



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA

Prospecção Química e Biológica de Fungos Endofíticos associados à
Aniba rosaeodora (Lauraceae)

CELINA DE JESUS SILVA

Manaus
2010

Ficha Catalográfica

S586p	<p>Silva, Celina de Jesus. Prospecção química e biológica de fungos endofíticos associados à <i>Aniba Rosaeodora</i> (Lauraceae) / Celina de Jesus Silva. -- Manaus : Universidade do Estado do Amazonas, 2010. 88 f. : il.</p> <p>Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia - UEA, 2010.</p> <p>Orientador: Prof^ª. Dra. Sandra Patrícia Zanotto.</p> <p>1. Fungos Endofíticos. 2. Aniba rosaeodora. 3. Linalol. 4. Terpenos. I. Título.</p>
-------	---

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária Suziane Batista.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA

CELINA DE JESUS SILVA

Prospecção Química e Biológica de Fungos Endofíticos associados à
***Aniba rosaeodora* (Lauraceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, da Universidade do Estado do Amazonas como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientação: Dra. Sandra Patricia Zanotto
Co-Orientação: Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza

Manaus
2010

CELINA DE JESUS SILVA

Prospecção Química e Biológica de Fungos Endofíticos associados à
Aniba rosaeodora (Lauraceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, da Universidade do Estado do Amazonas como requisito para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: Manaus, 24 de março de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Professora Dra. Sandra Patricia Zanotto

Universidade do Estado do Amazonas

Professora Dra. Yamile Benaion

Centro Universitário Nilton Lins

Professor Dr. Jamal Chaar

Universidade Federal do Amazonas

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus pais, Raimundo e Arilene, pelo amor, incentivo e paciência.

Ao meu querido irmão, Felipe, pelo amor, incentivo, paciência e os momentos
descontração.

Ao meu querido amor, amigo e companheiro, Anderson, pelo apoio.

Aos meus parentes e amigos.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Sandra Zanotto pela orientação e por ter acreditado na minha capacidade;

À professora Dra. Antônia Souza, que pacientemente me ajudava quando eu precisava, além de sempre ter uma palavra de conforto nos momentos difíceis;

Ao professor Dr. Paulo de Tarso, por ter me ajudado na coleta dos tecidos vegetais de *Aniba rosaeodora* para isolamento dos fungos endofíticos;

Ao professor Dr. Sérgio Duvoisin Jr., por ter me ajudado com as análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) das amostras, me ensinando a técnica e por sempre estar disposto a ajudar quando eu precisava;

À professora Dra. Aurea Echevarría, por ter colaborado com as análises em cromatografia de fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM), na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ);

Ao professor Dr. Afonso Souza, pela colaboração para execução dos testes antimicrobianos, cedendo seu laboratório na Universidade Federal do Amazonas (UFAM);

Ao amigo Rafael Lopes e Oliveira, por ter ajudado a dar os primeiros passos no trato com fungos endofíticos;

Aos amigos do curso de mestrado Dolores, Juci, Danielle, Márcia, Renah, Sandro, pelos momentos de descontração, companheirismo e aprendizagem;

Aos alunos de iniciação científica Soraya, Fabiana, Andréia, Fabrícia, Marta, Saloni, Yan, Starley, Thiago, Rick, Nadia, Gabriel, Adriana e Cássia pelos momentos de descontração e ajuda;

Ao querido Emerson Bacelar pelas longas conversas, pelo apoio nos momentos difíceis, e pelos filosóficos ensinamentos;

Ao professor Dr. Lozano, por sempre ter um bom conselho nos momentos de dificuldade;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho,

MUITO OBRIGADA!

“A mente que se abre para uma nova idéia, jamais terá seu tamanho inicial.”

Albert Einstein

RESUMO

Fungos endofíticos são microrganismos que vivem no interior das plantas sem causar dano aparente. O resultado dessa relação mútua pode justificar a produção de compostos de importância para biotecnologia. Como exemplo de árvore nativa da região amazônica, *Aniba rosaeodora* é produtora de óleo essencial rico em linalol, um metabólito secundário de grande interesse comercial. Considerando dados na literatura que reportam a capacidade dos fungos endofíticos produzirem, *in vitro*, metabólitos idênticos aos da planta hospedeira, o estudo com fungos endofíticos torna-se uma alternativa viável para busca por uma nova fonte para produção de linalol e de outros compostos que possam ter bioatividades relevantes. Foi possível isolar 262 fungos de quatro espécimes de *A. rosaeodora*. Esses fungos foram submetidos a processo de fermentação e após quatorze dias, os sobrenadantes foram analisados em aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), resultando em dez amostras que apresentaram cromatogramas com perfil diferenciado entre si e dezessete amostras que sugeriam a presença de linalol. Essas amostras foram fracionadas e encaminhadas para análise por aparelho de cromatografia de fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM). Sete amostras apresentaram espectro com o perfil de fragmentação semelhante ao perfil de linalol; o que sugere a produção deste composto pelos fungos endofíticos. Também foi possível observar na constituição dos sobrenadantes outras substâncias, como farnesol; citronelol; undecano; álcool fenético, entre outras. Para avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica os sobrenadantes dos fungos com os códigos PRII-Fo 68 e PRII-Ca 256 apresentaram atividade inibitória para o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, com média dos halos de inibição de 26 mm e 10 mm de diâmetro, respectivamente, e os extratos dos micélios dos fungos com os códigos PRIII-Fo 134 e PRIII-Fo 136 apresentaram atividade inibitória para o crescimento de *Penicillium avelani*, com média dos halos de inibição de 23 mm e 28 mm de diâmetro, respectivamente. Foi feita cultura em larga escala do fungo com código PRII-Fo 68 e o

sobrenadante passou por processo de partição líquido-líquido resultando em extratos de diferentes polaridades. Esses resultados sugerem boa perspectiva para uma possível nova fonte de linalol, e de outras substâncias que podem ter utilidade biotecnológica. Uma maneira sustentável para o resguardo da espécie vegetal (*A. rosaeodora*) do risco de extinção.

Palavras chave: Fungos endofíticos, *Aniba rosaeodora*, linalol, terpenos

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that live inside plants without causing apparent damage. The result of this mutual relationship can justify the production of important compounds to the biotechnology. As an example of an Amazon native tree, *Aniba rosaeodora* is producer of essential oil rich in linalool, a secondary metabolite of great commercial interest. Considering the literature, that report the capacity of endophytic fungi to produce, *in vitro*, metabolites identical to them of the host plant, the study with endophytic fungi becomes a viable alternative to search for a new source for production of linalool and other compounds that may have relevant activity. Were isolated 262 fungi from four specimens of *A. rosaeodora*. These fungi were subjected to fermentation and after fourteen days, the supernatants were analyzed in the chromatograph high performance liquid chromatography (HPLC), resulting in ten samples with chromatograms with different profile to each other and seventeen samples suggested the presence of linalool . These samples were fractionated and sent for analysis by a gas chromatography coupled to mass spectrometer (GC/MS). Seven samples showed a spectrum with the fragmentation profile similar to the profile of linalool standard, which suggests the production of this compound by endophytic fungi. They also observed the formation of supernatants other substances, such as farnesol, citronellol, undecane, phenethyl alcohol, among others. To evaluate the antibacterial and antifungal activity of supernatants of fungi with the codes PRII-Fo 68 and PRII-Ca 256 showed inhibitory activity for the growth of *Pseudomonas aeruginosa*, with average inhibition zones of 26 mm and 10 mm in diameter, respectively, and extracts of the mycelium of the fungi with the codes PRIII-Fo 134 and PRIII-Fo 136 showed inhibitory activity for the growth of *Penicillium avelani*, with average inhibition zones of 23 mm and 28 mm in diameter, respectively. Was done on a large scale culture of the

fungus with code PRII-Fo 68 and the supernatant was submitted to a liquid-liquid partition resulting in extracts of different polarities. These results suggest good prospects for a possible new source of linalool, and other substances that may be useful in biotechnology. A sustainable way to guard the plant species (*A. rosaeodora*) the risk of extinction.

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE GRÁFICOS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1.1.1 FUNGOS	6
1.1.1.1 Fungos endofíticos	11
1.1.2 FAMÍLIA LAURACEAE	19
1.1.2.1 <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 GERAL	26
2.2 ESPECÍFICOS	26
3 METODOLOGIA	27

3.1	ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Aniba rosaeodora</i>	28
3.1.1	COLETA	28
3.1.2	ISOLAMENTO	30
3.1.2.1	Desinfecção superficial	30
3.1.2.2	Inoculação dos fragmentos vegetais	30
3.1.3	PURIFICAÇÃO	32
3.2	PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	32
3.2.1	FERMENTAÇÃO	32
3.2.2	EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS	32
3.3	TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA ANÁLISE DOS METABÓLITOS	34
3.3.1	TRIAGEM DE PRODUÇÃO DE LINALOL	34
3.3.1.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	34
3.3.1.2	Cromatografia de fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM)	35
3.4	DETECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	35
3.4.1	AVALIAÇÃO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO	35
3.4.2	AVALIAÇÃO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO	36
3.5	CULTIVO EM LARGA ESCALA	37
3.6	IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	38
3.6.1	IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA MORFOLÓGICA	38
3.6.2	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	39
3.6.2.1	Extração de DNA	39
3.6.2.1.1	Manipulação dos reagentes	39
3.6.2.1.2	Extração de DNA fúngico	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1	ISOLAMENTOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>A. rosaeodora</i>	42
4.1.1	COLETA, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO	42
4.2	PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	51
4.2.1	FERMENTAÇÃO	51
4.3	TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA ANÁLISE DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	55

4.3.1	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	55
4.3.2	CROMATOGRAFIA DE FASE GASOSA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS	63
4.4	DETECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	78
4.5	CULTIVO EM LARGA ESCALA	80
5	CONCLUSÕES	83
6	PERSPECTIVAS	86
7	REFERÊNCIAS	88

LISTA DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1	Estrutura química do 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (linalol)	2
Figura 2	Metabólitos secundários de fungos idênticos às substâncias isoladas da planta hospedeira	4
Figura 3	Substâncias isoladas de fungos utilizadas como agroquímicos	5
Figura 4	Estruturas químicas de micotoxinas	8
Figura 5	Antibióticos de origem fúngica	9
Figura 6	Substâncias de origem fúngica com diferentes atividades farmacológicas	10
Figura 7	Substâncias de origem fúngica que conferem vantagens para planta hospedeira	14
Figura 8	Via metileritritolfosfato	16
Figura 9	Árvores de <i>Aniba rosaeodora</i> selecionadas para isolamento dos fungos endofíticos	28
Figura 10	Material vegetal coletado de cada espécime de <i>A. rosaeodora</i>	29
Figura 11	Armazenamento em sacos plásticos hermeticamente fechados	30
Figura 12	Desinfecção superficial	31
Figura 13	Inoculação dos fragmentos	31
Figura 14	a) Frascos de erlenmeyer no aparelho shaker, com caldo de batata dextrose e inóculo fúngico b) Filtração à vácuo para separação do micélio e sobrenadante	33
Figura 15	Sobrenadante filtrado e mantido à -19° C	33
Figura 16	Massa micelial após filtração e submersa em etanol	33

Figura 17	Aparelho de Cromatografia líquida de alta eficiência utilizado nas análises	34
Figura 18	Difusão em Agar das amostras para avaliação da atividade antimicrobiana	36
Figura 19	Frascos de erlenmeyer com 300mL de meio de cultura líquido cada para cultivo em larga escala	38
Figura 20	a) Partição do sobrenadante do cultivo em larga escala b) Trituração do micélio remanescente após a filtração à vácuo	38
Figura 21	Reação de equilíbrio da solução de hipoclorito de sódio	42
Figura 22	Fungo classificado no grupo 4 (PRII-Fo 56)	54
Figura 23	Sobreposição de cromatogramas: Sobrenadante sem inoculo fungico (A) e sobrenadante do fungo com código PRI-Fo 7 (B)	56
Figura 24	Sobreposição de cromatogramas: Sobrenadante do fungo com código PRII – Ca 100 (A) e Sobrenadante do fungo com código PRI - Ca 30 (B)	57
Figura 25	Cromatograma da amostra de PRI – Fo 8	58
Figura 26	Cromatograma da amostra de PRII – Fo 56	58
Figura 27	Cromatograma da amostra de PRII – Fo 58	58
Figura 28	Cromatograma da amostra de PRII – Fo 71	59
Figura 29	Cromatograma da amostra de PRIII – Fo 136	59
Figura 30	Cromatograma da amostra de PRIII – Fo 148	59
Figura 31	Cromatograma da amostra de PRIII – FoMF 156	60
Figura 32	Cromatograma da amostra de PRIII – Fl 188	60
Figura 33	Cromatograma da amostra de PRIII – Fl 189	60
Figura 34	Cromatograma da amostra de PRII – Se 253	61
Figura 35	Cromatograma da amostra padrão de linalol	61
Figura 36	Espectro de massas do linalol	73
Figura 37	a) Halo de inibição do sobrenadante de PRII-Fo 68; b) Halo de inibição do sobrenadante de PRII-Ca 256	79
Figura 38	a) Halo de inibição do sobrenadante de PRIII-Fo 134; b) Halo de inibição do sobrenadante de PRIII-Ca 136	79
Figura 39	Micélio do fungo PRII-Fo 68 em 300 mL de meio de cultura líquido	80
Figura 40	Erlenmeyer do lado esquerdo: meio de cultura sem inoculo; erlenmeyer do lado direito sobrenadante	81
Figura 41	Micélio triturado em extração com etanol	81
Figura 42	Cromatografia em camada delgada do extrato etanólico do micélio de	82

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1	Utilidade para espécies do gênero <i>Ocotea</i> 20
Tabela 2	Espécies do gênero <i>Ocotea</i> utilizadas na medicina tradicional 22
Tabela 3	Quantidade de fungos isolados em cada espécime e parte vegetal de <i>A. rosaeodora</i> 43
Tabela 4	Grupos e características dos fungos endofíticos de <i>A. rosaeodora</i> 45
Tabela 5	Taxa de colonização de cada espécime e parte vegetal 48
Tabela 6	Taxa de colonização de cada espécime 49
Tabela 7	Quantidade de fungos isolados por meio de cultura 50
Tabela 8	Quantidades de fungos com crescimento micelial nas condições de fermentação 52
Tabela 9	Distribuição dos fungos com crescimentos micelial por grupo 53
Tabela 10	a) descrição dos picos do cromatograma A; b) descrição dos picos do cromatograma B 56
Tabela 11	a) descrição dos picos do cromatograma A; b) descrição dos picos do cromatograma B 57
Tabela 12	Amostras que apresentaram aumento da área do pico no cromatograma 62
Tabela 13	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRI – FoMF 12 63
Tabela 14	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRI – Fo 8 63
Tabela 15	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – Fo 136 64
Tabela 16	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – FoMF 156 64

Tabela 17	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRII- Ca 258	65
Tabela 18	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – Fo 148	65
Tabela 19	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – Fl 188	66
Tabela 20	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – Fl 189	67
Tabela 21	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRII – Fo 61	67
Tabela 22	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRI – Fo 6	67
Tabela 23	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRII – Fo 58	68
Tabela 24	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – CaMF 183	68
Tabela 25	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRII – Fo 71	69
Tabela 26	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRII – 56	69
Tabela 27	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIV – Fo 198	70
Tabela 28	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – Ca 159	71
Tabela 29	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – Fo 140	71
Tabela 30	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – Ca 180	72
Tabela 31	Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – Ca 168	72
Tabela 32	Amostras que apresentaram presença do linalol	73
Tabela 33	Compostos em comum entre as amostras	74

LISTA DE GRÁFICOS

	PÁGINA	
Gráfico 1	Quantidade de fungos isolados por parte vegetal de cada espécime	44
Gráfico 2	a) Distribuição total dos isolados fúngicos em grupos	47
	b) Distribuição dos grupos de isolados fúngicos cultivados em M.F.	
	c) Distribuição dos grupos de isolados fúngicos cultivados em B.D.A.	
Gráfico 3	Quantidade de fungos encontrados e isolados por nº de fragmentos de cada parte vegetal	49
Gráfico 4	Qtde de fungos encontrados e isolados por nº de fragmentos de cada espécime	50
Gráfico 5	Porcentagem de fungos com crescimento micelial por grupo	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
AM	Amazonas
BDA	Agar batata dextrose
Ca	Galhos
CG-EM	Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Resolução
cm	Centímetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
Fl	Flores
Fo	Folhas
Fr	Frutos
g	Gramas
g/L	Gramas por litro
h	Horas
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
ITS	<i>Internal Transcribed Spacers</i> (Espaço Interno Transcrito)
Km	Quilometro
L	Litros
M	Molar
MF	Meio Folha
Min	Minutos

MHA	Agar Müller Hinton
mL	Mililitro
n°	Número
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação de Cadeia polimerase)
PRI	Espécime I de <i>A. rosaeodora</i> ;
PRII	Espécime II de <i>A. rosaeodora</i>
PRIII	Espécime III de <i>A. rosaeodora</i>
PRIV	Espécime IV de <i>A. rosaeodora</i>
Se	Sementes
T.C.	Taxa de Colonização
T.R.	Tempo de retenção
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
µL	Microlitro

Introdução

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A Amazônia possui a mais rica variedade de espécies vegetais e animais do mundo e, com a tendência mundial para revalorização dos produtos de origem natural que substituam os sintéticos, ela representa um foco de manejo equilibrado da biodiversidade, permitindo um desenvolvimento sustentável para a região (SILVÉRIO, 2004).

Em anos de pesquisa voltada para busca de compostos bioativos, as plantas são fornecedoras de novas substâncias usadas para as mais diversas finalidades. Podem ser utilizadas tanto na produção de medicamentos ou utilização do conhecimento tradicional para prevenir e curar doenças, quanto na indústria de alimentos e cosméticos, na produção de aromatizantes, flavorizantes ou antioxidantes (PLETSCHI, 1998; PINTO *et al.*, 2002).

Um exemplo de planta nativa da região amazônica é a *Aniba rosaeodora*, produtora de um óleo essencial com ingredientes úteis na indústria de cosméticos, cujo principal constituinte é o linalol (3,7-dimetilocta-1,6-dien-3-ol), um metabólito secundário utilizado como fixador de perfumes (MAIA *et al.*, 2007). Devido à produção desse constituinte, *A. rosaeodora* tem sido intensiva e desordenadamente explorada desde 1950, e por isso, é uma espécie que se encontra em risco de extinção (GONÇALVES *et al.*, 2005; LIMA E CHAAR, 2006).

O linalol é um monoterpene alcoólico terciário de cadeia aberta (Figura 1) e, por possuir um átomo de carbono assimétrico, apresenta-se como mistura racêmica em várias espécies vegetais. Tem sido utilizado principalmente, como fixador de aromas na indústria de cosméticos e como composto de partida para várias sínteses importantes - como a do acetato de linalila que também possui uma grande capacidade de fixação. Esse composto também tem sido testado como acaricida, bactericida e fungicida; além

de ter apresentado resultados promissores como sedativo e anticonvulsivante (SILVA *et al.*, 2003).

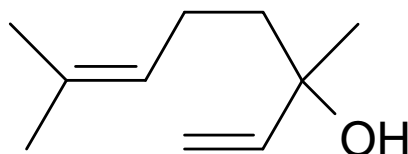


Figura 1 - Estrutura química do 3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (linalol)

O óleo essencial de *A. rosaeodora* é majoritariamente extraído da madeira e, para produzir 200 litros de óleo através dos métodos tradicionais de destilação, é necessário processar de 16 a 30 toneladas de madeira. O volume de óleo de pau-rosa exportado já atingiu mais de 500 t/ano, com cerca de 50 destilarias instaladas na região amazônica, extraindo aproximadamente 50 mil t/ano de madeira de pau-rosa de florestas nativas (SAMPAIO, 2003). Diante da exploração descontrolada surgiu a necessidade de alternativas para conservação e ao mesmo tempo para a utilização adequada do recurso natural.

O sucesso do manejo dos plantios de pau-rosa visando produção de óleo a partir de galhos e de folhas depende da capacidade de rebrota e do crescimento dos novos brotos. A capacidade de rebrota aliadas à maior produtividade de óleo dos galhos e folhas em relação à madeira das árvores indica que este método pode ser considerado como uma alternativa para o manejo sustentável de pau-rosa. Um estudo silvicultural demonstrou que a produtividade e a qualidade do óleo essencial de pau-rosa extraído de folhas e galhos de plantios de diferentes idades no município de Maués – AM é maior e melhor em amostras com idades entre 2 a 5 anos (LIMA E CHAAR, 2006).

Estudos com microrganismos associados às plantas - fungos e bactérias endofíticos - se tornou outro tema recorrente na pesquisa em Química de Produtos Naturais realizada hoje no Brasil, como uma alternativa para conservação de inúmeras espécies vegetais. Estes microrganismos vivem em associação íntima com as plantas hospedeiras vivas e sadias, podendo imitá-las quanto à produção de metabólitos secundários e conferir as mesmas uma maior adaptação ao meio ambiente e suas variações físicas, químicas, sazonais e microbiológicas.

Dados na literatura têm reportado a capacidade dos fungos endofíticos produzirem *in vitro* metabólitos secundários idênticos aos da planta hospedeira (Figura 2). O primeiro exemplo e o que deu impulso aos estudos com fungos endofíticos foi o

isolamento do metabólito secundário Taxol (estrutura 2 da figura 2) da espécie fúngica *Taxomyces andreanae* - fungo endofítico de *Taxus brevifolia* (Taxaceae). Este composto é um agente terapêutico antineoplásico, isolado por Strobel e colaboradores em 1993. Outro exemplo é a substância vincristina (estrutura 3 da figura 2), também com atividade anticancerígena, é produzida pelo fungo endofítico *Mycelia sterilia* associado à *Catharanthus roseus*, sendo isolada por Yang e colaboradores em 2004. Eyberger e sua equipe isolou em seu estudo com o fungo endofítico *Phialocephala fortinii*, associado à *Podophyllum peltatum*, a Podofilotoxina (estrutura 4 da figura 2), um precursor natural para três drogas anticancerígenas - teniposido, etoposido e etoposido fosfatado - substância primeiramente encontrada na planta *Podophyllum emodi* e por dificuldades para total síntese do composto houve necessidade por uma nova fonte natural (STROBEL, 2003; GUIMARÃES, 2006; EYBERGER *et al.*, 2006).

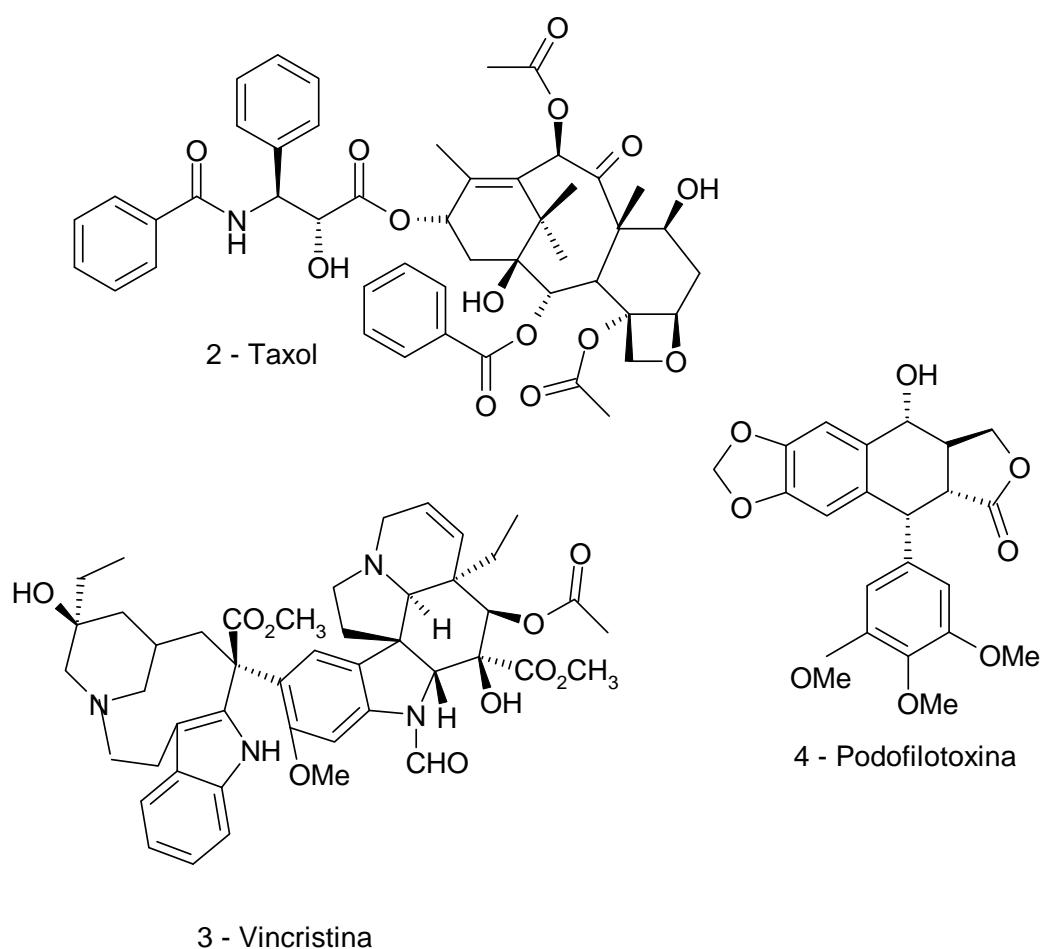
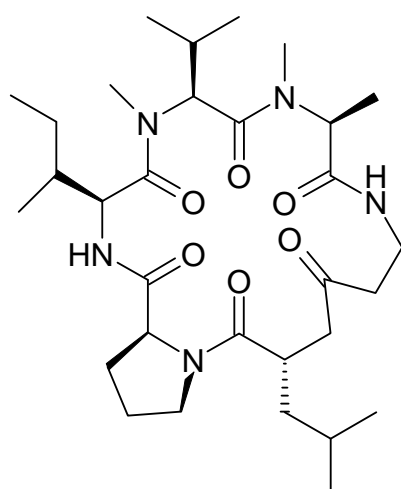
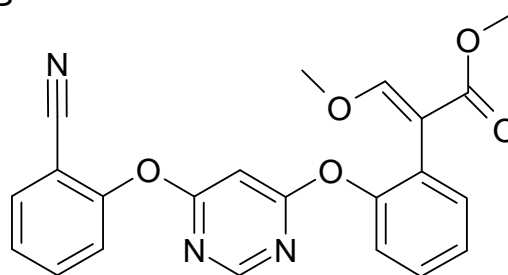


Figura 2 - Metabólitos secundários de fungos idênticos às substâncias isoladas da planta hospedeira

Além dos investimentos da indústria farmacêutica na produção de medicamentos a partir de substâncias de origem fúngica, a indústria agroquímica também tem bons resultados com compostos isolados a partir dos fungos, os quais se apresentam menos tóxicos do que os agroquímicos sintéticos (Figura 3). Pode-se citar como exemplos destruxinas (inseticidas) (estrutura 5 da figura 3) produzidas pelo fungo *Beauveria felina*; estrobirulinas (fungicidas) (estrutura 6 da figura 3) isoladas de um cogumelo identificado como *Strobilurus tenacellu*, e várias toxinas como as produzidas pelo fungo *Nimbya alternantherae* que agride rápida e violentamente a planta daninha *Alternanthera philoxeroides* (PINTO *et al.*, 2002; TERÃO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2006; DEMUNER *et al.*, 2006).



5 - Destruxina B



6 - Azoxystrobin

Figura 3 - Substâncias isoladas de fungos utilizadas como agroquímicos

Considerando esses aspectos, realizar a triagem dos metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos surge como uma nova alternativa que gerará conhecimento e contribuirá para preservação da espécie fúngica e da planta a que esta associada.

Portanto, o estudo com fungos endofíticos associados à *A. rosaeodora* favorecerá a identificação de espécies produtoras de linalol, bem como de outros constituintes ativos com possível aplicação na biotecnologia, possibilitando o surgimento de outra fonte natural de metabólitos e assim colaborando para a preservação das espécies.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 FUNGOS

Os fungos são seres eucariotos, podendo ser haploides, diploides ou poliploides; com parede rígida quitinosa constituída de polímeros de amino-açúcares. São heterotróficos, dependendo de substâncias orgânicas disponíveis. Desprovidos de clorofila, são incapazes de produzir energia por meio da luz e do gás carbônico. Pertencentes ao reino Fungi, são altamente eficientes na degradação de uma ampla variedade de substratos e podem se apresentar nas formas leveduriforme e hifal. Responsáveis pela produção de substâncias de interesse comercial, os fungos também representam importantes agentes decompositores dos componentes primários da madeira - lignina e celulose - o que resulta em um controle na produção de biomassa em um ecossistema florestal (MINAMI, 2003).

Segundo Loguercio-Leite (2004), os fungos estão agrupados em quatro filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. Do primeiro, fazem parte os fungos mais simples e com dimensões muito pequenas, que normalmente apresentam esporos flagelados. É considerada a linhagem mais primitiva de fungos. O filo Zygomycota apresenta duas classes: *Zygomycetes* e *Trichomycetes*. A classe *Zygomycetes* é distinguida pela produção de um esporo de resistência, de origem sexual, o zigosporo. Algumas espécies são utilizadas na fabricação de produtos industriais como amilases (*Mucor racemosus*), β -caroteno (*Blakeslea trispora*), ácido cítrico (*Mucor piriformes*), ácido fumárico (*Rhizopus oryzae*) e alguns alimentos. O filo Ascomycota possui o maior número de espécies até agora encontradas, e devido à variabilidade estrutural e numérica, ainda não existe uma delimitação mais precisa das

suas categorias taxonômicas superiores. Existem cerca de nove classes de ascomicetos que continuam em discussões entres os especialistas. Por fim, o filo Basidiomycota onde a maioria das espécies produz estruturas protetoras macroscópicas. São utilizados como fonte de proteínas e outros são cultivados comercialmente. Outros são comestíveis ou produtores de antibióticos (LOGUERCIO-LEITE, 2004).

Os fungos constituem um ótimo modelo para estudos em eucariontes devido à sua simplicidade se comparado a outros seres. Eles possuem entre 30 a 35 milhões de pares de nucleotídeos no genoma. Diversas características do DNA de fungos são semelhantes a de outros eucariontes. Por exemplo, seus cromossomos também possuem histonas e centrômeros; seus genes possuem introns e exons, sendo os introns em menor quantidade; entre outras (TUDZYNSKI E TUDZYNSKI, 1997; AZEVEDO, 2004).

A utilidade dos fungos já é conhecida há séculos, desde a fermentação de bebidas alcoólicas, como também servindo de alimentos (uma vez que são ricos em vitaminas), na fabricação de pães, queijos, até a capacidade metabólica em produzir uma grande diversidade de micromoléculas bioativas, como por exemplo, a produção de antibióticos.

A relação da indústria de alimentos com os fungos filamentosos é muito antiga e extensa. Os fungos estão associados à tecnologia de alimentos desde os primórdios das civilizações mais antigas conhecidas, como por exemplo, nos processos de preparação de alimentos orientais, bebidas de povos indígenas no continente americano e, na Europa, participam no processo de alimentos a base de leite. Com o desenvolvimento das pesquisas, já é possível conhecer o processo pelos quais os fungos modificam os alimentos, seja pela produção de micotoxinas ou com a contaminação de alimentos processados (PASTORES E MACEDO, 2004).

Os estudos toxicológicos da ação de micotoxinas datam dos anos 60, devido ao surgimento de casos de contaminação e morte de centenas de animais. Entre as micotoxinas (Figura 4) conhecidas, incluem-se as aflatoxinas (estrutura 7 da figura 4) – grupo de compostos tóxicos produzidos por certas cepas dos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*; ocratoxinas (estrutura 8 da figura 4) – composto derivado de isocumarinas com um grupo amida ligado ao grupo amino da fenilalanina produzida principalmente pelos fungos *Penicillium cyclopium*, *P. viridicatum*, *P. palitans* e algumas cepas de *Aspergillus*; citreoviridinas (estrutura 9 da figura 4), tricotecenos e fumonisinas, produzidos por fungos do gênero *Fusarium*, além de uma variedade de derivados indólicos (PINTO *et al.*, 2002; PASTORES E MACEDO, 2004).

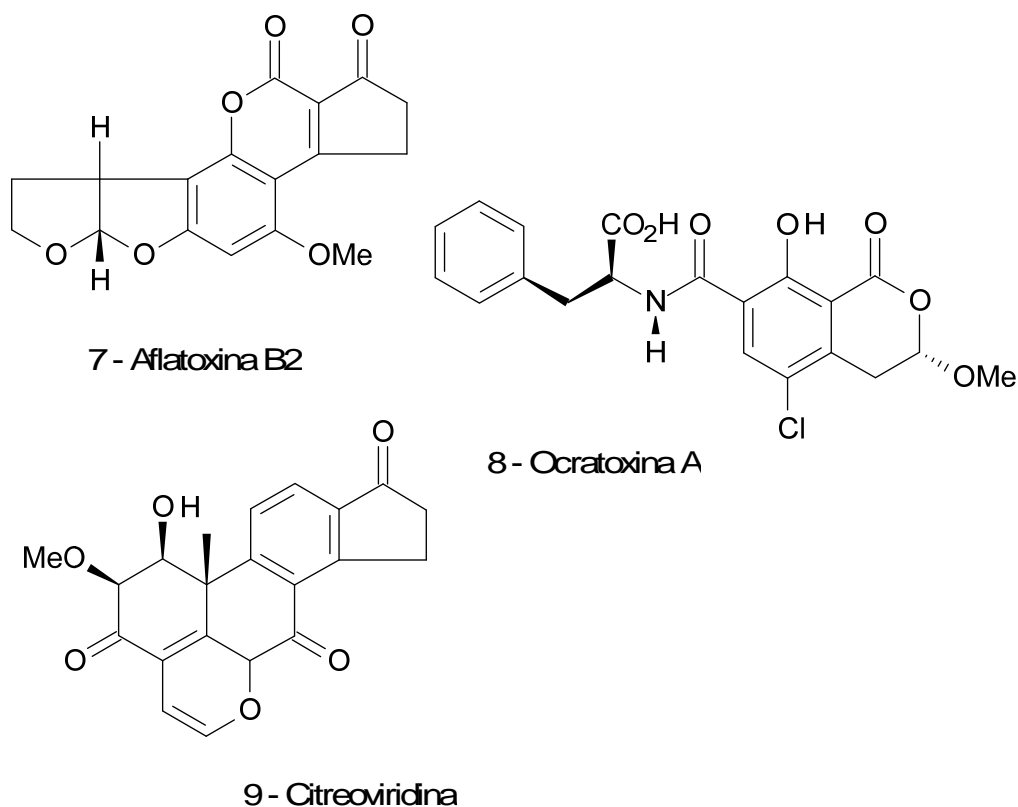


Figura 4 - Estruturas químicas de micotoxinas

Entre as enzimas fúngicas importantes para a indústria alimentícia destacam-se as amiloglucosidases, produzidas por linhagens de *Aspergillus* e *Rhizopus*; α -amilases, que transforma amido em dextrinas e oligossacarídeos e pode ser isolada por fermentação de linhagens de *A. niger*; reninas; lipases, que catalisam reversivelmente a hidrólise de triacilgliceróis sob condições naturais, podendo catalisar a transesterificação e a síntese estereoespecífica de ésteres em um grande número de substratos (PASTORES E MACEDO, 2004).

Além do potencial gastronômico, os fungos estão diretamente ligados à recuperação ambiental, tanto na reciclagem de resíduos agrícolas e agroindustriais, como na biodegradação de materiais lignocelulósicos (constituídos por celulose, poliose e lignina), especialmente a madeira (FERRAZ, 2004).

A maioria dos fungos produtores de enzimas necessárias para degradação de materiais lignocelulósicos pertencem aos grupos de *Ascomycetes*, *Deuteromycetes* e *Basidiomycetes*. Esses fungos podem causar três tipos de degradação: branca – degradam todos os componentes da madeira (*white-rot fungi*), marrom – degradam

principalmente polissacarídeos (*brown-rot fungi*), macia – podem degradar lignina e polissacarídeos, porém em velocidades baixas (*soft-rot fungi*). Essas degradações são em geral, feitas por enzimas oxidativas, principalmente do tipo lacases e peroxidases (DURÁN, 2004).

Para a indústria farmacêutica, importantes fármacos de uso clínico em várias patologias são obtidos de fungos. Dentre os medicamentos de maior repercussão terapêutica para doenças infecciosas, destacam-se como os exemplos mais conhecidos, os antibióticos (Figura 5): penicilina (estrutura 10 da figura 6), substância produzida por fungo do gênero *Penicillium*, descoberta em 1928 por Alexander Fleming; e a cefalosporina (estrutura 11 da figura 5), isolada de culturas de *Cephalosporium acremonium* em 1948 (MENEZES *et al.*, 2000; PINTO *et al.*, 2002).

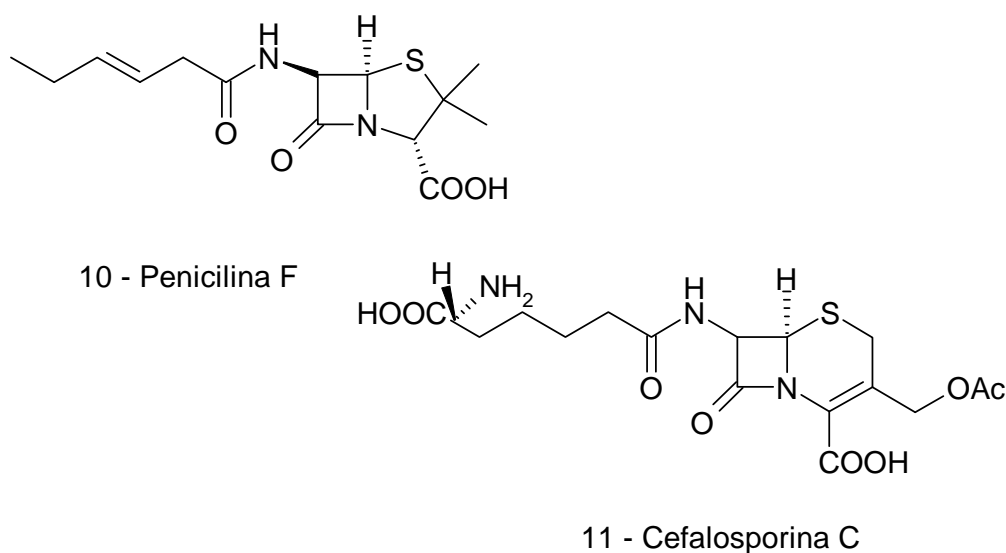


Figura 5 - Antibióticos de origem fúngica

Outros exemplos de substâncias produzidas a partir de metabólitos de fungos com atividades farmacológicas diferentes são (Figura 6): mevinolina (estrutura 12 da figura 6) - um agente redutor de colesterol; ciclosporinas; ergometrina (estrutura 13 da figura 6); asperlicina (estrutura 14 da figura 6) - um antagonista de doenças gastrointestinais e do sistema nervoso central; papulacandinas (estrutura 15 da figura 6) - um agente antifúngico, entre outros (PINTO *et al.*, 2002; MORO *et al.*, 2007).

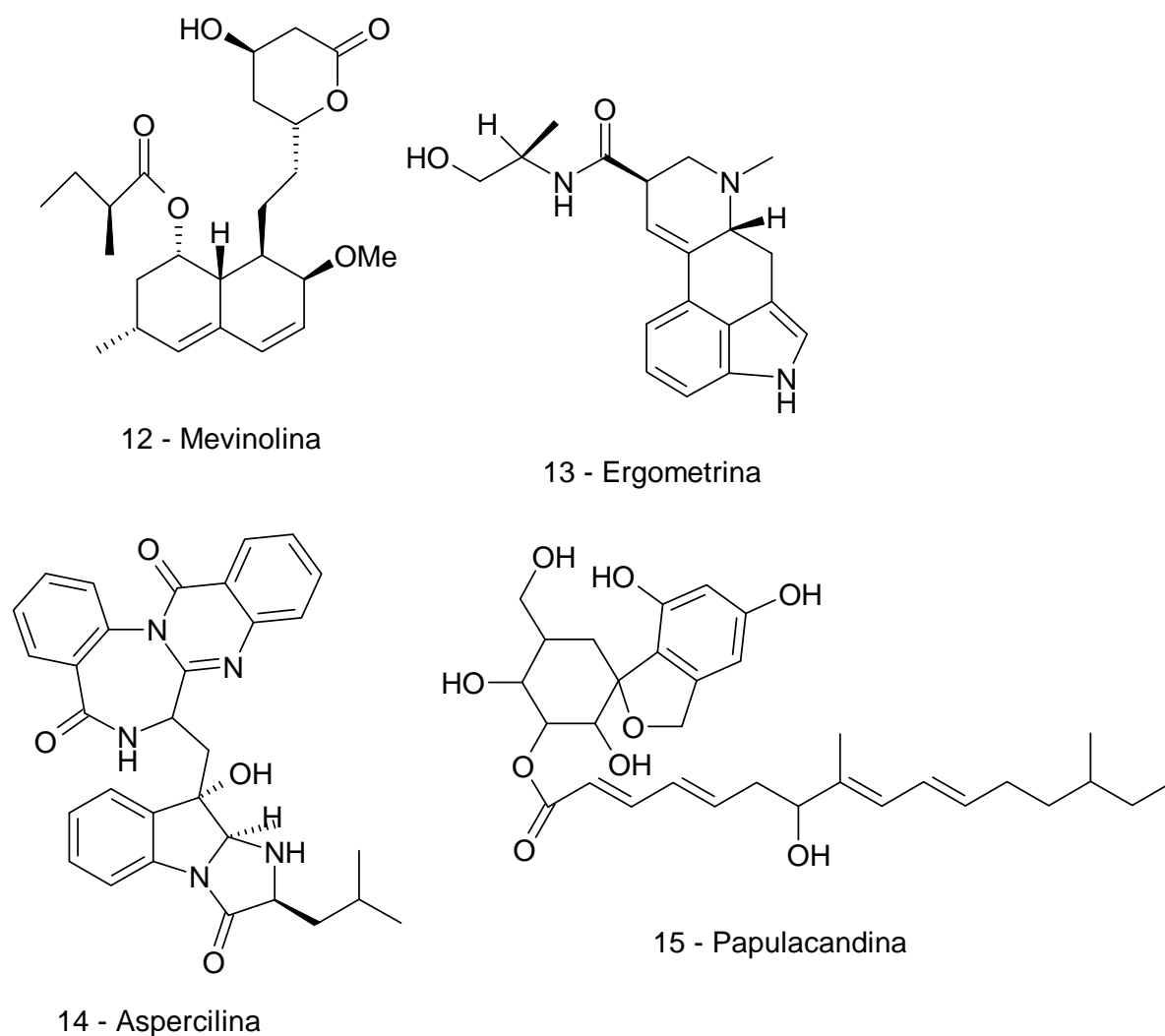


Figura 6 - Substâncias de origem fúngica com diferentes atividades farmacológicas

Outra utilização para os produtos obtidos a partir dos fungos é o controle biológico na agricultura. Destacam-se nesse processo, a utilização de fungos do gênero *Trichoderma* e *Metharizium* como micoerbicidas, micoInseticidas ou micoparasitas.

Os fungos têm ocorrência em todos os ambientes, podendo infectar animais, incluindo humanos; parasitam plantas, causando doenças e morte das árvores ou podem se associar em simbiose, onde colaboram com a planta para a absorção de água e sais minerais, aumentando a resistência da mesma ao estresse biótico e abiótico em que está exposta (GUIMARÃES, 2005).

1.1.1.1 Fungos Endofíticos

Os fungos endofíticos fazem parte de um grupo de microrganismos pouco estudado, mas que representa uma abundante e confiável fonte para novos compostos bioativos com grande potencial para aplicação em uma grande variedade de áreas (LIU *et al.*, 2007).

O termo “endófito” refere-se a microrganismos que em algum momento do seu ciclo de vida, vivem nos tecidos das plantas, normalmente ocupando espaços intercelulares dos troncos, pecíolos, folhas, raízes e etc, sem causar dano aparente. Ao contrário dos microrganismos ditos “fitopatogênicos”, que se apresentam danosos ao hospedeiro (AZEVEDO *et al.*, 2002; GUIMARÃES, 2005). A exata relação física que o fungo endofítico tem com a planta, na maioria dos casos, permanece obscura, pois é extremamente difícil encontrar um endofítico no tecido vegetal (DAISY *et al.*, 2002).

Como um endófito, o fungo cresce com a planta em uma relação mutualística de protocooperação. Essa relação beneficia o fungo através de provisão de energia, nutrientes, proteção e se manifesta como uma ajuda para o crescimento e sobrevivência individual da planta hospedeira. O resultado dessa relação pode justificar a produção de compostos bioativos, também denominados como metabolitos primários ou secundários, os quais podem ter uma ampla utilização na indústria farmacêutica, de alimentos e na agricultura (LIU *et al.*, 2007; DAISY *et al.*, 2002).

Esses compostos químicos são resultantes de síntese, degradação ou transformação no processo de metabolismo, sendo úteis para fornecimento de energia e síntese de substâncias essenciais à sobrevivência do organismo (SIMÕES *et al.*, 2004; GALVAGNO E FORCHIASSIN, 2004).

As principais macromoléculas – carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos – estão presentes em todo ser vivo, apresentando uma similaridade nos processos metabólicos dessas substâncias. O processo desses macro-nutrientes é considerado essencial para manutenção da vida do organismo, e por isso, é denominado como metabolismo primário (SIMÕES *et al.*, 2004).

Os microrganismos (assim como os vegetais) possuem um conjunto de substâncias químicas, entre essas as enzimas e coenzimas, capazes de produzir inúmeras outras substâncias que não estão, necessariamente, relacionadas com a sobrevivência do produtor. A produção dessas substâncias é definida como metabolismo secundário, nos

quais os metabólitos produzidos, embora não essencialmente úteis para a manutenção do organismo, podem trazer vantagens para a sobrevivência e para a perpetuação daquela espécie (GALVAGNO E FORCHIASSIN, 2004).

Os metabólitos secundários trazem características únicas para um determinado microrganismo, uma vez que sua produção depende de fatores bióticos e abióticos em que o fungo está envolvido. Sendo uma característica única, o interesse da pesquisa sobre esses metabólitos vem crescendo ao longo dos anos.

Embora descritos pela primeira vez na segunda metade do século XIX, apenas a partir de 1970 passaram a ser objetos de pesquisas mais profundas, depois que foi atribuído ao fungo endofítico do gênero *Balansiae* (Ascomycota) a produção de alcalóides da sua planta hospedeira (FIRÁKOVÁ *et al.*, 2007). À medida que se verificou que os fungos poderiam conferir vantagens ao seu hospedeiro, como por exemplo, proteção contra insetos e moléstias, alteração de características fisiológicas das plantas ou produção de substâncias de interesse biotecnológico, os estudos passaram a ser mais extensivos nessa área (AZEVEDO *et al.*, 2002; GUIMARÃES, 2005).

Diante de estudos químicos que demonstram a produção de inúmeras substâncias bioativas, permanece a dúvida quanto à justificativa para origem de tais compostos. Estes compostos podem ser produzidos pela planta e devido à co-evolução da mesma com microrganismo, pode ocorrer a transferência da informação genética para a sua produção ou pode ser uma consequência da relação mútua entre os organismos, ou seja, a substância não poderia ser produzida sem a presença de um dos participantes.

Do ponto de vista biológico, a produção de um metabólito pode estar fundamentada em vários mecanismos envolvidos na interação entre o microrganismo e seu habitat. A colonização, adaptação e propagação dos fungos endofíticos no hospedeiro, podem ser beneficiadas com a produção de compostos que atuem na competição com outros microrganismos, animais herbívoros e promoção de crescimento vegetal (AZEVEDO *et al.*, 2002; ZHI-LIN *et al.*, 2007).

A relação do endófito com o hospedeiro pode ter iniciado quando as primeiras plantas superiores apareceram na terra, há milhões de anos. Evidências de associações microbianas com plantas estão sendo descobertas em tecidos de troncos e folhas fossilizados. Como resultado dessa longa associação é possível imaginar que alguns desses microrganismos endofíticos podem ter desenvolvido sistemas genéticos que

permitam a transferência de informações entre eles e as plantas superiores (STROBEL, 2003; FIRÁKOVÁ *et al.*, 2007).

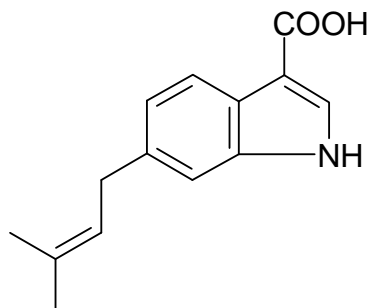
Os fungos endofíticos estão presentes em todos os órgãos da planta hospedeira e podendo ser transferidos pela semente. O micélio do fungo cresce dentro dos tecidos de revestimento, tronco, folha e finalmente penetra no tronco da flor passando para semente (TAN E ZOU, 2001).

Em geral, pode-se esperar que as condições ambientais em que a planta hospedeira cresce, podem influenciar no número e na variedade de fungos endofíticos. Por exemplo, no estudo com os extratos dos metabólitos de 15 isolados do fungo endofítico *Pestalotiopsis microspora* obtidos em 4 continentes, observou-se que apenas dois dos extratos apresentavam cromatogramas idênticos, ou seja, as condições ambientais dos continentes influenciaram diretamente na produção dos metabólitos de cada espécime (STROBEL, 2003).

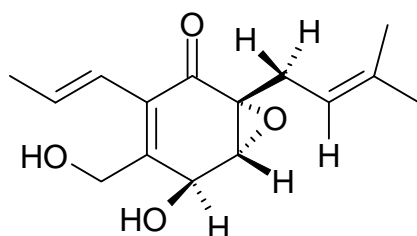
Como, em certos momentos, é uma relação onde ambos participantes se beneficiam; a planta hospedeira também tem vantagens com a infecção por fungos endofíticos. A produção de metabólitos secundários pelos endofíticos, proporciona uma variedade de aptidões tanto no aumento da resistência a herbívoros, parasitismo, estiagem, como favorecendo o crescimento da planta (FIRÁKOVÁ *et al.*, 2007).

Groppe, em 1999, estudou a relação do fungo endofítico *Epichloë bromicola* com a planta hospedeira *Bromus erectus*. Ele verificou que a concentração de fungo endofítico estava diretamente correlacionada com o vigor vegetativo da planta, sugerindo que durante o crescimento vegetativo, o fungo endofítico fosse mais benéfico para a planta quando estava em alta taxa de colonização. Lu e colaboradores, em 1999, isolaram um hormônio de crescimento vegetal, o ácido isoprenilindol-3-carboxílico (item 16 da Figura 7), do fungo endofítico *Colletotrichum* sp. (fungo endofítico de *Artemisia annua*), além de dois outros compostos com atividade antimicrobiana. Li e Strobel, em 2001, isolaram dois compostos com atividade antimicótica contra fungos do grupo oomycete (um dos mais comuns como patógenos de planta), jesterona (estrutura 17 da figura 7) e hidroxijesterona, a partir do fungo endofítico *Pestalotiopsis jesteri*. Em 2002, Silva e colaboradores, obtiveram extratos de origem fúngica com atividade nematicida contra *Meloidogyne incognita*. Nesse estudo, os fungos submetidos ao processo de fermentação foram *Cunninghamella elegans*, *Fusarium* sp., *Paecilomyces lilacinus* e *P. variotii*, sendo o extrato acetoetanólico de *Fusarium* sp. o mais ativo. Em 2005, Silva e sua equipe isolaram duas substâncias com atividades contra fungos

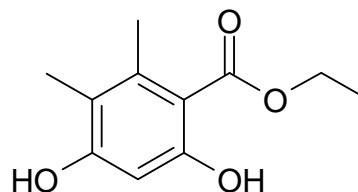
fitopatogênicos, 2,4-diidroxil-5,6-dimetil benzoato de etila (estrutura 18 da Figura 7) e phomopsilactona (GROPPE *et al.*, 1999; LU *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2005).



16 - Ácido isoprenilindol-3-carboxílico



17 - Jesterona



18 - 2,4-diidroxil-5,6-dimetilbenzoato de benzila

Figura 7 – Substâncias de origem fúngica que conferem vantagens para planta hospedeira

Na área de saúde, metabólitos secundários de origem fúngica tem sido de extrema utilidade para indústria farmacêutica. São utilizados como princípio ativo e ajudam a prevenir e curar inúmeras doenças.

O principal exemplo de metabólito secundário produzido por fungo endofítico é o taxol, utilizado no tratamento de câncer de mama e de útero. Sua principal fonte é a árvore *Taxus brevifolia*, encontrada em pântanos e alagadiços da costa oeste norte-americana. O fungo endofítico isolado da planta, *Taxomyces adreanae*, também é capaz de sintetizar taxol. Na planta, esse composto confere proteção contra fungos patogênicos à raiz que são característicos de ambientes alagados como *Phytium* e *Phytophthora*. Hoje sabe-se que vários fungos que colonizam *Taxus* spp. e outras plantas que não produzem taxol mas que crescem em solos alagados, também produzem a mesma substância (AZEVEDO *et al.*, 2002).

A aquisição pelos fungos endofíticos da via metabólica para a produção desse composto pode ter ocorrido durante o processo de co-evolução com a planta produtora ou mesmo por meio de transferência gênica. É uma explicação para a produção do mesmo composto em outras plantas que não o produzem, mas que possuem ecologia semelhante é a disseminação dos esporos fúngicos (AZEVEDO *et al.*, 2002; ZHI-LIN *et al.*, 2007).

A rota dos metabólitos secundários, provavelmente é apenas ativa em algum estágio particular de crescimento do fungo. De uma maneira geral, todos os metabólitos secundários são originados a partir do metabolismo da glicose (GALVAGNO E FORCHIASSIN, 2004).

A partir dos produtos de degradação da glicose, classificados como metabólitos primários, dependendo do estado fisiológico do microrganismo e da planta a que está associado, pode ocorrer a formação dos precursores dos metabólitos secundários.

Nas plantas, existem três grandes grupos de metabólitos secundários: os compostos fenólicos; alcalóides e terpenos. Os terpenos são formados a partir do ácido mevalônico ou de reações com piruvato mais gliceraldeído-3-fosfato. Os compostos fenólicos são formados a partir do ácido chiquímico ou ácido mevalônico (com rendimento menor). Os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos – triptofano e tirosina – os quais são formados a partir do ácido chiquímico e também de aminoácidos alifáticos – ornitina e lisina (SIMÕES *et al.*, 2004).

Nos fungos, a indução para acúmulo (ou biossíntese) de terpenos e carotenóides pode ocorrer por uma via alternativa à via do ácido mevalônico, a via metileritritol fosfato (Figura 8), que é derivado dos compostos piruvato e gliceraldeído-3-fosfato originados a partir da degradação da glicose (ZHI-LIN *et al.*, 2007).

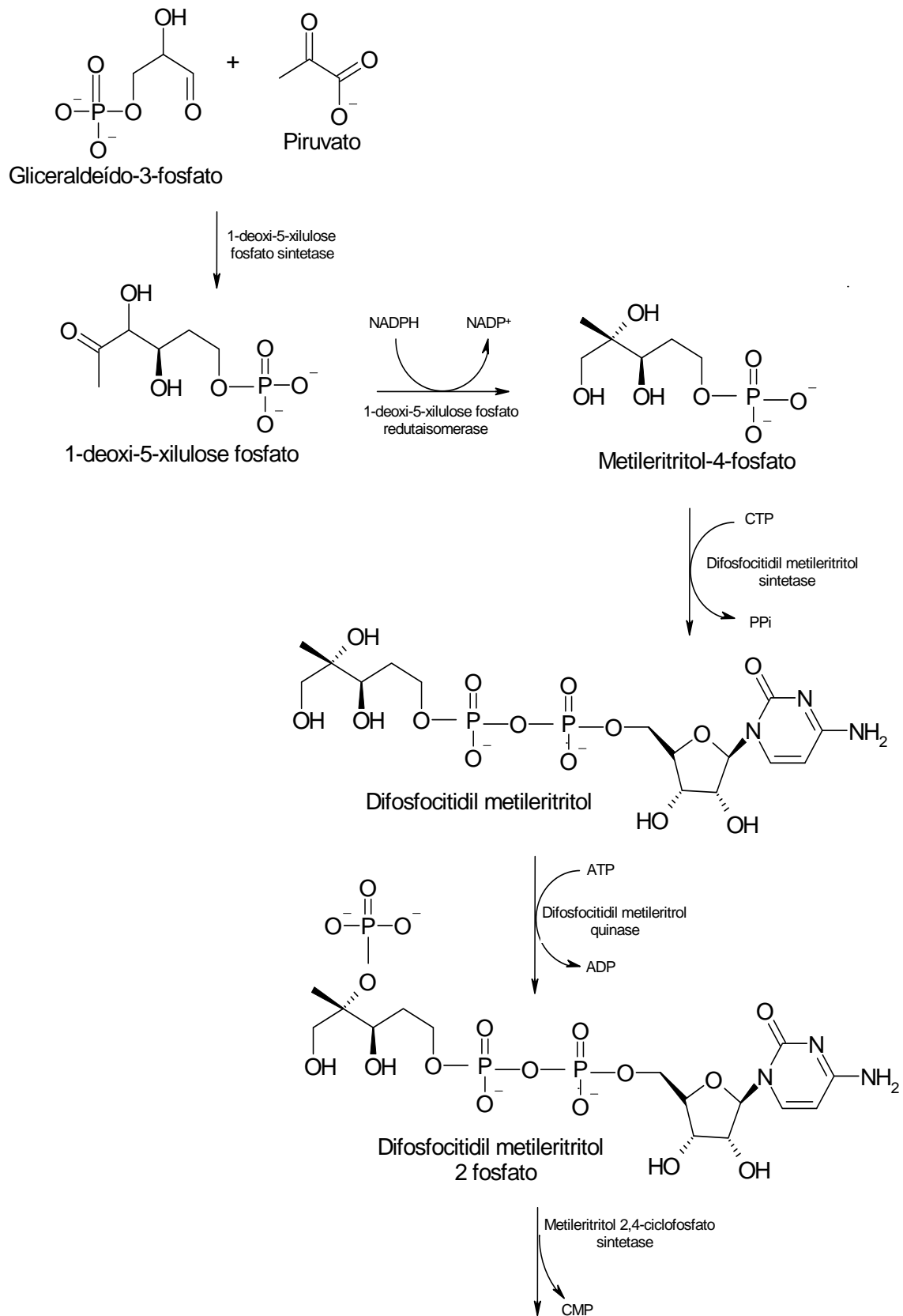


Figura 8 – Via metieritritol fosfato

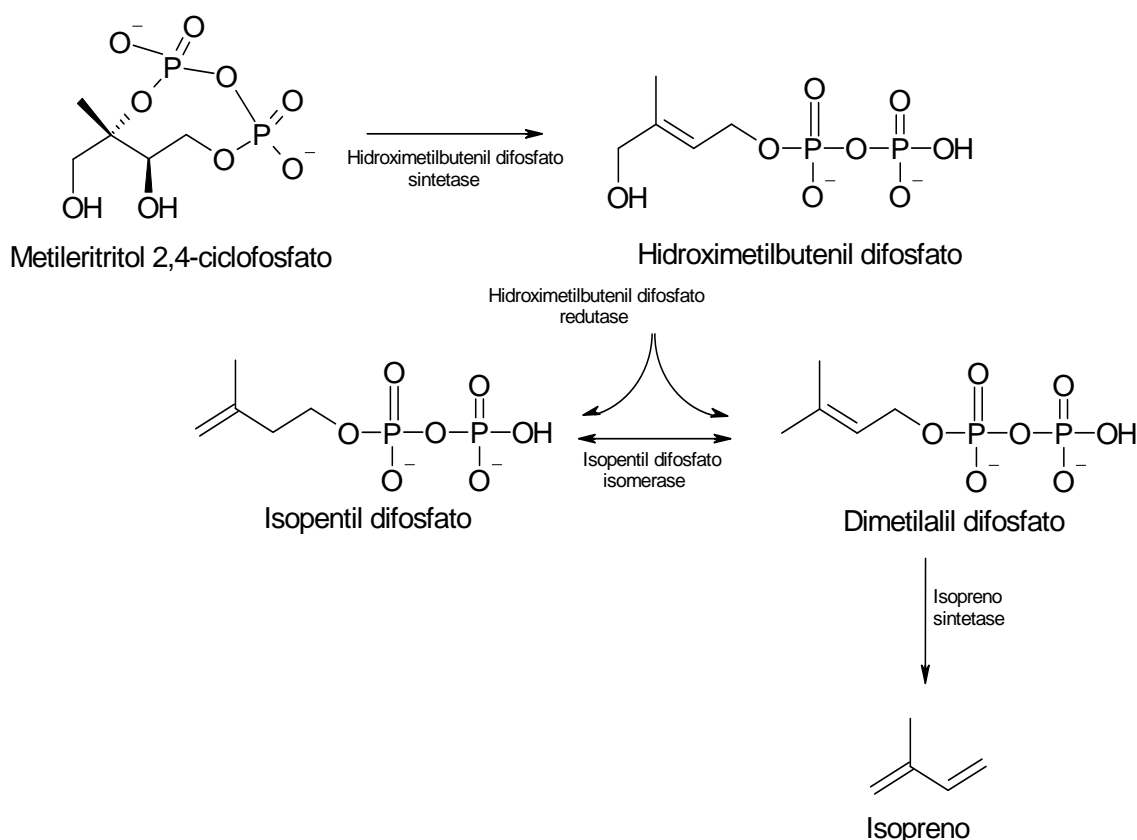


Figura 8 – Via metieritritol fosfato (continuação)

O isopreno resultante é a unidade comum nos terpenos. Os terpenos possuem essa unidade comum em suas formulas após a união de duas, quatro, seis, oito, ou mais unidade de isopreno. Os óleos essenciais classificados na sua maioria como monoterpenos e sesquiterpenos, por exemplo, são formados por duas e três unidades de isopreno, respectivamente. Os diterpenos são formados por quatro unidades; os triterpenos formados por seis unidades e assim sucessivamente até a formação dos politerpenos com cerca de duas mil unidades de isopreno formando, por exemplo, a borracha (COSTA, 1994).

No metabolismo do nitrogênio, tem sido observado que a fonte de nitrogênio adicionada ao meio gera íon amônio (NH_4^+) ou amônia (NH_3) para ser absorvido. Essa assimilação pode ser feita tanto por aminação redutiva, liberando L-aminoácidos, principalmente glutamato via glutamato desidrogenase, quanto pela via da glutamina. Os aminoácidos gerados são catabolizados em peptídeos, tornando a única fonte de carbono e nitrogênio para geração de energia (GALVAGNO E FORCHIASSIN, 2004).

Outros exemplos de metabólitos secundários com efeitos anticancerígenos são podofilotoxina, responsável pela produção dos medicamentos etoposido e teniposido; e

camptotecina, isolado do fungo da família Phycomycetes, associado à planta *Nothapodytes foetida* (PURI *et al.*, 2005).

Outras publicações demonstram que determinadas propriedades medicinais de certas plantas podem estar relacionadas com os metabólitos que são produzidos por microrganismos endofíticos. Por exemplo, o fungo endofítico *Pestalotiopsis leucothes* isolado de *Trypterygium wilfordii* produz metabólitos com efeitos variáveis sobre as células T, células B e monócitos, representando uma nova alternativa para pesquisa de compostos imunomoduladores ou para o tratamento de doenças auto-imune (AZEVEDO *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2005; FIRÁKOVÁ *et al.*, 2007).

A variedade de metabólitos secundários produzidos por um único microrganismo endofítico está sendo estimada, mas a expectativa é que seja alta. Por exemplo, *Colletotrichum* é um gênero considerado fitopatogênico, mas que já fora isolado como endofítico na planta *Artemisia annua*, já demonstrou síntese de vários compostos de interesse para indústria, entre esses a ergometrina e seus derivados, ácido indolacético e outros (LU *et al.*, 2002).

A maioria dos estudos realizados com fungos endofíticos é proveniente de material biológico oriundo de regiões de clima temperado. Entretanto, pesquisas sugerem existir grande potencial de microrganismos endofíticos associados às plantas de clima tropical. As pesquisas realizadas no Brasil têm revelado a existência de novas espécies de microrganismos.

O estudo dos microrganismos endofíticos de plantas da Amazônia é uma dinâmica linha de pesquisa na área de Biotecnologia na Universidade Federal do Amazonas iniciada pelo prof. Dr. José Odair Pereira em 1993. Trabalhos com prospecção de microrganismos endofíticos de *Paullinia cupana* (guaranazeiro), teve mais de 4000 isolados fúngicos obtidos a partir de cerca de 160 plantas. Quatro gêneros foram mais freqüentes das populações estudadas: *Guignardia*, *Phomopsis*, *Xylaria*, *Glomerella* e *Colletotrichum*. Outros menos freqüentes como: *Dreschlera*, *Nodulisporium*, *Pestalotia*, *Curvularia* e *Humicolata* também foram encontrados (AZEVEDO *et al.*, 2002).

Outra planta nativa da região amazônica que foi estudada, é *Theobroma grandiflorum*, o cupuaçuzeiro, no qual o gênero fúngico mais frequente encontrado foi *Guignardia*. A presença de gêneros de fungos associados a somente uma das plantas corrobora com a hipótese de especificidade do endofítico com seus hospedeiros (AZEVEDO *et al.*, 2002).

Outra abordagem com estudos de fungos endofíticos no Amazonas é a investigação de microrganismos endofíticos de plantas medicinais, como *Copaifera multifuga* (copaíba). Seu óleo vem sendo utilizado pela população como anti-inflamatório, anti-reumático, cicatrizante, tratamento de ulcerações e desinfetante das vias urinárias. Os principais gêneros fúngicos isolados foram *Guignardia*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Xylaria*, alguns fungos leveduriformes e muitas bactérias do gênero *Bacillus* (AZEVEDO *et al.*, 2002).

Diante de vários estudos que comprovam a produção, por fungos endofíticos, de metabólitos secundários que podem ter as mesmas atividades dos compostos isolados a partir das plantas hospedeiras, este trabalho se propõe a realizar o isolamento dos fungos endofíticos associados à *Aniba rosaeodora* (Lauraceae) e a análise química dos metabólitos por eles produzidos, com o intuito de colaborar com o acervo mundial de substâncias químicas de origem natural.

1.1.2 FAMÍLIA LAURACEAE

A família Lauraceae é considerada uma das famílias mais primitivas pertencentes à divisão Magnoliophyta. Descrita por Antoine Laurent de Jussieu, as árvores da família Lauraceae apresentam-se amplamente distribuídas através das regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo formadas por 49 gêneros e 2.500 - 3.000 espécies. No Brasil ocorrem 22 gêneros que habitam em sua maior parte as Florestas Pluviais e também as restingas e os cerrados (WERFF E RICHTER, 1996; STASI E HIRUMA-LIMA, 2002; QUINET, 2005).

Esta família destaca-se entre as demais pela sua importância econômica. São principalmente utilizadas na culinária, marcenaria e construção civil, fábrica de papel, indústria de cosméticos e medicina popular. Porém, a maioria das espécies tem seu uso restrito às comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas (MARQUES, 2001). Os principais gêneros são: *Laurus*, *Sassafras*, *Licaria*, *Ocotea*, *Nectandra*, *Aniba*, *Persea* e *Cinnamomum* (RIBEIRO *et al.*, 1999; STASI E HIRUMA-LIMA, 2002).

Na Tabela 1 pode ser observado alguns exemplos de espécies da família Lauraceae que são úteis na construção civil e na fabricação de objetos em geral.

Tabela 1 – Utilidade para espécies do gênero *Ocotea*

Espécie	Utilidade	Observação
<i>O. puberula</i>	Fabricação de papel	--
<i>O. organensis</i>	Carpintaria	Apresenta madeira de cor parda e de pouca duração.
<i>O. diospyrifolia</i>	Fabricação de postes e tábuas de assoalho. A casca contém tanino (útil em processo de fábrica de curtumes).	Espécie encontrada nas regiões sul e sudeste do Brasil, sendo comum ainda na Argentina e no Paraguai.
<i>O. guianensis</i>	Produção pasta para fabricação de papel.	Fornece madeira branca, leve, com densidade 0,44 m/L.
<i>O. acutifolia</i>	Marcenaria e construções civil.	--
<i>O. aciphylla</i>	Construção civil e fabricação de tábuas para assoalhos.	Fornece madeira amarela, aromática, resistente aos insetos, principalmente aos cupins.
<i>O. catharinensis</i>	Construção civil, na produção de vigas, ripas, assoalhos, móveis e moirões.	--
<i>O. canaliculata</i>	Marcenaria.	Fornece madeira de cor pardo-escura.
<i>O. spectabilis</i> , <i>O. divaricata</i> , <i>O. porosa</i> e <i>O. elegans</i>	Marcenaria e construções em geral.	--

Fonte: RIBEIRO *et al.*, 1999; MARQUES, 2001

O gênero *Nectandra*, possui características favoráveis à produção de papel, móveis, devido a rigidez elevada e coeficiente de flexibilidade mediano, sendo utilizadas principalmente as espécies *N. amazonum*, *N. leucothyrsus*, *N. angustifolia* e *N. rígida* (GUIMARÃES *et al.*, 1996).

As espécies do gênero *Aniba* merecem destaque pelo alto valor econômico, devido à constituição química do óleo essencial, encontrado em grande quantidade principalmente no tronco. Em 1881, Morim separou o óleo essencial de um álcool e o

chamou de linalol. Sua primeira exportação para a Europa aparece registrada na Guiana Francesa em 1883. Anos mais tarde, Koeller sugeriu que a espécie fosse denominada *O. caudata*. Posteriormente, Mez sugeriu o nome *A. parviflora*, contudo, Ducke, em 1926 passou a chamá-la *A. rosaeodora* Ducke, popularmente conhecida como pau-rosa. O próprio autor, neste mesmo ano, verificou que havia diferenças entre as espécies da Amazônia e das Guianas, daí passou a chamá-la *A. rosaeodora* var. *amazonica* Ducke. A última mudança foi feita em 1938, quando Kostermans propôs a alteração para *A. duckei* Kosterm e, a espécie que mais produz óleo essencial, para *A. fragans* Ducke. (BASTOS, 1943).

Segundo Ducke, o manejo comercial do gênero *Aniba* torna-se impossibilitado pela escassez de matéria-prima. Outras espécies, como *A. canellita* e *A. parviflora* também são usadas em perfumaria. Porém, esta última, é de ocorrência muito rara, o que restringe sua utilização (MARQUES, 2001).

Os caboclos geralmente distinguem três tipos de pau-rosa, conforme a coloração do lenho: “pau-rosa mulatinho” - que é mais escuro, de densidade elevada, e que submerge quando as toras são cortadas e atiradas na água; “pau-rosa itaúba” - de cor amarelada, menos densa, e “pau-rosa imbaúba” - muito leve e quase branca. O primeiro é mais rico em essência e o último, mais pobre. A exploração dos paus-rosa, fez com que essas espécies fossem levadas à beira da extinção. Cabe salientar que o óleo de pau-rosa já chegou a ocupar o terceiro lugar na pauta de exportação da região Amazônica, cabendo à borracha e à castanha, o primeiro e segundo lugar, respectivamente (BASTOS, 1943).

As aproximadamente 40 espécies do gênero *Aniba* são ocorrentes no Brasil. Algumas destas podem ser divididas em 3 grupos, de acordo com a natureza química do constituinte predominante no óleo essencial: o grupo do linalol (*A. roseodora*); o grupo do benzoato (*A. fragans*, *A. firmula*, *A. gardneri*, *A. burchelli*, *A. parviflora*, *A. permolis*, *A. guianensis*) e o grupo do alibenzeno (*A. canellita*, *A. hostmanniana*, *A. pseudocoto*) (MORAES *et al.*, 1972; GOTTLIEB *et al.*, 1981).

Na medicina popular, as espécies da família Lauraceae apresentam utilização variada, desempenhando diferentes funções contra diversas doenças (MARTINS E SANTOS, 1995). A Tabela 2 relaciona as espécies do gênero *Ocotea* que são popularmente conhecidas na medicina tradicional.

Tabela 2 – Espécies do gênero *Ocotea* utilizadas na medicina tradicional

Espécie	Indicação	Observação
<i>O. aciphylla</i>	Infusão das folhas: Tônico e estomáquico. Casca: anti-reumática e depurativa	Folha é utilizada para enrolar o cigarro e quando queimada, pode ter um efeito narcótico.
<i>O. spectabilis</i>	Infusão da casca e da raiz: tônico.	Tanto a casca quanto da raiz possui característica adstringente.
<i>O. pulchella</i>	Casca e as folhas: tônicas do útero.	--
<i>O. teleiandra</i>	Casca: Analgésico Folhas: Sudoríficas	Casca possui um gosto amargo
<i>O. indecora</i>	Sudorífica, anti-reumática e até antisifilítica	--
<i>O. guianensis</i>	Casca e folha: Abscessos	Possui casca e folha aromáticas

Fonte: EMMERICH E SENNA, 1985

Outra espécie da Amazônia, denominada *O. barcellensis*, possui um óleo que é extraído através de furos na madeira, sendo usado contra a pitiríase. Por vezes, é utilizado para substituir o querosene, assim como os das espécies *O. pretiosa*, *O. cymbarum* e ainda *Licaria puchury-major* Kosterm. Possuem atividade comprovada contra o desenvolvimento do ancilostomídeo humano (MARQUES, 2001).

Dentre as espécies medicinais, também merecem destaque as pertencentes ao gênero *Aniba*. A espécie *A. riparia*, por exemplo, é típica da região Amazônica e dela pode-se obter um extrato dos frutos e dos cálices persistentes que possuem atividade antibiótica comprovada contra *Cândida albicans*, *Bacillus cereus*, *Klebsiela pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. As espécies *A. canellita*, *A. duckei* Kosterm. e *A. hastmanniana*, também possuem atividade bloqueadora no desenvolvimento do ancilostomídeo humano, devido a ação do óleo essencial que é extraído do lenho e da casca. É usado ainda para banhos aromáticos com as folhas. O óleo essencial contém laurostearina, geraniol, linalol, cineol, terpineno, engenol e pineno, além de ácidos orgânicos, ácidos graxos e tanino (MARQUES, 2001).

1.1.2.1 *Aniba rosaeodora* Ducke

A *A. rosaeodora* é uma árvore da família Lauraceae, popularmente conhecida como pau-rosa, pau-rosa-mulatinho, pau-rosa-itaúba, pau-rosa-imbaúba, casca preciosa, *rosenholzbaum* (em alemão), *bois de rose* (em francês), *bois de rose femelle* (em francês), *rosewood* (em inglês), *palo de rosa* (em espanhol), *legno di rose* (em italiano), e as seguintes sinonímias: *Licaria guianensis* Aublet, 1775, *A. rosaeodora* var. *amazonica* Ducke, 1926 e *A. roseodora* Kostermans, 1938 (NEGRAES, 2003; LUPE, 2007; ALCÂNTARA, 2009). É encontrada nas florestas de terras firmes e altas, principalmente de mata pluvial não inundável (ALCÂNTARA, 2009).

O óleo essencial produzido por *A. rosaeodora* é constituído na maior parte por linalol (70-90%).

O linalol e seus ésteres, como acetato de linalila, são matérias odoríferas de cheiro intenso e agradável. Esse álcool é um importante intermediário na produção de vitamina E (OHASHI, 1997). O óleo extraído é também utilizado na medicina caseira para amenizar dor após a extração de dentes, embebendo-o em algodão e aplicando-o sobre o ferimento. O óleo também é empregado em tratamento de acnes, resfriados, tosse, dermatites, febre, dor de cabeça, tensão nervosa e náusea, diversas infecções e ferimentos (LORENZI E MATOS, 2008; NEGRAES, 2003).

É largamente utilizada em produtos cosméticos para cuidados com peles sensíveis; tratamento de acnes, rugas e dermatite na forma de lavagens faciais, vaporizações, sabonetes, loções, cremes e géis de limpeza; em banhos de imersão tonificantes; cremes massageadores para tratamento de estrias e cicatrizes; perfumes caseiros; spray para aromatizar ambientes e em loções com óleo de Andiroba (*Carapa guianensis*) para reumatismo. No interior do Estado do Amazonas, as lavadeiras utilizam-na durante o último enxágue das roupas, para conferir aroma de limpeza (NEGRAES, 2003; LUPE, 2007).

Na aromoterapia, o óleo essencial é aconselhado como estimulante celular, regenerador de tecidos, antidepressivo, tônico dos nervos, calmante, contra dores de cabeça e náuseas (NEGRAES, 2003).

Com vasta utilidade para a indústria cosmética, o óleo é vendido hoje por US\$ 80/kg, e, devido à escassez do produto, esse preço tem aumentado, considerando que as últimas fontes naturais estão se esgotando. Atualmente, os principais importadores do pau-rosa são os Estados Unidos, Alemanha, França, Espanha, Países Baixos e Reino Unido e alguns projetos de pesquisa interinstitucionais investigam as possibilidades de manejo sustentável do pau-rosa (LUPE, 2007; SAMPAIO, 1987).

De acordo com o IBAMA, para cada tambor de 180 litros de óleo produzido, 80 mudas de *A. rosaeodora*, deveriam ser plantadas, pois o principal problema para extração do óleo é a destruição da árvore. E para seguir a recomendação de reflorestamento adequado, seriam necessários 25 anos para a maturação da árvore.

Análises do óleo essencial das folhas de *A. rosaeodora* apresentaram alta concentração de linalol extraído da madeira, cerca de 85%, e na folhas, cerca de 81% (LUPE, 2007).

Nos últimos tempos, houve um declínio no consumo de óleo de pau-rosa, tanto pelo preço quanto pelo risco ambiental em causar a extinção da espécie, pois não é bom para nenhuma empresa estar veiculada a um processo de devastação ambiental. Fatores como a substituição do óleo natural de pau-rosa por correspondentes sintéticos e a inexistência de uma política florestal para o setor, também contribuíram para o declínio da exportação do óleo nas últimas décadas (SAMPALIO, 2000). E devido a esse risco, pesquisadores procuram fontes renováveis e sustentáveis como alternativas para obtenção do linalol.

Objetivos

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Realizar a triagem biológica dos fungos endofíticos associados à *Aniba rosaeodora* e a triagem química dos seus metabólitos secundários.

2.2 ESPECÍFICOS

- Isolar fungos endofíticos associados à *A. rosaeodora*.
- Obter extratos de metabólitos secundários dos fungos endofíticos isolados.
- Realizar a triagem química dos extratos utilizando técnicas cromatográficas.
- Realizar testes antimicrobianos com o sobrenadante do meio de cultura e com extratos miceliais dos fungos endofíticos.
- Realizar identificação dos isolados fúngicos que obtiverem resultados de bioatividade relevante.

odologia *Met*

Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *A. rosaeodora*

3.1.1 COLETA

Para o isolamento dos seus fungos endofíticos, coletaram-se diferentes partes vegetais de quatro espécimes de *A. rosaeodora*, situadas na Reserva Florestal Adolfo

Ducke, pertencente ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), localizada no Km 26 da estrada AM 010, Manaus-Itacoatiara.

As árvores utilizadas estavam previamente marcadas pelo grupo de pesquisa do Dr. Paulo de Tarso Sampaio (INPA/UEA) (Figura 9). As coletas foram realizadas no dia 24 de abril de 2008, no horário da manhã.

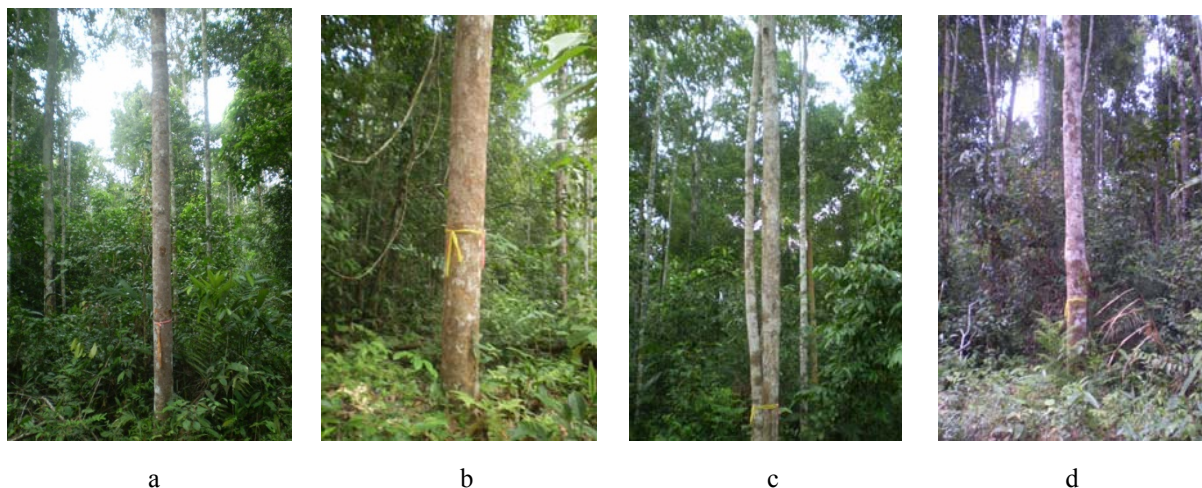
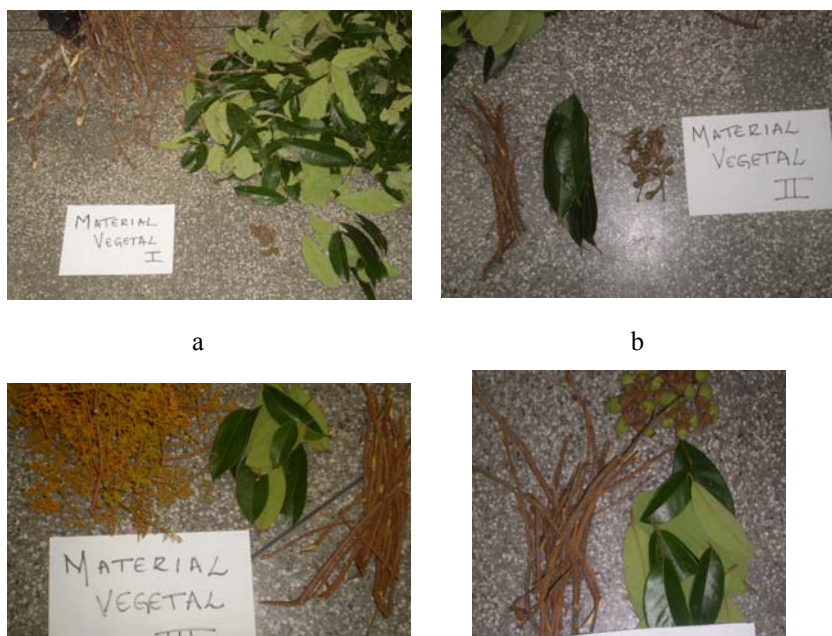


Figura 9 – Árvores de *Aniba rosaeodora* selecionadas para isolamento dos fungos endofíticos

Dos dois primeiros espécimes coletaram-se folhas, galhos, semente (Figura 9a, 9b e Figura 10a, 10b); do terceiro espécime coletaram-se folhas, galhos e flor (Figura 9c e Figura 10c); e, do quarto espécime coletaram-se folha, galhos e fruto (Figura 9d e Figura 10d).



c

d

Figura 10 - Material vegetal coletado de cada espécime de *A. rosaeodora*

Utilizou-se entre vinte e cinco à trinta fragmentos de folhas, galhos, frutos e flores da planta (ARAÚJO *et al.*, 2002). Após a coleta, as amostras foram transportadas para o laboratório de Biorgânica do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas (MBT/ESA/UEA), separadas, identificadas conforme Figura 10, acondicionadas em sacos plásticos hermeticamente fechados, identificadas e armazenadas sob temperatura de 4°C por 24 horas (Figura 11). Os tecidos utilizados foram selecionados quanto à ausência de sinais de doença.



Figura 11 – Armazenamento do material vegetal em sacos plásticos hermeticamente fechados

3.1.2 ISOLAMENTO

3.1.2.1 Desinfecção superficial

O isolamento dos fungos endofíticos foi executado de acordo com procedimento de Petrini (1992). As amostras vegetais coletadas foram lavadas em água corrente e com detergente neutro. Foram cortadas em fragmentos de 10 a 12 cm. Foram submetidas a uma seqüência de submersões em soluções na seguinte ordem e tempo: álcool a 70% por um minuto; hipoclorito de sódio 3% por quatro minutos; álcool a 70% por trinta segundos; e água destilada estéril por dois minutos (Figura 12). Este procedimento foi realizado em ambiente estéril, utilizando-se a câmara de fluxo laminar. Como contra-prova de esterilização, foram semeadas em meio ágar-batata-dextrose (BDA), alíquotas de água da última lavagem dos fragmentos vegetais e submetido a uma temperatura de 28°C por sete dias (PETRINI, 1992; FROHLICH *et al.*, 2000; GUIMARÃES *et al.*, 2009).

3.1.2.2 Inoculação de fragmentos vegetais

Após a desinfecção superficial, o material vegetal foi cortado em pequenos fragmentos e estes, foram inoculados em placas de petri contendo meio BDA e meio folha (MF), conforme Figura 13, previamente esterilizados em autoclave, acrescido de amoxicilina (0,5g/L), para evitar o crescimento de bactérias endofíticas. Foram utilizados cinco fragmentos em cada placa. Em seguida, foram incubadas sob temperatura de 28 °C por sete a quatorze dias, e retiradas da incubadora conforme observação macroscópica do crescimento dos fungos (ARAÚJO *et al.*, 2002; GUIMARÃES, 2005).



a



b



c d
 Figura 12 – Desinfecção superficial



a b
 Figura 13 – Inoculação dos fragmentos. a) Inoculação em BDA. b) Inoculação em MF

A taxa de colonização (T.C.) fúngica foi calculada por avaliação macroscópica dos microrganismos isolados, considerando a expressão abaixo (ARAÚJO *et al.*, 2002):

$$T.C. = \frac{\text{N}^\circ \text{ de fragmentos vegetais com crescimento fungico}}{\text{N}^\circ \text{ total de fragmentos vegetais}}$$

3.1.3 PURIFICAÇÃO

Foi utilizada a técnica de purificação por esgotamento para obtenção de colônias isoladas. Essa técnica consiste em fazer estrias, com auxílio de uma alça de platina, em meio sólido onde por esgotamentos se obtém colônias isoladas no final das estrias. Os meios utilizados para purificação foram os mesmos utilizados na inoculação inicial, para permitir a manutenção das características de cada fungo. Foram incubados por um a dois dias à 28 °C (ARAÚJO *et al.*, 2002; LEMOS E ARAÚJO, 2002).

Em seguida, foi retirado um disco do meio contendo a colônia isolada e inoculado em outra placa com o mesmo meio de cultura, colocando o fragmento no centro da placa. Assim, foi possível identificar as características de crescimento de cada fungo (ARAÚJO *et al.*, 2002; LEMOS E ARAÚJO, 2002).

3.2 PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

3.2.1 FERMENTAÇÃO

Três discos dos meios sólidos dos fungos purificados, medindo 6 mm de diâmetro, foram transferidos para frascos de erlenmeyer de 150 mL com 50 mL de meio líquido de batata-dextrose (acrescido de 0,2% de extrato de levedura) sob condições estéreis (SOUZA *et al.*, 2004). Os fungos isolados em meio de cultura MF foram primeiramente repicados para outra placa com meio de cultura BDA, e após crescimento neste meio de cultura, foi retirado discos deste meio sólido e foram transferidos para frascos de erlenmeyer sob condições estéreis.

Foram incubadas sob agitação por quatorze dias a uma temperatura de 28°C com a velocidade de 150 rotações por minuto. Em seguida, o caldo de fermentação dos fungos foi filtrado para separação do sobrenadante e o micélio (Figura 14a e b).

3.2.2 EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS

Os sobrenadantes foram armazenados sob a temperatura -19° C para posterior análise (Figura 15). As massas miceliais remanescentes foram mantidas submersas por sete dias em etanol para extração dos metabólitos (Figura 16). Os extratos foram concentrados com auxílio de um evaporador rotatório para utilização em testes antimicrobianos.



a



b

Figura 14 – a) Frascos de erlenmeyer no aparelho shaker, com caldo de batata dextrose e inoculo fúngico.

b) Filtração à vácuo para separação do micélio e sobrenadante.



Figura 15 – Sobrenadantes filtrados e mantidos à -19° C



Figura 16 – Massas miceliais após filtração e submersas em etanol

3.3 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA ANÁLISE DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

3.3.1 TRIAGEM DE PRODUÇÃO DE LINALOL

3.3.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os sobrenadantes filtrados foram submetidos à análise por CLAE em um aparelho modelo Star 800 da empresa Varian, com injetor automático Module interface e bomba para eluição modelo 240, série 00690 Varian ProStar, acoplado ao detector de luz ultra violeta modelo 310, série 01316 Varian ProStar (Figura 17).



Figura 17 – Aparelho de Cromatografia líquida de alta eficiência utilizado nas análises

As amostras foram filtradas novamente em filtro Chromafil – CA-45/25 Cellulose acetato 0,45 μm e em seguida injetadas no aparelho com auxílio do injetor automático, sendo analisadas a um comprimento de onda de 271 nm.

A coluna utilizada para as análises foi YMC Pack NH_2 de 250 x 4,6mm; com gradiente de 10% de água e 90% de acetonitrila por cinco minutos, seguido pelo aumento para 40% de água e 60% de acetonitrila após dez minutos, permanecendo sob essa concentração por mais quinze minutos. A solução padrão de linalol (Sigma®) também foi submetida à análise nas mesmas condições para comparação e possível detecção da produção deste pelos fungos.

Para os extratos que apresentaram picos com tempo de retenção na região da amostra padrão foram adicionados 10 μL da solução padrão de linalol na concentração de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e injetados novamente.

As amostras que apresentaram acréscimo na área do pico com mesmo tempo de retenção da amostra padrão foram submetidas a processo extração por partição com acetato de etila, utilizando-se 20 mL do solvente para cada 50mL de sobrenadante em três repetições. Em seguida, foram encaminhadas para o departamento de química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), sob os cuidados da Professora Dra. Aurea Echevarría, para análise por Cromatografia da fase gasosa acoplada ao espectrometro de massas.

3.3.1.2 Cromatografia de fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM)

As amostras encaminhadas para CG/EM, foram analisadas nas seguintes condições: O aparelho de cromatografia da empresa VARIAN; coluna cromatográfica: vf-5MS (30Mx0,25x0,25mm); a curva de aquecimento com temperatura inicial de

130°C mantida por um minuto, taxa de aquecimento de 10°C/min até a temperatura de 290°C, permanecendo sob essa temperatura por mais vinte e cinco minutos; detector de ionização por impacto de elétrons com energia de 70eV e base de dados Mainlib.

3.4 DETECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As linhagens selecionadas para realização dos testes foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25927), *Enterococcus faecalis* (n° 309), *Pseudomonas aeruginosa* (n° 024), *Bacillus cereus* (ATCC), *Streptococcus mutans* (n° 289), *Candida albicans* (n° 1132), *Penicillium avelani*.

Cerca de 15 mL das amostras dos sobrenadantes foram liofilizados e ressuspendido para 2 mL de água destilada autoclavada. As amostras de maceração micelial em etanol foram concentradas e 2 mg do material seco foi utilização em 2 mL de solução Dimetilsufóxido (DMSO) / água 1:9.

3.4.1 AVALIAÇÃO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO

As bactérias foram reativadas por repique em meio de cultura *Agar-brain-heart-infusion* (BHI), pela técnica de esgotamento, incubada por vinte e quatro horas à 37 °C. Em seguida, a colônia isolada foi inoculada em caldo Müeller-Hinton por mais vinte e quatro horas na mesma temperatura. O parâmetro utilizado para avaliação do crescimento bacteriano foi a escala de *MacFarland* n° 3 (6×10^9 unidade formadora de colônia). Adicionou-se a uma placa com meio de cultura agar BHI 50 µL da suspensão bacteriana e com auxílio da alça de Drigalski, a suspensão bacteriana foi inoculada por toda extensão da placa (SOUZA *et al.*, 2004).

Conforma a Figura 18, foram feitos seis pequenos poços com 5 mm de diâmetro cada no meio de cultura de cada placa para adicionar 100 µL dos extratos selecionados, previamente ressuspendidos (SOUZA *et al.*, 2004).

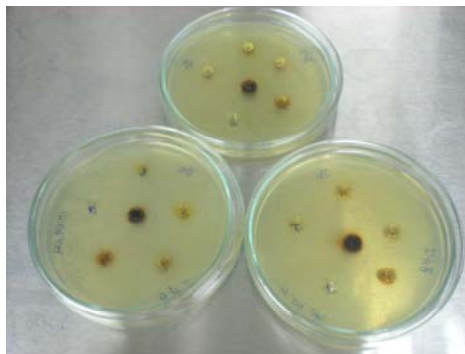


Figura 18 – Difusão em Agar das amostras para avaliação da atividade antimicrobiana

As placas foram incubadas em aerobiose por 18 a 24 horas em sob a temperatura de 37°C.

3.4.1 AVALIAÇÃO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO FÚNGICO

Para avaliação de inibição do crescimento celular da levedura *C. albicans*, a cepa padrão foi reativada por repique em meio de cultura Agar Saboraud (AS), pela técnica de esgotamento, incubada por 24 horas à 37 °C. Em seguida, a colônia isolada foi inoculada em caldo saboraud por mais 24 horas na mesma temperatura. Adicionou-se a uma placa com meio de cultura agar saboraud 50 µL da suspensão fúngica e com auxílio da alça de Drigalski a mesma foi inoculada por toda extensão da placa (SOUZA *et al.*, 2004).

Foram feitos seis pequenos poços com 5 mm de diâmetro cada no meio de cultura de cada placa para adicionar 100 µL dos extratos selecionados, previamente ressuspendidos.

Para avaliação de inibição do crescimento do fungo *P. avelani*, a cepa foi reativada por repique em meio de cultura AS pela técnica de diluição, incubada por sete dias à 26 °C. Em seguida, esporos da colônia foram suspendidos em uma solução de Tween 80 a 20 %. Três tubos com 9 mL de água auto-clavada foram utilizados para diluição em serie. Foi retirado 1 mL da suspensão de esporos em tween, adicionado ao primeiro tubo com água e em seguida foi ressuspendido. Deste primeiro tubo foi retirado 1 mL da solução, adicionado ao segundo tubo e mais uma vez foi ressuspendido. Da mesma maneira, foi retirado 1 mL da solução do segundo tubo para adição ao terceiro tubo e em seguida foi ressuspendido.

Foi vertido em placas de petri meio de cultura AS e antes que este esfriasse à placa foi adicionado 100 μ l da suspensão de esporos do terceiro tubo e cada placa foi levemente agitada para homogeneização do meio com a suspensão de esporos (SOUZA *et al.*, 2004).

Foram feitos seis pequenos poços com 5 mm de diâmetro cada no meio de cultura de cada placa para adicionar 100 μ L dos extratos selecionados, previamente ressuspensos (SOUZA *et al.*, 2004).

3.5 CULTIVO EM LARGA ESCALA

O fungo que apresentou extrato com a maior halo de inibição do crescimento bacteriano foi submetido à fermentação em larga escala (Figura 19). Foram preparados 18 L de caldo de batata dextrose, acrescido 0,2% de extrato de levedura (SOUZA *et al.*, 2004).

Após vinte e cinco dias de crescimento micelial, a cultura foi submetida a filtração a vácuo e o sobrenante foi extraído por partição com acetato de etila e em seguida com acetato de etila/isopropanol 7:3 (Figura 20a). A massa micelial remanescente foi triturada e mantida em maceração em etanol por vinte e quatro horas (Figura 20b).

Os extratos foram concentrados com auxílio de um evaporador rotatório e seus rendimentos mensurados.



Figura 19 – Frascos de erlenmeyer com 300mL de meio de cultura líquido cada para cultivo em larga escala



a b

Figura 20 – a) Partição do sobrenadante do cultivo em larga escala b) Trituração do micélio remanescente após a filtração à vácuo

3.6 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

3.6.1 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA MORFOLÓGICA

A identificação dos fungos que obtiveram resultados mais relevantes na triagem química e na avaliação da atividade antimicrobiana foi feita através da análise macroscópica de suas características e análise microscópicas das estruturas reprodutivas, estruturas de resistência ou morfologia das hifas, através de micro-cultivo. Foram consideradas características das culturas quanto: cor, textura, topografia, pigmento difuso, cor do verso da colônia e topografia do verso da colônia. Será retirado um fragmento da colônia isolada e colocado em uma lâmina previamente esterilizada em auto-clave para realização do microcultivo. As estruturas foram coradas com azul de lactofenol e observadas ao microscópio óptico em um aumento de 400 X. Foram observadas as septações das hifas, cor, esporos, presença de estrutura de resistência e ramificações.

3.6.2 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

3.6.2.1 Extração do DNA

3.6.2.1.1 Manipulação dos reagentes

Para início do processo de extração, foram manipuladas as seguintes soluções:

1) Tampão de extração; 2) Clorofil.; 3) Clorofane e 4) Tampão TE (MARTINS, 2005).

Para manipulação de 10 mL da solução 1, são necessários 2 mL de Tris-HCl 1M (Trizma-Base 121,0 g para 1 L de água); 0,5mL EDTA 0,5M (ácido etilenodiamino tetra-acético 37,22g para 100 mL de água); 1 mL SDS (Dodecilsulfato de sódio 10g para 100 mL de água); 0,5 mL NaCl 5M e 6 mL de água destilada (MARTINS, 2005).

Para manipulação da solução 2, utilizou-se uma proporção 24:1 de clorofórmio e álcool isoamílico (MARTINS, 2005).

Para o preparo da solução 3, utilizou-se uma proporção 1:1 da solução de clorofil e fenol (MARTINS, 2005).

Para a manipulação da solução 4, utilizou-se 1 mL Tris-HCl 1M e 0,2 mL EDTA 0,5M completando o volume final para 100 mL com água destilada (MARTINS, 2005).

3.6.2.1.2 Extração de DNA fúngico

Aproximadamente 1g do micélio do fungo selecionado foi triturado com 5 mL nitrogênio líquido. Cerca 8mg do micélio triturado foi transferido para um tubo de microcentrífuga com capacidade de 1,5 mL. Foi adicionado 1,5 mL de tampão de extração (Solução 1) e após a homogeneização, os tubos de microcentrífuga foram incubados em banho por 1 hora a 60°C, sob leve agitação. Após o período de incubação foi adicionado 1 ml de fenol, misturando-se suavemente as fases e centrifugado a 10.000 rpm por 15 min. A fase aquosa foi recuperada e transferida para um novo tubo de microcentrífuga e a esta foi adicionado 1mL da solução de clorofane (Solução 3). Novamente a solução foi homogeneizada e centrifugada na mesma condição anterior, onde o sobrenadante foi recuperando e transferido para outro tubo de microcentrífuga e a este foi adicionado 1mL de clorofil (Solução 2). Mais uma vez os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante, foi transferido para outro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e este foi acrescentado 0,75 mL NaCl 0,5M. A seguir, foram adicionados 0,75 mL de etanol 96%. As amostras foram submetidas à centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi lavado com etanol 70%. Os tubos foram invertidos até secagem completa do DNA. O pellet foi ressuscitado em 200µL do tampão TE (Solução 4) e foi mantido congelado sob -19°C (MARTINS, 2005).

*Resultados e
Discussões*

Resultados e Discussões

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A planta selecionada para realização deste trabalho faz parte de uma série de plantas escolhidas pelo grupo de pesquisa *Biotecnologia de Fungos da Amazônia*, objetivando o isolamento de fungos endofíticos para estudo de seus metabólitos secundários e potencial enzimático. Até o momento ainda não existe relato na literatura sobre estudos com fungos endofíticos de *Aniba rosaeodora*.

4.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *A. rosaeodora*

4.1.1 COLETA, ISOLAMENTO e PURIFICAÇÃO

Na técnica para esterilização externa (desinfecção superficial) dos tecidos vegetais de *A. rosaeodora*, os fungos que são recuperados dos fragmentos do material vegetal após o processo são considerados fungos endofíticos (ZITO *et al*, 1995).

Na metodologia que consiste em submeter o material vegetal a uma seqüência de imersões em soluções para desinfecção, o álcool etílico a 70% está em concentração adequada para penetração na membrana do microrganismo e age desnaturando proteínas, além de ser solvente para lipídeos (KALL e COSTA, 1994). A solução de hipoclorito de sódio encontra-se em equilíbrio conforme reação abaixo:



Figura 21 – Reação de equilíbrio da solução de hipoclorito de sódio

O hipoclorito em equilíbrio na solução fornece hidróxido de sódio (NaOH) que pode reagir com ácidos graxos e formar sabão e glicerol, caracterizando a reação de saponificação; podendo também reagir com aminoácidos em uma reação de neutralização e formar um sal amino e água. O ácido hipocloroso (HOCl) também pode reagir com aminoácido em uma reação de cloraminação e formar cloroamina e água. Essas reações levam a dissolução da membrana do microrganismo elucidando a atividade antimicrobiana da solução de hipoclorito de sódio (ESTRELA *et al*, 2002).

As duas soluções associadas na metodologia demonstraram eficiência na desinfecção superficial, pois durante o processo de isolamento dos fungos, como contra-prova de esterilização superficial dos tecidos vegetais, foram semeadas em meio BDA, alíquotas de água da última lavagem dos fragmentos vegetais e submetido a uma

temperatura de 28°C por sete dias, não sendo observado crescimento microbiano neste período.

Dos quatro espécimes coletados isolou-se 262 fungos endofíticos de diferentes partes da planta, conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Quantidade de fungos isolados em cada espécime e parte vegetal de *A. rosaeodora*

Espécime	Parte coletada	Qtde de fungos Isolados	Total
I	Folha	14	56
	Galho	31	
	Semente	11	
II	Folha	26	86
	Galho	44	
	Semente	16	
III	Folha	24	63
	Galho	27	
	Flor	12	
IV	Folha	20	57
	Galho	32	
	Fruto	5	
			262

Observou-se que houve isolamento de maior número de fungos a partir dos galhos de cada espécime de *A. rosaeodora* coletada. O Gráfico 1 mostra a distribuição dos isolados em cada parte da planta.

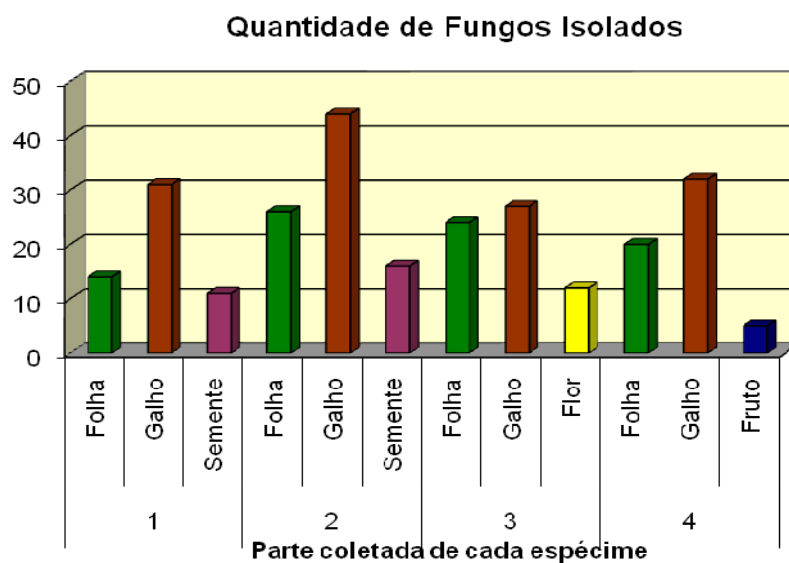


Gráfico 1 – Quantidade fungos isolados por parte vegetal de cada espécime

Segundo Guimarães (2006), existem duas maneiras para disseminação dos fungos na planta, sendo uma delas a transferência vertical de esporos fúngicos através da semente e a outra transferência horizontal dos esporos fúngicos de planta para planta (GUIMARÃES, 2006). Considerando um conjunto de fatores tais como: disseminação horizontal dos fungos, assepsia branda para este tecido e a presença de tecidos mortos (casca do galho), pode-se justificar o favorecimento para obtenção de maior número de isolados fúngicos a partir dos galhos. Além disso, o tecido dos galhos e caule apresenta maior resistência frente às alterações no habitat natural, oferecendo então, um ambiente favorável para a manutenção de fungos nesse tecido.

Os 262 fungos isolados foram agrupados em 22 grupos de acordo com as características macro-morfológicas das colônias apresentadas depois de sete a quatorze dias de crescimento a uma temperatura de 28°C, conforme exposto na Tabela 4.

No Gráfico 2, pode-se observar que cerca de 23% dos fungos estão classificados no grupo 8, cujas as características são micélio branco a cinza com numerosos ascos pequenos. Para o grupo 9 são 25% do total de isolados que apresentaram as mesmas características. Confirmando assim o que Strobel e colaboradores observaram em seus experimentos, que a maior parte dos fungos endofíticos isolados estão classificados como Ascomicetos (Strobel *et al.*, 2001).

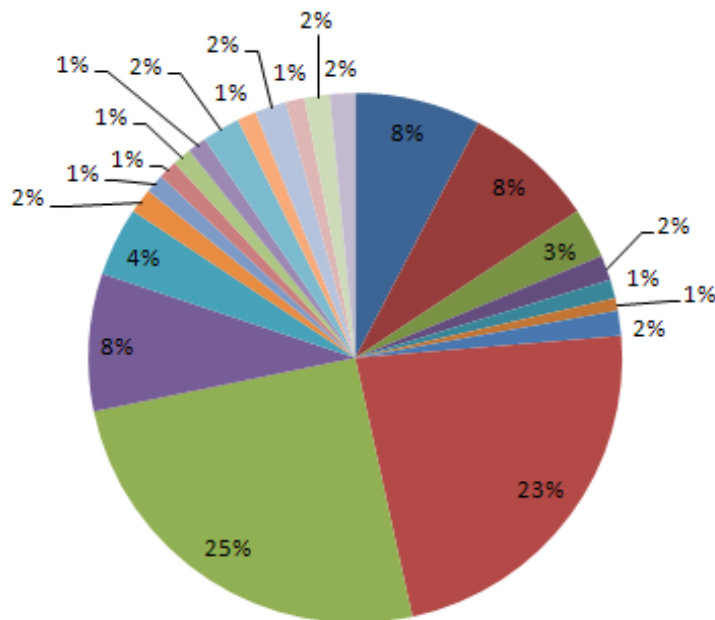
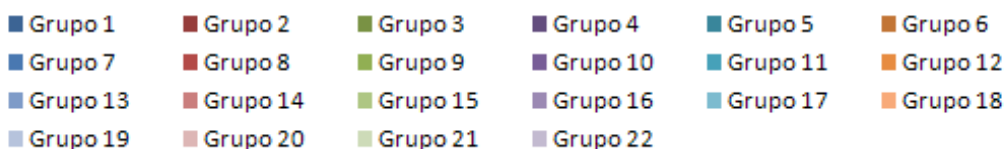
Tabela 4 – Grupos e características dos fungos endofíticos de *A. rosaeodora*

Grupo	Nº de isolados	Qtde de isolados por meios		Característica
		BDA	MF	
Grupo 1	20	12	8	Micélio preto, com poucos ascos.
Grupo 2	21	14	7	Micélio cinza a preto, rasteiro, sem estrutura de reprodução
Grupo 3	8	1	7	Micélio castanho claro, sem estrutura de reprodução
Grupo 4	4	3	1	Colônias de cor verde com numerosos esporos pequenos e micélio branco
Grupo 5	3	-	3	Micélio feltroso, amarelo-claro, sem estrutura de reprodução.
Grupo 6	2	1	1	Micélio castanho escuro, rasteiro
Grupo 7	4	3	1	Micélio cotonoso, rasteiro de cor branca
Grupo 8	60	55	5	Micélio branco à cinza; com numerosos ascos pequenos
Grupo 9	66	59	7	Micélio amarelo com numerosos ascos grandes.
Grupo 10	22	20	2	Micélio branco cotonoso, com pontos escurecidos no micélio. Sem estrutura de reprodução
Grupo 11	11	11	-	Micélio branco rasteiro levemente preguiado, ausência de esporos.
Grupo 12	4	4	-	Micélio negro cotonoso
Grupo 13	3	3	-	Micélio beje pregueado

Tabela 4 - Grupos e características dos fungos endofíticos de *A. rosaeodora* (continuação)

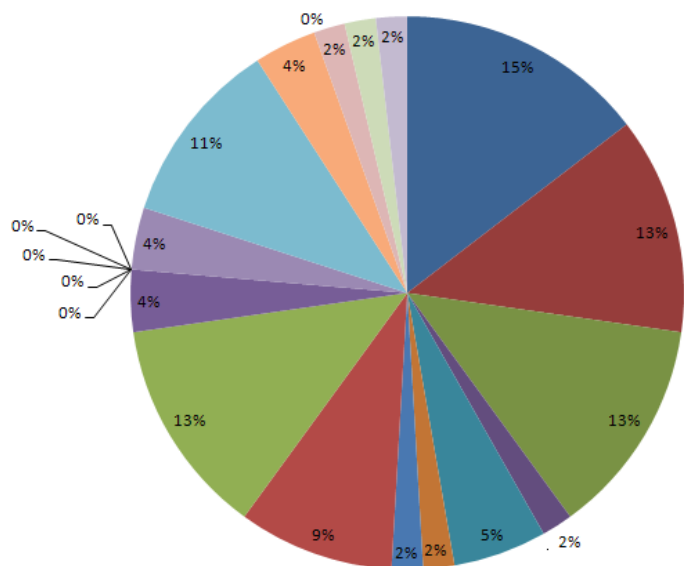
Grupo 14	3	3	-	Micélio cinza, rasteiro pregueado com pigmento difuso
Grupo 15	3	3	-	Micélio cinza feltroso
Grupo 16	3	1	2	Micélio creme levemente pregueado
Grupo 17	6	-	6	Micélio creme em camadas, levemente pregueado e feltroso
Grupo 18	3	1	2	Micélio creme, pregueado, feltroso
Grupo 19	5	5	-	Micélio preto, feltroso e pregueado
Grupo 20	3	2	1	Micélio preto, cerebriforme, com numerosos ascos.
Grupo 21	4	3	1	Micélio branco, preguiado, ausência de esporos e estrutura de reprodução
Grupo 22	4	3	1	Micélio laranja, com aspecto gelatinoso.

Distribuição dos isolados fúngicos



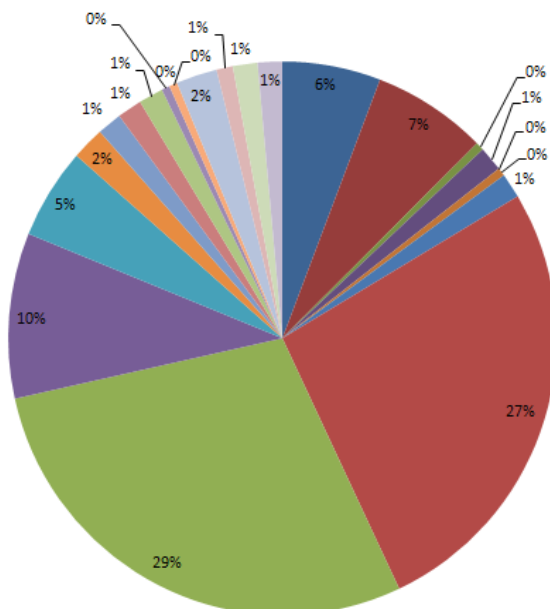
a

Distribuição de isolados em M.F.



b

Distribuição de isolados fúngicos em B.D.A.



c

Gráfico 2 – a) Distribuição total dos isolados fúngicos em grupos; b) Distribuição dos grupos de isolados fúngicos cultivados em meio-folha (M.F.); c) Distribuição dos grupos de isolados fúngicos cultivados em B.D.A.

A taxa de colonização é uma informação que relaciona o número de fragmento vegetal inoculado que apresentou crescimento fúngico com o número total de

fragmentos vegetais inoculados. De acordo com os dados da Tabela 5, o isolamento de fungos endofíticos de *A. rosaeodora*, apresentou maior número de isolados a partir dos galhos dos quatro espécimes analisados. Pode-se observar também, que a taxa de colonização permaneceu maior que 1 nessa região, ou seja, ocorreu o crescimento de mais de um fungo em um único fragmento de galho inoculado. Para as folhas, flores e semente, o número de taxa de colonização permaneceu próximo de 1. Ao contrário do que foi observado em outros tecidos vegetais, o fruto não apresentou um número significativo para a taxa de colonização, tornando esse material inviável para isolamento de fungos endofíticos. Provavelmente, devido fruto apresentar uma massa densa existe a dificuldade de permanência dos microrganismos em seu interior.

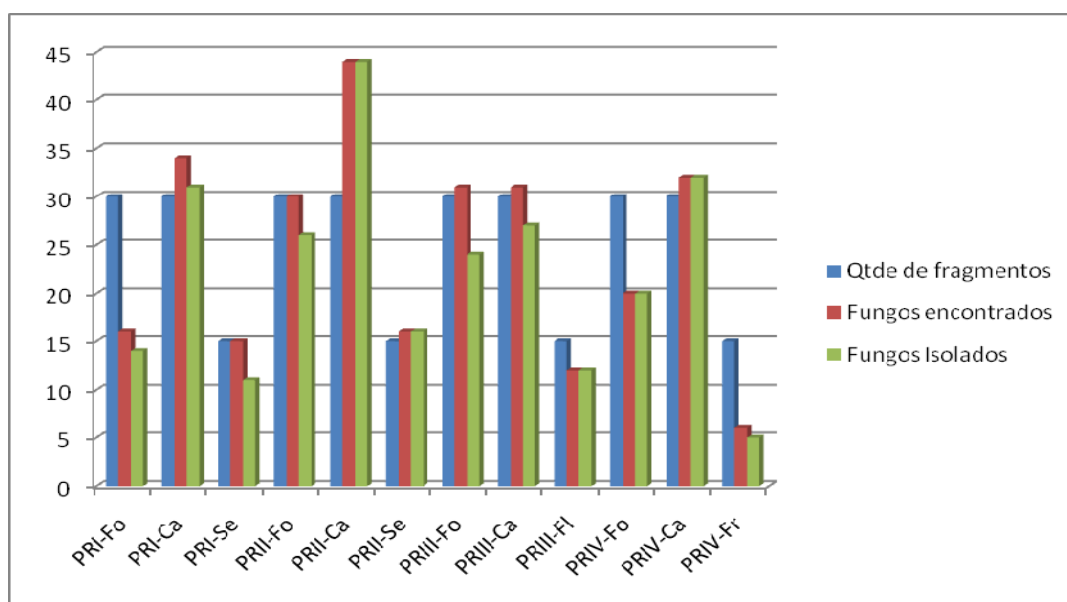
Tabela 5 – Taxa de colonização de cada espécime e parte vegetal

Placa	Qtde de fragmentos	Fungos encontrados	Fungos Isolados	Taxa de colonização
PRI-Fo	30	16	14	0,53
PRI-Ca	30	34	31	1,13
PRI-Se	15	15	11	1,00
PRII-Fo	30	30	26	1,00
PRII-Ca	30	44	44	1,47
PRII-Se	15	16	16	1,07
PRIII-Fo	30	31	24	1,03
PRIII-Ca	30	31	27	1,03
PRIII-FI	15	12	12	0,80
PRIV-Fo	30	20	20	0,67
PRIV-Ca	30	32	32	1,07
PRIV-Fr	15	6	5	0,40

PRI - Espécime I de *A. rosaeodora*; PRII - Espécime II de *A. rosaeodora*; PRIII - Espécime III de *A. rosaeodora*; PRIV - Espécime IV de *A. rosaeodora*; Fo – Folhas; Ca – Galhos; Se – Sementes; FI – Flores; Fr – Frutos.

O fato dos valores da taxa de colonização ser constantemente maior que 0,5; demonstra que a utilização dessa técnica para isolamento dos fungos endofíticos é eficaz, além de confirmar que é possível obter um número significativo de isolados fúngicos em qualquer um dos espécimes de *A. rosaeodora*.

O Gráfico 3 facilita a visualização da comparação entre o número de fungos isolado e número de fungos encontrados por fragmento em cada espécime.



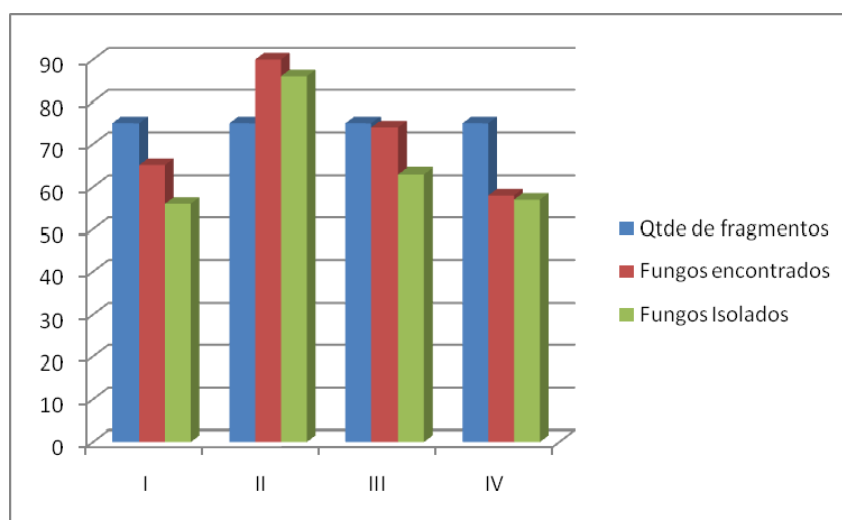
PRI - Espécime I de *A. rosaeodora*; PRII - Espécime II de *A. rosaeodora*; PRIII - Espécime III de *A. rosaeodora*; PRIV - Espécime IV de *A. rosaeodora*; Fo – Folhas; Ca – Galhos; Se – Sementes; Fl – Flores; Fr – Frutos.

Gráfico 3 – Quantidade de fungos encontrados e isolados por nº de fragmentos de cada parte vegetal

A Tabela 6 e o Gráfico 4 mostra a comparação da taxa de colonização entre os quatro espécimes de *A. rosaeodora* analisados. O espécime II apresentou uma taxa de colonização maior que 1, ou seja, no total de fragmentos inoculados, alguns apresentaram crescimento de mais de um fungo. Este fato pode ser relacionado pelo diâmetro do caule, pois dos quatro espécimes coletados para isolamento, este possui (visualmente) o maior diâmetro, ou seja, esta árvore é maior. Sendo assim, pode possuir uma distribuição maior de fungos entre os espaços intercelulares do seu caule, galhos e folhas. Os outros espécimes apresentaram valores entre 0,75 e 0,99; demonstrando proximidade nos valores.

Tabela 6 – Taxa de colonização de cada espécime

Espécime	Qtde de fragmentos	Fungos encontrados	Fungos Isolados	Taxa de colonização
I	75	65	56	0,87
II	75	90	86	1,20
III	75	74	63	0,99
IV	75	58	57	0,77



I - Espécime I de *A. rosaedora*; II - Espécime II de *A. rosaedora*; III - Espécime III de *A. rosaedora*; IV - Espécime IV de *A. rosaedora*.

Gráfico 4 – Qtde de fungos encontrados e isolados por n° de fragmentos de cada espécime

A Tabela 7 relaciona a quantidade de fungos endofíticos isolados de *A. rosaedora* com dois diferentes meios de cultura.

Tabela 7 – Quantidade de fungos isolados por meio de cultura

Parte do vegetal	Qtde de fragmentos	Qtde de fungos isolados	Meio de Cultura		% de fungos em B.D.A.	% de fungos em Meio folha
			B.D.A	Meio Folha		
PRI-Fo	30	14	11	3	44	60
PRI-Ca	30	31	25	6	100	120
PRI-Se	15	11	8	3	80	60
PRII-Fo	30	26	21	5	84	100
PRII-Ca	30	44	39	5	156	100
PRII-Se	15	16	11	5	110	100
PRIII-Fo	30	24	17	7	68	140
PRIII-Ca	30	27	25	2	100	40
PRIII-FI	15	12	7	5	70	100
PRIV-Fo	30	20	17	3	68	60
PRIV-Ca	30	32	25	7	100	140
PRIV-Fr	15	5	1	4	10	80

RI - Espécime I de *A. rosaedora*; PRII - Espécime II de *A. rosaedora*; PRIII - Espécime III de *A. rosaedora*; PRIV - Espécime IV de *A. rosaedora*; Fo – Folhas; Ca – Galhos; Se – Sementes; FI – Flores; Fr – Frutos; B.D.A – Agar batata-dextrose.

No meio de cultura BDA, foram utilizados vinte e cinco fragmentos vegetais em cinco placas para inoculação de folhas e galhos (ou seja, cinco fragmentos em cada placa) e dez fragmentos de flores, fruto e sementes foram em duas placas cada (ou seja, cinco fragmentos em cada placa). Para meio de cultura de MF, foram utilizados cinco fragmentos de cada parte vegetal em todas as placas, em um total de doze placas com MF.

Tendo a relação entre o número de isolados e o número de fragmentos inoculados em cada tipo de meio de cultura, pode-se observar que a porcentagem de isolados é maior no meio de cultura MF do que no meio de cultura B.D.A. Como MF é um meio diferenciado, composto por 200g de decocto das folhas de *A. rosaeodora*, este meio de cultura acabou se tornando específico para alguns fungos, como por exemplo, os fungos classificados nos grupos 2, 5 e 17. Pode-se considerar que este meio diferenciado é viável para isolamento dos fungos, pois a composição do meio de cultura é, parcialmente, semelhante à composição química em que fungo está adaptado em seu habitat e dessa maneira, o resultado de isolamento poderia ser mais fiel à diversidade fúngica existente no vegetal. Porém torna-se inviável, pois existe a necessidade de preparo do meio de cultura com os mesmo componentes, sempre que for preciso fazer o repique do fungo para a sua manutenção. Como a árvore é, normalmente, encontrada em ambiente inacessível, torna-se difícil o acesso às suas folhas.

4.2 PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

4.2.1 FERMENTAÇÃO

Conforme Tabela 8, dos 262 fungos isolados, apenas 86 fungos tiveram crescimento micelial nas condições pré-estabelecidas.

Pode-se observar que a maior parte dos fungos que obtiveram crescimento micelial foram os fungos isolados em BDA. Assim, pode-se concluir que o MF realmente tornou-se um meio de cultura específico para algumas espécies fúngicas. Este fato justifica a inviabilidade de utilização deste meio de cultura para um trabalho de prospecção.

Placa	Fungos encontrados	Fungos Isolados	Fungos q/ obtiveram massa micelial		Qtde por espécime
			BDA	MF	
PRI-Fo	16	14	9	2	
PRI-Ca	34	31	8	1	24
PRI-Se	15	11	4	-	
PRII-Fo	30	26	8	-	
PRII-Ca	44	44	14	-	25
PRII-Se	16	16	3	-	
PRIII-Fo	31	24	8	2	
PRIII-Ca	31	27	7	2	23
PRIII-Fl	12	12	3	1	
PRIV-Fo	20	20	5	-	
PRIV-Ca	32	32	6	2	14
PRIV-Fr	6	5	1	-	
TOTAL	287	262	86		86

PRI - Espécime I de *A. rosaeodora*; PRII - Espécime II de *A. rosaeodora*; PRIII - Espécime III de *A. rosaeodora*; PRIV - Espécime IV de *A. rosaeodora*; Fo - Folhas; Ca - Galhos; Se - Sementes; Fl - Flores; Fr - Frutos; B.D.A - Agar batata-dextrose; MF - Meio folha.

O tecido vegetal galho do espécime II apresentou o maior número de fungos que cresceram nas condições de fermentação estabelecidas, sendo justificável por ser a região e o espécime que apresentou maior número de isolados. Porém, em porcentagem, os valores de 14 fungos representam 31,82%, enquanto que os fungos isolados das folhas do espécime I representam 78,57% dos isolados.

Observou-se que os fungos isolados necessitam de estudos mais detalhados quanto às condições de crescimento, pois menos da metade dos isolados obtiveram crescimento micelial nas condições estabelecidas. Será necessário determinar alternativas de meios de cultura para analisar a produção de metabólitos dos demais fungos.

A Tabela 9 relaciona a quantidade de fungos que obtiveram crescimento micelial nas condições estabelecidas com os 22 grupos previamente classificados conforme a Tabela 4.

Tabela 9 – Distribuição dos fungos com crescimentos micelial por grupo

Grupo	% de fungos c/ crescimento	Qtde de fungos com crescimento	n° de isolados
Grupo 1	20	4	20
Grupo 2	38	8	21
Grupo 3	25	2	8
Grupo 4	75	3	4
Grupo 5	0	0	3
Grupo 6	0	0	2
Grupo 7	25	1	4
Grupo 8	45	27	60
Grupo 9	38	25	66
Grupo 10	18	4	22
Grupo 11	0	0	11
Grupo 12	25	1	4
Grupo 13	0	0	3
Grupo 14	33	1	3
Grupo 15	67	2	3
Grupo 16	33	1	3
Grupo 17	17	1	6
Grupo 18	33	1	3
Grupo 19	20	1	5
Grupo 20	33	1	3
Grupo 21	25	1	4
Grupo 22	50	2	4
TOTAL		86	262

Conforme Gráfico 5, cerca de 75% dos fungos classificados no grupo 4, cujas características são: colônias verdes com numerosos esporos pequenos e micélio branco, apresentou crescimento micelial nas condições estabelecidas, sendo assim, essas condições são as mais adequadas para fungos com essas características (Figura 22).

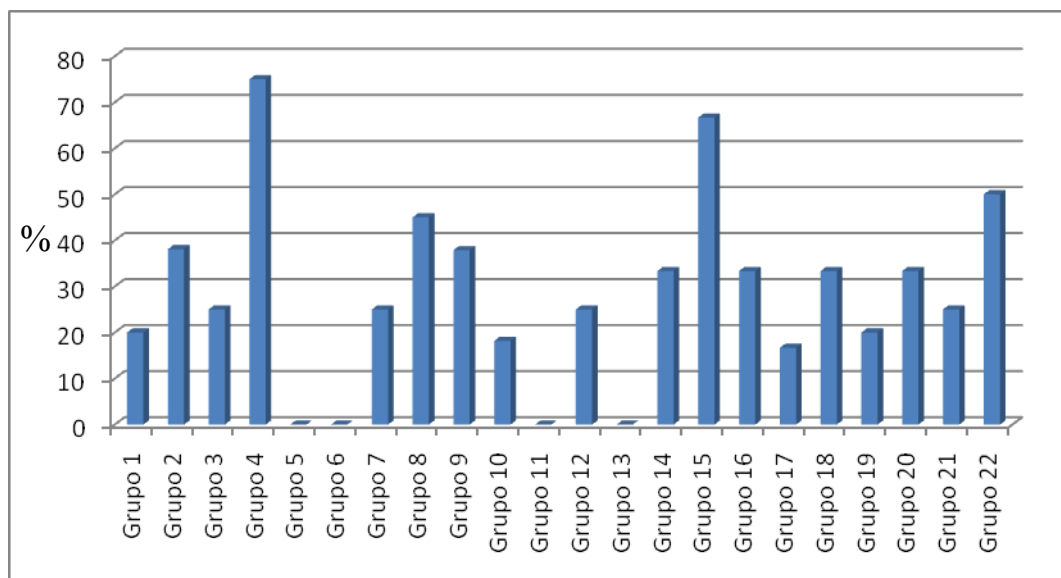


Gráfico 5 – Porcentagem de fungos com crescimento micelial por grupo

Os grupos 8 e 9, que apesar de possuírem maior número de isolados, não apresentaram bom crescimento no meio de cultura estabelecido, cerca de 45 e 38%, respectivamente. Provavelmente, como são fungos com características morfológicas descritas para ascomicetos, necessitariam de mais tempo ou nutrientes diferenciados para produção de seus ascósporos para assim, consumir os nutrientes fornecidos no meio de cultura resultando na produção dos metabólitos.

O segundo grupo que apresentou maior quantidade de fungos que obtiveram crescimento micelial, cerca de 67%, foi o grupo 15. Porém, este valor, representa 2 de 3 fungos isolados e classificados neste grupo.

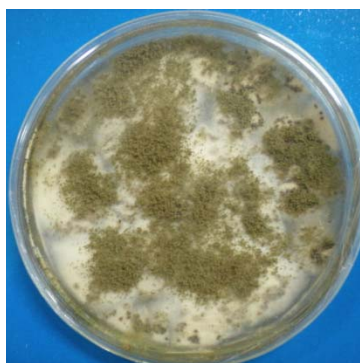


Figura 22 – Fungo classificado no grupo 4 (PRII-Fo 56)

4.3 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA ANÁLISE DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

4.3.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Foram analisados os 86 sobrenadantes dos fungos endofíticos de *A. rosaeodora* que obtiveram crescimento micelial nas condições fermentativas pré-estabelecidas.

Os perfis cromatográficos dos sobrenadantes de 76 amostras analisadas demonstraram similaridade diante das condições de análises estabelecidas. Na Figura 23 observa-se a sobreposição dos cromatogramas das amostras do meio de cultura utilizado com o sobrenadante do fungo PRI-Fo 7, demonstrando a semelhança entre eles. A sobreposição observada na Figura 24 confirma a semelhança entre as amostras dos sobrenadantes PRII – Ca 100 e PRI - Ca 30.

Porém, os cromatogramas dos sobrenadantes dos fungos com códigos PRI-Fo 8, PRII-Fo 56, PRII-Fo 58, PRII-Fo 71, PRIII-Fo 136, PRIII-Fo 148, PRIII-FoMF 156, PRIII-FI 188, PRIII-FI 189, PRII-Se 253 apresentaram perfil cromatográfico bastante diferenciados entre eles conforme as Figuras 25 a 34.

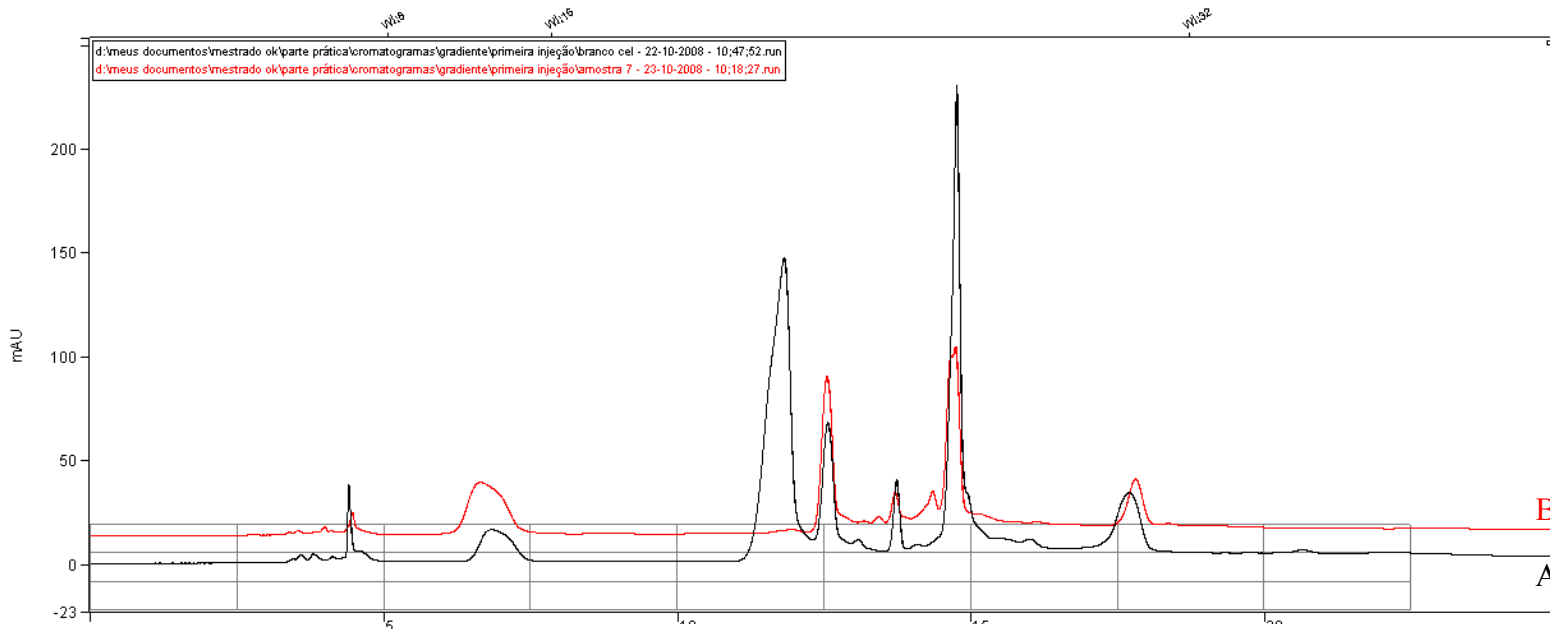


Figura 23 – Sobreposição de cromatogramas: Sobrenadante sem inoculo fúngico(A) e sobrenadante do fungo com código PRI-Fo 7 (B)

Tabela 10 – a) descrição dos picos do cromatograma A; b) descrição dos picos do cromatograma B

Peak No.	Peak Name	Result (°)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Peak No.	Peak Name	Result (°)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)
1		0.0876	3.447	0.000	4735	BV	7.2	1		0.1880	3.378	0.000	5882	BV	5.8
2		0.2917	3.583	0.000	15761	VV	9.2	2		0.3351	3.532	0.000	10483	VV	8.5
3		0.3814	3.792	0.000	20610	VV	9.2	3		0.2506	3.855	0.000	7842	VV	15.5
4		0.2277	4.111	0.000	12303	VV	8.7	4		0.4054	3.978	0.000	12684	VV	6.2
5		1.7138	4.395	0.000	92601	VV	3.6	5		0.2373	4.095	0.000	7423	VV	0.0
6		0.6771	4.553	0.000	36583	VB	22.9	6		0.0988	4.222	0.000	3092	VV	0.0
7		5.4208	6.823	0.000	292891	BB	36.6	7		1.8302	4.452	0.000	57258	VB	5.4
8		37.6355	11.804	0.000	2033498	BV	25.1	8		18.0810	6.635	0.000	565674	BB	42.6
9		9.6562	12.551	0.000	521740	VV	12.7	9		0.1364	10.566	0.000	4268	BB	0.0
10		1.5440	13.068	0.000	83426	VV	55.3	10		0.8041	11.929	0.000	25158	BV	27.7
11		2.8653	13.722	0.000	154815	VV	7.6	11		19.5632	12.538	0.000	612045	VV	12.1
12		0.6693	14.070	0.000	36162	VV	0.0	12		0.0822	13.170	0.000	2572	TS	0.0
13		29.1262	14.743	0.000	1573732	VB	9.2	13		1.5534	13.417	0.000	48599	VV	0.0
14		0.0904	15.417	0.000	4884	TS	0.0	14		4.3232	13.697	0.000	135254	VV	9.9
15		0.3101	15.990	0.000	16756	TS	0.0	15		5.7260	14.334	0.000	179140	VV	24.0
16		7.7816	17.684	0.000	420452	BB	25.3	16		33.1781	14.714	0.000	1037992	VV	14.7
17		0.0426	19.735	0.000	2303	BV	14.5	17		0.0352	15.650	0.000	1100	TS	0.0
18		0.4657	20.635	0.000	25165	VV	19.5	18		0.1409	16.107	0.000	4409	TS	0.0
19		1.0128	22.090	0.000	54724	VB	27.7	19		0.1111	16.637	0.000	3477	TS	0.0
20								20		9.3189	17.790	0.000	291545	VV	18.4
21								21		1.3233	18.343	0.000	41400	VV	0.0
22								22		2.0967	18.837	0.000	65597	VV	0.0
23								23		0.1808	20.208	0.000	5658	VB	319.9

a

b

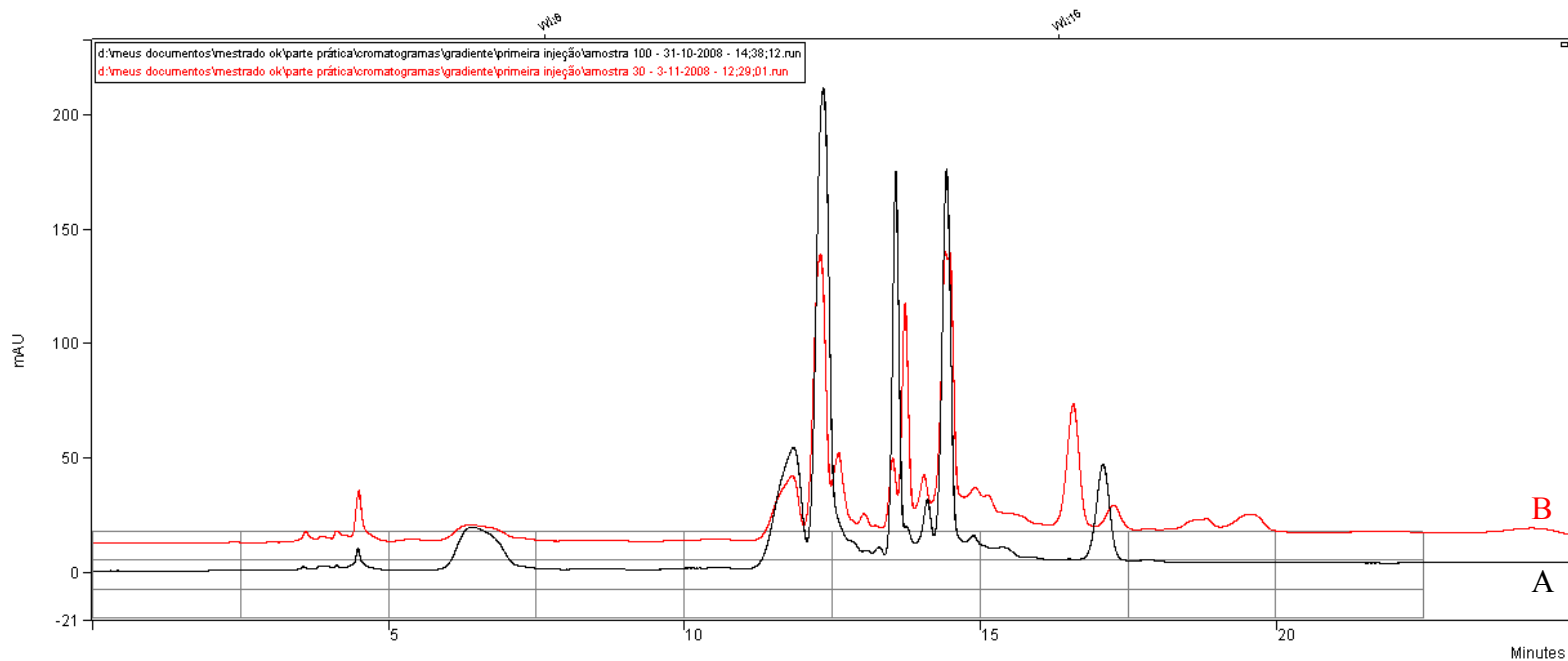


Figura 24 - Sobreposição de cromatogramas: Sobrenadante do fungo com código PRII – Ca 100 (A) e Sobrenadante do fungo com código PRI - Ca 30 (B)

Tabela 11 – a) descrição dos picos do cromatograma A; b) descrição dos picos do cromatograma B

Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Width Sep. 1/2 Code (sec)	Peak No.	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Width Sep. 1/2 Code (sec)
1		0.1118	3.548	0.000	6403	BV 6.4	1		0.0196	2.369	0.000	1094	BB 0.0
2		0.1358	3.842	0.000	7780	VV 6.4	2		0.4011	3.587	0.000	22443	BV 7.6
3		0.0913	3.971	0.000	5229	VV 0.0	3		0.2766	3.865	0.000	15475	VV 10.4
4		0.1195	4.114	0.000	6847	VV 0.0	4		0.3728	4.116	0.000	20859	VV 6.6
5		0.8422	4.472	0.000	48255	VB 5.0	5		0.1624	4.255	0.000	9087	VV 6.6
6		7.8845	6.403	0.000	451773	BB 46.7	6		1.9278	4.490	0.000	107866	VB 6.7
7		13.1917	11.831	0.000	755870	BV 27.5	7		0.2014	5.386	0.000	11270	BV 23.7
8		33.0327	12.335	0.000	1892732	VV 14.3	8		3.5681	6.379	0.000	199644	VB 52.0
9		0.0355	13.062	0.000	2035	TS 0.0	9		0.3119	10.308	0.000	17449	BP 64.0
10		0.1793	13.272	0.000	10274	TS 0.0	10		6.7758	11.809	0.000	379126	PV 26.1
11		12.6462	13.559	0.000	724612	VV 7.3	11		17.0623	12.283	0.000	954689	VV 13.8
12		1.2541	13.739	0.000	71861	VV 0.0	12		5.0750	12.589	0.000	283963	VV 16.4
13		2.9825	14.094	0.000	170893	VV 12.1	13		1.2703	13.024	0.000	71078	VV 0.0
14		20.5600	14.418	0.000	1178063	VB 9.9	14		0.4631	13.214	0.000	25912	VV 0.0
15		0.2962	14.874	0.000	16969	TS 0.0	15		2.9441	13.508	0.000	164734	VV 8.9
16		0.2865	15.357	0.000	16416	TS 0.0	16		8.1557	13.718	0.000	456340	VV 7.6
17		0.0305	15.878	0.000	1746	TS 0.0	17		3.1694	14.035	0.000	177337	VV 0.0
18		0.0184	16.475	0.000	1054	BV 10.6	18		18.7608	14.423	0.000	1049726	VV 13.9
19		6.0558	17.063	0.000	346989	VB 14.6	19		3.6935	14.899	0.000	206661	VV 0.0
20		0.0908	19.917	0.000	5201	BV 24.9	20		6.0466	15.104	0.000	338325	VV 94.1
21		0.0896	20.538	0.000	5135	VV 24.7	21		9.2342	16.558	0.000	516682	VV 14.8
22		0.0473	21.100	0.000	2708	VB 0.0	22		2.7664	17.233	0.000	154791	VV 23.0
23		0.0180	24.737	0.000	1032	BB 0.0	23		3.0531	18.807	0.000	170832	VV 0.0
24							24		2.8650	19.553	0.000	160308	VB 49.5
25							25		0.3461	21.850	0.000	19367	BB 42.9
26							26		1.0770	24.299	0.000	60263	BB 49.2

a

b

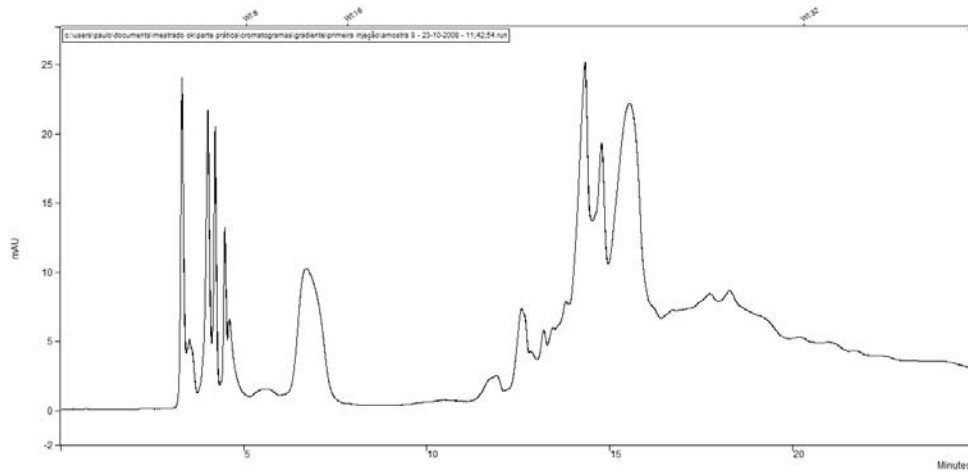


Figura 25 - Cromatograma da amostra de PRI – Fo 8

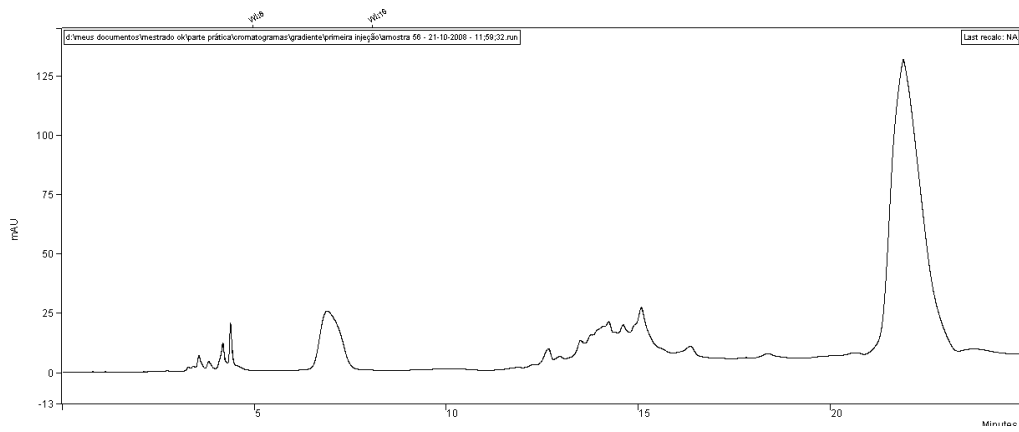


Figura 26 - Cromatograma da amostra de PRII – Fo 56

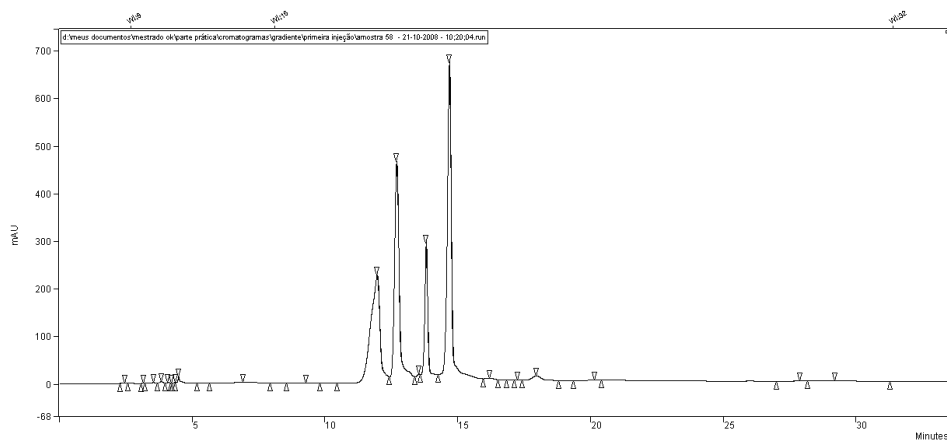


Figura 27 – Cromatograma da amostra de PRII – Fo 58

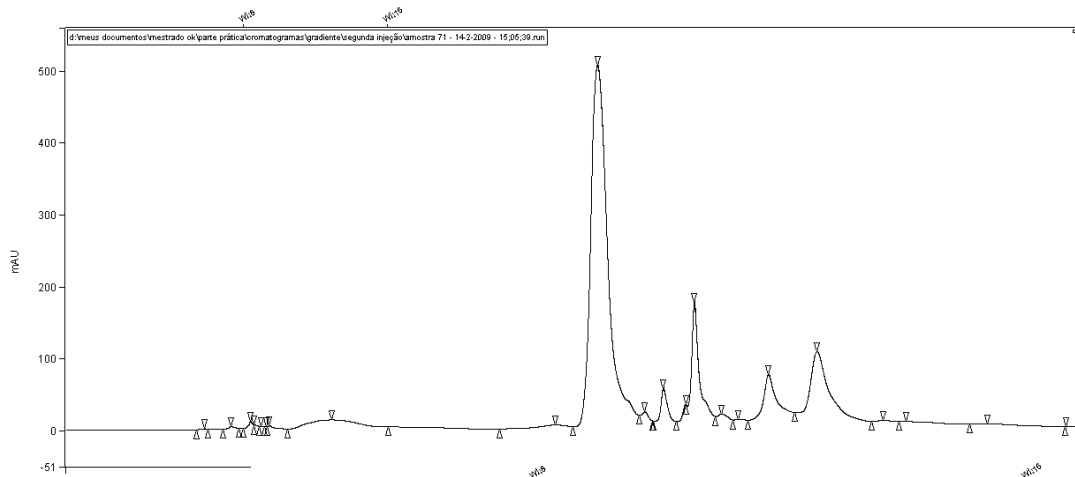


Figura 28
-
Cromatograma da amostra de PRII - Fo 71

Figura 29 -
Cromatograma da amostra de PRIII - Fo 136

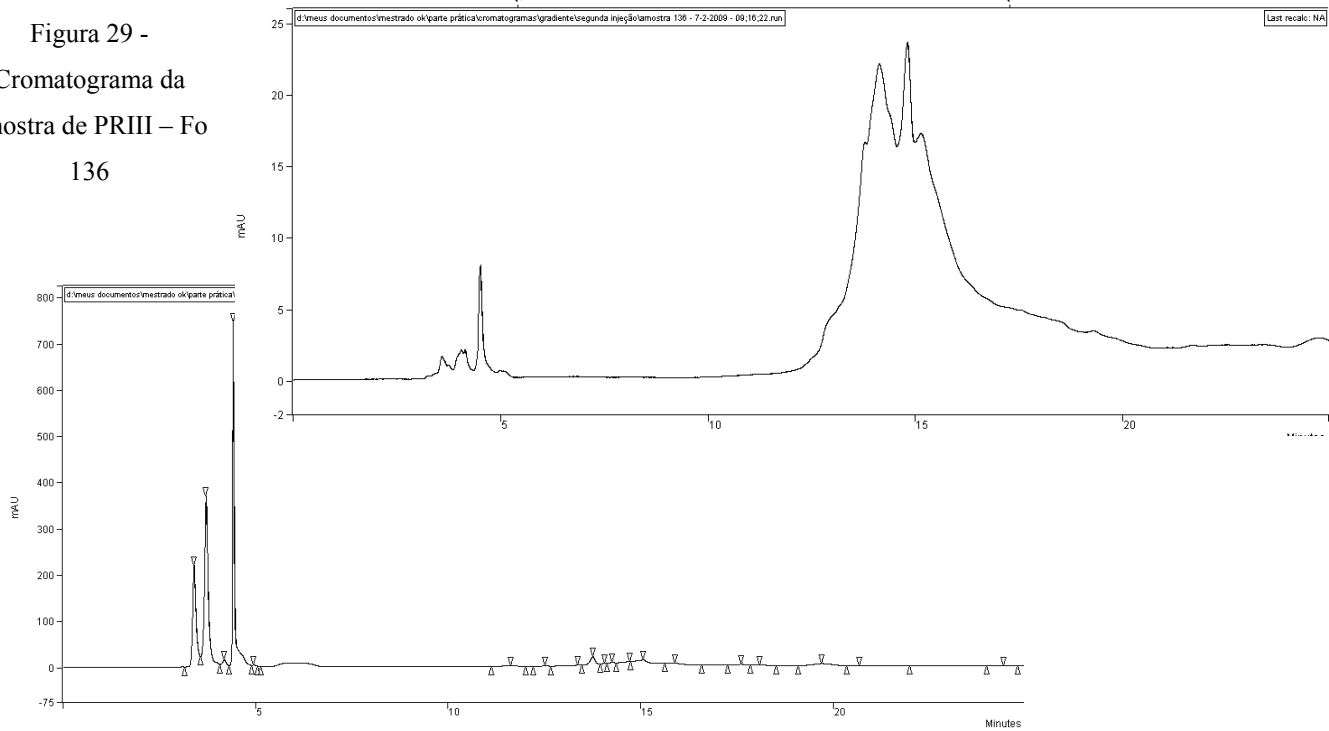


Figura 30 - Cromatograma da amostra de PRIII - Fo148

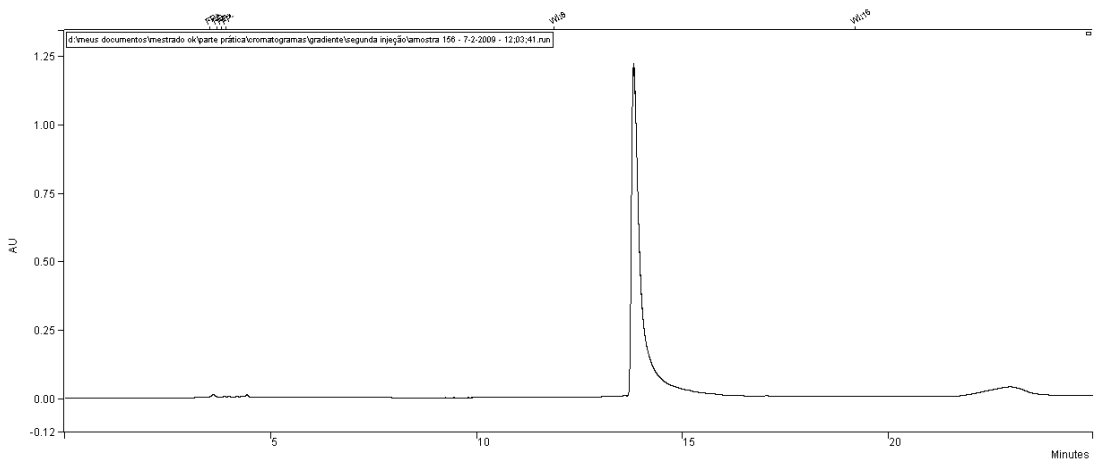


Figura 31 -
Cromatograma da

amostra de PRIII – FoMF 156

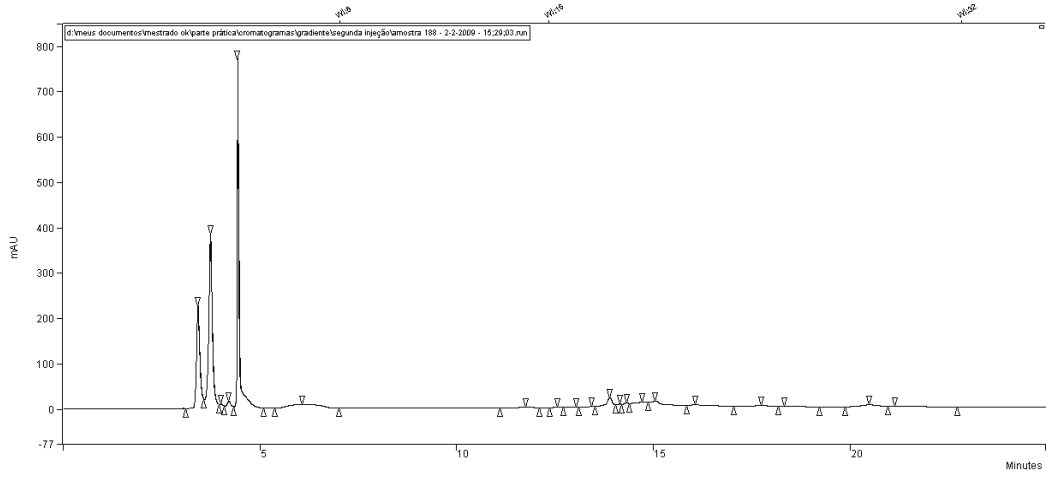


Figura 32 - Cromatograma da amostra de PRIII – Fl 188

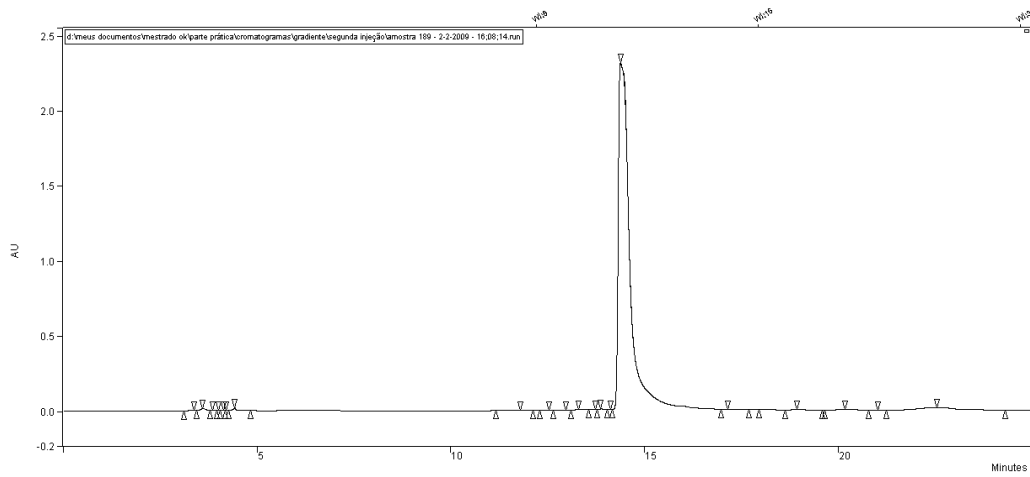


Figura 33 - Cromatograma da amostra de PRIII – Fl 189

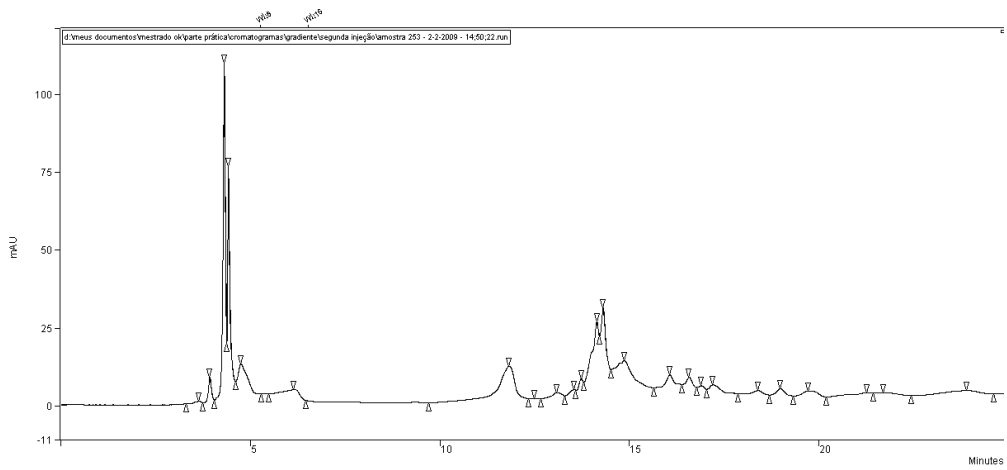


Figura 34 - Cromatograma da amostra de PRII – Se 253

Para análise da presença de linalol nas amostras foram comparados os 86 cromatogramas com o cromatograma do padrão linalol (Figura 35). Destas amostras foram selecionadas 29 que apresentaram um pico próximo ou no mesmo tempo de retenção do padrão. Nestas amostras foram adicionados 10 μ L da solução padrão para observar a ocorrência do aumento na área do provável pico.

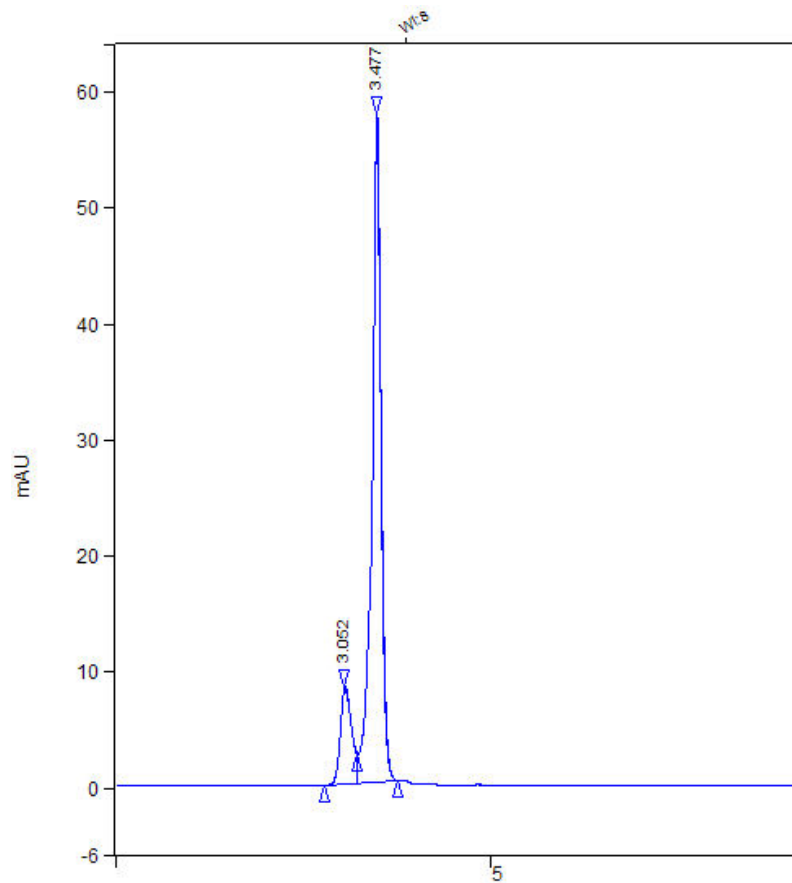


Figura 35 – Cromatograma da amostra padrão de linalol

Na Tabela 12, observam-se os códigos das amostras, tempo de retenção, área do pico antes da adição do padrão, área do pico depois da adição do padrão e a diferença entre as áreas dos picos. Foram destacadas somente as amostras que apresentaram aumento na área do pico após adição do padrão.

Tabela 12 – Amostras que apresentaram aumento na área do pico no cromatograma

Item	Amostra	TR (min)	Área do pico antes da adição	Área do pico depois da adição	Diferença das áreas
------	---------	----------	------------------------------	-------------------------------	---------------------

1	PRI – Fo 6	3,430	24015	26908	2893
2	PRI – Fo 8	3,493	9507	10105	598
3	PRI – Fo 10	3,541	82114	82771	657
4	PRI – FoMF 12	3,533	37149	41340	4191
5	PRII – Fo 61	3,434	40319	56530	16211
6	PRII – Ca 108	3,435	7301	8215	914
7	PRIII – Fo 140	3,594	2871	3102	231
8	PRIII – Ca 159	3,598	22405	23936	1531
9	PRIII – Ca 168	3,529	1126	1646	520
10	PRIII – Ca 170	3,632	5622	5925	303
11	PRIII – Ca 180	3,642	31224	31917	693
12	PRIII – CaMF 183	3,544	33071	33152	81
13	PRIII – Fl 187	3,668	18642	18715	73
14	PRIII – Fl 188	3,434	548063	561457	13394
15	PRIII – Fl 189	3,596	34878	36536	1658
16	PRIV – Fo 198	3,682	2424	3141	717
17	PRII – Ca 258	3,511	2933	3239	306

PRI - Espécime I de *A. rosaeodora*; PRII - Espécime II de *A. rosaeodora*; PRIII - Espécime III de *A. rosaeodora*; PRIV - Espécime IV de *A. rosaeodora*; Fo – Folhas; Ca – Galhos; Se – Sementes; Fl – Flores; Fr – Frutos

As amostras que apresentaram aumento na área do pico no cromatograma após adição do padrão, mais as amostras que apresentaram perfil cromatográfico diferenciado no CLAE, foram submetidas a um processo de extração líquido – líquido em acetato de etila. As frações resultantes foram submetidas à análise em cromatografia de fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM).

Foram encaminhadas dezenove amostras para análise, exceto os sobrenadantes dos fungos com os códigos PRI - Fo 10, PRII – Se 253; PRII – Ca 108; PRIII – Ca 170; PRIII – Fl 187; pois estes apresentaram quantidades insuficientes de sobrenadante para análise.

4.3.2 CROMATOGRAFIA DE FASE GASOSA ACOPLADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

As tabelas abaixo relacionam as amostras analisadas, com o tempo de retenção (TR) do pico, fragmentação no espectrômetro de massas e sugestão da identificação do composto fornecida pelo banco de dados do aparelho.

Tabela 13 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRI – FoMF 12

Nº do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	2,742	?	50; 65; 91; 92; 121
2	4,027	?	41; 42; 43; 56; 57; 70; 71; 83; 85; 97

3	5,043	?	41; 42; 43; 57; 70; 71; 83; 85; 97; 120
4	6,158	?	42; 43; 56; 57; 70; 71; 83; 85; 97
5	7,294	n-docosano (18,4%)	42; 43; 55; 57; 70; 71; 84; 85; 97; 111
6	8,448	n-docosano (15,3%)	42; 43; 55; 57; 70; 71; 84; 85; 97; 121; 178.
7	9,559	n-docosano (21,6%)	43; 55; 57; 70; 71; 85; 97; 115; 195
8	11,011	?	41; 69; 70; 86; 125; 154; 155
9	11,186	?	41; 68; 70; 86; 125; 154; 155
10	11,345	?	41; 149; 150; 223
11	15,702	?	41; 53; 55; 57; 69; 77; 95; 97; 105; 123; 147; 165; 207; 235; 264; 265; 266
12	15,987	?	42; 43; 55; 65; 69; 70; 93; 95; 97; 123; 151; 180; 207; 235; 265; 283
13	16,665	Bis-(2etilhexil)-ftalato (47,1%)	56; 57; 83; 104; 149; 150; 167; 207; 279
14	19,198	?	41; 53; 67; 69; 81; 94; 95; 121; 149; 207; 281

Tabela 14 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRI – Fo 8

Nº do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	2,572	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (37,7%)	40; 41; 43; 53; 55; 65; 69; 71; 77; 91; 92; 93; 109; 121; 136
2	2,728	Fenil álcool (43,8%)	50; 65; 91; 92; 122
3	4,034	n-docosano (14,5%)	42; 43; 56; 57; 70; 71; 84; 85; 97; 174
4	5,041	n-tetracosano (16,5)	42; 43; 56; 57; 70; 71; 83; 85; 96
5	6,158	n-docosano (18,9%)	42; 43; 55; 57; 70; 71; 83; 85; 96; 111
6	6,629	5-hidroxi-1,4-naftalenodiona (97,9%)	50; 63; 64; 92; 118; 120; 146; 173; 174
7	8,326	2,5,8-trimetil-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno (34,0%)	51; 63; 77; 102; 103; 115; 131; 132; 159; 160; 174; 175
8	8,580	3-metóxi-4,5-metilendióxi-alilbenzeno (47,7%)	50; 65; 77; 91; 105; 117; 120; 131; 146; 148; 163; 174; 192; 193
9	9,572	8-acetil-7-hidroxi-4-metil-	43; 57; 77; 91; 103; 115; 119; 133; 144; 158;

Tabela 14 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRI – Fo 8 (continuação)

10	10,358	cumarina (28,6%) N,N'-dietil-1,4-benzenodiamina (18,4%)	161; 175; 176 40; 43; 51; 57; 67; 77; 78; 91; 105; 117; 118; 131; 135; 145; 149; 160; 174; 175; 192; 193; 223
11	11,017	Acenafteno (77,4%)	41; 69; 70; 86; 125; 153; 154
12	11,190	Acenafteno (54,2%)	41; 55; 68; 70; 86; 125; 154; 155; 167
13	11,350	Di-N-butilftalato (38,8%)	41; 149; 150; 223
14	15,706	Ácido 9-metilester octadecenóico (83,3%);	41; 42; 55; 67; 68; 69; 93; 95; 97; 122; 125; 153; 179; 207; 235; 264; 265; 266
15	15,992	Ácido 9-metilester octadecenóico (74,5)	41; 42; 55; 67; 68; 69; 94; 95; 97; 123; 151; 180; 207; 235; 263; 265; 283
16	19,198	Trans-farnesol (11,6%)	41; 67; 69; 79; 81; 95; 135; 207; 209; 281; 341

Tabela 15 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – Fo 136

Nº do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	2,738	?	50; 65; 91; 92; 122
2	4,303	?	42; 43; 56; 57; 58; 70; 71; 83; 85; 97
3	5,034	?	42; 43; 55; 57; 70; 71; 83; 85; 97

4	5,933	5-hexildiidro-2-furanone (37,5%)	41; 57; 69; 85; 95; 110; 128
5	7,595	Ibuprofeno (71,4%)	41; 77; 91; 118; 119; 161; 162; 206
6	11,366	?	65; 149; 150; 223
7	13,373	Acido metilester-9-octadecenoico (74,0%)	41; 53; 55; 67; 69; 71; 94; 91; 135; 137; 180; 222; 223; 264; 265; 266; 355
8	15,432	Di-(2-etilhexil)-adipato (78,5%)	43; 55; 69; 71; 101; 129; 147; 207
9	16,012	Acido metilester-9-octadecenoico (80,9%)	42; 43; 55; 69; 81; 82; 97; 107; 111; 137; 166; 207; 235; 265; 283

Tabela 16 - Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PIII – FoMF 156

N° do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	2,072	Diidrocitronelol (12,2%)	43; 45; 56; 57; 69; 97
2	2,303	n-undecano (19,9%)	41; 42; 43; 45; 55; 57; 67; 70; 71; 84; 85; 108
3	2,522	n-undecano (17,2%)	41; 42; 43; 53; 56; 57; 68; 69; 70; 71; 84; 85
4	2,746	Ciclohexanamina (43,8%)	43; 55; 56; 70; 99
5	4,031	n-docosano (18,6%)	42; 43; 55; 57; 67; 70; 71; 84; 85; 97
6	4,278	N-acetilpirrolidina (40,1%)	42; 43; 55; 70; 84; 113; 114
7	5,041	n-tricosano (12,9%)	40; 41; 43; 56; 57; 71; 84; 111
8	5,391	Ácido 2-hexenilester hexanóico (39,2%)	42; 43; 54; 60; 81; 82; 83; 99; 100

Tabela 16 - Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PIII – FoMF 156 (continuação)

9	5,569	5-hidroxi-2-hidroximetil-4H-piran-4-one (98,3%)	41; 57; 69; 85; 113; 142; 143
10	11,340	?	149; 150; 223
11	16,367	2-aminobenzimidazol (18,6%)	41; 55; 72; 91; 114; 134; 135; 207; 302
12	17,116	9-cis-retinal (47,7%)	51; 57; 85; 128; 185; 212; 227; 255; 256; 284; 285
13	19,201	Trans-farnesol (20,1%)	41; 67; 68; 69; 81; 95; 107; 149; 207; 209; 265; 341

Tabela 17 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PII – Ca 258

N° do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	2,086	Sec-butilnitrito (19,8%)	41; 43; 45; 55; 81
2	2,541	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (9,64%)	41; 43; 44; 69; 71; 81; 93; 121
3	4,026	?	41; 42; 43; 56; 57; 70; 71; 83; 85; 97
4	5,041	?	41; 42; 43; 55; 57; 70; 71; 83; 85; 97
5	6,045	3,4-dimetoxibenzaldeído (79,3%)	41; 65; 77; 95; 105; 151; 166; 167

6	6,540	n-tetradecanol (12,3%)	42; 55; 56; 67; 83; 84; 97; 111
7	11,354	?	41; 149; 150; 223
8	13,378	?	41; 42; 55; 69; 70; 97; 111; 135; 155; 180; 221; 264
9	16,004	Ácido metilester-9-octadienoico (37,4%)	55; 56; 67; 69; 98; 123; 165; 207; 265; 316; 367; 423; 479; 535; 591; 647; 648; 649; 670

Tabela 18- Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – Fo 148

N° do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	5,897	1-tetradeceno (14,2%)	40; 41; 44; 55; 65; 67; 70; 84; 97; 111
2	6,532	1-octadeceno (13,5%)	41; 42; 55; 57; 82; 83; 85; 97; 111
3	9,115	2,3-diidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-metilcarbamato (19,7%)	55; 81; 109; 137; 138; 165; 166
4	10,844	3,5-tris(aziridin-1-il)benzo-1,4-quinona (21,7%)	43; 79; 119; 147; 175; 199; 200; 217; 232
5	11,428	6-tercbutil-2,4-dimetilfenol (30,4%)	41; 69; 69; 91; 122; 123; 135; 147; 163; 164; 233

Tabela 18- Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – Fo 148 (continuação)

6	11,539	2,6-bis-(1,1dimetiletil)-2,5-ciclohexadieno-1,4-diona (28,9%)	42; 55; 65; 67; 78; 91; 93; 107; 110; 125; 133; 149; 150; 175; 178; 191; 207; 219; 234; 235
7	11,760	Octahidro-4,4,8,8-tetrametil-4a-7-metano-4aH-naft[1,8a]oxireno (42,4%)	41, 67; 69; 91; 97; 121; 149; 165; 192; 219; 234; 235; 236
8	11,855	17- α -metiltestoterone (12,1%)	43; 53; 63; 67; 69; 78; 91; 95; 97; 107; 119; 133; 135; 136; 148; 163; 189; 215; 217; 232; 233; 234
9	12,031	Digitoxina (32,0%)	41; 43; 50; 53; 67; 69; 83; 105; 107; 109; 111; 133; 134; 147; 161; 175; 203; 236; 237.
10	13,006	Metil paraoxona (46,6%); 9-cis-retinal (13,0%)	43; 55; 78; 79; 119; 147; 148; 171; 186; 189; 197; 215; 216; 230; 248; 249
11	13,541	11- α -hidroxi-17- α -metiltestosterona (20,5%)	43; 51; 67; 77; 95; 119; 121; 135; 141; 150; 159; 189; 192; 193; 215; 233; 249
12	13,902	Citrinina (50,5%)	41; 43; 67; 69; 77; 95; 96; 97; 121; 123; 147; 161; 171; 189; 192; 215; 217; 232; 233; 234; 250; 251; 252

Tabela 19 - Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – FI 188

N° do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
-------------------	-----------------	------------------------------	---------------------

1	2,530	?	41; 42; 43; 53; 56; 57; 67; 70; 71; 84; 85
2	5,892	?	41; 43; 53; 55; 56; 57; 69; 70; 81; 83; 95; 97; 111
3	6,522	?	41; 43; 53; 55; 68; 69; 82; 83; 96; 97; 110; 111
4	9,113	2,3-diidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-metilcarbamato (26,2%)	41; 67; 81; 95; 109; 137; 138; 165; 166
5	10,836	3,5-tris(aziridin-1-il)benzo-1,4-quinona (26,7%)	43; 79; 119; 147; 159; 175; 199; 200; 217; 232; 233
6	11,422	6-terc-butil-2,4-dimetilfenol (43,2%)	41; 65; 67; 91; 122; 123; 135; 147; 163; 164; 199; 233
7	11,759	Octadiidro-4,4,8,8-tetrametil-4- α -7-metano-4H-nafto[1,8]xireno (50,0%)	41; 67; 69; 91; 97; 121; 149; 165; 201; 219; 234; 235
8	11,854	Viridilfloreno (12,2%)	43; 53; 66; 67; 69; 83; 91; 97; 107; 110; 135; 136; 161; 189; 217; 232; 233; 234
9	13,545	2,6-bis-(1,1-dimetil)-2,5-	43; 50; 67; 79; 82; 95; 105; 121; 134;

Tabela 19 - Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – Fl 188 (continuação)

		ciclohexadieno-1,4-diona (23,1%)	135; 149; 162; 164; 192; 193; 199; 217; 233; 250
10	13,892	Citrinina (50,5%)	43; 51; 67; 69; 91; 97; 119; 121; 147; 149; 177; 199; 215; 217; 233; 234; 250; 251; 252

Tabela 20 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – Fl 189

Nº do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	2,086	?	41; 43; 44; 56; 57; 69; 71; 89
2	2,308	?	40; 41; 43; 55; 57; 70; 71; 84; 85; 107
3	2,564	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (39,1%)	41; 43; 44; 55; 57; 68; 70; 71; 84; 85; 121
4	5,595	1-metilnaftaleno (62,9%)	41; 57; 69; 85; 113; 142; 143
5	11,358	?	50; 76; 149; 150; 223
6	15,985	?	42; 43; 44; 55; 67; 69; 79; 95; 97; 107; 111; 138; 165; 193; 207; 235; 265; 266; 283
7	17,126	9-cis-retinal (51,2%)	57; 85; 128; 185; 228; 229; 255; 256; 284; 285
8	19,231	Cis-Farnesol (13,3%)	41; 44; 67; 68; 69; 81; 95; 121; 149; 207; 281

Tabela 21 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRII – Fo 61

Nº do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
------------	----------	-----------------------	--------------

1	2,740	?	50; 65; 91; 92; 122
2	5,474	N-benziloxycarbonil-L-tyrosina (34,4%)	51; 77; 79; 107; 108; 138
3	11,026	?	41; 69; 70; 86; 125; 154; 155
4	11,197	?	41; 55; 68; 70; 86; 125; 154; 155

Tabela 22 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRI – Fo 6

Nº do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	2,743	Fenil etil álcool (45,3%)	50; 63; 65; 91; 92; 121

Tabela 23 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRII – Fo 58

Nº do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	11,202	Acenafteno (69,7%)	41; 68; 70; 86; 125; 154; 155
2	12,195	Benzantraceno (75,5%)	41; 55; 69; 70; 97; 129; 157; 185; 211; 228
3	12,449	Ácido 9-metilester octadecenóico (64,1%)	41; 42; 55; 69; 70; 93; 97; 123; 151; 189; 209; 227
4	12,531	Criseno (65,4%)	42; 43 70; 71; 97; 129; 157; 185; 228; 229
5	13,951	Ácido 9-metilester octadecenóico (57,7%)	40; 41; 55; 57; 69; 79; 96; 97; 99; 123; 151; 175; 193; 217; 236; 237; 238; 255
6	14,124	Isopropil palmitato (70,8%)	41; 43; 69; 70; 71; 97; 129; 157; 185; 213; 239; 256
7	14,270	Ácido 9-metilester octadecenóico (67,2%)	42; 43; 55; 67; 68; 69; 97; 101; 111; 137; 165; 194; 219; 237; 255; 325
8	14,446	Ácido butilester hexadecanóico (55,4%)	41; 43; 67; 69; 70; 95; 115; 157; 185; 255; 256; 257; 326
9	15,096	Ácido octadecanoico (30,3%)	40; 42; 43; 55; 57; 83; 95; 129; 153; 185; 213; 214; 241; 270; 271; 311; 340
10	15,158	Ácido 9-metilester octadecenóico (79,3%)	43; 55; 57; 69; 82; 97; 111; 137; 166; 207; 231; 251; 269
11	15,406	Di-(2-etilhexil)-adipato (89,4%)	43; 55; 83; 112; 129; 147
12	15,707	Ácido 9-metilester octadecenóico (57,0%)	41; 42; 43; 68; 70; 71; 97; 98; 123; 151; 179; 221; 247; 264; 265; 283
13	16,008	Ácido 9-metilester octadecenóico (55,8%)	41; 43; 54; 55; 57; 69; 81; 82; 95; 96; 113; 123; 124; 151; 153; 178; 179; 220; 221; 245; 247; 264; 265; 283; 353; 354

Tabela 24 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – CaMF 183

N° do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	2,554	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (33,3%)	41; 43; 44; 69; 70; 71; 91; 93; 121
2	4,023	n-docosane (19,9%)	41; 43; 55; 57; 70; 71; 84; 85
3	5,041	?	42; 43; 55; 57; 70; 71; 83; 85; 97
4	6,531	?	41; 42; 54; 55; 57; 68; 69; 70; 71; 83; 84; 96; 97; 110; 111
5	11,354	?	50; 76; 149; 150; 223
6	11,481	1,3,4,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametil-ciclopenta-2-benzopirano (41,6%)	50; 77; 115; 159; 187; 213; 215; 230; 243; 257; 258

Tabela 24 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRIII – CaMF 183 (continuação)

7	11,624	Ácido 2-(2-hidroxiétoxi)-etilester octadecanoico (49,1%); Ácido octadecanoico (35,6%)	42; 44; 55; 67; 69; 73; 88; 89; 111; 115; 143; 157; 158; 185; 200; 213; 227; 241; 255; 284
8	11,752	Octahidro-4,4,8,8-tetrametil-4,7-metano-4H-naft[1,8]-oxireno (34,0%)	41; 67; 69; 91; 97; 121; 147; 149; 173; 201; 234; 235
9	15,398	?	41; 55; 69; 83; 112; 129; 147
10	15,696	?	41; 53; 55; 5771; 73; 96; 97; 123; 148; 179; 207; 235; 265; 266
11	15,991	?	42; 43; 55; 67; 69; 70; 94; 97; 98; 123; 151; 180; 221; 245; 265; 283
12	16,364	2,6-Dichloro-4-nitroaniline-2,6-Dichloro-4-nitrobenzenamine (15,1%)	55; 56; 72; 91; 113; 114; 134; 135; 207; 302
13	16,673	?	50; 57; 76; 104; 149; 150; 167; 207; 279
14	17,107	Estrone metilester (31,5%)	63; 128; 199; 227; 229; 255; 256284; 285

Tabela 25- Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PRII – Fo 71

N° do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	5,957	n-tetradecene (13,3%)	41; 43; 53; 55; 56; 67; 69; 70; 82; 83; 96; 97; 111
2	6,533	n-dodeceno (8,99%)	41; 42; 43; 55; 56; 66; 67; 69; 70; 82; 83; 96; 97; 110; 111
3	11,032	?	41; 69; 70; 86; 125; 154; 155
4	11,201	?	41; 68; 70; 86; 125; 154; 155
5	15,705	?	41; 42; 55; 67; 68; 69; 92; 95; 97; 123; 125; 151; 153; 193; 207; 222; 244; 245; 264; 265; 266
6	15,988	?	43; 55; 57; 69; 79; 81; 97; 107; 111; 127; 151; 180; 221; 245; 265; 283;

7	31,864	a-11-hidroxipregn-4-eno-3,20-dione (23,0%)	55; 56; 72; 91; 120; 121; 160; 202; 230; 231; 246; 279; 280; 329; 330; 374; 378; 379; 422; 475; 476
---	--------	--	---

Tabela 26 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de P_{RII} – Fo 56

N° do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	6,680	Octadecene (9,62%)	41; 43; 54; 55; 5682; 83; 111
2	15,676	Di-(2-etilhexil)-adipato (74,4%)	40; 43; 55; 69; 71; 84; 101; 111; 128;

Tabela 26 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de P_{RII} – Fo 56 (continuação)

			129; 147; 207
3	15,963	Ácido 9-metilester octadecenoico (81,9%)	41; 53; 55; 57; 69; 85; 96; 97; 125; 151; 179; 221; 264; 265; 355; 429
4	16,245	Ácido 9-metilester octadecenoico(75,3%)	43; 55; 57; 67; 69; 94; 96; 97; 123; 151; 180; 222; 247; 265; 283
5	19,625	Acetato de nerolidila (10,3%)	40; 41; 69; 79; 95; 133; 207; 281; 341; 429;
6	24,804	Digitoxina (35,4%)	43; 55; 56; 95; 97; 98; 135; 173; 207; 208; 222; 265; 281; 327; 446

Tabela 27 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de P_{RIV} – Fo 198

N° do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	2,141	1,2,4-trimetilbenzeno (29,4%)	43; 44; 45; 56; 77; 104; 105; 119; 120
32	2,552	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (51,0%)	41; 43; 44; 45; 68; 67; 71; 83; 91; 93; 107; 119; 134
4	3,851	n-undecano (11,3%)	40; 42; 43; 58; 69; 71
5	4,037	n-heneicosano (10,3%)	40; 54; 55; 57; 70; 71; 84; 85; 97; 135
6	5,042	n-tridecano (14,2%)	40; 42; 43; 44; 56; 57; 70; 71; 83; 85; 97
7	6,021	Diidrociironelol (13,3%)	40; 41; 42; 44; 53; 55; 56; 67; 67; 69; 71; 83; 84; 85; 97; 111
8	6,540	1-eicoseno (8,90%)	41; 44; 54; 55; 57; 67; 83; 84; 97; 111; 221
9	7,304	n-docosano (15,6%)	43; 55; 57; 71; 83; 85; 111
10	8,442	?	40; 42; 43; 55; 57; 70; 71; 84; 85; 97; 111
11	8,946	?	40; 42; 43; 55; 57; 69; 71; 84; 85; 97; 111
12	11,644	Ácido octadecanoico (31,8%)	40; 43; 55; 60; 61; 73; 85; 87; 88; 109; 115; 143; 157; 158; 185; 186; 213; 214; 241; 255; 284
13	13,340	3-iso-thujopsanono (10,1%)	43; 55; 67; 69; 91; 95; 109; 111; 135; 178; 262
14	15,417	?	43; 55; 83; 101; 111; 129; 130; 147
15	15,716	?	41; 42; 55; 65; 67; 71; 82; 91; 97; 111; 112; 137; 165; 193; 221; 245; 264; 265; 266; 283
16		?	41; 42; 43; 55; 57; 67; 69; 71; 73; 81; 95; 97; 112; 123; 136; 151; 180; 221; 245; 264; 283

Tabela 28 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PIII – Ca 159

N° do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	2,560	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (30,9%)	43; 44; 55; 71; 91; 93; 121
2	4,032	?	42; 43; 56; 57; 70; 71; 84; 85
3	11,368	?	41; 76; 149; 150; 223
4	11,639	Ácido octadecanoico (52,2%)	43; 44; 55; 61; 67; 73; 86; 87; 88; 111; 115; 143; 152; 157; 172; 185; 200; 213; 227; 241; 255; 284
5	13,324	Octahidro-4,4,8,8-tetrametil-4,7-metano-4H-naft[1,8]-oxireno (44,4%)	41; 55; 67; 69; 71; 91; 95; 109; 111; 135; 163; 191; 263
6	15,416	Di-(2-etilexil)-adipato (86,6%)	43; 55; 83; 101; 111; 128; 147
7	15,709	?	41; 55; 56; 67; 71; 82; 97; 108; 111; 133; 151; 179; 207; 235; 264; 265; 266
8	16,006	Perileno (66,0%)	42; 43; 55; 69; 70; 73; 93; 96; 97; 123; 148; 166; 197; 222; 245; 265; 283
9	19,240	Dendrolasina (15,7%)	41; 67; 68; 69; 81; 94; 93; 95; 121; 123; 149; 175; 207; 209

Tabela 29 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PIII – Fo 140

N° do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	2,562	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (51,0%)	43; 44; 55; 71; 91; 93; 121
2	6,529	Octadeceno (9,73%)	41; 42; 43; 54; 55; 56; 67; 69; 70; 81; 83; 96; 97; 111
3	7,593	Ibuprofeno (71,4%)	45; 77; 91; 105; 119; 161; 162; 206; 207
4	9,941	Ciclopentadecanol (11,2%)	50; 53; 69; 81; 82; 83; 97; 99; 110; 112; 128
5	15,406	Di-(2-etilhexil)-adipate (87,9%)	43; 55; 83; 101; 111; 128; 129; 147
6	15,701	Perileno (92,0%)	41; 53; 55; 57; 71; 93; 96; 97; 112; 135; 166; 193; 221; 245; 264; 265; 266
7	15,982	Perileno (79,3%)	42; 43; 55; 69; 70; 93; 96; 97; 123; 151; 179; 221; 263; 264; 283
8	19,218	Cis-fernesol (24,6%)	41; 43; 67; 68; 69; 81; 95; 97; 121; 149; 177; 207; 281

Tabela 30 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PIII – Ca 180

N° do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	2,777	Fenil etil álcool (63,9%)	50; 63; 65; 91; 92; 122
2	6,033	n-tetradeceno (14,7%)	40; 41; 43; 54; 55; 56; 67; 69; 70; 81; 83; 96; 97; 111
3	6,667	?	41; 42; 55; 57; 81; 83; 85; 110; 111

4	15,938	?	41; 42; 43; 67; 68; 71; 93; 97; 98; 123; 151; 179; 221; 245; 264; 265; 266; 355.
5	16,221	?	41; 43; 53; 55; 56; 57; 67; 69; 84; 85; 96; 97; 110; 112; 134; 136; 166; 197; 221; 246; 265; 283

Tabela 31 – Perfil químico da fração acetato de etila do sobrenadante de PIII – Ca 168

Nº do Pico	TR (min)	Composto identificado	Fragmentação
1	2,544	?	41; 42; 43; 56; 57; 67; 70; 71; 84; 85
2	4,024	?	42; 43; 56; 57; 70; 71; 84; 85; 97
3	5,898	n-tridecanol (11,6%)	40; 41; 43; 54; 55; 56; 57; 67; 69; 70; 71; 82; 83; 85; 96; 97; 111
4	6,528	Octadecene (11,7%)	41; 42; 54; 55; 56; 67; 68; 69; 70; 81; 82; 83; 96; 97; 110; 111
5	11,357	?	76; 149; 150; 223
6	15,696	Ácido 9-metilester octadecenóico (74,9%)	40; 41; 44; 55; 70; 71; 79; 96; 97; 112; 135; 165; 193; 207; 222; 245; 265; 266
7	15,995	?	40; 43; 55; 56; 57; 67; 69; 79; 84; 97; 98; 110; 112; 135; 165; 197; 207; 246; 265; 283

Das amostras analisadas, sete apresentaram picos no mesmo tempo de retenção do padrão de linalol e o perfil de fragmentação desses picos são semelhantes à fragmentação do padrão (figura 36). A tabela abaixo relaciona as amostras que apresentaram a presença do linalol, com os tempos de retenção e probabilidade.

Tabela 32 – Amostras que apresentaram presença do linalol

Amostra	TR (min)	Probabilidade
PRI – Fo 8	2,572	30,7
PRIII – Fo 140	2,562	51,0
PRIII – Ca 159	2,560	30,9
PRIII – CaMF 183	2,554	33,3
PRIII – Fl 189	2,564	39,1
PRIV – Fo 198	2,552	51,0
PRII – Ca 258	2,541	9,64

PRI - Espécime I de *A. rosaeodora*; PRII - Espécime II de *A. rosaeodora*; PRIII - Espécime III de *A. rosaeodora*; PRIV - Espécime IV de *A. rosaeodora*; Fo – Folhas; Ca – Galhos; Se – Sementes; Fl – Flores; Fr – Frutos

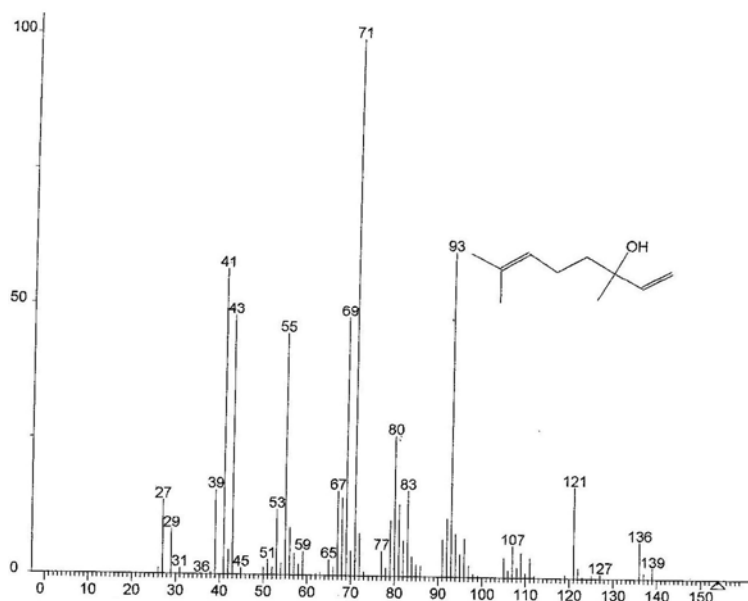


Figura 36 – Espectro de massas do linalol

Até o momento, não há relato na literatura sobre fungos filamentosos que possam produzir substâncias da classe de terpenos. Porém, estudos relacionados a interações fungos/plantas mencionam uma possível rota metabólica que favorece a produção dessa classe de substâncias. Essa rota é denominada *via non mevalonato – metileritritol fosfato* para produção de terpenos.

Os genes que codificam a expressão das enzimas 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintetase e 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato-isomerase, que regulam essa via, são transferidos pela planta para o fungo, provavelmente devido à co-evolução de ambos os indivíduos (CARRAU *et al.*, 2005; ZHI-LIN *et al.*, 2007). A partir de produtos de degradação da glicose, após reação catalizada pela enzima 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintetase a via de produção é iniciada (Figura 8).

Um estudo desenvolvido por Hock em 1984 revelou a produção dos terpenos linalol, geraniol e citronelol pelas leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces fermentati* durante a fermentação alcoólica (HOCK *et al.*, 1984). Um estudo mais recente de Carrau e colaboradores puderam identificar a produção majoritária de linalol e α -terpeniol por *Saccharomyces cerevisiae*, além da produção de outros terpenos como citronelol, geraniol e farnesol, após alteração de concentrações da fonte de nitrogênio no meio de cultura (CARRAU *et al.*, 2005).

Outras substâncias além do linalol apresentaram-se comuns entre as amostras, conforme relacionado na tabela 33 e encontram-se descritos na literatura com a obtenção

destas através de diferentes microrganismos e plantas como pode ser observado nas descrições abaixo.

Tabela 33 – Compostos em comum entre as amostras

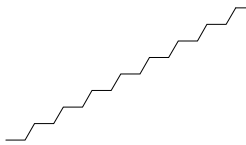
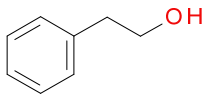
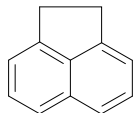
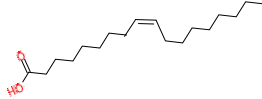
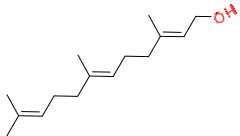
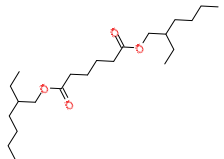
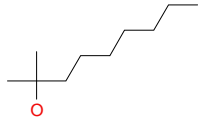

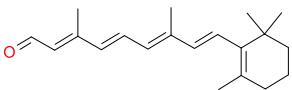
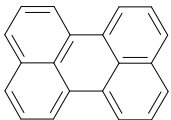
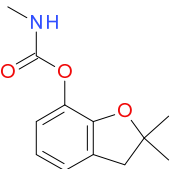
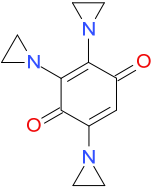
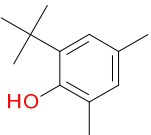
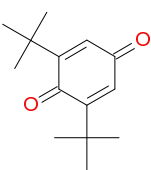
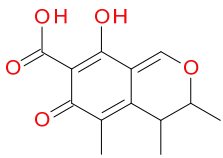
Ítem	Composto	Amostras	Fragmentação	Estrutura química
1	n-docosano	PRI – FoMF 12; PRI – Fo 8; PRIII – FoMF 156; PRIII – CaMF 183; PRIV – 198	41; 43; 55; 57; 70; 71; 84; 85	
2	Feniletíl álcool	PRI – Fo 6; PRIII – Ca 180; PRI – Fo 8	50; 63; 65; 91; 92; 122	
3	Acenafteno	PRI – Fo 8; PRII – Fo 58	41; 69; 70; 86; 125; 153; 154	
4	Ácido 9-metilester octadecenóico	PRI – Fo 8; PRIII – Fo 136; PRII – Fo 58; PRII – Fo 56; PRIII - Ca 168; PRII – Ca 258	40; 41; 44; 55; 70; 71; 79; 96; 97; 112; 135; 165; 193; 207; 222; 245; 265; 266	
5	(Cis/Trans)-Farnesol	PRIII – FoMF 156; PRI – Fo 8; PRIII – Fl 189; PRIII - Fo 140	41; 43; 67; 68; 69; 81; 95; 97; 121; 149; 177; 207; 281	

Tabela 33 – Compostos em comum entre as amostras (continuação)

6	Di-(2-etilhexil)-adipato	PRIII – Fo 136; PRII – Fo 58; PRII – Fo 56; PRII – Ca 159; PRIII – Fo 140	43; 55; 69; 71; 101; 129; 147; 207	
7	Diidrocitronelol	PRIII – FoMF 156; PRIV – Fo 198	43; 45; 56; 57; 69; 97	
8	n-undecano	PRIII – FoMF 156; PRIV – Fo 198	41; 42; 43; 45; 55; 57; 67; 70; 71; 84; 85; 108	

9	Cis - Retinal	PRIII – FoMF 156; PRIII – Fl 189	51; 57; 85; 128; 185; 212; 227; 255; 256; 284; 285	
10	Perileno	PRIII – Ca 159; PRIII – Fo 140	42; 43; 55; 69; 70; 93; 96; 97; 123; 151; 179; 221; 263; 264; 283	
11	2,3-diidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-ilmetilcarbamato	PRIII – Fo 148; PRIII – Fl 188	55; 81; 109; 137; 138; 165; 166	
12	3,5-tris(aziridin-1-il)benzo-1,4-quinona	PRIII – Fo 148; PRIII – Fl 188	43; 79; 119; 147; 175; 199; 200; 217; 232	
13	6-terc-butil-2,4-dimetilfenol	PRIII – Fo 148; PRIII – Fl 188	41; 69; 69; 91; 122; 123; 135; 147; 163; 164; 233	
14	2,6-bis(1,1dimetiletil)-2,5-ciclohexadieno-1,4-diona	PRIII – Fo 148; PRIII – Fl 188	42; 55; 65; 67; 78; 91; 93; 107; 110; 125; 133; 149; 150; 175; 178; 191; 207; 219; 234; 235	
15	Citrinina	PRIII – Fo 148; PRIII – Fl 188	41; 43; 67; 69; 77; 95; 96; 97; 121; 123; 147; 161; 171; 189; 192; 215; 217; 232; 233; 234; 250; 251; 252	

O item 1 da tabela 33 sugere um composto com fragmentação semelhante a n-docosano, presente nos sobrenadantes dos fungos com os códigos PRI – FoMF 12; PRI – Fo 8; PRIII – FoMF 156; PRIII – CaMF 183, PRIV – 198. É um hidrocarboneto derivado do petróleo que contém vinte e dois carbonos na sua estrutura e é encontrado em pequenas concentrações em óleos essenciais de algumas plantas, como por exemplo, erva-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*) e café (*Coffea arabica*). É industrialmente utilizado como parte da composição de óleos lubrificantes automotivos (SANTOS, 2005; FERNANDES *et al.*, 2009).

O Feniletil álcool, composto relacionado no item 2 da tabela 33, que apresenta peso molecular 122,07 é uma substância utilizada como componente ativo em alguns meios de

cultura seletivo para bactérias gram-positivas. Exerce ação bacteriostática inibitória sobre bactérias gram-negativas por inibir a síntese de DNA. Sendo um derivado terpênico, está presente na composição de óleos essenciais de várias plantas e em compostos voláteis de fungos endofíticos *Gliocladium roseum* e *Muscodor albu* (STROBEL *et al.*, 2008; STROBEL *et al.*, 2001).

A substância identificada como acenafteno (item 3 da tabela 33), é hidrocarboneto policíclico aromático (HPA). Faz parte de um grupo de substâncias encontradas em material particulado atmosférico de grande interesse ambiental devido suas propriedades tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas. São introduzidos no ambiente por fontes naturais e antropóicas. Entre as fontes naturais, incluem queima natural de florestas, emissões vulcânicas e processos petrogênico. Existe relato na literatura que confirmam a produção destes compostos por bactérias, algas e fungos; porém em quantidades reduzidas frente a outras fontes (CAVALCANTE *et al.*, 2007). Por ser um dos HPAs mais leve, é facilmente formado na atmosfera, podendo ser absorvidos pelas plantas. Dessa maneira, pode-se sugerir que a partir do acúmulo desta substância no vegetal, o fungo endofítico associado a mesma pode adquirir a capacidade para produzi-la (CAMINITTI, 2008).

O composto identificado como Ácido 9-metilester octadecenóico (item 4 da tabela 33), também conhecido como ácido oléico, é um ácido graxo que está presente em várias sementes oleaginosas, como por exemplo, a semente de *Copaifera officinalis*, constituinte de óleos fixos e já foi descrito como produto de origem fúngica, identificado no extrato metanólico do fungo do gênero *Xylaria* por Liu e colaboradores (LIU *et al.*, 2005; VEIGA JUNIOR *et al.*, 2007). Presente na maior parte dos óleos de origem vegetal é um composto de amplo interesse por possuir uma estrutura de cadeia carbônica insaturada, revelando-se favorável para prevenção de doenças cardiovasculares (FERNANDEZ E ROSOLEM, 1998).

O sesquiterpeno (cis/trans) farnesol (item 5 da tabela 33), está presente em inúmeros extratos vegetais e tem sido testado como indutor de apoptose. É um inseticida natural e também age como feromônio para outros insetos (JOO, 2009). Encontra-se associado ao linalol como constituinte de óleos essenciais e também já foi identificado como metabólito secundário de algumas leveduras do gênero *Saccharomyces* (CARRAU *et al.*, 2005).

Estudos toxicológicos com composto identificado como Di-(2-etilhexil)-adipato (item 6 da tabela 33) demonstrou que em ratos e camundongos pode causar embriotoxicidade, atrofia testicular e anomalias no sistema nervoso central. Em humanos pode causar problemas hepáticos e renais (SOUZA *et al.*, 2009). É um plastificante petroquímico e devido seu efeito

tóxico, pesquisas visam a substituição deste composto por outros polímeros menos tóxicos. Até o momento, não existe relato na literatura da produção deste composto a partir de metabolismos microbiológico.

O composto n-undecano (item 8 da tabela 33), é um hidrocarboneto derivado do petróleo que também se encontra presente na composição de feromônios para formigas. Foi identificado na composição de voláteis do fungo endofítico *Gliocladium roseum*, no estudo desenvolvido por Strobel e colaboradores em 2008. Também já foi identificado na composição química de óleos essenciais de algumas plantas como, por exemplo, *Salvia stenophylla* (Lamiaceae) (KAMATOU *et al.*, 2005; STROBEL *et al.*, 2008).

O composto identificado como Cis-retinal (item 9 da tabela 33), é um derivado carotenóide também conhecido como vitamina A. Em animais é sintetizado através da reação de clivagem de β -caroteno mediada pela enzima β -caroteno oxigenase I. Estudos com fungo *Fusarium fugikuroi* identificou o gene que codifica a expressão da enzima que cataliza as reações com carotenóides resultando na produção do composto acima citado pelo fungo (PRADO-CRABRERO *et al.*, 2007).

Perileno (item 10 da tabela 33), assim como o composto acenafteno, também é classificado como um hidrocarboneto policíclico aromático (HPA). Além das fontes naturais já citadas, também foi identificado na composição de extratos de fungo endofítico *Alternaria alternata* (GAO *et al.*, 2009).

O composto do item 11 da tabela 33, 2,3-diidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-ilmetilcarbamato, também conhecido como carbofurano, é um inseticida e nematicida do grupo dos carbamatos, que é parcialmente solúvel em água e facilmente degradado no meio ambiente devido a hidroxilação do anel benzofuranil. Seus principais metabólitos, o 3-hidroxicarbofurano e 3-cetocarbofurano, tem curta permanência no solo, são formados lentamente e apresentam baixa toxicidade aguda para insetos. Aplicações repetidas de carbofurano aumentam sua atividade degradativa devido ao maior crescimento de microrganismos capazes de utilizá-lo como fonte de carbono e nitrogênio (PEIXOTO, 2007).

O composto 3,5-tris(aziridin-1-il)benzo-1,4-quinona, também conhecido como Traziquone (item 12 da tabela 33), é um agente alquilante citotóxico que realiza ligações cruzadas no DNA resultando em morte celular por apoptose ou necrose. Agente antineoplásico utilizado principalmente no tratamento de tumores ovarianos. Foi primeiramente sintetizada por Gauss em 1958, nos laboratórios Bayer, Alemanha (SILVA *et al.*, 1992; HUANG *et al.*, 2009).

Citrinina (item 15 da tabela 33) é uma toxina, que pode causar hepato e nefrotoxicidade e já foi identificado em extratos dos fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Monascus*. Descrito principalmente como contaminante de alimentos, sua análise é incluída no controle de qualidade de alimentos, no intuito de prevenir intoxicações através da ingestão do composto (BLANC *et al.*, 1995; YU *et al.*, 2006; PATTANAGGU *et al.*, 2008)

Os compostos dos itens 13 e 14 da tabela 33 são pouco descritos na literatura e não apresentam fonte natural para produção.

4.4 DETECÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi testada com sobrenadante e com os extratos etanólicos dos micélios de vinte e sete fungos escolhidos aleatoriamente.

Dentre as amostras que foram testadas para detecção de atividade antibacteriana, os sobrenadantes dos fungos com os códigos PRII-Fo 68 e PRII-Ca 256 apresentaram atividade inibitória para o crescimento de *P. aeruginosa*, demonstrando uma média dos halos de inibição de 26 mm e 10 mm de diâmetro, respectivamente, conforme figura 37.

P. aeruginosa é um bacilo gram-negativo que apresenta alta taxa de mutação que resulta em resistência progressiva aos antibióticos o que dificulta a terapia antinfecçiosa. No Brasil, está frequentemente relacionada a infecções hospitalares e, devido sua capacidade de adquirir resistência, torna-se cada vez mais importante a pesquisa por novos produtos que possam ter atividade inibitória do seu crescimento (MATA E ABEGG, 2007).

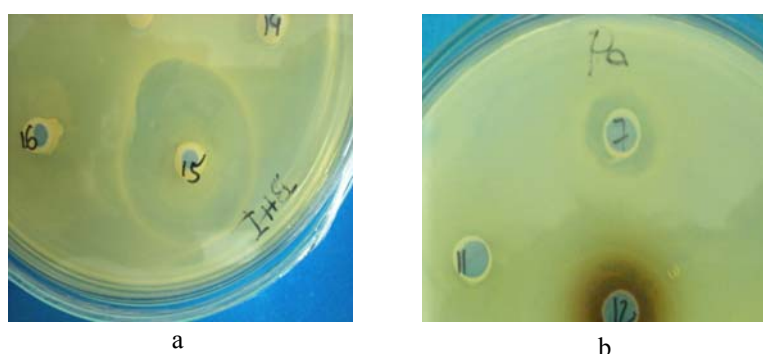


Figura 37 – a) Halo de inibição do sobrenadante de PRII-Fo 68; b) Halo de inibição do sobrenadante de PRII-Ca

Dentre as amostras que foram testadas para detecção de atividade antifúngica, os extratos dos micélios dos fungos com os códigos PRIII-Fo 134 e PRIII-Fo 136 apresentaram atividade inibitória para o crescimento de *P. avelani*, demonstrando uma média dos halos de inibição de 23 mm e 28 mm de diâmetro, respectivamente, conforme figura 38.

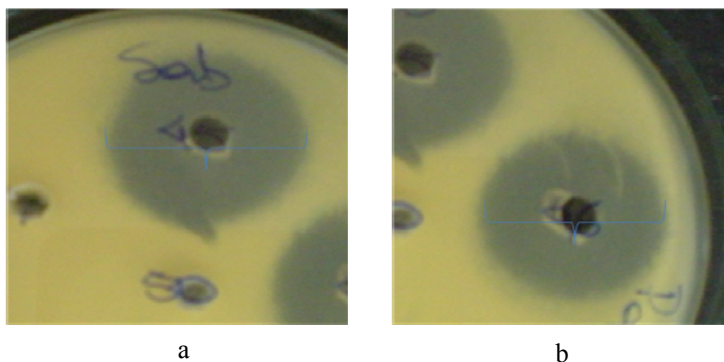


Figura 38 – a) Halo de inibição do sobrenadante de PRIII-Fo 134; b) Halo de inibição do sobrenadante de PRIII-Ca 136

4.5 CULTIVO EM LARGA ESCALA

O fungo com o código PRII-Fo 68, cujo sobrenadante apresentou melhor atividade de inibição do crescimento bacteriano, foi submetido a fermentação em larga escala.

Após 25 dias de crescimento micelial, a cultura foi submetida a filtração a vácuo e o sobrenante foi extraído por partição com acetato de etila e em seguida com acetato de etila/isopropanol 7:3. A massa micelial remanescente foi triturada e mantida em maceração em etanol por 24 horas (Figura 41).

O fungo apresentou bom crescimento (figura 39), porém, dos 18 L de meio de cultura apenas 14,4 L foram utilizados. Os 3,6 L restantes estavam contaminados.



Figura 39 – Micélio do fungo PRII-Fo 68 em 300 mL de meio de cultura líquido

Após a filtração a vácuo, o sobrenadante estava com coloração diferente ao meio de cultura sem inoculo, conforme a figura 40, o que demonstra visualmente que houve utilização pelo fungo dos nutrientes do meio de cultura para a produção de metabólitos.



Figura 40 – Erlenmeyer do lado esquerdo: meio de cultura sem inoculo; erlenmeyer do lado direito sobrenadante.



Figura 41- Micélio triturado em extração com etanol

Desta cultura em larga escala, foram obtidos três extratos. O primeiro foi resultado do processo de extração por partição do sobrenadante com o solvente acetato de etila. O rendimento foi de 2,46 g. O segundo extrato foi resultado da segunda etapa do processo extração do sobrenadante com acetato de etila/isopropanol na proporção 7:3. O rendimento foi de 1,87g. O terceiro extrato é resultado da maceração do micélio em etanol. O rendimento foi de 1,0g.

Durante o processo de concentração dos extratos no evaporador rotatório, o extrato etanólico do micélio apresentou partículas impregnadas no balão volumétrico que foram solubilizadas em hexano/diclorometano 1:1. Desta solução foi feito cromatografia em camada delgada e reveladas em luz ultravioleta no comprimento de onda de 365 nm e iodo, conforme figura 42.

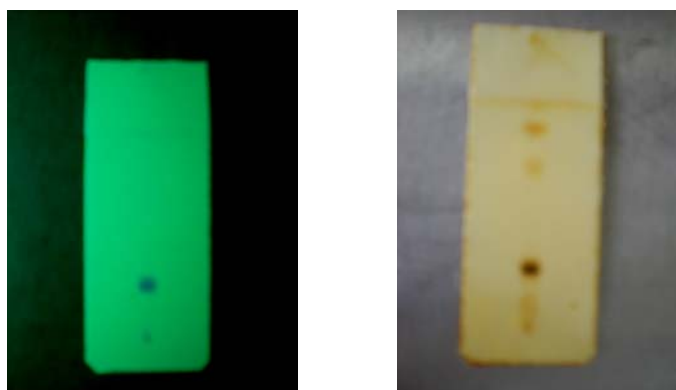
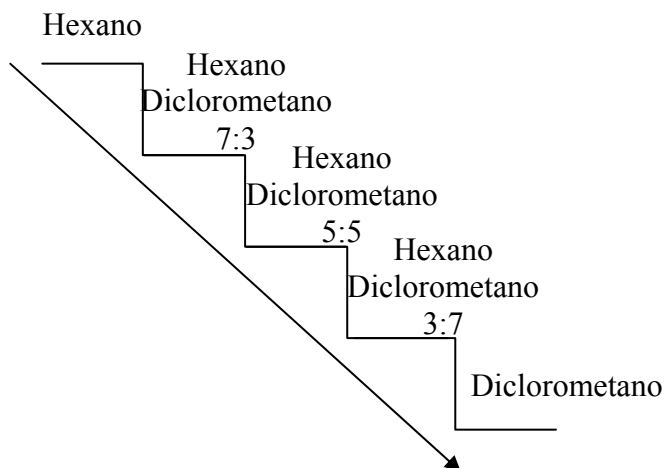


Figura 42 – Cromatografia em camada delgada do extrato etanólico do micélio de PRII – Fo 68

Conforme a figura acima, a placa do lado direito revelada em iodo, apresentou presença de mais outras três substâncias além da que apresentou fluorescência na revelação em ultra-violeta. Para separação dessa fração, foi feita uma coluna cromatográfica, com sistema de eluição crescente de hexano e diclorometano.



Os compostos isolados na fração hexano/diclorometano (5:5) e na fração diclorometano, foram conduzidos para análise em Ressonância magnética nuclear de próton (RMN- H^1) e CG/EM, porém as análises não ficaram prontas em tempo hábil para discussão neste trabalho.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

- Dos quatro espécimes coletados, foi possível isolar 262 fungos endofíticos, os quais foram classificados em 22 grupos diferentes, de acordo com suas características macro-morfológicas.
- Entre os tecidos coletados para isolamento, o galho apresentou maior quantidade de fungos isolados, com uma média de 33,5 fungos por espécime.
- As condições para fermentação dos fungos isolados não permitiram o crescimento adequado de todos os isolados.
- Os 86 fungos que obtiveram crescimento micelial nas condições de fermentação estabelecidas foram analisados por CLAE e apenas 10 deles apresentaram cromatogramas diferentes entre si.
- Para análise da presença do linalol via CLAE, 17 sobrenadantes apresentaram aumento no pico com mesmo tempo de retenção da amostra padrão e sete dessas amostras apresentaram fragmentação característica de linalol após análise em CG/EM.
- A literatura sugere que o fungo utiliza a via do metil-eritritol-fosfato para formação dos monoterpenos, e que com a relação de proto-cooperação com a planta hospedeira, a enzima que regula a via pode ser transferida possibilitando assim a produção do linalol pelos fungos.
- Mais de uma das amostras selecionadas apresentaram espectro com o perfil de fragmentação semelhante às seguintes substâncias: n-docosano; Fenil etil álcool; Acenafteno; Ácido-9-metilester octadecenóico; (Cis/Trans)-Farnesol; Di-(2-etilhexil)-adipato; Diidrocitronelol n-undecano; Cis- Retinal; Perileno; 2,3-diidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-metilcarbamato; 2,3,5-tris(aziridin-1-il)benzo-1,4-quinona; 6-terc-butil-2,4-dimetilfenol; 2,6-bis(1,1 dimetiletil)-2,5-ciclohexadieno-1,4-diona; Citrinina.

- O sobrenadante dos fungos PRII-Fo 68 e PRII-Ca 256 apresentaram atividade inibitória para o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, sendo PRII-Fo 68 o que apresentou maior média do halo de inibição.
- Os extratos dos micélios dos fungos PRIII-Fo 134 e PRIII-Fo 136 apresentaram atividade inibitória para o crescimento de *Penicillium avelani*, provavelmente pode ser o mesmo fungo, uma vez que foi isolado do mesmo tecido vegetal e espécime.
- O Cultivo em larga escala do fungo que apresentou maior halo de inibição contra *P. aeruginosa*, resultou na extração de um composto que, a partir de técnicas cromatográficas de análise foi isolado.
- O isolamento dos microrganismos, as extrações e as análises químicas foram realizados de acordo com a disponibilidade de equipamentos e reagentes, não sendo possível realizar a triagem com todos os isolados fúngicos até a presente data.

Perspectivas

6 PERSPECTIVAS

- Fazer novo isolamento dos fungos endofíticos de *Aniba rosaeodora* em diferentes estações para comparação da influência do clima na produção dos metabólitos.
- Triagem seletiva de fungos com meios de culturas diferenciados que favoreçam produção de substratos de interesse biotecnológico, incluindo o linalol e os outros compostos identificados.
- Estudo da fisiologia fúngica para determinação das condições adequadas de crescimentos para aperfeiçoar produção de metabolitos.
- Utilização de marcadores moleculares para seleção de fungos com genes que codificam enzimas que regulam a via metil eritritol fosfato.
- Estudo químico dos metabolitos produzidos pelo fungo PRII – FO 68, para possível identificação do composto ativo contra *Pseudomonas aeruginosa*.
- Estudo químico dos metabolitos produzidos pelos fungos PRIII-Fo 134 e PRIII-Fo 136, para possível identificação do composto ativo contra *Penicillium avelani*.
- Identificação dos seguintes fungos selecionados: PRII-Fo 68; PRIII-Fo 134; PRIII-Fo 136; PRIII – Ca 159 e PRII – Ca 258. Sendo os dois primeiro selecionados devido a atividade antimicrobiana e os dois últimos devido a produção do linalol.

Referências

7 REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, J. M. *Bioprospecção de espécies amazônicas da família Lauraceae com potencial aromático e medicinal*. 2009. 121 f. Dissertação (Mestrado em Química / Química Orgânica) Departamento de Química. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

ARAUJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAIVA, P.T. *Manual isolamento de microrganismo endofíticos*. Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.

AZEVEDO, J.L. Genética de fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, 2004. cap. 5, p. 173-180.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI J.R., W.; ARAUJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. *Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul: Educs, 2002. cap. 8, p. 233-265.

BASTOS, A. M. Os paus-rosa da indústria da essência. *Rodriguési.*, v. 16, p. 45-54, 1943.
CAMPBELL, M. K. e FARRELL, S. O. *Bioquímica*. São Paulo: Thompson Learning, 2007, v 3, cap. 17, 567 – 618; cap.

BLANC, P. J.; LAUSSAC, J.P.; LE BARS, J.; LORET, M.O.; PAREILLEUX, A.; PROMÉ, D.; PROMÉ, J.C.; SANTERRE, A.L.; GOMA, G. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *International Journal of Food Microbiology*. v. 27, p. 201-213, dec/1995.

CARMINITTI, L. *Estabelecimento do potencial de plantas no monitoramento de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) presentes na atmosfera urbana de São Paulo, SP*. 2008. 86f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade vegetal e Meio Ambiente / Análises Ambientais) Instituto de Botânica. Universidade de São Paulo, São Paulo.

CARRAU, F. M.; MEDINA, K.; BOIDO, E.; FARINA, L.; GAGGERO, C.; DELLACASSA, E.; VERSINI, G.; HENSCHKE, P. A. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology letters*, v. 243, p. 107-115. Nov/2004.

CAVALCANTE, R. M.; FILHO, N. S. M.; VIANA, R. B.; OLIVEIRA, I. R. N.; NASCIMENTO, R. F. Utilização da extração em fase sólida (SPE) na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em matrizes aquosas ambientais. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 560-564, jan/2007.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas, SP: editora da UNICAMP, 2006. Cap. 8, 9. p. 203-397.

COSTA, A. F. *Farmacognosia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. 5 ed, v. 1.

DAISY, B.H.; STROBEL, G.A.; CASTILLO, U.; EZRA, D.; SEARS, J.; WEAVER, D.K.; RUNYON, J.B. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, v.148, p. 3737-3741, aug/2002.

DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L.C.A.; VEIGA, T.A.M.; BARRETO, R.T. W.; KING-DIAZ, B.; LOTINA-HENNSEN, B. Phytotoxic constituents from *Nimbya alternantherae*. *Biochemical Systematics and Ecology*. v. 34, n.11, p. 790-795, nov/2006.

DURÁN, N. Enzimas ligninolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, 2004. cap. 7, p. 245-260.

EMMERICH, M.; SENNA, L. M. Estudos de etnobotânica no Parque indígena do Xingu II. Dois componentes do ritual de pajelância: o cigarro e a semente do pajé. *Bradea*, v. 4, n. 26, p. 170-175, 1985.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A.; BARBIN, E. L.; SPANÓ, J. C. E.; MARCHESAN, M. A. e PÉCORA, J. D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dentist Journal*, v. 13, n. 2, p. 113-117, jan/2002.

EYBERGUER, A. L.; REJESWARY, D.; PORTTER, J. R. Endofhytes fulgal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *Jornal of natural products*, v. 69, n. 8, p. 1121-1124, aug/2006.

FERNANDES, F. L.; GERALDO, G. C.; DEMUNER, A. J.; PICANÇO, M. C.; FERNANDES, M. E. S. Constituintes químicos em frutos e folhas em diferentes cultivares de café e relação insetos. *Enc. Biosfera*. n. 07, ISSN 1809-058351. Goiânia 2009.

FERNANDEZ, E. M.; ROSOLEM, C. A. Ácidos graxos e proteína em grãos de amendoim em função da calagem e do método de SECAGEM. *Bragantia*, v. 57, n. 1. 1998

FERRAZ, A.L. Fungos decompositores de madeira. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, 2004. cap. 6, p. 215-240.

FIRÁKOVÁ S.; ŠTURDÍKOVÁ, M.; MÚČKOVÁ, M.. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia, Bratislava*, v. 62, n. 3, p. 251-257, jan/2007.

FROHLICH, J.; HYDE, K. D. e PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. *Micologycal research*, v 104, n. 10, p. 1202-1212, oct/2000.

GALVAGNO, M. A. e FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, 2004. cap. 4, p. 123-169

GAO SS, LI XM, WANG BG. Perylene derivatives produced by *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Laurencia* species. *Natiural Products Communications*, v. 4, n. 11, p. 1477-80. nov/2009.

GONÇALVES, J.F.C.; BARRETO, D.C.S.; SANTOS JR., U.M.; FERNANDES, A.V.; SAMPAIO, P.T.B; BUCKERIDGE, M.S. Growth, photosynthesis and stress indicator in Young rosewood plants (*Aniba rosaeodora* Ducke) under different light intensities. *Braz. J. Plant Physiol*, v. 17, n. 3, p. 325-334, oct. 2005.

GOTTLIEB, O. R.; KOKETSU, M.; MAGALHÃES, M. T.; MAIA, J. G. S.; MENDES, P. H.; ROCHA, A. I. DA; SILVA, M. L. DA; WILBERG, V. C. Óleos essenciais da Amazônia VII. *Acta Amazonica*, v. 11, n. 1, p. 143-148, 1981.

GROPPE, K.; STEINGER, T.; SANDERS, I.; SCHMID, B.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T. Interaction between the endophytic fungus *Epichloë bromicola* and the grass *Bromus erectus*: effects of endophyte infection, fungal concentration and environment on grass growth and flowering. *Molecular Ecology*, v. 8, p. 1827-1835, jun/1999.

GUIMARÃES, A. C. *Estudo químico e biológico de Cladocolea micrantha, uma planta medicinal da região amazônica*. 2005. 330 f. Tese (Doutorado em Ciências/ Química de Produtos Naturais) – Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GUIMARÃES, A. C.; KUSTER, R. M.; NEVES JR., I.; LOURENÇO, M. C. S.; SARQUIS, M. I. Investigação preliminar da composição micelial e potencial antimicrobiano de fungos endofíticos da erva-de-passarinho amazônica *Cladocolea micrantha* (Eichler) Kuijt (Loranthaceae). *Revista Fitos*. v. 4, n. 2, dez/2009.

GUIMARÃES, D. O. *Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados a Viguiera arenaria (Asteraceae)*. 2006. 236 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

GUIMARÃES, E. F; MAUTONE, L; RIZZINI, C. T; MATTOS-FILHO, A. 1993. *Árvores do Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. 1a ed. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1996. 234p.

HUANG, C. H.; KUO, H. S.; LIU, J. W.; LIN, Y. L. Synthesis and antitumor evaluation of novel bis-triaziquone derivatives. *Molecules*. v.14, p. 2306-2316, jun/2009.

HOCK, R.; BENDA, I.; SCHREIER, P. Formation of terpenes by yeasts during alcoholic fermentation. *Z. Lebensm Unters Forsch*. v. 179, p. 450-452. 1984.

KALL, E. M. e COSTA, A. J. F. Desinfecção e esterilização. *Acta Ortopedia Brasileira*, v. 2, n. 4, p. 1-4, out/dez/1994.

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M.; GONO-BWALYA, A. B.; VAN ZIL, R.L.; VAN VUUREN, S. F.; LOURES, A. C. U.; BASER, K. H. C.; DEMIRCE, B.; LINDSEY, K. L.; STADEN, J.; STEENKAMP, P. The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation oh three South African *Salvia* species. *Journal of ethnopharmacology*, v. 102, p. 382-390, aug. 2005.

KUMAR, D. S. S.; LAU, C. S.; WAN, J.M.F.; YANG, D.; HYDE, K.D. Immunomodulatory compounds from *Pestalotiopsis leucothès*, an endophytic fungus from *Tripterygium wilfordii*. *Life Sciences*, v. 78, p.147-156, apr/2005.

LEMOS, J.L.S.; ARAÚJO, F.M.S. *Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo*. 2002. 8f. Contribuição técnica à X Jornada de Iniciação Científica do CETEM, Centro de Tecnologia Mineral, Rio de Janeiro.

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

LIMA, M.J.V.; CHAAR, J (Coords). *Avaliação silvicultural, da produtividade e Qualidade do óleo essencial de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) extraído de folhas e galhos de Plantios de diferentes idades no município de Maués/AM*. 2006. 13f. Relatório das atividades do projeto, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

LIU, X., DONG, M.; CHEN, X.; JIANG, M.; LV, X., YAN, G. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chemistry*, v. 105, p. 548-554, abr/2007.

LOGUERCIO-LEITE, C. Taxonomia dos fungos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, 2004. cap. 2, p. 47-88.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 2 ed. p. 337.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant science*, v. 151, p. 67-73, set/2000.

LUPE, F.A. *Estudos da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia*. 2007. 109 f. Dissertação (Mestrado em química na Área de Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MAIA, J.G.S.; ANDRADE, E.H.A; COUTO, H.A.R; SILVA, A.C.M.; MARX, F.; HENKE, C. Plant source of Amazon rosewood oil. *Química Nova*, v. 30, n. 8, p. 1906- 1910, dez. 2007.

MARQUES, C.A. Importância Econômica da Família Lauraceae Lindl. *Floresta e Ambiente*, v. 8, n.1, p. 195-206, jan./dez. 2001.

MARTINS, M. K. *Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp.e estudo da interação com a planta hospedeira*. 2005. 124 f. Tese (Doutorado em Agronomia, Área de concentração – Genética e melhoramentos de plantas) – Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MARTINS, E. R ; SANTOS, R. H. S. *Plantas medicinais: uma alternativa terapêutica de baixo custo*. Informe Técnico, UFV, v. 73, p. 1-26, 1995.

Mata PTG, Abegg MA. Descrição de caso de resistência a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*. *Arq. Mudi*. v. 11, n. 2, p. 20-25, set / 2007;

MENDHAM, J. *et al.* *Análise química quantitativa*. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos Científicos, 2002. Cap. 8, 9. p. 144-160.

MENEZES, J.C.; ALVES, T.P.; CARDOSO, J.P. Biotecnologia Microbiana: A produção de Penicilina. In: LIMA, N.; MOTA, M. *Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações*. DIFEL: 2000. cap. 12, 15 p.

MINAMI, P.S. *Micologia: métodos laboratoriais de diagnóstico de micoses*. Barueri: Manole, 2003. 199 p.

MORAES, A. A. DE; REZENDE; C. M. A DA M.; BÜLOW, M, v, vON; MOURÃO, J. C.; GOTTLIEB, O. R.; MARX, M. C.; ROCHA, A. I. DA; MAGALHÃES, M. T. Óleos essenciais de espécies do gênero Aniba. *Acta Amazonica*, v. 2, n. 1, p. 41-44, 1972.

MORO, F.; MAGALHÃES, E.; GALÚCIO, E.; MOYSÉS, K.; ANTUNES, V. C.; VINTAL, T. C. Efficacy of cyclosporine 0.05% for preventing endothelial loss in corneal transplant. *Rev. Bras Oftalmol*, v. 66, n. 5, p. 321- 326, out/2007.

NEGRAES, P. *Guia A-Z de plantas: Beleza*. São Paulo: Bei Comunicação, 2003. 278 p.
OHASHI, S.T. Brazilian rosewood oil: sustainable production and oil quality management. *Perfumer & Flavorist*, v. 22, p. 1-5. 1997.

OLIVEIRA, V.M; SETTE, L.D; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. *Construindo a história dos produtos naturais*. Campinas, v. 7, p. 1-18, set.2006.

PAIVA, D. L. *et al.* *Química Orgânica Experimental*. Porto Alegre: Bookman, 2009. 2 ed. Cap 6, p. 705 – 709.

PASTORE, G.L.; MACEDO, G. A. Utilização dos fungos na indústria de alimentos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, 2004. cap. 10, p. 311-334.

PATTANAGUL, P.; PINTHONG, R.; PHIANMONGKHOL; A.; THARATHA, S. Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus* sp. *International Journal of Food Microbiology*. v. 126, p. 20-23. Apr/2008.

PEIXOTO, S. C. *Estudo da estabilidade a campo dos pesticidas carbofurano e quincloraque em água de lavoura de arroz irrigado empregando SPE e HPLC-DAD*. 2007. 108f. Dissertação (Mestrado em química, Área de concentração em química analítica) – Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria – Rio Grande do Sul.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIREL,O. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural toxins*. v. 1, p.185-196, 1992.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, R.S. Produtos Naturais: Atualidades, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v. 25, sup. 1 especial, p. 45-51, jul. 2002.

PLETSCHI, M. Compostos naturais biologicamente ativos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v. 1, n. 4, p. 12-15, jan./fev. 1998.

PRADO-CABRERO, A.; SCHERZINGER, D.; AVALOS, J.; AL-BABILI S. Retinal biosynthesis in fungi: characterization of the carotenoid oxygenase carx from *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryotic Cell*, v. 6, n. 4, p.650–657, apr. 2007

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

QUINET, A. Sinopse taxonômica da família Lauraceae no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta botânica brasileira*, v. 19, n. 3, p. 563-572, jan/2005.

RIBEIRO, J. E. L. S. *et al.* Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme da Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999.p. 150-179.

SAMPAIO, P.T.B. 2000. Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). In: CLAY, J.W. *et al.* (Ed.). *Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização*. Manaus, INPA/SEBRAE. p. 290-297.

SAMPAIO, P.T.B. *Propagação vegetativa do pau-rosa (Aniba rosaeodora Ducke) pelo método da estaquia*. 1987. 112f. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

SAMPAIO, P.T.B.; FERRAZ, I.D.K.; CAMARGO, J.L.C. Pau-rosa *Aniba rosaeodora* Ducke Lauraceae. *Manual de sementes da Amazônia*. INPA. 2003, v. 3.

SANTOS, J. C. O.; SOBRINHO, E. V.; SOUZA, A. G.; SANTOS, I. M. G; CONCEIÇÃO, M. M. Estudo da degradação térmica de óleos lubrificantes automotivos por cromatografia gasosa / espectrometria de massa. *Anais 3º congresso brasileiro de P&D em petróleo e gás*. Salvador – BA, out/2005.

SILVA, J. M.; RAO, D. N. R.; O'BRIEN, P. J. Modulation of trenimon-induced cytotoxicity by DT-diaphorase in isolated rat hepatocytes under aerobic versus hypoxie conditions. *Cancer Research*, v. 52, p. 3015-3021, jun/1992.

SILVA, C.A.M. *Contribuição ao estudo químico e biológico de Pouteria guardnerii (Mart. & Miq.) Baehni (Sapotaceae)*. 2007. 197f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília.

SILVA, D.D; CHIERICE, G.O.; GALHIANE, M.S.; CHAAR, J.S.; MOUCHERK-FILHO, V.E. Quantificação do linalol no óleo essencial da *Aniba duckei* Korstermans utilizando uma nova coluna capilar polyh4-md em cromatografia gasosa. *Química Nova*, v. 26, n. 4, p. 461-465, mar/2003.

SILVA, G.H.; OLIVEIRA, D.F.; CAMPOS, V.P. Purificação de metabólitos fúngicos com efeitos tóxicos sobre *Meloidogyne incognita*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, p. 594-598, set/2002.

SILVÉRIO, M. B. *Análise econômica da biodiversidade na Amazônia brasileira*. 2004. 23f. Monografia (Bacharelado em Economia) – Departamento de Economia, Universidade de Brasília, Brasília.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.(orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004. cap. 16, p. 403-434.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.M; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta amazônica*, v. 34, n. 2, p. 185-195, abr/2004.

STASI, L. C. di; HIRUMA-LIMA, C. A. *Plantas Mediciniais na Amazônia e na Mata-Atlântica*. São Paulo: UNESP, 2002. 2 ed. cap. 5, p 107.

STROBEL, G. A. Endophytes as source of bioactive products. *Microbes and infection*, n. 5, p. 535-544.

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

STROBEL, G.A; DIRKSE, E.; SEARS, J; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, v. 147, p. 2943–2950. Jul/2001.

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

TERÃO, D.; OLIVEIRA, S.M.A.; VIANA, F.M.P.; ROSSETTI, A.G.; SOUZA, C.C.M. Integração de Fungicidas à refrigeração no controle de podridão pós-colheita em frutos de meloeiro. *Fitopatol. Bras*, v. 31, n. 1, p. 89-93, jan-fev/2006.

TUDZYNSKI, P; TUDZYNSKI, B. Fungal genetics: Novel techniques and regulatory circuits. In: ANKE, T. *Fungal Biotechnology*. London: Chapman and Hall, 1997. cap. 10, p. 229-243.

VEIGA JUNIOR, V. F.; ANDRADE JUNIOR, M. A.; FERRAZ, I. D. K.; CHRISTO, H. B.; PINTO, A. C. Constituintes da semente de *Copaifera officinalis* L. *Acta amazônica*. L, v. 37, n. 1, p. 123 – 126. jan/2007.

YU, F. Y.; LIAO, Y. C.; CHANG, C. H.; LIU; B. H. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. *Toxicology Letters*. v. 161; p. 143-151. Sep/2005.

WERFF, H. W.; RICHTER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 8, p. 419-432, 1996.

WERNER, C.; PETRINI, O. e HESS, M. Degradation of the polyamine alkaloid aphelandrine by endophytic fungi isolated from *Aphelandra tetragona*, v 155, p. 147-153.

ZHI-LIN, Y.; CHUAN-CHAO, D.; LIAN-QING, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 11, p. 1266-1271, jun/2007.

ZITO, R. K.; SEDIYAMA, C. S.; SEDIYAMA, T.; GOMES, J. L. L. e ROCHA, V. S. Hipoclorito de sódio e álcool na esterilização superficial de sementes de soja. *Revista Ceres*, v. 42, n. 244, p. 637-643, mai/1995.