



UFRJ

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Campus Macaé Professor Aloísio Teixeira
Curso de Farmácia



ELICIAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DA *Humiria balsamifera* PARA A
BUSCA DE NOVAS SUBSTÂNCIAS

BRUNO RODRIGUES PESSANHA

Macaé

Julho de 2016

BRUNO RODRIGUES PESSANHA

Título: Eliciação dos fungos endofíticos da *Humiria
balsamifera* para a busca de novas substâncias

Monografia Apresentada ao Curso de
Farmácia da Universidade Federal do Rio de
Janeiro – Campus Macaé como um dos
requisitos para obtenção do título de
Farmacêutico

Orientadora: Denise Oliveira Guimarães

Co-orientador: Willian Jonis Andrioli

Macaé

Julho de 2016.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por cuidar da minha vida e me sustentar até aqui durante todos esses anos. Sem Ele, nada disso seria possível.

Agradeço a minha família por sempre estar comigo e me apoiando. A minha mãe, fiel amiga, sempre presente e me aconselhando. Ao meu irmão, por me fazer olhar para o futuro e perder o medo do incerto. A minha cunhada Eugênia, onde muitas vezes me inspirou a seguir o caminho da Farmácia, sendo um grande exemplo de profissional. Ao meu pai, por me fazer forte com as cobranças e me incentivar a ser persistente na vida.

À minha orientadora Denise, que me aceitou no projeto e sempre me instruiu da melhor maneira, exigindo o meu melhor e acreditando no meu potencial.

Aos meus amigos da faculdade, minha querida turma. Sem vocês, seria difícil aguentar tanta coisa por tanto tempo.

Ao técnico Marcos por estar me auxiliando diversas vezes no laboratório até tarde, dando conselhos e me ensinando diversas técnicas no laboratório.

Aos amigos do LPBio e a todos os professores amigos que me orientaram em algum momento do projeto, compartilhando suas experiências e me incentivando nos momentos difíceis.

À Sabrina, por ter me dado conselhos e palavras de encorajamento nos dias difíceis, por sempre estar presente para me ajudar, pelo carinho e amizade.

Por fim, agradeço aos meus amigos Adriano Sano e Danilo Barreto por estarem sempre comigo, nos dias bons e ruins, pelo aprendizado, amizade e pelo convívio.

À FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: <i>Papaver somniferum</i> e a estrutura da morfina_____	11
Figura 02: Estrutura química do ácido salicílico e ácido acetilsalicílico_____	14
Figura 03: Estrutura química da epinefrina, benzocaína e barbital_____	14
Figura 04: Estrutura química dos antibióticos penicilina F, mevinolina e cefalosporina C_____	16
Figura 05: Estrutura química do taxol, podofilotoxina e vincristina_____	29
Figura 06: Lagoas localizadas no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba_____	21
Figura 07: Lagoa de Jurubatiba e um sabiá-da-praia num cacto_____	22
Figura 08: Partes aéreas da <i>Humiria balsamifera</i> _____	23
Figura 09: Interação de um eliciador com um micro-organismo_____	25
Figura 10: Interações entre micro-organismos durante uma co-cultura_____	26
Figura 11: Fungos HB18a e HB19a_____	33
Figura 12: Fluxograma do preparo e inoculação em meio BDA_____	34
Figura 13: Fluxograma do preparo e inoculação em meio pré-fermentativo_____	35
Figura 14: Fluxograma do preparo e inoculação em meio fermentativo Czapek_____	35
Figura 15: Organização dos tubos Falcon no <i>shaker</i> após inoculação em meio pré-fermentativo_____	37
Figura 16: Erlenmeyers contendo o fungo HB18a após o cultivo em T18 do fungo sozinho, com DMSO e com EBF e DMSO_____	37
Figura 17: Cromatograma do extrato de AcOEt do controle EBF+DMSO durante a padronização de 0,3%_____	41
Figura 18: Cromatograma do extrato de AcOEt do controle EBF+DMSO no tempo de incubação T0_____	42
Figura 19: Cromatograma do extrato de AcOEt do controle EBF+DMSO no tempo de incubação T18_____	42

- Figura 20:** Cromatograma do extrato de AcOEt do controle Czapek no tempo de incubação T0_____43
- Figura 21:** Cromatogramas sobrepostos dos extratos de AcOEt do fungo HB19a, presença de EBF 0,3% e DMSO 2%, no tempo de incubação T0_____45
- Figura 22:** Cromatogramas sobrepostos dos extratos de AcOEt do fungo HB19a, na presença de EBF 0,3% e DMSO 2%, nos tempos de incubação T6 e T12_____46
- Figura 23:** Cromatogramas sobrepostos dos extratos de AcOEt do fungo HB19a, na presença de EBF 0,3% e DMSO 2%, nos tempos de incubação T12 e T18_____47
- Figura 24:** Cromatogramas sobrepostos dos extratos de AcOEt do fungo HB18a, presença de EBF 0,3% e DMSO 2%, no tempo de incubação T0_____51
- Figura 25:** Cromatogramas sobrepostos dos extratos de AcOEt do fungo HB18a, na presença de EBF 0,3% e DMSO 2%, nos tempos de incubação T6 e T12_____52
- Figura 26:** Cromatogramas sobrepostos dos extratos de AcOEt do fungo HB18a, na presença de EBF 0,3% e DMSO 2%, nos tempos de incubação T12 e T18_____53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01:** Elicidores químicos utilizados em cultivos de micro-organismos_____28
- Tabela 02:** Condições analíticas utilizadas no CLAE durante análise_____39
- Tabela 03:** Tempos de retenção do controle em T0 (1) e em T18 (2) e suas respectivas áreas_____43
- Tabela 04:** Tempos de retenção dos picos majoritários (duplicata) durante o cultivo do fungo HB19a enriquecido com EBF 0,3% + DMSO 2% e suas respectivas áreas_____48
- Tabela 05:** Tempos de retenção dos picos majoritários (duplicata) durante o cultivo do fungo HB18a enriquecido com EBF 0,3% + DMSO 2% e suas respectivas áreas____54
- Tabela 06:** Resultados das massas no final do cultivo (T18) das duplicatas do fungo HB18a sozinho e do fungo cultivado na presença do EBF_____55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS – Ácido acetilsalicílico

AcOEt – Acetato de etila

BDA – Batata dextrose ágar

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos

DMSO – Dimetil sulfóxido

DMSO₂ – Dimetil sulfona

EBF – Extrato bruto etanólico da folha de *Humiria balsamifera*

PNRJ – Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba

T0 – Tempo de incubação de 0 dias

T6 – Tempo de incubação de 6 dias

T12 – Tempo de incubação de 12 dias

T15 – Tempo de incubação de 15 dias

T18 – Tempo de incubação de 18 dias

T_R – Tempo de retenção

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Breve histórico de produtos naturais	11
1.2. Plantas e desenvolvimento de fármacos	12
1.3. Micro-organismos e o desenvolvimento de fármacos	15
1.4. Fungos Endofíticos	16
1.5. A Restinga de Jurubatiba	20
1.6. Novas estratégias na descoberta de substâncias bioativas	23
1.6.1. Eliciação molecular	24
1.6.2. Eliciação biológica.....	26
1.6.3. Eliciação química.....	27
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. OBJETIVOS GERAIS	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. MATERIAL	31
4.1.1. Equipamentos	31
4.1.2. Solventes e reagentes	32
4.1.3. Meios de Cultivo	32
4.2. METODOLOGIA	33
4.2.1. Escolha dos Fungos Endofíticos	33
4.2.2. Cultivo em meio sólido BDA	33
4.2.3. Inoculação no Meio Pré-fermentativo	34
4.2.4. Preparo do meio fermentativo Czapek.....	36
4.2.5. Inoculação no Meio Fermentativo Czapek.....	36
4.2.6. Coleta das alíquotas	37
4.2.7. Partição líquido-líquido	38
4.2.10. Padronização das condições analíticas para análise via CLAE-DAD	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Controles EBF+DMSO e Czapek em T0 e T18	40
5.2. Fungo HB19a	44
5.3. Fungo HB18a	50
6. CONCLUSÃO	57
7. REFERÊNCIAS	57

ANEXO I.....	61
ANEXO II.....	67

Resumo

Os produtos naturais são fontes de diversas substâncias bioativas e apresentam elevada contribuição na descoberta de fármacos com diversas atividades, como agentes anti-infecciosos e anticâncer. Uma fonte natural promissora de substâncias bioativas são os micro-organismos, e, neste contexto, podemos citar os fungos endofíticos. Micro-organismos endofíticos são aqueles detectados em um momento particular associados ao tecido da planta hospedeira saudável e vem sendo amplamente utilizados na busca de substâncias com potencial farmacêutico. O objetivo deste estudo visa determinar o perfil químico, via CLAE-DAD, do extrato obtido pelo cultivo dos fungos endofíticos HB18a e HB19a cultivados na presença do extrato vegetal de sua planta hospedeira (EBF – extrato bruto etanólico obtido das folhas) e em dimetil sulfóxido (DMSO), na tentativa de obtenção da produção diferenciada de metabólitos secundários em comparação com o cultivo destes fungos sem a presença do extrato vegetal e de dimetil sulfóxido. O cultivo dos fungos foi feito em meio BDA por 7 dias, à 30 °C, seguido de duas etapas de cultivo: pré-fermentativo (5 dias, 120 rpm, 30 °C) e meio fermentativo Czapek (18 dias, 120 rpm, 30 °C). Foram realizados os seguintes experimentos: cultivo do fungo com EBF, previamente solubilizado em DMSO, do fungo sem a presença do EBF, do fungo com DMSO e sem o EBF, do meio Czapek com EBF e DMSO. Todos experimentos foram feitos em duplicata. Foram coletadas alíquotas de 5 mL dos fluídos das culturas nos seguintes tempos de incubação: 0, 6, 12, 15 e 18 dias. Posteriormente, foram feitas partições líquido-líquido utilizando-se acetato de etila (AcOEt). Os extratos em AcOEt foram concentrados, ressolubilizados em metanol/água Milli-Q 1:1, e, 50 µL foram analisados por CLAE-DAD nas seguintes condições: coluna C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm Phenomenex) com gradiente constituído por água Milli-Q (A) e metanol (B) da seguinte maneira: 0,01-10 min (5%B); 10-15 min (15%B); 15-35 min (50%B); 35-55 min (75%B); 55-67 min (100%B); 67-75 min (5%B), vazão de 1 mL/min, e, temperatura de 30 °C. Com relação aos experimentos com o fungo HB19a não foi observado um consumo significativo dos constituintes originalmente presentes no EBF e nem a produção de substância majoritária adicional. Com relação aos experimentos com o fungo HB18a foi observado um consumo dos constituintes minoritários do EBF ($T_R = 20,5$ min., $23,9$ min., $24,7$ min. e $25,3$ min) permanecendo até o dia 15 de cultivo os seguintes picos majoritários do EBF: $T_R = 19,5$ min., $22,7$ min. e $23,2$ min, sendo que os dois últimos picos foram consumidos ao final de 18 dias de cultivo, permanecendo apenas o pico em $T_R = 19,5$ min. Foi observado também um aumento intenso da massa micelial (até 10 vezes) do fungo HB18a durante o cultivo com EBF, em relação ao cultivo do fungo isolado, indicando que o EBF atua principalmente como fonte de carbono para o crescimento do fungo. Durante o cultivo do fungo HB19a em DMSO 2% foram observados novos picos em relação ao cultivo do mesmo sem DMSO. O mesmo não foi observado durante o cultivo do fungo HB18a. Assim, foi sugerido que o EBF não atua com função eliciadora para a produção de metabólitos secundários diferenciados quando comparados os cultivos simples dos fungos HB18a e HB19a. Já o DMSO atua como eliciador durante o cultivo do fungo HB19a, nos tempos de cultivo analisados.

Palavras-chave: Biotecnologia, CLAE-DAD, fermentação, fungos, Humiriaceae, metabólitos secundários.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Breve histórico de produtos naturais

A humanidade utiliza os produtos naturais desde os tempos remotos, com intuito de aliviar e curar doenças. O uso de plantas é uma das formas mais antigas com esse objetivo. Várias civilizações utilizavam os recursos naturais na medicina e podemos destacar algumas como Greco-romana, Egípcia e Chinesa. Várias preparações feitas por essas civilizações a milhares de anos atrás são estudadas até hoje na busca do isolamento de substâncias bioativas e por seu mecanismo de ação (VIEGAS et al., 2006). Um dos relatos mais antigos sobre descrições de plantas medicinais feitas pelo homem é o papiro de Ebers. Este papiro, que foi descoberto e também publicado por Georg Ebers, foi encontrado próximo da casa mortuária de Ramsés II. Nele, estão contidas cerca de 100 doenças e um grande número de drogas vegetais e animais (PINTO et al., 2002).

O período anterior a era cristã teve grandes filósofos que apresentavam obras relacionados a história natural. Um exemplo foi Hipócrates que tomava a natureza como um guia na escolha de remédios (*Natura medicatrix*). Outro exemplo foi Teocrasto, sendo responsável por escrever vários livros contendo história das plantas. Dentre alguns registros, está a utilização da *Papaver somniferum*, espécie vegetal que possui como princípio ativo a morfina, um potente analgésico (PINTO et al., 2002).

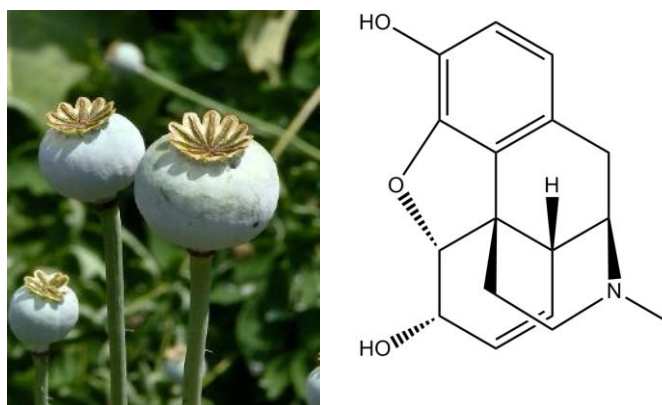


Figura 01: *Papaver somniferum* (a esquerda) e o seu princípio ativo morfina (a direita). Fonte: <http://newfs.s3.amazonaws.com/taxon-images-1000s1000/Papaveraceae/papaver-somniferum-fr-pdrobot-b.jpg>

Os árabes contribuíram de diversas formas com a medicina, como o emprego de purgativos vegetais. Um destaque é o médico islâmico Avicena, botânico que criou um tratado de medicamentos cardíacos, no século X. Uma de suas obras mais conhecidas foi “Canon”, sendo por muito tempo um dos textos médicos mais populares da Europa (PINTO et al., 2002).

Os povos primitivos e os indígenas foram de grande importância no descobrimento de substâncias tóxicas e alguns medicamentos. Um exemplo eram os curares (substâncias obtidas das espécies *Strychnos* e *Chondodendron*) utilizados nas pontas das flechas como veneno para caça. Os povos antigos também utilizavam de outro tipo de substâncias, as alucinógenas. Bebidas alucinógenas eram utilizadas em vários rituais mágicos e práticas religiosas como um meio de comunicação com suas divindades (VIEGAS et al., 2006). Diversas culturas americanas, como Asteca e Maya utilizavam algumas drogas vegetais como a quina, coca, ipecacuanha entre outras (PINTO et al., 2002).

No século XVIII iniciaram estudos de isolamento de substâncias puras de vegetais. Vários trabalhos de extração foram caracterizados, principalmente envolvendo alcaloides. Nesta época algumas substâncias importantes foram isoladas e também sintetizadas como a estriquinina, reserpina e quinina pelo químico Woodward em 1958 (PINTO et al., 2002).

1.2. Plantas e desenvolvimento de fármacos

O reino vegetal possui uma vasta contribuição no fornecimento de metabólitos secundários, onde em sua maioria possuem alto valor por serem aplicados na terapêutica como medicamentos (CHAPLA et al., 2013). Essa descoberta movimentou diversas indústrias na busca por substâncias bioativas, especialmente nos anos 90 (PINTO et al., 2002). O Brasil apresenta uma grande e complexa biodiversidade, contudo a maioria das espécies continuam inexploradas. A maioria das pesquisas são direcionadas com espécies vegetais e isolamento de substâncias dos mesmos. Além disso, há uma menor interdisciplinaridade entre os conhecimentos científicos e populares, dificultando os estudos relacionados a essa área (PUPO e GALO, 2007).

As plantas apresentam dois tipos de metabolismo, o primário e o secundário. O metabolismo primário está ligado com o crescimento e funcionamento do vegetal, sendo responsável por sintetizar proteínas, lipídios, ácidos nucleicos entre outras substâncias fundamentais a sobrevivência da planta. Já o metabolismo secundário está ligado com a síntese de substâncias (metabólitos secundários) que não são essenciais a sobrevivência da planta, porém são utilizados como defesa contra outras plantas, animais e micro-organismos. Estas substâncias variam de planta para planta e são produzidas a estímulos diferentes do meio-ambiente, como temperatura, solo e predadores. Também estão presentes em níveis diferentes em cada estágio de desenvolvimento da planta (LEMOS, 2006). Assim como as plantas, micro-organismos também possuem um metabolismo primário, relacionado ao funcionamento e crescimento; e secundário, relacionado com a produção de substâncias específicas que não estão relacionadas com crescimento do micro-organismo como antibióticos (LEMOS, 2006; VIEGAS et al., 2006; BORGES, 2008; CAMPOS, 2009; SILVA, 2009; SANTOS e VARAVALLO, 2011; TURIBIO, 2011; CHAPLA et al., 2013; CHAGAS, 2014).

Nos primeiros estudos com plantas medicinais, os químicos se limitavam a isolar e determinar estruturalmente as substâncias ativas (metabólitos secundários). Neste contexto, diversas substâncias ativas foram caracterizadas e incorporadas na terapêutica como medicamentos até hoje. Um importante exemplo desses estudos foi o descobrimento da salicilina, obtida da *Salix alba* (CHAPLA et al., 2013). Felix Hofmann pesquisando uma cura alternativa para doença de seu pai descobriu o ácido acetil-salicílico, o qual era menos ácido que o ácido salicílico, porém mantinha as propriedades analgésicas. O AAS então passou a ser um produto lançado no mercado pela Bayer para competir com os outros salicilatos naturais pelo nome de Aspirina® em 1897 (VIEGAS et al., 2006).

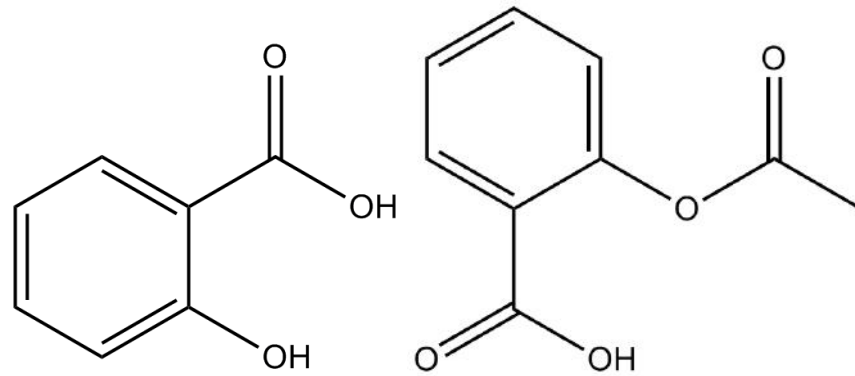


Figura 02: Estruturas do ácido salicílico (esquerda) e ácido acetil-salicílico (direita).

Após o descobrimento do AAS, vários fármacos foram isolados e sintetizados como a epinefrina (descongestionante nasal e broncodilatador), procaína e benzocaína (anestésicos locais sintetizados a partir da cocaína), barbital (agente hipnótico) entre outros. Já o período após II Guerra Mundial foi marcado pelo desenvolvimento de outros fármacos sintéticos como os ansiolíticos benzodiazepínicos, anti-histamínicos e antipsicóticos. Outro importante fármaco sintético desenvolvido neste período foi a indometacina, um fármaco anti-inflamatório não esteroide de natureza indólica (VIEGAS et al., 2006).

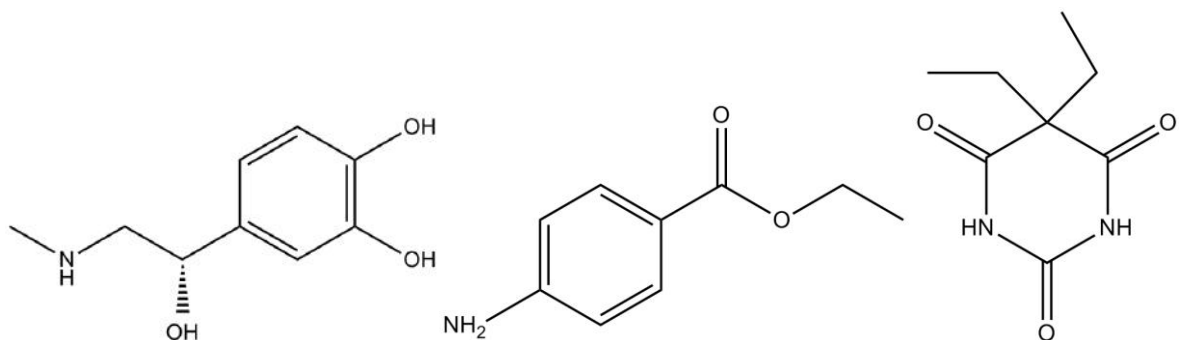


Figura 03: Estruturas da epinefrina (a esquerda), benzocaína (centro) e barbital (a direita).

Com o avanço da química, a síntese de fármacos a partir de produtos naturais começou a tomar outras proporções, onde passaram a ser utilizados modelos de química combinatória para, a partir de uma estrutura mãe, sintetizar outras substâncias com atividade. Isso pode ocorrer por diversas formas, como simplificação molecular, mudanças da lipossolubilidade/hidrossolubilidade, mudanças na rigidez da

estrutura, entre outras. Estes conceitos utilizados atualmente mudaram radicalmente a pesquisa de novos fármacos provenientes dos produtos naturais (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

1.3. Micro-organismos e o desenvolvimento de fármacos

Os micro-organismos possuem alta capacidade de produzir diversas substâncias bioativas e por isso, o seu estudo no descobrimento de substâncias bioativas vem sendo incorporado cada vez mais (LEMOS, 2006; VIEGAS et al., 2006; BORGES, 2008; CAMPOS, 2009; SILVA, 2009; SANTOS e VARAVALLO, 2011; TURIBIO, 2011; CHAPLA et al., 2013; CHAGAS, 2014).

Diversos fármacos importantes foram obtidos por meio de fungos. A descoberta da penicilina por Fleming em 1928, que foi isolada do fungo (*Penicillium notatum*) mudou a forma de como os fungos eram vistos. Estes passaram a ser uma fonte de produtos naturais e a partir daí, houve um avanço nas áreas de antibióticos, antineoplásicos entre outros. Como exemplos conhecidos de fármacos provenientes de fungos podemos destacar os antibióticos da classe das cefalosporinas e penicilinas, imunossupressores como ciclosporina entre outros (CHAPLA et al., 2013). Outro exemplo importante é a mevinolina, um agente redutor do colesterol. Os fungos também se destacam por produzir agroquímicos naturais, como as fitotoxinas (herbicidas), destruxinas (inseticidas) e estrobilurinas (fungicidas) (PINTO et al., 2002; SANTOS e VARAVALLO 2011; TURIBIO, 2011).

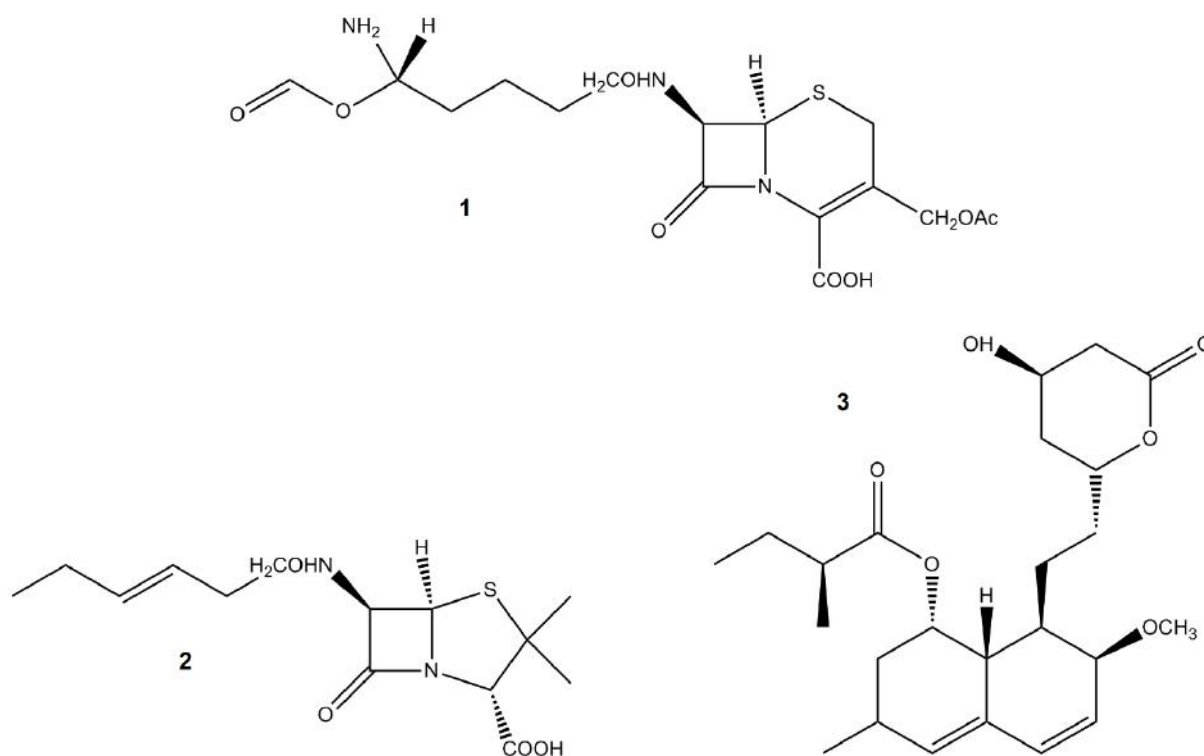


Figura 04: Estruturas da cefalosporina C (1), penicilina F (2) e mevinolina (3).

O estudo com micro-organismos associados, também conhecidos como endofíticos, tem sido um assunto recorrente de pesquisa na busca de substâncias bioativas. Os fungos e bactérias endofíticos vivem numa associação íntima com uma planta hospedeira e podem ser capazes de produzir as mesmas substâncias bioativas presentes em suas plantas hospedeiras (PINTO et al., 2002; LEMOS, 2006; VIEGAS et al., 2006; BORGES, 2008; CAMPOS, 2009; SILVA, 2009; SANTOS e VARAVALLO, 2011; TURIBIO, 2011; CHAPLA et al., 2013; CHAGAS, 2014).

1.4. Fungos Endofíticos

Plantas podem abrigar diversos micro-organismos, servindo como reservatórios para os mesmos. Alguns destes micro-organismos vivem em associação mutualística com essas plantas, ou seja, cada um é beneficiado de alguma maneira (LEMOS, 2006; VIEGAS et al., 2006; BORGES, 2008; CAMPOS, 2009; SILVA, 2009; SANTOS e VARAVALLO, 2011; TURIBIO, 2011; CHAPLA et al., 2013; CHAGAS, 2014). Alguns destes micro-organismos são os fungos, seres eucarióticos, produtores

de esporos, que podem ser unicelulares (leveduras) ou multicelulares (fungos filamentosos) (BORGES, 2008).

São considerados micro-organismos endofíticos (*endo*=dentro e *fítico*=planta) tanto fungos quanto bactérias, que vivem no interior de plantas. De modo geral, estes micro-organismos podem estar presentes em qualquer parte do vegetal e não causam danos aos seus hospedeiros. Os micro-organismos epifíticos (*epi*=superfície e *fítico*=planta) são aqueles que vivem na superfície dos tecidos vegetais e órgãos (AZEVEDO, 1999; LEMOS, 2006; VIEGAS et al., 2006; BORGES, 2008; CAMPOS, 2009; SILVA, 2009; SANTOS e VARAVALLO, 2011; TURIBIO, 2011; CHAPLA et al., 2013; CHAGAS, 2014).

Os endofíticos foram mencionados no século XIX, contudo foi em 1866 que Bary delineou uma distinção dos mesmos com os patógenos de plantas. Foram definidos primeiramente como assintomáticos, não gerando nenhum tipo de efeito (benéfico ou maléfico) aos seus hospedeiros. Deste modo, foram esquecidos e somente no final dos anos 70 voltaram a chamar a atenção (AZEVEDO, 1999).

Verificou-se que estes micro-organismos apresentavam propriedades interessantes como proteção inseticida e antibiótica. Essas propriedades fazem com que a planta se torne mais vigorosa e mais resistente a doenças. Foi visto também que herbívoros que fazem ingestão de plantas contaminadas com endofíticos acabam sofrendo diversos danos, podendo chegar a morte. Os micro-organismos endofíticos podem produzir diversas substâncias tóxicas, antibióticos e outros fármacos, produtos de interesse biotecnológico, assim como funções importantes para sobrevivência dos seus hospedeiros (AZEVEDO, 1999; LEMOS, 2006; VIEGAS et al., 2006; BORGES, 2008; CAMPOS, 2009; SILVA, 2009; SANTOS e VARAVALLO, 2011; TURIBIO, 2011; CHAPLA et al., 2013; CHAGAS, 2014). Essa diversidade e complexidade de substâncias que podem ser produzidas por esses fungos endofíticos deve-se também à sua alta capacidade de adaptação em diversos lugares distintos, como desertos, áreas com pouco umidade, entre outras (SILVA, 2009). Assim, o estudo desses micro-organismos torna-se altamente interessante e importante na busca de substâncias que possam vir a se tornar fármacos e posteriormente, medicamentos.

Geralmente, os endofíticos conseguem penetrar as plantas por aberturas naturais e algumas feridas, sendo as raízes uma das portas de entrada mais utilizadas.

Outras entradas são aberturas que podem ser causadas por insetos e até mesmo por fungos patogênicos (AZEVEDO, 1999).

Para o isolamento destes micro-organismos, alguns cuidados especiais devem ser feitos para se evitar que outros micro-organismos que vivem na superfície do hospedeiro sejam excluídos. O processo mais comum de isolamento destes micro-organismos é a lavagem de folhas, caules ou outros órgãos vegetais em etanol 70%, seguido de tratamento com hipoclorito de sódio 3% e por fim, etanol ou água esterilizada (SOUZA, 2004; PIMENTEL et al., 2006). Tanto a concentração do hipoclorito como os tempos de tratamento podem variar de acordo com a textura da amostra utilizada. A próxima etapa do isolamento consiste na transferência de fragmentos ou suspensões de células para meios apropriados. São utilizados meios sólidos em placas de Petri como Batata-Dextrose-Ágar e Sabouraud, adicionados de antibióticos para impedir o crescimento de bactérias. O material contendo os micro-organismos endofíticos é então incubado. A temperatura e tempo de incubação variam com o tipo de micro-organismo e finalidade do estudo. Por fim, é necessário purificar os micro-organismos isolados e posteriormente estocar de maneira apropriada (AZEVEDO, 1999).

Algumas substâncias de origem vegetal também são produzidas por fungos que habitam esses vegetais. Como exemplo, podemos citar o taxol, um metabólito secundário produzido pela planta *Taxus brevifolia* sendo utilizado no tratamento do câncer de útero e mama. Esta mesma substância também é produzida pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, que habita o interior da *T. brevifolia* (AZEVEDO, 1999). Outros exemplos são a vincristina (anticancerígeno isolada da planta *Catharanthus roseus*) também produzida pelo fungo endofítico *Fusarium oxysporum* presente na mesma planta e a podofilotoxina (anticancerígeno encontrado em espécies vegetais do gênero *Podophylum*) também produzida pelos fungos endofíticos *Trametes hirsuta* e *Phialocephala fortinii* (CHAPLA et al., 2013).

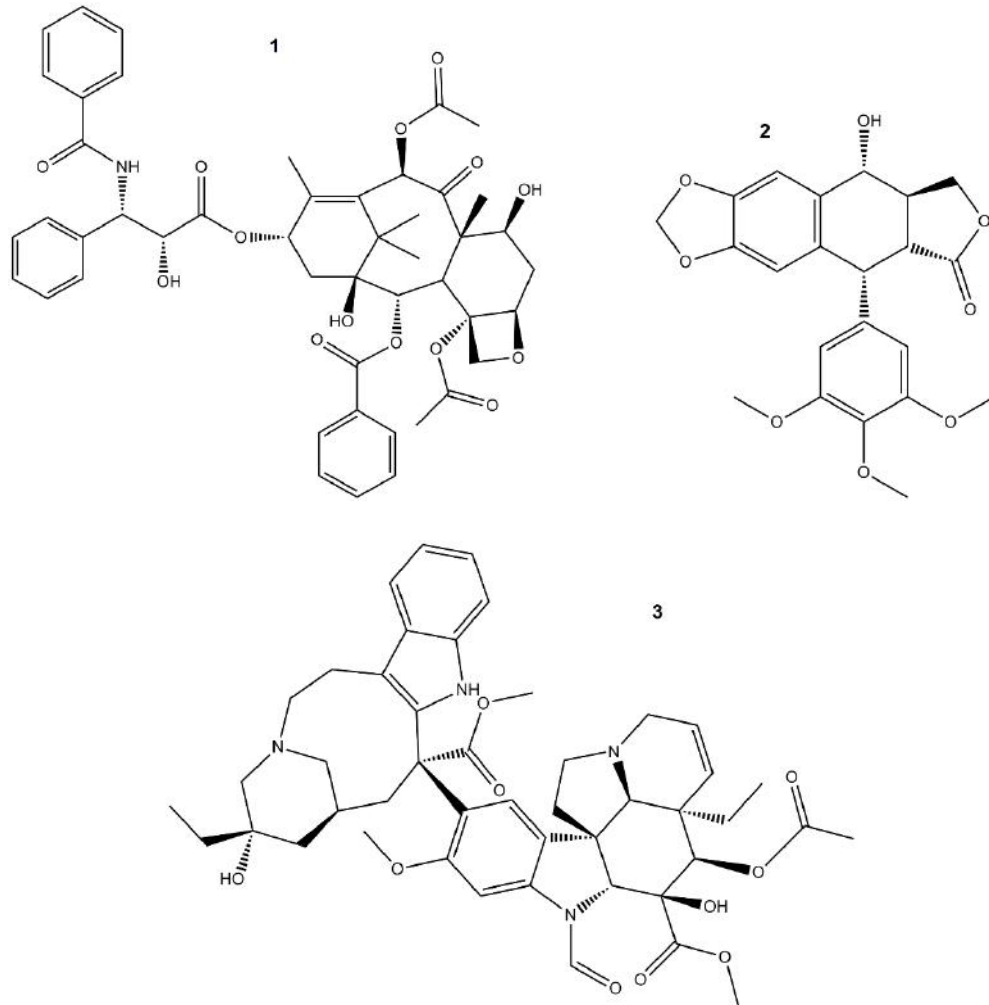


Figura 05: Estruturas do taxol (1), podofilotoxina (2) e vincristina (3).

Assim, conhecer o micro-organismo capaz de produzir as mesmas substâncias que sua planta hospedeira torna-se muito importante, visto que a cultura destes micro-organismos é mais fácil comparado com as plantas e muita das vezes, mais econômico (CAMPOS, 2009). Entretanto, existe um grande distanciamento quando comparamos o cultivo do fungo *in vitro* com o cultivo do fungo na planta *in vivo*. Assim, é necessário estudar as condições na qual o fungo vive associado aquela planta, como temperatura, umidade, substâncias provenientes da planta entre outros. Este trabalho tentou mimetizar um aspecto da situação em que o fungo endofítico vive: uso como constituinte do meio de cultura substâncias presentes no extrato bruto etanólico provenientes de sua planta hospedeira, *H. balsamifera*.

Para a agricultura, esses micro-organismos também apresentam algumas vantagens. Alguns endofíticos são capazes de aumentar a tolerância de plantas à

seca. Outros promovem a fixação não simbiótica do nitrogênio atmosférico (AZEVEDO, 1999). Outro importante fator que pode ser ressaltado é que na agricultura são utilizados diversos agrotóxicos, no qual causam danos não só para as plantas como para os agricultores. O emprego de bactérias e fungos endofíticos com intuito de biocontrole e promoção de crescimento dos vegetais auxilia na produção agrícola sustentável, diminuindo efeitos tóxicos causados ao ambiente e ao ser humano, culminando em alimentos mais saudáveis (SANTOS e VARAVALLO, 2011; TURIBIO, 2011).

1.5. A Restinga de Jurubatiba

O Brasil possui uma imensa e complexa biodiversidade, sendo rico em vários tipos de espécies vegetais desconhecidas e singulares. No entanto, diversas regiões vêm sendo atingidas por práticas humanas, sendo destruídas. Deste modo, a criação de áreas protegidas de forma integral vem sendo de grande importância ecológica. Os Parques Nacionais fazem parte deste grupo de áreas protegidas e vêm sendo implementado em todo o mundo (VAINER, 2010).

O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ) foi criado em 1998 com intuito de proteger uma região com uma grande biodiversidade de fauna e flora. Fica localizado na porção nordeste do Estado do Rio de Janeiro, ficando a 200 km da capital. Possui uma área litorânea de 14.860 hectares, abrangendo os municípios de Macaé (1%), Quissamã (65%) e Carapebus (34%), com uma faixa de areia de 44 km e 17 lagoas (**Fig. 06**), contemplando uma área total de 148,6 km² numa planície arenosa quaternária (VAINER, 2010). Seu clima predominante é o mesotérmico, apresenta uma nebulosidade elevada e amplitude térmica grande (MONTEZUNA e ARAUJO, 2007). Vem sofrendo grandes mudanças devido principalmente a indústria de exploração petrolífera.

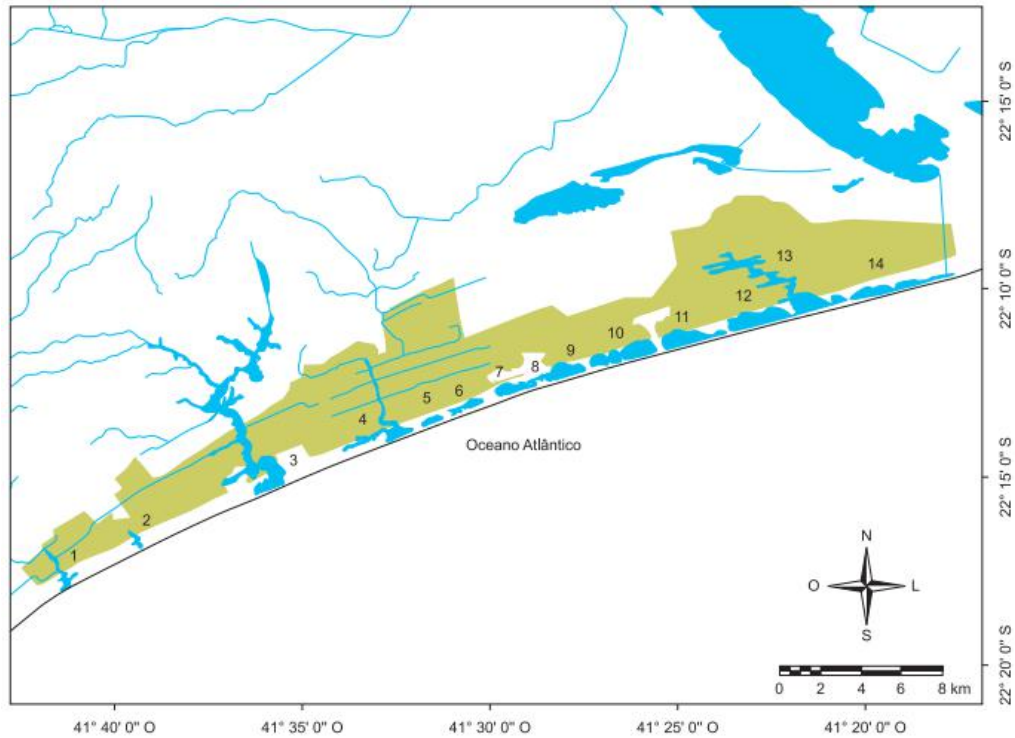


Figura 06: Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. Os números correspondem a localização das lagoas que são: Cabiúnas (1), Comprida (2), Carapebus (3), Paulista (4), Amarra-boi (5), Garças (6), Piripiri II (7), Piripiri I (8), Maria-menina (9), Robalo (10), Visgueiro (11), Pires (12), Preta (13) e Ubatuba (14). Obtido de LUZ, J.L. et al., (2011).

A flora é composta por mosaicos complexos, sendo distribuída de acordo com fatores como vento, solo, água entre outros (**Fig. 07**). Algumas vegetações encontradas são herbáceo-arbustiva (bromélias, cactos), moitas (abaneiro, almecega), mata de restinga (palmeiras, ipê-tamanco) entre outras. Já a fauna é composta principalmente por espécies de hábitos noturnos e de dia são observados animais como lagartos, corujas, sabiás, gaviões entre outros (**Fig. 07**). Assim como a flora, as espécies de animais variam de acordo com alguns fatores, como a proximidade do mar e condições do solo (SANTANA, 2005).



Figura 07: Lagoa de Jurubatiba (a esquerda) localizada entre Macaé e Carapebus e um Sabiá-da-praia se equilibrando em cima de um cacto (a direita). Fonte: <http://www.icmbio.gov.br/parnajurubatiba/>

A região vegetal localizada a 1,5 km da Lagoa Comprida e 2,5 km da Lagoa de Cabiúnas é caracterizada por apresentar uma vegetação de moitas com formatos irregulares, separadas entre si por vegetação herbácea. A cobertura do solo geralmente é feita por bromélias (*Vriesea neoglutinosa*) e já nas áreas mais abertas a cobertura é formada por gramíneas e ciperáceas. Nas áreas que ficam inundadas por chuvas fortes, observa-se a presença de *Protium icicariba*, *Clusia hilariana* e *Humiria balsamifera*. Já nas regiões onde o lençol freático é menos profundo, a vegetação é composta por *Bonnetia stricta* (MONTEZUNA e ARAUJO, 2007). Os fungos utilizados neste trabalho foram isolados da espécie *H. balsamifera* pertencente à família Humiriaceae.

A família Humiriaceae é constituída por oito gêneros que são *Duckesia*, *Endopleura*, *Hylocarpa*, *Humiria*, *Humirastrum*, *Sacoglottis*, *Shistostemon* e *Vantanea* e cerca de 50 espécies de plantas. A distribuição das espécies ocorre em regiões neotropicais: México, África tropical, América do Sul tropical e Centroamérica (BORGES, 2010).

O gênero *Humiria* é composto por cerca de 39 espécies, tendo uma distribuição mundial. Estas espécies são duráveis e possuem uma madeira altamente resistente. Também são relatadas como um grande potencial melífero, fornecendo uma grande quantidade de alimentação às abelhas, durante o ano todo (MIRANDA e ROCHA, 2009).

A *Humiria balsamifera* (Aubl) A. St. Hil. tem sido recomendada amplamente para uso de pasto apícola (promove aroma, sabor e coloração ao mel produzidos nas suas floradas). Seus frutos podem ser utilizados para consumo da fauna local (MIRANDA e ROCHA, 2009).



Figura 08: Partes aéreas da espécie vegetal *Humiria balsamifera*. Fonte: Laboratório de Produtos Bioativos – UFRJ – Macaé.

1.6. Novas estratégias na descoberta de substâncias bioativas

Alguns métodos vêm sendo utilizados com objetivo de descobrir rotas metabólicas de micro-organismos silenciadas e/ou novas, permitindo a descoberta de novas substâncias bioativas (BORGES 2008; CAMPOS 2009; SILVA, 2009).

Estes métodos estão relacionados com a forma de cultivos destes micro-organismos com substâncias específicas (CHAGAS, 2014). Estas substâncias específicas utilizadas como sinais extracelulares capazes de induzir uma resposta singular no metabolismo do micro-organismo são chamadas de eliciadores. O processo de eliciação pode ser químico (uso de substâncias químicas como solventes, metais pesados), biológico (co-cultura, uso de fragmentos de micro-organismos mortos na cultura de outro micro-organismo) e molecular (estudos genéticos do metabolismo secundário de micro-organismos) (ABDELMOHSEN et al., 2015).

1.6.1. Eliciação molecular

Atualmente, tem-se estudado a identificação dos genes que estão envolvidos com a regulação e biossíntese de metabólitos secundários em fungos. Frequentemente, os genes envolvidos na regulação dos metabólitos secundários estão localizados em *clusters* no cromossomo. Existe a possibilidade de que fatores epigenéticos possam controlar a taxa de transcrição destes genes, influenciando a síntese de metabólitos secundários (MULLER e PRADO, 2008). Existem dois tipos de mecanismos epigenéticos que podem ocorrer: modificações nas histonas (estruturas associadas ao DNA com função de organizar a cromatina) e padrão de metilação do DNA. Através destes mecanismos, ocorre um rearranjo genético, modificando a expressão de alguns genes e conseqüentemente, na tradução de novas proteínas (MULLER e PRADO, 2008). Estes estudos vêm sendo utilizados com micro-organismos com intuito de descobrir novas rotas metabólicas e assim, novas substâncias bioativas. A **Fig. 09** mostra como os eliciadores podem induzir o metabolismo de uma bactéria na síntese de substâncias novas.

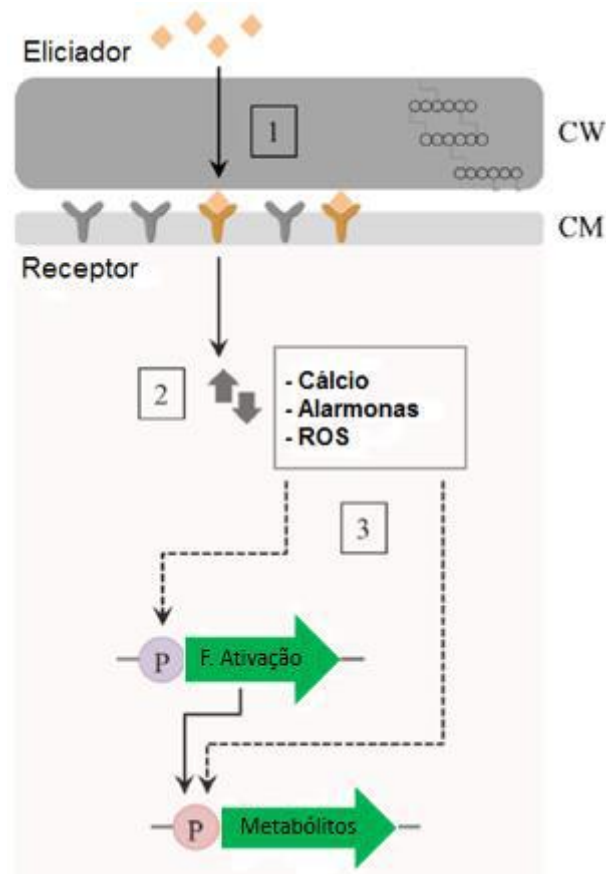


Figura 09: Interação de um eliciador com uma bactéria, onde: CW = parede celular e CM = membrana celular. No primeiro momento ocorre internalização do eliciador através da parede celular (1). Em seguida, o eliciador se liga aos receptores da membrana citoplasmática, alterando a concentração de sinalizadores intracelulares (2). Por fim, pode ocorrer indução da transcrição de metabólitos secundários (*clusters*) ou induzir um ativador de transcrição de um determinado gene envolvido com o metabolismo secundário (3). Adaptado de ABDELMOHSEN et al., (2015).

Willians et al. (2008) tentando acessar rotas diferentes na formação de produtos bioativos e para aumentar a síntese de metabólitos secundários em fungos, suplementaram a cultura destes micro-organismos com moduladores epigenéticos. Assim, como resultados, foi visto que dos 12 fungos estudados, 11 responderam ao experimento formando novos produtos e/ou aumentaram a produção de metabólitos secundários já identificados. Um outro exemplo foi a cultura do *Penicillium citreonigrum* com um modulador epigenético, acarretando em modificações do perfil metabólico de uma substância produzida pela cepa fúngica exclusivamente na presença do modulador epigenético (WANG et al., 2010). O cultivo do fungo entomopatogênico *Isaria tenuipes* na presença de RG-108 (inibidor de DNA-

metiltransferase) e ácido suberoidroxâmico aumentou de forma significativa a produção de metabólitos secundários do fungo, além de permitir o isolamento de uma substância inédita, o policetídeo tenuipirona (ASAI et al., 2012).

1.6.2. Eliciação biológica

A cultura mista ou co-cultura vem sendo uma interessante estratégia estudada na produção de substâncias bioativas por micro-organismos. Em um ambiente competitivo, os genes que controlam a expressão de metabólitos secundários e/ou rotas biossintéticas silenciadas podem ser ativados, levando a formação de novas substâncias como toxinas, antibióticos, antifúngicos entre outros (CHAGAS, 2014). As formas de interação entre dois micro-organismos em co-cultura e ativação de rotas biossintéticas singulares provenientes dessas interações podem ser vistas na **Fig. 10**.

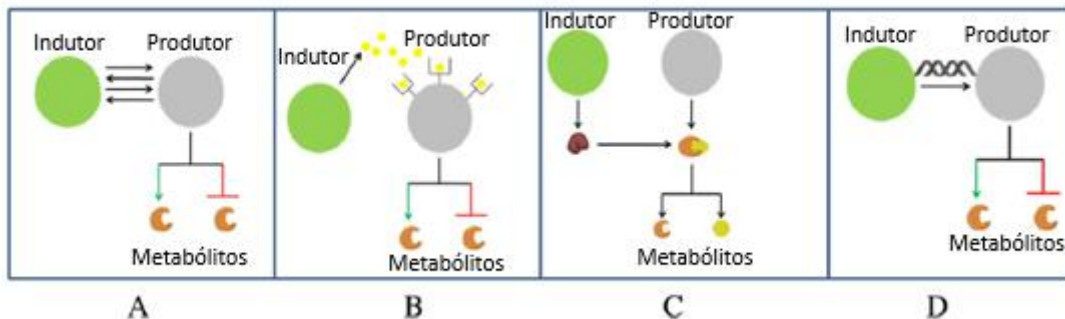


Figura 10: Interações entre dois micro-organismos durante a co-cultura, sendo um indutor e o outro produtor. Podem ocorrer interações físicas entre as células (A); interações mediadas por pequenas moléculas (B); ativação de precursores metabólicos catalíticos (C) e transferência horizontal de genes (D). Adaptado de ABDELMOHSEN et al., (2015).

As culturas mistas podem ser feitas com micro-organismos iguais (ex. bactéria A + bactéria A ou bactéria A + bactéria B). Outro método é realizar culturas mistas com fungos e bactérias (ABDELMOHSEN et al., 2015). Foi visto que durante a co-cultura da linhagem bacteriana *Sphingomonas* sp. com o fungo *Aspergillus fumigatus* houve produção de uma substância nova (glionitrina A), na qual possui atividade citotóxica e antibiótica (PARK et al., 2009). Outro exemplo de uma cultura mista

envolvendo bactérias e fungos foi o cultivo do fungo *Libertella* sp. com uma bactéria marinha, resultando na produção de diterpenos libertelenona A e D (OH et al., 2005). Investigações de culturas mistas envolvendo bactérias mostraram que duas bactérias eram responsáveis na produção de um antibiótico, sendo *Pseudomonas aeruginosa* a produtora e *Enterobacter* sp. a indutora. Foi sugerido que para ocorrer a produção do antibiótico, as bactérias faziam interações físicas, ou seja, contato célula-célula, entre outros mecanismos específicos (ANGELL et al., 2006). Novos antibióticos aminoglicosídeos de amplo espectro de ação foram produzidos por *Rhodococcus fascians* quando co-cultivado com *Streptomyces padanus*. Neste estudo, foi visto que a produção do antibiótico está relacionada com a presença de DNA de *S. padanus* em *R. fascians* (KUROSAWA et al., 2008).

1.6.3. Eliciação química

Os eliciadores químicos também vêm sendo utilizados para induzir a produção de metabólitos secundários em micro-organismos. O escândio, manganês, zinco, DMSO, dimetil sulfona (DMSO₂) e etanol são exemplos de eliciadores químicos que são utilizados na indução de metabólitos secundários. O mecanismo real de eliciação ainda não é totalmente conhecido (PETTIT, 2011). A **Tabela 01** mostra alguns destes exemplos durante estudos de micro-organismos da espécie *Streptomyces* sp.

Tabela 01: Elicidores químicos utilizados em cultivos de micro-organismos, os metabólitos secundários induzidos em cada cultivo e o mecanismo de eliciação. Adaptado de ABDELMOHSEN et al., (2015).

Elicificador	Micro-organismo	Metabólitos Secundários	Mecanismo de Eliciação
Escândio (Sc³⁺)	<i>S. coelicolor</i>	Actinorhodina	Upregulation* do ativador de transcrição do antibiótico e diminuição no nível da alarmona ppGpp pela ligação do Sc ³⁺
	<i>S. antibioticus</i> & <i>S. parvulus</i>	Actinomicina D	
	<i>S. griseus</i>	Streptomicina	
	<i>Bacillus subtilis</i> 168	Bacilisina	
DMSO	<i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	Cloranfenicol	Efeitos ao nível translacional
	<i>S. glaucescens</i>	Tetracenomicina C	
	<i>S. azureus</i> ATCC 14921	Thiostreptona	
	<i>S. lividans</i>	Prodigiosina	
Etanol/Dimetil sulfona	<i>S. glaucescens</i>	Tetracenomicina C	---
	<i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	Cloranfenicol	---

***Upregulation:** aumento de um componente celular em resposta a uma variável externa.

O DMSO e etanol foram utilizados em diferentes proporções por alguns pesquisadores na tentativa de eliciação de substâncias durante o cultivo de micro-organismos. Na presença de 3% de DMSO (v/v), foi visto uma produção três vezes maior de cloranfenicol no cultivo de *Streptomyces venezuelae* comparado com o cultivo do micro-organismo sem DMSO. Já no micro-organismo *Streptomyces azureus* foi visto uma produção duas vezes maior do peptídeo tiostreptona, também cultivado com DMSO 3%. Em relação as culturas tratadas com DMSO e nas culturas não

tratadas com DMSO, não foi visto uma diferença na biomassa. Já a dimetil sulfona (DMSO_2) teve um efeito estimulante menor, comparada ao DMSO, na produção destes antibióticos (CHEN et al., 2000). O etanol 1% foi utilizado como eliciador durante o cultivo de fungos marinhos do gênero *Pestalotia*, no qual houve produção de um novo antibiótico, a pestalona (CUETO et al., 2001). Já em concentrações maiores (etanol 6%), houve aumento intenso na síntese do antibiótico jadomicina B no cultivo de *S. venezuelae* (DOULL et al., 1994).

Outros exemplos de eliciadores químicos utilizados em trabalhos recentes como o Mn^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} demonstraram grande importância nas vias metabólicas de diversos micro-organismos. Metais pesados como Cobre, Cádmio e Cromo aumentaram a produção de uma substância produzida na cultura do fungo *P. quadrisepitata* associado a uma planta (PARANAGAMA et al., 2007). Alguns metais são importantes cofatores enzimáticos de micro-organismos e, por isso, o estudo dos mesmos são importantes para entendimento de rotas metabólicas e em estudos de eliciação (PETTIT, 2011).

Neste estudo, foram feitas culturas de dois fungos isoladas da *H. balsamifera* utilizando o extrato bruto etanólico da folha na tentativa de eliciar a produção de novas substâncias, em comparação com os cultivos destes fungos sem o extrato bruto etanólico da folha. Além disso, também foram feitos concomitantemente o cultivo destes fungos na presença de DMSO 2% para saber se este solvente ocasiona algum tipo de estresse nos fungos, e assim, produção de substâncias diferentes em comparação com o cultivo dos fungos sem e com o extrato bruto etanólico da folha de sua planta hospedeira.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente tem-se dado grande atenção para os micro-organismos como fonte de produtos naturais, sendo estes organismos responsáveis por uma grande variedade de substâncias ativas e originais. Estas substâncias são formadas no metabolismo secundário do micro-organismo como resposta a diversos fatores como estresse ambiental, comunicação com outros micro-organismos e defesa (PINTO et al., 2002).

Os micro-organismos associados (fungos e bactérias endofíticas) vem sendo amplamente estudados como fonte de substâncias bioativas. Eles vivem em uma associação íntima com a planta hospedeira, e podem produzir algumas substâncias bioativas que estão presentes nessas plantas (LEMOS, 2006; VIEGAS et al., 2006; BORGES, 2008; CAMPOS, 2009; SILVA, 2009; SANTOS e VARAVALLO, 2011; TURIBIO, 2011; CHAPLA et al., 2013; CHAGAS, 2014).

O conhecimento de genômica microbiana vem melhorando a compreensão dos princípios associados a biossíntese de produtos naturais. Avanços nessa área permitem descobrir alternativas capazes de otimizar a produção e descoberta de novas substâncias. Foi descoberto que as regiões biossintéticas encontradas no genoma dos micro-organismos em sua maioria se mantêm silenciadas e necessitam de um estímulo singular para aumentar sua expressão. Estes estímulos podem ser diversos como por exemplo, sinais ambientais ou nutrientes, porém ainda são desconhecidos. Algumas abordagens vêm sendo utilizadas com intuito de melhorar a produção de substâncias bioativas de micro-organismos como o remodelamento epigenético da biossíntese por mediadores químicos, o cultivo simultâneo de micro-organismos e o uso de métodos genômicos capazes de manipular as vias biossintéticas (CHAGAS, 2014).

Há poucos trabalhos envolvendo a cultura de fungos endofíticos na presença de extratos da planta hospedeira, porém foi visto que os fungos endofíticos podem mudar a composição do extrato vegetal durante a cultura do micro-organismo na presença do extrato vegetal, sendo uma abordagem nova e pouco estudada atualmente (CHAGAS, 2014). Assim este trabalho tem intenção de explorar essas novas abordagens para compreender melhor a relação dos fungos endofíticos

cultivados na presença do extrato vegetal de sua planta hospedeira, na busca de substâncias biotivas.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

O objetivo deste estudo visa determinar o perfil químico via CLAE-DAD do extrato obtido pelo cultivo dos fungos endofíticos HB18a e HB19a cultivados na presença do extrato vegetal de sua planta hospedeira (EBF) e em dimetil sulfóxido (DMSO), na tentativa de obtenção da produção diferenciada de metabólitos secundários.

3.2. Específicos

- Determinar a concentração de EBF e DMSO utilizados no cultivo dos fungos;
- Desenvolver um perfil analítico via CLAE.
- Avaliar o perfil químico via CLAE-DAD dos fungos HB18a e HB19a cultivados na presença do EBF.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Equipamentos

Vórtex mixer (Eduotec), Incubadora *shaker* (Solab SL – 223), Autoclave Vertical (Primatec série 9141), Câmara de Segurança Biológica de Classe II (Trox modelo FLV série 506), centrífuga (Eduotec 80-2B), filtros descartáveis 0,45 micras (ALLCROM), seringa 1,0 mL, *vials*, placas de Petri, pipetas automáticas 100-1000 µL (Labmate Pro), balanças semi-analítica e analítica (Sartorius), chapa de aquecimento (Fisatom modelo 752A série 1237464), geladeira (Consul), freezer -20 °C (Eletrolux modelo FE-26), tubos Falcon (TPP), palitos de madeira, *transfertubes*, pHmetro (BEL, modelo PHS3 – BW), bomba a vácuo (Fisatom modelo 826T série 1269391), vidro

relógio, papel de filtro, estufas (DELEO e Nova Ética), funil de Büchner, purificador (ELGA, PureLab Classic). O aparelho cromatográfico utilizado foi Shimadzu Prominence LC-20A que possui uma bomba quaternária (LC-20AT), um degaseificador (DGU-20A5), forno (CTO-20A), injetor (SIL-20A), detector (SPD-M20A), controlador (CBM-20A) e sistema LC SOLUTION.

4.1.2. Solventes e reagentes

Metanol (Tedia), acetato de etila (Tedia), dimetil sulfóxido (Chemco), extrato bruto etanólico obtido das folhas (EBF) da *H. balsamifera*, HCl 0,1 M (Êxodo), NaOH 1 M (Spectrum Chemical), NaNO₃ (Êxodo), KH₂PO₄ (Vetec), KCl (ProQuímio), MgSO₄ . 7 H₂O (Vetec), FeSO₄ . 7 H₂O (Vetec), água destilada e água ultrapura (Milli-Q), BDA (Himedia), triptona (Himedia), extrato de levedura (Himedia), extrato de malte (Himedia), dextrose (Himedia) e sacarose (Êxodo e Vetec).

4.1.3. Meios de Cultivo

4.1.3.1. Meio Batata Dextrose Ágar

Este meio foi utilizado segundo a proporção de 39 g de meio para 1 L de água destilada. Após preparo o meio foi autoclavado a 121 °C e 1 atm por 20 minutos.

4.1.3.2. Meio Pré-fermentativo

Composto por triptona 0,5%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 1% e dextrose 1% em água destilada. O pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,2$ com HCl 0,1M ou NaOH 1M. Após preparo o meio foi autoclavado a 121 °C e 1 atm por 20 minutos.

4.1.3.3. Meio Fermentativo Czapek

Composto por 3% de sacarose, 0,2% NaNO₃, 0,1% KH₂PO₄, 0,05% KCl, 0,05% MgSO₄ . 7 H₂O e 0,001% FeSO₄ . 7 H₂O em água destilada. Após preparo o meio foi autoclavado a 121 °C e 1 atm por 20 minutos.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. Escolha dos Fungos Endofíticos

Diversos fungos endofíticos foram isolados da planta *Humiria balsamifera* e estocados em geladeira em fragmentos de ágar BDA com o micélio previamente crescido em água destilada. Para escolha dos fungos observou-se os que apresentavam crescimento viável. Para o estudo, foram utilizados os fungos HB18a e HB19a.

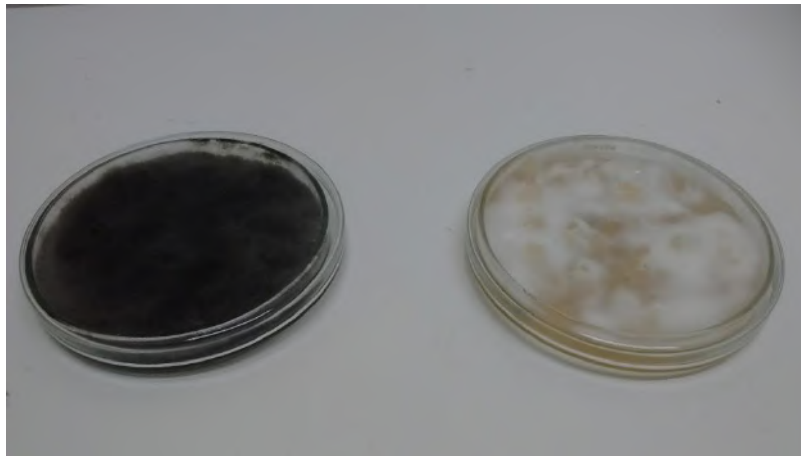


Figura 11: Fungo HB18a (a esquerda) e fungo HB19a (a direita).

4.2.2. Cultivo em meio sólido BDA

O repique dos fungos foi realizado em capela de fluxo laminar. Todos os materiais utilizados foram autoclavados previamente, a 120 °C e 1 atm por 20 minutos. Após o repique, as placas de Petri foram rotuladas e colocadas na incubadora a 30 °C por 7 dias. Foram utilizadas três placas de Petri para cada fungo e dois controles com 35 mL de meio cada.

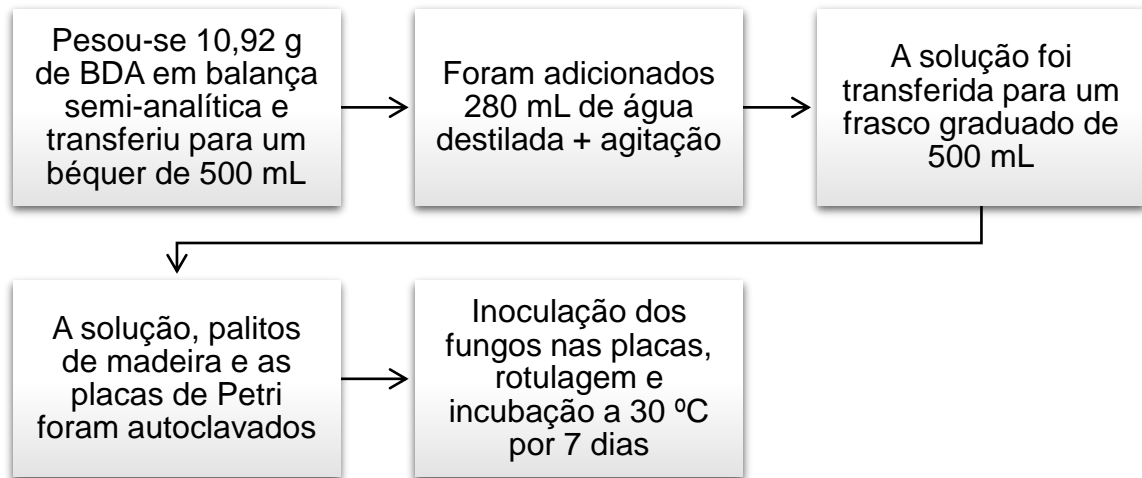


Figura 12: Fluxograma mostrando o preparo e inoculação dos fungos HB18a e HB19a em meio sólido BDA.

4.2.3. Inoculação no Meio Pré-fermentativo

Após os 7 dias de incubação, os fungos HB18a e HB19a foram transferidos das placas de Petri para os tubos Falcon contendo meio pré-fermentativo. A inoculação no meio pré-fermentativo foi realizada em capela de fluxo laminar. Para cada tubo Falcon, foram transferidos 12 plugs dos fungos HB18a e HB19a cultivados anteriormente em meio BDA. Em seguida, os tubos Falcon foram rotulados e colocados na incubadora *shaker* por 5 dias, a 30 °C e 120 rpm, conforme ilustrado no esquema abaixo.

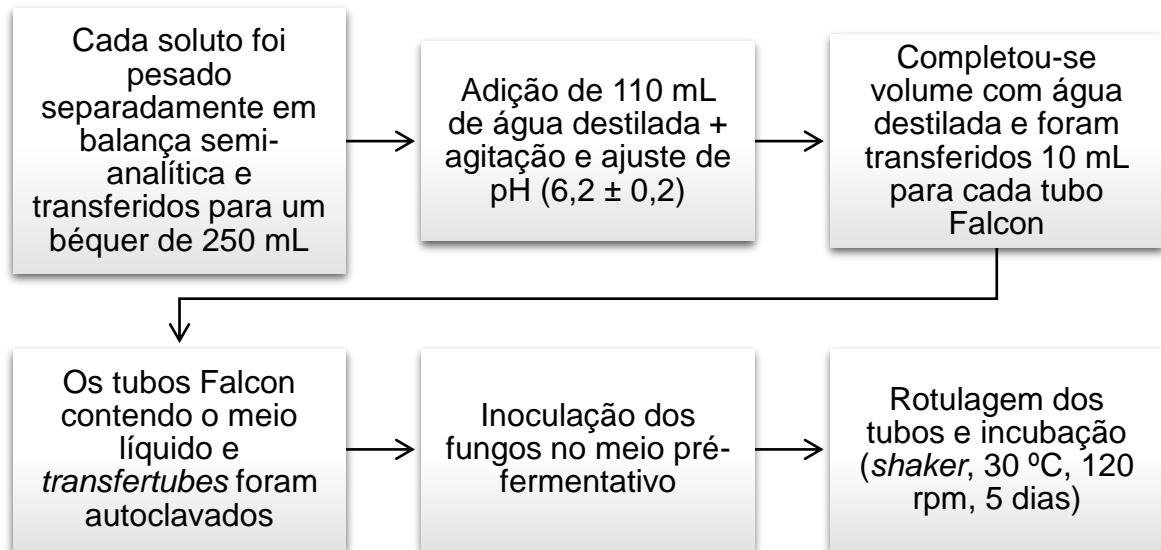


Figura 13: Fluxograma mostrando o preparo e inoculação dos fungos HB18a e HB19a em meio pré-fermentativo.



Figura 14: Tubos Falcon contendo meio pré-fermentativo com os fungos HB18a e HB19a dentro do *shaker* a 30 °C e agitação constante de 120 rpm.

4.2.4. Preparo do meio fermentativo Czapek

Foram utilizados 16 Erlenmeyers contendo 100 mL cada (volume final de 1600 mL), sendo dois destes utilizados como branco. O experimento foi feito da seguinte maneira: fungo sozinho no meio fermentativo Czapek, fungo no meio fermentativo Czapek com 2% DMSO e fungo no meio fermentativo Czapek enriquecido com 2% DMSO e 0,3% EBF (o EBF foi previamente obtido em colaboração com a aluna Jéssica de Oliveira e professoras Ivana Correa Ramos Leal e Michelle Frazão Muzitnao). Isso foi feito em duplicata (6 Erlenmeyers) para cada fungo (12 Erlenmeyers no total). Também foram feitos controles: branco contendo só o meio fermentativo Czapek e Czapek enriquecido com 2% DMSO e 0,3% EBF. Esses controles também foram feitos em duplicata (4 Erlenmeyers no total). Os componentes foram pesados separadamente em balança semi-analítica e analítica e posteriormente transferidos para um béquer de 3 L. Adicionou-se 1600 mL de água destilada e agitou-se com auxílio de bastão de vidro até completa solubilização. Dos 1600 mL, 600 mL foram enriquecidos com 2% com DMSO e 0,3% do EBF. Isso foi feito em um béquer de 1 L. Para melhorar a solubilização, utilizou-se chapa de aquecimento a 100 °C por 40 minutos e agitação. No final, foram transferidos 100 mL de meio para cada Erlenmeyer rotulado e em seguida foram autoclavados a 121 °C e 1 atm por 20 minutos.

4.2.5. Inoculação no Meio Fermentativo Czapek

A inoculação foi feita em capela de fluxo laminar. Foi feita a transferência do micélio dos fungos presentes em cada tubo Falcon com auxílio de palitos de madeira estéreis para os Erlenmeyers contendo o meio líquido Czapek. Os Erlenmeyers foram então colocados em uma incubadora *shaker* por 21 dias, a 30 °C e 120 rpm.

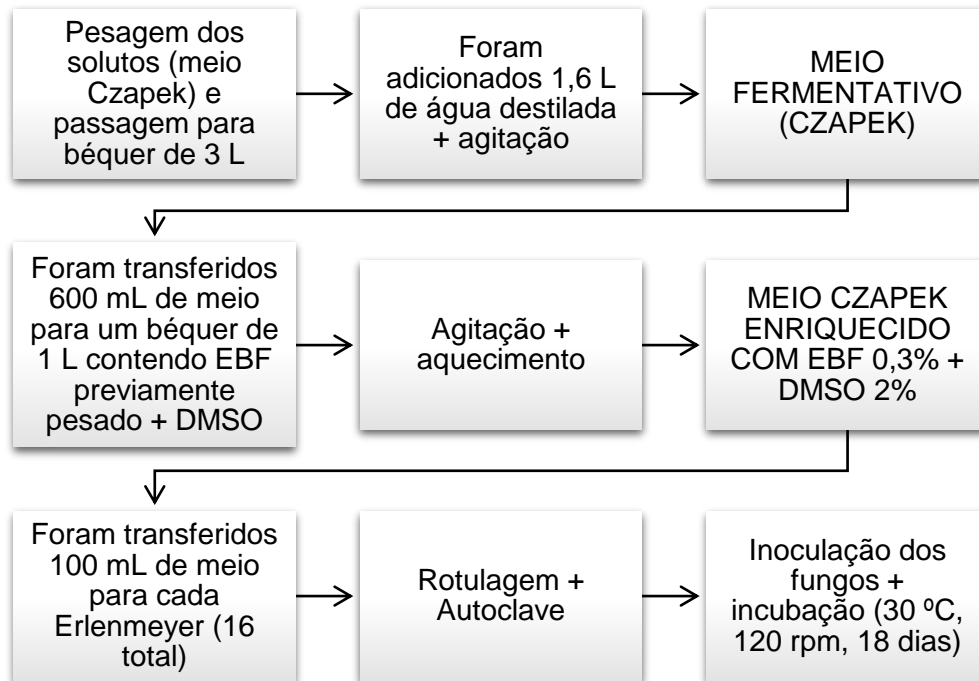


Figura 15: Fluxograma mostrando o preparo e inoculação dos fungos HB18a e HB19a no meio Czapek.



Figura 16: Fungo HB18a após o cultivo (T18) no meio fermentativo Czapek. Da esquerda para direita: fungo cultivado sem EBF, fungo na presença de DMSO 2% e fungo na presença do meio enriquecido com DMSO 2% e EBF 0,3%.

4.2.6. Coleta das alíquotas

Durante o cultivo no meio fermentativo Czapek, foram coletadas alíquotas de 5 mL com auxílio de ponteiras autoclavadas nos dias 0, 6, 12, 15 e 18 de incubação.

Cada amostra foi colocada em tubos de ensaio previamente autoclavados e rotulados e em seguida foram guardadas em freezer a -20 °C. A coleta de cada amostra foi feita em duplicata. Durante a coleta das alíquotas, o tempo foi padronizado.

4.2.7. Partição líquido-líquido

Para análise no CLAE-DAD, cada amostra foi particionada com acetato de etila. Após adição de 2,0 mL AcOEt, cada amostra foi colocada no agitador de tubos (vórtex) por 1 minuto, centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm, 1,5 mL foram retirados e concentrados sob ar comprimido até completa secagem (60 minutos). Os extratos AcOEt foram ressolubilizados em metanol/água na proporção de 1:1 (V_{FINAL} de 500 μ L). Antes de colocar cada amostra no *vial*, a mesma foi filtrada utilizando filtros descartáveis de 0,45 micras.

4.2.8. Análise no CLAE-DAD

As amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando coluna Luna C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm Phenomenex) utilizando como fase móvel gradiente de água Milli-Q (A) e Metanol (B), vazão de 1 mL/min e temperatura de 30 °C. As amostras foram analisados no UV pelo detector de arranjo de diodos (DAD) nos comprimentos de onda 225 nm e 340 nm e os cromatogramas foram analisados através do software LC SOLUTION.

Tabela 02: Gradiente de fase móvel utilizadas no CLAE (B = metanol).

Tempo (min)	Gradiente de Concentração
<i>0,01 – 10,00</i>	5% B
<i>10,00 – 15,00</i>	15% B
<i>15,00 – 35,00</i>	50% B
<i>35,00 – 55,00</i>	75% B
<i>55,00 – 67,00</i>	100% B
<i>67,00 – 75,00</i>	5% B

4.2.9. Pesagem do micélio do fungo HB18a após o cultivo no Meio Fermentativo Czapek

Para avaliar a massa micelial do fungo HB18a após o cultivo em meio fermentativo Czapek, deixou-se os Erlenmeyers contendo o fungo isolado no meio Czapek e o fungo presente no meio Czapek enriquecido com 2% de DMSO e 0,3% de EBF na estufa a 30 °C até evaporação total do meio Czapek. Após evaporação do meio Czapek, a cada Erlenmeyer foram adicionados 100 mL de água destilada e agitação manual vigorosa para desprender o fungo de cada Erlenmeyer. Posteriormente, foram feitas filtrações usando bomba a vácuo e funil de Büchner para cada Erlenmeyer para separar o micélio do fungo da água destilada que foi adicionada. Após a filtração, cada papel de filtro contendo o micélio de cada fungo foi posto sob um vidro relógio identificado e estes foram deixados numa estufa 24 horas (50 °C). Após secagem completa, cada amostra foi pesada em balança semi-analítica. O fungo HB19a não apresentou diferenças significativas da biomassa durante o cultivo, e por isso, não foi feita a pesagem do micélio deste fungo.

4.2.10. Padronização das condições analíticas para análise via CLAE-DAD

No início, foi proposto usar o extrato bruto etanólico da folha de *H. balsamifera* numa proporção de 1% (p/v) com o meio fermentativo Czapek e 2% de DMSO para facilitar a dissolução do EBF em meio Czapek. Contudo, não foi possível dissolver o EBF nesta proporção. Assim, foi proposto diminuir a quantidade de EBF para uma concentração menor. Foram feitas as seguintes diluições: 0,3%, 0,15%, 0,075%, 0,0375%, 0,01875%, 0,009375%. Estas diluições foram feitas utilizando o meio Czapek. Posteriormente, para cada diluição foram feitas partições líquido-líquido com acetato de etila. Foram feitas análises de cada diluição via CLAE para se determinar a melhor condição analítica. Isto foi feito também modificando a proporção dos solventes (metanol e água ultrapura), bem como o tempo de análise. Assim, foi visto que a melhor diluição foi a de 0,3% do EBF porque apresentou boa eficiência e resolução durante o tempo de análise. As condições analíticas finais utilizadas em cada análise já foram descritas (ver *Material e Métodos*, item 4.2.10.).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Controles EBF+DMSO e Czapek em T0 e T18

Durante a padronização da quantidade a ser empregada de EBF foi realizada uma prévia análise do perfil químico do mesmo, após o procedimento de extração líquido-líquido com AcOEt, para obtenção de um sistema de fase móvel adequado a ser utilizado nas análises CLAE-DAD. A **Fig. 17** mostra o cromatograma do extrato AcOEt durante a padronização, onde o extrato bruto foi solubilizado a 0,3% em meio Czapek.

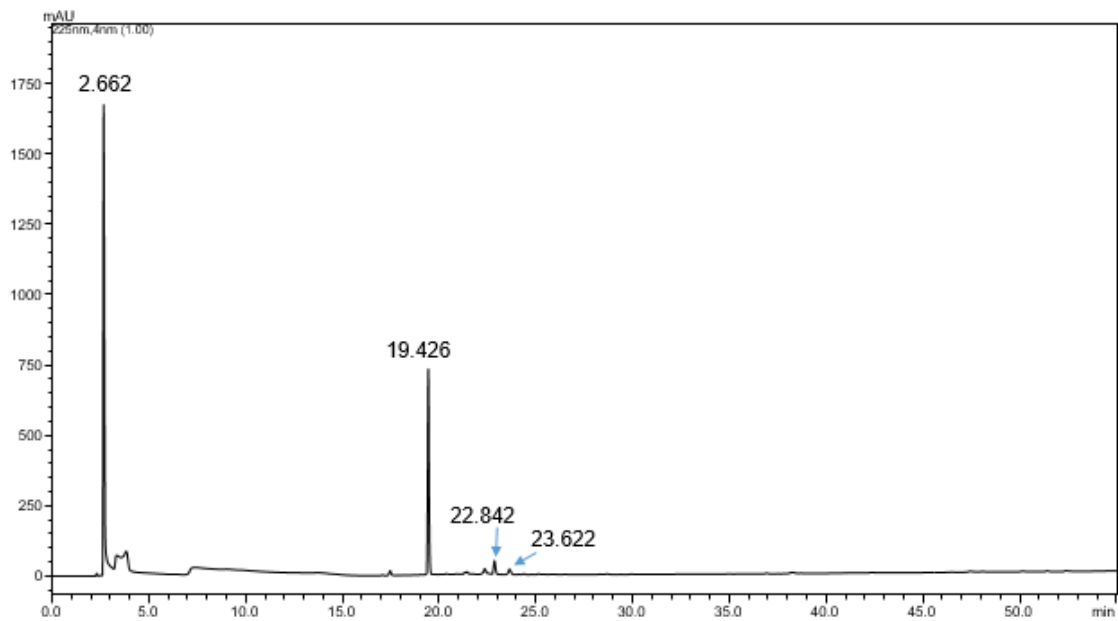


Figura 17: Cromatograma do extrato de AcOEt do controle (EBF + DMSO) durante a padronização a 0,3%, em 225 nm.

Durante o cultivo dos fungos, foram coletadas alíquotas do controle Czapek enriquecido com EBF 0,3% e DMSO 2% em todos os tempos de incubação (T0, T6, T12, T15 e T18), em duplicata. Contudo, somente foram analisados via CLAE os tempos T0 e T18 para certificar da possível degradação das substâncias presentes como constituintes do extrato bruto das folhas de *H. balsamifera* no controle. A **Fig. 18** e a **Fig. 19** mostram os cromatogramas do controle no tempo T0 e T18 respectivamente. A **Tabela 03** relaciona os picos majoritários contidos nos tempos T0 e T18 e suas respectivas áreas.

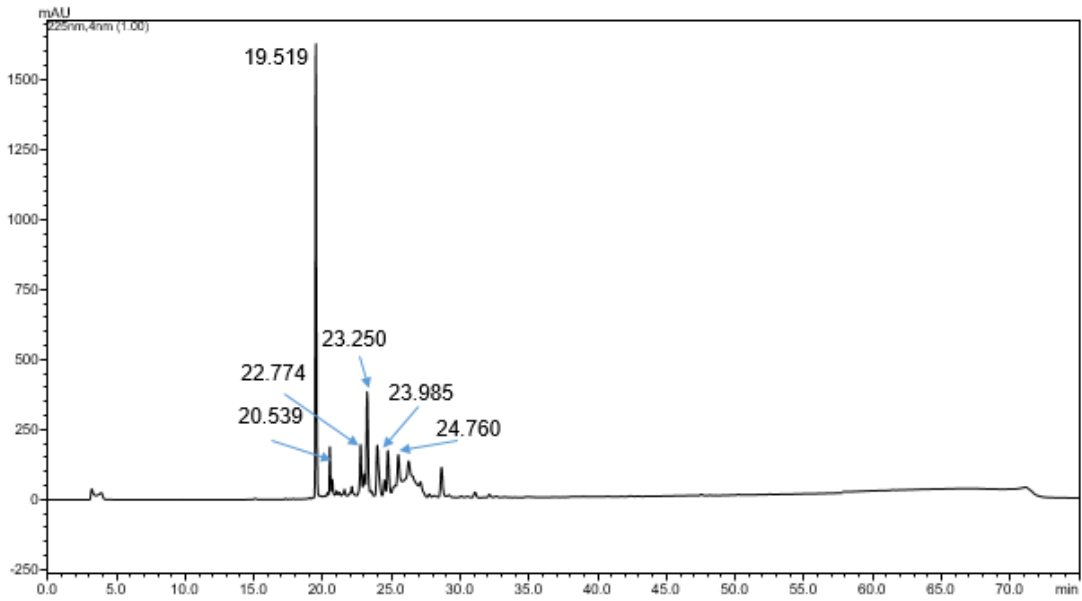


Figura 18: Cromatograma do extrato de AcOEt do controle (EBF + DMSO) no tempo de incubação T0, em 225 nm.

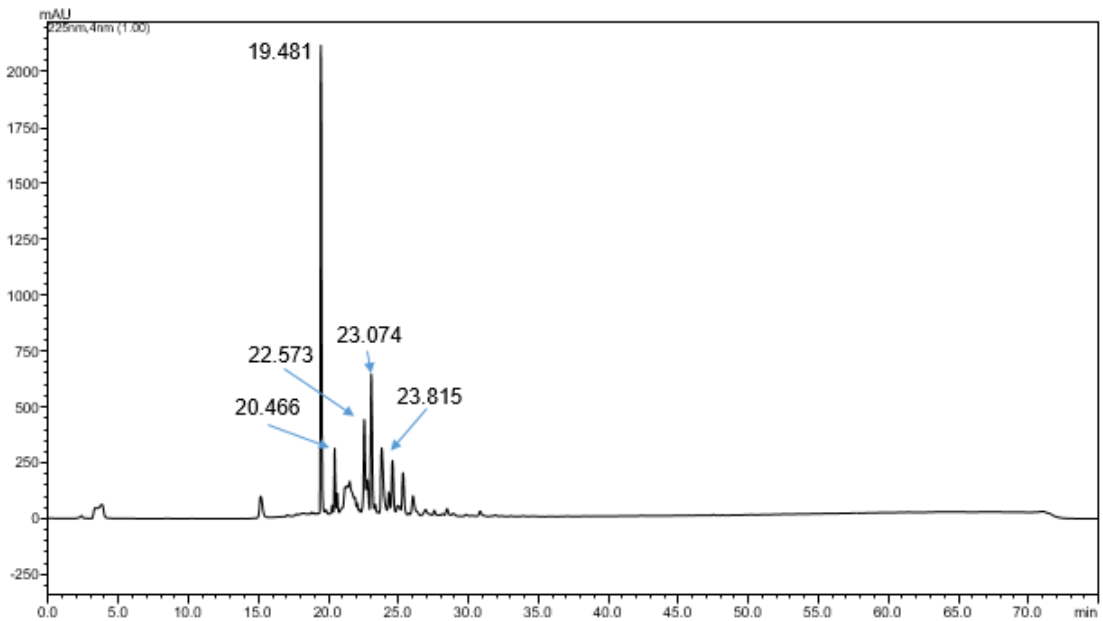


Figura 19: Cromatograma do extrato de AcOEt do controle (EBF + DMSO) no tempo de incubação T18, em 225 nm.

Tabela 03: Tempos de retenção do controle (EBF+DMSO) em T0 (1) e em T18 (2) e suas respectivas áreas em cada tempo.

Tempo de retenção (min)	Área em T0	Área em T18
19,51 (1) e 19,48 (2)	9.435.089	13.869.623
20,53 (1) e 20,46 (2)	845.750	1.473.794
22,77 (1) e 22,57 (2)	1.166.881	3.143.016
23,25 (1) e 23,07 (2)	2.632.850	4.500.786
23,98 (1) e 23,81 (2)	2.084.248	3.576.527
24,76 (1) e 24,58 (2)	1.245.857	1.987.346

É possível observar um pequeno aumento dos picos em T18 comparado com T0, o que provavelmente seria um erro analítico sistemático. Além do controle (EBF + DMSO), também foram coletadas alíquotas do branco do meio Czapek (**Fig. 20**).

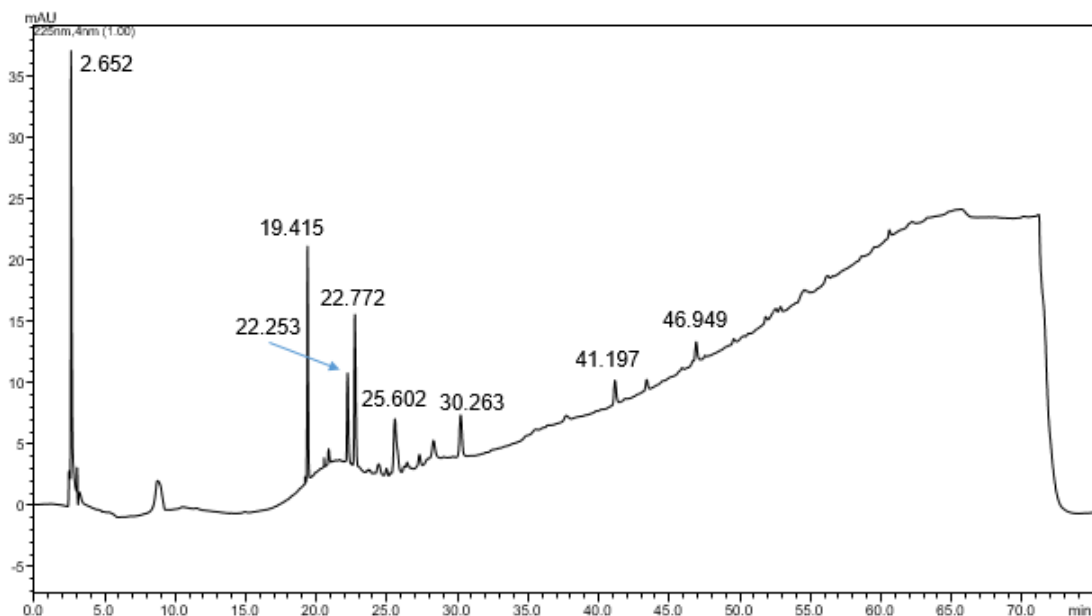


Figura 20: Cromatograma do extrato de AcOEt do branco (Meio Czapek) no tempo de incubação T0, em 225 nm.

O meio Czapek é constituído basicamente de um carboidrato (sacarose), sais e água destilada. Por isso, não é esperado a detecção de substâncias em quantidades significativas, pois o solvente utilizado para a extração líquido-líquido, AcOEt, não possui polaridade compatível para extrair sacarose e os sais presentes no meio Czapek. Além disso, essas substâncias não são detectadas pelo DAD. As substâncias

detectadas apresentam tempos de retenção parecidos com o controle Czapek enriquecido com EBF 0,3% + DMSO 2%, o que pode ter ocorrido devido a presença de substâncias retidas no injetor (carry-over) durante as injeções das amostras.

5.2. Fungo HB19a

Durante o cultivo do fungo HB19a não houve consumo significativo de substâncias presentes no EBF. Alguns picos mostraram-se majoritários durante todo o cultivo: $T_R = 19,50$ minutos, $T_R = 22,35$ minutos e $T_R = 23,36$ minutos. Os cromatogramas foram comparados com suas respectivas duplicatas, com o controle Czapek enriquecido com EBF 0,3% e DMSO 2% e com o controle Czapek puro. As duplicatas de cada amostra foram colocadas no **ANEXO I** para consulta.

Para melhor visualização, foram feitas sobreposições dos cromatogramas. Vale ressaltar que os cromatogramas foram colocados no mesmo tamanho para comparação (**Fig. 21**, **Fig. 22** e **Fig. 23**), tendo como referência o cromatograma contendo EBF + DMSO (absorvância máxima de 1700-1900 mAU) de cada cultivo, em comparação aos outros, onde os que continham DMSO apresentavam absorvância máxima em torno de 100-150 mAU e os que continham o fungo isolado em Czapek apresentavam absorvância máxima de 25-50 mAU. O programa utilizado para comparação no CLAE (LC SOLUTION – *Data Comparison*) mostrava todos os cromatogramas na mesma faixa de absorção, tendo como referência o que apresentava maior absorção. Logo, não era possível visualizar os menores picos contidos nos cultivos do fungo em meio Czapek e em meio Czapek com DMSO. Exemplos destas comparações estão no **ANEXO II**.

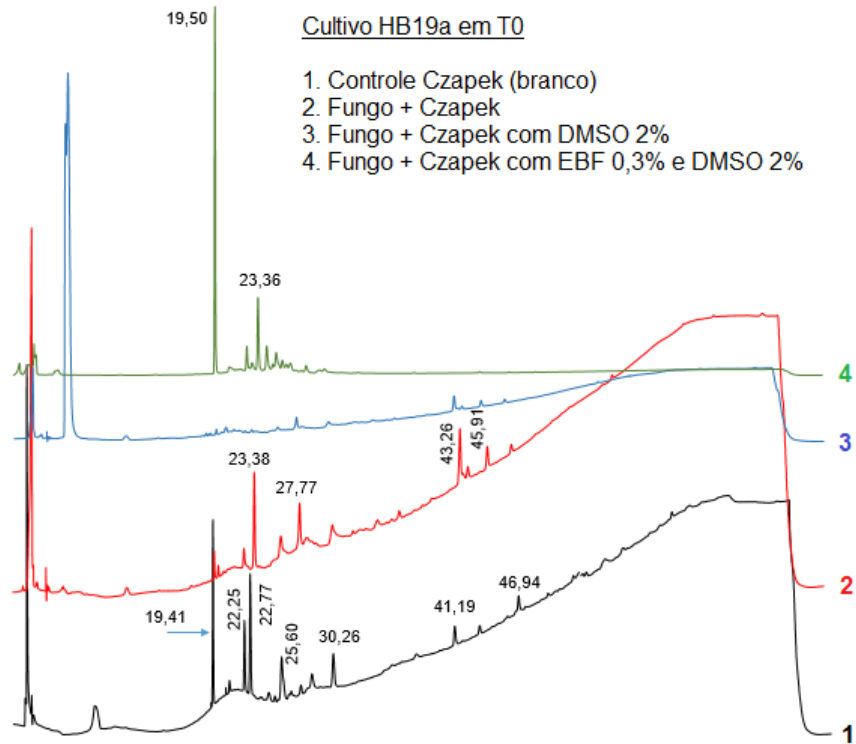


Figura 21: Cromatogramas sobrepostos dos extratos de AcOEt do fungo HB19a no tempo de incubação T0, onde: branco meio (1), fungo em Czapek (2), fungo em Czapek e DMSO 2% (3) e fungo em Czapek EBF 0,3% e DMSO 2% (4). Todos estão na faixa de 225 nm. Foram colocados tendo como referência o cromatograma contendo EBF + DMSO (4). O tempo de retenção dos picos majoritários foram destacados.

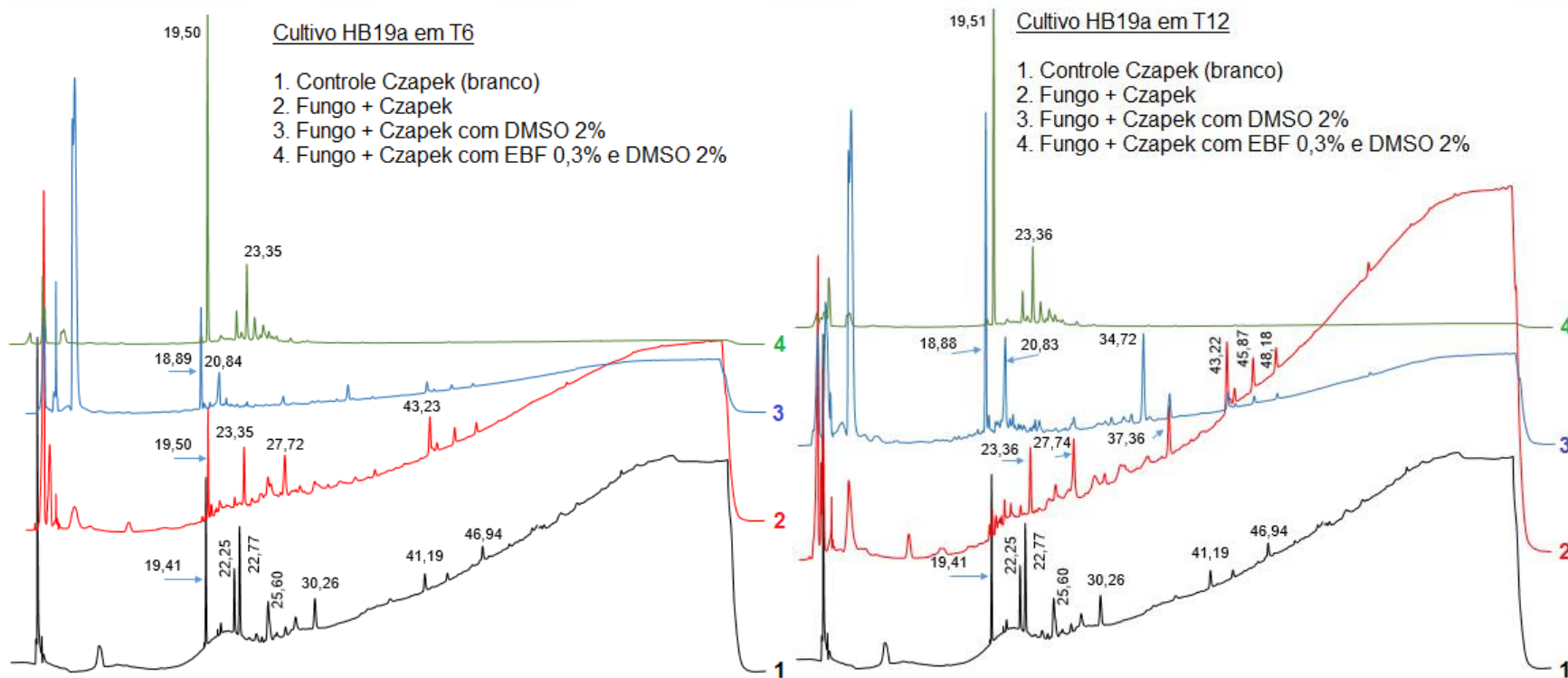


Figura 22: Cromatogramas dos extratos de AcOEt obtidas após cultivo do fungo HB19a em diferentes tempos de incubação (T6, T12), todos em 225 nm.

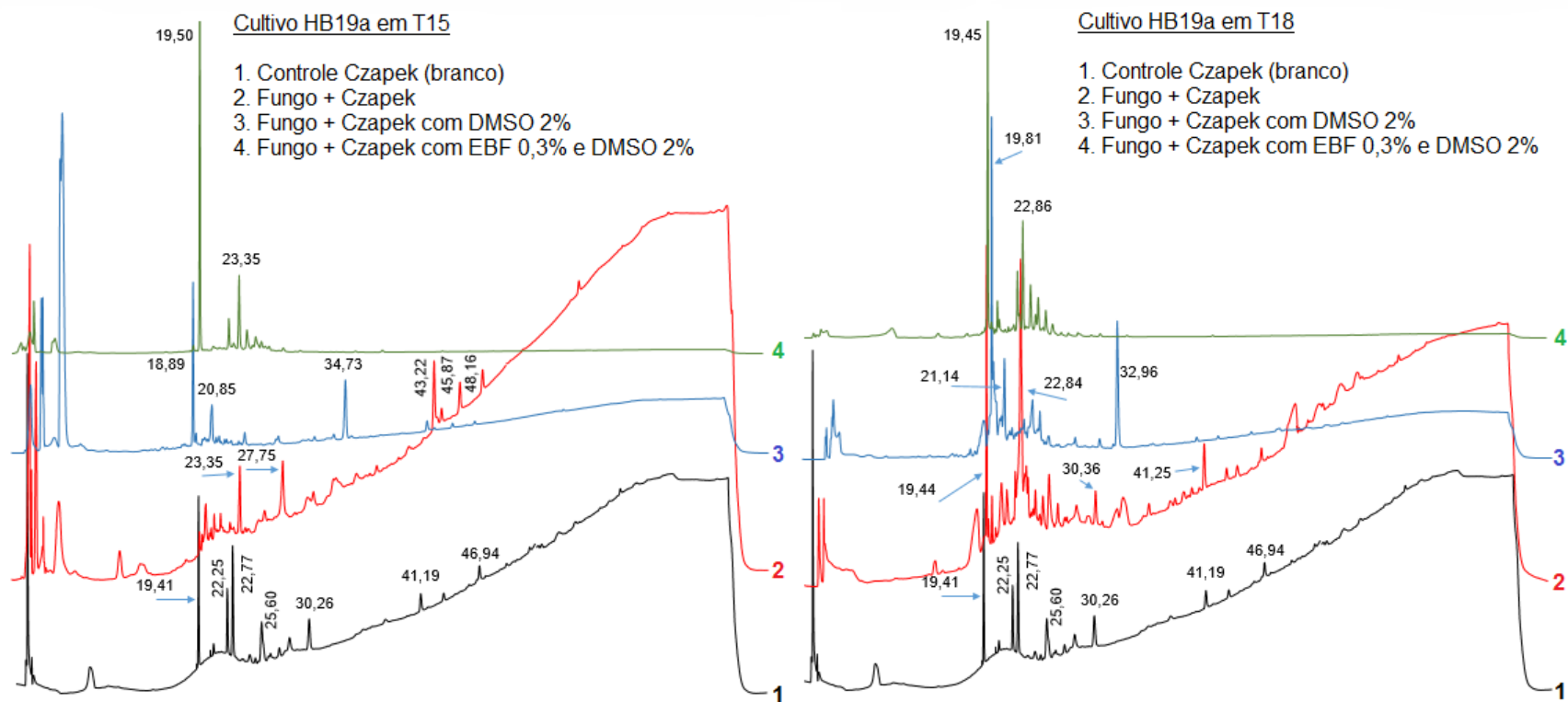


Figura 23: Cromatogramas dos extratos de AcOEt obtidas após cultivo do fungo HB19a em diferentes tempos de incubação (T15, T18), todos em 225 nm.

Não houve formação/consumo significativos de substâncias durante o cultivo do fungo HB19a na presença do EBF. Os picos majoritários $T_R = 19,42$ minutos, $T_R = 22,86$ minutos e $T_R = 23,60$ minutos apresentaram pequena variação de área ao longo de todo cultivo (**Tabela 04**).

Tabela 04: Tempos de retenção dos picos majoritários (duplicata) durante o cultivo do fungo HB19a enriquecido com EBF 0,3% + DMSO 2% e suas respectivas áreas nos tempos de incubação T6, T12, T15 e T18. Foram feitas as médias das áreas das duplicatas em cada tempo de incubação.

Tempo de retenção (min)	Média da área em T6	Média da área em T12	Média da área em T15	Média da área em T18
19,50 (1) e 19,43 (2)	11.980.611,5	12.709.764,5	12.329.371,5	13.278.138,0
22,35 (1) e 22,24 (2)	1.721.635,5	1.413.551,0	1.410.823,0	2.120.502,5
23,36 (1) e 23,48 (2)	2.766.438,0	2.875.486,0	2.749.497,5	2.315.023,5

Eliciadores vem sendo cada vez mais empregados em estudos envolvendo plantas, onde são utilizados com objetivo de melhorar a defesa das plantas contra micro-organismos patogênicos. Essa defesa pode ser obtida através de barreiras físicas (produção de ceras, tricomas, parede celular espessa entre outros) ou por substâncias com atividade antibiótica ou repelentes de insetos (produção de alcaloides, glicosídeos cianogênicos, enzimas hidrolíticas) (MAZARO, 2007). Algumas substâncias vêm sendo utilizadas nestes estudos, como uso de micronutrientes (boro, cobre e manganês) e extratos de plantas medicinais e micro-organismos (fungos e bactérias) na tentativa de induzir resistência contra patógenos (BONALDO, 2013). Estes estudos (plantas x extrato de micro-organismos) são utilizados na busca de metabólitos secundários novos em plantas, contudo o inverso (micro-organismos x extrato de plantas) ainda é pouco estudado, sendo essa uma abordagem nova durante o estudo de eliciação de micro-organismos. Foi observado que durante o cultivo do fungo HB19a com o EBF não houve diferenças significativas na formação de

metabólitos secundários e nem aumento da massa micelial do fungo.

Durante o cultivo do fungo HB19a isolado foram observados picos diferentes quando comparados com o Branco Czapek. Possivelmente estes picos estão relacionados com o metabolismo próprio do fungo. Contudo, estes picos relacionados com o cultivo do fungo isolado não foram analisados devido à falta de reprodutibilidade de suas respectivas duplicatas (**ANEXO I**).

Durante o cultivo em DMSO, houve formação de substâncias diferentes quando comparadas ao cultivo do fungo sem DMSO, como $T_R = 20,83$ minutos, $T_R = 32,96$ minutos e $T_R = 34,73$ minutos. Esses dois últimos podem ser os mesmos picos, visto que no cromatograma em T18 houve um deslocamento dos picos, em comparação com os demais. Em T18 foram observados picos majoritários $T_R = 19,81$ minutos e $T_R = 21,14$ minutos, semelhantes ao controle EBF+DMSO.

Estudos de eliciação de micro-organismos usando diferentes estratégias na busca de novas substâncias vem sendo utilizados. Esses estudos envolvem co-culturas de micro-organismos, modificações do meio de cultivo, modificações genéticas e uso de compostos químicos (ABDELMOHSEN et al., 2015). Dentre os compostos químicos, os solventes etanol, DMSO e DMSO₂ vem sendo utilizados em diferentes estudos de eliciação com micro-organismos. Alguns pesquisadores utilizaram uma concentração de DMSO 3% no cultivo de *Streptomyces venezuelae* e *Streptomyces azureus*, observando diferenças na produção de metabólitos por esses micro-organismos (CHEN et al., 2000). Outros eliciadores químicos também vêm sendo utilizados, como o etanol e dimetil sulfona (DMSO₂). Neste estudo, o fungo HB19a, quando cultivado com DMSO 2%, levou a formação picos diferentes quando comparados com o cultivo deste fungo sem DMSO ($T_R = 20,83$ minutos, $T_R = 32,96$ minutos e $T_R = 34,73$ minutos). Deste modo, o DMSO numa concentração de 2% pode estar atuando como um eliciador durante o cultivo do fungo HB19a, levando o fungo a um tipo de estresse, fazendo com que o mesmo sintetize uma substância diferente em comparação com o cultivo do fungo sem DMSO. Entretanto, houve diferenças nas duplicatas, sendo impossível confirmar a reprodutibilidade do experimento (**ANEXO I**). Somente em T18 houve formação de picos com intensidade razoável e iguais nas duplicatas. Deste modo, seria interessante analisar o cultivo do fungo com DMSO 2% em um tempo de incubação maior que T18, em triplicata, para entender se ocorre

formação de substâncias com o tempo de cultivo maior e observar a reprodutibilidade destas substâncias. Outra proposta seria variar a concentração de DMSO em novos cultivos deste fungo em tempos maiores de incubação para avaliar se ocorre aparecimento de picos com intensidade maior do que os analisados na concentração de 2% e posteriormente estudar qual seria o mecanismo de eliciação.

5.3. Fungo HB18a

Durante o cultivo do fungo HB18a em meio Czapek foi visto o consumo de substâncias provenientes do EBF, onde permaneceram os seguintes picos: $T_R = 19,52$ minutos, $T_R = 22,41$ minutos e $T_R = 23,41$ minutos. Estes picos estiveram presentes até T15, restando apenas o pico $T_R = 19,52$ minutos em T18. Os cromatogramas foram comparados com suas duplicatas, com o controle Czapek enriquecido com EBF 0,3% DMSO 2% e com o controle Czapek puro. As duplicatas de cada amostra foram colocadas no **ANEXO I** para consulta. Assim como foi feito para o fungo HB19a, foram feitas sobreposições dos cromatogramas. Vale ressaltar que os cromatogramas foram colocados no mesmo tamanho para comparação (**Fig. 24, Fig. 25 e Fig. 26**), tendo como referência o cromatograma contendo EBF + DMSO (absorvância máxima de 1700-1900 mAU) de cada cultivo, em comparação aos outros, onde os que continham DMSO apresentavam absorvância máxima em torno de 100-150 mAU e os que continham o fungo isolado em Czapek apresentavam absorvância máxima de 25-50 mAU.

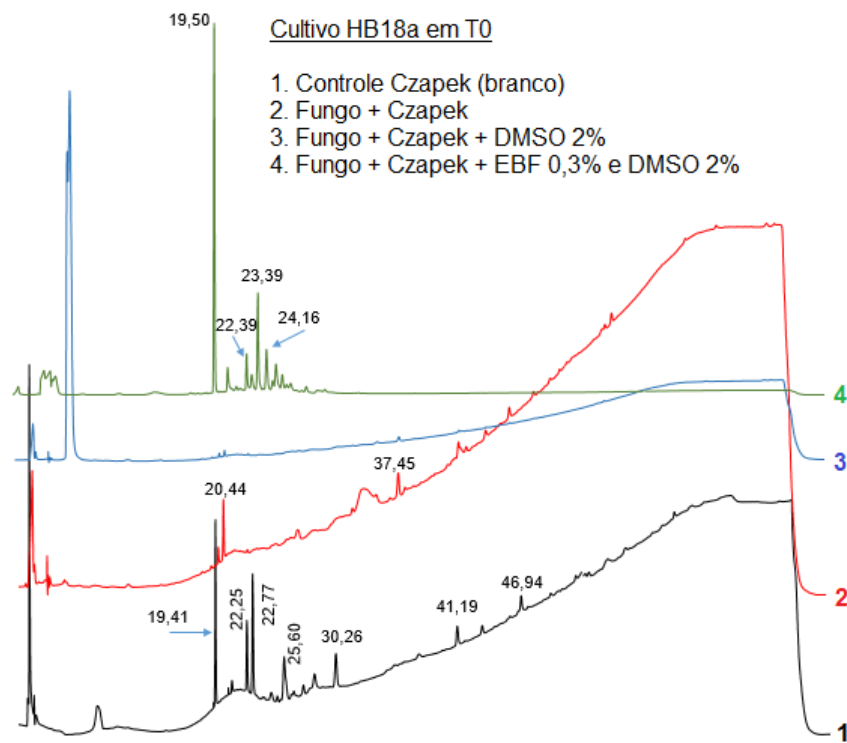


Figura 24: Cromatogramas sobrepostos dos extratos de AcOEt do cultivo do fungo HB18a no tempo de incubação T0, onde: branco meio (1), fungo em Czapek (2), fungo em Czapek e DMSO 2% (3) e fungo em Czapek EBF 0,3% e DMSO 2% (4). Todos estão na faixa de 225 nm. Foram colocados tendo como referência o cromatograma contendo EBF + DMSO (4).

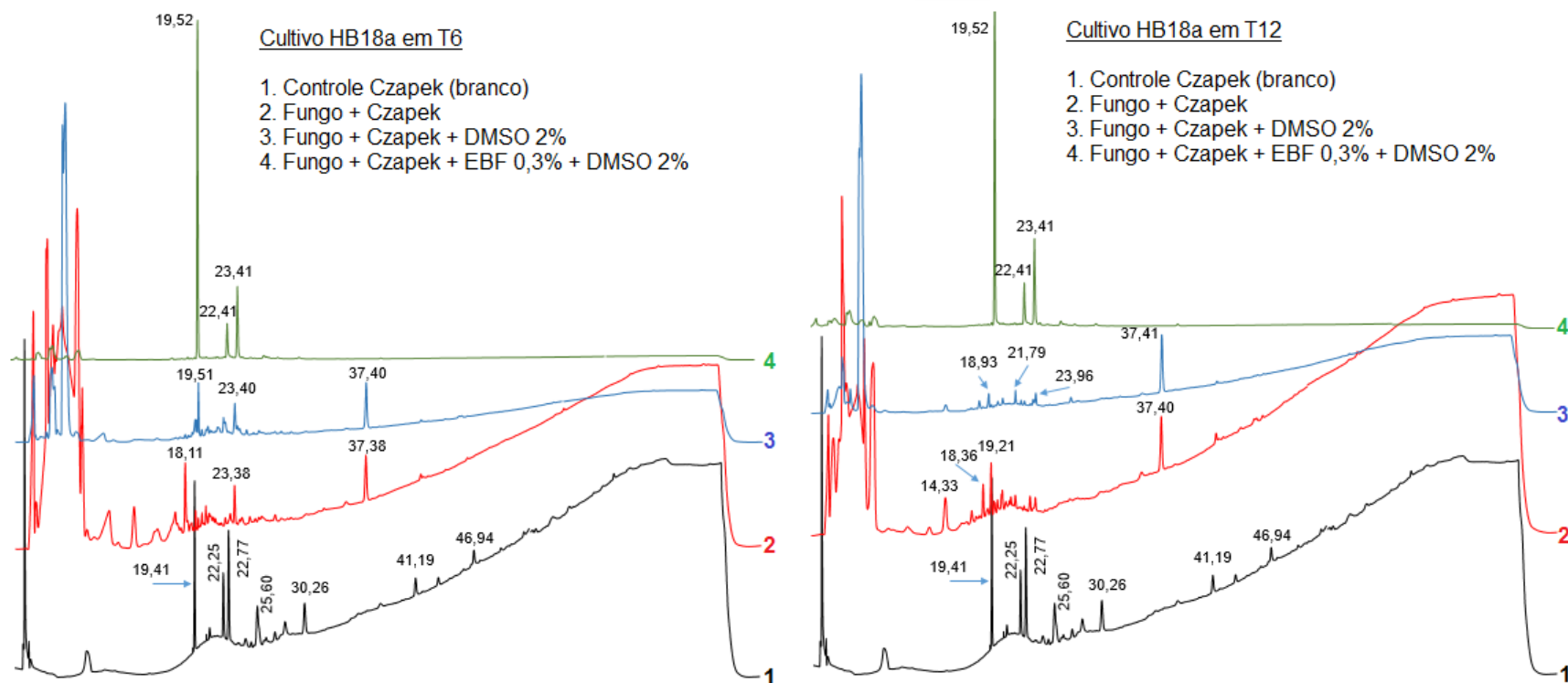


Figura 25: Cromatogramas dos extratos de AcOEt obtidas após cultivo do fungo HB18a em diferentes tempos de incubação (T6, T12), todos em 225 nm.

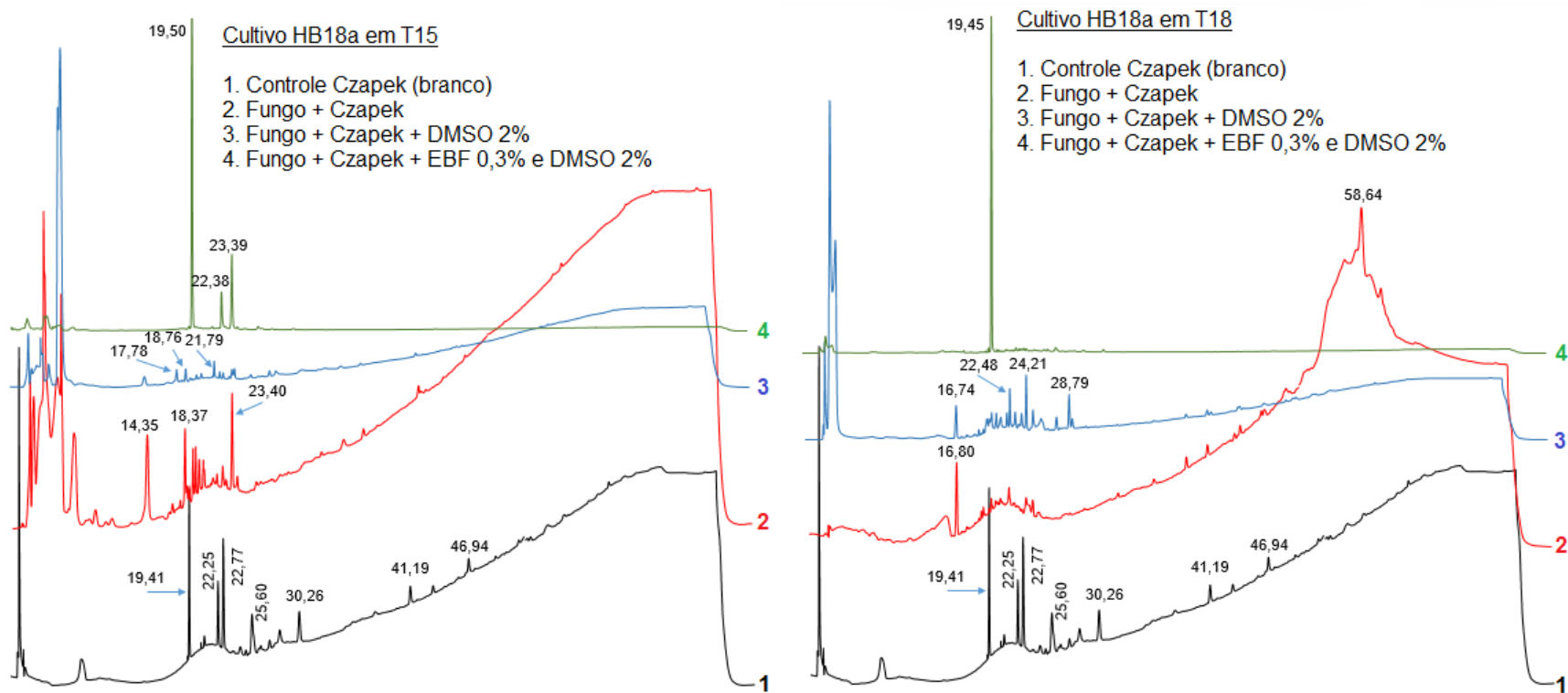


Figura 26: Cromatogramas dos extratos de AcOEt obtidas após cultivo do fungo HB18a em diferentes tempos de incubação (T15, T18), todos em 225 nm.

A **Tabela 05** mostra a área dos três picos majoritários durante o tempo de incubação T6 até T18.

Tabela 05: Tempos de retenção dos picos majoritários (duplicata) durante o cultivo do fungo HB18a enriquecido com EBF 0,3% + DMSO 2% e suas respectivas áreas nos tempos de incubação T6, T12, T15 e T18. Foram feitas as médias das áreas das duplicatas em cada tempo de incubação.

Tempo de retenção (min)	Média da Área em T6	Média da Área em T12	Média da Área em T15	Média da Área em T18
19,52 (1) e 19,43 (2)	12.795.428,0	13.322.813,5	12.346.682,5	13.484.805,0
22,41 (1) e 22,32 (2)	1.934.131,5	2.108.582,5	1.911.321,5	-----
23,24 (1) e 22,82 (2)	3.771.393,0	4.271.045,0	3.585.553,5	-----

Com base nos cromatogramas e na **Tabela 05**, foi visto que na presença do EBF não houve consumo da substância $T_R = 19,52$ minutos, a qual apresentou picos de áreas aproximadas durante todo o cultivo. Já os picos em $T_R = 22,41$ minutos e $T_R = 23,2$ minutos apresentaram diminuição da intensidade ao longo do período de incubação.

Foi visto que durante o cultivo do fungo HB18a na presença do EBF, houve um aumento intenso da massa micelial do fungo. Após preparo (ver *Materiais e Métodos*, item 4.2.11.), foram obtidos os seguintes resultados na pesagem:

Tabela 06: Resultados das massas no final do cultivo (T18) das duplicatas do fungo sozinho (amostras 1 e 2) e do fungo cultivado na presença do EBF (amostras E1 e E2), mostrando um aumento de até 10 vezes.

Amostras HB18a	Massa
<i>Amostra 1</i>	27 mg
<i>Amostra 2</i>	58 mg
<i>Amostra E1</i>	578 mg
<i>Amostra E2</i>	585 mg

Esse crescimento do fungo HB18a foi um dado importante do ponto de vista biotecnológico, onde obteve um crescimento da massa micelial bem significativo no cultivo contendo meio enriquecido com EBF e DMSO, em comparação com o cultivo em meio Czapek sem EBF.

O estudo envolvendo as condições de cultivo de micro-organismos são importantes do ponto de vista biotecnológico. A otimização do crescimento de micro-organismos é um assunto interessante porque o aumento da massa micelial pode, em alguns casos, estar relacionado com o aumento de metabólitos secundários produzidos pelo micro-organismo. Contudo, as condições que favorecem o aumento da massa micelial nem sempre são as mesmas que favorecem o aumento de metabólitos secundários (VIEIRA, 2005). Vários fatores podem afetar o crescimento da massa micelial e/ou aumento de metabólitos secundários durante o cultivo do micro-organismo, como temperatura do meio de cultivo, pH, tempo de incubação, crescimento intrínseco do micro-organismo, suplementação do meio de cultivo, composição do meio de cultivo entre outros. Com relação aos nutrientes utilizados na fermentação diretamente ligados na produção de metabólitos secundários e aumento da biomassa, podemos citar o carbono e nitrogênio como sendo os principais (VIEIRA, 2005). Assim, foi visto que o fungo HB18a utilizou os constituintes do EBF como fonte de carbono para aumentar sua massa micelial, não produzindo metabólitos secundários.

Durante o cultivo do fungo HB18a isolado foi observado formação de alguns picos diferentes quando comparadas com o Branco Czapek, como em $T_R = 14,35$ minutos e $T_R = 16,80$ minutos. Porém, estes são dados são bem diferentes se

comparados com as respectivas duplicatas, em particular o T18, sendo impossível confirmar a reprodutibilidade dessas análises (**ANEXO I**).

Durante o cultivo do fungo em DMSO não foi visto grandes alterações. Foram observados picos semelhantes ao cultivo do fungo sem DMSO, como em $T_R = 37,40$ minutos até T12 e de substâncias semelhantes ao controle EBF+DMSO, em 19,51 minutos e $T_R = 23,40$ minutos.

Como foi discutido durante o cultivo do fungo HB19a, estudos utilizando eliciadores químicos vem sendo utilizados como eliciação de micro-organismos (ABDELMOHSEN et al., 2015). Estes eliciadores químicos podem ser solventes (etanol, DMSO, DMSO₂) ou outros compostos como escândio e manganês (PETTIT, 2011). Os solventes vêm sendo utilizados como eliciadores em concentrações diferentes, como no caso do DMSO, onde Chen e colaboradores em 2000 utilizaram uma concentração de 3% no cultivo de *Streptomyces venezuelae* e *Streptomyces azureus*, observando diferenças na produção de metabólitos por esses micro-organismos (CHEN et al., 2000). O cultivo do fungo HB18a na presença de DMSO não gerou picos diferentes comparados com o controle do fungo cultivado sozinho, na concentração de DMSO 2%. Assim como no cultivo do fungo HB19a, nem todas as duplicatas se mostraram iguais, diminuindo a precisão do experimento, onde picos com intensidade razoável apareceram somente em uma amostra da duplicata. Assim, seria interessante fazer novos cultivos com DMSO num tempo de incubação maior que T18, em triplicata, para ter certeza que há formação de substâncias novas eliciadas por DMSO 2%. A concentração de DMSO poderia ser modificada para 3% em estudos posteriores para observar se ocorre maior estresse do fungo HB18a e formação de novas substâncias.

6. CONCLUSÃO

Foi sugerido que o EBF não atua como substância eliciadora de metabólitos secundários durante o cultivo dos dois fungos, nos tempos de cultivo analisados. Contudo, na presença do EBF o fungo HB18a teve um crescimento da biomassa considerável. Durante o cultivo do fungo HB18a na presença de DMSO 2% não foram observadas diferenças significativas. Já o cultivo do fungo HB19a na presença do DMSO 2% gerou picos diferentes em comparação ao cultivo do fungo sem DMSO, propondo assim que o DMSO possa atuar como uma substância eliciadora, nos tempos de cultivo analisados. A condição analítica via CLAE-DAD utilizada foi satisfatória para a análise qualitativa das amostras, assim como as concentrações de 0,3% do EBF e 2% de DMSO.

7. REFERÊNCIAS

ABDELMOHSEN, U. R., GRKOVIC, T., BALASUBRAMANIAN, S., KAMEL, M. S., QUINN, R. J., HENTSCHEL, U. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotchnology Advances* 33 (2015) 798-811.

ANGELL, S., BENCH, B. J., WILLIAMS, H., WATANABLE, C. M. H. Pyocyanin isolated from a marine microbial population: synergistic production between two distinct bacterial species and mode of action. *Chemistry & Biology* 13, 1349-1359, 2006.

ASAI, T., CHUNG, Y. M., SAKURAI, H., OZEKI, T., CHANG, F. R., YAMASHITA, K., OSHIMA, Y. Tenuipyronone, a novel skeletal polyketide from the entomopathogenic fungus, *Isaria tenuipes*, cultivated in the presence of epigenetic modifiers. *Organic Letters* 14, 513-515, 2012.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Goiás, CEP 74001-970, Goiânia, GO, 1999.

BONALDO, S. M. Controle alternativo de doenças de plantas por indutores de resistência em plantas. *Summa Phytopathologica*, v.39, Fevereiro, 2013.

BORGES, W. S. Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

BORGES, J. C. M. Acetilbergenina: Obtenção e Avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória. Dissertação, 2010. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

CAMPOS, F. F. Isolamento e identificação de substâncias bioativas produzidas por fungos endofíticos associados a *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

CUETO, M., JENSEN, P. R., KAUFFMAN, C., FENICAL, W., LOBKOVSKY, E., CLARDY, J. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. *J Nat Prod* 64: 1444-1446, 2001.

CHAGAS, F. O. Cultura mista, manipulação química e genética de micro-organismos: Estratégias para a diversificação do metabolismo secundário. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2014.

CHAPLA, V. M., BIASSETTO, C. R., ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma fonte inexplorada e sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. *Rev. Virtual Quim.*, 5 (3), 421-437, 2013.

CHEN, G. WANG, G. Y. S., LI, X., WATERS, B., DAVIES, J. Enhanced production of microbial metabolites in the presence of dimethyl sulfoxide. *J. Antibiot* 53: 1145-1153, 2000.

DOULL, J. L., SINGH, A. K., HOARE, M., AYER, S. W. Conditions for production of jadomycin B by *Streptomyces venezuelae* ISP5230: effects of heat shock, ethanol treatment and phage infection. *J Ind Microbiol* 13: 120-125, 1994.

ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação de Biodiversidade: Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/parnajurubatiba/>; acessado em 21 de Junho de 2016.

KUROSAWA, K., GHIVIRIGA, I., SAMBANDAN, T. G., LESSARD, P. A., BARBARA, J. E., RHA, C., SINSKEY, A. J. Rhodostreptomycins, antibiotics biosynthesized following horizontal gene transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians*. *Journal of the American Chemical Society* 130, 1126-1127, 2008.

LEMOS, S. D. C. Avaliação de eliciadores do metabolismo dos fenilpropanóides em *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae). Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LUZ, J. L., MANGOLIN, R., ESBÉRARD, C. E. L., BERGALLO, H. G. Morcegos (Chiroptera) capturados em lagoas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Biota Neotrop.* Vol. 11, No (4), 2011.

MIRANDA, A. R. L., ROCHA, A. E. R. Estudo Fitossociológico de *Humiria balsamifera* (Aubl.) A. St. Hill, em Área de Pasto Apícula em Floresta Ombrófila para Determinação de seus usos na Agricultura Familiar. VI Congresso Brasileiro de Agroecologia. Nov, 2009.

MONTANARI, C. A., BOLZANI, V. S. Planejamento Racional de Fármacos baseado em Produtos Naturais. *Quim. Nova*, Vol. 24, No. 1, 105-111, 2001.

MONTEZUNA, R. C. M., ARAUJO, D. S. D. Estrutura da Vegetação de uma Restinga Arbustiva Inundável no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro.

Pesquisas, Botânica Nº 58: 157-176 São Leopoldo: Instituto Anchieta de Pesquisas, 2007.

MAZARO, S. M. Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores. 2007. 105p. Dissertação (Pós-graduação em Agronomia – área de concentração em Produção Vegetal) – Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2007.

MULLER, H. R., PRADO, K. B. Epigenética: Um novo campo da genética. RUBS, Curitiba, v. 1, n. 3, p. 61-69, set./dez. 2008.

OH, D. C., KAUFFMAN, C. A., JENSEN, P. R., FENICAL, W. Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in competing co-culture. *Journal of Natural Products* 70, 515-520, 2007.

PARANAGAMA, P. A., WIJERATNE, E. M. K., GUNATILAKA, A. A. L. Uncovering Biosynthetic Potencial of plant-associated Fungi: Effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*. *Journal of Natural Products*, 2007, Vol. 70, No 12.

PARK, H. B., KWON, H. C., LEE, C. H., YANG, H. O. Glionitrin A, an antibiotic-antitumor metabolite derived from competitive interaction between abandoned mine microbes. *Journal of Natural Products* 72, 248-252, 2009.

PETTIT, R. K. Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. *Microbial Biotechnology* 2011, 4(4), 471-478.

PIMENTEL, I. C., KUCZKOWSKI, F. R., CHIME, M. A., AUER, C. G., JUNIOR, A. G. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). *Floresta*, Curitiba, PR, v. 36, n. 1, jan./ab. 2006.

PINTO, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., LOPES, P. L., EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova*, Vol. 25, Supl, 1, 45-61, 2002.

PUPO, M. T., GALLO, M.B.C. *Biologia Química: Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais*. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 6, 1446-1455, 2007.

SANTANA, L. C. Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba um ecossistema único. Programa de Pós-Graduação da Universidade Candido Mendes, Niterói, 2005.

SANTOS, T. T., VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, jul./dez. 2011.

SILVA, M. R. O. Diversidade de fungos endofíticos de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn.: Produção, isolamento e identificação da substância com atividade antimicrobiana. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

SOUZA, A. Q. L., SOUZA, A. D. L., FILHO, S. A., PINHEIRO, M. L. B., 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* Benth. *Acta Amazonica*. Vol. 34 (2) 2004: 185-195.

TURIBIO, T. O. Verificação da produção de substâncias bioativas a partir de fungos endofíticos isolados da Soja *Glycine max L. Merrill* contra patógenos humanos e de vegetais. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Tocantins, Porto Nacional, 2011.

VAINER, A. G. Ordenamento territorial e conflitos no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. V Encontro Nacional da Anppas, 4 a 7 de outubro, Florianópolis, SC, Brasil, 2010.

VIEGAS, C.J., BOLZANI, V. S., BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. Quim. Nova, Vol. 19, No. 2, 326-337, 2006.

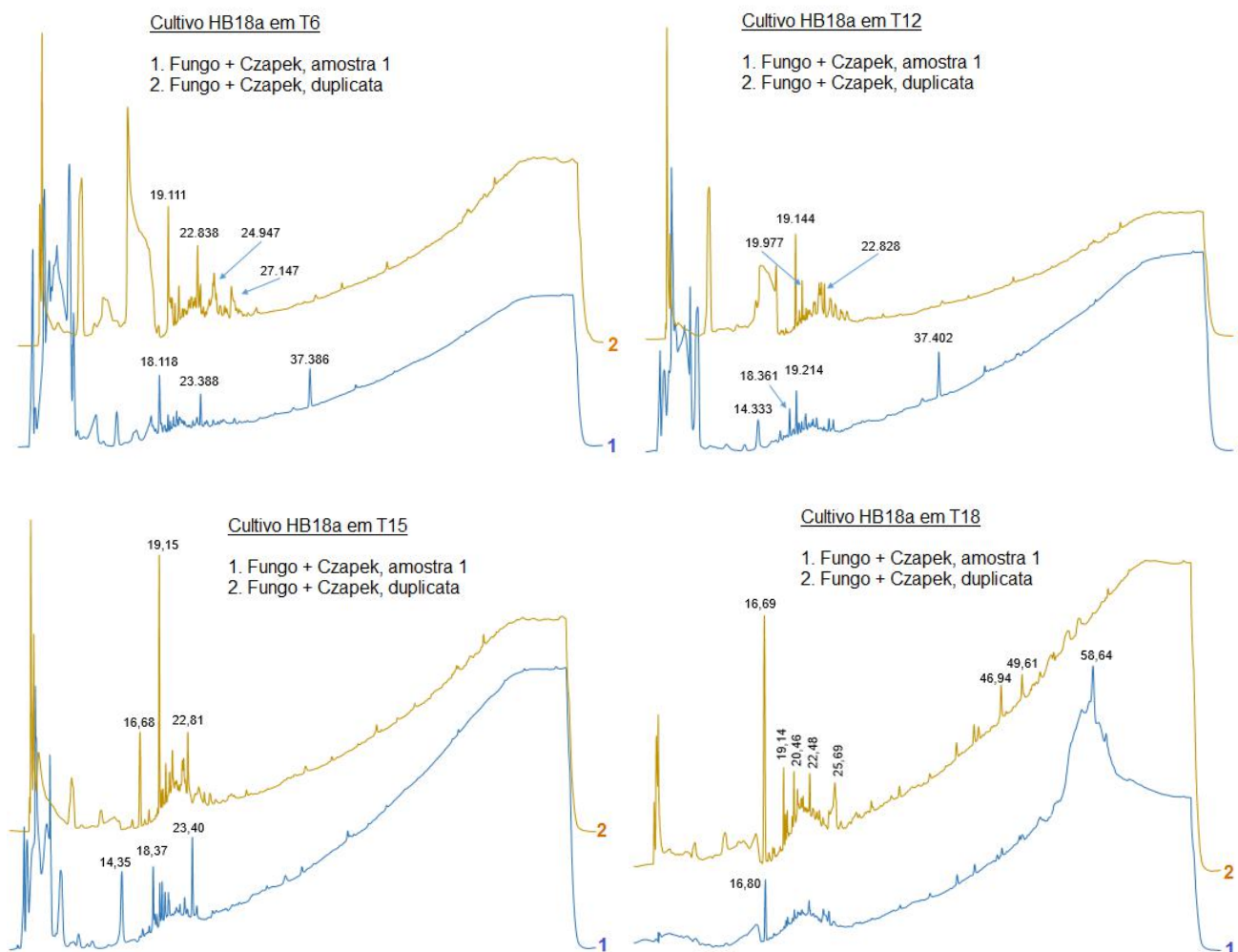
VIEIRA, G. R. T. Otimização das condições de cultivo de *Polyporus tricholoma* Mont. Visando a produção de substâncias antibacterianas. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

WANG, X., SENA FILHO, J. G., HOOVER, A. R., KING, J. B., ELLIS, T. K., POWELL, D. R., CICHEWICZ, R. H. Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum*. Journal of Natural Products 73, 942-948, 2010.

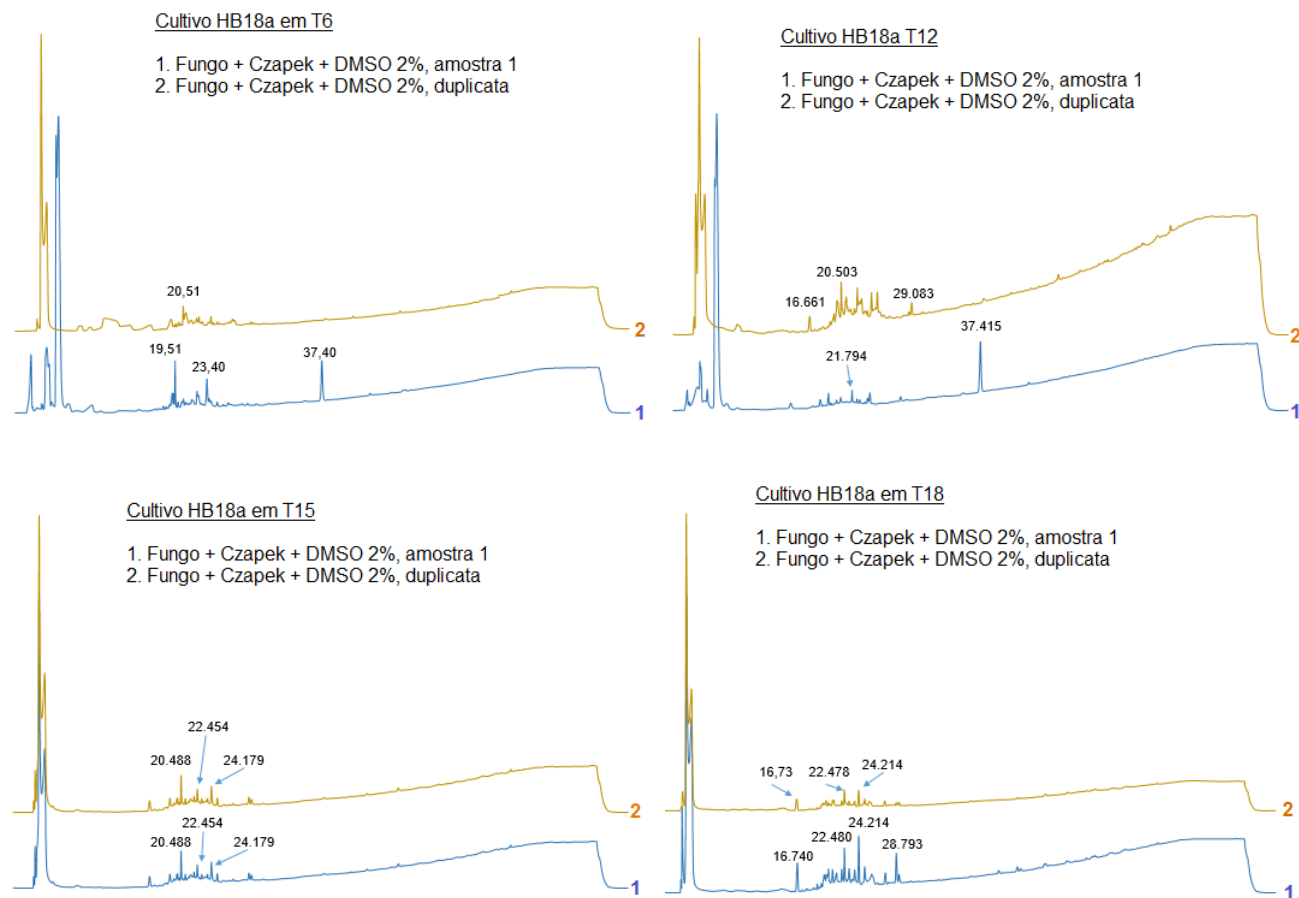
WILLIAMS, R. B., HENRIKSON, J. C., HOOVER, A. R., LEE, A. E., CICHEWICZ, R. H. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. Organic & Biomolecular Chemistry 6, 1895-1897, 2008.

ANEXO I

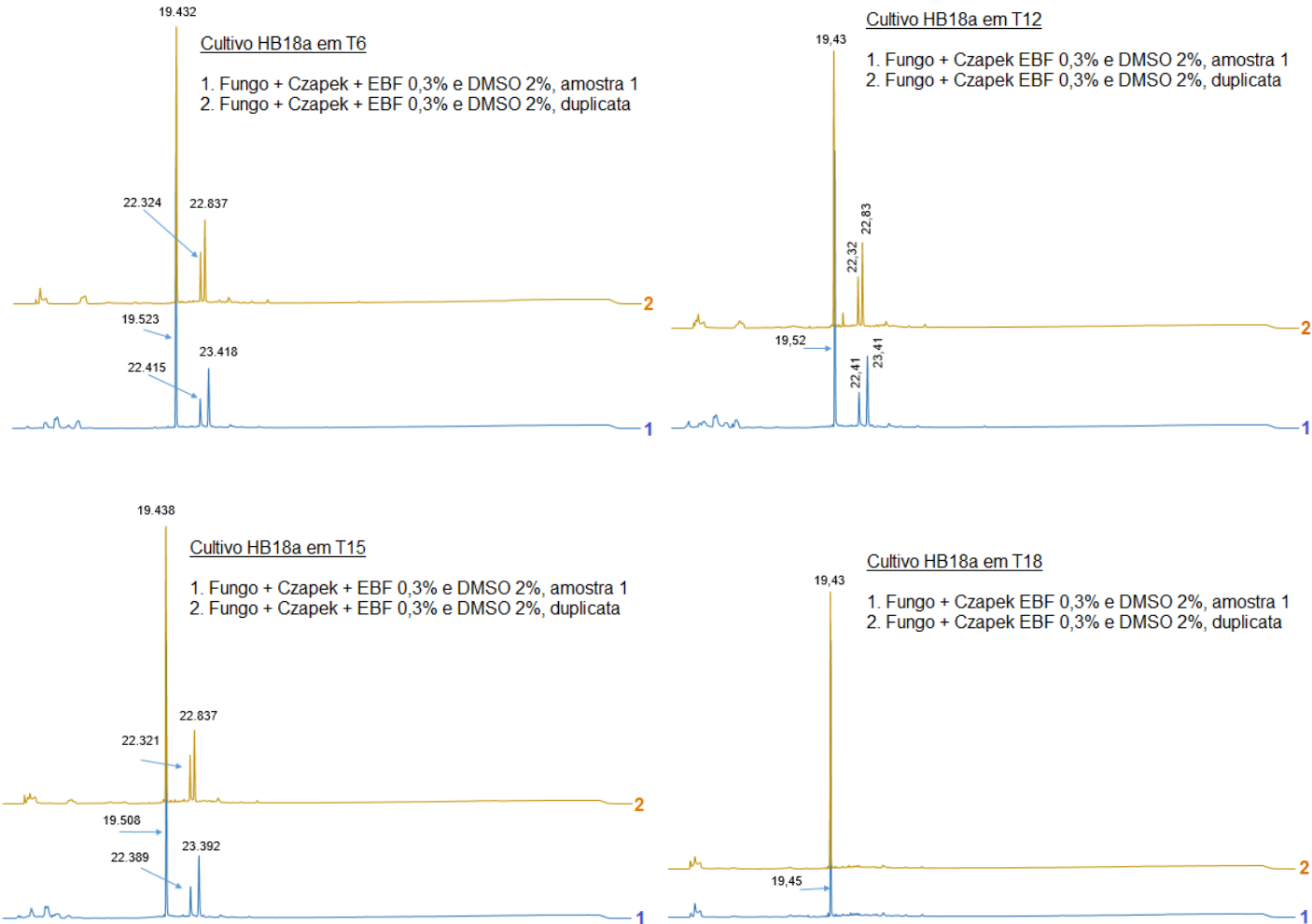
1. Cultivo Fungo HB18a isolado em T6, T12, T15 e T18, todos em 225 nm, duplicata.



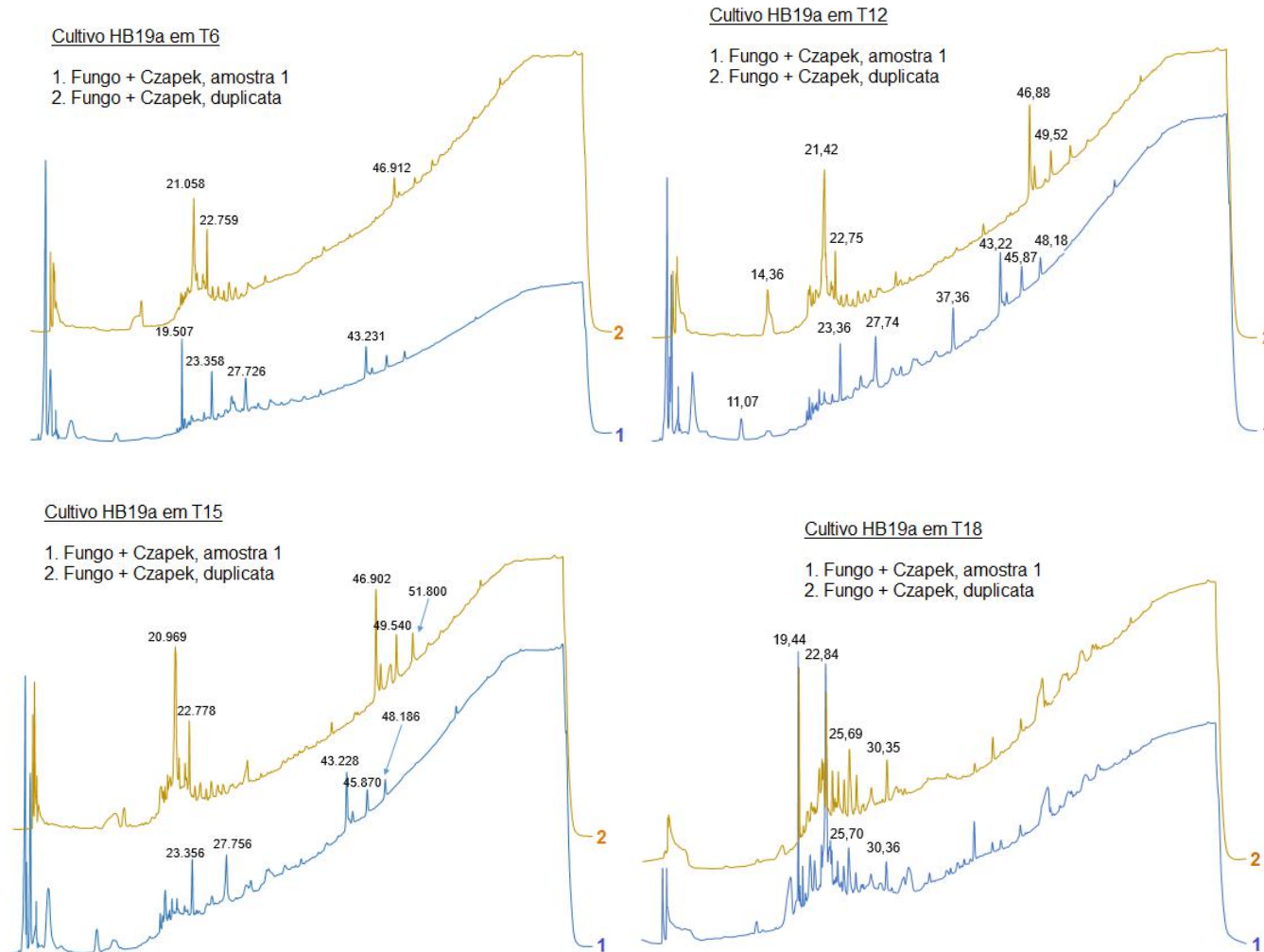
2. Cultivo fungo HB18a na presença de DMSO em T6, T12, T15 e T18, todos em 225 nm, duplicata.



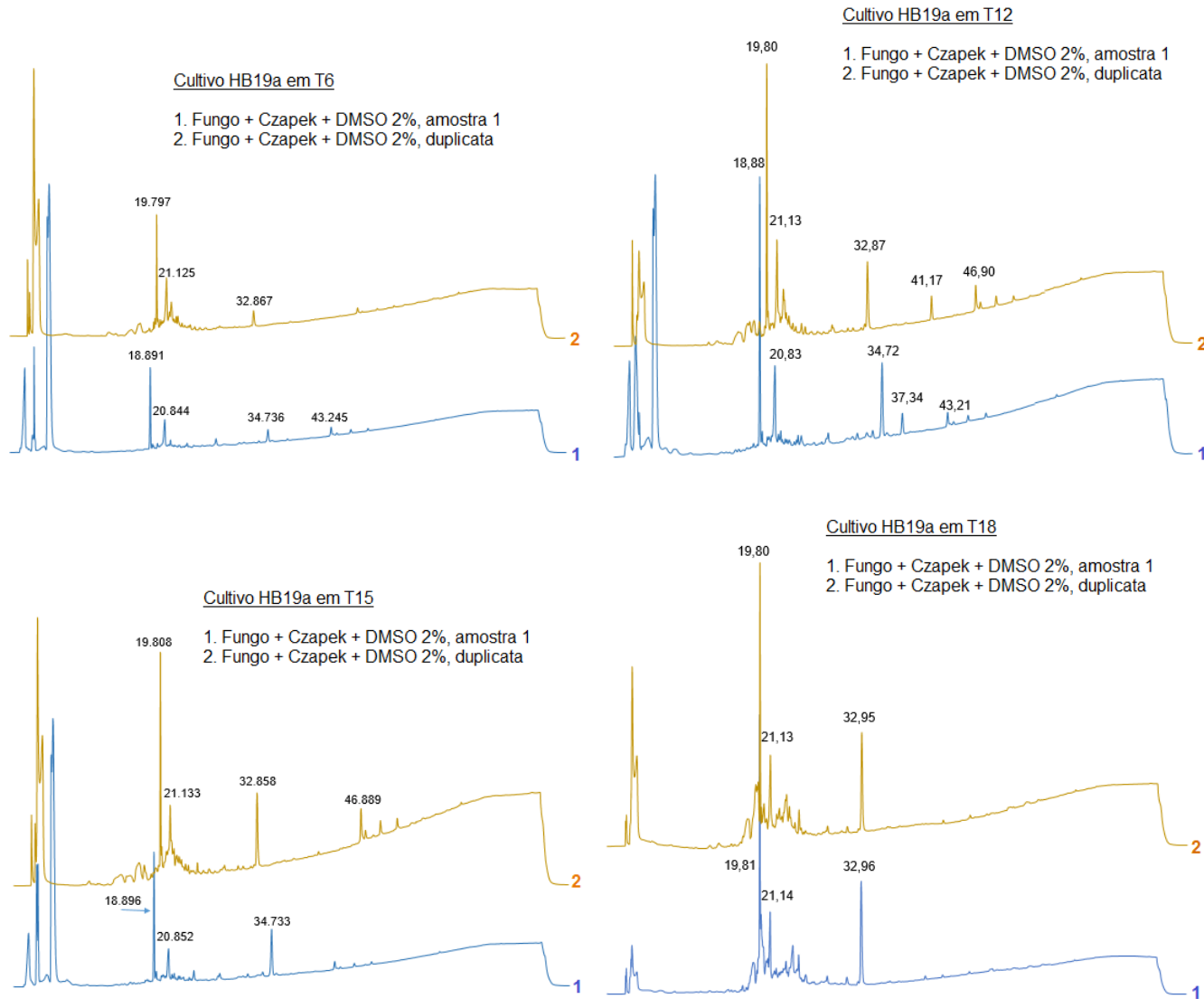
3. Cultivo fungo HB18a na presença de EBF+DMSO em T6, T12, T15 e T18, todos em 225 nm, duplicata.



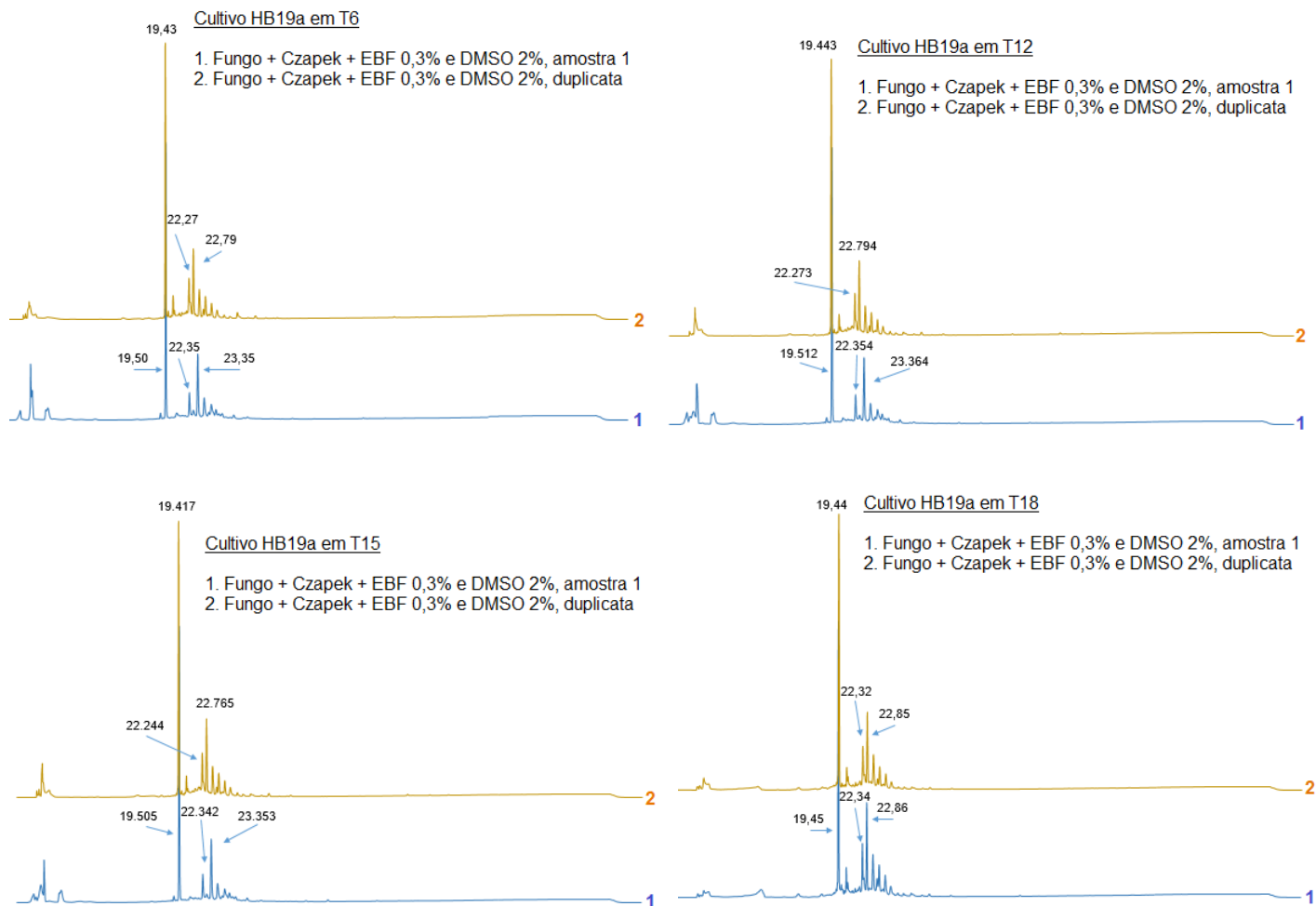
4. Cultivo Fungo HB19a isolado em T6, T12, T15 e T18, todos em 225 nm, duplicata.



5. Cultivo fungo HB19a na presença de DMSO em T6, T12, T15 e T18, todos em 225 nm, duplicata.



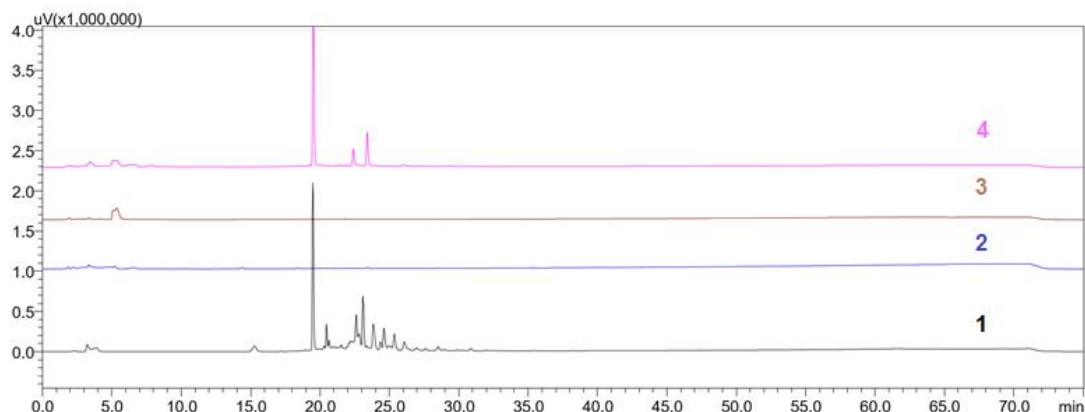
6. Cultivo fungo HB19a na presença de EBF+DMSO em T6, T12, T15 e T18, todos em 225 nm, duplicata.



ANEXO II

1. Cromatogramas das frações AcOEt do cultivo do fungo HB18a no tempo de incubação T15, em 225 nm, utilizando o LC SOLUTION para fazer a sobreposição dos cromatogramas.

Cultivo do HB18a no tempo de incubação T15 onde: controle EBF+DMSO (1), fungo HB18a + Czapek (2), fungo HB18a + DMSO 2% (3) e fungo HB18a + EBF 0,3% e DMSO 2% (4).



2. Cromatogramas das frações AcOEt do cultivo do fungo HB19a no tempo de incubação T15, em 225 nm, utilizando o LC SOLUTION para fazer a sobreposição dos cromatogramas.

Cultivo do HB19a no tempo de incubação T15 onde: controle EBF+DMSO (1), fungo HB19a + Czapek (2), fungo HB19a + DMSO 2% (3) e fungo HB19a + EBF 0,3% e DMSO 2% (4).

