



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química



NuBBE “*Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais*”

Bioprospecção dos fungos endofíticos associados as variedades morfoanatômicas de *Casearia sylvestris* e estudo químico de *Preussia* sp. por abordagens OSMAC

Andressa Somensi
Departamento de Química Orgânica

Araraquara
2016

ANDRESSA SOMENSI

Bioprospecção dos fungos endofíticos associados as variedades morfoanatômicas de
Casearia sylvestris e estudo químico de *Preussia* sp. por abordagens OSMAC

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araujo

Araraquara

2016

ANDRESSA SOMENSI

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Araraquara, 02 de dezembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Angela Regina Araújo (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Profª Drª Maysa Furlan
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCar, São Carlos - SP



Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto
Instituto de Química – USP, São Carlos -SP



Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto - SP

FICHA CATALOGRÁFICA

S693b Somensi, Andressa
Bioprospecção dos fungos endofíticos associados as variedades morfoanatômicas de *Casearia sylvestris* e estudo químico de *Preussia* sp. por abordagens *OSMAC*/ Andressa Somensi. – Araraquara : [s.n.], 2016
190 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Angela Regina Araujo

1. Produtos Naturais. 2. Fungos endofíticos. 3. *Casearia sylvestris*. 4. Metabólitos. 5. Xantona. I. Título.

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome: Andressa Somensi

Nome em citações bibliográficas: SOMENSI, A.

Endereço Profissional

NuBBE “Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais”
Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara –
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, Araraquara – SP.
Rua Prof. Francisco Degni, 55 – Araraquara-SP, CEP: 14081-970, SP - Brasil

E-mail: andressasomensi@gmail.com

Formação Acadêmica

2012-2016

Doutorado em Química - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Instituto de Química, Araraquara - SP.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araujo.

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

2010-2012

Mestrado em Química - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Instituto de Química, Araraquara - SP.

Título: Desreplicação dos metabólitos secundários produzidos por *Phomopsis stipata*, um endófito de *Styrax camporum* (Styracaceae).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araujo

Bolsa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

2003-2009

Graduação em Química Bacharelado - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Toledo - PR.

Título da Monografia: Estudo fitoquímico do extrato diclorometânico da raiz da espécie *Vernonia tweediana*.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Conceição de Fátima Alves Olguin

Bolsista de Iniciação Científica (2008-2009) – PIBIC - Fundação Araucária - Título do projeto: Avaliação do extrato diclorometânico da raiz da espécie *Vernonia tweediana*.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Conceição de Fátima Alves Olguin.

Bolsista de Iniciação Científica (2006-2007) – PIBIC - Unioeste - Título do projeto: Investigação fitoquímica biomonitorada do extrato acetato de etila da raiz da *Vernonia tweediana*. Orientadora: Prof^a. Dr^a Conceição de Fátima Alves Olguin.

Bolsista de Iniciação Científica (2005-2006) – PIBIC - Unioeste - Título do projeto: Estudo fitoquímico biomonitorado do extrato hexânico da Raiz da *Vernonia tweediana*.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Conceição de Fátima Alves Olguin.

Formação Acadêmica complementar

2015-2015

Licenciatura em Química - Curso: Programa Especial de Formação Pedagógica R2, Faculdade Polis das Artes (FEP), Embu das Artes - SP.

Produção Bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

- a) AMORIN, M.; SOMENSI, A. ARAUJO, A. R.; BONIFÁCIO, B.; BAUAB, T.; DOS SANTOS, L. C. Compounds of *Anthostomella brabeji*, an endophytic fungus isolated from *Paepalanthus planifolius* (Eriocaulaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1048-1054, 2016.
- b) DIAZ, G; NOGUEIRA, M A.; OLGUIN, C. F. A.; SOMENSI, A; VIDOTTI, G. J. Estudo Fitoquímico e Biológico de *Vernonia tweediana* Baker (Asteraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense** ^{JCR}, v. 1, p. 56-61, 2008.
- c) OLGUIN, C. F. A.; CARBONESI, L. H.; PERCIO, M. F.; SOMENSI, A. Avaliação da Atividade Biológica de Extratos Fracionados da Raiz da *Vernonia tweediana* Baker. **Varia Scientia**, v.5, p. 137-143, 2007.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

- a) BIASETTO, C. R.; SOMENSI, A.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; ARAUJO, A. R. Metabolites of *Xylaria cubensis* and *Colletotrichum* sp., endophytic fungi from *Eugenia brasiliensis*. In: 5nd Brazilian Conference on Natural Products (5nd BCNP) and the XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXXI RESEM), 2015, Atibaia-SP, Brasil.
- b) RATSBONE, Y.; ARAUJO, A. R.; SOMENSI, A. Perfil metabólico e fitotóxicidade de *Preussia* sp. Utilizando método OSMAC In: XXVII Congresso de Iniciação Científica da Unesp (CIC), 2015, Araraquara-SP, Brasil.
- c) BIASETTO, C. R.; SOMENSI, A.; MEDINA, R. P.; ARAUJO, A. R.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; YOUNG, M. C. M.; FERREIRA, P. M. P. Metabolites produced by *Diaporthe* sp., an endophytic fungus from *Eugenia brasiliensis* (Myrtaceae). In: 31nd Congresso Latinoamericano de Química (CLAQ-2014) and XXVII Congreso Peruano de Química, 2014, Lima-Peru.
- d) PRECCARO, M.; MEDINA, R. P.; BIASETTO, C. R.; SOMENSI, A.; YOUNG, M.C.M.; YOKOYA, N. S.; LOPES, M. N.; ARAUJO, A. R.; SILVA, D. H. S. Bioprospecção de fungos endofíticos das algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* e *Pyropia spiralis*. In: 37ª Reunião Anual da SBQ, 2014, Natal-RN, Brasil.
- e) MEDINA, R.; BIASETTO, C.; SOMENSI, A.; YOKOYA, N.; LOPES, M.; ARAUJO, A.; SILVA, D. 5-Hydroxymethylmellein: an isocoumarin derivative from an endophytic fungus from red alga *Asparagopsis taxiformis*. In: 62ª International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), 2014, Guimarães-Portugal.
- f) SOMENSI, A.; BIASETTO, C. R.; RUFINO, M. P.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; YOUNG, M. C. M.; ARAUJO, A. R. Dereplication of endophytic fungi using NMR virtual design and hyphenated techniques. In: 4nd Brazilian Conference on Natural Products (4nd BCNP) and the XXX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXX RESEM), 2013, NatalRN, Brasil

- g) BIASETTO, C. R.; SOMENSI, A.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; YOUNG, M. C. M.; ARAUJO, A. R. Endophytic fungi from *Eugenia brasiliensis*: a bioprospection. In: 4nd Brazilian Conference on Natural Products (4nd BCNP) and the XXX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXX RESEM), 2013, Natal-RN, Brasil.

Participações em reuniões científicas

- a) First Brazilian Workshop on Bioinformatics/Chemometrics for Metabolomics, 2015, USP, Ribeirão Preto-SP, Brasil. VI Workshop do NuBBE, 2015, IQ/UNESP, Araraquara-SP, Brasil.
- b) VI Workshop do NuBBE, 2015, IQ/UNESP, Araraquara-SP, Brasil.
- c) Workshop dos Programas de Pós-Graduação em Química e em Biotecnologia: Entrepreneurship for Graduate in Chemistry: a Glance for Brazilian Competitiveness Innovation & Development 2014, Araraquara (Instituto de Química de Araraquara-UNESP)- SP.
- d) Simpósio Recent Advances in NMR Spectroscopy: A Powerful Tool for Fundamental and Applied Research, 2014, IQ/UNESP, Araraquara-SP, Brasil.
- e) VIII Reunião de Avaliação do Programa BIOTA/FAPESP, 2014, São Pedro-SP.
- f) São Paulo School of Advanced School on Bioorganic Chemistry (ESPCA), 2013, Araraquara (UNESP)-SP.
- g) 4nd Brazilian Conference on Natural Products (4nd BCNP) and the XXX Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology (XXX RESEM), 2013, Natal-RN. Apresentação Oral e Painel: - Dereplication of endophytic fungi using NMR virtual design and hyphenated techniques.

Participações em cursos de curta duração

- a) Participação no curso: **“Introduction to NMR and Metabolomics”**, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara-UNESP, 2014, SP, Brasil.
- b) Participação no curso: **“Introduction to metabolomics and chemometrics applied to natural product chemistry”**, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara-UNESP, 2014, SP, Brasil.

- c) Participação no curso: **“Aspectos práticos da interpretação de espectros de massas com ionização por electrospray e MALDi, e sua aplicação na análise do metabolismo de produtos naturais”** (Carga horária: 8h), 2014, BIOTA/FAPESP, São Pedro, SP, Brasil.

Supervisão Científica

- a) Yan Ratsbone, graduando em Engenharia Química. Projeto: Fungos endofíticos: recursos renováveis na produção de metabólitos secundários novos e bioativos. Iniciação Científica 2014-2016. IQ/Unesp, Araraquara-SP, CNPq.
- b) Florentine Haug, aluna pelo programa IAESTE. Projeto: Estudo do potencial químico e biológico dos endófitos associados a *Casearia sylvestris* var. *sylvestris* e *Casearia sylvestris* var. *lingua* e avaliação da influência de moduladores epigenéticos. Estágio no período de 01/08/2014 a 30/09/2014. IQ/Unesp, Araraquara-SP.

Dedico esta tese

*À minha família, por me ajudarem a encontrar meu caminho em todos os momentos da
minha vida*

*Às minhas amigas Carolina Rabal Biasetto e Rebeca Medina Previati, e hoje escrevo
esta tese de Doutorado, é que em vocês encontrei todo apoio, motivação e superação
nesta caminhada.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Angela Regina Araujo, por ter aceitado orientar minha dissertação e em seguida minha tese, é uma honra ter tido estes seis anos de convivência. Ao longo desse período pude celebrar comigo momentos de vitória assim como demonstrar afeto, companheirismo, motivação e muitos outros adjetivos que serviram de inspiração nos momentos difíceis dessa trajetória.

À minha família, em especial aos meus pais e irmãos, que sempre me apoiaram e contribuíram cada um do seu jeito e com o que podiam, para que tudo fosse possível, sempre me proporcionaram incondicionalmente todos os requisitos necessários para chegar até aqui. Eles sempre foram e serão as minhas maiores inspirações do que é ser uma pessoa digna e guerreira.

Aos meus eternos grandes amigos – e anjos-da-guarda – Aline, Carol, Jupi, Marcelo, Micheli, Rebeca e Renata. Obrigada pela amizade tão especial, pelos maravilhosos momentos que passamos juntos e por sempre se fazerem presente. Eu não conseguiria ser justa, se tentasse citar aqui todos os motivos pelo qual sou grata a vocês, por isso: Obrigada por TUDO, e por serem estas pessoas tão especiais, que entraram na minha vida, cada um a sua maneira, para nunca mais sair.

A todos os amigos e colegas do IQ com quem convivi durante os anos de pós-graduação, em especial aos do Departamento de Química Orgânica e NuBBE, que de alguma maneira ou outra colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho, e também pelos momentos de alegria compartilhados que fizeram a rotina do laboratório e no Instituto ainda mais agradável.

Quero também deixar um agradecimento especial ao Yan Ratsbone, meu aluno de Iniciação Científica, pelo constante apoio, generosidade, pelas inerentes sugestões e contribuições.

À professora Lourdes Campaner e ao Dr. Nivaldo Boralle que participaram do exame de qualificação e contribuíram valiosamente com sugestões e ensinamentos.

Ao meu querido amigo Dr. Nivaldo Boralle, por tudo, pela amizade, paciência, pela experiência e pelos ensinamentos passados a cada experimento de RMN realizado.

Aos docentes do Departamento de Química Orgânica: Vanderlan S. Bolzani, Maysa Furlan, Alberto J. Cavalheiro, Lucia M. X. Lopes, Dulce H. Siqueira, Wagner Vilegas, Lourdes Campaner dos Santos, Ian Castro-Gamboa e Isabele Nascimento pelos ensinamentos transmitidos e pela amizade.

Aos técnicos e especialistas João Luis Bronzel, Juliana Rodrigues e Lucineia pelos inúmeros auxílios e dedicação impecável.

Ao Prof. Dr. Javier Ellena pela colaboração nos experimentos de Raios-X.

À Profa. Dra. Ilana L. B. C. Camargo, à Profa. Dra. Maria Cláudia Young, Prof. Dr. Paulo Michel e Profa. Dra. Claudia Pessoa pelos ensaios biológicos.

A todos os funcionários do Instituto de Química de Araraquara pela dedicação, competência e por serem sempre prestativos.

Agradeço também às agências de fomento à pesquisa FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro concedido.

Por fim, mas não menos importante, deixo um profundo e sincero agradecimento aos amigos que Araraquara me proporcionou, pessoas extremamente queridas por estarem sempre presentes, por todo o amor, carinho, dedicação, compreensão e apoio nos momentos mais difíceis.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso. ” (Charles Chaplin).

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção. ”

Paulo Freire

RESUMO

Micro-organismos associados a vegetais desempenham um papel importante na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Com isso, a busca por novas fontes de substâncias bioativas tem se intensificado, destacando os estudos realizados com fungos endofíticos, os quais apresentam uma elevada diversidade taxonômica e estrutural dos metabólitos secundários, sendo estes com potencial antitumoral, antimicrobiano e antifúngico. Estas observações motivaram o desenvolvimento do presente trabalho, o qual visa a bioprospecção dos fungos endofíticos associados as variedades morfoanatômicas da espécie vegetal *Casearia sylvestris* e o estudo do perfil metabolômico de *Preussia* sp por abordagens OSMAC (*One Strain Many Compounds*). Para tanto, o isolamento dos fungos endofíticos conduziu a vinte e quatro linhagens puras, sendo onze linhagens de *C. sylvestris* var. *lingua* e treze de *C. sylvestris* var. *sylvestris*, resultando em extratos brutos promissores na produção de substâncias bioativas. A bioprospecção inicial conduziu a seleção do fungo endofítico *Preussia* sp., afim de realizar um estudo químico da espécie por meio de abordagens OSMAC. O cultivo em laboratório, nem sempre mimetiza o habitat natural dos micro-organismos e não exploram de maneira completa toda diversidade das vias biossintéticas. Pequenas alterações nos parâmetros físicos e químicos de fermentação são capazes de modificar completamente o perfil metabolômico desses micro-organismos. Essas estratégias buscam elicitar novas rotas biossintéticas, aumentando a diversidade dos metabólitos secundários produzidos a partir de uma única cepa fúngica. Com isso, foram estabelecidas três estratégias de estudo, variando a composição nutricional do meio cultivo (MDB, Milho e MDB+Cu²⁺). O estudo de *Preussia* sp., cultivado em meio líquido de MDB, levou ao isolamento de seis dicetopiperazinas, uma isoflavona (Daidzeína) e o ácido 2-(4'-hidroxifenil) propiônico. Do cultivo da linhagem em meio sólido de Milho foram isoladas duas xantonas, sendo uma isolada pela primeira vez como produto natural, três oxepinocromanonas e três furocromanonas, sendo uma furocromanona descrita pela primeira vez na literatura. O cultivo da linhagem em meio líquido de MDB com adição de íons cobre, conduziu ao isolamento de duas oxepinocromanonas, sendo uma inédita, além de uma pirriolida e a 2,4-diidroxi-3,6-dimetilbenzaldeído. Varredura no espectro de UV do extrato bruto do cultivo em MDB, na ausência de cobre, não indicou a presença de cromonas, sugerindo que este metal esteja elicitando a produção desta classe de metabólitos. Esse resultado fortalece a abordagens de novas ferramentas eficazes na elicitação de novas vias biossintética por meio de alterações nos parâmetros de cultivos. Algumas substâncias puras foram submetidas à avaliação da atividade fitotóxica e erradicação de biofilme formado pela bactéria *S. epidermidis* ATCC 34984 e apresentaram bioatividade. Portanto, esses resultados ressaltam a importância de estudos da diversidade metabólica de fungos endofíticos, uma vez que estes possam ser uma fonte promissora de novos metabólitos secundários bioativos por meio de uma única cepa fúngica.

Palavras-chave: *Casearia sylvestris*. Fungos endofíticos. *Preussia* sp..OSMAC.

ABSTRACT

Microorganisms associated with plants perform an important role for discovery and development of new drugs. Hence, the search for new sources of natural bioactive compounds has been intensified, emphasizing the studies carried out with endophytic fungi, that present a high taxonomic and structural diversity of secondary metabolites, with antitumoral, antimicrobial and antifungal potential. These observations led to the purpose of the present work, that aimed the bioprospection of endophytic fungi associated with two morpho-anatomical varieties of the vegetal species of *Casearia sylvestris* and the metabolomic profile of *Preussia sp.* by the OSMAC (One Strain Many Comounds) approach. Therefore, the isolation of endophytic fungi conducted to twenty four pure strains, eleven strains from *C. sylvestris* var. *lingua* and thirteen from *C. sylvestris* var. *sylvestris*, resulting in promissing crude extracts for production of bioactive compounds. The initial bioprospecting led to the selection of the endophytic fungus *Preussia sp.* and a chemical study by OSMAC approach were accomplished. Cultivation in the laboratory doesn't always mimics the natural habitat of the microorganisms and because of that the diversity of biosynthetic pathways aren't fully exploit. Small changes in the physical and chemical parameters of fermentation are capable to modify completely the metabolomic profile of these microorganisms. These strategies are used to elicit new biosynthetic pathways and increase the production of secondary metabolites using only one fungal strain. Thereby, three strategies varying the nutritional composition of the culture medium (PDB, Corn and PDB+Cu²⁺) were selected. In the study of *Preussia sp.*, cultivated in liquid medium of PDB, six diketopiperazines, one isoflavone (daidzein) and the 2-(4-Hydroxyphenyl) propanoic acid were isolated. With the same strain, cultivated in solid medium of corn, two xantones, one of them isolated for the first time as a natural product, three oxepinochromenones and three furochromanones, one of them described for the first time in the literature, were isolated. The cultivation in liquid medium of PDB with addition of copper ions, afforded to the isolation of two oxepinochromenones, one already known and the other a novel molecule, besides the pirriolide and the 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzaldehyde. It wasn't found, with a closer look in the UV spectrum of the crude extracts obtained from the liquid medium of PDB without copper addition, the presence of chromones, suggesting that the metal elicited the production of this class of metabolite. This result strengthens that the new approaches for eliciting new biosynthetic pathways through changes in cultivation parameters are effective tools. Some of the isolated compounds were submitted to evaluation of the phytotoxic activity and eradication of biofilm formed by the bacterium *S. epidermidis* ATCC 34984 and presented bioactivity. Finally, these results highlights the importance of studies of the metabolic diversity of endophytic fungi, since it may be a promising source in the discovery of new bioactive fungal secondary metabolites through a single fungal strain.

Keywords: *Casearia sylvestris*. Endophytic fungi. *Preussia sp.*.OSMAC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfina e derivados 4-fenil-piperidínicos.	29
Figura 2 - Antibióticos produzidos por micro-organismos.	30
Figura 3 - Total de novos fármacos aprovados entre Janeiro/1981 e Dezembro/2014. (B - macromolécula biológica; N - Produto Natural inalterado; NB - fármaco botânico, definido como mistura; ND - derivado de Produto Natural; S - fármaco sintético; S* - fármaco sintético que apresenta como farmacóforo um Produto Natural; V - vacinas; /NM - mimetizam Produtos Naturais.	31
Figura 4 - Estruturas químicas epitiodicetopiperazinas isoladas do fungo endofítico <i>Penicillium raciborskii</i>	34
Figura 5 - Variedades morfoamatômicas de <i>Casearia sylvestris</i>	37
Figura 6 - Substâncias isoladas do gênero <i>Preussia</i>	40
Figura 7 - Etapas do isolamento das linhagens fúngicas.	47
Figura 8 - Processo para obtenção dos extratos brutos pelos fungos endofíticos isolados.	48
Figura 9 - Método por UHPLC-DAD para as análises dos extratos brutos dos fungos isolados em comparação com os extratos das variedades morfoanatômicas de <i>C. sylvestris</i>	49
Figura 10 - Processo para obtenção do extrato bruto de <i>Preussia</i> sp. em meio de cultivo MDB.	50
Figura 11 - Processo para obtenção do extrato bruto de <i>Preussia</i> sp. em meio de cultivo	51
Figura 12 - Processo para obtenção do extrato bruto de <i>Preussia</i> sp. em meio de cultivo	52
Figura 13 - Fracionamento do extrato bruto de <i>Preussia</i> sp. em meio de cultivo MDB.	52
Figura 14 - Isolamentos dos metabólitos da fração <i>Preussia</i> sp. MDB-Fr03.	53
Figura 15 - Isolamentos dos metabólitos da fração <i>Preussia</i> sp. MDB-Fr06.	54
Figura 16 - Isolamentos dos metabólitos do extrato <i>Preussia</i> sp. MDB+Cu ⁺²	55
Figura 17 - Fracionamento do extrato bruto de <i>Preussia</i> sp. em meio de cultivo Milho.	55
Figura 18 - Isolamentos dos metabólitos da fração <i>Preussia</i> sp. Milho-Fr9-14.	56
Figura 19 - Isolamentos dos metabólitos da fração <i>Preussia</i> sp. Milho-Fr15-23.	57
Figura 20 - Isolamentos dos metabólitos da fração <i>Preussia</i> sp. Milho-Fr105-106.	57

Figura 21 - Fungos endofíticos isolados das folhas e ramos de <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>lingua</i> .	63
Figura 22 - Fungos endofíticos isolados das folhas e ramos de <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>sylvestris</i> .	63
Figura 23 - CLAE-DAD dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>lingua</i> em coluna C18, gradiente linear H ₂ O/CH ₃ CN 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.	65
Figura 24 - CLAE-DAD dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>sylvestris</i> em coluna C18, gradiente linear H ₂ O/CH ₃ CN 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.	66
Figura 25 - Espectros de RMN de ¹ H dos extratos brutos em MDB dos fungos isolados dos ramos de <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>lingua</i> (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 MHz).	68
Figura 26 - Espectros de RMN de ¹ H dos extratos brutos em MDB dos fungos isolados das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>lingua</i> (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 MHz).	69
Figura 27 - Espectros de RMN de ¹ H dos extratos brutos em MDB dos fungos isolados dos ramos de <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>sylvestris</i> (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 MHz).	69
Figura 28 - Espectros de RMN de ¹ H dos extratos brutos em MDB dos fungos isolados das folhas de <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>sylvestris</i> (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 MHz).	70
Figura 29 - Estrutura do ácido nitropropiónico.	70
Figura 30 - Espectro de RMN de ¹ H do extrato bruto CS_Ca_01 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz).	71
Figura 31 - Avaliação dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>lingua</i> frente ao fitopatógeno <i>C. sphaerospermum</i> evidenciado em cromatoplaca.	72
Figura 32 - Avaliação dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>sylvestris</i> frente ao fitopatógeno <i>C. sphaerospermum</i> evidenciado em cromatoplaca.	72
Figura 33 - Efeito dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>lingua</i> no alongamento de coleóptilos estiolados de trigo. Porcentagem de inibição ou crescimento em relação ao controle negativo. (*) Difere estatisticamente do controle negativo, p <0,05. (°) Difere estatisticamente do herbicida, os tratamentos foram comparados entre concentrações iguais.	77
Figura 34 - Efeito dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>sylvestris</i> no alongamento de coleóptilos estiolados de trigo. Porcentagem	

de inibição ou crescimento em relação ao controle negativo. (*) Difere estatisticamente do controle negativo, $p < 0,05$. (°) Difere estatisticamente do herbicida, os tratamentos foram comparados entre concentrações iguais.	77
Figura 35 - (A) Gráfico de scores (PC1 x PC2) dos fungos isolados e do extrato das folhas de <i>C. sylvestris</i> var. <i>lingua</i> em 235 nm, (B) Gráfico de scores (PC1 x PC2) dos fungos isolados e do extrato das folhas de <i>C. sylvestris</i> var. <i>lingua</i> em 254 nm.....	79
Figura 36 - (A) Gráfico de scores (PC1 x PC2) dos fungos isolados e do extrato das folhas de <i>C. sylvestris</i> var. <i>sylvestris</i> em 235 nm, (B) Gráfico de scores (PC1 x PC2) dos fungos isolados e do extrato das folhas de <i>C. sylvestris</i> var. <i>sylvestris</i> em 254 nm.....	80
Figura 37 - CLAE-DAD do extrato bruto <i>Preussia</i> sp. - MDB em coluna C18, gradiente linear H_2O/CH_3CN 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.	83
Figura 38 - CLAE-DAD do extrato bruto <i>Preussia</i> sp. – MDB+ Cu^{+2} em coluna C18, gradiente linear $H_2O:CH_3CN$ 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.	83
Figura 39 - CLAE-DAD do extrato bruto <i>Preussia</i> sp. – Milho em coluna C18, gradiente linear $H_2O:CH_3CN$ 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.	84
Figura 40 - Comparação por meio de CLAE-DAD dos extratos brutos: <i>Preussia</i> sp. - MDB (azul), <i>Preussia</i> sp. - MDB+ Cu^{+2} (verde) <i>Preussia</i> sp. - Milho (roxo).....	84
Figura 41 - Espectros de RMN de 1H de <i>Preussia</i> sp. - Milho (azul), <i>Preussia</i> sp. - MDB (verde) e <i>Preussia</i> sp. - MDB+ Cu^{+2} (vermelho) (CD_3OD , 300 MHz).....	85
Figura 42 - Inibição/estímulo do crescimento dos coleótilos de trigo sob a atividade dos extratos brutos MDB e MDB+ Cu^{+2}	86
Figura 43 - Inibição/estímulo do crescimento dos coleótilos de trigo sob a atividade do extrato bruto Milho.....	86
Figura 44 - Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC da substância 7.....	89
Figura 45 - Espectro de RMN de 1H da substância 7 ($DMSO-d_6$; 600 MHz).....	90
Figura 46 - Mapa de contorno HSQC da substância 7 ($DMSO-d_6$; 600 e 150 MHz)..	91
Figura 47 - Mapa de contorno HMBC da substância 7 ($DMSO-d_6$; 600 e 150 MHz)..	91
Figura 48 - Mapa de contorno COSY da substância 7 ($DMSO-d_6$; 600 MHz).....	92
Figura 49 - Estereoisômeros da dicetopiperazina Prolina-Fenilalanina.	93
Figura 50 - Espectro de RMN de 1H da substância 6 ($DMSO-d_6$; 600 MHz).....	94

Figura 51 - Mapa de contorno HSQC da substância 6 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz)...	95
Figura 52 - Mapa de contorno HMBC da substância 6 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz)..	95
Figura 53 - Correlações observadas em COSY para a unidade Leucina da substância 5	96
Figura 54 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 5 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	98
Figura 55 - Mapa de contorno HSQC da substância 5 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz)...	99
Figura 56 - Mapa de contorno HMBC da substância 5 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz)..	99
Figura 57 - Mapa de contorno COSY da substância 5 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	100
Figura 58 - Correlações observadas em COSY para a unidade Isoleucina de 3 (DMSO- <i>d</i> ₆).....	101
Figura 59 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 3 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	102
Figura 60 - Mapa de contorno HSQC da substância 3 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).	103
Figura 61 - Mapa de contorno HMBC da substância 3 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).	103
Figura 62 - Mapa de contorno COSY da substância 3 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	104
Figura 63 - Principais correlações observadas em HMBC da substância 1	105
Figura 64 - Espectro de RMN de ¹ H (azul) e experimentos de TOCSY 1D (verde, irradiação em δ 1,49; vermelho, irradiação em δ 2,15) (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) para determinação estrutural da substância 2	106
Figura 65 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 1 e 2 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).	108
Figura 66 - Mapa de contorno HSQC da substância 1 e 2 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz)	109
Figura 67 -Mapa de contorno HMBC da substância 1 e 2 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).	109
Figura 68 - Principais correlações em COSY da substância 8	111
Figura 69 - Principais correlações observadas em HMBC da substância 8	111
Figura 70 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 8 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	113
Figura 71 - Mapa de contorno COSY da substância 8 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600).	114
Figura 72 - Mapa de contorno HSQC da substância 8 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz). 114	
Figura 73 - Mapa de contorno HMBC da substância 8 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz). 115	
Figura 74 - Principais correlações observadas em HMBC da substância 9	116
Figura 75 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 9 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 MHz).....	117
Figura 76 - Mapa de contorno HMBC da substância 9 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 600 e 150 MHz).	118
Figura 77 - Estrutura básica de uma cromona.	119

Figura 78 - Estrutura básica de uma xantona.	119
Figura 79 - Principais correlações observadas em HMBC para o anel A da substância 17.	120
Figura 80 - Principais correlações observadas em HMBC para o anel B da substância 17.	120
Figura 81 - Estrutura tridimensional da substância 17 obtida por meio de difração de Raios-X de monocristal.	121
Figura 82 - Estruturas polimórficas da substância 17.	121
Figura 83 - Espectro de RMN de ^1H da substância 17 (CD_3OD ; 600 MHz).	123
Figura 84 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 17 (CD_3OD ; 150 MHz).	124
Figura 85 - Mapa de contorno HSQC da substância 17 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz)...	125
Figura 86 - Mapa de contorno HMBC da substância 17 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz)..	125
Figura 87 - Espectro de Massas de alta resolução da substância 17 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).	126
Figura 88 - Correlações observadas em HMBC para o anel A da substância 20.....	127
Figura 89 - Espectro de dicroísmo circular da substância 20 e da substância 17 (200-400).....	127
Figura 90 - Espectro de RMN de ^1H da substância 20 (CD_3OD ; 600 MHz).	129
Figura 91 - Mapa de contorno HSQC da substância 20 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz)...	130
Figura 92 - Mapa de contorno HSQC da substância 20 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz)...	130
Figura 93 - Espectro de Massas de alta resolução da substância 20 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).	131
Figura 94 - Principais correlações observadas em HMBC e COSY para a substância 12.	132
Figura 95 - Espectro de RMN de ^1H da substância 12(CD_3OD ; 600MHz).	134
Figura 96 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 12 (CD_3OD ; 150 MHz).	135
Figura 97 - Mapa de contorno COSY da substância 12 (CD_3OD ; 600 MHz).	136
Figura 98 - Mapa de contorno HSQC da substância 12 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz)...	136
Figura 99 - Mapa de contorno HMBC da substância 12 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz)..	137
Figura 100 - Espectro de Massas de alta resolução da substância 12 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).	137
Figura 101 - Principais correlações observadas em HMBC da substância 15.	138
Figura 102 - Espectro de RMN de ^1H da substância 15 (CD_3OD ; 600 MHz).	140
Figura 103 - Mapa de contorno HSQC da substância 15 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).	141

Figura 104 - Mapa de contorno HMBC da substância 15 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).	141
Figura 105 - Principais correlações observadas em COSY e HMBC da substância 19	143
Figura 106 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 19 (CD ₃ OD; 600 MHz).	144
Figura 107 - Espectro de RMN de ¹³ C da substância 19 (CD ₃ OD; 150 MHz).	145
Figura 108 - Mapa de contorno HMBC da substância 19 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).	146
Figura 109 - Mapa de contorno COSY da substância 19 (CD ₃ OD; 600 MHz).	146
Figura 110 - Espectro de Massas de alta resolução da substância 19 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).	147
Figura 111 - Comparação dos perfis de RMN de ¹ H para as substâncias 19 e 18 (CD ₃ OD; 600 MHz).....	148
Figura 112 - Comparação dos perfis cromatográficos das substâncias 18 e 19	148
Figura 113 - CLAE-DAD da co-injeção das substâncias 18 (tr=19,3 min) e 19 (tr=21,7 min).....	149
Figura 114 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 18 (CD ₃ OD; 600 MHz).	150
Figura 115 - Espectro de RMN de ¹³ C da substância 18 (CD ₃ OD; 150 MHz).	151
Figura 116 - Mapa de contorno HMBC da substância 18 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).	152
Figura 117 - Espectro de Massas de alta resolução da substância 18 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).	152
Figura 118 - Principal correlação observada em HMBC para a substância 14	153
Figura 119 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 14 (CD ₃ OD; 600 MHz).	155
Figura 120 - Mapa de contorno HSQC da substância 14 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).	156
Figura 121 - Mapa de contorno HMBC da substância 14 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).	156
Figura 122 - Espectro de Massas de alta resolução da substância 14 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).	157
Figura 123 - Principais correlações observadas em HMBC da substância 13	158
Figura 124 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 13 (CD ₃ OD; 600 MHz).	159
Figura 125 - Mapa de contorno HSQC da substância 13 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz)..	160
Figura 126 - Mapa de contorno HMBC da substância 13 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).	160
Figura 127 - Principais correlações observadas no mapa de contorno de HMBC da substância 16	162
Figura 128 - Espectro de RMN de ¹ H da substância 16 (CD ₃ OD; 600 MHz).	163
Figura 129 - Mapa de contorno HSQC da substância 16 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).	164
Figura 130 - Mapa de contorno HMBC da substância 16 (CD ₃ OD; 600 e 150 MHz).	164

Figura 131 - Espectro de Massas de alta resolução da substância 16 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).	165
Figura 132 - Principais correlações observadas em HMBC para a substância 21	166
Figura 133 - Espectro de RMN de ^1H da substância 21 (CD_3OD ; 600 MHz).	167
Figura 134 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 21 (CD_3OD ; 150 MHz).	168
Figura 135 - Mapa de contorno HSQC da substância 21 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).	169
Figura 136 - Mapa de contorno HMBC da substância 21 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).	169
Figura 137 - Espectro de Massas de alta resolução da substância 21 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).	170
Figura 138 - Principais correlações observadas em HMBC e NOESY-1D para a substância 22	171
Figura 139 - Espectro de RMN de ^1H da substância 22 (CD_3OD ; 600 MHz).	172
Figura 140 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 22 (CD_3OD ; 150MHz).	173
Figura 141 - Mapa de contorno HMBC da substância 22 (CD_3OD ; 600 e 150 MHz).	174
Figura 142 - Espectro de NOESY 1D da substância 22 (CD_3OD ; 600 MHz).	174
Figura 143 - Espectro de Massas de alta resolução da substância 22 (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).	175
Figura 144 - Capacidade de erradicação do biofilme da <i>S. epidermidis</i> ATCC 34894 depois do tratamento com as substâncias 17 , 18 , e 19	176
Figura 145 - Inibição/estímulo do crescimento dos coleóptilos de trigo sob a atividade das substâncias 5 , 6 , 7 , 17 e 19	177

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meios de cultura utilizados para o cultivo dos fungos endofíticos.	44
Tabela 2 - Equipamentos para o desenvolvimento do projeto.....	46
Tabela 3 - Tempo de esterilização das folhas e caule.....	47
Tabela 4 - Condições do meio de cultivo MDB+Cu ⁺²	51
Tabela 5 - Massa dos extratos brutos obtida do cultivo dos fungos endofíticos isolados de <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>lingua</i> e <i>Casearia sylvestris</i> var. <i>sylvestris</i> em MDB.	64
Tabela 6 - Resultado da atividade antifúngica dos extratos brutos.	73
Tabela 7 - Resultado da atividade anticolinesterásica dos extratos brutos.	74
Tabela 8 - Avaliação dos extratos brutos frente às células tumorais.....	75
Tabela 9 - Médias de crescimento dos coleóptilos sob o efeito dos extratos brutos de <i>Preussia</i> sp MDB e MDB+Cu ⁺² .e do herbicida comercial GOAL [®]	86
Tabela 10 - Médias de crescimento dos coleóptilos sob o efeito dos extratos brutos de <i>Preussia</i> sp Milho.e do herbicida comercial GOAL [®]	86
Tabela 11 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 e 150 MHz) de 6 e 7 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).....	93
Tabela 12 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) de 5 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).	97
Tabela 13 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 e 150 MHz) de 3 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).....	101
Tabela 14 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 e 150 MHz) da substância 1 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).....	106
Tabela 15 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 e 150 MHz) da substância 2 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).....	107
Tabela 16 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 e 150 MHz) da substância 8 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).....	112
Tabela 17 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 e 150 MHz) da substância 9 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).....	116
Tabela 18 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (CD ₃ OD, 600 e 150 MHz) de 17 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).	122
Tabela 19 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (CD ₃ OD, 600 e 150 MHz) de 20 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).	128
Tabela 20 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (CD ₃ OD, 600 e 150 MHz) de 12 (δ em ppm e <i>J</i> em Hz).	133

Tabela 21 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 e 150 MHz) de 15 (δ em ppm e J em Hz).....	139
Tabela 22 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 e 150 MHz) de 19 (δ em ppm e J em Hz).	143
Tabela 23 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 e 150 MHz) da substância 18 e 19 (δ em ppm e J em Hz).	149
Tabela 24 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 MHz) de 14 (δ em ppm e J em Hz).	154
Tabela 25 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 MHz) de 13 (δ em ppm e J em Hz).	158
Tabela 26 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 MHz) de 16 (δ em ppm e J em Hz).	162
Tabela 27 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 e 150 MHz) da substância 21 (δ em ppm e J em Hz).....	166
Tabela 28 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 e 150 MHz) da substância 22 (δ em ppm e J em Hz).....	171

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

OSMAC	One Strain Many Compounds
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
UV	Ultravioleta
BDA	Batata Dextrose Agar
MDB	Meio de Dextrose e Batata
C18	Sílica gel de fase reversa tipo Octadecil silano
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
ESI-EM	Espectrometria de massas – Ionização por <i>electrospray</i>
TOF	Time of Flight (Tempo de voo)
Ext.	Extrato
grad.	Gradiente
min.	Minutos
nm	Nanômetro
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
COSY	Correlation Spectroscopy
TOCSY	Total Correlated Spectroscopy
MHz/Hz	Megahertz / Hertz
ppm	Partes por milhão
TMS	Tetrametilsilano
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
pág.	Página
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
Sub	Substância

PCA	Análise de componentes principais
PLS-DA	Análise discriminante com calibração multivariada
PLS	Mínimos Quadrados Parciais
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda
μ	Micro
$[M+H]^+$	Molécula protonada
$[M-H]^-$	Molécula desprotonada
$[M+Na]^+$	Molécula sodiada
$[M+K]^+$	Molécula potassada
J	Constante de acoplamento
s	Singleto
sl	Singleto Largo
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
t	Tripleto
m	Multipleto
m/z	Relação massa-carga

SUMÁRIO

1.	Introdução	28
1.1	Produtos Naturais	28
1.2	Fungos endofíticos e seu potencial metabólico.....	32
1.3	<i>Casearia sylvestris</i> Sw. (Salicaceae)	37
1.4	Gênero: <i>Preussia</i>	38
2.	Objetivos	42
3.	Materiais e métodos	44
3.1	Materiais.....	44
3.1.1	Meios de cultivo	44
3.1.2	Solventes.....	44
3.1.3	Reagentes.....	44
3.1.4	Cromatografia em Coluna	44
3.1.5	Cromatografia de Camada Delgada Comparativa	45
3.1.6	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).....	45
3.1.7	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (UHPLC).....	45
3.1.8	Ressonância Magnética Nuclear.....	45
3.1.9	Espectrometria de Massas	46
3.1.10	Outros	46
3.2	Métodos.....	46
3.2.1	Obtenção das linhagens fúngicas.....	46
3.2.2	Obtenção dos extratos brutos das linhagens fúngicas em escala reduzida	48
3.2.3	Análise multivariada dos dados de UHPLC dos extratos dos fungos isolados com os extratos das duas variedades morfoanatômicas de <i>C. sylvestris</i>	49

3.2.4	Variações no meio de cultivo de <i>Preussia</i> sp. (CL-F-04).	50
3.2.5	Fracionamento e obtenção das substâncias isoladas de <i>Preussia</i> sp. em meio de cultivo MDB	52
3.2.6	Fracionamento e obtenção das substâncias isoladas de <i>Preussia</i> sp. em meio de cultivo MDB+Cu ⁺²	54
3.2.7	Fracionamento e obtenção das substâncias isoladas de <i>Preussia</i> sp. em meio de cultivo Milho.....	55
3.2.8	Ensaio Biológicos	58
4.	Bioprospecção dos fungos endofíticos associados as variedades morfoanatômicas da espécie <i>Casearia sylvestris</i>.....	62
4.1	Isolamentos das cepas fúngicas.....	62
4.2	Prospecção química dos fungos isolados	64
4.3	Prospecção biológica dos fungos isolados	71
4.4	Estudos da variabilidade química organismal.....	77
4.5	Considerações	80
5.	Estudo do perfil metabólico de <i>Preussia</i> sp. por meio de abordagens OSMAC	82
5.1	Influência da composição do meio de cultivo na produção metabólica de <i>Preussia</i> sp.....	82
5.2	Identificação estrutural das substâncias produzidas por <i>Preussia</i> sp.....	87
5.2.1	Dicetopiperazinas	87
5.2.2	Isoflavonoides.....	110
5.2.3	Cromonas e xantonas.....	118
5.2.4	Outras classes	165
5.3	Avaliação das atividades biológicas para as substâncias isoladas	175
5.3.1	Erradicação de biofilme.....	175
5.3.2	Avaliação da atividade fitotóxica sobre o crescimento de coleóptilos de trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	177
5.4	Considerações preliminares	178

6.	Conclusões e Perspectivas	180
	REFERENCIAS.....	183

Introdução

1. Introdução

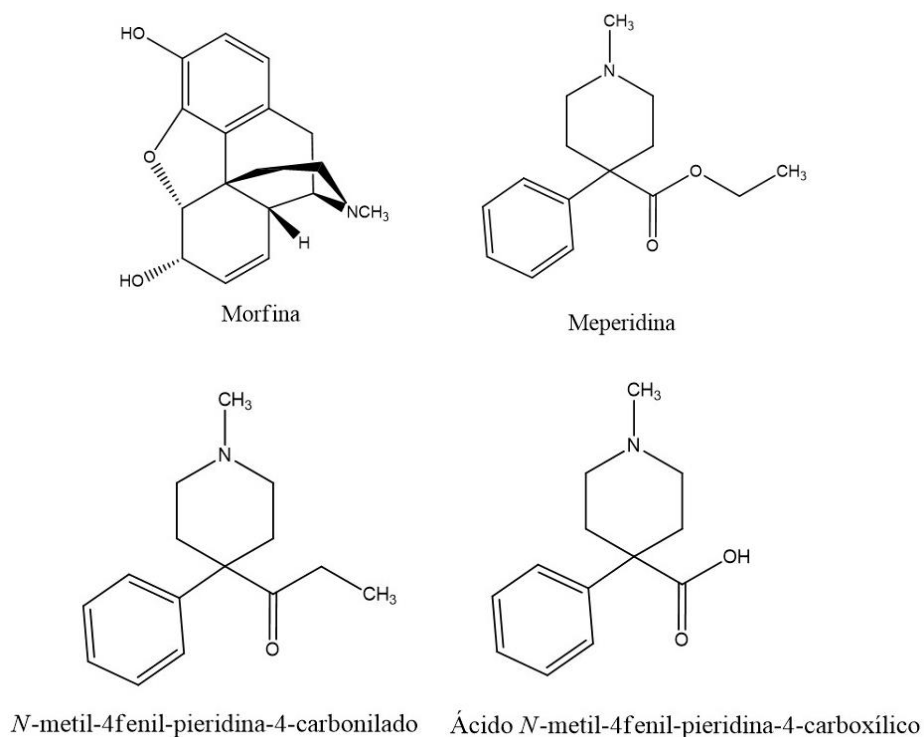
1.1 Produtos Naturais

Ao longo da história, sabe-se que a Natureza, principalmente as plantas, tem fornecido recursos naturais imprescindíveis para o desenvolvimento e sobrevivência do homem. Embora de forma rudimentar, a espécie humana utilizou os produtos naturais na caça, na alimentação, na cura de doenças, etc.

Apesar da grande importância dos metabólitos primários como matéria-prima para inúmeros processos, plantas, fungos, bactérias e animais são cultivados ou extraídos de seu habitat em busca de substâncias especiais, os chamados metabólitos secundários. Esses metabólitos servem de base na indústria agroquímica para a produção de pesticidas, herbicidas, fabricação de produtos cosméticos, perfumes, corantes e principalmente no desenvolvimento de fármacos (BARREIRO; BOLZANI, 2009; LUBBE; VERPOORTE, 2011).

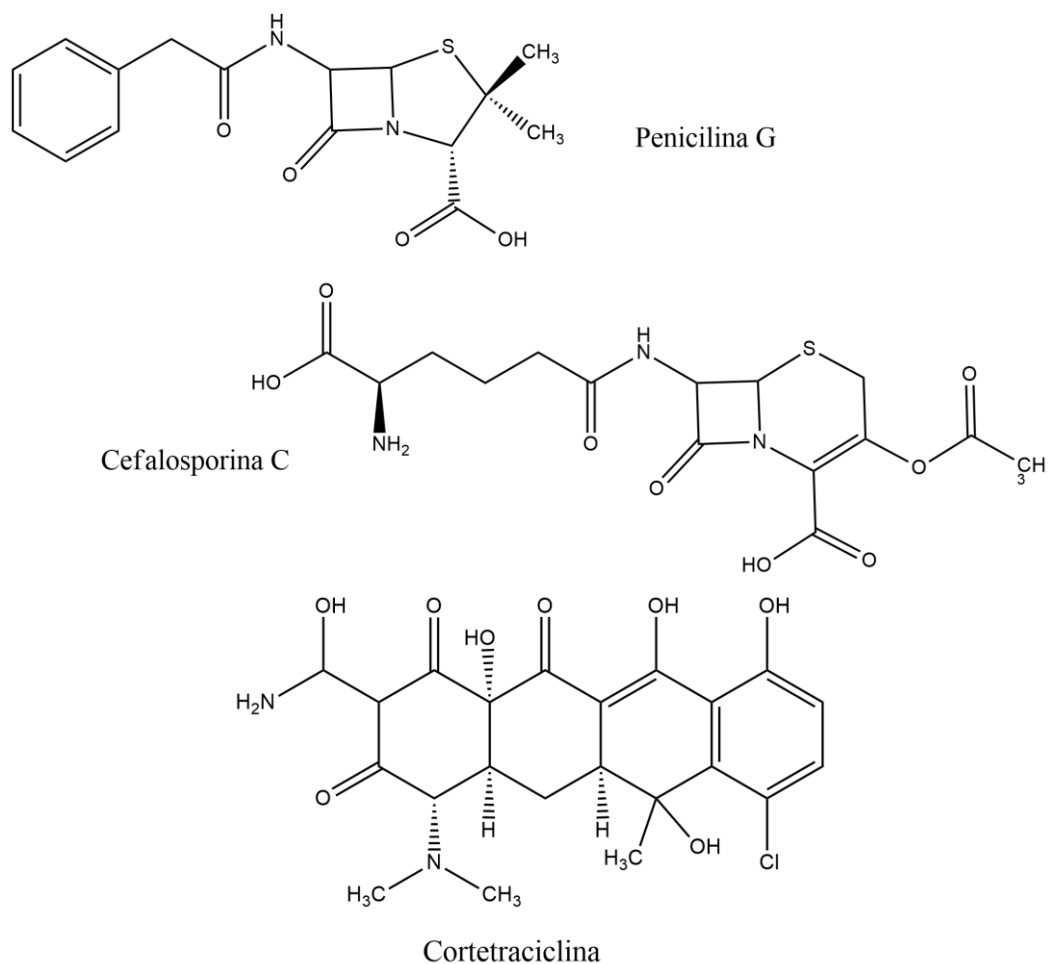
A curiosidade acerca das estruturas químicas dos produtos naturais é, no entanto, relativamente recente, e estudos sistemáticos feitos nesse sentido datam apenas da segunda metade do século XIX.

Isolada em 1804 pelo farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Adam, a morfina (Figura 1) como constituinte majoritário de *Papaver somniferum*, planta da qual se obtém o ópio, foi o primeiro metabólito secundário a ser comercializado, por E. Merck em 1826, e foi amplamente utilizada durante a Segunda Guerra Mundial e é usada até hoje como analgésico. E inspirou a descoberta posterior dos derivados 4-fenil-piperidínicos (Figura 1) como uma nova classe de hipnoanalgésicos de emprego mais efetivo e seguro. (BARREIRO; BOLZANI, 2009; CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014).

Figura 1 - Morfina e derivados 4-fenil-piperidínicos.

Fonte: Autor

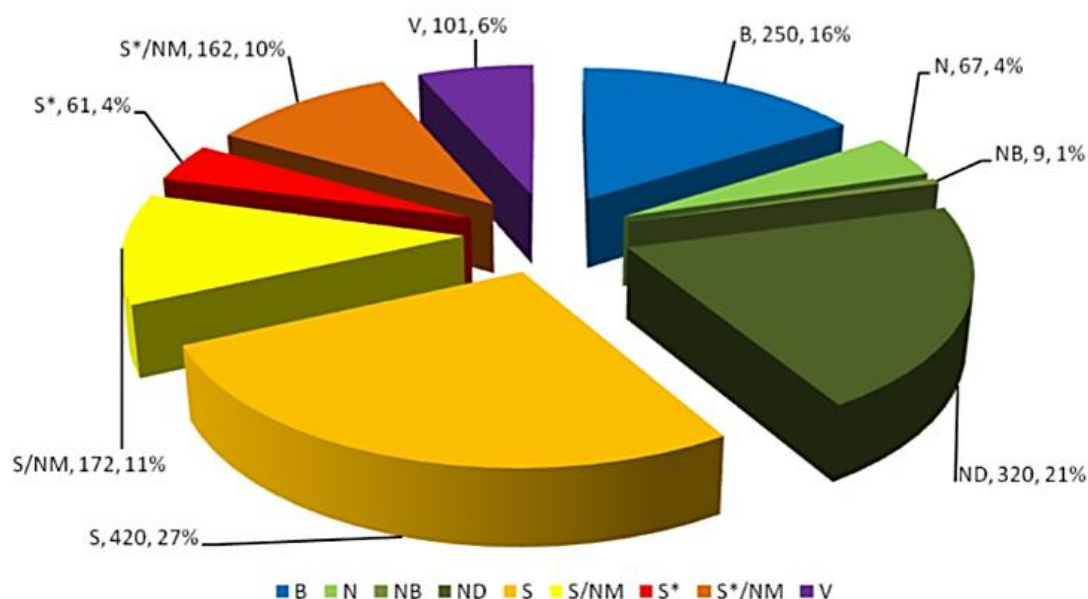
Descobertas como o antibiótico penicilina G (Figura 2), por Fleming em 1929, isolada do fungo *Penicillium notatum* e outros antibióticos não só auxiliaram no aumento da expectativa de vida, mas serviram de estímulo para desenvolvimento de novos programas de pesquisa em torno dos produtos naturais. Esta descoberta iniciou um período de extensa investigação de micro-organismos, principalmente por empresas farmacêuticas, na busca por novos antibióticos, como a descoberta das cefalosporinas, como a cefalosporina C, isolada de fungos do gênero *Acremonium*, e as tetraciclina, como a clortetraciclina, isoladas de actinomicetos do gênero *Streptomyces* (Figura 2) (CRAGG, GROTHAUS; NEWMAN, 2014).

Figura 2 - Antibióticos produzidos por micro-organismos.

Fonte: Autor

Newman & Cragg publicaram quatro revisões (2000, 2007, 2012 e 2016) as quais mostram que aproximadamente 31% dos fármacos de uso clínico presentes no mercado farmacêutico são origem natural (Figura 3). De modo geral, esses compostos são encontrados como isolados, derivados, análogos ou então obtidos através de processos de semi-síntese. Em última análise, os metabólitos obtidos de fontes naturais têm servido de inspiração para a síntese de novas entidades químicas (NEWMAN; CRAGG, 2007, 2012, 2014).

Figura 3 - Total de novos fármacos aprovados entre Janeiro/1981 e Dezembro/2014. (B - macromolécula biológica; N - Produto Natural inalterado; NB - fármaco botânico, definido como mistura; ND - derivado de Produto Natural; S - fármaco sintético; S* - fármaco sintético; S* - fármaco sintético que apresenta como farmacóforo um Produto Natural; V - vacinas; /NM - mimetizam Produtos Naturais.



Fonte: Newman e Cragg (2016)

Em revisão sobre produtos naturais como fontes de novos fármacos nos últimos 30 anos, Newman & Cragg (2012), relatam que um número significativo de fármacos baseados em produtos naturais são produzidos por micro-organismos. E mais interessante ainda, são produzidos pelas constantes interações microbianas com os hospedeiros na qual esses micro-organismos foram isolados.

Os micro-organismos têm atraído a atenção de muitos pesquisadores, e vem aumentando expressivamente nos últimos anos, principalmente, visando o entendimento das relações ecológicas as quais desenvolvem com seus hospedeiros, além de serem uma fonte inspiradora para a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos. De 23.000 compostos ativos (antimicrobianos, citotóxicos, antivirais e imunossupressores) a partir de micro-organismos, 42% são produzidos por fungos e 32% por actinomicetos. 12% dos antibióticos são produzidos por bactérias não filamentosas e cerca de 20% são produzidos por fungos filamentosos (DEMAIN, 2014).

Nesse contexto, uma classe específica de micro-organismos se destaca, os fungos que vivem no interior de espécies vegetais, sem afeta-las e, até mesmo protegendo-as contra stress bióticos e abióticos, chamados de fungos endofíticos.

1.2 Fungos endofíticos e seu potencial metabólico

Antes de se iniciar o estudo desta comunidade é importante a definição do termo endófito, termo originalmente introduzido por Bary (1866), refere-se a todos os organismos que colonizam tecidos de plantas, distintos dos epifíticos que vivem na superfície das plantas. Carroll (1986) definiu como endofíticos como mutualistas que colonizam partes aéreas de tecidos vegetais vivos e não causam danos ao hospedeiro, e a partir do qual fungos patogênicos, micorrízicos são excluídos (SUN; GUO, 2012). Petrini (1991) ampliou a definição de Carroll, incluindo todos os organismos que habitam diferentes órgãos vegetais (raiz, caule, folha, flor, frutas e sementes) das plantas hospedeiras, principalmente inter ou intra-celular, pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, sem causar dano aparente para a planta hospedeira (ZHENG et. al, 2016). Os micro-organismos endofíticos são isolados dos tecidos internos do hospedeiro, após esterilização da superfície dos mesmos, seguido de incubação sobre uma variedade de meios para estimular o crescimento destes (PETRINI et al., 1992).

Considerando a existência de cerca de 300 mil espécies de plantas de diferentes nichos e ecossistemas e que estas podem hospedar pelo menos um fungo endofítico, a diversidade destes micro-organismos é enorme (STROBEL; DAISY, 2003). No entanto, apenas alguns destes têm sido estudados, indicando que a oportunidade de se encontrar um fungo endofítico promissor é ampla. Além disso, estudos sobre os fungos endofíticos de plantas são fundamentais para fornecer informações sobre a diversidade global e distribuição, bem como para a descoberta de novas espécies (ZHENG et. al, 2016).

É relatado que as interações entre fungos e seus hospedeiros resultam no aumento da produção dos metabólitos secundários por estes micro-organismos. Dessa maneira, os fungos endofíticos são uma fonte importante para a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos, uma vez que crescem nos tecidos internos de plantas e seu crescimento envolve continua interação metabólica entre os organismos. Este é um exemplo de triagem inteligente e uma estratégia para a exploração do potencial de produção de metabólitos secundários bioativos que um fungo pode oferecer (SCHULZ et al., 2002).

As interações estabelecidas pelos endófitos podem variar de mutualismo (endófito e planta hospedeira obtém vantagens) a parasitismo (somente o endófito é beneficiado). Na associação mutualística o endófito recebe nutrientes e proteção da planta hospedeira, enquanto auxilia a planta na produção de enzimas e metabólitos secundários na proteção contra patógenos (BAE et al., 2009; KUSARI, 2015).

Alguns relatos sugerem um complexo sistema de comunicação envolvendo cruzamento de informações genéticas entre endófitos e a planta hospedeira durante a formação da associação. Além disso, os genes envolvidos podem regular a produção de metabólitos secundários bioativos e conferir resistência as plantas hospedeiras (BAILEY et al., 2006). Como exemplo, em plantas sensíveis a seca, os fungos endofíticos, além de armazenarem e secretarem açúcar e álcool, também reduzem a transpiração das folhas, evitando assim o stress hídrico da planta (ZHANG; SONG; TAN, 2006).

No entanto, a interação mutualística entre fungos endofíticos e plantas está sendo questionada, pois a adaptação em seu hospedeiro depende também do genótipo da planta e do endófito, de fatores abióticos e de outras espécies que interagem direta ou indiretamente com hospedeiro (FAETH, 2002; MULLER; KRAUSS, 2005).

Outros autores sugerem que a colonização assintomática decorre de um equilíbrio entre a virulência do fungo endofítico e as respostas de defesa da planta. Esta balança é dinâmica e pode ser alterada sob condições de stress do hospedeiro ou alterações fisiológicas em um dos organismos envolvidos (SCHULZ et al., 2005). A interação endófito-planta pode não ser apenas o equilíbrio entre a virulência e as respostas de defesa, mas uma interação mais complexa. Por exemplo, o endófito *F. solani*, isolado de *C. acuminata*, a qual produz o anticancerígeno camptotecina (KUSARI et al., 2009), também produz os precursores da camptotecina. No entanto, a enzima envolvida na biossíntese deste composto está presente somente na planta hospedeira (KUSARI; ZÜHLKE, SPITELLER, 2011). Então é necessário reconsiderar se a transferência horizontal de genes (planta para genoma do endófito ou vice-versa) é o único mecanismo no qual os endófitos possam produzir os mesmos compostos que seu hospedeiro (KUSARI; SPITELLER, 2011).

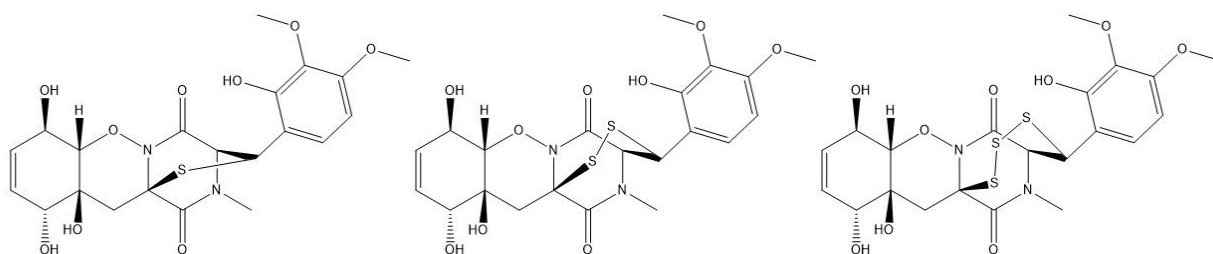
Como as plantas são colonizadas por diversos micro-organismos endofíticos, estes podem interagir direto ou indiretamente como outros endófitos. Estas interações desempenham um papel fundamental na produção de metabólitos por bactérias e fungos endofíticos (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

Dentre os estudos com fungos endofíticos, alguns produtos naturais merecem destaque, como os anticancerígenos: derivados de antracenediona (ZHANG et al., 2010), 22oxa-(12)-citocalasinas (PRITI et al., 2009) e novos meroterpenoides (pestalafones J e K) (WANG, B., 2016). Pesquisas ainda relatam outros compostos com atividades promissoras como a antraquinonas (ZHANG; SONG; TAN, 2006) e a 10-hidroxicamptotecina (SHWETA et al., 2010), poderosos agentes antineoplásicos, isolado dos fungos endófitos *Pleospora* sp. e *Fusarium solani*, respectivamente; e o subglutanol A e B, um agente imunossupressor, produzido pelo endófito *Fusarium subglutinans* (GUO et al., 2008). Kusari e Spiteller (2011) descreveram a produção de hipericina a partir de um endófito isolado de *Hypericum perforatum*, um agente usado no combate a depressão e ansiedade. Em 2012, isolou-se do fungo endofítico pertencente ao gênero *Phoma* associado a *Arisaema erubescens*, os metabólitos tricondermina e cercosporamida, com fortes atividades antifúngicas e antineoplásicas (WANG, L. et. al., 2012). Paclitaxel (quimioterápico) e a huperzina A (tratamento do mal de Alzheimer), foram detectadas em linhagens de fungos endofíticos obtidos das plantas originalmente produtoras dessas substâncias (NEWMAN; CRAGG, 2015).

Do fungo endofítico *Penicillium raciborskii*, isolado de *Rhododendron tomentosum* Harmaja (KAJULA, 2016), foram isolados os raros dipeptídeos cíclicos, epipolitiidicetopiperazinas, devido a presença de pontes de sulfeto entre os carbonos α - β ao invés da ponte entre os carbonos α - α (Figura 4).

Esses resultados demonstram a diversidade química dos micro-organismos endofíticos.

Figura 4 - Estruturas químicas epitiidicetopiperazinas isoladas do fungo endofítico *Penicillium raciborskii*.



Estudos recentes do genoma de micro-organismos revelaram que o potencial biossintético destes organismos é muito inexplorado. Desta forma, o número de genes que codificam a produção de enzimas responsáveis pela biossíntese de metabólitos

secundários é muito maior do que a produção destes metabólitos pelos micro-organismos estudados. Uma razão para esta observação é que apenas alguns subconjuntos de genes responsáveis pela biossíntese de produtos naturais sejam expressos sob as condições de cultivo laboratoriais. Desse modo, apenas uma porção limitada de metabólitos secundários é produzido (WILLIAMS et al., 2008; HERTWECK; SCHERLACH, 2009; CICHEWICZ, 2010; LIU et al., 2014).

Dentro dessa perspectiva, pesquisadores tem buscado alternativas para obter acesso a este reservatório de metabólitos secundários potencialmente bioativos, uma vez que o cultivo em laboratório não possui todas as condições para mimetizar o habitat natural dos micro-organismos e não exploram de maneira completa toda complexidade e diversidade estrutural que esses organismos biossintetizam (BRAKHAGE; SCHROECKH, 2011; WILLIAMS et al., 2008).

Desta forma, a partir de estudos de co-cultivo de micro-organismos, que envolve o cultivo de dois ou mais micro-organismos no mesmo ambiente, da epigenética, que consiste em mudanças hereditárias na expressão gênica, sem alteração na sequência de DNA, e modificações nos parâmetros de cultivo, se apresentam como metodologias alternativas para a exploração de moléculas biologicamente ativas e estratégias eficazes para induzir a expressão de vias silenciosas em micro-organismos (BERTRAND et al., 2014; CICHEWICZ, 2010; BILLS et al., 2007; BODE et al., 2002)

Nesta concepção, realizando modificações sistemáticas nos parâmetros de fermentação, altera-se de maneira significativa o perfil metabolômico desses micro-organismos. Essas alterações nos parâmetros de cultivo para aumentar a diversidade metabólica de uma única estirpe fúngica, é denominada de *OSMAC (One Strain - Many Compounds)* (BODE et al., 2002; CHIANG et al., 2009).

Nesse contexto, a *OSMAC* vem sendo incorporada aos estudos metabolômicos como ferramenta útil para obtenção de novos metabólitos secundários. Estudos têm demonstrado que os micro-organismos são sensíveis aos meios de cultura na produção de metabolitos secundários, e que a mudança do meio de cultura pode levar a alterações nos perfis do metabolômicos (DING et al., 2012, CHOMCHEON et al, 2009). Desse modo, o meio de cultura é um dos principais fatores que têm impacto sobre a produção de metabólitos de um micro-organismo.

Recentemente, ZHENG et al., 2013 e ZHAO et al., 2015, ao estudar o fungo *Nodulisporium* sp., isolado do líquen *Everniastrum* sp, observaram a produção de uma classe de esteróides (4-metil-progesteróides), em meio solido de arroz, raramente

obtidos na natureza e suas atividades biológicas ainda poucos relatadas. Utilizando a abordagem *OSMAC* o micro-organismo foi submetido a fermentação em diversos meios de cultivo e, a investigação química conduziu ao isolamento de dez análogos do 4-metil-progesteróides, em meio de cultivo MDB.

Estudos indicam que a incorporação de metais pesados ao meio de cultura, não só melhoraram a produção de metabólitos secundários, mas também aumentam a diversidade estrutural de metabólitos produzidos pelo fungo. Em revisão sobre a avaliação do efeito dos íons metálicos sobre a produção de metabólitos secundários/diferenciação celular, Weinberg, 1990, descreve que a regulação está envolvida principalmente a nível de transcrição. Além, três metais pesados, Mn^{+2} , Fe^{+3} e Zn^{+2} desenvolvem um papel chave no metabolismo secundário de uma grande variedade de micro-organismos (PARANAGAMA et al, 2007; PETTI, 2011).

Estudos realizados por FILL e colaboradores (2016) demonstraram que o metabolismo secundário de *Penicillium brasilianum* é sensível a variação da composição química do meio de cultivo. Em trabalhos anteriores *P. brasilianum* (FILL, et al., 2013), isolado das cascas da raiz de *Melia azedarach*, demonstrou ser um importante produtor de metabólitos secundários bioativos, principalmente brasiliamidas, meroterpenos, alcaloides, principalmente verrucologinina e verrucologinina TR2. Por meio da adição de $CuSO_4$ ao meio de cultura, *P. brasilianum* levou a inibição da biossíntese da verrucologinina e, ao mesmo tempo foi capaz de elicitar um novo composto sob estas condições, um ciclodepsipeptídeo, a estrutura única com três aminoácidos cíclicos e ácido pipecolínico, que é raro como produtos naturais, e este foi descrito pela primeira vez no em um organismo terrestre.

De posse do conhecimento de que os fungos endofíticos são prolíficos produtores de substâncias bioativas associado ao fato que alterações nas condições de crescimento microbiano aumentam a diversidade da produção metabólica, esse nicho de micro-organismos se torna uma fonte promissora para a descoberta de novos metabólitos de interesse. E possam contribuir para o entendimento das interações entre os micro-organismos e a espécie hospedeira e de valor biotecnológico.

1.3 *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae)

A espécie *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) é um exemplo notável de como variações morfológicas ocorrem de acordo com diferentes ecossistemas de origem, sendo que tais eventos parecem estar relacionados com as adaptações ao ambiente e com a plasticidade fenotípica. Trata-se de um importante representante do gênero *Casearia* Jacq. que contém cerca de 180 espécies de distribuição neotropical (SLEUMER, 1980; MARQUETE, 2010) e com 50 delas largamente distribuídas no Brasil (MAISTRO et al., 2004). Devido à enorme diversidade morfológica, Sleumer (1980) admite duas variedades distintas para esta espécie: *C. sylvestris* var. *sylvestris* e *C. sylvestris* var. *língua* (Figura 5).

Figura 5 - Variedades morfoamatômicas de *Casearia sylvestris*.

Casearia sylvestris var. *sylvestris*



Casearia sylvestris var. *língua*



Fonte: Autor

Além da grande importância química e ecológica, esta espécie possui também notável destaque econômico e farmacológico devido aos usos populares e comerciais de *C. sylvestris*, que incluem o tratamento de úlceras e gastrites, utilização como cicatrizante e antiofídico (FERREIRA et al., 2011). Propriedades biológicas de extratos, frações ou substâncias isoladas desta espécie têm sido estudadas, tais como as atividades antiulcerogênica (BASILE et al., 1990; ESTEVES et al., 2005), antiofídica (BORGES et al., 2000; BORGES et al., 2001; CAVALCANTE et al., 2007;), citotóxica (DA SILVA et al., 2008; MAISTRO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009; FERREIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2010) e anti-inflamatória (RASLAN et al., 2002), dentre outras. Por este motivo, *C. sylvestris* é uma das espécies consideradas como prioritárias

para conservação e manejo sustentável, uma vez que devido ao disseminado uso popular, torna-se alvo fácil para a exploração comercial e medicinal.

Quimicamente, tanto *C. sylvestris* quanto outras espécies do gênero *Casearia*, caracterizam-se pela presença de diterpenos clerodânicos altamente oxigenados, marcados pela presença de insaturações e geralmente com hidroxilas esterificadas. Tais compostos, também denominados casearinas, constituem marcadores taxonômicos para *Casearia* e são amplamente encontrados nas folhas, caule, casca do caule, raiz e sementes de indivíduos do gênero (CARVALHO et al., 1998; CARVALHO et al., 2009; SANTOS et al., 2007; WANG et al., 2009).

Estudos da variabilidade química infraespecífica da espécie *Casearia sylvestris* realizados por Bueno (2015), confirmam a produção prioritária de flavonoides glicosilados pela variedade *lingua*, para a variedade *sylvestris*, foi possível observar a produção característica de diterpenos clerodânicos.

A potencialidade química e biológica apresentada pelas variedades morfoanatômicas da espécie *Casearia sylvestris* associada ao fato que os fungos endofíticos apresentam uma enorme capacidade de produzir metabólitos secundários potencialmente bioativos, nos motivaram ao estudo químico e biológico dos fungos endofíticos associados a esta espécie vegetal, objetivando obter dados que direcionem para a compreensão da relação endófito-hospedeiro e a utilização dos produtos destes fungos nas áreas de interesse.

1.4 Gênero: *Preussia*

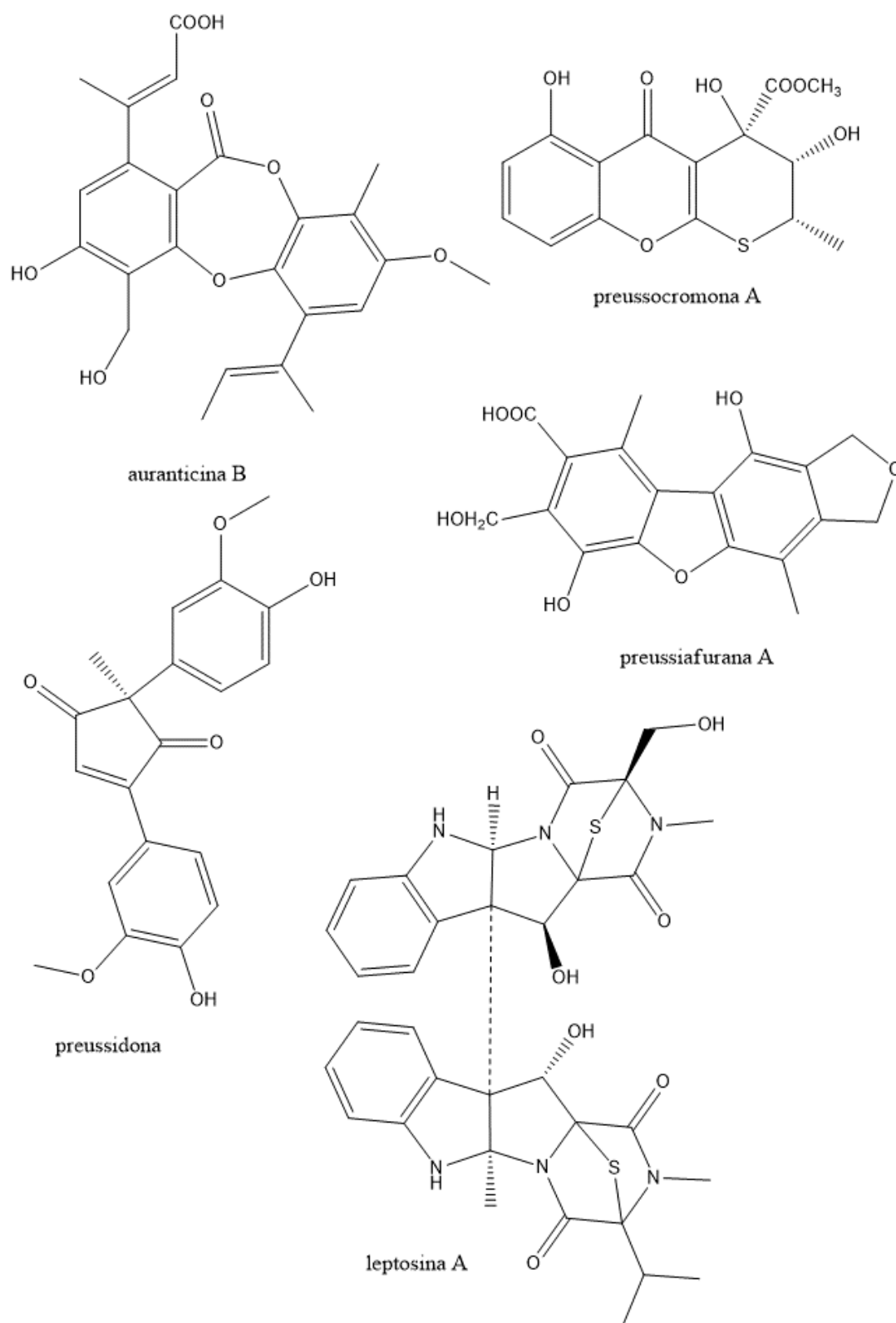
O gênero *Preussia* é um fungo filamentoso pertencente à família *Sporormiaceae*, e classe dos *Ascomycota*, o qual compreende espécies do solo, madeira, plantas mortas e ocasionalmente, como endofíticos. Várias espécies de *Preussia* foram documentados e incluem *P. africana*, *P. australis*, *P. mínimos*, *P. cylindrica* e *P. funiculata* como as principais espécies representantes do gênero (PFENNING, 2000; MAPPERSON et al., 2014).

Estudos químicos de *Preussia* revelam que o, metabaloma deste fungo endofítico ainda é pouco estudado. Pesquisa realizada na base de dados DNP (*Dictionary of Natural Products*) verificou a apenas trinta e dois compostos isolados para esse gênero. Estes resultados reforçam a necessidade de estudos da diversidade

metabólica de fungos endofíticos, uma vez que estes podem ser uma fonte promissora de novos metabólitos secundários bioativos.

Zhang et al. (2012) descreveram o isolamento de uma tiopiranocromona e cinco cromonas a partir do fungo *Preussia afriacana*, isolado do líquem *Ramalina calicaris*, sendo que o isolamento do metabolito da classe das tiopiranocromonas é o primeiro relato de ocorrência natural.

Na Figura 6, estão mostrados alguns metabólitos produzidos por fungos do gênero *Preussia*.

Figura 6 - Substâncias isoladas do gênero *Preussia*.

Fonte: Autor

Objetivos

2. Objetivos

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo a bioprospecção dos fungos endófitos associados as duas variedades morfoanatômicas da espécie vegetal *Casearia sylvestris* e estudar o perfil químico de *Preussia* sp. por abordagens OSMAC.

Materiais e Métodos

3. Materiais e métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Meios de cultivo

Tabela 1 - Meios de cultura utilizados para o cultivo dos fungos endofíticos.

Meios de cultura	[g L ⁻¹]	Composição	Fabricante
BDA	39	Fécula de batata (4g), dextrose (20g) e ágar (15g)	Acumedia
MDB	24	Fécula de batata (4g) e dextrose (20g)	Acumedia
Milho	1125	-	Yoki

Fonte: Autor

3.1.2 Solventes

Para a preparação dos extratos brutos em escala reduzida e ampliada, como para cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC), separações cromatográficas em coluna (CC) e em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram utilizados: solventes padrões analíticos (PA) como metanol (MeOH), acetato de etila (AcOEt), diclorometano (CH₂Cl₂), clorofórmio (CHCl₃) e solventes de grau CLAE como MeOH e acetonitrila (CH₃CN) das seguintes marcas: Merck, J.T. Baker, Synth e Qhemis.

Em análises de ressonância magnética nuclear (RMN) uni e bidimensional (1D e 2D) utilizou-se os solventes deuterados: DMSO-*d*₆, CDCl₃ e CD₃OD (Aldrich, CIL e Deutero).

3.1.3 Reagentes

Para os estudos dos extratos com adição de metais foi utilizado sulfato de cobre pentaidratado (CuSO₄.5H₂O) da marca Synth.

3.1.4 Cromatografia em Coluna

As separações cromatográficas em coluna foram realizadas em colunas de vidro, empregando como fase estacionária sílica de fase reversa do tipo octadesil silano (C-18), da marca Sorbent Technologies, com porosidade de 60 Å e tamanho de partículas de 40-75 µm (200-400 mesh) e sílica gel sílica gel da marca Aldrich, com porosidade de 60 Å e tamanho de partículas de 63-200 µm (70-230 mesh). As dimensões das colunas variaram de acordo com a quantidade de material adsorvido.

3.1.5 Cromatografia de Camada Delgada Comparativa

Nas análises por CCDC foram utilizadas placas de sílica gel 60 G F254 analíticas (Macherey-Nagel).

3.1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

As análises por CLAE-DAD analítico foram realizadas no equipamento Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A), com degaseificador DGU-20A3 e injetor automático Shimadzu SIL-20A. O tratamento dos dados foi obtido através do software Shimadzu LC solution (versão 1.25 SP2). Foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex Luna com sílica tipo octadesil silano (C-18) (250 x 4,60 mm; 5 μ m).

As separações cromatográficas por CLAE-DAD preparativo foram realizadas no equipamento Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu SPD-M20A), com degaseificador, injetor manual e software Shimadzu LC solution (versão 1.25 SP4). Foi utilizada uma coluna semi-preparativa Phenomenex Luna, sílica C-18 (250 x 10,0 mm; 5 μ m).

3.1.7 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (UHPLC)

As análises por UHPLC foram realizadas no equipamento Dionex, modelo Ultimate 3000 RS acoplado a detector de arranjo de diodos, compartimento para coluna com aquecimento, bomba quaternária e amostrador automático, todos modelo 3000RS. Para o tratamento e aquisição dos dados utilizou-se o software Chromeleon (versão 6.80SR12, Dionex). Foi utilizada uma coluna analítica Phenomenex de fase reversa com núcleo sólido (Core-Shell Kinetex de 150 mm x 2,1 mm, 2,6 μ m), com pré-coluna de mesma fase estacionária.

3.1.8 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN 1D e 2D foram realizados em dois espectrômetros, Bruker Fourier 300 com campo magnético de 7,0 T e Bruker Avance III HD 600 com campo magnético de 14,1 T e criosonda TCI (Triple Chanel Inverse) de 5 mm. Deslocamentos químicos de ^1H foram referenciados de acordo com o pico dos solventes, CDCl_3 (δ_{H} 7,26 -

Cambridge Isotope Laboratories, Inc.), DMSO-d₆ (δ_H 2,50 - Sigma-Aldrich;) ou CD₃OD (δ_H 3,31 - Sigma-Aldrich), utilizados para solubilizar as amostras. Os deslocamentos químicos de ¹³C também foram referenciados de acordo com o pico dos solventes, CDCl₃, DMSO-d₆ ou CD₃OD (δ_C 77,2; 39,5; 49,0 respectivamente).

3.1.9 Espectrometria de Massas

Para as análises de Espectrometria de Massas (EM) de alta resolução foi utilizado um espectrômetro da Bruker, modelo Maxix Impact, equipado com eletrospray (ESI) como fonte de ionização e analisador quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF).

3.1.10 Outros

Tabela 2 - Equipamentos para o desenvolvimento do projeto.

<i>Equipamento</i>	<i>Fabricante</i>
Autoclave vertical	Quimis e Phoenix Luferco
Câmara de fluxo laminar	Pachane PA-310
Milli-Q	Millipore
Rotaevaporador	BUCHI
Balança analítica	Mettler Toledo AG 245 e AG 204
Balança semi-analítica	Gehaka BG 2000

Fonte: Autor

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção das linhagens fúngicas

Foram selecionados e coletados folhas e ramos saudáveis das espécies *Casearia sylvestris* var. *sylvestris* e *Casearia sylvestris* var. *lingua* na cidade de Araraquara-SP.

As espécies vegetais tiveram a identificação confirmada pela Dra. Roseli B. Torres, botânica especialista na antiga família Flacourtiaceae e curadora do Herbário do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Amostras testemunho da var. *lingua* e da var. *sylvestris* foram depositadas no referido herbário sob os códigos IAC 55839 (ARA 13, P.C.P. Bueno et al. 56) e IAC 55840 (ARA 14, P.C.P. Bueno 57), respectivamente.

O isolamento dos fungos endófitos iniciou-se com a lavagem da superfície do material vegetal em água corrente, e esterilização por imersão em NaClO 1% e em etanol 70%, seguida de uma dupla lavagem em água estéril (Tabela 3). Após o processo de esterilização, as folhas /ramos foram seccionados assepticamente (3 a 4) e incubados em placas de Petri contendo batata-dextrose-ágar (BDA) estéril. Após a esterilização em autoclave, adicionou-se o antibiótico sulfato de gentamicina ($66,7 \mu\text{g mL}^{-1}$) ao meio de cultivo para inibir o crescimento bacteriano. O crescimento dos fungos foi monitorado diariamente e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras (Figura 7).

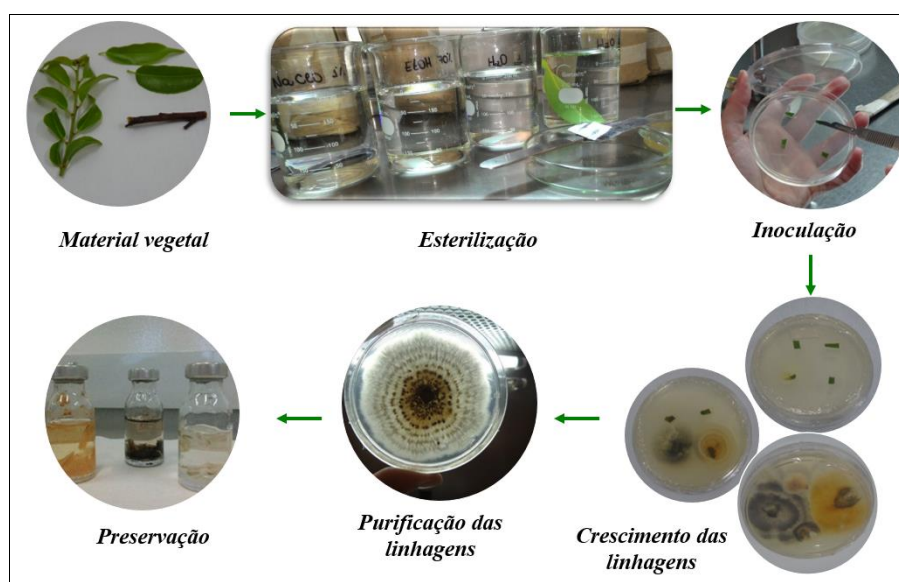
Estas foram avaliadas quanto à pureza, através da aparência uniforme nas placas, sendo posteriormente preservadas em água estéril (*slants*)

Tabela 3 - Tempo de esterilização das folhas e caule.

	<i>NaClO 1%</i>	<i>Etanol 70%</i>	<i>Águas de lavagem</i>
Folhas	3 min	1 min	10 min total
Ramos	5 min	3 min	10 min total

Fonte: Autor

Figura 7 - Etapas do isolamento das linhagens fúngicas.



Fonte: Autor

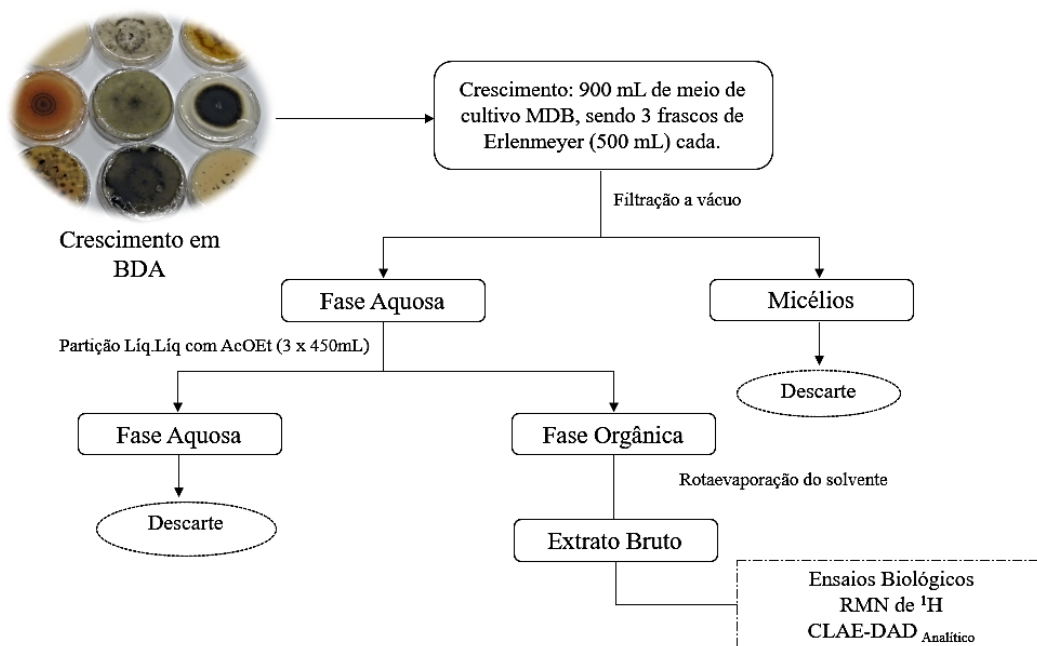
Após o isolamento, os fungos endófitos selecionados para os estudos químicos foram identificados por taxonomia e biologia molecular foi realizada pela empresa Genotyping (Botucatu-SP) e estão depositados na Micoteca do Departamento de Química Orgânica do IQ/Ar-UNESP.

3.2.2 Obtenção dos extratos brutos das linhagens fúngicas em escala reduzida

Os fungos isolados e preservados foram repicados em placas de Petri contendo BDA. Após o crescimento desses fungos, aproximadamente, um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado em meio líquido de batata-dextrose (MBD) contendo água ultra pura esterilizada (3 frascos de Erlenmeyer contendo 300 mL de meio líquido) por 28 dias a 25 °C, em modo estático.

Após 28 dias de incubação o caldo fermentado foi separado do micélio por filtração a vácuo e submetido à partição líquido/líquido com AcOEt (3 vezes, 450,0 mL). O solvente foi evaporado, obtendo-se assim os extratos bruto (Figura 8).

Figura 8 - Processo para obtenção dos extratos brutos pelos fungos endofíticos isolados.



Fonte: Autor

Os solventes recolhidos foram reutilizados em cada extração individual e após o término foram adequadamente descartados em frascos previamente rotulados e encaminhados ao descarte conforme as Normas Gerais de Gerenciamento de Resíduos Químicos no IQ/UNESP presente no site: www.iq.unesp.br/APOIO-TECNICO/normas-residuos.pdf.

Para as análises em CLAE-DAD modo analítico, as amostras (3,5 mg) foram solubilizadas em 1 mL de solução H₂O/CH₃CN (95:05) e submetidas a um “clean up” utilizando cartuchos de sílica C-18 (Mackerey-Nagel Chomabond® ou Phenomenex Strata™ - 3mL/500mg) acoplados em membrana Millipore® (0,2 µm), posteriormente redissolvidas na mesma condição. Após este procedimento, as amostras foram analisadas, utilizando uma coluna analítica Phenomenex Luna tipo octadesil silano (C-18), com injeção

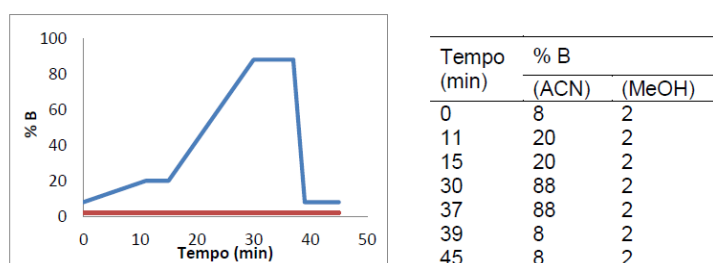
de 30,0 μL e eluição em gradiente linear de $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 95:05 à 00:100 em 40 min., mais 10 min limpeza, numa vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e faixa de detecção de 200 - 800 nm.

3.2.3 Análise multivariada dos dados de UHPLC dos extratos dos fungos isolados com os extratos das duas variedades morfoanatômicas de *C. sylvestris*

Com o objetivo de comparar estatisticamente a produção metabólica dos extratos brutos dos fungos isolados, com os extratos das folhas de *Casearia sylvestris* var. *lingua* e *Casearia sylvestris* var. *sylvestris*, estes foram analisados em UHPLC-DAD.

Para as análises em UHPLC, as amostras foram analisadas, utilizando-se uma coluna de fase reversa com núcleo sólido (coluna Core-Shell Kinetex de 150 mm x 2,1 mm, 2,6 μm , Phenomenex), com injeção de 0,2 μL e uma fase móvel ternária de H_2O (A), CH_3CN (B) e MeOH (C). O gradiente multilinear de 37 minutos está indicado na Figura 9 a seguir. Utilizou-se uma vazão de 0,250 mL/min e faixa de detecção de 200-800 nm.

Figura 9 - Método por UHPLC-DAD para as análises dos extratos brutos dos fungos isolados em comparação com os extratos das variedades morfoanatômicas de *C. sylvestris*.



Para a análise dos dados, todos os cromatogramas, adquiridos em 235 e 254 nm, foram exportados em formato ASCII, as matrizes resultantes foram então exportadas para o Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA). As matrizes foram normalizadas, afim de, compensar variações decorrentes da preparação das amostras e, erros sistemáticos dos equipamentos. A normalização selecionada foi aquela, centrada na média, para que as coordenadas ficassem no centro do conjunto de dados.

Os perfis metabólicos obtidos foram analisados utilizando a ferramenta quimiométrica: Análise Discriminatória por Mínimos Quadrados (PLS-DA – Partial last Square Discriminant Analysis), que otimiza a separação entre os grupos através da variação rotacional das componentes principais (PC Principal Component), sendo obtidas matrizes denominadas de *scores* e *loadings*. Tais matrizes revelam informações sobre as relações entre as amostras dispostas em planos dimensionais (*scores*) assim como para as variáveis (*loadings*) (SAVORANI, et al., 2013).

O software utilizado para o tratamento dos dados foi o programa computacional Matlab (2014a).

3.2.4 Variações no meio de cultivo de *Preussia* sp. (CL-F-04).

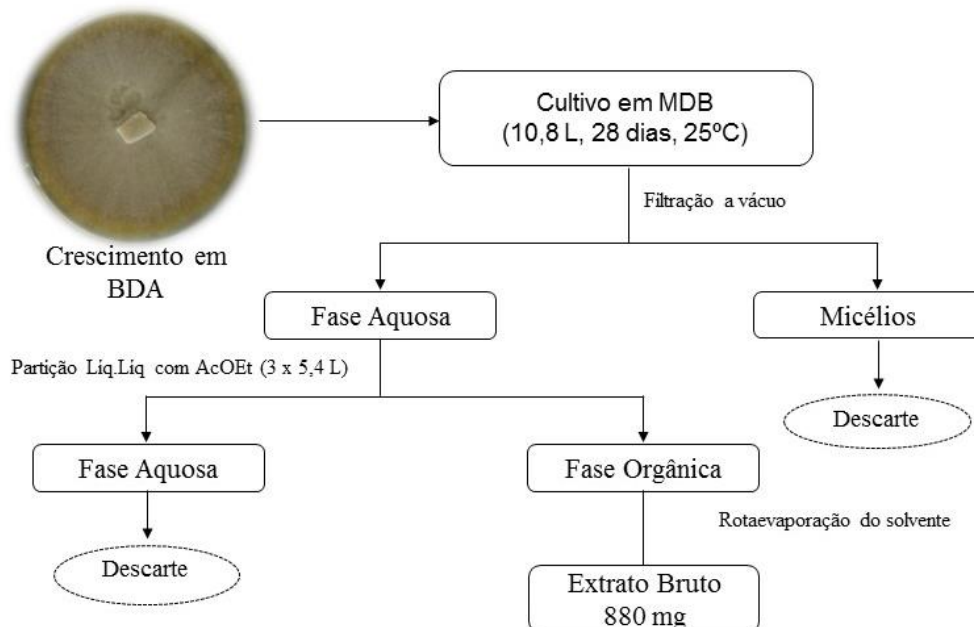
Após uma análise detalhada dos perfis químicos e biológicos dos fungos endofíticos isolados, a linhagem fúngica codificada como CL-F-04 (*Preussia* sp.), foi selecionada para estudo químico e biológico.

O fungo endofítico *Preussia* sp. foi cultivado em três condições de crescimento distintas, alterando-se o seu meio de cultivo (MDB, MDB+Cu⁺² e Milho).

- Obtenção do extrato bruto de *Preussia* sp. em meio de cultivo MDB

Esta linhagem, que foi preservada em *slants* foi cultivada em placas de Petri preparadas com meio BDA. Após seu crescimento, aproximadamente, um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado em meio líquido MBD, por 28 dias 25 ° C. Após esse período de incubação fez-se o processo descrito na Figura 10.

Figura 10 - Processo para obtenção do extrato bruto de *Preussia* sp. em meio de cultivo MDB.



Fonte: Autor

- Obtenção do extrato bruto de *Preussia* sp. em meio de cultivo MDB+Cu⁺²

O fungo endofítico *Preussia* sp. preservado em *slants* foi cultivado em placas de Petri preparadas com meio BDA, por 5 dias, posteriormente porções de massa micelar foram inoculadas em uma solução aquosa de peptona e glicose, 0,2% e 0,5% respectivamente, por 7

dias, para reativação da linhagem fúngica. Após esse período de incubação o fungo foi inoculado em placas de Petri preparadas com meio BDA. Após seu crescimento, aproximadamente, um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado em meio líquido MBD com solução de sulfato de cobre, por 28 dias 25 ° C. A concentração utilizada está descrita na Tabela 4.

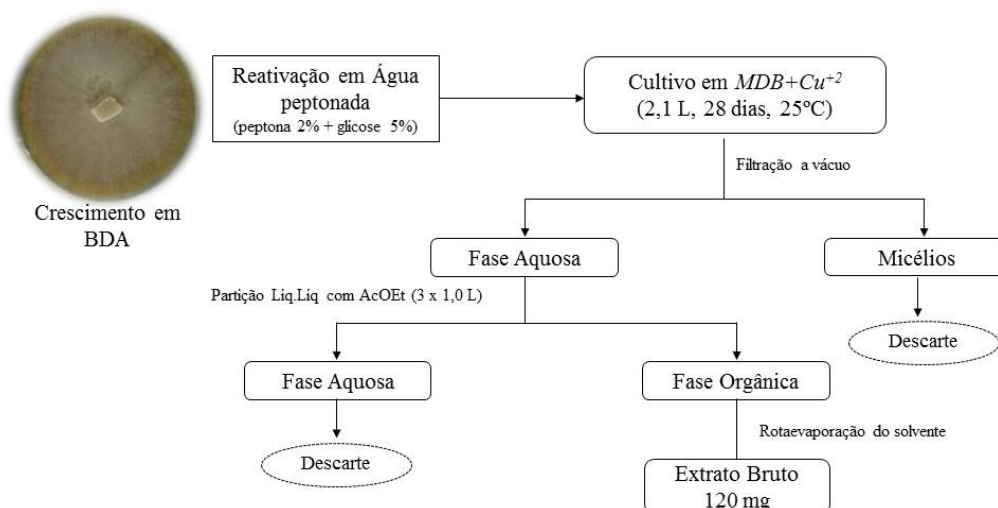
Tabela 4 - Condições do meio de cultivo MDB+Cu⁺².

	$[]$ final em μM	Volume de MDB em mL	$[]$ da solução estoque de CuSO ₄ .5H ₂ O em μM	Volume da solução estoque em μL
MDB+Cu⁺²	250	250	100	625

Fonte: Autor

Ao termino do período de incubação realizou-se o processo descrito na Figura 11 para obtenção do extrato bruto.

Figura 11 - Processo para obtenção do extrato bruto de *Preussia* sp. em meio de cultivo MDB+Cu⁺².

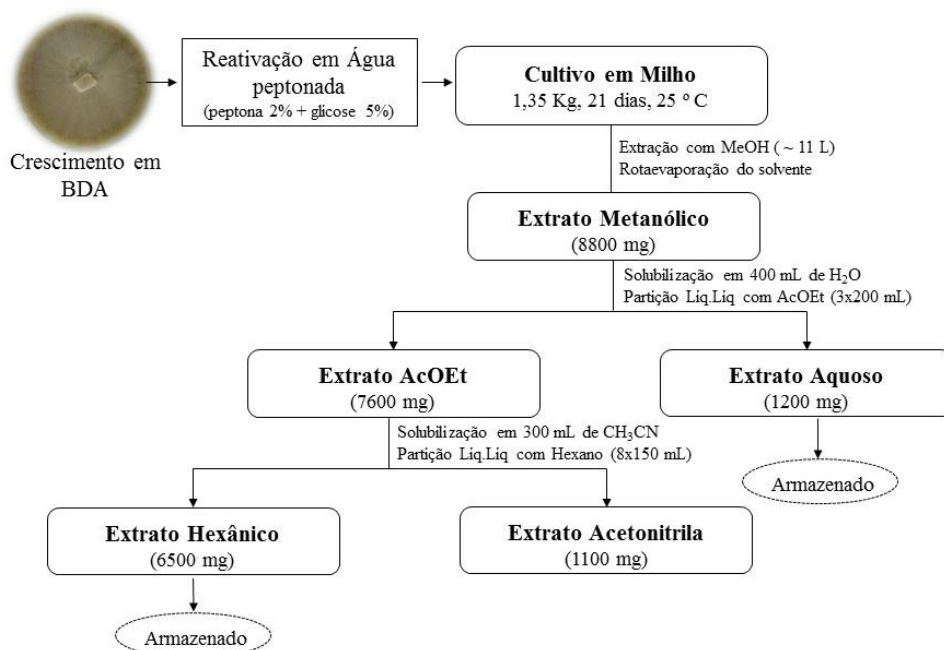


Fonte: Autor

- Obtenção do extrato bruto de *Preussia* sp. em meio de cultivo Milho

A linhagem endofítica, preservada em *slants* foi cultivada em placas de Petri preparadas com meio BDA, e reativada seguindo a metodologia descrita acima. Após o processo de reativação *Preussia* sp., aproximadamente um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado em meio sólido Milho, por 21 dias 25 ° C. Terminado o período de incubação, fez-se o processo descrito na Figura 12.

Figura 12 - Processo para obtenção do extrato bruto de *Preussia* sp. em meio de cultivo Milho.

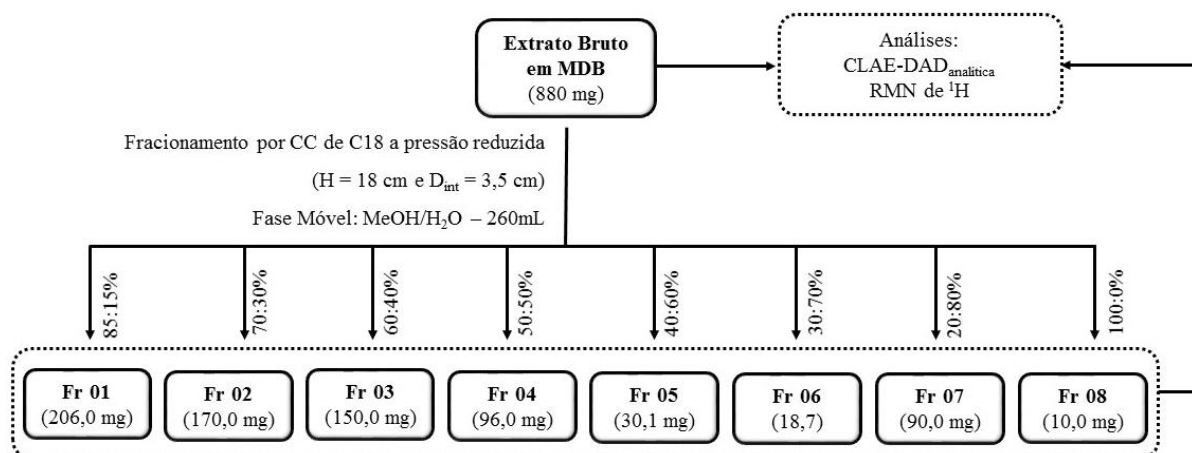


Fonte: Autor

3.2.5 Fracionamento e obtenção das substâncias isoladas de *Preussia* sp. em meio de cultivo MDB

A análise dos cromatogramas em CLAE-DAD em escala analítica do extrato bruto em meio de cultivo MDB, conduziu ao fracionamento do extrato por cromatografia em coluna sob vácuo, utilizando como fase estacionária sílica de fase reversa (C18) e como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente, resultando em 8 frações (Figura 13). As frações obtidas foram submetidas a análise em RMN de ¹H e em CLAE-DAD nas mesmas condições descritas no item 3.2.2.

Figura 13 - Fracionamento do extrato bruto de *Preussia* sp. em meio de cultivo MDB.

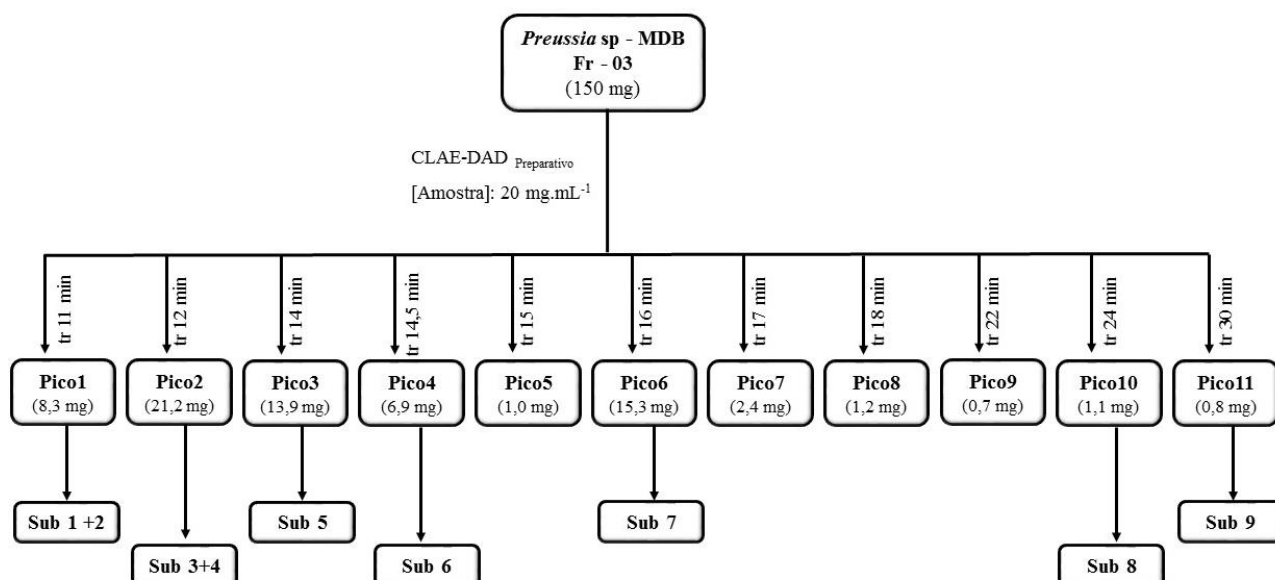


Fonte: Autor

Em seguida as frações Fr - 03 e Fr - 06 foram analisadas e otimizadas em CLAE-DAD analítico (Shimadzu) utilizando uma coluna C18 (PhenomenexLuna; 250 x 4,60 mm; 5 μ m) e eluição em gradiente ($\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$). A partir de então, as frações foram submetidas a fracionamento em CLAE preparativo para isolamento dos metabolitos.

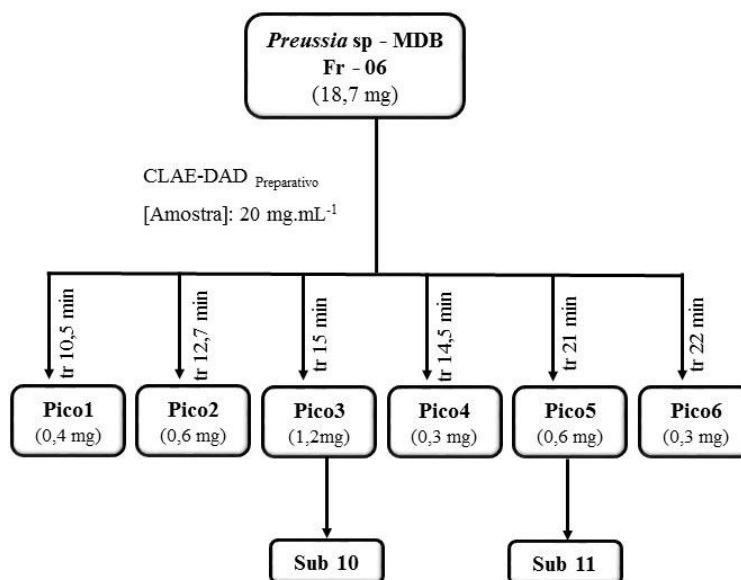
A fração Fr - 3 (150 mg), codificada como *Preussia* sp. MDB-Fr 03, foi submetida à CLAE em escala semi-preparativa, no qual foi usado uma coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.6 mm; 5 μ m; 100Å), em gradiente linear de 10 a 50% ($\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$) por 40 minutos e vazão de 3,5 mL.min⁻¹, volume de injeção de 200 μ L e faixa de detecção de 200-400 nm e monitoramento em 220 nm. Resultando no isolamento de nove substâncias (Figura 14).

Figura 14 - Isolamentos dos metabólitos da fração *Preussia* sp. MDB-Fr03.



Fonte: Autor

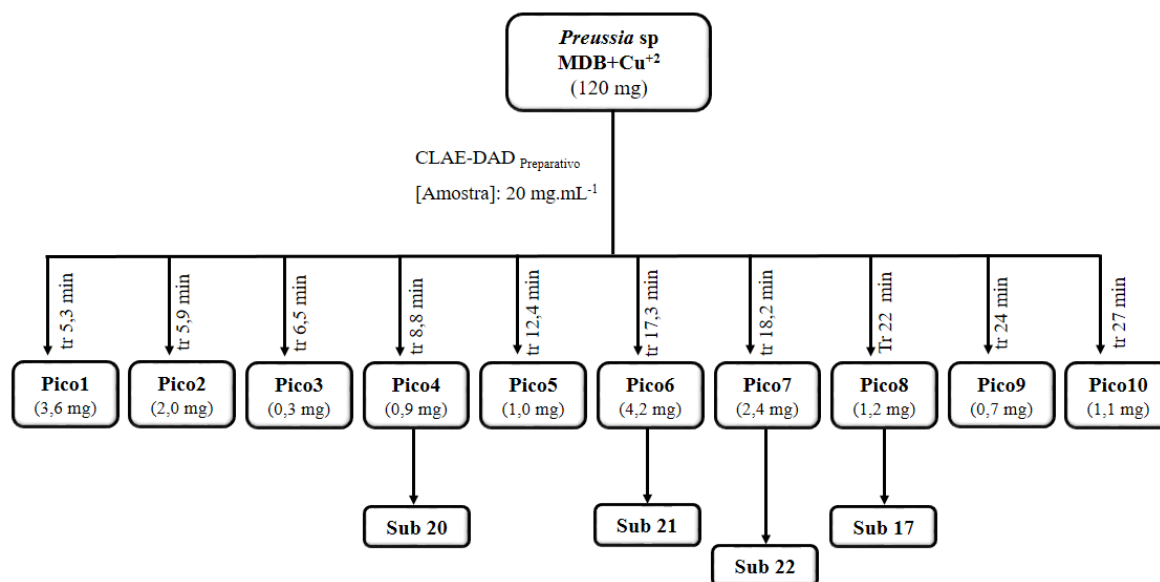
A fração Fr - 6 (18,7 mg), codificada como *Preussia* sp. MDB-Fr 06, foi submetida à CLAD em escala semi-preparativa, no qual foi usado uma coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.6 mm; 5 μ m; 100Å), em gradiente linear de 35 a 75% ($\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$) por 30 minutos e vazão de 3,5 mL min⁻¹, volume de injeção de 300 μ L e faixa de detecção de 200-400 nm e monitoramento em 254 nm, resultando no isolamento de duas substâncias (Figura 15).

Figura 15 - Isolamentos dos metabólitos da fração *Preussia* sp. MDB-Fr06.

Fonte: Autor

3.2.6 Fracionamento e obtenção das substâncias isoladas de *Preussia* sp. em meio de cultivo MDB+Cu⁺²

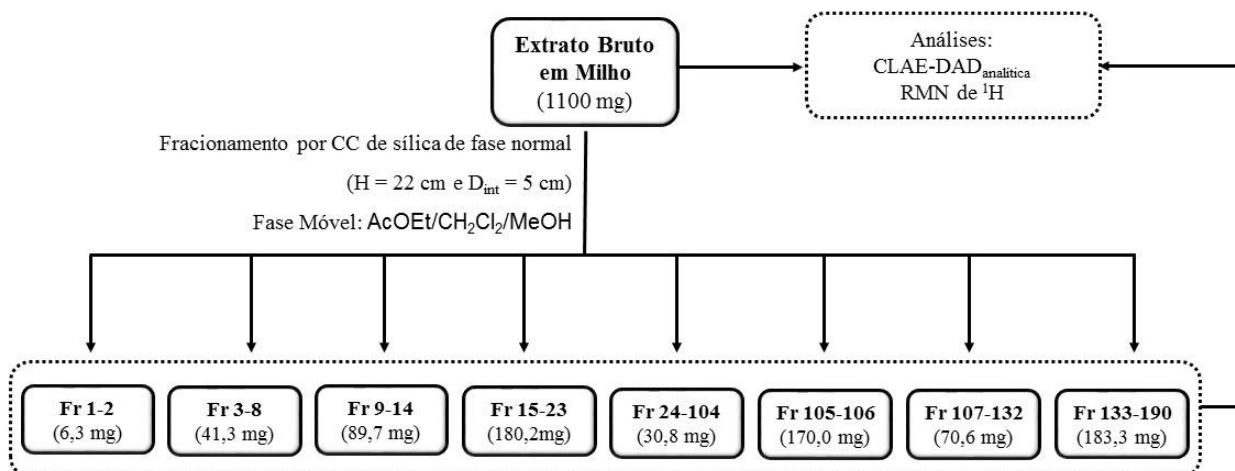
A partir do perfil obtido por CLAE-DAD em escala analítica e CCDC do extrato bruto em meio de cultivo MDB+Cu⁺², optou-se por submeter o extrato (120 mg) a um fracionamento em CLAE-DAD em escala semi-preparativa, no qual foi usado uma coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.6 mm; 5 µm; 100Å), em gradiente linear de 30 a 70% (H₂O:CH₃CN) por 50 minutos e vazão de 3,5 mL min⁻¹, volume de injeção de 300 µL e faixa de detecção de 200-800 nm e monitoramento em 254 e 220 nm. Resultando no isolamento de três substâncias e o reisolamento de uma sustância (Figura 16).

Figura 16 - Isolamentos dos metabólitos do extrato *Preussia* sp. MDB+Cu⁺².

Fonte: Autor

3.2.7 Fracionamento e obtenção das substâncias isoladas de *Preussia* sp. em meio de cultivo Milho

Após análise dos cromatogramas em CLAE-DAD em escala analítica e CCDC do extrato bruto em meio de cultivo Milho, optou-se por um fracionamento do extrato por cromatografia em coluna com sílica gel 60H, eluída com sistemas isocráticos e misturas binárias de AcOEt, CH₂Cl₂ e MeOH, com gradiente de polaridade crescente. Este processo cromatográfico resultou em 190 frações (aproximadamente 10 mL cada), as quais foram reunidas em 8 frações (Figura 17). Estas foram submetidas a análise em RMN de ¹H e em CLAE-DAD nas mesmas condições descritas no item 3.2.2.

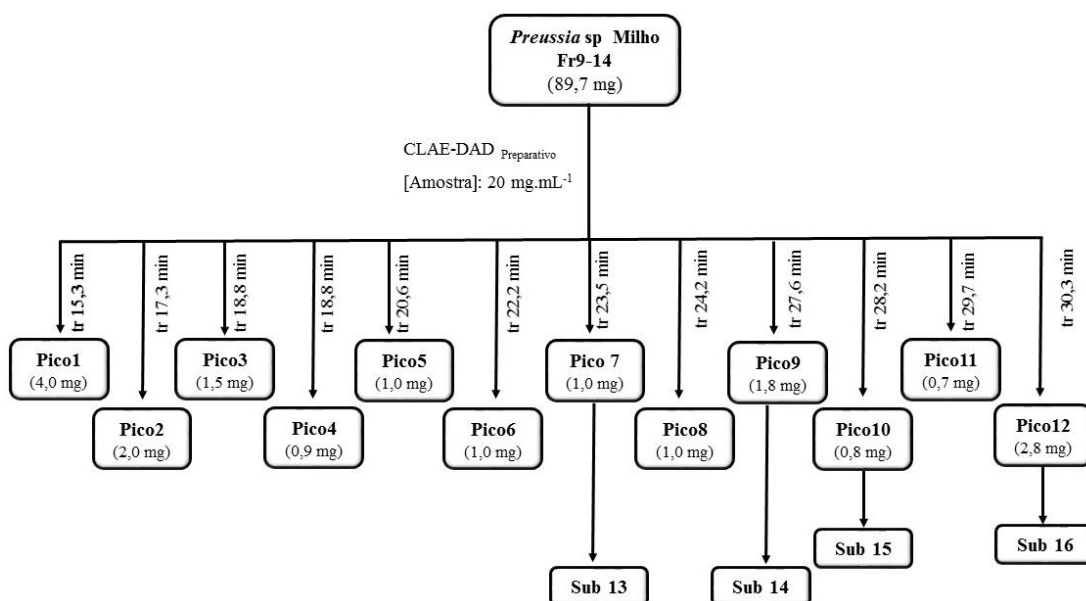
Figura 17 - Fracionamento do extrato bruto de *Preussia* sp. em meio de cultivo Milho.

Fonte: Autor

A partir da análise desses dados foram selecionadas as seguintes frações para o isolamento dos constituintes: Fr9-14, F15-23 e F105-106, otimizadas em CLAE-DAD analítico (Shimadzu) utilizando uma coluna C18 (PhenomenexLuna; 250 x 4,60 mm; 5 μ m) e eluição em gradiente ($H_2O:CH_3CN$). A partir de então, foram submetidas a fracionamento em CLAE preparativo para isolamento dos metabolitos.

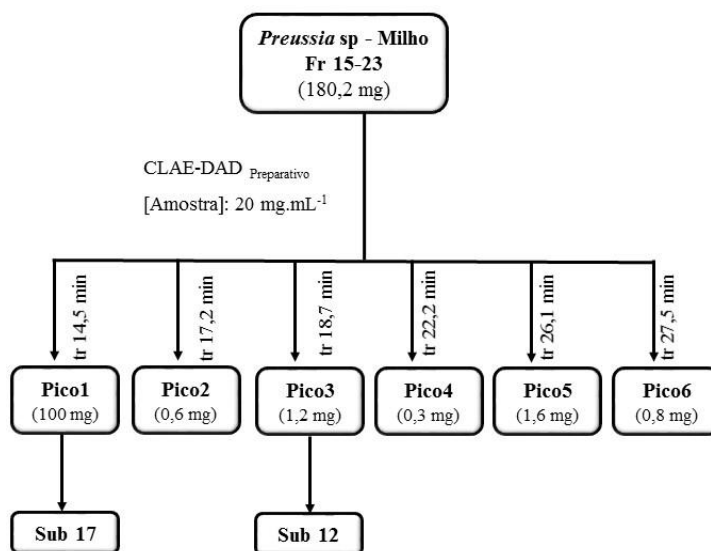
A fração Fr9-14 (87,9 mg), codificada como *Preussia* sp. Milho- Fr9-14, foi submetida à CLAE em escala semi-preparativa, no qual foi usado uma coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.6 mm; 5 μ m; 100Å), em gradiente linear de 35 a 80% ($H_2O:CH_3CN$) por 50 minutos e vazão de 3,5 mL.min⁻¹, volume de injeção de 200 μ L e faixa de detecção de 200-400 nm e monitoramento em 254 nm, resultando no isolamento de quatro substâncias (Figura 18).

Figura 18 - Isolamentos dos metabolitos da fração *Preussia* sp. Milho-Fr9-14.



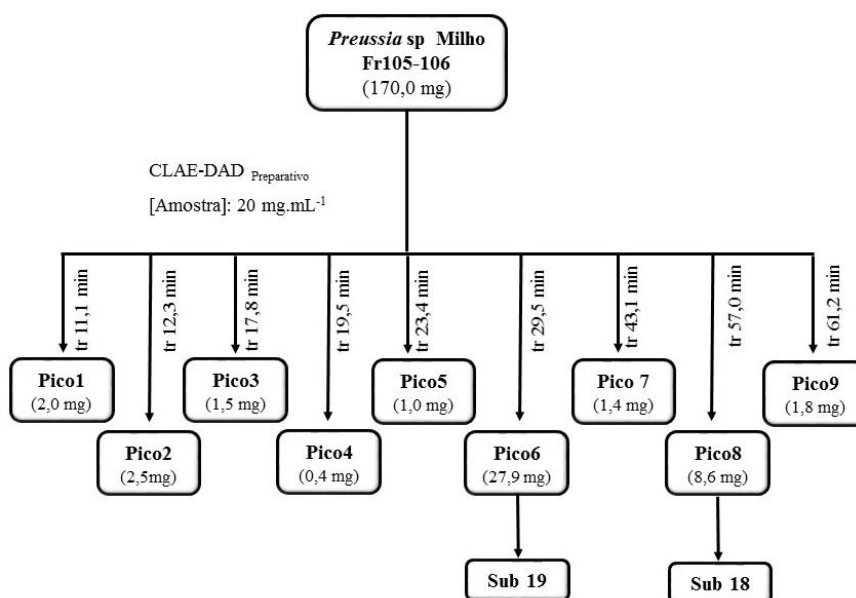
Fonte: Autor

A fração Fr15-23 (180,2 mg), codificada como *Preussia* sp. Milho- Fr15-23, foi submetida à CLAE em escala semi-preparativa, no qual foi usado uma coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.6 mm; 5 μ m; 100Å), em sistema isocrático de 68:32% ($H_2O:CH_3CN$) por 40 minutos e vazão de 3,5 mL.min⁻¹, volume de injeção de 300 μ L e faixa de detecção de 200-400 nm e monitoramento em 254 nm, resultando no isolamento de duas substâncias (Figura 19).

Figura 19 - Isolamentos dos metabólitos da fração *Preussia* sp. Milho-Fr15-23.

Fonte: Autor

A fração Fr105-106 (170,0 mg), codificada como *Preussia* sp. Milho- Fr105-106, foi submetida à CLAE em escala semi-preparativa, no qual foi usado uma coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4.6 mm; 5 μ m; 100Å), em sistema isocrático de 74:26 (H₂O:CH₃CN) por 75 minutos e vazão de 3,5 mL.min⁻¹, volume de injeção de 300 μ L e faixa de detecção de 200-400 nm e monitoramento em 254 nm, resultando no isolamento de duas substâncias (Figura 20).

Figura 20 - Isolamentos dos metabólitos da fração *Preussia* sp. Milho-Fr105-106.

Fonte: Autor

3.2.8 Ensaios Biológicos

3.2.8.1 Avaliação da atividade antifúngica¹

Os extratos brutos ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram eluídos em CCDC ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (85:15)). As cromatoplasmas foram nebulizadas com os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* (concentração de 5×10^7 esporos mL^{-1} , em solução de glicose e sais). As placas foram incubadas a 25°C por 48 horas, na ausência de luz. O padrão positivo utilizado para comparação foi a nistatina ($5 \mu\text{g}$).

3.2.8.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica¹

A atividade anticolinesterásica foi detectada a partir da eluição dos extratos brutos ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) em placas de sílica gel com eluentes adequados. Nestas cromatoplasmas foram borrifadas uma solução da enzima acetilcolinesterase, em seguida incubadas em câmara úmida fechada a 37°C por 20 minutos e após este período foi borrifada uma solução C². Como padrão positivo foi utilizado o composto fisostigmina a $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MARSTON; KISSLING; HOSTETTMANN, 2002).

¹Ensaio biológico realizado pela Profa. Dra. Maria Claudia Marx Young do Instituto Botânico, SP.

²Solução C contém 10 mL da solução A e 40 mL da solução B. Solução A: 250 mg de acetato de 1-naftila em 100 mL de etanol. Solução B: 400 mg do sal Fast Blue B em 160 mL de água destilada.

3.2.8.3 Avaliação da atividade antitumoral (citotoxicidade)³

O potencial citotóxico dos extratos brutos foi avaliado usando linhagens de células tumorais. As linhagens a serem utilizadas são MCF-7 (mama - humano), HCT-8 (cólon humano) HL-60 e CEM (leucemia promielocítica humana) e Melanoma- B16 (pele murina), cedidas pelo Mercy Children's Hospital, foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . Neste ensaio as células foram plaqueadas 2×10^4 céls./100 μL , para células suspensas e 2×10^3 céls 100 μL^{-1} , para células aderidas. As amostras teste foram acrescidas em diferentes concentrações, que variam entre 3,9 a $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ para extratos. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37°C . Em seguida, foram centrifugadas e o sobrenadante removido, quando então foram adicionados 200 μL da solução de MTT (sal de tetrazolium), incubando-se as placas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO em espectrofotômetro de placa a $\lambda = 550 \text{ nm}$.

³Ensaio realizado pelas Profa. Dra. Letícia Lotufo e Cláudia Pessoa, UFC, LOE.

3.2.7.4 Avaliação da atividade fitotóxica sobre o crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L.)⁴

A avaliação da atividade fitotóxica foi realizada pelo bioensaio de crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L. variedade Pizon). Cariopses de trigo foram germinadas em água destilada e mantidas em câmara de germinação a 25° C, durante 4 dias em ausência de luz (HANCOCK, et al. 1964). Posteriormente sob luz verde (NITSCH e NITSCH, 1956), para evitar a estagnação do crescimento das células, os coleóptilos foram selecionados e cortados em guilhotina de Van der Weij. Os ápices dos coleóptilos foram descartados, enquanto o restante foi cortado em 4 mm e adicionados em tubos de ensaio contendo uma solução tampão⁵ (pH = 5,6). Em cada tubo de ensaio foi adicionado 2 mL das amostras nas concentrações 0,8, 0,4 e 0,2 mg mL⁻¹ e cinco coleóptilos, sendo assim mantidos a 25° C no escuro, sob agitação de 6 rpm (MACÍAS et al., 2010). Após 24h, os coleóptilos foram retirados dos tubos, fotografados e medidos com o auxílio do programa Image J. Como controle positivo foi utilizado o herbicida comercial GOAL® (Oxyfluorfen 240 g.i.a. L⁻¹) nas mesmas concentrações das amostras. Como controle negativo foi utilizado a solução tampão com DMSO (5%).

A substância pura, foi testada nas concentrações 10⁻³, 3. 10⁻⁴, 10⁻⁴, 3. 10⁻⁵, 10⁻⁵ (NOVAES et al., 2013). Os dados foram avaliados pela porcentagem de inibição ou estímulo em relação ao controle negativo, onde o “zero” referência ao controle, enquanto os valores positivos indicam o estímulo da característica analisada, e os negativos a inibição (NOVAES et al., 2013). Todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Posteriormente foi utilizado ANOVA, seguida do teste de Tukey.

3 Ensaio realizado pela Profa. Dra Sonia Cristina Juliano Gualtieri, UFSCAR.

4 Solução tampão: sacarose (20 g L⁻¹), ácido cítrico monohidratado (1,05 g L⁻¹) e hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (2,9 g L⁻¹).

3.2.7.5 Determinação da capacidade de erradicação do biofilme⁵

Inocula-se *S. epidermidis* ATCC 12228 (Controle negativo, má formadora de biofilme) e *S. epidermidis* ATCC 35984 (controle positivo, boa formadora de biofilme) em Caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) 0,75% glicose em diversas replicatas em microplaca de 96 poços. A incubação é feita a 37 °C por 24 horas para a formação do biofilme. A capacidade de erradicação do biofilme formado será posteriormente testada após a formação do biofilme da *S. epidermidis* ATCC 35984.

Após 24 horas a 37 °C, retira-se o meio de cultura com as bactérias planctônicas e lava-se com solução fisiológica 0,85% para que permaneça na microplaca apenas o biofilme. Adiciona-se cada substância testada (512µg/mL), diluído em DMSO a 1% quando necessário, em meio BHI 0.75% glicose fresco nos poços onde há formação de biofilme pela *S. epidermidis* ATCC 34984. Como controle do crescimento do biofilme, 6 poços com o controle positivo e 6 com negativo deverão receber apenas caldo BHI 0.75% glicose, acrescido de 1% DMSO quando necessário. Incuba-se à 37 °C por mais 24 horas. Essa segunda etapa permitirá a erradicação do biofilme pelo composto.

Após as 24 horas, para quantificação do biofilme, os poços são lavados diversas vezes e corados com cristal violeta. Após etapas de lavagens e retirada do cristal violeta em excesso, é feita a remoção do cristal violeta com etanol:acetona (80:20) que é transferido para uma outra microplaca para quantificação indireta do biofilme a 595 nm. O controle do ensaio é baseado na comparação da média das absorbâncias do biofilme de *S. epidermidis* ATCC 34984 e da média das absorbâncias do biofilme de *S. epidermidis* ATCC 12228, ambos sem composto. A comparação das médias é realizada pelo Teste-T Student, cujo valor $P < 0.05$ prova a diferença significativa entre duas médias de duas amostras diferentes. Quanto à capacidade do composto em erradicar o biofilme, a análise dos dados é feita com base na comparação da produção de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 34984 sem composto com *S. epidermidis* ATCC 34984 com composto. Para isso utiliza-se a média das replicatas e o desvio padrão é feito para análise da coerência entre as replicatas. Para a análise estatística são realizadas análises de variância (ANOVA) da média de absorbância da produção de biofilme pela linhagem *S. epidermidis* ATCC 34984 sem composto e das médias de absorbância das produções de biofilme pela *S. epidermidis* ATCC 34984 com cada composto. Quando a análise de variância tem valor de $P < 0.05$ indica uma diferença significativa entre as duas amostras.

5 Ensaios realizados pela Profa. Dra. Ilana L. B. C. Camargo, Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo), IFSC-USP.

Bioprospecção dos fungos endofíticos associados as variedades morfoanatômicas da espécie *Casearia sylvestris*

4. Bioprospecção dos fungos endofíticos associados as variedades morfoanatômicas da espécie *Casearia sylvestris*

4.1 Isolamentos das cepas fúngicas

Os micro-organismos endofíticos podem ser observados diretamente em tecidos de plantas por meio de microscopia óptica ou eletrônica, ocupando espaços intercelulares, interior de tecidos vasculares ou intracelular. Entretanto, estudos do perfil químico de fungos endofíticos requer o isolamento dos micro-organismos em meios de cultura e sob condições controladas.

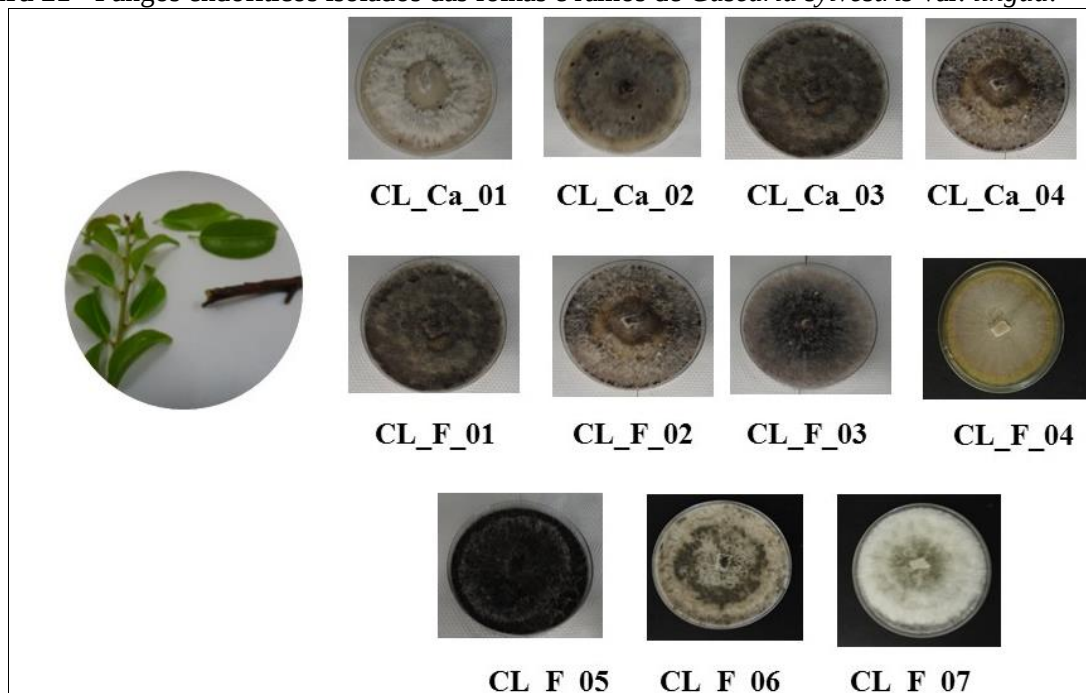
A etapa de isolamento e triagem dos fungos endofíticos foi realizada com plantas estudadas quimicamente pelo NuBBE, pertencentes à espécie vegetal *Casearia sylvestris* (*Casearia. sylvestris* var. *lingua* e *Casearia sylvestris* var. *sylvestris*) conduzindo ao isolamento de 24 linhagens puras (Figura 21 e Figura 22). Estas foram codificadas como CL_Ca_01, CL_Ca_02, CL_Ca_03, CL_Ca_04, CL_Ca_05, CL_Ca_06, CL_F_01, CL_F_02, CL_F_03, CL_F_04, CL_F_05, CS_Ca_01, CS_Ca_02, CS_Ca_03, CS_Ca_04, CS_Ca_05, CS_Ca_06, CS_Ca_07, CS_Ca_08, CS_Ca_09, CS_F_01, CS_F_02, CS_F_03 e CS_F_05, (CL= *Casearia. sylvestris* var. *lingua*; CS= *Casearia sylvestris* var. *sylvestris*; Ca= ramos; F= folha) sendo posteriormente preservados em *slant* (método Castelani) e depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica, IQ-UNESP.

O meio de cultivo utilizado para o isolamento dos fungos endofíticos foi BDA que é um meio rico em nutrientes primários essenciais ao crescimento de fungos. No entanto, devemos considerar que algumas espécies de micro-organismos precisam de condições especiais e nutrientes específicos para se desenvolver o que pode ter interferido no crescimento destas impedindo assim o seu isolamento. Desta forma, os fungos isolados foram os que melhor se adaptaram as condições de crescimento empregadas.

Foram adotadas como critérios de seleção as diferenças macroscópicas de cada cultura, como coloração, características da colônia (forma, borda, pigmentação, superfície) e taxa de crescimento. No entanto, algumas diferenças são muito sutis e podem estar relacionadas com as características microscópicas, como forma das células e do micélio, presença de estruturas reprodutivas (sexuada ou assexuada). Essa classificação preliminar dos micro-organismos permite uma melhor coleta dos dados, evitando a triagem de uma mesma

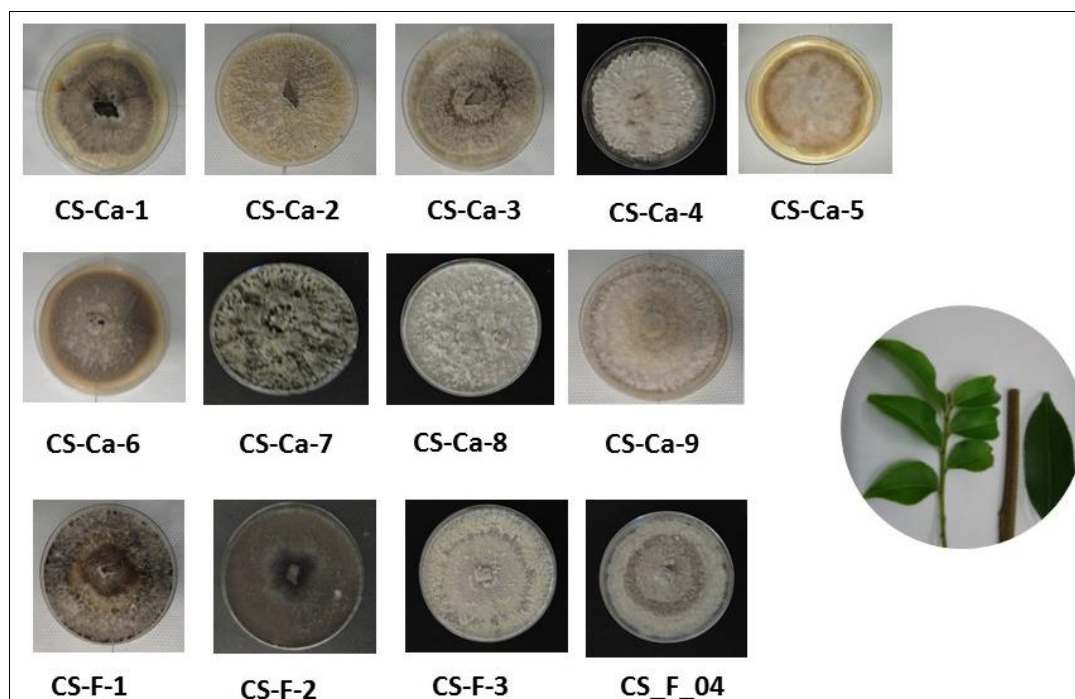
espécie repetidamente, uma vez que não foi possível a identificação de todos os fungos endofíticos isolados.

Figura 21 - Fungos endofíticos isolados das folhas e ramos de *Casearia sylvestris* var. *lingua*.



Fonte: Autor

Figura 22 - Fungos endofíticos isolados das folhas e ramos de *Casearia sylvestris* var. *sylvestris*.



Fonte: Autor

4.2 Prospecção química dos fungos isolados

As culturas fúngicas foram submetidas a crescimento em escala reduzida em meio líquido (MBD) para obtenção dos extratos brutos. As massas de extratos brutos obtidas foram consideradas satisfatórias (Tabela 5). A maior quantidade de massa observada para os fungos CL-F-05, CS-Ca-01 e CS-Ca-04 pode ser explicada pelo fato de que cada micro-organismo requer diferentes “condições ótimas de cultivo”, e neste trabalho foi empregada a mesma metodologia para todos os endófitos.

Tabela 5 - Massa dos extratos brutos obtida do cultivo dos fungos endofíticos isolados de *Casearia sylvestris* var. *lingua* e *Casearia sylvestris* var. *sylvestris* em MDB.

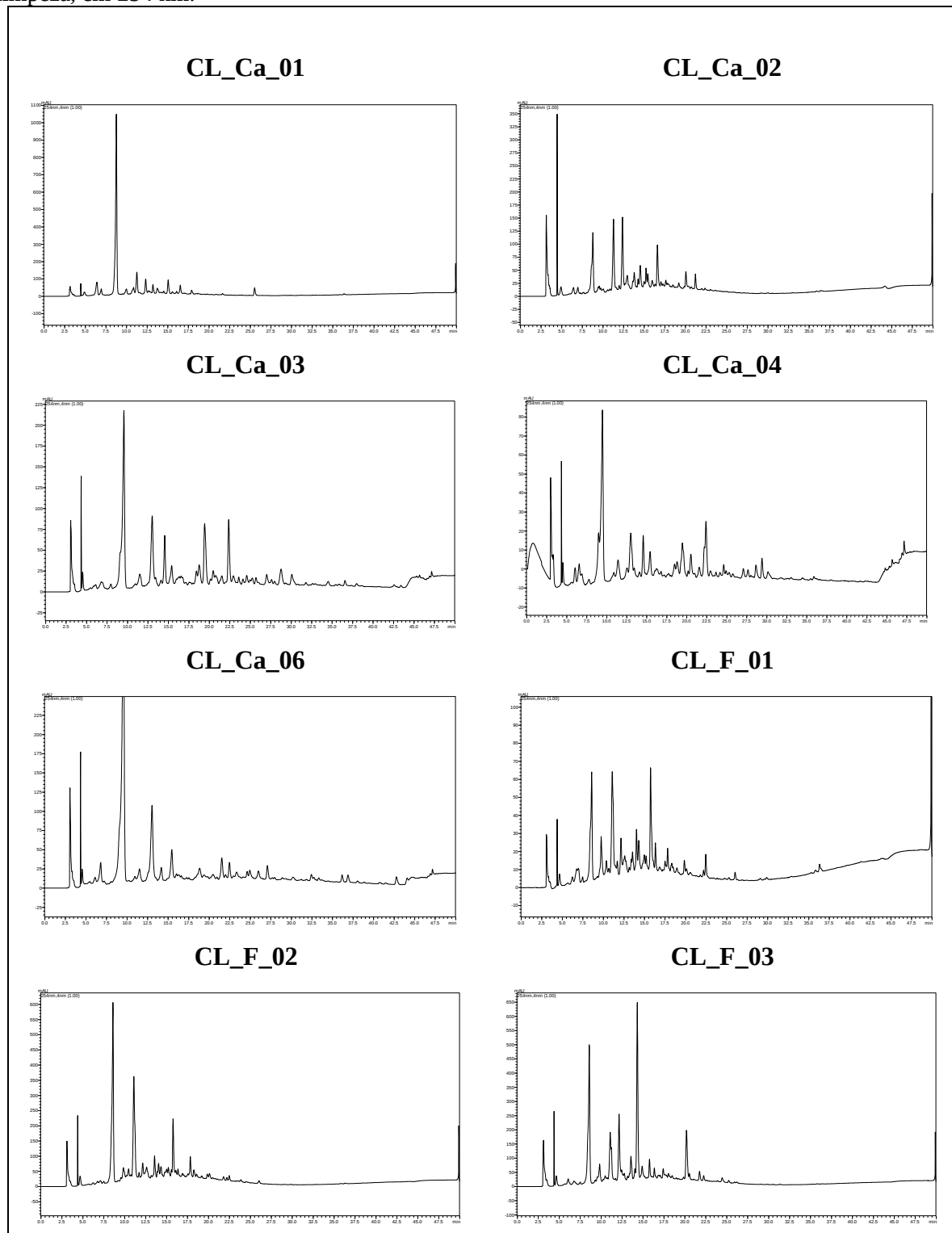
Folhas		Ramos	
Código do fungo	Extrato Bruto AcOEt (mg)	Código do fungo	Extrato Bruto AcOEt (mg)
CL_F_01	97,9	CL_Ca_01	102,6
CL_F_02	46,1	CL_Ca_02	63,1
CL_F_03	71,0	CL_Ca_03	98,8
CL_F_04	63,2	CL_Ca_04	110,3
CL_F_05	136,2	CL_Ca_06	77,3
CL_F_06	62,4	CS_Ca_01	173,1
CS_F_01	81,3	CS_Ca_02	127,6
CS_F_02	86,6	CS_Ca_03	64,6
CS_F_03	35,0	CS_Ca_04	136,2
CS_F_04	83,4	CS_Ca_05	45,1
		CS_Ca_06	43,1
		CS_Ca_07	62,3
		CS_Ca_08	52,3
		CS_Ca_09	115,3

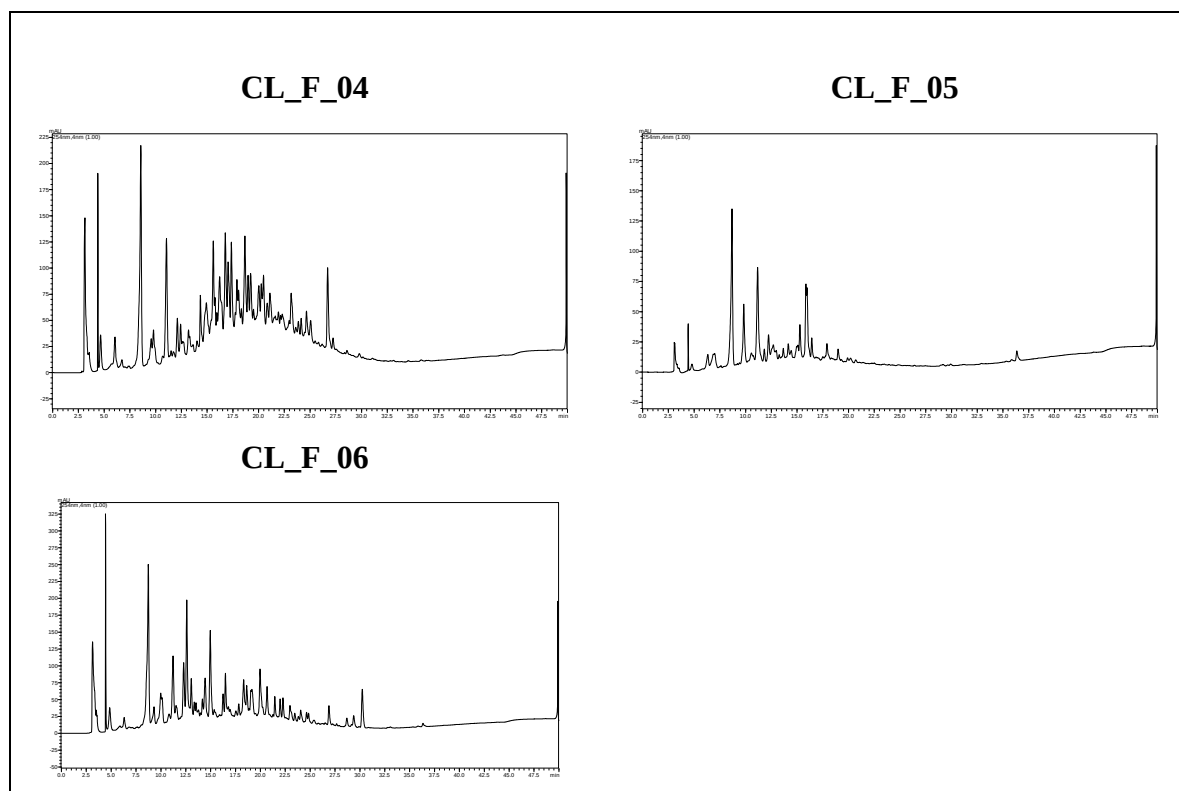
Visando estabelecer condições preliminares de comparação dos metabólitos produzidos, os extratos brutos foram submetidos a análises por meio CLAE-DAD e RMN de ^1H .

Os cromatogramas foram obtidos em coluna de fase reversa, em gradiente exploratório, conforme análise descrita no Tópico 3.2.2 (pág. 47), e revelaram para todos os extratos brutos, um perfil químico com grande variedade metabólica, picos com diferentes absorvâncias, picos variando de média a alta polaridade, e boa resolução cromatográfica. Nas Figura 23 e 24, estão apresentados os cromatogramas de cada extrato bruto, a variação

metabólica foi avaliada quanto ao número de picos apresentados nos cromatogramas nas condições testadas.

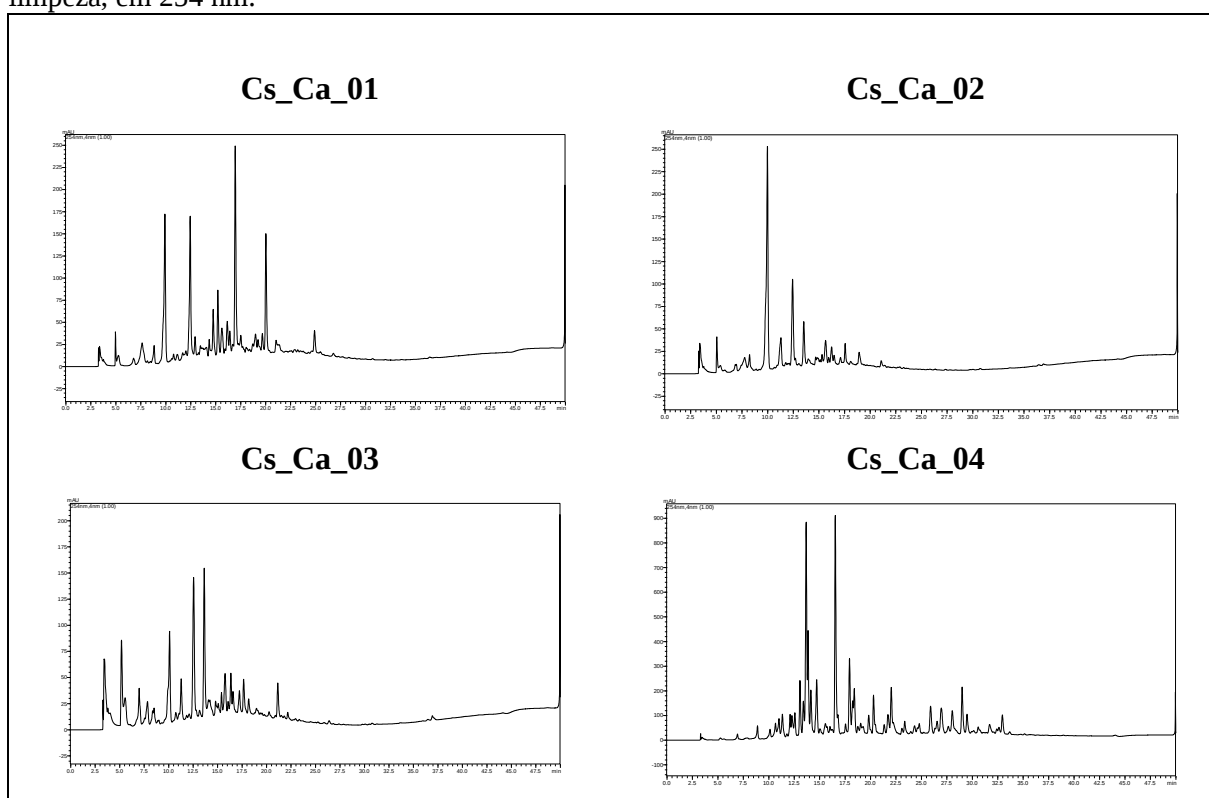
Figura 23 - CLAE-DAD dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de *Casearia sylvestris* var. *lingua* em coluna C18, gradiente linear H₂O/CH₃CN 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.



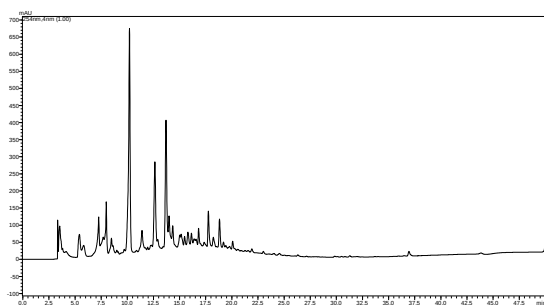


Fonte: Autor

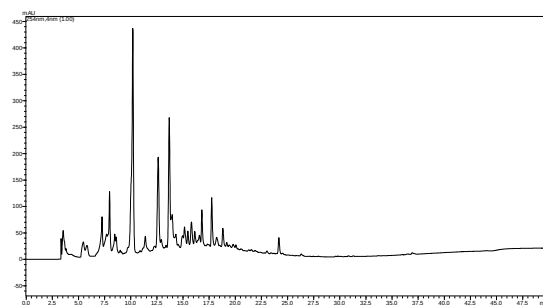
Figura 24 - CLAE-DAD dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de *Casearia sylvestris* var. *sylvestris* em coluna C18, gradiente linear H₂O/CH₃CN 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.



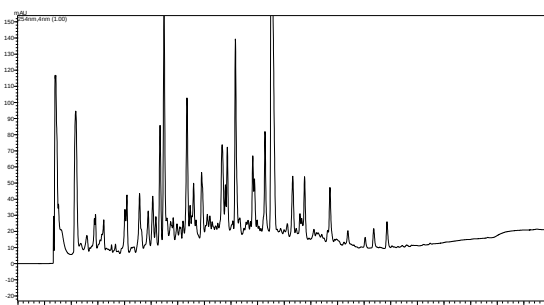
Cs_Ca_05



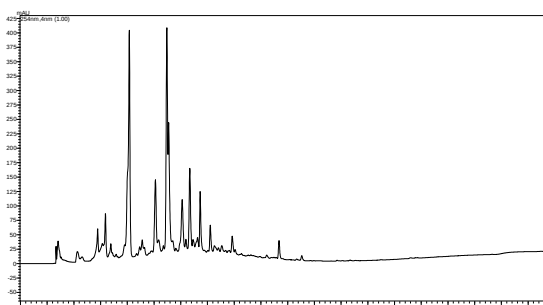
Cs_Ca_06



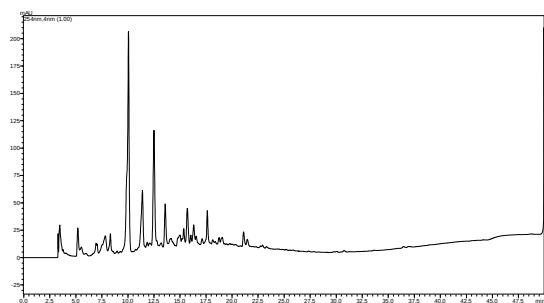
Cs_Ca_07



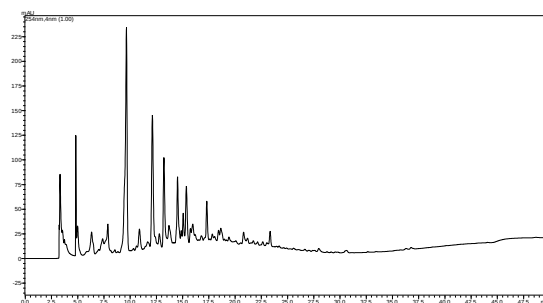
Cs_Ca_08



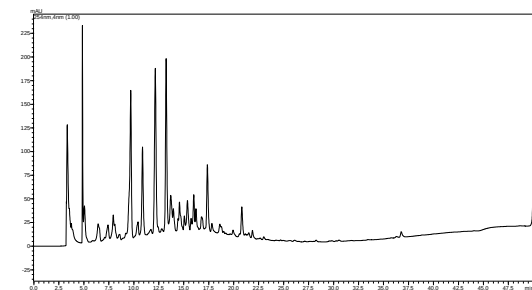
Cs_Ca_09



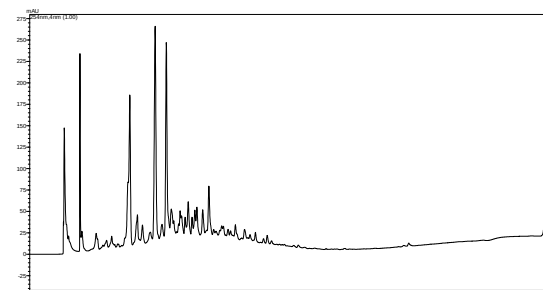
Cs_F_01



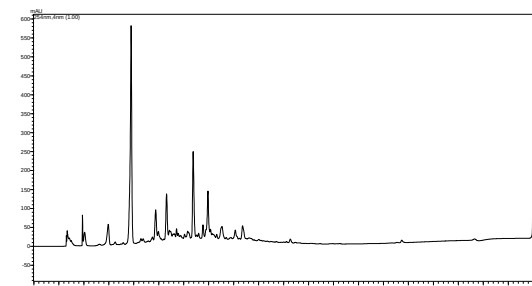
Cs_F_02



Cs_F_03



Cs_F_04



Todos os cromatogramas obtidos foram comparados com o controle (meio de cultivo sem inoculação do fungo) e não apresentaram picos com o mesmo tempo de retenção e absorções no ultravioleta semelhantes, evidenciando que os picos observados nos cromatogramas são provenientes da produção metabólica dos fungos endofíticos.

Os extratos brutos foram submetidos a RMN de ^1H com o objetivo de obter indicativos sobre a natureza química dos hidrogênios presentes nos metabólitos produzidos por cada fungo endofítico isolado.

De um modo geral, todos os espectros apresentaram sinais de hidrogênio abrangendo toda a faixa espectral, variando de δ_{H} 0,4 ppm até aproximadamente δ_{H} 16,0 ppm e sugerindo a possibilidade de várias classes de metabólitos secundários diferentes. A diversidade de sinais ressalta a grande diversidade química de cada extrato produzido pelos fungos endofíticos.

Figura 25 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos em MDB dos fungos isolados dos ramos de *Casearia sylvestris* var. *lingua* (DMSO- d_6 ; 300 MHz).

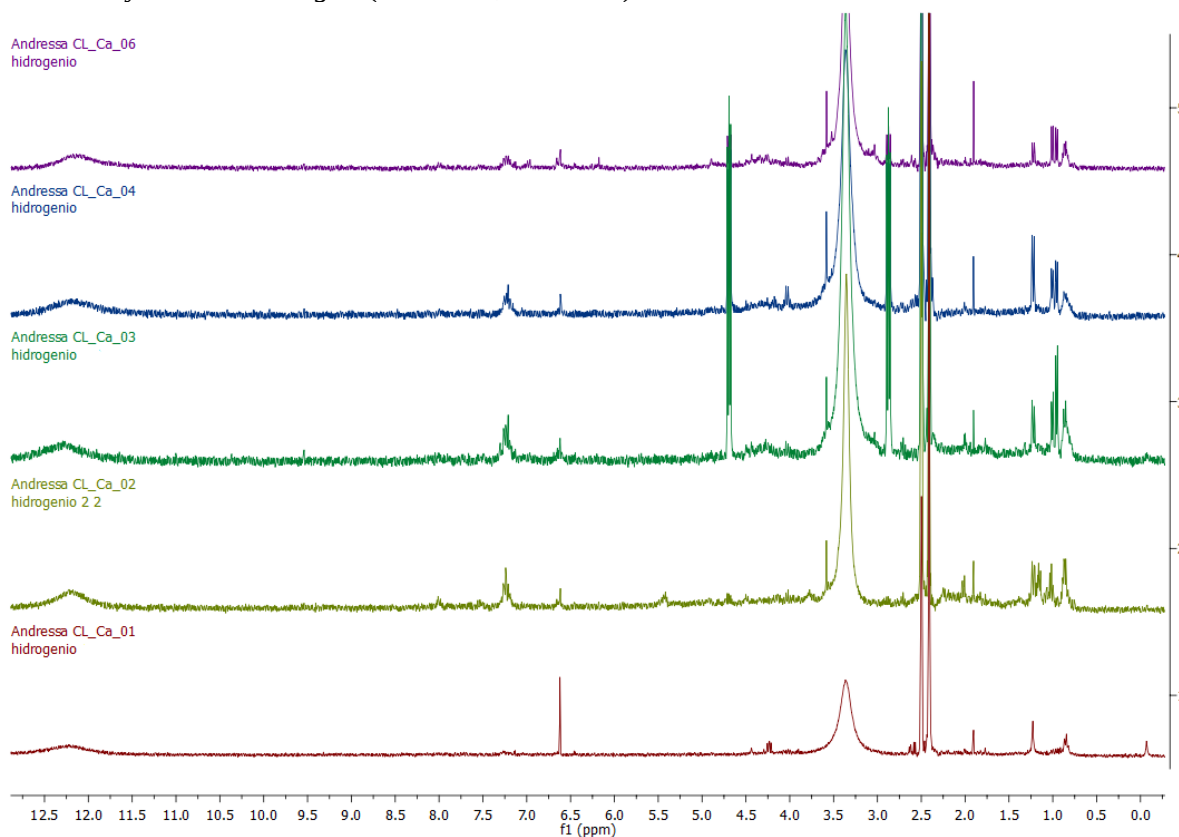


Figura 26 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos em MDB dos fungos isolados das folhas de *Casearia sylvestris* var. *lingua* (DMSO- d_6 ; 300 MHz).

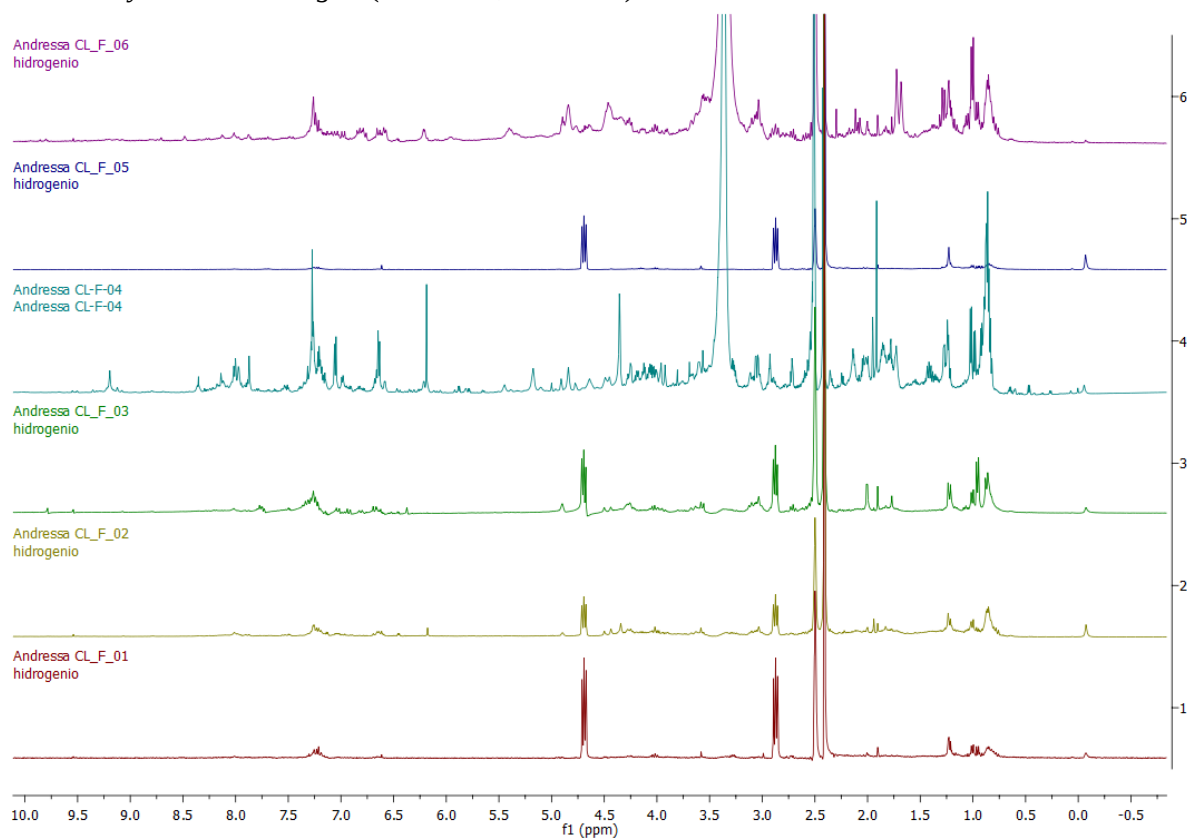


Figura 27 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos em MDB dos fungos isolados dos ramos de *Casearia sylvestris* var. *sylyvestris* (DMSO- d_6 ; 300 MHz).

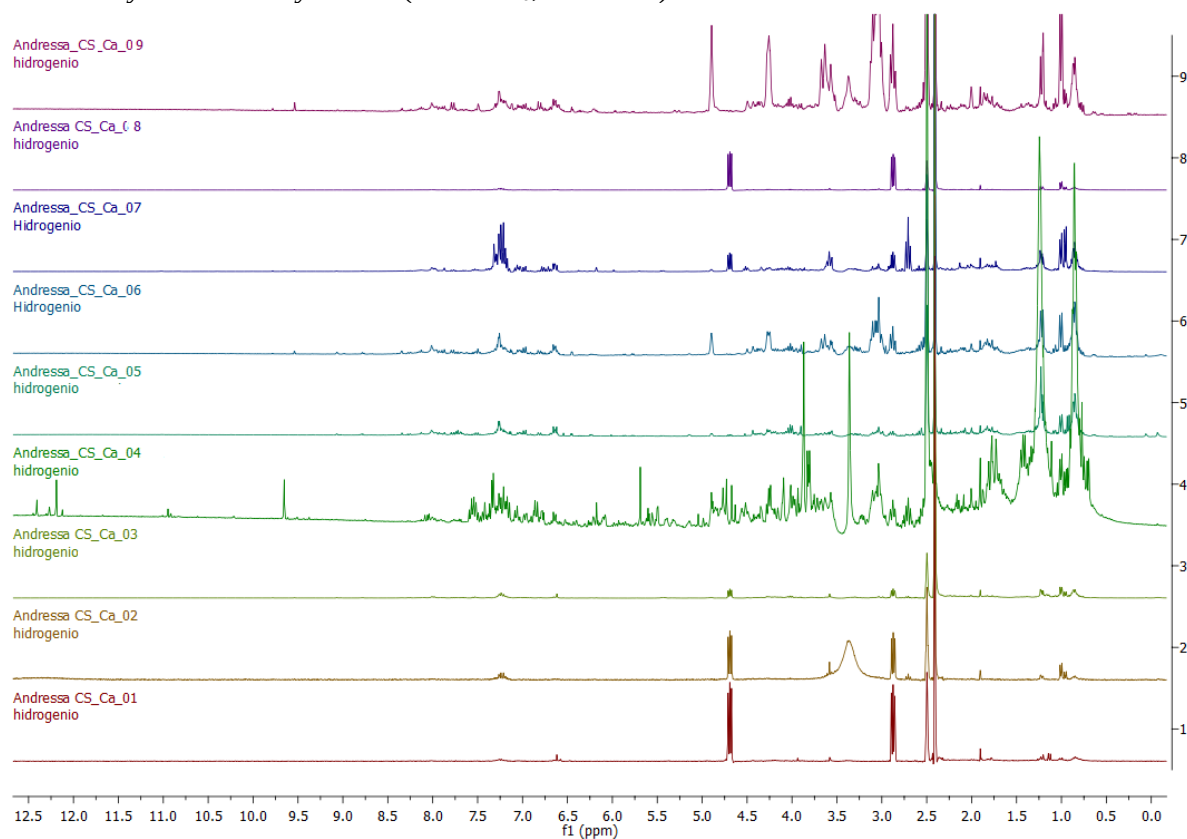
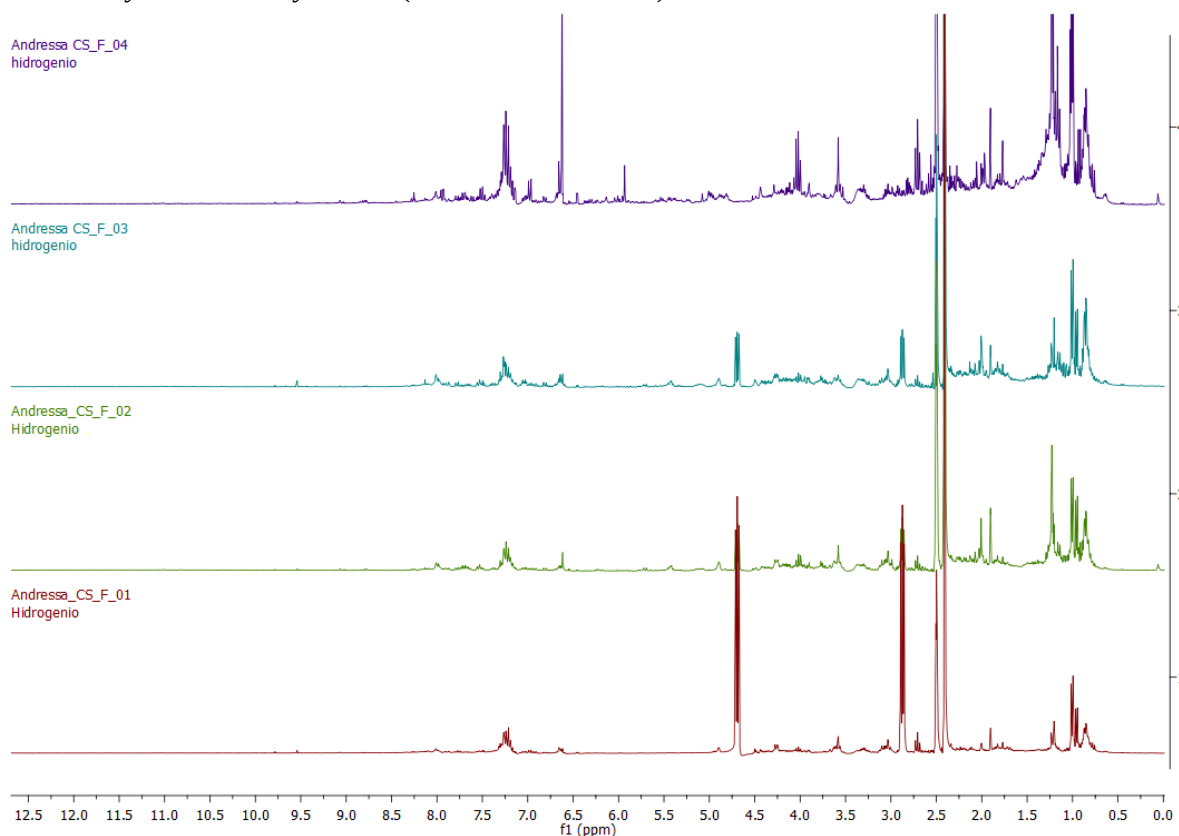
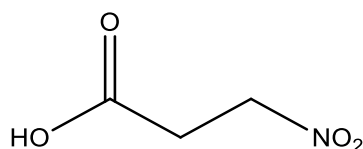


Figura 28 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos em MDB dos fungos isolados das folhas de *Casearia sylvestris* var. *sylvestris* (DMSO- d_6 ; 300 MHz).

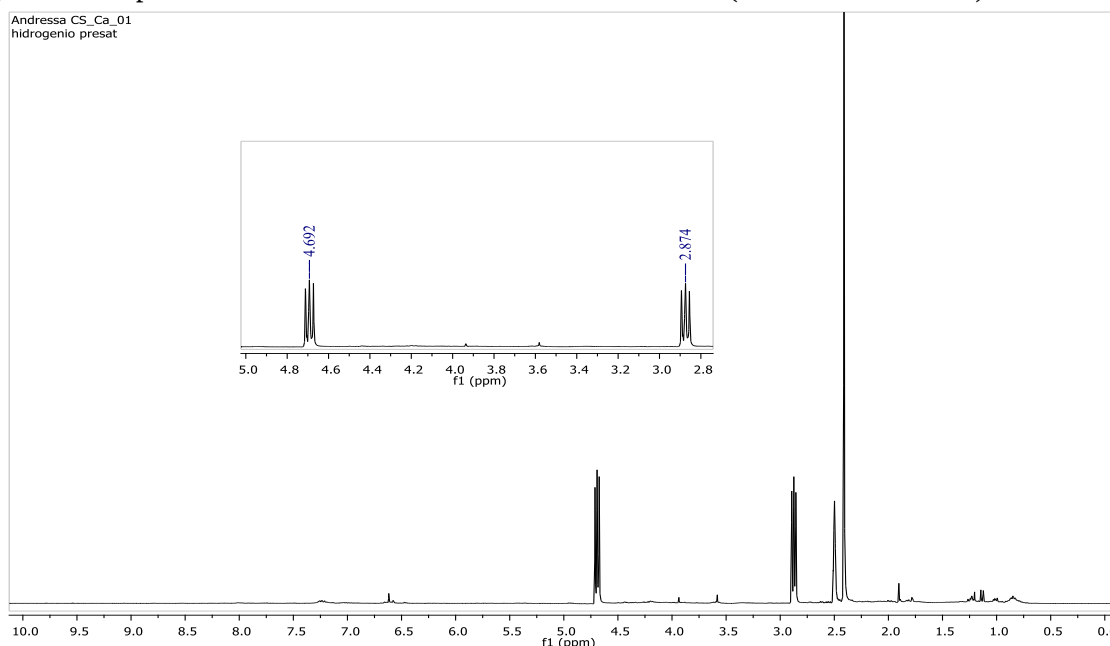


Ao analisar os espectros de RMN de ^1H dos extratos dos fungos isolados foi possível verificar a presença do ácido 3-nitropropiónico (Figura 29) como constituinte dos extratos CL_Ca_03, CL_Ca_06, CL_F_01, CL_F_02, CL_F_03, CL_F_5, CS_Ca_02, CS_Ca_03, CS_Ca_04, CS_Ca_08, CS_Ca_09, CS_F_01, CS_F_02 e CS_F_03. Esta substância apresenta sinais de hidrogênios característicos em δ_{H} 2,88 (t , $J=6,0$ Hz) e δ_{H} 4,70 (t , $J=6,0$ Hz) (FLORES et al., 2013) e é encontrada em diversos fungos endofíticos de plantas (CHOMCHEON et al., 2005). E ainda, estudos mostraram que este composto apresenta atividade antibacteriana (FLORES et al., 2013; CHOMCHEON et al., 2005; SMETANINA et al., 2004). Este ácido também possui propriedades nematicidas (SCHWARZ et al., 2004) e é conhecido como um potente agente neurotóxico, inibindo o metabolismo oxidativo mitocondrial (BROWNELL et al., 2004).

Figura 29 - Estrutura do ácido nitropropiónico.



No espectro de RMN de ^1H do extrato bruto do fungo CS-Ca-01 o ácido nitropropiónico é a substância majoritária, como pode ser observado na Figura 30.

Figura 30 - Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto CS_Ca_01 (DMSO- d_6 , 300MHz).

As atividades biológicas descritas para este metabólito nos permitem sugerir uma relação ecológica entre os fungos endofíticos e as espécies de *Casearia sylvestris*, o qual possui atividade antibacteriana, poder ser produzido por estes endófitos, como uma maneira de sobrevivência dentro dos tecidos vegetais e protegendo a espécie hospedeira de outros patógenos.

4.3 Prospecção biológica dos fungos isolados

Avaliação da atividade antifúngica

Várias doenças que ocorrem em plantas, animais e humanos são devidas ao ataque de fungos fitopatogênicos e patogênicos, respectivamente (CARDOSO, 2003). Fungicidas utilizados no controle de doenças na agricultura, além de serem nocivos ao meio ambiente, são prejudiciais à saúde humana. Infecções fúngicas são as principais causas de morbidade e mortalidade, sendo assim esta constatação indica a urgência pela busca de novos antifúngicos, sendo os fungos produtores promissores (COLEMAN et al., 2010).

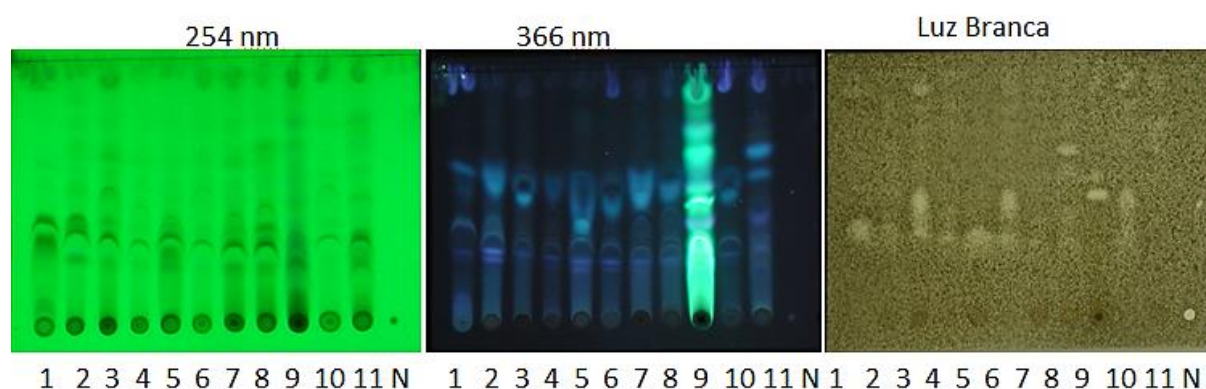
Tal fato tem incentivado pesquisas que busquem novas substâncias antifúngicas de origem natural. Considerando esta necessidade e a ecologia química relacionada com os fungos endofíticos foi realizada uma triagem biológica com os 24 extratos brutos produzidos pelos fungos endofíticos isolados.

A atividade antifúngica, potencial, dos extratos brutos foi avaliada frente ao fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum*, utilizando o método da Bioautografia. Após a revelação da cromatoplaça (contendo os extratos) com a solução fúngica, foi observada a inibição do crescimento do fungo em vários extratos, indicando a atividade antifúngica potencial. O padrão utilizado para comparação foi a nistatina (10 µg).

Os resultados obtidos deste bioensaio estão apresentados nas Figura 31 e Figura 32 e na Tabela 6.

Figura 31 - Avaliação dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de *Casearia sylvestris* var. *lingua* frente ao fitopatógeno *C. sphaerospermum* evidenciado em cromatoplaça.

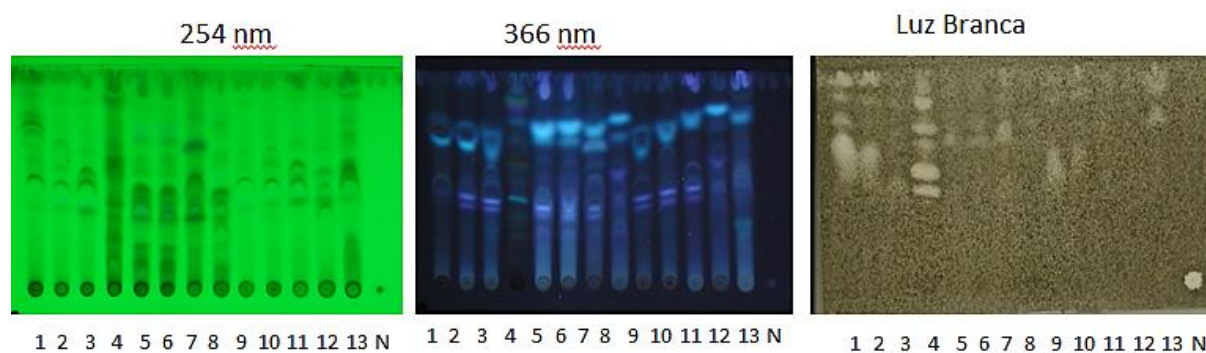
Cladosporium spharospermum



Códigos: CL-Ca-01(1), CL-Ca-02(2), CL-Ca-03(3), CL-Ca-04(4), CL-Ca-06(5), CL-F-01(6), CL-F-02(7), CL-F-03(8), CL-F-04(9), CL-F-05(10), CL-F-06(11) e Nistatina (N).

Figura 32 - Avaliação dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de *Casearia sylvestris* var. *sylvestris* frente ao fitopatógeno *C. sphaerospermum* evidenciado em cromatoplaça.

Cladosporium spharospermum



Códigos: CS -Ca-01(1), CS -Ca-02(2), CS -Ca-03(3), CS -Ca-04(4), CS -Ca-05(5), CS -Ca-06(6), CS -Ca-07(7), CS -Ca-08(8), CS -Ca-09(9), CS -F-01(10), CS -F-02(11), CS -F-03(12), CS -F-04(13) e Nistatina (N).

Tabela 6 - Resultado da atividade antifúngica dos extratos brutos.

Ensaio Antifúngico			
Extrato	<i>C. sphaerospermum</i>	Extrato	<i>C. sphaerospermum</i>
CL-Ca01	**	CS-Ca01	***/**/**/***
CL-Ca02	-	CS-Ca02	**/**/**
CL-Ca03	**/*	CS-Ca03	-
CL-Ca04	*	CS-Ca04	***/**/**/***/**/**
CL-Ca06	*	CS-Ca05	*
CL-F01	*/*	CS-Ca06	*
CL-F02	-	CS-Ca07	-
CL-F03	*/**	CS-Ca08	*
CL-F04	**	CS-Ca09	*
CL-F05	*	CS-F01	-
CL-F06	-	CS-F02	-
		CS-F03	-
		CS-F04	**/**

*** potencial forte; **potencial médio; *potencial fraco.

O resultado deste bioensaio evidencia a maioria dos extratos brutos como potencialmente antifúngicos. Este dado pode estar diretamente relacionado à ecologia química onde estes micro-organismos produzem substâncias bioativas para autodefesa e também contra outros micro-organismos fitopatógenos.

Avaliação da atividade anticolinesterásica

A doença de Alzheimer é uma doença que ocorre em pessoas de idade mais avançada, é progressiva, neurodegenerativa e eventualmente fatal, que vem aumentando na população com o aumento da expectativa de vida. Atualmente inibidores da enzima acetilcolinesterase constituem a base das novas drogas disponíveis para o tratamento desta doença. (VIEGAS *et. al.* 2005).

Na busca de novos inibidores da enzima acetilcolinesterase, realizou-se o ensaio de bioautográfico (CCDC) para os extratos brutos. Os resultados obtidos evidenciam que a maioria dos extratos possui substâncias com potencial moderado a fraco na inibição da enzima acetilcolinesterase (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultado da atividade anticolinesterásica dos extratos brutos.

<i>Extrato</i>	<i>Atividade anticolinesterásica</i>	<i>Extrato</i>	<i>Atividade anticolinesterásica</i>
CL-Ca01	**	CS-Ca01	*
CL-Ca02	**	CS-Ca02	*
CL-Ca03	*	CS-Ca03	-
CL-Ca04	*	CS-Ca04	-
CL-Ca06	**	CS-Ca05	-
CL-F01	*	CS-Ca06	-
CL-F02	*	CS-Ca07	*
CL-F03	-	CS-Ca08	-
CL-F04	-	CS-Ca09	*
CL-F05	*	CS-F01	*
CL-F06	-	CS-F02	*
		CS-F03	*
		CS-F04	*

*** potencial forte; **potencial médio; *potencial fraco.

Potencial citotóxico

Produtos naturais têm se mostrado como uma excelente fonte de substâncias bioativas para o tratamento de diversas doenças, como por exemplo o taxol[®] (paclitaxel) utilizado no tratamento do câncer. Deste modo, os extratos produzidos pelos fungos isolados foram submetidos ao ensaio para avaliação da atividade antitumoral.

O potencial citotóxico in vitro dos extratos foi realizado pelo método do MTT contra três linhagens de células tumorais: OVCAR-8 (carcinoma de ovário), HCT-116 (adenocarcinoma de cólon humano) e SF-295 (glioblastoma - humano).

O método do MTT é um método rápido, sensível, barato e tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE, 1996).

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para as amostras testadas. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico: amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (MO, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento variando de 75 a 100%) (ALMEIDA, 2014).

Os resultados obtidos evidenciam que a maioria dos extratos não possuem substâncias com atividade antitumoral, porem dois extratos apresentaram notável potencial contra as linhagens tumorais testadas (ativo > 75%), destacando-se CS_Ca_04 e CS_Ca_01 com atividade superior a 90%.

Tabela 8 - Avaliação dos extratos brutos frente às células tumorais.

<i>Amostra</i>		<i>HCT-116</i>	<i>SD</i>	<i>OVCAR-8</i>	<i>SD</i>	<i>SF-295</i>	<i>SD</i>
Nº	Identificação	GI% (média)		GI% (média)		GI% (média)	
1	CL-Ca-06	-0,33%	6,01%	9,79%	8,30%	27,03%	27,31%
2	CL-Ca-04	21,43%	6,40%	21,79%	0,36%	58,46%	4,12%
3	CL-Ca-03	32,68%	13,86%	14,00%	3,97%	31,92%	4,98%
4	CL-Ca-02	49,53%	9,44%	7,94%	8,93%	44,65%	6,25%
5	CL-Ca-01	-16,81%	7,53%	6,73%	2,71%	28,81%	31,83%
6	CL-F-03	-1,21%	5,02%	17,45%	3,61%	53,67%	6,51%
7	CL-F-05	-16,06%	15,71%	16,75%	5,50%	43,85%	0,60%
8	CL-F-06	-12,42%	12,02%	46,22%	4,60%	75,80%	0,20%
9	CL-F-04	16,48%	6,93%	22,68%	19,85%	53,91%	7,11%
10	CL-F-01	30,21%	2,71%	30,27%	1,35%	56,26%	2,19%
11	CL-F-02	24,84%	0,66%	13,24%	2,17%	12,37%	21,46%
12	CS-Ca-01	11,53%	3,10%	30,72%	1,98%	34,78%	4,52%
13	CS-Ca-02	21,99%	0,86%	24,66%	1,71%	56,35%	0,07%
14	CS-Ca-03	6,63%	7,92%	18,47%	0,18%	52,50%	4,45%
15	CS-Ca-04	97,53%	1,78%	99,11%	0,36%	93,28%	4,59%
16	CS-Ca-05	17,46%	3,70%	15,66%	2,53%	61,80%	0,60%
17	CS-Ca-06	76,14%	0,59%	48,01%	6,23%	71,62%	5,58%
18	CS-Ca-07	9,24%	18,49%	5,45%	2,71%	19,28%	22,99%
19	CS-Ca-09	-4,90%	15,52%	18,98%	2,89%	42,02%	5,45%
20	CS-Ca-08	-7,80%	12,48%	12,15%	3,88%	38,21%	13,22%

21	CS-F-02	-1,54%	3,24%	13,17%	4,42%	25,81%	13,22%
22	CS-F-01	-7,52%	6,27%	11,20%	3,43%	21,91%	11,83%
23	CS-F-03	100,19%	0,40%	99,94%	0,63%	100,05%	0,20%
24	CS-F-04	53,59%	0,00%	85,39%	15,07%	37,88%	26,31%

Avaliação da atividade fitotóxica sobre o crescimento de coleóptilos de trigo (Triticum aestivum L.)

Herbicidas naturais como os bilafanos, ácido pelargônico e óleo de cravo (COPPING; DUKE, 2007) não são prejudiciais ao meio ambiente, sendo uma vantagem em relação a herbicidas sintéticos.

Os metabólitos secundários como quinonas, flavonoides, fenois, cumarinas, terpeno, alcalóides, dentre outros, apresentam atividade fitotóxica (RICE, 1984). Dentro deste contexto os produtos naturais continuam a desempenhar um papel importante na busca por moléculas com potencial fitotóxico, para substituir o uso de herbicidas sintéticos, os quais provocam danos ambientais.

Os extratos brutos obtidos das 24 linhagens isoladas foram submetidos ao ensaio de atividade fitotóxica, e apresentaram notável potencial na inibição do alongamento dos coleóptilos, evidenciando que os extratos produzem substâncias com atividade fitotóxica. Indicando que estes possam atuar como promissores herbicidas naturais (Figura 33 e Figura 34)

Figura 33 - Efeito dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de *Casearia sylvestris* var. *lingua* no alongamento de coleóptilos estiolados de trigo. Porcentagem de inibição ou crescimento em relação ao controle negativo. (*) Difere estatisticamente do controle negativo, $p < 0,05$. (°) Difere estatisticamente do herbicida, os tratamentos foram comparados entre concentrações iguais.

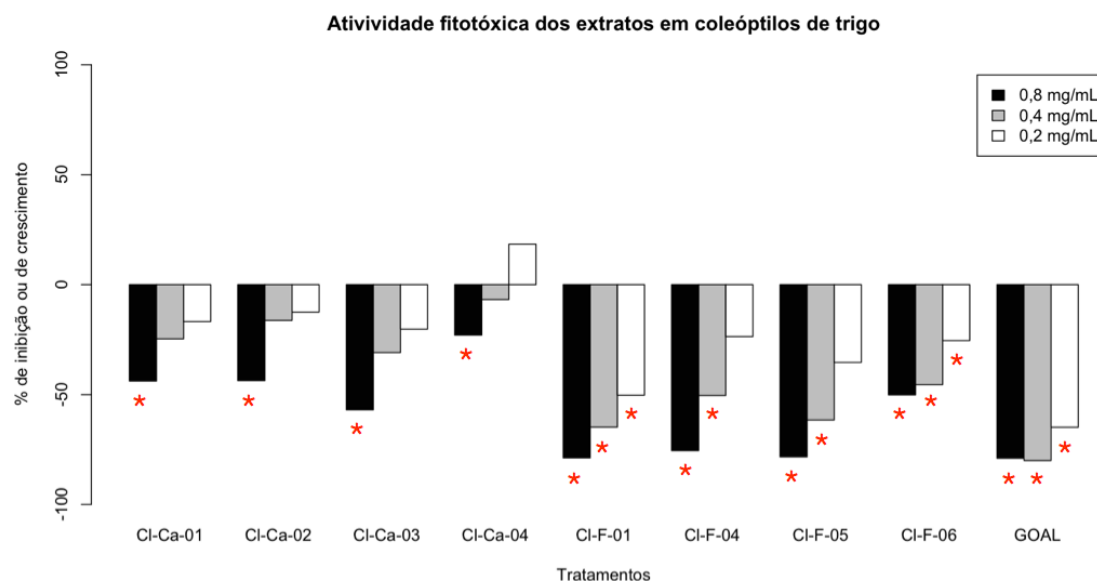
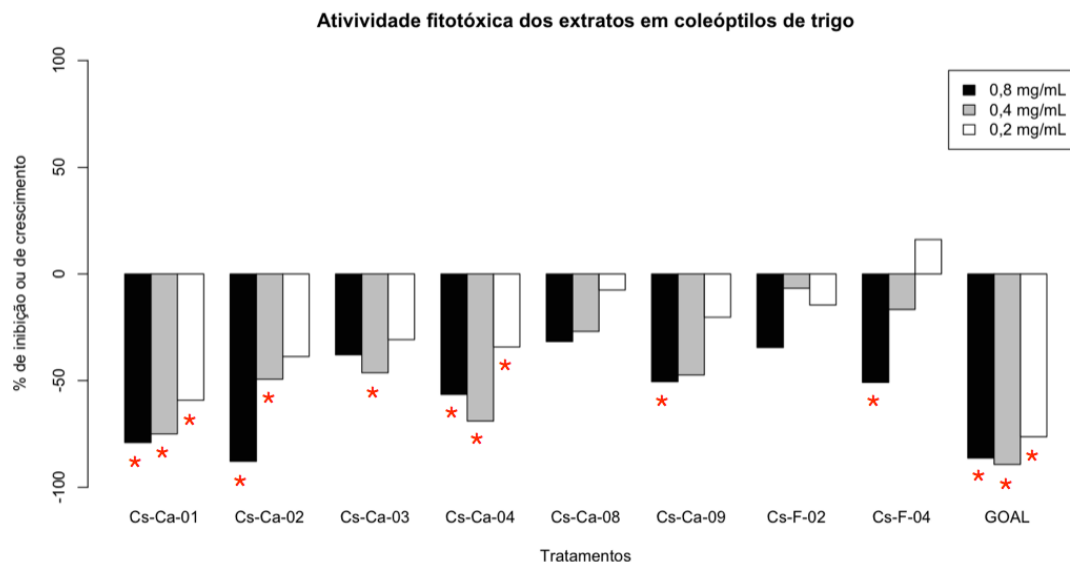


Figura 34 - Efeito dos extratos brutos dos fungos endofíticos isolados de *Casearia sylvestris* var. *sylvestris* no alongamento de coleóptilos estiolados de trigo. Porcentagem de inibição ou crescimento em relação ao controle negativo. (*) Difere estatisticamente do controle negativo, $p < 0,05$. (°) Difere estatisticamente do herbicida, os tratamentos foram comparados entre concentrações iguais.



4.4 Estudos da variabilidade química organismal

Biodiversidade, ou diversidade biológica, significa o alcance total de vida na Terra, incluindo todas as diferentes espécies em conjunto com a variação genética entre populações e indivíduos e a variedade de ecossistemas, comunidades e habitats (COX; MOORE, 2009). Neste contexto, a biodiversidade pode ser considerada em três níveis: a diversidade intraespecífica (dentro da mesma espécie, portanto diversidade genética), entre espécies (organismal) e entre

comunidades (diversidade ecológica) (RAMBALDI et al., 2003). No presente trabalho objetivou-se o estudo da biodiversidade no nível organismal visando a comparação na produção metabólica apresentada pela espécie *C. sylvestris* e seus fungos isolados.

Todas as amostras foram preparadas e analisadas de acordo com o método analítico definido por Bueno (2016), método cromatográfico utilizado para análise simultânea de compostos fenólicos e diterpenos clerodânicos em *C. sylvestris* var. *sylvestris* e *C. sylvestris* var. *lingua*, fornecendo os dados cromatográficos necessários para a análise quimiométrica.

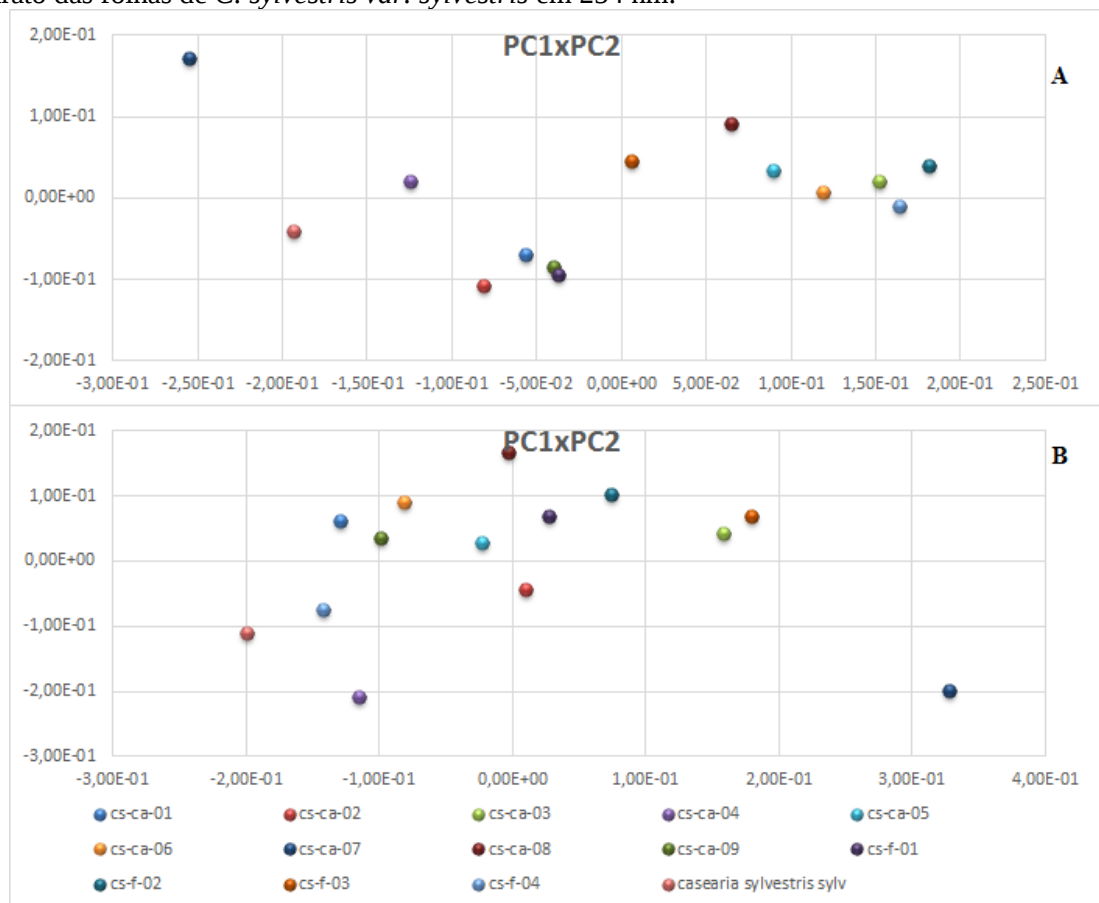
A Figura 35 a seguir evidencia os resultados encontrados nos gráficos de *scores* da PLS-DA, utilizando PC1xPC2 (como principais componentes), para o extrato das folhas de *Casearia sylvestris* var. *lingua* e seus respectivos fungos endofíticos isolados. Embora esta classificação possa ser considerada subjetiva, é possível observar uma clara distinção entre fungos CL-F-01, CL-Ca-01 e o extrato de *C. sylvestris* var. *lingua*, demonstrando que estes micro-organismos possam estar produzindo classes de metabólitos secundários totalmente distintos, quando comparado com a produção do extrato da espécie vegetal hospedeira, enquanto que os fungos CL-F-04, CL-F-05, CL-F-06, CL-Ca-02 são os que apresentam maior proximidade, dentre as variáveis que mais influenciam no agrupamento.

Figura 35 - (A) Gráfico de scores (PC1 x PC2) dos fungos isolados e do extrato das folhas de *C. sylvestris* var. *lingua* em 235 nm, (B) Gráfico de scores (PC1 x PC2) dos fungos isolados e do extrato das folhas de *C. sylvestris* var. *lingua* em 254 nm.



A Figura 36 evidencia os gráficos obtidos de scores da PLS-DA, utilizando PC1xPC2 (como principais componentes), para o extrato das folhas de *Casearia sylvestris* var. *sylvestris* e seus respectivos fungos endofíticos isolados. Pela análise de componentes principais, foi possível observar uma boa dispersão dos extratos oriundos dos fungos em relação ao extrato obtidos das folhas de *C. sylvestris* var. *sylvestris*, sugerindo que estes organismos produzem metabólitos diferentes.

Figura 36 - (A) Gráfico de scores (PC1 x PC2) dos fungos isolados e do extrato das folhas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* em 235 nm, (B) Gráfico de scores (PC1 x PC2) dos fungos isolados e do extrato das folhas de *C. sylvestris* var. *sylvestris* em 254 nm.



Em suma, conclui-se que a integração das técnicas cromatográficas com as abordagens metabolômica e quimiometria permitiram acessar e analisar importantes informações acerca da variabilidade química apresentada por *C. sylvestris* e seus fungos endofíticos. Tais resultados poderão ser utilizados na fundamentação de futuros trabalhos acerca da escolha de matrizes para cultivo de fungos endofíticos desta espécie.

4.5 Considerações

A abordagem adotada para o estudo das linhagens de fungos endofíticos isolados, que incluiu a avaliação preliminar do potencial de bioatividade do extrato bruto de cada linhagem e o estabelecimento do seu perfil químico por CLAE-DAD e por RMN de ^1H , mostrou-se eficiente para a seleção das amostras mais promissoras para prosseguimento dos estudos, e forneceu resultados de alta relevância tanto do ponto de vista químico, como biológico, reforçando a potencialidade desses micro-organismos como fonte de substâncias bioativas.

***Estudo do perfil químico de *Preussia* sp. por
abordagens OSMAC***

5. Estudo do perfil metabólico de *Preussia* sp. por meio de abordagens OSMAC

5.1 Influência da composição do meio de cultivo na produção metabólica de *Preussia* sp.

Como descrito na seção anterior, foi possível isolar 11 linhagens de fungos endofíticos de *Casearia sylvestris* var. *lingua* e 13 linhagens de *Casearia sylvestris* var. *sylvestris*. Os extratos brutos obtidos a partir do crescimento dessas linhagens em meio líquido foram avaliados quanto aos seus perfis químicos e biológicos. Os resultados obtidos permitiram a seleção da linhagem CL-F-04 para o desenvolvimento deste trabalho.

A identificação da linhagem CL-F-04 isoladas de *Casearia sylvestris* var. *lingua* foi realizada pela empresa Genotyping (Botucatu-SP), sendo identificada como *Preussia* sp..

A identificação foi feita através do sequenciamento Sanger de regiões específicas do DNA (ITS) do micro-organismo. Inicialmente foi feita a extração do material genético kit (ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™), seguido do preparo das reações para o sequenciamento. O sequenciamento das amostras foi feito automaticamente por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e, em seguida, o alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas foi comparado com as sequências de referência depositadas no GenBank (banco de dados genômicos).

Três abordagens foram aplicadas para verificar a influência da composição nutricional frente a produção metabólica e estudos de isolamento e elucidação estrutural dos metabólitos secundários de *Preussia* sp.: (1) cultivo em meio de MDB; (2) cultivo em meio de MDB com adição de íons cobre e (3) cultivo em meio de milho.

Inicialmente, explorou-se o comportamento cromatográfico dos extratos *Preussia* sp. – MDB, *Preussia* sp. – MDB+Cu⁺² e *Preussia* sp. – Milho, os quais indicaram a presença de picos ao longo de todo o gradiente exploratório (Figura 37-39). Sendo assim, possível verificar a semelhança entre os mesmos, ou seja, houve variação significativa nos perfis frente a variação da composição nutricional.

Figura 37 - CLAE-DAD do extrato bruto *Preussia* sp. - MDB em coluna C18, gradiente linear H₂O/CH₃CN 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.

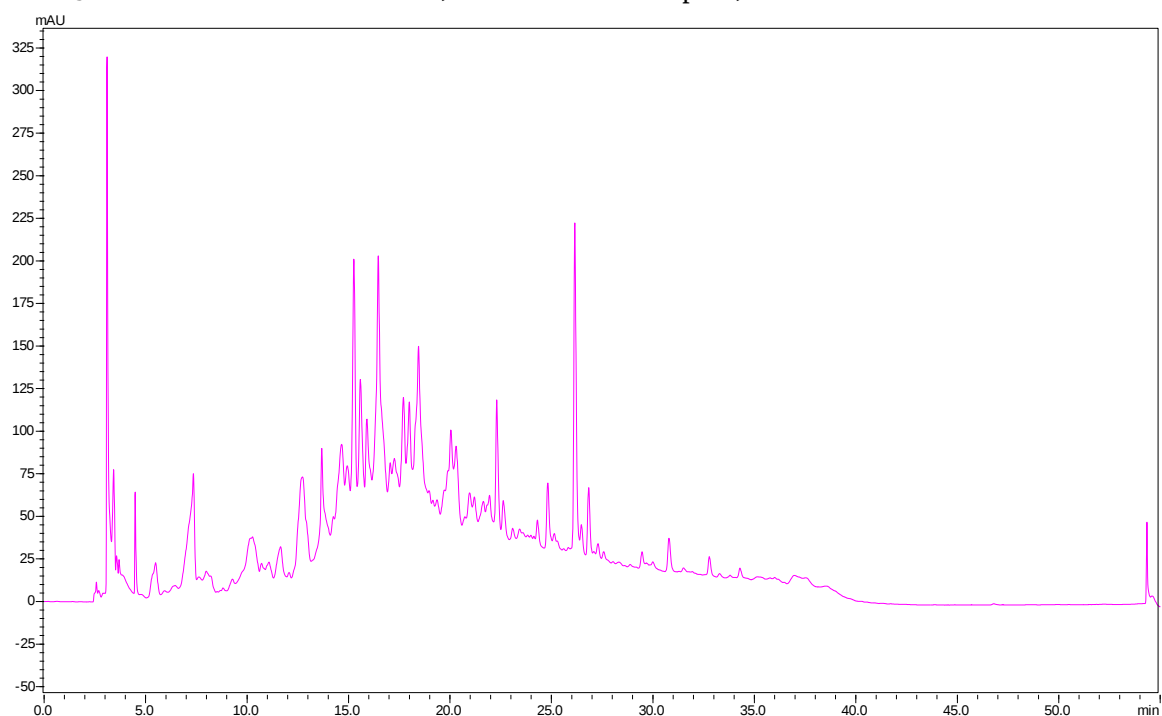


Figura 38 - CLAE-DAD do extrato bruto *Preussia* sp. - MDB+Cu⁺² em coluna C18, gradiente linear H₂O:CH₃CN 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.

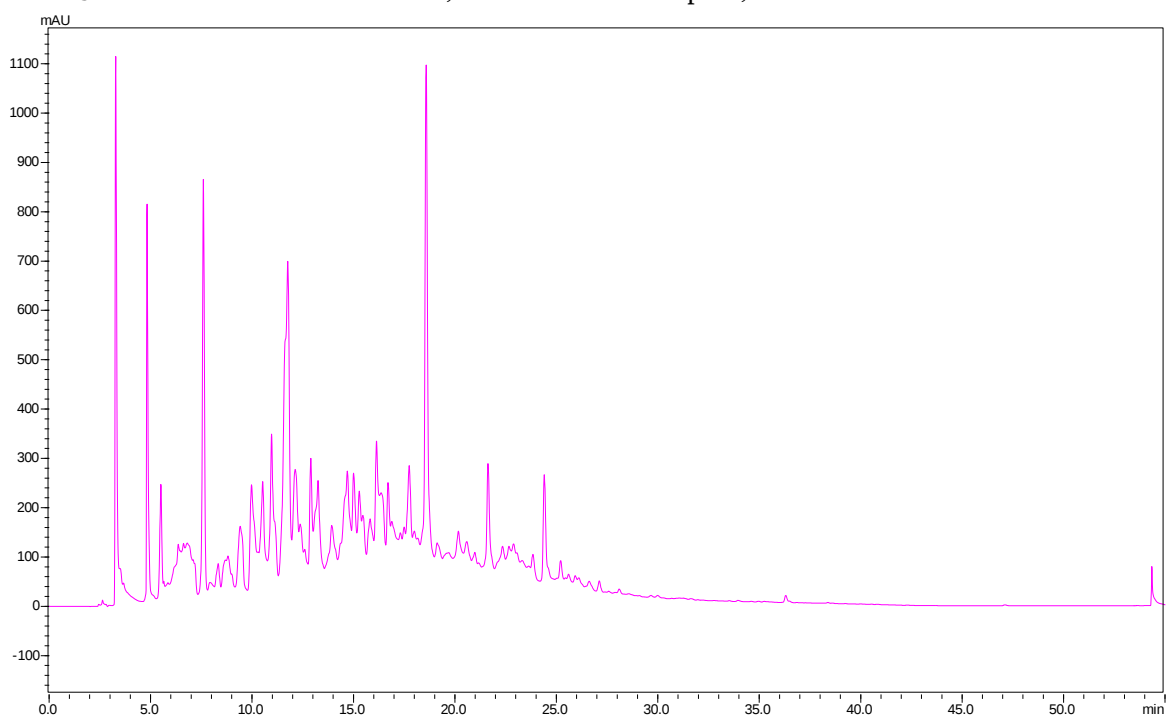
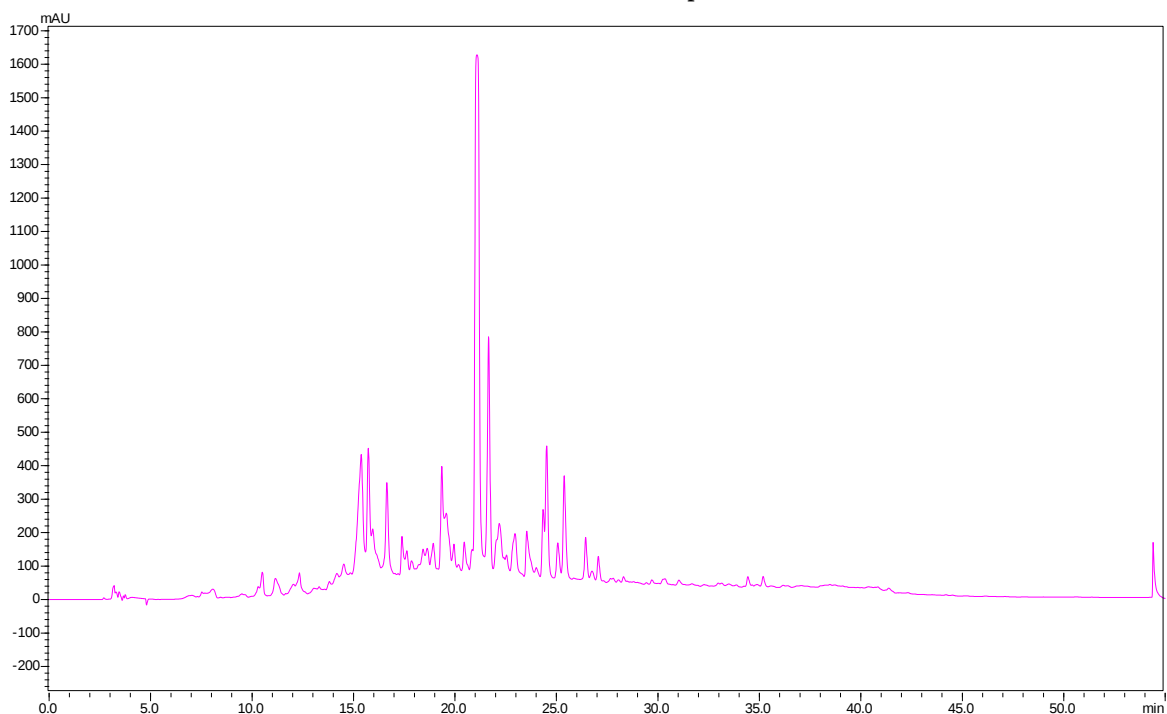
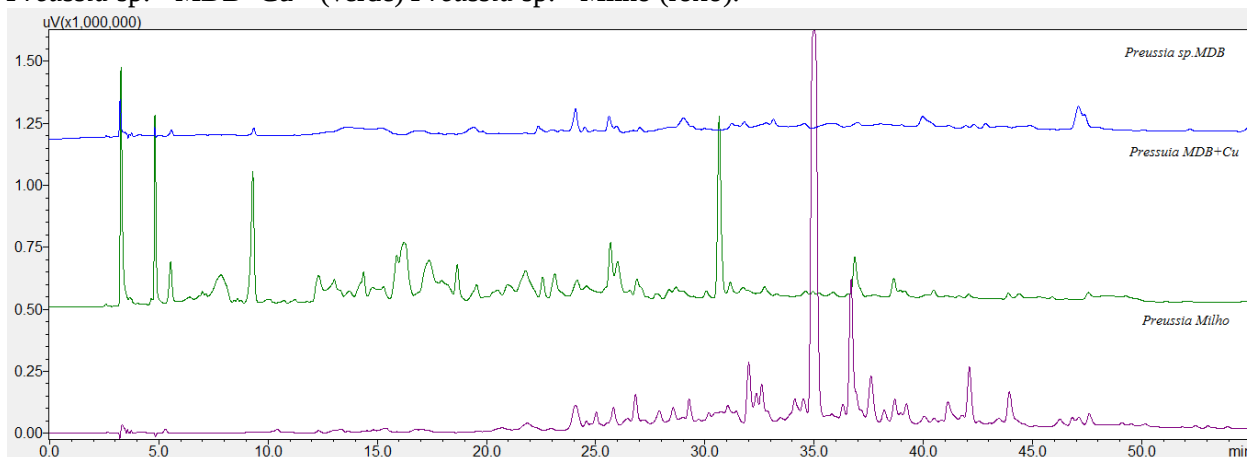


Figura 39 - CLAE-DAD do extrato bruto *Preussia* sp. – Milho em coluna C18, gradiente linear H₂O:CH₃CN 95:05 à 00:100 em 40 min, mais 10 min de limpeza, em 254 nm.



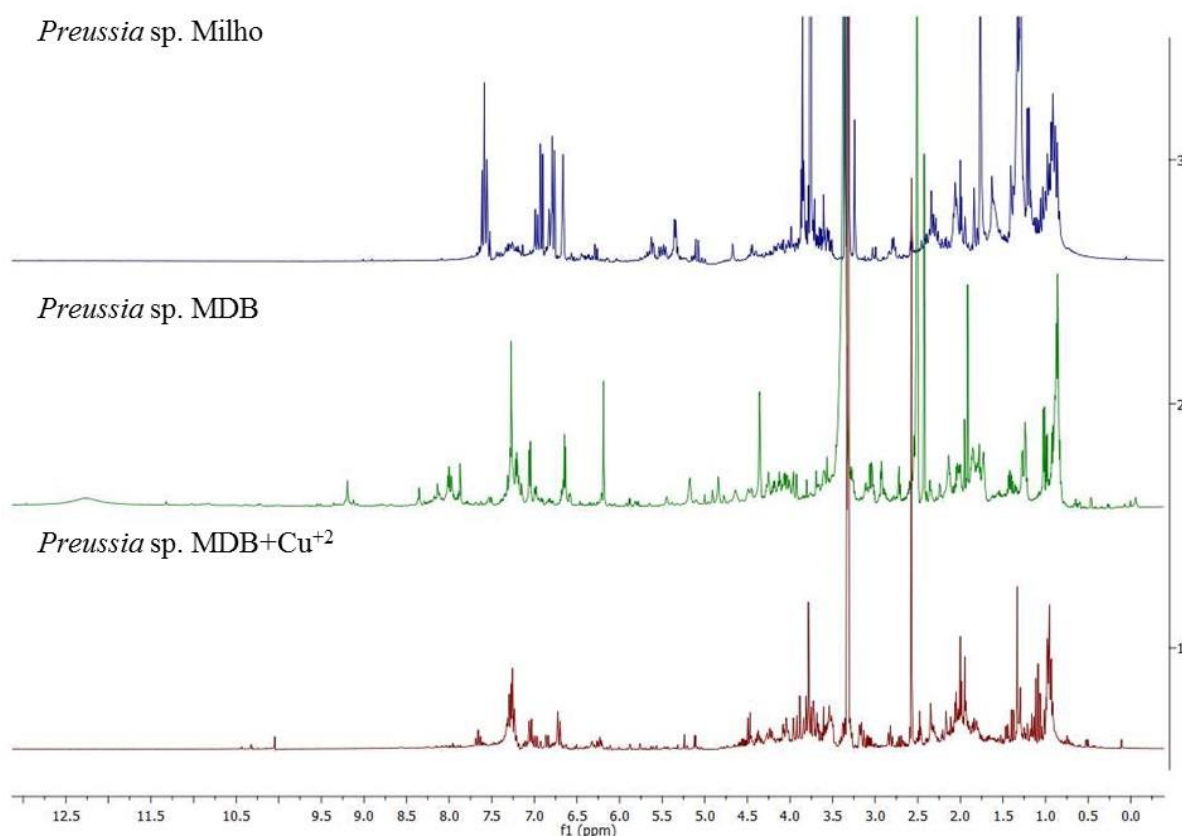
Para uma melhor compreensão do comportamento cromatográfico dos extratos, os mesmos foram submetidos a uma nova análise, alterando-se as condições do gradiente linear utilizado. Para uma nova análise os extratos foram submetidos às condições de H₂O:CH₃CN 95:05 à 30:70 em 50 min, com 10 min de limpeza (Figura 40). Nota-se que o perfil do cromatograma do extrato obtido pelo crescimento em meio com milho se diferencia bastante dos demais extratos obtidos quanto aos picos majoritários. Além disso, ambos extratos apresentam evidências de produção de substâncias dentro de uma ampla faixa de polaridades.

Figura 40 - Comparação por meio de CLAE-DAD dos extratos brutos: *Preussia* sp. - MDB (azul), *Preussia* sp. - MDB+Cu⁺² (verde) *Preussia* sp. - Milho (roxo).



Os espectros de RMN de ^1H (Figura 41) evidenciaram novamente a diferença na produção metabólica de *Preussia* sp., confirmando a proposição de que o meio de cultura influencia significativamente na produção de metabólitos secundários. Este resultado ressalta a potencialidade e importância do estudo da química de micro-organismos, pois por meio de alterações no meio de cultivo, os micro-organismos podem produzir uma variedade de substâncias diferentes e com diversas atividades biológicas.

Figura 41 - Espectros de RMN de ^1H de *Preussia* sp. - Milho (azul), *Preussia* sp. - MDB (verde) e *Preussia* sp. - MDB+ Cu^{+2} (vermelho) (CD_3OD , 300 MHz).



Os três extratos brutos produzidos por *Preussia* sp. foram avaliados frente a atividade fitotóxica sobre o crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L.) e inibiram o crescimento dos coleóptilos de trigo nas duas maiores concentrações testadas, 0,8 e 0,4 mg mL^{-1} (Figura 42 e Figura 43), comparados com os coleóptilos crescidos sob o efeito do controle negativo (solução tampão). As Tabela 9 e Tabela 10 comparam as médias de crescimento dos coleóptilos com os extratos testados nas concentrações 0,8; 0,4 e 0,2 mg mL^{-1} com as respectivas médias de crescimento produzidas pelo controle positivo (herbicida GOAL[®]).

Tabela 9 - Médias de crescimento dos coleóptilos sob o efeito dos extratos brutos de *Preussia* sp MDB e MDB+Cu⁺².e do herbicida comercial GOAL®.

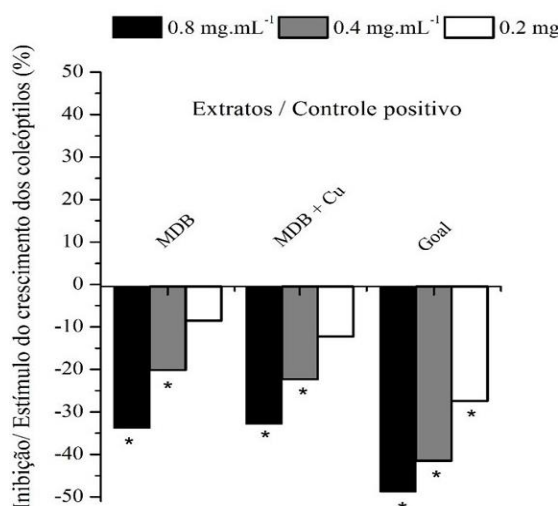
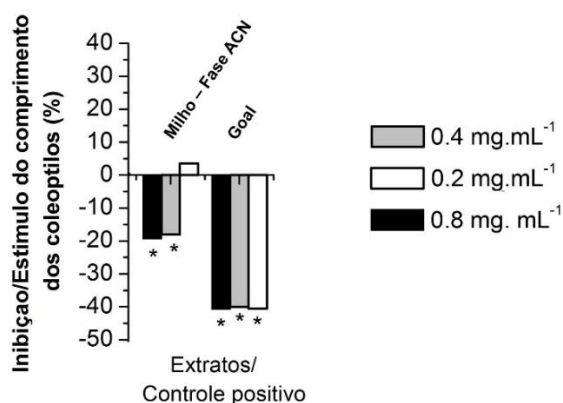
Amostras	Concentrações (mg ml ⁻¹)		
	0,8	0,4	0,2
<i>Preussia</i> sp. MDB	5,0 ± 0,1 b	6,1 ± 0,4 bc	7,0 ± 0,4 b
<i>Preussia</i> sp. MDB+Cu	5,1 ± 0,3 b	5,9 ± 0,2 c	6,7 ± 0,2 b
GOAL	4,0 ± 0,2 c	4,4 ± 0,2 d	5,5 ± 0,2 a

Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Tabela 10 - Médias de crescimento dos coleóptilos sob o efeito dos extratos brutos de *Preussia* sp Milho.e do herbicida comercial GOAL®.

Amostras	Concentrações (mg ml ⁻¹)		
	0,8	0,4	0,2
<i>Preussia</i> sp. Milho	4,4 ± 0,0 b	4,3 ± 0,1 b	5,1 ± 0,0 b
GOAL	6,9 ± 0,3 a	6,9 ± 0,3 a	6,9 ± 0,3 a

Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Figura 42 - Inibição/estímulo do crescimento dos coleóptilos de trigo sob a atividade dos extratos brutos MDB e MDB+Cu⁺².**Figura 43** - Inibição/estímulo do crescimento dos coleóptilos de trigo sob a atividade do extrato bruto Milho.

5.2 Identificação estrutural das substâncias produzidas por *Preussia* sp.

Neste item estão compreendidos os dados que auxiliaram a determinação estrutural ou identificação das substâncias isoladas.

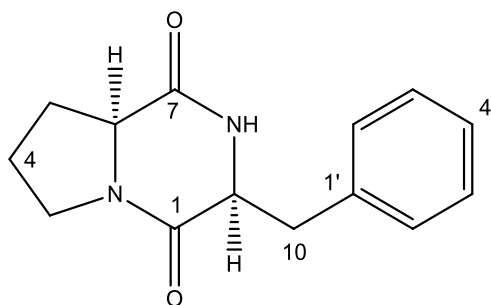
A determinação estrutural das substâncias produzidas por *Preussia* sp. abaixo, não seguirão a ordem de isolamento, mas a classe e os dados de RMN uni e bidimensionais e o meio de cultivo onde foram produzidas.

5.2.1 *Dicetopiperazinas*

As dicetopiperazinas são metabólitos produzidos por micro-organismos. Eles são frequentemente isolados de fungos, especialmente em gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. O interesse nessa classe de metabólitos é devido a sua ampla gama de atividades biológicas, tais como atividade antimicrobiana, antiviral, citotóxica, imunomoduladora, anti-oxidante e inseticida. Por consequência, podem ter o potencial de ser utilizados em medicamentos ou estruturas base para o desenvolvimento de novas drogas (MA, et al, 2016).

Essa classe de metabólitos são os menores peptídeos cíclicos conhecidos, regularmente biossintetizados a partir da condensação de dois ou mais aminoácidos, como a L-prolina, L-fenilalanina, L-leucina, entre outros. Estas substâncias apresentam esqueleto comum quiral, rígido e funcionalizado, diferenciando-se uma das outras pelos substituintes da cadeia lateral de cada aminoácido. Com isso, as dicetopiperazinas são estruturas importantes, pois possuem a capacidade de se ligarem a uma grande variedade de receptores com alta afinidade, gerando assim diversas atividades biológicas (ADAMCZESKI, 1995).

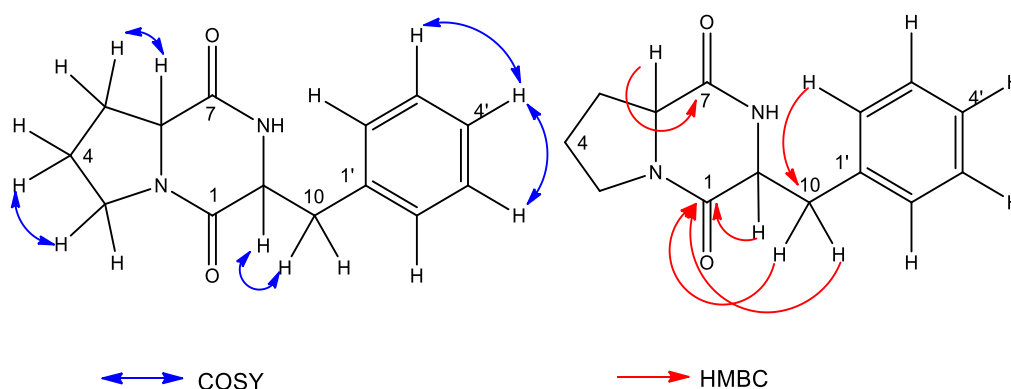
- Identificação estrutural da substância 7.



A substância 7 foi submetida à análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e 1 e 2 D. Os espectros de RMN de ^1H e HSQC (Figura 45 e Figura 46) apresentaram na região de alifáticos, multipletos em δ_{H} 3,39-3,26, δ_{H} 1,69-1,74 e δ_{H} 1,40-2,00, integrando para dois hidrogênios cada. Na região de aromáticos, foi visualizado um multipletto na região de δ_{H} 7,20-7,29 (δ_{C} 126,3; δ_{C} 127,9; δ_{C} 129,7), além de dois duplos dubletos em 3,02 (1H, *dd*, 14,0; 5,0 Hz) e 3,05 (1H, *dd*, 14,0; 5,0 Hz), evidenciando um sistema benzílico com o anel aromático monossustituído. Foram observados ainda, dois tripletos em 4,07 (1H; *t*, 8,5Hz, δ_{C} 58,2) e 4,35 (1H; *t*, 5,0 Hz, δ_{C} 55,5), que pelos valores de deslocamento químico sugerem ligação com nitrogênio α à carbonila e um singletto em 8,01(1H; *s*), que devido à ausência de correlação no experimento de HSQC foi atribuído N-H (Tabela 11).

No experimento de HMBC (Figura 47) foram visualizadas correlações a longa distância dos sinais em 4,07 (δ_{C} 58,2) e 4,35 (δ_{C} 55,5) com os carbonos em 168,9 e 164,9, respectivamente, sugerindo, dicetopiperazinas que são substâncias formadas pela condensação de dois ou mais aminoácidos (FDHIL, F. et al., 2003).

Os multipletos visualizados em δ_{H} 3,39/3,26, δ_{H} 1,72 e δ_{H} 1,40/2,00 são característicos dos hidrogênios metilênicos e pelas correlações observadas nos experimentos de COSY (Figura 48), entre $\text{H-3} \leftrightarrow \text{H-4} \leftrightarrow \text{H-5} \leftrightarrow \text{H-6}$, foram atribuídos a uma ao aminoácido prolina. A presença de um anel benzílico observado em RMN de ^1H associado à correlação a longa distância, observada no experimento HMBC, entre $\text{H-10a/H-10b} \leftrightarrow \text{C-2'}/\text{C-6'}/\text{C-1}$, permitiu definir o segundo aminoácido como sendo fenilalanina.

Figura 44 - Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC da substância 7.

A literatura descreve que a configuração relativa de C-6 e C-9 pode ser definida baseando-se nos valores de deslocamento químico de RMN de ^1H . Quando H-6 e H-9 encontram-se no mesmo plano da molécula, os valores de deslocamento químico para estes encontram-se na faixa de δ_{H} 3,90-4,30 (FDHILA et al., 2003), essa condição é estabelecida para todas as dicetopirazinas que contem esse núcleo básico em comum. Para a substância 7 os valores encontrados para H-6 (δ_{H} 4,07) e H-9 (δ_{H} 4,35), permitiram atribuir a configuração relativa *cis*. Os dados espectrais foram comparados com a literatura (SETO et al., 2005; FDHILA et al., 2003) e a substância 7 foi identificada como *Rel.ciclo*(Pro-Phe).

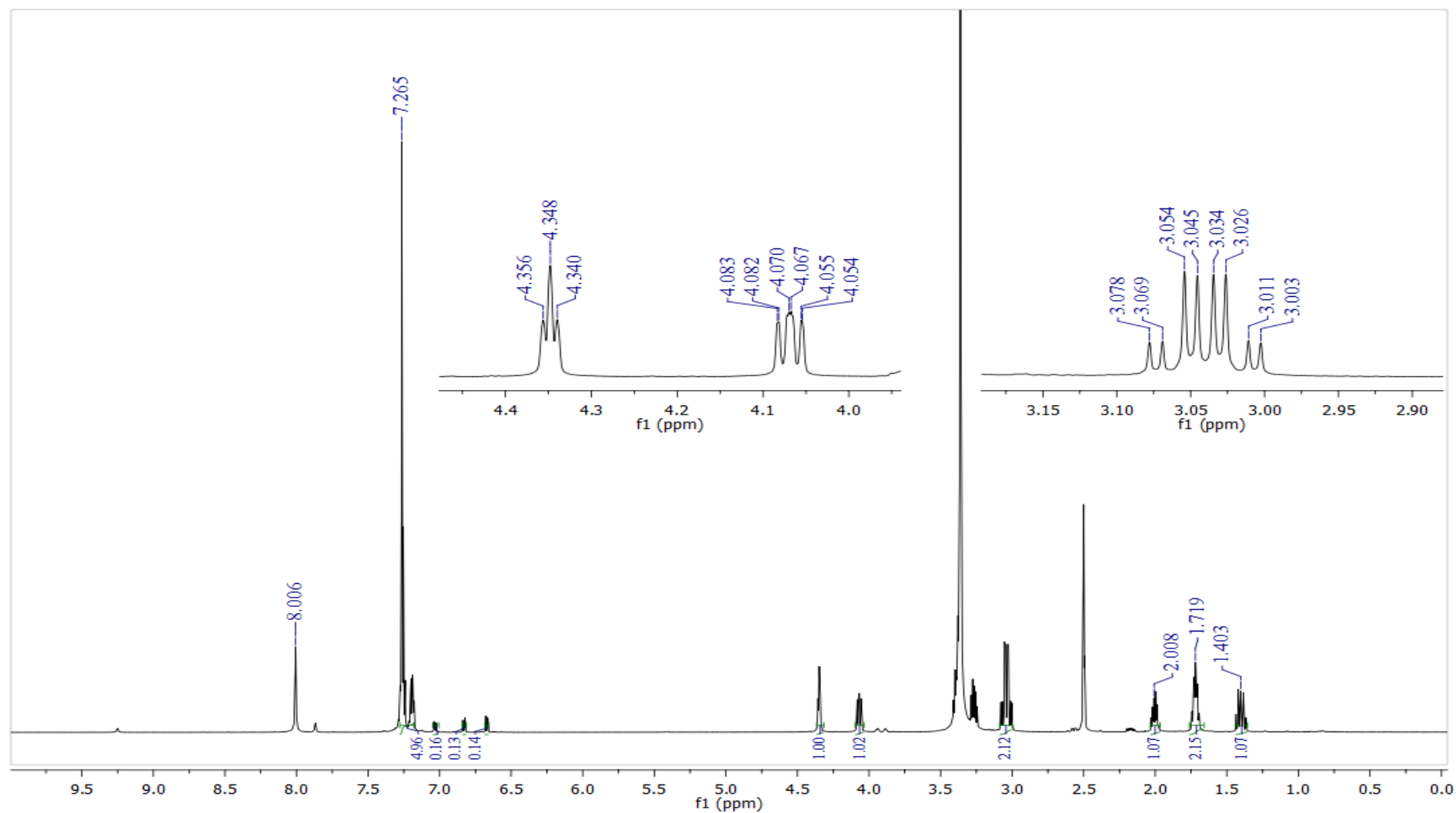
Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H da substância 7 (DMSO- d_6 ; 600 MHz).

Figura 46 - Mapa de contorno HSQC da substância 7 (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz).

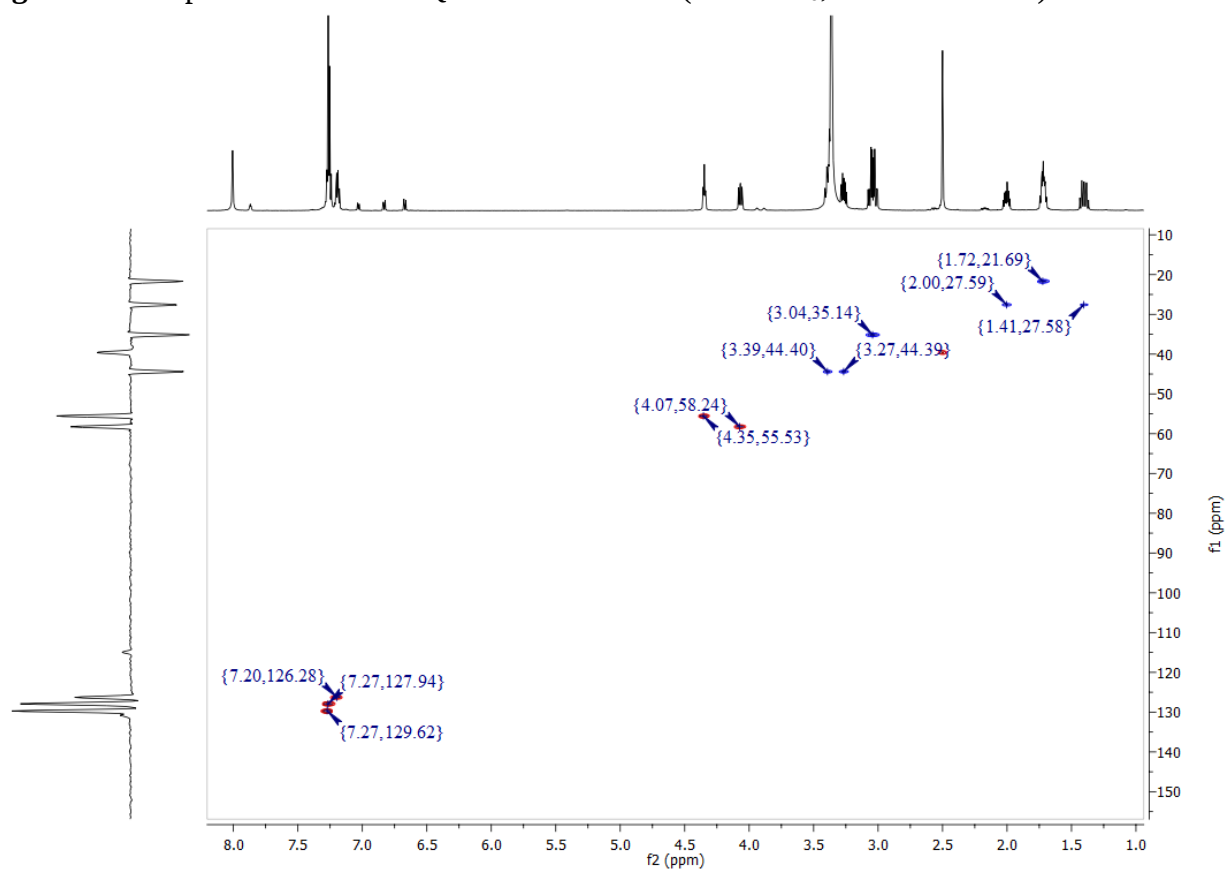


Figura 47 - Mapa de contorno HMBC da substância 7 (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz).

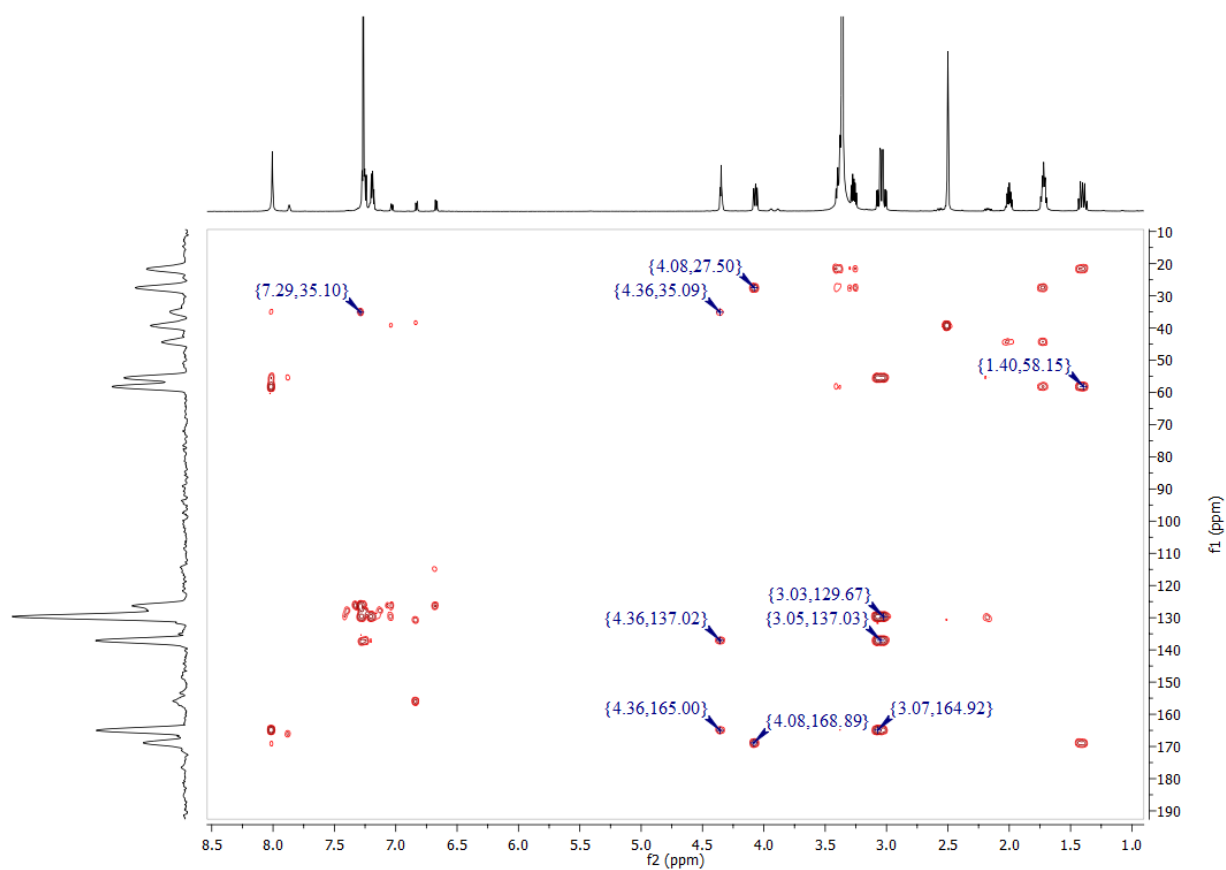
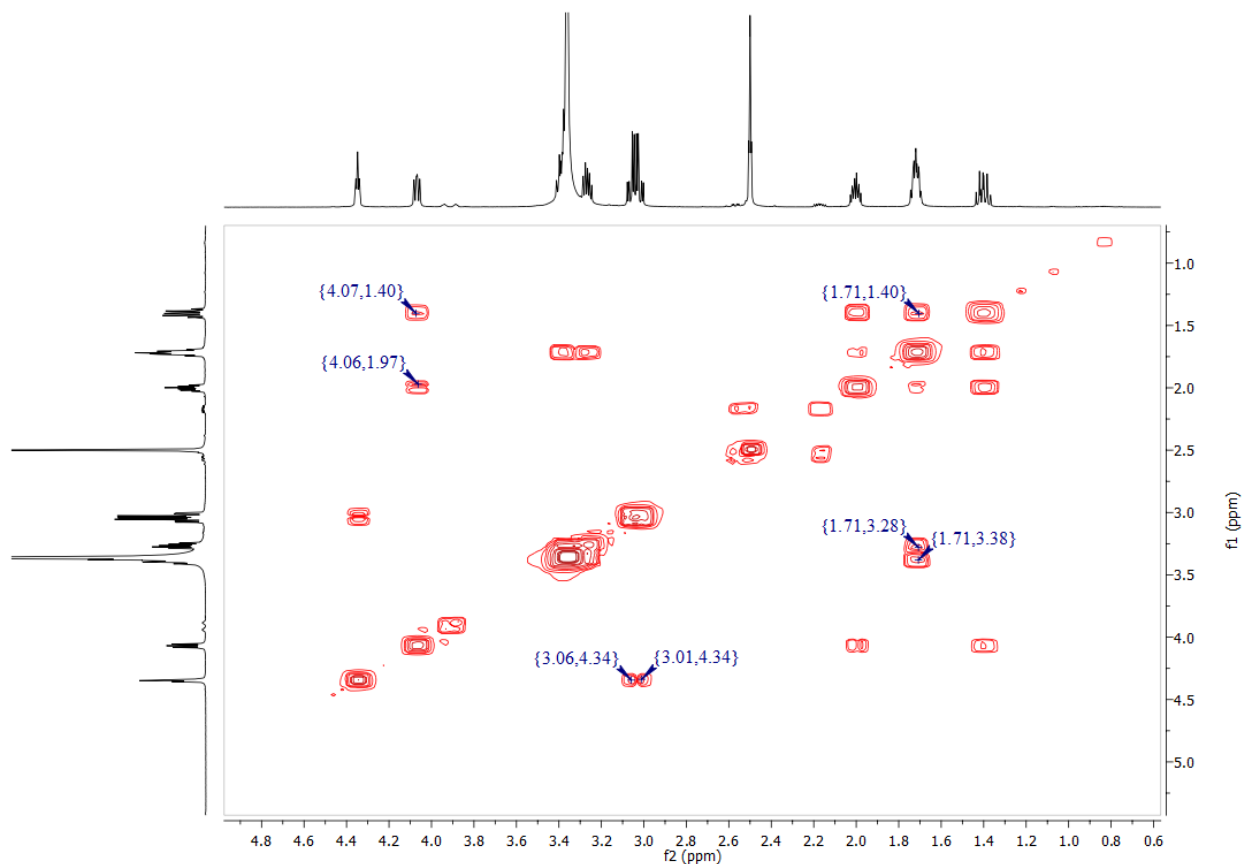
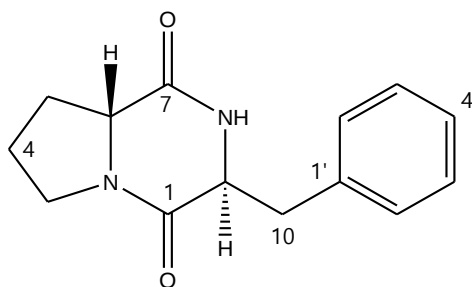


Figura 48 - Mapa de contorno COSY da substância 7 (DMSO- d_6 ; 600 MHz).

- Identificação estrutural da substância 6.



A análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H , HSQC e HMBC (Figura 50, Figura 51 e Figura 52) da substância **6** permitiu observar uma grande semelhança dos deslocamentos químicos comparado com substância **7**, diferindo apenas nos dados referentes aos hidrogênios metínicos α as carbonilas, H-6 e H-9.

Esta informação, associada aos dados da literatura, permitiram identificar as substâncias **6** e **7** como estereoisômeros. Assim, a sugestão é corroborada pelo valor encontrado para o deslocamento químico de H-6 em 2,93 ppm (Tabela 11) em **6**, condizente com valores esperados quando H-6 e H-9, quando estes encontram-se em planos diferentes (Figura 49), conferindo a configuração relativa *trans* para a substância **6**.

Figura 49 - Estereoisômeros da dicetopiperazina Prolina-Fenilalanina.

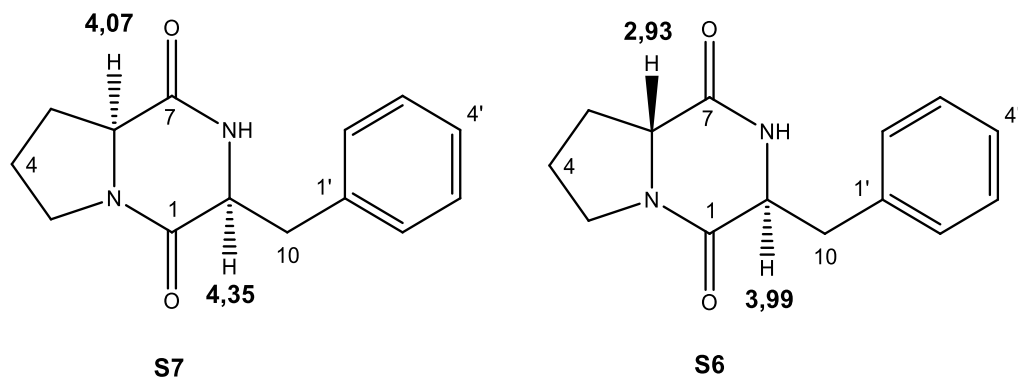


Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 600 e 150 MHz) de **6** e **7** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	6		7	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	-	165,0	-	164,9
2	-	-	-	-
3	3,20(m)/3,40 (m)*	44,4	3,27(m)/3,39 (m)*	44,4
4	1,56(m)/1,79(m)	21,1	1,69/1,74(m)	21,7
5	1,59(m)/ 1,94(m)	28,3	1,41(m)/ 2,00(m)	27,6
6	2,93(t; 8,5)	56,9	4,07(dt;0,6; 8,5)	58,2
7	-	169,3	-	168,9
8	8,18 (s)	-	8,00	-
9	3,99(t; 5,0)	57,7	4,35(t; 5,0)	55,5
10	3,03(dd;5,0;14,0)/ 2,88(dd;5,0; 14,0)	39,1	3,02(dd;5,0;14,0)/ 3,05(dd;5,0; 14,0)	35,1
1'	-	136,2	-	137,2
2' e 6'	7,14 (m)	129,7	7,20 (m)	126,3
3' e 5'	7,29 (m)	126,7	7,27 (m)	127,9
4'	7,27 (m)	128,1	7,27 (m)	129,6

*Sinal sob a água residual do $\text{DMSO}-d_6$.

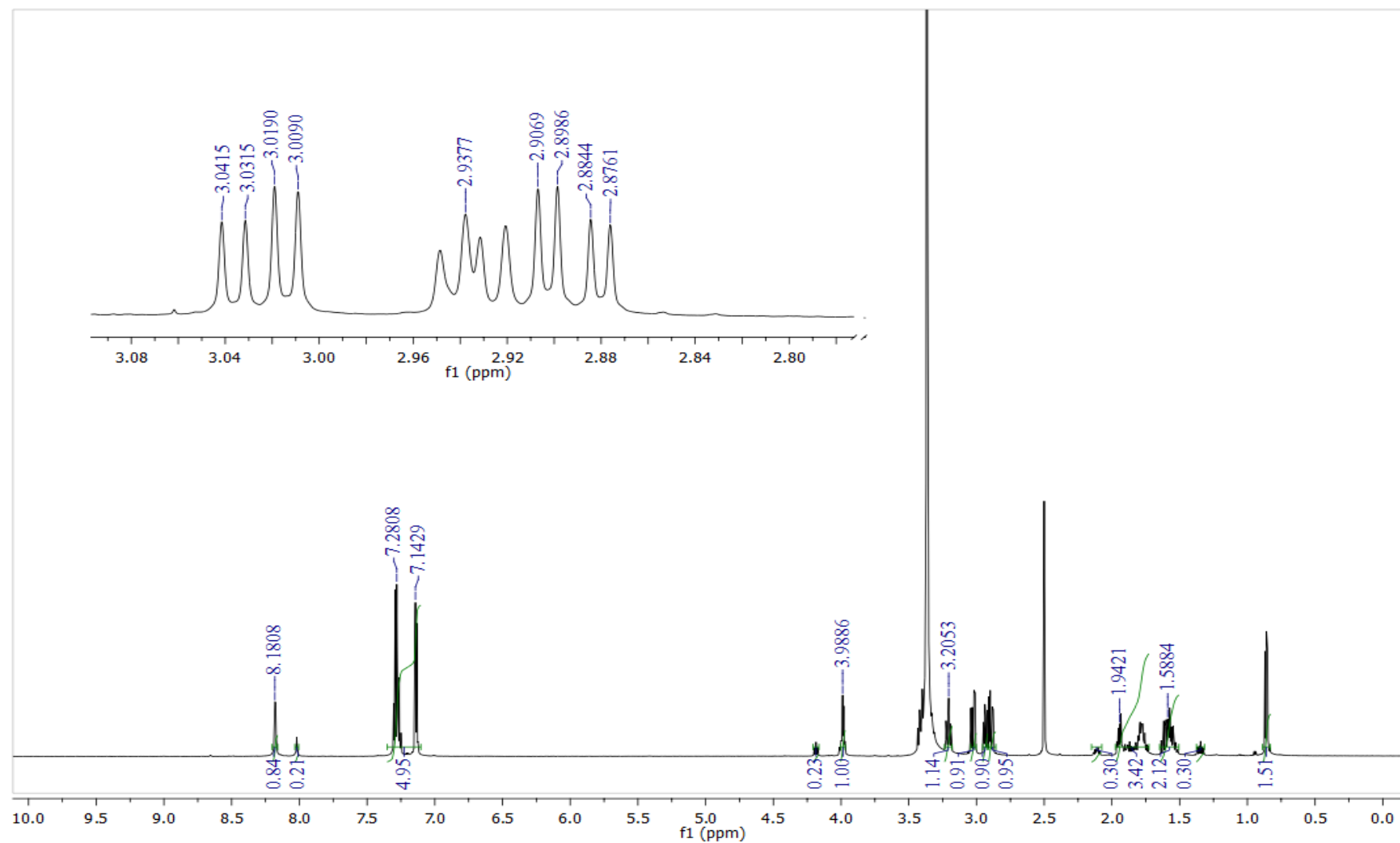
Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H da substância 6 (DMSO- d_6 ; 600 MHz).

Figura 51 - Mapa de contorno HSQC da substância **6** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz).

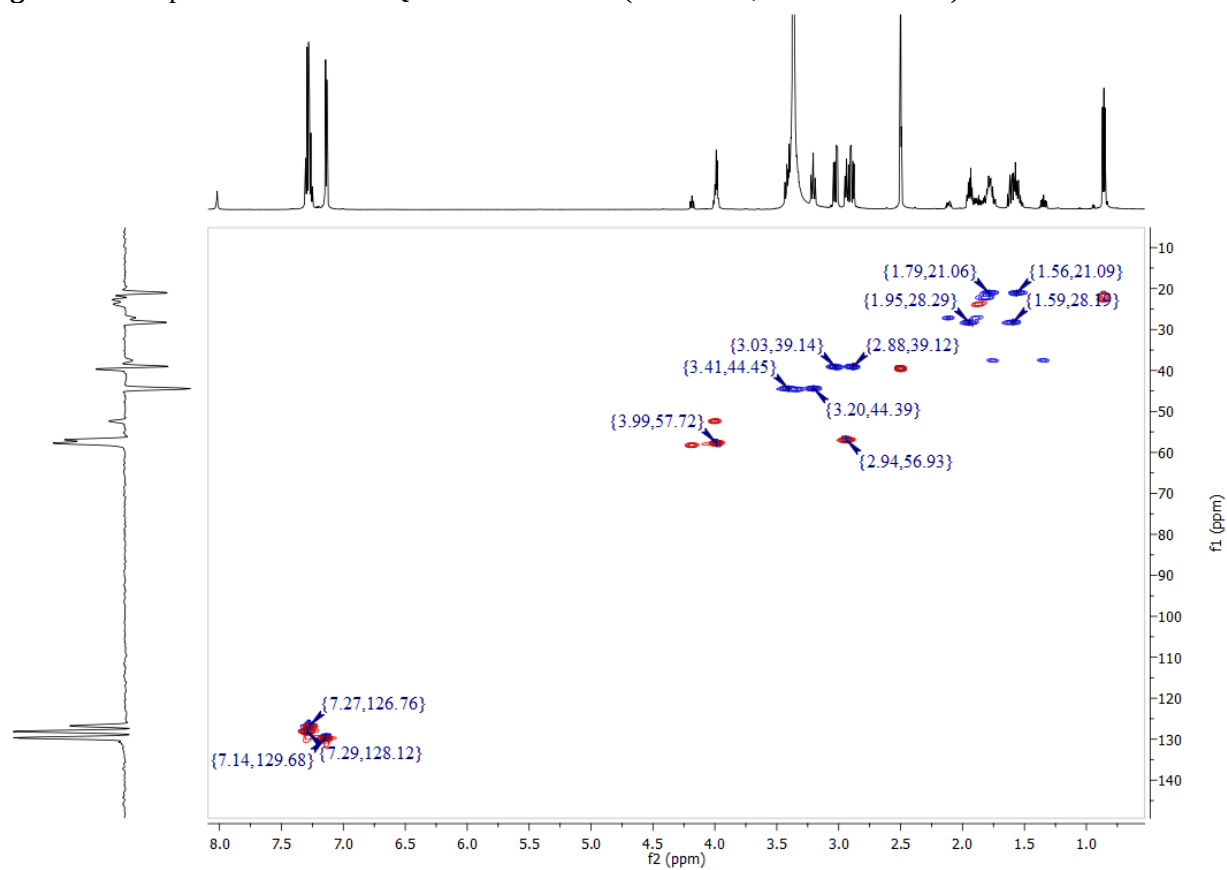
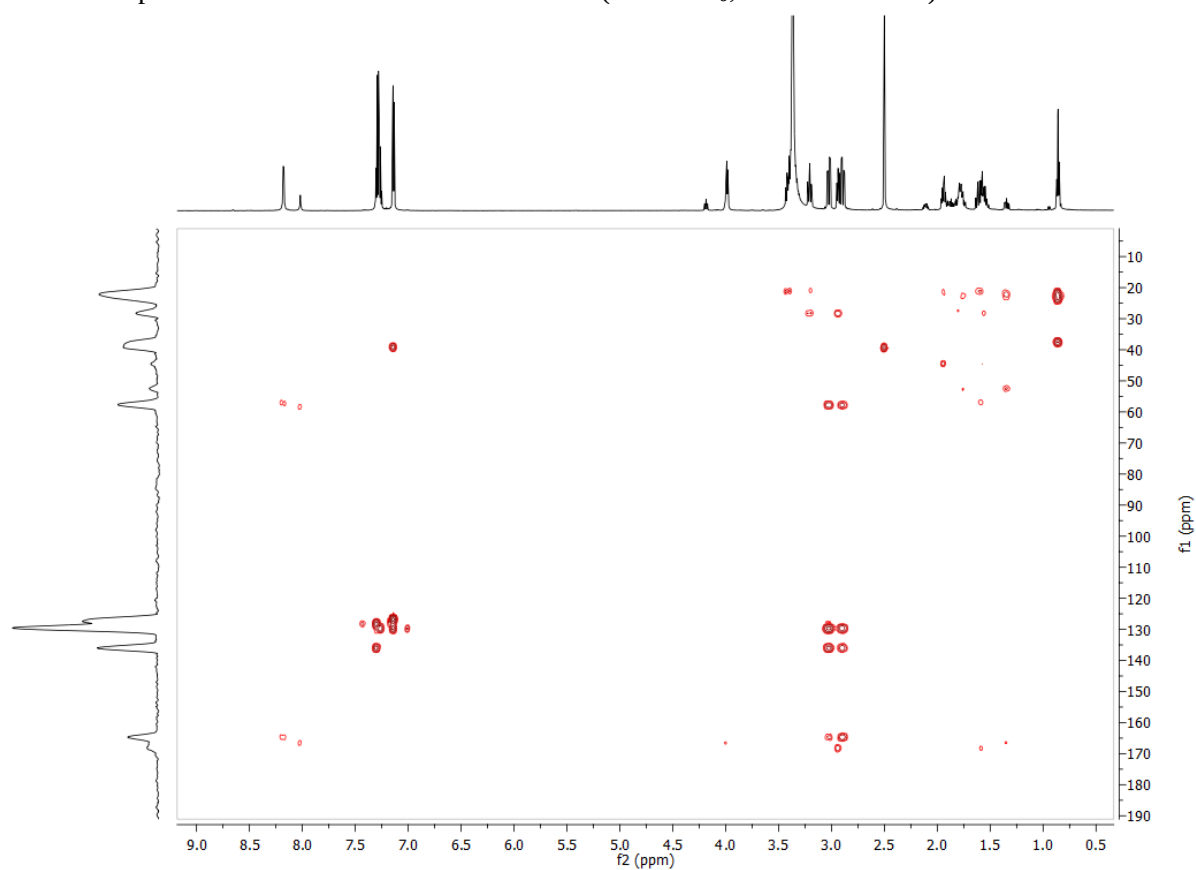
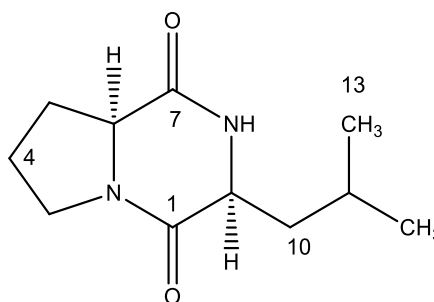


Figura 52 - Mapa de contorno HMBC da substância **6** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz).



- Identificação estrutural da substância 5.

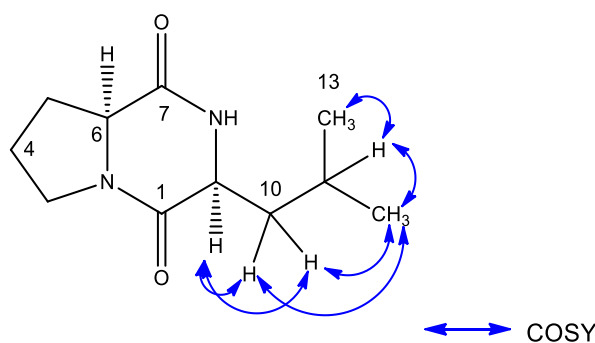


A análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H , COSY, HSQC e HMBC (Figura 54, Figura 55, Figura 56 e Figura 57) da substância 5 permitiu observar uma grande semelhança dos deslocamentos químicos comparado com 7, sugerindo uma dicetopiperazina.

No espectro de RMN ^1H foi observado a presença de 2 dubletos em δ_{H} 0,85 ($J=5,4\text{Hz}$, 3H) e 0,86 ($J=5,4\text{Hz}$, 3H) (Tabela 12), indicando a presença de 2 metilas. As correlações observados em COSY, entre δ_{H} 0,85 (H-12)/ δ_{H} 0,86 (H-13) $\leftrightarrow$ δ_{H} 1,87 (H-11) $\leftrightarrow$ δ_{H} 1,34 e 1,75 (H-10a e H-10b) $\leftrightarrow$ δ_{H} 4,00 (H-9) permitiram sugerir a presença de uma unidade do aminoácido Leucina (Leu) como um dos componentes de 5. Os dois dubletos em δ_{H} 0,85 e δ_{H} 0,86 permitem distinguir entre leucina e isoleucina, uma vez que a última apresentaria um dubleto e um tripleto.

A presença de três multipletos variando de (δ_{H} 1,3-3,4) (Tabela 12), referentes à hidrogênios metilênicos, indicaram a presença de resíduo do aminoácido Prolina (FDHIL, F. et al., 2003). As correlações observadas por COSY (Figura 53) entre H-3 $\leftrightarrow$ H-4 $\leftrightarrow$ H-5 $\leftrightarrow$ H-6 confirmam esta sugestão. O deslocamento químico em 4,18 (δ_{C} 58,3) foi atribuído a H-6, o qual mostra correlação à longa distância com C-5 (δ_{C} 27,2) e C-1 (δ_{C} 170,4), conforme observado na análise do espectro de HMBC.

Figura 53 - Correlações observadas em COSY para a unidade Leucina da substância 5.



Comparando-se o conjunto de dados espectrais com os da literatura (STARK, T.; HOFMANN, T., 2005), indicando a substância 5 como a *Rel.ciclo(Leu-Pro)*.

Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 600 MHz) de **5** (δ em ppm e J em Hz).

<i>Posição</i>	δ_H	δ_C
1	-	166,4
2	-	-
3	3,35 (<i>m</i>) *	44,6
4	1,81(<i>m</i>)	22,3
5	1,89(<i>m</i>) / 2,11(<i>m</i>)	27,2
6	4,18(<i>t</i> ; 8,5)	58,3
7	-	170,4
8	8,02	-
9	4,00(<i>t</i> ; 5,0)	52,4
10	1,34(<i>ddd</i> ; 6,0, 7,8, 13,8) /1,74(<i>m</i>)	37,6
11	1,87(<i>m</i>)	23,8
12	0,85 (<i>d</i> ; 5,4)	21,7
13	0,86 (<i>d</i> ; 5,4)	22,6

*Sinal sob a água residual do DMSO- d_6 .

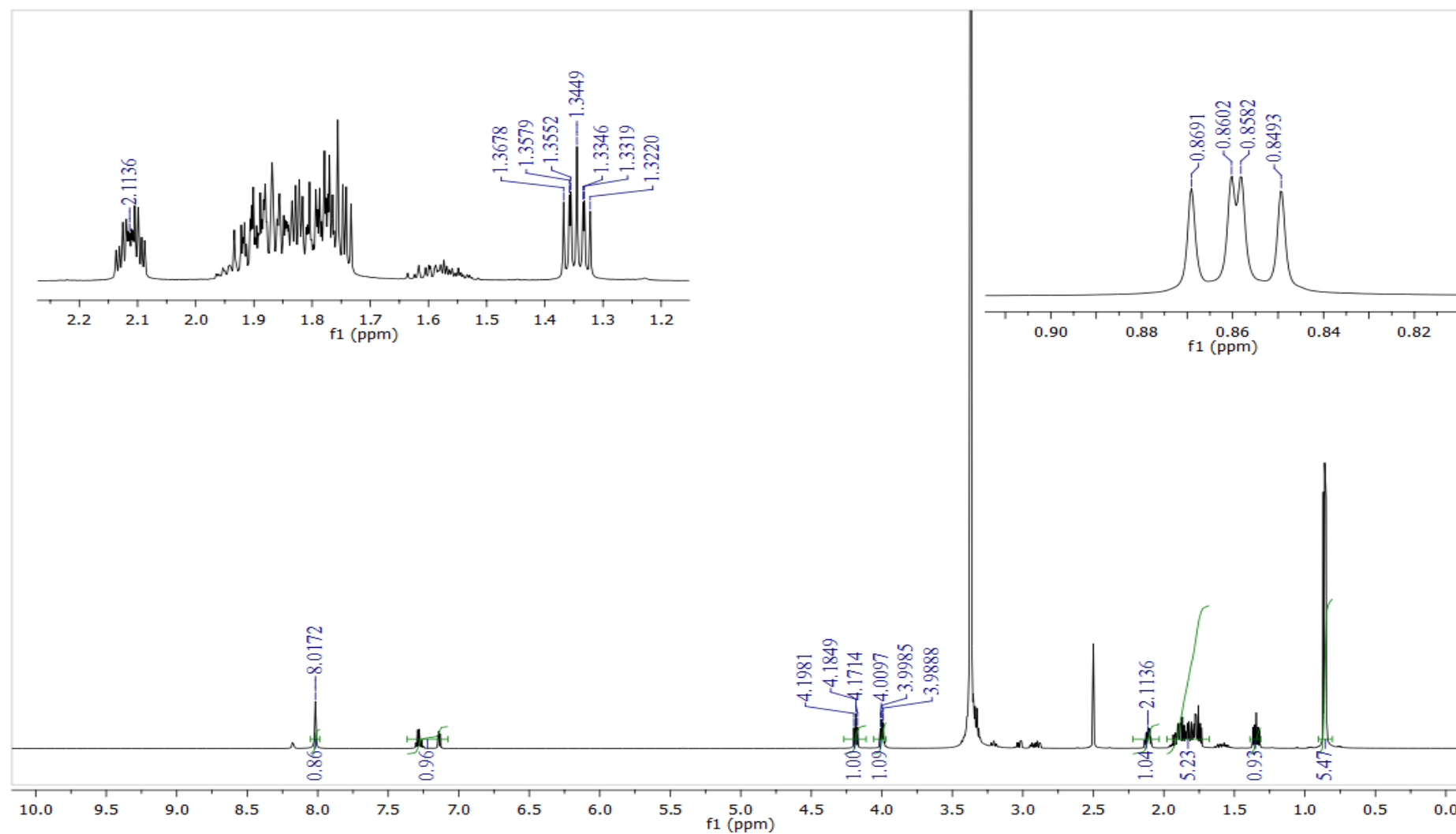
Figura 54 - Espectro de RMN de ^1H da substância 5 (DMSO- d_6 ; 600 MHz).

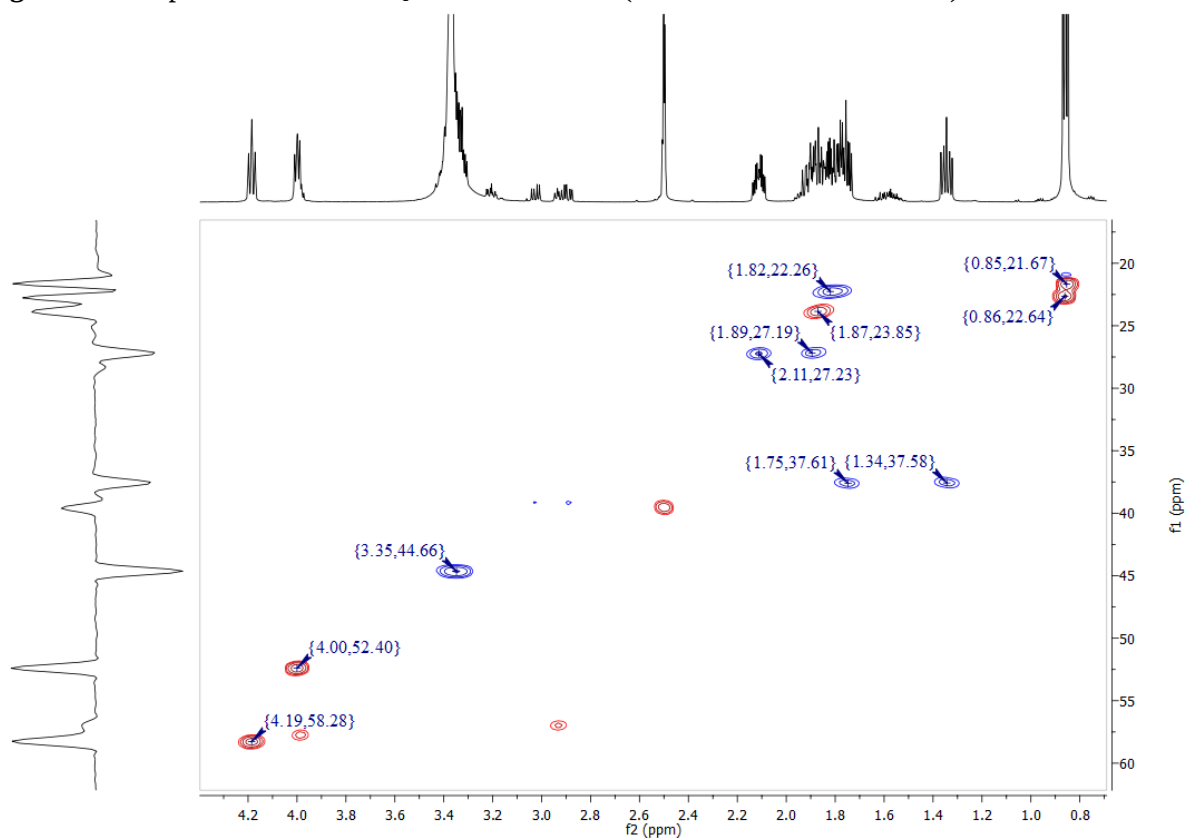
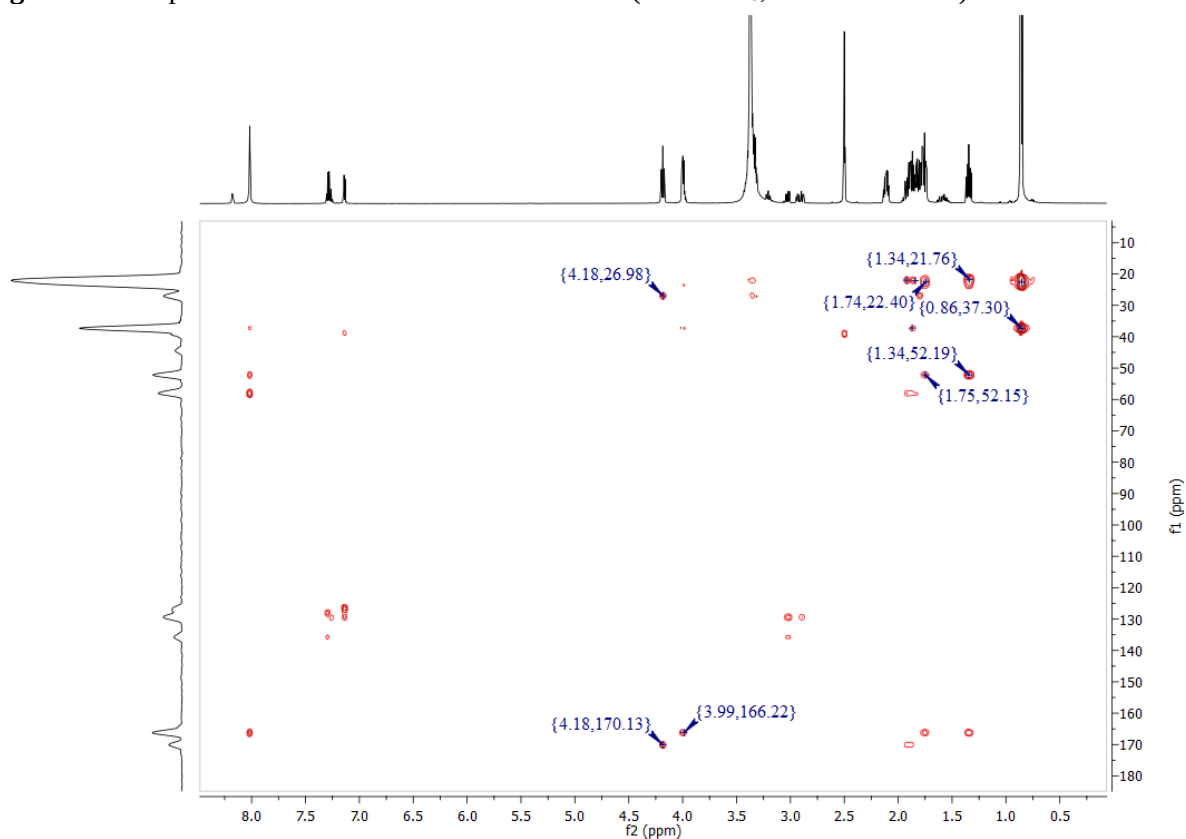
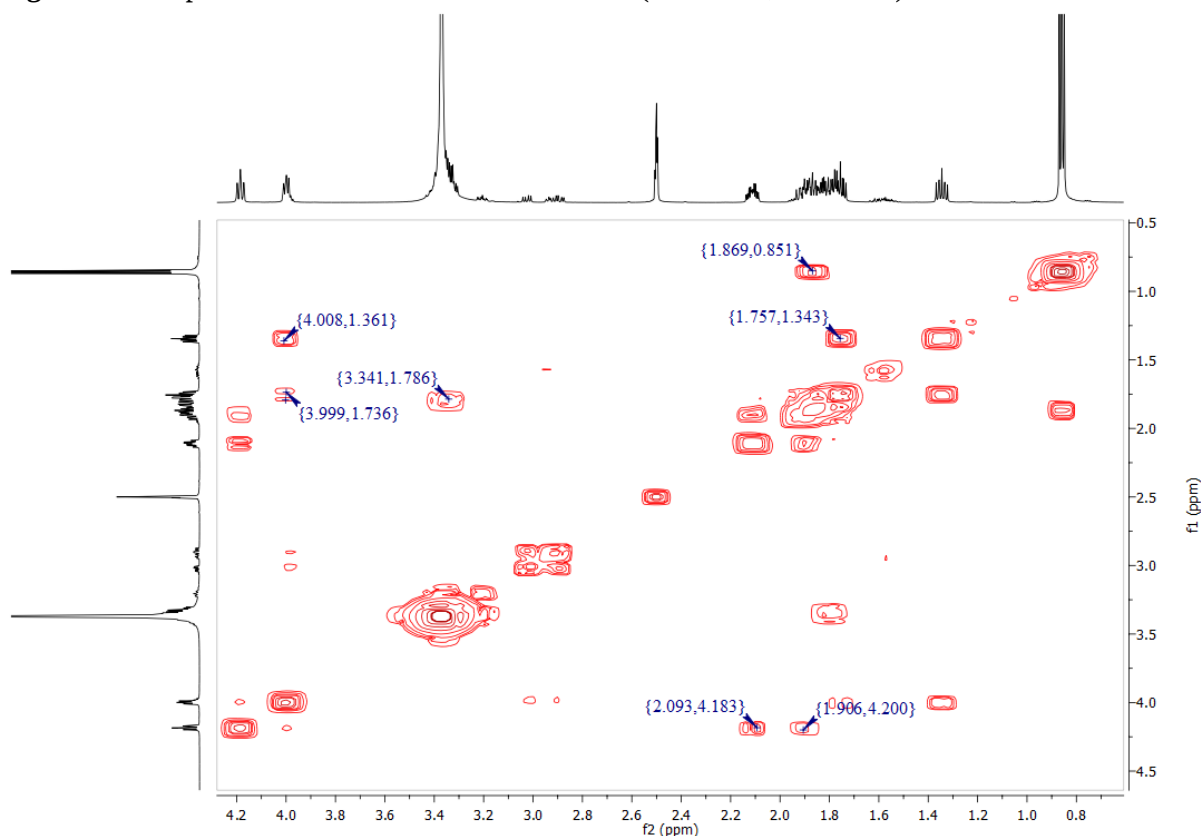
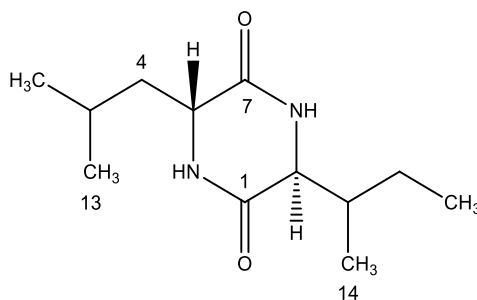
Figura 55 - Mapa de contorno HSQC da substância 5 (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz).**Figura 56** - Mapa de contorno HMBC da substância 5 (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz).

Figura 57 - Mapa de contorno COSY da substância 5 (DMSO- d_6 ; 600 MHz).

- Identificação estrutural da substância 3.



A substância 3 foi submetida à análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e uni e bidimensionais (Figura 59-62) e apresentou perfil espectroscópico semelhante com a substância 5, sugerindo uma dicetopiperazina, diferindo pela ausência do aminoácido prolina.

Foram observados quatro sinais em δ_{H} 0,82 (*t*, $J = 7,5$ Hz, 3H, δ_{C} 12,0), 0,87 (*d*, $J = 6,5$ Hz, 3H, δ_{C} 21,3), 0,91 (*d*, $J = 6,5$ Hz, 3H, δ_{C} 22,6) e δ_{H} 0,98 (*d*, 7,2 Hz, δ_{C} 14,7) (Tabela 13), evidenciando a presença de quatro metilas, o que sugere a presença dos aminoácidos leucina e isoleucina. Os deslocamentos químicos observados em δ_{H} 3,61 (H-3, *q*, $J = 4,8$ Hz, 1H, δ_{C} 55,0) e δ_{H} 3,95 (H-9, *sl*, 1H, δ_{C} 58,9) evidenciaram configuração relativa *trans*. Estas observações associadas às correlações observadas no COSY (Figura 58) $\text{H-3} \leftrightarrow \text{H-4} \leftrightarrow \text{H-}$

13 $\leftrightarrow$ H-5 $\leftrightarrow$ H-6 e de H-9 $\leftrightarrow$ H-10 $\leftrightarrow$ H-14 $\leftrightarrow$ H-11a e Hb $\leftrightarrow$ H-12, nos permitiram atribuir para **3** a dicetopiperazina *Rel.ciclo* (Leu-Ile).

Figura 58 - Correlações observadas em COSY para a unidade Isoleucina de **3** (DMSO- d_6).

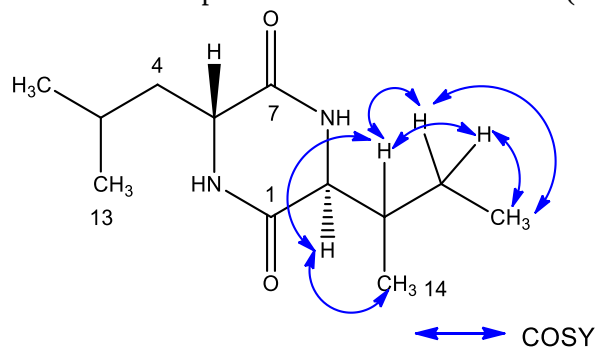


Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz) de **3** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_{H}	δ_{C}
1	-	169,5
2	8,37 (s)	-
3	3,61 (q; 4,8)	55,0
4	1,42(m)/ 1,56(m)	42,0
5	1,69 (m)	23,6
6	0,87(d; 6,6)	21,3
7	-	165,1
8	7,97 (s)	-
9	3,95(sl)	58,9
10	2,02 (m)	34,6
11	1,27(m)/ 1,34m)	23,6
12	0,82 (t; 7,5)	12,0
13	0,91(d; 6,6)	22,8
14	0,98(d; 7,2)	14,7

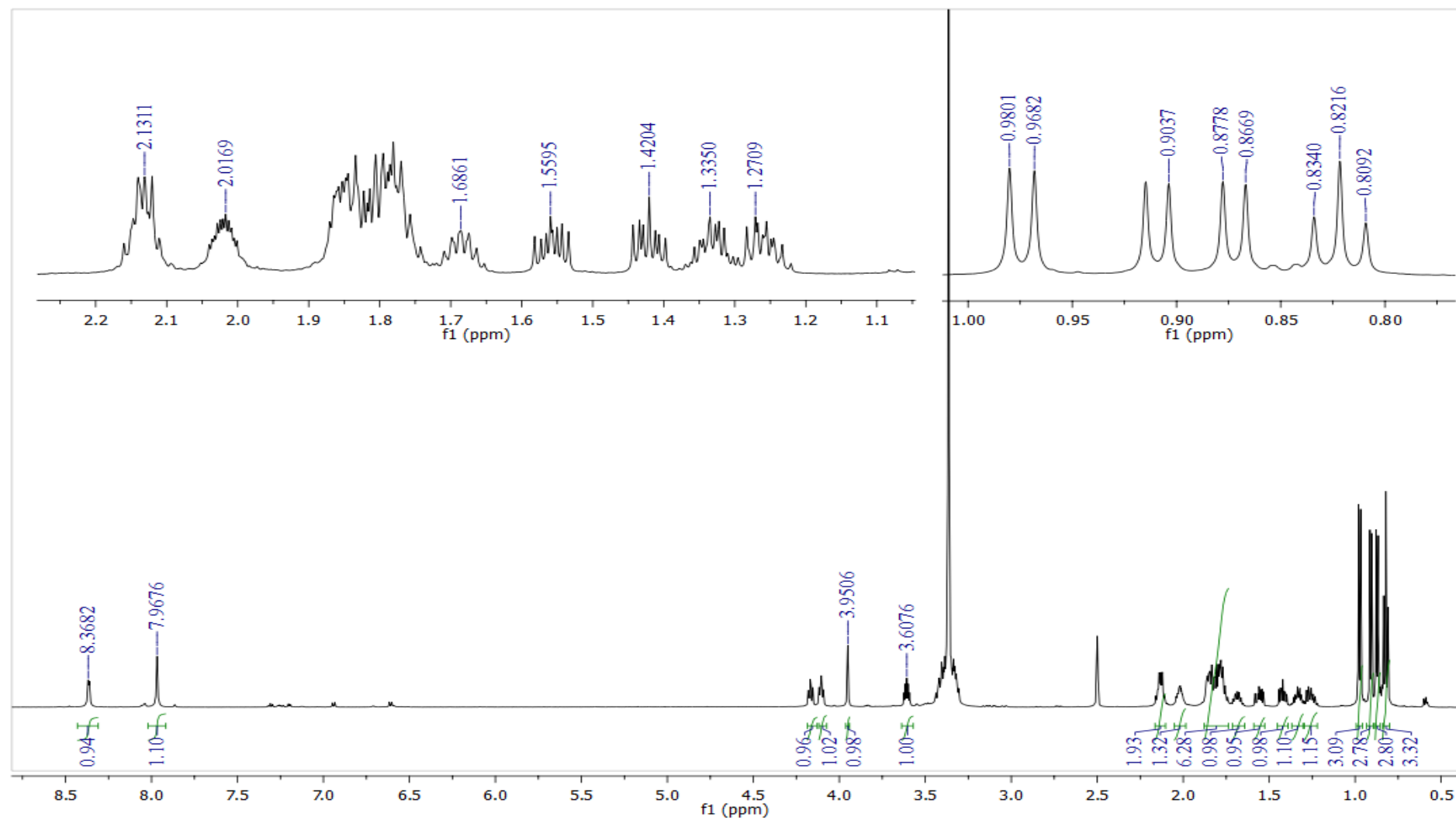
Figura 59 - Espectro de RMN de ^1H da substância **3** ($\text{DMSO}-d_6$; 600MHz).

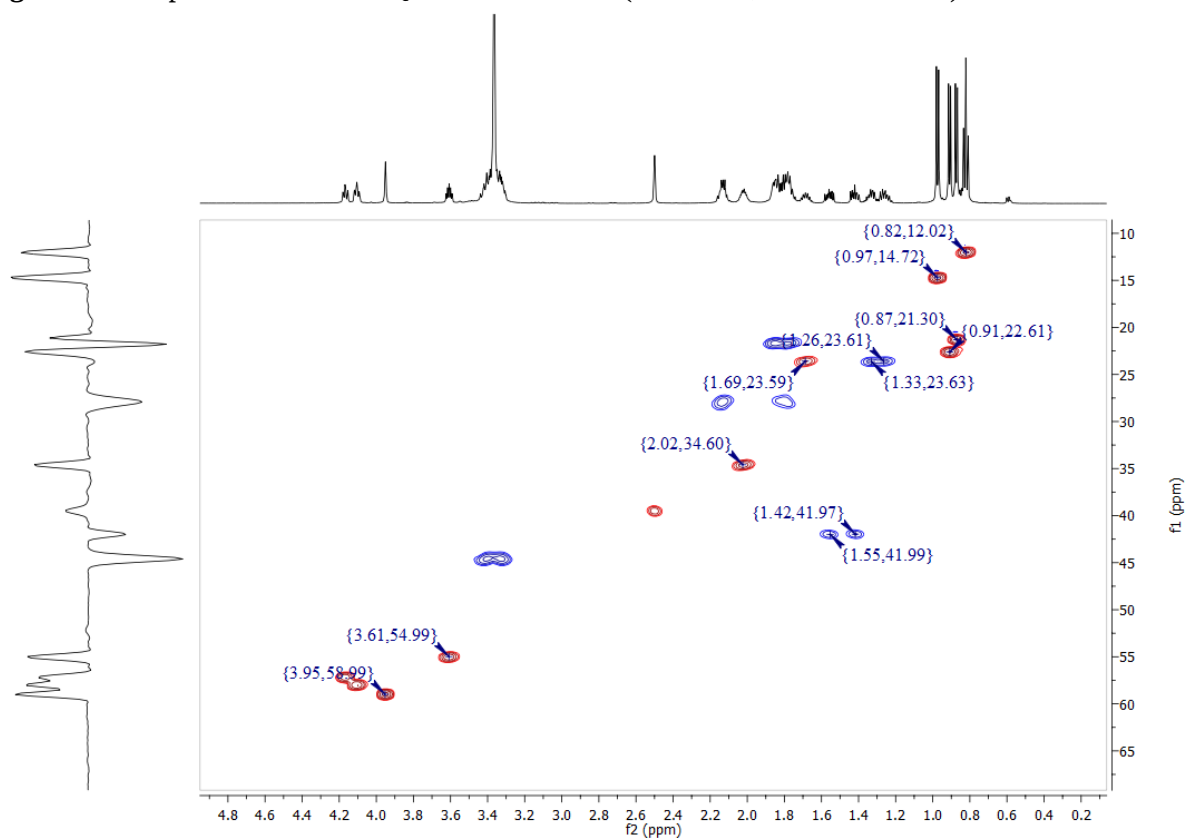
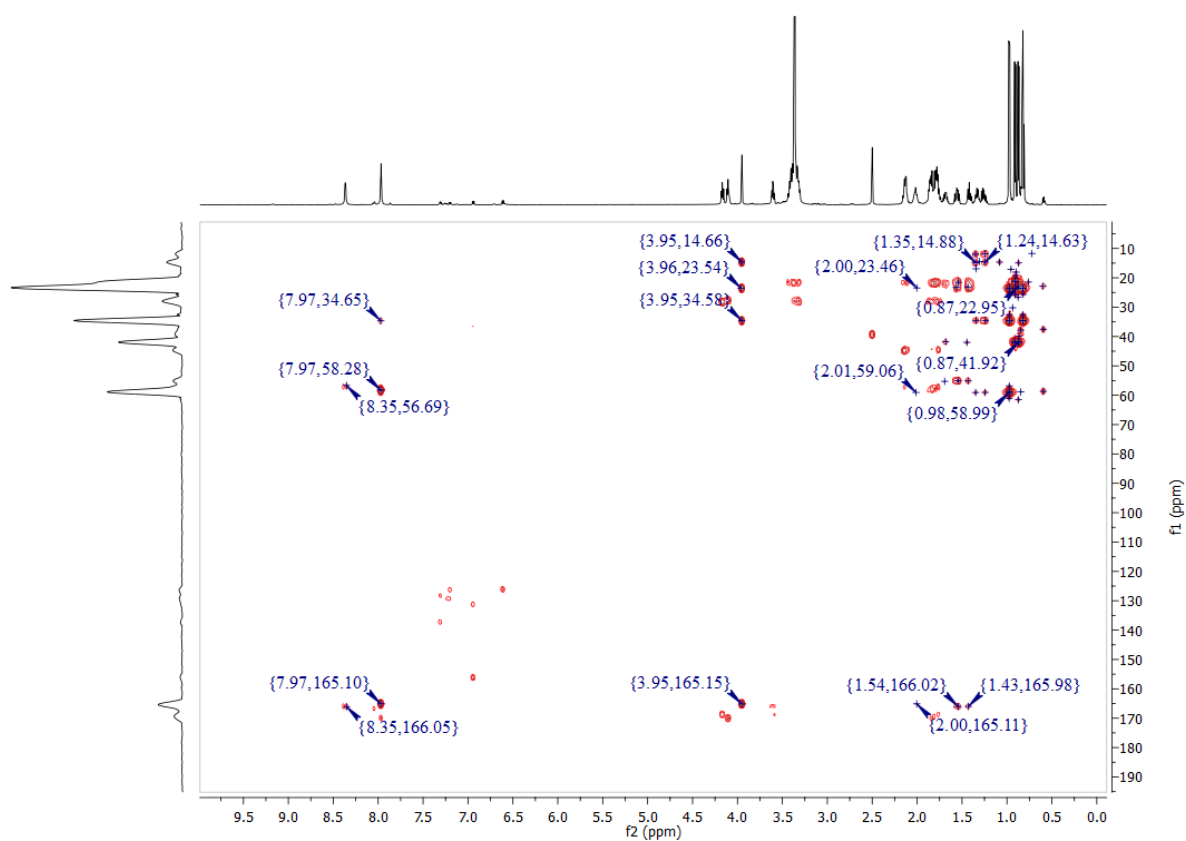
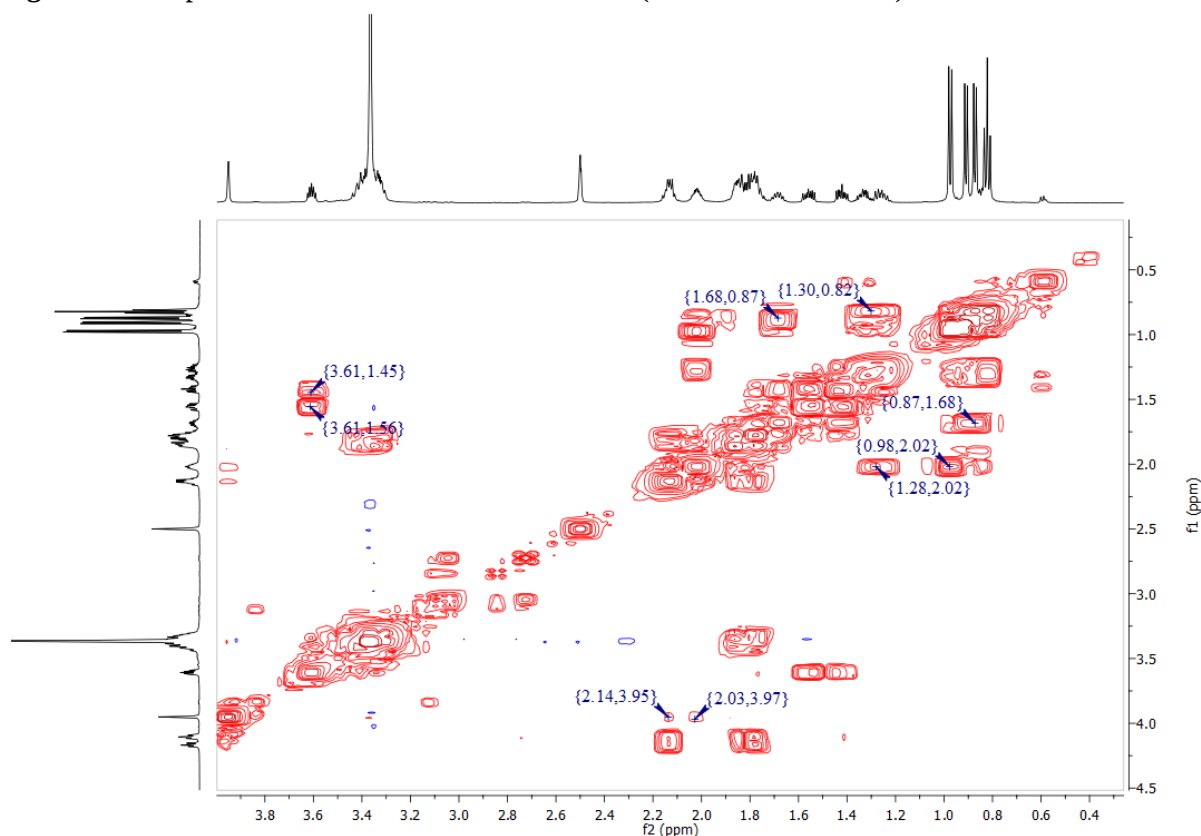
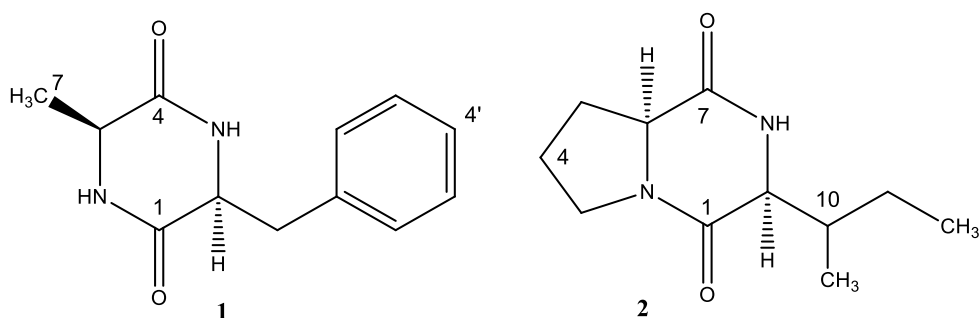
Figura 60 - Mapa de contorno HSQC da substância **3** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz).**Figura 61** - Mapa de contorno HMBC da substância **3** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz).

Figura 62 - Mapa de contorno COSY da substância **3** (DMSO-*d*₆; 600 MHz).

- Identificação estrutural das substâncias **1** e **2**.



Análise detalhada do espectro de RMN de ^1H (Figura 65, Tabela 14) de *Preussia* sp. MDB-Fr03-Pico 1 (8,3 mg) evidenciou uma mistura de duas substâncias, sendo por meio dos valores de integração foi possível estabelecer uma proporção de aproximadamente 1:2. Os dados em HSQC evidenciaram quatro carbonilas típicas de dicetopiperazinas, confirmando a presença de duas substâncias

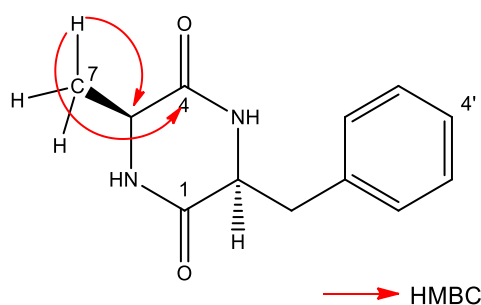
A partir do espectro de RMN de ^1H , bem como do mapa de contornos HSQC foi possível verificar na substância **1** em um multiplete na região de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,15-7,27 (δ_{C} 126,6; δ_{C} 127,9; δ_{C} 130,3), além de dois duplos dubletos em 3,11 (1H, *dd*,

14,0; 4,2 Hz; δ_C 38,0) e 2,85 (1H, *dd*, 14,0; 4,2 Hz; δ_C 38,0), evidenciando um sistema benzílico com o anel aromático monossustituído. Foram observados ainda, um singlete largo em δ_H 4,17 (1H; *sl*; δ_C 54,8) e duplo dubleto em δ_H 3,61 (1H; *dd*; 7,0; 4,8 Hz δ_C 49,3), o que pelos valores de deslocamento químico sugerem ligação com nitrogênio e α à carbonila e um dubleto em δ_H 0,45 (3H; *d*; 7,0 Hz δ_C 19,5) (Tabela 14).

A análise detalhada dos espectros de HMBC da substância **2** permitiu observar uma grande semelhança dos deslocamentos químicos comparado com substância **7**, indicaram que está também possui a unidade do aminoácido fenilalanina, diferenciando apenas pela segunda unidade do aminoácido.

A presença de um sinal em δ_H 0,45 evidenciou uma metila bem protegida, o que se comparando com os dados da literatura (FDHILA et al., 2003), sugeriu como a segunda unidade do aminoácido, a alanina, o que foi confirmado pelo mapa de contorno HMBC, onde foram visualizadas as correlações a 3J de H-7 $\leftrightarrow$ C-4 e a 2J de H-7 $\leftrightarrow$ C-3 (Figura 63). Assim, a substância **2** foi identificada como *Rel.ciclo*(Ala-Phe).

Figura 63 - Principais correlações observadas em HMBC da substância **1**.



Para a substância **2** foram observados dois sinais em δ_H 0,86 (*d*, J = 7,0 Hz, 3H, δ_C 14,9), e δ_H 0,85 (*t*, 8,4 Hz, δ_C 10,8) (Tabela 13), evidenciando a presença de duas metilas, o que sugere a presença do aminoácido isoleucina.

Em continuidade a determinação estrutural da substância **2**, dificuldades foram encontrados devido a coalescência de alguns sinais com os da água residual do solvente utilizado. Desse modo, com o auxílio do experimento de TOCSY 1D (Figura 64) foi possível observar os sinais que estavam obscurecidos. A análise deste espectro e do mapa de contorno HSQC permitiu atribuir os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos para a substância **2** (Tabela 15). Pelo mapa de contornos HMBC foi possível observadas as correlações entre H-10 $\leftrightarrow$ C-9/C-11/C-12 e de H-12a/12b $\leftrightarrow$ C-10/C-13, permitiram confirmar a unidade prolina e identificar a substância **2** como a dicetopiperazina *Rel.ciclo*(Pro-Ile).

Figura 64- Espectro de RMN de ^1H (azul) e experimentos de TOCSY 1D (verde, irradiação em δ 1,49; vermelho, irradiação em δ 2,15) ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) para determinação estrutural da substância 2.

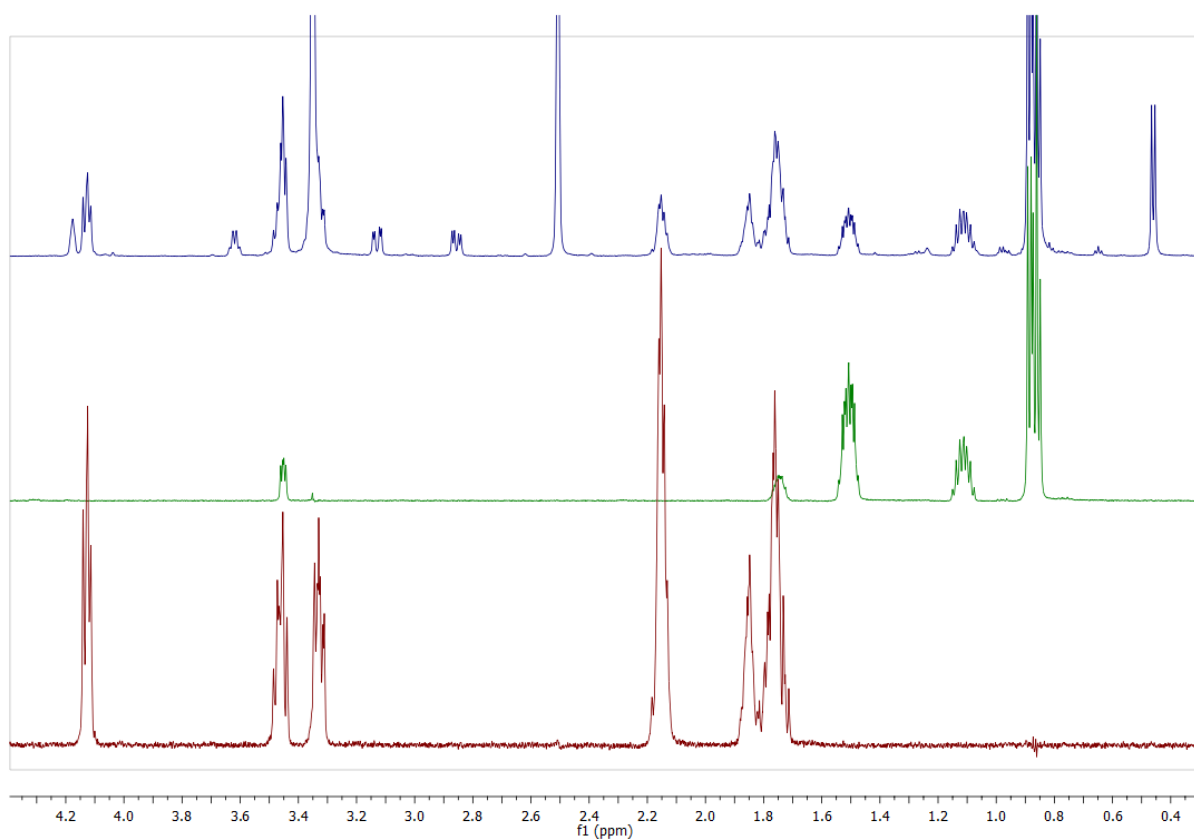


Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 600 e 150 MHz) da substância 1 (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_H	δ_C
1	-	165,9
2	8,15 (s)	-
3	3,61 (dd; 7,0 e 4,8)	49,4
4	-	167,4
5	8,01 (s)	-
6	4,17 (sl)	55,1
7	0,45 (d; 7,0)	19,5
8	3,11 (dd; 14,0 e 4,2)/ 2,85 (dd; 14,0 e 4,2)	38,1
1'	-	135,7
2' e 6'	7,16 (m)	130,3
3' e 5'	7,28 (m)	127,9
4'	7,22 (m)	126,6

Tabela 15 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz) da substância **2** (δ em ppm e J em Hz).

<i>Posição</i>	δ_{H}	δ_{C}
1	-	164,6
2	-	-
3	3,45/3,31 (<i>m</i>)	44,9
4	1,84/1,75 (<i>m</i>)	21,2
5	2,15/1,75 (<i>m</i>)	28,5
6	4,12 (<i>m</i>)	57,5
7	-	168,3
8	8,33 (<i>s</i>)	-
9	3,44 (<i>m</i>)	61,3
10	1,73 (<i>m</i>)	38,5
11	1,49/1,08 (<i>m</i>)	24,4
12	0,86 (<i>d</i> ; 7,0)	14,9
13	0,85 (<i>t</i> ; 8,4)	10,8

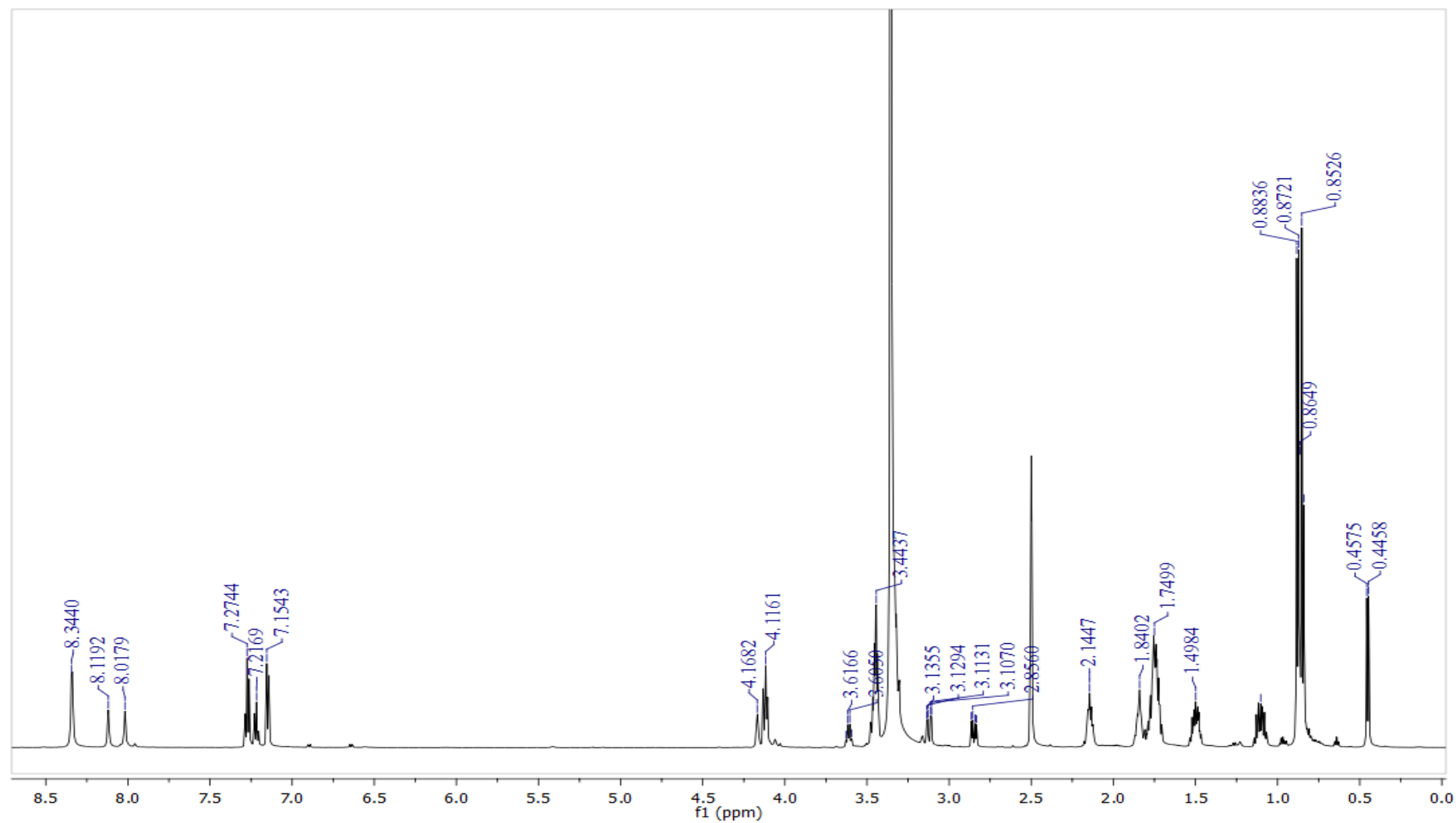
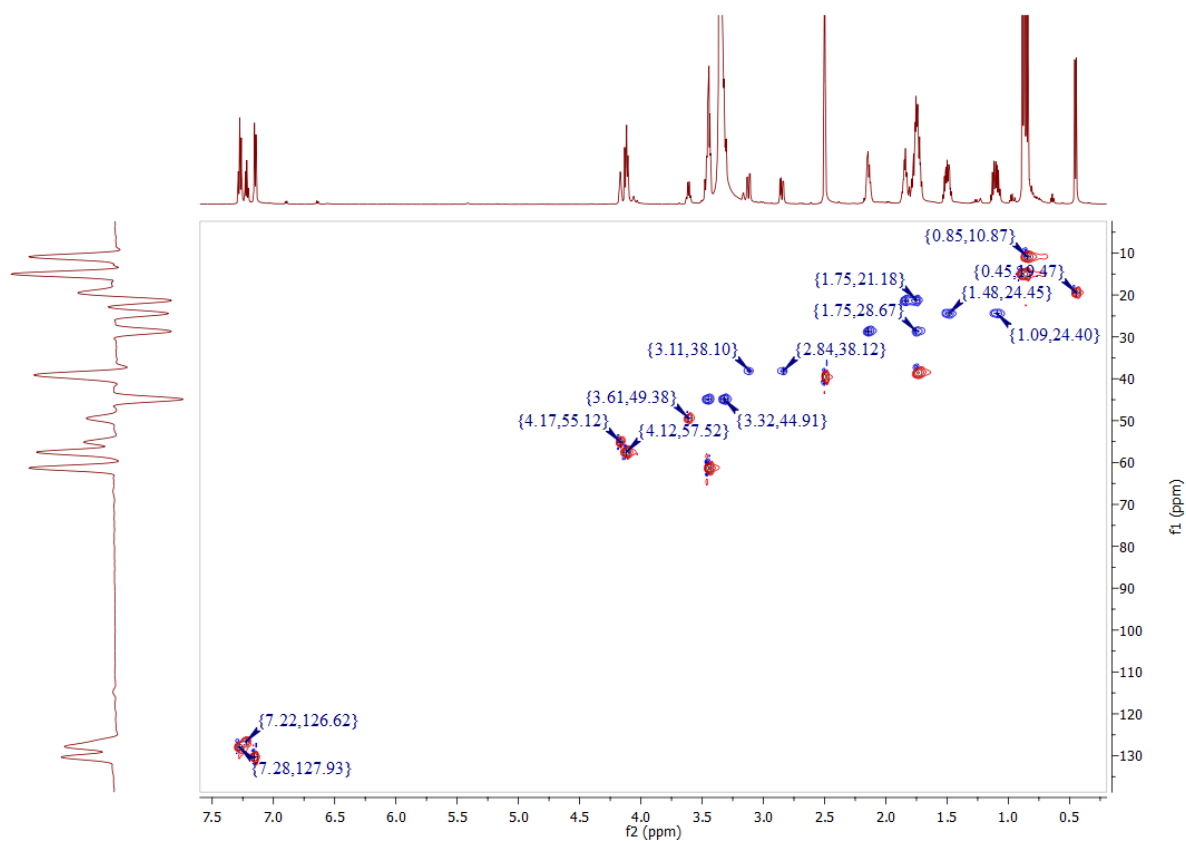
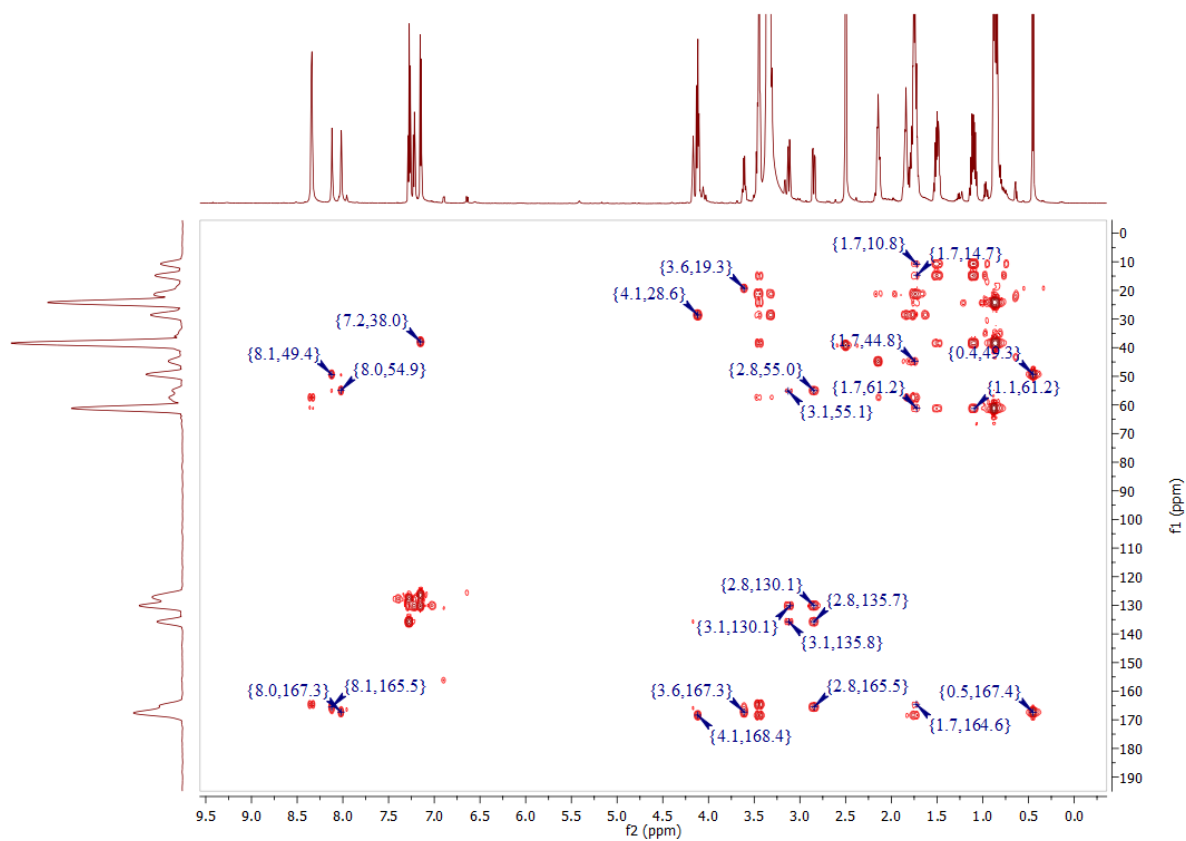
Figura 65- Espectro de RMN de ^1H da substância **1** e **2** ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz).

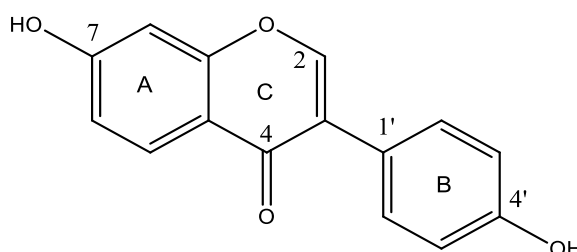
Figura 66 - Mapa de contorno HSQC da substância **1** e **2** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz)**Figura 67** - Mapa de contorno HMBC da substância **1** e **2** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz).

5.2.2 Isoflavonoides

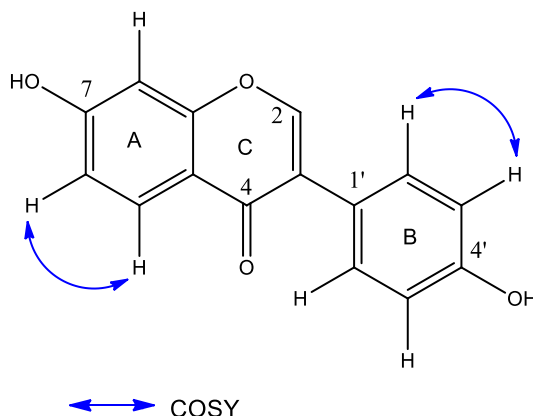
As isoflavonas são pertencentes à classe dos flavonoides e podem ocorrer tanto na forma de aglicona como na forma glicosilada. Presentes principalmente na família Fabaceae, e abundantes na soja sendo que os principais isoflavonóides são a genistina e a daidzina (DEWIK, 2002) chamados de fitoestrogénios devido a atividade estrogênica.

Estudos demostram que espécies de bactérias do gênero *Streptomyces* produzem isoflavonas, como a daidzeína, a partir da biotransformação de componentes do meio de cultivo provenientes da soja (HUANG, R. et al, 2013). Já o estudo realizado por Chang, T. S. et al. (2007) mostrou que fungos usados no preparo de alimentos fermentados de soja metabolizam a daidzeína e a genisteína (outra isoflavona) a 8-hidróxi-daidzeína e 8-hidróxi-genisteína.

- Identificação estrutural da substância 8.



O espectro de RMN de ^1H (Figura 70) da substância **8** apresentou dois dubletos em δ_{H} 7,36 (2H, $J = 8,5\text{Hz}$) e δ_{H} 6,80 (2H, $J = 8,5\text{Hz}$), o que, pelas multiplicidades e valores dos deslocamentos químicos em RMN de ^{13}C , sugeriram um anel aromático fenólico dissustituído. A presença dos dubletos em δ_{H} 7,94 (1H; $J = 8,7\text{Hz}$), δ_{H} 6,83 (1H; $J = 2,2\text{Hz}$) e do duplo dubleto δ_{H} 6,90 (1H; $J = 8,7$ e $2,2\text{ Hz}$) (Tabela 16), evidenciou um sistema aromático fenólico trissustituído. Adicionalmente foi observado um sinal em δ_{H} 8,25 (1H; s, δ_{C} 157,7), característico da classe dos isoflanoides. Estas observações foram corroboradas pela análise do mapa de contorno de COSY (Figura 68)

Figura 68 - Principais correlações em COSY da substância **8**.

Com base nos mapas de contorno de HSQC (Figura 72) e HMBC (Figura 73), foi possível verificar oito carbonos metínicos e sete quaternários aromáticos, sendo três ligados a oxigênio (δ_C 163,7; 157,9; 157,2), uma carbonila em δ_C 175,6. As correlações observadas em HMBC (Figura 69) de $H-2 \leftrightarrow C-4/C-8a/C-1'$, indicando a presença de uma cetona α,β -insaturada em um sistema altamente conjugado.

As correlações observadas em HMBC (Figura 69) de $H-2' \leftrightarrow C-3$, permitiu a conexão do anel C com o anel B. As correlações observadas de $H-2 \leftrightarrow C-4/C-8a$ e de $H-5 \leftrightarrow C-4/C-7/C-8a$ e $H-6 \leftrightarrow C-8/C-4a$, permitiram identificar a substância **8** como 7-hidroxi-3-(4'-hidroxifenil) cromona, conhecida como Daidzeína.

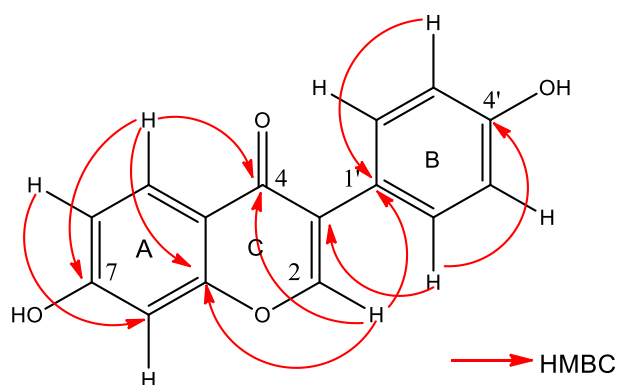
Figura 69 - Principais correlações observadas em HMBC da substância **8**.

Tabela 16 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz) da substância **8** (δ em ppm e J em Hz).

<i>Posição</i>	δ_H	δ_C
1	-	-
2	8,25 (<i>sl</i>)	157,7
3	-	123,0
4	-	175,6
4a	-	116,8
5	7,94 (<i>d</i> ; 8,6)	127,2
6	6,90 (<i>dd</i> ; 2,2, 8,6)	115,4
7	-	163,7
8	6,83(<i>d</i> ; 2,2)	102,0
8a	-	157,9
1'	-	123,7
2' e 6'	7,36 (<i>d</i> ; 8,6)	130,1
3' e 5'	7,80 (<i>d</i> ; 8,6)	114,9
4'	-	157,2

Figura 70 - Espectro de RMN de ^1H da substância **8** ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz).

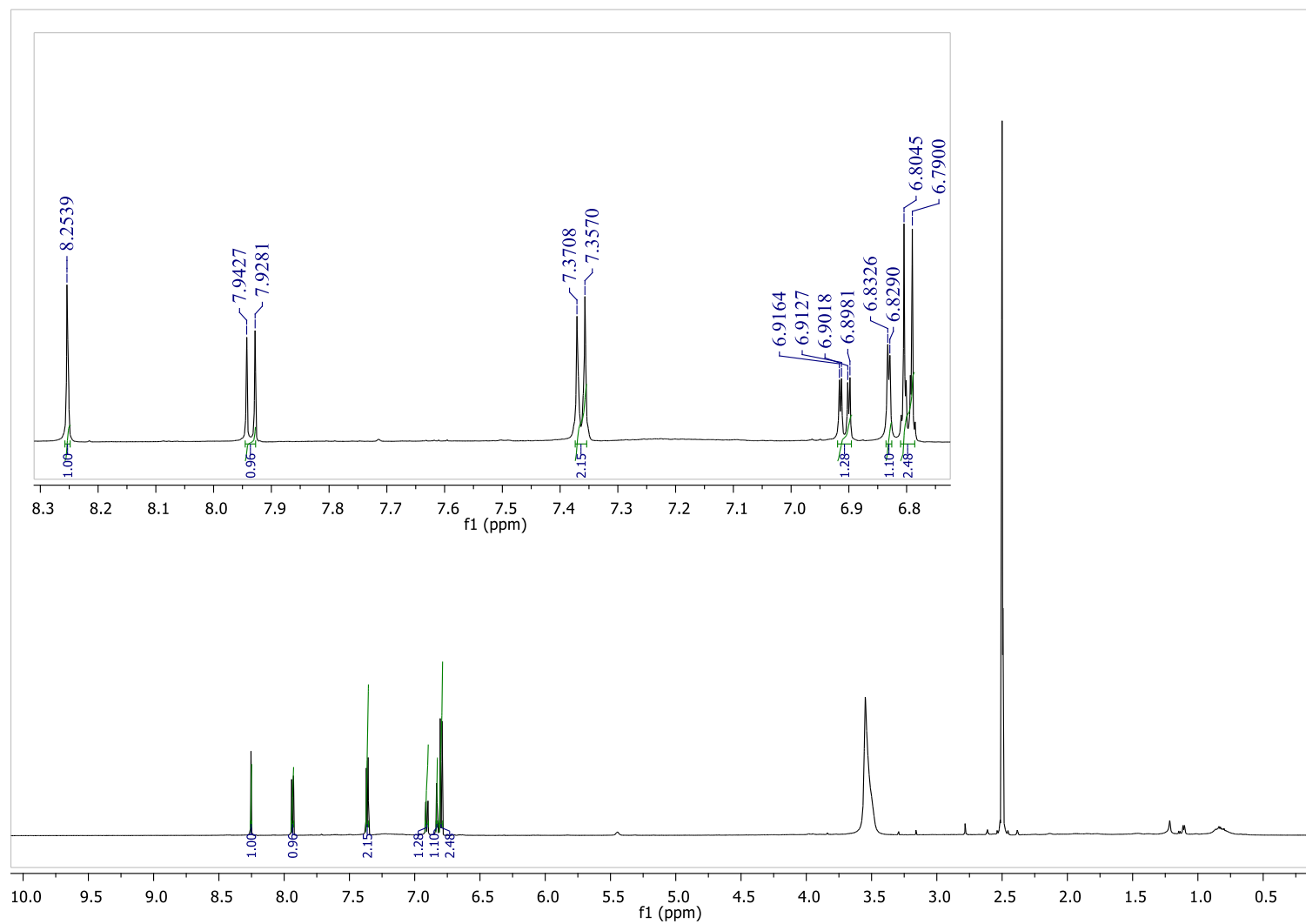


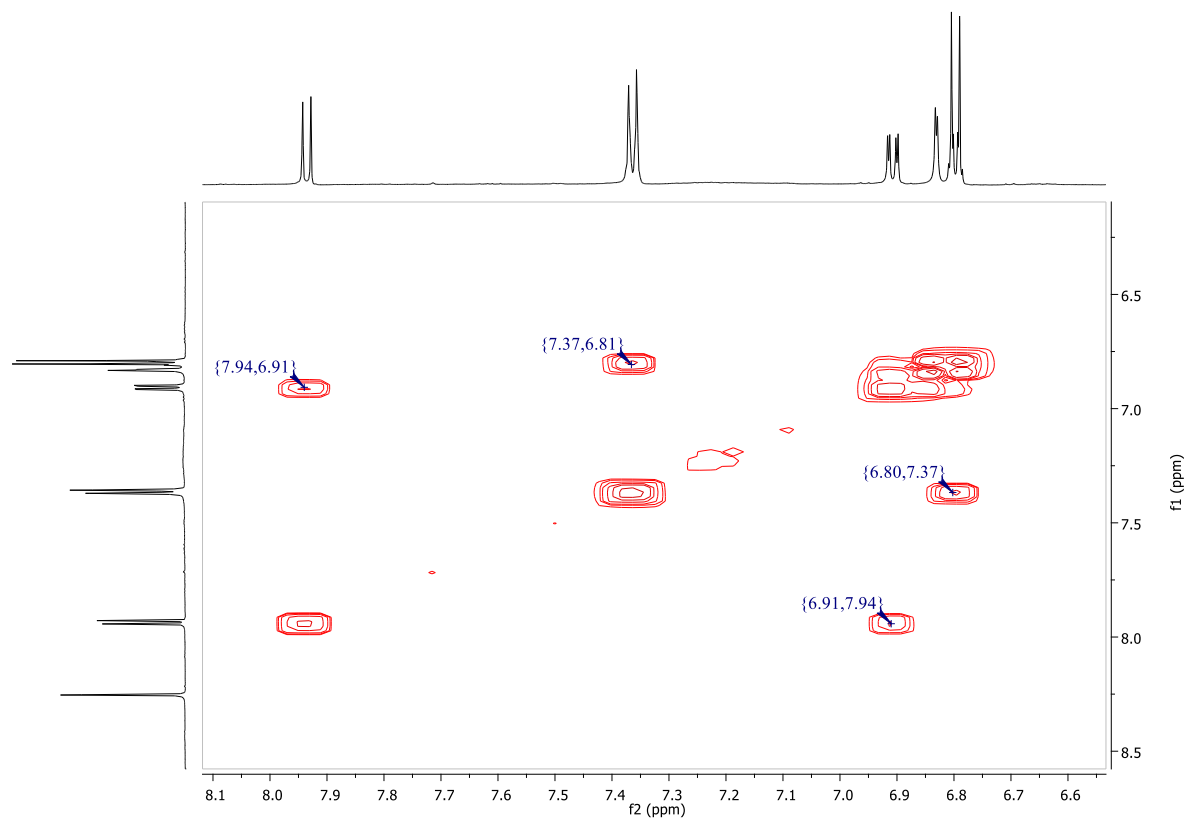
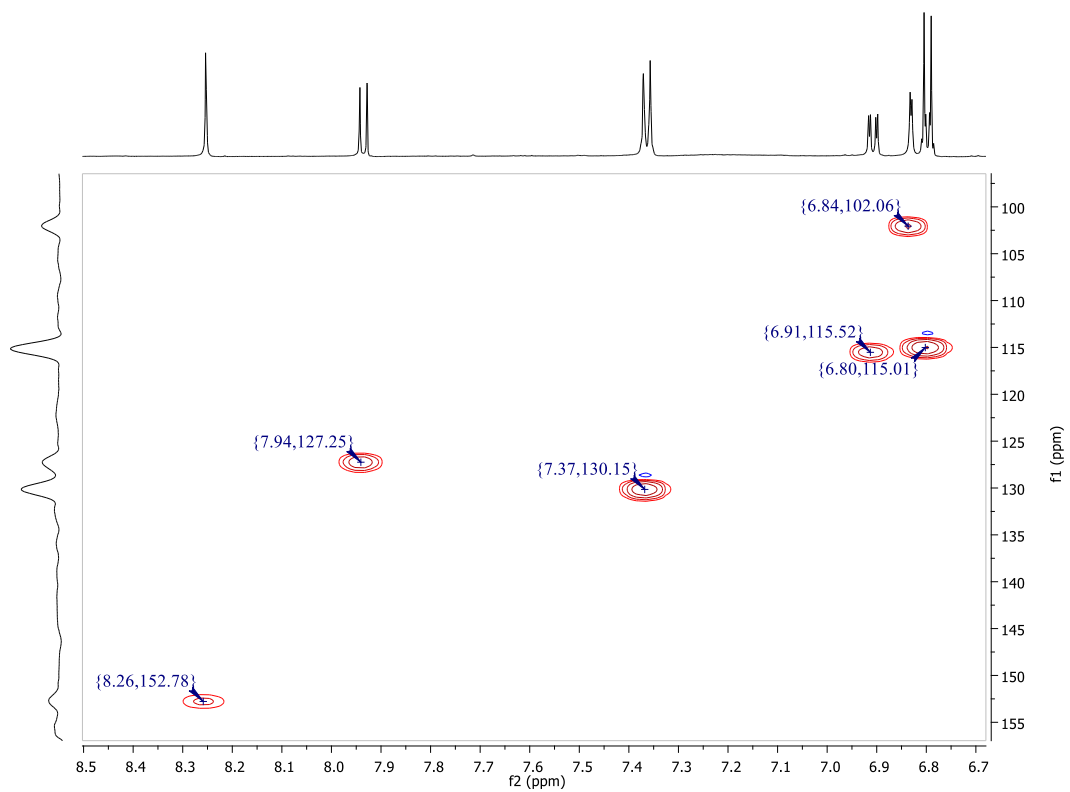
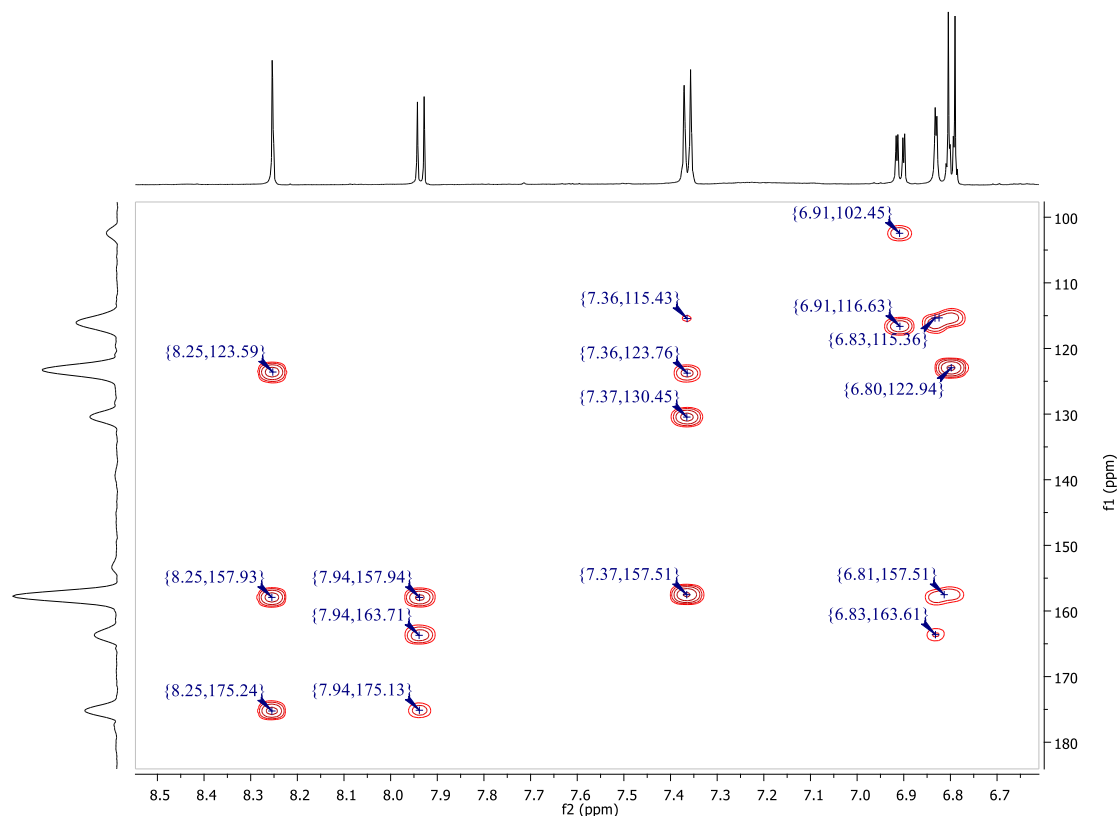
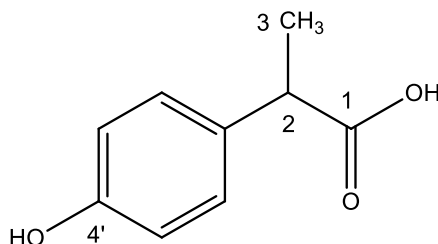
Figura 71 - Mapa de contorno COSY da substância **8** (DMSO- d_6 ; 600).**Figura 72** - Mapa de contorno HSQC da substância **8** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz).

Figura 73 - Mapa de contorno HMBC da substância **8** (DMSO- d_6 ; 600 e 150 MHz).

- Identificação da substância 9

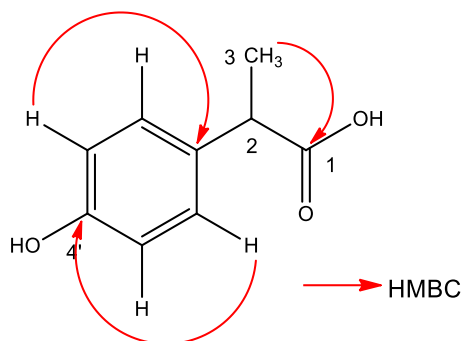


O espectro de massas obtido por ESI-Qq-TOF, modo positivo, evidenciou para **9** a molécula protonada em m/z 167,0283 $[\text{M}+\text{H}]^+$, que associado aos dados de RMN uni e bidimensionais permitiu propor fórmula molecular de $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 75) da substância **9** evidenciou dois dubletos em 7,34 (2H, $J= 8,6\text{Hz}$) e 6,79 (2H, $J= 8,6\text{Hz}$) que indicaram um anel aromático *para*-substituído. Também foi observado em dubleto em δ_{H} 1,08 (3H, d , $J= 6,7\text{ Hz}$) atribuído a uma metila e um hidrogênio benzílico metínico em ($\delta_{\text{H}} \sim 3,3$), (Tabela 17), encoberto pelos sinais da água residual do DMSO.

No experimento de HMBC (Figura 76) visualizou-se correlações entre H-3 e C-1, além das correlações entre H-2'/C-4' e H-3'/C-1 (Figura 74). Estes dados aliados às informações da literatura (XIU-LING, W. et al., 2004) permitiram identificar sendo possível identificar **9** como ácido 2-(4'-hidroxifenil) propiônico.

Figura 74 - Principais correlações observadas em HMBC da substância **9**.



O ácido 2-(4'-hidroxifenil) propiônico, conhecido como 2-HPPA, tem sido reportado por inúmeras publicações como produto de clivagem da classe isoflavonoides, principalmente a daidzeína, e, alguns micro-organismos, especificamente bactérias da microbiota intestinal humana, são capazes de realizar a clivagem da daidzeína. O recente interesse nos produtos de biotransformação dos isoflavonoides, é devido a estes apresentarem atividade estrogênica superior aos dos seus produtos de origem. (XIU-LING, W. et al., 2004; KIM, M.; HAN, J., 2014).

Tabela 17 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz) da substância **9** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_H	δ_C
1	-	177,7
2	*	*
3	1,08 (<i>d</i> , 6,7)	21,3
1'	-	122,5
2' e 6'	7,34 (<i>d</i> ; 8,6)	130,0
3' e 5'	6,79 (<i>d</i> ; 8,6)	114,9
4'	-	157,7

*Sinal sob água residual do DMSO.

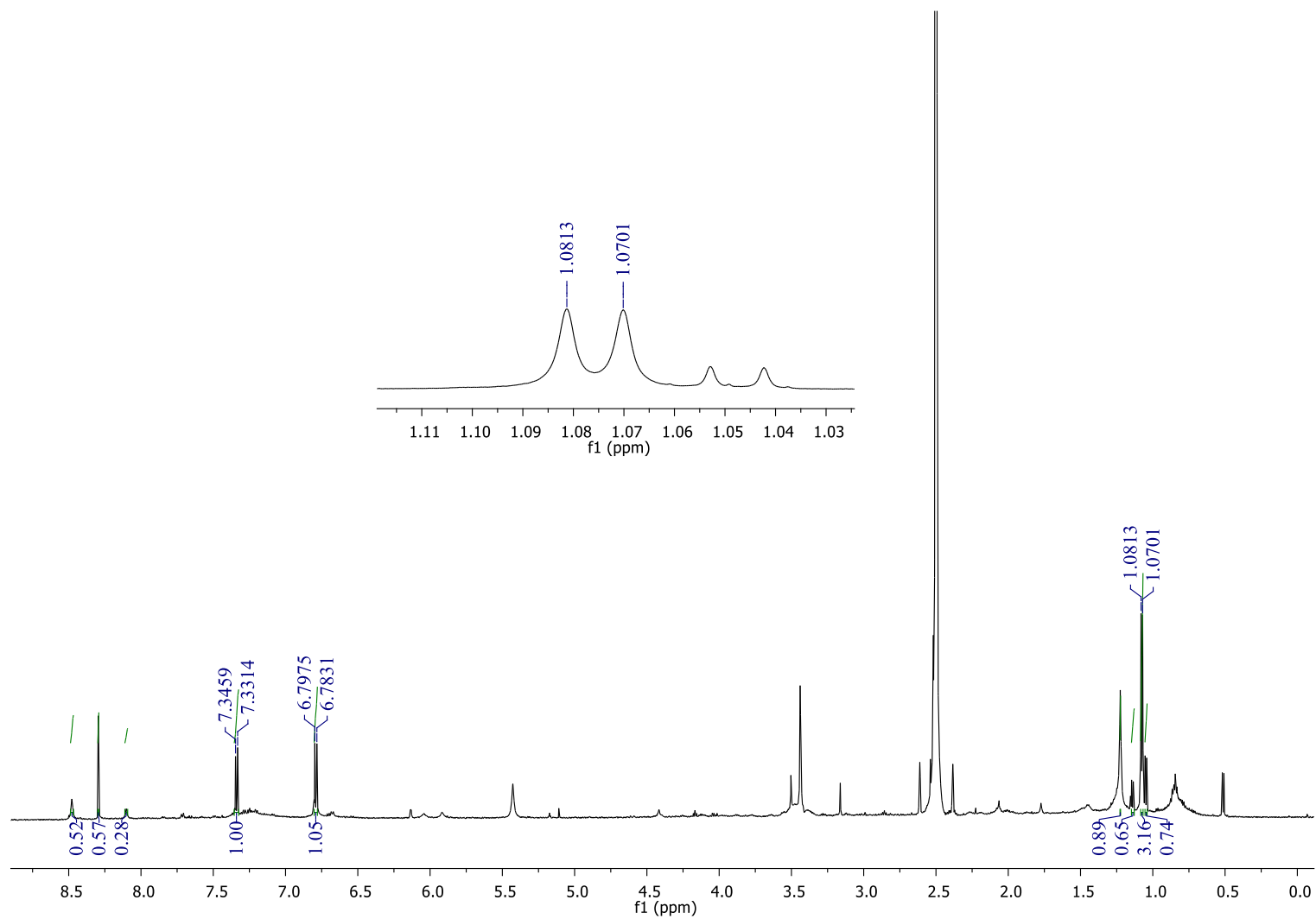
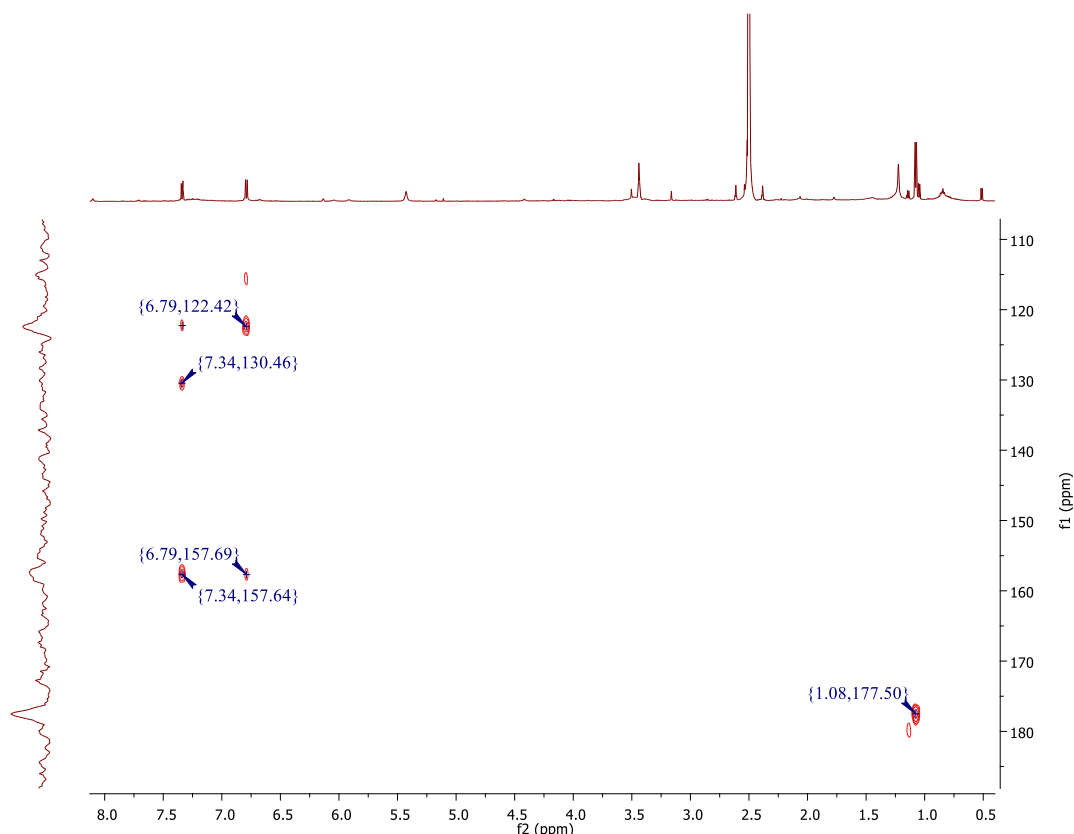
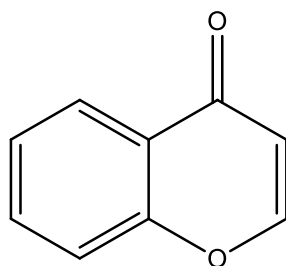
Figura 75 - Espectro de RMN de ^1H da substância **9** ($\text{DMSO}-d_6$; 600 MHz).

Figura 76 - Mapa de contorno HMBC da substância **9** (DMSO-*d*₆; 600 e 150 MHz).

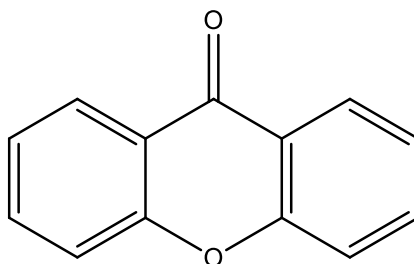
5.2.3 Cromonas e xantonas

Durante as últimas décadas um grande número de cromonas e xantonas foram isoladas de plantas superiores, bem como de fungos e líquens. Estas classes de metabólitos exibem propriedades farmacológicas muito bem documentadas, atribuídas principalmente a seus heterocíclis oxigenados e à diversidade dos isósteros e grupos farmacofóricos que podem ser formados a partir de cromonas e xantonas naturais (SILVA, et al., 2016; KERI, et al., 2014; EL-SEEDI, et al., 2009).

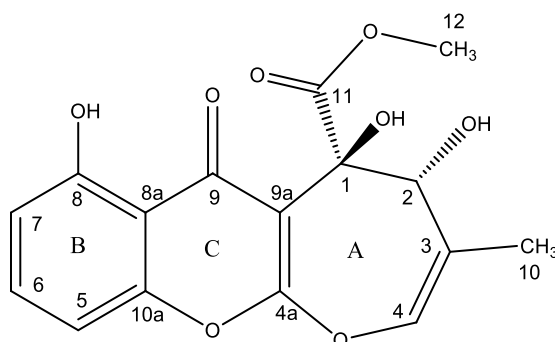
As cromonas, ou 4H-1-benzopiron-4-ona ou 4H-croman-4-ona (Figura 77) são compostos heterocíclicos oxigenados, formados por um anel benzênico (A) e uma γ -pirona (C). Com base na formação desse núcleo são originadas outras classes de metabólitos, tais como flavonoides, flavonas e isoflavonas (SILVA, et al., 2016).

Figura 77- Estrutura básica de uma cromona.

As xantonas, também conhecidas como 9H-xanten-9-ona, são estruturalmente formada por dois anéis benzênicos (A e B) e uma γ -pirona central (C), conferindo um arranjo simétrico a este tipo de composto (Figura 78). Todas as posições de 1-4 e de 5-8 podem estar substituídas, resultando em uma variedade de derivados xantônicos que podem ser obtidos por meios naturais ou por rotas sintéticas (EL-SEEDI, et al., 2009).

Figura 78 - Estrutura básica de uma xantona.

- Identificação estrutural da substância 17.



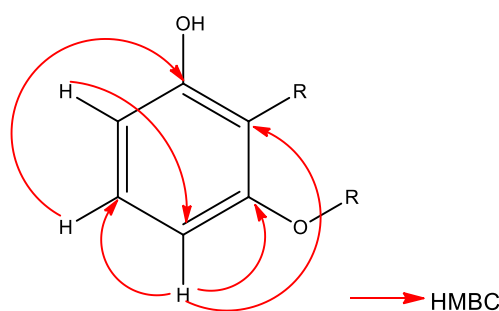
A análise dos dados de espectrometria de massas, ESI-Qq-TOF (Figura 87), modo positivo, apresentou para a substância 17 a molécula protonada m/z 335,0763 $[M+H]^+$ e a formação da molécula cationizada m/z 357,0583 $[M+Na]^+$, o que associado aos experimentos RMN uni e bidimensionais permitiram propor a fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_8$.

Na análise conjunta dos dados de RMN de 1H e ^{13}C (Figura 83 e Figura 84), foram visualizados dois duplos dubletos em δ_H 6,89 (1H, *dd*, $J= 0,7$ e $8,5$ Hz; δ_C 107,6), 6,75 (1H, *dd*, $J= 0,7$ e $8,0$ Hz; δ_C 112,6), e um triplete em 7,56 (1H, *t*, $8,5$ Hz; δ_C 136,8), evidenciando

um anel aromático trissubstituído (Tabela 18). A posição dos substituintes no anel aromático foi realizada com base nos valores dos deslocamentos químicos, multiplicidade e pelas correlações à longa distância, observadas em HMBC (Figura 79).

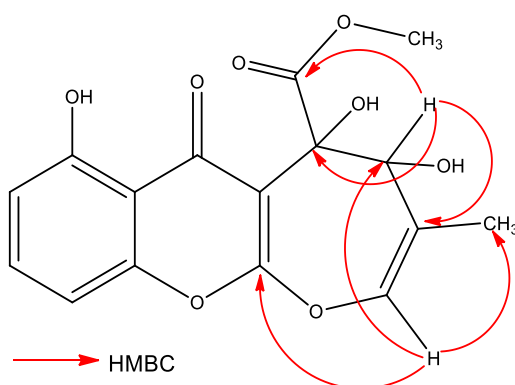
Adicionalmente no espectro de RMN de ^{13}C , foram observados nove carbonos sp^2 , dos quais três são oxigenados (δ_{C} 154,5; δ_{C} 161,4 e δ_{C} 164,9), dois são de carbonilas, sendo: uma δ_{C} 174,2 atribuída a um éster metílico, confirmado por HMBC e outra em δ_{C} 186,2. Além de dois carbonos sp^3 , ambos oxigenados (δ_{C} 77,8; δ_{C} 74,1).

Figura 79 - Principais correlações observadas em HMBC para o anel A da substância **17**.



Com base no espectro de RMN de ^1H foram observados, ainda, um singlete em δ_{H} 3,75 (3H, s, δ_{C} 53,3), atribuído a um grupo metoxila, um grupo metílico em δ_{H} 1,75 (3H, d, $J=1,2$ Hz; δ_{C} 14,7), e um hidrogênio olefínico em δ_{H} 6,65 (1H, m; δ_{C} 139,2). Estes dados aliados às informações obtidas pelas correlações observadas em experimento de HMBC (Figura 80) e a literatura (KROHN, et al., 2009) permitiram identificar a substância **17** como a 1-éster metil-1,2,8-dihidroxi-3-metil-9-oxocromona.

Figura 80 - Principais correlações observadas em HMBC para o anel B da substância **17**.



A configuração absoluta da substância **17** foi determinada por difração de raios-X de monocristal, e a substância foi caracterizada como (1*R*, 2*R*) 1-éster metil-1,2,8-dihidroxi-3-metil-9-oxocromona (Figura 81), apresentando duas estruturas polimórficas (Figura 82).

Figura 81 - Estrutura tridimensional da substância **17** obtida por meio de difração de Raios-X de monocristal.

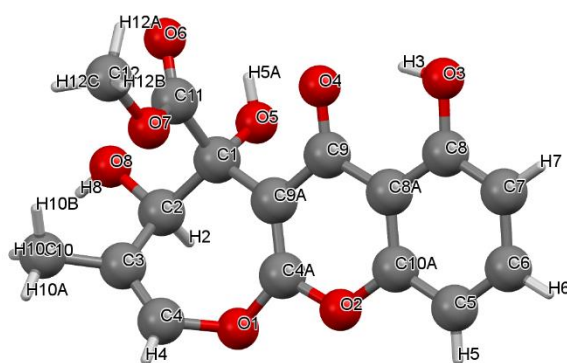


Figura 82 - Estruturas polimórficas da substância **17**.

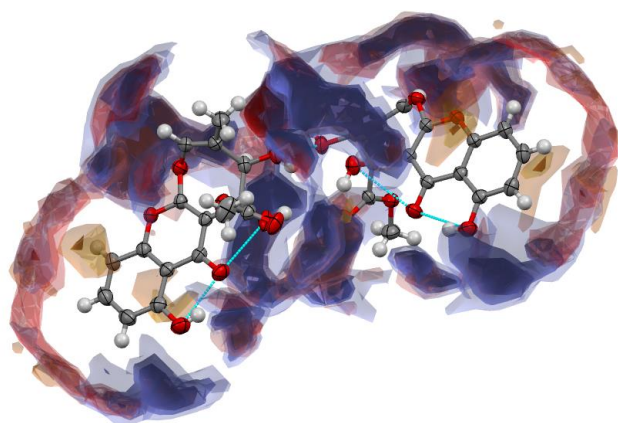


Tabela 18 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 e 150 MHz) de **17** (δ em ppm e J em Hz).

<i>Posição</i>	δ_{H}	δ_{C}
1	-	77,8
2	4,67 (<i>sl</i>)	74,1
3	-	131,1
4	6,65 (<i>m</i>)	139,2
4a	-	164,9
5	6,89 (<i>dd</i> ; 0,7; 8,5)	107,6
6	7,56 (<i>t</i> ; 8,5)	136,8
7	6,75 (<i>dd</i> ; 0,7; 8,5)	112,6
8	-	161,4
8a	-	109,5
9	-	186,2
9a	-	105,1
10	1,75 (<i>d</i> ; 1,2)	14,7
10a	-	154,5
11	-	174,2
12	3,75	53,3

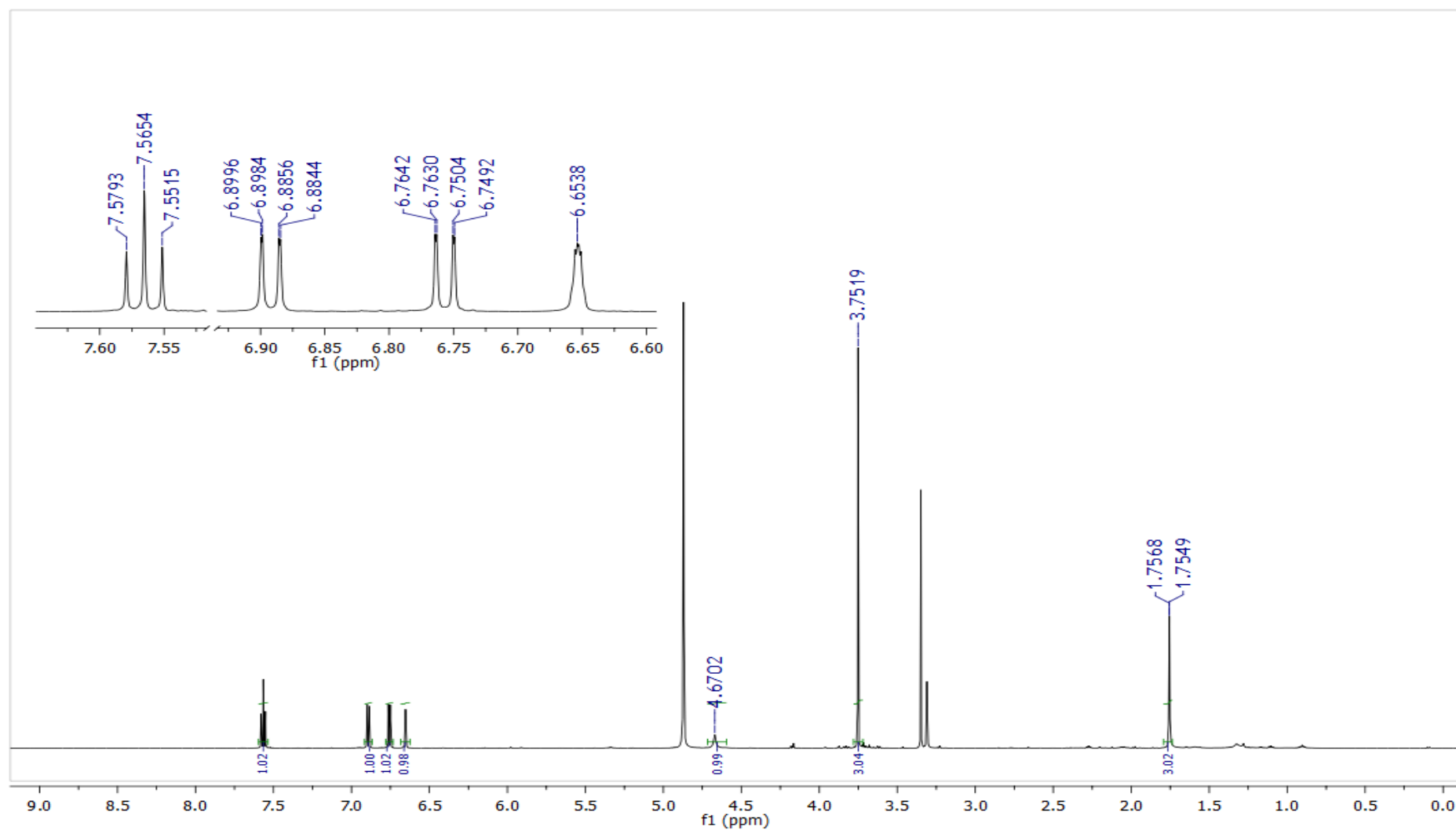
Figura 83 - Espectro de RMN de ^1H da substância **17** (CD_3OD ; 600 MHz).

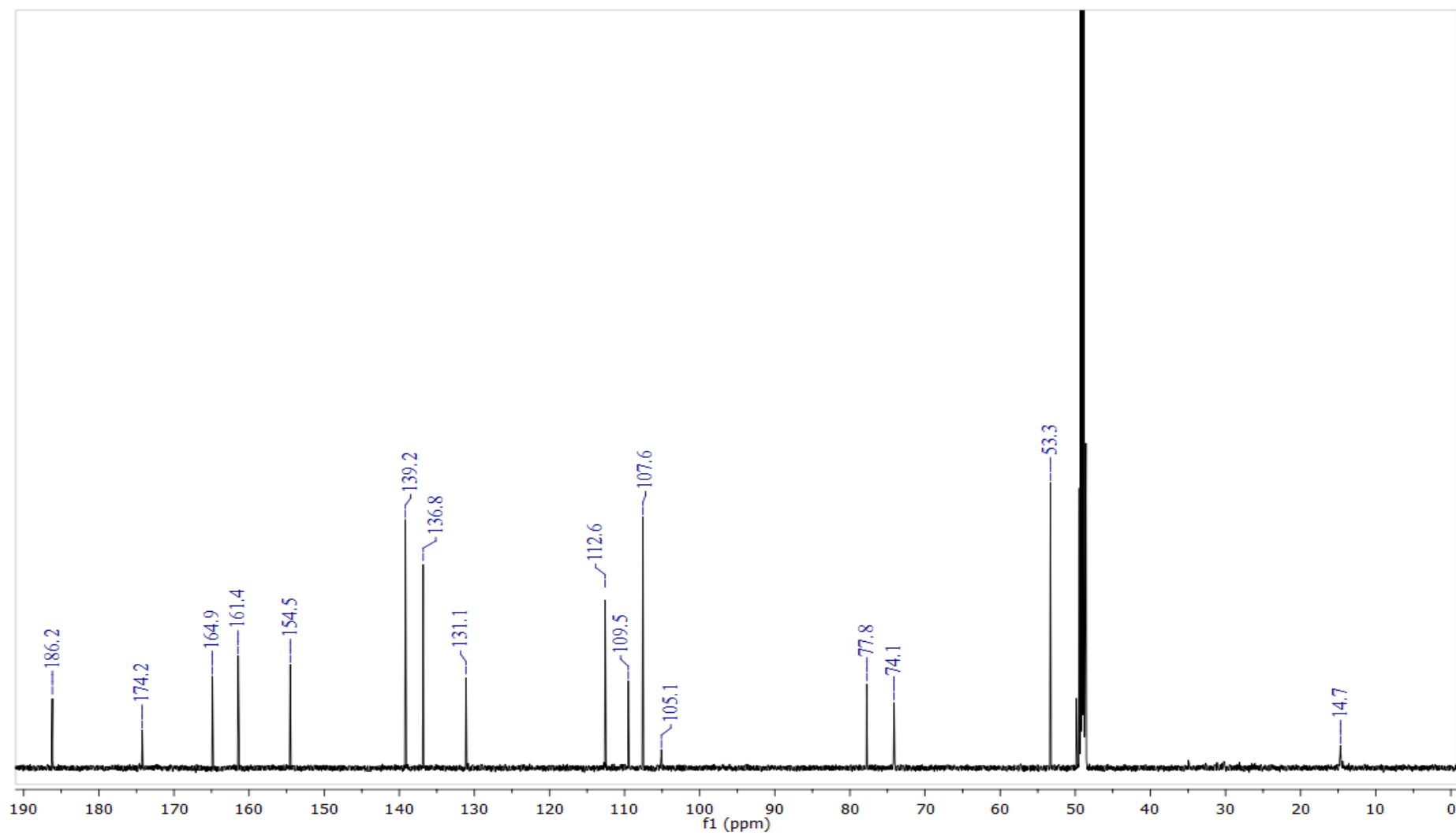
Figura 84 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **17** (CD_3OD ; 150 MHz).

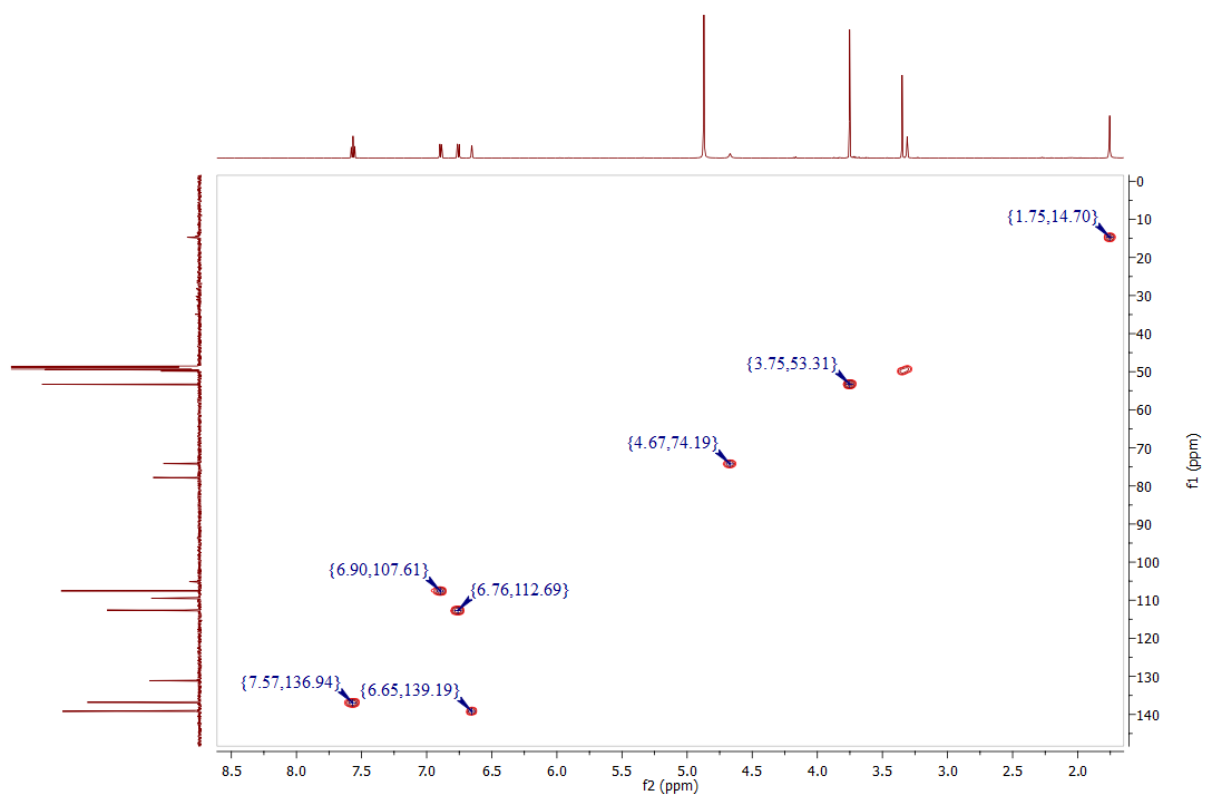
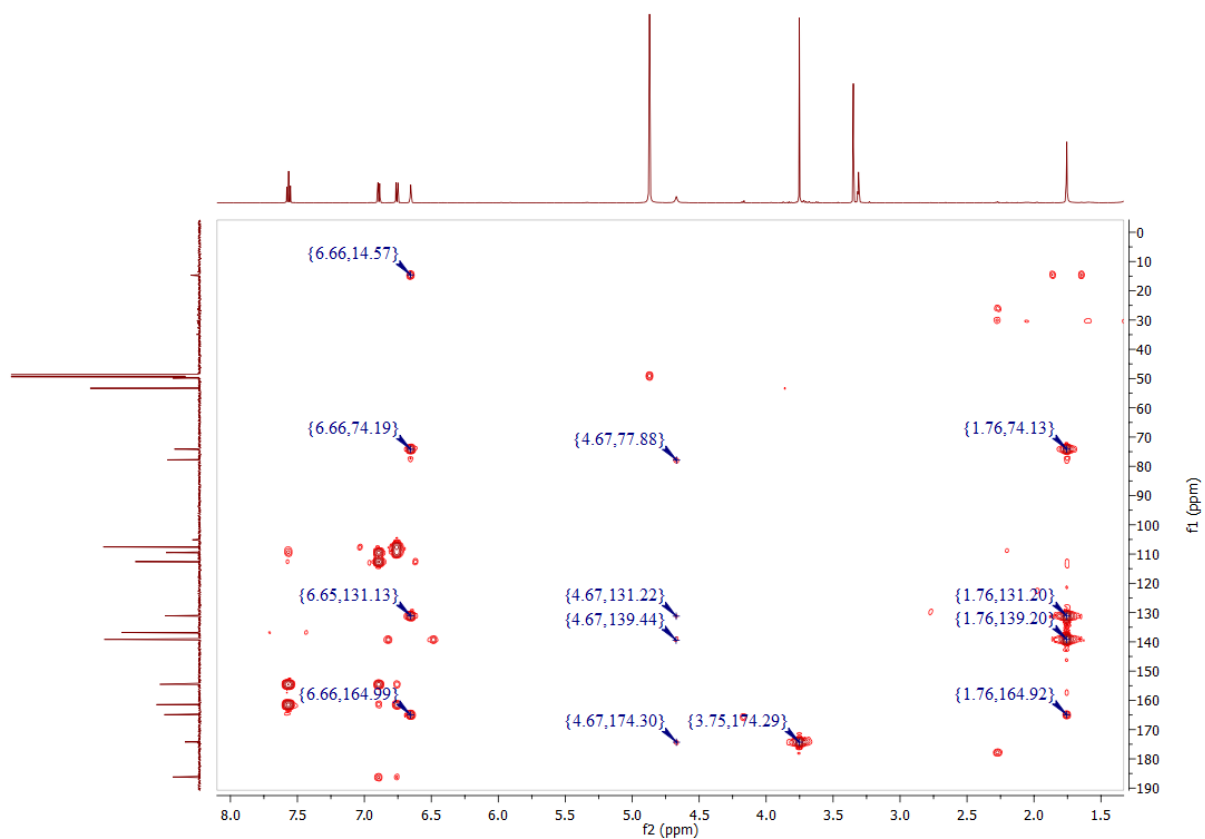
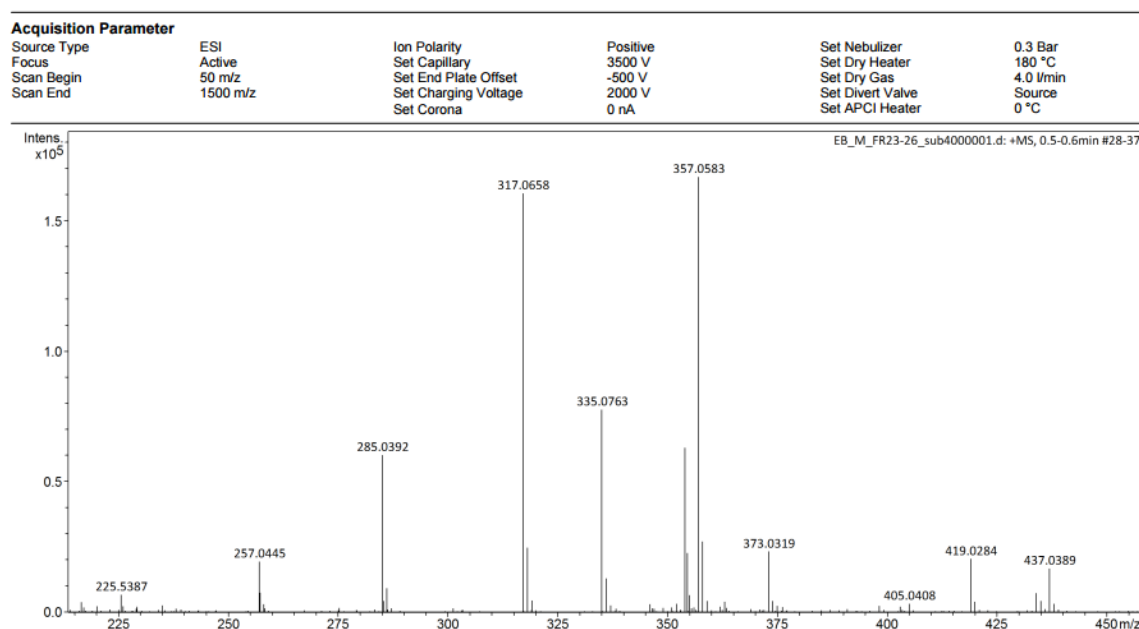
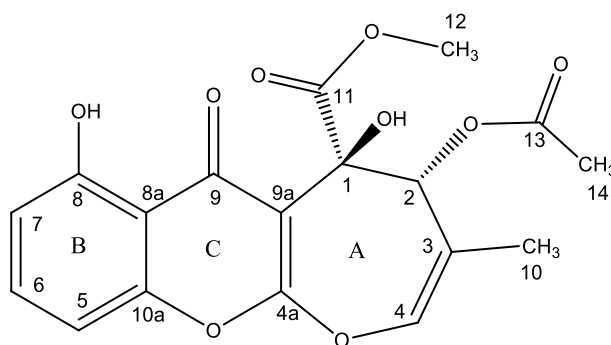
Figura 85 - Mapa de contorno HSQC da substância **17** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).**Figura 86** - Mapa de contorno HMBC da substância **17** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).

Figura 87 - Espectro de Massas de alta resolução da substância **17** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).



• Identificação da substância 20.



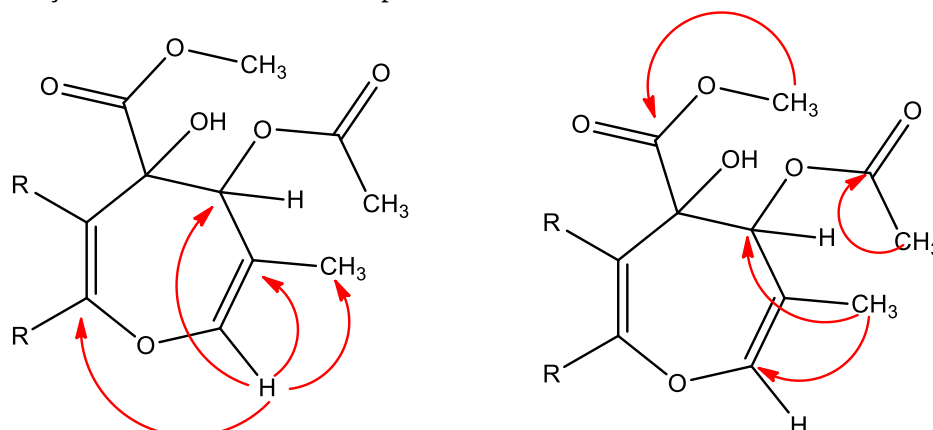
A análise dos dados de espectrometria de massas, ESI-Qq-TOF (Figura 93), modo positivo, apresentou para a substância **20** a molécula protonada m/z 377,0867 $[M+H]^+$ e a formação da molécula cationizada m/z 399,0685 $[M+Na]^+$, o que associado aos experimentos RMN uni e bidimensionais permitiram propor a fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_9$.

Na análise conjunta dos dados de RMN de 1H (Figura 90), HSQC (Figura 91) e HMBC (Figura 92) da substância **20** permitiu observar uma grande semelhança dos deslocamentos químicos e das multiplicidades dos sinais quando comparado com a substância **17**.

A presença de um singlete em δ_H 2,05 (3H, δ_C 20,2) atribuído a uma metila de um grupo acetóxi, aliada as correlações observadas em HMBC (Figura 88), nos permitiram

propor uma acetilação na hidroxila do C2 da substância **17**. Esses dados nos permitiram atribuir para a substância **20** como a cromona inédita e nomeada 1-éstermetil-1,8-diidroxi-2-acetóxi-3-metil-9-oxocromona.

Figura 88 - Correlações observadas em HMBC para o anel A da substância **20**.



Para determinar a configuração dos centros quirais C1 e C2 foram realizados experimentos de dicroísmo circular. O espectro de dicroísmo circular da substância **20** (Figura 89) apresentou efeito Cotton positivo em 236 ($\Delta\epsilon$ 1,00) e efeito Cotton negativo em 203 nm ($\Delta\epsilon$ -5,47). Os dados descritos foram comparados com os da substância **17**, efeito Cotton positivo em 238 ($\Delta\epsilon$ 9,66) e efeito Cotton negativo em 210 nm ($\Delta\epsilon$ -6,24) (Figura 89), indicaram a configuração *R* para C-1 e C-2. Sendo assim, a substância **20** nomeada como: (1*R*-2*R*)-1-éstermetil-1,8-diidroxi-2-acetóxi-3-metil-9-oxocromona

Figura 89 - Espectro de dicroísmo circular da substância **20** e da substância **17** (200-400).

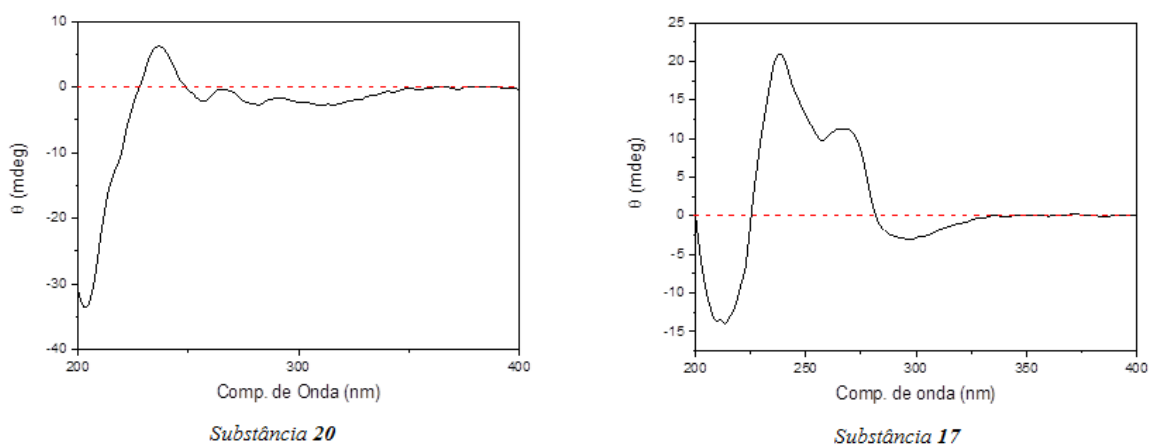


Tabela 19 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 e 150 MHz) de **20** (δ em ppm e J em Hz).

<i>Posição</i>	δ_{H}	δ_{C}
1	-	*
2	4,62 (<i>sl</i>)	74,5
3	-	127,3
4	6,73 (<i>m</i>)	140,6
4a	-	164,3
5	6,95 (<i>dd</i> ; 0,6; 8,4)	107,4
6	7,62 (<i>t</i> ; 8,4)	136,9
7	6,80 (<i>dd</i> ; 0,6; 8,4)	112,6
8	-	161,1
8a	-	109,2
9	-	*
9a	-	*
10	1,83 (<i>sl</i>)	16,4
10a	-	154,4
11	-	173,4
12	3,72	53,3
13	2,05	20,2

*Sinal não observado.

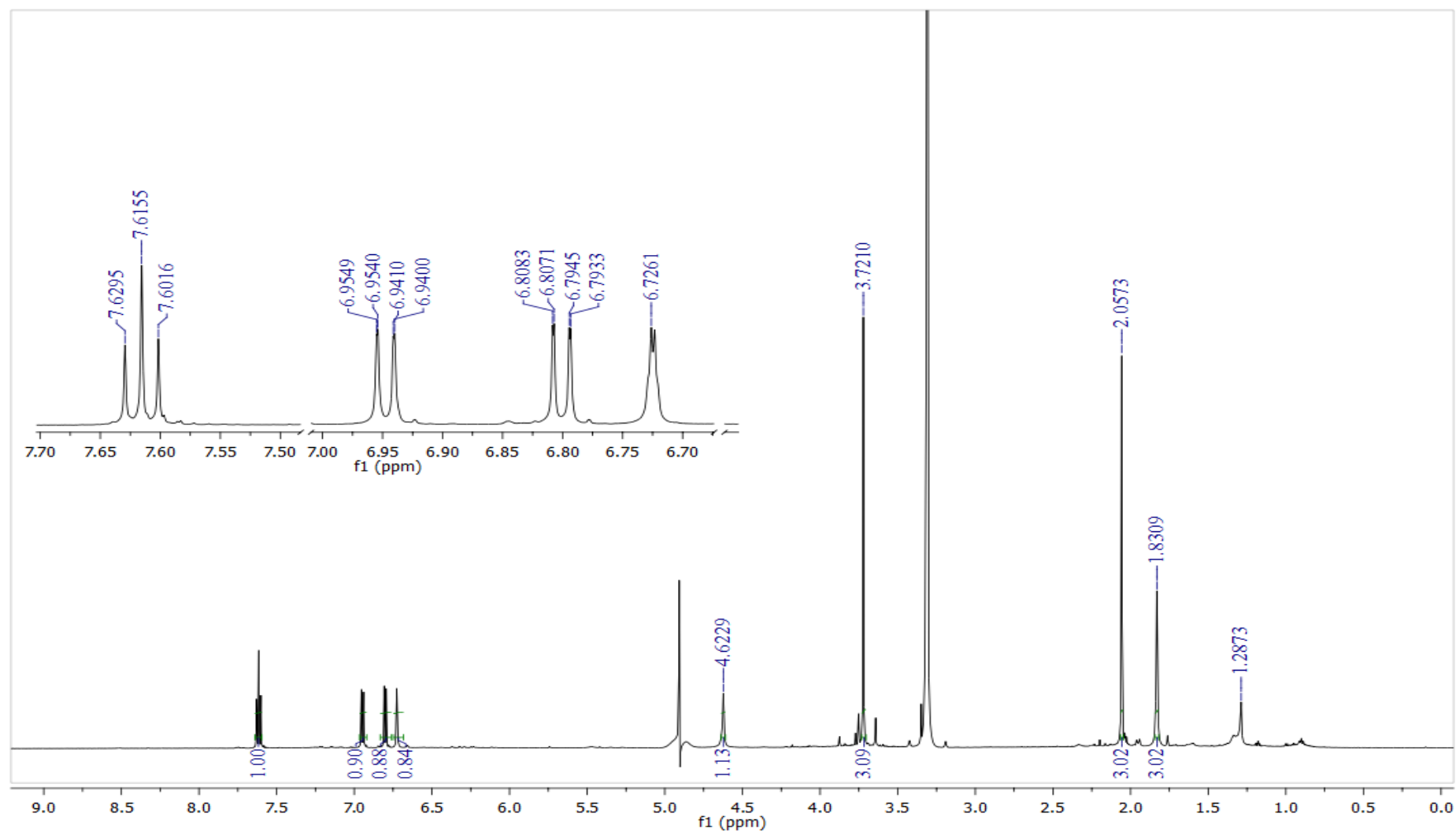
Figura 90 - Espectro de RMN de ^1H da substância **20** (CD_3OD ; 600 MHz).

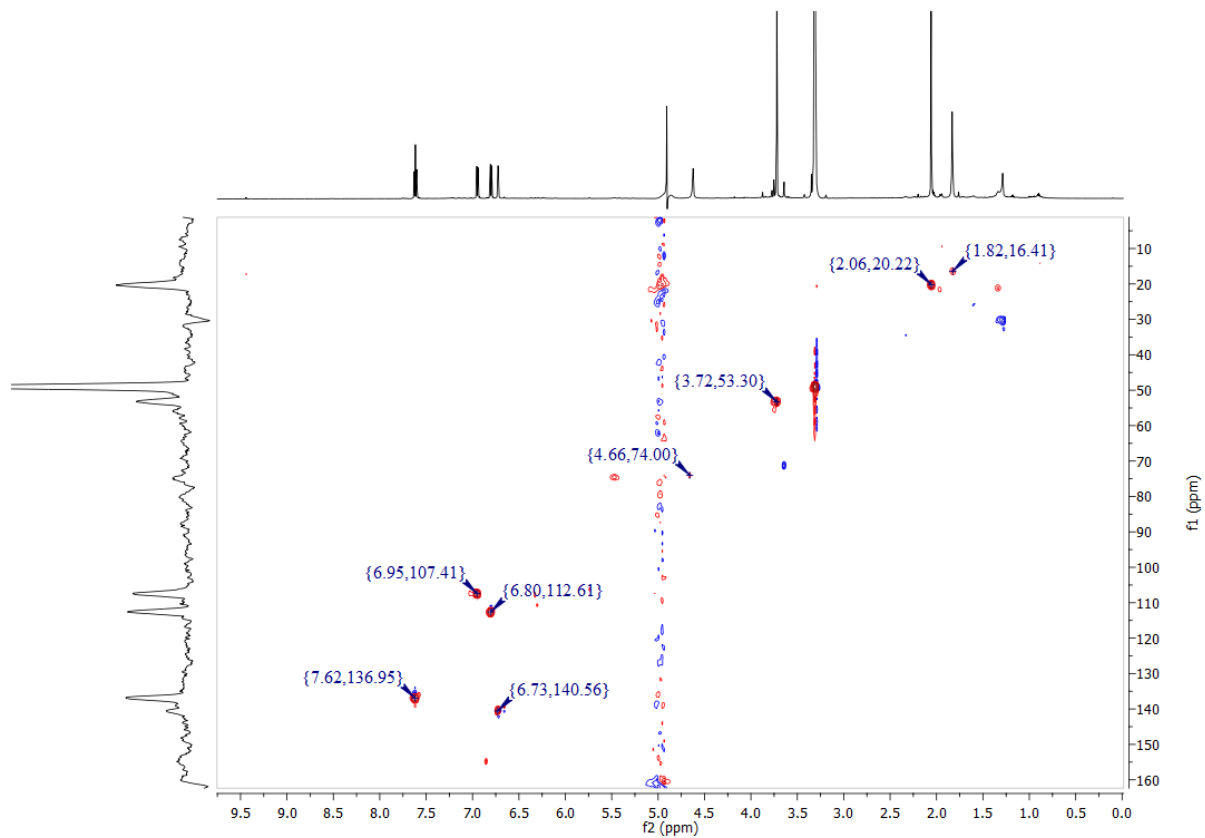
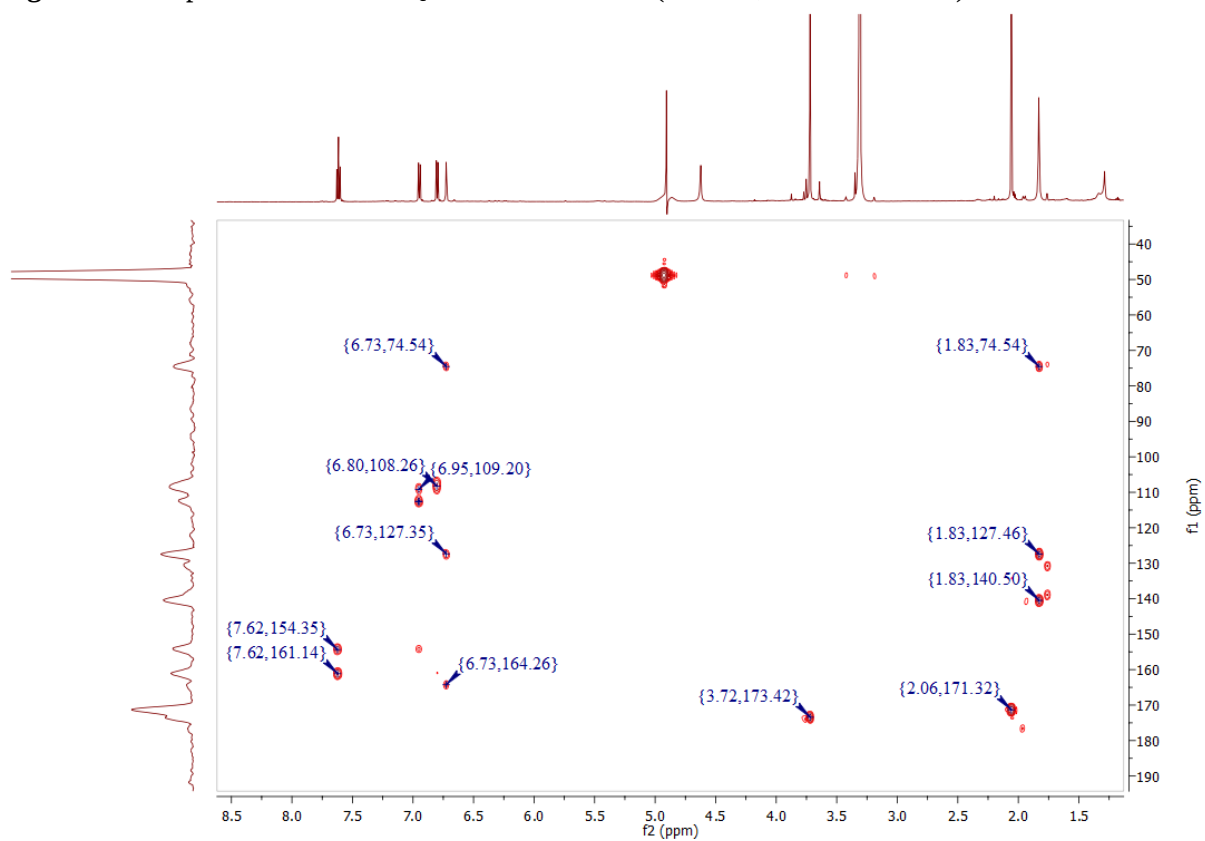
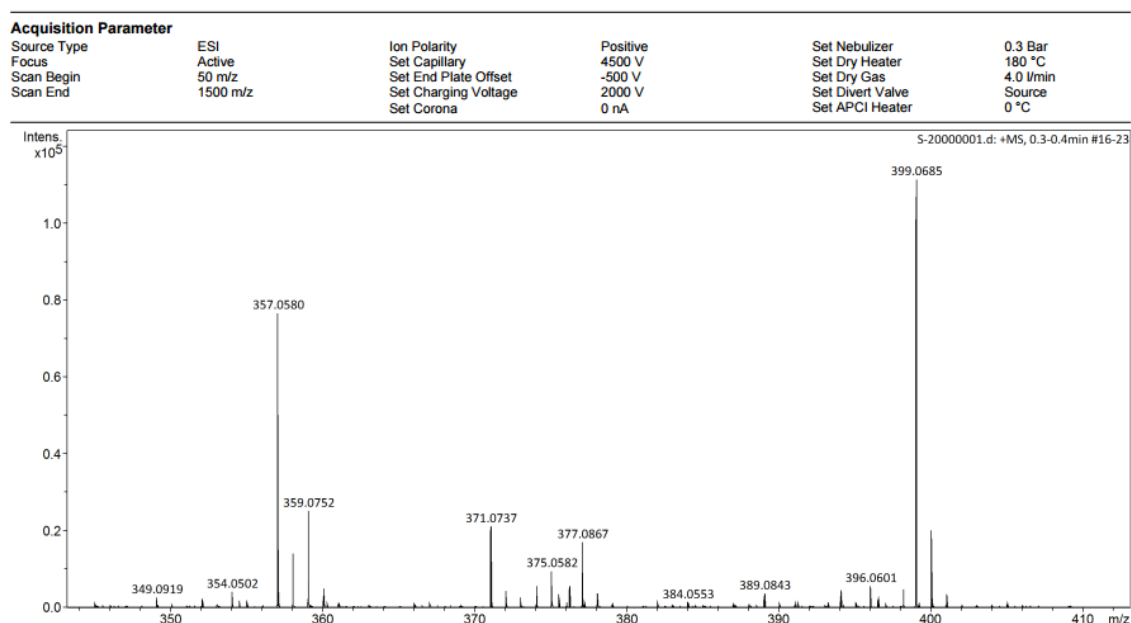
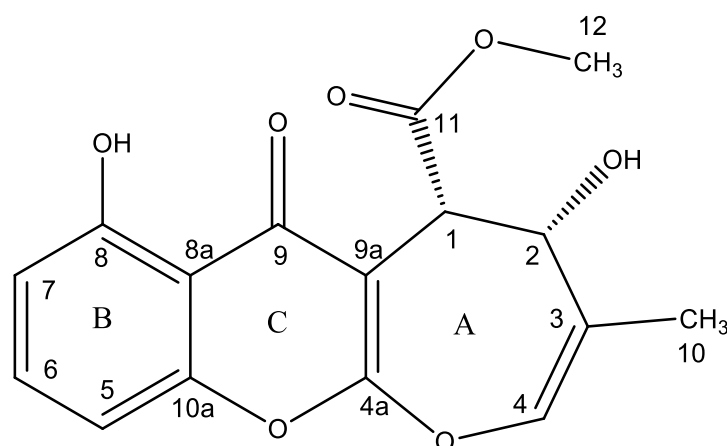
Figura 91 - Mapa de contorno HSQC da substância **20** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).**Figura 92** - Mapa de contorno HSQC da substância **20** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).

Figura 93 - Espectro de Massas de alta resolução da substância **20** (Bruker - MaXis Impact - ESI-Q-TOF).



- Identificação da substância 12



A análise dos dados de espectrometria de massas, ESI-Qq-TOF (Figura 100), modo positivo, apresentou para a substância **12** a molécula protonada m/z 319,0812 $[M+H]^+$ e a formação da molécula cationizada m/z 341,0633 $[M+Na]^+$, o que associado aos experimentos RMN uni e bidimensionais permitiram propor a fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_6$.

A presença de um dubleto em δ_H 4,44 (1H, $J = 3,6$ Hz, δ_C 47,5) reafirma a redução de C-1, o qual passou de A substância **12** apresentou perfil espectroscópico (Figura 95, Figura 96, Figura 97, Figura 98 e Figura 99) semelhante ao da substância **17**, sendo que as diferenças observadas foram a ausência do carbono carbinolico em δ_C 74,1 e o aparecimento de uma carbono em δ_C 47,5 indicando a redução de C-1. carbono quaternário para um carbono

metínico. Esta suposição foi confirmada pela interação observada em COSY entre H-1 $\leftrightarrow$ H-2 e pela correlação em HMBC de H-1 $\leftrightarrow$ C-2/C-3/C-4a/C-9/C-9a/C-11 (Figura 97).

A análise conjunta dos dados espectroscópicos aliados aos dados da literatura (KROHN, et. al., 2009), permitiram atribuir a substância **12** como a 1-éster metil-2,8-dihidroxi-3-metil-9-oxocromona.

A determinação da configuração absoluta de **12** foi realizada com base em considerações biossintéticas e na substância **17**. De acordo com KROHN, et. al., 2009, a desidratação de **17** levando a **12** ocorre lentamente mesmo sob condições severas de desidratação (alta temperatura e com catalise ácida ou básica). Esta observação indica que H-2 não se encontra em uma relação 1,2 *trans* diaxial com OH em C-2, dificultando a reação. Caso H-2 se encontrasse em uma relação 1,2-*trans* diaxial OH em C-2 a eliminação ocorreria facilmente sob catalise ácida ou básica e com aquecimento. Deste modo a configuração absoluta de **12** foi definida como 1S, 2S.

Figura 94 - Principais correlações observadas em HMBC e COSY para a substância **12**.

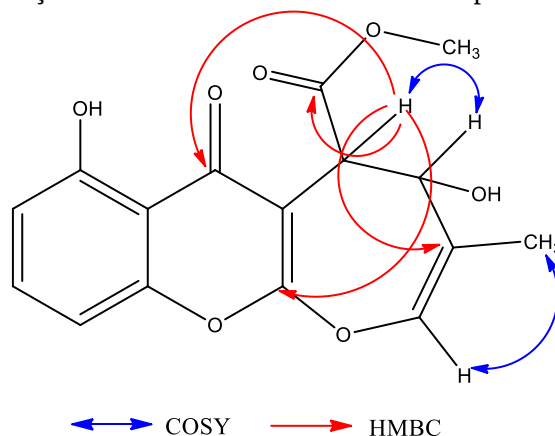


Tabela 20 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 e 150 MHz) de **12** (δ em ppm e J em Hz).

<i>Posição</i>	δ_{H}	δ_{C}
1	4,44(<i>d</i> ; 3,6)	47,5
2	4,85**	68,9
3	-	128,4
4	6,43(<i>q</i> ; 3,7)	134,3
4a	-	164,8
5	6,90 (<i>dd</i> ; 0,6; 8,7)	107,6
6	7,57 (<i>t</i> ; 8,7)	136,6
7	6,77 (<i>dd</i> ; 0,6; 8,7)	112,5
8	-	161,5
8a	-	109,0
9	-	184,8
9a	-	99,6
10	1,73 (<i>t</i> ; 1,3)	14,9
10a	-	154,9
11	-	173,1
12	3,69 (<i>s</i>)	52,8

**Sinal sobreposto pela água residual do CD_3OD .

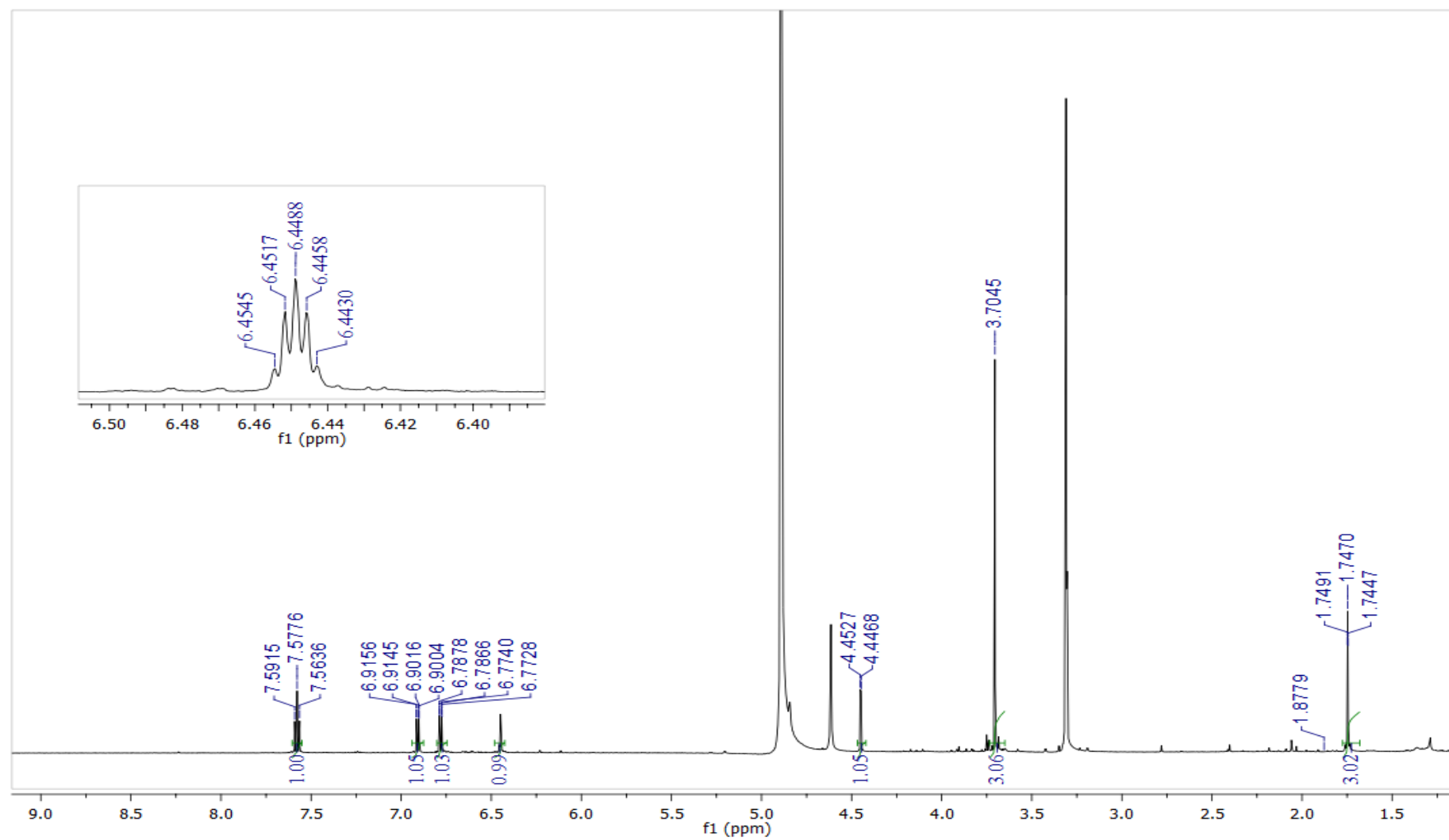
Figura 95 - Espectro de RMN de ^1H da substância **12** (CD_3OD ; 600 MHz).

Figura 96 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **12** (CD_3OD ; 150 MHz).

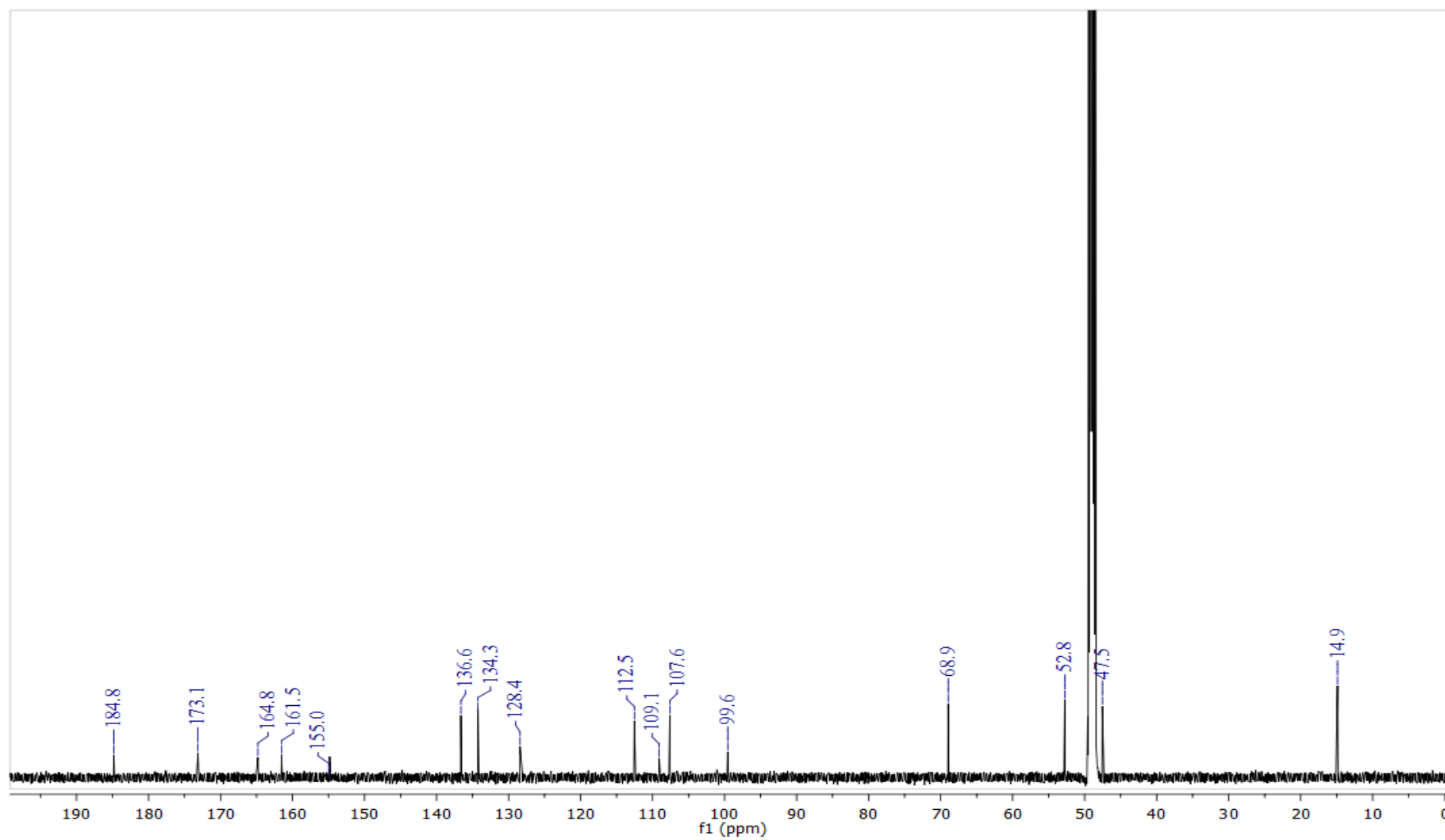


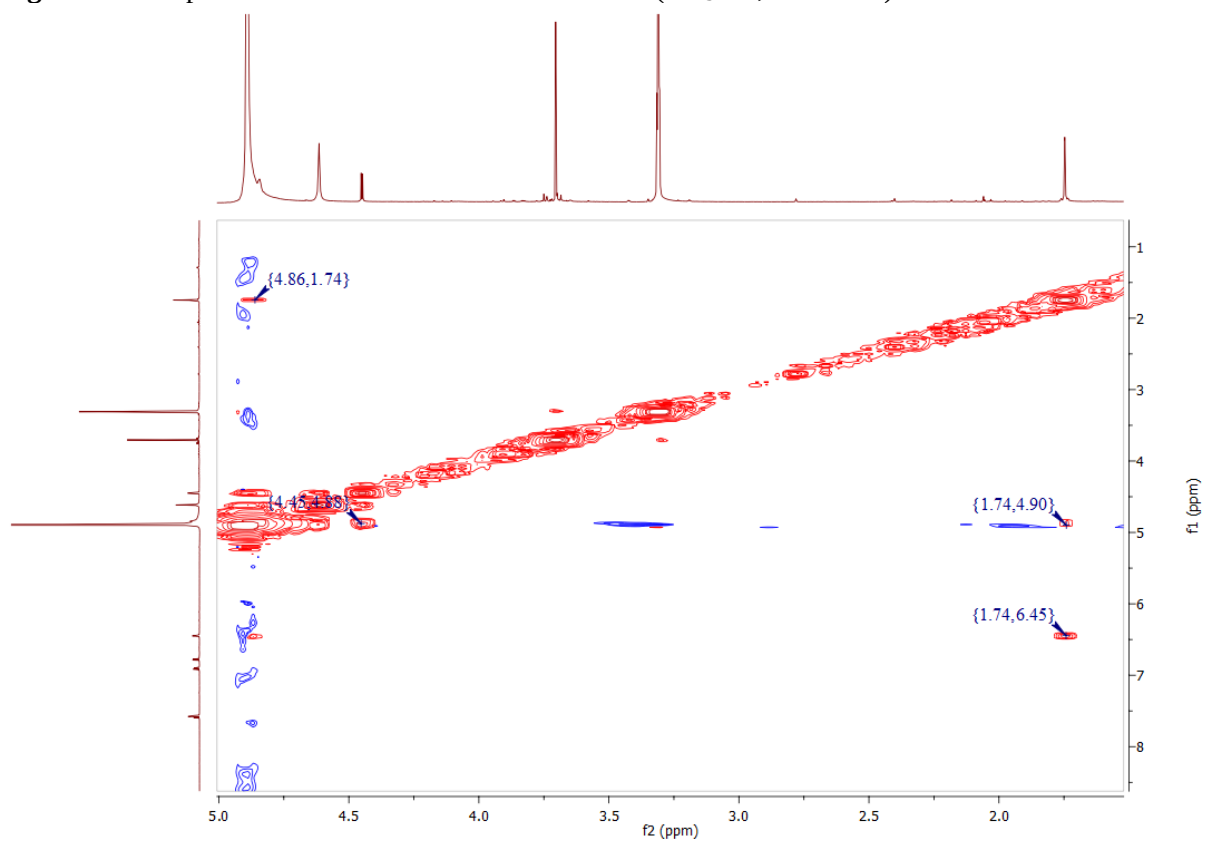
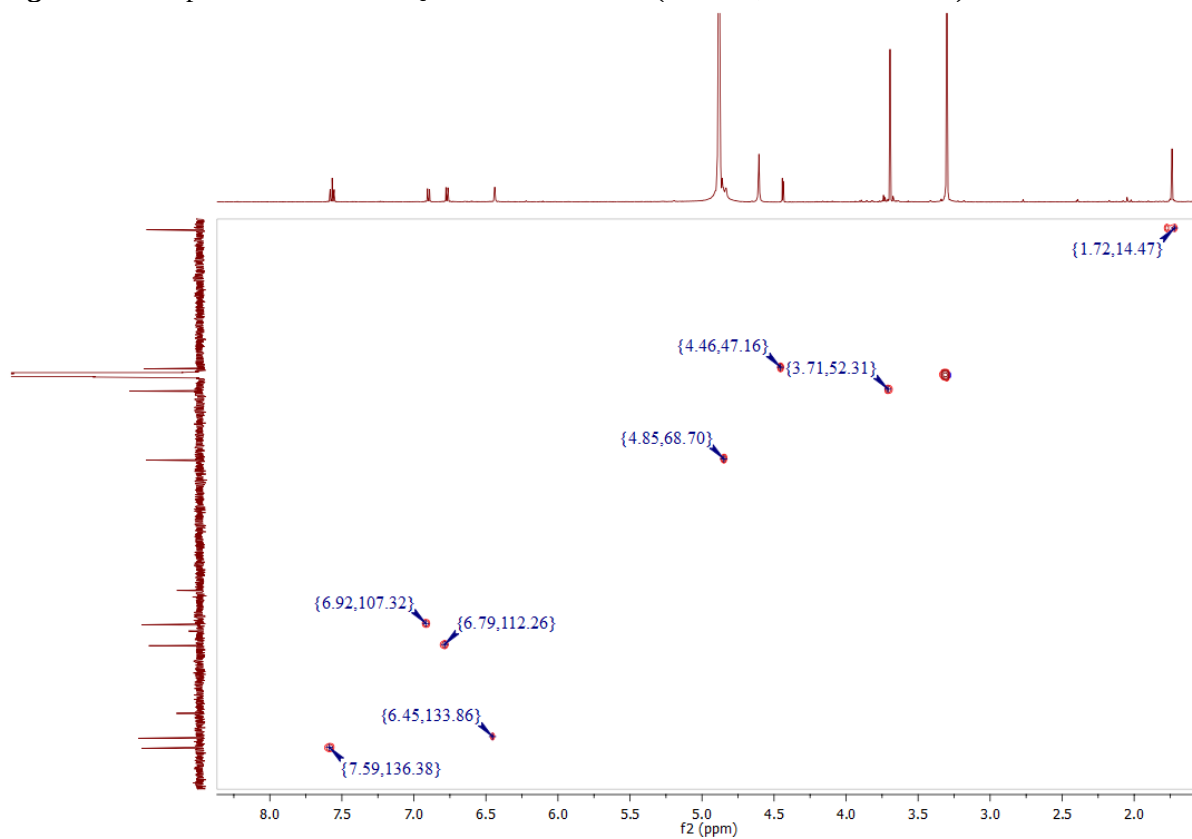
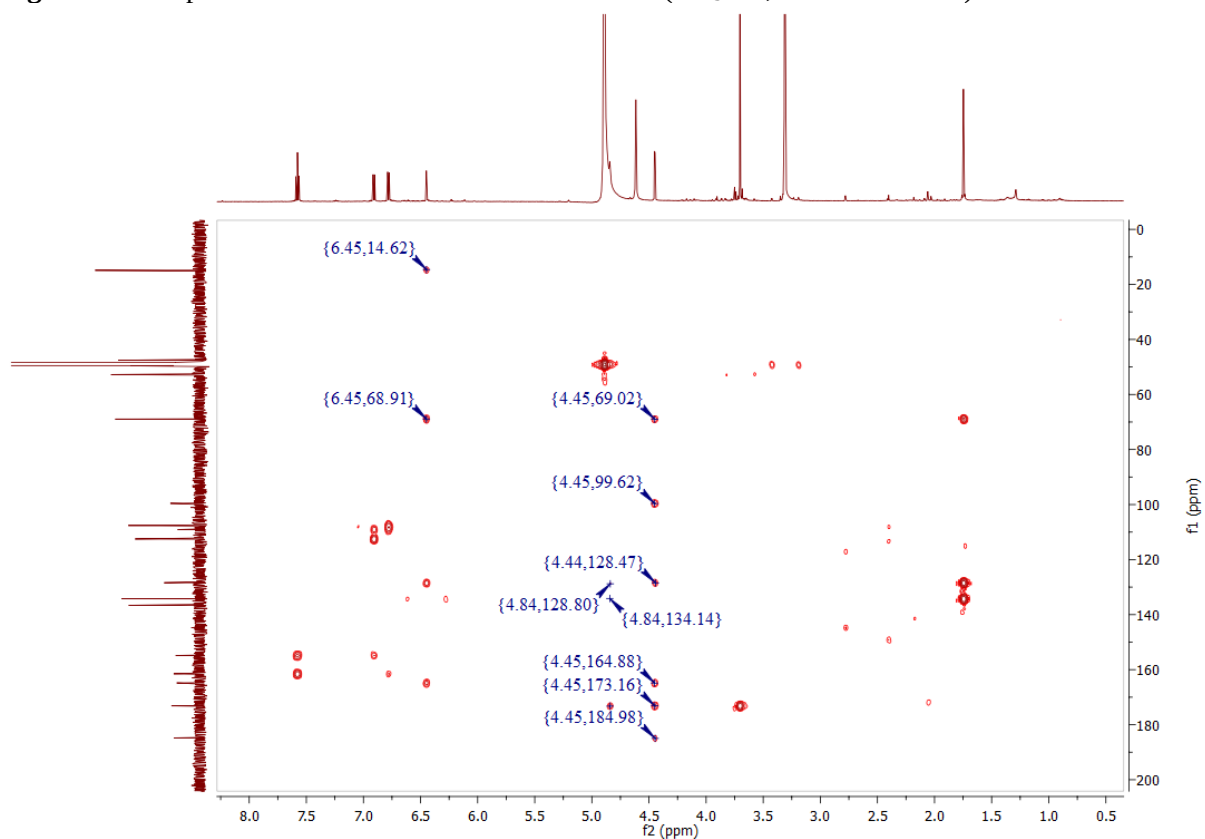
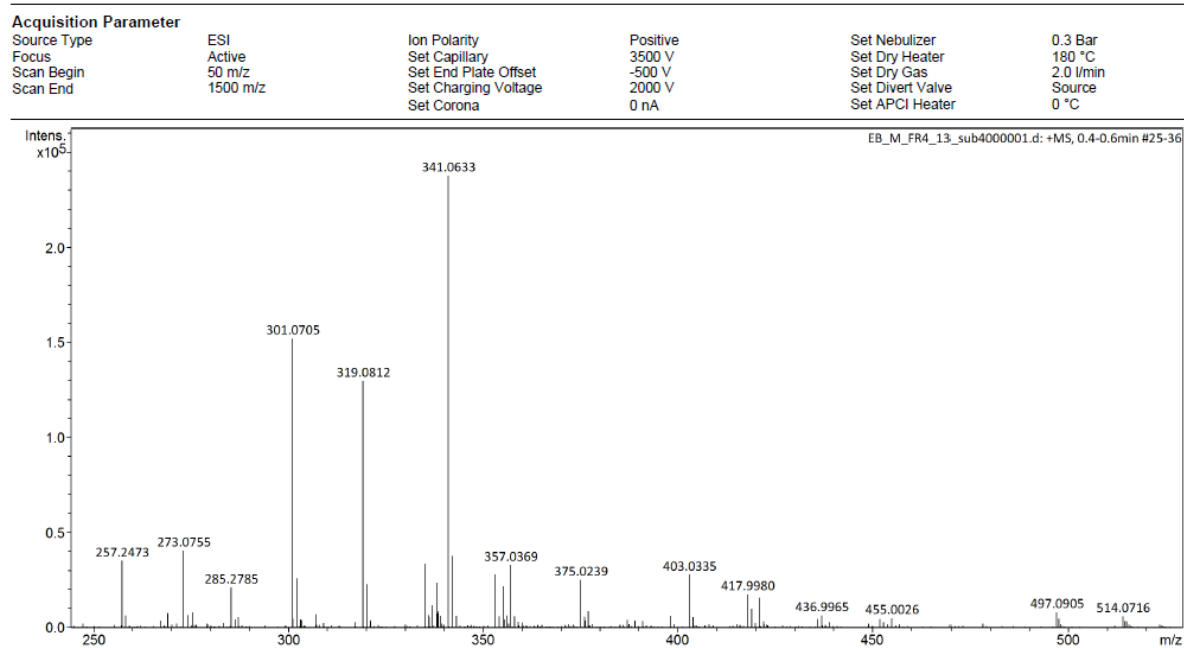
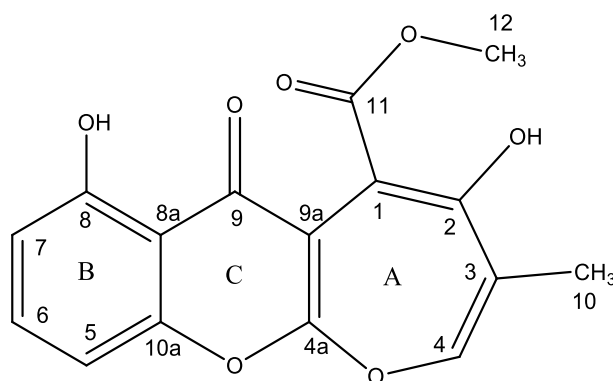
Figura 97 - Mapa de contorno COSY da substância **12** (CD₃OD; 600 MHz).**Figura 98** - Mapa de contorno HSQC da substância **12** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).

Figura 99 - Mapa de contorno HMBC da substância **12** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).**Figura 100** - Espectro de Massas de alta resolução da substância **12** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).

- Identificação da substância 15



A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 102) juntamente com os mapas de contorno HSQC e HMBC (Figura 103 e Figura 104) mostraram que a substância **15** apresentou perfil espectroscópico semelhante ao da substância **17**, em que a maior diferença é observada no anel A.

Com os dados obtidos nos experimentos foi possível observar na substância **15** o desaparecimento dos carbonos carbinolicos C-1(δ_{C} 77,8) e C-2(δ_{C} 74,1) e o aparecimento dos carbonos C-1(δ_{C} 130,8) e C-2(δ_{C} 150,5), evidenciando claramente o aumento da conjugação do anel A com a perda de água (Tabela 21).

Pelas correlações observadas no mapa de contorno HMBC (Figura 101) e associado aos dados da literatura (KROHN, et. AL., 2009) nos permitiram atribuir para a substância **15** a xantona 1-éster metil-2,8-dihidroxi-3-metil-9-oxoxantona.

Figura 101 - Principais correlações observadas em HMBC da substância **15**.

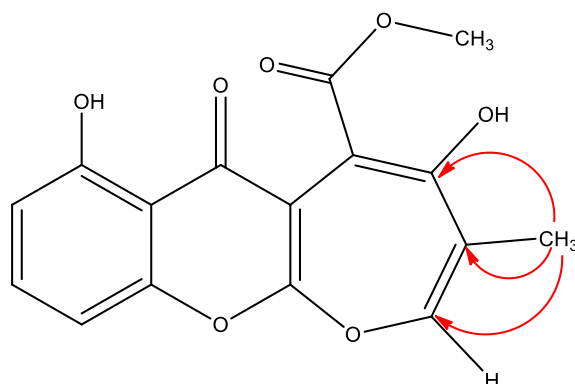


Tabela 21 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 e 150 MHz) de **15** (δ em ppm e J em Hz).

<i>Posição</i>	δ_{H}	δ_{C}
1	-	130,8
2	-	150,5
3	-	139,4
4	7,46 (<i>d</i> ; 0,9)	121,0
4a	-	*
5	6,97 (<i>dd</i> ; 0,8; 8,0)	107,7
6	7,64 (<i>t</i> ; 8,0)	137,8
7	6,74 (<i>dd</i> ; 0,8; 8,0)	110,8
8	-	163,1
8a	-	*
9	-	*
9a	-	*
10	2,42 (<i>d</i> ; 0,9)	17,2
10a	-	*
11	-	169,8
12	3,97 (<i>s</i>)	52,9

*Sinal não observado.

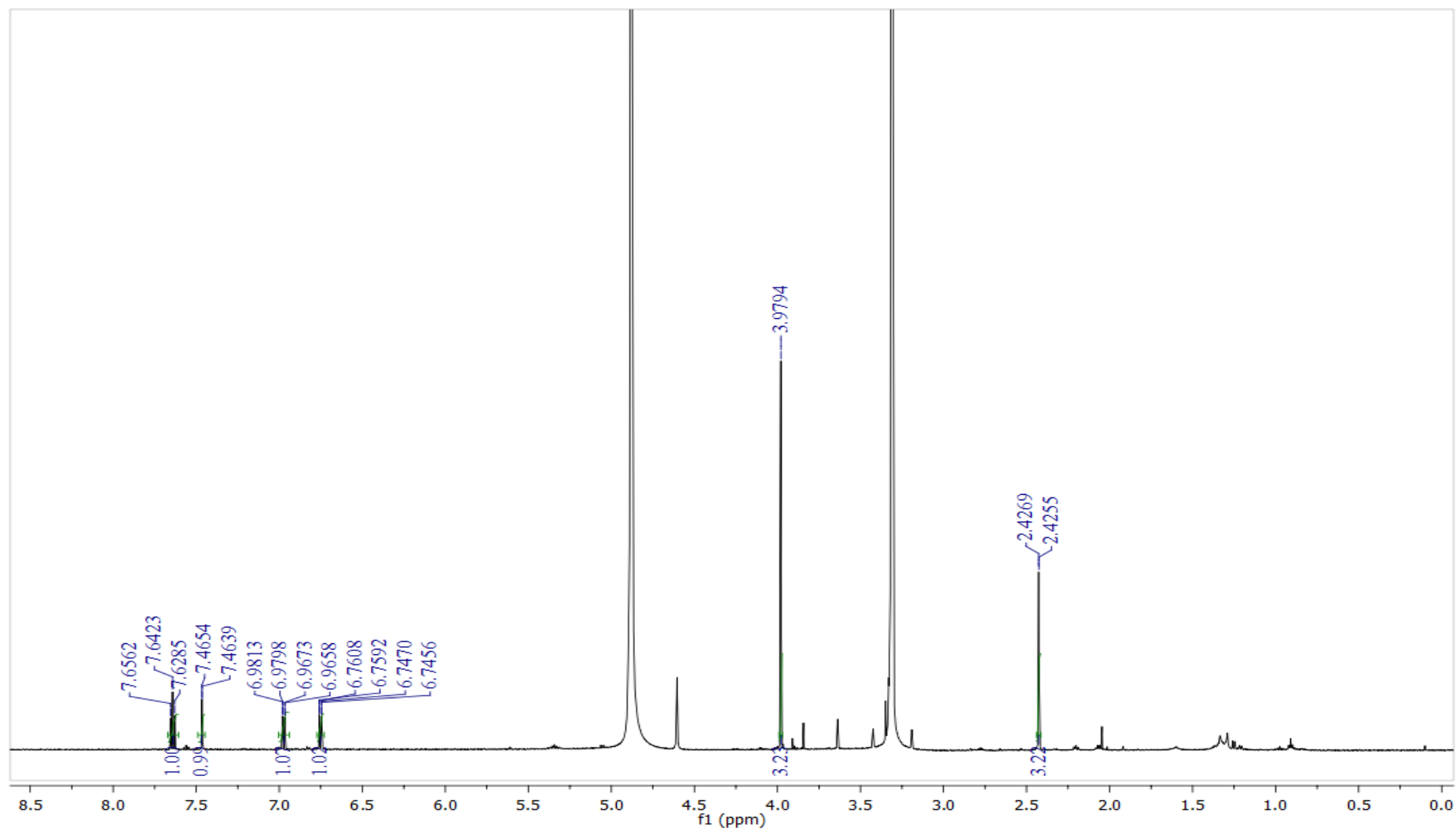
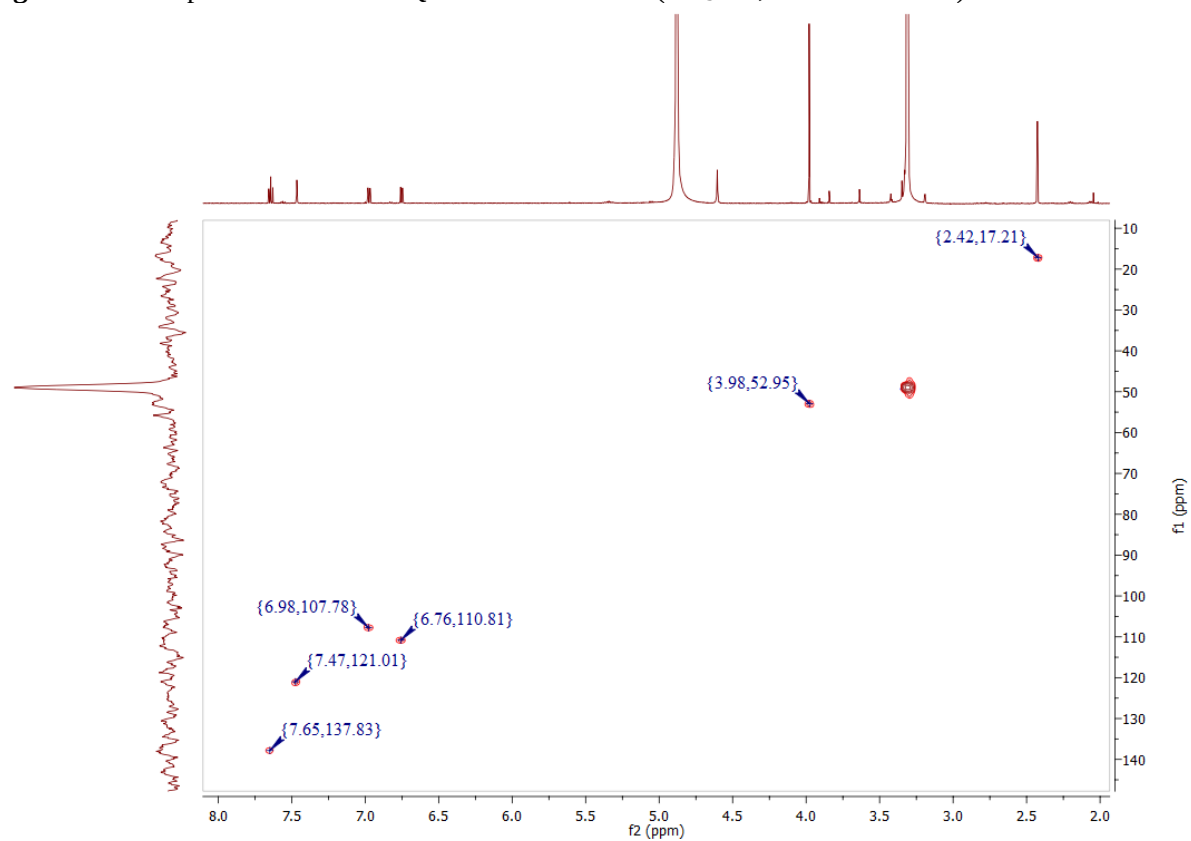
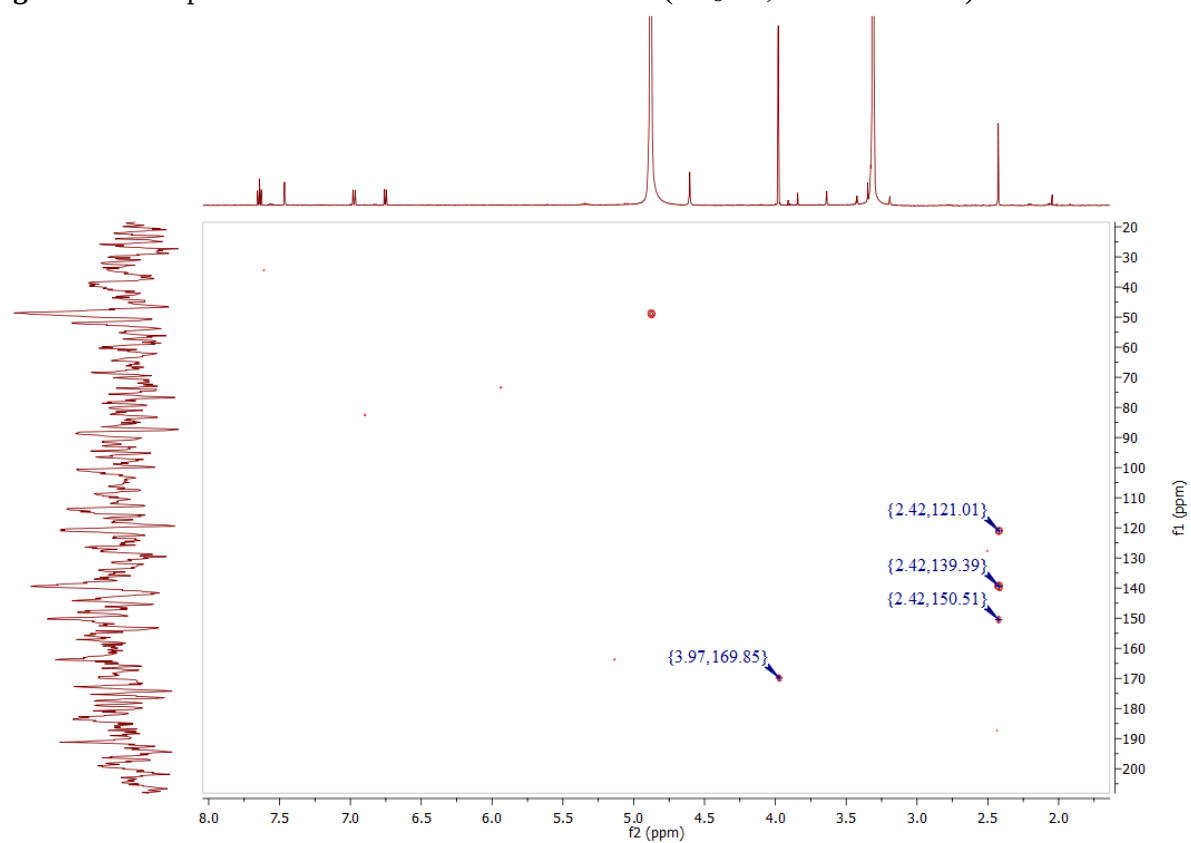
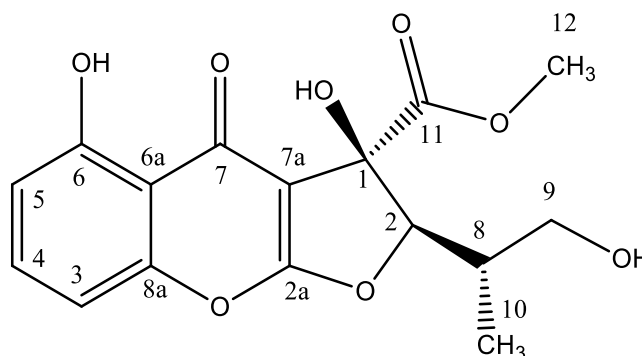
Figura 102 - Espectro de RMN de ^1H da substância **15** (CD_3OD ; 600 MHz).

Figura 103 - Mapa de contorno HSQC da substância **15** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).**Figura 104** - Mapa de contorno HMBC da substância **15** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).

- Identificação da substância 19.



A análise conjunta dos dados de espectrometria de massas, ESI-Qq-TOF (Figura 110), modo positivo, apresentou para a substância **19** a molécula protonada m/z 337, 0913 $[M+H]^+$, e a formação das moléculas cationizadas m/z 359,0734 $[M+Na]^+$ e m/z 375,0471 $[M+K]^+$, o que associado aos experimentos RMN 1 e 2D (Figura 106, Figura 107, Figura 108 e Figura 109) permitiram propor a fórmula molecular $C_{16}H_{16}O_8$.

No experimento de RMN de 1H foram visualizados dois duplos dubletos em δ_H 6,96 (1H, *d*, J = 8,5 Hz), 6,80 (1H, *d*, J = 8,5 Hz), e um tripleto aparente em 7,53 (1H, *t*, J = 8,5 Hz), evidenciando um anel aromático trissubstituído. Este perfil associado aos deslocamentos químicos observados para os anéis B e C nas substâncias **12**, **17** e **20** permitiram evidenciar uma unidade cromona para a substância **19**.

Adicionalmente foram observados sinais em 3,85 (3H, *s*, δ_C 53,9) e em 1,19 (*d*, J = 6,8 Hz, δ_C 13,7) atribuídos a uma metoxila e uma metila, respectivamente (Tabela 22). Pelo experimento de COSY (Figura 24) um sistema de spins de $-CHCH(CH_3)CH_2O-$ foi visualizado, pelas correlações em δ_H 5,08 (*d*, J = 9,0 Hz, δ_C 96,1), δ_H 2,41(*m*, δ_C 35,8), um metileno carbinólico em δ_H 3,52 (*dd*, J = 5,2 e 10,8 Hz, δ_C 64,2) e 3,64 (*dd*, J = 5,2 e 10,8 Hz, δ_C 64,2), este último evidenciando ser vizinho a um centro estereogênico. O dubleto em δ_H 5,08 (J = 9,0 Hz) associado ao carbono em δ_C 96,1 sugeriu a presença de um anel furânico.

Esta proposta foi corroborada pelas correlações observadas no experimento de HMBC, onde foi, possível visualizar e posicionar o éster metílico, a hidroxila e propanol como substituintes no anel furânico (Figura 105). A configuração absoluta da substância **19** foi determinada por difração de raio-X de monocristal, e a substância foi caracterizada como (*1R*, *2R*, *8S*).

Comparação com os dados da literatura (XIONG, H. et. al., 2014) permitiram atribuir a **19** como a esporormielina B.

Figura 105 - Principais correlações observadas em COSY e HMBC da substância **19**.

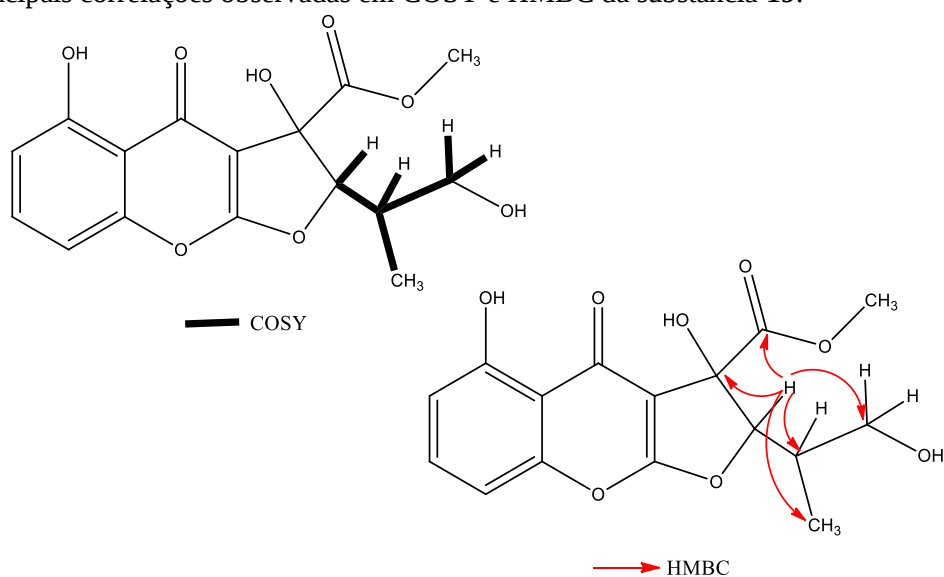


Tabela 22 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 e 150 MHz) de **19** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_{H}	δ_{C}
1	-	79,8
2	5,08 (<i>d</i> ; 9,0)	96,1
2a	-	171,6
3	6,96 (<i>d</i> ; 8,5)	108,2
4	7,53 (<i>t</i> ; 8,5)	135,6
5	6,80 (<i>d</i> ; 8,5)	113,9
6	-	162,4
6a	-	110,3
7	-	180,6
7a	-	100,3
8	2,42 (<i>m</i>)	35,8
8a	-	155,2
9	3,64 (<i>dd</i> ; 5,2; 10,9) / 3,52 (<i>dd</i> ; 5,2; 10,9)	64,2
10	1,19 (<i>d</i> ; 6,8)	13,7
11	-	173,4
12	3,85 (<i>s</i>)	53,9

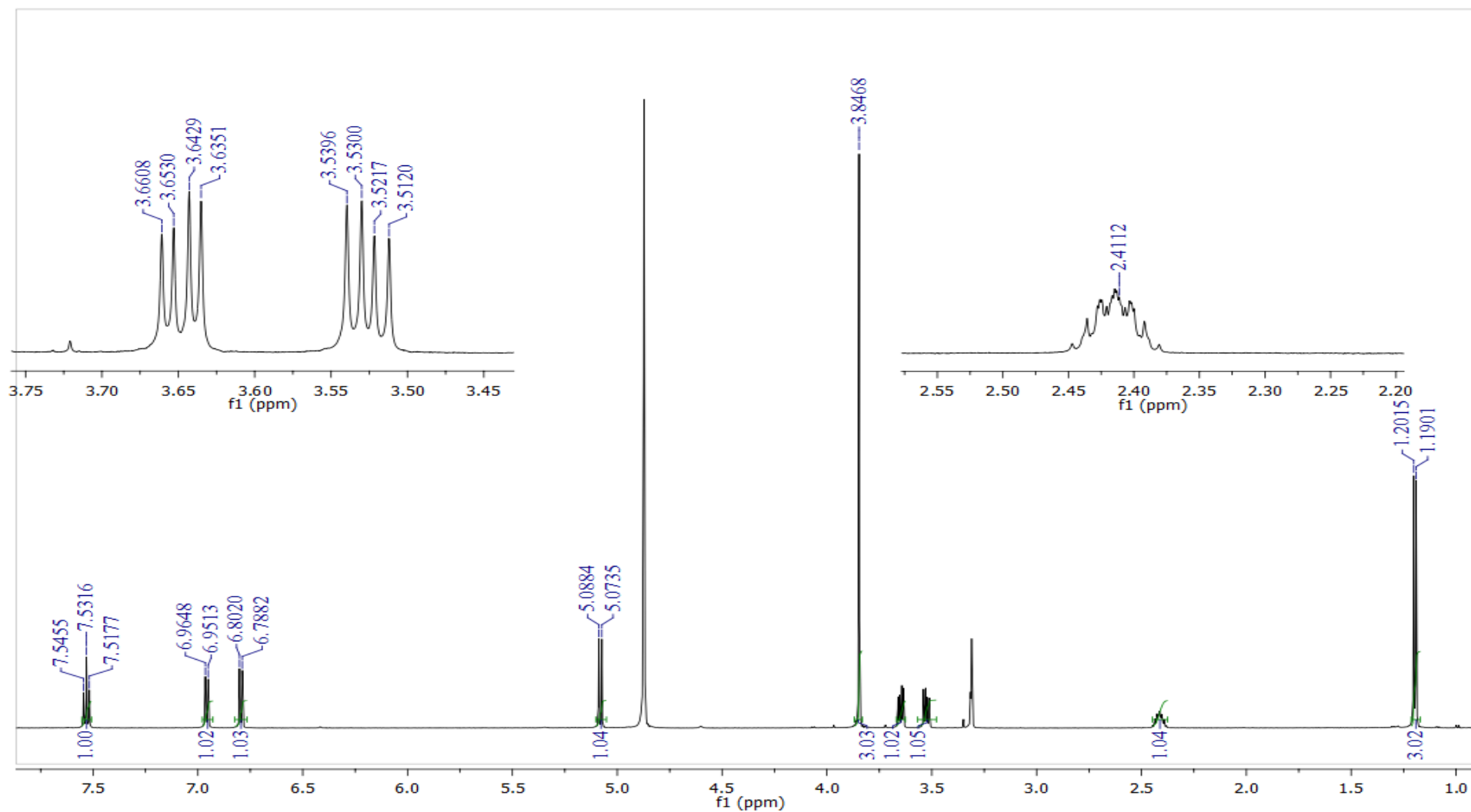
Figura 106 - Espectro de RMN de ^1H da substância **19** (CD_3OD ; 600 MHz).

Figura 107 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **19** (CD_3OD ; 150MHz).

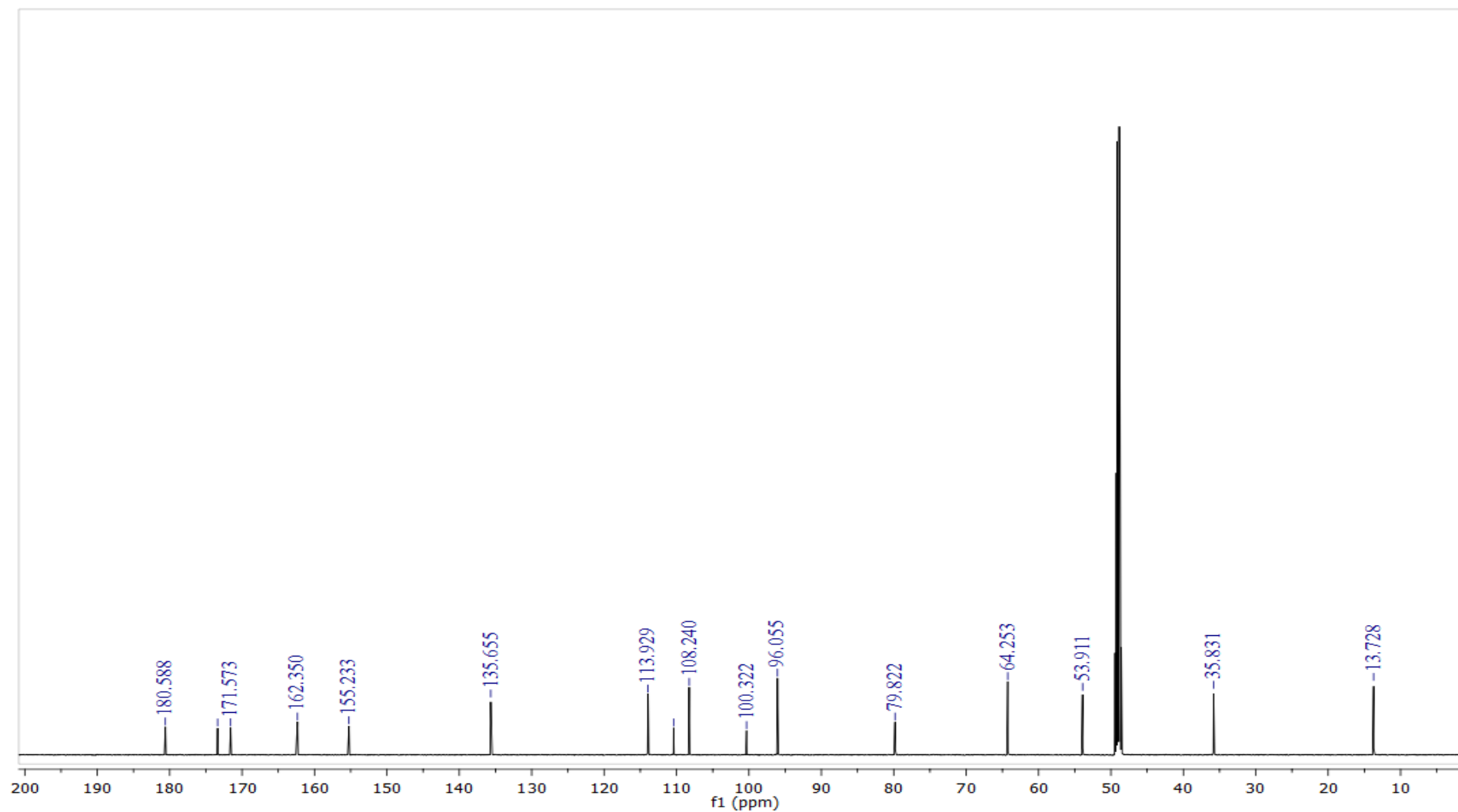


Figura 108 - Mapa de contorno HMBC da substância **19** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).

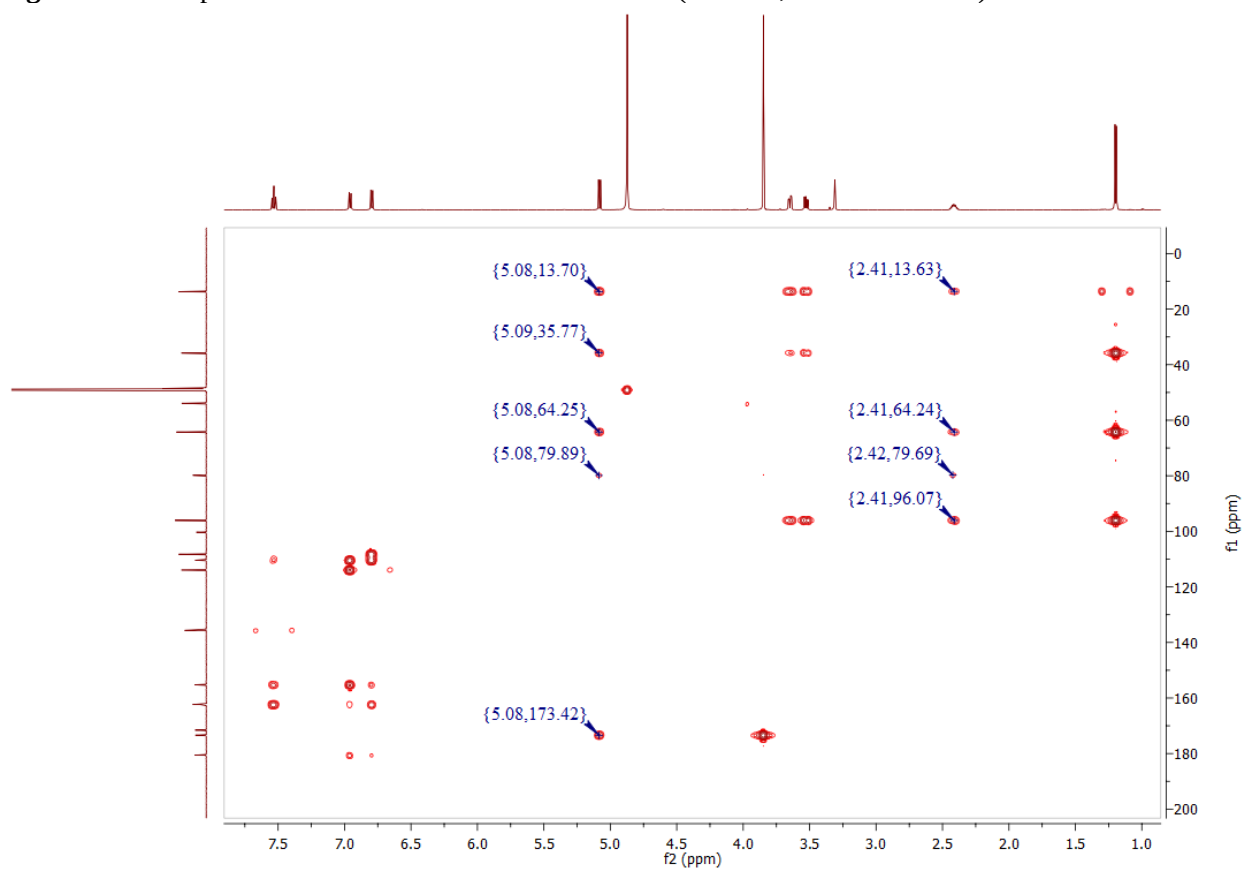


Figura 109 - Mapa de contorno COSY da substância **19** (CD₃OD; 600 MHz).

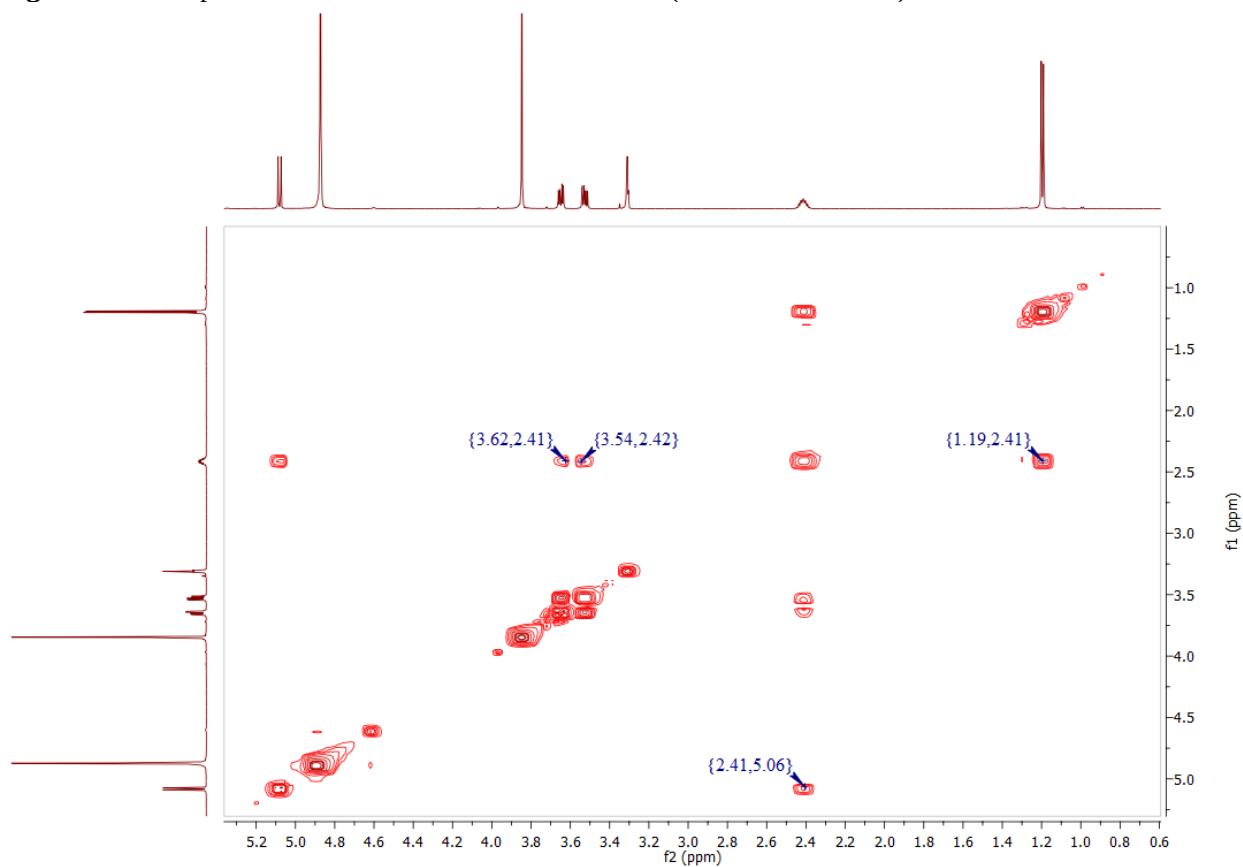
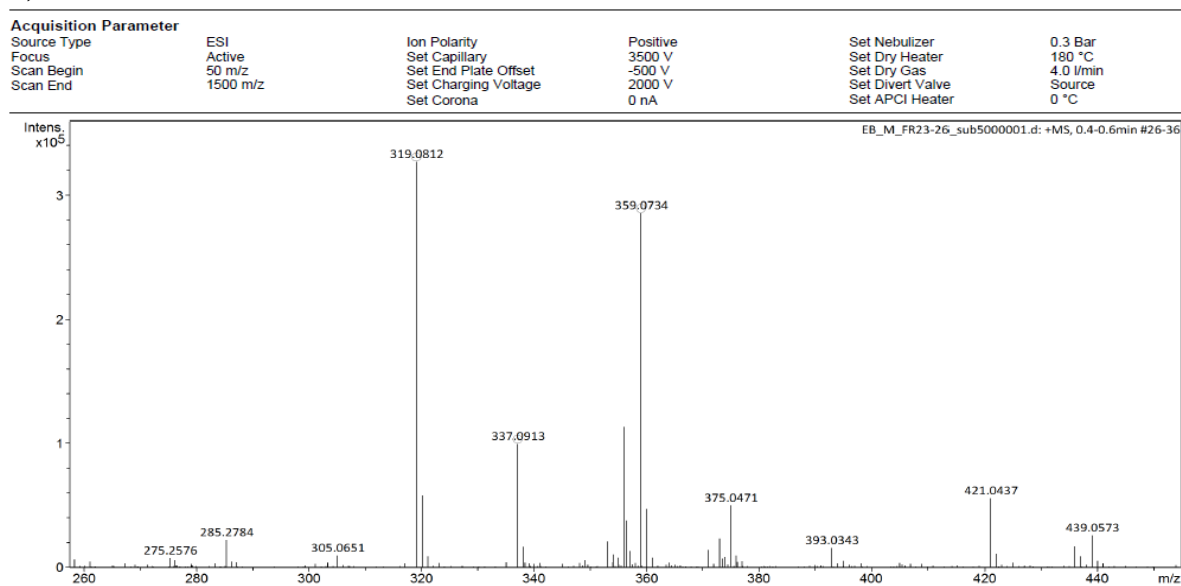
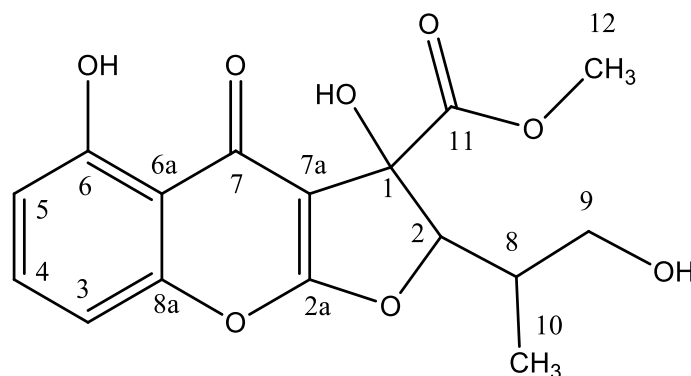


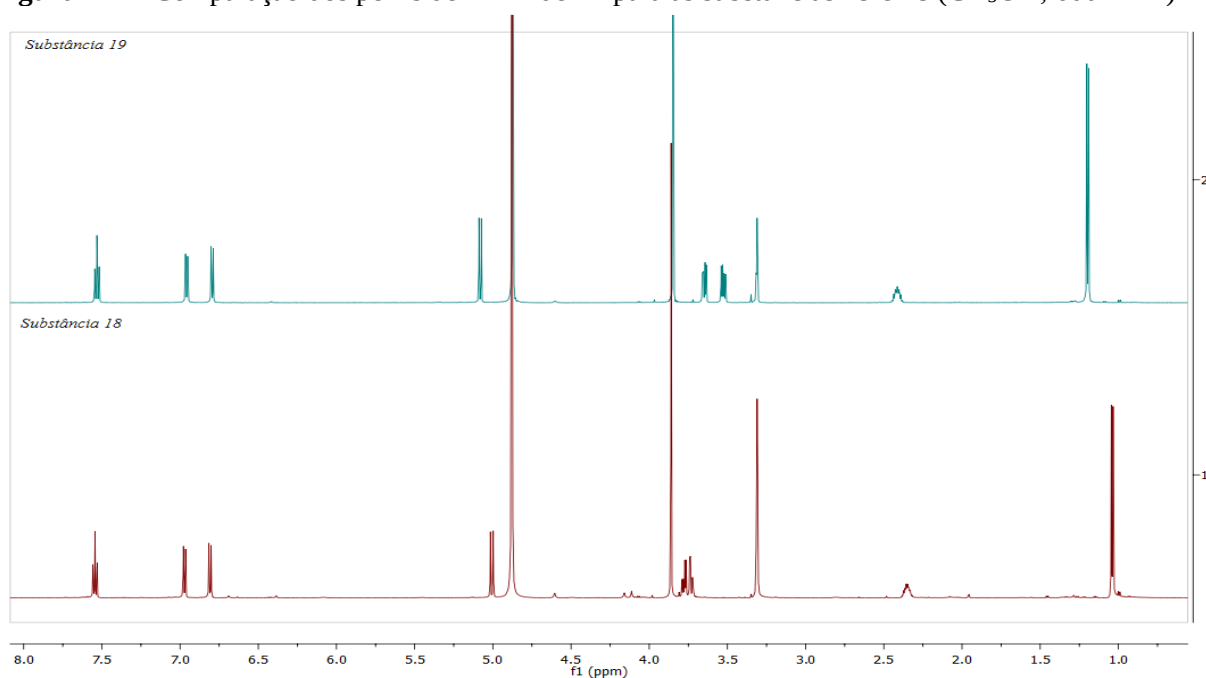
Figura 110 - Espectro de Massas de alta resolução da substância **19** (Bruker - MaXis Impact - ESI-Q-TOF).



- Identificação estrutural da substância **18**.



Na análise do perfil espectroscópico, uni e bidimensional (Figura 114, Figura 115 e Figura 116), da substância e **18** evidenciaram um perfil semelhante com a substância **19**, como pode ser visualizado na comparação entre os espectros de RMN de ^1H das mesmas (Figura 111). Os deslocamentos químicos, multiplicidades dos sinais (Tabela 23) e as correlações observados nos mapas de contorno HMBC em corroboração com os dados de espectrometria de massas, ESI-Qq-TOF (Figura 117), nos conduziram a sugerir que a substância **18** fosse diastereoisômeros da substância **19**.

Figura 111 - Comparação dos perfis de RMN de ^1H para as substâncias **19** e **18** (CD_3OD ; 600 MHz)

Para comprovar tal suposição as substâncias foram submetidas a $\text{CLAE}_{\text{anal}}$ utilizando uma coluna de sílica de fase reversa C18 e como eluente um gradiente linear $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (05:95 à 0:100) em 40 min, em 254, mais 10 min de limpeza. Após a análise do perfil cromatográfico pode-se assumir a proposição de que as três substâncias são diastereoisômeros, uma vez que as mesmas apresentaram tempos de retenção distintos entre si (Figura 112), o que foi confirmado com a co-injeção das substâncias nas mesmas condições (Figura 113)

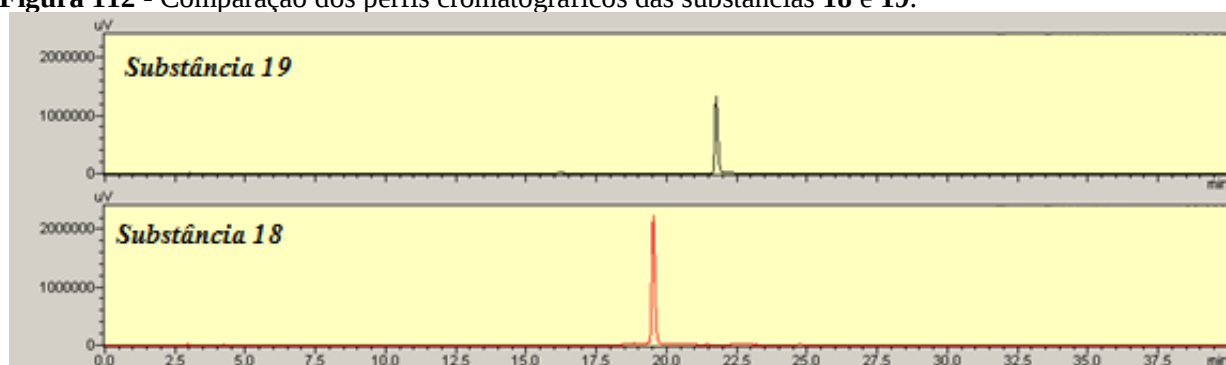
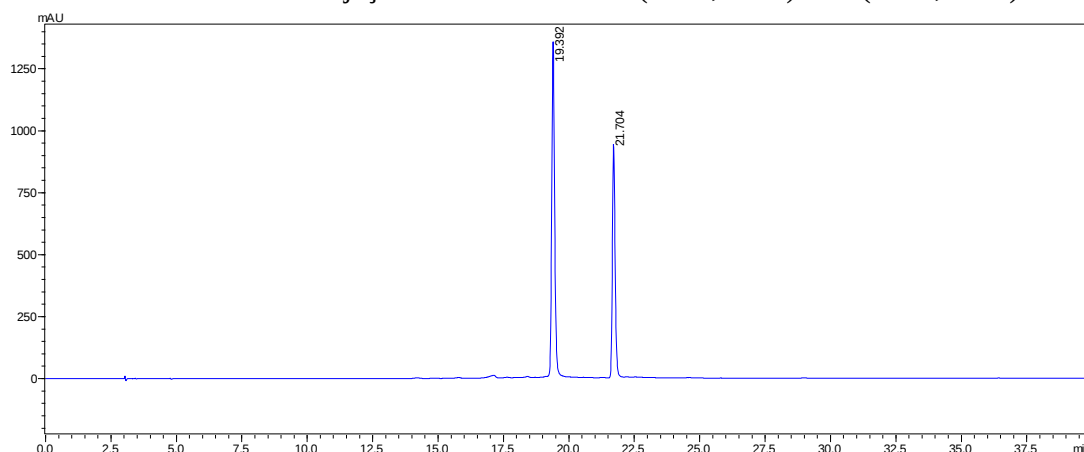
Figura 112 - Comparação dos perfis cromatográficos das substâncias **18** e **19**.

Figura 113 - CLAE-DAD da co-injeção das substâncias **18** (tr=19,3 min) e **19** (tr=21,7 min).

Os dados obtidos foram comparados com a literatura (XIONG, et al., 2014) e permitiram identificar a substâncias **18** como diastereoisômero de **19**, sendo **18** descrita pela primeira vez na literatura.

Tabela 23 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 e 150 MHz) da substância **18** e **19** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	19		18	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	79,8	-	79,5
2	5,08 (<i>d</i> ; 9,0)	96,1	5,00 (<i>d</i> ; 10,8)	95,3
2a	-	171,6	-	171,6
3	6,96 (<i>d</i> ; 8,5)	108,2	6,97 (<i>d</i> ; 8,3)	108,3
4	7,53 (<i>t</i> ; 8,5)	135,6	7,54 (<i>t</i> ; 8,3)	135,7
5	6,80 (<i>d</i> ; 8,5)	113,9	6,80 (<i>d</i> ; 8,3)	114,0
6	-	162,4	-	162,4
6a	-	110,3	-	110,3
7	-	180,6	-	180,6
7a	-	100,3	-	100,3
8	2,42 (<i>m</i>)	35,8	2,35 (<i>m</i>)	36,0
8a	-	155,2	-	155,3
9	3,64 (<i>dd</i> ; 5,2; 10,9) / 3,52 (<i>dd</i> ; 5,2; 10,9)	64,2	3,78 (<i>dd</i> ; 4,1; 11,0) / 3,72 (<i>dd</i> ; 4,1; 11,0)	64,2
10	1,19 (<i>d</i> ; 6,8)	13,7	1,04 (<i>d</i> ; 6,8)	12,8
11	-	173,4	-	173,4
12	3,86 (<i>s</i>)	53,9	3,86 (<i>s</i>)	53,9

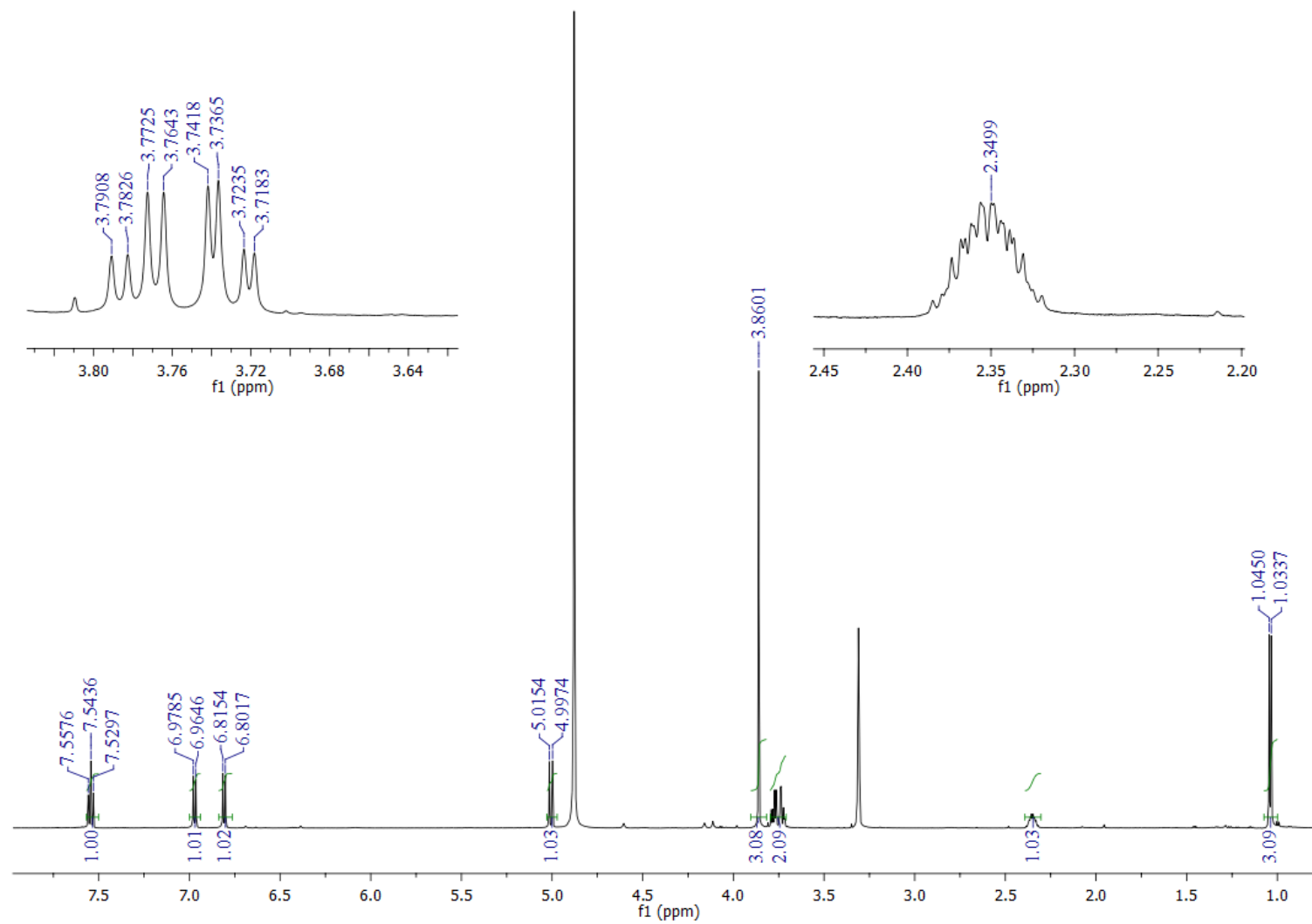
Figura 114 - Espectro de RMN de ^1H da substância **18** (CD_3OD ; 600 MHz).

Figura 115 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **18** (CD_3OD ; 150 MHz).

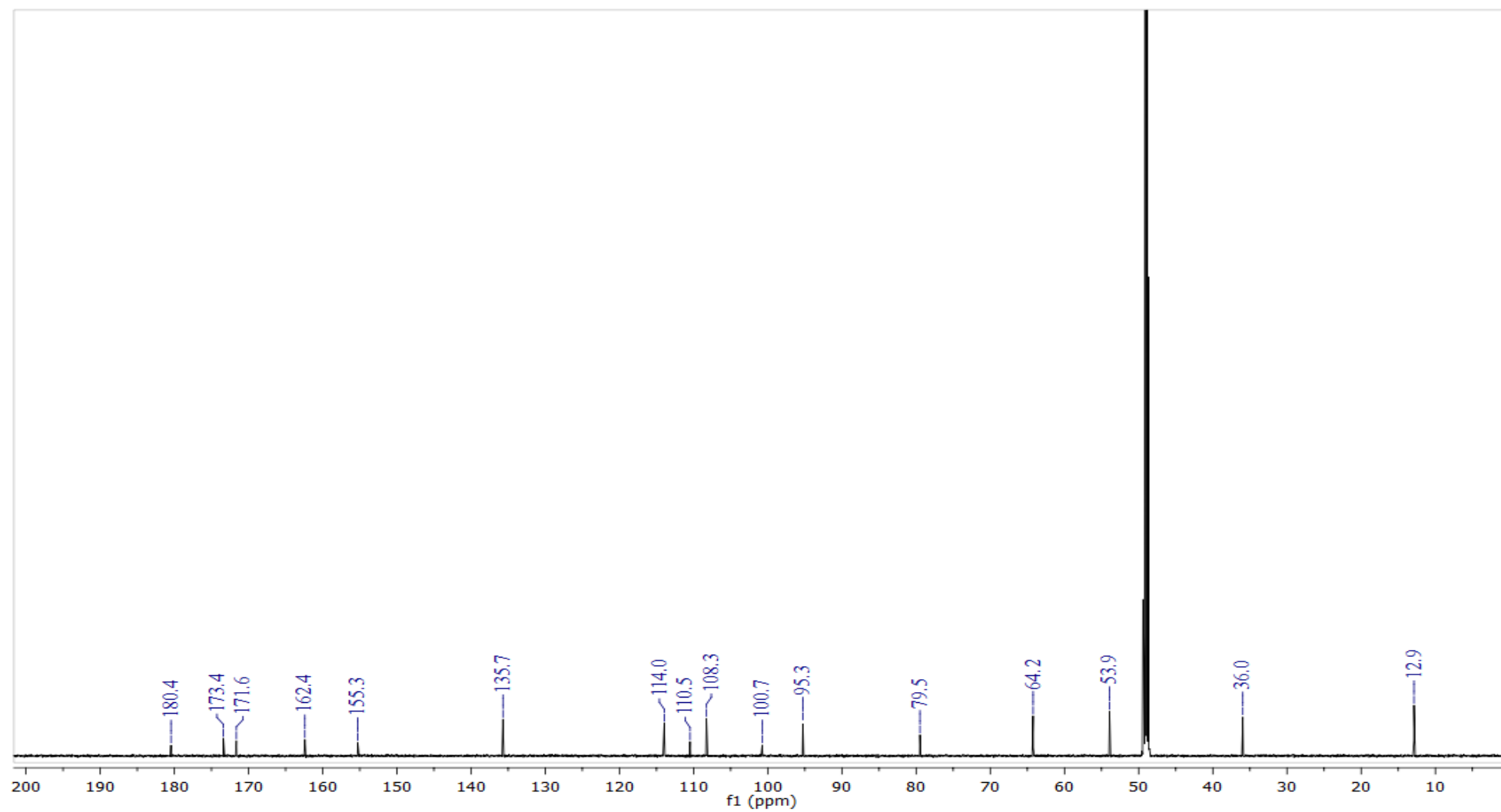
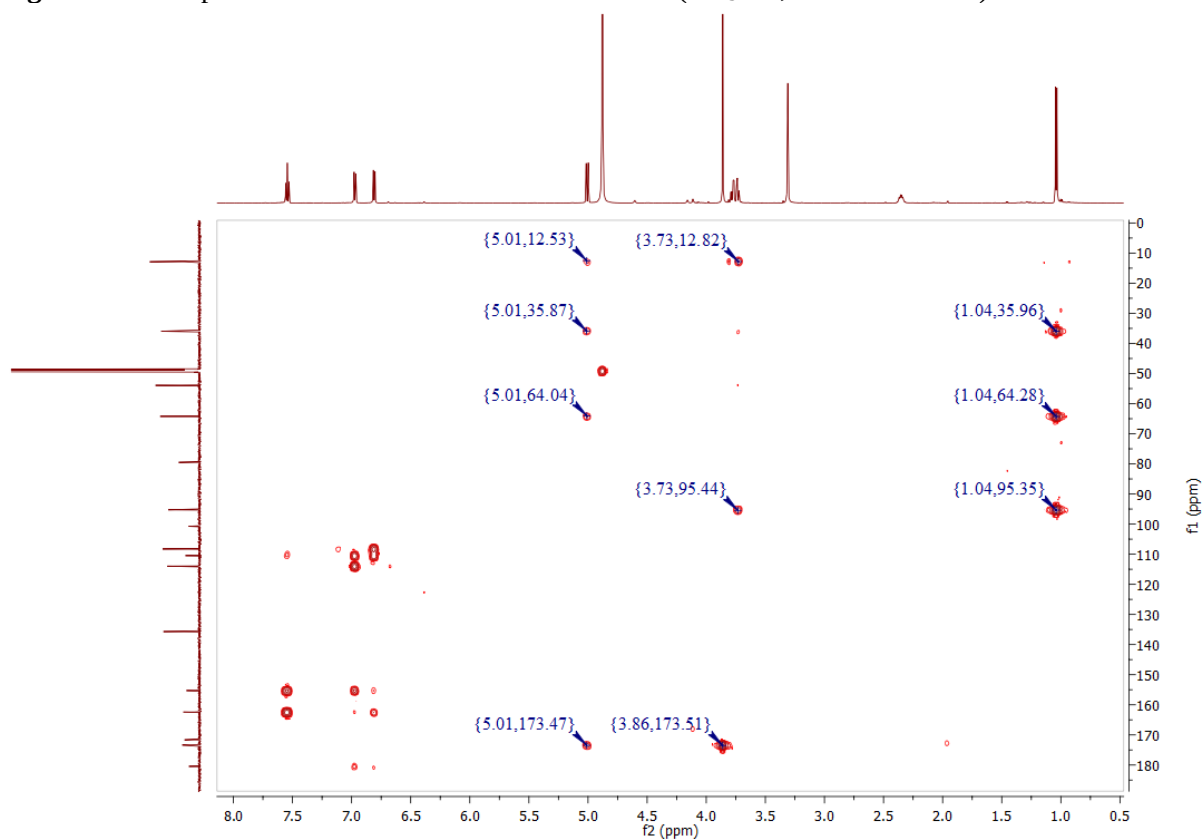
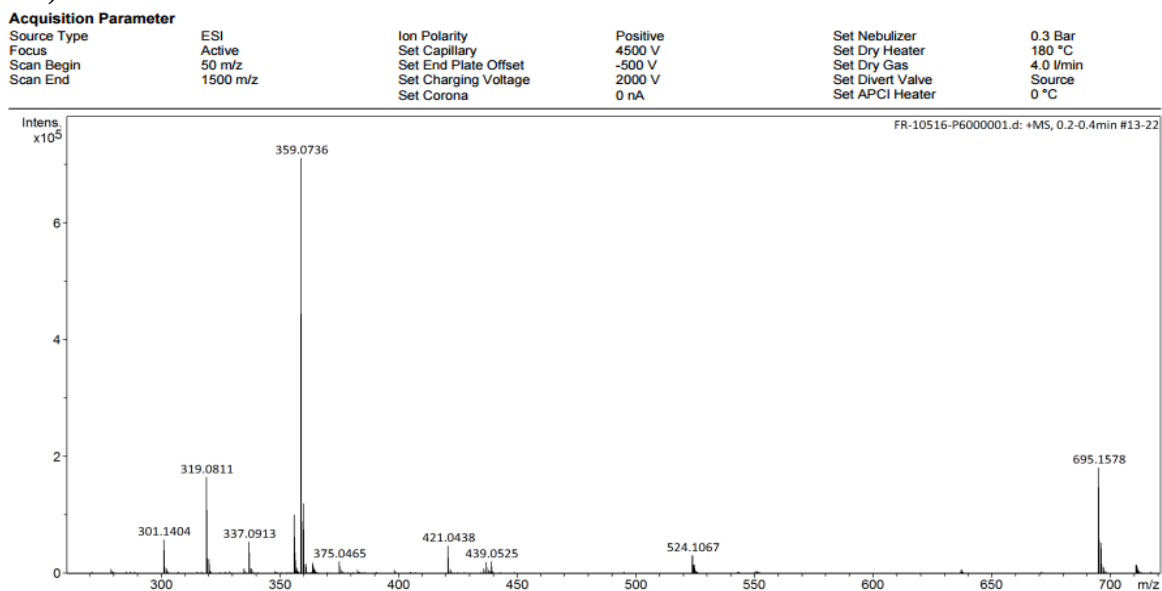
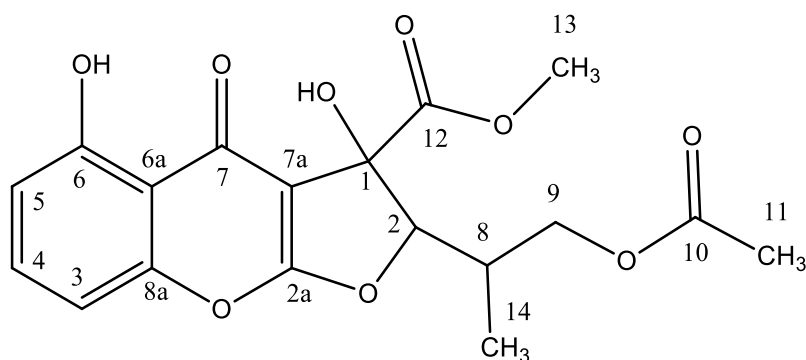


Figura 116 - Mapa de contorno HMBC da substância **18** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).**Figura 117** - Espectro de Massas de alta resolução da substância **18** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).

- Identificação estrutural da substância 14.



A análise dos dados de espectrometria de massas, ESI-Qq-TOF (Figura 122), modo positivo, apresentou para a substância **14** a molécula protonada m/z 379,1029 $[M+H]^+$ e a formação da molécula cationizada m/z 401,0850 $[M+Na]^+$, o que associado aos experimentos RMN uni e bidimensionais permitiram propor a fórmula molecular $C_{18}H_{18}O_9$.

Na análise conjunta dos dados de RMN de 1H (Figura 119), HSQC (Figura 120) e HMBC (Figura 121) da substância **14** permitiu observar uma grande semelhança dos deslocamentos químicos e das multiplicidades dos sinais quando comparado com a substância **19**.

A presença de um singlete em δ_H 2,05 (3H, δ_C 19,1) (Tabela 24) atribuído a uma metila de um grupo acetóxi, aliada as correlações observadas em HMBC entre H-9a/9b $\leftrightarrow$ C-10 (Figura 118) e associado dos dados da literatura (XIONG, H. et. al., 2014) nos permitiram identificar a substância **14** como a cromona esporormielina C.

Figura 118 - Principal correlação observada em HMBC para a substância **14**.

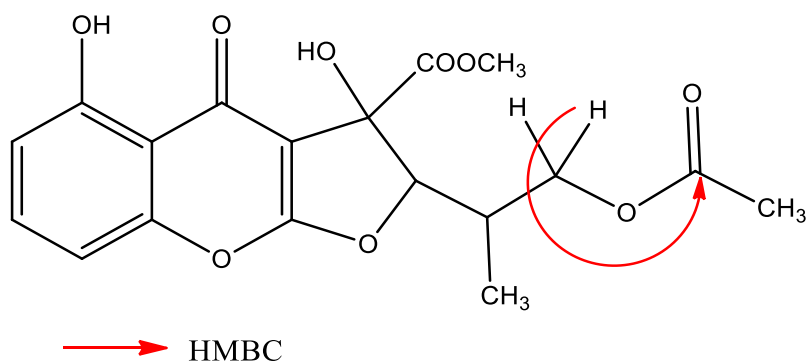


Tabela 24 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 MHz) de **14** (δ em ppm e J em Hz).

<i>Posição</i>	δ_{H}	δ_{C}
1	-	78,2
2	5,06 (<i>d</i> ; 9,4)	93,6
2a	-	*
3	6,99 (<i>dd</i> ; 0,7; 8,4)	106,8
4	7,56(<i>t</i> ; 8,4)	134,4
5	6,82 (<i>dd</i> ; 0,7; 8,4)	112,6
6	-	161,2
6a	-	108,9
7	-	*
7a		*
8	2,60 (<i>m</i>)	31,9
8a	-	153,8
9	4,26 (<i>dd</i> ; 4,2; 11,7) 4,09 (4,2; 11,7)	65,1
10	-	171,1
11	2,05 (<i>s</i>)	19,1
12	-	171,7
13	3,84 (<i>s</i>)	52,4
14	1,25 (<i>d</i> ; 6,9)	12,6

*Sinal não observado.

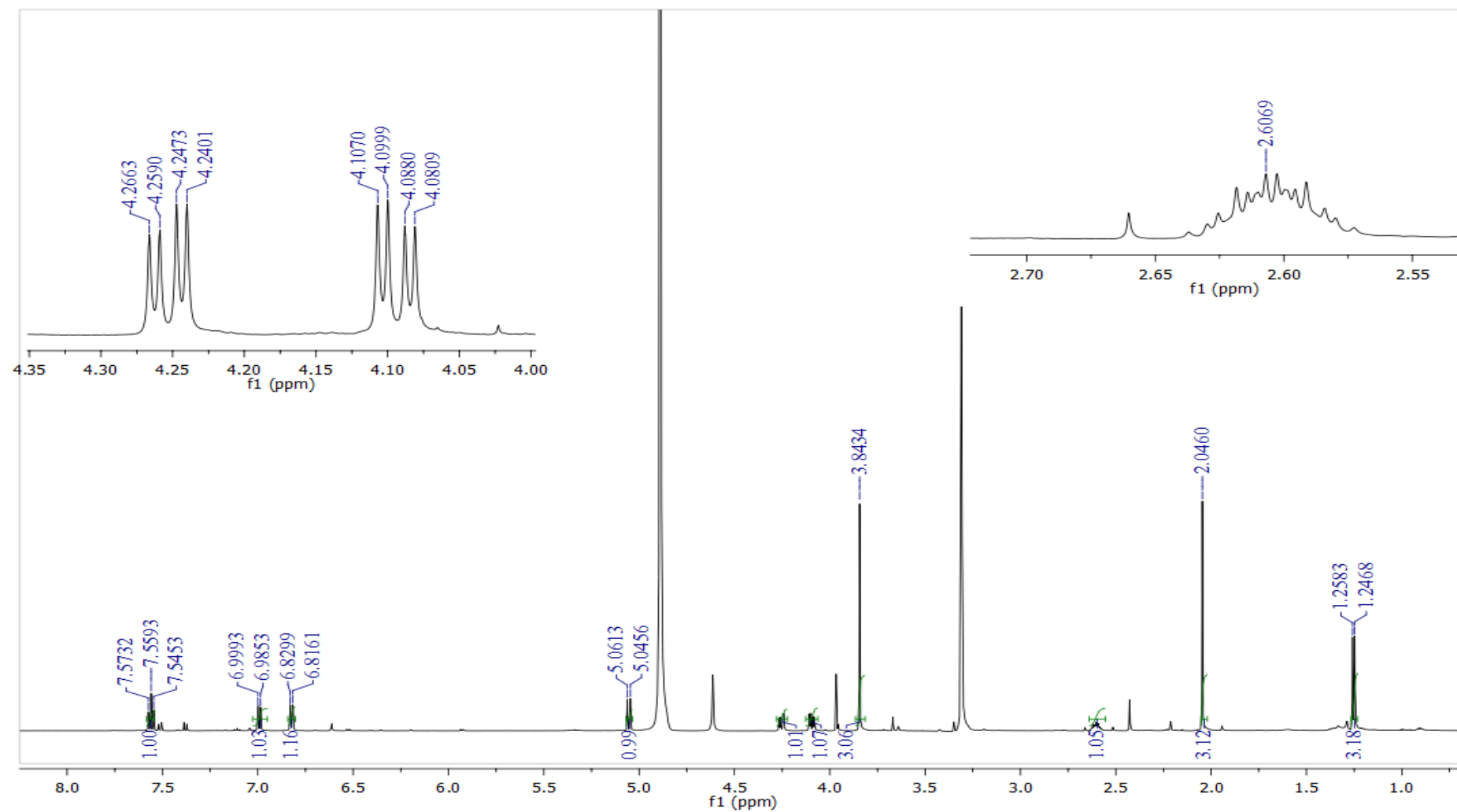
Figura 119 - Espectro de RMN de ^1H da substância **14** (CD_3OD ; 600 MHz).

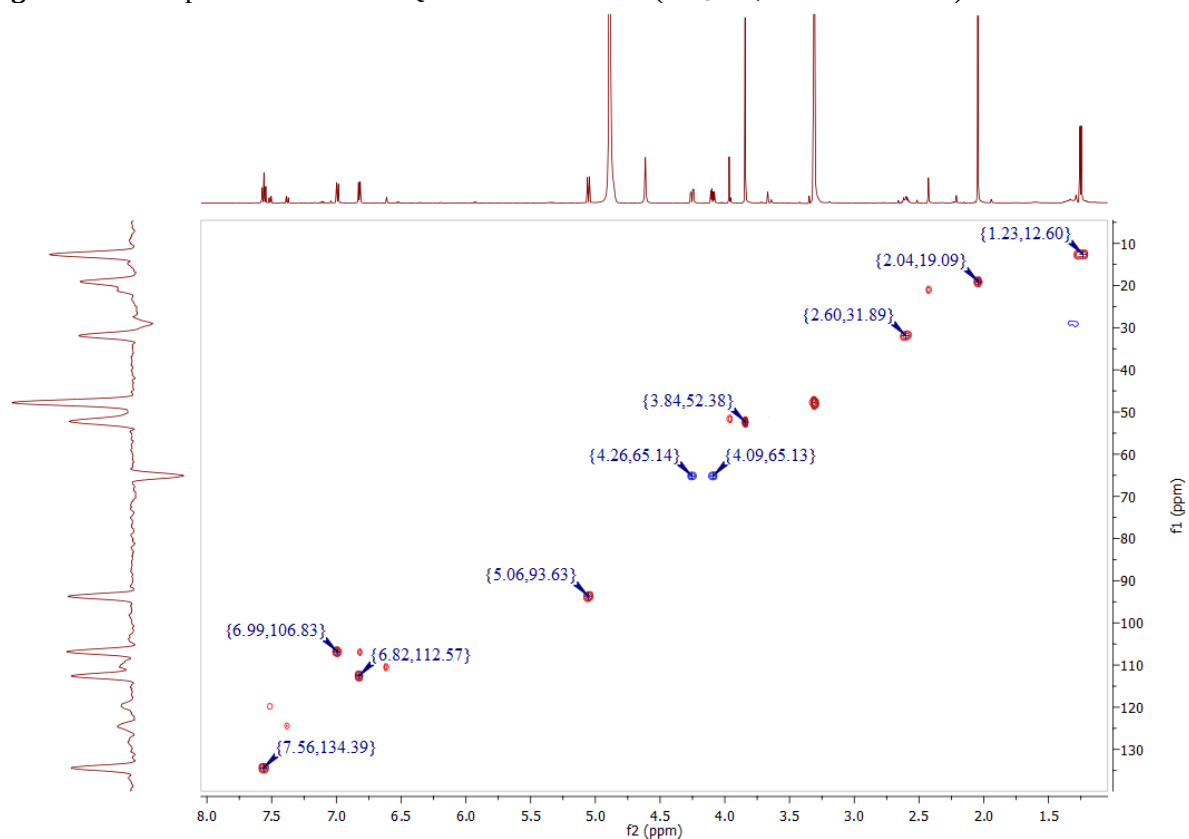
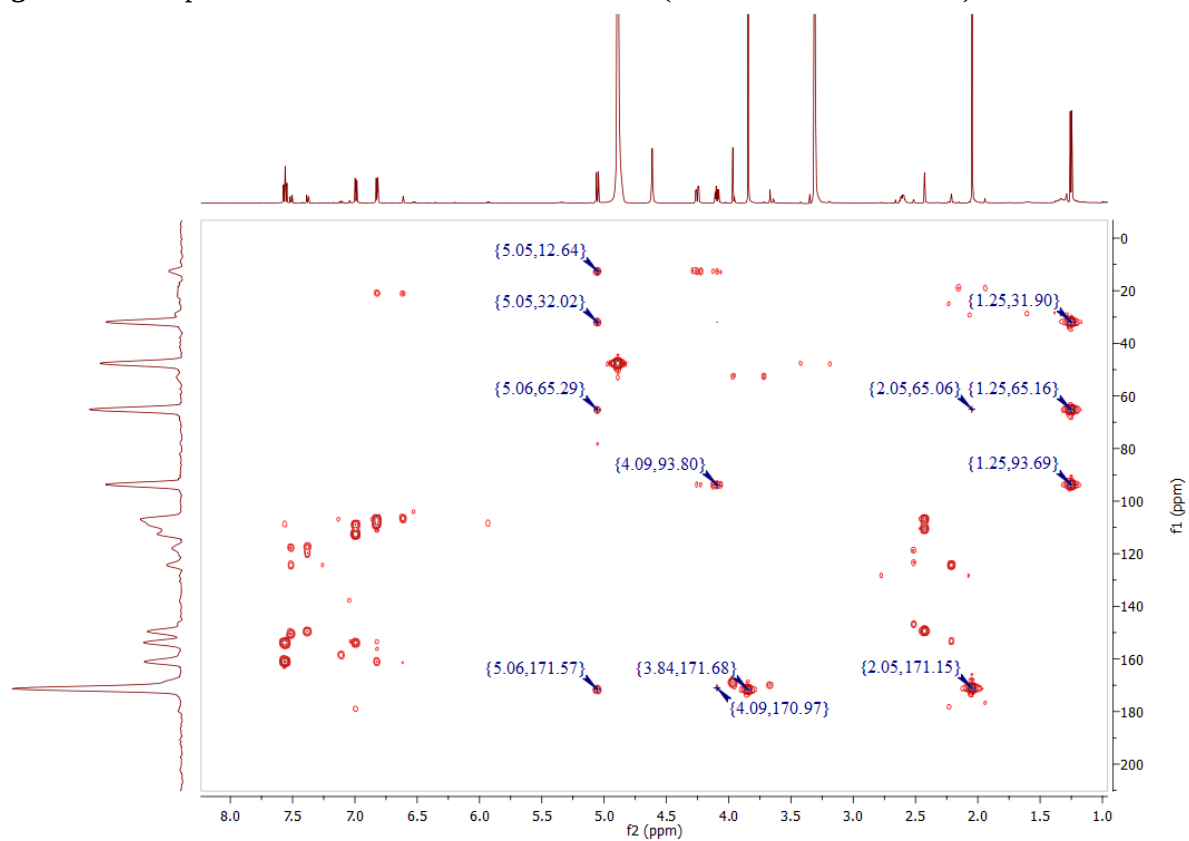
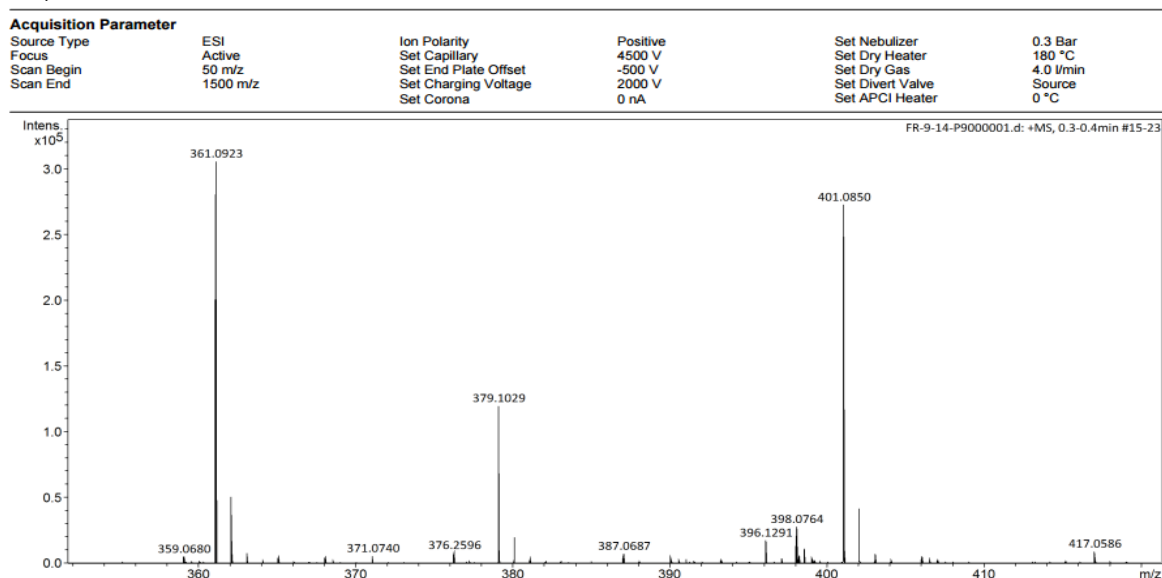
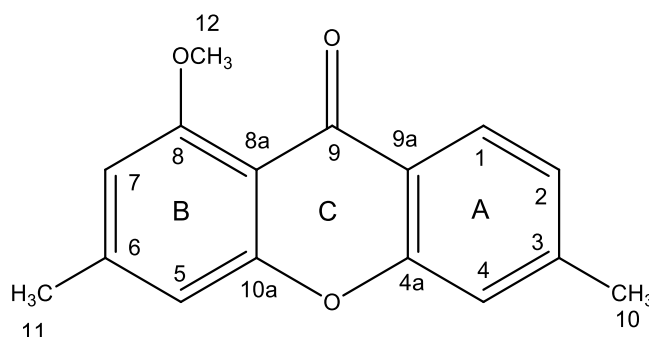
Figura 120 - Mapa de contorno HSQC da substância **14** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).**Figura 121** - Mapa de contorno HMBC da substância **14** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).

Figura 122 - Espectro de Massas de alta resolução da substância **14** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).



- Identificação estrutural da substância **13**.



A identificação da substância **13** foi feita pela análise dos espectros de RMN de 1 e 2D (Figura 124, Figura 125 e Figura 126), os quais apresentaram sinais de hidrogênios aromáticos, em δ_H 6,36 (*d*; 2,9 Hz; δ_C 101,1) e δ_H 6,31 (*dd*, 0,4; 2,9 Hz; δ_C 107,6), evidenciando acoplamento em *meta*, entre si e, um acoplamento alílico com os hidrogênios metílicos em δ_H 2,03 (3H, *sl*; δ_C 16,2) e uma metoxila em δ_H 3,74 (3H, *s*; δ_C 155,5). As correlações observadas em HMBC (Figura 123), permitiram determinar as posições dos grupos substituintes, o grupo OCH_3 em C-6 e o CH_3 em C-8.

O espectro RMN de 1H também apresentou sinais hidrogênios aromáticos para um segundo anel aromático, permitindo visualizar dois multipletos δ_H 6,24 (1H, δ_C 110,1) e δ_H 6,13 (1H, δ_C 107,9) e um triplete em δ_H 6,03 (*t*, 0,4; 2,2 Hz; δ_C 100,1). As correlações de H-1 $\leftrightarrow$ C4a, H-2 $\leftrightarrow$ C1/C10 e H-4 $\leftrightarrow$ C2/C4a no experimento de HMBC (Figura 123), permitiram atribuir as posições destes no segundo anel aromáticos.

Os dados obtidos (Tabela 25) foram comparados com a literatura (MASTERS, S., BRÄSE, S., 2012) e permitiram identificar a substância **13** como a 3,6-dimetil-8-metóxi-9-oxoxantona, sendo esta a primeira vez descrita como um produto natural, tendo sido apenas encontrada na literatura como produto de síntese.

Figura 123 - Principais correlações observadas em HMBC da substância **13**.

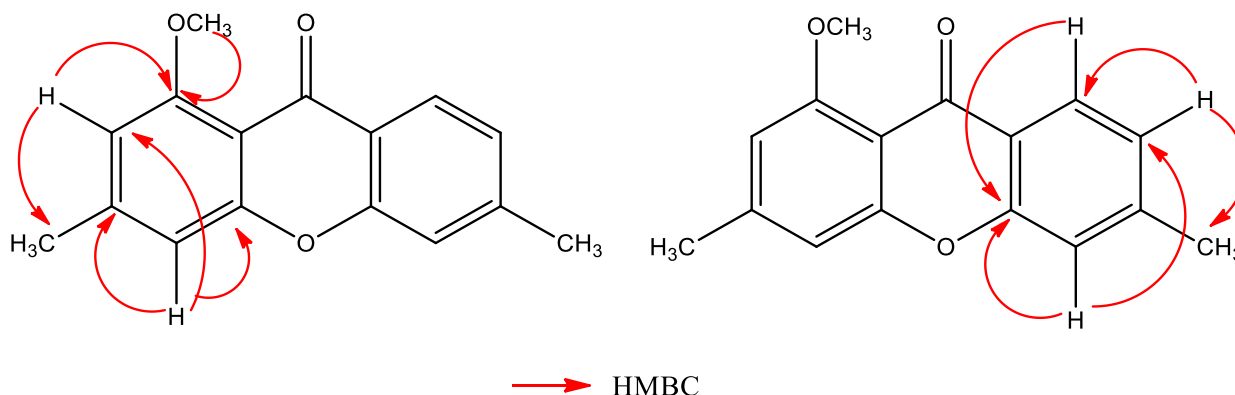


Tabela 25 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 MHz) de **13** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_{H}	δ_{C}
1	6,13 (<i>m</i>)	107,8
2	6,24 (<i>m</i>)	110,1
3	-	141,0
4	6,03(<i>dt</i> ; 0,4; 2,2)	100,1
5	6,36 (<i>dd</i> ; 0,3; 2,9)	101,0
6	-	158,3
7	6,31 (<i>dd</i> ; 0,6; 3,0)	107,6
8	-	135,0
8^a	-	113,7
9	-	*
9^a	-	115,8
10	2,18 (<i>sl</i>)	21,5
10a	-	151,6
11	2,03 (<i>sl</i>)	16,2
12	3,74 (<i>s</i>)	55,6

*Sinal não observado.

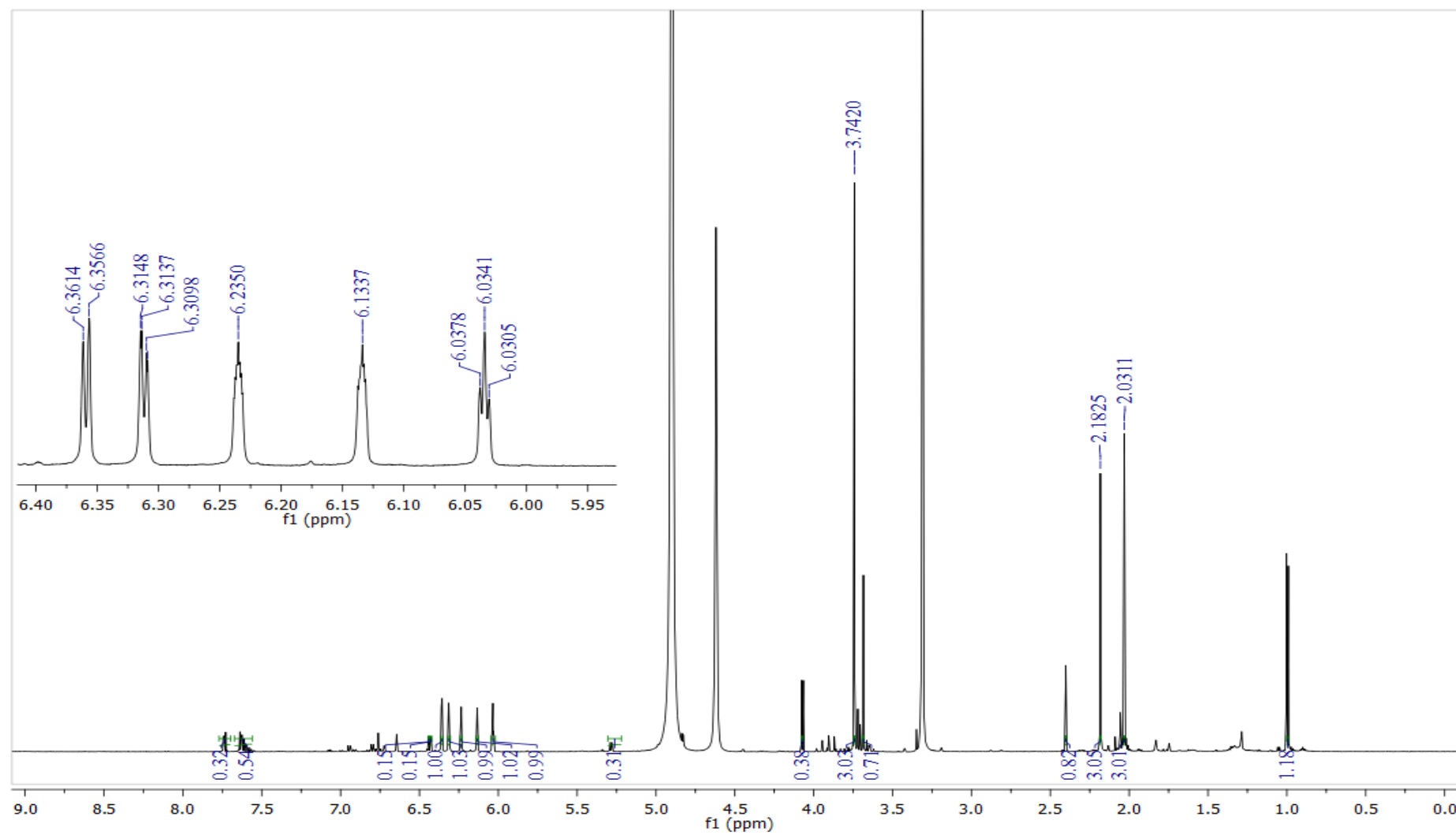
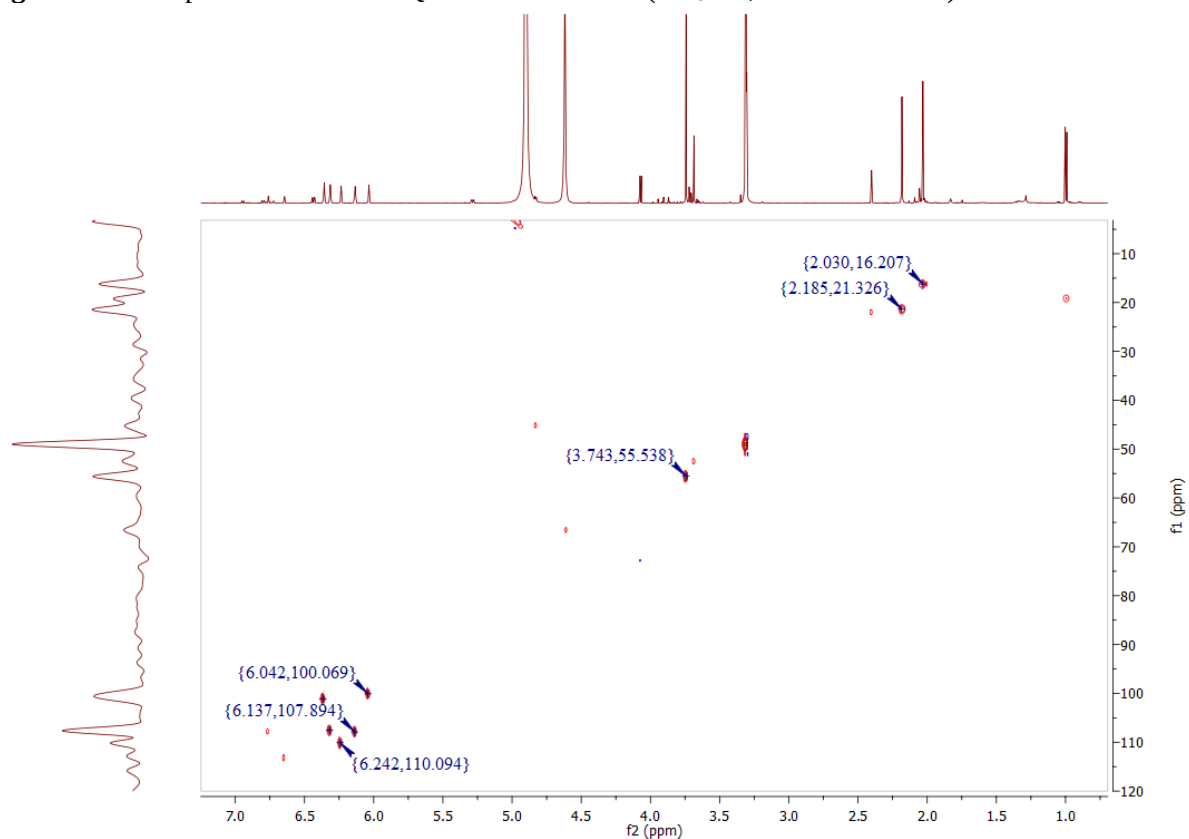
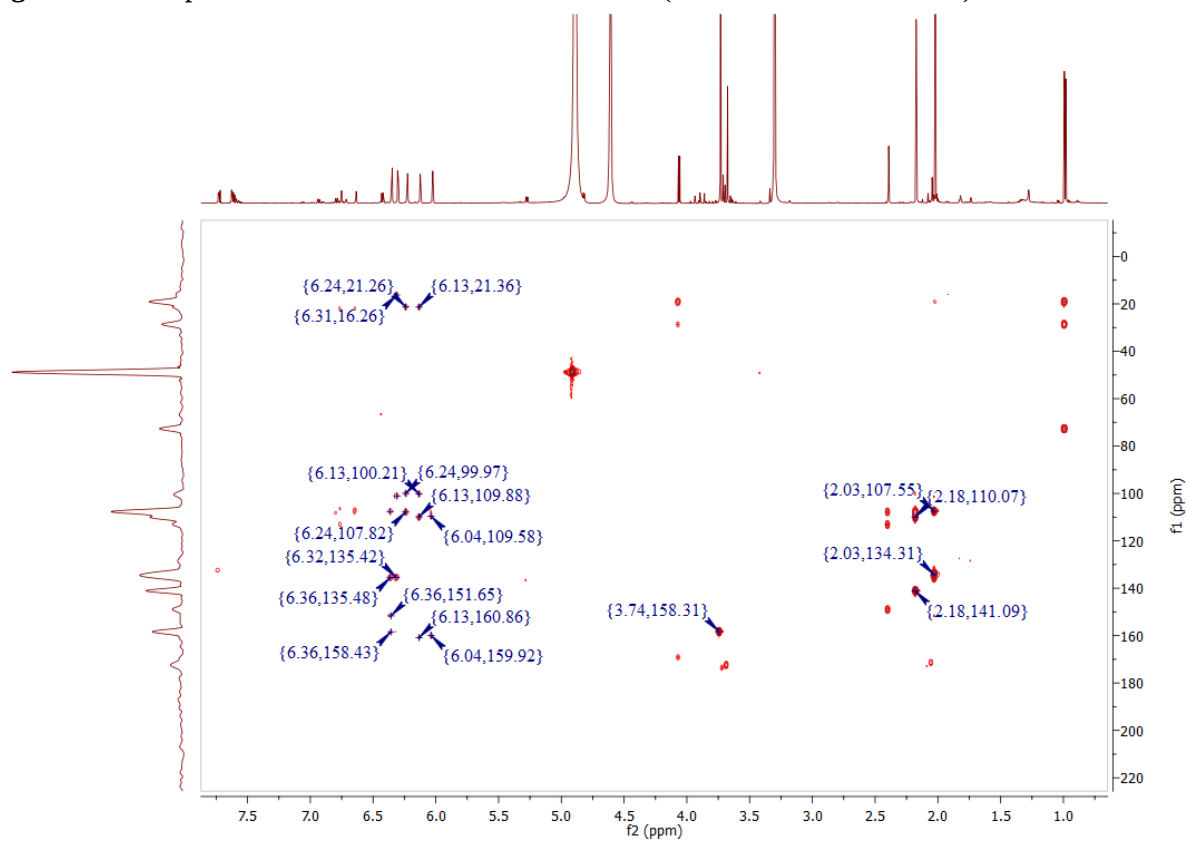
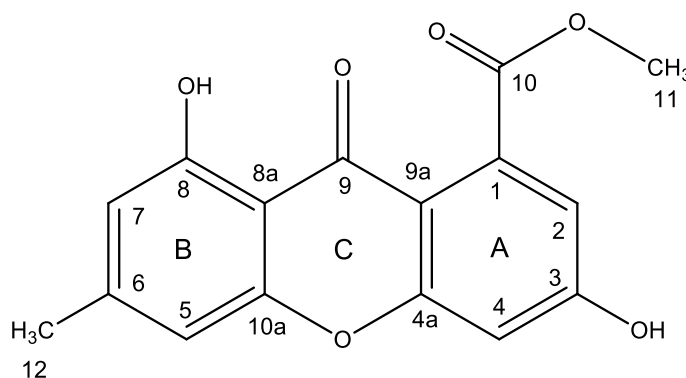
Figura 124 - Espectro de RMN de ^1H da substância **13** (CD_3OD ; 600 MHz).

Figura 125 - Mapa de contorno HSQC da substância **13** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).**Figura 126** - Mapa de contorno HMBC da substância **13** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).

- Identificação estrutural da substância **16**.

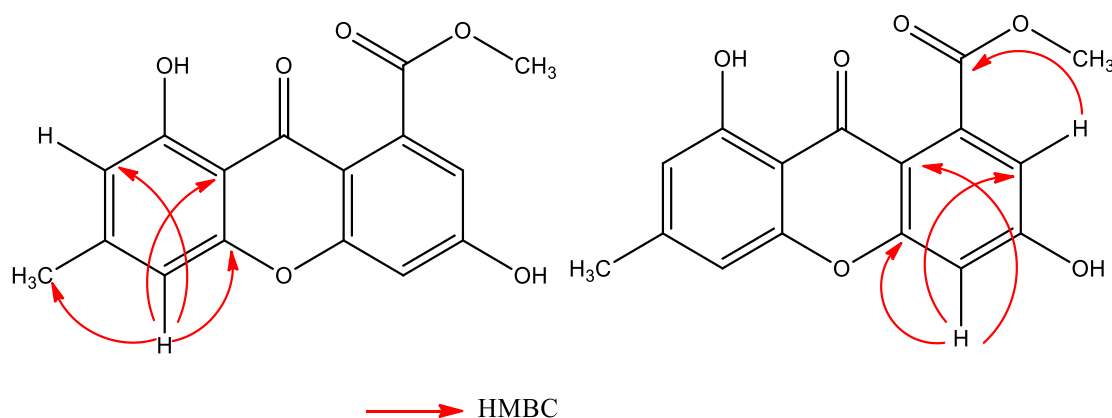


A análise conjunta dos dados de espectrometria de massas, ESI-Qq-TOF (Figura 131), modo positivo, apresentou para a substância **16** a molécula protonada m/z 301, 0705 $[M+H]^+$, o que associado aos experimentos RMN 1 e 2D (Figura 128, Figura 129 e Figura 130) permitiram propor a fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_6$.

A mesma metodologia de análise do espectro de RMN de 1H aplicada para a elucidação estrutural de **13** foi utilizada para elucidar a estrutura da substância **16**, pois apresentou perfil espectroscópico semelhante, diferindo de **13** pelos substituintes dos anéis aromáticos.

A análise do espectro de RMN de 1H de **16** evidenciou para os hidrogênios aromáticos constantes de acoplamentos em posição indicando acoplamento em *meta*, o que juntamente com as correlações observadas em HMBC mostraram que os hidrogênios aromáticos estão posicionados ao sistema aromático tetrassubstituído.

Com o experimento de HMBC foi possível confirmar a posição dos hidrogênios metílicos, com base nas correlações observadas entre $H-12 \leftrightarrow C-5(\delta_C 108,1)/C-6(\delta_C 149,8)/C-7(\delta_C 11,9)$ e dos hidrogênios aromáticos referentes ao anel B, $H-5 \leftrightarrow C-7(\delta_C 110,6)/C-8a(\delta_C 105,1)/C-10a(\delta_C 159,6)$ e $H-7 \leftrightarrow C-5(\delta_C 108,1)$. Para hidrogênios aromáticos referentes ao anel A, foram observadas correlações entre $H-2$ com $C-4(\delta_C 104,8)/C-9a(\delta_C 109,8)/C-10(\delta_C 171,2)$ e $H-4 \leftrightarrow C-2(\delta_C 113,8)/C-4a(\delta_C 159,6)/C-9a(\delta_C 109,8)$ (Figura 127).

Figura 127 - Principais correlações observadas no mapa de contorno de HMBC da substância **16**.

Os dados obtidos (**Tabela 26**) foram comparados com a literatura (HAMASAKI, TAKASHI; KIMURA, YASUO, 1983) e permitiram identificar a substância **16** como a 2,3-dihidroxi-6-metil-9-oxoxantona-1.

Tabela 26 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 MHz) de **16** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_{H}	δ_{C}
1	-	*
2	6,74 (<i>d</i> , 2,2)	113,2
3	-	*
4	6,83(<i>d</i> ; 2,3)	103,2
5	6,79 (<i>sl</i>)	107,1
6	-	148,6
7	6,79 (<i>sl</i>)	110,6
8	-	*
8a	-	105,1
9	-	*
9a	-	108,4
10	-	170,0
10a	-	155,6
11	3,95 (<i>s</i>)	52,0
12	2,41 (<i>sl</i>)	21,1

*Sinal não observado.

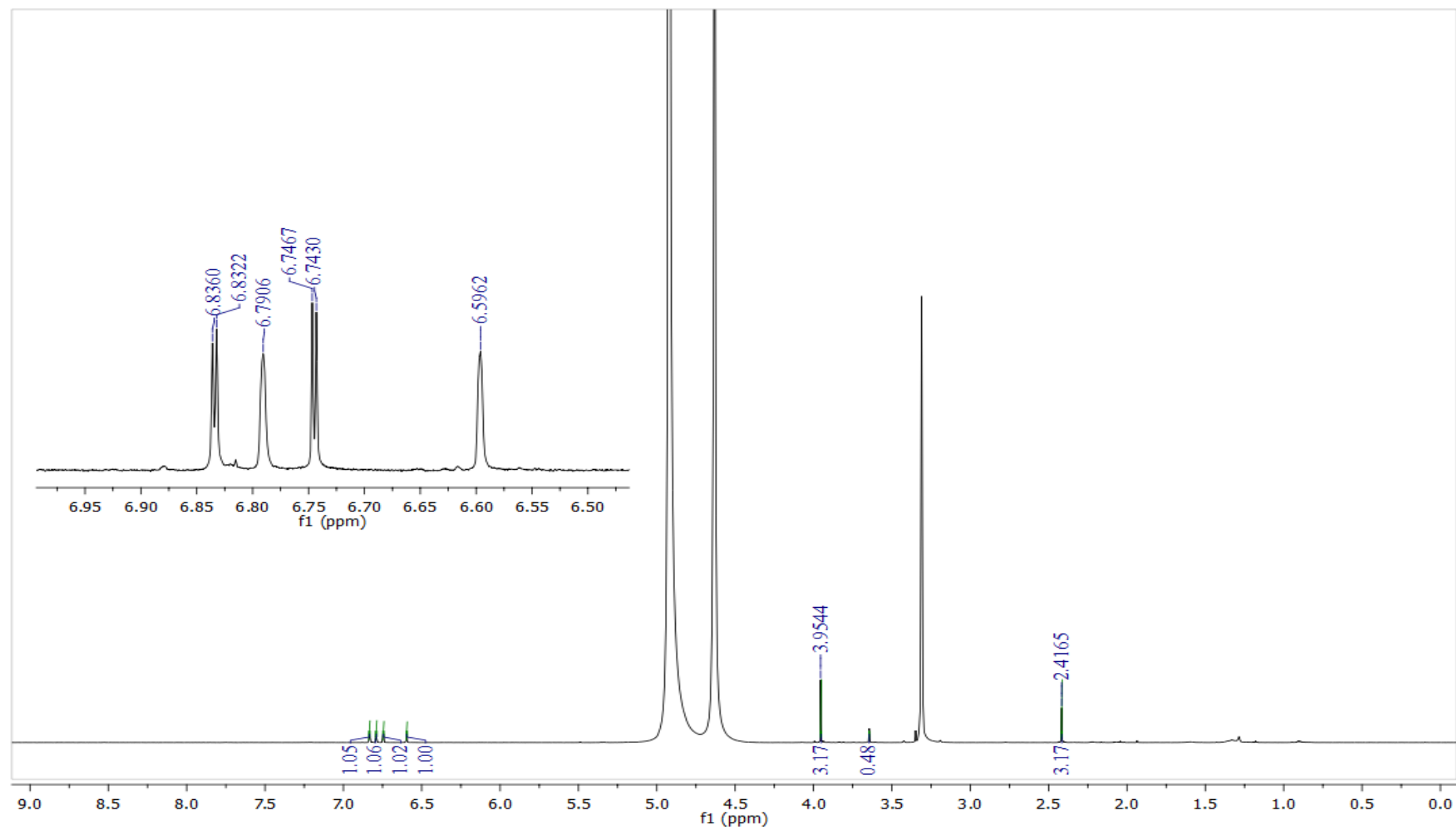
Figura 128 - Espectro de RMN de ^1H da substância **16** (CD_3OD ; 600 MHz).

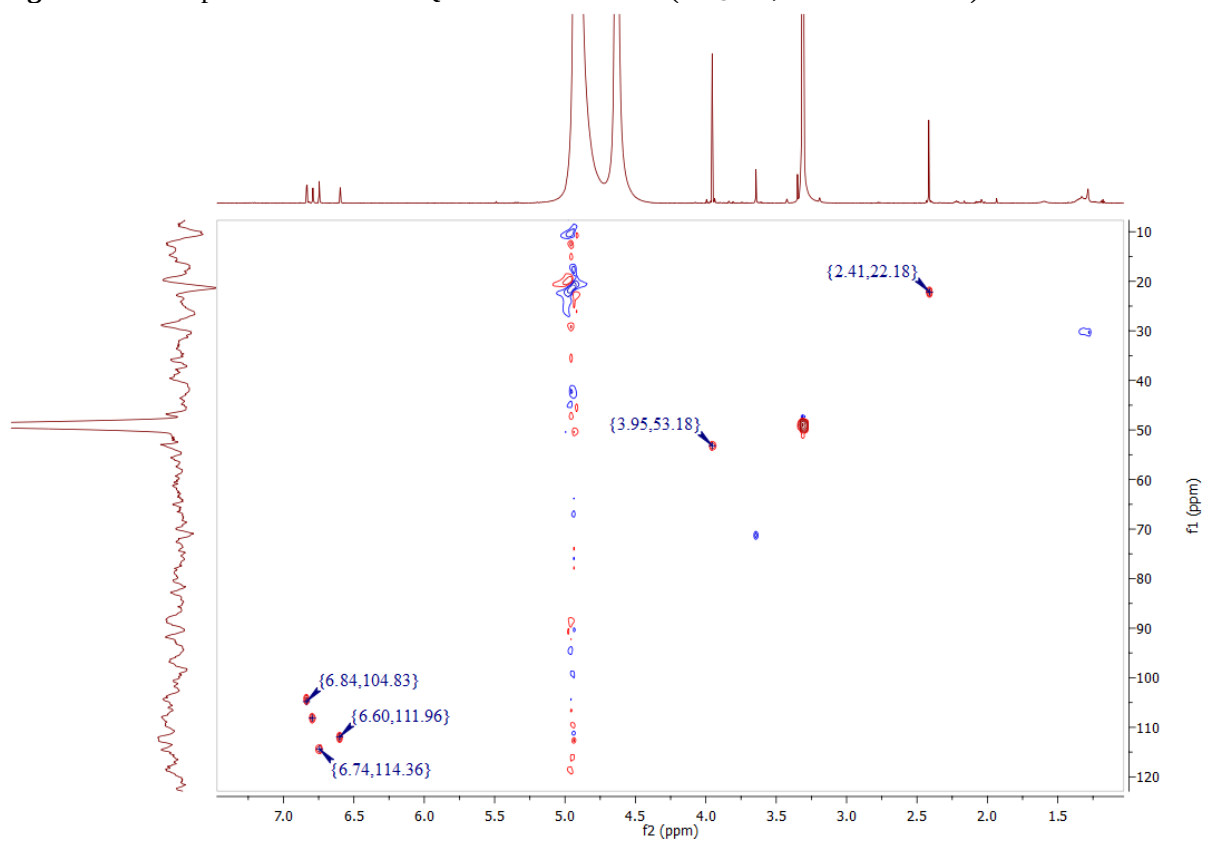
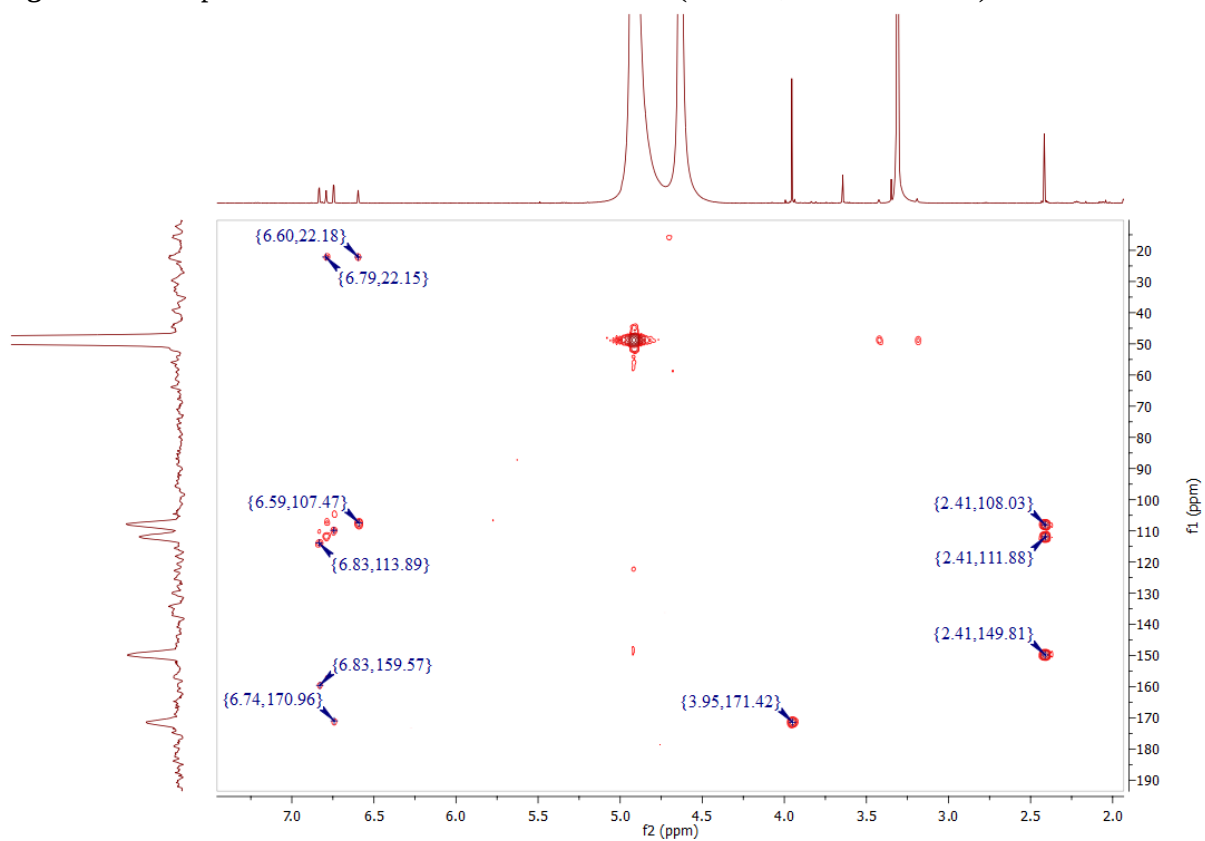
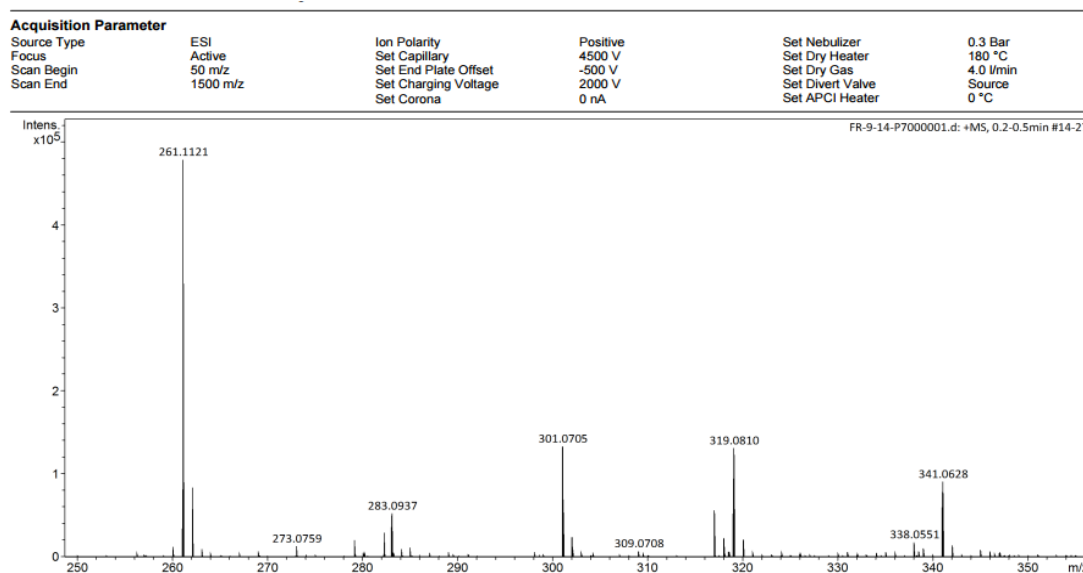
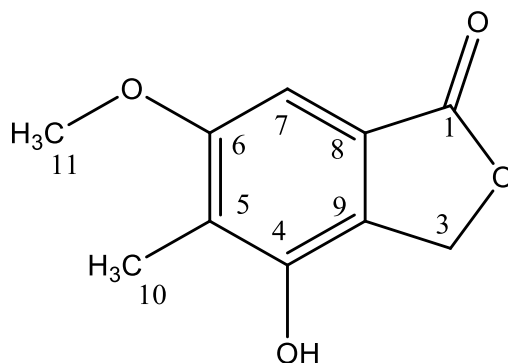
Figura 129 - Mapa de contorno HSQC da substância **16** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).**Figura 130** - Mapa de contorno HMBC da substância **16** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).

Figura 131 - Espectro de Massas de alta resolução da substância **16** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).



5.2.4 Outras classes

- Identificação estrutural da substância **21**.



A análise dos dados de espectrometria de massas, ESI-Qq-TOF (Figura 137), modo positivo, apresentou para a substância **21** a molécula protonada m/z 195,0655 $[M+H]^+$ e a formação da molécula cationizada m/z 217,0477 $[M+Na]^+$, o que associado aos experimentos RMN uni e bidimensionais permitiram propor a fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_4$.

Na análise conjunta dos dados de RMN de 1H e ^{13}C (Figura 133 e Figura 134), foram visualizados quatro singletos em δ_H 6,90 (1H; δ_C 98,2), 5,22 (2H; δ_C 69,7), 3,87 (3H; δ_C 56,4) e 2,16 (3H; δ_C 9,2), adicionalmente foram observados seis carbonos sp^2 , dos quais dois são

oxigenados (δ_C 151,2 e δ_C 161,4), um de carbonila, sendo em δ_C 174,2 atribuída a uma lactona, três olefínicos (δ_C 121,5; δ_C 124,9; 128,2).

O mapa de contorno HMBC (Figura 136) mostrou as correlações entre H-5a/5b $\leftrightarrow$ C-1/C-4/C-8/C-9, H-7 $\leftrightarrow$ C-1/C-5/C-6/C-8 e H-10 $\leftrightarrow$ C-4/C-5/C-6, evidenciando as conectividades essenciais para a confirmação da estrutura da substância **21**, como demonstrado na Figura 132. A estrutura proposta foi comparada com os dados da literatura (SUEMITSU, et al., 1993), permitindo identificá-la como a porriolida, porém com um padrão de substituição diferente, propondo uma nova substância descrita na literatura.

Figura 132 - Principais correlações observadas em HMBC para a substância **21**.

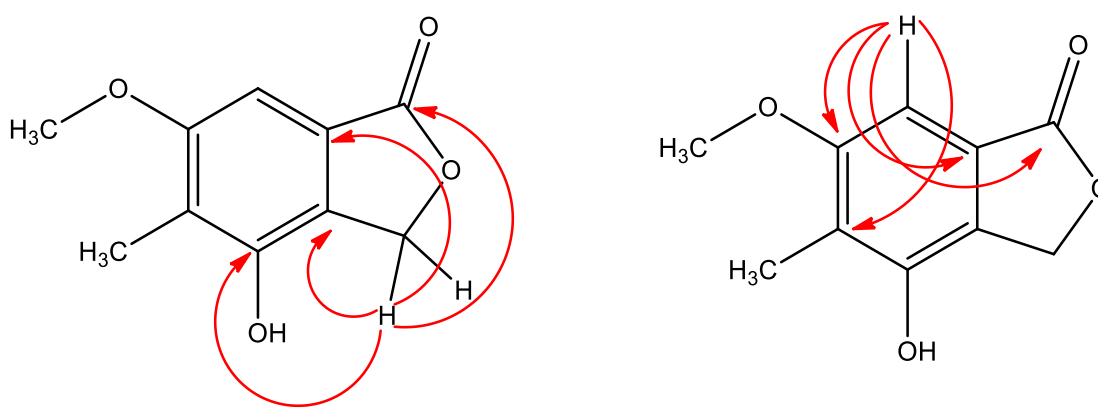


Tabela 27 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 600 e 150 MHz) da substância **21** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_H	δ_C
1	-	174,2
2	-	-
3	5,22 (s)	69,7
4	-	151,2
5	-	121,5
6	-	161,4
7	6,90 (s)	98,2
8	-	128,2
9	-	124,9
10	2,16 (s)	9,2
11	3,87 (s)	56,4

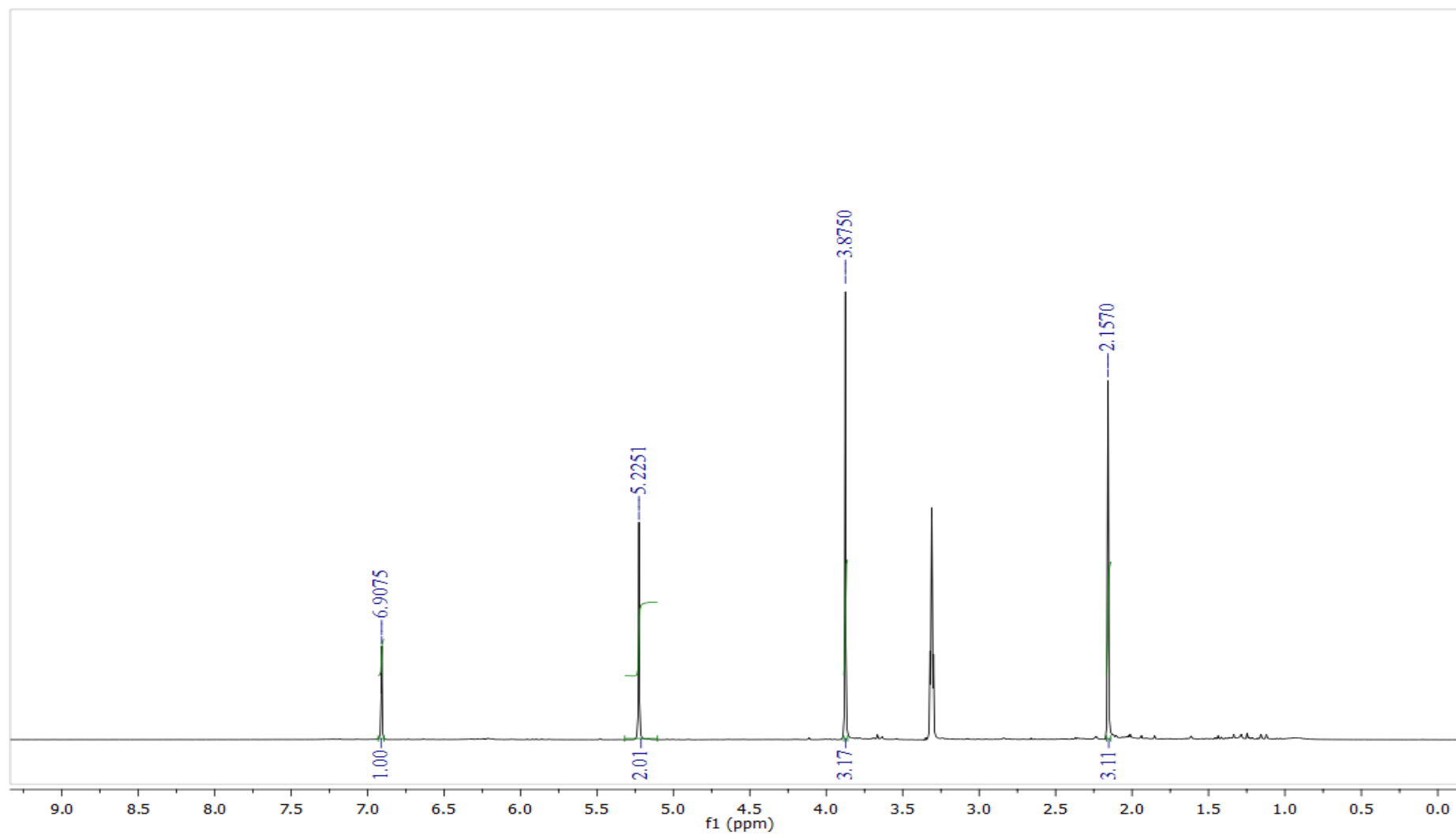
Figura 133 - Espectro de RMN de ^1H da substância **21** (CD_3OD ; 600 MHz).

Figura 134 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **21** (CD_3OD ; 150 MHz).

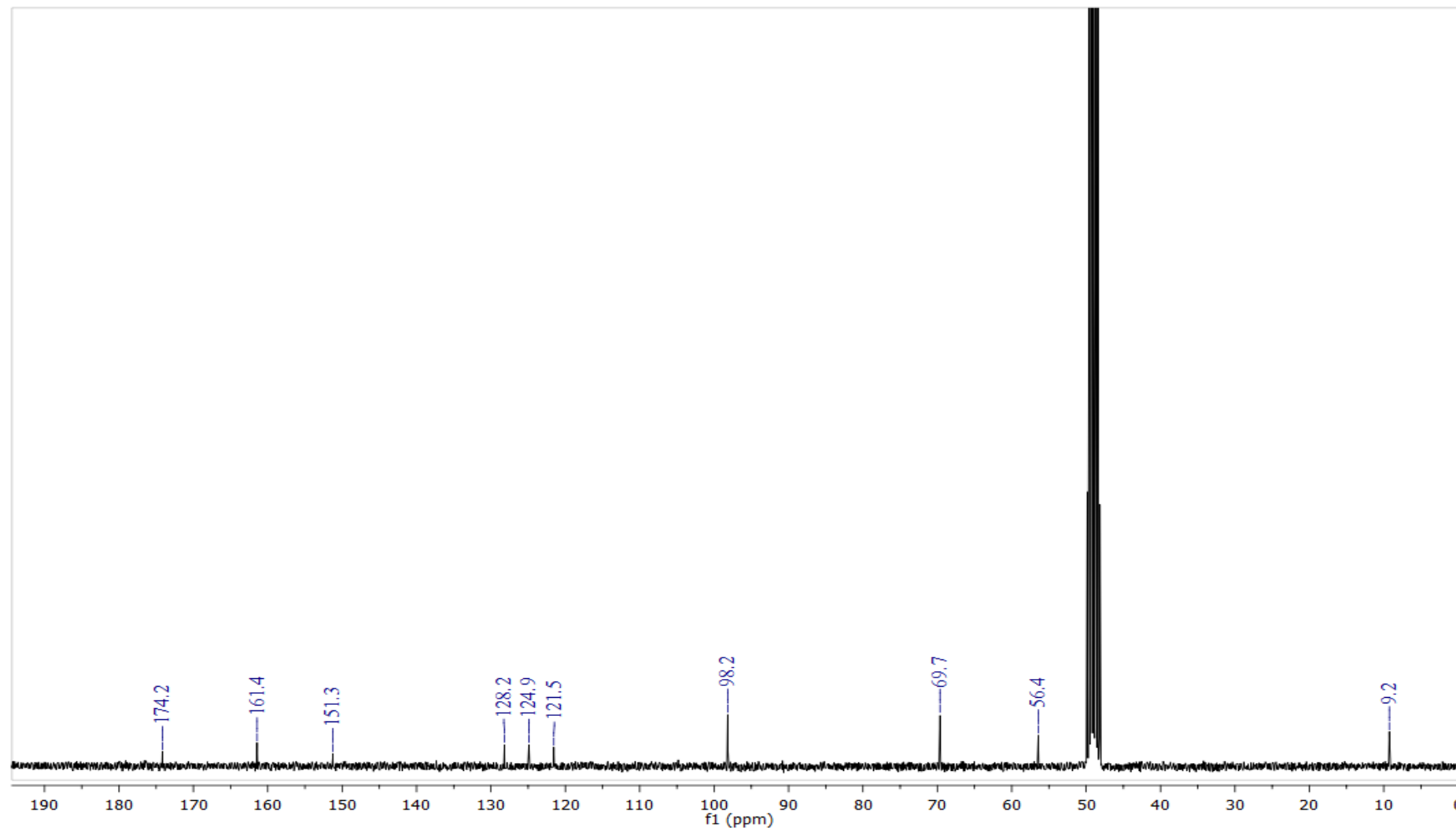


Figura 135 - Mapa de contorno HSQC da substância **21** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).

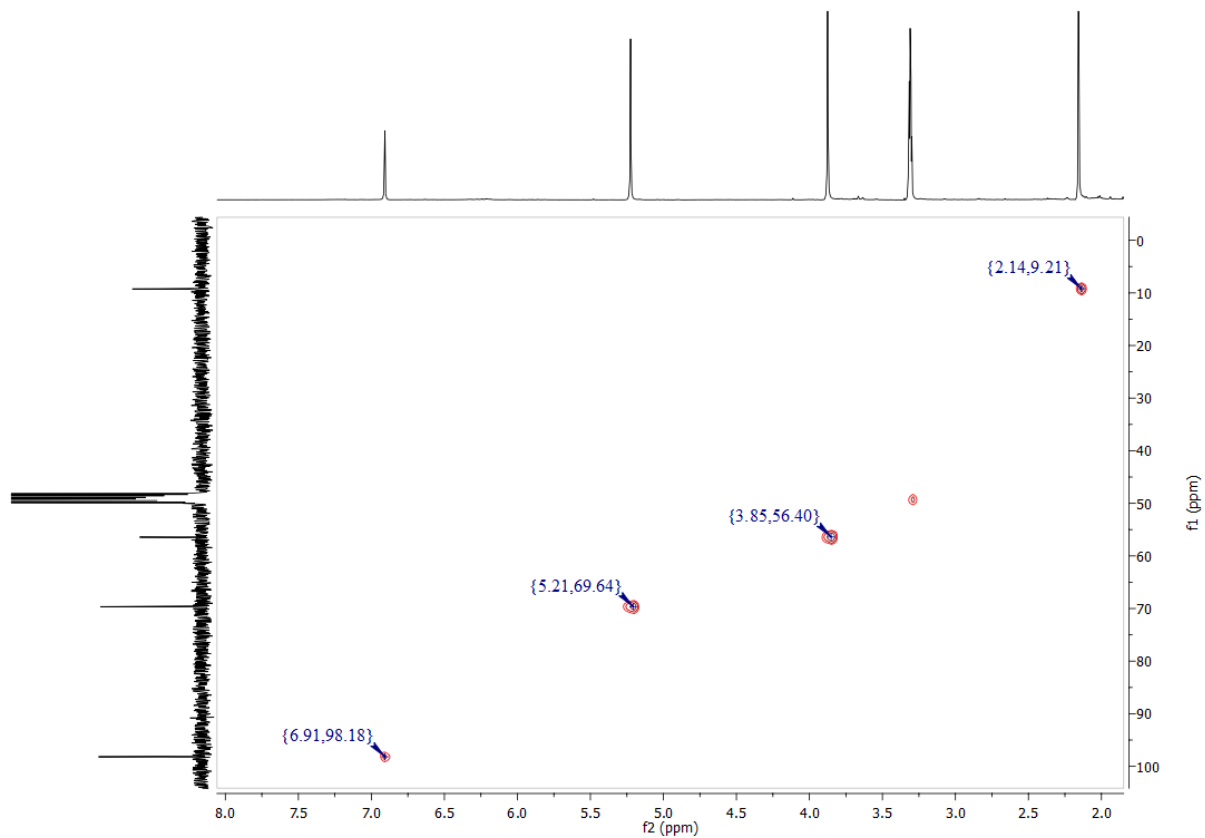


Figura 136 - Mapa de contorno HMBC da substância **21** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).

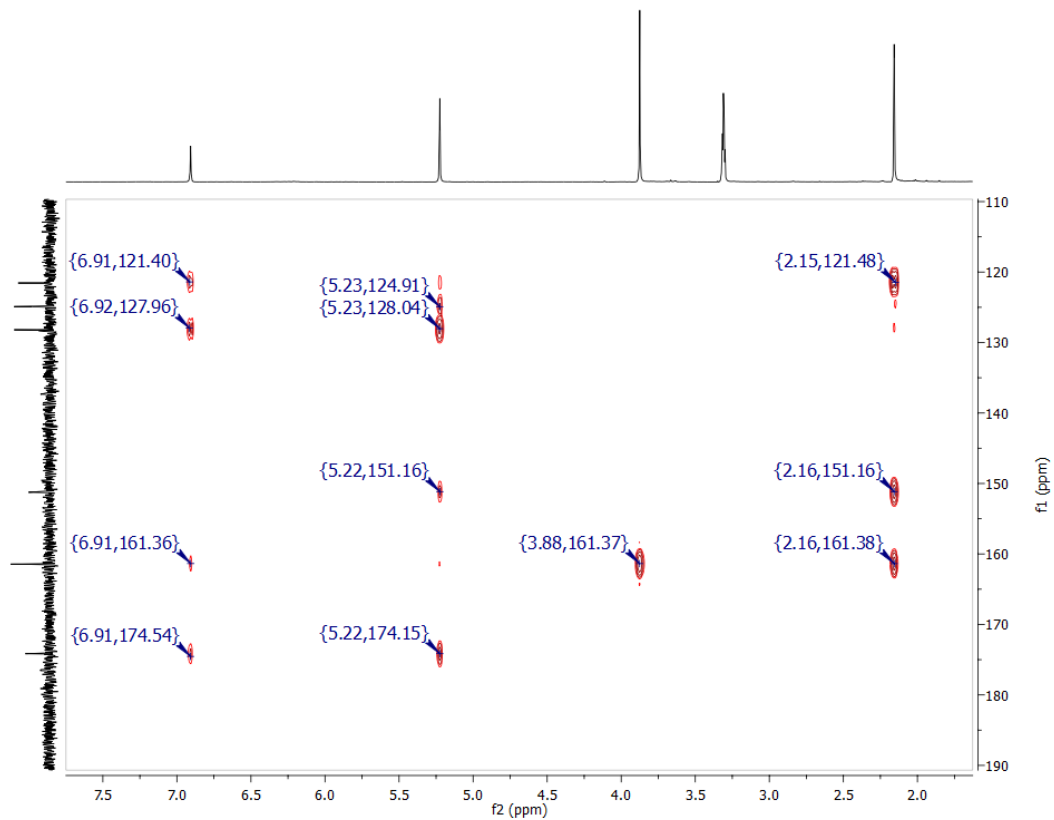
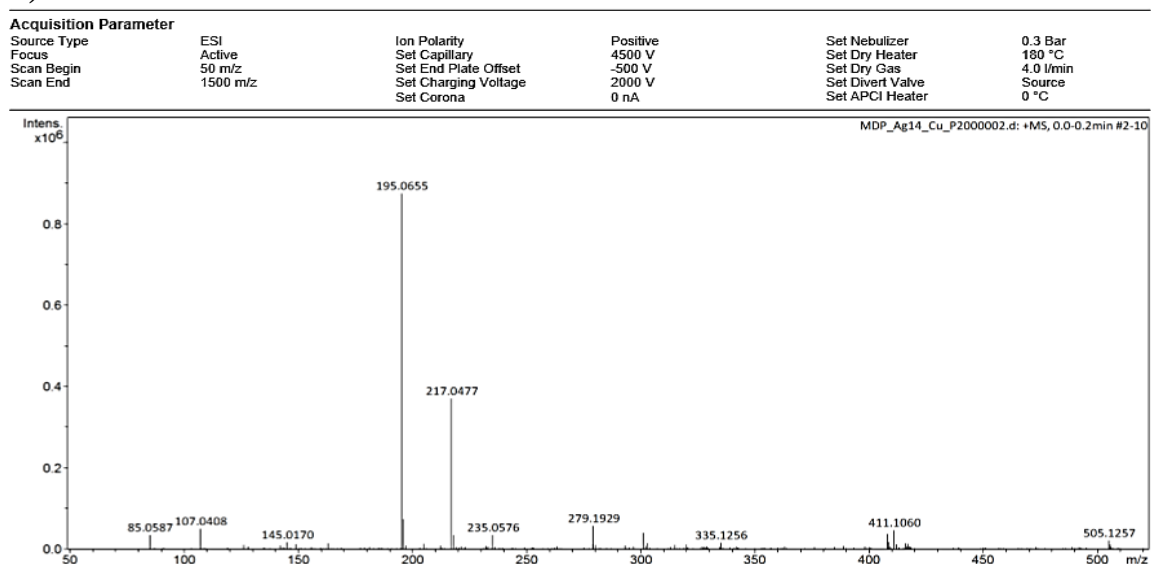
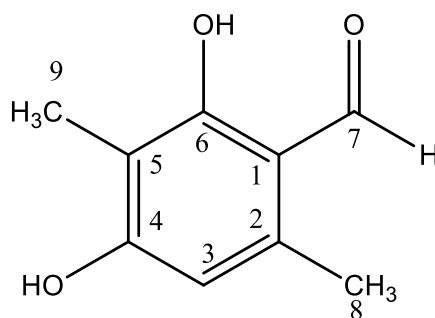


Figura 137 - Espectro de Massas de alta resolução da substância **21** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).



- Identificação estrutural da substância **22**.



A análise dos dados de espectrometria de massas, ESI-Qq-TOF (Figura 143), modo negativo, apresentou para a substância **21** a molécula desprotonada m/z 165,0563 $[M-H]^-$, o que associado aos experimentos RMN uni e bidimensionais permitiram propor a fórmula molecular $C_9H_{10}O_4$.

Os espectros de RMN de 1H e ^{13}C (Figura 139 e Figura 140) evidenciaram sinais referentes a duas metilas em δ_H 1,97 (s; δ_C 7,1) e δ_H 2,46 (s; δ_C 18,0), um hidrogênio aromático em δ_H 6,24 (s; δ_{Cb} 110,9) e um hidrogênio de um grupo aldeído em δ_H 10,02 (s; δ_C 194,5), além de quatro carbonos quaternários, sendo dois oxigenados (δ_C 110,0, δ_C 113,7, δ_C 164,9 e δ_C 165,1).

O experimento de NOESY 1D (Figura 142) revelou as interações espaciais entre a metila em δ_H 2,46 com H-3(δ_H 6,24) e H-7 (δ_H 10,02), esse dado aliado as correlações observadas no mapa de contorno HMBC (Figura 141) permitiram identificar a substância **22** como a 2,4-diidrox-3,6-dimetilbenzaldeído.

Figura 138 - Principais correlações observadas em HMBC e NOESY-1D para a substância **22**.

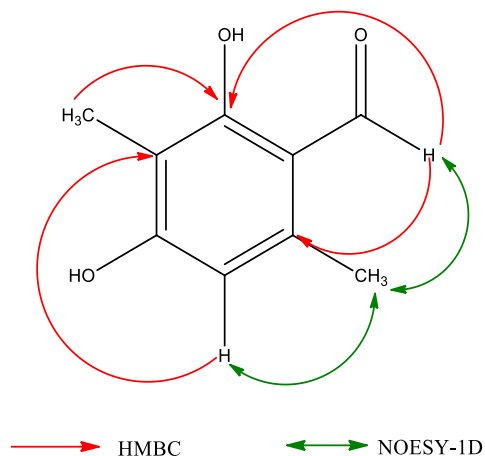


Tabela 28 - Dados de RMN de 1H e ^{13}C (CD₃OD, 600 e 150 MHz) da substância **22** (δ em ppm e J em Hz).

Posição	δ_H	δ_C
1	-	143,0
2	-	113,7
3	3,24(s)	110,9
4	-	164,9
5	-	110,0
6	-	165,1
7	10,02 (s)	194,5
8	1,97 (s)	7,1
9	2,46 (s)	18,0

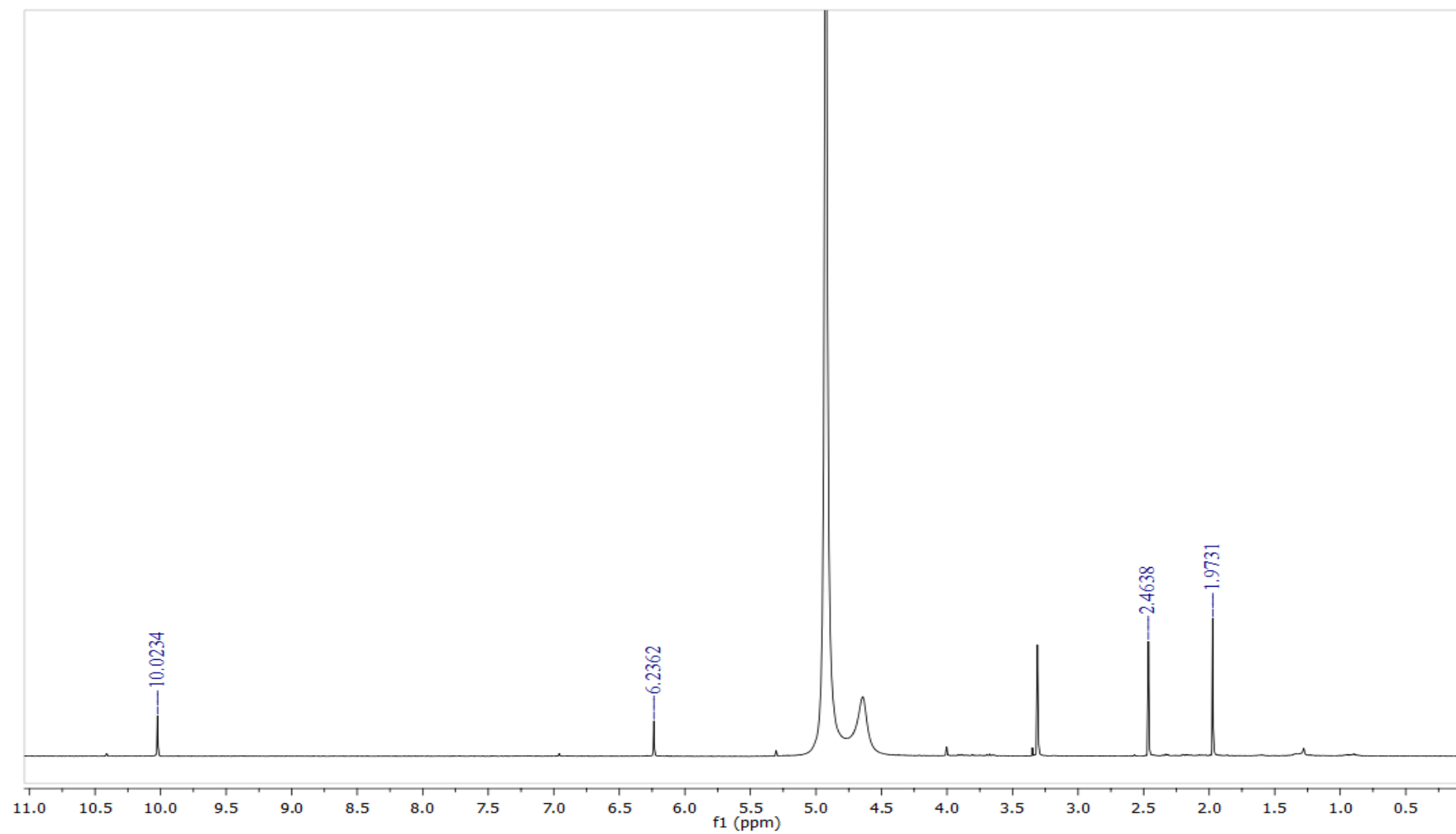
Figura 139 - Espectro de RMN de ^1H da substância **22** (CD_3OD ; 600 MHz).

Figura 140 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância **22**(CD_3OD ; 150MHz).

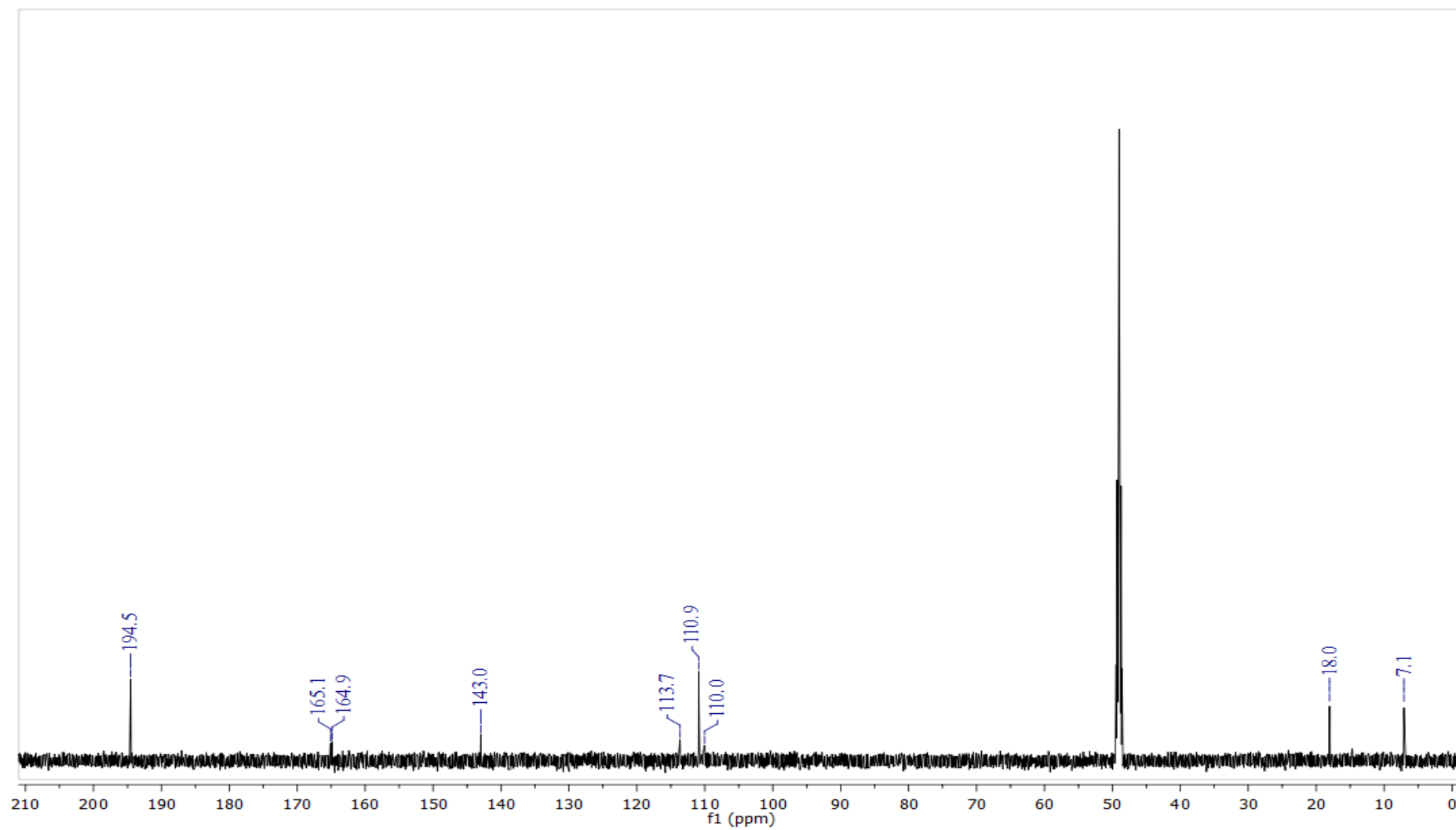


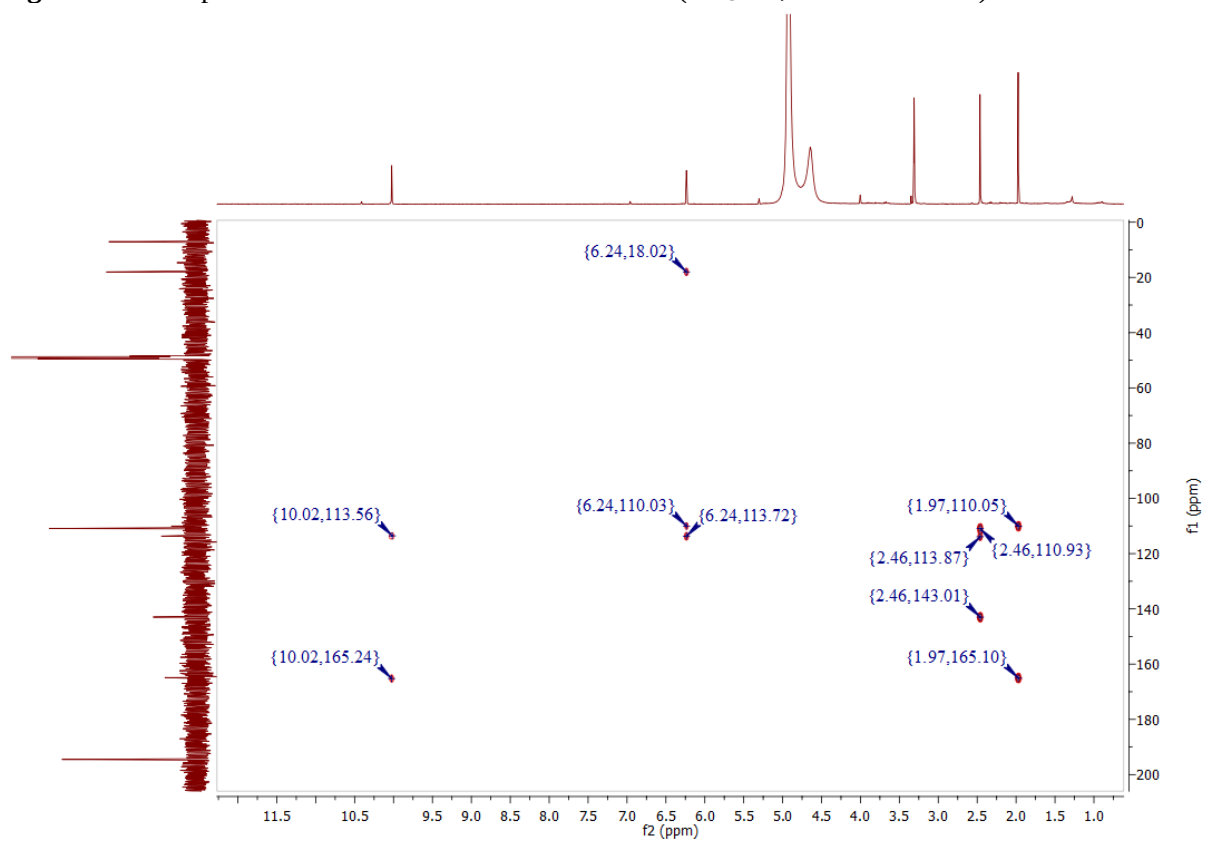
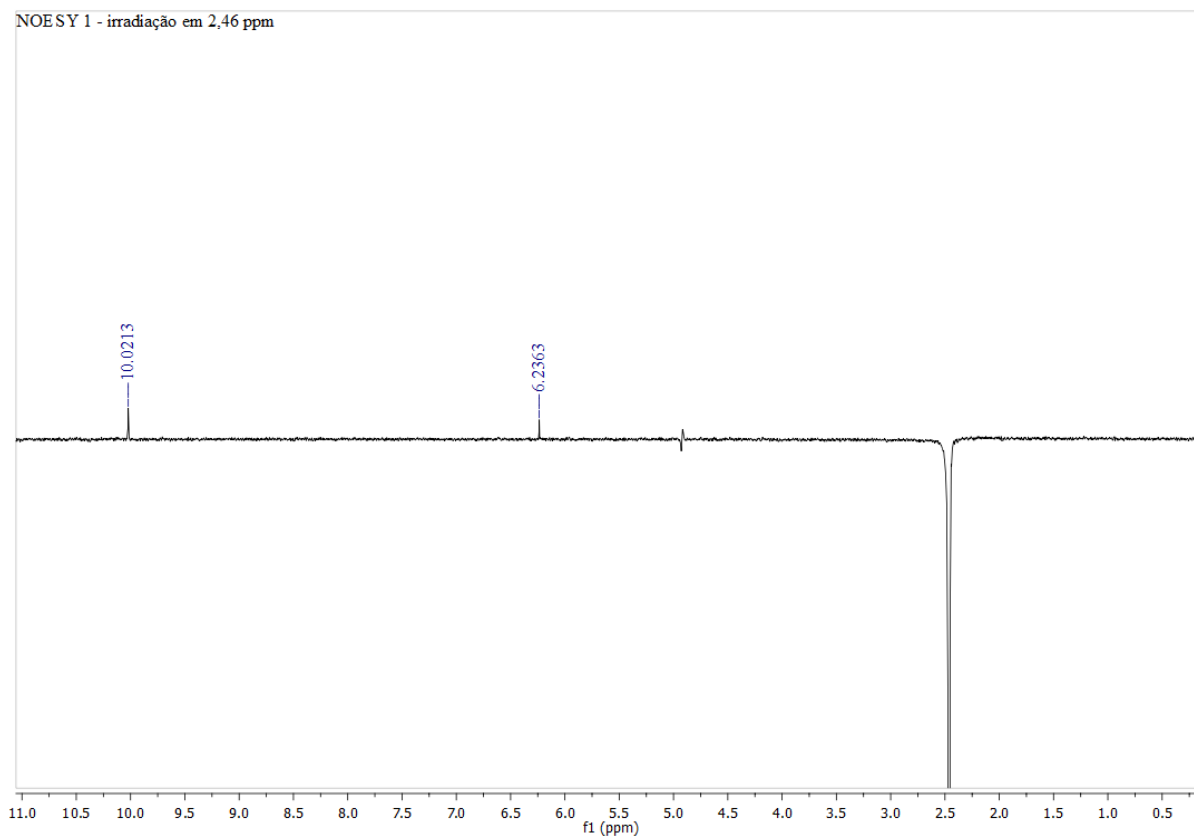
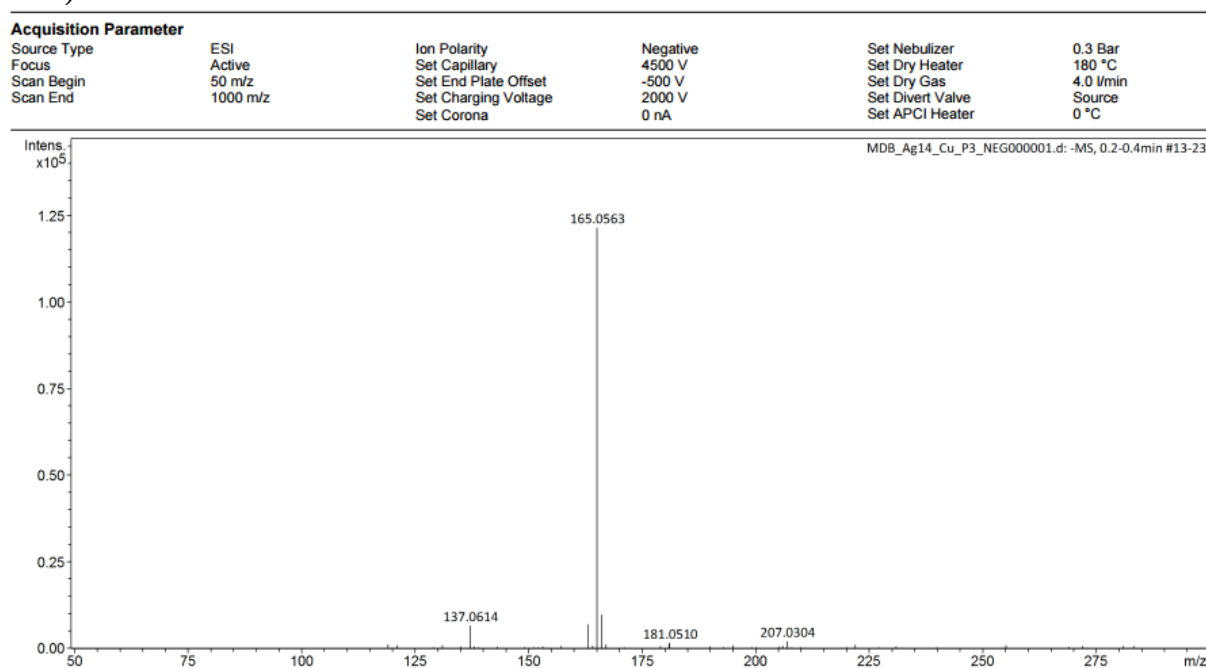
Figura 141 - Mapa de contorno HMBC da substância **22** (CD₃OD; 600 e 150 MHz).**Figura 142** - Espectro de NOESY 1D da substância **22** (CD₃OD; 600 MHz).

Figura 143 - Espectro de Massas de alta resolução da substância **22** (Bruker - MaXix Impact - ESI-Q-TOF).

5.3 Avaliação das atividades biológicas para as substâncias isoladas

As substâncias isoladas, que apresentaram massa significativa, foram avaliadas frente a duas atividades biológicas: erradicação de biofilme e potencial fitotóxico.

5.3.1 Erradicação de biofilme

Infecções, causadas por agentes etiológicos amplamente resistentes aos antimicrobianos, representam um dos grandes desafios atuais da saúde pública, acarretando em altas taxas de morbi-mortalidade, aumento no tempo de internação e nos gastos do sistema de saúde (NEIDELL *et al.*, 2012).

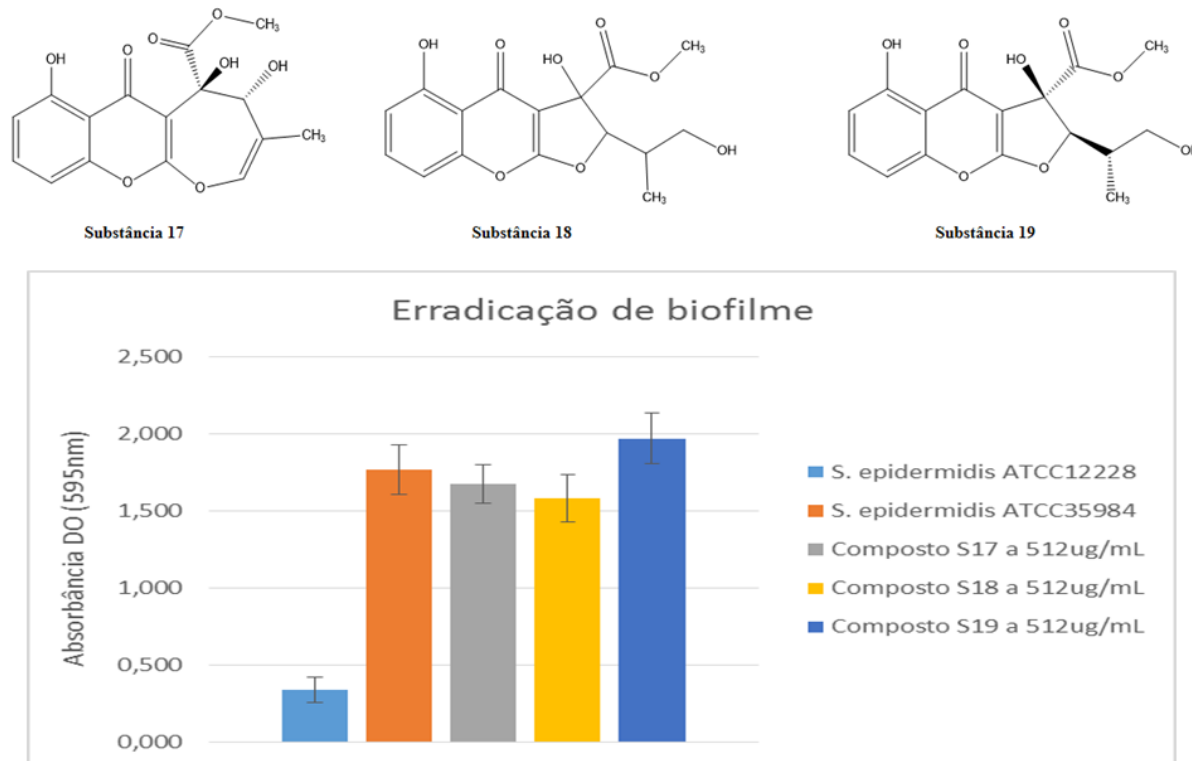
Estima-se que 80% das infecções humanas estejam associadas a biofilmes bacterianos, especialmente aquelas que envolvem implantes biomédicos, como próteses e cateteres. Devido ao aumento da expectativa de vida humana, maior é a necessidade de substituição de funções biológicas, aumentando, assim, o número de pessoas que receberão algum dispositivo implantável. Nesse sentido, grandes esforços são destinados à busca de terapias, capazes de prevenir ou erradicar biofilmes patogênicos, incluindo a pesquisa de

novas substâncias, novos mecanismos de ação e a criação de materiais com superfícies anti-infectivas.

As substâncias **17**, **18** e **19** isoladas a partir do cultivo de *Preussia* sp. em milho, foram avaliadas, pelo ensaio de determinação da capacidade de erradicação do biofilme formado pelas bactérias *S. epidermidis* ATCC 34984, linhagem considerada boa formadora de biofilme, e *S. epidermidis* ATCC 12228, linhagem má formadora de biofilme.

A capacidade de erradicação do biofilme formado pela *S. epidermidis* ATCC 34984, foi analisada (Figura 144), e a substância **18** apresentou capacidade de erradicação do biofilme, enquanto as substâncias **17** e **19** não apresentaram capacidade, sendo que a substância **19**, um diastereoisômero de **18**, apresentou um efeito contrário, ou seja, observou-se um aumento no crescimento do biofilme formado pela bactéria *S. epidermidis* ATCC 34984. A mudança na estereoquímica conduz a alteração na resposta estrutura-atividade.

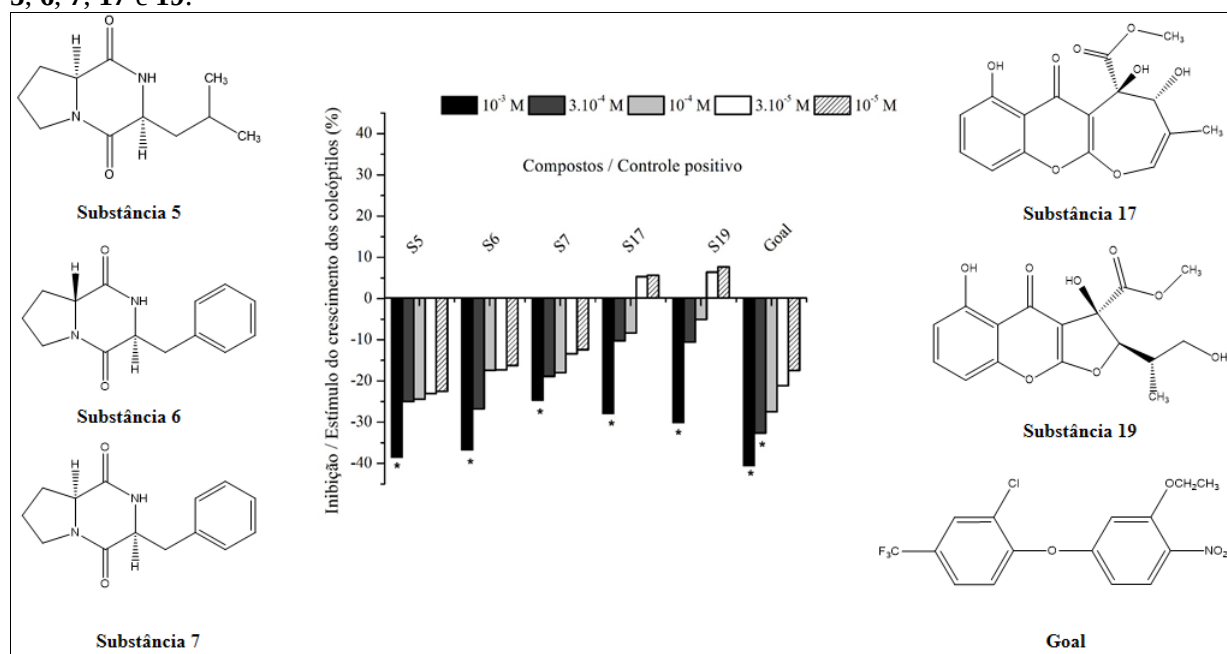
Figura 144 - Capacidade de erradicação do biofilme da *S. epidermidis* ATCC 34894 depois do tratamento com as substâncias **17**, **18**, e **19**.



5.3.2 Avaliação da atividade fitotóxica sobre o crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L.)

As substâncias **5**, **6**, **7**, **17** e **19** foram avaliadas frente a atividade fitotóxica sobre o crescimento de coleóptilos de trigo (*Triticum aestivum* L.) e inibiram o crescimento dos coleóptilos de trigo na maior concentração testada, 10^{-3} mol L⁻¹, (Figura 145), comparados com os coleóptilos crescidos sob o efeito do controle negativo (solução tampão). Observou-se que nas concentrações $3 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ e 10^{-5} mol L⁻¹, as substâncias **17** e **19** provocaram um aumento crescimento dos coleóptilos (Figura 145).

Figura 145 - Inibição/estímulo do crescimento dos coleóptilos de trigo sob a atividade das substâncias **5**, **6**, **7**, **17** e **19**.



Estes dados demonstram que as substâncias testadas alteram as condições bioquímicas e fisiológicas dos coleóptilos de trigo, influenciando o crescimento, dormência e germinação destes. Assim estas substâncias podem ser utilizadas como herbicidas naturais ou servir de modelo para a síntese de produtos mais específicos e menos prejudiciais ao ambiente.

Os herbicidas naturais possuem algumas vantagens sobre os sintéticos como a ausência de compostos halogenados em sua composição, menor tempo de meia-vida, maior solubilidade em água e menor susceptibilidade de desenvolvimento de resistências das espécies infestantes (HABERMANN, et al., 2015). Estes dados impulsionam a busca por substâncias com a capacidade de inibição de ervas daninhas causadoras de grandes prejuízos na agricultura.

5.4 Considerações preliminares

Diferentes abordagens são essenciais na exploração do perfil químico dos fungos endofíticos, uma vez que o cultivo em laboratório não possui todas as características para mimetizar o habitat natural dos micro-organismos e não exploram de maneira completa toda diversidade das vias biossintéticas. Na era pós-genômica, obteve-se muita informação a respeito da biossíntese de metabólitos secundários, assim como foi possível a observação de que o número de genes codificando as enzimas biossintéticas, em fungos, superam o número de metabólitos secundários sintetizados por esses micro-organismos, indicando assim que apenas uma determinada quantidade genes responsáveis pelas vias metabólicas são expressos em condições laboratoriais (HERTWECK, 2009).

As três abordagens aplicadas para verificar a influência da composição do meio de cultivo na produção metabólica de *Preussia* sp., mostraram que esse micro-organismo é sensível ao meio de cultivo e que a alteração do meio induz diferentes genes biossintéticos, aumentando significativamente a produção qualitativa de metabólitos secundários.

O cultivo em meio de MDB promoveu majoritariamente a produção da classe das dicetopiperazinas. Estas são biossintetizadas pela condensação de dois ou mais aminoácidos, sendo que o MDB em sua composição possui aminoácidos livres, sugerindo que *Preussia* sp. expressou somente uma pequena quantidade de genes. Em contrapartida, o cultivo em meio sólido (Milho) produziu substâncias da via policetílica, indicando que as enzimas PKSs (policetídeo sintase) foram expressas, decorrente da ativação dos genes silenciados, responsáveis por essa classe de metabólitos. O conhecimento prévio da produção metabólica de *Preussia* sp em MDB, conduziu a incorporação de íons cobres ao meio de cultivo, o qual elicitou a via biossintética das cromonas, estas também oriundas da via policetílica, anteriormente não observada na ausência do metal.

Conclusões e Perspectivas.

6. Conclusões e Perspectivas

A estratégia experimental multidisciplinar utilizada no decorrer deste trabalho bem como os resultados aqui descritos e discutidos permitem fundamentar a hipótese de que fungos endofíticos compreendem um grupo de micro-organismos que possuem uma enorme capacidade na produção de substâncias bioativas com potencial para serem utilizados na indústria farmacêutica e agroquímica, além agregar valor aos produtos oriundos da biodiversidade brasileira.

As duas variedades morfoanatômicas da espécie vegetal *Casearia sylvestris* mostraram-se ser hospedeiras de diversos fungos endofíticos, sendo que neste trabalho isolou-se 24 linhagens (11 linhagens de *C. sylvestris* var. *lingua* e 13 linhagens de *C. sylvestris* var. *sylvestris*) que resultaram em extratos brutos promissores na produção de substâncias bioativas. A variação metabólica observada pela análise dos dados de RMN de ^1H e CLAE-DAD dos extratos brutos das linhagens cultivadas foi muito distinta, evidenciando diversas classes de metabólitos secundários. Esta observação sugere que essas substâncias estejam exercendo um possível papel ecológico na espécie vegetal. A potencialidade destes extratos frente as atividades anticolinesterásica e antifúngica e ensaios para avaliação da atividade herbicida, assim como atividade citotóxica foram surpreendentes, considerando que todas as linhagens apresentaram uma ou mais substâncias com potencial atividade.

Tais resultados poderão ser utilizados na fundamentação de futuros trabalhos acerca da escolha de matrizes para cultivo de fungos endofíticos isolados desta espécie para fins medicinais e biotecnológicos, no estudo das rotas biossintéticas para a produção dos metabólitos secundários de interesse, na condução de ensaios de atividades biológicas e, finalmente, no melhor conhecimento da nossa biodiversidade.

A abordagem OSMAC adotada para o estudo do perfil químico de *Preussia* sp. proporcionou alterações marcantes na produção metabólica e garantiu a obtenção de diferentes compostos a partir de uma mesma linhagem fúngica, evidenciando o enorme potencial dos micro-organismos para estudos de bioprospecção, já que essas variações ou uso de eliciadores, podem influenciar a ativação de vias biossintéticas silenciadas e assim, aumentar diversidade de substâncias produzidas.

Em estudos realizados com extratos de folhas de *C. sylvestris* var. *lingua* de diversos biomas brasileiros apresentaram majoritariamente a produção de compostos fenólicos,

principalmente flavonoides glicosilados. O cultivo de *Preussia* sp. isolado das folhas da *C. sylvestris* var. *lingua* resultou no isolamento de um isoflanoide, o que lança questionamentos se esses dois organismos produzem estas substâncias pelas mesmas vias ou vias distintas e se for pela mesma via biossintética teria sido possível pela transposição de genes? Esses questionamentos são prioritários para estudos futuros permitindo a compreensão da interação endófito-espécie vegetal hospedeira.

Os derivados de xantonas são encontrados com frequência como compostos bioativos de plantas e fungos, mas apenas um número limitado de oxepinocromanonas e furocromanonas têm sido relatadas na literatura. O isolamento de duas substâncias inéditas pertencentes a estas classes, reforçam o estudo deste micro-organismo como fonte de novas substâncias potencialmente bioativas desta classe.

Pesquisa realizada na base de dados DNP (*Dictionary of Natural Products*) verificou a apenas trinta e dois compostos isolados para esse gênero, indicando que este micro-organismo é pouco estudado. Neste trabalho, vale ressaltar, o isolamento e identificação de vinte duas substâncias deste micro-organismo, que contribui para a compreensão da quimiodiversidade desse endófito, sendo que essas substâncias estão sendo relatadas pela primeira vez para esse micro-organismo.

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a potencialidade do estudo neste nicho de micro-organismos, principalmente quando considera-se a taxa de extinção da biodiversidade que abriga inúmeros endófitos que nem sequer foram descritos e consequentemente explorados do ponto de vista químico e biológico.

Referências.

REFERENCIAS

ADAMCZESKI, M.; REED, A. R.; CREWS, P. New and know diketopiperazines from the Caribbean sponge, Calyx CF. Podatyda. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 2, p. 201-208, 1995.

ALMEIDA, J. R. G. S. et al. Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 258-264, 2014. Edição especial.

BAE, H. et al. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 3279-3295, 2009.

BAILEY, B. A. et al. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. **Planta**, v. 224, p. 1449-1464, 2006.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BASILE, A. C. et al. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris* I: preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, n. 2, p. 185-197, 1990.

BERRIDGE, M. V. et al. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, n. 1, p. 14-19, 1996.

BERTRAND, S. et al. De novo production of metabolites by fungal co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1157-1165, 2013.

BILLS, G. F. Analysis of microfungal diversity from a users perspective. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. 1, p. S33-S41, 1995.

BODE, H. B. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBioChem**, v. 3, p. 619-627, 2002.

BRAKHAGE, A. A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites-strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48. p. 15-22, 2011.

BROWNELL, A. et al. 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity-assessed by ultra high resolution positron emission tomography with comparison to magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, n. 5, p. 1206-1214, 2004.

- BUENO, P. C. P. **Variabilidade química infraespecífica e dinâmica de metabólitos secundários fenólicos e diterpênicos em *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae): correlação metabolômica e proteômica utilizando cromatografia, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear e quimiometria.** 2015. 254 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.
- CARVALHO, E. S.; SANTOS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Sw. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 277-284, 2009.
- CARVALHO, P. R. F. et al. Acetylated DNA-damage clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1659-1662, 1998.
- CAVALCANTE, L. G. W. et al. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 490-497, 2007.
- CICHEWICZ, R. H. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 11-22, 2010.
- CHANG, T. S. et al. Metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein by fungi used in the preparation of various fermented soybean foods. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 5, p. 1330-1333, 2007.
- CHIANG, Y. et al. Unlocking fungal cryptic natural products. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 11, p. 1505-1510, 2009.
- CHOMCHEON, P. et al. 3-Nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: is 3-NPA in some plants produced by endophytes? **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1103-1105, 2005.
- CHOMCHEON, P. et al. Metabolites from the endophytic mitosporic *Dothideomycete* sp. LRUB20. **Phytochemistry**, v. 70, p. 121-127, 2009.
- COLEMAN, J. J. et al. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. **ACS Chemical Biology**, v. 5, n. 3, p. 321-332, 2010.
- COPPING, L. G.; DUKE, S. O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. **Pest Management Science**, v. 63, p. 524-554, 2007.
- COX, C. B.; MOORE, P. D. **Biogeografia: uma abordagem ecológica e evolucionária.** 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009. 412 p.
- CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 703-723, Mar. 2014.
- DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 185-201, 2014.

- DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 499-514, 2000.
- DEWICK, P. M. The acetate pathway: fatty acids and polyketides. In: _____. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002. Chap. 3, p. 35-120.
- DING, G. et al. Photopyrones A and B, new pyrone derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis photiniae*. **Journal Antibiotics**, v. 65, p. 271-273, 2012.
- EL-SEEDI, R. H. et al. Naturally occurring xanthenes; latest investigations: isolation, structure elucidation and chemosystematic significance. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 2581-2626, 2009.
- FAETH, S. H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? **OIKOS**, v. 98, p. 25-36, 2002.
- FDHILA, F. et al. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1299-1301, 2003.
- FERREIRA, P. M. P. et al. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1-12, 2011.
- FIL, P.-T. et al. Copper and manganese cations alter secondary metabolism in the fungus *Penicillium brasilianum*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, 2016. Ahead of print. doi:10.5935/0103-5053.20160163.
- FLORES, A. C. et al. Production of 3-nitropropionic acid by endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from *Trichilia elegans* A. JUSS ssp. *elegans* and evaluation of biological activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 923-932, 2013.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.
- GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.
- HAMASAKI, T.; KIMURA, Y. Isolation and structures of four new metabolites from *Aspergillus wentii*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 163-165, 1983.
- HUANG, R. et al. A new isoflavone derivative from *Streptomyces* sp. YIM GS3536. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, n. 6, p. 966-969, 2013.
- KAJULA, M. et al. Bridged epipolythiodiketopiperazines from *Penicillium raciborskii*, an endophytic fungus of *Rhododendron tomentosum* Harmaja. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 4, p. 685-1690, 2016.

- KERI, S. R. et al. Chromones as a privileged scaffold in drug discovery: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 78, p. 340-374, 2014.
- KROHN, K. et. al. Xanthones and oxepino [2,3-b] chromones from three endophytic fungi. **Chemical European Journal**. v. 15, p. 12121-12132, 2009.
- KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1203-1207, 2011
- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 792-798, 2012.
- KUSARI, S.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 1, p. 2-7, 2009.
- KUSARI, S. et al. Implications of endophyte-plant crosstalk in light of quorum responses for plant biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 5383-5390, 2015.
- LIU, Y. et al. A new polyketide from *Diaporthe* sp. SXZ-19, an endophytic fungal strain of *Camptotheca acuminata*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 22, p. 2100-2104, 2013.
- LUBBE, A.; VERPOORTE, R. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 785-801, 2011.
- MA, Y. et al. Structural diversity and biological activities of indole diketopiperazine alkaloids from fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2016. Ahead of print. doi:10.1021/acs.jafc.6b01772
- MAISTRO, E. L.; CARVALHO J. C.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 3, p. 337-342, 2004.
- MAPPERSON, R. R. et al. The diversity and antimicrobial activity of *Preussia* sp. Endophytes isolated from australian dry rainforests. **Current Microbiology**, v. 68, p. 30-37, 2014.
- MARQUETE, R. **O gênero Casearia Jacq. no Brasil**. 2010. 438 f. Tese (Doutorado em Botânica) - Escola Nacional de Botânica Tropical, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- MASTERS, S.; BRÄSE, S. Xanthones from fungi, lichens, and bacteria: the natural products and their synthesis. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 3717-3776, 2012.
- MULLER, C. B.; KRAUSS, J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 450-456, 2005.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Endophytic and epiphytic microbes as “sources” of bioactive agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, 2015. doi:10.3389/fchem.2015.00034.

- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, Mar. 2016.
- NEWMAN, D. J.; GIDDINGS, L-A. Natural products as leads to antitumor drugs. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, p. 123-137, 2014.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000.
- PARANAGAMA, A. P; WIJERATNE, M. E. K; GUNATILAKA, A. A. L. Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi: effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 12, p. 1939-1945, 2007
- PFENNING, L. H. **Introdução a micologia**. Lavras: Ed. Ufla, 2000. 638 p.
- PRITI, V. et al. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites? **Current Science**, v. 97, n. 4, p. 477-478, 2009.
- RAMBALDI, D. M.; OLIVEIRA, D. A. S. (Org.). **Fragmentação de ecossistemas**: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. Brasília, DF: MMA/SBF, 2003. 510 p.
- RASLAN, D. S. et al. Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. **Bollettino Chimico Farmacêutico**, v. 141, n. 6, p. 457-460, 2002.
- RICE, E. L. **Allelopathy**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1984. 422 p.
- SANTOS, A. G. et al. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* SWARTZ. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1100-1103, 2007.
- SAVORANI, F. et al. A primer to nutritional metabolomics by NMR spectroscopy and chemometrics. **Food Research International**, v. 52, p. 1131-1145, 2013.
- SCHAWARZ, M. et al. 3-Hydroxypropionic acid as a nematocidal principle in endophytic fungi. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2239-2245, 2004.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.
- SCHULZ, B. et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

- SETO, Y. et al. Production of phleichrome by *Cladosporium phlei* as stimulated by diketopiperazines of *Epichloe typhina*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1515-1519, 2005.
- SHWETA, S. et al. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaeae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9methoxycamptothecin. **Phytochemistry**, v. 71, p. 117-122, 2010.
- SILVA, M. F. C. et al. Chromones: a promising ring system for new antiinflammatory drugs. **ChemMedChem**, v. 11, p. 2252-2260, 2016.
- SLEUMER, H. O. **Flacourtiaceae**. New York: The New York Botanic Garden, 1980. 499 p. (Flora neotropica monograph, n. 22).
- SMETANINA, O. F. et al. Metabolites of the marine fungus *Humicola fuscoatra* KMM 4629. **Russian Chemical Bulletin.**, v. 53, n. 11, p. 2643-2646, 2004.
- STARK, T.; HOFMANN, T. Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7222-7231, 2005.
- STROBEL, G. A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 491-502, 2003.
- SUEMITSUA, R. et al. Structure of porriolide, a new metabolite from *Alternaria porri*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57, n. 2, p. 334-335, 1993.
- SUN, X.; GUO, L. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. **Mycology**, v. 3, n. 1, p. 65-76, 2012.
- VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- WANG, L. W. et al. Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1231-1239, 2012.
- WANG, W. et al. New clerodane diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Fitoterapia**, v. 80, n. 7, p. 404-407, 2009.
- WANG, W.-X. et al. Antibacterial azaphilones from an endophytic fungus, *Colletotrichum* sp. BS4. **Journal of Natural Products**, 2016. Ahead of print. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00436.
- WILLIAMS, R. B. et al. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, p. 1895-1897, 2008.
- XIONG, H. et. al. Sporormiellin A, the first tetrahydrofuran-fused furochromone with an unprecedented tetracyclic skeleton from *Sporormiella minima*. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 4, p. 24295-24299, 2014.

- XIU-LING, W. et al. C-Ring cleavage of isoflavonas daidzein and genistein by a newly-isolated human intestinal bacterium *Eubacterium ramulus* Julong 601. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 766-771, 2004.
- ZHANG, F. et al. A thiopyranchromenone and other chromone derivatives from an endolichenic fungus, *Preussia africana*. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 230-237, 2012.
- ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 753-771, 2006.
- ZHANG, J. Y. et al. Anthracenedione derivatives as anticancer agents isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1469-1481, 2010.
- ZHAO, Q. et al. Nodulisporisteroids C - L, new 4-methyl-progesteroides from *Nodulisporium* sp. **Steroids**, v. 102, p. 101-109, 2015.
- ZHENG, Q. et al. Nodulisporisteroids A and B, the first 3,4-seco-4-methyl-progesteroides from *Nodulisporium* sp. **Steroids**, v. 78, p. 896-901, 2013.
- ZHENG, Y. et al. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. **Annals Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 529-542, 2016.