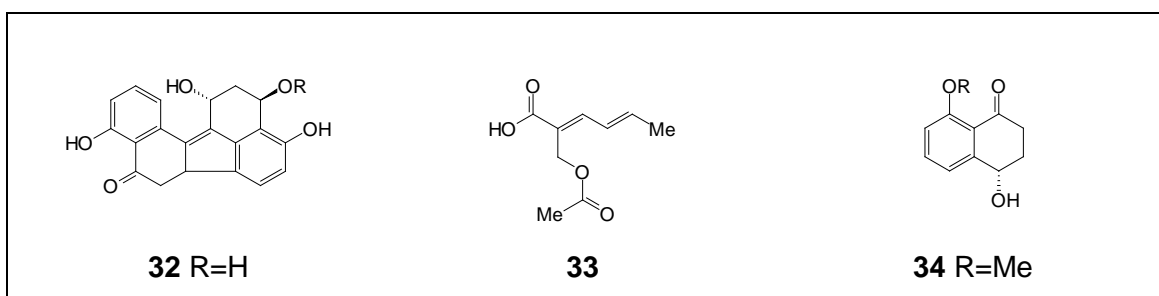


Figura 7. Alguns compostos isolados do fungo *Xylaria* PSU-A80.

A análise fitoquímica do extrato de *Torreia jackii*, uma planta endêmica no sudoeste da china, levou ao isolamento, a determinação estrutural e determinação das atividades biológicas de três novos sesquiterpenos: xylarenonas A e B e ácido xilarênico extraídos do material fúngico identificado como *Xylaria* sp. NCY2. (HU et al., 2008).

Pongcharoen et al. (2006), testaram a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos. Após análises químicas de culturas de fungos *Xylaria* sp. PSU-D14 isolados de folhas de *Galcinia dulcis*, os autores isolaram e identificaram dois glicosídeos derivativos: xilarosídeos A e B. Os autores descreveram ainda a presença de dois compostos conhecidos: sordaricina (HAUSER; SIGG, 1971; MANDER; THOMSON, 2005; WEBER et al., 2005) e 2,3-dihidro-5-hidroxi-2-metil-4H-1-benzopirano-4-ona. (GRAY et al., 1999; DAI et al., 2006). Os metabólitos foram identificados por métodos espectroscópicos e os dados espectroscópicos de ^1H e ^{13}C RMN foram comparados com os descritos na literatura. Os compostos isolados foram testados contra *Candida albicans* (CA28). A sordaricina demonstrou atividade antifúngica moderada contra *Candida Albicans* ATCC90028 com um valor de MIC de 32 $\mu\text{g/ml}$.

Uma série de novos compostos denominados xyloketal foram isolados de fungos identificados como *Xylaria* sp (#2508). Wu et al. (2005), identificaram o metabólito Xyloketal F que apresentou importante atividade bloqueadora de canais de cálcio. Xu et al. (2007) utilizaram métodos espectroscópicos, principalmente RMN 1D e 2D para identificar os metabólitos xyloketal J (**35**), xyloester A (**36**) (Figura 8) e xyloallenolideo B isolados do fungo endofítico *Xylaria* sp.(#2508). Além destes, foi ainda isolado um substituinte conhecido como dihidrobenzofurano (LIU et al.; 2006) e o xyloketal B (LIN et al., 2001) já previamente identificado.

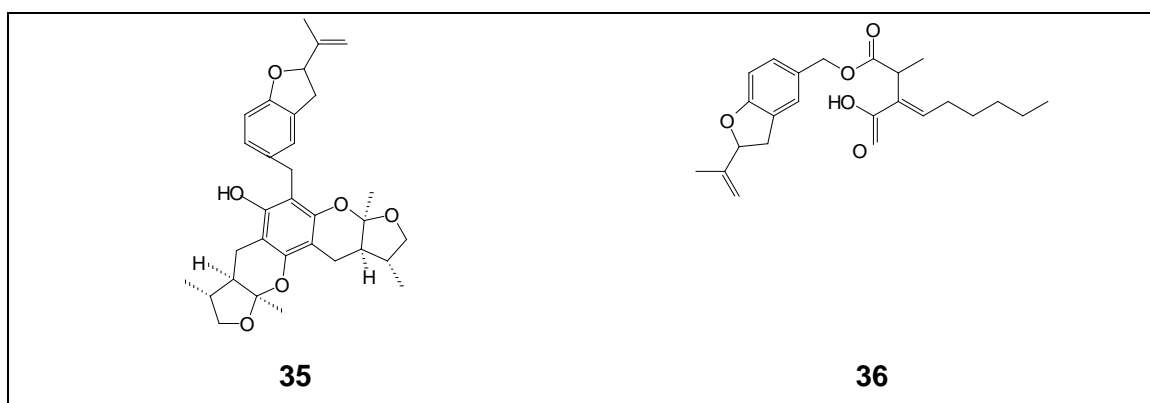


Figura 8. Xyloketal J (**35**) e Xyloester A (**36**) isolados do fungo endofítico *Xylaria* sp.(#2508).

Baseado na abundância de metabólitos secundários encontrados na família Xylariaceae, Liu et al. (2008), identificaram e descreveram a atividade biológica do composto 7-amino-4-metilcumarina (**37**) (Figura 9) extraído do fungo endofítico *Xylaria* sp YX-28. O fungo foi isolado da tradicional planta medicinal chinesa *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae). O metabólito foi identificado por RMN e espectrofotometria de massa. O composto isolado demonstrou atividade contra *Staphylococcus aureus* (MIC, 16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), *Escherichia coli* (MIC, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), *Salmonella typhia* (MIC, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), *Salmonella typhimurium* (MIC, 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), *Salmonella enteriditis* (MIC, 8,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), *Aeromonas hydrophila* (MIC, 4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), *Yerisinia* sp. (MIC, 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) *Vibrio anguillarum* (MIC, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), *Shigella* sp. (MIC, 6,3 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), *Vibrio parahaemolyticus* (MIC, 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), *Candida albicans* (MIC, 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), *Penicilium expansum* (MIC, 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e *Aspergillus niger* (MIC, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

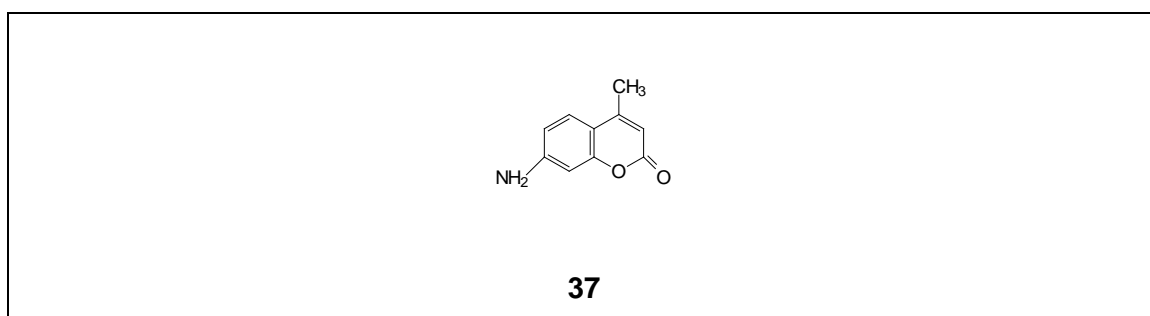


Figura 9. 7-amino-4-metilcumarina extraída do fungo endofítico *Xylaria* sp YX-28.

No trabalho desenvolvido por Pittayakhajonwut et al. (2005), foram isolados do fungo *Xylaria mellisii* (BCC 1005) os seguintes compostos: melisol, e 1,8-dihidroxi-naftol 1-*O*- α -glucopiranosídeo. Os compostos exibiram atividade

biológica contra cepas do vírus Herpes simples tipo 1 nas concentrações de 10,50 µg/mL e 8,40 µg/mL, respectivamente.

Shiono et al. (2009) estudaram a atividade biológica de compostos produzidos por corpos de frutificação do fungo *Xylaria polymorpha*. O isolamento levou a elucidação estrutural de três novos diterpenóides glicosídeos: ácido 16- α -D-mano-piranosiloxisopimar-7-en-19-oico, ácido 15-hidroxi-16- α -D-mano-piranosiloxiso-pimar-7-en-19-oico e ácido 16- α -D-glicopiranosiloxisopimar-7-en-19-oico, os quais demonstraram atividades citotóxicas pela indução de apoptose em células cancerígenas humanas (células HL60).

2.4 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD)

As técnicas cromatográficas são utilizadas para separar os constituintes de uma mistura de substâncias seja para identificação ou obtenção da substância pura, sendo empregadas para a investigação química dos extratos brutos e caracterização dos metabólitos secundários de interesse. (STREGE, 1999). As técnicas espectroscópicas são utilizadas para a identificação estrutural destas moléculas.

A cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjos de diodos (CLAE-DAD) consiste em um importante método de investigação de perfil químico de metabólitos de fungos. A associação com detectores de diodo permite a seleção do melhor comprimento de onda, para cada componente da amostra. Trata-se de um método simples e rápido que pode ser utilizado para análise de pequenas quantidades de amostras, permitindo avaliar o perfilamento de poucas gramas de extratos de culturas ou de amostras vegetais em curto espaço de tempo (ABREU, 2010). Os limites de detecção alcançados na técnica são a níveis de µg L⁻¹. O método permite também a realização de análises comparativas entre extratos submetidos a diferentes condições de cultivo. (SMEDSGAARD; NIELSEN, 2005).

A técnica de CLAE-DAD é amplamente utilizada em análises quantitativas e qualitativas avaliando o efeito de diferentes solventes orgânicos

utilizados na extração dos compostos. (CARDOZO et al, 2011). A CLAE pode ser utilizada para a purificação dos compostos extraídos de fungos usando diferentes sistemas de solventes, como metanol e água. (LI et al., 2010).

A técnica baseada em CLAE está entre os métodos de escolha para a determinação do perfil de metabólitos secundários de fungos isolados da família Xylariaceae. Ascomycetos como *Daldinia*, *Hypoxylon* e *Xylaria* tem sido estudados extensivamente através da técnica analítica, pela determinação do perfil químico dos componentes majoritários e minoritários das amostras. As análises baseiam-se nos tempos de retenção característicos e nos espectros de absorção no UV (STADLER et al., 2004).

Métodos cromatográficos são extremamente úteis para avaliar a quimiotaxonomia de fungos. Pigmentos e outros metabólitos secundários podem ser separados de acordo com suas polaridades. A introdução do método de extração de metabólitos em micro-escala, por Smeedgaard em 1997, fez da CLAE-DAD um método efetivo para a caracterização quimiotaxonômica de um grande número de fungos. Neste método, poucos fragmentos das colônias (plugs) são retirados e extraídos com uma pequena quantidade de solvente. A quimiotaxonomia (perfilamento de metabólitos secundários) tem se mostrado bastante efetiva na classificação e diferenciação de fungos pertencentes à Ascomycota. (ANDERSEN et al., 2008).

3. OBJETIVOS:

3.1 GERAL

- Isolar e caracterizar fungos endofíticos de *Mikania laevigata* (Asteraceae) e realizar a análise química de seus extratos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Isolar fungos endofíticos da *Mikania laevigata*;
- Purificar e preservar os isolados fúngicos obtidos;
- Identificar os fungos através de técnicas clássicas e moleculares;
- Obter os extratos a partir do(s) fungo (s) endofítico(s);
- Analisar os extratos por cromatografia líquida de alta eficiência

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 OBTENÇÃO DE *Mikania laevigata*

As amostras de *Mikania laevigata* foram coletadas no Horto Florestal da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), localizada na Rodovia Ilhéus/Itabuna, na cidade de Ilhéus (Bahia), em setembro de 2009. Foram selecionadas três plantas para a retirada das folhas saudáveis. De cada planta, foram coletadas cinco folhas, totalizando uma amostragem de quinze folhas de *Mikania* (Figura 10). Após a coleta, as folhas foram imediatamente conduzidas ao Laboratório de Pesquisas em Microbiologia da UESC e submetidas ao procedimento de isolamento dos fungos endofíticos.



Figura 10. *Mikania laevigata*

4.2 DESINFECÇÃO DE *MIKANIA LAEVIGATA* E ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Antes do isolamento dos fungos endofíticos, as folhas foram selecionadas e submetidas a um procedimento de desinfestação superficial, seguindo o método padronizado por Maitan (1998), com algumas modificações. O objetivo deste procedimento é eliminar a sujeira e grande parte dos fungos epifíticos e saprófitos que possam estar presentes na superfície dos tecidos vegetais. Assim, o material foi lavado abundantemente com água corrente para retirar o excesso de poeira e de epifíticos. Em seguida, em câmara asséptica, o material foi imerso em álcool a 70% v/v por 1 minuto, e depois mergulhado em hipoclorito de sódio a 3% m/v por 5 minutos. Após este procedimento, as folhas foram lavadas três vezes com água destilada estéril, por 1 minuto cada, para retirar o excesso de hipoclorito (Figura 11A).

Após assepsia, foram retirados com auxílio de um bisturi o ápice e a base da cada folha, os quais foram descartados, devido à maior concentração de contaminantes nestas regiões. Foi utilizada apenas a parte central das folhas. Para o controle da desinfestação superficial, as folhas foram carimbadas em placas contendo o meio BDA (meio de batata, dextrose e Agar) suplementado com antibiótico cloranfenicol (100 µg/mL) e Rosa de Bengala (25 µg/mL) para inibir o crescimento bacteriano no isolamento dos fungos. O carimbo consiste em imprimir nas placas contendo o meio de cultura, as regiões adaxiais e abaxiais da parte central das folhas, após desinfestação.

Para o isolamento dos fungos, as lâminas foliares foram trituradas em gral e pistilo contendo 6,0 mL de solução tampão fosfato de sódio a 0,5 M estéril (Figura 11B). O material extraído desta maceração (100 µL) foi espalhado com alça de Drigalsky nos seguintes meios de cultura: BDA, Saboraud, ISP-2 (Agar extrato de levedura-extrato de malte) e Ágar aveia, suplementados com cloranfenicol (100 µg/mL) e Rosa de Bengala (25 µg/mL) (Figura 11C e D). Foram utilizadas cinco placas de cada meio. Durante o procedimento, foi realizado o controle de contaminação ambiental na cabine de segurança biológica, onde o material vegetal foi manipulado.

As placas foram transferidas para o Laboratório de Pesquisas em Microbiologia (LAPEM), na Universidade Estadual de Feira de Santana, onde foram incubadas em estufa tipo B.O.D a 28°C por quinze dias.

A partir do décimo segundo dia de incubação, pequenos fragmentos de ágar contendo micro-organismos (fungos) recém-desenvolvidos foram transferidos para placas contendo meio BDA, para isolamento e purificação das colônias.

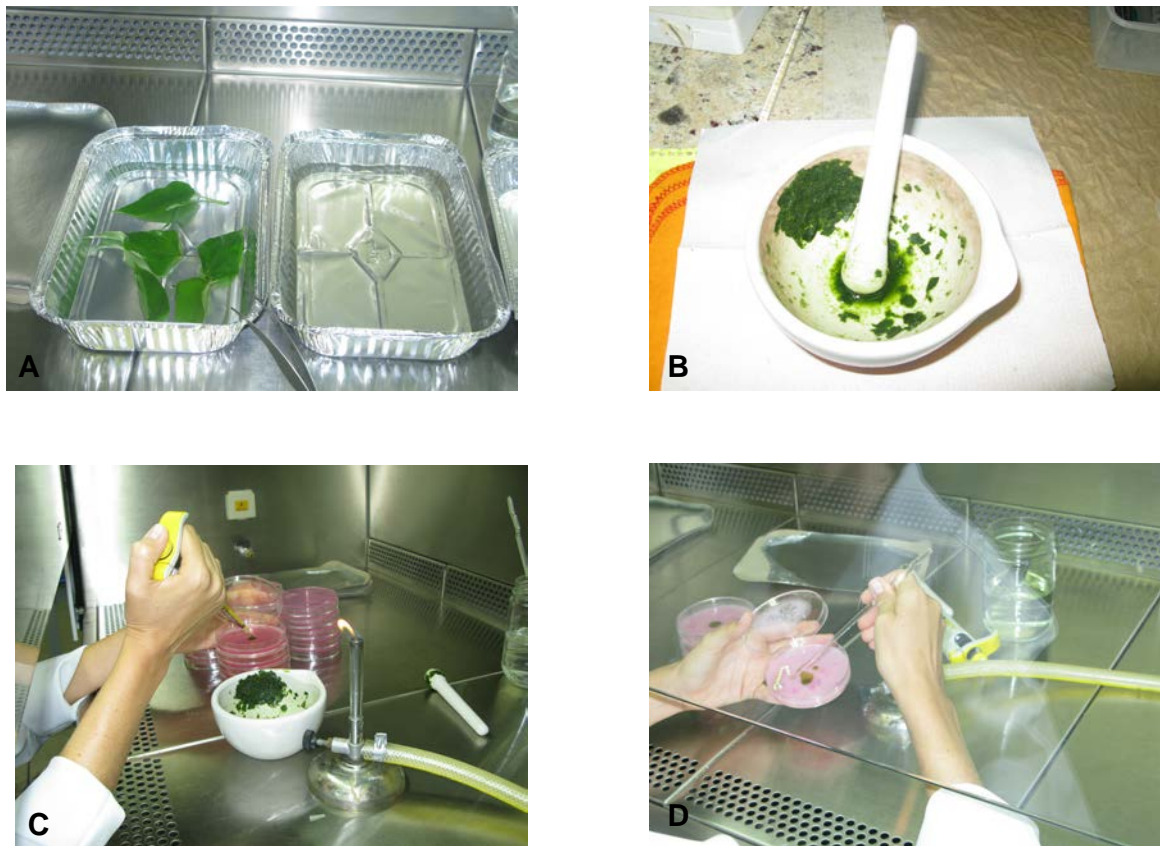


Figura 11. Isolamento dos fungos endofíticos de *Mikania laevigata*. A- Desinfestação superficial; B- Obtenção do extrato foliar após maceração das folhas; C- Transferência do extrato para as placas; D- Extrato foliar espalhado.

4.3 PRESERVAÇÃO E ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Após isolamento, procedeu-se a purificação dos fungos através da técnica de sucessivos repiques. Os isolados fúngicos foram armazenados conforme a metodologia de Castellani (1967). A técnica consiste em transferir pequenos discos contendo micélio e ágar (foram utilizados cinco discos) obtidos das culturas puras para frascos de vidro contendo água destilada estéril. Os frascos também foram previamente esterilizados. Os frascos contendo os micélios foram armazenados a temperatura ambiente para posterior reativação das amostras.

Para a identificação dos fungos através da metodologia clássica, as amostras foram encaminhadas para o LAMIC (Laboratório de Micologia), UEFS, onde foram observados os aspectos macro e micro-morfológicos das estruturas vegetativas e reprodutivas. Para o preparo das lâminas, foi adicionada uma gota de ácido láctico à lâmina, o material fúngico foi pescado delicadamente e espalhado com auxílio de uma agulha, foi colocado lamínula e a amostra foi analisada por microscopia. Os resultados foram comparados com base em literatura específica.

4.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

4.4.1 Extração de DNA e amplificação por PCR

Para esta etapa, as amostras foram cultivadas em caldo extrato de malte durante duas semanas a 28°C ao abrigo da luz para estimular o crescimento fúngico. As amostras foram semeadas em tubos contendo o meio EM (água, extrato de malte a 1% e ágar). A extração do DNA foi realizada de acordo com metodologia proposta por Doyle & Doyle (1978) com algumas modificações.

Os primers ITS5 e ITS4 foram utilizados para as amplificações das regiões ITS (internal transcribed spacer) (White et al. 1990). A amplificação foi realizada em um volume de reação de 25 µL contendo os seguintes componentes: 100 mM Tris-HCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,5 µL a 1 pmol de cada primer, 2,5 unidades de Taq polimerase de DNA, 1M de Betaína e aproximadamente 1 ng de DNA genômico.

O programa utilizado no termociclador foi o seguinte: 1 ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 1 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), anelamento a 60°C por 1 minuto e meio e extensão a 72°C por 2 minutos, além de um ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos. Os produtos da reação de PCR foram examinados por eletroforese em gel de agarose a 1% e as concentrações destes produtos foram estimadas pela comparação da intensidade das bandas com a intensidade das bandas do

marcador low molecular mass DNA (Invitrogen). O programa Kodak 1D 3.6 que permite a análise e a fotodocumentação de géis foi utilizado para este procedimento. Os produtos do PCR purificado foram seqüenciados no seqüenciador automatizado ABI 3130XL (Applied Biosystems).

4.4.2 Alinhamento, sequenciamento do DNA e análise filogenética

As análises filogenéticas foram conduzidas usando critérios de máxima parcimônia no *software* PAUP 4.0 (Swofford, 1998). Foi realizada busca heurística com 1000 replicações de adição aleatória de táxons, algoritmo TBR com 10 árvores salvas a cada replicação. O suporte foi avaliado através de bootstrap de caracteres (FELSENSTEIN, 1985), com 1000 pseudoreplicações, adição simples de táxons e algoritmo TBR e salvando 10 árvores por replicação. Os dados gerados foram depositados no Treebase com ID 11520 e as seqüências no Genbank com números JN051356 - JN051363.

4.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Para cada fungo endofítico isolado foram incubados três plugs (discos contendo micélio e Agar) de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio EM líquido (sem adição de Agar) (Figura 9 A). O experimento foi realizado em duplicata. Como controles foram utilizados dois frascos contendo somente meio. Os frascos foram incubados por quatro semanas à 28°C, em estufa tipo B.O.D. sob o abrigo da luz. Após o período estabelecido, as amostras foram filtradas à vácuo em funil de Büchner, separadamente, para obter os componentes contidos na massa

micelial e no sobrenadante. Após esta etapa, o fluido da cultura (sobrenadante) foi submetido à partição líquido-líquido com 20 mL de acetato de etila (AcOEt), três vezes, para obtenção dos extratos em acetato e aquoso, após a concentração utilizando rotaevaporador, o mesmo procedimento foi realizado com metanol para obter o extrato externo em metanol. À massa micelial foi adicionado 100 mL de metanol, o micélio foi macerado e o extrato metanólico obtido foi submetido a refluxo por duas horas (Figura 12B), fornecendo o extrato metanólico do micélio. O micélio também foi submetido a extração com acetato para obter o extrato bruto do micélio em acetato. Em seguida, o material foi filtrado em papel de filtro (Whatman n.1) e concentrado (Figura 16).



Figura 12. Obtenção dos extratos dos fungos endofíticos isolados. A- Crescimento de um dos fungos isolados neste trabalho em frascos Erlenmeyer; B- Equipamento de extração por refluxo do micélio do fungo.

4.6 ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CLAE-DAD

Os extratos foram analisados e monitorados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) em fase reversa, em cromatógrafo líquido Hitachi modelo Laechrom Elite, coluna LiCospher 100 RP₁₈ (5µm, 150 x 4mm) (Merck) e uma pré-coluna de 4.6mm x 2mm foi usada para análises das amostras. Os dados espectrais foram obtidos na faixa de 200 a 400nm durante toda a corrida. A fase móvel foi composta do solvente (A) H₂O/H₃PO₄ 0.1% e do solvente (B) MeOH. O gradiente do solvente foi composto da mistura de A (75-0%) e B (25-100%) por 25 minutos. O fluxo utilizado foi de 1.0mL/min e a temperatura da coluna foi mantida em 30 °C. Para os extratos foi utilizado um volume de injeção de 20 µL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Após a obtenção de *Mikania laevigata* conduziu-se o procedimento de isolamento dos fungos endofíticos. Esta etapa resultou no isolamento de 40 fungos, entretanto, através da análise morfológica foram selecionados 15 fungos endofíticos (FEX1 a FEX15). De acordo com a morfologia da colônia e pelos aspectos microscópicos observados foi sugerida que as amostras analisadas pertenciam à família Xylariaceae, por comparação com dados da literatura.

A identificação baseada apenas em técnicas morfológicas tradicionais muitas vezes é insuficiente para a caracterização do endofítico. Portanto, métodos moleculares são necessários para a identificação de fungos. Assim, para a identificação molecular foram selecionados isolados que possuíam diferentes características morfológicas (morfotipos) para o seqüenciamento da região ITS-rDNA. A identificação realizada através do seqüenciamento da região ITS rDNA somada às análises feitas no BLASTn do NCBI mostraram que estes fungos endofíticos possuem uma maior identidade com os gêneros *Nodulisporium*, *Xylaria*, *Daldinia* e *Hypoxyton* (PELÁEZ et al. 2008). A figura 13 apresenta a árvore filogenética dos fungos endofíticos identificados (FEX1, FEX2, FEX5, FEX7, FEX8, FEX9, FEX11 e FEX13).

A matriz de ITS confeccionada para a análise filogenética consistiu de 8 sequências geradas neste estudo e 41 sequências obtidas no Genbank. O alinhamento do ITS rDNA consistiu de 750 caracteres incluindo os intervalos com 91 sítios variáveis. De acordo com a topologia da figura 14, a reconstrução filogenética revelou a formação de quatro clados onde foram distribuídos os fungos endofíticos deste estudo. *Neurospora crassa* M13906 foi usada como grupo externo por apresentar características comuns à família Xylariaceae. (PELÁEZ et al. 2008).

Assim, através do seqüenciamento genético foi possível identificar quatro gêneros de Xylariaceae. O fungo FEX13 demonstrou possuir uma alta identidade com a espécie *Xylaria luteostromata* GU324739 com alto suporte de

bootstrap de 96 %. O fungo FEX7 revelou pertencer às linhagens do gênero *Daldinia*, enquanto os fungos FEX2, FEX8 e FEX11 pertencem às linhagens de fungos do gênero *Hypoxylon*. Os fungos FEX1, FEX5 e FEX9 foram caracterizados como pertencentes à linhagem de fungos do gênero *Nodulisporium*. (Figura 14). Todos estes clados possuem um alto suporte estatístico de bootstrap com valores acima de 90 %. Com as demais espécies (FEX3, FEX4, FEX6, FEX10, FEX12, FEX14 e FEX15) não foi possível fazer qualquer identificação. A tabela 1 resume a caracterização dos fungos isolados.

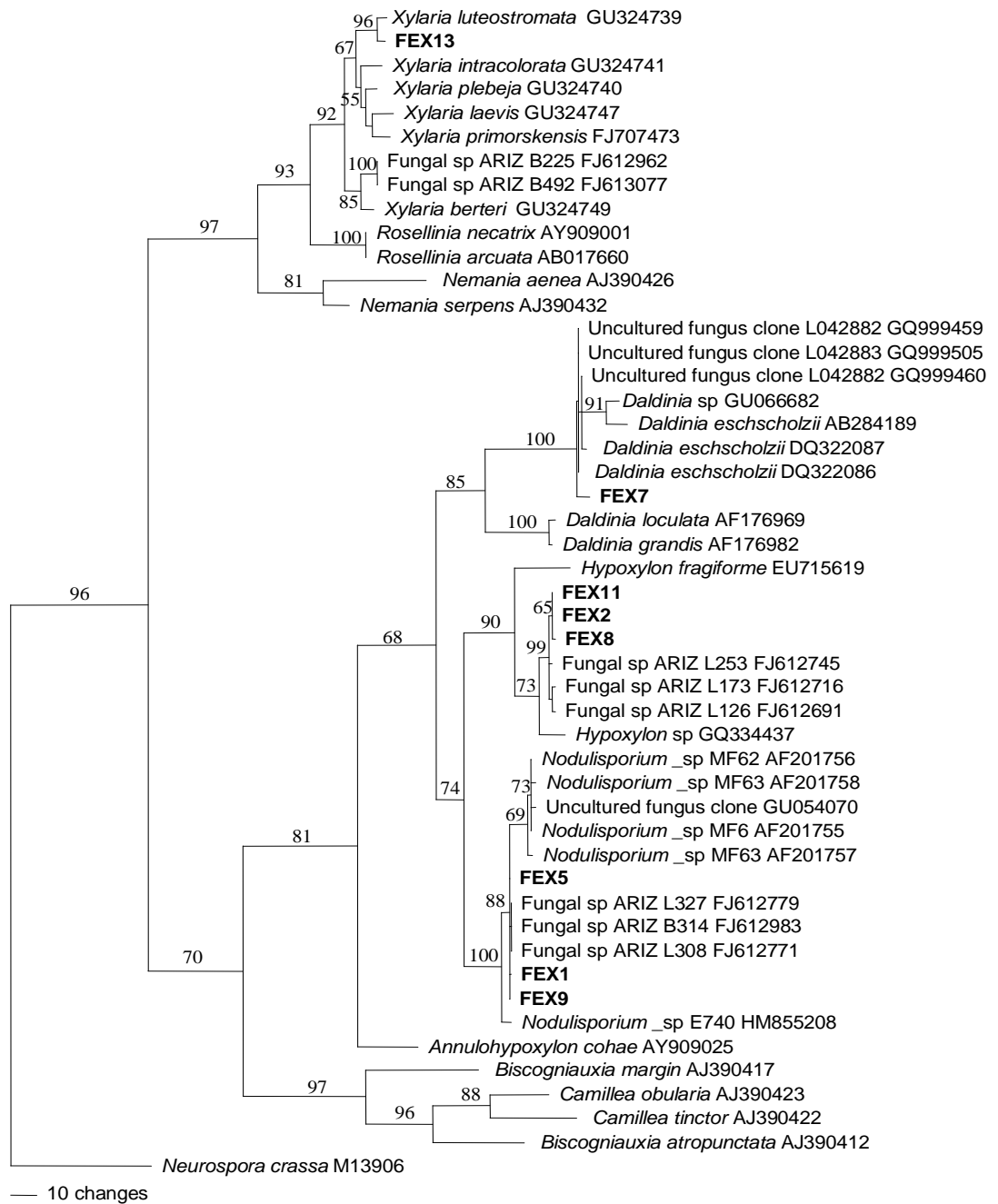


Figura 13. Árvore Filogenética dos fungos endofíticos isolados de *Mikania laevigata*.

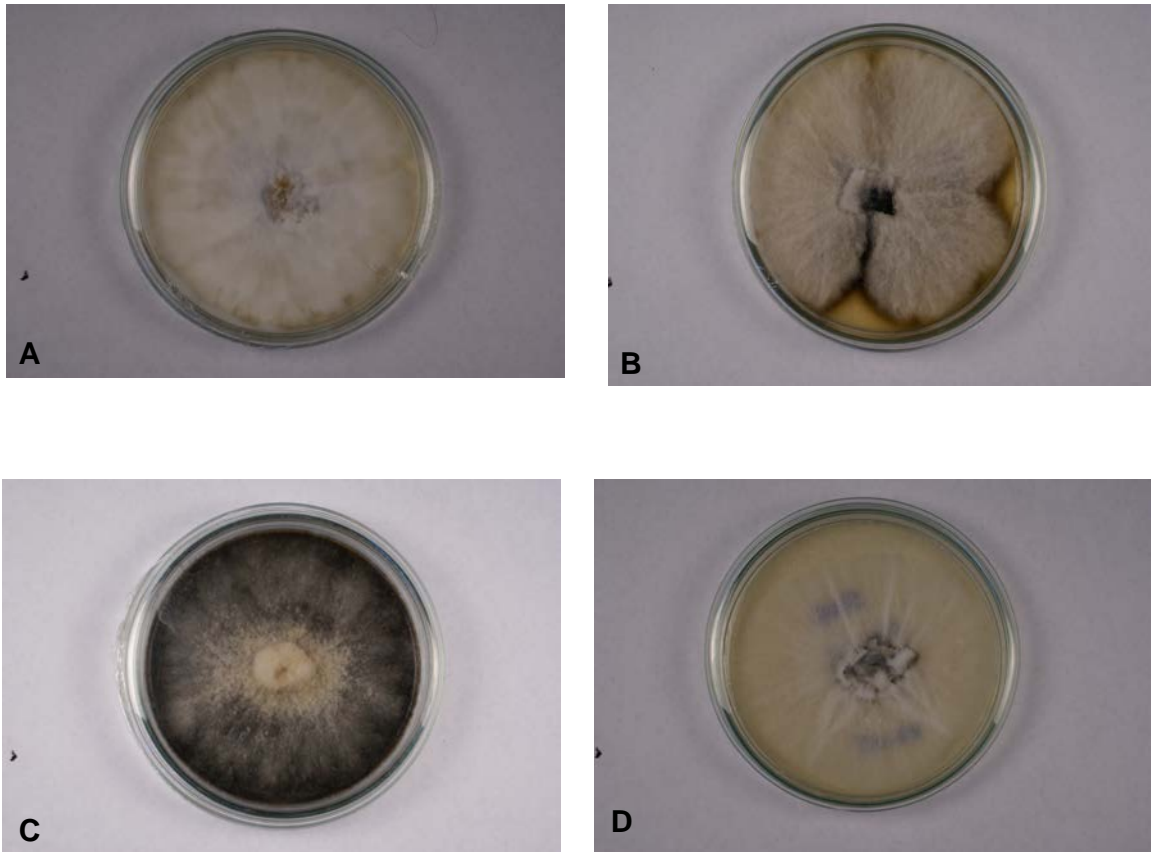


Figura 14. Algumas amostras cultivadas em placas contendo o meio EM, utilizadas para a identificação molecular. A- *Nodulisporium* sp (FEX9), B- *Daldinia* sp. (FEX7), C- *Hypoxylon* sp. (FEX11) e D- *Xylaria luteostromata* (FEX13).

Tabela 1. Fungos isolados e seqüenciados no estudo

Código da amostra	Identificação molecular
FEX1	<i>Nodulisporium</i> sp (Espécie1)
FEX2	<i>Hypoxylon</i> sp (Espécie 2)
FEX3	Não identificado
FEX4	Não identificado
FEX5	<i>Nodulisporium</i> sp (Espécie3)
FEX6	Não identificado
FEX7	<i>Daldinia</i> sp.
FEX8	<i>Hypoxylon</i> sp (Espécie 3)
FEX9	<i>Nodulisporium</i> sp (Espécie2)
FEX10	Não identificado
FEX11	<i>Hypoxylon</i> sp (Espécie 1)
FEX12	Não identificado
FEX13	<i>Xylaria luteostromata</i>
FEX14	Não identificado
FEX15	Não identificado

5.2 ANÁLISE DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS POR CLASSE.

5.2.1 Obtenção dos Extratos

A literatura preconiza que fungos endofíticos da família Xylariaceae excretam para os meios de crescimento substâncias decorrentes do seu metabolismo secundário. Podemos citar como compostos isolados de extratos externos de *Xylaria* sp, os metabólitos xyloallenoide A e eucalyptene (LIN et al., 2001) (Figura 15).

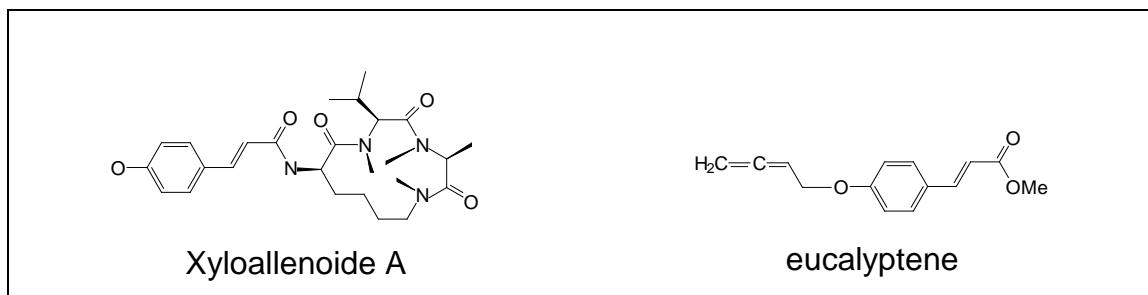


Figura 15. Alguns compostos isolados do fungo endofítico *Xylaria* sp.

Alguns estudos destacam a análise de metabólitos extraídos do micélio, a exemplo do trabalho realizado por Shiono et. al. (2009), que resultou no isolamento de diterpenos glicosídios do extrato metanólico de corpos de frutificação de *Xylaria polimorfa*. Outros trabalhos pesquisaram metabólitos a partir de análises do filtrado, como observado no estudo realizado por Pongcharoen et al. (2008), que levou ao isolamento de glicosídeos derivativos do fungo *Xylaria* sp. PSU-D14. Assim, a extração dos metabólitos secundários de fungos endofíticos pode ser realizada tanto na porção micelial quanto no filtrado da cultura.

Após o período de incubação dos fungos isolados de *Mikania laevigata* em meio extrato de malte, notou-se a formação de duas fases: uma líquida (caldo da cultura) e uma sólida (massa micelial). Estas fases foram filtradas para separar a porção líquida da porção micelial. Cada grupo foi submetido à extração líquido-líquido utilizando acetato de etila e metanol, fornecendo, respectivamente, os extratos em acetato de etila e os extratos em metanol do

caldo de cultura e da massa micelial. A obtenção dos extratos é descrita na Figura 16.

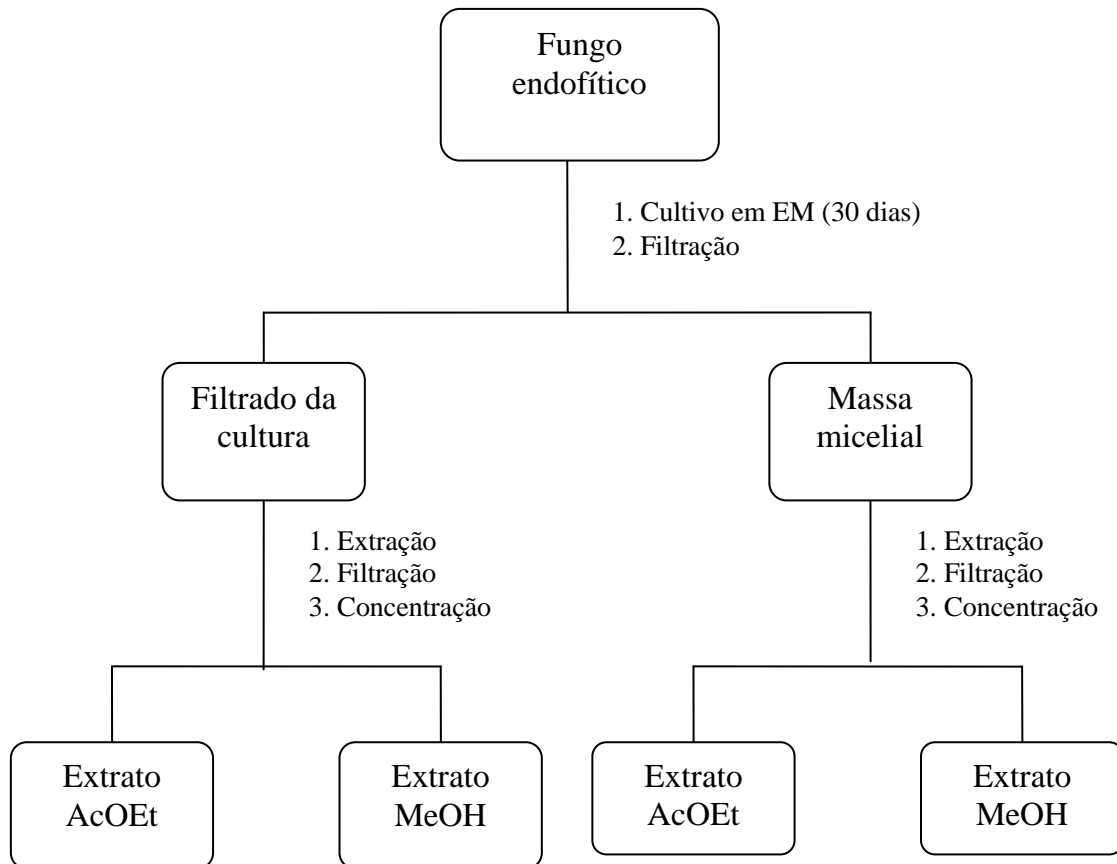


Figura 16. Fluxograma demonstrando a obtenção dos extratos de fungos endofíticos de *Mikania laevigata*.

5.2.2 Análise dos Extratos Brutos dos Caldos das Culturas (metabólitos externos)

Após isolamento e seleção dos fungos, tanto as amostras identificadas em nível molecular (*Nodulisporium* sp, *Hypoxylon* sp, *Daldinia* sp e *Xylaria luteostromata*) quanto aquelas que não foram identificadas (FEX3, FEX4, FEX6, FEX10, FEX12, FEX14 e FEX15) foram analisadas quanto a presença de metabólitos. As análises dos perfis dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD foram realizadas através de comparação dos extratos de fungos analisados com os mesmos gêneros isolados em estudos anteriores.

As condições cromatográficas possibilitaram a avaliação dos componentes dos extratos, mantendo um comprimento de absorção a 260 nm. Os tempos de retenção das amostras avaliadas não ultrapassaram vinte e cinco minutos. A associação de detectores por arranjo de diodos à CLAE permitiram a obtenção de espectros de absorção na região do UV para os picos eluídos nos respectivos cromatogramas durante o tempo de análise.

As figuras 17 a 23 apresentam os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos externos em acetato de etila e em metanol dos fungos endofíticos selecionados. Os respectivos espectros de UV estão representados nos anexos A a X.

Quanto a presença de picos majoritários notou-se que dois extratos apresentaram apenas um pico, cinco extratos apresentaram dois picos e dezessete extratos apresentaram vários picos majoritários. A tabela 2 apresenta de forma resumida estes resultados.

Tabela 2. Análise por CLAE-DAD dos picos eluídos nos cromatogramas dos extratos externos dos fungos isolados.

Quanto ao número de picos majoritários	Figura	Cromatograma	Fungo	Solvente
0	18	C	FEX4	AcOEt
1	14	E	<i>Nodulisporium</i> sp. (espécie 3)	AcOEt
2	19	E	FEX14	AcOEt
	14	C	<i>Nodulisporium</i> sp. (espécie 2)	AcOEt
Vários	15	B	<i>Hypoxylon</i> sp. (espécie 1)	MeOH
	18	A	FEX3	AcOEt
	19	A e C	FEX10 e 12	AcOEt
		A e B	<i>Nodulisporium</i> sp. (espécie 1)	AcOEt e MeOH
	14	D	<i>Nodulisporium</i> sp. (espécie 2)	MeOH
		A e B	<i>Hypoxylon</i> sp. (espécie 1)	AcOEt e MeOH
	15	C	<i>Hypoxylon</i> sp. (espécie 2)	MeOH
	16	A e B	<i>Daldinia</i> sp.	AcOEt e MeOH
Vários	17	A e B	<i>Xylaria luteostromata</i>	AcOEt e MeOH
		B e D	FEX3 e 4	MeOH
	18	E	FEX6	AcOEt
	19	B e D	FEX10 e 12	MeOH
	20	A e B	FEX15	AcOEt e MeOH

Extratos em acetato de etila

Extratos em metanol

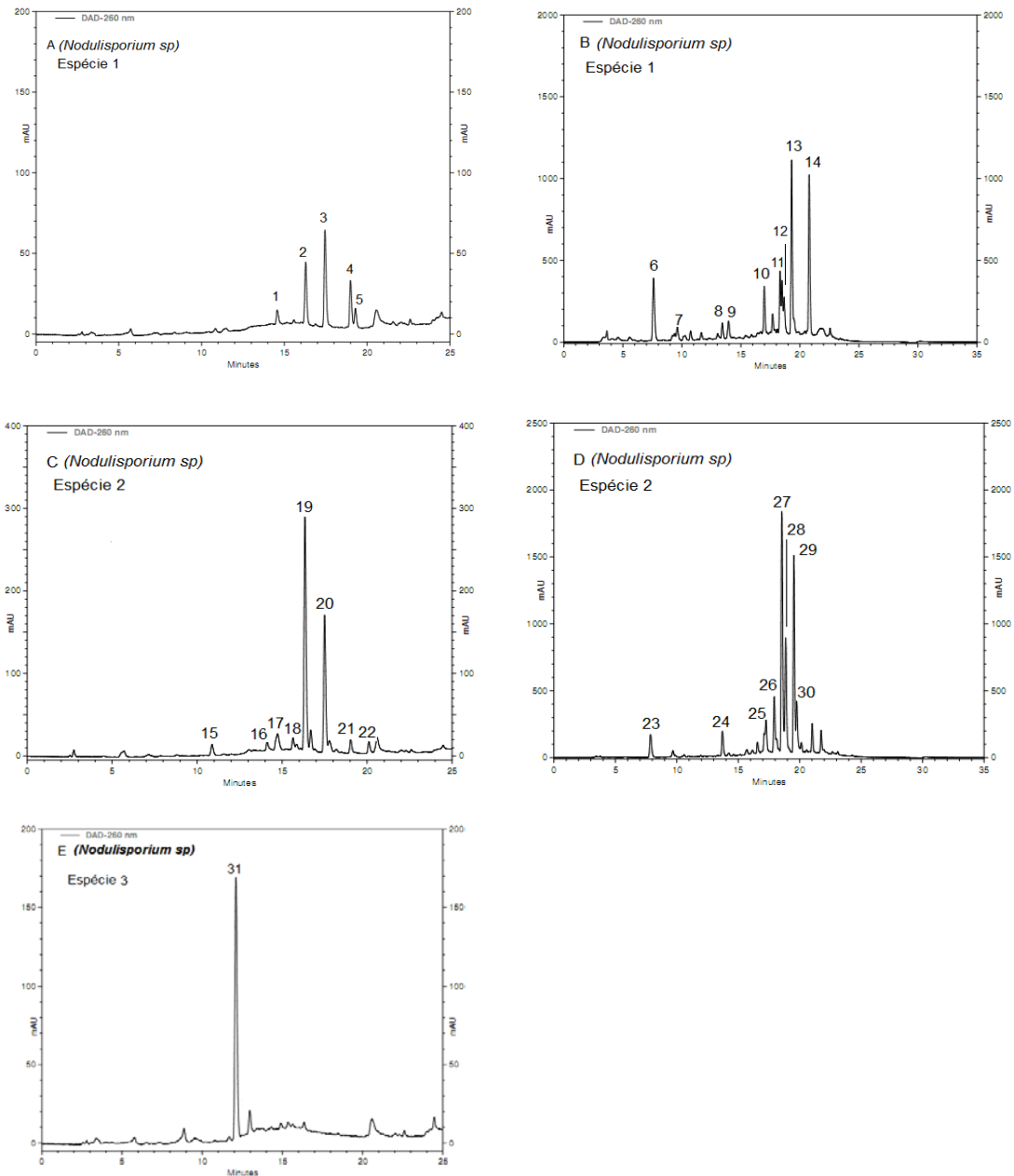


Figura 17. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol da parte externa dos fungos endofíticos *Nodulisporium* sp. (espécies 1-3).

Extratos em acetato de etila

Extratos em metanol

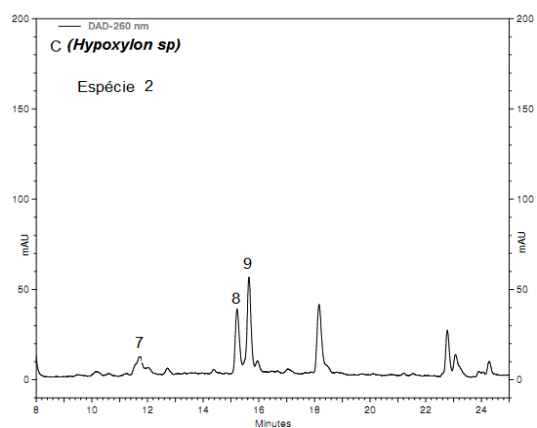
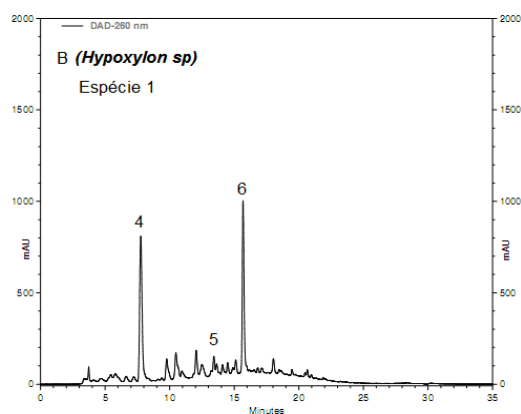
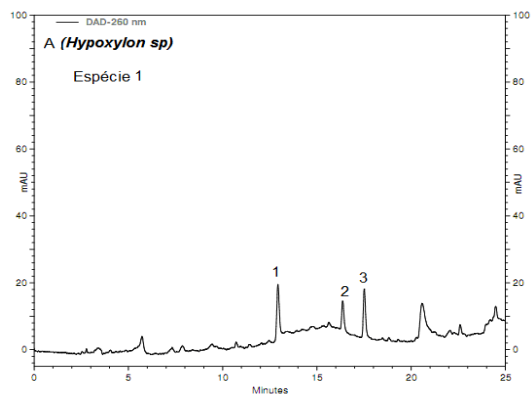


Figura 18. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol da parte externa dos fungos endofíticos *Hypoxyton sp.* (espécie 1 e 2).

Extratos em acetato de etila

Extratos em metanol

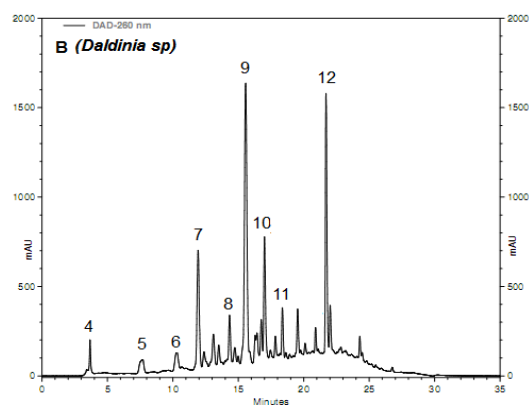
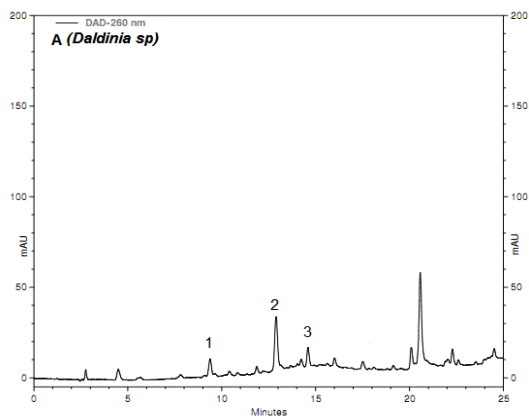


Figura 19. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol da parte externa dos fungos endofíticos *Daldinia sp.*

Extratos em acetato de etila

Extratos em metanol

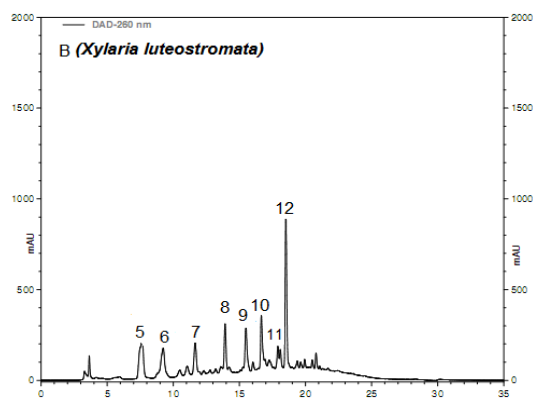
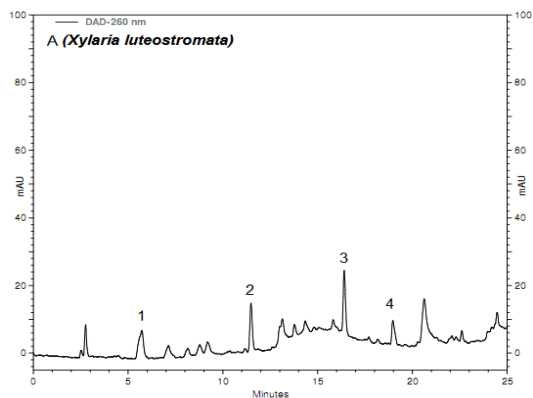


Figura 20. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol da parte externa dos fungos endofíticos *Xylaria luteostromata.*

Extratos em acetato de etila

Extratos em metanol

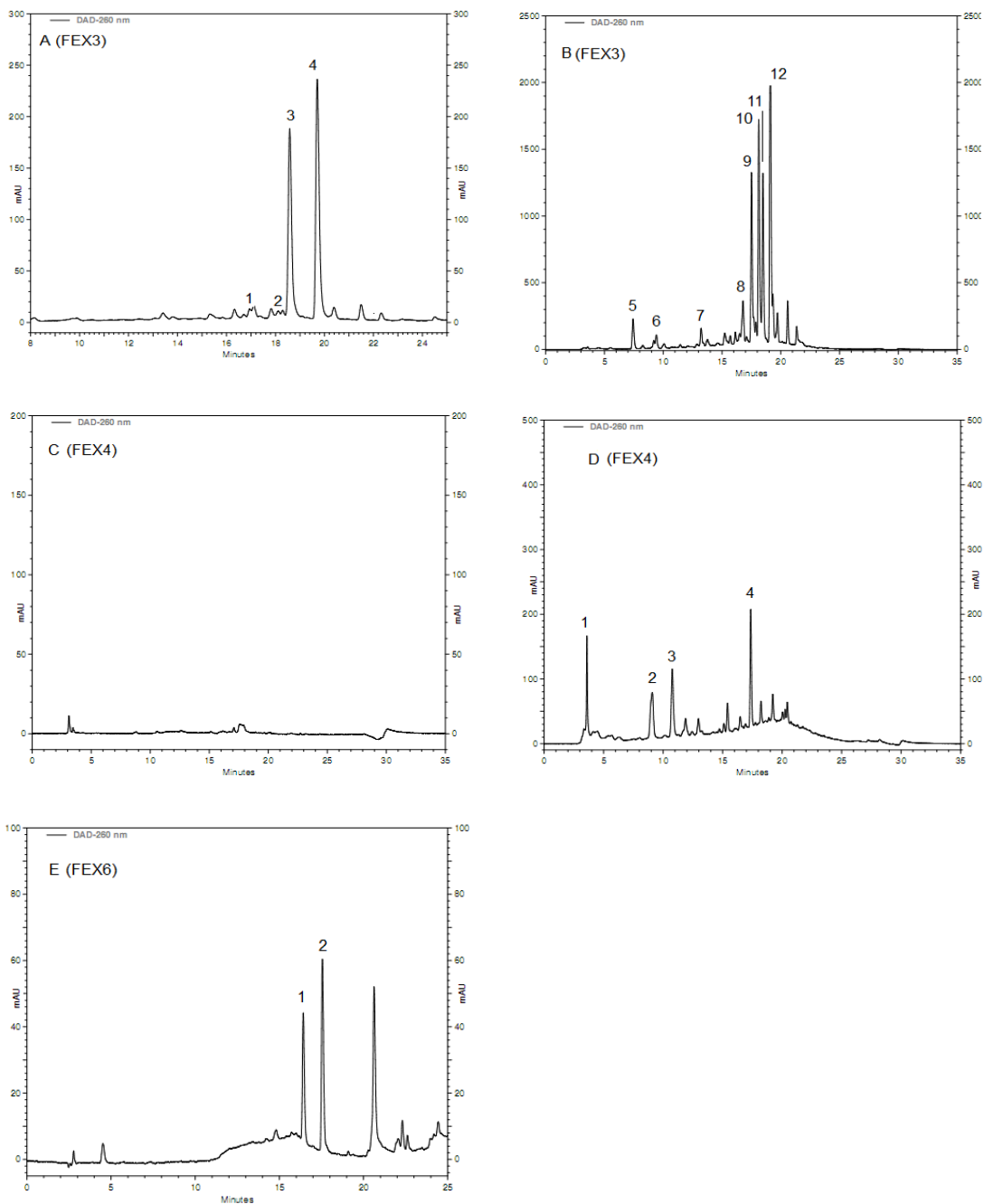


Figura 21. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol dos extratos externos dos fungos endofíticos classificados como FEX3, FEX4 e FEX6.

Extratos em acetato de etila

Extratos em metanol

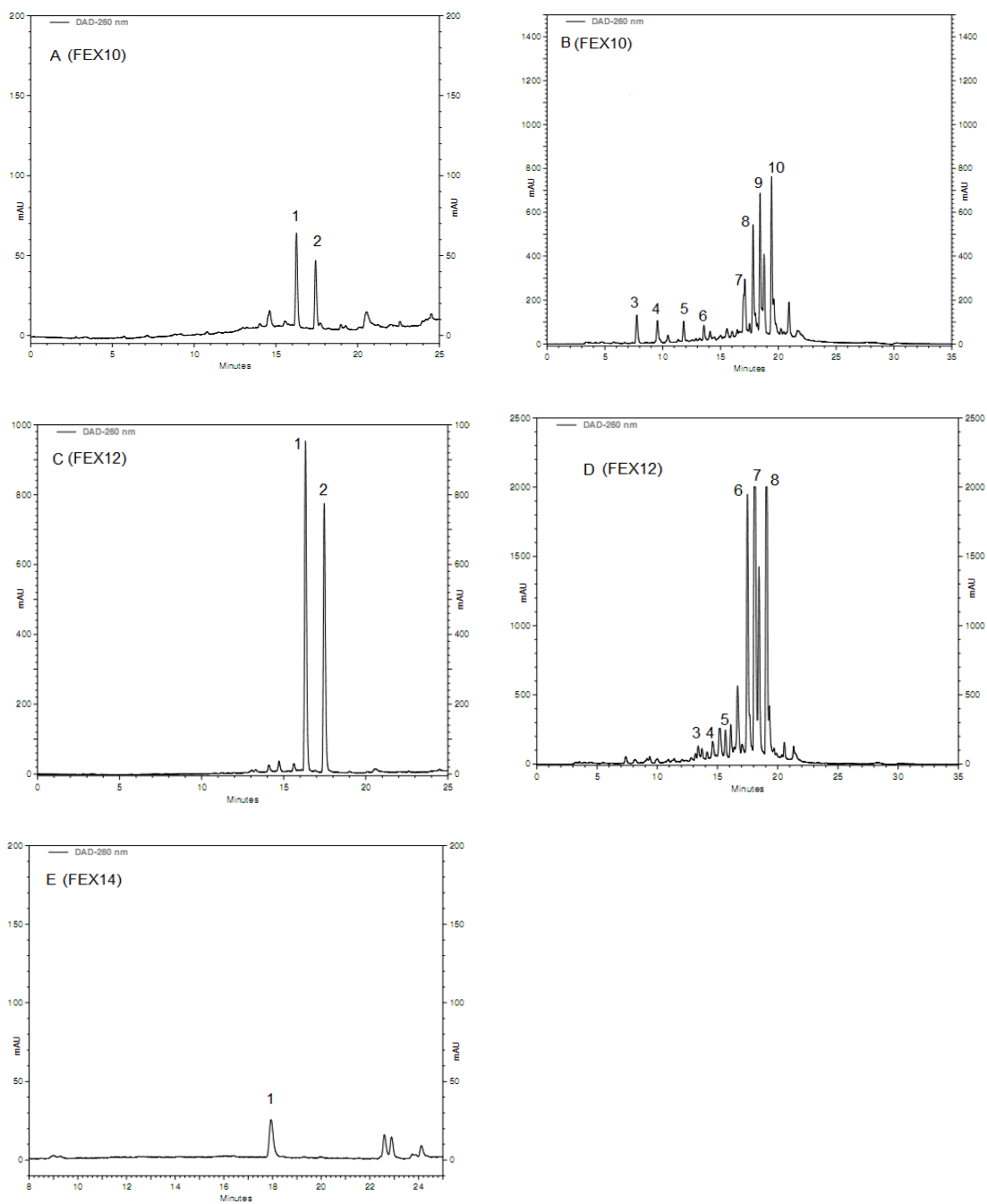


Figura 22. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol dos extratos externos dos fungos endofíticos classificados como FEX10, FEX12 e FEX14

Extratos em acetato de etila

Extratos em metanol

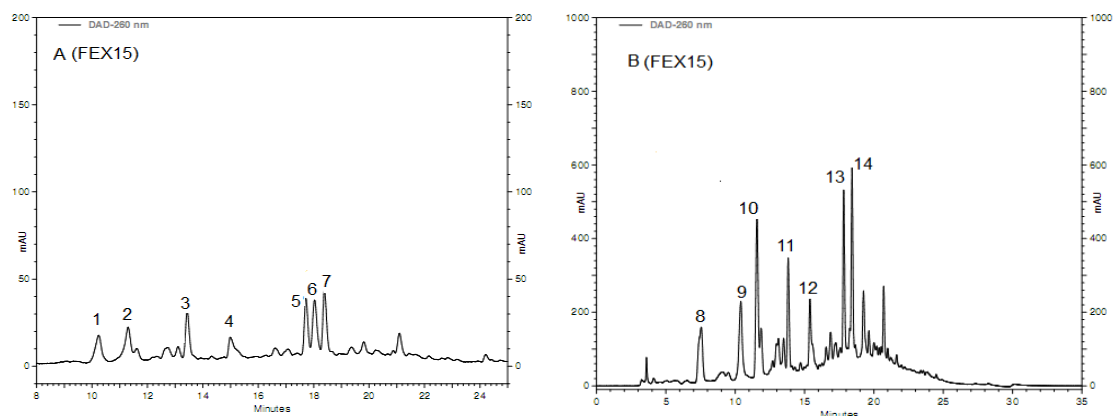


Figura 23. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol dos extratos externos dos fungos endofíticos classificados como FEX15

Os fungos do gênero *Nodulisporium* são reconhecidos como importantes fontes de metabólitos secundários bioativos. Tetralois, diidroisocumarinas e

cromonas estão entre os compostos naturais extraídos deste gênero (KAMISUKI et al., 2007).

Os compostos presentes nos extratos externos dos fungos identificados como *Nodulisporium* sp. foram avaliados de acordo com os cromatogramas e os espectros de absorção no UV, que foram impressos e comparados visualmente. As análises apontaram diferenças no que diz respeito à produção de metabólitos secundários. Os resultados demonstraram que alguns compostos obtidos diferiram dos demais gêneros avaliados do ponto de vista químico, de acordo com os tempos de retenção e os espectros de UV apresentados.

A análise dos extratos externos em acetato de etila (cromatogramas A, C e E) demonstrou que as amostras do gênero *Nodulisporium* estudadas apresentaram perfis químicos distintos com os seguintes picos majoritários: espécie 1 (pico 3, t_R 17,45 min), espécie 2 (pico 19, t_R 16,35 min) e espécie 3 (pico 31, t_R 12,1 min). Quanto aos espectros de UV, os picos 2-3 (*Nodulisporium* espécie 1) e 19-20 (*Nodulisporium* espécie 2) sugerem ter o mesmo perfil de cromóforos (236 e 292 nm).

Na análise do extrato externo em metanol observou-se um maior número de picos eluídos no cromatograma em relação ao extrato em acetato. Foram detectados 9 picos na espécie 1 e 8 picos na espécie 2. A utilização do metanol proporcionou ainda o aparecimento de picos em tempos de retenção entre 6 e 8 minutos. As análises espectroscópicas dos picos eluídos nos cromatogramas B e D demonstraram certa similaridade quanto aos tempos de retenção (t_R) obtidos. Os resultados sugerem que os picos **10** e **12** pertencem ao mesmo grupo funcional pelos espectros de UV apresentados. Os resultados encontrados entre os picos **6** e **23**, também sugerem similaridade química. Esta análise comparativa não pode ser realizada na espécie 3 de *Nodulisporium* porque foi avaliado apenas o extrato em acetato de etila (Figura 17).

As análises cromatográficas dos extratos em acetato de etila das amostras de *Hypoxyylon* (Figura 18) apontaram semelhanças no que diz respeito à produção de metabólitos secundários quando os extratos foram submetidos à extração com acetato de etila (Cromatogramas A e C). Os compostos detectados na espécie 1 eluíram em tempos de retenção de 12,94,

16,37 e 17,51 min, enquanto que aqueles detectados na espécie 2 apareceram nos tempos de 11,71, 15,21 e 15,64 min.

As análises espectroscópicas dos extratos metanólicos revelaram, entre outros compostos, a presença dos picos **4** e **6** como componentes majoritários (cromatograma B) com tempos de retenção de 7,78 e 15,73 min respectivamente. Segundo dados da literatura, algumas espécies de *Hypoxylon* produzem isocumarinas (WHALLEY & EDWARDS, 1995). Entretanto, não foram detectados espectros de UV compatíveis com estas substâncias nos extratos de *Hypoxylon* analisados neste trabalho. Métodos espectrofotométricos serão necessários para a identificação destes compostos.

Os extratos obtidos de fungos do gênero *Hypoxylon* apresentaram menor rendimento, no que diz respeito à produção de metabólitos secundários tanto na extração com acetato de etila quanto com metanol, quando comparados aos perfis apontados nas espécies de *Nodulisporium* avaliadas neste estudo. Não foram realizadas análises dos extratos externos em metanol do fungo *Hypoxylon* (espécie 2), bem como do *Hypoxylon* (espécie 3) devido a quantidade insuficiente de amostras.

O perfil cromatográfico do extrato externo do fungo *Daldinia* sp. isolado é demonstrado na figura 19, que aponta a presença maior de compostos no extrato em metanol quando comparado com o extrato em acetato de etila.

Um pico majoritário (**2**) (t_R 12,89 min) e dois picos minoritários em 9,36 min (**1**) e 14,6 min (**3**) foram detectados no extrato em acetato. O extrato em metanol apresentou vários compostos, sendo dois majoritários, (picos **9** e **12**), que apresentaram tempos de retenção de 15,55 min e 21,93 minutos, respectivamente. Os picos **10** e **11** são quimicamente semelhantes de acordo como o perfil de UV apresentado, com absorção em 230, 300 e 320 nm.

A diversidade de picos apresentados no cromatograma B (extrato em metanol) está de acordo com os dados da literatura, que apontam ascomycetos do gênero *Daldinia* como importantes fontes produtoras de metabólitos secundários (QUANG et al, 2002). Espécies de *Daldinia* sp. apresentam, entre outros compostos, terpenóides e em muitas culturas, derivados de naftalenos foram isolados como metabólitos secundários (STADLER et al., 2001). De acordo com os resultados apresentados, o pico **12** (cromatograma B) apresentou elevada similaridade com o metabólito 8-metoxi-1-naftol detectado

em amostras de *Daldinia* sp. (STADLER et al., 2001a), sugerindo que este composto pode estar presente na amostra avaliada pelo espectro de UV apresentado.

As análises por CLAE-DAD dos extratos do fungo endofítico *Xylaria luteostromata* (Figura 20) revelaram que, assim como outras espécies do gênero *Xylaria*, esta também se destaca como uma importante fonte produtora de metabólitos secundários. O extrato em acetato de etila (cromatograma A) revelou a presença dos picos **1-4**, cujos tempos de retenção foram de 5,71, 11,48, 16,64 e 18,97 min, respectivamente. Com relação aos espectros de UV, o composto **3** se destaca apresentando absorções em 220, 240 e 280 nm.

O extrato em metanol (cromatograma B) permitiu a detecção de um maior número de metabólitos. O pico **5** (t_R 7,58 min) apresenta perfil de UV semelhante aqueles encontrados nos extratos metanólicos de *Nodulisporium* (picos 6 e 23, figura 17) sugerindo que estes fungos apresentam metabólitos em comum. O composto **8** detectado (cromatograma B) apresenta similaridade com o ácido orselínico detectado em amostras de *Hypoxylon moravicum*. (STADLER et al., 2006a), pelo espectro de absorção apresentado, sugerindo a presença do composto no extrato de *Xylaria luteostromata* avaliado. O pico **10** provavelmente é também um derivado do ácido orselínico por apresentar mesmo cromóforo, entretanto, deve apresentar uma parte lipofílica (substituinte do grupo metila com cadeia carbônica maior) fazendo com que o tempo de retenção seja maior.

A literatura cita que extratos obtidos a partir de culturas de *Xylaria* são ricos em compostos fenólicos e flavonóides (LIU et al., 2007). Terpenóides (DEYRUP et al., 2007), xyloketals (LIN et al., 2001), xantonas (HEALY et al., 2004), citocalasinas (ESPADA et al., 1997) entre outros, também são encontrados. As análises dos extratos de *Xylaria luteostromata* avaliados descartam a presença de flavonóides pelos espectros de UV apresentados.

Os fungos que não foram identificados em nível molecular (FEX3, FEX4, FEX6, FEX10, FEX12, FEX14 e FEX15), também foram avaliados por CLAE-DAD, pelos seus índices de retenção e espectros de absorção na região do UV. Os cromatogramas dos extratos em acetato de etila e em metanol dos fungos FEX3, FEX4 e FEX6 estão demonstrados na figura 21.

Na análise do perfil cromatográfico dos extratos em acetato de etila das amostras FEX3 (cromatograma A) podemos destacar os picos **3** e **4** como componentes majoritários, apresentando fortes cromóforos, com tempos de retenção de 18,58 e 19,71 min, respectivamente. Já nos extratos em metanol foi detectado um maior número de picos eluídos entre 18 e 20 min. Os picos **9-12** destacaram-se como componentes majoritários, apresentando tempos de retenção de 17,50, 18,25, 18,52 e 19,21 min, respectivamente. Foram detectados ainda quatro picos minoritários com tempos de retenção iniciando em 7,74 min (pico **5**).

Os picos majoritários dos extratos em acetato de etila (pico **4**) e em metanol (pico **12**) do fungo FEX3 mostraram tempos de retenção e espectros de UV semelhantes, o que indica que os compostos podem ser do mesmo grupo químico.

O extrato em acetato de etila da amostra FEX4 não produziu quantidades detectáveis de metabólitos, enquanto o extrato em metanol forneceu quatro metabólitos majoritários que apresentaram os seguintes tempos de retenção: 3,59 min (**1**), 9,07 min (**2**), 10,74 min (**3**) e 17,38 min (**4**).

Os perfis dos compostos obtidos pela análise por CLAE-DAD, a partir do extrato em acetato de etila da amostra FEX6 destacam os metabólitos **1** e **2** como picos majoritários com tempos de retenção de 16,35 e 17,41 min.

O perfil cromatográfico do extrato em acetato de etila da amostra FEX10 (Figura 22) destaca 2 picos como majoritários com os tempos de retenção de 16,22 e 17,41 min, respectivamente, apresentando similaridade com o espectro da amostra FEX6.

A análise do extrato em metanol da amostra FEX10 forneceu os seguintes compostos como componentes majoritários **7** a **10**, apresentando tempos de retenção de 17,00, 17,80, 18,42 e 19,41 min, respectivamente (cromatograma B), sendo os espectros dos picos **7** e **9** semelhantes ao pico 11 encontrado na amostra de *Nodulisporium* (figura 17, cromatograma B).

As análises dos extratos em acetato de etila da amostra FEX12, apontaram 2 picos majoritários com tempos de retenção de 16,32 e 17,47 min. Devido a intensidade dos picos, deve-se considerar que os metabólitos presentes apresentam cromóforos intensos em 220, 240, 260 e 290 nm.

O perfil espectrofotométrico dos extratos em metanol das amostras FEX12 (cromatograma B) destaca os picos **6**, **7** e **8** como componentes majoritários, com tempos de retenção de 17,51, 18,52 e 18,86 min, respectivamente. De acordo com os dados de UV, os picos **6** e **8** assemelham-se ao pico **28** detectado na amostra de *Nodulisporium* (Figura 17, cromatograma D).

Apenas 1 pico majoritário foi detectado após análise do extrato em acetato do fungo FEX14 que apresentou tempo de retenção de 17,94 min. O extrato em metanol não foi avaliado por CLAE-DAD.

As análises das amostras FEX15 forneceram vários metabólitos majoritários. O extrato em acetato forneceu 7 picos com tempos de retenção que variaram entre 10,23 e 18,38 min. O extrato em metanol forneceu um número maior de picos, sendo que os picos **9** e **11** apresentam perfis semelhantes de metabólitos secundários, pois apresentam dados de UV similares nas condições testadas.

5.2.3 Análise dos Extratos Brutos dos Micélios

Os extratos obtidos dos micélios dos fungos isolados foram submetidos ao mesmo tratamento dado às amostras extraídas do extrato externo, ou seja, a extração com acetato de etila e com metanol. Um fator importante observado nas amostras dos micélios extraídas com metanol é o aparecimento de picos em tempos de retenção inferiores a 3 minutos, quando comparados a extração com acetato que em média apresentou tempos de retenção acima de 8 minutos para a maioria das amostras.

As figuras 24 a 30 apresentam os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos micelares em acetato de etila e em metanol dos fungos endofíticos selecionados. Os respectivos espectros de UV estão representados nos anexos Z a Ax. A tabela 3 apresenta um resumo da quantidade de picos encontrados em cada extrato de fungo.

Tabela 3. Análise por CLAE-DAD dos picos eluídos nos cromatogramas dos extratos micelares dos fungos isolados

Quanto ao número de picos majoritários	Figura	Cromatograma	Fungo	Solvente
0	23	B	<i>Daldinia</i>	MeOH
1	21	E	<i>Nodulisporium</i> sp. (espécie 3)	AcOEt
2	21	C	<i>Nodulisporium</i> sp. (espécie 2)	AcOEt
	22	D	<i>Hypoxylon</i> sp. (espécie 2)	MeOH
	25	A e E	FEX3 e 6	AcOEt
	26	A e C	FEX10 e 12	AcOEt
Vários		A e B	<i>Nodulisporium</i> sp. (espécie 1)	AcOEt e MeOH
	21	D	<i>Nodulisporium</i> sp. (espécie 2)	MeOH
		F	<i>Nodulisporium</i> sp. (espécie 3)	
		A e B	<i>Hypoxylon</i> sp. (espécie 1)	AcOEt e MeOH
	22	C	<i>Hypoxylon</i> sp. (espécie 2)	AcOEt
		E e F	<i>Hypoxylon</i> sp. (espécie 3)	AcOEt e MeOH
	23	A	<i>Daldinia</i> sp.	AcOEt
	24	A e B	<i>Xylaria</i> <i>luteostromata</i>	AcOEt e MeOH
	25	B e F	FEX3 e 6	MeOH
	26	B, D e F	FEX10, 12 e 14	MeOH

Extratos em acetato de etila

Extratos em metanol

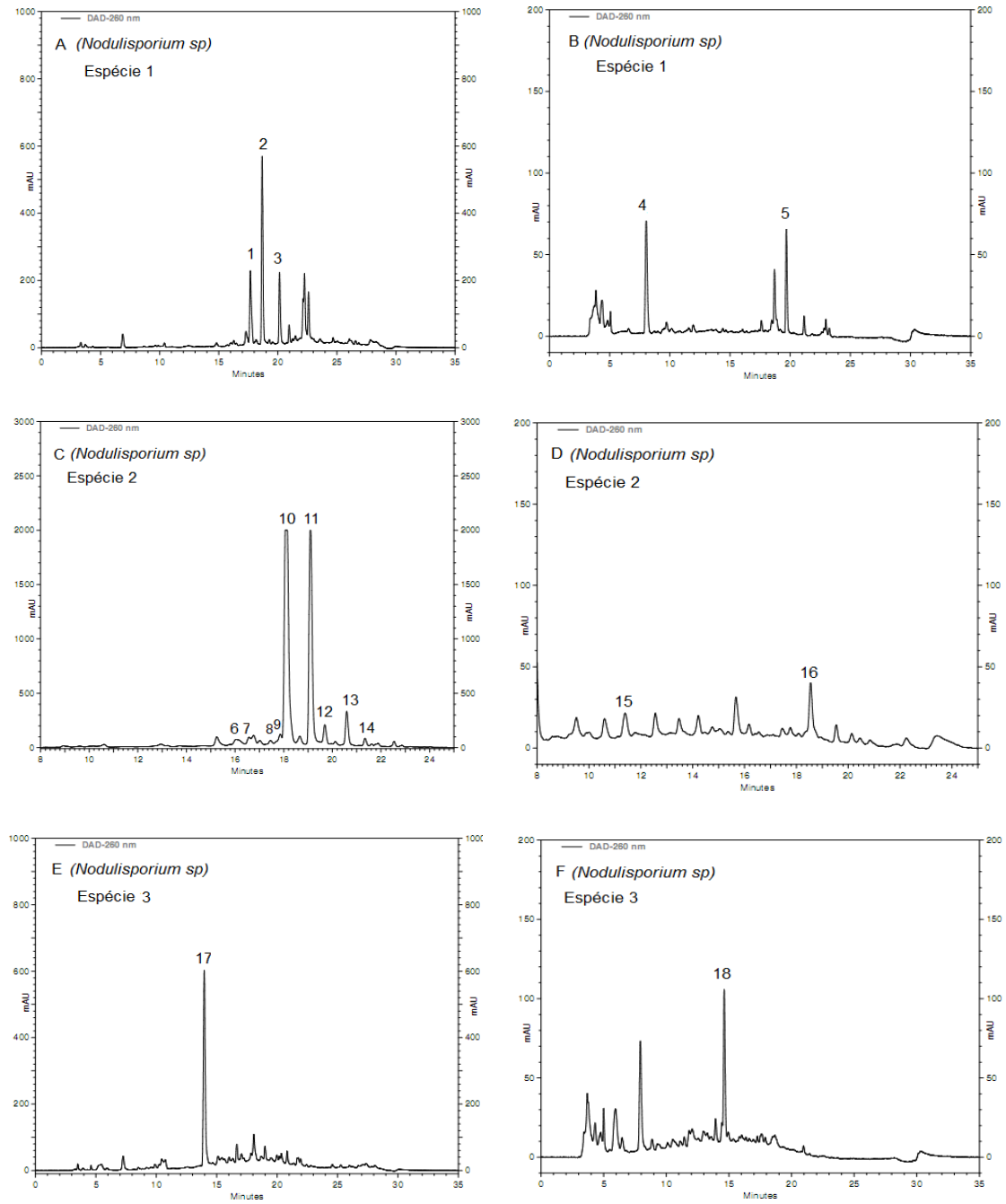


Figura 24. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol do micélio dos fungos endofíticos *Nodulisporium sp.* (espécies 1-3).

Extratos em acetato de etila

Extratos em metanol

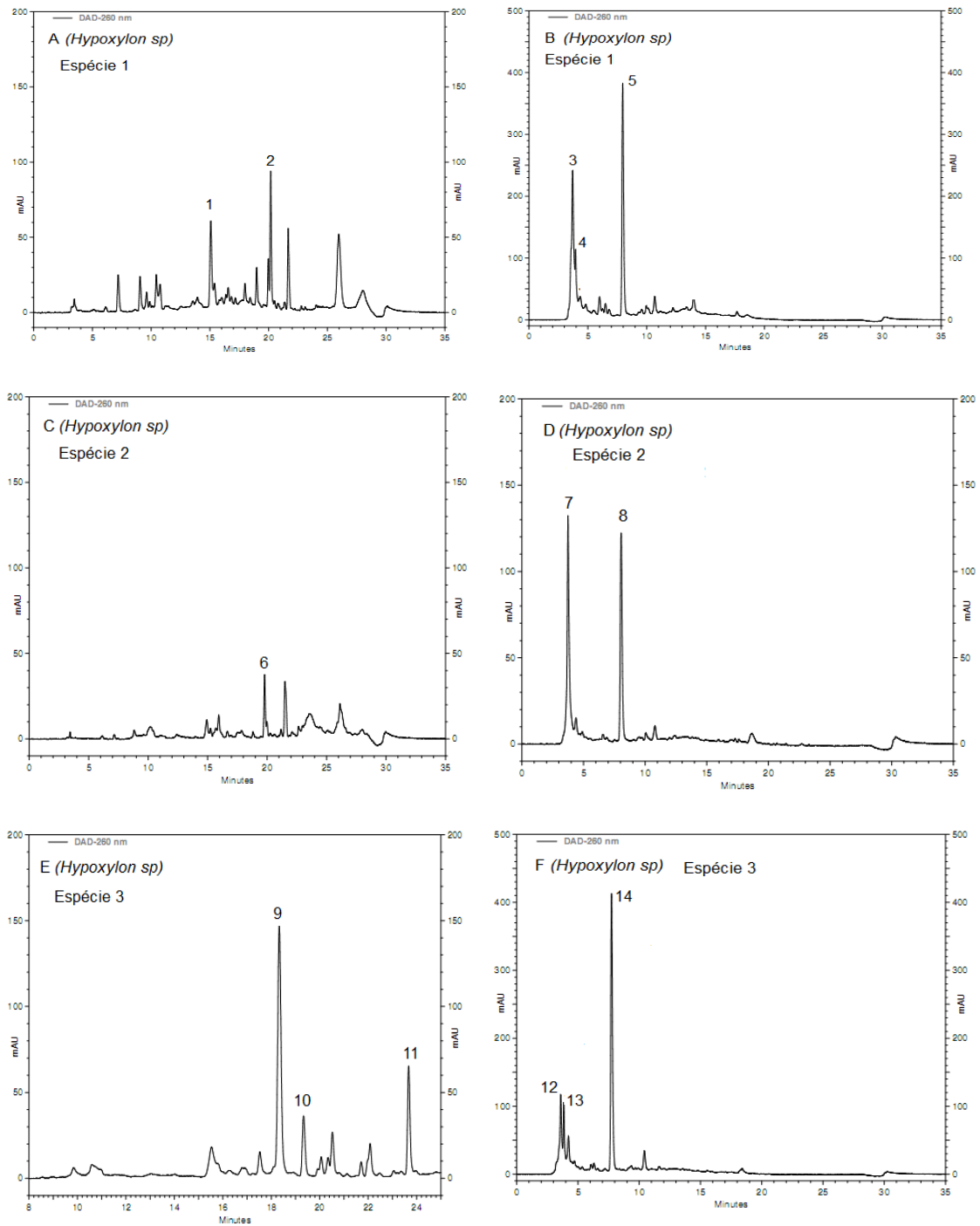


Figura 25. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol do micélio dos fungos endofíticos *Hypoxylon sp.* (espécies 1-3).

Extratos em acetato de etila

Extratos em metanol

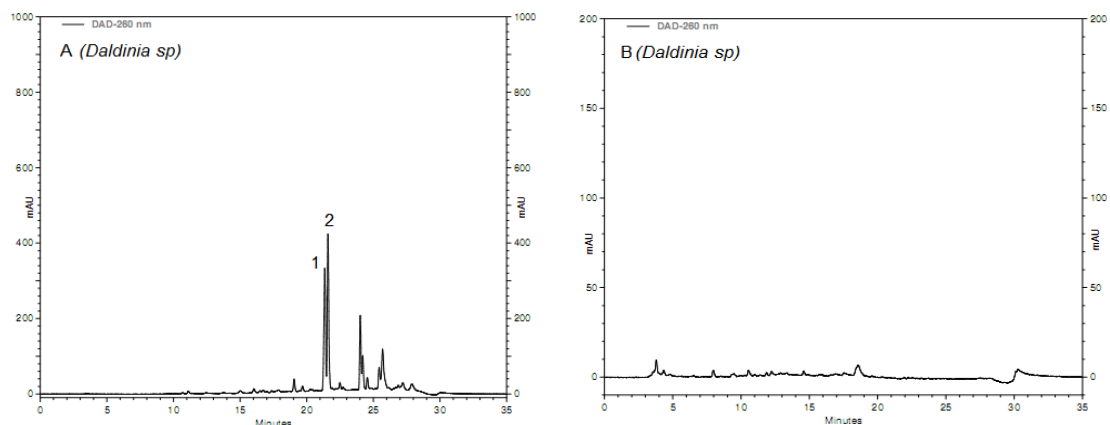


Figura 26. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol do micélio dos fungos endofíticos *Daldinia sp*

Extratos em acetato de etila

Extratos em metanol

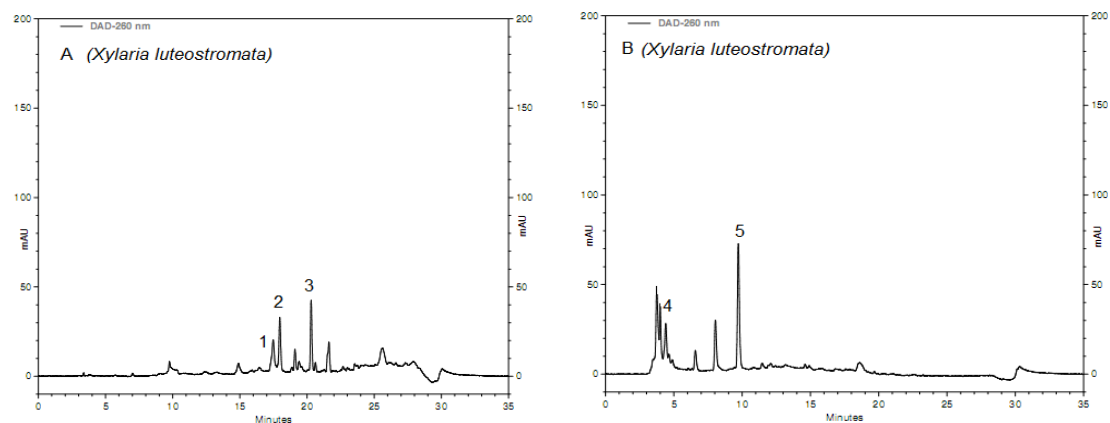


Figura 27. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol do micélio dos fungos endofíticos *Xylaria luteostromata*

Extratos em acetato de etila

Extratos em metanol

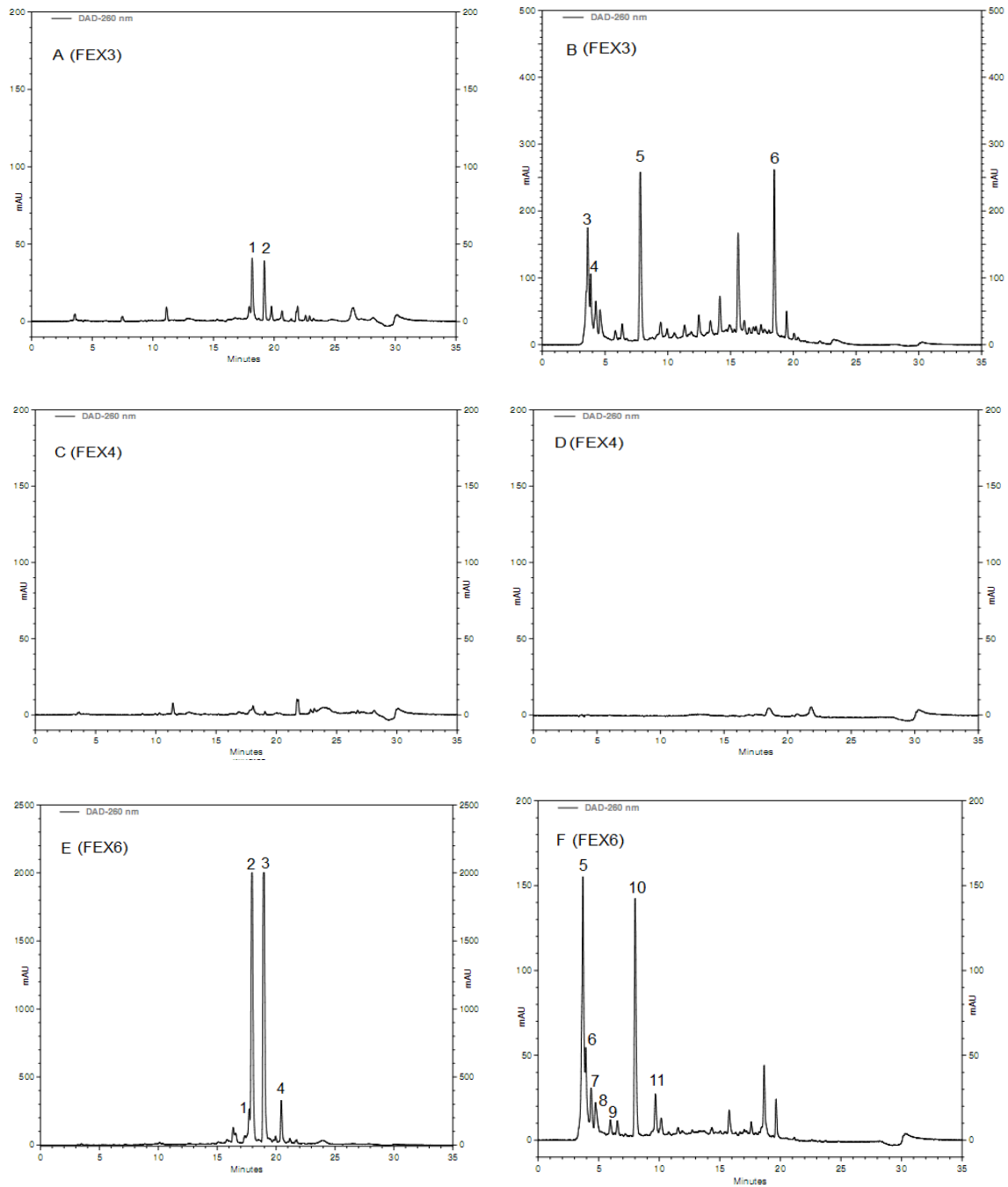


Figura 28. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol dos micélios dos fungos endofíticos classificados como FEX3, FEX4 e FEX6

Extratos em acetato de etila

Extratos em metanol

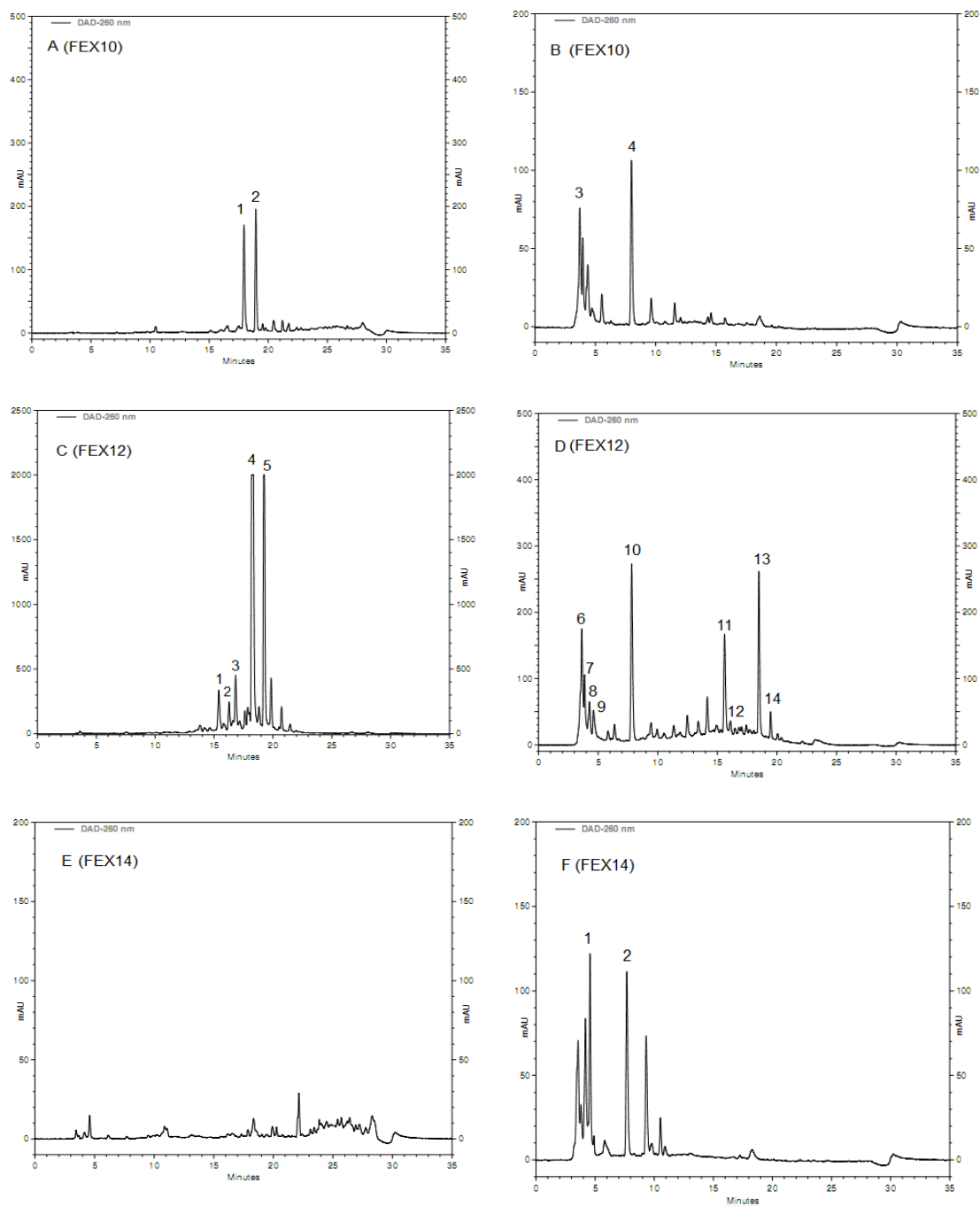


Figura 29. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol dos micélios dos fungos endofíticos classificados como FEX10, FEX12 e FEX14.

Extratos em acetato de etila

Extratos em metanol

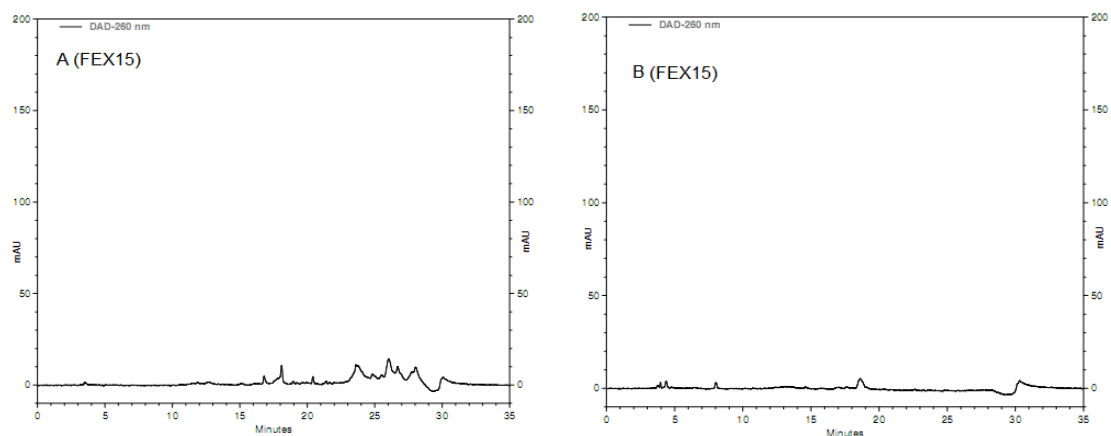


Figura 30. Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e em metanol dos micélios dos fungos endofíticos classificados como FEX15

As culturas de *Nodulisporium* sp foram estudadas por comparação em relação a produção de metabólitos secundários quando os solventes acetato de etila e metanol foram utilizados para a extração. Os perfis cromatográficos estão representados na figura 24. O cromatograma A demonstra as análises da espécie 1 em acetato de etila, onde três picos foram detectados. Estes picos apresentaram tempos de retenção de 17,69 (1), 18,68 (2) e 20,16 min (3), respectivamente, sendo 2 o componente majoritário que apresentou maior intensidade de pico. O pico (3) apresenta o mesmo espectro de UV encontrado no pico 9 no extrato externo de *Nodulisporium* (Figura 17).

O extrato em metanol (cromatograma B) resultou na detecção de 2 picos majoritários com tempos de retenção de 8,04 (4) e 19,68 min (5). Os picos reaparecem nos extratos externos (Figura 17, pico 6 e 23), sugerindo a presença de metabólitos comuns em ambos os extratos.

Entre os nove compostos detectados na espécie 2 após extração com acetato de etila, 2 componentes majoritários exibiram tempos de retenção entre 18,01 e 19,03 min (picos 10 e 11, respectivamente). Estes compostos apresentaram semelhantes perfis de UV. Na análise do extrato em metanol, 2 compostos se destacaram: pico 15 com tempo de retenção de 11,38 min e o pico 16 com tempo de retenção de 18,55 min. Os espectros apresentados sugerem que os metabólitos apresentam características em comum com aqueles encontrados no extrato em acetato de etila.

Na espécie 3 foi detectado apenas um composto majoritário (17) apresentando forte cromóforo no extrato em acetato. O tempo de retenção deste composto foi de 13,94 min. O extrato em metanol forneceu também um pico majoritário (18) cujo tempo de retenção foi de 14,6 min.

Os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos em acetato de etila e metanol dos micélios dos fungos *Hypoxyton* sp estão demonstrados na figura 25. Os resultados encontrados nas amostras de *Hypoxyton* avaliadas neste estudo apontam a presença de dois compostos majoritários na espécie 1 (cromatograma A). Os dados espectrais revelaram os seguintes resultados: pico 1 com tempo de retenção de 15,05 min e pico 2 com tempo de retenção de 20,14 min. Três compostos foram detectados nesta mesma espécie no extrato com metanol (cromatograma B), pico 3 com tempo de retenção de 3,72 min, pico 4 com tempo de retenção de 3,99 min e pico 5 com tempo de

retenção de 7,96 min, o qual é também semelhante ao composto 6 de *Nodulisporium* (Figura 17) . De acordo com dados da literatura, a maioria dos compostos isolados de amostras de *Hypoxylon* sp. apresentam tempos de retenção acima de 6 minutos (STADLER et al., 2008), contrariando os resultados encontrados no presente estudo.

Após análises da espécie 2 de fungos do gênero *Hypoxylon*, o composto 6 foi detectado com tempo de retenção de 19,77 min na amostra extraída com acetato e os picos 7 e 8 eluíram nos tempos 3,74 min e 8,05 min, respectivamente. A inspeção visual dos cromatogramas A e B da espécie 3 de *Hypoxylon* revelaram três componentes no extrato em acetato (picos 9, 10 e 11) e 3 componentes no extrato em metanol (picos 12,13 e 14). O pico 14 parece ser o mesmo encontrado no pico 6 de *Nodulisporium* (Figura 17) pelos dados de absorção no UV (260 nm). Este dado se repete em alguns extratos, sugerindo que o composto pode ser considerado um marcador químico nos gêneros estudados.

Os cromatogramas dos fungos do gênero *Daldinia* estão demonstrados na figura 26. Análises dos micélios das culturas revelaram a presença de dois componentes majoritários no extrato em acetato de etila, apresentando tempos de retenção entre 22 e 25 minutos. Assim como detectado no extrato externo, os picos (1 e 2) detectados apresentaram elevada similaridade aos metabólitos 8-metoxi-1-naftol e BNT (binaftaleno) detectados em amostras de *Daldinia* spp. (STADLER et al., 2001a), sugerindo que estes compostos podem estar presentes na amostra avaliada pelos espectros de absorção apresentados. Em trabalho realizado por Stadler et al. (2004) o metabólito BNT (binaftaleno) foi detectado como componente majoritário em amostras de *Phylacia*, *Pulveria*, *Rophalostroma* e *Thamnomycetes* analisadas. Trata-se de um derivado naftaleno, composto largamente distribuído na família xylariaceae, apesar de não estar presente em todos os gêneros.

A porção micelial do fungo também não produziu quantidades detectáveis de metabólitos quando o solvente metanol foi utilizado para a extração dos compostos.

Foi observada baixa quantidade de picos nas análises por CLAE-DAD dos micélios dos fungos *Xylaria luteostromata*, independente do solvente utilizado (Figura 27). Os componentes detectados nos extratos em acetato de

etila apresentaram as mesmas características gerais das amostras de *Nodulisporium*, *Hypoxylon* e *Daldinia* avaliadas neste estudo no que diz respeito aos componentes encontrados no micélio. Os cromatogramas apresentaram picos com os seguintes tempos de retenção: 17,47 min (1), 17,96 min (2), 20,3 min (3), 3,75 min (4) e 9,72 min (5).

Os perfis cromatográficos dos extratos em acetato de etila e em metanol dos fungos FEX3, FEX4 e FEX6 estão demonstrados na figura 28. As análises espectroscópicas dos extratos em acetato da amostra FEX3 apontam 2 metabólitos com tempos de retenção de 18,19 (1) e 19,18 (2) cada. A análise do extrato em metanol forneceu picos a partir de 3,65 min (3), seguido de picos em 3,89 min (4), 7,83 min (5) e 18,49 min (6).

O extrato do micélio da amostra FEX4 não produziu quantidades detectáveis de metabólitos, independente do solvente utilizado.

Após análises de extratos da espécie FEX6, foram detectados quatro picos nos extratos em acetato de etila e sete picos nos extratos em metanol. Os picos (2) e (3) apresentados no cromatograma A e os picos (5) e (10) apresentados no cromatograma B foram apontados como metabólitos majoritários para estas amostras.

A amostra FEX10 exibiu um perfil cromatográfico semelhante às amostras FEX6 e FEX12, no entanto, apresentou um menor número de compostos após extração com os solventes utilizados. A amostra FEX12 foi considerada uma importante fonte de metabólitos de fungos, apresentando cinco metabólitos após extração com acetato e nove compostos após a extração com metanol. Na amostra FEX14 somente foram detectados metabólitos nos extratos metanólicos, apresentando dois picos majoritários: picos (1) e (2) com tempos de retenção de 4,54 min e 7,70min, respectivamente. No extrato em acetato da amostra FEX14 (Figura 26) e nos demais extratos da amostra FEX15 não foram detectados picos relevantes (Figuras 30).

6. CONCLUSÃO

Este trabalho contribuiu para o conhecimento científico dos fungos endofíticos presentes em uma espécie *Mikania laevigata*. A análise das folhas desta espécie vegetal possibilitou o isolamento de 40 fungos, dos quais 15 foram selecionados pelas características morfológicas.

Através do seqüenciamento da região ITS-rDNA foi possível identificar 8 fungos da família Xylariaceae, sendo eles: 3 cepas de *Nodulisporium* sp, 3 de *Hypoxylon* sp., 1 *Daldinia* sp. e uma espécie identificada como *Xylaria luteostromata*. Não foi possível identificar em nível molecular as demais amostras submetidas ao seqüenciamento.

A análise por CLAE-DAD em fase reversa na faixa de detecção em 260 nm permitiu traçar o perfil químico dos extratos em acetato de etila e em metanol destes fungos através dos tempos de retenção e dos espectros de UV dos respectivos picos. Esta análise forneceu informações sobre os metabólitos extraídos dos micélios e das culturas dos fungos da família Xylariaceae isolados no experimento. De maneira geral, foi verificado um maior número de metabólitos nos extratos externos em comparação com os micélios, de acordo com o número de picos apresentados. Entre as amostras analisadas, destacaram-se os extratos dos fungos *Nodulisporium* sp. A comparação entre os extratos em acetato de etila e metanol de cada fungo analisado demonstrou que os extratos metanólicos forneceram um maior número de metabólitos na maioria dos extratos testados.

De acordo com os perfis de UV avaliados, sugere-se que entre outros compostos, o ácido orselínico, o 8-metoxi-1-naftol e o binaftaleno (BNT) estejam presentes em alguns extratos avaliados.

Para a determinação estrutural dos metabólitos de interesse será necessário a produção e caracterização por outras técnicas espectroscópicas como a Ressonância magnética nuclear e CLAE-EM.

REFERÊNCIAS

ABDEL SALAM, N.A.; MAHMOUD, Z.F.; KASSEM, F.K. Sesquiterpene lactones, coumarins and flavonoids of *Launnaea tenuiloba* Boiss. grown in Egypty. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 1, p.275-282, 1986.

ABREU, Lucas Magalhães. 2005. **Perfilamento de metabólitos secundários, prospecção química e estudos taxonômicos de fungos endófitos**. 2010. 1v. 301f. Dissertação (Doutorado em Química)- UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.

ALY, et al. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. Isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1716-1725, 2008.

AMARAL, R.R. et al. Avaliação da atividade IMAO e antibacteriana de extratos de *Mikania Glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 13, p. 24-27, 2003.

ANDERSEN, B., DONGO, A., PRYOR, B.M. Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila*. **Mycological Research**, p. 241-250, 2008.

ARAÚJO, W.L. et al. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: ESALQ, 2002. 86p.

ARNOLD, A.E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges and frontiers. **Fungal Biology reviews**, v. 21, p. 51-66, 2007.

ARNOLD, A.E. et al. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v. 3, p. 267-274, 2000.

AZEVEDO, J.L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biothechnology**, v. 3, p. 40-65, 2000.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.

BARROS, F.A.P.; RODRIGUES-FILHO, E. Four spiroquinazoline alkaloids from *Eupenicillium* sp. Isolated as an endophytic fungus from leaves of *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 33, p. 257-268, 2005.

BORGES, W. S., PUPO, M.T. Novel Antraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophytic found in association with the medicinal plant *Tithonia diversifolia* (Asteracea). **Brazilian Journal of Chemistry Society**. v. 17, p. 929-934, 2006.

BITZER, J. et al. Affinities of Phylacia and the daldinoid Xylariaceae, inferred from chemotypes of cultures and ribosomal DNA sequences. **Mycological Research**, p. 251-270, 2008.

CARDOZO, K.H.M. et al. Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 2, p. 202-208, 2011.

CARROL, G.C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennial. *In*: Fokkema, N.J., Heuvel, J.V. den (Editors). **Microbiology of phyllosphere**. London: Cambridge University, p. 205-222, 1986.

CARROL, G.C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, p. 2-9, 1988.

CARROL, G.C. Forest endophytes: pattern and process. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, v.73, p. S1316-S1324, 1995. Supplement I.

CARROL, G.C.; CARROLL, F.E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa, v.56, n.24, p. 3034-3043, 1978.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungal in sterile distilled water, for the researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v.70, n.8, p. 181-184, 1967, 1967.

COS, P. et. al. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p.155, 2002.

DAVIS, R.A. et al. Phomoxins B e C: Polyketides from an endophytic fungus of the genus *Eupenicillium*. **Phytochemistry**, Australia, v. 66, p. 2771-2775, 2005.

DAY, et al. Metabolites from the endophytic fungus *Nodulisporium* sp. from *Juniperus cedre*. **Journal of Organic Chemistry**, p. 3498-3506, 2006.

DEYRUP, S.T. et al. Kolosides A-D: Triterpenoid Glicosides from a Hawaiian Isolated of *Xylaria* sp. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 378-382, 2007.

DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

EBEL, R. Secondary metabolites from marine-derived fungi. In: Proksch, P., Muller, W.E.G. (Eds.), *Frontiers in Marine Biotechnology*. **Horizon Scientific Press**, Norwich, p. 73-143, 2006.

ESPADA, A. et al. New cytochalasins from the fungus *Xylaria hypoxylon*. **Tetrahedron**, v. 53, p. 6485-6492, 1997.

FALCAO, H.S. et al. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p. 381-391, 2005.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-91, 1985.

GOFFIN, E. et al. Quantification of tagitinin C in *Tithonia diversifolia* by reversed phase high-performace liquid chromatography. **Planta Medica**, v. 68, p. 543, 2002.

FERRACIN, R.J. et al. Flavonoids from the fruits of *Murraya paniculata*. **Phytochemistry**, v. 47. p. 393-396, 1998.

GRAY, L.E. et al. Production and toxicity of 2,3-dihydro-5-hydroxy-2-methyl-4H-1-benzopyran-4-one by *Phyalophora gregata*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 1337-1340, 1999.

GU, J.Q. et al. Evaluation of *Cassia occidentalis* for in vitro cytotoxicity against human cancer cell lines and antibacterial acivity. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 532, 2002.

GUPTA, M.P. **270 Plantas Medicinales Iberoamericanas**. Programa Iberoamericano de Ciencia Y tecnología para El desarrollo. Subprograma de Química Fina Farmaceutica, 1994. 124p.

GUPTA, M.P. **270 Plantas Medicinales Iberoamericanas**. Santa Fé de Bogotá: Presencia, 1995. 617p.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n.1, p. 1-93, 2006.

HALLMAN, J.A. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HANSON, James R. The Chemistry of Fungi. Brighton: RSC Publishing, 2008. 221p.

HEALY, P. C. et al. Xanthones from a microfungus of the genus *Xylaria*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2373-2378, 2004.

HO, C.K., HUANG, Y.L., CHEN, C.C. Garcinone E, a xanthone derivative, has potent cytotoxic effect against hepatocellular carcinoma cell lines. **Planta Medica**, v. 68, p. 975-979, 2002.

HU, et al. Three New Sesquiterpenoids from *Xylaria* sp. NCY2. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, p. 46-51, 2008.

JACOBS, M.J.; BUGDEE, W.M.; GABRIELSON, D.A. Enumeration location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany**, v. 63, p. 1262-1265, 1985.

JAY, M.; GONNET, J.F. Isoscutelleine isolee de *Pinguicula vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 12, n. 4, p. 953-954, 1973.

JORGESSEN, J.H. et al. Activities of clinafloxacin, gatifloxacin, gemifloxacin, and travafloxacin against recent clinical isolates of levofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v. 44, p. 2962-2968, 2000.

KAMISUKI, S. et al. Nodulisporol and Nodulisporone, novel specific inhibitors of human DNA polymerase λ from a fungus, *Nodulisporium* sp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3109-3114, 2007.

KATZNELSON, H.; COLE, S.E. Production of gibberellin-like substances by bacteria and actinomycetes. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 733-741, 1965.

KELLER, N.P., TURNER, G., BENNETT, J.W. Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 937-947, 2005.

KOBAYASHI, D.Y., PALUMBO, J.D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: C.W. Bacon and J.F. White (ed). **Microbial endophytes**. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., p. 659-674, 2000.

KROHN, K.; RIAZ, M. Total synthesis of (+)-xyloketal D, a secondary metabolite from the mangrove fungus *Xylaria* sp. **Tetrahedron Letters**, v.45, p. 293-294, 2004.

LEAL, L.K.A.M., FERREIRA, A.A.G., BEZERRA, G.A. et al. Antinociceptive and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 2, p 151-159, 2000.

LI, K-K. et al. The metabolites of mangrove endophytic fungus Zh6-B1 from the South China Sea. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 3326-3328, 2010.

LIN, C.N. et al. Synthesis and anti-inflammatory effects of xanthone derivatives. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, p. 532-538, 1996.

LIN, Y. et al. Five unique compound: xyloketals from mangrove fungus *Xylaria* sp. from the South China Sea Coast. **Journal of Organic Chemistry**, v. 66, p. 6252-6256, 2001.

LISTER, P.D. Pharmacokinetics of gatifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* in an in vitro pharmacokinetic model: impact of area under the curve/ MIC ratios on eradication. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v. 46, p. 67-74, 2002.

LIU, X. et al. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 241-247, 2008.

LIU, X.H. et al. Xyloketal H from the mangrove endophytic fungus *Xylaria* sp. 2508. **Russian Chemical Bulletin**, v. 55, p. 1091-1092, 2006.

LIU, X. et al. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. **Food Chemistry**, v. 105, p. 548-554, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. São Paulo: Nova Odessa, p.165-166, 2002.

LU, H. et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v. 151, p. 67-73, 2000.

MAITAN, V.R. **Isolamento e caracterização de actinomicetos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* (lobeira)**. 1988. 1v. 122f. Dissertação de Mestrado- Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.

MALET-CASCON, L., et al. IB- 00208, a new cytotoxic polycyclic xanthone produced by a marine-derived *Actinomadura*. I. Isolation of the strain, taxonomy and biological activities. **Journal of Antibiotics**, v. 56, p. 219-225, 2003.

MANDER, L.N; THOMSON, R.J. Total synthesis of sordaricin. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 1654-1670, 2005.

MARKHAM, K.R. et al. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acetylated derivatives. **Tetrahedron**, v. 34, n. 9, p. 1389-1397, 1978.

MINAMI, H. et al. Antioxidant xanthenes from *Garcinia subelliptica*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 501-506, 1994.

MOSADDIK, M.A., ALAM, K.M. The anti-ulcerogenic effect of an alkaloidal fraction from *Mikania cordata* on diclofenac sodium-induced gastrointestinal lesions in rat. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, n. 9, p.1157-1162, 2000.

NAIK, B.S.; SHASHIKALA, J.; KRISHNAMURTHY, Y.L. Diversity of fungal endophytes in shrubby medicinal plants of Malnad region, Western Ghats, Southern India. **Fungal Ecology**, p. 89-93, 2008.

OLIVEIRA, F. et al. Isolation and identification of components of *Mikania glomerata* Spreng, e *Mikania laevigata* Schultz Bib ex Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 20, n2, p. 169-833, 1984.

PELÁEZ, F. et al. Molecular phylogenetic studies within the *Xylariaceae* based on ribosomal DNA. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 111-134, 2008.

PEREIRA, N.A. et al. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; IV. Protection against jararaca venom by isoalted constituents. **Planta Medica**, v. 60, p. 99-100, 1994.

PERES, V. NAGEM, T.J. Trioxygenated naturally occurring xanthonnes. **Phytochemistry**, v. 44, p. 191-214, 1996.

PERES, V. et al. Tetraoxygenated naturally occurring xanthonnes. **Phytochemistry**, v. 55, p. 683-710, 2000.

PETRINI, L.E.; MÜLLER, E. Haupt-Und Nebebendfruchtformen europäischer *Hypoxylon*-Arten (*Xylariaceae*, *Sphaeriales*) and verwandter Pilze. **Mycology Helvetica**, v.1, p. 501-627, 1986.

PETRINI, O. et al. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1, p. 185-186, 1992.

PITTAYAKHAJONWUT et al. An anti-herpes simplex vírus-type 1 agent from *Xylaria mellisii* (BCC 1005). **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 1341-1344, 2005.

PONGCHAROEN, W. et al. Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1900-1902, 2008.

QUANG, D.N. et al. Concentricols B, C and D, three squalene- type triterpenoids from the ascomycete *Daldinia concentrica*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 345-353, 2002.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

ROBBERS, James; SPEEDIE, Marylin; TYLER, Varro. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier,1997. 372p.

ROCHA, L. et al. An antifungal γ -pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1381-1385, 1994.

RODRIGUEZ, et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v.182, n. 2, p. 314-330, 2009.

RUKACHAISIRIKUL, V. et al. Metabolites from the Xylariaceous Fungus PSU-A80. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 9, p. 1316-1318, 2007.

SCHULZ, B., BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SERAFINI, Luciana Atti; BARROS, Neiva Monteiro; AZEVEDO, João Lúcio. **Biotechnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 463p.

SHIONO, Y. et al. Isopimarane diterpene glycosides, apoptosis inducers, obtained from fruiting bodies of the ascomycete *Xylaria polymorpha*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 935-939, 2009.

SILVA, G.H. et al. Candinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). **Phytochemistry**, v. 67, p. 1964-1969, 2006.

SIMÕES, C.M.O., MENTZ, L.A. et al. **Plantas medicinais popular do Rio Grande do Sul**. 4. ed. Porto Alegre: Ed. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. 174 p.

SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. **Journal of Chromatography A**, v. 760, p. 264-270, 1997.

SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, p. 273-286, 2005.

SMITH, C.J. et al. Novel sesquiterpenoids from the fermentation of *Xylaria persicaria* are selective ligands for the NPY Y5 receptor. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 5001-5004, 2002.

SOUZA, A.Q.L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, v.43, n. 2, p.185-195, 2004.

STADLER M. et al. Changes in secondary metabolism during stomatal ontogeny of *Hypoxyton fragiforme*. **Mycological Research**, v.110, p. 811-820, 2006a.

STADLER, M. et al. Secondary metabolite profiles, genetic fingerprint and taxonomy of *Daldinia* and allies. **Mycotaxon**, v. 77, p. 379-429, 2001.

STADLER, M. et al. Chemotaxonomy of *Entonaema*, *Rhopalostroma* and other Xylariaceae. **Micological Research**, v.3, p. 239-256, 2004.

STADLER, M. et al. Recognition of hypoxyloid and xylarioid *Entonaema* species and allied *Xylaria* species from a comparasion of holomorphic morphology, HPLC profiles, and ribosomal DNA sequences. **Mycological progress**, 2008.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreane*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.

STREGE, M.A. High-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 725, n. 1, p. 67-78, 1999.

STROBEL, G.A., Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Rewiews in Biotechnology**, v. 22, n.4, p. 315-333, 2002.

STZELECKA, M. et. al. Antinflammatory effects of extracts from some tradicional Mediterranean diet plants. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, p. 139-156, 2005.

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

TAECHOWISAN, T. et al. Biological activity of chemical constituents isolated from *Streptomyces* sp. Tc052, an endophytic in *Alpinia galangal*. **International Journal of pharmacology**. v. 4, n. 2, p. 95-101, 2008.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Herbarium: Compêndio de Fitoterapia**. Curitiba, Herbarium, 1997.

WANG, X.N.; Tan, R.X.; Liu, J.K. Xylactam, a new nitrogen-containing compound from the fruiting bodies of ascomycete *Xylaria euglossa*. **Journal of Antibiotics**, v. 58, p. 268-270, 2005.

WEBER, R.W.S. et al. Production of sordarin and related metabolites by the coprophilus fungus *Podospora pleiospora* in submerged culture and in its natural substrate. **Mycological Research**, v. 109, p. 619-616, 2005.

WHALLEY, A.J.S., EDWARDS, R.I. Secondary metabolites and systematic arrangement within the *Xylariaceae*. **Canadian Journal of Botany**, v. 73 (Suppl1), p. S802-S810, 1995.

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

WILSON, D.; CARROLL, G.C. Infection studies of *Discula quercina* an endophytic of *Quercus garryana*. **Micologia**, v. 86, p. 635-647, 1994.

WU, X.Y. et al. Xyloketal F: A Strong L-Calcium Channel Bloker from the Mangrove Fungus *Xylaria* sp. (#2508) from the South China Sea Coast. **Journal of Organic Chemistry**, p. 4061-4064, 2005.

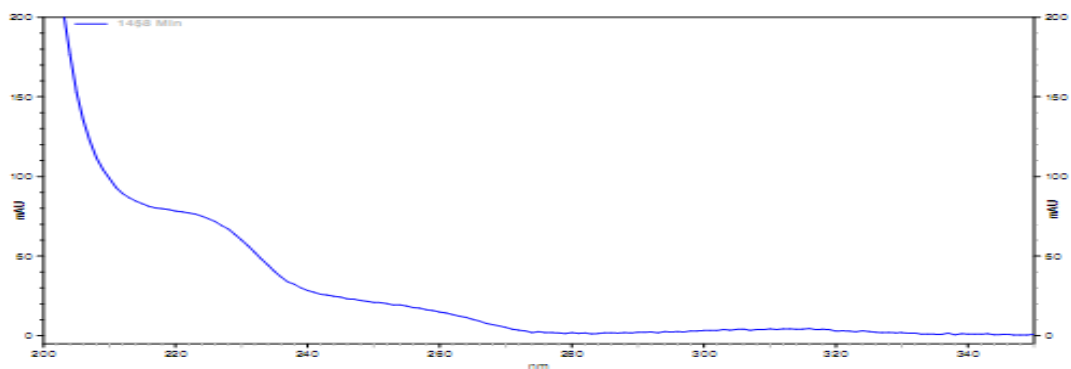
XU, et al. Benzofuran Derivatives from the Mangrove Endophytic Fungus *Xylaria* sp. (#2508). **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1251-1253, 2008.

YAMOGUCHI, K. **Spectral data of natural products**, v. 1. Elsevier Publishing Co. Amsterdam, London, New York, 1970.

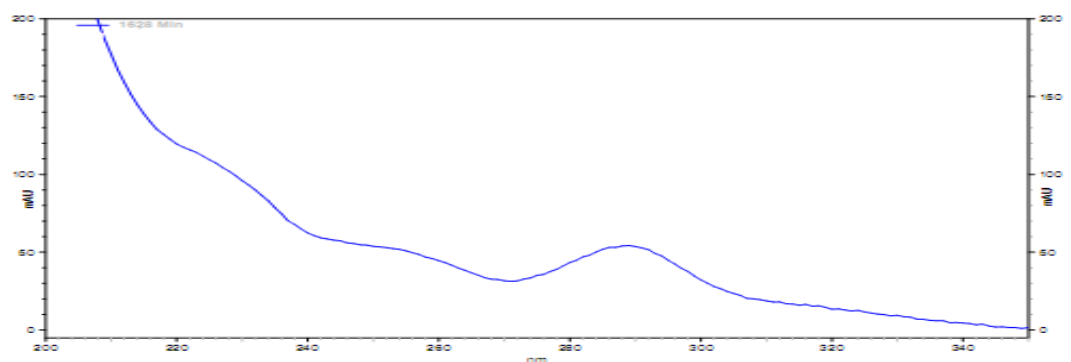
ANEXOS

ANEXO A - Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A dos extratos em acetato de etila da parte externa dos fungos endofíticos

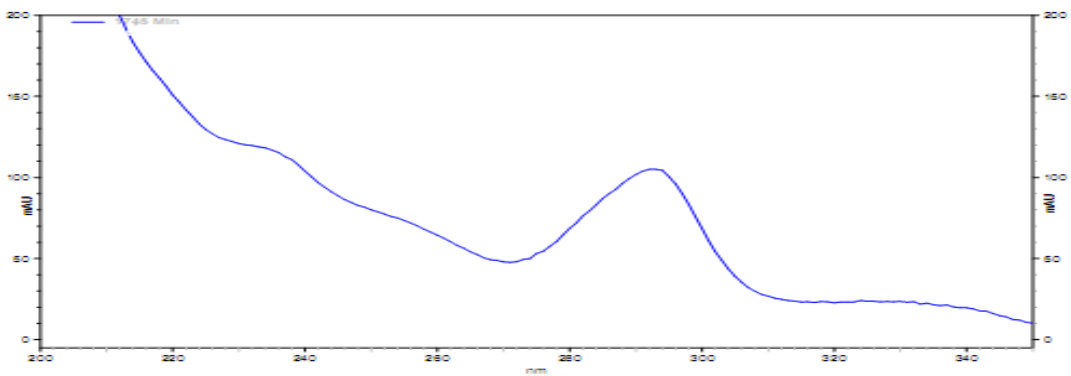
Nodulisporium sp. (Espécie 1)



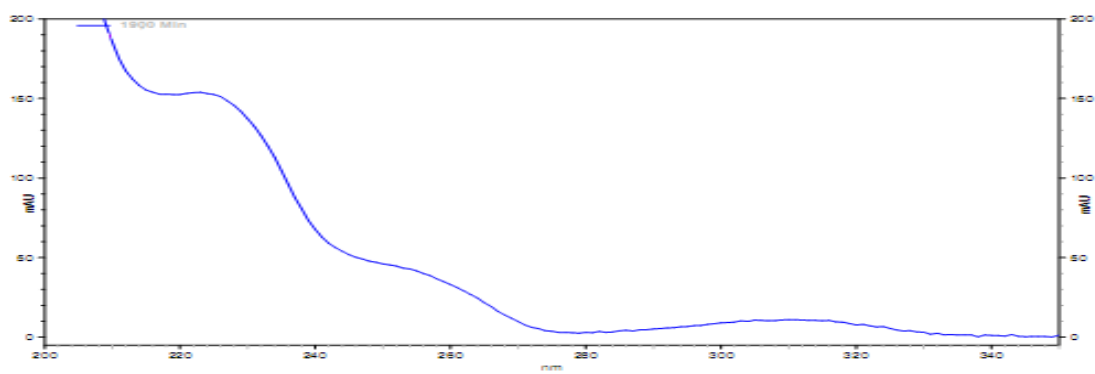
Pico 1 (t_R : 14,58 min)



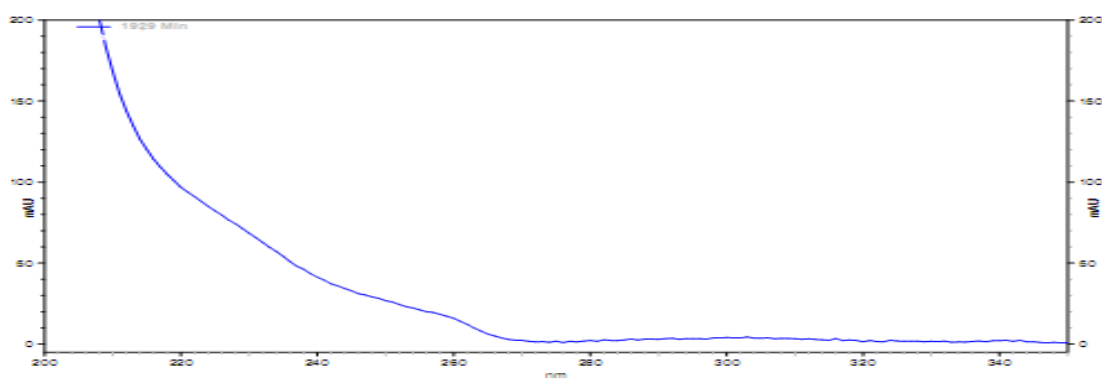
Pico 2 (t_R : 16,28 min)



Pico 3 (t_R : 17,45 min)

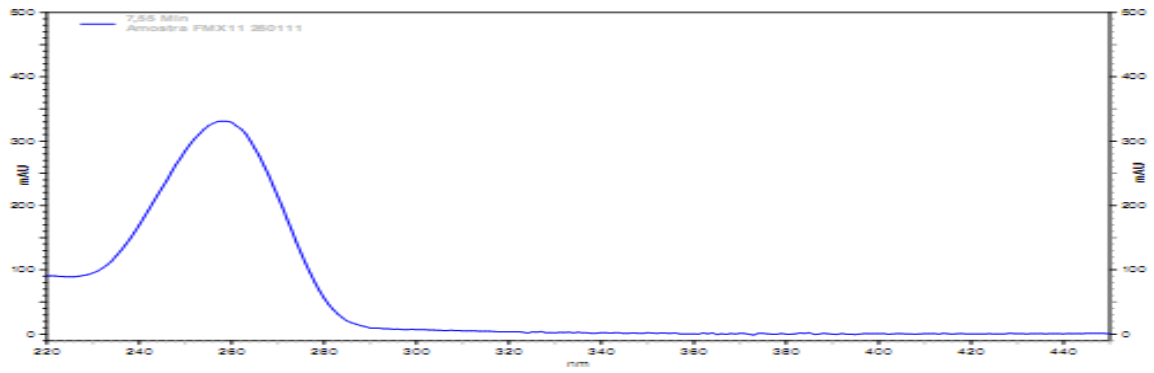


Pico 4 (t_R: 19,00 min)

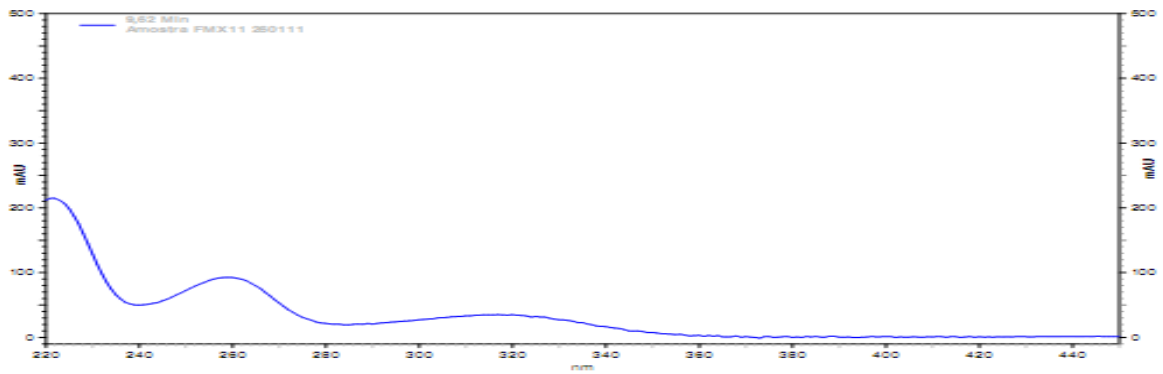


Pico 5 (t_R: 19,29 min)

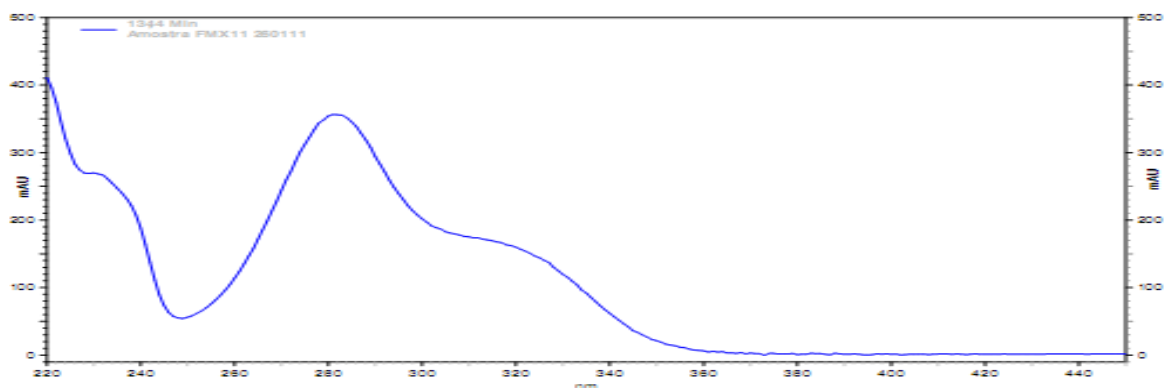
ANEXO B - Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B dos extratos em metanol da parte externa dos fungos endofíticos *Nodulisporium sp.* (Espécie 1)



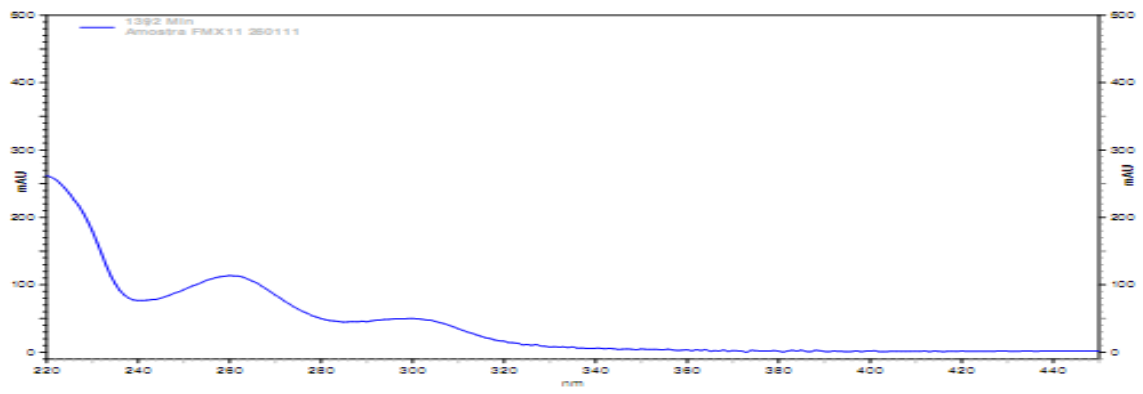
Pico 6 (t_R : 7,55 min)



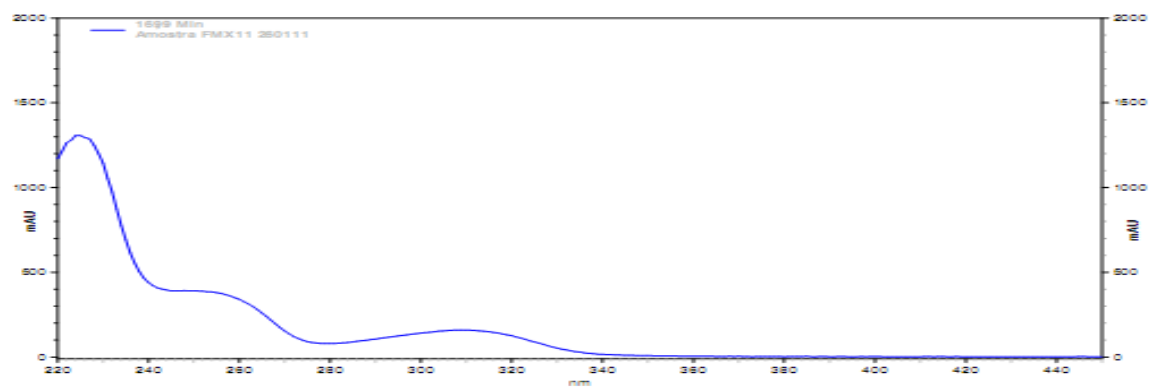
Pico 7 (t_R : 9,62 min)



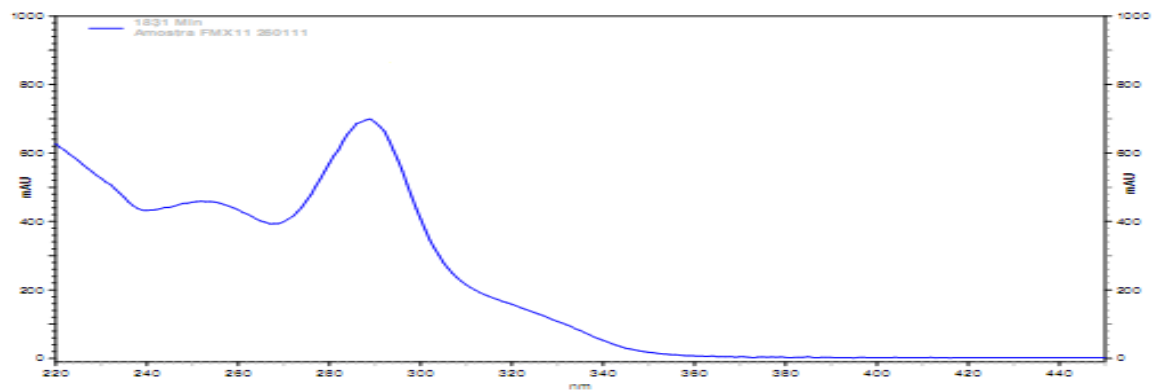
Pico 8 (t_R : 13,44 min)



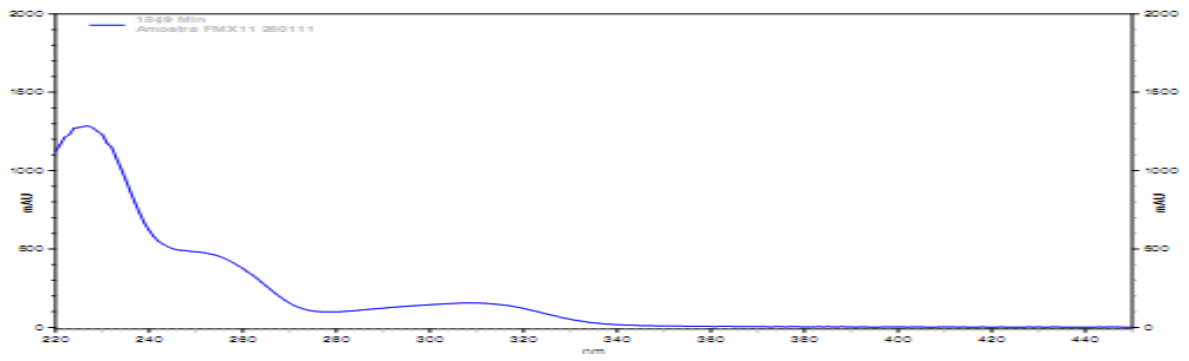
Pico 9 (t_R : 13,92 min)



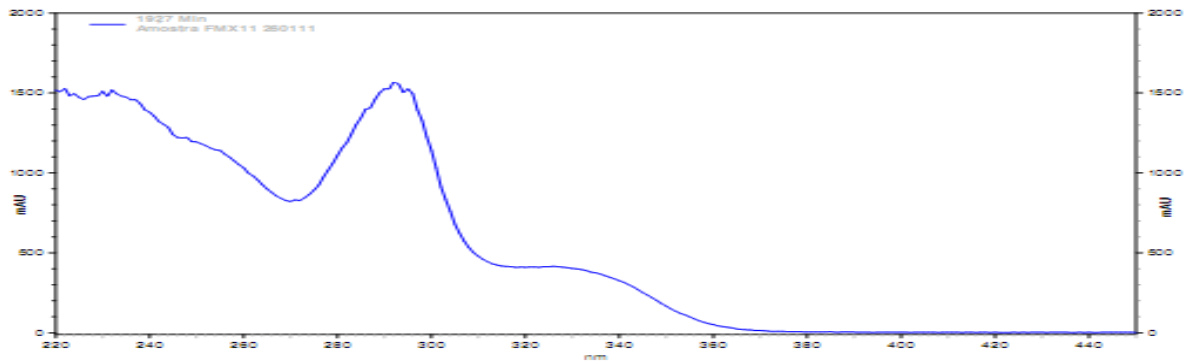
Pico 10 (t_R : 16,99 min)



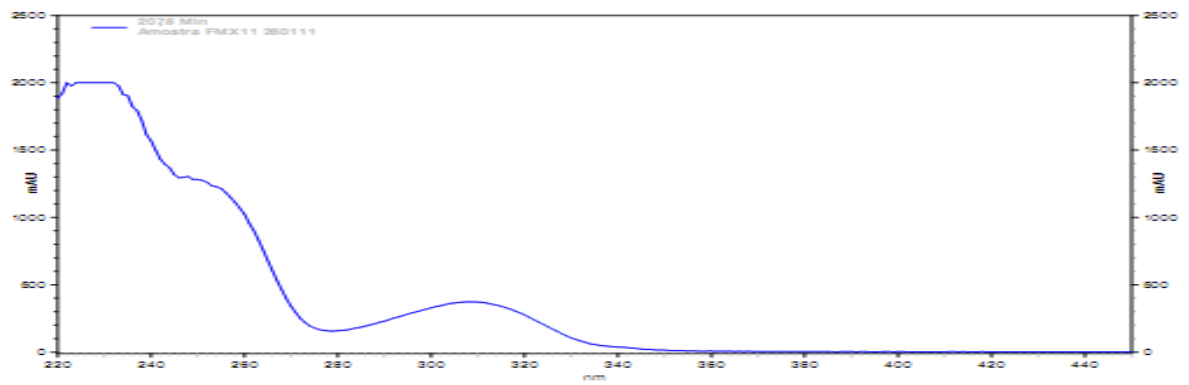
Pico 11 (t_R : 18,31 min)



Pico 12 (t_R: 18,49 min)

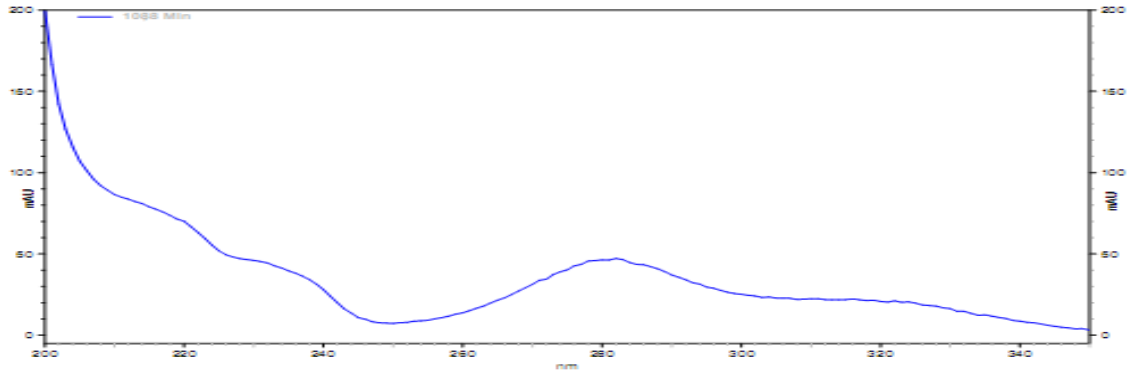


Pico 13 (t_R: 19,27 min)

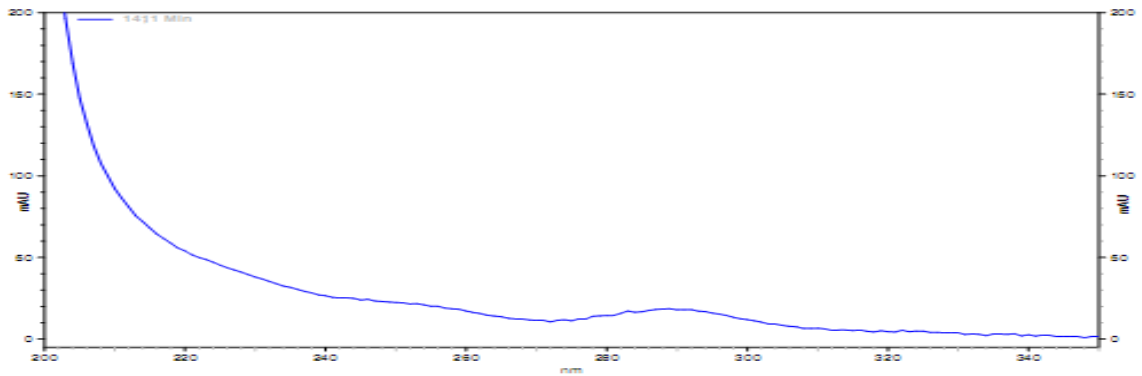


Pico 14 (t_R: 20,78 min)

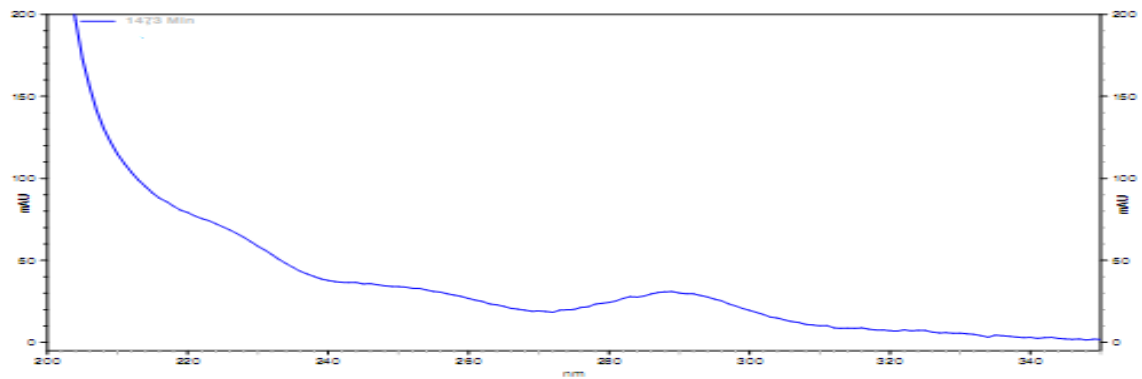
ANEXO C - Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma C dos extratos em acetato de etila da parte externa dos fungos endofíticos *Nodulisporium* sp. (Espécie 2)



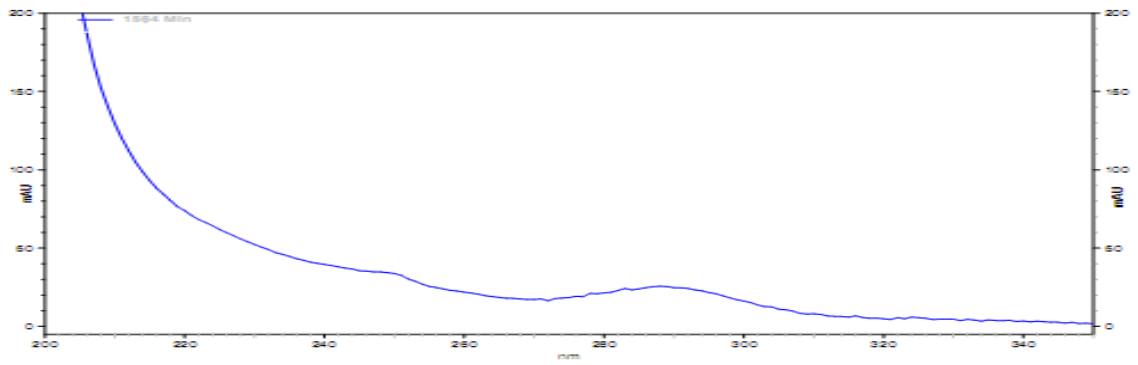
Pico 15 (t_R : 10,88 min)



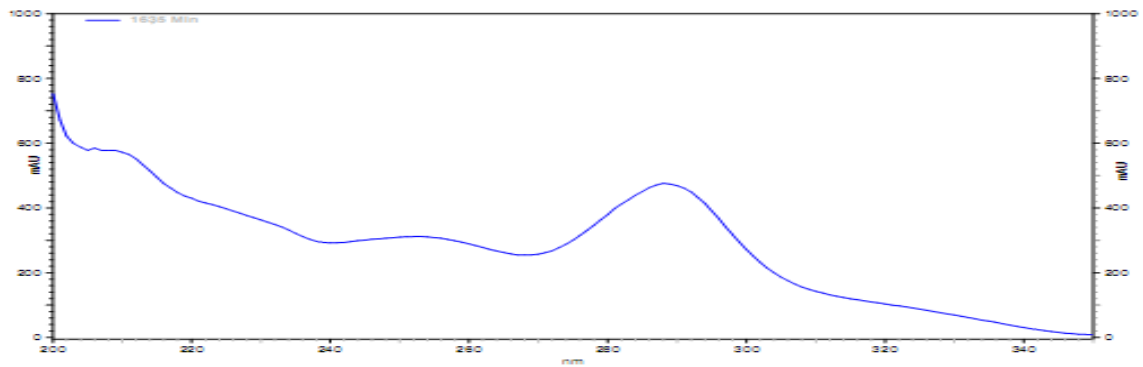
Pico 16 (t_R : 14,11 min)



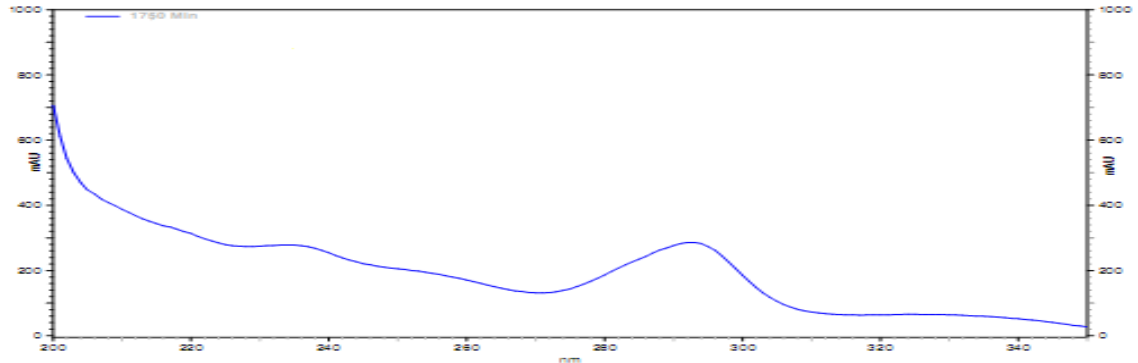
Pico 17 (t_R : 14,73 min)



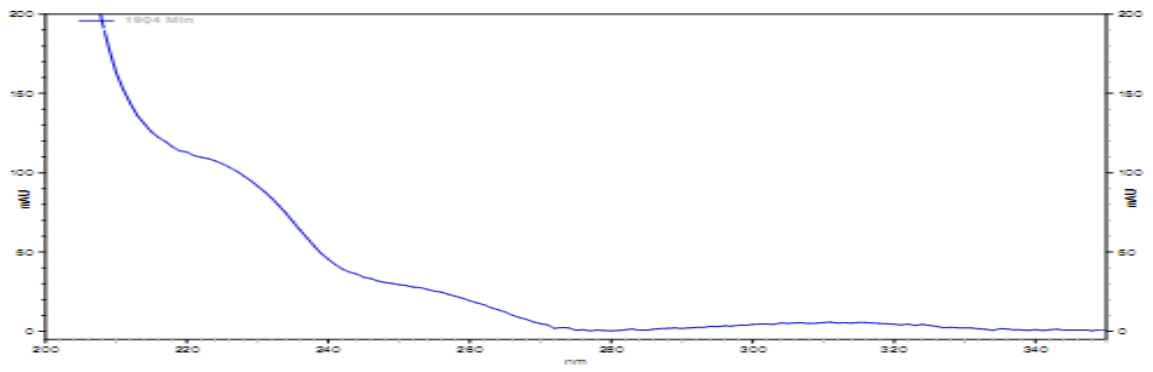
Pico 18 (t_R: 15,84 min)



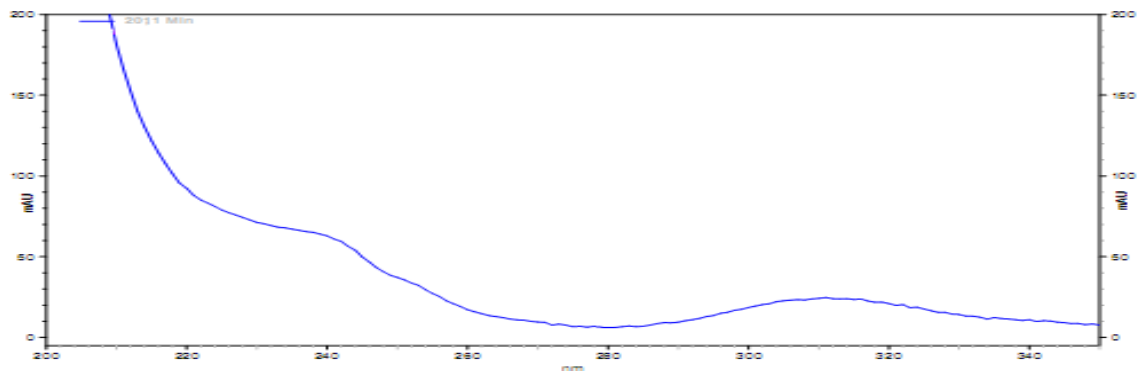
Pico 19 (t_R: 16,35min)



Pico 20 (t_R: 17,50 min)

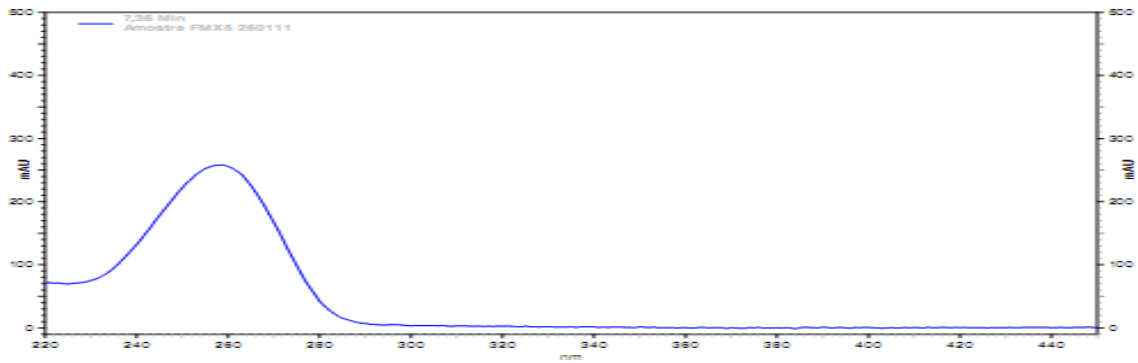


Pico 21 (t_R : 19,04 min)

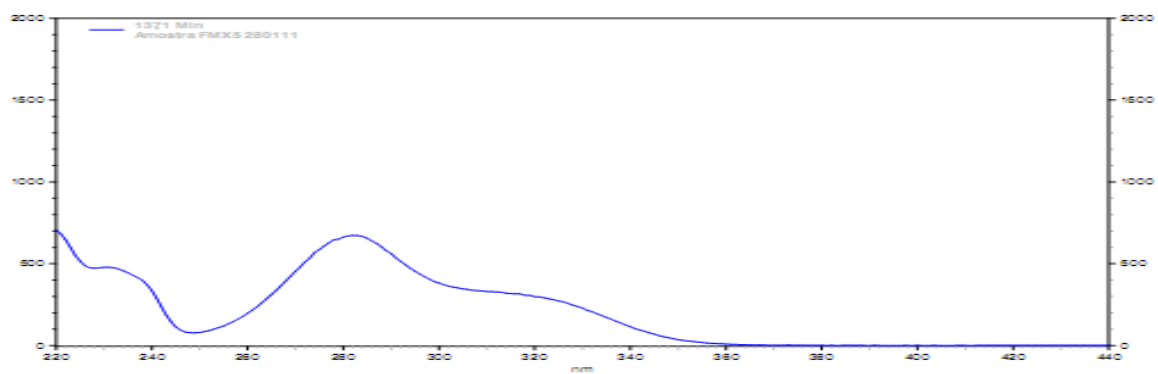


Pico 22 (t_R : 20,11 min)

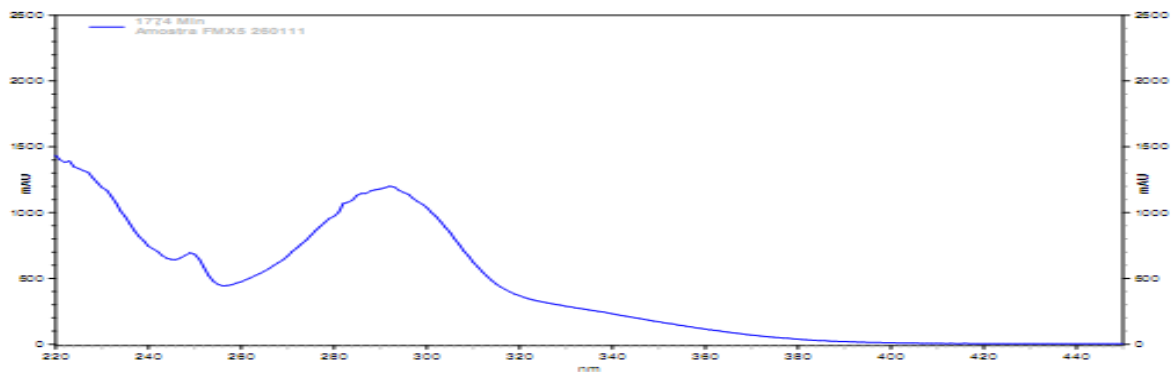
ANEXO D - Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma D dos extratos em metanol da parte externa dos fungos endofíticos *Nodulisporium sp.* (Espécie 2)



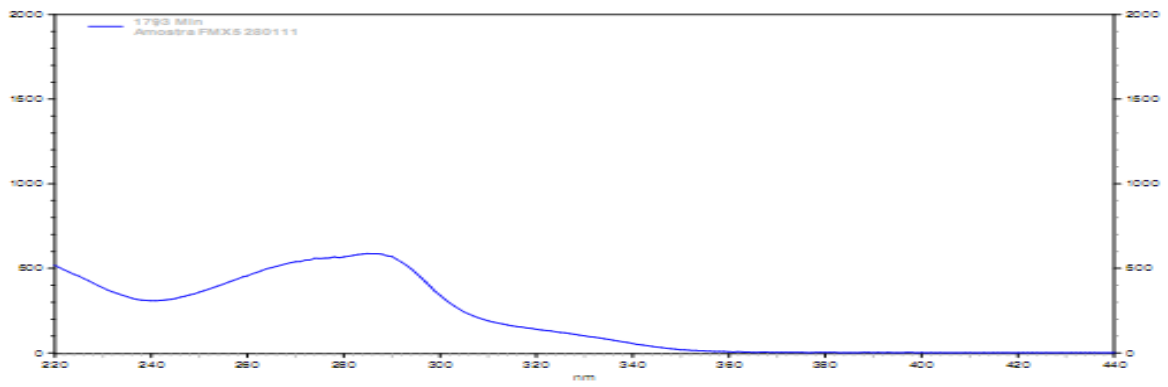
Pico 23 (t_R : 7,36 min)



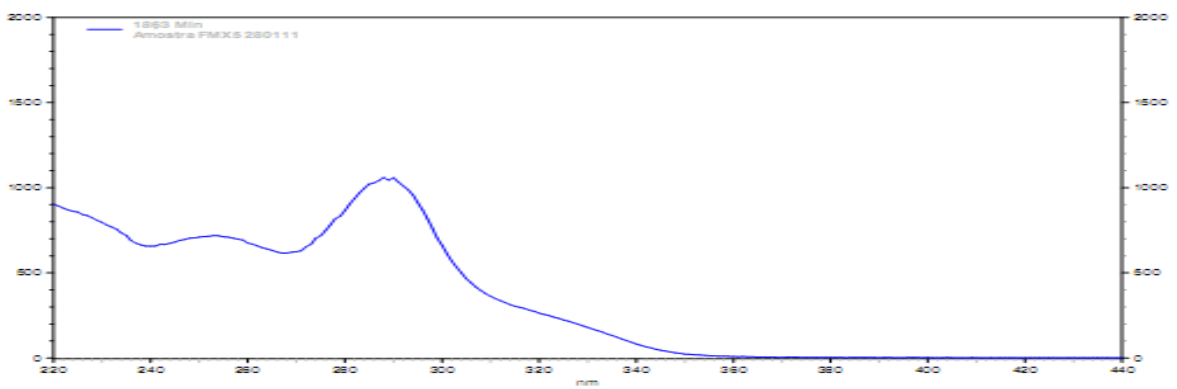
Pico 24 (t_R : 16,80 min)



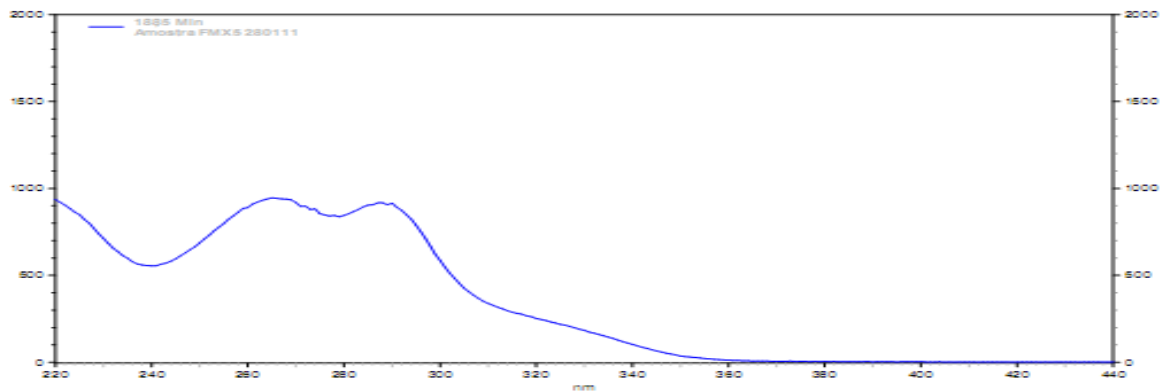
Pico 25 (t_R : 17,55 min)



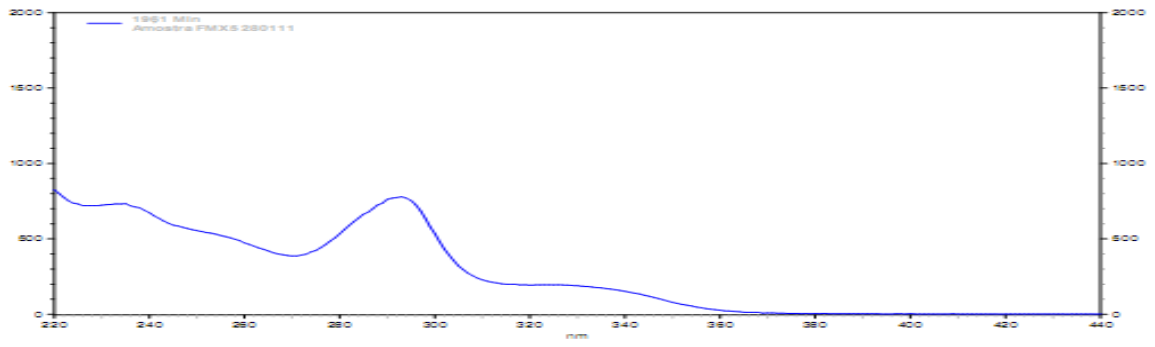
Pico 26 (t_R : 17,74 min)



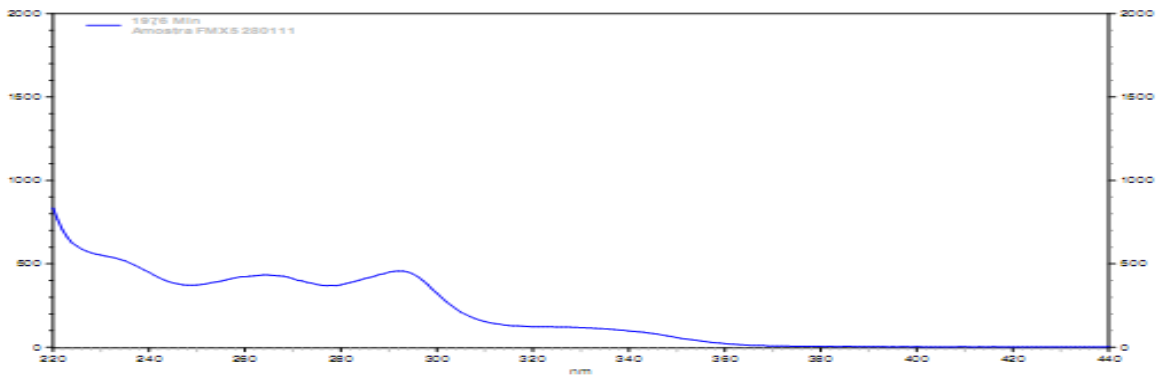
Pico 27 (t_R : 18,12 min)



Pico 28 (t_R : 18,46 min)

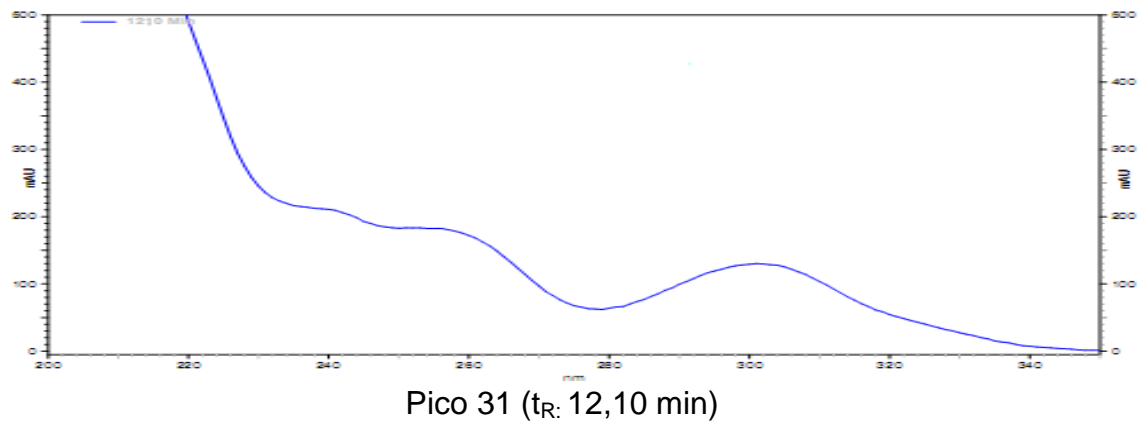


Pico 29 (t_R : 19,13 min)

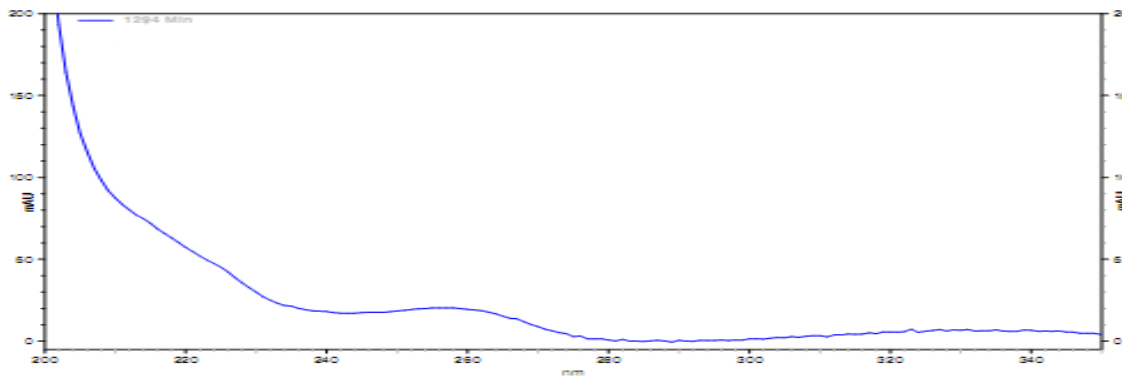


Pico 30 (t_R : 20,61 min)

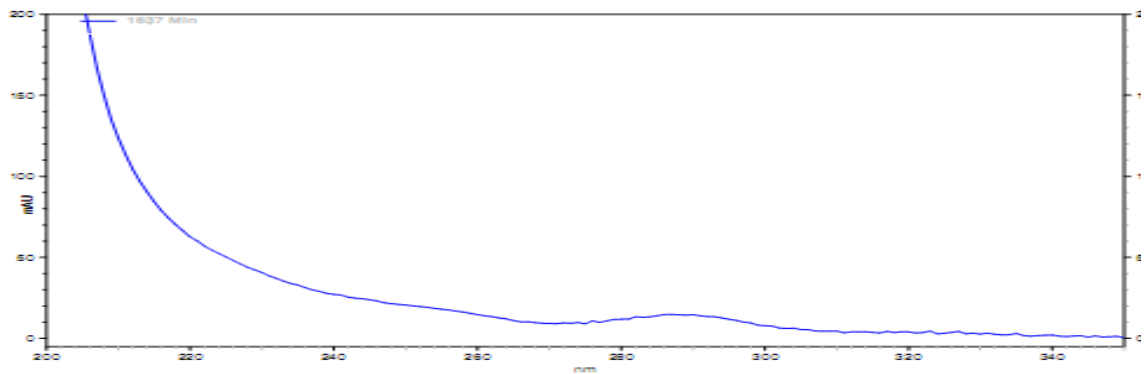
ANEXO E - Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma E dos extratos em acetato de etila da parte externa dos fungos endofíticos *Nodulisporium* sp. (Espécie 3)



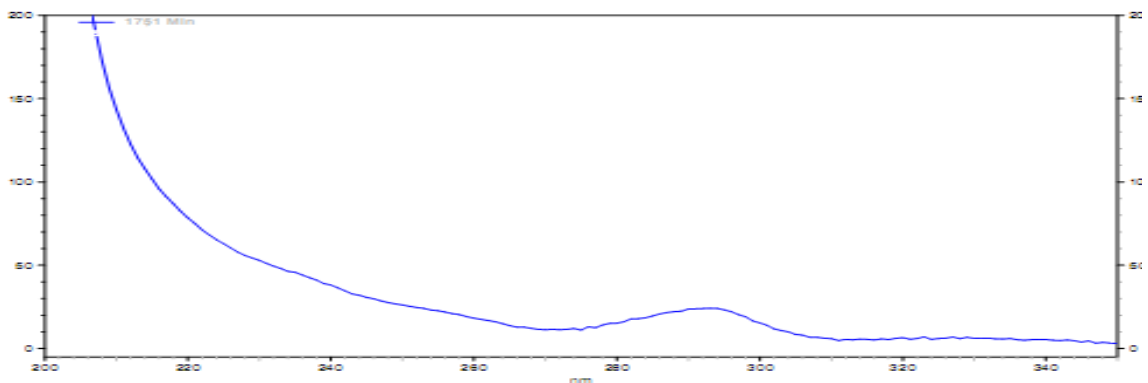
ANEXO F - Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas A dos extratos em acetato de etila da parte externa dos fungos endofíticos *Hypoxyton sp.* (Espécie 1)



Pico 1 (t_R : 12,94)

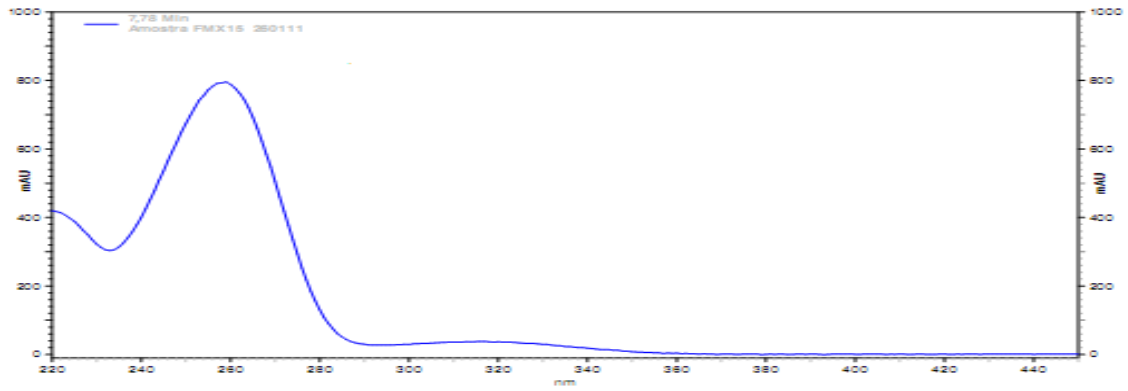


Pico 2 (t_R : 16,37 min)

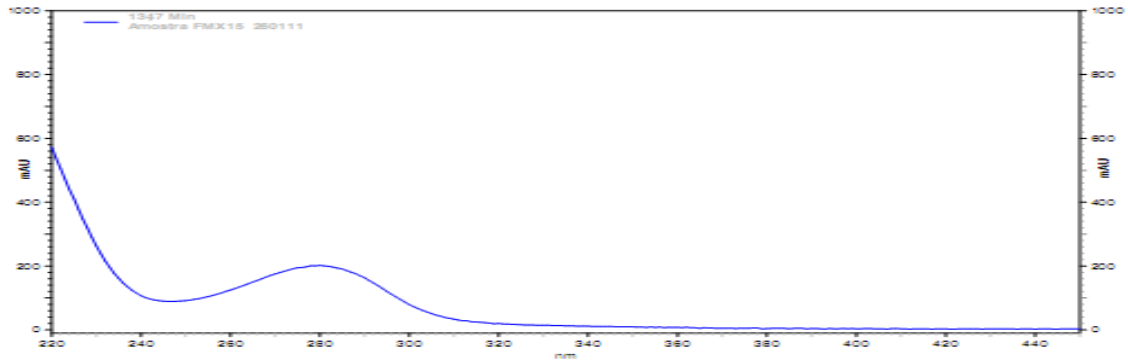


Pico 3 (t_R : 17,51 min)

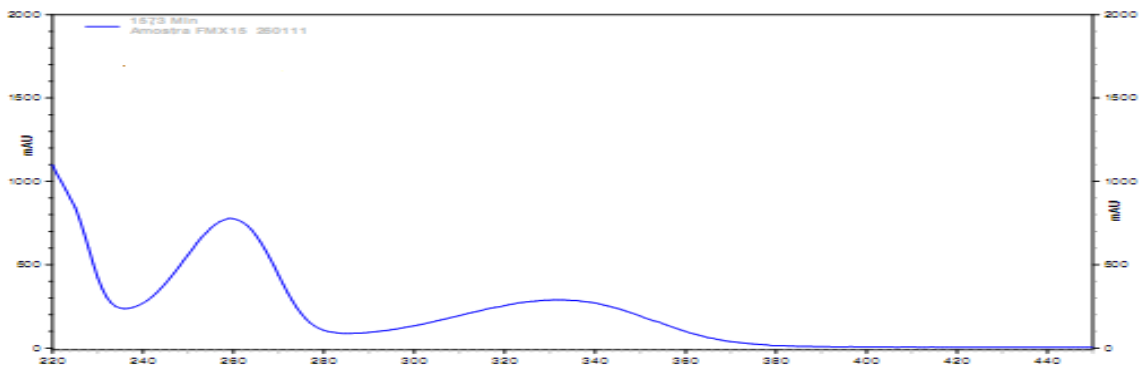
ANEXO G - Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas B dos extratos em metanol da parte externa dos fungos endofíticos *Hypoxylon* sp. (Espécie 1)



Pico 4 (t_R: 7,78 min)

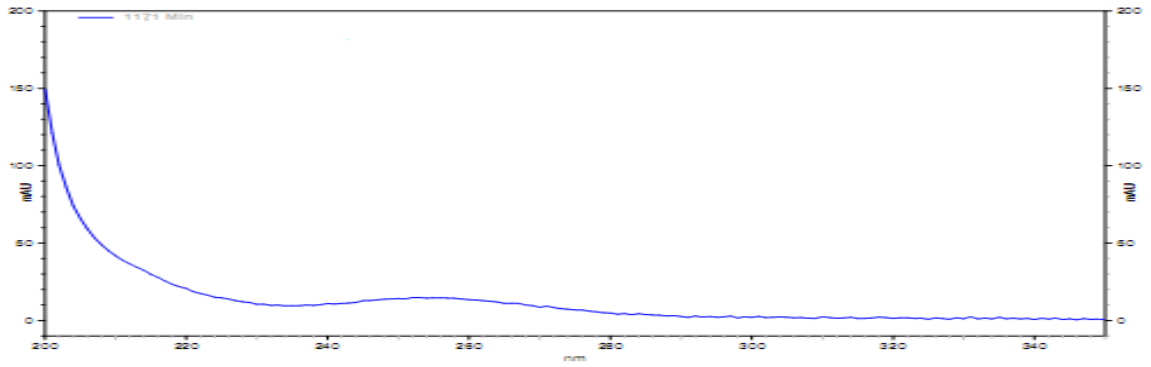


Pico 5 (t_R: 13,47 min)

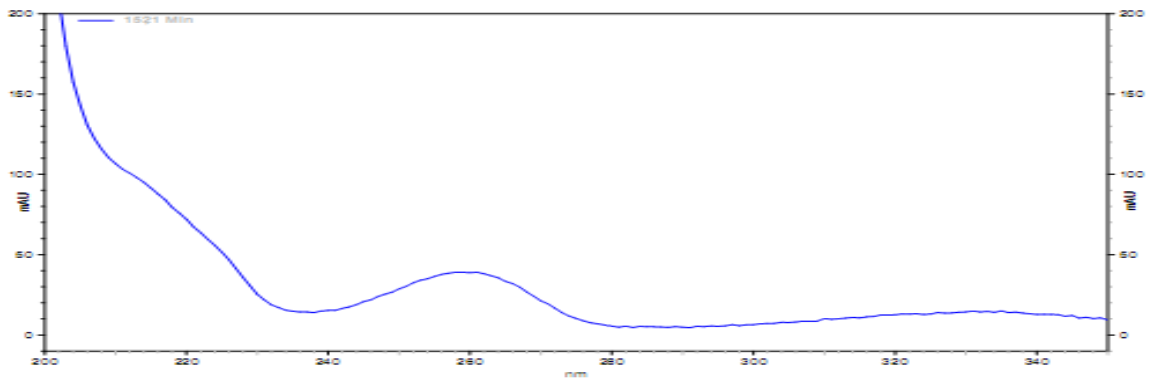


Pico 6 (t_R: 15,73 min)

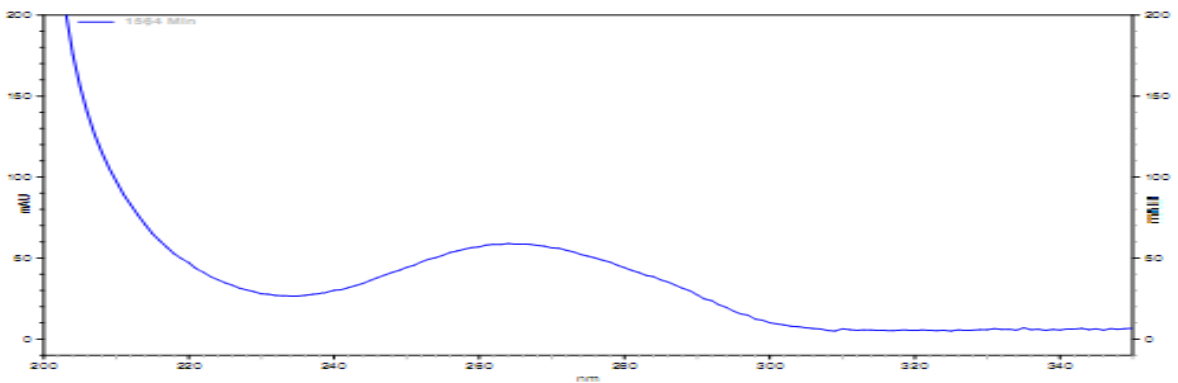
ANEXO H - Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas C dos extratos em acetato de etila da parte externa dos fungos endofíticos *Hypoxylon* sp. (Espécie 2)



Pico 7 (t_R : 11,71 min)

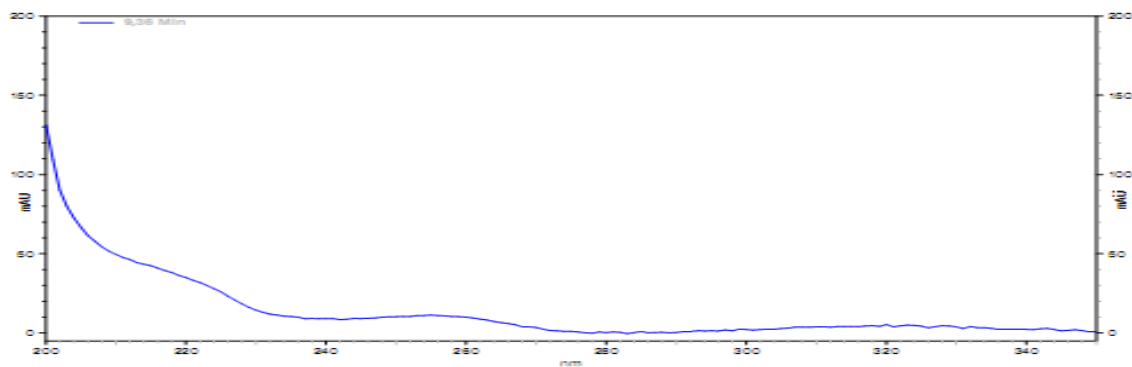


Pico 8 (t_R : 15,21 min)

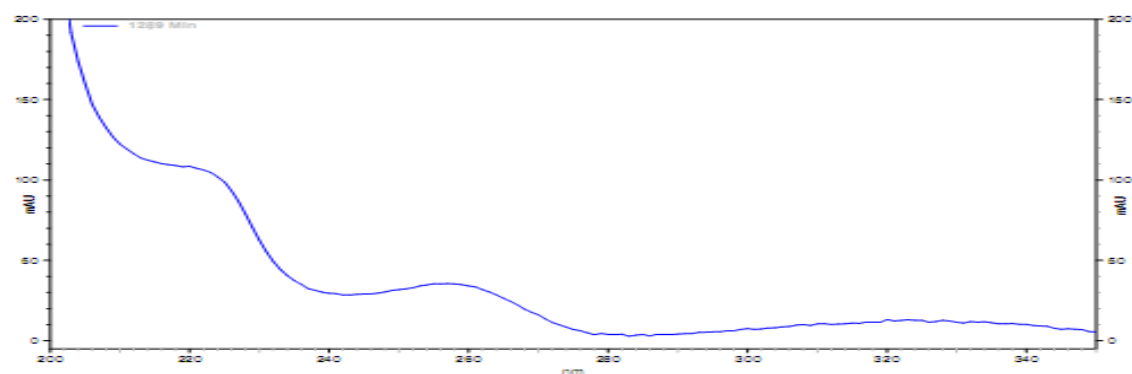


Pico 9 (t_R : 15,64 min)

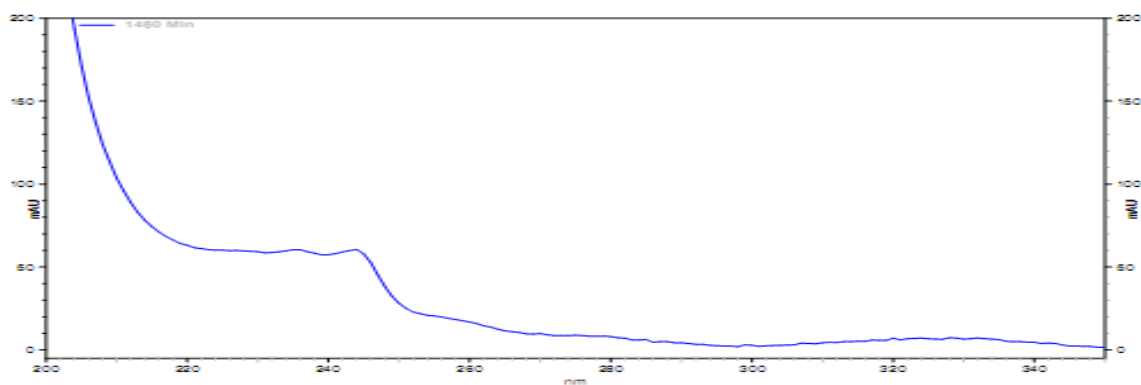
ANEXO I - Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas A dos extratos em acetato de etila da parte externa dos fungos endofíticos *Daldinia* sp.



Pico 1 (t_R : 9,36min)

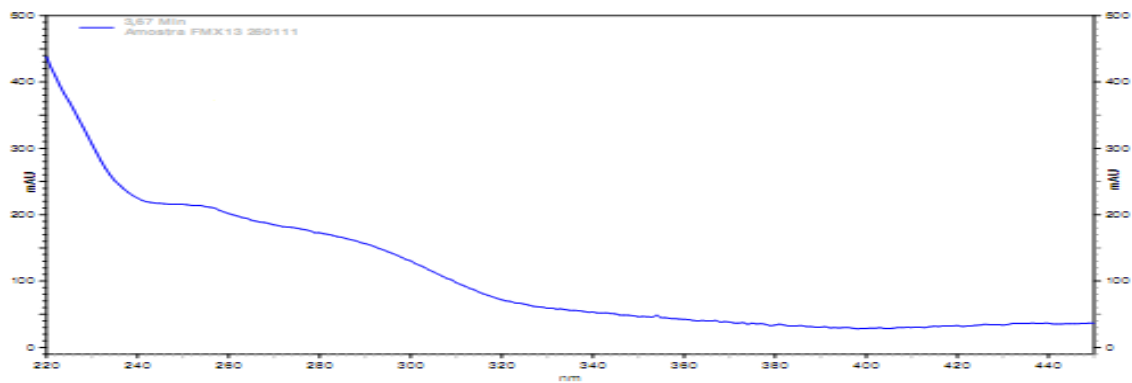


Pico 2 (t_R : 12,89 min)

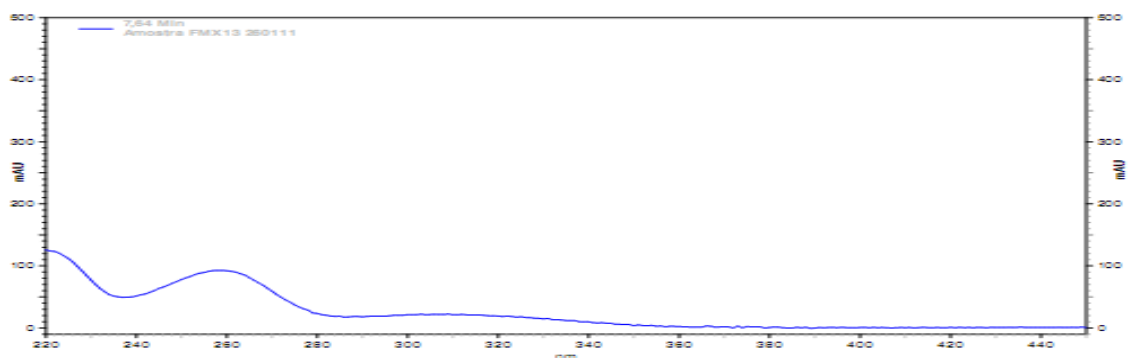


Pico 3 (t_R : 14,60 min)

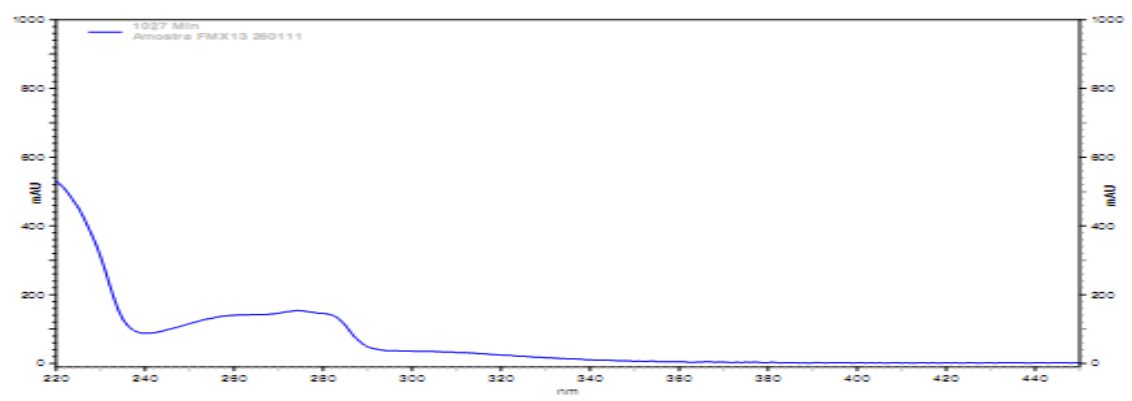
ANEXO J - Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B do extrato em metanol da parte externa dos fungos endófitos *Daldinia sp.*



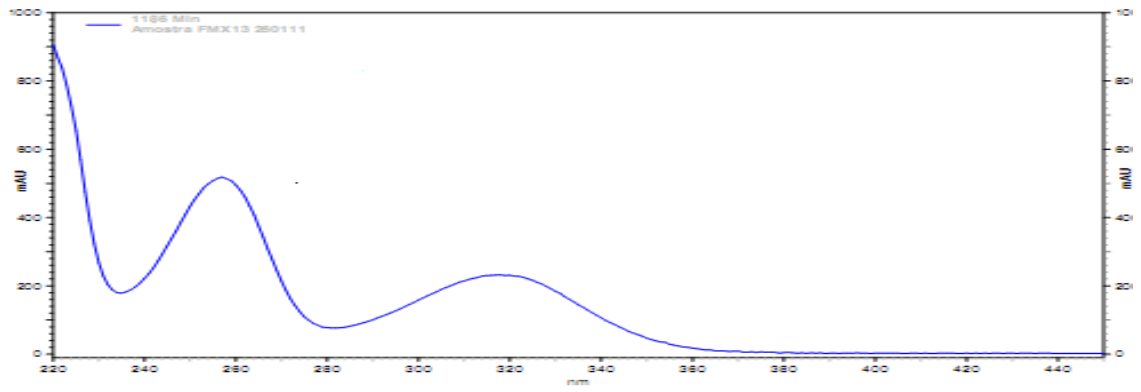
Pico 4 (t_R : 3,67 min)



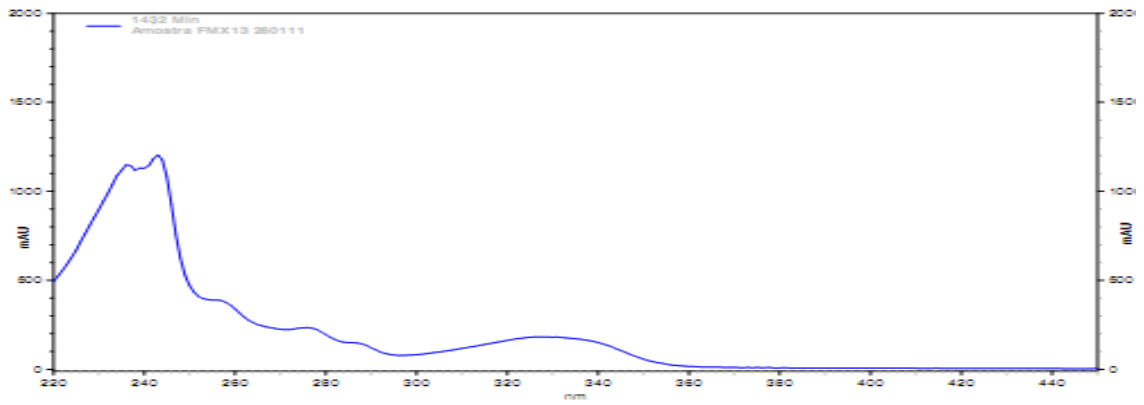
Pico 5 (t_R : 7,64 min)



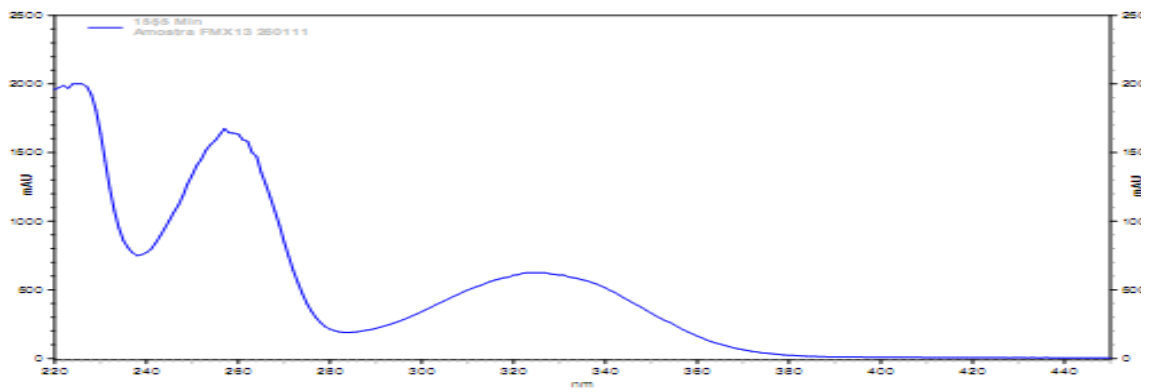
Pico 6 (t_R : 10,27 min)



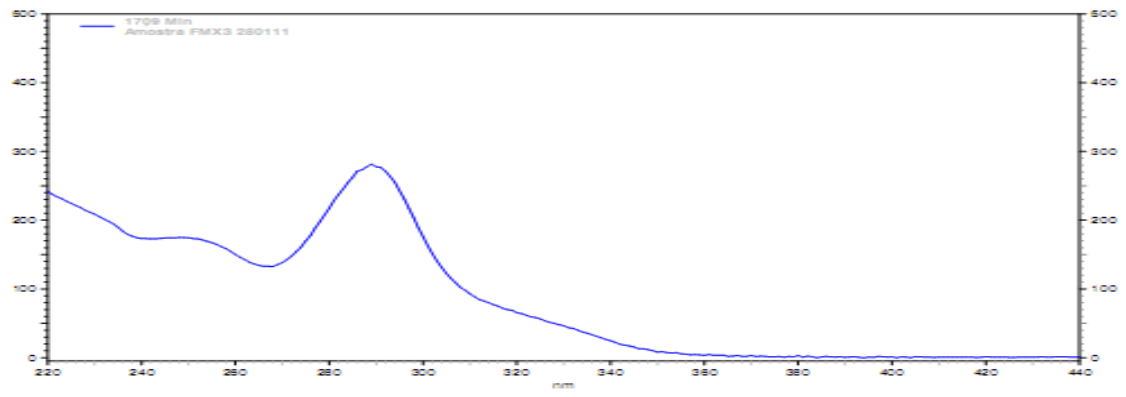
Pico 7 (t_R: 11,86 min)



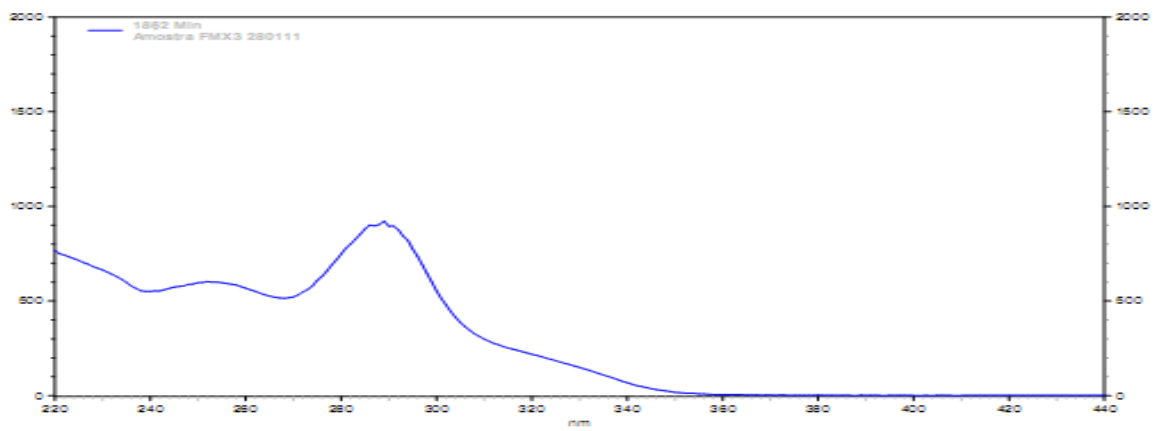
Pico 8 (t_R: 14,32 min)



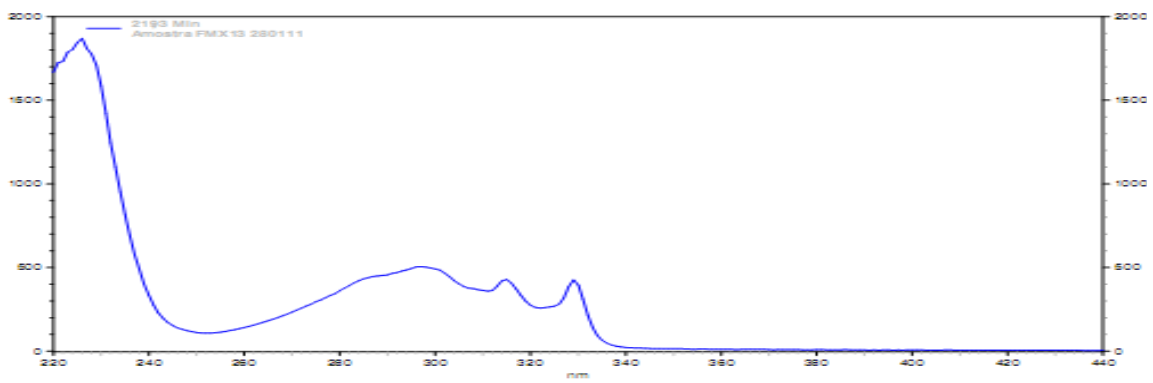
Pico 9 (t_R: 15,55 min)



Pico 10 (t_R: 17,09 min)

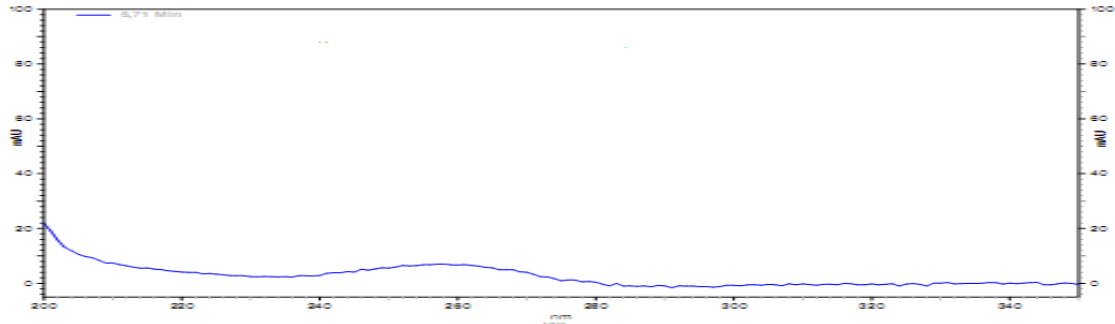


Pico 11 (t_R: 18,62 min)

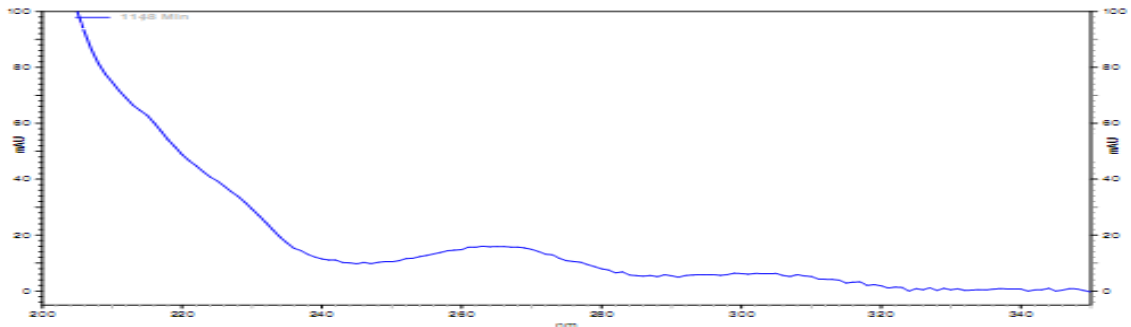


Pico 12 (t_R: 21,93 min)

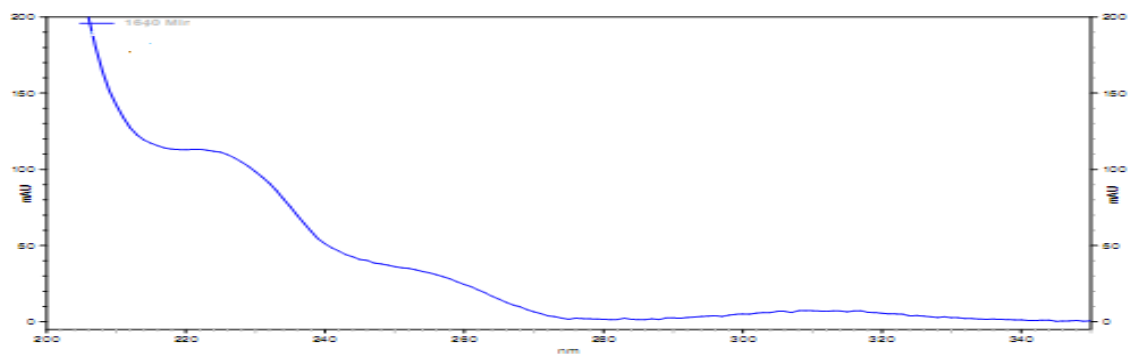
ANEXO K - Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A do extrato em acetato de etila da parte externa dos fungos endofíticos *Xylaria luteostromata*.



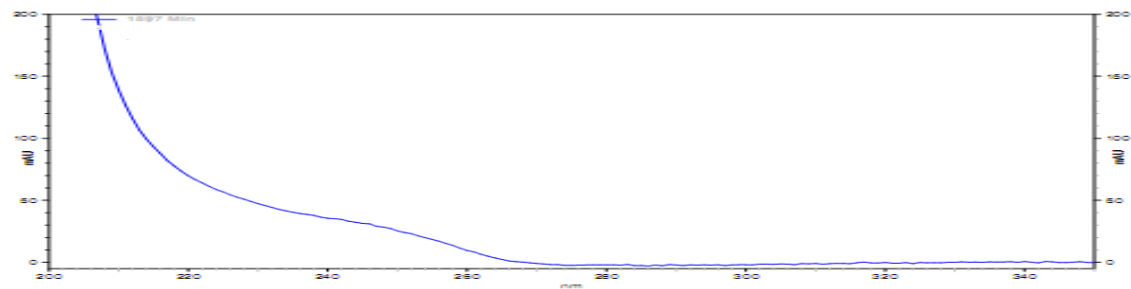
Pico 1 (t_R : 5,71 min)



Pico 2 (t_R : 11,48 min)

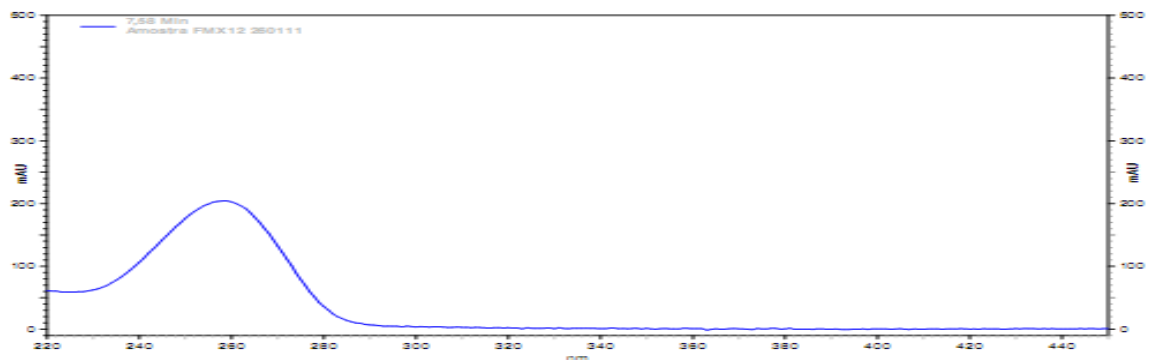


Pico 3 (t_R : 16,64 min)

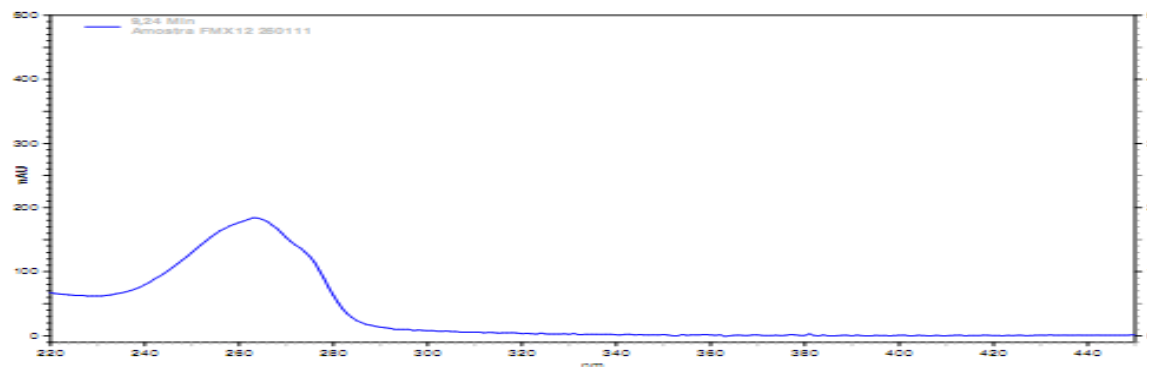


Pico 4 (t_R : 18,97 min)

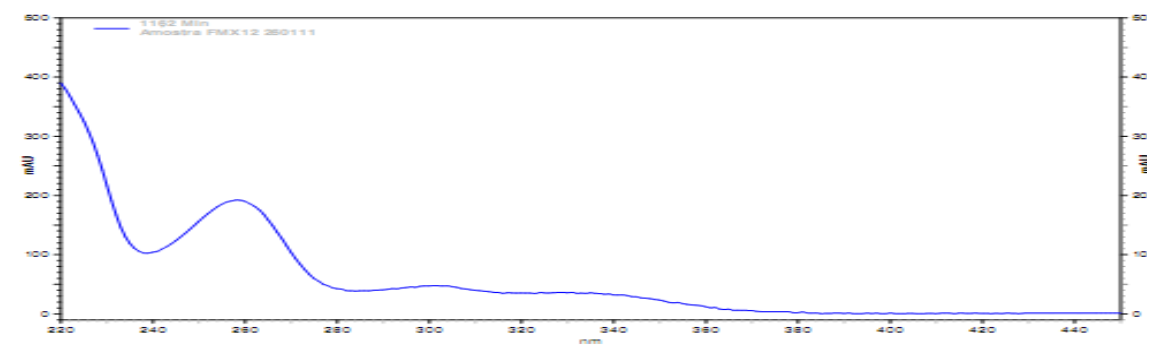
ANEXO L - Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B do extrato em metanol da parte externa dos fungos endofíticos *Xylaria luteostromata*.



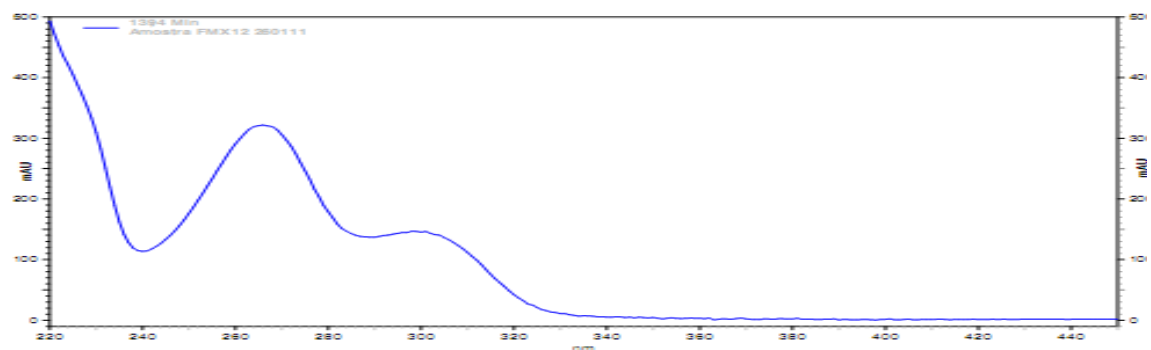
Pico 5 (t_R : 7,58 min)



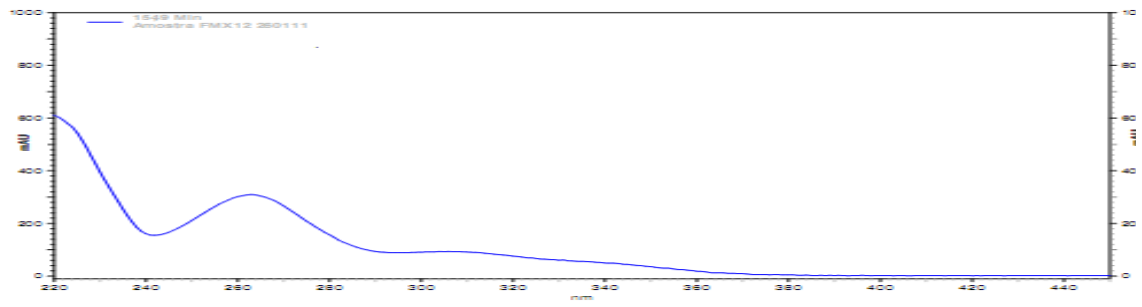
Pico 6 (t_R : 9,24 min)



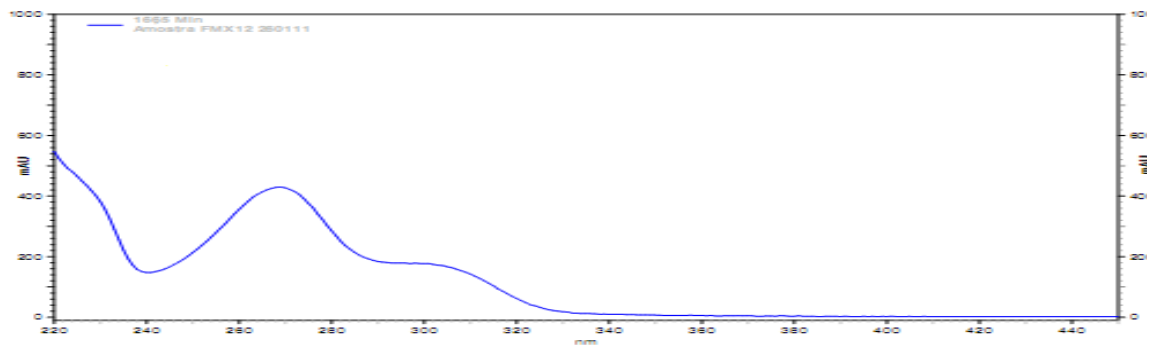
Pico 7 (t_R : 11,62 min)



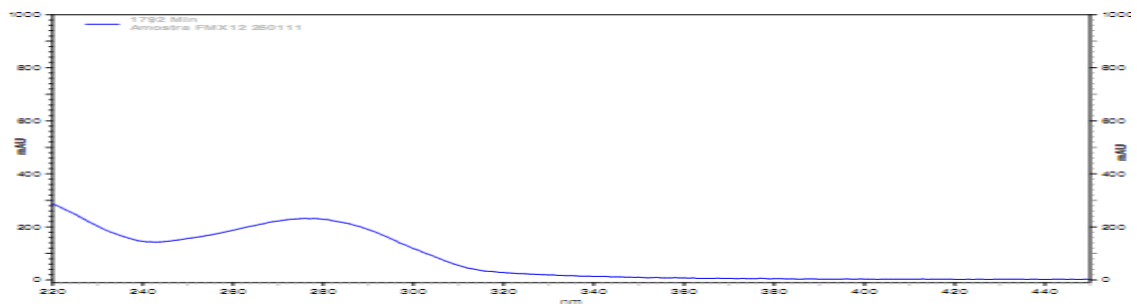
Pico 8 (t_R : 13,94 min)



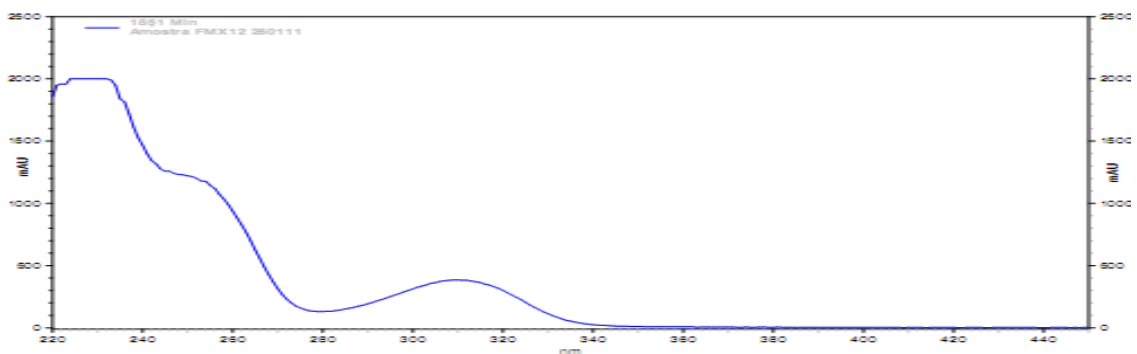
Pico 9 (t_R: 15,49 min)



Pico 10 (t_R: 16,65 min)

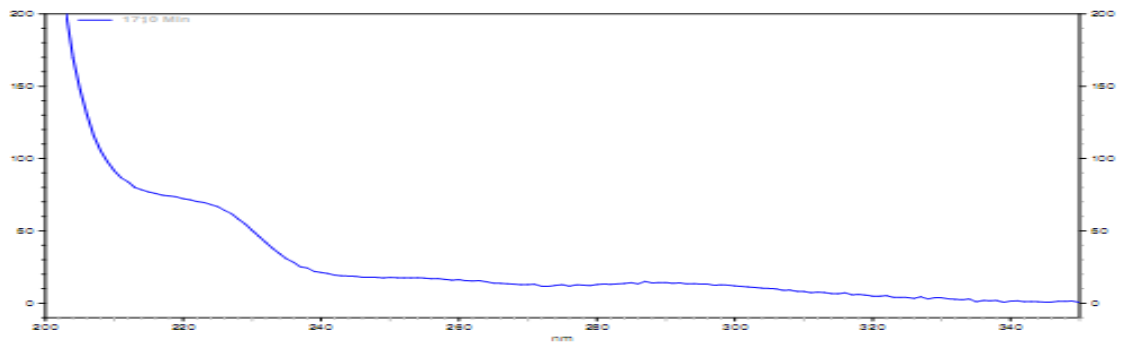


Pico 11 (t_R: 17,92 min)

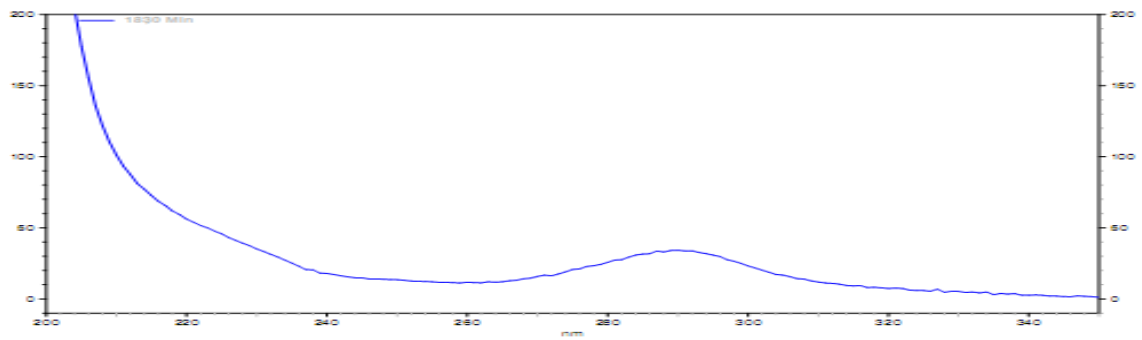


Pico 12 (t_R: 18,51 min)

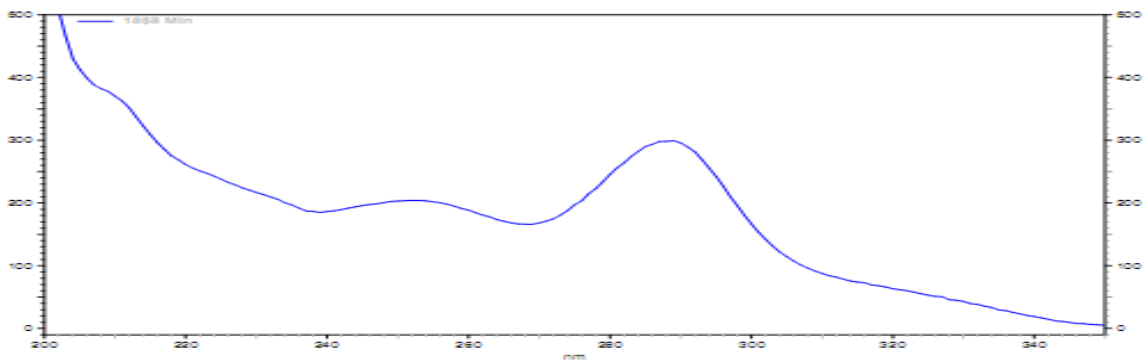
ANEXO M - Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A do extrato em acetato de etila da parte externa do fungo endofítico FEX3.



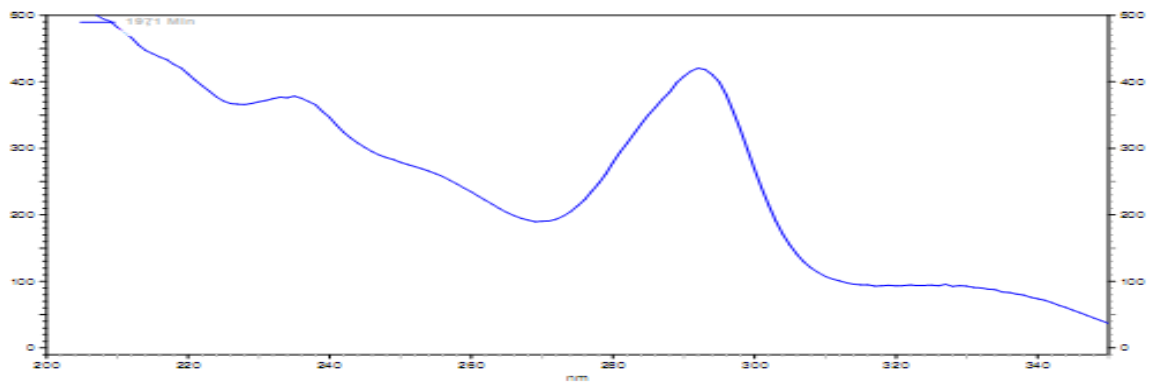
Pico 1 (t_R : 17,01 min)



Pico 2 (t_R : 18,30 min)

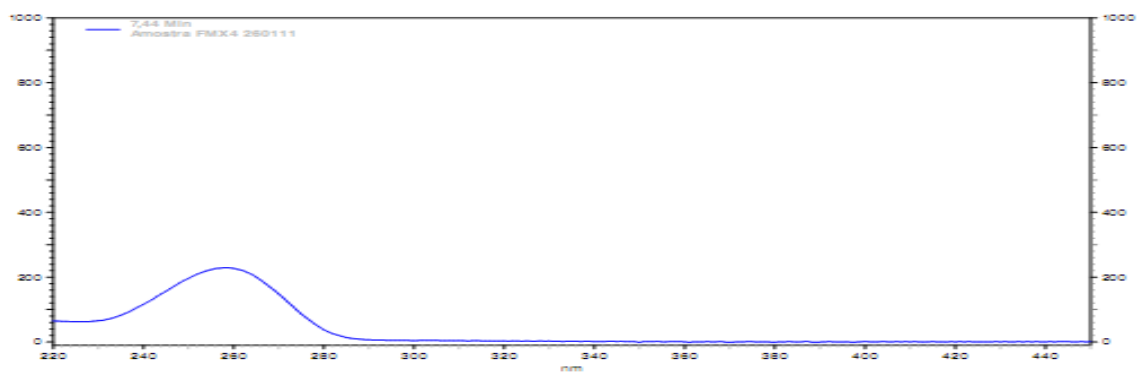


Pico 3 (t_R : 18,58 min)

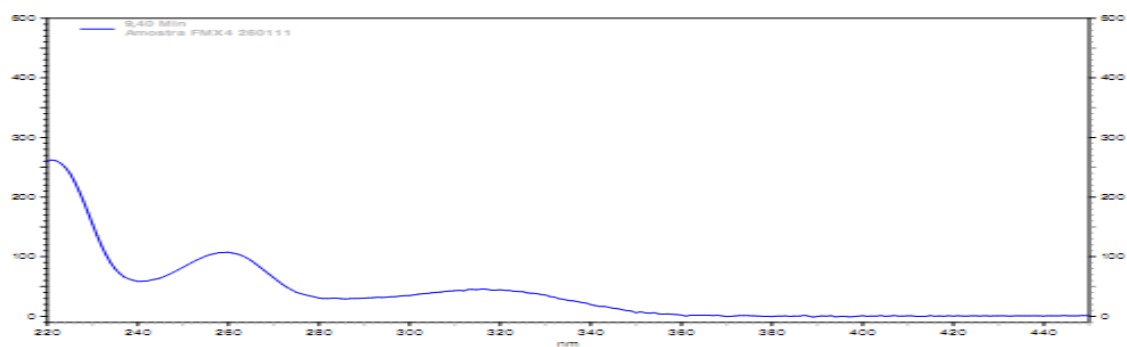


Pico 4 (t_R : 19,71 min)

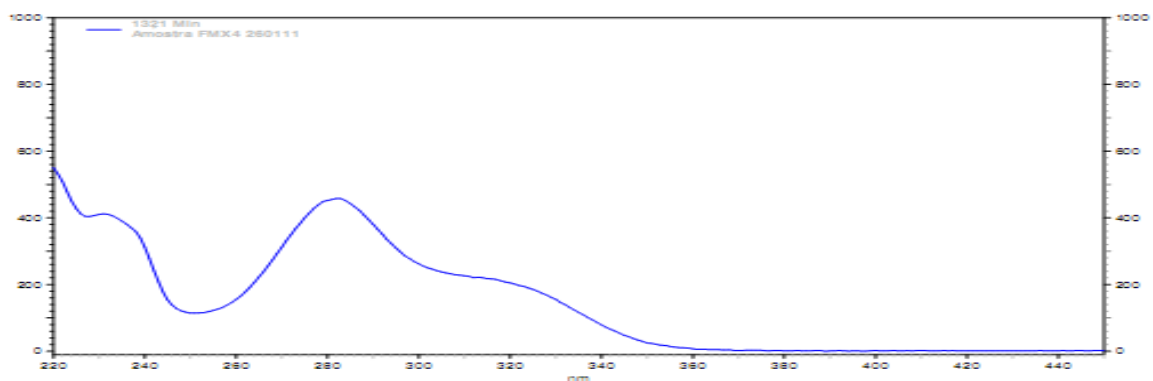
ANEXO N - Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B do extrato em metanol da parte externa do fungo endofítico FEX3.



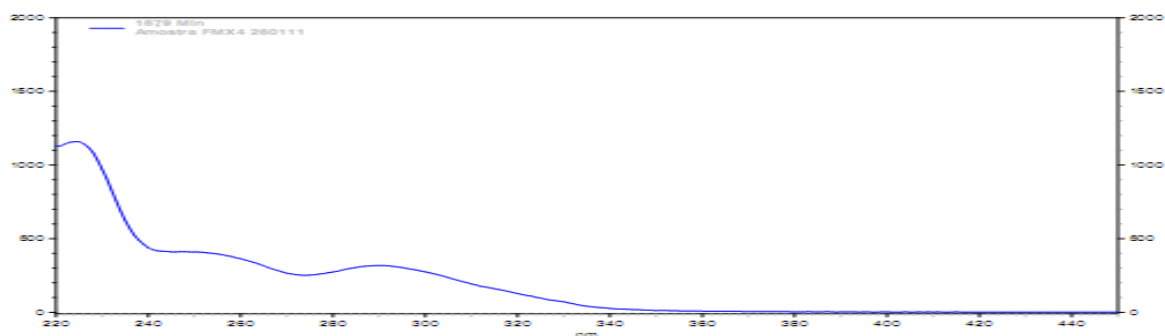
Pico 5 (t_R: 7,74 min)



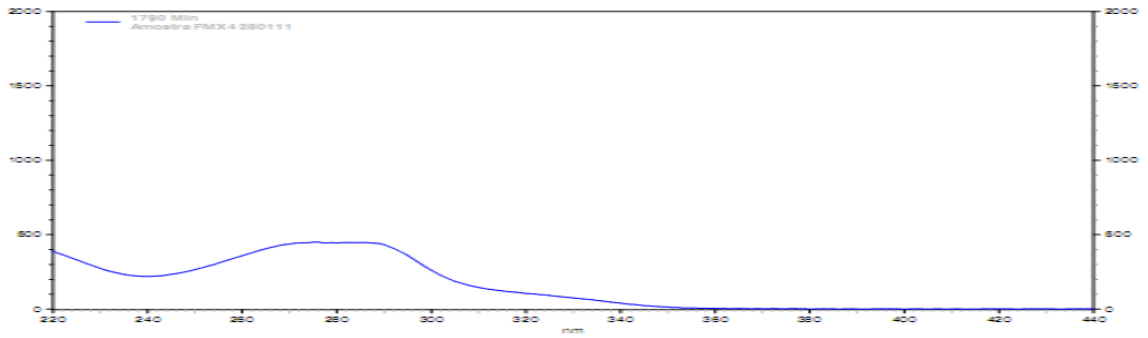
Pico 6 (t_R: 9,40 min)



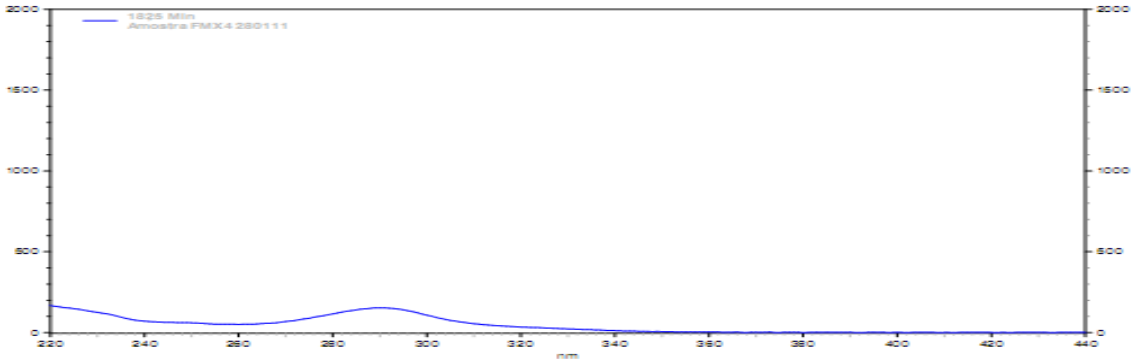
Pico 7 (t_R: 13,21 min)



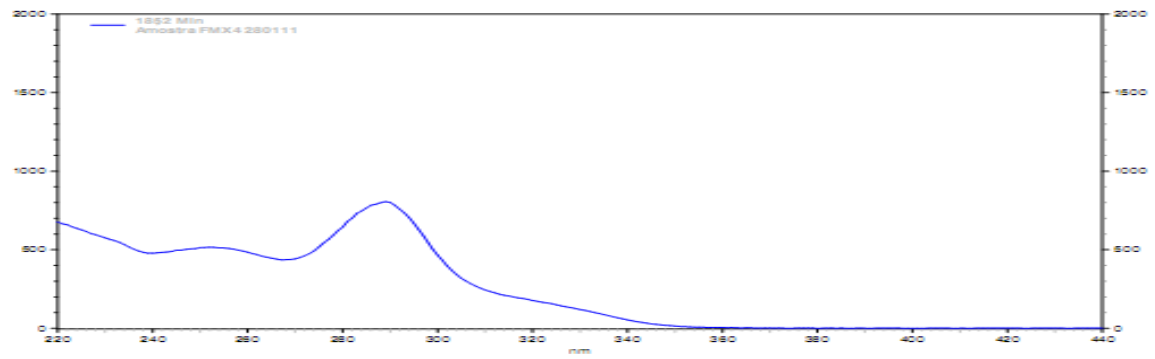
Pico 8 (t_R: 16,79 min)



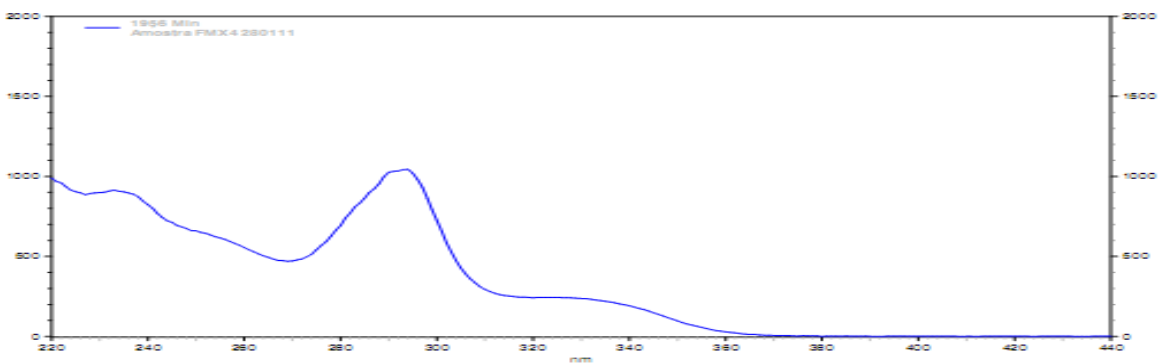
Pico 9 (t_R : 17,51 min)



Pico 10 (t_R : 18,25 min)

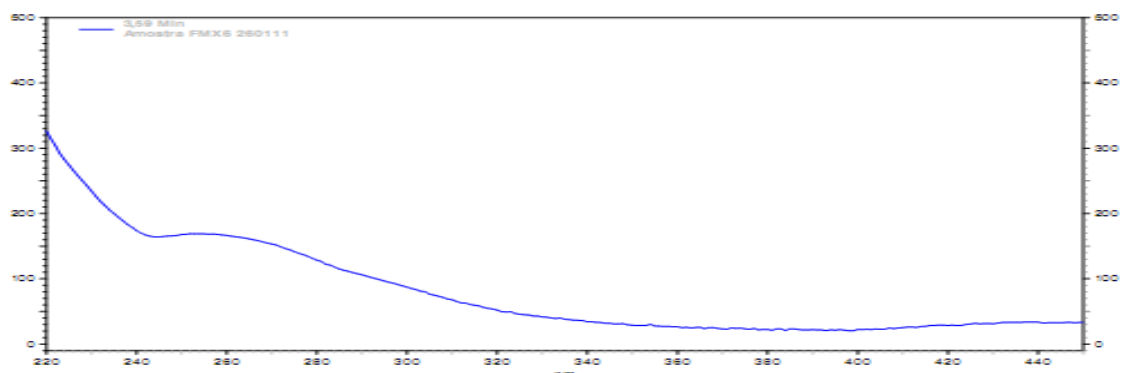


Pico 11 (t_R : 18,52 min)

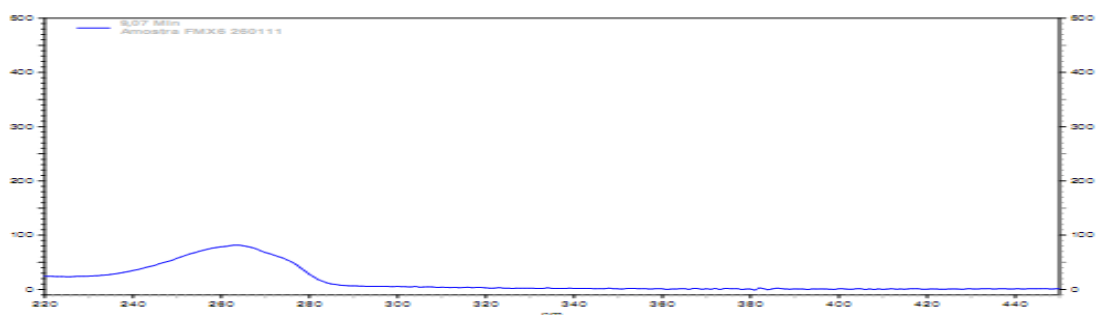


Pico 12 (t_R : 19,21 min)

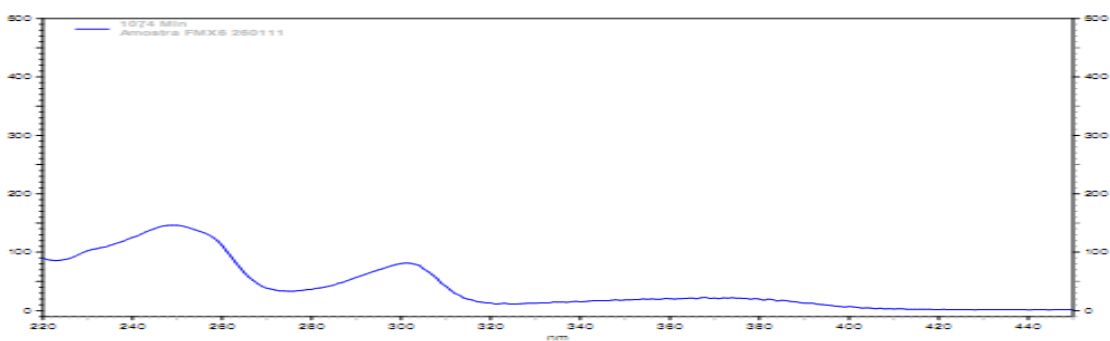
ANEXO O - Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma D do extrato em metanol do meio externo do fungo endofítico FEX4.



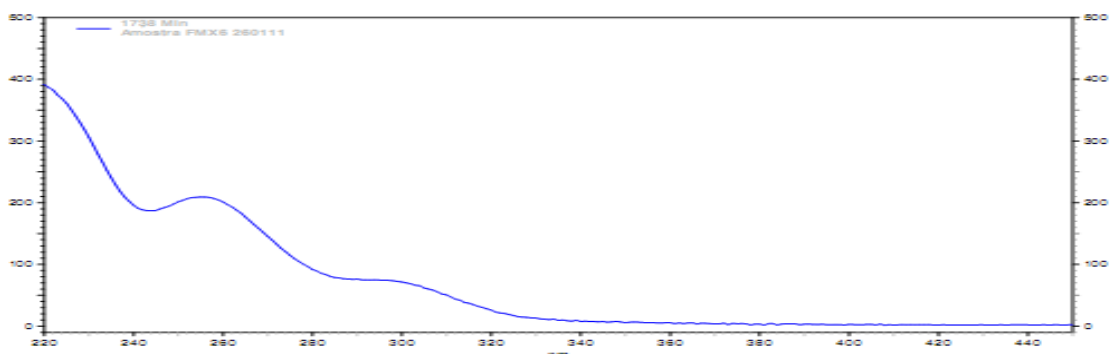
Pico 1 (t_R: 3,59 min)



Pico 2 (t_R: 9,07 min)

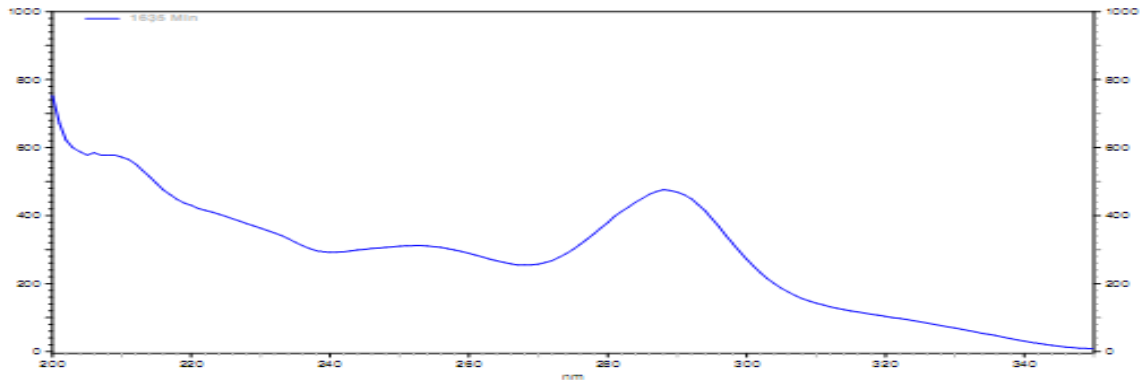


Pico 3 (t_R: 10,74 min)

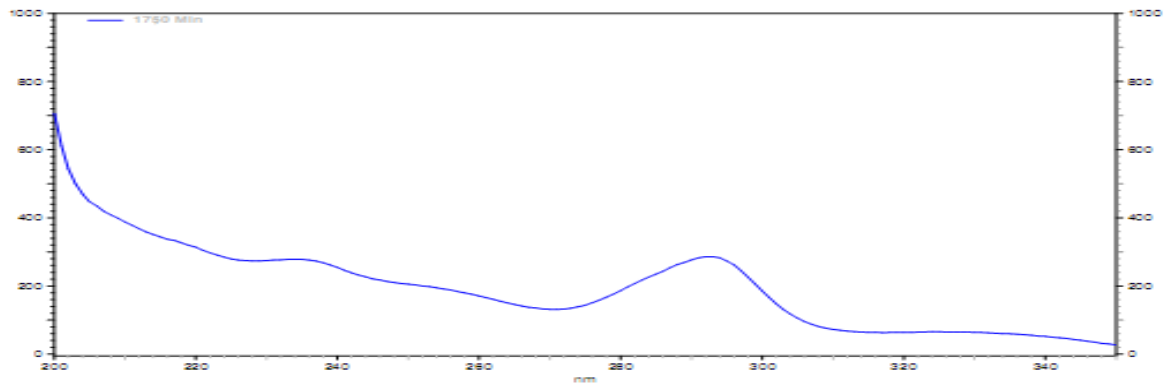


Pico 4 (t_R: 17,38 min)

ANEXO P - Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma E do extrato em acetato de etila do meio externo do fungo endófito FEX6.

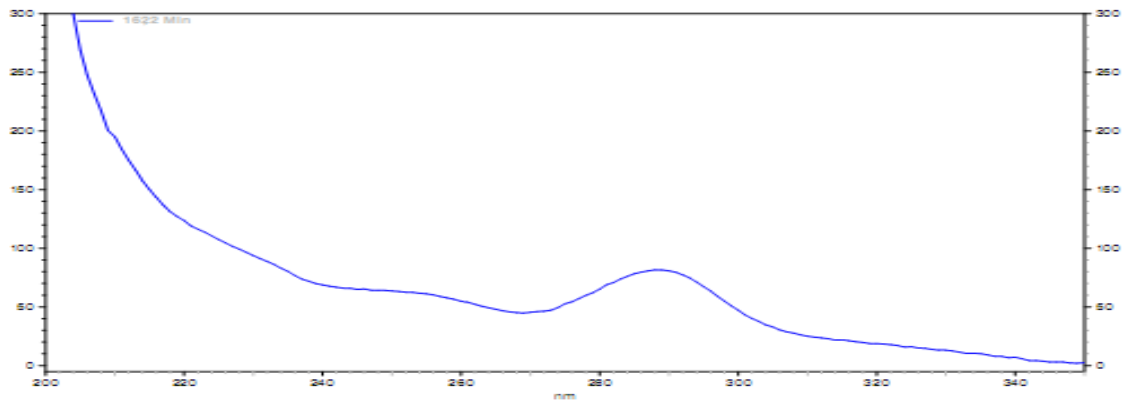


Pico 1 (t_R : 16,35 min)

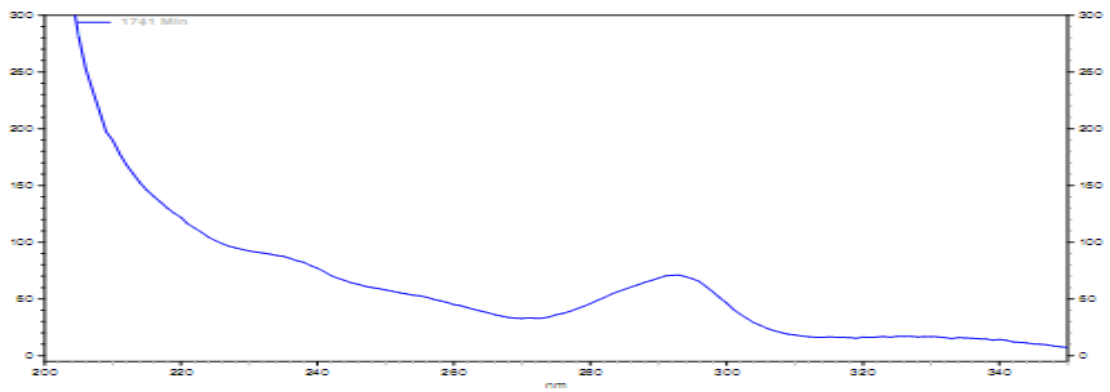


Pico 2 (t_R : 17,50 min)

ANEXO Q - Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A do extrato em acetato de etila do meio externo do fungo endofítico FEX10.

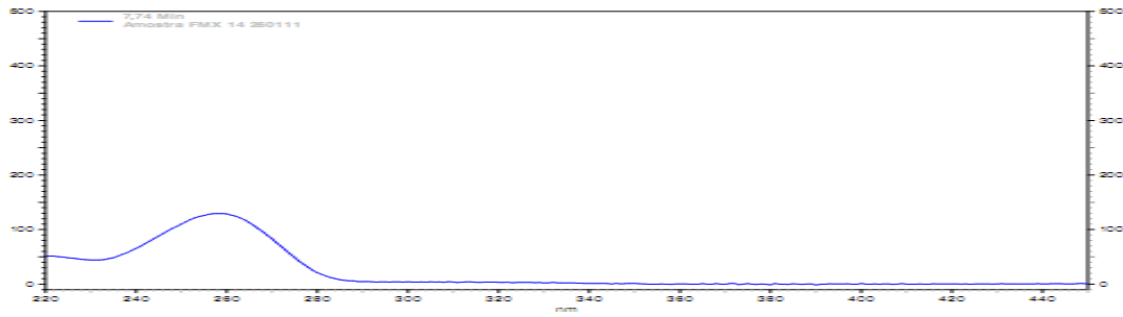


Pico 1 (t_R : 16,29 min)

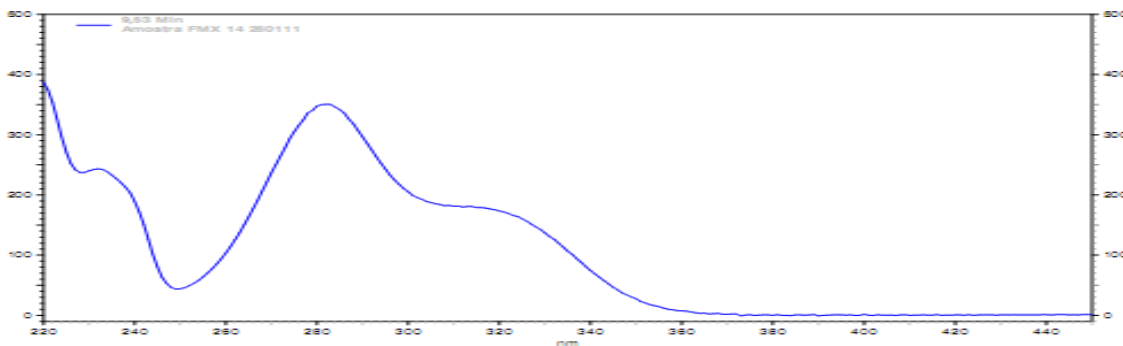


Pico 2 (t_R : 17,41 min)

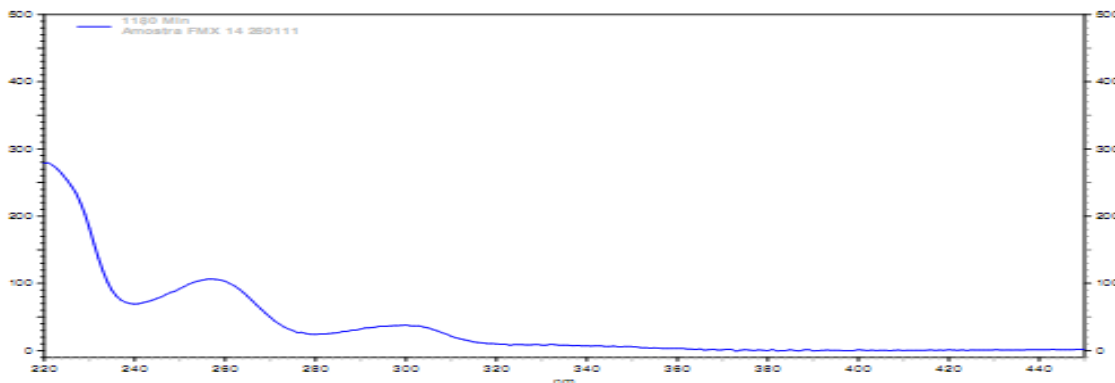
ANEXO R - Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B do extrato em metanol da parte externa do fungo endofítico FEX10.



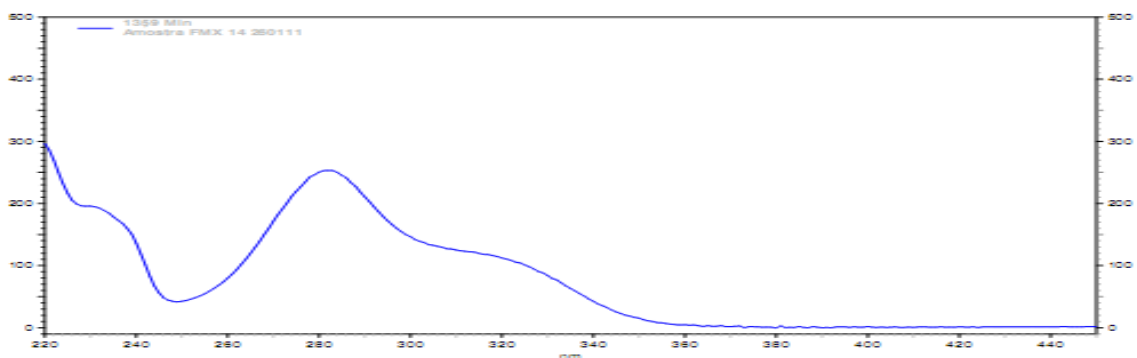
Pico 3 (t_R: 7,74 min)



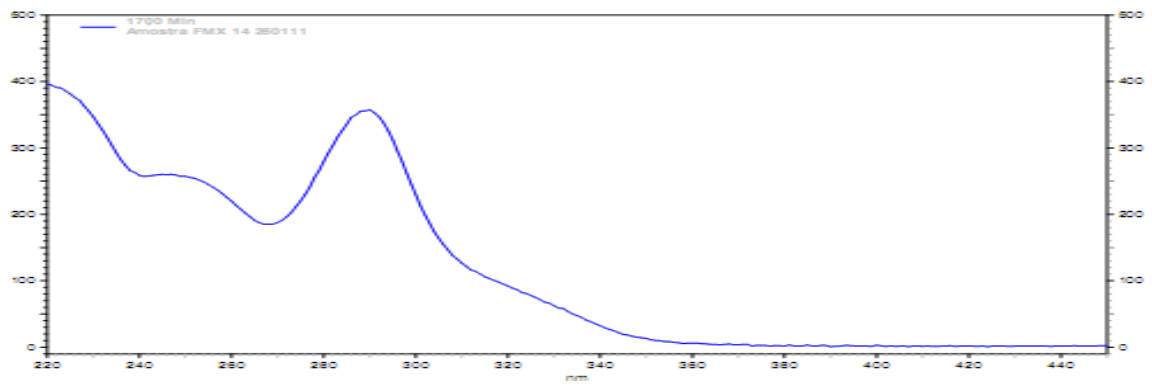
Pico 4 (t_R: 9,53 min)



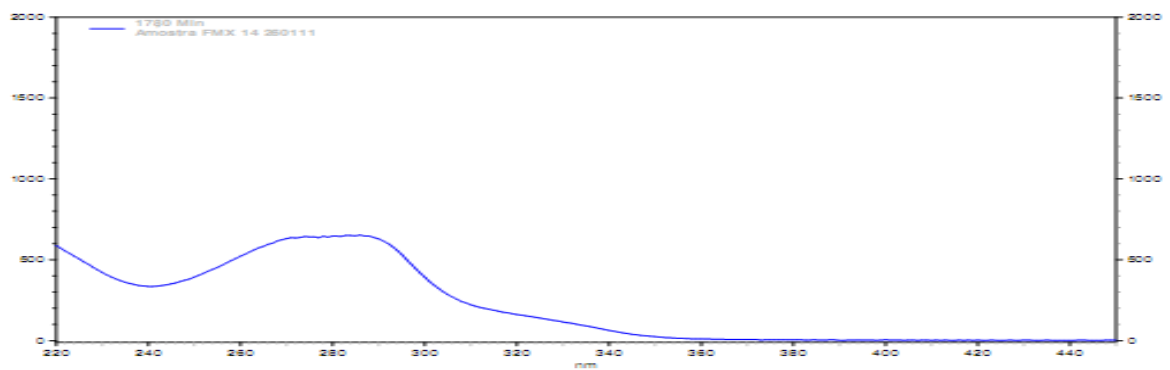
Pico 5 (t_R: 11,80 min)



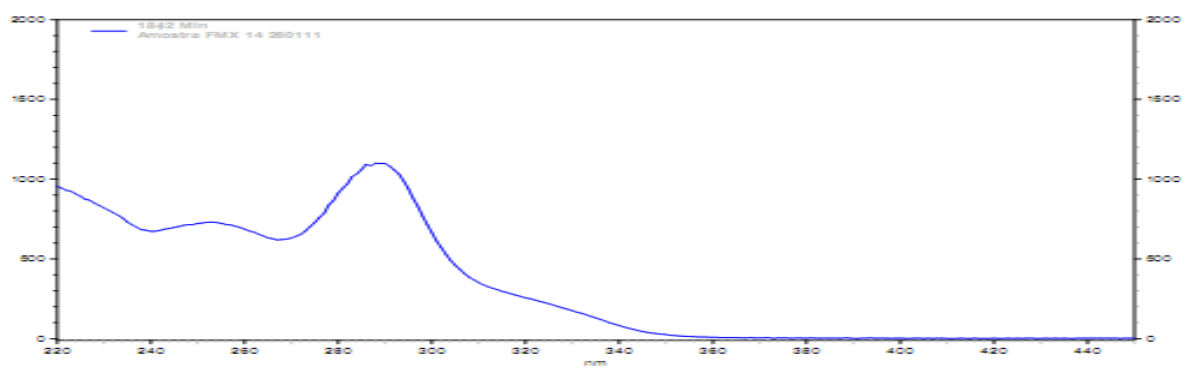
Pico 6 (t_R: 13,59 min)



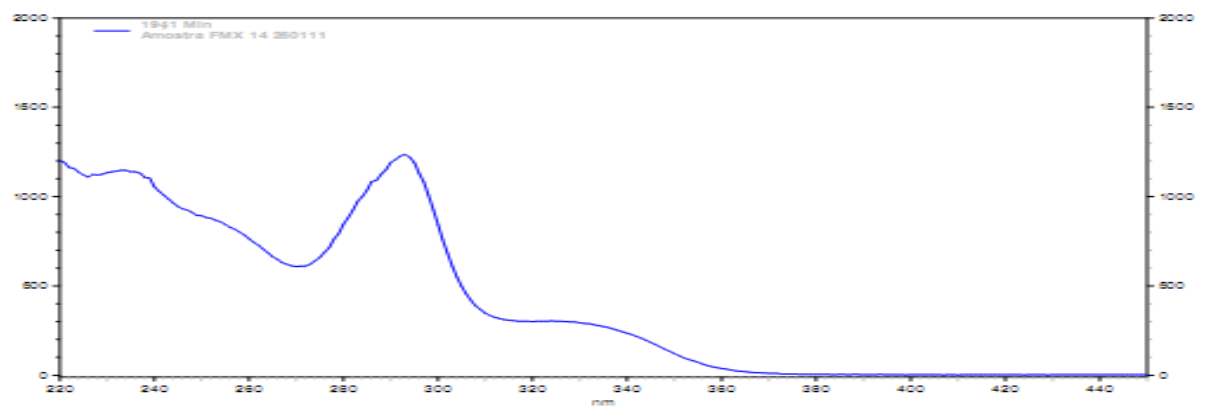
Pico 7 (t_R : 17,00 min)



Pico 8 (t_R : 17,80 min)

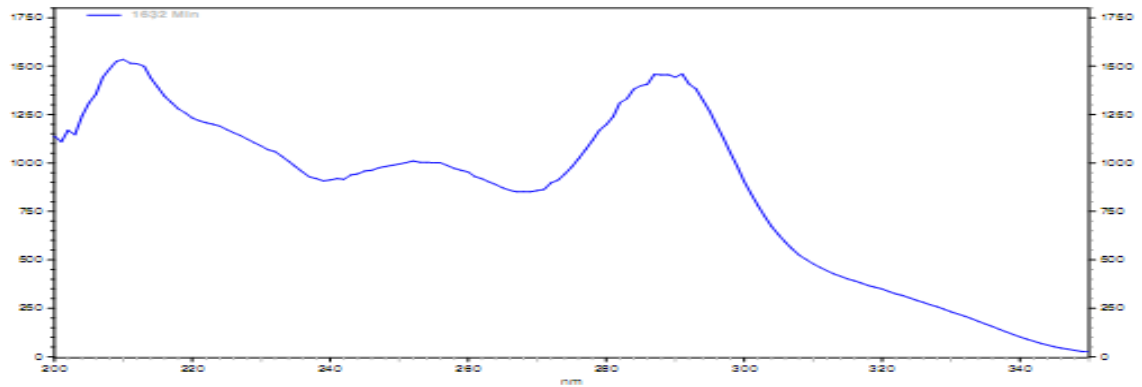


Pico 9 (t_R : 18,42 min)

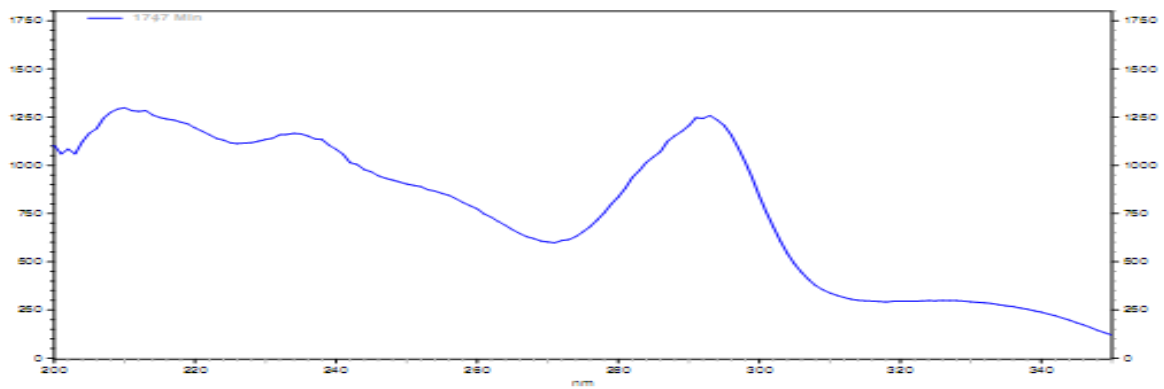


Pico 10 (t_R : 19,41 min)

Anexo S: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma C do extrato em acetato de etila da parte externa do fungo endofítico FEX12.

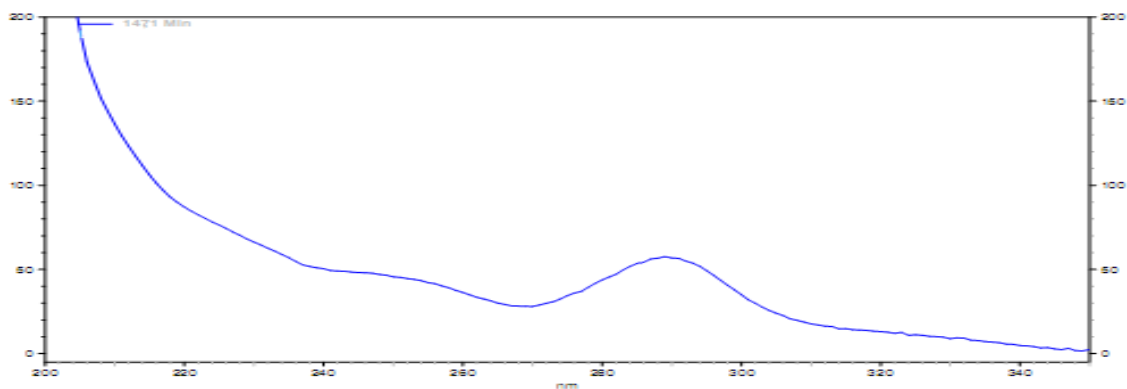


Pico 1 (t_R : 16,32 min)

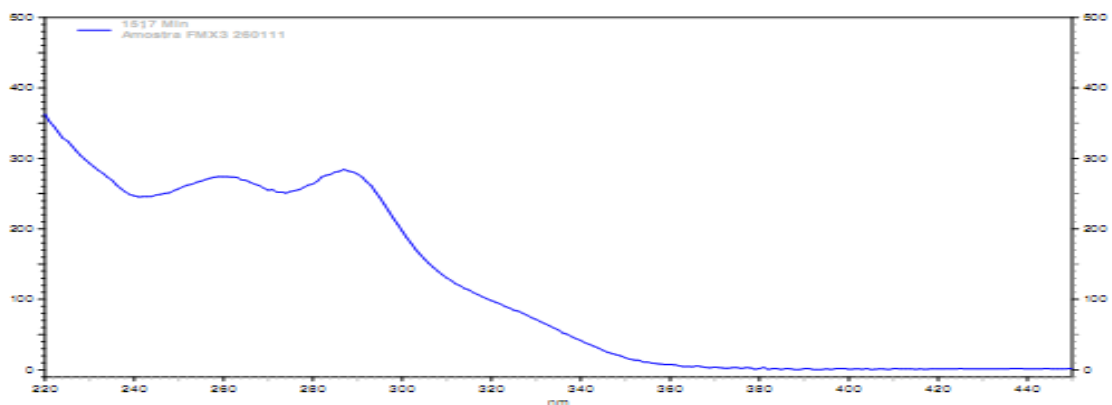


Pico 2 (t_R : 17,47 min)

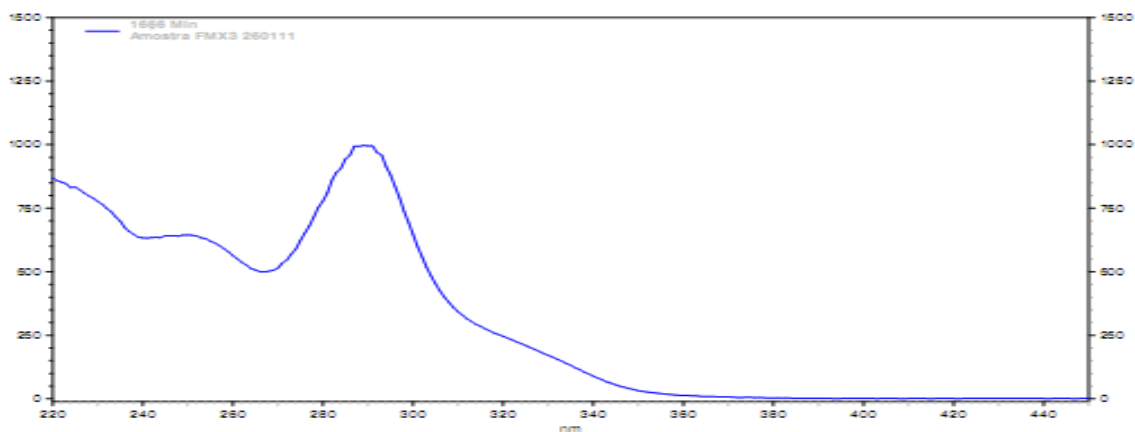
Anexo T: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma D do extrato em metanol do fungo endófito FEX12.



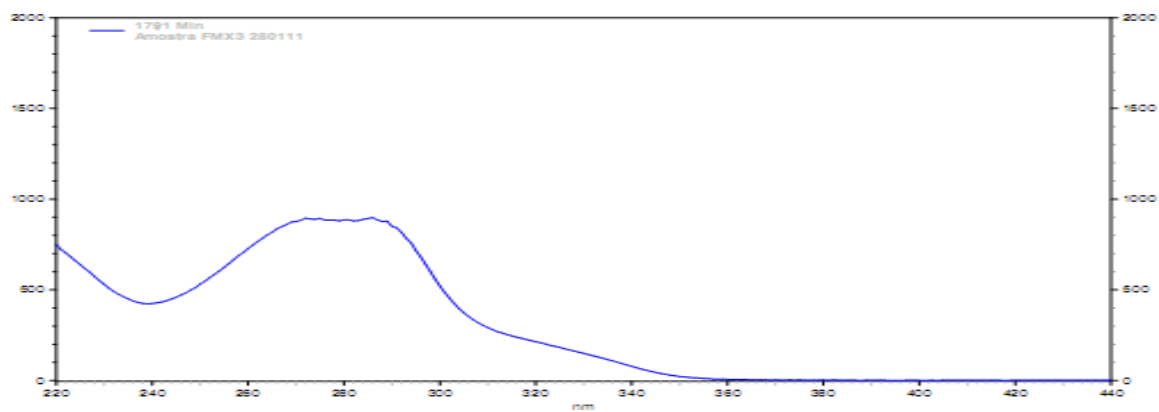
Pico 3 (t_R: 14,71 min)



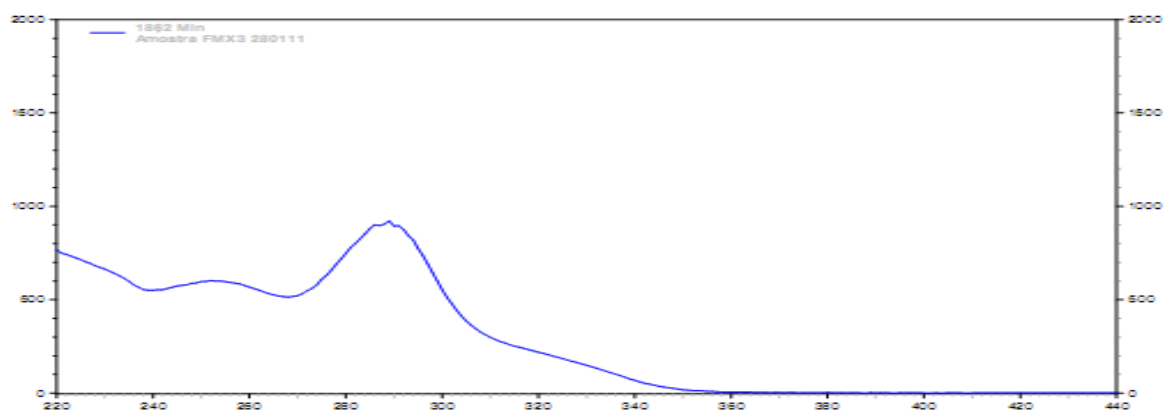
Pico 4 (t_R: 15,17 min)



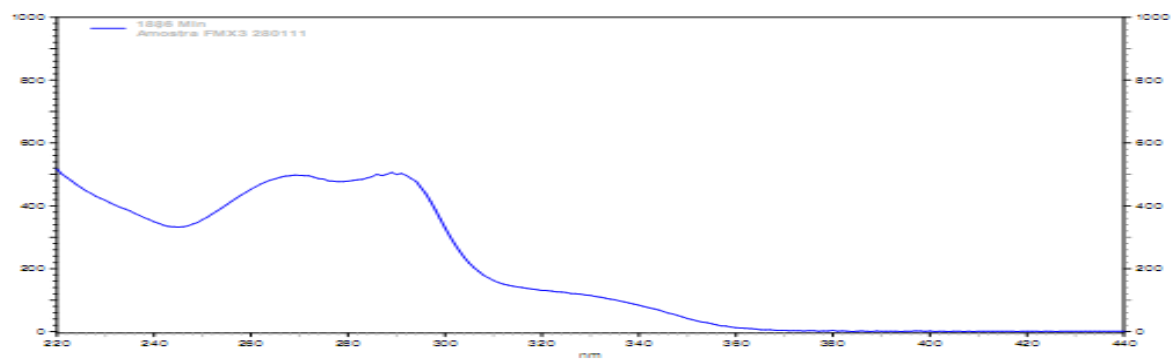
Pico 5 (t_R: 16,66 min)



Pico 6 (t_R : 17,51 min)

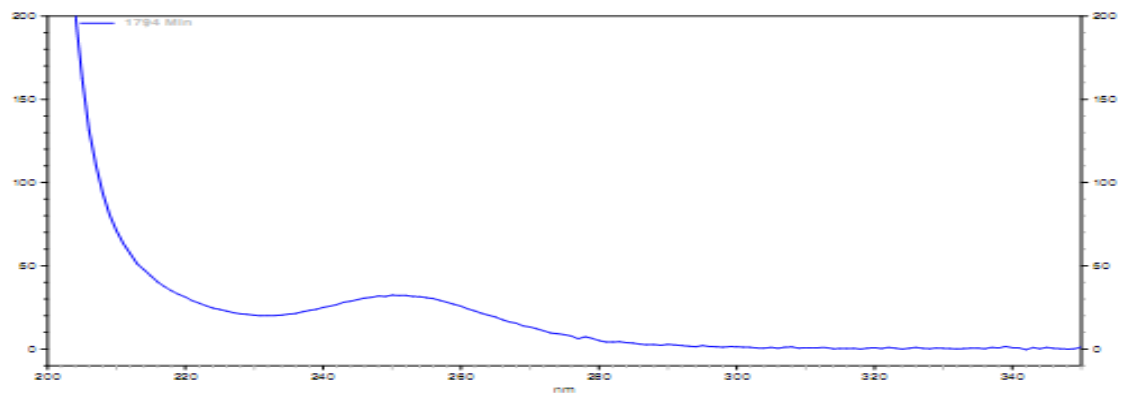


Pico 7 (t_R : 18,52 min)



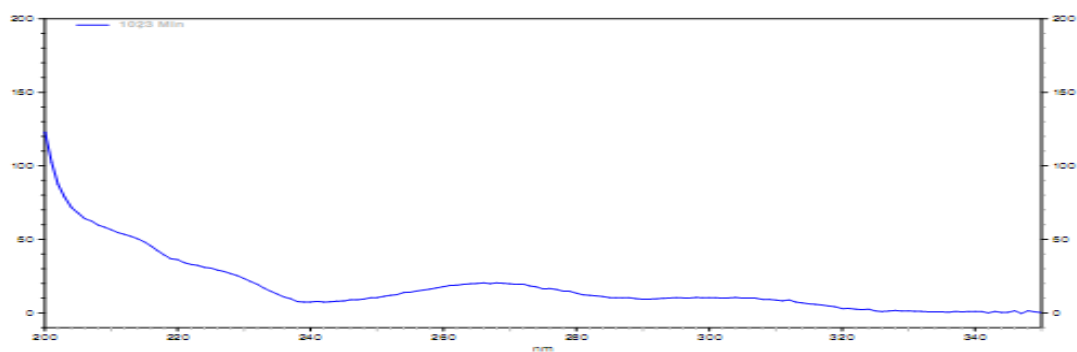
Pico 8 (t_R : 18,86 min)

Anexo U: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma E do extrato em acetato de etila do fungo endofítico FEX14.

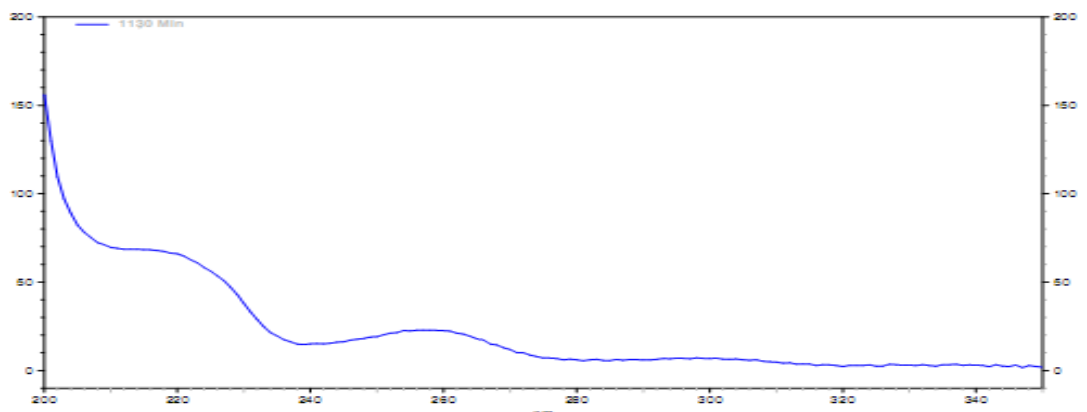


Pico 1 (t_R : 17,94 min)

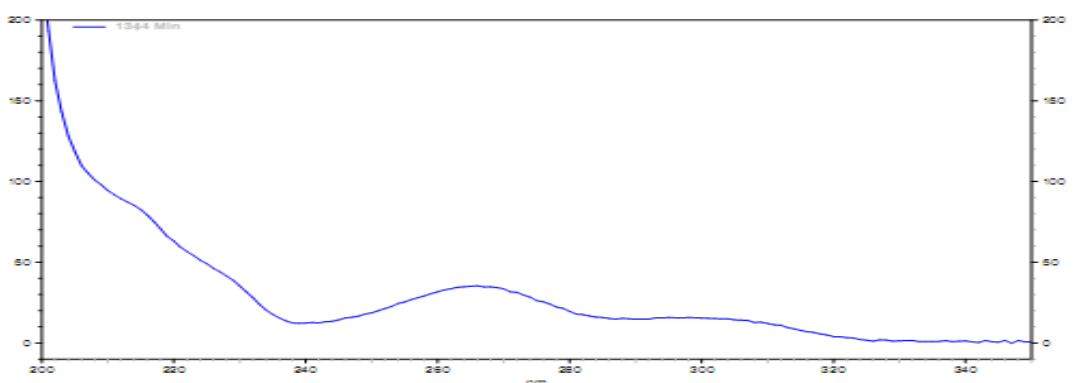
Anexo V: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A do extrato em acetato de etila da parte externa do fungo endofítico FEX15.



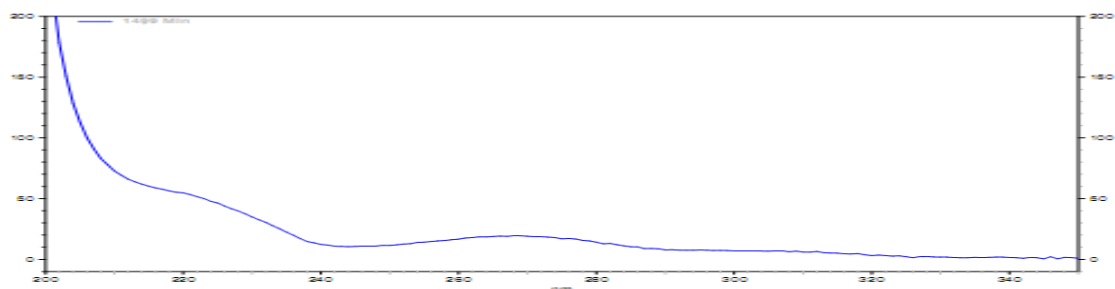
Pico 1 (t_R : 10,23 min)



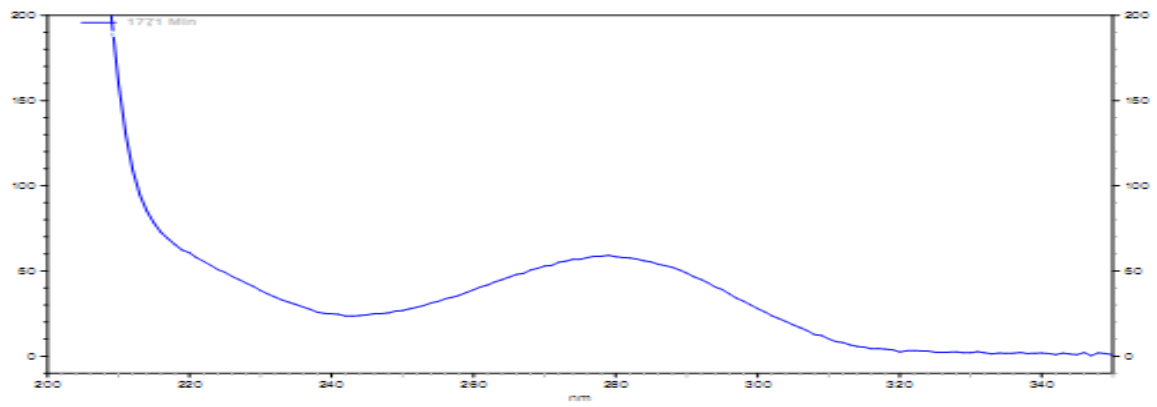
Pico 2 (t_R : 11,30 min)



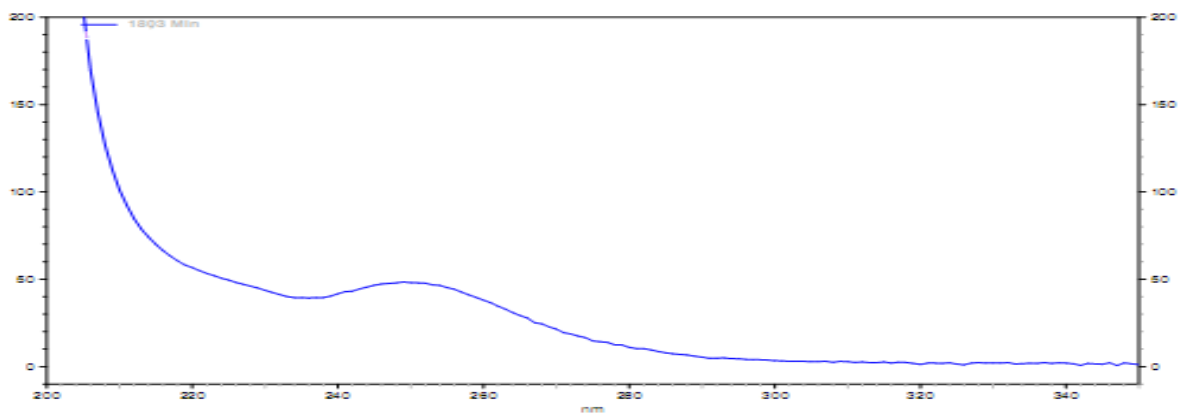
Pico 3 (t_R : 13,44 min)



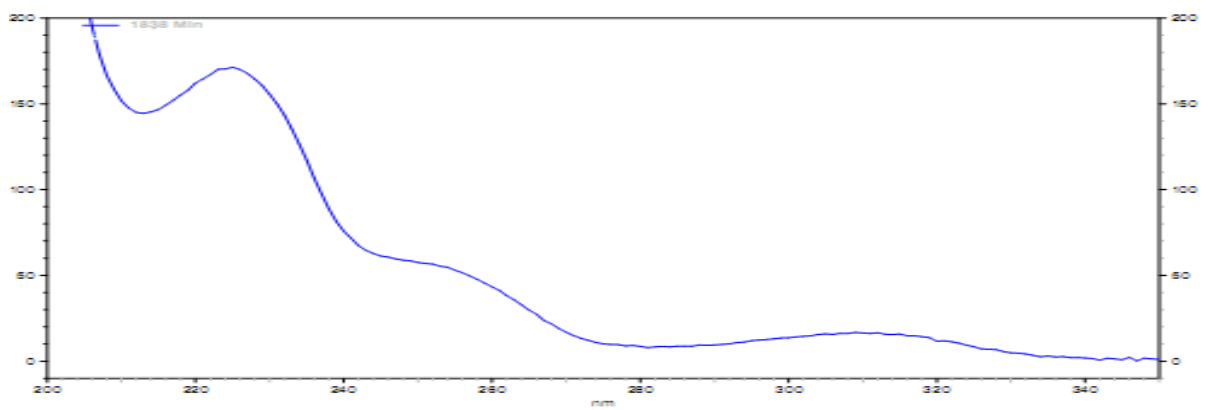
Pico 4 (t_R : 14,99 min)



Pico 5 (t_R: 17,71 min)

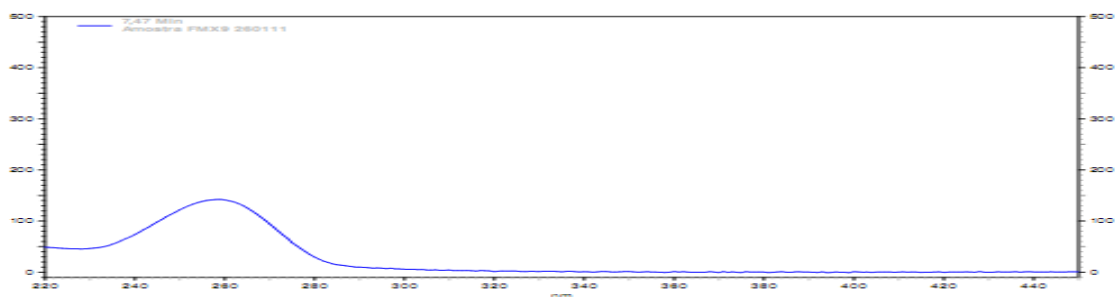


Pico 6 (t_R: 18,03 min)

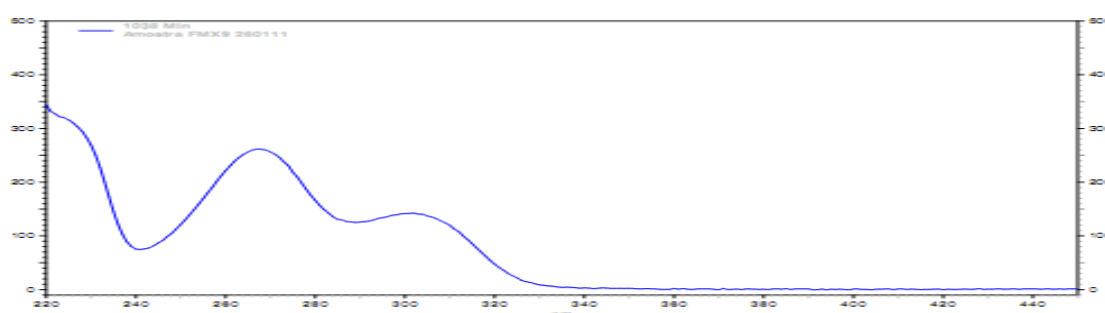


Pico 7 (t_R: 18,38 min)

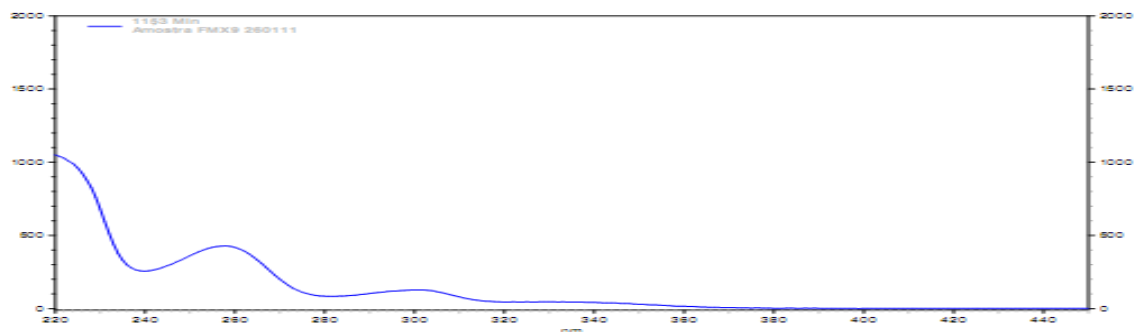
Anexo X: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B do extrato em metanol do fungo endófito FEX15.



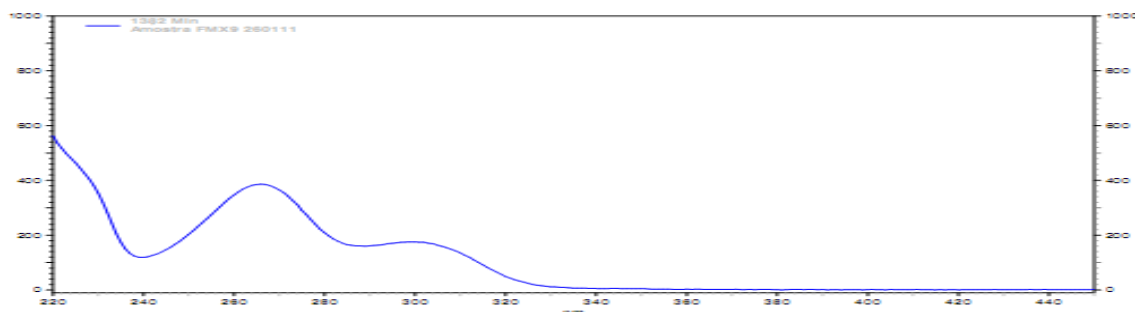
Pico 8 (t_R: 7,47 min)



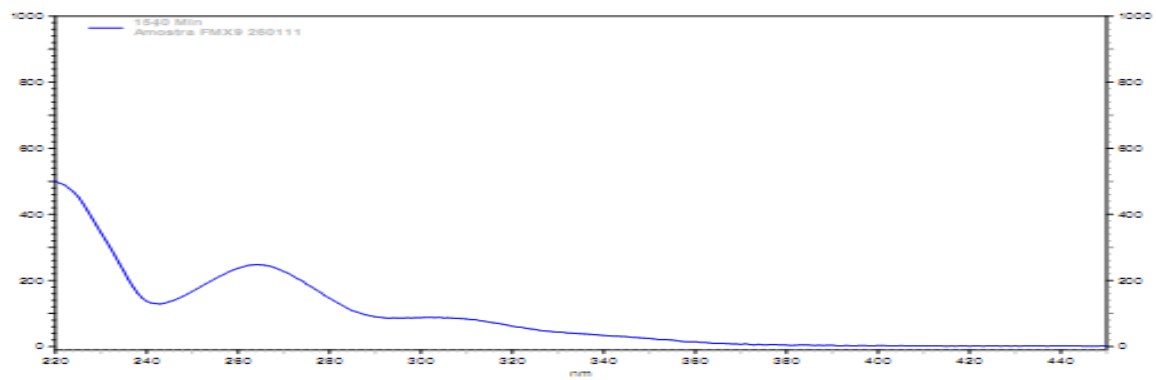
Pico 9 (t_R: 10,38 min)



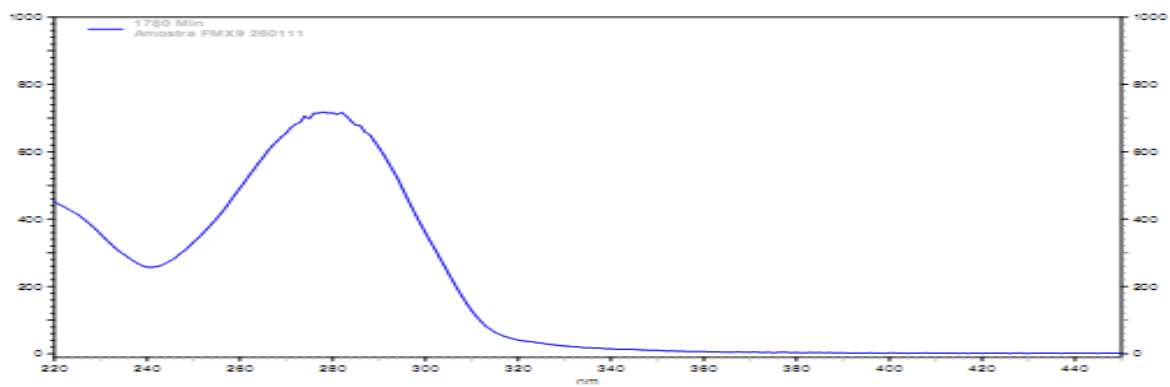
Pico 10 (t_R: 11,53 min)



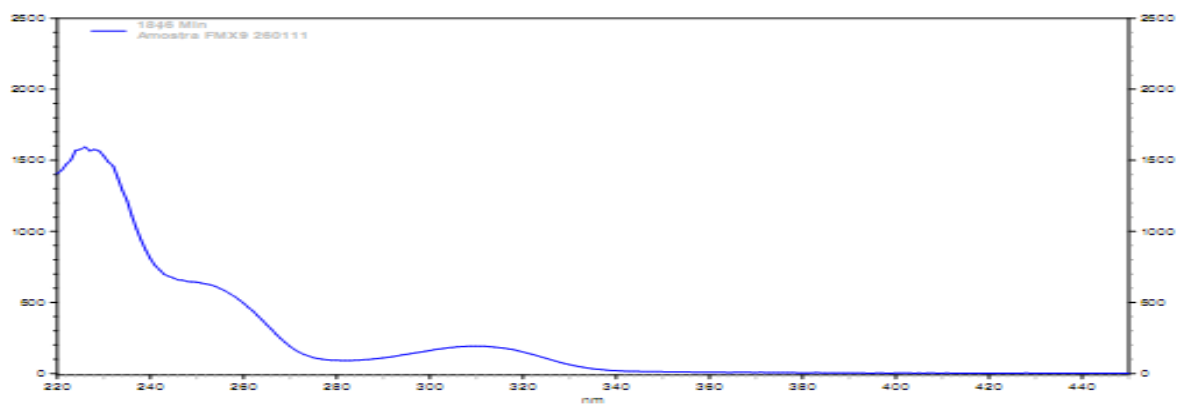
Pico 11 (t_R: 13,82 min)



Pico 12 (t_R: 15,40 min)

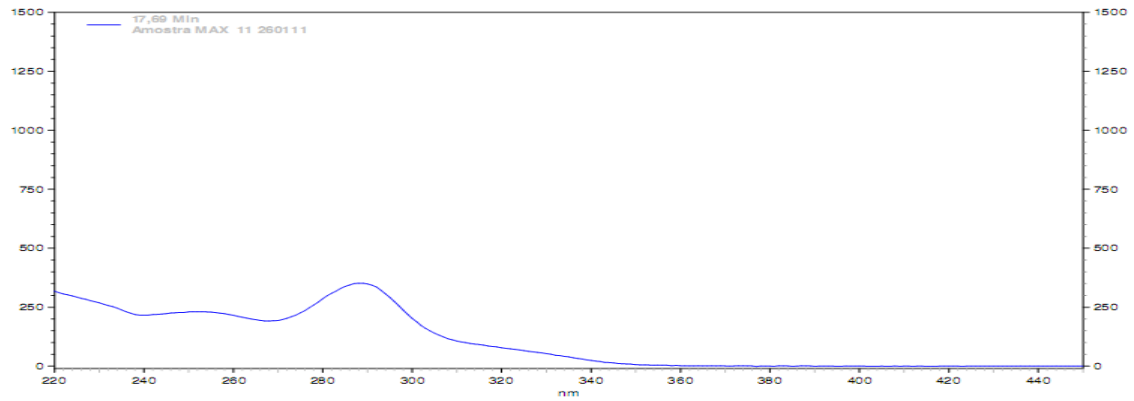


Pico 13 (t_R: 17,80 min)

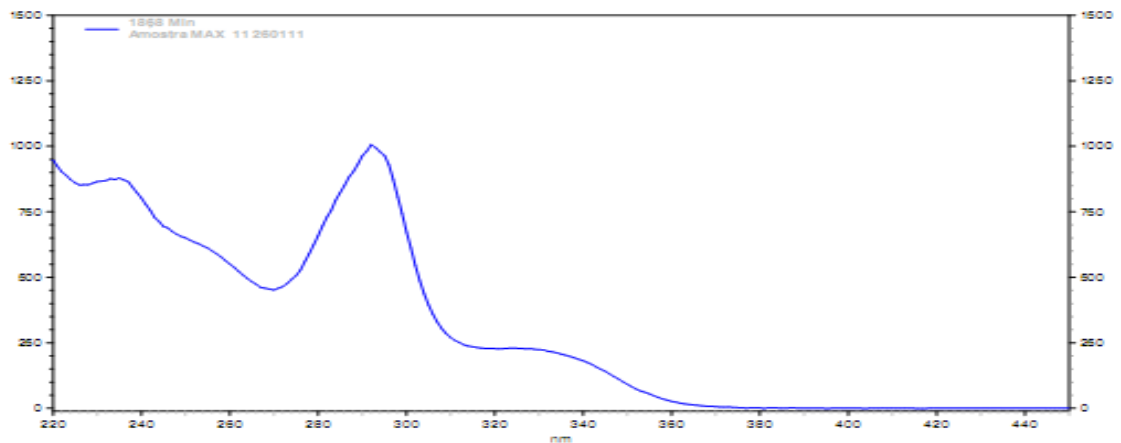


Pico 14 (t_R: 18,46 min)

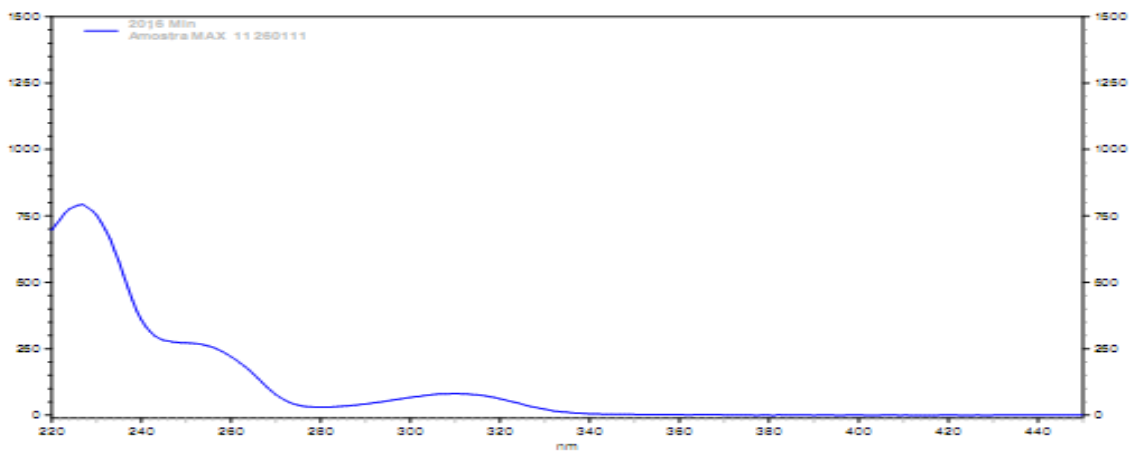
Anexo Z: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A dos extratos em acetato de etila do micélio dos fungos endofíticos *Nodulisporium* sp. (Espécie 1)



Pico 1 (t_R: 17,69 min)

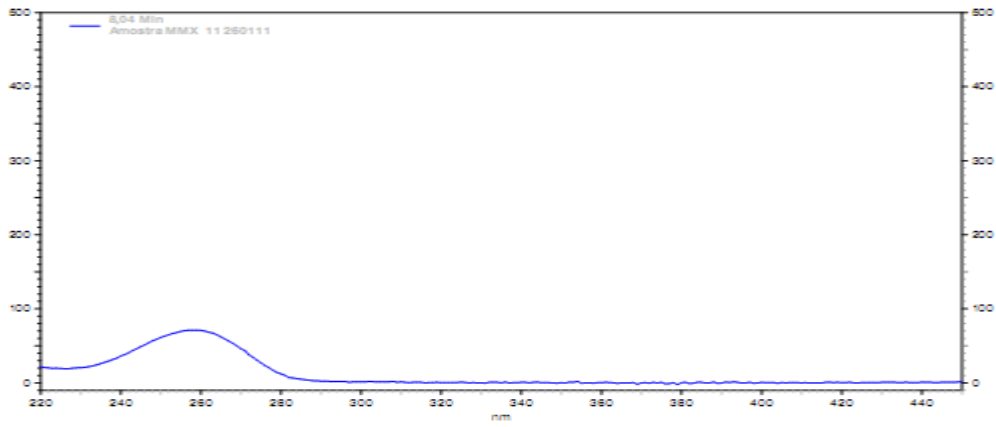


Pico 2 (t_R: 18,68 min)

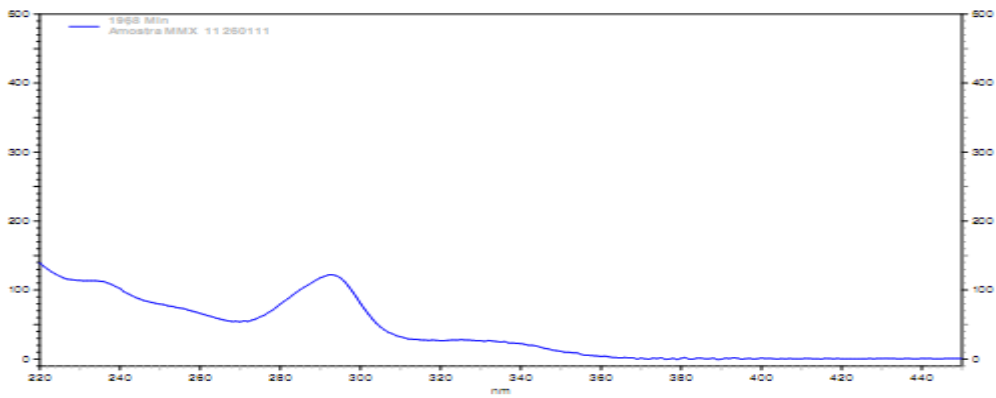


Pico 3 (t_R: 20,16 min)

Anexo Aa: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B dos extratos em metanol do micélio dos fungos endofíticos *Nodulisporium* sp. (Espécie 1)

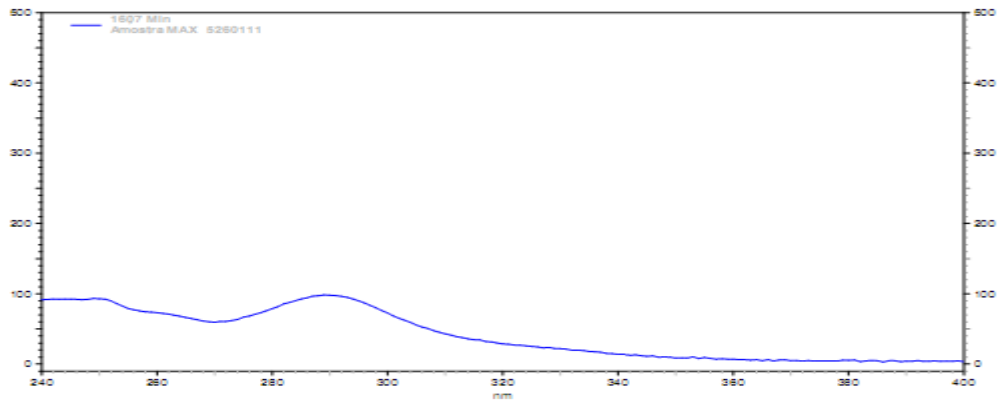


Pico 4 (t_R : 8,04 min)

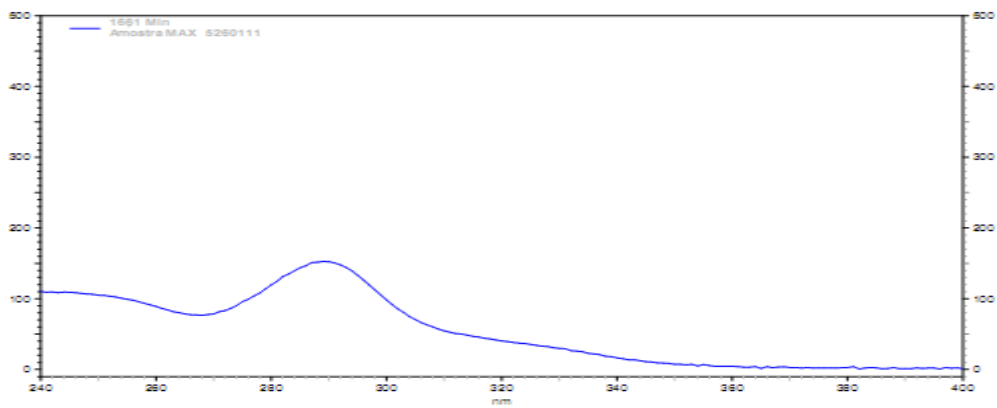


Pico 5 (t_R : 19,68 min)

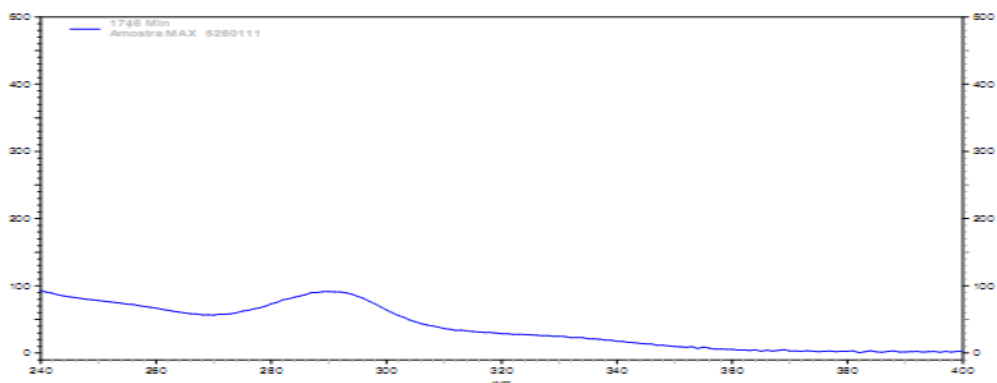
Anexo Ab: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma C dos extratos em acetato de etila do micélio dos fungos endofíticos *Nodulisporium* sp. (Espécie 2)



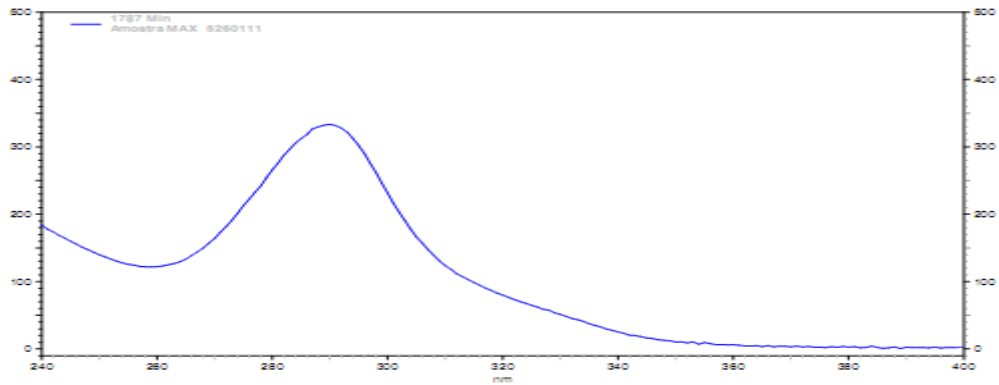
Pico 6 (t_R: 16,07 min)



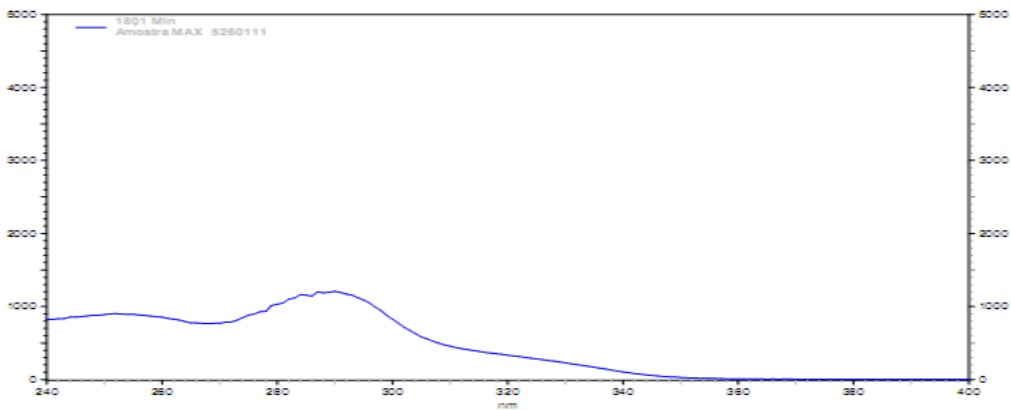
Pico 7 (t_R: 16,61 min)



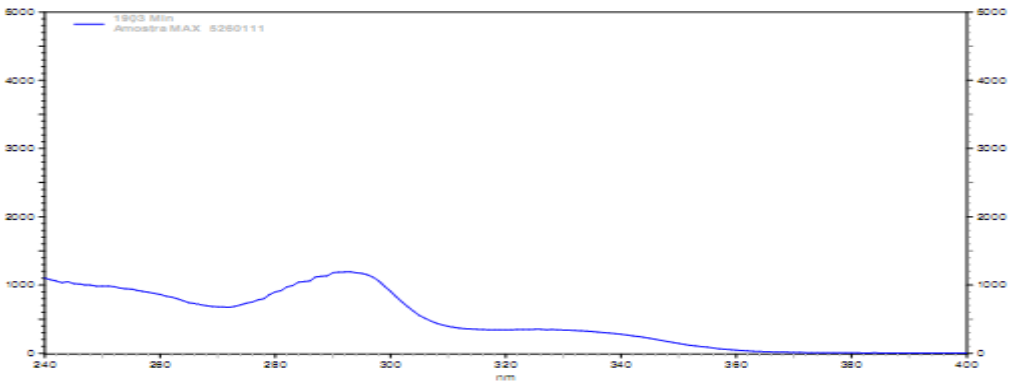
Pico 8 (t_R: 17,46 min)



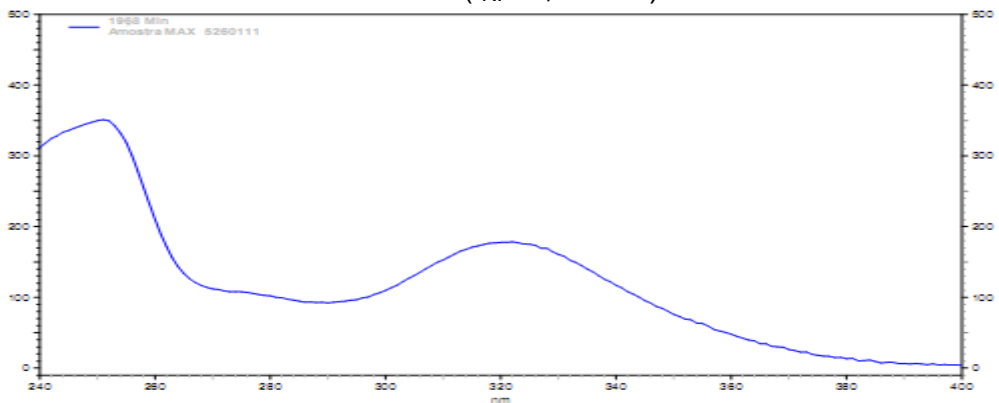
Pico 9 (t_R: 17,87 min)



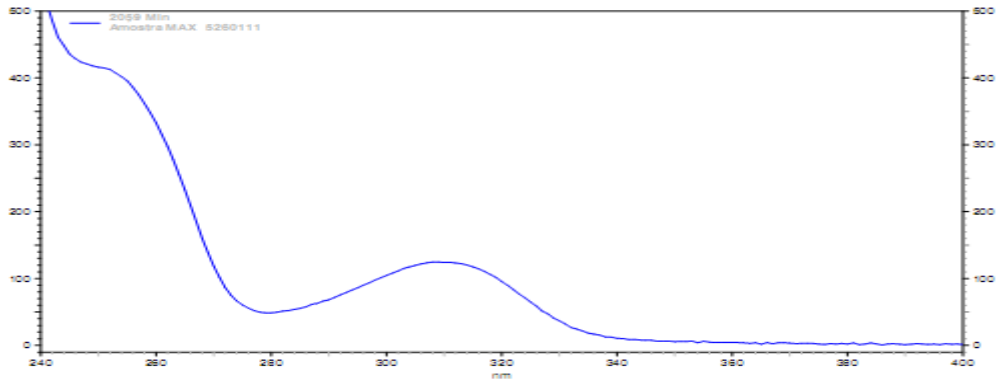
Pico 10 (t_R: 18,01 min)



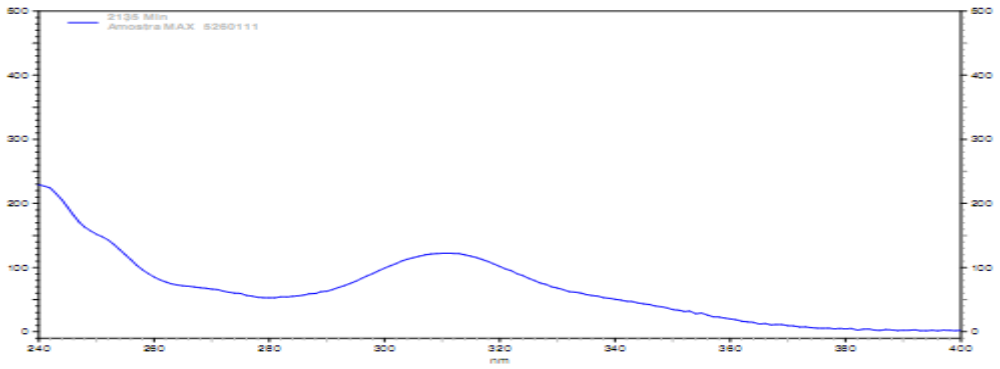
Pico 11 (t_R: 19,03 min)



Pico 12 (t_R: 19,68 min)

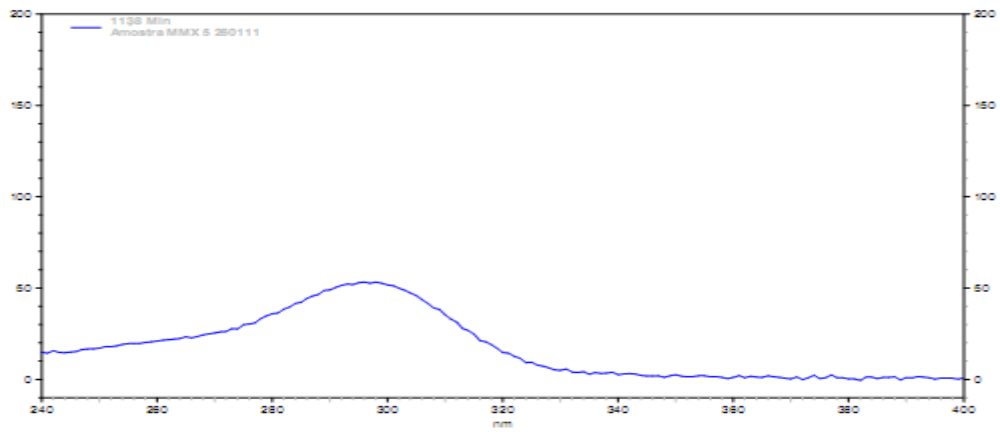


Pico 13 (t_R: 20,59 min)

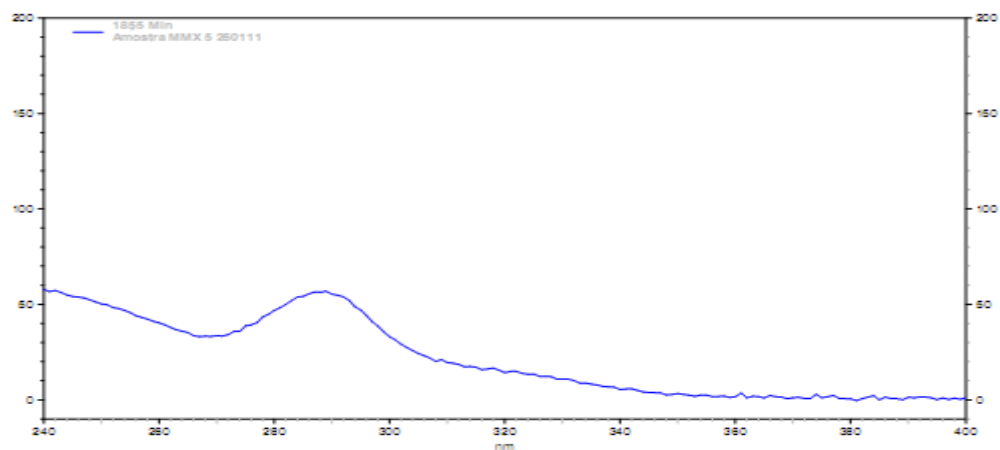


Pico 14 (t_R: 21,35 min)

Anexo Ac: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma D dos extratos em metanol do micélio dos fungos endofíticos *Nodulisporium* sp. (Espécie 2)

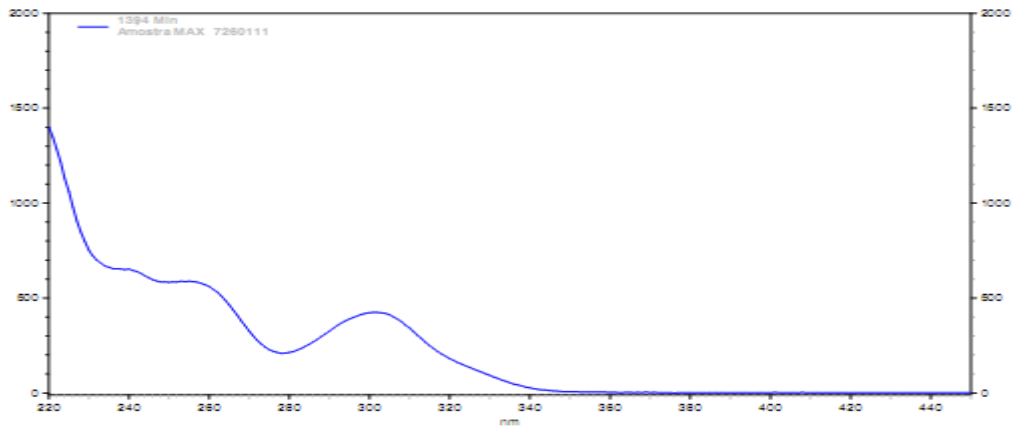


Pico 15 (t_R : 11,38 min)



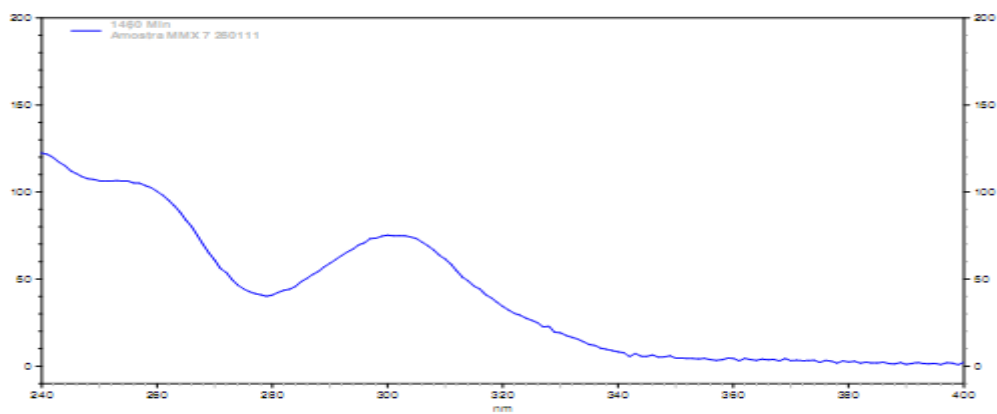
Pico 16 (t_R : 18,55 min)

Anexo Ad: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma E dos extratos em acetato de etila do micélio dos fungos endofíticos *Nodulisporium* sp. (Espécie 3)



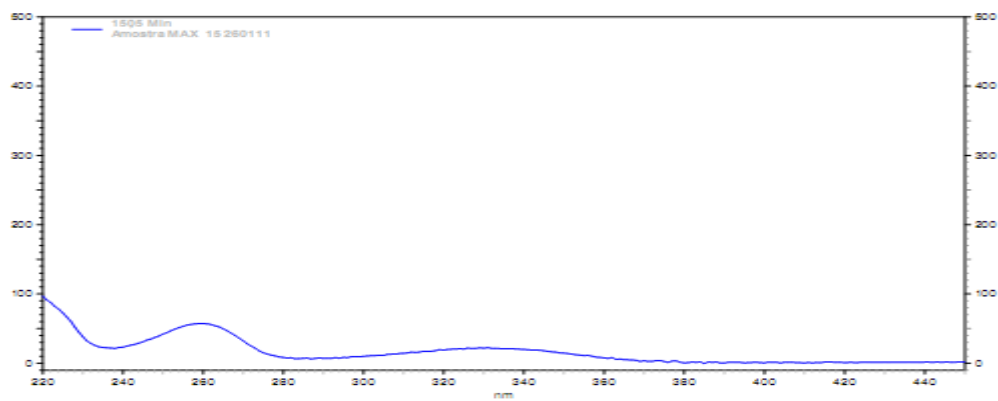
Pico 17 (t_R : 13,94 min)

Anexo Ae: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma F dos extratos em metanol do micélio dos fungos endofíticos *Nodulisporium* sp. (Espécie 3)

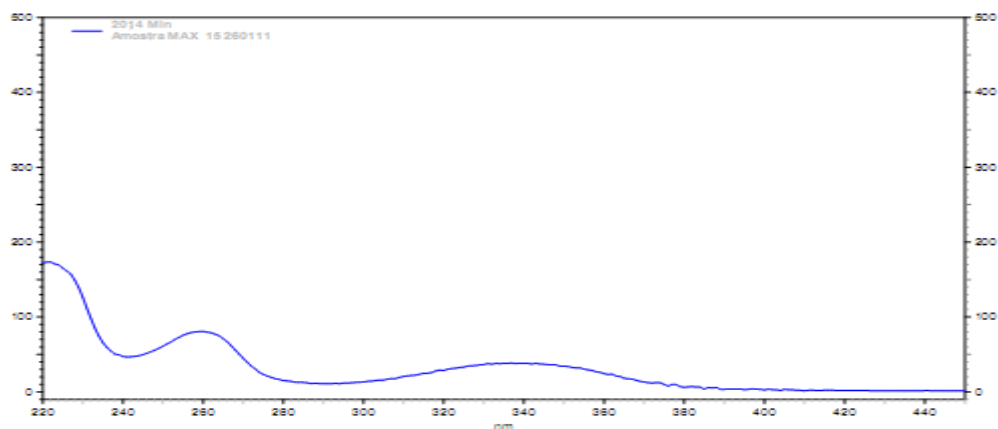


Pico 18 (t_R : 14,60 min)

Anexo Af: Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas A dos extratos em acetato de etila do micélio dos fungos endofíticos *Hypoxylon* sp. (Espécie 1)

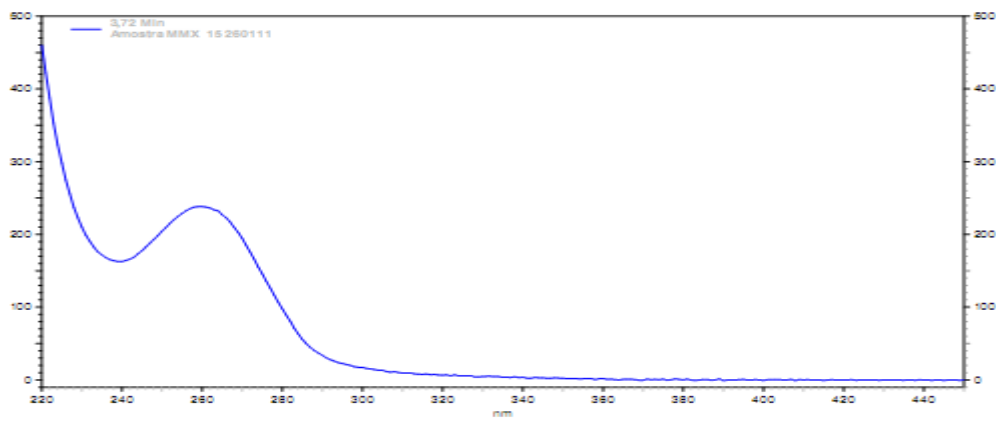


Pico 1 (t_R : 15,05 min)

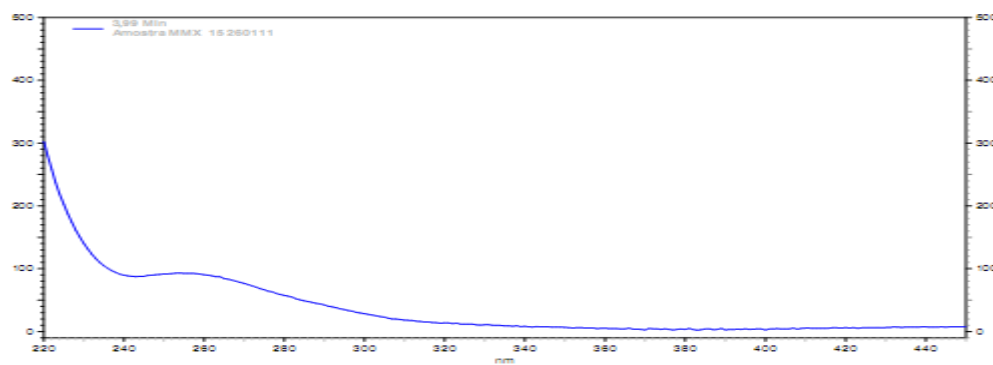


Pico 2 (t_R : 20,14 min)

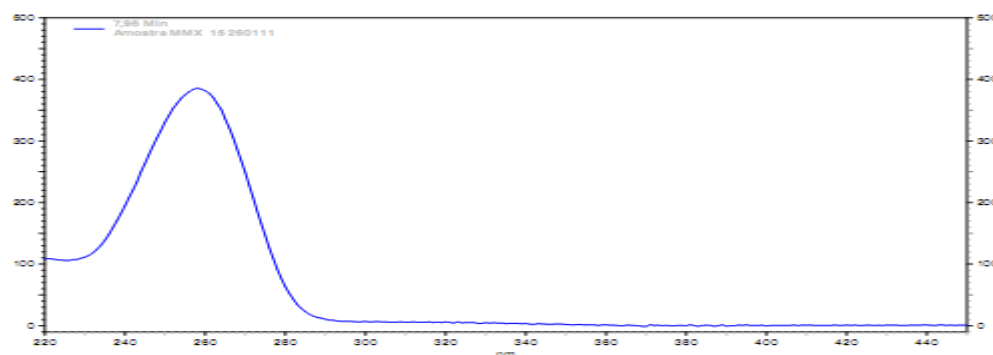
Anexo Ag: Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas B dos extratos em metanol do micélio dos fungos endofíticos *Hypoxylon* sp. (Espécie 1)



Pico 3 (t_R: 3,72 min)

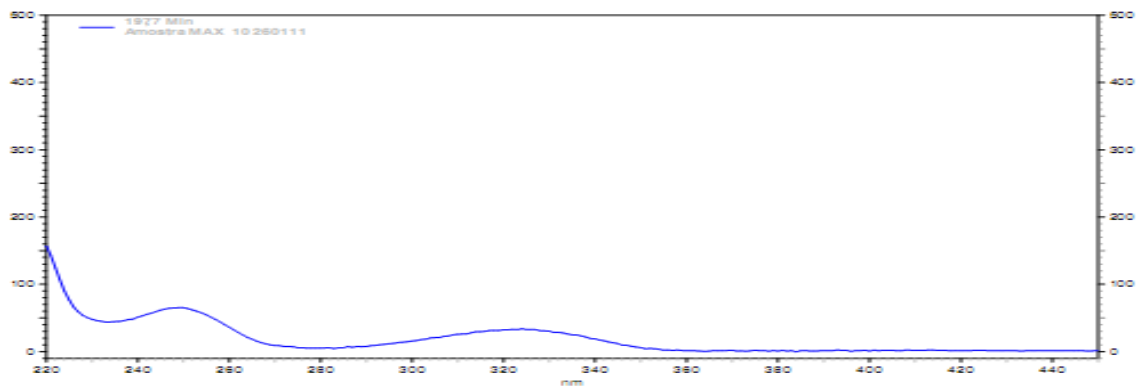


Pico 4 (t_R: 3,99 min)



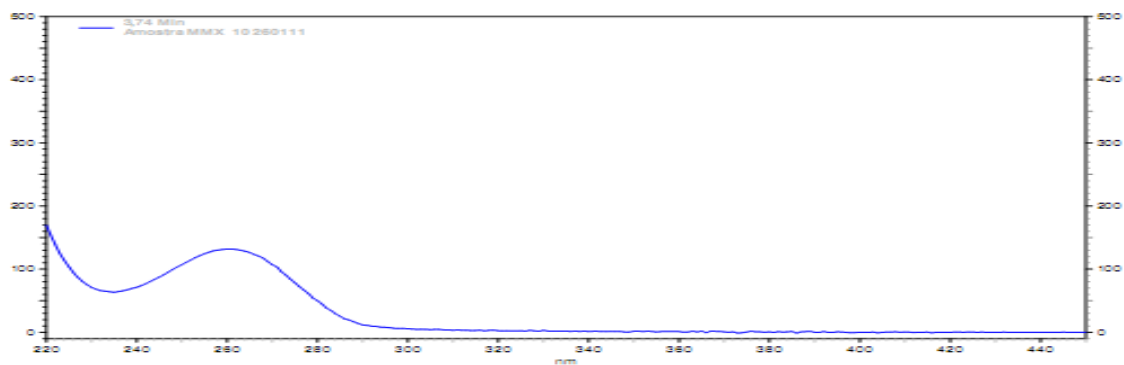
Pico 5 (t_R: 7,96 min)

Anexo Ah: Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas C dos extratos em acetato de etila do micélio dos fungos endofíticos *Hypoxylon* sp. (Espécie 2)

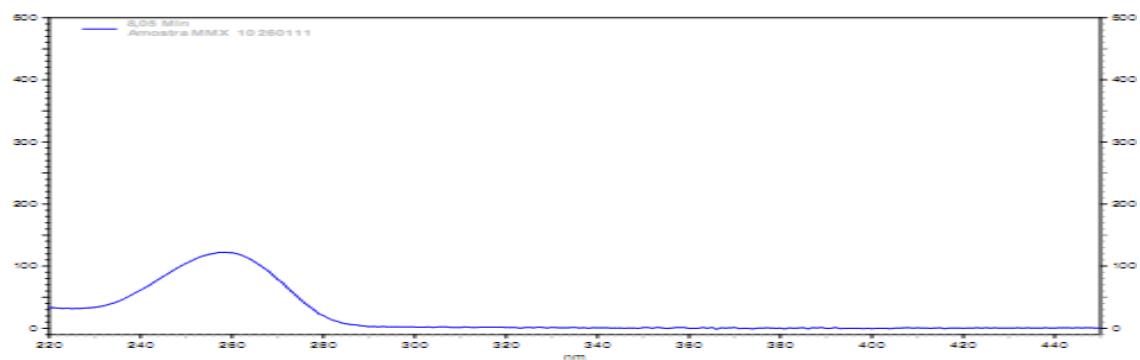


Pico 6 (t_R : 19,77 min)

Anexo Ai: Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas D dos extratos em metanol do micélio dos fungos endofíticos *Hypoxylon* sp. (Espécie 2)

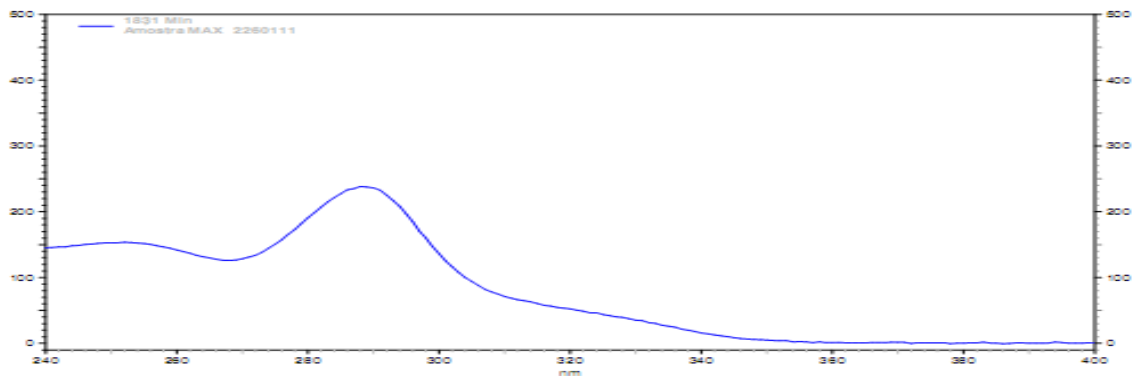


Pico 7 (t_R : 3,74 min)

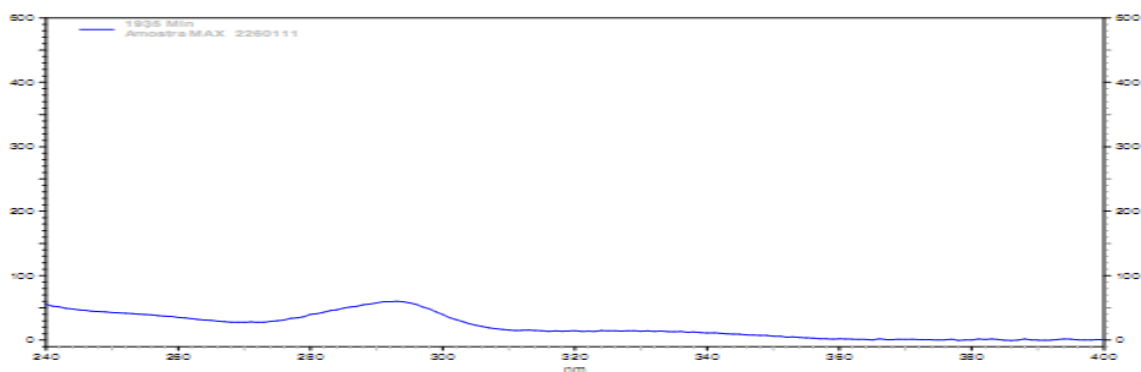


Pico 8 (t_R : 8,05 min)

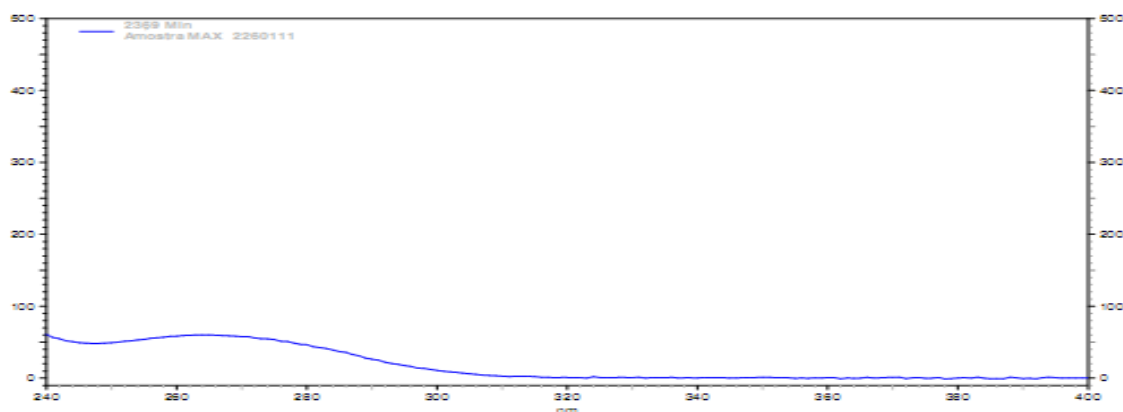
Anexo Aj: Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas E dos extratos em acetato de etila do micélio dos fungos endofíticos *Hypoxylon* sp. (Espécie 3)



Pico 9 (t_R: 18,31 min)

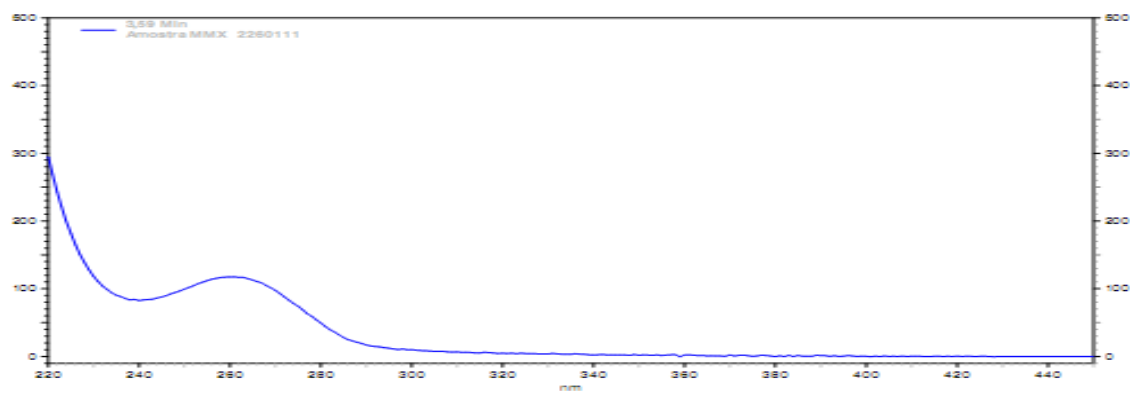


Pico 10 (t_R: 19,35 min)

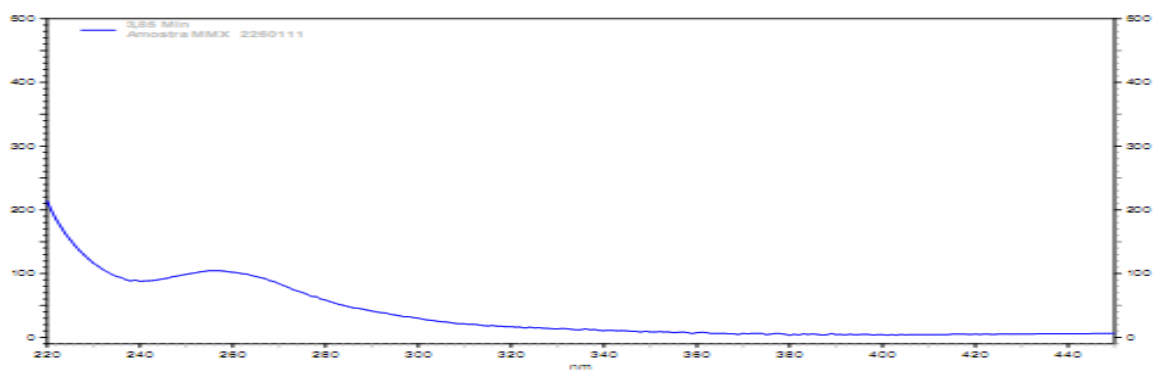


Pico 11 (t_R: 23,69 min)

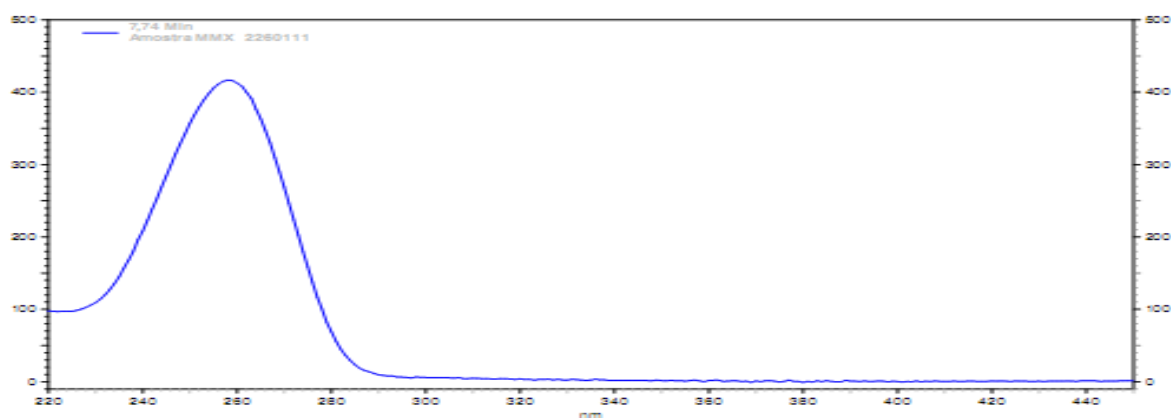
Anexo Ak: Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas F dos extratos em metanol do micélio dos fungos endofíticos *Hypoxylon* sp. (Espécie 3)



Pico 12 (t_R : 3,59 min)

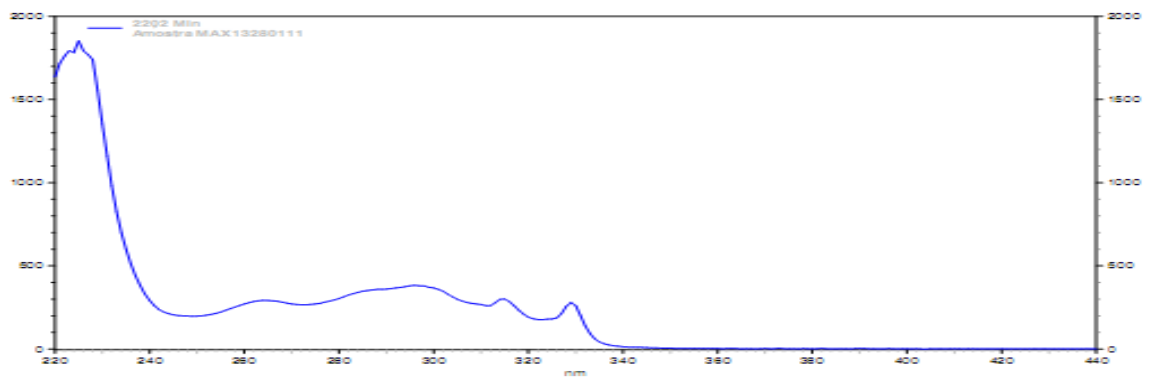


Pico 13 (t_R : 3,85 min)

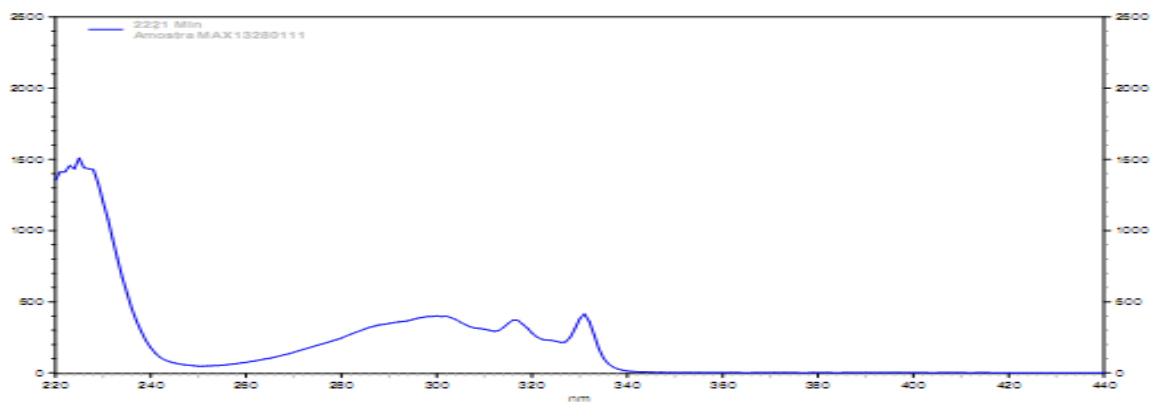


Pico 14 (t_R : 7,74 min)

Anexo A1: Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas A dos extratos em acetato de etila do micélio dos fungos endofíticos *Daldinia* sp.

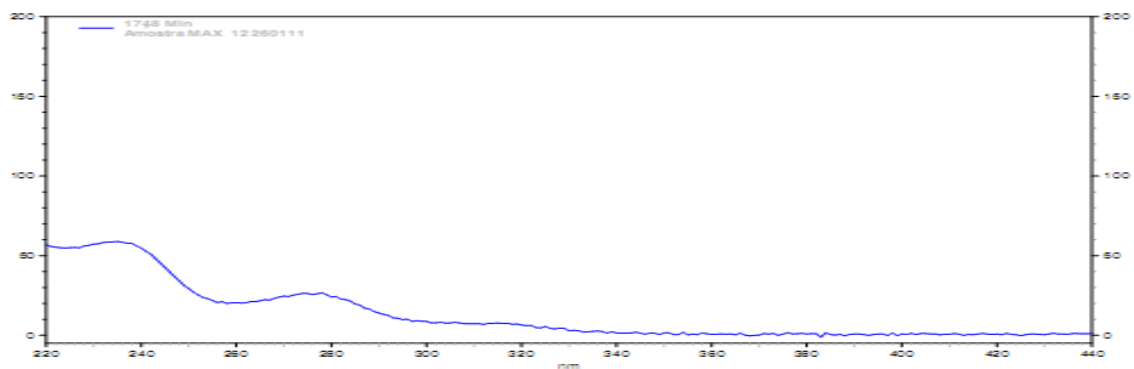


Pico 1 (t_R: 22,02 min)

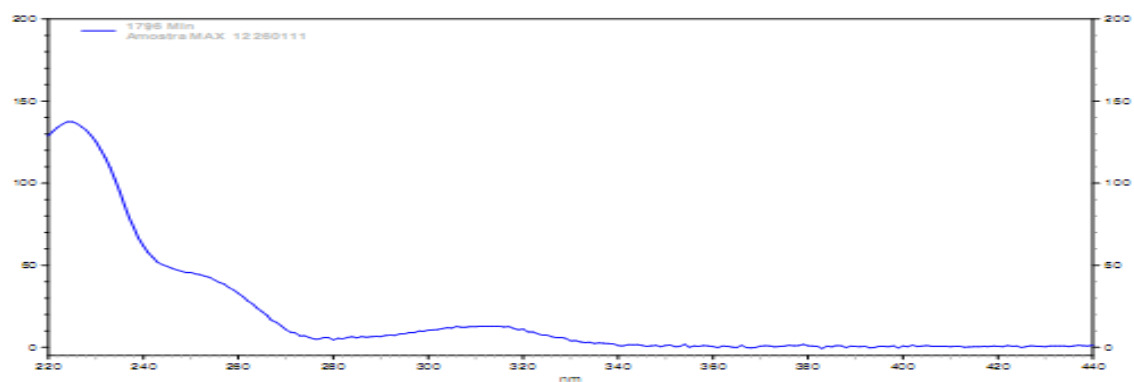


Pico 2 (t_R: 22,21 min)

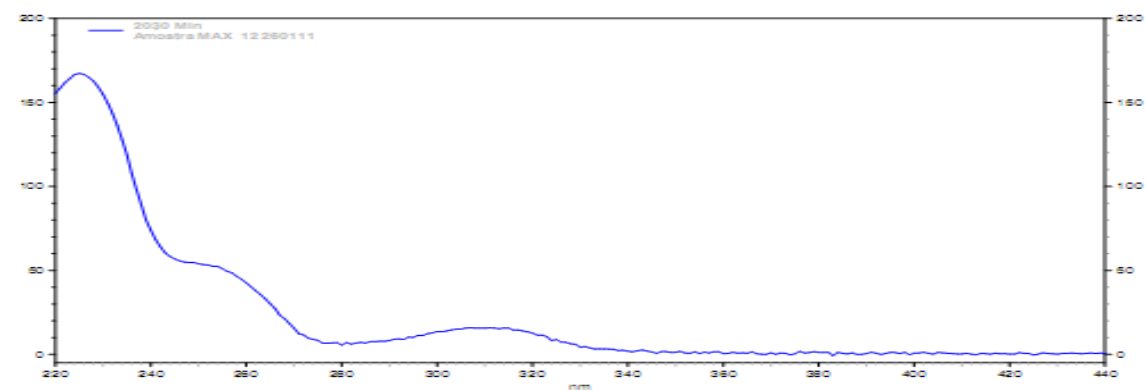
Anexo Am: Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas A dos extratos em acetato de etila do micélio dos fungos endofíticos *Xylaria luteostromata*.



Pico 1 (t_R : 17,47 min)

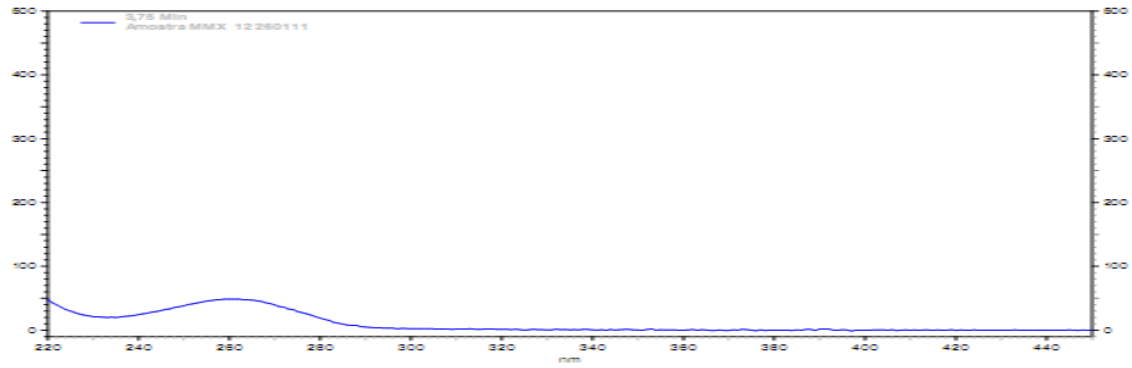


Pico 2 (t_R : 17,96 min)

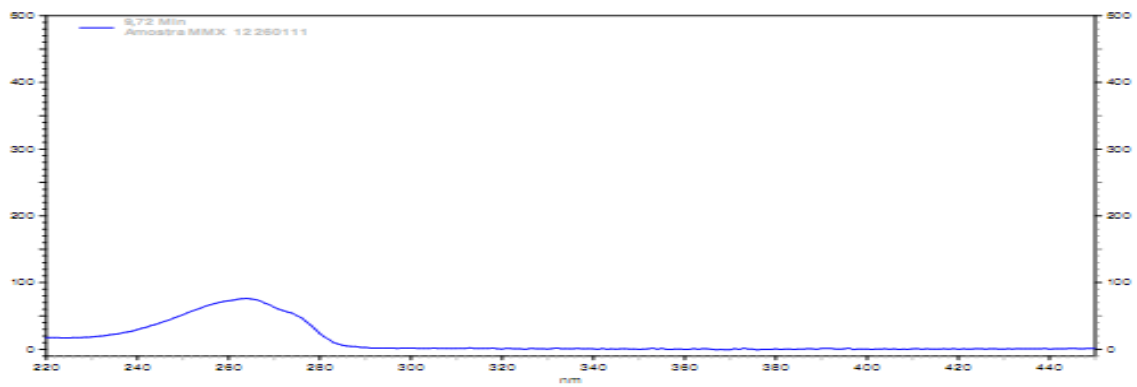


Pico 3 (t_R : 20,30 min)

Anexo An: Espectros de UV dos picos eluídos nos cromatogramas B dos extratos em metanol do micélio dos fungos endofíticos *Xylaria luteostromata*.

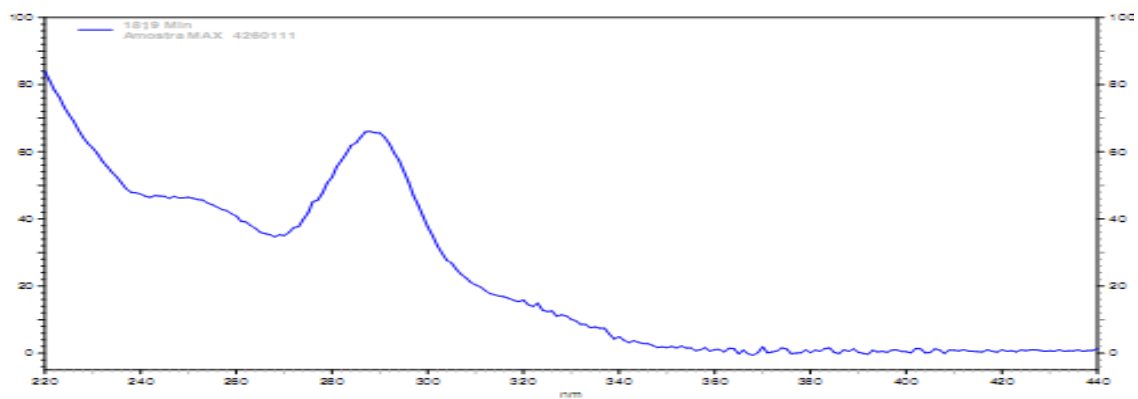


Pico 4 (t_R : 3,75 min)

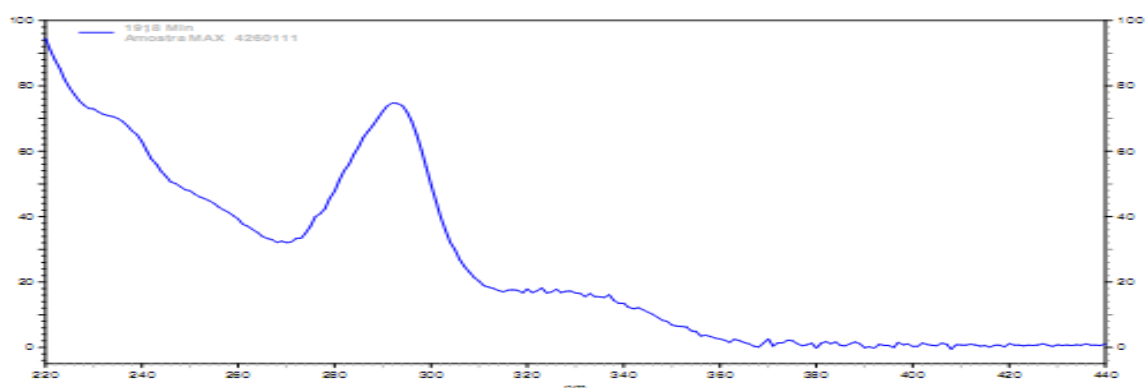


Pico 5 (t_R : 9,72 min)

Anexo Ao: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A do extrato em acetato de etila do micélio do fungo endofítico FEX3

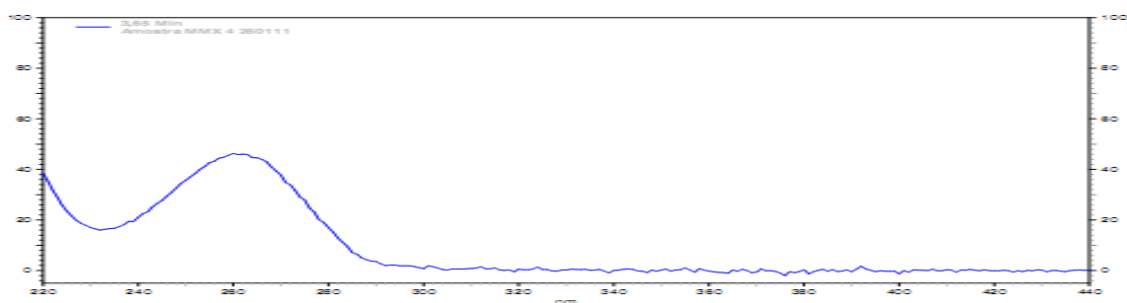


Pico 1 (t_R : 18,19 min)

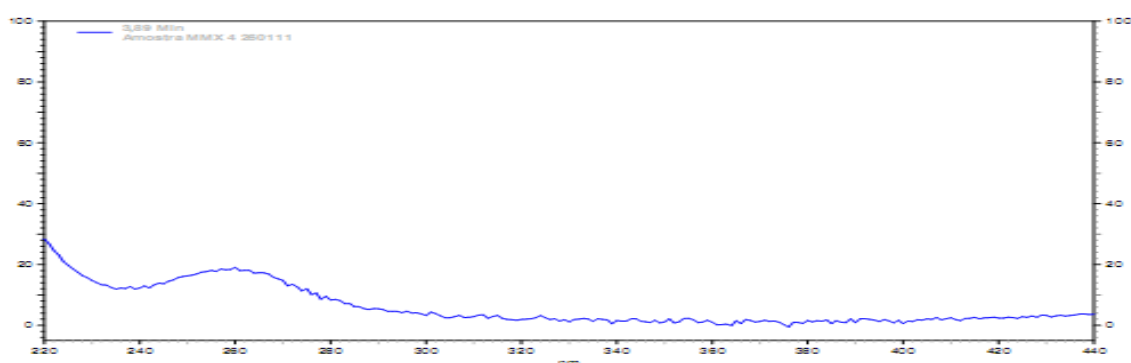


Pico 2 (t_R : 19,18 min)

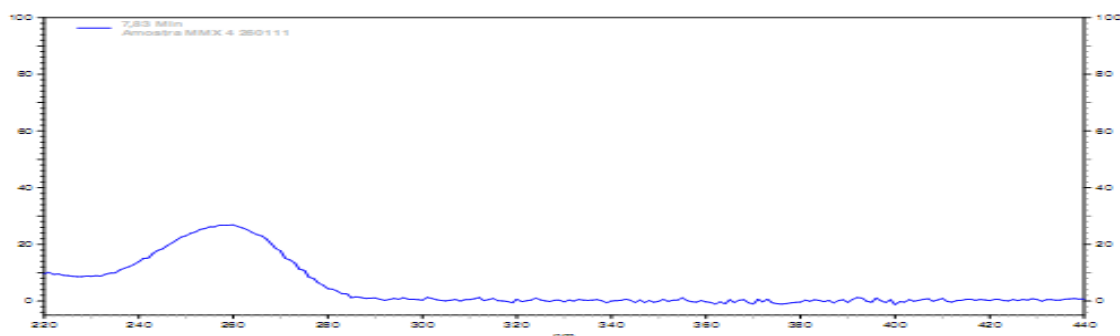
Anexo Ap: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B do extrato em metanol do micélio do fungo endofítico FEX3



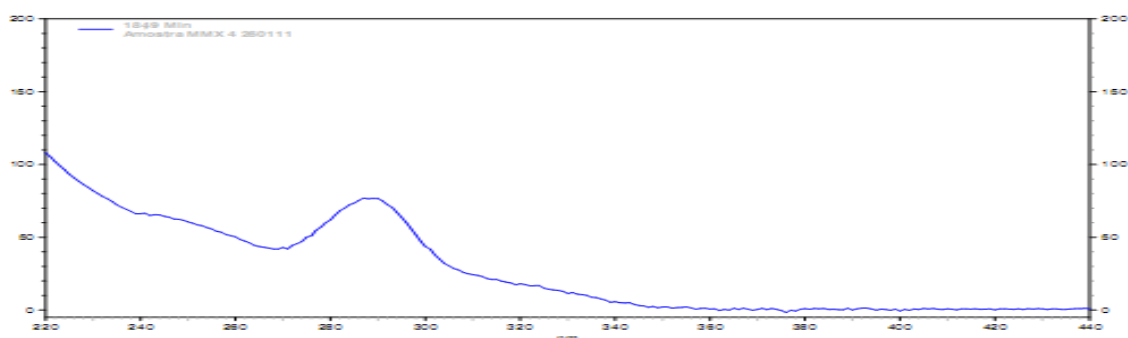
Pico 3 (t_R: 3,65 min)



Pico 4 (t_R: 3,89 min)

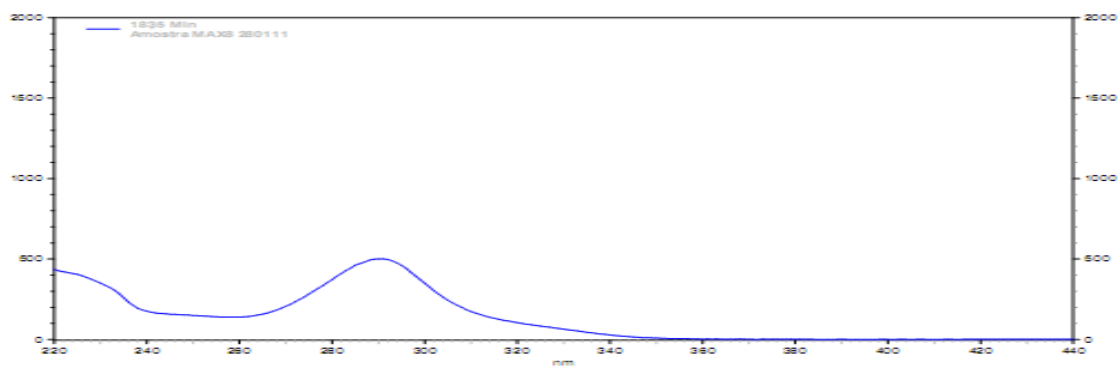


Pico 5 (t_R: 7,83 min)

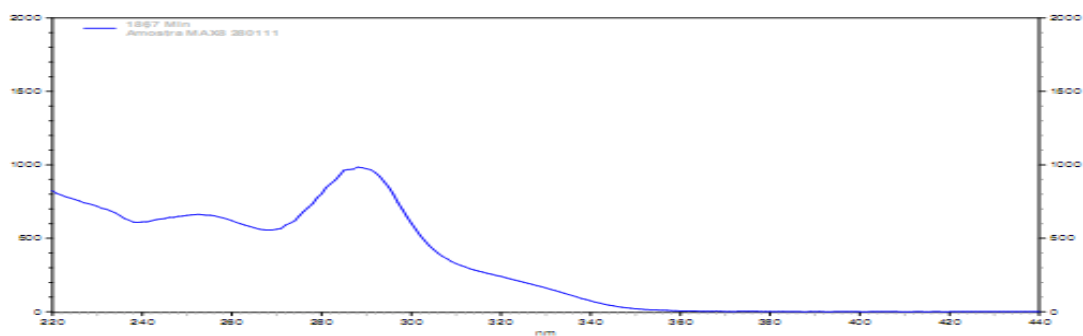


Pico 6 (t_R: 18,49 min)

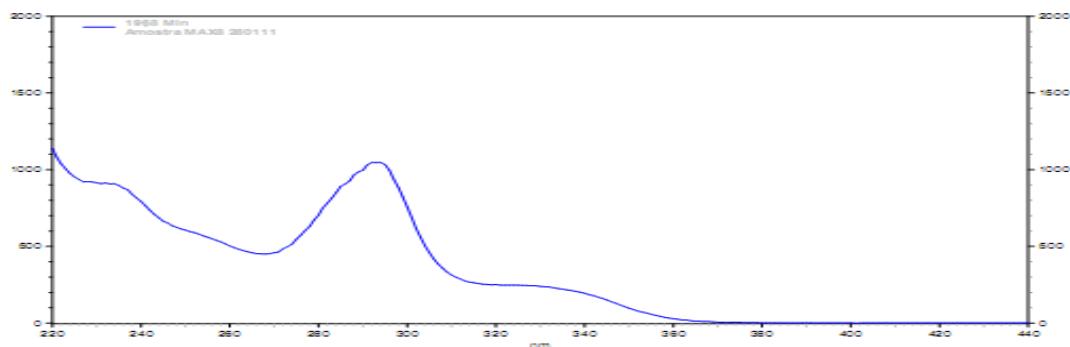
Anexo Aq: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma E do extrato em acetato de etila do micélio do fungo endófito FEX6.



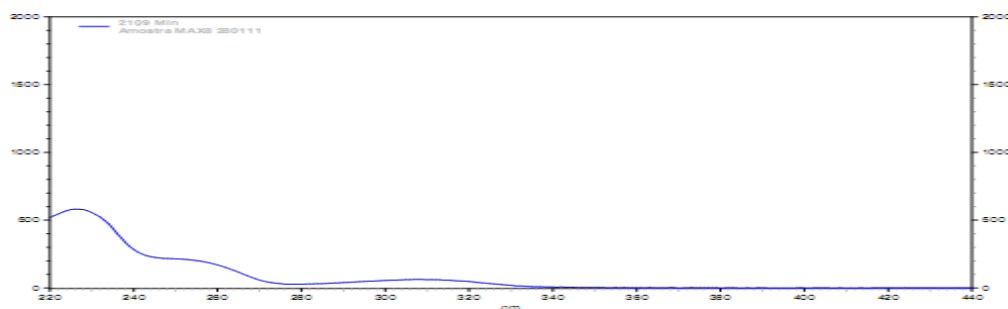
Pico 1 (t_R : 18,35 min)



Pico 2 (t_R : 18,67 min)

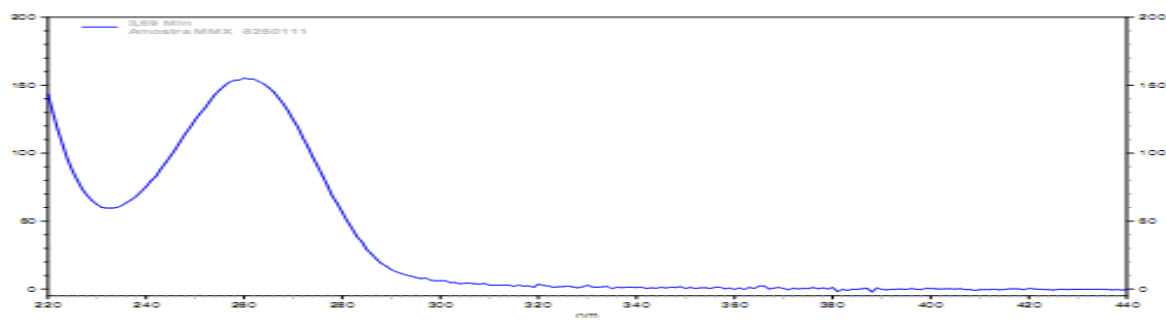


Pico 3 (t_R : 19,68 min)

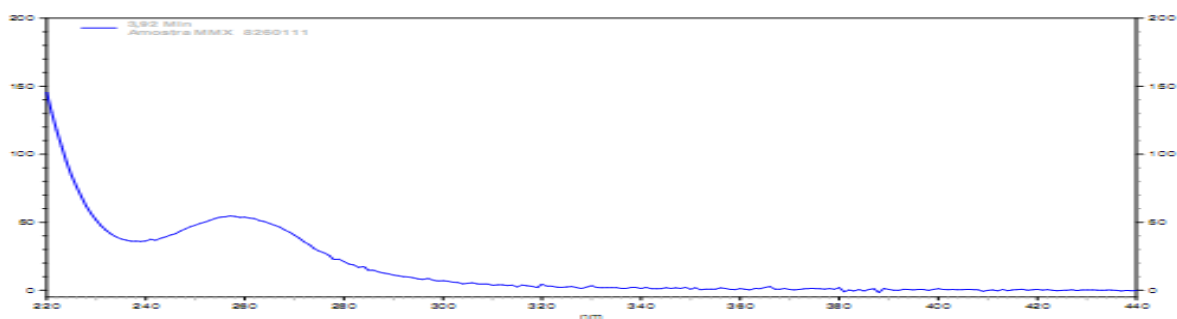


Pico 4 (t_R : 21,09 min)

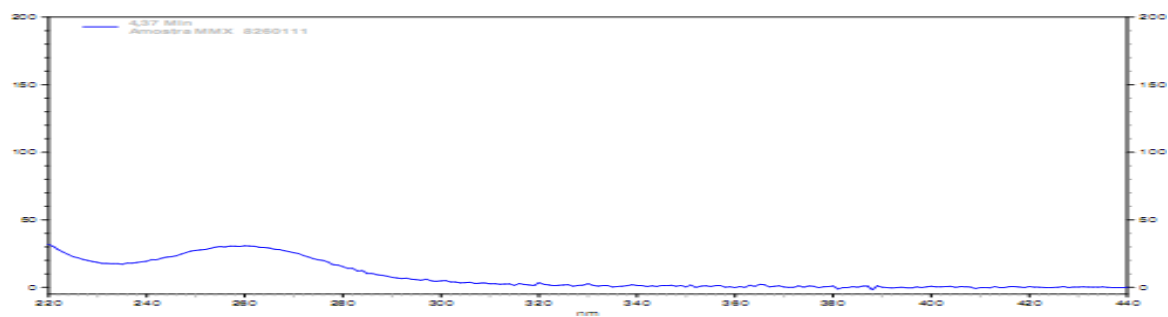
Anexo Ar: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma F do extrato em metanol do micélio do fungo endofítico FEX6.



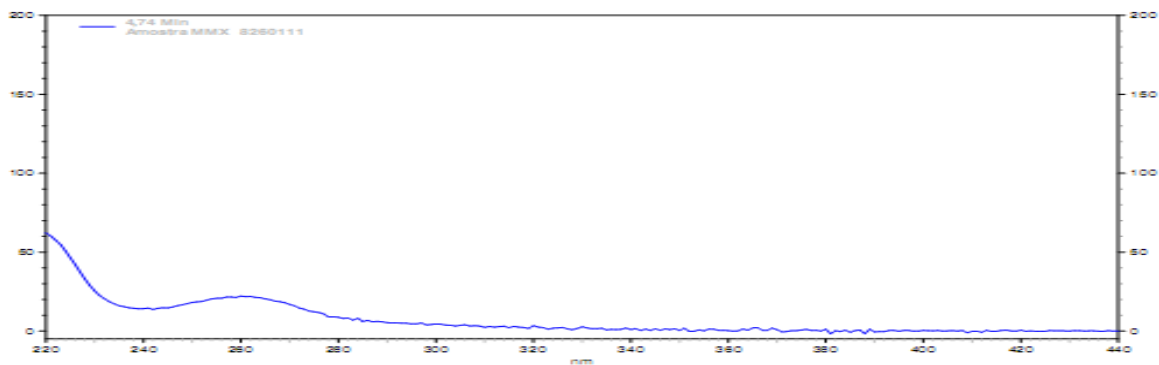
Pico 5 (t_R: 3,69 min)



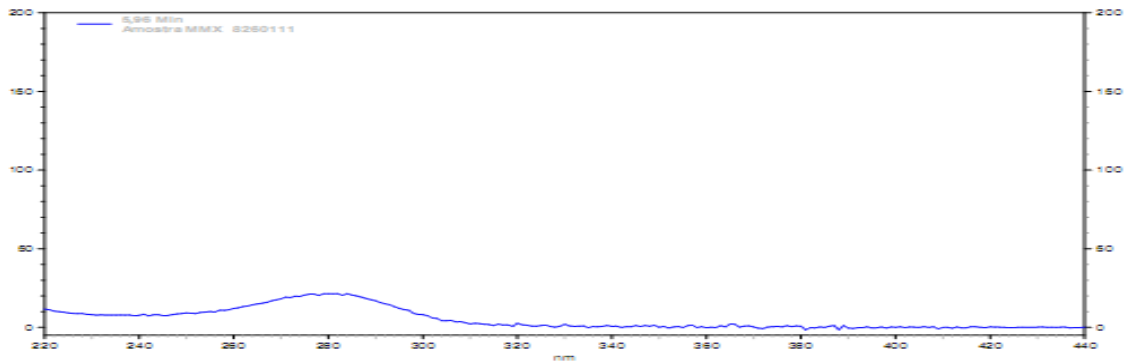
Pico 6 (t_R: 3,92 min)



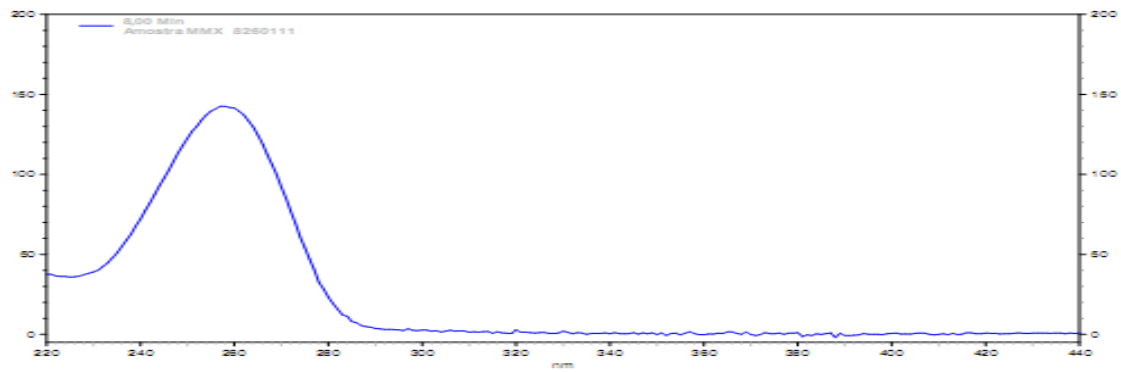
Pico 7 (t_R: 4,37 min)



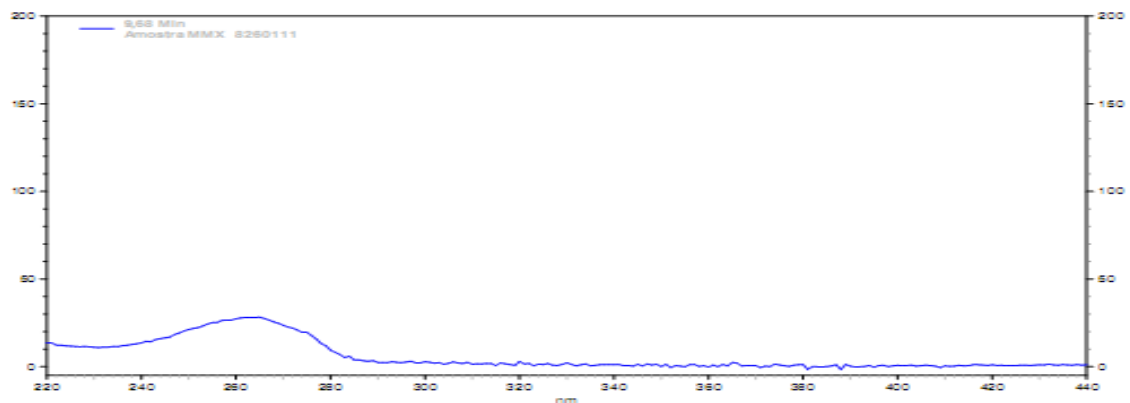
Pico 8 (t_R: 4,74 min)



Pico 9 (t_R: 5,96 min)

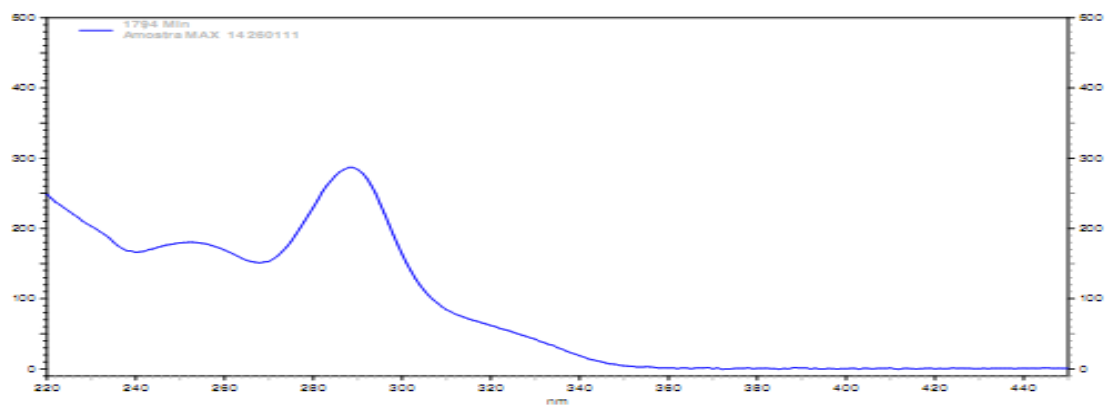


Pico 10 (t_R: 8,0 min)

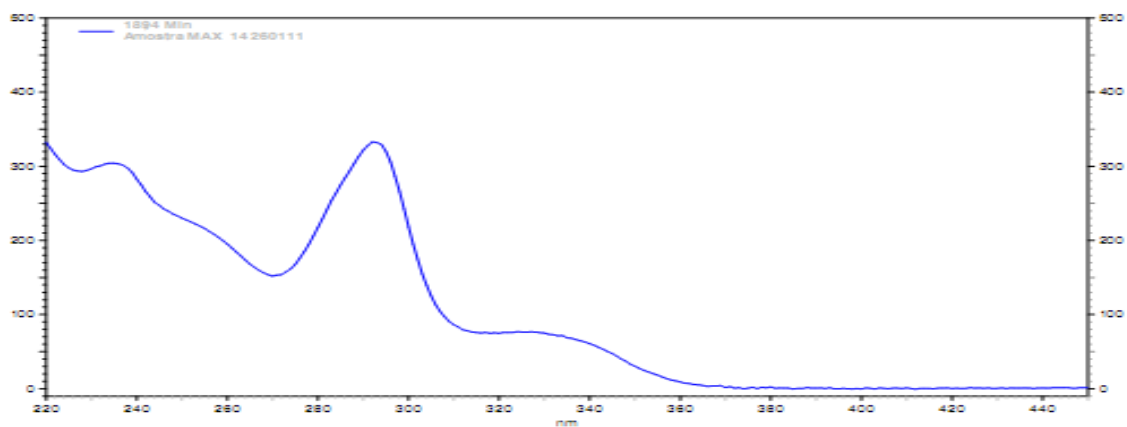


Pico 11 (t_R: 9,68 min)

Anexo As: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma A do extrato em acetato de etila do micélio do fungo endofítico FEX10.

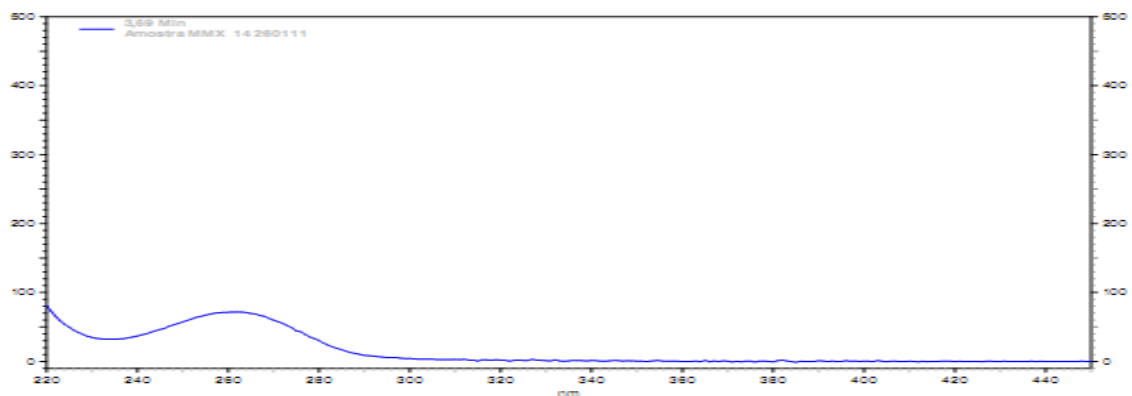


Pico 1 (t_R: 17,94 min)

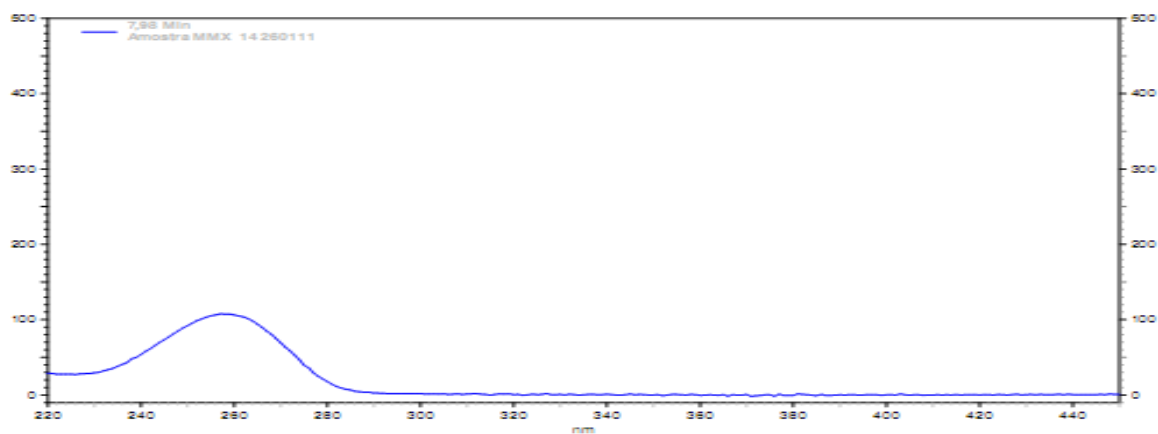


Pico 2 (t_R: 18,94 min)

Anexo At: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma B do extrato em metanol do micélio do fungo endofítico FEX10.

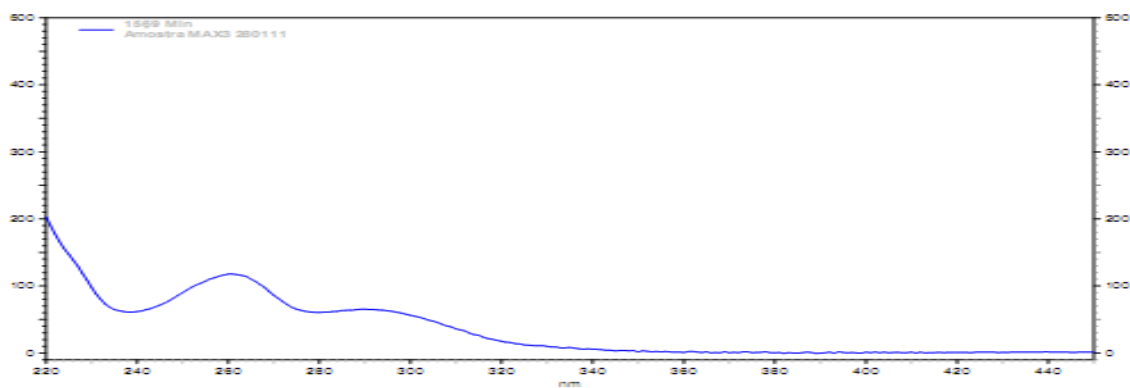


Pico 3 (t_R : 3,69 min)

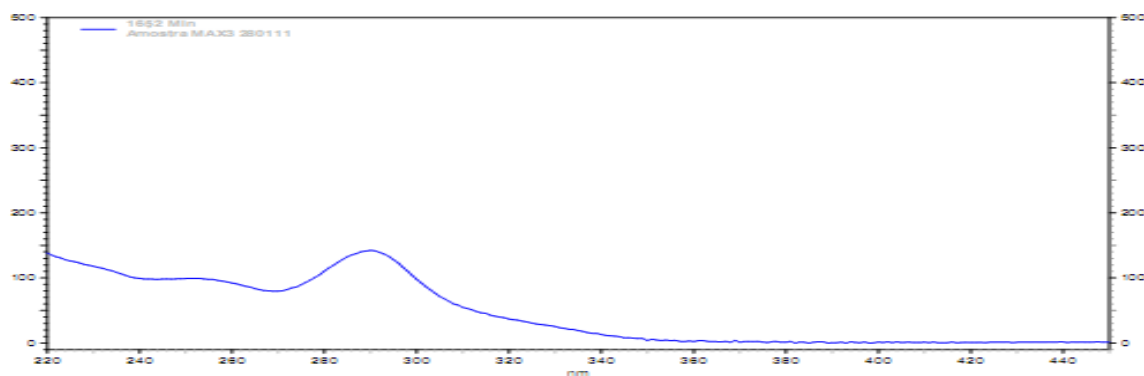


Pico 4 (t_R : 7,98 min)

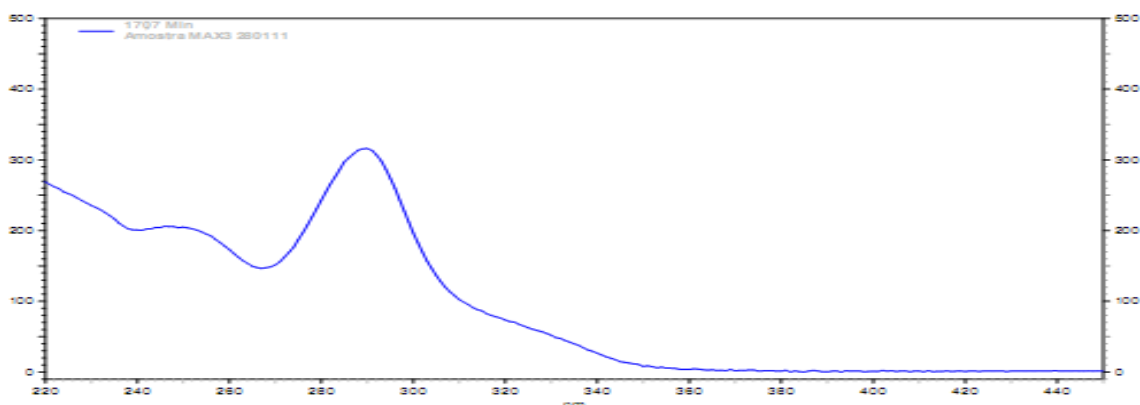
Anexo Au: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma C do extrato em acetato de etila do micélio do fungo endófito FEX12.



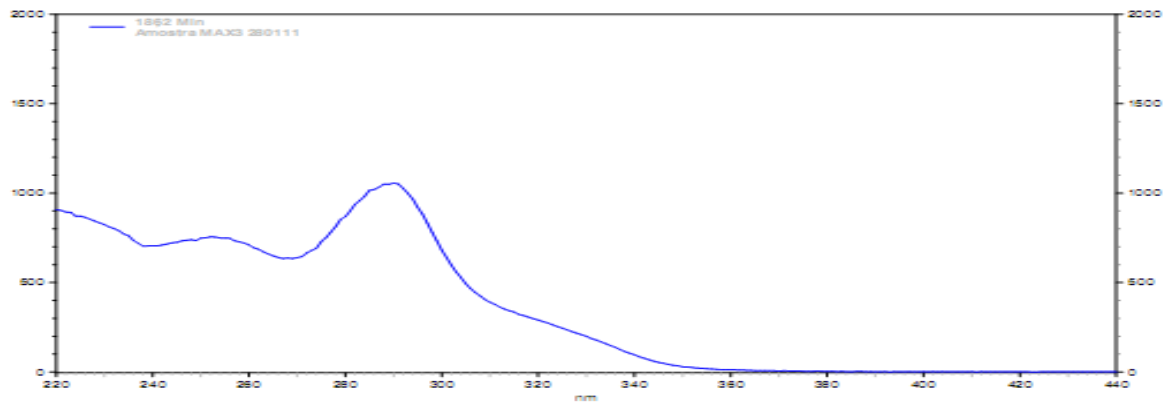
Pico 1 (t_R: 15,69 min)



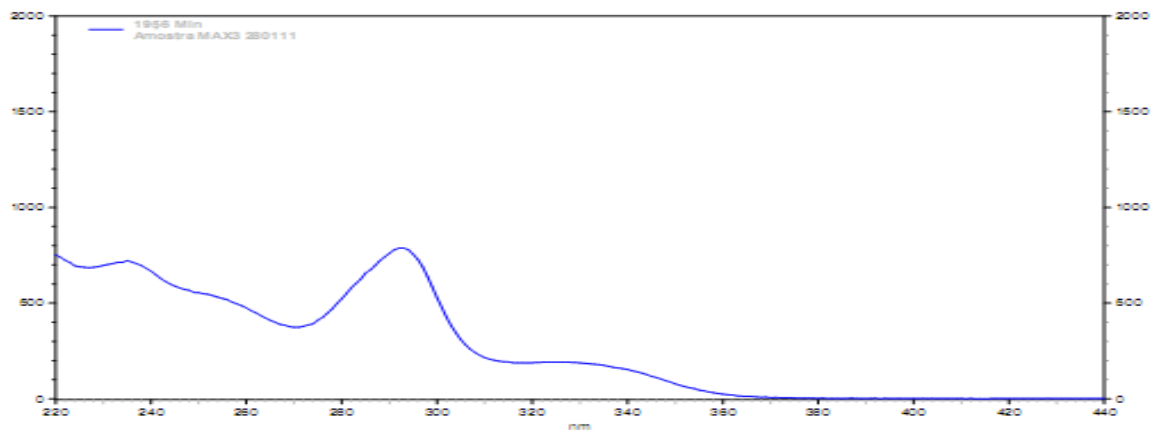
Pico 2 (t_R: 16,52 min)



Pico 3 (t_R: 17,07 min)

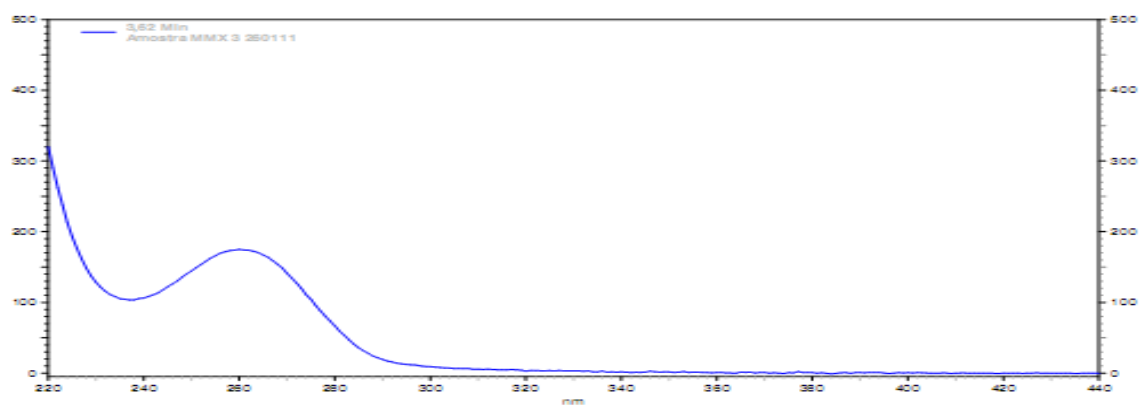


Pico 4 (t_R : 18,00 min)

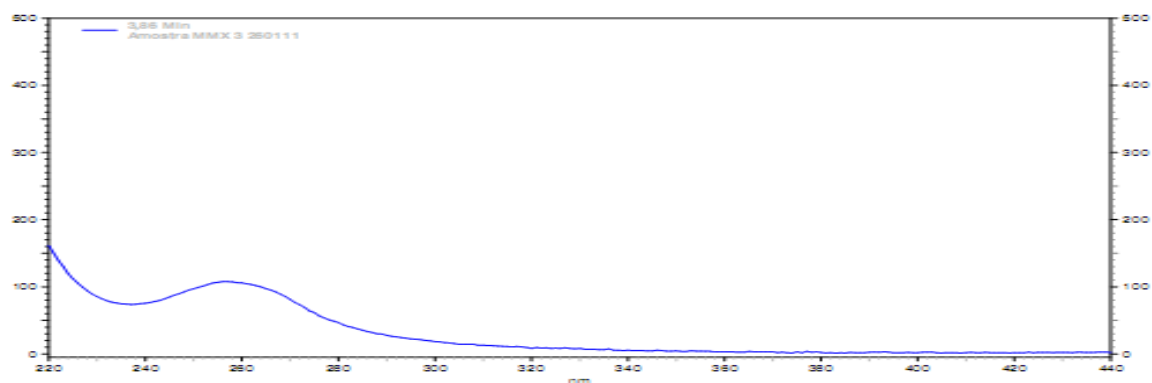


Pico 5 (t_R : 19,50 min)

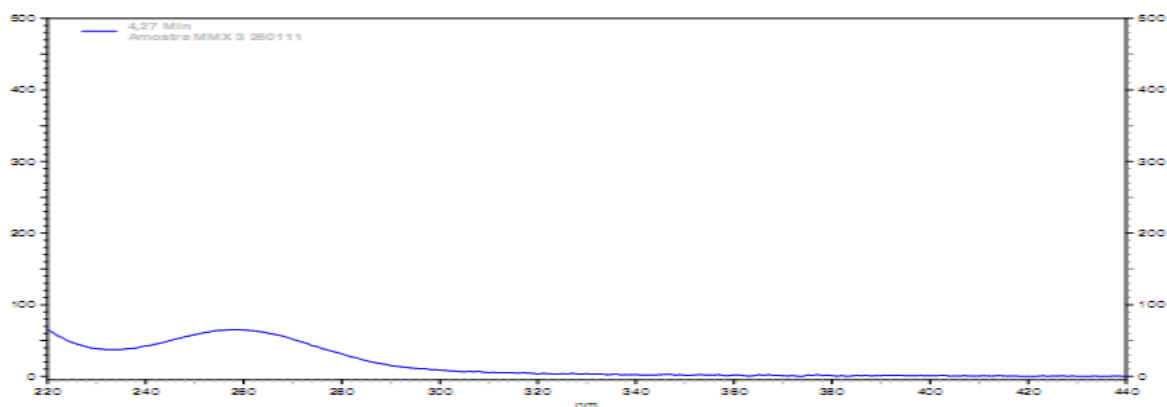
Anexo Av: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma D do extrato em metanol do micélio do fungo endofítico FEX12.



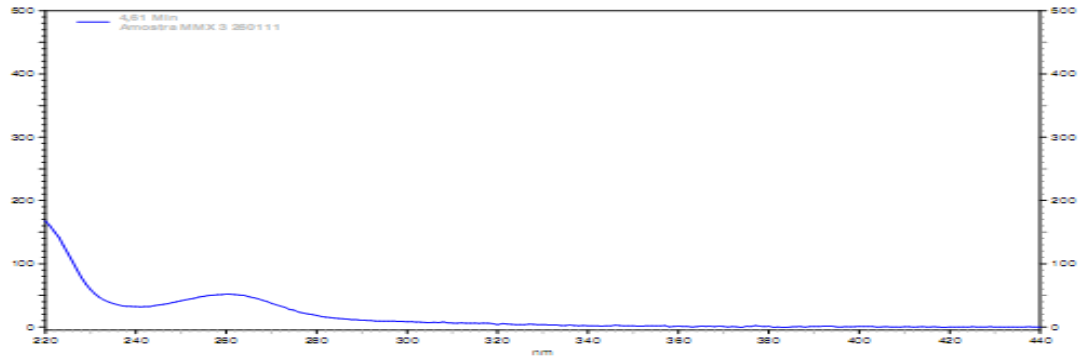
Pico 6 (t_R: 3,62 min)



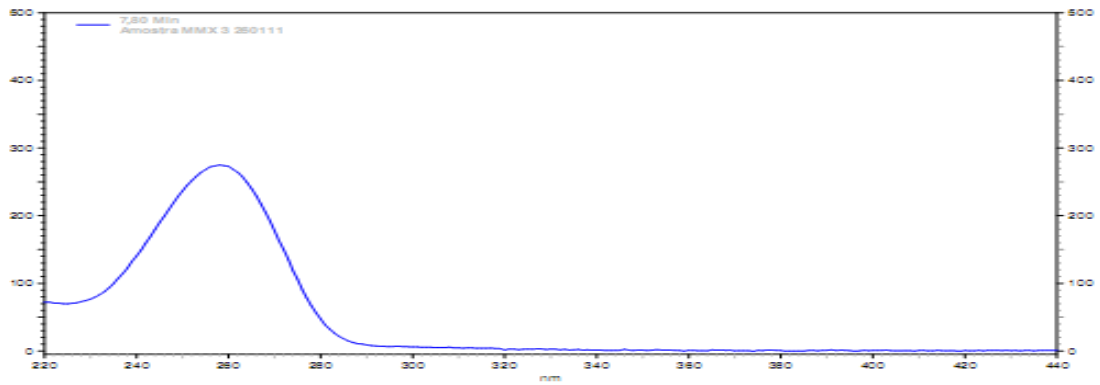
Pico 7 (t_R: 3,86 min)



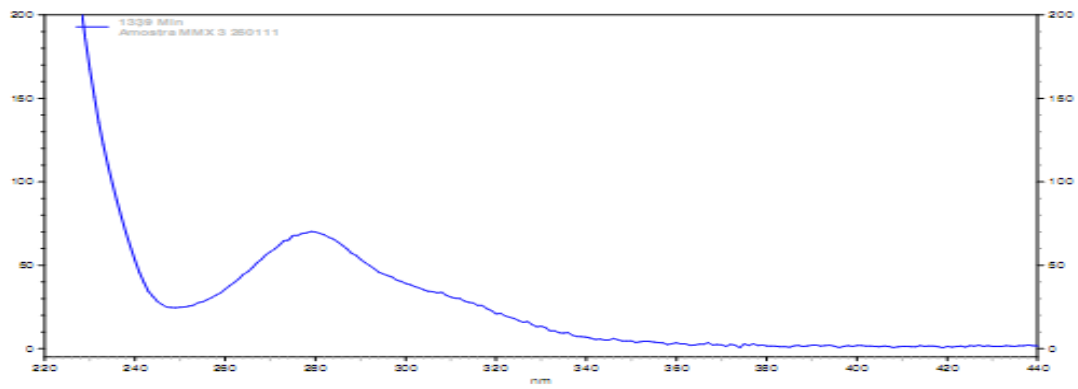
Pico 8 (t_R: 4,27 min)



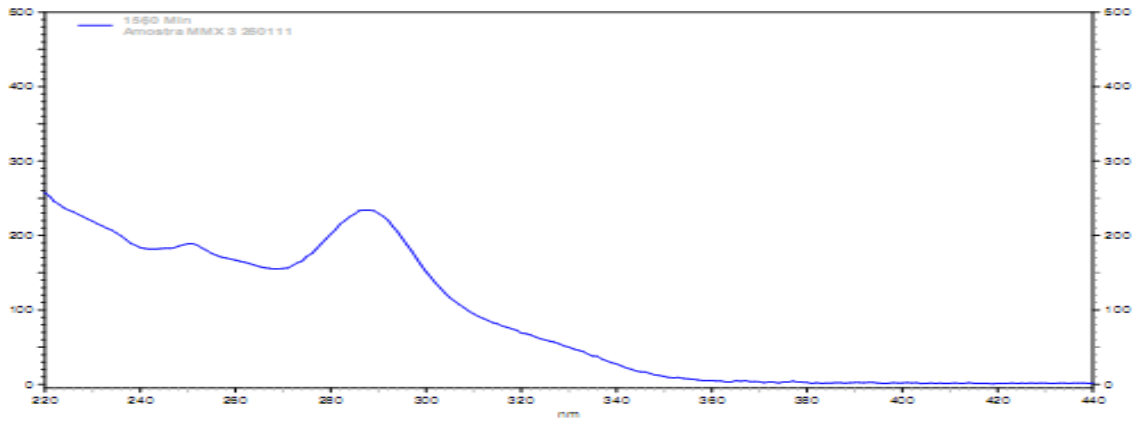
Pico 9 (t_R: 4,61 min)



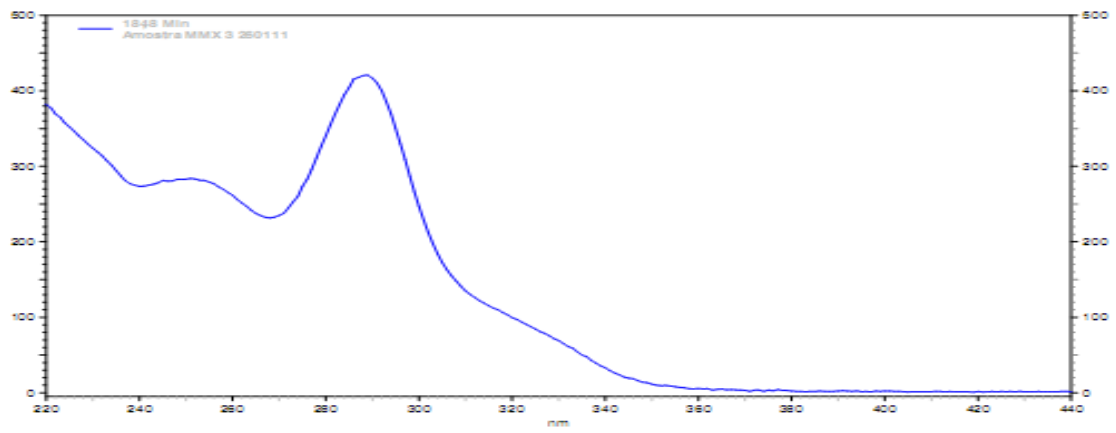
Pico 10 (t_R: 7,80 min)



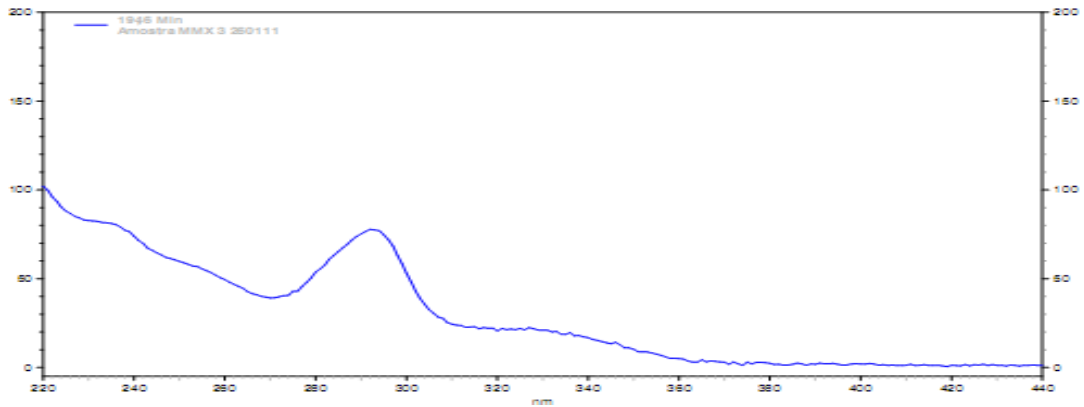
Pico 11 (t_R: 13,39 min)



Pico 12 (t_R: 15,60 min)

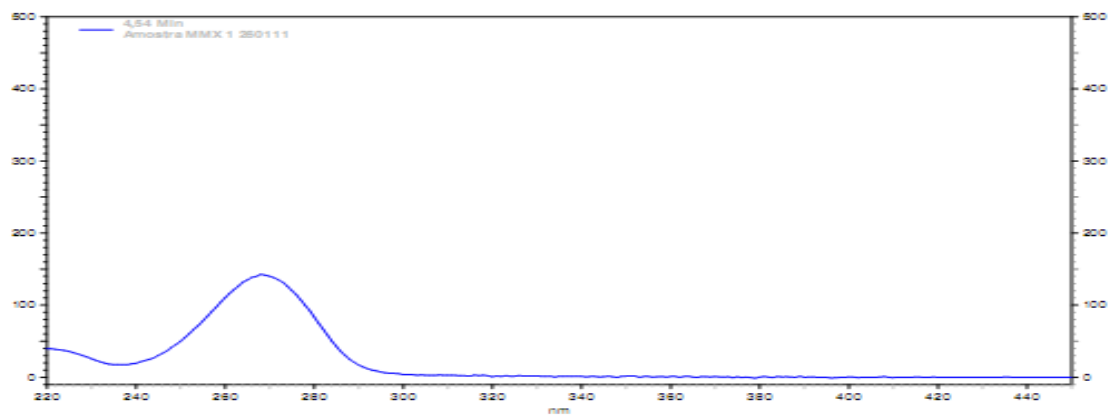


Pico 13 (t_R: 18,48 min)

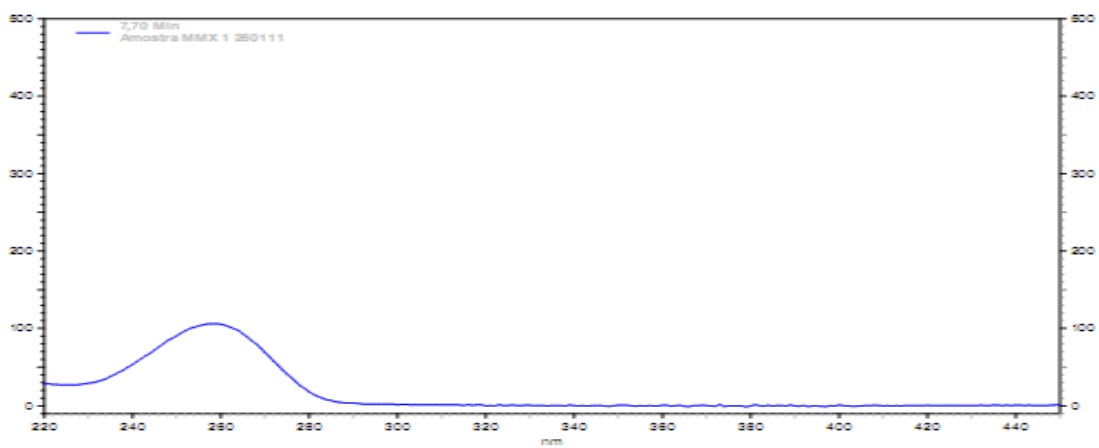


Pico 14 (t_R: 19,46 min)

Anexo Ax: Espectros de UV dos picos eluídos no cromatograma F do extrato em metanol do micélio do fungo endofítico FEX14.



Pico 1 (t_R : 4,54 min)



Pico 2 (t_R : 7,70 min)