

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP
Instituto de Química – Campus de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Química
Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais – NuBBE

Thomas Rafael Habeck

PROSPECÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DO FUNGO ENDOFÍTICO *Camarops* sp.
ISOLADO DE *Alibertia macrophylla*

Araraquara

2012

THOMAS RAFAEL HABECK

PROSPECÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DO FUNGO ENDOFÍTICO *Camarops* sp.
ISOLADO DE *Alibertia macrophylla*

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Química

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

Araraquara

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

H113p	Habeck, Thomas Rafael Prospecção química e biológica do fungo endofítico <i>Camarops</i> sp. isolado de <i>Alibertia macrophylla</i> / Thomas Rafael Habeck. – Araraquara : [s.n], 2012 148 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Angela Regina Araújo 1. Produtos naturais. 2. Metabólicos secundários. 3. Fungos endofíticos. I. Título.
-------	---

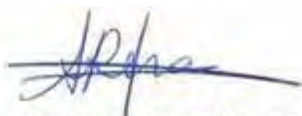
Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

THOMAS RAFAEL HABECK

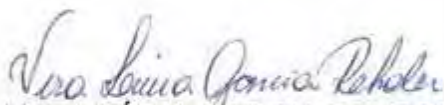
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 13 de agosto de 2012.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª ANGELA REGINA ARAUJO (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Drª VERA LÚCIA GARCIA REHDER
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA -
UNICAMP, Paulínia - SP



Drª MARY-ANN FOGLIO
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA -
UNICAMP, Paulínia - SP

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Dra. Angela Regina Araújo, por acreditar e confiar em meu trabalho no desenvolvimento desta pesquisa, e por ser um exemplo de profissional, sempre se dedicando a orientar e auxiliar seus alunos no que fosse necessário.

A minha amiga Juliana Gubiani, por ter me ajudado muito, sendo sua participação fundamental para a realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório, que fizeram parte desta etapa da minha vida.

Ao Dr. Alberto Camilo Alécio, por ter realizado sempre com muito empenho as análises de espectrometria de massas e também ao Dr. Nivaldo Boralle pelas análises de ressonância magnética nuclear, essenciais para a elaboração deste estudo.

A todos os meus amigos do Instituto de Química.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

Ao programa de pós-graduação da UNESP pela oportunidade, as agências de fomento (FAPESP, CNPq, CAPES) que financiaram diretamente ou indiretamente o meu trabalho.

RESUMO

Os fungos endofíticos são micro-organismos que residem nos espaços intercelulares das plantas superiores. Estão comumente presentes em quase todas as plantas e são importantes fontes de produtos naturais com atividades biológicas diversificadas. Este trabalho teve como objetivo a obtenção de substâncias potencialmente bioativas a partir do fracionamento do extrato bruto em Czapek[®] produzido pelo fungo endofítico *Camarops* sp. isolado das folhas saudáveis de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae) e para o melhor entendimento da relação entre os fungos endofíticos e as espécies hospedeiras. Inicialmente o fungo endofítico foi cultivado em pequena escala nos meios sólido (arroz) e líquido: meio de dextrose e batata (MDB) extrato de malte (EM), extrato de levedura (YM), Czapek[®] e Nutrient[®]. Os extratos brutos obtidos foram submetidos a bioensaios para avaliação das atividades antifúngica, antioxidante, tripanocida e anticolinesterásica, sendo também analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector em Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H). Esta avaliação nos permitiu selecionar o meio de cultura Czapek[®] como o meio mais promissor para cultivo do endófito em escala ampliada. Após o período de fermentação (21 dias) de *Camarops* sp. em meio de Czapek[®], sucessivas extrações com acetato de etila foram realizadas e o extrato bruto foi obtido após evaporação do solvente. Este foi submetido ao fracionamento por técnicas cromatográficas convencionais, o que resultou no isolamento e identificação estrutural de 7 substâncias, que foram determinadas por RMN de ¹H e ¹³C 1D e 2D.

Palavras-Chave: *Camarops* sp., fungo endofítico e *Alibertia macrophylla*

ABSTRACT

Endophytic fungus are microorganisms that reside in the intercellular spaces of higher plants. They are commonly present in almost all plants and are important sources of natural products with diverse biological activities. This study aimed to obtain potentially bioactive substances from the fractionation of crude extract in Czapek[®] produced by the endophytic fungus *Camarops* sp. isolated from healthy leaves of *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae) and to contribute to a better understanding of the relationship between endophytes and host species. Initially the endophytic fungus was grown, in small-scale, on solid media (rice) and liquid: potato dextrose broth (PDB), Malt Extract (ME), Yeast Maintenance (YM), Czapek[®] and Nutrient[®]. The extracts were subjected to bioassays for evaluation of antifungal, antioxidant, anticholinesterase and trypanocidal activity, and was also analyzed by thin layer chromatography (TLC), High Pressure Liquid Chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD) and Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen (NMR ¹H). This assessment allowed us to select the Czapek[®] culture medium as the most promising for cultivation of endophytes on an enlarged scale. After the fermentation period (21 days) of *Camarops* sp. in Czapek[®] medium, successive extractions were performed with ethyl acetate and the crude extract was obtained after evaporation of the solvent. This was subjected to fractionation by conventional chromatographic techniques, which resulted in the isolation of seven substances that determined by NMR ¹H and ¹³C 1D and 2D.

Keywords: *Camarops* sp., endophytic fungus and *Alibertia macrophylla*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Substâncias isoladas de <i>Alibertia macrophylla</i> por Bolzani e Viviane C. da Silva	17
Figura 1.2 - Substâncias produzidas pelo fungo endofítico <i>Penicillium</i> sp.1 isoladas por Camila M. de Oliveira	18
Figura 1.3 - Substâncias isoladas de <i>Camarops</i> sp. por Camila M. de Oliveira	19
Figura 1.4 - Substâncias isoladas de <i>Camarops</i> sp. por Juliana R. Gubiani	20
Figura 4.1 – Etapas de obtenção do extrato bruto em meio líquido e avaliação do perfil químico e biológico.	28
Figura 4.2 – Etapas de obtenção do extrato bruto em meio sólido e avaliação do perfil químico e biológico.	29
Figura 4.3 - <i>Camarops</i> sp. cultivado em BDA	30
Figura 4.4 - Esquema da placa de microdiluição utilizada para a realização dos ensaios da atividade antifúngica	33
Figura 4.5 - Esquema da placa de microdiluição utilizada para a realização dos ensaios da atividade tripanocida	35
Figura 4.6 - Esquema da placa de microdiluição utilizada para a realização dos ensaios da atividade antioxidante	37
Figura 4.7 - Fluxograma do método de fracionamento do extrato bruto de Czapek®	39
Figura 4.8 – Fluxograma método de fracionamento da Fr. 2 e obtenção das substâncias 1 a 5	40
Figura 4.9 – Fluxograma do método de fracionamento da Fr.3 e obtenção das substâncias 4 a 8.	41
Figura 5.1 - Avaliação do perfil químico dos extratos brutos por CCDC.	44
Figura 5.2 - Cromatogramas dos extratos brutos obtidos em escala reduzida dos meios de cultura de YM, MDB, EM, Czapek®, Nutrient® e Arroz por CLAE – DAD.	45
Figura 5.3 - Espectros de absorção no UV dos picos identificado como 1A e 1C	47
Figura 5.4 - Espectros de absorção no UV dos picos 2C, 2E, 1P, 2P e 1Y	48
Figura 5.5 - Espectros de absorção no UV dos picos 2A, 3A, 4A, 5A e 1E.	48
Figura 5.6 - Avaliação qualitativa da atividade antifúngica frente aos fungos <i>Cladosporium shaerospermum</i> e <i>C. cladosporioides</i>	50

Figura 5.7 - Avaliação qualitativa da atividade anticolinesterásica.....	53
Figura 5.8 - Estruturas químicas da nifurtimox (XLIX) e benzonidazol (L)	54
Figura 5.9 - Mecanismo de ação proposto dos fármacos nifurtimox e benzonidazol	55
Figura 5.10 - Redução do radical estável DPPH	58
Figura 5.11 - Avaliação qualitativa da atividade antioxidante por CCDC	59
Figura 5.12 - Gráfico da % de sequestro do radical livre estável DPPH pela padrão positivo quercetina.	60
Figura 5.13 - Gráfico da % de sequestro do radical livre estável DPPH pelos extratos brutos	60
Figura 5.14 - Comparação dos cromatogramas do extratos brutos de Czapek® obtidos em escala ampliada(EA) e reduzida (ER) obtidos por CLAE – DAD.....	62
Figura 5.15 - Cromatogramas das frações obtidas do fracionamento do extrato bruto de Czapek® por CC sob pressão.....	64
Figura 5.16 - Espectros de absorção no UV dos picos 2 e 4.....	64
Figura 5.17 - Espectros de absorção no UV dos picos 1,3,5 e 6.....	65
Figura 5.18 - Cromatogramas das frações aquosa e orgânica resultantes da partição líquido-líquido da Fr.2.....	67
Figura 5.19 - Espectro de massas da fração aquosa da Fr.2 (Full).....	68
Figura 5.20 - Espectro de massa dos filhos do sinal 359,21 (MS2)	68
Figura 5.21 – Cromatogramas da fração orgânica (Fr.2) submetida a análise em modo gradiente utilizando as colunas Luna Phenomenex® e Synergi Hydro Phenomenex® por CLAE - DAD	69
Figura 5.22 – Cromatogramas da fração orgânica (Fr.2) submetida a análise em modo gradiente e isocrático, utilizando coluna Synergi Hydro Phenomenex®	70
Figura 5.23 – Cromatogramas da fração orgânica (Fr.2) submetida a HPLC utilizando coluna Synergi Hydro Phenomenex®, em modo: A) semi- preparativo B) analítico	71
Figura 5.24 - Espectros de absorção dos picos	72
Figura 5.25 – Cromatogramas da fração orgânica (Fr.3) submetida a eluição em modo gradiente exploratório e isocrático MeOH/H ₂ O (25:75 v/v) utilizando coluna cromatográfica Luna Phenomenex® (4,6x250mm)	73

Figura 5.26 – Cromatogramas da fração orgânica (Fr. 3) submetida a HPLC- preparativo utilizando coluna Supelco [®] , em modo: A) analítico B) semi- preparativo	74
Figura 5.27 - Mapa de contorno dos espectros de absorção dos picos da Fr.3 em função do tempo em modo semi-preparativo	75
Figura 5.28 - Espectros de absorção dos picos identificados no mapa de contornos da fração Fr.3	75
Figura 5.29 - Sub-frac.3_DP4 submetida a eluição em modo gradiente exploratório e isocrático MeOH/H ₂ O (7:3 v/v) utilizando coluna cromatográfica Luna Phenomenex [®] (4,6x250mm)	77
Figura 5.30 - Sub-frac.3_DP4 submetida a HPLC em modo: A) analítico B) semi- preparativo	77
Figura 5.31 - Mapa de contorno dos espectros de absorção dos picos da Fr.3_DP4 em função do tempo obtidos em modo semi-preparativo.....	78
Figura 5.32 - Espectros de absorção dos picos identificados no mapa de contornos da sub-fração Fr.3_DP4 obtidos em modo semi-preparativo	79
Figura 5.33 - Substâncias produzidas por Camarops sp em meio de Czapek [®]	80
Figura 5.34 - Correlações observadas nos mapas de contorno do experimento de HMBC do ácido p-hidroxifenilático (1)	82
Figura 5.35 - RMN de ¹ H do ácido p-hidroxifenilático (1) (DMSO-d ₆ , 500MHz)	83
Figura 5.36 - Mapa de contorno de gHMQC do ácido p-hidroxifenilático (1) (DMSO-d ₆ , 125MHz).....	83
Figura 5.37 - Mapa de contorno de gHMBC do ácido p-hidroxifenilático (1) (DMSO-d ₆ , 125 Hz)	84
Figura 5.38 - Correlações dos hidrogênios do ácido p-hidroxifenilático (1) (COSY) em DMSO-d ₆	85
Figura 5.39 - ESI-MS do ácido p-hidroxifenilático	85
Figura 5.40 - Correlações observadas em HMBC da substância 2	88
Figura 5.41 - RMN de ¹ H do Ácido p-hidroxibenzóico (3) (DMSO-d ₆ , 500MHz)	89
Figura 5.42 - Mapa de contorno de gHMQC do Ácido p-hidroxibenzóico (3) (DMSO- d ₆ , 125MHz)	90
Figura 5.43 - Mapa de contorno de gHMBC do Ácido p-hidroxibenzóico (3) (DMSO- d ₆ , 125 Hz)	90

Figura 5.44 - Correlações observadas nos mapas de contorno em HMBC do Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico (3)	91
Figura 5.45 - Correlações observadas em HMBC do <i>p</i> -hidroxibenzaldeído (4)	93
Figura 5.46 - Mapa de contorno de gHMBC do <i>p</i> -hidroxibenzaldeído (4) (DMSO- d_6 , 125 Hz).....	94
Figura 5.47 - RMN de ^{13}C do <i>p</i> -hidroxibenzaldeído (4) (DMSO- d_6 , 300MHz)	94
Figura 5.48 - RMN de 1H do <i>p</i> -hidroxibenzaldeído (4) (DMSO- d_6 , 500MHz).....	95
Figura 5.49 - Mapa de contorno de gHMQC do <i>p</i> -hidroxibenzaldeído (4) (DMSO- d_6 , 125MHz).....	95
Figura 5.50 - Correlações observadas em HMBC do Ácido fenilático (5).....	98
Figura 5.51 - RMN de 1H do Ácido fenilático (5) (DMSO- d_6 , 500MHz)	98
Figura 5.52 - ESI-MS do Ácido fenilático (5).....	99
Figura 5.53 - Correlações observadas nos mapas de contorno do experimento de HMBC.....	102
Figura 5.54 - RMN de 1H dos ésteres 6-8 (DMSO- d_6 , 500MHz)	102
Figura 5.55 - Mapa de contorno de gHMQC das substâncias 6-8 (DMSO – d_6 , 125MHz).....	103
Figura 5.56 - Mapa de contorno de gHMBC das substâncias 6-8 (DMSO - d_6 , 125MHz).....	103
Figura 5.57 - Correlações dos hidrogênios das substâncias 6-8 (COSY) em DMSO- d_6	104
Figura 5.58 - ESI-MS das Substâncias 6-8	105

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - RMN de ^1H do extrato bruto de arroz (CDCl_3 , 500MHz)	118
ANEXO 2 - RMN de ^1H do extrato bruto de Czapek [®] (DMSO-d_6 , 500MHz)	119
ANEXO 3 - RMN de ^1H do extrato bruto de Extrato de Malte - EM (DMSO-d_6 , 500MHz)	120
ANEXO 4 - RMN de ^1H do extrato bruto de Nutrient [®] (DMSO-d_6 , 500MHz)	121
ANEXO 5 - RMN de ^1H do extrato bruto de Meio de Dextrose e Batata - MDB (DMSO-d_6 , 500MHz)	122
ANEXO 6 - RMN de ^1H do extrato bruto em Meio de Cultura de Levedura - YM (DMSO-d_6 , 500MHz)	123
ANEXO 7 - Diagramas das curvas de absorção no UV dos picos identificados nos extratos brutos	124
ANEXO 8 - Diagramas das curvas de absorção no UV dos picos identificados nas frações	125
ANEXO 9 - RMN de ^1H da Fr.1 obtida do fracionamento do extrato bruto de Czapek [®] por CC sob pressão (DMSO-d_6 , 500MHz)	126
ANEXO 10 - RMN de ^1H da Fr.2 obtida do fracionamento do extrato bruto de Czapek [®] por CC sob pressão (DMSO-d_6 , 500MHz)	127
ANEXO 11 - RMN de ^1H da Fr.3 obtida do fracionamento do extrato bruto de Czapek [®] por CC sob pressão (DMSO-d_6 , 500MHz)	128
ANEXO 12 - RMN de ^1H da Fr.4 obtida do fracionamento do extrato bruto de Czapek [®] por CC sob pressão (DMSO-d_6 , 500MHz)	129
ANEXO 13 - RMN de ^1H da Fr.5 obtida do fracionamento do extrato bruto de Czapek [®] por CC sob pressão (DMSO-d_6 , 500MHz)	130
ANEXO 14 - RMN de ^1H da Fr.6 obtida do fracionamento do extrato bruto de Czapek [®] por CC sob pressão (DMSO-d_6 , 500MHz)	131
ANEXO 15 - RMN de ^1H da Fr.7 obtida do fracionamento do extrato bruto de Czapek [®] por CC sob pressão (DMSO-d_6 , 500MHz)	132
ANEXO 16 - RMN de ^1H da Fr.8 obtida do fracionamento do extrato bruto de Czapek [®] por CC sob pressão (DMSO-d_6 , 500MHz)	133
ANEXO 17 - RMN de ^1H da fração orgânica da Fr.2 (DMSO-d_6 , 500MHz)	134
ANEXO 18 - RMN de ^1H da fração aquosa da Fr.2 (DMSO-d_6 , 500MHz)	135

ANEXO 19 - RMN de ^1H da sub-fração Fr2_DP1 (DMSO- d_6 , 500MHz).....	136
ANEXO 20 - RMN de ^1H da sub-fração Fr2_DP2 (DMSO- d_6 , 500MHz).....	137
ANEXO 21 - RMN de ^1H da sub-fração Fr2_DP3 (DMSO- d_6 , 500MHz).....	138
ANEXO 22 - RMN de ^1H da sub-fração Fr2_DP4 (DMSO- d_6 , 500MHz).....	139
ANEXO 23 - RMN de ^1H da sub-fração Fr2_DP5 (DMSO- d_6 , 500MHz).....	140
ANEXO 24 - RMN de ^1H da sub-fração Fr2_DP6 (DMSO- d_6 , 500MHz).....	141
ANEXO 25 - RMN de ^1H da sub-fração Fr3_DP1 (DMSO- d_6 , 500MHz).....	142
ANEXO 26 - RMN de ^1H da sub-fração Fr3_DP2 (DMSO- d_6 , 500MHz).....	143
ANEXO 27 - RMN de ^1H da sub-fração Fr3_DP3 (DMSO- d_6 , 500MHz).....	144
ANEXO 28 - RMN de ^1H da sub-fração Fr3_DP4 (DMSO- d_6 , 500MHz).....	145
ANEXO 29 - RMN de ^1H da sub-fração Fr3_DP5 (DMSO- d_6 , 500MHz).....	146
ANEXO 30 - RMN de ^1H da sub-fração Fr3_DP4_P1 (DMSO- d_6 , 500MHz)	147
ANEXO 31 - RMN de ^1H da sub-fração Fr3_DP4_P2 (DMSO- d_6 , 500MHz)	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Meios de cultura sólido e líquido utilizados para a avaliação do perfil químico e biológico de <i>Camarops</i> sp	23
Tabela 4.1 - Sistema de eluição utilizado para o fracionamento do extrato bruto obtido do meio de cultura Czapek® em escala ampliada	39
Tabela 5.1 - Massas dos extratos brutos obtidos do fungo <i>Camarops</i> sp. cultivado em meios de cultura líquido e sólido.	43
Tabela 5.2 - Picos cromatográficos selecionados para avaliação dos espectros de UV.	46
Tabela 5.3 - Avaliação qualitativa da atividade antifúngica	51
Tabela 5.4 – Extratos brutos avaliados frente as linhagens de <i>Candida</i> e de <i>Cryptococcus</i>	52
Tabela 5.5 - Avaliação qualitativa da atividade anticolinesterásica	53
Tabela 5.6- Avaliação quantitativa da atividade tripanocida.....	56
Tabela 5.7 - Análise quantitativa da atividade antioxidante.....	60
Tabela 5.8 - Massas das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto de Czapek® por CC sob pressão.....	63
Tabela 5.9 – Picos coletados em modo isocrático MeOH/H ₂ O (15:85 v/v) utilizando coluna semi-preparativa Synergi Hydro Phenomenex® (21,2x250mm, 4µm)	71
Tabela 5.10 - Picos coletados em modo isocrático MeOH/H ₂ O (25:75 v/v) utilizando coluna semi-preparativa Supelco® (21,2x250mm, 4µm)	76
Tabela 5.11 - Picos coletados em modo isocrático MeOH/H ₂ O (7:3 v/v) utilizando coluna semi-preparativa Luna Phenomenex® (21,2x150mm, 4µm)	79
Tabela 12 - Sinais de RMN de ¹ H (500MHz) e ¹³ C (125MHz) da substância 1 em DMSO ^a	84
Tabela 13 -RMN de ¹ H (500MHz) e ¹³ C (125MHz) do Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico (3) em DMSO ^a	91
Tabela 14 - Sinais de RMN de ¹ H (500MHz) e ¹³ C (300MHz) do <i>p</i> -hidroxibenzaldeído (4) em DMSO ^a	96
Tabela 15 - RMN de ¹ H (500MHz) e ¹³ C (125MHz) do Ácido fenilático (5) em DMSO ^a	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
AM-01	Linhagem de fungo endofítico isolado por Geraldo H. da Silva
AM-02	Linhagem de fungo endofítico isolado por Geraldo H. da Silva
AcOEt	Acetato de etila
AcHE	Enzima acetilcolinesterase
ACN	Acetonitrila
BDA	Batata dextrose agar
C-18	Sílica gel em fase reversa tipo octadesil silano
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector com arranjo de diodo
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazina
DMSO-d ₆	Dimetil sulfóxido deuterado
EM	Extrato de Malte
FM	Fase Móvel
HOPLA	Ácido <i>p</i> -hidroxifenilático
MDB	Meio de dextrose e batata
MHz	Megahertz
Min	minutos
Pág.	Página
PLA	Ácido fenilático
<i>p</i> HBA	Ácido para-hidroxibenzóico
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMPI	Roswell Park Memorial Institute
TMS	Tetrametilsilano
UV-Vis	Ultra violeta-visível
YM	Extrato de levedura

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
1.1	A Espécie Vegetal Hospedeira: <i>Alibertia macrophylla</i> K. Shum	15
1.1.1	Fungos endofíticos isolados de <i>A. macrophylla</i>	16
1.1.1.1	Substâncias isoladas de <i>Penicillium</i> sp.1 (AM-01)	18
1.1.1.2	Substâncias isoladas de <i>Camarops</i> sp. (AM-02)	18
1.1.2	O gênero <i>Camarops</i>	20
2.	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo Geral	22
2.2	Objetivos Específicos	22
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1	Especificação dos Materiais e Equipamentos Utilizados	23
3.1.1	Meios de cultura.....	23
3.1.2	Solventes utilizados	23
3.1.3	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).....	24
3.1.4	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	24
3.1.5	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN – ¹ H) e de Carbono (RMN – ¹³ C).....	24
3.1.6	Espectrometria de massas (EM)	24
3.1.7	Ensaio biológicos	25
3.1.7.1	Atividade antifúngica	25
3.1.7.2	Atividade antifúngica – Patógenos humanos	25
3.1.7.3	Atividade anticolinesterásica	25
3.1.7.4	Atividade tripanocida.....	26
3.1.8	Ensaio químicos.....	26
3.1.8.1	Atividade antioxidante	26
3.1.9	Outros equipamentos.....	26
4.	PARTE EXPERIMENTAL.....	27
4.1	Coleta do Material Vegetal	27
4.2	Obtenção dos fungos endofíticos de <i>Alibertia macrophylla</i>	27
4.3	Identificação microbiológica da cultura intitulada AM-02.....	27
4.4	Metodologia Utilizada.....	28
4.5	Cultivo do endófito em escala reduzida em diversos meios de cultura e obtenção do extrato bruto.	29
4.6	Avaliação do perfil químico e biológico de <i>Camarops</i> sp em diversos meios de cultura.....	31
4.6.1	Avaliação dos extratos brutos por CLAE-DAD	31
4.6.2	Avaliação dos extratos brutos por CCDC	31
4.6.3	Avaliação do perfil biológico – Ensaio biológicos	32
4.6.3.1	Atividade antifúngica	32
4.6.3.1.1	Atividade Antifúngica – Fitopatógenos	32
4.6.3.1.2	Atividade antifúngica – Patógenos Humanos.....	32
4.6.3.2	Atividade anticolinesterásica.....	34
4.6.3.3	Atividade tripanocida.....	35

4.6.4	Avaliação do perfil químico – Ensaio antioxidante por sequestro do radical livre estável DPPH.....	36
4.6.4.1	Ensaio da atividade antioxidante realizada por CCDC	36
4.6.4.2	Ensaio da atividade antioxidante por espectrofotometria	37
4.7	Cultivo do endófito em escala ampliada em meio de Czapek® e obtenção do extrato bruto.....	38
4.8	Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de Czapek®	38
4.8.1	Fracionamento e purificação das frações selecionadas.....	40
4.8.1.1	Fracionamento da Fr.2	40
4.8.1.2	Fracionamento da Fr.3	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1	Obtenção e avaliação química e biológica dos extratos brutos obtidos em escala reduzida	43
5.1.1	Massas dos extratos brutos obtidos em escala reduzida.....	43
5.1.2	Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos (escala reduzida)	43
5.1.3	Avaliação dos espectros de RMN de ¹ H dos extratos (escala reduzida)	49
5.1.4	Avaliação das atividades biológicas	50
5.1.4.1	Atividade antifúngica - Fitopatógenos	50
5.1.4.2	Atividade antifúngica – Patógenos Humanos	51
5.1.4.3	Atividade anticolinesterásica.....	52
5.1.4.4	Atividade tripanocida.....	54
5.1.5	Avaliação da atividade antioxidante	56
5.1.5.1	Ensaio antioxidante realizado por CCDC	58
5.1.5.2	Ensaio antioxidante por espectrofotometria	59
5.2	Avaliação dos resultados obtidos	61
5.3	Análise do extrato bruto obtido em escala ampliada do meio de cultura Czapek® por CLAE-DAD	62
5.4	Fracionamento cromatográfico do extrato bruto em Czapek®	62
5.4.1	Fracionamento e purificação das frações selecionadas.....	66
5.4.1.1	Fracionamento da Fr.2	66
5.4.1.2	Fracionamento da Fr.3	72
5.4.1.2.1	Purificação da sub-fração Fr3_DP4.....	76
5.5	Determinação estrutural das substâncias isoladas	80
5.5.1	Substâncias produzidas por <i>Camarops</i> sp. em meio de Czapek®	80
5.5.2	Identificação estrutural da substância 1	81
5.5.3	Identificação estrutural da substância 2	87
5.5.4	Identificação estrutural da substância 3	89
5.5.5	Identificação estrutural do <i>p</i> -hidroxibenzaldeído (5).....	93
5.5.6	Identificação estrutural da substância 6	97
5.5.7	Identificação estrutural dos 3,4- dihidroxi benzoato de butila (7), 3,4- dihidroxibenzoato de hexila (8) e 3,4- dihidroxibenzoato de octila (9).....	101
6.	CONCLUSÕES	106
	REFERÊNCIAS	108
	ANEXOS	117

1. INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos são micro-organismos que residem nos espaços intercelulares das plantas superiores e tem se mostrado como uma fonte de novos produtos naturais com atividades biológicas diversificadas^[1,2]. Estima-se que, aproximadamente 300.000 espécies de plantas existam na terra e que cada planta é hospedeira de pelo menos um fungo endofítico, sendo que destas, poucas foram até agora completamente estudadas. Deste modo, a probabilidade de se encontrar novos e interessantes fungos endofíticos dentre as milhares de plantas presentes nos mais diversos ecossistemas é muito alta^[3]. Taxonomicamente, a maioria dos fungos endofíticos pertence ao filo *Ascomycetos*, enquanto algumas espécies também pertencem aos fillos *Zygomycota* e *Basidiomycota*^[4].

Os fungos se dispersam facilmente e são capazes de colonizar diferentes substratos e ecossistemas. A sua abundância e diversidade parecem diminuir conforme partimos de latitudes mais baixas para as mais altas, ou seja das regiões tropicais para as árticas^[5]. Em trabalho recente publicado por Rosa^[5], um estudo demonstrou a presença de fungos endofíticos habitando os tecidos de plantas do continente Antártico, sendo que mais da metade destes fungos é capaz de produzir melanina, substâncias capazes de transformar energia proveniente da radiação UV em energia metabólica. Considerando que a planta deve suportar repetitivos ciclos de congelamento e descongelamento e altas taxas de radiação ultravioleta, o fungo endofítico fornece condições para a sobrevivência da planta e em contrapartida a planta representa para o fungo um habitat que o protege contra as condições climáticas extremas. Esta associação mutuamente vantajosa é denominada simbiose^[1].

A interação mutualística do tipo simbiótica entre o fungo endofítico e a planta hospedeira confere benefícios mútuos, uma vez que o fungo endofítico fornece proteção e melhores condições de sobrevivência ao hospedeiro através da produção de uma miríade de substâncias bioativas e esta por sua vez, fornece ao micro-organismo alimento e proteção^[6]. A produção de substâncias bioativas pelos fungos endofíticos esta diretamente relacionada a sua evolução independente, visto que tais micro-organismos durante seu desenvolvimento devem ter incorporado informações genéticas das plantas superiores, assim permitindo que se adaptem a planta

hospedeira, desta forma realizando algumas funções tais como fornecer proteção contra patógenos, insetos e animais herbívoros^[7].

A maioria dos fungos endofíticos é transmitida horizontalmente para as plantas hospedeiras, pelo ar, através de esporos. Alguns endofíticos, no entanto, também podem ser transmitidos verticalmente para as próximas gerações do hospedeiro através de suas sementes^[8]. Uma vez dentro do tecido vegetal da planta hospedeira, os fungos assumem um estado de latência por todo o período de vida da planta ou por um extenso período de tempo, por exemplo, até que as condições ambientais sejam favoráveis para o fungo^[9]. No entanto, de acordo com Schulz & Boyle^[10], não há neutralidade entre as interações dos micro-organismos endofíticos e seus hospedeiros, pois estas interações sempre envolvem um equilíbrio de antagonismos, onde a defesa da planta hospedeira limita o desenvolvimento das espécies fúngicas.

Os fungos endofíticos podem ter impacto na ecologia, adaptação e o formato de uma comunidades de plantas, conferindo resistência a estresses abióticos (temperatura, pH, pressão osmótica) e bióticos (originários de bactérias, fungos, nematóides e insetos) ^[11]. No entanto, os benefícios desta interação podem depender da disponibilidade de recursos naturais, tais como água e nutrientes no solo ^{[12] [13]}.

Embora a descoberta dos fungos endofíticos data de aproximadamente 1904, foi só a partir de 2006, com a descoberta de sua importância farmacológica e ecológica, que os fungos endofíticos passaram a ter um maior reconhecimento^[14]. As substâncias bioativas produzidas pelos micro-organismos endofíticos, além de desempenharem seu papel na relação endófito-hospedeiro, também se mostraram como uma interessante fonte de novas substâncias com aplicabilidade nas áreas da medicina, indústria e agricultura^[15]. A presença de novos alvos bacterianos, a evolução das doenças infecciosas, a resistência aos atuais antibióticos e a toxicidade de certas substâncias reivindicam a descoberta de novos agentes terapêuticos eficazes no tratamento das enfermidades em humanos, plantas e animais. Um recente trabalho publicado por Kinghorn^[16] relata que a contribuição da descoberta de novos produtos naturais, entre os anos de 2001 e 2010, pelos micro-organismos terrestres e fúngicos, dentre os quais os endofíticos estão juntamente inseridos, passou de 9,3% (106 substâncias) em 2001 para 12,4% em 2010 (170 substâncias).

Na agricultura as atenções tem se voltado cada dia mais a procura de novos agentes que causam pequeno ou nenhum impacto ambiental e que sejam eficazes no controle de pestes, doenças e organismos causadores de doenças. Nesse sentido a utilização de micro-organismos se mostrou recentemente uma solução econômica e ambientalmente viável. Campos^[17], utilizou uma suspensão contendo esporos do fungo endofítico *Beauveria sp.* como um eficiente carrapaticida, em substituição aos atuais agentes químicos que não tem se mostrado eficientes além de causarem contaminação ambiental. Podemos também citar a azadiractina, um limonóide que tem se mostrado uma referência no desenvolvimento de novos inseticidas naturais por apresentar baixa toxicidade ao homem, baixa persistência no meio ambiente e ação sistêmica. Foi obtido inicialmente dos extratos vegetais da planta *Azadiractina indica*^[19], tendo sido recentemente isolado de seu fungo endofítico *Eupenicillium parvu*^[18].

Na medicina, a descoberta do taxol (placitaxel) incentivou a busca por novas drogas anticancerígenas, possivelmente devido ao modo único de ação, interferindo diretamente na multiplicação das células cancerígenas, reduzindo e até mesmo interrompendo o crescimento. No ano de 2000 alcançou a posição de medicamento anticancerígeno mais comercializado no mundo, sendo indicado principalmente para o tratamento dos cancer de mama, pulmão e ovário . Foi inicialmente isolado, em 1962, da casca das árvores pertencentes ao gênero *Taxus*, sendo a espécie vegetal *Taxus brevifolia* sua principal representante^[20]. No entanto, estas árvores são incomuns, de crescimento lento e produzem pequenas quantidades de Taxol, o que explica o alto preço exigido por este medicamento na época, quando obtido a partir desta fonte natural^[21]. Além disso, o uso de apenas uma fonte vegetal para a obtenção do Taxol limitou o suprimento desta droga devido ao desmatamento descontrolado destas árvores^[22]. Este fato motivou a busca de novas fontes naturais para a bioprospecção do taxol. Apenas em 1993, Stierle *et al.*^[23] ao investigar os metabólicos secundários produzidos pelos fungos endofíticos associados a *Taxus brevifolia*, relatou, pela primeira vez na literatura, o isolamento do taxol de um micro-organismo endofítico (*Taxus andreanae*), com um rendimento de 25-50ng.L⁻¹. Esta descoberta se mostrou uma alternativa menos escassa para a obtenção do taxol por processos fermentativos^[24]. A partir daí, Taxol e muitas outras substâncias com propriedades anticancerígenas vem sendo isolados de inúmeros gêneros de fungos endofíticos.

Outra importante substância anticancerígena é a camptotecina, um alcaloide que diferente do taxol, atua inibindo a enzima do DNA, topoisomerase I. Foi inicialmente isolada em 1966 da casca e do tronco de *Camptotheca acuminata* Decaisne (Nyssaceae), uma árvore nativa da China^[25]. Apesar dos ótimos resultados obtidos nos ensaios clínicos, camptotecina apresentou alguns inconvenientes tais como baixa solubilidade em meio aquoso e alta toxicidade^[26,27]. Por outro lado, utilizando-se como precursores a camptotecina e seu análogo 10-hidroxicamptotecina, foram obtidos por semi-síntese, dois importantes derivados: o irinotecano e o topotecan, que se mostraram mais eficientes e tão ativos quanto a camptotecina natural. Irinotecano (Camptosar) e topotecan (Hycamtin) foram aprovados para o tratamento de pacientes com câncer de colo e reto pela U.S FDA (Food and Drugs Administration) em 1998 e 2007 respectivamente^[28,29]. Em busca de novas fontes para a obtenção de Camptotecina, diversos fungos endofíticos foram estudados, sendo muitos os relatos descritos na literatura da obtenção de Camptotecina assim como de seus análogos^[30-34].

Muitos outros compostos com propriedades anticancerígenas isolados de micro-organismos endofíticos foram relatados na literatura, tais como: Ergoflavina, uma xantona dimérica, isolada do fungo endofítico que habita as folhas da planta medicinal *Mimusops elengi* (Sapotaceae)^[35]; Podofilotoxina, uma lignana não alcaloide, utilizada como precursora de medicamentos anticancerígenos (etoposídeo, teniposídeo) isolada dos fungos endofíticos *Aspergillus fumigatus* de *Juniperus communis*^[36], *Phialocephala fortinii* de *Podophyllum peltatu*^[37] e *Fusarium oxysporum* de *Juniperus recurva*^[38] ;

Entretanto, apesar do foco da maioria dos estudos estar voltado para a descoberta de substâncias com atividade anticancerígena, também existem inúmeros relatos de substâncias isoladas de fungos endofíticos que se apresentam como agentes: antiviral^[39], antiparasitário^[40], fungicida^[41], bactericida^[42], microbicida, antifúngico^[43], antioxidante^[44], antidiabético^[45], imunossupressivo^[46] e como repelente de insetos^[47], entre outros. Os fungos endofíticos também se apresentam como interessantes alternativas nos processos de biotransformação^[48-50] e como fonte lipídica para produção de biocombustíveis^[51-52].

Atualmente a obtenção de produtos naturais baseia-se principalmente na extração destas substâncias de suas respectivas fontes naturais. Tal fato apresenta diversas complicações, tais como: a biodisponibilidade da substância a ser extraída,

visto que a produção da mesma é diretamente dependente das características: genéticas (devido as diferenças genéticas dentre a mesma espécie), sazonais e climáticas; Assim como questões políticas e ecológicas de todo o processo, desde o plantio até o desmatamento^[53]. Esta situação exige abordagens inovadoras que contornem os atuais problemas enfrentados e procurem novas alternativas promissoras para a obtenção de tais compostos. Diante deste fato, diversos grupos de pesquisa tem se mostrado motivados a avaliar a real potencialidade dos micro-organismos nos processos biotecnológicos para a obtenção de substâncias bioativas, uma vez que, compreendem uma fonte inesgotável, rentável e renovável de tais substâncias^[54].

A espécie vegetal hospedeira da qual foi isolado o fungo endofítico escolhido para o desenvolvimento do trabalho pertence à família *Rubiaceae* Juss., ordem *Gentianales* e compreende cerca de 637 gêneros e 10700 espécies, tem distribuição predominantemente tropical e subtropical e é constituída essencialmente de espécies lenhosas, entretanto, observa-se a ocorrência de alguns representantes herbáceos e arbustivos^[55-57].

Os poucos relatos químicos encontrados na literatura sobre o gênero *Alibertia*, pertencente à subfamília *Ixoroideae*, faz destaque a sua rica constituição terpenoídica. Espécies de *Alibertia* são conhecidas como fontes de triterpenos pentacíclicos, especialmente do tipo oleanano e ursano^[57].

1.1 A Espécie Vegetal Hospedeira: *Alibertia macrophylla* K. Shum

O interesse pelo estudo fitoquímico da espécie vegetal *Alibertia macrophylla* foi iniciado por Bolzani^[58], em 1991, quando foi constatado a presença de constituintes fungitóxicos nos extratos da planta. Dos extratos polares das folhas foram isolados: 6 iridóides não glicosilados (VIII a XIII), o ácido cafeico (I), os ésteres cafeoato de 2-feniletina (II) e cafeoato de 2-metil-4-hidroxibutira (III) e dos caules, 7 triterpenos (XVIII, XXI, XXIII, XXIV, XXV, XVI, XVII). As estruturas isoladas de *A. macrophylla* podem ser visualizadas na Figura 1.1, pág 17. A forte atividade fungitóxica contra as linhagens fúngicas de *Aspergillus niger*, *Cladosporium sphaerospermum*, *C. cladosporioides*, e *Colletotrichum gloeosporioides* dos extratos das folhas de *A. macrophylla* pode ser atribuída a presença das agliconas iridoidais, e dos derivados do ácido cafeico, principalmente o éster cafeoato de 2-metil-4-

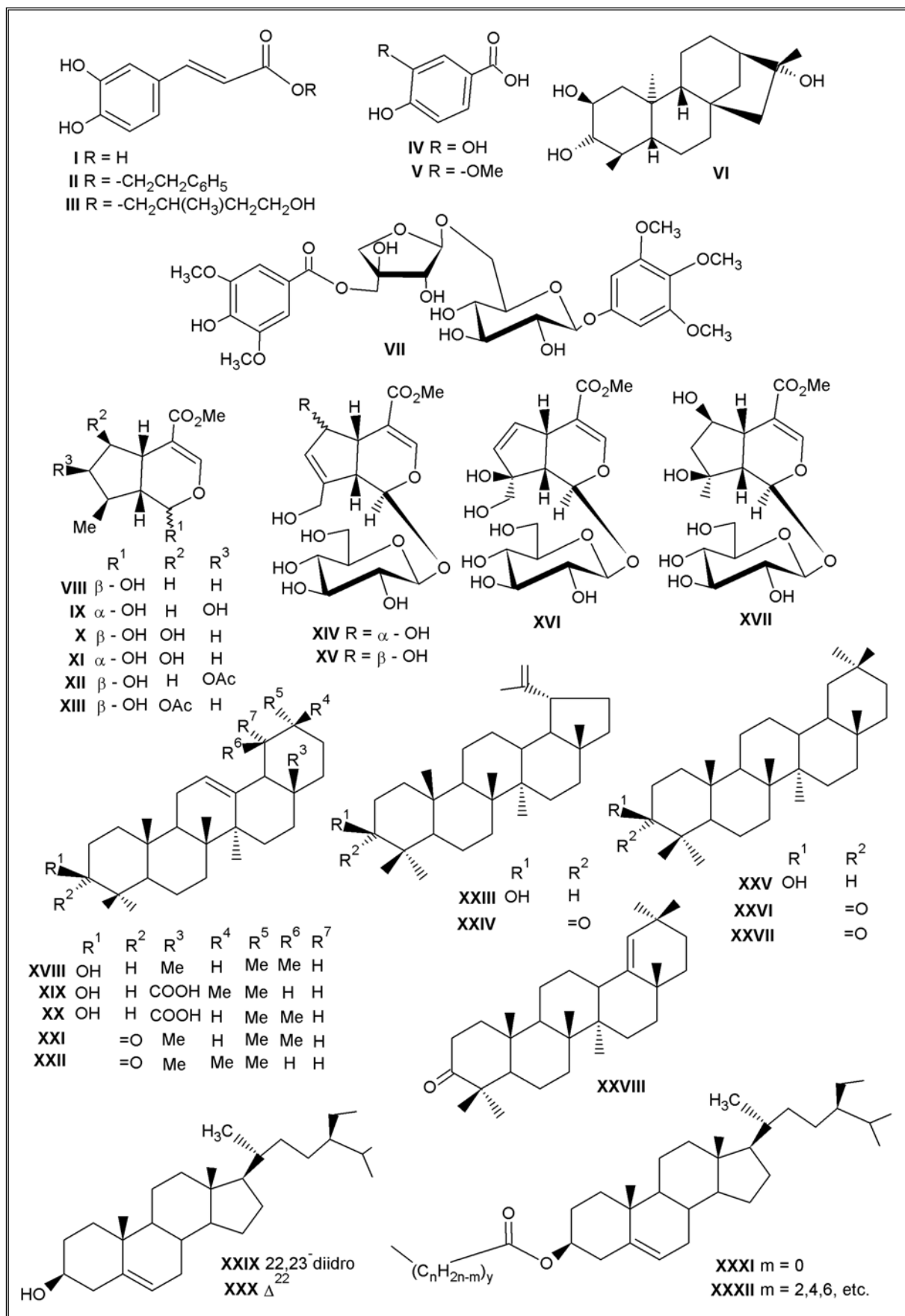
hidroxibutila, constatada pela formação de halos de inibição de crescimento fúngico nos respectivos bioensaios^[55,58].

Em outro estudo fitoquímico envolvendo a espécie vegetal *A. macrophylla*, Viviane C. da Silva^[56] relatou o isolamento de 17 substâncias extraídas do caule da planta: 4 iridóides glicosilados (XIV a XVII), 4 triterpenos (XIX, XX, XII, XXVIII), 3 triterpenos já isolados por Bolzani^[58] (XXIII, XXIV, XXVI), 2 esteróides (XXIX, XXX), 1 diterpeno inédito (VI), ácido cafeico (I) já isolado por Bolzani, 2 ácidos fenólicos (IV, V). O diterpeno do tipo *ent*-caurano apresentou forte atividade antifúngica frente ao patógeno humano *Candida albicans*^[56,59]. As estruturas das substâncias isoladas de *A. macrophylla* podem ser visualizadas na Figura 1.1, pág 17.

O conhecimento prévio da química e bioatividade de *A. macrophylla* proveniente dos estudos acima citados, ambos realizados pelo Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), incentivou Camila M. de Oliveira^[60], em seu trabalho de doutorado, a contribuir para uma possível compreensão da relação existente entre os micro-organismos endofíticos e a planta hospedeira, ao estudar os fungos endofíticos e seus metabólicos secundários, realizando a comparação dos perfis químicos da planta com os obtidos pelos fungos endofíticos isolados.

1.1.1 Fungos endofíticos isolados de *A. macrophylla*

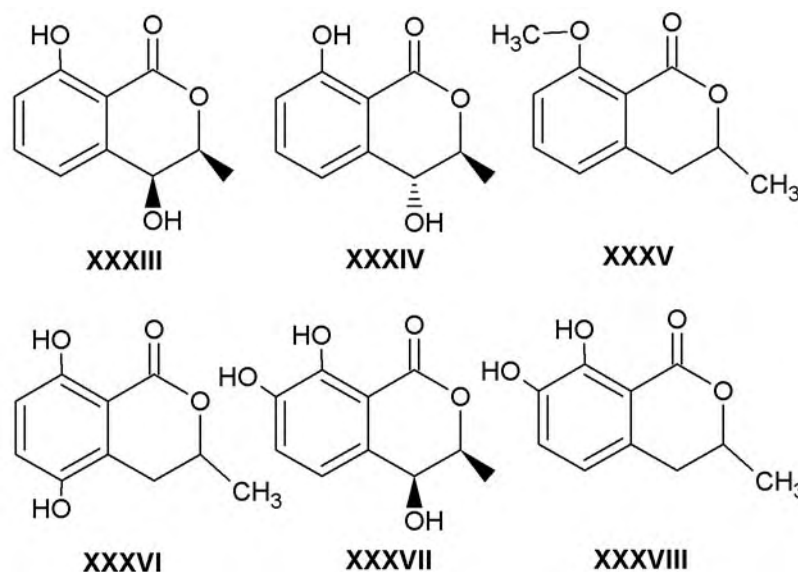
O estudo da produção metabólica destes fungos realizados anteriormente^[60] resultou no isolamento e determinação estrutural de 11 metabólicos secundários: estruturas XXXIII a XXXVIII (Figura 1.2, pág. 18) isolados do fungo endofítico *Penicillium sp.1*; XXXIX a XLIII (Figura 1.3, pág. 19) isolados de *Camarops sp.*

Figura 1.1 - Substâncias isoladas de *Alibertia macrophylla* por Bolzani e Viviane C. da Silva

1.1.1.1 Substâncias isoladas de *Penicillium sp.1* (AM-01)

O estudo químico do fungo endofítico *Penicillium sp.1*, cultivado em milho, levou ao isolamento de 6 isocumarinas (Figura 1.2, pág. 18), sendo duas inéditas (estruturas XXXVII e XXXVIII).

Figura 1.2 - Substâncias produzidas pelo fungo endofítico *Penicillium sp.1* isoladas por Camila M. de Oliveira



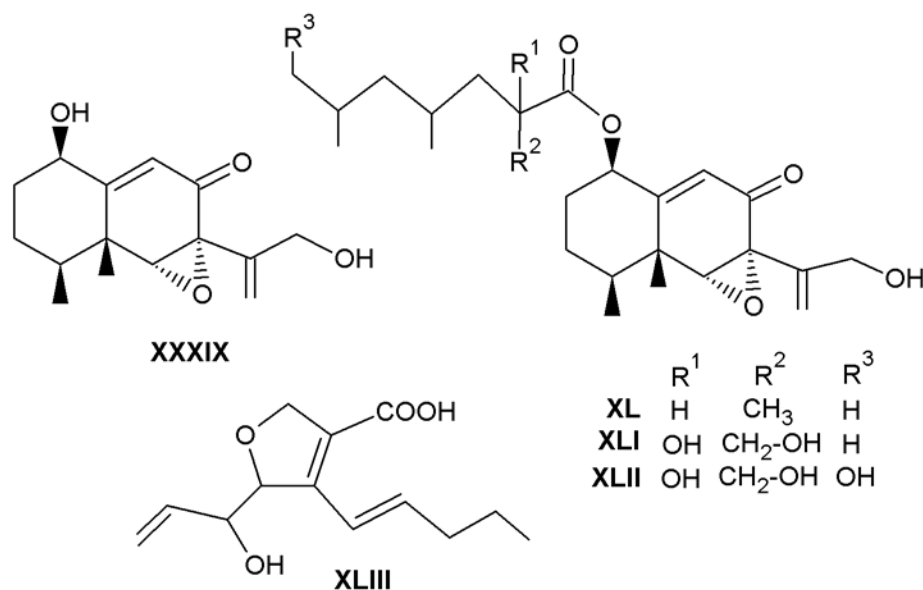
Os bioensaios realizados revelaram que todas as isocumarinas apresentaram forte atividade antifúngica contra o fungo fitopatogênico *C. cladosporioides*, com destaque para as substâncias XXXIII, XXXIV e XXXVII.

As substâncias XXXVII e XXXVIII também apresentaram significativa atividade antioxidante. Os bons resultados observados se devem provavelmente a presença de núcleos fenólicos e catecóis presentes nestas substâncias.

A substância XXXVIII também apresentou resultados promissores na avaliação da atividade anticolinesterásica^[60].

1.1.1.2 Substâncias isoladas de *Camarops sp.* (AM-02)

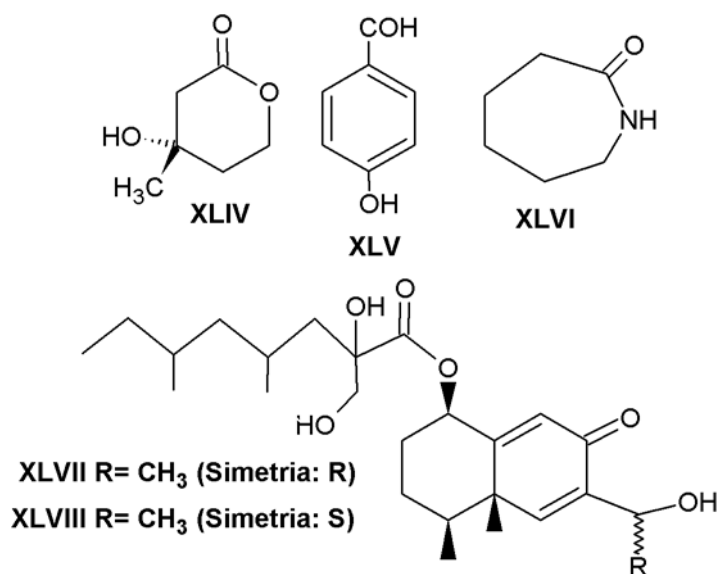
Do extrato bruto de *Camarops sp.* cultivado em milho, foram isolados 4 sesquiterpenos do tipo eremofilano, sendo 3 inéditos^[60] (substâncias XL, XLI e XLIII) e uma substância com anel furânico XLIII, também inédito (Figura 1.3, pág. 19)

Figura 1.3 - Substâncias isoladas de *Camarops* sp. por Camila M. de Oliveira

As substâncias XL e XLI apresentaram potente atividade inibitória da protease pepsina (ensaio anti-HIV).

Os resultados dos ensaios biológicos mostrados pelas substâncias produzidas por *Camarops* sp., reafirmam os endófitos como uma promissora fonte de metabólicos bioativos, sendo capazes de produzir importantes substâncias para o desenvolvimento de potenciais novos fármacos^[60].

Dando continuidade ao trabalho de doutorado desenvolvido por Oliveira, C. M.^[60] na busca por novas substâncias bioativas em *Camarops* sp., Gubiani, J. R.^[61], em seu trabalho de mestrado, recultivou e reinvestigou a produção metabólica de *Camarops* sp. (AM-02) em meio de milho. Este trabalho resultou no isolamento de 8 substâncias: mevalonolactona (XLIV), *para*-hidroxi benzaldeído (XLV), azepan-2-ona (XLVI), dois sesquiterpenos eremofilano inéditos XLVII e XLVIII, e os sesquiterpenos eremofilanos XL, XLI e XLIII (Figura 1.3, pág. 19) anteriormente isolados por Oliveira, C.M.^[60]. As estruturas das substâncias isoladas por Gubiani, J.R.^[61] podem ser visualizadas na Figura 1.4, pág. 20

Figura 1.4 - Substâncias isoladas de *Camarops* sp. por Juliana R. Gubiani^[62]

Observando a diversidade metabólica produzida por *Camarops* sp. em milho, o potencial biológico apresentado pelas substâncias isoladas e com o conhecimento prévio de que a produção metabólica dos micro-organismos endofíticos varia com o meio de cultura utilizado^[62], nos propomos neste trabalho ao re-cultivo de *Camarops* sp. em diversos meios de cultivo objetivando a avaliação da produção metabólica e a possível bioatividade das substâncias isoladas.

Em um levantamento bibliográfico realizado não foi possível encontrar nenhum registro do isolamento ou identificação de metabólitos secundários produzidos por *Camarops* sp. a não ser o publicado por Oliveira, C. M.^[59] Esta constatação descrita acima, reforçou nosso interesse no estudo da variação metabólica de *Camarops* sp. em diferentes meios de cultura.

1.1.2 O gênero *Camarops*

O gênero *Camarops* pertence taxonomicamente à família *Boliniaceae* (*Boliniales*), a qual é subdividida em 12 gêneros e aproximadamente 69 espécies. Dentre os gêneros fungicos descritos, *Camarops* e *Endoxyla* são os mais numerosos, com respectivamente 22 e 23 espécies fúngicas identificadas e catalogadas. Dinamarca, Suíça e Reino Unido são os países com a maior quantidade de registros de espécies fungicas pertencentes a família *Boliniaceae* localizadas em seus territórios, em um total de mais de 668 registros. No Brasil existem apenas três, a identificação no estado do Amazonas das espécies

Apiocamarops alba e *Camarops polysperma* em 1984 e 1985 respectivamente e de *Camarops ustulinoides* no estado de Santa Catarina em 2007 e 2008^[63 - 66].

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Buscar compreender a relação ecológica existente entre o fungo endofítico *Camarops* sp. e a sua espécie vegetal hospedeira *Alibertia macrophylla*.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar o cultivo, em escala reduzida, do fungo endofítico *Camarops* sp. em diversos meios de cultura líquido (MDB, Czapek[®], Extrato de Malte, Nutrient[®] e YM) e sólido (Arroz) a fim de se avaliar a produção metabólica quando submetido a crescimento em diferentes tipos de nutrientes.
- ✓ Avaliar a produção metabólica quimicamente através das análises por RMN de ¹H e CLAE – DAD e biologicamente através dos ensaios biológicos (atividades antifúngica, antioxidante, tripanocida e anticolinesterásica);
- ✓ A partir da avaliação do perfil químico e biológico dos extratos brutos obtidos em escala reduzida, selecionar o meio de cultura mais promissor para o recultivo de *Camarops* sp., agora em escala ampliada, visando a identificação/isolamento e a determinação estrutural dos metabólicos secundários produzidos;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Especificação do Material e Equipamentos Utilizados

3.1.1 Meios de cultura

Para a avaliação do perfil químico do fungo endofítico *Camarops sp.* foram utilizados os meios de cultura sólido e líquido descritos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Meios de cultura sólido e líquido utilizados para a avaliação do perfil químico e biológico de *Camarops sp.*

Meio de cultura	Tipo	C (g/L)	Composição	Especificação	Fabricante
EM	Líquido	20	Extrato de malte (20g)	Base para cultivo de fungos e bactérias	DIFCO
MDB	Líquido	24	Fécula de batata (4g), dextrose (20g)	Base para cultivo de leveduras e fungos	DIFCO
YM	Líquido	21	Extrato de levedura (3g), extrato de malte (3g), peptona (5g), dextrose (10g)	Base para cultivo de leveduras, fungos e outros micro-organismos acidúricos	DIFCO
Nutrient[®]	Líquido	8	Extrato de carne (3g), peptona (5g)	Base para cultivo de micro-organismos não-fastidiosos	DIFCO
Czapek[®]	Líquido	35	Sacarose (30g), NaNO ₃ (3g), Na ₂ (PO ₄) ₃ (1g), MgSO ₄ (0,5g), KCl (0,5g), FeSO ₄ (0,01g)	Base para cultivo de fungos e bactérias capazes de utilizar nitrogênio inorgânico	DIFCO
Arroz	Sólido	-	-	Arroz parbolizado	Tio João
BDA	Sólido	39	Fécula de batata (4g), dextrose (20g), 23 ágar (15g)	Base para cultivo de leveduras e fungos	SIGMA

3.1.2 Solventes utilizados

Deuterados: Merck, Aldrich e Fluka.

Não-Deuterados: Merck, J. T. Baker, Synth e Mallinckrodt P.A.

3.1.3 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Foram utilizadas placas comerciais de sílica 60G da Merck compostas por um fino filme de sílica gel com espessura de aproximadamente 250µm, utilizando como suporte uma estreita placa de alumínio. As revelações das substâncias separadas nas placas foram feitas por irradiação com UV (λ 254 e 366nm) e através da nebulização com solução metanólica contendo anisaldeído, com posterior aquecimento.

A solução de anisaldeído foi preparada pela adição de 1mL de anisaldeído, 20mL de ácido acético, 170mL de metanol e 10mL de ácido sulfúrico nesta ordem, tomando o cuidado de preparar o revelador em béquer envolto em gelo.

3.1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O perfil químico e o fracionamento das substâncias foram realizados por CLAE, utilizando um cromatógrafo binário (bombas modelo LC-20AT) da marca Shimadzu, equipado com detector UV-Vis de arranjo de diodos (DAD), modelo SPD M20A e autoamostrador SIL 20A.

3.1.5 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN – ^1H) e de Carbono (RMN – ^{13}C)

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram realizados em espectrômetro Varian INOVA utilizando como referência interna o TMS e operando na frequência de 500 MHz para o núcleo de hidrogênio e 125 MHz para o isótopo 13 do carbono.

3.1.6 Espectrometria de massas (EM)

As análises das frações e sub-frações foram realizadas em espectrômetro de massa modelo LCQ Fleet, da Thermo Scientific com analisador de captura de íons (*ion trap*), utilizando para tal o modo de injeção direta por eletrospray (modo negativo), com os seguintes parâmetros: temperatura do capilar a 275 °C; Voltagem do capilar variando entre 5 a 40 V; Voltagem do spray a 5 kV; Fluxo de gás de nitrogênio a 6 unidades; Tube lens a -100 V (modo negativo) ou 100 V (modo positivo); Fluxo de injeção da amostra a 10 µL/min utilizado bomba de infusão.

3.1.7 Ensaios biológicos

3.1.7.1 Atividade antifúngica*

Para a realização do ensaio antifúngico utilizou-se placas comerciais de sílica 60G da Merck e soluções reveladoras esterilizadas (solução C) de esporos do fungo *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides*.

Composição da solução C: Solução preparada no momento da aplicação utilizando 10mL da solução A + 60mL da solução B

Composição da solução A: Solução aquosa de glicose 30%

Composição da solução B: 7,0g de KH_2PO_4 ; 3,0g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 4,0g de KNO_3 ; 1,0g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,0g de NaCl por litro de H_2O .

* Ensaio realizado no Instituto Botânico de São Paulo – seção de Fisiologia Vegetal, sob responsabilidade da Dra. Maria Cláudia Marx Young.

3.1.7.2 Atividade antifúngica – Patógenos humanos*

Para a realização do ensaio da atividade antifúngica utilizou-se de um meio de cultura aquoso de RMPI – 1640, que consiste de 10,4 g de meio RPMI-1640 em pó (com glutamina e vermelho fenol, sem bicarbonato), 34,53 g de tampão de MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico) para 1 L de H_2O destilada. O pH é ajustado para 7,0 (25 °C) com NaOH (1 mol/L) e ao final, o meio é esterilizado por filtração em membrana (tamanho de poro: 0,22 μm) e armazenado em recipiente estéril a 4 °C.

* Ensaio realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Campus de Araraquara, Laboratório de Micologia Clínica, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

3.1.7.3 Atividade anticolinesterásica*

O ensaio para avaliação da atividade anticolinesterásica foi realizado pelo teste com reagente de Ellman, utilizando Fisostigmina como padrão positivo. As seguintes soluções foram utilizadas:

Solução A: Adiciona-se acetilcolinesterase (1000 U, Sigma, produto nº C2880) a 150mL de tampão Tris-HCl (0,05 M; pH=7.9). A solução estoque é armazenada a

4°C e no momento do uso, a solução é enriquecida com 0,1% de albumina de soro bovino.

Solução B: Adiciona-se 250mg de acetato de 1-naftila em 100mL de etanol;

Solução C: Adiciona-se 400mg do sal Fast Blue B em 160mL de água destilada;

Solução D: Mistura-se 10mL da solução B com 40mL da solução C.

* Ensaio realizado no Instituto Botânico de São Paulo – seção de Fisiologia Vegetal, sob responsabilidade da Dra. Maria Cláudia Marx Young.

3.1.7.4 Atividade tripanocida*

Para a realização do ensaio tripanocida foram utilizados os reagentes colorimétricos MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio), PMS (bromide phenazinemethosulfate), detergente SDS (dodecil sulfato de sódio) para dissolver os cristais de formazan formados e cultura estéril contendo os parasitas de *Trypanosoma cruzi*.

* Ensaio realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Laboratório de Imunologia, sob responsabilidade da Profa. Dra. Regina Maria Baretto Cicarelli

3.1.8 Ensaios químicos

3.1.8.1 Atividade antioxidante

O ensaio por CCDC utilizou placas de sílica 60G comerciais como fase estacionária, solução de anisaldeído como revelador e solução metanólica 0,02% (0,2g/L) do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH).

Para os ensaios por espectrofotometria (avaliação da porcentagem de sequestro do radical DPPH) foram utilizadas placas de microdiluição de 96 poços, do padrão quercetina, do leitor de microplacas Synergy-HTS e de uma solução 0,004% (0,04g/L) de DDPH.

3.1.9 Outros equipamentos

Autoclave vertical – Quimis Aparelhos científicos Ltda;

Balança Analítica – Mettler Toledo AG 245;

Câmara de fluxo Laminar – NUEIRE II, A/B3;

Deionizador – Milli-Q Plus;

Evaporador rotatório – Buchi;

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Coleta do Material Vegetal*

As folhas de *A. macrophylla* foram coletadas na estação ecológica experimental de Mogi-Guaçu, em Junho de 2001, na fazenda Campininha, e identificadas pela Profa. Dra. Inês Cordeiro, do Instituto de Botânica de São Paulo. A exsicata do material vegetal encontra-se depositada no Herbário do Jardim Botânico de São Paulo (N° SP 370.915).

* A coleta do material vegetal foi realizada por Geraldo Humberto da Silva, durante seu trabalho de Doutorado ^[67].

4.2 Obtenção dos fungos endofíticos de *Alibertia macrophylla**

As superfícies das folhas saudáveis de *A. macrophylla* foram esterilizadas por imersão em NaClO 1% (5 minutos) e etanol 70% (1 minuto), seguida de uma dupla lavagem em água estéril (1 minuto). A água da segunda lavagem foi plaqueada para verificação da presença de fungos remanescentes. Pedacos de folhas seccionadas assepticamente (3 a 4) foram inseridos em meio de cultura sólida contendo batata-dextrose-água (BDA) ou ágar-água (AA), preparados com antibiótico (sulfato de gentamicina, 50 mg/mL), para evitar o crescimento bacteriano. O crescimento dos fungos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras, que foram preservadas em frascos com água esterilizada (*slants*) ^[60].

Das folhas de *Alibertia macrophylla* foram isoladas 4 linhagens fúngicas codificadas como AM-01, 02, 03 e 04 ^[67]. As linhagens isoladas estão depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica/IQAr-SP.

* O isolamento dos fungos endofíticos associados a *A. macrophylla* foi realizado pelo Dr. Geraldo Humberto da Silva, durante seu doutorado, em 2005 ^[67].

4.3 Identificação microbiológica da cultura intitulada AM-02

O fungo endofítico AM-02 foi identificado como *Camarops* sp. pela Dra. Lara Durães Sette, do CPQBA/UNICAMP, CBMAI - Divisão de Recursos Microbianos

A linhagem fúngica pura de *Camarops* sp. encontra-se depositada nas micotecas do Departamento de Química Orgânica do IQAr/UNESP e do CPQBA.

4.4 Método Utilizado

O método experimental empregado para o cultivo e extração dos metabólitos secundários produzidos pelo fungo endofítico *Camarops sp.*, nos meios de cultura sólido e líquido, está resumida na Figura 4.1 e Figura 4.2, pág. 29. O esquema também faz referência a que ensaios químicos e biológicos os extratos brutos foram submetidos, assim como menciona o uso das técnicas de RMN de ^1H e CLAE para análise do perfil químico

Figura 4.1 – Etapas de obtenção do extrato bruto em meio líquido e avaliação do perfil químico e biológico.

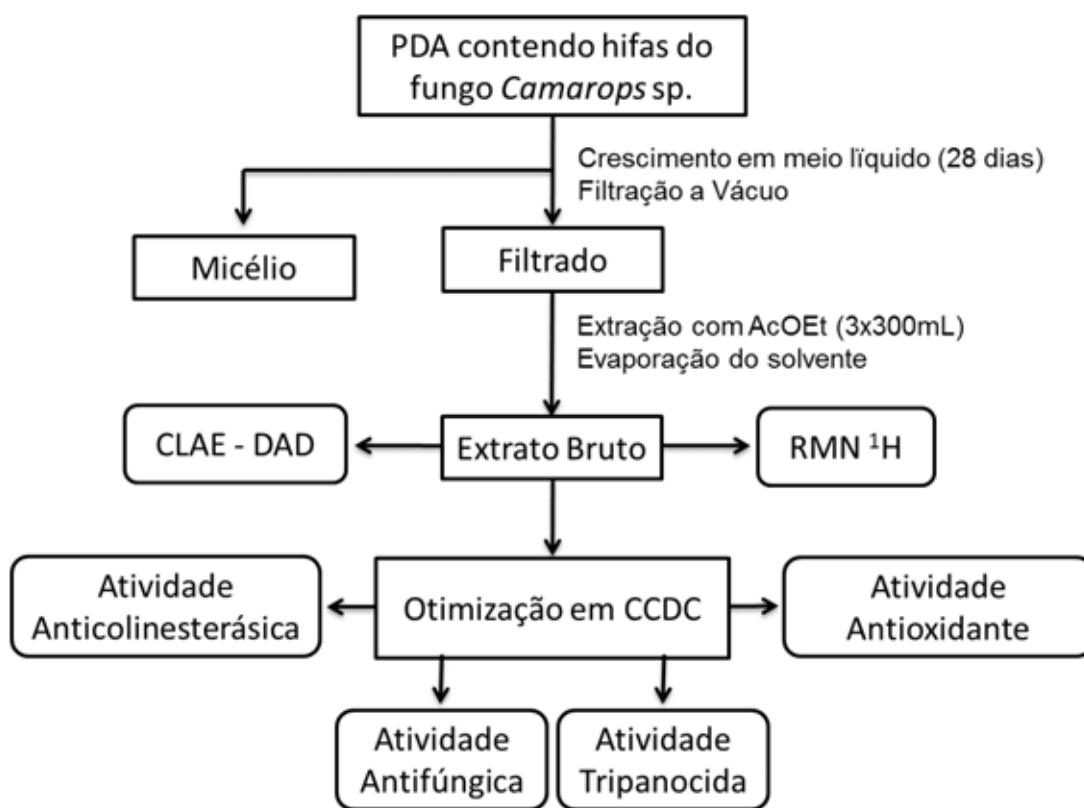
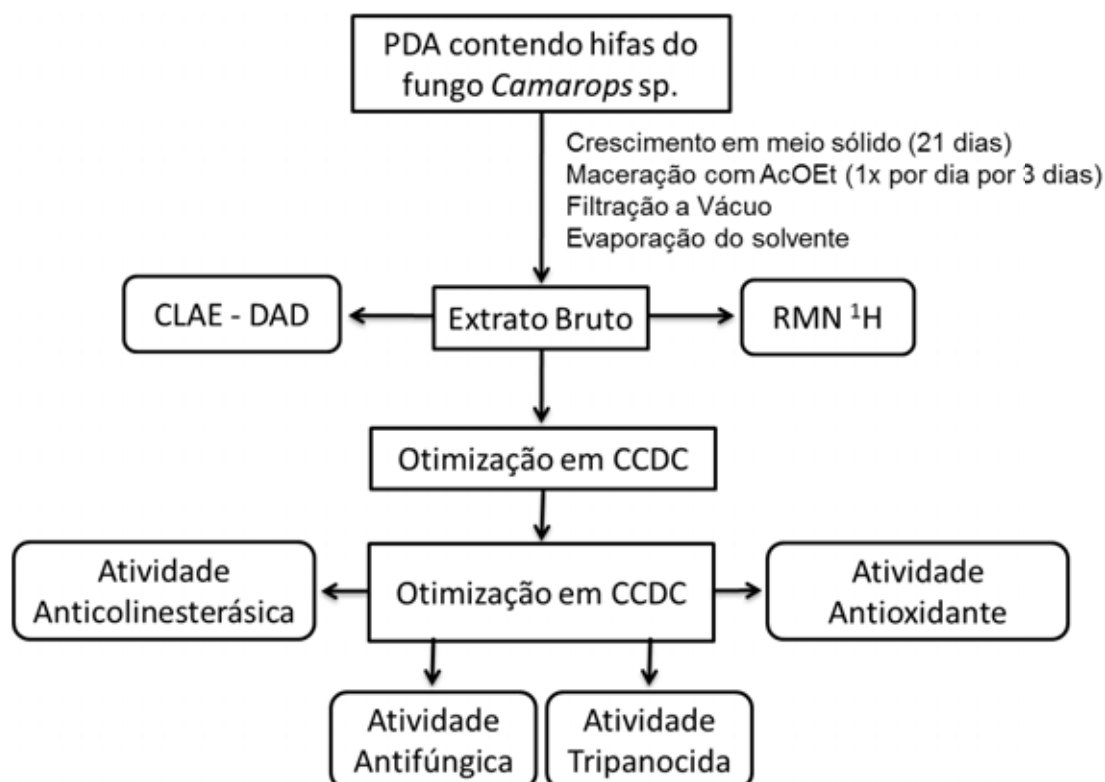


Figura 4.2 – Etapas de obtenção do extrato bruto em meio sólido e avaliação do perfil químico e biológico.



4.5 Cultivo do endófito em escala reduzida em diversos meios de cultura e obtenção do extrato bruto

O fungo endofítico *Camarops* sp inicialmente preservado em *slants* estéreis foi repicado para placas de Petri contendo BDA (20mL) e incubado por um período de uma a duas semanas a temperatura controlada de 25°C (Figura 4.3, pág. 30). Após esse período de crescimento, o fungo foi repicado novamente para os meios de cultura líquidos (EM, MDB, YM, Nutrient® e Czapek®) e sólido (Arroz).

O cultivo em meio líquido foi realizado em frascos de Erlenmeyer (500mL) contendo cada um 300mL do meio de cultura, em um total de 3 frascos por meio de cultura. Depois de inoculados os meios de cultura foram incubados em modo estático por 28 dias sob temperatura controlada de 25°C. Após esse período de fermentação, os meios líquidos foram filtrados a vácuo a fim de se separar os caldos contendo os metabólicos secundários excretados pelo fungo, dos micélios. Os filtrados dos meios líquidos (900mL por meio) foram submetidos a partição líquido-líquido com AcOEt (3x 300mL), secos em evaporador rotatório a vácuo fornecendo os respectivos extratos brutos.

O cultivo em meio sólido foi realizado em frascos de Erlenmeyer (500mL) contendo 90g de arroz e 75mL de água purificada cada, em um total de 3 frascos. Depois de inoculado, o meio de cultura sólido foi incubado em modo estático por 21 dias sob temperatura controlada de 25°C. Após esse período, o meio de cultura sólido foi macerado com AcOEt e sua extração assistida por ultrassom por 30 minutos, este procedimento foi realizado uma vez por dia, durante 3 dias. Os extratos foram reunidos e filtrados a vácuo, secos sob vácuo em evaporador rotatório fornecendo o extrato bruto em meio sólido.

Todos os meios de cultura utilizados foram devidamente esterilizados previamente à inoculação do fungo, ficando em observação por no mínimo três dias, período no qual se verificou visualmente a presença ou ausência de colônias bacterianas ou fúngicas, que são indícios de contaminação. Os meios líquidos foram autoclavados uma única vez à temperatura de 121°C, por 20 minutos e o meio sólido, três vezes (1x por dia) à temperatura de 121°C, por 40 minutos. Os processos de repicagem foram realizados em capela de fluxo laminar vertical utilizando-se de uma chama proveniente de um bico de Bunsen para a esterilização dos materiais utilizados.

Figura 4.3 - *Camarops* sp. cultivado em BDA



Os extratos brutos obtidos foram pesados (Tabela 5.1, pág. 43) e submetidos à análise do perfil químico por CCDC, RMN de ^1H e do perfil cromatográfico por CLAE-DAD, tendo sido posteriormente submetidos a avaliação das atividades biológicas (atividade antifúngica, anticolinesterásica e tripanocida) e química (atividade antioxidante).

4.6 Avaliação do perfil químico e biológico de *Camarops sp* em diversos meios de cultura

4.6.1 Avaliação dos extratos brutos por CLAE-DAD

A análise do perfil cromatográfico de cada extrato bruto foi realizada em cromatógrafo Shimadzu, equipado com coluna analítica Luna Phenomenex® (4.6x250mm, 5µm) de fase estacionária do tipo octadesil silano (C-18). Utilizou-se modo de eluição gradiente H₂O:MeOH (95:05 → 0:100) em 40 minutos, permanecendo nessa condição final por mais 10 minutos a fim de se ter a certeza da eluição de todas as substâncias. O fluxo utilizado foi de 1mL/min e o comprimento de onda de leitura (λ) escolhido foi de 254nm. As amostras dos extratos brutos foram preparadas (1mg/mL), filtradas em membrana (0,45µm) e injetadas (20µL) no sistema cromatográfico por auto amostrador. Os cromatogramas obtidos dos extratos brutos analisados podem ser visualizados na Figura 5.2, pág. 45.

4.6.2 Avaliação dos extratos brutos por CCDC

Os extratos brutos foram solubilizados em metanol e analisados por CCDC. Soluções contendo um ou mais solventes orgânicos (CHCl₃, AcOEt, MeOH) em diversas proporções (v/v) foram utilizadas e testadas a fim de se obter fases móveis com força de eluição e seletividade diferentes (α). Uma boa resolução cromatográfica é condição essencial para a realização dos ensaios antifúngico, anticolinesterásico, tripanocida e antioxidante. As placas foram então eluídas em cubas saturadas pela FM e ao final da corrida cromatográfica, cada placa era fotografada enquanto irradiada com luz UV (λ 254 e 366nm). Uma vez localizadas as substâncias que apresentaram absorção no UV, as placas foram reveladas por nebulização com anisaldeído seguida de aquecimento em placa de aquecimento. A melhor separação e resolução cromatográfica das substâncias presentes nos extratos brutos por CCDC foi obtida utilizando o sistema de eluição CH₃Cl:MeOH (85:15) para o extrato em arroz e CH₃Cl:MeOH (8:2) para os extratos em EM, YM, Czapek®, MDB e Nutrient®. Os resultados podem ser visualizados na Figura 5.1, pág. 44.

4.6.3 Avaliação do perfil biológico – Ensaios biológicos

Os extratos brutos foram submetidos aos ensaios biológicos para avaliação das atividades antifúngica, anticolinesterásica e tripanocida.

4.6.3.1 Atividade antifúngica

4.6.3.1.1 Atividade Antifúngica – Fitopatógenos*

Soluções dos extratos brutos foram preparadas na concentração de 40mg/mL e 10µL (400µg) de cada solução foram aplicados, junto com o padrão positivo, nas extremidades de placas de sílica. Essas foram submetidas à CCDC (em duplicata) utilizando o sistema de eluição previamente otimizado (ver item 4.6.2) a temperatura de aproximadamente 30°C. Ao final da corrida cromatográfica, as placas foram fotografadas enquanto irradiadas com luz UV (λ 254 e 366nm). Uma vez localizadas as substâncias, as placas foram nebulizadas com solução reveladora (solução C) uma delas contendo esporos do fungo *Cladosporium sphaerospermum* e a outra esporos do fungo *C. cladosporioides*, ambas com concentração de 5×10^7 esporos/mL. As placas foram incubadas em atmosfera úmida, a temperatura controlada de 25°C por um período de 2 a 3 dias, na ausência de luz. Decorrido esse período de incubação, o fungo em questão cresceu sobre toda a placa, exceto nas regiões onde se encontravam as substâncias ativas que inibiram o crescimento do fungo gerando manchas brancas na cromatoplaça. Os resultados podem ser visualizados na Figura 5.6, pág. 50.

O padrão positivo utilizado foi a nistatina (1µg), substância reconhecida por sua atividade antifúngica, ao inibir o ergosterol, componente presente apenas na membrana plasmática de fungos, ocasionando a morte destes.

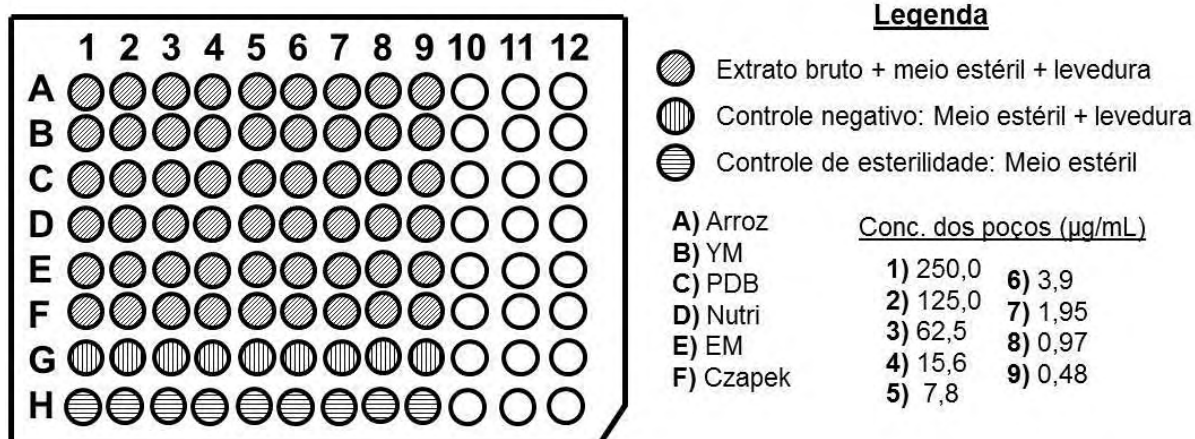
* Ensaio realizado no Instituto Botânico de São Paulo – seção de Fisiologia Vegetal, sob responsabilidade da Dra. Maria Cláudia Marx Young.

4.6.3.1.2 Atividade antifúngica – Patógenos Humanos*

Soluções estoque dos extratos brutos foram preparadas individualmente utilizando meio de RPMI (meio de cultura). Os ensaios foram realizados por microdiluição utilizando placas de 96 poços esterilizadas, uma para cada espécie de levedura testada. Por meio de uma série de consecutivas diluições a partir da solução estoque, concentrações finais de 250,0; 125,0; 62,5; 15,6; 7,8; 3,9; 1,95;

0,97 e 0,48 µg/mL foram obtidas respectivamente nos poços 1 a 9 das fileiras A a F de uma placa de microdiluição. Em seguida, os primeiros 9 poços das fileiras A a G foram inoculados com 100 µL de uma suspensão padronizada de levedura, o que leva a diluição dos extratos as concentrações antes mencionadas. Cada poço apresentou uma concentração de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ células de levedura por mililitro. A fileira A foi utilizada para se realizar os ensaios da atividade do extrato bruto de Arroz, assim como a fileira B foi utilizada para o extrato bruto de YM, sendo as demais utilizadas conforme o esquema da Figura 4.4, pág 33 abaixo. O controle negativo foi realizado na fileira G, contendo os poços apenas o meio estéril (RPMI) e o inóculo em questão, sendo isento a presença do extrato bruto. Na fileira H foi realizado o controle da esterilidade do meio de cultura, contendo os poços apenas o meio estéril. Um total de 6 leveduras foram testadas, sendo elas: *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *Cryptococcus neoformans* tendo todas elas utilizado a metodologia acima descrita.

Figura 4.4 - Esquema da placa de microdiluição utilizada para a realização dos ensaios da atividade antifúngica



Após a preparação de todas as placas, estas foram incubadas a 35°C, por 24 horas em modo estático. A ausência de crescimento fúngico nos poços da fileira H certificou que o meio de cultura utilizado estava estéril. A ausência de crescimento da levedura em questão nos poços das fileiras A a F é indício da presença de substâncias antifúngicas nos extratos brutos analisados. A fim de se simplificar a leitura dos resultados, os poços das fileiras A a F receberam uma pontuação (escore) quando comparados visualmente com os respectivos poços da fileira G (controle negativo), usando a seguinte escala: 0 = opticamente claro, 1 =

crescimento indefinido; 2 = redução proeminente de crescimento; 3 = ligeira redução de crescimento e 4 = nenhuma redução do crescimento. O valor da Concentração Inibitória Mínima (CIM), para cada extrato analisado, foi definido tendo como base o poço contendo a menor concentração na qual se observou o escore zero (opicamente claro). Os resultados podem ser visualizados na Tabela 5.4, pág. 52.

* Ensaio realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Campus de Araraquara, Laboratório de Micologia Clínica, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

4.6.3.2 Atividade anticolinesterásica*

Soluções dos extratos brutos foram preparadas na concentração de 20mg/mL e 10 μ L (200 μ g) de cada solução foi aplicado, juntamente com o padrão positivo, nas extremidades de placas de sílica. Essas foram submetidas à CCDC (em duplicata) utilizando as condições de eluição anteriormente otimizadas (ver item 4.6.2, pág. 31). Ao final da corrida cromatográfica, as placas foram fotografadas enquanto irradiadas com luz UV (λ 254 e 366nm). Uma vez localizadas as substâncias, uma das placas foi revelada quimicamente com uma solução contendo ácido sulfúrico seguida de aquecimento em manta térmica e a outra foi nebulizada com a solução A contendo a enzima acetilcolinesterase (AChE) (6,66U), incubada em atmosfera úmida a 37°C por 20min sendo em seguida borrifada com a solução reveladora D. Caso existam substâncias presentes nos extratos brutos capazes de inibir a ação da enzima AChE, manchas brancas surgem na cromatoplaça sobre um fundo de coloração rosa, devido a reação entre o produto da degradação da acetilcolina com a enzima acetilcolinesterase e o reagente revelador D. Os resultados podem ser visualizados na Figura 5.7, pág. 53 e resumidos na Tabela 5.5, pág. 53.

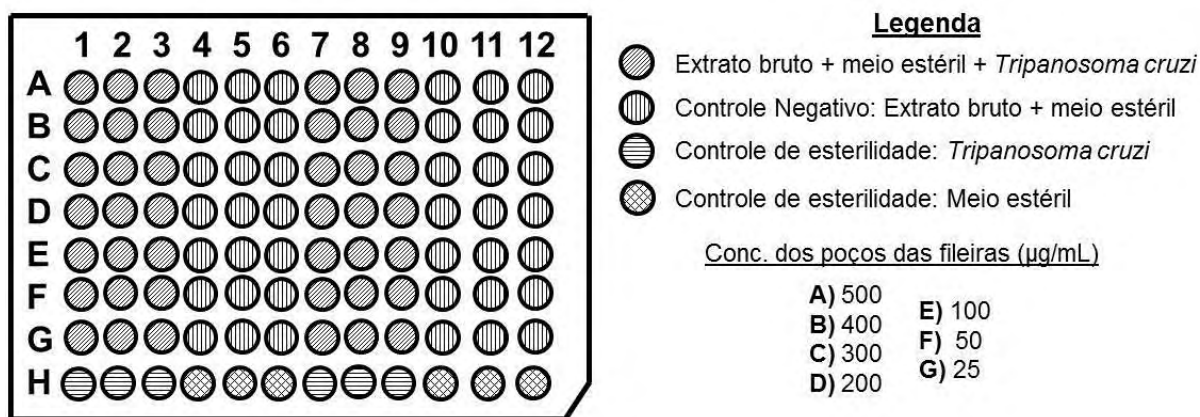
O padrão positivo utilizado foi a fisostigmina (0,05 μ g), um carbamato que inibe a enzima acetilcolinesterase (AChE) ao se ligar reversivelmente a ela, impedindo assim o metabolismo da acetilcolina, um neurotransmissor. Ao impedir a degradação da acetilcolina, esta não reage com a solução reveladora D não formando o composto de coloração marron. A fisostigmina, em doses terapêuticas, atua como uma droga no tratamento de doenças como o mal de Alzheimer, mas em doses mais elevadas pode acabar levando ao óbito por envenenamento.

* Ensaio realizado no Instituto Botânico de São Paulo – seção de Fisiologia Vegetal, sob responsabilidade da Dra. Maria Cláudia Marx Young.

4.6.3.3 Atividade tripanocida*

Soluções estoque dos extratos brutos foram preparadas individualmente na concentração de 0,5mg/mL em DMSO. Os ensaios foram realizados por microdiluição em caldo utilizando placas de 96 poços esterilizadas, uma para cada extrato bruto testado. Por meio de uma série de consecutivas diluições a partir da solução estoque, concentrações finais de 500; 400; 300; 200; 100; 50 e 25µg/mL foram obtidas em todos os poços das fileiras A a G respectivamente. Os poços 1,2,3 e 7,8,9 de todas as fileiras (A a H) foram então inoculadas com o parasita, sendo que a concentração do parasita obtida foi a mesma em todos os poços. A fileira H foi utilizada como controle da esterilidade do meio de cultura e do meio dos parasitas, contendo os poços das colunas 1,2,3 e 7,8,9 somente os parasitas e os poços 4,5,6 e 10,11,12 somente o meio de cultura. O esquema da placa de microdiluição pode ser visualizado na Figura 4.5, pág. 35.

Figura 4.5 - Esquema da placa de microdiluição utilizada para a realização dos ensaios da atividade tripanocida



A seguir, as placas foram incubadas em câmara úmida a 28°C por 72 horas. Após esse período, antes de se adicionar a solução reveladora (MTT), a presença de contaminação nas placas foi verificada. As placas foram submetidas à observação em microscópio (invertido) em busca da proliferação de matéria orgânica (MO). Caso a causa da contaminação seja proveniente do extrato bruto analisado, será observada a proliferação de MO nos poços do controle negativo, sendo a contaminação mais intensificada nas fileiras de maior concentração de EB

(contaminação em A > B > C...) e não será observada a proliferação de MO nos poços da fileira H (controle da esterilidade). Caso a contaminação seja proveniente do meio e/ou dos parasitas haverá proliferação de MO em todos os poços da placa inclusive nos poços da fileira H. Após se verificar a ausência de contaminação nas placas, adicionou-se 10 µL de solução MTT + PMS por orifício (2,5mg/mL de MTT e 0,22 mg/mL de PMS) em todos os poços da placa, repetindo-se a incubação por mais 1h15min ao abrigo da luz. Adicionou-se 100 µL de solução SDS 10%/HCl 0,01M para dissolver os cristais de formazan formados sendo a placa novamente incubada por mais 30 min.

A determinação da concentração mínima necessária para que 50% dos parasitas morram (IC₅₀) foi determinada com a construção de gráficos das absorbâncias obtidas durante a leitura da Densidade Óptica (DO) realizada utilizando leitor de Elisa (BioRad) a 595 nm. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 5.6, pág. 56.

* Ensaio realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Laboratório de Imunologia, sob responsabilidade da Profa. Dra. Regina Maria Baretto Cicarelli

4.6.4 Avaliação do perfil químico – Ensaio antioxidante por sequestro do radical livre estável DPPH

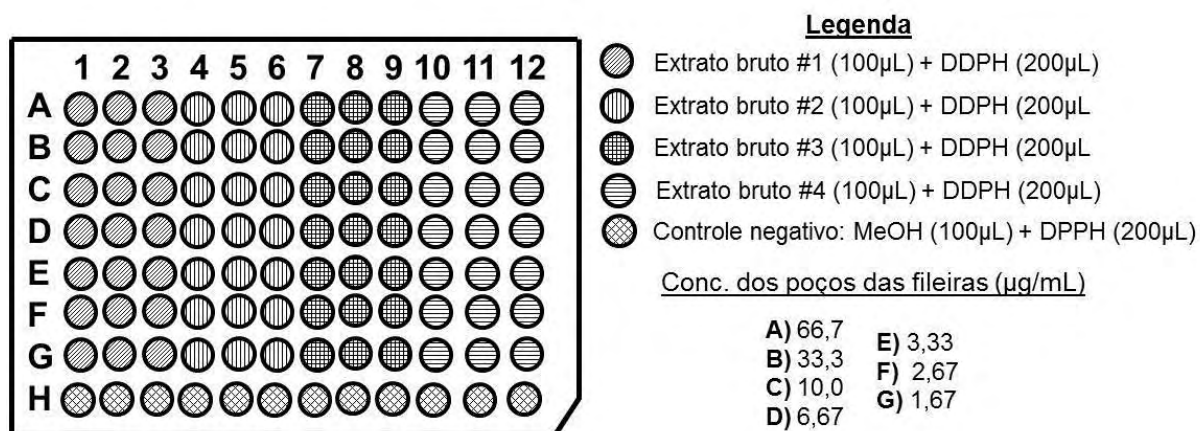
4.6.4.1 Ensaio da atividade antioxidante realizado por CCDC

Os extratos brutos foram solubilizados em metanol e aplicados, com a ajuda de capilares, nas extremidades de placas de sílica e submetidos à CCDC (em duplicata) utilizando o sistema de eluição previamente otimizado (ver item 4.6.2, pág. 31). Ao final da corrida cromatográfica, uma das placas foi fotografada enquanto irradiada com luz UV (λ 254 e 366nm) e em seguida revelada através de nebulização com anisaldeído seguido de aquecimento em manta térmica. A outra placa foi revelada por nebulização com uma solução metanólica 0,02% de DDPH e exposta a luz solar por um período de aproximadamente 60 minutos. Ao final desse período, o indício da presença, nos extratos brutos, de substâncias com potencial atividade antioxidante é verificada pelo aparecimento de halos de coloração amarelada sobre a cromatoplaça que apresenta uma coloração roxa, cor característica do radical DPPH. Os resultados podem ser visualizados na Figura 5.11, pág. 59.

4.6.4.2 Ensaio da atividade antioxidante por espectrofotometria

Os ensaios foram realizados por microdiluição, utilizando placas de 96 poços esterilizadas, uma placa para cada 4 extratos brutos testados. Soluções estoque dos extratos brutos foram preparadas individualmente na concentração de 1mg/mL em meio de MeOH. Por meio de uma série de consecutivas diluições, concentrações finais de 66,7; 33,3; 10,0; 6,67; 3,33; 2,67 e 1,67 $\mu\text{g/mL}$ foram obtidas respectivamente nos poços (100 μL por poço) das fileiras A a G de uma placa de microdiluição, sendo reservadas três fileiras por extrato bruto testado (análise em triplicata). Em seguida foram adicionados 200 μL de uma solução 0,004% de DDPH a todos os poços da placa e esta mantida ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. A fileira H foi utilizada como controle negativo, contendo cada poço 100 μL de MeOH e 200 μL de DPPH. O esquema da placa pode ser visualizado na Figura 4.6, pág. 37.

Figura 4.6 - Esquema da placa de microdiluição utilizada para a realização dos ensaios da atividade antioxidante



O padrão positivo utilizado foi a quercetina, um composto flavonoide que apresenta 4 grupos hidroxila ligados a 2 anéis aromáticos. A quercetina foi testada nas seguintes concentrações: 33,3; 26,7; 20,0; 13,3; 6,7; 3,3 e 1,7 μM utilizando a mesma metodologia descrita para os extratos brutos.

Utilizou-se também de uma placa para o branco, ou seja, todos os poços de uma placa de microdiluição foram preenchidos com 300 μL de MeOH.

Decorrido os 30 minutos, foi realizada a leitura da absorbância dos poços das placas do branco, do padrão e dos extratos brutos utilizando o λ de 517nm para a

leitura das absorvâncias. Os dados obtidos então foram processados utilizando a fórmula a seguir para o cálculo da porcentagem de sequestro do radical livre estável DDPH (%), assim sendo possível gerar os gráficos das atividades antioxidantes para as amostras e para o padrão.

$$\Delta A(\%) = \frac{(Abs. \text{ do controle negativo} - Abs. \text{ do Branco} - Abs. \text{ da Amostra ou padrão})}{(Abs. \text{ do controle negativo} - Abs. \text{ do Branco})} \times 100$$

A atividade antioxidante foi expressa em termos de IC₅₀ (concentração do extrato em mg/mL necessário para sequestrar 50% do radical livre DPPH). Os resultados podem ser visualizados na Figura 5.12 e na Figura 5.13, pág. 60 e estão resumidos na Tabela 5.7, pág. 60.

4.7 Cultivo do endófito em escala ampliada em meio de Czapek® e obtenção do extrato bruto

O fungo endofítico *Camarops sp*, preservado em *slants*, estéreis foi repicado para placas de Petri contendo BDA (20mL) e incubado por um período de uma a duas semanas a temperatura controlada de 25°C. Após esse período de crescimento, o fungo foi inoculado em 19 frascos de Erlenmeyer (500mL) contendo cada um 300mL de meio líquido de Czapek®, previamente esterilizados. Depois de inoculados os meios de cultura foram incubados em modo estático por 28 dias sob temperatura controlada de 25°C. Após este período, os meios foram filtrados a vácuo e o filtrado (5,7L) posteriormente submetido a uma partição líquido-líquido com AcOEt (3 x 2,85L), seco em evaporador rotatório fornecendo o extrato bruto.

A produção metabólica foi avaliada por CLAE-DAD utilizando os mesmos parâmetros descritos no item 4.6.1, pág. 31 e o cromatograma foi comparado com o obtido em escala reduzida (Figura 5.14, pág. 62).

4.8 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de Czapek®

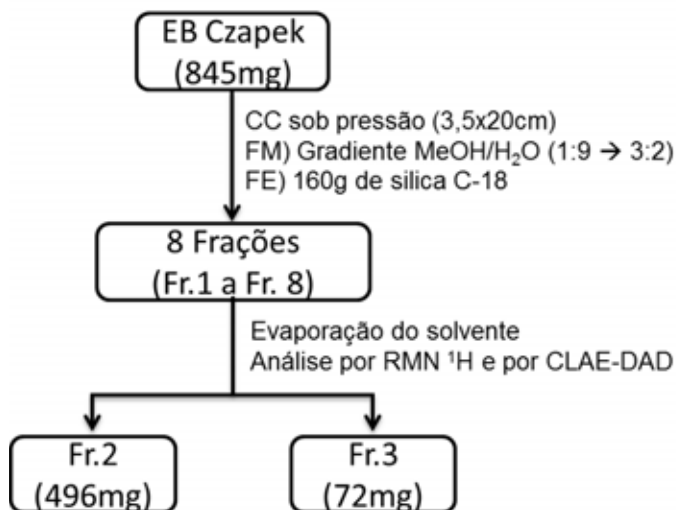
O extrato bruto (845mg) foi fracionado por cromatografia em coluna sob pressão, utilizando 160g de sílica do tipo octadecil silano (C-18), empacotada a 20cm de altura em uma coluna com 3,5cm de diâmetro interno. Foi utilizado um sistema de eluição em gradiente (Tabela 4.1, pág. 39) sendo ao todo coletadas 8 frações, cada uma contendo 210mL (3Vm). Depois de secas, as frações foram

analisadas por RMN de ^1H e por CLAE-DAD, utilizando os mesmos parâmetros descritos no item 4.6.1, pág. 31. A análise dos resultados, e das massas obtidas, nos conduziram a escolha das frações Fr.2 e Fr.3 para se dar continuidade ao processo de fracionamento do extrato bruto. A metodologia utilizada pode ser visualizada no fluxograma da Figura 4.7, pág. 39

Tabela 4.1 - Sistema de eluição utilizado para o fracionamento do extrato bruto obtido do meio de cultura Czapek[®] em escala ampliada

Fração (n°)	Sistema de eluição (MeOH:H ₂ O)
1	1:9 MeOH:H ₂ O
2	15:85 MeOH:H ₂ O
3	1:4 MeOH:H ₂ O
4	25:75 MeOH:H ₂ O
5	3:7 MeOH:H ₂ O
6	2:3 MeOH:H ₂ O
7	1:1 MeOH:H ₂ O
8	3:2 MeOH:H ₂ O
Limpeza	100% MeOH

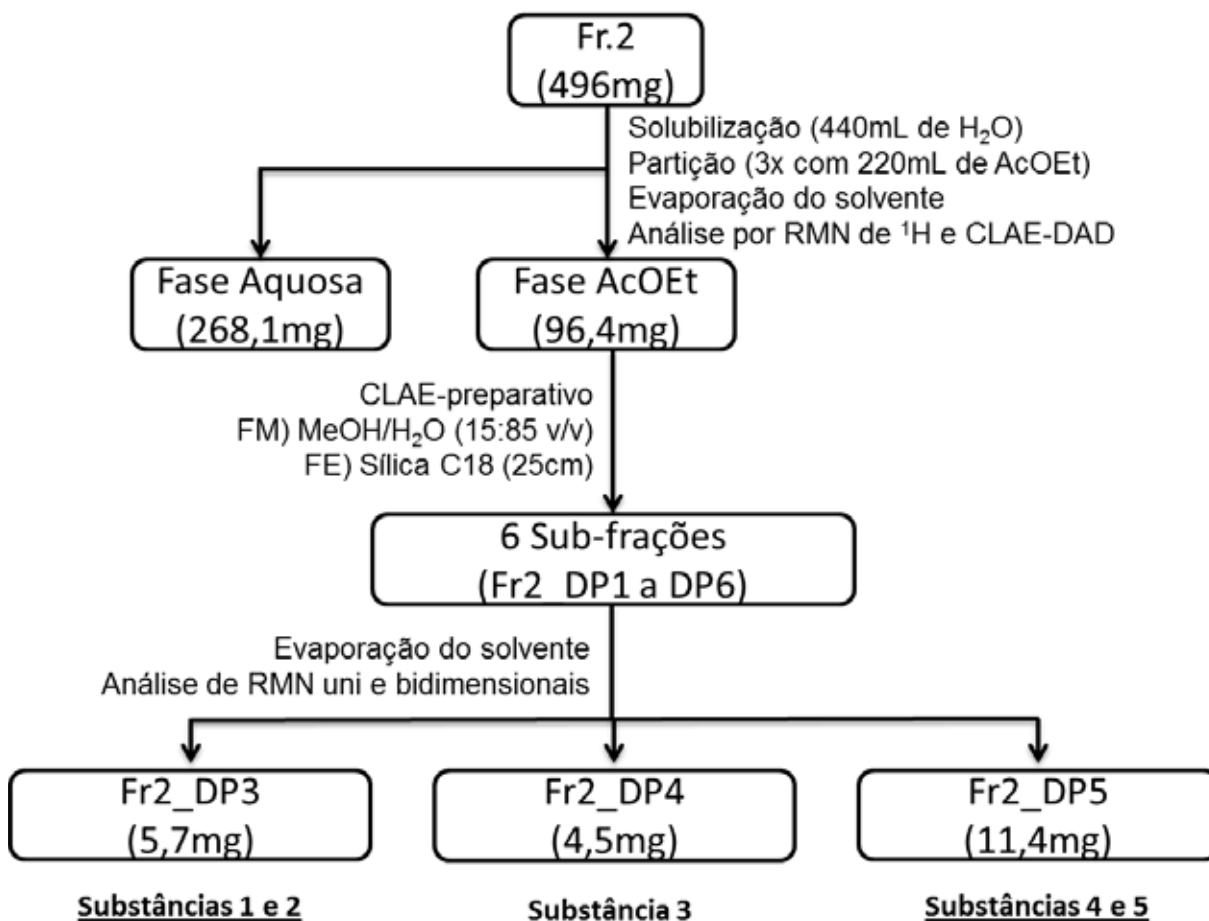
Figura 4.7 - Fluxograma do método de fracionamento do extrato bruto de Czapek[®]



4.8.1 Fracionamento e purificação das frações selecionadas

4.8.1.1 Fracionamento da Fr.2

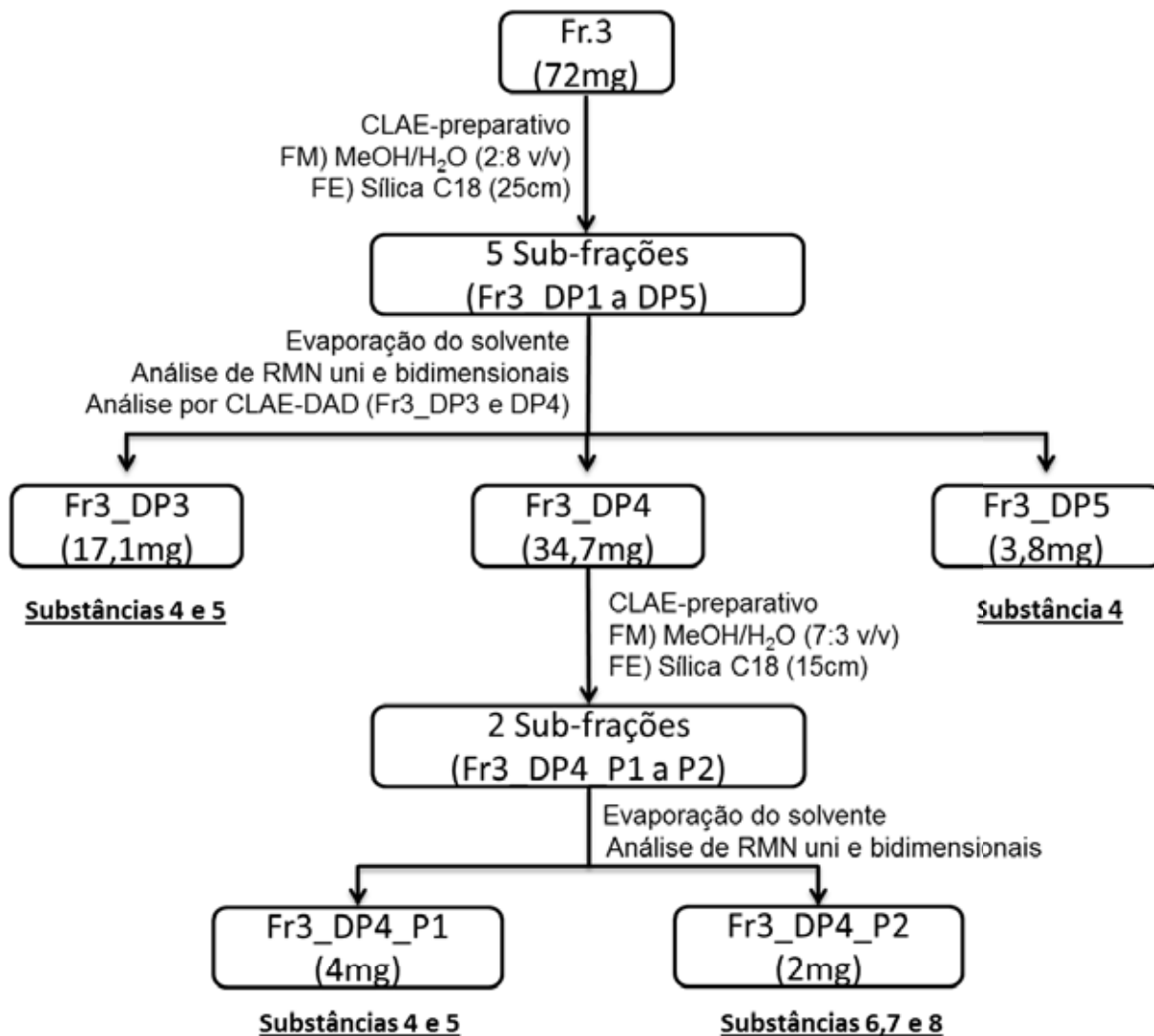
Figura 4.8 – Fluxograma método de fracionamento da Fr. 2 e obtenção das substâncias 1 a 5



O fracionamento em CLAE foi realizado em cromatógrafo Shimadzu equipado com coluna semi-preparativa Synergi Hydro Phenomenex® (21,2x250 mm, 4 µm) de fase estacionária do tipo octadesil silano (C18). Utilizou-se modo de eluição isocrático MeOH/H₂O (15:85 v/v) com um tempo de corrida de aproximadamente 60 minutos. O fluxo utilizado foi de 10 mL/min e a leitura com λ=254 nm. A amostra (fase orgânica) foi solubilizada na FM, filtrada em membrana (0,4 5µm) e injetada seis vezes (8 mg/injeção) utilizando um *loop* de 1 mL.

4.8.1.2 Fracionamento da Fr.3

Figura 4.9 – Fluxograma do método de fracionamento da Fr.3 e obtenção das substâncias 4 a 8.



A fração 3 (Fr.3) foi submetida a CLAE em cromatógrafo Shimadzu equipado com coluna semi-preparativa Supelcosil Supelco® (21,2x250 mm, 12 µm) de fase estacionária do tipo octadesil silano (C18). Utilizou-se modo de eluição isocrático MeOH/H₂O (2:8 v/v) com um tempo de corrida de aproximadamente 15 minutos. O fluxo utilizado foi de 10 mL/min e a leitura com $\lambda=254$ nm. A amostra (Fr.3) foi solubilizada na FM, filtrada em membrana (0,45 µm) e injetada 24 vezes (3mg/injeção) utilizando um *loop* de 1 mL.

A sub-fração Fr.3_DP4 foi submetida a CLAE-DAD utilizando cromatógrafo Shimadzu equipado com coluna semi-preparativa Luna Phenomenex® (21,2x150mm, 5µm) de fase estacionária do tipo octadesil silano (C18). Utilizou-se modo de eluição

isocrático MeOH/H₂O (7:3 v/v) com um tempo de corrida de aproximadamente 25 minutos. O fluxo utilizado foi de 10mL/min e a leitura com $\lambda=254$ nm. A amostra (Fr3_DP4) foi solubilizada na FM, filtrada em membrana (0,45 μ m) e injetada 7 vezes (4 mg/injeção) utilizando um *loop* de 1 mL.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e avaliação química e biológica dos extratos brutos obtidos em escala reduzida

5.1.1 Massas dos extratos brutos obtidos em escala reduzida

O fungo endofítico *Camarops sp.* foi cultivado em diversos meios de cultura sólido (270g) e líquido (900mL) por 21 e 28 dias, respectivamente. Os metabólitos secundários produzidos pelo fungo foram extraídos por partição líquido-líquido (meios líquidos) e macerados (meios sólidos), com AcOEt, sendo posteriormente secos em evaporador rotatório sob vácuo fornecendo os respectivos extratos brutos (Figura 4.1 e Figura 4.2, pág. 28). Os extratos brutos obtidos foram pesados (Tabela 5.1, pág. 43) e avaliados por CLAE-DAD, RMN de ^1H e CCDC.

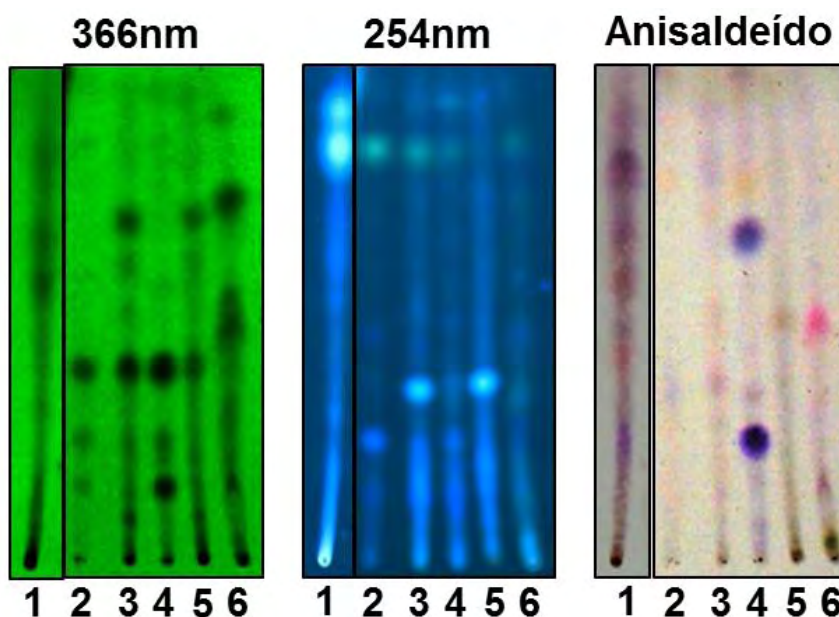
Tabela 5.1 - Massas dos extratos brutos obtidos do fungo *Camarops sp.* cultivado em meios de cultura líquido e sólido.

Meio de Cultura	Massa (mg)
MDB	97,3
EM	62,1
Czapek [®]	281,9
YM	13,4
Nutrient	33,9
Arroz	4176

5.1.2 Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos (escala reduzida)

A melhor separação e resolução cromatográfica, das substâncias presentes nos extratos brutos por CCDC, foi obtida utilizando o sistema de eluição $\text{CH}_3\text{Cl}:\text{MeOH}$ (85:15) para o extrato em arroz e $\text{CH}_3\text{Cl}:\text{MeOH}$ (8:2) para os extratos em EM, YM, Czapek[®], MDB e Nutrient[®] (Figura 5.1, pág. 44).

Figura 5.1 - Avaliação do perfil químico dos extratos brutos por CCDC.

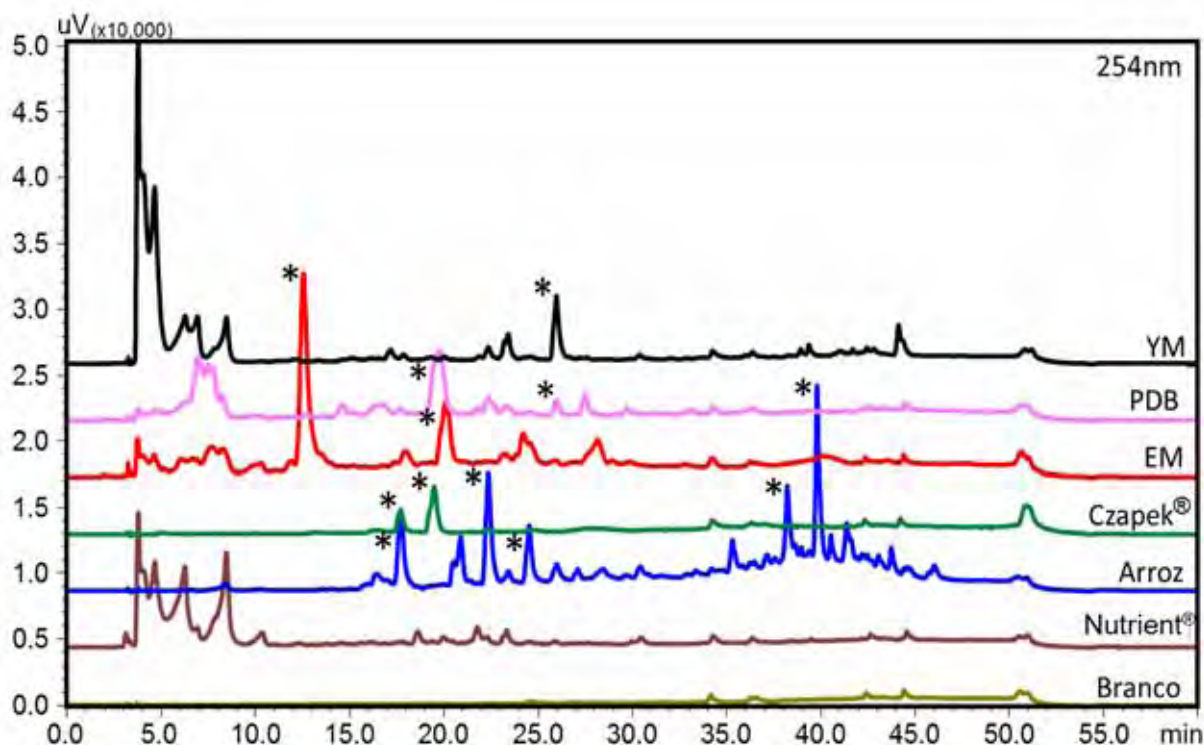


Legenda: 1- Arroz; 2-YM; 3-MDB; 4-Nutrient®; 5-EM; 6-Czapek®.

As cromatoplacas revelaram substâncias de média a alta polaridade, no eluente utilizado, em sua maioria com fator de retenção (R_f) < 0,5. Observou-se também a presença de substâncias na base da aplicação da amostra, retidas devido a baixa força de eluição da fase móvel utilizada. No entanto a condição de eluição utilizada permitiu a obtenção de um sistema com uma boa resolução cromatográfica. A diversidade de manchas com fatores de retenção diferentes presentes nos extratos confirma que a produção de metabólicos secundários pelo micro-organismo é influenciada pelo tipo de meio de cultura utilizado. Alguns extratos brutos revelaram manchas com mesmo R_f , no entanto não se pode afirmar que tais manchas correspondam às mesmas substâncias utilizando esta análise.

Em seguida os extratos foram submetidos a CLAE-DAD e a análise dos cromatogramas obtidos (Figura 5.2, pág. 45) evidenciaram a presença de inúmeras substâncias de média a alta polaridade em todos os extratos brutos. Também foi possível observar uma variação da produção metabólica nos diferentes meios de cultura, pois os cromatogramas apresentaram picos com diferentes tempos de retenção. Este fato reforça os resultados obtidos na análise dos extratos por CCDC, no qual o perfil cromatográfico obtido pelos fungos varia em função dos nutrientes presentes nos meios de cultura.

Figura 5.2 - Cromatogramas dos extratos brutos obtidos em escala reduzida dos meios de cultura de YM, MDB, EM, Czapek[®], Nutrient[®] e Arroz por CLAE – DAD.



A triagem de um analito utilizando CLAE equipado com detector de arranjo de diodos (do inglês *diode array detector* – DAD), é um recurso muito importante para a investigação do perfil cromatográfico de qualquer extrato bruto. Uma das vantagens de se possuir este tipo de detector consiste na utilização de toda uma faixa de comprimento de onda do UV-Vis simultaneamente na detecção das substâncias eluídas. Isso significa que, o detector fornece, para as substâncias capazes de absorver radiação no intervalo de comprimento de onda especificado, um perfil de absorção individual. Através da análise deste perfil de absorção, pode-se inferir qual a pureza dos picos cromatográficos. Através de um recurso presente no software destes detectores, todos os picos cromatográficos são representados em uma corrida cromatográfica pelos seus λ máximos de absorção. Desta forma, esta ferramenta se torna muito útil, pois torna possível a visualização de todas as substâncias (capazes de absorver no UV-Vis), no máximo de suas intensidades, em um único cromatograma. A fim de se facilitar a reprodução deste mesmo perfil em outros cromatógrafos desprovidos deste tipo específico de detector (UV-Vis), optou-se pela escolha do comprimento de onda de 254 nm para a leitura de todos os extratos brutos, pois utilizando-se deste comprimento de onda, foi possível detectar a presença de todos os picos cromatográficos visualizados anteriormente.

O simples fato dos cromatogramas apresentarem picos com mesmo tempo de retenção não prova que estes meios produzam as mesmas substâncias. Entretanto, uma análise das curvas de absorção normalizadas no UV dos picos e dos respectivos espectros de absorção uni e bidimensionais (disponíveis apenas em cromatógrafos equipados com detector do tipo DAD) pode nos fornecer maiores indícios da pureza e da identidade dos picos analisados. No entanto, os picos escolhidos para análise devem contemplar certas condições: estarem praticamente resolvidos e apresentarem uma boa simetria e resolução. Estes parâmetros foram selecionados a fim de se obter espectros de absorção passíveis de serem comparados, com o mínimo possível de interferência (co-eluição, ruído da linha de base, etc.). Foram então escolhidos os picos assinalados com um asterístico (*) e estes destacados nos cromatogramas da Figura 5.2, pág. 45, sendo também resumidos na Tabela 5.2, pág. 46.

Tabela 5.2 - Picos cromatográficos selecionados para avaliação dos espectros de UV.

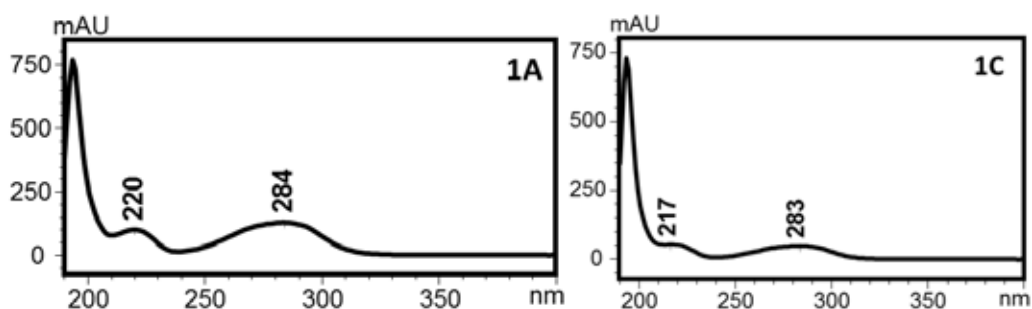
Pico	Meio de Cultura	Tr (min)	Pico	Meio de Cultura	Tr (min)
1A	Arroz	17,7	2C	Czapek [®]	19,5
2A	Arroz	22,3	1E	EM	12,6
3A	Arroz	24,5	2E	EM	20,1
4A	Arroz	38,2	1P	MDB	19,8
5A	Arroz	39,8	2P	MDB	25,9
1C	Czapek [®]	17,7	1Y	YM	25,9

É importante ressaltar que os espectros de absorção unidimensionais no UV dos picos selecionados, por serem obtidos de um único ponto localizado no ápice do pico, não correspondem necessariamente ao espectro de apenas uma substância (a menos que o pico cromatográfico esteja puro), mas sim da soma do espectro da substância majoritária com os espectros de outras substâncias que estão co-eluído com a mesma. A proporção da contribuição espectral dessas substâncias no espectro de absorção final é proporcional a posição de seus centros de massa dentro do pico cromatográfico analisado, quanto mais próximos do ápice do pico (espectro de referência), maior a interferência. É muito frequente também ocorrer a sobreposição de bandas de absorção no UV. Isto é devido ao espectro da substância majoritária apresentar uma curva de absorção mais intensa, a qual se sobrepõe a uma outra, menos intensa. No entanto, apesar das dificuldades

discutidas, o espectro de absorção unidimensional no UV pode ser útil no estudo do rastreamento de uma determinada substância (pico) durante o desenvolvimento de um método cromatográfico ou mesmo entre diferentes amostras e também pode vir a fornecer informações de quais grupos funcionais estão presentes na estrutura química da(s) substância(s) que compõe(m) o pico.

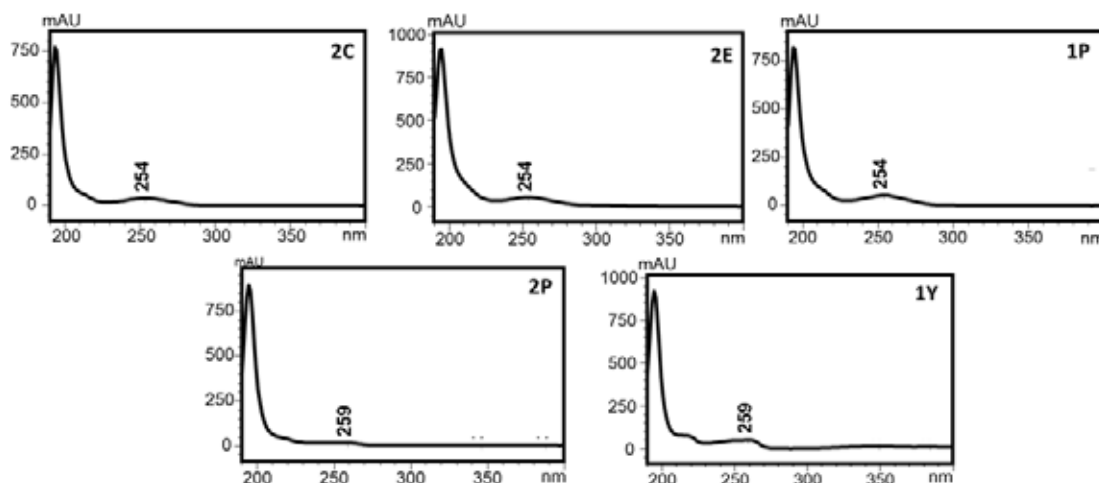
Os espectros de absorção dos picos 1A (17,7min) e 1C (17,7min) dos meios de cultura de arroz e Czapek[®] (Figura 5.3, pág. 47), apresentam um perfil de absorção muito semelhante, com bandas que absorvem com comprimentos de onda muito semelhantes, em aproximadamente 284 nm e 220nm. Ambos os picos apresentam considerável nível de pureza, constatada pelas curvas de absorção normalizadas no UV em diversos comprimentos de onda (ANEXO 7, pág. 124). Assim, pode-se sugerir a presença de uma substância muito semelhante em ambos os extratos.

Figura 5.3 - Espectros de absorção no UV dos picos identificado como 1A e 1C



Assim como os espectros de absorção dos picos 1A e 1C, os espectros dos picos identificados como 2C (19,5min), 2E (20,1min) e 1P (19,8min) presentes nos meios de cultura de Czapek[®], EM e MDB respectivamente, também apresentam um perfil muito semelhante, com $\lambda_{\text{máx}}$ a 254nm. Apesar da semelhança, a análise do diagrama de curvas de absorção do pico 1P, que revela um desdobramento de outro pico a 399nm (ANEXO 7, pág. 124), fato este que pode indicar a presença de uma outra substância co-eluído sobre o mesmo pico cromatográfico.

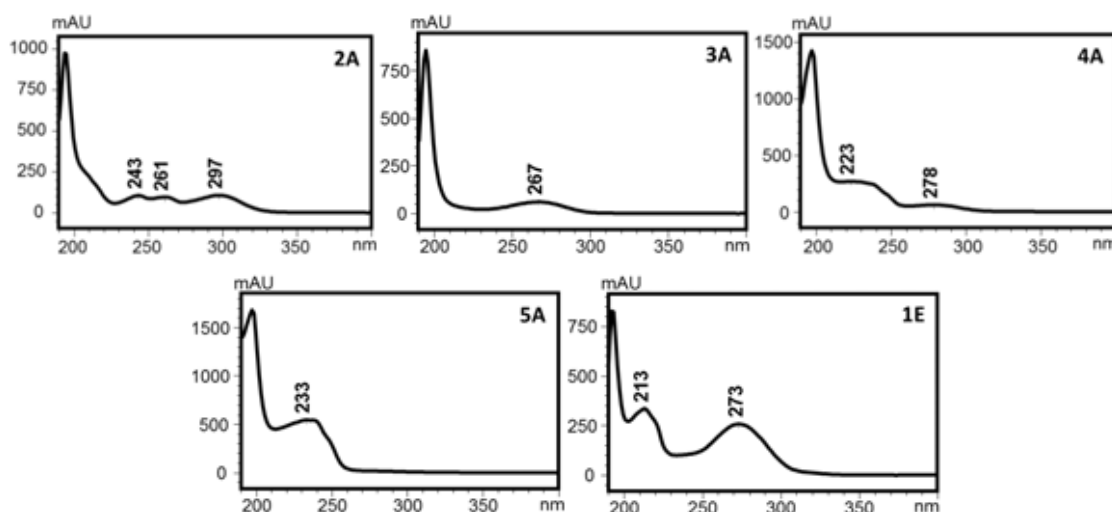
Figura 5.4 - Espectros de absorção no UV dos picos 2C, 2E, 1P, 2P e 1Y



Da mesma forma, os picos 2P (25,9min) e 1Y (25,9min) também apresentam um espectro de absorção no UV muito semelhante, com uma banda com intensidade muito baixa a 259 nm (Figura 5.4, pág. 48). No entanto, a análise do diagrama de curvas de absorção revela que tais picos não se apresentam com um nível considerável de pureza, sendo que o espectro de absorção apresentado é o resultado da presença de duas ou mais substâncias sobre o mesmo pico cromatográfico.

Os espectros apresentados na Figura 5.5 (pág. 48) correspondem aos picos cromatográficos presentes exclusivamente nos extratos brutos em questão. Pode-se observar uma grande diferença nos espectros de absorção de cada pico, com bandas de absorção com diferentes $\lambda_{\text{máx}}$. Os diagramas das curvas de absorção dos picos em questão podem ser visualizados no ANEXO 7, pág. 124.

Figura 5.5 - Espectros de absorção no UV dos picos 2A, 3A, 4A, 5A e 1E



A análise dos espectros de absorção no UV, dos diagramas normalizados das curvas de absorção no UV e dos tempos de retenção dos picos nos forneceu maiores subsídios para propor que os picos identificados como 1A e 1C; 2C, 2E e 1P; 2P e 1Y podem corresponder a substâncias semelhantes produzidas pelo fungo *Camarops* sp. em diferentes meios de cultura. A produção dos metabólicos é dependente do meio de cultura, visto que os picos 2A, 3A, 4A, 5A e 1E são metabólicos produzidos exclusivamente nos meios de cultura em questão, não estando presentes nos demais extratos analisados.

Vale ressaltar que o trabalho não tem como objetivo avaliar a presença (ou a ausência) dos mesmos metabólicos secundários produzidos por *Camarops* sp. nos diferentes meios de cultura utilizados.

5.1.3 Avaliação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos (escala reduzida)

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos evidenciaram uma alta e diversificada produção de metabólicos secundários em todos os meios, com sinais abrangendo toda largura espectral (ANEXO 1 a ANEXO 6, págs 118 a 123). Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos das análises por CCDC e CLAE-DAD, confirmando mais uma vez que a produção metabólica de *Camarops* sp. é dependente do tipo de meio de cultura utilizado.

A presença de sinais com deslocamentos químicos (δ) 1,2 ppm e 0,8 (sendo os sinais mais intensos em 1,2 ppm), como os apresentados pelo extrato em arroz (ANEXO 1, pág. 118), são sinais característicos da presença de ácidos graxos. A maior intensidade dos sinais em 1,2 ppm se deve a grande quantidade de hidrogênios metilênicos (CH_2) presentes na cadeia apolar do ácido graxo. Os ácidos graxos estão presentes no extrato devido ao processo de maceração do meio de cultivo com AcOEt. Além de graxas também pode ser observado mais significativamente nos espectros dos extratos cultivados em arroz e Czapek[®] (ANEXO 1 e ANEXO 2) a presença de açúcares, com sinais de hidrogênio com deslocamento químico na faixa de 3 a 4 ppm. A presença de açúcares nos extratos também não é de se estranhar, uma vez que ambos os meios de cultura apresentam tais nutrientes em suas composições.

5.1.4 Avaliação das atividades biológicas

5.1.4.1 Atividade antifúngica - Fitopatógenos

É frequente o uso de pesticidas sintéticos para o controle de pragas na agricultura tradicional. Por se tratar de substâncias de alta toxicidade, estes insumos representam um sério risco para o homem e para o meio ambiente. Tal fato tem incentivado pesquisas com foco na descoberta de novas substâncias antifúngicas de igual ou superior eficiência mas com um menor índice de periculosidade. Tendo isso em mente, 400 µg de cada extrato bruto, obtidos a partir da fermentação do fungo endofítico *Camarops sp*, foram aplicados a placas de silica e submetidos a CCDC, sendo revelados e avaliados quanto a potencialidade antifúngica.

A potencial atividade antifúngica dos extratos brutos foi avaliada frente aos micro-organismos fitopatogênicos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides*. Os resultados estão dispostos na Figura 5.6, pág. 50 e resumidos na Tabela 5.3, pág. 51.

Figura 5.6 - Avaliação qualitativa da atividade antifúngica frente as fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides*

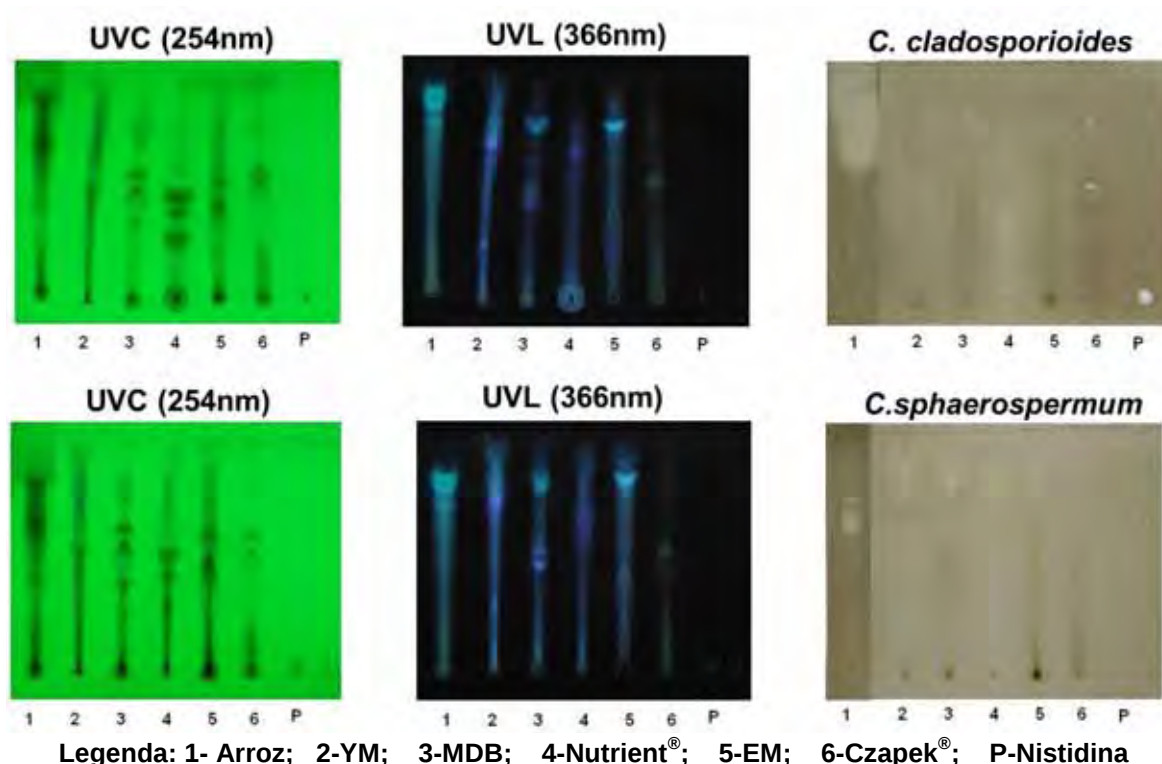


Tabela 5.3 - Avaliação qualitativa da atividade antifúngica

Extrato Bruto	Rf dos halos de inibição em CCDC	
	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
Arroz	0,794 / Mancha (3,5 cm)	0,705 / 0,611
YM	-	0,823 / 0,235
MDB	-	0,705
Nutrient [®]	0,301	0,729
EM	-	0,823
Czapek [®]	0,759 / 0,481	0,823
Nistidina	Base	-

Dentro os extratos brutos avaliados, o extrato cultivado em arroz se destacou por apresentar o maior número de zonas de inibição de crescimento fúngico, como pode ser observado pelas manchas brancas sobre a cromatoplaça. O extrato bruto em Czapek[®] também se mostrou ativo contra a linhagem fúngica *C. cladosporioides* apresentando duas zonas de inibição (RF 0,759 e 0,481). Os demais extratos também apresentaram atividade, em sua maioria contra a linhagem fúngica *C. sphaerospermum*.

Este resultado mostra a importância do estudo dos fungos endofíticos como fonte de substâncias potenciais antifúngicas.

5.1.4.2 Atividade antifúngica – Patógenos Humanos

Recentemente, o aumento de infecções fúngicas causadas por fungos oportunistas, como *Candida* e *Aspergillus*, e a resistência microbiana a uma série de antibióticos disponível no mercado estão motivando, novamente, as companhias farmacêuticas a investirem na busca por substâncias antifúngicas de fontes naturais [68].

Neste contexto, os extratos brutos obtidos de *Camarops sp.* foram submetidos a avaliação da atividade antifúngica contra linhagens fúngicas responsáveis por causar infecções invasivas ao homem. Este ensaio verifica a sensibilidade destas leveduras contra agentes antifúngicos utilizando a metodologia por microdiluição em caldo. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 5.4, pág 52.

Tabela 5.4 – Extratos brutos avaliados frente as linhagens de *Candida* e de *Cryptococcus*

Extrato Bruto	CIM (Concentração Inibitória Mínima) (µg/mL)					
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida a krusei</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Arroz	62,5	125	250	250	250	125
YM	ND*	250	>250	>250	>250	250
MDB	125	250	62,5	250	125	125
Nutrient [®]	125	250	250	250	250	62,5
EM	125	125	125	250	250	250
Czapek [®]	125	125	125	250	125	125

* Problemas apresentados na cultura de *C. albicans* impediram a análise do extrato

Os resultados apresentados revelaram que todos os extratos brutos (exceto YM) são potencialmente nocivos as linhagens fúngicas testadas. O menor valor de CIM apresentado foi de 62,5 µg/mL para os extratos brutos em arroz, MDB e Nutrient[®] frente a *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* respectivamente, enquanto o maior valor foi de 250 µg/mL sendo obtido pelo extrato bruto em YM e por todos os extratos brutos utilizados para a inibição do crescimento do micro-organismo *Candida glabrata*.

Para efeito de comparação, se supormos que o valor de 62,5 corresponda a 3 pontos, 125 corresponda a 2 pontos e 250 corresponda a 1 ponto, somados os pontos para cada extrato e dividindo este valor obtido pelo número de micro-organismos testados (6), obteremos a média aritmética para cada extrato. O melhor valor obtido foi de 1,8 para os extratos brutos em MDB e Czapek[®], o que quer dizer que estes dois extratos apresentaram para todos os seis micro-organismos testados, as melhores respostas fungitóxicas. Os extratos brutos em arroz, Nutrient[®] e EM apresentaram médias aritméticas de 1,6; 1,5 e 1,5 respectivamente.

A partir dos resultados apresentados, verificou-se que os extratos de MDB e Czapek[®] apresentaram, em média, efeito inibitório do crescimento das linhagens fúngicas testadas, principalmente contra *C. parapsilosis*, servindo como um interessante meio de cultura para estudos de âmbito toxicológico e farmacológico.

5.1.4.3 Atividade anticolinesterásica

Os extratos brutos foram submetidos a avaliação da potencial atividade anticolinesterásica por CCDC, utilizando a metodologia desenvolvida por Marston, Kissling e Hostettmann^[69]. O aparecimento de manchas brancas em alguns extratos sob um fungo de coloração roxo, é a indicação da existência de substâncias

capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase. Os resultados estão resumidos Tabela 5.5, e podem ser visualizados na Figura 5.7.

Figura 5.7 - Avaliação qualitativa da atividade anticolinesterásica

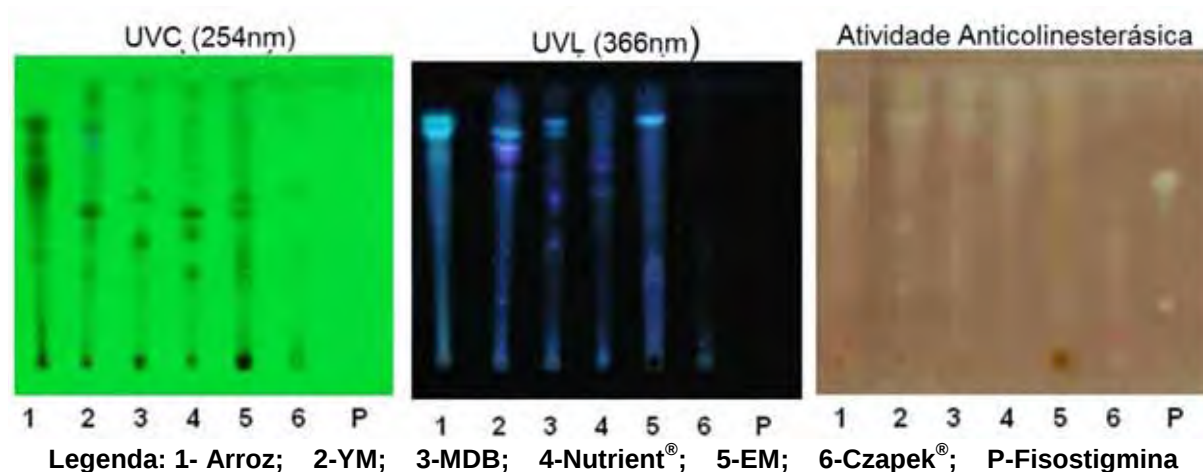


Tabela 5.5 - Avaliação qualitativa da atividade anticolinesterásica

Extrato Bruto	Rf dos halos de inibição em CCDC
Arroz	0,628
YM	0,819 / 0,457 / 0,240
MDB	0,843 / 0,819
Nutrient®	0,650 / 0,433
EM	0,915
Czapek®	Base
Fisostigmina	0,602

De acordo com o observado na cromatoplaça e confirmado na tabela, todos os extratos brutos apresentaram potencial atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase, dando ênfase para o extrato em YM, que exibiu 3 halos de inibição com fatores de retenção (Rf), respectivamente de 0,82; 0,46 e 0,24. Os extratos brutos em MDB e Nutrient® apresentaram dois halos de inibição e o restante dos extratos apresentou apenas um. O extrato em Czapek®, na condição de eluição utilizada, também mostrou-se eficaz na inibição da enzima apenas na base da aplicação do extrato, sendo que as demais substâncias que eluíram pela placa não apresentaram atividade significativa. Este resultado confirma a importância do estudo dos fungos endofíticos como fonte na produção de potenciais substâncias anticolinesterásicas.

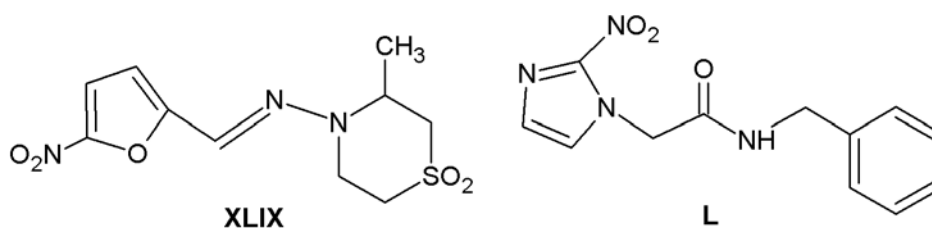
5.1.4.4 Atividade tripanocida

As doenças infecciosas parasitárias, tais como a malária, doença de Chagas, tripanossomíase africana (doença do sono), leishmaniose e esquistossomose representam uma crescente ameaça mundial, afetando milhões de pessoas nas diferentes regiões geográficas mais pobres do planeta, especialmente as do continente africano^[70].

A doença de Chagas, descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, é um dos principais problemas socioeconômicos enfrentados na América Latina. Esta doença, causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 18 milhões de pessoas do sul dos Estados Unidos até a Patagônia, causando aproximadamente 50.000 mortes por ano, sendo que outros 100 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco de contaminação. São estimados aproximadamente 300 mil novos casos por ano.^[70]

O nifurtimox (XLIX), 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino) tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido e o Benzonidazol (L), N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida (Figura 5.8, pág. 54), são as únicas drogas terapêuticas disponíveis atualmente no mercado para o combate à doença de Chagas. No entanto, estes medicamentos apresentam resultados promissores apenas na fase aguda da doença, que tem duração média de 2 meses, com índices de cura entre 50 a 70%, em contraste com valores percentuais de cura inferiores a 20 na fase crônica da doença^[70].

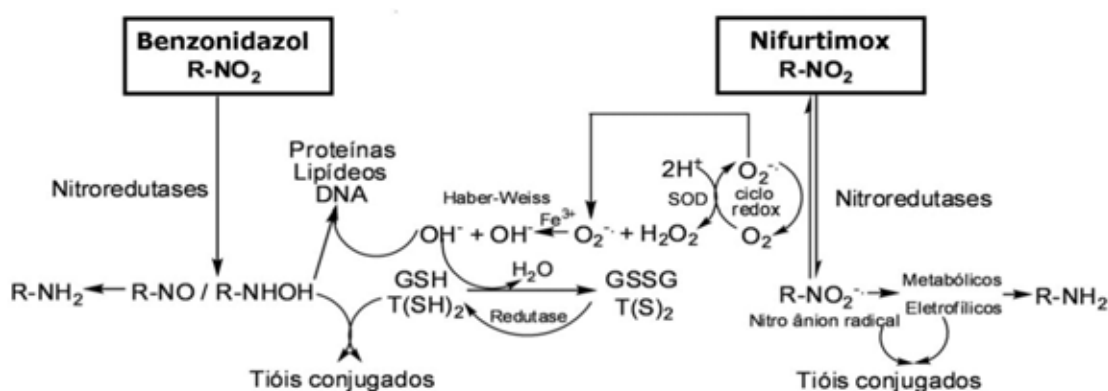
Figura 5.8 - Estruturas químicas da nifurtimox (XLIX) e benzonidazol (L)



Evidências indicam que o nifurtimox (XLIX) e benzonidazol (L) atuam através da formação de radicais livres ou metabólicos eletrofílicos (Figura 5.9, pág.55). O grupo nitro (NO₂) presente nestas moléculas é reduzido ao grupo amino (NH₂) pela ação de enzimas do tipo nitroredutases, que atuam especificamente em sistemas moleculares do tipo R-NO₂. Este processo, iniciado pela reação catalisada pela NADPH citocromo P450 redutase, leva à formação de um intermediário nitro

radicalar ($R\text{-NO}_2^{\cdot-}$) com subsequente formação de hidroxilamina ($R\text{-NHOH}$). No caso do nifurtimox, o radical reduz o oxigênio molecular (O_2) formando o íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e regenerando o grupo NO_2 num processo conhecido como ciclo redox (*redox cycling*). O íon superóxido formado é captado pela enzima superóxido dismutase gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, através da reação de Haber-Weiss na presença de íons Fe^{III} , forma o radical hidroxila ($\cdot OH$). A esta espécie tem sido atribuído o efeito tripanocida por mecanismos complexos que envolvem ligação a lipídeos, proteínas e ao DNA do *T. cruzi*. Por outro lado, o fármaco benzonidazol não atua através do ciclo redox e não depende diretamente de espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*). O radical nitro formado estaria envolvido com seu efeito tripanocida através da formação de ligações covalentes com macromoléculas do *T. cruzi* (e.g., DNA e citocromo P450) [70].

Figura 5.9 - Mecanismo de ação proposto dos fármacos nifurtimox e benzonidazol [20]



Efeitos secundários severos associados à utilização desses fármacos têm sido reportados, tendo como consequência a interrupção do tratamento medicamentoso. Esses efeitos são provocados pelos metabólicos reativos formados pelo próprio mecanismo de ação do medicamento, devido a sua baixa especificidade, estes produtos acabam contribuindo para os efeitos citotóxicos observados no paciente [70].

Em busca de substâncias capazes de atuar no tratamento da doença de Chagas, os extratos brutos de *Camarops sp.* foram testados (Tabela 5.6, pág. 56). O extrato em meio de arroz apresentou uma concentração mínima inibitória de 175,9 $\mu\text{g/mL}$. Este resultado sugere a presença de substâncias com potencial atividade tripanocida neste extrato. No entanto os demais extratos brutos não apresentaram

atividade contra o protozoário *Trypanosoma cruzi* dentre dos limites de concentração utilizados no experimento, tendo todos os extratos apresentado um valor de IC₅₀ superior a concentração máxima analisada (500 µg/mL).

Tabela 5.6- Avaliação quantitativa da atividade tripanocida

Extrato Bruto	IC₅₀ (µg/mL)
Arroz	175,9
YM*	-
MDB*	-
Nutrient®	>500
EM	>500
Czapek®	>500

*Os extratos de YM e MDB apresentaram contaminação.

5.1.5 Avaliação da atividade antioxidante

Os radicais livres são átomos ou moléculas que apresentam elétrons de valência desemparelhados sendo, portanto altamente reativos. Atuam como mediadores nas transferências eletrônicas de várias reações bioquímicas, tais como na síntese de substâncias biológicas e na produção de energia. Também são essenciais nos processos de fagocitose, sinalização intercelular e na regulação do crescimento celular. No entanto, quando estas espécies encontram-se em excesso (estresse oxidativo), o organismo produz uma série de substâncias capazes de regenerar ou evitar os danos oxidativos provocados pelos radicais, exercendo o papel de antioxidantes. Entretanto, quando as substâncias antioxidantes produzidas são insuficientes para neutralizar os radicais livres em excesso, estes passam a danificar as moléculas de DNA, as proteínas e as organelas celulares provocando alterações na estrutura e funções celulares. Sabe-se que a longo prazo, os danos causados pelo excesso de radicais livres estão envolvidos em diversas patologias, tais como: câncer; doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas; envelhecimento precoce, disfunções cognitivas, etc^[71].

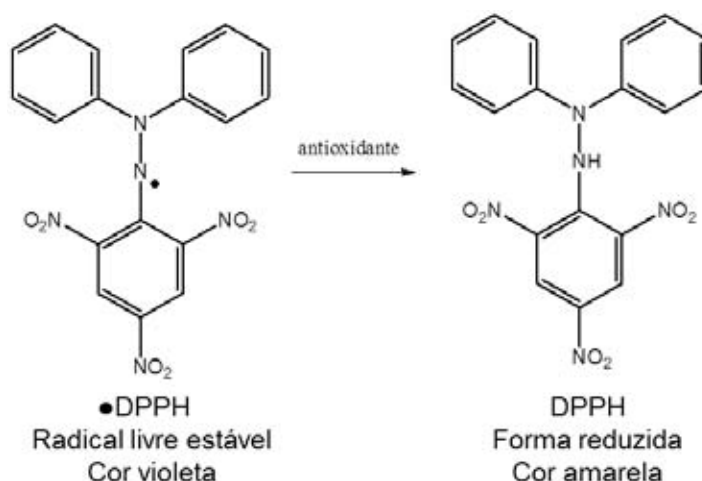
Os radicais livres também atuam de maneira deletéria nas plantas e alimentos. Ela é responsável pela modificação do odor e sabor dos alimentos, bem como da perda da qualidade nutricional. A adição de antioxidantes aos alimentos industrializados visa minimizar os efeitos da oxidação durante o período de armazenagem, aumentando o tempo de prateleira dos mesmos^[71].

A descoberta do efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças, agindo como causador ou agravante, assim como o interesse da indústria alimentícia por novos compostos antioxidantes, impulsionou a busca por substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos provocados pelos agentes oxidativos^[71].

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas (Método da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico; sequestro do radical: DPPH, peroxil, superóxido, hidroxil; sequestro do peróxido de hidrogênio, etc) O método por sequestro do radical DPPH foi escolhido por ser tratar, do ponto de vista metodológico, de um método simples, preciso e reprodutivo^[71].

O ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520nm. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio radicalar é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (Figura 5.10, pág. 58)^[71].

Figura 5.10 - Redução do radical estável DPPH

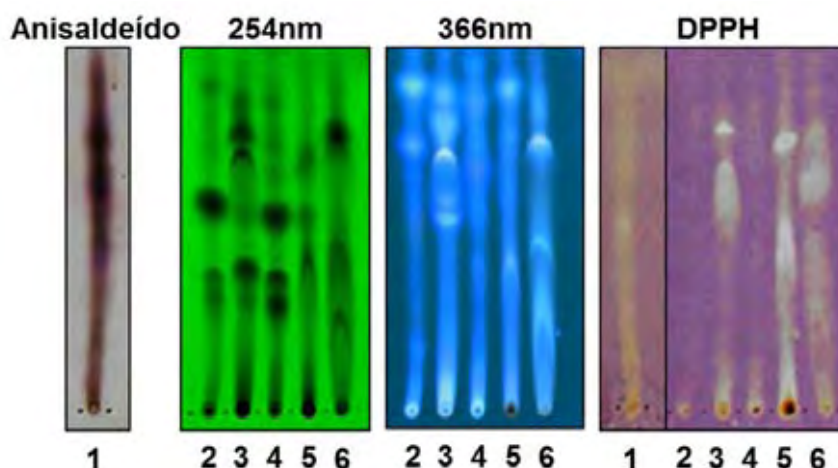


A interação de uma potencial substância antioxidante com o DPPH depende, sobretudo, de sua conformação estrutural e do número de grupos hidroxílicos disponíveis. Assim a capacidade antioxidante pode ser identificada nas estruturas químicas que têm a capacidade de doar um hidrogênio radicalar, estabilizando facilmente o elétron desemparelhado remanescente na sua estrutura por ressonância. Esse modelo geralmente é observado em estruturas fenólicas, sendo os flavonoides os principais alvos na busca por novas substâncias antioxidantes.

5.1.5.1 Ensaio antioxidante realizado por CCDC

Com base no contexto acima, os extratos brutos foram submetidos a CCDC e posteriormente revelados com solução metanólica 0,02% de DPPH. Os resultados podem ser visualizados na Figura 5.11 pág. 59.

Figura 5.11 - Avaliação qualitativa da atividade antioxidante por CCDC



Legenda: 1-Arroz; 2-YM; 3-MDB; 4-Nutrient®; 5-EM; 6-Czapek®

Através da análise das cromatoplasmas acima, é possível afirmar que todos os extratos brutos, exceto o extrato em meio de YM e Nutrient®, apresentaram potencial atividade antioxidante caracterizada pela formação de manchas brancas sobre um fundo de coloração roxa. Dentre os extratos que apresentaram atividade, os extratos em EM e Czapek®, juntamente com o extrato em meio de MDB, se mostraram mais ativos, devido a presença de um maior número de manchas brancas, sendo estas mais intensas que as demais. Estes resultados podem estar relacionados com a ecologia química entre o fungo endofítico e a espécie hospedeira, sendo o fungo capaz de produzir substâncias antioxidantes que preservam a planta contra os danos provocados por agentes oxidantes. Estes dados confirmam que o estudo de fungos endofíticos associados a espécies vegetais do cerrado são promissores fontes de substâncias bioativas.

5.1.5.2 Ensaio antioxidante por espectrofotometria

Os extratos brutos obtidos dos meios de cultura de *Camarops sp.* foram submetidos a análise quantitativa da atividade antioxidante por DPPH, sendo testados nas concentrações de 66,7; 33,3; 10,0; 6,67; 3,33; 2,67 e 1,67 µg/mL. O padrão positivo utilizado foi a quercetina nas concentrações de 33,3; 26,7; 20,0; 13,3; 6,7; 3,3 e 1,7 µM. A porcentagem de sequestro do radical livre estável DPPH foi determinada pelo decaimento da absorbância medido a 517nm por espectrofotometria e os resultados podem ser visualizados nos gráficos da Figura 5.12, Figura 5.13, pág. 60, e na Tabela 5.7, pág. 60.

Figura 5.12 - Gráfico da % de sequestro do radical livre estável DPPH pela padrão positivo quercetina.

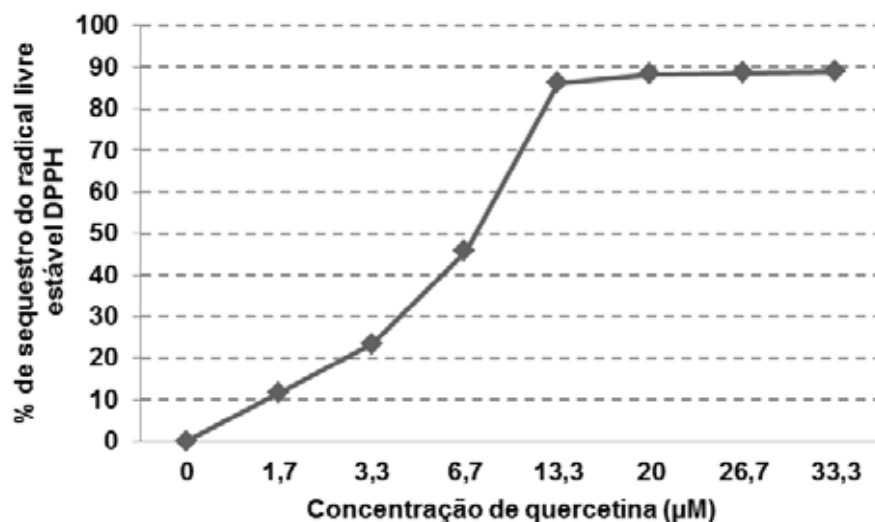


Figura 5.13 - Gráfico da % de sequestro do radical livre estável DPPH pelos extratos brutos

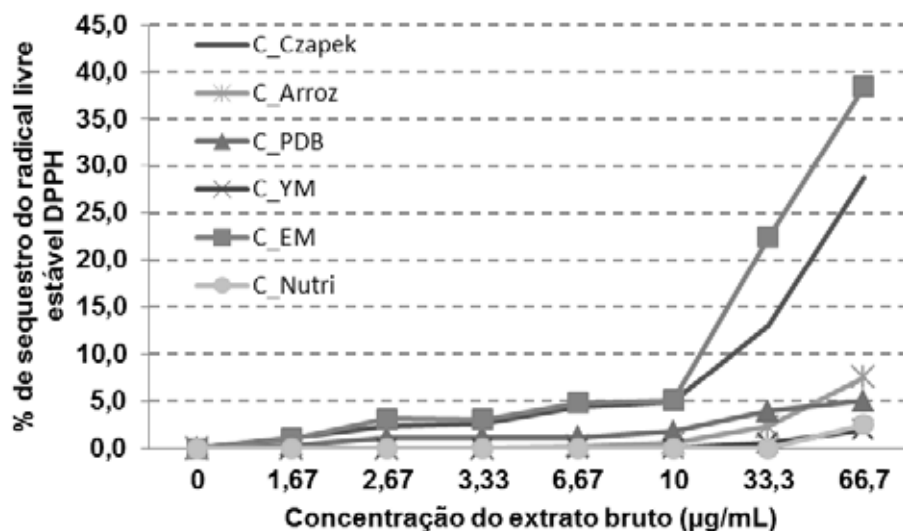


Tabela 5.7 - Análise quantitativa da atividade antioxidante

Extrato Bruto	IC ₅₀ (µg/mL)	% Sequestro (10 ppm)
Czapek®	> 66,7	4,9
Arroz	> 66,7	0,5
MDB	> 66,7	1,7
YM	> 66,7	0
EM	> 66,7	5,0
Nutrient®	> 66,7	0
Quercetina	2,24	88,9

Todos os extratos brutos analisados não apresentaram, dentro dos limites do ensaio quantitativo, uma concentração capaz de sequestrar 50% dos radicais livres de DPPH. No entanto, dentre os extratos brutos analisados, Czapek[®] e EM apresentaram os melhores resultados, com 4,9 e 5,0% de sequestro de radical livre respectivamente, a uma concentração de extrato de 10 ppm. Estes dados estão em conformidade com os obtidos nas cromatoplasmas reveladas com solução metanólica de DPPH (item anterior).

5.2 Avaliação dos resultados obtidos

Os ensaios biológicos e químicos realizados, demonstraram que todos os extratos brutos são potenciais fontes de metabólitos secundários bioativos..

O perfil cromatográfico dos extratos brutos revelou uma diversidade de picos, variando de alta polaridade (presentes principalmente nos extratos brutos de YM e Nutrient[®]) a baixa polaridade (presentes principalmente no extrato bruto de Arroz). Todos os extratos brutos avaliados, exceto os extratos em Arroz e Nutrient[®], apresentaram picos com boa resolução e intensidade (254nm), desta forma, mais facilmente isolados por CLAE preparativo.

Os espectros de RMN de ¹H dos extratos brutos evidenciaram uma alta e diversificada produção metabólica em todos os meios, observada pela diversidade de sinais em toda a largura espectral. Dentro os extratos brutos obtidos, Czapek[®] apresentou sinais de hidrogênio característicos para compostos aromáticos com multipletos muito bem definidos e intensos, evidenciando como um meio muito seletivo na produção substâncias aromáticas

Os meios de cultura de Arroz e Czapek[®] (Tabela 5.1, pág. 43), apresentaram os maiores rendimentos, com massas de 4,2g e 280mg, respectivamente. No entanto, deve se considerar que no meio de arroz isola-se muitos metabólitos provenientes do meio de cultivo, como por exemplo os açúcares e os ácidos graxos, devido a presença destes compostos na matrix nutricional deste meio de cultura.

Portanto, as análises do perfil cromatográfico (CLAE-DAD) e espectrométrico (RMN de ¹H), aliada as massas dos extratos brutos obtidas, nos conduziu a selecionar o meio de cultura de Czapek[®] para o cultivo de *Camarops sp.* em escala ampliada, a fim de se isolar substâncias ainda não isoladas nos trabalhos anteriores^[60, 61].

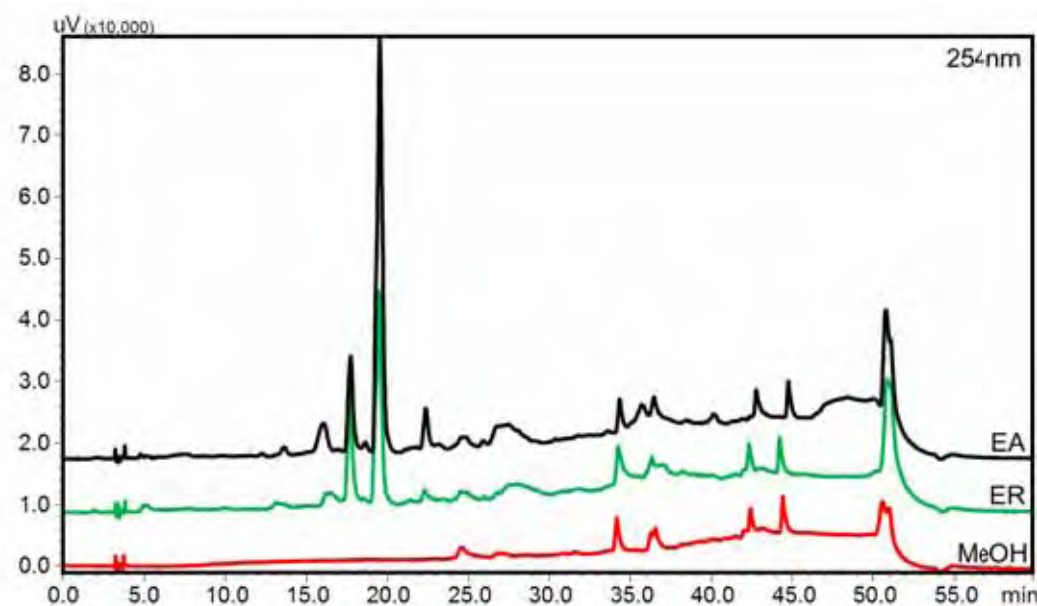
5.3 Análise do extrato bruto obtido em escala ampliada do meio de cultura Czapek[®] por CLAE-DAD

O extrato bruto obtido em escala ampliada (845mg) foi submetido a análise do perfil cromatográfico por CLAE-DAD sendo posteriormente comparado ao perfil cromatográfico anteriormente obtido em escala reduzida.

A análise dos cromatogramas (Figura 5.14, pág. 62) revelou a presença de picos cromatográficos com tempos de retenção idênticos em ambos os extratos, sugerindo que a produção metabólica em escala ampliada foi praticamente igual a obtida em escala reduzida.

A partir dessa avaliação, deu-se início ao processo de fracionamento cromatográfico do extrato.

Figura 5.14 - Comparação dos cromatogramas do extratos brutos de Czapek[®] obtidos em escala ampliada(EA) e reduzida (ER) obtidos por CLAE – DAD.



5.4 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto em Czapek[®]

O extrato bruto (845 mg) foi inicialmente fracionado em coluna cromatográfica sob pressão, utilizando sílica do tipo octadecil silano (C-18) e um sistema de eluição em modo gradiente MeOH/H₂O. Ao todo foram coletadas 8 frações (210mL cada), as quais foram secas em evaporador rotatório sob vácuo sendo em seguida analisadas por RMN de ¹H e CLAE-DAD. As massas das frações obtidas estão resumidas na Tabela 5.8, pág. 63.

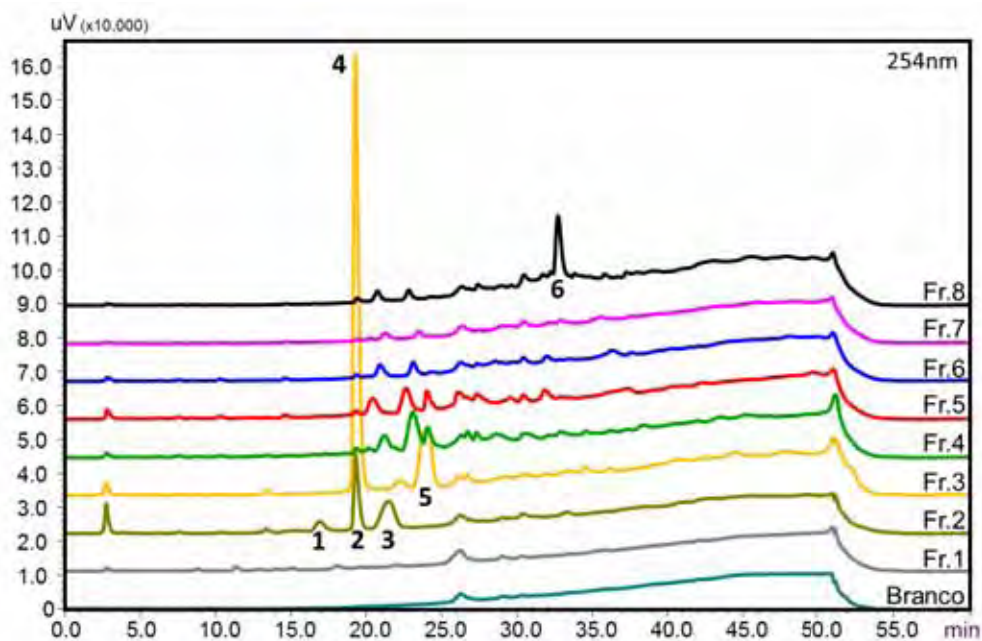
Tabela 5.8 - Massas das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto de Czapek[®] por CC sob pressão.

Fração (n°)	Massa obtida (mg)	Sistema de eluição (MeOH:H ₂ O)
1	56	1:9 MeOH:H ₂ O
2	495,7	15:85 MeOH:H ₂ O
3	72,7	1:4 MeOH:H ₂ O
4	38,4	25:75 MeOH:H ₂ O
5	29,5	3:7 MeOH:H ₂ O
6	26,4	2:3 MeOH:H ₂ O
7	23,4	1:1 MeOH:H ₂ O
8	6,5	3:2 MeOH:H ₂ O
MeOH	59,7	100% MeOH

A análise da tabela acima revelou que a maior porção da massa do extrato bruto fracionada na coluna ficou concentrada nas frações 2 (495,7mg) e 3 (72,7mg). Tais substâncias, portanto, apresentam alta polaridade, pois foi necessário utilizar uma FM contendo apenas 25% de MeOH para eluir da coluna a maior parte das substâncias presentes no extrato. Este resultado está de acordo com os cromatogramas das frações obtidas do fracionamento do extrato bruto por CC sob pressão (Figura 5.15, pág. 64), pois nestas frações é visível a presença em maior quantidade de picos com menor tempo de retenção.

A análise dos cromatogramas também nos revelou que o processo de fracionamento em coluna sob pressão foi satisfatório, pois ao se comparar os cromatogramas, pode-se observar a presença de picos com diferentes tempos de retenção. Esta distinção é mais fácil de ser visualizada ao se comparar as frações 2 (Fr.2) e 3 (Fr.3) e a fração Fr.8. As demais (Fr.4, Fr.5, Fr.6 e Fr.7) apresentam em sua maioria picos com mesmo tempo de retenção, no entanto com intensidades diferentes (maior intensidade na Fr.4 e menor na Fr.7), caracterizando um espalhamento das substâncias do extrato pelas frações.

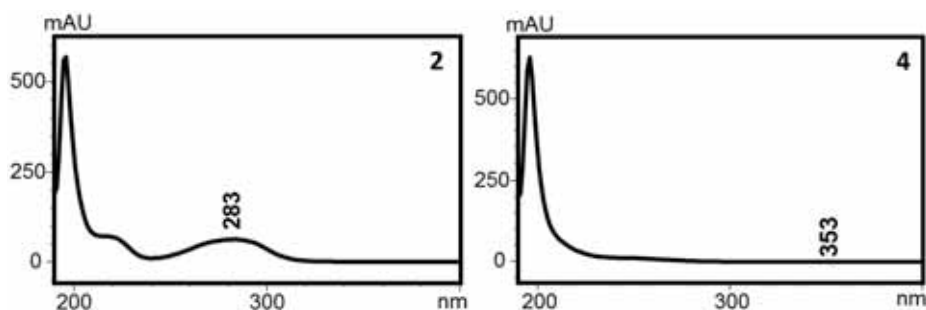
Figura 5.15 - Cromatogramas das frações obtidas do fracionamento do extrato bruto de Czapek[®] por CC sob pressão



Legenda: Branco - 100% MeOH

Os picos identificados como 2 e 4 (Figura 5.16, pág. 64) presentes nas Fr.2 e Fr.3, respectivamente, apresentam um tempo de retenção muito próximo, no entanto ao se observar os espectros de absorção de ambos os picos, pode-se perceber que estes não são semelhantes, o que significa que os picos, a princípio, não correspondam a (s) mesma (s) substância(s). No entanto este fato não é conclusivo, visto que todos os picos analisados não apresentam um nível de pureza significativo (ANEXO 8, pág. 125).

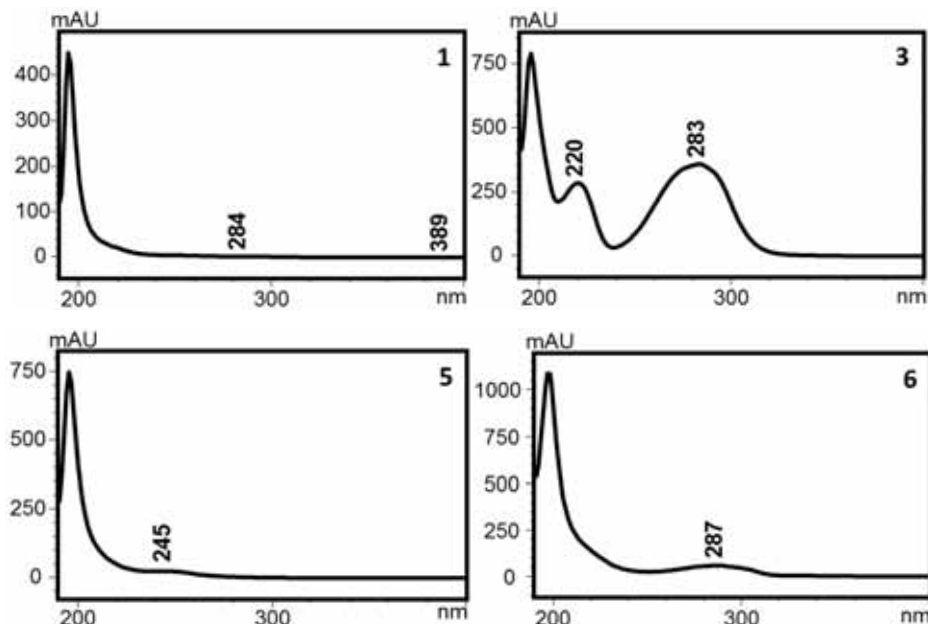
Figura 5.16 - Espectros de absorção no UV dos picos 2 e 4



Os demais picos (1,3,5 e 6) (Figura 5.17, pág. 65) também foram avaliados, e enquanto o pico 1 apresentou um máximo em 283 nm, o pico 3 apresentou três máximos em 200, 220 e 283 nm e o pico seis apresentou uma banda pequena em 287 nm, assim como os picos em 1 e 5, que apresentaram uma leve banda de

absorção em 284 e 245 nm, respectivamente. Esta análise revelou que os picos em questão (1, 3, 5 e 6) não apresentam semelhança em seus espectros de absorção no UV.

Figura 5.17 - Espectros de absorção no UV dos picos 1,3,5 e 6



A análise do espectro de RMN de ^1H da Fr.1 (ANEXO 9, pág 126) revelou um espectro com poucos sinais, sendo a maioria concentrada no intervalo de 3 a 4ppm, sinais característicos da presença de açúcares, provavelmente provenientes da sacarose presente no meio de cultura utilizado.

Os espectros de RMN de ^1H das frações 2 (Fr.2) e 3 (Fr.3) (ANEXO 10 e ANEXO 11, págs 127 e 128), no entanto, apresentaram uma grande variedade de sinais, abrangendo desde os deslocamentos químicos dos hidrogênios metílicos e metilênicos até os hidrogênios aromáticos. Pode-se observar uma grande semelhança de sinais entre as duas frações que se diferem principalmente em intensidade. Dentre os sinais podemos destacar: o sinal a 9,79ppm característico de hidrogênio de aldeído; o dubleto a 7,76ppm, os sinais de 7,26 a 7,19ppm e o dubleto a 6,93ppm. Além destes sinais a Fr.2 ainda apresenta um outro dubleto a 7ppm e um singleto muito intenso a 6,62ppm. A análise do espectro da Fr.2 também apresenta indícios da presença de ácidos graxos na fração, devido a presença de sinais de hidrogênios metilênicos (CH_2) em 1,2 ppm mais intensos do que os sinais dos hidrogênios metílicos (CH_3), em 0,9 ppm.

As frações 4 (Fr.4) a 8 (Fr.8) (ANEXO 12 a ANEXO 16, págs. 129 a 133) apresentaram espectros de RMN de ^1H semelhantes, com a presença dos dubletos a 7,00 e 6,64ppm. No entanto, a partir da Fr.5 ocorre o aparecimento de um singlete a 5,12ppm. Os espectros das frações diferem apenas na intensidade dos sinais de 7,26 a 7,19ppm que são muito mais intensos na Fr.4. Isto comprova os resultados observados nos cromatogramas acima e nos valores de massa das frações, caracterizando um espalhamento das substâncias do extrato por estas frações

A análise das Fr.2 e Fr.3, revelaram um perfil cromatográfico com picos intensos e bem resolvidos e um interessante perfil químico quando analisadas por RMN de ^1H , estes fatos aliados a quantidade de massa de cada fração obtida, nos conduziu a selecionar as Fr.2 e Fr.3 para dar continuidade ao processo de fracionamento.

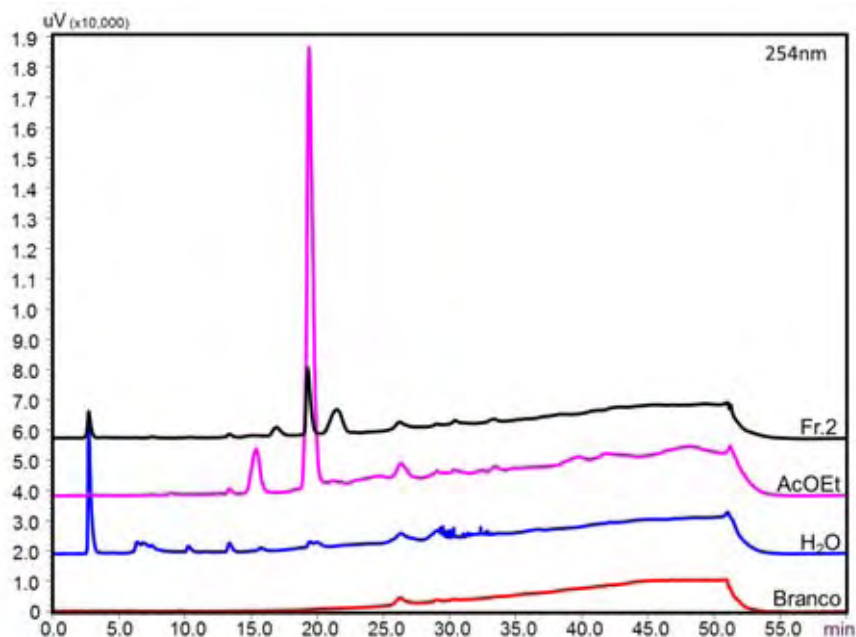
5.4.1 Fracionamento e purificação das frações selecionadas

5.4.1.1 Fracionamento da Fr.2

A presença de açúcares na Fr.2 foi constatada pela análise do RMN de ^1H (ANEXO 10, pág. 127), esta foi submetida a partição líquido-líquido com AcOEt e H_2O . Após eliminação do solvente sob vácuo em evaporador rotatório, as frações da fase aquosa e fase orgânica (AcOEt) foram analisadas por CLAE-DAD e RMN de ^1H .

A partição líquido-líquido concentrou as substâncias de interesse na porção orgânica, como pode ser verificado pela presença de picos de absorção a 254nm e pela ausência de picos na porção aquosa (Figura 5.18). O resultado foi satisfatório, visto que dos 496mg de fração inicial, apenas 96,4mg compõem agora a massa da porção orgânica (AcOEt).

Figura 5.18 - Cromatogramas das frações aquosa e orgânica resultantes da partição líquido-líquido da Fr.2



No entanto, a baixa intensidade de alguns sinais presentes no cromatograma da fração aquosa, por ser justificado pela análise do espectro de RMN de ^1H (ANEXO 18, pág. 135). Este espectro revelou a existência de sinais característicos de substâncias aromáticas, tais como: um dubleto a 7,00 ppm; sinais próximos a 7,25 ppm e um forte singleto a 6,62 ppm. Entretanto, como era de se esperar, muitos sinais que compreendem o intervalo de 3 a 4 ppm podem ser visualizados agora compondo a fração aquosa da Fr.2 sendo pouco presentes na porção orgânica (ANEXO 17, pág. 134). O fato da presença de sinais de hidrogênios aromáticos pode ser justificado pela presença de agliconas ligadas a unidades de açúcares na fração aquosa, o que justificaria o seu arraste durante a partição líquido-líquido. Tal hipótese foi confirmada por MS-ESI-MSⁿ. Os resultados podem ser visualizados na Figura 5.19 e Figura 5.20, pág. 68.

Figura 5.19 - Espectro de massas da fração aquosa da Fr.2 (Full)

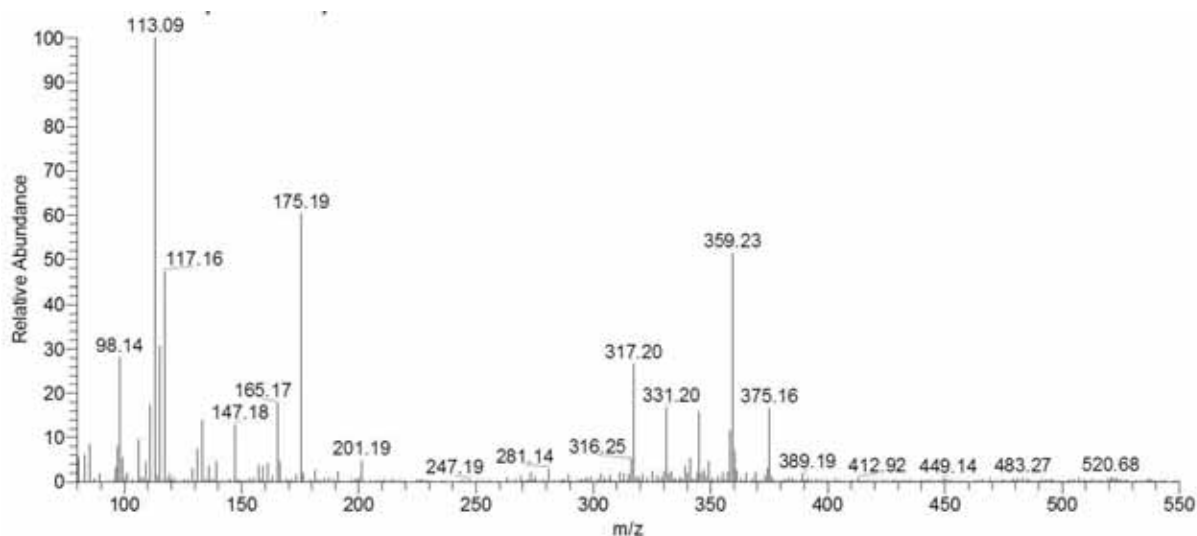
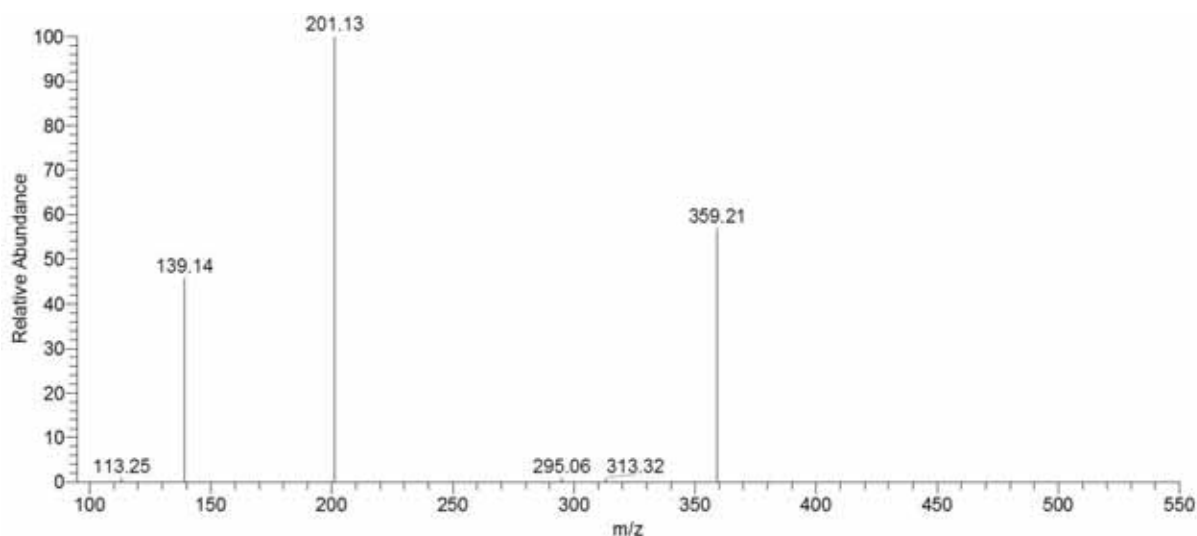


Figura 5.20 - Espectro de massa dos filhos do sinal 359,21 (MS2)



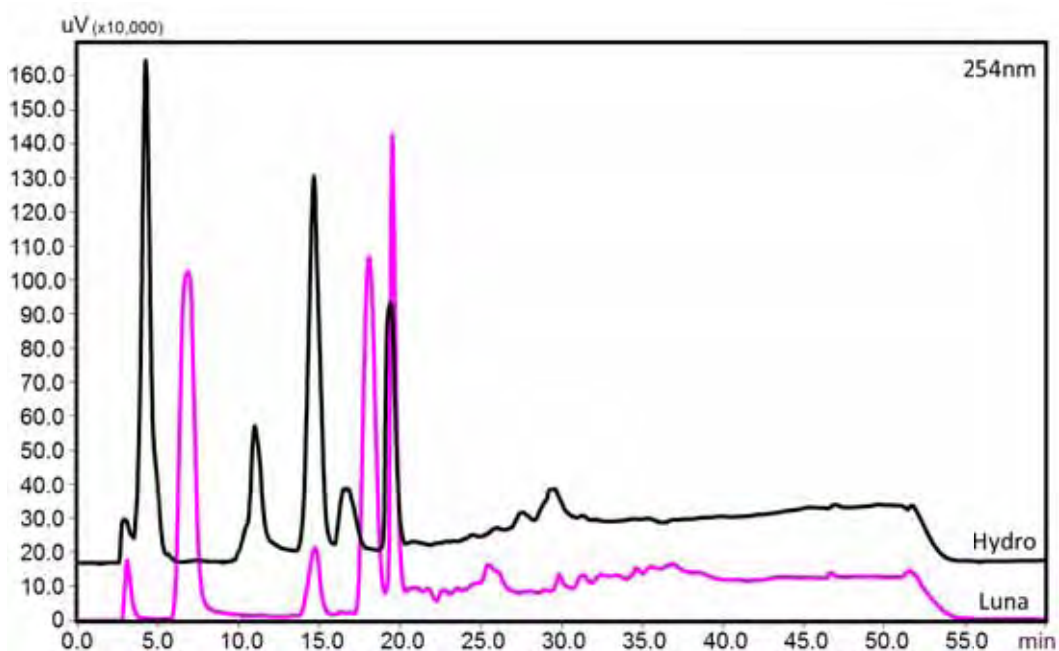
Como pode ser verificado pela análise do MS² do pico 359,31, o pico em questão perde exatamente 160 unidades de massa (hexose) gerando o pico filho a uma relação massa/carga de 201,13. Esta informação comprova a hipótese anteriormente levantada confirmando a existência de agliconas ligadas a unidades de açúcar no extrato aquoso da Fr.2, justificando seu arraste durante a partição líquido-líquido.

Com base na análise dos cromatogramas e dos espectros de ressonância das frações, a fração orgânica foi submetida a análise por CLAE analítico visando o isolamento das substâncias por CLAE preparativo.

A fração orgânica foi inicialmente submetida a análise do perfil cromatográfico em modo analítico, utilizando eluição em modo gradiente H₂O:MeOH (95:05 →

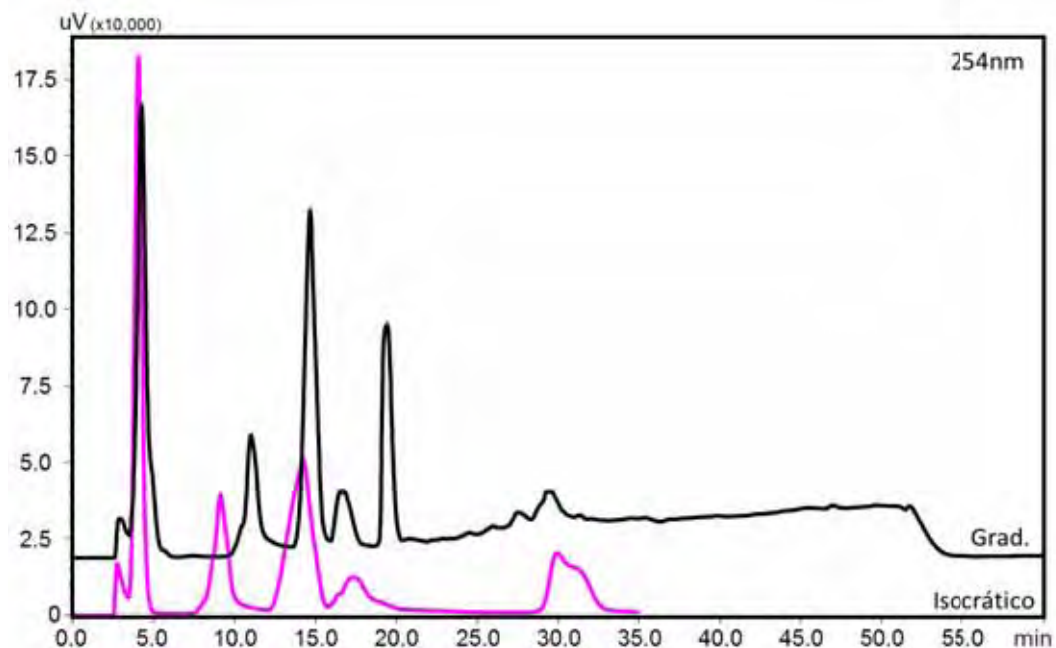
0:100) em 40 minutos. O fluxo utilizado foi de 1mL/min e o comprimento de onda de leitura (λ) escolhido foi de 254nm. Foram utilizadas dois tipos de coluna: Luna Phenomenex® (4.6x250mm, 5 μ m) e Synergi Hydro Phenomenex® (4,6x250mm, 5 μ m), ambas de fase estacionária do tipo octadesil silano (C-18). Conforme os resultados obtidos (Figura 5.21, pág. 69), a coluna Hydro foi selecionada por ter apresentado uma melhor resolução entre os picos cromatográficos.

Figura 5.21 – Cromatogramas da fração orgânica (Fr.2) submetida a análise em modo gradiente utilizando as colunas Luna Phenomenex® e Synergi Hydro Phenomenex® por CLAE - DAD



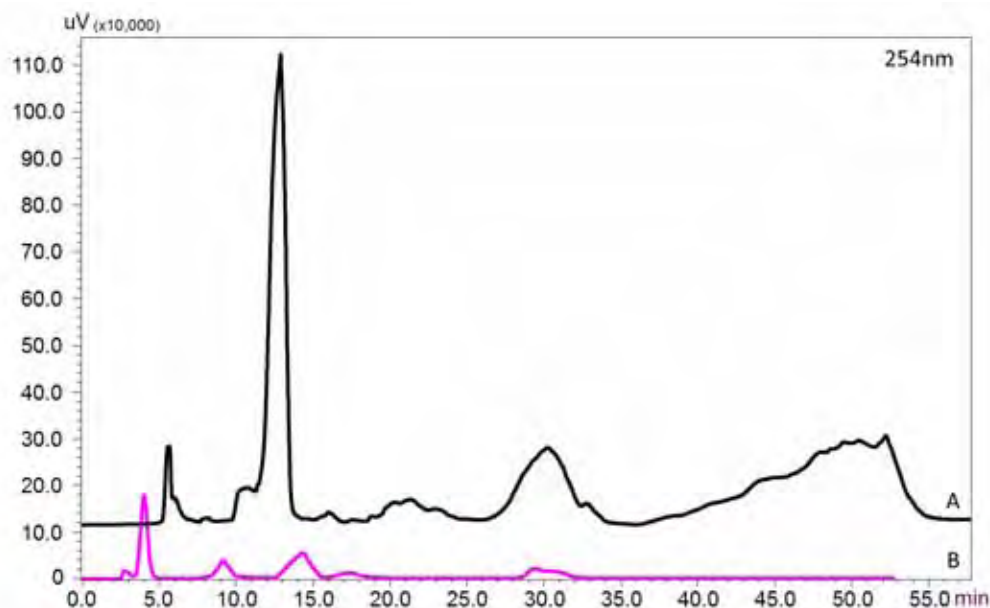
Ainda utilizando a coluna Hydro, a condição isocrática foi determinada, visando preservar a boa simetria e resolução entre os picos cromatográficos anteriormente observada, desse modo foi utilizada uma FM composta de 15% de MeOH e 85% de H₂O, em um fluxo de 1mL/min. O resultado pode ser visto na Figura 5.22, pág. 70.

Figura 5.22 – Cromatogramas da fração orgânica (Fr.2) submetida a análise em modo gradiente e isocrático, utilizando coluna Synergi Hydro Phenomenex®



Para purificação utilizou-se de um sistema composto por uma coluna semi-preparativa Synergi Hydro Phenomenex® (21,2x250 mm, 4 μ m) de fase estacionária do tipo octadesil silano (C18). Utilizou-se modo de eluição isocrático MeOH/H₂O (15:85 v/v) com um tempo de corrida de aproximadamente 60 minutos. O fluxo utilizado foi de 10mL/min e a leitura a λ =254 nm. Foram realizadas ao todo seis injeções (8 mg/injeção) utilizando um *loop* de 1 mL e o resultado obtido pode ser visualizado na Figura 5.23, pág. 71.

Figura 5.23 – Cromatogramas da fração orgânica (Fr.2) submetida a HPLC utilizando coluna Synergi Hydro Phenomenex®, em modo: A) semi-preparativo B) analítico

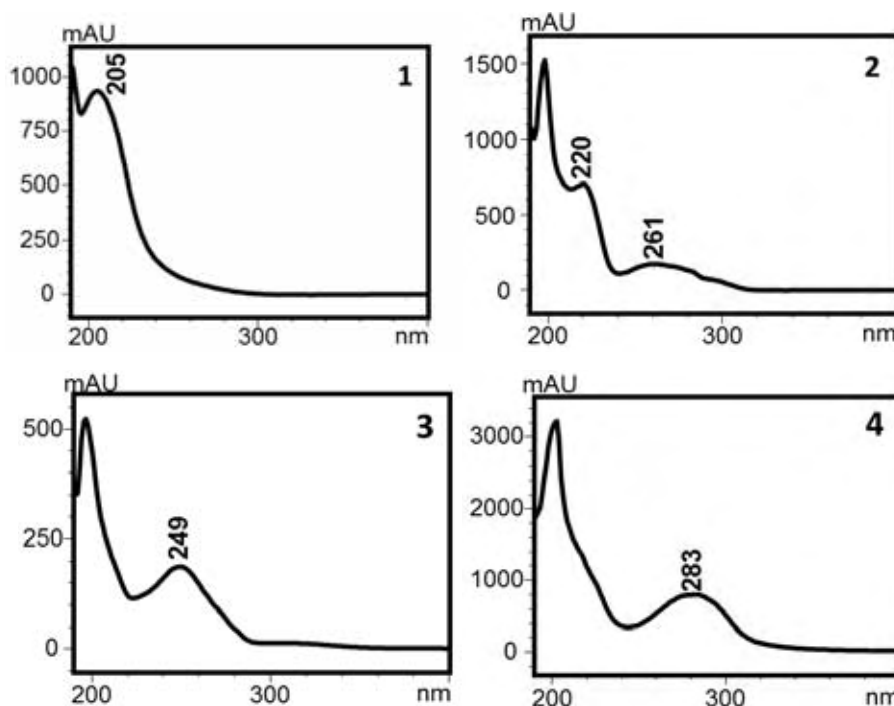


Foram coletadas 6 sub-frações (Tabela 5.9, pág. 71), realizou-se a eliminação do solvente sob vácuo em rota-evaporador sob vácuo e submetidas a análise por RMN uni e bidimensional, nos conduzindo a determinação estrutural das substâncias **1**, **2**, **3**, **4** e **5**. As substâncias **1** e **2** estão presentes em mistura na sub-fração Fr2_DP3 (5,7mg), a substância **3** está presente na sub-fração Fr2_DP4 (4,5mg) e as substâncias **4** e **5** estão presentes em mistura na sub-fração Fr2_DP5 (11,4mg). O processo de identificação e determinação estrutural das substâncias isoladas pode ser acompanhado detalhadamente no item 5.5 (Determinação estrutural das substâncias isoladas). Os espectros no UV dos picos coletados podem ser visualizados na Figura 5.24, pág. 72. Os espectros de RMN de ^1H das sub-frações Fr2_DP1 a Fr2_DP6 podem ser visualizadas nos Anexos das págs. 136 a 141.

Tabela 5.9 – Picos coletados em modo isocrático MeOH/H₂O (15:85 v/v) utilizando coluna semi-preparativa Synergi Hydro Phenomenex® (21,2x250mm, 4µm)

Sub-fração	Isocrático	Intervalo de tempo (min)	Massa (mg)
Fr2_DP1	15:85 (v/v)	5 - 7	4,0
Fr2_DP2	15:85 (v/v)	10 -14	28,0
Fr2_DP3	15:85 (v/v)	27 -35	5,7
Fr2_DP4	15:85 (v/v)	36 - 55	4,5
Fr2_DP5	100%	-	11,4
Fr2_DP6	15:85 (v/v)	15 - 26	1,7

Figura 5.24 - Espectros de absorção dos picos

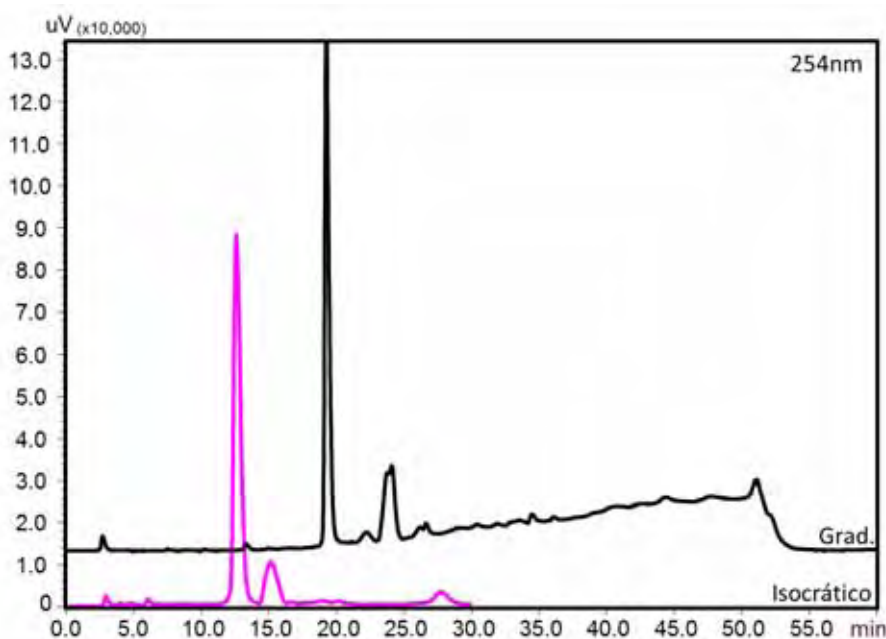


Legenda: 1) DP2 (10-14min); 2) DP3 (27-35min); 3) DP4 (33-55min); 4) DP5 (100% MeOH)

5.4.1.2 Fracionamento da Fr.3

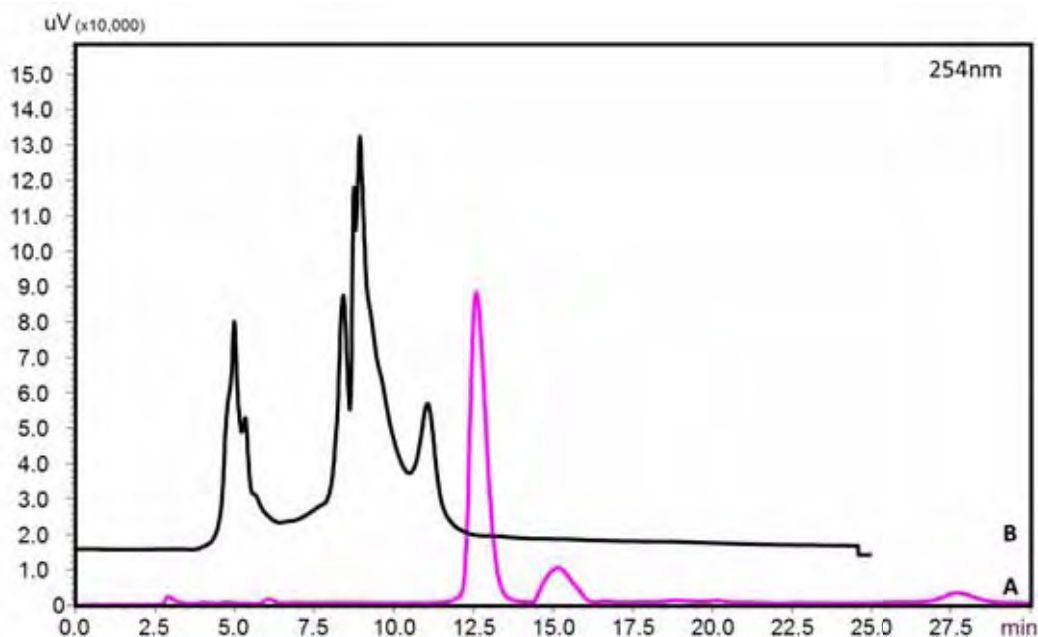
A análise detalhada do espectro de RMN de ^1H da Fr.3, não evidenciou a presença de ácidos graxos ou de açúcares, deste modo, esta fração foi submetida a CLAE em condição isocrática, objetivando o isolamento das substâncias presentes. Foi utilizada uma FM composta de MeOH/H₂O (25:75 v/v). Tanto o modo isocrático quanto o modo gradiente foram desenvolvidos em coluna Luna Phenomenex[®] (4.6x250mm, 5 μ m). O cromatograma pode ser visualizado na Figura 5.25, pág. 73.

Figura 5.25 – Cromatogramas da fração orgânica (Fr.3) submetida a eluição em modo gradiente exploratório e isocrático MeOH/H₂O (25:75 v/v) utilizando coluna cromatográfica Luna Phenomenex® (4,6x250mm)



Devido a ausência de uma coluna semi-preparativa do modelo Luna Phenomenex®, diversas outras colunas foram testadas a fim de se manter a boa simetria e resolução dos picos obtidos em escala analítica. Foram testadas as colunas: Luna Phenomenex® C8 (21,2x250mm) que apresentou baixa resolução para os picos de interesse; Luna Phenomenex® C18 (21,2x60mm) que provocou um alargamento dos picos cromatográficos além de perda da resolução; Supelco® C18 (21,2x250mm) que dentre as colunas testadas foi capaz de manter uma boa resolução entre os picos de interesse e por isso foi selecionada para a etapa do isolamento no modo preparativo.

Figura 5.26 – Cromatogramas da fração orgânica (Fr. 3) submetida a HPLC-preparativo utilizando coluna Supelco®, em modo: A) analítico B) semi-preparativo



Pela análise dos espectros bidimensionais dos picos (Figura 5.27, pág. 75) é possível verificar visivelmente pelo menos 5 regiões com diferentes perfis de absorção. Estas regiões estão identificadas com os algarismos de 1 a 5 e para cada região identificada existe um espectro de absorção pontual vinculado. Assim, para exemplificar, para a região identificada com o algarismo 4, que compreende o pico que elui com um t_r próximo a 9 minutos, podemos observar pelo mapa de contorno um espectro de absorção que apresenta um $\lambda_{\text{máx}}$ próximo a 200nm e uma segunda banda de absorção próxima a 275nm. Esta observação é coerente com o espectro de absorção da Figura 5.28, pág. 75, onde é possível verificar um $\lambda_{\text{máx}}$ de 190nm e uma banda mais afastada e menos intensa a 283nm. A partir da análise deste mapa de contorno e dos espectros que o compõem, podemos inferir a presença de no mínimo 5 substâncias diferentes eluindo nas condições cromatográficas utilizadas.

Figura 5.27 - Mapa de contorno dos espectros de absorção dos picos da Fr.3 em função do tempo em modo semi-preparativo

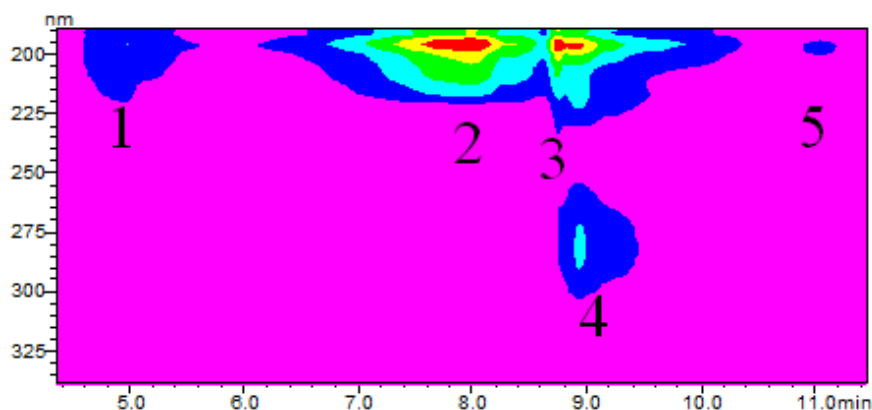
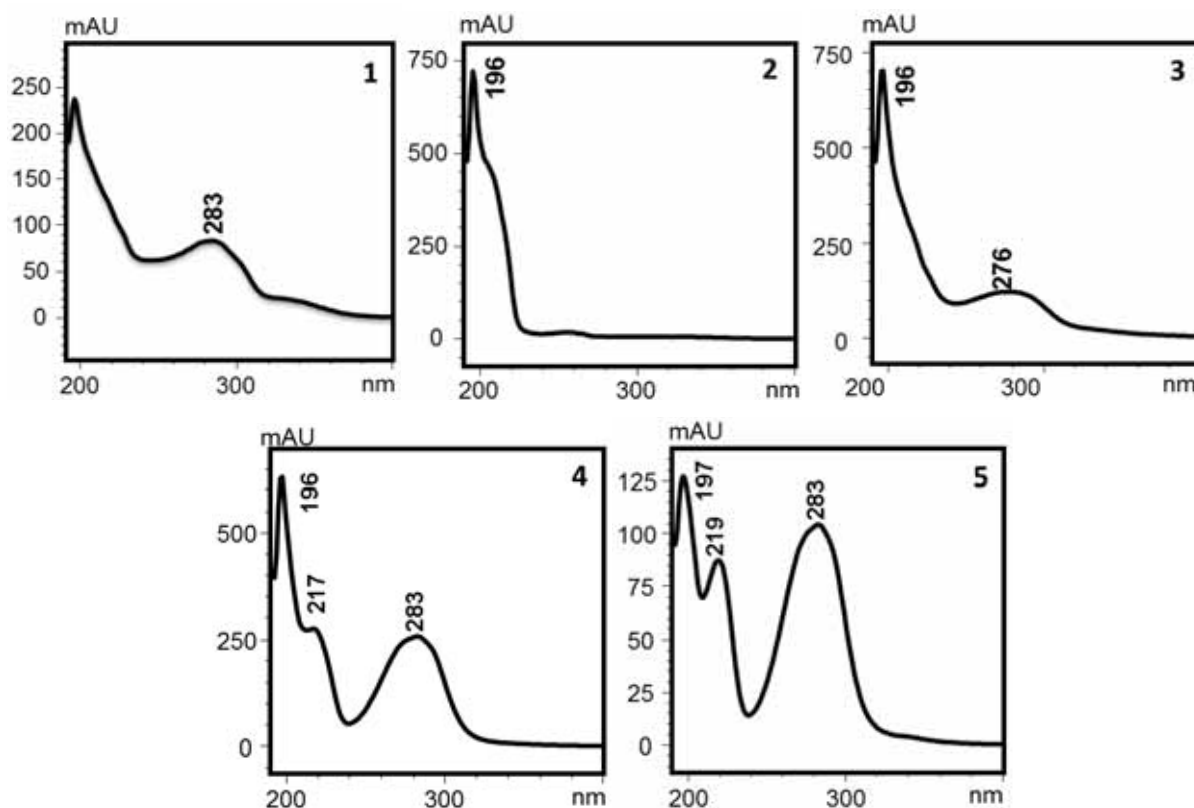


Figura 5.28 - Espectros de absorção dos picos identificados no mapa de contornos da fração Fr.3



Sendo assim, utilizou-se de um sistema composto por uma coluna semi-preparativa Supelco® (21,2x250 mm, 4µm) de fase estacionária do tipo octadesil silano (C18). Modo de eluição isocrático MeOH/H₂O (25:75 v/v) com um tempo de corrida de aproximadamente 15 minutos utilizando um fluxo de 10 mL/min. Foram realizadas ao todo dez injeções (4 mg/injeção) utilizando um *loop* de 1mL sendo coletadas ao final 5 sub-frações (Tabela 5.10, pág. 76), que foram secas em

rotoevaporador sob vácuo e submetidas a análise por RMN uni e bidimensional. A análise dos resultados nos conduziu ao isolamento das substâncias **4** e **5** anteriormente isoladas na Frac.2. As substâncias **4** e **5** foram determinadas em mistura nas sub-fração Fr3_DP3 (17,1mg). A substância **4** foi isolada na Fr3_DP5, com uma massa de 3,8 mg. Os espectros de RMN de ^1H das sub-frações Fr3_DP1 a Fr3_DP5 podem ser visualizadas nos Anexos das págs. 142 a 146.

Tabela 5.10 - Picos coletados em modo isocrático MeOH/H₂O (25:75 v/v) utilizando coluna semi-preparativa Supelco® (21,2x250mm, 4µm)

Sub-fração	Intervalo de tempo (min)	Massa (mg)
Fr3_DP1	4 - 5	1,3
Fr3_DP2	5 - 8,5	5,1
Fr3_DP3	8,5 - 9,5	17,1
Fr3_DP4	9,5 - 10,5	34,7
Fr3_DP5	10,5 - 12,5	3,8

Devido a complexidade de sinais presentes no espectro de RMN de ^1H da sub-fração Fr3_DP4 e também levando em consideração a quantidade de massa, esta sub-fração foi novamente submetida a purificação por HPLC preparativo.

5.4.1.2.1 Purificação da sub-fração Fr3_DP4

A sub-fração Fr3_DP4 foi novamente submetida a HPLC analítico em modo gradiente, a fim de se verificar a quantidade de picos a serem resolvidos durante a corrida cromatográfica. As condições utilizadas foram as mesmas descritas no item 4.6.1 (pág. 31). Apenas 2 picos majoritários foram detectados nesta sub-fração, condição esta que facilitou o desenvolvimento de um método isocrático capaz de manter a boa resolução obtida no modo gradiente. Utilizou-se então de uma FM composta por MeOH/H₂O (7:3 v/v) e os cromatogramas obtidos tanto em modo gradiente quanto em modo isocrático podem ser visualizados na Figura 5.29, pág. 77. Em seguida, utilizou-se a condição isocrática em escala semi-preparativa, tendo o cromatograma resultante apresentado um perfil cromatográfico semelhante ao obtido em modo analítico (Figura 5.30, pág. 77).

Figura 5.29 - Sub-frac.3_DP4 submetida a eluição em modo gradiente exploratório e isocrático MeOH/H₂O (7:3 v/v) utilizando coluna cromatográfica Luna Phenomenex® (4,6x250mm)

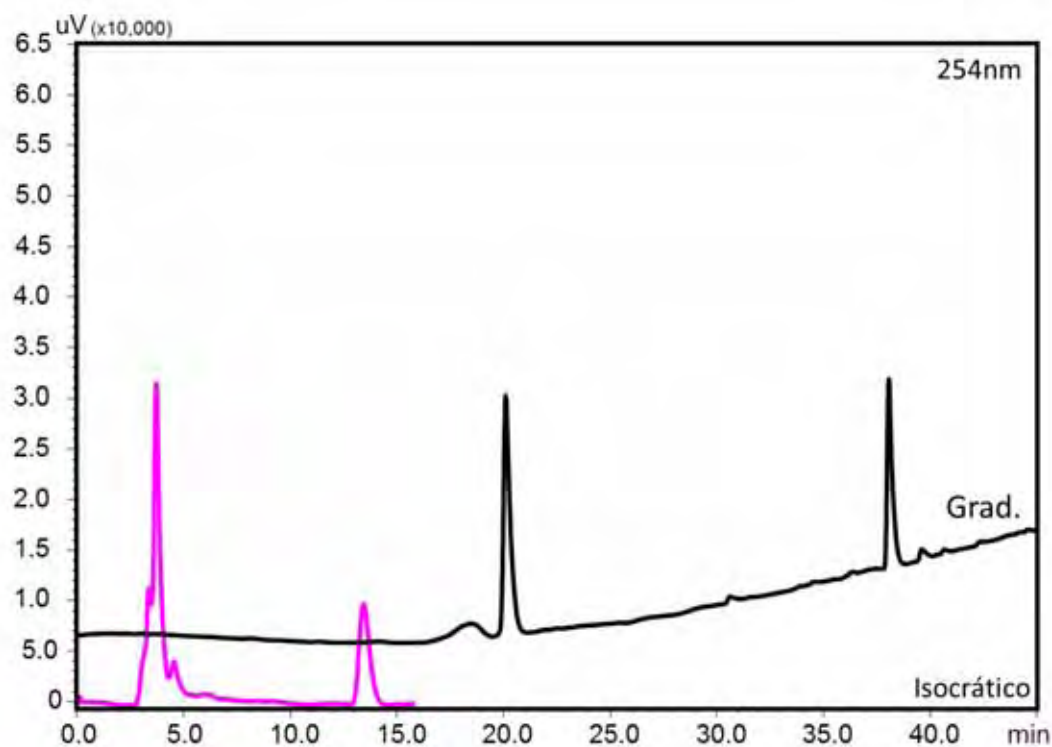
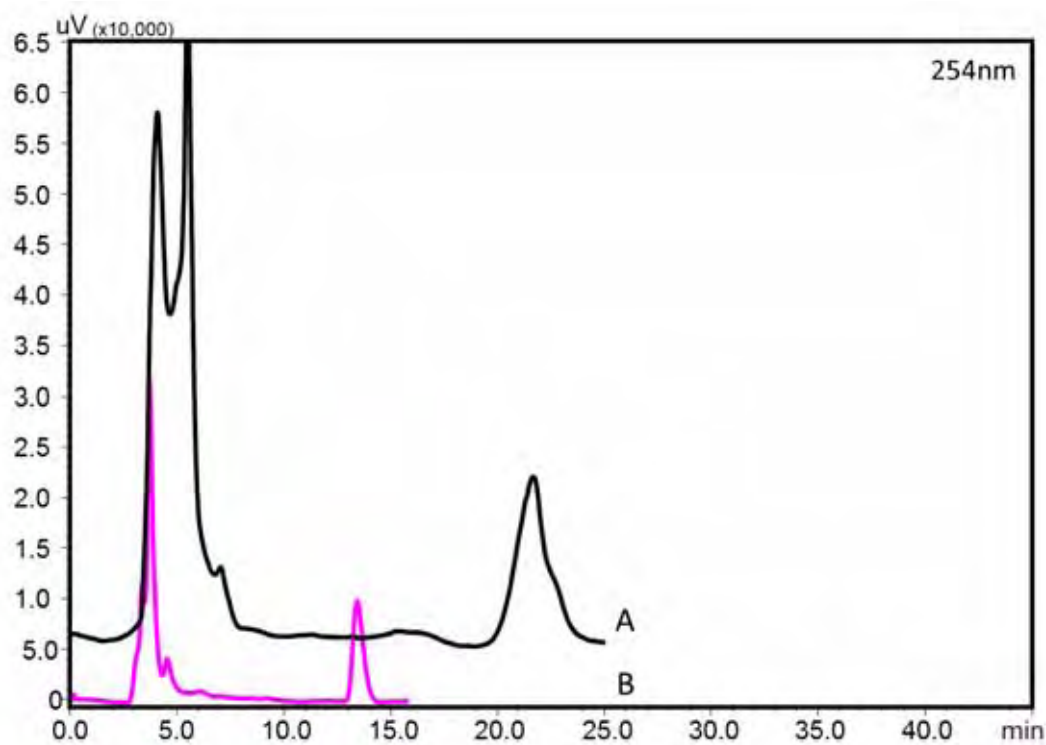


Figura 5.30 - Sub-frac.3_DP4 submetida a HPLC em modo: A) analítico B) semi-preparativo



Através da análise dos espectros bidimensionais dos picos em modo semi-preparativo (Figura 5.31, pág. 78) é possível verificar visivelmente pelo menos 6 regiões com diferentes perfis de absorção, identificadas com os algarismos de 1 a 6. Os respectivos espectros pontuais podem ser visualizados na Figura 5.32, pág. 79.

Figura 5.31 - Mapa de contorno dos espectros de absorção dos picos da Fr.3_DP4 em função do tempo obtidos em modo semi-preparativo

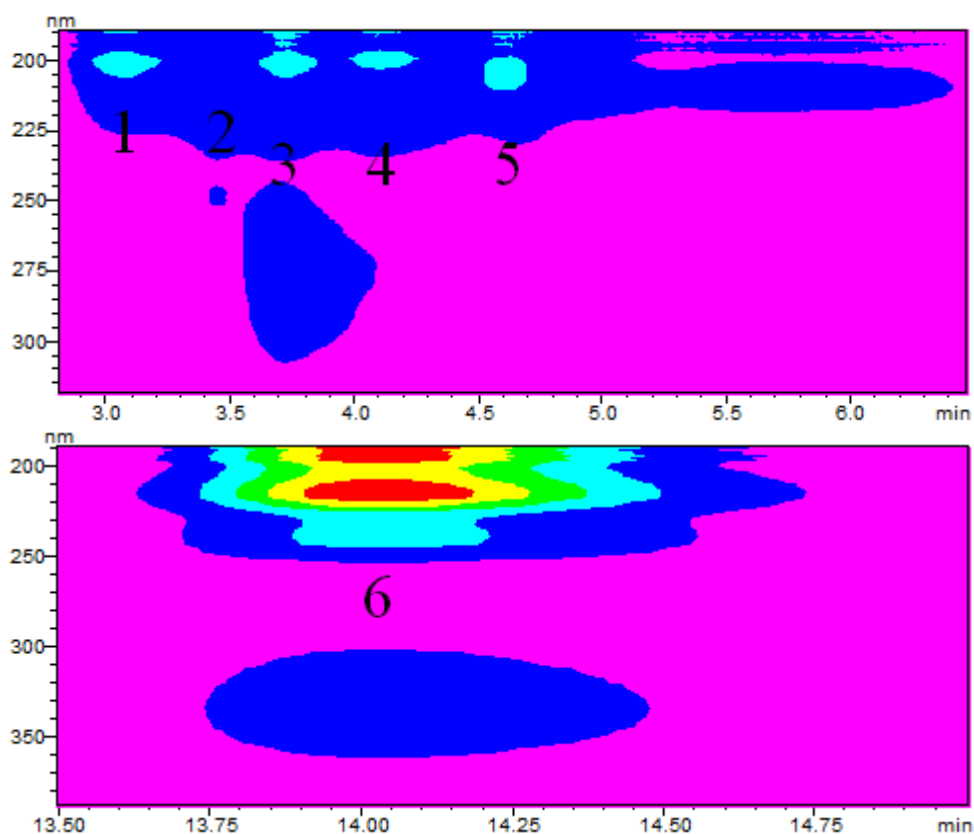
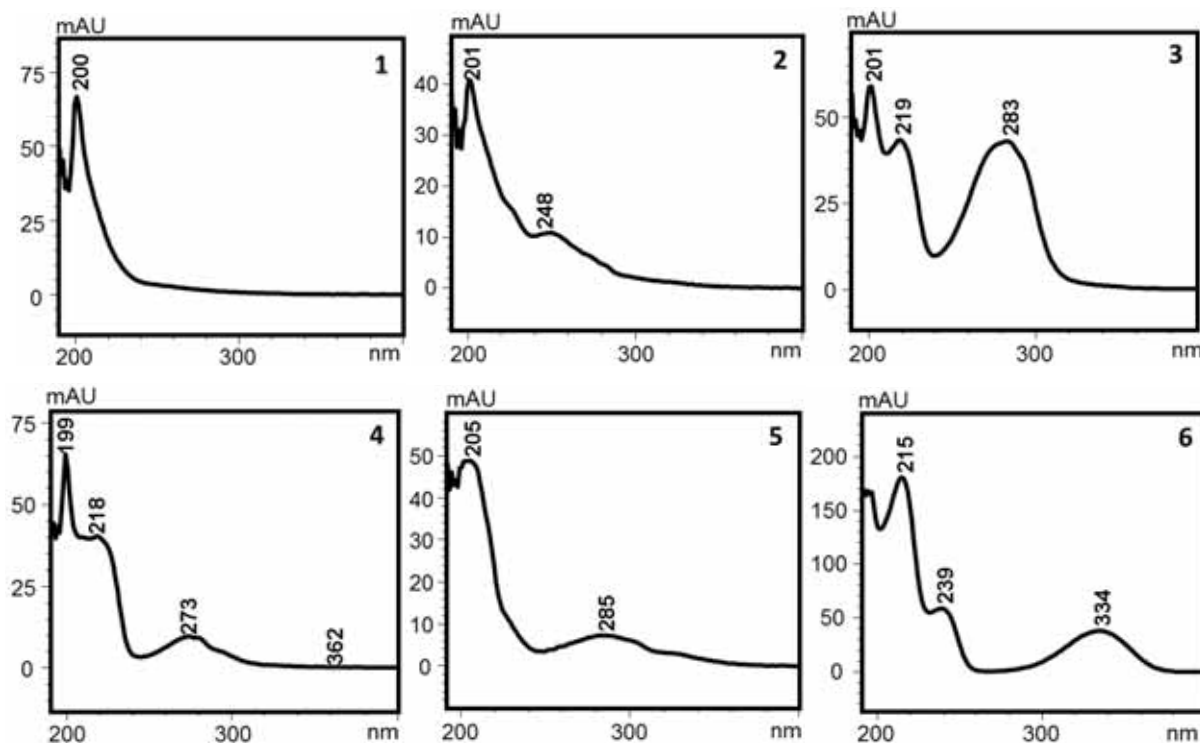


Figura 5.32 - Espectros de absorção dos picos identificados no mapa de contornos da sub-fração Fr.3_DP4 obtidos em modo semi-preparativo



Finalmente, utilizou-se de um sistema composto por uma coluna semi-preparativa Luna Phenomenex® (21,2x150mm, 4µm) de fase estacionária do tipo octadesil silano (C18). Modo de eluição isocrático MeOH/H₂O (7:3 v/v) com um tempo de corrida de aproximadamente 25 minutos utilizando um fluxo de 10mL/min. Foram realizadas ao todo sete injeções (4mg/injeção) utilizando um loop de 1mL sendo coletadas ao final 2 sub-frações, que foram secas em rotoevaporador sob vácuo e submetidas a análise por RMN uni e bidimensional. Através da análise dos espectros da sub-fração Fr.3_DP4_P1 (4,0mg) foi possível a determinação em mistura das substâncias **4** e **5**, e das substâncias **6**, **7** e **8** na sub-fração Fr.3_DP4_P2. Os espectros de RMN de ¹H das sub-frações Fr3_DP4_P1 e Fr3_DP4_P2 podem ser visualizadas nos Anexos das págs. 147 e 148.

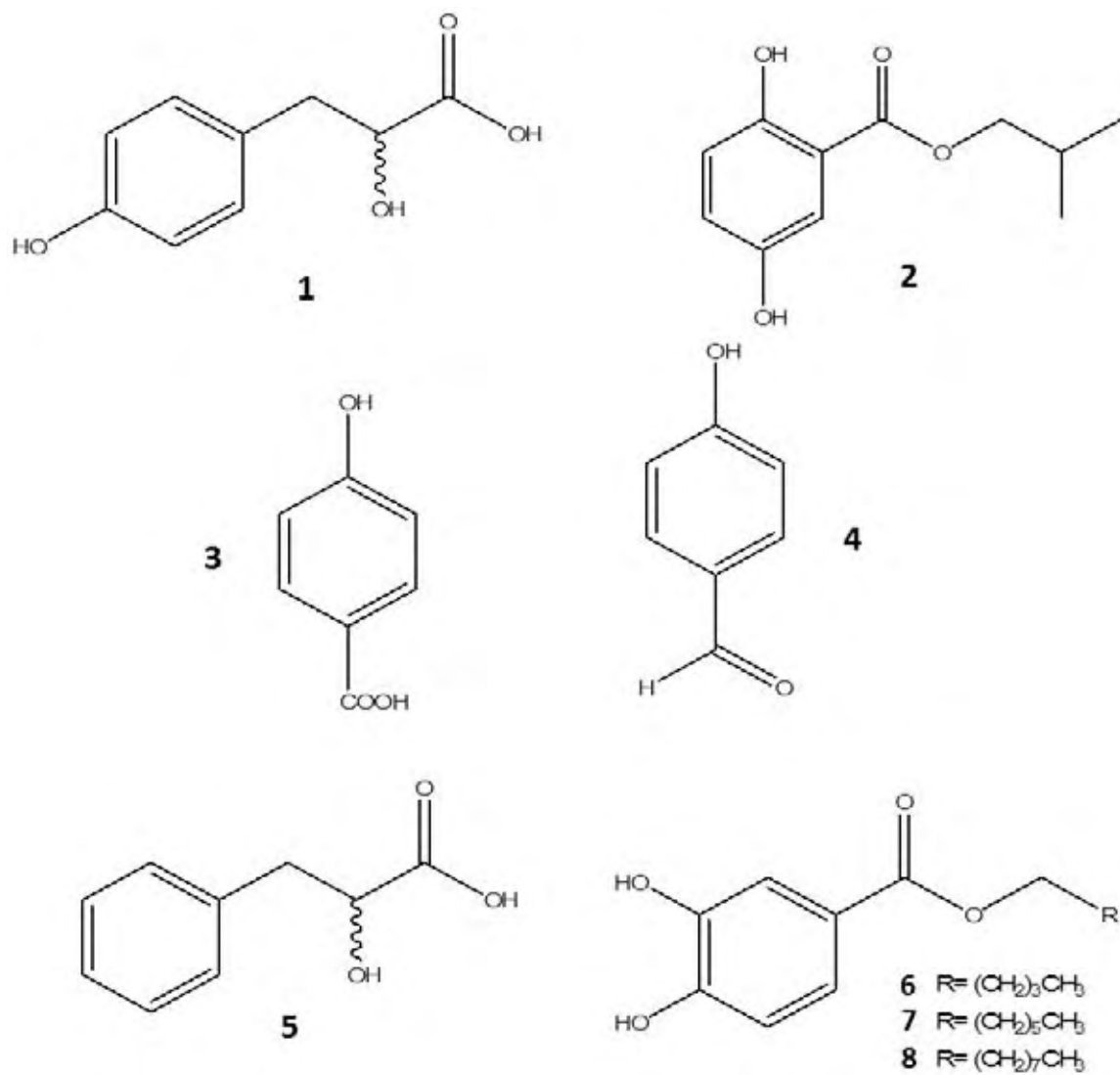
Tabela 5.11 - Picos coletados em modo isocrático MeOH/H₂O (7:3 v/v) utilizando coluna semi-preparativa Luna Phenomenex® (21,2x150mm, 4µm)

Sub-fração	Intervalo de tempo (min)	Massa (mg)
Fr3_DP4_P1	3 - 8	4,0
Fr3_DP4_P2	20 - 25	2,0

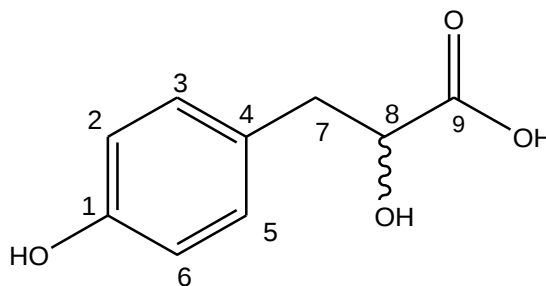
5.5 Determinação estrutural das substâncias isoladas

5.5.1 Substâncias produzidas por *Camarops* sp. em meio de Czapek®

Figura 5.33 - Substâncias produzidas por *Camarops* sp em meio de Czapek®



5.5.2 Identificação estrutural do Ácido *p*-hidroxifeniláctico (1)



Ácido *p*-hidroxifeniláctico (HOPLA) (4HPLA) (**1**)

A análise do espectro de RMN de ^1H da fração Fr.2_DP3 evidenciou a presença de duas substâncias, sendo uma majoritária, deste modo optamos por identificá-las em mistura.

A análise do espectro de RMN de ^1H da fração Fr.2_DP3 (Figura 5.35, pág. 83), evidenciou a presença de dois dubletos em δ_{H} 7,00 (2H, H-3 e H-5, δ_{C} 130,8) e δ_{H} 6,63 (2H, H-2 e H-6, δ_{C} 115,4), integrados para dois hidrogênios cada, com constantes de acoplamento característicos de hidrogênios acoplados em relação *orto* ($J=8,2\text{Hz}$) nos permitiu identificar o sistema como um anel aromático dissubstituído. Foi observado também, sinais em δ_{H} 3,96 (*s*l, 2H, H-8, δ_{C} 72,0), δ_{H} 2,85 (*dl*, 1H, H-7, δ_{C} 40,2) e δ_{H} 2,62 (*m*, 1H, H-7, δ_{C} 40,2). A presença dos dois últimos sinais com o mesmo δ_{C} evidenciou um carbono vizinho a um centro estereogênico e pelo deslocamento químico do carbono, evidenciou tratar-se de um carbono benzílico. O deslocamento em δ_{H} 3,96 (δ_{C} 72,0) é característico de um hidrogênio carbinólico e nos conduziu a propor a presença de um grupamento hidroxila ligado diretamente a um carbono β ao anel aromático.

Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos, pela análise dos mapas de contorno dos experimentos de *g*HSQC (Figura 5.36, pág. 83).

Nas análises dos mapas de contorno dos experimentos de *g*HSQC e nas correlações em *g*HMBC (Figura 5.37, pág. 84), foi possível visualizar os carbonos em δ_{C} 130,8 (C-3 e C-5); 114,4 (C-2 e C-6); 128,4 (C-4); 155,6 (C-1) e 175,5 (C-9), sendo que os dois últimos indicaram a presença de um carbono fenólico e uma função carboxílica, respectivamente.

A cadeia lateral foi posicionada em C-4, com base nos valores dos deslocamentos químicos e multiplicidades dos sinais do anel aromático, além das interações observadas em COSY (Figura 5.38 pág. 85) entre $\text{H-7} \leftrightarrow \text{H-8}$ e das

correlações observadas nos mapas de contorno em HMBC de H-7/H-8 $\leftrightarrow$ C-4. A função carboxílica foi confirmada com base nos valores de δ_C 175,5 em C-8.

A Figura 5.34 abaixo, mostra as correlações observadas nos experimentos de *g*HMBC e nos permitiram atribuir para a substância **1** a estrutura do *para*-hidroxifenilático ou ácido 2-hidroxi-3-(4-hidroxifenil) propanóico.

A estrutura foi confirmada por Espectrometria de Massas (ESI-EM, modo negativo), por apresentar um sinal massa/carga de 181,84, que representa a perda de um próton (Figura 5.39, pág. 85)

Por encontrar-se em mistura, não foi possível determinar a configuração absoluta de C-8.

Figura 5.34 - Correlações observadas nos mapas de contorno do experimento de HMBC do ácido *p*-hidroxifenilático (1**)**

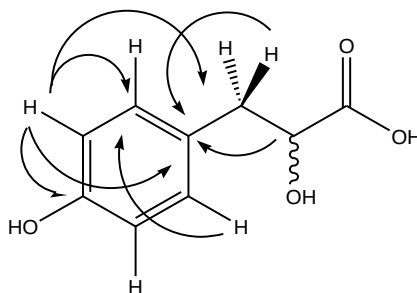


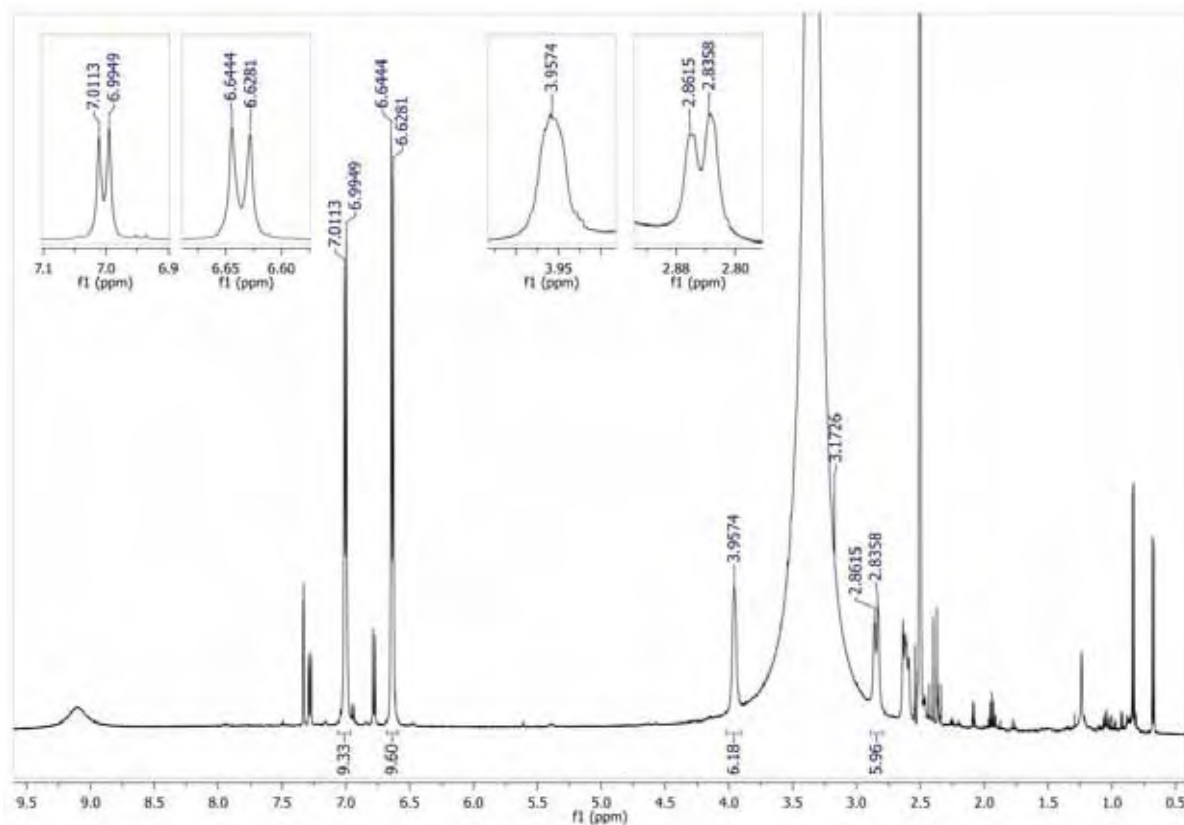
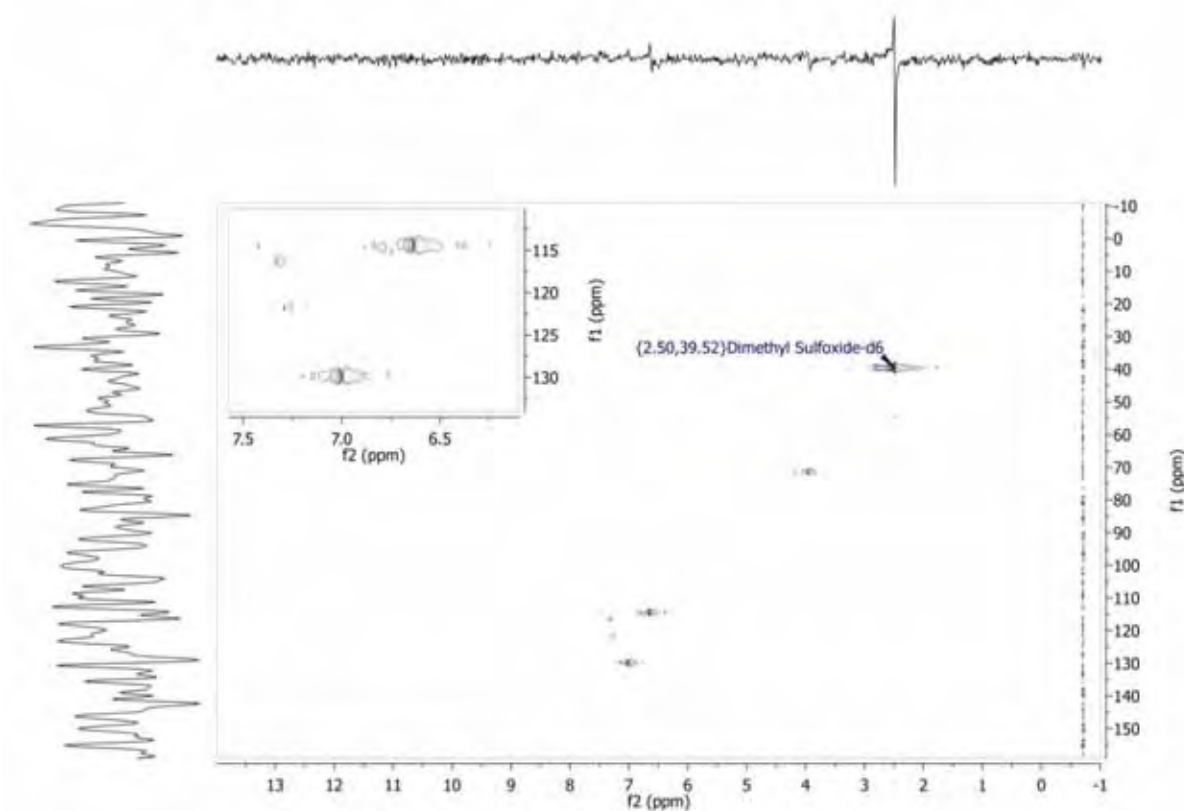
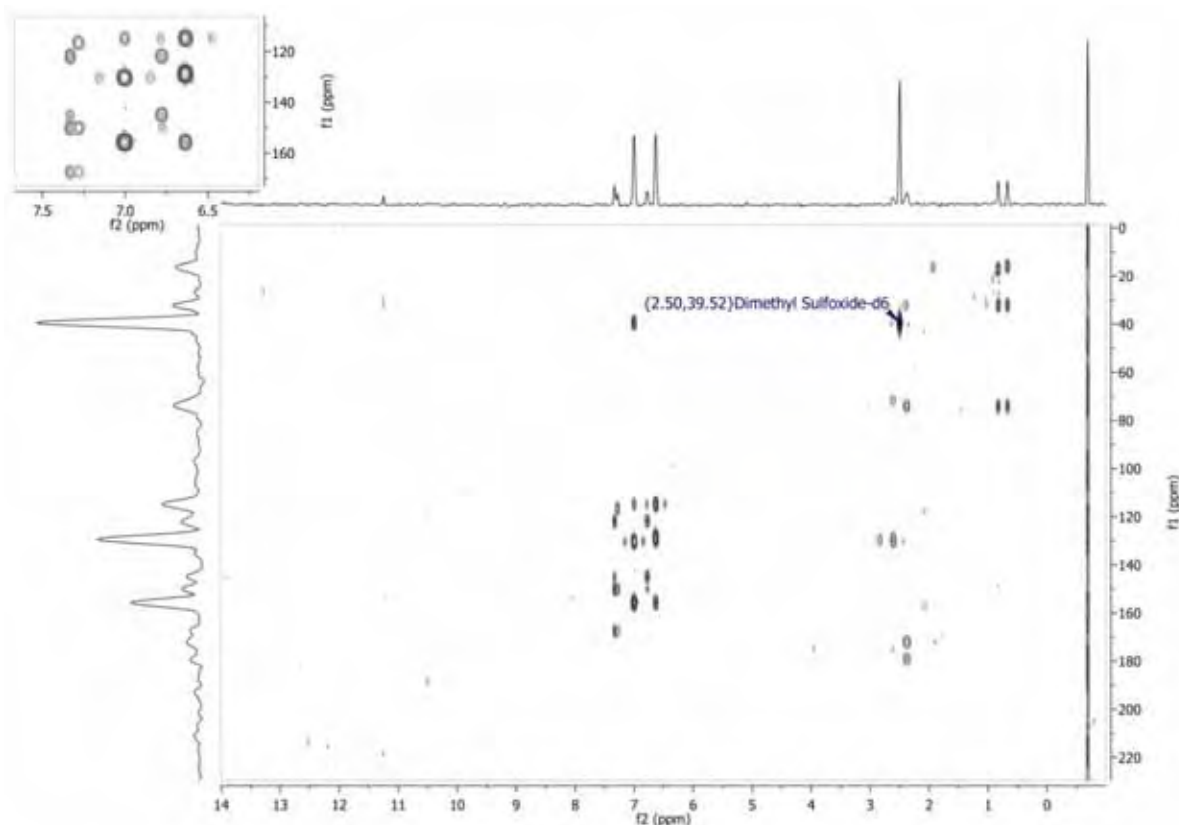
Figura 5.35 - RMN de ^1H do ácido p-hidroxifenilático (1) (DMSO-d_6 , 500MHz)Figura 5.36 - Mapa de contorno de gHMQC do ácido p-hidroxifenilático (1) (DMSO-d_6 , 125MHz)

Figura 5.37 - Mapa de contorno de gHMBC do ácido p-hidroxifenilático (1) (DMSO_d₆, 125 Hz)Tabela 12 - Sinais de RMN de ^1H (500MHz) e ^{13}C (125MHz) da substância 1 em DMSO^a

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)	gHMBC
1	-	130,3	-
2	6,63 (d, 8,2Hz)	114,4	C-1; C-3; C-4
3	7,00 (d, 8,2Hz)	129,8	C-5; C-2
4	-	155,7	-
5	7,00 (d, 8,2Hz)	129,8	C-5; C-2
6	6,63 (d, 8,2Hz)	114,4	C-1; C-3; C-4
7a	2,62 (<i>m</i>)	39,3	C4
7b	2,85 (<i>dl</i>)	-	-
8	3,96 (<i>sl</i>)	71,4	-
9	-	175,5	-

^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna,(δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

Figura 5.38 - Correlações dos hidrogênios do ácido p-hidroxifenilático (1) (COSY) em DMSO_d₆

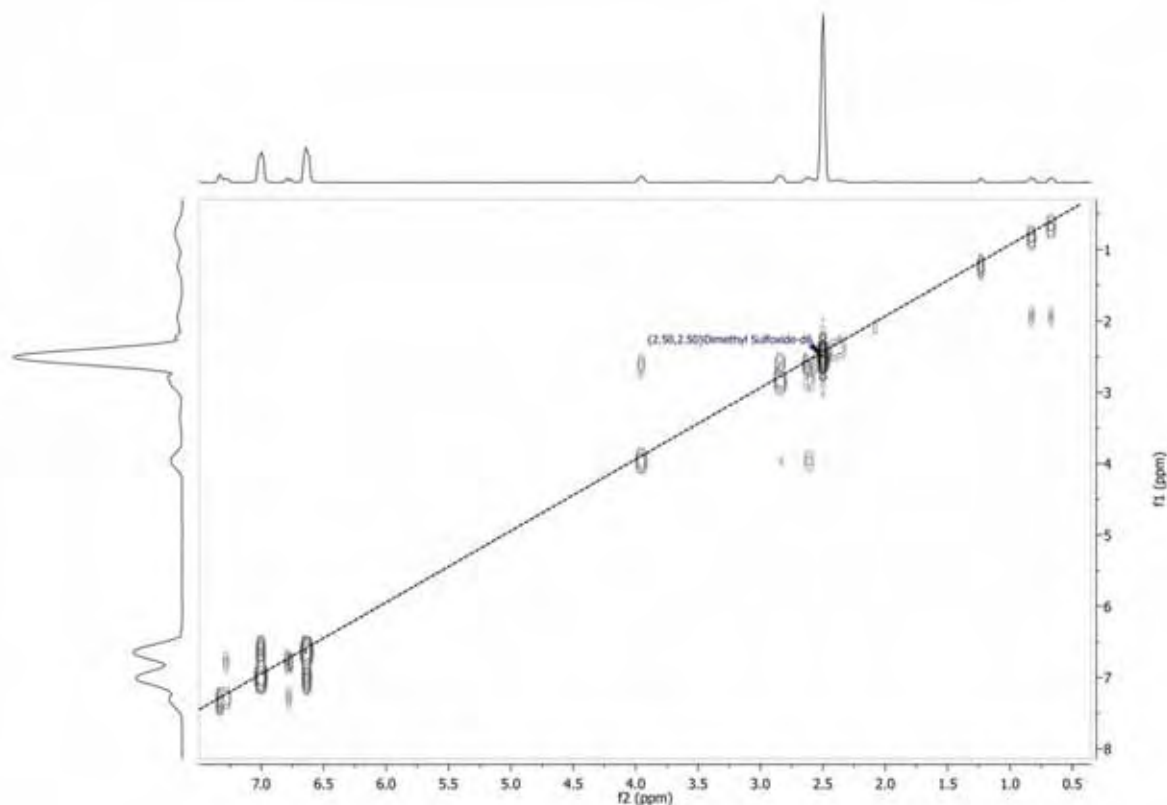
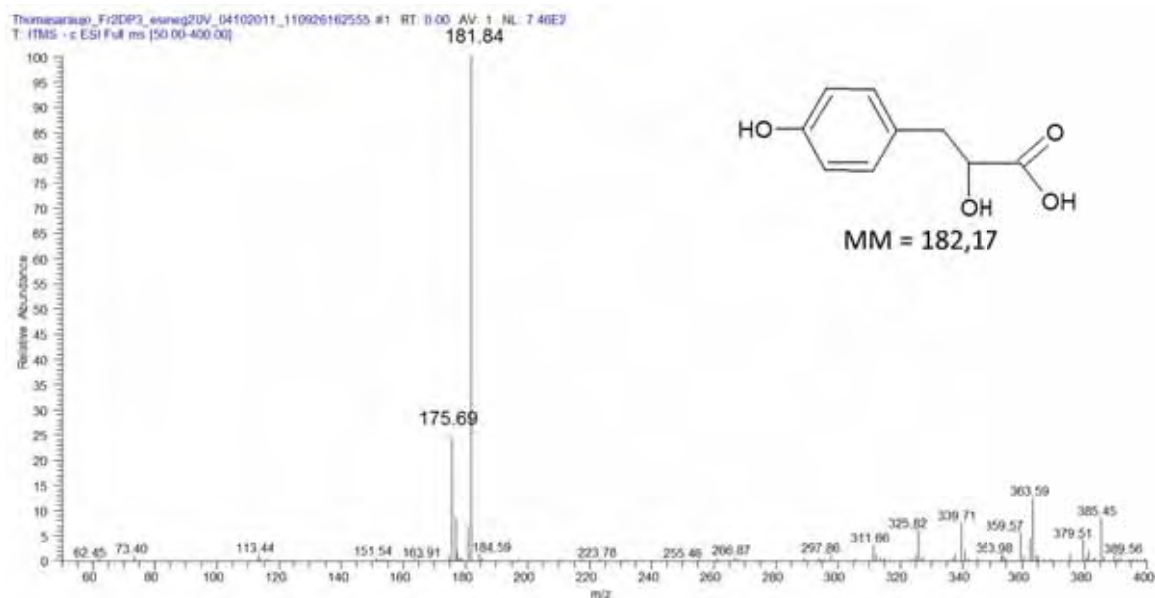


Figura 5.39 - ESI-MS do ácido p-hidroxifenilático



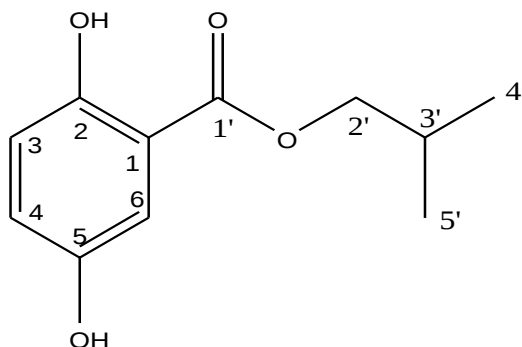
O ácido *p*-hidroxifenilático, dentre outros metabólicos secundários, foi isolado anteriormente do extrato bruto obtido em meio de cultura de MPGA (Extrato de malte, peptona e glicose-agar) das cepas de *Cryphonectria parasítica* [72], bactéria responsável por causar uma doença nos frutos do castanheiro-da-europa. Também

foi determinado nos extratos das cepas bacterianas de *Candida spp.* ^[73] e *Lactobacillus plantarum* ^[74]. Este metabólico também foi isolado da monocultura não estéril de *Scenedesmus incrassatulus*, sendo considerado um novo metabólico isolado de algas ^[75].

O ácido *p*-hidroxifenil láctico, concomitantemente com o ácido *p*-hidroxibenzóico (**3**) também apresentaram-se presentes nos extratos obtidos das folhas das espécies vegetais de *Tecoma stans* ^[76], *Euphrasia rostkoviana* ^[77], *Lysimachia vulgaris* ^[78] e *Melilotus officinalis* ^[79], nas folhas e frutos de *Cordia macleodii* ^[80] e em várias espécies de amoras ^[81].

O ácido *p*-hidroxifenil láctico pode apresentar um efeito fisiológico ao induzir o crescimento diferencial de células (crescimento dos ápices de raízes) ^[72], e apresenta atividade contra diversas linhagens fúngicas ^[74].

5.5.3 Identificação estrutural do 2,5 – dihidroxibenzoato de isobutila (2)



2,5 – dihidroxibenzoato de isobutila (2)

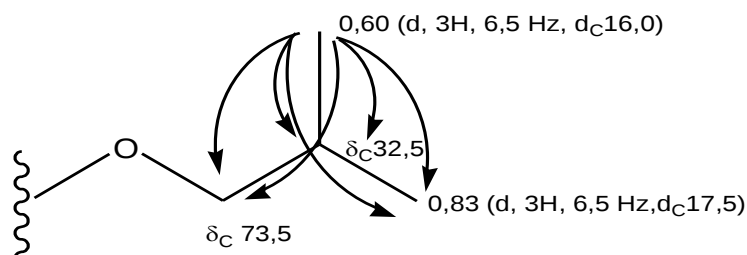
Esta substância encontrou-se em mistura com a substância 1 e minoritária na fração Fr.2_DP3, e como já colocado, optamos pela determinação estrutural em mistura.

Analizando-se o espectro de RMN de ^1H (Figura 5.35, pág. 83) e subtraindo-se os sinais referentes ao ácido *para*-hidroxiláctico, foi visualizada uma região de aromáticos, com três sinais em δ_{H} 7,33 (*d*, $J=2,0$ Hz, 1H, δ_{C} 117,3, H-6), 6,78 (*d*, $J=8,0$ Hz, 1H, δ_{C} 116,0, H-3) e 7,28 (*dd*, $J=2,0$; 8,0 Hz, 1H, δ_{C} 122,6, H-4), evidenciando um anel aromático trissubstituído. Adicionalmente, utilizando os mapas de contorno dos experimentos de HSQC e HMBC (Figura 5.36 e Figura 5.37e, págs.83 e 84 e), foram visualizados, sinais adicionais de carbonos aromáticos em δ_{C} 149,9; δ_{C} 144,8; δ_{C} 121,6 e δ_{C} 167,3.

Os valores dos deslocamentos químicos em RMN de ^{13}C de δ_{C} 149,9; δ_{C} 144,8 nos sugeriram duas hidroxilas em posição *para* e o terceiro substituinte foi posicionado em função do padrão de multiplicidade do anel aromático.

Ainda nos espectros de RMN de ^1H , foram observados dois dubletos em 0,67 (*d*, $J=6,5$ Hz, 1H, δ_{C} 16,0, H-4') e 0,83 (*d*, $J=6,5$ Hz, 1H, δ_{C} 17,5, H-5'). Pelos experimentos de HSQC e HMBC observamos carbonos em δ_{C} 16,0 (CH_3); 17,5 (CH_3); 32,5 (CH); e 73,5 (CH_2), o que baseados nas correlações observadas nos mapas de contorno de HMBC nos permitiram propor a estrutura parcial B.

Figura 5.40 - Correlações observadas em HMBC da substância 2

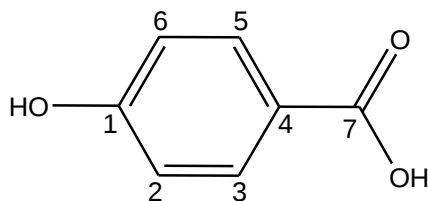
**Estrutura parcial B**

O valor de 167,3 observado em HSQC associado à correlação observada nos mapas de contorno de HMBC de H-6 (δ_H 7,33) $\leftrightarrow$ C-1' (167,3), nos permitiu posicionar a função éster em C-1.

Com estas informações foi possível elucidar a substância **2**.

Não foi possível localizar nenhum registro desta substância na literatura sendo, portanto, esta substância de caráter inédito.

5.5.4 Identificação estrutural do Ácido *p*-hidroxibenzóico (3)



Ácido *p*-hidroxibenzóico (pHBA) (3)

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 5.41, pág. 89), gHSQC (Figura 5.42, pág. 90), evidenciou a presença de dois dubletos a δ_{H} 7,76 (2H, $J=8,5\text{Hz}$, δ_{C} 114,87) e δ_{H} 6,80 (2H, $J=8,5\text{Hz}$, δ_{C} 131,14), nos permitiu identificar o sistema como um anel aromático dissubstituído.

Os átomos de hidrogênio foram atribuídos aos respectivos carbonos, pela análise dos mapas de contorno dos experimentos de gHMQC (Figura 5.43, pág. 90).

Figura 5.41 - RMN de ^1H do Ácido *p*-hidroxibenzóico (3) (DMSO- d_6 , 500MHz)

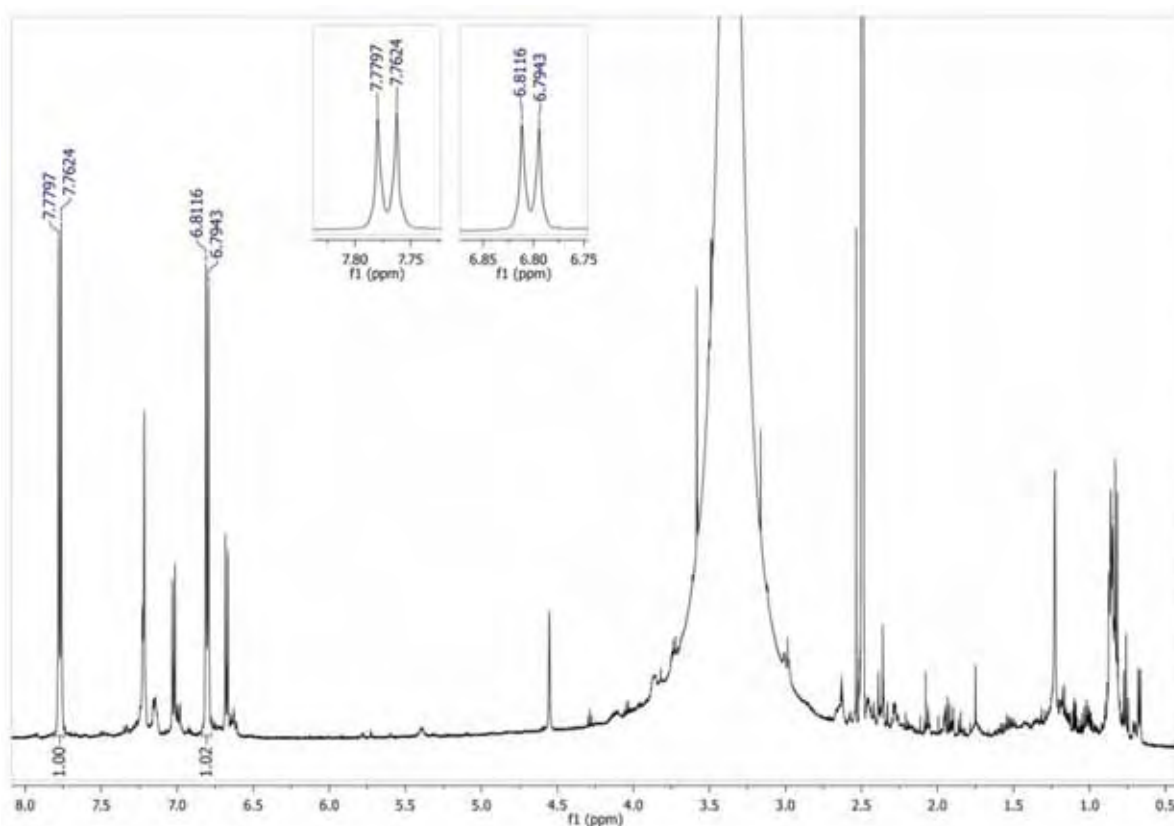
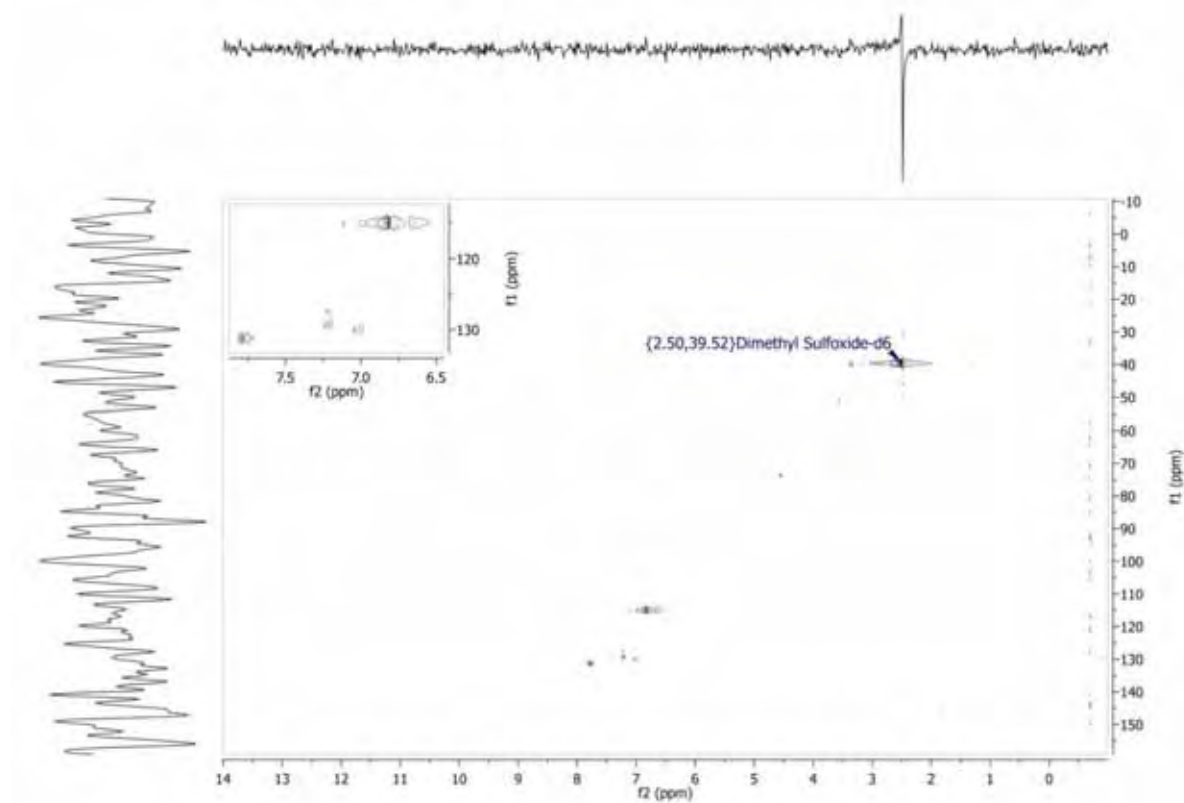
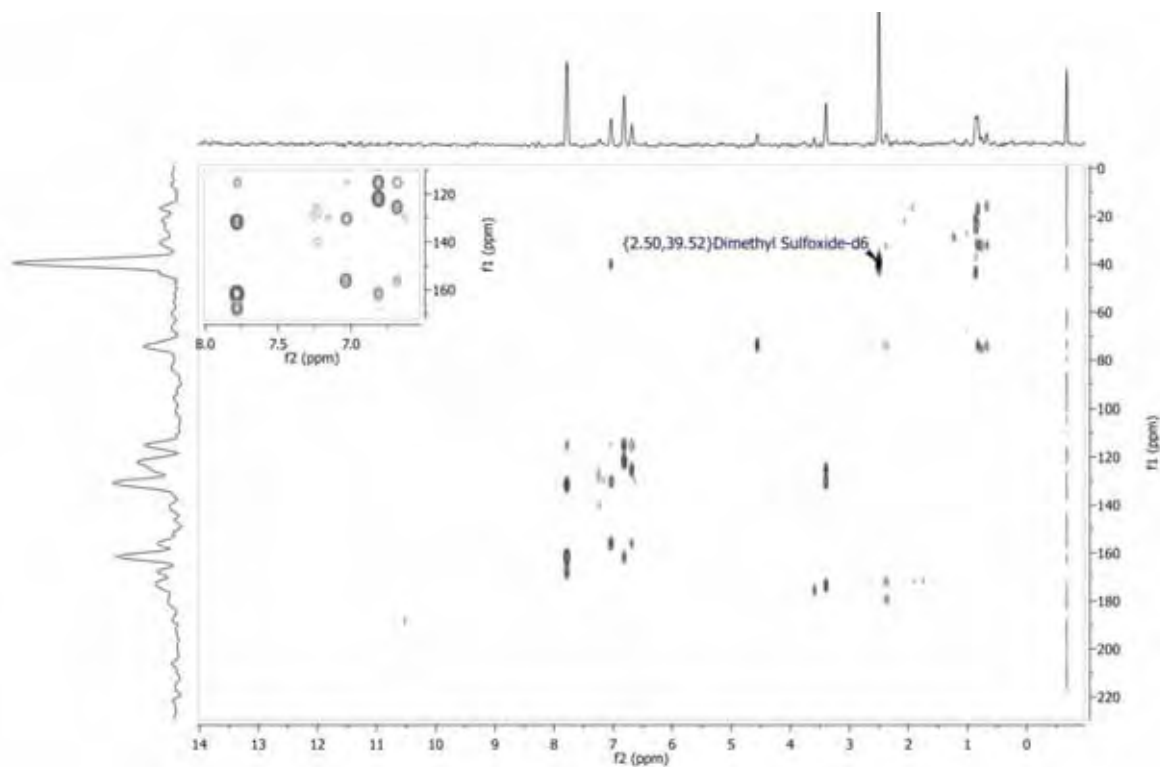
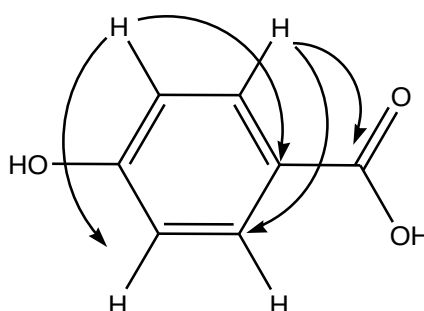


Figura 5.42 - Mapa de contorno de gHMQC do Ácido p-hidroxibenzoico (3) (DMSO-d₆, 125MHz)Figura 5.43 - Mapa de contorno de gHMBC do Ácido p-hidroxibenzoico (3) (DMSO-d₆, 125 Hz)

Uma análise detalhada dos experimentos de *g*HMBC e *g*HSQC nos permitiram constatar a presença de cinco carbonos, sendo dois deles com δ_C 161,6 e δ_C 167,7, sugerindo um carbono fenólico e outro de uma função carboxílica, provavelmente referente a um ácido carboxílico ligado a um anel benzênico. Tal suposição foi baseada no alto deslocamento químico de δ_C 167,7.

Figura 5.44 - Correlações observadas nos mapas de contorno em HMBC do Ácido *p*-hidroxibenzóico (3)



Estes dados associados às correlações observadas nos mapas de contorno dos experimentos de HMBC e comparação com a literatura nos permitiram atribuir a substância **3** o ácido *para*-hidroxibenzóico.

Tabela 13 -RMN de ^1H (500MHz) e ^{13}C (125MHz) do Ácido *p*-hidroxibenzóico (3) em DMSO^a.

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)	<i>g</i> HMBC
1	-	121,9	-
2	6,81 (d, 8,7Hz)	114,9	C-1; C-3
3	7,76 (d, 8,7Hz)	131,1	C-2; C-3;C-7
4	-	161,6	-
5	7,76 (d, 8,7Hz)	131,1	C-2; C-3;C-7
6	6,80 (d, 8,7Hz)	114,9	C-1; C-3
7	-	167,7	-

^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna,

(δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

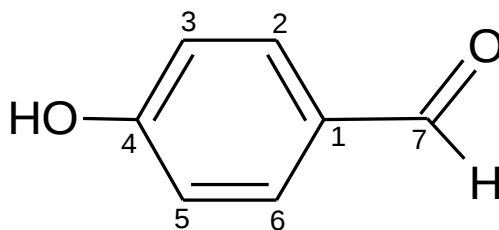
O ácido *p*-hidroxibenzóico (pHBA) já fora anteriormente isolado de fungos endofíticos^[82,83], assim como de bactérias^[84], organismos marítimos^[85], fungos^[86], plantas^[87] e frutos^[81].

Apresenta grande importância industrial na área alimentícia por se tratar de um intermediário indispensável no metabolismo de síntese do pigmento avermelhado shikonin, o qual é produzido pela espécie vegetal *Lithospermum erythrorhizon*^[88].

Na indústria eletrônica, o pHBA é o principal monômero para a produção de LCPs (em inglês *liquid crystal polymers*). O mercado global para os LCPs é de aproximadamente 10mil toneladas por ano (1999), visto que tem sido empregado maciçamente na fabricação de *displays* para equipamentos eletrônicos de todos os tipos^[88]. Atualmente, o PHBA é obtido através do processo de Kolbe-Schmitt sob condições severas de temperatura e pressão, o que torna o processo muito caro em escala industrial^[88]. Assim, os fungos endofíticos podem se tornar uma alternativa financeiramente mais viável, ambientalmente sustentável e renovável para a produção de grandes quantidades de pHBA.

O ácido *p*-hidroxibenzóico também tem sido utilizado como agente conservante em cosméticos, fármacos e alimentos^[89], sendo reconhecido por apresentar significativa atividade antifúngica^[84].

5.5.5 Identificação estrutural do *p*-hidroxibenzaldeído (4)



***p*-hidroxibenzaldeído (4)**

Esta substância foi identificada em mistura da fração Fr2_DP5 e encontra-se minoritariamente.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 5.30) foi observada a presença de um singlete desblindado em δ_{H} 9,78 que sugeriu a existência de uma função aldeído. Também, foi possível visualizar sinais característicos de hidrogênios de um anel benzênico *para*-disubstituído em δ_{H} 6,93 (*d*, $J=8,5$ Hz, 2H, δ_{C} 115,8) e δ_{H} 7,75 (*d*, $J=8,5$ Hz, 2H, δ_{C} 132,0). Estes dados, associados a uma comparação com os da substância **3** e o sinal em 190,9 visualizado no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 5.47, pág. 94) evidenciou a redução de C-7 de um ácido carboxílico para aldeído

Para confirmarmos tal suposição, os experimentos de *g*HMQC (Figura 5.49, pág. 95) e HMBC (Figura 5.46, pág. 94) foram minuciosamente analisados e nos permitiram atribuir todos os carbonos aos respectivos hidrogênios, atribuindo para a substância **4** o *para*-hidroxibenzaldeído.

Figura 5.45 - Correlações observadas em HMBC do *p*-hidroxibenzaldeído (4)

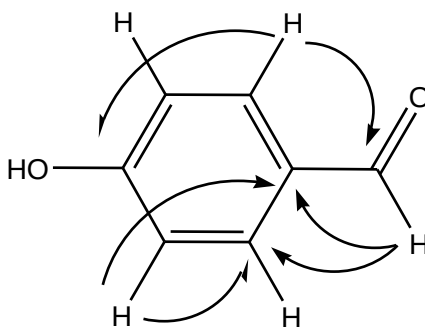


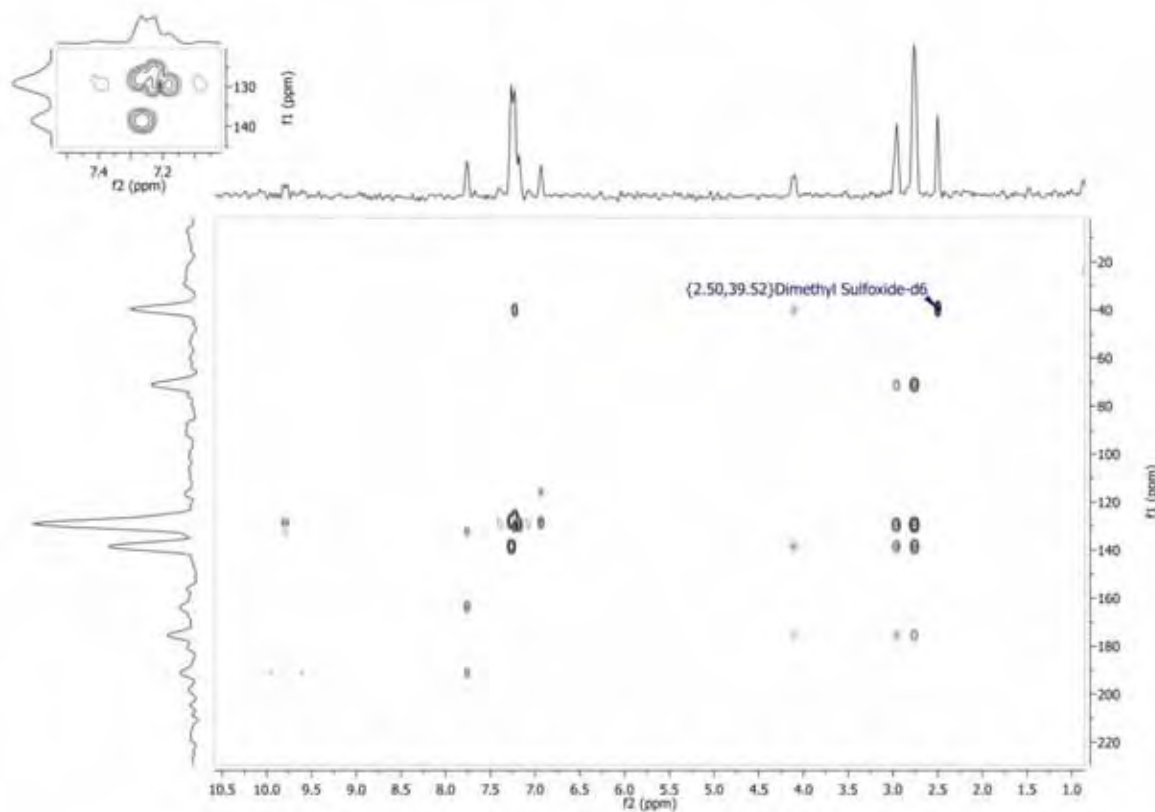
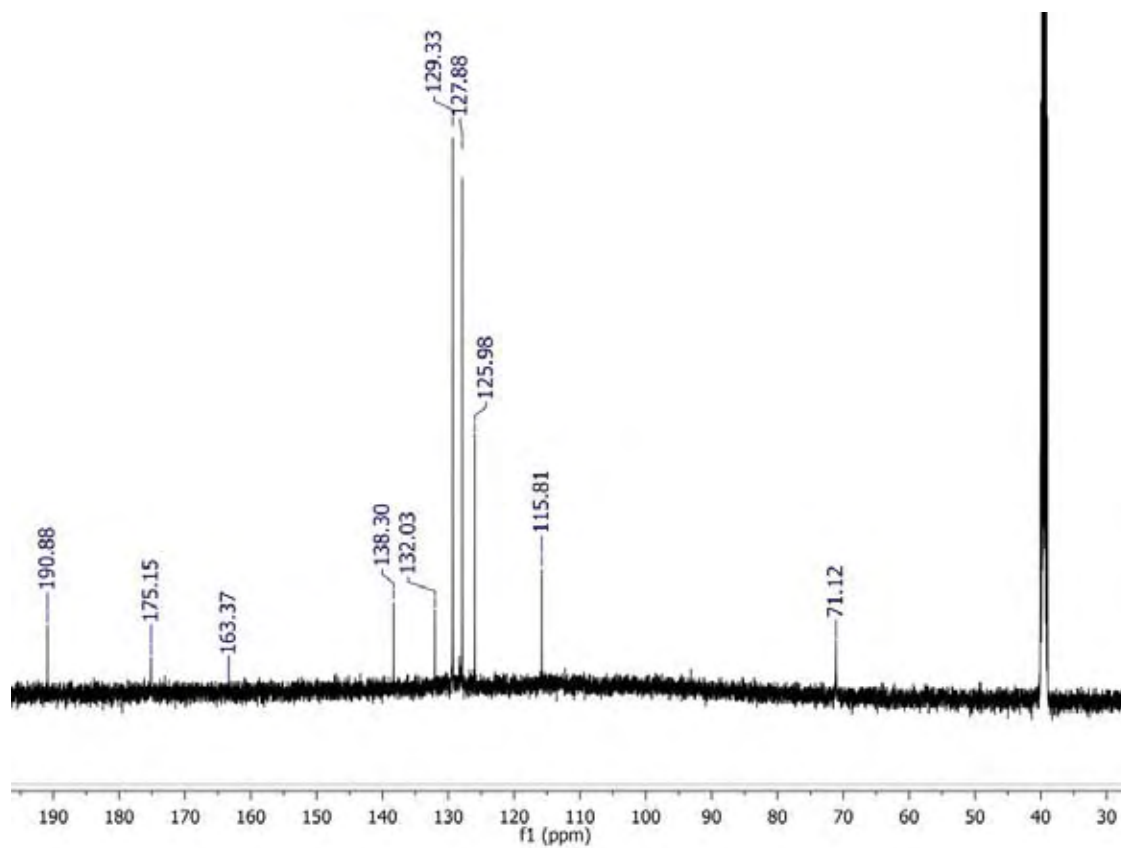
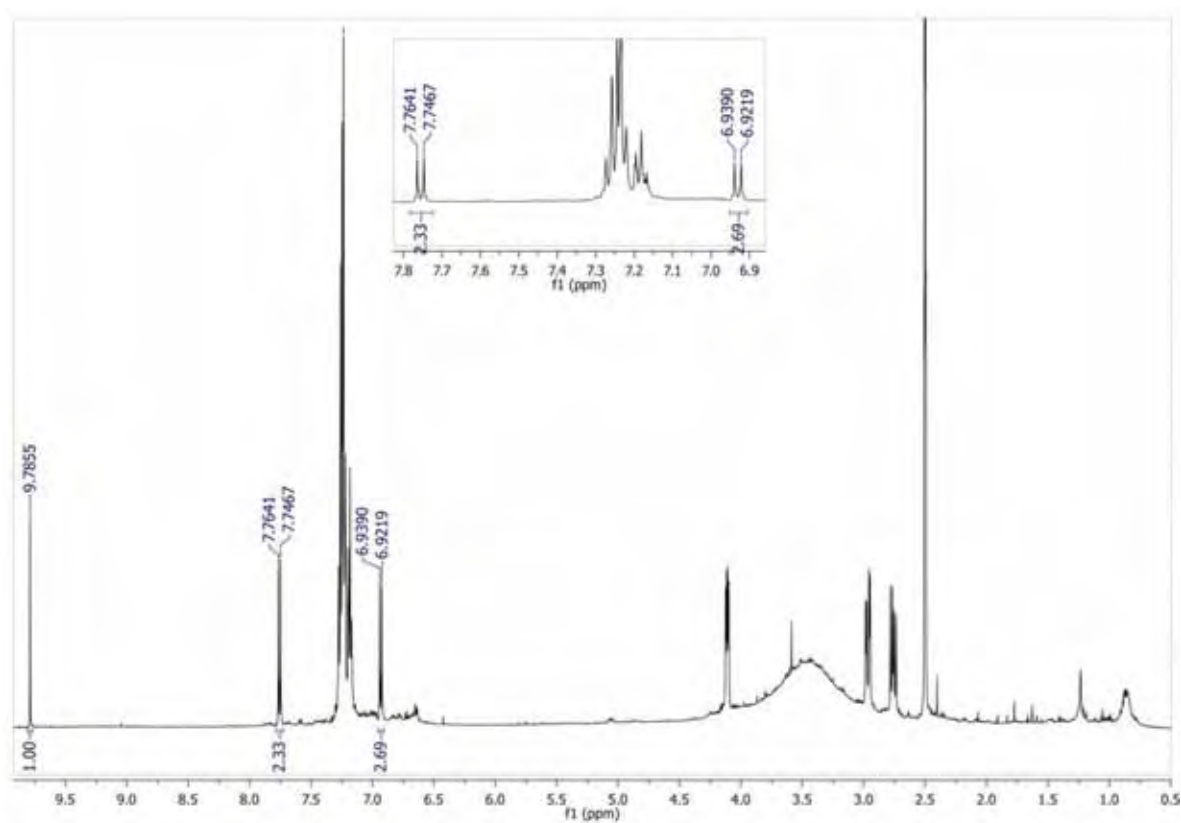
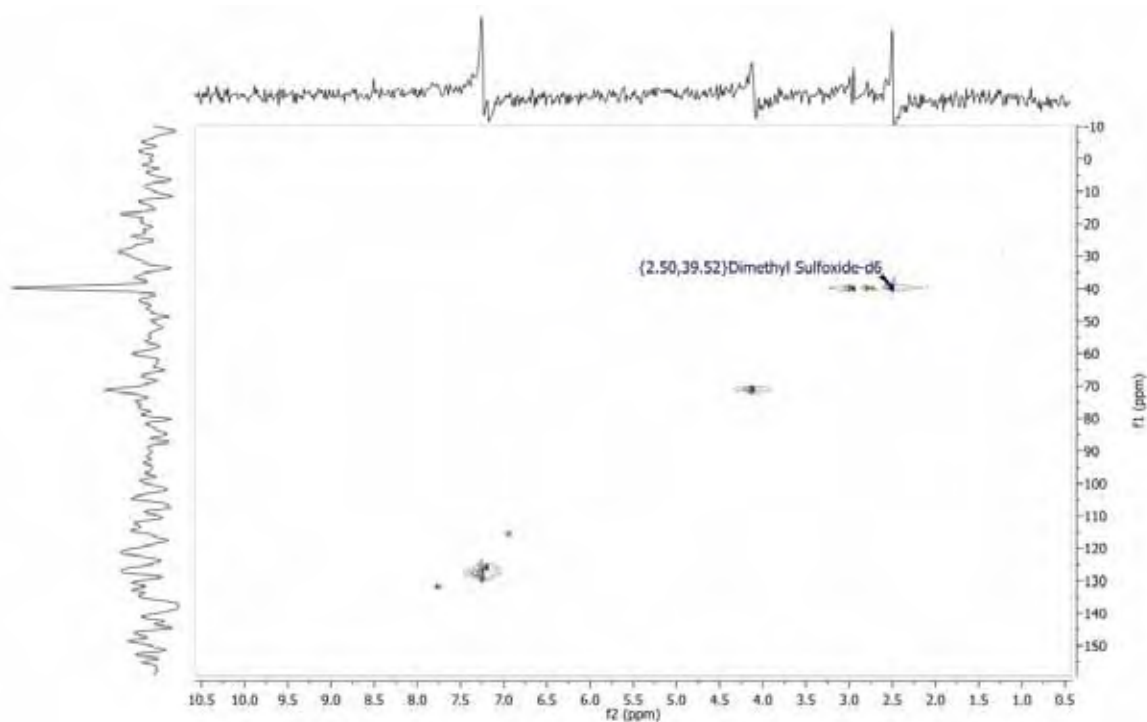
Figura 5.46 - Mapa de contorno de gHMBC do *p*-hidroxibenzaldeído (4) (DMSO- d_6 , 125 Hz)Figura 5.47 - RMN de ^{13}C do *p*-hidroxibenzaldeído (4) (DMSO- d_6 , 300MHz)

Figura 5.48 - RMN de ^1H do *p*-hidroxibenzaldeído (4) (DMSO- d_6 , 500MHz)Figura 5.49 - Mapa de contorno de gHMQC do *p*-hidroxibenzaldeído (4) (DMSO- d_6 , 125MHz)

Estes dados, associados à comparação com a literatura, nos permitiram atribuir para a substância **4** à estrutura do *para*-hidroxibenzaldeído.

Tabela 14 - Sinais de RMN de ^1H (500MHz) e ^{13}C (300MHz) do *p*-hidroxibenzaldeído (**4**) em DMSO^a.

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)	<i>g</i> HMBC
1	-	129,3	-
2	7,75 (d, 8,7Hz)	132,0	C-2; C-6; C-4; C-7
3	6,925 (d, 8,5Hz)	115,8	C-1; C-3; C-5
4	-	163,3	-
5	6,925 (d, 8,5Hz)	115,8	C-1; C-3; C-5
6	7,75 (d, 8,7Hz)	132,0	C-2; C-6; C-4; C-7
7	9,79 (s)	190,8	C-1; C-2; C-6

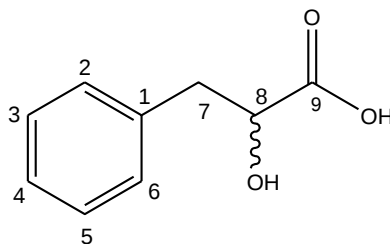
^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna, (δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

Esta substância fora anteriormente relatada como um metabólico secundário produzido pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis* sp. isolado da planta *Rhizophora mucronata*^[90], assim como também foi determinado nos extratos fermentados do fungo endofítico isolado de uma espécie vegetal de mangue^[91], de plantas^[92], invertebrados^[93] e organismos marinhos^[85].

O *p*-hidroxibenzaldeído também foi determinado, na seiva das folhas e caules injuriados da espécie vegetal *Phaseolus lunatus*, concomitantemente com o ácido cianídrico^[94]. Segundo Buhrmester, a explicação da presença de tais substâncias, se deve ao processo denominado cianogênese. Muitas plantas são capazes de sintetizar compostos que liberam ácido cianídrico (HCN) quando o tecido vegetal é injuriado. Estas substâncias podem ser cianoglicosídeos ou cianolipídios que quando hidrolisados por enzimas, formam açúcares, ácidos graxos, aldeído ou cetona e ácido cianídrico^[95]. A liberação do ácido cianídrico é considerada um mecanismo de defesa vegetal, contra herbívoros, insetos, fungos e bactérias^[96]. A cianogênese também tem sido registrada em bactérias, fungos e líquens^[95].

Existem muitos relatos sobre os estudos desta classe de compostos químicos como potenciais agentes antifúngicos^[97,98].

5.5.6 Identificação estrutural do Ácido feniláctico (5)



Ácido feniláctico (PLA) (5)

Como citado na discussão acima, a sub-fração codificada Fr.2_DP5 encontrava-se em mistura e devido à massa reduzida, optamos pela determinação estrutural das substâncias presentes sem purificação.

Para a determinação dos carbonos não foram levados em consideração os dois dubletos em δ_H 6,93 e δ_H 7,75, e o singlete em δ_H 9,78 que são os sinais característicos dos hidrogênios do *para*-hidroxibenzaldeído, elucidada no item anterior a este.

A substância predominante nesta mistura apresentou um espectro de RMN de 1H muito parecido com o da substância **1**, sendo que a única diferença observada foi o anel aromático, que neste caso evidenciou tratar-se de um anel mono substituído, em função da multiplicidade dos sinais apresentados. Neste caso visualizamos uma região aromática complexa na forma de um multiplete.

Para confirmarmos tal proposta, os experimentos de EM assim como os mapas de contorno de gHSQC e g HMBC foram cuidadosamente analisados.

A fórmula molecular foi estabelecida após análise dos dados do espectro de massas de baixa resolução por ionização em “eletrospray” em modo negativo (Figura 5.52, pág. 99), onde foi visualizado o sinal m/z 165,68 referente à formação da molécula desprotonada $[M]^-$. A massa para $[M]^-$ foi calculada em 166,17, que com auxílio dos dados de gHSQC e gHMBC nos permitiram propor a fórmula molecular $C_9H_{10}O_3$.

Os deslocamentos químicos dos carbonos foram obtidos com base nos experimentos de gHSQC e gHMBC (Figura 5.46 e Figura 5.49 pág. 94 e 95). As correlações observadas nos mapas de contorno do experimento HMBC nos permitiram propor inequivocamente o ácido fenilático para a substância **5**.

Figura 5.50 - Correlações observadas em HMBC do Ácido fenilático (5)

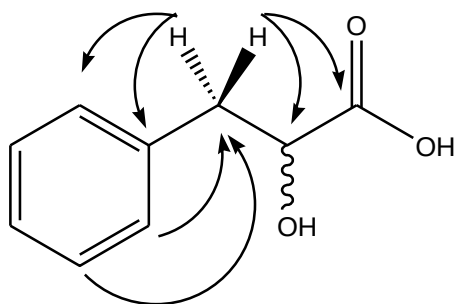
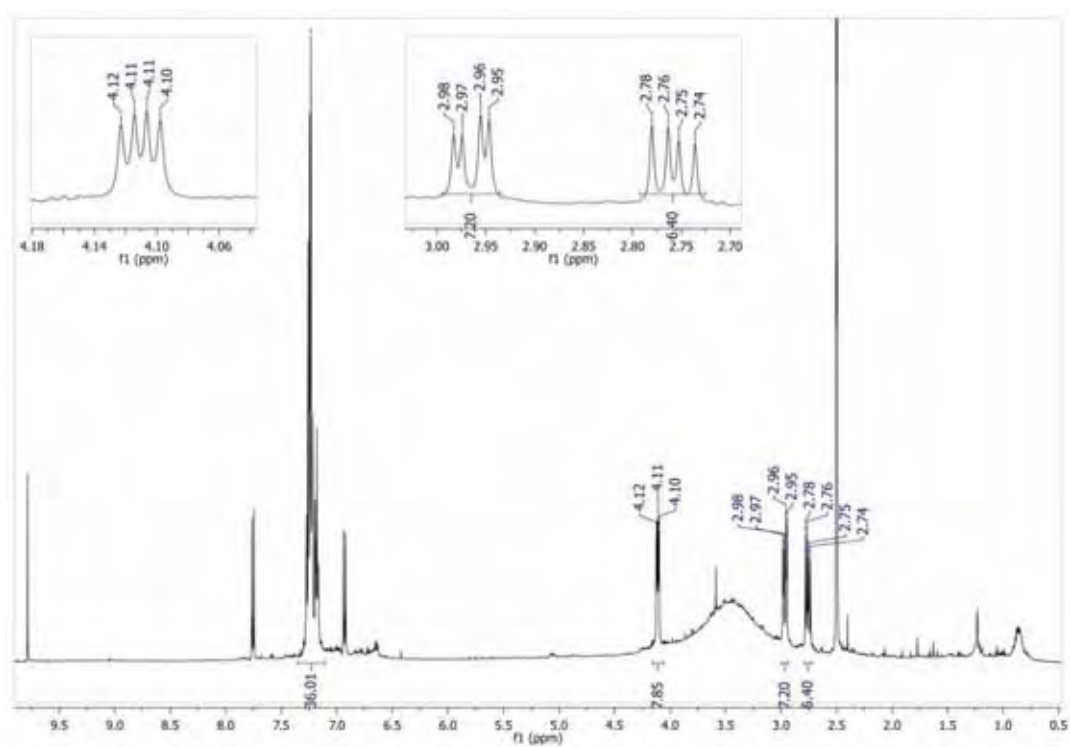
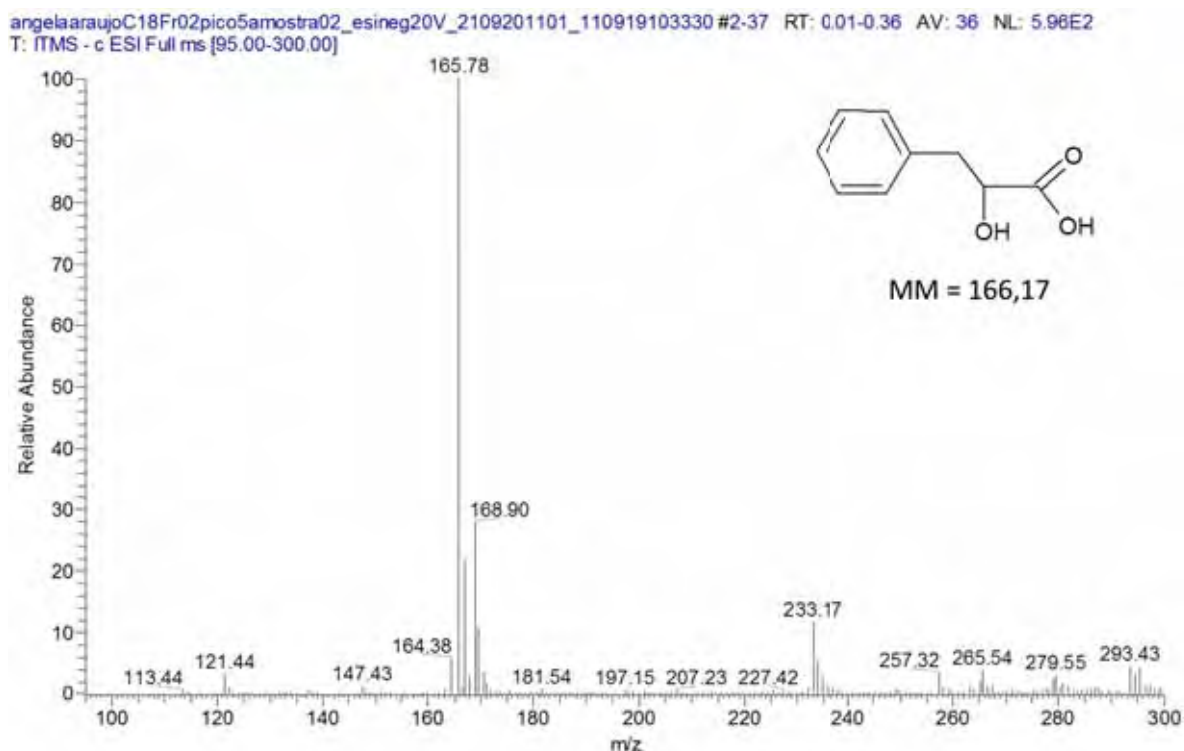
Figura 5.51 - RMN de ¹H do Ácido fenilático (5) (DMSO-d₆, 500MHz)

Figura 5.52 - ESI-MS do Ácido fenilático (5)



Estes dados nos permitiram atribuir para a substância **5** à estrutura do ácido fenil-lático, no entanto a estereoquímica absoluta de C-8 não foi determinada pelo fato da substância encontrar-se em mistura.

Tabela 15 - RMN de ^1H (500MHz) e ^{13}C (125MHz) do Ácido fenilático (5) em DMSO^a.

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)	<i>g</i> HMBC
1	-	138,3	
2	7,23 (m)	129,3	2; 3; 4; 5; 6; 7
3	7,23 (m)	127,8	2; 3; 4; 5; 6; 7
4	7,23 (m)	125,98	2; 3; 4; 5; 6; 7
5	7,23 (m)	127,8	2; 3; 4; 5; 6; 7
6	7,23 (m)	129,3	2; 3; 4; 5; 6; 7
7	2,75 (dd; 10,0; 5,0Hz) 2,96 (dd; 10,0; 5,0Hz)	40,0	1; 2; 6; 8; 9
8	4,11(dd; 5,0; 5,0Hz)	71,1	1; 7; 9
9	-	175,1	-

^a deslocamentos químicos relativos ao TMS como referência interna,
(δ) em ppm, constante de acoplamento entre parênteses e em Hz.

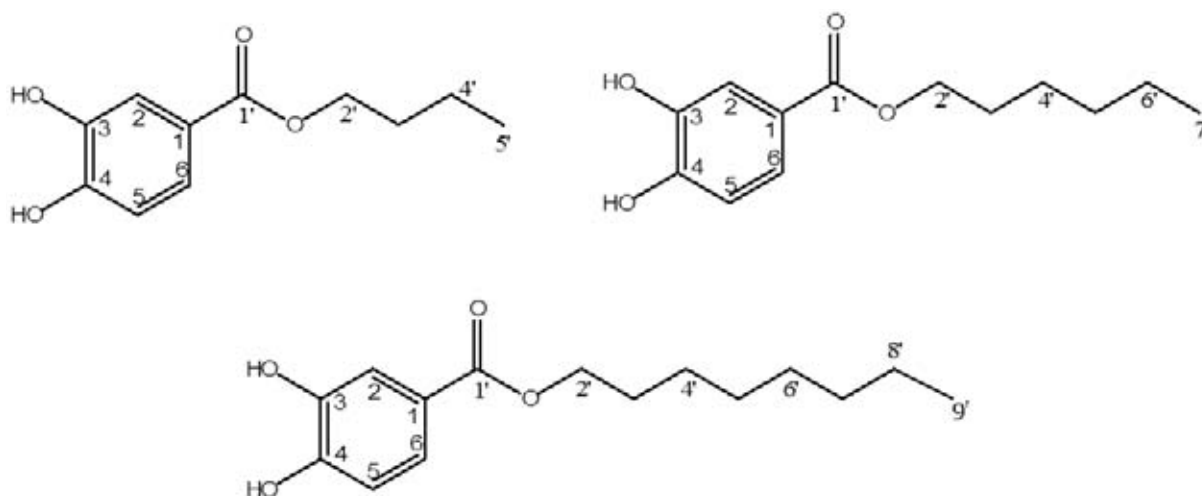
O ácido fenil-lático já foi anteriormente identificado da cultura fúngica de *Geotrichum candidum* (fungo responsável pelo apodrecimento de pêssegos, nectarinas, tomates e cenouras), sendo identificado como sendo a principal

substância responsável pela forte atividade antifúngica apresentada pelo extrato filtrado desta linhagem. Também já foi isolado, juntamente com a substância **3**, do extrato bacteriano de *Lactobacillus plantarum* [74, 84] e do caldo fermentado do fungo endofítico *Penicillium sp* isolado de *Kandelia candel* [83]

O ácido fenil-láctico apresenta uma reconhecida atividade antifúngica contra as linhagens de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* [99,100], dentre outras linhagens fúngicas [74]. O PLA também é considerado um dos ácidos aromáticos mais abundantes a que propriedades antibacterianas têm sido atribuídas [101,102], sendo a presença em grande quantidade desta substância característico de méis produzidos do néctar de *Calluna vulgaris* (urze) e *Brassica napus* (colza) [101].

O ácido feniláctico, juntamente com a substância **3**, também têm sido identificado com metabólicos produzidos por linhagens bacterianas pela degradação dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, responsáveis pela formação do aroma característico de queijo [84].

5.5.7 Identificação estrutural dos 3,4- dihidroxi benzoato de butila (6), 3,4- dihidroxibenzoato de hexila (7) e 3,4- dihidroxibenzoato de octila (8)



3,4- dihidroxi benzoato de butila (6), 3,4- dihidroxibenzoato de hexila (7) e 3,4- dihidroxibenzoato de octila (8)

O espectro de RMN de ^1H da fração Fr3_DP4_P2 (Figura 5.54, pág. 102) mostrou-se praticamente pura, apenas com traços de acetato de etila. Na região de aromáticos foram visualizados três sinais em 6,82 (*d*, $J=8,0$ Hz, 1H, δ_{C} 117,7, H-5), 6,98 (*dd*, $J=2,0$ e 8,0 Hz, 1H, δ_{C} 123,4, H-6), e 7,17 (*d*, $J=2,0$ Hz, 1H, δ_{C} 113,6, H-2), evidenciando um anel aromático trissubstituído. Adicionalmente foram observados um tripleto em δ_{H} 4,30 (*t*, $J=6,5$ Hz, 2H, δ_{C} 64,8, H-2'), dois multipletos em δ_{H} 1,72 (*m*, δ_{C} 27,2, CH_2), e em δ_{H} 1,37 (*m*, δ_{C} 27,2, CH_2) e um tripleto em δ_{H} 0,91 (*t*, $J=7,0$ Hz, 3H, δ_{C} 13,4, CH_3).

A análise dos mapas de contorno dos experimentos de HSQC (Figura 5.55, pág. 103) e HMBC (Figura 5.56, pág. 103) nos evidenciaram carbonos adicionais em δ_{C} 112,6; 149,6; 153,0; 168,8. Estas informações associadas ao COSY (Figura 5.57, pág. 104) nos conduziram a um anel aromático trissubstituído com duas hidroxilas e uma carbonila de éster conjugado. Estes dados, associados às interações observadas nos mapas de contorno dos experimentos de HSQC e HMBC, os valores dos deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento, nos permitiram atribuir para a fração Fr.3_DP4_P2 a estrutura **6**.

7,17 (114,7)

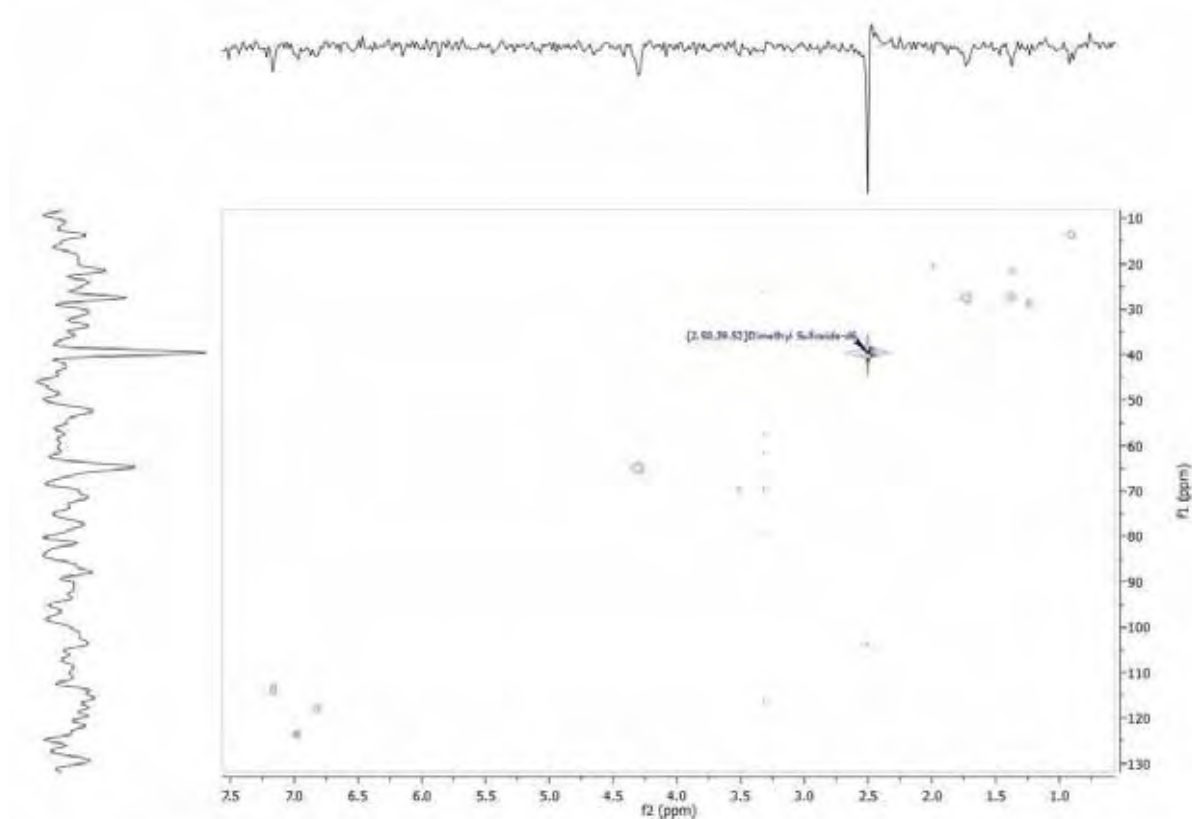
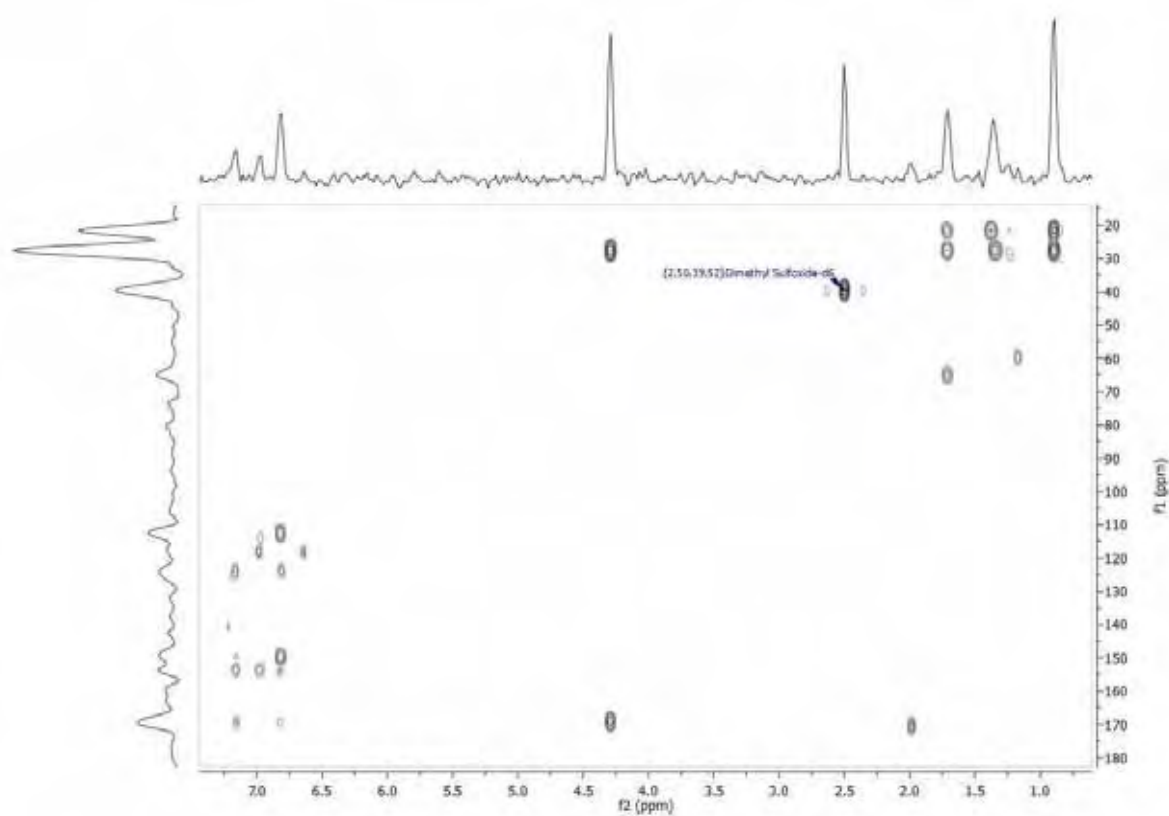
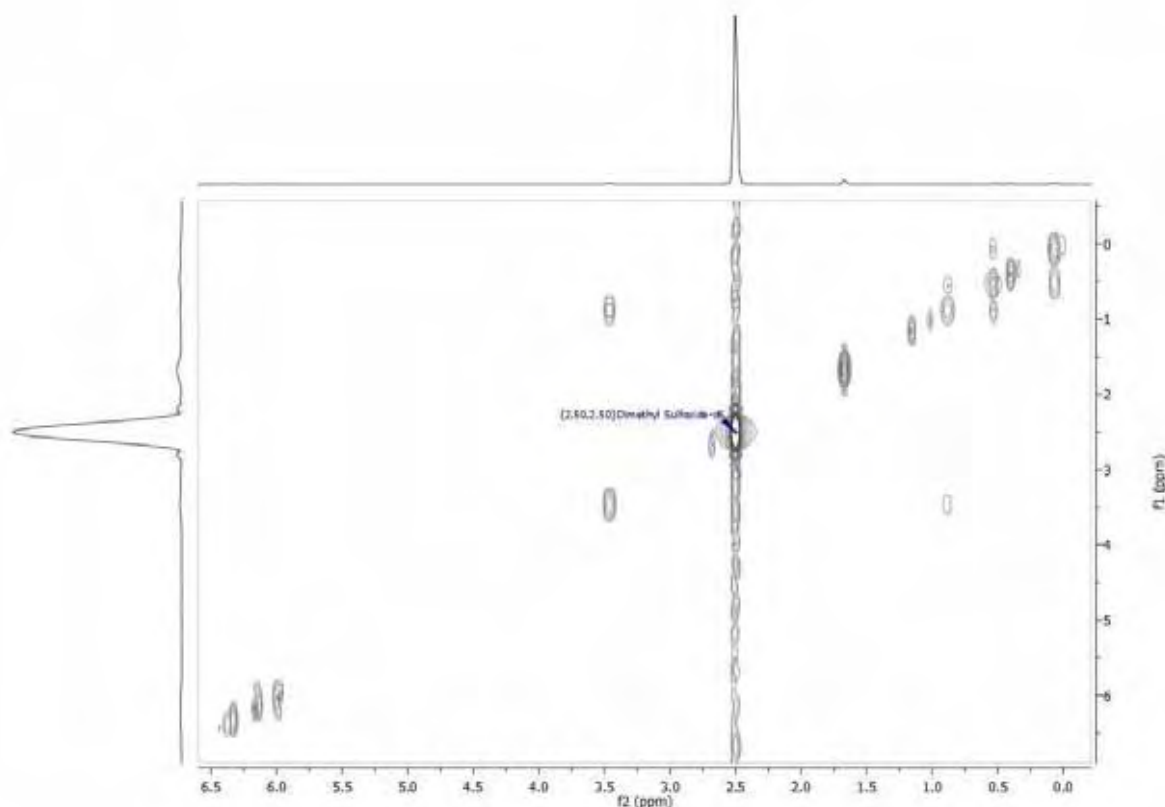
Figura 5.55 - Mapa de contorno de gHMQC das substâncias 6-8 (DMSO - d₆, 125MHz)Figura 5.56 - Mapa de contorno de gHMBC das substâncias 6-8 (DMSO - d₆, 125MHz)

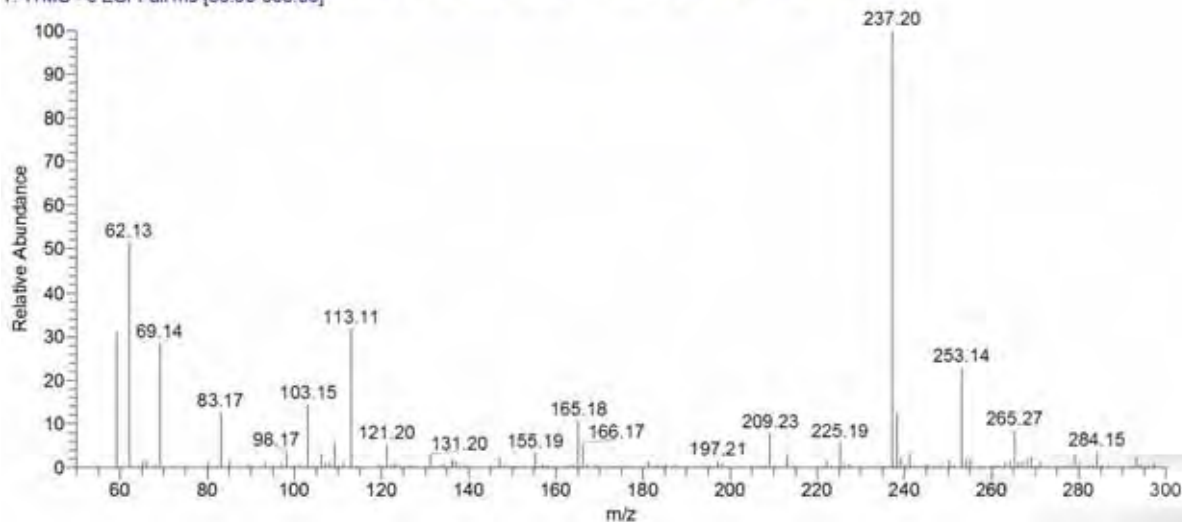
Figura 5.57 - Correlações dos hidrogênios das substâncias 6-8 (COSY) em DMSO-d₆

Como discutido, todos os dados conduziam a estrutura proposta acima, no entanto, a integração para os $-\text{CH}_2$ da cadeia alquila não estavam congruentes com a estrutura proposta. Deste modo um espectro de massas foi realizado e foi possível detectar os isômeros **6-8**, justificando a falta de congruência com a integral registrada no RMN de ^1H .

As estruturas dos ésteres foram confirmadas por espectrometria de massas (ESI-EM, modo negativo), por apresentar um sinais massa/carga de 209,23; 237,19 e 265,27, que representa a perda de um próton (Figura 5.58, pág. 105)

Figura 5.58 - ESI-MS das Substâncias 6-8

Thomas_Pico4_pico2_esineg25V_2903201101_110318151301 #1-33 RT: 0.00-0.32 AV: 33 NL: 1.19E2
T: ITMS - c ESI Full ms [50.00-300.00]



Os hidróxi-benzoatos já foram anteriormente isolados de fontes naturais^[103] e a eles tem sido atribuídos diversas propriedades, tais como: tripanocida^[104] e anticancerígenas^[105], assim como têm sido identificados como potenciais agentes antioxidantes^[103, 106], antibacterianos^[106] e antifúngicos^[106, 107, 108]

6. CONCLUSÕES

O trabalho realizado com o fungo endofítico *Camarops* sp., isolado de folhas saudáveis de *Alibertia macrophylla*, permitiu comprovar que a produção metabólica do fungo endofítico esta diretamente relacionada aos tipos de nutrientes a ele fornecidos durante seu período de fermentação, como pôde ser constatado pela análise dos espectros de RMN de ^1H , os quais apresentaram sinais por toda largura espectral e também pelos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD, que nos revelaram picos cromatográficos com diversos tempos de retenção, revelando a presença de substâncias de caráter polar e apolar nos diversos meios de cultura avaliados.

Os extratos brutos obtidos em meio sólido (arroz) e líquido (MDB, YM, Extrato de Malte, Nutrient[®] e Czapek[®]) apresentaram potenciais atividades nos ensaios químico e biológico (antifúngico, anticolinesteráisco, tripanocida, anticolinesterásico e antioxidante), revelando que os fungos endofíticos são ricas fontes de metabólicos secundários bioativos.

O estudo do fungo endofítico *Camarops* sp. cultivado em meio de cultura líquida de Czapek[®] em escala ampliada, resultou na identificação de 9 substâncias: **(1)** Ácido *p*-hidroxifenilático; **(2)** 2,5 – dihidroxibenzoato de isobutila; **(3)** Ácido *p*-hidroxibenzóico; **(4)** *p*-hidroxibenzaldeído; **(5)** Ácido fenilático; **(6)** 3,4 - dihidroxibenzoato de butila; **(7)** 3,4 - dihidroxibenzoato de hexila; **(8)** 3,4 - dihidroxibenzoatode octila, sendo a substância **(2)** inédita na literatura. Pode-se concluir que o cultivo de *Camarops* sp. em meio de cultura líquido de Czapek[®] é muito seletivo, visto que todas as substâncias identificadas são moléculas aromáticas, sendo que destas, oito são fenólicas.

Todas as substâncias são descritas apresentando diversas atividades biológicas (antifúngica, antibacteriana, antioxidante), reforçando a hipótese de uma relação simbiótica existente entre o fungo endofítico *Camarops* sp. e a planta hospedeira *Alibertia macrophylla*. Os metabólicos secundários também se revelaram como potências substâncias de uso farmacológico, dando destaque especial as substâncias **6** a **8**, por apresentarem resultados promissores *in vitro* nos ensaios anticancerígenos. Estas observações sugerem que *Camarops* sp. apresenta-se

como um potencial fungo endofítico na descoberta de novas substâncias bioativas, com potencial para serem utilizadas em fins terapêuticos.

Além de desempenharem sua função na relação simbiótica endófito-planta e apresentarem propriedades farmacológicas, o ácido p-hidroxibenzóico **(3)** também apresentou características biotecnológicas, visto que este ácido é o principal monômero utilizado para a produção de polímeros de cristal líquido. Tendo isto em vista, os fungos endofíticos também podem vir a ser utilizados como uma fonte alternativa para a produção de substâncias de uso na indústria química, por serem financeiramente mais viáveis, ambientalmente sustentáveis e renováveis.

As substâncias isoladas puras ou em misturas são descritas com inúmeras atividades biológicas, propriedades farmacológicas e biotecnológicas. Visto a importante contribuição que os estudos com fungos endofíticos trariam a nossa sociedade, mais pesquisas neste nicho biológico se fazem necessárias por se tratar de uma fonte de metabólitos secundários ainda pouco explorada.

REFERÊNCIAS

- 1 BASHYAL, B. P. et al. Globosumones A-C, cytotoxic orsellinic acid esters from the sonoran desert endophytic fungus *Chaetomium globosum*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 724-728, 2005.
- 2 GUO-HONG, L. et al. The chemical constituents of endophytic fungus *Trichoderma* sp. MFF-1. **Chem. Biodivers.**, v. 7, p. 1790-1795, 2010.
- 3 STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.
- 4 HUANG, Y. et al. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 31, p. 163-167, 2011.
- 5 ROSA, L. H. et al. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 73, p. 178-189, 2010.
- 6 STROBEL, G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.
- 7 STROBEL, G. A. Endophytes as a source of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 6, p. 535-544, 2003.
- 8 HARTLEY, S. E.; GANGE, A. C. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 54, p. 323-342, 2009.
- 9 SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biol. Rev.**, v. 21, p. 75-89, 2007.
- 10 SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycol. Res.**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.
- 11 RODRIGUEZ, A. et al. The large subunit ribosomal RNA genes of infrequens comprise sequences related to two different glomalean families. **New Phytol.**, v. 152, p. 159-167, 2001.
- 12 REN, A. Z. et al. Benefits of a symbiotic association with endophytic fungi are subject to water and nutrient availability in *Achnatherum sibiricum*. **Plant Soil**, v. 346, p. 363-373, 2011.

13 MALINOWSKI, D.; BELESKY, D. P. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. **Crop. Sci.**, v. 40, p. 923-940, 2000.

14 GUNATILAKA, A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implication of their occurrence. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 509-526, 2006.

15 STROBEL, G. A. Microbial gifts from rain forests. **Can. J. Plant. Pathol.**, v. 24, n. 1, p. 14-20, 2002.

16 KINGHORN, A. D. et al. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 1539-1555, 2011.

17 CAMPOS, R. A. et al. Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria sp* to control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Gen. Mol. Res.**, v. 9, n. 3, p. 1421-1430, 2010.

18 KUSARI, S. et al. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 28, n. 3, p. 1287-1294, 2012.

19 VIEGAS JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

20 KINGSTON, D. G. I. Recent advances in the chemistry of taxol. **J Nat. Prod.**, v. 63, p. 726-727, 2000.

21 GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, n. 5, p. 717-724, 2008.

22 GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.

23 STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

24 KINGSTON, D. G. I. Taxol, a molecule for all seasons (Review). **Chem. Commun.**, n. 10, p. 867-880, 2001.

25 WALL, M. E. et al. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 88, n. 16, p. 3888-3890, 1966.

- 26 LI, Q-Y. et al. Review camptothecin: current perspectives. **Curr. Med. Chem.**, v. 13, n. 17, p. 2021-2039, 2006.
- 27 KEHRER, D. F. S. et al. Modulation of camptothecin analogs in the treatment of cancer: a review. **Ant. Drugs**, v. 12, n. 2, p. 89-105, 2001.
- 28 FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **NDA 20 – 571/5 – 008**.
Disponível em:
<http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/appletter/1998/20571s8ltr.pdf>.
Acesso em: 10 nov. 2011.
- 29 FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **NDA 20 – 571/5 – 008**.
Disponível em:
<<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucm095638.htm>>.
Acesso em: 10 nov. 2011.
- 30 KUSARI, S.; ZUHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. **J. Nat. Prod.**, v. 72, n. 1, p. 2-7, 2009.
- 31 LIU, K. et al. 10-hydroxycamptothecin produced by a new endophytic *Xylaria* sp., M20, from *Camptotheca acuminata*. **Biotechnol. Lett.**, v. 32, n. 5, p. 689-693, 2010.
- 32 REHMAN, S. et al. An endophytic *Neurospora* sp. from *Nothapodytes foetida* producing camptothecin. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 203-209, 2008.
- 33 AMNA, T. et al. Bioreactor studies on the endophytic fungus *entrophospora infrequens* for the production of an anticancer alkaloid camptothecin. **Can. J. Microbiol.**, v. 52, n. 3, p. 189-196, 2006.
- 34 PURI, S. G. et al. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **J. Nat. Prod.**, v. 68, n. 12, p. 1717-1719, 2005.
- 35 DESHMUKH, S. K. et al. Anti-inflammatory and anticancer activity of ergoflavin isolated from an endophytic fungus. **Chem. Biodivers.**, v. 6, n. 5, p. 784-789, 2009.
- 36 KUSARI, S.; LAMSHOE, M.; SPITELLER, M. *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. **J. Appl. Microbiol.**, v. 107, n. 3, p. 1019-1030, 2009.
- 37 EYBERGER, A. L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J. R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n. 8, p. 1121-1124, 2006.
- 38 KOUR, A. et al. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, n. 7, p. 1115-1121, 2008.

- 39 ZHANG, G. et al. Antiviral isoindolone derivatives from an endophytic fungus *Emericella* sp. associated with *Aegiceras corniculatum*. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1436-1442, 2011.
- 40 MARTÍNEZ-LUIS, S. et al. Screening and evaluation of antiparasitic and *in vitro* anticancer activities of Panamanian endophytic fungi. **Int. Microb.**, v. 14, p. 95-102, 2011.
- 41 BRADY, F.; CLARDY, J. A new pentakide antifungi agent isolated from an endophytic fungus. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 10, p. 1447-1448, 2000.
- 42 HORN, W. S. E. A. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. **Tetrahedron**, v. 51, p. 3969-3978, 1995.
- 43 LI, J. Y.; STROBEL, G.; HARPER, J. K. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercia*. **Org. Lett.**, v. 2, n. 6, p. 167-770, 2000.
- 44 HUANG, W. E. A. A potential antioxidant resource endophytic fungi from medicinal plants. **Econ. Bot.**, v. 61, p. 14-30, 2007.
- 45 ZHANG, B. B.; SALITURO, G. M.; PELAEZ, F. Discovery of a small molecule insulin receptor activator. **Rec. Prog. Horm. Res.**, v. 56, p. 107-126, 2001.
- 46 LEE, J. C. et al. Subglutininol-a subglutininol-b -immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium-subglutinans*. **J. Org. Chem.**, v. 60, p. 7076-7077, 1995.
- 47 DAISY, B. H. E. A. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology-SGM**, v. 148, p. 3737-3741, 2002.
- 48 ZHANG, J. et al. Microbial transformation of 10-deacetyl-7-epitaxol and 1 β -hydroxybaccatin I by fungi from the inner bark of *Taxus yunnanensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, n. 4, p. 497-500, 1998.
- 49 SHIBUYA, H. et al. Transformation of Cinchona alkaloids into 1-N-oxide derivatives by endophytic *Xylaria* sp. isolated from *Cinchona pubescens*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 51, n. 1, p. 71-74, 2003.
- 50 SIMANJUNTAK, P. et al. Chemical studies on a curcumin analogue produced by endophytic fungal transformation. **Asian J. Appl. Sci.**, v. 3, p. 60-66, 2010.
- 51 SANTO-FO, F. et al. Endophytic fungi as a source of biofuel precursors. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 21, n. 7, p. 728-733, 2011.

- 52 DEY, P.; BENERJEE, J.; MAITI, M. K. Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates - *Colletotrichum sp.* and *Alternaria sp.* having potential utilities as biodiesel feedstock. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 5815-5823, 2011.
- 53 BICAS, J. L.; DIONÍSIO, A. P.; PASTORE, G. M. Bio-oxidation of terpenes: an approach for the flavor industry. **Chem. Rev.**, v. 109, n. 9, p. 4518-4531, 2009.
- 54 KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes. **Nat. Prod. Rep.**, v. 28, p. 1203-1207, 2011.
- 55 YOUNG, M. C. M. et al. Fungitoxic non-glycosidic iridoids from *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3433-3435, 1992.
- 56 SILVA, V. C. D. **Estudo químico e biológico de espécies de Rubiaceae**. 2007. Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara. Tese de Doutorado
- 57 SILVA, V. C. D. E. A. A New ent-kaurane diterpene from stems of *Alibertia macrophylla* K. Schum (Rubiaceae). **Helv. Chim. Acta.**, v. 90, p. 1781-1785, 2007.
- 58 BOLZANI, V. D. S.; TREVISAN, L. M. V.; YOUNG, M. C. M. Caffeic acid esters and triterpenes of *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 2089-2091, 1991.
- 59 SILVA, V. C. et al. A new ent-kaurane diterpene from stems of *Alibertia macrophylla* K. Schum. (Rubiaceae). **Helv. Chim. Acta.**, v. 90, p. 1781-1785, 2007.
- 60 OLIVEIRA, C. M. **Estudo químico e biológico dos fungos associados com a espécie vegetal *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. 2009. Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara. Tese de Doutorado.
- 61 GUBIANI, J. R. **Prospecção química e biológica do fungo endofítico *Camarops sp.* isolado de *Alibertia Macrophylla* (Rubiaceae)**. 2011. Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara. Dissertação de Mestrado.
- 62 HABECK, T. R. **Triagem química e biológica dos fungos endofíticos associados a *Senna spectabilis*, uma espécie vegetal do cerrado**. 2009. Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara. Monografia.
- 63 HUHNDORT, S. M.; MILLER, A. N. A new species of *Camarops* and phylogenetic analysis of related taxa in the Boliniaceae. **North American Fungi**, v. 3, p. 231-239, 2008.
- 64 VASILYEVA, L. N.; STEPHENSON, S. L.; MILLER, A. N. Pyrenomycetes of the Great Smoky Mountains National Park. IV. *Biscogniauxia*, *Camaropella*, *Camarops*, *Camillea*, *Peridoxylon* and *Whalleya*. **Fungal Diversity**, v. 25, p. 219-231, 2007.

- 65 BISBY, F. A. et al. **Species 2000 & ITIS Catalogue of Life**: 2011 annual checklist., 2011. Disponível em: <www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2011>. Acesso em: 12 maio 2011.
- 66 **GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY**, 2011. Disponível em: <<http://data.gbif.org/welcome.htm>>, Acesso em: 12 maio 2011.
- 67 SILVA, G. H. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria sp.*, *Phomopsis cassiae* e *Acremonium sp.* associados a espécies vegetais do Cerrado**. 2005. Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho". Araraquara. Tese de Doutorado.
- 68 CAFÊU, M. C. et al. Substâncias antifúngicas de *Xylaria sp.*, um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravi* (Rubiaceae). **Quim. Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.
- 69 MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochem. Anal.**, v. 13, p. 51-54, 2002.
- 70 DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de Chagas - estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.
- 71 ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- 72 ARNONE, A. et al. Cryphonectric acid and other minor metabolites from a hypovirulent strain of *Cryphonectria parasitica*. **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 48-50, 2002.
- 73 NARAYANAN, T. K.; RAO, G. R. Production of B-(4-hydroxyphenyl)ethanol and B-(4-hydroxyphenyl)lactic acid by *Candida* species. **Can. J. Microbiol.**, v. 22, n. 3, p. 384-389, 1976.
- 74 LAVERMICOCCA, P. et al. Purification and characterization of novel antifungal compounds from sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 9, p. 4084-4090, 2000.
- 75 KAMBOUROVA, R.; PETROV, G.; BANKOVA, V. Extracellular polar organic substances in cultures of the green alga *Scenedesmus*. **Algol. Studies**, v. 119, p. 155-162, 2006.
- 76 SUGUMARAN, M. et al. Phenolic acids of *Tecoma stans*. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 13, n. 1, p. 93, 1975.
- 77 LUCZAK, S.; SWIATEK, L. Phenolic acids in *Euphrasia rostkoviana* Hayne. **Plant. Med. Phyt.**, v. 24, n. 1, p. 66-70, 1990.

- 78 LUCZAK, S.; SWIATEK, L.; DANIEWSKI, M. Phenolic acids in *Lysimachia nummularia* and *Lysimachia vulgaris* herbs. **Acta Poloniae Pharm.**, v. 46, n. 4, p. 381-385, 1989.
- 79 DOMBROWICZ, E. et al. Phenolic acids in herb *Melilotus officinalis*. **Pharmazie**, v. 46, n. 2, p. 156-157, 1991.
- 80 SAYED, N. H. et al. Phenolics and flavonoids of *Cordia macleodii*. **Rev. Latinoam. Quim.**, v. 26, n. 1, p. 30-35, 1998.
- 81 ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic acid profiles in some small berries. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 21118-2124, 2005.
- 82 HUANG, Z-J. et al. New anthraquinone derivative produced by cultivation of mangrove endophytic fungus *Fusarium sp.* ZZF60 from the south China sea. **Chinese J. Appl. Chem.**, v. 27, n. 4, p. 394-397, 2010.
- 83 LI, X. et al. Chemical study on fermentation product of endophyte fungus GT6105. **Chin. J. Nat. Med.**, v. 5, n. 1, p. 20-23, 2007.
- 84 ARMAFORTE, E. et al. High-performance liquid chromatography determination of phenyllactic acid in MRS broth. **J. Chromatogr. A**, v. 1131, p. 281-284, 2006.
- 85 ZHANG, H. et al. A search for BACE inhibitors reveals new biosynthetically related pyrrolidones, furanones and pyrroles from a southern Australian marine sponge, *Lanthella sp.* **Org. Biomol. Chem.**, v. 10, p. 2656-2663, 2012.
- 86 LI, C-Y. et al. Secondary metabolites of a marine mangrove fungus (*Penicillium sp.* no. 2556) from south China sea. **J. Chinese Med. Mat.**, v. 31, n. 7, p. 960-962, 2008.
- 87 YANG, W-Z. et al. Chemical constituents from *Cichorium glandulosum*. **Chinese J. Nat. Med.**, v. 7, n. 3, p. 193-195, 2009.
- 88 McQUALTER, R. B. et al. Initial evaluation of sugarcane as a production platform for p-hydroxybenzoic acid. **Plant. Biotechnol. J.**, v. 3, p. 29-41, 2005.
- 89 SACHAN, A.; GHOSH, S.; MITRA, A. Biotransformation of p-coumaric acid by *Paecilomyces variotii*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 42, p. 35-41, 2006.
- 90 XU, J. et al. Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis sp.* isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. **Tet. Lett.**, v. 52, p. 21-23, 2011.
- 91 NA-NA, X. et al. Secondary metabolites of mangrove endophytic fungus SK5 in the south China sea. **J. of Chinese Med. Mat.**, v. 32, n. 12, p. 1843-1845, 2009.

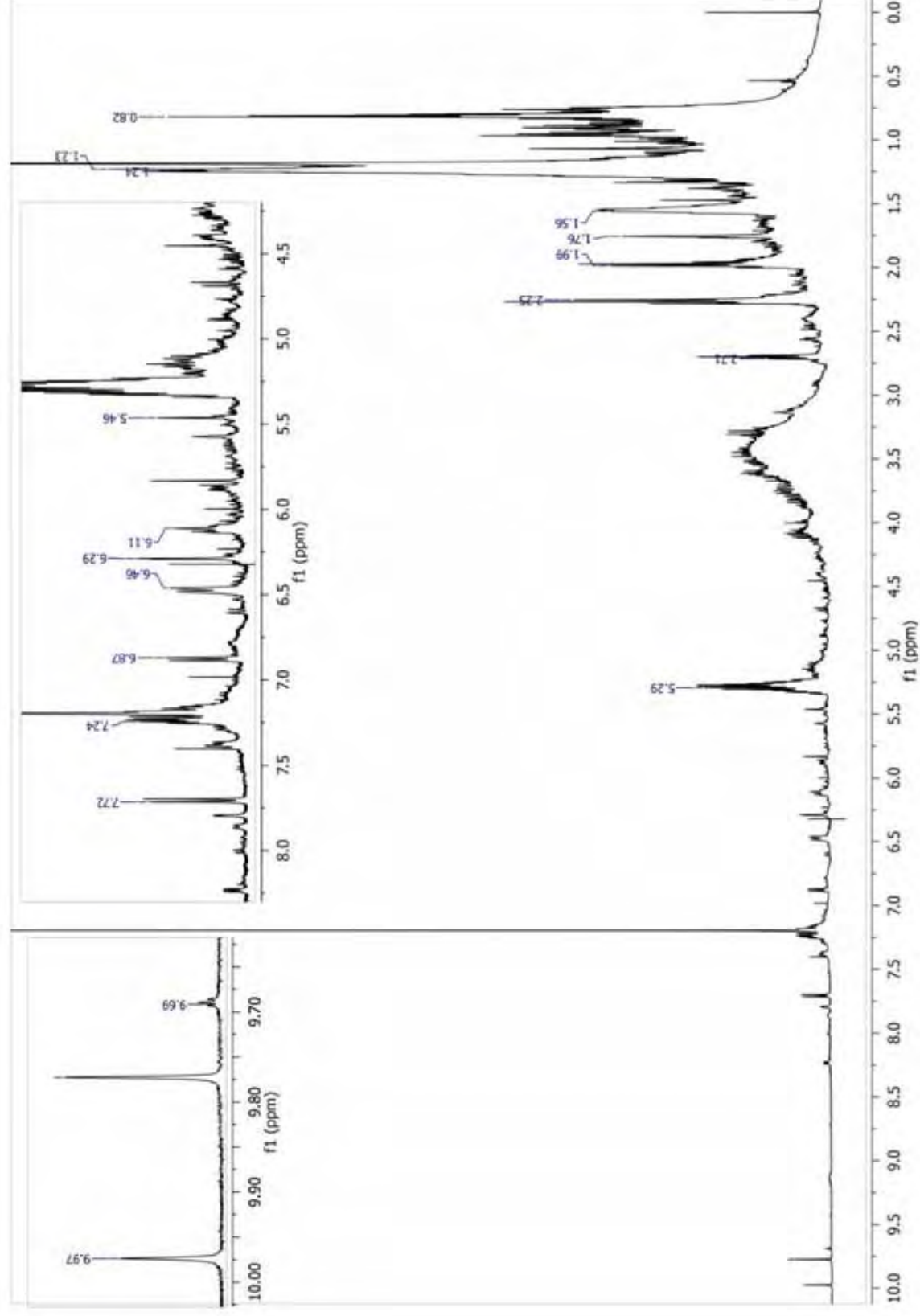
- 92 WATTANADILOK, R. et al. Antifungal activity evaluation of the constituents of *Haliclona baeri* and *Haliclona cymaeformis*, collected from the Gulf of Thailand. **Mar. Drugs**, v. 5, p. 40-51, 2007.
- 93 DUFFEY, S. S.; UNDERHILL, E. W.; TOWERS, G. H. N. Intermediates in the biosynthesis of HCN and benzaldehyde by a polydesmid millipede, *Harpaphe haydeniana* (wood). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 47B, p. 753-766, 1974.
- 94 BELL, A. A. 4-Hydroxybenzaldehyde and vanillin as toxins formed in leaf wound sap of *Phaseolus lunatus*. **Phytopathology**, v. 60, p. 161-165, 1970.
- 95 BUHRMESTER, R. A.; EBINGER, J. E.; SEIGLER, D. S. Sambunigrin and cyanogenic variability in populations of *Sambucus canadensis* L. (Caprifoliaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 28, p. 689-695, 2000.
- 96 SANTOS, M. G. et al. Cianogênese em esporófitos de pteridófitas avaliada pelo teste do ácido pícrico. **Acta. Bot. Bras.**, v. 19, n. 4, p. 783-788, 2005.
- 97 KIM, J. H. et al. Chemosensitization of fungal pathogens to antimicrobial agents using benzo analogs. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 281, p. 64-71, 2008.
- 98 FITZGERALD, D. J. et al. Structure-function analysis of the vanillin molecule and its antifungal properties. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 1769-1775, 2005.
- 99 LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; VISCONTI, A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 1, p. 634-640, 2003.
- 100 LIND, H. et al. Antifungal compounds from cultures of dairy propionibacteria type strains. **Microbiology**, p. 310-315, 2007.
- 101 DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Compostos voláteis em méis florais. **Quim. Nova**, v. 26, n. 1, p. 90-96, 2003.
- 102 DIEULEVEUX, V.; LEMARINIER, S.; GUÉGUEN, M. Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 40, p. 177-183, 1998.
- 103 TUNG, Y-T. et al. Antioxidant activities and phytochemical characteristics of extracts from *Acacia confusa* bark. **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 509-514, 2009.
- 104 GRADY, R. W.; BIENEN, E. J.; CLARKSON JUNIOR, A. B. Esters of 3,4-dihydroxybenzoic acid, highly effective inhibitors of the sn-glycerol-3-phosphate oxidase of *Trypanosoma brucei* brucei. **Mol. Biochem. Paras.**, v. 21, p. 55-63, 1986.
- 105 KIM, S.-J.; MYUNG, P.-K.; SUNG, N.-D. CoMFA on the melanogenesis inhibitory activity of alkyl-3-4-dihydroxybenzoate, n-alkyl-3,4-dihydroxybenzamide analogues, and prediction of higher active compounds. **Arch. Pharm. Res.**, v. 31, n. 12, p. 1540-1546, 2008.

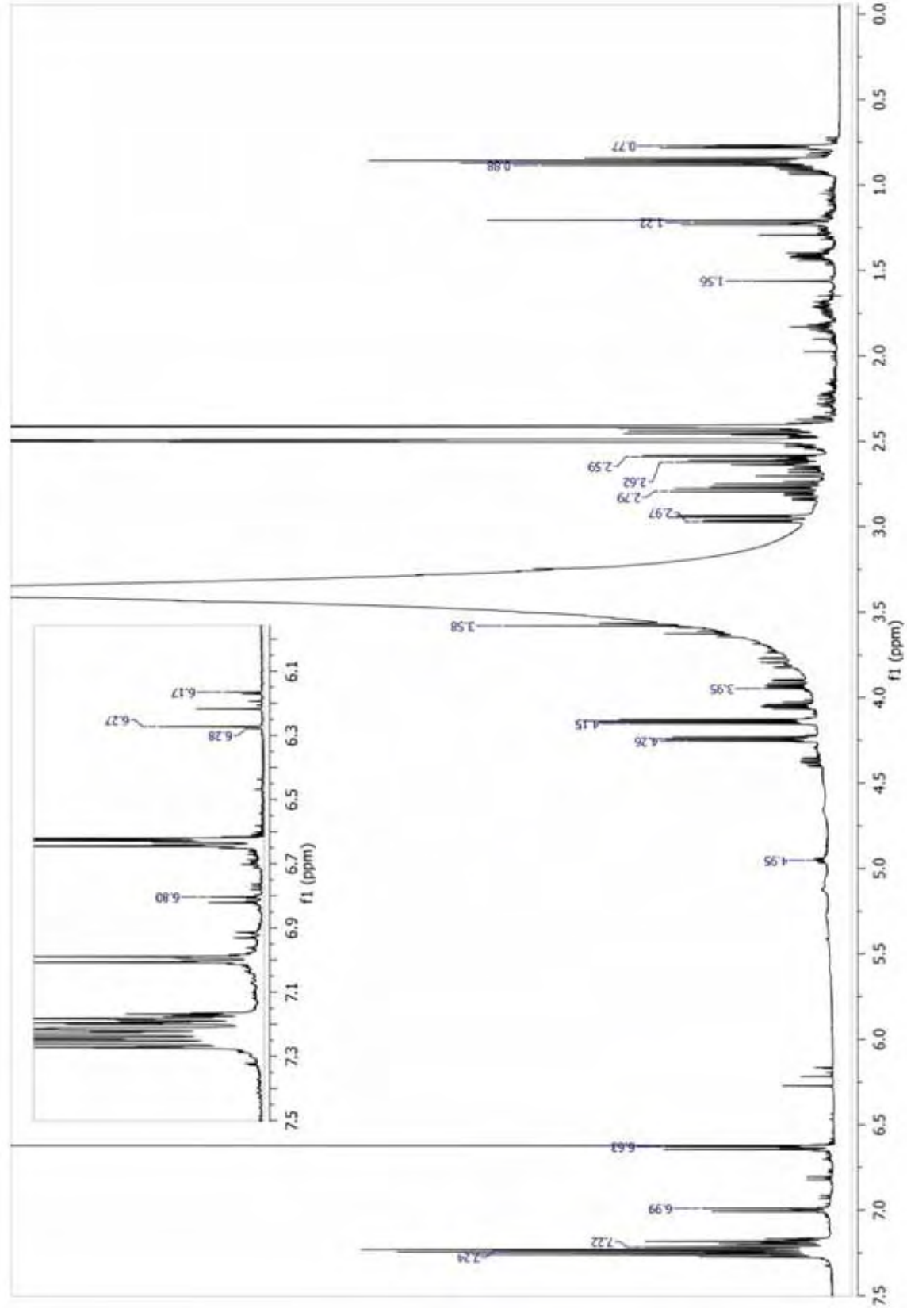
106 MERKL, R. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. **Czech. J. Food Sci.**, v. 28, n. 4, p. 275-279, 2012.

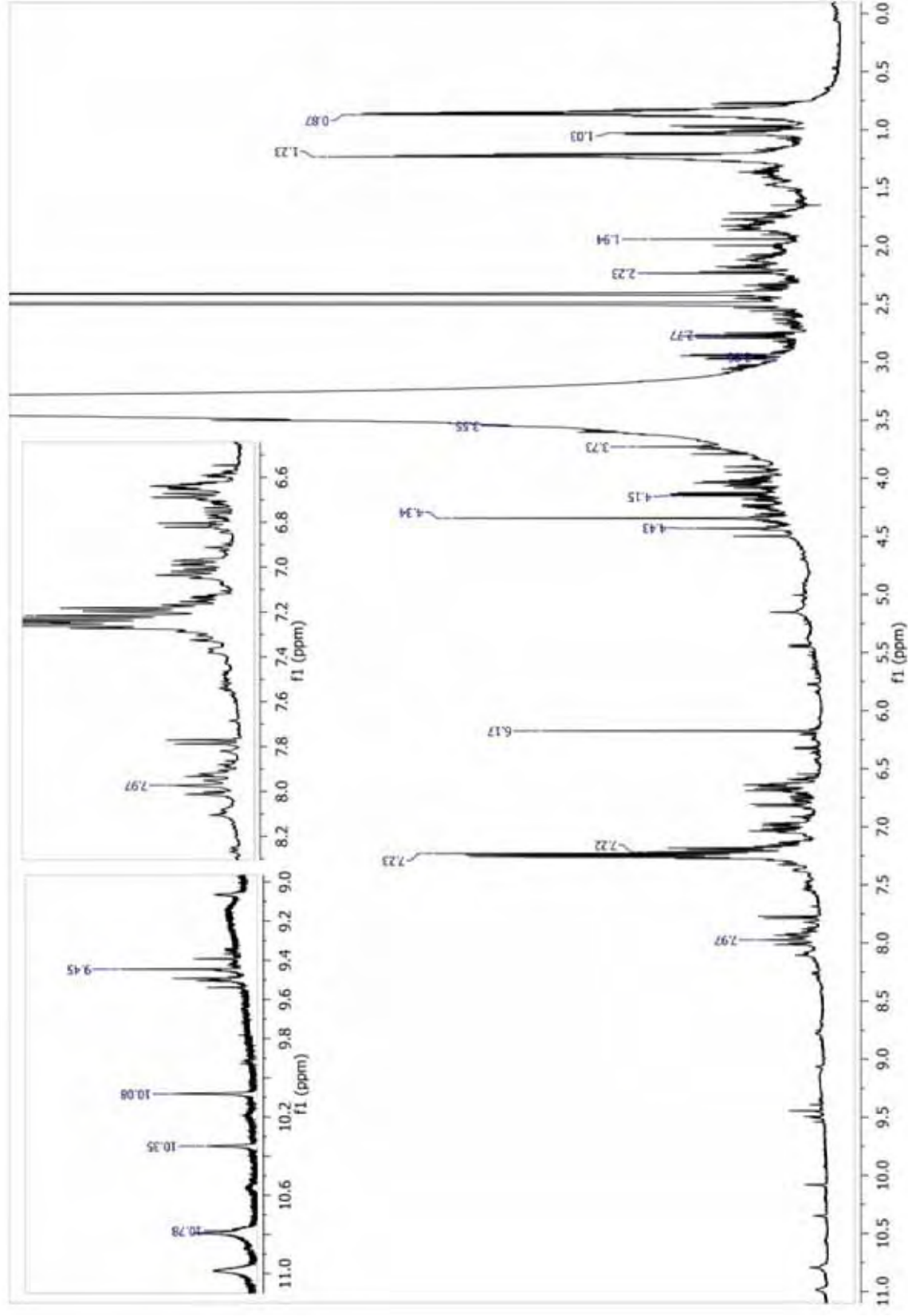
107 NIHEI, K.-I.; NIHEI, A.; KUBO, I. Rational design of antimicrobial agents: antifungal activity of alk(en)yl dihydroxybenzoates and dihydroxyphenyl alkanoates. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 13, p. 3993-3996, 2003.

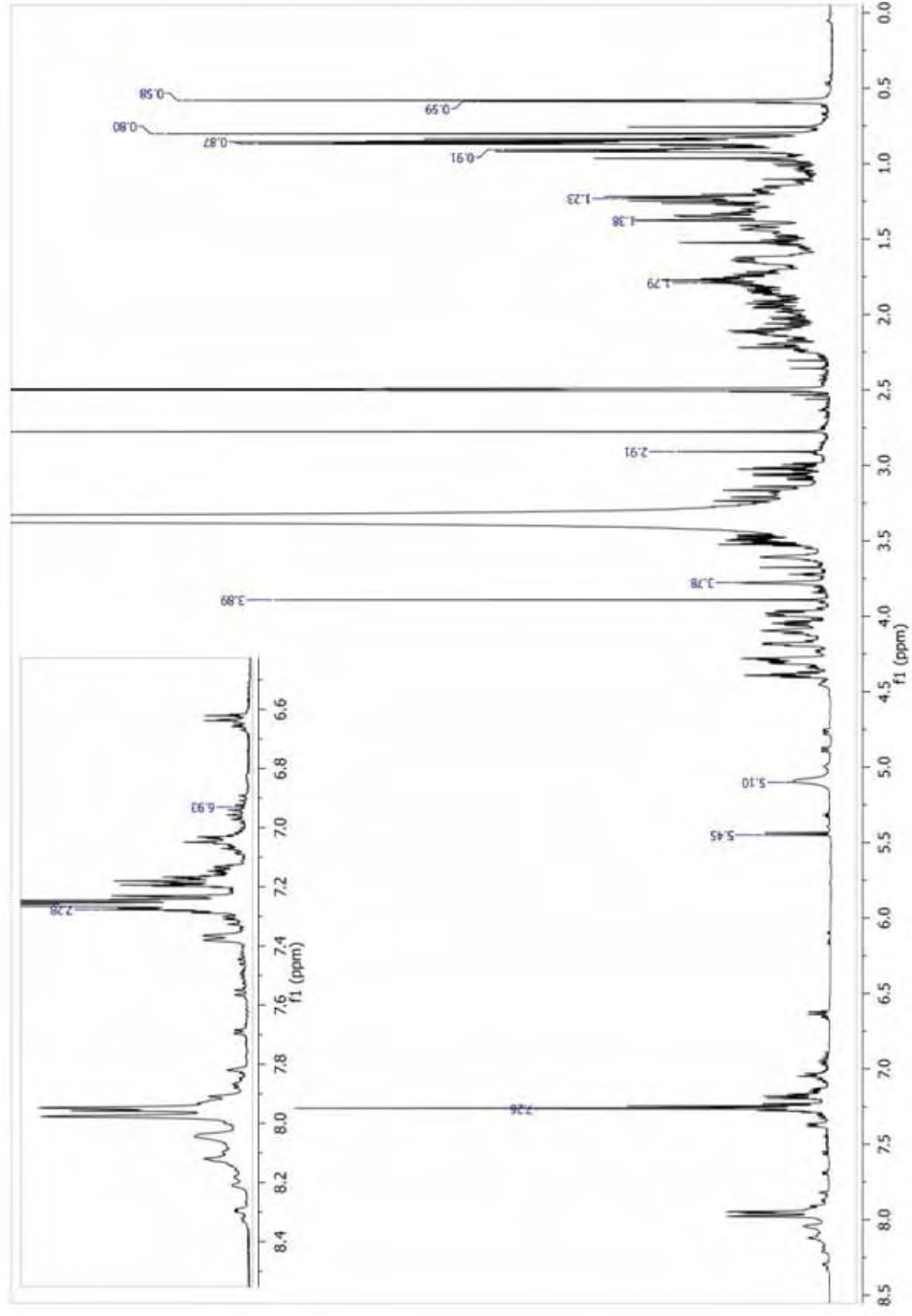
108 NIHEI, K.-I.; NIHEI, A.; KUBO, I. Molecular design of multifunctional food additives: antioxidative antifungal agents. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 5011-5020, 2004.

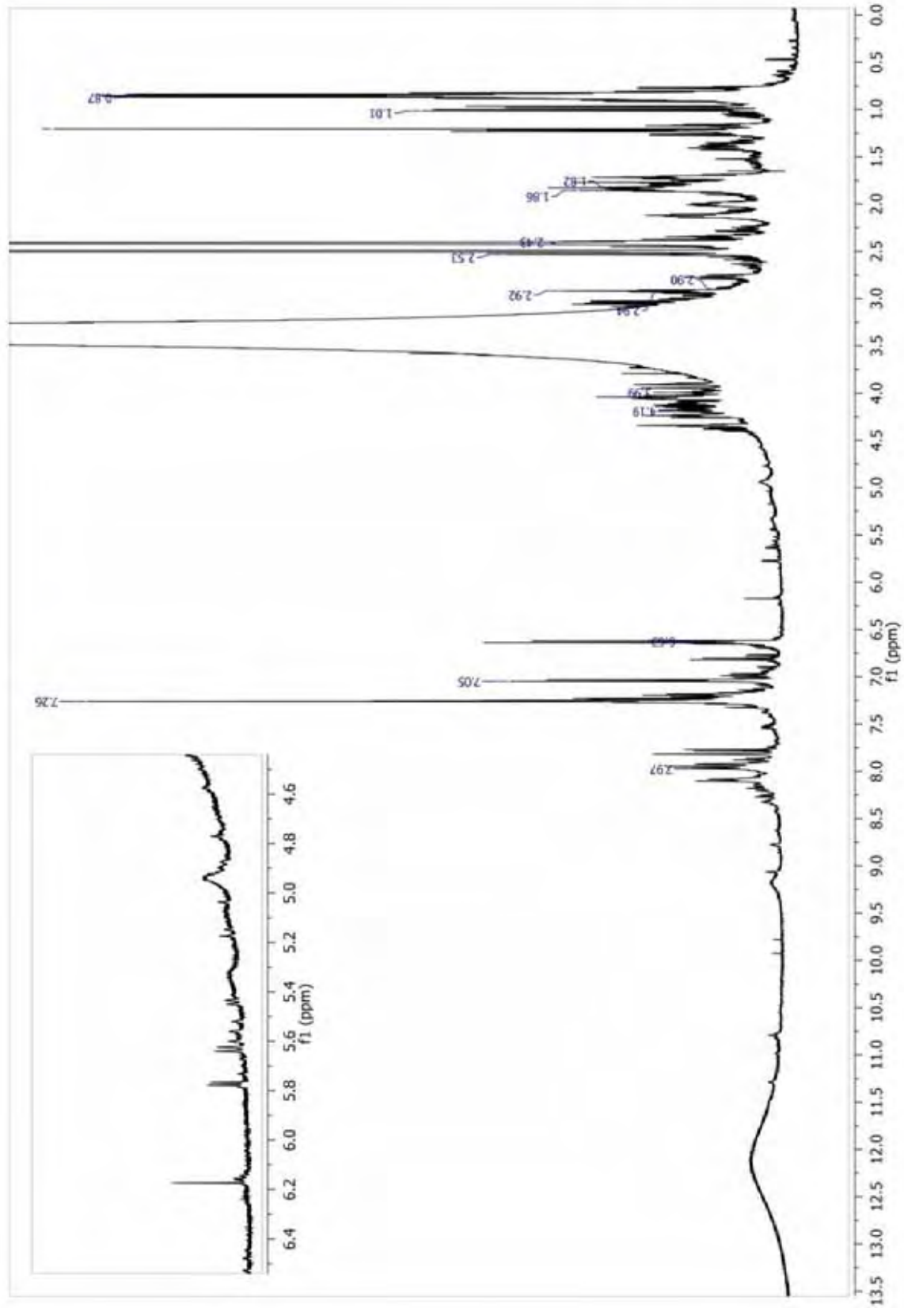
ANEXOS

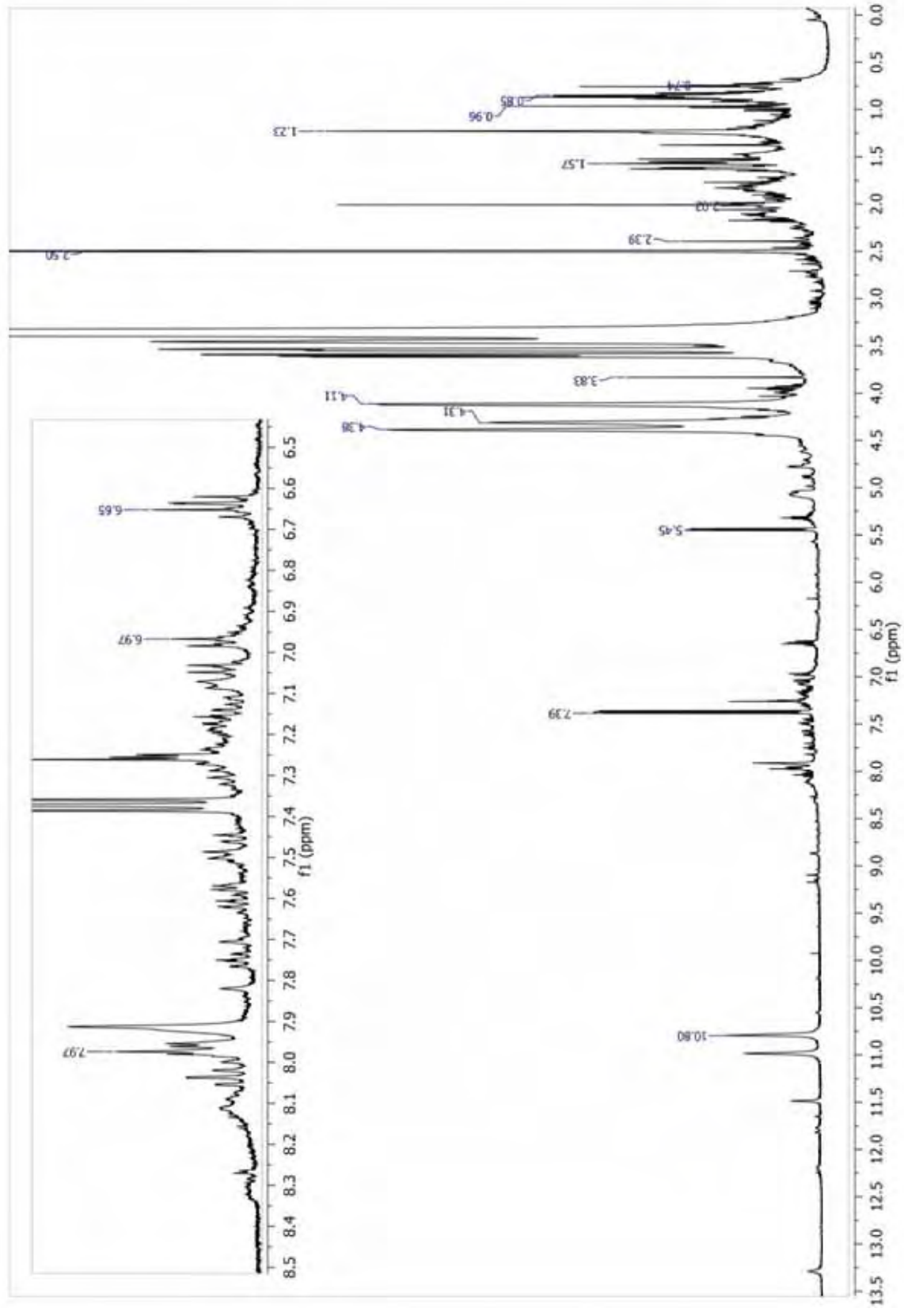
ANEXO 1 -RMN de ^1H do extrato bruto de arroz (CDCl_3 , 500MHz)

ANEXO 2 - RMN de ^1H do extrato bruto de Czapek[®] (DMSO- d_6 , 500MHz)

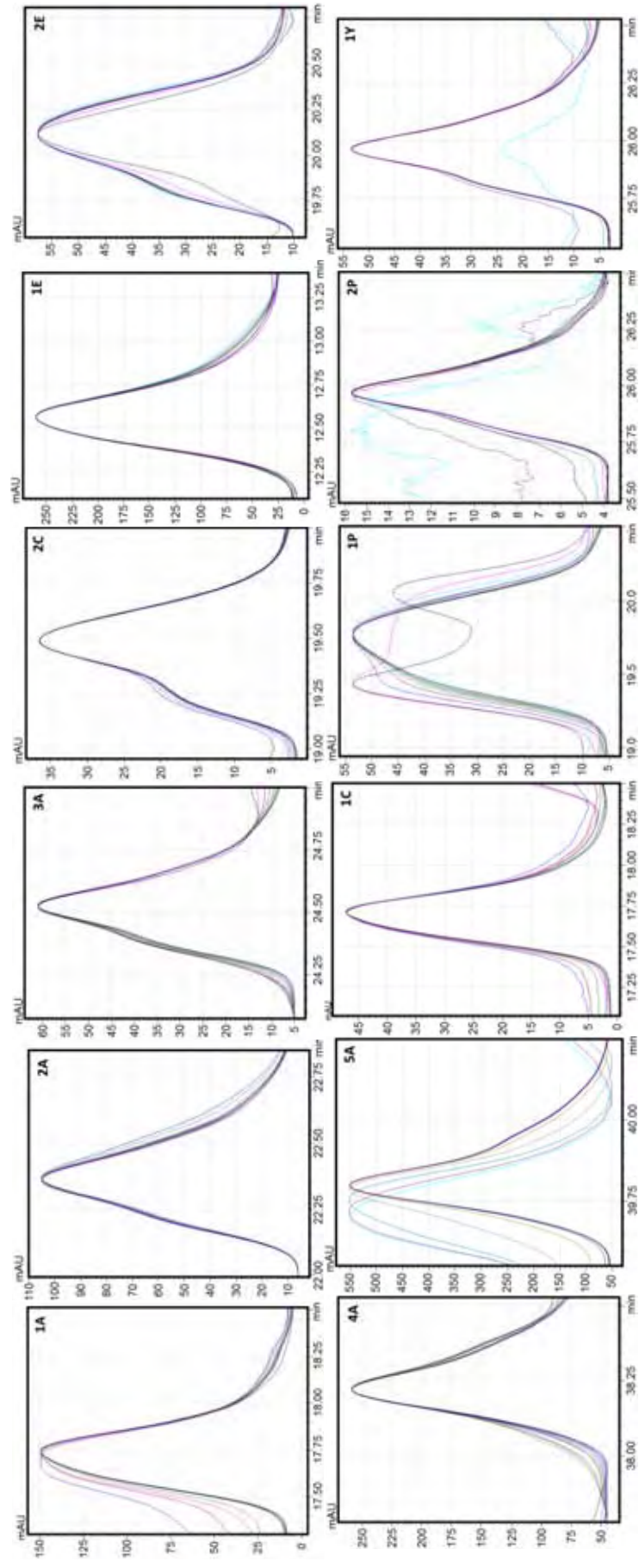
ANEXO 3 - RMN de ^1H do extrato bruto de Extrato de Malte – EM (DMSO- d_6 , 500MHz)

ANEXO 4 - RMN de ^1H do extrato bruto de Nutrient[®] (DMSO- d_6 , 500MHz)

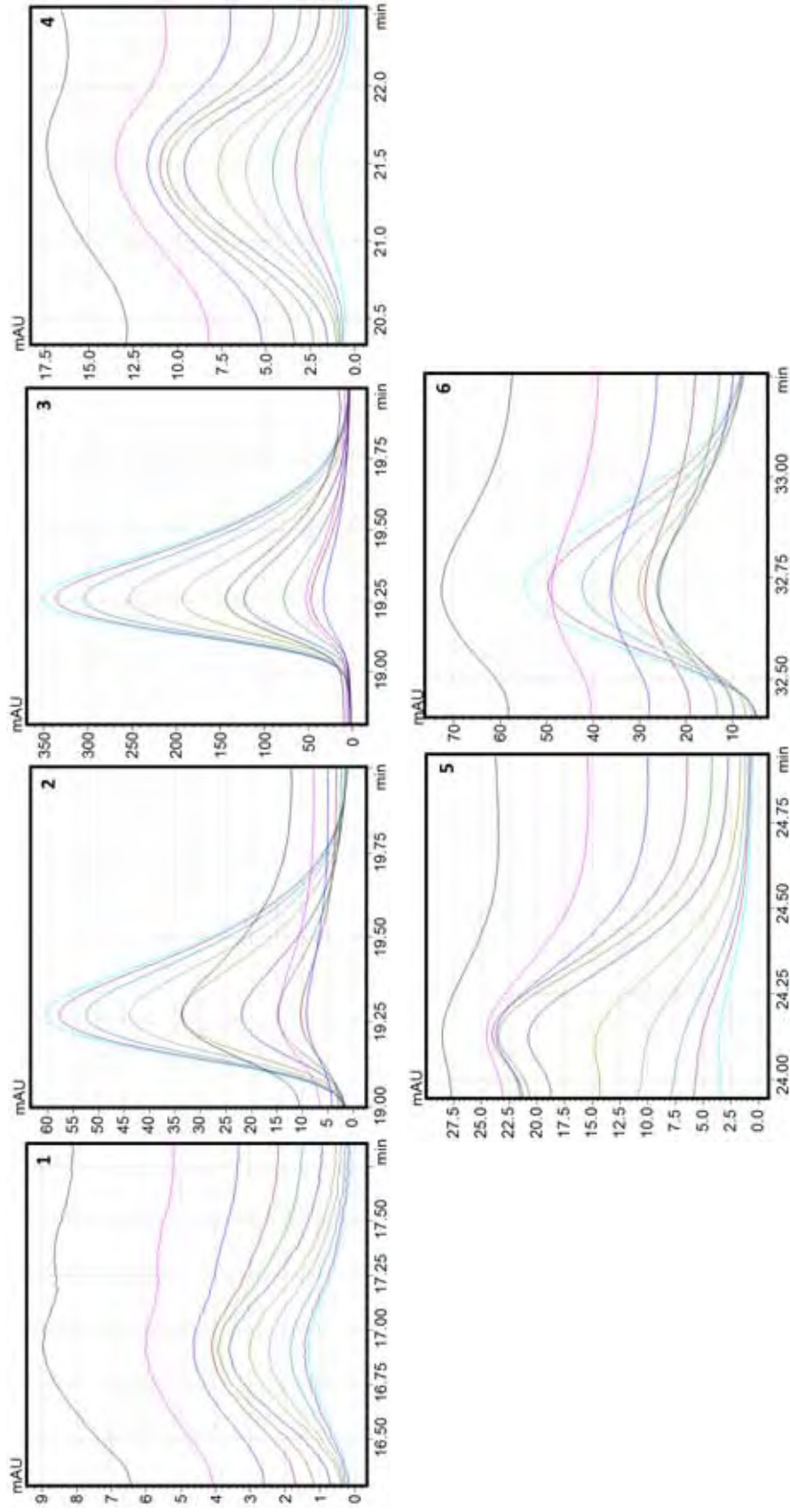
ANEXO 5 - RMN de ^1H do extrato bruto de Meio de Dextrose e Batata - MDB (DMSO- d_6 , 500MHz)

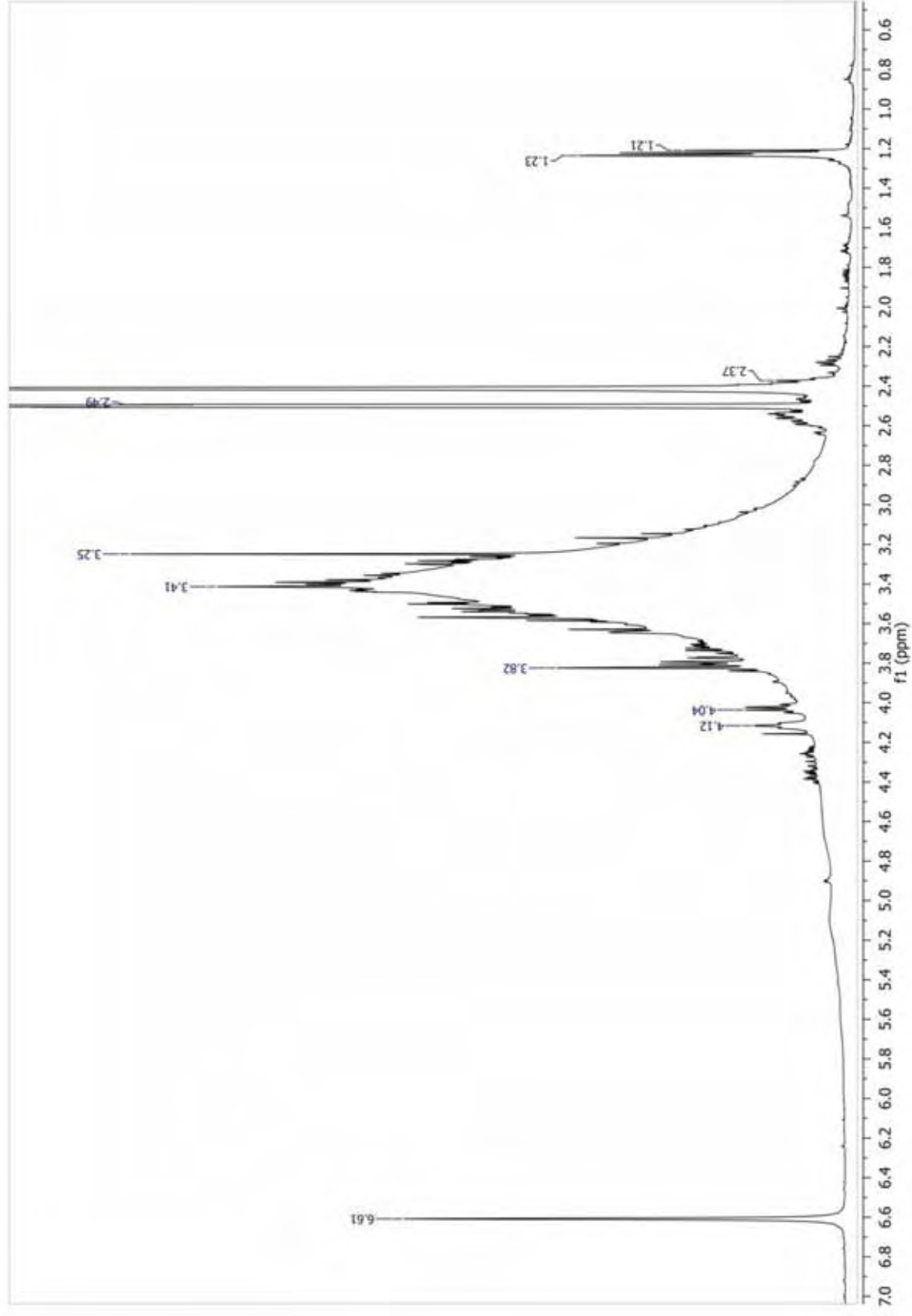
ANEXO 6 - RMN de ^1H do extrato bruto de Caldo de Levedura - YM (DMSO- d_6 , 500MHz)

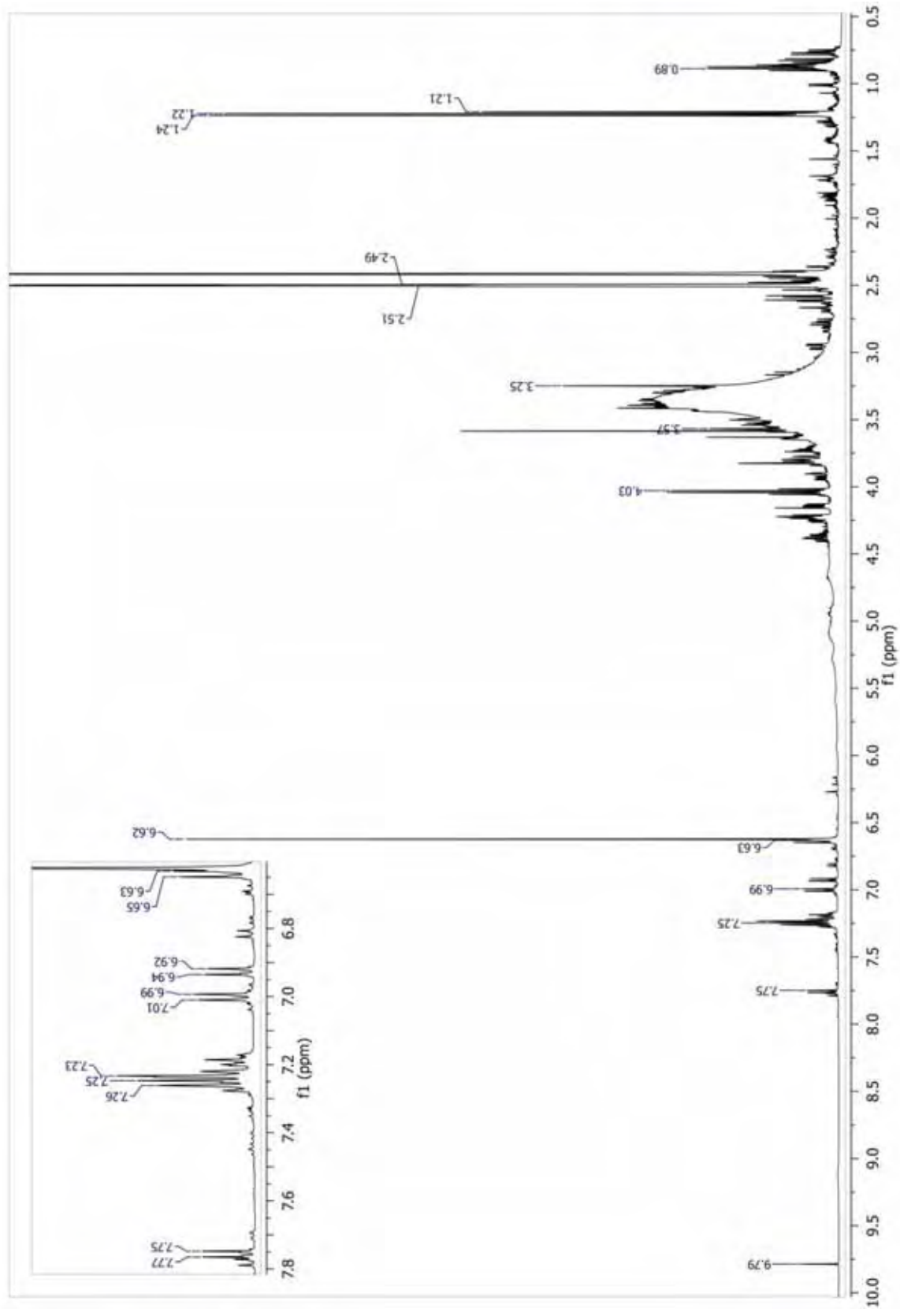
ANEXO 7 - Diagramas das curvas de absorção no UV dos picos identificados nos extratos brutos

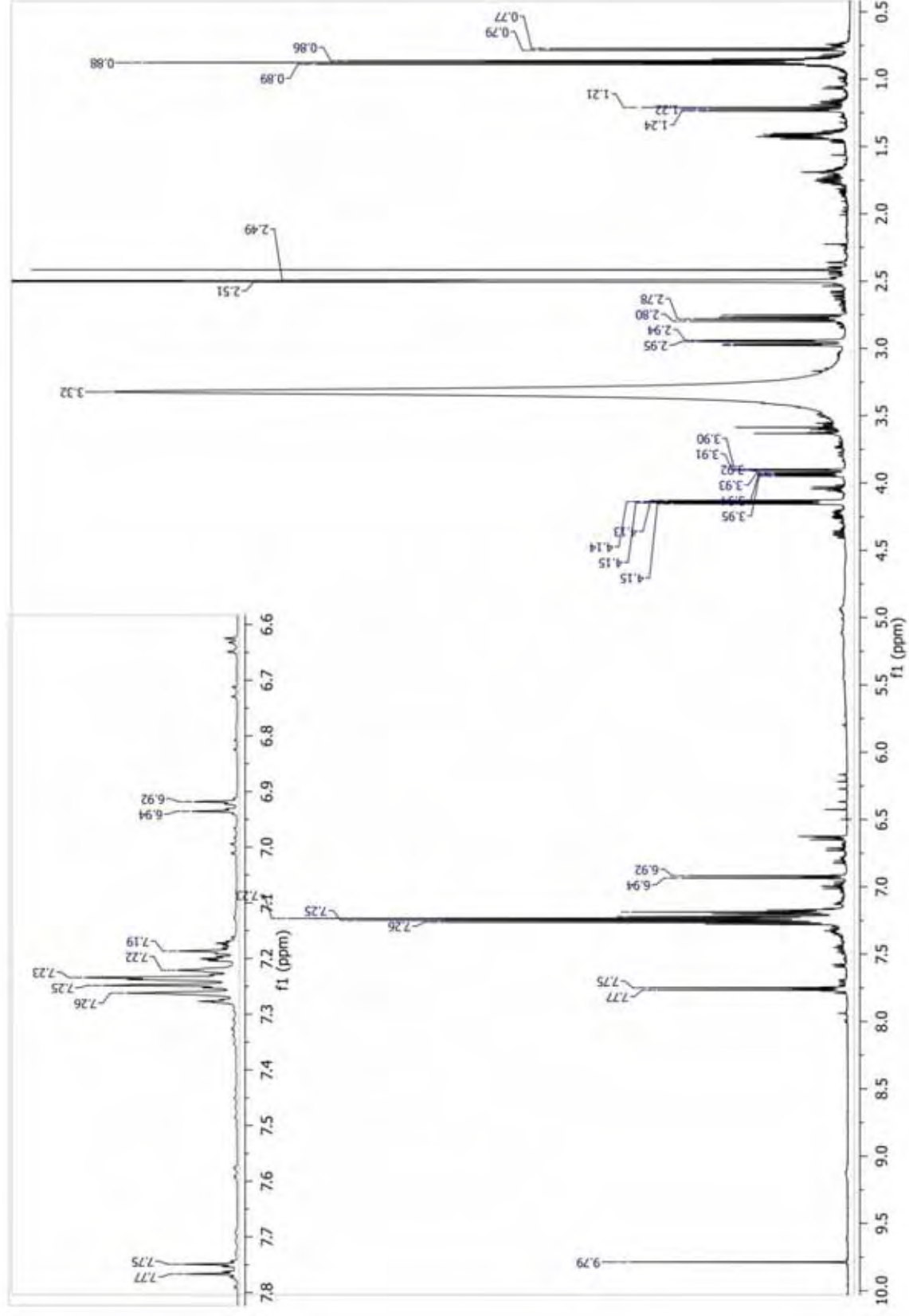


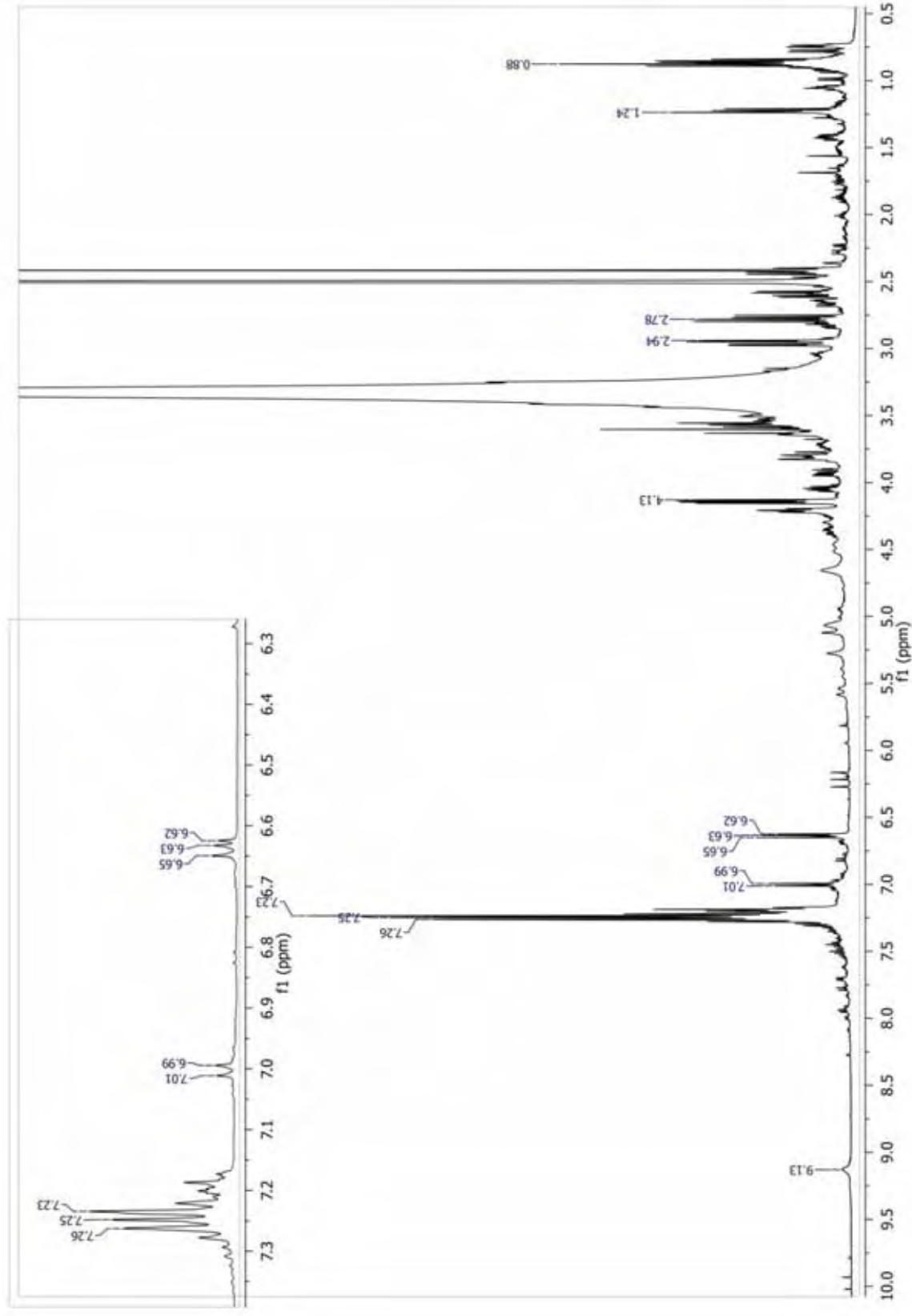
ANEXO 8 - Diagramas das curvas de absorção no UV dos picos identificados nas frações

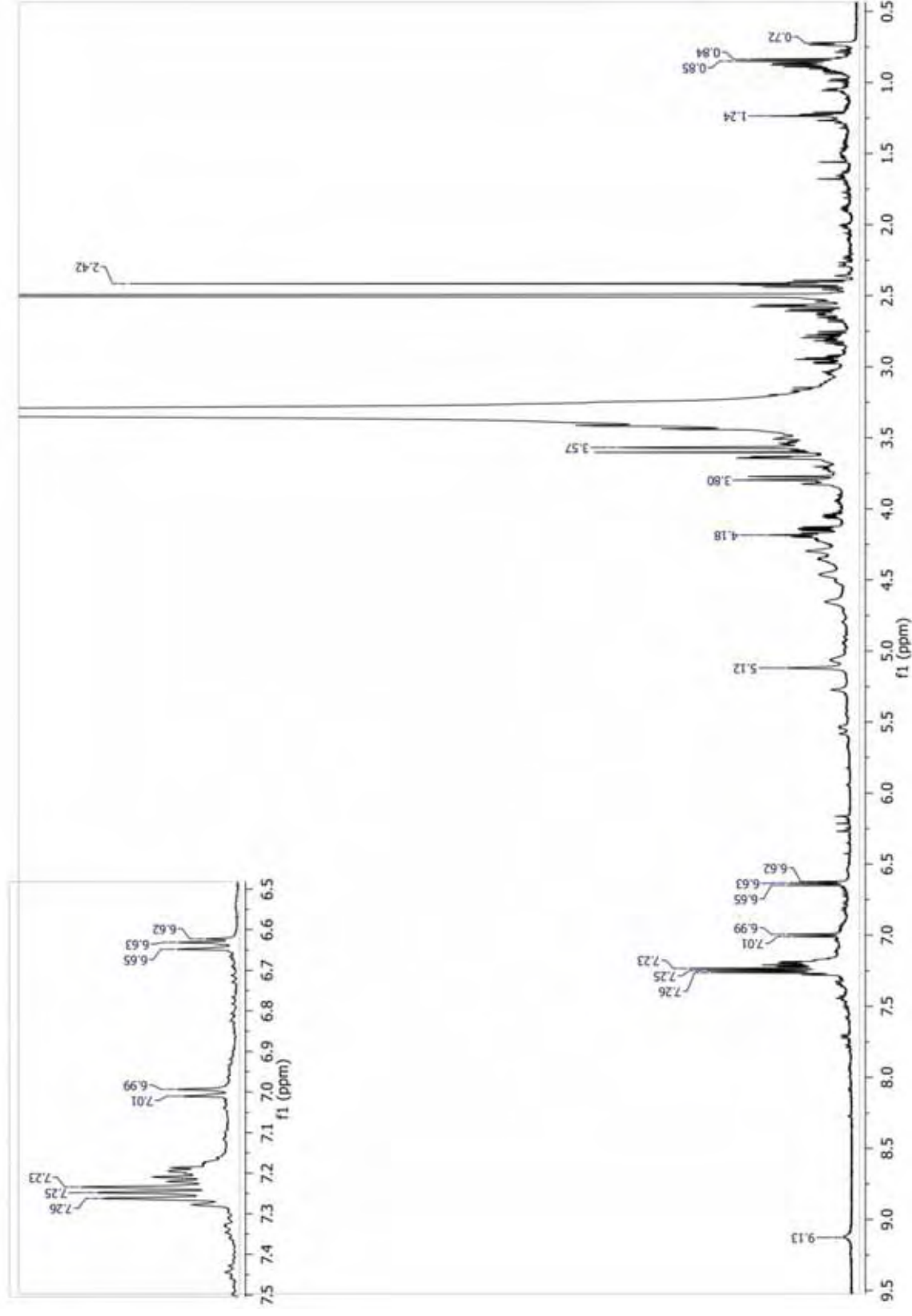


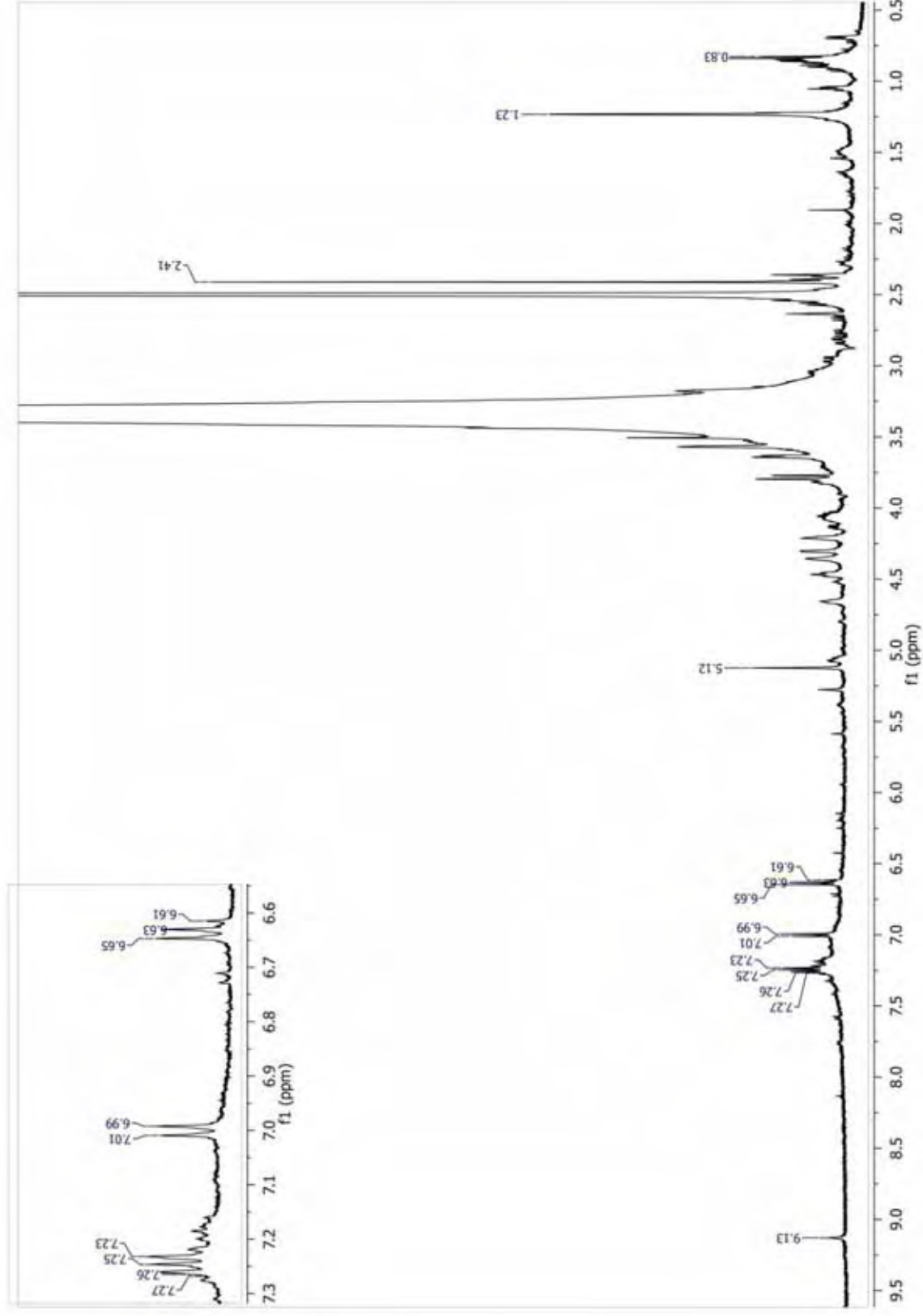
ANEXO 9 - RMN de ^1H da Fr.1 obtida do fracionamento do extrato bruto de Czapek[®] por CC sob pressão (DMSO- d_6 , 500MHz)

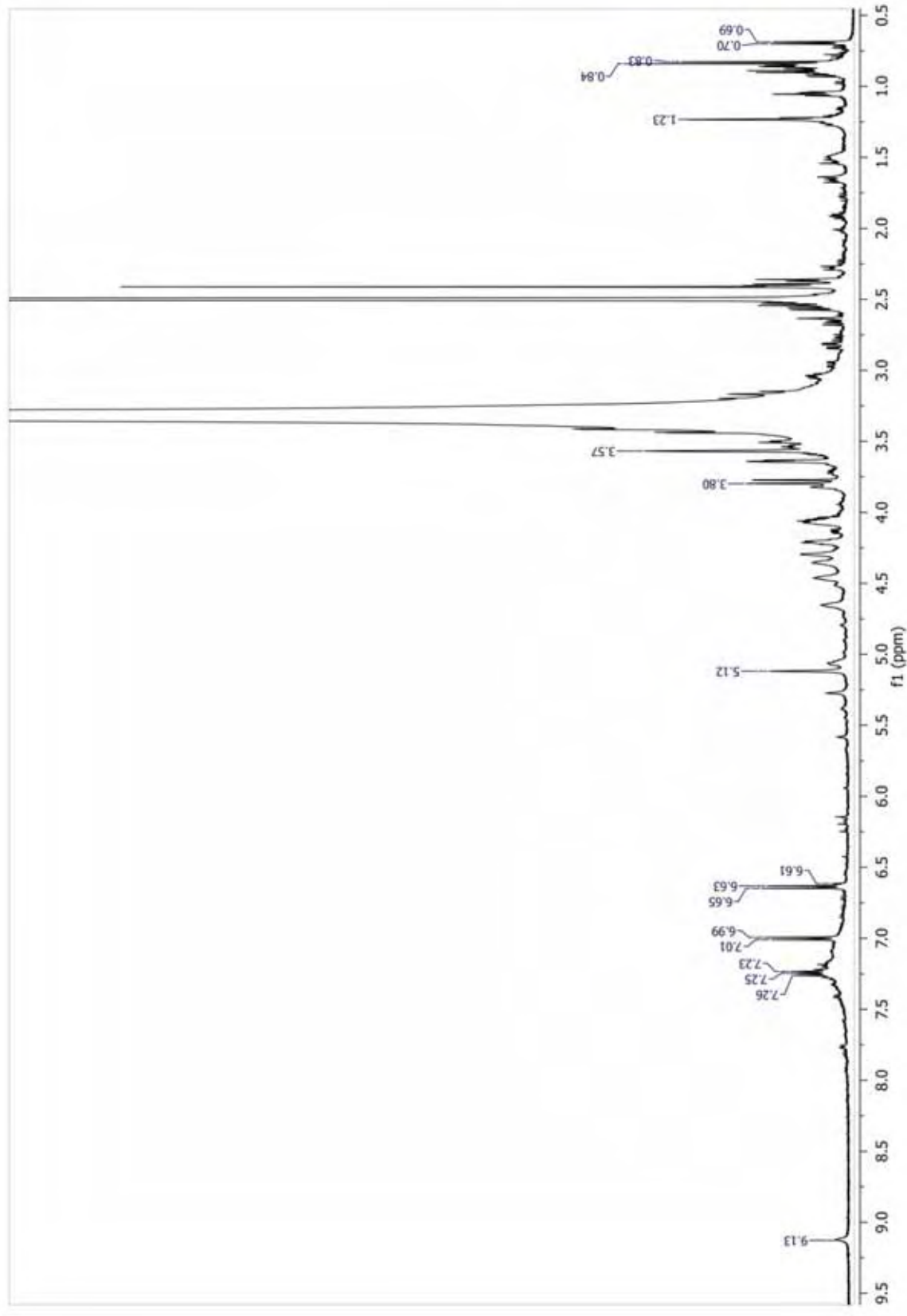
ANEXO 10 - RMN de ^1H da Fr.2 obtida do fracionamento do extrato bruto de Czapek[®] por CC sob pressão (DMSO- d_6 , 500MHz)

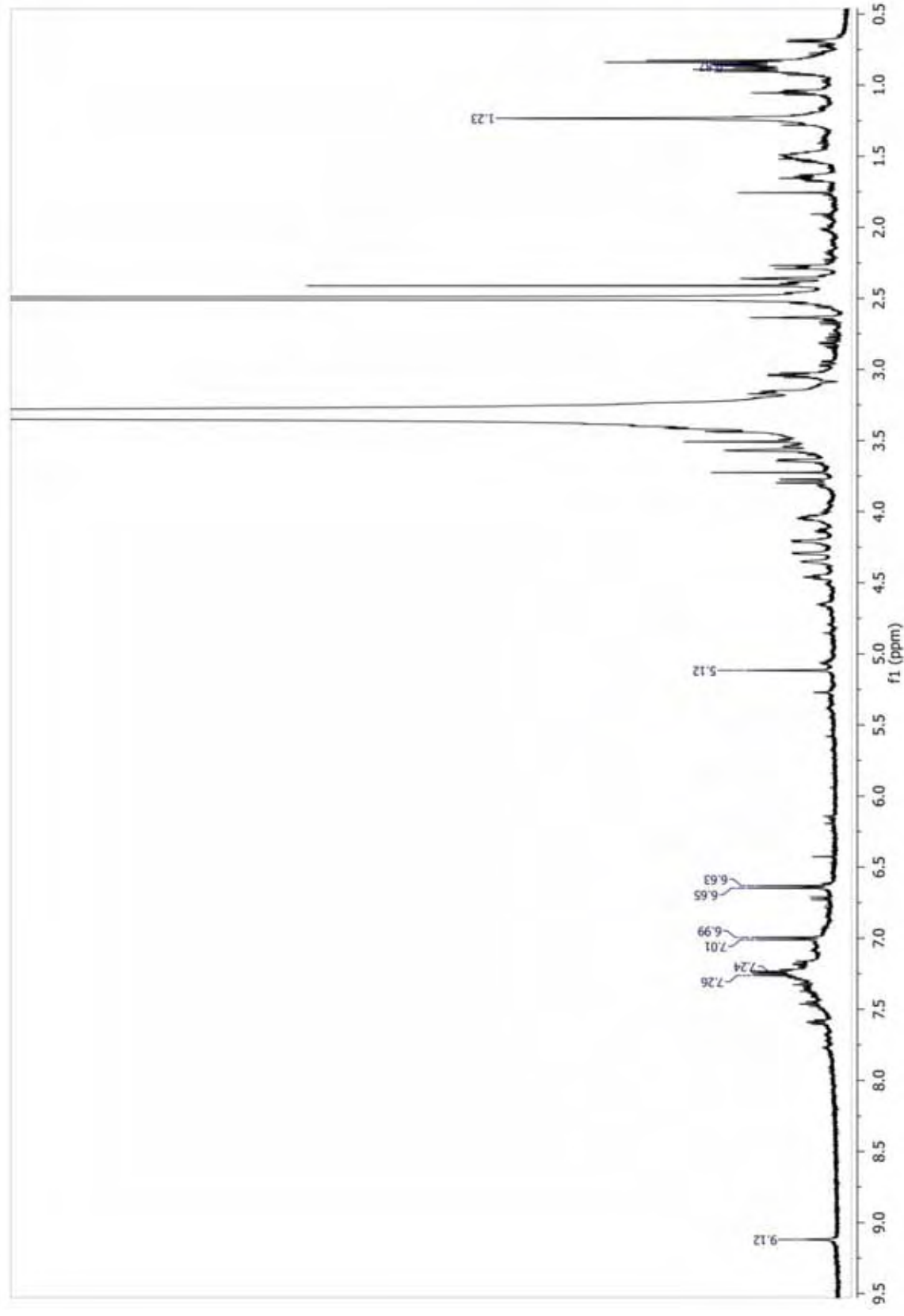
ANEXO 11 - RMN de ^1H da Fr.3 obtida do fracionamento do extrato bruto de Czapek[®] por CC sob pressão (DMSO- d_6 , 500MHz)

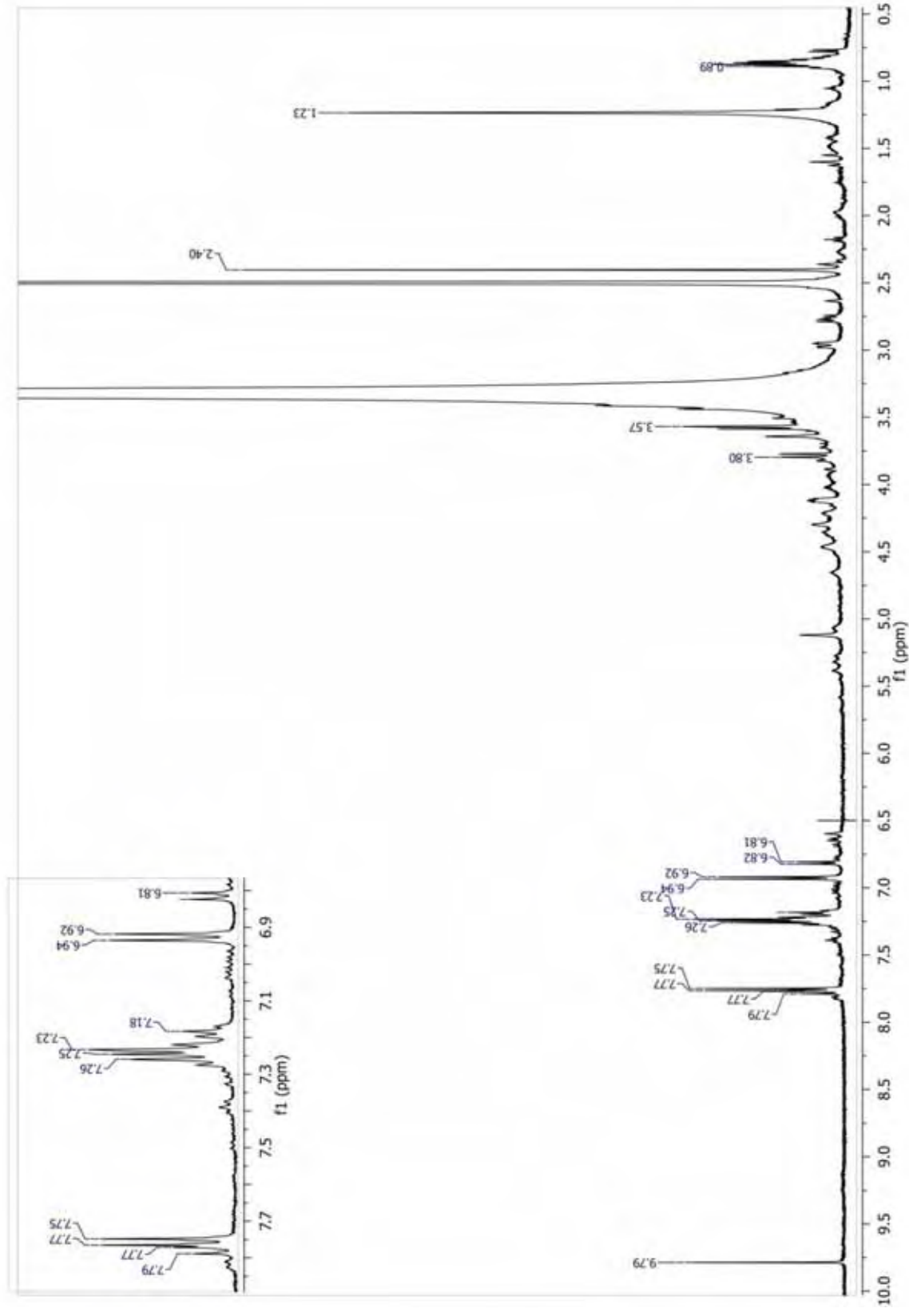
ANEXO 12 - RMN de ^1H da Fr.4 obtida do fracionamento do extrato bruto de Czapek[®] por CC sob pressão (DMSO- d_6 , 500MHz)

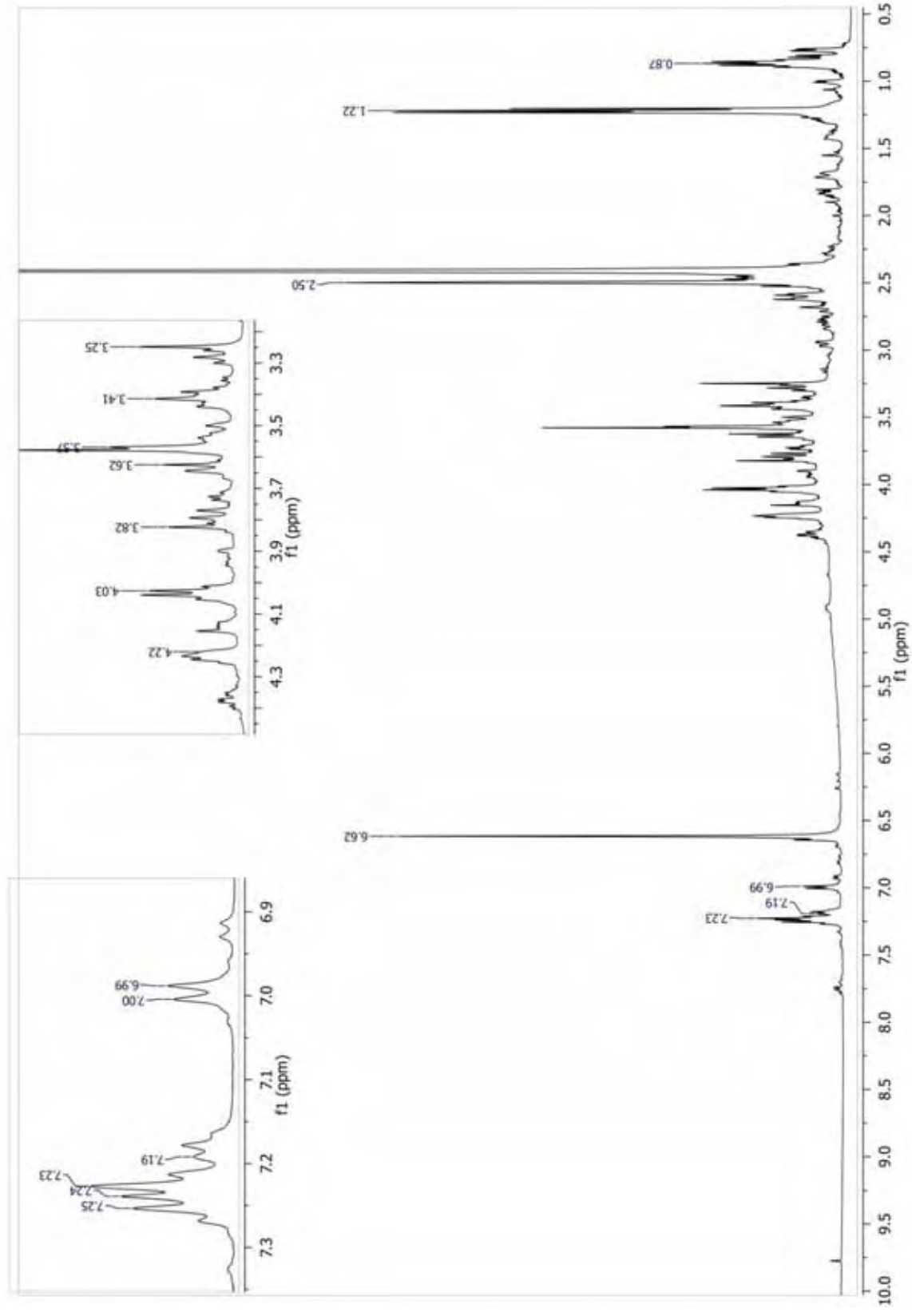
ANEXO 13 - RMN de ^1H da Fr.5 obtida do fracionamento do extrato bruto de Czapek[®] por CC sob pressão (DMSO- d_6 , 500MHz)

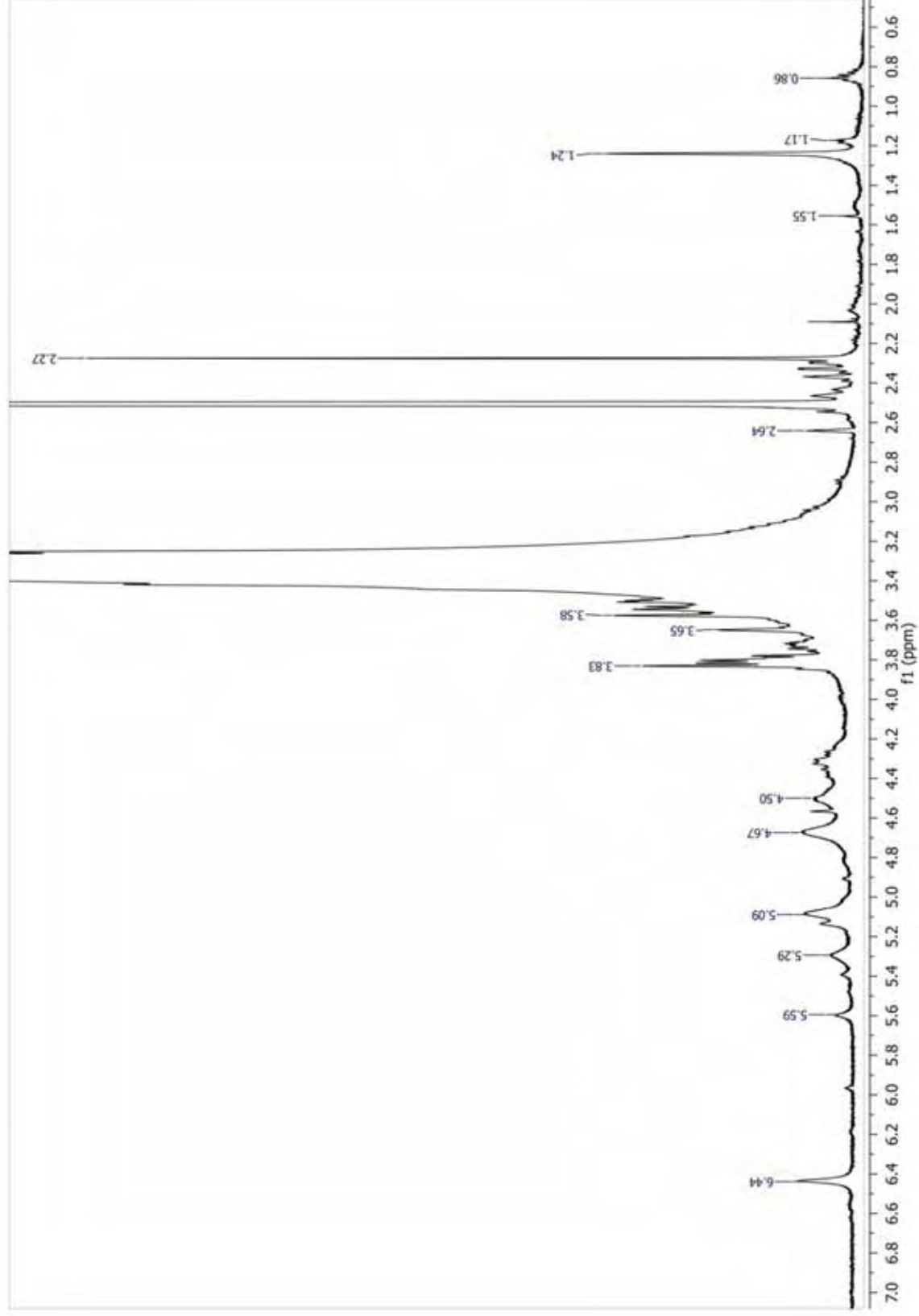
ANEXO 14 - RMN de ^1H da Fr.6 obtida do fracionamento do extrato bruto de Czapek[®] por CC sob pressão (DMSO- d_6 , 500MHz)

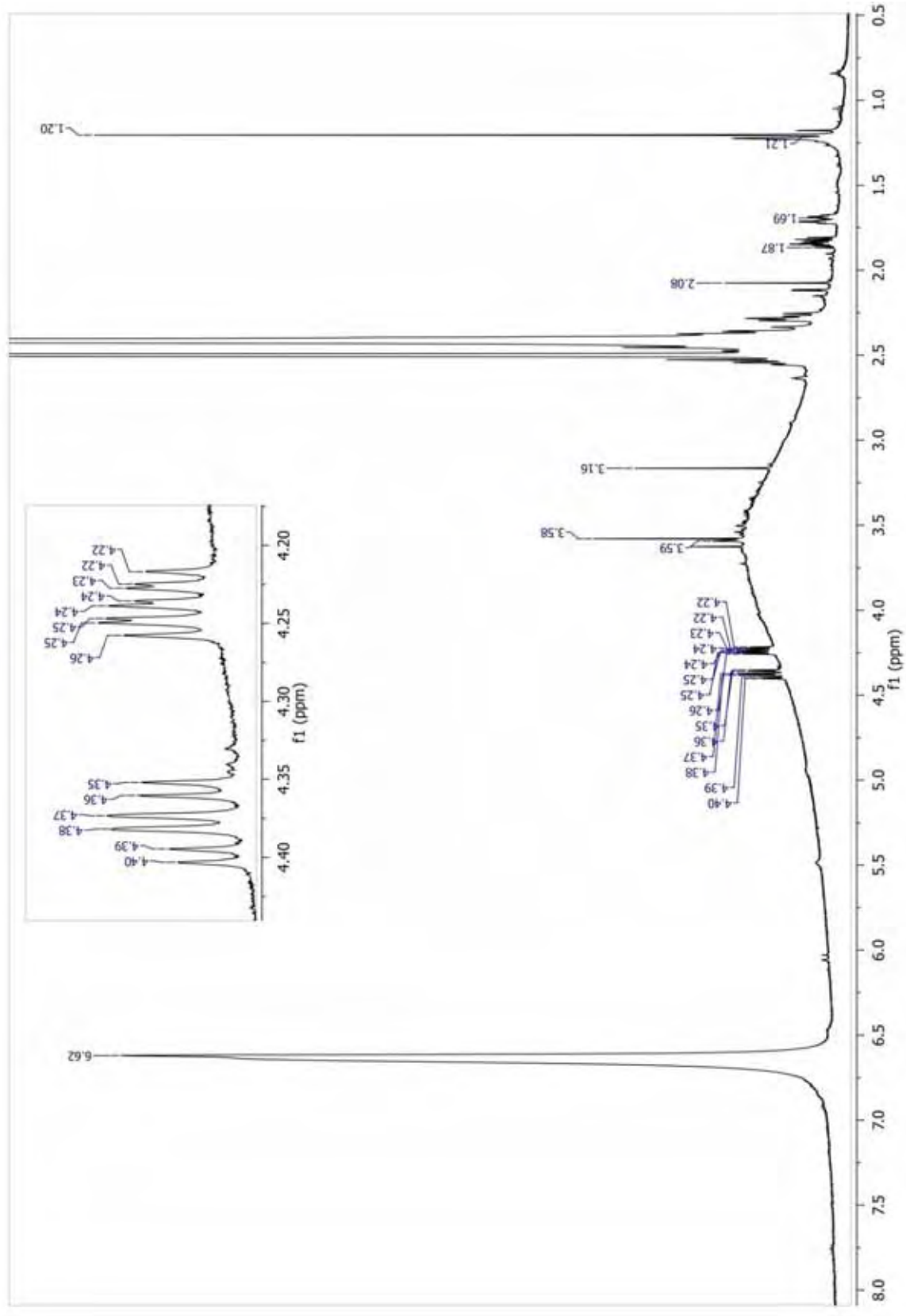
ANEXO 15 - RMN de ^1H da Fr.7 obtida do fracionamento do extrato bruto de Czapek[®] por CC sob pressão (DMSO- d_6 , 500MHz)

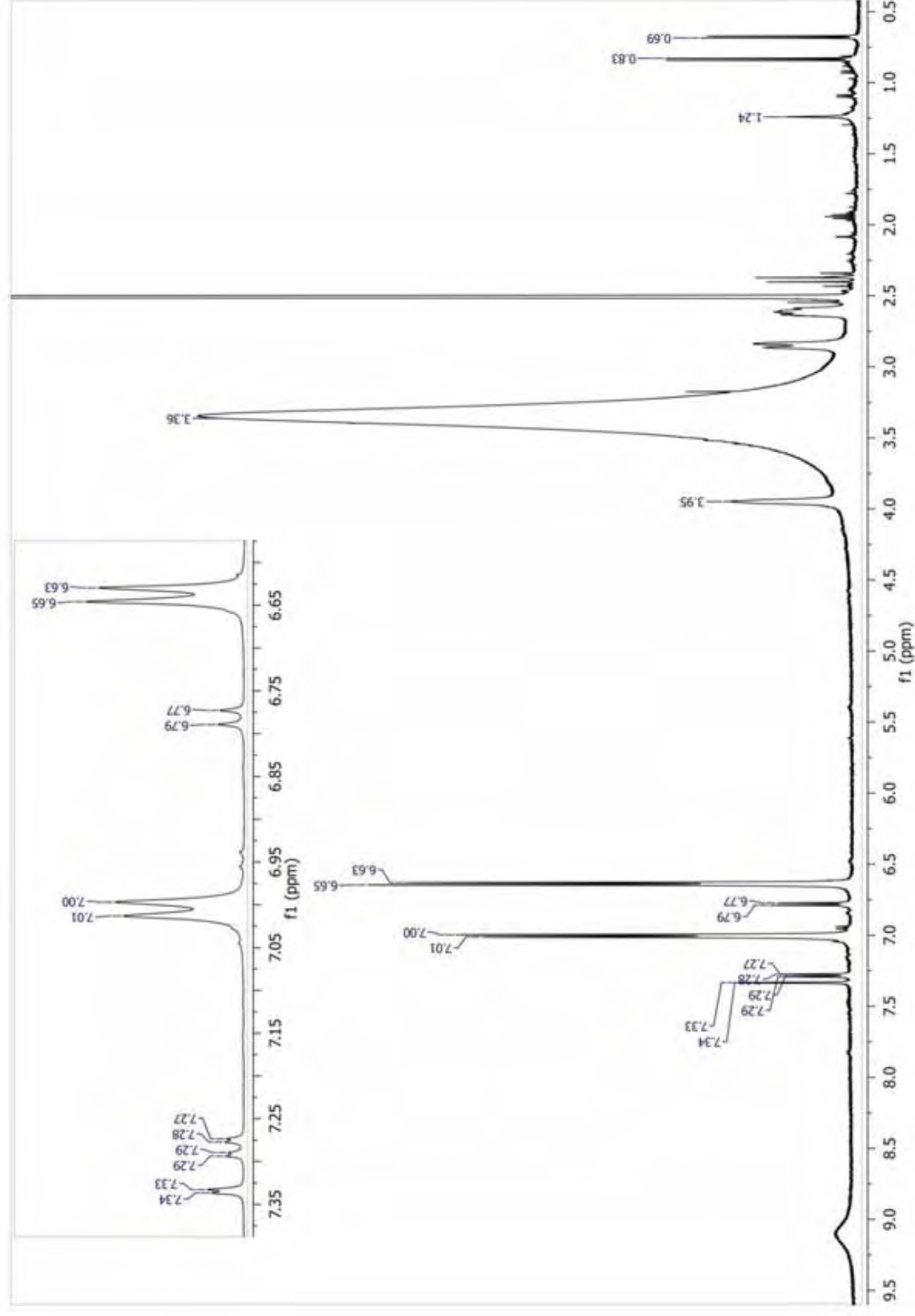
ANEXO 16 - RMN de ^1H da Fr.8 obtida do fracionamento do extrato bruto de Czapek[®] por CC sob pressão (DMSO- d_6 , 500MHz)

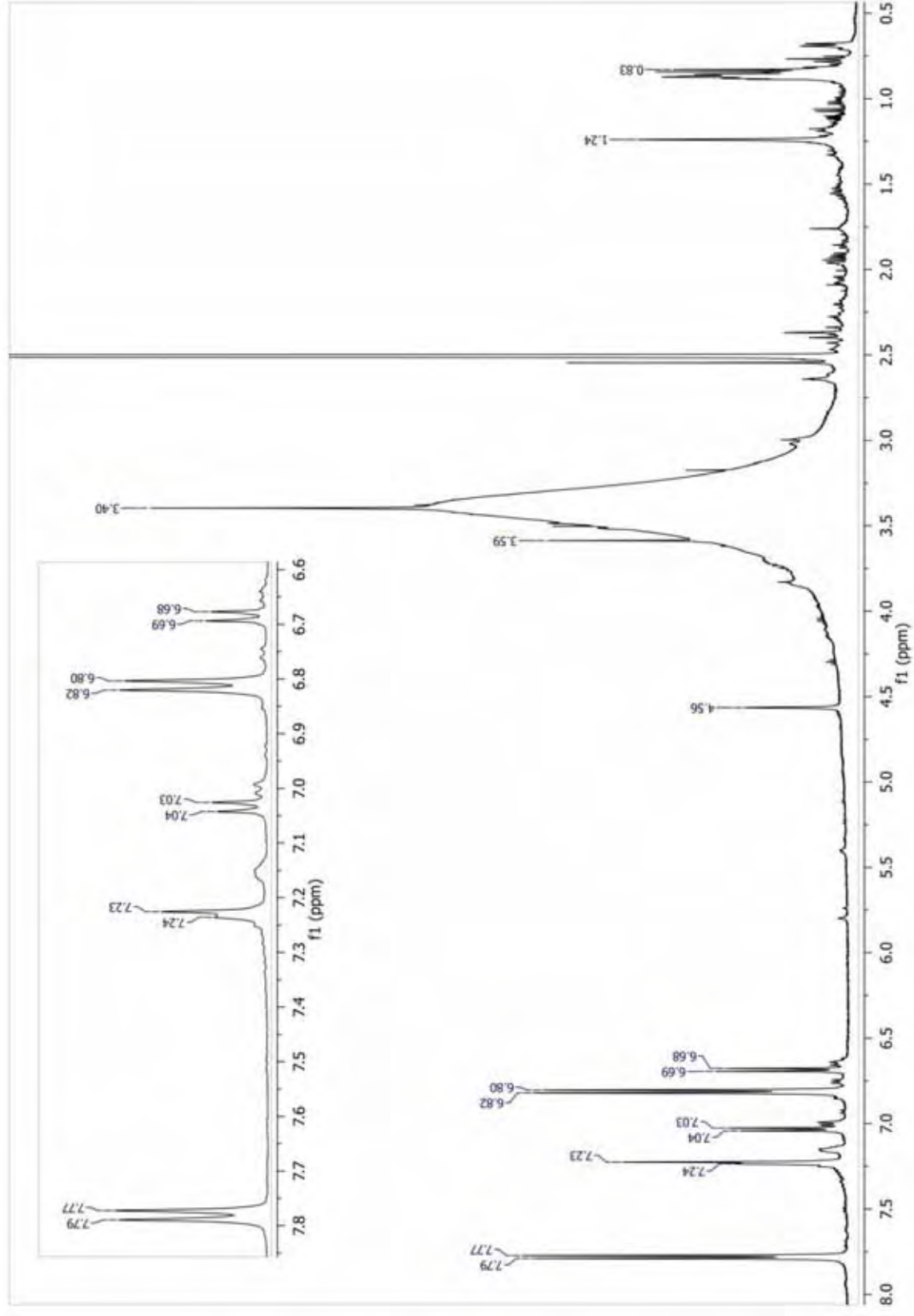
ANEXO 17 - RMN de ^1H da fração orgânica da Fr.2 (DMSO- d_6 , 500MHz)

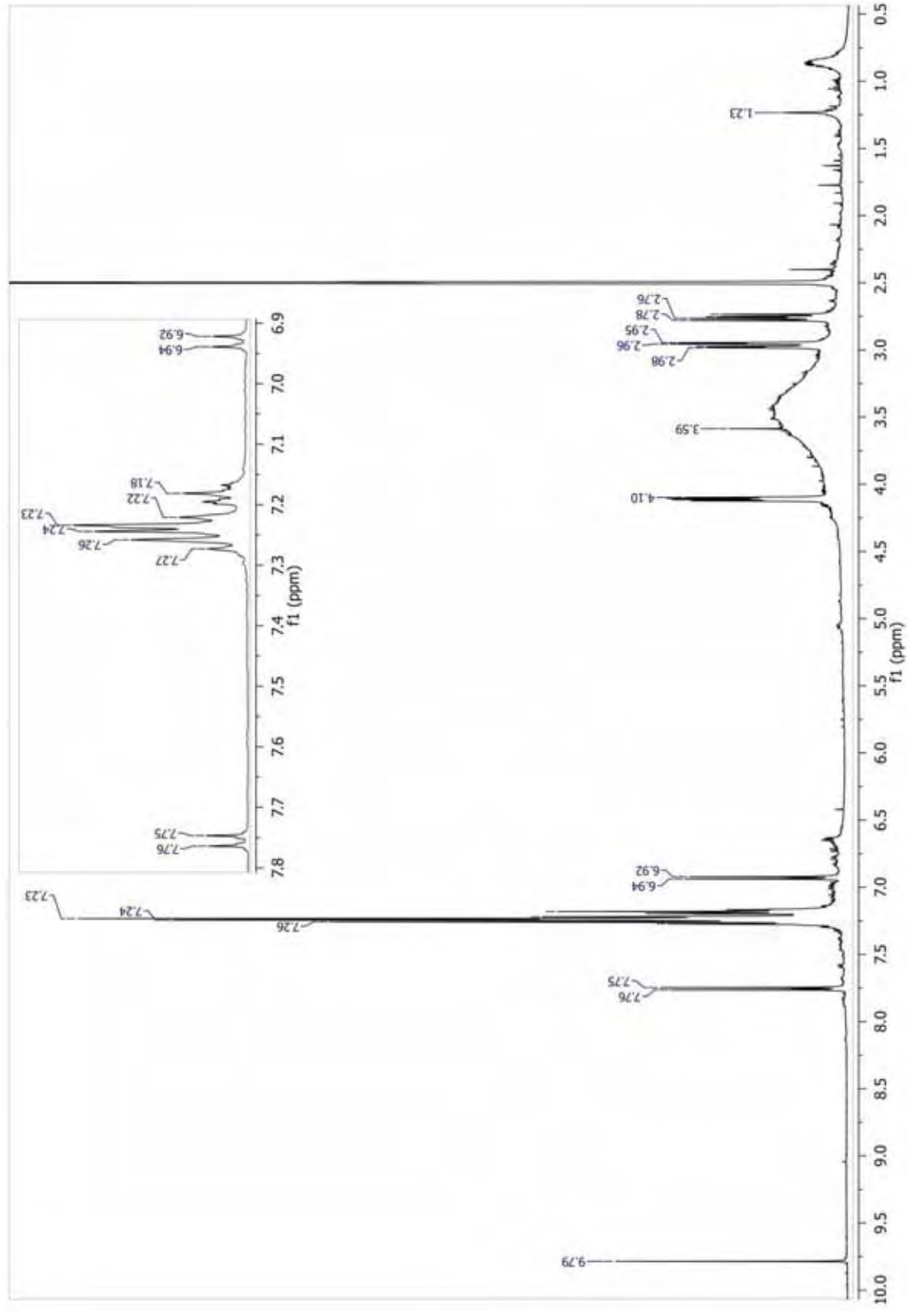
ANEXO 18 - RMN de ^1H da fração aquosa da Fr.2 (DMSO- d_6 , 500MHz)

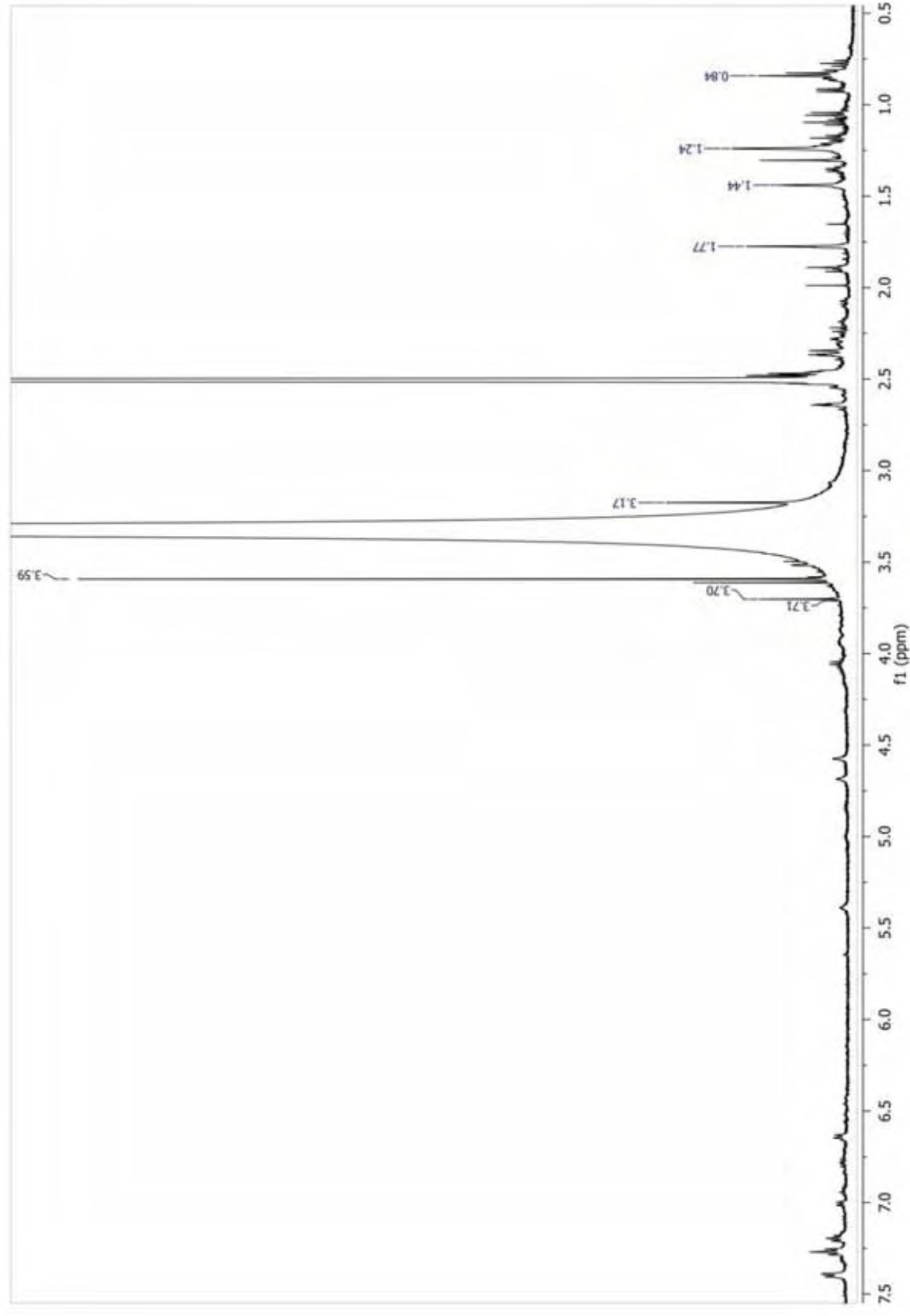
ANEXO 19 - RMN de ^1H da sub-fração Fr2_DP1 (DMSO- d_6 , 500MHz)

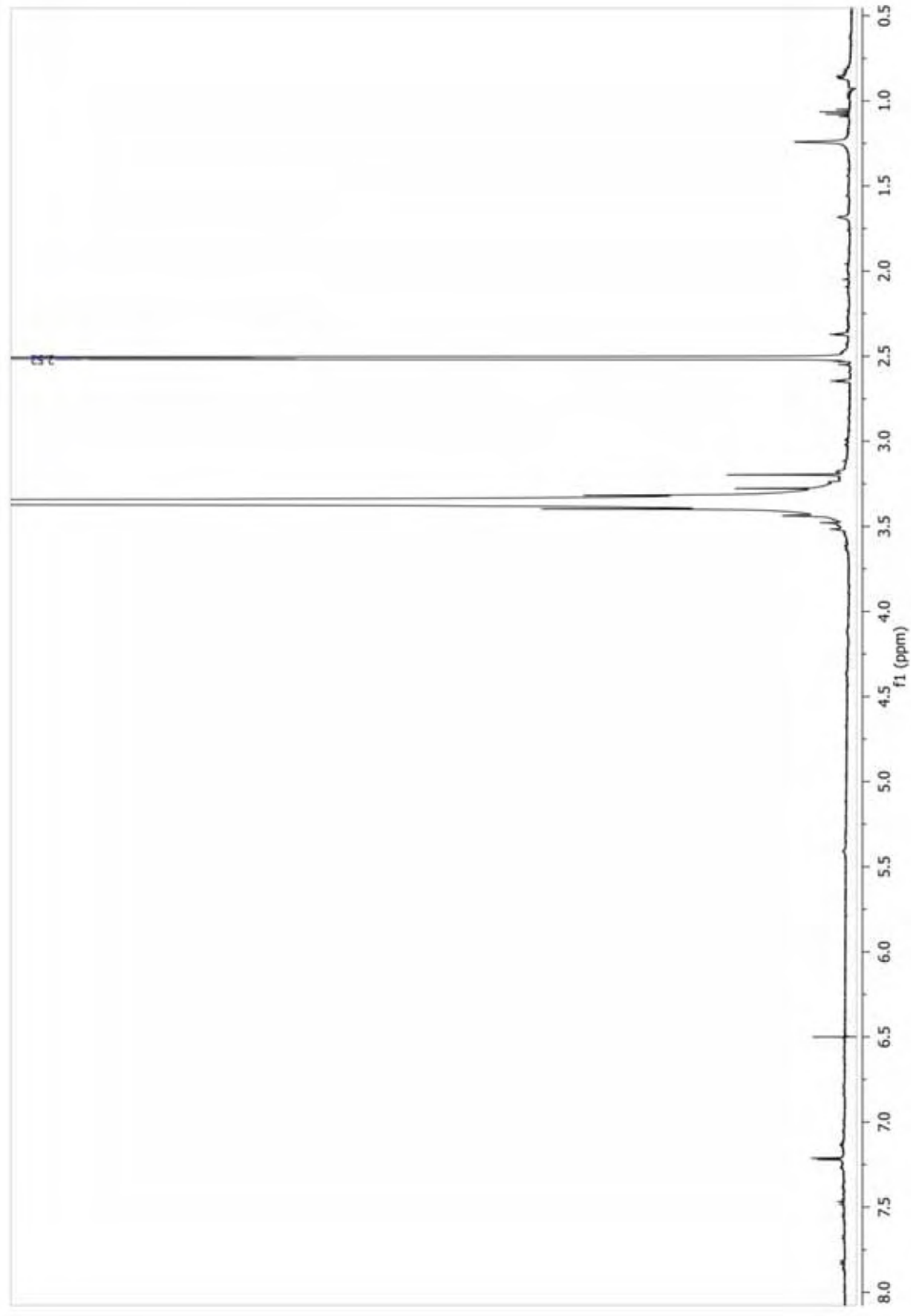
ANEXO 20 - RMN de ^1H da sub-fração Fr2_DP2 (DMSO- d_6 , 500MHz)

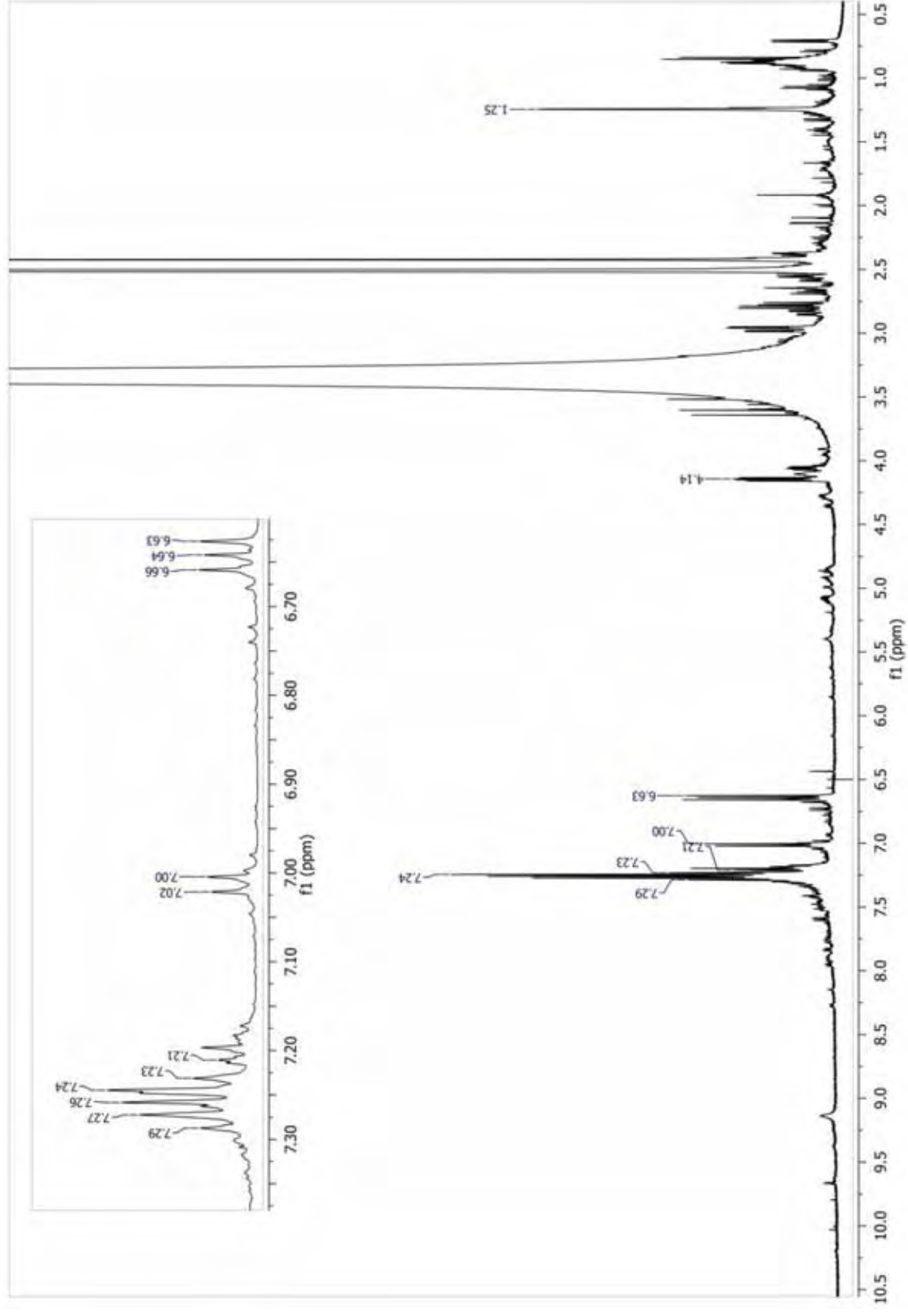
ANEXO 21 - RMN de ^1H da sub-fração Fr2_DP3 (DMSO- d_6 , 500MHz)

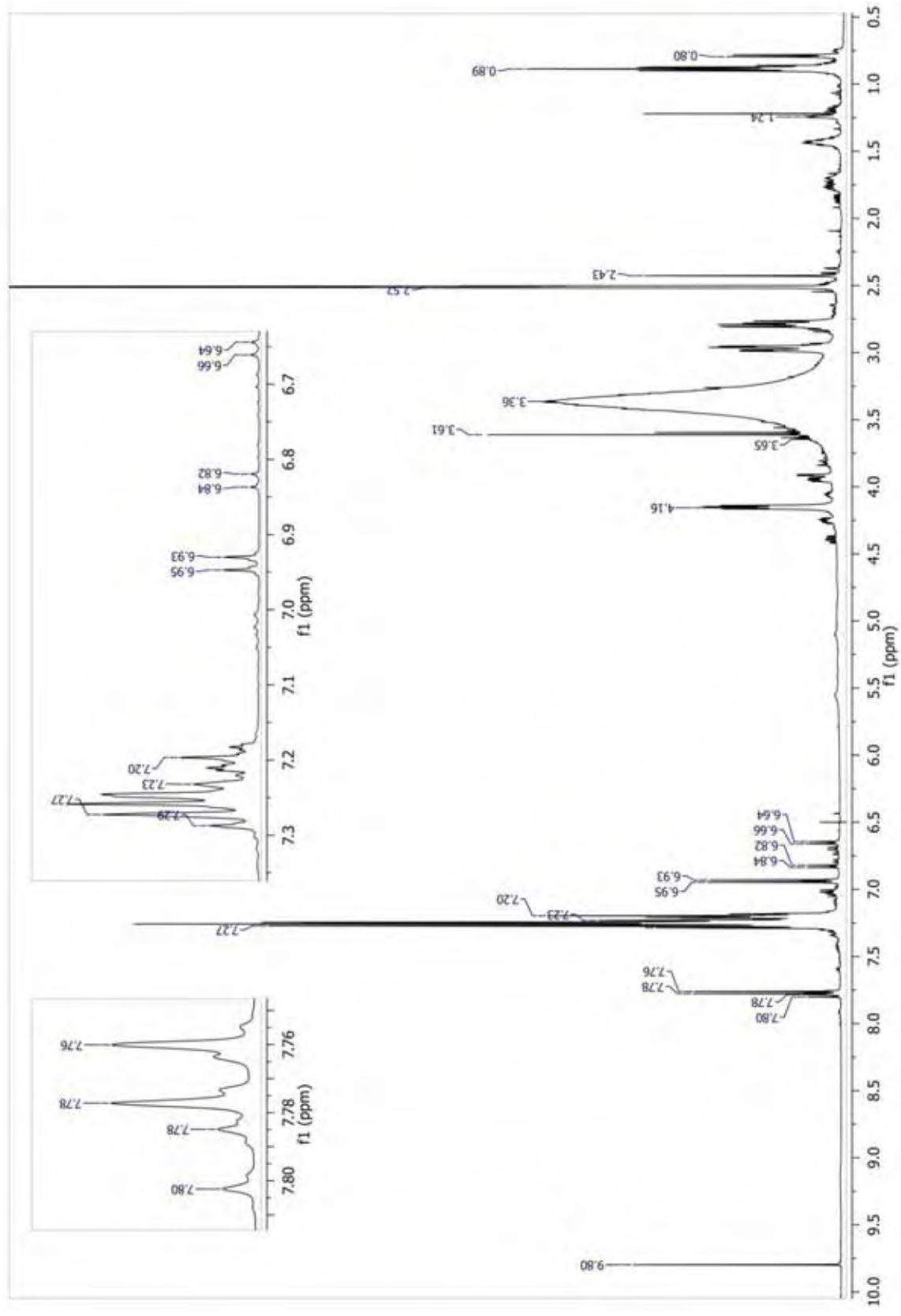
ANEXO 22 - RMN de ^1H da sub-fração Fr2_DP4 (DMSO- d_6 , 500MHz)

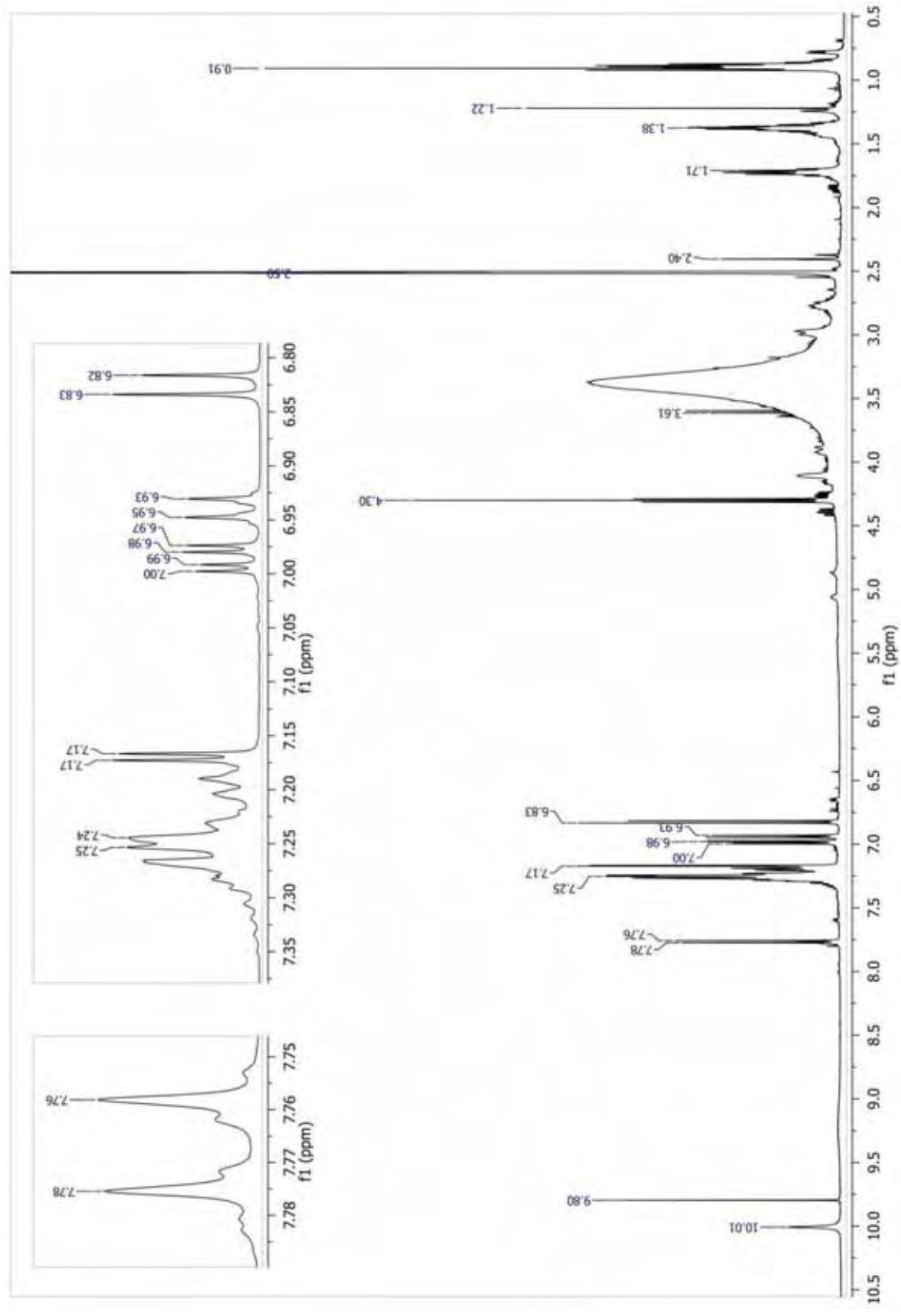
ANEXO 23 - RMN de ^1H da sub-fração Fr2_DP5 (DMSO- d_6 , 500MHz)

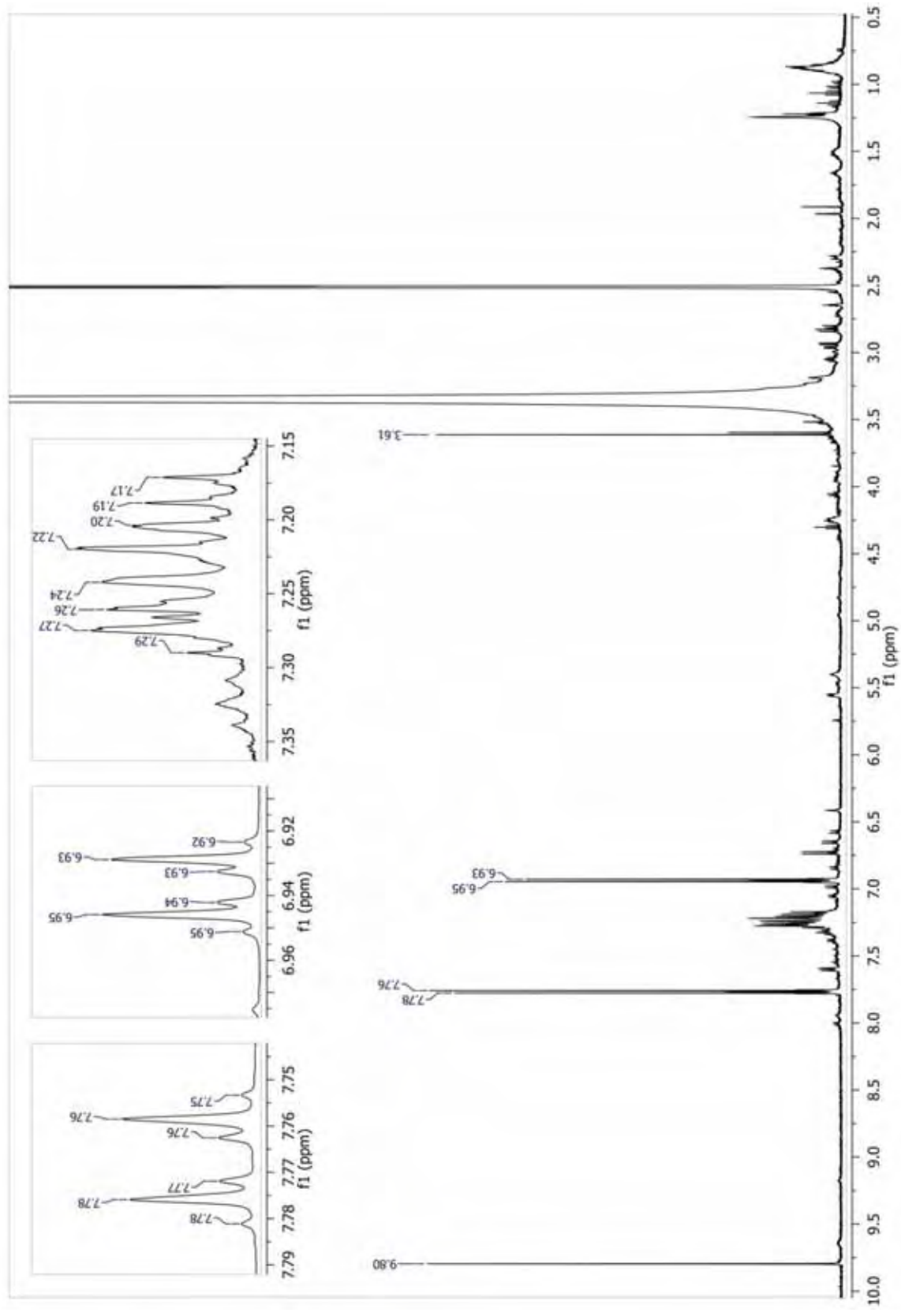
ANEXO 24 - RMN de ^1H da sub-fração Fr2_DP6 (DMSO- d_6 , 500MHz)

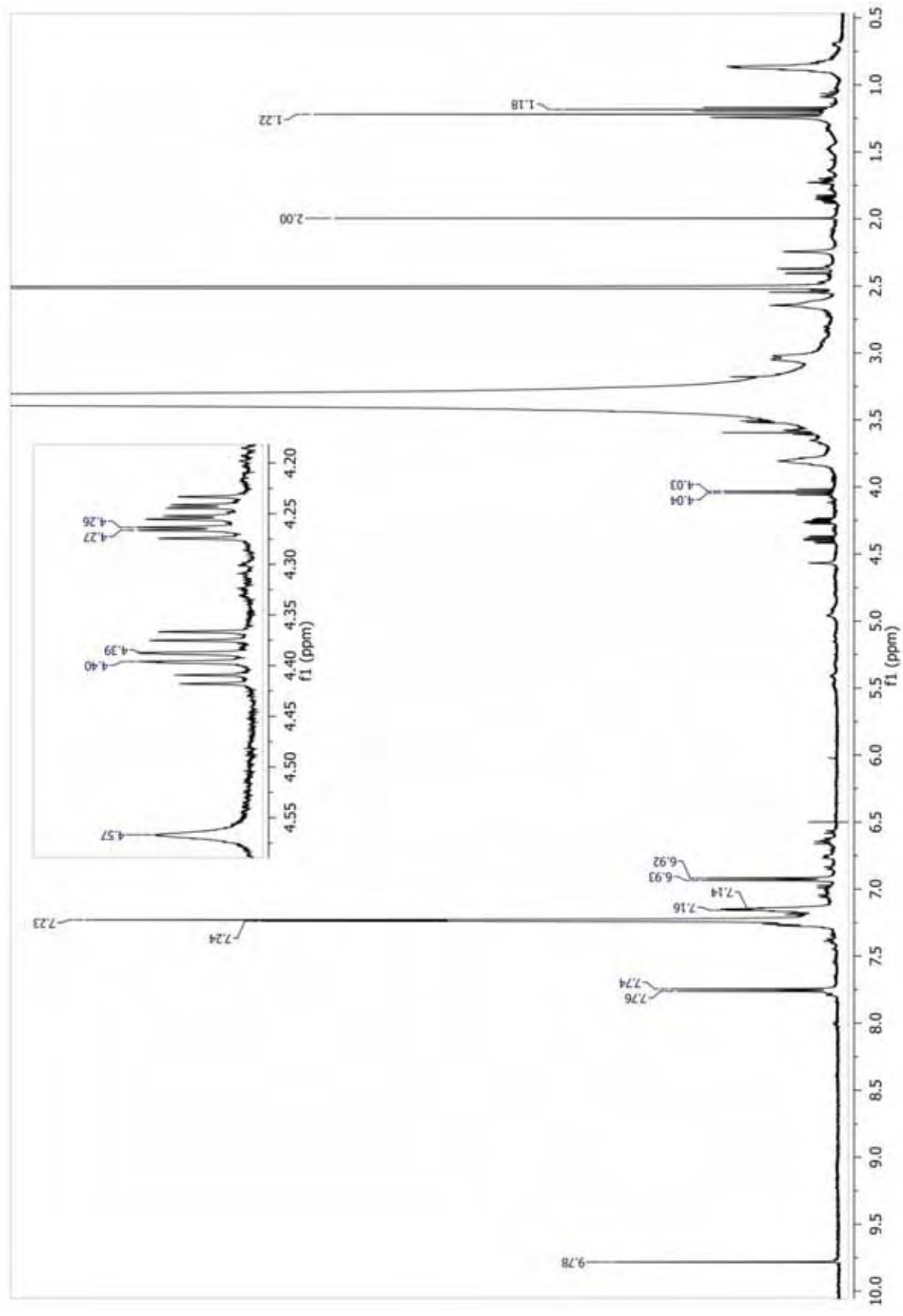
ANEXO 25 - RMN de ^1H da sub-fração Fr3_DP1 (DMSO- d_6 , 500MHz)

ANEXO 26 - RMN de ^1H da sub-fração Fr3_DP2 (DMSO- d_6 , 500MHz)

ANEXO 27 - RMN de ^1H da sub-fração Fr3_DP3 (DMSO- d_6 , 500MHz)

ANEXO 28 - RMN de ^1H da sub-fração Fr3_DP4 (DMSO- d_6 , 500MHz)

ANEXO 29 - RMN de ^1H da sub-fração Fr3_DP5 (DMSO- d_6 , 500MHz)

ANEXO 30 - RMN de ^1H da sub-fração Fr3_DP4_P1 (DMSO- d_6 , 500MHz)

ANEXO 31 - RMN de ^1H da sub-fração Fr3_DP4_P2 (DMSO- d_6 , 500MHz)