

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 08/09/2018.

ERIKA THALYTA VERAS PEREIRA

Bioprospecção do fungo endofítico *Microascus intricatus* associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*: investigação química e avaliação do potencial farmacológico.

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
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

P436b Pereira, Erika Thalyta Veras
Bioprospecção do fungo endofítico *Microascus intricatus*
associado à alga marinha *Asparagopsis taxiformis*
investigação química e avaliação do potencial
farmacológico / Erika Thalyta Veras Pereira. –
Araraquara : [s.n.], 2017
96 f. : il.

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

1. Fungos endofíticos. 2. Metabólitos. 3. Produtos
naturais. 4. Alga. 5. Inibidores de colinesterase. I. Título.

ERIKA THALYTA VERAS PEREIRA

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

Araraquara, 08 de março de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof^a Dr^a Cíntia Duarte de Freitas Milagre
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Marlana Helena Chaves
Universidade Federal do Piauí / UFPI / Teresina - PI

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Erika Thalyta Veras Pereira

Nome em citações bibliográficas: PEREIRA, E. T. V.,

ENDEREÇO PROFISSIONAL:

NUBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara, Universidade

Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Rua Prof. Francisco Degni, 55 – Araraquara-SP, CEP: 14081-970, SP - Brasil

e-mail: erikathalyta@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2010 - 2014

-Graduação em Licenciatura plena em Química- Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina -PI. Título da Monografia: Quimiodiversidade e potencial biológico de *Combretum duarteanum* Cambess. em duas regiões de Cerrado do estado do Piauí.

Orientadora: Prof. Dra. Mariana Helena Chaves

-Bolsista de Iniciação Científica (2011-2012) - UFPI - Título do projeto: Documentação química e farmacológica de extratos vegetais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariana Helena Chaves

- Bolsista de Iniciação Científica (2012 - 2014) - UFPI - Título do projeto: Potencial químico e farmacológico de três plantas da família Combretaceae coletadas em regiões de cerrado do Estado do Piauí

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariana Helena Chaves

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Avaliação da Aprendizagem no Ensino Superior e as Tecnologias Educacionais- Curso de aperfeiçoamento (Carga horária:100 hrs), NEaD-UNESP, 2016.

Projeto de extensão: Desenvolvimento da capacidade argumentativa dos estudantes: ações no ensino básico e na formação inicial de professores de ciências e matemática. (Carga horária: 32 h), UFPI, 2013.

Coordenador do projeto: Jerino Queiroz.

Minicurso: Curso de química forense. (Carga horária: 9h). Renova Cursos-Ribeirão Preto-SP, 2015.

Minicurso: Multivariate Curve Resolution (MCR). (Carga horária: 8h). II Escola de Inverno de Quimiometria-UNICAMP, 2015.

Minicurso Second and Higher-Order Data Generation and Processing. (Cara horária: 8h). II Escola de Inverno de Quimiometria-UNICAMP, 2015.

Minicurso: Drogas de Abuso: Identificação e Casuística. (Cara horária: 8h). XXXI Encontro Nacional de Estudantes de Química, 2013.

Minicurso: Produtos naturais marinhos: Ecologia, atividade farmacológica e caracterização química. (Cara horária: 8h).XXXI Encontro Nacional de Estudantes de Química, 2013.

Minicurso: Produtos naturais de plantas brasileiras: Potencial e importância biotecnológica. (Cara horária: 4h) Simpósio Latino-americano de biotecnologia do Nordeste, 2013

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos publicados em periódico:

FARIAS, R. R. S.; PEREIRA, E. T. V.; CHAVES, M. H. ; CASTRO, A. A. J. F.. Prospecção científica e tecnológica das espécies *Combretum duarceanum* Cambess e *Combretum mellifluum* Eichler. Revista GEINTEC: gestao, inovacao e tecnologias, v. 5, p. 1606-1616, 2015.

FARIAS, R. R. S.; LOIOLA, M. I. B.; CASTRO, A. A. J. F.; Chaves, M. H.; PEREIRA, E. T. V. Botânica (Aspectos Morfológicos) e Distribuição Geográfica de Três Espécies de Combretaceae nos Cerrados do Piauí, Nordeste do Brasil. Publicações Avulsas em Conservação de Ecossistemas, v. 31, p. 1, 2014.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos:

FARIAS, R. R. S.; PEREIRA, E. T. V.; Chaves, M. H.; FERREIRA, P. M. P.; PESSOA, C. O.; LIMA, D. J. B. Citotoxicidade in vitro das espécies *Combretum duarceanum* Cambess e *Combretum mellifluum* EICHLER (Combretaceae). In: Simpósio latino-americano de biotecnologia do nordeste, 2013, Parnaíba. Simpósio latino-americano de biotecnologia do nordeste, 2013.

PEREIRA, E. T. V.; FARIAS, R. R. S.; Chaves, M. H. . POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTICOLINESTERÁSICO DE QUATRO ESPÉCIES DE COMBRETACEAE. In: XXI Seminário de Iniciação científica IV Seminário em desenvolvimento tecnológico e Inovação, 2012.

Chaves, M. H. ; PEREIRA, E. T. V. ; FARIAS, R. R. S. . Potencial Farmacológico de *C. duarceanum* Cambess e *Combretum mellifluum* Eicher. In: I Encontro estratégico de Ciências Farmacéuticas e I Seminário Ibero Americano de P&D de Medicamentos, 2013, Teresina. Aspectos interdisciplinares de P&D de medicamentos. Teresina: EDUFPI, 2013

Apresentação de trabalho durante o período do mestrado:

FARIAS, R. R. S.; PEREIRA, E. T. V.; CHAVES, M. H.; CARVALHO, R. B. F.; FERREIRA, P. M. P. Potencial Farmacológico de *Terminalia actinophylla* MART. II Encontro Estratégico em Ciências Farmacêuticas / II Seminário Ibero Americano de P & D de Medicamentos / I Simpósio Internacional de Farmácia Clínica, Teresina-PI, 2015.

Participação em eventos científicos durante o período do mestrado:

-II Escola de Inverno de Quimiometria (UNICAMP- Julho de 2015)

-XXIII Congresso Nacional de Criminalística (Novembro de 2015)

**A minha família por acreditar e apoiar minhas decisões
e a Ruth Raquel por carregar comigo
os sentimentos que a vida acadêmica traz.**

VIR A SER

Eu procuro por mim.
Eu procuro por tudo o que é meu
e que em mim se esconde.
Eu procuro por um saber
que ainda não sei,
mas que de alguma forma já sabe em mim.
Eu sou assim...
processo constante de vir a ser.
O que sou e ainda serei
são verbos que se conjugam
sob áurea de um mistério fascinante.
Eu me recebo de Deus e a Ele me devolvo.
Movimento que não termina
porque terminar é o mesmo que deixar de ser.
Eu sou o que sou na medida em que
me permito ser.
E quando não sou é porque o ser eu não
soube escolher.

Fábio de Melo

Agradecimentos

A Deus por me dar a paz e tranquilidade necessária em cada momento, mesmo quando as vezes tudo parecia não está tão certo, eu tinha certeza que o melhor sempre aconteceria. Eu, humana e falha que sou, nunca conseguirei agradecer o sacrifício e amor desprendido a mim.

Aos meus pais, que apesar de nem sempre concordarem ou compreenderem todas as minhas decisões, acreditam no meu julgamento, apoiam cada uma delas e sonham junto comigo, se hoje sou quem sou é resultado do esforço e abnegação deles.

A minha irmã, que sempre foi fonte de inspiração, a primeira a me dizer pra escolher o melhor, mesmo que não fosse o mais cômodo, e a me mostrar que podemos ir além.

A profa. Dulce Helena, por ser gentil, por todo conhecimento compartilhado, e conversas inspiradoras; por ir além e não só ensinar química, mas ensinar também qual a minha responsabilidade depois de tudo que aprendi e vivi.

A Ruth Raquel, por ser a pessoa mais amável que tive o prazer de conhecer, por sonhar e caminhar comigo cada passo da minha vida acadêmica, você sempre será minha orientadora, companheira de laboratório e amiga, a parte bióloga desta química.

A minha família, que sempre vibra com as minhas conquistas e sonhos. Impossível descrever em palavras o amor de tias, que são como mães, e de primas, que são como irmãs. Sinto muito por não usufruir esse amor de perto e obrigada por compreenderem.

Aos amigos do Piauí, em especial a Tauani e a Thatá pela constante companhia mesmo há kms de distância. Tauani, você tem me ensinado a ser alguém melhor. Thatá, pare de fazer rir quando a situação demanda choro.

A Cibeli Lira, que desde 2010 tem sido a coragem das minhas ideias, juntas compartilhamos expectativa, a vontade de conquistar o mundo e ao mesmo tempo manter nossas raízes. Obrigada por me emprestar seus pais e ainda teremos muitas desventuras.

A minha colônia de piauiense e agregados. Sobre nós: de algum feito a gente acha um cantinho, se acomoda, se sente confortável. No meio de tantas diferenças encontramos algo em comum, o desejo de sentir em casa. E a gente ri, torce, fica triste, desabafa, conta “segredos”, planeja, faz festa ou simplesmente não faz nada. Tentamos de alguma forma tornar isso o mais real possível, por que daqui há algum tempo nos perguntaremos se sentimos tudo isso mesmo, se vivemos tudo isso juntos. Tudo será só lembrança. Agradecimento especial aos meus irmãos científicos Everton e Luis Paulo pela ajuda com os PNs.

A IASD, por ser família onde quer que se esteja, obrigada pelos conhecimentos compartilhados, as orações e palavras de incentivo, em especial Victor e Andressa por me acolherem tão gentilmente.

Aos técnicos Nivaldo, Juliana e João, pela disponibilidade e ENORME paciência. Tudo seria mais difícil sem a ajuda e sorriso de vocês.

Aos “alunos da Dulce”, pela amizade e conhecimento compartilhado; em especial a Rebeca, pela paciência frente aos meus muitos questionamentos, e a Alana, por “sutilmente” nos influenciar a amar os fungos.

Aos professores do IQ, em especial aos professores do NuBBE, por todos os ensinamentos e gentileza.

Ao instituto de química da UNESP de Araraquara e o departamento de química orgânica, pelos recursos e possibilidade de desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa concedida e aos demais órgãos que fomentam o ensino e a pesquisa no instituto de química da UNESP de Araraquara.

Resumo

Sabe-se que os fungos exercem importantes papéis no cotidiano, sendo utilizados na produção de alimentos fermentados e de enzimas de interesse industrial, em processos de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, além de auxiliar na agricultura como parte do corpo de decompositores, e ainda na defesa e crescimento de plantas em que vivem em simbiose. Adicionalmente, nos últimos anos, as pesquisas com fungos e outros micro-organismos têm-se intensificado pelo surgimento de evidências crescentes de seu potencial como fonte de substâncias bioativas para o desenvolvimento de agentes terapêuticos, como as penicilinas e cefalosporinas – antibióticos, a mevastatina e lovastatina - redutores de colesterol, ciclosporina e rapamicina-imunossuppressores, entre outros. Muitos fungos endofíticos possuem potencial farmacológico, demonstrando atividades como citotóxica, antibacteriana, anticolinesterásica, antifúngica, antiplasmódica, entre outras. Além de indicarem ser fonte de uma grande variedade de novos metabólitos secundários, decorrente de sua quimiodiversidade marcante. Este contexto levou à investigação de uma linhagem fúngica isolada da alga marinha *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan, identificada como *Microascus intricatus*. O cultivo desta linhagem em meio PDB por 28 dias, 65 frascos de Erlenmeyer forneceu o extrato AT-07, que foi submetido a partição com acetato de etila. As frações AT-07 F3, AT-07 F4 e AT-07 F6 foram submetidas a procedimentos cromatográficos e levou ao isolamento de produtos naturais pertencentes às classes das dicetopiperazinas e uma isoflavona. As substâncias isoladas foram identificadas como ciclo-(Pro-Tir), ciclo-(Pro-Phe), ciclo-(Phe-Phe) e daidzeína com base em seus dados espectrométricos e espectroscópicos, como EM, RMN, IV DC e UV. Estes resultados contribuem para o desenvolvimento da pesquisa na área de Produtos Naturais de micro-organismos marinhos, com destaque para a pesquisa de bioprospecção visando a descoberta de novos agentes terapêuticos, e realçam, ainda, a importância das relações ecológicas e da preservação de ambientes marinhos, pois são locais de grande biodiversidade tanto biológica como química.

Palavras Chaves: Fungos. Dicetopiperazina. *Microascus intricatus*.

Abstract

Fungi play important roles in our daily life as in the production of fermented food and enzymes for industrial applications, biodegradation processes and biological treatment of effluents, in addition to its roles in agriculture, enhancing decomposition, and defense and growth of plants living in symbiosis. Research involving fungi and other microorganisms has been intensified in the last decades owing to growing evidence of their potential as important sources of novel bioactive compounds for the development of therapeutic agents as penicillins, cephalosporins (antibiotics), mevastatin and lovastatin (cholesterol lowering agents), cyclosporine and rapamycin (immunosuppressors), among others. Several endophytic fungal strains exhibit pharmacological potential as cytotoxic, antibacterial, anticholinesterase antifungal, antiplasmodial activities, which has been markedly associated to the huge chemodiversity of their secondary metabolites. Such context prompted us to investigate one fungal strain isolated from marine red alga *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan, which has been identified as *Microascus intricatus*. Cultivation of the fungal strain in PDB media for 28 days, Erlenmeyer flasks yielded extract AT-07 partition with etoac extract which was submitted to chromatographic procedures and led to the isolation of natural products belonging to diketopiperazines classes and one isoflavone. The isolated compounds were identified as cyclo-(Pro-Tir), cyclo-(Pro-Phe), cyclo-(Phe-Phe) and daidzein based on their spectrometric and spectroscopic data, mainly MS, NMR, IR, CD and UV. Such results contribute to the development of research on marine microorganisms natural products, including the discovery of novel therapeutic agents, in addition to the importance of their ecological roles and preservation of marine environment, as they host a huge diversity both regarding biological and chemical aspects.

Keywords: Fungus. Diketopiperazine. *Microascus intricatus*.

Lista de figuras

Figura 1- Locais de coleta para a descoberta de produtos naturais marinhos, 1965- 2014.	22
Figura 2- Novos compostos por região/país durante o período 1965-2014,por semi-década.	23
Figura 3- Filos mais estudados no ambiente marinho de 1963 a 2013.	24
Figura 4- Estrutura básica da 2,5-dicetopiperazina.	29
Figura 5- Fungo AT-07.	34
Figura 6- Fracionamento do extrato AT-07 por CC sobre Sephadex LH-20 e eluente metanol 100%.	35
Figura 7- Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD do extrato bruto de AT-07.	39
Figura 8- Espectro de RMN ¹ H do extrato bruto de AT-07 (2) e do meio de cultivo (1) (DMSO- <i>d</i> 6, 300 MHz).	40
Figura 9- Perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD das frações AT-07 F1, AT-07 F2, AT-07 F3, AT-07 F4, AT-07 F5, AT-07 F6.	42
Figura 10- Espectro de RMN de hidrogênio das frações AT-07 F1(1), AT-07 F2 (2), AT-07 F3 (3), AT-07 F4 (4), AT-07 F5 (5) e AT-07 F6 (6) (DMSO- <i>d</i> 6,300MHz).	43
Figura 11- Estrutura da 2,5 dicetopiperazina ciclo (Pro-Phe).	44
Figura 12- Cromatograma obtido por CLAE-DAD da subfração F3-13.	44
Figura 13- Espectro no UV-Vis das substâncias F3-13S1 e F3-13S2.	45
Figura 14- Correlações de HMBC (→) e COSY (—) da substância F3-13S1	46
Figura 15- Correlações de HMBC (→) e COSY (—) da substância F3-13S2	46

Figura 16- Espectro de RMN de ^1H da substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz).	48
Figura 17- Espectro de RMN de ^{13}C da substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6, 150 MHz).	49
Figura 18- Mapa de contorno HSQC da substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 e 150 MHz)	50
Figura 19- Mapa de contorno COSY da substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	50
Figura 20- Mapa de contorno HMBC da substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 e 150 MHz).	51
Figura 21- Espectro de TOCSY irradiado no H-3 (δ_{H} : 3.21) da substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	51
Figura 22- Espectro de RMN de ^1H da substância F3-13S2 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz).	52
Figura 23- Espectro de RMN de ^{13}C da substância F3-13S2 (DMSO- <i>d</i> 6, 150 MHz).	53
Figura 24- Mapa de contorno HSQC da substância F3-13S2 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 e 150 MHz).	54
Figura 25- Mapa de contorno COSY da substância F3-13S2 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	54
Figura 26- Mapa de contorno HMBC da substância F3-13S2 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 e 150 MHz).	55
Figura 27- Configuração relativa proposta pelo NOESY 2D para substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	56
Figura 28- Configuração relativa proposta pelo NOESY 1D para substância F3-13S2 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	56
Figura 29- Espectro de NOESY 2D da substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	57
Figura 30- Expansão do espectro de NOESY 2D da substância F3-13S1 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	57

Figura 31- Espectro de NOESY 1D da substância F3-13S2 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	58
Figura 32- Estrutura e espectro no UV-Vis da substância F4-2 (2,5-dicetopiperazina ciclo-(Pro-Tir).	59
Figura 33- Correlações de HMBC (→) e COSY (—) observadas para a substância F4-2.	60
Figura 34- Espectro de RMN de ¹ H da substância F4-2 (MeOH- <i>d</i> 4, 500 MHz).	62
Figura 35- Espectro de RMN de ¹³ C da substância F4-2 (MeOH- <i>d</i> 4, 125 MHz).	63
Figura 36- Mapa de contorno HSQC da substância F4-2 (MeOH- <i>d</i> 4; 500 e 125 MHz).	63
Figura 37- Mapa de contorno COSY da substância F4-2 (MeOH- <i>d</i> 4; 500 e 125 MHz)	64
Figura 38- Mapa de contorno HMBC da substância F4-2 (MeOH- <i>d</i> 4; 500 e 125 MHz).	64
Figura 39- Expansão do espectro de RMN ¹ H (3), HOMODEC com irradiação em δ _H 4.36 (2), HOMODEC com irradiação em δ _H 4.05 (3) (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	65
Figura 40- Espectros de RMN de ¹ H da substância F4-2 (1) e NOESY 1D irradiado em δ _H 4.36 (2) (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	65
Figura 41- Estrutura e espectro no UV-Vis da substância F4-10, ciclo-(Phe-Phe).	66
Figura 42- Correlações de HMBC (→) e COSY (—) para a substância F4-10.	67
Figura 43- Espectro de RMN de ¹ H da substância F4-10 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	68
Figura 44- Mapa de contorno HSQC da substância F4-10 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 e 150 MHz).	69
Figura 45- Mapa de contorno COSY da substância F4-10 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 MHz).	69

Figura 46- Mapa de contorno HMBC da substância F4-10 (DMSO- <i>d</i> 6; 600 e 150 MHz).	70
Figura 47- Estrutura e espectro de UV-Vis da substância daidzeína F6-9.	70
Figura 48- Correlações de HMBC da substância F6-9.	71
Figura 49- Espectro de RMN de ¹ H da substância F6-9 (MeOH- <i>d</i> 4; 600 MHz).	73
Figura 50- Mapa de contorno HSQC da substância F6-9 (MeOH- <i>d</i> 4; 600 e 150 MHz).	74
Figura 51- Mapa de contorno HMBC da substância F6-9 (MeOH- <i>d</i> 4; 600 e 150 MHz).	74
Figura 52- Estrutura da substância F6-15	67
Figura 53- Sistemas de spins observados pelos experimentos de TOCSY da substância F6-15	76
Figura 54- Correlações observadas no HMBC da substância F6-15	77
Figura 55- Espectro de RMN de H da substância F6-15 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 MHz)	79
Figura 56- Mapa de contorno HSQC da substância F6-15 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 e 150 MHz)	80
Figura 57- Mapa de contorno COSY da substância F6-15 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 e 150 MHz)	80
Figura 58- Mapa de contorno HMBC da substância F6-15 (DMSO- <i>d</i> 6, 600 e 150 MHz)	81
Figura 59- Espectro de TOCSY irradiado no H-1 (4 δ_H 6.71) , H-3 (3 δ_H 6.30), H-5 (2 δ_H 4.40) e RMN de ¹ H (1) da substância F6-15.	81
Figura 60- Espectro de TOCSY irradiado no H-11 (3 δ_H 5.63), H-12 (2 δ_H 4.60) e RMN de ¹ H (1) da substância F6-15.	82

Lista de tabelas

Tabela 1- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e HMBC (DMSO- <i>d</i> 6, 600 e 150 MHz) das substâncias F3-13S1 e F3-13S2.	47
Tabela 2- Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e HMBC (MeOH- <i>d</i> 4, 500 e 125 MHz) da substância F4-2.	61
Tabela 3- Dados de RMN de ^1H e dos mapas de contorno HSQC e HMBC (MeOH- <i>d</i> 4 600 e 150 MHz) da substância F4-10.	67
Tabela 4- Dados de RMN de ^1H e mapa de contorno HSQC e HMBC (MeOH- <i>d</i> 4 600 e 150 MHz) da substância F6-9.	72
Tabela 5- Dados de RMN de ^1H e dos mapas de contorno HSQC e HMBC (MeOH- <i>d</i> 4 600 e 150 MHz) da substância F6-15 e dados da literatura	78
Tabela 6- Atividade anticolinesterásica do extrato e frações do fungo AT-07.	83

Lista de abreviaturas e siglas

AT-07	<i>Microascus intricatus</i>
AChE-ee	Enzimas acetilcolinesterase de enguia elétrica
AChE-hu	Enzimas acetilcolinesterase humana
ATChI	Acetilcolina
δ_H	Deslocamento químico de ^1H (em ppm)
δ_C	Deslocamento químico de ^{13}C (em ppm)
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia de camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i> - Espectroscopia de correlação ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$)
C-18	Sílica de fase reversa do tipo octadecil-silano
d	Dupleto
DAD	Detector de arranjo de diodos
DC	Dicroísmo circular
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetilsulfóxido deuterado
EI	Ionização por elétron
EM	Espectrometria de Massas
ESI	Ionização por Eletrospray
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i> – correlação heteronuclear a múltiplas ligações ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$)
HOMODEC	<i>Homonuclear Decoupling</i> - Desacoplamento homonuclear (H-H)
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i> – correlação heteronuclear a uma ligação ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MeOH	Metanol
MeOH- <i>d</i> 4	Metanol deuterado
mg	Miligramas
MHz	Mega Hertz
Min	Minutos
mL	Mililitro

mult.	Multiplicidade
m/z	Relação massa/carga
nm	Nanômetro
NOESY-1D	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> – espectroscopia de efeito nuclear Overhauser em uma dimensão
NOESY-2D	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> – espectroscopia de efeito nuclear Overhauser em duas dimensões
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
OVCAR-8	Linhagem de células de carcinoma de ovário
PDA	Potato-Dextrose-Agar- Batata Dextrose e Agar
PDB	Potato Dextrose Broth- Caldo de Dextrose e Batata
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
ppm	Partes por milhão
Q-TOF	Quadrupolo-Tempo de Voo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
UV	Ultra-violeta
UV-Vis	Ultra-violeta-visível
s	Sinpleto
t	Tripleto
Tir	Tirosina
TMS	Grupo trimetilsilano
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i> - espectroscopia de correlação total
tR	Tempo de retenção
λ	Comprimento de onda
μm	Micro
$[\text{M}+\text{H}]^+$	Molécula protonada
$[\text{M}-\text{H}]^-$	Molécula desprotonada

Sumário

1	Introdução	21
1.1	<i>Fungos endofíticos</i>	25
1.2	<i>Fungos endofíticos de algas</i>	26
1.3	<i>Gênero Microascus</i>	26
1.4	<i>2,5-Dicetopiperazinas</i>	28
2	Parte experimental	31
2.1	<i>Materiais</i>	31
2.1.1	Solventes e equipamentos gerais	31
2.1.2	Cromatografias em coluna	31
2.1.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	32
2.1.4	Ressonância magnética nuclear	33
2.1.5	Espectrometria de massas	33
2.2	<i>Métodos</i>	33
2.2.1	Identificação da linhagem fúngica	33
2.2.2	Obtenção do extrato bruto em escala ampliada	34
2.2.3	Perfil do extrato e frações	35
2.2.4	Fracionamento do extrato bruto por Cromatografia por exclusão de tamanho	35
2.2.5	Isolamento dos metabólitos presentes na fração AT-07 F3	36
2.2.6	Isolamento dos metabólitos presentes na fração AT-07 F4	36
2.2.7	Isolamento dos metabólitos presentes na fração AT-07 F6	36
2.2.8	Identificação das substâncias isoladas	37

2.2.9 Avaliação da atividade anticolinesterásica	37
3 Resultados e discussão	38
3.1 <i>Perfil químico do extrato e frações</i>	38
3.2 <i>Identificação estrutural das substâncias F3-13S1 e F3-13S2</i>	44
3.3 <i>Identificação estrutural da substância F4-2</i>	58
3.4 <i>Identificação estrutural da substância F4-10</i>	66
3.5 <i>Identificação estrutural da substância F6-9</i>	70
3.6 <i>Identificação estrutural da substância F6-15</i>	75
3.7 <i>Atividade anticolinesterásica</i>	84
4 Conclusão	76
Referências	85

1 Introdução

A natureza como fonte terapêutica está bem consolidada seja no âmbito social (BARRETOS, 2014), espiritual (WHITE, 2008) ou científico (FIRN; JONES, 2003). Sua potencialidade tem sido explorada de forma empírica, com o uso de chás e infusões desde civilizações antigas, como os egípcios, sumérios, babilônios e chineses (GROTHAUS; CRAGG; NEWMAN, 2010), e de forma mais sistemática, com o isolamento da morfina em 1804, pelo farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Adam. Esta substância foi o primeiro produto natural a ser comercializado por E. Merck em 1826, e seu uso na segunda guerra mundial foi de suma importância, permanecendo até hoje como analgésico ou como fonte de inspiração de novas substâncias com propriedades analgésicas (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Entendendo a potencialidade e importância da natureza, o homem tem buscado diferentes fontes de produtos naturais com potencial farmacológico, e como exemplos de fontes de substâncias bioativas temos as plantas (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006), animais, algas (BLUNT et al., 2016) e mais recentemente os micro-organismos, como as bactérias e fungos (NEWMAN; CRAGG, 2015).

As plantas foram extensivamente estudadas e renderam ao homem substâncias valiosas como os salicilatos, isolados da *Salix alba*, com propriedades analgésicas, antipiréticas, anti-inflamatória e de inibição da agregação plaquetária, (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI, 2006); a quinina, um alcaloide isolado de espécies do gênero *Cinchona*, com atividade antimalárica (CRAGG; NEWMAN, 2013); a artemisinina, o fármaco atual de mais rápida ação contra a malária isolado da espécie *Artemisia annua* (O'NEILL; POSNER, 2004) e que levou à concessão de parte do prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 2015 à chinesa Youyou Tu; além de uma extensa lista de substâncias com atividade antitumoral, como por exemplo o Taxol, isolado de espécies do gênero *Taxus*, entre outras atividades (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Atualmente o ambiente marinho tem conquistado espaço como importante fonte de produtos naturais. Blunt e colaboradores (2016) no artigo de revisão "Marine natural products" relatam que o número de novos produtos naturais marinhos descritos em cada ano cresceu de 332 em 1984 para 1378 em 2014. As substâncias foram isoladas de esponjas, algas, moluscos, cnidários, tunicados, briozoários, equinodermos, plantas, além de organismos do fitoplâncton e micro-organismos. No Brasil o ambiente marinho ainda é pouco explorado (Figura 1), e em toda a América do

Sul há relato de apenas 538 novos compostos em 210 artigos no período de 1965 a 2014 (Figura 2). Como ilustração da importância dos produtos naturais marinhos temos a trabectedina (**6**, ET-743, Yondelis[®]), um alcaloide isolado da ascídia *Ecteinascidia turbinata* (POMMIER et al., 1996), utilizado como fármaco no tratamento de câncer de tecidos moles desde 2007, além de estar em fase 3 para tratamento de câncer de ovário, em fase 2 para câncer de próstata e endometrial, e em estudo para tratamento de câncer de mama, lipossarcoma, mielossarcoma, leiomiossarcoma e tumores sólidos pediátricos (ClinicalTrials.gov).

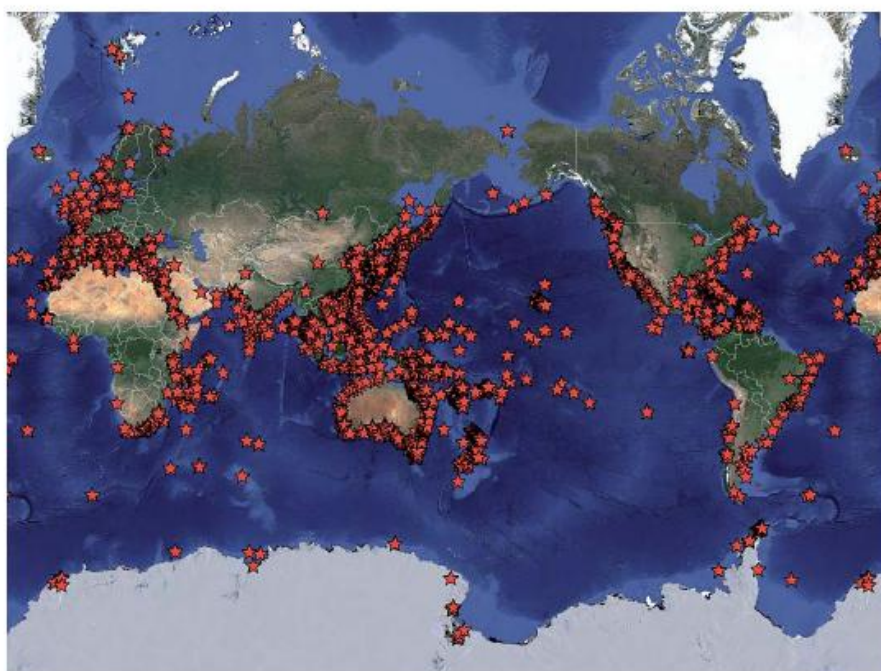


Figura 1- Locais de coleta para a descoberta de produtos naturais marinhos, 1965-2014.
Fonte: Blunt et al., 2016

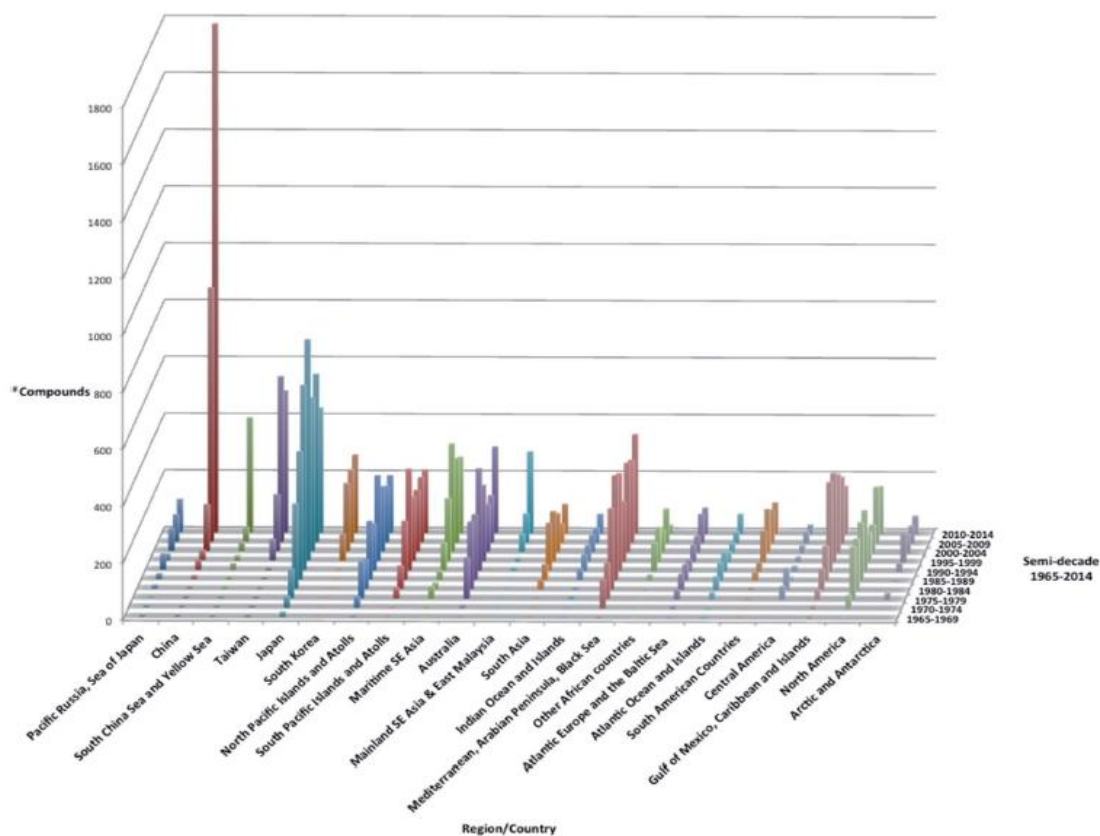


Figura 2- Novos compostos por região/país durante o período 1965-2014, por semi-década.
Fonte: Blunt et al., 2016

No ambiente marinho os filos Porifera e Cnidaria possuem o maior número de publicações, com ressalva para os filos Ascomycota, Actinobacteria e Cyanobacteria, que apresentaram um rápido crescimento a partir da década de 1990 (Figura 3) (BLUNT, et al. 2015), isso possui relação com o recente interesse no estudo de micro-organismos como fonte de metabólitos bioativos, os quais têm fornecido importantes produtos naturais para a indústria farmacêutica.

Dentre os micro-organismos, os fungos têm recebido atenção especial pela produção de substâncias complexas e com alto valor agregado por seu potencial farmacológico (MORAES et al., 2014; RATEB; EBEL, 2011).

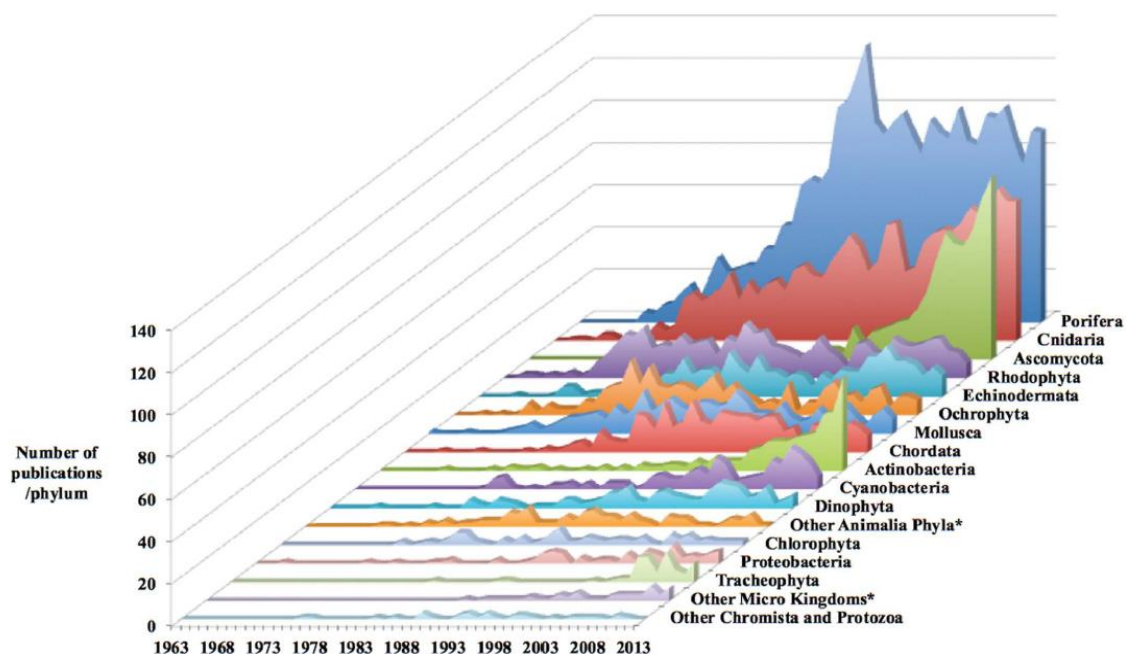


Figura 3- Filos mais estudados no ambiente marinho de 1963 a 2013.

Fonte: Blunt et al. 2015

Durante muitos anos os fungos foram taxados como seres nocivos por produzirem substâncias tóxicas ao ser humano, conhecidas como micotoxinas. As aflatoxinas são micotoxinas que se destacam por estarem presentes em alimentos comuns como amendoim, castanhas, feijão, milho e arroz. (CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002). A partir de 1940, com a descoberta da penicilina, isolada do *Penicillium notatum*, e seu sucesso como antibiótico, os fungos passaram a ser vistos como uma fonte de produtos naturais valiosa (SURYANARAYANAN, et al., 2009).

Atualmente sabe-se que os fungos exercem importantes papéis no cotidiano, sendo utilizados na produção de alimentos fermentados e de enzimas de interesse industrial, na biotransformação e em processos de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, auxiliam na agricultura, como parte do corpo de decompositores ou na defesa e crescimento de plantas em que vivem em simbiose. (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015). Além de serem fontes de produtos naturais utilizados como fármacos, por exemplo, as cefalosporinas (antibióticos), a mevastatina e lovastatina (redutores de colesterol), ciclosporina e rapamicina (imunossupressores), entre outros (NEWMAN; CRAGG, 2005).

Os fungos têm-se mostrado prolíficos na produção de metabólitos secundários, sendo descrito o isolamento de esteroides, lactonas (MARINHO; MARINHO; RODRIGUES FILHO, 2007), antraquinonas, terpenos, alcaloides (XUE et al., 2012),

lignananas (PURI et al., 2006), flavonoides, peptídeos (PINTO et al., 2011) dentre outros. Seus extratos e substâncias isoladas exibem ainda várias atividades farmacológicas, tais como antibacteriana, citotóxica (RAMASAMY et al., 2010), antidiabética (ZHANG et al., 1999), antifúngica (CHAPLA et al., 2014), antimalárica (ISAKA et al., 2010), tripanocida, antileishmania (COTA et al., 2008), além da inibição de diversas enzimas, como mieloperoxidase e acetilcolinesterase, associadas a importantes patologias como a Doença de Alzheimer, artrite reumatoide, dentre outras.

1.1 Fungos endofíticos

Embora muito tenha sido escrito sobre organismos endofíticos há uma discussão sobre o real significado do termo. A definição mais usada e aceita é a de Petrini (1991), que os define como: “Todo organismo que habita órgãos de plantas em algum momento de sua vida, podendo colonizar tecidos internos da planta sem causar dano aparente ao hospedeiro.” (PETRINI, 1991 apud HYDE; SOYTONG, 2008, tradução nossa), os vários significados que Hyde e Soyton (2008) utilizam remetem sempre a organismos vivendo dentro de planta por um período de tempo sem produzir dano aparente.

Embora o termo ‘fito’ refira-se a plantas aquáticas ou terrestres, o termo endofítico é comumente usado também para micro-organismos que vivem em associação com esponjas (PROKSCH et al., 2010), anêmonas, moluscos, (ZHANG et al., 2009), estrela-do-mar e corais (BLUNT et al., 2015) ou com algas (ELSEBAI et al., 2011a). Estes fungos podem trazer benefícios ao hospedeiro, como mecanismo de defesa contra doenças (ARNOLD et al., 2003) e insetos (AKELO et al., 2007), resistência a estresse hídrico e aumento da temperatura, entre outros (BAE et al., 2009).

Zang e colaboradores (2009), comparando diversos substratos utilizados (plantas aquáticas superiores, moluscos, anêmonas, algas e esponjas) para isolamento de fungos observou que as duas algas *Sargassum thunbergii* (marrom) e *Gracilaria lemaneiformis* (vermelha), e a esponja *Perlevis hymeniacidon* foram os substratos que renderam mais variedades de fungos e que possuem os fungos que produziram extratos mais bioativos.

1.2 Fungos endofíticos de algas

Fungos isolados de algas marinhas têm-se mostrado uma interessante fonte de produtos naturais, apresentando diversas atividades farmacológicas como citotóxica, antibacteriana (ELSEBAI et al., 2011b), anticolinesterásica (QIAO et al., 2011), antifúngica (DAÍ et al., 2010), antimalárica (OSTERHAGE et al., 2000), entre outras (OLIVEIRA; FELÍCIO; DEBONSI, 2012).

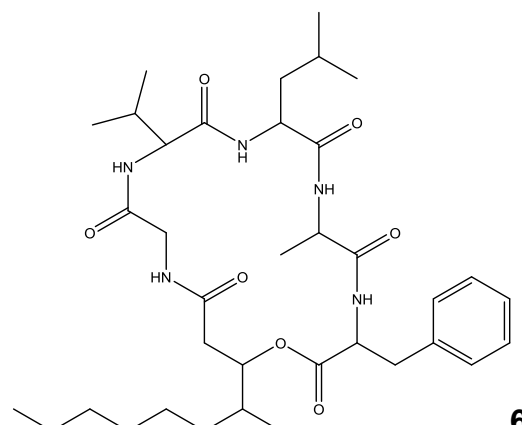
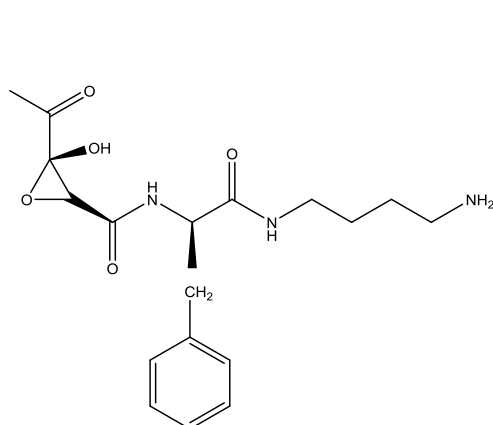
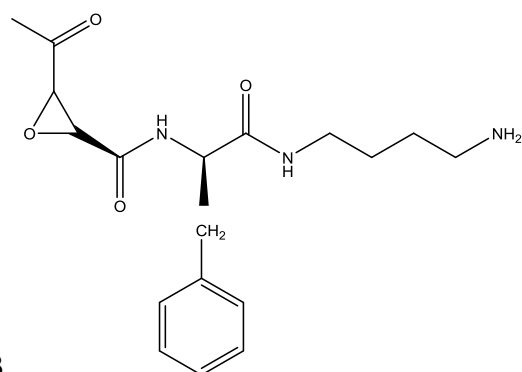
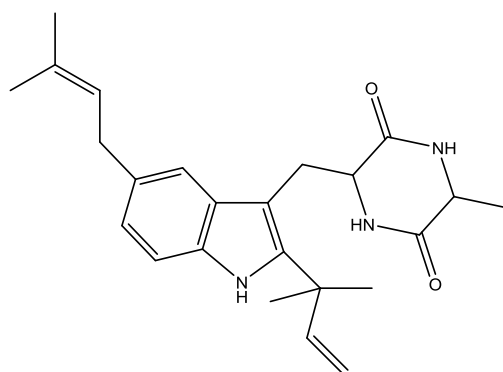
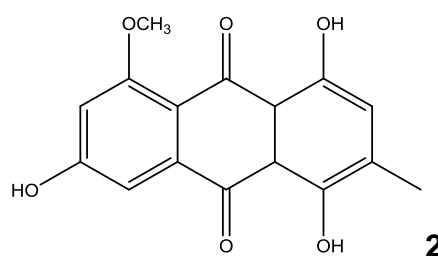
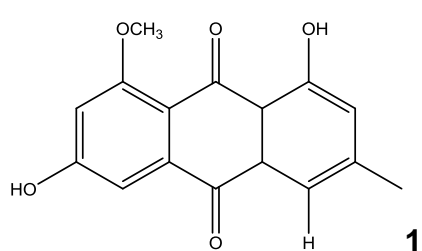
Fungos endofíticos de algas já indicaram ser fonte de uma grande variedade de novos metabólitos secundários. Elsebai e colaboradores (2011b) isolaram sete novos derivados de fenalenona do fungo *Coniothyrium cereale* extraído da alga verde *Enteromorpha* sp. Lin e colaboradores (2008) isolaram dois derivados de 5-hidroxi-2-pirona de *Aspergillus flavus*, extraído de *Enteromorpha tubulosa*. Metabólitos de biossíntese mista como derivados de policetídeos acoplados a unidade de glicerol e de monoterpreno foram isolados do fungo *Penicillium chrysogenum*, associado à alga vermelha *Laurencia* sp. (GAO, et al., 2011), enquanto a linhagem de *Aspergillus niger* isolada da alga marrom *Colpomenia sinuosa* forneceu um novo derivado de naftoquinoneimina (ZHANG et al., 2007). Além dessas substâncias inéditas, muitas outras foram relatadas nos últimos anos, confirmando a imensa quimiodiversidade exibida por fungos endofíticos isolados a partir de algas marinhas.

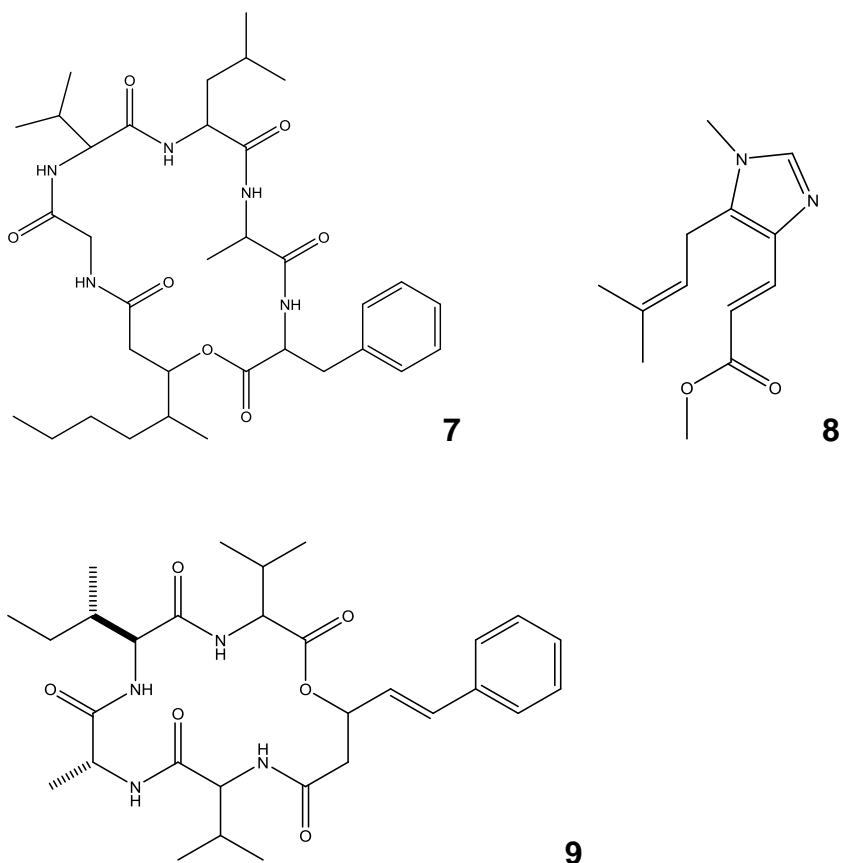
1.3 Gênero *Microascus*

Fungos do gênero *Microascus* são conhecidos por serem patogênicos, vinculados principalmente a infecções pulmonares, como a pneumonia (MOHAMMEDI, I. et al, 2004). Fungos deste gênero já foram isolado de plantas (SIQUEIRA et al.,2011), solo (KAUL; SUMBALI, 2000), esponjas (HOLLER et al., 2000), queijos (MARÍN;PALMERO; JURADO, 2014) e algas (MEDINA, 2016).

Fujimoto e colaboradores (1999) isolaram oito constituintes químicos do fungo endofítico *Microascus tardifaciens*, sendo que três deles: a questina (1), rubrocristina (2) e a tardioxopiperazina A (3), mostraram atividade imunossupressora. De *Microascus longirostris* foram isoladas as catestatinas A (4) e B (5), com atividade inibitória de cisteína protease, indicativo de atividade antiviral (YU et al. 1995). Yu e colaboradores (2008) isolaram os scopularídeos A (6) e B (7) da fase anaforma do *Mi-*

croascus brevicaulis, substâncias com atividade antitumoral frente às linhagens de Colo357 (colorretal) e Panc89 (pâncreas), além de atividade antibacteriana. Holler e colaboradores (2000) isolaram do extrato acetato de etila do fungo *Microascus* sp., o alcaloide fungerina (**8**), com atividade antimicrobiana, enquanto a substância EGM-556 (**9**), um ciclodepsipeptídeo de biossíntese mista, foi isolada de outra linhagem do fungo *Microascus* sp., ao se empregar o ácido hidroxâmico suberoilânilida (SAHA) como manipulador epigenético (VERVOORT; DRASKOVIC; CREWS, 2011).





1.4 2,5-Dicetopiperazinas

As dicetopiperazinas constituem uma classe de metabólitos secundários frequentemente isolada de fungos. As mais comuns são as 2,5-dicetopiperazinas que são biossintetizadas pela condensação de dois aminoácidos por substituição nucleofílica entre os grupos aminos e as carboxilas, formando um ciclodipeptídeo (Figura 4). Possuem uma estrutura capaz de se ligar a diversos receptores, além de um esqueleto heterocíclico pequeno, conformacionalmente rígido, com estereoquímica controlada em quatro posições e possibilidade de introduzir substituintes seis substituintes. Essas características conferem às 2,5-dicetopiperazinas uma série de atividades farmacológicas (BORTHWICK, 2012).

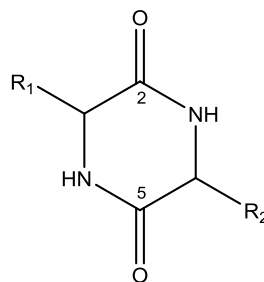
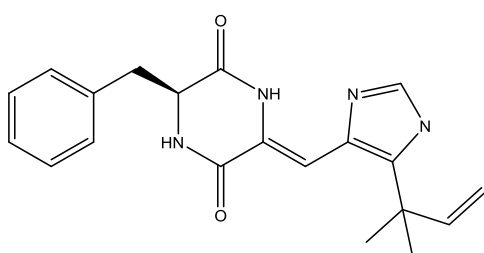


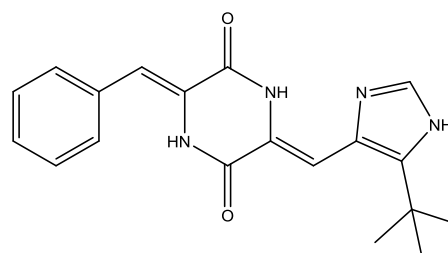
Figura 4- Estrutura básica da 2,5-dicetopiperazina.

Os diversos estudos descritos na literatura comprovam a variedade de estruturas e atividades farmacológicas das 2,5-dicetopiperazinas, sendo relatadas atividades como antimicrobiana (KUMAR et al., 2013), inseticida (LAN et al., 2016), antifúngica (PUOPOLLO et al., 2014), antibacteriana (FDHILA et al., 2003), cardioprotetora (MITSUI-SAITOH et al., 2011), citotóxica (ZHAO et al., 2002), antiviral (MAS et al., 2006) entre outras (BORTHWICK, 2012) para estas substâncias.

A 2,5-dicetopiperazina plinabulina, um derivado sintético da halimida obtida do fungo *Aspergillus* sp. encontrado em associação à alga verde *Halimeda copiosa* (FENICAL 1999), demonstrou ser um potente agente antitumoral em amplo espectro de células cancerígenas, incluindo câncer de mama, próstata, ovário e gastrointestinal. Atualmente encontra-se na fase 3 de testes clínicos para o tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas aliado ao quimioterápico docetaxel; e será avaliada em fase 3 no tratamento de neutropenia, além de 140 patentes relacionadas a estudos em fase 1 e 2. (BEYONDSRING PHARMACEUTICALS, 2015).



Halimida



Plinabulina

O elevado potencial químico e farmacológico atribuído aos fungos endofíticos na produção de substâncias inéditas e bioativas, aliado ao recente

interesse em estudá-los, demonstra a necessidade de se pesquisar esse grupo de organismos, principalmente os fungos endofíticos de algas.

Além disso, a escassez de estudos químicos e a inexistência de relatos na literatura sobre o fungo *Microascus intricatus* despertou o interesse de estudar este fungo, visando a oportunidade de encontrar na linhagem do fungo em estudo, uma fonte de substâncias bioativas. Esta abordagem permitirá agregar valor à espécie, para seu possível emprego como produtora de substâncias para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, além de contribuir para a conservação e utilização sustentável da biodiversidade marinha do Brasil.

Objetivos:

Geral: Realizar a investigação química e prospecção farmacológica do fungo codificado como AT-07 isolado da alga *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan.

Específicos:

- Cultivar em larga escala o fungo endofítico codificado como AT-07 em meio líquido de PDB para obtenção do extrato bruto com massa suficiente para investigação estrutural de metabólitos secundários e prospecção farmacológica;
- Obter o perfil químico do extrato bruto utilizando RMN de ^1H e CLAE/DAD;
- Fracionar o extrato bruto utilizando técnicas cromatográficas convencionais e/ou sofisticadas para o isolamento e/ou identificação em mistura de metabólitos secundários;
- Elucidar e/ou identificar as substâncias isoladas utilizando técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais, DC, Ultravioleta, Infravermelho) e espectrométricas (EM);
- Avaliar o potencial farmacológico, por meio dos ensaios de atividade antifúngica e anticolinesterásica do extrato e frações;
- Fornecer informações químicas e farmacológicas para o desenvolvimento de pesquisas visando à valorização e utilização sustentável da espécie e conservação da biodiversidade do ambiente marinho.

4 Conclusão:

A linhagem estudada do fungo *Microascus intricatus*, isolado da alga marinha vermelha *Asparagopsis taxiformis* mostrou quimiodiversidade atrativa ao analisarmos seu perfil químico por meio de cromatografia líquida de alta eficiência e Ressonância Magnética Nuclear.

Através de fracionamento cromatográfico empregando CC, CCD e CLAE foi possível isolar cinco substâncias, que foram identificadas a partir de análises espectrométricas e espectroscópicas, sendo elas quatro dicetopiperazinas, a ciclo-(Pro-Tir), ciclo-(Phe-Phe) e um par de diastereoisômeros da ciclo-(Pro-Phe), bem como a isoflavona, daidzeína. Essas substâncias possuem atividades biológicas já descritas na literatura, agregando valor a esta linhagem do fungo *Microascus intricatus* como fonte de substâncias bioativas.

A fração AT-07 F4, obtida do extrato da cultura do fungo em estudo, apresentou boa atividade anticolinesterásica frente à enzima de *Electrophorus electricus* (enguia elétrica) ao compararmos com o padrão tacrina. No entanto, esta atividade não foi observada para as outras frações do mesmo extrato, assim como no ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase de eritrócitos humanos.

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam o potencial químico e biológico do fungo *Microascus intricatus* e contribuem para o desenvolvimento da pesquisa na área de Produtos Naturais de micro-organismos marinhos, com destaque para a pesquisa de bioprospecção. Além disso, reforça o potencial dos fungos endofíticos, assim como do nicho de micro-organismos e do ambiente marinho, com destaque para a importância das relações ecológicas, bem como fundamenta a valorização e utilização sustentável não só da espécie fúngica, mas também a conservação do habitat do seu substrato, representado pelas algas marinhas.

Referências

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista UNINGÁ Review**, v. 21, n.1, p. 55-59, 2015.
- AKELLO, J. et al. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 34-42, 2007.
- ARNOLD, A. E. et al. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 26, p. 15649-15654, Dec. 2003.
- BAE, H. et al. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 11, p. 3279-3295, 2009.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARRETOS, J. J. **Plantas medicinais: saberes tradicionais**. Bahia: Solisluna, 2014.
- BEYONDSRING PHARMACEUTICALS. **NSCLC and neutropenia prevention**. New York. Disponível em: <<http://www.beyondspringpharma.com/en/plinabulin/lead-indication/>>. Acesso em: 05 fev. 2017.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 32, p. 116-211, 2015.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 382-431, Mar. 2016.
- BORTHWICK, A. D. 2,5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. **Chemical Reviews**, v. 122, p. 3641-3716, 2012.
- CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risks to human health. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.
- CAO, F.; JIN, T. Y.; ZHOU, Y. F. Inhibitory effect of isoflavones on prostate cancer cells and PTEN gene. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 19, p. 35-41, 2006.
- CHAPLA, V. M. et al. Bioactive secondary metabolites from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus from *Senna spectabilis*. **Molecules**, v. 19, p. 6597-6608, 2014.
- CHINWORRUNGSEE, M. et al. Bioactive compounds from the seed fungus *Menisporopsis theobromae* BBC 3975. **Journal Natural Products**, v. 69, p. 1404-1410, 2006.

- CONSTANTINO, A. I. et al. The soy isoflavone daidzein improves the capacity of tamoxifen to prevent mammary tumours. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 647-654, 2005.
- COTA, B. B. et al. Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp., inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, p. 177-182, 2008.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, p. 3670-3695, June 2013.
- 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, Nov. 2010.
- ELSEBAI, M. F. et al. HLE-inhibitory alkaloids with a polyketide skeleton from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereal*. **Journal Natural Products**, v. 74, p. 2282-2285, 2011a.
- ELSEBAI, M. F. et al. Antimicrobial phenalenone derivatives from the marine-derived fungus *Coniothyrium cereal*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, p. 802-808, 2011b.
- FDHILA, F. et al. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1299-1301, 2003.
- FENG-WU, W. Bioactive metabolites from *Guignardia* sp., an endophytic fungus residing in *Undaria pinnatifida*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 1, p. 72-76, 2012.
- FIRN, R. D.; JONES, C. G. Natural products-a simple model to explain chemical diversity. **Natural Product Reports**, v. 20, p. 382-391, 2003.
- FUJIMOTO, H. et al. Immunomodulatory constituents from an Ascomycete, *Microascus tardifaciens*. **Chemistry Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 10, p. 1426-1432, 1999.
- GAO, S. et al. Secondary metabolites from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Marine Drugs**, v. 9, p. 59-70, 2011.
- GROTHAUS, P. G.; CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plant natural products in anticancer drug discovery. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1781-1791, 2010.
- GUO, J. M. et al. Effects of daidzein on estrogen-receptor-positive and negative pancreatic cancer cells in vitro. **World Journal Gastroenterology**, v. 10, p. 860-863, 2004a.
- GUO, J. M. et al. Biphasic effect of daidzein on cell growth of human colon cancer cells. **Food Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1641-1646, 2004b.

HOLLER, U. et al. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 104, p. 1354-1365, 2000.

HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 163-173, 2008.

IMHOFF, J. F.; LABES, A.; WIESE, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 468-482, 2011.

ISAKA, M. et al. Eremophilane-type sesquiterpenes from the fungus *Xylaria* sp. BCC 21097. **Journal Natural Products**, v. 73, p. 683-687, 2010.

KALE, M. S.; LADDHA, K. S. Isolation, characterization and quantification of Isoflavone in *Momordica dioica* Roxb. Ex Wild (Cucurbitaceae) fruits. **International Journal of Applied Research in Natural Products**. v. 5, n. 4, p. 28-36, 2012.

KAUL, S.; SUMBALI, G. Keratinophilic fungi from poultry farm soils of Jammu, India. **Mycologist**, v.14, n. 2, p. 89-91, 2000.

KUMAR, N. et al. Isolation of proline-based cyclic dipeptides from *Bacillus* sp. N strain associated with rhabditid entomopathogenic nematode and its antimicrobial properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 355-364, 2013.

LAN, W. et al. Secondary metabolites with chemical diversity from the marine-derived fungus *Pseudallescheria boydii* F19-1 and their cytotoxic activity. **Royal Society of Chemistry**, v. 6, p. 76206-76213, 2016.

LIN, A. et al. Two new 5-Hydroxy-2-pyrone derivatives isolated from a marine-derived fungus *Aspergillus flavus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 61, n. 4, p. 245-249, 2008.

LO, F. H.; MAK, N. K.; LEUNG, K. N. Studies on the anti-tumor activities of the soy isoflavone daidzein on murine neuroblastoma cells. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 61, p. 591-595, 2007.

MARÍN, P.; PALMERO, D.; JURADO, M. Effect of solute and matric potential on growth rate of fungal species isolated from cheese. **International Dairy Journal**, v. 36, p. 89-94, 2014.

MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E. Constituintes químicos de *Penicillium* sp, um fungo endofítico isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, n. 2, p. 189-199, jul/dez, 2007.

MAS, V. et al. Identification of selective inhibitors of VHSV from biased combinatorial libraries of N,N-disubstituted 2,5-piperazinediones. **Antiviral Research**, v. 72, p. 107-115, 2006.

MEDINA, R. P. **Prospecção química e biológica das algas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* e *Pyropia spiralis* e seus fungos endofíticos**. 2016. 430 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

MITSUI-SAITOH, K. et al. Protective effects of cyclo(L-Leu-L-Tyr) against postischemic myocardial dysfunction in guinea-pig hearts. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 3, p. 335-342, 2011.

MOHAMMEDI, I. et al. Fatal *Microascus trigonosporus* (anamorph *Scopulariopsis*) pneumonia in a bone marrow transplant recipient. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, p. 215-217, 2004.

MORAES, J. F. et al. Bioprospecção de micro-organismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **Revista UNINGÁ Review**, v. 17, n. 1, p. 27-34, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Endophytic and epiphytic microbes as “sources” of bioactive agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, 2015.
doi:10.3389/fchem.2015.00034.

OLIVEIRA, A. L. L.; FELÍCIO, R.; DEBONSI, H. M. Marine natural products: chemical and biological potential of seaweeds and their endophytic fungi. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 906-920, 2012.

O'NEILL, P. M.; POSNER, G. H. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 2945-2964, 2004.

OSTERHAGE, C. et al. Ascosalipyrrolidinone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae*. **Journal Organic Chemistry**, v. 65, p. 6412-6417, 2000.

QIAO, M. et al. Steroids and an oxylipin from an algicolous isolate of *Aspergillus flavus*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, p. 366-369, 2011.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução a espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage, 2012. 692 p.

PINTO, F. C. L. et al. Glicoalcaloides antifúngicos, flavonoides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 284-288, 2011.

POMMIER, Y. DNA sequence- and structure-selective alkylation of Guanine N2 in the dna minor groove by Ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. **Biochemistry**, v. 35, n. 41, p. 13303-13309, 1996.

PROKSCH, P. et al. Bioactive natural products from marine sponges and fungal endophytes. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 475-489, 2010.

PUOPOLO, G. et al. *Lysobacter capsici* AZ78 produces cyclo(L-Pro-L-Tyr), a 2,5-diketopiperazine with toxic activity against sporangia of *Phytophthora infestans* and *Plasmopara viticola*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, p. 1168-1180, 2014.

PURI, S. C. et al. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 494-510, 2006.

RAMASAMY, K. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of malaysian endophytes. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 640-643, 2010.

RATEB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Products Reports**, v. 28, p. 290-344, 2011.

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (United States). W. Fenical; P. R. Jensen; X. C. Cheng. **Halimide, a cytotoxic marine natural product, and derivatives thereof**. US6069146, 12 Nov. 1998, 30 May 2000.

SIQUEIRA, V. M. et al. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**, v. 53, p. 89-95, 2011.

SU, S. J.; YEH, T. M.; LEI, H. Y. Chow NH the potential of soybean foods as a chemoprevention approach for human urinary tract cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 230-236, 2006.

SUGYAMA, Y. et al. Indole derivatives from a marine sponge-derived yeast as DPPH radical scavengers. **Journal Natural Products**, v. 72, p. 2069-2071, 2009.

SURYANARAYANAN, T. S. et al. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, p. 9-19, 2009.

U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Clinical trials.gov**. Rockville, Nov. 2012. Disponível em:
<<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=trabectedin&Search=Search>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

VERVOORT, H. C.; DRASKOVIC, M.; CREWS, P. Histone deacetylase inhibitors as a tool to up-regulate new fungal biosynthetic products: isolation of EGM-556, a cyclodepsipeptide, from *Microascus* sp. **Organic Letters**, v. 13, n. 3, p. 410-413, 2011.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WELCH, T. R.; WILLIAMS, R. M. Epidithiodioxopiperazin: occurrences, synthesis and biogenesis. **Natural Products Reports**, v. 31, p. 1336-1404, 2014.

WHITE, E. G. **Mensagens escolhidas**. Tatuí: Casa Publicadora Brasileira, 2008. v. 2, 293 p.

XUE, H. et al. Secondary metabolites of *Aspergillus* sp. CM9a, an endophytic fungus of *Cephalotaxus mannii*. **Records Natural Products**, v. 6, n. 1, p. 28-34, 2012.

YU, C. et al. Potent inhibitors of cysteine protease from the marine fungus *Microascus longirostris*. **The Journal Antibiotics**, v. 42, n. 4, p. 395-397, 1995.

YU, C. et al. Scopularides A and B, cyclodepsipeptides from a marine sponge-derived fungus, *Scopulariopsis brevicaulis*. **Journal Natural Products**, v. 71, n. 6, p. 1054-1054, 2008.

ZAO, S. et al. Biological activity of the tryprostatins and their diastereomers on human carcinoma cell lines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 1559-1562, 2002.

ZHANG, B. et al. Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. **Science**, v. 284, p. 974-977, May 1999.

ZHANG, Y. et al. A new naphthoquinoneimine derivative from the marine algal-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* EN-13. **Chinese Chemical Letters**, v. 18, p. 951-953, 2007.

ZHANG, Y. et al. Broad-spectrum antimicrobial epiphytic and endophytic fungi from marine organisms: isolation, bioassay and taxonomy. **Marine Drugs**, v. 7, p. 97-112, 2009.