

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E
ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DE MOLÉCULAS
BIOATIVAS NO FUNGO ECTOMICORRÍZICO
Scleroderma UFSMSc1(Persoon)Fries**

TESE DE DOUTORADO

Liziane Maria Barassuol Morandini

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

I

**ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E
ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DE MOLÉCULAS
BIOATIVAS NO FUNGO ECTOMICORRÍZICO
*Scleroderma UFSMSc1(Persoon)Fries.***

Liziane Maria Barassuol Morandini

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração Química Orgânica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Química.**

Orientador: Prof. Dr. Ademir Farias Morel

Santa Maria, RS – Brasil.

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Morandini, Liziane Maria Barassuol
Isolamento, determinação estrutural e atividade
microbiológica de moléculas bioativas no fungo
ectomicorrízico Scleroderma UFSMSc1 (Persoon) Fries /
Liziane Maria Barassuol Morandini.-2013.
189 p.; 30cm

Orientador: Ademir Farias Morel
Coorientadora: Ionara Irion Dalcol
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2013

1. Isolamento 2. Molécula Bioativas 3. Scleroderma
UFSMSc1 4. Determinação Estrutural 5. Atividades
Microbiológicas I. Morel, Ademir Farias II. Dalcol,
Ionara Irion III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado**

**ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE
MICROBIOLÓGICA DE MOLÉCULAS BIOATIVAS NO FUNGO
ECTOMICORRÍZICO *SCLERODERMA UFSMSc1***

elaborada por
Liziane Maria Barassuol Morandini

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Ademir Farias Morel, Dr.
(Presidente/Orientador) – UFSM

Moacir Geraldo Pizzolatti, Dr. – UFSC

Marco Aurélio Mostardeiro, Dr. – UFS

Zaida Inês Antonioli, Dr^a. – UFSM

Eduardo Miranda Ethur, Dr. – UNIVATES

Santa Maria, 26 de agosto, 2013.

Ao meu marido Raul e a meu
filho Guilherme pela paciência,
amor, apoio e incentivo dedicados
durante esta etapa
importante da minha vida.

A meus pais Celso e Iracy,
porto seguro em
minha vida.

Ao prof. Dr. Ademir Farias Morel
e a Prof. Dr^a Zaida Inês Antonioli,
meu sincero agradecimento por
acreditarem nesta pesquisa, pela
orientação, paciência, estímulo,
amizade e principalmente por
terem me ensinado muito
no decorrer deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores, Dr. Eduardo Miranda Ethur – UNIVATES, Dr. Marco Aurélio Mostardeiro – UFS e Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti – UFSC, pelo auxílio para a melhoria deste trabalho como membros da banca examinadora.

A Professora Dr^a Ionara Irion Dalcol, minha co-orientadora, um agradecimento especial pelo apoio durante o decorrer de todo o trabalho.

A colega e amiga Denise Russowski pelos conselhos, amizade e apoio no decorrer desta etapa.

Ao funcionário Ubiratan Flores da Silva pelas análises realizadas.

A colega Tanize Fernandes pelos conselhos, pelas trocas de ideias pela divisão dos momentos de angústia e pelos momentos de descontração.

Ao colega Marcelo Pedroso pela realização das análises de RMN e pelos ensinamentos relacionados ao assunto.

A amiga Josiane Moraes dos Santos pelo carinho, amizade, ensinamentos, conselhos e por estar sempre disposta a me ajudar durante este período.

Aos colegas Janice, Patrícia, Gabriele, Alexandre, Carolina, Luciana e Vinicius com os quais dividi o mate, os materiais, as risadas, enfim, pelo companheirismo demonstrado durante a realização deste trabalho.

Aos alunos da Iniciação Científica, Mateus, Alessandra, Pamela e Adriana pelos momentos compartilhados.

Aos Programas de Pós-Graduação em Química e em Ciência do Solo da UFSM que proporcionaram infraestrutura para que eu pudesse realizar este trabalho.

Aos funcionários da Pós-Graduação em Química, Ademir e Valéria, que colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos demais colegas de laboratório que já não estão mais no nosso convívio diário e a todos que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.

Precisamos dar um sentido humano às nossas construções. E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os Lírios do campo e as aves do céu.

(Erico Verissimo)

RESUMO

Scleroderma UFSMSc1 spp. (Persoon:Fries) é um fungo ectomicorrizico pertencente à ordem Boletales, subordem Sclerodermatinae, família *Sclerodermataceae*, Basidiomycete, conhecido como Gasteromycete, bastante comum em solos gaúchos. Este fungo demonstrou ser portador de moléculas bioativas tais como triterpenos do tipo lanostano que formam um relevante grupo de triterpenóides tetracíclicos derivados do lanosterol, os quais possuem importantes propriedades biológicas e farmacológicas com potencial atividade como anticancerígeno, anti-inflamatório, antiviral e antimicrobiano. Através de um estudo biodirigido foi identificada atividade antimicrobiana, apresentando tanto atividade antibacteriana como antifúngica, merecendo desta forma um estudo mais aprofundado, objetivando identificar novas moléculas e suas atividades biológicas. De exemplares de *Scleroderma UFSMSc1* spp. (Persoon:Fries) provenientes do banco de fungos do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria e subculturados a cada 45 dias, foram isoladas moléculas das quais foram estudados o perfil cromatográfico, por cromatografia em coluna e CCD; a identificação e confirmação estrutural dos compostos, por análise de difração de raios X, RMN, índice de rotação, ponto de fusão e suas atividades microbiológicas, detectadas pelas técnicas de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) para verificação de atividade bactericida e fungicida. Foram obtidas 10 frações: Hexano-AcOEt (80:20), Hexano-AcOEt (80:20), Hexano-AcOEt (60:40), Hexano-AcOEt (50:50), Hexano-AcOEt (40:60), Hexano-AcOEt (30:70), Hexano-AcOEt (10:90), AcOEt-MeOH (80:20), AcOEt-MeOH (60:40), AcOEt-MeOH (50:50), MeOH (100%) e na fração dois foram isolados os compostos SC5, SC8, SC7, do tipo lanosteno triterpeno. O composto SC5 identificado como 3,10(S),5,13,14,17,20(R)-25-metoxilanosta-8-23-dien-3-ol apresentou atividade antifúngica acentuada. O composto SC7 já havia sido isolado, porém ao submetê-lo a ebulição em acetona formou o artefato SC7-1 inédito na literatura e que apresentou atividade antifúngica, porém não relevante. Além destes compostos foram isolados os açúcares manitol e trealose α -D-Galactopiranosídeo, α -D-glucopiranosil. A molécula da classe dos triterpenos SC5 é totalmente inédita quando obtida através do isolamento em produtos naturais, tornando este fungo presente no Bioma Pampa, uma fonte promissora para obtenção de fármacos.

ABSTRACT

Scleroderma UFSMSc1 spp. (Persoon:Fries) is an ectomycorrhizal fungus of the Boletales order, Sclerodermatinae suborder and of the *Sclerodermataceae* family, Basidiomycete, known as Gasteromycete, very common in Rio Grande do Sul soils. This fungus showed to be carrier of bioactive molecules like triterpenes of the lanostane type, that form a relevant group of tetracyclic triterpenoids derived from lanosterol, which have important biological and pharmacological properties, with potential activity as anticarcinogenic, anti-inflammatory, antiviral and antimicrobial. Through a bio directed study, an antimicrobial activity was identified, having both antibacterial and antifungal activity, deserving a detailed study, aiming in identifying new molecules and their biological activities. From *Scleroderma UFSMSc1* spp.(Persoon:Fries) specimens coming from the fungi bank of the Soil Department of the Federal University of Santa Maria, and subcultured every 45 days, molecules were isolated, of which was studied the chromatographic profile, by column chromatography and TLC; the structural identification and confirmation of the compounds, by analysis of diffraction of X-Rays, NMR, rotation index, fusion points and their microbiological activities, detected by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Lethal Concentration (MLC) techniques to verify the bactericide and fungicide activity. 10 fractions were obtained: Hexane-EtOAc (80:20), Hexane-EtOAc (80:20), Hexane-EtOAc (60:40), Hexane-EtOAc (50:50), Hexane-EtOAc (40:60), Hexane-EtOAc (30:70), Hexane-EtOAc (10:90), EtOAc-MeOH (80:20), EtOAc-MeOH (60:40), EtOAc-MeOH (50:50), MeOH (100%) and the compounds SC5, SC8 and SC7 of the lanostene triterpene type, present in the fraction 1, were isolated. The compound SC5, identified as 3,10(S),5,13,14,17,20(R)-25-metoylanosta-8-23-dien-3-ol presented pronounced antifungal activity. The compound SC7 had already been isolated, but when it was submitted to ebullition in acetone, it formed the compound SC7-1, unseen before in the literature, which presented an antifungal, but non-relevant, activity. Beside these compounds, the sugars mannitol and trehalose α -D-Galactopyranoside, α -D-glucopyranosyl were isolated. The molecule of the class of triterpene SC5 is completely unpublished when obtained from the isolation in natural products, making this fungus present in the Pampa biome, a promising source for obtaining drugs.

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE TABELAS	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XX
LISTA DE ANEXOS E APÊNDICES	XXIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. <i>Scleroderma spp</i> – Aspectos Biológicos, Sistemáticos e Taxonômicos.....	5
3.2. Fungos Micorrízicos - Micorrizas.....	10
3.3. Fungos Ectomicorrízicos – Ectomicorrizas.....	16
3.4. Metabólitos Secundários	27
3.4.1. Compostos Fenólicos	36
3.4.2. Alcalóides	38
3.4.3. Terpenos e Esteróis	41
3.5. Metabólitos Secundários em Basidiomicetos.....	49
3.5.1. Biossíntese de triterpenos.....	58
3.6. Metabólitos Secundários de <i>Scleroderma sp</i>	61
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
4.1. Obtenção e manutenção do isolado do fungo ectomicorrízico	64
4.2. Teste da ação antimicrobiana da ectomicorriza <i>Scleroderma UFSMSc1 in vivo</i>	65
4.2.1. Cultivo do fungo <i>Scleroderma UFSMSc1</i> (Persoon)	66
4.2.2. Determinação da atividade microbiana “ <i>in vitro</i> ”	67
4.2.3. Técnica M27-A2121 (CLSI) de microdiluição em caldo para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) frente à fungos ¹⁷²	68
4.2.4. Técnica M7-A5 (CLSI)120 de microdiluição em caldo para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos isolados frente a bactérias patogênicas ¹⁷¹	69
4.2.5. Preparação dos compostos isolados para a avaliação da atividade antimicrobiana	70
4.3. Espectrometria de ressonância magnética nuclear de ¹ H e ¹³ C	72
4.4. Espectrometria de massa (GC-EM).....	73
4.5. Espectrometria de massa de Alta Resolução (EMAR)	73

4.6. Cromatografia gasosa (CG).....	74
4.7. Determinação do ponto de fusão	74
4.8. Determinação do índice de rotação ótica	74
4.9. Difração de Raio-X	75
4.10. Cromatografia	75
4.10.1. Cromatografia em Coluna.....	75
4.10.2. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	75
4.11. Metabólitos Isolados e Identificados do Scleroderma UFSMSc1	76
4.11.1. Triterpeno 3,10(S),5,13,14,17,20(R)-25-metoxilano-8-23-dienol (SC5).....	76
4.11.2. Identificação do composto 25-metoxipropanolano-8,24-dienol (SC8).....	77
4.11.3. Identificação do composto lanosta-8,24-dien-3,25-diol (SC7).....	77
4.11.4. Identificação do composto lanosta-8,23,25-trien-3-ol (SC7-1)	78
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	80
5.1. Ensaio biodirigido antifúngico e antimicrobiano.....	80
5.1.1. Ensaio biodirigido antifúngico utilizando-se <i>Candida albicans</i> ATCC10231	80
5.1.2. Ensaio biodirigido antibacteriano com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27893... ..	82
5.1. Extração, fracionamento, cromatografia.	84
5.2. Identificação do metabólito SC5.....	86
5.3. Identificação do metabólito SC8.....	103
5.4. Identificação do metabólito SC7.....	111
5.5. Identificação do composto SC7-1	123
5.6. Identificação do metabólito Manitol.....	131
5.7. Identificação do metabólito trealose:	135
5.8. Apresentação e discussão dos resultados biológicos	141
6. CONCLUSÃO	146
7. BIBLIOGRAFIA.....	147
8. ANEXOS	159
8.1 Meios de cultura utilizados:	159
8.1.1. Meio Melin-Norkans Modificado – MNM.....	159
8.1.2. Meio Agar Müller-Hinton: meio utilizado para o repique de bactérias	160
8.1.3. Meio Caldo Müller-Hinton.....	160
8.1.4. Meio Agar Sabouraud.....	161
8.1.5. Meio Caldo Sabouraud.....	161
8.1.6. Solução salina 0,85 %	162

8.2. Solventes e reagentes purificados.....	162
8.3. Espectrometria de massa de alta resolução	163

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Taxonomia dos Fungos	6
Figura 2-	Exemplos de fungos do gênero <i>Scleroderma</i>	8
Figura 3-	A associação de plantas com outros tipos de (micro) organismos pode acelerar o processo de fitorremediação de solos contaminados com metais, aumentando mobilização/ imobilização do metal.	22
Figura 4-	Exemplos de alcalóides.	39
Figura 5-	Compartimentalização da Rota dos Isoprenóides	42
Figura 6-	Rota citosólica – Via do mevalonato (MVA)	43
Figura 7-	Via plastídica – metileritritol 4-fosfato (MEP)	44
Figura 8 -	Descrição da via biossintética isoprenóide em plantas com respeito aos tipos de produtos finais e a sua importância fisiológica.	46
Figura 9-	Alguns terpenos importantes	47
Figura 10-	Estruturas químicas de alguns diterpenóides	56
Figura 11-	Estruturas químicas de alguns triterpenóides encontrados em basidiomicetos	57
Figura 12-	Biossíntese do esqualeno.	59
Figura 13-	Biossíntese do farnesil pirofosfato	59
Figura 14-	Biossíntese do lanosterol	60
Figura 15-	Estruturas químicas dos principais constituintes do fungo <i>Scleroderma citrinum</i> (Pers.)	62
Figura 16-	Estruturas químicas dos principais constituintes do fungo <i>Scleroderma aurantium</i> (Pers.)	63
Figura 17-	Isolados de <i>Scleroderma UFSMSc1</i> (Pers.) mantidos em meio de cultura MNM- Modificado sólido.	65
Figura 18-	Ação antifúngica do <i>Scleroderma Sc 133</i> e <i>Scleroderma Sc 119</i>	80
Figura 19-	Ação antifúngica do <i>Scleroderma sp. Sc 60</i> .	81

Figura 20-	Ação antifúngica do <i>Scleroderma</i> Sc 129 e <i>Scleroderma UFSM Sc1</i>	81
Figura 21-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27893 em meio MNM.	82
Figura 22-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27893 em meio ágar Müller-Hinton.	82
Figura 23-	Ação da ectomicorriza <i>Scleroderma UFSMSc1</i> sobre a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27893.	83
Figura 24-	Perfil cromatográfico da fração de Materiais Graxos	86
Figura 25-	Estrutura proposta para o 3,10(S),5,13,14,17,20(R)-25-metoxilano-8-23-dieno-3-ol (SC5)	87
Figura 26-	Espectro RMN de ^1H do metabólito (SC5) em CDCl_3 a 400 MHz	88
Figura 27-	Espectro RMN de ^1H do metabólito (SC5) em CDCl_3 a 400 MHz com expansão mostrando os hidrogênios dos grupamentos metila	89
Figura 28-	Espectro RMN de ^1H do metabólito (SC5) em CDCl_3 a 400 MHz com expansão mostrando o grupamento O-Me, os hidrogênios olefínicos H-23 e H-24 e ainda o H-3	89
Figura 29-	Espectro RMN do ^{13}C do metabólito SC5 em CDCl_3 a 100 MHz	90
Figura 30-	Expansão do espectro de RMN do ^{13}C do metabólito SC5 em CDCl_3 a 100 MHz, mostrando os carbonos olefínicos.	90
Figura 31-	Espectro de RMN de Dept 135° do metabólito SC5, em CDCl_3 , a 100 MHz	92
Figura 32-	Expansão do espectro de RMN de Dept 135° do metabólito SC5 em CDCl_3 , a 100 MHz	93
Figura 33-	Expansão do espectro de RMN de Dept 135° do metabólito SC5 em CDCl_3 , a 100 MHz.	93
Figura 34-	Expansão do espectro de RMN do ^{13}C do metabólito SC5 em CDCl_3 a 100 MHz.	94
Figura 35-	Expansão do espectro de RMN do ^{13}C do metabólito SC5 em CDCl_3 a 100 MHz	94
Figura 36-	Espectro de RMN 2D Cosy H-H do metabólito SC5 em CDCl_3 , a 100 MHz	95

Figura 37-	Expansão do espectro de RMN 2D Cosy H-H do metabólito SC5 em CDCl ₃ , a 100 MHz.	96
Figura 38-	Expansão do espectro de RMN 2D Cosy H-H do metabólito SC5 em CDCl ₃ , a 100 MHz.	96
Figura 39-	Correlações observadas no espectro HMBC	97
Figura 40-	Espectro de RMN HMBC do metabólito SC5 em CDCl ₃ , a 100 MHz	98
Figura 41-	Espectro de RMN HMQC do metabólito SC5 mostrando as correlações dos carbonos olefínicos, dos carbonos ligados a metoxila e a hidroxila em CDCl ₃ , a 100 MHz	99
Figura 42-	Espectro de RMN HMQC mostrando as demais correlações hidrogênios/carbono do metabólito SC5 em CDCl ₃ , a 100 MHz.	100
Figura 43-	Estrutura obtida através da difração de Raios-X do composto 60 com a estereoquímica relativa	102
Figura 44-	Espectrometria de massas de alta resolução do composto SC5	103
Figura 45-	Estrutura química e numeração proposta para o composto isolado (SC8)	104
Figura 46-	Espectro RMN de ¹ H do metabólito (SC8) em CDCl ₃ a 400 MHz	105
Figura 47-	Expansão do espectro RMN de ¹ H do metabólito (SC8) em CDCl ₃ a 400 MHz	105
Figura 48-	Expansão do espectro RMN de ¹ H do metabólito (SC8) em CDCl ₃ a 400 MHz, demonstrando as metilas do composto	106
Figura 49-	Espectro RMN de ¹³ C do metabólito SC8 em CDCl ₃ a 100 MHz	107
Figura 50-	Espectro de RMN de Dept 135° do metabólito SC8, em CDCl ₃ , a 100 MHz	108
Figura 51-	Espectro RMN de ¹³ C do metabólito SC8 em CDCl ₃ a 100 MHz com atribuição dos carbonos do composto SC8	109
Figura 52-	Espectrometria de massas de alta resolução do composto SC8	111

Figura 53-	Estrutura proposta para o composto SC7	112
Figura 54-	Espectro RMN de ^1H do metabólito (SC7) em DMSO a 400 MHz	113
Figura 55-	Expansão do espectro RMN de ^1H do metabólito (SC7) em DMSO a 400 MHz.	114
Figura 56-	Expansão do espectro RMN de ^1H do metabólito (SC7) em DMSO a 400 MHz	114
Figura 57-	Espectro RMN de ^1H do metabólito (SC7) em DMSO a 400 MHz com expansão mostrando os dois hidrogênios olefínicos	115
Figura 58-	Espectro RMN de ^1H do metabólito (SC7) em DMSO a 400 MHz com expansão mostrando os hidrogênios dos grupamentos metila	116
Figura 59-	Espectro RMN de ^{13}C do metabólito SC7 em DMSO a 100 MHz	117
Figura 60-	Espectro de RMN de Dept 135° do metabólito SC7, em DMSO, a 100 MHz	118
Figura 61-	Expansão do espectro de RMN de Dept 135° do metabólito SC7, em DMSO, a 100 MHz	118
Figura 62-	Expansão do espectro de RMN do ^{13}C do metabólito SC7 em DMSO a 100 MHz	119
Figura 63-	Espectro de RMN HMQC do metabólito SC7 em DMSO, a 100 MHz	120
Figura 64-	Expansão do espectro de RMN HMQC do metabólito SC7 em DMSO, a 100 MHz	121
Figura 65-	Estrutura proposta para a estrutura SC7-1	123
Figura 66-	Mecanismo proposto para a formação da ligação dupla terminal.	124
Figura 67-	Espectro RMN de ^1H da substância SC7-1 em CDCl_3 a 400 MHz	125
Figura 68-	Espectro RMN de ^1H da substância SC7-1 em CDCl_3 a 400 MHz com expansão mostrando os hidrogênios olefínico e o hidrogênio ligado ao C-3	126
Figura 69-	Espectro RMN de ^1H da substância SC7-1 em CDCl_3 a	127

400 MHz com expansão mostrando os grupamentos metila

- Figura 70-** Espectro de RMN de Dept 135° da substância SC7-1, em CDCl₃, a 100 MHz **127**
- Figura 71-** Espectro de RMN de Dept 135° da substância SC7-1, mostrando os carbonos metilênicos em CDCl₃, a 100 MHz **128**
- Figura 72-** Espectro de RMN de ¹³C da substância SC7-1, em CDCl₃, a 100 MHz **129**
- Figura 73-** Estrutura do manitol **131**
- Figura 74-** Espectro RMN de ¹H do metabólito (manitol) em DMSO a 400 MHz **132**
- Figura 75-** Expansão do espectro RMN de ¹H do metabólito (manitol) em DMSO a 400 MHz **133**
- Figura 76-** Espectro RMN de ¹³C do metabólito (manitol) em DMSO a 100 MHz **134**
- Figura 77-** Espectro de RMN de Dept 135° do metabólito (manitol), em DMSO, a 100 MHz **134**
- Figura 78-** Estrutura da trealose α-D-Galactopiranosideo, α-D-glucopiranosil **138**
- Figura 79-** Espectro do ¹³C retirado do Scifinder.cas.org. representativo da molécula de trealose α-D-Galactopiranosideo, α-D-glucopiranosil **138**
- Figura 80-** Espectro do ¹³C do composto trealose α-D-Galactopiranosideo, α-D-glucopiranosil em MeOH, a 100 MHz **139**
- Figura 81-** Espectro de RMN de Dept 135° do metabólito trealose α-D-Galactopiranosideo, α-D-glucopiranosil em MeOH, a 100 MHz **140**
- Figura 82-** Espectro de RMN 2D Cosy H-H do metabólito trealose em MeOH, a 100 MHz **140**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Famílias e gêneros com associações ectomicorrizas confirmadas	24
Tabela 2 -	Principais terpenóides encontrados nas plantas	42
Tabela 3 -	Alguns dos metabólitos secundários importantes produzidos por fungos	50
Tabela 4 -	Microrganismos indicadores	68
Tabela 5 -	Cromatografia em coluna do extrato bruto	84
Tabela 6 -	Resultados cromatográficos da fração de materiais graxos da ectomicorriza <i>Scleroderma UFSMSc1</i>	85
Tabela 7 -	Dados de RMN de ^{13}C obtidos pelo composto isolado SC5	100
Tabela 8 -	Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos SC5 e SC8	110
Tabela 9 -	Dados de RMN de ^{13}C obtidos pelo composto isolado (SC7)	122
Tabela 10 -	Comparação entre os deslocamentos ^{13}C das substâncias SC7 e SC7-1	130
Tabela 11 -	Dados de RMN ^1H para o composto manitol	133
Tabela 12 -	Dados de RMN ^{13}C para o composto manitol	135
Tabela 13 -	Exemplos de trealose e seus respectivos RMN	136
Tabela 14 -	Resultados de CIM e CLM antibacteriano para o extrato bruto e os metabólitos SC5, SC8	143
Tabela 15 -	Resultados de CIM e CLM antifúngico para o extrato bruto e os metabólitos SC5, SC8, SC7 e SC7-1	145

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	- Deslocamento Químico
J	- Constante de Acoplamento
μg	- Micrograma
ABA	- Ácido abscísico
AcOEt	- Acetato de etila
SIDA	- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Al	- Alumínio
ANVISA	- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	- American Type Culture Collection
ATP	- Adenosina Trifosfato
°C	- Graus Celsius
CC	- Cromatografia em Coluna
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
Cd	- Cádmiio
CHS	- Chalcona sintase
CH₂Cl₂	- Diclorometano
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CLM	- Concentração Letal Mínima
CLSI	- National Committee for Clinical Laboratory Standards
CO₂	- Gás carbônico
COSY	- Correlated Spectroscopy
Cu	- Cobre
d	- Dupleto
dd	- Duplo dupleto
DMAPP	- Dimetilalil pirofosfato
DMSO	- Dimetil sulfóxido
DxP	- Deoxixilulose-5-Fosfato
ECM	- Ectomicorrízico; ectomicorriza
EM	- Ectendomicorrizas
EMAR	- Espectrometria de Massa de Alta Resolução

EPSP	- 5-enolpiruvil-3-fosfochiquimato sintase
EPS	- Substâncias poliméricas extracelulares
Fig.	- Figura
Fosm	- Fosmidomicina
FPP	- Farnesil pirofosfato
Ga	- Gálio
CG	- Cromatografia Gasosa
GGPP	- Geranil-geranil Pirofosfato
GPP	- Geranil Pirofosfato
Hz	- Hertz
In	- Índio
IPP	- Isopentenil pirofosfato
m	- Multipleteo
MA(s)	- Micorriza(s) Arbuscular(es)
MEP	- Metil Eritriol Fosfato
mev	- Mevinolina
MeOH	- Metanol
mg	- Miligramas
MVA	- Mevalonato
n.	- Número
MNM	- Meio Melin-Norkans Modificado
NOESY	- Nuclear Overhouser Enhancement Spectroscopy
NPPN	- Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais
p.	- Página
PAL	- Fenilalanina amônio liase
Pb	- Chumbo
P.F.	- Ponto de fusão
PGPR	- Plant Growth Promoting Rhizobacteria - Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal
pH	- Potencial de hidrogênio
POPs	- Poluentes orgânicos persistentes
ppm	- Parte por Milhão

RMN	- Ressonância Nuclear Magnética
s	- Singleto
SNC	- Sistema nervoso central
sp.	- Espécie
spp.	- Espécies
t	- Tripleto
UFSC	- Universidade de Santa Catarina
UFSM	- Universidade Federal de Santa Maria
UV	- Ultravioleta
v.	- Volume
Zn	- Zinco

LISTA DE ANEXOS E APÊNDICES

Anexo 1 -	Meio Melin-Norkans Modificado – MNM	159
Anexo 2 -	Soluções estoque	159
Anexo 3 -	Solução Estoque de Micronutrientes (200 mL)	159
Anexo 4 -	Preparo do meio Melin-Norkans Modificado – MNM	160
Anexo 5 -	Meio Agar Müller-Hinton	160
Anexo 6 -	Meio Caldo Müller-Hinton	160
Anexo 7-	Meio Agar Sabouraud	161
Anexo 8 -	Meio Caldo Sabouraud	161
Anexo 9 -	Solução salina 0,85%	162
Anexo 10-	Solventes e reagentes purificados	162
Anexo 11-	Espectrometria de massa de alta resolução	163

1. INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da penicilina os microrganismos têm sido uma das principais fontes de novas substâncias utilizadas para o desenvolvimento de novos medicamentos para as mais variadas áreas da saúde humana e veterinária além de servirem como agroquímicos. A busca por novos medicamentos para combate a SIDA, câncer e microrganismos resistentes aos antibióticos em uso leva a novos caminhos para estas descobertas, com isso os fungos endofíticos e micorrízicos podem ser uma alternativa no combate a estas doenças.

As ectomicorrizas são associações entre fungos que habitam naturalmente o solo do Bioma Pampa e as raízes de plantas lenhosas. Geralmente, estas associações ocorrem com fungos basideomicetos, onde as hifas fúngicas formam uma bainha ao redor da raiz da planta sem penetrarem na mesma¹ e apresentam uma série de metabólitos secundários destacando-se alcalóides, quinolinas, indol, pirrolidinas, cumarinas, triterpenos, etc.². Estudos realizados por Gill (2003)³ e por Zhou e Liu (2012)⁴ indicam que os pigmentos destes fungos se apresentam sob forma de diferentes substâncias bioativas, participando de várias rotas biogénicas. Estes mesmos autores revelaram que as micorrizas também apresentam metabólitos incolores importantes.

As ectomicorrizas da família *Sclerodermataceae* estudadas até o momento apresentam um grupo relevante de triterpenóides tetracíclicos derivados do lanosterol⁵ que estão sendo testados como anticancerígenos^{6,7}, antimicrobianos^{8,9}, anti-inflamatórios¹⁰ e como antivirais¹¹.

¹ MADIGAN, M.T. et. al. - **Microbiologia de Brock**. ARTMED, Porto Alegre, 624 p., 2010.

² DAHM, H. et. al. - Ectomycorrhiza and secondary metabolites. **Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae, Soil Biology**, v. 25, p. 371-385, 2011.

³ GILL, M. - Pigments of fungi (macromycetes). **Natural Product Reports**, v. 20 (6), p. 615–639, 2003.

⁴ ZHOU, Z. et. al. - Pigments of fungi (macromycetes). **Natural Product Reports**, v. 27, p. 1531–1570, 2010.

⁵ NAKATA, T. et. al - New lanostane triterpenoids Inonotsutriols D, and E from *Inonotus Obliquus*. **Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 53-64, 2009.

Especial interesse foi dispensado ao gênero *Scleroderma* em decorrência de estudos prévios, utilizando-se ensaios biodirigidos, desenvolvidos nas dependências do Laboratório de Microbiologia do Solo, sob orientação da professora Dr. Zaida Inês Antonioli, em que foi observado que duas cepas de *Scleroderma citrinum* (Persoon), uma amostra de *Scleroderma sp. Sc 60* (Persoon), uma cepa de *Scleroderma aerolatum* (Ehrenberg) e uma de *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries), apresentaram uma ação antifúngica e antibacteriana *in vivo*. Testes com *Scleroderma citrinum* (Persoon) das cepas 119 e UFSC 133 apresentaram ação antifúngica contra *Candida albicans* (Robin) ATCC 10231, porém não significativa, embora a cepa de *Scleroderma sp. Sc 60* tenha apresentado resultado oposto, ao inibir o crescimento do mesmo fungo. Porém, devido à contaminação da amostra, não foi possível utilizá-la nos experimentos subsequentes. Cepas 129 do *Scleroderma aerolatum* (Ehrenberg) e *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) apresentaram ação inibitória significativa do crescimento de *Candida albicans* (Robin) em 48 horas. Então, testaram-se ambas as cepas para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27893 (Schroeter), onde o *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) apresentou um resultado mais favorável.

Como consequência dos resultados obtidos no ensaio biodirigido, houve necessidade de se realizar um estudo mais aprofundado da espécie *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) com o intuito de descobrir novas fontes de substâncias bioativas. Para isso, processos de cultivo de *Scleroderma*, extração, isolamento e

⁶ HUANG, H. et. al. - Lanostane triterpenoids and sterols from *Antrodia camphorate*. **Phytochemistry**, v. 84, p. 177–183, 2012.

⁷ NOMURA, M. et. al. - Inotodiol, a lanostane triterpenoid, from *Inonotus obliquus* inhibits cell proliferation through caspase-3-dependent apoptosis. **Anticancer Research**, v. 28, p. 2691-2696, 2008.

⁸ BAE, K-G, et. al. – The structure and antibiotic activities of hydroxy acid of lanosterol compound in *Daedalea dickinsii*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 21, p. 1199-1201, 2000.

⁹ LIU, X.T., et. al. - Antibacterial compounds from mushrooms I: a lanostane-type triterpene and prenylphenol derivatives from *Jahnporus hirtus* and *Albatrellus flettii* and their activities against *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecalis*, **Planta Medica**, v. 76, p. 182–185, 2010.

¹⁰ KAMO, T., et. al. – Anti-inflammatory lanostene-type triterpene acids from *Piptoporus betulinus*, **Journal Natural Product**, v. 66(8), p. 1104-1106, 2003.

¹¹ LI, H. Y., et. al. – Anti-AIDS agentes 9.Subersol, a new C31 lanostane-type triterpene and anti-HIV principle from *Polyalthia suberosa*. **Journal Natural Product**, v. 56 (7), p. 1130-1133, 1993.

identificação de metabólitos bioativos foram realizados, bem como testes de atividades farmacológicas das substâncias puras isoladas.

Neste contexto, o grupo do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NPPN), da Universidade Federal de Santa Maria, cujo coordenador é o Professor Dr. Ademir Farias Morel, iniciou o desenvolvimento de pesquisas nesta área visando um maior conhecimento acerca do isolamento e determinação estrutural das substâncias bioativas presentes nas ectomicorrizas.

Sendo assim, este trabalho se apresenta na forma de Tópicos Principais, constituindo-se de i) uma breve introdução; ii) uma revisão bibliográfica alusiva aos aspectos biológicos, fitoquímicos e etnofarmacológicos de *Scleroderma spp.*, a qual conduziu a formulação de iii) metas e objetivos; iv) uma seção de materiais e métodos, onde serão discutidas as metodologias utilizadas tanto para os estudos biodirigidos, como para os estudos químicos relativos à identificação e determinação da estrutura química dos compostos descobertos, bem como das suas respectivas atividades biológicas; v) uma seção onde os resultados serão apresentados, fundamentados e analisados conforme bibliografias existentes e por fim, consta de uma vi) conclusão.

2. OBJETIVOS

- 1- Caracterizar os metabólitos secundários produzidos pelo fungo ectomicorrizico *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries), cultivado *in vitro* através da obtenção de extratos e frações e, a partir destes, realizar a separação e a purificação dos constituintes principais.
- 2- Isolar e determinar a estrutura química de novas moléculas bioativas com potencial para uso em novos medicamentos ou agroquímicos a partir do fungo ectomicorrizico *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries), por meio do uso de técnicas de RMN, RX, EMAR.
- 3- Determinar uma metodologia para obtenção de metabólitos secundários de fungos *Scleroderma sp.* cultivados *in vitro*.
- 4- Avaliar o potencial de uso destas moléculas como antibiótico, através de análises microbiológicas visando estabelecer sua ação como antibacteriano e antifúngico.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Scleroderma* spp. – Aspectos Biológicos, Sistemáticos e Taxonômicos

Scleroderma spp. é um fungo pertencente ao reino Fungi, filo Basidiomycota, subfilo Agaricomycotina, classe Agaricomycetes, subclasse Agaricomycetidae, ordem Boletales e à família Sclerodermataceae. Esta ordem está dividida em oito grupos: Boletineae, Paxillineae, Sclerodermatineae (onde se encontra a família Sclerodermataceae), Suillineae, Hygrophoropsidaceae, Coniophorineae, Serpulaceae e Tapinellineae^{2,12,13,14}. Hibbett et al. (2007)¹⁵, atualizando a sistemática e a taxonomia dos Basidiomicetos, postulou o reino Fungi dividido em dois sub-reinos, o primeiro deles formado por fungos inferiores ou basais com oito filos como mostra a Figura 1A, e um segundo chamado Dikaria, com os Filos Ascomycota¹⁶ e Basidiomycota, sendo este último, portador dos subfilos Pucciniomycotina, Ustilaginomycotina e Agaricomycotina, como mostra a figura 1B¹⁷.

¹² CORAZZINI, A.C., et. al. - **Taxonomia de Boletales (Fungi, Agaricomycotina) da Região de Santa Maria, RS, Brasil.** In: Anais da 25ª Jornada Acadêmica Integrada da Universidade Federal de Santa Maria (JAI-UFSM). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 04/01/2010.

¹³ CORTEZ, V.G. et. al. - Gasteroid mycobiota of Rio Grande do Sul, Brazil: Boletales. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 2, n. 4, p. 44 -52, 2011.

¹⁴ ALFREDO, D.S., et. al. - *Scleroderma minutisporum*, a new earthball from the Amazon rainforest. **Mycosphere**, v. 3, n. 3, p. 294–299, 2012. Doi 10.5943 /mycosphere/3/3/4.

¹⁵ HIBBETT, D.S., et. al. - A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, v. 111, p. 509-547, 2007.

¹⁶ Por questões de legibilidade, o filo Ascomycota não foi apresentado, mas pode ser visto detalhadamente no capítulo 1 do livro *The Mycota*, de K. Esser, facilmente encontrado no site http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-00286-1_10#page-1, ou então acessar Hibbett et al., 2007.

¹⁷ WEBER, R.W.S. - Recent developments in the molecular taxonomy of fungi. In: Esser, K. (ed). **The mycota**. Volume XV - Cap. 1. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009.

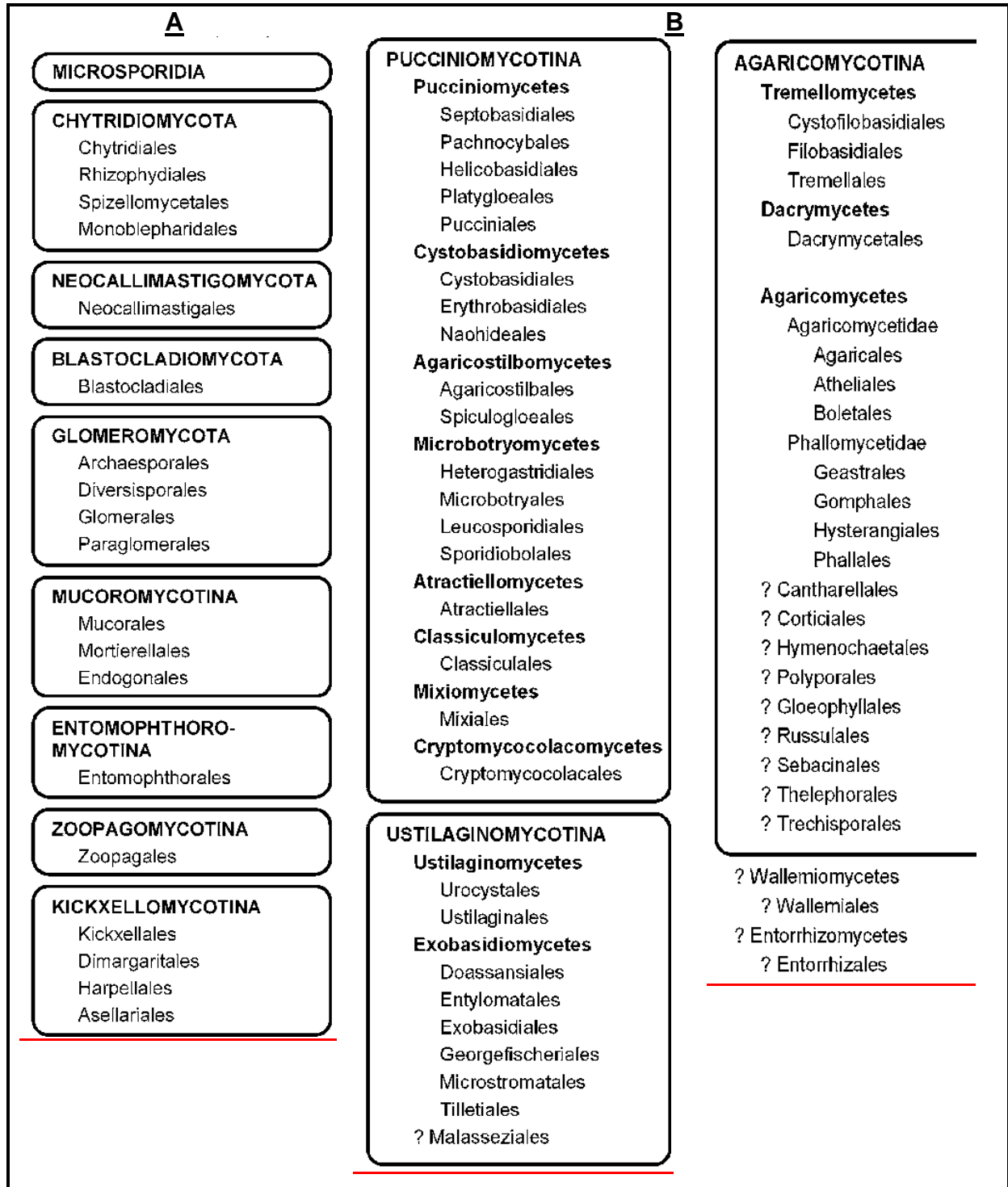


Figura 1: Taxonomia dos Fungos revisada por Hibbett et al. (2007). A) Sub-reino dos fungos Basais e B) Sub-reino Dikaria.

Scleroderma é um gênero de fungo globoso, de ampla distribuição mundial, disseminando-se desde as áreas tropicais até as temperadas, o que abrange a maioria das áreas do globo terrestre. Sua taxonomia está baseada nas

características das estruturas e deiscências do perídio e, fundamentalmente nas do basidiósporo. Estudos moleculares recentes consolidaram a acomodação do gênero *Scleroderma* dentro da ordem Boletales¹⁴. O subfilo Agaricomycotina apresenta ainda muitas sinonímias entre os representantes dos filios Basidiomicetos e Hymenomycetos, de modo que a morfologia dos corpos frutíferos não é suficiente para classificá-los corretamente, sendo a morfologia do basidiósporo um pobre indicador filogenético¹⁷. Além dos caracteres morfológicos e bioquímicos, como atividade enzimática hidrolítica, presença da polifenóis oxidase, chaves contendo descrições fisiológicas e características dos meios de cultura, também são utilizadas para a classificação taxonômica e sistemática, devido à dificuldade em se isolar fungos agáricos de outros gasteromicetos. Boletos dos gêneros *Boletinus*, *Suillus* e *Xerocomus* e gasteromicetos relacionados, como os dos gêneros *Pisolithus*, *Rhizopogon* e *Scleroderma*, podem ser distinguidos dos demais pela produção de pigmentos em meios de cultura contendo altos níveis de glicose¹⁸. Análises taxonômicas numéricas de caracteres culturais, portanto, pode ser útil para examinar as relações taxonômicas estreitas entre boletos e alguns gasteromicetos, mas também as circunscrições genéricas de gêneros como *Laccaria* e *Lactarius*. No entanto, avaliações taxonômicas empregando dados de cultivo devem ser extremamente criteriosas, devido às constantes adaptações dos fungos às frequentes alterações do meio (solo, clima e hospedeiro). Assim, grupos ecológicos, bem como taxonômicos puderam ser reconhecidos, separados e identificados. Espécies de *Hebeloma* e *Laccaria* falharam em produzir o pigmento sob baixas temperaturas toleradas e a ureia foi metabolizada. Isto sugere que um grande cuidado deve ser tomado na utilização de caracteres culturais em estudos filogenéticos¹⁸. Muitos estudos filogenéticos têm tentado subdividir fungos atualmente agrupados na classe Agaricomycetos¹⁵, aproximadamente equivalente à antiga classe dos Homobasidiomicetos. A dificuldade em separá-los está no fato fortemente repetido: eles com bastante frequência formam associações ectomicorrízicas (ECM)¹⁷.

Das 1316 espécies descritas para ordem Boletales, esta ordem ainda compreende uma gama de variedade de fungos, incluindo os boletos e “*earthballs*”,

¹⁸ DICKINSON, T.A., et. al. - Numerical taxonomic methods, cultural characters, and the systematics of ectomycorrhizal agarics, boletes and gasteromicetes. **Mycological Research**, v. 101, n. 4, p. 477-492, 1997.

sendo *Rhizopogon roseolus* (Corda) (Rhizopogonaceae), *Calostoma zanchianum* (Rick), *Pisolithus arhizus* (Scopoli), *Scleroderma albidum* (Patouillard e Trabut), *Scleroderma bovista* (Fries), *Scleroderma aerolatum* (Ehrenberg), *Scleroderma citrinum* (Persoon) (Fig. 2), *Scleroderma dictyosporium* (Patouillard), *Scleroderma fuscum* (Wallroth), *Scleroderma laeve* (Lloyd) e *Scleroderma verrucosum* (Bulliard: Persoon) (Sclerodermataceae), as espécies encontradas no Rio Grande do Sul, localizado na região mais meridional do Brasil^{12,13}.

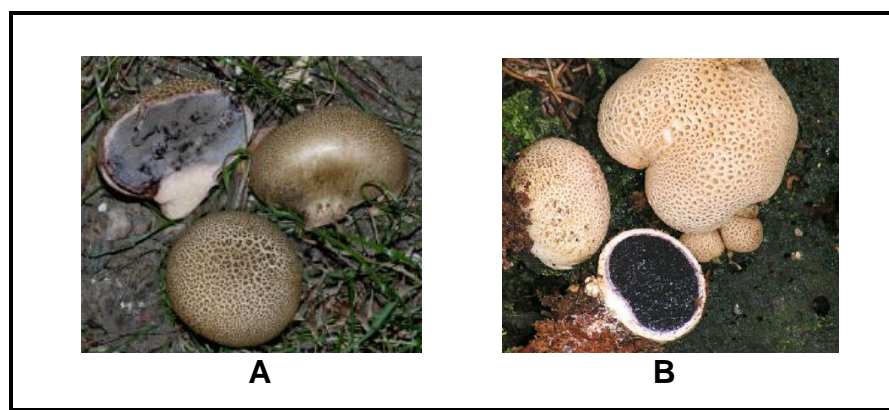


Figura 2: Exemplos de fungos do gênero *Scleroderma* **A)** *Scleroderma areolatum* (Ehrenberg) e **B)** *Scleroderma citrinum* (Persoon).

Os corpos de frutificação são formados na superfície do solo ou logo abaixo e lembram uma batata na aparência. Cerca de 25 espécies de *Scleroderma* foram descritas em todo o mundo e, pelo menos, quatro delas são conhecidos por serem venenosas: *Scleroderma albidum* (Patouillard e Trabut), *Scleroderma areolatum* (Ehrenberg), *Scleroderma cepa* (Persoon) e *Scleroderma citrinum* (Persoon)¹⁹. Os sintomas de intoxicação podem ocorrer dentro de uma hora após a ingestão do fungo e incluem perda de consciência, náuseas, dores abdominais, vômitos, suor, sensação de formigamento generalizada, espasmos, dores, paralisias e choque anafilático^{20,21,22}. Foi relatado que os esporos de *Scleroderma citrinum* (Persoon)

¹⁹ NUGROHO, J.D., et. al. - Morphological characteristics of ectomycorrhizas on Merbau [*Intsia bijuga* (Colebr.) O. Kuntze]. **Journal of Biosciences**, v. 17, n. 2, p. 68-72, 2010.

²⁰ LAMPE, K.F. - Toxic fungi. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 19, p. 85-104, 1995.

possuem alguma propriedade anti-inflamatória²³. Além disso, também foi descoberto que aumentam o crescimento das plantas parasitadas, devido a um aumento na absorção de nutrientes e de água pela planta hospedeira^{24,25}, além de tornar a planta micorrizada mais tolerante a patógenos radiculares, a metais pesados e a extremos de temperatura^{25,26,27,28,29}.

Os fungos do gênero *Scleroderma* possuem o perídio relativamente duro, pouco elástico, quebradiço e coberto por projeções de hifas que se assemelham a escamas que recobrem todo basidioma^{30,31}. O interior é bem escuro, quase preto¹³ e extremamente pulverulento^{14,32}. Estes fungos só conseguem disseminar seus esporos quando totalmente maduros, pois só então ocorre o rompimento do perídio

²¹ STEVENSON, J.A. - Scleroderma poisoning. **Mycologia**, v. 53, p. 438-39, 1961.

²² TRESTRAIL, J.H. - Management of poisoning by unknown fungi – **INCHEM - Chemical Safety**. Information from Intergovernmental Organizations. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/pims/fungi/fungi.htm>. Acesso em 02/02/2013.

²³ NASCIMENTO, M.S., et. al. - Polysaccharides from the fungus *Scleroderma nitidum* with anti-inflammatory potential modulate cytokine levels and the expression of Nuclear Factor kB. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 60-68, 2012.

²⁴ MARSCHNER, H., et. al. - Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 159, p. 89-102, 1994.

²⁵ MOREIRA, F.M.S., et. al. - **Microbiologia e Bioquímica do solo**. Editora UFLA. 729 p. 2002.

²⁶ SMITH, S.E., et.al. - **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic press, 787 p., 2008.

²⁷ CORDIER, C. et. al. - Cell defense responses associated with localized and system icresistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, p. 1017-1028, 1998.

²⁸ BRUNNER, I., et. al - Detection and localization of aluminum and heavy metals in ectomycorrhiza Norwayspruce seedlings. **Environmental Pollution**, v. 108, p. 121-128, 2000.

²⁹ COSTA, M.D. et. al. - Ectomicorizas: a face oculta das florestas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento** – n. 29, p. 38-46, 2002.

³⁰ BASEIA, I.G., et. al. - First record of *Scleroderma polyrhizum* Pers. (Gasteromycetes) from Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 14(2), p. 181-184. 2000.

³¹ NOUHRA, E.R., et. al. - The species of *Scleroderma* from Argentina, including a new species from the *Nothofagus* Forest, **Mycologia**, v. 104(2), p. 488–495, 2012.

³² GUERRERO, R.T., et. al. - **Glossário Ilustrado de Fungos: termos e conceitos aplicados à micologia**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 93 p., 2003.

e a exposição destes esporos ao meio externo. Para que a disseminação ocorra, é necessária a ação do vento, da chuva ou mesmo de animais^{33,34}.

No Brasil, este gênero conta com quatro espécies, distribuídas desde o sudeste até o nordeste, e duas espécies (*Scleroderma minutisporum* (Alfredo) e *S. stellatum* (Berkeley)) na região amazônica, na região norte do país, embora outras cinco espécies tenham sido encontradas na Amazônia Venezuelana. Várias espécies de *Scleroderma* da região Neotropical são conhecidas por serem exóticas e/ou introduzidas, especialmente com *Pinus* e *Eucalyptus*, por serem fungos micorrízicos. No entanto, as espécies nativas de *Scleroderma* foram registradas a partir de diferentes tipos de vegetação autóctone no Brasil¹⁴.

Estudos recentes revelaram certa diversidade de fungos ectomicorrízicos (ECM), os quais estabelecem relações simbiótico-mutualística com raízes de plantas lenhosas, sem invadi-las internamente¹. Fungos basidiomicetos ECM hipógeos (aqueles que ocorrem abaixo do solo) como os das espécies do gênero *Scleroderma*, foram encontrados associados às plantações de *Eucalyptus* spp. na região Central do Rio Grande do Sul³⁵. Além disso, foram encontradas as espécies: *Chondrogaster pachysporus* (Maire), *Descomyces albus* (Berkeley), *Hysterangium affine* (Masse e Rodway), *Hysterangium inflatum* (Rodway) e *Setchelliogaster tenuipes* (Setchell)³⁶.

3.2. Fungos Micorrízicos - Micorrizas

Existe enorme gama de informações científicas sugerindo que exsudatos radiculares podem agir como mensageiros químicos e comunicar, iniciar e

³³ CLARDY, J., et. al. - Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004.

³⁴ FREIRE, C.G., et. al. - Levantamento de fungos ectomicorrízicos em floresta de *Pinus taeda* em Caçador – SC. **Ignis**, Caçador, v. 1, n. 1, 2012.

³⁵ MELLO, A.H., et. al. - Fungos arbusculares e ectomicorrízicos em áreas de eucalipto e de campo nativo em solo arenoso. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 3, p. 293-301, 2006.

³⁶ SULZBACHER, M.A. - **Fungos ectomicorrízicos do sul do Brasil, com ênfase no hábito hipógeo**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

desenvolver interações biológicas e físicas entre raízes e organismos que habitam o solo^{37,38}.

O termo micorriza (o que significa fungo-raiz) foi originado por Frank (1885), que considerava um fenômeno de natureza generalizada, resultante da união entre as raízes e o micélio dos fungos, com dependência fisiológica, em que ambas as partes se beneficiariam. Ele ainda especulou sobre o possível envolvimento desta associação na nutrição e crescimento das plantas. Ele demonstrou em 1894 de maneira convincente, que a colonização das raízes das árvores pelos fungos resultava em um micélio abundante ao redor das mesmas o que as ajudava a absorver nutrientes do solo e do húmus e, além disso, que o fungo não causaria danos, injúrias ou disfunção nas raízes o que caracterizava o caráter mutualista desta associação³⁹.

Mais recentemente, este termo tem sido definido como associações entre hifas fúngicas e órgãos de plantas superiores com intuito de absorver substâncias a partir do solo. Atualmente, micorrizas são consideradas como um caso muito particular de associação entre plantas-e-fungos, porque elas são associações íntimas com uma interface especializada, onde trocas de materiais ocorrem entre as células vivas. A maioria das micorrizas ocorre nas raízes, que evoluíram para abrigar fungos, mas também podem ocorrer em caules subterrâneos de certas espécies e em talos de briófitas. A nova definição, mais ampla de micorrizas é: associação simbiótica essencial para um ou ambos os parceiros, entre um fungo terrestre (especializado para vida no solo e plantas) e uma raiz (ou outro órgão de contato com um substrato) de uma planta viva⁴⁰. As micorrizas são, portanto, associações simbióticas do tipo mutualísticas entre fungos e as raízes das plantas⁴¹. Micorrizas,

³⁷ WALKER, T.S., et.al. - Root exudation and rhizosphere biology. **Plant Physiology**, v. 132, p. 44-51, 2003.

³⁸ BAIS, H.P., et. al. - How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 26–32, 2004.

³⁹ SIQUEIRA, J.O., et. al. - **Biotechnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/ABEAS/ESAL/FAEPE, 1988, 236 p.

⁴⁰ BRUNDRETT, M.C. - Diversity and classification of mycorrhizal associations. **Biological Reviews**, v. 79, p. 473–495, 2004. DOI: 10.1017/S146479310300 6316.

⁴¹ BRUNDRETT, M., et. al. - **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia. 1996.

em termos histofisiológicos são órgãos de natureza multivariada e especializados em absorção de íons, moléculas e outras substâncias, e que exercem esta função duplamente: absorvem nutrientes e água do solo tanto para os fungos, quanto para as plantas. A taxa de fertilidade e reprodução de ambos os parceiros aumentou após o estabelecimento da simbiose/mutualismo^{40,42}.

A importância dos fungos micorrízicos está em promoverem a decomposição de resíduos orgânicos (porque fungos micorrízicos também podem apresentar função saprofítica)^{36,43} e ainda são os responsáveis pela origem, sobrevivência e diversificação das plantas terrestres. Isso porque determinados fungos ECM provocaram a lignificação dos vasos condutores de nutrientes e água, enrijecendo-os, condição imprescindível que permitiu a adaptação das plantas em ambiente terrestre⁴⁴. Fungos micorrízicos suprem seus hospedeiros com nutrientes, dentre os quais, aqueles que contêm fosforo, nitrogênio ou carbono orgânico (principalmente em plantas aclorofiladas)⁴⁵. Em adição ao seu papel nutricional, fungos micorrízicos também cooperam para a saúde do hospedeiro, através da proteção contra organismos nocivos ou estresses ambientais bióticos e abióticos⁴⁶.

A presença de fungos micorrízicos no solo é um fator essencial para a colonização do ambiente terrestre pelas plantas. Cifras correspondentes indicam que entre 80 e 92% das espécies de plantas e famílias terrestres pesquisadas são

⁴² WANG, B., et. al. - Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. **Mycorrhiza**, v. 16, p. 299–363, 2006. DOI 10.1007/s00572-005-0033-6.

⁴³ KASPER, J., et. al. - The composition of carcass volatile profiles in relation to storage time and climate conditions. **Forensic Science International**, v. 223, p. 64–71, 2012.

⁴⁴ SUTELA, S., et. al. - Phenolic compounds in ectomycorrhizal interaction of lignin modified silver birch. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 124, p. 1-15, 2009.

⁴⁵ McKENDRICK, S.L., et. al - Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. **New Phytologist**, v. 145, p. 539–548, 2000.

⁴⁶ BAREA, J.M., et. al. - Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 417, p. 1761–1778, 2005, DOI:10.1093/jxb/eri197.

micorrízicas^{26,42,47}, totalizando cerca de 220.000 a 420.000 espécies de plantas, aproximadamente 2% do total das espécies conhecidas⁴⁸.

Inicialmente, as plantas terrestres passaram por um estágio simbiótico do tipo arbo-micorrízico, onde as hifas fúngicas penetraram nos tecidos radiculares das plantas terrestres. Aliás, fungos e plantas terrestres são majoritariamente arbo-micorrízicos. Posteriormente, algumas dessas associações evoluíram para o tipo ectomicorrízico, tanto os fungos quanto as espécies vegetais, e co-evoluíram independentemente um do outro e paralelamente. Cabe salientar que os fungos evoluíram da condição micorrízica para a não-micorrízica, de modo que a evolução dos fungos pode explicar o surgimento e disseminação das plantas/vegetais na porção terrestre do globo^{42,49,50}. Fungos micorrízicos também podem apresentar características patogênicas para outras espécies vegetais (que não sua hospedeira), bem como parasitar nematoides, artrópodes e inclusive outros fungos, e por isso têm sido utilizados como recurso eficaz no controle biológico⁵¹. Mas tal mutualismo/simbiose pode ser desfeita a qualquer momento, sendo os fungos ECM, oportunistas. Fungos ECM podem se tornar saprofíticos e vice-versa⁵².

Brundrett et al. (1996)⁴¹ relatam sete tipos de associações micorrízicas conhecidas, sendo as micorrizas arbusculares e as ectomicorrizas consideradas como as de maior importância econômica^{25,40,53}:

⁴⁷ BRUNDRETT, M.C. - Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. **Plant Soil**, v. 320, p. 37-77, 2009. DOI:10.1007/s11104-008-9877-9).

⁴⁸ TEDERSOO, L., et. al. - Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. **Mycorrhiza**, v. 20, p. 217–263, 2009.

⁴⁹ PIROZYNSKI, K.A., et. al. - The origin of land plants: a matter of mycotrophism. **BioSystems, Care**, v. 6, p. 153–164, 1975.

⁵⁰ PIROZYNSKI, K.A. - An interaction between fungi and plants through the ages. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 59, p. 1824-1827, 1981.

⁵¹ ALEXOPOULOS, C.J., et. al. - **Introductory Mycology**. 4 ed. John Wiley & Sons. New York, USA. 869 p., 1995.

⁵² COMANDINI, O., et. al. - Together, but not for ever: ectomycorrhizal symbiosis is an unstable affair. **Mycological Research**, v. 105, n. 2, p. 129-131, 2001.

⁵³ CARNEIRO, M.A.C., et. al. - Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no Sudeste do Brasil. **Cerne**, v. 4, n. 1, p. 129-145, 1998.

a) Micorrizas Arbusculares (MA): formadas geralmente entre fungos Glomeromycota e as raízes de plantas herbáceas (não lenhosas). Indicações apontam que 80% das espécies vegetais formam este tipo de micorriza. O fungo coloniza as células do córtex inter e intracelularmente, de modo muito característico, formando arbúsculos, que são estruturas intra-radulares altamente ramificadas e típicas das MAs. Nas MAs não há evidência de especificidade hospedeira e nem ocorrem alterações morfológicas macroscópicas nas raízes colonizadas, sendo a presença detectada apenas microscopicamente^{26,41,54,55}.

b) Ectendomicorrizas (EM): formadas por fungos Basidiomicetos com a bainha reduzida ou ausente, rede de Hartig geralmente é bem desenvolvida, com alto grau de penetração nas células da planta, especialmente nas partes velhas da raiz. Uma mesma espécie de fungo pode formar ectomicorrizas em uma espécie de planta e ectendomicorrizas em outra. Ocorrem principalmente em membros das coníferas, como os *Pinus*^{26,55,56}. Fungos endofíticos colonizam as raízes sem formar uma associação micorrízica típica. Embora a fisiologia deste tipo de interação não seja bem elucidada, eles podem agir como biofertilizadores. *Phialocephala fortinii* (Wang e Wilcox), um dos mais abundantes fungos endofíticos podem aumentar a nutrição mineral em *Pinus contorta* (Douglas) e *Salix glauca* (Linnaeus)^{55,57}.

c) Micorrizas Orquidóides: presentes nas orquídeas e formadas por fungos septados que colonizam intracelularmente as raízes formando enrolados de hifas típicos no interior das células. O fungo que coloniza é do tipo *Rhizoctonia*. Geralmente os fungos colonizam os antróceros de onde se espalham para as células estabelecendo a associação. O fungo fornece carbono para a orquídea, obtidos pela hidrólise de carboidratos insolúveis no solo, do meio ou de outra planta através da ligação via

⁵⁴ SIQUEIRA, J.O., et. al. - Fungos micorrízicos arbusculares - Características, associação simbiótica e aplicação na agricultura. **Biociência**, **18**, n. 25, p. 12-21, 2002.

⁵⁵ SIQUEIRA, J.O. - **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras, 290 p., 1996.

⁵⁶ PRESCOTT, L.M., et. al. - **Microbiology** - McGraw-Hill Higher Education, New York, 5th Edition, 1026 p., 2002.

⁵⁷ HAWKSWORTH, D.L. - Unite: molecular identification of ectomycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v. 109, n. 10, p.1057–1062, 2005.

hifa. Quando a orquídea se torna fotossintetizante o processo de transferência de carbono se inverte da planta para o fungo^{25,26,41,55}.

d) Micorrizas Ericóides: recebem este nome por ser comum a associação com plantas da família Ericaceae. As ericáceas predominam em solos ácidos pobres em minerais e matéria orgânica. Estas micorrizas se caracterizam por produzir pouco micélio externo, similar a um manto estreito. O fungo é septado e produz hifas enroladas e um extenso crescimento das hifas dentro das células do córtex radicular, sendo muito específicas do hospedeiro. Possuem uma estrutura delicada e uniforme. Nas raízes ericóides, as células epidermais não produzem pelos radiculares, mas são colonizadas intracelularmente pelos fungos, onde estabelecem uma rede complexa de hifas. A penetração ocorre por invaginação da membrana plasmática, podendo o fungo tomar completamente o conteúdo celular. Os fungos envolvidos possuem a capacidade de transformar uma grande variedade de compostos orgânicos em produtos assimiláveis pelas plantas. Este tipo de micorriza pode degradar quitina e hexosaminas como importante fonte de nitrogênio. Em alguns casos pode conferir à planta resistência a metais pesados e baixos níveis de pH do solo^{25,26,41,55}.

e) Micorrizas Monotropóides: micorriza que se caracteriza por se estabelecer somente com plantas da família Monotropaceae (pertencente à ordem das Ericales), que possui 10 gêneros de plantas pequenas completamente aclorófilas (sem clorofila), que dependem muito do fungo associado para obter nutrientes. O fungo nunca penetra na parede da célula. Os fungos envolvidos nessa associação são Basidiomicetos, um bem conhecido é *Boletus edulis* (Bulliard). Os fungos associados são sempre do grupo Basidiomycotina, principalmente dos gêneros *Lactarius*, *Russula*, *Suillus*, *Rhizopogon*. As sementes das plantas do gênero *Monotropa* são pequenas e apresentam dificuldades para germinar na ausência de fungos associados⁵⁸. Por outro lado, foi observado que o fungo que forma micorriza monotropoide é capaz de colonizar as raízes de árvores próximas (um a dois

⁵⁸ ANDRADE-TORRES, A. - Micorrizas: antigua interacción entre plantas y hongos. **Ciencia**. Octubre-diciembre. p. 84-90, 2010.

metros) principalmente dos gêneros *Pinus* e *Picea* e transportar nutrientes desde a árvore para as plantas aclorófilas^{41,55,59}.

f) Micorriza Arbutóide: este tipo de micorriza possui aspectos semelhantes à Ericóide, por se associarem a plantas da ordem Ericales, principalmente a espécies dos gêneros *Arctostaphylos* e *Arbutus*, e algumas espécies da família Pyrolaceae. Os fungos envolvidos pertencem aos Basidiomicetos. Muito similar a ectomicorriza, esta associação arbutóide produz uma rede de Hartig intercelular, geralmente restrita à camada de fora das células. A região mais interna da raiz (hipoderme) formada por depósitos de suberina e estrias de Caspary previne a penetração profunda da rede de Hartig^{25,26,55}. O emaranhado intracelular, junto com a bainha do manto e a rede de Hartig dá a aparência que identifica as micorrizas arbutoides²⁶.

g) Ectomicorrizas (ECM): os fungos ectomicorrízicos são muito importantes nos ecossistemas, pois sua associação mutualística com plantas de diferentes espécies auxilia na absorção de nutrientes, água e na proteção da planta hospedeira em relação aos patógenos e estresses abióticos. Nos ecossistemas florestais, o papel das ectomicorrizas é ainda mais pronunciado, atuando fortemente nos ciclos biogeoquímicos, na dinâmica das comunidades vegetais e na manutenção da estrutura do solo^{60,61}.

3.3. Fungos Ectomicorrízicos – Ectomicorrizas

Estima-se que existam mais de seis mil espécies de fungos ECM. Considerando-se que apenas 5% da diversidade fúngica do planeta é conhecida,

⁵⁹ PETERSON, R.L., et. al. – Mycorrhizas - Integrated development between roots and fungi. **Mycologia**, v. 86 (3), p. 311-326, 1994.

⁶⁰ MORRIS, M.H., et. al. - Influence of host species on ectomycorrhizal communities associated with two co-occurring oaks (*Quercus spp.*) in a tropical cloud forest. **FEMS Microbiology ecology**, v. 69, n. 2, p. 274-287, 2009.

⁶¹ RILLIG, M.C., et.al. - Tansley review: mycorrhizas and soil structure. **New Phytologist**, v. 171, p. 41-53, 2006.

com aproximadamente 80.000 espécies descritas⁶², de um total estimado de 1,5 milhão de espécies^{57,63}, pode-se supor que o número de espécies de fungos ectomicorrízicos seja ainda maior.

Em sua grande maioria os fungos ectomicorrízicos pertencem à classe Basidiomycota, destacando-se os gêneros *Amanita*, *Hebeloma*, *Hysterangium*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Rhizopogon*, *Russula*, *Scleroderma*, *Suillus*, *Tricholoma*, *Pisolithus*, entre outros⁶⁴. A associação destes fungos a espécies florestais cultivadas como, por exemplo, os gêneros *Pinus*, *Eucalyptus* e *Acacia*, têm se apresentado como extremamente favoráveis. Embora ocorram em apenas cerca de 3% dos vegetais superiores, as ectomicorrizas envolvem uma grande variedade de espécies fúngicas, principalmente dos filos Basidiomycota e Ascomycota, e são predominantes nas essências florestais mais utilizadas em silvicultura no mundo (espécies das famílias *Pinaceae*, *Myrtaceae* e *Fagaceae*)^{26,51,65}. Alguns fungos ECM que apresentam função saprofítica, tanto como decompositores da madeira como das partes aéreas dos vegetais, são capazes de promover efeitos benéficos para o desenvolvimento e saúde de sua hospedeira, o que inclui (i) decomposição dos detritos orgânicos; (ii) promoção do crescimento de rizobactérias (Plant Growth Promoting Rhizobacteria - PGPR), e (iii) atuarem como antagonistas de fungos e bactérias patogênicos às micorrizas⁴⁶. As PGPR são definidas através de três características intrínsecas: (i) devem ser capazes de colonizarem as raízes; (ii) devem sobreviver e multiplicar-se no micro-habitat de superfície das raízes e (iii) devem promover o crescimento vegetal⁴⁶. Embora eles não formem associações íntimas com as plantas, fungos saprofíticos podem agir como biofertilizante, quando lito-decompositores. A solubilização de fosfatos parcialmente solúveis é decorrente da ação de ácidos orgânicos quelantes exsudados pelos fungos, promovendo a absorção destes fosfatos e conseqüentemente, o desenvolvimento vegetal. Além

⁶² KIRK, P.M., et. al. - **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi**. 9th ed. CAB International. Wellington, 616 p., 2001.

⁶³ HAWKSWORTH, D.L. - **The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation**. *Mycological Research* (New York), v. 95, p. 641-655, 1991.

⁶⁴ VELLINGA, E.C. et. al. - Global patterns of ectomycorrhizal introductions. *New Phytologist*, v. 10, p. 1-14, 2009.

⁶⁵ WILCOX, H.E. - Mycorrhizal Associations. In: NAKAS, J.P.; HAGEDORN, C. (eds). **Biotechnology of plant-microbe interactions**. McGraw-Hill, New York, USA. p. 227-255, 1990.

disso, ele também pode limitar o desenvolvimento de doenças agindo como antagonistas de fungos e bactérias patogênicos à sua hospedeira⁵⁷.

Dos diversos tipos de micorrizas existentes, as ectomicorrizas destacam-se em locais onde há presença de espécies lenhosas. Dados dessa natureza podem representar informações fundamentais para a sustentabilidade, para o conhecimento de organismos presentes e de novas espécies, como indicadores da qualidade ambiental⁵⁵. A importância de fungos ECM no crescimento e morfologia das raízes aumentou o interesse na sua utilização como agentes de promoção em culturas “*in vitro*”. A inoculação com fungos ECM específicos induziu o desenvolvimento e crescimento de raízes adventícias e também melhorou a subsequente aclimação às condições “*ex vitro*”. No entanto, nas condições herméticas do sistema fechado “*in vitro*”, as concentrações de nutrientes e CO₂ podem perturbar o equilíbrio entre os parceiros simbióticos e posteriormente, reduzir o crescimento das mudas. Estudos realizados levaram ao desenvolvimento de um sistema de cultivo “*in vitro*” para induzir formação e crescimento de raízes adventícias de pinheiro por meio de inoculação com o fungo ECM *Pisolithus tinctorius* (Persoon)⁶⁶.

Diferente do observado em micorrizas arbusculares, as células fúngicas das ectomicorrizas não penetram na parede celular da planta, mas distribuem-se no espaço intercelular, formando uma malha na epiderme e córtex da raiz, denominada rede de Hartig. Além disso, formam um revestimento derivado desta rede em torno da raiz, o qual recebe o nome de manto⁴². Além disso, possuem a capacidade de estender suas hifas formando as rizomorfos e, desta maneira, exploram mais amplamente o ambiente, favorecendo a nutrição. Desta forma, o aporte de água e nutrientes pode ser realizado para as plantas hospedeiras, auxiliando no crescimento e desenvolvimento das mesmas⁶⁷. As ectomicorrizas recebem, em troca, fotossintatos da planta, o que contribui para os diferentes metabólitos secundários produzidos pela planta ou pelas ectomicorrizas^{68,69}. Vários fungos

⁶⁶ NIEMI, K., et. al. - *Suillus variegatus* causes significant changes in the content of individual polyamines and flavonoids in Scots pine seedlings during mycorrhiza formation *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 3, p. 391-401, 2007. DOI:10.1093/jxb/erl209

⁶⁷ NARA, K., et. al. - Ectomycorrhizal fungi on established shrubs facilitate subsequent seedling establishment of successional plant species. **Ecology**, v. 85, n. 6, p. 1700-1707, 2004.

⁶⁸ STRACK, D., et. al. - Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 9, p. 1955-1979, September 2003.

micorrízicos podem desenvolver um papel benéfico para as plantas hospedeiras, protegendo-as de patógenos (fungos e bactérias), atuando como agentes biocontroladores naturais. Esta função tem sido descrita para fungos micorrízicos arbusculares e ectomicorrízicos⁵⁷.

Nas associações ectomicorrízicas mutualistas a planta recebe nutrientes minerais e água do fungo e o fungo é suprido com carboidratos por sua hospedeira. Além disso, fungos ectomicorrízicos, através de seu metabolismo, não só aliviam como também aumentam a tolerância de suas hospedeiras aos estresses, tanto bióticos como abióticos^{69,70}. Fungos ECM proporcionam à sua planta hospedeira maior vigor, fertilidade, melhoram o desempenho vital, aumentando sua sobrevivência e longevidade a campo, pois as ectomicorrizas propiciam às plantas o aumento da absorção de nutrientes e água, além protegê-las contra patógenos e estresses ambientais. Em troca, os fungos ectomicorrízicos retiram compostos orgânicos necessários à sua sobrevivência²⁶.

Fungos ectomicorrízicos são conhecidos por aumentar o conteúdo de nitrogênio e fósforo de seus hospedeiros, fornecendo acesso a frações de nitrogênio inorgânico e/ou orgânico no solo e fosfatos metabolizados pelas micorrizas^{71,72}. Todos os fungos ECM têm alguma capacidade para aumentar a aquisição de nitrogênio inorgânico. Nitrogênio orgânico representa a maior fração de nitrogênio em solos de florestas temperadas e muitos fungos ECM podem adquirir nitrogênio a partir de uma gama de compostos orgânicos simples, incluindo amidas de aminoácidos, peptídeos, e proteínas. Transferência subsequente do nitrogênio a partir de tais fontes orgânicas para a planta hospedeira também tem sido demonstrada por alguns fungos ECM. Os aminoácidos livres são considerados

⁶⁹ LUO, Z.B., et. al. - Upgrading root physiology for stress tolerance by ectomycorrhizas: insights from metabolite and transcriptional profiling into reprogramming for stress anticipation. **Plant Physiology**, v. 151, n. 4, p. 1902-1917, 2009. DOI: 10.1104/pp.109.143735.

⁷⁰ LUO, Z.B. et. al. - The ectomycorrhizal fungus (*Paxillus involutus*) modulates leaf physiology of poplar towards improved salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, n. 2, p. 304-311, 2011. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2011.04.008.

⁷¹ ANDERSON, I.C., et. al. - Characteristics of glutamine uptake by two Australian *Pisolithus* species. **Mycology Research**, v. 105, n. 8, p. 97- 982, 2001.

⁷² BÜCKING, H. - Phosphate absorption and efflux of three ectomycorrhizal fungi as affected by external phosphate, cation and carbohydrate concentrations. **Mycological Research**, v. 108, n. 6, p. 599-609, 2004.

quantitativamente mais importantes em muitos solos florestais, no entanto, em algumas florestas subtropicais australianas de eucalipto, as proteínas podem ser mais abundantes do que os aminoácidos, muito embora preferencialmente as plantas hospedeiras absorvam nitrogênio na forma de íons amônio. A absorção de aminoácidos ocorre através da ação de enzimas proteolíticas extracelulares, que geram os aminoácidos, os quais são então absorvidos pelo fungo ECM⁷¹.

Além disso, fungos ECM são de grande importância para manutenção dos ecossistemas naturais. A manipulação biotecnológica destes fungos proporciona melhoria da nutrição das plantas, em especial na recuperação de áreas degradadas e na incorporação de solos pobres na cadeia produtiva³⁶. De acordo com Nara et. al.(2004)⁶⁷, o papel das ectomicorrizas é fundamental na recuperação de áreas impactadas ambientalmente, principalmente os solos arenosos e degradados por mineração, de grande susceptibilidade à ação humana. Também tem sido proposto que os fungos ECM estimulam o crescimento das plantas em solos de baixa fertilidade pelo aporte de nutrientes proporcionado pela captação dos mesmos pelos fungos e posterior transferência destes para a planta hospedeira⁷³. Compostos fenólicos, principalmente flavonoides, ácidos fenólicos e taninos, condensados ou não, exsudados pelas raízes de espécies hospedeiras simbiotes, atuam como quimio-atratores de fungos ECM⁷⁴. Em troca, os fungos, além de nutrientes e água, são capazes de transferir reguladores de crescimento vegetal, que influenciam no desenvolvimento das raízes, como auxinas e citocinias⁴⁰.

Além de complementar à função de desenvolvimento da macroflora, fungos ECM ainda são capazes de exercer função de participação na dieta humana como fonte de proteínas, como o *Agaricus bisporus* (Lange), um fungo basideomiceto da família Agaricaceae, conhecido e cultivado no Brasil com o nome de Champignon⁷⁵, atuam na biodegradação/biodeterioração tanto de materiais orgânicos (material húmico) como inorgânicos, pois têm habilidades bem conhecidas para dissolução

⁷³ LI, C., et. al. - The most widely recognized mushroom: chemistry of the genus *Amanita*. **Life Sciences**, v. 78, p. 532–538, 2005.

⁷⁴ JUNG, N.C., et. al. - Anatomical observation of polyphenol changes in epidermal cells during the development of *Quercus acutissima*–*Scleroderma verrucosum* ectomycorrhizae. **Trees**, v. 26, p. 301–310, 2012. DOI 10.1007/s00468-011-0592-4

⁷⁵ MORIN, E., et. al. - Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. **Proceedings in National Academic Science - PNAS**, v. 109, n. 43, p. 17501–17506, 2012.

mineral, especialmente fosfatos^{75,76}. A biodeterioração de peças de marfim e ossos é um exemplo clássico. Detritos orgânicos bem como camadas orgânicas do solo são principalmente colonizados por fungos saprotróficos, enquanto que as camadas minerais são colonizadas por fungos ECM. Alguns deles até foram "batizados" de fungos comedores de rochas, povoando solos podzólicos e aqueles pobres em mineralizações, proporcionando a estes ecossistemas um reequilíbrio. Fungos ECM ocorrem em florestas onde a baixa qualidade da cobertura do solo (palha) e a reduzida taxa de decomposição causam limitação no fornecimento de nitrogênio e fósforo para as plantas⁷⁶.

Igualmente, fungos ECM são muito úteis na fitorremediação – que seria um processo de detoxificação do ambiente com a ajuda (micro) organismos –, como absorção de metais pesados e/ou substâncias indesejadas ou nocivas ao ambiente. Plantas e (micro) organismos associados liberam compostos orgânicos e inorgânicos que possuem capacidade acidificante, quelantes e/ou redutora. Estas funções estão implicadas a desempenhar um papel na absorção do metal pela planta. Em geral, associações micorrízicas podem ser benéficas, pois, aperfeiçoam a eficiência do processo, alterando diretamente a fitorremediação do metal através do acúmulo do mesmo nos tecidos vegetais e, indiretamente, através da promoção da produção de biomassa aérea e da raiz. A absorção de metais pesados pode ocorrer através de várias estratégias biogeoquímicas incluindo translocação, transformação, ionização, quelação, imobilização, solubilização, precipitação, volatilização e complexação dos metais pesados, facilitando a fitorremediação. Todas estas ações envolvem a produção de metabólitos como sideróforos, que são agentes quelantes com ferro iônico em sua estrutura molecular, ácidos orgânicos e surfactantes (Figura 3)^{57,77}.

⁷⁶ PINZARI, F., et. al. - Biodegradation of ivory (natural apatite): possible involvement of fungal activity in biodeterioration of the Lewis Chessmen. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 1050–1062, 2013.

⁷⁷ RAJKUMAR, M., et. al. - Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1562–1574, 2012.

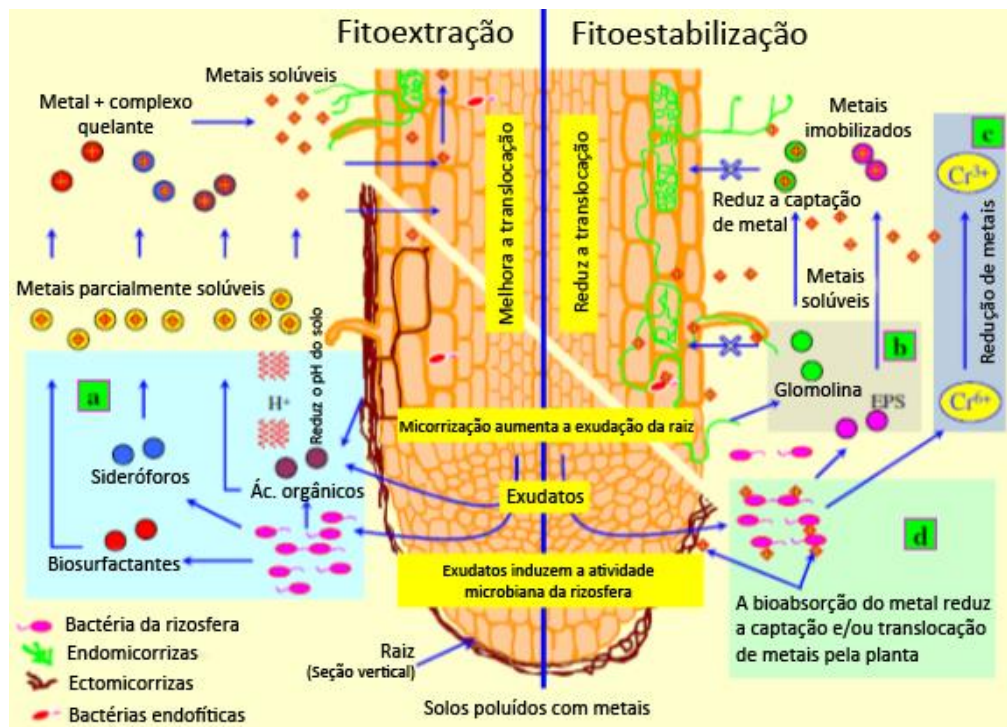


Figura 3: A associação de plantas com outros tipos de (micro) organismos pode acelerar o processo de fitorremediação de solos contaminados com metais, aumentando mobilização/ imobilização do metal. (a) Associações heterotróficas podem melhorar a absorção do metal pela planta através da produção de quelantes de metais, mobilizando o metal do solo para dentro de estruturas de armazenamento na planta, (b) produção de metais imobilizando metabólitos, (c) a redução de metal e / ou (d) de metal biossoro. Abreviaturas: substâncias poliméricas extracelulares (EPS)⁷⁷.

Fitossideróforos são moléculas quelantes de baixa massa molecular (400-1000 Daltons), formando complexos, principalmente com ferro, mas também podem formar complexos estáveis com outros metais, como o Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb e Zn. Embora sideróforos possam conter outros grupos funcionais, eles são geralmente classificados em três principais grupos, com base na natureza química da coordenação do metal: catecolatos, hidroxamatos ou (α)-hidroxi-carboxilatos, como por exemplo, enterobactina, desferrioxaminas e aerobactina, respectivamente. Estes compostos têm função importante na fitorremediação ambiental, uma vez que podem retirar do solo metais pesados e imobilizá-los na forma de complexos, ou ainda se o complexo for do tipo sideróforo, ser absorvido pelas micorrizas. Corpos de frutificação de fungos ECM *Sclerotinia verrucosum* (Bulliard), *Suillus luteus* (Linnaeus:Fries) e *Rhizopogon luteolus* (Fries e Nordholm) isolados de *Pinus radiata* (David Don) foram capazes de produzir sideróforos catecolatos e hidroxamatos sob condições de deficiência de ferro. Estes estudos sugerem que, inoculando as plantas com organismos produtores de sideróforos, torna-se possível melhorar a

absorção de metais pesados em plantas. Apesar disso, algumas bactérias simbiotes produziram sideróforos que reduziram a capacidade de absorção de metais pesados. Tais efeitos contraditórios apresentados pelos sideróforos são decorrentes de vários fatores como biodisponibilidade do metal, tipo de planta e da sua capacidade para o transporte e armazenamento do mesmo⁷⁷.

Fungos ECM podem produzir quelatos de modo a alterar o estado iônico/molecular do elemento contaminante e desta forma reduzir ou eliminar radicais livres ou formas iônicas nocivas. Alguns saprotróficos podem tornar compostos químicos recalcitrantes através da biodegradação⁵⁷.

As ectomicorrizas podem assumir formas diversas, desde nodular, piramidal, bifurcada, coralóide, entre outras, com cores determinadas pela cor do micélio do fungo simbiote, seja preta, vermelha, amarela, castanha, branca, etc. A formação de ectomicorrizas inibe a formação de pêlos radiculares, os quais são substituídos pelas hifas dos fungos. A inibição da formação de pêlos radiculares envolve a secreção de compostos indólicos pelo fungo, tais como o ácido indolacético e a hipaforina, os quais regulam a morfogênese radicular⁷⁸.

Scleroderma é um fungo ECM, ou seja, capaz de estabelecer relações simbiótico-mutualística com raízes de plantas lenhosas, sem invadi-las internamente¹. Fungos ECM são fungos superiores aptos a desenvolver associações com Gimnospermas e Angiospermas ou nas famílias de plantas listadas na Tabela 1.

Associações ectomicorrízicas consistem em um sistema de micélio do solo, ligando raízes micorrízicas e de armazenamento ou estruturas reprodutivas. Raízes ectomicorrízicas se caracterizam pela presença de um manto e rede de Hartig. A rede de Hartig consiste em um “labirinto de hifas” que se desenvolve entre (e não dentro) as células de raiz e assume forma líquida. Esta rede líquida de hifas fúngicas estabelece contato íntimo com as células radiculares, de modo a gerar uma interface, onde ocorrem as transferências de íons, moléculas e substâncias diversas. A presença da rede de Hartig é utilizada para designar as associações ectomicorrízicas. Normalmente as associações ectomicorrízicas são formadas predominantemente nas pontas das raízes finas da planta hospedeira e distribuídas

⁷⁸ SIQUEIRA, J.O., et. al. – **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Editora UFLA, Lavras, 716 p., 2010.

irregularmente ao longo do perfil do solo, sendo mais abundante nas camadas superficiais de solo contendo húmus, do que nas camadas subjacentes de solo mineral^{40,41,79,80}. Geralmente, ectomicorrizas são formadas por fungos basideomicetos¹.

Tabela 1: Famílias e gêneros com associações ectomicorrízicas confirmadas

FAMÍLIA	GÊNERO
GYMNOSPERMAS	
Gnetaceae	<i>Gnetum</i>
Pinaceae	<i>Abies, Cathaya, Cedrus, Keteleeria, Larix, Picea, Pinus, Pseudolarix, Pseudotsuga, Tsuga.</i>
ANGIOSPERMAS	
Betulaceae (inc. Corylaceae)	<i>Alnus, Betula, Carpinus, Corylus, Ostrya, Ostryopsis.</i>
Casuarinaceae	<i>Allocasuarina, Casuarina</i>
Cistaceae	<i>Cistus, Fumana, Helianthemum, Hudsonia, Lechea, Tuberaria.</i>
Dipterocarpaceae	<i>Anisoptera, Dipterocarpus, Hopea, Marquesia, Monotes, Pakaraimaea, Shorea, Vateria, Vateriaopsis, Vatica.</i>
Ericaceae I Gêneros com micorrizas ericóides	Categoria Arbutóide de ECM e ECM: <i>Arbutus, Arctostaphylos, Cassiope, Chimaphila, Comarostaphylis, Gaultheria, Kalmia, Leucothoe, Pyrola.</i>
Ericaceae II Gêneros com micorrizas ericóides	Categoria Monotropóide de ECM: <i>Monotropa, Pterospora, Sarcodes, etc.</i>
Fabaceae (Leguminosae/Fabales)	
Caesalpinioideae (Caesalpinaceae)	<i>Azelia, Anthonotha, Aphanocalyx, Berlinia, Brachystegia, Cryptosepalum, Dicymbe, Didelotia, Eperua, Gilbertiodendron, Gleditsia, Intsia, Isoberlinia, Julbernardia, Microberlinia, Monopetalanthus, Paraberlinia, Paramacrolobium, Pellegriniodendron, Tetraberlinia, Toubaouate.</i>
Papiloioideae (Papilionaceae)	<i>Aldinia, Gastrolobium, Gompholobium, Jacksonia, Lonchocarpus, Mirbelia, Oxyllobium, Pericopsis.</i>
FAMÍLIA	GÊNERO
ANGIOSPERMAS	
Fabaceae (Leguminosae/Fabales)	
Mimosoideae (Mimosaceae)	<i>Acacia, Calliandra</i>
Fagaceae	<i>Castanea, Castanopsis, Fagus, Lithocarpus, Quercus.</i>
Junglandaceae	<i>Carya, Engelhardtia</i>
Melastomataceae	ECM (ectendomycorrhizal) associação com ascomiceto (<i>Hymenoscyphus</i>), VAM também: <i>Graffenrieda.</i>
Meliaceae	<i>Owenia</i>
Myrtaceae	<i>Allosyncarpia, Agonis, Angophora, Baeckea, Eucalyptus, Leptospermum, Melaleuca, Tristania, Tristaniopsis.</i>

⁷⁹ BRUNDRETT, M.C. - **Mycorrhizas in natural ecosystems**. In: Macfayden A, Begon M, Fitter AH (eds) *Advances in Ecological Research*, v. 21, p. 171-313. Academic Press, London. 1991.

⁸⁰ BRUNDRETT, M.C. - Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. **New Phytologist**, v. 154, p. 275-304, 2002.

Nothofagaceae (Fagaceae)	<i>Nothofagus</i>
Nyctaginaceae	<i>Guapira, Neea, Pisonia.</i>
Phyllanthaceae (Euphorbiaceae)	<i>Uapaca*</i> , <i>Ampera</i> , <i>Poranthera</i> (*antigamente na Uapaceaceae).
Polygonaceae	<i>Polygonum</i> (ervas dos Alpes e ártico), <i>Coccoloba</i> (árvore tropical).
Rhamnaceae	<i>Cryptandra, Pomederris, Spyridium, Trymalium.</i>
Rosaceae	<i>Dryas</i> (ervas dos Alpes e ártico), <i>Cercocarpus*</i> , <i>Purshia**</i> VAM também.
Salicaceae	<i>Populus, Salix.</i>
Sapotaceae	<i>Manilkara.</i>
Sarcocaulaceae Família intimamente relacionada com Dipterocarpaceae e Cistaceae	<i>Leptolaena, Sarcocaula, Schizolaena.</i>
Tiliaceae	<i>Tilia</i>
Monocotiledôneas	
Cyperaceae	<i>Kobresia</i> (ervas dos Alpes e ártico)

Associações micorrízicas e outros meios de nutrição das plantas vasculares: compreendendo a diversidade global de plantas hospedeiras, resolvendo informações conflitantes e desenvolvendo meios confiáveis de diagnóstico⁴⁷.

Existem duas categorias básicas morfológicas de fungos ectomicorrízicos: (i) associações com angiospermas, tais como *Eucalyptus*, *Betula*, *Populus*, *Fagus* e *Shorea*, que apresentam uma rede de Hartig confinada às células epidérmicas, e (ii) associações com gimnospérmicas, tais como membros das famílias *Pinaceae* onde o líquido Hartig ocupa múltiplas camadas de células no córtex⁴⁰. Cerca de 3% das espécies de Fanerógamas são colonizados por fungos ectomicorrízicos (ECM), que inclui plantas com uma grande distribuição mundial, como por exemplo, espécies das famílias *Pinaceae* e *Fagaceae*⁷⁶.

Portanto, sendo o *Scleroderma spp.* um fungo ectomicorrízico ele estabelece relações simbióticas com várias espécies vegetais de diferentes de famílias: *Quercus acutissima* (Carruthers) (*Fagaceae*), um carvalho originalmente nativo do Japão, China e Coréia, porém atualmente também é encontrado na América do Norte⁷⁴; *Gnetum spp.* (único gênero da família *Gnetaceae*) se compõe de pequenas árvores perenes encontradas na Ásia, América do Sul e África, as quais, também estabelecem simbiose com ectomicorrizas de diferentes espécies de *Scleroderma*⁸¹.

⁸¹ BECHEM, E.E.T., et. al. - Mycorrhiza status of *Gnetum* spp. in Cameroon: evaluating diversity with a view to ameliorating domestication efforts. **Mycorrhiza**, v. 22, p. 99–108, 2012. DOI 10.1007/s00572-011-0384-0

Scleroderma citrinum (Persoon) preferencialmente estabelece associação com *Pinus patula* (Schlechtendal e Chamisso) (Pinnaceae), na Índia. Pode ser facilmente encontrado em húmus ácidos e solos de florestas de espécies lenhosas tanto na Europa como na América do Norte⁸². *Carya illinoensis* (Wangenhein) (noz pecan) pertencente à família Juglandaceae (a mesma da noqueira) também apresentou alta taxa de simbiose com *Scleroderma bovista* (Fries) e *Pisolithus tinctorius* (Persoon), apesar de apresentar associações com mais de 40 tipos de fungos ectomicorrízicos. Outros gêneros de Basidiomicetos encontrados nas raízes de *Carya illinoensis* (Wangenhein) foram: *Hebeloma*, *Hymenogaster*, *Russula*, *Inocybe*, *Thelephora*, *Xerocomus*, e *Sebacina*. Estes fungos parecem melhorar a saúde de plântulas. Isso por que, fungos ectomicorrízicos têm a capacidade de captar nutrientes de muitas formas e são funcionalmente importantes na nutrição mineral de suas plantas hospedeiras⁸³. Simbioses com espécies de *Eucalyptus* também têm sido frequentemente observadas¹⁴, e esta associação é de grande interesse para o setor madeireiro, no Brasil.

Associações ectomicorrízicas são ecologicamente importantes e pobremente estudadas nas florestas equatoriais úmidas da América do Sul. Estudos recentes na Serra de Pakaraima (Guiana) revelaram associações ectomicorrízicas com certas espécies de leguminosas até então não relatadas: basidiomicetos de 75 espécies ou morfo-espécies distribuídas entre as famílias Boletaceae, Amanitaceae, Russulaceae, Cortinariaceae, Cantharellaceae, Clavulinaceae, e Entolomataceae foram identificadas⁸⁴. A maioria dos estudos realizados sobre fungos ectomicorrízicos se concentra principalmente naqueles que ocorrem acima do solo, os fungos ectomicorrízicos epígeos. Por outro lado, aqueles que se encontram abaixo dele, como alguns dos basidiomicetos, os ectomicorrízicos hipógeos, são ainda pouco estudados³⁶.

⁸² NATARAJAN, K., et. al. - On the occurrence of *Scleroderma citrinum* in India. **Current Science**, v. 48, n. 24, p. 1086-7, 1979.

⁸³ BONITO, G., et. al. - Ectomycorrhizal fungal diversity in orchards of cultivated pecan (*Carya illinoensis*; Juglandaceae). **Mycorrhiza**, v, 21, p. 601–612, 2011.

⁸⁴ HENKEL, T.W., et. al. - Ectomycorrhizal fungi and their leguminous hosts in the Pakaraima Mountains of Guyana. **Mycological Research**, v. 106, n. 5, p. 515–531, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0953756202005919>.

As ectomicorrizas apresentam uma série de metabólitos secundários destacando-se alcalóides, quinolinas, compostos indólicos, pirrolidinas, cumarinas, triterpenos, etc.. Estudos realizados por Gill (2003)³ e por Zhou e Liu (2010)⁴ indicam que os pigmentos destes fungos se apresentam na forma de várias substâncias bioativas e estão presentes em várias rotas biogénéticas.

3.4. Metabólitos Secundários

O estudo dos metabólitos produzidos pelos organismos vivos se divide em metabólitos primários e metabólitos secundários.

Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial nos organismos vegetais e animais, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal⁸⁵.

Metabólitos primários compreendem moléculas que são essenciais para a vida; principalmente proteínas, carboidratos, gorduras e ácidos nucleicos. Estas moléculas são produzidas pelo metabolismo das vias comuns a maioria dos organismos e demonstram a unidade fundamental da matéria viva. Por exemplo, o ciclo de Krebs é utilizado pela maioria dos organismos para a produção de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP), enquanto que a fotossíntese é utilizada por todas as plantas verdes para produzir alimento (glicose). O estudo de metabólitos primários (catabolismo e anabolismo) é conhecido como a bioquímica⁸⁵.

Metabólitos secundários de plantas e outros organismos vivos, muitas vezes referidos como produtos naturais, compreendem uma grande variedade de moléculas não proteicas, muitas vezes de peso molecular relativamente baixo, que ocorrem em certas taxas e não são essenciais para o crescimento e desenvolvimento de base, mas estão frequentemente envolvidos na adaptação aos estresses ambientais, tanto bióticos e abióticos. Metabólitos secundários também têm papéis importantes na polinização e dispersão de sementes, bem como na interação de plantas com espécies mutualistas de bactérias e fungos, que envolvem

⁸⁵ STRYER, L. - **Bioquímica**. 4ª Ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1104 p., 1995.

quimiotaxia. Quimiotaxia são interações químicas entre moléculas exsudadas e provenientes de espécies iguais ou diferentes, por exemplo, alelopatia ou função de reconhecimento e recrutamento de predadores (defesa indireta)⁸⁶.

Embora o metabolismo secundário nem sempre seja necessário para que as espécies completem seu ciclo de vida, ele desempenha um papel importante na interação destes com o ambiente. Um dos principais componentes do meio externo cuja interação é mediada por compostos do metabolismo secundário são os fatores bióticos. Desse modo, produtos secundários possuem um papel contra a herbivoria, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e microrganismos simbiotes. Contudo, produtos secundários também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição à UV e deficiência de nutrientes minerais⁸⁷.

Metabólitos secundários são encontrados apenas em organismos específicos, ou grupos de organismos, e é uma expressão da individualidade das espécies, ao contrário dos metabólitos primários, que estão presentes em todos os organismos vivos. Assim, metabólitos secundários são de difusão restrita, e alguns são únicos para uma única espécie⁸⁵. Estes metabólitos não são necessariamente produzidos em todas as condições⁸⁵. Alguns são produzidos em períodos específicos do desenvolvimento do ciclo de vida em contextos ou situações específicas. Estes incluem metabólitos produzidos durante a fome, como antibióticos carbapenêmicos produzido por bactérias *Pseudomonas spp.*, em desenvolvimento, como antibióticos produzidos quando a bactéria *Streptomyces spp.* entra em vias de diferenciação celular, e sinalização, como sensoramento de densidade de moléculas biossintetizadas em determinada cultura de microrganismos³³.

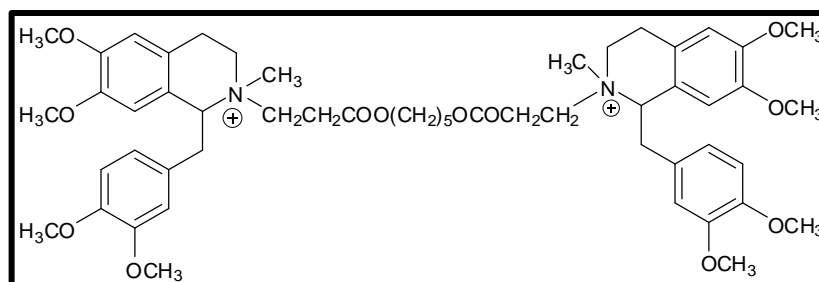
Como consequência prática, esses compostos podem ser utilizados em estudos taxonômicos (quimiosistemática). Um exemplo clássico são as antocianinas e betalainas, as quais não ocorrem conjuntamente em uma mesma espécie vegetal. As betalainas são restritas a algumas famílias de plantas,

⁸⁶ HARTMANN, T. - From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2831–2846, 2007.

⁸⁷ FACCHINI, P.J. - Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 29-66, 2001.

pertencentes à ordem *Caryophyllales*, que conseqüentemente não possuem antocianinas. Como a beterraba (*Beta vulgaris* Linnaeus) pertence a uma dessas famílias (*Chenopodiaceae*), a coloração avermelhada de suas raízes só pode ser atribuída à presença de betalainas, e não às antocianinas, como erroneamente costuma se pensar⁸⁸.

Estas milhares de moléculas produzidas como metabólitos secundários têm aplicações interessantes em farmacologia, indústria química, novos materiais e agricultura. Sendo os metabólitos secundários um tipo de produto natural, causam enorme impacto na vida humana: quinino foi descoberto ser um agente antimalárico. Sem esta solução, possivelmente a colonização das Américas teria tido um resultado diferente⁸⁹. Ou o exemplo da utilização do curare, um veneno relaxante muscular extraído da planta *Chondrodendron tomentosum* (Ruiz e Pavon) e *Strychnos sp.*, há muito usado pelos indígenas para a caça. Ele exerce seu efeito antagonizando a ação da acetilcolina na junção neuromuscular e levou a morte muitos dos conquistadores espanhóis no século XVI. Este veneno levou ao desenvolvimento do atracúrio (**1**), que permite uma redução do tempo da anestesia durante a cirurgia⁹⁰.



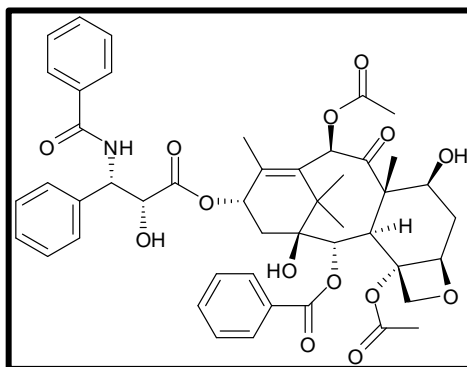
Atracúrio (1)

⁸⁸ PERES, L.E.P. - **Metabolismo secundário** (Apostila). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - lazaropp@esalq.usp.br, 2004.

⁸⁹ CROTEAU, R., et. al. - Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L., eds. Biochemistry and molecular biology of plants. **American Society of Plant Physiologists** (ASPP), Rockville, p. 1250–1318, 2000.

⁹⁰ BISSET, N.G. - War and hunting poisons of the New World. Part 1. Notes on the early history of curare. **Journal Ethnopharmacology**, v. 36, p. 1-26, 1992.

A diversidade dos metabólitos secundários também resulta de compostos de origem mista. É muito comum se encontrar compostos oriundos de uma combinação de intermediários derivados de diferentes rotas metabólicas. Um exemplo típico são os flavonóides, os quais são montados a partir de intermediários das rotas acetato-malonato e chiquimato. O alcalóide Taxol (**2**) é classificado como uma amida diterpênica, cuja porção terpênica deriva de isopentenil bifosfato, proveniente da rota dos isoprenóides (terpenóides) e a porção amídica de fenilalanina da Rota dos Compostos Fenólicos. O envolvimento de duas ou mais rotas na biossíntese de alguns metabólitos secundários contribui para o alto grau de complexidade na regulação do fluxo metabólico que leva a estes compostos²³.



Taxol (**2**)

Devido à sua complexidade estrutural, incluindo frequentemente vários centros quirais, os metabólitos secundários de plantas são muito difíceis para sintetizar quimicamente com rendimentos adequados, fazendo das plantas ou das células e tecidos derivados, a única fonte comercialmente viável destas moléculas⁹¹. As plantas ainda formam as mais importantes fontes de drogas derivadas de produtos naturais. Fungos e organismos marinhos têm recebido atenção de pesquisadores e representam novas fontes potenciais para a descoberta de novas

⁹¹ WU, S., et. al. - Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p.145–152, 2008.

estruturas bioativas com potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos⁹².

Um fungo ascomiceto filamentosso habitante do solo, *Tolypocladium inflatum* (Walter Gams), foi responsável pela descoberta do agente imunossupressor ciclosporina A (**3**), um marco na medicina na década de 1980⁹³. A década de 1980 acabou por ser a década de pesquisa de produtos naturais em que houve o ressurgimento na descoberta de compostos úteis a partir de fontes de fungos, não só antibióticos, mas também para outras áreas terapêuticas. Casos de sucesso incluem o agente de redução do colesterol mevinolina (**4**), uma das chamadas estatinas, isoladas do *Aspergillus terreus* (Thom) e a asperlicina (**5**) antagonista de doenças gastrointestinais e do Sistema Nervoso Central (SNC) isoladas de *Aspergillus alliaceus* (Thom e Church)⁹⁴. A manipulação da estrutura deste composto levou à descoberta das benzodiazepinas (**6**) utilizada para o tratamento de ansiedade grave e insônia^{95,96}.

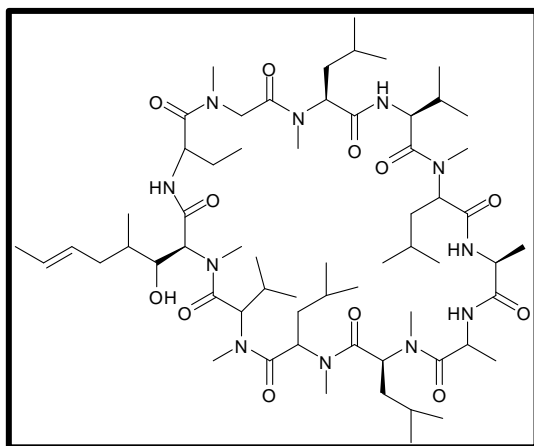
⁹² VERDAM, M.C. dos S., et. al. - O estudo de plantas medicinais e a correta identificação botânica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 11, n. 1, p. 7-13, 2010.

⁹³ DREWS, J. - Drug discovery: a historical perspective. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 1960-1964, 2000.

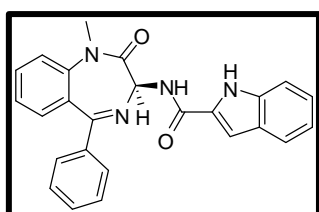
⁹⁴ PINTO, A.C., et. al. - Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.

⁹⁵ PÉREZ, J.A.G. - **Panorama actual de la química farmacêutica** – Sevilla, Universidad de Sevilla, Secretariado de Publicaciones, 385 p., 2004.

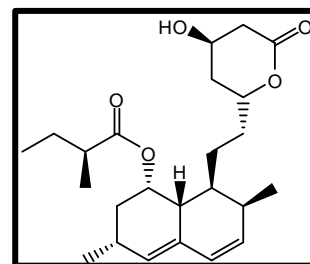
⁹⁶ BARREIRO, E.J., et. al. - **Química medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**, **Artmed**, 2008, 2ª edição, Porto Alegre, 526 p.



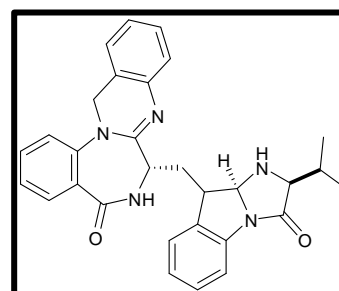
Ciclosporina A (3)



Benzodiazepiana (devazepido)(6)



Mevinolina (4)



Asperlicina (5)

Os blocos de construção para os produtos naturais são frequentemente os constituídos de monômeros (por exemplo, aminoácidos para peptídeos não ribossomais e isoprenil-pirofosfatos para terpenos) de vias metabólicas primárias, que são desviados para as vias secundárias quando um canal metabólico particular está aberto⁹⁷.

Há milhares de anos, medicina e produtos naturais estão associados pelo uso de medicamentos tradicionais e venenos naturais. Os primeiros registros foram escritos em placas de argila na Mesopotâmia em 2600 a.C. O registro farmacêutico antigo mais conhecido é o papiro egípcio de Ebers datado de 1500 a.C., um documento que descreve cerca de 700 drogas (principalmente a partir de plantas). Ele inclui fórmulas para gargarejos, cataplasmas, infusões, comprimidos e pomadas⁹⁸. A Matéria Médica Chinesa e Sistemas de Ayurveda Indiana têm registros de 1100 a.C. e 1000 a.C., respectivamente⁹². Estes medicamentos

⁹⁷ HUBBARD, B.K., et. al. - Vancomycin assembly: nature's way. **Angewandte Chemie International**, v. 42, n. 7, p. 730-765, Ed. 2003.

⁹⁸ CRAGG, G.M., et. al - Biodiversity: A continuing source of novel drug. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, p. 7-24, 2005.

tradicionais, que derivam principalmente de plantas, após estudos clínicos, farmacológicos e químicos, formaram a base da maior parte dos medicamentos (produto farmacêutico tecnicamente obtido ou elaborado com a finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico)¹⁰² atuais. Exemplos famosos incluem a droga cardiotônica e antiarrítmica digitoxina (**7**) a partir de espécies de *Digitalis purpurea* (Linnaeus) e *Digitalis lanata* (Ehrhart)⁹⁹, aspirina[®] ou ácido acetilsalicílico (**8**), derivados de ácido salicílico, isolados da casca do salgueiro (*Salix alba* Linnaeus) e pilocarpina (**9**) alcalóide extraído do *Pilocarpus microphyllus* (Stapf)^{100,101}, já conhecida há tempos pelos índios sul-americanos tupis-guaranis⁹².

Sabe-se que muitos compostos naturais são constantemente utilizados como modelos de drogas (de acordo com a ANVISA¹⁰², droga é uma substância ou matéria prima que tenha finalidade medicamentosa ou sanitária) sintéticas e semissintéticas de uso farmacêutico e medicinal^{100,103}. Dados revelam que entre 60 e 75% dos novos fármacos contra câncer e doenças infecciosas aprovados entre 1981 e 2002⁹⁸ foram originados ou apresentaram sua estrutura química baseada naquelas presentes em produtos naturais como os alcalóides isolados de *Catharanthus roseus* (Linnaeus), o etoposídeo (**10**) derivado do *Podophyllum peltatum* (Linnaeus), o taxol (**2**) isolado da *Taxus brevifolia* (Nuttall) e, recentemente, o ipomeanol (**11**), derivado do fungo *Fusarium solani* (Martius)^{104,105,106}, todos indicados como anticancerígenos⁸⁷.

⁹⁹ KALANT, H., et. al. - **Princípios da Farmacologia Médica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 5ª edição, 688 p., 1989.

¹⁰⁰ COUTINHO, A.C. - **Dicionário enciclopédico de Medicina**. 3ª ed. Argo Editora. Lisboa, Portugal, 2533 p., 1997.

¹⁰¹ BUTLER, M.S. - The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal Natural Product**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

¹⁰² ANVISA, portaria SVS/MS nº 344 de 12 de maio de 1998, em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/conceito.htm#1.1>, acesso em 28/05/2013.

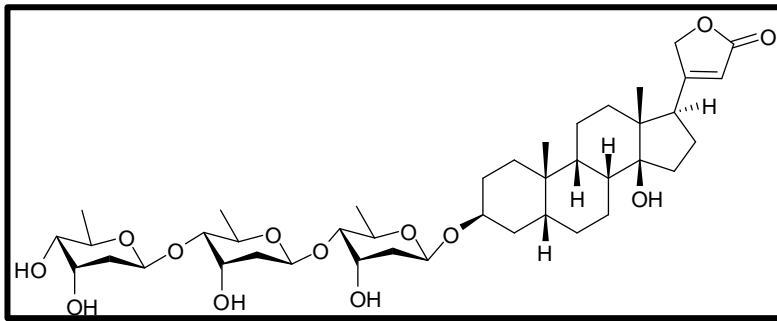
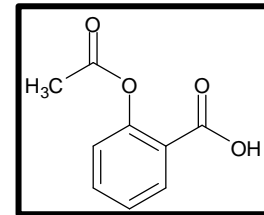
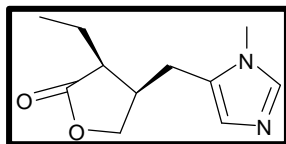
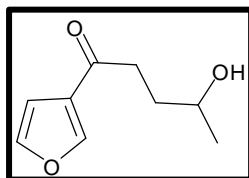
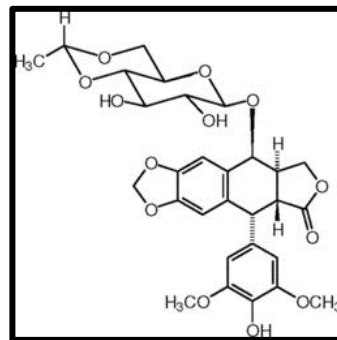
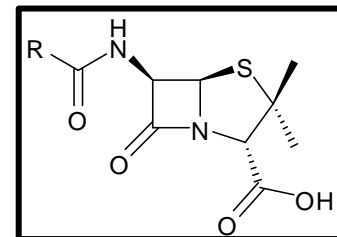
¹⁰³ LAM, K.S. - New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v.15, n. 6, p. 279-289, 2007.

¹⁰⁴ YOUNES, R.N., et. al. - Selection, extraction and identification of new anti-cancer drugs from Brazilian plants. **Acta Oncológica Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 15-19, 2000.

¹⁰⁵ YOUNES, R.N., et. al. - Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics**, v. 62, n. 6, p. 763-768, 2007.

¹⁰⁶ CRAGG, G. M., et. al. - Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 112-116, 1997.

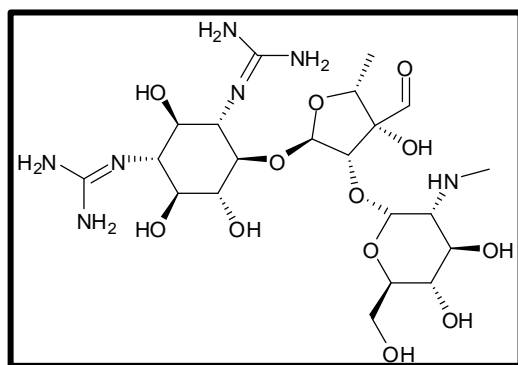
Drogas naturais derivadas de microrganismos têm uma história mais curta, seu impacto sobre a medicina remonta apenas para cerca de 60 anos atrás com a introdução do antibiótico penicilina (**12**), descoberta por Fleming em 1924 que foi reestudada e os seus testes clínicos realizados em 1940¹⁰⁰.

Digitoxina (**7**)Ácido acetilsalicílico (**8**)Pilocarpina (**9**)Ipomeanol (**11**)Etoposídeo (**10**)Penicilinas (**12**)

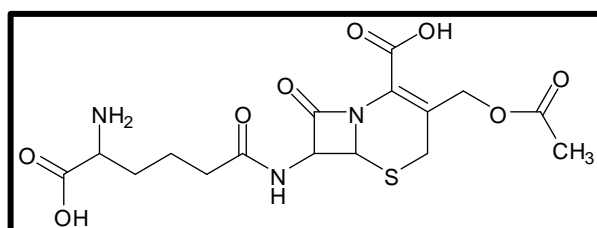
Desde então, os microrganismos têm desempenhado um papel importante na química dos produtos naturais. O enorme sucesso da penicilina levou a um esforço mundial por parte de empresas farmacêuticas e de grupos de pesquisa para montar grandes coleções de microrganismos, a fim de tentar descobrir novos antibióticos¹⁰³. O esforço valeu a pena, e de fato, os primeiros anos foram extremamente prolíficos e contou com a descoberta da estreptomicina (**13**), cloranfenicol (**14**), cefalosporina

C (15), e vancomicina. Todos estes compostos ou seus derivados, estão ainda em uso como drogas¹⁰⁷.

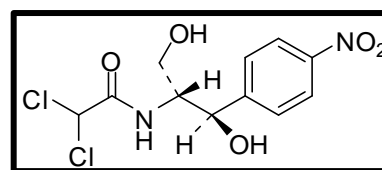
Produtos naturais que possuem metabólitos produzidos por microrganismos tiveram seu auge na indústria farmacêutica nos anos 1970 e 1980¹⁰⁸. Isto ocorreu provavelmente devido a descoberta em 1970 do mecanismo de investigação com base no fracionamento biomonitorado⁹². Alguns dos primeiros compostos identificados no início de 1970 utilizando este método incluíram o inibidor de β -lactamase, ácido clavulânico (16), a partir de *Streptomyces clavuligerus* (Higgins e Kastner). Uma mistura de ácido clavulânico e amoxicilina está ainda hoje em uso como um antibiótico de primeira linha¹⁰³.



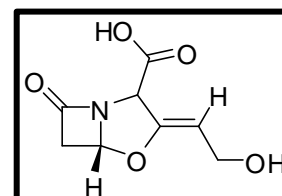
Estreptomicina (13)



Cefalosporina C (15)



Cloranfenicol (14)



Ácido clavulânico (16)

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: compostos fenólicos, alcalóides e terpenos, sendo os policetídeos, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos e aminoácidos não proteicos, grupos menores, mas não em

¹⁰⁷ NEWMAN, D.J., et. al. - The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Report**, v. 17, p. 215–234, 2000.

¹⁰⁸ KOEHN, F.E., et. al. - The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 206-220, 2005.

importância^{23,88}. Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). Por fim, os terpenos são feitos a partir do ácido mevalônico no citoplasma, ou do piruvato e 3-fosfoglicerato, no cloroplasto⁸⁸.

3.4.1. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos estão muito presentes na vida cotidiana do homem. Desse modo, muito do sabor, odor e coloração de diversos vegetais e demais organismos vivos são derivados dos compostos fenólicos, como o aldeído cinâmico da canela (*Cinnamomum zeylanicum*, Blume) e a vanilina da baunilha (*Vanilla planifolia*, Jacks), os quais são largamente empregados na indústria de alimentos^{88,109,110,111,112}. E como são metabólitos secundários, estão relacionados com o desenvolvimento de mecanismos que aperfeiçoam e alongam a vida dos organismos, preparando-os para reveses e estresses, bem como atraindo organismos polinizadores, dispersores de sementes ou predadores de seus predadores.

Além disso, esse grupo de compostos é importante para proteger as plantas contra os raios UV, insetos, fungos, vírus e bactérias patogênicos. Existem certas espécies vegetais que desenvolveram compostos fenólicos para inibir o crescimento de outras plantas competidoras (ação alelopática). Exemplos de compostos fenólicos com ação alelopática são o ácido cafeico e o ácido ferúlico^{44,88,111,112,113,114}.

¹⁰⁹ RIZZINI, C.T., et. al. - **Botânica econômica brasileira**. São Paulo, EPU, EDUSP, 119 p., 1976.

¹¹⁰ GILBERT, K.G., et. al. - Dyes from plants: past usage, present understanding and potential. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 57-69, 2001.

¹¹¹ VAINSTEIN, A., et. al. - Floral fragrance. New inroads into an old commodity. **Plant Physiology**, v. 127, p.1383-1389, 2001.

¹¹² BOUVIER, F., et. al. - Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (Annatto). **Science**, v. 300, p. 2089-2091, 2003b.

¹¹³ TAIZ, L., et. al. - **Plant physiology**. California, The Benjamin/Cummings Publishing Co., 559 p., 1998.

Eles também têm sido considerados fundamentais para a conquista do ambiente terrestre pelas plantas. Esse é o caso da lignina, a qual proporcionou o desenvolvimento do sistema vascular, dando rigidez aos vasos. A parede celular secundária dos vegetais é composta de várias camadas de microfibrilas de celulose incorporada em uma matriz de hemicelulose, lignina e pectina. A parede celular secundária é essencial para a condução da água e a integridade estrutural das plantas vasculares bem como para a defesa contra insetos herbívoros e patógenos^{44,88,109,110,111,112,113,114}.

Do ponto de vista químico, compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Esses compostos são sintetizados a partir de duas rotas metabólicas principais: a via do ácido chiquímico e a via do ácido mevalônico que é menos significativa^{44,88,109,110,111,112,113,114,115}.

Outra importante classe de compostos é a classe dos flavonóides. Embora sejam quase ausentes em fungos, algas, briófitas e pteridófitas, sua importância nas angiospermas é muito grande. Flavonóides formam um grande e heterogêneo grupo de compostos secundários exercendo diversas funções bioativas nos organismos, como enrijecimento da parede celular, germinação do tubo polínico, atração de polinizadores e dispersores de sementes, bem como reações de defesa contra predadores e patógenos e condições de estresse abiótico^{44,88,115}.

Os flavonoides fenólicos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos, constituindo-se em defesas contra pragas, pois se ligam a proteínas digestivas dos predadores, tornando os organismos (vegetais ou não) impalatáveis ou indigestos^{44,88,116}.

Atividade sedativa e ansiolítica dos flavonóides há muito é conhecida: flavonóides presentes em espécies de *Passiflora*^{117,118} têm sido exaustivamente

¹¹⁴ BRISKIN, D.P. - Medical plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. - **Plant Physiology**, v. 12, p. 507-514, 2000.

¹¹⁵ HERRMANN, K.M., et. al. - The shikimate pathway. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 473-503, 1999.

¹¹⁶ SCHIJLEN, E.G.W.M., et. al. - Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2631-2648, 2004.

¹¹⁷ MÜLLER, S.D., et. al. - LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 399-403, 2005.

estudados e explorados como princípios ativos tanto de medicamentos sintéticos como de fitoterápicos para controle/tratamento dos distúrbios do sono e ansiedade^{118,119,120}.

Por serem os flavonóides um grande grupo de metabólitos secundários, várias outras funções têm sido creditadas a eles tal como uma bem conhecida ação antioxidante^{117,121}. As concentrações dos compostos variam de acordo com a espécie, estágio de desenvolvimento, clone ou órgão dos organismos, bem como com os diferentes fatores ambientais. Além disso, determinados taninos e flavonóides têm desempenhado importante papel na defesa contra herbívoros e proteção contra a radiação UVB⁴⁴.

3.4.2. Alcalóides

Já na antiguidade há referência ao uso dessa classe de compostos. Talvez o caso mais famoso seja a execução do filósofo grego Sócrates, condenado a ingerir cicuta (*Conium maculatum*, Linnaeus), uma fonte do alcalóide coniina. Os romanos também faziam uso de alcalóides em homicídios. Os principais alcalóides em questão eram a hiosciamina, a atropina e a baladonina, todos derivados de *Atropa belladonna* (Linnaeus). Tal uso fez com que essa e outras plantas da família Solanaceae ficassem em evidência⁸⁸.

De acordo com Mahmoud et al. (2010)¹²², alcalóides são um grupo de compostos orgânicos cíclicos (Figura 4) de caráter básico, de origem vegetal ou

¹¹⁸ SKERGET, M., et. al. - Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 8, p. 191-198, 2005.

¹¹⁹ SIMMEN, U., et. al. - Preserved pharmacological activity of hepatocytes-treated extracts of valerian and St. John's wort. **Planta Medica**, v. 71, n. 7, p. 592-598, 2005.

¹²⁰ TAI, M.C., et. al. - Therapeutic potential of wogonin: a naturally occurring flavonoid. **Central Nervous System Drug Reviews**, v. 11, n. 2, p. 141-150, 2005.

¹²¹ BETA, T., et. al. - Phenolic content and antioxidant activity of pearled. **Wheat Cereal Chemistry**, v. 82(4), p. 390-393, 2005.

¹²² MAHMOUD, S.S., et. al. - Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. **Proceeding in National Academic Science**, v. 98, n. 15, p. 8915-8920, 2001.

microbiana, contendo, pelo menos, um átomo de nitrogênio em um anel da molécula¹²² já que a presença do átomo de N apresenta um par de elétrons não compartilhados, formando um grupo diverso, de baixo peso molecular. Eles são encontrados em cerca de 20% das espécies de plantas.

Contudo, existem alcalóides de caráter ácido, como a colchicina. Os alcalóides são sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se, em seguida, nos vacúolos e, dessa forma, não aparecem em células jovens. Essa classe de compostos do metabolismo secundário é conhecida pela presença de substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas largamente utilizadas como venenos ou alucinógenos⁸⁸.

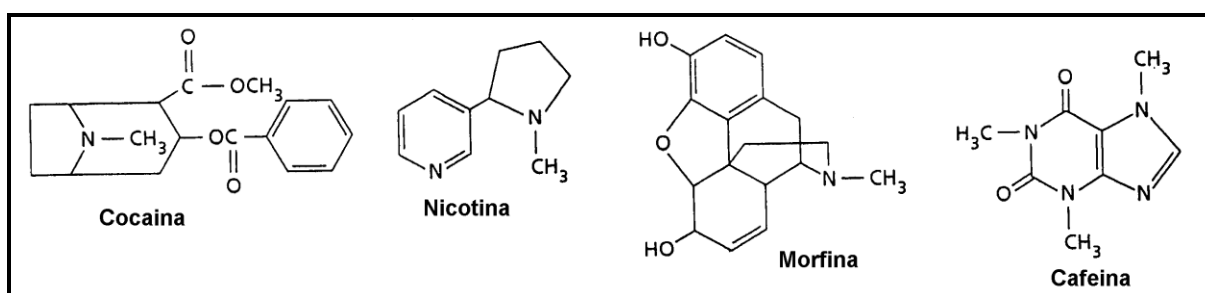
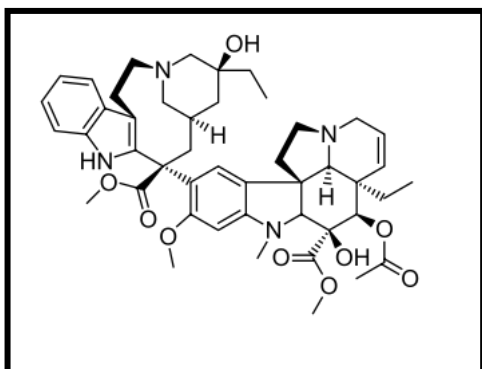
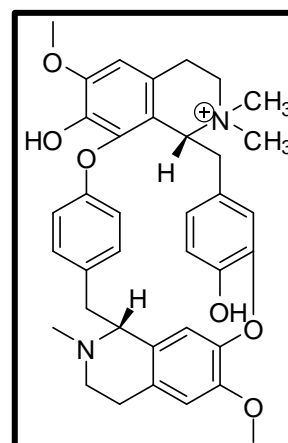


Figura 4: Exemplos de alcaloides. Notar que uma característica comum dos alcaloides é a presença de nitrogênio no anel carbônico. Essa estrutura indica que os alcaloides são derivados de aminoácidos. Desse modo, a cocaína é um alcaloide tropanico derivado de ornitina. A nicotina é um alcaloide pirrolidínico derivado de lisina. A morfina é um alcaloide isoquinolínico derivado de tirosina. A cafeína é um alcaloide purínico, a qual por sua vez é derivada de aminoácidos tais como glicina, ácido L-aspártico e L-glutamina⁸⁸.

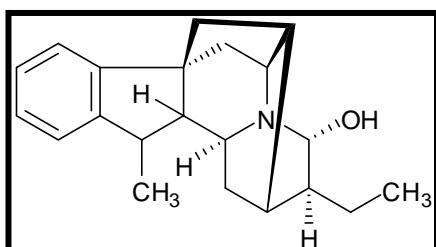
Muitos dos 12.000 alcalóides, com estruturas químicas descritas, têm sido relatados com função de defesa vegetal, contra herbívoros e patógenos. A potente atividade biológica de alguns também levou a sua exploração como medicamentos, estimulantes, narcóticos e venenos, com utilidade clínica ou não, como é caso daqueles que agem como analgésicos no caso da morfina (Figura 4) e da codeína, como agentes anticancerígenos tais como a vimblastina **(17)** e o taxol **(2)**, como relaxante muscular (+)-tubocurarina **(18)**, como antiarrítmico, por exemplo, a ajmalina **(19)** e a escopolamina **(20)** e ainda como sedativos. Outros alcalóides importantes de origem vegetal incluem a cafeína, nicotina, cocaína, e a sintética heroína derivado da morfina (Figura 4)⁸⁷.



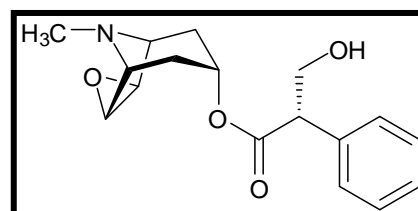
Vimblastina (17)



(+)-tubocurarina (18)



Ajmalina (19)



Escopolamina (20)

Os alcalóides podem ser subdivididos em vários grupos, de acordo com sua origem. Desse modo, têm-se os alcalóides derivados da ornitina, incluem os alcalóides tropânicos (atropina, escopolamina e cocaína), nicotínicos (nicotina), quinolínicos (chinchonina, quinina, quinidina) e os alcalóides pirrolizidínicos (senecionina); alcalóides derivados da lisina são os quinolizidínicos (lupanina), aqueles que se originam de fenilalanina/tirosina, que são os alcalóides isoquinolínicos (morfina, codeína, papaverina), os derivados do triptofano, que são os alcalóides indólicos (vincristina, vimblastina, reserpina), ergotínicos (ergotamina) e terpeno-indólicos, os derivados de uma mistura variada de aminoácidos, como aqueles derivados do ácido nicotínico, os derivados do núcleo de Xantina, os derivados de histidina, e aqueles de fontes diversas, como os imidazólicos [Pilocarpina (9)], indolizidínicos e derivados do ácido antranílico^{87,123,124}.

¹²³ CORDELL, G.A., et. al. - **Photochemistry and Pharmacognosy - Alkaloids and their biosynthesis**. E-Book. Disponível em: www.eolss.net/Sample-Chapters/C06/E6-151-04.pdf. Acesso em: julho 2013.

3.4.3. Terpenos e Esteróis

Terpenos são uma classe de metabólitos secundários que apresentam imensa variabilidade de estrutura química e este termo deriva da denominação dada aos primeiros compostos isolados da turpentina, i.e. “terpentin” em alemão. Todos os terpenos são derivados da condensação repetida de unidades de isopreno (5 carbonos) e daí advém o nome da Rota dos Isoprenóides, embora não seja o isopreno, mas sim o isopentenil pirofosfato (IPP), que atua como precursor biológico desta família de metabólitos⁸⁹. São, portanto uma enorme classe de produtos naturais, abrangendo mais de 30.000 membros^{125,126}. Eles têm sido usados ao longo da história para uma ampla variedade de propósitos, desde perfumes e aromatizantes, até medicamentos¹²⁷.

De todas as três principais categorias de metabólitos secundários, os terpenos e terpenóides correspondem com 55%, seguido dos alcaloides, com 27% do total e, por fim, os compostos fenólicos que participam com 18%⁸⁸. O termo terpeno geralmente refere-se a uma molécula de hidrocarboneto, enquanto que terpenóide refere-se a um terpeno que tenha sido modificado, tal como pela adição de oxigênio. Os isoprenóides são, portanto, os blocos de construção de outros metabólitos como hormônios vegetais, esteróis, carotenoides, borracha, o fitol (cauda de clorofila) e terebentina¹²⁷.

Nas plantas, podem ser biossintetizados através de duas vias metabólicas, ambas partindo de isopentenil pirofosfato (IPP) e di-metilalil pirofosfato (DMAPP) (Figura 5). Cada uma destas unidades de isopreno constitui blocos, que serão

¹²⁴ MOLYNEUX, R.J., et. al. - Pyrrolizidine alkaloid toxicity in livestock: a paradigm for human poisoning? **Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & ampr; Risk Assessment**, v. 28, n. 3, p. 293-307, 2011.

¹²⁵ HEMMERLIN, A., et. al. - Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 29, p. 26666-26676, 2003.

¹²⁶ WALKER, J.R., et. al. - Synthesis and evaluation of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate analogues as chelation-based inhibitors of methylerythritol phosphate synthase. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 9955-9959, 2005.

¹²⁷ ZWENGER, S., et. al. - Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 001-007, 2008.

montados sequencialmente por série de enzimas para produzirem mono, di, sesqui, tetra e politerpenos (Tabela 2 e Figura 5)^{88,127,128}.

Tabela 2. Principais terpenóides encontrados nas plantas.

Nº de Isoprenos	Nº Átomos de Carbono	Terpenos	Exemplos
1	5	Isopreno	
2	10	Monoterpeno	Eucaliptol, Limoneno
3	15	Sesquiterpeno	Nerolidol, Bisabolol
4	20	Diterpeno	Dolabelano – anti HIV
6	30	Triterpeno	Lanosterol,
8	40	Tetra ou Politerpeno	β-Caroteno
N	N	Polisopreno/Politerpeno	Borrachas

Fonte: Peres, 2004⁸⁸; Zwenger e Basu, 2008¹²⁷; Lira et al., 2009¹²⁸.

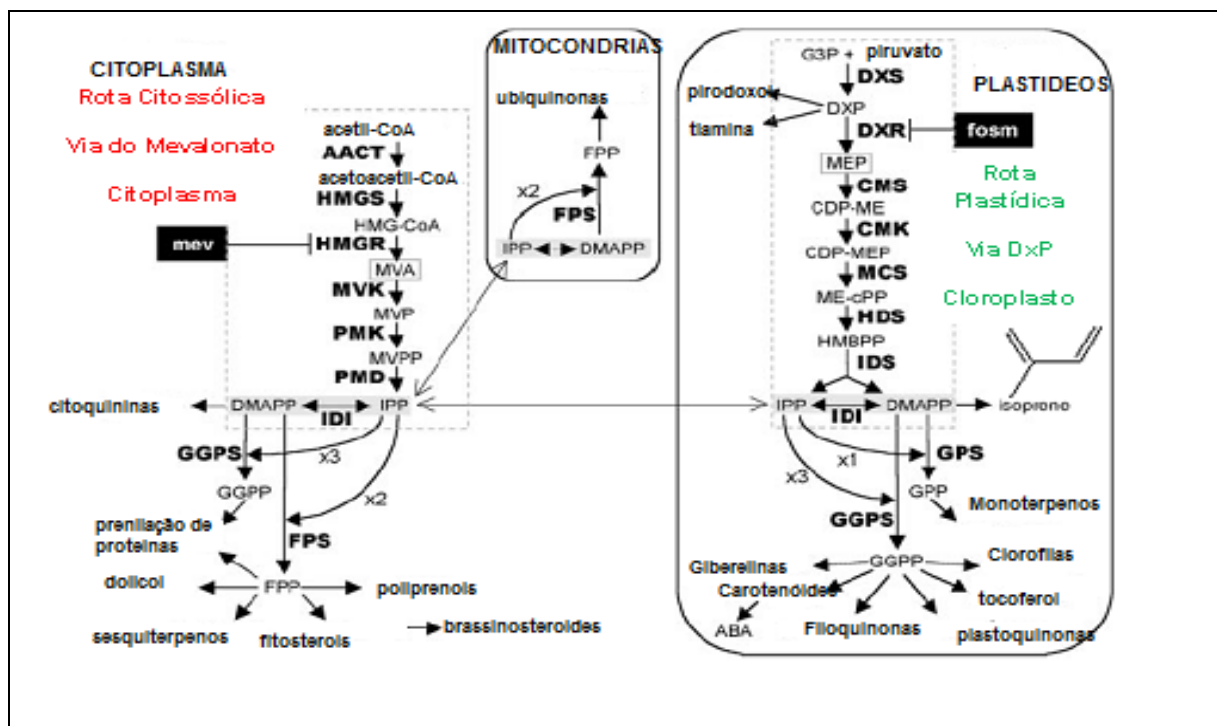


Figura 5 – Compartimentalização da Rota dos Isoprenóides. FPP – Farnesil Pirofosfato; GPP – Geranyl Pirofosfato; GGPP – Geranyl-geranyl Pirofosfato; mev - Mevinolina.; fosm – fosmidomicina. Caracteres em negrito são abreviaturas das enzimas catalisadoras. Setas em negrito simples representam a direção da formação do produto enzimático e as duplas se referem às reações de isomerização; setas simples indicam translocação de compostos entre os compartimentos celulares. Setas truncadas indicam inibição enzimática, juntamente com o respectivo inibidor¹³³.

¹²⁸ LIRA, P.N. et. al. - Essential oil composition of three *Peperomia* species from the Amazon, Brazil. *Natural Product Communications*, v. 4, p. 427-430, 2009.

As duas vias de biossíntese para a produção de IPP e DMAPP são a via do mevalonato (MVA) (Figura 6) e a mais recentemente descoberta, a via da desoxixilulose-5-Fosfato (DxP)¹³¹ (Figura 7).

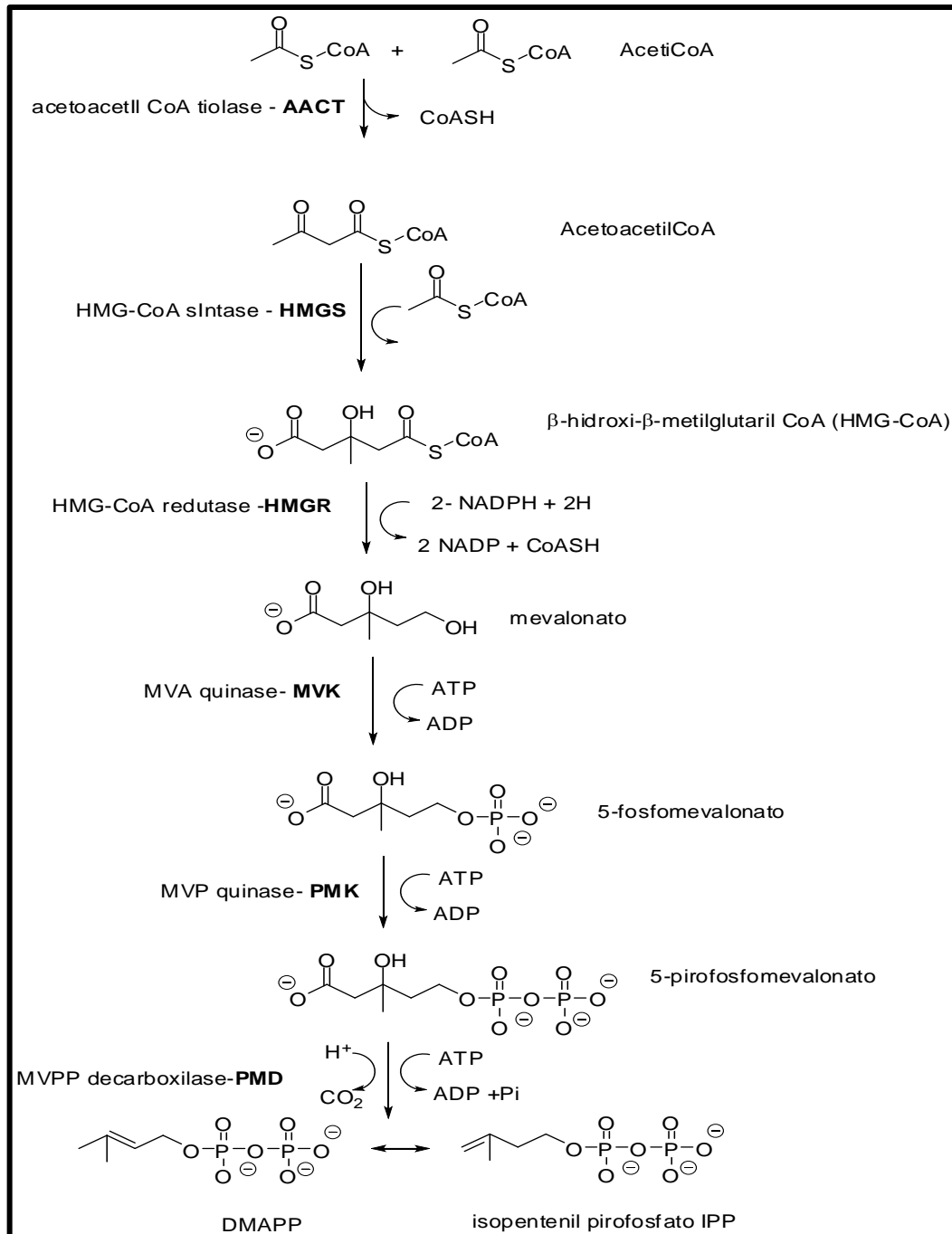


Figura 6: Rota citosólica – Via do mevalonato (MVA)¹³²

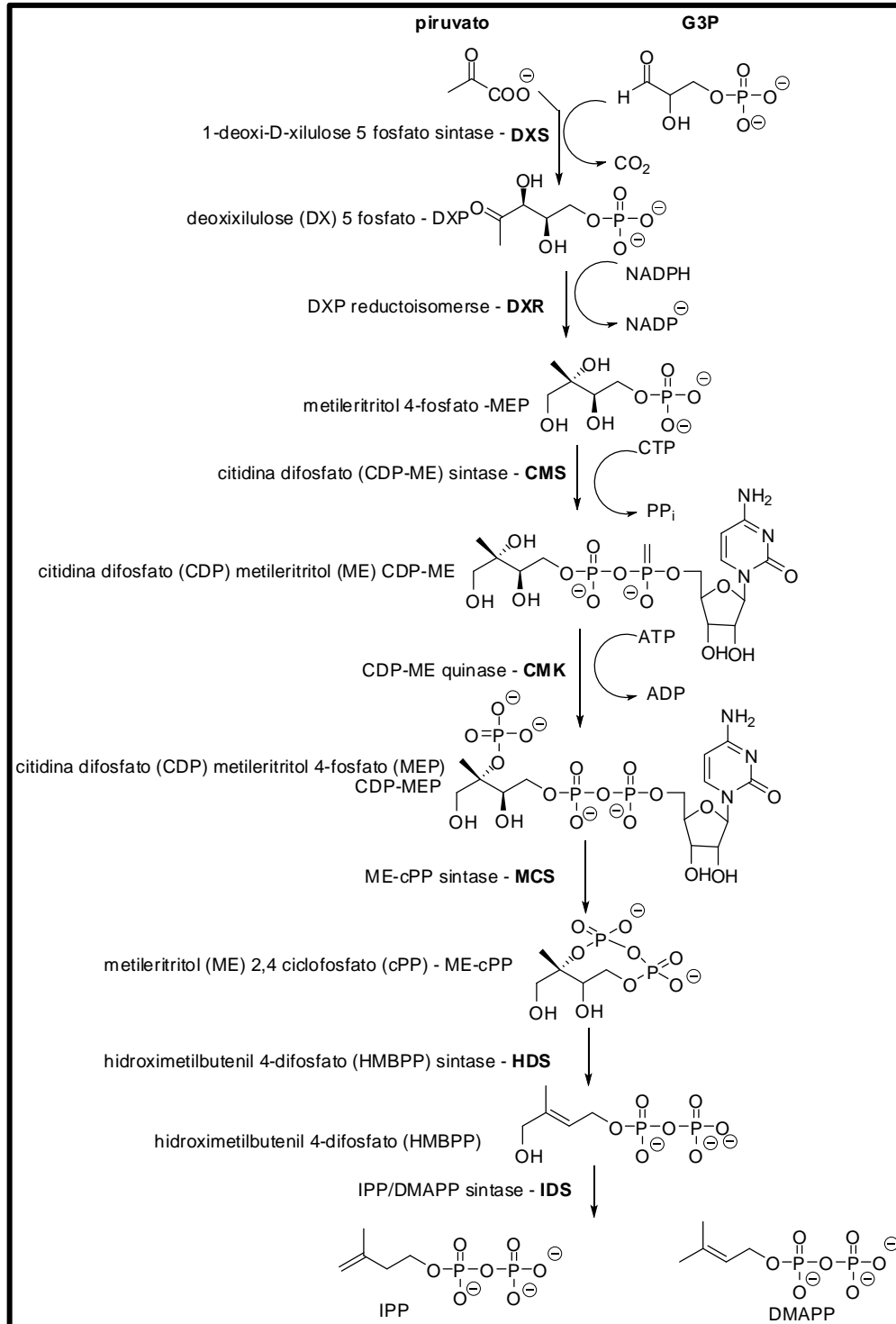


Figura 7: Via plastidica – metileritritol 4-fosfato (MEP)¹³²

Terpenos podem compor hormônios, como os hormônios vegetais giberelinas e ácido abscísico (ABA), participam da fotossíntese através da biossíntese de pigmentos fotossintéticos (carotenóides e cadeia de fitol da clorofila, bem como a própria biogênese de cloroplastos); constituem elementos estruturais, através da

biossíntese de componentes estruturais de membrana, como fitosteróis; integram substâncias atrativas para polinizadores e dispersores de sementes (terpenos voláteis e coloridos, como monoterpenos, sesquiterpenos e carotenóides) e de defesa vegetal (terpenos de resina, fitoalexinas e fitoanticipinas^{122,125,129,130,131}. A importância desta classe de metabólitos é muito grande, pois os compostos nela presentes participam tanto do metabolismo primário como do secundário¹³².

A rota citosólica do MVA fornece IPP para produção de sesquiterpenos (C15), triterpenos (C30), cadeia lateral da ubiquinona e esteróis^{89,122,130,133,134,135}, a partir de acetil-CoA passando pelo intermediário ácido mevalônico, do qual deriva o nome desta rota citosólica (Figura 5)^{89,122,133,134,135}. A rota plastídica MVA-independente é responsável pela biossíntese dos isoprenos (C5), monoterpenos (C10), certos sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), tertraterpenos (C40) e politerpenos (C40+x ou (C5)_n onde n=9 à 30.000), como carotenóides e cadeias laterais dos tocoferóis, filoquinonas e clorofilas (Figura 5)^{89,133,135,136}. Esta via plastídica (Figura 8) é iniciada pela a condensação de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (G3P-GAP), gerando um primeiro intermediário 1-desóxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP), seguido de isomerização e redução deste intermediário a 2-C-metileritritol-4-fosfato (MEP). Em decorrência,

¹²⁹ LANGE, B.M., et. al. - A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. **Proceeding in National Academic Science**, v. 95, p. 2100-2104, 1998.

¹³⁰ KORTH, K.L., et. al. - Developmental and light-regulated post-translational control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase levels in potato. **The Plant Journal**, v. 23, n. 4, p. 507-516, 2000.

¹³¹ MAHMOUD, S.S., et. al. - Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 8, p. 366-373, 2002.

¹³² RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M., et. al. - Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during arabidopsis seedling development. **The Plant Cell**, v. 16, p. 144-156, 2004a.

¹³³ EISENREICH, W., et. al. - Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 2, 78-84, 2001.

¹³⁴ ESTÉVEZ, J.M., et. al. - 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 22901–22909, 2001.

¹³⁵ RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M., et. al. - Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1079-1089, 2002.

¹³⁶ DUBEY, V.S., et. al - An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Bioscience**, v. 28, n. 5, p. 637–646, 2003.

esta rota tem sido denominada de Rota Mevalonato-Independente, Rota da DXP ou ainda Rota MEP^{89,122,133,134,135,137}.

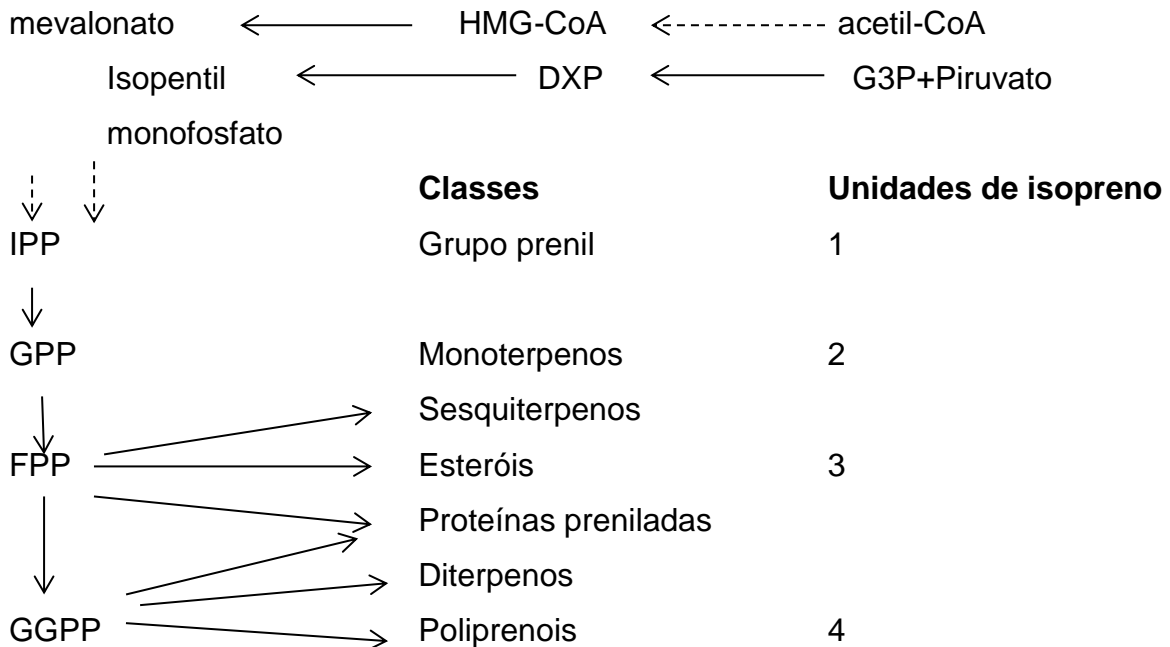


Figura 8: Descrição da via biossintética isoprenóide em plantas com respeito aos tipos de produtos finais e a sua importância fisiológica. Flechas quebradas indicam várias etapas ou reações¹³⁸.

Os terpenos participam ativamente da vida cotidiana nas sociedades humanas. Indústrias farmacêuticas e de alimentos têm explorando-os principalmente como medicamentos, realçadores de sabor e aromatizantes, devido sua eficácia. Vários são os terpenos importantes (Figura 9): cânfora, mentol, piretrinas (inseticidas), produtos de limpeza, agentes antialérgicos e solventes. β -Caroteno, rosina (um diterpeno), limoneno, carvona, hecogenina (um detergente) e digitoxigenina, Vitamina D₂ e colesterol também são importantes terpenos^{89,127}. A agropecuária também tem mostrado um interesse crescente nos terpenos. Eles demonstraram atividade antimicrobiana e isto é importante devido ao aumento na resistência das bactérias aos antibióticos, que está ocorrendo globalmente e em um

¹³⁷ PROTEAU, P.J. - 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: an overview. **Bioorganic Chemistry**, v. 32, p. 483-493, 2004.

¹³⁸ NEWMAN J.D., et. al. - Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34(2), p. 95–106, 1999.

ritmo alarmante. Adição de terpenos na alimentação do gado pode substituir antibiótico convencional, que por sua vez iria reduzir a taxa de antibiótico a resistência das bactérias. Óleos vegetais que contêm terpenos (mono e sesquiterpenos) são bastante promissores no combate a uma variedade de bactérias. Por exemplo, óleo de canela mostrou atividade de amplo espectro contra *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter)¹²⁷. Outros micróbios também têm se mostrado inibidos por terpenos como, por exemplo, triterpenos de *Ekebergia capensis* (Sparman) se mostraram eficazes no combate ao *Plasmodium falciparum* (Welch), agente causador da malária¹³⁹.

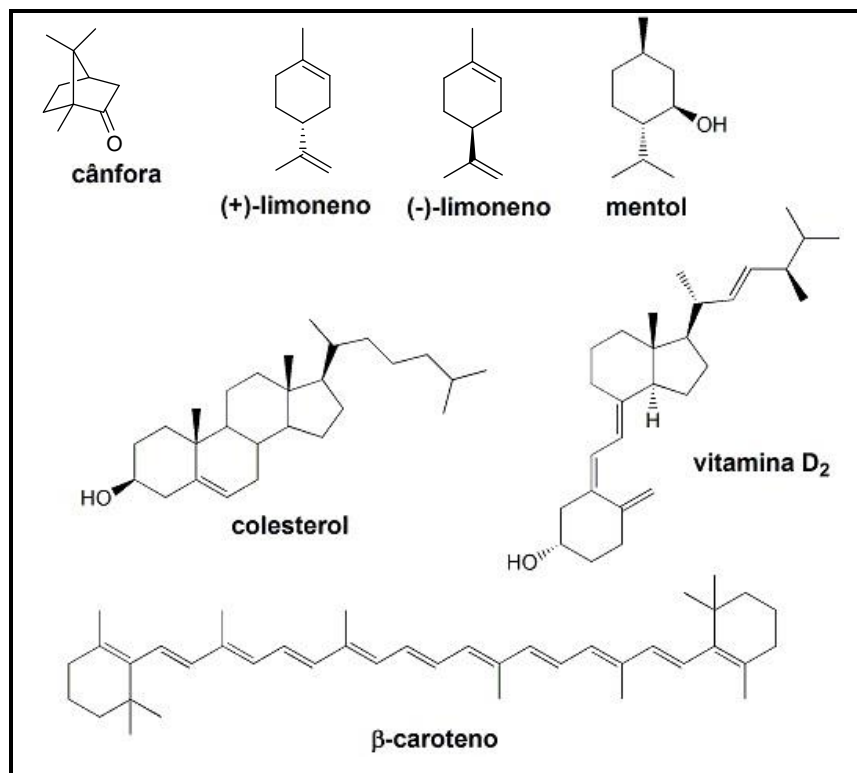


Figura 9 – Alguns terpenos importantes

Outro exemplo é o cumeno (isopropilbenzeno) que tem sido utilizado em estudos de biorremediação. Em experimento realizado com bactérias o cumeno apresentou resultados satisfatórios, pois promoveu o aumento de absorção de

¹³⁹ MURATA, T., et. al. - Antiplasmodial triterpenoid from *Ekebergia capensis*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 2, p. 167–174, 2008.

tricloroetileno (organoclorado-veneno) pelas diferentes cepas bacterianas¹²⁷. Fungos também podem promover o aumento na resistência e sobrevivência de plantas hospedeiras em áreas contaminadas com metais ou outras substâncias tóxicas. Uma variedade de fungos ectomicorrízicos tem demonstrado capacidade de degradar cinco das principais classes dos chamados poluentes orgânicos persistentes (POPs). Entende-se que há também um benefício para o ecossistema, já que a inoculação das plantas com fungos micorrízicos pode diminuir significativamente a quantidade de fertilizantes requerida para o cultivo de vegetais^{140,141}. As raízes colonizadas possuem maior longevidade, e uma maior resistência a patógenos, a elementos tóxicos presentes no solo e a condições extremas de temperatura, acidez e umidade¹⁴².

Alguns estudos mostram que pode haver outros benefícios indiretos às raízes hospedeiras. Marx (1972)¹⁴³ sugere que o estabelecimento da simbiose ectomicorrízica aumenta drasticamente o conteúdo de polifenóis ou terpenos das raízes, inibindo o crescimento de patógenos radiculares. Sylvia e Sinclair (1983)¹⁴⁴ e Smith e Read (1997)²⁶ sugerem que a produção de compostos fenólicos pelos tecidos vegetais, em resposta à presença de fungos micorrízicos, pode ser responsável pela redução de doenças causadas por *Fusarium oxysporum* (Schlecht) em *Pseudotsuga menziesii* (Mirbel), *Picea abies* (Linnaeus) e *Pinus sylvestris* (Linnaeus).

¹⁴⁰ MARX, D.H. - The practical significance of ectomycorrhizae in forest establishment. **In: The Marcus Wallenberg foundation Symposia Proceedings:7**. M. Wallenberg Foundation, Stockolm: p. 54-90, 1991.

¹⁴¹ MARX, D.H., et. al. - Application of specific ectomycorrhizal fungi in Word Forestry. **In: LEATHAM, G.F. (Ed.). Frontiers in Industrial Mycology**. Chapman & Hall, New York, USA. p. 78-98, 1992.

¹⁴² ALLEN, M.F. - **The ecology of mycorrhizae**. University Press, 1991. Cambridge UK. 184 p.

¹⁴³ MARX, D.H. - Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. **Annual Review Phytopathology**, v. 10, p. 429-454, 1972.

¹⁴⁴ SYLVIA, D.M., et. al. - Phenolic compounds and resistance to fungal pathogens induced in primary roots of Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. **Phytopathology**, v. 73, p. 390-397, 1983.

3.5. Metabólitos Secundários em Basidiomicetos

Ainda no século passado, aproximadamente 3.000 metabólitos de fungos haviam sido listados, dos quais muitos têm atividades biológicas com potencial para uso como agroquímico ou médico. Mais de 300 micotoxinas são conhecidas, provenientes de mais de 350 espécies de fungos: quando as variações dentro das espécies são consideradas, estima-se que existam 10.000 espécies produtoras de micotoxinas que possam reagir com gêneros alimentícios¹⁴⁵.

Basidiomicetos se constituem em uma fonte única rica em metabólitos secundários, muitos dos quais não são encontrados nos demais fungos¹⁴⁶. Os fungos estão entre os maiores produtores de metabólitos secundários, muitos dos quais estão entre os mais tóxicos para os demais organismos vivos do planeta¹⁴⁵. Muitos destes metabólitos ainda têm sua função desconhecida tanto nos fungos, como para outros seres vivos, apesar de que existe farta bibliografia alusiva aos efeitos dos metabólitos secundários fúngicos de impacto nocivos, como as toxinas ou benéficos, como os antibióticos. Embora os biólogos moleculares tenham apenas "arranhado" a superfície do metabolismo secundário, fungos filamentosos, tais como o gênero *Aspergillus*, parecem ter evoluído para formas sofisticadas de produção e regulando uma infinidade de metabólitos secundários^{145,147}. A capacidade para regular o metabolismo secundário é creditada a adaptação para assegurar a exploração eficiente do ambiente e de recursos e sintetizar compostos energeticamente caros, bem como lançar mão destes compostos como armas químicas contra seus inimigos naturais e concorrentes. Portanto, a diversidade química de tais compostos e sua regulação em fungos podem ser consideradas como um ponto-chave na vida, onde, pela seleção natural, quem sobrevive não é o mais forte, nem o mais inteligente, mas sim o mais apto e o mais adaptável^{145,147}.

¹⁴⁵ PATERSON, R.R.M. - Standardized one- and two-dimensional thin-layer chromatographic methods for the identification of secondary metabolites in *Penicillium* and other fungi. **Journal of Chromatography**, v. 368, p. 249-264, 1986.

¹⁴⁶ ESSER, K. - **The Mycota**. Anke, T.; Weber, D. Volume XV: Physiology and genetics: selected basic and applied aspects. 1ª ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.

¹⁴⁷ ROHLFS, M., et.al. - **Evolutionary and ecological interactions of mould and insects**. In: Esse, K. (ed). **The Mycota**. Volume XV – Cap. 7. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009.

Metabólitos secundários são específicos de espécies e frequentemente se acumulam em certos estágios de desenvolvimento ou durante diferenciação morfogênica. Uma pesquisa realizada incluiu mais de 1.500 metabólitos secundários e forneceu evidências de que mais de 50% dos metabólitos mostrou atividade antibacteriana ou antifúngica¹⁴⁷. Alguns até mostraram atividade antitumoral¹⁴⁵. Esta última pode ser devida ao fato de que as moléculas antifúngicas podem também prejudicar outras células eucarióticas, incluindo células de tumor. Metabólitos secundários de fungos podem ser separados em quatro grupos: alcalóides, peptídeos não ribossômicos, policetídeos e terpenos^{146,147}. Exemplos de alguns metabólitos bem caracterizados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Alguns dos metabólitos secundários importantes produzidos por fungos.

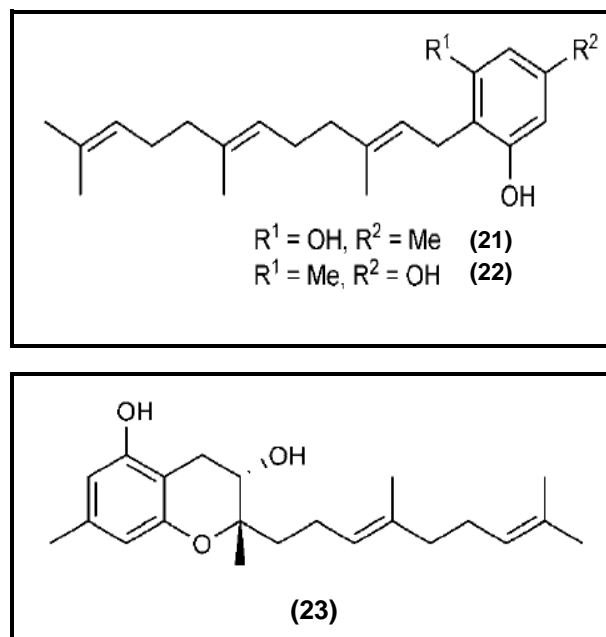
Grupo principal	Metabólito secundário	Organismo
Alcalóides	Ergotamina	<i>Claviceps purpúrea</i> (Fries)
Peptídeos	Gliotoxina	<i>Aspergillus fumigatus</i> (Fresen)
	Ciclosporina	<i>Tolypocladium inflatum</i> (Gams)
Policetídeos	Aflotoxina	<i>Aspergillus flavus</i> (Link)
	Lovastatina	<i>Aspergillus terreus</i> (Thom)
Terpenos	Giberelina	<i>Gibberella fujikuroi</i> (Sawada)

Fonte: Rolfs et al., *apud* Esser, 2009.

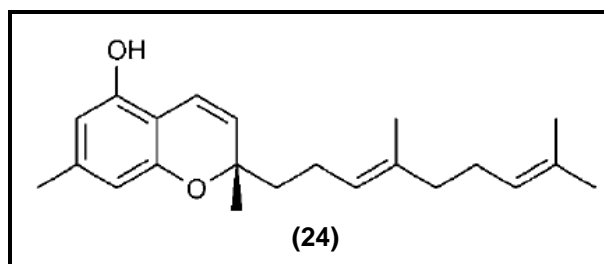
Basidiomicetos compreendem uma grande classe de fungos superiores adaptados a muitos climas, habitats e substratos diferentes e por isso desenvolveram um metabolismo secundário muito rico e diversificado. Seus produtos diferem de forma significativa em biogenética, origem e estrutura de seus metabólitos em comparação com aqueles produzidos pelos ascomicetos. Basicamente, basidiomicetos são produtores de gás natural, toxinas, alucinógenos e pigmentos. Basidiomicetos, saprófitos ou outros microrganismos habitantes de solo são prolíficos produtores de metabólitos secundários. Seu micélio e corpos frutíferos são expostos a inúmeros predadores ou concorrentes, o que em alguns casos, podem explicar a produção de antibióticos, inseticidas, ou agentes anti-

nutracêuticos. Entre os antibióticos α -metileno-lactonas e cetonas têm uma ampla e inespecífica ação contra procariontas e eucariontas¹⁴⁸.

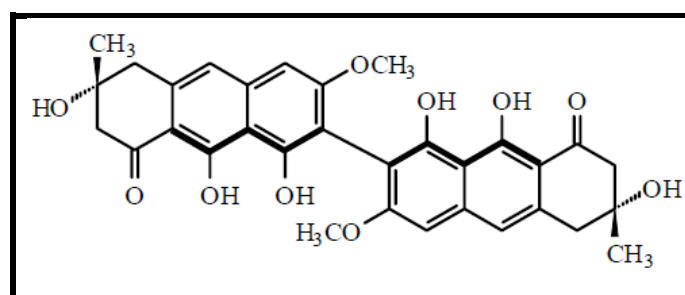
Fungos superiores como os ascomicetos e basidiomicetos são, caracteristicamente, fungos produtores de pigmentos, cujos precursores podem ser provenientes das rotas biossintéticas do chiquimato (corismato), policetídeos (acetato-malonato) e terpenóides (mevalonato). Fungos não apresentam clorofilas e antocianinas em suas colorações. Betalainas, carotenóides e outros terpenóides são difundidos apenas em algumas espécies de fungos superiores. Muitos dos pigmentos de fungos superiores são as quinonas ou similares. Os principais grupos de pigmentos e suas leucoformas incluem benzoquinonas simples, terfenilquinonas, ácido pulvínico e produtos derivados antraquinonas, quinonas terpenóides, benzotropolonas, compostos de origem de ácidos graxos e pigmentos que contêm nitrogênio, como as betalainas e alcalóides. Grifolina (**21**), neogrifolina (**22**), 2-(4,8-dimetilnona-3,7-dienil)-3,4-dihidro-2,7-dimetil-2H-[1]benzopiran-3,5-diol (**23**), e 2-((2E,6E)-4,8-dimetilnona-3,7-dienil)-2,7-dimetil-2H-[1]benzopiran-5-ol (**24**), são pigmentos da classe dos compostos fenólicos obtidos de *Boletus pseudocalopus* (Hongo)⁴.



¹⁴⁸ SCHÜFFLER, A., et. al. - **Secondary Metabolites of Basidiomycetes**. In: Esser, K. (ed). The Mycota. Volume XV – Cap. 10. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009.



Diversos tipos de antraquinonas (antraquinona dimerica flavomannina-6,6'- di-O-metil éter **(25)**, antranol, antrona, antra-hidroquinona e oxantrona-derivados) de coloração amarelo alaranjadas foram encontradas em basidiomicetos, principalmente em representantes da ordem Agaricales. Vários pigmentos derivados xantinas e correlatos, também foram encontrados nesta ordem, bem como em Boletales, como por exemplo, as muscarinas. Outros pigmentos, como agaritina **(26)** e correlatos **(27)** presentes em Agaricales conferem ação carcinogênica aos fungos que os possuem¹⁴⁹. Uma extensa lista de metabólitos secundários de basidiomicetos constituintes de pigmentos das ordens Agaricales (a que pertence o gênero *Scleroderma*) e Boletales é exposta por Abraham (2001)¹⁵⁰, Esser (2009)¹⁴⁶, Zhou e Liu (2010)⁴, Velíšek e Cejpek (2011)¹⁴⁹, Alves et al., 2012¹⁵¹.

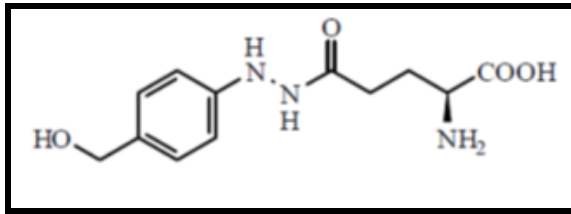
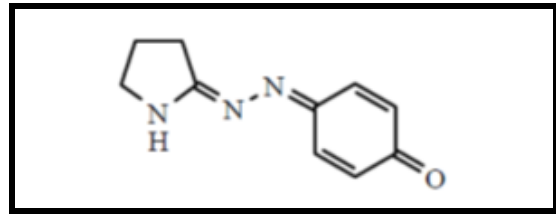


Antraquinona dimerica flavomannina-6,6'- di-O-metil éter **(25)**¹⁴⁵.

¹⁴⁹ VELÍŠEK, J., et. al. - Pigments of higher fungi: a review. **Czech Journal of Food Science**, v. 29, n. 2, p. 87–102, 2011.

¹⁵⁰ ABRAHAM, W.R. - Bioactive sesquiterpenes produced by fungi: are they useful for humans as well? **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 583–606, 2001.

¹⁵¹ ALVES, M.J., et. al. - A Review on Antimicrobial Activity of Mushroom (Basidiomycetes) Extracts and Isolated Compounds. **Planta Medica**, v. 78, n. 16, p. 1707-1718, 2012. DOI: 10.1055/s-0032-1315370

Agaritina (26)¹⁴⁵.Agaricon (27)¹⁴⁵.

Fungos ectomicorrízicos se tornam um forte dreno de monossacarídeos das plantas, e os acumulam em suas hifas, para posteriormente incorporá-los ao seu metabolismo de crescimento e ou de manutenção (Glicólise, Ciclo das Pentoses-fosfato) ou serem utilizados ao longo do tempo na forma de glicogênio e intermediários como trealoses ou como formas de armazenamento. Concentrações externas de monossacarídeos parecem controlar a expressão gênica de seus fungos mutualistas. A presença de monossacarídeos ativa genes de transporte de açúcares fúngicos (AmMSt1). Outro gene controlado por açúcares é o gene que codifica para Fenilalanina Amino Liase (PAL), que é uma enzima-chave do metabolismo secundário e relacionada com a biossíntese de compostos fenólicos, tanto para proteção do próprio fungo como a de sua planta hospedeira, contra bactérias ou ataques de fungos patogênicos a ela. Mas ainda é inconclusiva como a concentração dos açúcares provenientes da planta hospedeira controla a expressão de PAL. Até o momento sabe-se, apenas que o gene de PAL encontra-se naturalmente reprimido por uma molécula repressora¹⁵².

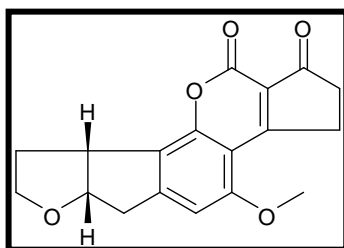
Alcalóides são mais frequentemente sintetizados a partir de dimetilalil pirofosfato (isômero de Isopentenil pirofosfato – IPP) e triptofano. Por vezes, os outros aminoácidos podem estar envolvidos. A biossíntese de ergotamina em *Claviceps purpúrea* (Fries) é particularmente bem caracterizada. O primeiro passo enzimático é prenilação do triptofano pela dimetilalil triptofano sintetase, seguido por metilação e várias reações de oxidação, que levam ao ácido lisérgico. Incorporação de dois peptídeos não ribossomais por diferentes sintetases finalizam a biossíntese de ergotamina⁸⁷. O primeiro alcaloide a ser isolado de um organismo não vegetal foi de *Claviceps purpúrea* (Fries), o causador da ferrugem do centeio. Também foi observado que outros fungos e plantas superiores também eram capazes de

¹⁵² NEHLS, U., et. al. - Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizas: gene expression, monosaccharide transport and metabolic control. **New Phytologist**, v. 150, p. 533–541, 2001.

produzir este mesmo alcalóide, que posteriormente foi identificado como uma hidroxietilamida do ácido lisérgico, além de novos derivados do ácido lisérgico simples: Lisergol, Lisergina e Lisergeno. Essas micotoxinas são ativas contra bactérias, nematódeos, insetos e mamíferos¹⁵³.

Peptídeos não ribossômicos são sintetizados por uma classe de enzimas de fungos com multidomínios e vários módulos chamadas sintetases de peptídeos não ribossômica, que catalisam uma variedade de peptídeos não-ribossomais utilizando aminoácidos proteinogênicos e não proteinogênicos. A primeira sintetase peptídeo não-ribossomal caracterizada foi aquela que catalisa a formação de antibióticos β -lactâmicos^{142,143}. Essas enzimas podem tornar o fungo que a possui patogênico¹⁵⁴.

Policetídeos parecem ser os metabólitos secundários mais abundantes nos fungos. Exemplos bem conhecidos são as aflatoxinas **(28)** e a lovastatina, substância anticolesterol (colestrolênêmica). Policetídeos fúngicos são sintetizados pelas policetídeo sintases, que são enzimas muito semelhantes às ácido-graxos sintases dos eucarióticos. Elas condensam ácidos carboxílico de cadeia curta (acetilCoA, malonilCoA) para formar cadeias de carbono de comprimentos diferentes^{146,147}.



Aflatoxinas **(28)**

Terpenos são tipicamente associados com plantas. Consequentemente, uma grande quantidade de terpenos é conhecida a partir de plantas, porém existem

¹⁵³ MAHMOOD, Z., et. al. - Bioactive alkaloids produced by fungi. I. Updates on alkaloids from the species of the genera *Boletus*, *Fusarium* and *Psilocybe*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v. 23, n. 3, p. 349-357, 2010.

¹⁵⁴ COLLEMARE, J., et. al. - Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: the role of hybrid PKS-NRPS in pathogenicity. **Mycological Research**, v. 112, p. 207–215, 2008.

fungos que produzem terpenos. Várias enzimas terpenos ciclases provenientes de fungos já foram identificadas e caracterizadas. Fungos *Gibberella fujikuroi* (Sawada) e espécies de *Fusarium* sp. são tipicamente produtores de terpenos. Terpenos são biossintetizados a partir de unidades de isopreno, e podem ser lineares ou cíclicos, saturados ou insaturados, e podem ser modificados de várias maneiras^{146,147}. Terpenóides estão entre os metabólitos proeminentes de basidiomicetos. A maioria destes têm estruturas não encontradas nos demais organismos, com a notável exceção de que alguns sesquiterpenos contendo anéis também são encontrados em plantas superiores, por exemplo, os cariofilanos e acoranos^{150,155}.

Dentre os terpenos alguns se destacam pela sua importância como os sesquiterpenos tremulanos provenientes de *Phellinus tremulae* (Bondarzew), um fungo basidiomiceto envolvido na degradação da madeira de espécies de álamo. São eles: tremuladienol 1, as lactonas tremulenolidos A e B isoméricas e tremulenodial e seu correspondente tremulenodiol B e os tremulenodiois isoméricos A e C. A biossíntese destes metabólitos é executada através da ciclização do humuleno e uma mudança de um grupo metila originando o esqueleto biciclo¹⁵⁰.

Os cariofilenos [sesquiterpenos extraídos de *Hypholoma* (= *Naematoloma*) *fasciculare* (Hudson)] são compostos citotóxicos, com ação antiviral e vasodilatadora. Um deles foi isolado, identificado e denominado naematolina. Os punctaporonanos, que são sesquiterpenos denominados punctaporoninas, derivados dos cariofilenos e o Collybial, que é antibiótico sesquiterpênico potente contra bactérias do tipo *Bacillus* sp. Collybial é notável pela sua atividade antiviral. Combate o vírus da estomatite. Também apresentou atividade citotóxica frente a certas linhagens de células cancerosas. Collybial tem sido extraído de *Collybia confluens* (Persoon)¹⁵⁰.

O maior grupo de sesquiterpenos de basidiomicetos é o dos protoiludanos. Eles servem de intermediários para uma série de outros sesquiterpenos, bem como dão origem vários ésteres. Como exemplo temos o derivado extraído de *Radulomyces confluens* (Fries), o Radulone A é um potente inibidor de agregação de plaquetas humanas, agindo como anticoagulante. Além disso, é citotóxico e antimicrobiano¹⁵⁰.

¹⁵⁵ LORENZEN, K., et. al. - Biologically active metabolites from basidiomycetes. **Current Organic Chemistry**, v. 2, p. 329–364, 1998.

Diterpenos (Figura 10) e triterpenos (Figura 11) estão difundidos entre os basiodimetos. Entre os diterpenóides, aparecem as ciatinas e estriatinas, obtidas de *Cyathus spp.* com atividade citotóxica e sarcodoninas e escabroninas, de *Sarcodon scabrosus* (Fries) com atividade anti-inflamatória e antibacteriana, presentes na família Thelephoraceae. Da família Tricholomataceae, podem ser citados ilurinas que são antifúngicas, e tintinnadiol com atividade citotóxica^{146,148}.

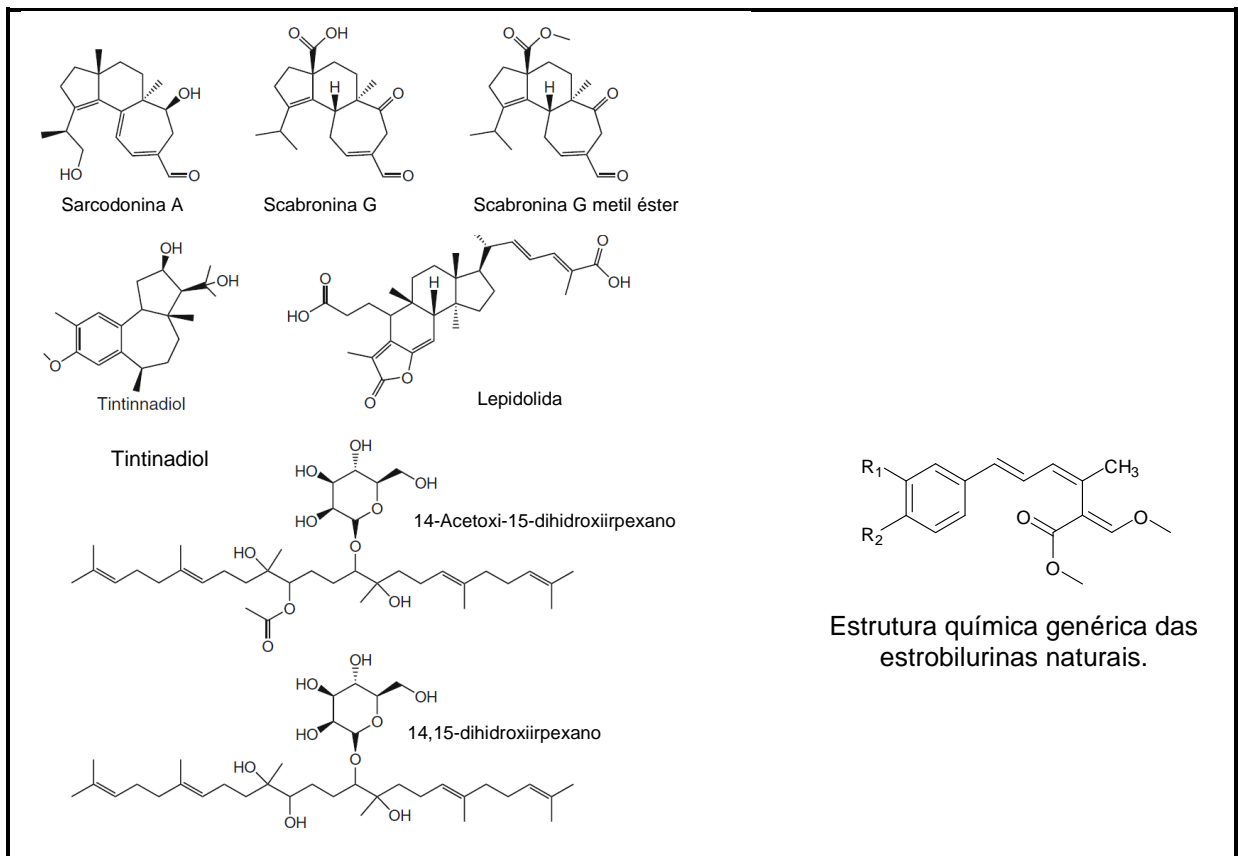


Figura 10– Estruturas químicas de alguns diterpenóides^{146,148}.

Atividade antifúngica foi encontrada para estrobilurinas provenientes de espécies de *Agaricus sp.* (Agaricaceae) que apresentaram forte atividade contra fungos filamentosos e leveduras. Favolona A e B e lasquiatriona (Figura 11) são os mais novos antibióticos triterpênicos e laschiatriona possui um esqueleto esteroidal, também com evidente ação antifúngica contra *Candida albicans* (Robin), *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice), *Aspergillus flavus* (Link), *Fusarium verticillioides* (Saccardo:Nirenberg), *Trichophyton mentagrophytes* (Robin) e

Microsporium sp. Na família Polyporaceae são encontrados os triterpenos lanosteranos com atividade inibitória da DNA-polimerase e ergosterol e derivados inibidores das ciclooxigenases^{146,148}.

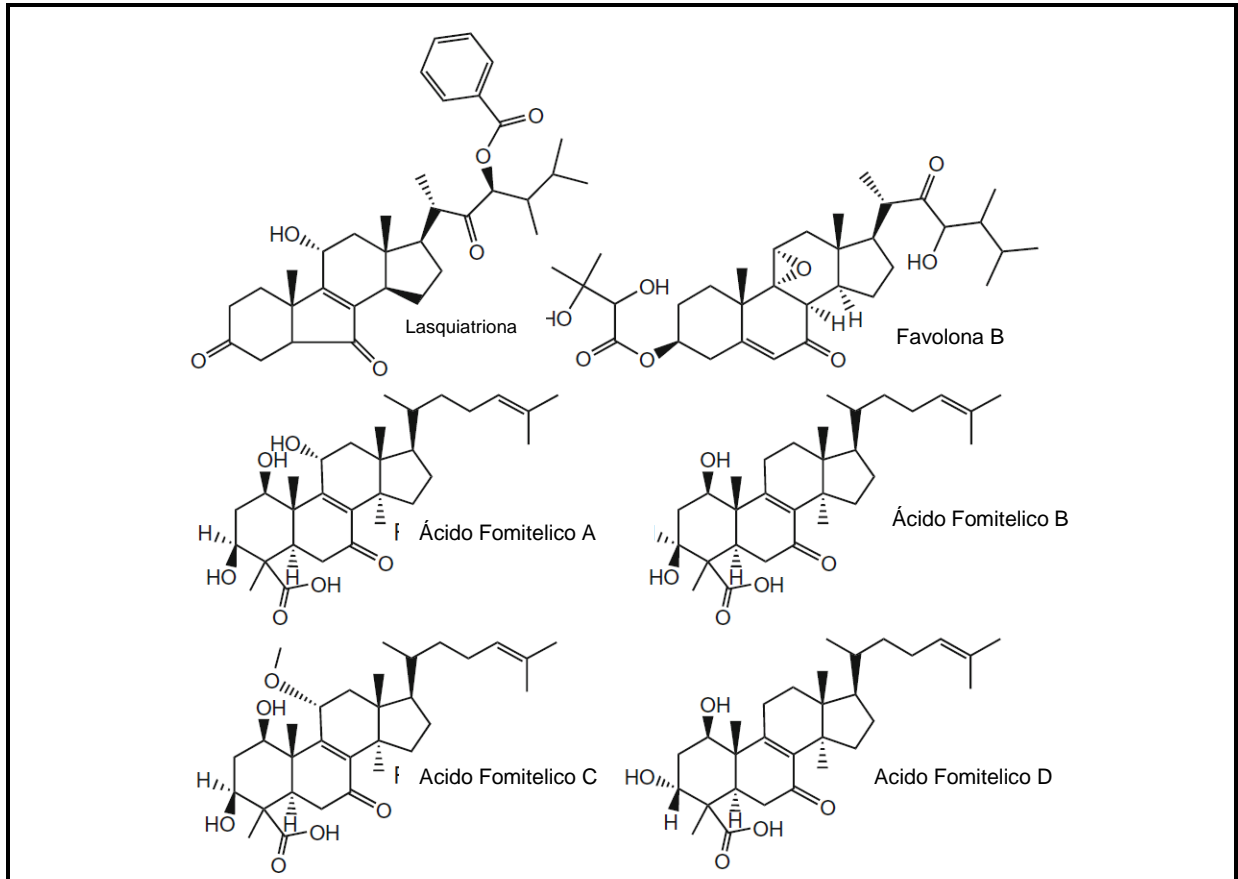


Figura 11 – Estruturas químicas de alguns Triterpenóides encontrados em basidiomicetos^{146,148}.

De modo geral, as principais enzimas envolvidas na síntese dos metabólitos secundários em fungos (tomando-se como base o organismo-modelo para o estudo de metabólitos secundários em fungos, que são as espécies de *Aspergillus*) são: as enzimas dimetil triptofano sintetase, para síntese de alcalóides (DMATS-dimethylallyl tryptophan synthetase), as enzimas ácido-graxos sintase (FAS-fatty acid synthase) e as enzimas policetídeos sintase (PKS-polyketide synthase), as enzimas peptídeos não-ribossomais sintetase (NRPS-non-ribosomal peptide synthetase) e as enzimas sesquiterpenos ciclase (SesCyc-sesquiterpene cyclase)^{146,147}.

3.5.1. Biossíntese de triterpenos

Triterpenóides representam uma grande classe de produtos naturais. Os esteróis, tais como o lanosterol C_{30} são compostos que tem um papel essencial como constituintes das membranas celulares, onde ajudam a manter a integridade estrutural e permeabilidade de controle.

Os esteróis são metabolizados para produzir moléculas biologicamente ativas tais como a vitamina D e os hormônios sexuais humanos. Nos fungos o lanosterol catalisado pela enzima 14- α -amilase forma o ergosterol, principal constituinte da membrana celular¹⁵⁶.

O passo inicial na biossíntese do lanosterol é a formação da acetoacetil-coenzima A (CoA), a partir de 2 moléculas de acetil-CoA. A condensação de uma molécula de uma terceira acetil-CoA resulta na formação de um intermediário chave, o 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA). A formação da HMG-CoA pela enzima inibidora da HMG-CoA-sintase é uma das várias etapas da biossíntese que é regulado através da inibição da retroalimentação. HMG-CoA sofre redução pela HMG-CoA redutase para formar mevalonato no passo mais regulado da via¹⁵⁷.

Isopentenil Pirofosfato (IPP), a estrutura de 5 carbonos, que serve como unidade básica para síntese de isopreno (C_5H_8), é formada a partir do mevalonato através de uma série de fosforilações e uma descarboxilação. O IPP polimeriza para formar pirofosfato de geranyl (GPP), um isoprenóide de 10 carbonos a partir do qual o pirofosfato de farnesil com 15 carbonos (FPP) é formado (Figuras 12 e 13)¹⁵⁷.

¹⁵⁶ MARICHAL, P., et. al. - Mechanisms of resistance to azole antifungals. **Acta Biochemical Polonica**, v. 42, p. 509-516, 1995.

¹⁵⁷ RUSSELL, D.W. - Cholesterol biosynthesis and metabolism. - **Cardiovascular Drugs and Therapy**, n. 6, p. 103-110, 1992.

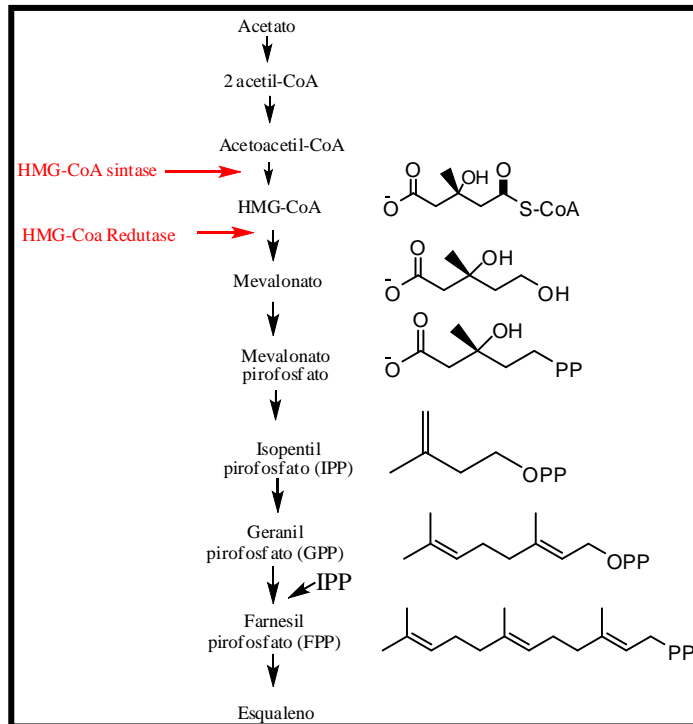


Figura 12: Biossíntese do esqualeno¹⁵⁷.

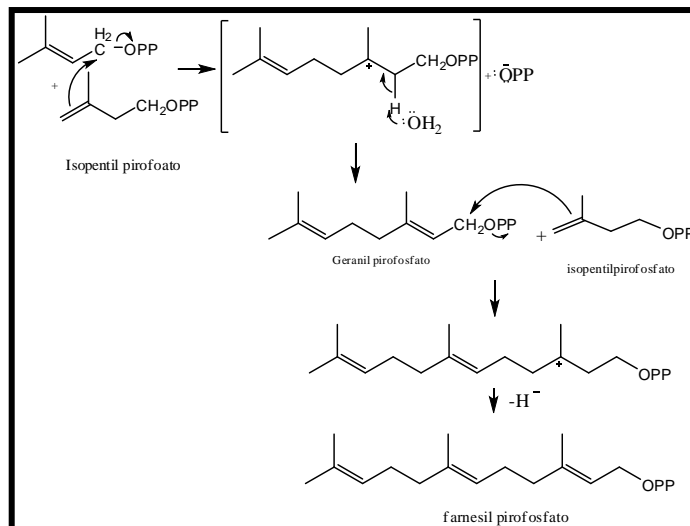


Figura 13: Biossíntese do farnesil pirofosfato¹⁵⁷

Segundo MacMurry¹⁵⁸ e Abe¹⁵⁹, a biossíntese do lanosterol inicia a partir da condensação de duas moléculas de farnesil pirofosfato, com redução do NADPH,

¹⁵⁸ MACMURRY, J. – **Química Orgânica** - LTC editora, Rio de Janeiro, 4ª edição 660 p., 1997.

dando origem ao esqualeno catalisada pela enzima esqualeno sintase; o esqualeno é então reduzido pelo NADPH em 2,3-oxidoesqualeno catalisada pela enzima esqualeno mono-oxigenase; o 2,3-oxidoesqualeno é convertido num anión pró-esterol e finalmente convertido em lanosterol, catalisada pela enzima lanosterol sintase (Figura 14).

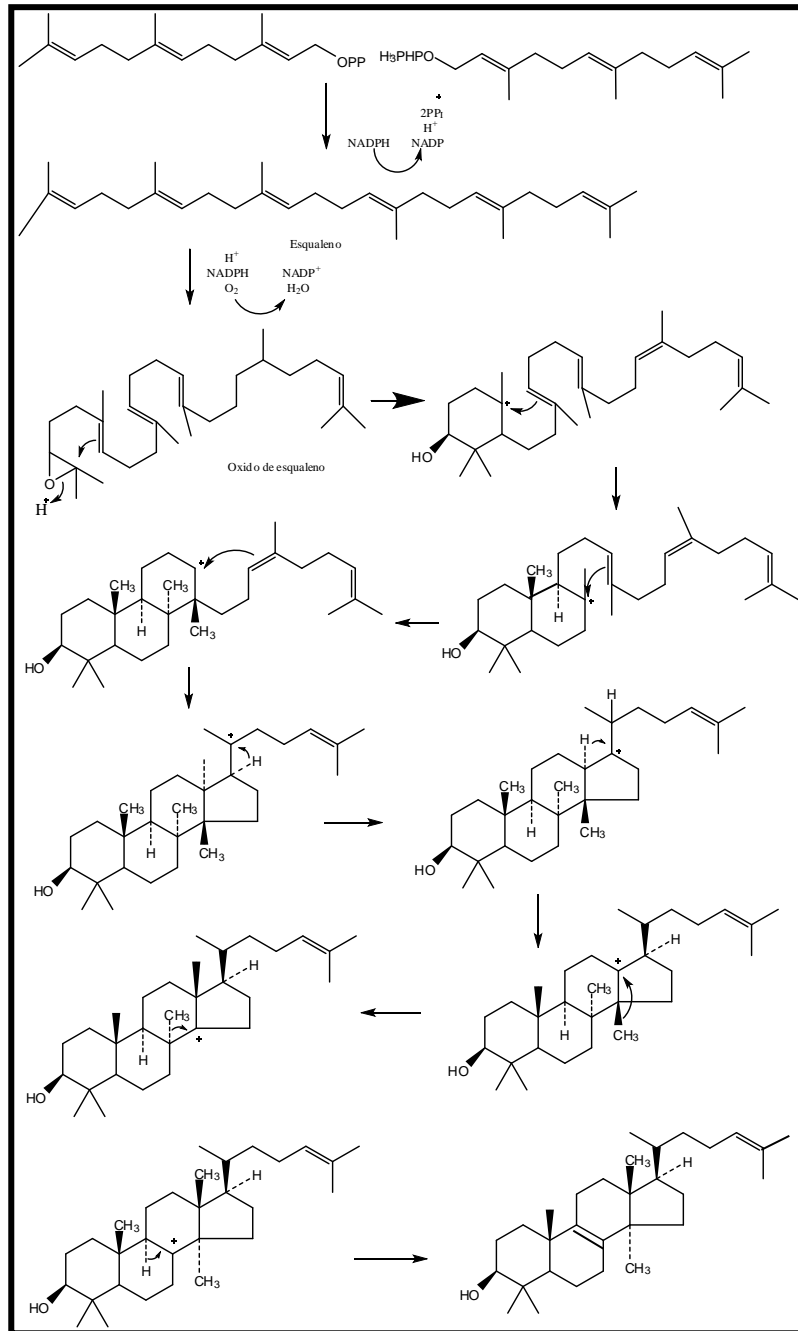


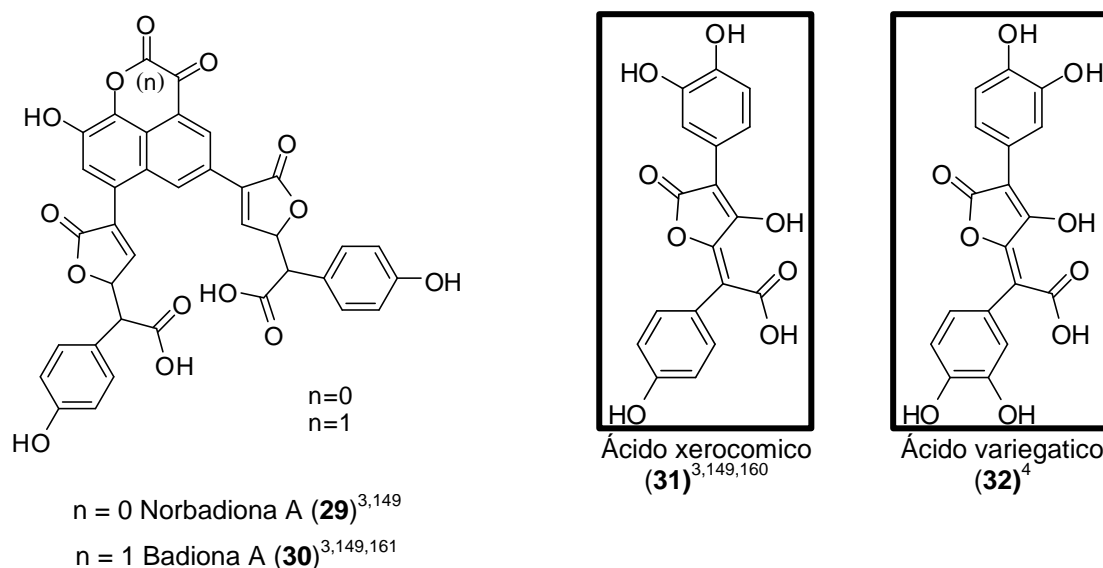
Figura 14: Biossíntese do lanosterol¹⁵⁸.

¹⁵⁹ ABE, I., et. al. - Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chemical Reviews*, v.93 (6), p. 2189-2206, 1993.

3.6. Metabólitos Secundários de *Scleroderma* sp.

A química do *Scleroderma* spp. é em grande parte desconhecida. De fato, até o presente momento existem apenas duas classes de produtos naturais que foram descritos: triterpenos do tipo lanostano e derivados do ácido pulvínico^{160,161}. Os constituintes das espécies *Scleroderma citrinum* (Persoon)^{160,161} e *Scleroderma aurantium* (Persoon)¹⁶² são as mais bem estudadas.

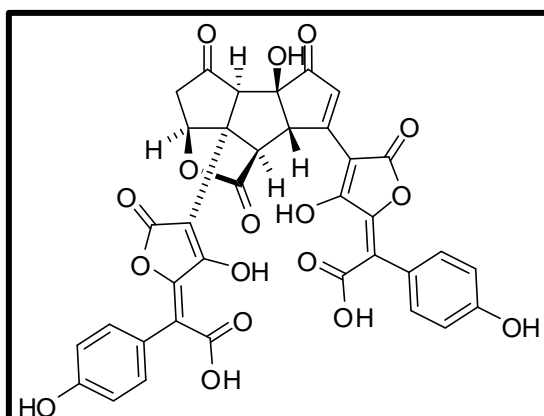
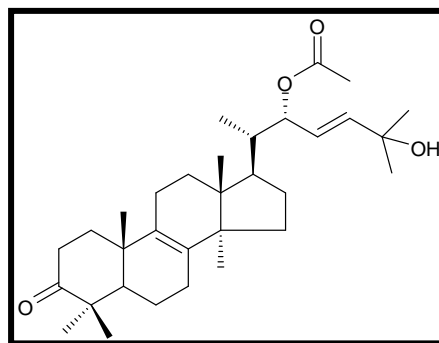
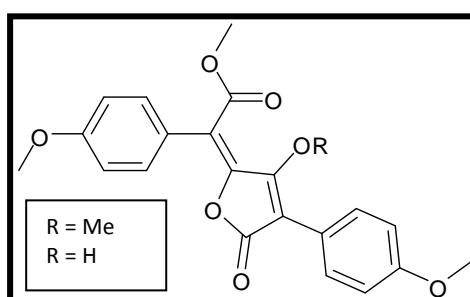
Alguns dos constituintes químicos isolados de *Scleroderma citrinum* (Persoon) são norbadiona A (**29**)^{3,149}, badiona A (**30**)^{3,149,161}, ácido xerocomico (**31**)^{3,149,161}, ácido variegatico (**32**)⁴, sclerocitrina (**33**)^{149,161}, (20S,22S,23E)-22-O-acetil-25-hidroxilano-8,23(E)-dieno-3-ona (**34**)¹⁶⁰, metil 4,4'-dimetoxivulpinato (**35**)¹⁶⁰ e o ácido 4,4'-dimetoxivulpínico (**36**)¹⁶⁰.



¹⁶⁰ KANOKMEDHAKUL, S., et. al. - A bioactive triterpenoid and vulpinic acid derivatives from the mushroom *Scleroderma citrinum*. **Planta Medica**, v. 69, p. 568-571, 2003.

¹⁶¹ WINNER, M., et. al. - Unusual pulvinic acid dimers from the common fungi *Scleroderma citrinum* (Common Earthball) and *Chalciporus piperatus* (Peppery Bolete). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, p. 1883–1886, 2004.

¹⁶² KARDONO, L.B.S., et. al. - Chemical constituents of *Scleroderma aurantium* I: a new triterpene, 3,25-Dihydroxy-22-acetoxyl-lanosta-8,23-diene. **Eurasian Journal of Forest Research**, v. 5, p. 33-37, 2002.

Sclerocitrina (**33**)¹⁶¹(20S,22S,23E)-22-O-acetil-25-hidroxi lanosta-8,23(E)-dien-3-ona (**34**)¹⁶⁰

R = Me Metil 4,4'-dimetoxivulpinato (**35**)¹⁶⁰
 R = H Ácido 4,4'-dimetoxivulpinico (**36**)¹⁶⁰

Figura 15: Estruturas químicas dos principais constituintes do fungo *Scleroderma citrinum* (Persoon)

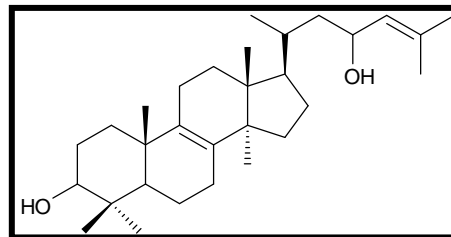
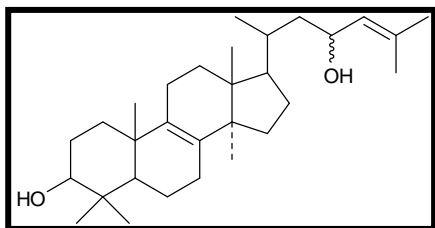
No *Scleroderma aurantium* (Persoon) foram encontrados os seguintes constituintes químicos: 23ξ-hidroxi-lanosterol (lanosta-8,24-dien-3β,23-diol) (**37** e **38**)^{163,164}, 3,25-dihidroxi-22-acetoxil-lanosta-8,23-dieno (**39**)¹⁶², lanosta-8,23-dien-3β,25-diol (**40**)¹⁶⁵ e lanosta-8,24-dien-3β,23-diol (**41**)¹⁶². O *Scleroderma* sp. encontrado na Malásia apresentou o composto metil-3',5'-dicloro-4,4'-di-O-metilatromentato (**42**)¹⁶⁶.

¹⁶³ ENTWISTLE, N., et. al. - 23ξ-hydroxy-lanosterol - A new triterpene fungal metabolite of the Basidiomycete *Scleroderma aurantium*, **Tetrahedron**, v. 24(10), p. 3949-53, 1968.

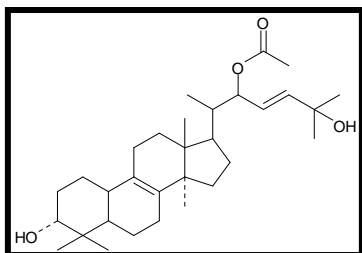
¹⁶⁴ TRAPP M.A., et. al. - Triterpenos lanostanos obtidos do fungo *Scleroderma* sp., 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **Anais**, 2007.

¹⁶⁵ VRKOČ, J., et. al. - Constituents of the basidiomycete *Scleroderma aurantium*, **Phytochemistry**, v. 15, Issue 11, p. 1782–1784, 1976.

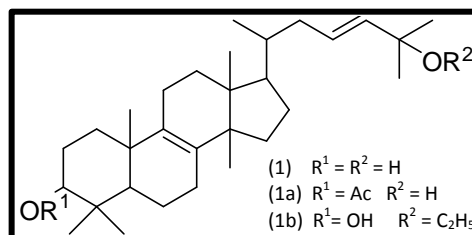
¹⁶⁶ VAN DER SAR, S.A., et. al. – Dichlorinated pulvinic acid derivative from Malasyan *Scleroderma* sp. **Journal Natural Product**, v. 68, p. 1799–1801, 2005.



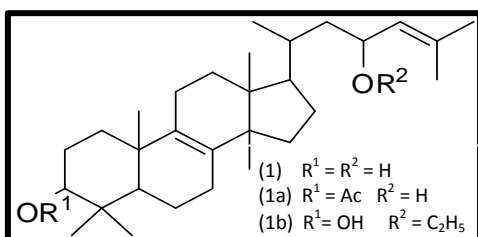
23ξ-hidroxi-lanosterol (lanosta-8,24-dien-3β,23-diol) (**37 e 38**)^{163,164}



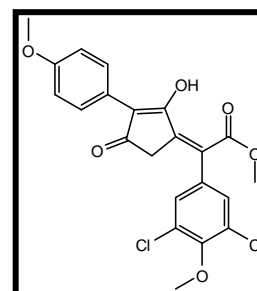
3,25-Dihidroxi-22-acetoxil-lanosta-8,23-dieno (**39**)¹⁶⁴



Lanosta-8,23-dien-3β,25-diol (**40**)¹⁶⁴



Lanosta-8,24-dien-3β,23-diol (**41**)¹⁶⁵



Metil-3',5'-dicloro-4,4'-di-O-metilatromentato (**42**)¹⁶⁶

Figura 16: Estruturas químicas dos principais constituintes do fungo *Scleroderma aurantium* (Persoon).

O *Scleroderma sp.* (Persoon) coletado no campus da Universidade de São Carlos, situada no município de São Carlos, no estado de São Paulo, apresentou o lanosteno triterpeno Lanosta-8,23-dien-3β,25-diol (**40**)¹⁶⁷.

¹⁶⁷ GOMES, D.Z., et. al. - Triterpenos lanostanos obtidos do fungo *Scleroderma sp.*: isolamento e identificação de dois isômeros. *Anais*, 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção e manutenção do isolado do fungo ectomicorrízico

O fungo ectomicorrízico estudado foi coletado em uma plantação de *Eucalyptus grandis* (W. Hill ex-Maiden) situada na Fazenda Ynhacundá, localizada no primeiro distrito do município de São Francisco de Assis, Rio Grande do Sul, em 2007. O fungo foi mantido e multiplicado desde então em intervalos de 45 a 50 dias no Laboratório de Biologia e Microbiologia do Solo Prof. Marcos Rubens Fries da Universidade Federal de Santa Maria. A descrição morfológica do isolado *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) foi realizada pela Prof.^a Vetúria Lopes de Oliveira, da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

Além da identificação morfológica, o fungo *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) foi submetido a um sequenciamento genético no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria e cujos resultados encontram-se no GenBank - NCBI Blast com número de acesso EF517491^{168,169}.

O isolado foi mantido em meio de cultura sólido Melin-Norkans Modificado – MNM (Marx), em placa de Petri de 9 cm de diâmetro, em estufa (DeLeo) a 25 °C, por 45 dias. Em seguida, foram feitas suspensões micelianas em 25 mL de MNM líquido em erlenmeyers de 250 mL, a partir de discos de 8 mm de diâmetro obtidos das culturas em placa. O material foi incubado em estufa a 25 °C por 45 dias¹⁷⁰.

¹⁶⁸ LUPATINI, M., et. al. - Caracterização do DNA ribossômico do isolado de *Scleroderma UFSMSc1* de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex-Maiden, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2677-2682, Número Especial, 2008.

¹⁶⁹ LUPATINI, M., et. al. - Ribossomal DNA characterization of *Scleroderma UFSCSc1* ectomycorrhizal fungi from *Eucalyptus grandis* (W. Hill ex-Maiden). 2007. Número de acesso ao GenBank: EF517491.

¹⁷⁰ MARX, D.H. - The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, v. 59, p. 153-163, 1969.

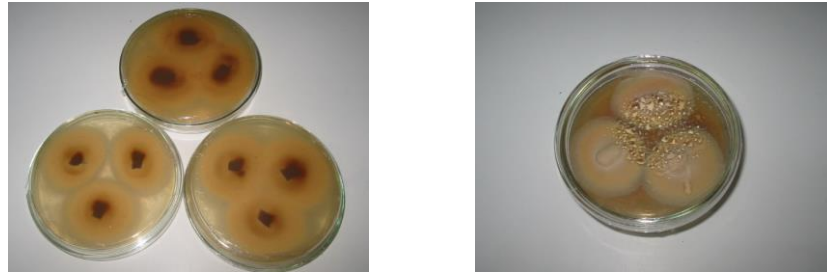


Figura 17: Isolados de *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) mantidos em meio de cultura MNM-Modificado sólido, com 45 dias, incubados a 25 °C.

4.2. Teste da ação antimicrobiana da ectomicorriza *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) “*in vivo*”

Cinco isolados de ectomicorrizas pertencentes ao Banco de Fungos do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria foram escolhidas para a realização de um “*screening*” com o objetivo de verificar “*in vivo*” por meio de competição, qual possuía ação antifúngica e antibacteriana.

O ensaio foi realizado com amostras pertencentes ao gênero *Scleroderma* (Persoon) sendo utilizadas duas cepas de *Scleroderma citrinum* (Persoon), uma de *Scleroderma aerolatum* (Persoon), uma de *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon), e ainda uma amostra de *Scleroderma sp. Sc 60* (Persoon). O estudo foi feito em triplicata e repetido por três vezes, utilizando-se o MNM como meio de cultura para o crescimento das amostras.

As amostras foram incubadas por 35 dias a 25 °C para o seu desenvolvimento e, após, foi feita a semeadura do fungo *Candida albicans* (Robin) ATCC 10231 na mesma placa, ao redor das colônias, para observar o comportamento da mesma por 48 horas, objetivando-se verificar o seu crescimento ou a sua inibição. Após esta observação, foi retirada uma alçada do fungo *Candida albicans* (Robin), semeado em meio Agar Sabourand, colocado em estufa a 25 °C por 48 horas, para a observação da sua capacidade de crescimento em meio próprio para o seu desenvolvimento.

Os fungos ectomicorrízicos que apresentaram uma maior capacidade de inibição do crescimento da *Candida albicans* (Robin) ATCC 10231 foram testados

também quanto a sua capacidade de inibição da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) ATCC 27893.

O fungo *Candida albicans* (Robin) ATCC 10231 e a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) ATCC 27893 foram escolhidos devido a sua capacidade de crescimento em meio MNM.

4.2.1. Cultivo do fungo *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon) e obtenção do extrato bruto

O isolado foi mantido em meio de cultura sólido Melin-Norkans Modificado - MNM em placa de Petri de 9 cm de diâmetro, em estufa a 25 °C (DeLeo), por 45 dias. Em seguida, foram feitas suspensões micelianas em 25 mL de MNM líquido em 120 erlenmeyers de 250 mL, a partir de discos de 8 mm de diâmetro obtidos das culturas em placa. O material foi encubado em estufa a 25 °C por 45 dias¹⁶⁶.

Após este tempo de crescimento em estufa, a suspensão micelial foi separada por filtração a vácuo, picada e seca em estufa a 55 °C, sendo posteriormente submetida à extração a frio em MeOH a temperatura ambiente (25 °C) até que não houvesse mais a presença da coloração amarela, característica do fungo no solvente utilizado.

O solvente foi então evaporado a pressão reduzida para obtenção de um extrato de coloração marrom-avermelhada. Esta técnica foi repetida por oito vezes até atingir 28,35 g de massa micelial seca, que forneceu 9,225 g de extrato bruto metanólico.

O extrato metanólico bruto (9,225 g) foi dividido em duas partes (4,6125 g por fração) e cromatografado em coluna aberta de sílica gel eluída com Hexano-AcOEt (80:20), Hexano-AcOEt (60:40), Hexano-AcOEt (50:50), Hexano-AcOEt (40:60), Hexano-AcOEt (30:70), Hexano-AcOEt (10:90), AcOEt-MeOH (80:20), AcOEt-MeOH (60:40), AcOEt-MeOH (50:50), MeOH (100%). Cinquenta frações (150 mL) foram coletadas e analisadas por CCD utilizando como eluentes Hexano-AcOEt, nas proporções correspondentes as da coluna (80:20, 60:40, 50:50), e AcOEt-MeOH (75:15)¹⁵⁶. As frações 5 a 8 foram cromatografadas individualmente em (Hexano-AcOEt 60:40), purificadas por CCD preparativa e resultaram nos compostos SC5,

SC8, SC7 e SC7-1 (46 mg, 43 mg, 13 mg, 5 mg respectivamente) e na fração AcOEt-MeOH (40:40) foram encontrados os compostos manitol (30 mg) e trealose (13 mg). As frações intermediárias de Hexano-AcOEt (60:40, 50:50, 40:60, 30:70 e 10:90), AcOEt-MeOH (80:20, 50:50) e MeOH (100%), compostas por várias manchas na CCD, que foram isoladas em pequenas quantidades impossibilitando ou dificultando a separação, foram recolhidas e armazenadas sob refrigeração (550 mg).

4.2.2. Determinação da atividade microbiana “*in vitro*”

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Pesquisas Microbiologias do NPPN da Universidade Federal de Santa Maria sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ademir Farias Morel. As leituras foram realizadas em um aparelho de espectrofotômetro Spectra Max M2 (Molecular Devices Corp.).

A concentração inibitória mínima (CIM) e as concentrações letais mínimas (CLM) foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo padronizados (M7-A5) e (M27-A2) pelo CLSI.

Os microrganismos utilizados nos ensaios microbiológicos são espécies catalogadas na coleção “American Type Culture Collection” (ATCC), incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas^{171,172} e os fungos (Tabela 4).

¹⁷¹ National Committee for Clinical Laboratory Standards, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard; 5th ed. CLSI document M7-A5, Wayne, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standard, 2002.

¹⁷² National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: approved standard. CLSI document M27-A2. Wayne, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.

Tabela 4: Microrganismos indicadores

Grupo	Microrganismos
Bactérias gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659 <i>Enterococcus sp.</i> ATCC 6589 <i>Bacillus cereus</i> ATCC 33019
Bactérias gram-negativas	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759 <i>Providencia stuartii</i> IAL 1971 <i>Morganella morganii</i> ATCC 8019 <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 1304 <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933 <i>Enterobacter sp.</i> ATCC 2581 <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028
Fungos	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Candida tropicalis</i> ATCC 18803 <i>Candida krusei</i> ATCC 6258 <i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 22018 <i>Cryptococcus gatti</i> ATCC 28952 <i>Sacharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601 <i>Candida parapslosis</i> ATCC 2601

4.2.3. Técnica M27-A2121 (CLSI) de microdiluição em caldo para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) frente a fungos ¹⁷²

A técnica M27-A2 foi utilizada para a determinação da susceptibilidade dos fungos patogênicos frente à atividade antifúngica das moléculas isoladas; foi realizada em duplicata e utilizando-se como padrão um controle de crescimento positivo.

4.2.3.1. Preparação do inóculo

A suspensão com os fungos foi diluída a 1:50 no meio caldo Sabouraud, pipetando-se 0,01 mL da suspensão em 0,5 mL do meio, caracterizando um inóculo

prévio. Esse inóculo prévio foi novamente diluído 1:20 no meio, utilizando-se 0,1 mL do inóculo em 1,9 mL do meio.

4.2.3.2. Inoculação no meio de cultura

As amostras a serem testadas foram diluídas em meio líquido (Metanol, DMSO – 1 mg/mL) e diluídas novamente em placas de cultura estéreis de 96 poços, nas concentrações de 500 a 3,12 $\mu\text{g/mL}$. Cada poço foi inoculado com os microrganismos (1×10^6 células viáveis) e homogeneizados, sendo então, as microplacas incubadas a 26 °C por 48 horas para verificar o crescimento dos fungos.

4.2.4. Técnica M7-A5 (CLSI)120 de microdiluição em caldo para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos isolados frente a bactérias patogênicas¹⁷¹

A técnica M7-A5 é utilizada na determinação da susceptibilidade de bactérias a agentes antibacterianos; os quais foram realizados em duplicata e utilizando-se como padrão um controle de crescimento positivo.

4.2.4.1. Preparação do inóculo

As bactérias foram incubadas em ágar Müller-Hinton a 35 °C durante 24 h. Depois de decorrido este período, foi preparada uma suspensão dos microrganismos em solução salina 0,85 % estéril ajustando-se a turvação visualmente de acordo com o tubo nº 0,5 da escala MacFarland que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. A suspensão foi, então, diluída a 1:50 no caldo Müller-Hinton, pipetando-se 0,01 mL da suspensão em 0,5 mL do meio,

caracterizando um inóculo prévio. Este inóculo prévio foi novamente diluído 1:20 no meio, utilizando-se 0,1 mL do inóculo em 1,9 mL do meio.

4.2.4.2. Inoculação no meio de cultura

As amostras a serem testadas foram diluídas em meio líquido (Metanol, DMSO – 1mg/mL) e diluídas novamente em placas de cultura estéreis de 96 poços, nas concentrações de 500 a 3,12 $\mu\text{g/mL}$. Cada poço foi inoculado com os microrganismos (1×10^6 células viáveis) e homogeneizados, sendo então, as microplacas incubadas por 24 horas a 35 °C para verificar o crescimento das bactérias.

4.2.5. Preparação dos compostos isolados para a avaliação da atividade antimicrobiana

Uma alíquota de cada composto foi dissolvida em 1 mL uma mistura de DMSO:Meio de crescimento Müller-Hinton (1:7) de maneira a se obter uma solução estoque.

A solução estoque foi diluída no meio de cultura de modo a se obter as concentrações intermediárias de 640-320-160-80-40-20-10-5-2,5-1,25-0,625-0,315 $\mu\text{g/mL}$, de maneira que as concentrações finais testadas fossem 320-160-80-40-20-10-5-2,5-1,25-0,625-0,315-0,156 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.5.1. Incubação

As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas para bactérias e 48 horas para os fungos. Após o período de incubação, observou-se o crescimento

microbiano pelo aparecimento de turvação, possibilitando assim a verificação da CIM.

4.2.5.2. Leitura do teste

A leitura do teste foi realizada depois de transcorrido o período de incubação preconizado pela metodologia para cada microrganismo (bactérias e fungos). A leitura foi realizada mediante comparação visual com o controle de crescimento positivo, determinando-se como CIM a menor concentração da(s) substância(s) testada(s) onde não foi visualizado crescimento do microrganismo e também pela medida da Densidade Ótica em um aparelho espectrofotômetro (Molecular Devices modelo SpectraMax M2).

A interpretação dos resultados foi baseada nos breakpoints do cloranfenicol para bactérias patogênicas e anfotericina B para fungos, todos de acordo com as técnicas M7-A5 e M27-A2 (CLSI).

Cultura bacteriana (180 µL) foi adicionada em uma microplaca de 96 poços. A microplaca de 96 poços foi colocada num Spectra Max M2 espectrofotômetro de microplacas (Molecular Devices Corp) programado para realizar as medições a 23 ° C. As densidades óticas das culturas celulares foram lidas usando um filtro de emissão de 620 nm a cada 15 min, com agitação (30 s) entre cada uma das medições de leitura. As células foram ainda cultivadas a fase semi-logarítmica. As soluções de cada amostra de teste e de antibióticos (20 µL) a diferentes concentrações em caldo fresco caseína de soja foram adicionados em uma microplaca de 96 poços. A microplaca de 96 poços foi colocada num Spectra Max M2 e OD das culturas celulares contendo as amostras de teste e antibióticos foram lidas após 10 horas de incubação. Dados técnicos foram descritos anteriormente ¹⁷³.

¹⁷³ LEHTINEN, J., et. al. - Real-time monitoring of antimicrobial activity with the multiparameter microplate assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 381–389, 2006.

4.2.5.3. Análise estatística

Os efeitos das diferentes concentrações das amostras testadas, da ampicilina usada como controle positivo na proliferação de bactérias e da nistatina usada como controle positivo para fungos foram determinadas usando análise de uma via da variância (ANOVA) seguida por medidas de teste Bonferroni post-hoc repetido. OD é apresentada como % do grupo de controle não tratado. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado significativo. As análises foram realizadas utilizando o software estatístico SPSS, versão 18.0 (SPSS Inc. Chicago, IL).

4.2.5.4. Determinação da concentração bactericida e fungicida

Para se determinar a concentração bactericida (CLM) dos compostos, fizeram-se repiques das diluições em que não havia crescimento de microrganismos para placa de Petri contendo ágar Müller-Hinton para bactérias. As placas foram incubadas de acordo com o microrganismo em questão. Após o período de incubação, verificou-se qual a menor concentração capaz de causar a morte dos microrganismos, determinando assim a CLM, nos testes com bactérias.

4.3. Espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram realizados em um Espectrômetro Bruker DPX-400, no departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Maria, operando a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C . Para a preparação das amostras, utilizou-se quantidade entre 5-10 mg de amostra em 0,5 mL de solvente deuterado em tubos de 5 mm. Os solventes utilizados para a análise das amostras foi o clorofórmio deuterado (CDCl_3) e MeOH. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em “ppm” (partes por milhão) e as constantes de deslocamento (J) foram calculadas em Hertz (Hz). Para a calibração dos espectros utilizou-se como

referência interna o TMS (δ 0,00) para os espectros de hidrogênio, e para a calibração dos espectros de ^{13}C utilizou-se CDCl_3 (δ 77,00). Os espectros 1D e 2D foram processados com o software TOPSPIN-NMR 1.0.

Os espectros 2D Homonuclear (COSY) e Heteronuclear (HMQC e HMBC) foram realizados conforme os parâmetros de aquisição fornecidos pelo aparelho e processados pelo software XwinNMR 1.3 da Bruker.

4.4. Espectrometria de massa (GC-EM)

As análises foram realizadas Cromatógrafo a Gás Varian CP-3800 acoplado com detector de massas Saturn 2200 MS/MS (Varian), com autosampler CP 8400 (Varian) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria – Laboratório de Química Analítica - equipado com injetor Split 1:20, coluna capilar VF-5MS 30 m x 0.25 mm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura do filme. Foi utilizado como gás de arraste hélio ultrapuro a 1,0 mL/min, sendo a temperatura do injetor de 280 °C e a programação de análise com T inicial = 50 °C e T final = 300 °C rampa de aquecimento de 15 °C/min. Os dados obtidos foram comparados com os dados da biblioteca de padrões NIST 2009 de espectros de massa.

4.5. Espectrometria de massa de Alta Resolução (EMAR)

As análises foram realizadas em um Espectrômetro de Massas de Alta Resolução modelo Xevo G2 Q-TOF da Waters do departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria – Laboratório de Química Analítica. A amostra foi introduzida em infusão em solução de $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (80:20) com 0,1 % de ácido fórmico a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, em modo ESI (+), tensão do capilar 2 kV, cone de extração 1V, cone de amostragem 15V, a temperatura da fonte foi de 150 °C, a temperatura de dessolvatação de 500 °C, cone de gás a 10 L/hora, o gás de dessolvatação a 600 L/hora, utilizando-se como gás de dessolvatação nitrogênio.

4.6. Cromatografia gasosa (CG)

Os experimentos de CG foram realizados em cromatógrafo a gás Varian, modelo 3400. A detecção dos sinais foi realizada através de um detector de ionização de chama (DIC), utilizando hidrogênio ultrapuro como gás de arraste (fase móvel), com uma pressão do gás de arraste de 7 Psi, Split 10 temperatura do injetor de 220 °C e do detector de 290 °C. As condições utilizadas estão descritas nos respectivos cromatogramas.

4.7. Determinação do ponto de fusão

Os valores de ponto de fusão (não corrigidos) das substâncias foram determinados em um aparelho MQAPF-301 da Microquímica.

4.8. Determinação do índice de rotação ótica

A determinação da rotação ótica das amostras foi realizada em um polarímetro PerkinElmer 341 automático com lâmpada de mercúrio com precisão de 0,05 graus, em cubeta de 10 dm de comprimento, utilizando diclorometano e metanol como solventes dependendo da solubilidade das amostras. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais / CEPETRO da Universidade Federal de Santa Maria.

4.9. Difração de Raios-X

Os dados de intensidade de raios-X foram medidos num espectrômetro Bruker Kappa X8 APEX II CCD sistema difratômetro equipado com um monocromador de grafite e um cristal de Mo selado tubo cerâmico de raios X ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) da Universidade Federal de Santa Maria – Laboratório de Cristalografia.

4.10. Cromatografia

4.10.1. Cromatografia em Coluna

A cromatografia em coluna (CC) foi realizada com sílica gel (230-400 mesh), produzida pela MERCK, em colunas de tamanhos variados e eluída por solventes puros ou em sistemas de gradientes; sendo este o método utilizado para a separação inicial dos compostos.

4.10.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

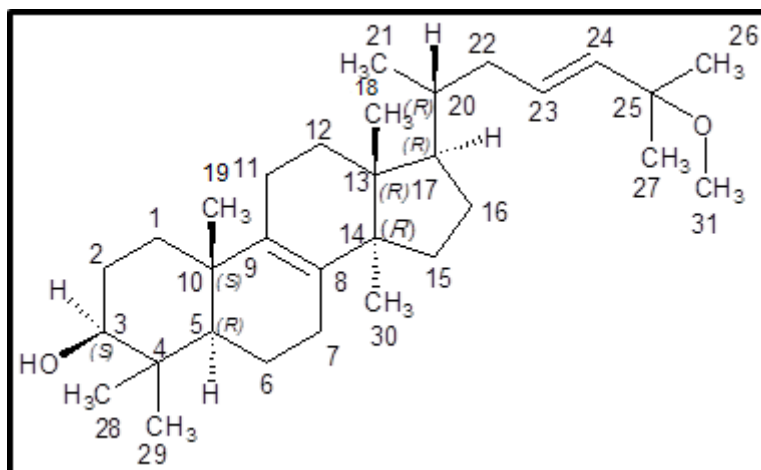
A técnica de cromatografia em camada delgada do tipo ascendente foi realizada em cromatoplasmas comerciais de sílica gel 60 GF254 com 0,25 mm de espessura, sobre alumínio, como fase estacionária e utilizada a título de acompanhamento das reações e avaliação do grau de pureza dos produtos.

As fases móveis correspondem a misturas de solventes, descritas na literatura, ou criada no decorrer do presente estudo. A revelação foi realizada com luz UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$ e 365 nm) e, através da borrifação com solução EtOH/H₂SO₄ a 5%, seguida de tratamento térmico.

4.11. Metabólitos Isolados e Identificados do Scleroderma UFSMSc1

4.11.1. Identificação do Triterpeno 3,10(S),5,13,14,17,20(R)-25-metoxilanosta-8-23-dien-3-ol (SC5)

Sólido cristalino branco, com Ponto de Fusão: 165,8 - 167,4 °C, Índice de

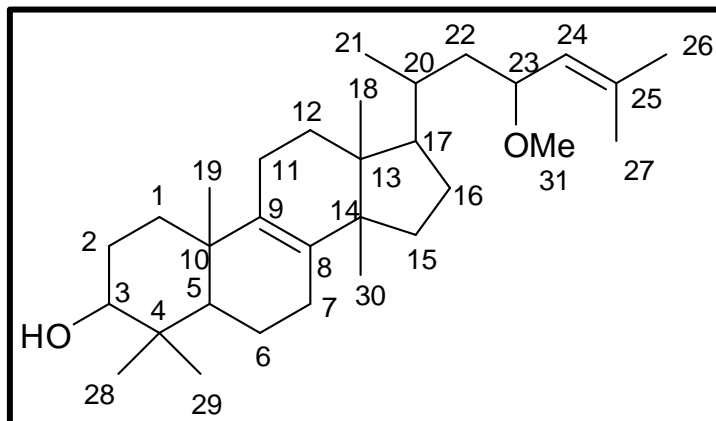


Rotação $[\alpha]_D^{20} = + 29,8^\circ$ (em CH_2Cl_2 , concentração: $0,0009 \text{ g/cm}^3$), isolado da fração II hexano/acetato de etila (80:20), RMN de ^1H a 400,13 Mz, CDCl_3 , δ 1,27 (1 H, m, H-1), δ 1,76 (1 H, m, H-1), δ 1,60 (1 H, m, H-2), δ 1,68 (1 H, m, H-2), δ 3,24 (1

H, dd, $J = 11,6; 4,8 \text{ Hz}$, H-3), δ 1,09 (1 H, dd, $J = 12,6 \text{ Hz}$, H-5), δ 2,04 (2 H, m, H-6), δ 2,07 (2 H, m, H-7), δ 1,53 (1 H, m, H-11), δ 1,72 (1 H, m, H-11), δ 1,21 (1 H, m, H-12), δ 1,71 (1 H, m, H-12), δ 1,21 (1 H, m, H-15), δ 1,71 (1 H, m, H-15), δ 1,37 (1 H, m, H-16), δ 1,97 (1 H, m, H-16), δ 1,52 (1 H, m, H-17), δ 0,73 (3 H, s, H-18), δ 1,00 (3 H, s, H-19), δ 1,51 (1 H, m, H-20), δ 0,92 (3 H, d, $J = 5,66 \text{ Hz}$, H-21), δ 2,21 (1 H, m, H-22), δ 1,81 (1 H, m, H-22), δ 5,55 (1 H, ddd, $J = 16,0, 8,2, 5,3 \text{ Hz}$, H-23), δ 5,44 (1 H, d, $J = 16,0 \text{ Hz}$, H-24), δ 1,27 (3 H, s, H-26), δ 1,27 (3 H, s, H-27), δ 1,02 (3 H, s, H-28), δ 0,83 (3 H, s, H-29), δ 0,89 (3 H, s, H-30), δ 3,17 (s, O-Me); RMN ^{13}C a 100,62 MHz, δ 35,5 (C-1), δ 27,7 (C-2), δ 79,0 (C-3), δ 38,7 (C-4), δ 50,0 (C-5), δ 20,8 (C-6), δ 26,4 (C-7), δ 134,5 (C-8), δ 134,4 (C-9), δ 36,9 (C-10), δ 18,1 (C-11), δ 30,8 (C-12), δ 44,4 (C-13), δ 49,7 (C-14), δ 30,7 (C-15), δ 27,9 (C-16), δ 50,1 (C-17), δ 15,7 (C-18), δ 18,6 (C-19), δ 36,5 (C-20), δ 19,0 (C-21), δ 39,2 (C-22), δ 128,7 (C-23), δ 136,7 (C-24), δ 74,9 (C-25), δ 26,0 (C-26), δ 25,6 (C-27), δ 27,8 (C-28), δ 15,3 (C-29), δ 24,1 (C-30), δ 50,3 (O-Me).

4.11.2. Identificação do composto 23-metoxilanosta-8-25-dienol (SC8)

Sólido incolor, com Ponto de Fusão; 169,4 - 170,6 °C, isolado da fração II

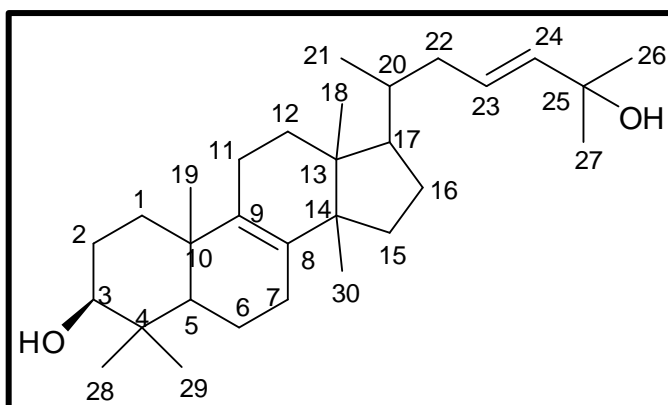


hexano/acetato de etila (80:20), RMN ^1H , a 400,13 Mz, CDCl_3 , δ 3,37 (1H, d, $J=11,3$, 4,1 Hz, H-3), δ 0,73 (3H, s, H-18), δ 1,00 (3H, s, H-19), δ 0,95 (H3, d, $J = 6,48$ Hz, H-21), δ 3,98 (1H, ddd, $J = 15,7$, 9,7 e 2,87 Hz, H-23), δ 5,08 (H1, dd,

$J = 8,86$ Hz, H-24), δ 1,76 (H1, m, H-26), δ 1,28 (H3, s, H-27), δ 1,02 (H3, s, H-28), δ 0,84 (H3, s, H-29), δ 1,28 (H3, s, H-30), δ 3,37 (O-Me), RMN ^{13}C a 100,62 MHz, δ 31,2 (C-1), δ 27,9 (C-2), δ 79,0 (C-3), δ 39,0 (C-4), δ 49,9 (C-5), δ 21,1 (C-6), δ 26,6 (C-7), δ 134,4 (C-8), δ 134,4 (C-9), δ 37,0 (C-10), δ 18,3 (C-11), δ 30,9 (C-12), δ 42,8 (C-13), δ 51,1 (C-14), δ 29,7 (C-15), δ 27,9 (C-16), δ 50,5 (C-17), δ 15,9 (C-18), δ 18,8 (C-19), δ 33,1 (C-20), δ 19,2 (C-21), δ 35,7 (C-22), δ 74,9 (C-23), δ 127,2 (C-24), δ 134,5 (C-25), δ 25,9 (C-26), δ 18,2 (C-27), δ 15,4 (C-28), δ 24,3 (C-29), δ 28,0 (C-30), δ 55,7 (O-Me).

4.11.3. Identificação composto lanosta-8,24-dien-3,25-diol (SC7)

Sólido branco, Ponto de Fusão: 173 – 174 °C (Lit. 189 – 190 °C, Vrkok, 1976),

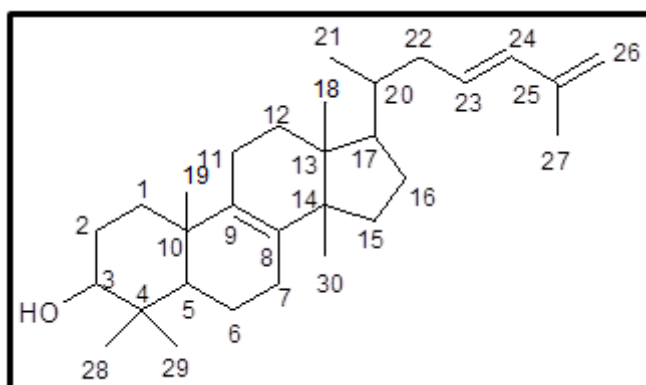


$[\alpha]_D^{20} = + 38,08^\circ$ (MeOH, concentração: 0,0026 g/cm^3 , Lit. $[\alpha]_D^{21} = + 60,3$, Vrkok, 1976), isolado da fração II hexano/acetato de etila (80:20) e precipitação com CH_2Cl_2 , RMN de ^1H a 400,13 Mz, MeOH- D_4 , δ 1,12

(1 H, m, H-1), δ 1,65 (1 H, m, H-1), δ 1,91 (1 H, m, H-2), δ 1,32 (1 H, m, H-2), δ 3,04 (1 H, m, H-3), δ 1,49 (2 H-, m, H-4), δ 1,99 (2 H, m, H-6), δ 2,01 (2 H, m, H-7), δ 1,63 (1 H, m, H-11), δ 1,64 (1 H, m, H-11), δ 1,65 (2 H, m, H-12), δ 1,48 (2 H, m, H-12), δ 1,69 (1 H, m, H-15), δ 1,63 (1 H, m, H-15), δ 1,48 (2 H, m, H-16), δ 0,98 (1 H, m, H-17), δ 0,67 (3 H, s, H-18), δ 0,91 (3H, s, H-19), δ 1,45 (1 H, d, H-20), δ 0,86 (3 H, d, $J = 5,76$, H-21), δ 2,08 (1 H, m, H-22), δ 1,73 (1 H, m, H-22), δ 5,48 (1 H, ddd, $J = 15,68; 7,13$ e $5,73$ H-23), δ 5,55 (1 H, d, $J = 15,4$, H-24), δ 1,16 (3 H, s, H-26), δ 1,16 (3 H, s, H-27), δ 0,84 (3 H, s, H-28), δ 0,72 (3 H, s, H-29), δ 0,96 (3 H, s, H-30), RMN de ^{13}C a 100,62 Mz, MeOH-D₄, δ 35,2 (C-1), δ 28,0 (C-2), δ 76,8 (C-3), δ 38,5 (C-4), δ 49,5 (C-5), δ 20,4 (C-6), δ 26,0 (C-7), δ 134,4 (C-8), δ 133,6 (C-9), δ 36,5 (C-10), δ 17,8 (C-11), δ 30,4 (C-12), δ 44,0 (C-13), δ 49,3 (C-14), δ 30,5 (C-15), δ 27,4 (C-16), δ 50,1 (C-17), δ 15,6 (C-18), δ 28,0 (C-19), δ 36,1 (C-20), δ 18,4 (C-21), δ 38,5 (C-22), δ 123,1 (C-23), δ 140,7 (C-24), δ 68,8 (C-25), δ 30,0 (C-26), δ 30,1 (C-27), δ 23,9 (C-28), δ 15,6 (C-29), δ 18,9 (C-30).

4.11.4. Identificação do composto lanosta-8,23,25-trien-3-ol (SC7-1)

Sólido cristalino branco, obtido a partir do composto SC7 submetido à



ebulição em acetona, Ponto de

Fusão: 169,4 - 170,3 °C, Índice de

Rotação $[\alpha]_D^{20} = + 41,4^\circ$ em C₂Cl₂,

concentração: 0,0212 g/cm³, RMN

de ¹H a 400,13 Mz, MeOH-D₄, δ 1,12

(1 H, m, H-1), δ 1,65 (1 H, m, H-1), δ

1,91 (1 H, m, H-2), δ 1,32 (1 H, m, H-

2), δ 3,04 (1 H, m, H-3), δ 1,49 (2 H,

m, H-4), δ 1,99 (2 H, m, H-6), δ 2,01 (2 H, m, H-7), δ 1,63 (1 H, m, H-11), δ 1,64 (1 H,

m, H-11), δ 1,69 (1 H, m, H-15), δ 1,63 (1 H, m, H-15), δ 1,48 (1 H, m, H-16), δ 0,98

(1 H, m, H-17), δ 0,67 (3 H, s, H-18), δ 0,91 (3 H, s, H-19), δ 1,65 (1 H, d, H-20), δ

0,84 (3 H, d, $J = 5,76$, H-21), δ 2,08 (1 H, m, H-22), δ 1,73 (1 H, m, H-22), δ 5,48 (1

H, m, H-23), δ 5,50 (1 H, d, $J = 15,8$, H-24), δ 4,84 (2 H, s, H-26), δ 1,91 (3 H, s, H-

27), δ 0,84 (3 H, s, H-28), δ 0,72 (3 H, s, H-29), δ 0,93 (3 H, s, H-30), RMN de ^{13}C a 100,62 Mz, MeOH-D₄, δ 35,2 (C-1), δ 28,0 (C-2), δ 76,8 (C-3), δ 38,4 (C-4), δ 49,4 (C-5), δ 20,4 (C-6), δ 25,9 (C-7), δ 134,4 (C-8), δ 134,5 (C-9), δ 36,5 (C-10), δ 30,1 (C-11), δ 30,3 (C-12), δ 44,0 (C-13), δ 49,3 (C-14), δ 30,4 (C-15), δ 27,4 (C-16), δ 50,1 (C-17), δ 15,5 (C-18), δ 27,4 (C-19), δ 36,1 (C-20), δ 17,8 (C-21), δ 38,4 (C-22), δ 134,1,1 (C-23), δ 129,5 (C-24), δ 142,2 (C-25), δ 113,9 (C-26), δ 18,3 (C-27), δ 23,8 (C-28), δ 15,6 (C-29), δ 18,8 (C-30).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Ensaio biodirigido antifúngico e antimicrobiano

Os resultados obtidos a partir do “screening” para verificar “*in vivo*” a ação antibacteriana e antifúngica demonstrou potencial de uso com este objetivo das cepas utilizadas.

5.1.1. Ensaio biodirigido antifúngico utilizando-se *Candida albicans* ATCC10231 (Robin)

Como pode ser observado na Figura 18 às cepas UFSC 133 e UFSC 119 de *Scleroderma citrinum* (Persoon) apresentaram ação antifúngica considerada não significativa, pois é possível verificar o desenvolvimento do fungo *Candida albicans* ATCC 10231 (Robin) ao redor da colônia das ectomicorrizas testadas. Ao ser retirada uma alçada do fungo *Candida albicans* ATCC10231 (Robin) para o desenvolvimento em Agar Sabourand este apresentou crescimento normal em estufa bacteriológica a 28 °C / 48 horas indicando que não houve ação dos metabólitos das ectomicorrizas testadas.

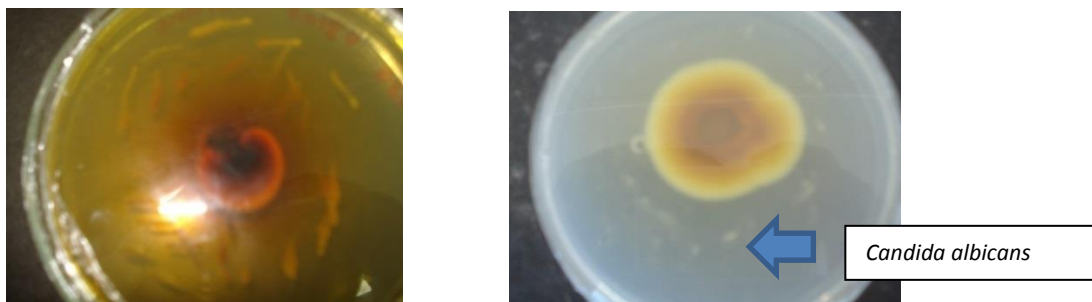


Figura 18: Ação antifúngica do *Scleroderma* Sc 133 (A) e *Scleroderma* Sc 119 (B)

Como pode ser observado na Figura 19 a cepa de *Scleroderma sp. Sc 60* (Persoon) apresentou ação antifúngica ao inibir o crescimento do fungo *Candida albicans* ATCC 10231 (Robin), porém devido à contaminação da amostra no banco de fungos, não foi possível utilizá-la no experimento.

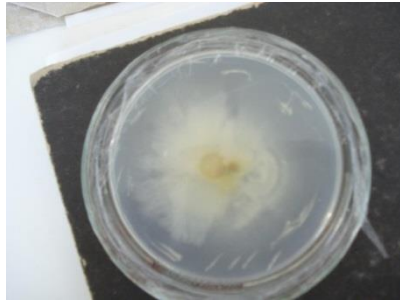
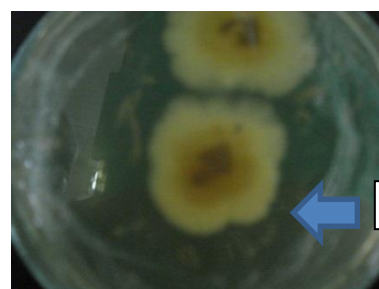


Figura 19: Ação antifúngica do *Scleroderma sp. Sc 60*.

As cepas do *Scleroderma aerolatum* (Persoon) Sc129 e as do *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) apresentaram uma ação inibitória significativa como pode ser observado na Figura 20, em que a alçada de *Candida albicans* ATCC 10231 (Robin) semeada apresenta coloração escura indicativa da sua dificuldade de crescimento a temperatura de 28 °C / 48 horas. Ao ser retirada uma alçada para o crescimento em meio próprio para o seu desenvolvimento (Agar Sabourand) apresentaram dificuldades de crescimento no tempo indicado (48 horas), sendo necessário um tempo maior (72 horas) para o seu desenvolvimento. Isto é indicativo de que as cepas utilizadas no bioensaio apresentaram ação antifúngica frente à *Candida albicans* ATCC 10231 (Robin).



Candida albicans

Figura 20: Ação antifúngica do *Scleroderma Sc 129* e *Scleroderma UFSM Sc1*

5.1.2. Ensaio biodirigido antibacteriano com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27893 (Schroeter)

A partir destes resultados, as amostras de *Scleroderma* Sc129 (Persoon) e *Scleroderma* UFSMSc1 (Persoon:Fries) foram testadas para verificar se as mesmas também apresentavam ação bactericida frente à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27893 (Schroeter).

A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27893 (Schroeter) foi capaz de crescer em um meio destinado ao crescimento de fungos, como pode ser verificado na Figura 21, indicando que a inibição do seu crescimento não foi influenciada pelo meio de cultura MNM e sim pela presença das colônias das ectomicorrizas testadas.

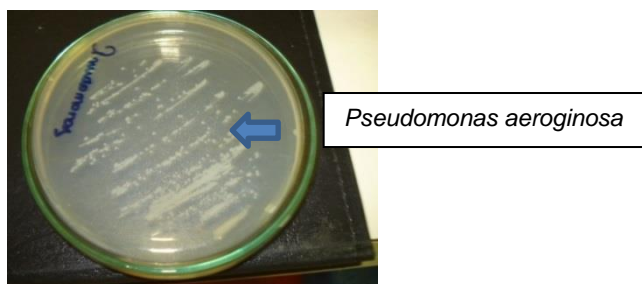


Figura 21: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27893 em meio ágar Müller-Hinton.



Figura 22: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27893 em meio MNM.

Na Figura 21 pode-se observar o crescimento das colônias da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27893 (Schroeter) que apresentam uma coloração branca característica do seu desenvolvimento utilizando-se para isto um meio indicado para o crescimento bacteriano (ágar Müller-Hinton). Porém não há registros

bibliográficos se ocorreria o desenvolvimento da mesma em um meio indicado para o crescimento de fungos ectomicorrizicos (Melin-Norkans Modificado–MNM), o que poderia interferir no resultado desejado, ou seja, observar a influência dos metabólitos produzidos pelo fungo *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) no crescimento bacteriano.

Na Figura 22 pode-se perceber que o meio não teve influência no crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27893 (Schroeter) uma vez que ela apresentou um crescimento satisfatório em que apresentou colônias brancas características de sua propagação, mesmo estando em um meio não indicado para o seu desenvolvimento (Melin-Norkans Modificado – MNM).

Sendo assim, é possível verificar que as duas amostras de ectomicorrizas utilizadas no estudo apresentaram um resultado favorável inibindo o crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27893 (Schroeter) que não conseguiu se desenvolver apresentando uma coloração marrom e que após a retirada de uma alçada da mesma e colocada em meio Müller-Hinton não conseguiu se desenvolver satisfatoriamente em estufa por 24 horas a 36 °C. Sendo assim optou-se pela utilização para estudos posteriores a amostra de *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) devido ao crescimento lento da cepa *Scleroderma Sc129* (Persoon).



Figura 23: Ação da ectomicorriza *Scleroderma UFSMSc1* sobre a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27893.

Como é possível verificar na Figura 23 a ectomicorriza *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) promoveu a inibição do crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27893 (Schroeter). Em comparação com as Figuras 21 e 22 pode-se perceber que as colônias da bactéria apresentam coloração marrom indicando incapacidade de crescimento.

Isto indica que *in vivo* a ectomicorriza *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) apresenta ação antibacteriana, pois promoveu a inibição do crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27893 (Schroeter).

5.1. Extração, fracionamento, cromatografia.

A suspensão micelial obtida foi separada por filtração a vácuo e o micélio seco em estufa a 55 °C, picado e submetido à extração a frio em um balão de 500 mL com MeOH até que não houvesse mais a presença da coloração amarela característica do fungo no solvente utilizado. O solvente foi evaporado a pressão reduzida, resultando em um extrato de coloração marrom avermelhada denominado Extrato Bruto (EB).

O Extrato Bruto (9,225 g) foi dividido em duas partes de (4,6125 g cada fração) e cromatografado em coluna, utilizando-se como adsorvente sílica gel 60H (70-230 mesh) e hexano-AcOEt-MeOH como sistema eluente em polaridades crescentes. As frações obtidas foram reunidas, de acordo com análise em CCD. A revelação foi realizada com luz UV ($\lambda = 254$ nm e 365 nm) através da borrifação com solução EtOH/H₂SO₄ a 5 %, seguida de tratamento térmico (Tabela 5).

Tabela 5: Cromatografia em coluna do extrato bruto

Fração	Sistema de solvente	Substância	Peso (mg)
I	Hexano-AcOEt (80:20)	Material Graxo	86
II	Hexano-AcOEt (80:20)	Substâncias 1,2 e 3	357
III	Hexano-AcOEt (60:40)	Mistura complexa de substâncias	102
IV	Hexano-AcOEt (50:50)	Mistura complexa de substâncias	100
V	Hexano-AcOEt (40:60)	Mistura complexa de substâncias	69
VI	Hexano-AcOEt (30:70)	Mistura complexa de substâncias	61
VII	hexano-AcOEt (10:90),	Mistura complexa de substâncias	64
VIII	AcOEt-MeOH (80:20),	Mistura complexa de substâncias	392
IX	AcOEt-MeOH (60:40)	Manitol e Trealose	471
X	EtOAc-MeOH (50:50),	Mistura complexa de substâncias	948
XI	MeOH (100%)	Resíduo	1,50

A Fração I apresentou 86 mg de um material graxo, mas na tentativa de separa-los em coluna cromatográfica demonstrou ser em quantidade insuficiente para um fracionamento como pode ser observado no Cromatograma (Figura 21), a amostra apresentava oito compostos principais. Esta mistura de triglicerídeos apresentou massa molecular de 148,95 m/z, 74,05 m/z, 67,05 m/z, 55,05 m/z, 148,95 m/z. Como é possível perceber na Tabela 6 há a predominância de um metabólito principal com quantidade equivalente a 25,22% na amostra, mas mesmo assim em quantidade insuficiente de material disponível para separa-los dos demais compostos.

De acordo com Vrkoc ¹⁶⁵ (1976) que analisou esta mesma fração composta por material graxo por IR e MS em seu trabalho de análise química da ectomicorriza *Scleroderma aurantium* (Persoon), os compostos apresentados são ácidos graxos.

Tabela 6: Resultados cromatográficos da fração de materiais graxos da ectomicorriza *Scleroderma UFSMSc1*.

Número do pico	Porcentagem na amostra (%)	Tempo de retenção (min)	Íon molecular
1	18,92	3,00	Não calculado
2	4,50	24,67	148,95 m/z
3	8,32	28,22	74,05 m/z
4	9,45	33,53	67,05 m/z
5	6,78	33,64	55,05 m/z
6	25,22	34,92	148,95 m/z
7	13,13	39,21	Não calculado
8	13,65	48,81	Não calculado
TOTAL	99,94		

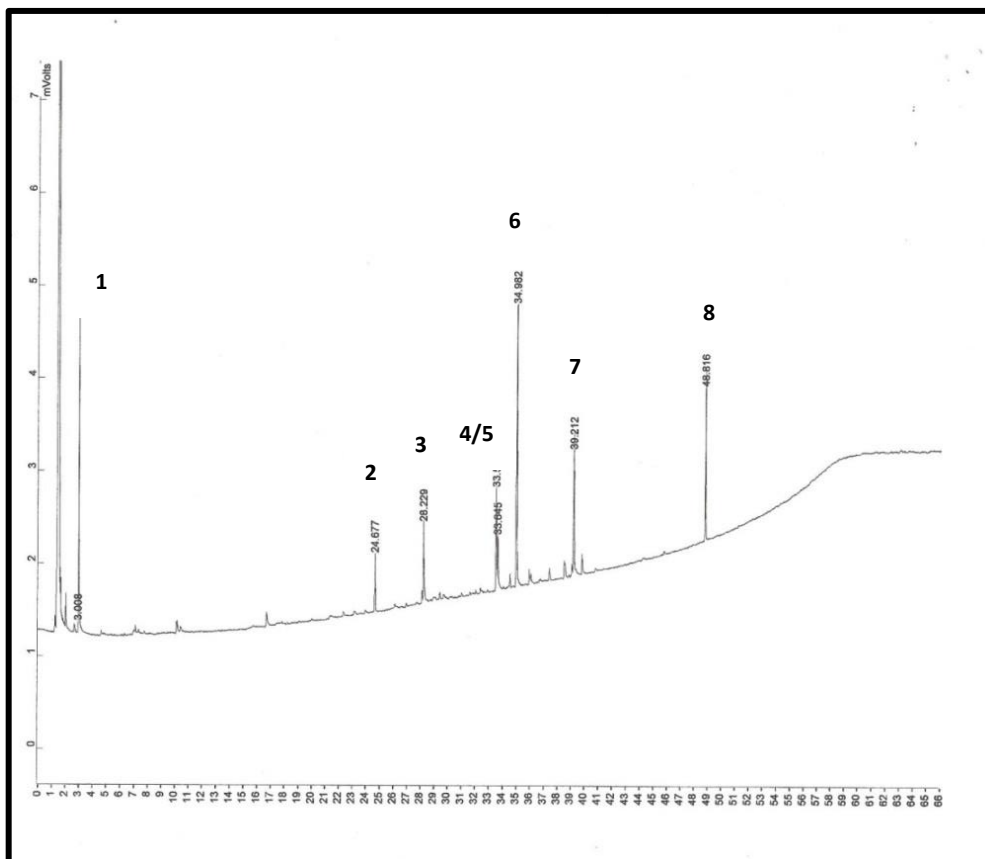


Figura 24: Perfil cromatográfico da fração de Materiais Graxos, utilizando coluna DB5, CCSF de 25 m. Programa de análise: T inicial = 50 °C, T final = 290 °C, rampa de 4 °C por min.

A Fração II foi a que apresentou os metabólitos isolados conforme descrito na parte experimental. A elucidação dos compostos foi realizada através da comparação entre dados descritos na literatura com os dados encontrados a partir dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C , Dept 135, Cosy H-H, HMQC e HMBC e Raios-X.

5.2. Identificação do metabólito SC5

O metabólito **SC5** foi obtido da Fração II como descrito na página 66 na forma de um sólido cristalino branco, com Ponto de Fusão: 165,8 - 167,4 °C, e rendimento de 1,17 % ou 46 mg em 4,612 g de extrato bruto. O seu espectro de EMAR exibe $[\text{M} + \text{H} - \text{OMe}]^+$ a m/z 425,3766 (calculada para $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$, m/z 425,3783), que em

combinação com os dados espectroscópicos de ^{13}C RMN, sugere uma fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_2$. Este composto havia sido obtido em uma etapa para a síntese do (22*R*)-3 β ,22-dihidroxi lanosta-8,24-dieno¹⁷⁴, composto isolado do fungo *Inonotus obliquus* que apresenta interesse biológico devido a sua atividade como anticancerígeno, e que a partir desta rota sintética apresenta estereoquímica estereoespecífica e bom rendimento.

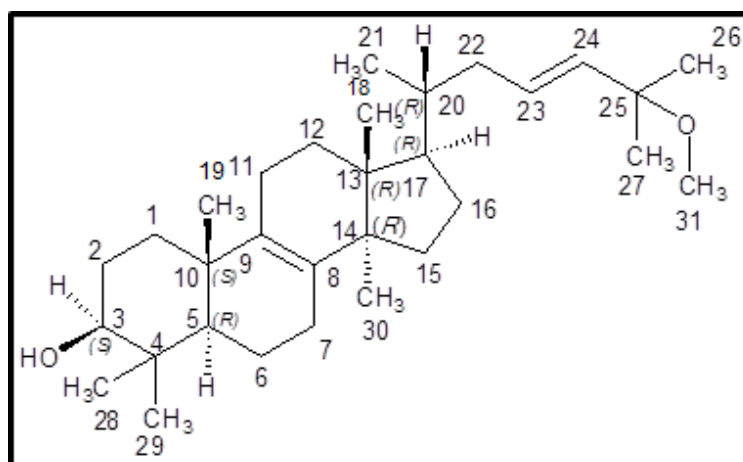


Figura 25: Estrutura proposta para o 3,10(*S*),5,13,14,17,20(*R*)-25-metoxilano-8-23-dieno-3-ol (**SC5**).

A estrutura do composto **SC5** foi determinada com base nos experimentos de ^1H , ^{13}C e Dept 135⁰ e difração de Raios-X.

¹⁷⁴ AMANN, A., et. al. – A novel synthesis of 22-hydroxylated triterpenes and steroids: syntheses of 22*R*-hydroxylanosterol and 22*R*-hydroxydesmosterol. **Synthesis**, v. 8, p. 696-700, 1987.

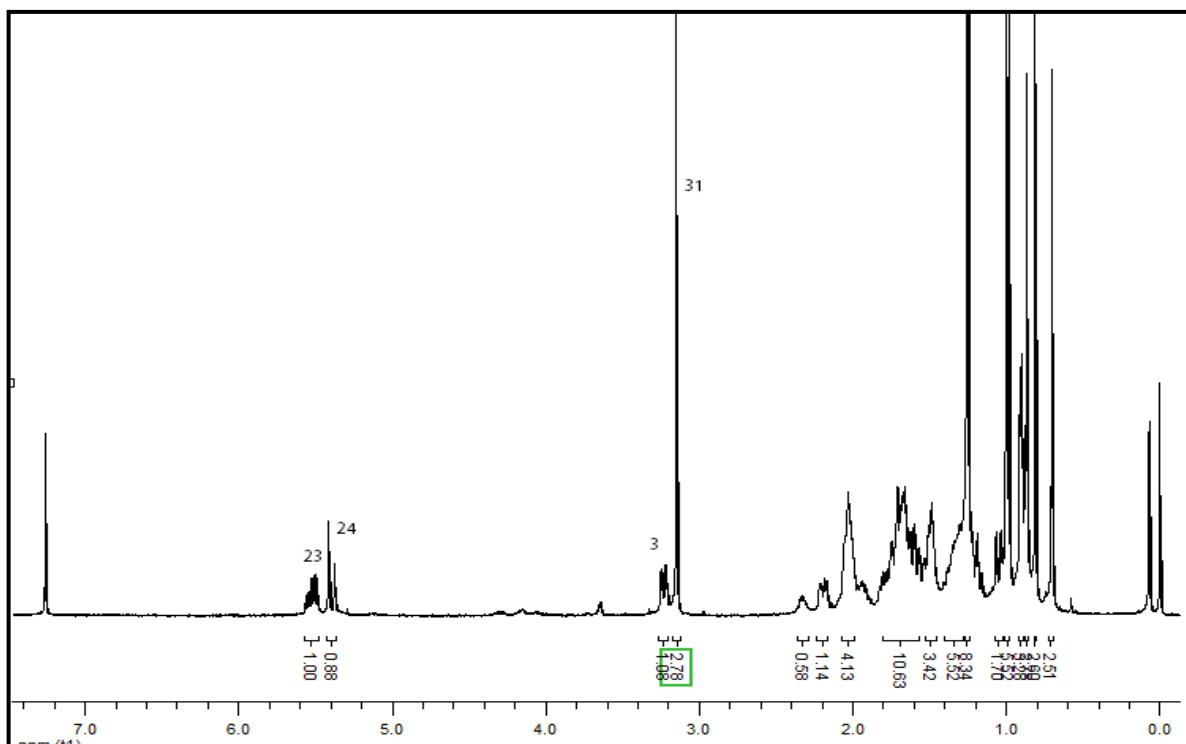


Figura 26: Espectro RMN de ^1H do metabólito (**SC5**) em CDCl_3 a 400 MHz.

Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) juntamente com Dept 135° apresenta nove grupamentos metila, sendo cinco grupos metílicos ligados a carbonos terciários a δ_{H} 0,73 (3H, s, H-18), 0,83 (3H, s, H-29), 0,89 (3H, s, H-30), 1,00 (3H, s, H-19), 1,02 (3H, s, H-28), 1,27 ppm (s, 2 x 3H, H-26 e H-27), um grupo metil ligado a carbono secundário em δ_{H} 0,92 (3H, d, $J = 5,66$ Hz, H-21), e um O-metil em δ_{H} 3,17 (s, 3H). Além disso, o espectro mostra um hidrogênio metínico ligado ao carbono do grupamento hidroxila a δ_{H} 3,24 (1H, dd, $J = 11,6; 4,8$ Hz, H-3), dois hidrogênios olefínicos, em δ_{H} 5,44 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-24, *trans*) e δ_{H} 5,55 (1H, ddd, $J = 16,0; 8,2$ e $5,3$ Hz, H-23, *trans*) (Figura 26), e dois hidrogênios metínicos em δ_{H} 1,09 (1H, d, $J = 12,64$, Hz, H-5), e em δ_{H} 1,52, (1H, m, H-17). Os hidrogênios metilênicos ligados aos carbonos C-1, C-2, C-6, C-7, C-11, C-12, C-15, C-16 e C-22 aparecem na região de δ_{H} 1,0-2,5 (m). A constante de acoplamento de 11,6 Hz sugere uma relação diaxial entre H-3 e o hidrogênio em C-2 (Figura 26), suportando o postulado de que o grupo hidroxila está localizado na face β da estrutura, ou seja, numa posição equatorial, Figura 25.

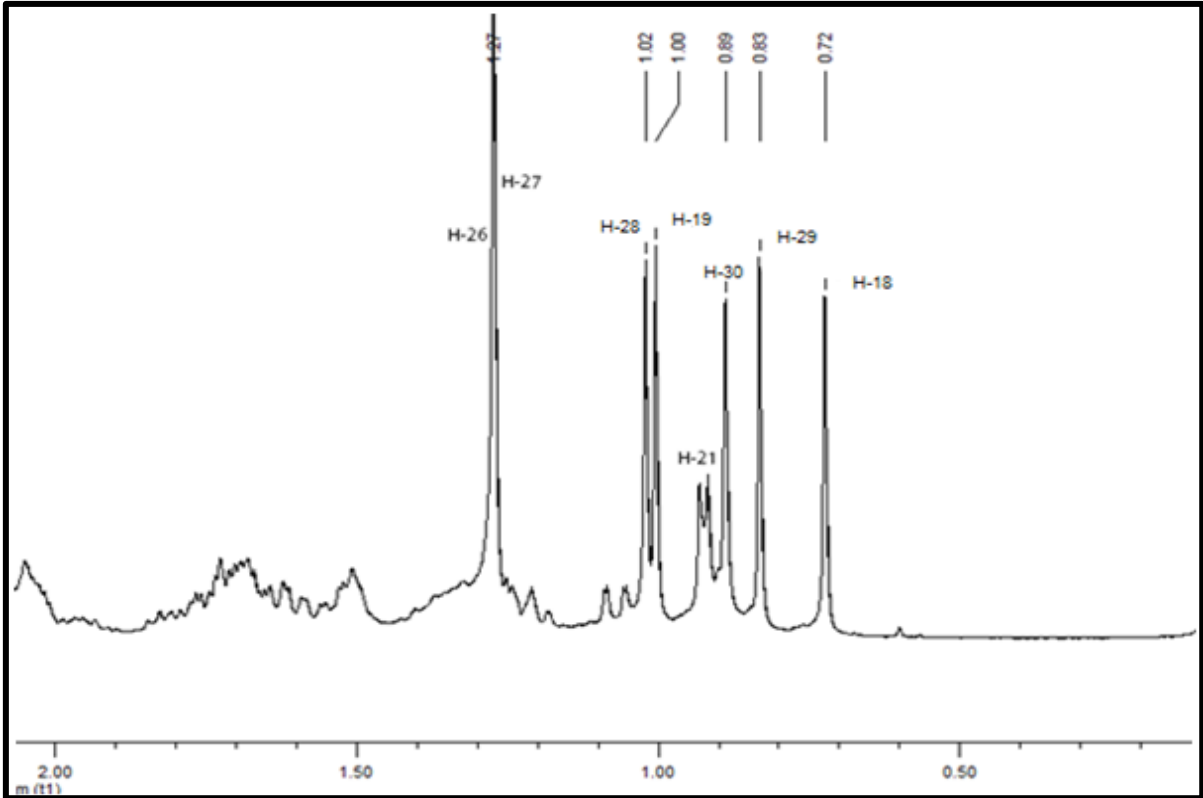


Figura 27: Espectro RMN de ^1H do metabólito (**SC5**) em CDCl_3 a 400 MHz com expansão mostrando os hidrogênios dos grupamentos metila.

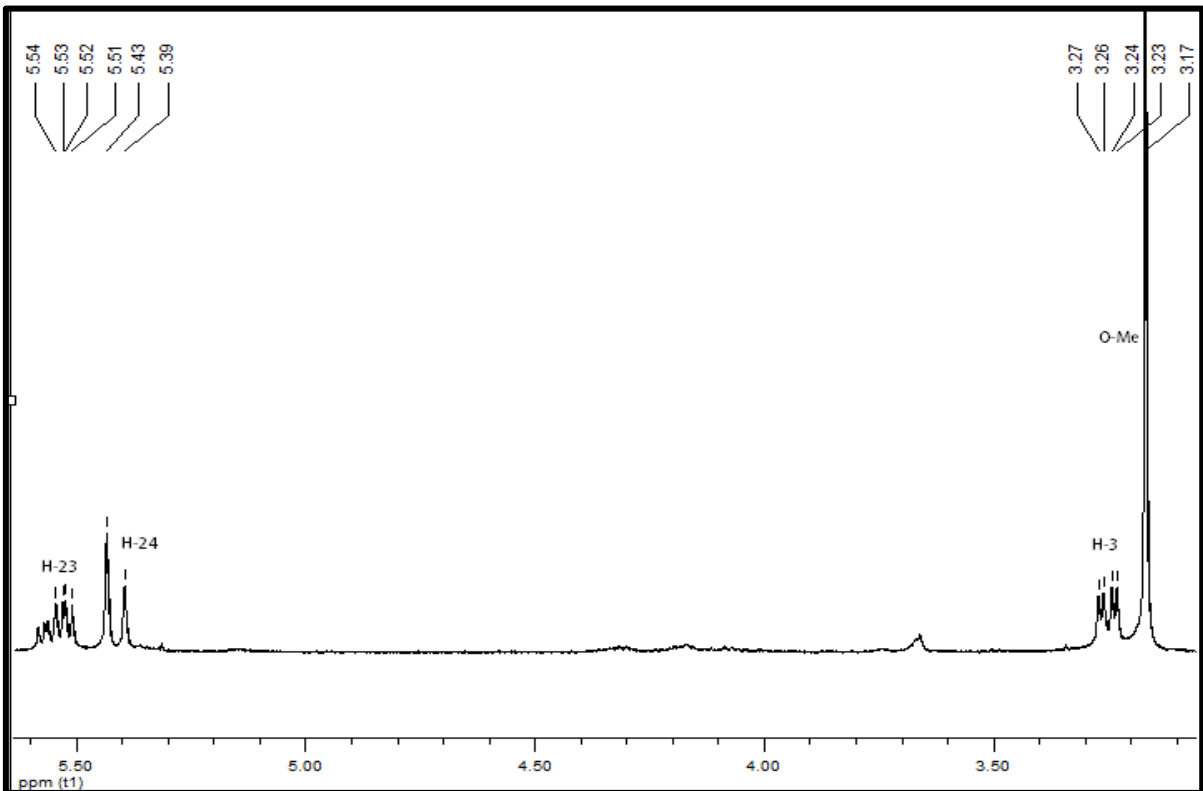


Figura 28: Espectro RMN de ^1H do metabólito (**SC5**) em CDCl_3 a 400 MHz com expansão mostrando o grupamento OMe, os hidrogênios olefínicos H-23 e H-24 e ainda o H-3.

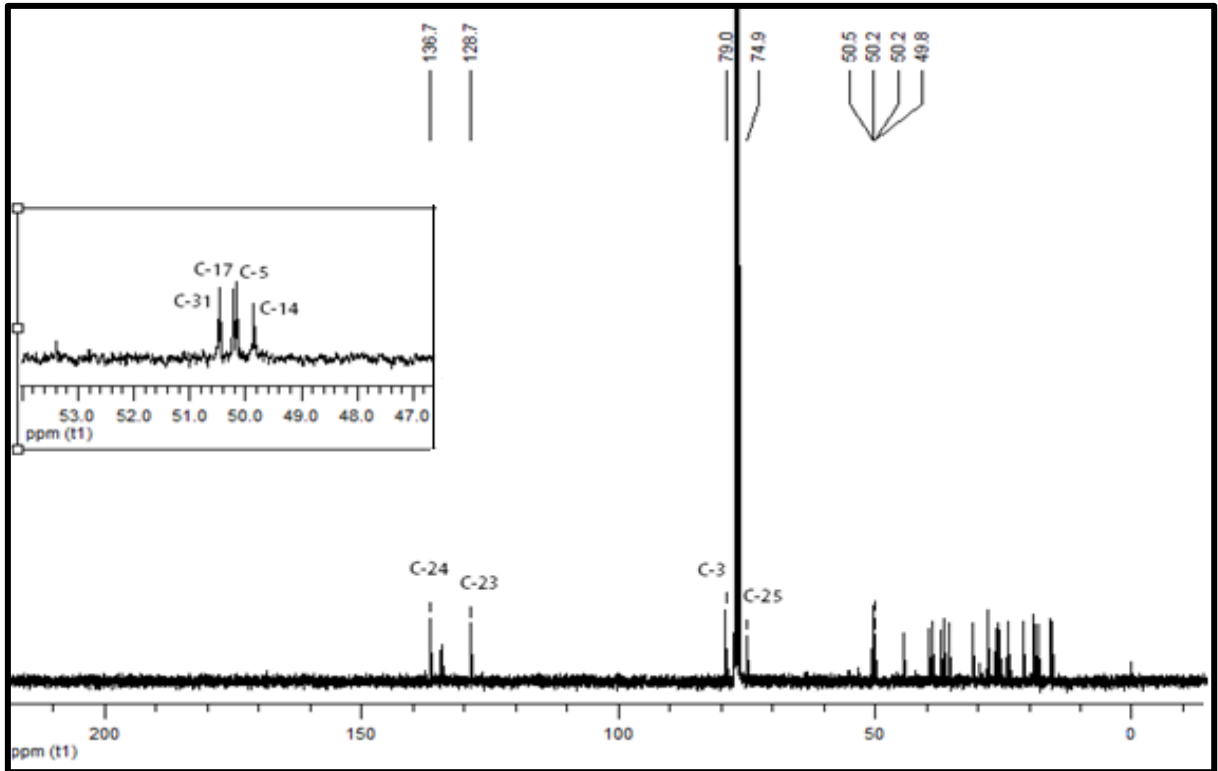


Figura 29: Espectro RMN do ^{13}C do metabólito SC5 em CDCl_3 a 100 MHz.

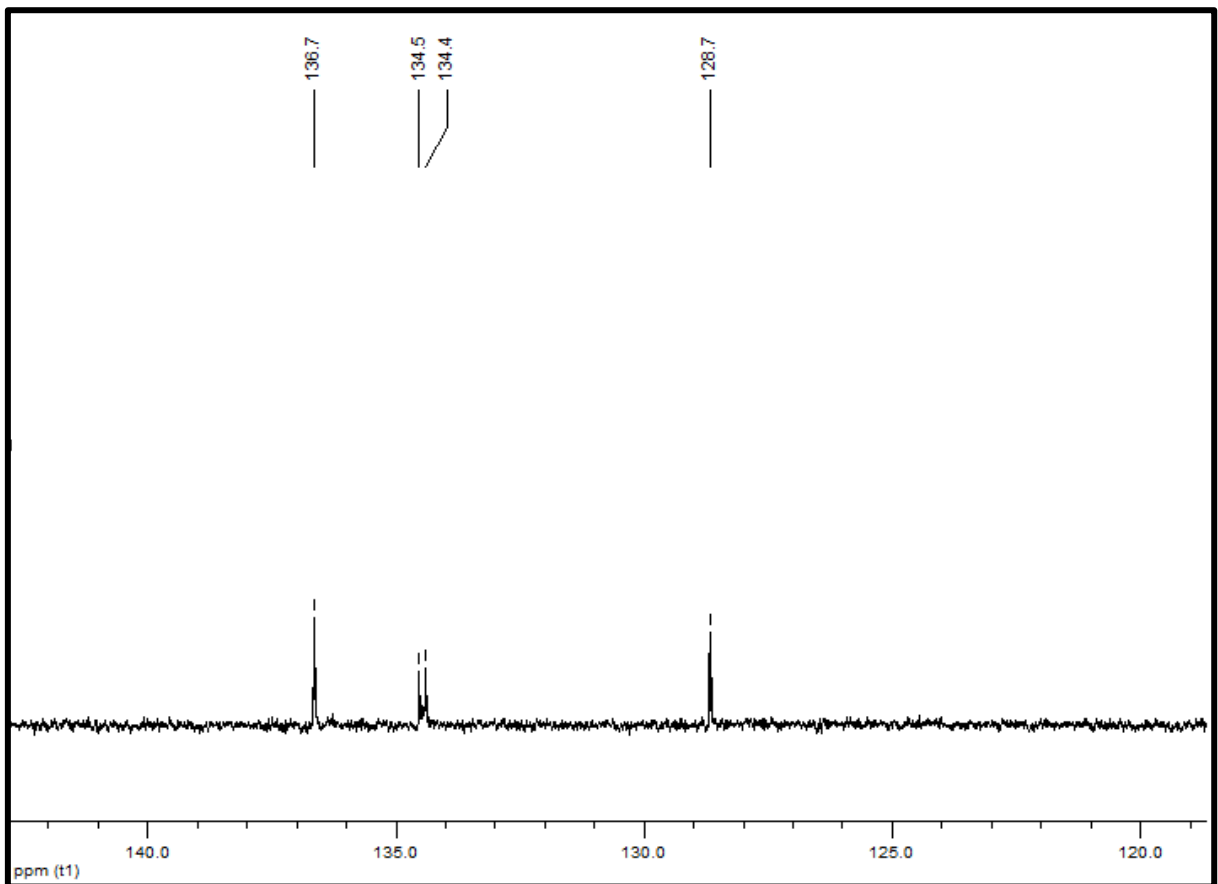


Figura 30: Expansão do espectro de RMN do ^{13}C do metabólito SC5 em CDCl_3 a 100 MHz, mostrando os carbonos olefínicos.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 29) mostrou 31 carbonos sendo nove metílicos e dentre estes se encontra o O-Me, seis carbonos metínicos, sete carbonos quaternários incluindo o carbono quaternário oxigenado e nove carbonos metilênicos. Além disso, é possível verificar seis unidades de instauração, as duas olefinas representam duas unidades e os outros quatro ciclos completam estas unidades. A fórmula molecular do composto é $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_2$, apresenta um grupamento hidroxila ligado a um carbono secundário e um carbono ligado a um substituinte oxigenado no caso o O-Me. Os picos com deslocamentos químicos δ 134,4 e 134,5 ppm são sugestivos dos carbonos C-8 e C-9 olefínicos. Os outros dois carbonos metínicos sp^2 com δ 136,7 ppm (C-24) e 128,7 ppm (C-23), são átomos de carbono da cadeia lateral da olefina dissubstituída.

O sinal a δ 78,9 ppm é atribuído ao C-3 ligado ao grupo hidroxila. A metoxila 31 encontra-se a δ 49,7 ppm, região característica para esta função química.

A atribuição dos outros carbonos foi realizada com base nos espectros de RMN Dept 135° e espectros 2D HMQC e HMBC.

O espectro Dept 135° (Figuras 31 e 32) mostrou 15 sinais com a amplitude positiva (carbonos metílicos e metínicos) e 9 sinais com amplitude negativa (carbonos metilênicos), ficando evidente que 7 carbonos não hidrogenados fazem parte da estrutura do composto isolado, pois não aparecem no espectro apresentado para a molécula **SC5**.

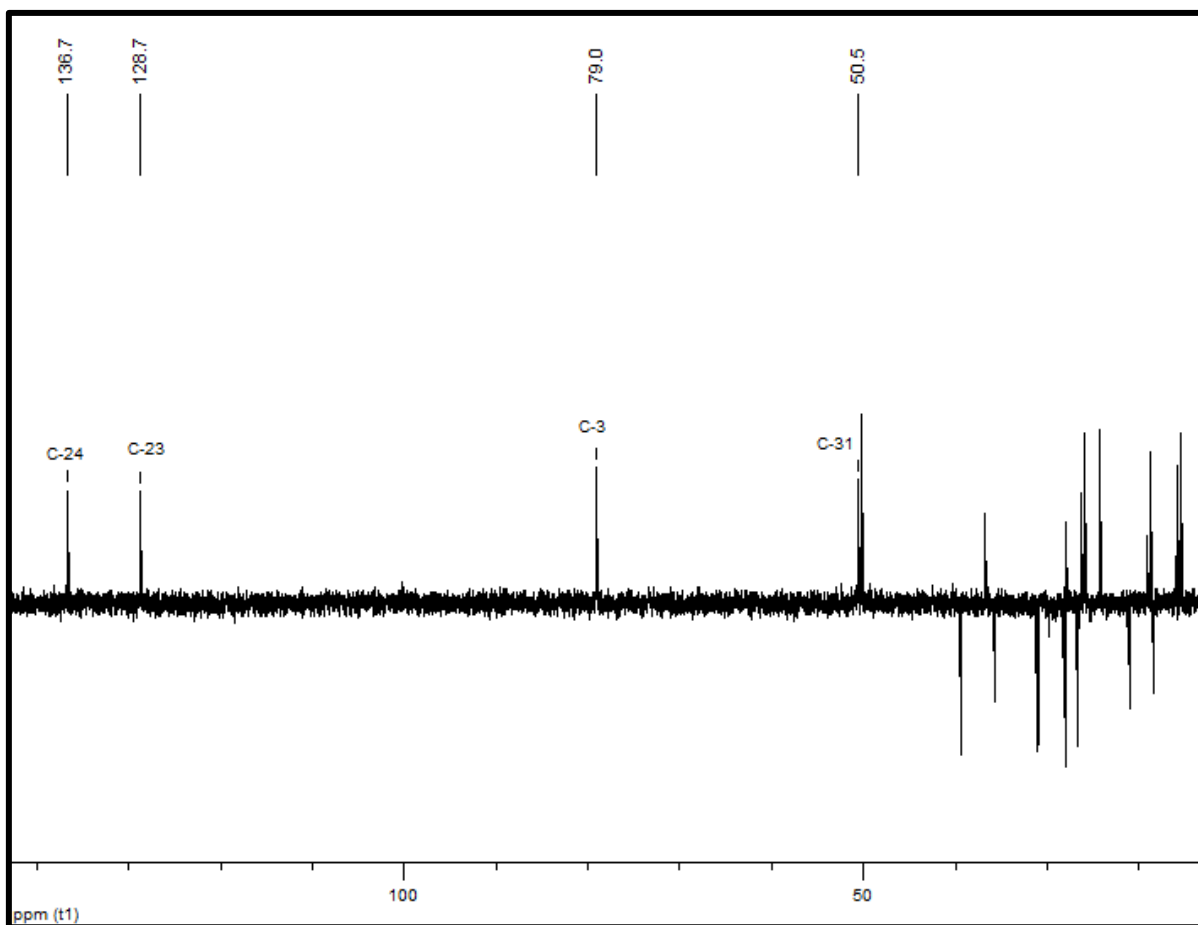


Figura 31: Espectro de RMN de Dept 135° do metabólito **SC5**, em CDCl₃, a 100 MHz.

Analisando o espectro Dept 135° foi possível a atribuição dos outros carbonos. Para melhor visualização, nas Figuras 32, 33 e 34 está a identificação dos carbonos.

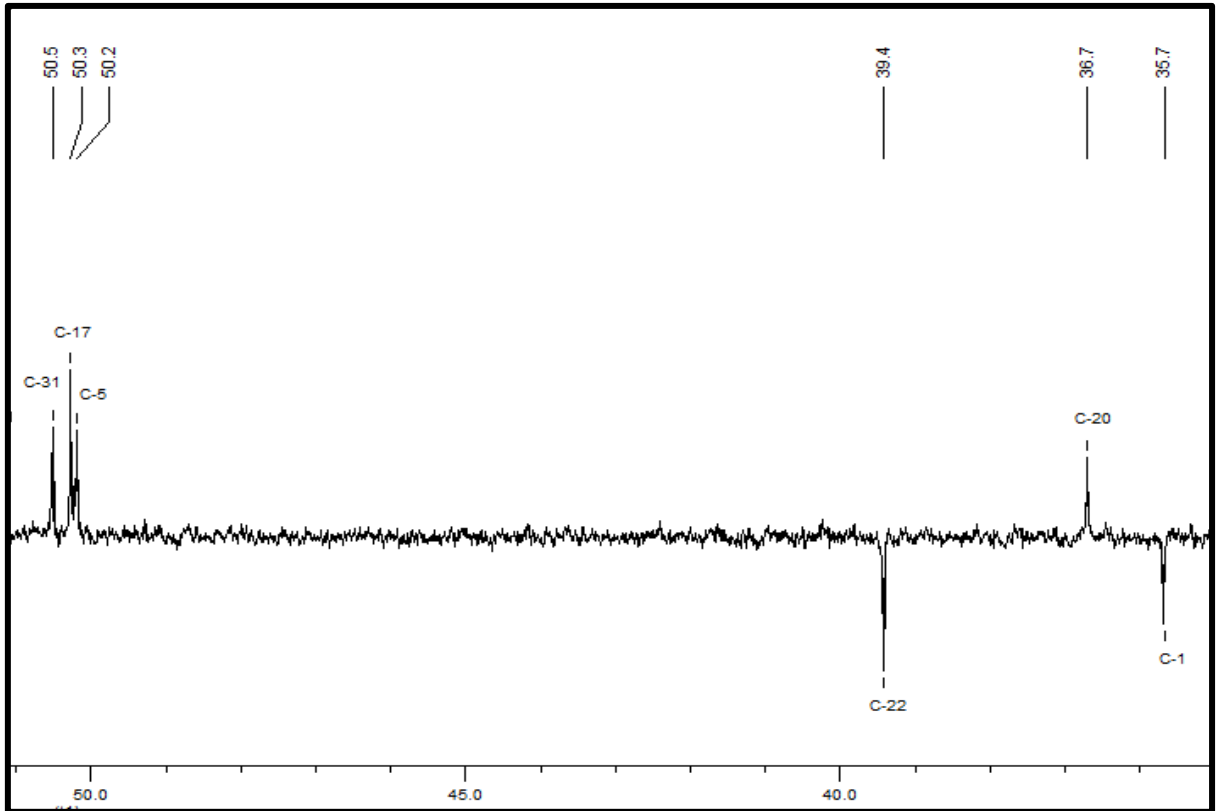


Figura 32: Expansão do espectro de RMN de Dept 135° do metabólito **SC5** em CDCl₃, a 100 MHz.

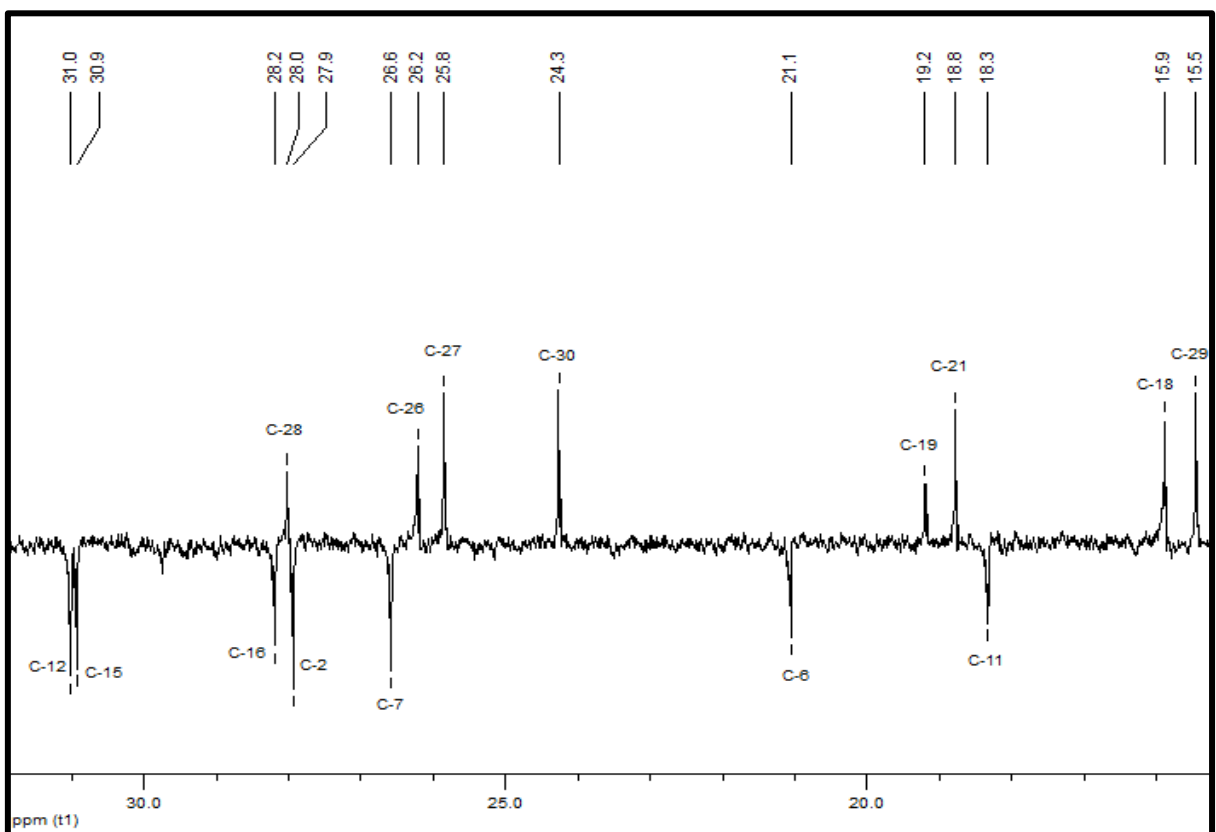


Figura 33: Expansão do espectro de RMN de Dept 135° do metabólito **SC5** em CDCl₃, a 100 MHz.

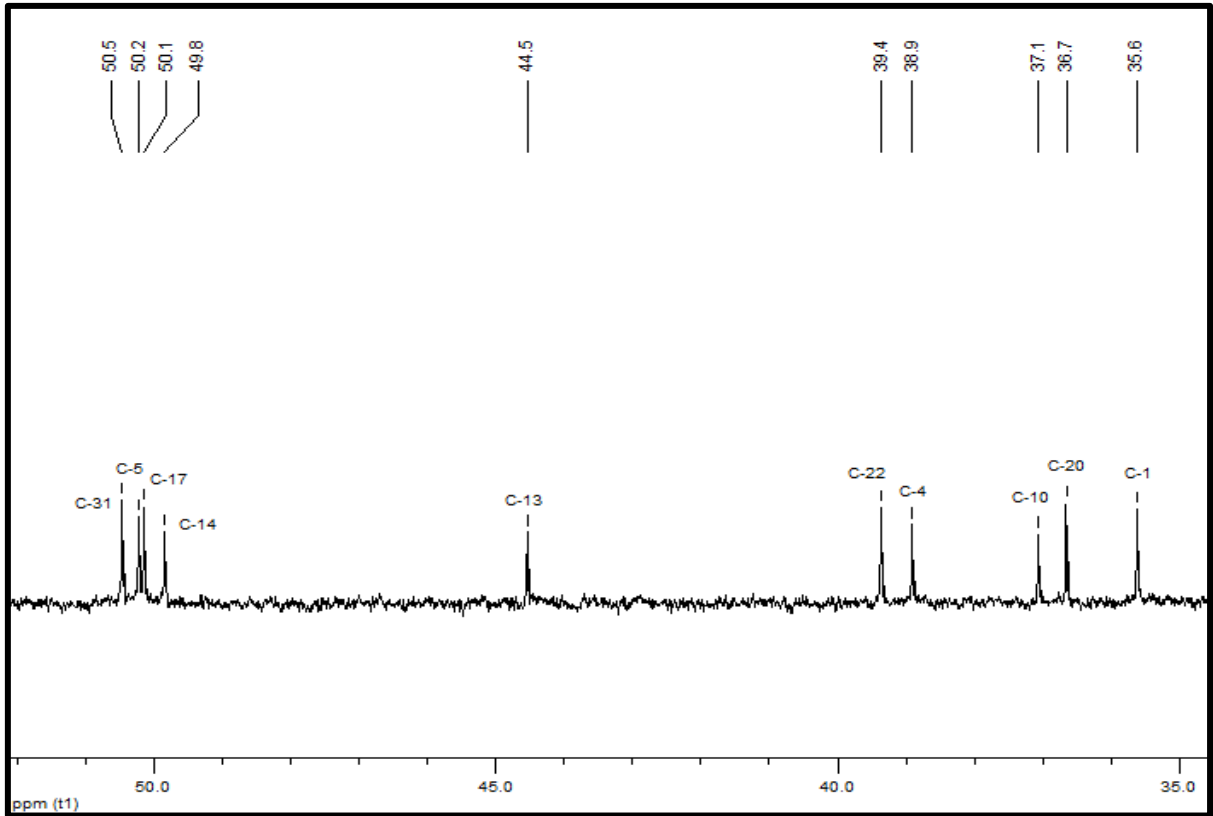


Figura 34: Expansão do espectro de RMN do ^{13}C do metabólito **SC5** em CDCl_3 a 100 MHz.

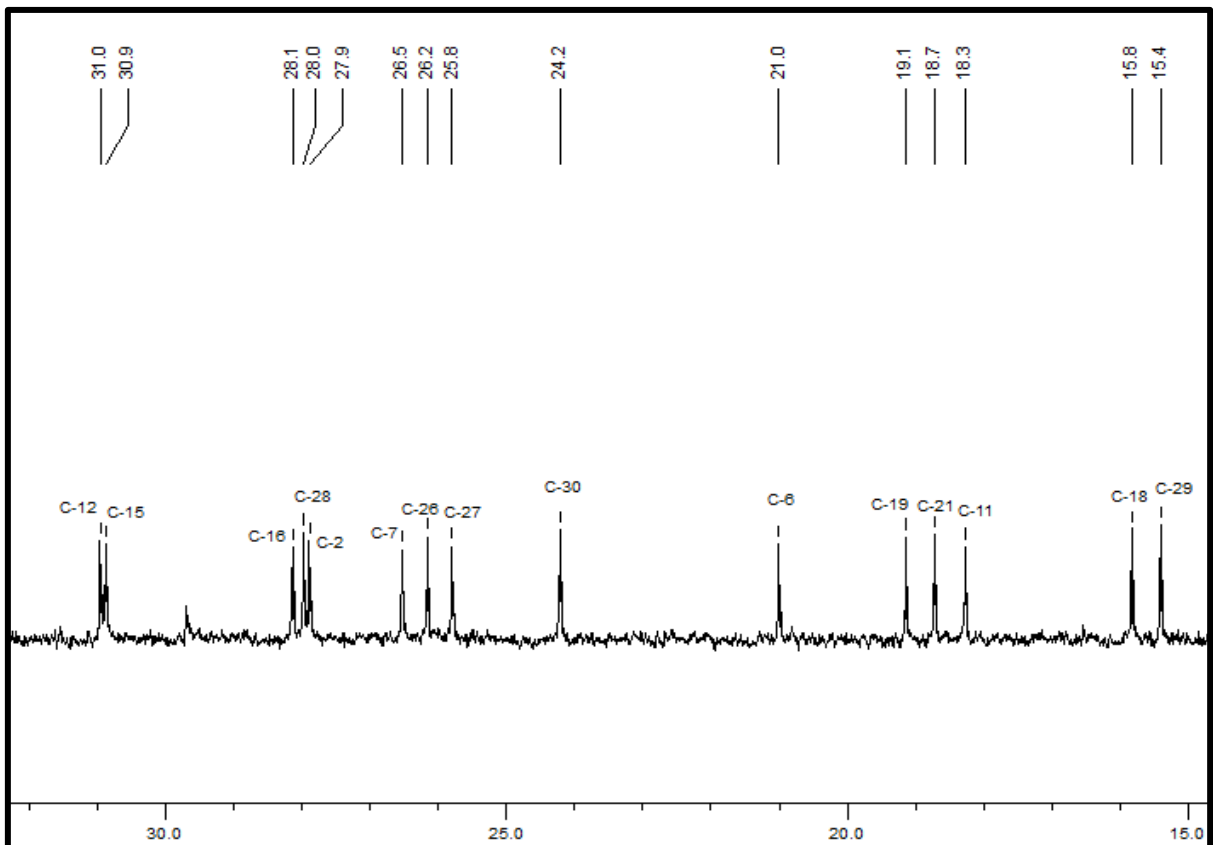


Figura 35: Expansão do espectro de RMN do ^{13}C do metabólito **SC5** em CDCl_3 a 100 MHz.

O espectro de RMN 2D Cosy H-H, mostra as correlações entre os hidrogênios vizinhos de um mesmo sistema de spins. Para o espectro 2D Cosy H-H (Figura 36) do composto isolado várias correlações podem ser visualizadas. A identificação correta dos prótons H-23 e H-24 pode ser confirmada através da correlação apresentada no espectro (Figuras 36, 37 e 38).

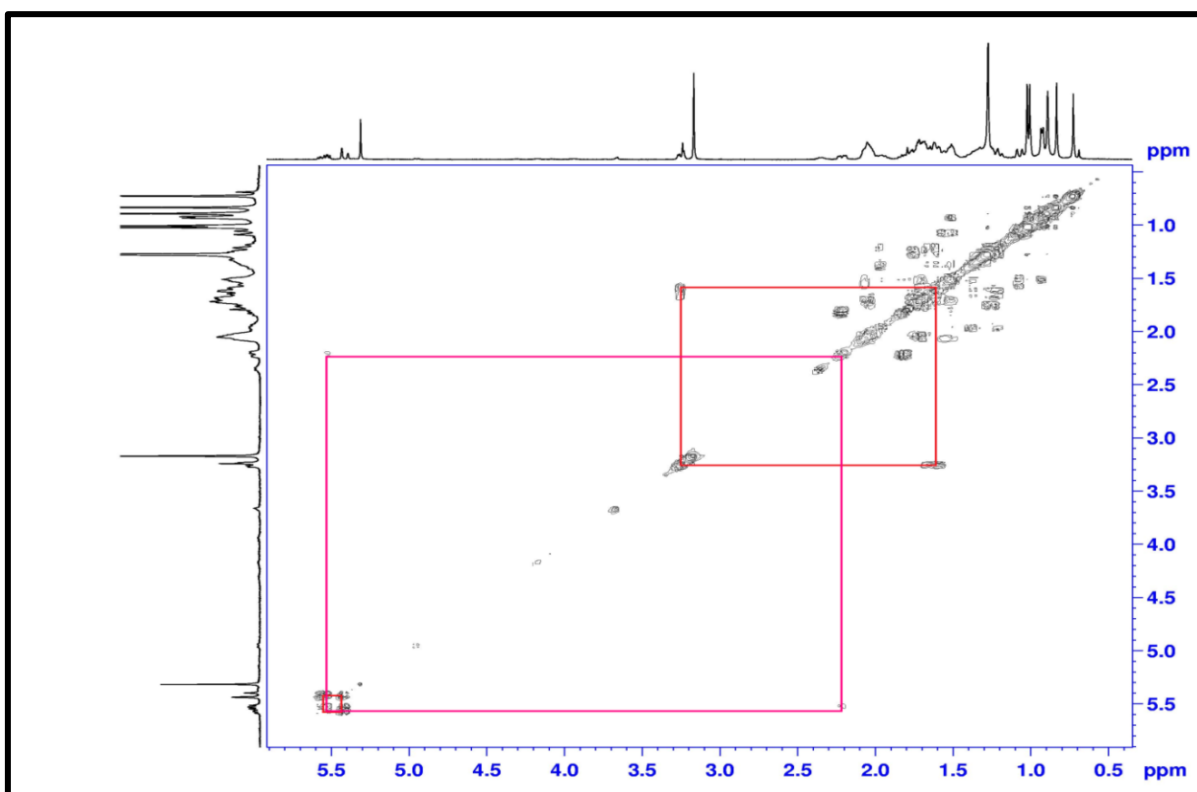


Figura 36: Espectro de RMN 2D Cosy H-H do metabólito **SC5** em CDCl_3 , a 100 MHz.

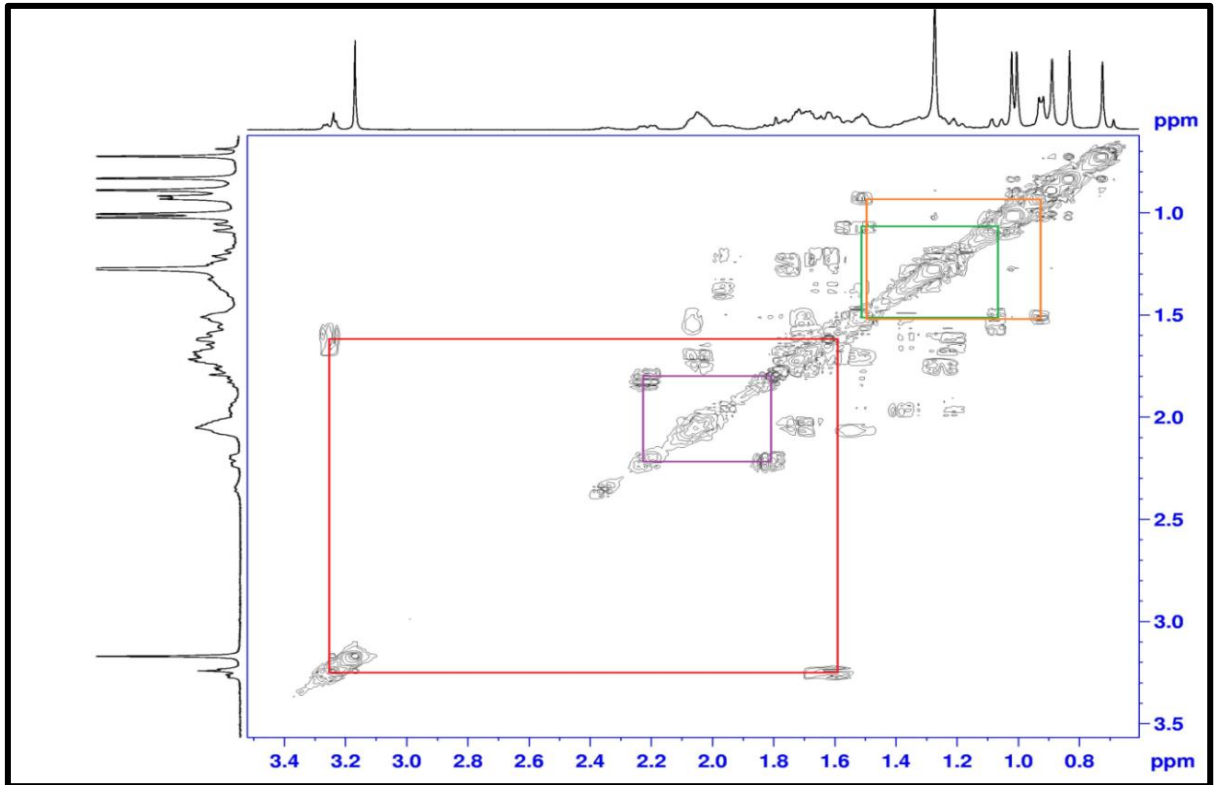


Figura 37: Expansão do espectro de RMN 2D Cosy H-H do metabólito **SC5** em CDCl_3 , a 100 MHz.

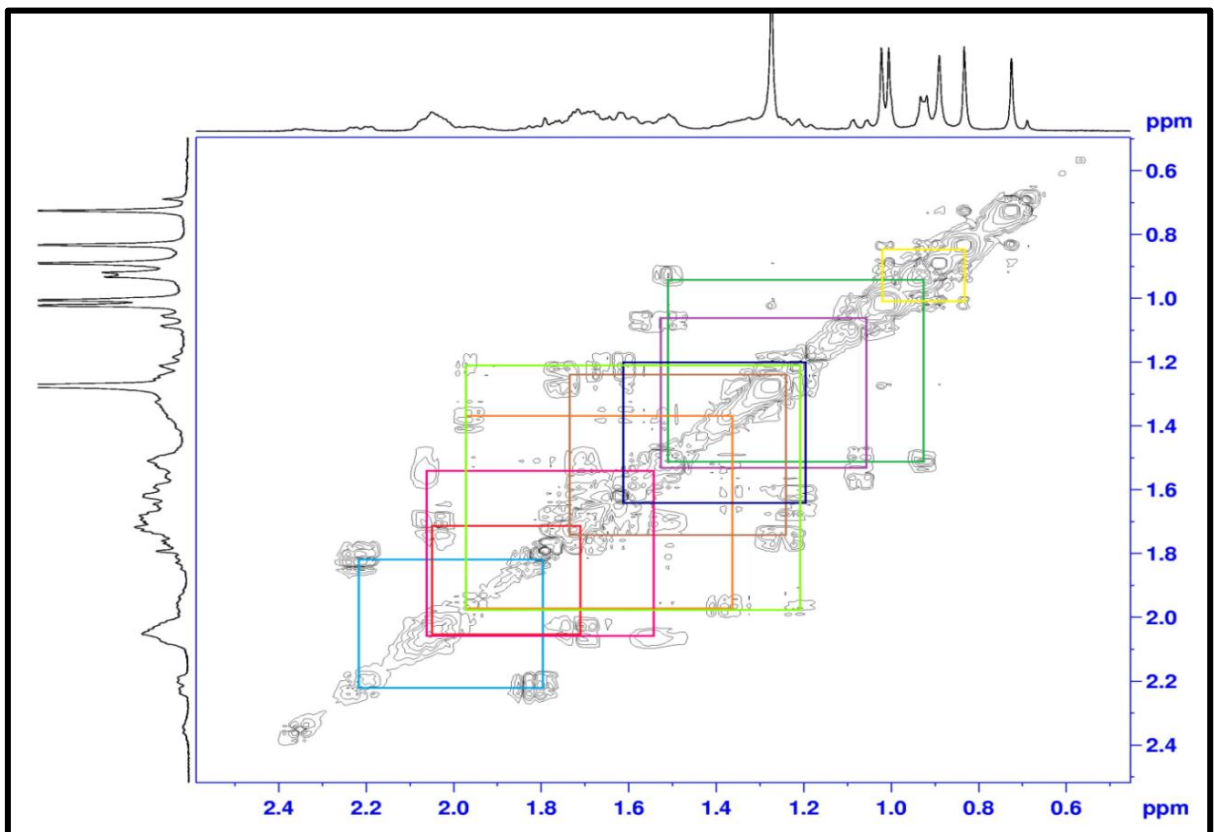


Figura 38: Expansão do espectro de RMN 2D Cosy H-H do metabólito **SC5** em CDCl_3 , a 100 MHz.

No experimento RMN 2D de HMBC (Figura 40) podemos verificar os acoplamentos dos carbonos com os hidrogênios vizinhos a duas e três ligações. Esses acoplamentos nos permitiram a atribuição correta dos carbonos metilênicos C-18, C-19, C-21, C-26, C-27, C-28, C-29 e C-30. As correlações entre os carbonos e hidrogênios do composto podem ser visualizadas no espectro descrito na figura 33.

Com base no espectro HMBC, podemos verificar que os carbonos C-24 e C-25 correlacionam-se com as metilas C-26 e C-27. Os hidrogênios ligados ao C-30 são atribuídos pelos C-8, C-13 e C-14. Já os hidrogênios ligados ao C-19 podem ser atribuídos pelos carbonos C-5, C-9 e C10. Os carbonos C-13 e C-14 também atribuem os hidrogênios H-18. Os hidrogênios H-28 e H-29 apresentam correlações com os carbonos C-3 e C-4 e C-5. Os hidrogênios H-21 são atribuídos pelos carbonos C-20 e C-17 com os quais apresentam correlações observadas no espectro.

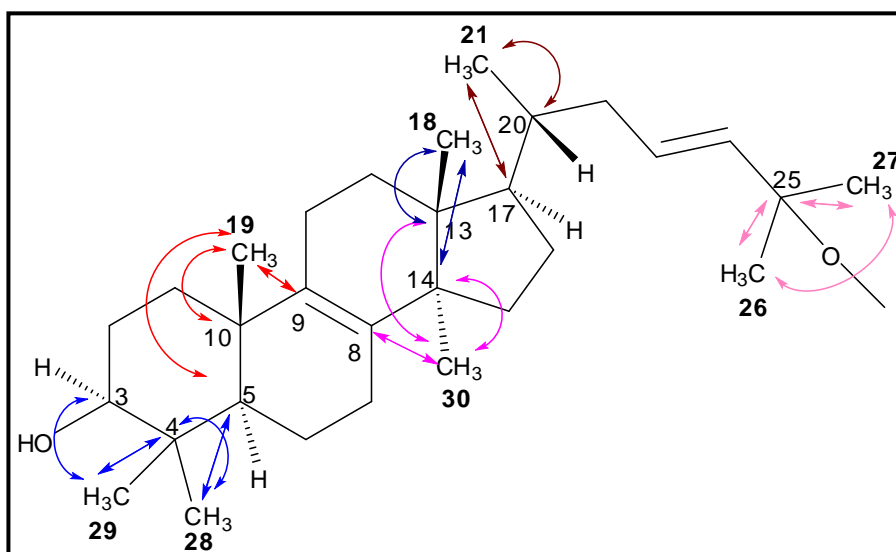


Figura 39: Correlações observadas nos espectro HMBC.

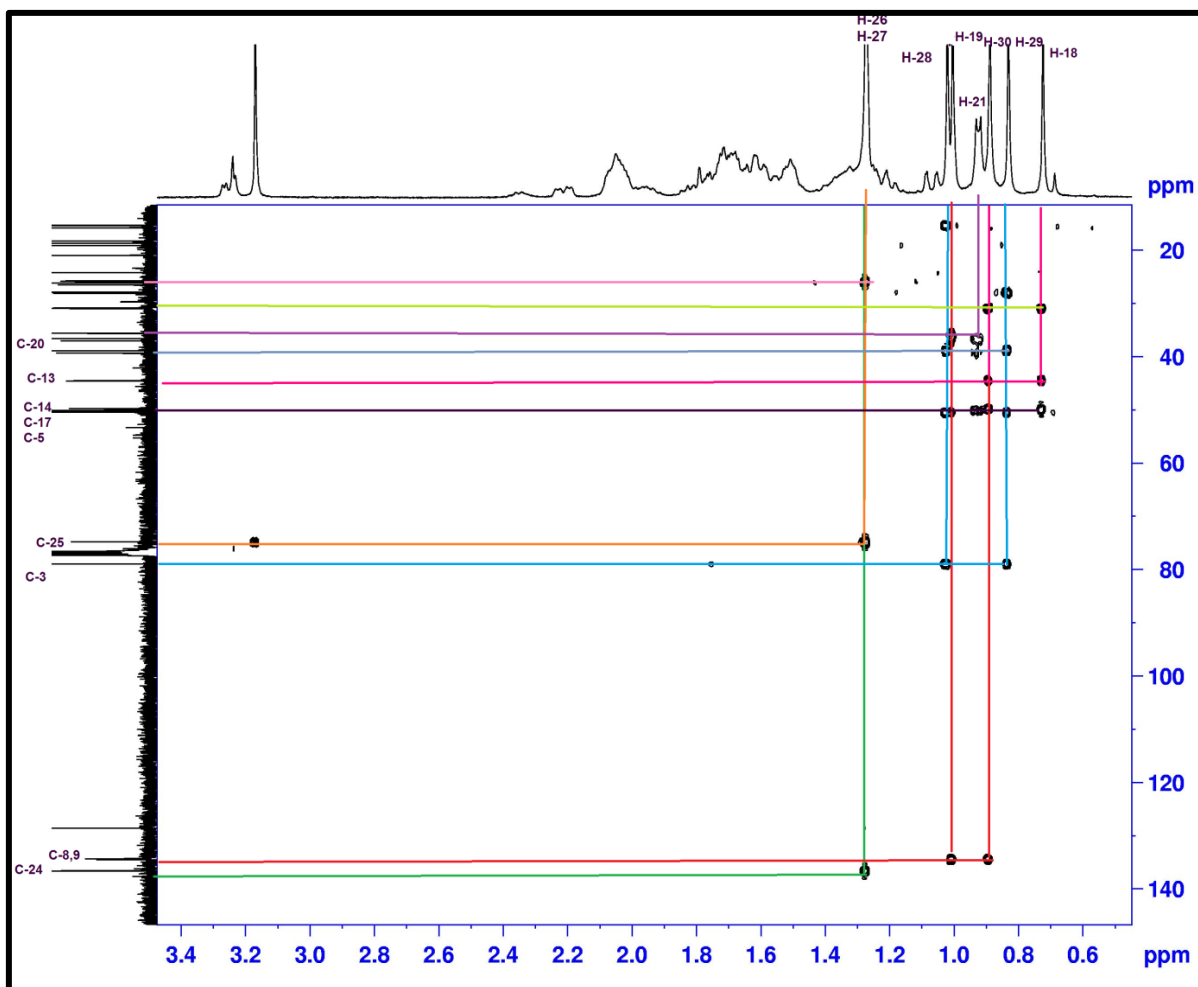


Figura 40: Espectro de RMN HMBC do metabólito **SC5** em CDCl_3 , a 100 MHz.

No espectro de 2D HMQC (Figuras 41 e 42), temos a correlação dos hidrogênios com seus respectivos carbonos. Assim, no espectro HMQC (Figura 41) podemos verificar que o H-23 tem correlação com o carbono que está em δ 128,6 ppm; o H-24 tem correlação com o carbono que se encontra em δ 136,6 ppm e o H-3 tem correlação com o carbono que está a δ 78,8 ppm.

Na Figura 41 podemos identificar os carbonos metilênicos, o carbono ligado ao grupamento metoxila e o carbono ligado ao grupamento hidroxila do composto isolado através das correlações apresentadas.

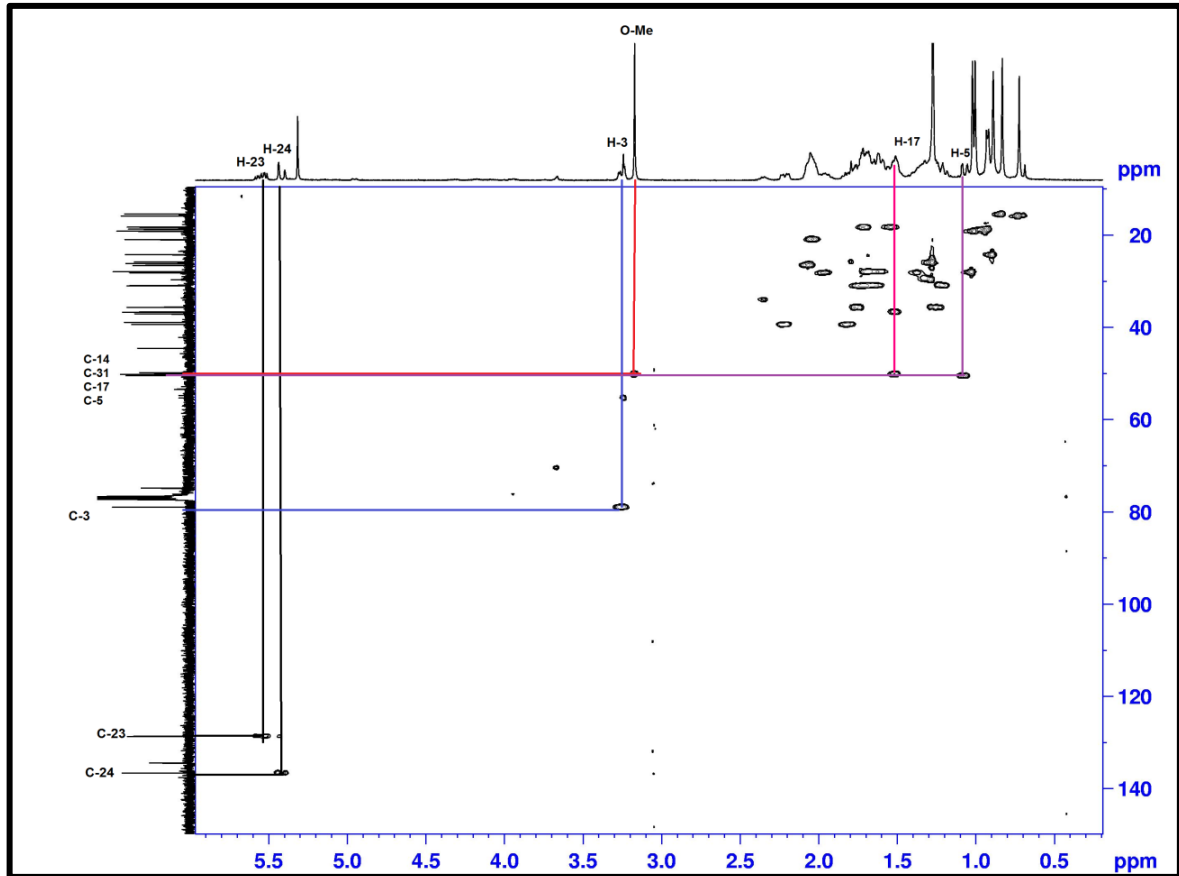


Figura 41: Espectro de RMN HMQC do metabólito **SC5**, mostrando as correlações dos carbonos olefínicos, dos carbonos ligados a metoxila e a hidroxila em CDCl_3 , a 100 MHz.

Na Figura 42 podemos verificar a correlação dos demais carbonos com os seus respectivos hidrogênios.

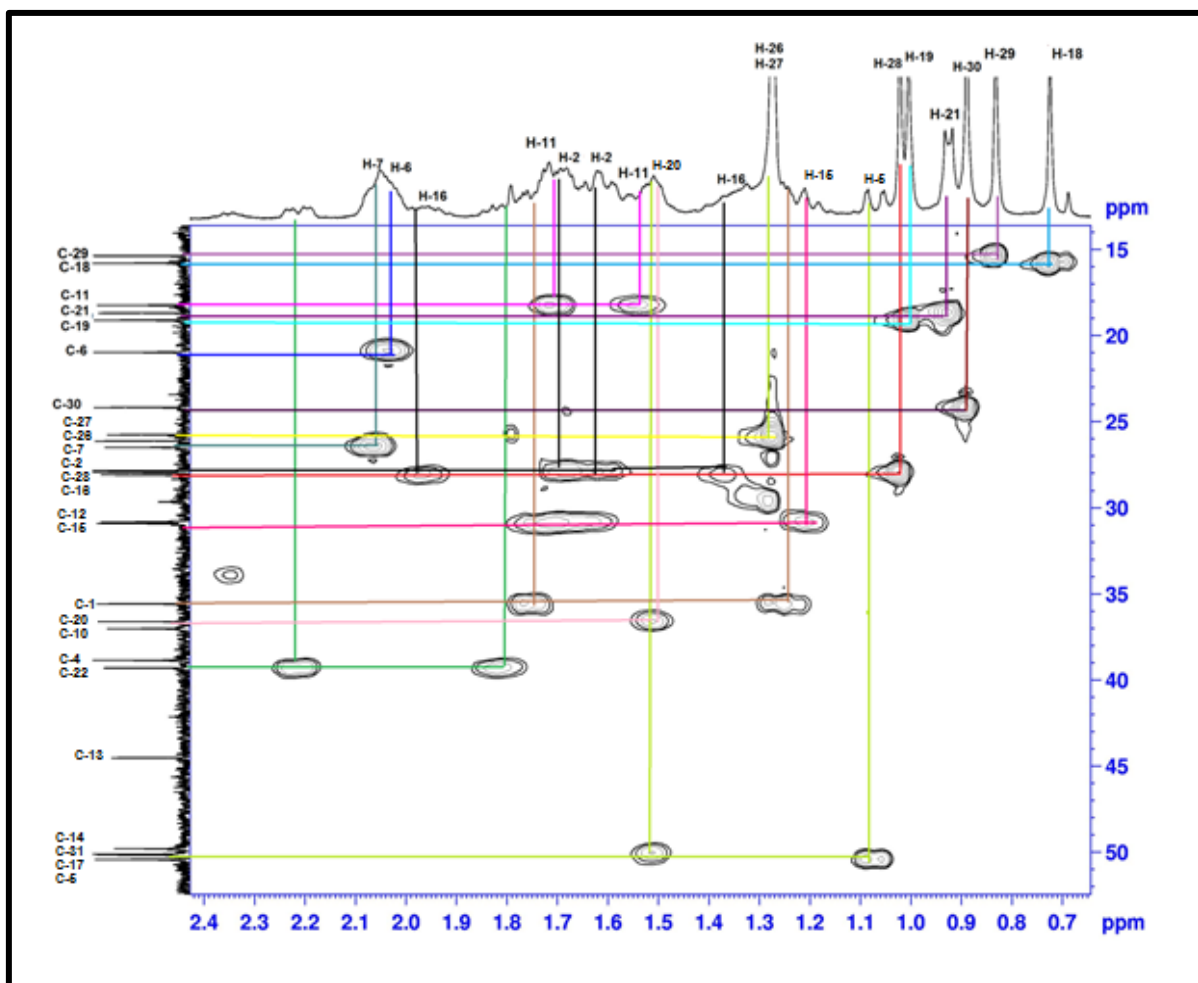


Figura 42: Espectro de RMN HMQC mostrando as demais correlações hidrogênios/carbono do metabólito **SC5** em CDCl_3 , a 100 MHz.

A Tabela 7 apresenta os dados de RMN do composto obtido.

Tabela 7: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos pelo composto isolado (**SC5**).

Posição	δ ^1H (ppm)	δ ^{13}C (ppm)
1	m, 1,27, m, 1,76	35,6
2	m, 1,60, m, 1,68	27,9
3	dd, 3,24 ($J=1$ 1,6; 4,8 Hz)	79,0
4	-	38,9
5	dd, 1,09 ($J=$ 12,6 Hz)	50,2
6	m, 2,04	21,0
7	m, 2,07	26,5
8	-	134,5
9	-	134,4
10	-	37,1
11	m, 1,53, m, 1,72	18,3
12	m, 1,21, m 1,71	31,0
13	-	44,5
14	-	49,8
15	m, 1,21, m, 1,71	30,9
16	m, 1,37, m, 1,97	28,1
17	m, 1,52	50,1
18	s, 0,73	15,8
19	s, 1,00	19,1
20	m, 1,51	36,7
21	d, 0,92 ($J=$ 5,66 Hz)	18,7
22	m, 2,21, m, 1,81	39,4
23	dd, 5,55 ($J=$ 16,0; 8,2 e 5,3 Hz)	128,7
24	d, 5,44 ($J=$ 16,0; H-24 Hz)	136,7
25	-	74,9
26	s, 1,27	26,2
27	s, 1,27	25,8
28	s, 1,02	28,0
29	s, 0,83	15,4
30	s, 0,89	24,2
O-Me	s, 3,17	50,5

A cristalização deste composto ocorreu por dissolução em diclorometano seguido de repouso a temperatura ambiente da solução formada, com a formação de cristais pequenos, porém possíveis de ser medidos, o que permitiu a determinação da estereoquímica relativa do composto **SC5** em um único cristal por difração de raios-X. O cristal de analisado apresentou 31 carbonos, um grupamento hidroxila ligado ao carbono 3, um grupamento metila ligado ao carbono 25 e ainda

sete grupamentos metila ligados a carbonos quartenários e uma metila ligada a carbono terciário.

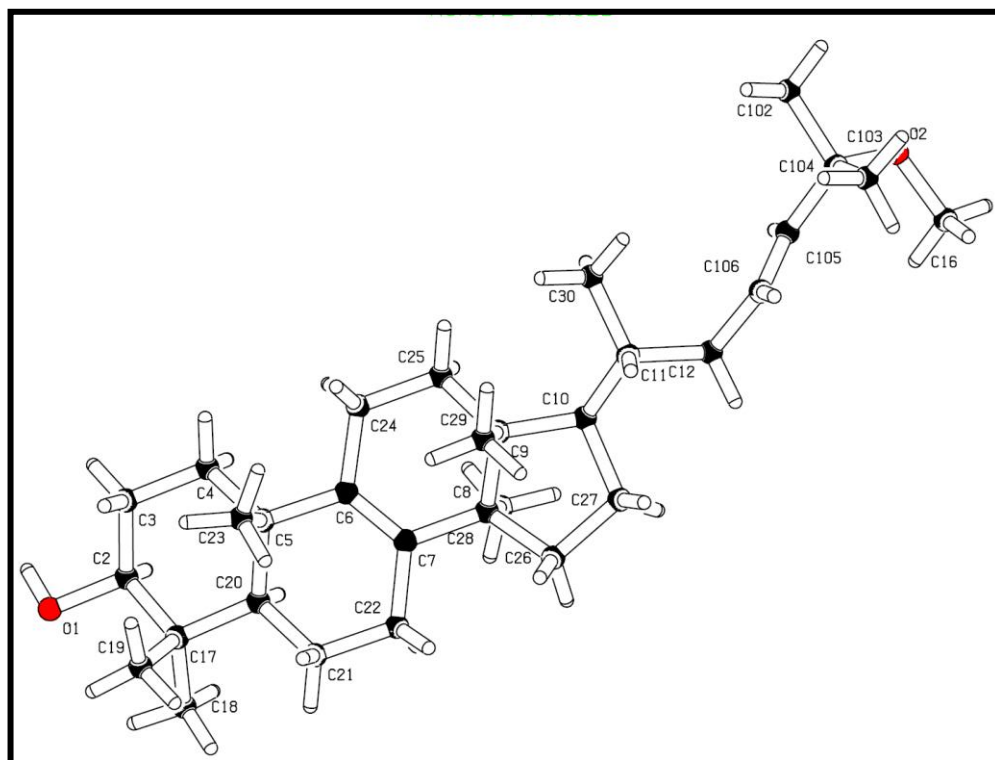


Figura 43: Estrutura obtida através da difração de Raios-X do composto **SC5** com a estereoquímica relativa.

A realização de uma análise de Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR) (Figura 44) confirmou o peso molecular do composto **SC5** ($M^+ - OMe$).

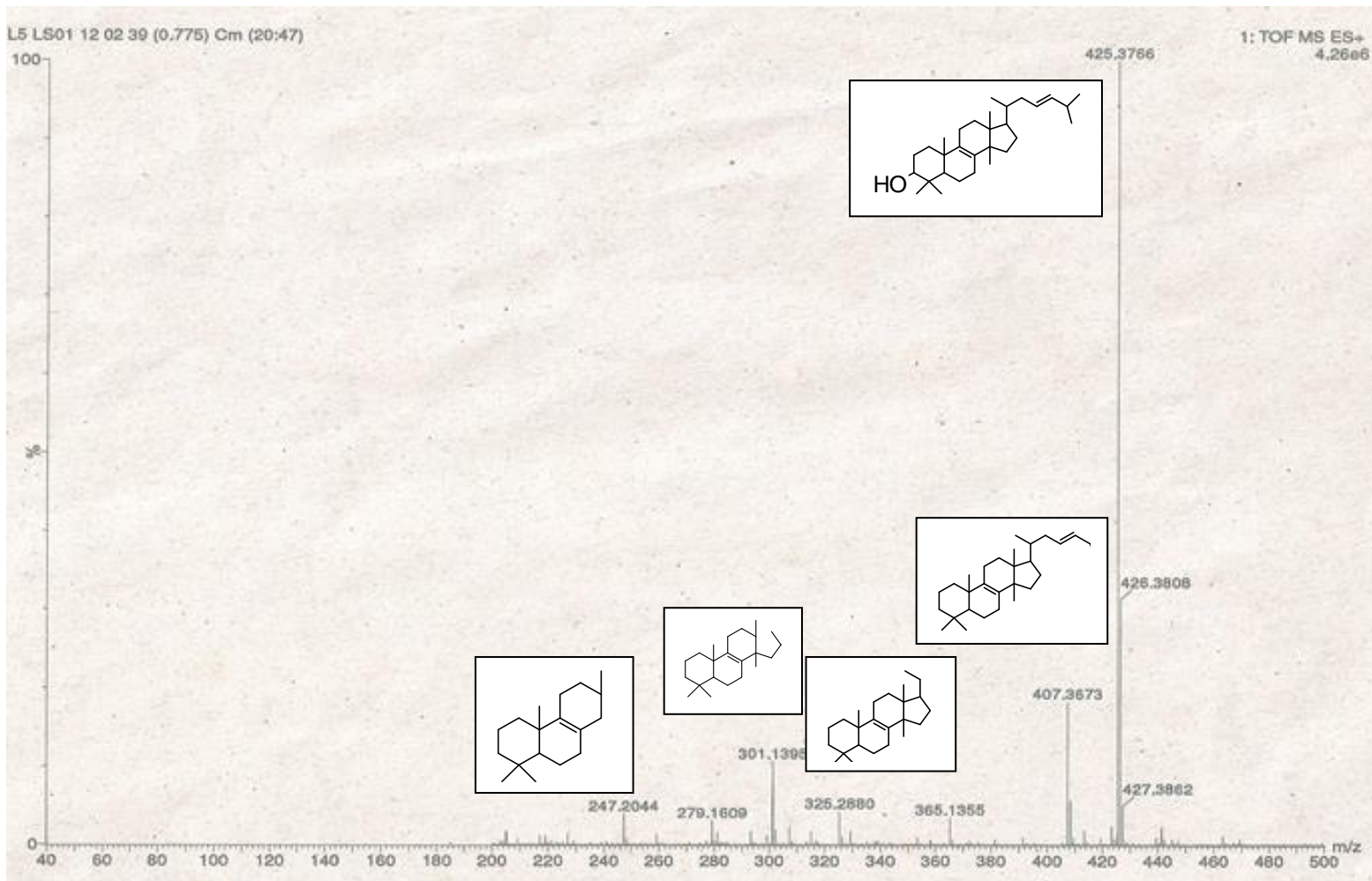


Figura 44: Espectrometria de massas de alta resolução do composto **SC5**.

5.3. Identificação do metabólito **SC8**

O metabólito **SC8** foi isolado como um sólido branco em um sistema de solvente hexano/acetato de etila (80:20) utilizando cromatografia em placa preparativa, com ponto de fusão: 169,4 – 170,6 °C, visível à luz ultravioleta. A identificação do composto foi realizada através dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C e Dept 135 com base em dados já descritos na literatura¹⁷⁵ e na estrutura **SC5**. Na Figura 45 estão apresentadas às estruturas do composto com sua respectiva numeração.

¹⁷⁵ ENTWISTLE, N., et. al. - Studies of artefacts of the acid treatment of (23S)-lanosta-8,24-diene-3 β ,23-diol. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry* (1972-1999) (12), p. 1235-1239, 1973.

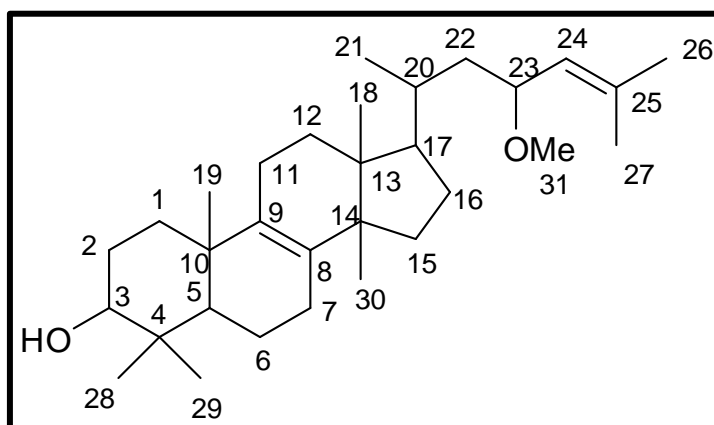


Figura 45: Estrutura química e numeração proposta para o composto isolado SC8.

Com base na análise do espectro de ^1H (Figura 46) e dados descritos na literatura¹⁷⁵, o H ligado ao carbono 24 aparece como um dubleto na região de δ_{H} 5,08 ppm (1H, d, $J = 8,86$ Hz) referente ao acoplamento com o H do carbono 23. O H ligado C-23 encontra-se na região de δ_{H} 3,90 ppm e aparece como um dubleto de dubletos, referente ao acoplamento com os hidrogênios do C-24 e com os hidrogênios ligados ao C-22 que são diastereotópicos. O H-3 encontra-se a δ_{H} 3,37 ppm como um dubleto de dubletos. A metoxila ligada ao carbono 23 está em δ_{H} 3,23 ppm e aparece como um singlete. Os outros sinais não são possíveis de identificação sem a utilização de outros experimentos.

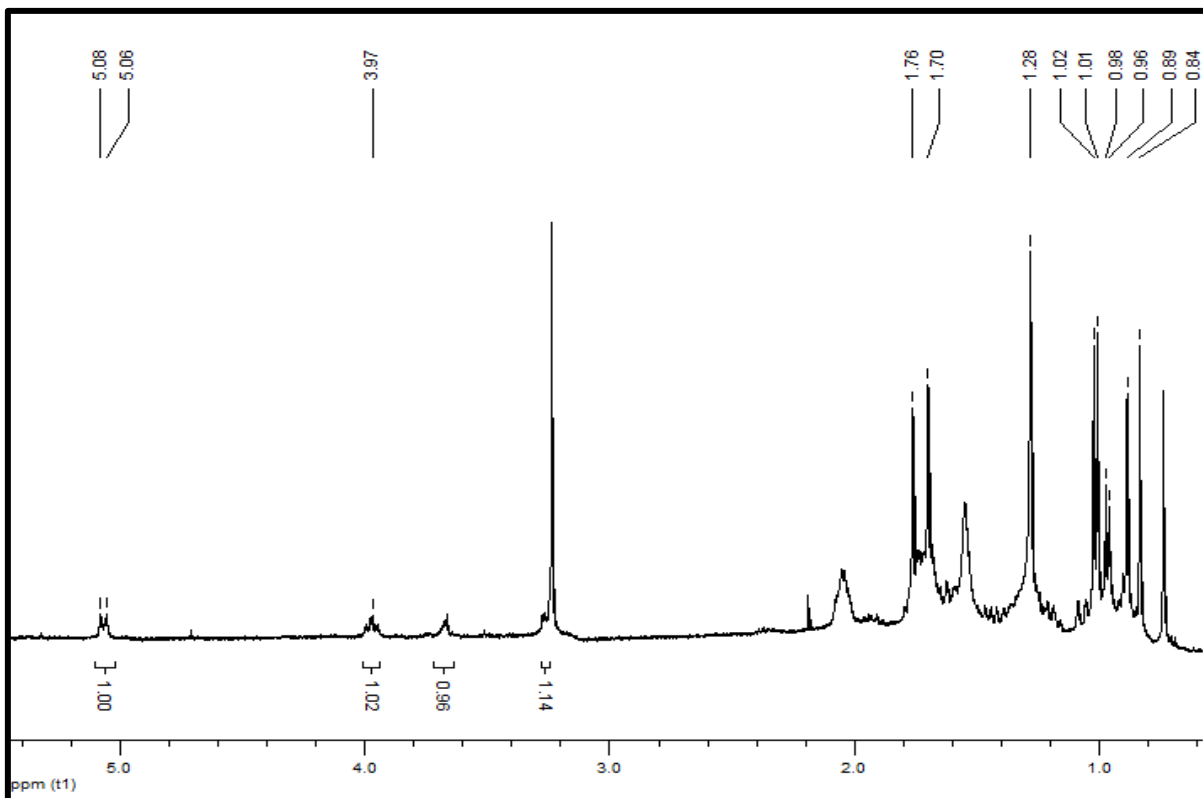


Figura 46: Espectro RMN de ^1H do metabólito **SC8** em CDCl_3 a 400 MHz

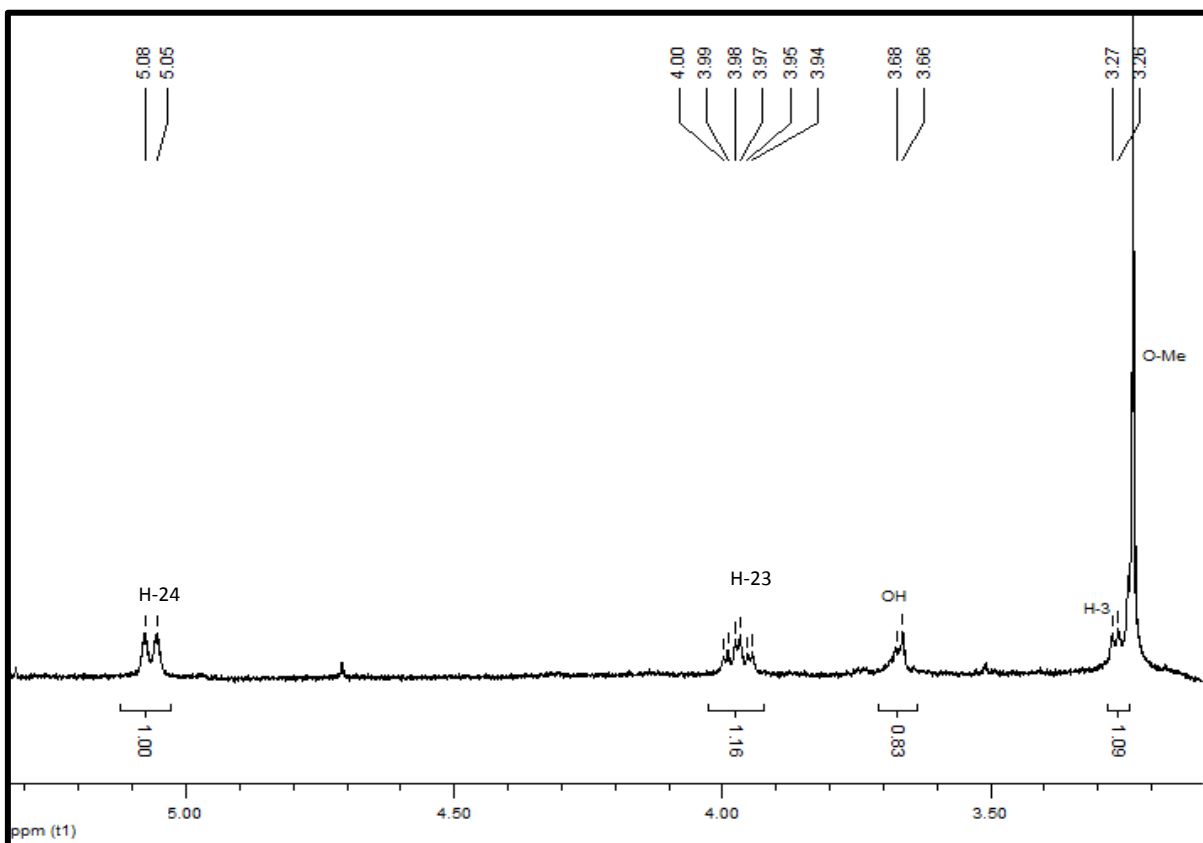


Figura 47: Expansão do espectro RMN de ^1H do metabólito **SC8** em CDCl_3 a 400 MHz.

A identificação das metilas foi feita com base no metabólito **SC5** e dados da literatura¹⁷⁶. O H ligado ao C-21 forma um duplete característico com o H ligado ao C-20 com um $J = 6,48$ Hz. A molécula também apresenta sete grupos metílicos ligados a carbonos terciários δ_H 0,83 ppm (3H, s, H-29), δ_H 0,89 ppm (3H, s, H-18), δ_H 1,01 ppm (3H, s, H-19), δ_H 1,02 ppm (3H, s, H-28), δ_H 1,28 ppm (3H, s, H-30), sendo que duas estão ligadas a uma dupla ligação δ_H 1,70 ppm (3H, s, H-27) e δ_H 1,76 ppm (3H, s, H-26).

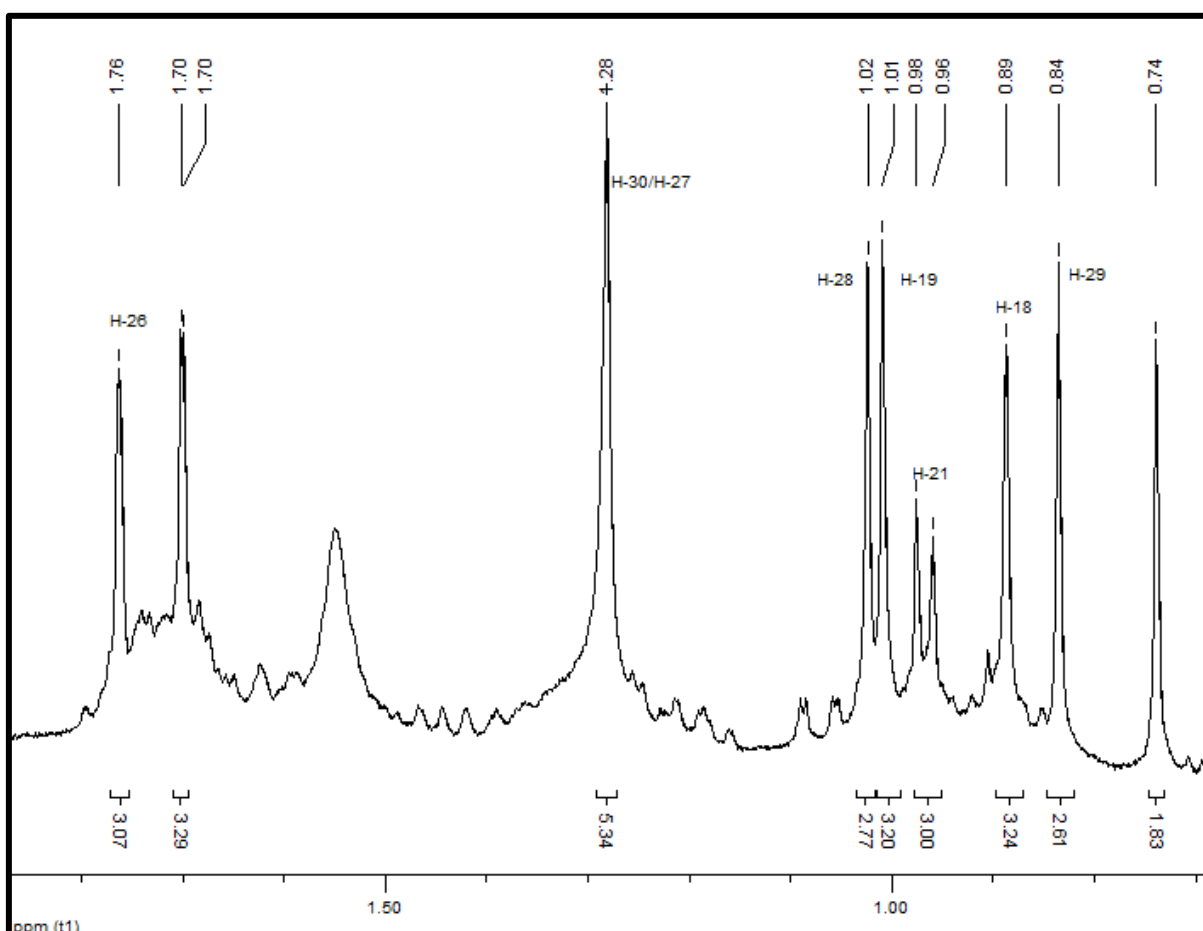


Figura 48: Expansão do espectro RMN de ^1H do metabólito **SC8** em CDCl_3 a 400 MHz mostrando os grupamentos metílicos.

No espectro de ^{13}C (Figura 49), em 134,5 ppm encontra-se o C-24. O carbono 9 está em 134,4 ppm, e em 134,3 ppm temos o carbono 8. O C-25 aparece a 127,1 ppm, região característica de dupla ligação. O carbono do álcool, o C-3 aparece a 79,0 ppm. Em 74,8 ppm encontra-se o C-23, vizinho da metoxila. O carbono da

metoxila, o C-31, aparece a 55,6 ppm, região característica para a função. As atribuições foram feitas com base nos dados descritos na literatura.

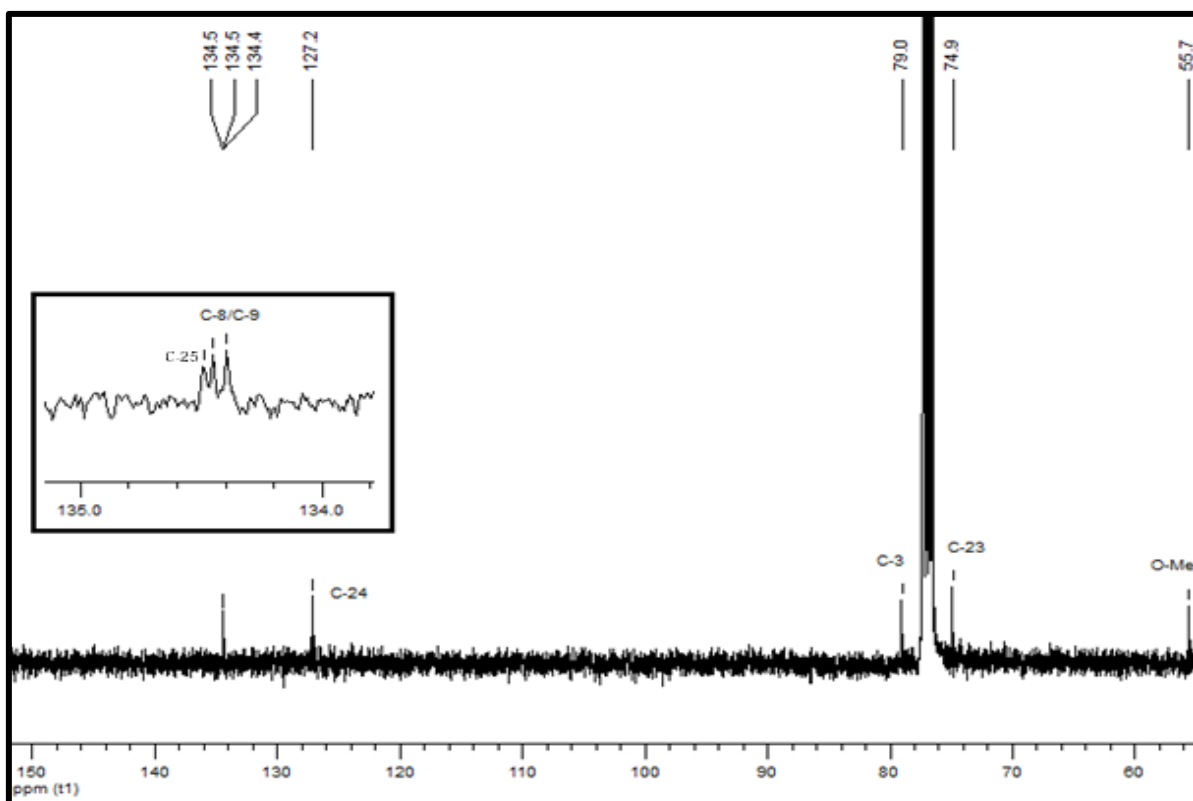


Figura 49: Espectro RMN de ^{13}C do metabólito **SC8** em CDCl_3 a 100 MHz.

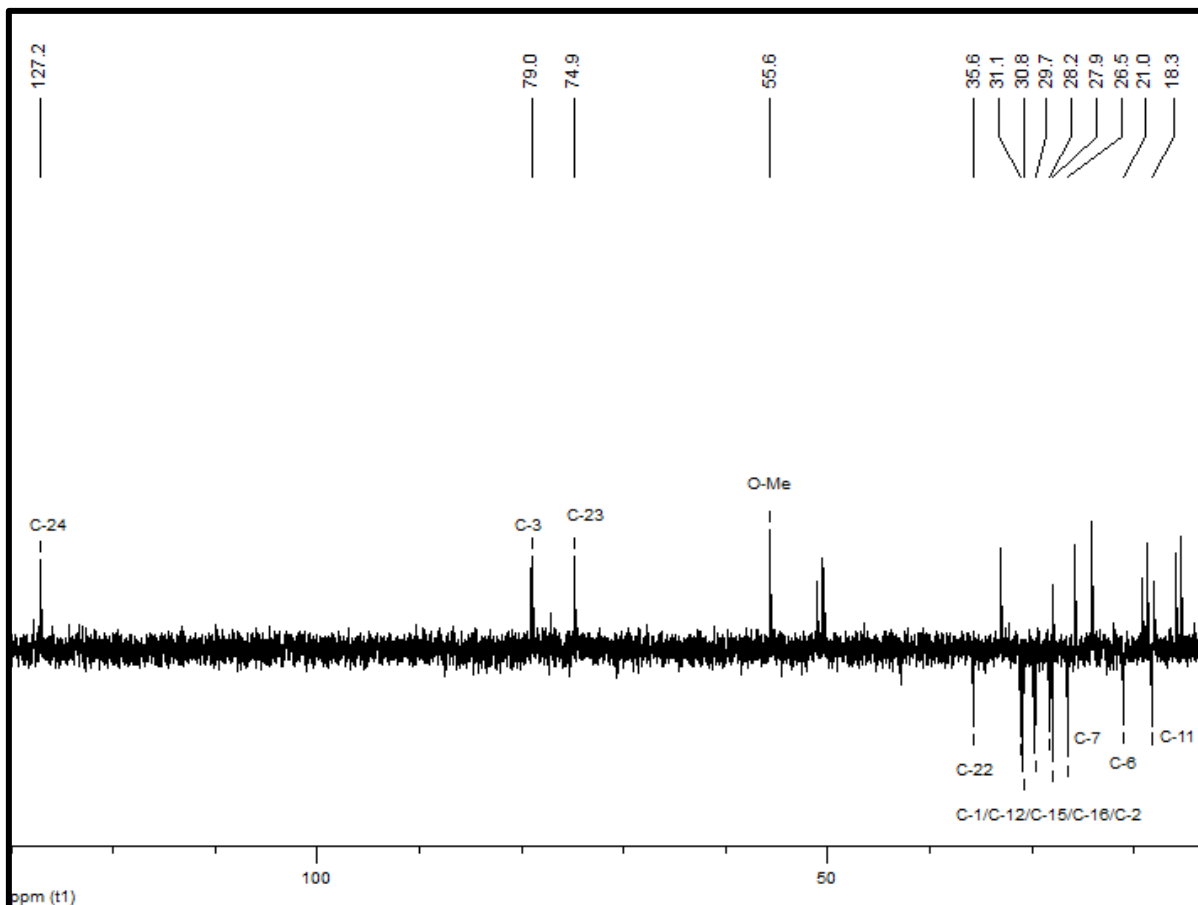


Figura 50: Espectro de RMN de Dept 135° do metabólito **SC8**, em CDCl₃, a 100 MHz.

No experimento de Dept 135° (Figura 50) os carbonos metilênicos aparecem com amplitude negativa e os carbonos metílicos e metínicos com amplitude positiva. Analisando o espectro Dept 135° do composto, pode-se identificar a presença de 9 carbonos metilênicos, e 15 carbonos metílicos e metínicos, ficando evidente que 7 carbonos não hidrogenados também fazem parte da estrutura, pois não aparecem no espectro de Dept 135°.

A atribuição dos demais carbonos (Figura 51) foi realizada com base na análise dos espectros de ¹³C e Dept 135° e comparação com os dados da literatura.

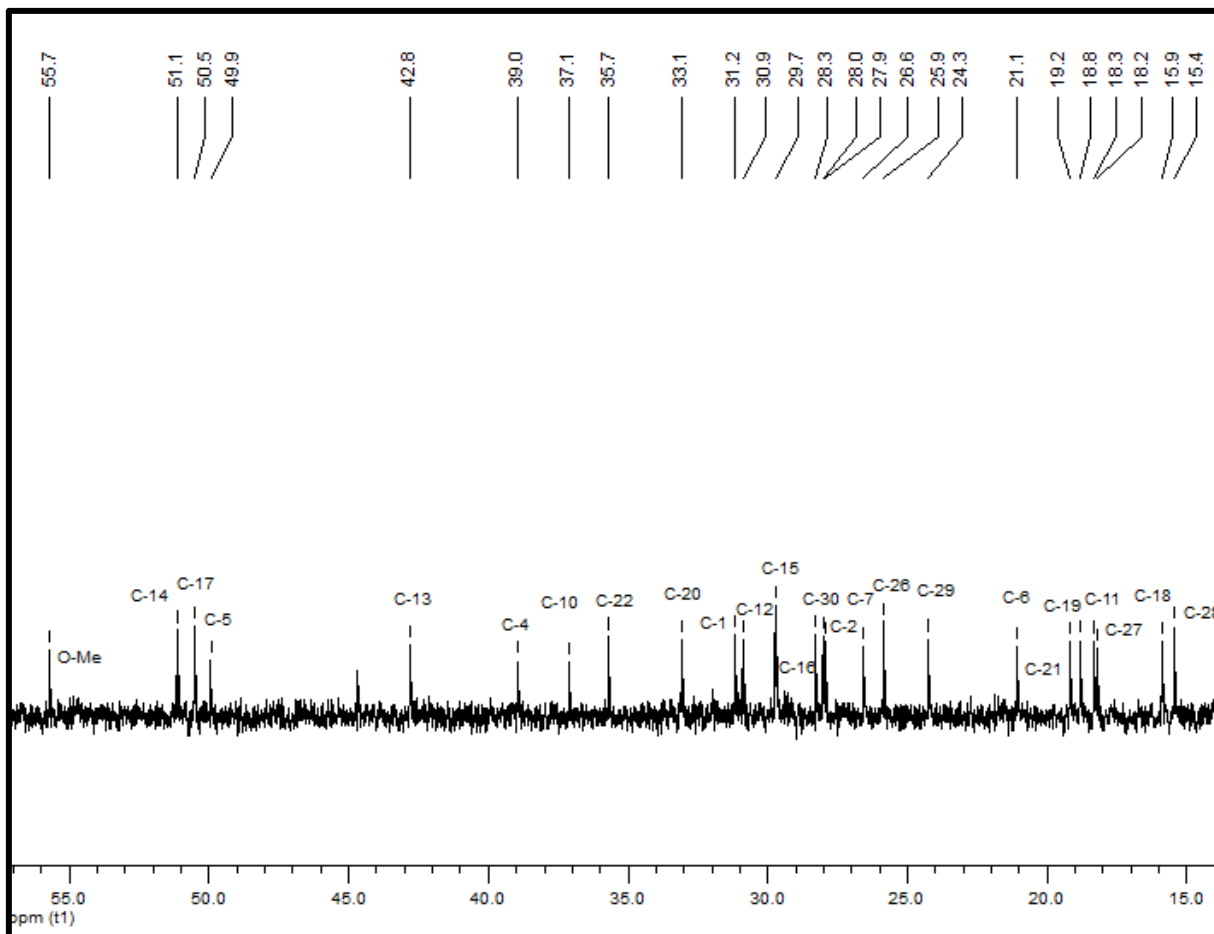


Figura 51: Espectro RMN de ^{13}C do metabólito **SC8** em CDCl_3 a 100 MHz com atribuição dos carbonos do composto.

Na Tabela 8 são apresentados os dados comparativos entre os compostos SC5 e SC8, demonstrando que o composto SC8 é um derivado do SC5, em que há uma modificação na localização do grupamento metoxi. No composto SC5 ele está ligado ao carbono 25 e no composto SC8 este grupamento está ligado ao carbono 23.

Tabela 8 - Comparação dos dados de RMN de ^{13}C obtidos pelo composto isolado (**SC8**) com os dados da estrutura **SC5**:

Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm) SC5	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (SC8)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) (SC5)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) (SC8)
1	m, 1,27, m, 1,76		35,5	31,2
2	m, 1,60, m, 1,68		27,7	27,9
3	d, 3,24 ($J = 11,6$; 4,8 Hz)	d, 3,37 ($J = 11,3$, 4,1 Hz)	79,0	79,0
4	-	-	38,7	39,0
5	dd, 1,09 ($J = 12,6$ Hz)		50,0	49,9
6	m, 2,04		20,8	21,1
7	m, 2,07		26,4	26,6
8	-	-	134,5	134,4
9	-	-	134,4	134,5
10	-	-	36,9	37,1
11	m, 1,53, m, 1,72		18,1	18,3
12	m, 1,21, m, 1,71		30,8	30,9
13	-	-	44,4	42,8
14	-	-	50,3	51,1
15	m, 1,21, m, 1,71		30,7	29,7
16	m, 1,37, m, 1,97		27,9	27,9
17	m, 1,52		50,1	50,5
18	s, 0,73	s, 0,73	15,7	15,9
19	s, 1,00	s, 1,00	18,6	18,8
20	m, 1,51		36,5	33,1
21	d, 0,92 ($J = 5,66$)	d, 0,95 ($J = 6,48$ Hz)	19,0	19,2
22	m, 2,21, m, 1,81		39,4	35,7
23	dd, 5,55 ($J = 16,0$; 8,2 e 5,3 Hz)	ddd, 3,98 (1H, $J = 15,7$, 9,7 e 2,87 Hz)	128,7	74,9
24	d, 5,44 ($J = 16,0$; H-24 Hz)	d, 5,08 (1H, d, $J = 8,86$ Hz)	136,7	127,2
25	-	-	74,9	134,5
26	s, 1,27	s, 1,76	26,2	25,9
27	s, 1,27	s, 1,28	25,8	18,2
28	s, 1,02	s, 1,02	28,0	15,4
29	s, 0,83	s, 0,84	15,4	24,3
30	s, 0,89	s, 1,28	24,2	28,0
31	s, 3,17	s, 3,26	50,5	55,7

O peso molecular da substância **SC8** foi confirmado através de Espectrometria de Massa de Alta Resolução (EMAR) indicando que o metabólito é um derivado do composto **SC5**, pois o seu peso molecular é semelhante.

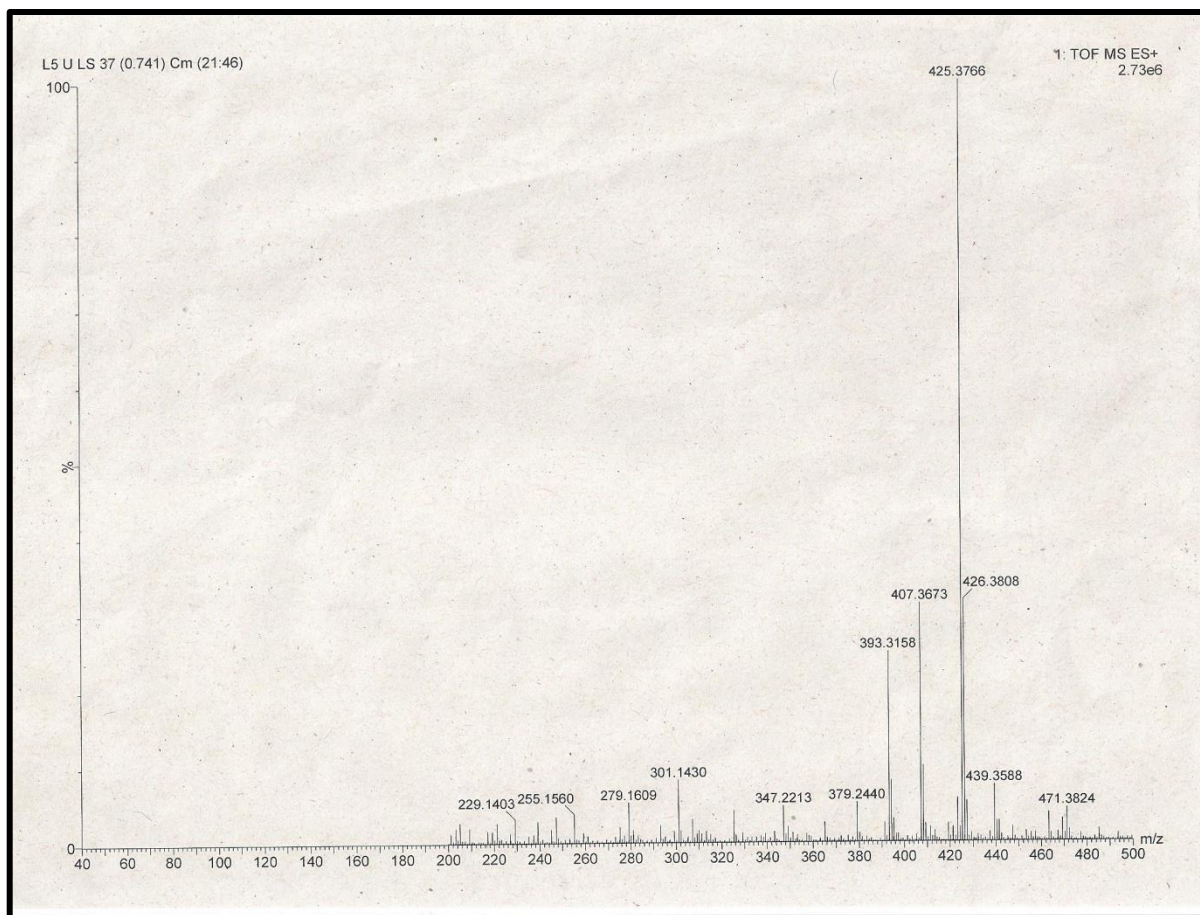


Figura 52: Espectrometria de massas de alta resolução do composto **SC8**.

5.4. Identificação do metabólito **SC7**

O metabólito **SC7** foi obtido como um sólido branco, com Ponto de Fusão 173 – 174 °C, após separação em coluna com sistema eluente Hexano/acetato de etila (80:20), e posterior precipitação com CH₂Cl₂ com rendimento de 1,32% ou 60 mg em 4,612 g de extrato bruto. O seu espectro de ¹H RMN exibe [M – H₂ – H₂O]⁺ a m/z 439,3683 (calculada para C₃₀H₅₀O₂ + H-H₂O, m/z 439,3683) (Anexo 1, p. 163) que em combinação com os dados espectroscópicos de ¹³C RMN, sugere uma fórmula

molecular $C_{30}H_{50}O_2$. Este composto já havia sido identificado por Vrkok et al.¹⁶⁵ no *Scleroderma aurantium* (Persoon). O composto é bastante polar, sendo solúvel em DMSO a quente. O composto, porém mostrou-se solúvel na quantidade de 2 mg por 10 mL em MeOH.

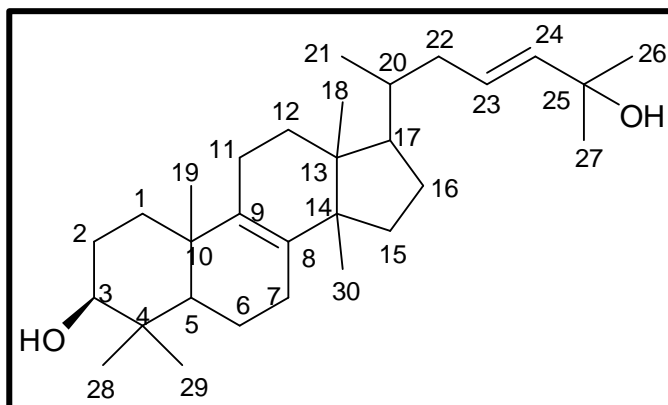


Figura 53: Estrutura proposta para o composto **SC7**

A estrutura do composto **SC7** foi determinada com base nos experimentos de RMN de 1H , ^{13}C e Dept 135^0 , e comparada com dados já descritos na literatura¹⁶⁵.

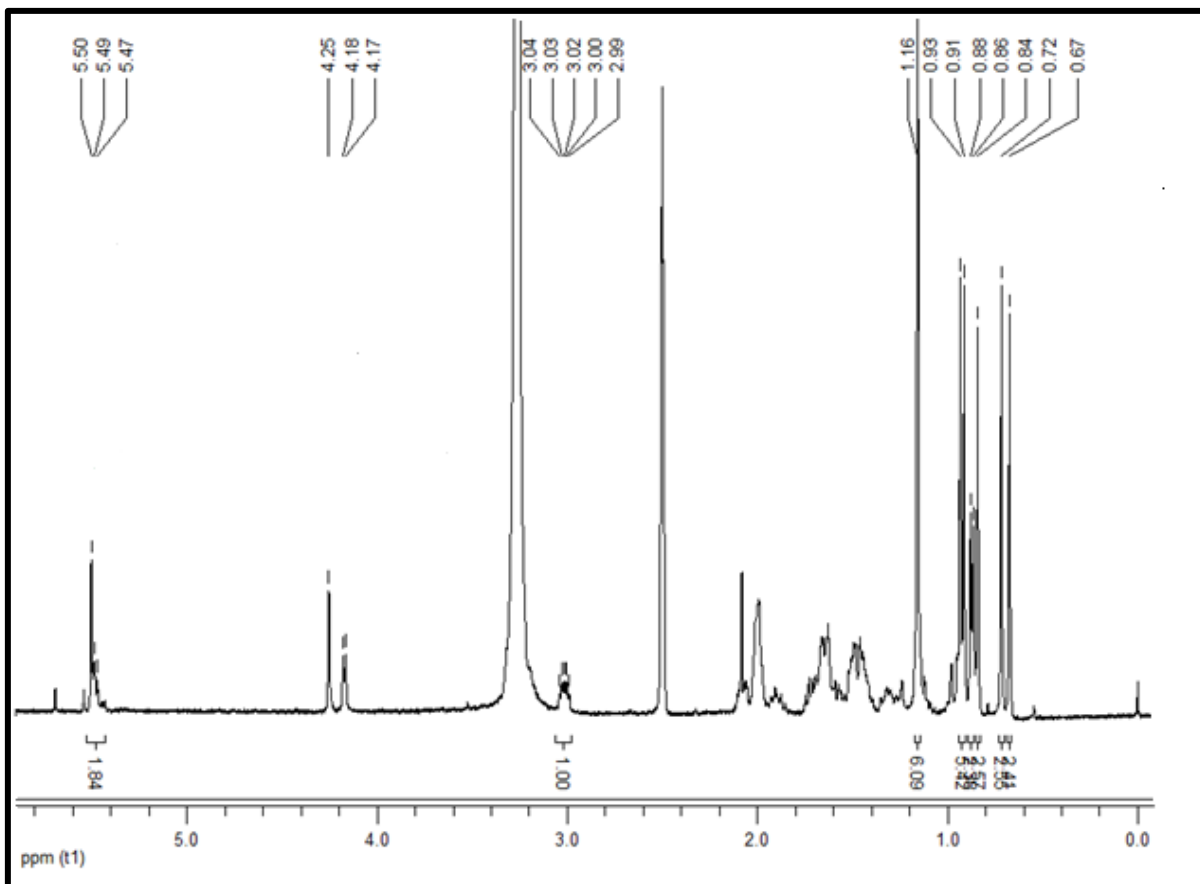


Figura 54: Espectro RMN de ^1H do metabólito (**SC7**) em DMSO a 400 MHz.

Espectro de RMN ^1H (DMSO, 400, MHz) em combinação com o Dept 135° apresenta os sinais de oito grupamentos metílicos, sendo cinco grupos metílicos terciários a δ 0.67 ppm (3H, s, H-18), 0.72 ppm (3H, s, H-29), 0.84 ppm (3H, s, H-28), 0.91 ppm (3H, s, H-19), 0.93 ppm (3H, s, H-30) e o sinal de dois grupamentos metílicos ligados ao carbono quaternário a δ_{H} 1,16 ppm (2 x 3H, s, H-26 e H-27), um grupo metílico secundário a δ 0,87 ppm (3H, d, $J = 5,95$ Hz, H-21). Além disso, o espectro mostra o sinal do hidrogênio metínico oxigenado que aparece como um multiplete na região a δ 2,99-3,04 ppm (1H, m, H-3), dois hidrogênios olefínicos a δ 5.55 (1H, d, $J = 15,4$ H-24, *trans*) e δ 5,48 (1H, ddd, $J = 15,68; 7,13$ e $5,73$ Hz, H-23, *trans*) que foi determinado através da análise do espectro de RMN ^1H do composto obtido a partir do SC7). Os hidrogênios metilênicos H-1, H-2, H-6, H-7, H-11, H-12, H-15, H-16 e H-22 aparecem em campo alto no espectro do RMN de ^1H . Estes foram determinados através do espectro RMN 2D de HMQC que mostra as correlações dos hidrogênios com seus respectivos carbonos.

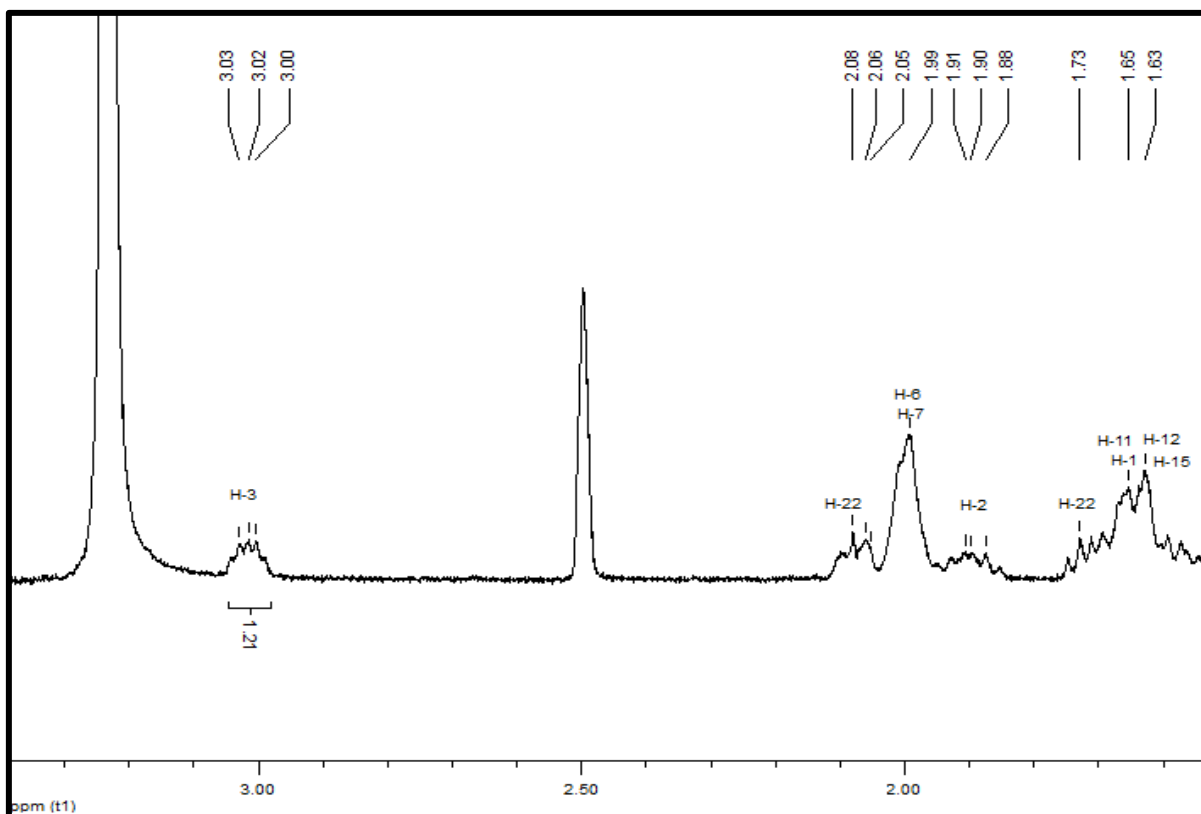


Figura 55: Expansão do espectro RMN de ¹H do metabólito (SC7) em DMSO a 400 MHz.

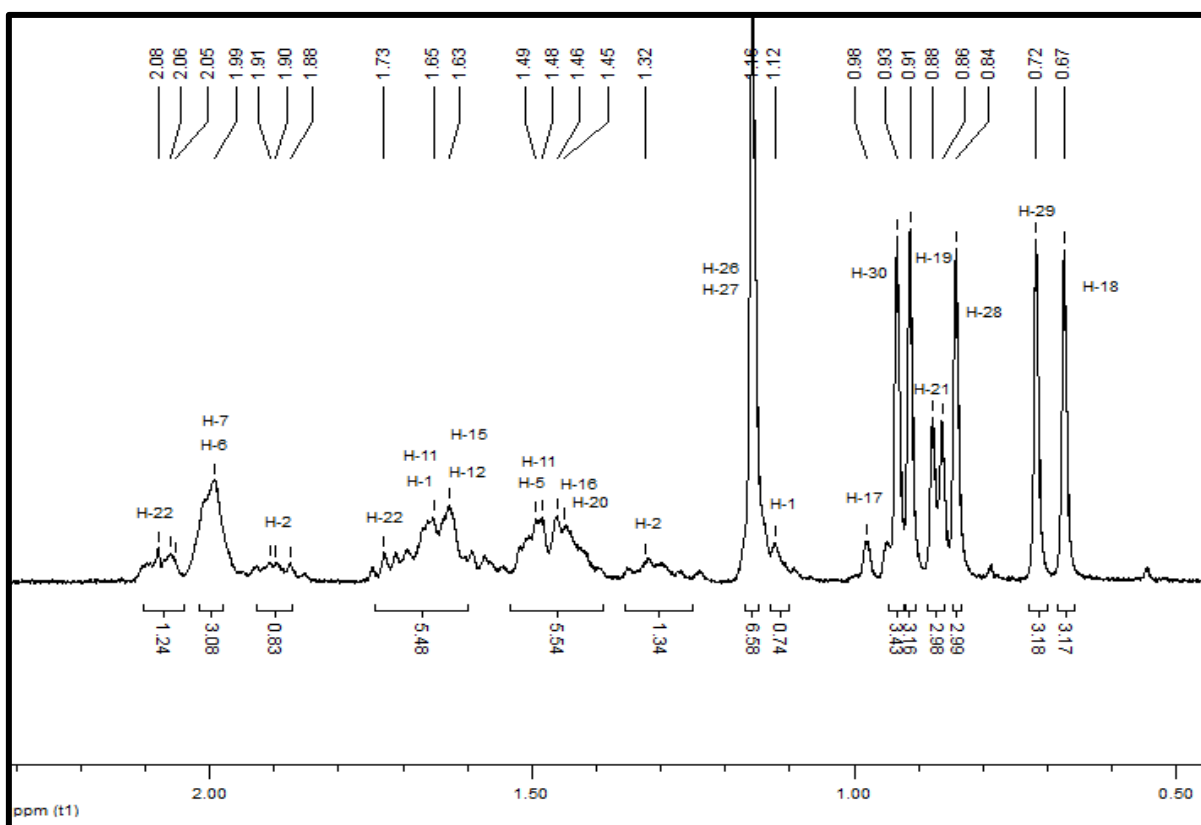


Figura 56: Expansão do espectro RMN de ¹H do metabólito (SC7) em DMSO a 400 MHz.

Com base no espectro de HMQC (Figuras 63 e 64), os hidrogênios H-1 são diastereotópicos e aparecem a δ_H 1,12 ppm e na região de δ_H 1,65 ppm. Um dos hidrogênios H-2 está na região de δ_H 1,24-1,32 ppm e o outro aparece a δ_H 1,88-1,91 ppm. O hidrogênio H-5 está na região de δ_H 1,45-1,48 ppm. Os hidrogênios H-6 e H-7 aparecem como um singlete alargado a δ_H 1,99 ppm. Os hidrogênios H-11 e H-12 estão localizados na região de δ_H 1,63-1,73 ppm e 1,45-1,49 ppm. Os hidrogênios H-15 estão na região de δ_H 1,63-1,73 ppm e os hidrogênios H-16 ppm na região de δ_H 1,45-1,49 ppm. O hidrogênio H-17 aparece como um singlete a δ_H 0,98 ppm. Os hidrogênios H-22 são diastereotópicos e aparecem a δ_H 2,07 ppm e 1,73 ppm.

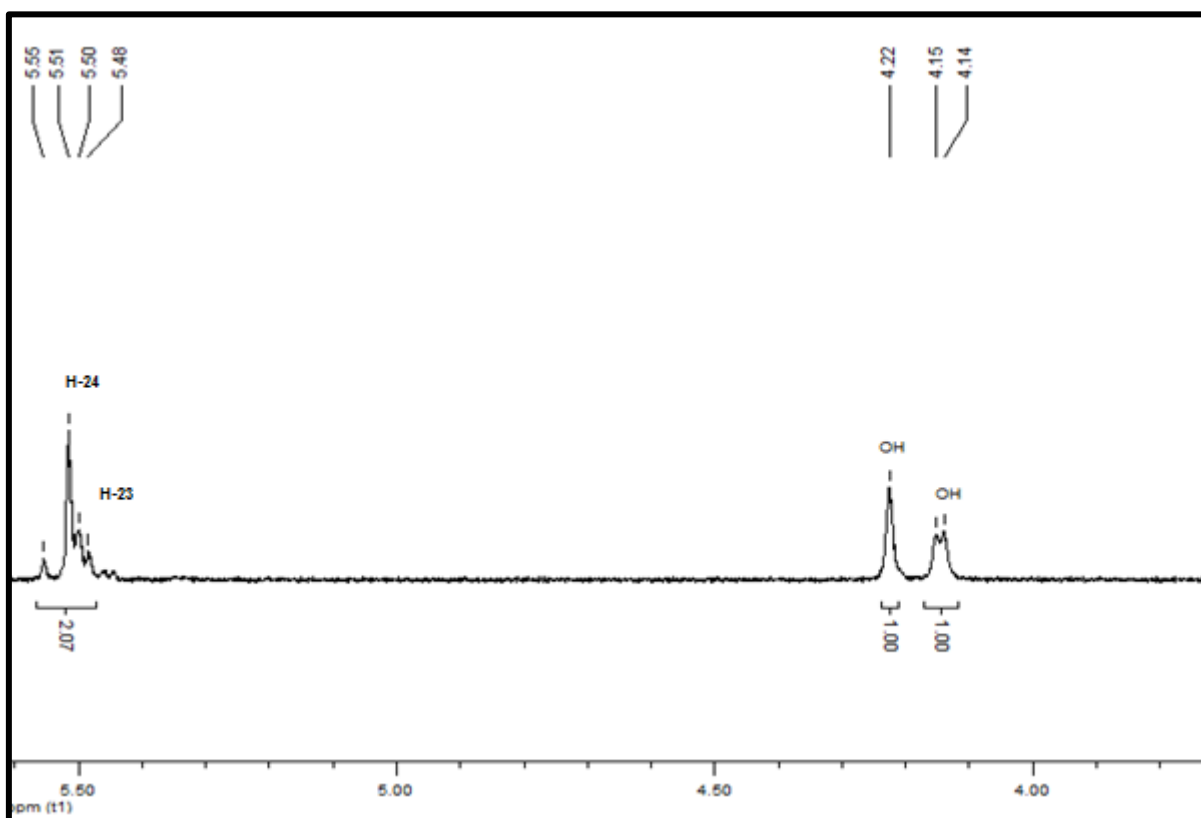


Figura 57: Espectro RMN de ^1H do metabólito **SC7** em DMSO a 400 MHz com expansão mostrando os dois prótons olefínicos.

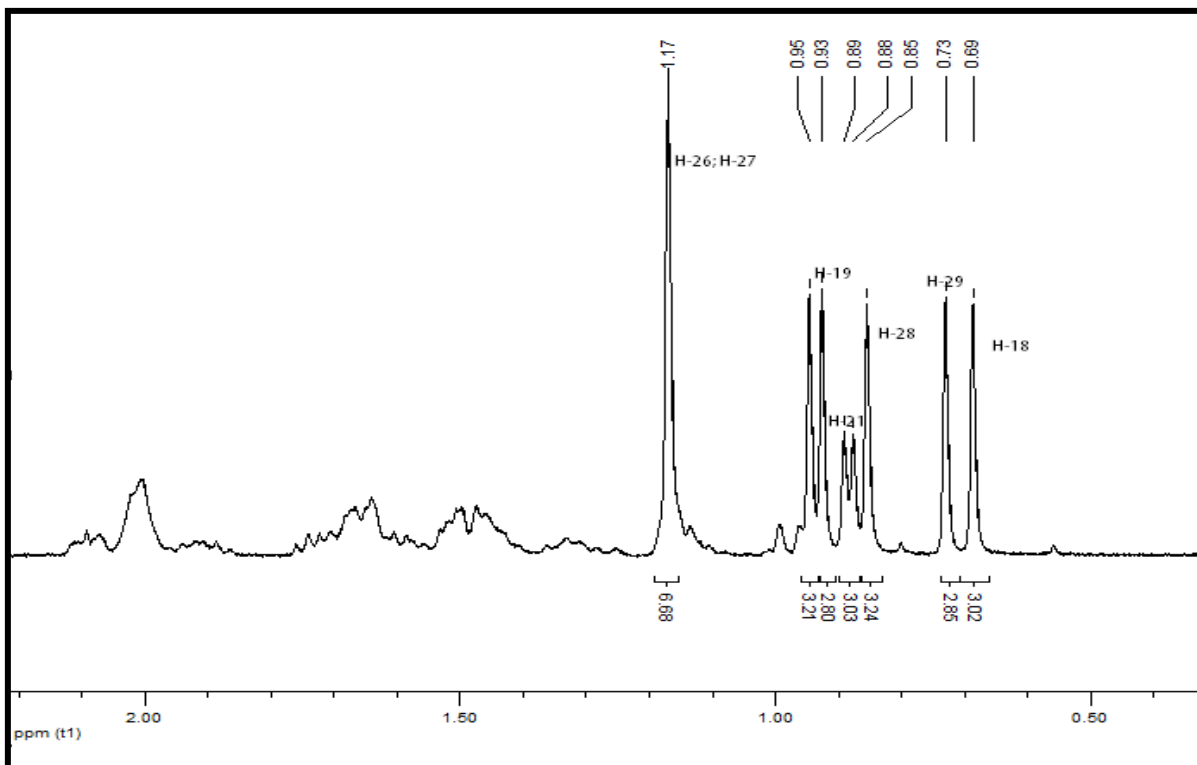


Figura 58: Espectro RMN de ^1H do metabólito **SC7** em DMSO a 400 MHz com expansão mostrando os hidrogênios dos grupamentos metila.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 59) mostrou os sinais de 30 carbonos sendo oito carbonos metílicos; seis carbonos metínicos, nove carbonos metilênicos e sete carbonos quaternários incluindo o carbono quaternário oxigenado. Isto indica a presença de seis unidades de instauração, duas ligações duplas e quatro ciclos. A estrutura apresenta um grupamento hidroxila ligada a um carbono secundário e uma a um carbono terciário. Os sinais com deslocamentos químicos em δ 133,4 e 134,6 ppm são sugestivos dos carbonos C-8 e C-9 olefínicos. Os sinais dos outros dois carbonos metínicos a δ 123,1 ppm (C-23) e 140,7 ppm (C-24), são átomos de carbono da cadeia lateral da olefina dissustituída.

O sinal a δ 76,8 ppm é atribuído ao C-3 ligado ao grupamento hidroxila do anel triterpenico. O sinal do carbono C-25 localizado na cadeia lateral ligado ao grupamento hidroxila encontra-se a δ 68,8 ppm.

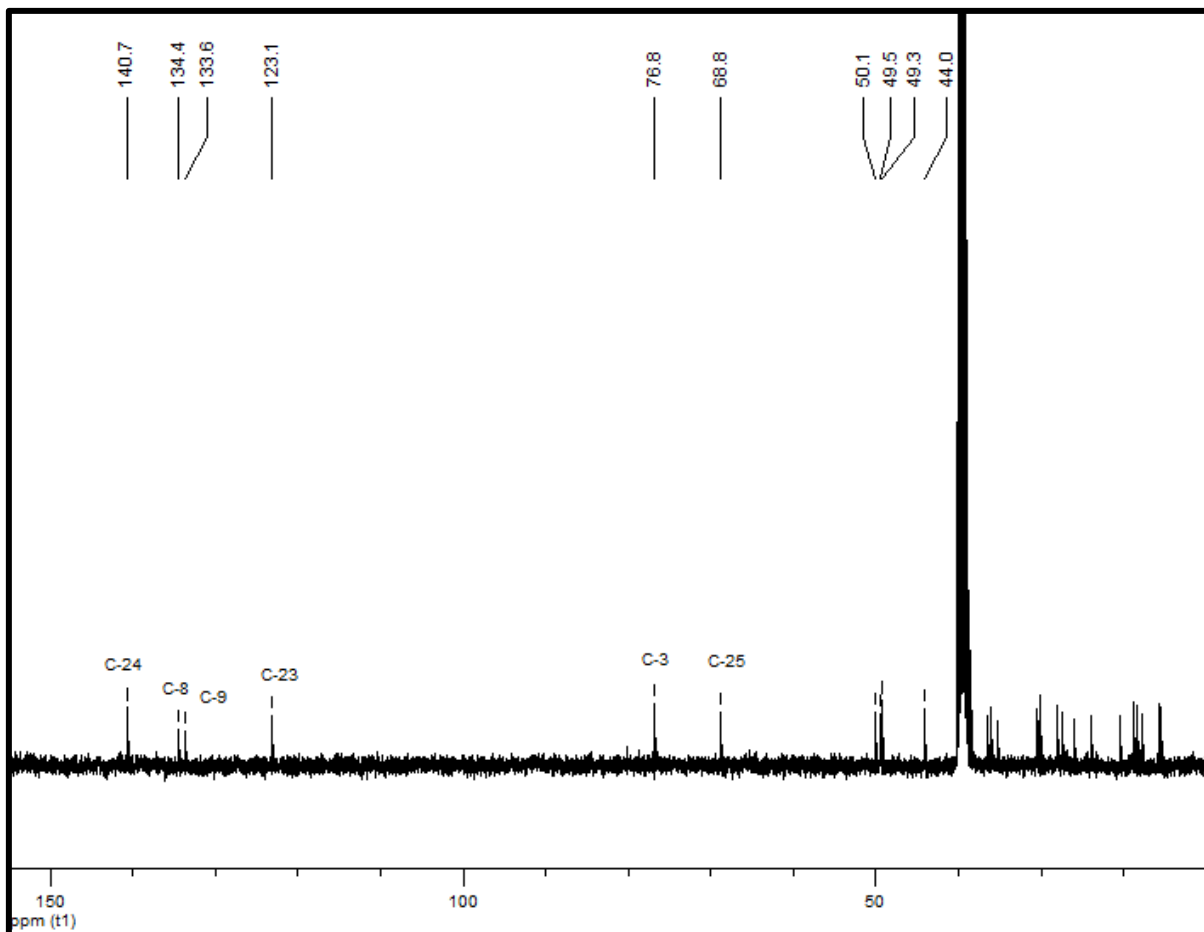


Figura 59: Espectro RMN de ^{13}C do metabólito **SC7** em DMSO a 100 MHz.

A atribuição dos demais carbonos foi realizada com base nos espectros de RMN Dept 135° e espectros 2D HMQC e HMBC e comparação com dados descritos na literatura¹⁷¹.

O espectro Dept 135° (Figura 60) mostrou 14 sinais com a amplitude positiva (carbonos metílicos e metínicos) e 9 sinais com amplitude negativa (carbonos metilênicos), ficando evidente que 7 carbonos não hidrogenados fazem parte da estrutura do composto isolado, pois não aparecem no espectro.

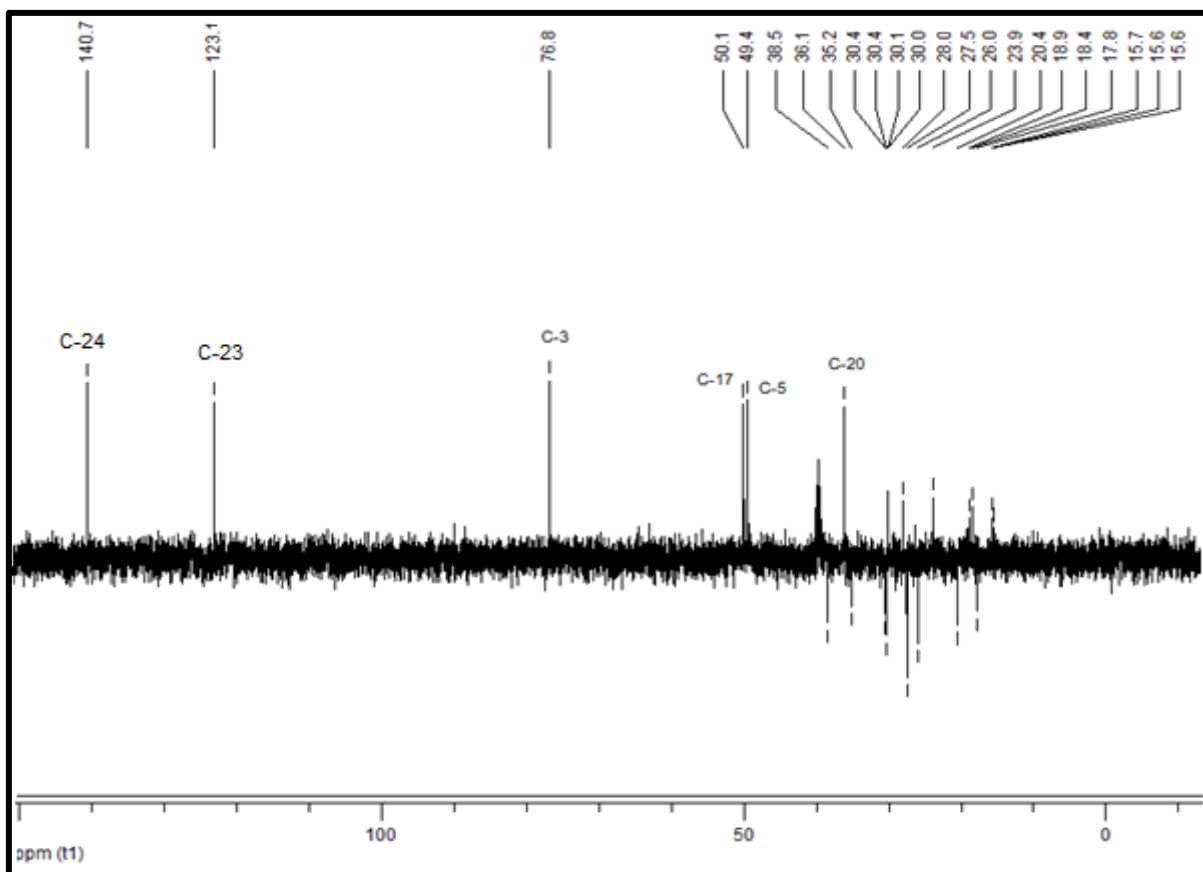


Figura 60: Espectro de RMN de Dept 135° do metabólito **SC7**, em DMSO, a 100 MHz.

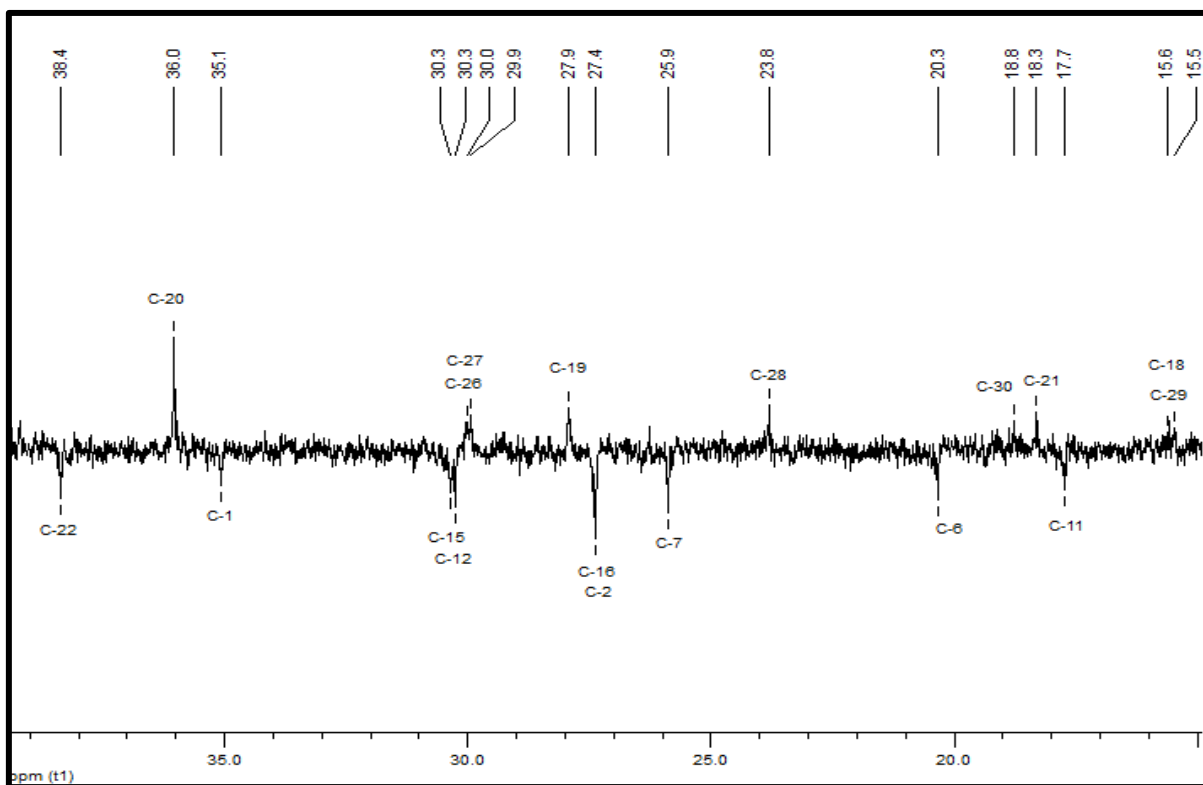


Figura 61: Expansão do espectro de RMN de Dept 135° do metabólito **SC7**, em DMSO, a 100 MHz.

Os carbonos não hidrogenados C-4, C-10, C-13, C-14 e C-25 estão localizados respectivamente a δ 38,4 ppm, 36,5 ppm, 44,0 ppm, 49,3 ppm e 68,8 ppm.

Fazem parte dos carbonos metílicos o C-18, C-19, C-21, C-26, C-27, C-28, C-29. O C-18 está em 15,6 ppm; em 28,0 ppm está o C-19; o C-21 encontra-se a δ 18,4 ppm. Os C-26 e C-27 aparecem quase juntos a δ 30,1 e 30,0 ppm. O C-28 encontra-se a δ 23,9 ppm e o C-29 a δ 15,5 ppm.

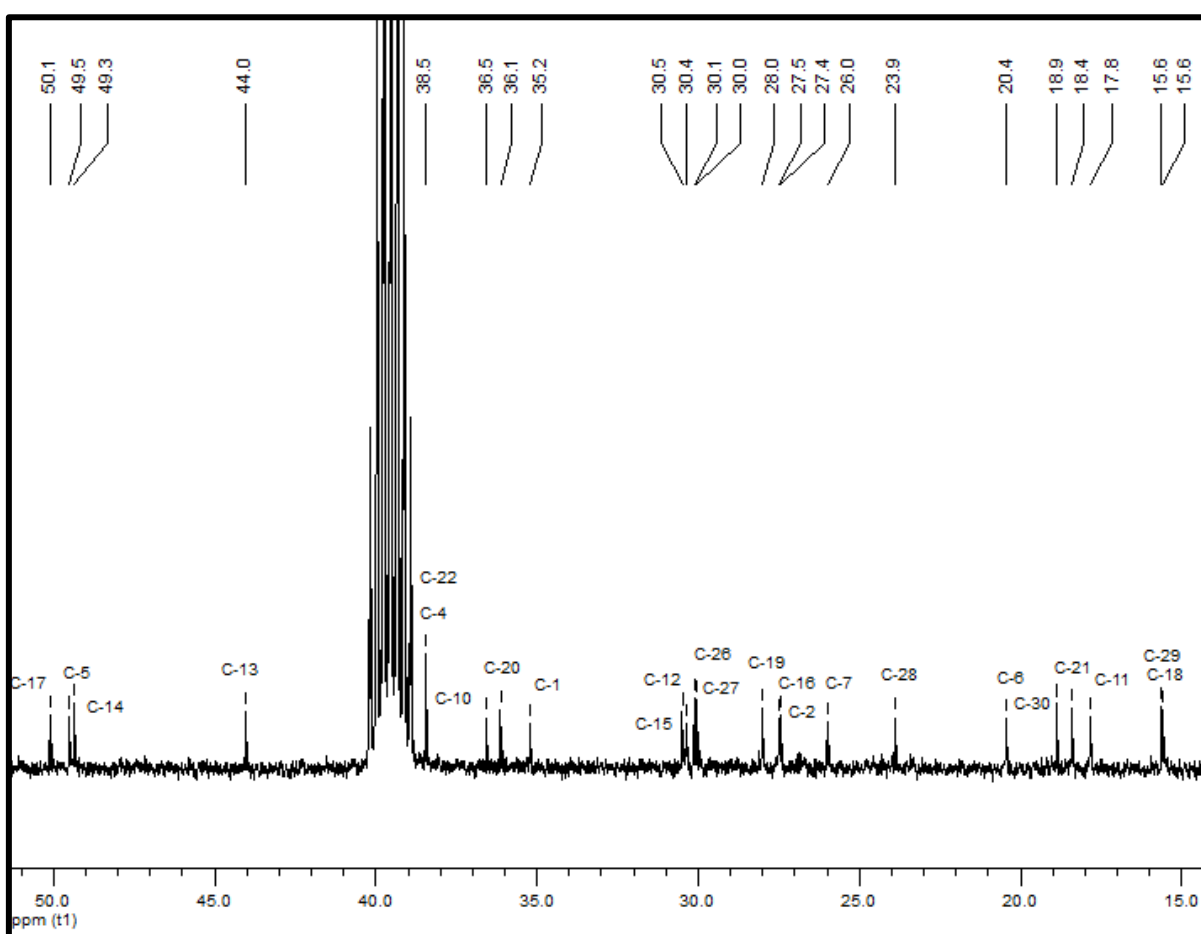


Figura 62: Expansão do espectro de RMN do ^{13}C do metabólito **SC7** em DMSO a 100 MHz.

O sinal do carbono metilênico C-1 aparece a δ 35,2 ppm, do C-2 está a δ 27,5 ppm, do C-16 encontra-se a δ 27,4. Em δ 20,4 ppm encontra-se o sinal do C-6; o sinal do C-7 está a δ 26,0 ppm. O sinal do C-11 e C-12 aparecem a δ 17,8 ppm e

30,4 ppm, respectivamente. O sinal do C-15 localiza-se a δ 30,5 ppm. O sinal do C-22, vizinho a dupla ligação está a δ 38,5 ppm e aparece junto com o sinal do C-4.

O experimento de RMN 2D de HMQC mostra a correlação direta dos hidrogênios com seus respectivos carbonos. Assim, na Figura 63 podemos identificar corretamente os carbonos hidrogenados do composto isolado através das correlações apresentadas. Desta forma torna-se possível a identificação dos hidrogênios olefínicos da cadeia lateral e seus respectivos carbonos. O sinal do hidrogênio H-23 tem correlação com o carbono que está a δ 140,7 ppm; o H-24 tem correlação com o carbono que se encontra a δ 123,1 ppm e o H-3 tem correlação com o carbono que está a δ 76,8 ppm.

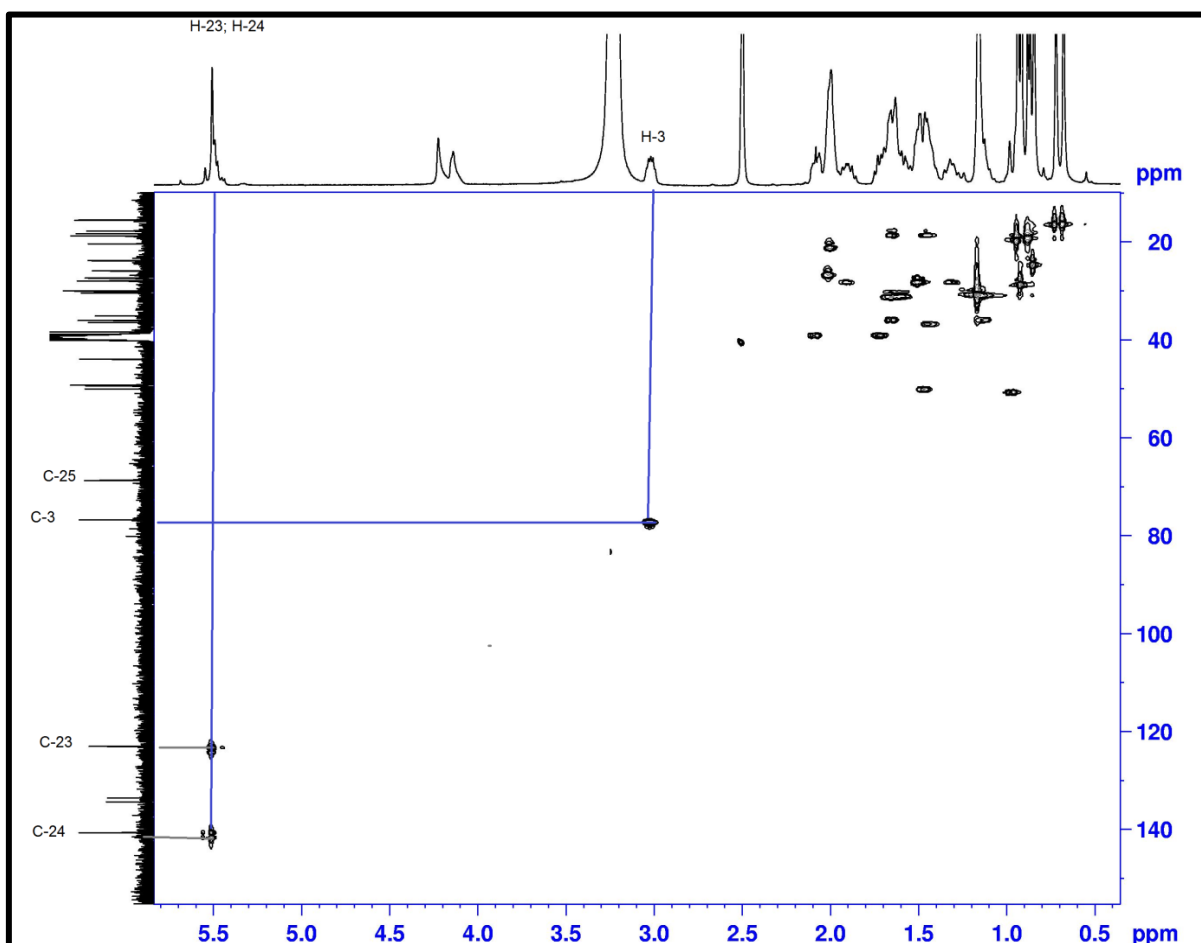


Figura 63: Espectro de RMN HMQC do metabólito **SC7** em DMSO, a 100 MHz.

Através das demais correlações apresentadas no espectro 2D de HMQC foi possível à identificação de todos os hidrogênios presentes na estrutura como pode ser verificado na Figura 64 abaixo.

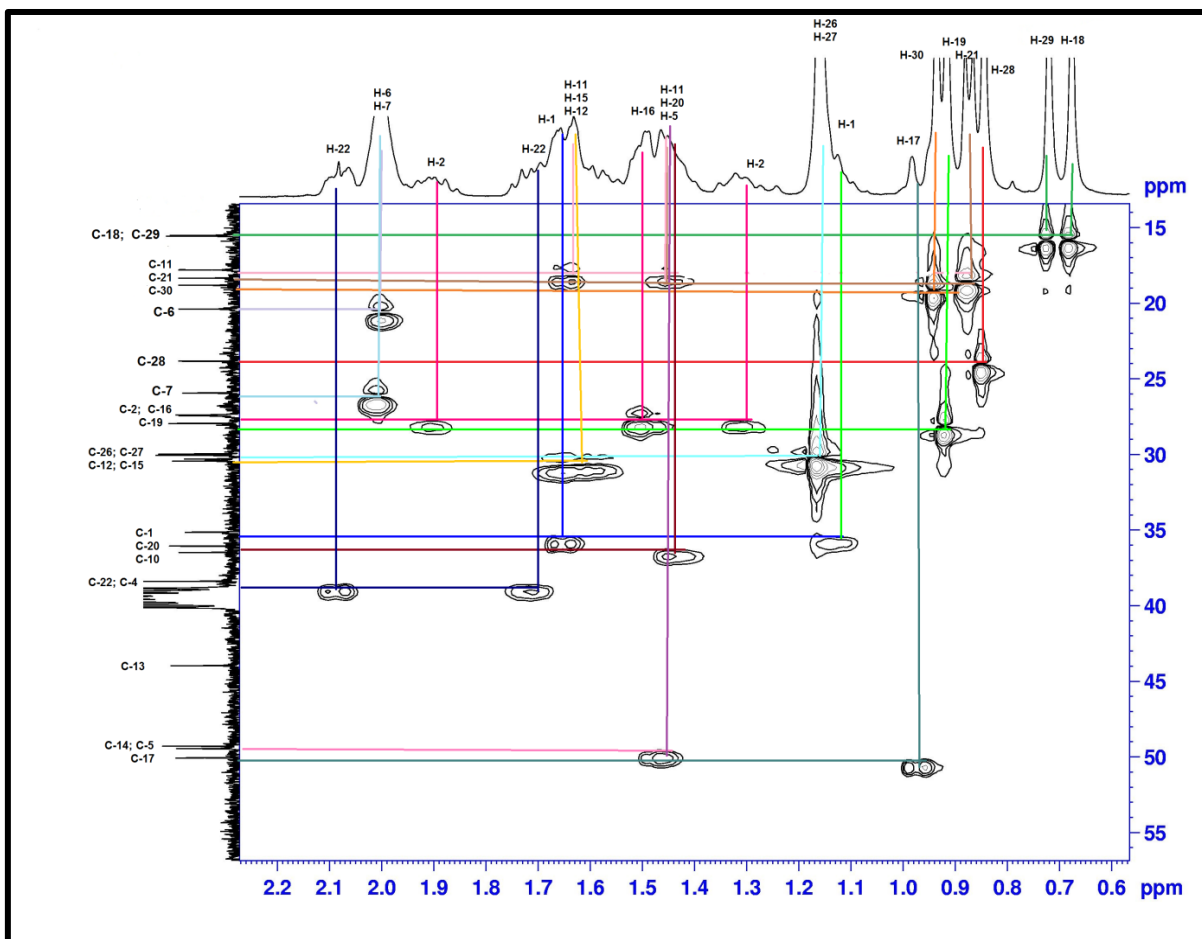


Figura 64: Expansão do espectro de RMN HMQC do metabólito **SC7** em DMSO, a 100 MHz.

Na Tabela 9 abaixo estão apresentados os dados de RMN do composto obtido.

Tabela 9: Dados de RMN de ^{13}C obtidos pelo composto isolado **SC7**.

Posição	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)
1	m, 1,12, m, 1,65	35,2
2	m, 1,91, m, 1,32	28,0
3	m, 3,04	76,8
4	-	38,5
5	m, 1,49	49,5
6	m, 1,99	20,4
7	m, 2,01	26,0
8	-	134,4
9	-	133,6
10	-	36,5
11	m, 1,63, m, 1,64	18,3
12	m, 1,65, m, 1,48	30,4
13	-	44,0
14	-	49,3
15	m, 1,69, m, 1,63	30,5
16	m, 1,46	27,4
17	m, 0,98	50,1
18	s, 0,67	15,5
19	s, 0,91	28,0
20	m, 1,45	36,1
21	d, 0,86 (3H, $J = 5,95$ Hz)	18,4
22	m, 2,08; m, 1,73	38,5
23	ddd, 5,48 (1H, $J = 15,68$; 7,13 e 5,73 Hz)	123,1
24	d, 5,50, (1H, $J = 15,4$)	140,7
25	-	68,8
26	s, 1,16	30,0
27	s, 1,16	30,1
28	s, 0,84	23,9
29	s, 0,72	15,6
30	s, 0,96	18,9

A fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$ do composto **SC7** foram confirmados através da realização da análise de Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR) (Anexo 1, p. 163) que juntamente com o RMN confirmou o peso molecular do composto.

5.5. Identificação do composto **SC7-1**

A substância **SC7-1** foi obtida a partir do metabolito **SC7**, ao ser submetida a aquecimento em acetona que resultou na desidratação e eliminação da hidroxila terciária ligada ao carbono C-25 e a formação de uma dupla ligação. A eliminação da hidroxila pode ser atribuída ao fato do mesmo estar ligado a um carbono terciário e estar próxima a uma dupla ligação que conjuga com a nova ligação formada estabilizando-a. Desta forma diminui-se a polaridade da substância tornando possível a solubilização em CDCl_3 . A substância foi obtida como um sólido branco, Ponto de Fusão 169,4 – 170,3 °C, após reação de eliminação do grupamento hidroxila do metabolito **SC7** com rendimento de 0,50% ou 23 mg em 4,552 g do extrato bruto. O seu espectro (Anexo 2, p. 164) de EMAR exibe $[M + H]^+$ a m/z 425,3801 (calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O} + \text{H}^+$ m/z 425,3801), que em combinação com os dados espectroscópicos de ^{13}C RMN, sugere uma fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$.

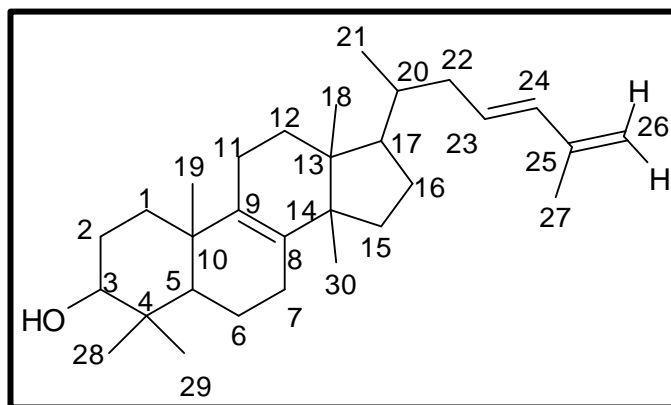


Figura 65: Estrutura proposta para a estrutura **SC7-1**

A utilização de um solvente prótico leva a proposição de um mecanismo sincrônico para a eliminação do grupamento hidroxila (Figura 66) e formação da dupla ligação.

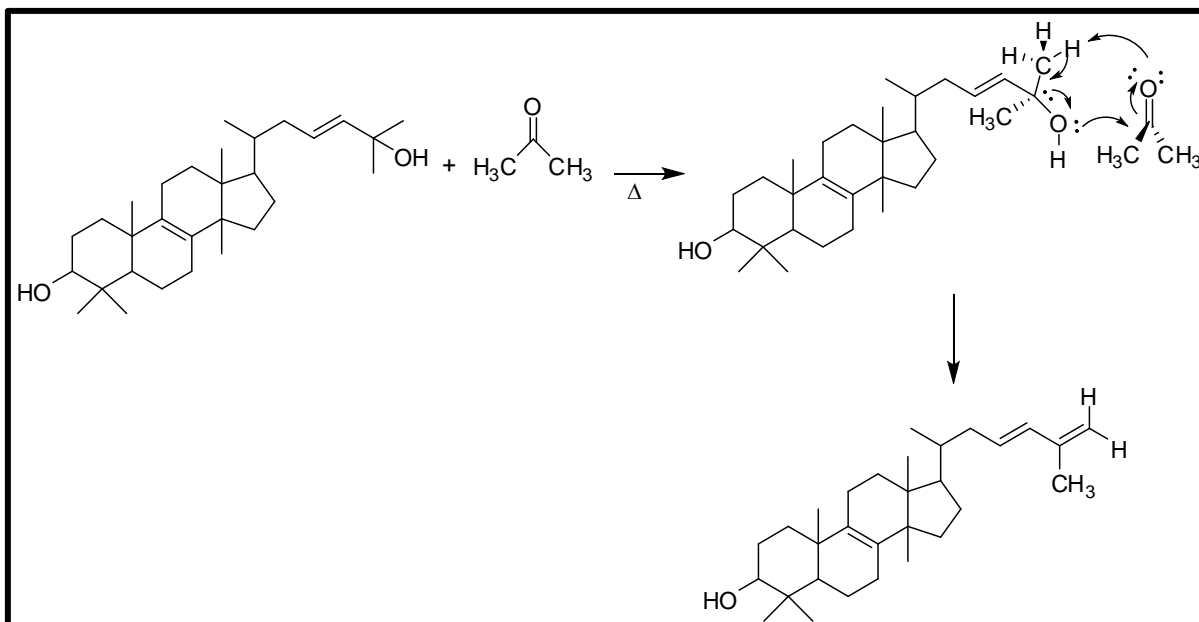


Figura 66: Mecanismo proposto para a formação da ligação dupla terminal.

Outro mecanismo possível para a desidratação seria eliminação via carbocátions o que explicaria os sinais de menor intensidade que aparecem no espectro ^1H .

Com base nos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , Dept 135 e 2D (COSY H-H e HMQC) pode-se confirmar que o composto isolado é derivado do metabólito **SC7**. A principal diferença encontrada entre os dois metabólitos está na região de absorção dos hidrogênios olefínicos.

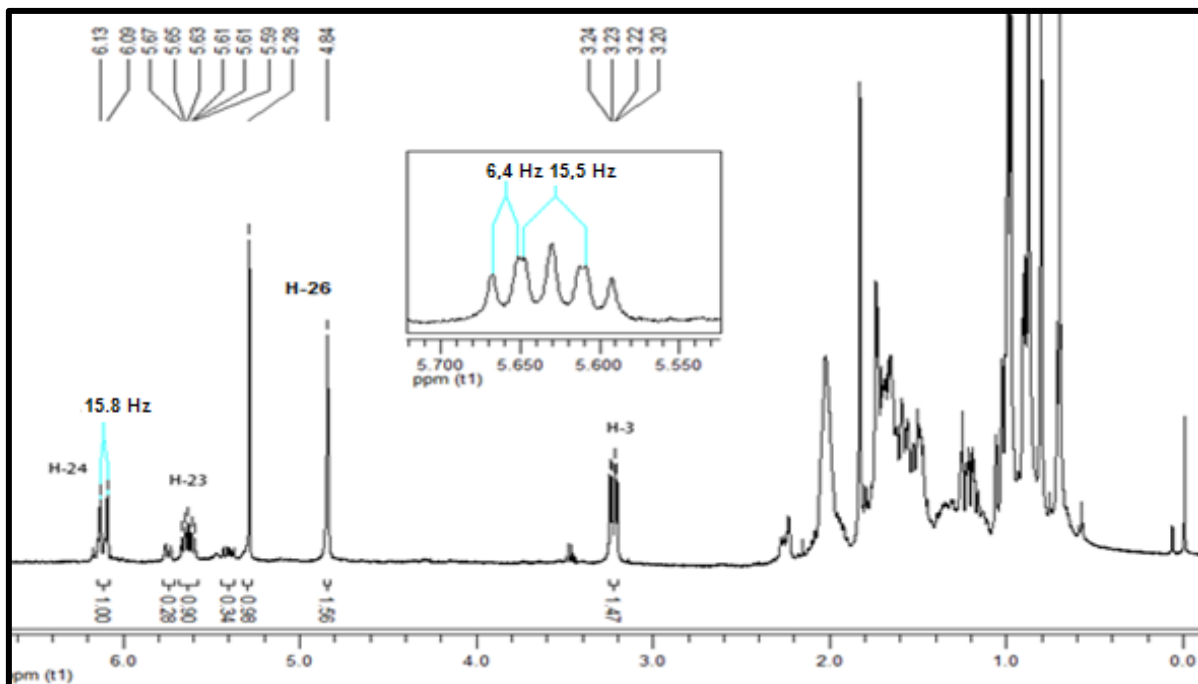


Figura 67: Espectro RMN de ^1H da substância **SC7-1** em CDCl_3 a 400 MHz.

No espectro de ^1H (Figura 67) a δ_{H} 6,10 ppm há o sinal de um dubleto com constante de acoplamento de 15,8 Hz referente ao H-24. O H-23 aparece como um multiplete na região de δ_{H} 5,59-5,67 ppm devido ao acoplamento com os hidrogênios ligados ao C-24 e os hidrogênios ligados ao C-22. O espectro mostra um hidrogênio metínico ligado carbono do grupamento hidroxila em δ 3,24 ppm (1H, dd, $J = 11,5, 4,5$ Hz, H-3) devido ao acoplamento com os hidrogênios ligados ao C-2. A identificação do hidrogênio H-26 não pode ser confirmada através do ^1H , pois a integração dos picos não confere com o composto. Os deslocamentos dos demais hidrogênios são semelhantes ao do composto do qual este metabólito foi originado e, portanto, não serão identificados novamente.

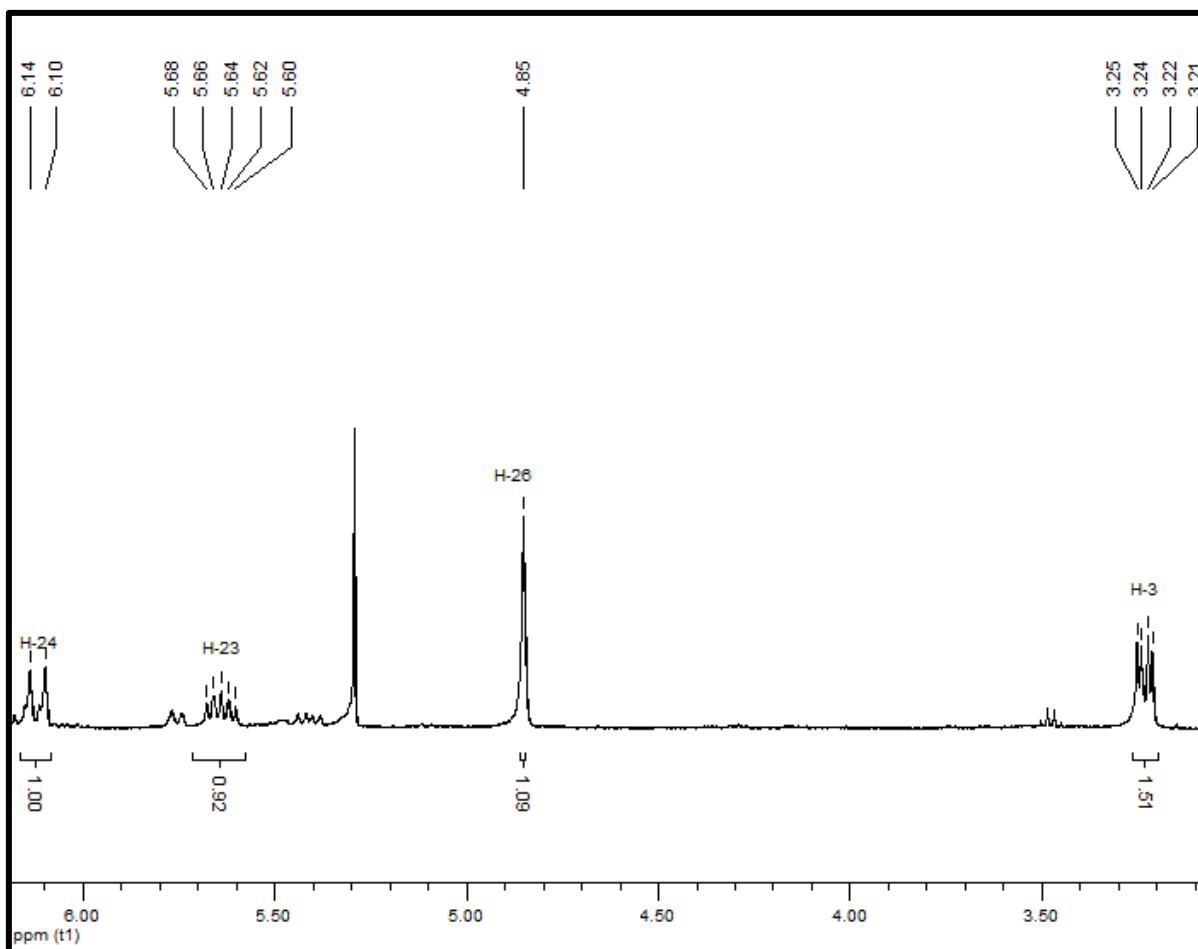


Figura 68: Espectro RMN de ^1H da substância **SC7-1** em CDCl_3 a 400 MHz com expansão mostrando os hidrogênios olefínicos e o hidrogênio ligado ao Carbono 3.

Na Figura 68 a expansão do espectro de ^1H mostra o aparecimento do sinal de um singleto a δ_{H} 1,83 ppm, que pode ser o H-27 e o desaparecimento do singleto a δ_{H} 1,17 ppm referentes aos H-26 e H-27 do composto **SC7**.

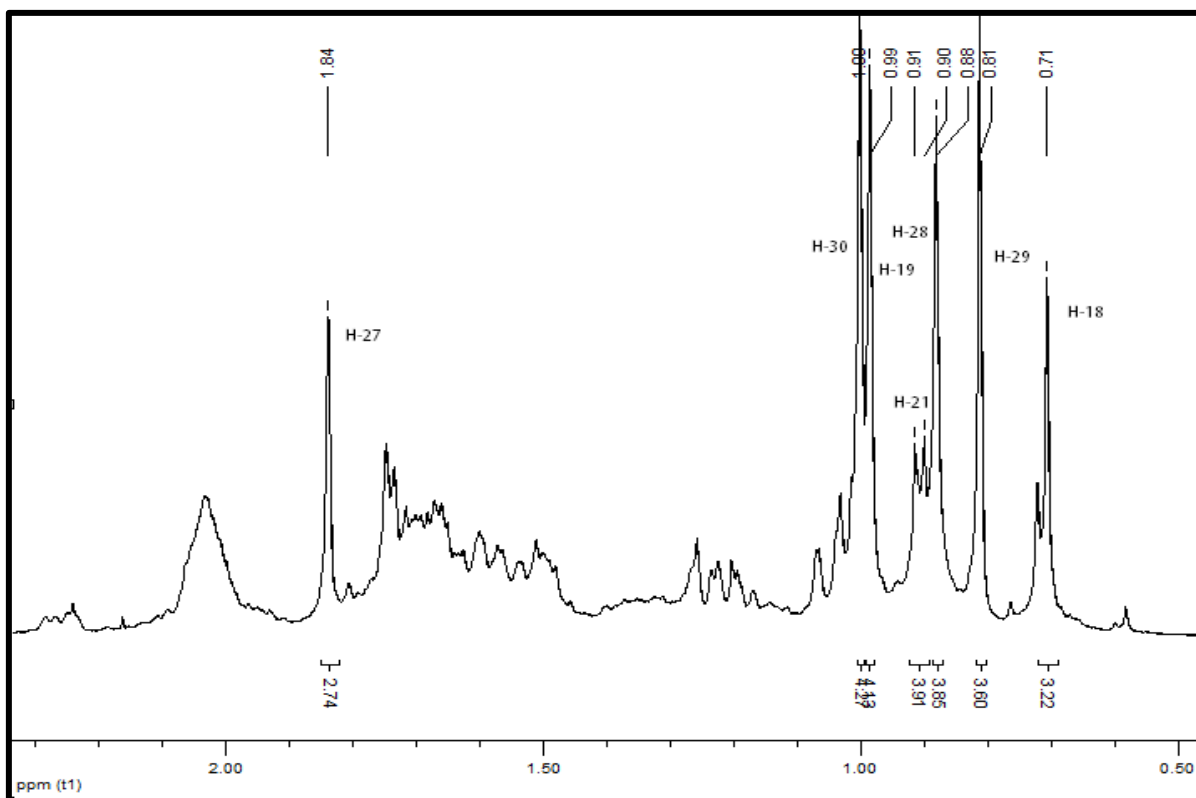


Figura 69: Espectro RMN de ^1H da substância **SC7-1** em CDCl_3 a 400 MHz com expansão mostrando os grupamentos metila.

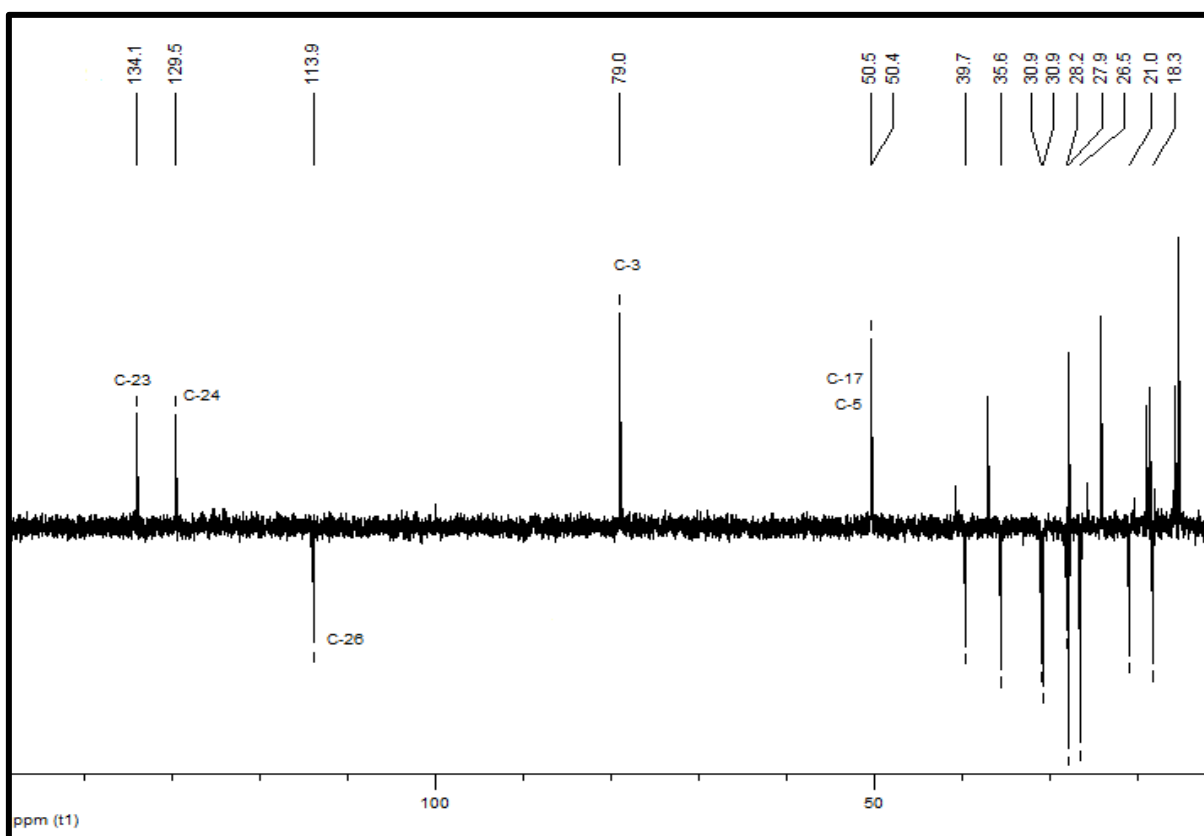


Figura 70: Espectro de RMN de Dept 135° da substância **SC7-1**, em CDCl_3 , a 100 MHz.

Pelo espectro de Dept 135° (Figura 70) podemos verificar que a δ 113,9 ppm aparece o sinal de um carbono com fase negativa, indicando que há uma dupla terminal. Isso confirma a eliminação do grupo hidroxila. O desaparecimento do sinal do carbono a δ 68,8 ppm também comprova que houve a reação de eliminação, e a formação de uma dupla ligação. Também é possível verificar a presença de 10 carbonos de amplitude negativa indicativo do aumento no número de carbonos metilênicos na molécula formada (Figura 71).

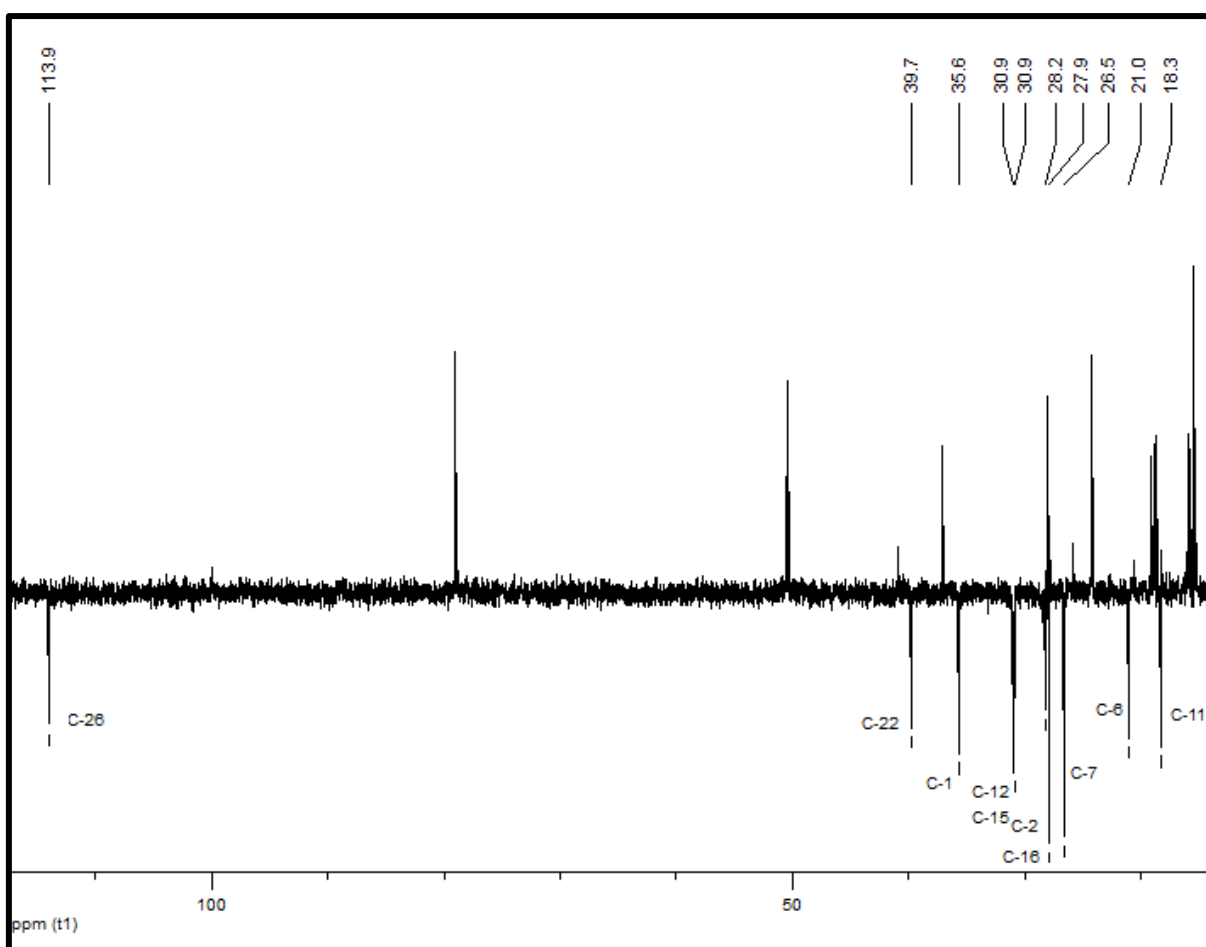


Figura 71: Espectro de RMN de Dept 135° da substância **SC7-1**, mostrando os carbonos metilênicos em CDCl_3 , a 100 MHz.

Na Figura 72 temos o espectro de ^{13}C do composto. A δ 142,2 ppm encontra-se o sinal do carbono olefínico não hidrogenado que faz parte da dupla terminal, o C-25. Os sinais dos C-8 e C-9 estão a δ 134,4 e 134,5 ppm, respectivamente. O C-23 está a δ 134,1 ppm; a δ 129,5 ppm encontra-se o sinal do C-24. O sinal do

carbono hidrogenado da dupla terminal, o C-26, aparece a δ 113,9 ppm. O sinal do C-3 esta localizado a δ 79,0 ppm, deslocamento característico para estes compostos. Os outros carbonos estão localizados nas mesmas regiões de deslocamento do composto que o originou e não serão identificados novamente.

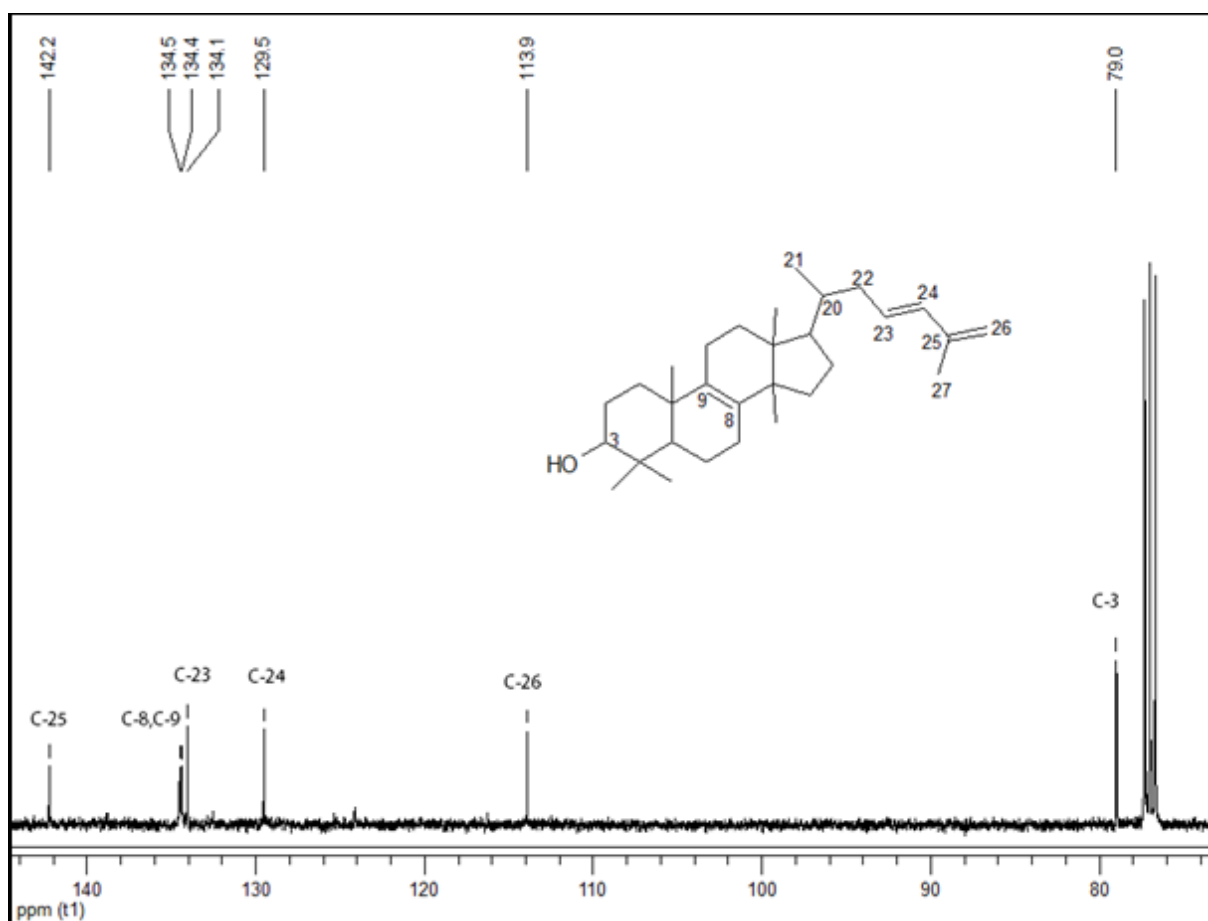


Figura 72: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **SC7-1**, em CDCl_3 , a 100 MHz.

Na Tabela 10 temos a comparação entre os deslocamentos da substância SC7 e do seu artefato SC7-1. É possível verificar as diferenças de deslocamentos devido à formação de uma dupla terminal devido a eliminação do grupamento hidroxila ligado ao carbono 25.

Tabela 10: Comparação entre os deslocamentos ^{13}C das substâncias **SC7** e **SC7-1**.

Posição	^{13}C da substância SC7	^{13}C da substância SC7-1
1	35,2	35,6
2	28,0	30,9
3	76,8	79,0
4	38,5	38,9
5	49,5	49,8
6	20,4	21,0
7	26,0	26,5
8	134,4	134,4
9	133,6	134,5
10	36,5	37,1
11	17,8	18,3
12	30,4	30,9
13	44,0	44,6
14	49,3	49,9
15	30,5	30,9
16	27,4	28,2
17	50,1	50,4
18	15,6	15,4
19	28,0	28,0
20	36,1	37,1
21	18,4	18,8
22	38,4	39,7
23	123,1	134,1
24	140,7	129,5
25	68,8	142,2
26	30,0	113,9
27	30,1	19,1
28	23,9	24,3
29	15,6	15,8
30	18,9	18,7

Os dados foram confirmados através da realização de análise de Espectrometria de Massas de Alta Resolução (Anexo 2, p. 164) que confirmou o peso molecular do composto **SC7-1**.

5.6. Identificação do metabólito Manitol

O manitol é um alditol com seis carbonos. É uma das moléculas mais abundantes para armazenamento de energia e carbono na natureza, produzidas por uma variedade de organismos, incluindo bactérias, leveduras, fungos, algas, líquens e muitas plantas. Uma via metabólica para a síntese do manitol, conhecido como o ciclo de manitol em fungos, foi descoberto em um tipo de algas vermelhas (*Caloglossa leprieurii*, Montagne) e é altamente possível que outros microrganismos empreguem as mesmas vias.

Poliois acíclicos são produzidos por fungos e sua real função ainda não foi determinada. O manitol foi isolado pela primeira vez como metabólito fúngico em 1811 pelo pesquisador Henri Braconnot¹⁷⁶ e é o carboidrato solúvel mais abundante nestes organismos. O manitol apresenta diversas aplicações tais como edulcorante na fabricação de produtos dietéticos, como excipiente de comprimidos na indústria farmacêutica^{177,178}, na fabricação de resinas e plastificantes¹⁷⁹.

O manitol cuja fórmula química é $C_6H_{14}O_6$ possui ponto de fusão de 166 °C. Foi isolado na fração AcOEt-MeOH com rendimento de 0,65 % ou 30 mg em 4,612 g, na forma de cristais brancos solúveis em DMSO.

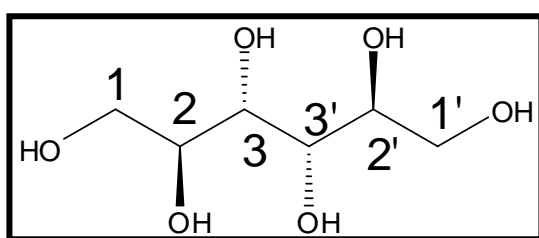


Figura 73: Estrutura do manitol

¹⁷⁶ SOLOMON, P.S., et.al. - Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. **TRENDS in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 257-262, 2007.

¹⁷⁷ http://www.merckmillipore.com.br/pharmaceutical-ingredients/parteck-m/c_l2Ob.s1OTLgAAAEtlaM.w6jr, acesso em 07/07/2013.

¹⁷⁸ OLIVEIRA, P.S.M. de, et. al. - Utilização do D-manitol em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 441-452, 2009.

¹⁷⁹ Poliois, aditivos e ingredientes. http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/81.pdf, acesso em 07/07/2013.

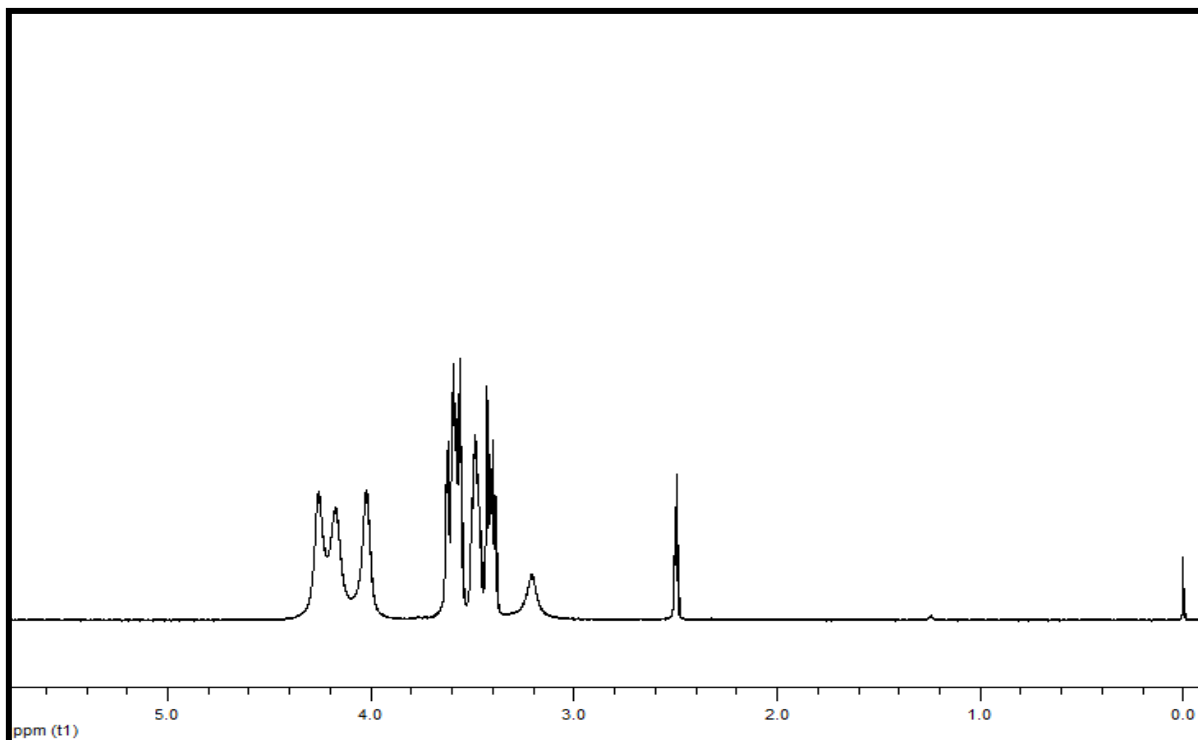


Figura 74: Espectro RMN de ^1H do metabólito (manitol) em DMSO a 400 MHz.

O espectro RMN ^1H (Figuras 74 e 75) apresentou quatro sinais referentes a 8 hidrogênios de carbonos ligados a grupamentos hidroxila, dois dubletos de dubletos em δ_{H} 3,38 ($J=16,0$ e $6,0$ Hz, 2H) e δ_{H} 3,62 ($J=14,0$ e $3,2$ Hz, 2H), um duplo duplo dubleto em δ_{H} 3,48 ($J= 16,8; 7,6; 2,8$ Hz, 2H) e um dubleto a δ_{H} 3,57 ($J= 8\text{Hz}$, 2H)¹⁸⁰.

¹⁸⁰ MOREIRA, B.T. - Bioprospecção do potencial farmacêutico de duas espécies de fungos do solo do cerrado mineiro. **Dissertação**, UFOP- 2009

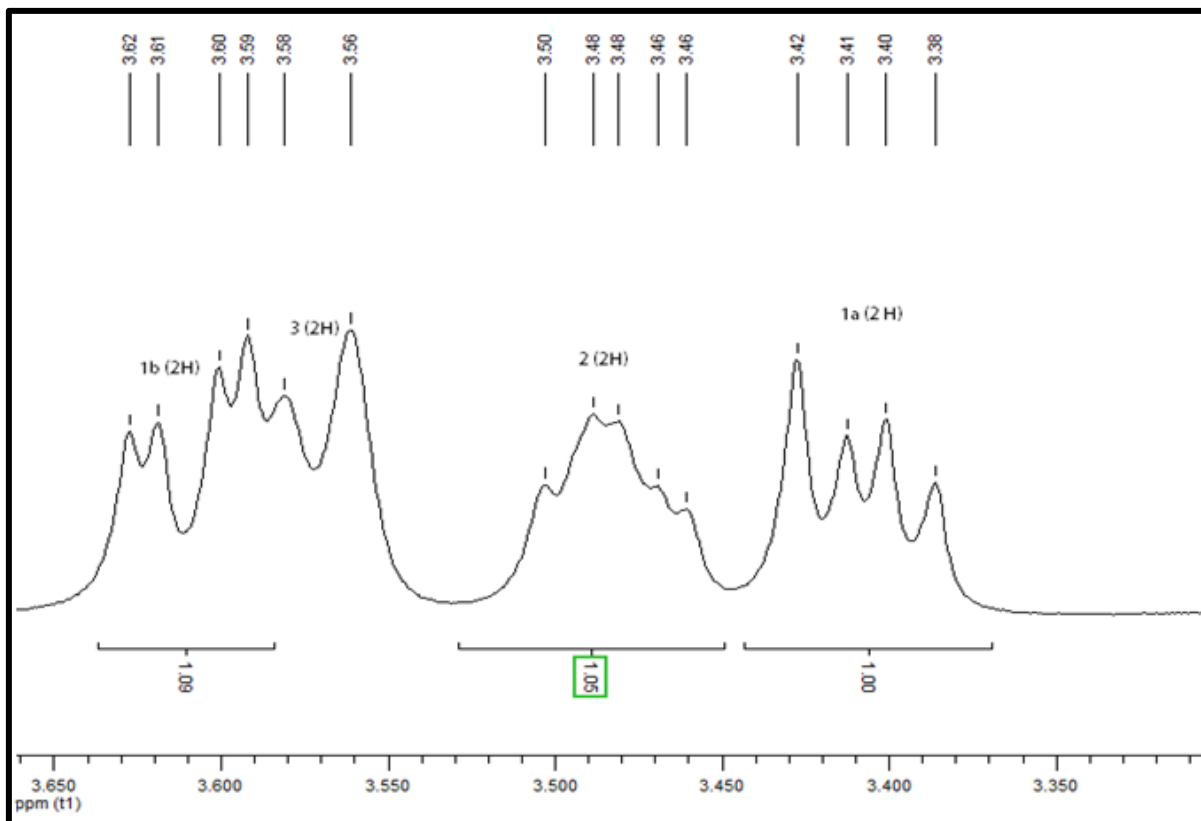


Figura 75: Expansão do espectro RMN de ^1H do metabólito (**manitol**) em DMSO a 400 MHz.

Tabela 11: Dados de RMN ^1H para o composto manitol.

Hidrogênio	Manitol $\delta^1\text{H}$	HAGIWARA, S. et al. 2005 ¹⁸¹ $\delta^1\text{H}$
1 - 6	3,38 (dd, $J=16; 6,0\text{Hz}$, 2H)	3,65 (2H, dd, $J = 11,9$ e $6,1$, Hz)
2 - 5	3,48 (ddd, $J= 16,8; 7,6; 2,8$ Hz, 2H)	3,76 (2H, ddd, $J = 8,6$ Hz)
3 - 4	3,57 (d, $J= 8\text{Hz}$, 2H)	3,73 (2H, d)
1 - 6	3,62 (dd, $J=14; 3,2$ Hz, 2H)	3,84 (2H, dd, $J = 3:3, 11,8$ Hz)

*Constantes de acoplamento em Hz e integrais entre parênteses. Solvente da literatura D_2O , solvente da substancia manitol DMSO.

No espectro de RMN de ^{13}C observou-se 3 sinais (Figura 76) de sendo um deles referente ao carbono metilênico e os outros dois ligados a grupamentos

¹⁸¹ HAGIWARA, S., et. al. - A Phytochemical in the Edible Tamogi-take Mushroom (*Pleurotus cornucopiae*), D-Mannitol, Inhibits ACE Activity and Lowers the Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rats. **Bioscience Biotechnology Biochem**, v. 69 (8), p. 1603–1605, 2005.

hidroxila a δ 63,6 ppm (CH) 69,8 ppm (CH) e 71,3 ppm (CH₂), referentes aos carbonos presentes na molécula.

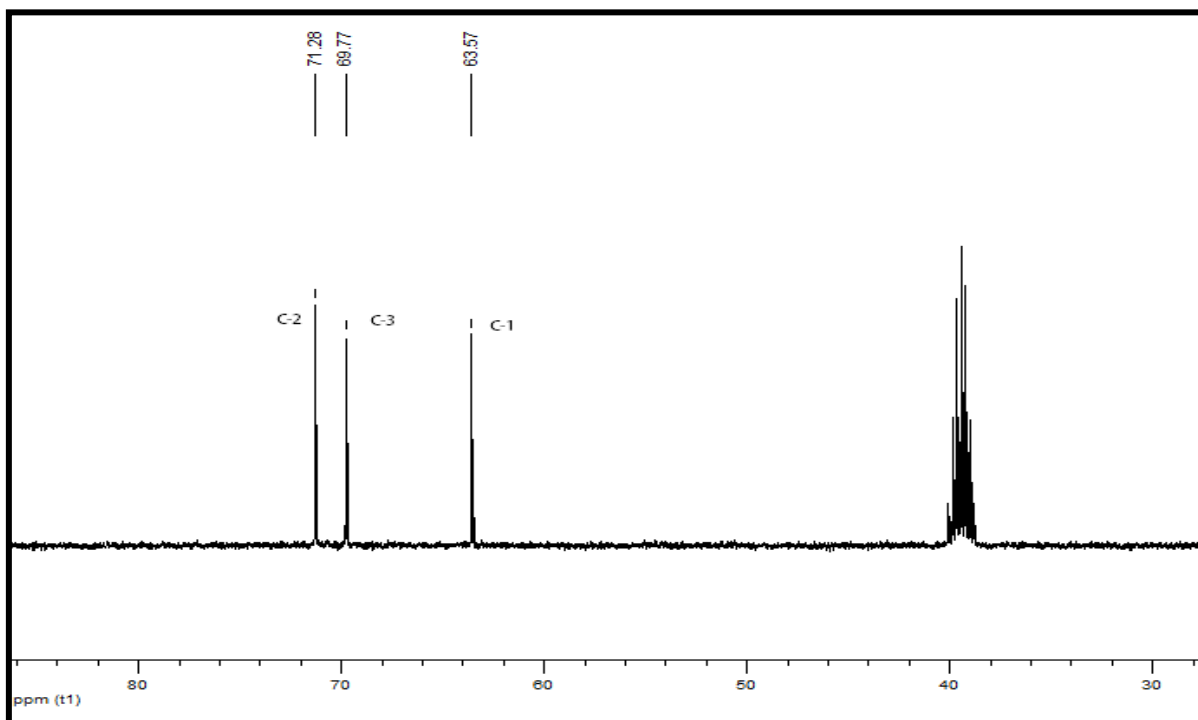


Figura 76: Espectro RMN de ¹³C do metabólito (**manitol**) em DMSO a 100 MHz.

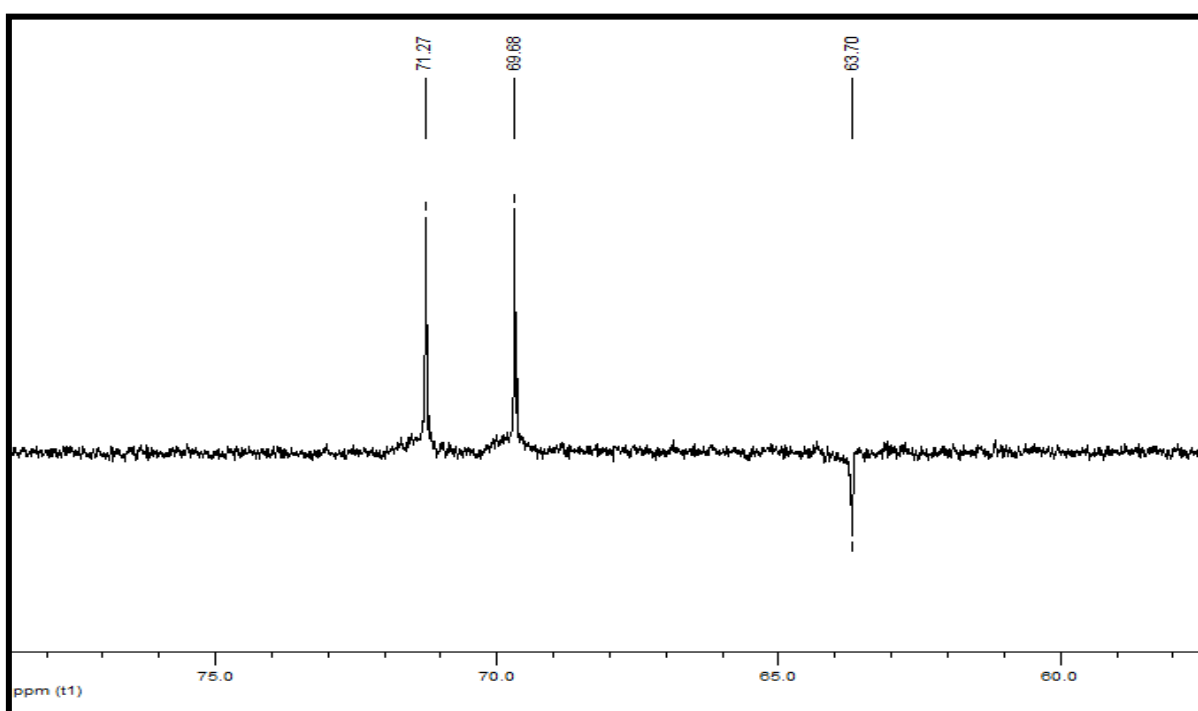


Figura 77: Espectro de RMN de Dept 135° do metabólito (**manitol**), em DMSO, a 100 MHz

A existência de apenas três sinais no espectro de RMN ^{13}C é explicada pela simetria da molécula, mas corresponde a seis carbonos. Com base nestes resultados foi proposta para esta estrutura um poliol com seis carbonos, que após comparação com dados da literatura levou a confirmação desta estrutura como o açúcar manitol ^{177, 178}.

Os valores encontrados foram confrontados com valores encontrados na literatura (Tabela 12)

Tabela 12: Dados de RMN ^{13}C para o composto manitol

Carbono	Manitol $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	MOREIRA, M. T. 2009 $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1 e 6	63,57	63,20
2 e 5	71,28	70,83
3 e 4	69,77	69,63

5.7. Identificação do metabólito trealose:

A trealose é um dissacarídeo produzido por fungos e plantas e tem a função de proteger o organismo em períodos prolongados de desidratação.

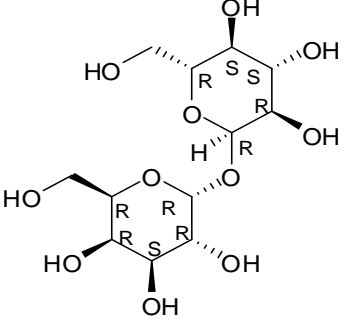
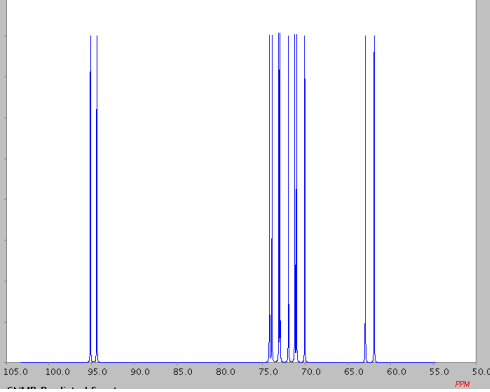
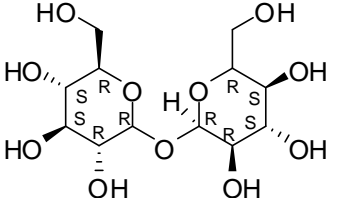
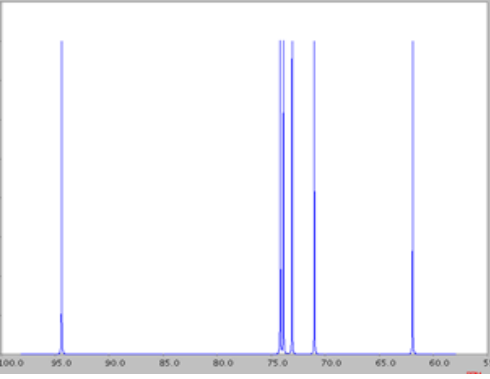
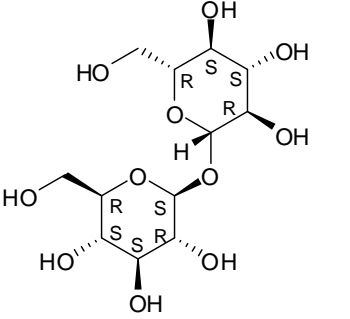
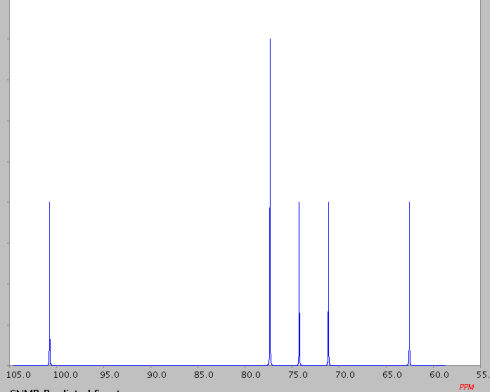
A trealose é um dissacarídeo não redutor no qual duas moléculas de glicose estão ligadas por uma ligação glicosídica do tipo 1,1. Alguns microrganismos como o *Mycobacterium smegmatis*¹⁸² produzem trealose a partir de moléculas de galactose e glicose. Embora existam três anômeros possíveis (α 1- α 1; α 1- β 1; β 1- β 1), somente trealose α 1- α 1 tem sido isolada a partir de organismos vivos. Porém a partir destes três anômeros é possível a formação de trealoses com estereoquímicas diferentes e em função desta estereoquímica ser mais ou menos simétrica é que pode ser determinado o espectro de RMN do ^{13}C . Estas características são possíveis de visualização na base de dados do Scifinder.cas.org¹⁸³.

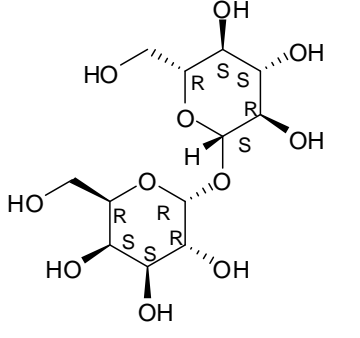
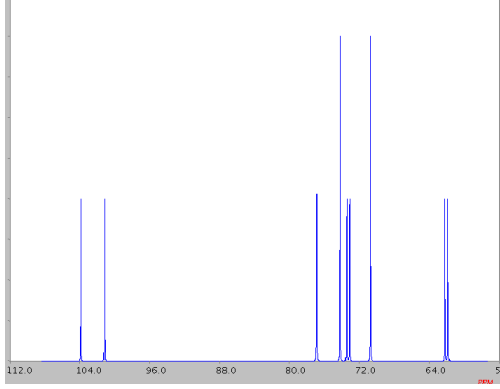
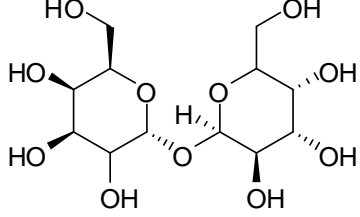
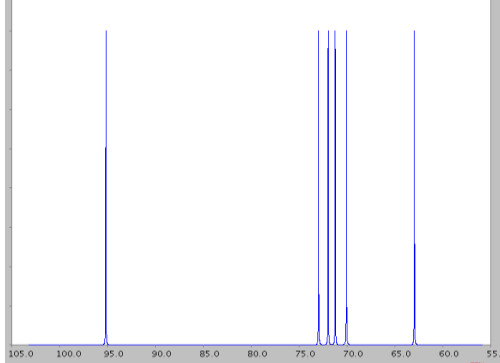
¹⁸² WOODRUFF, P.J. et. al. - Trehalose Is Required for Growth of *Mycobacterium smegmatis*. The journal of biological chemistry, v. 279, n. 28, Issue of July 9, p. 28835–28843, 2004.

¹⁸³ <http://scifinder.cas.org/scifinder/login>. Acesso em 03/08/2013.

Exemplos de trealoses isolados a partir de organismos vivos e preparados através de sínteses podem ser verificados na Tabela 13:

Tabela 13: Exemplos de trealose e seus respectivos RMN

Nomenclatura	Estrutura	RMN ^{13}C
<p>α-D-Galactopiranosideo, α-D-glucopiranosil. CAS Registro Número: 61277-35-8</p>		
<p>α-D-Glucopiranosideo, α-D-glucopiranosil CAS Registro número: 99-20-7</p>		
<p>β-D-Glucopiranosideo, β-D-glucopiranosil CAS Registro Número: 499-23-0</p>		

<p>α-D-Glucopiranosideo, β-D-glucopiranosil CAS Registro Número: 585-91-1</p>		
<p>α-D- Galactopiranosideo, α- D-galactopiranoil CAS Registro Número: 28140-35-4</p>		

A trealose foi isolada na fração AcOEt-MeOH (40:40), na quantidade de 13 mg como um composto na forma de cristais grandes e brancos característicos de açúcares, na quantidade de 0,28 % ou 13 mg em 4,612 g, solúveis em metanol, com ponto de fusão de 363-364 °C. Com fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$ e massa molecular de 342,2964 (dados da literatura)¹⁸⁴, cujo nome IUPAC é (2R,3S,4S,5R,6R)-2-(hidroximetil)-6-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxioxane-3,4,5-triol.

¹⁸⁴ <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=7427#x27>. Acesso em 03/08/2013.

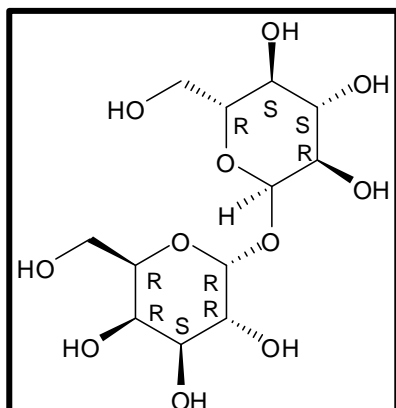


Figura 78: Estrutura da trealose α -D-Galactopiranosideo, α -D-glucopiranosil.

De acordo com o Scifinder.cas.org., o espectro (Figura 79) é a que representa o RMN ^{13}C (Figura 80) do composto trealose (Figura 78).

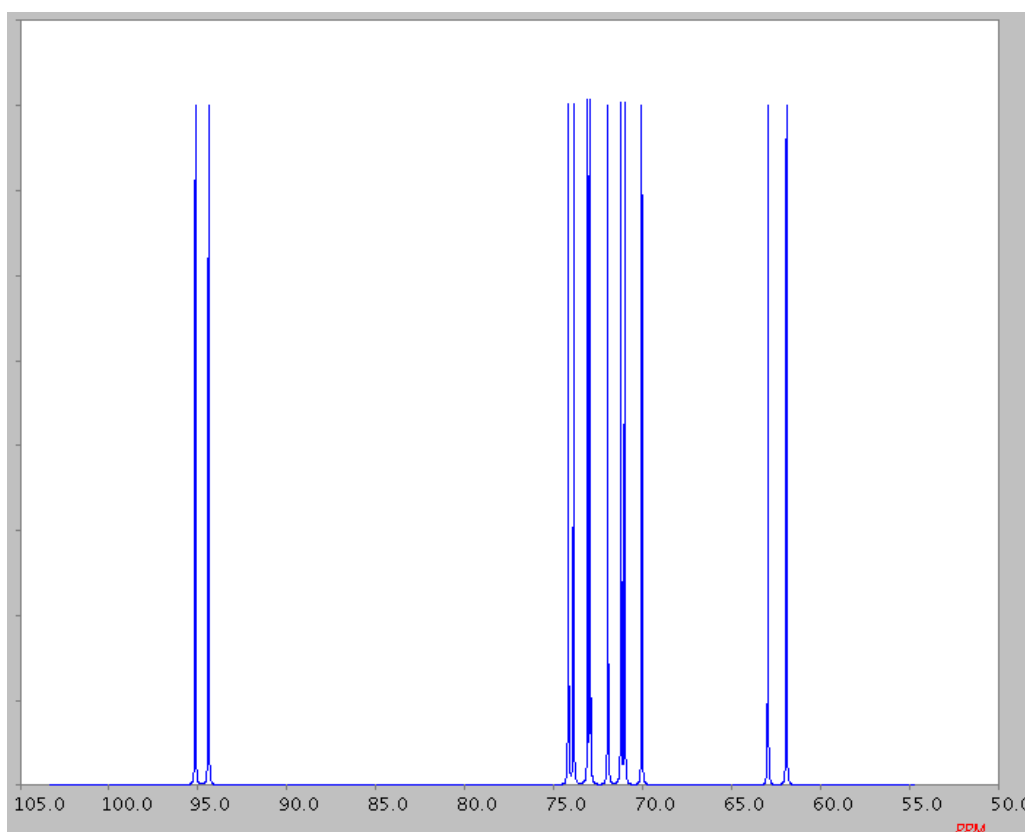


Figura 79: Espectro do ^{13}C retirado do Scifinder.cas.org.¹⁸³ representativo da molécula de trealose α -D-Galactopiranosideo, α -D-glucopiranosil.

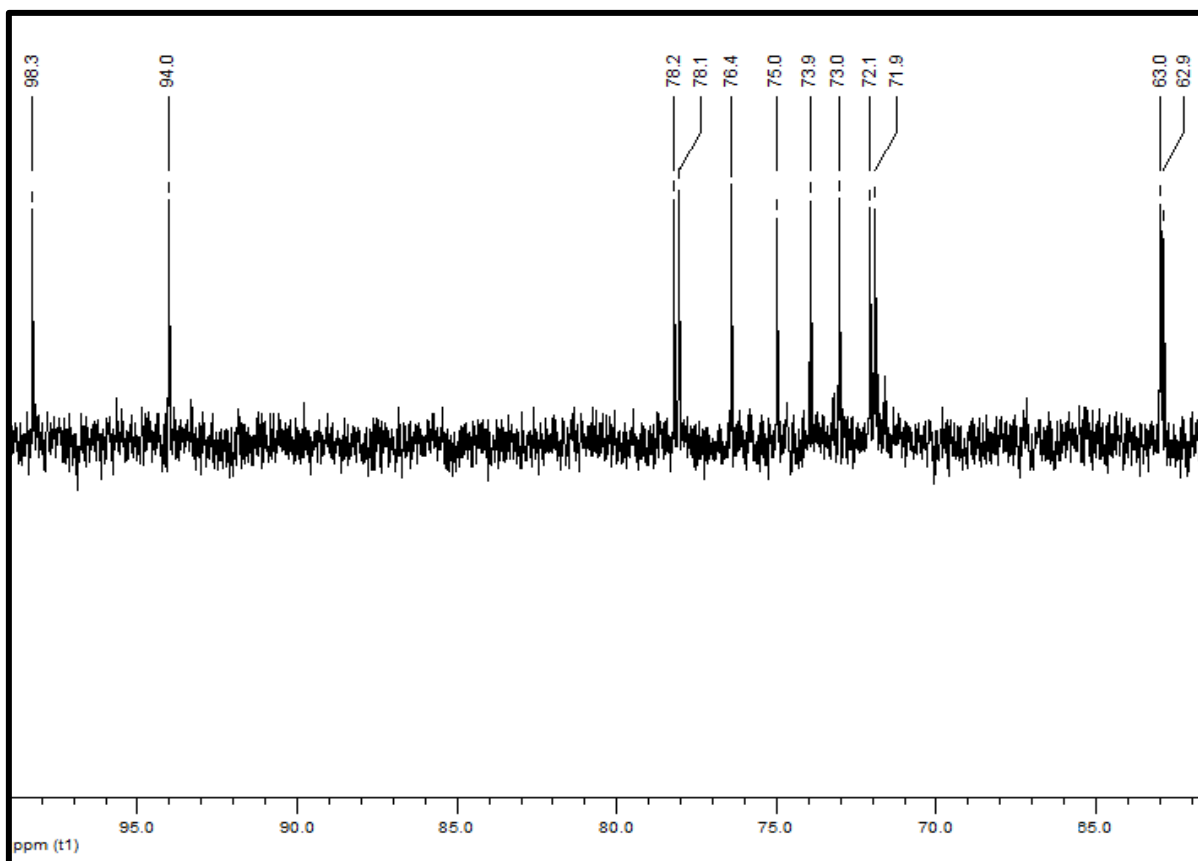


Figura 80: Espectro do ^{13}C do composto trealose α -D-Galactopiranosideo, α -D-glucopiranosil em MeOH a 100 Hz.

O espectro do ^{13}C demonstra que a molécula não apresenta uma simetria em sua estrutura.

Como é possível observar na Figura 81 pelo Dept 135° a molécula apresenta dois carbonos metilênicos e 10 carbonos metínicos, não apresentando nenhum carbono quaternário o que demonstra ser pertencente à molécula de trealose.

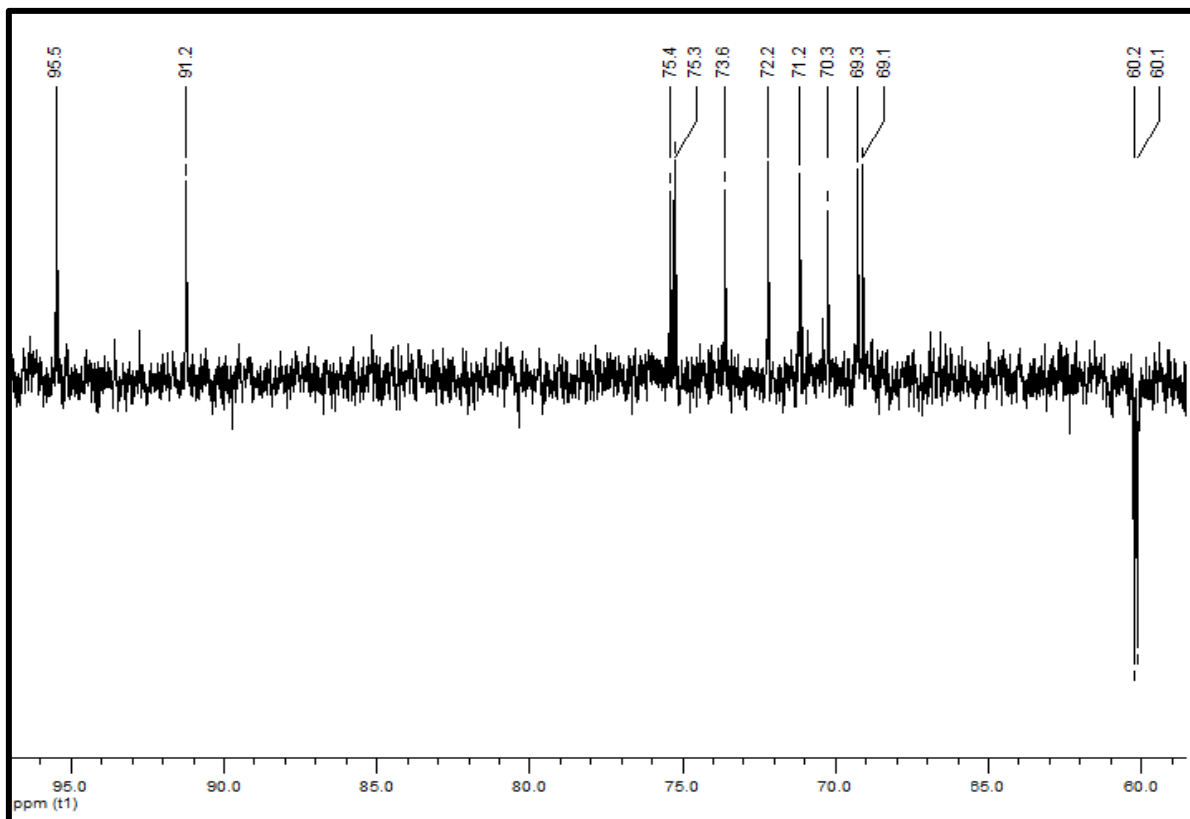


Figura 81: Espectro de RMN de Dept 135° do metabólito trealose α -D-Galactopiranosideo, α -D-glucopiranosil em MeOH, a 100 MHz.

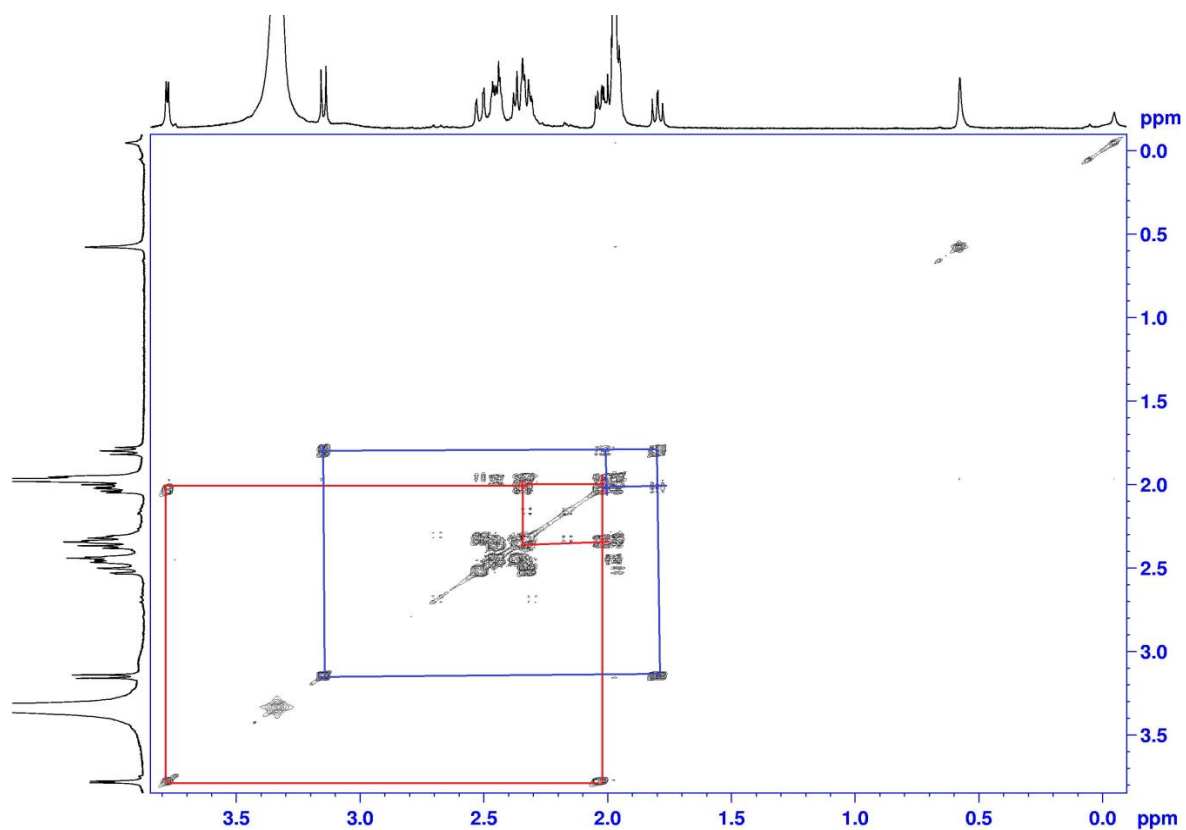


Figura 82: Espectro de RMN 2D Cosy H-H do metabólito trealose em MeOH, a 100 MHz.

Como é possível verificar no espectro COSY H-H aparecem dois sistemas de *spin* como indicativo de que a molécula apresenta dois hidrogênios que formam dubletos e se ligam a hidrogênios que formam tripletos.

A trealose pode ter sido formada a partir do açúcar maltose que foi fornecido a ectomicorriza *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) através do meio de cultura utilizado.

De acordo com Scifinder.cas.org esta estrutura de trealose é obtida em sua grande maioria a partir de síntese. Sua obtenção a partir de organismos produtores é mais difícil. Porém os microrganismos *Mycobacterium tuberculosis* (Zopf) e *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) são descritos, até o momento, como os únicos capazes de produzi-la naturalmente.

Isto demonstra a importância do crescimento *in vitro* da ectomicorriza *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries).

5.8. Apresentação e discussão dos resultados biológicos

Muitas classes de compostos orgânicos têm demonstrado promissores efeitos biológicos e a literatura científica relata significativo crescimento de novas moléculas com potencial similar ou superior as hoje utilizadas como fármacos, sendo que muitas delas encontram-se em estudos pré-clínicos e clínicos avançados e pormenorizados^{185,186}. Entre estas substâncias, podem-se inserir os triterpenos isolados em outras espécies de *Scleroderma sp.* que apresentaram ação antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis*¹⁸⁷ e *Bacillus subtilis*¹⁶⁶ alvo deste estudo.

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos capazes de inibir ou de promover a morte de microrganismos, obtidos a partir de compostos orgânicos ou de

¹⁸⁵ NOGUEIRA, R.C., et. al. - Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 20(2), p. 1-13, 2010.

¹⁸⁶ NEWMAN, D.J., et. al. - Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal Natural of Product**, v. 70, p. 461-477, 2007.

¹⁸⁷ CLARIDGE, A.W. - Ecological role of hypogeous ectomycorrhizal fungi in Australian forests and woodlands. **Plant and Soil**, v. 244, p. 291-305, 2002.

plantas, têm sido objeto de estudo de vários pesquisadores de diversos países. Microbiologistas clínicos, químicos medicinais e demais pesquisadores têm suas razões para buscar por este tipo de ação. Em primeiro lugar, existe a premência de se encontrar novos agentes que possam substituir antibióticos tradicionais que já não são efetivos devido ao fenômeno da resistência. Outro fator é a rápida taxa de extinção de muitas espécies vegetais, fato que está acarretando a provável perda definitiva de muitas estruturas promissoras.

A atividade antimicrobiana *in vitro* dos compostos isolados e do extrato bruto foi avaliada frente a um grupo de microrganismos. Entre as bactérias incluídas neste estudo estão às bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 19659), *Enterococcus sp.* (ATCC 6589), *Bacillus cereus* (ATCC 33019) e as bactérias gram-negativas, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Burkholderia cepacia* (ATCC 17759), *Providencia stuartii* (IAL 1971), *Morganella morganii* (ATCC 8019), *Enterobacter cloacae* (ATCC 1304), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Enterobacter sp.* (ATCC 2581), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028).

Os fungos incluídos neste estudo foram *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis* ATCC 18803, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapslosis* ATCC 22018, *Cryptococcus neoformans* ATCC 28952, *Cryptococcus gatti* ATCC 2601, *Sacharomyces cervisiae* ATCC 260.

A interpretação dos resultados foi baseada nos *break points* da nistatina para fungos e no do cloranfenicol para bactérias, todos de acordo com as técnicas M27-A2¹⁷¹ e M7-A4¹⁷² respectivamente.

O extrato bruto e os compostos SC5 e SC8 isolados foram avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana “*in vitro*” frente ao grupo de bactérias citados acima para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e letal mínima (CLM) pelos métodos de microdiluição em caldo segundo os padrões do CLSI.

As amostras de extrato bruto, SC5, SC8 e SC7 e SC7-1 foram testados quanto a sua atividade fungicida “*in vitro*” frente ao grupo de fungos citados acima para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e letal mínimas (CLM) pelos métodos de microdiluição em caldo segundo os padrões do CLSI.

Nas avaliações das atividades, considerou-se que CIMs até 100 µg/mL⁻¹ como de “significativa atividade” para o extrato bruto, para os metabólitos

considerou-se significativa atividade a concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ acima destas concentrações, as atividades antimicrobianas não foram consideradas.

Como é possível visualizar na Tabela 14 o extrato bruto apresentou atividade bacteriostática frente aos microrganismos Gram-positivos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 19659) e *Bacillus cereus* (ATCC 33019) e aos Gram-negativos *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Providencia stuartii* (IAL 1971), *Morganella morganii* (ATCC 8019) e *Enterobacter sp.* (ATCC 2581). Porém não demonstrou atividade bactericida frente a nenhuma bactéria Gram-positiva e Gram negativa. Mas confirmou o que foi demonstrado através do ensaio biodirigido em que a ectomicorrizas *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) demonstrou atividade antibacteriana.

Os metabólitos testados quanto à ação antibacteriana, entretanto, não demonstraram atividade bactericida e bacteriostática indicando que o metabólito responsável por esta ação não foi isolado ou é o conjunto destes que apresenta atividade. Isto vem demonstrar que esta ação pode acontecer na natureza com a associação da micorriza com a planta em que a mesma exerce uma função antibiótica de proteção as plantas as quais está associada.

Tabela 14: Resultados de CIM e CLM antibacteriano para o extrato bruto e os metabólitos **SC5** e **SC8**.

Características	Microrganismos ^a	Extrato bruto		Metabólito SC5		Metabólito SC8	
		CIM ^b	CLM ^b	CIM ^b	CLM ^b	CIM ^b	CLM ^b
Gram-positivos	<i>Staphylococcus aureus</i>	100	>200	200	>200	100	>200
	<i>Bacillus subtilis</i>	100	>200	200	.200	100	>200
	<i>Enterococcus sp.</i>	200	>200	100	>200	>200	>200
	<i>Bacillus cereus</i>	100	>200	100	200	200	>200
Gram-negativos	<i>Escherichia coli</i>	200	>200	100	>200	>200	>200
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	200	100	200	100	>200
	<i>Bulkholderia cepacia</i>	200	>200	100	>200	100	200
	<i>Providencia stuartii</i>	100	>200	100	>200	200	>200
	<i>Morganella morganii</i>	100	>200	100	>200	100	200
	<i>Enterobacter cloacae</i>	100	>200	100	>200	>200	>200
	<i>Proteus mirabilis</i>	>200	>200	200	>200	100	>200
	<i>Enterobacter sp.</i>	100	>200	100	>200	>200	>200
<i>Salmonella typhimurium</i>	200	>200	100	>200	>200	>200	

^a ATCC (American Type Culture Collection), ^b em mg/mL^{-1}

O extrato bruto (Tabela 15) mostrou atividade antifúngica interessante contra: *Candida albicans* e *Candida parapsolosis* (CIM = 250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, cada), *Candida tropicalis* (CIM = 125 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$), *Candida krusei* (CIM = 31,2 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$); *Cryptococcus neoformans* (CIM = 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) e *Sacharomyces cerivesiae* (CIM = 250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$). Com estes dados os compostos SC5, SC8, SC7 e SC7-1 foram testados quanto à atividade antifúngica.

O composto **SC5** apresentou atividade antifúngica superior à do extrato. O melhor resultado foi contra *Candida krusei* (CIM/CLM = 12,5/50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$), seguido de *Candida tropicalis* (CIM/CLM = 25/50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$), *Cryptococcus neoformans* (CIM/CLM = 25/25 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$). Porém o composto **SC5** foi menos ativo contra *Candida albicans* (CIM/CLM = 50/50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) e *Candida tropicalis* (CIM/CLM = 50/50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$). Estes resultados mostram que o composto é um fungicida ou fungistático nestas concentrações.

O composto **SC8** apresentou ação bacteriostática contra *Candida krusei* (CIM/CLM 12,5/>100 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, menos ativo contra *Cryptococcus neoformans* 50/50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, demonstrando atividade contra estes microrganismos, porém não apresentou atividade contra os demais fungos testados.

O metabólito **SC7** apresentou atividade moderada frente à *Candida parapsolosis* (CIM/CLM = 25/100 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) e também contra *Cryptococcus gatti* (CIM/CLM = 25/25 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) e não foi muito ativo contra *Sacharomyces cerivesiae* (CIM/CLM = 50/50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$).

O composto **SC7-1** derivado do **SC7** demonstrou possuir a mesma capacidade antifúngica, indicando desta forma que a presença ou ausência da hidroxila não interfere na ação da molécula, bem como a sua polaridade uma vez que o composto SC7 é muito polar.

Nistatina, utilizado como um antibiótico de controle apresentou os seguintes resultados: *Candida albicans* (CIM/CLM = 0,77/3,1 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$), *Candida parapsolosis* (CIM/CLM = 1,52/6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$), *Candida tropicalis* (CIM/CLM = 1,52/3,1 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$); *Candida krusei* (CIM/CLM = 0,77/3,1 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$), *Cryptococcus neoformans* (CIM/CLM = 0,77/3,1 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$), e *Sacharomyces cerivesiae* (CIM/CLM = 0,77/3,1 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$).

Tabela 15: Resultados de CIM e CLM antifúngico para o extrato bruto e os metabólitos **SC5**, **SC8**, **SC7** e **SC7-1**.

Microrganismo	Extrato bruto		SC5		SC8		SC7		SC7-1		Controle Nistatina	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<i>Candida albicans</i>	250	>250	50	50	>100	-	50	>100	50	>100	0,77	3,1
<i>Candida tropicalis</i>	125	>250	50	50	>100	-	50	100	50	>100	1,52	3,1
<i>Candida krusei</i>	31,2	>250	12,5	50	12,5	>100	NT	NT	NT	NT	0,77	0,77
<i>Candida parapslosis</i>	250	>250	25	50	100	>100	25	100	50	100	0,77	1,52
<i>Cryptococcus neoformans</i>	62,5	>250	25	25	50	50	NT	NT	NT	NT	1,52	3,1
<i>Cryptococcus gatti</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT	25	25	25	100	3,1	3,1
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	250	250	25	50	100	>100	50	100	50	>100	1,52	3,1

NT – Não testada

Estes resultados demonstram que a atividade antifúngica é bem acentuada confirmando os resultados obtidos no ensaio biodirigido em que a ectomicorrizas *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) apresentou resultados significativos, frente à *Candida albicans* ATCC 10231 (Robin).

Os resultados obtidos indicam que as micorrizas podem ter ação antifúngica quando associadas a plantas. Estudos realizados por Chu, 2005¹⁸⁸, que ao testar a ação de fungos de solo patogênicos (*Fusarium solani f. sp. piperi* (Albuquerque)) em mudas de pimenta do reino obteve uma ação significativa de proteção nas mudas em que foram inoculadas ectomicorrizas.

¹⁸⁸ CHU, E.Y. - Embrapa Amazônia Oriental, Sistemas de Produção, 01 ISSN 1809-4325 Versão Eletrônica. 2005.

6. CONCLUSÃO

1 - Demonstrou-se que os resultados obtidos no ensaio biodirigido em que a ectomicorriza *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) apresentou ação antifúngica foi comprovado com o isolamento de moléculas que demonstraram a mesma ação.

2 - Foram isoladas, identificadas e determinadas as estruturas que demonstraram ser inéditas quando isoladas de produtos naturais.

3 – O fungo ectomicorrizico *Scleroderma UFSMsC1* (Persoon:Fries) apresenta ação antifúngica para os fungos

4 - Do fungo ectomicorrizico *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) estão isoladas, identificadas e determinadas as estruturas dos compostos 3,10(S),5,13,14,17,20(R)-25-metoxilanosta-8-23-dienol (**SC5**), 23-metoxilanosta-8-25-dienol (**SC8**), lanosta-8,24-dien-3,25-diol (**SC7**), lanosta-8,23,25-trien-3-ol (**SC7-1**), além dos açucares manitol e trealose.

5 - Como o crescimento do *Scleroderma UFSMSc1* é relativamente lento, se fazem necessárias adequações a esta técnica, de modo a se obter maiores quantidades do produto desejado.

6 – O fungo ectomicorrizico *Scleroderma UFSMSc1* (Persoon:Fries) apresentou a estrutura trealose α -D-Galactopiranosídeo, α -D-glucopiranosil de origem natural, cujo isolamento foi realizado em apenas dois fungos. Os demais isolamentos eram provenientes de síntese.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1 - MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLOP, P.V.; CLARK, D.P. - **Microbiologia de Brock**. ARTMED, Porto Alegre, 624 p., 2010.
- 2 - DAHM, H.; GOLIŃSKA, P. - Ectomycorrhiza and secondary metabolites. **Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae, Soil Biology**, v. 25, p. 371-385, 2011.
- 3 - GILL, M. - Pigments of fungi (macromycetes). **Natural Product Reports**, v. 20 (6), p. 615–639, 2003.
- 4 - ZHOU, Z.; LIU, J. - Pigments of fungi (macromycetes). **Natural Product Reports**, v. 27, p.1531–1570, 2010.
- 5 - NAKATA, T.; TAJI, S.; YAMADA, T.; TANAKA, R. - New lanostane triterpenoids Inonotsutriols D, and E from *Inonotus Obliquus*. **Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 53-64, 2009.
- 6 - HUANG, H.; LIAW, C.; YANG, H.; HSEU, Y.; KUO, H.; TSAI, Y.; CHIEN, S.; AMAGAYA, S.; CHEN, Y.; KUO, Y. - Lanostane triterpenoids and sterols from *Antrodia camphorate*. **Phytochemistry**, v. 84, p. 177–183, 2012.
- 7 - NOMURA, M.; TAKAHASHI, T.; UESUGI, A.; TANAKA, R., KOBAYASHI, S. - Inotodiol, a lanostane triterpenoid, from *Inonotus obliquus* inhibits cell proliferation through caspase-3-dependent apoptosis. **Anticancer Research**, v. 28, p. 2691-2696, 2008.
- 8 - BAE, K-G, MIN, T-J. – The structure and antibiotic activities of hydroxy acid of lanosterol compound in *Daedalea dickinsii*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 21 p. 1199-1201, 2000.
- 9 - LIU, X.T.; WINKLER, A.L.; SCHWAN, W.R.; VOLK, T.J.; ROTT, M.A.; MONTE, A. - Antibacterial compounds from mushrooms I: a lanostane-type triterpene and prenylphenol derivatives from *Jahnoporus hirtus* and *Albatrellus flettii* and their activities against *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecalis*, **Planta Medica**, v. 76, p. 182–185, 2010.
- 10 - KAMO, T. ASONOMA, M.; SHIBATA, H.; HIROTA, M. – Anti-inflammatory lanostene-type triterpene acids from *Piptoporus betulinus*, **Journal Natural Product**, v. 66(8), p. 1104-1106, 2003.
- 11 - LI, H.Y.; SUN, N. J.; KASHIWADA, Y.; SUN, L.; SNIDER, J.V.; COSENTINO, L.M.; LEE, K.H. – Anti-AIDS agentes 9.Subersol, a new C31 lanostane-type triterpene and anti-HIV principle from *Polyalthia suberosa*. **Journal Natural Product**, v. 56 (7), p. 1130-1133, 1993.
- 12 - CORAZZINI, A.C.; COELHO, G. - **Taxonomia de Boletales (Fungi, Agaricomycotina) da Região de Santa Maria, RS, Brasil**. In: Anais da 25ª Jornada Acadêmica Integrada da Universidade Federal de Santa Maria (JAI-UFSM). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 04/01/2010.
- 13 - CORTEZ, V.G.; BASEIA, I.G.; SILVEIRA, R.M.B. - Gasteroid mycobiota of Rio Grande do Sul, Brazil: Boletales. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 2, n. 4, p. 44 -52, 2011.
- 14 - ALFREDO, D.S.; LEITE, A.G.; BRAGA-NETO, R.; CORTEZ, V.G.; BASEIA, I.G. - *Scleroderma minutisporum*, a new earthball from the Amazon rainforest. **Mycosphere**, v. 3, n. 3, p. 294–299, 2012. DOI 10.5943 /mycosphere/3/3/4.
- 15 - HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.F.; ERIKSSON, O.E.; HUHDORF, S.; JAMES, T.I.; KIRK, P.M.; LÜCKING, R.; LUMBSCH, H.T.; LUTZONI, F.;

MATHENY, P.B.; McLAUGHLIN, D.J.; POWELL, M.J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C.L.; SPATAFORA, J.W.; STALPERS, J.A.; VILGALYS, R.; AIME, M.C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G.L.; CASTLEBURY, L.A.; CROUS, P.W.; DAI, Y.-C.; GAMS, W.; GEISER, D.M.; GRIFFITH, G.W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D.L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R.A.; HYDE, K.D.; IRONSIDE, J.E.; KÖLJALG, U.; KURTZMAN, C.P.; LARSSON, K.-H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIADLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J.-M.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASO, E.; REEB, V.; ROGERS, J.D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J.P.; SCHÜßLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R.G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W.A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M.M.; WINKA, K.; YAO, Y.-J.; ZHANG, N. - A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological research**, v. 111, p. 509-547, 2007.

17 - WEBER, R.W.S. - Recent developments in the molecular taxonomy of fungi. In: Esser, K. (ed.). **The mycota**. Volume XV - Cap. 1. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009.

18 - DICKINSON, T.A.; HUTCHISON, L.J. - Numerical taxonomic methods, cultural characters, and the systematics of ectomycorrhizal agarics, boletes and gasteromycetes. **Mycological Research**, v. 101, n. 4, p. 477-492, 1997.

19 - NUGROHO, J.D.; MANSUR, I.; PURWITO, A.; SUHENDANG, E. - Morphological characteristics of ectomycorrhizas on Merbau [*Intsia bijuga* (Colebr.) O. Kuntze]. **Journal of Biosciences**, v. 17, n. 2, p. 68-72, 2010.

20 - LAMPE, K.F. - Toxic fungi. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 19, p. 85-104, 1995.

21 - STEVENSON, J.A. - Scleroderma poisoning. **Mycologia**, v. 53, p. 438-39, 1961.

22 - TRESTRAIL, J.H. - Management of poisoning by unknown fungi – **INCHEM - Chemical Safety**. Information from Intergovernmental Organizations. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/pims/fungi/fungi.htm>. Acesso em 02/02/2013.

23 - NASCIMENTO, M.S.; MAGALHÃES, J.E.M.; PINHEIRO, T.S.; da SILVA, T.A.; COUTINHO, L.G.; BASEIA, I.G.; LIMA, L.F.A.; LEITE, E.L. - Polysaccharides from the fungus *Scleroderma nitidum* with anti-inflammatory potential modulate cytokine levels and the expression of Nuclear Factor κB. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 60-68, 2012.

24 - MARSCHNER, H.; DELL, B. - Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 159, p. 89-102, 1994.

25 - MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. - **Microbiologia e Bioquímica do solo**. Editora UFLA. 729 p. 2002.

26 - SMITH, S.E.; READ, D.J. - **Mycorrhizal symbiosis**. London: Academic press, 787 p., 2008.

27 - CORDIER, C.; POZO, M. J.; BAREA, J.M.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. - Cell defense responses associated with localized and system icresistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, p. 1017-1028, 1998.

28 - BRUNNER, I.; FREY, B. - Detection and localization of aluminum and heavy metals in ectomycorrhiza Norwayspruce seedlings. **Environmental Pollution**, v. 108, p. 121-128, 2000.

29 - COSTA, M.D.; PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M.; BORGES, A.C. - Ectomicorrizas: a face oculta das florestas. **Biotechnology, Ciência & Desenvolvimento** – n. 29, p. 38-46, 2002.

30 - BASEIA, I.G.; MILANEZ, A.I. - First record of *Scleroderma polyrhizum* Pers. (Gasteromycetes) from Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 14(2), p. 181-184. 2000.

- 31 - NOUHRA, E.R.; CAFFOT, M.L.H.; PASTOR, N. - The species of *Scleroderma* from Argentina, including a new species from the *Nothofagus* Forest, **Mycologia**, v. 104(2), p. 488–495, 2012.
- 32 - GUERRERO, R.T., SILVEIRA, R.M.B. - **Glossário Ilustrado de Fungos: termos e conceitos aplicados à micologia**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 93 p., 2003.
- 33 - CLARDY, J.; WALSH, C. - Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004.
- 34 - FREIRE, C.G.; de CAMPOS, R.F.F.; de OLIVEIRA, L.P. - Levantamento de fungos ectomicorrízicos em floresta de *Pinus taeda* em Caçador – SC. **Ignis**, Caçador, v. 1, n. 1; 2012.
- 35 - MELLO, A.H.; ANTONIOLLI, Z.I.; KAMINSKI, J.; SOUZA, E.L.; OLIVEIRA V.L. - Fungos arbusculares e ectomicorrízicos em áreas de eucalipto e de campo nativo em solo arenoso. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 3, p. 293-301, 2006.
- 36 - SULZBACHER, M.A. - **Fungos ectomicorrízicos do sul do Brasil, com ênfase no hábito hipógeo**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- 37 - WALKER, T.S.; BAIS, H.P.; GROTEWOLD, E.; VIVANCO, J.M. - Root exudation and rhizosphere biology. **Plant Physiology**, v. 132, p. 44–51, 2003.
- 38 - BAIS, H.P.; PARK, S.W.; WEIR, T.L.; CALLAWAY, R.M.; VIVANCO, J.M. - How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 26–32, 2004.
- 39 - SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. - **Biotechnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/ABEAS/ESAL/FAEPE, 1988, 236 p.
- 40 - BRUNDRETT, M.C. - Diversity and classification of mycorrhizal associations. **Biological Reviews**, v. 79, p. 473–495, 2004. DOI: 10.1017/S146479310300 6316.
- 41 - BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GROVE, T. MALAJCZUK, N. - **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia. 1996.
- 42 - WANG, B.; QIU, Y. L. - Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. **Mycorrhiza**, v.16, p. 299–363, 2006. DOI 10.1007/s00572-005-0033-6.
- 43 - KASPER, J.; MUMM, R.; RUTHER, J. - The composition of carcass volatile profiles in relation to storage time and climate conditions. **Forensic Science International**, v. 223, p. 64–71, 2012.
- 44 - SUTELA, S.; NIEMI, K.; EDESI, J.; LAAKSO, T.; SARANPÄÄ, P.; VUOSKU, J.; MÄKELÄ, R.; TIIMONEN, H.; CHIANG, V.L.; KOSKIMÄKI, J.; SUORSA, M.; JULKUNEN-TIITTO, R.; HÄGGMAN, H. - Phenolic compounds in ectomycorrhizal interaction of lignin modified silver birch. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 124, p. 1-15, 2009.
- 45 - MCKENDRICK, S.L.; LEAKEM, J.R.; READ, D.J. - Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. **New Phytologist**, v. 145, p. 539–548, 2000.
- 46 - BAREA, J.-M.; POZO, M.J.; AZCON, R.; AZCON-AGUILAR, C. - Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 417, p. 1761–1778, 2005. DOI:10.1093/jxb/eri197.
- 47 - BRUNDRETT, M.C. - Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. **Plant Soil**, v. 320, p. 37-77, 2009. DOI:10.1007/s11104-008-9877-9).

- 48 - TEDERSOO, L.; MAY, T.W.; SMITH, M.E. - Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. **Mycorrhiza**, v. 20, p. 217–263, 2009.
- 49 - PIROZYNSKI, K.A.; MALLOCH, W. - The origin of land plants: a matter of mycotrophism. **BioSystems, Care**, v.6, p. 153–164, 1975.
- 50 - PIROZYNSKI, K.A. - An interaction between fungi and plants through the ages. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 59, p. 1824-1827, 1981.
- 51 - ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. - **Introductory Mycology**. 4 ed. John Wiley & Sons. New York, USA. 869 p., 1995.
- 52 - COMANDINI, O.; RINALDI, A.C. - Together, but not for ever: ectomycorrhizal symbiosis is an unstable affair. **Mycological Research**, v. 105, n. 2, p. 129-131, 2001.
- 53 - CARNEIRO, M.A.C., et. al. - Micorriza arbuscular em espécies arbóreas e arbustivas nativas de ocorrência no Sudeste do Brasil. **Cerne**, v. 4, n. 1, p. 129-145, 1998.
- 54 - SIQUEIRA, J.O.; LAMBAIS, M.R.; STÜRMER, S.L. - Fungos micorrízicos arbusculares - Características, associação simbiótica e aplicação na agricultura. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 25, p. 12-21, 2002.
- 55 - SIQUEIRA, J.O. - **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras, 290 p. 1996.
- 56 - PRESCOTT, L.M. HARLEY, J.P., KLEIN, D.A. - **Microbiology** - McGraw-Hill Higher Education, New York, 5th Edition, 1026 p., 2002.
- 57 - HAWKSWORTH, D.L. - Unite: molecular identification of ectomycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v. 109, n. 10, p.1057–1062, 2005.
- 58 - ANDRADE-TORRES, A. - Micorrizas: antigua interacción entre plantas y hongos. **Ciencia**. Octubre-diciembre, p. 84-90, 2010.
- 59 - PETERSON, R.L.; FARQUHAR, M.L. – Mycorrhizas - Integrated development between roots and fungi. **Mycologia**, v. 86 (3), p. 311-326, 1994.
- 60 - MORRIS, M.H.; PEREZ-PEREZ, M.A.; SMITH, M.E.; BLEDSOE, C.S. - Influence of host species on ectomycorrhizal communities associated with two co-occurring oaks (*Quercus spp.*) in a tropical cloud forest. **FEMS Microbiology ecology**, v. 69, n. 2, p. 274-287, 2009.
- 61 - RILLIG, M.C.; MUMMEY, D.L. - Tansley review: mycorrhizas and soil structure. **New Phytologist**, v.171, p. 41-53, 2006.
- 62 - KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; DAVID, J.C.; STALPERS, J.A. - **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi**. 9th ed. CAB International, Wellingford, 616 p., 2001.
- 63 - HAWKSWORTH, D.L. - **The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation**. **Mycological Research** (New York), v. 95, p. 641-655, 1991.
- 64 - VELLINGA, E.C.; WOLFE, B.E.; PRINGLE, A. - Global patterns of ectomycorrhizal introductions. **New Phytologist**, v. 10, p. 1-14, 2009.
- 65 - WILCOX, H.E. - Mycorrhizal Associations. In: NAKAS, J.P.; HAGEDORN, C. (eds.). **Biotechnology of plant-microbe interactions**. McGraw-Hill. New York, USA. p. 227-255, 1990.
- 66 - NIEMI, K.; JULKUNEN-TIITTO, R.; HAGGMAN, H.; SARJALA, T. - *Suillus variegatus* causes significant changes in the content of individual polyamines and flavonoids in Scots pine seedlings during mycorrhiza formation *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 3, p. 391-401, 2007. DOI:10.1093/jxb/erl209

- 67 - NARA, K.; HOGETSU, T. - Ectomycorrhizal fungi on established shrubs facilitate subsequent seedling establishment of successional plant species. **Ecology**, v. 85, n. 6, p. 1700-1707, 2004.
- 68 - STRACK, D.; FESTER, T.; HAUSE, B.; SCHLIEMANN, W.; WALTER M.H. - Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 9, p. 1955-1979, September 2003.
- 69 - LUO, Z.B.; JANZ, D.; JIANG, X.N.; GOBEL, C.; WILDHAGEN, H.; TAN, Y.P.; RENNENBERG, H.; FEUSSNER, I.; POLLE, A. - Upgrading root physiology for stress tolerance by ectomycorrhizas: insights from metabolite and transcriptional profiling into reprogramming for stress anticipation. **Plant Physiology**, v. 151, n. 4, p. 1902-1917, 2009. DOI: 10.1104/pp.109.143735.
- 70 - LUO, Z.B.; LI, K.; GAI, Y.; GOBEL, C.; WILDHAGEN, H.; JIANG, X.N.; FEUSSNER, I.; RENNENBERG, H.; POLLE, A. - The ectomycorrhizal fungus (*Paxillus involutus*) modulates leaf physiology of poplar towards improved salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, n. 2, p. 304-311, 2011. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2011.04.008.
- 71 - ANDERSON, I.C.; CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, J.W.G. - Characteristics of glutamine uptake by two Australian *Pisolithus* species. **Mycology Research**, v. 105, n. 8, p. 97- 982, 2001.
- 72 - BÜCKING, H. - Phosphate absorption and efflux of three ectomycorrhizal fungi as affected by external phosphate, cation and carbohydrate concentrations. **Mycological Research**, v. 108, n. 6, p. 599–609, 2004.
- 73 - LI, C.; OBERLIES, N.H. - The most widely recognized mushroom: chemistry of the genus *Amanita*. **Life Sciences**, v. 78, p. 532–538, 2005.
- 74 - JUNG, N.C.; TAMAI, Y. - Anatomical observation of polyphenol changes in epidermal cells during the development of *Quercus acutissima*–*Scleroderma verrucosum* ectomycorrhizae. **Trees**, v. 26, p. 301–310, 2012. DOI 10.1007/s00468-011-0592-4
- 75 - MORIN, E.; KOHLER, A.; BAKER, A.R.; FOULONGNE-ORIOU, M.; LOMBARD, V.; NAGYE, L.G. OHM, R.A.; PATYSHAKULIYEVA, A.; BRUN, A.; AERTS, A.L.; BAILEY, A.M.; BILLETTE, C.; COUTINHO, P.M.; DEAKIN, G.; DODDAPANENI, H.; FLOUDAS, D.; GRIMWOOD, J.; HILDÉN, K.; KÜESO, U.; LABUTTI, K.M.; LAPIDUS, A.; LINDQUIST, E.A.; LUCAS, S.M.; MURATA, C.; RILEY, R.W.; SALAMOV, A.A.; SCHMUTZ, J.; SUBRAMANIAN, V.; WÖSTEN, H.A.B.; XU, J.; EASTWOOD, D.C.; FOSTER, G.D.; SONNENBERG, A.S.M.; CULLEN, D.; VRIES, R.P.de; LUNDELL, T.; HIBBETT, D.S.; HENRISSAT, B.; BURTON, K.S.; KERRIGAN, R.W.; CHALLEN, M.P.; GRIGORIEV, I.V.; MARTIN, F. - Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. **Proceedings in National Academic Science - PNAS**, v.109, n. 43, p. 17501–17506, 2012.
- 76 - PINZARI, F.; TATE, J.; BICCHIERI, M.; RHEE, Y.J.; GADD, G.M. - Biodegradation of ivory (natural apatite): possible involvement of fungal activity in biodeterioration of the Lewis Chessmen. **Environmental Microbiology**, v.15, n.4, p. 1050–1062, 2013.
- 77 - RAJKUMAR, M.; SANDHYA, S.; PRASAD, M.N.V.; FREITAS, H. - Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1562–1574, 2012.
- 78 - SIQUEIRA, J.O.; de SOUZA F.A; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. – **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Editora UFLA, Lavras, 716 p., 2010.
- 79 - BRUNDRETT, M.C. - **Mycorrhizas in natural ecosystems**. In: Macfayden A, Begon M, Fitter AH (eds.) *Advances in Ecological Research*, v. 21, p. 171-313. Academic Press, London. 1991.
- 80 - BRUNDRETT, M.C. - Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. **New Phytologist**, v. 154, p. 275-304, 2002.

- 81 - BECHEM, E.E.T.; ALEXANDER, I. J. - Mycorrhiza status of *Gnetum* spp. in Cameroon: evaluating diversity with a view to ameliorating domestication efforts. **Mycorrhiza**, v. 22, p. 99–108, 2012. DOI 10.1007/s00572-011-0384-0
- 82 - NATARAJAN, K.; KANNAN, K. - On the occurrence of *Scleroderma citrinum* in India. **Current Science**, v. 48, n. 24, p. 1086-7, 1979.
- 83 - BONITO, G.; BRENNEMAN, T.; VILGALYS, R. - Ectomycorrhizal fungal diversity in orchards of cultivat pecan (*Carya illinoensis*; Juglandaceae). **Mycorrhiza**, v, 21, p. 601–612, 2011.
- 84 - HENKEL, T.W.; TERBORGH, J.; VILGALYS, R.J. - Ectomycorrhizal fungi and their leguminous hosts in the Pakaraima Mountains of Guyana. **Mycological Research**, v. 106, n. 5, p. 515–531, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0953756202005919>.
- 85 - STRYER, L. - **Bioquímica**. 4ª Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1104 p., 1995.
- 86 - HARTMANN, T. - From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2831–2846, 2007.
- 87 - FACCHINI, P.J. - Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 29-66, 2001.
- 88 - PERES, L.E.P. - **Metabolismo secundário** (Apostila). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - lazaropp@esalq.usp.br, 2004.
- 89 - CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. - Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L., eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. **American Society of Plant Physiologists** (ASPP), Rockville, p. 1250–1318, 2000.
- 90 - BISSET, N.G. - War and hunting poisons of the New World. Part 1. Notes on the early history of curare. **Journal Ethnopharmacology**, v. 36, p. 1-26, 1992.
- 91 - WU, S.; CHAPPELL, J. - Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p.145–152, 2008.
- 92 - VERDAM, M.C. dos S.; da SILVA, C.B. - O estudo de plantas medicinais e a correta identificação botânica. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 11, n. 1, p. 7-13, 2010.
- 93 - DREWS, J. - Drug discovery: a historical perspective. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 1960-1964, 2000.
- 94 - PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V. da S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R. de A. - Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.
- 95 - PÉREZ, J.A.G. - **Panorama actual de la química farmacêutica** – Sevilla, Universidad de Sevilla, Secretariado de Publicaciones, 385 p., 2004.
- 96 - BARREIRO, E.J.; FRAGA, C A.M. - **Química medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**, **Artmed**, 2008, 2ª edição, Porto Alegre, 526 p.
- 97 - HUBBARD, B.K.; WALSH, C.T. - Vancomycin assembly: nature's way. **Angewandte Chemie International**, v. 42, n. 7, p. 730-765, Ed. 2003.
- 98 - CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. - Biodiversity: A continuing source of novel drug. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, p. 7-24, 2005.
- 99 - KALANT, H. ROSCHLAU, W.H.E. - **Princípios da Farmacologia Médica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 5ª edição, 688 p., 1989.

- 100 - COUTINHO, A.C. - **Dicionário enciclopédico de Medicina**. 3ª ed. Argo Editora. Lisboa, Portugal, 2533 p., 1997.
- 101 - BUTLER, M.S. - The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal Natural Product**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.
- 102 - ANVISA, portaria SVS/MS nº 344 de 12 de maio de 1998, em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/conceito.htm#1.1>, acesso em 28/05/2013.
- 103 - LAM, K.S. - New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 279-289, 2007.
- 104 - YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D.; SUFFREDINI, I.B. - Selection, extraction and identification of new anti-cancer drugs from Brazilian plants. **Acta Oncológica Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 15-19, 2000.
- 105 - YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D.; SUFFREDINI, I.B. - Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics**, v. 62, n. 6, p. 763-768, 2007.
- 106 - CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. - Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 112-116, 1997.
- 107 - NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M. - The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Report**, v. 17, p. 215-234, 2000.
- 108 - KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. - The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 206-220, 2005.
- 109 - RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. - **Botânica econômica brasileira**. São Paulo, EPU, EDUSP, 119 p., 1976.
- 110 - GILBERT, K.G.; COOKE, D.T. - Dyes from plants: past usage, present understanding and potential. **Plant Growth Regulation**, v. 34, p. 57-69, 2001.
- 111 - VAINSTEIN, A.; LEWINSOHN, E.; PICHESKY, E.; WEISS, D.- Floral fragrance. New inroads into an old commodity. **Plant Physiology**, v. 127, p.1383-1389, 2001.
- 112 - BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CAMARA, B. - Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (Annatto). **Science**, v. 300, p. 2089-2091, 2003b.
- 113 - TAIZ, L., ZEIGER, E. - **Plant physiology**. California, The Benjamin/Cummings Publishing Co., 559 p., 1998.
- 114 - BRISKIN, D.P. - Medical plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. - **Plant Physiology**, v. 12, p. 507-514, 2000.
- 115 - HERRMANN, K.M. & WEAVER, L.M. - The shikimate pathway. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 473-503, 1999.
- 116 - SCHIJLEN, E.G.W.M.; RIC DE VOS, C.H.; VAN TUNEN, A.J.; BOVY, A.G. - Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2631-2648, 2004.
- 117 - MÜLLER, S.D.; VASCONCELOS, S.B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M.W. - LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 399-403, 2005.
- 118 - SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A.R.; SIMONIC, M.; KNEZ, Z. - Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 8, p. 191-198, 2005.

- 119 - SIMMEN, U.; SALADIN, C.; KAUFMANN, P.; PODDAR, M.; WALLIMANN, C.; SCHAFFNER, W. - Preserved pharmacological activity of hepatocytes-treated extracts of valerian and St. John's wort. **Planta Medica**, v. 71, n. 7, p. 592-598, 2005.
- 120 - TAI, M.C.; TSANG, S.Y.; CHANG, L.Y.F.; XUE, H. - Therapeutic potential of wogonin: a naturally occurring flavonoid. **Central Nervous System Drug Reviews**, v. 11, n. 2, p. 141-150, 2005.
- 121 - BETA, T.; NAM, S.; DEXTER, J.E.; SAPIRSTEIN, H.D. - Phenolic content and antioxidant activity of pearled. **Wheat Cereal Chemistry**, v. 82(4), p. 390-393, 2005.
- 122 - MAHMOUD, S.S.; CROTEAU, R.B. - Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. **Proceeding in National Academic Science**, v. 98, n. 15, p. 8915-8920, 2001.
- 123 - CORDELL, G.A., CHOI, T. - **Photochemistry and Pharmacognosy - Alkaloids and their biosynthesis**. E-Book. Disponível em: www.eolss.net/Sample-Chapters/C06/E6-151-04.pdf. Acesso em: julho 2013.
- 124 - MOLYNEUX, R.J.; GARDNER, D.L.; COLEGATE, S.M.; EDGAR, J.A. - Pyrrolizidine alkaloid toxicity in livestock: a paradigm for human poisoning? **Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, v. 28, n. 3, p. 293-307, 2011.
- 125 - HEMMERLIN, A.; HOFFLER, J.F.; MEYER, O.; TRITSCH, D.; KAGAN, I.A.; GROSDEMANGE-BILLIARD, C.; ROHMER, M.; BACH, T.J. - Cross-talk between the cytosolic mevalonate and the plastidial methylerythritol phosphate pathways in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 29, p. 26666-26676, 2003.
- 126 - WALKER, J.R.; POULTER, C.D. - Synthesis and evaluation of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate analogues as chelation-based inhibitors of methylerythritol phosphate synthase. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 9955-9959, 2005.
- 127 - ZWENGER, S.; BASU, C. - Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 001-007, 2008.
- 128 - LIRA, P.N.; DA SILVA, J.K.; ANDRADE, E.H.; SOUSA, P.J.; SILVA, N.N.; MAIA, J.G. - Essential oil composition of three *Peperonia* species from the Amazon, Brazil. **Natural Product Communications**, v. 4, p. 427-430, 2009.
- 129 - LANGE, B.M.; WILDUNG, M.R.; McCASKILL, D.; CROTEAU, R. - A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. **Proceeding in National Academic Science**, v. 95, p. 2100-2104, 1998.
- 130 - KORTH, K.L.; JAGGARD, D.A. & DIXON, R. - Developmental and light-regulated post-translational control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase levels in potato. **The Plant Journal**, v. 23, n. 4, p. 507-516, 2000.
- 131 - MAHMOUD, S.S.; CROTEAU, R.B. - Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 8, p. 366-373, 2002.
- 132 - RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; FORÉS, O.; MARTÍNEZ-GARCÍA, J.F.; GONZÁLEZ, V.; PHILLIPS, M.A.; FERRER, A. & BORONAT, A. - Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during arabidopsis seedling development. **The Plant Cell**, v. 16, p. 144-156, 2004a.
- 133 - EISENREICH, W.; ROHDICH, F.; BACHER, A. - Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 2, 78-84, 2001.

- 134 - ESTÉVEZ, J.M.; CANTERO, A.; REINDL, A.; REICHLER, S.; LEÓN, P. - 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 22901–22909, 2001.
- 135 - RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; BORONAT, A. - Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1079-1089, 2002.
- 136 - DUBEY, V.S.; BHALLA, R. & LUTHRA, R. - An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Bioscience**, v. 28, n. 5, p. 637–646, 2003.
- 137 - PROTEAU, P.J. - 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: an overview. **Bioorganic Chemistry**, v. 32, p. 483-493, 2004.
- 138 - NEWMAN J.D., CHAPPELL, J. - Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34(2), p. 95–106, 1999.
- 139 - MURATA, T.; MIYASE, T.; MUREGI, F.W.; NAOSHIMA-ISHIBASHI, Y.; UMEHARA, K.; WARASHINA, T.; KANOU, S.; MKOJI, G.M.; TERADA, M.; ISHII, A. - Antiplasmodial triterpenoid from *Ekebergia capensis*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 2, p. 167–174, 2008.
- 140 - MARX, D.H. - The practical significance of ectomycorrhizae in forest establishment. In: **The Marcus Wallenberg foundation Symposia Proceedings:7**. M. Wallenberg Foundation, Stockholm: p. 54-90, 1991.
- 141 - MARX, D.H.; MAUL, S.B.; CORDELL, C.E. - Application of specific ectomycorrhizal fungi in Wood Forestry. In: **LEATHAM, G.F. (Ed.). Frontiers in Industrial Mycology**. Chapman & Hall, New York, USA. p. 78-98, 1992.
- 142 - ALLEN, M.F. - **The ecology of mycorrhizae**. University Press, 1991. Cambridge UK. 184 p.
- 143 - MARX, D.H. - Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. **Annual Review Phytopathology**, v. 10, p. 429–454, 1972.
- 144 - SYLVIA, D.M.; SINCLAIR, W.A. - Phenolic compounds and resistance to fungal pathogens induced in primary roots of Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. **Phytopathology**, v. 73, p. 390-397, 1983.
- 145 - PATERSON, R.R.M. - Standardized one- and two-dimensional thin-layer chromatographic methods for the identification of secondary metabolites in *Penicillium* and other fungi. **Journal of Chromatography**, v. 368, p. 249-264, 1986.
- 146 - ESSER, K. - **The Mycota**. Anke, T.; Weber, D. Volume XV: Physiology and genetics: selected basic and applied aspects. 1^a ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009.
- 147 - ROHLFS, M.; TRIENENS, M.; FOHGRUB, U.; KEMPKEN, F. - **Evolutionary and ecological interactions of mould and insects**. In: Esse, K. (ed.). *The Mycota*. Volume XV – Cap. 7. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009.
- 148 - SCHÜFFLER, A.; ANKE, TIMM. - **Secondary Metabolites of Basidiomycetes**. In: Esser, K. (ed.). *The Mycota*. Volume XV – Cap. 10. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009.
- 149 - VELÍŠEK, J.; CEJPEK, K. - Pigments of higher fungi: a review. **Czech Journal of Food Science**, v. 29, n. 2, p. 87–102, 2011.
- 150 - ABRAHAM, W.R. - Bioactive sesquiterpenes produced by fungi: are they useful for humans as well? **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 583–606, 2001.

- 151 - ALVES, M.J.; FERREIRA, I.C.F.R.; DIAS, J.; TEIXEIRA, V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. - A Review on Antimicrobial Activity of Mushroom (Basidiomycetes) Extracts and Isolated Compounds. **Planta Medica**, v. 78, n. 16, p. 1707-1718, 2012. DOI: 10.1055/s-0032-1315370.
- 152 - NEHLS, U.; MIKOLAJEWSKI, S.; MAGEL, E.; HAMPP, R. - Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizas: gene expression, monosaccharide transport and metabolic control. **New Phytologist**, v. 150, p. 533-541, 2001.
- 153 - MAHMOOD, Z.A.; AHMED, S.W.; AZHAR, I.; SUALEH, M.; BAIG, M.T.; ZOHA, S.M.S. - Bioactive alkaloids produced by fungi. I. Updates on alkaloids from the species of the genera *Boletus*, *Fusarium* and *Psilocybe*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v. 23, n. 3, p. 349-357, 2010.
- 154 - COLLEMARE, J.; BILLARD, A.; BOHNERT, H.U.; LEBRUN, M.H. - Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: the role of hybrid PKS-NRPS in pathogenicity. **Mycological Research**, v. 112, p. 207-215, 2008.
- 155 - LORENZEN, K.; ANKE, T. - Biologically active metabolites from basidiomycetes. **Current Organic Chemistry**, v. 2, p. 329-364, 1998.
- 156 - MARICHAL, P.; VANDENBOSSCHE, H. - Mechanisms of resistance to azole antifungals. **Acta Biochimica Polonica**, v. 42, p. 509-516, 1995.
- 157 - RUSSELL, D.W. - Cholesterol biosynthesis and metabolism. - **Cardiovascular Drugs and Therapy**, n. 6, p. 103-110, 1992.
- 158 - MACMURRY, J. - **Química Orgânica** - LTC editora, Rio de Janeiro, 4ª edição 660 p., 1997.
- 159 - ABE, I.; ROHMER, M.; PRESTWICH, G.D. - Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. **Chemical Reviews**, v. 93 (6), p. 2189-2206, 1993.
- 160 - KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; PRAJUABSUK T.; SOYTONG, K.; KONGSAEREE, P.; SUKSAMRARN, A. - A bioactive triterpenoid and vulpinic acid derivatives from the mushroom *Scleroderma citrinum*. **Planta Medica**, v. 69, p. 568-571, 2003.
- 161 - WINNER, M.; GIMNEZ, A.; SCHMIDT, H.; SONTAG, B.; STEFFAN, B.; STEGLICH, W. - Unusual pulvinic acid dimers from the common fungi *Scleroderma citrinum* (Common Earthball) and *Chalciporus piperatus* (Peppery Bolete). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, p. 1883 - 1886, 2004.
- 162 - KARDONO, L.B.S.; BASUKI, T.; TRIANADEWI, R.; KAWANISHI, K. - Chemical constituents of *Scleroderma aurantium* I: a new triterpene, 3,25-Dihydroxy-22-acetoxyl-lanosta-8,23-diene. **Eurasian Journal of Forest Research**, v. 5, p. 33-37, 2002.
- 163 - ENTWISTLE, N.; PRATT, A.D. - 23 ξ -hydroxy-lanosterol - A new triterpene fungal metabolite of the Basidiomycete *Scleroderma aurantium*, **Tetrahedron**, v. 24(10), p. 3949-53, 1968.
- 164 - TRAPP M.A., GOMES, D.Z., RODRIGUES FILHO, E. - Triterpenos lanostanos obtidos do fungo *Scleroderma sp.*, 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, **Anais**, 2007.
- 165 - VRKOČ, J.; BUDĚŠÍNSKÝ, M.; DOLEJŠ, L. - Constituents of the basidiomycete *Scleroderma aurantium*, **Phytochemistry**, v. 15, Issue: 11, p. 1782-1784, 1976.
- 166 - VAN DER SAR, S.A.; BLUNT, J.W.; COLE, A.L.J.; DIN, L.B.; MUNRO, M.H.G. - Dichlorinated pulvinic acid derivative from Malaysian *Scleroderma sp.* **Journal Natural Product**, v. 68, p. 1799-1801, 2005.
- 167 - GOMES, D.Z.; TRAPP, M.A.; RODRIGUES FILHO, E. - Triterpenos lanostanos obtidos do fungo *Scleroderma sp.*: isolamento e identificação de dois isômeros. **Anais**, 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008.

- 168 - LUPATINI, M.; de MELLO A.H.; ANTONIOLLI, Z.I. - Caracterização do DNA ribossômico do isolado de *Scleroderma UFSCSc1* de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex-Maiden, **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2677-2682, Número Especial, 2008.
- 169 - LUPATINI, M.; MELLO, A.H.; ANTONIOLLI, Z.I. - Ribossomal DNA characterization of *Scleroderma UFSCSc1* ectomycorrhizal fungi from *Eucalyptus grandis* (W. Hill ex-Maiden). 2007. Número de acesso ao GenBank: EF517491.
- 170 - MARX, D.H. - The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic inflections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, v. 59, p. 153-163, 1969.
- 171 - National Committee for Clinical Laboratory Standards, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard; 5th ed. CLSI document M7-A5, Wayne, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standard, 2002.
- 172 - National Committee for Clinical Laboratory Standards, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: approved standard. CLSI document M27-A2. Wayne, PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.
- 173 - LEHTINEN, J., JÄRVINEN, S., VIRTA, M.A., LILIUS, E.M. - Real-time monitoring of antimicrobial activity with the multiparameter microplate assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 381–389, 2006.
- 174 - AMANN, A.; OURISSON, G.; LUU, B. – A novel synthesis of 22-hidroxyated triterpenes and steroids: syntheses of 22R- hidroxylanosterol and 22R-hidroxydesmosterol. **Synthesis**, v. 8, p. 696-700, 1987.
- 175 - ENTWISTLE, N.; PRATT, A.D. - Studies of artefacts of the acid treatment of (23S)-lanosta-8,24-diene-3 β ,23-diol. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry** (1972-1999) (12), p. 1235-1239, 1973.
- 176 - SOLOMON, P.S., WATERS, O.D.C.; OLIVER, R.P. - Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. **TRENDS in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 257-262, 2007.
- 177 - http://www.merckmillipore.com.br/pharmaceutical-ingredients/parteck-m/c_l2Ob.s1OTLgAAAEtlaM.w6jr, acesso em 07/07/2013.
- 178 - OLIVEIRA, P.S.M. de; FERREIRA, V F. I.; SOUZA, M V.N. de. - Utilização do D-manitol em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 32, n. 2,441-452, 2009.
- 179 - Poliois, aditivos e ingredientes. http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/81.pdf, acesso em 07/07/2013.
- 180 - MOREIRA, B.T. - Bioprospecção do potencial farmacêutico de duas espécies de fungos do solo do cerrado mineiro. **Dissertação**, UFOP- 2009
- 181 - HAGIWARA, S. TAKAHASHI, M.; SHEN, Y.; KAIHOU, S.; TOMIYAMA, T.; YAZAWA, M.; TAMAI, Y.; SIN, Y.; KAZUSAKA, A.; TERAZAWA. A. - A Phytochemical in the Edible Tamogi-take Mushroom (*Pleurotus cornucopiae*), D-Mannitol, Inhibits ACE Activity and Lowers the Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rats. **Bioscience Biotechnology Biochem**, v. 69 (8), p. 1603–1605, 2005.
- 182 - WOODRUFF, P.J.; CARLSON, B.L.; SIRIDECHADILOK, B.; PRATT, M.R.; SENARATNE, R. H.; MOUGOUS, J.D.; RILEY, L.W.; WILLIAMS, S.J.; BERTOZZI, C.R. - Trehalose Is Required for Growth of *Mycobacterium smegmatis*. **The journal of biological chemistry**, v. 279, n. 28, Issue of July 9, p. 28835–28843, 2004.
- 183 - <http://scifinder.cas.org/scifinder/login>. Acesso em 03/08/2013.

- 184 - <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=7427#x27>. Acesso em 03/08/2013.
- 185 - NOGUEIRA, R.C.; de CERQUEIRA, H.F.; SOARES, M.B.P. - Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 20(2), p. 1-13, 2010.
- 186 - NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. - Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal Natural of Product**, v. 70, p. 461-477, 2007.
- 187 - CLARIDGE, A.W. - Ecological role of hypogeous ectomycorrhizal fungi in Australian forests and woodlands. **Plant and Soil**, v. 244, p. 291–305, 2002.
- 188 - CHU, E.Y. - Embrapa Amazônia Oriental, Sistemas de Produção, 01 ISSN 1809-4325 Versão Eletrônica. 2005.

8. ANEXOS

8.1 Meios de cultura utilizados:

8.1.1. Meio Melin-Norkans Modificado – MNM

8.1.1.1. Soluções estoque

Ingrediente	Quantidade g/L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	6,7 g
NaCl	2,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	15,0 g
Tiamina	0,01 g
KH ₂ PO ₄	50,0 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	25,0 g
FeCl ₃	10,0 g

As soluções acima foram preparadas antecipadamente e armazenadas em geladeira.

8.1.1.2. Solução Estoque de Micronutrientes (200 mL).

Ingrediente	Quantidade g/L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,200 g
MnSO ₄ .H ₂ O ou MnSO ₄ .7H ₂ O	0,1414 g ou 0,235 g
H ₃ BO ₃	0,280 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,008 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,024 g
Água destilada	200 mL

A solução de micronutrientes foi preparada antecipadamente e armazenada em geladeira.

8.1.1.3. Preparo do meio Melin-Norkans Modificado – MNM

- 10 mL de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Tiamina, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e 1,2 mL de FeCl_3 para cada litro de meio de cultura preparado.
- 2 mL de solução de micronutrientes.
- 10 g de glicose.
- 3,0 mL de extrato de malte
- Ajustar o pH em 5,8.
- Para o preparo de meio sólido acrescentar 16 g de Ágar e autoclavar pelo período de 15 – 20 minutos.

8.1.2. Meio Agar Müller-Hinton: meio utilizado para o repique de bactérias

Ingredientes	Quantidade g/mL
Infuso de carne	300 g
Caseína hidrolisada	17,5 g
Amido	1,5 g
Ágar-ágar	17,0 g
Água destilada	1000,0 mL

Preparado conforme as instruções do fabricante: reidratação 38,0 g em água destilada, em seguida esterilização em autoclave por 15 minutos a 120 °C.

8.1.3. Meio Caldo Müller-Hinton

Meio utilizado para o cultivo de bactérias nos ensaios de concentração inibitória mínima.

Ingredientes	Quantidade g/mL
Infuso de carne	300 g
Caseína hidrolisada	17,5 g
Amido	1,5 g
Água destilada	1000,0 mL

Preparado conforme as instruções do fabricante: reidratação de 38,0 g em água destilada, em seguida esterilização em autoclave por 15 minutos a 120 °C.

8.1.4. Meio Agar Sabouraud

Meio utilizado para o repique de fungos.

Ingredientes	Quantidade g/mL
Peptona	10,0 g
Dextrose	40,0 g
Ágar-ágar	15,0 g
Água destilada	1000,0 mL

Reidratou-se em 1000 mL de água destilada 65,0 g do meio, com aquecimento até a fusão do ágar. Posteriormente, cerca de 5,0 mL foram distribuídos em tubos de ensaio 16 X 150 mm e esterilizados em autoclave a 120 °C por 20 minutos. Após a esterilização, os tubos foram mantidos inclinados até a sua solidificação.

8.1.5. Meio Caldo Sabouraud

Meio utilizado para o cultivo de fungos nos ensaios de concentração inibitória mínima.

Ingredientes	Quantidade g/mL
Peptona de carne	5,0 g
Dextrose	40,0 g
Peptona de caseína	5,0 g
Água destilada	1000,0 mL

Preparado conforme as instruções do fabricante: reidratação de 38,0 g em água destilada, em seguida esterilização em autoclave por 15 minutos a 120 °C.

8.1.6. Solução salina 0,85 %

Esterilizada por autoclavação a 121 °C por 15-20 min.

8.2. Solventes e reagentes purificados

Os solventes e reagentes utilizados foram produtos analiticamente puros Vetec, Nuclear, Tedia e Merck. Em certos casos foram utilizados solventes nível técnico que receberam tratamentos com técnicas específicas de purificação, obtendo-se assim produtos de melhores condições de umidade e possíveis contaminantes.

Os principais solventes utilizados foram:

Acetato de etila (AcOEt)

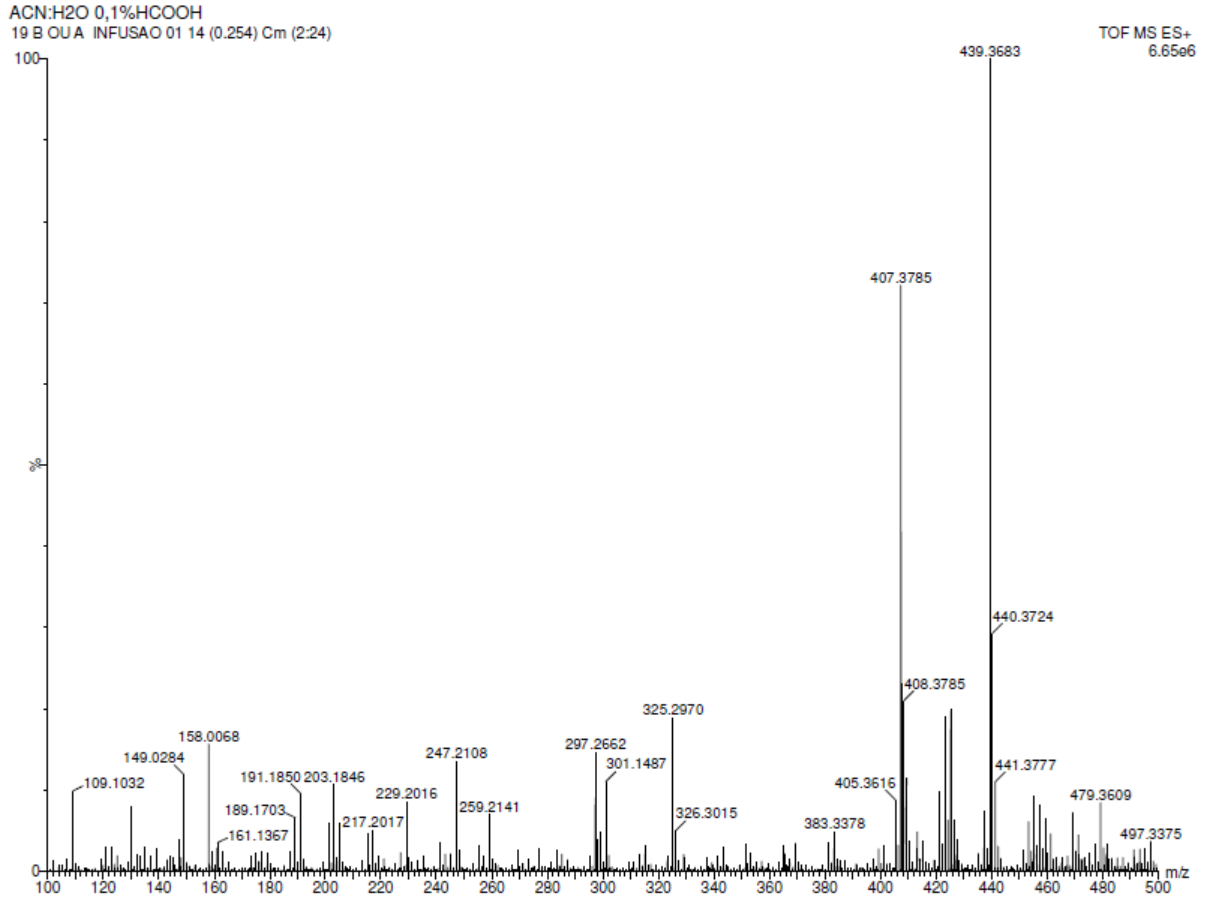
Diclorometano (CH₂Cl₂)

Hexano (n-Hexano)

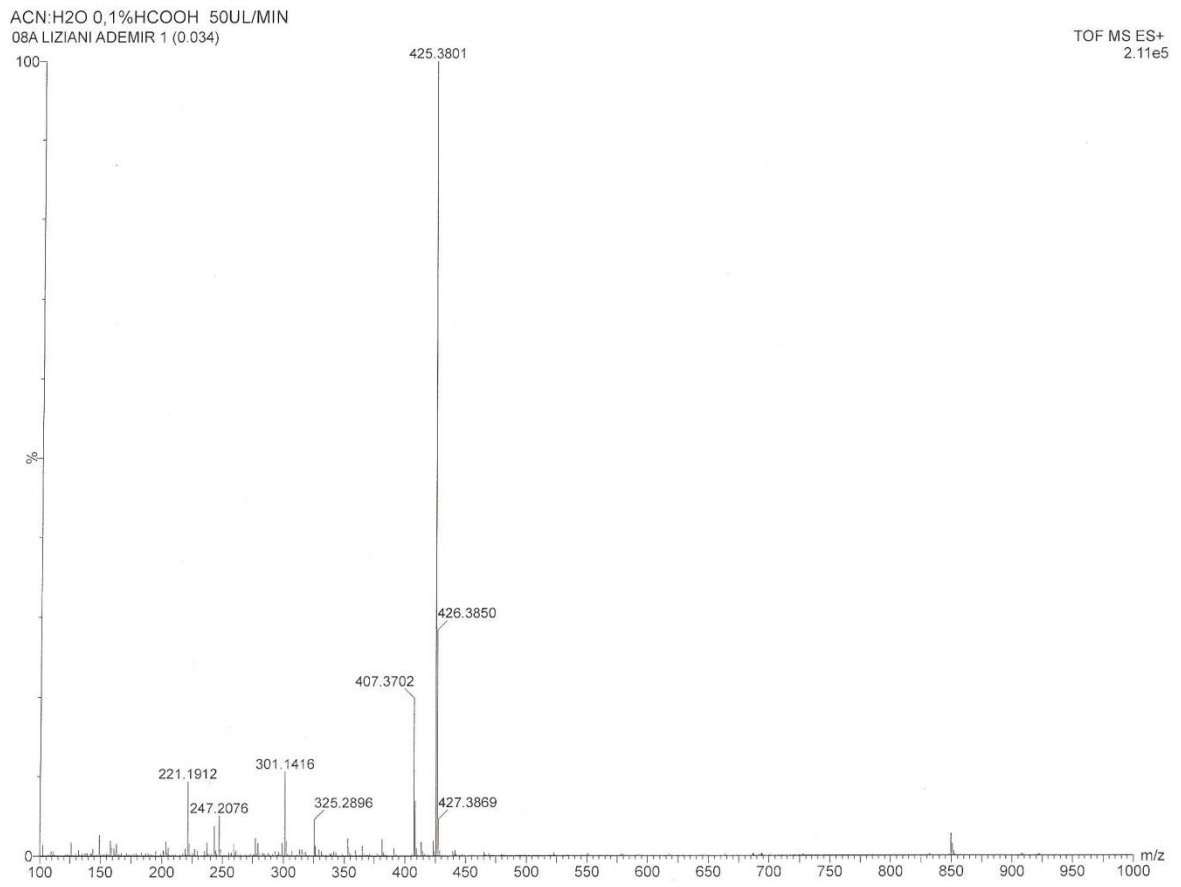
Metanol (MeOH)

Acetona (C₃H₆O)

8.3. Espectrometria de massa de alta resolução



Anexo 1: Espectrometria de massa de alta resolução do composto **SC7**



Anexo 2: Espectrometria de massa de alta resolução do composto **SC7-1**