

RENATA SORDI

Estudo Químico e Biológico de Fungos Endofíticos Isolados das Folhas de
Styrax camporum Pohl (Styracaceae)

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

Orientadora: Prof. Dra Ângela Regina Araújo.

ARARAQUARA
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

S713e Sordi, Renata
Estudo químico e biológico de fungos endofíticos isolados das folhas de *Styrax camporum Pohl* (Styracaceae) / Renata Sordi. -- Araraquara : [s.n], 2007
121 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Ângela Regina Araújo

1. Cromatografia. 2. Microrganismos. 3. Antifúngicos. 4. Antibacteriano.
I. Título.

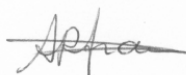
Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

RENATA SORDI

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

Araraquara, 23 de fevereiro de 2007.

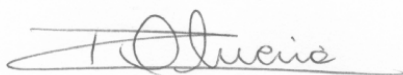
BANCA EXAMINADORA



Profª Dª ÂNGELA REGINA ARAÚJO (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª MÁRCIA NASSER LOPES
Instituto de Química – UNESP, Araraquara.



Profª Drª DIONÉIA CAMILO RODRIGUES DE OLIVEIRA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP / Ribeirão Preto

Dedico:

Aos pais amados, Jorge e Conceição,

Aos irmãos queridos Tânia e Reinaldo,

As amigas Maisa, Carenina e Graziela,

Ao melhor amigo Ioanis,

Pelo apoio, incentivo, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Deus acima de tudo;
- ✓ Aos meus pais pelo exemplo de vida e pelo amor dedicado. Vocês são os presentes mais preciosos que Deus me concedeu;
- ✓ A minha irmã e segunda mãe Tânia pelo apoio, confiança e amor. Meu exemplo de força, coragem e honestidade;
- ✓ Ao meu cunhado Wilson pela “ajudinha” com o inglês;
- ✓ À Profa. Ângela Regina Araújo, pela orientação, paciência e carinho, possibilitando não só a realização deste trabalho, como também minha evolução como pessoa;
- ✓ Aos amigos Helder, Geraldo e Ioanis, que muito colaboraram para a realização deste trabalho;
- ✓ A todos os amigos que eu ganhei no NuBBE;
- ✓ Aos amigos Nivaldo e Albertinho pela realização dos espectros;
- ✓ As amigas de hoje e sempre Nina, Maisa, Graziela, Amanda e Camila pelas horas de diversão, pela “força” nos momentos difíceis e pelos melhores anos da minha vida!
- ✓ Aos professores Wagner Vilegas, Alberto J. Cavalheiro, Maysa Furlan, Márcia Nasser, Dulce Helena, Lucia Xavier, Ian Castro e Vanderlan S. Bolani, pelos ensinamentos que colaboraram muito para minha formação profissional;
- ✓ Aos demais professores, alunos e funcionários do Instituto de Química;
- ✓ Aos novos amigos e “família” da PremieR Pet, em especial, Cássio, Cristiana e Roberto que permitiram as várias “escapadas” do trabalho para terminar esta dissertação. Não se animem o Doutorado vem aí!
- ✓ Ao CNPq pela Bolsa fornecida.

SUMÁRIO

	pg.
DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
SUMÁRIO	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	11
ÍNDICE DE ESQUEMAS	11
ÍNDICE DE QUADROS	12
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	13
DEFINIÇÕES	14
RESUMO	15
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO GERAL	19
OBJETIVOS	21
CAPÍTULO I	22
I. Introdução	22
I.1 A família <i>Styracaceae</i>	22
I.2 O gênero <i>Styrax</i>	22
I.3 A espécie <i>Styrax camporum</i>	23
I.4 Fungos: uma visão geral	25
I.5 Fungos endofíticos	28
I.6 Materiais e Métodos	31
I.6.1 Solventes e Reagentes	31
I.6.2 Sistemas Cromatográficos	31
I.6.3 Equipamentos	31
I.6.4 Metodologia de Preparo dos Extratos	32
I.6.5 Meios de cultura	33
I.7 Isolamento e triagem dos endofíticos de <i>Styrax camporum</i>	33
I.7.1 Obtenção e classificação das cepas fúngicas	33
I.7.2 Cultivo dos fungos endofíticos em pequena escala (triagem)	34

I.7.3 Obtenção dos extratos brutos produzidos pelos fungos (triagem)	35
I.8 Resultados e discussões da triagem química dos endofíticos isolados	36
I.9 Avaliação do perfil químico dos fungos SC-01 a SC-07 (triagem)	37
CAPÍTULO II	46
II. Introdução	46
II.1. Fungos da família <i>Diaphorthales</i>	46
II.2. Gênero <i>Phomopsis</i> / <i>Diaphorthe</i>	47
II.3. Diversidade química do gênero <i>Phomopsis</i>	48
II.4 Materiais e Métodos	49
II.4.1 Sistemas Cromatográficos	49
II.4.2 Equipamentos	49
II.4.3 Meios de Cultura	49
II.5 Estudo químico do endofítico <i>Phomopsis stipata</i> (SC-04)	50
II.5.1 Cultivo do endofítico SC-04 em MBD e obtenção do extrato bruto (larga escala)	50
II.5.2 Separação cromatográfica do extrato bruto produzido por SC-04 em MBD (larga escala)	51
II.5.3 Cultivo do endofítico SC-04 em diferentes meios de cultura comerciais	53
II.5.4 Cultivo do endofítico SC-04 em cereais	56
II.6 Resultados e discussões do estudo químico do extrato bruto AcOEt	58
II.7 Elucidação estrutural dos metabólitos isolados	58
II.8 Resultados e discussões da variação metabólica de SC-04 em diferentes cultivos	65
CAPÍTULO III	76
III. Introdução	76
III.1 Detecção de metabólitos antifúngicos (Bioautografia)	78
III.1.1 Materiais e Métodos	79
III.1.2 Resultados da atividade antifúngica	79
III.2 Detecção de metabólitos antioxidantes	82
III.2.1 Materiais e métodos	82
III.2.2 Resultados da atividade antioxidante	82

III.3 Detecção de inibidores da enzima acetilcolinesterase	83
III.3.1 Materiais e Métodos	83
III.3.2 Resultados da atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase	84
III.4 Perfil de sensibilidade de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> frente aos extratos obtidos	84
III.4.1 Materiais e Métodos	84
III.4.2 Resultados da atividade antibacteriana	86
III.5 Discussão do perfil biológico dos endofíticos isolados	86
III.6 Discussão do perfil biológico de <i>Phomopsis stipata</i> em diferentes cultivos	88
CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	92
ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	102
ANEXOS (CROMATOGRAMAS E ESPECTROS)	103

ÍNDICE DE FIGURAS

	pg.
Fig. 01 – Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por SC-01	37
Fig. 02 – Curvas de UV dos metabólitos produzidos por SC-01	38
Fig. 03 – Detalhes dos espectros de RMN ¹ H em CDCl ₃ dos extratos brutos produzidos por SC-02 e SC-03 e estrutura do ácido 3-nitropropiónico	38
Fig. 04 - Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por SC-02	39
Fig. 05 - Curvas de UV dos metabólitos produzidos por SC-02	39
Fig. 06 - Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por SC-03	40
Fig. 07 - Curvas de UV dos metabólitos produzidos por SC-03	40
Fig. 08 - Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por SC-04	41
Fig. 09 - Curvas de UV dos metabólitos produzidos por SC-04	42

Fig. 10 - Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por SC-05	42
Fig. 11 - Curvas de UV dos metabólitos produzidos por SC-05	43
Fig. 12 - Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por SC-06	43
Fig. 13 - Curvas de UV dos metabólitos produzidos por SC-06	44
Fig. 14 - Cromatograma em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por SC-07	44
Fig. 15 - Curvas de UV dos metabólitos produzidos por SC-07	45
Fig. 16 - Estruturas fúngicas importantes na classificação do filo Ascomycota	46
Fig. 17 - Ilustração do corpo de frutificação tipo Peritécio	46
Fig. 18 - Estrutura atribuída para a substância <u>1</u>	58
Fig. 19 - Estruturas parciais A, B, C e D atribuídas para a substância <u>1</u>	59
Fig. 20 - Estrutura atribuída para a substância <u>2</u> .	62
Fig. 21 - Estruturas parciais A e B atribuídas para a substância <u>2</u> .	63
Fig. 22 - Principais correlações em HMBC (A) e COSY (B) para a substância <u>2</u> .	63
Fig. 23 - Cromatogramas em gradiente exploratório da partição AcOEt do meio EM sem a inoculação do fungo “branco”	66
Fig. 24 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por SC-04 em EM	66
Fig. 25 - Cromatogramas em gradiente exploratório da partição AcOEt do meio YM sem a inoculação do fungo “branco”	67
Fig. 26 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por SC-04 em YM	68
Fig. 27 - Cromatogramas em gradiente exploratório da partição AcOEt do meio Nutriente sem a inoculação do fungo “branco”	69
Fig. 28 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por SC-04 em Nutriente	70
Fig. 29 - Cromatogramas em gradiente exploratório da partição AcOEt do meio Czapek sem a inoculação do fungo “branco”	71
Fig. 30 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por SC-04 em Czapek	71
Fig. 31 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido	

por SC-04 em Arroz (A) e Milho (B) (Extração AcOEt)	72
Fig. 32 - Cromatogramas em gradiente exploratório da partição AcOEt do Arroz sem a inoculação do fungo “branco”	73
Fig. 33 - Cromatogramas em gradiente exploratório da partição AcOEt do Milho sem a inoculação do fungo “branco”	73
Fig. 34 - Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por SC-04 em Arroz (A) e Milho (B) (Extração ACN)	74
Fig. 35 – Ensaio de bioautografia com os extratos AcOEt produzidos pelos endofíticos triados	80
Fig. 36 – Ensaio de bioautografia com os extratos AcOEt produzidos por SC-04 em diferentes meios de cultura	80
Fig. 37 – Ensaio de bioautografia com os metabólitos produzidos por SC-04 em MBD	81
Fig. 38 – Ensaio para verificação do limite de detecção da atividade antifúngica de <u>2</u>	81
Fig. 39 – Cromatoplaça revelada com DPPH após aplicação dos extratos brutos produzidos pelos endofíticos isolados de <i>Styrax camporum</i>	82
Fig. 40 – Cromatoplaça revelada com DPPH após aplicação dos extratos brutos produzidos pelo endofítico SC-04 em diferentes meios de cultura	83
Fig. 41 – Ensaio anticolinesterásico com a substância <u>1</u>	84
Fig. 42 – Microplate Alamar Blue Assay (MABA)	86
Fig. 43 – Perfil biológico dos fungos isolados	87
Fig. 44 – Perfil biológico de SC-04 em diferentes cultivos	89
Fig. 45 – Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto AcOEt produzido por SC-04 em MBD (larga escala)	104
Fig. 46 – Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos parciais EP1 a EP5 obtidos do fracionamento do extrato bruto produzido por SC-04 em MBD	105
Fig. 47 – Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos parciais EP5 a EP9 obtidos do fracionamento do extrato bruto produzido por SC-04 em MBD	105
Fig. 48 – Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos parciais EP9 a EP12 obtidos do fracionamento do extrato bruto produzido por SC-04	

em MBD	106
Fig. 49 – Cromatograma em sistema isocrático do extrato parcial EP10	106
Fig. 50 – Cromatograma em sistema isocrático do extrato parcial EP9	107
Fig. 51 – Espectro de RMN ^1H em DMSO-d6 do extrato bruto produzido por SC-01	107
Fig. 52 – Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 do extrato bruto produzido por SC-02	108
Fig. 53 – Espectro de RMN ^1H em DMSO-d6 do extrato bruto produzido por SC-03	108
Fig. 54 – Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 do extrato bruto produzido por SC-04	109
Fig. 55 – Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 do extrato bruto produzido por SC-05	109
Fig. 56 – Espectro de RMN ^1H em DMSO-d6 do extrato bruto produzido por SC-06	110
Fig. 57 – Espectro de RMN ^1H em DMSO-d6 do extrato bruto produzido por SC-07	110
Fig. 58 – Espectro de RMN ^1H em DMSO-d6 do extrato bruto produzido por SC-04 em EM	111
Fig. 59 – Espectro de RMN ^1H em DMSO-d6 do extrato bruto produzido por SC-04 em YM	111
Fig. 60 – Espectro de RMN ^1H em DMSO-d6 do extrato bruto produzido por SC-04 em Nutriente	112
Fig. 61 – Espectro de RMN ^1H em DMSO-d6 do extrato bruto produzido por SC-04 em Czapek	112
Fig. 62 – Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 do extrato bruto produzido por SC-04 em Milho (Extração AcOEt)	113
Fig. 63 – Espectro de RMN ^1H em DMSO-d6 do extrato bruto produzido por SC-04 em Milho (Fração ACN)	113
Fig. 64 – Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 do extrato bruto produzido por SC-04 em Arroz (Extração AcOEt)	114
Fig. 65 – Espectro de RMN ^1H em DMSO-d6 do extrato bruto produzido por SC-04 em Arroz (Fração ACN)	114
Fig. 66 - Espectro de RMN de ^1H em DMSO-d6 da substância <u>1</u>	115
Fig. 67 - Espectro de RMN de ^{13}C em DMSO-d6 da substância <u>1</u>	115
Fig. 68 - Espectro de gHMQC em DMSO-d6 da substância <u>1</u>	116

Fig. 69 - Espectro de <i>g</i> HMBC em DMSO-d6 da substância <u>1</u>	116
Fig. 70 - Espectro de <i>g</i> COSY em DMSO-d6 da substância <u>1</u>	117
Fig. 71 - Espectro de RMN de ¹ H em DMSO-d6 da substância <u>2</u>	117
Fig. 72 - Espectro de RMN de ¹³ C em DMSO-d6 da substância <u>2</u>	118
Fig. 73 - Espectro de <i>g</i> HMQC em DMSO-d6 da substância <u>2</u>	118
Fig. 74 - Espectro de <i>g</i> HMBC em DMSO-d6 da substância <u>2</u>	119
Fig. 75 - Espectro de <i>g</i> COSY em DMSO-d6 da substância <u>2</u>	119
Fig. 76 - Espectros de NOESY 1D em DMSO-d6 da substância <u>1</u>	120
Fig. 77 - Espectro de Massas da substância <u>1</u>	121
Fig. 78 - Espectro de Massas da substância <u>2</u>	121

ÍNDICE DE TABELAS

	pg.
Tabela 01 - Metabólitos secundários de algumas espécies de <i>Styrax</i>	24
Tabela 02 – Meios de cultura utilizados para o cultivo dos endofíticos isolados	33
Tabela 03 - Extratos brutos produzidos pelos fungos triados	35
Tabela 04 – Meios de cultura utilizados para os crescimentos do fungo SC-04	50
Tabela 05 – Extratos parciais obtidos no fracionamento do extrato bruto em larga escala	52
Tabela 06 – Extratos brutos produzidos pelo fungo SC-04 em diferentes meios comerciais	54
Tabela 07 – Extratos brutos produzidos pelo fungo SC-04 em cereais	57
Tabela 08 – Dados de RMN de ¹³ C, ¹ H, HMBC, HMQC e COSY da Substância <u>1</u>	61
Tabela 09 – Dados de RMN de ¹³ C, ¹ H, HMBC, HMQC e COSY da Substância <u>2</u>	64
Tabela 10 – CIM dos extratos produzidos pelos fungos isolados em MBD	86
Tabela 11 – CIM dos extratos produzidos por SC-04 em diferentes meios	86

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	pg.
Esquema 01 - Obtenção das cepas fúngicas	34

Esquema 02 - Cultivo dos fungos em pequena escala, obtenção dos extratos brutos e triagem químico/biológica	36
Esquema 03 - Cultivo de SC-04 em MBD, obtenção do extrato bruto em larga escala e verificação do perfil químico/biológico	51
Esquema 04 - Fracionamento cromatográfico do extrato bruto SC-04 (larga escala) em fase reversa	53
Esquema 05 – Cultivo do endofítico SC04 (pequena escala) em diferentes meios de cultura líquidos comerciais	55
Esquema 06 – Cultivo do endofítico SC-04 (pequena escala) em cereais	57

ÍNDICE DE QUADROS

	pg.
Quadro 01 - Metabólitos secundários de espécies de <i>Styrax</i>	24
Quadro 02 - Metabólitos secundários produzidos por fungos	27
Quadro 03 - Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos	30
Quadro 04 – Metabólitos secundários bioativos produzidos pelo gênero <i>Phomopsis</i>	48
Quadro 05 - Estruturas relacionadas com as substâncias 1 e 2 .	65

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
ACN	Acetonitrila
aq.	Aquosa
BDA	Batata Dextrose Ágar
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CD ₃ OD	Metanol Deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Correlated Spectroscopy
C18	Sílica Gel de Fase Reversa (octadecilsilano)
DAD	Detector em Arranjo de Diodos
DCM	Diclorometano
d	dubleto
dd	duplo dubleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido Deuterado
DPPH	Difenil-Picril-Hidrazida
EM	Extrato de Malte
EtOH	Ácool Etílico
fig.	Figura
<i>g</i> COSY	Gradient Correlated Spectroscopy
<i>g</i> HMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence
<i>g</i> HMQC	Gradient Heteron. Multiple Quantum Coherence
Glu	Glicose
grad.	Gradiente
grad. expl.	Gradiente exploratório
<i>J</i>	constante de acoplamento

m	multiplete
MBD	Meio de Batata e Dextrose
MeOH	Metanol
MHz/Hz	Megahertz/Hertz
min.	minuto
<i>m/z</i>	relação massa/carga
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NuBBE	Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Eco-Fisiologia de Produtos Naturais
pg.	Página
pH	Potencial Hidrogeniônico
prep.	Preparativo(a)
Rf	Fator de Retenção
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN - 2D	Ressonância Magnética Nuclear Bidimensional
s	singleto
sl	singleto largo
t	triplete
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
tr	Tempo de Retenção
UV-Vis	Ultra Violeta - Visível
δ	deslocamento químico

DEFINIÇÕES

Extrato bruto: extrato obtido por extração líquido/líquido com acetato de etila a partir do meio de cultura líquido de crescimento do fungo endofítico.

Extrato parcial: fração obtida a partir do fracionamento do extrato bruto.

RESUMO

Microrganismos endofíticos são definidos como organismos que habitam pelo menos um período de seu ciclo vital, o interior de um vegetal, sem causar aparentemente nenhum dano a este. Na busca de novos organismos e novos metabólitos secundários, um estudo foi conduzido visando avaliar a diversidade química de fungos endofíticos por meio do isolamento e identificação de metabólitos secundários produzidos por *Phomopsis stipata*, um fungo endofítico obtido das folhas de *Styrax camporum*, uma planta do Cerrado brasileiro.

Sete fungos foram isolados das folhas de *Styrax camporum* (SC-01, 02, 03, 04, 05, 06 e 07) e cultivados em meio de cultura líquido MDB, inicialmente em pequena escala (400 mL), durante 28 dias em incubadora rotatória à temperatura ambiente. A seguir, os caldos contendo os metabólitos secretados pelos fungos foram separados do micélio por filtração e submetidos à partição líquido-líquido com AcOEt, fornecendo os extratos brutos. Os extratos brutos obtidos foram submetidos a um processo de triagem química e biológica, que compreendeu análise do perfil cromatográfico e espectroscópico e avaliação das atividades: antioxidante (através do teste com DPPH), antifúngica (frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides*), antibacteriana (frente ao *Mycobacterium tuberculosis*), e anticolinesterásica.

Dos microrganismos triados, SC-04 (*Phomopsis stipata*) foi cultivado em larga escala e seu extrato bruto obtido em MBD submetido a fracionamento cromatográfico resultando no isolamento das substâncias 1 e 2.

Paralelamente, foi realizada a comparação da diversidade na produção metabólica do fungo quando cultivado em cereais (arroz e milho) e em diferentes

meios de cultura comerciais, através de dados espectroscópicos e do perfil cromatográfico via RMN e CLAE, assim como avaliação das atividades antioxidante e biológica dos extratos brutos obtidos (antifúngica, antibacteriana e anticolinesterásica).

ABSTRACT

Endophytic microorganisms are defined as organisms that inhabit the interior of a vegetable at least during a period of the vital cycle, without causing any apparent damage. In the search for new organisms and new secondary metabolites, a study was conducted to evaluate the chemical diversity of endophytic fungi through the isolation and identification of secondary metabolites produced by *Phomopsis stipata*, an endophytic fungi obtained from the leaves of *Styrax camporum*, a plant of the Brazilian Cerrado.

Seven fungi had been isolated from the *Styrax camporum leaves* (SC-01, 02, 03, 04, 05, 06 e 07) and cultivated on a liquid medium of MDB culture, initially in a small scale (400 ml), during 28 days in a rotating incubator at room temperature. To follow, the culture broth containing the metabolites secreted by the fungi had been separated from the micelium by filtration and submitted to the liquid-liquid partition with AcOEt, to give the crude extracts. These extracts had been submitted to a chemical and biological screening process, which consisted in an analysis of the chromatographic and spectroscopic profile and evaluation of the following activities: antioxidant (by DPPH test), antifungal (in relation to the phytopathogenic fungi *Cladosporium sphaerospermum* and *Cladosporium cladosporioides*), bactericidal (in relation to *Mycobacterium tuberculosis*), and anticolinesterasic.

From the screened fungi, SC-04 (*Phomopsis stipata*) had been cultivated in large scale and its raw extract obtained by MBD had been submitted in a chromatographic fragmentation, resulting in an isolation of substances 1 and 2.

At the same time, had been made a comparison of the diversity in the metabolic production of the fungi when cultivated in cereals (rice and corn) and in different commercial culture way, through spectroscopic data and chromatographic

profile by RMN e CLAE, as well as evaluation of the antioxidant and biological activities of the obtained crude extracts (antifungal, bactericidal and anticholinesterasic).

INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento da resistência a drogas em algumas bactérias e fungos torna urgente a procura por novos e melhores antibióticos. Doenças que comprometem o sistema imunológico como AIDS e câncer ou intervenções cirúrgicas como transplante de órgãos aumentam a probabilidade de infecções causadas por patógenos oportunistas como *Aspergillus*, *Cryptococcus* e outros, fazendo-se necessária a busca por novos antimicóticos (STROBEL, 2003).

Um dos mais importantes fatores para o sucesso no descobrimento de um novo fármaco é a diversidade química dos compostos a serem selecionados, cujas fontes podem ser sintéticas, naturais ou originadas de química combinatória. Dentre estas, os produtos naturais são considerados como uma das maiores fontes de diversidade química (TREVISAN et al., 2003)

Produtos naturais são bioprodutos obtidos a partir de microrganismos, plantas e animais e representam uma valiosa alternativa na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Esses bioprodutos têm sido utilizados pela medicina tradicional há muito tempo. Estudos clínicos, farmacológicos e químicos destes medicamentos tradicionais, derivados predominantemente de plantas, foram a base para muitos fármacos, tais como aspirina, digitoxina, morfina, quinina e pilocarpina (BUTLER, 2004).

A descoberta de quimioterápicos eficazes como vimblastina (Velban®) e vincristina (Oncovin®) motivou a indústria farmacêutica a reativar o interesse por medicamentos de origem vegetal, buscando principalmente por estruturas moleculares complexas cuja síntese seja inviável economicamente (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Segundo Newman, Gragg e Snader (2003), no período de 1981 a 2002, 33% das 877 novas moléculas bioativas descobertas são de origem natural ou derivadas por semi-síntese. Dos fármacos produzidos a partir de 1995, 244 estruturas químicas têm sido utilizadas como protótipos, sendo que 83% destas são provenientes de fontes naturais e 17% são sintéticas (FURTADO, 2004).

O avanço tecnológico propiciou rapidamente o surgimento de novos medicamentos. Entre os anos de 2000 e 2003 houve uma constante introdução de novos produtos naturais e medicamentos derivados destes, nos EUA, Europa e

Japão. Um total de 15 novos fármacos foi lançado, os quais incluem os antiinflamatórios arteether, a caspofungina (derivado de ecnocandina), a droga galantamina (inibidor de acetilcolinesterase), o antibacteriano daptomicina, entre outros (BUTLER, 2004).

OBJETIVOS

- Avaliar o perfil químico e biológico dos fungos endofíticos (codificados SC-01, SC-02, SC-03, SC-04, SC-05, SC-06 e SC-07), isolados das folhas de *Styrax camporum* e cultivados em MBD por RMN ^1H , CLAE, ensaio preliminar com DPPH para detecção de atividade antioxidante e ensaios biológicos para detecção de atividade antifúngica e antibacteriana;
- Estudo químico do extrato bruto em acetato de etila produzido pelo endofítico *Phomopsis stipata* em MBD e avaliação das atividades antifúngica e anticolinesterásica das substâncias isoladas;
- Crescimento do fungo SC-04 (pequena escala) em diferentes meios nutritivos para comparação das variações metabólica;
- Avaliação das atividades antioxidante, antifúngica e antibacteriana dos extratos brutos produzidos por *Phomopsis stipata* em diferentes meios.

Capítulo I

I. Introdução

I.1 A família *Styracaceae*

A família *Styracaceae* é composta por onze gêneros distribuídos na Europa, Ásia, trópicos e subtropicais americanos (JOLY, 1985). São conhecidas cerca de 120 espécies nesta família, estando bem representadas no Brasil. Em alguns gêneros de *Styracaceae*, na qual se inclui *Styrax*, predominam substâncias de natureza resinosa e balsâmica, que possuem o ácido benzóico como principal componente. Essas substâncias, muito usadas na medicina popular, foram denominadas como “benjoin”, “estoraque”, dentre outros. Há algumas décadas o “benjoin” está registrado na farmacopéia (REYNOLDS, 1996), sendo indicado como fitoterápico para casos de fumigações e bronquites devido às ações anti-séptica, cicatrizante, homeostática, dentre outras (COIMBRA, 1958). Em geral, as espécies desta família caracterizam-se por apresentarem árvores pequenas ou arbustos campestres, bastante comuns nos estados centrais do Brasil, em regiões de Cerrado (RIZZINI; MORS, 1976).

I.2 O gênero *Styrax*

O principal gênero de *Styracaceae* é o *Styrax* com cerca de 60 espécies registradas (GILG, 1926). Algumas espécies destacam-se por apresentarem propriedades medicinais, sendo objetivo de amplos estudos, tais como:

Styrax aurea, de ocorrência nos Estados de Minas Gerais, Bahia e Alagoas e chamada de “estoraqueiro-do-Brasil” ou “benjoeiro” é uma árvore muito conhecida pela goma-resinosa que se obtém por incisão do caule. Seu bálsamo é usado na medicina popular para o tratamento das úlceras crônicas, da blenorragia e da leucorréia, sendo também indicado nos casos de tosse, dispnéia, rouquidão e como calmante (BALBACH, 1976).

As espécies *Styrax benjoin* e *Styrax tonkinensis*, originárias de Java, Sumatra, Tailândia e Tonkin, também fornecem resina balsâmica. A composição química da

resina de *Styrax tonkinensis* é formada de ácido benzóico livre (23%), ácido cinâmico (3%), álcool coniferílico, benzoato de coniferila e vanilina. A resina de *Styrax benjoin* contém principalmente ácido cinâmico livre, pequeno teor de ácido benzóico, álcool coniferílico e cinamato de coniferila. Ambas são usadas no preparo de expectorantes balsâmicos e anti-sépticos das vias respiratórias, sendo também extremamente cicatrizantes (COSTA, 1968).

I.3 A espécie *Styrax camporum*

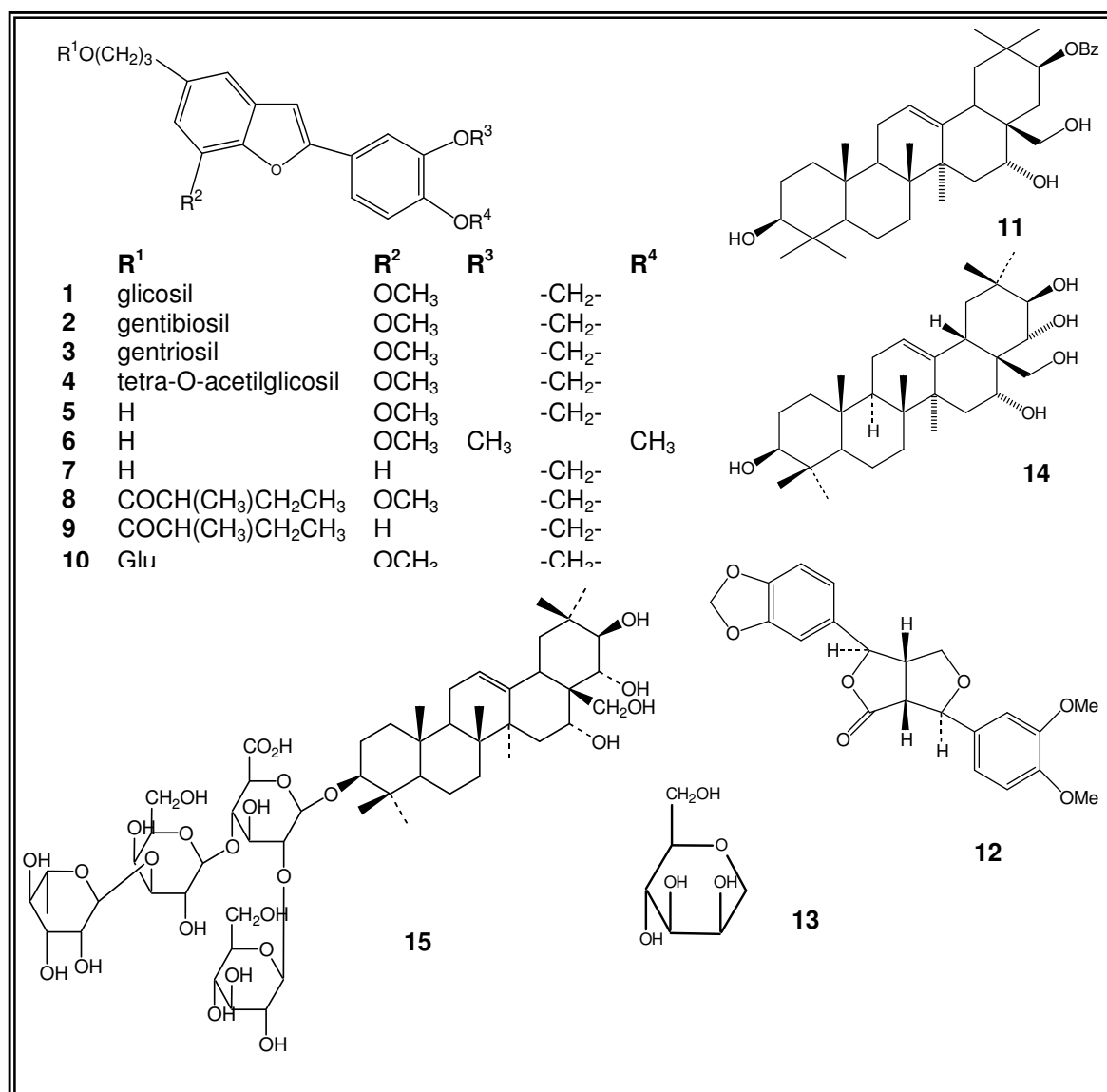
A espécie *Styrax camporum* ocorre nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná, predominando em regiões de Cerrado (LORENZI, 1998). Amplamente utilizada em doenças gastroduodenais pela medicina popular, teve seu potencial antiulcerativo avaliado, bem como sua toxicidade utilizando testes biológicos em cobaias de laboratório (camundongos), a partir da análise do extrato bruto de seus caules (BACCHI; SERTIÉ, 1994) e de algumas frações cromatográficas (BACCHI et al., 1995), sendo comprovada sua eficiência no combate a úlceras estomacais, mediante os resultados obtidos no estudo de frações polares.

O potencial antiulcerativo de *S. camporum* foi atribuído supostamente à presença de taninos (substâncias com ação cicatrizante), juntamente com outros metabólitos presentes em frações cromatográficas mais polares (BACCHI et al., 1995). Os taninos possuem em suas estruturas os grupos hidroxílicos fenólicos, conferindo-lhes uma forte ação antioxidante, contribuindo diretamente para a ação antiulcerogênica (CASA et al., 2000).

Levantamento bibliográfico sobre a constituição química das espécies do gênero *Styrax* evidenciou a ocorrência de poucas classes de produtos naturais, predominando lignóides, triterpenos e saponinas, observadas na tabela abaixo, e no Quadro 01, pg. 24.

Tabela 01: Metabólitos secundários de algumas espécies de *Styrax*

Subst.	Classe Química	Espécie	Referência Bibliográfica
1-4	<i>nor</i> -neolignana	<i>S. officinalis</i>	(ANIL, 1980)
5	<i>nor</i> -neolignana	<i>S. obassia</i>	(TAKANASHI; TAKIZAWA, 1988)
6	<i>nor</i> -neolignana	<i>S. camporum</i>	(GIESBRECHT et al., 1985)
7	<i>nor</i> -neolignana	<i>S. obassia</i>	(TAKANASHI; TAKIZAWA; MITSUHASHI, 1974)
8-10	<i>nor</i> -neolignana	<i>S. obassia</i>	(TAKANASHI; TAKIZAWA, 1988)
11	Triterpeno	<i>S. officinalis</i>	(ANIL, 1979)
12	Lignana	<i>S. officinalis</i>	(ULUBELEN et al., 1978)
13	Monossacarídeo	<i>S. officinalis</i>	(ANIL, 1977)
14	Triterpeno	<i>S. japônica</i>	(NAKANO et al., 1967)
15	saponina	<i>S. japônica</i>	(KITAGAWA et al., 1974)

**Quadro 01:** Metabólitos secundários de espécies de *Styrax*.

I.4 Fungos: uma visão geral

Fungos podem ser unicelulares (leveduriforme) ou pluricelulares (micélio), são organismos quimiorganotróficos típicos de ambientes úmidos e encontram-se distribuídos em habitats diversos como água, solo, ar e sobre partículas em suspensão. Os fungos são divididos conforme o habitat em grupos como coprófilos, micoparasitas, de água doce, marinhos, termofílicos, filoplanos, epifíticos, endofíticos, entre outros (AINSWORTH; SUSSMAN, 1995).

O reino dos fungos constitui o segundo maior grupo sobre a Terra, perdendo apenas para os insetos. Estima-se que existam pelo menos um milhão e quinhentas mil espécies de fungos espalhadas pelo mundo, mas apenas cerca de 69.000 espécies foram até hoje descritas, o que representa menos de 5% das espécies possivelmente existentes (HAWKSWORTH, 2001).

Os fungos comumente prosperam em ambientes competitivos, mantendo relações simbióticas (mutualismo ou comensalismo), tróficas (predação e parasitismo) e de competição (por território e recursos alimentares) com outros organismos do ecossistema.

Os fungos são alvos de predadores como insetos e nematóides. Fungos endofíticos do gênero *Claviceps* encontrados principalmente em gramíneas, produzem os alcalóides de ergot, substâncias que ingeridas junto com a planta provocam doenças em insetos e mamíferos herbívoros, protegendo o fungo e a planta dos predadores (HUTCHISON; MADZIA; BARRON, 1996 e RIFFLE, 1967,1971).

A relação de parasitismo fungo-planta envolve a produção de fitoalexinas (substâncias de defesa da planta), que são produzidas visando conter a infecção fúngica (GLOER, 1995). Os fungos, por sua vez, produzem fitotoxinas que causam a necrose e/ou morte do tecido vegetal (HARBONE, 1993). Fungos patogênicos de ervas daninhas tem sido uma fonte de novos herbicidas, uma vez que fitotoxinas com estruturas novas e não usuais têm sido isoladas destes fungos, mostrando que eles podem exibir uma larga atividade herbicida (HOAGLAND, 1990).

O mecanismo de antagonismo, em muitos casos, envolve a produção de agentes químicos por uma espécie, inibindo o crescimento da outra. Isto é um indicativo de que os metabólitos responsáveis por esses efeitos são essencialmente

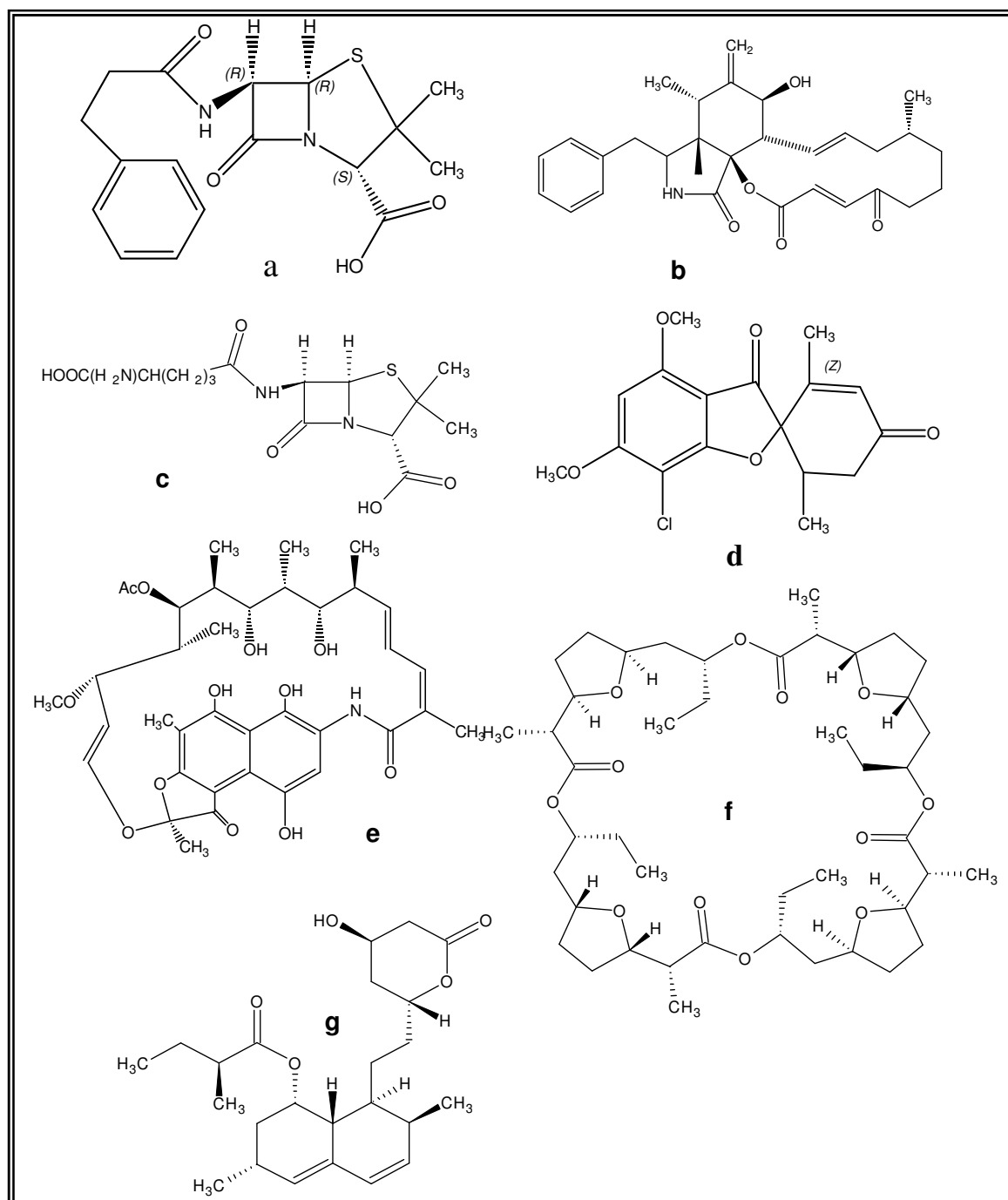
antibióticos naturais. Relações de antagonismos entre fungos do mesmo ecossistema têm sido relatadas entre coprófilos (WICKLOW, 1992), carbonícolos (WICKLOW; HIRSCHFELD, 1979), lignolíticos (STRUNZ; KAKUSHIMA; STILLWELL, 1972), rizosfera (CARROL, 1992), marinhos (STRONGMAN et al., 1987) e fungos aquáticos (SHEARER; ZARE-MAIVAN, 1988).

Entre os sistemas celulares, os fungos são de grande interesse biotecnológico, sendo talvez, dentre os seres vivos, os que mais têm contribuído com produtos e processos de importância fundamental para o bem-estar da população. Eles constituem a base de uma grande indústria de produção de alimentos graças a sua ação fermentadora (panificação, indústria cervejeira e de outras bebidas, produção de certos tipos de queijo, etc.). Os fungos são ainda importantes na produção de álcool, ácidos orgânicos como o cítrico e o acotínico, antibióticos e esteróides (AINSWORTH; SUSSMAN, 1996).

Aproximadamente 25% dos produtos naturais biologicamente ativos conhecidos foram obtidos a partir de fungos (KONGSAEREE, et al., 2003). Dentre estes, destacam-se os antibióticos β -lactâmicos das classes da Penicilina (**a**) e Cefalosporina (**c**) (Quadro 02, pg. 27), que juntos representam um mercado mundial de 15 bilhões de dólares (DEMAIN, 2000). Outras substâncias de grande relevância como medicamentos são o agente redutor de colesterol Lovastatina (**g**) e o antimicótico Griseofulvina (**d**) (Quadro 02, pg. 27) (DEMAIN, 2000). Como fármacos potenciais destacam-se as Citocalasinas (**b**), Cefalosporinas (**c**), Rifamicina SV (**e**) entre outros (MASUREKAR, 1992) (Quadro 02, pg. 27).

Substâncias isoladas de fungos possuem emprego não apenas no tratamento humano, mas também no combate de pragas, que consomem um grande percentual da produção agrícola mundial. Esses metabólitos atuam como agroquímicos naturais, tais como destruxinas (inseticidas), estrobilurinas (fungicidas), além de várias fitotoxinas (herbicidas) (GARDNER; MCCOY 1992). Como produto natural útil na agricultura pode-se citar a Tetranactina (**f**) (Quadro 02, pg. 27) um dos primeiros pesticidas úteis que, no início dos anos 70, foi isolado do fungo *Streptomyces aureus*. Esta substância apresenta significativa atividade inseticida contra a broca e ácaro carmim do feijão Azuki, inibe o crescimento de bactérias *gram* positivas, além de ser ativa contra fungos fitopatogênicos. Os inseticidas de origem microbiana têm sido vistos como uma excelente alternativa de controle, tendo em vista a resistência

que os insetos desenvolveram contra inseticidas químicos e devido às exigências ecológicas e ambientais do mercado mundial.



Quadro 02: Metabólitos secundários produzidos por fungos.

I.5 Fungos endofíticos

Fungos endofíticos vivem sistematicamente no interior de plantas habitando, de modo geral, suas partes aéreas como folhas e caules, podendo também estar presentes nas raízes. Com a evolução das espécies, estes se especializaram em invadir espaços celulares dos tecidos vegetais (ANDREWS; HIRANO, 1991) através das raízes do hospedeiro, aberturas naturais como estômatos e feridas causadas por choques mecânicos, insetos e fungos patogênicos. Uma vez instalado, o endófito pode habitar a planta por toda sua vida, sendo transmitido, em alguns casos, para futuras gerações através da semente do hospedeiro (CARROL, 1988).

Os endofíticos não apresentam haustórios, estrutura comum em fungos fitopatogênicos e em geral, as infecções causadas por fungos endofíticos não produzem sintomas externos, podendo estar latentes ou serem assintomáticas (PETRINI; CARROL, 1981, PETRINI, 1986). Mudanças no hospedeiro causadas por fatores de stress (biótico ou abiótico) podem induzir a transição de um estado simbiótico (mutualismo ou comensalismo) a trófico (parasitismo), passando o endofítico a exercer uma ação patogênica ao hospedeiro (PETRINI, 1991).

Evidências da associação planta-microrganismo têm sido descobertas em tecidos fossilizados de caules e folhas. Provavelmente, ao longo do tempo e da evolução das espécies, os endofíticos podem ter desenvolvido sistemas genéticos que permitissem a transferência de informações entre eles e a planta e vice-versa, possibilitando ao endofítico lidar com condições ambientais instáveis e aumentando a compatibilidade com a planta hospedeira (STROBEL et al., 2004).

Estudos baseados na cultura de caules e folhas esterilizados superficialmente revelaram uma espetacular diversidade de espécies de fungos existentes subcuticularmente nos tecidos de muitos tipos de plantas saudáveis (CARROL, 1988). Qualquer espécie de planta vascular pode hospedar entre 10 e 100 diferentes espécies de fungos endofíticos, sendo no mínimo duas específicas no hospedeiro (chamadas de espécies dominantes) (DREYFUSS; CHAPELA, 1994).

Nas relações mutualistas, além de proteger as plantas contra insetos, pragas e patógenos, os endofíticos ainda são capazes de produzir metabólitos que aumentam o crescimento e enraizamento da planta hospedeira e a sua resistência a estresses bióticos e abióticos (HALLMANN et al., 1997). Estas moléculas que podem

possuir atividade de hormônios, antibióticos, antitumorais entre outras funções biológicas, apresentam grande interesse industrial e biotecnológico. Pesquisadores da Sandoz, em um programa de triagem de produtos naturais oriundos de fungos, verificaram que, entre os fungos filamentosos, os endofíticos são o grupo mais produtivo quimicamente, apresentando uma produção de metabólitos secundários 73% maior que os outros fungos (DREYFUSS; CHAPELA, 1994).

Taxol (h), substância que recentemente tem sido utilizada no tratamento do câncer mamário e de útero, foi inicialmente isolada da planta *Taxus brevifolia*. Entretanto, o isolamento de taxol do meio de cultura produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreane* (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993), isolado da mesma planta, encoraja o estudo de fungos associados com espécies vegetais, objetivando a verificação da co-produção de substâncias produzidas pela planta.

Tan e Zou (2001) examinaram a diversidade dos metabólitos isolados de fungos endofíticos enfatizando seu potencial papel ecológico, e mostraram que estes metabólitos são sintetizados por várias vias metabólicas, ou seja, derivações de polipeptídeos, isoprenóides e aminoácidos. Eles relatam o isolamento de substâncias pertencentes a diversos grupos estruturais como esteróides, xantonas, fenóis, isocumarinas, alcalóides, quinonas, furandionas, terpenóides, peptídeos, citocalasinas e compostos alifáticos.

Estudo recente mostra que 51% das substâncias biologicamente ativas isoladas de fungos endofíticos eram inéditas em comparação com somente 38% de novas substâncias isoladas da microflora de solo (SCHULZ et al, 2002).

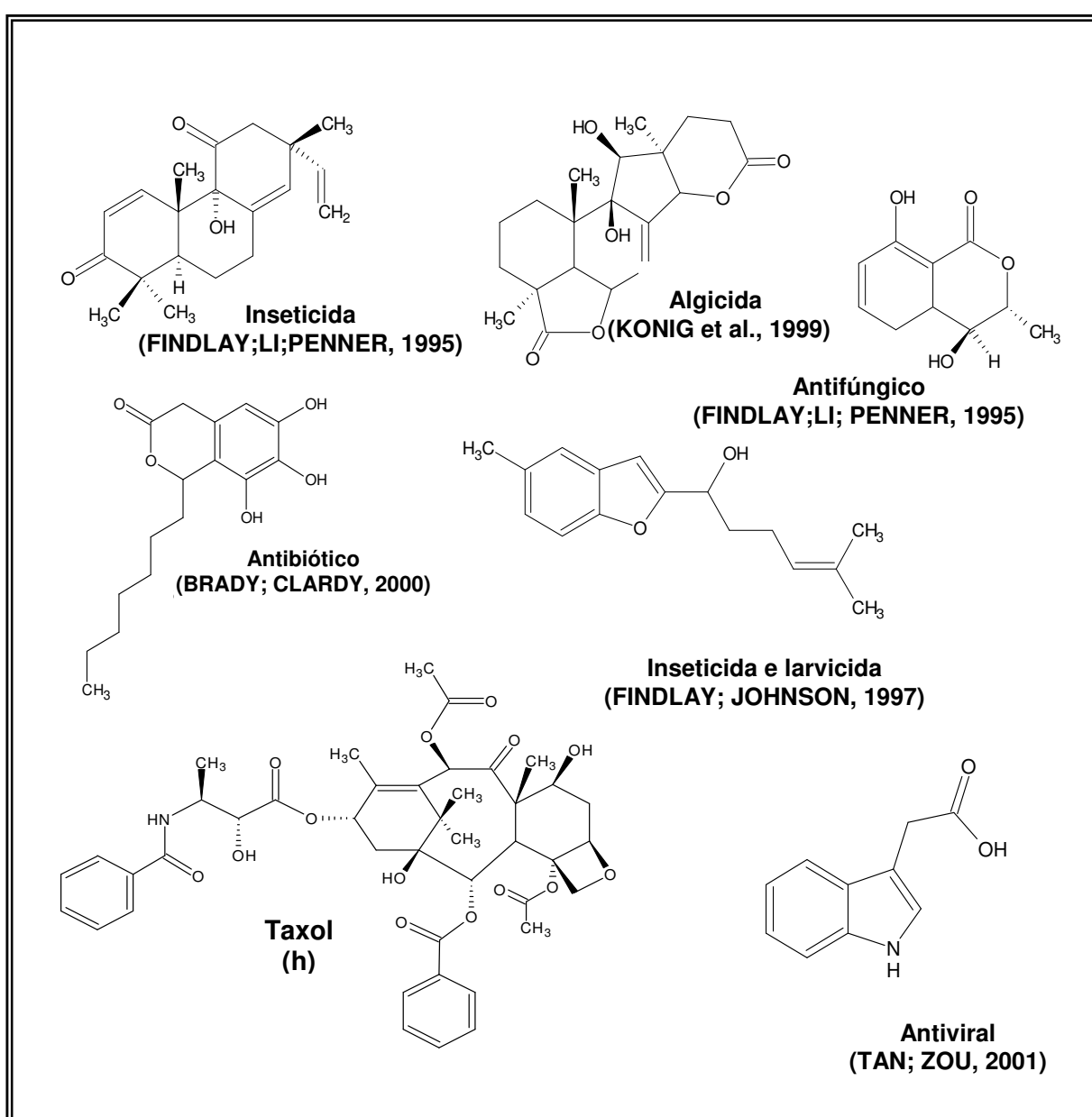
Um dos maiores problemas no futuro da biologia dos endofíticos é a rápida diminuição das florestas tropicais, que representam a possível maior fonte para adquirir novos microrganismos e seus produtos. Estima-se que somente 40-50% do que foi a original floresta tropical existente a 1000-2000 anos atrás estão atualmente no planeta. Levando em consideração que muitas associações planta-microrganismo são específicas de hospedeiro, quando uma espécie vegetal desaparece, também irá desaparecer um conjunto inteiro de endofíticos associados a ela (STROBEL et al., 2004).

Além do extrativismo predatório, outro fator igualmente importante na extinção dos endofíticos, porém mais silencioso, é a poluição atmosférica. Estudo recente em regiões praianas da Itália demonstrou que as árvores atingidas pelo “spray” da água marinha contaminada com o detergente aniônico sintético SDBS (dodecilbenzeno

sulfonato) apresentaram uma colonização de endofíticos significativamente menor (63,8%) do que árvores controle das mesmas espécies não contaminadas (85,4%) (DANTI et al, 2002).

O exposto acima apenas confirma a urgente necessidade de uma política ambiental mundial mais eficiente, temendo-se a perda da biodiversidade.

Levantamento bibliográfico sobre a ocorrência de metabólitos secundários isolados a partir do estudo químico de diversas espécies de fungos endofíticos, evidenciou um grande número de substâncias bioativas, sendo destacadas algumas no Quadro 03, pg. 30.



Quadro 03: Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos.

I.6 Materiais e Métodos

I.6.1 Solventes e Reagentes

SOLVENTES: Foram utilizados solventes comuns dos fabricantes JT. Backer e Mallinckrodt para CLAE (grau HPLC). Para outros fins, foram utilizados solventes Merck e Synth p.a., após prévio tratamento. Para experimentos de RMN, foram utilizados os solventes deuterados CDCl_3 e DMSO-d_6 produzidos por Merck, Aldrich ou Fluka.

REAGENTES: Para as revelações das placas cromatográficas foram utilizados reagentes dos fabricantes Synth, Vetec e Sigma.

I.6.2 Sistemas Cromatográficos

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA: Nas análises por CCDC foi utilizada sílica gel 60G. As placas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica em água destilada, na proporção 1:2 (m/v), sobre placa de vidro de 5, 10 e 20 x 20 cm, obtendo-se 0,25 mm de espessura de adsorvente, através da utilização de espalhador Quickfitt. Após a preparação das placas, essas foram deixadas em repouso por cerca de 6 horas à temperatura ambiente e depois ativadas em estufa a 120 °C por 120 minutos. As revelações foram obtidas por: radiação ultravioleta (λ 254 e 366 nm); nebulização com anisaldeído seguida de aquecimento e exposição a iodo sublimado.

CRITÉRIOS DE PUREZA: O critério de pureza adotado foi a obtenção de uma única mancha após análise em CCDC, utilizando diferentes sistemas de eluentes e, quando separado por CLAE, a obtenção de um único pico simétrico, mesmo após variação das condições de análise.

I.6.3 Equipamentos

EVAPORADOR ROTATÓRIO: As soluções foram concentradas em evaporador rotatório da Buchi (rotavapor R-114 e waterbath B-480).

INCUBADORA ROTATÓRIA: Para o cultivo dos fungos endofíticos utilizou-se incubadoras rotatórias dos fabricantes Marconi e Tecnal.

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR: Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C foram registrados em espectrômetro Brucker AC 200-F 4.7 T operando a 200 MHz para o núcleo de ^1H e 50 MHz para o núcleo de ^{13}C . Experimentos uni e bidimensionais foram realizados em espectrômetro Varian Inova 500 11.7 T operando a 500 MHz para o núcleo de ^1H e em 125 MHz para o núcleo de ^{13}C . Foi utilizado TMS como referência interna.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA: Os cromatogramas foram obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em aparelhos:

- Varian Pro Star (Solvent Delivery Module 240 e Auto Sampler 410) acoplado ao detector Varian Pro Star Photodiode Array Ultra-violet (PDA-UV) 330 e registrados em microcomputador de 500 MHz com processador Pentium II, utilizando o software Varian Star Chromatography Workstation versão 5.52 – Modo analítico – gradiente exploratório.
- Shimadzu (bomba Shimadzu LC-10 AD, auto injetor Shimadzu SIL 10 A) acoplado ao detector ultra-violeta em arranjo de diodos Shimadzu SPD MX AVP e registrados em microcomputador de 500 MHz com processador Pentium II, utilizando o software Shimadzu CLASS-LC10 versão 1.64A – Modo analítico- gradiente exploratório.

Utilizou-se coluna analítica Phenomenex tipo LUNA (C18, 250 x 4,6 mm, 5 μm)

I.6.4 Metodologia de preparo dos extratos

ANÁLISES VIA CLAE: Para eliminação de interferentes apolares (material graxo) submeteu-se a amostra à Extração em Fase Sólida (EFS) em cartucho preenchido com sílica de Fase Reversa (C18), utilizando-se MeOH/Água 5:95 como eluente. Inicialmente o adsorvente foi ativado com MeOH puro (2-3 Vm) e posteriormente equilibrado com o eluente escolhido (2-3 Vm).

O extrato foi solubilizado em 1 mL de MeOH/Água 5:95, aplicado no cartucho e eluído com 2 mL da fase móvel. A solução recolhida foi filtrada em disco de membrana polimérica e armazenada em vial para CLAE. A limpeza do cartucho foi

feita com MeOH puro e depois com DCM. Por se tratar de estudo químico qualitativo, não foram feitos cálculos de concentração das amostras analisadas.

ANÁLISES VIA RMN: As amostras foram diluídas em 0,6 mL de solvente deuterado (CDCl₃, DMSO-d₆ ou D₂O) e em seguida, as soluções foram filtradas em esfera de algodão e armazenadas em tubo de vidro próprio para RMN.

I.6.5 Meios de Cultura

Os meios de cultura sólidos e líquidos comerciais utilizados para os crescimentos estão descritos na Tabela 02, pg. 33.

Tabela 02: Meios de cultura utilizados para o cultivo dos endofíticos isolados de *Styrax camporum*.

Meio de cultura	Tipo	C (g/L)	Composição	Especificação	Fabricante
BDA	Sólido	39	Fécula de batata (4g), dextrose (20g), agar (15g)	Base para cultivo de leveduras e fungos	SIGMA
MBD	Líquido	24	Fécula de batata (4g), dextrose (20g)	Base para cultivo de leveduras e fungos	DIFCO

I.7 Isolamento e triagem dos endofíticos de *Styrax camporum*

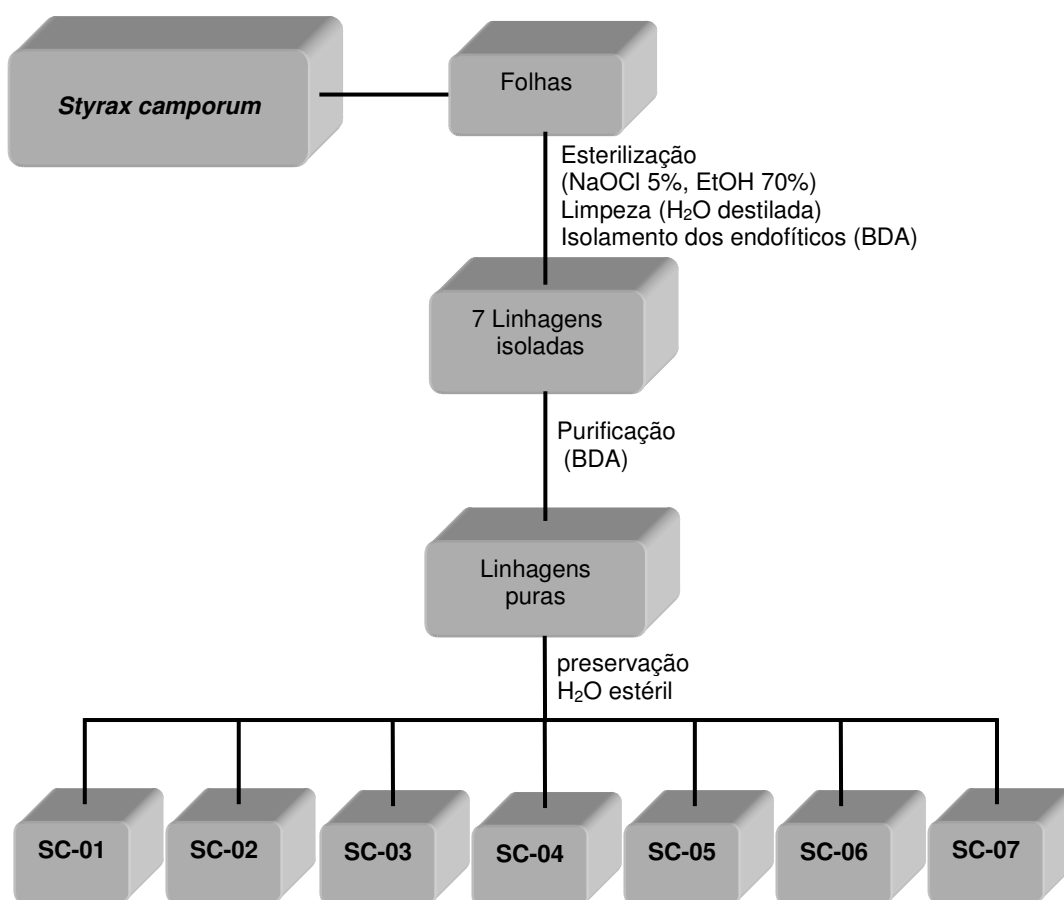
I.7.1 Obtenção e classificação das cepas fúngicas.

A espécie vegetal foi coletada em região de Cerrado na Estação Ecológica Experimental de Mogi-Guaçu, fazenda Campininha/São Paulo. As folhas da espécie coletada foram esterilizadas em banhos subsequentes de NaOCl a 5%, de EtOH a 70 % e água destilada, para retirada de microrganismos epifíticos (Esquema 01, pg. 34). A seguir, o material vegetal foi inoculado em meio de cultura sólido BDA e após período de incubação de 7 dias, as linhagens obtidas foram separadas, purificadas e preservadas em água estéril.* Obtiveram-se 7 colônias puras que receberam os seguintes códigos: SC-01, SC-02, SC-03, SC-04, SC-05, SC-06 e SC-07. A sigla SC refere-se ao nome da espécie vegetal (*Styrax camporum*), e o número refere-se à seqüência de isolamento.

As culturas puras estão sendo classificadas pelo Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning do Departamento de Fitopatologia - Universidade Federal de Lavras - MG.

*O processo de isolamento e preservação destas e de outras cepas fúngicas foi realizado pelo Doutor em Química Geraldo Humberto Silva.

Esquema 01: Obtenção das cepas fúngicas.



I.7.2 Cultivo dos fungos endofíticos em pequena escala (triagem)

Os microrganismos SC-01 02, 03, 04, 05, 06 e 07 preservados em água estéril foram inoculados em meio sólido BDA, e monitorados até que suas hifas atingissem 2-3 cm de diâmetro. As linhagens foram avaliadas quanto à pureza, através da

aparência uniforme da colônia nas placas. As culturas puras obtidas em meio sólido foram repicadas para cultivo em meio líquido em pequena escala, sendo inoculadas em 400 mL de MBD (2 frascos contendo 200 mL de meio para cada fungo), e mantidas em incubadora rotatória sob temperatura controlada (25 °C) por 28 dias (Esquema 02, pg. 36).

I.7.3 Obtenção dos extratos brutos produzidos pelos fungos (triagem)

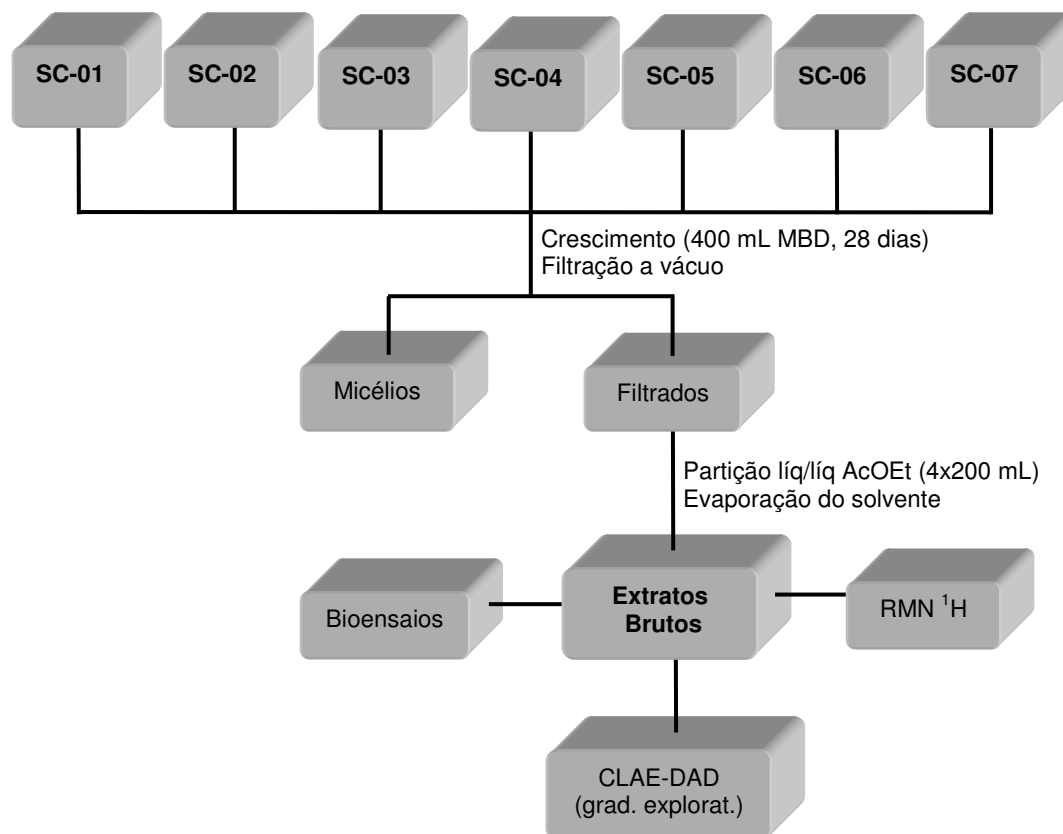
Ao final do período de incubação (crescimento em meio líquido), as suspensões micelares foram submetidas à filtração, separando-se os micélios dos filtrados. Os filtrados aquosos, contendo os metabólitos secretados pelos fungos, foram submetidos à partição líquido-líquido com AcOEt. Evaporação do solvente em evaporador rotatório forneceu os extratos brutos AcOEt (Esquema 02, pg. 36). Os rendimentos obtidos para cada fungo estão listados na Tabela 03, pg. 35.

Tabela 03: Extratos brutos produzidos pelos fungos triados.

Código do Fungo	Volume de MBD (mL)	Massa de Extrato Bruto (mg)
SC-01	400	13,0
SC-02	400	83,0
SC-03	400	28,6
SC-04	400	18,3
SC-05	400	43,3
SC-06	400	386,6
SC-07	400	76,7

Todos os extratos brutos obtidos foram submetidos a CLAE-DAD em gradiente exploratório H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 40 min permanecendo mais 10 min em MeOH 100 % com fluxo de 1,0 mL/min. a 254 nm. (Fig. 01 a 15, pg. 37 a 45), RMN ¹H (Fig. 51 a 57, pg. 107 a 110), ensaios para detecção de atividade antifúngica (Figura 35, pg. 78), antioxidante (Figura 39, pg. 81), antibacteriana, e anticolinesterásica. Os resultados destas análises serão discutidos no capítulo III (pg. 77).

Esquema 02: Cultivo dos fungos em pequena escala, obtenção dos extratos brutos e triagem química/biológica.



I.8 Resultados e discussões da triagem química dos endofíticos isolados

Até o momento, dos endofíticos isolados das folhas saudáveis de *Styrax camporum*, três linhagens foram classificadas:

- **SC-02** – *Phomopsis sp.*
- **SC-03** – *Phomopsis stipata* - 1
- **SC-04** – *Phomopsis stipata* - 2

O cultivo dos fungos em meio sólido foi realizado somente em BDA, pois estes se desenvolveram satisfatoriamente neste meio e, portanto testes com outros meios de cultura foram desnecessários.

As condições para o cultivo dos endofíticos (meio de cultura líquido MBD, tempo de incubação de 28 dias em incubadora rotatória e ambiente climatizado a 25 °C) foram adotadas com base nos resultados obtidos com o estudo anteriormente

realizado pelos alunos de doutorado Geraldo Humberto Silva e Helder Lopes Teles que isolaram este e outros 95 fungos de espécies vegetais. A metodologia empregada foi padronizada para todos os fungos isolados, observando e comparando-se o tempo de incubação e crescimento desses.

O meio de cultura líquido utilizado (MBD) foi escolhido em função de este ter proporcionado um crescimento satisfatório do endofítico. O solvente AcOEt foi escolhido para a partição líquido-líquido do meio de cultura por se tratar de um solvente com polaridade intermediária que extrai desde graxas até peptídeos e baseando-se em dados da literatura, sendo que muitos trabalhos descritos de investigações químicas semelhantes a esta adotaram também este solvente.

I.9 Avaliação do perfil químico dos fungos SC-01 a SC-07 (triagem)

SC-01: O espectro de RMN¹H (Fig. 51, pg. 107) do extrato bruto produzido por este fungo indicou a presença de substâncias aromáticas devido aos sinais observados entre 6 e 8 ppm. Comparação das curvas de UV (Fig. 02, pg. 38) dos picos observados no cromatograma em gradiente exploratório (Fig. 01, pg. 37) revelou a produção de metabólitos que possivelmente apresentam os mesmos grupos cromóforos (picos 5, 7 e 8).

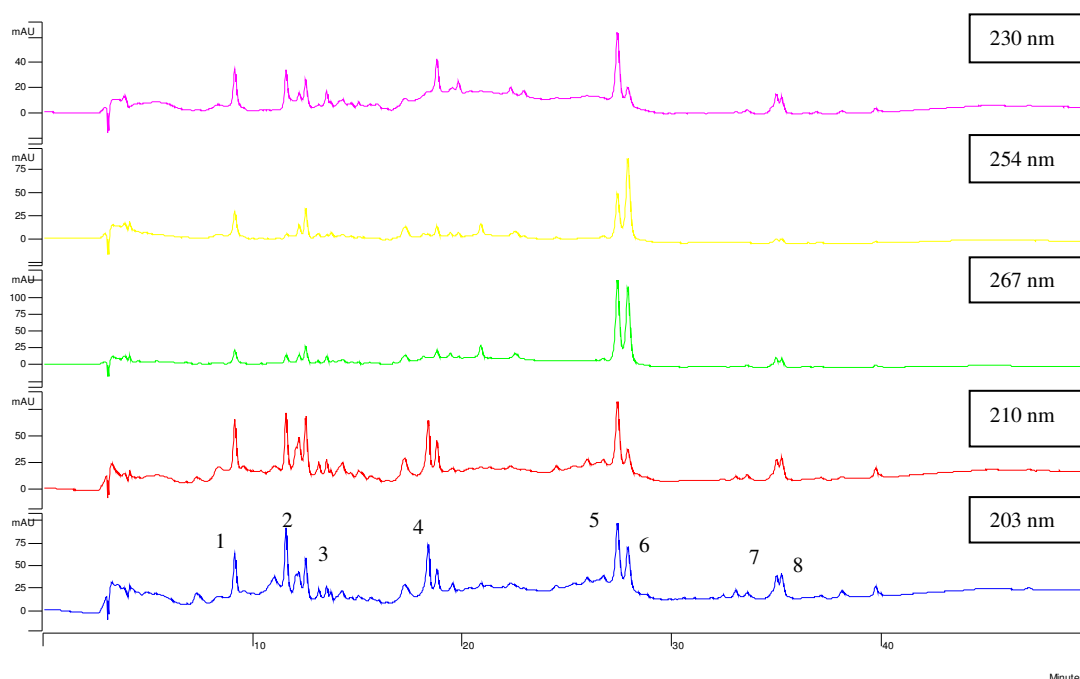


Figura 01: Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por **SC-01** (H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 50 mm iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/min.).

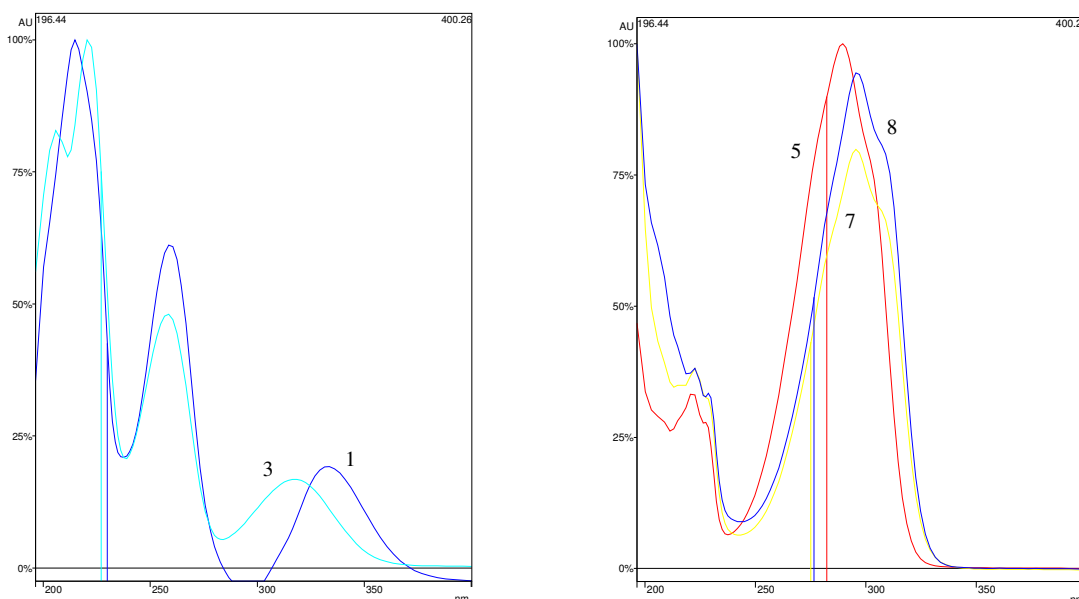


Fig 02: Curvas de UV dos metabólitos produzidos por **SC-01**

SC-02 e SC-03: Os espectros de RMN ^1H (Figuras 52 e 53, pág. 108, respectivamente) dos extratos brutos produzidos por estes dois fungos revelam a presença de uma substância majoritária em comum. Os sinais observados em 3,07 e 4,60 ppm indicaram se tratar do ácido 3-nitropropiónico (Figura 03, pg. 38). Consulta bibliográfica revelou que a produção deste ácido é comum em fungos do gênero *Phomopsis* e que este é um potente composto antibacteriano (CHOMCHEON, et al., 2005).

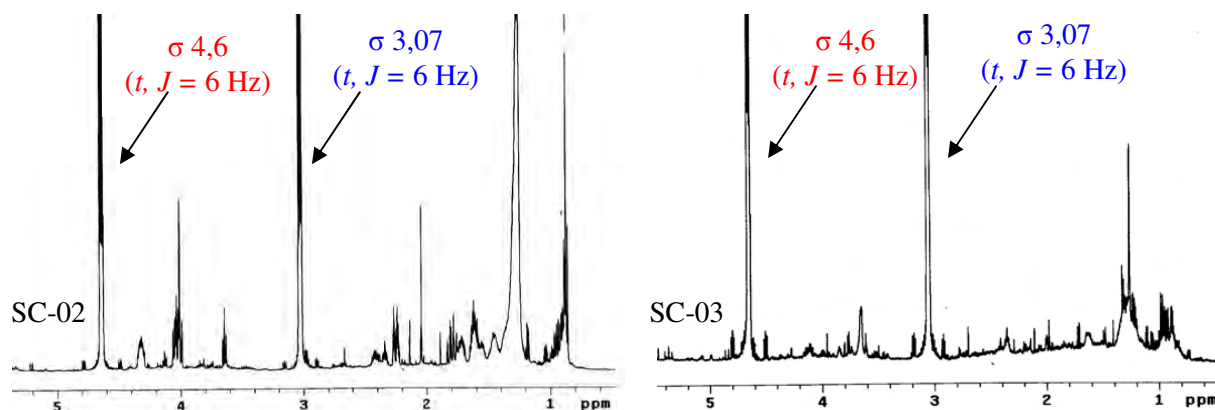
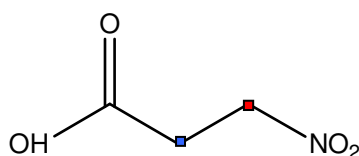


Figura 03: Detalhes dos espectros de RMN de ^1H em CDCl_3 dos extratos brutos produzidos pelos fungos **SC-02 e SC-03** e estrutura do ácido 3-nitropropiónico.

Comparação das curvas de UV (Fig. 05 e 07, pg. 39 e 40, respectivamente) dos picos observados nos cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos de SC-02 e 03 (Figuras 04 e 06, pág. 39 e 40, respectivamente) indica que estes dois fungos produzem metabólitos em comum.

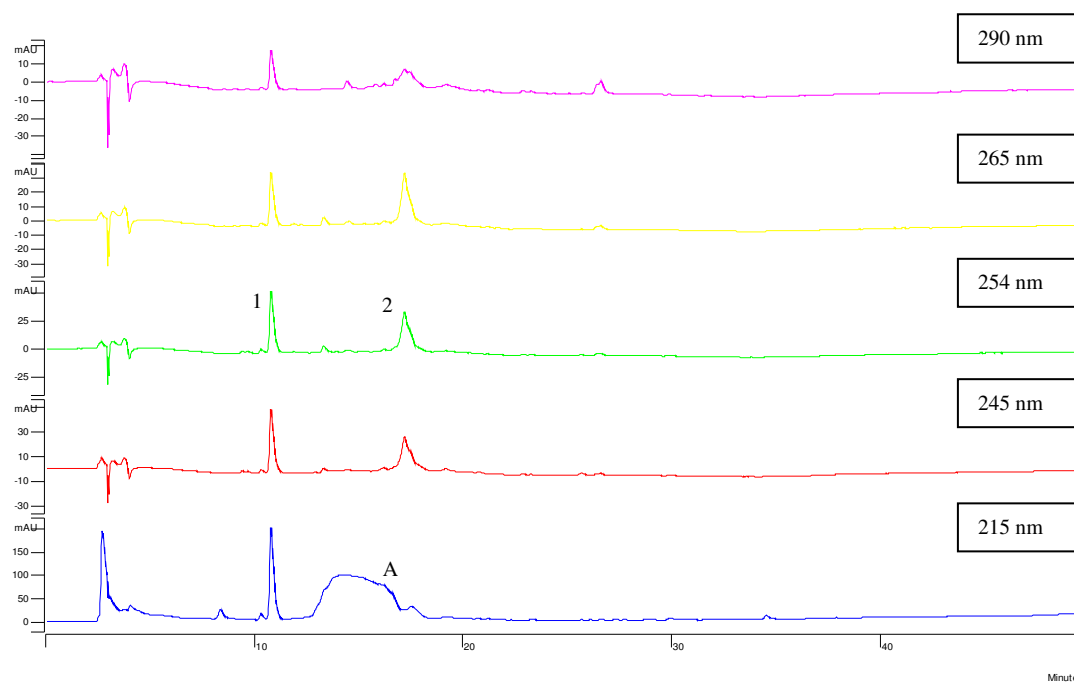


Figura 04: Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por **SC-02** ($H_2O/MeOH$ 95:5 a 0:100 em 50 min iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/min.).

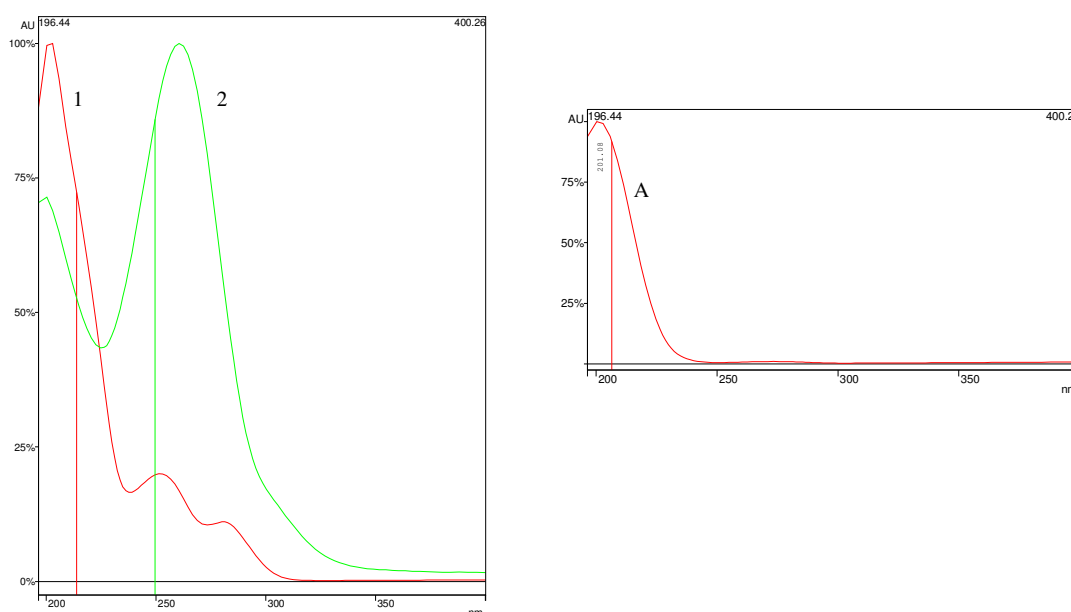


Fig 05: Curvas de UV dos metabólitos produzidos por **SC-02**.

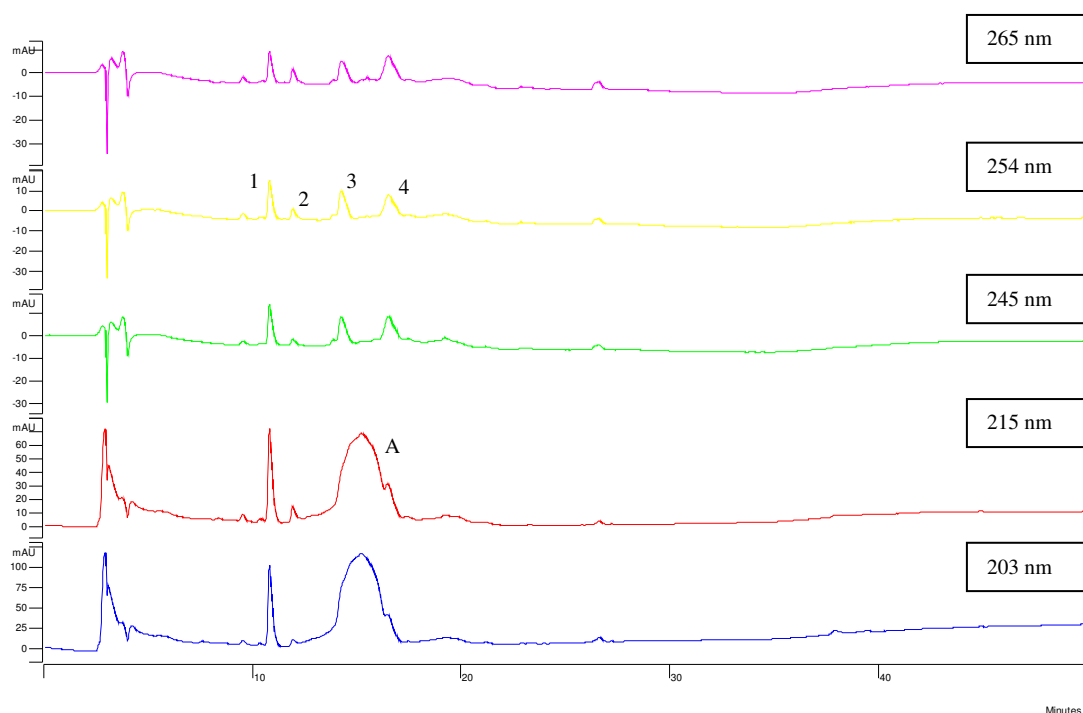


Figura 06: Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por **SC-03** ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 95:5 a 0:100 em 50 min iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/min.).

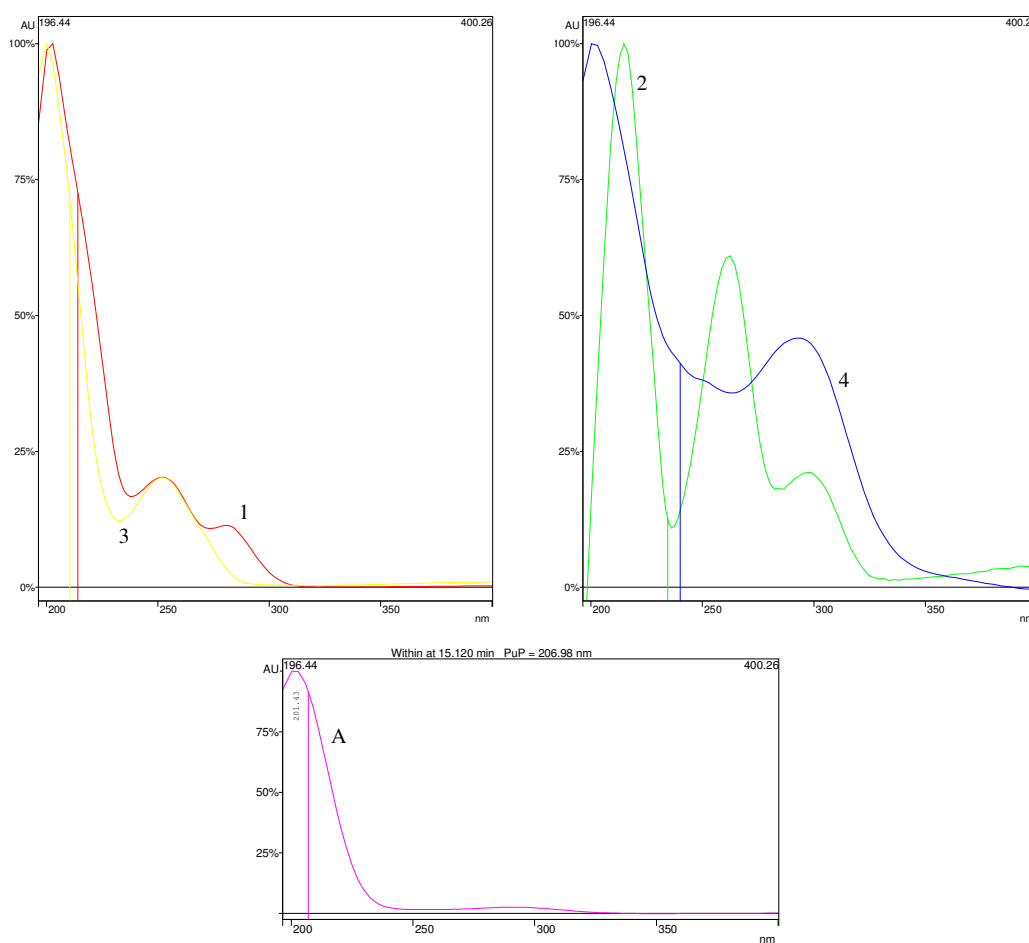


Fig 07: Curvas de UV dos metabólitos produzidos por **SC-03**.

SC-04: Análise do espectro de RMN¹H (Fig. 54, pg. 109) revelou a presença de sinais por toda faixa espectral, evidenciando uma excelente produção metabólica, entretanto esta produção não foi visualizada no cromatograma em gradiente exploratório (Fig. 08, pg. 41), indicando que grande parte dos metabólitos produzidos não apresenta absorção no UV. Comparação das curvas de UV (Fig. 09, pg. 42) dos picos observados no cromatograma deste extrato revelou a produção de metabólitos semelhantes. Apesar de SC-04 e SC-03 terem sido classificados como *Phomopsis stipata*, os extratos produzidos por eles não apresentaram semelhanças em nenhuma das análises, indicando tratar-se de linhagens diferentes.

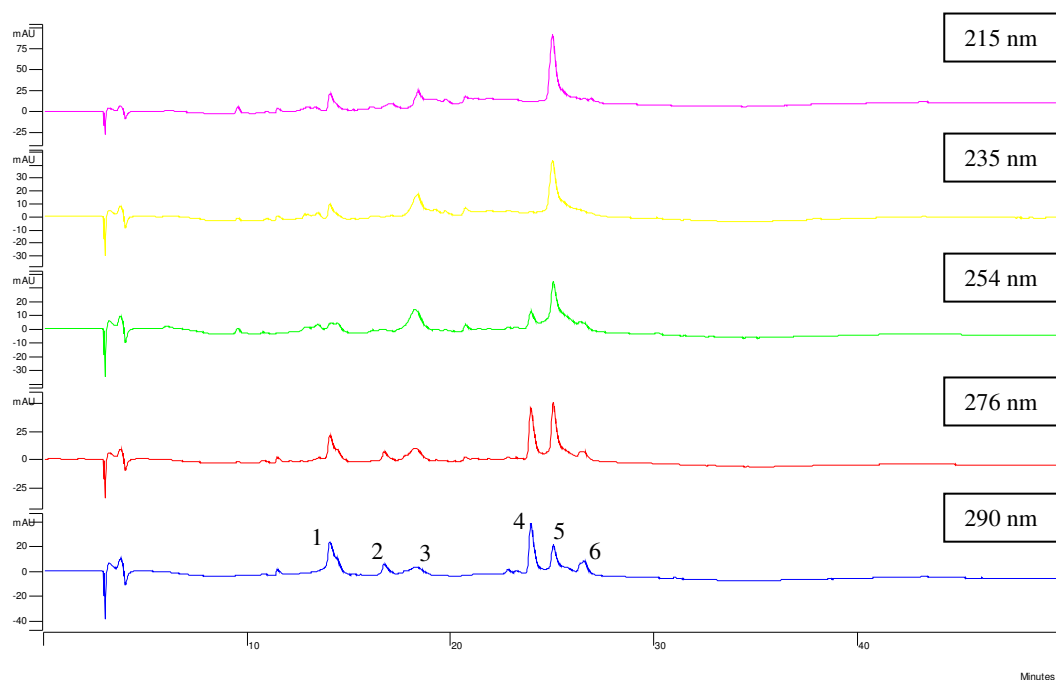


Figura 08: Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por **SC-04** (H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 50 mim iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/mim.).

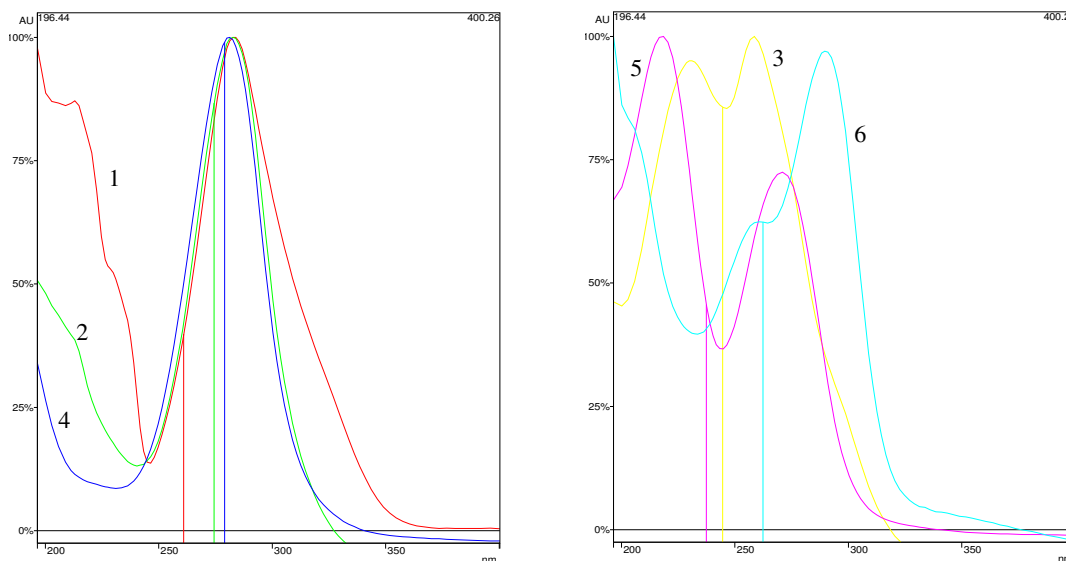


Fig 09: Curvas de UV dos metabólitos produzidos por **SC-04**.

SC-05: O cromatograma em gradiente exploratório deste extrato bruto (Fig. 10, pg. 42) indicou uma alta produção metabólica devido à grande quantidade de sinais observados. No espectro de RMN¹H (Fig. 55, pg. 109) pôde-se observar, na região de 0,80 a 2,40 ppm, um grande acúmulo de picos, sugerindo a presença de terpenos. A região de hidrogênios carbinólicos também apresentou um grande número de sinais. Os poucos picos observados na região de aromáticos sugere que a produção metabólica consiste principalmente de terpenos.

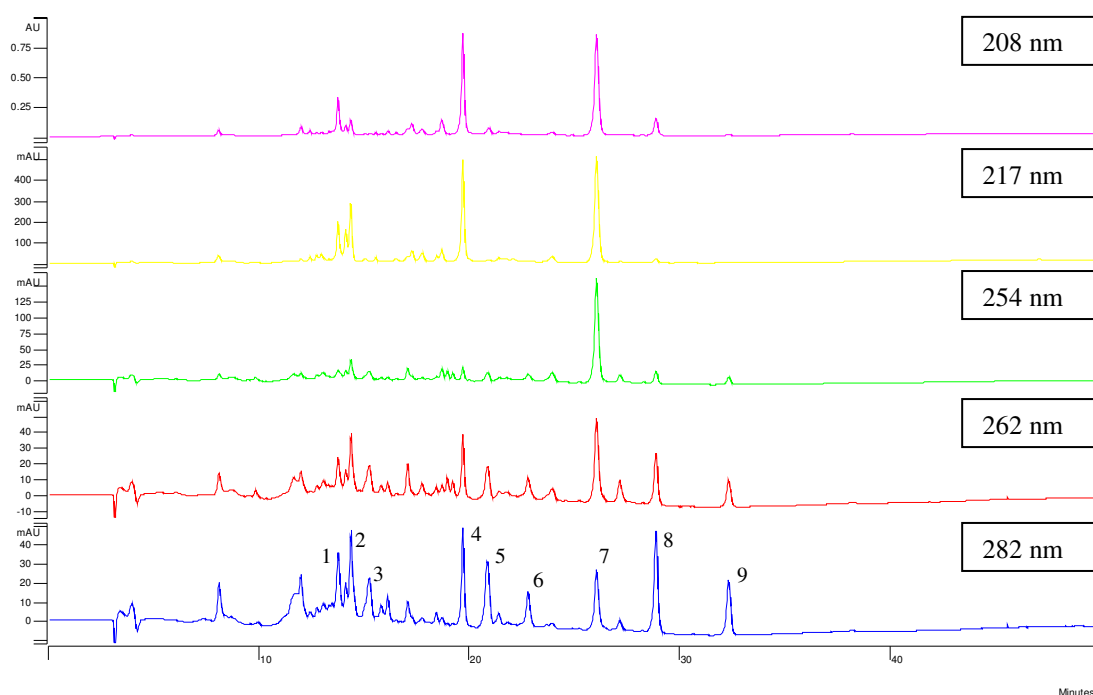


Figura 10: Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por **SC-05** (H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 50 min iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/min.).

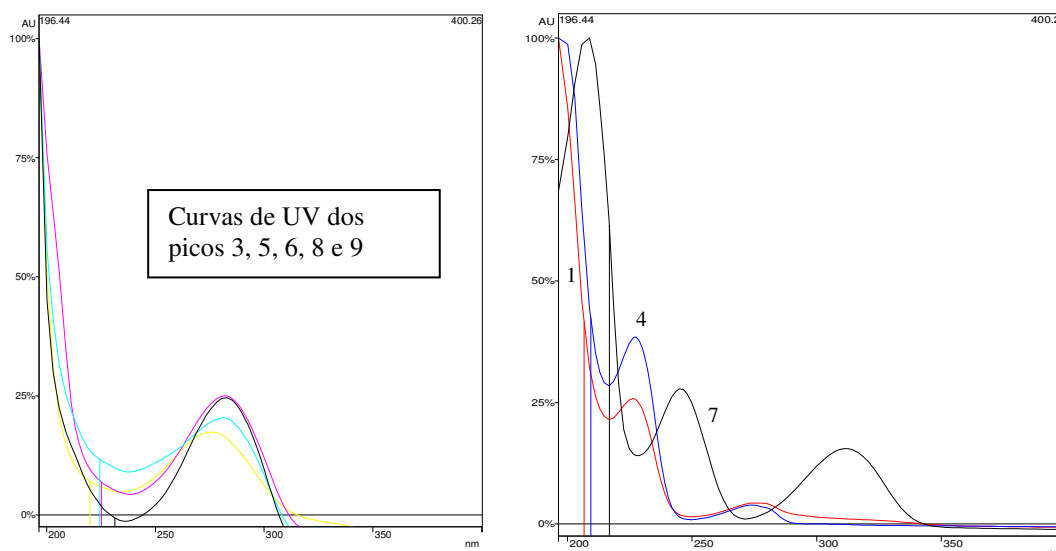


Fig 11: Curvas de UV dos metabólitos produzidos por **SC-05**.

SC-06: O cromatograma em gradiente exploratório (Fig. 12, pg. 43) revelou uma boa produção metabólica e com baixa absorvidade no UV próximo. O espectro de RMN ^1H (Fig. 56, pg. 110) mostra a possível presença de aromáticos (sinais entre 6 e 8 ppm), aldeídos (9 a 10 ppm), ácidos carboxílicos ou fenóis (sinais entre 12 e 13 ppm) e possivelmente terpenos oxidados devido aos sinais entre 3 e 4 ppm.

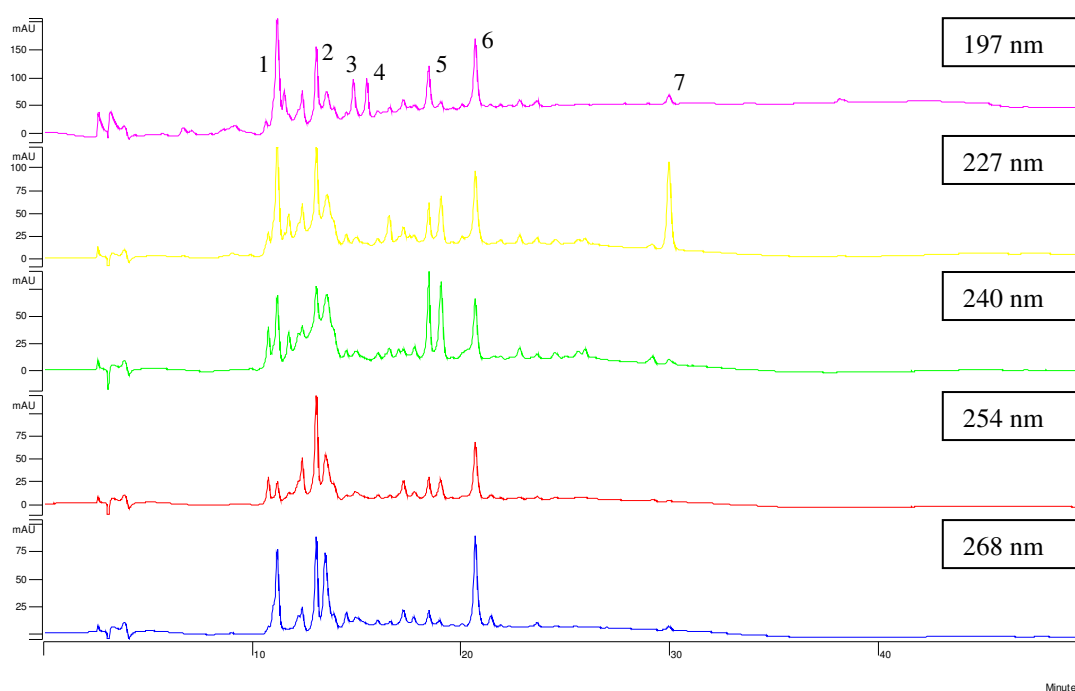


Figura 12: Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por **SC-06** ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 95:5 a 0:100 em 50 min iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/min.).

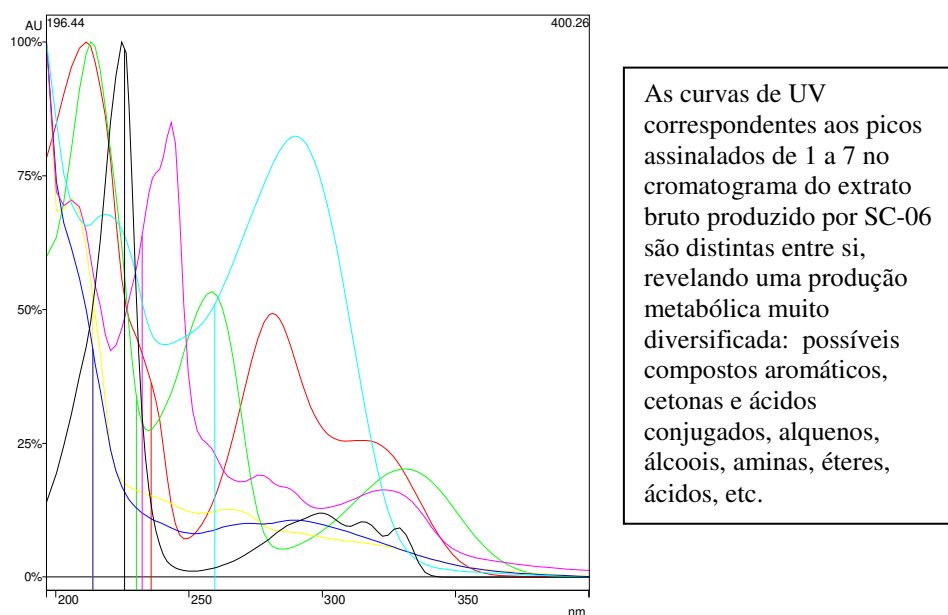


Fig 13: Curvas de UV dos metabólitos produzidos por **SC-06**.

SC-07: No espectro de RMN¹H (Fig. 57, pg. 110) podem-se observar sinais uma grande quantidade de sinais entre 9 e 11 ppm sugerindo a presença de aldeídos, fenóis ou β -ceto-ésteres. No cromatograma em gradiente exploratório (Fig. 14, pg. 44) pôde-se observar uma rica produção metabólica.

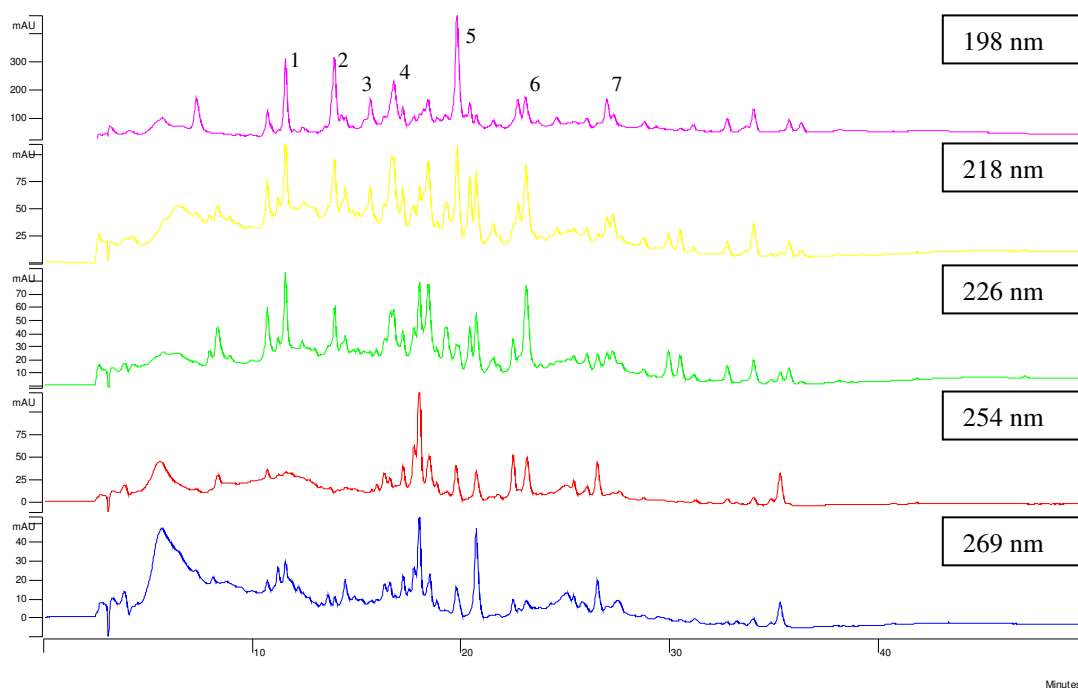
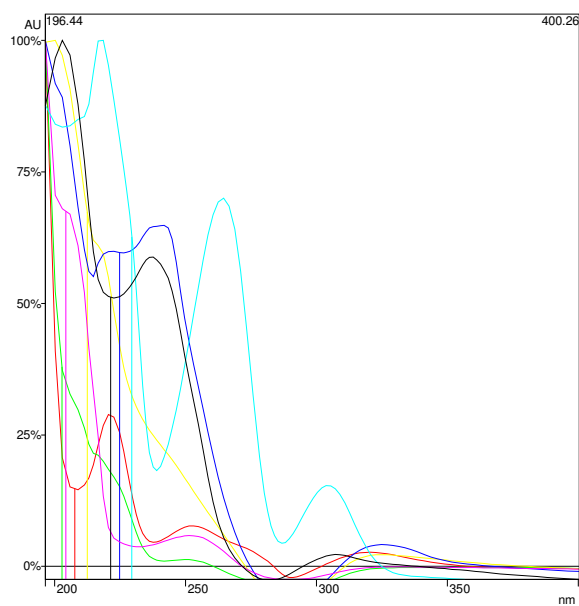


Figura 14: Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por **SC-07** ($H_2O/MeOH$ 95:5 a 0:100 em 50 min iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/min.).



As curvas de UV correspondentes aos picos assinalados de 1 a 7 no cromatograma do extrato bruto produzido por SC-07 são distintas entre si, revelando uma produção metabólica muito diversificada: compostos aromáticos, cetonas e ácidos conjugados, alquenos, álcoois, aminas, éteres, ácidos, etc.

Fig 15: Curvas de UV dos metabólitos produzidos por **SC-07**.

Capítulo II

II. Introdução

II.1 Fungos da família *Diaphorthales*

A família *Diaphorthales* pertence ao filo *Ascomycota*, o qual apresenta micélio septado e septos simples contendo quitina nas paredes celulares. A principal característica que distingue os Ascomicetos de todos os outros fungos é a formação endogênica de meiósporos (Ascósporos) em uma estrutura chamada Asco. O Asco é uma estrutura com diversas formas de diferenciação e, junto com a morfologia dos corpos de frutificação (Ascósporos, Ascoma) é de fundamental importância para a classificação dos táxons inferiores (PFENNING, 2000).

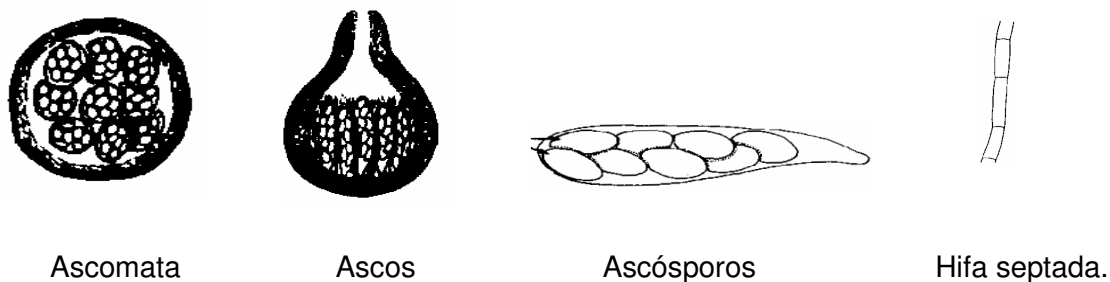


Figura 16: Estruturas fúngicas importantes na classificação do filo *Ascomycota*.

A família *Diaphorthales* está situada à classe dos *Pyromycetes*, que são caracterizados pelo corpo de frutificação do tipo peritécio (PFENNING, 2000).

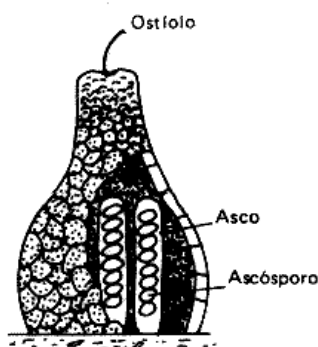


Figura 17: Ilustração do corpo de frutificação tipo Peritécio.

II.2 Gênero *Phomopsis*/*Diaphorthe*.

O gênero *Phomopsis* corresponde à forma mitospórica (anamorfa) do gênero *Diaphorthe* que é um ascomiceto da família *Diaphortheales*. Dentro do táxon de fungos mitospóricos, ele está na subdivisão *Coeleomyces* por produzir conídios (esporos assexuais) em cavidades constituídas por tecidos fúngicos do tipo picnídio que se formam em baixo do stroma (massa de hifas) (PFENNING, 2000). Fungos do gênero *Phomopsis* produzem stroma geralmente indefinido, escasso e escuro; conidióforos e células conidiogênicas que forram a base e os lados do picnídio até o ostiolo (abertura no ápice do picnídio).

Os conidióforos são geralmente formados de uma ou várias células e comportam as células conidiogênicas no cume. As células conidiogênicas de *Phomopsis* são alongadas com um ápice limitado, fluorescente e compacto, a partir do qual o conídio se desenvolve. Em *Phomopsis* tipicamente se formam conídios α e β e dois glóbulos oleosos por conídio. (FARR et al, 2002).

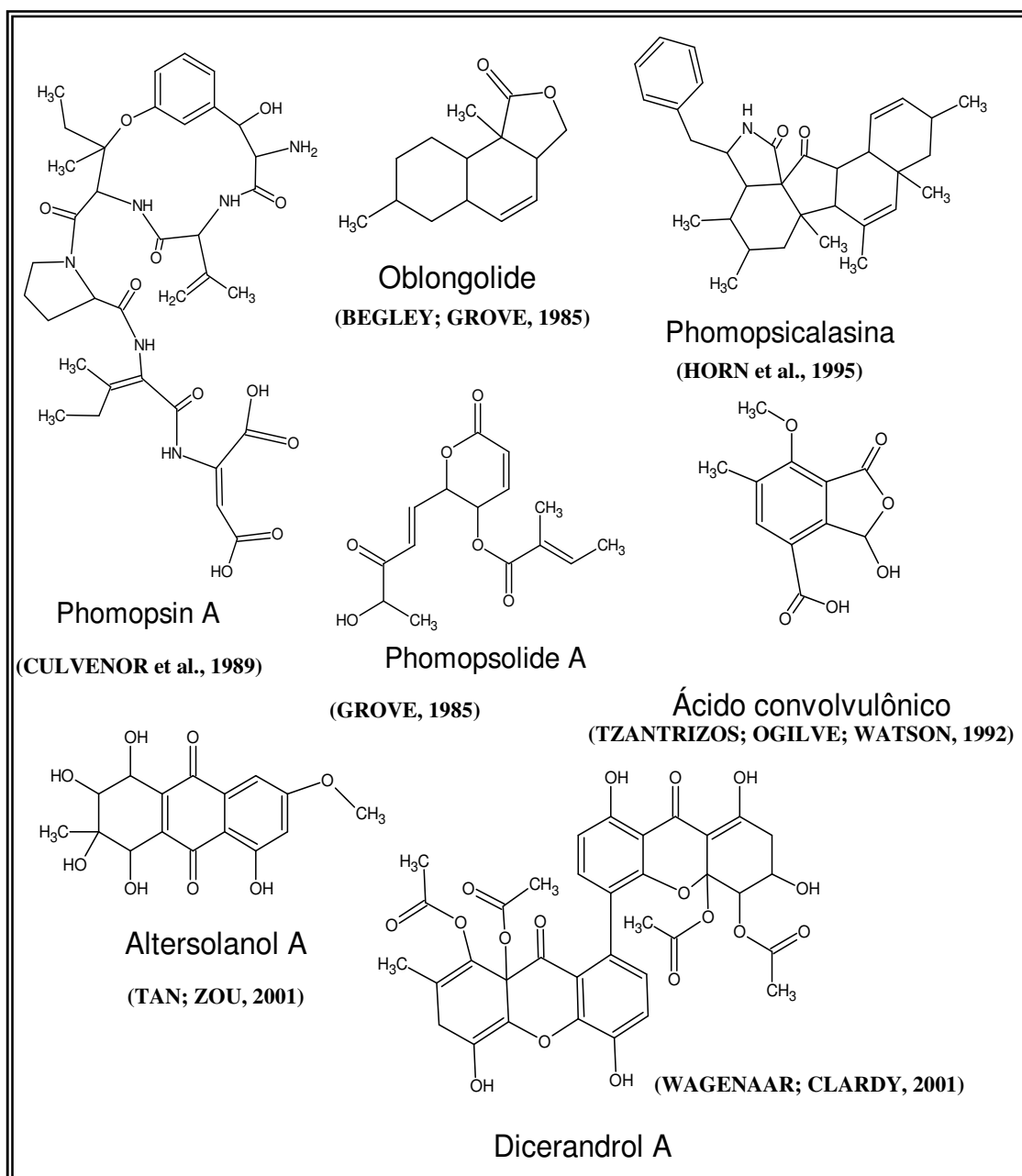
Devido à sua simples forma e estrutura, espécies de *Phomopsis* são difíceis de identificar (classificar) baseando-se apenas em sua morfologia. Para facilitar o processo de classificação novas técnicas estão sendo desenvolvidas como, por exemplo, sequenciamento de DNA (PCR) aliado a análise de características morfológicas (BECKER, 1995).

Fungos do gênero *Phomopsis* são conhecidos por sua fitopatogenicidade e o consequente prejuízo econômico advindo desta. Geralmente causam doenças em plantações de soja, citrus, cereja, maçã e pepino. Na maior parte do tempo o fungo é latente e não causa danos visíveis à planta hospedeira, mas sobre certas condições ele pode se tornar um patógeno severo (BECKER, 1995).

Na agricultura a fitopatogenicidade característica de fungos do gênero *Phomopsis* está sendo usada para o biocontrole de pragas, como no caso do fungo *Phomopsis amaranthicola* que está sendo usado como bioherbicida para *Amaranthus spp.*, uma erva daninha que prejudica plantações mundialmente (WYSS et al, 2002). Outro exemplo é *Phomopsis convolvulus* que causa lesões necróticas nas folhas da erva daninha *Convolvulus arvensis* (TSANTRIZOS; OGILVIE; WATSON, 1992).

II.3 Diversidade química do gênero *Phomopsis*

O gênero *Phomopsis* é conhecido por ser uma fonte rica em metabólitos secundários bioativos de estruturas diversas. Levantamento bibliográfico sobre as substâncias isoladas de *Phomopsis* revela que, apesar do grande potencial deste gênero, este ainda é pouco estudado. No Quadro 04 (pg. 48) estão relacionados os principais metabólitos produzidos por fungos do gênero *Phomopsis*.



Quadro 4: Metabólitos secundários bioativos produzidos pelo gênero *Phomopsis*.

II.4 Materiais e Métodos

Neste estudo, além dos materiais e técnicas descritos no item I.6 (pg. 31), foram utilizados:

II.4.1 Sistemas Cromatográficos

CROMATOGRAFIA EM COLUNA: Nas separações cromatográficas em coluna aberta ou sob pressão foi utilizada Sílica Gel 60 RP-18 43-60 μm (Merck), como fase estacionária.

II.4.2 Equipamentos

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA: Os cromatogramas foram obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em aparelhos:

- Varian Pro Star (Solvent Delivery Module SDM 230) acoplado ao detector Varian Pro Star UV/Vis 310 e registrados em microcomputador de 500 MHz com processador Pentium II, utilizando o software Varian Star Chromatography Workstation versão 5.52 – Modo analítico – sistema isocrático.
- Varian Pro Star (Solvent Delivery Module SDM SD-1) acoplado ao detector Varian Pro Star UV/Vis 320 e registrados em microcomputador de 500 MHz com processador Pentium II, utilizando o software Varian Star Chromatography Workstation versão 5.52 – Modo preparativo.

Utilizou-se coluna preparativa Phenomenex tipo LUNA (C18, 250 x 21,20 mm, 10 μm).

II.4.3 Meios de Cultura

Os meios de cultura sólidos e líquidos comerciais utilizados para os crescimentos estão descritos na Tabela 04, pg. 50.

Tabela 04: Meios de cultura utilizados para os crescimentos do fungo SC-04.

Meio de cultura	Tipo	C (g/L)	Composição	Especificação	Fabricante
EM	Líquido	20	Extrato de malte (20g)	Base para cultivo de fungos e bactérias	DIFCO
YM	Líquido	21	Extrato de levedura (3g), extrato de malte (3g), peptona (5g), dextrose (10g)	Base para cultivo de leveduras, fungos e outros microrganismos acidúricos	DIFCO
Nutriente	Líquido	8	Extrato de carne (3g), peptona (5g)	Base para cultivo de microrganismos não-fastidiosos	DIFCO
Czapek-Dox	Líquido	35	Sacarose (30g), NaNO ₃ (3g), Na ₂ (PO ₄) ₃ (1g), MgSO ₄ (0,5g), KCl (0,5g), FeSO ₄ (0,01g)	Base para cultivo de fungos e bactérias capazes de utilizar Nitrogênio inorgânico	DIFCO
Milho	Sólido	-	-	Milho tipo canjica	Yoki
Arroz	Sólido	-	-	Arroz parbolizado	Tio João

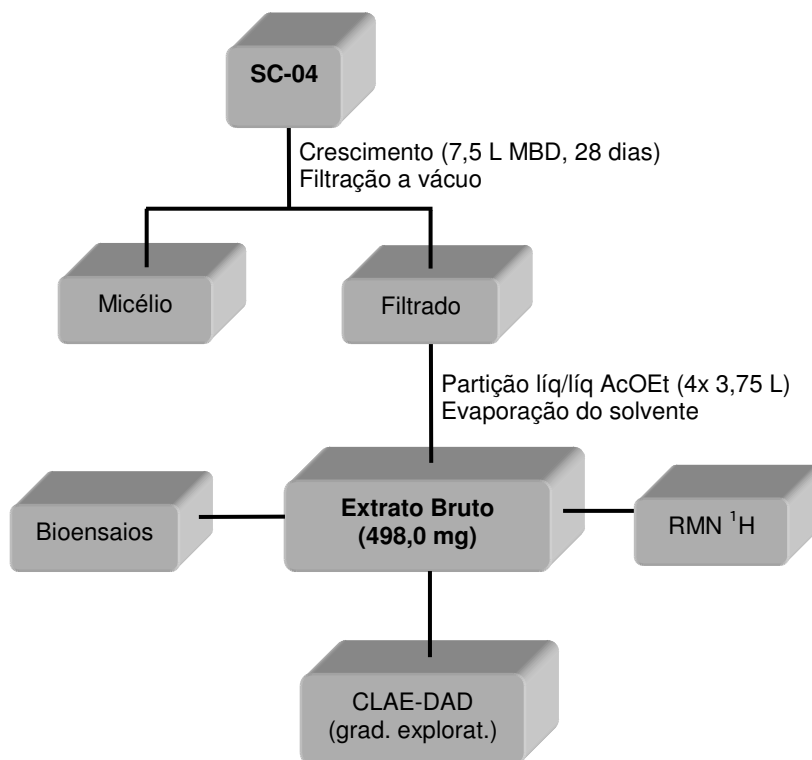
II.5 Estudo químico do endofítico *Phomopsis stipata* (SC-04)

II.5.1 Cultivo do endofítico SC-04 em MBD e obtenção do extrato bruto (larga escala)

O isolado SC-04 preservado em água estéril foi inoculado em meio sólido BDA e monitorado até que suas hifas atingissem 2-3 cm de diâmetro. A linhagem foi avaliada quanto à pureza, através da aparência uniforme da colônia nas placas. A cultura pura obtida em meio sólido foi repicada para cultivo em meio líquido em larga escala, sendo inoculada em 7,5 L de MBD (30 frascos contendo 250 mL de meio), e mantida em incubadora rotatória sob temperatura controlada (25 °C) por 28 dias (Esquema 03, pg. 51).

Terminado o período de incubação, verificou-se que 8 dos 30 frascos (~2 L) de caldo estavam contaminados, portanto estes foram rejeitados. O caldo (não contaminado) contendo os metabólitos secundários secretados pelo fungo foi separado do micélio por filtração a vácuo e submetido à partição líquido-líquido com AcOEt. Após evaporação do solvente em evaporador rotatório, obteve-se 498,0 mg de extrato bruto. Reservou-se uma parte (~40 mg) do extrato obtido para ser usado como padrão em futuras análises.

Esquema 03: Cultivo de SC-04 em MBD, obtenção do extrato bruto em larga escala e verificação do perfil químico/biológico.



II.5.2 Separação cromatográfica do extrato bruto produzido por SC-04 em MBD (larga escala)

O extrato bruto obtido em larga escala (~458,0 mg) foi submetido à CC de fase reversa (C18, 10 X 3,5 cm) sob pressão reduzida, utilizando como fase móvel o sistema binário em gradiente H₂O/MeOH 9:1 a 0:10 (Esquema 04, pg. 53). O fracionamento resultou em 13 extratos parciais (Tabela 05, pg. 52) após evaporação do solvente.

Tabela 05: Extratos parciais obtidos no fracionamento do extrato bruto em larga escala.

Código do Extrato parcial	H ₂ O:MeOH	Volume (mL)	Massa (mg)
EP1	90:10	170	22,2
EP2	85:15	170	6,5
EP3	80:20	170	6,7
EP4	75:25	170	13,2
EP5	70:30	340	33,6
EP6	65:35	340	28,5
EP7	55:45	340	39,5
EP8	50:50	170	25,8
EP9	40:60	340	114,0
EP10	30:70	340	72,0
EP11	20:80	340	39,7
EP12	10:90	340	22,7
EP13	0:100	340	16,3
Total: 13	-	-	440,7

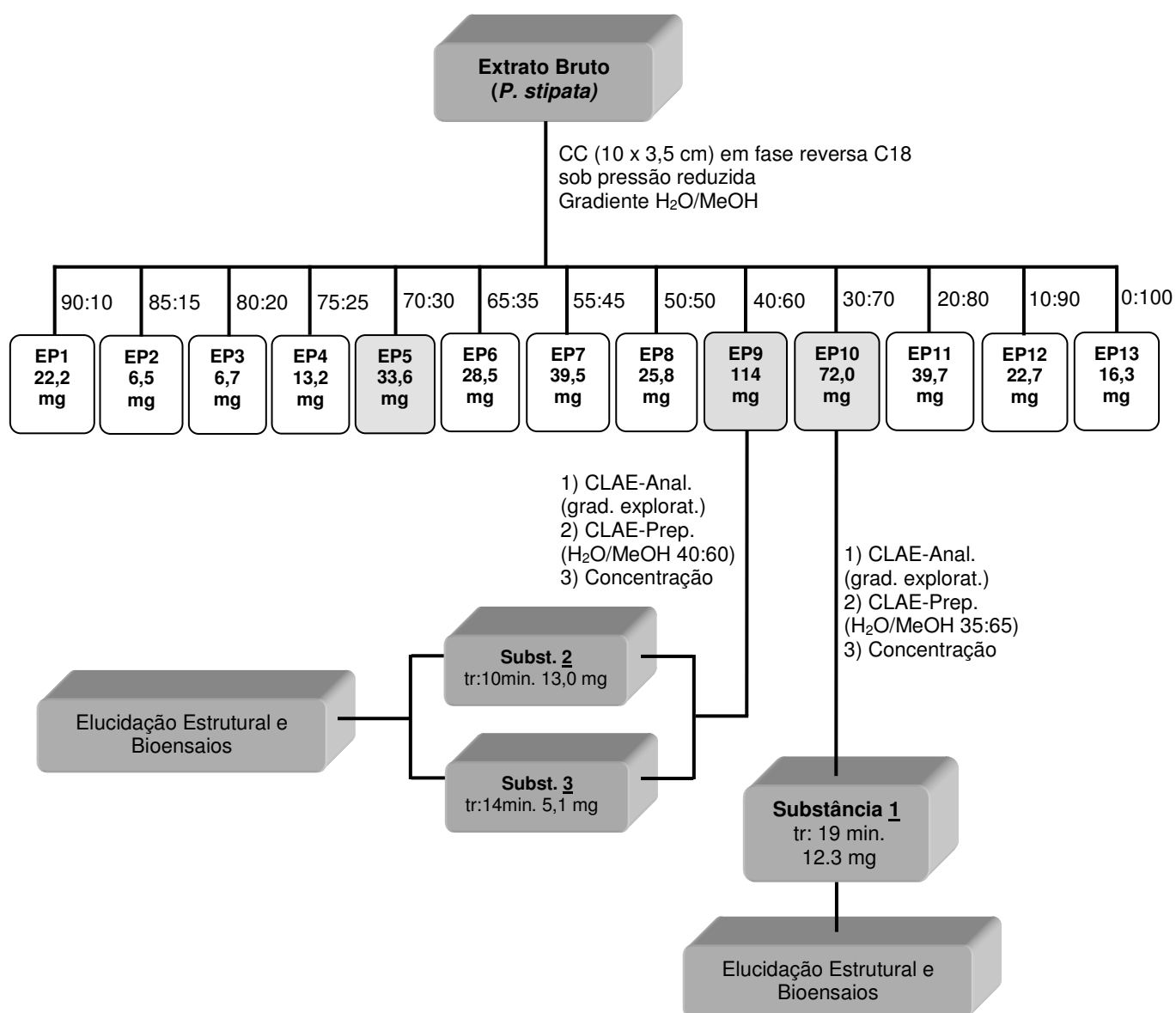
Os extratos parciais obtidos foram submetidos à RMN¹H e CLAE-DAD em gradiente exploratório com H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 40 min permanecendo mais 10 min em MeOH 100% com fluxo de 1,0 mL/min. a 254 nm. (Fig. 46 a 48, pg. 105 e 106).

Após análise dos cromatogramas, dos espectros e dos rendimentos em massa selecionou-se os extratos parciais EP9 e EP10 para fracionamento via CLAE-prep. (Esquema 04, pg. 53).

Otimizou-se a separação cromatográfica do extrato parcial EP10 em sistema de eluição isocrático H₂O/MeOH 35:65 a 243 nm com fluxo de 1,0 mL/min. (Fig. 49, pg. 106) e submeteu-se este a CLAE-prep nas condições estabelecidas com fluxo de 15 mL/min., resultando no isolamento das substâncias **1** (tr:19min, 12,3 mg) (Esquema 04, pg. 53).

No fracionamento cromatográfico via CLAE-prep de EP9 em sistema de eluição isocrático H₂O/MeOH 40:60 a 270 nm com fluxo de 20 mL/min (Fig. 50, pg. 107) obteve-se as substâncias **2** (tr:10min, 13 mg) e **3** (tr:14min, 5,1 mg) (Esquema 04, pg. 53).

Esquema 04: Fracionamento cromatográfico do extrato bruto SC-04 (larga escala) em fase reversa.



II.5.3 Cultivo do endofítico SC-04 em diferentes meios de cultura comerciais

Paralelamente ao processo de fracionamento do extrato bruto, foi iniciado um estudo do fungo SC-04 em diferentes meios de cultura líquidos comerciais.

O endofítico SC-04 foi cultivado em pequena escala nos seguintes meios de cultura líquidos comerciais: EM, YM, Nutriente e Czapek (250 mL em duplicata para cada meio) adotando o mesmo procedimento utilizado para crescimento em larga

escala que resultou no extrato bruto (Esquema 05, pg. 55). Foram preparados mais 250 mL de cada meio sem a inoculação do fungo, visando obter um “branco” para as análises (Esquema 05, pg. 55).

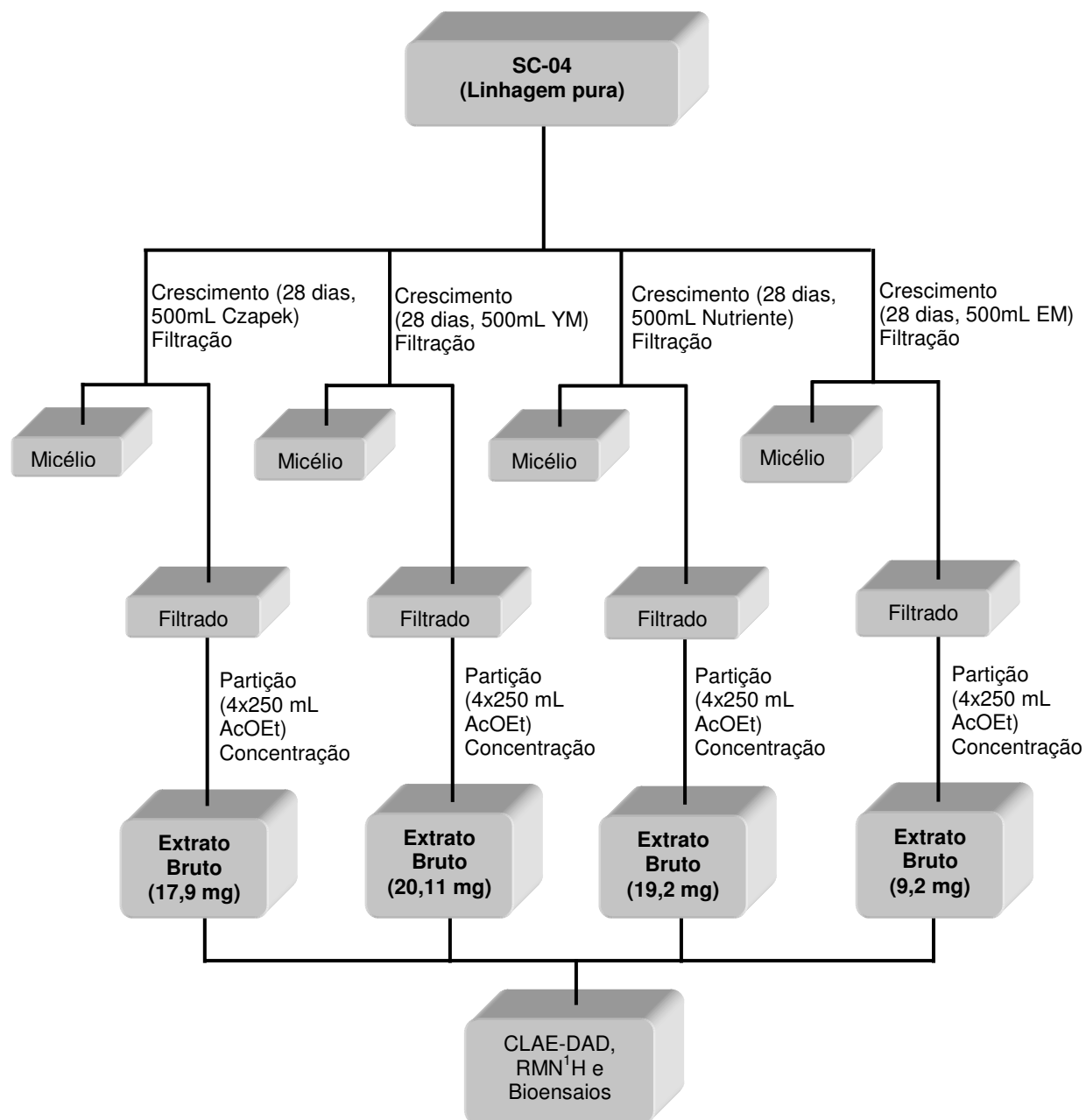
Após o período de incubação, os meios líquidos de cultura contendo os metabólitos e os micélios do fungo foram submetidos à filtração, separando-se os micélios dos meios aquosos contendo os metabólitos secretados pelo fungo, sendo estes últimos posteriormente submetidos à partição líquido-líquido com AcOEt (Esquema 05, pg. 55).

A concentração das soluções resultou nos extratos brutos demonstrados na Tabela 06, pg. 54. Cada extrato bruto foi submetido à CLAE-DAD (Esquema 05, pg. 55) com coluna analítica Phenomenex C18 em gradiente exploratório, usando sistema de eluentes MeOH:H₂O (95:5 V/V) a (0:100 V/V) em 40 min., permanecendo nesta condição (MeOH 100%) por mais 10 min., num fluxo de 1,0 mL/min.; iniciando em 253 nm. (Fig. 23 a 30, pg. 66 a 71). Os extratos também foram analisados por RMN ¹H (Fig. 58 a 61, pg. 111 e 112) e encaminhados para avaliação da atividade antifúngica. Para uma análise mais rigorosa, os padrões também foram submetidos à mesma análise nas mesmas condições.

Tabela 06: Extratos brutos produzidos pelo fungo SC-04 em diferentes meios comerciais.

Meios de cultura	Massa de Extrato Bruto (mg)
EM	9,2
YM	20,1
Nutriente	19,2
Czapek	17,9

Esquema 05: Cultivo do endófito SC-04 (pequena escala) em diferentes meios de cultura líquidos comerciais.



II.5.4 Cultivo do endofítico SC-04 em cereais

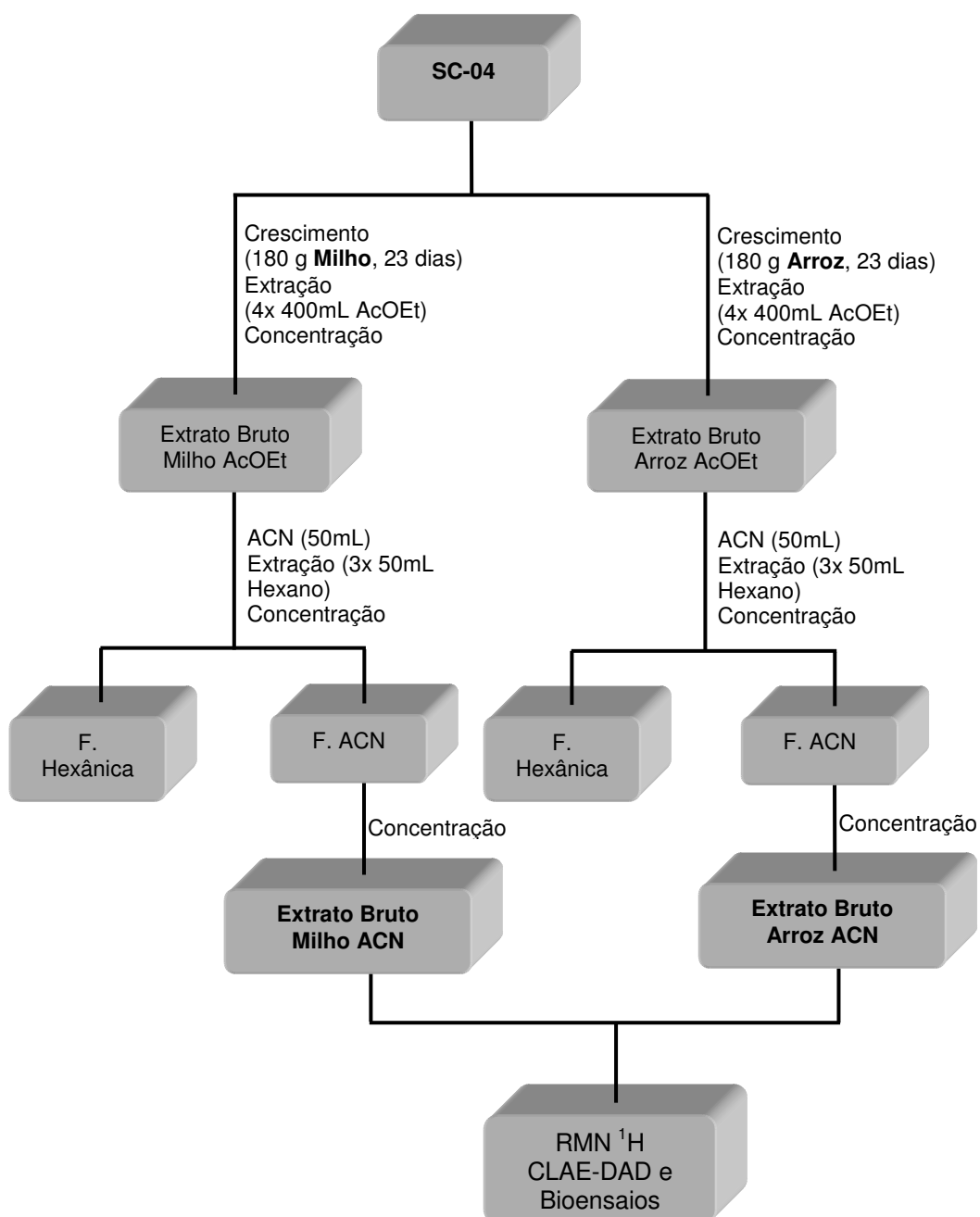
O cultivo do endofítico em milho e arroz (cultura estática) foi realizado utilizando-se 90 g de cada cereal em duplicata (Esquema 06, pg. 57). A cada recipiente, contendo o meio de cultura não cozido, foram adicionados 80 mL de água destilada e estes foram autoclavados a 121°C por 20 min três vezes em um intervalo de 72 horas. O fungo endofítico foi inoculado nos meios de cultura cozidos já resfriados. Após o período de incubação de 23 dias, procedeu-se a extração dos metabólitos secundários produzidos pelo fungo, utilizando-se 4 porções de 400 mL de AcOEt para cada recipiente com agitações periódicas (Esquema 06, pg. 57). Foram também preparados mais 40 g de cada meio sem a inoculação do fungo, visando obter um “branco” para as análises (Esquema 06, pg. 57).

A concentração das soluções resultou nos extratos brutos (Esquema 06, pg. 57) demonstrados na Tabela 07, pg. 57. Cada extrato bruto foi submetido à CLAE-DAD (Esquema 06, pg. 57) com coluna analítica Phenomenex C18 em gradiente exploratório, usando sistema de eluentes MeOH:H₂O (95:5 V/V) a (0:100 V/V) em 40 min., permanecendo nesta condição (MeOH 100%) por mais 10 min., num fluxo de 1,0 mL/min.; iniciando em 253 nm. (Fig. 31, pg. 72). Os extratos também foram analisados por RMN ¹H (Fig. 62 e 64, pg. 113 e 114). Para uma análise mais rigorosa, os brancos também foram submetidos à mesma análise nas mesmas condições.

Análise dos espectros de RMN¹H dos extratos obtidos revelou a produção de glicerídeos em grande quantidade que impediam a visualização dos outros metabólitos produzidos, portanto estes extratos foram submetidos a uma partição hexano/acetonitrila (Esquema 06, pg. 57) para retirada do material graxo. Os novos extratos obtidos (Tabela 07, pg. 57) foram submetidos à CLAE-DAD em gradiente exploratório (Fig. 34, pg. 74), RMN de ¹H (Fig. 63 e 65, pg. 113 e 114) e encaminhados para avaliação das atividades antifúngica, antioxidante, antibacteriana e anticolinesterásica.

Tabela 07: Extratos brutos produzidos pelo fungo SC-04 em cereais.

Meio de Cultura	Massa de Extrato Bruto AcOEt (g)	Massa Extrato Bruto ACN (g)
Milho	3,05	0,670
Milho (branco)	0,43	-
Arroz	2,88	0,869
Arroz (branco)	0,31	-

Esquema 06: Cultivo do endófito SC-04 (pequena escala) em cereais.

II.6 Resultados e discussões do estudo químico do extrato bruto AcOEt

II.7 Elucidação Estrutural dos metabólitos isolados

As substâncias **1** (Tabela 08, pg. 61) e **2** (Tabela 09, pg. 64) foram submetidas às técnicas espectroscópicas para elucidação estrutural, destacando-se: RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (*g*COSY, *g*HMBC, *g*HMQC, etc.) e espectrometria de massas.

Determinação estrutural da substância **1**

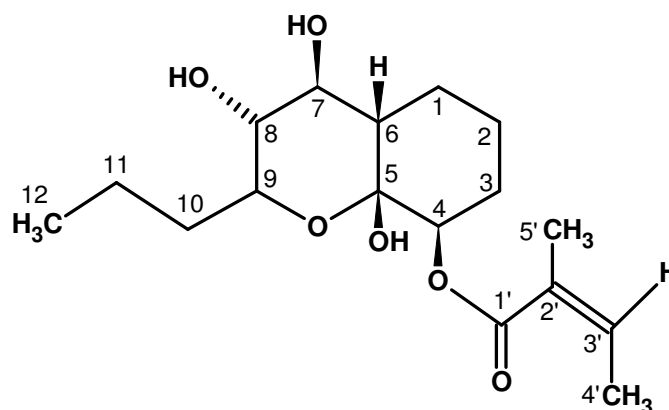


Figura 18: Estrutura atribuída para a substância **1**

A substância **1** (Figura 18, pg. 58) foi submetida a espectrometria de massas de alta resolução com a técnica ESI-MS (+) (Figura 77, pg. 121), e apresentou o pico base m/z 351,1930 (100%) indicando a formação do aduto $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e os íons *quasi* moleculares em 367,1688 (57%), e 311,1991 (42%), indicando a formação dos adutos $[\text{M} + \text{K}]^+$, e $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$, respectivamente. A massa para $[\text{M}+\text{Na}]^+$ foi calculada 351,17836, o que com auxílio dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT permitiu atribuir a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_6$, evidenciando quatro graus de insaturação.

O espectro de RMN ^{13}C com auxílio do DEPT indicou a presença de dezessete carbonos, sendo quatro carbinólicos metínicos (δ_{C} 69,6; 71,1; 71,9 e 76,9), três metílicos (δ_{C} 14,1; 15,5 e 20,3), cinco metilênicos (δ_{C} 18,0; 22,1; 22,5, 28,1 e 33,8), um carbono terciário metínico (δ_{C} 46,5), um cetálico (δ_{C} 94,9), dois olefínicos (δ_{C} 128,0 e 137,2) e uma carbonila (δ 166,9).

Os experimentos de RMN¹H evidenciaram a presença de um tripleto em δ_H 0,85 (δ_C 14,1, *t*, 7,0 Hz), dois duplos dubletos em δ_H 3,87 (δ_C 69,6; *dd*, 10,0; 5,0 Hz, H-7) e δ_H 4,58 (δ_C 76,9; *dd*, 10,0; 5,0 Hz, H-4), um tripleto em δ_H 3,11 (δ_C 71,1; *t*, 10,0 Hz, H-8), dois duplos tripletos em δ_H 3,52 (δ_C 71,9; *dt*, 10,0; 2,5 Hz, H-9) e em δ_H 1,76 (δ_C 46,5; *dt*, 10,0; 4,5 Hz, H-6).

Pela análise detalhada dos experimentos de RMN¹H e ¹³C, também foi possível visualizar um duplo quadrupeto largo em δ_H 1,95 (δ_C 15,5, *dq l*, 7,5; 1,5 Hz, H-4'), um tripleto largo em δ_H 1,84 (δ_C 20,3, *tl*, 1,5 Hz, H-5') e um quádruplo quadrupeto em δ_H 6,08 (δ_C 137,2, *qq*, 7,0; 1,0 Hz, H-3'), além de um sinal em δ_{C-1} 166,9, atribuídos a uma unidade angeloil, estrutura parcial A (Figura 19, pg. 59), justificando dois graus de insaturação, dos quatro observados pelos experimentos de RMN¹³C e EM. Deste modo, foi possível sugerir a presença de dois anéis para a substância em questão.

Pela análise conjunta dos dados de RMN ¹H, ¹³C, DEPT e os mapas de contorno *g*HMQC (correlações diretas ¹H x ¹³C - *g*HMQC - ¹J_{CH}) (Tabela 08, pg. 61), todos os hidrogênios foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono.

Com as informações acima colocadas, e os dados espectrais fornecidos pelas correlações de ¹H-¹H COSY, onde se visualizou as interações entre H-4 (δ_H 4,58) \leftrightarrow H-3 (δ_{Ha} 1,48 e δ_{Hb} 1,64) \leftrightarrow H-2 (δ_{Ha} 1,69 e δ_{Hb} 1,17) \leftrightarrow H-1 (δ_{Ha} 1,17 e δ_{Hb} 1,69) \leftrightarrow H-6 (δ_{Hax} 1,76), de \leftrightarrow H-7 (δ_{Hax} 3,87) \leftrightarrow H-8 (δ_{Hax} 3,11) \leftrightarrow H-9 (δ_{Hax} 3,52) e de H-10 (δ_H 1,35 e 1,68) \leftrightarrow H-11 (δ_H 1,33 e 1,46) \leftrightarrow H-12 (δ_H 0,85), foi possível sugerir a estrutura parcial B para a substância **1** (Figura 19, pg. 59).

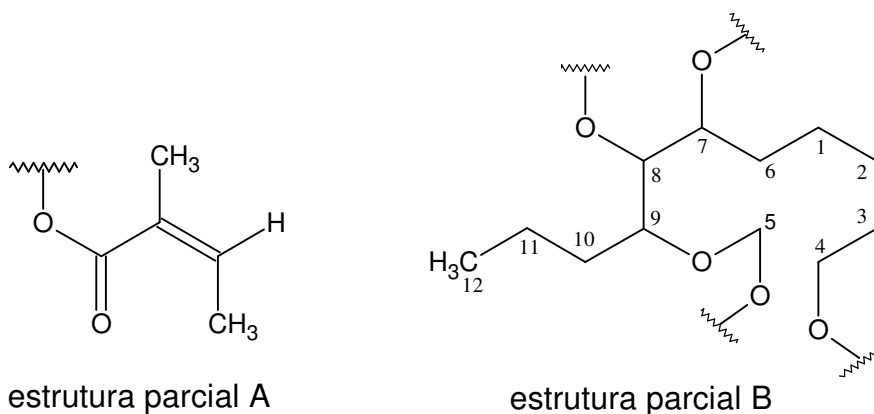


Figura 19: Estruturas parciais A e B atribuídas para a substância **1**.

Detalhada análise dos mapas de contorno dos experimentos de HMBC permitiu posicionar o radical angeloil em C-4 devido a correlação a longa distância 3J entre H-4 \leftrightarrow C-1, o qual foi posicionado em C-4 ao invés de em C-3 ou C-2 devido a multiplicidade de H-4, que se apresentou como *dd* (12,0; 5,0 Hz).

A correlação a curta distância observada no experimento HMBC entre H-4 \leftrightarrow C-5 (δ_C 94,9)/C-3 (δ_C 28,1) permitiu inferir que C-5 tratava-se de um carbono cetálico (dois oxigênios ligados a este).

A ligação entre C-6 e C-7 foi possível devido a interação à longa distância 3J observada em HMBC entre H-7 \leftrightarrow C-1 e a curta distância 2J entre H-6 \leftrightarrow C-1/C-7/C-5. As correlações em COSY entre H-7 \leftrightarrow H-6 \leftrightarrow H-1, também corroboraram para esta proposta de junção. A correlação a curta distância entre H-6 \leftrightarrow C-5 (δ_C 94,4), permitiu fechar os anéis A e B (Figura 19, pg. 59).

O posicionamento da cadeia propílica em C-9 foi realizado pela observação da correlação em HMBC entre H-8 \leftrightarrow C-10 e de H-9 \leftrightarrow C-10/C-11. Deste modo foi possível atribuir a estrutura planar de **1** como mostrado na (Figura 18, pg. 58).

A estereoquímica relativa de **1** foi definida com base nas multiplicidades e constantes de acoplamento de H-4 (δ_H 4,58; *dd*, 10,0; 5,0 Hz) \leftrightarrow H-3, de H-6 (δ_H 1,76; *dt*, 10,0; 4,5 Hz) \leftrightarrow H-7, de H-7 (δ_H 3,87; *dd*, 10,0; 5,0 Hz) \leftrightarrow H-8, de H-8 (δ_H 3,11; *t*, 10,0 Hz) \leftrightarrow H-9 e de H-9 (δ_H 3,52; *dt*, 10,0; 2,5 Hz) \leftrightarrow H-10 (Tabela 08, pg. 61), permitindo posicioná-los em uma relação *trans* diaxial um em relação ao outro.

A junção *cis* entre os anéis A e B foi auferida com base na multiplicidade de H-6 que se apresentou como um duplo tripleto 1,76 com constantes de acoplamento de 10,0; 4,5 Hz. Esta observação foi confirmada pela observação de interações entre H-7 \leftrightarrow H-8 \leftrightarrow H-9 no experimento de NOESY 1D (Figura 76, pg. 120), as quais só são observadas se houver interconversão entre as conformações dos anéis A e B. Se a junção entre os anéis A e B fosse *trans*, observaríamos um sistema rígido com impossibilidade de interconversão e relação espacial entre H-7 \leftrightarrow H-8 \leftrightarrow H-9. Deste modo, a estereoquímica relativa de **1** foi estabelecida como mostrado na (Figura 18, pg. 58).

Tabela 08: Dados de RMN de ^{13}C , ^1H , HMBC e COSY da substância 1.

^1H .	δ (ppm) Multiplic. <i>J</i> (Hz)	^{13}C δ (ppm)	HMBC (δ)	COSY (δ)
1	1,16 e 1,69 (<i>m</i>)	22,1	28,1	1,69/1,76
2	1,17 e 1,69 (<i>m</i>)	22,5	76,9/94,9	1,43 e 1,66
3	1,43 e 1,66 (<i>m</i>)	28,1	-	1,69/1,17/1,69/4,58
4	4,58 (<i>dd</i> , 10,0 e 5,0)	76,9	166,9/94,9	1,48 e 1,64
5	-	94,9		-
6	1,76 (<i>dt</i> , 10,0 e 4,5)	46,5	22,1/94,9/69,6/71,1	1,16/3,87
7	3,87 (<i>dd</i> , 10,0 e 5,0)	69,6	46,5/22,1/71,1	1,76/3,11
8	3,11 (<i>t</i> , 10,0)	71,1	69,6/71,9/33,8	3,87/3,52
9	3,52 (<i>dt</i> , 10,0; 2,5)	71,9	18,0	3,11/1,35
10	1,35 e 1,68 (<i>m</i>)	33,8	18,0	1,33 e 1,46
11	1,33 e 1,46 (<i>m</i>)	18,0	71,9/33,8/14,1	1,35 e 1,68/0,85
12	0,85 (<i>t</i> , 7,0)	14,0	33,8/18,0	1,33 e 1,46
1'	-	166,9	-	-
2'	-	128,0	-	-
3'	6,08 (<i>qq</i> , 7,5 e 1,0)	137,2	^{20,3}	1,95/1,84
4'	1,95 (<i>dq l</i> , 7,5 e 1,5)	15,5	128,0/137,2	6,08
5'	1,84 (<i>tl</i> , 1,5)	20,3	128,0/166,9/137,2	6,08

Determinação Estrutural da Substância 2

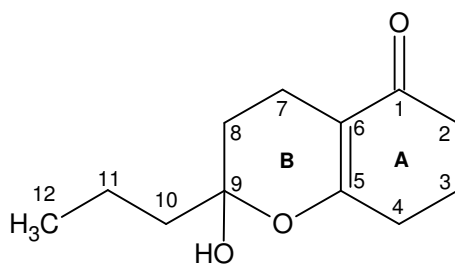


Figura 20: Estrutura atribuída para a substância 2.

A substância 2 (Figura 20, pg. 62) foi submetida a espectrometria de massas de alta resolução ESI-MS (+) (Figura 78, pg. 120), e apresentou o pico base m/z 233,1266 (100%) indicando a formação do aduto $[M+Na]^+$ e os íons *quasi* moleculares em 249,1002 (94%), e 211,1440 (94%) e 193,1323 (40%), indicando a formação dos adutos $[M+K]^+$, $[M+H]^+$ e $[M-H_2O+H]^+$, respectivamente. A massa para $[M+Na]^+$ foi calculada em 233,11536, o que com auxílio dos espectros de RMN¹³C e DEPT permitiu atribuir a fórmula molecular C₁₂H₁₈O₃, evidenciando 4 graus de insaturação.

O espectro de RMN¹³C, com auxílio do DEPT, indicou a presença de doze carbonos, sendo um metílico (δ_C 13,7), sete metilênicos (δ_C 17,7; 21,3; 21,4; 22,1; 24,0; 25,2; 35,0), e quatro carbonos quaternários (δ_C 105,3; 109,6; 186,3 e 199,4).

Pela análise conjunta dos dados de RMN ¹H, ¹³C, DEPT e os mapas de contorno *g*HMQC (correlações diretas ¹H x ¹³C - *g*HMQC - ¹J_{CH}) (Tabela 09, pg. 64), os hidrogênios foram atribuídos aos respectivos átomos de carbono.

No espectro de RMN¹H foi visualizado um tripleto em δ_H 0,82 (δ_C 13,7) um multiplete em δ_H 1,22 (δ_C 22,1), e um tripleto em δ_H 1,12/1,22 (δ_C 24,0), atribuídos a uma metila e dois metilenos, respectivamente. As correlações observadas nos mapas de contorno do experimento HMBC e COSY (Figura 22, pg. 63) evidenciaram tratar-se, assim como em 1, de um radical propil (estrutura parcial A, Figura 21, pg. 63).

Os carbonos quaternários (δ_C 109,6; 186,3 e 199,4) foram atribuídos a uma cetona α,β -insaturada tetra-substituída e o carbono em δ_C 105,3 foi atribuído a um carbono cetálico (estrutura parcial B) como visualizado na Figura 21, pg. 63).

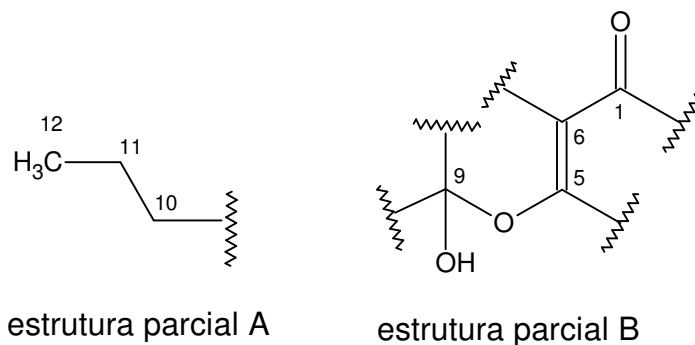


Figura 21: Estruturas parciais A e B atribuídas para a substância 2.

Com base na literatura o carbono com deslocamento químico em 35,0 (δ_H 1,58/1,64, H-2, *m*) foi posicionado α à carbonila, o que aliado aos dados fornecidos pelos mapas de contorno dos experimentos bidimensionais HMBC onde foi visualizado correlações de H-2 com C-3 (*m*, δ_C 21,3, CH₂)/C-4 (*t*, δ_C 25,2, CH₂) e também de H-4 com C-3/C-5/C-6 foi possível ciclizar o anel A. Foi também possível visualizar a correlação a longa distância $^3J_{CH}$ de H-2 com C-6 (δ_C 109,6, CH₂). A formação deste anel foi corroborada pelas correlações observadas no experimento de COSY entre H-2, H-3 e H-4, (Figura 22, pg. 63).

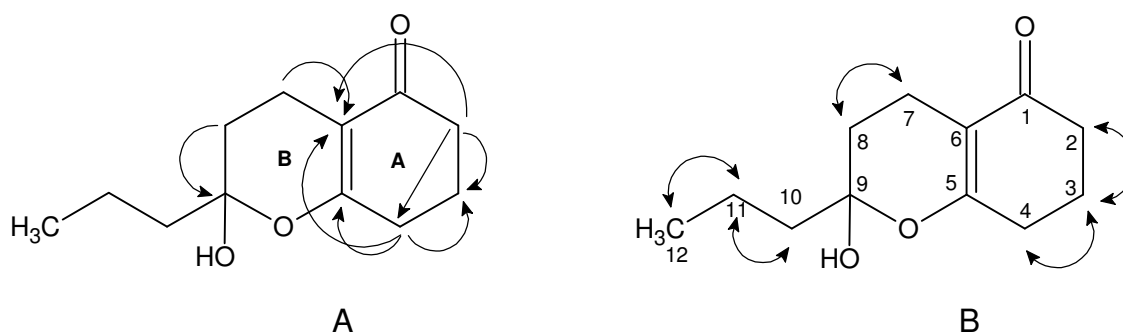


Figura 22: Principais correlações em HMBC (A) e COSY (B) para a substância 2.

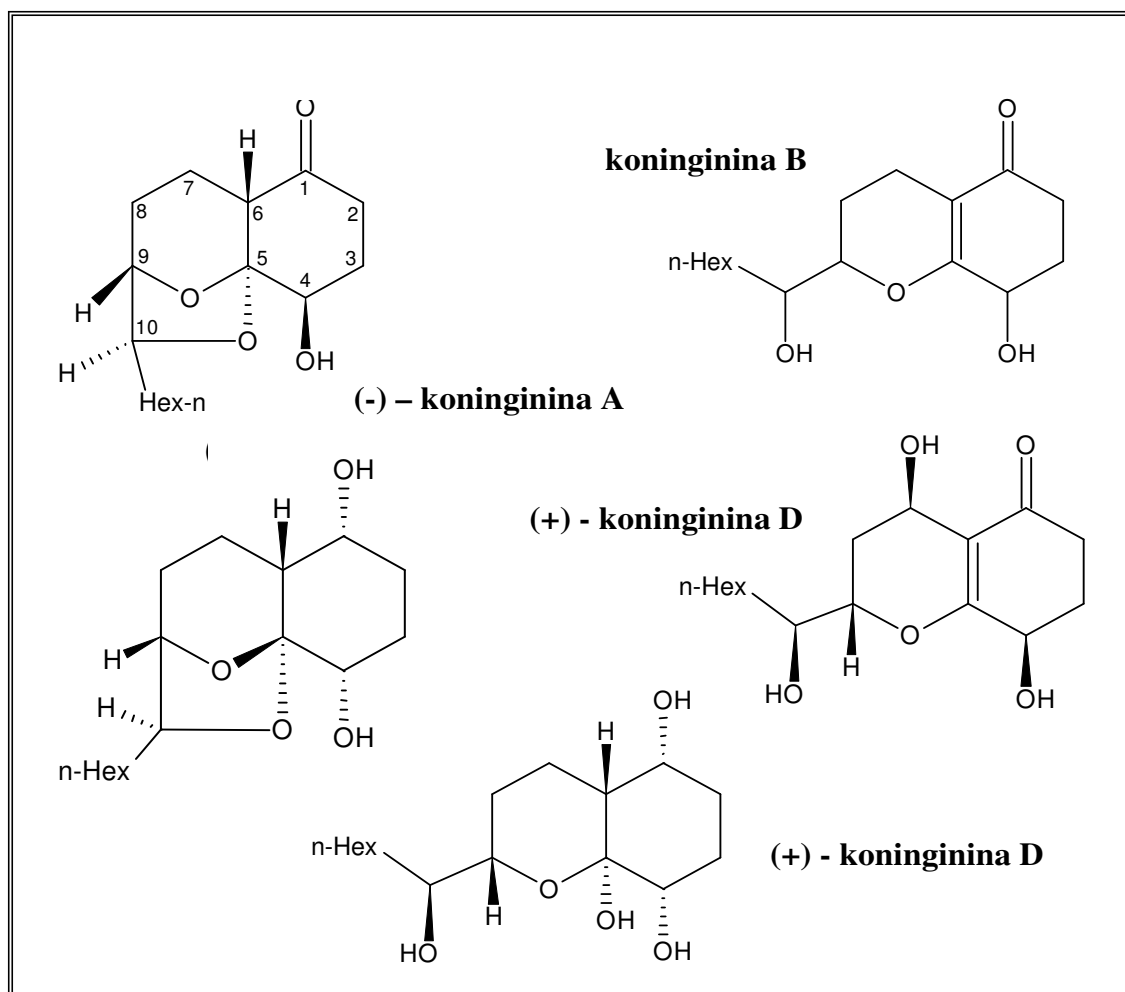
O anel B foi proposto pelas correlações 1H - 1H observadas no experimento COSY, entre H-7 (δ_H 2,00, *m*, CH₂) e H-8 (δ_H 1,58/1,73, *m*, CH₂), além das correlações a curta distância $^2J_{HC}$, observadas no experimento HMBC de H-7 com C-6 (δ_C 109,6) e C-8 (δ_C 21,3). Deste modo, foi possível atribuir para a substância 2 a estrutura planar mostrada na Figura 20, pg. 62.

Um minucioso levantamento bibliográfico realizado em várias bases de dados evidenciou tratar-se de uma substância inédita, com o mesmo esqueleto básico da substância **1**.

O Quadro 05 (pg. 65) mostra substâncias produzidas por fungos do gênero *Trichoderma* que apresentam esqueletos carbônicos mais próximos de **1** e **2**. Estas substâncias denominadas koningininas apresentam diversas atividades biológicas e segundo os autores (CUTLER et al., 1989; 1991; 1999 e referências citadas), (PARKER; CUTLER; SCHREINER, 1995 e referências citadas), (LIU; WANG, 1999) são derivadas da via do acetato e classificadas como octacetídeos.

Tabela 09: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC e COSY da substância **2**.

^1H .	δ (ppm) Multiplic. J(Hz)	^{13}C δ (ppm)	HMBC (δ)	COSY (δ)
1	-	199,4	-	-
2	1,58/1,64 (m)	35,0	21,3/25,2/109,6	1,73
3	1,73 (m)	21,3	25,2	1,58/1,64 e 2,36
4	2,36 (t, 7,0)	25,2	186,3/21,3/109,6	1,73
5	-	186,3	-	-
6	-	109,6	-	-
7	2,00 (m)	17,7	109,6/186,3/21,3	1,58/1,73
8	1,58/1,73 (m)	21,4	17,7/105,3	2,00
9	-	105,3	-	-
10	1,12/1,22 (m)	24,0	22,1	1,22
11	1,22 (m)	22,1	24,0/24,0	0,82
12	0,82 (t,7,0)	13,7	22,1/24,0	1,22



Quadro 05: Estruturas relacionadas com as substâncias **1** e **2**.

II.8 Resultados e discussões da variação metabólica de SC-04 em diferentes cultivos

Cultivo em EM: Análise das curvas de UV dos sinais presentes no cromatograma do extrato bruto obtido em EM (Fig. 24, pg. 66) revelou que a variedade de sinais corresponde somente aos metabólitos secretados pelo fungo, uma vez que o cromatograma do extrato AcOEt deste meio de cultura sem a inoculação do endofítico (Fig. 23, pg. 66) apresentou somente alguns picos não coincidentes com os do extrato bruto.

Comparando-se o cromatograma e as curvas de UV deste extrato com o extrato bruto obtido em MBD (Fig. 08 e 09, pg. 41 e 42), se observa a não equivalência de sinais, evidenciando que o metabolismo do fungo nestes dois meios seja diferente.

Análise do espectro de RMN¹H (Fig. 58, pg. 111) revelou a presença de compostos aromáticos e alquenos conjugados devido aos sinais entre 6 e 7 ppm.

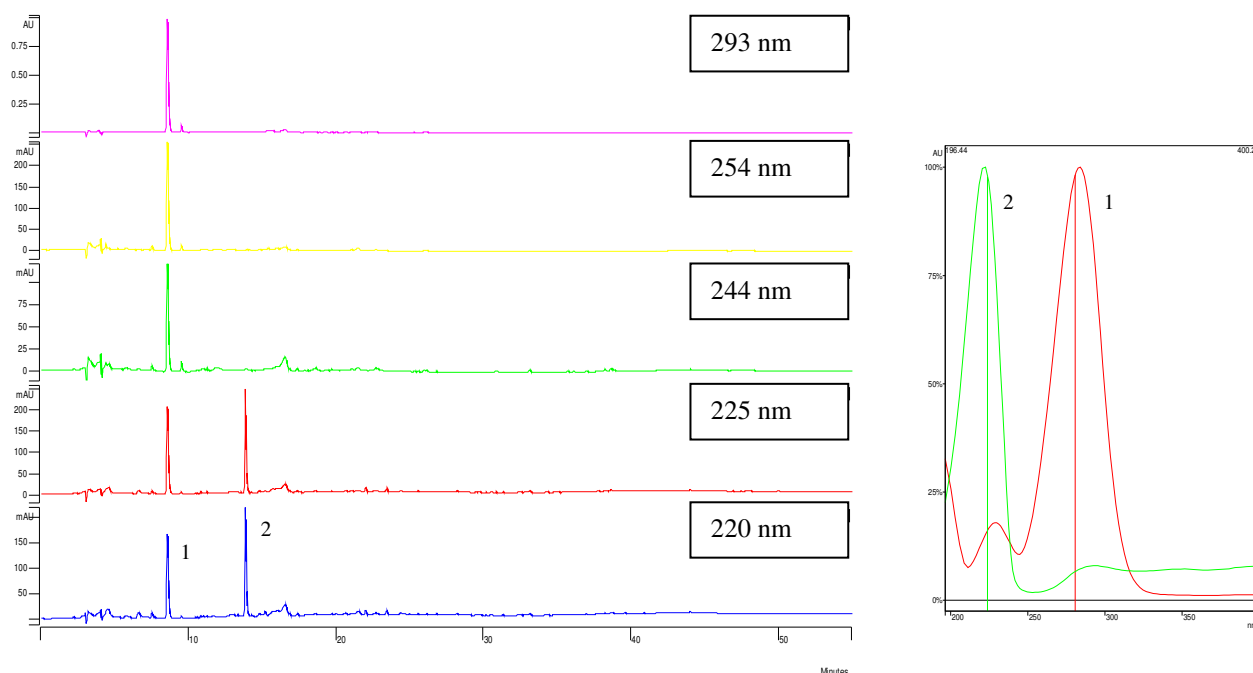


Figura 23: Cromatogramas em gradiente exploratório da partição AcOEt do meio EM sem a inoculação do fungo “branco” (H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 50 mim iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/mim).

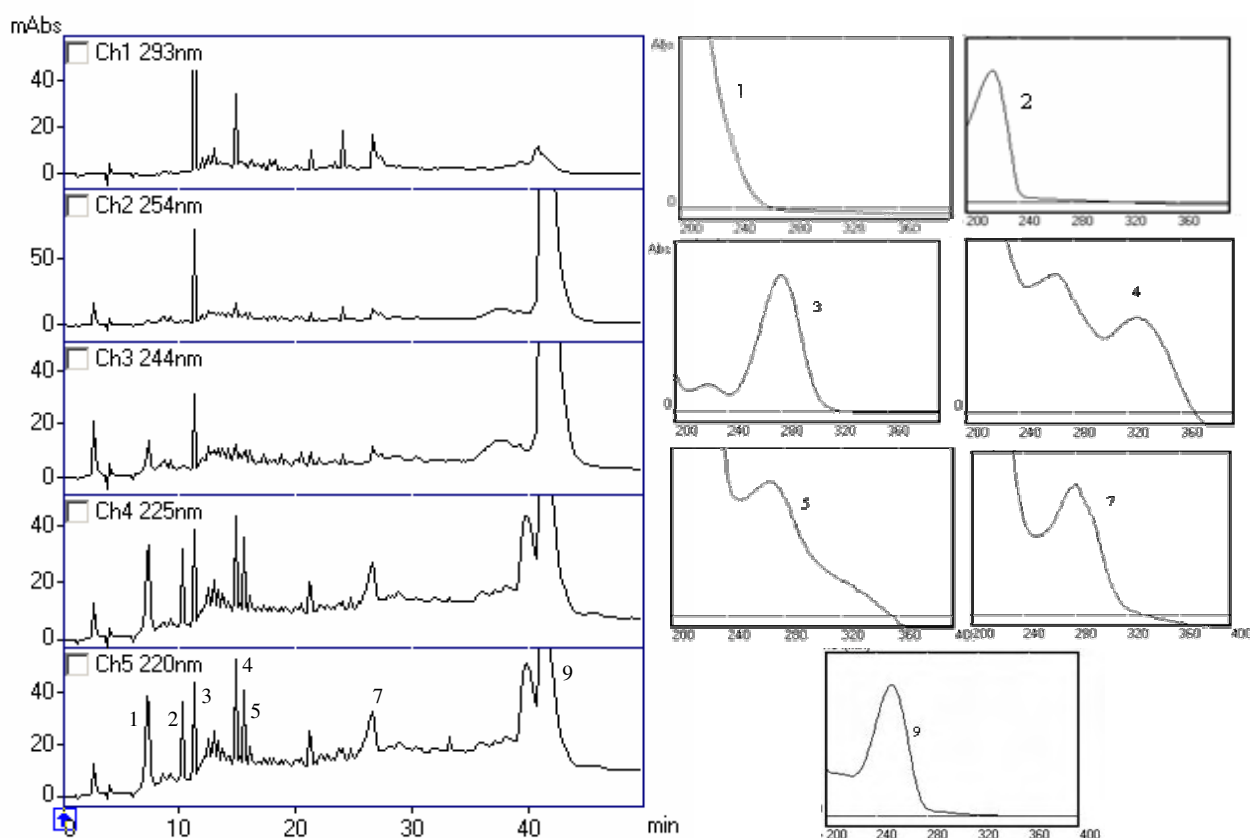


Figura 24: Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por SC-04 em EM (H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 50 mim iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/mim.).

Cultivo em YM: A mesma análise feita com o extrato bruto obtido em YM (Fig. 26, pg. 68) revelou que os sinais observados não são equivalentes aos obtidos em MBD e que somente traços das substâncias do próprio meio de cultura (Fig. 25, pg. 67) são identificados no extrato bruto. Análise do espectro de RMN¹H (Fig. 59, pg. 111) mostrou a possível presença de substâncias aromáticas devido aos sinais entre 6 e 8 ppm. Sinais entre 9 e 11 ppm indicam a presença de aldeídos, fenóis, ácidos ou oximas.

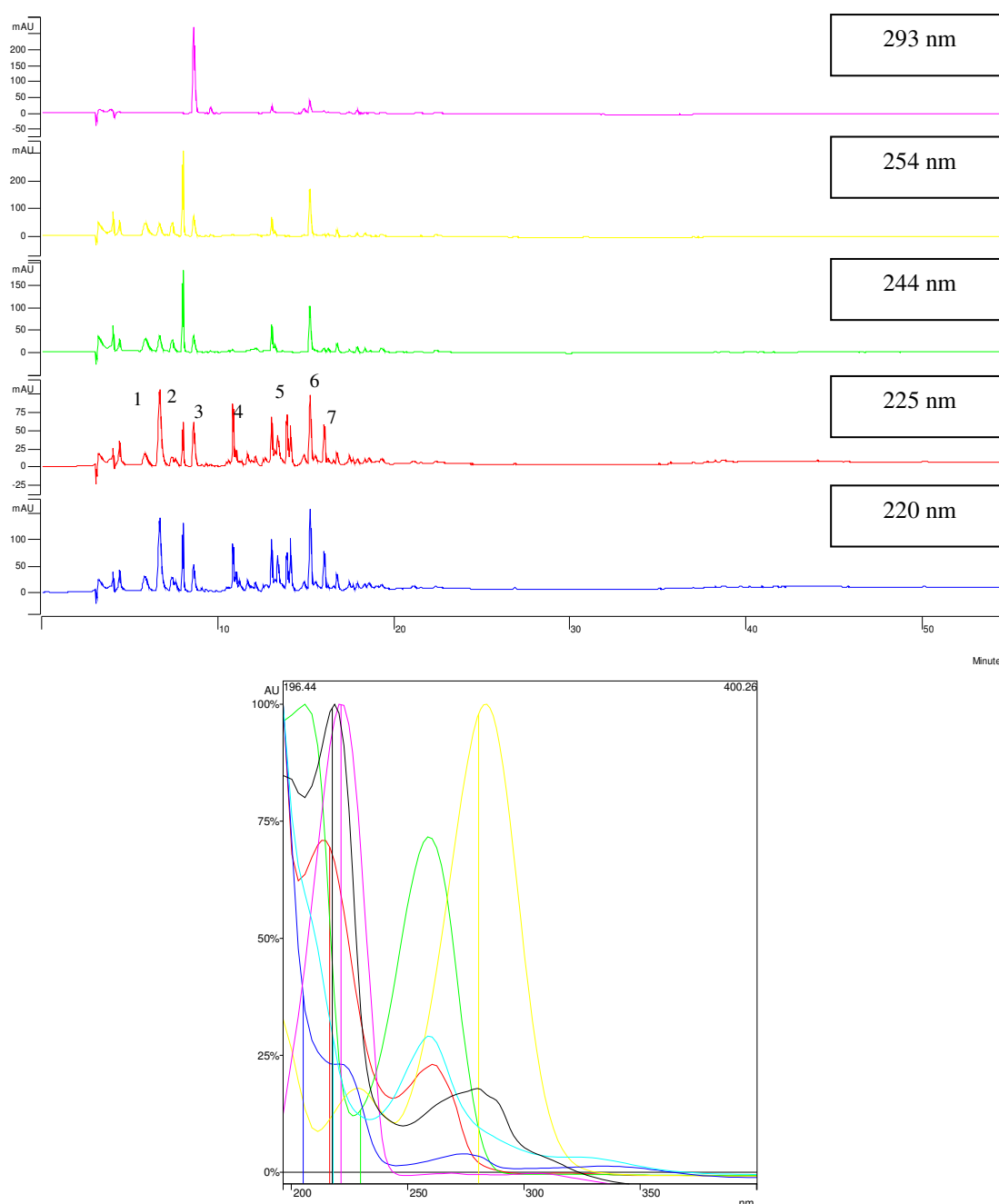


Figura 25: Cromatogramas em gradiente exploratório da partição AcOEt do meio YM sem a inoculação do fungo “branco” (H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 50 mim iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/mim).

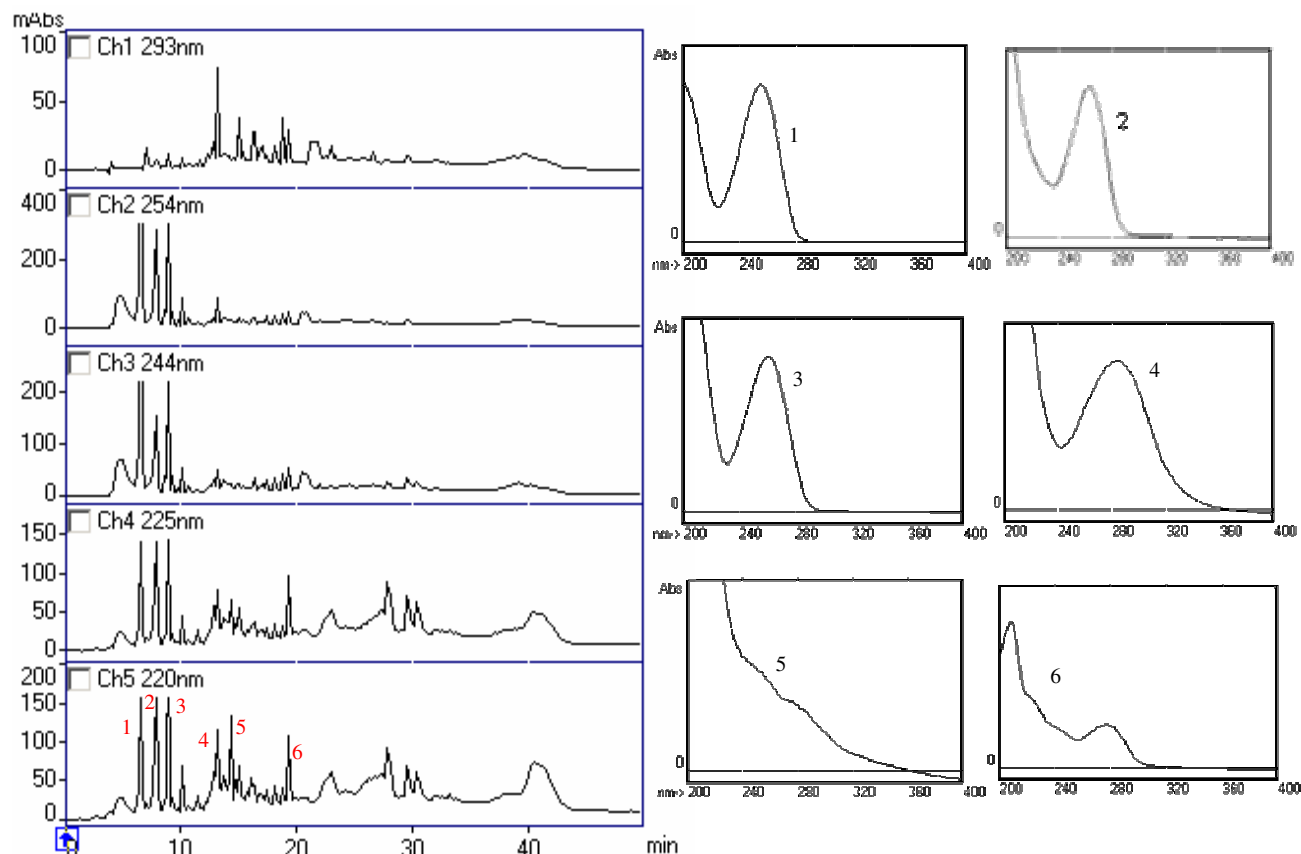


Figura 26: Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por **SC-04** em YM (H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 50 mim iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/mim.).

Cultivo em Nutriente: Para o extrato bruto obtido em Nutriente (Fig. 28, pg. 70), as análises mostram que o fungo apresentou metabolismo diferente do que em MBD, uma vez que não houve equivalência de sinais tanto nos espectro de RMN¹H quanto nos cromatogramas. Comparando-se os cromatogramas do extrato bruto obtido em Nutriente com o do extrato AcOEt deste meio sem a inoculação do fungo (Fig. 27, pg. 69) observa-se que muitos dos sinais correspondentes a substâncias do próprio meio não estão presentes no cromatograma do extrato bruto. Análise do espectro de RMN¹H (Fig. 60, pg. 112) mostra grande quantidade de sinais entre 7 e 8 ppm indicando a possível presença de compostos aromáticos e alquenos conjugados.

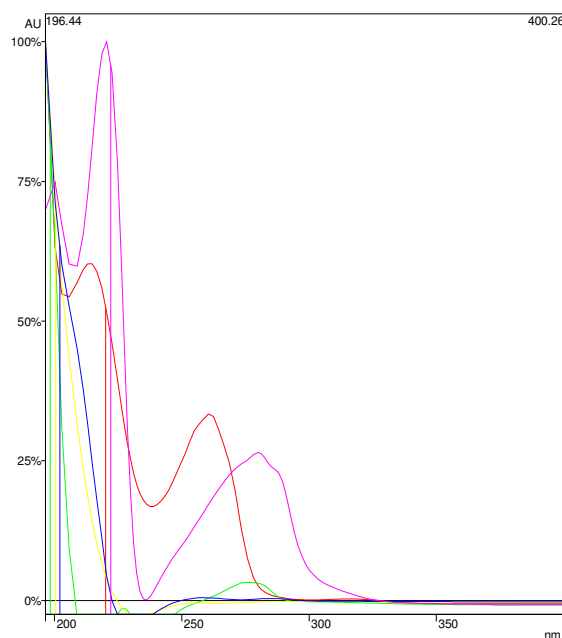
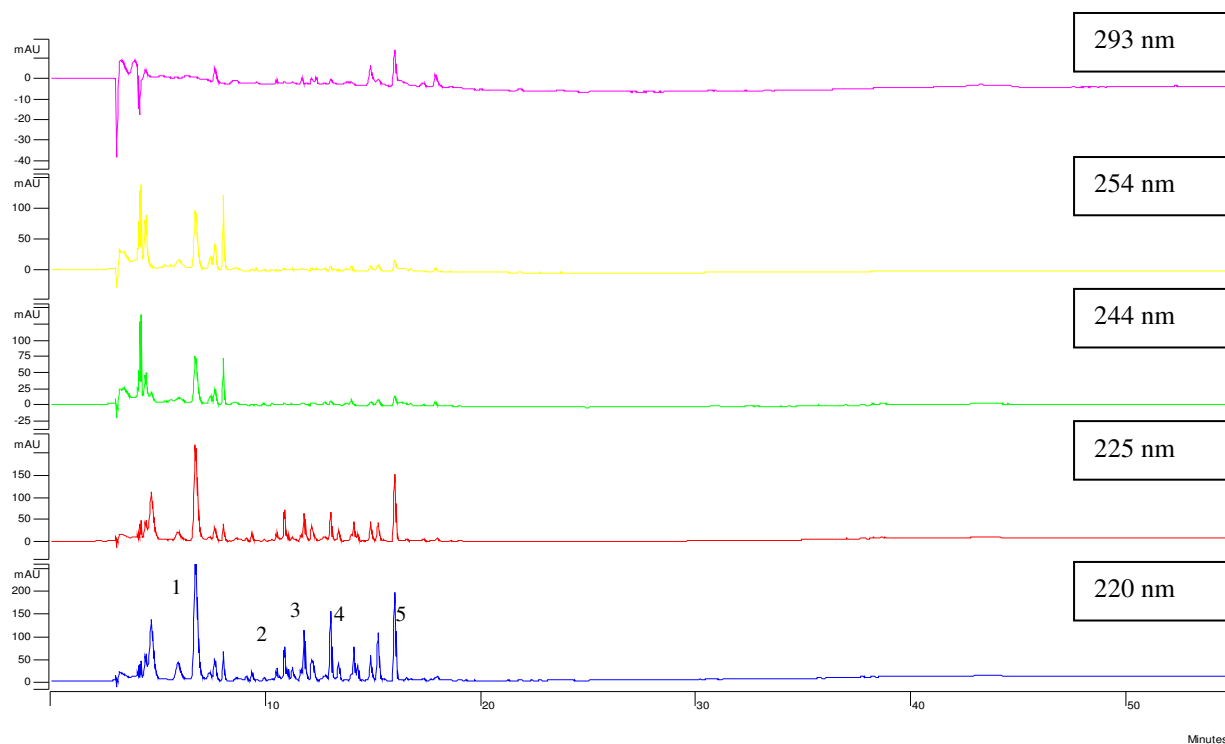


Figura 27: Cromatogramas em gradiente exploratório da partição AcOEt do meio Nutriente sem a inoculação do fungo "branco" ($H_2O/MeOH$ 95:5 a 0:100 em 50 mim iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/mim).

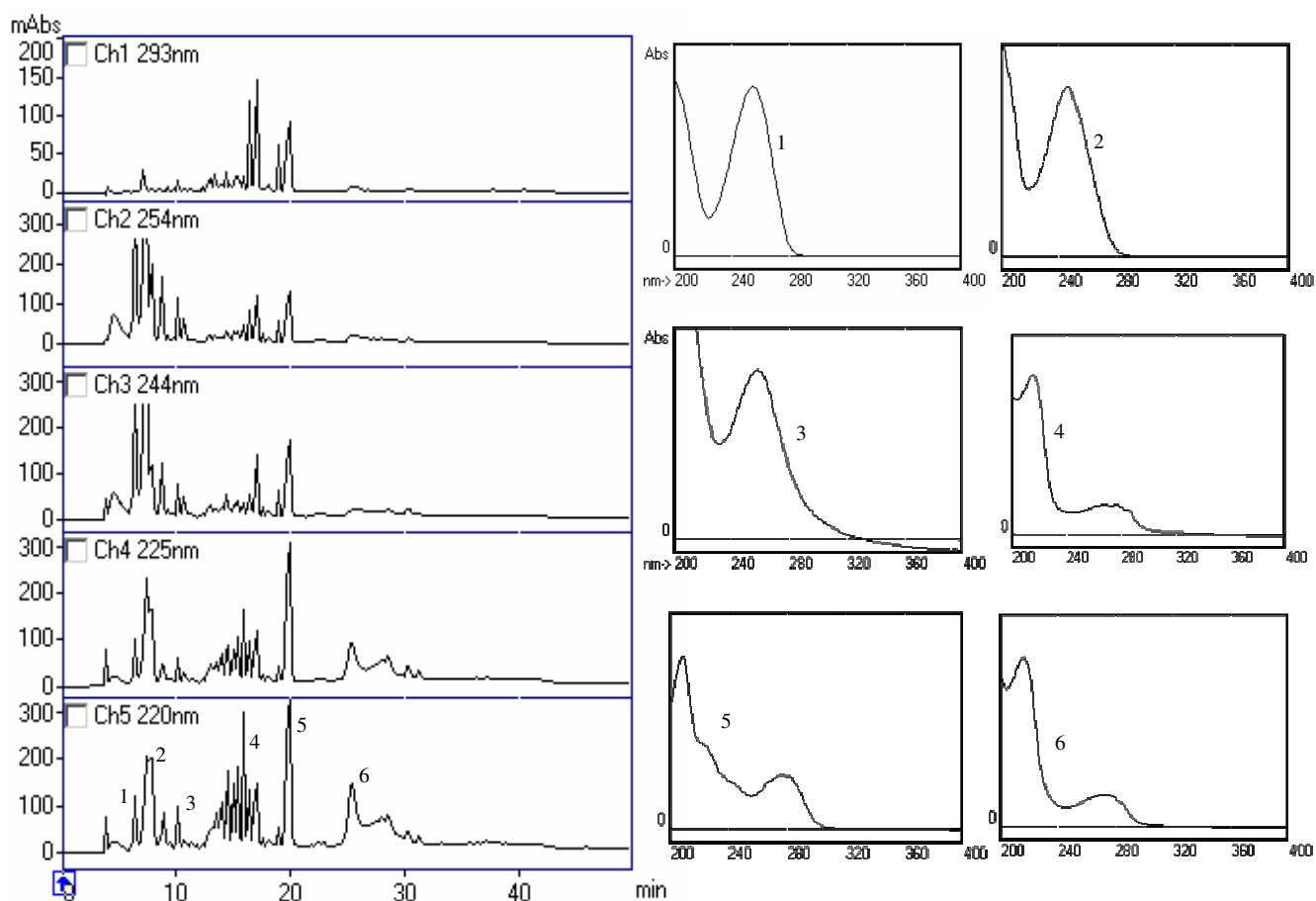


Figura 28: Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por **SC-04** em Nutriente ($H_2O/MeOH$ 95:5 a 0:100 em 50 mim iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/mim.).

Cultivo em Czapek: O cromatograma do extrato bruto obtido em Czapek (Fig. 30, pg. 71) apresenta sinais em menor quantidade do que os outros extratos e, analisando suas curvas de UV e os tempos de retenção, observa-se que alguns são equivalentes aos sinais observados no cromatograma do extrato bruto obtido em MBD, diferenciando-se apenas na concentração. A análise também mostra que o extrato AcOEt de Czapek sem a inoculação do fungo não apresenta nenhuma absorção no UV-Vis (Fig. 29, pg. 71). No espectro de RMN^1H (Fig. 61, pg. 112) não se observa produção de substâncias majoritárias e menor produção de aromáticos do que nos outros meios.

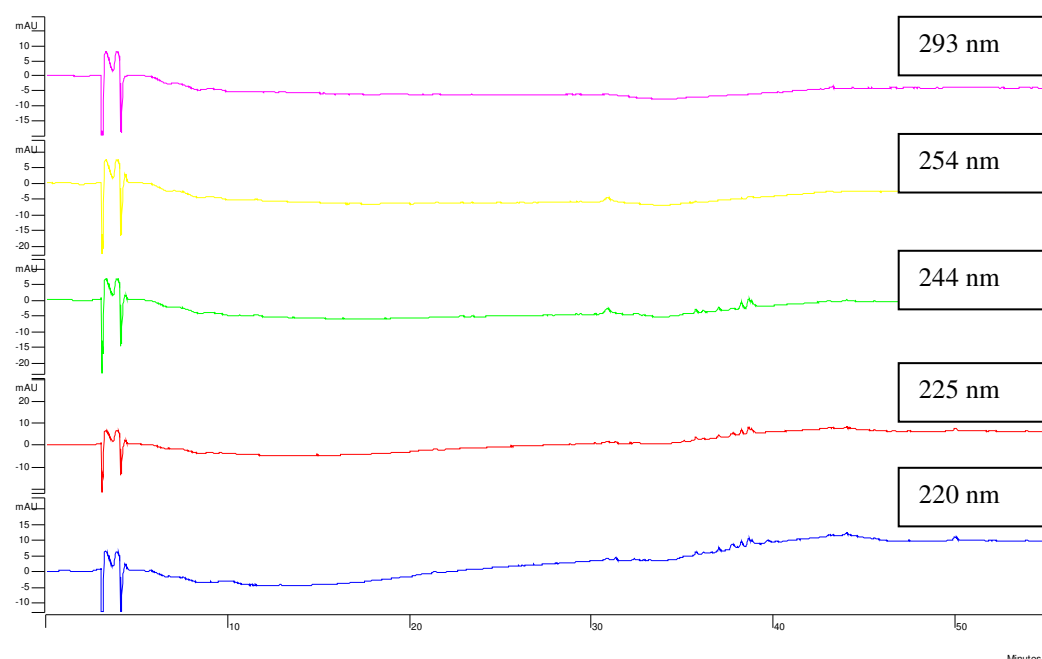


Figura 29: Cromatogramas em gradiente exploratório da partição AcOEt do meio Czapek sem a inoculação do fungo “branco” ($H_2O/MeOH$ 95:5 a 0:100 em 50 mim iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/mim).

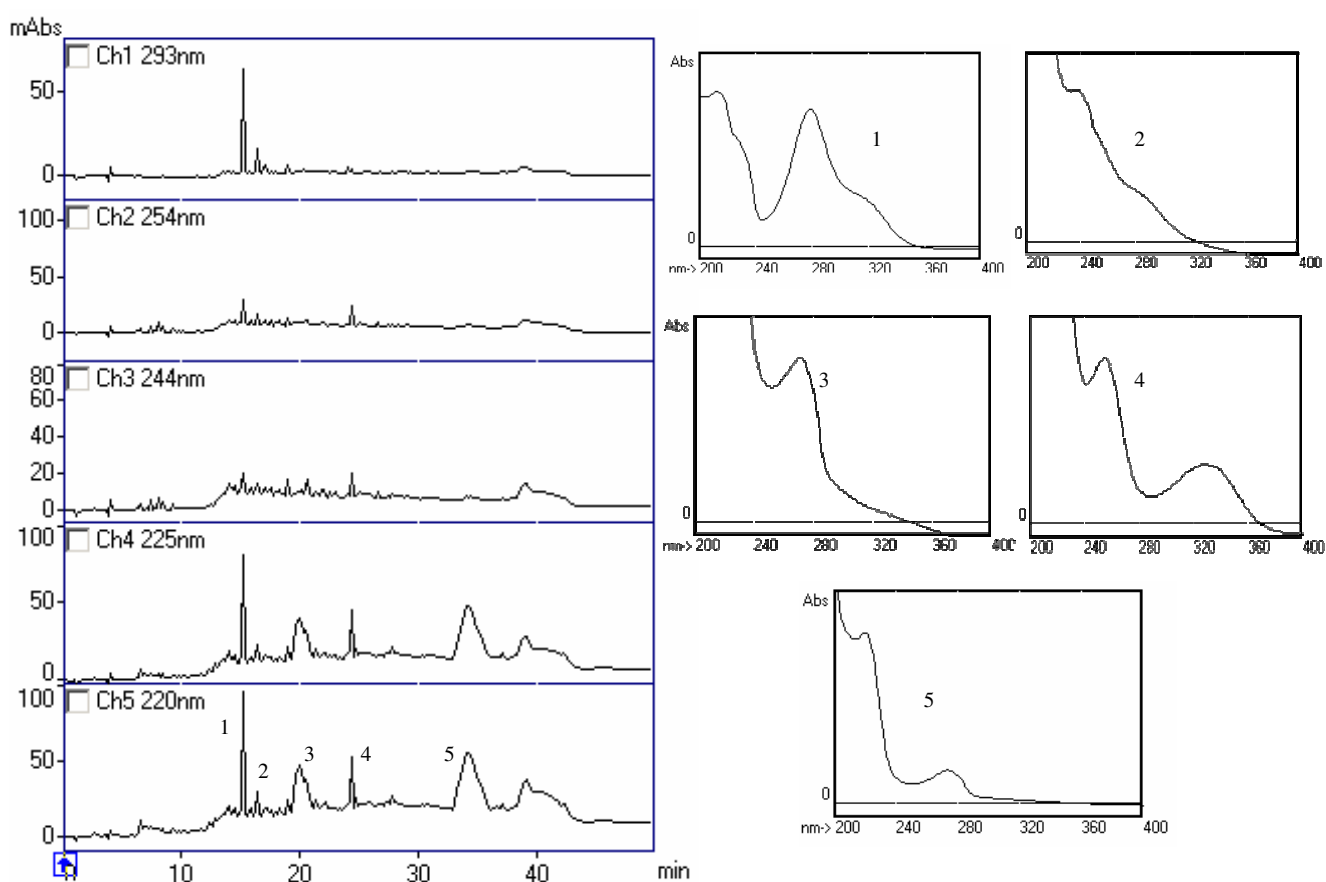


Figura 30: Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por **SC-04** em Czapek ($H_2O/MeOH$ 95:5 a 0:100 em 50 mim iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/mim.).

Visando o estudo de meios de cultura alternativos para o crescimento do endófito SC-04, procedeu-se o crescimento deste em milho e arroz. Verificou-se que, por se tratar de meios de cultura complexos, houve variação e aumento na produção metabólica do fungo quando comparado com os crescimentos em meios de cultura completos comerciais.

Análise dos cromatogramas dos extratos brutos AcOEt obtidos em milho e arroz (Fig. 31, pg. 72), revelou uma grande variedade de sinais, além disso, os dois cromatogramas se apresentaram semelhantes, não sendo possível evidenciar diferença significativa na produção metabólica do fungo. Análise das curvas de UV dos sinais presentes nos cromatogramas obtidos das extrações AcOEt dos cereais sem a inoculação do fungo (Fig. 32 e 33, pg. 73) e dos extratos brutos produzidos pelo endófito, mostrou que houve extração de alguns constituintes dos próprios cereais, em virtude da presença de sinais equivalentes.

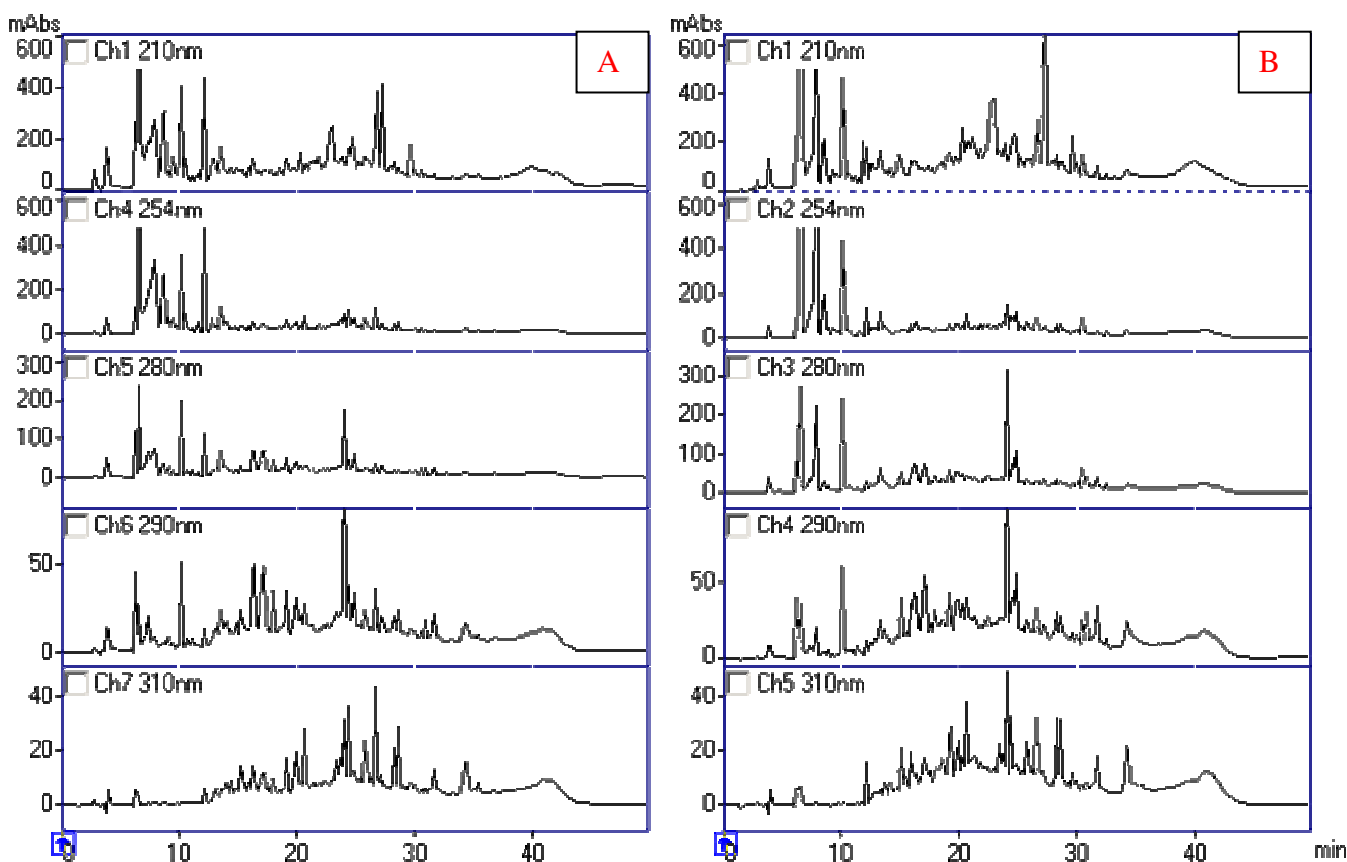


Figura 31: Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto produzido por **SC-04** em Arroz (A) e Milho (B) (Extração AcOEt) - H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 50 min iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/min.

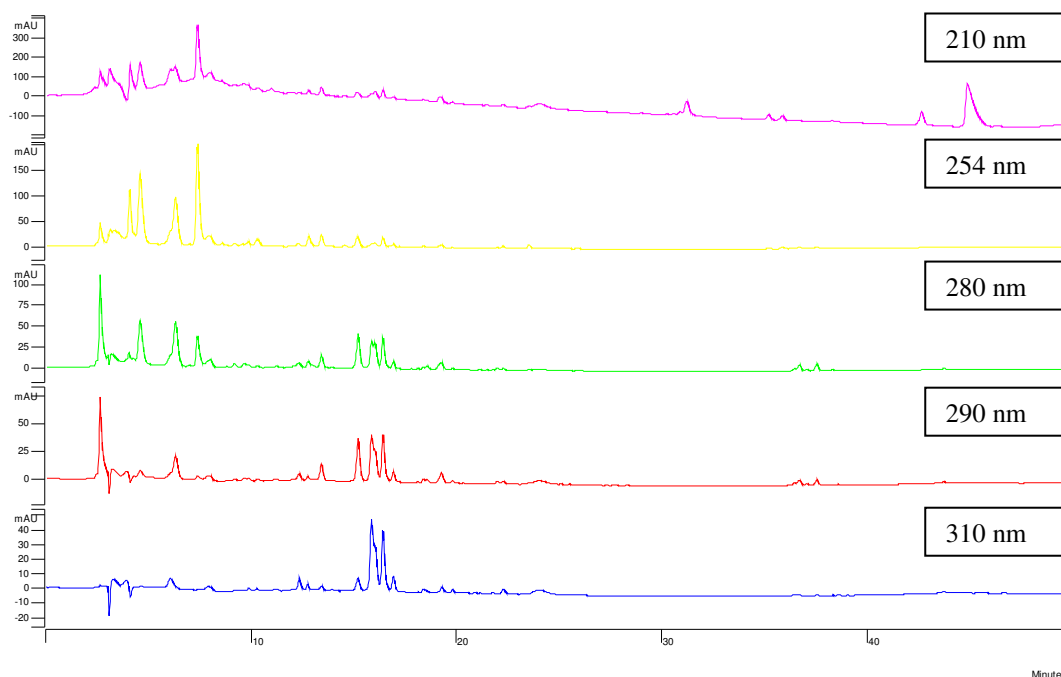


Figura 32: Cromatogramas em gradiente exploratório da partição AcOEt do Arroz sem a inoculação do fungo “branco” (H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 50 mim iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/mim).

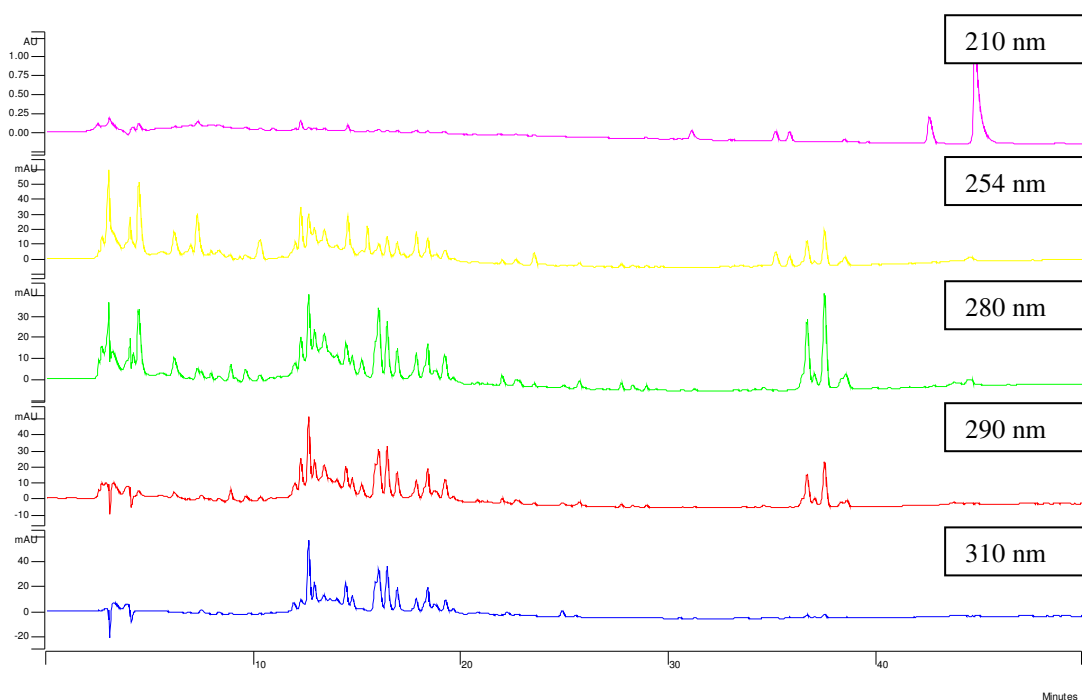


Figura 33: Cromatogramas em gradiente exploratório da partição AcOEt do Milho sem a inoculação do fungo “branco” (H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 50 mim iniciando em 254nm com fluxo de 1,0 mL/mim).

Análise prévia dos espectros de RMN¹H dos extratos AcOEt produzidos por SC-04 em Milho e Arroz (Fig. 62 e 64, pg. 113 e 114) revelou a produção de glicerídeos em grande quantidade que impediam a visualização dos outros constituintes dos extratos, portanto submeteram-se estes extratos a uma partição hexâno/ACN (Esquema 06, pg. 57) para retirada destes.

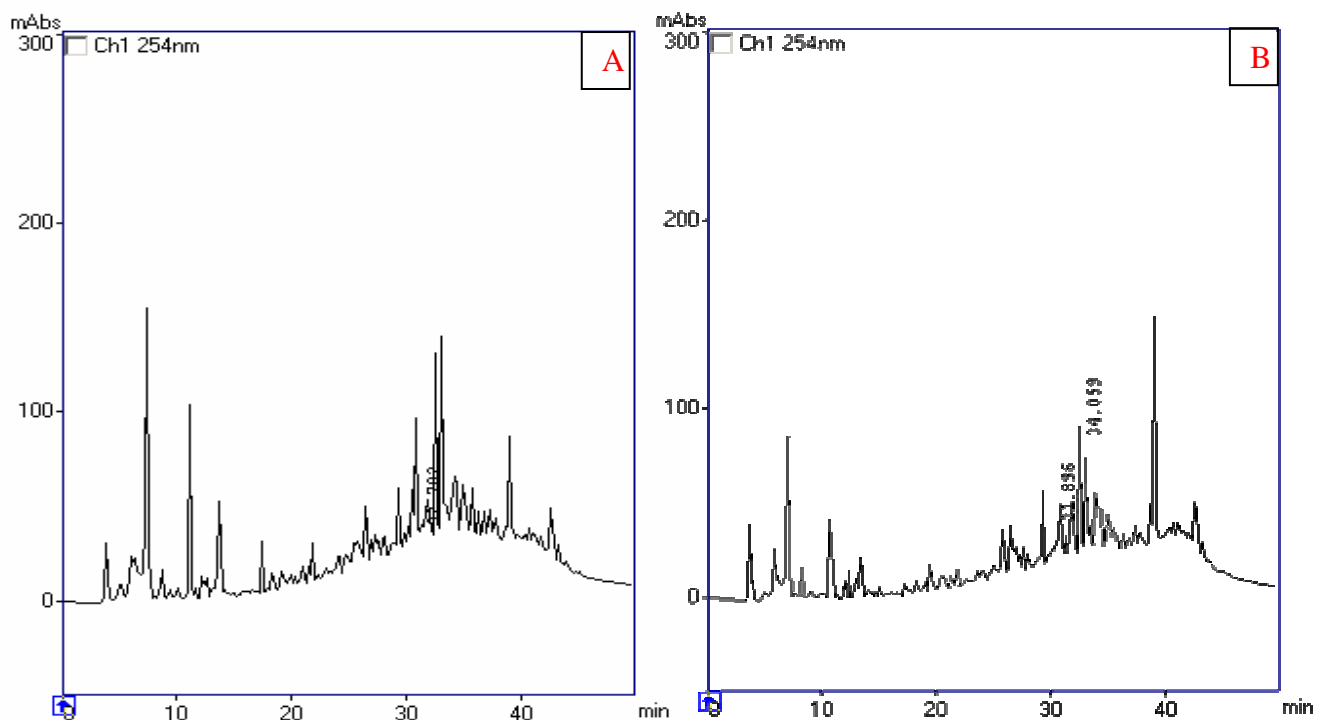


Figura 34: Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos brutos produzidos por **SC-04** em Arroz (A) e Milho (B) (Extração ACN) - H₂O/MeOH 95:5 a 0:100 em 50 mim a 254nm com fluxo de 1,0 mL/mim.

Os espectros de RMN¹H dos extratos brutos obtidos da fração ACN (Fig. 63 e 65, pg. 113 e 114) mostraram redução significativa dos sinais característicos de glicerídeos, indicando que a partição hexânica foi eficiente.

Assim como os cromatogramas em gradiente exploratório (Fig. 34, pg. 74), os espectros de RMN¹H dos extratos brutos obtidos da partição hexânica se apresentaram semelhantes, confirmando que o fungo SC-04 apresenta a mesma produção metabólica quando cultivado em Arroz e em Milho.

Comparando-se o rendimento (em massa) na produção de extratos em todos os cultivos de SC-04, observou-se que, quando cultivado em cereais (arroz e milho), o endofítico produz maior massa de extrato do que em meios líquidos comerciais (Tabelas 06 e 07, pg. 54 e 57). Entre os meios de cultura líquidos, YM proporcionou maior rendimento em massa de extrato bruto (Tabela 06, pg. 54). Em relação à variação da composição metabólica, observou-se que o cultivo de SC-04 em Czapek apresentou a menor variação devido à pequena quantidade de picos e sinais observados nos cromatogramas e espectros, respectivamente; enquanto que em cereais obteve-se a maior variação. Este fato já era esperado em virtude da grande diferença na composição desses meios de cultura, uma vez que o meio Czapek é considerado um meio de cultura mínimo que contém somente fontes de nitrogênio e energia, enquanto que os cereais *in natura* possuem uma grande variedade de nutrientes.

Um estudo mais profundo da variação metabólica deste endofítico seria de grande valor na otimização do isolamento de metabólitos bioativos de interesse, uma vez que, conhecendo-se o comportamento deste endofítico em cultivos variados, poder-se-ia “manipular” sua produção metabólica.

Capítulo III

III. Introdução

Na agricultura, 80% das fitopatologias decorrem de ataque fúngico. Os fungos constituem agentes de maior impacto em frutas armazenadas, com perdas substanciais na indústria de processamento (SUGAR et al., 1994). Na categoria, destaca-se *Penicillium expansum*, que além de colonizar o fruto e causar dano à polpa, produz a patulina, micotoxina teratogênica e cancerígena (PRIETA et al., 1994 e SYDENHAM et al., 1997).

As infecções permanecem como uma das principais causas de mortalidade de pacientes transplantados. Tal fato ocorre devido ao tratamento imunossupressor que, embora essencial para a sobrevivência dos pacientes, leva ao comprometimento das defesas imunológicas do organismo (COUTO et al., 2001). Em hospitais terciários, o gênero *Candida* responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas. No Brasil, um estudo epidemiológico reunindo dados sobre infecções de corrente sanguínea constatou que, durante um período de 12 meses, um total de 7.038 episódios de bacteremias e fungemias foi avaliado. (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Recentemente, o aumento de infecções fúngicas causadas por fungos oportunistas, e a resistência microbiana a uma série de antibióticos disponível no mercado estão motivando, novamente, as companhias farmacêuticas a buscar substâncias antifúngicas em fontes naturais (NEWMAN; GRAGG; SNADER, 2003).

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) é inevitável no metabolismo aeróbico do organismo. Estas espécies podem causar a oxidação lipídica e protéica, a ruptura na fita de DNA e a modificação nas bases e na modulação da expressão gênica (LEE; KOO; MIND, 2004). O entendimento do papel das EROs em muitas doenças como arteriosclerose, cânceres, asma, artrite, doenças cardiovasculares entre outras, promoveram progressos sem precedentes nos últimos anos. A prevenção da oxidação das biomoléculas pela ação de radicais livres derivados do O₂, diminui o risco do desenvolvimento de processos degenerativos (ORTIZ et al., 2003).

Antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de inibir ou retardar a oxidação deste, sem com isso se tornar um radical livre. Existem duas categorias básicas de antioxidantes: sintéticos e naturais (HALL III; CUPPERTT, 1997). Antioxidantes sintéticos, tais como BHA, BHT e TBHQ, são comumente utilizados na preservação de alimentos. Entretanto, propriedades carcinogênicas têm sido apontadas para os antioxidantes sintéticos. Dessa forma, antioxidantes de origem natural estão sendo avaliados para proteger os alimentos da oxidação e têm recebido maior atenção da comunidade científica (CHEUNG; CHEUNG; OOI, 2003).

Além de úteis na preservação de alimentos, os antioxidantes são importantes na prevenção de doenças, inibindo ou atrasando a oxidação das biomoléculas por meio da prevenção da iniciação ou da propagação da cadeia de reações de oxidação (KAUR; KAPOOR, 2001). Antioxidantes sintéticos requerem testes extensos e de custo elevado para comprovar a sua segurança para aplicação em alimentos, fármacos ou cosméticos, por esta razão, a busca por antioxidantes naturais tem elevado o número de pesquisas envolvendo plantas e microrganismos como novas fontes destas substâncias (MARTINEZ-VALVERDE; PERIAGO; PROVAN, 2002, OLIVEIRA JUNIOR; PINTO NETO; FERRARI, 1996; WENG et al., 1998 e GRAEFE; DERENDORF; VEIT, 1999).

O mal de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa que atinge a memória, a capacidade de raciocínio e a comunicação. Essa doença está associada à redução de neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina, noradrenalina e serotonina. O tratamento para o mal de Alzheimer é sintomático e consiste justamente na tentativa de restauração da função colinérgica. Dessa forma a elevação do nível da acetilcolina pode se mostrar útil para amenizar a deficiência da aprendizagem, um dos sinais da doença. (TREVISAN et al., 2006).

Companhias farmacêuticas vêm apoiando fortemente a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos que aumentem a capacidade cognitiva. Os inibidores da colinesterase aumentam a função colinérgica central e são utilizados no tratamento da doença de Alzheimer. Os fármacos, usualmente disponíveis no mercado, são Cognex (tacrina) e Exelon (rivastigmina) e Reminyl (galantamina) apresentam preços bastante onerosos, R\$ 130,00, R\$ 105,00 e R\$ 316,00, respectivamente (TREVISAN et al., 2003).

Portanto, a busca de novos inibidores de origem natural seria de grande importância para a população, na medida em que estes seriam economicamente mais viáveis.

A tuberculose pulmonar é uma doença infecciosa causada por micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Com o advento da AIDS, a co-infecção HIV/TB tem provocado um impacto na epidemiologia da tuberculose em todo o mundo (RAVIGLIONE et al., 1997, GARCIA et al., 1994 e MCMACKEN; CASTRO, 1994).

Em um levantamento promovido pela Organização Mundial de Saúde, estimou-se que um terço da população mundial estaria infectada pelo *M. tuberculosis*. A incidência de tuberculose está em torno de 8 milhões de novos casos, e 3 milhões de mortes por ano.

Estreptomicina, isoniazida e rifampicina são atualmente utilizadas em associação no tratamento da tuberculose em um esquema de curta duração (6 meses) (TOMAN, 1979). Nos últimos anos tem-se observado, em nível mundial, um aumento na incidência da tuberculose causada pelo *M. tuberculosis* resistente às principais drogas, o que reflete falha dos programas de controle da doença. (BLOCH et al., 1994, COHN; BUSTREO; RAVIGLIONE, 1997 e BRAGA; BARRETO; HIIJAR, 1999).

O problema da adesão aos quimioterápicos utilizados no tratamento da tuberculose, das reações colaterais provocadas por eles, e o constante abandono do tratamento, tem levado os pesquisadores à busca de princípios ativos em extratos brutos de plantas ou outras fontes naturais com atividade antibacteriana (COWAN, 1999).

III.1 Detecção de metabólitos antifúngicos (Bioautografia)

III.1.1 Materiais e Métodos*

O ensaio para avaliação do potencial antifúngico foi realizado com os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides*. Foram utilizadas placas preparadas para CCDC da Merck. Para a preparação da solução estoque

utilizou-se: glicose e sais inorgânicos. A solução foi autoclavada a 120 °C, por 20 minutos.

A bioautografia consiste da associação entre a cromatografia em camada delgada e um ensaio biológico *in situ*, permitindo localizar constituintes biologicamente ativos presentes em uma matriz complexa ou indicar o potencial biológico de substâncias puras. O método fundamenta-se na aplicação de um microrganismo sobre um cromatograma e incubação deste visando o aparecimento de possíveis zonas de inibição por constituintes ativos (HOMANS; FUCHS, 1970).

Os extratos brutos, frações e substâncias puras foram submetidos a este bioensaio, sendo aplicados (em duplicata) em placas cromatográficas pré-prontas, e posteriormente eluídos empregando-se um sistema de solventes preestabelecido, em concentração de 2,0 mg/mL, à temperatura de ~30 °C.

Após a evaporação dos solventes e localização das manchas (substâncias) por meio de absorção no UV, nebulizou-se os cromatogramas com uma suspensão de esporos dos fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides* em um meio preparado no momento de proceder ao ensaio (10 mL de solução aquosa de glicose a 30% e 60 mL da solução estoque). Após nebulização, procedeu-se a incubação das placas em atmosfera úmida por 2 a 3 dias a 25 °C.

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

III.1.2 Resultados da atividade antifúngica

Os extratos brutos AcOEt das 7 linhagens estudadas foram avaliados quanto ao potencial antifúngico e apresentaram forte atividade frente aos fungos fitopatogênicos *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides* (Fig. 35, pg. 80).

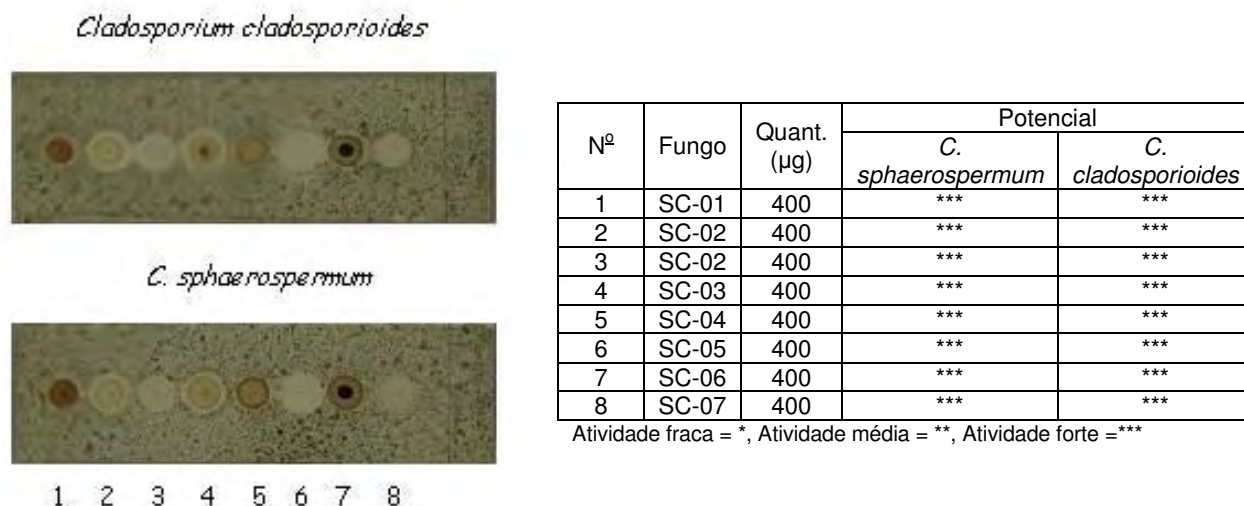


Figura 35: Ensaio de bioautografia com os extratos AcOEt produzidos pelos endofíticos triados.

O perfil biológico de SC-04 quando cultivado em diferentes meios foi também avaliado para verificação da atividade antifúngica, observando-se que apenas os extratos produzidos em cereais (Arroz e Milho) inibiram o crescimento das linhagens:

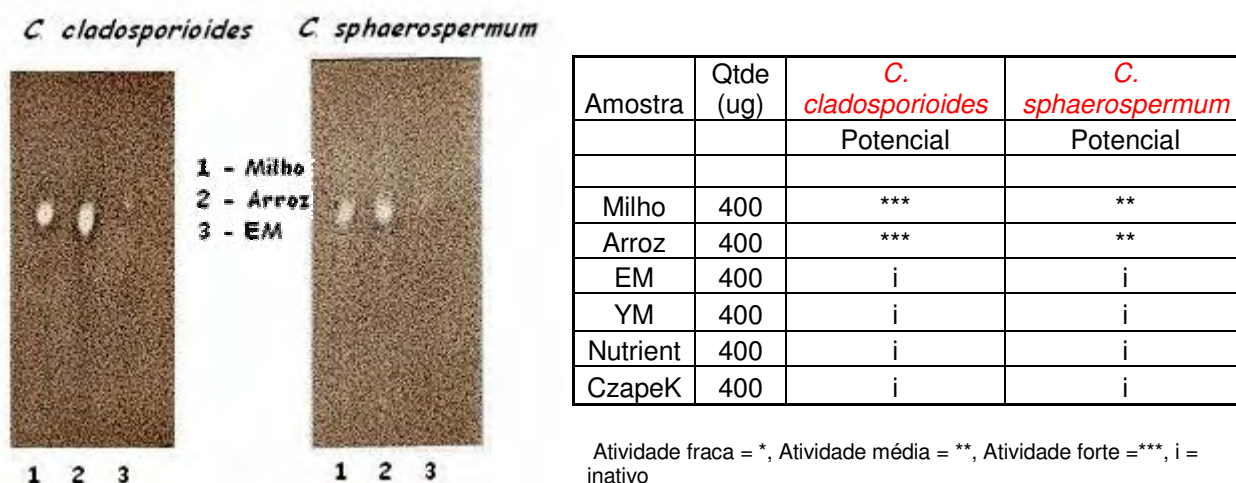


Figura 36: Ensaio de bioautografia com os extratos AcOEt produzidos por SC-04 em diferentes meios de cultura.

Os metabólitos isolados no estudo químico de SC-04 (Extrato AcOEt) foram avaliados quanto ao potencial antifúngico. As substâncias **1** e **3** inibiram parcialmente a linhagem *Cladosporium cladosporioides* e a substância **2** inibiu totalmente tanto *C. sphaerospermum* quanto *C. cladosporioides* (100 ug), mantendo atividade considerável até o limite de 25 ug.



Substância	Qtde	<i>C.cladosporioides</i>	<i>C.sphaerospermum</i>
		Potencial	Potencial
<u>1</u>	100ug	*	i
<u>2</u>	100ug	***	***
<u>3</u>	100ug	*	i

Atividade fraca = *, Atividade média = **, Atividade forte =***, i = inativo

Figura 37: Ensaio de bioautografia com os metabólitos produzidos por SC-04 em MBD.



	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (ug)					
Substância	100	50	25	10	5	1
<u>2</u>	***	**	*	i	i	i

	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (ug)					
Substância	100	50	25	10	5	1
<u>2</u>	***	**	*	i	i	i

Atividade fraca = *, Atividade média = **, Atividade forte =***, i = inativo

Figura 38: Ensaio para verificação do limite de detecção da atividade antifúngica de 2.

III.2 Detecção de metabólitos antioxidantes

III.2.1 Materiais e Métodos

A propriedade antioxidante pode ser identificada nas estruturas químicas que têm a capacidade de doar um hidrogênio radicalar (reação com quebra homolítica), estabilizando facilmente o elétron desemparelhado remanescente na sua estrutura, através de ressonância, sendo esse modelo geralmente observado em estruturas fenólicas.

Os extratos obtidos foram analisados quanto à atividade antioxidante frente ao composto difenilpicrilhidrazol (DPPH). Esta atividade foi observada quando o DPPH foi reduzido após reação com os compostos antioxidantes presentes nos extratos (SIMÕES-PIRES et al., 2005). Para esta análise, foram aplicados 400 µg de cada extrato sobre cromatoplacas de sílica. As cromatoplacas foram reveladas com solução metanólica 0,2% de DPPH e a atividade antioxidante evidenciada com a presença de manchas brancas ou amarelas decorrentes da redução do DPPH, contra a coloração púrpura de fundo.

III.2.2 Resultados da atividade antioxidante

Os resultados obtidos na análise dos extratos brutos produzidos pelos endofíticos isolados de *Styrax camporum* indicaram a presença de metabólitos com potencial antioxidantes, destacando-se os extratos produzidos por SC-04, SC-06 e SC-07 que apresentaram forte atividade antioxidante (Figura 39, pg. 82).

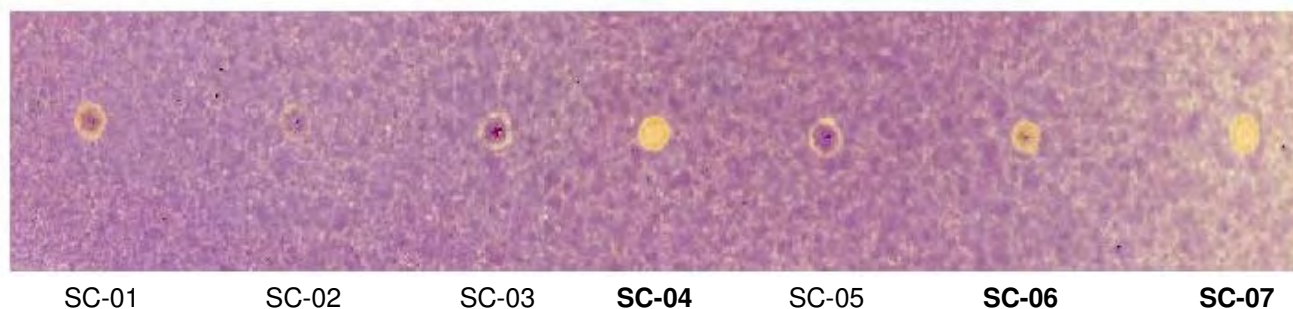


Figura 39: Cromatoplaca revelada com DPPH após aplicação dos extratos brutos produzidos pelos endofíticos isolados de *Styrax camporum* no ensaio de avaliação do potencial antioxidante.

Os extratos brutos produzidos pelo endofítico SC-04 em diferentes meios de cultura também foram ensaiados e os resultados obtidos indicam que, em meios de cultura ricos como MBD, EM e YM, a produção de metabólitos com potencial antioxidante é mais acentuada (Figura 40, pg. 83).

Arroz

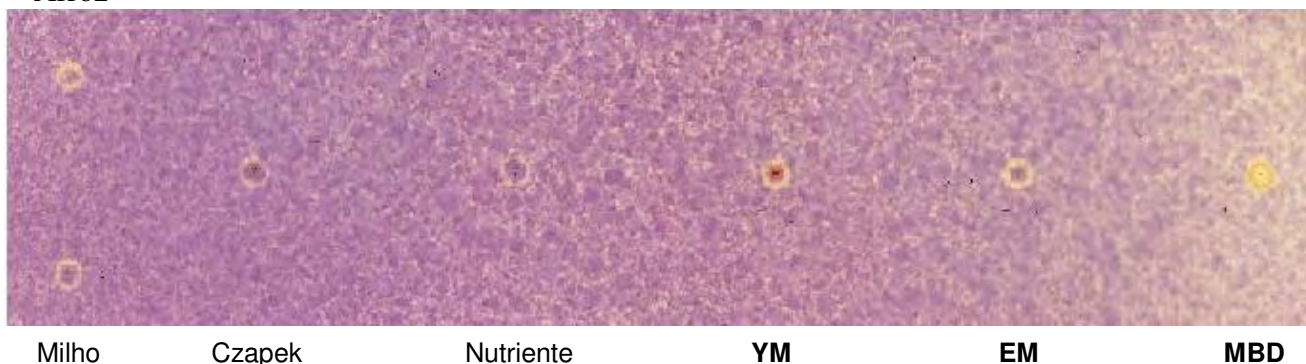


Figura 40: Cromatoplaça revelada com DPPH após aplicação dos extratos brutos produzidos pelo endofítico SC-04 em diferentes meios de cultura no ensaio de avaliação do potencial antioxidante.

III.3 Detecção de inibidores da enzima acetilcolinesterase

III.3.1 Materiais e Métodos*

A constatação da inibição da AChE é possível seguindo-se a metodologia de Marston, Kissling e Hostettmann (2002) para cromatografia em camada delgada fina. Neste ensaio o extrato foi dissolvido em metanol (80 mg/mL). Uma amostra de 200 µg (2,5 µL) do extrato foi analisada em CCD de sílica gel 60 F254 (0,2 mm, MERCK). Como controles positivos foram utilizados galantamina (1 µg) e fisostigmina (0,3 µg), dissolvidos em metanol. A placa foi eluída com a fase móvel CHCl₃:MeOH (9:1). Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com a solução da enzima acetilcolinesterase (Solução A) e o solvente evaporado novamente. A placa cromatográfica foi incubada em uma câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos, e em seguida borrifada com a solução D.

A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de mancha branca (indicação de inibição da reação enzimática), sobre um fundo de coloração roxa indica que houve inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase.

Os resultados são observados e fotografados em câmera fotográfica Epson e os valores de Rf calculados onde houver inibição da reação.

Solução A: Acetilcolinesterase (1000 U, Sigma, produto nº C2880) dissolvida em 150 mL do tampão Tris-HCl (0,05 M; pH=7.9), a solução estoque será armazenada a 4 °C, no momento do uso será adicionado 0,1% de albumina de soro bovino fração V;

Solução B: 250 mg de 1-naftil acetato em 100 mL de etanol;

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

Solução D: mistura de 10 mL da solução B + 40 mL da solução C.

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

III.3.2 Resultados da atividade inibidora de acetilcolinesterase

Dos extratos e substâncias ensaiadas, somente a substância **1** apresentou atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase:

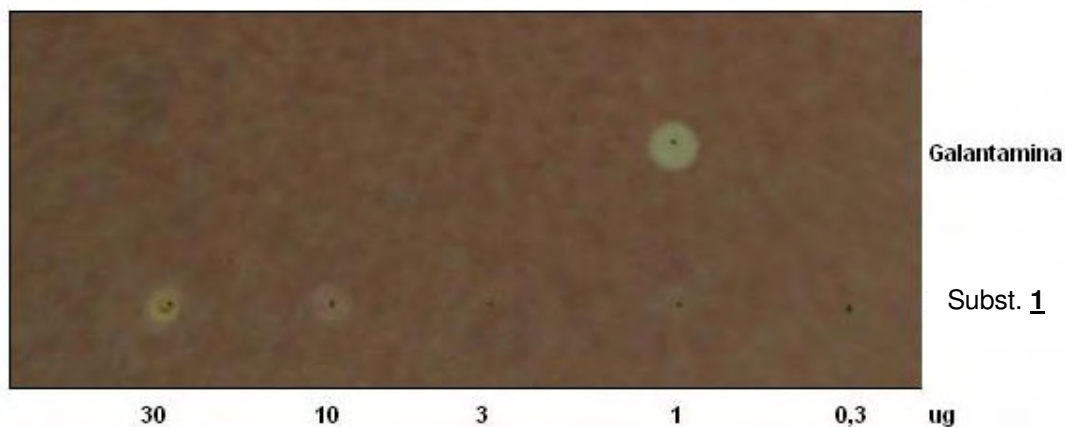


Figura 41: Ensaio anticolinesterásico com a substância **1**. Resultado positivo até 10 µg (alvos brancos).

III.4 Perfil de sensibilidade de *Mycobacterium tuberculosis* frente aos extratos obtidos

III.4.1 Materiais e Métodos*

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi feita através da técnica em microplaca utilizando Alamar Blue como revelador (MABA) frente à cepa de *M. tuberculosis* H₃₇R_v segundo metodologia proposta por Franzblau et al. (1998).

Em todos os orifícios da periferia de uma microplaca estéril de 96 orifícios foram depositados 200 µL de água destilada estéril, para evitar a evaporação durante a incubação na estufa. A isoniazida e os extratos foram eluídos em DMSO para se obter soluções de 4000 µL/mL e de 16000 µL/mL, respectivamente. Em seguida foram realizadas diluições destas soluções no caldo 7H9 (Middlebrook 7H9) de maneira a se obter concentrações variáveis de isoniazida (de 0,5 a 0,015 µg/mL) e dos extratos (de 4000 a 62,5 µg/mL). A cepa de *M. tuberculosis* H₃₇R_v – ATCC 27294 foi cultivada no caldo 7H9 a 37 °C até atingir turvação igual à escala McFarland nº 1.

A cultura foi diluída 25 vezes e inoculada (100 µL) em cada um dos orifícios contendo as soluções de isoniazida e dos extratos. As microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 37 °C por 6 dias. Após este período, adicionou-se o Alamar Blue (25 µL) aos orifícios controle da cepa micobacteriana. As placas foram incubadas por 24 horas e posteriormente realizou-se a leitura. A manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rósea, como de multiplicação do microrganismo. A CIM foi definida como a menor concentração da droga capaz de impedir a mudança da cor azul para rósea. (SATO, 1998).

*ensaio realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (Unesp) – Dep. de Ciências Biológicas pela aluna Karina A. de Prince sob responsabilidade da Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite.

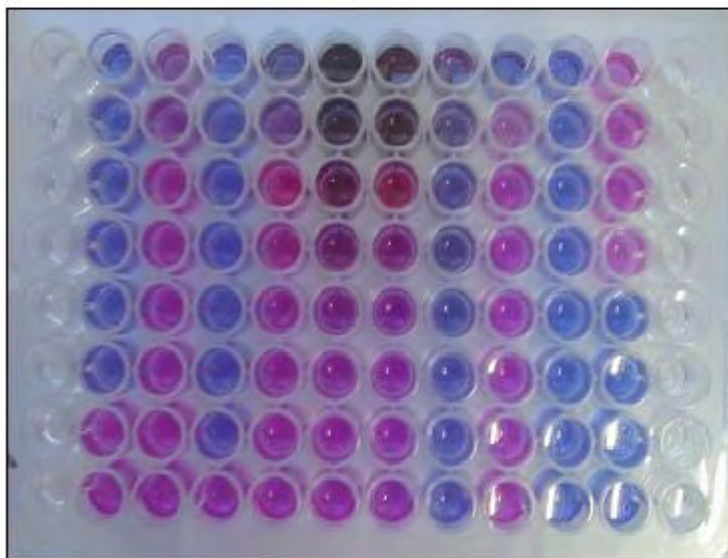


Figura 42: Microplate Alamar Blue Assay (MABA); cor rosa indica crescimento micobacteriano e cor azul indica inibição do crescimento.

III.4.2 Resultados da atividade antibacteriana

Tabela 10: CIM dos extratos produzidos pelos fungos isolados em MBD

Fungo	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
	> 250	250	125
SC-01	x		
SC-02	x	x	
SC-03	x	x	x
SC-04	x	x	x
SC-05	x	x	x
SC-06	x		
SC-07	x		

Tabela 11: CIM dos extratos produzidos por SC-04 em diferentes meios nutritivos.

Extrato	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
	> 250	250	125
MBD	x	x	x
EM	x		
Nu	x		
YM	x		
Czapek	*	*	*
Milho	x	x	x
Arroz	x	x	

* Não inibiu o crescimento bacteriano.

III.5 Discussão do perfil biológico dos endofíticos isolados

Os resultados obtidos evidenciaram a potencialidade dos fungos endofíticos como fonte de metabólitos bioativos, pois todos os extratos produzidos pelos isolados apresentaram atividade biológica como demonstrado no gráfico a seguir (Figura 43, pg. 87).

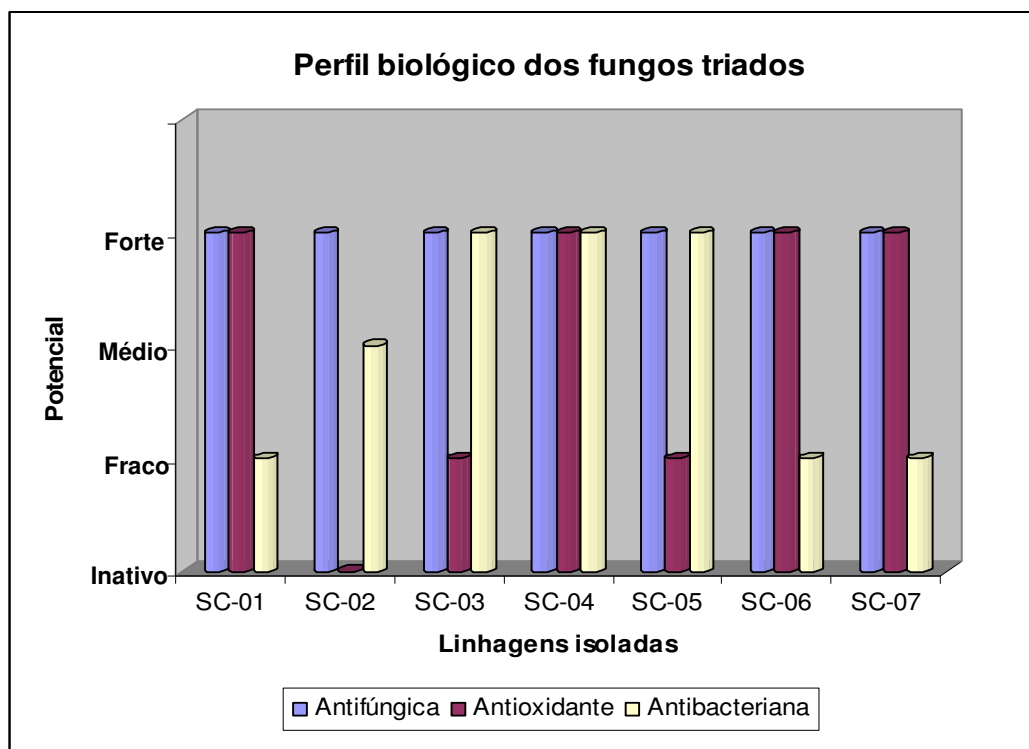


Figura 43: Perfil biológico dos fungos isolados.

A atividade antibacteriana observada nos extratos produzidos por SC-02 e SC-03 (*Phomopsis sp* e *P. stipata*) pode ser atribuída ao ácido 3-nitropropiónico majoritário, visto que, de acordo com Chomcheon, *et. al.* (2005), este ácido apresentou forte atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*. A diferença na CIM observada entre os dois extratos pode estar associada à concentração do ácido, sendo que pelos espectros de RMN ^1H (Fig. 52 e 53, pg. 108) verifica-se que SC-03 produz esta substância em maior quantidade que SC-02.

Devido a sua diversificada composição é provável que a ação antioxidante observada para os extratos brutos produzidos pelos endofíticos isolados seja resultante da ação sinérgica de várias substâncias, pertencentes a diferentes grupos químicos. Entretanto pôde-se observar que os extratos com maior potencial antioxidante foram os que apresentaram mais sinais na região de hidrogênios aromáticos e fenólicos. Os resultados obtidos são apenas qualitativos, pois dependem principalmente da concentração dos metabólitos contidos nos extratos ensaiados.

O potencial antifúngico apresentado pelos extratos produzidos pelos endofíticos isolados e a produção da substância **1** com atividade frente aos fungos

fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* por *Phomopsis stipata* dá indícios de que os endófitos associados com *Styrax camporum* se encontram em uma relação de simbiose, produzindo substâncias antifúngicas contra possíveis fungos fitopatogênicos.

III.6 Discussão do perfil biológico de *Phomopsis stipata* em diferentes cultivos

Na avaliação do perfil biológico de *P. stipata* quando cultivado em diferentes meios, observou-se que somente os extratos produzidos em meios de cultura complexos apresentaram atividade biológica significativa (gráfico a seguir). Dessa forma, pode-se sugerir que a atividade biológica está relacionada à “riqueza” do meio nutritivo, ou seja, quanto mais rico em nutrientes o meio de cultura utilizado, maior a atividade biológica observada.

O exposto acima se evidencia no baixo rendimento (em massa) obtido no cultivo de *P. stipata* em Czapek (meio de cultura mínimo composto apenas por sais inorgânicos e glicose) somado ao fato de que este extrato não apresentou atividade biológica em nenhum dos ensaios realizados.

Embora milho e arroz sejam meios de cultura naturais, *P. stipata* apresentou maior potencial biológico quando cultivado em MBD. Neste caso pode-se pensar em disponibilidade de nutrientes e não na variedade destes.

Os resultados obtidos evidenciam a potencialidade de *P. stipata* na produção de metabólitos bioativos e fixa o ponto de partida para a otimização de um crescimento em larga escala visto que neste estudo pode-se conhecer os fatores ótimos (em termos nutricionais) de crescimento deste endofítico visando à busca de moléculas com atividade biológica (Figura 44, pg. 89).

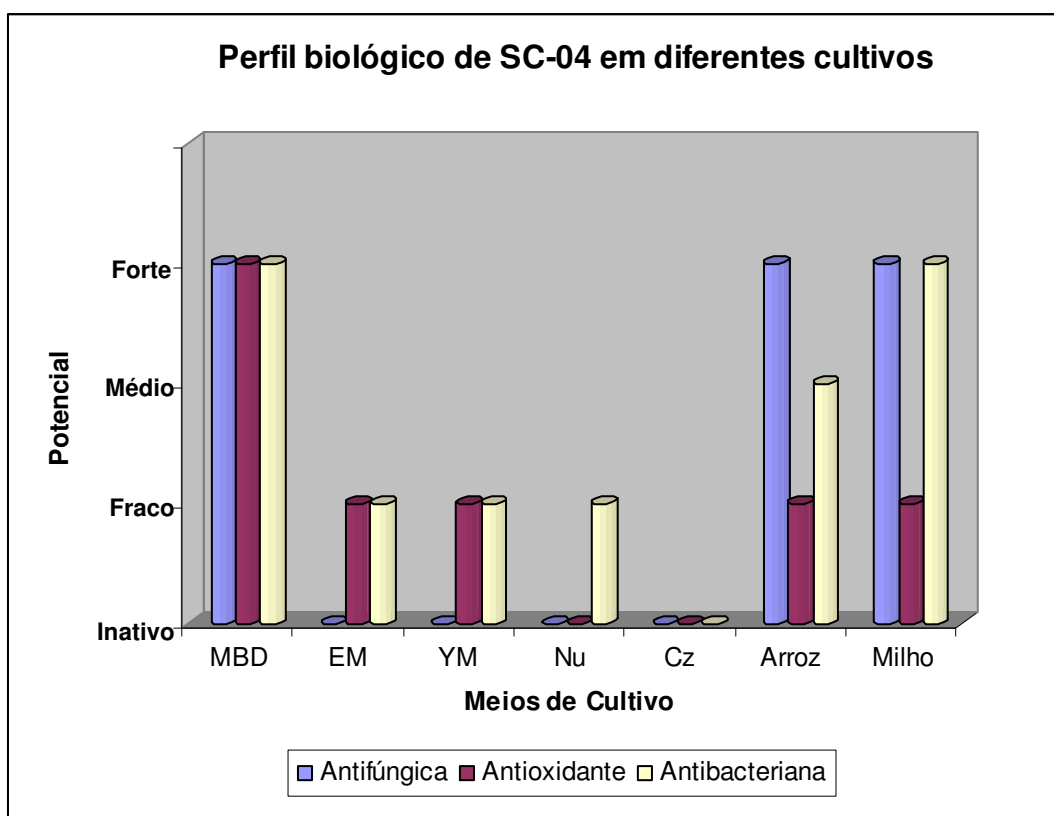


Figura 44: Perfil biológico de SC-04 em diferentes cultivos.

CONCLUSÕES

Análise do perfil químico (triagem) das sete linhagens (SC-01 a SC-07) isoladas das folhas de *Styrax camporum* permitiu a avaliação da complexidade e natureza química dos metabólitos produzidos pelos fungos, possibilitando a escolha do fungo *Phomopsis stipata* para cultivo em larga escala, além de fornecer dados (cromatogramas, espectros e resultados de bioensaios) que serão catalogados junto com os materiais obtidos para os outros fungos já estudados pelo grupo.

Análise dos dados obtidos na triagem dos fungos selecionados também permitiu a comparação entre eles, revelando que os sete fungos apresentam diferentes metabolismos, sendo que somente SC-02 e 03 apresentaram produção metabólica semelhante devido à produção do ácido 3-nitropropiónico majoritário em comum. Observou-se, também, a possível presença de substâncias aromáticas, aldeídicas ou fenólicas e metabólitos de alta a média polaridade em quase todos os extratos brutos analisados.

O estudo do perfil biológico das sete linhagens isoladas evidenciou a potencialidade dos fungos endofíticos como prolíficos produtores de metabólitos bioativos, sendo que os extratos produzidos pelos isolados de *Styrax camporum* apresentaram atividade biológica promissora frente aos ensaios para detecção de substâncias antifúngicas, antibacterianas e antioxidantes.

O fracionamento cromatográfico do extrato bruto produzido pelo fungo endofítico codificado SC-04 (*Phomopsis stipata*) permitiu o isolamento de três substâncias bioativas: **1**, **2** inéditas e **3** que se encontra em fase de determinação estrutural.

Considerando a natureza de média a alta polaridade das substâncias extraídas pela partição com AcOEt, foi de fundamental importância a submissão dos extratos brutos e frações à CLAE, verificando a adequação desta técnica cromatográfica no trabalho experimental, e também contribuir para o conhecimento da natureza química das substâncias presentes.

Os espectros de RMN ^1H dos extratos brutos foram determinantes para a avaliação da produção metabólica dos fungos e, portanto, foram fundamentais na seleção do fungo a ser estudado (*Phomopsis stipata*). Observaram-se espectros

ricos em sinais, abrangendo grande parte da largura espectral, e espectros que demonstraram a presença de uma substância majoritária.

A utilização do aparelho CLAE com detector em arranjo de diodos foi de fundamental importância no processo cromatográfico. Utilizando-se os softwares Aurora, PolyView e Interactive Graphics (propriedade Varian), foi possível obter os cromatogramas dos extratos brutos nos melhores comprimentos de onda, e também comparar as curvas de absorção na região de ultravioleta dos picos de interesse.

O cultivo do endofítico *Phomopsis stipata* em cereais (Milho e Arroz) e análise via CLAE e de RMN¹H dos extratos brutos obtidos revelou que, nestes meios de cultura complexos, a produção metabólica do endofítico é semelhante e, em comparação com o cultivo do endofítico em MBD, verifica-se a variação da produção metabólica e produção de triglicerídeos em grande quantidade. A utilização de cereais como meio de cultura mostrou uma série de vantagens (tempo de extração e custo reduzidos; procedimento experimental mais facilitado; etc.) em comparação com o cultivo em meios de cultura convencionais.

O estudo da variação da produção metabólica de *Phomopsis stipata* quando cultivado em diversos meios de cultura comerciais mostrou que este endofítico não apresenta exigências nutricionais visto que apresentou crescimento satisfatório em todos os meios testados. Análises dos espectros e cromatogramas dos extratos obtidos revelam a predominância de compostos de alta a média polaridade e baixa absorção no ultravioleta.

Embora *Phomopsis stipata* não tenha apresentado exigências nutricionais, para efeitos de crescimento miscelar, observou-se no estudo de seu perfil biológico que a produção de metabólitos bioativos possa estar relacionada à riqueza e disponibilidade de nutrientes do meio de cultura utilizado, visto que os extratos produzidos por *Phomopsis stipata* em meios de cultura complexos como MBD, Arroz e Milho apresentaram melhores resultados nos ensaios biológicos.

O estudo realizado neste trabalho mostrou que os fungos endofíticos são fontes ricas de novos metabólitos bioativos e que mais pesquisas neste nicho biológico se fazem necessárias, visto serem fontes ainda pouco exploradas.

Levando-se em consideração que os fungos triados foram isolados de folhas de um espécime saudável de *Styrax camporum*, e que todos os extratos apresentaram algum tipo de atividade nos ensaios biológicos realizados, a hipótese de uma simbiose endofítico-planta não pode ser descartada.

Referências

AINSWORTH, G. C.; SUSSMAN, A. S. (Ed.). **The fungi, an advanced treatise**. New York: Academic Press, 1995. v. 1, 748 p.

AINSWORTH, G. C.; SUSSMAN, A.S. (Ed.). **The fungi, an advanced treatise**. New York: Academic Press, 1996. v. 2, 805 p.

ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Ed.). **Microbiol ecology of leaves springer**. New York: Springer-Verlag, 1991.

ANIL, H. Isolation of styracitol and sucrose from fruit peels of *Styrax officinalis* L. **Doga**, v. 10 -12, p. 326-328, 1977.

ANIL, H. Benzoylbarringtonol C, a sapogenin from *Styrax officinalis*. **Phytochemistry**, v. 18, n. 1, p. 1760-1761, 1979.

ANIL, H. Four benzofuran glycosides from *Styrax officinalis*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 12, p. 2784-2786, 1980.

BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J. A. A. Antiulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta Medica**, v. 60, n. 1, p. 118-120, 1994.

BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J. A. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, v. 61, n. 1, p. 204-207, 1995.

BALBACH, A. **A flora nacional na medicina doméstica**. 4. ed. São Paulo: EDEL, 1976. v. 1, 396 p.

BECKER, H. *Phomopsis* eludes positive I.D.-until now. **Agricultural Research**, 1995.

BEGLEY, M. J.; GROVE, J. F. Metabolic products of *Phomopsis oblonga*. Part 1. 3a,5a,6,7,8,9,9a,9b-Octahydro-7,9b-dimethylnaphtho[1,2-c]furan-1(3H)-one (Oblongolide). **Journal of Chemical Society: Perkin Transactions I**, v. 1, p. 861-863, 1985.

BLOCH, A. B.; CAUTHEN, G. M.; ONORATO, I. M.; DANSBURY, K. G.; KELLY, G. D.; DRIVER, C. R.; SNIDER JÚNIOR, D. E. Nationwide survey of drug-resistant tuberculosis in the United States. **JAMA**, v. 271, n. 9, p. 665-671, 1994.

BRAGA, J. U.; BARRETO, A. M. W.; HIJAR, M. A. Nationwide survey of drug resistance in Brazil. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 3, p. S-121, 1999. Supplement 1.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, a new pentakide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 10, p. 1447-1448, 2000.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

CARROLL, G. C. Fungus endophytes in steams and larvae: from latent pathogens to mutualistic symbiot. **Ecology**, v. 69, n. 1, p. 2-9, 1988.

CARROLL, G. C. Fungal mutualism. In: CARROLL, G. C.; WICKLOW, D. T. (Ed.). **The fungal community: its organization and role in the ecosystem**. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 327-354.

CASA, C. La; VILLEGAS, I.; LASTRA, A. DE LA; MOTILVA, V.; CALERO, M. J. M. Evidence for protective and antioxidant of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1, p. 45-53, 2000.

CHEUNG, L. M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v. 80, n. 2, p. 249-255, 2003.

CHOMCHEON, P.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; NGAMROJANAVANICH, N.; ISARANGKUL, D.; KITTAKOOP, P. 3-Nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from endophytic fungi: is a 3-NPA in some plants produced by endophytes? **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 7, p. 1103-1105, 2005.

COHN, D. L.; BUSTREO, F.; RAVIGLIONE, M. C. Drug-resistant tuberculosis: review of de worldwide situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. S121-130, 1997. Supplement 1.

COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958. 74 p.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Cândida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COUTO, W. J.; BRANCO, J. N. R.; ALMEIDA, D.; CARVALHO, A. C.; VICK, R.; TELES, C. A.; AGUIAR, L. F.; BUFFOLO, E. Transplante cardíaco e infecção. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 16, n. 2, p. 141-151, 2001.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1968. v. 1, p. 738-739.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CULVENOR, C. C. J.; EDGAR, J. A.; MACKAY, M. F.; GORST-ALLMAN, C. P.; MARASAS, W. F. O.; STEYN, P. S.; VLEGGAR, R.; WESSELS, P. L. Structure elucidation and absolute configuration of phomopsin A, a hexapeptide mycotoxin produced by *Phomopsis leptostromiformis*. **Tetrahedron**, v. 45, n. 8, p. 2351-2372, 1989.

CUTLER, H. G.; HIMMELSBACH, D. S.; ARRENDALE, R. E.; COLE, P. D.; COX, R. D. Koninginin A: a novel plant growth regulator from *Trichoderma koningii*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 2604-2611, 1989.

CUTLER, H. G.; HIMMELSBACH, D. S.; YAGEN, B.; ARRENDALE, R. F.; JACYNO, J. M.; COLE, P. D.; COX, R. H. Koninginin B : a biologically active congener of koninginin A from *Trichoderma koningii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 977-980, 1991.

CUTLER, H. G.; CUTLER, S. J.; ROSS, S. A.; EL SAYED, K.; DUGAN, F. M.; BARTLETT, M. G.; HILL, A. A.; HILL, R. A.; PARKER, S. R. Koninginin G, a new metabolite from *Trichoderma aureoviride*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 1, p. 137-139, 1999.

DANTI, R.; SIEBER, T. N.; SANGUINETI, G.; RADDI, P.; Di LONARDO, V. Decline in diversity and abundance of endophytic fungi in twigs of *Fagus sylvatica* L. after experimental long-term exposure to sodium dodecylbenzene sulphonate (SDBS) aerosol. **Environmental Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 696-702, 2002.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 6, p. 499-514, 2000.

DREYFUSS, M. M.; CHAPELA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel low-molecular weight pharmaceuticals. In: GULLO, V. P. **The discovery of natural products with therapeutic potential**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994. cap. 3, p. 49-80.

FARR, D. F.; CASTLEBURY, L. A.; ROSSMAN, A. Y.; PUTNAM, M. L. A new species of *Phomopsis* causing twig dieback of *Vaccinium vitis-idaea* (lingonberry). **Mycological Research**, v. 106, n. 6, p. 745-752, 2002.

FINDLAY, J. A.; LI, G.; PENNER, P. E. Novel diterpenoid insect toxins from a conifer endophyte. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 197-200, 1995.

FINDLAY, J. A.; JOHNSON, J. A. Bioactive compounds from an endophytic fungus from eastern larch (*Larix laricina*) needles. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 75, n. 6, p. 716-719, 1997.

FRAZBLAU, S. G.; WITZIG, R. S.; McLAUGHLIN, J. C.; TORRES, P.; FUENTES, P.; COOK, M. B.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M. T.; QUENZER, V. K.; FEERGUSON, R. M.; SHEEN, P.; GILMAN, R. H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 362-366, 1998.

FURTADO, N. A. J. C. **Estudo sobre as condições de produção e as atividades antibiótica e antichagásica de substâncias isoladas de *Aspergillus fumigatus***. 2004. 293 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

GARCIA, M. L. G.; GÓMEZ, J. L. V.; SANCHO, M. C. G.; ÁLVAREZ, R. A. S.; ZACARIAS, F.; AMOR, J. S. Epidemiología del SIDA y la tuberculosis. **Boletín De La Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 116, n. 6, p. 546-564, 1994.

GARDNER, W. A.; McCOY, C. W. Inseticides and herbicides. In: FINKELSTEIN, D. B.; BALL, C. **Biotechnology of filamentous fungi: technology and products**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. p. 335-359.

GIESBRECHT, A. M.; ALVARENGA, M. A. D.; SILVA, J. J.; PANIZZA, S. Presença de homoeogonol de *Styrax camporum*. **Anais de Química e Farmácia**, v. 25, p. 55-57, 1985.

GILG, E. **Botânica aplicada a la farmácia**. 6. ed. Buenos Aires: Labor, 1926. p. 437-438.

GLOER, J. B. The chemistry of fungal antagonism and defense. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. S1265-S1274, 1995. Supplement 1.

GRAEFE, E. U.; DERENDORF, H.; VEIT, M. Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. **The International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 37, n. 5, p. 219-233, 1999.

GROVE, J. F. Metabolic products of *Phomopsis oblonga*. Part 2. Phomopsolide A and B, tiglic esters of two 6-substituted 5,6-dihydro-5-hydroxypyran-2-ones. **Journal of Chemical Society: Perkin Transactions I**, v. 1, p. 865-869, 1985.

HALL III, C. A.; CUPPERT, S. L. Structure-activities of natural antioxidants. In: ARUOMA, O. I.; CUPPERT, S. L. (Ed.). **Antioxidant methodology in vivo and in vitro concepts**. Illinois: AOCS Press, 1997. p. 141-172.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARBORNE, J. B. Recent advances in chemical ecology. **Natural Product Reports**, v. 10, p. 327-348, 1993.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HOAGLAND, R. E. Microbes and microbial products as herbicides: an overview. In: HOAGLAND, R. E. (Ed.). **Microbes and microbial products as herbicides**. Washington: American Chemical Society, 1990. p. 2-52.

HOMANS, A. L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v. 51, n. 2, p. 327-329, 1970.

HORN, W. S.; SIMMONDS, M. S. J.; SCHWARTZ, R. E.; BLANEY, W. M. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. **Tetrahedron**, v. 51, p. 3969-3978, 1995.

HUTCHISON, L. J.; MADZIA, S. E.; BARRON, G. L. The presence and antifeedant function of toxin producing secretory cells on hyphae of the lawn-inhabiting agaric *Conocybe lactea*. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, n. 3, p. 431-434, 1996.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 7. ed. São Paulo: Nacional, 1985. p. 219-221.

KAUR, C.; KAPPOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, p. 703-725, 2001.

KITAGAWA, I.; MAKURA, Y.; HAYASHI, T.; YOSIOKA, I. Structure of deacyljegosaponin a common derivative of jegosaponen isolated from pericarps of *Styrax japonica*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, p. 1675-1677, 1974.

KONGSAEREE, P.; PRABPAI, S.; SRIUBOLMAS, N.; VONGVEIN, C.; WIYAKRUTTA, S. Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotrichum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 5, p. 709-711, 2003.

KONIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; AUST, H. J.; DRAGER, S.; SCHULZ, B. Genticulol, a new biologically active diterpene from the endophytic fungus *Geniculosporium* sp. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 1, p. 155-157, 1999.

LEE, J.; KOO, N.; MIND, D. B. Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 21-33, 2004.

LIU, G.; WANG, Z. First total synthesis of (+)-Koninginin D. **Chemical Communications**, v. 1, n. 1, p. 1129-1130, 1999.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1998. p. 332.

MARSTON, A.; KISSLING, 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.

MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; PROVAN, G. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 3, p. 323-330, 2002.

MASUREKAR, P. S. Therapeutic metabolites. In: FINKELSTEIN, D. B.; BALL, C. **Biotechnology of filamentous fungi**: technology and products. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. p. 241-301.

McMACKEN, M.; CASTRO, K. G. La tuberculosis y el vírus de la inmunodeficiencia humana em los Estados Unidos, 1985-1992. **Boletín De La Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 117, n. 1, p. 77-83, 1994.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. DA S. J. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

NAKANO, T.; HASEGAWA, M.; FUKUMAM, T.; TOBINAGA, S. The structure of Jegosapogenol. **Tetrahedron Letters**, v. 4, p. 365-371, 1967.

NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

OLIVEIRA JUNIOR, L.; PINTO NETO, N.; FERRARI, A. Filtros solares derivados de extratos vegetais. **Aerosol & Cosméticos**, v. 16, n. 99, p. 43-48, 1996.

ORTIZ, H. N.; GIACOPINI, M. I.; ALFONSO, C.; BOSCH, V. Efecto antioxidante del tomate (*Lycopersicum escaletum* Mill) en la lipoproteína de alta densidad (HDL) y en los microsomas hepático de la rata. **Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica**, v. 22, n. 1, p. 1-12, 2003.

PARKER, S. R.; CUTLER, H. G.; SCHREINER, P. R. Koninginin C : a biologically active natural product from *Trichoderma koningii*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 6, p. 1126-1127, 1995.

PARKER, S. R.; CUTLER, H. G.; SCHREINER, P. R. Koninginin E : isolation of a biologically active natural product from *Trichoderma koningii*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 9, p. 1747-1749, 1995.

PETRINI, O.; CARROL, G. Endophytic fungi in foliage of some cupressaceae in Oregon. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p. 629-636, 1981.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N. J. J.; VAN DEN HEUVAL, J. (Ed.). **Microbiology of the phylosphere**. Cambridge: University Press Cambridge, 1986. p. 175-187.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Ed.). **Microbiol ecology of leaves springer**. New York: Springer-Verlag, 1991. cap. 9, p. 179-197.

PFENNING, L. H. **Introdução a micologia**. Lavras: UFLA, 2000. 38 p.

PRIETA, J.; MORENO, A.; DÍAZ, S.; SUAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by the diphasic dialysis membrane procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1701-1703, 1994.

RAVIGLIONE, M. C.; DYE, C.; SCHMIDT, S.; KOCHI, A. WHO global surveillance and monitoring project. Assessment of worldwide tuberculosis control. **Lancet**, v. 350, n. 9078, p. 624-629, 1997.

REYNOLDS, J. E. F. **Martindale: the extra pharmacopeia**. 31 st ed. London: Royal Pharmaceutical Society, 1996. p. 1756.

RIFFLE, J. W. Effect of an *Aphelenchoides* species on growth of a mycorrhizal and a pseudomycorrhizal fungus. **Phytopathology**, v. 57, n. 6, p. 541-544, 1967.

RIFFLE, J. W. Effects of nematodes on root-inhabiting fungi. In: HACSKAYLO, (Ed.). **Mycorrhizae: proceedings 1st North American Conference on Mycorrhizae**. Washington: USDA Forest Service Misc. Publ., 1971. p. 97-113.

RIZZINI, C. T.; MORS, B. W. **Botânica econômica brasileira**. São Paulo: EPU, 1976. p. 42.

SATO, D. N. **Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* de compostos derivados do ácido isonicotínico frente ao *Mycobacterium tuberculosis***. 1998. 99 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SHEARER, C. A.; ZARE-MAIVAN, H. *In vitro* hyphal interactions among wood- and leaf-inhabiting ascomycetes and fungi imperfecti from freshwater habitats. **Mycologia**, v. 80, p. 31-37, 1988.

SIMÕES-PIRES, C. A.; QUEIROZ, E. F.; HENRIQUES, A. T.; HOSTETTMANN, K. Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 307-314, 2005.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, v. 260, n. 1, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 1, p. 535-544, 2003.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

STRONGMAN, D. B.; MILLER, J. D.; CALHOUN, L.; FINDLAY, J. A.; WHITNEY, N. J. The biochemical basis for interference competition among some lignicolous marine fungi. **Botany**, v. 30, p. 21-26, 1987.

STRUNZ, G. M.; KAKUSHIMA, M.; STILLWELL, M. A. Scytalidin: a new fungitoxic metabolite produced by a *Scytalidium* species. **Journal of the Chemical Society: Perkin Transactions I**, v. 18, n. 1, p. 2280-2283, 1972.

SUGAR, D.; ROBERTS, R. G.; HILTON, R. J.; RIGHETTI, T. L.; SANCHEZ, E. E. Integration of cultural methods with yeast treatment for control of post-harvest fruit decay in pear. **Plant Disease**, v. 78, n. 7, p. 791-795, 1994.

SYDENHAM, E. W.; VISMER, H. F.; MARASAS, W. F.; BROWN, N. L.; SCHLECHTER, M.; RHEEDER, J. P. The influence of deck storage and initial processing on patulin levels in apple juice. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, n. 5, p. 429-434, 1997.

TAKANASHI, M.; TAKIZAWA, Y.; MITSUHASHI, T. 5-(3-hydroxypropyl)-2-(3',4'-metylenedioxyphenyl) benzofuran. New benzofuran from *Styrax obassis*. **Chemistry Letters**, v. 8, p. 869-871, 1974.

TAKANASHI, M.; TAKIZAWA, Y. New benzofurans related to egonol from immature seeds of *Styrax obasia*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 1, p. 1224-1226, 1988.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

TOMAN, K. **Tuberculosis**: case-finding and chemotherapy: questions and answers. Geneva: World Health Organization, 1979.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V.; MEENT, M. V.; RHEE, I. K.; VERPOORTE, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.

TREVISAN, M. T. S.; BEZERRA, M. Z. B.; SANTIAGO, M. P.; FEITOSA, C. M.; VERPOORTE, R.; BRAZ FILHO, R. Atividades larvídica e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 415-418, 2006.

TSANTRIZOS, Y. S.; OGILVIE, K. K.; WATSON, A. K. Phytotoxic metabolites of *Phomopsis convolvulus*, a host-specific pathogen of field bindweed. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 2276-2284, 1992.

ULUBELEN, A.; SAIKI, Y.; LOTTER, H.; CHARI, V. M.; WAGER, H. Chemical components of *Styrax officinalis* - the structure of a new oligan styraxin. **Planta Medica**, v. 34, p. 403-407, 1978.

WAGENAAR, M. M.; CLARDY, J. Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimmers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an endangered mint. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 1, p. 1006-1009, 2001.

WENG, X. L.; REN, G. P.; DUAN, S.; DONG, X. W.; JIANG, A. L. Screening of natural antioxidantes from chinese medicines, herbs and spices. **Journal of Chinese Cereals and Oils Association**, v. 13, p. 46-48, 1998.

WICKLOW, D. T. Interference competition. In: CARROLL, G. D.; WICKLOW, D. T. (Ed.). **The fungal community: its organization and role in the ecosystem**. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 265-274.

WICKLOW, D. T.; HIRSCHFIELD, B. J. Competitive hierarchy in post-fire ascomycetes. **Mycologia**, v. 71, p. 47-54, 1979.

WYSS, G. S.; CHARUDATTAN, R.; ROSSKOPF, E. N.; LITTELL, R. C. Effects of selected pesticides and adjuvants on germination and vegetative growth of *Phomopsis amaranthicola*, a biocontrol agent for *Amaranthus* spp. **European Weed Research Society**, v. 44, p. 469-482, 2004.

Atividades Extras e Curriculares

Disciplinas cursadas

- **Química Orgânica Avançada**

Ministrado por: Profa. Dra. Ângela Regina Araújo e Prof. Dr. Wagner Villegas (IQ-Unesp-Araraquara)

1º semestre 2004 – 12 créditos

Conceito final: B

- **Métodos Espectrométricos I**

Ministrado por: Prof. Dr. Wagner Villegas (IQ-Unesp-Araraquara)

1º semestre 2004 – 12 créditos

Conceito final: A

- **Métodos de Purificação e Análise de Produtos Naturais**

Ministrado por: Prof. Dr. Alberto J. Cavalheiro (IQ-Unesp-Araraquara)

1º semestre 2004 – 12 créditos

Conceito final: B

Participações em Congressos

- **27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e Congresso Latino-americano de Química (Salvador – 30 de Maio a 02 de Junho de 2004)**

Apresentação do trabalho: *Novos metabólitos antifúngicos produzidos pelo fungo endofítico XYA-04 isolado das folhas de Xylopia aromatica.*

Outros

- **Estágio Docência Junto à Disciplina Química Analítica Orgânica (Parte Experimental) Oferecida ao Curso Bacharelado em Química**

Início em 09/2004 – término em 12/2004 – 04 horas semanais

Conceito final: A

Anexos

Figuras (Cromatogramas e Espectros)

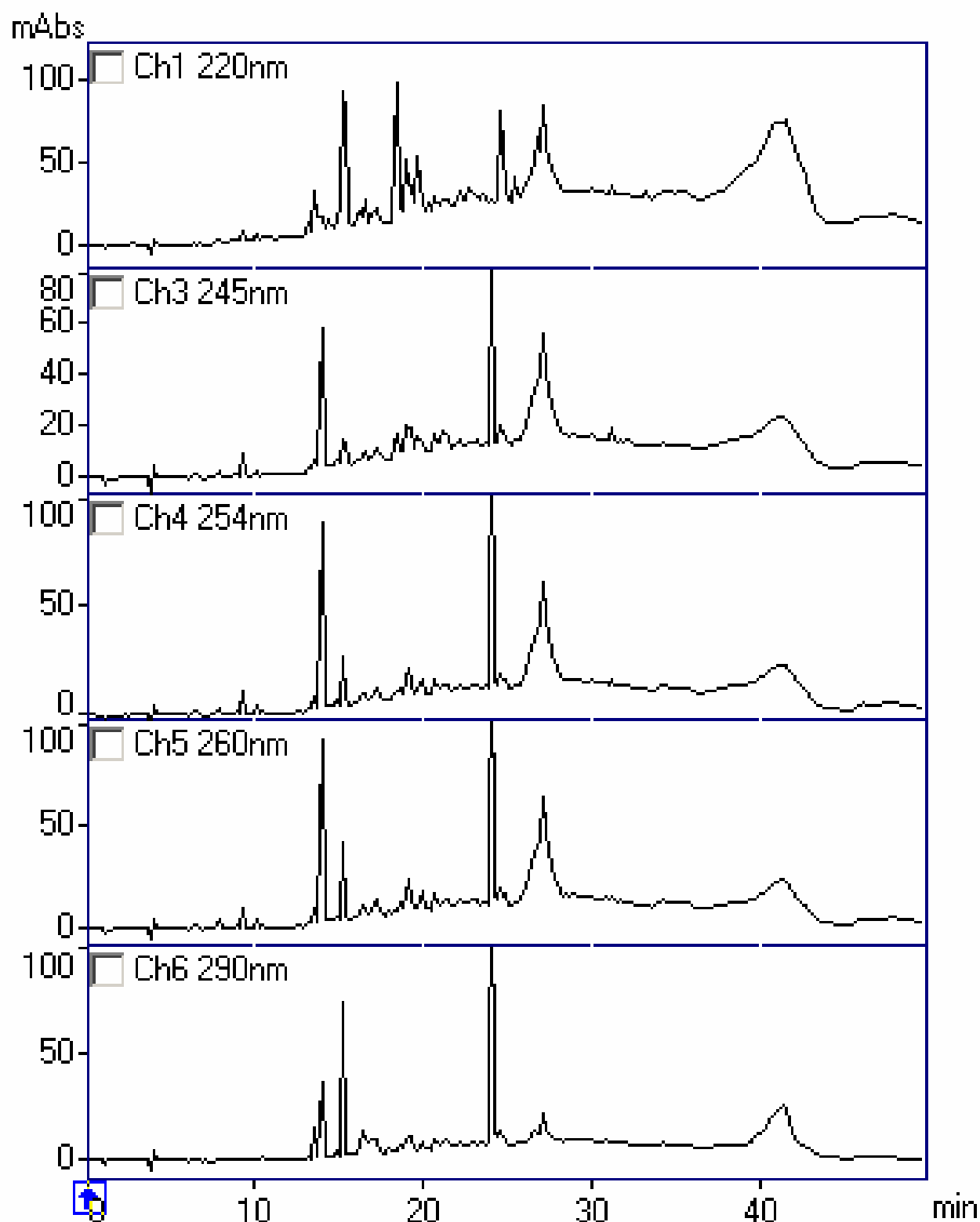


Figura 45: Cromatogramas em gradiente exploratório do extrato bruto AcOEt produzido por SC-04 em MBD em larga escala ($H_2O/MeOH$ 95:5 a 0:100 em 40 min a 1,0 mL/min.).

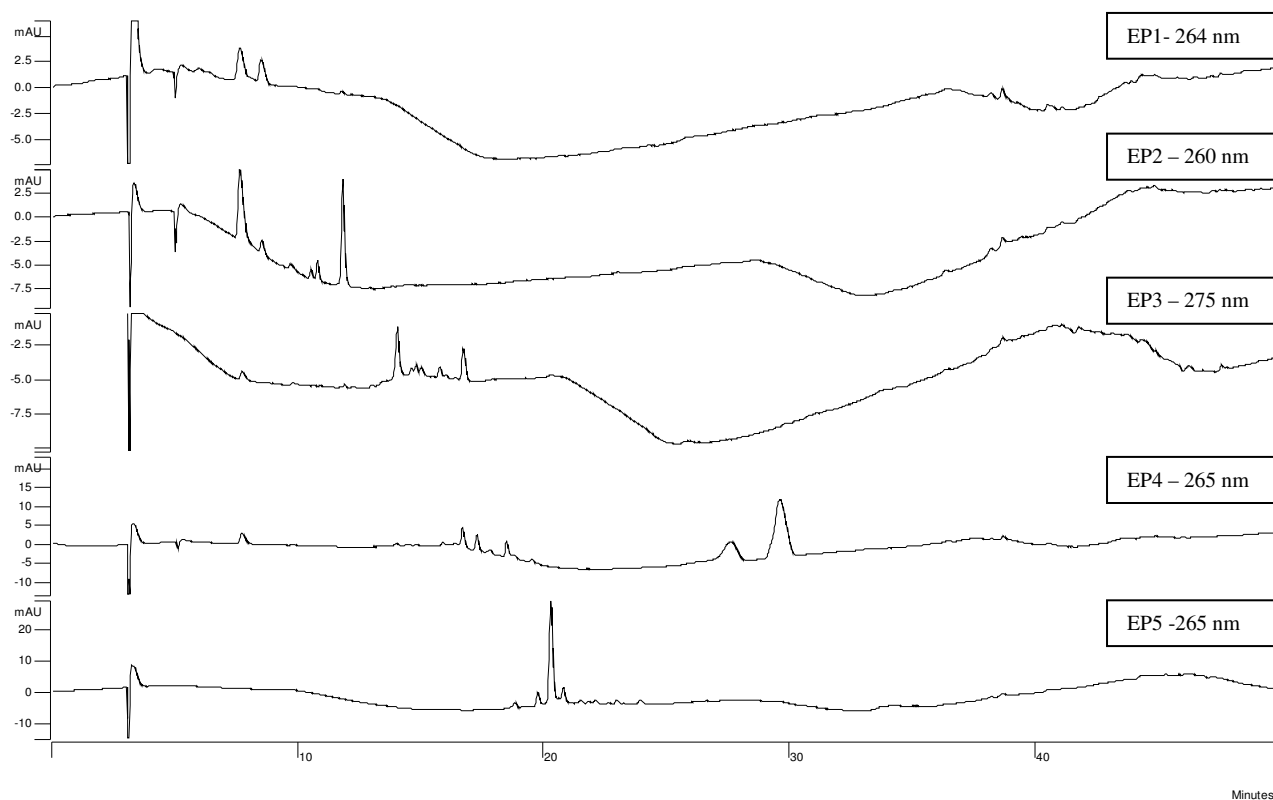


Figura 46: Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos parciais **EP1** a **EP5** ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 95:5 a 0:100 em 40 mim a 1,0 mL/mim.) obtidos do fracionamento do extrato bruto produzido por SC-04 em MBD.

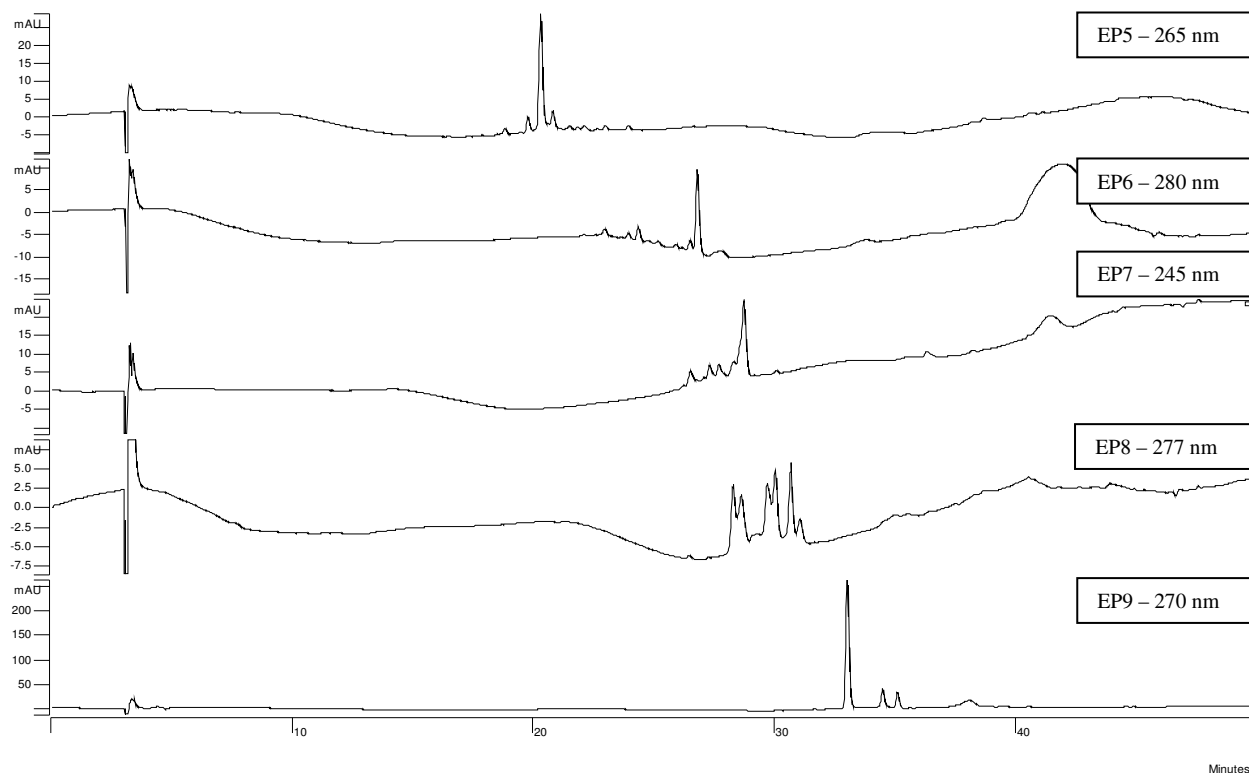


Figura 47: Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos parciais **EP5** a **EP9** ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 95:5 a 0:100 em 40 mim a 1,0 mL/mim.) obtidos do fracionamento do extrato bruto produzido por SC-04 em MBD.

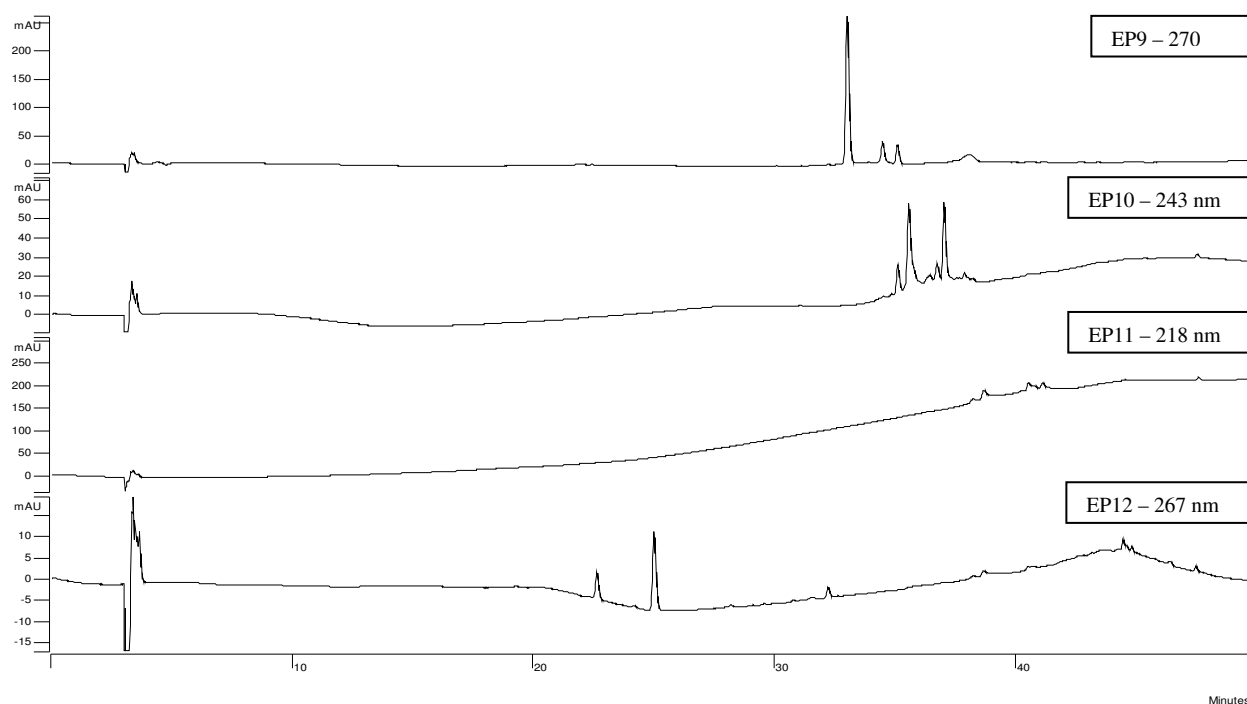


Figura 48: Cromatogramas em gradiente exploratório dos extratos parciais **EP9** a **EP12** ($H_2O/MeOH$ 95:5 a 0:100 em 40 mim a 1,0 mL/mim.) obtidos do fracionamento do extrato bruto produzido por SC-04 em MBD.

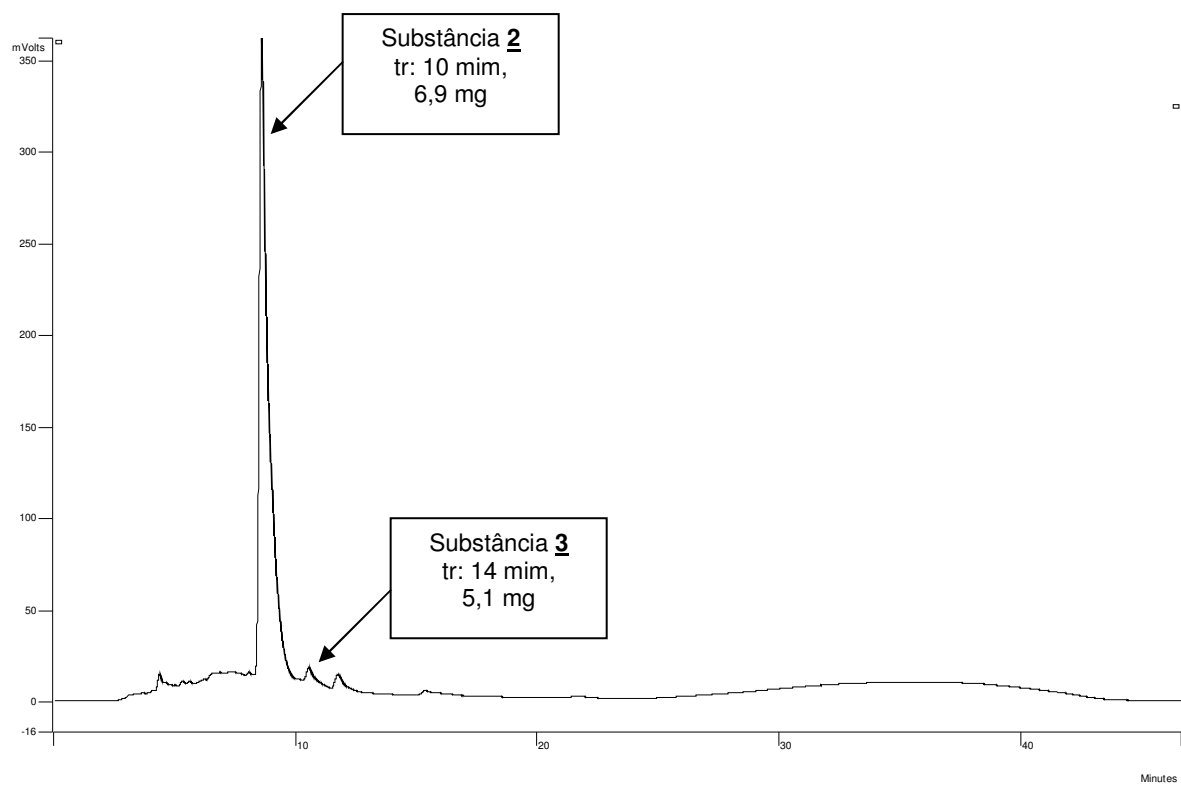


Figura 49: Cromatograma em sistema isocrático do extrato parcial **EP9** ($H_2O/MeOH$ 40:60 em 45 mim a 270 nm com fluxo de 1,0 mL/mim.).

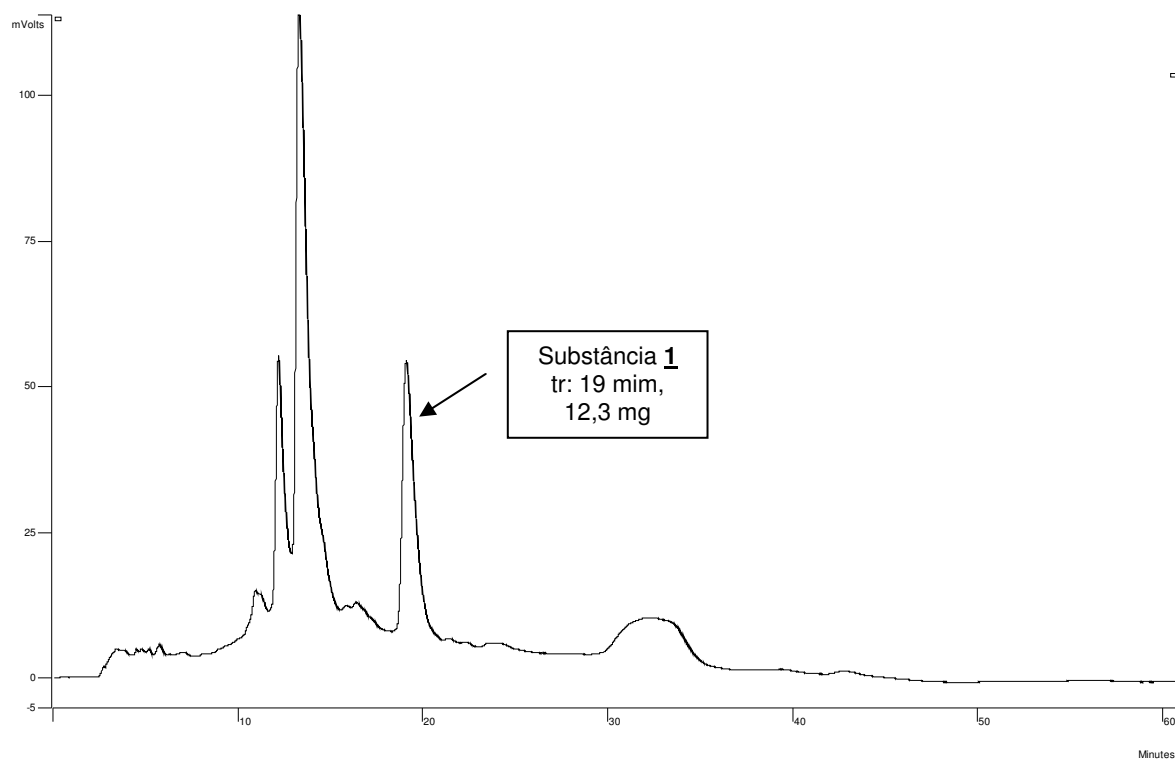


Figura 50: Cromatograma em sistema isocrático do extrato parcial **EP10** (H₂O/MeOH 35:65 em 60 mim a 243 nm com fluxo de 1,0 mL/mim.).

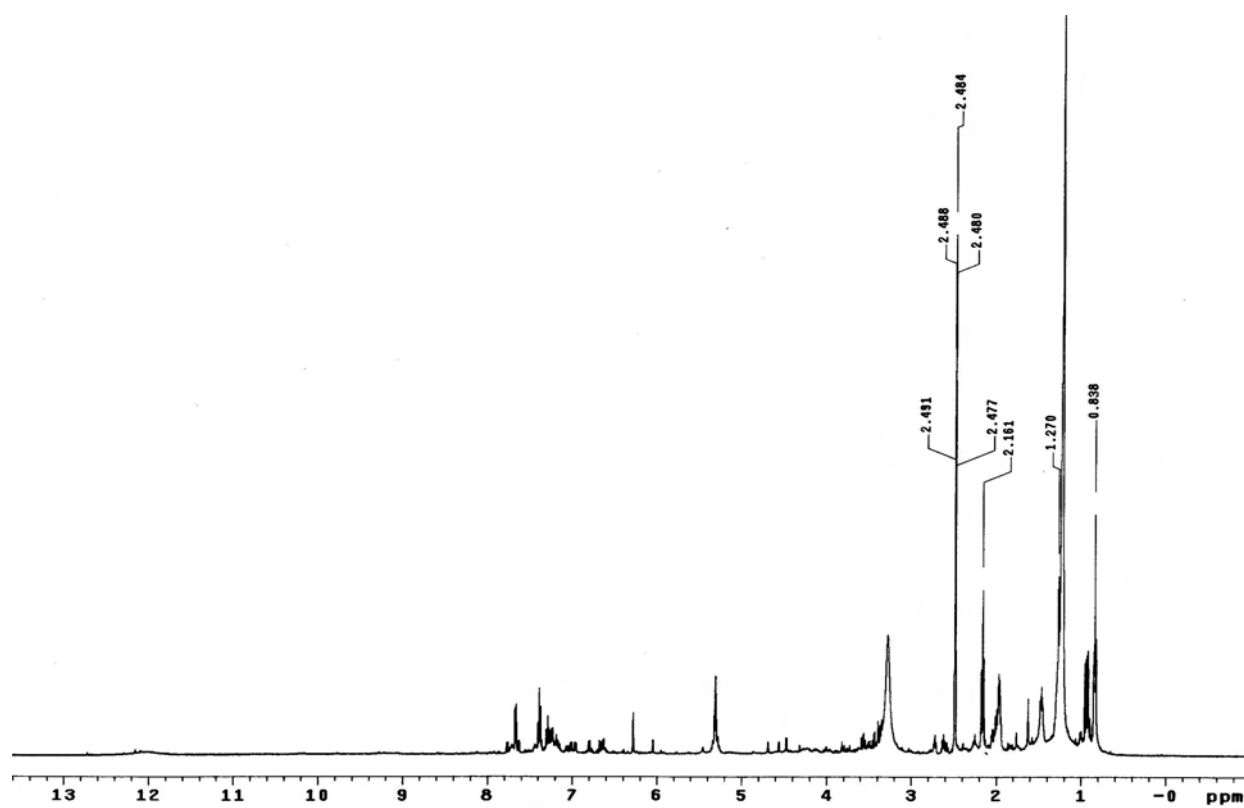


Figura 51: Espectro de RMN de ¹H em DMSO-d₆ do extrato bruto produzido pelo fungo **SC-01**

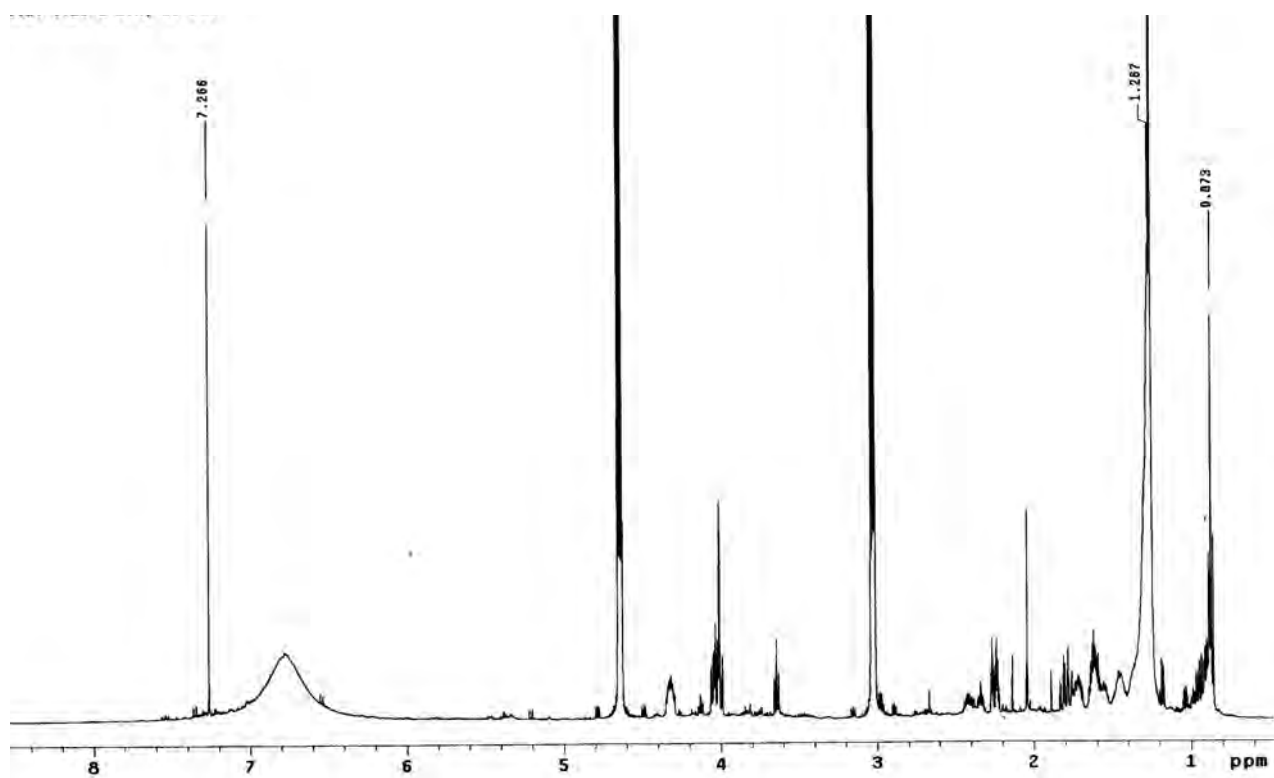


Figura 52: Espectro de RMN de ¹H em CDCl₃ do extrato bruto produzido pelo fungo **SC-02**

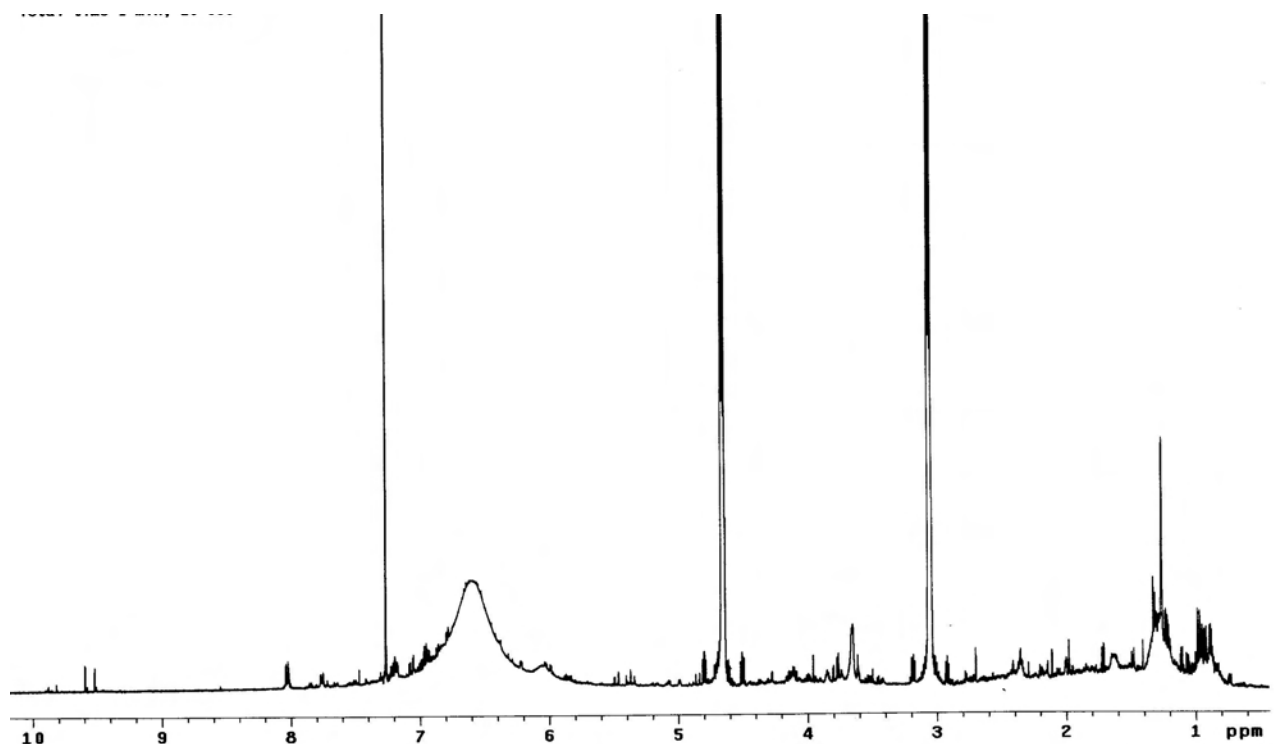


Figura 53: Espectro de RMN de ¹H em CDCl₃ do extrato bruto produzido pelo fungo **SC-03**

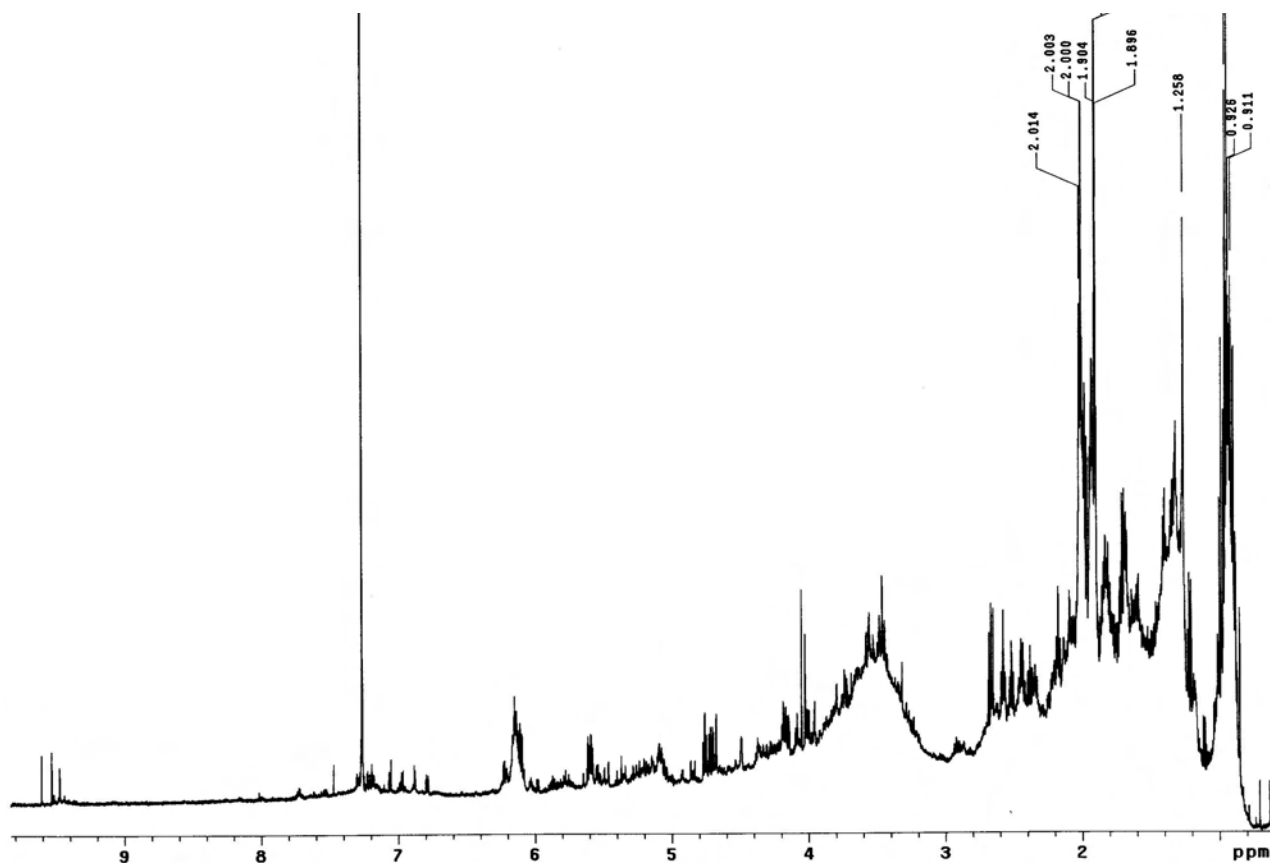


Figura 54: Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 do extrato bruto produzido pelo fungo SC-04

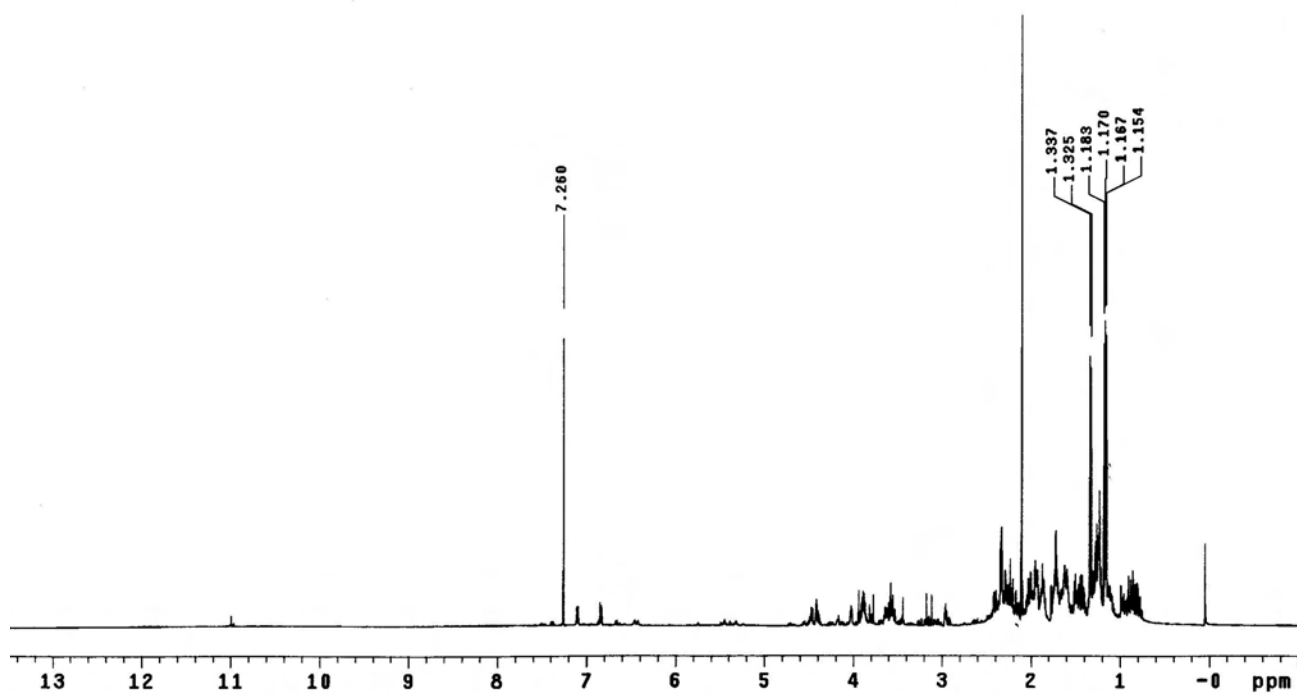


Figura 55: Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 do extrato bruto produzido pelo fungo SC-05

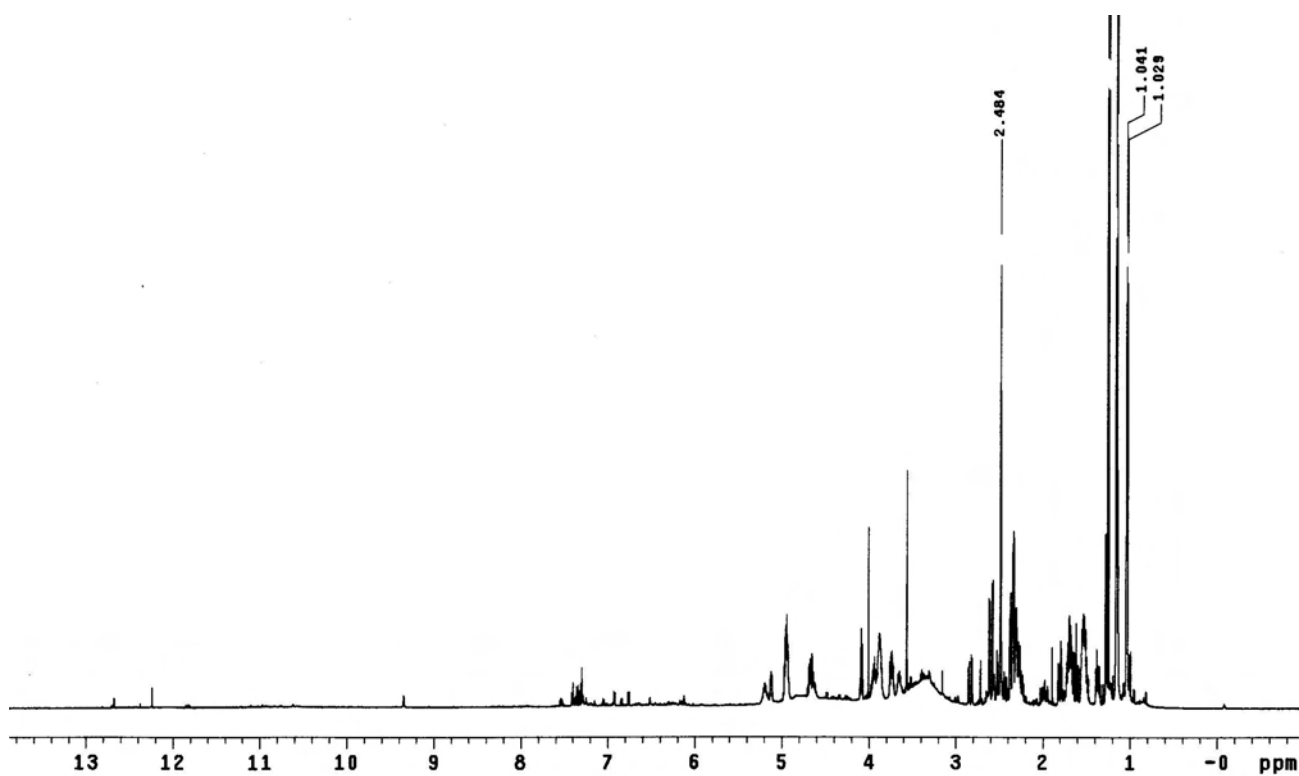


Figura 56: Espectro de RMN de ^1H em DMSO-d_6 do extrato bruto produzido pelo fungo SC-06

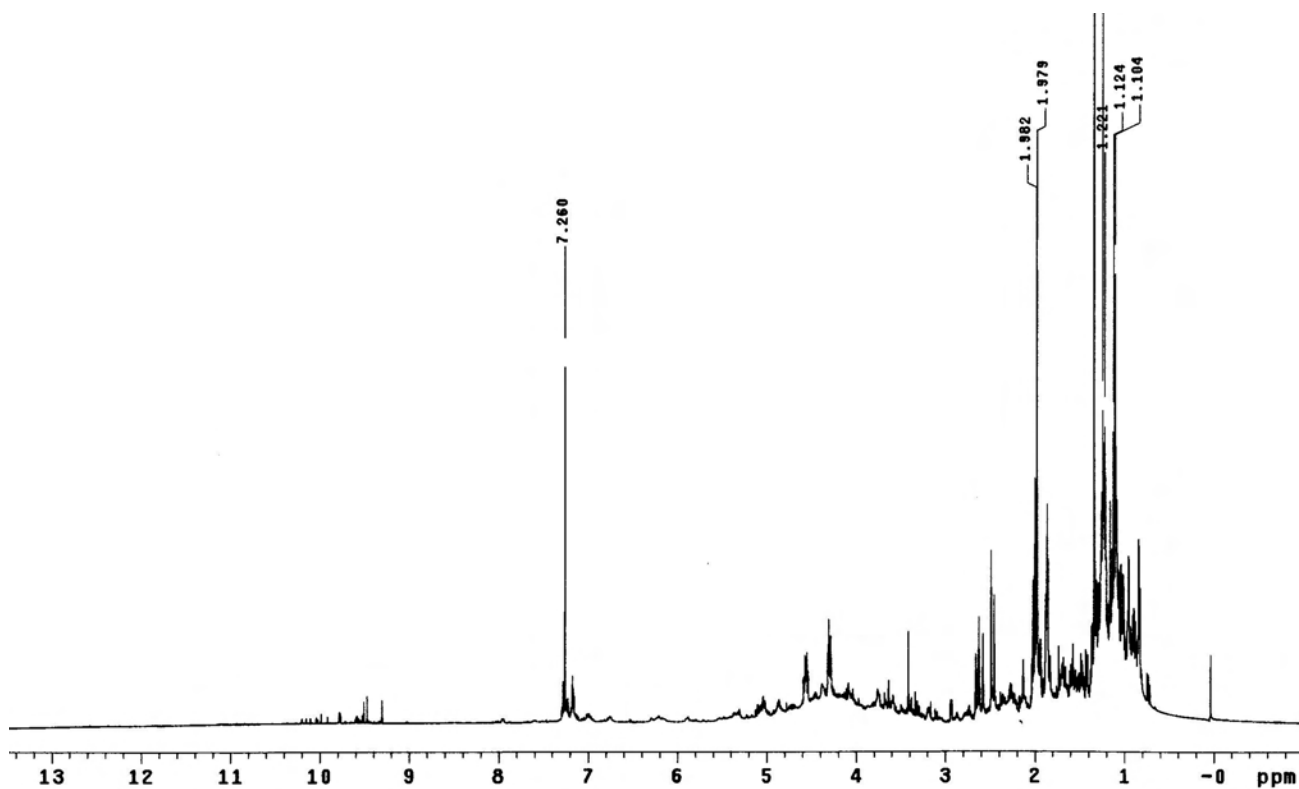


Figura 57: Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 do extrato bruto produzido pelo fungo SC-07

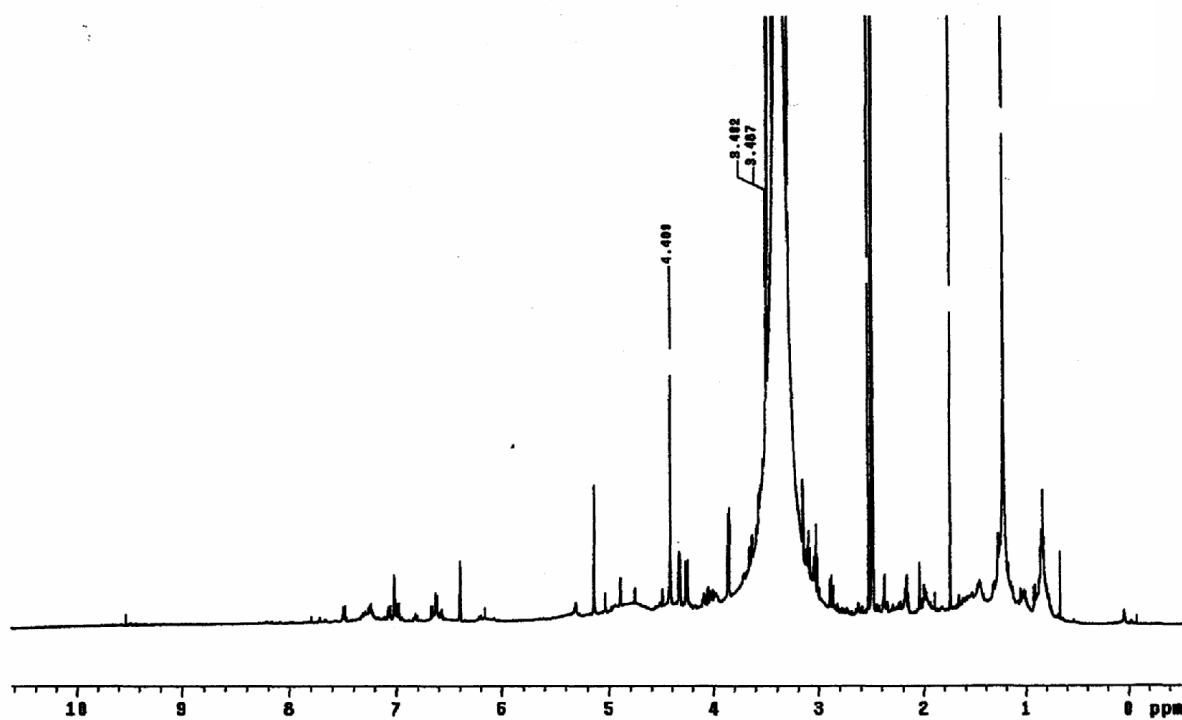


Figura 58: Espectro de RMN de ¹H em DMSO-d₆ do extrato bruto produzido pelo fungo **SC-04** em ME.

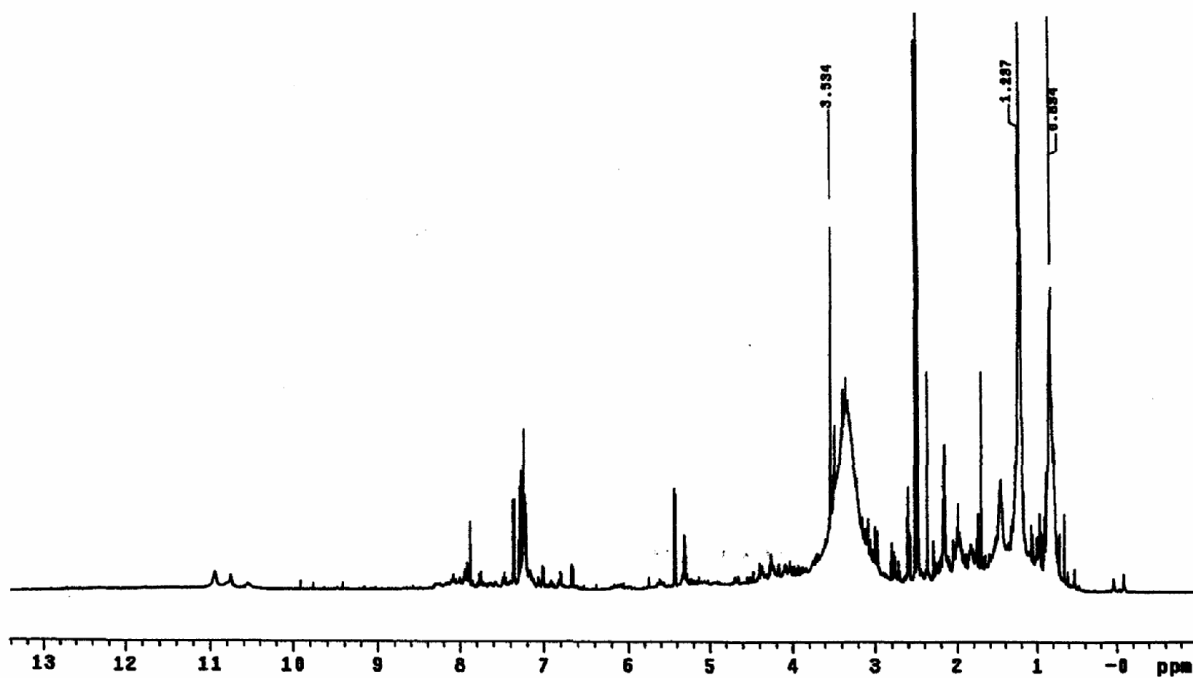


Figura 59: Espectro de RMN de ¹H em DMSO-d₆ do extrato bruto produzido pelo fungo **SC-04** em YM.

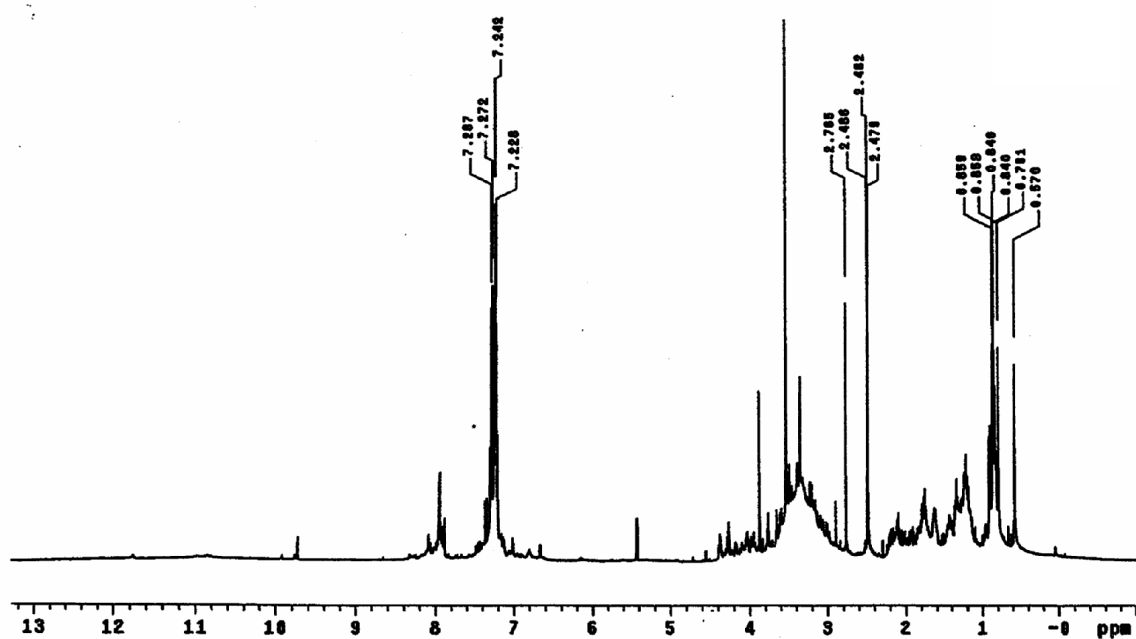


Figura 60: Espectro de RMN de ^1H em DMSO- d_6 do extrato bruto produzido pelo fungo SC-04 em Nutrient.

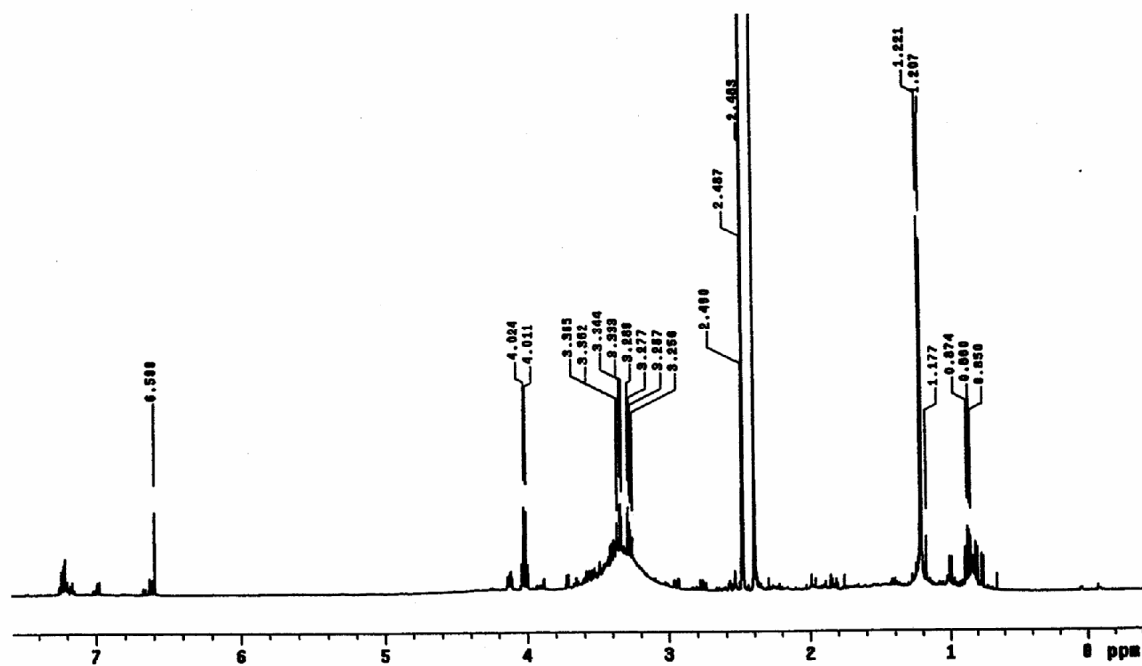


Figura 61: Espectro de RMN de ^1H em DMSO- d_6 do extrato bruto produzido pelo fungo SC-04 em Czapek.

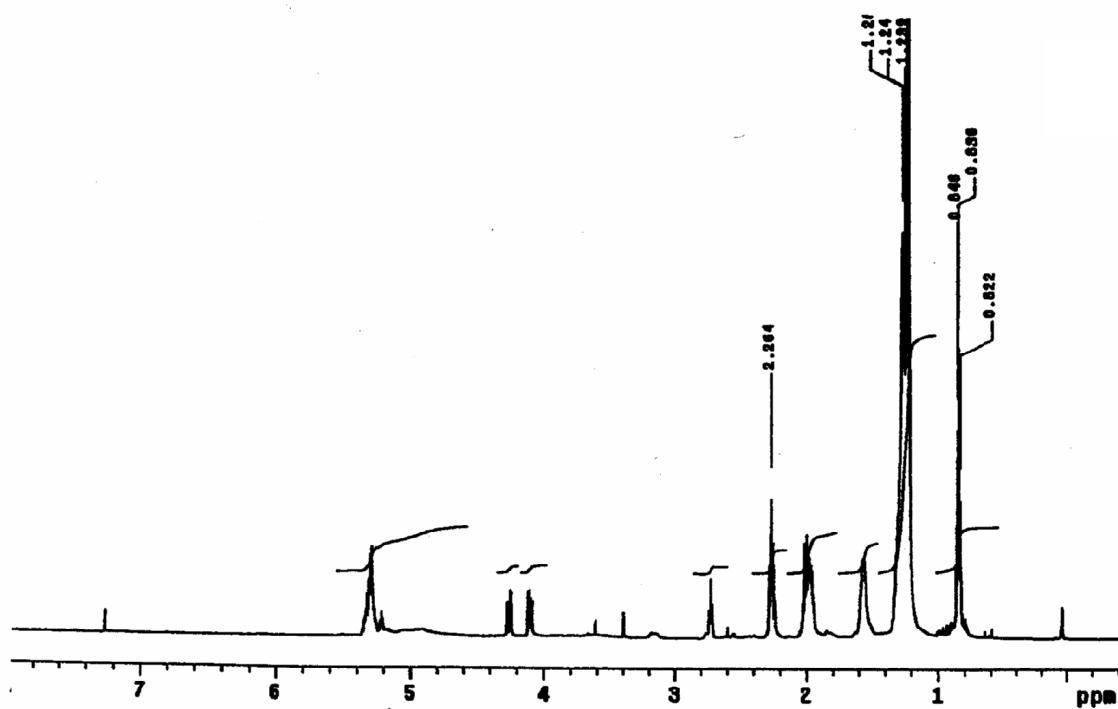


Figura 62: Espectro de RMN de ¹H em CDCl₃ do extrato bruto produzido pelo fungo SC-04 em Milho (Extração AcOEt).

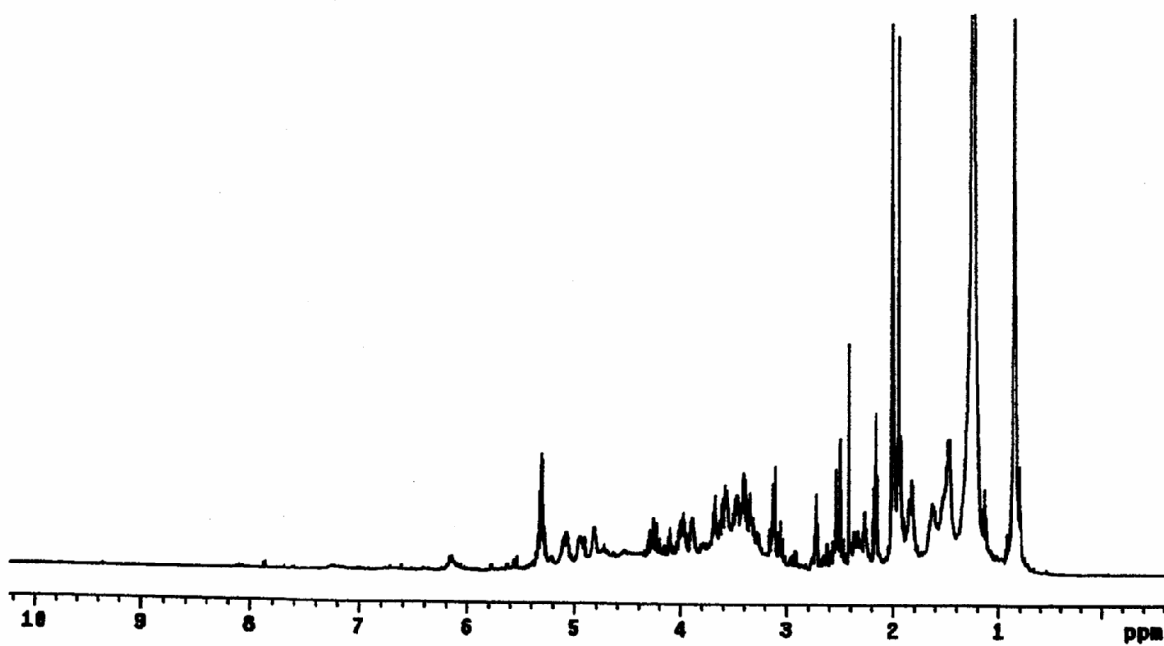


Figura 63: Espectro de RMN de ¹H em DMSO-d₆ do extrato bruto produzido pelo fungo SC-04 em Milho (Fração ACN).

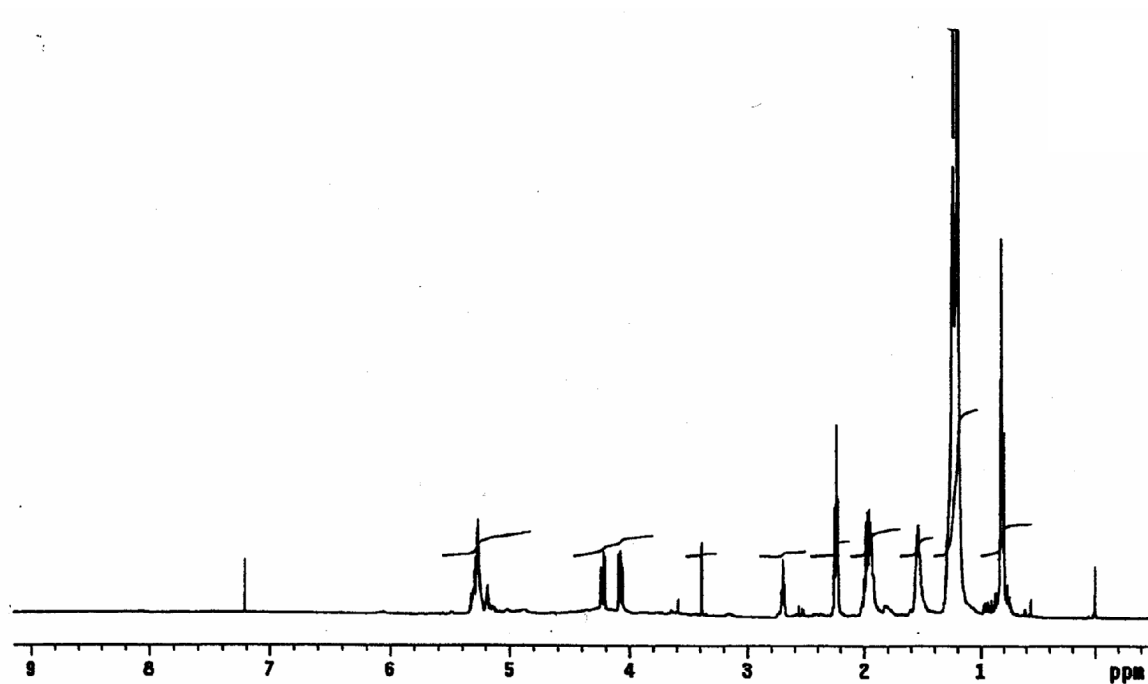


Figura 64: Espectro de RMN de ¹H em CDCl₃ do extrato bruto produzido pelo fungo **SC-04** em Arroz (Extração AcOEt).

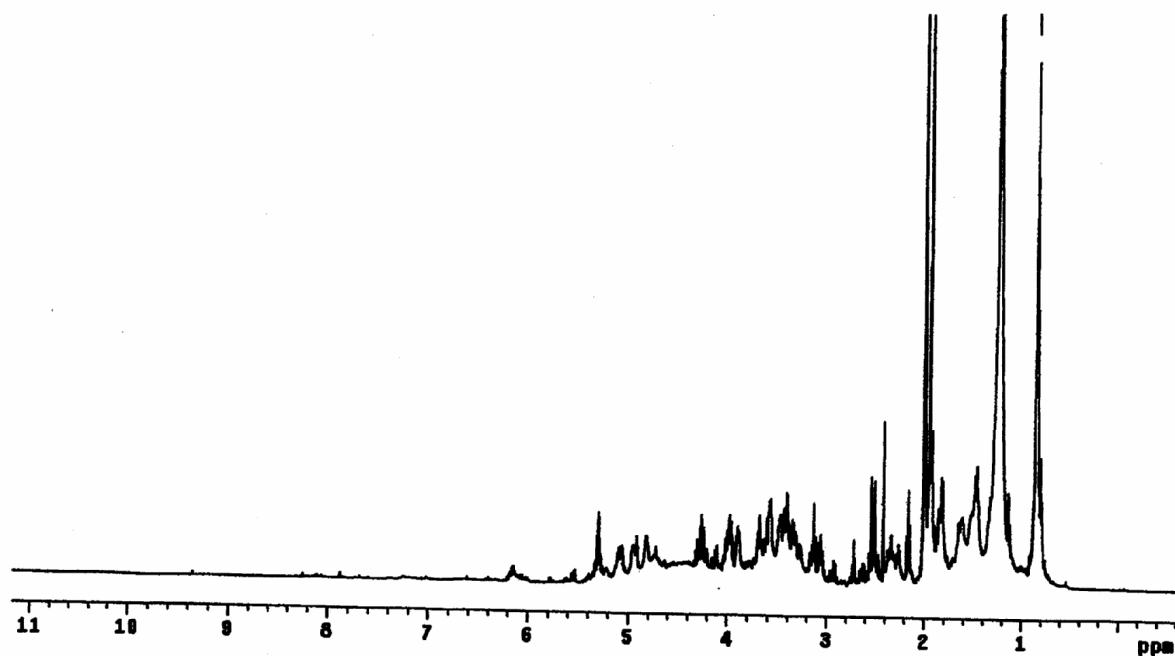


Figura 65: Espectro de RMN de ¹H em DMSO-d₆ do extrato bruto produzido pelo fungo **SC-04** em Arroz (Fração ACN).

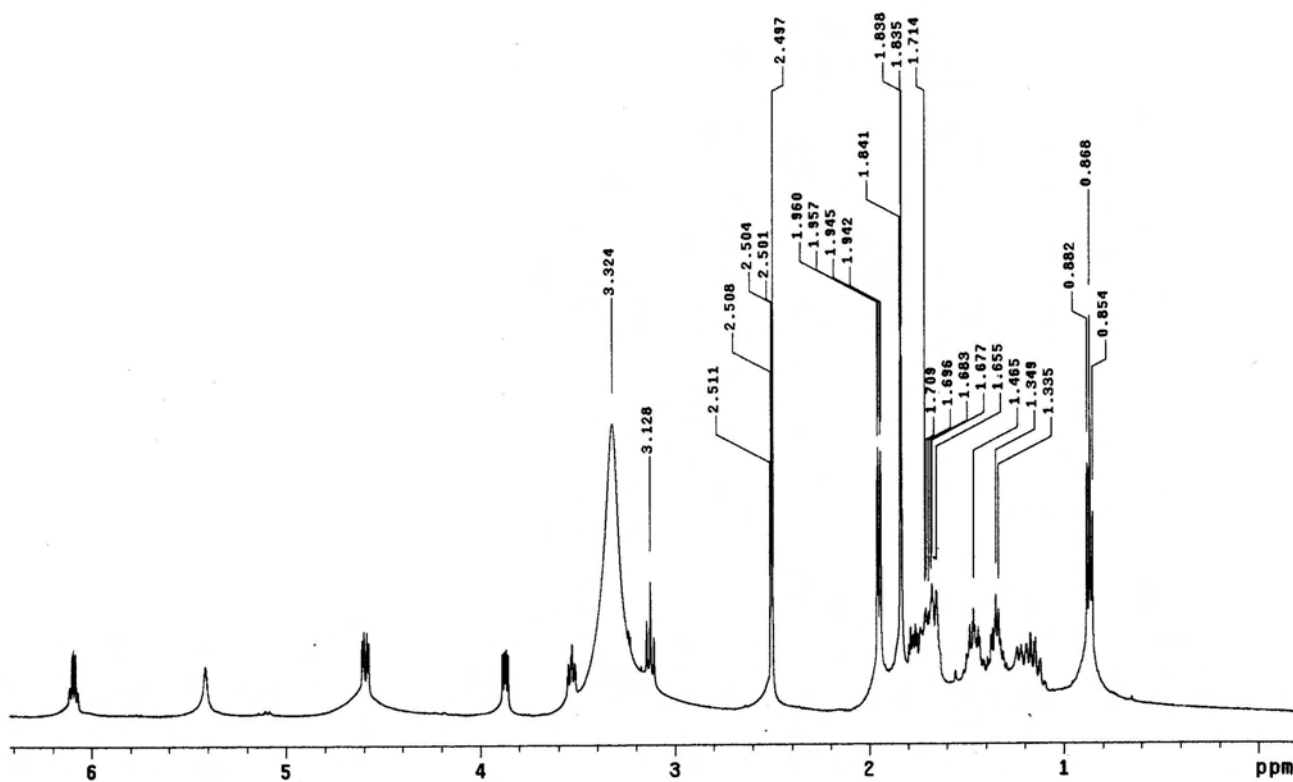


Figura 66: Espectro de RMN de ^1H em DMSO- d_6 da substância 1

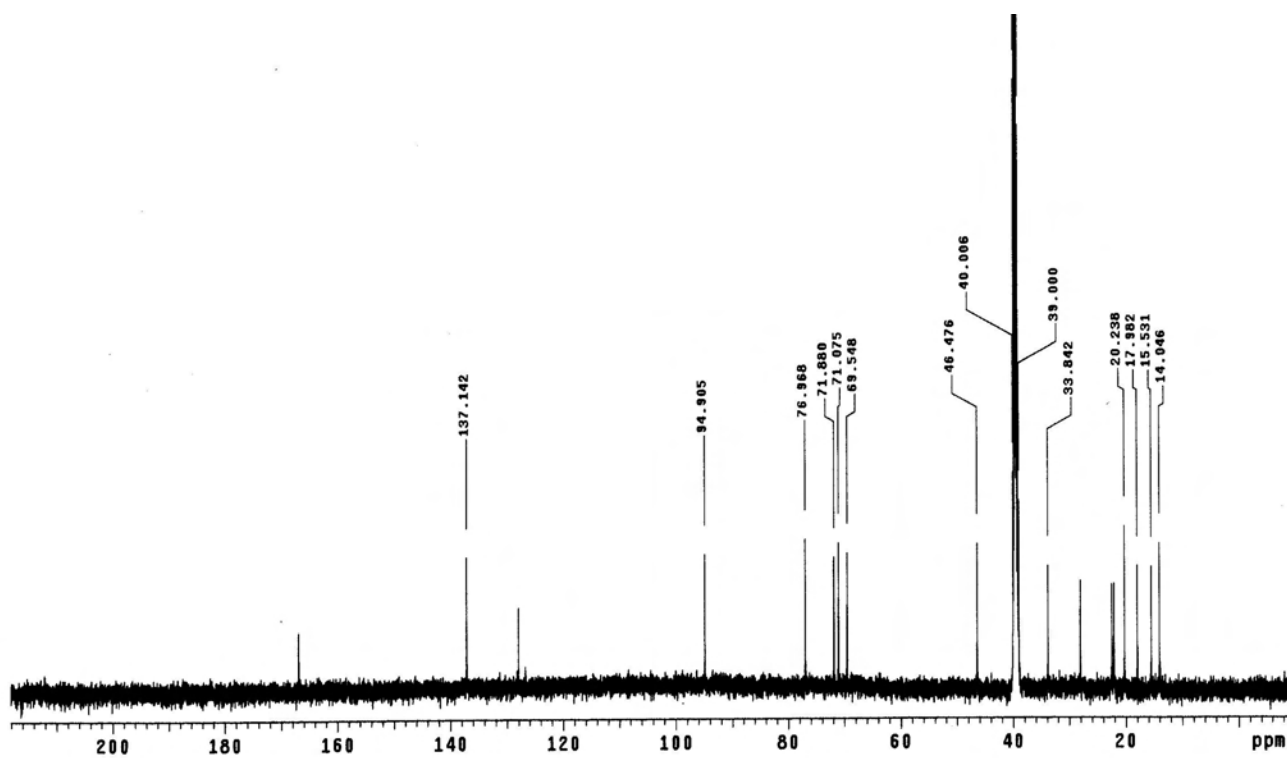


Figura 67: Espectro de RMN de ^{13}C em DMSO- d_6 da substância 1

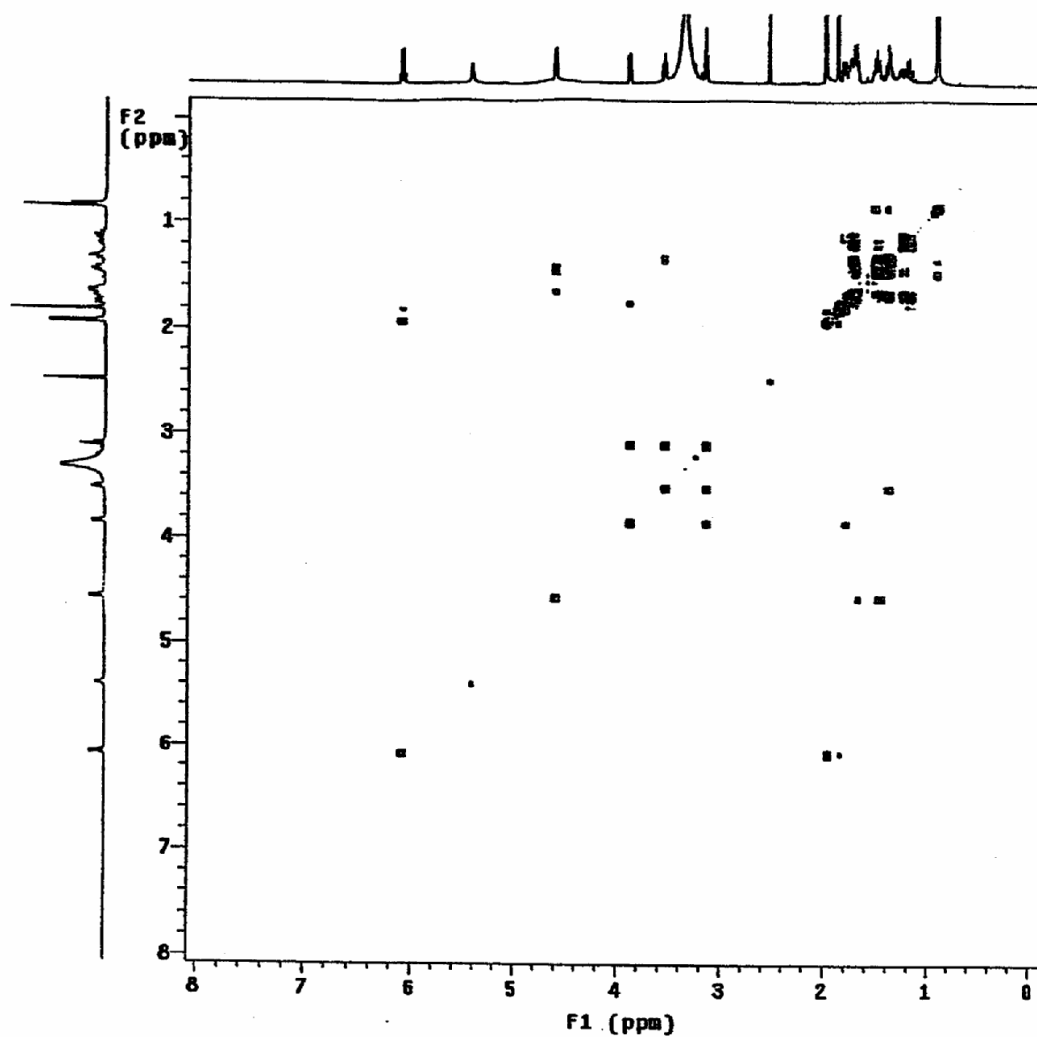


Figura 70: Espectro de gCOSY em DMSO-d6 da substância 1

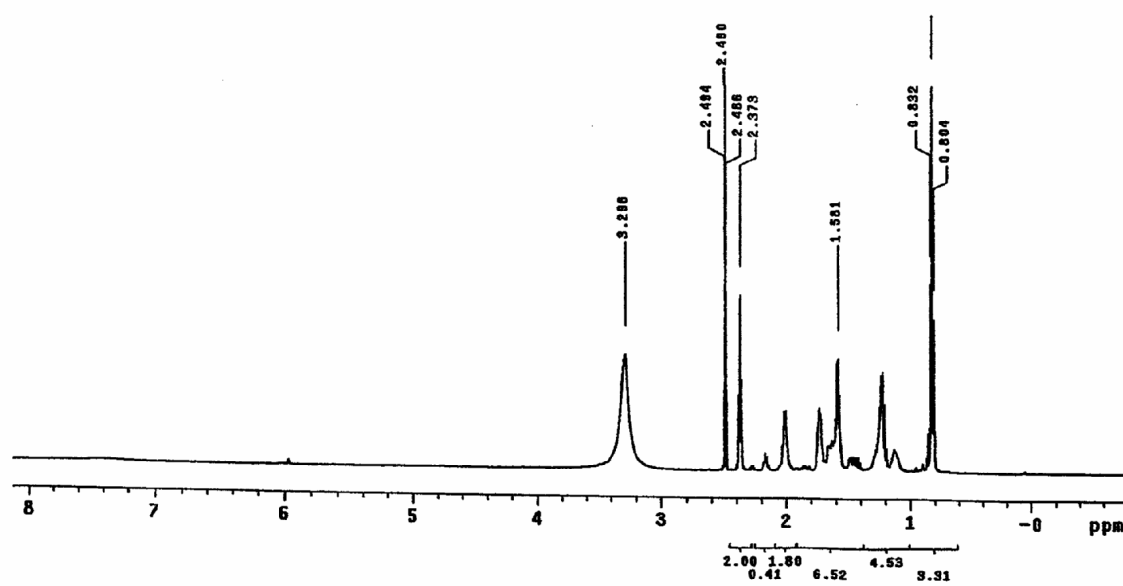


Figura 71: Espectro de RMN de ^1H em DMSO-d6 da substância 2

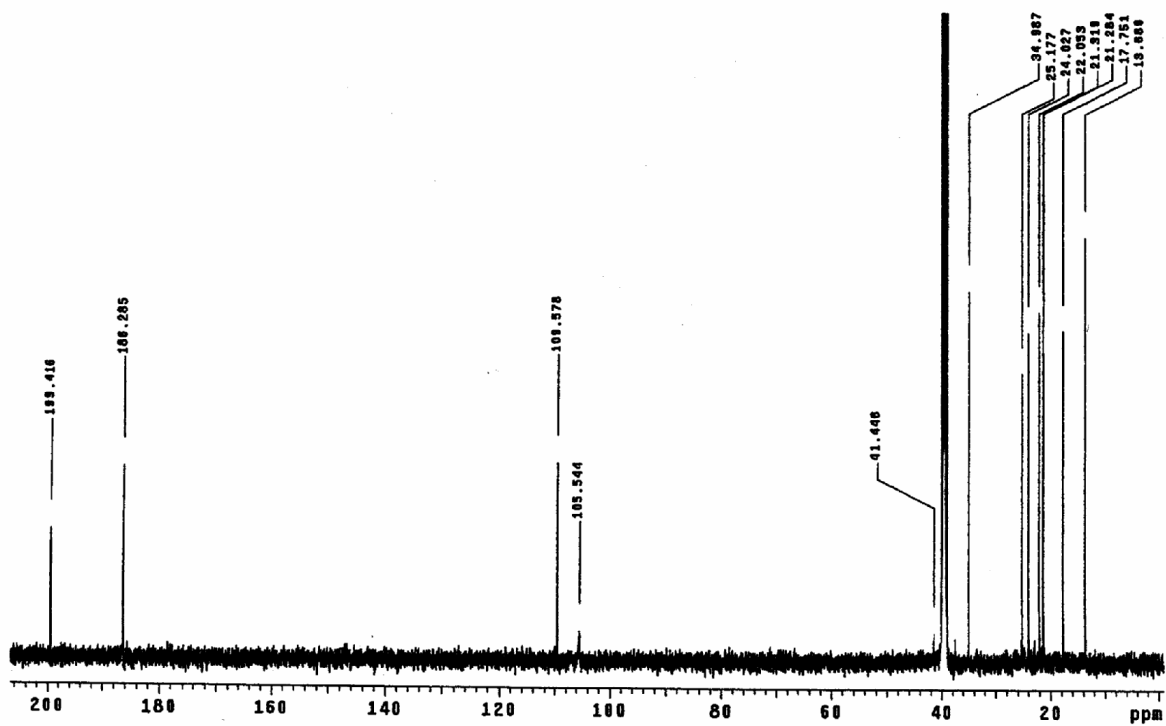


Figura 72: Espectro de RMN de ^{13}C em DMSO-d6 da substância 2

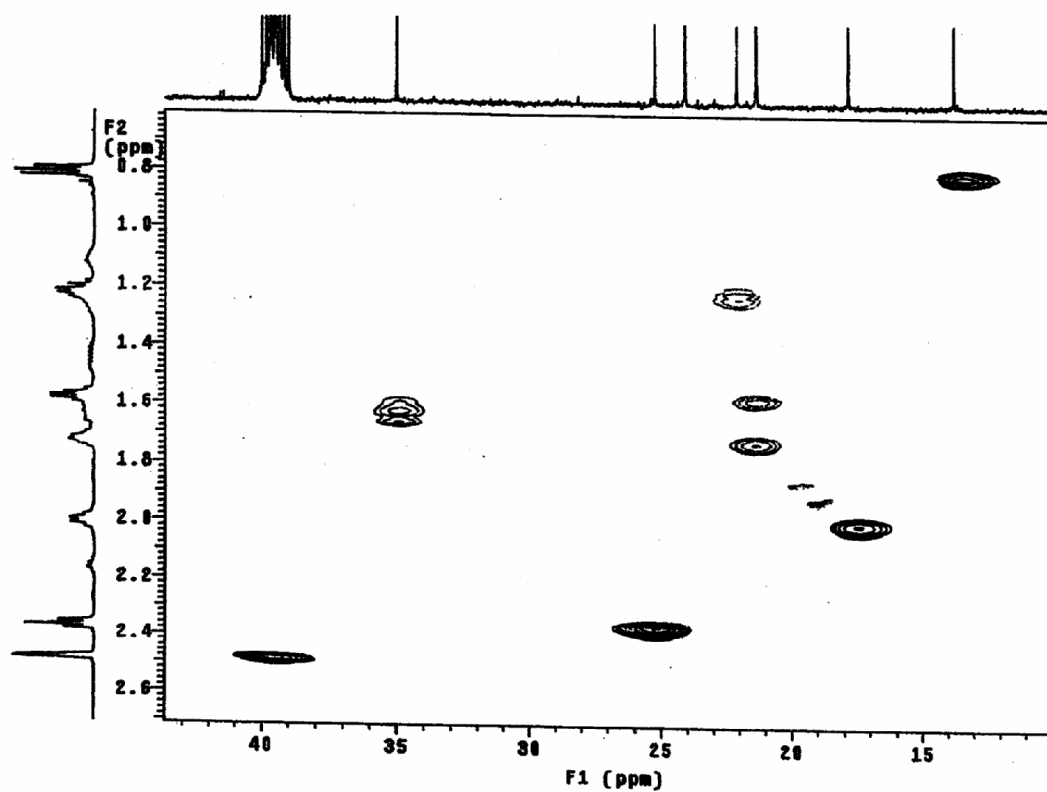


Figura 73: Espectro de gHMBC em DMSO-d6 da substância 2

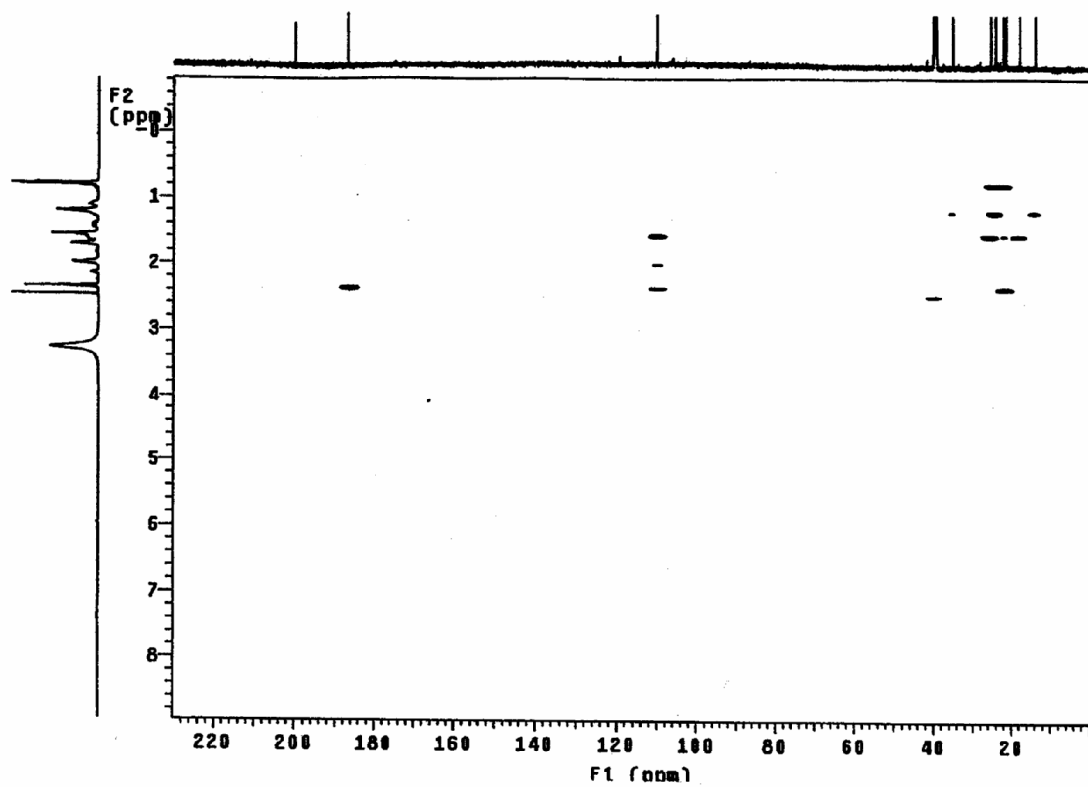


Figura 74: Espectro de gHMBC em DMSO-d6 da substância 2

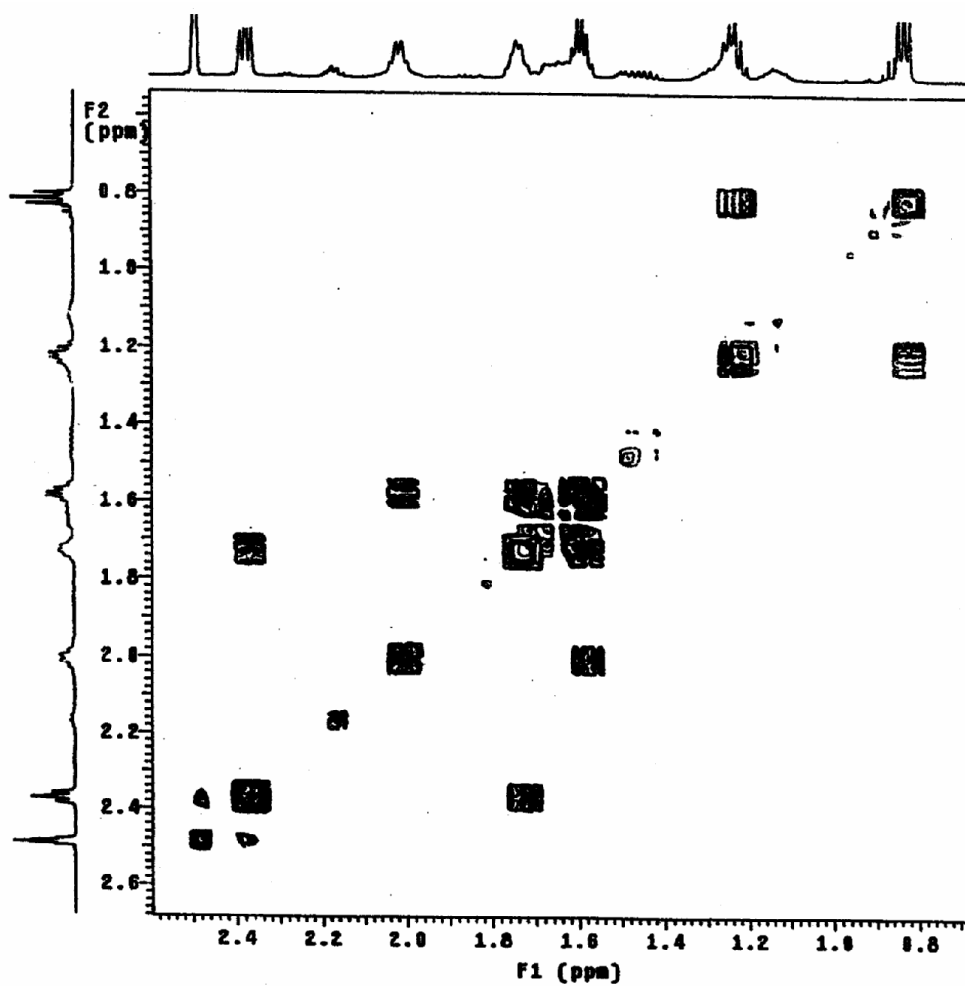


Figura 75: Espectro de gCOSY em DMSO-d6 da substância 2

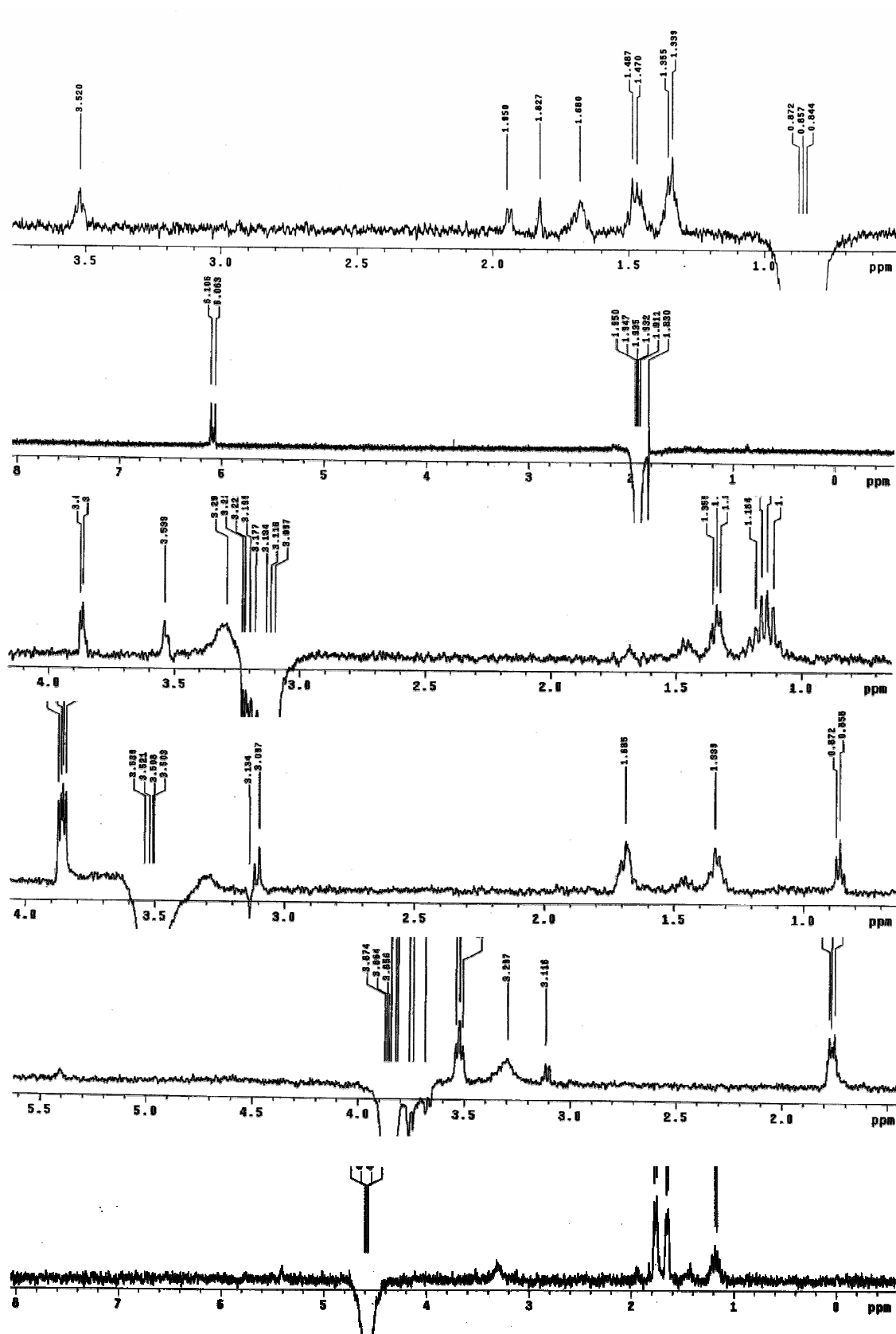


Figura 76: Espectros de NOESY 1D em DMSO-d6 da substância 1

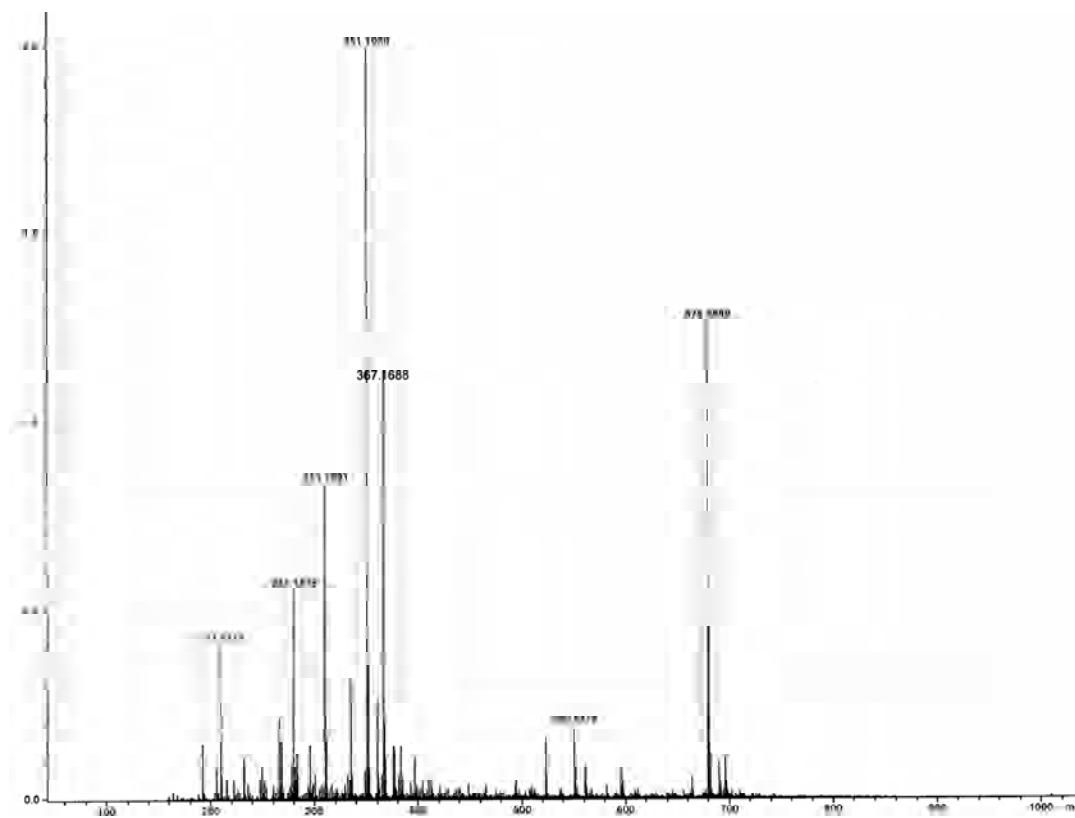


Figura 77: Espectro de Massas da substância 1

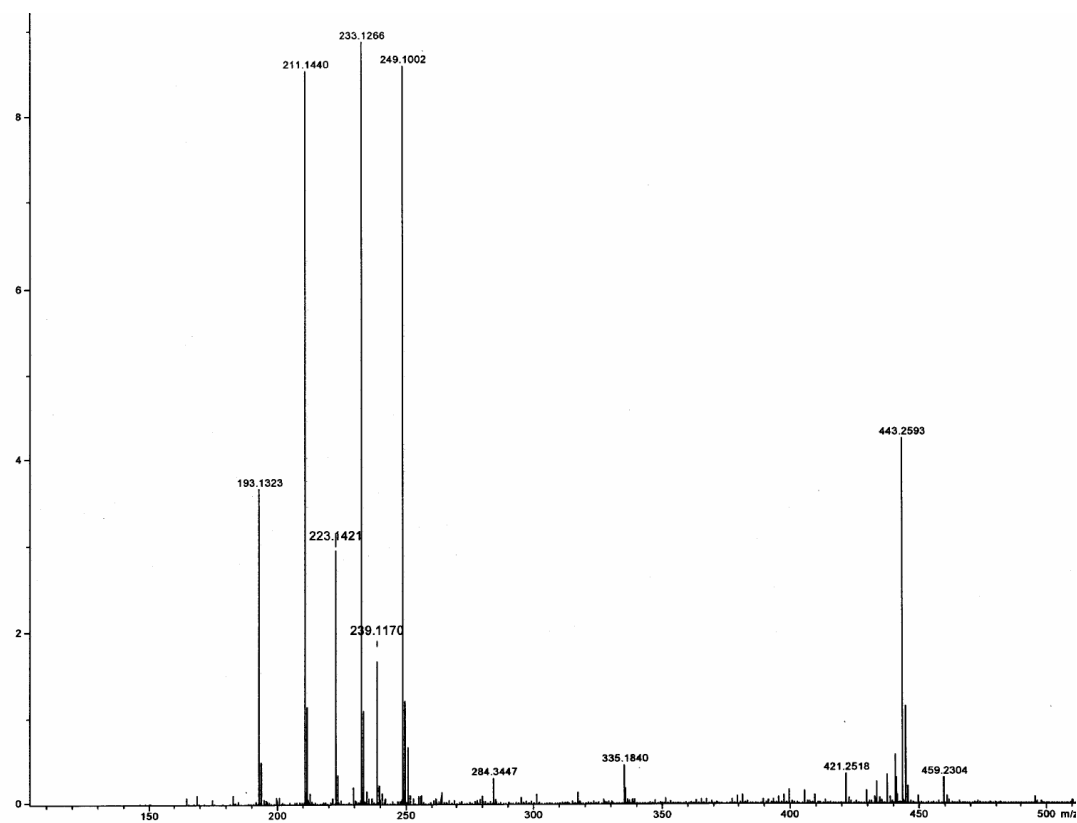


Figura 78: Espectro de Massas da substância 2.