

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

LUIS PAULO DE SOUSA COSTA

**Bioprospecção de fungos endofíticos
da alga vermelha *Pyropia spiralis***

Luis Paulo de Sousa Costa
Departamento de Química Orgânica

Araraquara
2016

LUIS PAULO DE SOUSA COSTA

Bioprospecção de fungos endofíticos da alga vermelha *Pyropia spiralis*

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. Dulce Helena Siqueira Silva

Araraquara
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

C837b Costa, Luis Paulo de Sousa
Bioprospecção de fungos endofíticos da alga vermelha
Pyropia spiralis / Luis Paulo de Sousa Costa. – Araraquara :
[s.n.], 2016
107 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Dulce Helena Siqueira Silva

1. Fungos endofíticos. 2. Alga marinha. 3. Metabólitos.
4. Fungos marinhos. 5. Microorganismos. I. Título.

LUIS PAULO DE SOUSA COSTA

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

Araraquara, 05 de agosto de 2016.

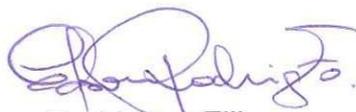
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva
Instituto de Química - UNESP – Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araujo
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



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

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

Nome: Luis Paulo de Sousa Costa

Filiação: João Barroso Costa e Raimunda Sotero de Sousa Costa

Nascimento: 25/08/1991 – Teresina-PI-Brasil

Endereço profissional

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

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara -
Universidade

Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP, Araraquara - SP.

Endereço eletrônico: luispaulo604@hotmail.com

Formação acadêmica

2009-2014

Graduação: Licenciatura Plena em Química

Instituição: Universidade Federal do Piauí – UFPI – Teresina- PI

2014-2016

Mestrado: Química, Área de Concentração - Química Orgânica

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”- UNESP- Instituto
de Química de Araraquara- SP.

Dissertação: Bioprospecção de fungos endofíticos da alga vermelha *Pyropia spiralis*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siquiera Silva

Bolsa: CAPES

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos

- A) New macrolides from marine red algae *Pyropia spiralis* endophytic fungus. In:
5th Brazilian Conference on Natural Products and the XXXI Meeting on
Micromolecular, Evolution, Systematic and Ecology (RESEM) (26 a 29 de
outubro de 2015 - Atibaia - SP)

Participação em eventos científicos

- a) 5th Brazilian Conference on Natural Products and the XXXI Meeting on
Micromolecular, Evolution, Systematic and Ecology (RESEM) (26 a 29 de
outubro de 2015 - Atibaia - SP).

AGRADECIMENTOS

A UNESP e ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química-
Araraquara, pela possibilidade do desenvolvimento deste trabalho.

A prof. Dra. Dulce Helena S. Silva pela orientação, dedicação, compreensão, ,
muito obrigada pela confiança, sabedoria e apoio.

Aos alunos do nosso grupo: Erika, Rebeca, Alana, Leonardo e aos ex- alunos;
Camila, Teresinha, Neirilson e Airton.

A prof. Dra. Angela Regina e ao prof. Dr. Alberto Cavalheiro que participaram do
exame de qualificação, e contribuíram para a finalização deste trabalho.

Aos professores membros da banca prof. Dra. Angela Regina e prof. Edson
Rodrigues, que gentilmente aceitaram o convite para
avaliação desta dissertação.

Aos professores do departamento de Química Orgânica em especial ao NuBBE por
seus ensinamentos

A todos os funcionários do IQ da Unesp.

Ao querido Nivaldo Boralle pela realização dos espectros de RMN, por estar sempre
disposto a compartilhar os seus conhecimentos.

Ao técnico Marquinhos, por ser tão prestativo. Aos técnicos João e Juliana que
sempre nos ajuda.

A prof. Dr. Maria Cláudia M. Young, Prof^a. Dr^a. Carmen Lúcia Cardoso e ao prof. Dr.
Paulo Michel P. Ferreira pela realização dos ensaios biológicos.

À CAPES pela bolsa concedida e ao Instituto de Química pelo apoio e estrutura.

DEDICATORIA

A **DEUS** por me conceder essa grande vitória,
por sua presença e benção em minha vida.

A minha **Mãezinha** Raimunda Sotero, que hoje está no céu
Pois sei que seus ensinamentos, amor incondicional e carinho irão se perpetuar
por toda minha vida e por ser meu maior exemplo e espelho
na minha vida.

A **Meu Pai** João Barroso, que tanto luta e batalha para dar o seu melhor
por ser um homem integro.

A **Minha Irmã** Ana Beatriz, por todo seu amor,
carinho, atenção e apoio.

Aos **Meus Irmãos**, João Henrique e Well Fernandes por todo
incentivo, apoio e amor

A toda **Minha Família** por acreditarem e me ajudaram a realizar
esse tão querido sonho.

As **Minhas Avós** Maria Sotero e Teresinha Barroso, por sempre me ajudarem,
por suas doces palavras e abraços.

Aos **Meus Amigos** de Teresina, por toda amizade e confiança

Aos **Meus Amigos** do Piauí (nossa colônia) que estiveram junto
durante esse tempo longe de nossa querida terra, amigos que certos momentos eram
também minha família
pelo total apoio em todos os momentos.

Aos **Amigos** que aqui em Araraquara conquistei, do laboratório e UNESP pelos
momentos que compartilhamos das reuniões com muita animação e alegria.

em especial aos que convivi na **Rep. Lira** Vitor, João e Thulio.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a concretização
deste trabalho. **MUITO OBRIGADO !!!**

RESUMO

Este trabalho consistiu no estudo dos micro-organismos *Sarocladium strictum* (Ps-02) e *Coniothyrium* sp. (Ps-03) associados à macroalga vermelha *Pyropia spiralis*, coletada no litoral paulista. Os extratos foram obtidos em diferentes meios de cultivos: arroz, malte e Czapek, e induziram produção metabólica diversificada, conforme apontado pelas análises por CLAE-DAD e RMN de ^1H , evidenciando que o perfil metabólico é dependente do meio de cultivo para estas linhagens. Os extratos e frações de *Sarocladium strictum* e *Coniothyrium* sp. foram avaliados em ensaios para atividade antifúngica, anticolinesterásica e citotóxica e apresentaram uma ou mais potenciais atividades. A fração Ps-03 A-ACN de *Coniothyrium* sp. apresentou atividade antifúngica e citotóxica, e foi selecionada para fracionamento por cromatografia em coluna sob pressão em modo reverso (C18) com eluição em gradiente $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$. A purificação das frações por CLAE-DAD ou cromatografia flash em modo normal levou ao isolamento de uma dicetopiperazina, policetídeos e esteroides, que tiveram suas estruturas determinadas por análises na região do UV, RMN 1D e 2D, e por espectrometria de massas. Os policetídeos isolados neste estudo incluem três macrolídeos aromáticos (**1** – **3**): a (3*R*,5*R*)-sonnerlactona e dois análogos à sonnerlactona, sendo um inédito na literatura e outro, inédito como produto natural; o butenolídeo aromático gymnoascolídeo A (**4**), e a tetralona antiviral 10-norparvulenona (**7**). Foram também obtidos os esteroides ergosterol-5,8-endoperóxido- $\Delta^{6,22}$ (**5**) e 22*E*-ergosta-7,22-dieno-3 β ,5,6-triol (**6**), estruturalmente relacionados, provavelmente por rearranjo que inclui a abertura do anel endoperóxido e deslocamento da ligação dupla. A substância **8** uma dicetopiperazina: formada por unidades do aminoácido fenilalanina, e outra, do aminoácido treonina. Estes resultados confirmam a expressiva quimiodiversidade de fungos endofíticos de origem marinha, e seu potencial de bioatividade relevante, abrindo perspectivas atrativas para estudos de bioprospecção neste nicho ecológico

Palavras-chave: fungo endofítico. Alga marinha. Metabólitos. Fungos marinhos. Micro-organismo

ABSTRACT

This work dealt with the study of fungal strains *Sarocladium strictum* (Ps-02) e *Coniothyrium* sp. (Ps-03) associated to the red macroalga *Pyropia spiralis*, collected at SP State shore. Their extracts were obtained in different culture media: rice, malt and Czapek, which induced diversified metabolic production, as shown by HPLC-DAD and NMR analyses and evidenced that the metabolic profile depends on culture media for these strains. Extracts and fractions from *Sarocladium strictum* and *Coniothyrium* sp. were evaluated in antifungal, anticholinesterasic and cytotoxic assays and presented one or more potential bioactivities. Fraction Ps-03 A-ACN from *Coniothyrium* sp. showed antifungal and cytotoxic activities, and was selected for reversed phase column chromatography under positive pressure and gradient elution with H₂O:MeOH. Fractions purification by HPLC-DAD or normal phase column chromatography led to the isolation of one diketopiperazine, polyketides and steroids, which had their structural elucidation by UV, 1D and 2D NMR, and MS analyses. The polyketides isolated in this study include three aromatic macrolides (**1** – **3**): (3*R*,5*R*)-sonnerlactone and two sonnerlactone analogues: one novel compound and one novel as a natural product; the aromatic butenolide gymnoascolide A (**4**), and the antiviral tetralone 10-norparvulenone (**7**). Two steroids: ergosterol-5,8-endoperoxido- $\Delta^{6,22}$ (**5**) and 22*E*-ergosta-7,22-dieno-3 β ,5,6-triol (**6**) were also isolated. They are structurally related, probably due to rearrangement, which includes opening of the endoperoxide ring and double bond shift. Compound **8** is a diketopiperazine, that results from one unit phenylalanine and one of threonine. Such results confirm the strong chemodiversity of marine-derived endophytic fungi and their relevant bioactivity potential, which represents an open and attractive path towards deeper bioprospection studies on such ecological niche.

Keywords endophytic fungi, marine alga, metabolites, marine fungi, microorganisms

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 0.1- Cultivo das linhagens Ps-02 e Ps-03, e obtenção dos extratos brutos em diferentes meios líquidos.....	33
Fluxograma 0.2- Cultivo das linhagens Ps-02 e Ps-03, e obtenção dos extratos brutos em meio sólido.....	34

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1. Catálise da acetilticolina e reação de Ellman	42
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cromatograma da F-5 por CLAE usando coluna RP18 e gradiente H ₂ O:MeOH (95:05) por 40 min e detecção em 254 nm	37
Figura 2. Cromatograma da análise de F-3 por CLAE usando coluna RP18 e gradiente H ₂ O:ACN 28-65% em 40 min e detecção em 254 nm.....	38
Figura 3. Cromatograma da F-2 por CLAE usando coluna RP18 e gradiente H ₂ O:MeOH (95:05) por 40 min e detecção em 254 nm.	39
Figura 4. Cromatograma ilustrando o decrescimento da atividade enzimática do ICER-AChEe na presença de inibidor padrão a 200 µmol L ⁻¹	43
Figura 5. Cromatogramas via CLAE usando coluna RP18 em gradiente exploratório dos extratos brutos e frações em diferentes meios de cultivo (a) Ps-02 Malte; (b) Ps-02 A-ACN; (c) Ps-02 Czapek; (d) Ps-02 A-Aq.	46
Figura 6. Cromatogramas via CLAE usando coluna RP18 em gradiente exploratório dos extratos brutos e frações em diferentes meios de cultivo (a) P3-02 Malte; (b) Ps-03 Czapek; (c) Ps-03 A-CN; (d) Ps-03 -Aq.....	46
Figura 7. Espectros de RMN de ¹ H de Ps-02 A-Hex (CDCl ₃ , 300 MHz) e Ps-02- A-Aq e Acn, Ps-02 Malte e Czp (DMSO-d ₆ , 300 MHz).....	48
Figura 8. Espectros de RMN de ¹ H de Ps-03 A-Hex (CDCl ₃ , 300 MHz) e Ps-03- A-Aq e Acn, Ps-03 Malte e Czp (DMSO- d ₆ , 300 MHz).....	49
Figura 9. Espectro no Ultravioleta da Substância 1	52
Figura 10. Espectro de RMN ¹ H da Substância 1 (CD ₃ OD, 600 MHz)	53
Figura 11. Espectro de RMN ¹³ C da Substância 1 (CD ₃ OD, 150 MHz).	54
Figura 12. Espectro de RMN DEPT-135° da Substância 1 (CD ₃ OD, 150 MHz).	55
Figura 13. Mapa de correlações de COSY ¹ H- ¹ H da Substância 1 (CD ₃ OD, 600 MHz).	56
Figura 14. Mapa de correlações de HMBC 1H-13C da Substância 1 (600 MHz para ¹ H e 150 MHz para ¹³ C, CD ₃ ODa)	58
Figura 15. Estrutura da Substância 1	59
Figura 16. Espectro no Ultravioleta da Substância 2.....	61
Figura 17. Espectros de RMN de ¹ H das substâncias 1 e 2 (CD ₃ OD, 600 MHz).	62
Figura 18. Espectro DEPT-135° da substância 2 (CD ₃ OD, 150 MHz).....	63
Figura 19. Estrutura da Substância 2.	65

Figura 20. Espectro de RMN de ^1H da Substância 3 (CD_3OD , 600 MHz).	67
Figura 21. Espectro de RMN de DEPT-135 $^\circ$ da substância 3 (CD_3OD , 150 MHz). ..	68
Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3 (CD_3OD , 150 MHz).....	69
Figura 23. Principais correlações de HMBC ^1H - ^{13}C da Substância 3.....	70
Figura 24. Estrutura da Substância 3	71
Figura 25. Espectro no Ultravioleta da Substância 04.....	72
Figura 26. Espectro de RMN de ^1H da Substância 4 (CD_3OD , 600 MHz).	73
Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 4 (CD_3OD , 150 MHz).....	74
Figura 28. Principais correlações de HMBC ^1H - ^{13}C da Substância 4.....	75
Figura 29. Estrutura da Substância 4.....	76
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H da Substância 5 (CD_3OD , 600 MHz).	80
Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 5 (CD_3OD , 150 MHz).....	81
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H da Substância 6 (CDCl_3 , 600 MHz).....	84
Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 6 (CDCl_3 , 150 MHz).....	85
Figura 34. Espectro na região do UV da substância 07.....	87
Figura 35. Espectro de RMN de ^1H da Substância 7 (CD_3OD , 600 MHz).	90
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H da Substância 8 (CD_3OD , 600 MHz).	93
Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 8 (CD_3OD , 150 MHz).....	94
Figura 38. Mapa de correlações de HSQC ^1H - ^{13}C da Substância 8 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3OD^a)	96
Figura 39. Mapa de correlações de COSY ^1H - ^1H da Substância 8 (600 MHz, CD_3OD^a)	97
Figura 40. Mapa de correlações de HMBC ^1H - ^{13}C da Substância 8 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3OD^a).....	98
Figura 41. Substâncias isoladas de <i>Coniothyrium</i> sp	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos aprovados pela FDA para tratamento clínico	18
Tabela 2. Massa (mg) dos extratos brutos e frações em diferentes meios de cultivos para as linhagens de fungos Ps-02 e Ps-03 em escala reduzida.....	34
Tabela 3. Sistemas de eluentes otimizados para os ensaios biológicos em CCD dos extratos brutos e frações em diferentes meios de cultivos para os fungos Ps-02 e Ps-03 em escala reduzida.....	35
Tabela 4. Atividade antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos e frações dos fungos endofíticos e seus Rf.	50
Tabela 5. Atividade citotóxica dos extratos brutos e frações	51
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância 1 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3ODa)	60
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância 2 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3ODa)	64
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de substância 3 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3ODa)	71
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância 4 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3ODa)	77
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância 5 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3ODa).....	79
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância 6 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , (CD_3OD^a)	86
Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância 7 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3OD^a).....	89
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância 8 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3OD^a).....	92

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Organismos marinhos.....	16
1.2 Fungos marinhos e sua quimiodiversidade	19
1.3 Gênero <i>Coniothyrium</i>	23
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Materiais.....	29
3.1.1 Macroalga e micro-organismos associados	29
3.1.2 Solventes e equipamentos gerais	29
3.1.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	29
3.1.4 Cromatografia em coluna	30
3.1.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).....	30
3.1.6 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.....	30
3.1.7 Espectrometria de Massas	31
3.1.8 Cultivo dos fungos endofíticos:.....	31
3.2 Métodos	31
3.2.1 Obtenção das cepas fúngicas	31
3.2.2 Obtenção dos extratos.....	32
3.2.3 Fracionamento da Fração Acetonitrila de Ps-03 A-ACN (escala reduzida).....	35
3.2.4 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos e frações.	39
3.2.5 Identificação das cepas fúngicas.....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Avaliação do perfil químico dos extratos brutos e frações obtidos em diferentes meios de cultivos (escala reduzida) dos fungos Ps-02 e Ps-03.....	45
4.2 Perfil Cromatográfico dos extratos brutos e frações (escala reduzida) em CLAE-DAD	45
4.3 Perfil químico dos extratos brutos e frações (peq. escala) em RMN de ¹ H.	47
4.4 Avaliação das atividades antifúngica e anticolinesterásica.....	50
4.5 Atividade citotóxica	51
4.6 Identificação e Elucidação estrutural das substâncias produzidas pelo endófito (Ps-03) <i>Coniothyrium</i> sp.	51
4.6.1 Determinação estrutural da substância 1	51
4.6.2 Determinação estrutural da substância 2	60
4.6.3 Determinação estrutural da substância 3	65

4.6.4	Determinação estrutural da substância 4	72
4.6.5	Determinação estrutural da substância 5	77
4.6.6	Determinação estrutural da substância 6	82
4.6.7	Determinação estrutural da substância 7	87
4.6.8	Determinação estrutural da substância 8	91
5.	CONCLUSÕES	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 Organismos marinhos

Os oceanos ocupam cerca de 3/4 da superfície da Terra, são habitados por espécies de animais, plantas, esponjas, octocorais, ascídeas e briozoários, além de enorme quantidade de micro-organismos. As pesquisas com produtos naturais marinhos tiveram impulso acentuado na década de 50 com advento de grande investimento da indústria farmacêutica, além da popularização e desenvolvimento de técnicas de mergulho em maiores profundidades. Entretanto, estudos com micro e organismos marinhos vêm se desenvolvendo de maneira crescente a partir da década de 90, já que podem viver em condições adversas em ecossistemas extremos como em regiões polares e profundezas dos oceanos suportando altas pressões, em que a evolução e sobrevivência dessas espécies estimulam a compreensão do rico habitat marinho (PINTO et al., 2002; SCOPEL, 2012).

Com o isolamento dos nucleosídeos antivirais espongouridina (I) e espongotimida (II) da esponja *Cryptotethya crypta* foi possível, somente após 15 anos, obter seus derivados sintéticos: citarabina (III) (Ara-C), utilizado no tratamento câncer e vidarabina (IV) (Ara-A), um antiviral. Outros exemplos de substâncias que foram aprovadas para uso clínico pela FDA (Food and Drug Administration) incluem o ziconotídeo, derivado do peptídeo ω -conotoxina (V), que foi isolado do molusco *Conus magnus* e é constituído por 25 aminoácidos, para uso no tratamento de dores crônicas, e que confirma ser viável e muito atrativo o uso de substâncias oriundas de organismos marinhos no desenvolvimento de novos fármacos. Foram relatados 2600 novos compostos oriundos de fontes marinhas entre os anos de 1963 e 2014 (BLUNT et al., 2015; BLUNT et al., 2016), sendo que só no ano de 2014 foram descritos 1378 compostos (BLUNT et al., 2016), o que mostra o intenso crescimento no interesse em compostos de origem marinha, em especial nos últimos 5 anos

Este cenário é decorrente de importantes descobertas relacionadas com o estabelecimento do potencial de bioatividade de produtos naturais de fontes marinhas que resultaram no desenvolvimento de agentes terapêuticos, além dos já citados, como o mesilato de eribulina, obtido a partir do macrolídeo citostático halicondrina B, isolado a partir da esponja marinha *Halinchodria okadae*. O mesilato de eribulina, Halaven® foi aprovado pelo FDA em 2010 para tratamento de

pacientes com câncer de mama metastático (DYBDAL-HARGREAVES et al., 2015; COSTA-LOTUFO et al., 2009)

Outro agente terapêutico, a trabectedina, é um alcaloide tetraidroisoquinolínico, isolado do tunicato marinho *Ecteinascidia turbinata*, encontrado nos mares das Caraíbas. Atualmente encontra-se aprovado pela Comissão Européia para tratamento de sarcomas de tecidos moles. A trabectedina é obtida por síntese química a partir da cianosafracina B, oriunda da cultura da bactéria *Pseudomonas fluorescens* (COSTA-LOTUFO et al., 2009; BEESOO et al., 2014).

Merece destaque também, o Brentuximab vendotin, um derivado sintético da dolastatina 10, um peptídeo citostático natural, que contém em sua estrutura várias unidades de aminoácidos, e foi isolado a partir do molusco marinho *Dolabella auricularia*. A dolastatina 10 foi relatada pela primeira vez em 1987 por Pettit et al., (1987) e estudos posteriores evidenciaram que a dolastatina é produzida pela cianobactéria *Symploca* sp., que são consumidas pelo molusco como alimento (PETTIT et al., 2001).

Além destes, estudos recentes demonstram a importância de ácidos ômega-3 na dieta, como forma de proteção ao sistema nervoso central, bem como por suas propriedades, que auxiliam no combate de patologias como o câncer, asma, diabetes, hipertensão arterial, distúrbios neurológicos e doenças cardiovasculares. Estas descobertas contribuíram para a aprovação do éster etílico de ácidos ômega-3 como agente terapêutico para tratamento de hipertrigliceridemia (VAZ et al., 2014)

Atualmente existem 07 compostos de origem marinha aprovados pela FDA (**Tabela 01**) com atividade antitumoral, anti-inflamatória, antiviral ou anti-hipertrigliceridemia, utilizados no tratamento clínico.

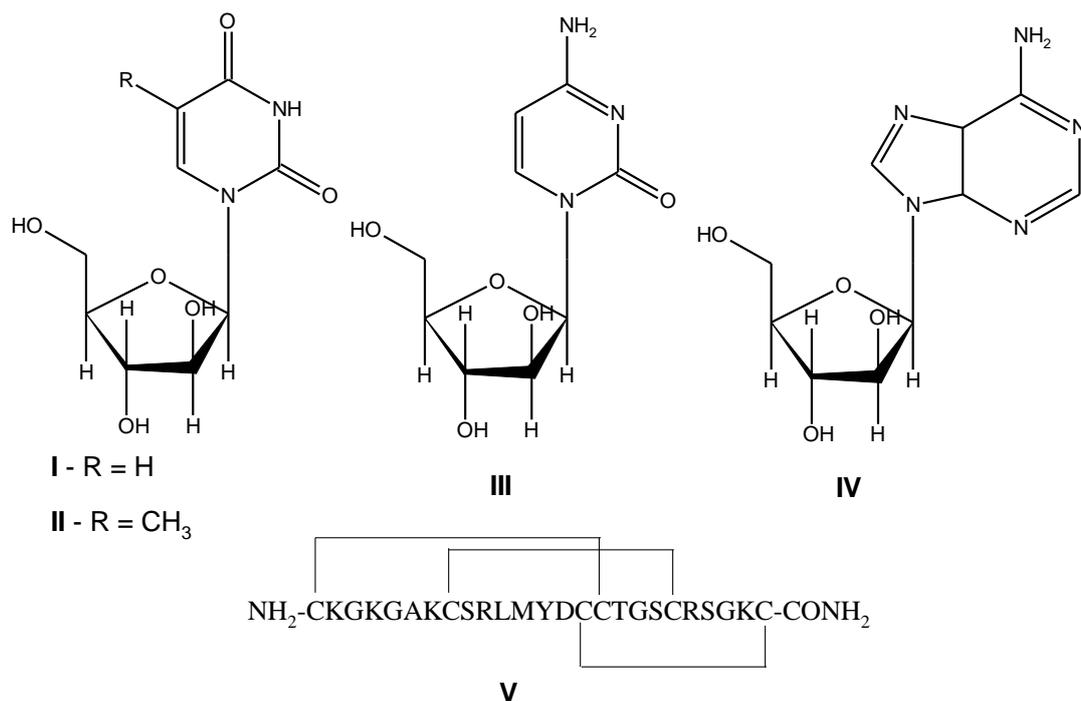


Tabela 1. Compostos aprovados pela FDA para tratamento clínico

Ano de aprovação	Composto	Organismo marinho	Uso
1969	Citarabina (Ara-c)	Esponja	Câncer: Leucemia
1976	Vidarabina (Ara-A)	Esponja	Antiviral
2004	Ziconotídeo	Caracol (molusco)	Dor crônica
2010	Mesilato de Eribulina	Esponja	Câncer de mama
2004	Omega-3-ácido-etil ésteres	Peixe	Hipertrigliceridemia
2015	Trabectedina (ET-743)	Tunicato	Câncer de ovário e sarcoma
2011	Brentuximab vedotina (SGN-35)	Molusco	Câncer linfomas

Fonte: <<http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinPipeline.htm>>

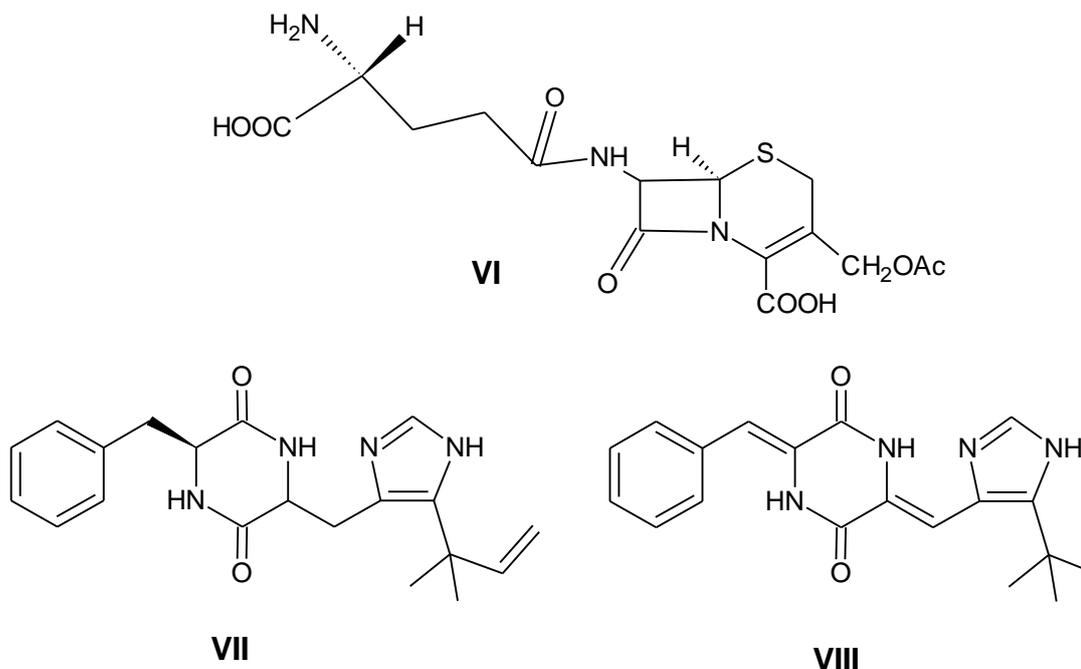
1.2 Fungos marinhos e sua quimiodiversidade

Fungos marinhos podem ser classificados em dois grupos: obrigatórios e facultativos. Fungos marinhos obrigatórios são aqueles que crescem e esporulam exclusivamente em ambiente marinho ou estuário, enquanto os facultativos podem viver em água doce ou ambiente terrestre e são capazes de crescer e esporular no ambiente marinho (KOHLMEYER & KOHLMEYER, 1979). Até 2010 foram listadas 530 espécies de fungos obtidos do ambiente marinho distribuídos em 03 filos e 321 gêneros, grande parte pertencente ao filo Ascomycota, com 424 espécies (pertencentes a 251 gêneros), 94 espécies anamórficas (pertencentes a 61 gêneros) e apenas 12 espécies inseridas em Basidiomycota (distribuídas em 09 gêneros) (EBEL e RATEB, 2011). Estes podem estar presentes de forma independente ou associados a diversos nichos como plantas marinhas, incluindo algas, ervas marinhas e plantas de mangue, bem como em invertebrados marinhos, principalmente em esponjas, corais, acídias e crustáceos, e ainda, em vertebrados (peixes) ou, matéria inorgânica (solos e sedimentos) (WIESE et al., 2011).

Os micro-organismos marinhos são capazes de produzir uma grande diversidade metabólica em função das condições de crescimento incluindo diversos parâmetros como fonte de nutrientes, temperatura e tempo de cultivo, tipo de água (mar e ultrapura), dentre outros, produzindo grande variedade de produtos naturais como policetídeos, terpenoides, alcaloides, peptídeos, além de metabólitos de biossíntese mista. Muitos destes têm mostrado também enorme diversidade de substâncias bioativas, sendo muitas pertencentes a classes químicas novas e sendo ainda não encontradas em fontes terrestres. A importância destes micro-organismos, produtores de substâncias bioativas, é evidenciada pelo grande número de novos compostos isolados. De acordo com Blunt e colaboradores (2016), 540 novos compostos de micro-organismos de origem marinha foram relatados entre 2013 e 2014, sendo que a fonte predominante de diversidade de fungos são as algas, seguidas por esponjas e espécies do habitat de mangues (EBEL e RATEB, 2011).

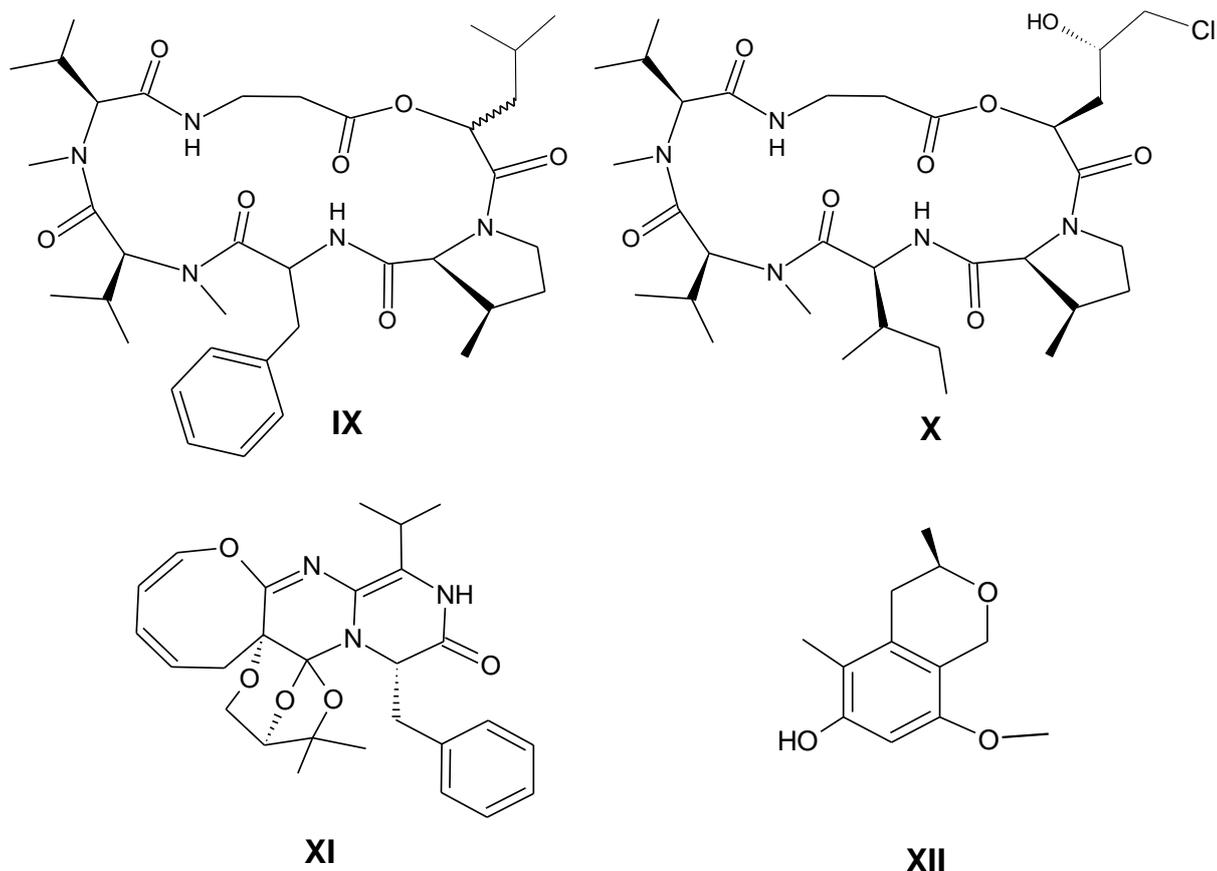
Desde o primeiro metabólito bioativo isolado do fungo *Cephalosporium* sp. obtido de água do mar, o antibiótico cefalosporina C (VI), em 1951 (BURTON e ABRAHAM, 1951), os fungos marinhos têm se revelado uma fonte atrativa para a descoberta de novas substâncias e agente antivirais, antibacterianos, antiplasmódicos, anti-inflamatórios e anticancerígenos (DUARTE et al., 2012).

Sendo as algas detentoras da maior diversidade de micro-organismos, muitos estudos têm focalizado em algas de diferentes filós (Rhodophyta, Chlorophyta, Phaeophyta) na busca por linhagens fúngicas associadas para investigação químico-biológica. O estudo do fungo *Aspergillus sp.*, isolado da alga verde *Halimeda copiosa*, levou ao isolamento da dicetopiperazina halimida (**VII**), que apresentou potente atividade citotóxica contra células de carcinoma de ovário e cólon. Para a obtenção de análogos visando à otimização da bioatividade, foram planejadas modificações estruturais que forneceram a plinabulina (**VIII**), atualmente em fase III de testes clínicos para o desenvolvimento de agente terapêutico antitumoral (Clinical Trials, 2015).



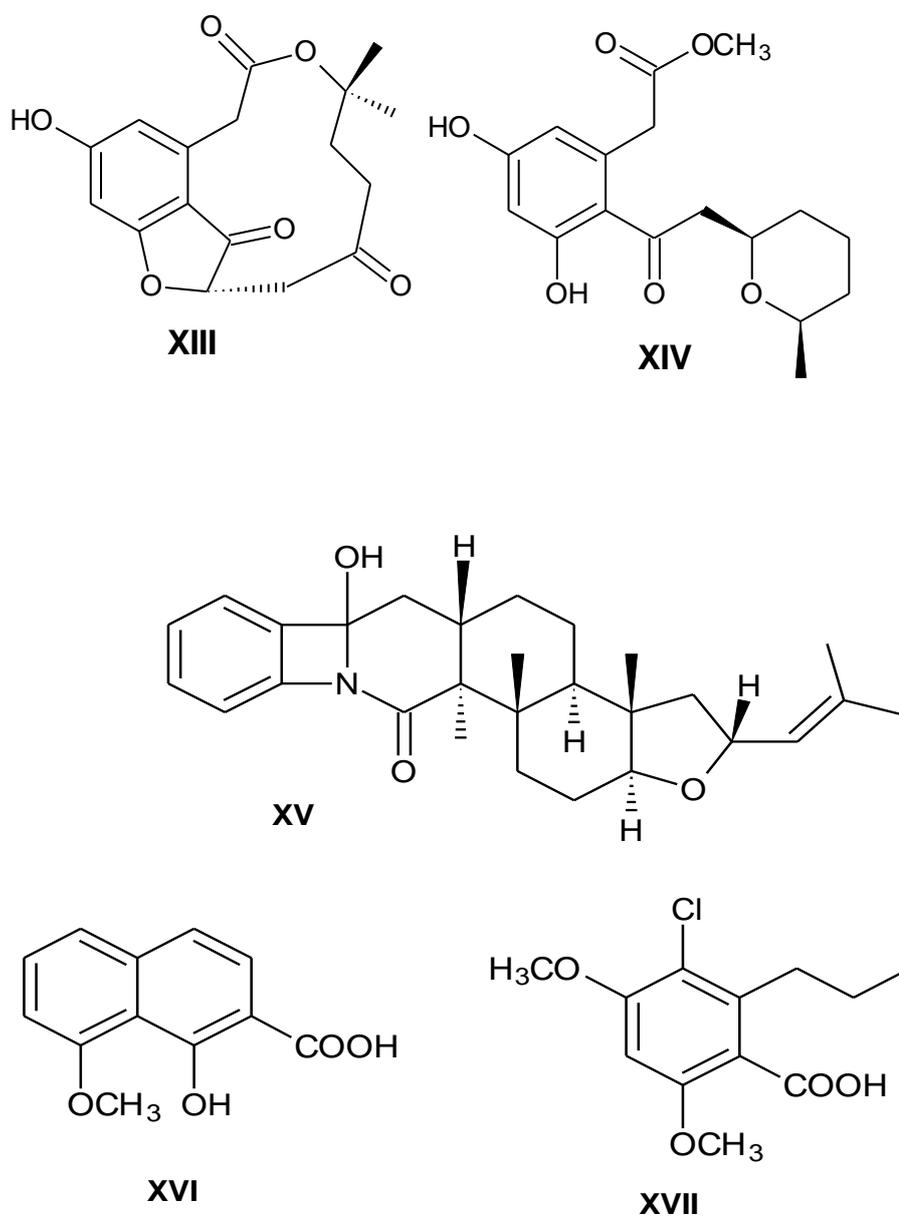
Outros exemplos da diversidade estrutural dos metabólitos produzidos por fungos são apresentados no estudo realizado por Vita-Marques e colaboradores (2008), que investigaram o fungo *Beauveria felina* associado à alga *Caulerpa sp.* Este estudo levou ao isolamento de dois novos derivados do ciclodepsipeptídeo destruxina, que apresentou potencial inseticida e também foram isoladas do fungo de solo *Metarhizium anisopliae*. Estes derivados, a pseudodestruixina C (**IX**) e destruxina E β-Me-Pro chlorohydrin (**X**) apresentaram potencial acaricida (MORAIS-URANO et al., 2012).

Zhang e colaboradores (2014) isolaram do fungo *Paecilomyces variotii* da alga vermelha *Grateloupia turuturu* um novo alcaloide, varioxepine A (**XI**), com atividade contra fungo patogênico *Fusarium graminearum*. Da cultura do fungo *Penicillium steckii* isolado da alga do gênero *Sargassum* identificou-se o (S)-8-metoxi-3,5-dimetilisochroman-6-ol (**XII**) com atividade antimicrobiana (KOSSUGA et al., 2011).

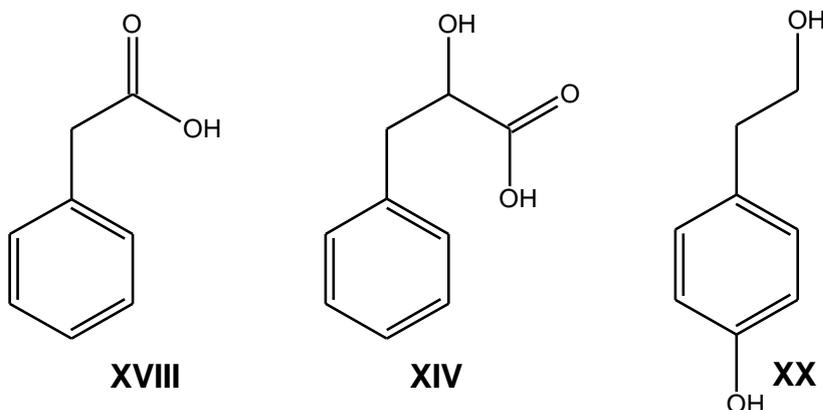


Os endófitos isolados de algas vermelhas (Rodofíceas) apresentam em geral substâncias com estruturas químicas interessantes e potencial biológico. Dentre estas, destacam-se os macrolídeos **XIII** e **XIV**, do tipo curvularina, isolados de *Curvularia* sp., que apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana, bem como um novo derivado indoloditerpênico (**XV**) isolado do fungo *Aspergillus oryzae*, que foi obtido da alga vermelha *Heterosiphonia japonica*. Outros exemplos incluem policetídeos como o 2-carboxi-8-metoxi-naftalenol (**XVI**), que apresentou atividade

citotóxica e contra o fitopatógono *Cladosporium cucumerinum* e foi obtido da cultura do fungo associado à alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*, e ainda, o acremonisol A (**XVII**), um policetídeo aromático isolado do fungo *Acremonium* sp. associado à alga *Plocamium* sp. (DAI et al, 2010; QUIAO et al, 2010; PONTIUS et al, 2008; TARMAN et al, 2011), que evidenciam a quimiodiversidade marcante apresentada por fungos associados a algas vermelhas.



A partir da cultura do fungo *Cladosporium* sp., associado a alga *Pyropia yezoensis*, Ding et al. (2008) isolaram o ácido fenil-acético (**XVIII**), L-β-fenil-lático (**XIX**) e o tirosol (**XX**), que apresentaram forte atividade antimicrobiana.



O desenvolvimento de estudos com fungos endofíticos apresentam diversas vantagens em relação outros organismos, por exemplo, por apresentarem crescimento mais rápido, demandarem menor espaço para cultivo, além de representarem uma fonte renovável de material para as pesquisas e aplicações. Além disso, modificações no tipo de meio de cultivo (fonte de carbono) e/ou condições como temperatura, pH, aeração, dentre outras, podem controlar ou direcionar os processos de produção metabólica de interesse (GLOER, 2007). Estas considerações permitem prever uma ampla gama de investigações visando aplicações biotecnológicas para produtos oriundos ou derivados de fungos endofíticos, com destaque para aqueles associados a organismos marinhos.

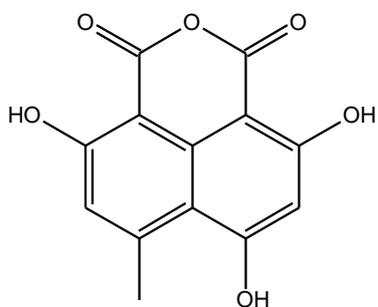
1.3 Gênero *Coniothyrium*

O gênero *Coniothyrium* pertence ao filo *Ascomycota* e família *Leptosphaeriaceae*, possuindo algumas espécies relatadas em ambiente marinho, segundo a base de dados acessada em www.marinespecies.org. Algumas espécies são relatadas como fitopatogênicas, como *Coniothyrium diplodiella*, associado à podridão branca de uvas (ZHANG et al., 2013).

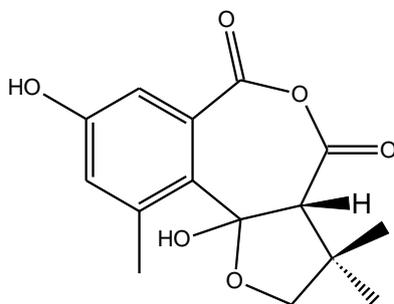
O estudo com o fungo *Coniothyrium cereale*, isolado da alga *Enteromorpha* sp. levou ao isolamento de uma série de derivados de fenalenonas (**XXI**) (ELSEBAI et al., 2011), policetídeos (**XXII**) e alcaloides (**XXIII**) com atividades antimicrobiana, citotóxica (ELSEBAI et al., 2011a, 2011b).

Diversos estudos relatam o isolamento de substâncias bioativas a partir de espécies de *Coniothyrium* obtidas de plantas terrestres. Krohn e colaboradores (2008) estudaram o fungo *Coniothyrium* sp., isolado da *Sideritis chamaedryfoliai*, isolando nitronaftalenos (**XXIV** e **XXV**) com atividade antibacteriana e antifúngica, e inibição do crescimento de algas. De *Carpobrotys edulis*, espécie ornamental conhecida como 'chorao-da-praia', foi isolado o fungo *Coniothyrium* sp., cujos extratos revelaram a presença de massarilactona (**XXVI**), massarigenina E (**XXVII**) e coniothyrenol (**XXVIII**), espirolactonas com potencial antimicrobiano e herbicida (KOCK et al., 2007).

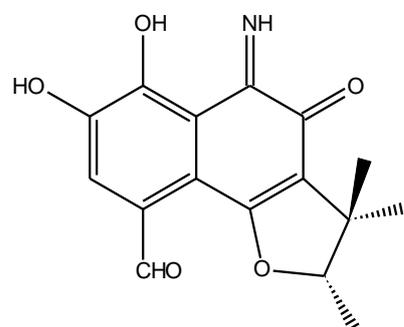
Uma nova classe de antibióticos, as palmarumycinas C₂, C₃ e C₅, apresentou atividades antibacteriana, antifúngica e herbicida, e foi isolada de cultura de *Coniothyrium* sp., obtido de alga marinha. A determinação estrutural da palmarumycinas **XXIX**, **XXX** e **XXXI** foram realizados por análise de raios-X (KROHN et al, 1994). Estudos com linhagens de *Coniothyrium* sp. isoladas de solo revelaram a presença da coniothyriomycina (**XXXII**), uma imida de cadeia aberta, de estrutura relativamente simples, com forte potencial antifúngico. Posteriormente Krohn et al., (1992) realizaram estudos de estrutura e atividade de seus análogos sintéticos.



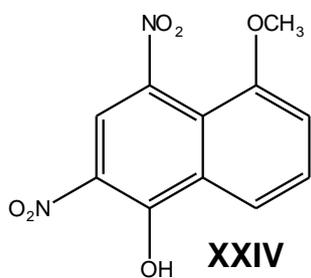
XXI



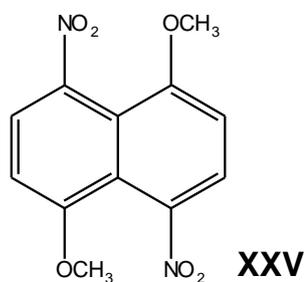
XXII



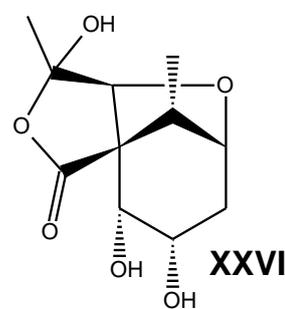
XXIII



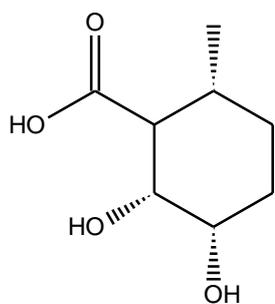
XXIV



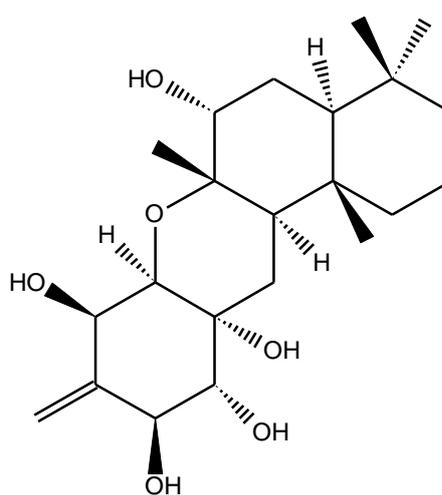
XXV



XXVI



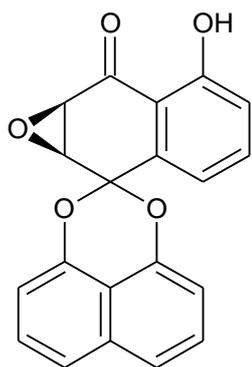
XXVII



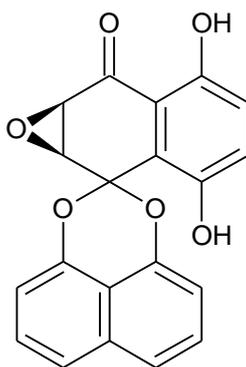
XXVIII

A espécie *Coniothyrium minitans* é considerada um micoparasita (antagonista) que realiza o controle biológico de fitopatógenos como as espécies *Sclerotinia sclerotiorum* e *Sclerotinia cepivorum*, responsáveis por causar o mofo branco em plantas. A cultura de *Coniothyrium minitans* em meio líquido de Czapek forneceu como metabólito majoritário o macrosphelídeo A (**XXXIII**) (McQUILKEN et al, 2003).

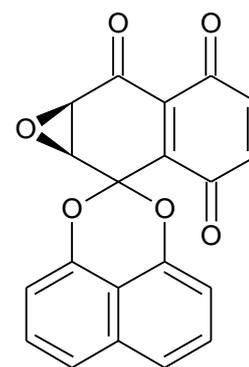
A investigação de linhagem de *Coniothyrium* sp., realizada por HUSSAIN et al., (2014), levou ao isolamento de um novo éter fenoxi-fenílico (**XXXIV**) e outros compostos já conhecidos, como o coniol (**XXXV**) e (+)-epoxydon (**XXXVI**) que apresentaram atividade antibacteriana contra *Bacillus megaterium* e inibidora do crescimento da alga *Chlorella fusca*.



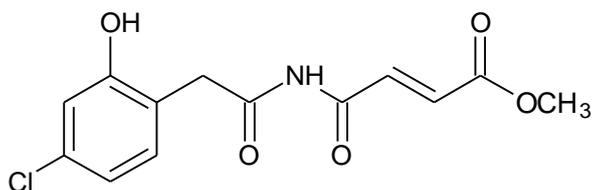
XXIX



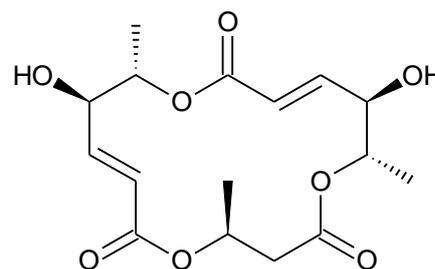
XXX



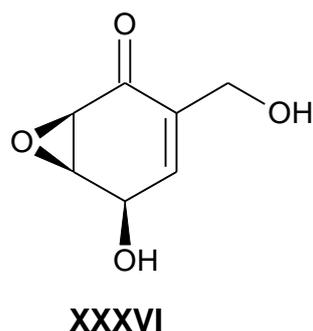
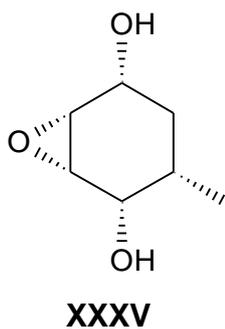
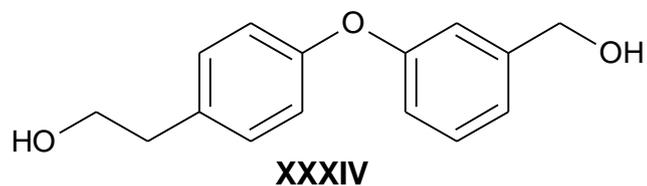
XXXI



XXXII



XXXIII



Para este estudo foram selecionados fungos endofíticos isolados da alga marinha vermelha *Pyropia spiralis*, visando contribuir para o conhecimento da quimiodiversidade de fungos de origem marinha e explorar as potencialidades biológicas e biotecnológicas de organismos oriundos da costa brasileira como fonte de metabólitos biologicamente ativos. O ambiente marinho é ainda subexplorado no Brasil e os esforços direcionados a um maior conhecimento de suas características podem também contribuir para ações que visem à proteção dos frágeis ecossistemas num contexto que privilegie o desenvolvimento sustentável.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral: estudar quimicamente as linhagens de fungos isolados da alga vermelha marinha *Pyropia spiralis* e avaliar seu potencial de bioatividade

Objetivos específicos:

- Classificar os fungos isolados (Ps-02 e Ps-03) obtidos da alga *Pyropia spiralis*.
- Fracionar os extratos e purificar as substâncias presentes nos extratos dos fungos que se mostrarem mais promissores do ponto de vista químico e de bioatividade.
- Avaliar o potencial dos extratos, frações e substâncias puras frente aos diferentes ensaios biológicos; antifúngico, anticolinesterásico e citotóxico.
- Identificar ou elucidar as estruturas químicas das substâncias isoladas através da combinação de métodos espectroscópicos (RMN de ^1H e de ^{13}C , uni e bidimensionais, UV, IV) e espectrométricos (EM, CLAE-EM e CG-EM), conforme suas características estruturais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Macroalga e micro-organismos associados

A macroalga *Pyropia spiralis* (Ps) foi coletada no Litoral do Estado de SP, na praia da Fortaleza, próxima a Ubatuba, para isolamento dos micro-organismos associados. Uma excicata da alga foi identificada pela Dra. Nair Yokoya e depositada no Herbario do Instituto de Botânica (SMA/SP).

As linhagens fúngicas isoladas foram identificadas como *Sarocladium strictum* (Ps-02) e *Coniothyrium* sp. (Ps-03) pela empresa Genotyping (Botucatu/SP).

3.1.2 Solventes e equipamentos gerais

Foram utilizados solventes padrões analíticos (PA) das marcas Synth, Dinâmica, Vetec, Merck, Ecibra: Diclorometano (DCM), clorofórmio, metanol (MeOH), acetato de etila, n-hexano, acetonitrila (MeCN). Estes solventes foram usados para extração, fracionamento e obtenção de perfil por cromatografia em camada delgada (CCD).

Os solventes Deuterados: CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$ e CD_3OD (CIL, Acros ou Sigma-Aldrich) foram utilizados para análises de RMN.

Os extratos e frações foram concentrados em evaporador rotatório da Buchi R-114, sob pressão reduzida com auxílio de bombas de vácuo FABBE; Banho termostático Marconi BTC-9090. Foram ainda utilizados: Autoclave vertical Phoenix Luferco; Câmara de Fluxo laminar vertical da marca Pachane; Balanças Mettler Toledo AG245 e AG204 (analíticas) e Marconi BG2000 (semi-analítica).

3.1.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para as análises por CCD foram utilizadas placas comerciais (marca Whatman) de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV254), 0,20 mm de espessura.

3.1.4 Cromatografia em coluna

As cromatografias em coluna (CC) foram realizadas em colunas de vidro, empregando como fase estacionária sílica modo reverso do tipo octadesil silano (C18), da marca Sorbent Technologies, com porosidade de 60 Å e tamanho de partículas de 40-75 µm (200-400 mesh), sílica para cromatografia flash, fase normal (40-60 µm) (Acros Organics), e ainda Sephadex LH-20 para cromatografia por exclusão. As dimensões das colunas variaram de acordo com a quantidade de material a ser aplicado.

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

As análises por CLAE-DAD foram realizadas em dois equipamentos Shimadzu com detector ultravioleta em arranjo de diodos (DAD):

- Analítico: duas bombas LC-20AT, degaseificador DGU-20A3, comunicadora CBM-20A, injetor automático SIL-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A,
- Analítico e Semipreparativo: duas bombas LC-6AD, comunicadora CBM-20A, injetor automático (modo analítico) SIL-10AF, detector de arranjos de diodos SPD-M20A. O tratamento dos dados foi realizado utilizando o software Shimadzu LC solution (versão 1.23 SP1).

Foram utilizadas colunas C-18 Phenomenex Gemini e Luna (250 x 4.60 mm; 5 µm; 110Å) no modo analítico e coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 10 mm; 5 µm; 110Å) no modo semipreparativo.

3.1.6 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram realizados em dois espectrômetros, Bruker Fourier 300 com campo magnético de 7,0 T e Bruker Ascend III 600 com campo magnético de 14,1 T. Além dos solventes deuterados especificados acima, TMS foi utilizado como referência interna.

3.1.7 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro de massas modelo UltrOTOFG (ESI-TOF Mass Spectrometer, Bruker Daltonics), operando no modo positivo ou negativo.

Condições do Experimento: Bomba de infusão.

Fluxo 250 μ L/h.

Fase móvel para a solubilização: CH₃OH 100% ou CHCl₃ 100%.

Modo de detecção: positivo e negativo para as amostras.

3.1.8 Cultivo dos fungos endofíticos:

- Meios de cultivo:

- BDA (Acumedia): Batata Dextrose Ágar: 39 g L⁻¹ de água;

- Czapek: Sacarose (30 g.L⁻¹), NaNO₃ (3,0 g.L⁻¹), Na₂(PO₄)₃ (1,0 g.L⁻¹), MgSO₄ (0,5 g.L⁻¹), KCl (0,5 g.L⁻¹) e FeSO₄ (0,01 g.L⁻¹);

- Malte (extrato de malte) de concentração de 20 g.L⁻¹;

- Arroz comercial.

Os meios líquidos de cultura foram submetidos à esterilização em autoclave (Quimis) a 121°C por 20 minutos e o meio sólido foi esterilizado três vezes a cada 24 horas, a 121°C por 20 minutos.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção das cepas fúngicas

Em junho de 2013 foi realizada a coleta, no costão direito da praia da Fortaleza, Ubatuba - SP, de pequenas quantidades da alga *Pyropia spiralis* (PS) para o isolamento dos fungos endofíticos. Foram escolhidos espécimes saudáveis, que foram lavados cuidadosamente em água do mar e armazenados em frascos contendo água do mar coletada no mesmo local e esterilizada por autoclavagem, e o antibiótico cloranfenicol (200 mg L⁻¹), visando a inibição de proliferação bacteriana.

Estes frascos foram acondicionados em caixas térmicas e transportados ao Instituto de Química de Araraquara-UNESP. Já no laboratório, a alga foi esterilizada superficialmente por imersão em solução de NaOCl 1% por 5 segundos seguida de lavagem com água do mar estéril por 10 minutos. O procedimento de esterilização foi otimizado com base em análises prévias, em que foram testadas variações na concentração de NaOCl e no tempo de imersão. As condições adotadas foram suficientes para a esterilização sem danificar os tecidos da alga ou fungos endofíticos, o que foi confirmado pelo sucesso na obtenção das linhagens fúngicas a partir da alga.

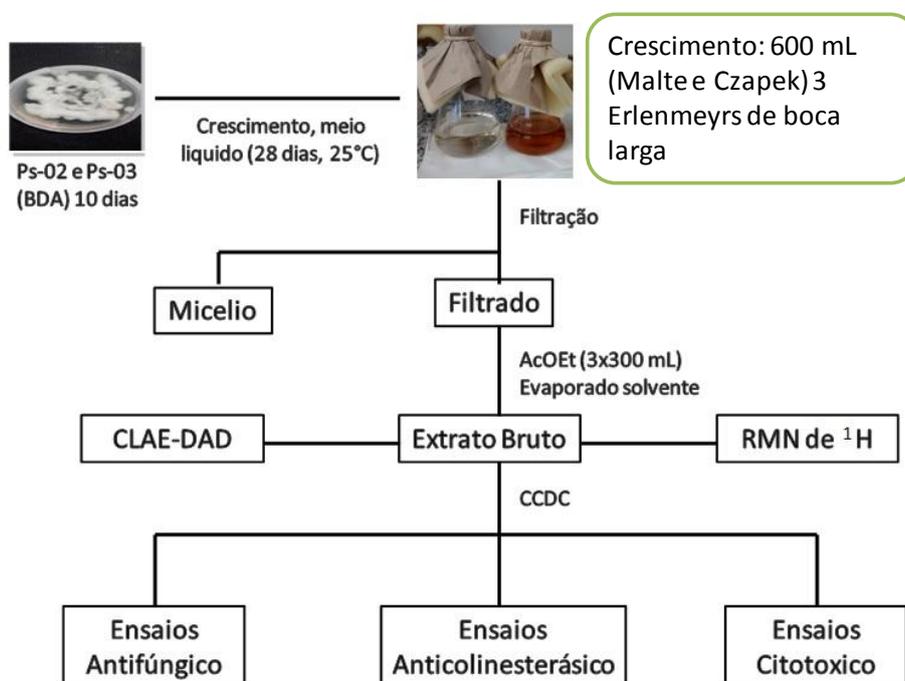
Após o processo de esterilização, a alga foi fragmentada com uso de pinça e bisturis cirúrgicos estéreis e transferida para placas de Petri contendo meio de cultivo de batata-dextrose-ágar (BDA), água do mar ou água MilliQ esterilizadas e o antibiótico cloranfenicol (200 mg L^{-1}). Em cada placa foram colocados 4 fragmentos da alga e para cada método foram usadas 2 placas preparadas com água MilliQ e duas placas com água do mar. Para controle da eficácia do método de esterilização, uma alíquota de água de lavagem foi inoculada em BDA/água MilliQ e BDA/água do mar. O crescimento dos fungos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras, preservadas em “slants” (frascos contendo água do mar ou água MilliQ estéril e o fungo em meio sólido MDA), que foram lacrados e mantidos em temperatura ambiente. A partir da alga PS foram isoladas 3 linhagens (PS-01 – PS-03). Vale ressaltar que a linhagem fúngica PS-01 foi isolada em placas de Petri contendo meio de cultivo preparado com água MilliQ, enquanto as linhagens PS-02 e PS-03 em água do mar.

3.2.2 Obtenção dos extratos

As linhagens fúngicas isoladas denominadas Ps-02 e Ps-03 foram preservadas em “slants” e repicadas em placas de Petri contendo BDA (Batata Dextrose Agar). Após o crescimento (10 dias) fúngico, aproximadamente um terço de micélio de cada placa de Petri foi inoculado em meio líquido de Malte e Czapek, (**Fluxograma 01**) ou em meio sólido de Arroz (**Fluxograma 02**) para obtenção dos extratos em escala reduzida. Paralelamente foi realizado o branco (controle negativo) em todos os meios seguindo a mesma metodologia sem a inoculação dos fungos endofíticos.

Os solventes orgânicos foram eliminados utilizando evaporador rotatório a pressão reduzida, fornecendo os respectivos extratos brutos (**Tabela 02**). Os solventes recuperados foram adequadamente descartados em frascos previamente rotulados e encaminhados à recuperação ou descarte conforme as Normas Gerais de Gerenciamento de Resíduos Químicos no IQ/UNESP presente no site: www.iq.unesp.br/APOIO-TECNICO/normasresiduos.pdf.

Fluxograma 0.1- Cultivo das linhagens Ps-02 e Ps-03, e obtenção dos extratos brutos em diferentes meios líquidos.



Fluxograma 0.2- Cultivo das linhagens Ps-02 e Ps-03, e obtenção dos extratos brutos em meio sólido.

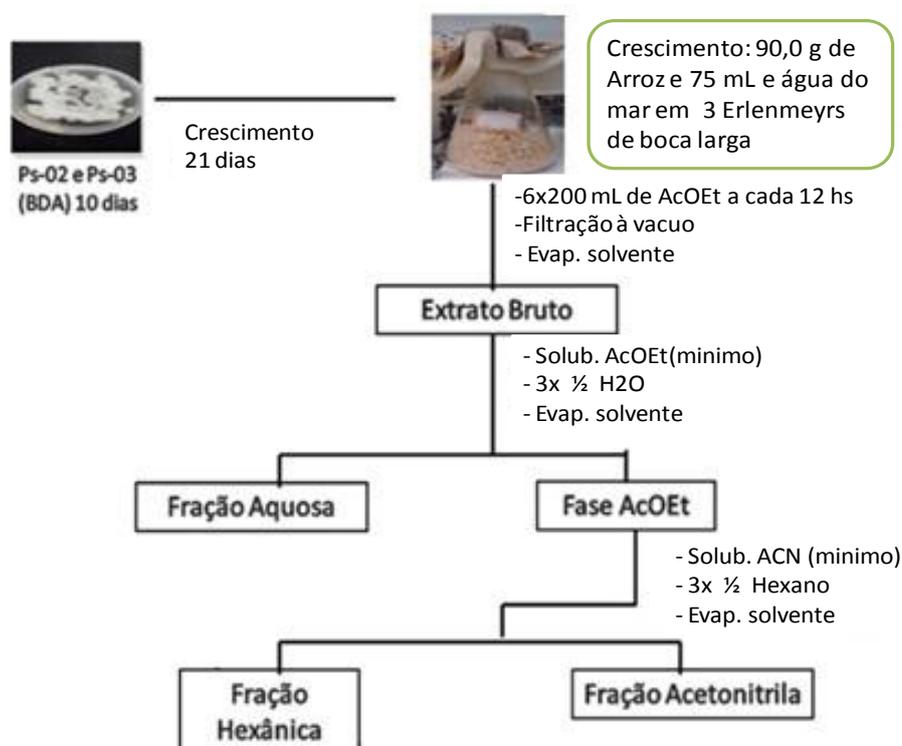


Tabela 2. Massa (mg) dos extratos brutos e frações em diferentes meios de cultivos para as linhagens de fungos Ps-02 e Ps-03 em escala reduzida

Extratos	Ps-02	Ps-03
Czapek	20	110
Malte	71	58
Fração Hexânica	1,233	960
Fração Acetonitrila	570	760
Fração Aquosa	290	631

Os extratos brutos obtidos em meios líquidos e frações no meio sólido em pequena escala foram submetidos aos ensaios biológicos para orientar a escolha das amostras para prosseguimento do estudo. Além disso, foram realizadas análises por RMN de ^1H e CLAE-DAD em gradiente exploratório, a fim de estabelecer o perfil químico das amostras, o que também contribuiu para a seleção daquelas mais promissoras para prosseguimento do estudo, bem como para traçar estratégias de separação por técnicas cromatográficas, incluindo CLAE.

Antes das análises por CLAE-DAD em modo analítico, cada amostra (3,5 mg) foi solubilizada em 1 mL de solução MeOH (95 %) e submetida a procedimento de limpeza utilizando cartucho de sílica C-18 acoplados a membrana Millipore® (0,2 µm). Após este procedimento, as amostras (3,5 mg mL⁻¹) foram armazenadas em frascos para injeção. O sistema utilizado para análise em CLAE-DAD foi coluna analítica Phenomenex Gemini (250 x 4.60 mm; 5 µm; 110Å) tipo octadesil silano (C-18), com injeção de 20,0 µL e eluição em gradiente exploratório H₂O:MeOH (95:05 v/v) à (0:100 v/v) por 40 min., com detecção de λ = 200 nm até 800 nm.

Nas análises por CCD foram testados vários sistemas de eluição (**Tabela 03**) com diferentes solventes, a fim de obter melhor perfil para os extratos. Foram utilizadas placas comerciais (marca Whatman) de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV 254 nm) e 0,20 mm de espessura.

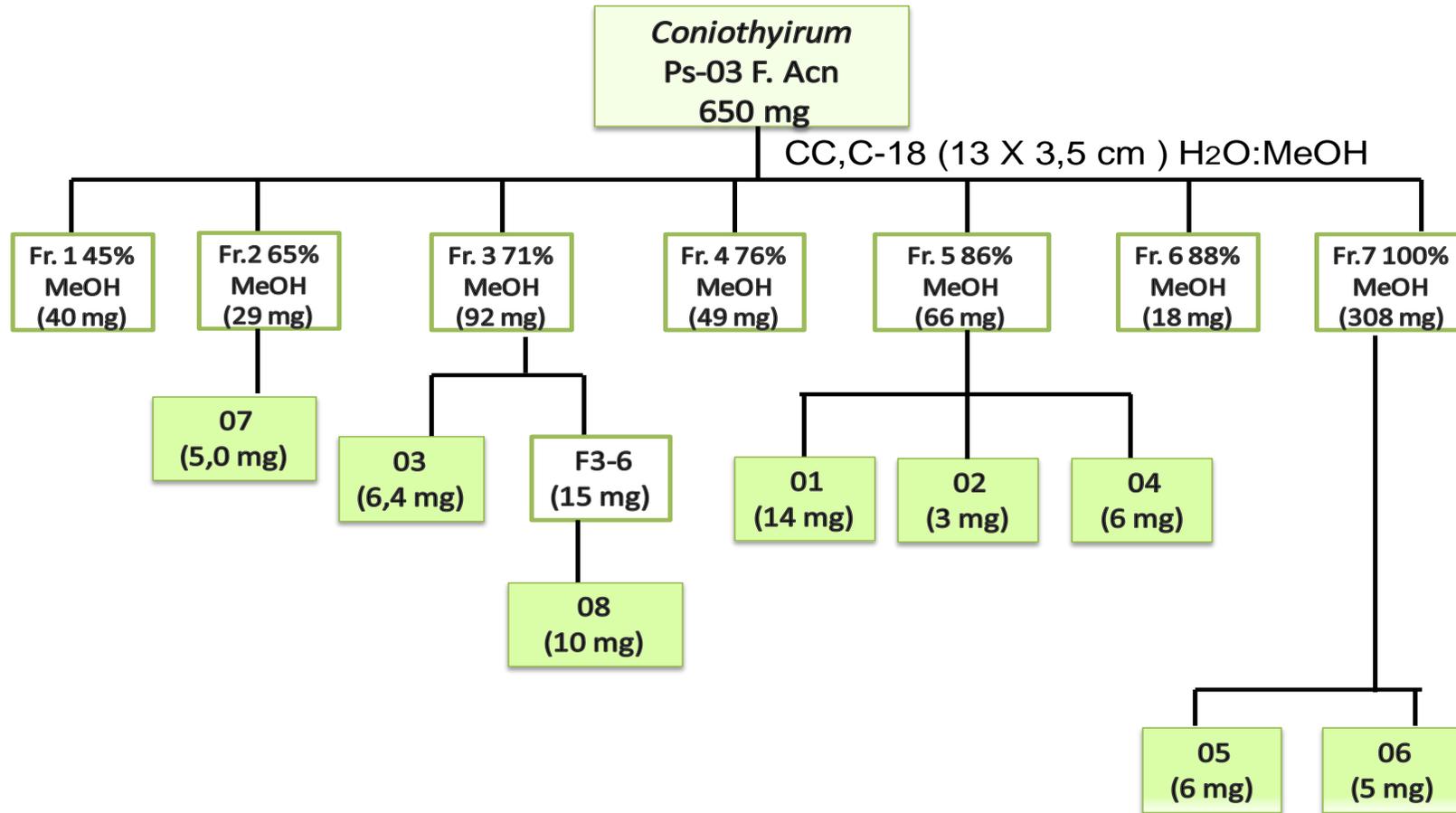
. **Tabela 3.** Sistemas de eluentes otimizados para os ensaios biológicos em CCD dos extratos brutos e frações em diferentes meios de cultivos para os fungos Ps-02 e Ps-03 em escala reduzida.

Extratos	Ps-02	Ps-03
Czapek	CHCl ₃ :MeOH: H ₂ O 65:30:05	CHCl ₃ :MeOH 88:12
Malte	CHCl ₃ :MeOH 8:2	CHCl ₃ :MeOH: H ₂ O 65:30:05
Fração Hexânica	CHCl ₃ :MeOH 9:1	CHCl ₃ :MeOH 9:1
Fração Acetonitrila	CHCl ₃ :MeOH 8:2	CHCl ₃ :MeOH 88:12
Fração Aquosa	CHCl ₃ :MeOH: H ₂ O 65:30:05	CHCl ₃ :MeOH: H ₂ O 65:30:05

3.2.3 Fracionamento da Fração Acetonitrila de Ps-03 A-ACN (escala reduzida)

A análise do cromatograma em CLAE-DAD de Ps-03 A-ACN, permitiu realizar um fracionamento por cromatografia em coluna (13 cm de altura e 3,5 cm de diâmetro) sob pressão, utilizando como fase estacionária sílica modo reverso (C18, 65 g) e como fase móvel o sistema de eluentes em gradiente H₂O:MeOH (**Fluxograma 03**), resultando em 7 frações (60,0 mL cada).

Fluxograma 0.3- Fracionamento da amostra Ps-03 A-ACN de *Coniothyrium* sp.



As frações obtidas foram submetidas a análise por CLAE-DAD nas mesmas condições descritas no item 3.3. Após esta análise, a fração 5 (**Figura 1**) foi submetida à separação por CLAE-DAD semipreparativa, na qual a amostra foi solubilizada e submetida a etapa de limpeza utilizando cartuchos de sílica C-18. Posteriormente, a amostra foi seca e diluída em solução de H₂O:MeOH de mesma polaridade do início da corrida, e com volume necessário para as amostras apresentarem concentração de 20 mg.mL⁻¹. Antes da injeção as amostras foram devidamente filtradas em membranas PTFE (0,22 µm). A coluna utilizada foi C-18 Phenomenex Luna (250 x 10 mm; 5 µm; 110Å) e a eluição em gradiente 65-100% MeOH ocorreu em 30 min com vazão de 3,5 mL.min⁻¹. Este procedimento levou ao isolamento das substâncias **1** (14,0 mg), **2** (3,0 mg) e **4** (4,0 mg).

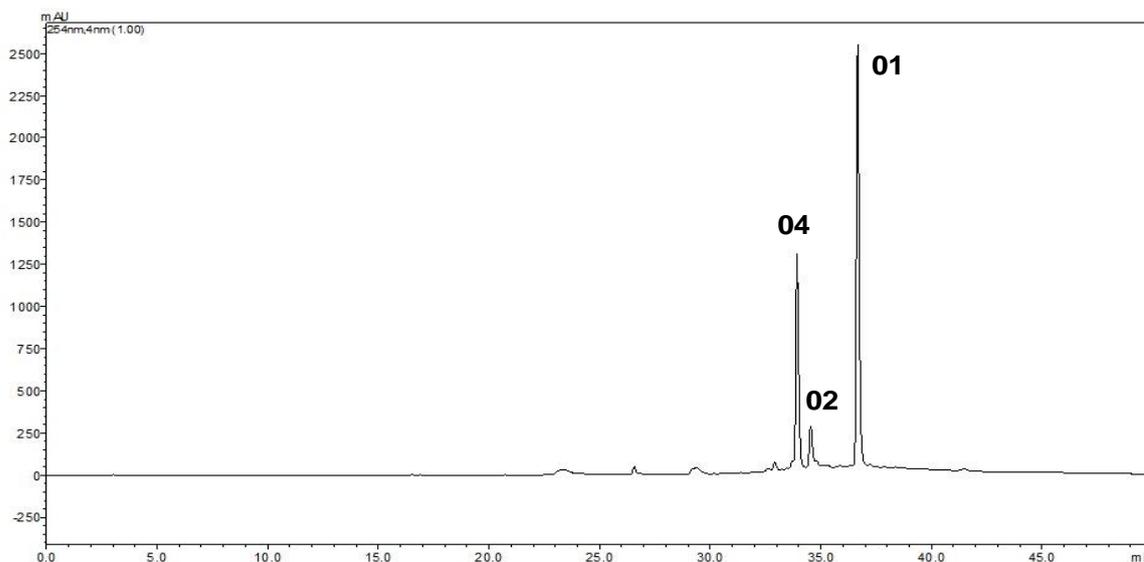


Figura 1. Cromatograma da F-5 por CLAE usando coluna RP18 (analítica) e gradiente H₂O:MeOH (95:05) por 40 min e detecção em 254 nm

A fração 3 (**Figura 2**) também foi submetida a separação por CLAE-DAD semipreparativa, coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 10 mm; 5 µm; 110Å) com eluição em gradiente H₂O:ACN 28-65% em 40 min e vazão de 3,5 mL.min⁻¹, que resultou no isolamento da substância **3** (6,4 mg).

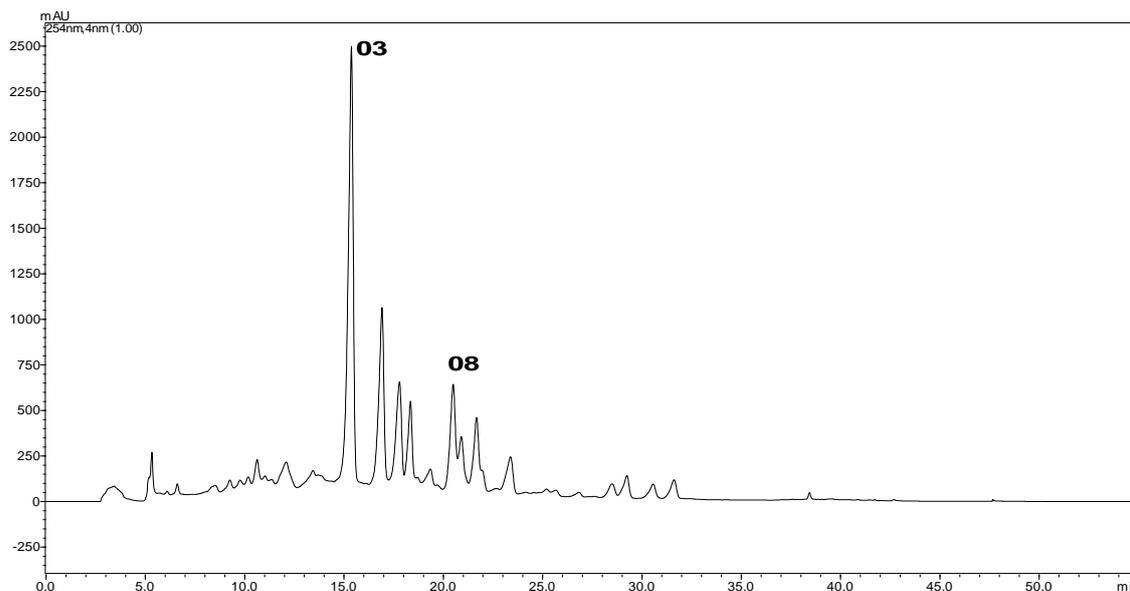


Figura 2. Cromatograma da análise de F-3 por CLAE usando coluna RP18 (analítica) e gradiente H₂O:ACN 28-65% em 40 min e detecção em 254 nm.

Para substância **8**, foi coletado um sinal cromatográfico em 20,50 minutos (**Figura 2**), denominado F3-6 (15,0 mg). Em seguida foi realizado o fracionamento cromatográfico em coluna (30 cm x 2 cm) de sephadex LH-20, utilizando como fase móvel metanol e diclorometano em proporção 1:1. Após análises por CCDC utilizando como eluentes Hex : AcOEt 6:4 após revelar uma mancha amarela, sugerindo pureza suficiente para sua identificação por análise espectrométrica. A análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C permitiu a identificação da substância **8** (10,0 mg).

A fração 7 (0,230 g) foi submetida a fracionamento cromatográfico *flash* em coluna (19cm x 2 cm) de gel de sílica (34,0 g) sobre pressão, utilizando hexano, acetato de etila e metanol em diferentes proporções como fase móvel para eluição em gradiente crescente de polaridade. Após remoção do solvente e análises por CCDC, as frações foram reunidas por similaridade dos fatores de retenção (R_f) e manchas na placa após revelação.

Os grupos denominados F7-16 e F7-32, após análises por CCDC utilizando como eluentes Hex:AcOEt 6:4 e AcOEt:MeOH 75:25, respectivamente, revelou a presença de apenas uma mancha para cada fração, sugerindo pureza suficiente para sua identificação por análise espectrométrica. A análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C permitiram a identificação das substâncias **5** (6,0 mg) e **6** (5,0 mg).

A fração 2 (**Figura 3**) também foi submetida a separação por CLAE-DAD semipreparativa, coluna C-18 Phenomenex Luna (250 x 10 mm; 5 μm ; 110 \AA) com vazão de 4,0 mL.min⁻¹, em gradiente 30-60% H₂O:MeOH em 30 min, que resultou no isolamento da substância **7 (4,0 mg)**.

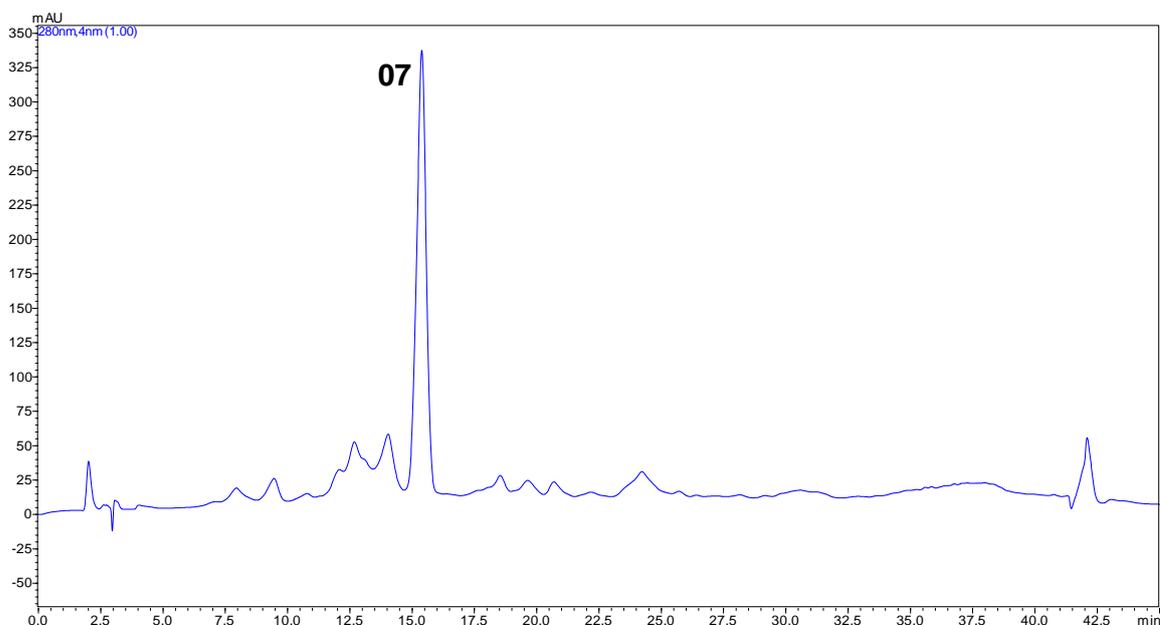


Figura 3. Cromatograma da F-2 por CLAE usando coluna RP18 (analítica) e gradiente H₂O:MeOH (95:05) por 40 min e detecção em 254 nm.

3.2.4 Avaliação das atividades biológicas dos extratos brutos e frações.

3.2.4.1 Avaliação da atividade anticolinesterásica

A atividade anticolinesterásica foi detectada por teste em CCD a partir da eluição dos extratos brutos e frações em concentração de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, utilizando as fases móveis descritas acima (tabela 02). As cromatoplasmas foram nebulizadas com uma solução da enzima acetilcolinesterase, e incubadas em câmara úmida fechada a 37°C por 20 minutos. Após este período foi borrifada uma solução C (contendo 10 mL da solução A e 40 mL da solução B, sendo: Solução A: 250 mg de acetato de 1-naftila em 100 mL de etanol. Solução B: 400 mg do sal Fast Blue B em 160 mL de água destilada). Como padrão positivo foi utilizado o composto fisostigmina (0,05 μg

mL⁻¹) (MARSTON, 2002). Este ensaio foi realizado sob a supervisão da Dr^a. Maria Claudia Marx Young (Instituto de Botânica, SMA/SP).

3.2.4.2 Avaliação da atividade antifúngica

. Os extratos brutos e frações em concentrações de 400 µg mL⁻¹ foram eluídos em CCDC, utilizando fase móvel de acordo com a tabela 02. As cromatoplaças foram nebulizadas com solução de esporos dos fungos fitopatogênicos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* (concentração de 5x10⁷ esporos.mL⁻¹, em solução de glicose e sais) (HOMANS e FUCHS, 1970; RAHALISON, 1994). As placas foram incubadas a 25° C por 48 horas, na ausência de luz. O padrão positivo utilizado para comparação foi a nistatina (1 µg mL⁻¹). Este ensaio foi realizado também sob a supervisão da Dr^a. Maria Claudia Marx Young (Instituto de Botânica, SMA/SP).

3.2.4.3 Avaliação do potencial citotóxico.

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha (LaBBMar, Universidade Federal do Ceará). O ensaio se baseia na medida da absorbância do formazan formado após a metabolização do sal de MTT pelas células tumorais viáveis (MOSMANN, 1983).

Células tumorais de adenocarcinoma de cólon (HCT-116) e mama (MCF-7) cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino foram aplicadas em placas de 96 poços e expostas às amostras por 72 horas. Três horas antes do término do tempo de incubação, o sal de MTT (0,5 mg.mL⁻¹) foi adicionado e a absorbância mensurada a 595 nm. A triagem inicial foi realizada utilizando 2 concentrações das amostras para avaliar a porcentagem de inibição do crescimento da célula tumoral (%GI). Para amostras que demonstraram inibição maior que 75%, o valor de CI₅₀ é calculado por regressão não linear utilizando o GraphPad Prism 4.0 (Intuitive Software for Science).

3.2.4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana.

Foram selecionadas a fração Ps-03 Acn e subfrações F-3, F-5 e F-7 frente aos patógenos humanos *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Escherichia coli* (UBC 8161); *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina - MRSA (ATCC33591); *Bacillus subtilis* (H344) e *Candida albicans* (ATCC 90028).

Foram adicionados inicialmente 5 mL de meio líquido Muller Hinton (MHB - Muller Hinton Broth) em um tubo Falcon de 15 mL juntamente com um repique da placa de ágar Muller Hinton (MHA - Muller Hinton Agar) de cada patógeno. Estes foram incubados a 37°C (ou 30°C para *B. subtilis*) por 18 a 24 horas.

Após o período de incubação, a suspensão celular de cada patógeno foi diluída (usando MHB) para uma concentração final de 1×10^5 células/mL e $2,8 \times 10^5$ células/mL para *C. albicans*. Para verificar a concentração final foi feita a medida de densidade óptica (DO) a 600 nm de cada suspensão, sendo que um valor de DO de 0,0001 equivale a 1×10^5 células/mL.

Em seguida, 5 a 7 mL da suspensão celular de cada patógeno foram distribuídos na superfície de placa de MHA seca, sendo que ao final o excesso de suspensão foi retirado.

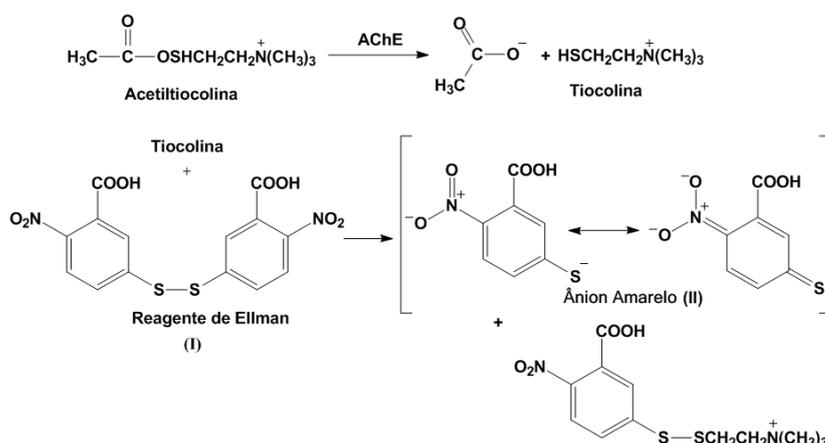
As amostras foram diluídas com metanol a uma concentração de 2 mg/mL e 20 µL de cada amostra foram colocados em um disco estéril (e poço da placa de 96 poços), tendo ao final uma concentração de 40 µg/disco. Após a completa secagem das amostras nos discos, 20 µL de DMSO foi adicionado em cada disco contendo as amostras, bem como em um disco limpo, como controle negativo. Como controle positivo foram utilizados os antibióticos polimixina B (30 µg/disco) para *P. aeruginosa*, *E. coli* e *B. subtilis*, rifamicina (10 µg/disco) para MRSA, e o antifúngico anfotericina B (20 µg/disco) para *C. albicans*.

Os discos contendo amostras, DMSO, antibióticos e/ou antifúngico foram colocados na superfície da placa de cada patógeno, em seguida, as mesmas foram lacradas e incubadas a 37°C (ou 30°C para *B. subtilis*) durante 18 a 24 horas.

Após o período de incubação das placas, foi feita a medida do diâmetro (em mm) das zonas de inibição ao redor das amostras e/ou controles positivos e negativos. Este ensaio foi realizado sob a supervisão do Prof. Dr. Raymond Andersen da University of British Columbia, Vancouver, Canadá com colaboração da Dra. Rebeca Priviate.

3.2.4.4 Avaliação da atividade anticolinesterásica por cromatografia de bioafinidade

Este ensaio foi realizado frente às enzimas acetilcolinesterase humana e de enguia elétrica (AChE-hu e AChE-ee) imobilizadas em biorreatores (SILVA et al., 2013). Utilizando o método modificado de Ellman (ELLMAN et al., 1961), que se baseia na medida da velocidade de produção da tiocolina formada através da hidrólise do análogo do substrato da AChE, a acetiltiocolina. A tiocolina formada reage com o chamado Reagente de Ellman (ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico]) formando uma mistura de dissulfetos e um ânion amarelo com intensa absorção em 412 nm (**Esquema 1**).



Esquema 1. Catálise da acetiltiocolina e reação de Ellman

Os biorreatores denominados ICERs de 30 cm x 0,01 mm em capilar de sílica fundida serão preparados pela imobilização de 2 enzimas acetilcolinesterase diferentes resultando em:

- ICER-AChE-ee – com a enzima Acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* (enguia elétrica);
- ICER-AChE-hu – com a enzima Acetilcolinesterase de eritrócitos humanos; Os ICERs serão utilizados como colunas conectadas ao equipamento de CLAE.

O monitoramento do produto da reação enzimática pela observação da banda cromatográfica correspondente à formação do produto da reação enzimática foi realizado nas seguintes condições:

- Fase móvel (Tampão de trabalho): Tampão Tris 0,1M pH 8,0 e reagente de Ellman (DTNB - ácido 5,5-ditiobis[2-nitrobenzóico]) 0,126 mM;
- Amostra injetada: 10 μL da solução contendo 1mM de Acetilcolina (ATChI) para AChE-ee e 2 mM para AChE-hue 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de amostra a ser testada;
- Vazão: 0,05 mL/min;
- Detector DAD-UV: 412nm;
- Inibidor padrão utilizado: Tacrina.

A **Figura 4** mostra um cromatograma representando a diminuição da banda cromatográfica referente ao produto na presença e ausência do inibidor padrão.

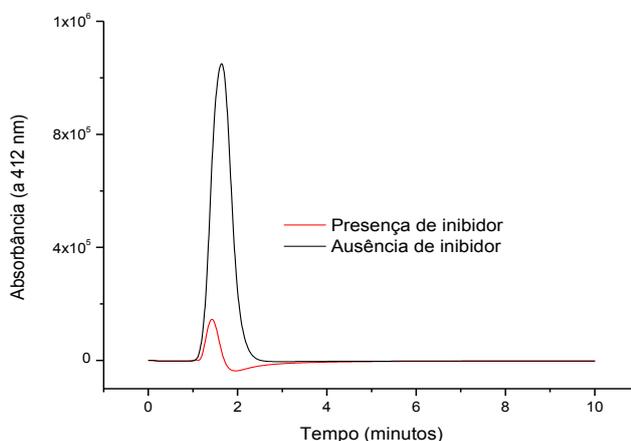


Figura 4. Cromatograma ilustrando o decrescimento da atividade enzimática do ICER-AChEe na presença de inibidor padrão a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Os percentuais de inibição serão obtidos comparando-se a área da atividade da enzima na presença do inibidor (A_i) com a área da atividade da enzima na ausência de inibidor (A_0), de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ de inibição} = \left[1 - \frac{A_i}{A_0} \right] \times 100$$

As amostras foram diluídas em metanol em concentrações de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ para extratos e frações semi-puras e $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ para frações puras. A partir dessas soluções estoque serão preparadas soluções de $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ contendo: $60 \text{ } \mu\text{L}$ da solução de tampão trabalho, $20 \text{ } \mu\text{L}$ da solução do extrato ou fração e $20 \text{ } \mu\text{L}$ da solução de ATChI. O volume final será de $100 \text{ } \mu\text{L}$. As soluções foram preparadas em duplicatas e alíquotas de $10 \text{ } \mu\text{L}$ serão injetadas no ICER. Antes de cada amostra ser injetada apenas o substrato da enzima ($60 \text{ } \mu\text{L}$ da solução de tampão trabalho, $20 \text{ } \mu\text{L}$ da solução de ATChI e $20 \text{ } \mu\text{L}$ de metanol) foi injetado para a avaliação da atividade enzimática. Também foi injetado um branco de cada amostra ($60 \text{ } \mu\text{L}$ da solução de tampão trabalho, $20 \text{ } \mu\text{L}$ da solução do extrato e $20 \text{ } \mu\text{L}$ de metanol). Este ensaio foi realizado sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Carmen Lúcia Cardoso, da Faculdade de Ciências e Letras da USP-Ribeirão Preto.

3.2.5 Identificação das cepas fúngicas

As linhagens de endófitos Ps-02 e Ps-03 foram identificadas pela empresa Genotyping Biotecnologia (Divisão Micro-organismos, Laboratório Central, Botucatu/SP). O Sequenciamento automático foi feito por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) e de acordo com a comparação do alinhamento das sequências de nucleotídeos produzidas com as sequências de referência depositadas no GenBank. Os microrganismos Ps-02 e Ps-03 apresentam 99% de indentidade com o fungo da espécie *Sarocladium strictum* e o fungo do gênero *Coniothyrium* sp., respectivamente. Ambas linhagens estão depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica/IQAr – SP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do perfil químico dos extratos brutos e frações obtidos em diferentes meios de cultivos (escala reduzida) dos fungos Ps-02 e Ps-03

Com o intuito de avaliar a produção metabólica das linhagens dos fungos *Ps-02* e *Ps-03* em diferentes meios de cultivo, foram selecionados dois meios líquidos (Czapek e Malte) e um meio sólido (arroz) a fim de determinar a melhor condição de crescimento para os endófitos.

4.2 Perfil Cromatográfico dos extratos brutos e frações (escala reduzida) em CLAE-DAD

Os cromatogramas dos extratos *Ps-02* Czapek (20 mg), *Ps-02* Malte (71 mg), e das frações *Ps-02* A-ACN (570 mg) e *Ps-02* A-aq (290 mg) utilizando gradiente exploratório e detecção em λ 254 nm (CLAE-DAD) apresentaram vários picos associados a substâncias com polaridades variando de média a alta, com boa resolução cromatográfica e diferentes absorbâncias, indicando a produção de diferentes classes de metabólitos. Entretanto não foi possível observar grande produção metabólica e rendimento em massa (**Tabela 2**) para *Ps-02* Czapek quando comparado (**Figura 5**) com os outros extratos. Isso pode se dever a este ser considerado um meio de cultivo pobre em nutrientes e rico em sais minerais.

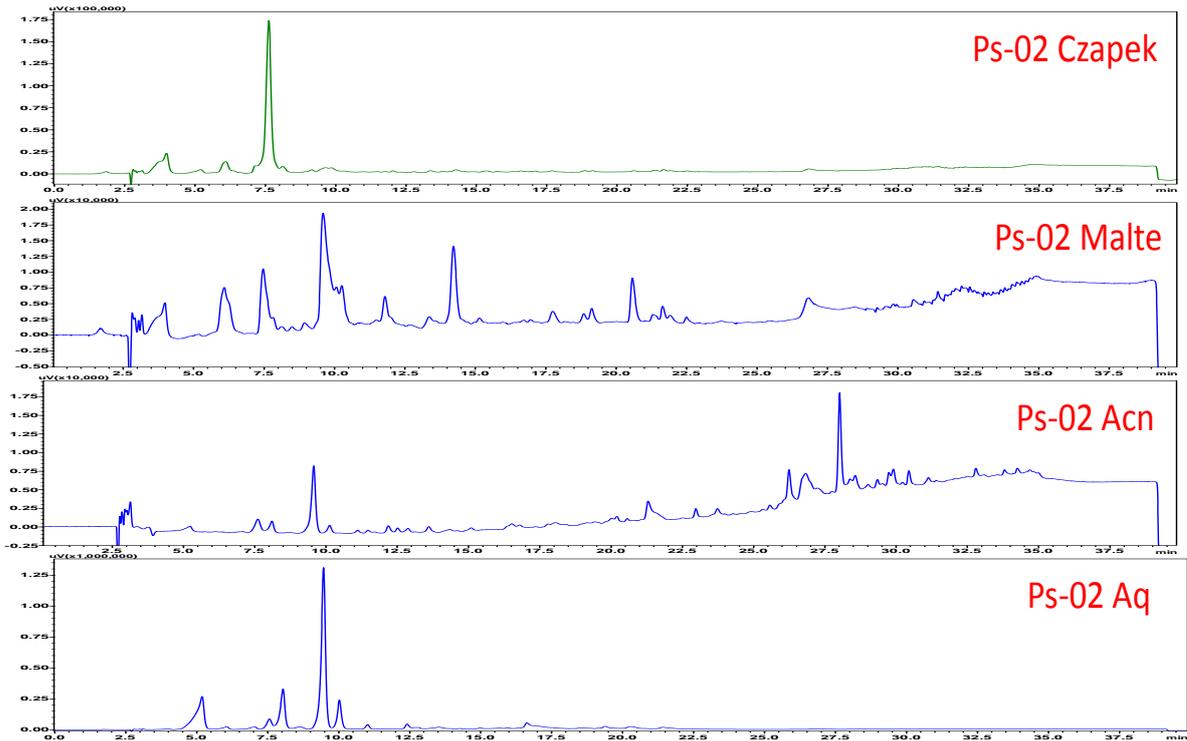


Figura 5. Cromatogramas via CLAE usando coluna RP18 em gradiente exploratório dos extratos brutos e frações em diferentes meios de cultivo (a) Ps-02 Malte; (b) Ps-02 A-ACN; (c) Ps-02 Czapek; (d) Ps-02 A-Aq.

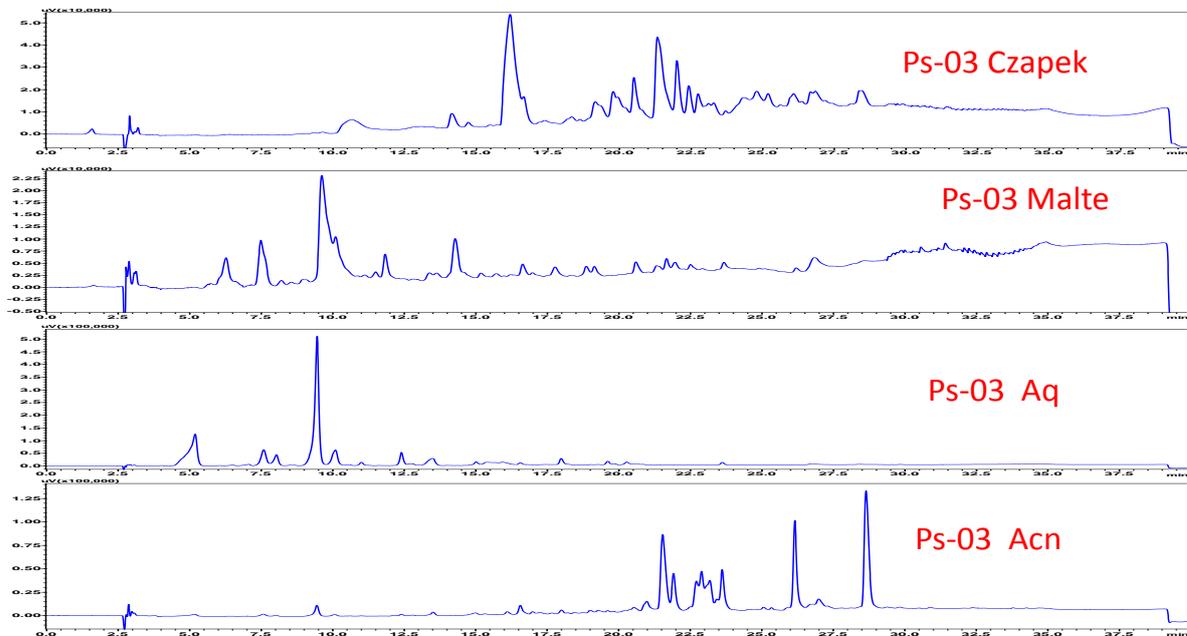


Figura 6. Cromatogramas via CLAE usando coluna RP18 em gradiente exploratório dos extratos brutos e frações em diferentes meios de cultivo (a) P3-02 Malte; (b) Ps-03 Czapek; (c) Ps-03 A-CN; (d) Ps-03 -Aq

Para os extratos produzidos pelo fungo Ps-03, foi usado gradiente exploratório com detecção em λ 254 nm (CLAE-DAD). Para os extratos Ps-03 Czapek (110 mg) Ps-03 Malte (58 mg) e frações Ps-03 A-ACN (760 mg) e Ps-03 A-Aq (631 mg), foi possível observar uma grande produção metabólica pela comparação dos picos (**Figura 6**) ao longo do cromatograma nas regiões de baixa a alta polaridade, com boa resolução cromatográfica. Merecem destaque o extrato Ps-03 Czapek e fração Ps-03 A-ACN que apresentaram picos distribuídos nas regiões de baixa a média polaridade com absorbâncias e tempos de retenção distintos nos cromatogramas.

4.3 Perfil químico dos extratos brutos e frações (peq. escala) em RMN de ^1H .

Os espectros de RMN de ^1H para os extratos e frações das linhagens dos fungos Ps-02 (**Figura 7**) e Ps-03 (**Figura 8**) corroboram a alta quimiodiversidade evidenciada pelos dados obtidos na análise por CLAE-DAD, com sinais em δH 0,8 até aproximadamente δH 9,5 característicos de hidrogênios olefínicos, carbinólicos, aldeídicos, metílicos, metilênicos e metínicos. Observou-se também uma região complexa associada a hidrogênios aromáticos para as amostras Ps-02 A-Aq, Ps-03 Czp, Ps-03 A-ACN e Ps-03 Malte, sugerindo a presença de constituintes de várias classes e evidenciando a diversidade metabólica destes extratos e frações. A variação de meios de cultivos contribuiu também para uma produção metabólica diferenciada.

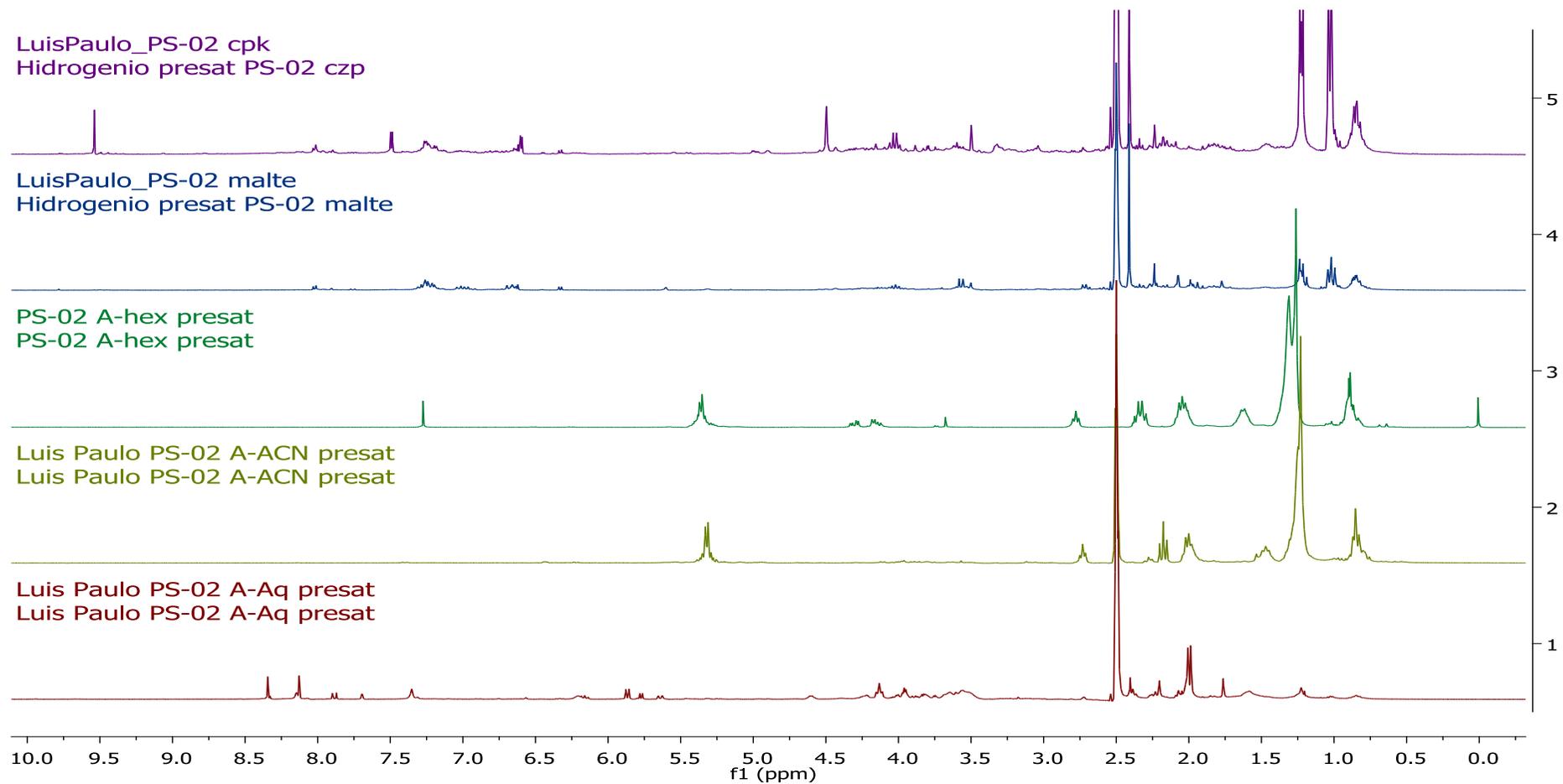


Figura 7. Espectros de RMN de ¹H de Ps-02 A-Hex (CDC₃, 300 MHz) e Ps-02- A-Aq e Acn, Ps-02 Malte e Czp (DMSO-*d*₆, 300 MHz).

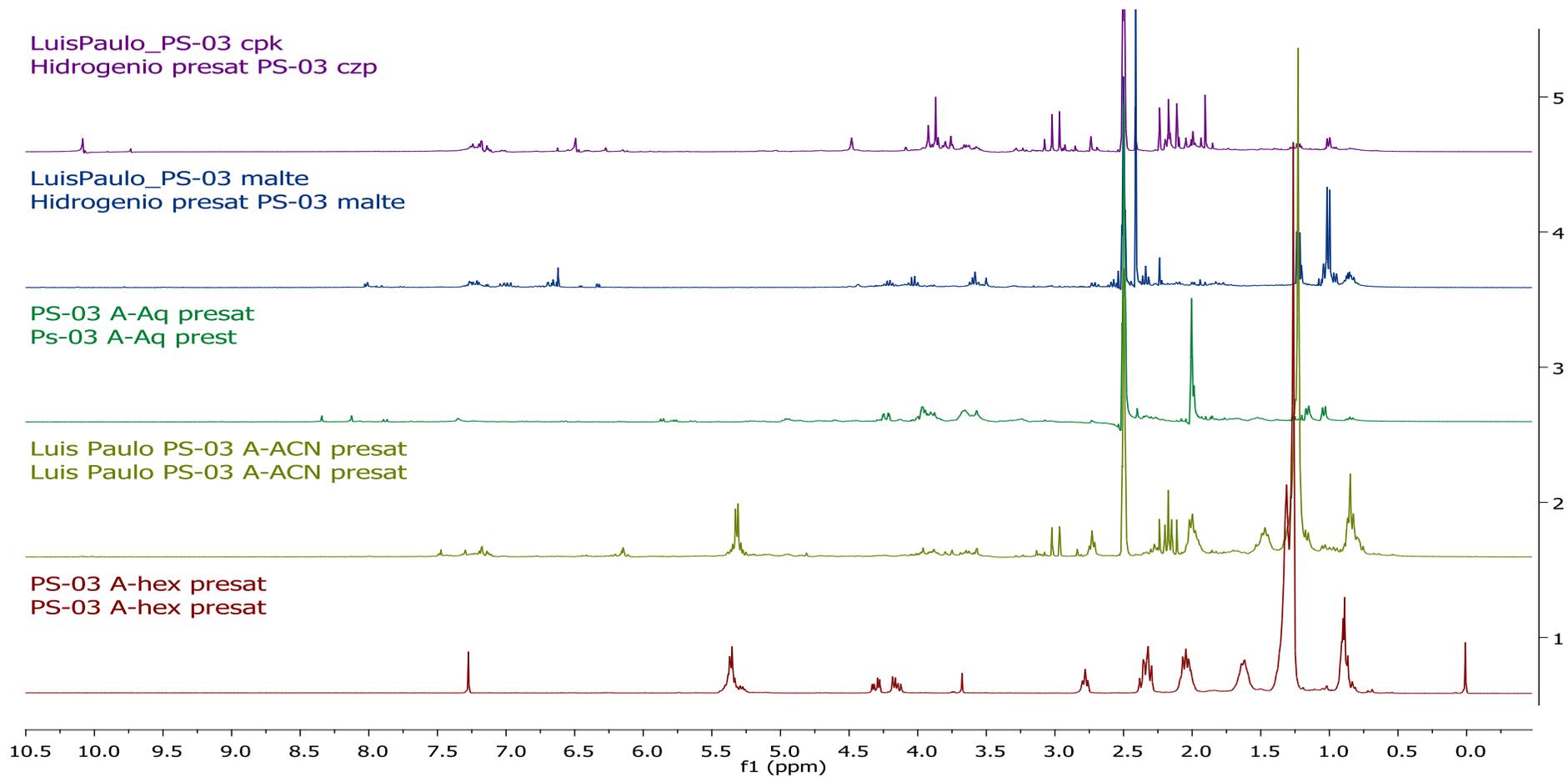


Figura 8. Espectros de RMN de ¹H de Ps-03 A-Hex (CDCl₃, 300 MHz) e Ps-03- A-Aq e Acn, Ps-03 Malte e Czp (DMSO- d₆, 300 MHz).

4.4 Avaliação das atividades antifúngica e anticolinesterásica

A **Tabela 4** mostra os resultados obtidos para a atividade antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos e frações dos fungos Ps-02 e Ps-03. Podemos observar que apenas as frações Ps-02 A-Acn, Ps-02 A-Aq e Ps-03 A-Aq apresentaram atividade fraca ou moderada para os ensaios empregados. Os demais extratos e frações apresentaram forte atividade para ambos ensaios. Nota-se pelo sistema de eluição adotado (**Tabela 03**) para cada extrato e fração, que as substâncias associadas aos Rf (fator de retenção) com atividade inibitória são diferentes, mostrando que o potencial de atividade pode ser atribuído a diferentes classes de metabólitos. Como exemplo, a fração Ps-03 Czp, que mostra forte atividade para os ensaios realizados, apresenta também substâncias ativas com diferentes Rf para cada ensaio.

Tabela 4. Atividade antifúngica e anticolinesterásica dos extratos brutos e frações dos fungos endofíticos e seus Rf.

Amostra	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>	Anticolinesterásico
Ps -02 Malte	0,41 a 0,46 ^{**} ; 0,53 - 0,59 ^{***}	0,66-0,81 ^{**}	0,65-0,71 ^{***}
Ps-02 A-Hex	-	-	0,51-0,62 ^{***}
Ps-02 A-Acn	0,41-0,46 ^{**}	0,43-0,49, [*]	-
Ps-02 A-Aq	0,49-0,55 [*]	-	-
Ps-03 Czp	0,26-0,84 ^{***}	0,40-0,86 ^{***}	0,65-0,71 ^{***}
Ps-03 Malte	0,68 a 0,94 ^{***}	0,82-0,95 [*]	-
Ps-03 A-Hex	0,65 [*]	-	0,53-0,62 ^{***}
Ps-03 A-Acn	0,66-0,82 ^{***}	0,58-0,63; 0,71-0,84 ^{***}	-
Ps-03 A-Aq	0,81 - 0,95 [*]	-	-
Padrão	nistatina ^{***}	origem ^{***}	fisostigmina ^{***}

*atividade fraca/**atividade moderada/***atividade forte

4.5 Atividade citotóxica

Os ensaios foram realizados com duas linhagens de células tumorais de adenocarcinoma de cólon (HCT-116) e mama (MCF-7). De acordo com os resultados (**Tabela 5**), as frações e extratos não mostraram inibição relevante da proliferação celular tumoral nas linhagens testadas, consideradas, portanto não ativas, com exceção do extrato Ps-03 Czp, e fração Ps-03 A-ACN com CI_{50} variando de 3.9 a 16.7 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 5. Atividade citotóxica dos extratos brutos e frações

Amostra	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	HCT-116	MCF-7
Ps-02 A-ACN	50	>50
Ps-03 A-ACN	9.9	10.3
Ps-03 Czp	3.9	16.7
Doxorubicina*	-	-

*Padrão

Os resultados de bioatividade orientaram a escolha da fração Ps-03 A-ACN para estudo detalhado, conforme apresentado abaixo.

4.6 Identificação e Elucidação estrutural das substâncias produzidas pelo endófito (Ps-03) *Conithyrium* sp.

4.6.1 Determinação estrutural da substância 1

A substância **1** (14,0 mg) foi isolada da fração 5 de Ps-03 A-Acn e apresentou no espectro de UV (**Figura 9**) absorções com λ_{max} em 264 nm e 299 nm. Sua determinação estrutural se deu por meio das análises dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135°, mapas de contorno COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$, HSQC e HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$, além dos dados de espectrometria de massas em alta resolução e por comparação com dados da literatura.

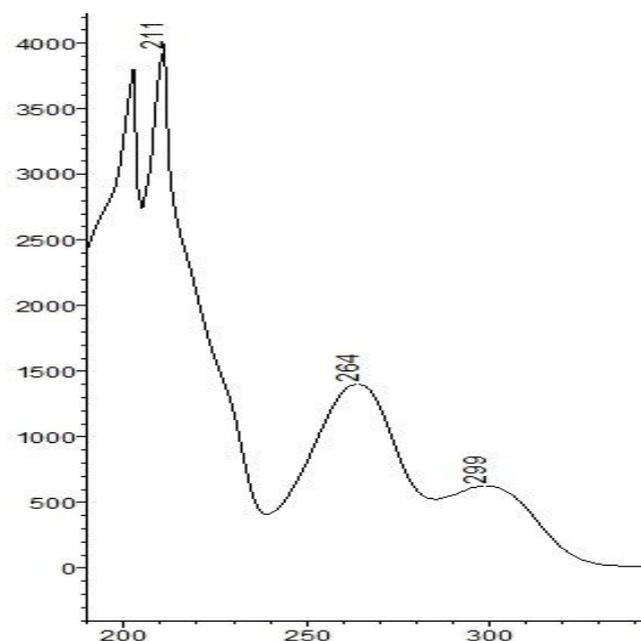


Figura 9. Espectro no Ultravioleta da Substância 1

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 10**) mostrou um sinal para grupo metila (δ_{H} 1.37; *d*, J 6.4 Hz), um sinal em δ_{H} 5.25 (*m*) característico de hidrogênio desprotegido, sugerindo a presença em sua vizinhança de elemento eletronegativo e foi atribuído a H-3, e ainda, sinais na região de hidrogênios aromáticos: dois dupletos em δ_{H} 6.15 (H-11) e δ_{H} 6.20 (H-9) ambos com J 2,4 Hz, atribuídos aos hidrogênios em posição *meta* do anel aromático tetra-substituído. Este espectro também apresentou sinais característicos de hidrogênios alifáticos entre δ_{H} 1.37 – 3.27.

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 11**) mostrou sinais para quatorze carbonos, incluindo um sinal para grupo carbonila de éster em δ_{C} 171.9 (C-1) e outro para carbono oxigenado em δ_{C} 73.0 (C-3). A análise do espectro DEPT 135° (**Figura 12**), em conjunto com o experimento HSQC e comparação com os dados de RMN de ^{13}C , evidenciou a presença de um sinal para carbono metílico, cinco metilênicos, dois metínicos, um oximetínico (C-3) e ainda cinco sinais para carbonos não hidrogenados, sendo quatro aromáticos e um carboxílico (**Tabela 6**). O espectro de RMN de ^{13}C mostrou ainda que, dentre os carbonos aromáticos, os sinais em δ 163.4 e δ 164.5, característicos de carbonos aromáticos oxigenados, puderam ser atribuídos a C-10 e C-12, respectivamente, e evidenciaram a presença de hidroxilas fenólicas para substância 1.

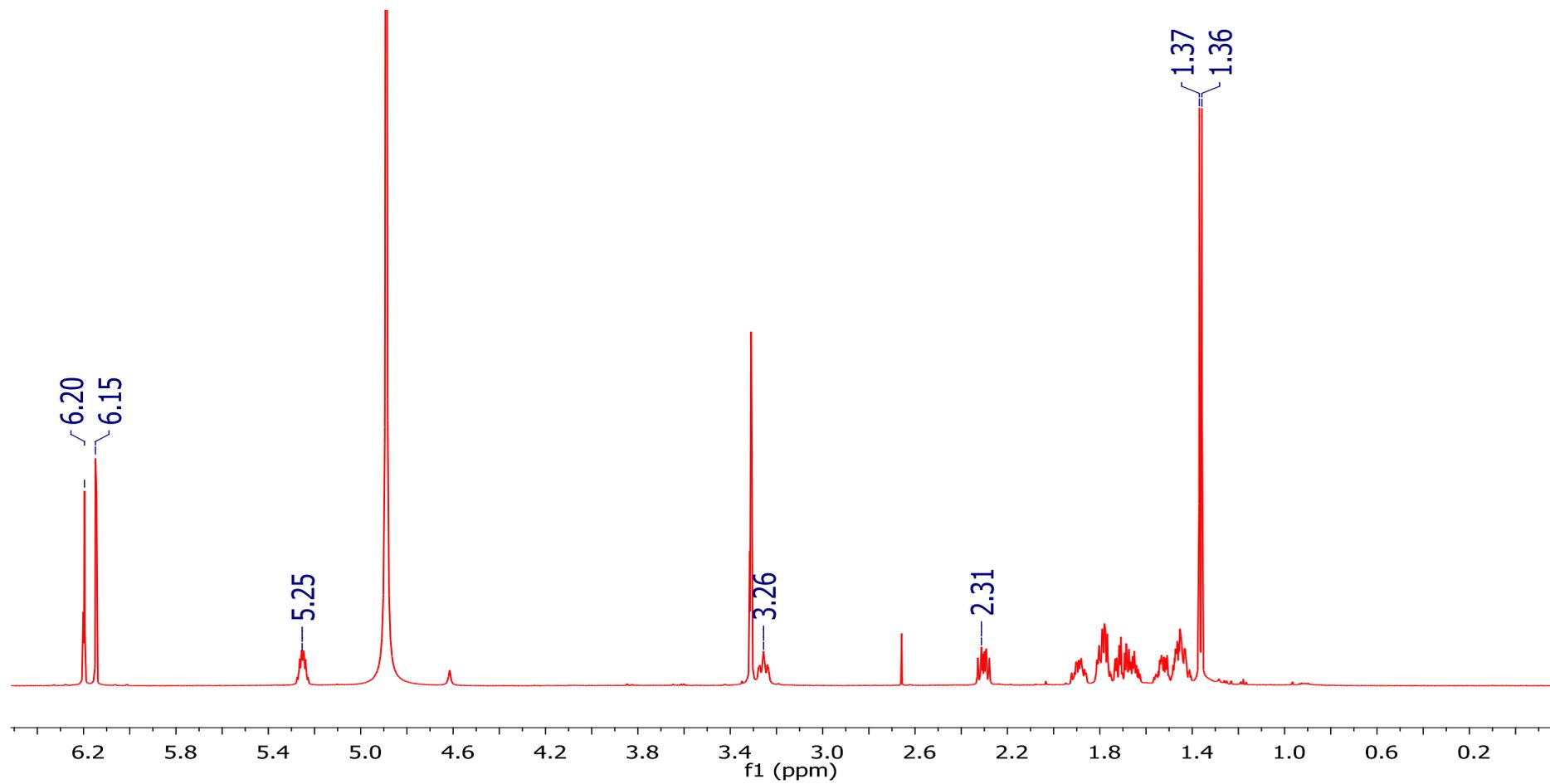


Figura 10. Espectro de RMN ^1H da Substância 1 (CD_3OD , 600 MHz)

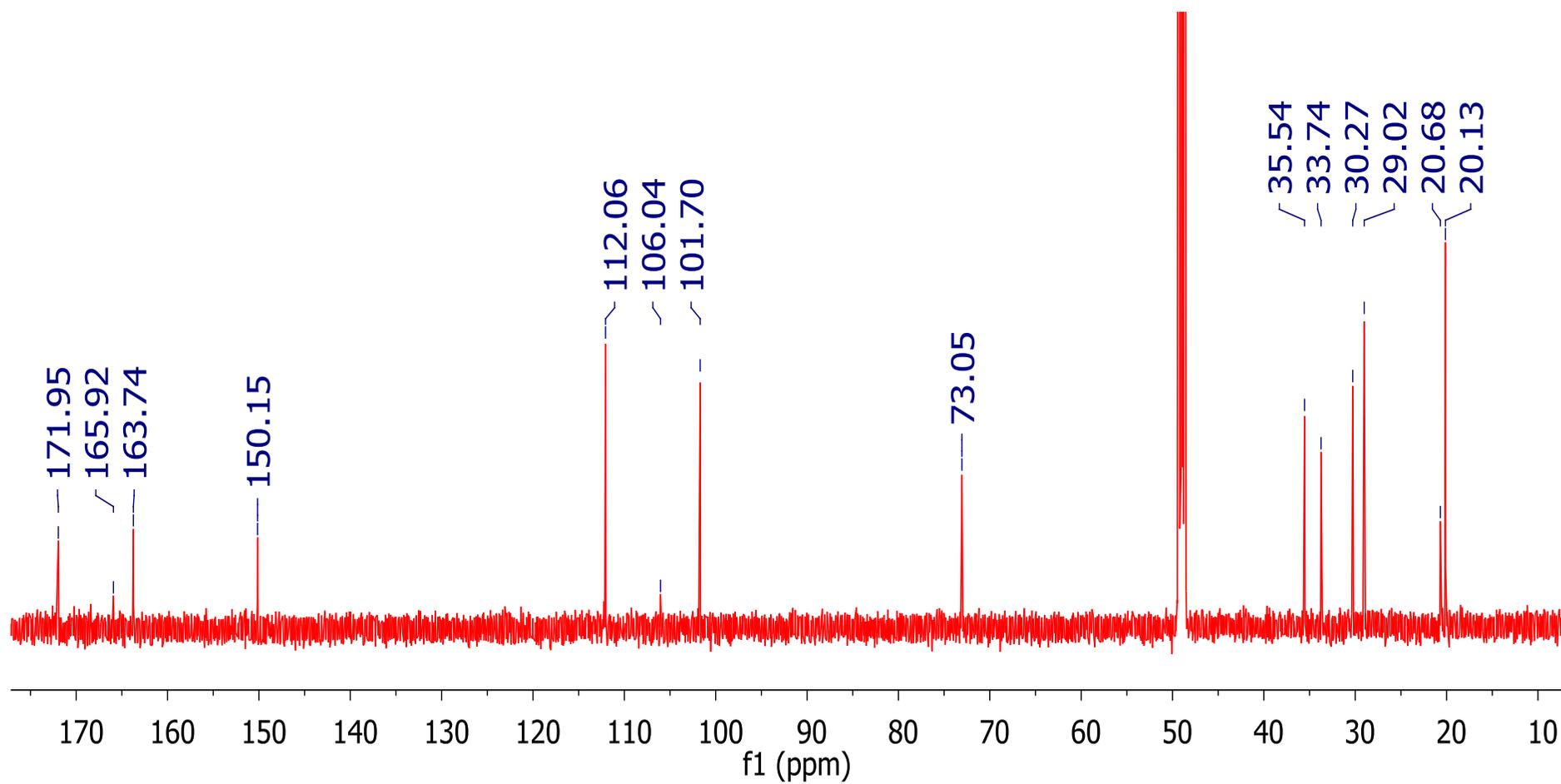


Figura 11. Espectro de RMN ^{13}C da Substância 1 (CD_3OD , 150 MHz).

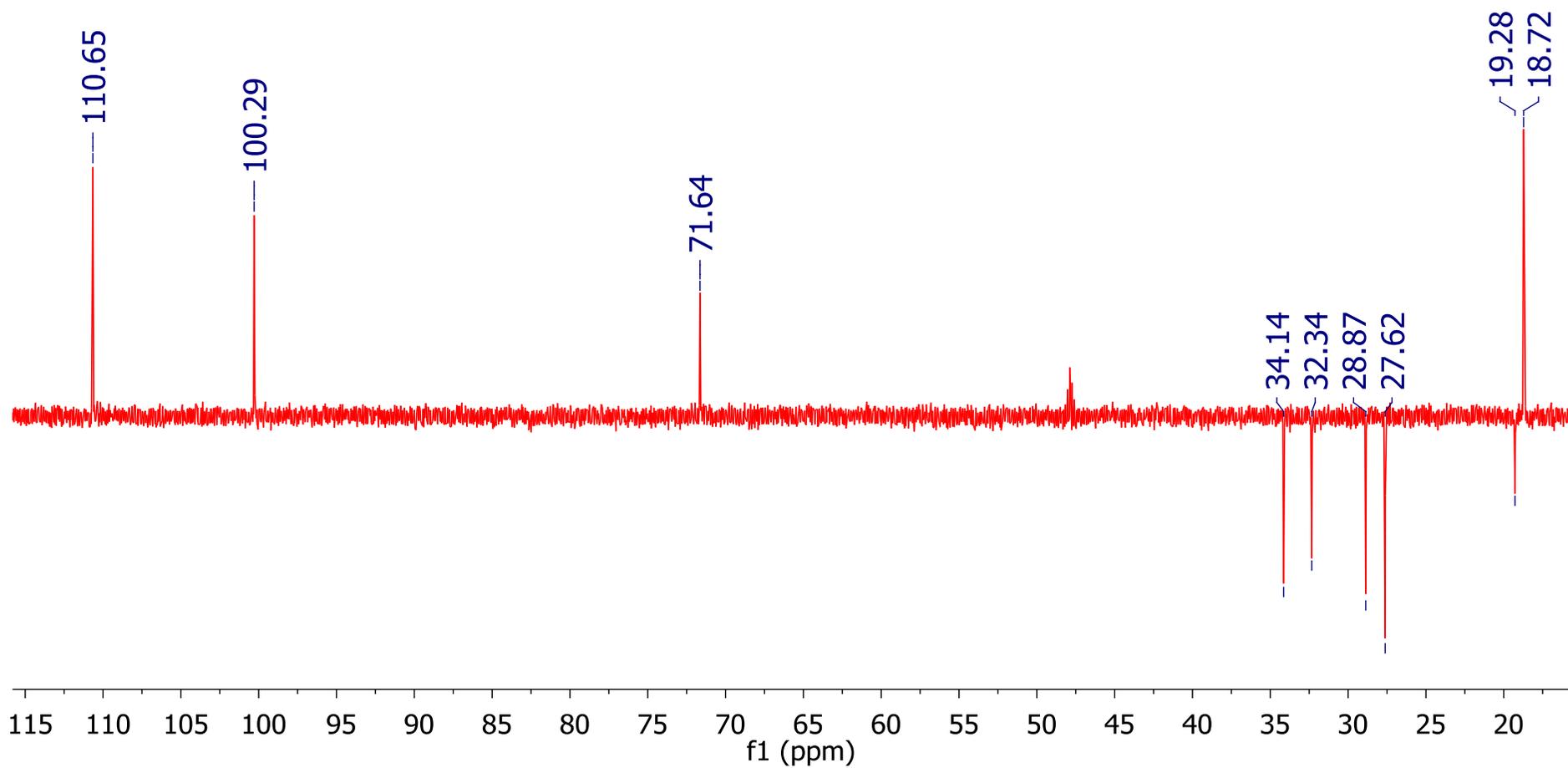


Figura 12. Espectro de RMN DEPT-135° da Substância 1 (CD₃OD, 150 MHz).

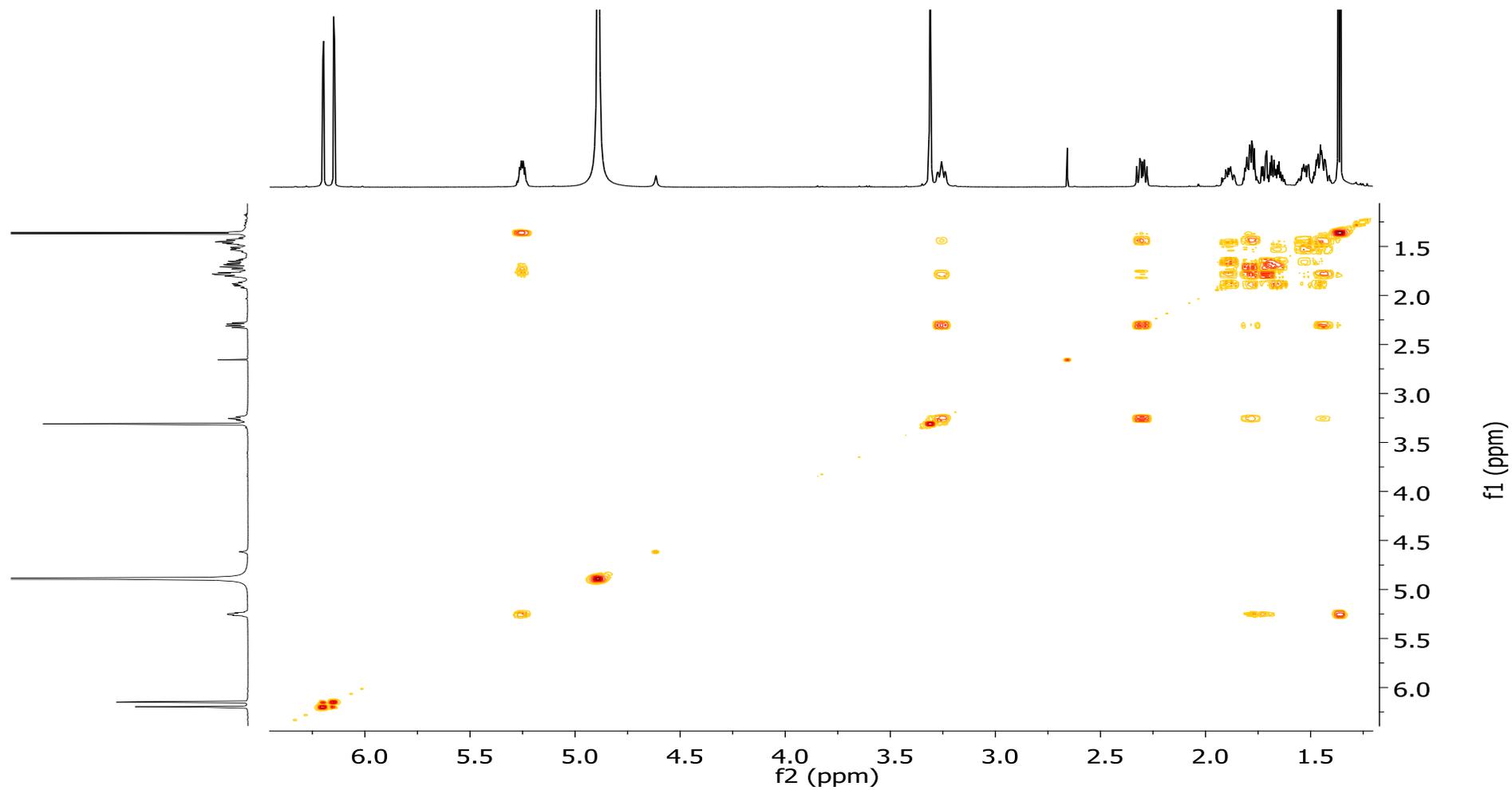
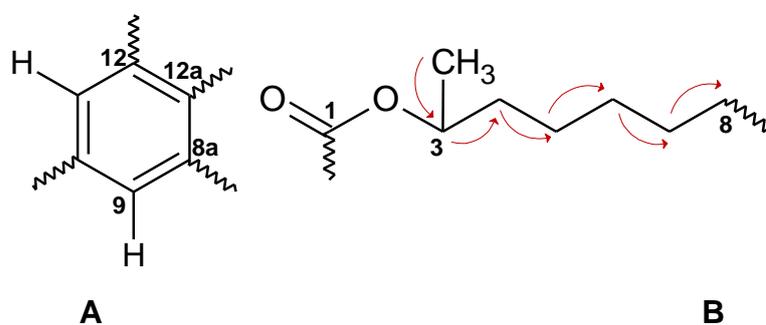
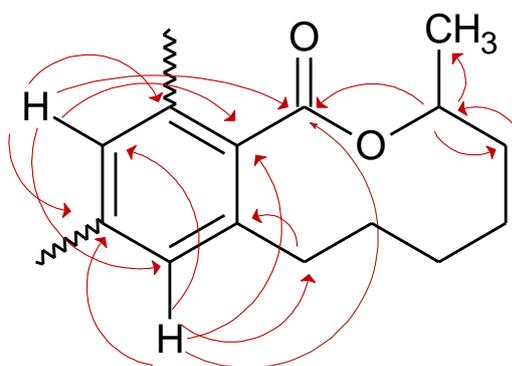


Figura 13. Mapa de correlações de COSY ^1H - ^1H da Substância 1 (CD_3OD , 600 MHz).

A sub-estrutura do sistema alifático foi confirmada pelas correlações indicadas no mapa de contorno COSY ^1H - ^1H (**Figura 13**) abrangendo os sinais para o grupo metila em C3, além de H-3, H-4, H-5, H-6, H-7 e H-8. Esta análise mostrou também um sistema isolado para os hidrogênios aromáticos. Estes dados, associados aos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , permitiram definir duas sub-estruturas parciais **A** e **B** para substância **1**, bem como confirmar a atribuição dos sinais para carbonos metilênicos (C-4, C-5, C-6, C-7 e C-8), metínicos (C-9 e C-11), hidroximetínico (C-3) e quaternários (C-1, C-8a, C-10, C-12 e C-12a), e ainda para o grupo metila.



A junção entre as estruturas parciais **A** e **B** foi definida com base nas correlações observadas no mapa de contorno HMBC (**Figura 14**). Esta análise exibiu a correlação entre H-3 (δ 5.24) e C-1 (δ 172.9), em que H-3 é oximetínico e C-3 está ligado ao átomo de O da unidade éster. As correlações entre H-8 e C-7/C-8, e entre H-9 e C-8 demonstraram que C-8 está ligado ao grupo fenila através de C-8^a, enquanto as correlações de H-9 com C-1, C-8, C-10, C-11 e C-12a e ainda, de H-11 com C-1, C-9, C-10, C-12 e C-12a foram importantes para definir as conectividades de cada subestrutura, bem como as ligações entre as mesmas, e definir a atribuição dos sinais a cada posição no anel aromático.



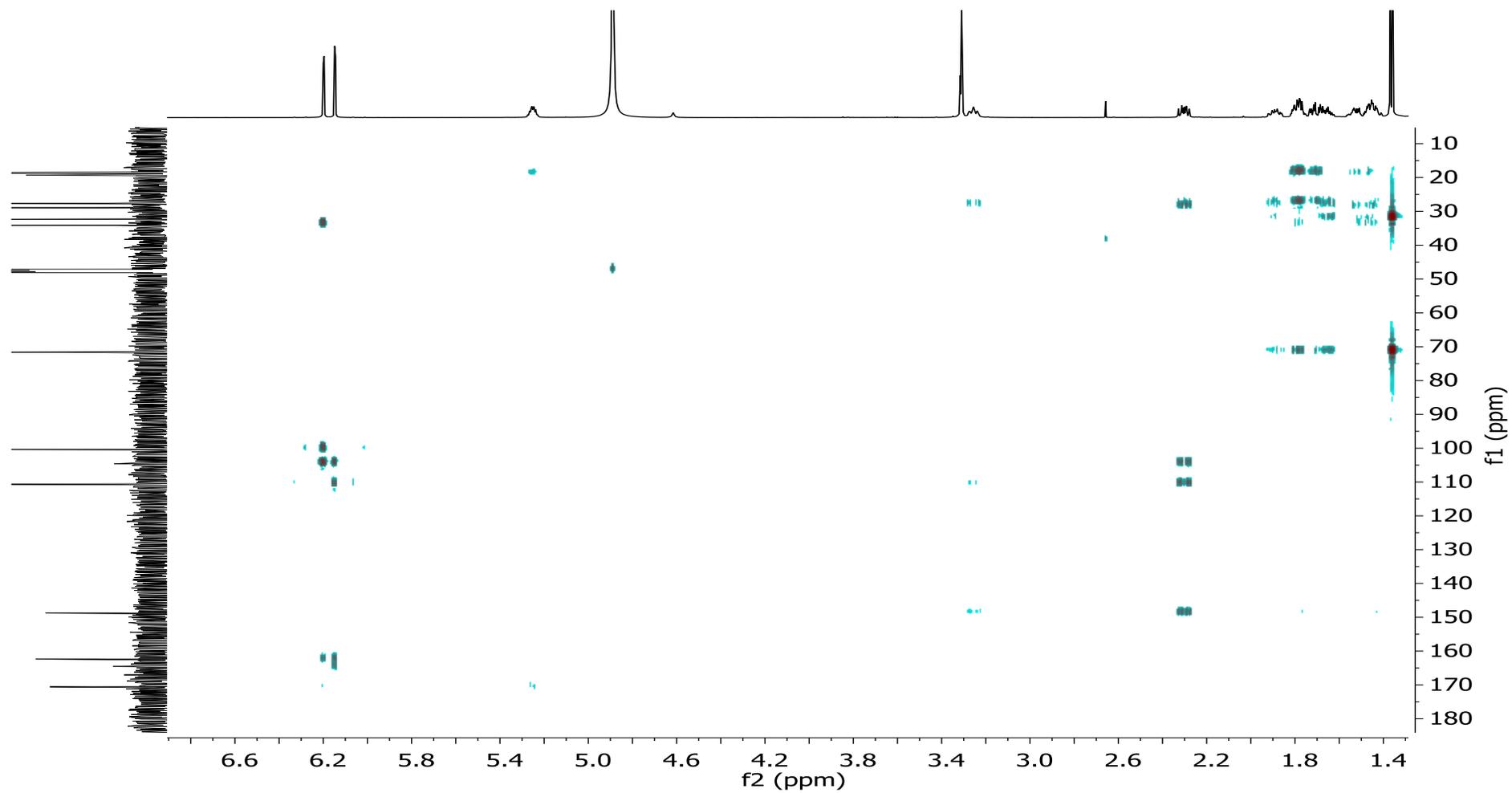


Figura 14. Mapa de correlações de HMBC ^1H - ^{13}C da Substância 1 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3OD_d)

A análise da subst. **1** por espectrometria de massas de alta resolução, evidenciou os sinais em ESI(+) com m/z 273.1100 $[M + Na]^+$, e m/z 251.1279 $[M+H]^+$, que sugeriram a fórmula molecular $C_{14}H_{18}O_4$. Os dados de RMN de ^{13}C , evidenciaram a presença de hidroxilas fenólicas, dentre outros sinais, que confirmaram os dados obtidos pelas análises de espectrometria de massas de alta resolução, e permitiram sugerir a fórmula molecular $C_{14}H_{18}O_4$ (**Figura 15**) para substância **1**.

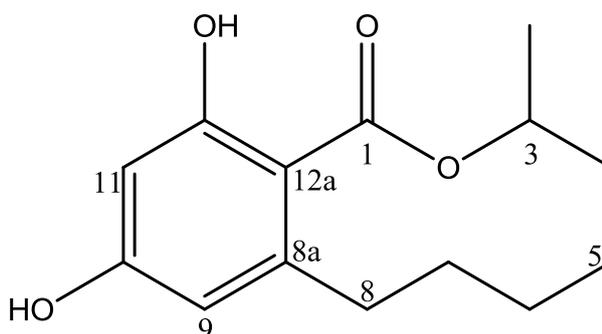


Figura 15. Estrutura da Substância **1**

..

O levantamento bibliográfico realizado nas bases de dados Web of Science e Scifinder indicou que este policetídeo macrolídeo de 10 membros foi descrito por Yoshihara e colaboradores (2001) como produto intermediário na síntese de derivados do ácido β -resorcílico, embora se trate de uma substância inédita oriunda de fontes naturais. A substância **1** apresenta a mesma constante de acoplamento (6,4 Hz) para o sinal dos hidrogênios do grupo metila em C-3 quando comparada com os dados descritos na literatura por Yoshihara e col. (2001). Como C-3 é o único centro de assimetria desta molécula, este dado sugere que ambas apresentam a mesma configuração (*R*) para C3, por se tratar de um síntese estereosseletiva.

De acordo com Liu e colaboradores (2015), diversos macrolídeos marinhos foram isolados de esponjas, algas, dinoflagelados, bem como de outros invertebrados e micro-organismos. Estas substâncias demonstraram diversas propriedades biológicas, tais como citotóxica, antimicrobiana, antiviral e atividades moluscidas.

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância **1** (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3ODa)

Posição	^1H δ	^{13}C δ	HMBC
1	-	172.9; C	-
3	5.24 <i>m</i>	73.0; CH	C-1, C-4 e CH_3
4	1.71 <i>m</i>	33.7; CH_2	C-3, C-6 e CH_3
	1.79 <i>m</i>		
5	1.66 <i>m</i>	20.6; CH_2	C-3, C-4 e C-6
	1.90 <i>m</i>		
6	1.45 <i>m</i>	29.0; CH_2	C-4, C-7 e C-8
	1.53 <i>m</i>		
7	1.42 <i>m</i>	30.2; CH_2	C-6 e C-11
	1.77 <i>m</i>		
8	2.30, <i>ddd</i> (12,6; 9,1; 7,6)	35.5; CH_2	C-6, C-7, C-8a, C-9
	3.27, <i>t</i> (9,9)		
8^a	-	150.1; C	-
9	6.20, <i>d</i> (2,4)	112.0; CH	C-1, C-8, C-10, C-11, C-12a,
10	-	163.7; C	-
11	6.15, <i>d</i> (2,4)	101.6; CH	C-1, C-9, C-10, C-11, C-12a,
12	-	164.5; C	-
12^a	-	106.0; C	-
3-CH_3	1.37, <i>d</i> (6,4)	20.1; CH_3	C-3, C-4

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

4.6.2 Determinação estrutural da substância **2**

A substância **2** (3,0 mg) foi isolada da fração 5 de Ps-03 A-Acn e apresentou espectro de UV (**Figura 16**) com absorções com λ_{max} em 274 nm e 307 nm. Foi identificada por meio das análises dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135°, mapas de contorno COSY ^1H - ^1H , HSQC e HMBC ^1H - ^{13}C , além de espectrometria de massas em alta resolução e por comparação com os dados da substância **1** e da literatura.

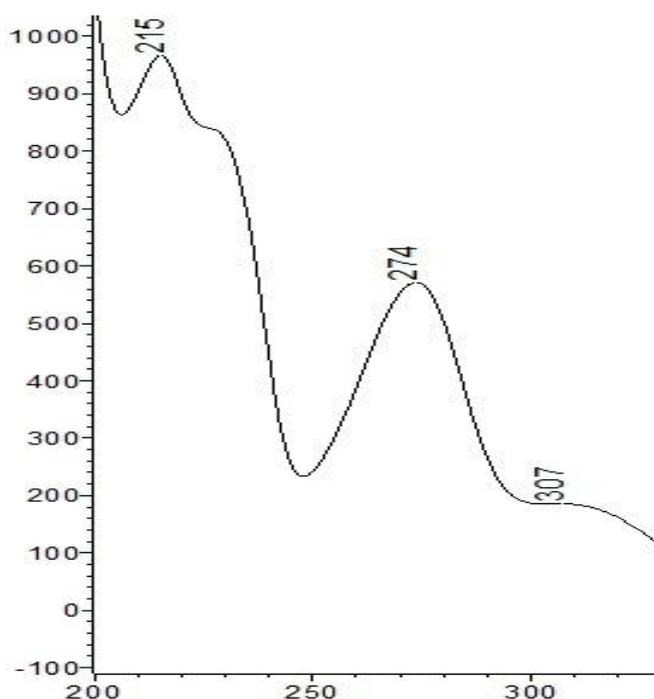


Figura 16. Espectro no Ultravioleta da Substância 2

Os espectros de RMN das substâncias **1** e **2** (**Figura 17**) e seus espectros de UV indicaram que pertencem à mesma classe de metabólitos, ou seja, macrolídeos de 10-membros. A comparação com os sinais do espectro de RMN ^1H da substância **01** na região de hidrogênios aromáticos, que apresentou dois dupletos em δ_{H} 6.15 (H-11) e δ_{H} 6.20 (H-09), mostrou uma diferença importante, já que o espectro de RMN de ^1H da substância **2** apresentou apenas um sinal em δ 6.24, integrando para um hidrogênio (H-9). Este dado indicou a presença de outro substituinte na posição 11 da substância **2**, caracterizando assim um anel aromático pentassubstituído. Adicionalmente, o experimento HSQC evidenciou a presença de somente um carbono aromático metínico (C-9), confirmando a proposta estrutural para subst. **2**.

O espectro de DEPT 135° (**Figura 18**), com auxílio do experimento de HSQC, mostrou a presença de um sinal de carbono metílico (CH_3), cinco metilênicos (C-4, C-5, C-6, C-7 e C-8), um metínico (C-9), um carbinólico (C-3) e seis sinais de carbonos não hidrogenados (C-1, C-8a, C-10, C-11, C-12 e C-12a), sugerindo que a substância **2** possui o mesmo esqueleto da substância **1** (**Tabela 7**).

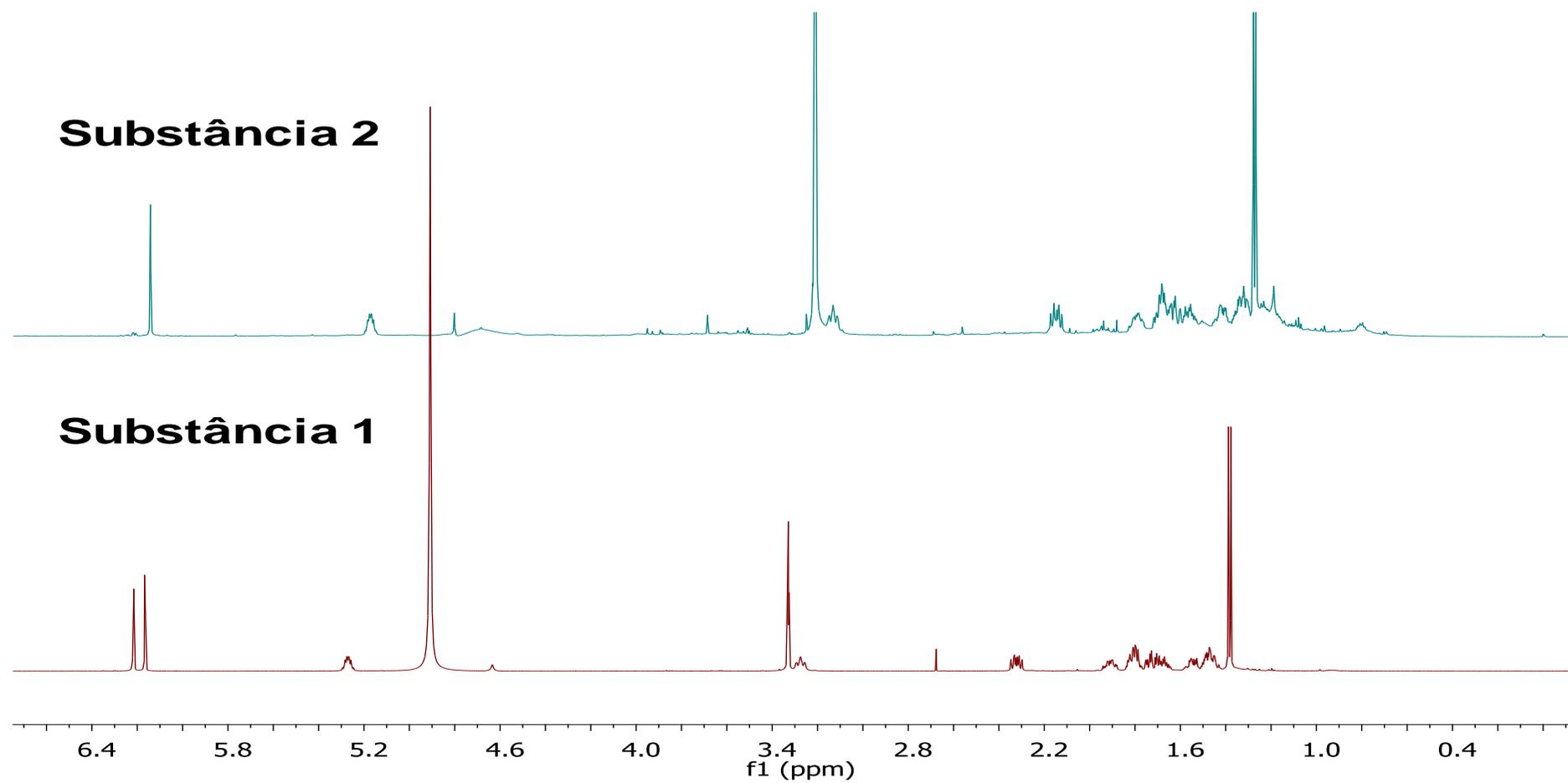


Figura 17. Espectros de RMN de ^1H das substâncias 1 e 2 (CD_3OD , 600 MHz).

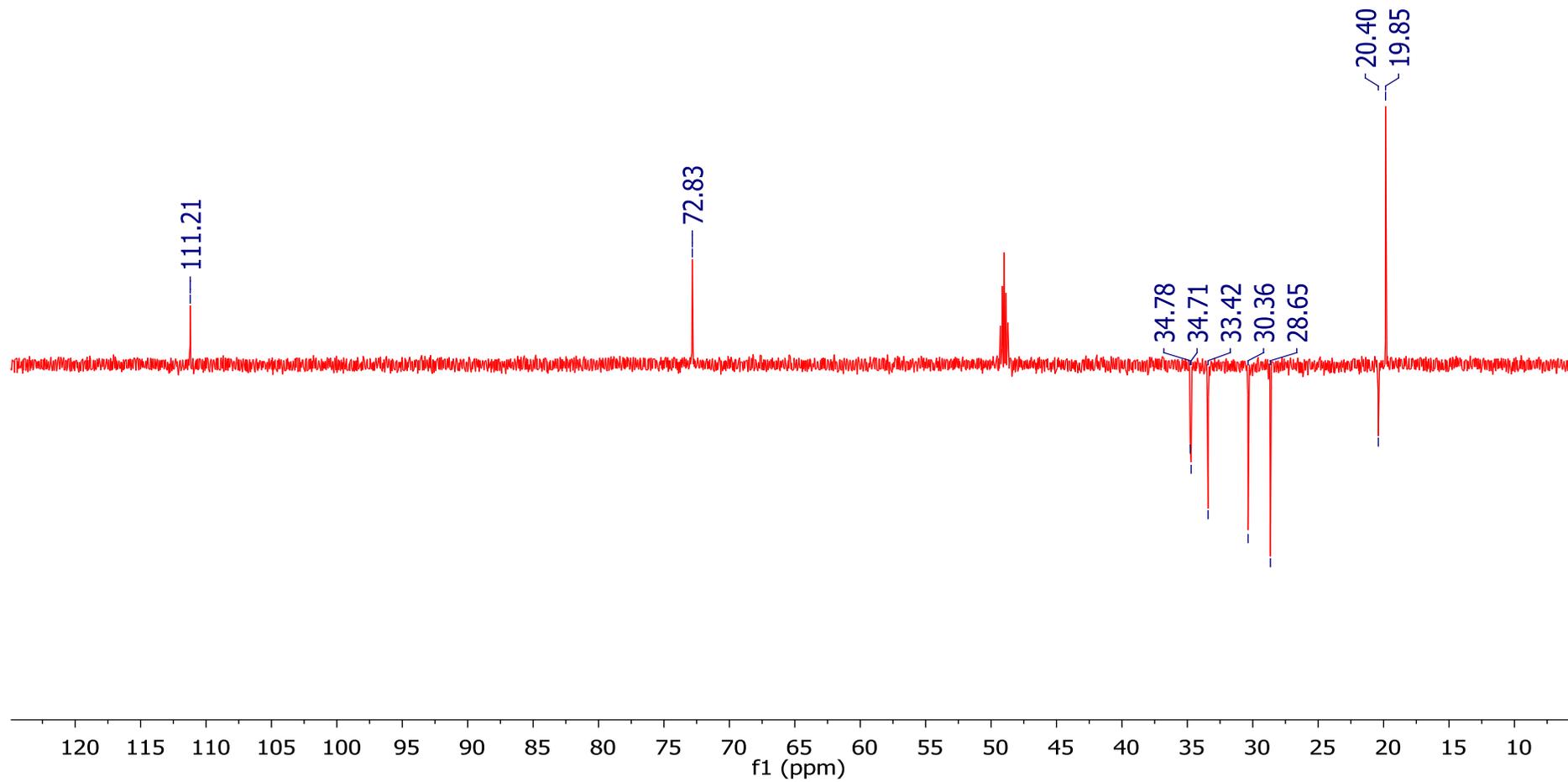


Figura 18. Espectro DEPT-135° da substância **2** (CD₃OD, 150 MHz)

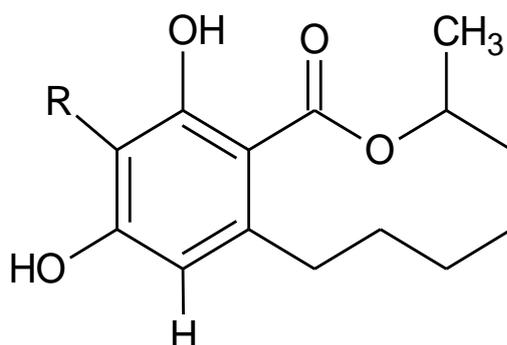


Tabela 7. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância **2** (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3ODa)

Posição	^1H δ	^{13}C δ	HMBC
1	-	172.2; C	-
3	5.27, <i>m</i>	72.8; CH	C-1, C-4 e CH_3
4	1.74, <i>m</i>	33.7; CH_2	C-3, C-6 e CH_3
	1.80, <i>m</i>		
5	1.66, <i>m</i>	20.4; CH_2	C-3, C-4 e C-6
	1.91, <i>m</i>		
6	1.44, <i>m</i>	28.6; CH_2	C-4, C-7 e C-8
	1.53, <i>m</i>		
7	1.41, <i>m</i>	30.3; CH_2	C-6 e C-11
	1.79, <i>m</i>		
8	2.25, <i>ddd</i> (12,8; 9,0; 7,7)	34.7; CH_2	C-6, C-7, C-8a, C-9
	3.22, <i>t</i> (9,9)		
8a	-	139.4; C	-
9	6.24, <i>s</i>	109.9; CH	C-1, C-8, C-10, C-11, C-12a,
10	-	153.2; C	-
11	-	131.7; C	-
12	-	150.7; C	-
12a	-	106.0; C	-
3-CH_3	1.37, <i>d</i> (6,4)	19.8; CH_3	C-3, C-4

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

Esta substância foi também analisada por espectrometria de massas de alta resolução, evidenciando os picos por ESI(+) com m/z 289,1041 $[M + Na]^+$ e m/z 267,1231 $[M+H]^+$. A comparação com os dados de EM da substância **1** mostra que a diferença entre as massas e dados de RMN ^{13}C da substância **2** (Figura 19) deve-se ao substituinte hidroxila em C-11e. e permitiu propor a fórmula molecular $C_{14}H_{18}O_5$ para a substância **2**.

O levantamento bibliográfico realizado nas bases de dados Web of Science e Scifinder indicou tratar-se de uma substância inédita. Os dados de RMN de 1H obtidos para substância **1** sugerem que a substância **2** deve ter a mesma configuração (*R*) em C-3 por apresentarem constantes de acoplamento ($J = 6,4$ Hz) idênticas.

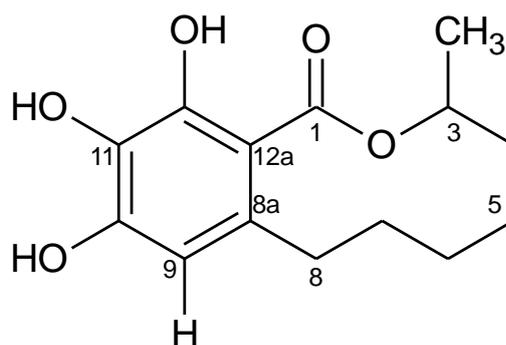


Figura 19. Estrutura da Substância **2**.

4.6.3 Determinação estrutural da substância **3**

A substância **3** (6,4 mg) foi isolada da fração 3 de Ps-03 A-Acn e identificada por meio das análises dos espectros de RMN de 1H , ^{13}C e DEPT 135° , mapas de contorno do tipo; COSY $^1H - ^1H$, HSQC e HMBC $^1H - ^{13}C$, espectrometria de massas de alta resolução e por comparação com dados da literatura e aqueles obtidos para as substâncias **1** e **2**.

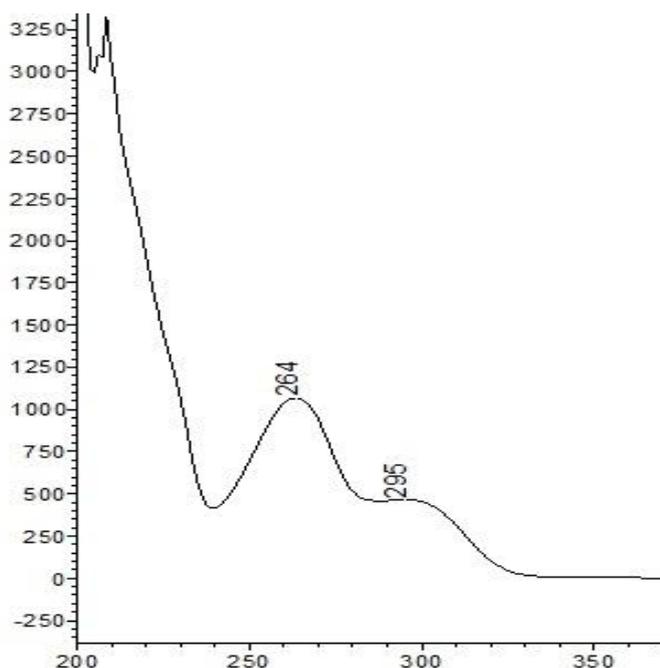


Figura 19. Espectro no Ultravioleta da substância **3**

Os espectros da substância **3** apresentaram sinais característicos semelhantes aos mostrados nos espectros de RMN e UV (**Figura 20**) da substância **01**, incluindo absorções com λ_{\max} em 260 nm e 295 nm e sugerindo tratar-se da mesma classe de compostos. O esqueleto carbônico de substância **3** foi confirmado pelos sinais característicos em δ 170.7 (C-1), 107.1 (C-12a) e 147.5 (C-8a), observados no espectro de RMN de ^{13}C , bem como os sinais em δ 6.16 (*d*, H-9), 6.18 (*d*, H-11), 4.98 (*m*, H-3) e 1.44 (*d*, 3-CH₃), observados no espectro de RMN de ^1H (**Figura 21**) (**Tabela 08**).

O espectro DEPT 135° (**Figura 22**), com auxílio do experimento HMBC e em comparação com o espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 23**), mostrou a presença de sinais para dois carbonos oximetínicos em δ 71.0 (C-5) e 72.0 (C-3). Estes espectros permitiram ainda destacar a principal diferença entre **1** e **3**, associada à presença de uma hidroxila adicional em C-5.

As atribuições dos sinais de C e H foram determinadas através do experimento HMBC pelas correlações (**Figura 24**) de H-3 com C-1, C-4, C-5 e 3-CH₃, e de H-6 com C-4, C-5 e C-7, e ainda, confirmadas pelas correlações observadas no mapa de contorno COSY ^1H - ^1H , com destaque para aquelas abrangendo os sinais do sistema alifático que inclui 3-CH₃, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7 e H-8.

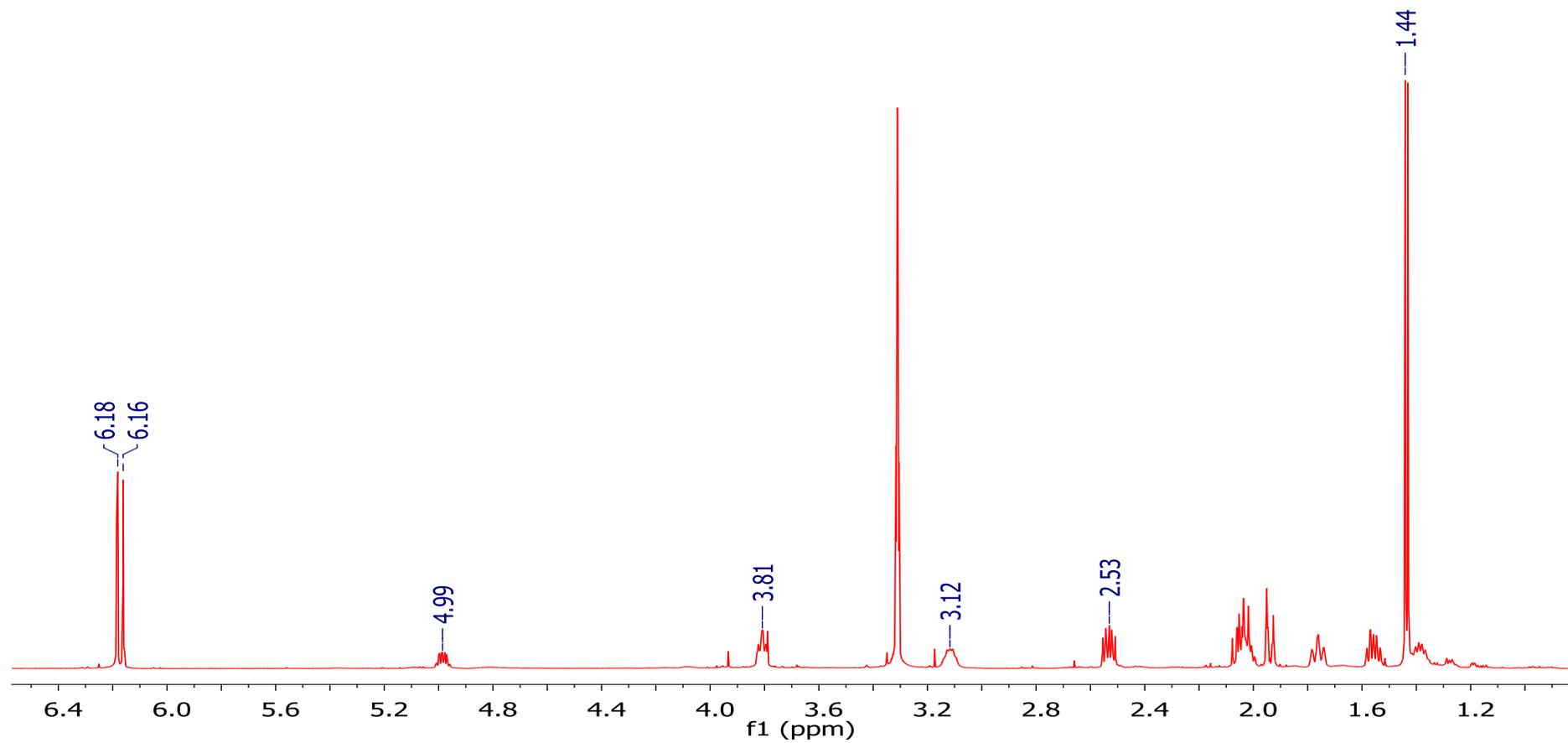


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H da Substância 3 (CD_3OD , 600 MHz).

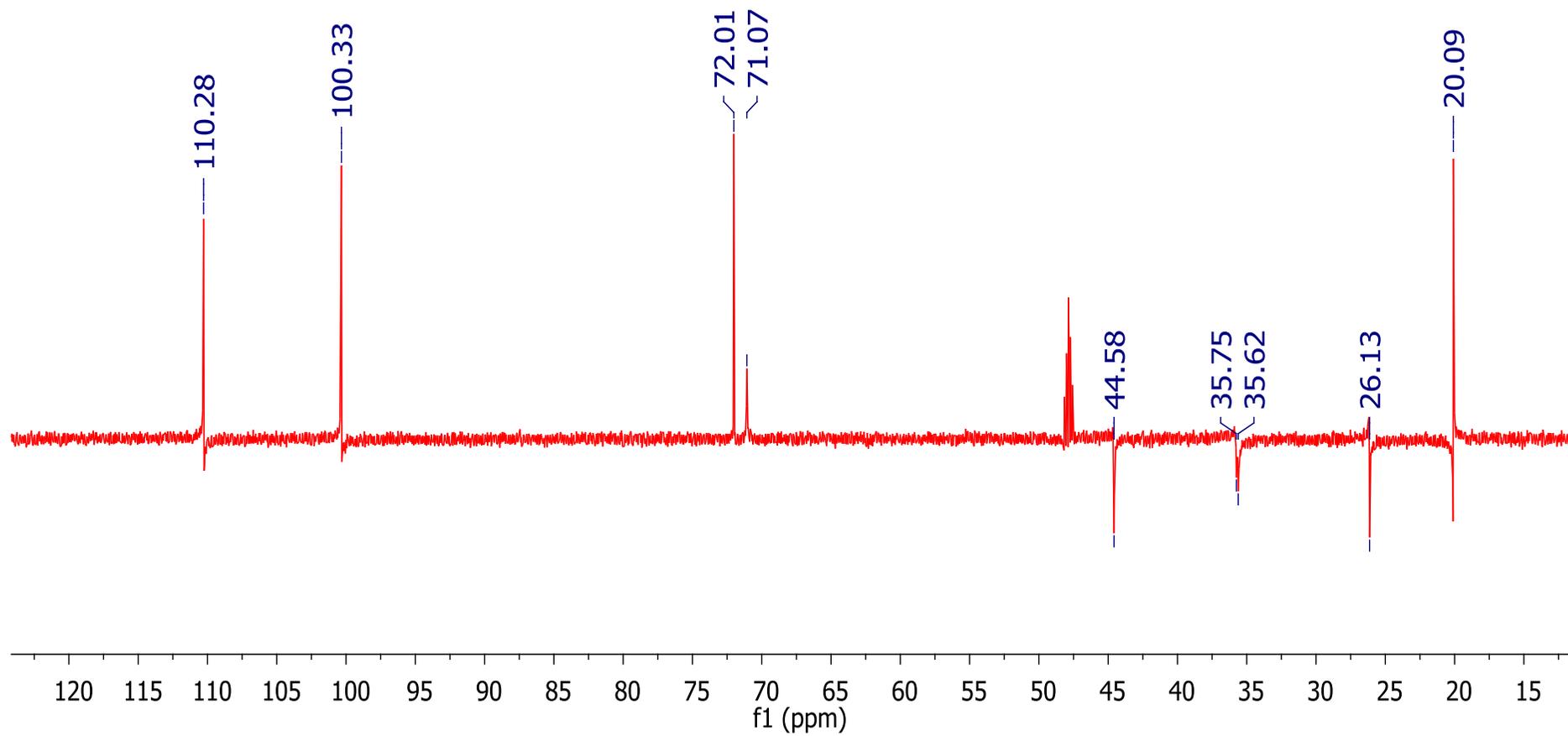


Figura 21. Espectro de RMN de DEPT-135° da substância **3** (CD₃OD, 150 MHz).

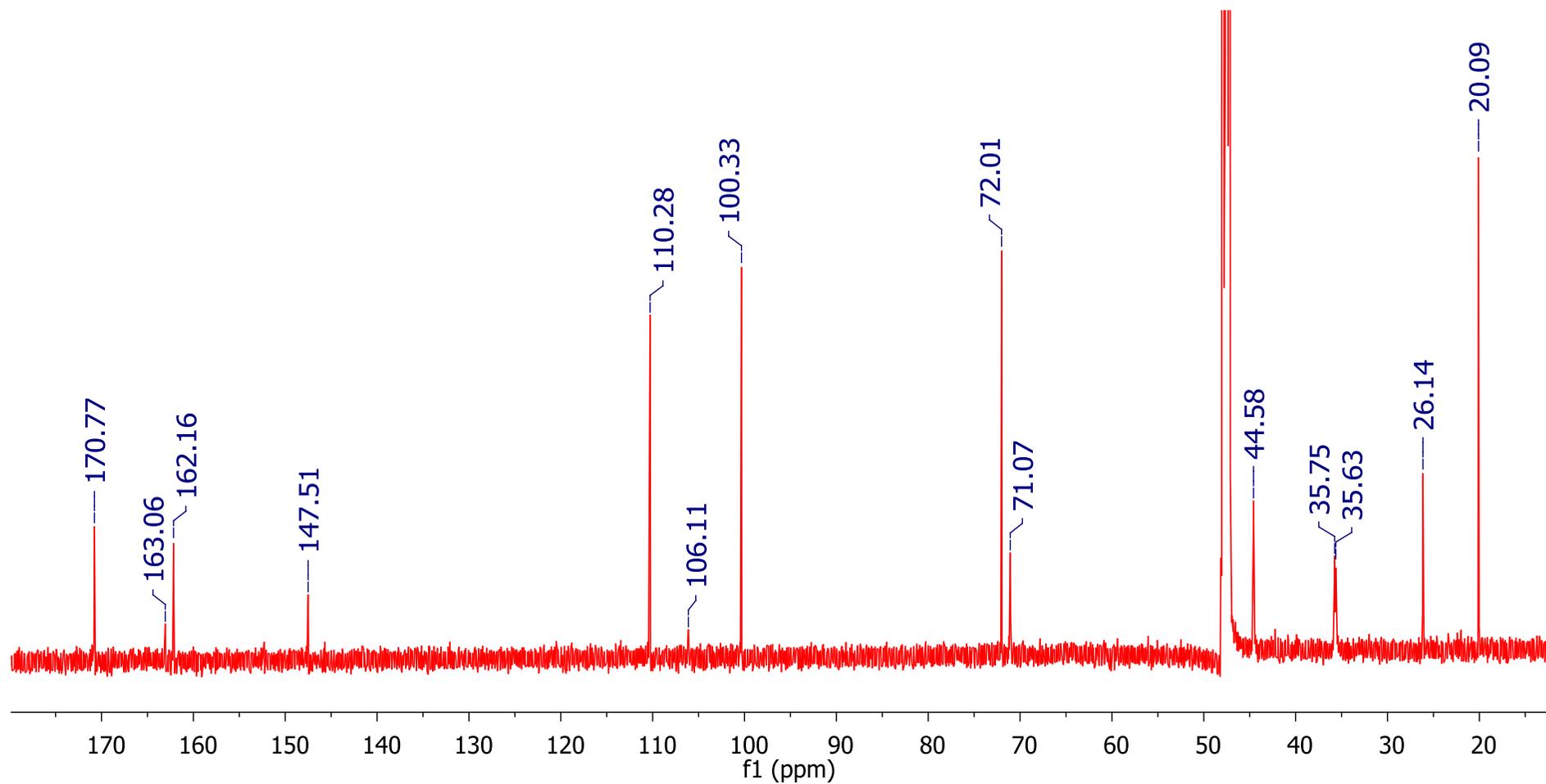


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3 (CD_3OD , 150 MHz).

A substância **3** foi analisada por espectrometria de massas de alta resolução , que mostrou picos em ESI (+) com m/z 289.1043 $[M + Na]^+$, e m/z 267.1223 $[M+H]^+$. A comparação com os dados da literatura (Li et al, 2010) e com aqueles obtidos para as substâncias **1** e **2**, além dos dados de EM e de RMN ^{13}C , sugeriu a presença de grupo hidroxila em C-5 (δ 71.0) e fórmula molecular $C_{14}H_{18}O_5$.

Estes dados permitiram identificar substância **3** com um macrolídeo já conhecido, isolado anteriormente do fungo endofítico (Zh6-B1), obtido das cascas de *Sonneratia apetala*, que ocorre no mangue na costa sul do Mar da China. Li e colaboradores (2010) isolaram dois macrolídeos diastereoméricos de 10-membros, a (3*R*,5*R*)-sonnerlactona e (3*R*,5*S*)-sonnerlactona, cuja avaliação de citotoxicidade mostrou que ambas atuam como inibidores de células de carcinoma multi-resistentes.

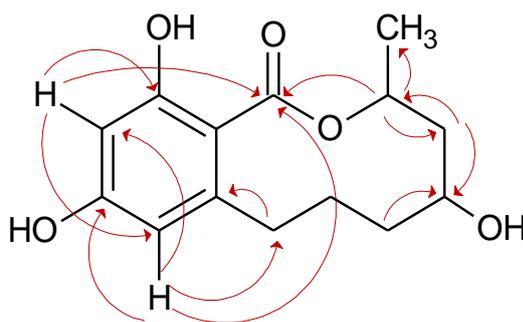


Figura 23. Principais correlações de HMBC 1H - ^{13}C da Substância **3**

Para proposta da estereoquímica foram analisados os dados de RMN 1H e ^{13}C , (tabela 8), em especial, aqueles dos centros assimétricos C-3 e C-5 da substância **03** (Figura 24) e dos macrolídeos diastereoméricos (3*R*,5*R*)-sonnerlactona e (3*R*,5*S*)-sonnerlactona. O sinal para o H-3 e sua constante de acoplamento (J) com o grupo metila em C-3 (δ 4.99; 6,4 Hz) mostraram-se idênticos aos relatados para a (3*R*,5*R*)-sonnerlactona, enquanto diferiram substancialmente daqueles observados para seu diastereômero, a (3*R*,5*S*)-sonnerlactona (δ 4.99; 6,8 Hz). Além disso, os sinais de H-5 (δ 3.81) e de C-5 (δ 71.0) mostraram semelhança acentuada com os dados do macrolídeo (3*R*,5*R*)-sonnerlactona, que apresentou os sinais de H-5 em δ 3.85 e C-5 em δ 72.0. Por outro lado, os dados obtidos para substância **3** diferem do macrolídeo (3*R*,5*S*)-sonnerlactona, cujos sinais para H-5 e C-5 foram observados

em δ 4.23 e δ 67.9, respectivamente. A análise conjunta dos dados acima sugere a estrutura do macrolídeo (3*R*,5*R*)-sonnerlactona para substância **3**.

Tabela 8. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de subst.03 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3ODa)

Posição	^1H δ	^{13}C δ	HMBC
1	-	170.7; C	-
3	4.99, <i>dqd</i> (12,4; 6,4; 2,0)	72.0; CH	C-1,C-4 e CH_3
4	1.75, <i>dd</i> (14,1;11,9) 2.05, <i>m</i>	44.5; CH_2	C-3, C-6 e CH_3
5	3.81, <i>m</i>	71.0; CH_2	-
6	1.55, <i>m</i> 1.76, <i>m</i>	35.6; CH_2	C-4, C-5, C-7 e C-8
7	1.40, <i>m</i> 2.09, <i>m</i>	26.1; CH_2	C-5, C-6 e C-8 ^a
8	2.53, <i>dd</i> (13,1; 8,0; 6,2) 3.12, <i>dt</i> (12,9; 6,6)	34.7; CH_2	C-6, C-7, C-8a, C-9 e C-12 ^a
8^a	-	147.5; C	-
9	6.16, <i>d</i> (2,4)	110.2; CH	C-1, C-8,C-10, C-11, C-12a,
10	-	162.1; C	-
11	6.18, <i>d</i> (2,4)	100.3; CH	C-1,C-9, C-10, C-11, C-12a,
12	-	163.0; C	-
12^a	-	106.1; C	-
3-CH_3	1.37, <i>d</i> (6,4)	20.0; CH_3	C-3, C-4

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

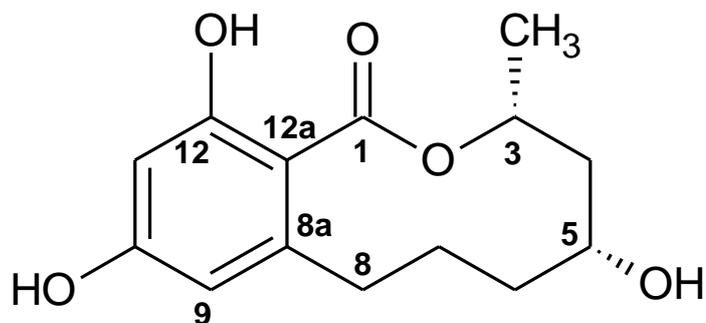


Figura 24. Estrutura da Substância **3**

4.6.4 Determinação estrutural da substância 4.

A substância **4** (6,0 mg) foi isolada da fração 5 de Ps-03 A-Acn e apresentou no espectro de UV (**Figura 25**) absorções com λ_{\max} em 247 nm. Sua identificação se deu por meio das análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e mapas de contorno COSY ^1H - ^1H , HSQC e HMBC ^1H - ^{13}C , além de espectrometria de massas de alta resolução e por comparação com dados da literatura.

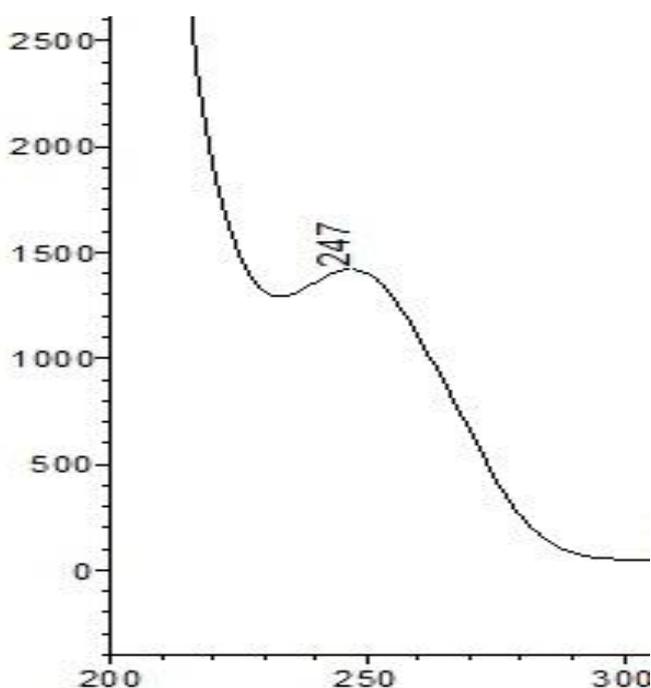


Figura 25. Espectro no Ultravioleta da Substância **04**

O espectros de RMN de ^1H (**Figura 26**) e ^{13}C (**Figura 27**) da substância **04** apresentaram sinais para dois sistemas característicos de anéis aromáticos monossustituídos, além de um sinal para carbonila de éster/lactona em δ 174.3 (C-2), e sinais para dois carbonos metilênicos isolados: C-5 (δ_{C} 71.47; δ_{H} 4.78, s) e C-6 (δ_{C} 33.15; δ_{H} 3.99, s). Estes espectros mostraram ainda sinais para dois carbonos sp^2 em δ 126.6 e δ 162.1, atribuídos a C-3 e C-4, respectivamente, caracterizando uma ligação dupla conjugada à carbonila do éster de um sistema carbonílico α,β -insaturado (**Tabela 09**).

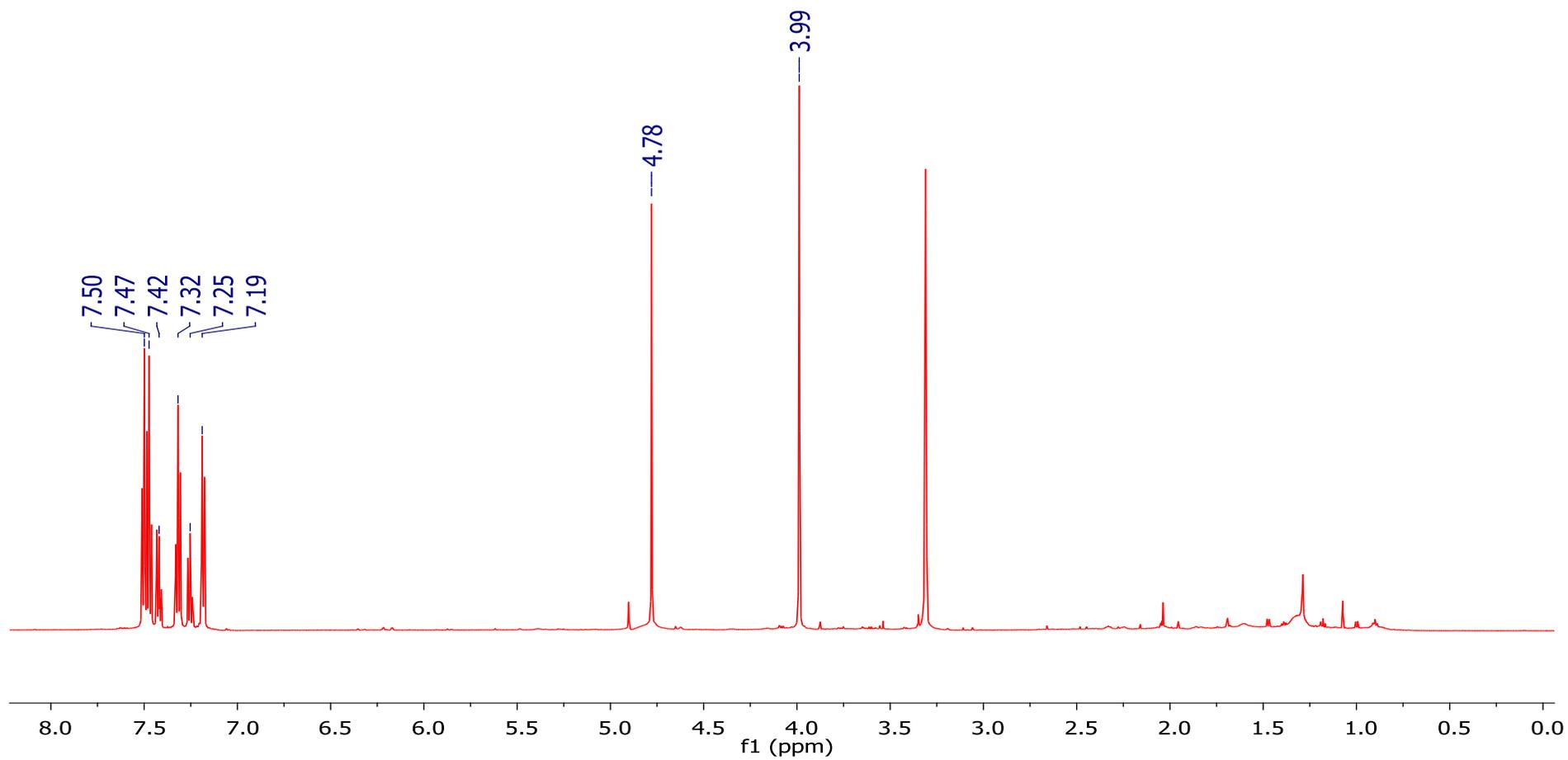


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H da Substância 4 (CD_3OD , 600 MHz).

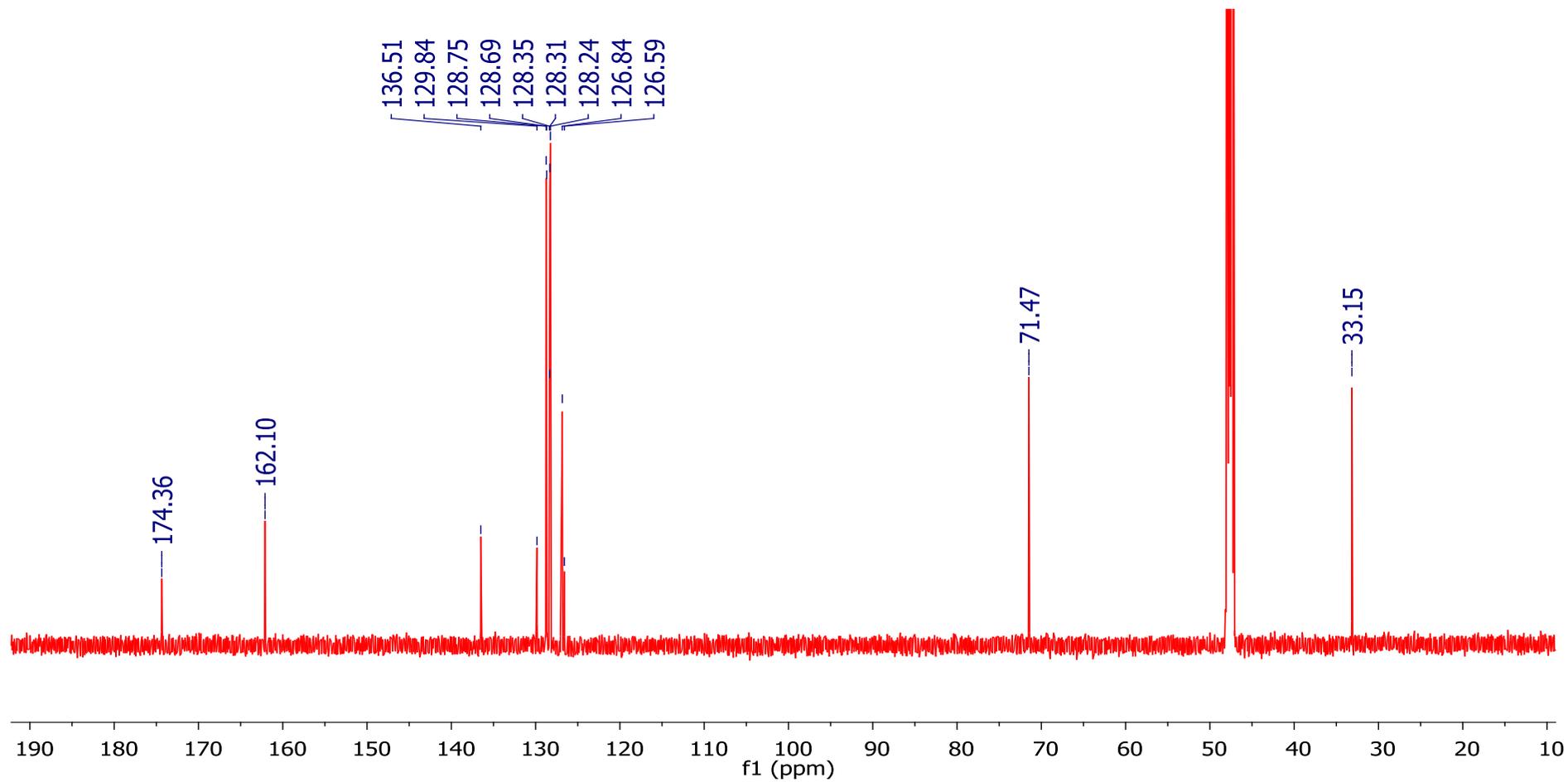
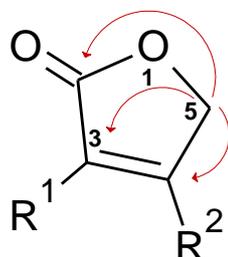


Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 4 (CD_3OD , 150 MHz).

Através do experimento HMBC, foi possível verificar as correlações entre H-5 e C-2, C-3 e C-4, capazes de definir o anel γ -lactona α,β -insaturado que caracterizam um butenolídeo.



Adicionalmente, as correlações entre H-6 e C-1'', C-3, C-4 e C-5 indicaram um grupo benzila ligado ao anel lactônico através dos carbonos C-6 e C-4. As correlações entre H-2''/H-6'' e C-6, bem como entre H-3''/H-5'' e C-1'' reforçaram as conectividades internamente ao grupo benzila. As demais correlações observadas entre H-2'/H-6' e C-1', e entre H-3'/H-5' e C-3 permitiram confirmar a presença de um grupo fenila, conectado ao anel lactônico através da ligação entre os carbonos C-1' e C-3 (Figura 28), caracterizando um butenolídeo α,β -dissubstituído por um grupo fenila e um benzila, respectivamente.

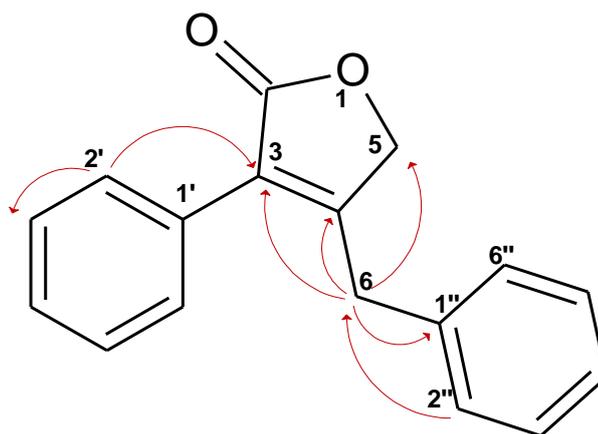


Figura 28. Principais correlações de HMBC ^1H - ^{13}C da Substância **4**.

A substância **4** foi analisada por espectrometria de massas de alta resolução que mostrou os picos por (ESI (+) em m/z 273.0884 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, e m/z 251.1063 $[\text{M} + \text{H}]^+$. A comparação com os dados da literatura, além dos dados de EM e de RMN

^{13}C , permitiu identificar a substância **4** como um butenolídeo aromático de fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_2$, já relatado na literatura como gymnoascolídeo A (**Figura 29**) e anteriormente isolado do ascomiceto *Gymnoascus reessii*, obtido do solo australiano (BRINGMANN et al, 2005).

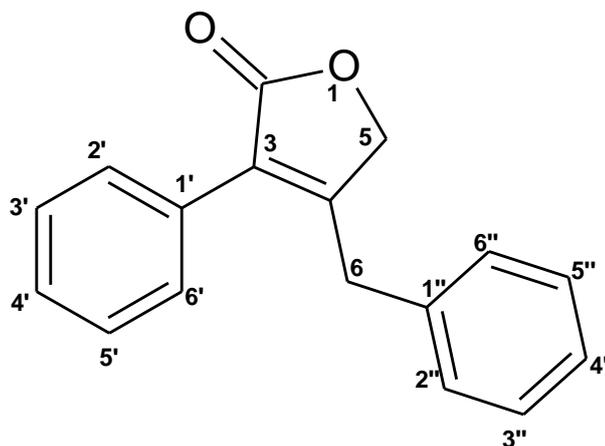


Figura 29. Estrutura da Substância **4**.

Os butenolídeos correspondem a γ -lactonas insaturadas (BARBOSA et al, 2010) e suas atividades biológicas são frequentemente relacionadas à presença da insaturação do anel, além da natureza e posições dos diferentes substituintes do mesmo (BASSETIli, M.; D'ANNIBALE, A. 2013). Os gymnoascolídeos possuem uma rara estrutura, formada por uma unidade de butenolídeo e anéis aromáticos que são encontrados a partir de fontes microbianas.

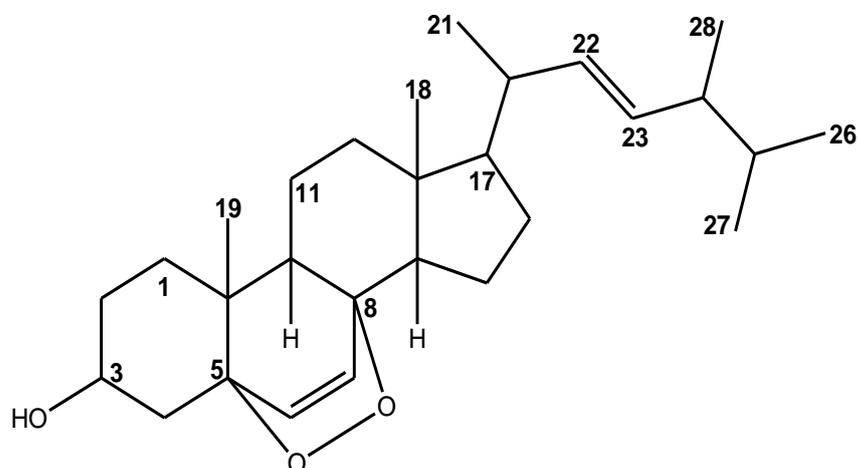
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância **4** (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3ODa)

Posição	^1H δ	^{13}C δ	HMBC
2	-	174.3; C	-
3	-	126.5; C	-
4	-	162.1; C	-
5	4.78, s	71.4; C	1', 1'', 2, 3, 4, 6
6	3.99, s	33.1; CH_2	2, 3, 4, 5, 1''
1'	-	129.8; CH_2	-
2'/6'	7.50	128.7 CH	3, 1', 3'/5'
3'/5'	7.47	128.3; CH	2'/6'
4'	7.42	128.2; CH	2'/6', 3'/5'
1''	-	136.5; C	-
2''/6''	7.19	128.3; CH	6, 4''
3''/5''	7.32	128.6; CH	1'', 3''/5''
4''	7.25	126.8; CH	2''/6'', 3''/5''

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

R¹

4.6.5 Determinação estrutural da substância **5**.



A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C da fração F7-16 permitiu a identificação da substância **5**, pertencente à classe dos esteroides.

O espectro de RMN ^1H (**Figura 30**) apresentou dois simpletos em δ 0.81 e 0.89 correspondentes aos hidrogênios metílicos em carbono não hidrogenado (H-18 e H-19); um mutipletto em δ 3.77 (1H, *m*) atribuído ao hidrogênio hidroximetínico H-3, além de sinais em δ 5.20 (1H, dd, $J= 15.2, 8.3$ Hz), e 5.23 (1H, dd, $J= 15.2, 8.3$ Hz) correspondentes aos hidrogênios olefínicos H-22 e H-23 na cadeia lateral e sinais em δ 6.50 (1H, *d*, 8.5 Hz) e 6.27 (1H, *d*, 8.5 Hz) associados aos hidrogênios da dupla ligação endocíclica entre C-6 e C-7, respectivamente (**Tabela 10**).

O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 31**) mostrou sinais para 28 carbonos, sendo quatro olefínicos, em δ 136.8, 133.5, 131.7 e 136.8, seis metilas em δ 13.2, 18.6, 21.3, 20.0, 20.4 e 18.1, além do carbono carbinólico em δ 67.0 atribuído a C-3 e dois carbonos quaternários oxigenados adjacentes do grupo peróxido em δ 83.5 e 80.7, atribuídos a C-5 e C-8.

As correlações no mapa de contorno HMBC de H-4 com C-3 e C-5 e de H-14 com C-8 confirmaram a presença o grupo peroxido conectando C-5 e C-8. A comparação destes dados de RMN ^1H e ^{13}C com os relatados na literatura (KWON et al, 2002) permitiu propor a estrutura do esteroide ergosterol-5,8-endoperóxido $\Delta^{6,22}$ para substância **5**. A análise por espectrometria de massas de alta resolução mostrou os picos em (ESI (+) com m/z 451.3185 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ e m/z 429.3368 $[\text{M} + \text{H}]^+$, associados à fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$, que confirmou a estrutura de **5**.

Ergosterol endoperóxido, já foi descrito na literatura em linhagens de *Aspergillus versicolor* isolado da alga parda *Sargassum thunbergii*, bem como em fungos terrestres, incluindo linhagens obtidas no deserto do Atacama, e corais e possui atividade antibacteriana e citotóxica (MIAO et al, 2012; YAOITA et al, 1998; YU et al, 2006; GONÇALVES et al, 2016).

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância **5** (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3ODa)

Posição	^1H δ	^{13}C δ	HMBC
1	Ha= 1.70; Hb= 1.90	35.9	2, 3, 10
2	Ha= 1,78; Hb= 1.51	30.8	1, 3
3	3.77 <i>m</i>	66.9	
4	1.96	37.7	3, 5, 6
5	-	83.9	
6	6.50 <i>d</i> (8.5)	131.7	5, 7, 8
7	6.27 <i>d</i> (8.5)	136.8	5, 6, 8
8	-	80.7	
9	1.45	52.7	8, 10
10	-	37.7	
11	Ha= 1.25; Hb= 1.55	24.3	
12	1.95	38.1	
13	-	45.7	
14	1.53	53.1	
15	1.50	21.5	
16	1.76	29.8	
17	1.24	57.5	
18	0.84 <i>s</i>	13.2	13
19	0.90 <i>s</i>	18.6	10
20	1.99	40.6	
21	1.02 <i>d</i> (6.6)	21.3	
22	5.20 <i>dd</i> (15.2, 8.3)	136.8	17, 20, 21, 23, 24
23	5.23 <i>dd</i> (15.2, 8.3)	133.4	17, 20, 22, 24,
24	2.06	41.1	
25	1.47	34.3	
26	0.85 <i>d</i>	20.0	23, 24, 25, 27
27	0.85 <i>d</i>	20.4	23, 24, 25, 26
28	0.93 <i>d</i> (6.8)	18.1	23, 24, 25

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

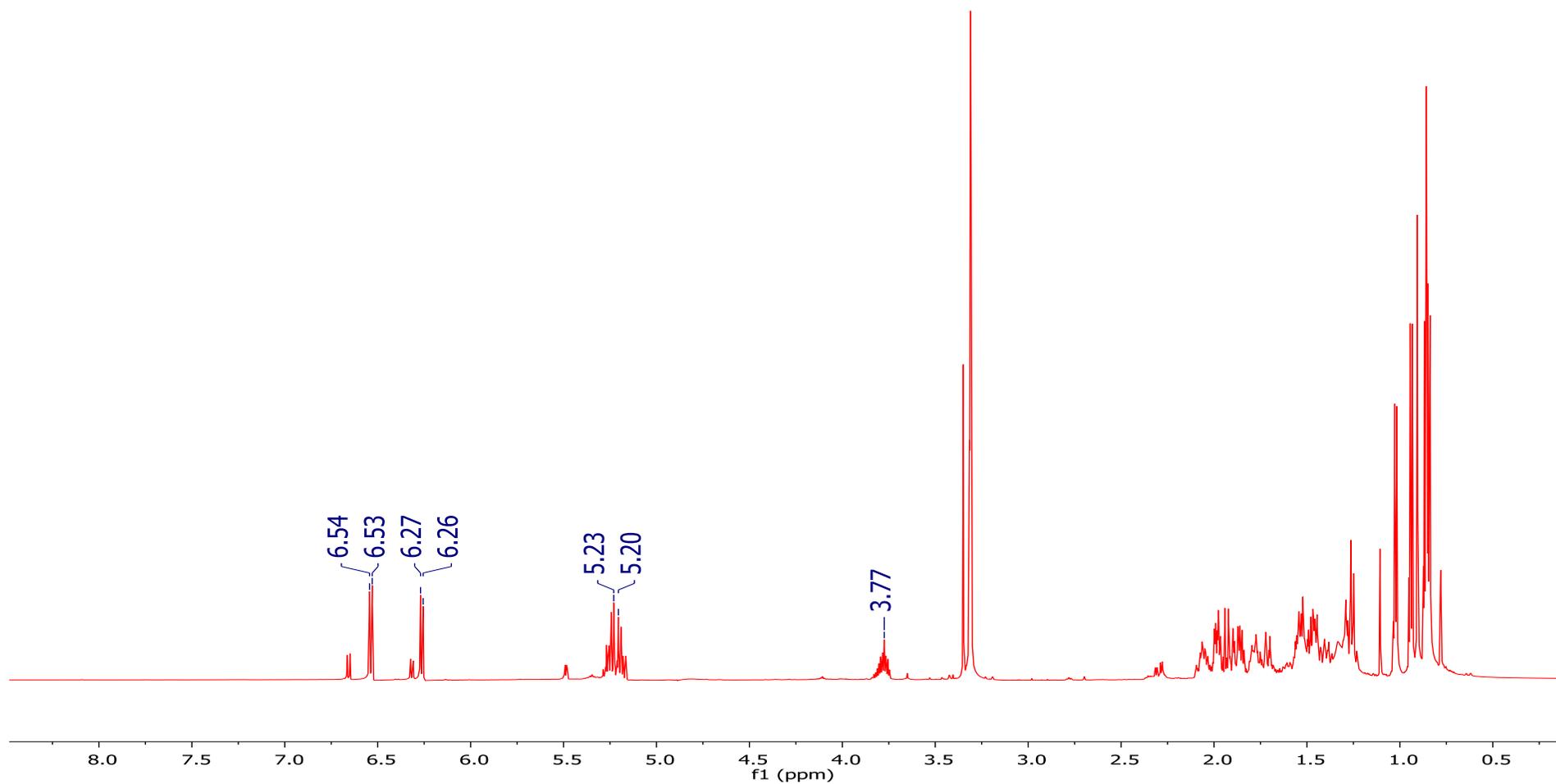


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H da Substância 5 (CD_3OD , 600 MHz).

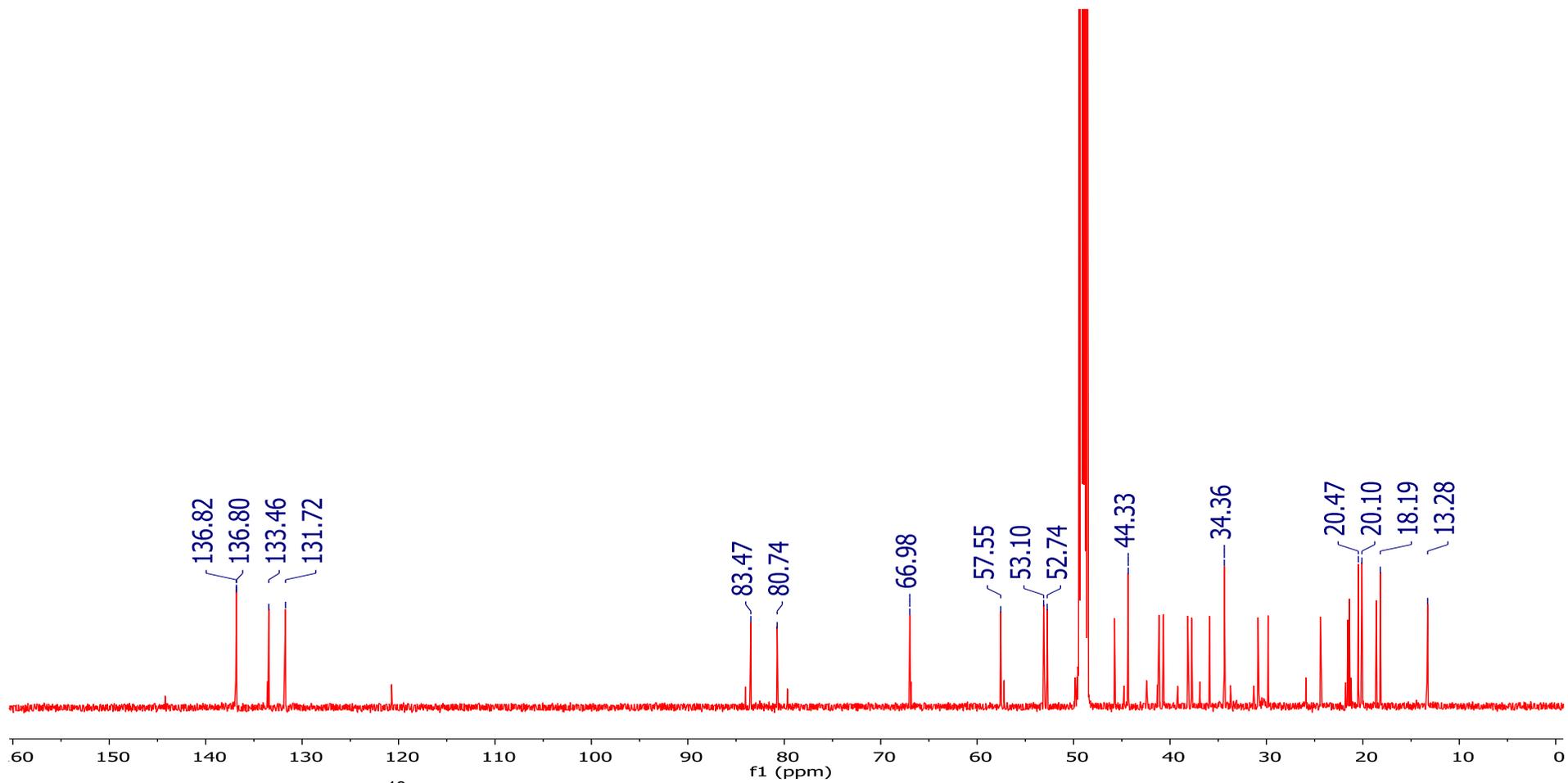
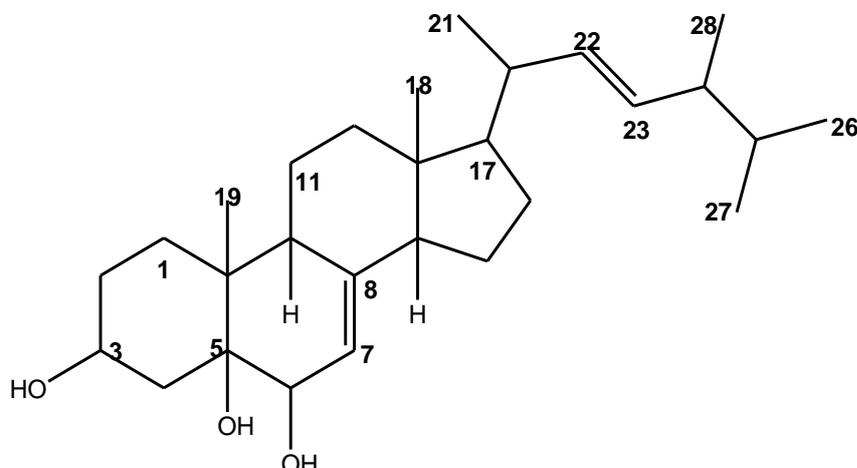


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 5 (CD_3OD , 150 MHz)

4.6.6 Determinação estrutural da substância **06**.

Os espectros de RMN das substâncias **5** e **6** mostraram similaridades, indicando que ambas pertencem à mesma classe de metabólitos, os esteroides. Ambas mostraram sinais de RMN ^1H na região de hidrogênios olefínicos em δ 5.23 e 5.16, referentes a H-22 e H-23, respectivamente, da cadeia lateral acíclica do esteroide.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 32**) apresentou dois simpletos em δ 0.59 e 1.08 correspondentes aos hidrogênios metílicos sobre carbono quaternário (H-18 e H-19); dois sinais para hidrogênios hidroximetínicos em δ 4.08 (1H, *m*) e em δ 3.62 (1H, *d*, 4.6 Hz), atribuídos a H-3 e H-6, além de sinais para dois hidrogênios olefínicos em δ 5.16 (1H, dd, $J = 15.3, 8.3$ Hz) e 5.23 (1H, dd, $J = 15.3, 8.3$ Hz), que foram atribuídos a H-22 e H-23, por mostrarem correlação no experimento HSQC com os sinais em δ 132.3 e 135.5, associados aos carbonos sp^2 C-22 e C-23, respectivamente, da cadeia lateral. A comparação com dados de RMN de ^1H da substância **5** indicou a diferença marcante associada à posição da ligação dupla endocíclica, já que para a substância **6** foi observado sinal para apenas mais um hidrogênio olefínico, em contraste com os dois sinais adicionais observados para **5** nesta região. Este espectro permitiu assim, a atribuição do sinal em δ 5.35 a H-7, pela sua correlação com C-7 (δ 117.7), observada no mapa de contorno HSQC, bem como aquelas de H-7 com C-5, C-9 e C-14, observadas no experimento HMBC. Este experimento evidenciou também a correlação entre H-9 e o sinal para carbono sp^2 não hidrogenado em δ 144.2, que foi então atribuído ao C-8, bem como a posição da dupla ligação entre C-7 e C-8.

Análise adicional dos dados de RMN ^{13}C (**Figura 33**) confirmou esta proposta, em especial pela análise de sinais diagnósticos como aqueles de carbonos sp^2 e oxigenados. Este espectro mostrou 28 sinais, sendo quatros sinais de carbonos olefínicos em δ 132.3, 135.5, 117.6 e 144.1, além de sinais para carbonos hidroximetínicos em δ 67.0 e em δ 73.8, atribuídos a C-3 e C-6, e para carbono quaternário oxigenado em δ 76.1, atribuído a C-5. A análise destes dados e sua comparação com dados de RMN de ^{13}C da substância **5**, confirmaram a diferença associada à posição da ligação dupla endocíclica, já que os sinais para carbonos oxigenados da substância **6**, em conjunto com os dados de RMN 2D, sugeriram a posição da dupla ligação endocíclica entre C-7 e C-8 e ausência do grupo peróxido (**Tabela 11**).

Correlações adicionais no mapa de contorno HMBC entre H-19 e C-5, e entre H-7 e C-5, bem como seu descolamento químico em δ 76.1, confirmaram que C-5 esteja ligado ao substituinte OH, caracterizando um álcool terciário. Durante o processo de purificação destes esteroides, verificou-se a maior polaridade da substância **6** quando comparada à **5**, contribuindo para o respaldo da proposta estrutural com dois grupos hidroxila adicionais para **6**.

As análises descritas acima, bem como a comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C com os dados da literatura (KAWAGISHI et al, 1988 e ZHAO et al, 2014) permitiram confirmar a estrutura proposta com fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_3$ e identificar a substância **6** com o esteroide 22E-ergosta-7,22-dieno-3 β ,5,6-triol.

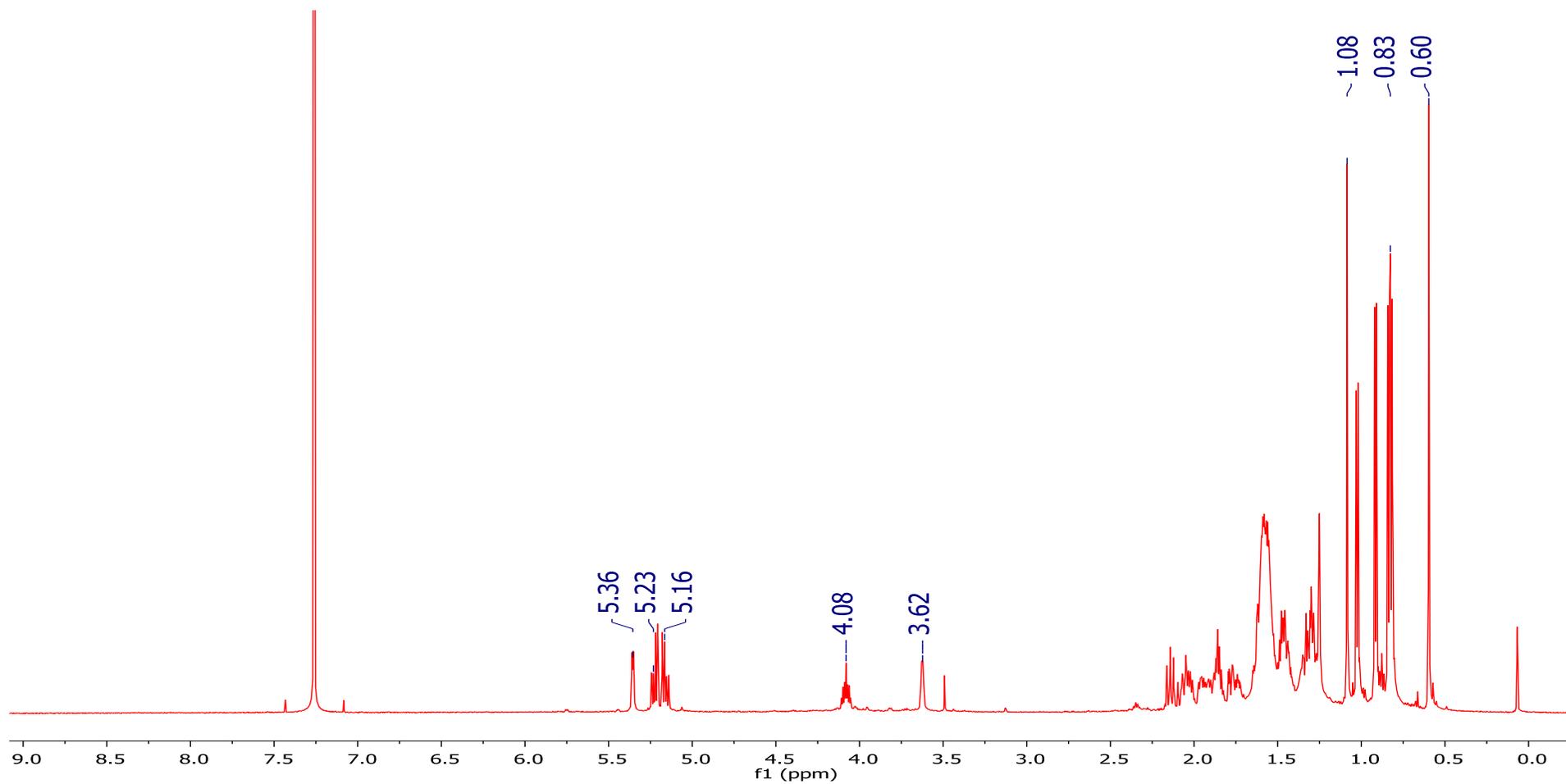


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H da Substância 6 (CDCl_3 , 600 MHz).

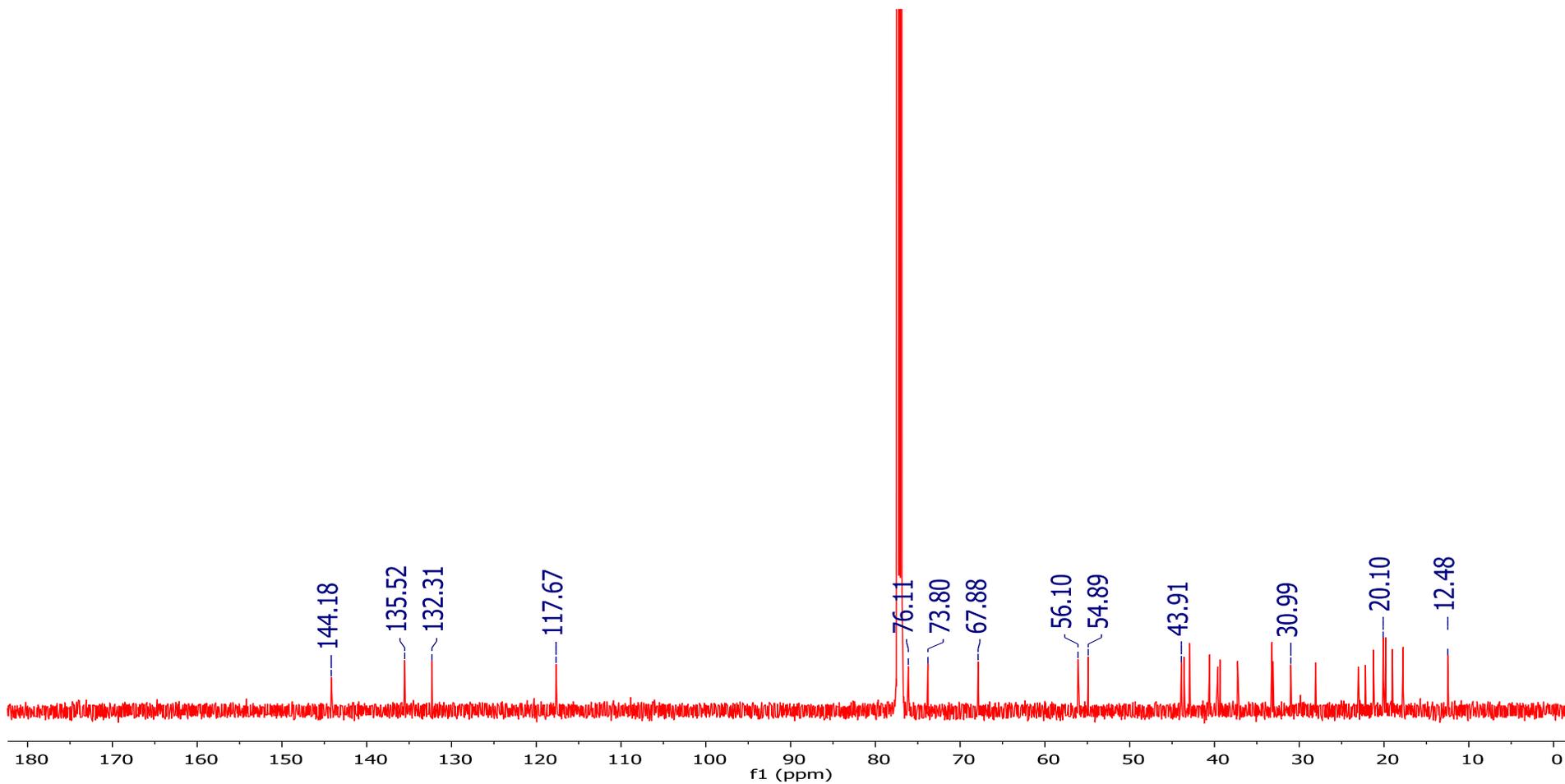


Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 6 (CDCl_3 , 150 MHz).

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância **6** (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , (CD_3OD^a))

Posição	^1H δ	^{13}C δ	HMBC
1	Ha= 1.53; Hb= 1.60	33.2	2, 3, 10
2	1,86	30.9	1, 3, 4
3	4.08 <i>m</i>	67.8	
4	Ha= 1.77; Hb= 2.14	39.5	2, 3, 5
5	-	76.1	
6	3.62 <i>d</i> (8.5)	73.7	5, 6, 7, 8
7	5.35 <i>d</i> (8.5)	117.6	5, 6, 8
8	-	144.1	
9	1.95 <i>t</i>	43.6	8, 10
10	-	37.2	
11	1.45	23.0	
12	Ha= 1.31; Hb= 2.05	39.3	
13	-	43.9	
14	1.91	54.8	
15	1.57	22.1	
16	1.73	28.0	
17	1.29 <i>m</i>	56.1	
18	0.59 <i>s</i>	12.4	13, 17
19	1.08 <i>s</i>	19.0	5, 9, 10
20	2.02	40.5	
21	1.02 <i>d</i> (6.6)	21.3	17, 20, 22
22	5.23 <i>dd</i> (15.3, 8.3)	132.3	20, 21, 23, 24
23	5.16 <i>dd</i> (15.3, 8.3)	135.5	20, 22, 24, 25
24	1.84	42.9	
25	1.46	33.1	
26	0.82 <i>d</i>	19.7	24, 25, 27
27	0.83 <i>d</i>	20.1	24, 25, 26
28	0.91 <i>d</i> (6.8)	17.3	23, 24, 25

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

4.6.7 Determinação estrutural da substância 7

A substância **7** (4,0 mg) isolada da fração 2 de Ps-03 A-Acn apresentou no espectro de UV (**Figura 34**) absorções com λ_{\max} em 223 e 286 nm. Sua identificação se deu por meio das análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e mapas de contorno COSY ^1H - ^1H , HSQC e HMBC, além de espectrometria de massas de alta resolução e por comparação com dados da literatura.

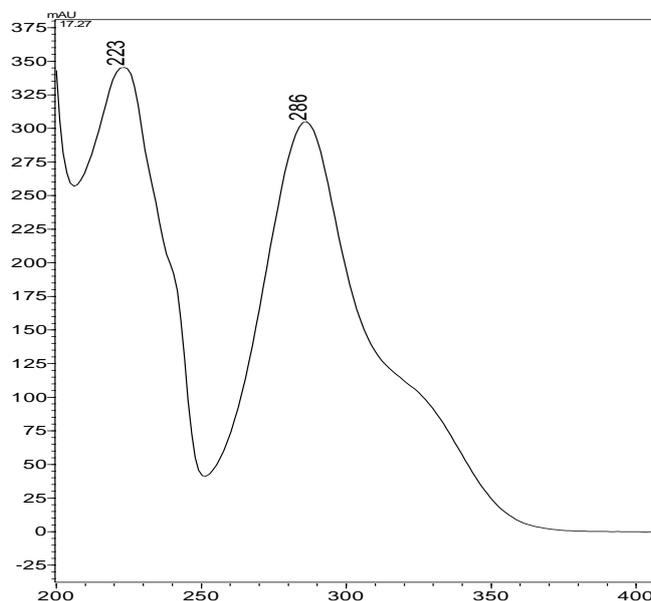
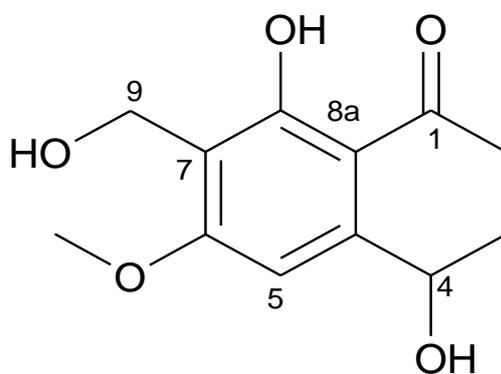


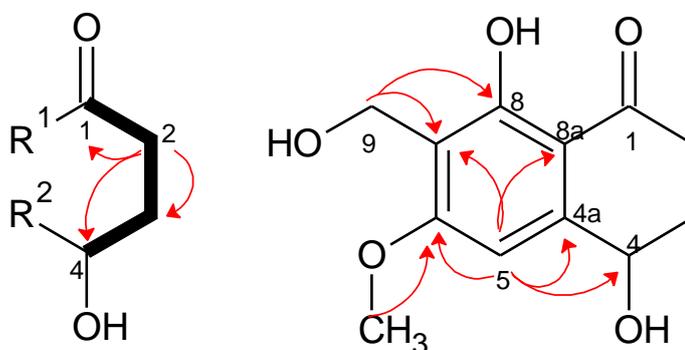
Figura 34. Espectro na região do UV da substância **07**.

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 35**) apresentou um único sinal na região característica de hidrogênios aromáticos em δ 6.82 s (H-5) integrando para 1H, além de simpletos em δ 4.67 (H-9) e 3.97 (6-OCH₃) integrando para 2H e 3H,

respectivamente. Este espectro mostrou também sinais para um sistema alifático composto por um hidrogênio oximetínico (H-4) (δ 4.80, dd) e dois pares de hidrogênios metilênicos diastereotópicos (H-2 e H-3) (**Tabela 12**).

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais para uma metila (δ 56.4), três carbonos metilênicos (δ 32.7, 36.0 e 52.7), dois metínicos (δ 68.6 e 101.8) e seis carbonos quaternários (δ 111.7, 115.0, 151.2, 163.5, 165.8 e 204.1). As atribuições foram realizadas de acordo com as correlações diretas observadas no mapa de contorno HSQC e por comparação com os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C .

Através do mapa de contorno HMBC, foi possível verificar as principais correlações entre H-2 e C-1, C-3 e C-4, que contribuíram para definir o sistema alifático, bem como entre H-5 e C-4, C-4a, C-6, C-7 e C-8a, indicando que C-4 (δ 68.7) está ligado ao anel aromático através de C-4a (δ 151.2). Adicionalmente, as correlações de H-9 com C-6, C-7 e C-8 mostraram a conectividade do grupo hidroximetilênico ao anel aromático, enquanto os sinais atribuídos ao grupo metoxila aromático (δ_{H} 3.97 e δ_{C} 56.47), bem como sua correlação com C-6 (δ 165.8), confirmaram a posição do grupo metila no anel aromático.



A substância **07** foi também analisada por espectrometria de massas de alta resolução que mostrou os picos em (ESI (+) com m/z 261.0731 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, e m/z 239.0910 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Estes dados, em conjunto com os dados de RMN e comparação com a literatura, permitiram identificar a substância **7** como 10-norparvulenona, de fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$, já relatada na literatura como produto do fungo endofítico (Zh6-B1), isolado das cascas de *Sonneratia apetala* que ocorre no mangue na costa sul do Mar da China (Li et al, 2010) e do fungo endofítico *Pulvinula* sp. 11120, isolado das folhas de *Cupressus arizonica* do deserto de Sonora

(WIJERATNE et al, 2015). Omura e colaboradores (OMURA et al, 2000) descreveram que a 10-norparvulenona possui atividade antiviral, inibindo a replicação do vírus influenza da gripe (A/PR/8/34).

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância 7 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3OD^a)

Posição	^1H δ	^{13}C δ	HMBC
1	-	204.1; C	-
2	2.30; 2.05	36.0; CH_2	1, 3, 4
3	2.81; 2.66	32.7; CH_2	2, 4
4	4.88	68.6; CH	-
4a	-	151.2; C	-
5	6.81, s	101.8; CH	1, 4, 4a, 6, 7, 8
6	-	165.8; C	-
6- OCH_3	3.97, s	56.4; CH_3	6
7	-	115.0; C	-
8	-	163.5; C	-
8a	-	111.7; C	-
9	4.67, s	52.73; CH_2	6, 7, 8

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

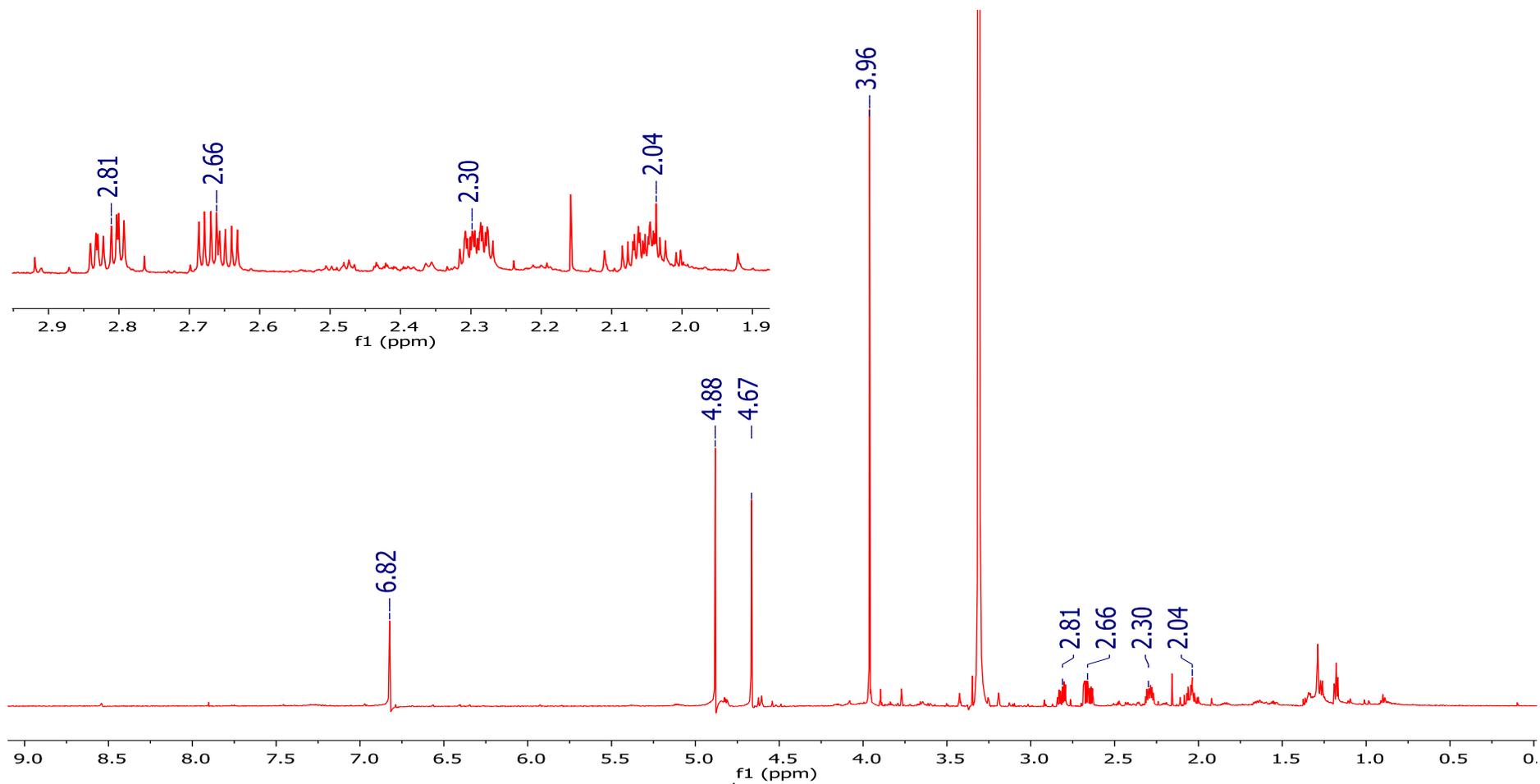
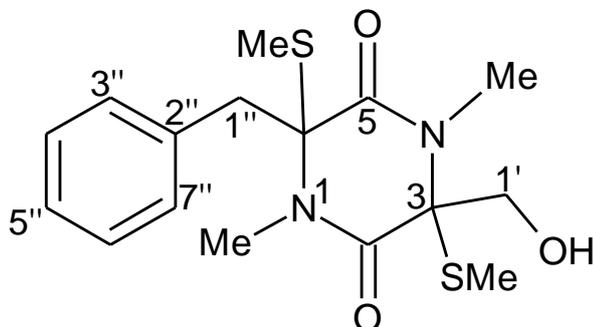


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H da Substância 7 (CD_3OD , 600 MHz).

4.6.8 Determinação estrutural da substância **8**

A substância **8** (10,0 mg) foi isolada da fração 3 de Ps-03 A-Acn e descrita no item 3.2.3. Sua fórmula molecular foi determinada como $C_{16}H_{22}N_2O_3S_2$, por análise de espectrometria de massas de alta resolução, que evidenciou os sinais em m/z 377.0964 $[M+Na]^+$ e m/z 355.1142 $[M+H]^+$. Sua determinação estrutural se deu por meio das análises dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C e mapas de contorno COSY 1H - 1H , HSQC e HMBC 1H - ^{13}C e HMBC 1H - ^{15}N , além de espectrometria de massas em alta resolução e por comparação com dados da literatura.

O espectro de RMN de 1H (**Figura 36**) da substância **8** apresentou sinais de um sistema característico de anel aromático monossustituído, integrando para 5 hidrogênios na região entre δ_H 7.14-7.22 (H-3''/H-7'', H-4''/H-6'' e H-5''), além sinais de dois pares de hidrogênios diastereotópicos em δ_H 3.27 e 3.77 (*d*, 14.5, H-1''), e em 3.57 e 3.72 (*d*, 11.7, H-1'). Adicionalmente foram observados simpletos para quatro metilas isoladas em δ_H 2.16; 2.28; 3.10 e 3.17 (**Tabela 13**).

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 37**) mostrou sinais para quatorze carbonos, que puderam ser atribuídos com auxílio do mapa de contorno HSQC (**Figura 38**). Foram observados sinais para duas carbonilas em δ_C 166.9 (C-2) e 167.4 (C-5), dois carbonos metilênicos em δ_C 64.9 (C-1') e 43.3 (C-1''), quatro carbonos metílicos em δ_C 13.5; 14.4; 30.4; 31.4, além de dois carbonos sp^3 não hidrogenados em δ_C 73.9 (C-3) e 74.3 (C-6). Os sinais observados em δ_C 131.0 e 128.3 foram atribuídos aos carbonos do anel aromático monossustituído que apresentam equivalência química (C-3''/C-7'' e C-4''/C-6''), respectivamente. Este espectro mostrou ainda sinais para um carbono sp^2 não hidrogenado em δ_C 135.6 (C-2'') e um carbono hidrogenado em δ_C 129.5 (C-5''), contabilizando um total de 16 carbonos (**Tabela 13**).

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da Substância **8** (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3OD^a)

Posição	^{13}C δ	^1H δ	HMBC
1 N-Me	31.4	3.17 s; CH_3	2 e 6
2	166.9	C=O	-
3	73.9	C	-
4 N-Me	30.4	3.10 s; CH_3	3 e 5
5	167.4	C=O	-
6	74.3	C	-
1'	64.9	3.57; 3.72 (d; 11.7)	2 e 3
1''	43.3	3.27; 3.77 (d; 14.5)	5, 6, 2'' e 3''
2''	135.6	C	-
3'' e 7''	131.0	7.14; CH	1'', 2'', 4'' e 5''
4'' e 6''	128.7	7.21; CH	2'', 3'' e 5''
5''	129.5	7.22; CH	3'' e 4''
3 S-Me	13.5	2.16 s CH_3	3
6 S-Me	14.4	2.28 s CH_3	6

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

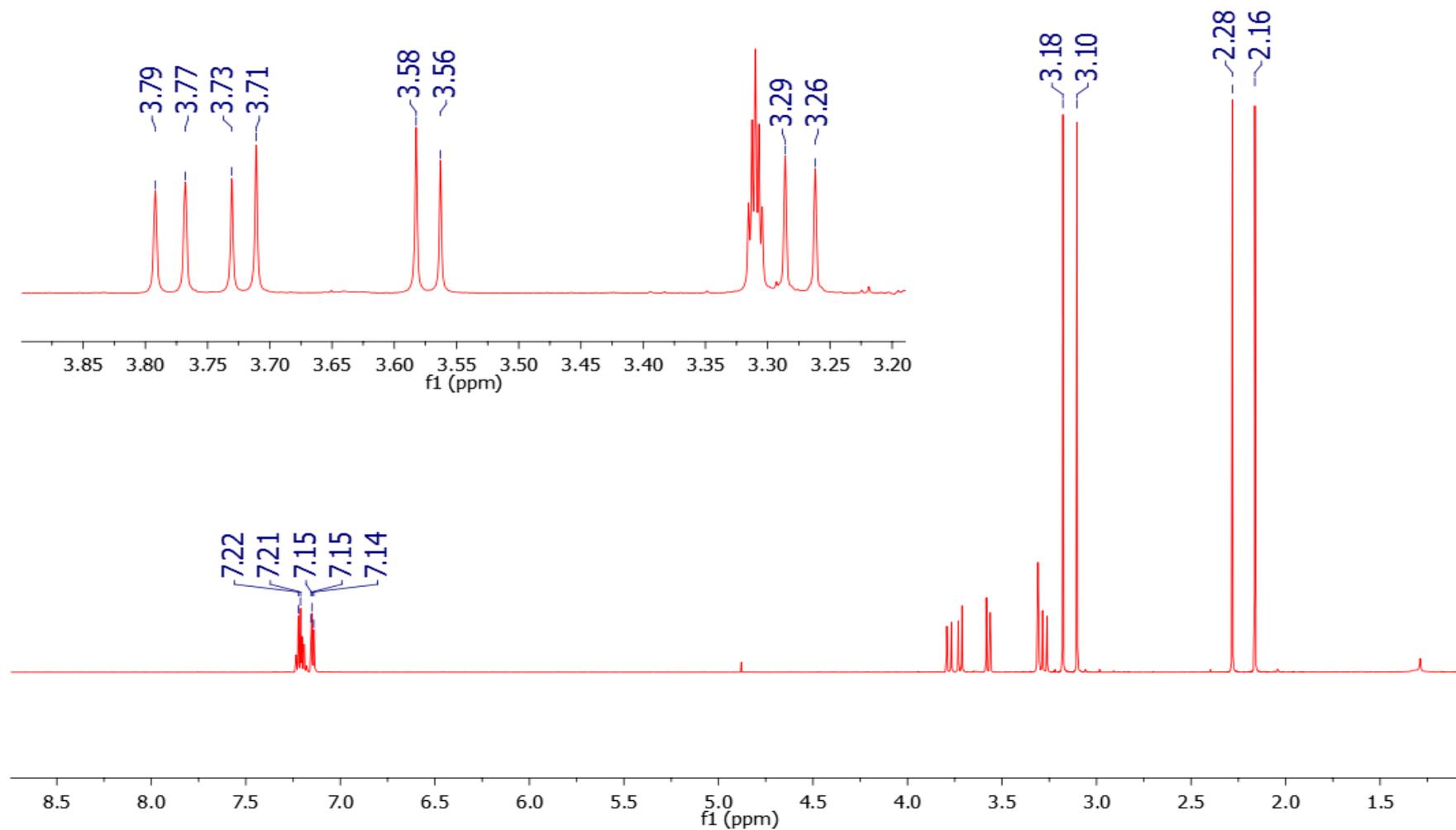


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H da Substância 8 (CD_3OD , 600 MHz).

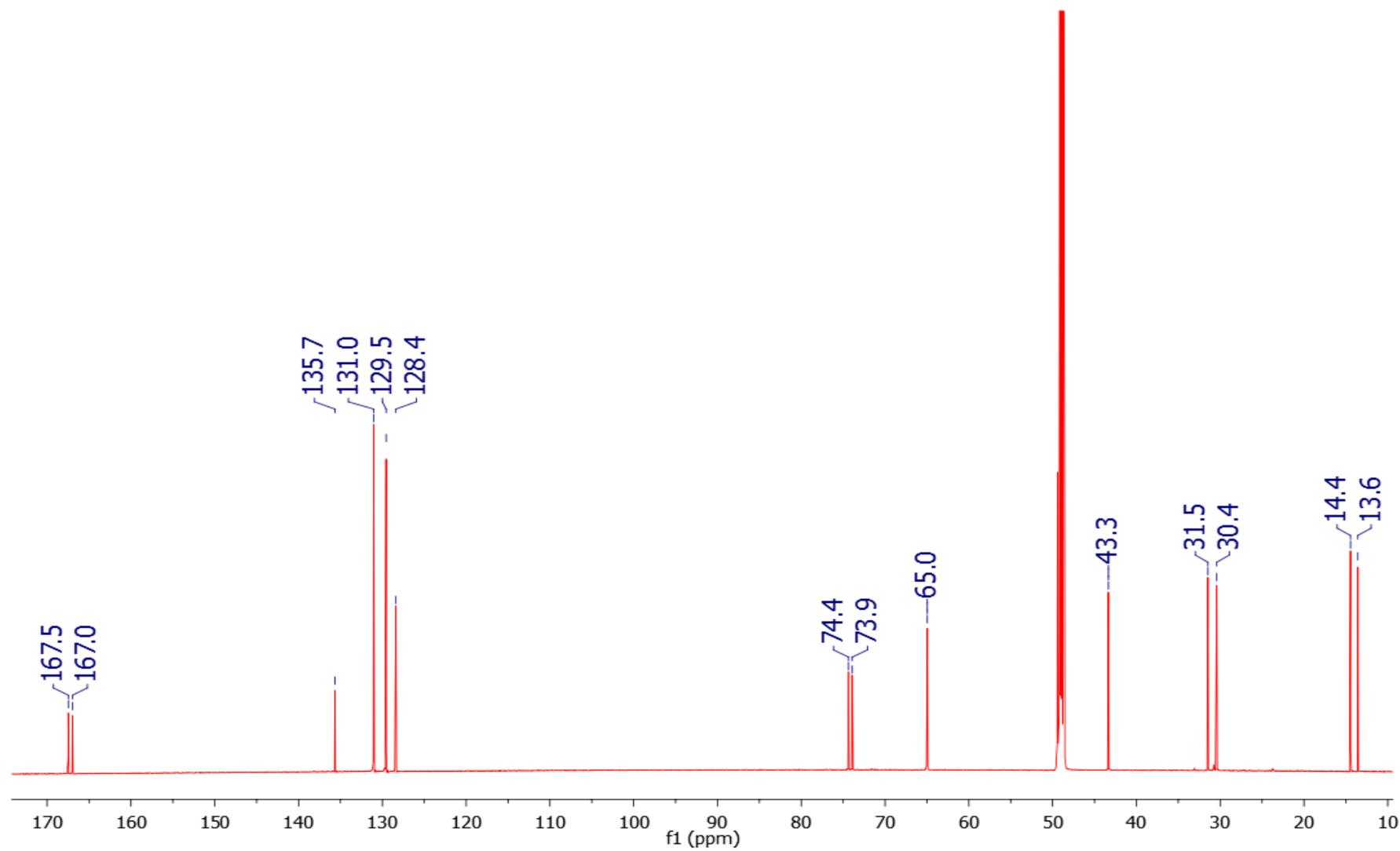


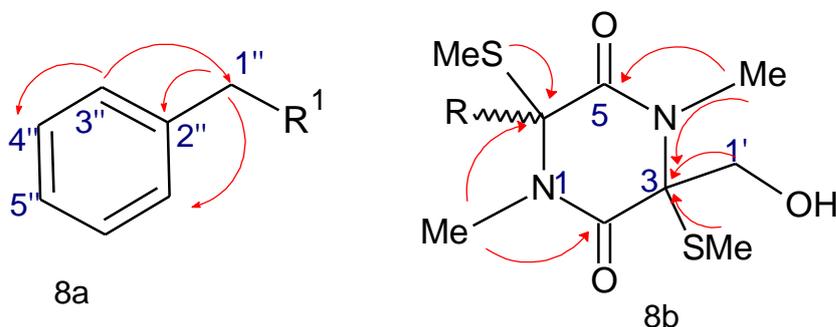
Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C da Substância **8** (CD_3OD , 150 MHz).

Através do experimento COSY (**Figura 39**) e HMBC (**Figura 40**), foi possível verificar as correlações do sinal δ_{H} 7.14 (H-3'') com os carbonos em δ_{C} 43.3 (C-1''), 128.3 (C-4''/C-7''), além de sinais em δ_{H} 3.27 e 3.77, correspondentes aos hidrogênios diastereotópicos H-1'', que mostraram correlação com os carbonos em δ_{C} 131.0 (C-3''/C-7'') e 135.6 (C-2''), consistente com a presença de um grupo benzila conforme mostra a subestrutura 8a.

Os hidrogênios metílicos em δ_{H} 2.28 mostraram correlação com o sinal para carbono em δ_{C} 74.3 (C-6), enquanto aqueles em δ_{H} 3.17 (1 N-Me) mostraram correlação com os carbonos em δ_{C} 74.3 (C-6) e 166.9 (C-2), conforme mostrou o experimento HMBC, sugerindo que a distância entre elas seja de três ligações. Correlações similares foram observadas para a metila em δ_{H} 2.16, que mostrou interação com sinal em δ_{C} 73.9 (C-3) e também para a metila em δ_{H} 3.10 (4 N-Me), que mostrou correlação com os sinais em δ_{C} 73.9 (C-3) e 167.4 (C-5).

Adicionalmente, foram observados sinais para os hidrogênios diastereotópicos em δ 3.57 e 3.72 (*d*, 11.7, H-1'), que mostraram correlação com os carbonos em δ_{C} 73.9 (C-3) e 166.9 (C-2), sugerindo uma subestrutura cíclica de 6 membros.

O experimento HMBC mostrou ainda correlações que permitiram definir a junção das duas subestruturas 8a e 8b, principalmente aquelas entre os sinais em δ_{H} 3.27 e 3.77 (*d*, 14.5 H-11') e os carbonos em δ_{C} 74.3 (C-6), 131.0 (C-3''), 135.6 (C-2'') e 167.4 (C-5).



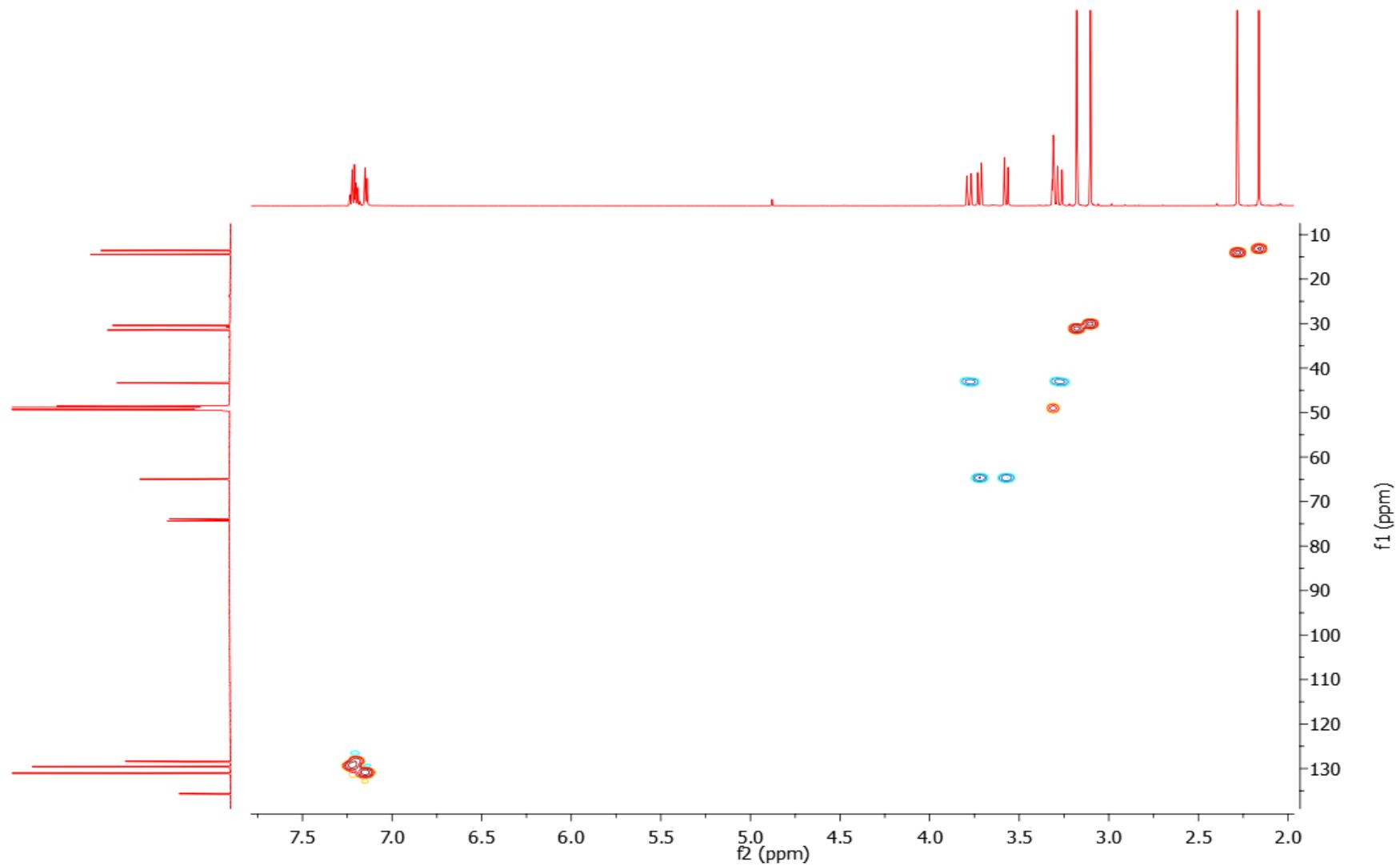


Figura 38. Mapa de correlações de HSQC ^1H - ^{13}C da Substância 8 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3OD^a)

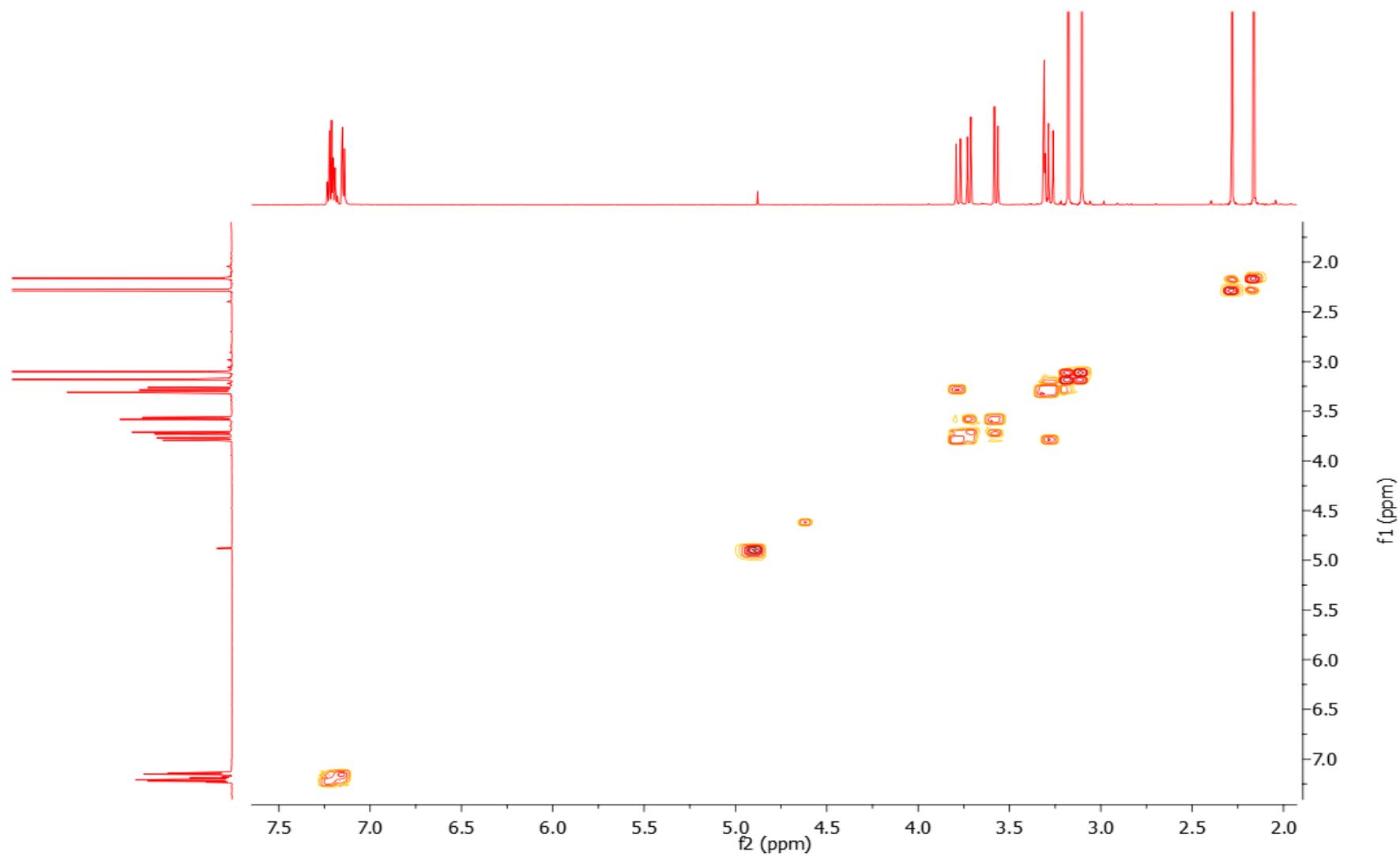


Figura 39. Mapa de correlações de COSY ¹H-¹H da Substância **8** (600 MHz, CD₃OD^a)

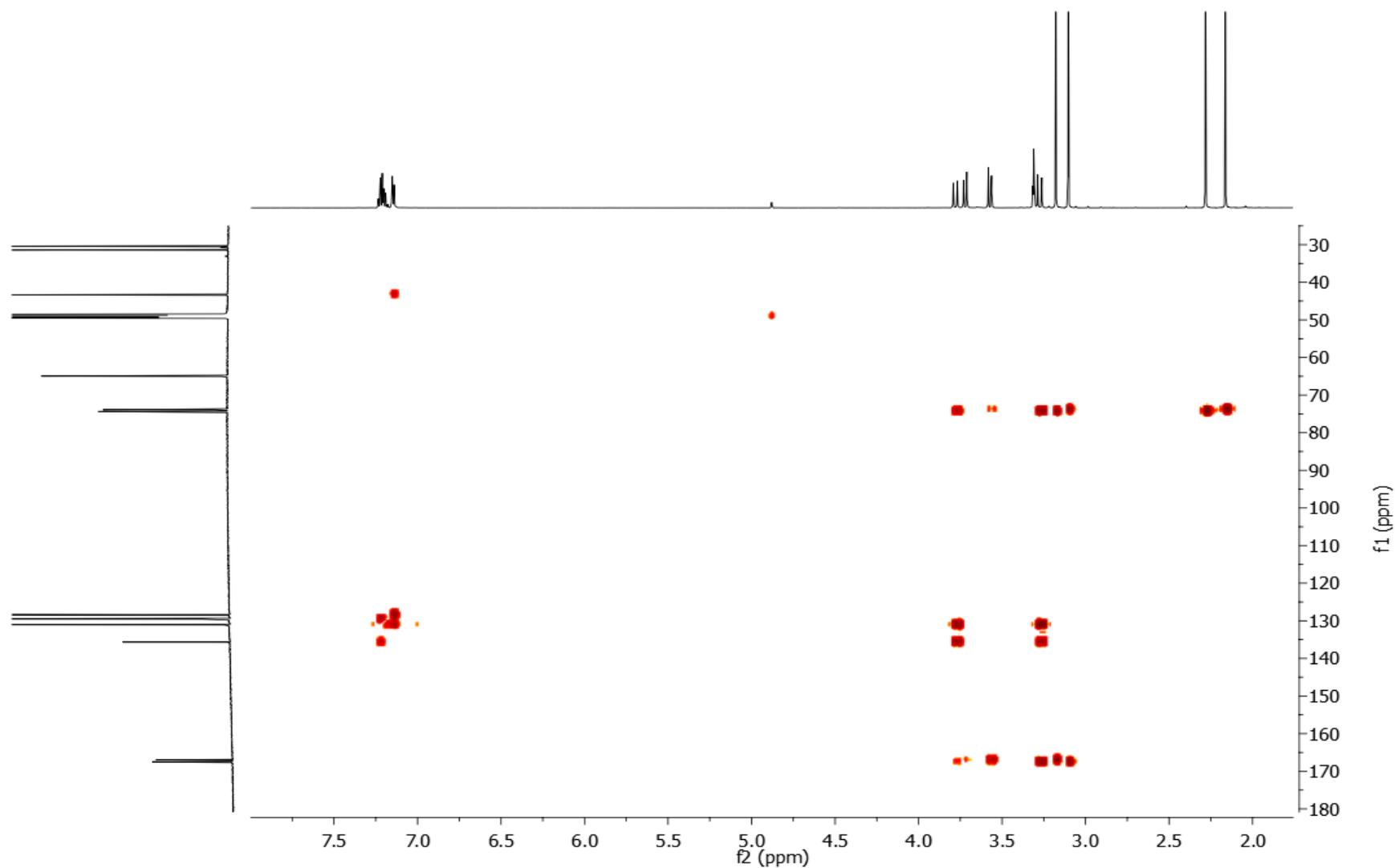


Figura 40. Mapa de correlações de HMBC ^1H - ^{13}C da Substância **8** (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C , CD_3OD^a).

O experimento de HMBC ^1H - ^{15}N permitiu verificar as posições das metilas e atribuir os sinais em δ_{C} 31.4 ao grupo metila ligado ao nitrogênio na posição 1 (1 N-Me) e em δ_{C} 30.4 ao grupo metila ligado ao nitrogênio na posição 4 (4 N-Me).. Dessa forma foi possível definir a estrutura do anel dicetopiperazínico de seis membros.

A análise da substância **8** por espectrometria de massas de alta resolução evidenciou o sinal em ESI(+) com m/z 355.1142 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Os dados de RMN de ^{13}C e correlações de HMBC evidenciaram a presença de hidroxila ligada ao C-1', o que confirmou os dados obtidos por espectrometria de massas em alta resolução, permitindo sugerir a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ para substância **8**.

A comparação com os dados da literatura, além dos dados de EM e de RMN ^{13}C , permitiu identificar a substância **8** como gliovictina, uma dicetopiperazina pertencente à subclasse das epiditiodicetopiperazinas, que apresenta N-metilação e grupos metil-sulfeto, de ocorrência restrita a fungos. Estas substâncias têm como precursores ao menos um aminoácido aromático e apresentam marcantes atividades biológicas, com destaque para atividade antibiótica contra MRSA, além de atividade citotóxica contra linhagens celulares tumorais. A gliovictina foi anteriormente identificada em fungos isolados do solo pertencentes ao gênero *Penicillium* e *Helminthosporiu*, bem como de cultura marinha de *Astermyces cruciutus* (deuteromicetos). Essa substância apresentou atividade citotóxica contra linhagens de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) e fibroblastos (FENICAL, W.; SHIN, J, 1987; GULDER et al., 2012; ISAKA et al., 2005; Welch and Williams, 2014)

5. CONCLUSÕES

Os trabalhos realizados com os micro-organismos *Sarocladium strictum* (Ps-02) e *Coniothyrium* sp (Ps-03) permitiram uma avaliação da potencialidade dos extratos brutos e frações, para a produção de metabólitos secundários. Os dois meios de cultivo líquidos comerciais (Extrato de Malte e Czapek®) e o meio sólido (Arroz) induziram uma produção metabólica diversificada para ambas as linhagens, conforme apontado pelas análises por CLAE-DAD e RMN de ^1H , evidenciando que o perfil metabólico é dependente do meio de cultivo para estas linhagens. Foi demonstrado também, que os cultivos em meio líquido produziram massa muito pequena de extrato, com exceção de Ps-03 (*Coniothyrium* sp.), quando cultivado em meio Czapek.

A potencialidade biológica dos extratos e frações obtidos em escala reduzida frente aos ensaios anticolinesterásico, antifúngico e citotóxico mostraram resultados relevantes, sendo que os extratos ou frações, tanto de *Sarocladium strictum* como de *Coniothyrium* sp., apresentaram uma ou mais potencial atividade, confirmando a importância de fungos endofíticos como fontes promissoras de protótipos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos.

Algumas frações foram selecionadas para avaliação de potencial antimicrobiano. Dentre elas, a fração Ps-03 Acn e subfrações F-3, F-5 e F-7 não apresentaram atividade significativa frente aos patógenos *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Escherichia coli* (UBC 8161); *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina - MRSA (ATCC33591); *Bacillus subtilis* (H344) e *Candida albicans* (ATCC 90028).

Esse estudo destacou ainda a eficiência da abordagem que incluiu o estabelecimento do perfil químico das linhagens de fungos endofíticos em estudo por CLAE-DAD e por RMN de ^1H , bem como a avaliação preliminar do potencial de bioatividade do extrato bruto de cada linhagem. A análise conjunta destes dados foi essencial para a seleção das amostras mais promissoras para prosseguimento do estudo, permitindo alcançar resultados relevantes sobre a química e bioatividade linhagens de fungos em estudo.

Merece ainda destaque a marcante quimiodiversidade apresentada pela linhagem Ps-03, identificada como *Coniothyrium* sp, cujo extrato foi submetido a

fracionamento cromatográfico e resultou no isolamento de uma dicetopiperazina, policetídeos e esteroides.

Os policetídeos representam uma classe de produtos naturais de grande importância, com diversos exemplos de protótipos para o desenvolvimento de fármacos, alguns já em estudos de fase clínica e outros já em uso na terapêutica. Os policetídeos isolados neste estudo incluem três macrolídeos aromáticos (**1** – **3**): a (3*R*,5*R*)-sonnerlactona, que mostrou potencial inibidor de células de carcinoma multi-resistentes em estudos anteriores, além de dois análogos à sonnerlactona, sendo um inédito na literatura e outro, inédito como produto natural, que foi relatado anteriormente apenas como produto de síntese. Foram obtidos também o gymnoascolídeo A (**4**), um butenolídeo aromático anteriormente isolado do ascomiceto *Gymnoascus reessii*, obtido do solo australiano, e a 10-norparvulenona (**7**), uma tetralona com atividade antiviral contra o vírus influenza da gripe (A/PR/8/34), relatada anteriormente como produto do fungo associado às cascas de *Sonneratia apetala* e também do fungo endofítico *Pulvinula* sp. 11120, isolado das folhas de *Cupressus arizonica*.

Os esteroides isolados, ergosterol-5,8-endoperóxido $\Delta^{6,22}$ (**5**) e 22*E*-ergosta-7,22-dieno-3 β ,5,6-triol (**6**), são estruturalmente relacionados, provavelmente através de rearranjo que inclui a abertura do anel endoperóxido, decorrente do ataque de água em C6 e deslocamento da ligação dupla para a posição C7-C8. O ergosterol-5,8-endoperóxido- $\Delta^{6,22}$ apresentou atividade antibacteriana e citotóxica anteriormente e já foi isolado de *Aspergillus versicolor* obtido da alga parda *Sargassum thunbergii*, bem como de fungos terrestres, incluindo linhagens obtidas no deserto do Atacama.

As dicetopiperazinas são os menores peptídeos cíclicos conhecidos, formados através de duas ligações amídicas, com duas ou mais unidades de aminoácidos, produzidas por diferentes organismos como mamíferos, leveduras, líquens, fungos, bactérias e actinomicetos marinhos. A substância **8**, identificada como gliovictina, é uma dicetopiperazina que apresenta em sua estrutura átomos de enxofre constituindo grupos metil-sulfeto, e metilações nos átomos de nitrogênio, caracterizando a subclasse das epiditiodicetopiperazinas. Diversos estudos biossintéticos foram realizados com substâncias desta subclasse, que indicaram a provável quebra da ligação dissulfeto de derivados da gliotoxina, uma

epiditiopiperazina contendo ciclo com ponte de dissulfeto, e posteriormente metilações nos átomos de nitrogênio do anel piperazínico.

Com base nestes resultados, pode-se também concluir que a costa brasileira é um ambiente que demanda investigações mais amplas e aprofundadas do ponto de vista químico, já que representa importante fonte de material para novos estudos de bioprospecção. Merecem destaque as substâncias produzidas por microorganismos e por fungos endofíticos de origem marinha, em particular, decorrente de sua expressiva quimiodiversidade e potencial de bioatividade relevante, conforme demonstrado neste estudo.

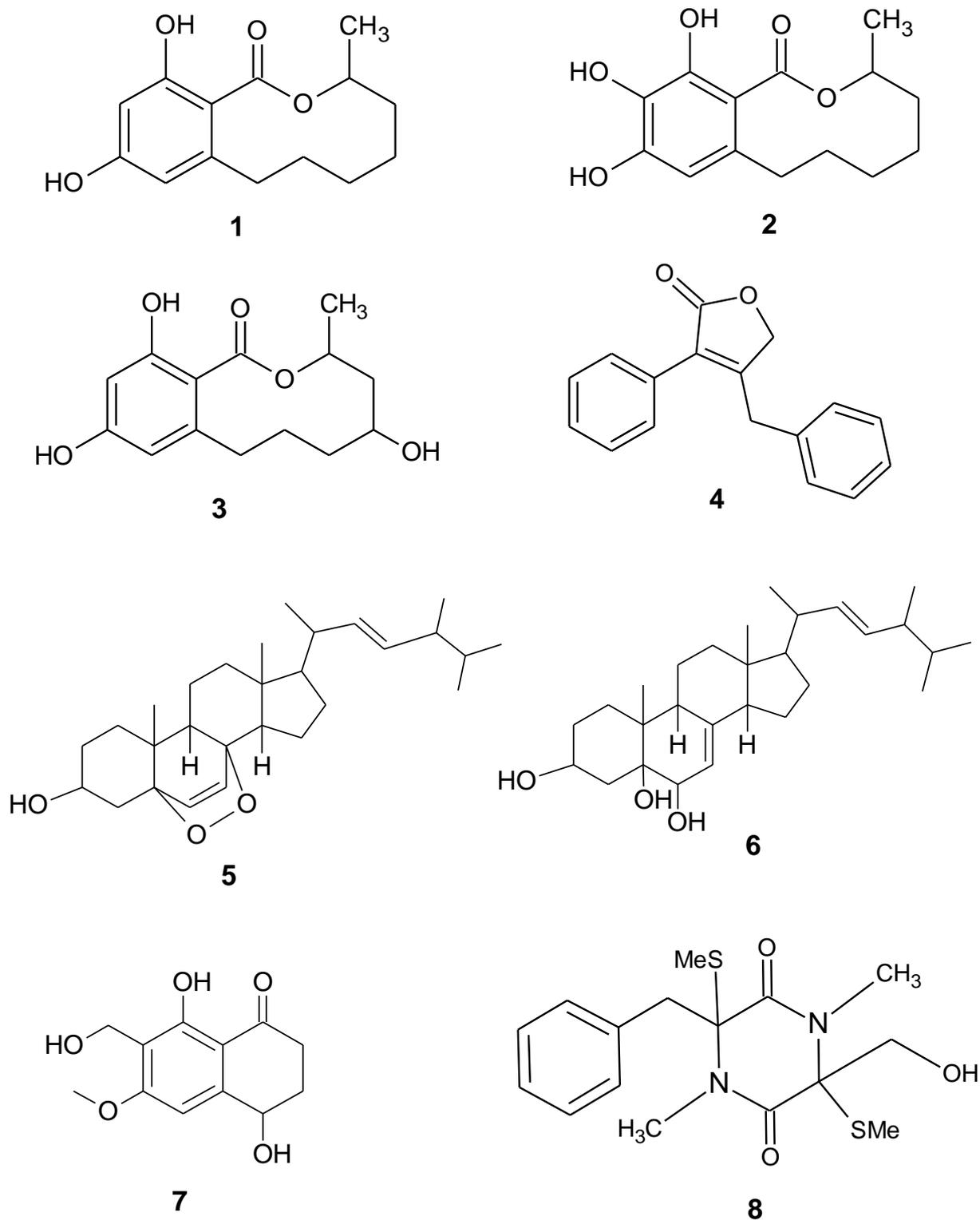


Figura 41. Substâncias isoladas (1-8) de *Coniothyrium* sp

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, L. C. A. et al. Estratégias para a síntese de γ -alquilidenobutenolídeos. **Química Nova**, v. 33, n. 5, p. 1163-1174, 2010.
- BASSETII, M.; D'ANNIBALE, A. Formation of five- and six-membered α,β -unsaturated lactones through ring-closing metathesis of functionalized Acrylates. applications to synthesis of natural products. **Current Organic Chemistry**, v. 17, n. 22, p. 264-2677, 2013.
- BEESOO, R. Apoptosis inducing lead compounds isolated from marine organisms of potential relevance in cancer treatment. **Mutation Research**, v. 768, p. 84-97, 2014.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Nature Products Reports** v. 32, p. 116-211, 2015.
- BRINGMANN, G. et al. Gymnoascolides A-C: aromatic butenolides from a Australian isolate and the soil Ascomycete *Gymnoascus reessii*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1226-1230, 2005.
- BURTON, H. S.; ABRAHAM, E. P. Isolation of antibiotics from a species of *Cephalosporium*. Cephalosporins P1, P2, P3, P4 and P5. **Biochemical Journal**, v. 50, p. 168-174, 1951.
- CLINICAL TRIALS. **Randomized phase 3 assessment of second line chemotherapy with docetaxel + plinabulin compared to docetaxel alone in patients with advanced non-small cell lung cancer with at least 1 large lung lesion**. Bethesda, 2015. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/archive/NCT02504489/2015_07_21>. Acesso em: 10 jul. 2016.
- COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 703-716, 2009.
- DAI, J. et al. Curvularin-type metabolites from the fungus *Curvularia* sp. isolated from a marine alga. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 36, p. 6928-6937, 2010.
- DING, L. et al. Isolation, antimicrobial activity, and metabolites of fungus *Cladosporium* sp. associated with red alga *Porphyra yezoensis*. **Current Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 229-235, 2008.
- DUARTE, K. et al. Analytical techniques for discovery of bioactive compounds from marine fungi. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 97-110, 2012.
- DYBDAL-HARGREAVES, N. F. et al. Eribulin mesylate: mechanism of action of a unique microtubule-targeting agent. **American Association for Cancer Research Journals**, v. 21, p. 2445-2452, 2015.
- EBEL, R.; RATED, M. E. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Nature Products Reports**, v. 28, p. 290-344, 2011.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-90, July 1961.

ELSEBAI, M. F. et al. Antimicrobial phenalenone derivatives from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereale*. **Organic Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 802-808, 2011a.

ELSEBAI, M. F. et al. HLE-inhibitory alkaloids with a polyketide skeleton from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereale*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 10, p. 2282-2285, 2011b.

FENICAL, W.; SHIN, J. Isolation of gliovictin from the marine deuteromycete *Asteromyces cruciatus*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 12, p. 3347, 1987.

GLOER, J. B. Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products. In: KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. (Ed.). **Environmental and microbial relationships**. Springer-Verlag, 2007. Chap. 15, p. 257-286. (The mycota, v. 4).

GONÇALVES, V. N. et al. Fungi associated with rocks of the Atacama Desert: taxonomy, distribution, diversity, ecology and bioprospection for bioactive compounds. **Environmental Microbiol**, v. 18, n. 1, p. 232-245, 2016

GULDER, T. A. M. et al. Isolation, structure elucidation and total synthesis of lajollamide A from the marine fungus *Asteromyces cruciatus*. **Marine drugs**, v. 10, n. 10, p. 2912-2935, 2012.

HOMANS, A. L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v. 51, p. 327-329, 1970.

HUSSAIN, H. et al. Coniothyre: a new phenoxuphenyl ether from endophytic fungus, *Coniothyrium* sp. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 16, n. 11, p. 1094-1098, 2014.

ISAKA, M. et al. Unique diketopiperazine dimmers from the insect pathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum* BCC 1449. **Organic Letters**, v. 7, n. 11, p. 2257-2260, 2005.

KAWAGISHI, H. et al. Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 9, p. 2777-2779, 1988.

KOCK, I. et al. New massarilactones, massarigenin E, and coniothyrenol, isolated from the endophytic fungus *Coniothyrium* sp., from *Carpobrotus edulis*. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 13, p. 2186-2190, 2007.

KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E. **Marine mycology: the higher fungi**. New York: Academic Press, 1979.

KOSSUGA, M. H. et al. Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 257-267, 2012.

KROHN, K. et al. Isolierung, synthese und biologische Wirkung von Coniothyriomycin sowie synthese. und siotestung analoger offenkettiger Imide. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 12, n. 8, p. 789-798, 1992.

KROHN, K. et al. Palmarumycins C1 to C16 from *Coniothyrium* sp. isolation, structure elucidation, and biological activity. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 11, p. 1099-1108, 1994.

KROHN, K. et al. Bioactive nitronaphthalenes from an endophytic fungus, *Coniothyrium* sp., and their chemical systhesis. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 21, p. 3615-3618, 2008.

KWON, H. C. et al. Cytotoxic ergosterol from *Paecilomyces* sp. J300. **Archives of Pharmacal Research**, v. 25, n. 6, p. 851-855, 2002.

LI, Y. C. et al. The metobolites of mangrove endophytic fungus Zh6-B1 from the South Chia Sea. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 3326-3328, 2010.

LIU, Q. A. et al. The chemistry and bioactivity of macrolide from marine microorganisms. In: RAHMAN, Atta-ur. (Ed.). **Studies in natural products chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2015. v. 44, chap. 7, p. 353-401.

MARSTON, A.; KISSILING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.

McQUILKEN, M. P. et al. Production of macrosphelide A by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. **FEMS Microbioly Letters**, v. 219, p. 27-31, 2003.

MIAO, F. P. et al. Secondary metabolites from an Algicolous *Aspergillus versicolor* strain. **Marine Drugs**, v. 10, n. 1, p. 131-139, 2012.

MORAIS-URANO, R. P.; CHAGAS, A. C.; BERLINCK, R. G. Acaricidal action of destruxins produced by a marine-derived *Beauveria felina* on the bovine tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 3, p. 362-366, 2012.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

OMURA, S. et al. A new anti-influenza virus antibiotic 10-Norparvulenone from *Microspheropsis* sp. FO-5050. **The Journal of Antibiotcs**, v. 53, n. 10, p. 1215-1218, 2000.

PETTIT, G. R. et al. The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: dolastatin 10. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, p. 6883-6885, 1987.

PETTIT, G. R. et al. Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *symploca* species VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplostatins 1. **Journal Natural Products**, v. 64, p. 907-910, 2001.

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

PONTIUS, A. et al. Aromatic polyketides from marine algicolous fungi. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 2, p. 272-274, 2008.

QUIAO, M.-F. et al. Indoloditerpenes from an algicolous isolate of *Aspergillus oryzae*. **Biorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 19, p. 5677-5680, 2010.

RAHALISON, L. et al. Antifungal tests in phytochemical investigations comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. **Planta Medica**, v. 60, p. 41-44, 1994.

SCOPEL, M. **Isolamento, investigação química e avaliação do potencial antibiótico, antibiofilme e anti-*Trichononas vaginalis* de fungos associados a organismos marinhos da Costa Sul do Brasil**. 2012. 215 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

SILVA, J. I. Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 44-52, Jan. 2013.

TARMAN, K. et al. Isolation of a new natural product and cytotoxic and antimicrobial activities of extracts from fungi of Indonesian marine habitats. **Marine Drugs**, v. 9, n. 3, p. 294-306, 2011.

VAZ, D. S. S. et al. A importância do ômega 3 para a saúde humana: um estudo de revisão. **Revista Uningá Review**, v. 20, n. 2, p. 48-54, 2014.

WELCH, T. R.; WILLIAMS, R. M. Epidithiodioxopiperazines occurrence synthesis and biogenesis. **Nature Produce Reporter**, v. 31, n. 10, p. 1376-1404, 2014.

WIESE, J. et al. Phylogenetic identification of fungi isolated from the marine sponge *Tethya aurantium* and identification of their secondary metabolites. **Marine Drugs**, v. 9, n. 4, p. 561-585, 2011.

WIJERATNE, E. M. et al. Pulvinulin A, graminic C, and *cis*-gregatin B – new natural furanones from *Pulvinula* sp. 11120, a fungal endophyte of *Cupressus arizonica*. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 1, p. 107-111, 2015.

YAOITA, Y. et al. Sterol constituents from five Edible Mushrooms. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 6, p. 944-950, 1998.

YOSHIHARA, T.; YANG, Q.; TOSHIMA, H. Syntheses of β -resorcylic acid derivatives, novel potato micro-tuber inducing substances isolated from *Lasiodiplodia theobromae*. **Tetrahedron**, v. 57, p. 5377-5384, 2001.

YU, S. et al. 5,8-Epodioxysterols and related derivatives from a Chinese soft coral *Sinularia flexibilis*. **Steroids**, v. 71, p. 955-959, 2006.

ZHANG, G. et al. Antifungal metabolites produced by *Chaetomium globosum* no.04, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. **Indian Journal Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 175-180, 2013.

ZHANG, P. et al. Varioxepine A, a 3 *H*-oxepine-containing alkaloid with a new oxacage from the marine algal-derived endophytic fungus *Paecilomyces variotii*. **Organic Letters**, v. 16, n. 18, p. 4834-4837, 2014.

ZHAO, Y. et al. The individual lipid compositions produced by *Cunninghamella* sp. Salicorn 5, an endophytic oleaginous fungus from *Salicornia bigelovii* Torr. **European Food Research and Technology**, v. 238, p. 621-633, 2014.